

## 酶-化学级联催化制备(S)-烟碱

刘茜琳<sup>1</sup>, 高静<sup>1</sup>, 马丽<sup>1\*</sup>, 宋浩雷<sup>2\*</sup>, 贺莹<sup>1</sup>, 郑晓冰<sup>1</sup>

(1. 河北工业大学 化工学院, 天津 300400; 2. 河北亚诺生物科技有限公司, 河北 石家庄 052160)

**摘要:** 传统(S)-烟碱合成方法步骤复杂且依赖多种化学催化剂。为了实现(S)-烟碱的绿色合成, 设计了酶-化学级联途径: 首先, 构建了亚胺还原酶(IRED)与甲酸脱氢酶(FDH)的偶联体系, 以麦斯明为底物合成(S)-降烟碱; 然后, 将(S)-降烟碱经 Eschweiler-Clarke 反应制备(S)-烟碱。通过大肠杆菌宿主分别对 IRED 和 FDH 进行表达, 得到含酶细胞及酶液, 考察了 pH 和温度对细胞中 IRED 和 FDH 酶活力的影响。优化酶催化制备(S)-降烟碱的反应条件, 在 30 °C、pH 7.5 条件下, 添加质量浓度为 30 g/L 的麦斯明、600 U/L FDH 细胞、900 U/L IRED 细胞、0.6 mmol/L NADP<sup>+</sup>和质量浓度为 90 g/L 的甲酸钠, (S)-降烟碱的产率>98%, 对映体过量(e.e.)值>99%。最后, 通过化学法将(S)-降烟碱甲基化得到(S)-烟碱, 此步骤产率和 e.e.值均达 99%以上。

**关键词:** (S)-烟碱; 亚胺还原酶; 甲酸脱氢酶; (S)-降烟碱; 生物工程

**中图分类号:** TQ203.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2024) 01-0127-10

## Production of (S)-nicotine by enzymatic-chemical cascade catalysis

LIU Xilin<sup>1</sup>, GAO Jing<sup>1</sup>, MA Li<sup>1\*</sup>, SONG Haolei<sup>2\*</sup>, HE Ying<sup>1</sup>, ZHENG Xiaobing<sup>1</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300400, China; 2. Hebei Yanuo Bioscience Co., Ltd., Shijiazhuang 052160, Hebei, China)

**Abstract:** The traditional synthesis method of (S)-nicotine involves complex steps and relies on multiple chemical catalysts. Herein, a enzymatic-chemical cascade pathway was designed to achieve the green synthesis of (S)-nicotine. Firstly, a coupling system of imine reductase (IRED) and formate dehydrogenase (FDH) was constructed to catalyzed the synthesis of (S)-nornicotine from myosmine as substrate, then (S)-nicotine was prepared via Eschweiler-Clarke reaction of (S)-nornicotine. The IRED and FDH enzyme-containing cells and enzyme solution were obtained from *E. coli* expression system and the effects of pH and temperature on the enzyme activity of IRED and FDH were investigated. The yield of (S)-nornicotine reached >98% with enantiomeric excess (e.e.) value of >99% under the optimal reaction conditions of temperature 30 °C, pH 7.5, myosmine mass concentration 30 g/L, FDH cells 600 U/L, IRED cells 900 U/L, NADP<sup>+</sup> 0.6 mmol/L and sodium formate mass concentration 90 g/L. Finally, (S)-nicotine with a yield and e.e. value of above 99% was obtained by chemical methylation of (S)-nornicotine.

**Key words:** (S)-nicotine; imine reductase (IRED); formate dehydrogenase (FDH); (S)-nornicotine; bioengineering

烟碱(1-甲基-2-[3-吡啶基]吡咯烷)又名尼古丁, 是一种可以从烟草植物叶子中获得的天然物质, 被广泛应用于农业、医药以及烟草等领域。特别是(S)-构型的烟碱可直接用于治疗皮肤病、心血管病、蛇虫咬伤等<sup>[1]</sup>。贺桂泉<sup>[2]</sup>研究表明, 烟碱可通过刺激烟碱

受体释放乙酰胆碱, 提高阿尔兹海默症患者的神经传递能力, 从而改善阿尔兹海默症患者的认知功能。市场上色谱纯的烟碱(HPLC纯度>98.5%)每吨售价近百万元人民币, 以烟碱为有效成分的药物销售额也在逐年增长。国内生产的烟碱大多纯度较低, 因此, 制

收稿日期: 2023-03-06; 定用日期: 2023-05-06; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230172

基金项目: 国家自然科学基金项目(22178083); 河北省自然科学基金项目(B2020202036); 河北省重点研发计划项目(22372802D)

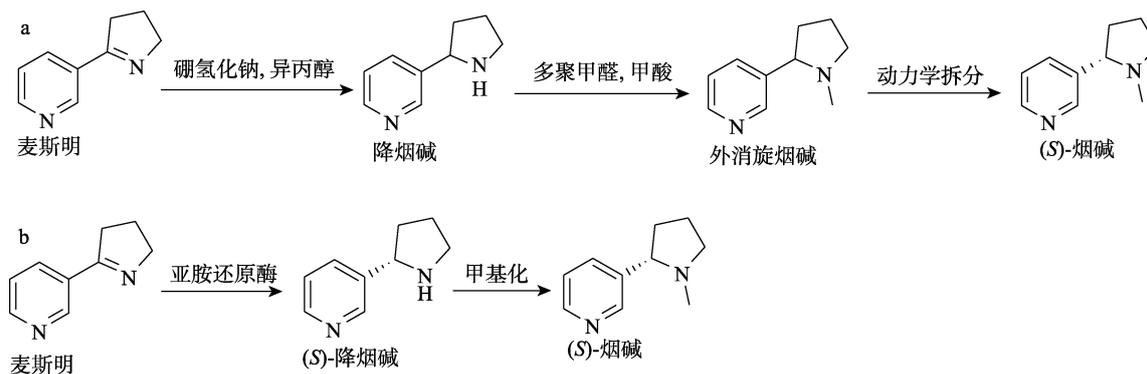
作者简介: 刘茜琳(1998—), 女, 硕士生, E-mail: liuxilinLXL@163.com。联系人: 马丽(1983—), 女, 高级实验员, E-mail: mali0503@hebut.edu.cn; 宋浩雷(1976—), 男, 高级工程师, E-mail: songh\_yanuo@163.com。

备高纯度(S)-烟碱具有巨大应用价值<sup>[3]</sup>。

目前, 可通过烟草植物叶提取的方法获得(S)-烟碱, 但此法杂质多、纯度低、受地理环境因素影响大, 并存在杂质难分离的问题<sup>[4]</sup>。此外, (S)-烟碱也可由化学合成的方法获得, 即由底物麦斯明通过化学方法制备降烟碱, 再通过甲基化得到(R)-烟碱和(S)-烟碱的外消旋混合物, 再将其进行拆分, 从而获得(S)-烟碱<sup>[5]</sup>。此法相对提取法可以获得纯度较高的

产品, 并能进行工业化生产, 但步骤繁杂, 对环境危害较大(图 1a)。

生物催化法具有高度的立体选择性, 且具备反应条件温和、对环境友好等优点。将酶催化取代部分化学催化, 构建酶-化学级联催化体系制备(S)-烟碱是非常有意义的思路(图 1b), 其原料易得、成本低廉且具有步骤简洁、环保高效的优势, 具有良好的工业应用前景和经济效益<sup>[6-8]</sup>。



a—化学催化法; b—酶-化学级联催化法

图 1 (S)-烟碱制备过程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of preparation progress of (S)-nicotine

