



专论与综述

羧酸还原酶的研究进展

石焜 郁惠蕾* 许建和

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237

摘要: 羧酸还原酶(carboxylic acid reductases, CARs)可以催化羧酸还原为相应的醛,反应条件温和、拥有广阔的底物范围且副反应较少。本文旨在综述近年来羧酸还原酶系统发育、结构与催化机理、蛋白质工程和固定化工程等方面的研究成果,揭示其作为重要工具酶在生物转化及合成生物学中的应用前景。

关键词: 羧酸还原酶, 系统发育, 蛋白结构, 催化机理, 分子改造

Recent advances in carboxylic acid reductases

SHI Kun YU Hui-Lei* XU Jian-He

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Carboxylic acid reductases (CARs) are capable of reducing carboxylic acids to the respective aldehydes under mild conditions, and have a broad substrate scope with no side products. Herein, we summarize recent advances in the research of phylogeny divergence, protein structure, catalytic mechanism and protein engineering of CARs, revealing its application prospect as an important tool enzyme in biological transformation and synthetic biology.

Keywords: Carboxylic acid reductase, Phylogenesis, Protein structure, Catalytic mechanism, Molecular modification

作为一种重要的生产生活原料,羧酸广泛分布于自然界。近年来,由可再生资源生产羧酸的成本逐年降低,进一步吸引了来自工业界及学术界的目光。然而在传统化学法中,将羧酸还原成相应的醛是一项具有挑战性的任务^[1]。羧酸基团中的碳原子处于最高氧化态,其还原过程需要强还原剂(例如氢化铝或乙硼烷)的参与;但强还原剂易与水或空

气发生爆炸,反应条件较为苛刻,大规模应用存在环境和安全问题;此外,由于醛易于继续还原生成醇,难以积累终产物醛^[2]。通常的策略是先过度还原得到产物醇,再氧化成相应的醛,此反应需要依赖价格昂贵且污染环境的试剂(例如氯铬酸吡啶盐和戴斯马丁氧化剂),不符合绿色环保的原则^[3]。除此之外,化学催化的选择性较差,烯烃底物中的

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21922804, 21536004); National Key Research and Development Program of China (2019YFA09005000)

*Corresponding author: Tel: 86-21-64250840; E-mail: huileiyu@ecust.edu.cn

Received: 18-03-2020; Accepted: 13-05-2020; Published online: 04-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21922804, 21536004); 国家重点研发计划(2019YFA09005000)

*通信作者: Tel: 021-64250840; E-mail: huileiyu@ecust.edu.cn

收稿日期: 2020-03-18; 接受日期: 2020-05-13; 网络首发日期: 2020-06-04

碳碳双键往往也被还原,限制了其应用的范围^[4]。

相比之下,生物催化在环境友好性及选择性方面有诸多优势,近年来受到了研究者越来越多的重视。1959年, Farmer 等第一次发现真菌变色栓菌可以催化少量芳香族羧酸还原生成相应的醛或醇^[5]。目前,研究者们从微生物、植物甚至动物中已鉴定出多种可以催化羧酸还原反应的酶类(表 1)。其中,通称为脂肪酰辅酶 A 还原酶(fatty acyl-CoA reductase, FAR)的四类酶大多为真核生物来源,其羧酸底物需要先酶促活化为真实底物(脂肪酰辅酶 A 或脂酰基载体蛋白),再进一步还原为醛^[4]。来源于古细菌和厌氧细菌的醛氧化还原酶(aldehyde oxidoreductase, AOR)催化机理较为特殊,活性中心包含钨或钼,可以利用还原型联吡啶氯化物或还原型甲基紫精等作为电子供体推动羧酸还原^[4]。然而,此反应属可逆反应,且更倾向于将醛氧化成酸^[6],为了得到醛类产物,需增加还原力并及时移出产物醛类。羧酸还原酶(carboxylic acid reductase, CAR)和 α -氨基己二酸还原酶(α -aminoadipate reductase, AAR)具有相似的结构域,均可以利用 ATP 赋能活化羧酸生成酰基-AMP,之后再借由 NAD(P)H 进一步生成醛^[1-3]。相比之下,羧酸还原酶的天然底物谱最为丰富,研究人员对其催化机制

的研究也最为深入,是当下羧酸生物还原的主要研究方向。本文旨在综述近期关于羧酸还原酶系统发育、结构及催化机理等方面的研究成果,揭示其作为重要的生物催化剂在生物转化及合成生物学中的应用前景。

