

过氧化氢原位生成驱动过氧合酶催化反应研究进展

李可欣^a 杨庆远^{*,a} 张鹏鹏^b 张武元^{*,b}^(a) 西安交通大学化学工程与技术学院 西安 710049^(b) 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308

摘要 C—H 键的选择性催化氧官能团化反应是有机化学中非常具有挑战的一类反应。与贵金属络合物催化剂相比,生物酶在选择性和活性等方面表现出一定优势。其中,过氧合酶(peroxygenase)作为近年来研究热点,能够直接利用过氧化氢(H₂O₂)作为共底物催化 C—H 键的氧官能团化反应。过氧合酶结合了 P450 单加氧酶的催化多功能性且无须依赖辅酶及其再生体系,因此在有机合成中引起越来越多的重视。但是,过氧合酶在实际应用中存在一个瓶颈:即过氧合酶对其催化所必须的 H₂O₂ 浓度敏感,当反应体系中 H₂O₂ 浓度过高时,会引起过氧合酶中的亚铁血红素氧化分解,从而导致酶失活。为突破该瓶颈,调控反应体系中 H₂O₂ 的浓度对于高效应用过氧合酶来说格外重要。概括了近年来多种原位生成 H₂O₂ 驱动过氧合酶催化的方法,从酶催化、光催化、电催化原位生成 H₂O₂ 角度出发,全面分析了近年来开发的高原子经济性 H₂O₂ 原位生成技术驱动过氧合酶催化体系的优缺点,为促进该酶在有机合成中的应用提供参考。

关键词 过氧合酶; H₂O₂ 原位生成; 碳氢键氧官能团化; 生物催化; 有机合成

Research Progress of Peroxygenase-Catalyzed Reactions Driven by *in-situ* Generation of H₂O₂Li, Kexin^a Yang, Qingyuan^{*,a} Zhang, Pengpeng^b Zhang, Wuyuan^{*,b}^(a) School of Chemical Engineering and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049^(b) Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308

Abstract Selective catalytic oxygen functionalization reactions of C—H bonds are a very challenging class of reactions in organic chemistry. Compared with traditional metal complex catalysts, enzymes exhibit certain advantages in terms of selectivity and activity. Amongst them, peroxygenases are able to catalyze the oxidative functionalization of C—H bonds by direct use of H₂O₂ as a co-substrate. Peroxygenases combine the catalytic versatility of P450 monooxygenases without relying on coenzymes and their regenerative systems for cofactors. Therefore, peroxygenases have attracted considerable attention in organic synthesis. However, a bottleneck in the practical application of peroxygenase is that, like all heme-dependent enzymes, peroxygenase is sensitive to H₂O₂, and higher concentration of H₂O₂ in the reaction system will cause oxidative decomposition of ferrous heme, resulting in the enzyme inactivation. To overcome this, regulating the concentration of H₂O₂ in the reaction is particularly important for the efficient use of peroxygenase. This paper outlines a variety of methods used for *in situ* generation of H₂O₂ to drive peroxygenases reported in recent years. The pros and cons of biocatalysis, photocatalysis and electrocatalysis used for high atom-efficient H₂O₂ generation are comprehensively analyzed. This review paper is expected to provide a reference for promoting the application of peroxygenases in organic synthesis.

Keywords peroxygenase; H₂O₂ *in situ* generation; C—H bond oxyfunctionalization; biocatalysis; organic synthesis

氧化酶正处于成为实用的选择性氧化反应催化剂的前沿,它能提供更直观、高效和简洁的合成路线,催化范围包括简单的醇氧化以及 C—H 键的选择性卤化等,在绿色化学技术开发领域具有重要价值^[1-2]。对于上述氧化反应,已经报道的“经典”化学催化剂尚无法与

之媲美。过去十多年中,大量研究集中在含血红素的氧化酶,尤其是加氧酶[oxygenases, 包括单加氧酶(E.C. 1.13)和双加氧酶(E.C. 1.14)]。其中, P450 单加氧酶是最受欢迎的生物酶催化剂,可催化 C—H 键的区域和立体选择性羟基化、环氧化和杂原子氧合反应。P450 单加氧

* Corresponding authors. E-mail: qingyuan.yang@xjtu.edu.cn; zhangwy@tib.cas.cn

Received August 28, 2021; revised September 30, 2021; published online October 21, 2021.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32171253).

国家自然科学基金(No. 32171253)资助项目。

酶催化 $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ 复合物(Compound I)的生成需经历电子的一系列传递过程: 电子转移到静息状态的血红素基团, 与氧结合, 进一步还原并脱水. 该历程所需的还原电子通常由还原态的辅酶[NAD(P)H]通过复杂的传输链传递(图 1a). 而 P450 酶复杂的分子结构导致它在实际应用面临诸多挑战: 电子传输链复杂导致其难以精准把控, 这限制了酶的工业化应用. 为此, 通过开展定向进化、人工设计、反应过程优化等研究来进一步提升 P450 酶的功能与应用势在必行.

相比之下, 过氧合酶(peroxygenases, E.C. 1.11.2, 又称过氧化酶、过加氧酶)作为氧化酶的一种, 能够直接利用 H_2O_2 驱动有机化合物的氧官能团化反应(图 1b). 过氧合酶结合了 P450 酶的催化多功能性同时无须依赖辅酶及其再生循环体系. 因此, 使用过氧合酶有效规避了 P450 酶在氧化反应中的诸多困难. 过氧合酶仅需 H_2O_2 作为协同底物, 而后者作为化学合成中的清洁氧化剂(副产物仅为 H_2O), 在开发高原子经济性、绿色的催化工艺研究中备受青睐.

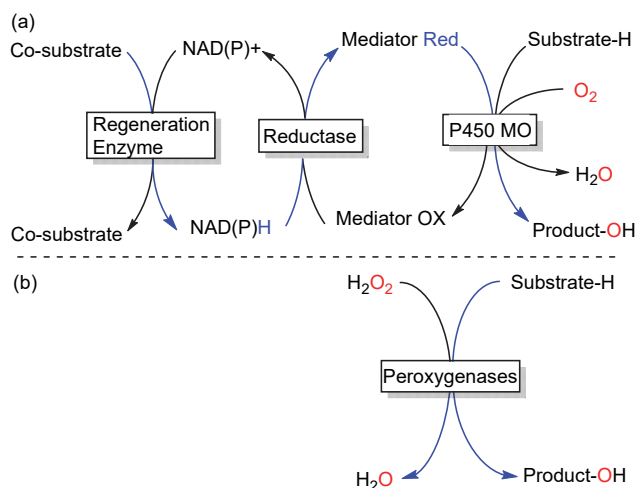


图 1 P450 单加氧酶(a)和过氧合酶(b)催化的 C—H 键氧官能团化反应

Figure 1 P450 monooxygenase (a) and peroxygenase (b) catalyzed C—H bond oxyfunctionalization reactions

但需要指出的是, 过氧合酶在实际应用中存在一个瓶颈: 和所有血红素依赖性酶一样, 过氧合酶对 H_2O_2 浓度敏感. 因此, 反应体系中 H_2O_2 必须保持在适宜浓度以维持酶的反应活性. 目前, 较多的研究集中于 H_2O_2 的原位生成技术, 本文将在简要介绍该酶的研究现状的基础上, 对近年来开发的多种 H_2O_2 原位生成技术驱动过氧合酶催化的研究展开综述. 主要从催化体系稳定性、酶催化活性、底物浓度及实用性等角度对上述杂合催化体系展开评述, 旨在为促进过氧合酶在有机合成中(尤其是选择性氧化反应)的应用提供参考.