亚胺还原酶 (IRED) 依赖还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH), 在手性胺的合成方面有重要的应用潜力<sup>[9-10]</sup>。NADPH 会随着产物的生成而消耗, 且价格昂贵, 限制了 IRED 的大规模生产应用。可通过在反应系统中加入另一种再生酶, 构建一个高效、低成本的辅酶再生体系, 实现 NADPH 的再生<sup>[11]</sup>。目前, 葡萄糖脱氢酶 (GDH) 被广泛应用于 NADPH 再生, 其催化葡萄糖生成葡萄糖酸的同时将氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP<sup>+</sup>) 还原为 NADPH<sup>[12-14]</sup>。虽然 GDH 是构建 NADPH 再生体系常用的氧化还原酶, 但在实际生产过程中, 其产生的葡萄糖酸不仅使反应 pH 下降, 还增加了目标产物的分离难度。例如: 在应用亮氨酸脱氢酶 (LeuDh) 生产 L-叔亮氨酸的工艺中, 虽然 LeuDh 偶联 GDH 体系反应的产率比偶联甲酸脱氢酶 (FDH) 体系高 20%, 但其产物分离、纯化

较困难, 生产成本反而更高<sup>[15-16]</sup>。相比而言, FDH 可催化甲酸盐再生 NADPH, 同时产生气体 CO<sub>2</sub>, 既能简化目标产物的后期分离步骤, 又能降低生产成本<sup>[17-18]</sup>。目前, 在自然界中 NADP<sup>+</sup> 依赖型 FDH 的数量仅占 20%, 这一缺点限制了其在工业生产中的应用。近年来, 诸多文献报道了 FDH 的改造实例<sup>[19-20]</sup>, 但并未将其投入实际应用。将研究中获得的催化活性更高、稳定性更强的 FDH 应用于工业生产, 具有巨大潜力。

因此, 为了更加绿色、高效地制备(S)-烟碱, 本研究拟以 NADP<sup>+</sup>/NADPH 依赖型的 IRED 和 FDH 来构建 IRED-FDH 双酶体系催化麦斯明合成(S)-降烟碱, 并对反应条件进行优化; 最后, 通过 Eschweiler-Clarke 甲基化反应得到高纯度(S)-烟碱(图 2)。本文设计的酶-化学级联催化体系有望为(S)-烟碱的绿色生产提供理论参考, 并具有良好的应用前景。

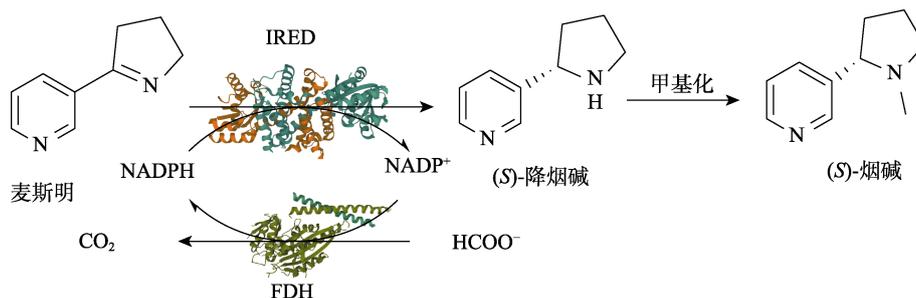


图 2 酶-化学级联催化制备(S)-烟碱过程示意图

Fig. 2 Schematic diagram of preparation progress of (S)-nicotine by enzymatic-chemical cascade catalysis

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

酵母浸粉、胰蛋白胨, 生化试剂, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 甘油, 分析纯, 天津鼎国生物有限公司; 卡那霉素, 药用级, 北京索莱宝科技有限公司; 异丙基- $\beta$ -硫代半乳糖苷 (IPTG), 药用级, 日本 Takara 公司; NADPH (质量分数 95%)、NADP<sup>+</sup> (质量分数 97%)、麦斯明 (质量分数 98%)、磷酸盐 (PBS) 缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.0)、PBS 缓冲液 (1 mol/L, pH 6.5)、甲酸钠 (分析纯)、葡萄糖 (分析纯), 阿拉丁科技 (上海) 股份有限公司; 多聚甲醛、甲酸、甲基叔丁基醚, 分析纯, 北京迈瑞达科技有限公司; 碳酸钠、氢氧化钠、无水硫酸钠、氯化钠, 分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司。

UV-1100 型紫外-可见分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; 5910-Ri 型高速冷冻离心机, 德国艾本德公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; Tanon 1600 型凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; BILON-250Y 型高压匀质机, 上海顾信生物科技有限公司; LRH-1000F 型生化培养箱, 上海恒一科学仪器有限公司; LC-20A 型高效液相色谱仪, 岛津实验器材有限公司; ZWY-2000 型恒温培养振荡器、ZHJH-C1118B 型超净工作台, 上海智诚分析仪器有限公司。

菌株和质粒: 表达载体为 pET-28a(+), 表达宿主菌为 *E. coli* BL21(DE3), 金唯智生物科技有限公司。

培养基: LB 培养基包括质量分数 0.5% 酵母浸粉、质量分数 1.0% 胰蛋白胨、质量分数 1.0% 氯化钠和质量分数 1.5% 琼脂 (固体培养基添加); TB 培养基包括质量分数 2.4% 酵母浸粉、质量分数 1.2% 胰蛋白胨、质量分数 0.4% 甘油、质量分数 10.0% PBS 缓冲液 (1 mol/L, pH 6.5)。培养基于 121 °C 灭菌 20 min, 添加卡那霉素至终质量浓度为 50 mg/L。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组菌株的构建

由 NCBI 基因库中得到具有麦斯明底物活性的 IRED 基因序列 (Genbank: WP\_074958336.1)<sup>[6]</sup>, 并对其进行密码子优化, 将 IRED 基因克隆至表达载体 pET-28a(+), 的酶切位点 *Nde* I 和 *Eco*R I 之间, 构建重组表达质粒 pET-28a(+)-IRED。将构建的重组质粒 pET-28a(+)-IRED 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 涂布于含有卡那霉素的抗性平板培养过夜, 挑选单菌落经聚合酶链反应 (PCR) 验证获

得阳性菌株。基因合成委托金唯智生物科技有限公司完成。

选择 *Pseudomonas* sp. 101 来源的经突变后的 FDH<sup>[21]</sup>。同样地, 以 *E. coli* BL21(DE3) 为宿主菌株, 以 pET-28a(+) 为表达载体, 酶切位点选取 *Nco* I 和 *Xho* I。获得重组菌株的其他制备过程与上述一致。

#### 1.2.2 目的基因的诱导表达及酶学性质的测定

挑取阳性菌株单菌落接种至 10 mL 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 活化培养 12~16 h。将活化后的菌液以体积分数 1% 的接种量接种至 50 mL 卡那霉素抗性的 TB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 待菌液在 600 nm 下的吸光度 (OD<sub>600</sub>) 为 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 20 °C、180 r/min 诱导表达 18~20 h。将发酵后的菌液在 4 °C、8000 r/min 下离心 10 min 收集菌体。所得菌体用 PBS 缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.0) 洗涤两次, 随后重悬菌体, 并在高压匀质机中破碎, 收集破碎液, 于 4 °C、12000 r/min 下离心 15 min, 取上清液即获得粗酶液, 并用于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测蛋白表达。

酶活力 (1U) 定义为: 30 °C 下, pH 7.0 条件下, 每分钟还原 (氧化) 1  $\mu$ mol NADPH (NADP<sup>+</sup>) 的酶量。

IRED 的酶活力测定方法为: 30 °C 下, 在 1 mL 的反应体系中, 含 10 mmol/L 底物麦斯明、0.1 mmol/L NADPH、100 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0) 以及适量的 IRED 细胞<sup>[22]</sup>。通过紫外-可见分光光度计检测反应体系在 340 nm 处 1 min 内吸光度的变化量。

FDH 的酶活力测定方法为: 30 °C 下, 在 1 mL 的反应体系中, 含 100 mmol/L 底物甲酸钠、1 mmol/L NADP<sup>+</sup>、100 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0) 以及适量的 FDH 细胞<sup>[23]</sup>。通过紫外-可见分光光度计检测反应体系在 340 nm 处 1 min 内吸光度的变化量。

