

多酶一步纯化共固定系统的构建及催化不对称还原合成手性醇的研究

宋浩雷^{1,2}, 欧阳亚萍², 原 泉², 王天尧², 马 丽^{2*}

(1. 河北亚诺生物科技股份有限公司, 河北 石家庄 050035; 2. 河北工业大学化工学院, 天津 300401)

摘要:开发了一步纯化共固定老黄酶(OYE1)、醇脱氢酶(ADH-A)和葡萄糖脱氢酶(GDH)系统并一锅级联催化烯酮转化为手性醇类化合物,同时实现辅酶的原位再生。以镍离子金属螯合亲和层析介质(Ni-NTA)修饰的SiO₂纳米花为载体,对带有His-tag的目的蛋白ADH-A、OYE1和GDH粗酶液进行一步分离纯化及固定化,并在优化的反应条件下进行反应,对手性醇产物的产率最高可达92.37%。固定化酶相比于游离酶的稳定性更加出色。在连续5次循环使用后,固定化酶在使用时仍有较高的转化率。同时,固定化酶OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂对环状、链状及芳香族烯酮类化合物均具有良好的催化性能。

关键词:老黄酶;不对称合成;一步纯化固定化;多酶级联;手性化合物

中图分类号:TQ46

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2023)11-0104-07

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.11.021

Construction of a multi-enzyme one-step purification co-immobilization system to catalyze asymmetric reduction for synthesis of chiral alcohols

SONG Hao-le^{1,2}, OUYANG Ya-ping², YUAN Quan², WANG Tian-yao², MA Li^{2*}

(1. Hebei Yanuo Bioscience Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China;

2. School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China)

Abstract: A system is developed for one-step purification co-immobilization of old yellow enzyme (OYE1), alcohol dehydrogenase (ADH-A) and glucose dehydrogenase (GDH), and a one-pot cascade catalytic system is developed to catalyze ketene to high value-added chiral alcohol compounds while the in situ regeneration of coenzymes (NADPH and NADH) is achieved. SiO₂ nanoflower modified by nickel ion metal chelation affinity chromatography medium (Ni-NTA) is taken as carrier, crude enzyme solutions containing ADH-A, OYE1, and GDH, targeted proteins with His-tag, are separated, purified and immobilized in one-step, and the reaction is performed under the optimized reaction conditions. The highest yield of chiral alcohol products can reach 92.37%. Compared with free enzyme, OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ immobilization enzyme has better stability. After it has been used for 5 consecutive cycles, the immobilization enzyme still delivers a high conversion. OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ immobilization enzyme shows good catalytic performance for cyclic, chain and aromatic ketenes.

Key words: old yellow enzyme; asymmetric synthesis; one-step purification immobilization; multi-enzyme cascade; chiral compounds

近年来,手性化合物由于其独特的优势,在医药和农药领域具有极大的市场需求^[1]。然而,自然界中存在的对映体纯的物质有限且种类稀少,仅靠从自然界中获取远远不能满足市场需求。因此,手性纯化合物的合成研究前景广阔。传统合成方法中, α,β -不饱和羰基化合物的不对称氢化反应是由过渡金属(如钨^[2]、铱^[3]、钨^[4]、铑^[5]和钴^[6])与手性配体络合进行催化。虽然这些方法具有良好的选择性和产率,但在药物的生产过程中完全去除金属杂

质仍然是严峻的挑战^[7]。生物酶催化具有不对称氢化反应条件温和、可在常温常压无需金属配体的情况下合成手性药物的特点,越来越多的受到人们的关注^[8-9]。通过酶催化不对称氢化反应获得手性分子是一种经济、高效和绿色的方法。当前对于含有单个手性中心化合物的合成已经设计了一系列简便、普适且高效的合成策略^[10]。然而,对于含有多个手性中心的化合物的合成更具挑战和研究价值。

老黄酶可催化 α,β -不饱和酮、醛、硝基烯烃、羧

收稿日期:2022-12-31;修回日期:2023-09-13

基金项目:河北省自然科学基金(B2020202036);河北省省级科技计划资助(22372802D)

作者简介:宋浩雷(1976-),男,博士,高级工程师,研究方向为生物医药, songhl_yanuo@163.com;马丽(1983-),女,博士,高级实验师,硕士生导师,研究方向为生物催化与转化,通讯联系人, mali0502@hebut.edu.cn。