1 过氧合酶的研究现状

过氧合酶是选择性官能团化反应中具有应用潜力的生物催化剂. 该酶结合了 P450 单加氧酶的催化多功能性却无须依赖辅酶及其再生循环系统. 过氧合酶在结构上与 P450 单加氧酶相似, 含有与半胱氨酸配位的血红素单元, 从酶催化的机制层面分析, 过氧合酶拥有理论上与 P450 酶相同范围数量庞大的底物和产物库. 同时, 过氧合酶不经历 O_2 的还原活化, 直接使用 H_2O_2 生成 Compound I. 2004 年, Hofrichter 等^[4]首次报道了来自茶树菇的新型过氧合酶(*Agrocybe aegerita*; AaeUPO; 在当时被称作过氧化物酶)可以氧化多种醇底物, 由于反应条件温和、方法简单易操作, 在最近十年备受人们关注^[5-6].

截至目前, 有超过 5000 个推定的过氧合酶基因保存在基因组数据库中, 但文献只报道了两种过氧合酶的晶体结构. 2006 年, Hofrichter 等^[5]详细讨论了 AaeUPO 的催化机理, 指出远端的谷氨酸 196 和精氨酸 189 在 H_2O_2 活化步骤中通过酸碱催化发挥关键作用. 但鉴于有限的酶晶体解析研究报道, 仍需进一步阐释过氧合酶的作用机制, 这对丰富酶学理论及应用具有重要意义.

目前已经报道了过氧合酶催化惰性 C—H 键羟基化、环氧化、杂原子氧合等多类具有重要意义的氧官能团化反应(如图 2), 展现出过氧合酶广阔的应用前景.

野生型 AaeUPO 催化 sp^3 类型 C—H 键的羟基化反应时, 可将脂肪酸转化为 ω 、 $\omega-1$ 和 $\omega-2$ 羟基化产物的混合物; 而直链烷烃则优先生成 2-和 3-链烷醇的混合物^[7]. 上述反应虽然区域选择性相对较差, 但对映体选择性高达 99%. 2016 年, Gutiérrez 等^[8]拓展了惰性烷烃的羟基化研究, 发现 AaeUPO 对胆囊钙化甾醇(维生素 D)的羟基化反应选择性低, 但来自灰盖鬼伞菌(*Coprinopsis cinerea*)的过氧合酶(CciUPO)则催化得到单一且具有高选择性光学纯度的产物. 这表明底物扩散的通道尺寸差异和底物平移的自由度是造成酶选择性显著不同的主要原因.

同时, 过氧合酶可催化芳香族 sp^2 -C—H 键氧化, 如 2-(4-羟基苯氧基)丙酸^[9]和普萘洛尔^[10]. 该催化功能在药物修饰及药物代谢物的合成方面展示出巨大应用潜力^[5]. 但是芳烃羟基化过程中会经历攫氢反应, 而使用自由基捕获剂可以有效避免这种情况^[6]. 2016 年, Alcalde 等^[11]首次通过调控 AaeUPO 的关键结构, 有效规避了芳香烃氧化时的聚合反应.

除了上述“经典”的氧官能团化反应外, 对过氧合酶的另一个研究方向是开发新的催化反应. 2014 年, Deska 等^[12]发表在 *Nat. Commun.* 上的研究表明, CfuUPO

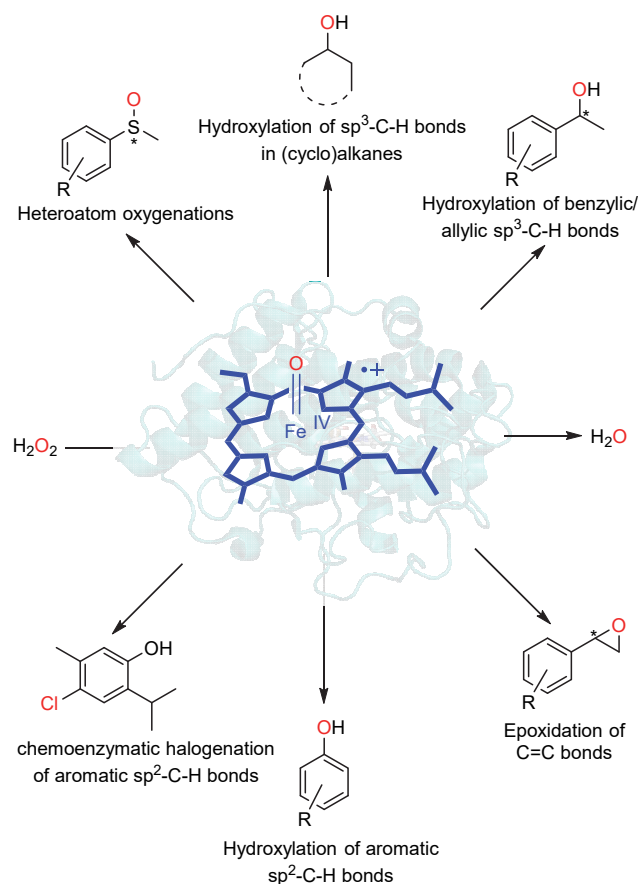


图2 过氧合酶催化 C—H 键的选择性活化及转化

Figure 2 Selective activation and transformation of C—H bonds catalyzed by peroxigenases

还可以催化呋喃基甲醇转化为吡喃酮(Achmatowicz 反应). 鉴于该反应在天然产物合成中的重要性, 进一步研究该反应具有重要意义.

虽然报道了多类有意义的有机合成反应, 但过氧合酶对 H_2O_2 的高敏感性, 限制了其在实际合成中的应用^[13]. 为了保证酶的催化稳定性, 反应中 H_2O_2 的浓度必须保持在一个最佳水平: H_2O_2 的供给与消耗达到高度匹配. 若直接向反应体系中添加 H_2O_2 溶液, 会造成局部浓度过高, 引起过氧合酶快速失活. 由于葡萄糖廉价易得, 且被氧化后可以产生过氧合酶所需的 H_2O_2 , 故葡萄糖/葡萄糖氧化酶体系是较常用的 H_2O_2 供给体系^[14]. 但是该体系在大规模使用中存在显著缺点: 原子效率低且葡萄糖酸内酯大量累积. 为克服低原子经济性及副产物的累积, 近年来有很多研究集中在开发高原子经济性的 H_2O_2 原位生成技术方面, 进而驱动过氧合酶进行下一步氧官能团化反应. 根据已有报道, 本文将从酶催化、光催化和电催化三类原位生成 H_2O_2 技术展开, 从驱动过氧合酶催化反应体系的稳定性、酶催化活性、底物浓度及实用性等角度展开分析讨论.