其中, 比酶活力按照式 (1) 进行计算<sup>[24]</sup>:

$$\text{比酶活力 (U/g)} = \frac{K}{m} \quad (1)$$

式中:  $K$  为酶活力, U;  $m$  为细胞湿重, g。

pH 对细胞中 IRED 和 FDH 酶活力的影响: 在 30 °C 下, 取 5 g 湿细胞, 分别于不同 pH (5.0~12.0) 的缓冲液中孵育 5 min, 测定其在不同 pH 缓冲液中的相对酶活力, 相对酶活力是以 IRED 和 FDH 在各自最适 pH 条件下的酶活力作为对照 (100%)。为了测定细胞在不同 pH 条件下的稳定性, 在 30 °C 下, 取适量细胞, 分别于不同 pH (IRED: 6.0~10.0, FDH:

5.0~9.0) 的缓冲液中孵育一定时间, 定时取样测其剩余酶活力, 剩余酶活力以孵育 0 h 时的酶活力作为对照 (100%)。

温度对细胞中 IRED 和 FDH 酶活力的影响: 取 5 g 湿细胞, 分别于不同温度 (10~70 °C) 孵育 5 min 后, 在最适 pH 下测定其在不同温度下的酶活力, 并以 IRED 和 FDH 在各自最适温度下的酶活力作为对照 (100%)。为了研究细胞在不同温度条件下的稳定性, 将适量细胞, 分别于不同温度 (20~70 °C) 孵育一定时间, 定时取样测其剩余酶活力, 剩余酶活力以孵育 0 h 时的酶活力作为对照 (100%)。

### 1.2.3 IRED-FDH 催化体系的构建及反应条件的优化

将 IRED 细胞和 FDH 细胞与不同 pH (6.0~11.0) 的缓冲体系 (200 mL) 充分混合, 将得到的反应混合物在 20~70 °C 下反应 14 h, 以确定全细胞反应的最优 pH 和温度; 接下来分别将细胞 (200~700 U/L) 以不同的活性添加比例 (IRED 与 FDH 的酶活力比值为 0.75~2.00) 在不同质量浓度的麦斯明 (10~70 g/L)、不同浓度的 NADP<sup>+</sup> (0.1~0.7 mmol/L)、不同质量浓度的甲酸钠 (50~110 g/L) 下合成(S)-降烟碱, 以考察细胞添加量及添加比例、底物质量浓度、NADP<sup>+</sup>浓度和甲酸钠质量浓度对反应的影响。筛选出最优反应条件, 在最优条件下反应 14 h, 检测产物的产率和对映体过量 (e.e.) 值。

### 1.2.4 化学法合成(S)-烟碱

将酶法催化得到的 200 mL 含(S)-降烟碱反应液于 4 °C、12000 r/min 下离心 10 min, 取上清液并向其中加入 40 mL 多聚甲醛 (0.3 mol/L) 和 40 mL 甲酸 (0.3 mol/L), 之后将混合物逐渐升温加热至 80 °C 反应约 4 h。待液体冷却后, 加入 40 mL 氢氧化钠溶液 (0.4 mol/L) 碱化, 之后使用 600 mL 甲基叔丁基醚对反应液进行萃取, 并用无水硫酸钠干燥, 将萃取液进行蒸馏, 得到(S)-烟碱<sup>[6]</sup>。由高效液相色谱仪测定其产率及 e.e. 值。

### 1.2.5 分析方法

(S)-降烟碱和(S)-烟碱均采用高效液相色谱仪分析。(S)-降烟碱分析条件<sup>[25]</sup>: Chiralpak AD-H 柱 (250 mm×4.6 mm×5 μm), 流动相为 V(正己烷): V(乙醇): V(二乙胺)=74.9: 25.0: 0.1 混合液, 检测波长 254 nm, 流速 1 mL/min。(S)-烟碱分析条件<sup>[6]</sup>: Chiracel OD-H 柱 (250 mm×4.6 mm×5 μm), 流动相为 V(正己烷): V(1-丁醇): V(二乙胺)=94.9: 5.0: 0.1 混合液, 检测波长 254 nm, 流速 1 mL/min。

产物的产率和 e.e. 值分别由式 (2) 和 (3) 进行计算:

$$X/\% = \frac{c_1}{c_2} \times 100 \quad (2)$$

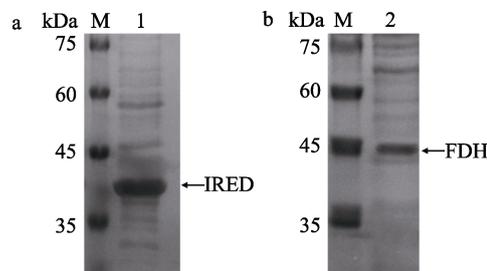
$$Y/\% = \frac{[S]-[R]}{[S]+[R]} \times 100 \quad (3)$$

式中: X 为产率, %; Y 为 e.e. 值, %; c<sub>1</sub> 为产物的实际产量, mol; c<sub>2</sub> 为产物的理论产量, mol; [S] 为样品中(S)构型产物的量, mol; [R] 为样品中(R)构型产物的量, mol。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组菌株的蛋白表达

将重组菌株单菌落活化 14 h 后, 接种到 TB 培养基中, 待 OD<sub>600</sub> 达到 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 诱导表达 18~20 h。离心获得菌体, 经高压匀质机破碎后, 离心获得粗酶液。经 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 结果见图 3。



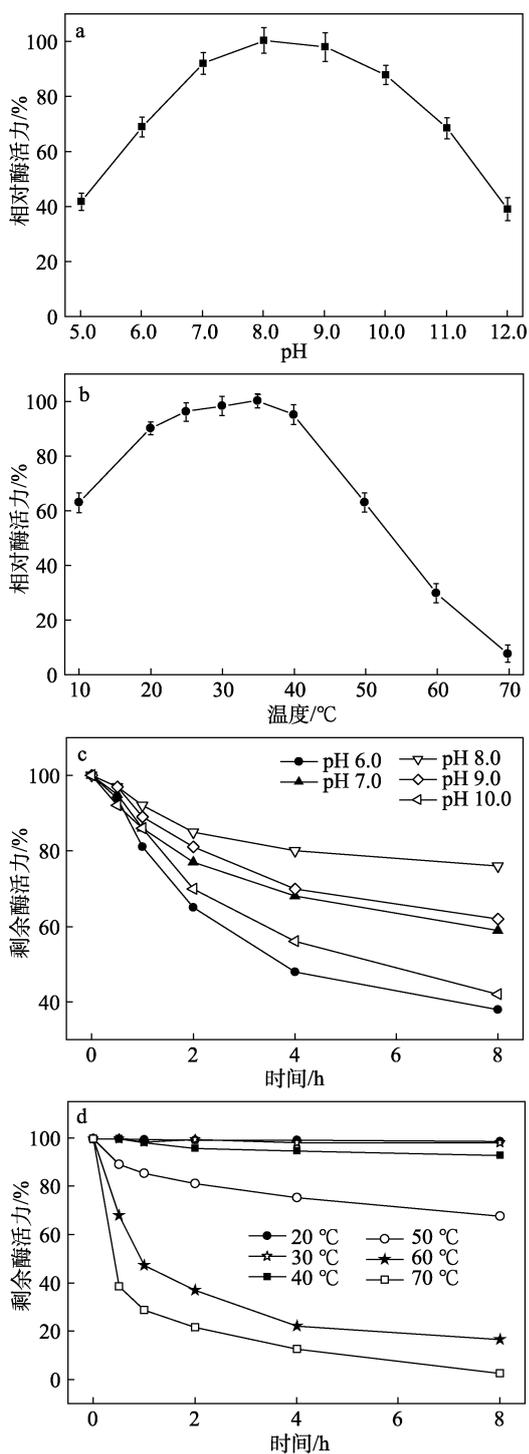
注: M 为标准蛋白 Marker; 1 为 IRED 粗酶液; 2 为 FDH 粗酶液  
图 3 IRED 和 FDH 粗酶液的 SDS-PAGE 蛋白电泳分析  
Fig. 3 SDS-PAGE protein electropherograms of the crude enzyme solution of IRED and FDH