1 羧酸还原酶的系统发育

序列分析研究对于了解酶的构效关系至关重要。近年来,诸多工作集中于羧酸还原酶的系统发育方面^[1,6-11]。Stolterfoht 等通过基因挖掘,在大肠杆菌中成功表达了归属羧酸还原酶(E.C.1.2.1.30)的 17 个酶(分别来源于 10 种细菌和 7 种真菌),并通过系统发育分析将其分为 4 个亚型^[9]。细菌来源的羧酸还原酶序列保守性较高,说明其有一个共同的祖先,而真菌来源的羧酸还原酶则有多个来源。之后诸多类似的工作也进一步证实了这一结论,例如 Khusnutdinova 等对来自真菌门[均为子囊菌纲(*Ascomycota*)和担子菌纲(*Basidiomycota*)]、放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)及变形菌门(*Proteobacteria*)的 1 755 个疑似羧酸还原酶进行系统发育分析,并将细菌来源的羧酸还原酶进一步分为 5 个家族^[6,10,12]。在此基础上,中国科学院天津工业生物技术研究所孙周通团队详尽归纳了所有

表 1 催化羧酸还原反应的酶类
Table 1 Enzyme classes catalyzing carboxylic acid reduction

酶类 Enzyme class	名称 Name	通称及缩写 Common/Abbreviation
E.C.1.2.1.42	十六醛脱氢酶 Hexadecanal dehydrogenase	脂肪酰辅酶 A 还原酶 Fatty acyl-CoA reductase, FAR
E.C.1.2.1.50	长链脂肪酰辅酶 A 还原酶 Long-chain-fatty-acyl-CoA reductase	脂肪酰辅酶 A 还原酶 Fatty acyl-CoA reductase, FAR
E.C.1.2.1.80	长链脂肪酰基载体蛋白还原酶 Long-chain acyl-(acyl-carrier-protein) reductase	脂肪酰辅酶 A 还原酶 Fatty acyl-CoA reductase, FAR
E.C.1.2.1.84	生醇脂肪酰辅酶 A 还原酶 Alcohol-forming fatty acyl-CoA reductase	脂肪酰辅酶 A 还原酶 Fatty acyl-CoA reductase, FAR
E.C.1.2.99.6	醛氧化还原酶 Aldehyde oxidoreductase	醛氧化还原酶 Aldehyde oxidoreductase, AOR
E.C.1.2.1.30	NADP ⁺ 依赖型芳基醛脱氢酶 Aryl-aldehyde dehydrogenase (NADP ⁺)	羧酸还原酶 Carboxylic acid reductase, CAR
E.C.1.2.1.31	L-氨基己二酸半醛脱氢酶 L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase	α -氨基己二酸还原酶 α -aminoadipate reductase, AAR

推定羧酸还原酶的系统发育树^[1]。有研究发现,细菌源羧酸还原酶绝大部分属放线菌门,但其在放线菌中的具体生理功能仍未明晰^[13]。当下的研究大多集中于细菌源羧酸还原酶,这是由于其具有更高的序列保守性、更多的结构数据及更易于在模式微生物中异源表达。真菌源羧酸还原酶的序列保守性较低,可能意味着催化性能的多样性亟待挖掘和开发^[14]。

2 羧酸还原酶的结构及催化机理

目前已经发现的羧酸还原酶主要由 3 个模块化的结构域组成,如图 1 所示,分别为 N-端的腺苷酰化结构域(N-terminal adenylation domain, A domain)、硫醇化结构域(thiolation domain, T domain)和还原酶结构域(reductase domain, R domain)。相较于已经广泛研究的非核糖体多肽合成酶(nonribosomal peptide synthase, NRPS),羧酸还原酶仅仅缺少了 N 端的缩合结构域。NRPS 的缩合结构域与 AAR 的腺苷酸激活结构域有一定的序列相似性,后者缺少一些保守序列,表明其在维持重要结构域完整性的同时已经丧失了部分缩合催化功能^[15]。Finnigan 等将羧酸还原酶的腺苷酰化结构域与腺苷形成酶超家族的酰基 CoA 连接酶(acyl-CoA synthetase)、萤火虫荧光素酶(luciferase)及非核糖体多肽合成酶进行序列比对,发现其序列相似性达 20%,且拥有保守的氨基酸序列^[6]。诸多工作证明与 NRPS 相同,羧酸还原酶的腺苷酰化结构域决定了全酶的底物特异性^[6,16-21]。羧酸还原酶的硫醇化结构域同样需要转录后修饰,即在辅助的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(phosphopantetheinyl transferase, PPTase)催化下将磷酸泛酰巯基乙胺基团共价连接到保守的丝氨酸上(图 2),进而获得全酶的最大催化活性^[4,22]。研究表明羧酸还原酶的还原酶结构域属于短链脱氢酶超家族(short-chain dehydrogenases/reductases, SDR),拥有保守的罗斯曼折叠基序(Rossmann fold)^[3,23-24]。在近期有关羧酸还原酶结构域交换杂化的相关工作中,作者推测还原酶结构域

与硫醇化结构域的构象变化是影响全酶催化速率的决定因素,提升全酶反应速率的关键在还原酶结构域的改造^[3,18]。更值得关注的是,唐奕团队近期发现了一个新的羧酸还原酶(uniprot Q5B2B2)具有独特的 ATRR 结构,即 C 端拥有 2 个还原酶结构域,可以连续催化 2 次双电子还原^[25]。考虑到羧酸还原酶模块化的结构组成,这或许意味着蛋白质融合方面的独特优势^[26]。