2 高原子经济性的 H_2O_2 原位生成

过氧合酶催化惰性 C—H 键羟基化、环氧化、杂原子氧合等具有重要意义的氧官能团化转化问题已被多次报道, 而过氧合酶对 H_2O_2 浓度的高度敏感使其在实际的应用中受到诸多限制. 如上所述, H_2O_2 对于过氧合酶具有双重作用. 一方面, 它可以简化复杂的电子转移链, 提高过氧合酶的催化活性. 另一方面, H_2O_2 过多, 极易导致亚铁血红素基团失去活性. 由于 H_2O_2 光照条件下易分解, 这使得准确添加所需化学计量变得困难, 缓慢多次添加尤为必要, 而多次添加低浓度 H_2O_2 不仅会使反应体积明显增大而且繁琐费力. 目前最先进的 H_2O_2 添加方式是通过分子氧的部分还原原位生成 H_2O_2 , 这种高原子经济性的 H_2O_2 原位生成技术为过氧合酶维持最佳水平稳定性与高反应活性提供了依托. 基于此, 下文从酶催化、光催化、电催化三个方面讨论近年来高原子经济性 H_2O_2 原位生成技术的优缺点(表 1).

2.1 酶催化原位生成 H_2O_2

酶催化原位生成 H_2O_2 使用 O_2 为氧来源, 氧化酶与电子牺牲剂共同作用还原 O_2 生成 H_2O_2 . 由于氧化酶与过氧合酶的催化环境相容、催化体系均一, 故酶催化原位生成 H_2O_2 驱动过氧合酶催化氧官能团化体系受到广泛研究(图 3).

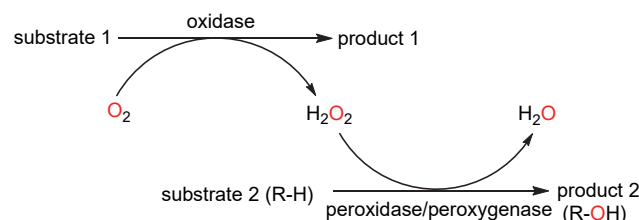


图3 酶催化原位生成 H_2O_2 驱动过氧合酶催化选择性氧官能团化反应

Figure 3 Peroxygenase-catalyzed selective oxyfunctionalization reactions driven by enzymatic in situ H_2O_2 generation

其中, 葡萄糖/葡萄糖氧化酶体系因其稳定性与可工业化生产而被人们熟知. 但发现之初所使用的葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD, EC. 1.1.3.4)催化 H_2O_2 生成效率低, 与过氧合酶偶联时产物收率有待提高. 如何提高 H_2O_2 生成效率是酶催化原位生成 H_2O_2 研究的重点. 2000 年, van de Velde^[14]将葡萄糖氧化酶和过氧合酶共同固定化在聚氨酯泡沫中, 提高了葡萄糖/葡萄糖氧化酶 H_2O_2 原位生成驱动过氧合酶体系稳定性. 产物的立体选择性对映体过量值可达到 99%, 过氧合酶 TON 可以达到 250000. 然而, 葡萄糖/葡萄糖氧化酶体系存在显著缺点: 即葡萄糖利用率低(一个葡萄糖完全氧化产生 24 个电子, 但是仅有两个电子能被葡萄糖氧化酶

表 1 原位生成 H₂O₂ 驱动过氧合酶催化反应对比表
Table 1 Comparison of in situ H₂O₂ generation used for driving peroxxygenase

年份	原位生成 H ₂ O ₂ 方式	催化剂/电极	酶	底物	产物	ee ^a /%	TON/TTN ^b	Ref.
2000		葡萄糖氧化酶	CPO (氯过氧化物 Chloroperoxidase)	硫代苯甲醚	(R)-苯甲基亚砷	99	250000	[14]
2002		D-氨基酸	CiP (来自灰盖鬼伞菌的过氧合酶, peroxidase from <i>Coprinus cinereus</i>)	(三种)芳香甲基硫化物	(三种)芳甲基亚砷	97	>500	[18]
2007		甲醇氧化酶	CiP	硫代苯甲醚	(R)-苯甲基亚砷	75 左右	>700	[20]
2014		甲酸脱氢酶、NADH 氧化酶	HRP (辣根过氧合酶, peroxidase from horse-radish)	乙苯	(R)-1-苯乙醇	—	6785	[21]
2015	酶催化	甲醇氧化酶、 甲醛歧化酶、 NADH 氧化酶、 甲酸脱氢酶、 3-羟基苯甲酸- 6-羟化酶	AaeUPO (真菌过加氧酶, The unspecific peroxxygenase from <i>Agrocybe aegerita</i>)	乙苯	(R)-1-苯乙醇	>99	294700	[23]
2018		NADH 氧化酶、 YqjM	rAaeUPO (重组真菌过加氧酶, recombinant peroxxygenase from <i>Agrocybe aegerita</i>)	乙苯	(R)-1-苯乙醇	>96	390000	[25]
2020		甲酸氧化酶	rAaeUPO	乙苯 环己烷 顺式 β -甲基苯乙烯	(R)-1-苯乙醇 环己醇 (1R,2S)-顺- β - 甲基苯乙烯	97.5	49000	[27]
2009		黄素单核苷酸	CPO	硫代苯甲醚	(R)-苯甲基亚砷	<99	22000	[29]
2013		黄素单核苷酸	CPO	硫代苯甲醚	(R)-苯甲基亚砷	>96	12600	[31]
2017		Au-TiO ₂	rAaeUPO	乙苯	(R)-1-苯乙醇	>98	>71000	[32]
2019	光催化	石墨相氮化碳 g-C ₃ N ₄	rAaeUPO	乙苯	(R)-1-苯乙醇	>97.8	60000	[35]
2019		酚藏红花、 亚甲基蓝、 黄素单核苷酸	rAaeUPO	乙苯	(R)-1-苯乙醇	>95	100000	[36]
2020		水溶性蒽醌 磺酸钠	CiVCPO; rAaeUPO	百里香酚 乙苯 环己烷 苯乙烯 4-戊烯酸	卤化百里香酚 (R)-1-苯乙醇 环己醇, 环己酮 1-苯基-2-溴乙醇 氧化苯乙烯 4-溴甲基环戊内酯	34	318000; 177000	[37]
2004		碳基电极	CPO	硫代苯甲醚	(R)-苯甲基亚砷	>98.5	95000 58900	[39]
2006		碳基电极	CPO	三种底物	三种产物	93、99	64400 7000	[40]
2007		碳基电极	CPO	硫代苯甲醚	(R)-苯甲基亚砷	98.5	145000	[41]
2011	电催化	GDE 电极	CPO	单氯二甲醚 硫代苯甲醚 吡啶	二氯二甲醚 (R)-苯甲基亚砷 羟吡啶	—	203100 83600 39000	[43]
2014		GDE 电极	CPO	一氯二甲酮 乙苯	二氯二甲酮	—	1150000	[44]
2017		黄素-SWNT 电极	AaeUPO	2-苯氧基丙酸 吡啶	(R)-1-苯乙醇	95%	123900±7290 5900±210 4900±340	[46]
2019		氧化碳纳米管	CiVCPO	4-戊烯酸	溴内酯	—	—	[48]

^a ee: enantiomeric excess. ^b TON: turnover number, TTN: total turnover number.

利用原位生成 H_2O_2 , 即一分子葡萄糖只能产生一分子 H_2O_2 , 并且随着反应的进行会不可避免地发生 pH 的改变. 因此, 选择一种更为高效的氧化酶原位生成 H_2O_2 , 以促进过氧合酶的催化反应尤为重要. 其中氨基酸氧化酶(AOD)、甲醇氧化酶(MOD)、胆碱氧化酶(ChOx)运用较为广泛^[15-17].