由图 3 可知, IRED 和 FDH 粗酶液中分别含有一条明显蛋白条带, 相对分子质量大小分别约为 38 和 45 kDa, 与理论蛋白相对分子质量一致。由此可知, IRED 和 FDH 在 *E. coli* BL21(DE3) 中均成功表达。

### 2.2 pH 和温度对细胞中 IRED 和 FDH 酶活力的影响

pH 是影响酶活力的一个关键因素, 不同 pH 对应的离子环境维持着基团的离子形式, 极端的 pH 可导致酶分子活性中心的氨基酸解离, 使酶的空间构象发生变化, 影响酶活力<sup>[26]</sup>。按 1.2.2 节实验方法, 考察了 pH 和温度对细胞中 IRED 酶活力的影响, 结果见图 4。由图 4a 可见, 随着 pH 的增高, 细胞中 IRED 的相对酶活力呈现先升高后降低的趋势, 在 pH 为 8.0 时, 相对酶活力达到最高。根据已有研究报道<sup>[27-29]</sup> 可知, IRED 的最适 pH 通常在 6.0~8.0 之间, 本研究所使用的 IRED 最适 pH 为 8.0。由图 4c 可知, 随着孵育时间的增加, 细胞中 IRED 的剩余酶活力逐渐降低, 在 pH 8.0 的缓冲液中孵育 8 h 后, 细胞中 IRED 的剩余酶活力为初始酶活力的 76%, 而在 pH 10.0 的缓冲液中孵育 8 h 后, 剩余酶活力为 42%; 在 pH 7.0~9.0 的范围内孵育 8 h 后, 剩余酶活力均在 50% 以上。结果证明, 在此 pH 范围内, 细胞中 IRED 有较好的稳定性, 也说明其在弱碱性环境中具有良好

的酶活力和稳定性。



a—最适 pH; b—最适温度; c—pH 稳定性; d—热稳定性

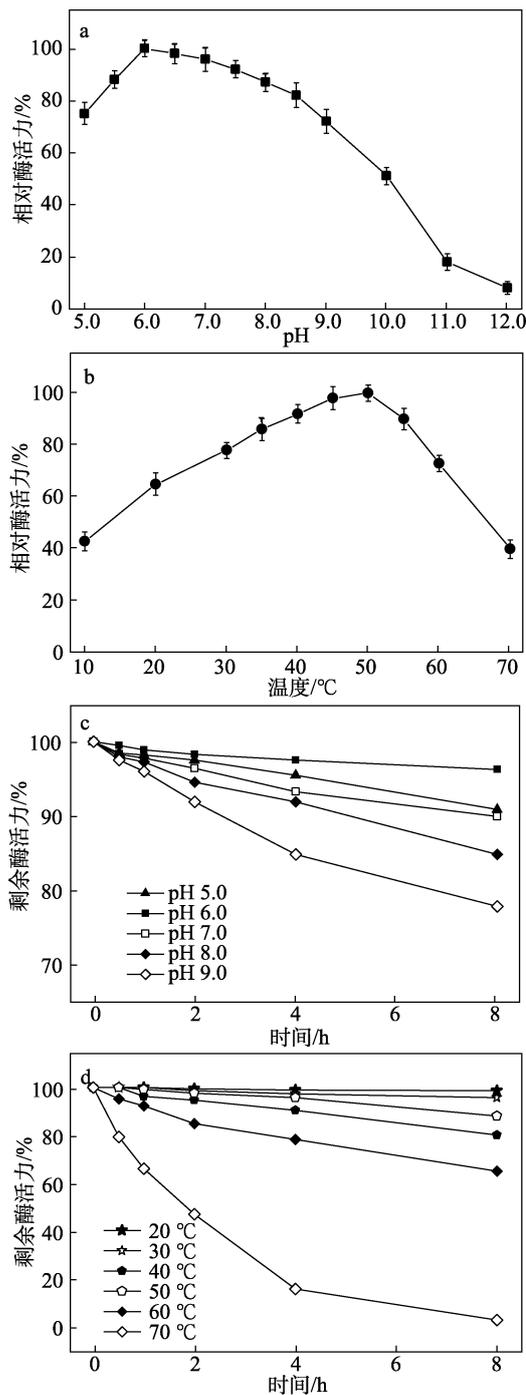
图 4 pH 和温度对细胞中 IRED 酶活力的影响

Fig. 4 Effects of pH and temperature on IRED enzyme activity in cells

温度对酶蛋白稳定性有着重要的影响, 随着温度的升高, 可能会导致维持酶蛋白空间构象的次级键断裂, 导致酶失活<sup>[30]</sup>。由图 4b 可见, IRED 最适温度为 35 °C。由于反应过程通常持续若干小时, 因此, 测定了细胞中 IRED 的热稳定性, 结果如图 4d 所示。由图 4d 可见, 孵育 8 h 后, IRED 在 20~40 °C

范围内的剩余酶活力为 90% 以上, 随着温度的升高, 细胞中 IRED 的剩余酶活力有所降低。一般而言, 对与底物结合和参与反应的关键氨基酸残基进行突变可能会提升酶活力和热稳定性, ZHANG 等<sup>[13]</sup>和 SCHOBEL 等<sup>[31]</sup>通过改变关键残基位点提升了 IRED 的最适温度、pH 稳定性和热稳定性, 然而这方面的研究还需要进一步展开。

按 1.2.2 节实验方法, 考察了 pH 和温度对细胞中 FDH 酶活力的影响, 结果见图 5。



a—最适 pH; b—最适温度; c—pH 稳定性; d—热稳定性

图 5 pH 和温度对细胞中 FDH 酶活力的影响

Fig. 5 Effects of pH and temperature on FDH enzyme activity in cells

pH 对细胞中 FDH 相对酶活力的影响如图 5a 所示。由图 5a 可知,随着 pH 的增高,细胞中 FDH 的相对酶活力变化呈现同 IRED 相同的趋势,与之不同的是,在 pH 为 6.0 时,FDH 相对酶活力达到最高。细胞中 FDH 的 pH 稳定性的测定结果如图 5c 所示。由图 5c 可知,随着孵育时间的增加,FDH 的酶活力逐渐降低,在 pH 6.0 的缓冲液中孵育 8 h 后,FDH 的剩余酶活力为 96.3%,而在 pH 9.0 的缓冲液中孵育 8 h 后,剩余酶活力为 78.0%,证明在此 pH 范围内,细胞中的 FDH 有很好的稳定性。

温度对细胞中 FDH 相对酶活力的影响如图 5b 所示。由图 5b 可知,FDH 的最适温度为 50 °C。其热稳定性的测定结果如图 5d 所示。由图 5d 可知,孵育 8 h 后,在 20~50 °C 范围内 FDH 的剩余酶活力均在 80% 以上,并且随着温度的升高,FDH 的酶活力下降速度变快。酶活力的丧失通常与催化过程的化学修饰和热变性有关,FDH 在高温下容易失活的主要原因是半胱氨酸残基存在易被氧化的巯基,程峰等<sup>[20]</sup>通过对比不同来源 FDH 中的半胱氨酸残基位点发现,来源于细菌的 FDH 半胱氨酸残基数量最多,其次为来源于植物的 FDH,来源于酵母菌和真菌的 FDH 半胱氨酸残基数量略低于细菌和植物。不仅在高温下酶失活与半胱氨酸残基有关,大多数情况下,低于 40 °C 时的变性也是由该残基的化学修饰或氧化引起的<sup>[32]</sup>。