酸及其衍生物等不对称还原,是制备手性纯化合物的良好催化剂。但老黄酶是一类含黄素单核苷酸(FMN)的NAD(P)H依赖型氧化还原酶,其催化反应的重要组成部分——辅酶(NAD(P)H)价格昂贵,限制了该生物催化剂的大规模应用^[11]。醇脱氢酶(ADH,EC1.1.1.X)也是一种辅酶(NAD(P)H)依赖型氧化还原酶,能够可逆催化醛和酮选择性还原为伯醇和仲醇^[12]。近年来,已经开发了多种ADH级联反应合成手性醇。Zhang等^[13]通过转氨酶(TA)与ADH一锅双酶级联获得手性 β -氨基醇,获得高的转化率(79%~99%)和高选择性(97%~99%),并在该系统中实现了辅酶的自循环;Zhang等^[14]通过丙酮酸脱羧酶(PDC)与ADH一锅双酶级联实现由己二醛向1,2-环己二醇的转化。但与老黄酶的级联催化合成手性醇的反应体系研究较少。此前有报道利用金属催化剂Pd纳米粒子与NADH依赖性醇脱氢酶一锅级联,实现了由3-甲基-2-环己烯-1-酮向3-甲基环己醇的转化,由于金属纳米粒子对酶的毒性作用,收率最高为36%^[12]。而通过多酶级联实现这一转化,可避免催化剂之间相互影响所造成的催化剂失活的现象。

笔者构建了一锅多酶级联反应体系用于催化烯酮向手性醇的转化。首先以课题组制备的Ni-NTA修饰的SiO₂纳米花为载体,对带有His-tag的目的蛋白ADH-A、OYE1和GDH粗酶液进行一步分离纯化及固定化;随后对固定化酶OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂的制备条件进行优化;最后考察OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂的催化性能及在烯酮类化合物向手性醇的转化中的应用。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

苯乙醇(分析纯)、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠盐(分析纯)和1-乙酰基-1-环己烯(分析纯),上海阿拉丁生化科技有限公司生产;2-甲基环己醇(分析纯)、2-甲基环戊醇(分析纯)、环戊醇(分析纯)、4-甲基-2-戊醇(分析纯)、异丙基叉丙酮(分析纯),RHAWN生产;环己醇(分析纯),天津市风船化学试剂科技有限公司生产;ADH-A(2100U/g_{蛋白})、OYE1(462U/g_{蛋白})和GDH(4010U/g_{蛋白}),均为本实验室菌株发酵培养。

1.2 实验仪器

电子天平(FA2004),上海精科科技有限公司生产;集热式恒温加热磁力搅拌器(DF-101S),河南省予华仪器有限公司生产;高压灭菌器(GI154T),致微仪器有限公司生产;超净工作台(SW-CJ-1FD),苏净集团安泰公司生产;台式高速离心机(TG18G),盐城凯特实验仪器有限公司生产;紫外分光光度计(UV-1100),上海仪电分析仪器有限公司生产;pH计(PHS-2F),上海米沙瓦医科工业有限公司生产;恒温培养振荡器(ZWY-2000),上海智城分析仪器有限公司生产;超声波细胞粉碎机(BILON-250Y),北京比朗实验设备有限公司生产;电泳仪(DYY-6C),北京市六一仪器厂生产;生化培养箱(LRH-1000F),上海一恒科学仪器有限公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 固定化酶的制备

取课题组前期制备的Ni-NTA@SiO₂(70mg)加入到10mL离心管中^[15],加入适量的OYE1、ADH-A和GDH,25℃、160r/min条件下孵育2h,用PBS缓冲液洗涤3次备用。

1.3.2 游离酶和固定化酶酶学性质探究

游离酶和固定化酶热稳定性:将OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂与相同酶比例、相同酶量的游离酶在40℃和45℃条件下孵育不同时间后用于级联反应,并检测产物(1S,3S)-3-甲基环己醇的产率。

游离酶和固定化酶pH稳定性:将OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂与相同酶比例、相同酶量的游离酶在pH5和pH10的缓冲液中孵育不同时间后用于催化级联反应,并检测(1S,3S)-3-甲基环己醇的产率。

游离酶和固定化酶储存稳定性:将固定化酶及游离酶置于4℃冰箱中,间隔一定时间取相同酶比例及酶量的固定化酶和游离酶催化级联反应,检测(1S,3S)-3-甲基环己醇的产率。

1.3.3 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂重复使用性的探究

以3-甲基-2-环己烯-1-酮(10mmol/L)为底物,并加入NADP⁺(1mmol/L)、葡萄糖(200mmol/L)及一定量的固定化酶,于35℃、pH7.5的磷酸钠缓冲溶液中反应24h后,通过气相色谱(GC)对产物进行检测。反应结束后,将固定化酶用磷酸钠缓冲