2002 年, Okrasa 课题组^[18]尝试使用氨基酸/氨基酸氧化酶(EC. 1.4.3.3)体系原位生成 H_2O_2 , 相较于葡萄糖而言, 氨基酸作为电子牺牲剂使得体系 pH 稳定, 由于超过化学计量的 H_2O_2 导致的酶失活问题尚未完全解决, 所以, 由氨基酸/氨基酸氧化酶体系原位生成 H_2O_2 导致过氧合酶的转化率不高(TON > 500), 并且氨基酸昂贵的价格限制了其作为氧化底物的大规模.

对于此问题, 人们发现当使用甲醇作为电子牺牲剂时具有以下两个优势: 一是甲醇作为电子牺牲剂廉价易得; 二是酶催化多以水相反应体系为主, 甲醇可以作为疏水底物的助溶剂. 因此, 在酶催化原位生成 H_2O_2 体系中, 使用甲醇/甲醇氧化酶体系代替上述两种体系展现出巨大潜力.

2005 年, Therisod 课题组^[19]首次使用甲醇/甲醇氧化酶体系原位生成 H_2O_2 , 由于甲醇未完全氧化, 产生副产物甲醛. 2007 年, Pezzotti 和 Therisod^[20]使用甲醇/甲醇氧化酶体系生成 H_2O_2 , 以此驱动来自 *Coprinus cinereus* 的过氧合酶 CiP(EC. 1.11.1.7)对硫代苯甲醚进行选择氧化, 在最优反应条件下, 产物的对映体过量值为 75%, 甲醇作为电子牺牲剂在大规模运用中展现出独特优势.

2014 年, Rocha-Martin 和同事们^[21]尝试将两种酶(来自 *Thermus thermophilus* 的甲酸脱氢酶 NOX 与来自 *Pseudomonas* 的 NADH 氧化酶 FDH)共同固定在被乙醛基团活化过的琼脂糖载体上, 结合 NADH 辅酶因子, 以甲酸为电子牺牲剂来实现原位生成 H_2O_2 , 而后驱动被固定化在琼脂糖载体上的 HRP 催化酚类物质的氧化. 该固定化酶系统有效地避免了过氧合酶因 H_2O_2 浓度过高而失活的问题. 并且, 与 Hartmann 课题组^[22]在 2008 年所提出的分子筛 SBA-15 固定化酶系统原子经济性(9.1%)相比, 此系统提高了 4.7 倍.

2015 年, Ni 等^[23]验证了一种将甲醇完全氧化成为 CO_2 的高原子经济性 H_2O_2 原位生成系统. 首先通过甲醇氧化酶 PpAOx(E.C.1.2.3.1)氧化甲醇为甲醛产生第一分子 H_2O_2 , 随后, 甲醛歧化酶 PpFDM (E.C.1.2.99.4)将甲醛转化为甲酸产生第二分子 H_2O_2 , 由于所报道的甲酸氧化酶的操作窗口^[24]与该研究中所使用酶的操作窗口没有充分重叠, 于是使用两种酶 CbFDH(来自 *Candida boidinii* 的甲酸脱氢酶)、j3HB6H(来自 *Rhodococcus jostii* 的 3-羟基苯甲酸-6-羟化酶)和辅酶因

子 NADH 将甲酸氧化为 CO_2 产生第三分子 H_2O_2 , 该体系实现了甲醇的彻底氧化(图 4). 在该多酶协同催化体系下, 过氧合酶催化乙苯氧化时 TTN 可达 290000, 产物的 ee 为 99%. 但需要指出的是, 该多酶原位生成 H_2O_2 体系将甲酸转化为 CO_2 电子传递路径冗长且依赖辅酶, 限制了其应用前景.

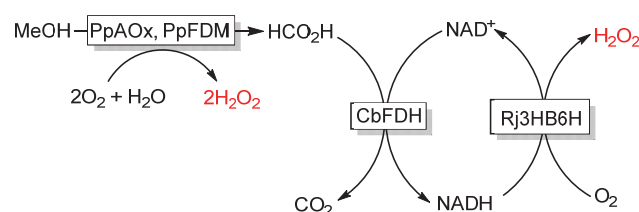


图 4 多酶偶联催化甲醇的彻底氧化并释放 3 equiv. 的 H_2O_2
Figure 4 Multi-enzyme cascade used for complete methanol oxidation to CO_2 in releasing 3 equiv. of H_2O_2

2018 年, Pesic 等^[25]对多酶偶联原位生成 H_2O_2 体系进行了验证. 在辅酶因子 NAD^+ 存在的情况下, 使用甲酸脱氢酶 FDH 催化甲酸生成 CO_2 , 被还原的 NADH 与来自 *Bacillus subtilis* 的 YqjM 结合重新氧化生成 NAD^+ , 形成辅酶因子循环, 并且将分子氧转化为 H_2O_2 , 进一步驱动 rAaeUPO(来自 *Agroclybe aegerita*)进行乙苯羟基化反应验证(图 5). 通过调整酶与辅酶因子的反应浓度, 提高羟基化的周转率, 在最佳浓度比例条件下, 产物的对映体过量值达到 96%以上.

2019 年, Hollmann 团队^[26]发现一种新型甲酸氧化酶 AoFOx(来自 *Aspergillus oryzae*), 代替前文提到的五酶线性偶联法, 将甲酸彻底氧化为 CO_2 , 高效原位产生 H_2O_2 . 该原位生成 H_2O_2 体系具有良好的普适性, 可促进多种酶催化反应: 如过氧合酶 rAaeUPO 催化羟基化、细胞色素 CytC 磺化氧化、CiVCPO(来自 *Curvularia inaequalis*)卤化等. 2020 年, 他们^[27]尝试使用甲醇甲醛作为电子牺牲剂, 驱动过氧合酶进行羟基化、环氧化反应(图 6), 酶的周转次数(49000)较于此甲酸/AoFOx 原

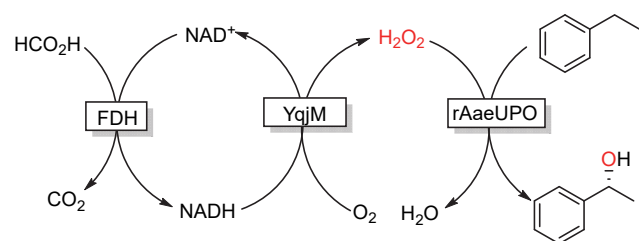


图 5 FDH、YqjM 和 NADH 三者结合原位生成 H_2O_2 驱动 rAaeUPO 对乙苯进行羟基化反应

Figure 5 rAaeUPO-catalyzed hydroxylation of ethylbenzene driven by H_2O_2 in situ generated via the combination of FDH, YqjM and NADH

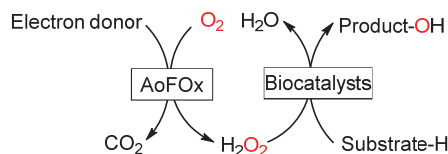


图6 新型甲酸氧化酶 AoFOX 原位生成 H_2O_2 驱动不同的生物酶催化多类型反应

Figure 6 Novel formic acid oxidase AoFOX used for *in situ* H_2O_2 generation and its combination with various enzymes

位 H_2O_2 生成体系(300000)大幅下降, 主要原因有: (1)野生型 AoFOX 对甲醇的米氏常数较高; (2) O_2 在水体系中的溶解度较低. 但是, 仅用一种酶就可以将甲醇完全氧化为 CO_2 , AoFOX 在未来酶催化原位生成 H_2O_2 体系中的优势不言而喻.