尽管目前尚未获得羧酸还原酶全酶晶体结构,但有研究者团队已报道了来自于 *Mycobacterium chelonae*、*Nocardia iowensis*、*Mycobacterium marinum* 和 *Segniliparus* 的单/多结构域复合物晶体结构^[17,19]。羧酸还原酶的催化机制类似 NRPS,可以分为以下几个步骤(图 2)^[1,17]:

(1) 转录后修饰,形成羧酸还原酶全酶。

(2) ATP 与腺苷酰化结构域结合,羧酸分子腺苷酰化。由于从羧酸到醛的转化是一个耗能的过程,羧酸基团的活化需要 ATP 的腺苷酰化作用,进而脱去无机焦磷酸(pyrophosphoric acid, PPi),形成一个酰基-AMP 复合物。

(3) 酶转化为硫醇化状态,腺苷酰化结构域与硫醇化结构域产生新的相互作用表面。酰基-AMP 复合物的羰基碳遭到磷酸泛酰巯基乙胺硫醇的亲核攻击,形成硫酯臂并释放 AMP。

(4) 通过硫酯臂的摆动,酰基-硫酯由腺苷酰化结构域转移到还原酶结构域。

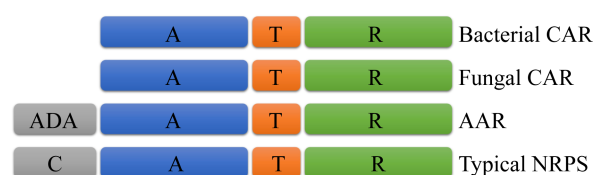


图 1 羧酸还原酶、 α -氨基己二酸还原酶与非核糖体多肽合成酶的结构对比^[1]

Figure 1 Domain architecture of CARs, AAR and NRPS^[1]

注: A: 腺苷酰化结构域; T: 硫醇化结构域; R: 还原酶结构域; ADA: 腺苷酸激活结构域; C: 缩合结构域。

Note: A: Adenylation domain; T: Thiolation domain; R: Reductase domain; ADA: Adenylation activating domain; C: Condensation domain.