溶液(pH 7.5, 50 mmol/L)洗涤 3 次后,重复进行上述操作,考察 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 的重复使用性。

1.3.4 一锅多酶级联催化反应体系的构建

向反应体系中依次加入葡萄糖(50 mmol/L)、NADP⁺(0.2 mmol/L)、NAD⁺(0.2 mmol/L)和异丙醇(体积分数为 15%)及一定量的 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂,在 30℃、160 r/min 下反应 24 h,用乙酸乙酯对产物进行萃取,并通过气相色谱进行产物的定性分析,通过加入内标物质检测产率。

1.3.5 气相色谱检测条件

采用 CP-Chirasil 柱(25 m×0.32 mm×0.25 μm),检测器 FID,正十五烷为内标物,70℃保持 2 min,以 2℃/min 的速度先升温至 135℃,再以 25℃/min 的速度升温至 180℃,保持 2 min。

2 结果与讨论

2.1 固定化酶 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 的表征

通过 CLSM 对 3 种酶在 Ni-NTA@SiO₂ 上负载情况进行表征,结果如图 1 所示。利用罗丹明 B、异硫氰酸荧光素和四甲基异硫氰酸罗丹明 3 种荧光试剂分别对 OYE1、GDH 和 ADH-A 进行荧光标记,并将荧光标记后的酶蛋白固定在 Ni-NTA@SiO₂ 上,

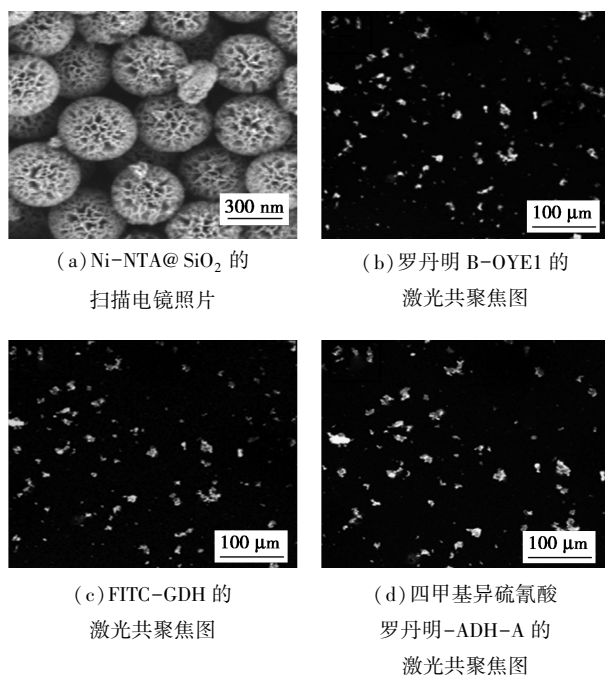


图 1 固定化酶的表征结果

对固定化酶 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 进行 CLSM 表征。从图 1 中可以看出,在 3 种不同波长的激发光作用下,荧光标记的酶分子显示出红、绿和黄三种不同的颜色,表明 OYE1、ADH-A 和 GDH 成功固定于载体 Ni-NTA@SiO₂ 上。

2.2 Ni-NTA@SiO₂ 对 OYE1、ADH-A 和 GDH 的特异性选择

将 Ni-NTA@SiO₂ 置于按一定比例混合的 OYE1、ADH-A 和 GDH 粗酶液中孵育 2 h,然后离心收集沉淀,并用含有咪唑浓度 30 mmol/L 的缓冲液洗涤 3 次获得固定化酶(OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂)。随后,获得的固定化酶用含有高浓度咪唑(300 mmol/L)的磷酸钠缓冲液将目的蛋白从载体上洗脱下来,通过 SDS-PAGE 分析固定化效果,结果如图 2 所示。可以看出 3 条明显的蛋白质条带,OYE1、ADH-A 和 GDH 的分子质量分别在 45、35 kDa 和 28 kDa 左右,与电泳条带显示的分子质量一致,表明 Ni-NTA@SiO₂ 纳米花能在细胞裂解液中特异性吸附并富集 OYE1、ADH-A 和 GDH。