### 2.3 反应条件对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响

#### 2.3.1 温度和 pH 对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响

温度和 pH 均会影响酶的活性,不同的酶在催化反应中往往有不同的最适温度和 pH,但当两种酶处于同一反应体系中催化反应时,需要综合考虑温度和 pH 对两种酶的影响。细胞膜有保护胞内酶的作用,能抵御部分胞外环境的变化。在使用全细胞作催化剂时,除了要满足酶的温度和 pH 条件外,还要保证细胞完整,以防因细胞破碎而影响酶蛋白结构。因此,在最适温度和 pH 条件下保证全细胞的高效反应进行尤为重要。

在生物催化的反应中,过高的温度会导致酶的失活,反应温度过低时,反应速率又会降低。另一方面,在酶催化合成手性化合物过程中,温度有时会改变酶的立体选择性<sup>[33]</sup>。按 1.2.3 节实验方法和 1.2.5 节分析方法,考察了温度对全细胞催化反应的影响。在 200 mL、pH 7.0 的体系内包含质量浓度 20 g/L 麦斯明、质量浓度 110 g/L 甲酸钠、0.6 mmol/L NADP<sup>+</sup>、700 U/L IRED 细胞和 700 U/L FDH 细胞,于 20~70 °C 下反应 14 h,测定(S)-降烟碱的产率及 e.e.值,结果如图 6a 所示。由图 6a 可知,当温度从 20 °C 上升到 30 °C,反应速率加快,含酶细胞对麦

斯明的催化效率提高,在 30 °C 达到最高。但当温度高于 30 °C 时,随着温度的持续升高,(S)-降烟碱的产率和 e.e.值迅速下降。因此,全细胞催化麦斯明合成(S)-降烟碱反应的最佳温度为 30 °C。

pH 除了影响酶分子活性域相关基团或底物的解离,使得反应速度发生变化外,也影响催化过程中产物的对映选择性<sup>[28]</sup>。因此,按 1.2.3 节实验方法和 1.2.5 节分析方法,考察了 pH 对全细胞催化不对称还原反应的影响。在 200 mL 的体系内包含质量浓度 20 g/L 麦斯明、质量浓度 110 g/L 甲酸钠、0.6 mmol/L NADP<sup>+</sup>、700 U/L IRED 细胞和 700 U/L FDH 细胞,于 6.0~11.0 的 pH 梯度下,30 °C 反应 14 h,测定(S)-降烟碱的产率及 e.e.值。pH 对全细胞催化不对称还原反应的影响如图 6b 所示。从图 6b 可以看出,随着 pH 从 6.0 增加到 7.5,细胞催化的反应速率明显增加。在 pH 为 7.5 的反应体系中,产物的产率最高,当 pH 从 7.5 增加到 11.0 时,(S)-降烟碱的产率降低。推断由于过碱的条件使细胞中的酶变性失活。为了更准确的揭示原因,测定反应后细胞剩余酶活力,其中,剩余酶活力以初始 pH 7.5 时的酶活力作为对照(100%),结果见图 7。由图 7 可知,pH>7.5 时,FDH 剩余酶活力受 pH 影响更大,因此判断,过碱的环境会导致 FDH 失活,从而影响催化效率。然而,不同 pH 条件对产物的对映选择性影响不大,产物(S)-降烟碱的 e.e.值始终保持在 99% 以上。

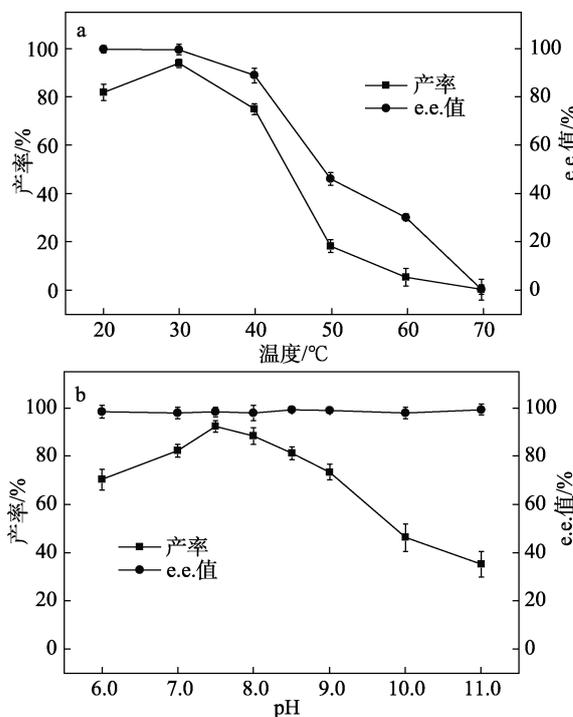


图 6 温度 (a) 和 pH (b) 对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响

Fig. 6 Effects of temperature (a) and pH (b) on whole-cell catalytic preparation of (S)-nornicotine

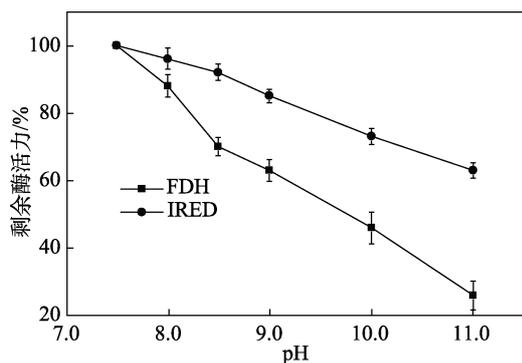


图 7 不同 pH 反应条件下 IRED 和 FDH 的剩余酶活力  
Fig. 7 Residual enzyme activities of IRED and FDH in different pH reaction conditions

### 2.3.2 麦斯明质量浓度对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响

在全细胞催化转化过程中, 高底物质量浓度有利于实现高容量生产力。然而, 过高浓度的底物会抑制细胞内酶的活性<sup>[34]</sup>。因此, 按 1.2.3 节实验方法和 1.2.5 节分析方法, 研究了底物麦斯明质量浓度对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响。在 pH 7.5、200 mL 的体系内包含质量浓度 10~70 g/L 麦斯明、质量浓度 110 g/L 甲酸钠、0.6 mmol/L NADP<sup>+</sup>、700 U/L IRED 细胞和 700 U/L FDH 细胞, 于 30 °C 下反应 14 h, 测定(S)-降烟碱的产率及 e.e.值, 结果见图 8。

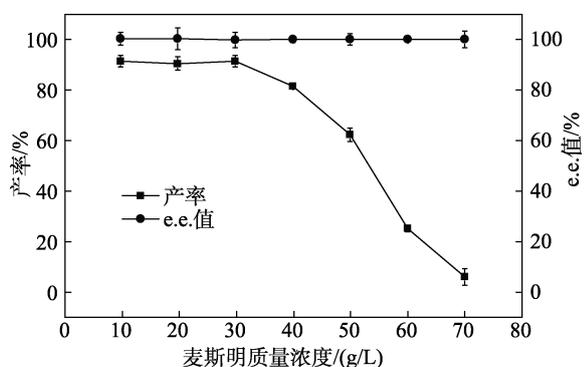


图 8 麦斯明质量浓度对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响  
Fig. 8 Effect of myosmine mass concentration on whole-cell catalytic preparation of (S)-nornicotine

从图 8 可以看出, 在全细胞催化过程中, 随着麦斯明质量浓度的增加, 产物(S)-降烟碱的 e.e.值始终保持在 99%以上。当底物质量浓度>30 g/L 时, (S)-降烟碱的产率随着麦斯明质量浓度的增加而急剧下降。

测定不同底物质量浓度反应结束后的 pH, 结果如表 1 所示。

由表 1 可知, 随底物质量浓度的升高, 反应后体系 pH 也逐渐升高, 而在 pH 8.0~9.0 条件下, FDH 的酶活力损失较多(图 5c), 另外, 高质量浓度底