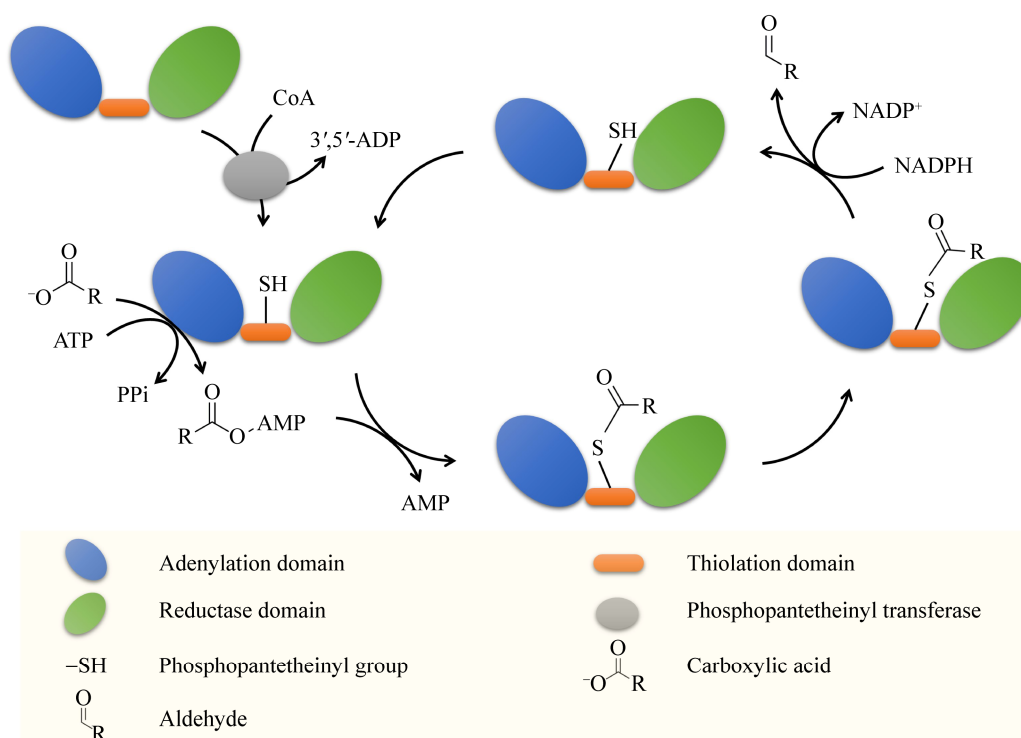


图2 羧酸还原酶的催化模型

Figure 2 The catalytic model of CARs

(5) 硫酯在 NADPH 作用下裂解还原生成醛。还原酶结构域中的保守残基所控制的开关保证了严格的两电子还原，防止进一步还原生成相应的醇^[17]。

(6) 硫酯臂摆动回到腺苷酰化结构域。

3 羧酸还原酶的蛋白质工程

醛是一种活泼的合成前体。羧酸还原酶通过偶联酶促反应可以将醛进一步转化为众多高附加值产物，包括醇(利用醇脱氢酶)、烷烃(利用醛去甲酰加氧酶)和胺(利用转氨酶)等，极具商业化潜力^[7]。然而许多问题亟待解决，例如改善稳定性、底物谱拓展、辅因子改造和循环及 ATP 再生等，解决这些问题需要更深入的酶学研究及蛋白质工程改造。

3.1 羧酸还原酶的催化特异性及其分子改造

羧酸还原酶的一个显著优势是其底物谱广泛涉及脂肪酸、芳香族羧酸及杂环羧酸(图 3)，详细的总结表可以参考文献[3]，该综述文章详细涵盖了截

至 2019 年底所有已表征羧酸还原酶的底物及其催化活力。此外，文献[3]未涉及的近期报道总结于表 2。对于芳香族羧酸底物，添加给电子基团通常会降低 K_m ，提高催化效率；相对应地，添加吸电子基团或邻位基团会导致催化效率的降低^[6,27]。底物的羧酸基团和芳环之间包含双键、三键、环状结构或取代结构也会导致较低的催化活性，研究者认为此时羧酸基团的结构刚性或缺电子状态会降低 k_{cat} ^[6]。羧酸还原酶相对偏好具有更大杂环原子或芳香性更低的杂环底物，但其催化效率均低于芳香族底物^[6,28]。

羧酸还原酶对 C2–C18 的脂肪酸底物均有活性，对 C5–C8 底物的活性最高^[6,7,10,13,17,28-29]。来源于真菌粗糙脉胞霉(*Neurospora crassa*)的羧酸还原酶 NcCAR 对丁酸活性最高，Stolterfoht 等通过将大位阻氨基酸残基(P234 和 P285)替换为丙氨酸，成功将其底物偏好改为戊酸，同时提升了对脂肪酸底物

近的极性基团会导致催化活性的下降^[10]。近期，其团队进一步基于腺苷酰化结构域复合物晶体结构 (PDB: 6OZ1)对羧酸还原酶 MAB4714 进行定点突变(L345E)，成功拓展了对氨基酸(特别是 6-氨基己酸)的催化活性^[19]。

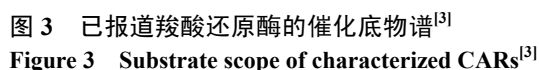


表 2 近期文献报道中的羧酸还原酶底物及其活力

Table 2 Characterized CAR substrates and corresponding CAR activities from recent literature

编号 No.	底物 Substrate	羧酸还原酶 CAR	催化效率 k_{cat}/K_m (L/(min·mmol))	参考文献 References
1	Benzoic acid	AncCAR-A	2.4	[12]
		AncCAR-PA	2.2	[12]
		AncCAR-PF	0.9	[12]
2	4-methylbenzoic acid	AncCAR-A	61.3	[12]
		AncCAR-PA	26.7	[12]
		AncCAR-PF	8.8	[12]
3	4-methoxybenzoic acid	AncCAR-A	34.7	[12]
		AncCAR-PA	20.1	[12]
		AncCAR-PF	11.4	[12]
4	3-methoxybenzoic acid	AncCAR-A	11.9	[12]
		AncCAR-PA	7.9	[12]
		AncCAR-PF	4.3	[12]
5	3-phenylpropionic acid	AncCAR-A	9.9	[12]
		AncCAR-PA	6.9	[12]
		AncCAR-PF	3.3	[12]
6	(E)-3-phenylprop-2-enoic acid	AncCAR-A	226.1	[12]
		AncCAR-PA	99.1	[12]
		AncCAR-PF	51.0	[12]
7	Phenylpropyonic acid	AncCAR-A	1.8	[12]
		AncCAR-PA	0.6	[12]
		AncCAR-PF	0.34	[12]
8	4-oxo-4-phenylbutyric acid	AncCAR-A	10.6	[12]
		AncCAR-PA	9.4	[12]
		AncCAR-PF	4.4	[12]
9	2-thiophene carboxylic acid	AncCAR-A	1.5	[12]
		AncCAR-PA	1.4	[12]
		AncCAR-PF	0.4	[12]
10	Octanoic acid	AncCAR-A	34.8	[12]
		AncCAR-PA	31.3	[12]
		AncCAR-PF	15.2	[12]