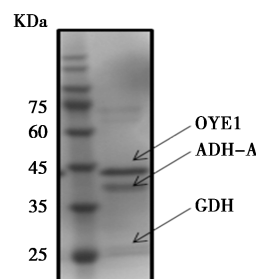


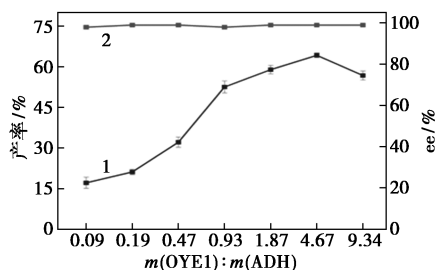
图 2 特异性吸附 OYE1、ADH-A 和 GDH 的 SDS-PAGE 分析

2.3 固定化酶制备条件的优化

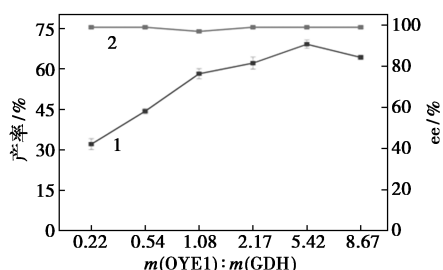
2.3.1 三酶添加比例的优化

用不同质量比的 OYE1 和 ADH-A 混合液与过量 GDH 混合后用于固定化酶的制备,其性能如图 3(a)所示。从图 3(a)中可以看出,(1S,3S)-3-甲基环己醇的产率随着 OYE1/ADH-A 质量比的增大而增大,因为在 OYE1 与 ADH-A 的级联过程中,OYE1 为限速步骤,为提高底物转化效率,需要提高 OYE1 的占比。当 $m(\text{OYE1})/m(\text{ADH-A})=4.67$ 时产率最高为 64.28%,此后进一步增加 OYE1 加入量,会使得 ADH-A 的量不足以转化过量的中间产物,使得中间产物积累,对酶产生抑制作用,产率下降。综上,固定化时,OYE1 和 ADH-A 的加入质量比为 4.67。

保持 OYE1 和 ADH-A 的质量比恒定,以 OYE1 为基础,考察与不同质量比 GDH 粗酶液混合制备固定化酶,并用于催化级联反应的性能,结果如图 3 (b)所示。从图 3(b)中可以看出,当 $m(\text{OYE1})/m(\text{GDH})$ 较小时,级联反应的产率较低,此时 OYE1 的加入量较少致使底物转化效率低;后随着 OYE1 加入量的增加,产率增大,当 $m(\text{OYE1})/m(\text{GDH}) = 5.42$ 时,产率最高到达 69.17%;继续增大 OYE1 加入量,产率有所下降,其原因为 GDH 量过少,不足以提供体系所需辅酶循环量,从而导致产率下降。综上,3 种酶的质量比为 $m(\text{OYE1})/m(\text{ADH-A})/m(\text{GDH}) = 5.42:1.16:1.00$ 。



(a) 不同质量比的 OYE1 和 ADH-A 固定化酶的性能



(b) 不同质量比的 OYE1 和 GDH 固定化酶的性能

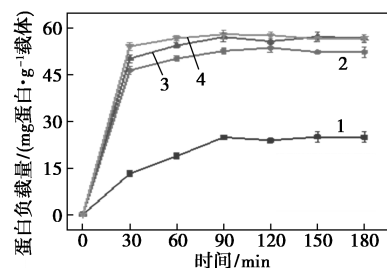
1—产率;2—ee

图 3 三酶固定化比例的优化

2.3.2 酶浓度和固定化时间的优化

酶在混合液质量浓度为 0.5~2.0 mg/mL、固定化时间在 0~180 min 内酶负载量的变化情况如图 4 所示。从图 4 中可以看出,在 30 min 内固定化酶量随着固定化时间的增长呈快速上升趋势,在 30~90 min 内,蛋白负载量增长速率降低,并在 90 min 左右达到饱和。对比不同酶质量浓度对蛋白负载量的影响,当酶质量浓度为 0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 时载体的负载呈不饱和状态,酶质量浓度在 1.5 mg/mL 且达到负载平衡时,其蛋白负载量与酶质量浓度为 2.0 mg/mL 平衡时基本相同,表明此时载体负载量已经达到饱和状态。为提升经济效益,确定固定化酶初始质量浓度为 1.5 mg/mL,固定化