2.2 光催化原位生成 H_2O_2

光催化剂被光源照射激活, 氧化电子牺牲剂同时自身被还原, 光催化剂还原 O_2 原位形成 H_2O_2 , 供过氧合酶选择性氧化反应利用(图 7)^[28]. 常见的光催化剂有黄素类催化剂、 TiO_2 、水溶性蒽醌磺酸钠(SAS)等.

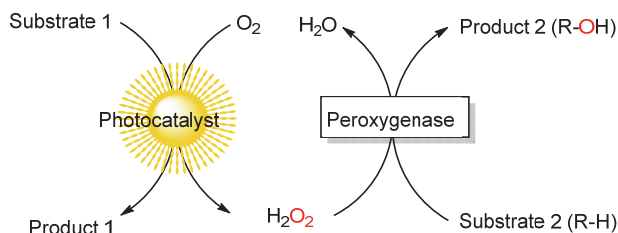


图7 光催化原位生成 H_2O_2 驱动过氧合酶反应过程(在光照激发下光催化剂被活化, 氧化底物 1(即电子牺牲剂), 从而将 O_2 还原为 H_2O_2 驱动过氧合酶)

Figure 7 Photocatalytic *in situ* generation of H_2O_2 used for driving peroxygenase-catalyzed reactions (photocatalyst is activated under light excitation to oxidize substrate 1 (namely electron sacrificial agent), thereby reducing O_2 to H_2O_2 to drive peroxygenase-catalyzed reactions)

2009 年, Perez 等^[29]以乙二胺四乙酸(EDTA)为电子牺牲剂、黄素单核苷酸(FMN)为光催化剂, 在一锅法条件下与来自 *Caldariomyces fumago* 的氯过氧合酶 CPO 实现硫代苯甲醚的选择性催化氧化反应. 此体系的立体选择性可达 99%, 但 TON 只有 22000, CPO 在 C-H 键羟基化和环氧化反应中性能很低, 且 EDTA 作为电子牺牲剂会产生有毒有害副产物甲醛和乙二胺, 而当电子牺牲剂换为甲酸后, 过氧合酶 CPO 的对映体选择性呈现出下降趋势. 为拓展该光催化原位生成 H_2O_2 体系的适用范围, 2011 年, Churakova 等^[30]使用过氧合酶 AaeAPO 替换上述体系 CPO, 发现该酶在羟基化、环氧化以及对甲酸稳定性耐受性方面得到极大提升. 2013 年, Hollmann 等^[31]设计了双液相体系(2 two liquid phase system,

2LPS)(图 8), 有效解决了 O_2 在水中的扩散速率限制, 通过底物与产物在有机相、水相中的溶解度差异, 有效提高产物收率(最佳反应条件下 CPO 的立体(对映体)选择性达到 96%以上 TON=126000).

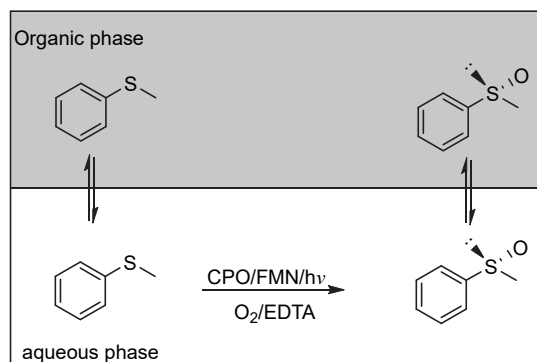


图8 2LPS 反应体系原位生成 H_2O_2 驱动 CPO 催化亚砷化反应

Figure 8 2LPS reaction system used for *in situ* generation of H_2O_2 and promoting CPO-catalyzed sulfoxidation reaction

由于 EDTA 作为电子牺牲剂的缺点, 2017 年, Zhang 等^[32]以鲁棒性良好的 TiO_2 (Au-TiO_2)为光催化剂, 在可见光照射条件下, 采用甲醇为电子牺牲剂, 并将其彻底氧化成 CO_2 原位生成 H_2O_2 (图 9). 在该体系中过氧合酶可以催化一系列惰性烷烃的羟基化反应, 产物 ee 值大于 98%, TON 最高为 71000.

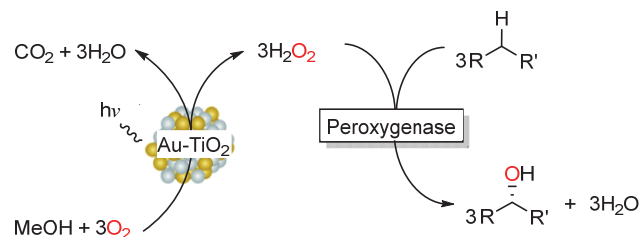


图9 Au-TiO_2 作光催化剂原位生成 H_2O_2 驱动 rAaeUPO 进行羟基化反应

Figure 9 rAaeUPO-catalyzed hydroxylation reactions driving by Au-TiO_2 as photocatalyst for *in situ* H_2O_2 generation

2018 年, Zhang 等^[33]使用光催化剂金红石 Au-TiO_2 , 仅以水作为电子牺牲剂(同时为反应溶剂)将 O_2 还原为 H_2O_2 . 在该体系中过氧合酶 rAaeUPO 保持了良好的稳定性(反应时间达 96 h), 因为金红石 Au-TiO_2 表面相对疏水, 与酶蛋白的相互作用较弱, 所以光催化剂表面产生的羟基自由基对酶的氧化作用减弱, 增强了氧化酶的稳定性^[34], 酶的 TON=21000、产物 ee>98%. 仅用水作为电子牺牲剂和溶剂的 H_2O_2 原位生成技术在绿色化学范畴中更具可行性.

2019 年, van Schie 等^[35]尝试了光催化剂 g- C_3N_4 和 rAaeUPO 协同催化, 对乙苯进行选择性催化氧化, 甲酸

因其在催化效率和鲁棒性上的优势而作电子牺牲剂,反应的TON可达60000.而相对较低的 H_2O_2 生成速率以及羟基自由基使过氧合酶失活是此体系所存在的主要问题.

受产物抑制、反应动力学影响,在已报道的原位生成 H_2O_2 的方法中只有基于黄素的光催化剂和 TiO_2 光催化剂催化效果出色,且这些反应大多只能利用蓝光(400~520 nm)进行反应.因此,提高光源利用率扩展可利用光谱范围显得很有必要.2019年,Willot等^[36]设计了一种由波长互补的光催化剂组合原位生成 H_2O_2 的体系,该体系既拓宽了可利用光谱范围,同时溶解度不依赖pH.结合过氧合酶*rAaeUPO*将乙苯羟基化,反应中过氧合酶的TON可达100000、产物的 ee 均在95%以上.

2020年,Zhang等^[37]进一步尝试了均相的光催化反应体系,进一步拓宽可利用光谱范围并且提高反应体系的活性,利用光催化剂水溶性蒽醌磺酸钠(SAS)原位生成 H_2O_2 ,可顺利促进*CiVCPO*及*rAaeUPO*催化实现卤化、羟卤化、羟化等多种反应,两类反应中酶的TON分别可达318000和177000.但是,SAS在光诱导条件下本身具有很强的氧化性,在羟化反应中可导致过度氧化(生成酮或醛产物).