3.2 羧酸还原酶的稳定性及其分子改造

羧酸还原酶的最适 pH 大多为中性(pH 7.5)。在 30 °C 条件下, 已表征的羧酸还原酶半衰期大多不超过 55 h, 所以实际的工作温度普遍不高于 37 °C, 催化时间不超过 48 h^[6-7,12,31-32]。天然羧酸还原酶的有机溶剂耐受性一般。例如, Yakunin 团队发现助溶剂二甲基亚砷(DMSO) (1%)、二价阳离子(Mg²⁺和 Ca²⁺)及二醇(1,4-丁二醇和 1,6-己二醇)的添加会显著影响羧酸还原酶 MAB4714 的催化活性, 最高降幅接近 50%^[31]。

提高反应温度可以加快反应速率、提升底物溶解、减少降温设备的使用及杂菌感染的风险, 而更加稳定意味着酶可以在单批反应中工作更长时间, 进而提升生产效率, 降低生产成本^[12]。细菌源羧酸还原酶中, 来源于鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*) 的 MavCAR 和来自于草分枝杆菌(*Mycobacterium phlei*)的 MpCAR 相对较为耐热; 前者在 45 °C 保温 30 min 后仍保持 90%催化活力, 而后者在 30 °C 下半衰期最长可达 123.2 h^[6-7]。此外, 来源于真菌嗜热毁丝霉菌(*Thermothelomyces*

thermophila)的 TtCAR 兼具一定的高温及有机溶剂耐受性, T_m 达到 55.5 °C, 且添加 10% DMSO 或甲醇后酶活力保持在 90%以上^[32]。近期 Harmer 团队利用祖先序列重建技术, 所获得的祖先酶相较于母本 T_m 提升了 35 °C, 37 °C 下半衰期延长了 9 倍, 显著提升了对助溶剂 DMSO 的耐受性, 拓展了在碱性环境下的催化能力, 是迄今为止最稳定的羧酸还原酶^[12]。

3.3 羧酸还原酶的高通量筛选方法

羧酸还原酶具有复杂的多结构域特性, 筛选检测的方法往往只能针对催化过程中的一步。目前使用最广泛的测定方法是 NADPH 消耗测定法, 只能获取还原酶结构域所催化的还原步骤的速率^[26]。然而, 羧酸还原酶腺苷酰化结构域决定了全酶的底物特异性, 是酶工程改造的主要对象, 新的检测方法亟待开发。

近期, Winkler 团队开发了一种基于紫外及荧光的高通量分析方法, 利用检测 2-氨基苄氨脒(2-amino benzamidoxime, ABAO)与醛类物质的特异性反应来定量检测醛类物质^[33]。他们随后将此方法应用到对源自艾阿华诺卡氏菌(*Nocardia iowensis*)的羧酸还原酶 NiCAR 的定点突变筛选工作中, 成功改变了酶的底物特异性^[34]。此外, 介于 NRPS 与羧酸还原酶的催化机理相似性, 诸多 NRPS 的高通量筛选方法(尤其是多酶偶联检测 PPi 的生成)也可能是一种潜在可用的表征手段^[26]。

4 羧酸还原酶的辅因子工程

羧酸还原酶的催化过程需要两种昂贵的辅因子, 即 NADPH 和 ATP, 这一定程度上阻碍了羧酸还原酶的工业化应用。实现辅因子循环最简单的方法便是胞内催化, 利用细胞自身代谢提供辅因子。然而其局限性也十分明显: (1) 高浓度的醛产物可能对细胞有毒, 无法满足工业级底物上载量^[26]; (2) 内源性酶(例如醇脱氢酶)会进一步还原醛生成一系列副产物^[10]; (3) 某些底物无法进入胞内或存

在传质限制, 影响催化效率; (4) 过表达酶过量, 催化负载过大, 消耗的辅因子影响底盘微生物正常代谢平衡; (5) 微生物的 NADPH 合成需要氧气参与, 增加了氧限制因素。

为了克服这些困难, 一些研究组也开展了研究。Hansen 团队选择粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为底盘微生物, 异源表达了包括编码羧酸还原酶基因在内的多个基因, 通过异源表达糖基转移酶(glycosyl transferase), 将香草醛转化为香草醛-D-糖苷, 降低了产物对底盘细胞的毒性^[35-36]。同时, 结合计算机辅助手段, 降低副产物合成的代谢流, 最终将香草醛产量提升 5 倍, 相关糖基化衍生物产量达 500 mg/L (图 4)^[35]。类似地, Kunjapur 等通过敲除涉及副反应的 6 个内源基因, 成功在不影响大肠杆菌生长的前提下将香草醛的产量提升 55 倍^[37]。