时间为 90 min,此时蛋白负载量为 57.20 mg/(g_{载体})。



1—0.5 mg/mL;2—1.0 mg/mL;3—1.5 mg/mL;4—2.0 mg/mL

图 4 不同酶浓度下的固定化进程曲线

2.4 固定化酶性能研究

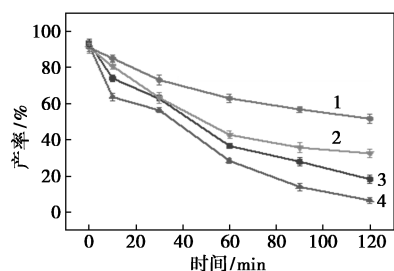
将 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 与相同酶比例、相同酶量的游离酶在 40℃ 和 45℃ 条件下孵育不同时间后用于级联反应,并检测产物 (1S, 3S)-3-甲基环己醇的产率,结果如图 5(a)所示。从图 5(a)中可以看出,在相同温度孵育相同时间后,固定化酶催化级联反应的产率均高于游离酶,表明固定化后酶的热稳定性有所提升。原因是固定化后,酶分子刚性结构增强,空间结构更加稳定,需要更高的能量才能使酶失活^[8]。

将 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 与相同酶比例、相同酶量的游离酶在 pH 5 和 pH 10 的缓冲液中孵育不同时间后用于催化级联反应,并检测 (1S,3S)-3-甲基环己醇的产率,结果如图 5(b)所示。由图 5(b)中可以看出,无论在偏酸或是偏碱性环境中,OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 都展现出更加优异的催化性能。

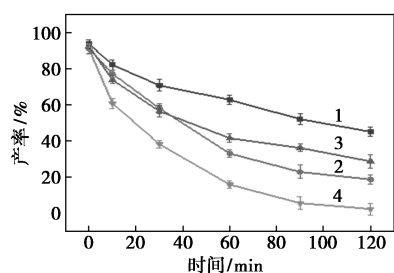
为了探究 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 的储存稳定性,将固定化酶及游离酶置于 4℃ 冰箱中,间隔一定时间取相同酶比及酶量的固定化酶和游离酶用于催化级联反应,检测 (1S,3S)-3-甲基环己醇的产率,结果如图 5(c)所示。从图 5(c)中可以看出,固定化酶和游离酶的催化性能随着储存时间的延长呈下降趋势。储存 20 d 后,固定化酶催化级联反应产率为 45.18%,而游离酶仅为 5.06%。其次,在储存相同时间后固定化酶催化的产率均高于游离酶。

固定化酶催化 3-甲基-2-环己烯-1-酮转化为 (1S,3S)-3-甲基环己醇的重复使用性能如图 5(d)所示。从图 5(d)中可以看出,随着循环次数的增加,级联反应产率随之降低,其原因是由于洗涤过程中酶的损失及长时间反应过程中酶失活所致。在连续循环使用 5 次后,(1S,3S)-3-甲基环己醇

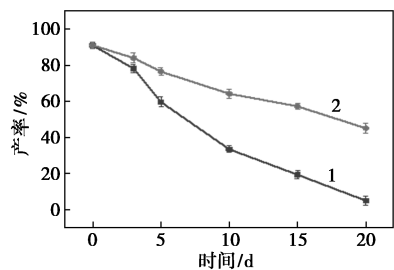
的产率仍保持在 45.27%, 表明固定化酶具有较好的稳定性。



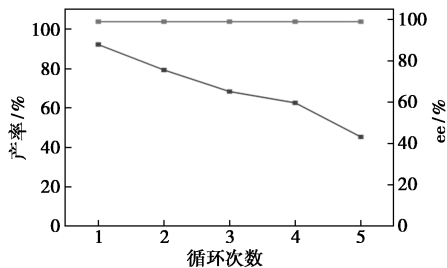
1—40℃ 固定化酶; 2—45℃ 固定化酶; 3—40℃ 游离酶;
4—45℃ 游离酶
(a) 热稳定性



1—pH 5 固定化酶; 2—pH 5 游离酶; 3—pH 10 固定化酶;
4—pH 10 游离酶
(b) pH 稳定性



1—游离酶; 2—固定化酶
(c) 储存稳定性



(d) 重复使用性

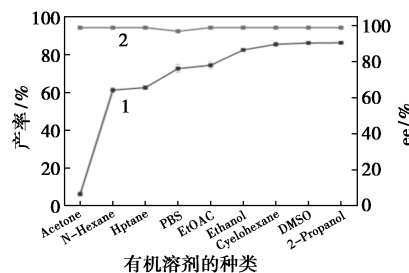
图 5 游离酶和 OYE1&ADH-A&GDH@ Ni-NTA@ SiO₂ 的性能研究