物的存在会显著抑制 IRED 催化生成产物, 导致产率降低<sup>[35]</sup>, 同时也会存在底物不完全溶解的现象, 综合以上原因, (S)-降烟碱的产率急剧下降。因此, 选择质量浓度为 30 g/L 作为最适底物质量浓度进行全细胞催化还原反应。

表 1 不同底物质量浓度反应液 pH

Table 1 pH of reaction solution with different substrate mass concentrations

底物质量浓度/(g/L)	40	50	60	70
反应后 pH	8.82	9.03	9.21	9.43

### 2.3.3 细胞添加量和添加比例对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响

在全细胞催化麦斯明制备(S)-降烟碱的反应过程中, 反应体系中细胞添加量和添加比例也会对催化效果和反应产率产生影响, 因此, 按 1.2.3 节实验方法和 1.2.5 节分析方法, 考察了不同细胞添加量和添加比例对反应体系的影响。在 pH 7.5、200 mL 的体系内包括质量浓度 30 g/L 麦斯明、质量浓度 110 g/L 甲酸钠、0.6 mmol/L NADP<sup>+</sup>、200~700 U/L IRED 细胞和 FDH 细胞 (IRED 与 FDH 的酶活力比值为 0.75~2.00), 于 30 °C 下反应 14 h, 测定(S)-降烟碱的产率及 e.e.值, 结果如图 9 所示。

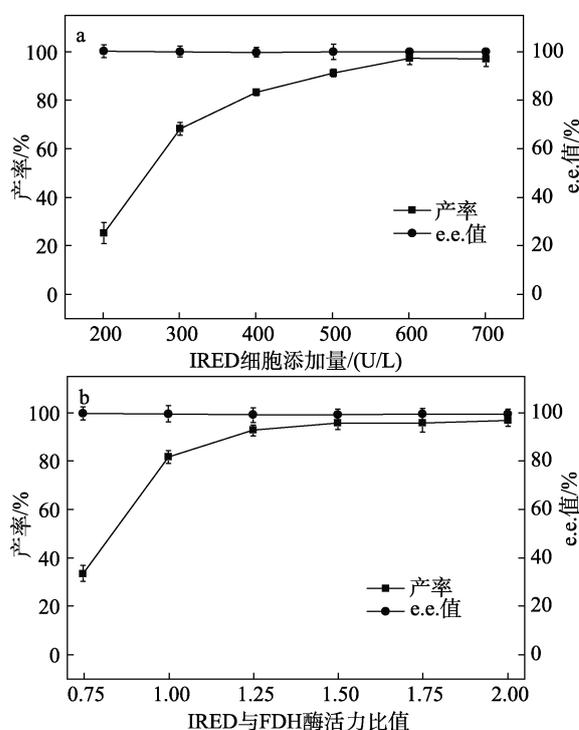


图 9 IRED 细胞和 FDH 细胞添加量 (a) 和添加比例 (b) 对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响

Fig. 9 Effects of IRED cells and FDH cells activity addition (a) and cell activity addition ratio (b) on whole-cell catalytic preparation of (S)-nornicotine

由图 9 可知,随着 IRED 细胞和 FDH 细胞添加量的增加,反应的产率也随之增加,产物(S)-降烟碱的 e.e.值基本保持不变。当 FDH 细胞酶活添加为 600 U/L, IRED 与 FDH 的酶活力比值达到 1.50 时,产物(S)-降烟碱产率为 95%以上,继续增加比例,反应的产率保持平衡。因此在研究的范围内,综合反应产率、工业成本等问题,确定后续反应添加 600 U/L FDH 细胞、900 U/L IRED 细胞。

### 2.3.4 NADP<sup>+</sup>浓度和甲酸钠质量浓度对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响

IRED 主要依赖 NADPH 提供还原力来完成生物催化过程,由于 NADPH 的高成本,限制了 IRED 在工业化规模进行生物催化的经济可行性。按 1.2.3 节实验方法和 1.2.5 节分析方法,考察了 NADP<sup>+</sup>浓度对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响。在 pH 7.5、200 mL 的体系内包含质量浓度 30 g/L 麦斯明、质量浓度 110 g/L 甲酸钠、0.1~0.7 mmol/L NADP<sup>+</sup>、600 U/L FDH 细胞和 900 U/L IRED 细胞,于 30 °C 下反应 14 h,测定(S)-降烟碱的产率及 e.e.值,结果如图 10a 所示。由图 10a 可知,当 NADP<sup>+</sup>浓度为 0.6 mmol/L 时,在经济可行性范围内,同时在催化反应过程中能取得良好的催化效果,其产率为 96%, e.e.值>99%。

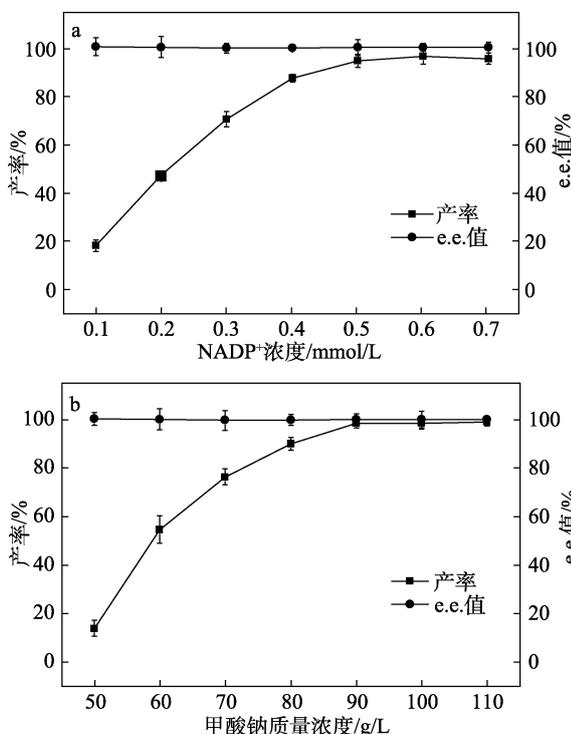


图 10 NADP<sup>+</sup>浓度 (a) 和甲酸钠质量浓度 (b) 对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响

Fig. 10 Effects of NADP<sup>+</sup> concentration (a) and sodium formate mass concentration (b) on whole-cell catalytic preparation of (S)-nornicotine

FDH 作为 NADPH 再生酶,在氧化还原反应过程中可以将甲酸盐转化为 CO<sub>2</sub>,为 IRED 提供所需的 NADPH。但反应所添加的甲酸钠呈碱性,添加量过少不能高效供给 NADPH 再生,添加量过多则会改变反应体系的酸碱度,从而影响产物的产率和 e.e.值。因此,需要在反应体系中加入适量的甲酸钠,以实现 NADPH 再生。按 1.2.3 节实验方法和 1.2.5 节分析方法,考察了甲酸钠质量浓度对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响。在 pH 7.5、200 mL 的体系内包含质量浓度 30 g/L 麦斯明、质量浓度 50~110 g/L 甲酸钠、0.6 mmol/L NADP<sup>+</sup>、600 U/L IRED 细胞和 900 U/L FDH 细胞,于 30 °C 下反应 14 h,测定(S)-降烟碱的产率及 e.e.值。甲酸钠质量浓度对全细胞催化制备(S)-降烟碱的影响如图 10b 所示。由图 10b 可知,随着甲酸钠质量浓度的增加,(S)-降烟碱的产率明显提高。当甲酸钠质量浓度达到 90 g/L,此时(S)-降烟碱的产率>98%, e.e.值>99%。

因此,综合考虑工业成本、产率等因素,以 NADP<sup>+</sup>浓度 0.6 mmol/L、甲酸钠质量浓度为 90 g/L 进行(S)-降烟碱的制备。

### 2.3.5 (S)-降烟碱的最优工业制备

在 IRED 参与的实际生产中,引入氧化还原酶再生 NADPH 的方法虽然降低了一部分生产成本,但采用 GDH 再生 NADPH 的同时生成了葡萄糖酸,其繁琐复杂的分离步骤又限制了 IRED 的大规模生产应用。FDH 再生 NADPH 时产生的 CO<sub>2</sub> 以其易于分离的优势,成为了 IRED 工业应用时的更优选择。因此,在最优条件的基础上,其他条件不变,分别添加等物质的量的甲酸钠、葡萄糖和相同酶活力的 FDH 和 GDH,反应 14 h,检测反应进程,结果如图 11 所示。