利用包含羧酸还原酶的细胞裂解液催化并构建体外辅因子循环系统也是研究的另一方向。多数短链脱氢酶的 NADPH 再生依靠多酶级联, 本团队构建羧基还原酶与葡萄糖脱氢酶的串联共表达大肠杆菌细胞, 利用该细胞催化多种前手性芳基酮的不对称还原^[38]。目前的研究工作中, 羧酸还原酶大多偶联葡萄糖脱氢酶或甲酸脱氢酶^[10,39-42]。短链脱氢酶的辅因子偏好性偏转策略已较为成熟。考虑到羧酸还原酶的还原酶结构域与短链脱氢酶的高度相似性, 有理由相信将来羧酸还原酶利用 NADH 作为替代性还原力的潜力^[3]。体外 ATP 再生则大多采用与多聚磷酸激酶(PPK)偶联的方案, 利用廉价的多聚磷酸盐作为磷酸供体驱动反应^[10,40-43]。然而, 本方案存在无法回避的缺陷, 过量的磷酸盐离子会造成镁离子的络合沉淀, 而一定浓度的镁离子是羧酸还原酶催化的必要条件^[39-40,44]。这一矛盾已经给构建羧酸还原酶体外多酶级联模型造成了困难, 增加了模型整体的不确定性^[42]。

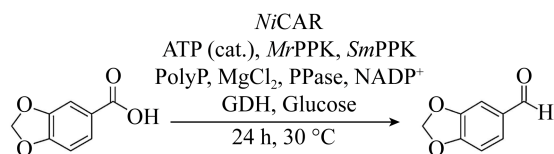


图5 制备级的胡椒酸体外还原^[40]

Figure 5 Preparative scale *in vitro* reduction of piperonylic acid^[40]

注: NiCAR: 源于艾阿华诺卡氏菌的羧酸还原酶; NcCAR: 源于粗糙脉胞霉的羧酸还原酶; MrPPK: 源于红色亚栖热菌的多聚磷酸激酶; SmPPK: 源于苜蓿中华根瘤菌的多聚磷酸激酶; PolyP: 多聚磷酸盐。

Note: NiCAR: CAR from *N. iowensis*; MrPPK: PPK from *Meiothermus ruber*; SmPPK: PPK from *Sinorhizobium meliloti*; PolyP: Polyphosphate.

醛是一种活泼的反应中间体, 通过将羧酸还原酶与其他酶进行级联, 可以获得一系列衍生产品。基于内源性的醇脱氢酶, 醇是最为常见的羧酸还原酶级联催化产物^[7,10,27,45,47-53]。诸多文献也报道了与脂肪醛去甲酰加氧酶 (aldehyde-deformylating oxygenase, ADO) 级联合成脂肪烃^[49,54], 以及与 ω -转氨酶 (ω -transaminase, ω -TA) 级联合成胺类及其衍生物的相关工作^[19,43,55-56]。有两篇综述类文章详细总结了这一方面的工作^[2-3]。由于腺苷酰化结构域的催化产物(酰基-AMP)易受外部亲核试剂(胺)攻击, 羧酸还原酶也可以催化羧酸生成酰胺^[57]。此外, 除了作为催化路径中的工具酶, 羧酸还原酶也可以充当辅助酶, 重新将副产物羧酸还原回醛, 提高催化效率^[37,58]。

7 小结

羧酸还原酶可以催化羧酸还原为相应的醛。其底物范围广阔, 包括脂肪酸、芳香族羧酸及杂环羧酸, 因而近年来吸引了越来越多学术界和工业界的关注。然而, 目前所表征的羧酸还原酶仍旧偏少, 而且大多集中于细菌来源, 更多真菌来源的资源亟待开发。羧酸还原酶的应用还面临许多问题, 但随着生物信息学技术的介入^[59]及酶学研究的深入, 通过蛋白质工程改造获得理想催化剂成为可能。将羧酸还原酶与其他酶进行组合催化级联反应, 可进一

步创造一系列“绿色”合成途径及高价值产品, 预示着其作为工具酶光明的应用前景。

REFERENCES

- [1] Qu G, Guo JG, Yang DM, et al. Biocatalysis of carboxylic acid reductases: phylogenesis, catalytic mechanism and potential applications[J]. *Green Chemistry*, 2018, 20(4): 777-792
- [2] Derrington SR, Turner NJ, France SP. Carboxylic acid reductases (CARs): an industrial perspective[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 304: 78-88
- [3] Butler N, Kunjapur AM. Carboxylic acid reductases in metabolic engineering[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 307: 1-14
- [4] Napora-Wijata K, Strohmeier GA, Winkler M. Biocatalytic reduction of carboxylic acids[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(6): 822-843
- [5] Farmer VC, Henderson MEK, Russell JD. Reduction of certain aromatic acids to aldehydes and alcohols by *Polystictus versicolor*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1959, 35: 202-211
- [6] Finnigan W, Thomas A, Cromar H, et al. Characterization of carboxylic acid reductases as enzymes in the toolbox for synthetic chemistry[J]. *Chem Cat Chem*, 2017, 9(6): 1005-1017
- [7] Kramer L, Hankore ED, Liu YL, et al. Characterization of carboxylic acid reductases for biocatalytic synthesis of industrial chemicals[J]. *Chem Bio Chem*, 2018, 19(13): 1452-1460
- [8] Brandenburger E, Braga D, Kombrink A, et al. Multi-genome analysis identifies functional and phylogenetic diversity of basidiomycete adenylate-forming reductases[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2018, 112: 55-63
- [9] Stolterfoht H, Schwendenwein D, Sensen CW, et al. Four distinct types of E.C.1.2.1.30 enzymes can catalyze the reduction of carboxylic acids to aldehydes[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 257: 222-232
- [10] Khusnutdinova AN, Flick R, Popovic A, et al. Exploring bacterial carboxylate reductases for the reduction of bifunctional carboxylic acids[J]. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(11): 1600751
- [11] Kalb D, Lackner G, Hoffmeister D. Functional and phylogenetic divergence of fungal adenylate-forming reductases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(19): 6175-6183
- [12] Thomas A, Cutlan R, Finnigan W, et al. Highly thermostable carboxylic acid reductases generated by ancestral sequence reconstruction[J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 429
- [13] Duan YT, Yao PY, Chen X, et al. Exploring the synthetic