2.5 级联催化反应条件的优化

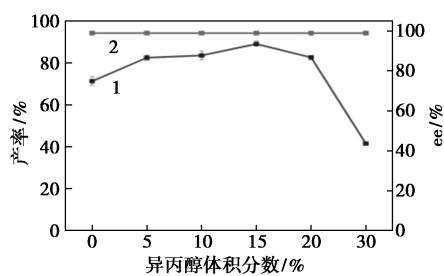
2.5.1 助溶剂的选择及用量优化

底物及中间产物的低溶解度影响其在水相中的分布, 影响底物及中间产物与酶的相互作用, 导致反

应产率偏低^[18]。为进一步提升产率, 向反应体系中添加有机溶剂作为底物的助溶剂, 提高底物溶解度, 增加底物与酶的有效接触。有机溶剂对 OYE1&ADH-A&GDH@ Ni-NTA@ SiO₂ 催化性能的影响如图 6 (a) 所示。从图 6(a) 中可以看出, 以磷酸钠缓冲液反应体系作为对照, 在反应 24 h 后, 二甲基亚砜 (DMSO)、异丙醇 (2-Propanol)、乙醇 (Ethanol) 和环己烷 (Cyclohexane) 的产率分别为 86.17%、86.28%、82.50% 及 85.46%, 均高于对照组 (73.20%), 表明 4 种有机溶剂对级联反应有明显的促进作用。其中, 加入 2-Propanol (异丙醇) 催化效果最佳, 这是由于异丙醇与水互溶, 可增强底物的扩散, 且 ADH-A 在异丙醇存在的情况下, 可由异丙醇作为供氢体, 且不需要额外加入 NADH^[18]。此外, 庚烷 (Heptane)、正己烷 (N-Hexane) 和丙酮 (Acetone) 产率仅分别为 62.60%、61.27% 和 6.35%, 对反应有明显的抑制作用。综上, 选择异丙醇作为助溶剂添加到级联反应体系中。



(a) 有机溶剂的影响



(b) 异丙醇体积分数的影响

1—产率; 2—ee

图 6 有机溶剂、异丙醇体积分数对 OYE1&ADH-A&GDH@ Ni-NTA@ SiO₂ 催化性能的影响

加入不同体积分数 (0~30%) 的异丙醇时, 对 OYE1&ADH-A&GDH@ Ni-NTA@ SiO₂ 的催化性能的影响如图 6(b) 所示。从图 6(b) 中可以看出, 当异丙醇体积分数低于 20% 时, 对级联反应起促进作用; 当异丙醇体积分数为 15% 时, 级联反应产率达到最大值 89.11%, ee 值大于 99%; 而加入过量异丙

醇(30%)后,产率快速下降,原因是过量的有机溶剂对酶的毒性作用使酶活性降低,从而导致产率下降明显。








2.5.2 其他反应条件的优化

对一锅级联反应的其他条件进行单因素优化,包括对底物浓度、固定化酶加入量、反应 pH、反应温度以及反应时间,所有反应均在含有 0.2 mmol/L NADP⁺、0.2 mmol/L NAD⁺ 和 40 mmol/L 葡萄糖的 5 mL PBS 缓冲液中进行,并用气相色谱检测反应的 ee 值。实验结果表明,在底物浓度为 10 mmol/L、pH 7.5、35°C、24 h 和 100 mg 固定化酶加入量条件下,级联催化反应的产率为 92.95%,ee >99%。

2.6 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 底物拓展

为拓展 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 的应用范围,探究了 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 对商购的几种底物的催化性能,结果如表 1 所示。

表 1 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂

催化还原烯酮化合物					
产物	产率/%	ee 值/%	产物	产率/%	ee 值/%
	93.83			86.98	99(S)
	94.53			64.49	99(S)
	9.84	78(1S,2R)		89.25	99(S)
	92.37	99(1S,3S)			

注:反应体系中均添加 NADP⁺(0.2 mmol/L)、NAD⁺(0.2 mmol/L)、葡萄糖(40 mmol/L)于 5 mL PBS 缓冲液中。

从表 1 中可以看出,对于没有其他侧链的基团环状小分子化合物的催化性能(1a 和 2a),OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 表现出良好的催化性能,产率分别为 93.83% 和 94.53%。OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 对环状烯酮在 α 位和 β 位甲基取代的底物的催化性能有着明显差异,产率分别为 9.84% 和 92.37%(3a 和 4a)。此外,对比环状与催化芳香族类不饱和羰基化合物,链状不饱和羰基化合物的产率更低(64.49%)。综