在致力于提升反应体系原子经济性的过程中,最近,Zhang等^[38]将光促酶催化策略拓展到了核化学领域.首次实现了利用放射性Co-60辐射(γ -射线,本质为光催化)分解 H_2O 原位生成 H_2O_2 ,并驱动过氧合酶(peroxygenase)进行C—H键的羟化及羟卤化反应.该杂合催化体系无须引入光催化剂,体现了清洁及原子经济性的合成理念,该工作同时证实了乏燃料元素(U-235)可驱动 H_2O_2 依赖性氧化还原酶催化,这为全球不断增长的核废料更高效和高值化应用提供了新思路.但是,酶的稳定性及核燃料的可及性是该技术能否真正实用的关键.

2.3 电催化原位生成 H_2O_2

除上述酶催化及光催化原位生成 H_2O_2 方法外,电催化也是另一类关注较多的方法.电催化原位生成 H_2O_2 ,仅消耗 O_2 、 H^+ 和电子、不产生副产物、易大规模生产、反应速率易控制(图10).在不影响阴极 O_2 还原的情况下,可与不同来源的过氧合酶在一锅法条件下实现协同催化反应.而不同的电极材料产生 H_2O_2 的效率有所不同,常使用的有碳基材料电极、GDE电极等.

碳基电极最早被运用于 H_2O_2 原位生成体系,2004年,Lvtz等^[39]首次将电化学催化原位生成 H_2O_2 用于驱动过氧合酶催化氧化,选择性氧化硫代苯甲醚反应.产物的对映体过量值在98.5%以上、TON可达95000左右.随后,2006年,Kohlmann和Lvtz^[40]尝试扩展上述体系底物范围,使用上述体系,对甲基硫甲苯、4-甲基基茴香

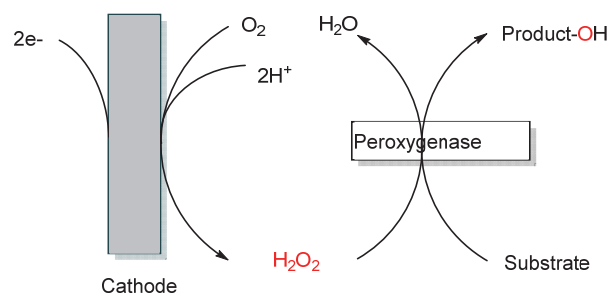


图10 电催化原位生成 H_2O_2 驱动过氧合酶反应过程
Figure 10 Peroxygenase-catalyzed reaction process driven by electrocatalytic in situ H_2O_2 generation

硫醚、蛋氨酸甲酯盐酸盐进行选择性催化氧化,令人欣喜的是,该体系对三种底物都表现出高活性.2007年,Lvtz、Vuorilehto和Liese^[41]对电催化原位生成 H_2O_2 体系的碳基电极进行优化,使用一种三室电极(由一个填充床的石墨阴极和位于其两侧的阳极组成),在助溶剂叔丁醇(*tert*-Butanol)的协作下,产物的对映体过量值大于98.5%、纯度大于99%、时空收率(space time yield, STY)约为 $104 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、TON可达145000.

具有固体、液体和气体三相界面的GDE电极由催化剂、聚四氟乙烯(PTFE)和添加剂组成,该电极比表面积高、运行成本低,相较于碳基电极而言,GDE电极原位生成 H_2O_2 更具有优势^[42].2011年,Krieg等^[43]首次使用GDE电极原位生成 H_2O_2 来驱动氯过氧合酶CPO催化反应(图11).作者考察了一氯二甲醚、茴香硫醚(硫代苯甲醚)、吡啶的适用性,反应的TON分别可达203100、83600、39000.2014年,Holtmann等^[44]进一步验证了GDE电极在CPO模型中的稳定性,使用GDE电极与过氧合酶将一氯二甲基酮氯化为二氯二甲基酮,最优条件下TON可达1150000、STY最高可达 $52 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,充分证明了GDE电极在电催化原位生成过程中的稳定性与可用性.2016年,Horst等^[45]采用GDE电极原位生成 H_2O_2 ,意外地发现当端电压过大时副反应的发生会影响*AaeUPO*的总反应速率,但酶的TON仍在400000以上、STY达到 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (与上述五酶偶联体系相当).

降低 O_2 还原电势是电催化原位生成 H_2O_2 过程节能的重要步骤,为此有部分研究聚焦在对现有碳基电极、GDE电极进行优化或开发更加节能环保的电极方面.黄素类化合物因其在氧化还原反应中的作用而广泛成为电催化协同催化剂,在原位生成 H_2O_2 体系中有独特的优势,2017年,Choi等^[46]将黄素类化合物Lumichrome(LC)固定在单壁纳米管(SWNT)表面,形成新节能电极LC-SWNT电极,驱动过氧合酶*AaeUPO*、CPO,对乙苯、2-苯氧基丙酸、吡啶进行选择性氧化反应(图12).与

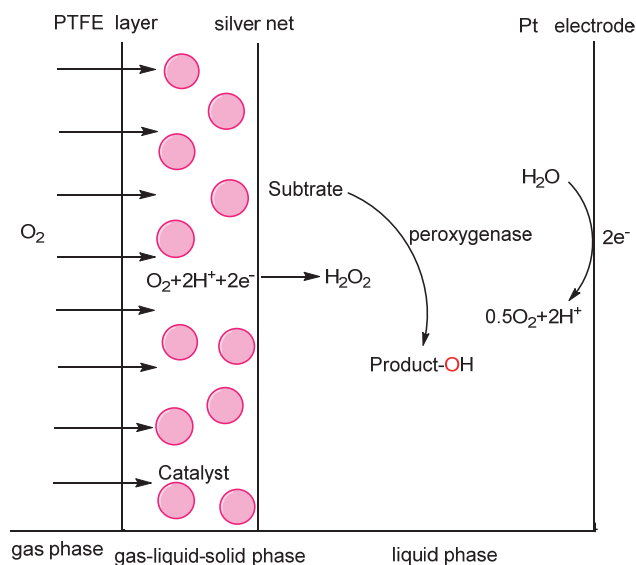


图 11 使用 GDE 电极电催化原位生成 H_2O_2 驱动 CPO 催化反应

Figure 11 CPO-catalyzed reactions driven by electrocatalysis using GDE electrode

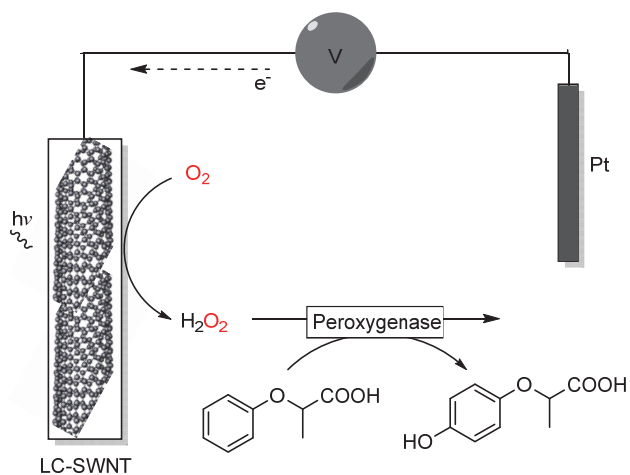


图 12 LC-SWNT 电极原位生成 H_2O_2 驱动 C_iVCPO 选择性催化氧化反应过程

Figure 12 C_iVCPO -catalyzed selective oxidation reactions driven by H_2O_2 in situ generated on LC-SWNT electrode