- applicability of a new carboxylic acid reductase from *Segniliparus rotundus* DSM 44985[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 115: 1-7
- [14] Ling JG, Mansor MH, Abdul Murad AM, et al. A functionally-distinct carboxylic acid reductase PcCAR4 unearthed from a repertoire of type IV CARs in the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 307: 55-62
- [15] Kalb D, Lackner G, Rappe M, et al. Activity of α -aminoadipate reductase depends on the N-terminally extending domain[J]. *Chem Bio Chem*, 2015, 16(10): 1426-1430
- [16] Gahloth D, Aleku GA, Leys D. Carboxylic acid reductase: structure and mechanism[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 307: 107-113
- [17] Gahloth D, Dunstan MS, Quaglia D, et al. Structures of carboxylic acid reductase reveal domain dynamics underlying catalysis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(9): 975-981
- [18] Kramer L, Le X, Hankore ED, et al. Engineering and characterization of hybrid carboxylic acid reductases[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 304: 52-56
- [19] Fedorchuk TP, Khusnutdinova AN, Evdokimova E, et al. One-pot biocatalytic transformation of adipic acid to 6-aminocaproic acid and 1,6-hexamethylenediamine using carboxylic acid reductases and transaminases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(2): 1038-1048
- [20] Qu G, Liu BB, Zhang K, et al. Computer-assisted engineering of the catalytic activity of a carboxylic acid reductase[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 306: 97-104
- [21] Clark L, Leatherby D, Krilich E, et al. *In silico* analysis of class I adenylate-forming enzymes reveals family and group-specific conservations[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203218
- [22] Venkitasubramanian P, Daniels L, Rosazza JP. Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(1): 478-485
- [23] King JD, Harmer NJ, Preston A, et al. Predicting protein function from structure — the roles of short-chain dehydrogenase/reductase enzymes in *Bordetella* O-antigen biosynthesis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374(3): 749-763
- [24] Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(24): 3895
- [25] Hai Y, Huang AM, Tang Y. Structure-guided function discovery of an NRPS-like glycine betaine reductase for choline biosynthesis in fungi[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(21): 10348-10353
- [26] Tee KL, Xu JH, Wong TS. Protein engineering for bioreduction of carboxylic acids[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 303: 53-64
- [27] Horvat M, Fritsche S, Kourist R, et al. Characterization of type IV carboxylate reductases (CARs) for whole cell-mediated preparation of 3-hydroxytyrosol[J]. *Chem Cat Chem*, 2019, 11(16): 4171-4181
- [28] Moura M, Pertusi D, Lenzini S, et al. Characterizing and predicting carboxylic acid reductase activity for diversifying bioaldehyde production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(5): 944-952
- [29] Akhtar MK, Turner NJ, Jones PR. Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(1): 87-92
- [30] Stolterfoht H, Steinkellner G, Schwendenwein D, et al. Identification of key residues for enzymatic carboxylate reduction[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 250
- [31] Fedorchuk TP, Khusnutdinova AN, Flick R, et al. Site-directed mutagenesis and stability of the carboxylic acid reductase MAB4714 from *Mycobacterium abscessus*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 303: 72-79
- [32] Horvat M, Fiume G, Fritsche S, et al. Discovery of carboxylic acid reductase (CAR) from *Thermothelomyces thermophila* and its evaluation for vanillin synthesis[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 304: 44-51
- [33] Ressmann AK, Schwendenwein D, Leonhartsberger S, et al. Substrate-independent high-throughput assay for the quantification of aldehydes[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2019, 361(11): 2538-2543
- [34] Schwendenwein D, Ressmann AK, Doerr M, et al. Random mutagenesis-driven improvement of carboxylate reductase activity using an amino benzamidoxime-mediated high-throughput assay[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2019, 361(11): 2544-2549
- [35] Brochado AR, Matos C, Møller BL, et al. Improved vanillin production in baker's yeast through *in silico* design[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 84
- [36] Hansen EH, Møller BL, Kock GR, et al. *De novo* biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(9): 2765-2774
- [37] Kunjapur AM, Tarasova Y, Prather KLJ. Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of *Escherichia coli*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(33): 11644-11654
- [38] Xu GC, Yu HL, Zhang XY, et al. Access to optically active aryl halohydrins using a substrate-tolerant carbonyl reductase discovered from *Kluyveromyces thermotolerans*[J]. *ACS Catalysis*, 2012, 2(12): 2566-2571
- [39] Thompson MP, Derrington SR, Heath RS, et al. A generic platform for the immobilisation of engineered biocatalysts[J]. *Tetrahedron*, 2019, 75(3): 327-334
- [40] Strohmeier GA, Eiteljörg IC, Schwarz A, et al. Enzymatic