上,OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 对环状、链状、芳香类不饱和羰基化合物均具有一定的催化效果。其中,对无侧链的环状烯酮类化合物催化性能更高。此外,对在 α 位和 β 位甲基取代的环状烯酮的不对称氢化反应中,其催化性能有着显著差异。

3 结论

构建了一锅多酶级联催化体系,由 OYE1 和 ADH-A 催化环状烯酮转化为含多个手性中心、高附加值的醇类化合物,并通过偶联 GDH 实现辅酶(NADPH 和 NADH)的再生。同时,将酶固定化技术与固定金属离子亲和色谱(IMAC)技术相结合,利用 Ni-NTA@SiO₂ 上螯合的 Ni²⁺ 与酶组氨酸标签的亲合作用实现酶的一步分离、纯化与固定化。获得的固定化酶 OYE1&ADH-A&GDH@Ni-NTA@SiO₂ 在烯酮的不对称还原中展现出优异的催化性能,反式(1S,3S)-3-甲基环己醇的产率可高达 92.37%(ee>99%)。与游离酶相比,固定化酶的热稳定性、pH 稳定性和重复使用性都得到明显提升,连续 5 次循环使用后,(1S,3S)-3-甲基环己醇产率仍保持在 45.27%,且展现出良好的立体选择性(ee>99%)。

参考文献

- [1] Erica E Ferrandi, Daniela Monti. Amine transaminases in chiral amines synthesis: Recent advances and challenges[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 34(1): 13.
- [2] Kenta Tanaka, Yasushi Hashimoto, et al. Electrocatalytic asymmetric hydrogenation of α,β-unsaturated acids in a PEM reactor with cinchona-modified palladium catalysts[J]. Electrochemistry Communications, 2020, 115: 106734.
- [3] Alban Cadu, Pher G Andersson. Development of iridium-catalyzed asymmetric hydrogenation: New catalysts, new substrate scope[J]. Journal of Organometallic Chemistry, 2012, 714: 3-11.
- [4] Haruno Murayama, Yuya Ikutake, Hiroshi Nakashima, et al. Structures analyses of supported ruthenium catalysts under asymmetric hydrogenation reaction[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2020, 175: 108158.
- [5] Jiang Xiaobin, Mvan den Berg, Adriaan J Minnaard, et al. The application of monodentate secondary phosphine oxide ligands in rhodium- and iridium-catalyzed asymmetric hydrogenation[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15(14): 2223-2229.
- [6] Yang Xiaoxu, Ge Shaozhong. Recent progress in cobalt-catalyzed enantioselective hydrogenation and hydroboration reactions of alkenes[J]. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2021, 31: 100542.