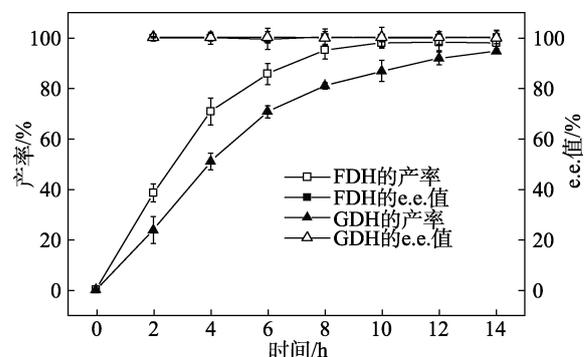


图 11 IRED-FDH 和 IRED-GDH 两种体系催化制备(S)-降烟碱反应进程曲线

Fig. 11 Time course of (S)-nornicotine synthesis process catalyzing by IRED-FDH and IRED-GDH systems

由图 11 可以看出,当采用 FDH 再生 NADPH 时,IRED 催化制备(S)-降烟碱的反应在 10 h 达到平

衡; 而当采用 GDH 再生 NADPH 时, 反应 10 h, (S)-降烟碱的产率仅为 79%。

检测反应过程中 pH 的变化和细胞剩余酶活力, 其中, 剩余酶活力以初始 pH 7.5 时的酶活力作为对照 (100%), 结果见表 2。由表 2 可见, IRED-GDH 体系 pH 变化较大且呈酸性, 在此体系内, IRED 的酶活力损失较大, 酶活力仅剩余 42%。这是由于体系中葡萄糖氧化产生的葡萄糖酸不断积累, 降低了整个反应体系的 pH, 从而对 IRED 酶活力产生了较大影响, 导致产率降低<sup>[36-37]</sup>。这一结果也证明了 IRED-FDH 催化体系除了有利于后期的产物分离这一优势, 还有更好的催化效率。

表 2 不同辅酶循环体系对比

体系	初始 pH	10 h 时 pH	剩余酶活力 /%	IRED 剩余酶活力 /%
IRED-FDH	7.5	8.68	73 <sup>①</sup>	81
IRED-GDH	7.5	5.90	69 <sup>②</sup>	42

①FDH 剩余酶活力; ②GDH 剩余酶活力。

此外, 根据目前市场上化学试剂的官方价格对酶法生产每千克(S)-降烟碱的成本进行估算, 结果见表 3。

表 3 酶法制备(S)-降烟碱的成本估算

项目	名称	消耗	价格	成本
原料	麦斯明	1007 g	2265 元/g	2280855 元
	NADP <sup>+</sup>	15 g	150 元/g	2250 元
	甲酸钠	3 kg	100 元/kg	300 元
辅料	培养基	133 L	40 元/L	5320 元
	缓冲盐	2.4 kg	200 元/kg	480 元
	纯化水	167 L	4 元/L	668 元
	萃取剂	84 L	55 元/L	4620 元
公用工程 <sup>[38]</sup>	电费	—	—	4 元/d
	人工费	—	—	75 元/t
	折旧费	—	—	197 元/t
	修理费	—	—	30 元/t
处理费	—	—	20 元/t	
投入成本	—	—	—	2300000 元/kg
产品售价	—	—	7100000 元/kg	—

注: “—”代表数据不需单独计算。

表 3 显示, 酶法制备(S)-降烟碱具有巨大经济收益。

## 2.4 化学法合成(S)-烟碱

将由上述酶法催化得到的 200 mL 含(S)-降烟碱反应液于 4 °C、12000 r/min 下离心 10 min, 取上清

液并向其中加入 40 mL 多聚甲醛 (0.3 mol/L) 和 40 mL 甲酸 (0.3 mol/L), 将混合物逐渐升温至 80 °C, 处理 6 h, 其中在 4 h 后反应完成, 待液体逐渐冷却, 加入 40 mL 氢氧化钠溶液 (0.4 mol/L) 碱化。用 600 mL 甲基叔丁基醚萃取。得到的液体使用无水硫酸钠干燥后, 将混合物蒸馏, 即得到(S)-烟碱, 图 12 为化学法合成(S)-烟碱进程曲线。从图 12 可以看出, 由高效液相色谱仪测得(S)-烟碱的产率和 e.e. 值均 >99%。

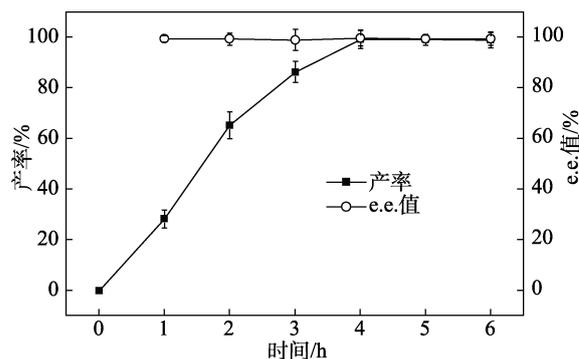


图 12 化学法合成(S)-烟碱进程曲线

Fig. 12 Time course of (S)-nicotine synthesis process by chemical method

## 3 结论

为了实现(S)-烟碱的绿色合成, 本文设计了酶-化学级联反应途径。成功构建 IRED-FDH 双酶体系催化麦斯明合成(S)-降烟碱, 研究了 pH 和温度对细胞中 IRED 和 FDH 酶活力的影响。结果表明, 细胞中的 IRED 在 pH 7.0~9.0、20~40 °C 时有较好的稳定性, 其最适温度和最适 pH 分别为 35 °C 和 8.0; 细胞中的 FDH 在 pH 6.0~9.0、20~50 °C 时有较好的稳定性, 其最适温度和最适 pH 分别为 50 °C 和 6.0。进一步地获得了优化的催化反应条件: 当反应温度为 30 °C、pH 7.5 时, 添加质量浓度 30 g/L 麦斯明、600 U/L FDH 细胞、900 U/L IRED 细胞、0.6 mmol/L NADP<sup>+</sup> 和质量浓度 90 g/L 甲酸钠, 反应 10 h 后, (S)-降烟碱的产率 >98%, e.e. 值 >99%。通过级联化学法将酶法得到的(S)-降烟碱合成(S)-烟碱, 其产率和 e.e. 值均达 99% 以上。本文设计的酶-化学级联合成(S)-烟碱的方法步骤简洁且环保高效, 具有原料易得、成本低廉的经济优势, 在工业生产中具有巨大的应用价值和前景, 可为工业生产(S)-烟碱提供重要理论和技术支持。

后续仍存在很多潜力有待挖掘。例如: 应用 IRED、FDH 共表达和融合技术可提高底物转化和辅酶再生速率, 降低体系复杂性, 有助于实现更高效率的级联反应<sup>[39]</sup>。将技术与生产相结合, 从催化效