GDE 电极相比, 此电极的电压范围更低(170 mV), 反应最大 TON 达到 123000 以上. 2018 年, Kim 等^[47]尝试对传统碳基电极 rGO 进行优化, 优化后的 F-mrGO (600) 电极生成 HO^{2-} (H_2O_2 在碱性溶液中的存在形式)能力超过已报道的最先进碱性催化剂(在 <10 mV 的情况下依旧可以生成), 并且选择性可达到 100%, 在 4.5 V 电压条件下稳定生成 H_2O_2 15 h 以上. 为进一步提高 H_2O_2 的生成效率, 可以在使用 GDEs 电极时辅以一些贵金属材料, 从而有效降低电催化原位生成 H_2O_2 电极反应的过电位. 但是使用贵金属材料作为辅助催化剂, 无疑会提高反应

体系的成本^[47]. 2019 年, Bormann 等^[48]将一种氧化碳纳米管(oxidized carbon nanotubes; O-CNT)作为 GDE 电极原位生成 H_2O_2 过电位的辅助材料, 用于驱动 C_iVCPO 的氧化反应体系, 顺利地将 4-戊烯酸氧化为溴内酯, 在保持原有产物形成速率的情况下, 经 oCNT 的修饰生成 H_2O_2 时过电位可降低至 100 mV. 该电极反应效率高, 但是卤化酶对 H_2O_2 利用率低是该电极的一个明显缺点.

2.4 其他催化原位生成 H_2O_2

除上述酶催化、光催化及电催化三类原位生成 H_2O_2 技术来驱动过氧合酶进行催化外, 还有其他新兴技术可以实现 H_2O_2 的原位生成, 并促进过氧合酶进行高效的 C-H 键氧化反应.

化学催化原位生成 H_2O_2 体系促进氧化酶催化吸引了越来越多的研究兴趣, 而直接使用 H_2 和 O_2 化学合成 H_2O_2 安全性差, 2009 年, Karmee 等^[49]尝试使用 $\text{scCO}_2/\text{H}_2\text{O}$ 双相体系, 通过 $\text{Pd}(0)$ 化学催化生成的 H_2O_2 可以进一步促进 CPO 进行亚砷化反应(图 13). 在不影响产物的产率前提下, 他们向反应装置中通入 CO_2 , 降低 H_2 与 O_2 直接接触的爆炸风险, 随着输入 H_2 与 O_2 的压力增高, 整体反应产率相应增加.

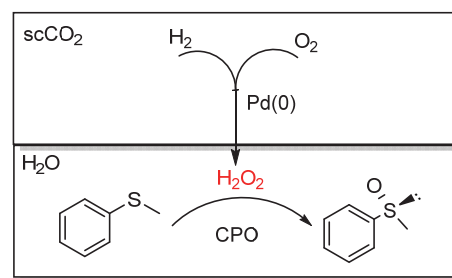


图 13 $\text{scCO}_2/\text{H}_2\text{O}$ 双相介质中原位生成 H_2O_2 驱动 CPO 催化选择性氧化反应

Figure 13 CPO-catalyzed selective oxidation reactions driven by H_2O_2 in situ generated in $\text{scCO}_2/\text{H}_2\text{O}$ biphasic medium

2013 年, Edwards 等^[50]验证了一种化学法原位生成 H_2O_2 系统, 该系统通过 Au-Pd 作用于 H_2 和 O_2 直接生成 H_2O_2 . 2019 年, Freakley 等^[51]提出使用多相串联催化剂 $\text{Au-Pd}/\text{TiO}_2$ 原位生成 H_2O_2 , 只需加入 H_2 即可有效地原位生成 H_2O_2 , 该体系优势在于, 与光催化体系相比, 它不需要照明, 副产物仅为水, 并且不需要电子牺牲剂提供电子, 多相串联催化剂为原位生成 H_2O_2 提供了新的思路.

为获得更加经济的 H_2O_2 原位生成系统, 更多非典型案例被提出. 压电材料具有将机械能转化为电能的特性, 广泛地运用于各种研究, 压电催化则是利用压电响应时产生的自由载流子驱动氧化还原反应. 2020 年, Yoon 等^[52]利用具有独特层状结构的三元半导体材料

Bi₂O₃ 微薄片原位生成 H₂O₂ 驱动过氧合酶 rAaeUPO, 通过羟基化反应以及环氧化反应验证此 H₂O₂ 生成体系的效果. 与已有 H₂O₂ 原位生成系统相比, 虽然该方法催化效果呈数量级降低, 但其优势在于可以利用机械能原位生成 H₂O₂. 当然, 压电效率以及压电材料与酶的兼容性是决定该体系能否广泛运用的关键.

4 总结与讨论

氧化酶能够催化一系列重要的氧化反应, 在有机合成中显示出巨大的潜力和实用性. 始于 C—H 键活化的选择性氧官能团化反应是有机合成中相当具有挑战的一类反应. 氧化酶如 P450 单加氧酶、过氧合酶等可利用过渡态的 compound I 结构, 高选择性地催化 C—H 键氧官能团化反应. 其中, 过氧合酶因直接使用 H₂O₂ 作为氧供体及电子受体, 可以大幅度地简化氧化反应过程的电子传递路径. 但高浓度的 H₂O₂ 会同时导致过氧合酶迅速失活. 因此, 在过去 5 年中, 有大量的研究集中在过氧化物原位生成的方法开发方面. 这些研究都具有一个共同目标: 致力于构建高原子经济、鲁棒性及兼容性的协同催化反应体系. 其中, 酶催化、光催化及电催化是研究较多的三类 H₂O₂ 原位生成方法, 均可用于驱动过氧合酶催化 C—H 键的氧官能团化反应, 实现一系列底物的选择性羟基化. 本文所讨论的最新研究进展可为促进该酶在有机合成中的应用提供参考, 相信在不久的将来, 过氧合酶在有机化学中将会体现更高的价值. 此外, 由光催化、电催化原位生成 H₂O₂ 技术来驱动过氧合酶的协同催化对发展交叉催化技术具有一定的启发与指导意义.