- [7] Yang Jungwong, Hechavarria Fonseca Maria T, Vignola Nicola, *et al.* Metal-free, organocatalytic asymmetric transfer hydrogenation of alpha, beta-unsaturated aldehydes [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 44(1): 108–110.
- [8] Mélanie Hall, Clemens Stueckler, Wolfgang Kroutil, *et al.* Asymmetric bioreduction of activated alkenes using cloned 12-oxophytodienoate reductase isoenzymes OPR-1 and OPR-3 from *Lycopersicon esculentum* (tomato): A striking change of stereoselectivity [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(21): 3934–3937.
- [9] Heather A Relyea, Wilfred A van der Donk. Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2005, 33(3): 171–189.
- [10] Helen S Toogood, Anna Fryszkowska, Victoria Hare, *et al.* Structure-based insight into the asymmetric bioreduction of the C=C double bond of alpha, beta-unsaturated nitroalkenes by pentaerythritol tetranitrate reductase [J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2008, 350(17): 2789–2803.
- [11] Dash Subhagit, Chaudhuri Haribandhu, Viswakarma Sangita, *et al.* Surface modified nano fly ash as an activator in the Reduction of Ketones [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2018, 18(6): 4282–4287.
- [12] Coccia, Francesca, Tonucci, Lucia, *et al.* Stereoselective double reduction of 3-Methyl-2-cyclohexenone, by Use of Palladium and Platinum Nanoparticles, in Tandem with Alcohol Dehydrogenase [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, 8(10): 853–869.
- [13] Zhang Jiandong, Yang Xiaoxiao, Jia Qiao, *et al.* Asymmetric ring opening of racemic epoxides for enantioselective synthesis of (S)- β -amino alcohols by a cofactor self-sufficient cascade biocatalysis system [J]. *Catalysis Science & Technology*, 2019, 9(1): 70–74.
- [14] Zhang Yan, Yao Peiyuan, Cui Yunfeng, *et al.* One-pot enzymatic synthesis of cyclic vicinal diols from aliphatic dialdehydes via intramolecular C=C bond formation and carbonyl reduction using pyruvate decarboxylases and alcohol dehydrogenases [J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2018, 360(21): 4191–4196.
- [15] Li Yongxing, Luan Pengqian, Zhou Liya, *et al.* Purification and immobilization of his-tagged organophosphohydrolase on yolk-shell Co/C@SiO₂@Ni/C nanoparticles for cascade degradation and detection of organophosphates [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 167: 107895–107909.
- [16] Li Han, Cui Xiumei, Zheng Liangyu. Functionalized poplar powder as a support material for immobilization of enoate reductase and a cofactor regeneration system [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(4): 607–616.
- [17] Jennifer Engel, Katlego S Mthethwa, Diederik J Opperman, *et al.* Characterization of new baeyer-villiger monooxygenases for lactonizations in redox-neutral cascades [J]. *Molecular Catalysis*, 2019, 468: 44–51.
- [18] Li Yaohui, Zhang Rongzhen, Xuyan. Structure-based mechanisms: On the way to apply alcohol dehydrogenases/reductases to organic-aqueous systems [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 168: 412–427.
- [19] Padhi, Santosh Kumar, Despina J. Bougioukou, *et al.* Site-saturation mutagenesis of tryptophan 116 of *Saccharomyces pastorianus* old yellow enzyme uncovers stereocomplementary variants [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131: 3271–3280.
- [20] Melis Kayikci, Venkatakrishnan A J, James Scott-Brown, *et al.* Visualization and analysis of non-covalent contacts using the protein contacts atlas [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2018, 25(2): 185–194.
- [21] Liu Guigao, Li Shang, Shi Qinghua, *et al.* Engineering of *Saccharomyces pastorianus* old yellow enzyme 1 for the synthesis of pharmacologically active (S)-profen derivatives [J]. *Molecular Catalysis*, 2021, 507: 111568. ■
- (上接第 103 页)
- [20] Li J Y, Tang C, Zhang M, *et al.* Exploring the Cr(VI) removal mechanism of *Sporosarcina saromensis* M52 from a genomic perspective [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 225: 112767.
- [21] Emeka O E, Chidiebere O, Maxwell O, *et al.* Radiological and toxicity risk exposures of oil based mud: Health implication on drilling crew in Niger Delta [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, 27(5): 5387–5397.
- [22] 郑瑾, 付雅丽, 宋权威, 等. 微生物强化修复石油污染土壤的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3622–3635.
- [23] 赵苒, 唐晨, 王万鹏, 等. 一株耐铬的石油烃降解菌 Tph2-23 及其应用: CN110184206B [P]. 2019-09-28.
- [24] 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所. 生活饮用水标准检验方法 金属指标 [Z]. 中华人民共和国卫生部; 中国国家标准化管理委员会, 2006: 96.
- [25] Zhao R, Wang B, Cai Q, *et al.* Bioremediation of hexavalent chromium pollution by *Sporosarcina saromensis* M52 isolated from offshore sediments in Xiamen, China [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2016, 29(2): 127–136.
- [26] Ballav S, Swagata C, Kumar M. Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1 [J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2010, 59(3): 185–190.
- [27] Murugavelh S, Mohanty K. Isolation, identification and characterization of Cr(VI) reducing *Bacillus cereus* from chromium contaminated soil [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 230: 1–9.
- [28] 李维宏, 杨宁, 魏晓峰, 等. 一株 Cr(VI) 还原菌的筛选鉴定及其还原特性研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(11): 2133–2139.
- [29] 潘云飞, 唐正, 彭欣怡, 等. 石油烃污染土壤微生物修复技术研究现状及进展 [J]. *化工进展*, 2021, 40(8): 4562–4572.
- [30] 魏斐, 杨丽荣, 薛保国, 等. 还原六价铬细菌及其还原酶的研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(4): 53–59.
- [31] Hassan I A, Mohamedelhassan E E, Yanful E K, *et al.* Isolation and characterization of novel bacterial strains for integrated solar-bioelectrokinetic of soil contaminated with heavy petroleum hydrocarbons [J]. *Chemosphere*, 2019, 237: 124514.
- [32] Li M K, Zhuo Y T, Hu Y T, *et al.* Exploration on the bioreduction mechanism of Cr(VI) by a gram-positive bacterium: *Pseudochrobactrum saccharolyticum* W1 [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 184: 109636. ■