- one-step reduction of carboxylates to aldehydes with cell-free regeneration of ATP and NADPH[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2019, 25(24): 6119-6123
- [41] Ramsden JI, Heath RS, Derrington SR, et al. Biocatalytic *N*-alkylation of amines using either primary alcohols or carboxylic acids via reductive aminase cascades[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(3): 1201-1206
- [42] Finnigan W, Cutlan R, Snajdrova R, et al. Engineering a seven enzyme biotransformation using mathematical modelling and characterized enzyme parts[J]. *Chem Cat Chem*, 2019, 11(15): 3474-3489
- [43] Citoler J, Derrington SR, Galman JL, et al. A biocatalytic cascade for the conversion of fatty acids to fatty amines[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(18): 4932-4935
- [44] Wei XL, Xie LP, Job Zhang YHP, et al. Stoichiometric regeneration of ATP by A NAD(P)/CoA-free and phosphate-balanced *in vitro* synthetic enzymatic biosystem[J]. *Chem Cat Chem*, 2018, 10(24): 5597-5601
- [45] Xu Y, Li F, Yang KX, et al. A facile and robust non-natural three enzyme biocatalytic cascade based on *Escherichia coli* surface assembly for fatty alcohol production[J]. *Energy Conversion and Management*, 2019, 181: 501-506
- [46] Banerjee G, Chattopadhyay P. Vanillin biotechnology: the perspectives and future[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(2): 499-506
- [47] Napora-Wijata K, Robins K, Osorio-Lozada A, et al. Whole-cell carboxylate reduction for the synthesis of 3-hydroxytyrosol[J]. *Chem Cat Chem*, 2014, 6(4): 1089-1095
- [48] Sheppard MJ, Kunjapur AM, Wenck SJ, et al. Retro-biosynthetic screening of a modular pathway design achieves selective route for microbial synthesis of 4-methyl-pentanol[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5031
- [49] Xu P, Qiao KJ, Ahn WS, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(39): 10848-10853
- [50] Chen ZY, Shen XL, Wang J, et al. Establishing an artificial pathway for *de novo* biosynthesis of vanillyl alcohol in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(9): 1784-1792
- [51] Weber N, Hatsch A, Labagnere L, et al. Production of (*S*)-2-aminobutyric acid and (*S*)-2-aminobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 51
- [52] Klumbys E, Zebec Z, Weise NJ, et al. Bio-derived production of cinnamyl alcohol via a three step biocatalytic cascade and metabolic engineering[J]. *Green Chemistry*, 2019, 20(3): 658-663
- [53] Maurer S, Schewe H, Schrader J, et al. Investigation of fatty aldehyde and alcohol synthesis from fatty acids by α Dox- or CAR-expressing *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 305: 11-17
- [54] Kallio P, Pásztor A, Thiel K, et al. An engineered pathway for the biosynthesis of renewable propane[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4731
- [55] France SP, Hussain S, Hill AM, et al. One-pot cascade synthesis of mono- and disubstituted piperidines and pyrrolidines using carboxylic acid reductase (CAR), ω -transaminase (ω -TA), and imine reductase (IREO) biocatalysts[J]. *ACS Catalysis*, 2016, 6(6): 3753-3759
- [56] Hepworth LJ, France SP, Hussain S, et al. Enzyme cascades in whole cells for the synthesis of chiral cyclic amines[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(4): 2920-2925
- [57] Wood AJL, Weise NJ, Frampton JD, et al. Adenylation activity of carboxylic acid reductases enables the synthesis of amides[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(46): 14498-14501
- [58] Bayer T, Milker S, Wiesinger T, et al. *In vivo* synthesis of polyhydroxylated compounds from a "hidden reservoir" of toxic aldehyde species[J]. *Chem Cat Chem*, 2017, 9(15): 2919-2923
- [59] Chen Q, Li CX, Zheng GW, et al. Computational analysis of structure-activity relationship of industrial enzymes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(10): 1829-1842 (in Chinese)
- 陈琦, 李春秀, 郑高伟, 等. 工业蛋白质构效关系的计算生物学解析[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1829-1842