References

- [1] Dong, J.-J.; Fernández-Fueyo, E.; Hollmann, F.; Paul, C. E.; Pasic, M.; Schmidt, S.; Wang, Y.-H.; Younes, S.; Zhang, W.-Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 9238.
- [2] Zeng, Z.-G.; Sang, X.-K.; Yuan, B.; Wu, M.-H.; Zhang, W.-Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 959 (in Chinese). (曾志刚, 桑贤轲, 袁波, 吴鸣虎, 张武元, 有机化学, **2021**, *41*, 959.)
- [3] Bormann, S.; Baraibar, A. G.; Ni, Y.; Holtmann, D.; Hollmann, F. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 2038.
- [4] Ullrich, R.; Nüske, J.; Scheibner, K.; Spantzel, J.; Hofrichter, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4575.
- [5] Hofrichter, M.; Ullrich, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 276.
- [6] Zhang, W.-Y.; Hollmann, F. *Synthesis of Vinyl Polymers via Enzymatic Oxidative Polymerisation*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, **2019**, p. 343.
- [7] Peter, S.; Kinne, M.; Wang, X.-S.; Ullrich, R.; Kayser, G.; Groves, J. T.; Hofrichter, M. *FEBS J.* **2011**, *278*, 3667.
- [8] Lucas, F.; Babet, E. D.; Cañellas, M.; del Río, J. C.; Kalum, L.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Guallar, V.; Martínez, A. T.; Gutiérrez, A. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 288.
- [9] Kinne, M.; Ullrich, R.; Hammel, K. E.; Scheibner, K.; Hofrichter, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5950.
- [10] de Santons, P. G.; Cañellas, M.; Tieves, F.; Younes, S. H. H.; Molina-Espeja, P.; Hofrichter, M.; Hollmann, F.; Guallar, V.; Alcalde, M. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 4789.
- [11] Molina-Espeja, P.; Cañellas, M.; Plou, F. J.; Hofrichter, M.; Lucas, F.; Guallar, V.; Alcalde, M. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 341.
- [12] Thiel, D.; Doknić, D.; Deska, J. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5278.
- [13] Valderrama, B.; Ayala, M.; Vazquez-Duhalt, R. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 555.
- [14] van de Velde, F.; Lourenco, N. D.; Bakker, M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 286.
- [15] Bakker, M.; van de Velde, F.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *70*, 342.
- [16] Okrasa, K.; Guibé-Jampel, E.; Therisod, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, *7*, 1077.
- [17] Ribitsch, D.; Karl, W.; Wehrschütz-Sigl, E.; Tutz, S.; Remler, P.; Weber, H. J.; Gruber, K.; Stehr, R.; Bessler, C.; Hoven, N.; Sauter, K.; Schwab, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81*, 875.
- [18] Okrasa, K.; Falcimaigne, A.; Guibé-Jampel, E.; Therisod, M.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 519.
- [19] Pezzotti, F.; Okrasa, K.; Therisod, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2681.
- [20] Pezzotti, F.; Therisod, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 701.
- [21] Rocha-Martin, J.; Velasco-Lozano, S.; Guisán, J. M.; López-Gallego, F. *Green Chem.* **2014**, *16*, 303.
- [22] Jung, D.; Streb, C.; Hartmann, M. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *113*, 523.
- [23] Ni, Y.; Fernández-Fueyo, E.; Baraibar, A. G.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Yanase, H.; Alcalde, M.; van Berkel, W. J. H.; Hollmann, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *55*, 798.
- [24] Chang, A.; Scheer, M.; Grote, A.; Schomburg, I.; Schomburg, D. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D588.
- [25] Pesic, M.; Willot, S. J. P.; Fernández-Fueyo, E.; Tieves, F.; Alcalde, M.; Hollmann, F. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2018**, *74*, 100.
- [26] Tieves, F.; Willot, S. J. P.; van Schie, M. M. C. H.; Rauch, M. C. R.; Younes, S. H. H.; Zhang, W.-Y.; Dong, J.-J.; de Santos, P. G.; Robbins, J. M.; Bommarius, B.; Alcalde, M.; Bommarius, A. S.; Hollmann, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 7873.
- [27] Willot, S. J. P.; Hoang, M. D.; Paul, C. E.; Alcalde, M.; Arends, I. W. C. E.; Bommarius, A. S.; Bommarius, B.; Hollmann, F. *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2713.
- [28] Li, Y.-Y.; Yuan, B.; Sun, Z.-T.; Zhang, W.-Y. *Green Synth. Catal.* **2021**, *2*, 267.
- [29] Perez, D. I.; Grau, M. M.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. *Chem. Commun.* **2009**, *41*, 6848.
- [30] Churakova, E.; Kluge, M.; Ullrich, R.; Arends, I.; Hofrichter, M.; Hollmann, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 10716.
- [31] Churakova, E.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 565.
- [32] Zhang, W.-Y.; Burek, B. O.; Fernández-Fueyo, E.; Alcalde, M.; Bloh, J. Z.; Hollmann, F. *Angew. Chem.* **2017**, *56*, 15451.
- [33] Zhang, W.-Y.; Fernández-Fueyo, E.; Ni, Y.; van Schie, M.; Gacs, J.; Renirie, R.; Wever, R.; Mutti, F. G.; Rother, D. R.; Alcalde, M.; Hollmann, F. *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 55.
- [34] Teranishi, M.; Hoshino, R.; Naya, S.; Tada, H. *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 12965.
- [35] van Schie, M. M. C. H.; Zhang, W.-Y.; Tieves, F.; Choi, D. S.; Park, C. B.; Burek, B. O.; Bloh, J. Z.; Arends, I. W. C. E.; Paul, C. E.; Alcalde, M.; Hollmann, F. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 7409.
- [36] Willot, S. J. P.; Fernández-Fueyo, E.; Tieves, F.; Pesic, M.; Alcalde, M.; Arends, I. W. C. E.; Park, C. B.; Hollmann, F. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 890.
- [37] Yuan, B.; Mahor, D.; Fei, Q.; Wever, R.; Alcalde, M.; Zhang, W.-Y.; Hollmann, F. *ACS Catal.* **2020**, *10*, 8277.
- [38] Zhang, W.-Y.; Liu, H.-H.; van Schie, M. M. C. H.; Hagedoorn, P. L.; Alcalde, M.; Denkova, A. G.; Djanashvili, K.; Hollmann, F. *ACS Catal.* **2020**, *10*, 14195.
- [39] Lvtz, S.; Steckhan, E.; Liese, A. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 583.

- [40] Kohlmann, C.; Lvtz, S. *Eng. Life Sci.* **2006**, *6*, 170.
- [41] Lvtz, S.; Vuorilehto, K.; Liese, A. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 525.
- [42] Horst, A. E. M.; Mangold, K. M.; Holtmann, D. *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 260.
- [43] Krieg, T.; Hvttmann, S.; Mangold, K. M.; Schrader, J.; Holtmann, D. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2686.
- [44] Holtmann, D.; Krieg, T.; Getrey, L.; Schrader, J. *Catal. Commun.* **2014**, *51*, 82.
- [45] Horst, A. E. W.; Bormann, S.; Meyer, J.; Steinhagen, M.; Ludwig, R.; Drews, A.; Ansorge-Schumacher, M.; Holtmann, D. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2016**, *133*, S137.
- [46] Choi, D. S.; Ni, Y.; Fernández-Fueyo, E.; Lee, M.; Hollmann, F.; Park, C. B. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 1563.
- [47] Kim, H. W.; Ross, M. B.; Kornienko, N.; Zhang, L.; Guo, J.-H.; Yang, P.-D.; McCloskey, B. D. *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 282.
- [48] Bormann, S.; van Schie, M. M. C. H.; De Almeida, T. P.; Zhang, W.-Y.; Stöckl, M.; Ulber, R.; Hollmann, F.; Holtmann, D. *ChemSusChem* **2019**, *12*, 4759.
- [49] Karmee, S. K.; Roosen, C.; Kohlmann, C.; Lvtz, S.; Greiner, L.; Leitner, W. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1052.
- [50] Edwards, J. K.; Freakley, S. J.; Carley, A. F.; Kiely, C. J.; Hutchings, G. J. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 845.
- [51] Freakley, S. J.; Kochius, S.; van Marwijk, J.; Fenner, C.; Lewis, R. J.; Baldenius, K.; Marais, S. S.; Opperman, D. J.; Harrison, S. T. L.; Alcalde, M.; Smit, M. S.; Hutchings, G. J. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1.
- [52] Yoon, J.; Kim, J.; Tieves, F.; Zhang, W.-Y.; Alcalde, M.; Hollmann, F.; Park, C. B. *ACS Catal.* **2020**, *10*, 5236.

(Cheng, F.)