率和成本控制两方面解决工业生产中的关键问题, 促进工业化应用。

### 参考文献:

- [1] LIU Z Y (刘振宇). Extraction, separation and purification of effective components[D]. Dalian: Dalian University of Technology (大连理工大学), 2017.
- [2] HE G Q (贺桂泉). Modern clinical pharmacological treatment of Alzheimer's disease and prospects[J]. Occupation and Health (职业与健康), 2007, (17): 1551-1553.
- [3] LI Y (李野). The separation and purification of effective components in waste tobacco leaves[D]. Dalian: Dalian University of Technology (大连理工大学), 2020.
- [4] LUAN Q Q (栾倩倩). Separation and purification of active ingredients in fresh tobacco leaves[D]. Dalian: Dalian University of Technology (大连理工大学), 2018.
- [5] WEBER B, PAN B. Enantiomeric separation of racemic nicotine by addition of an *o,o*-disubstituted tartaric acid enantiomer: EP3710437[P]. 2022-12-14.
- [6] LI J Q (李家全), WEI G H (魏庚辉), MENG X Q (孟宪强). Method for preparing (S)-2-(3-pyridine)-pyrrolidine: CN112795603B[P]. 2022-06-24.
- [7] WEBER B, LOTHSCHÜTZ C, PAN B. Preparation of racemic nicotine by reaction of ethyl nicotinate with *N*-vinylpyrrolidone in the presence of an alcoholate base and subsequent process steps: AU2018391652B2[P]. 2022-03-10.
- [8] LIU H (刘涵), LI Z H (李正华), ZHANG L (张磊), *et al.* A method for the synthesis of (S)-nicotine: CN114807265A[P]. 2022-07-29.
- [9] CHENG F (程峰), LI Q H (李清华), LI H (李恒), *et al.* NAD(P)H-dependent oxidoreductases for synthesis of chiral amines by asymmetric reductive amination of ketones[J]. Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报), 2020, 36(9): 1794-1816.
- [10] CHEN Q, LI B B, ZHANG L L, *et al.* Engineered imine reductase for larotrectinib intermediate manufacture[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(23): 14795-14803.
- [11] ROBESCU M S, RUBINI R, BENEVENTI E, *et al.* From the Amelioration of a NADP<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase to the discovery of a new enzyme: Round trip from theory to practice[J]. ChemCatChem, 2020, 12(9): 2478-2487.
- [12] MONTGOMERY S L, PUSHANATH A, HEATH R S, *et al.* Characterization of imine reductases in reductive amination for the exploration of structure-activity relationships[J]. Science Advances, 2020, 6(21): 9320.
- [13] ZHANG J, LIAO D H, CHEN R C, *et al.* Tuning an imine reductase for the asymmetric synthesis of azacycloalkylamines by concise structure-guided engineering[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2022, 61(24): 202201908.
- [14] ROIBAN G D, KERN M, LIU Z, *et al.* Efficient biocatalytic reductive aminations by extending the imine reductase toolbox[J]. ChemCatChem, 2017, 9(24): 4475-4479.
- [15] LIU W M, MA H M, LUO J X, *et al.* Efficient synthesis of L-tert-leucine through reductive amination using leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase coexpressed in recombinant *E. coli*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2014, 91: 204-209.
- [16] LI J, PAN J, ZHANG J, *et al.* Stereoselective synthesis of L-tert-leucine by a newly cloned leucine dehydrogenase from *Exiguobacterium sibiricum*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 105: 11-17.
- [17] WECKBECKER A, GRÖGER H, HUMMEL W. Regeneration of nicotinamide coenzymes: Principles and applications for the synthesis of chiral compounds[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2010, 120: 195-242.
- [18] TASSANO E, HALL M. Enzymatic self-sufficient hydride transfer processes[J]. Chemical Society Reviews, 2019, 48(23): 5596-5615.
- [19] JIANG H W, CHEN Q, PAN J, *et al.* Rational engineering of formate dehydrogenase substrate/cofactor affinity for better performance in NADPH regeneration[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 192(2): 530-543.
- [20] CHENG F (程峰), WEI L (魏澜), WANG C J (王成娇), *et al.* Formate dehydrogenase and its application in biomanufacturing of chiral chemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报), 2022, 38(2): 632-649.
- [21] CALZADIAZ-RAMIREZ L, CALVÓ-TUSELL C, STOFFEL G M M, *et al.* In vivo selection for formate dehydrogenases with high efficiency and specificity toward NADP<sup>+</sup>[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(14): 7512-7525.
- [22] MITSUKURA K, KURAMOTO T, YOSHIDA T, *et al.* A NADPH-dependent (S)-imine reductase (SIR) from *Streptomyces* sp. GF3546 for asymmetric synthesis of optically active amines: Purification, characterization, gene cloning, and expression[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(18): 8079-8086.
- [23] ZHANG X L (张晓露). Preparation and characterization of NADP<sup>+</sup> dependent formate dehydrogenase[D]. Nanjing: Southeast University (东南大学), 2018.
- [24] CUI W T, XUE H R, CHENG H D, *et al.* Increasing the amount of phosphoric acid enhances the suitability of Bradford assay for proteomic research[J]. Electrophoresis, 2019, 40(7): 1107-1112.
- [25] MITSUKURA K, SUZUKI M, TADA K, *et al.* Asymmetric synthesis of chiral cyclic amine from cyclic imine by bacterial whole-cell catalyst of enantioselective imine reductase[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010, 8(20): 4533-4535.
- [26] BAUDUIN P, RENONCOURT A, TOURAUD D, *et al.* Hofmeister effect on enzymatic catalysis and colloidal structures[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2004, 9(1): 43-47.
- [27] MITSUKURA K, SUZUKI M, SHINODA S, *et al.* Purification and characterization of a novel (R)-imine reductase from *Streptomyces* sp. GF3587[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75(9): 1778-1782.
- [28] CAO W B (曹文斌). Study on imine reductases for tetrahydroisoquinoline synthesis[D]. Shanghai: East China University of Science Technology (华东理工大学), 2021.
- [29] LI J X (李骥璇). Co-expressed system construction and site-directed mutagenesis of imine reductase[D]. Beijing: Tsinghua University (清华大学), 2019.
- [30] ARUS V L, PRENTICE E J, HOBBS J K, *et al.* On the temperature dependence of enzyme-catalyzed rates[J]. Biochemistry, 2016, 55(12): 1681-1688.
- [31] SCHOBER M, MACDERMAID C, OLLIS A A, *et al.* Chiral synthesis of LSD1 inhibitor GSK2879552 enabled by directed evolution of an imine reductase[J]. Nature Catalysis, 2019, 2(10): 909-915.
- [32] HOELSCH K, SÜHRER I, HEUSEL M, *et al.* Engineering of formate dehydrogenase: Synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2013, 97(6): 2473-2481.
- [33] ZHANG R Z, XU Y, SUN Y, *et al.* Ser67Asp and His68Asp substitutions in *Candida parapsilosis* carbonyl reductase alter the coenzyme specificity and enantioselectivity of ketone reduction[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(7): 2176-2183.
- [34] LI Y M, ZHANG X Y, LI N, *et al.* Biocatalytic reduction of HMF to 2,5-bis(hydroxymethyl)furan by HMF-tolerant whole cells[J]. ChemSusChem, 2017, 10(2): 372-378.
- [35] BORNADEL A, BISAGNI S, PUSHANATH A, *et al.* Technical considerations for scale-up of imine-reductase-catalyzed reductive amination: A case study[J]. Organic Process Research & Development, 2019, 23(6): 1262-1268.
- [36] ZHANG C Z (张蔡喆), YANG T W (杨套伟), ZHOU J P (周俊平), *et al.* Whole-cell biotransformation for simultaneous synthesis of L-2-aminobutyric acid and d-gluconic acid in recombinant *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报), 2017, 33(12): 2028-2034.
- [37] SUN T Q (孙太强), LI B (李斌), NIE Y (聂尧), *et al.* Asymmetric synthesis of (S)-N,N-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine by cell-free system of carbonyl reductase CR2[J]. Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 2017, 38(10): 1772-1777.
- [38] ZHONG H X (钟慧娴). The manufacturing flow and cost evaluation of N-propanol[J]. Guangdong Chemical Industry (广东化工), 2022, 49(24): 121-123.
- [39] KOHL A, SRINIVASAMURTHY V, BTTCHER D, *et al.* Co-expression of an alcohol dehydrogenase and a cyclohexanone monooxygenase for cascade reactions facilitates the regeneration of the NADPH cofactor[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 108: 53-58.