

理性改造光脱羧酶并用于反式脂肪酸选择性脱羧反应

曾森海, 鲍雨妍, 曹募, 黄小强*

配位化学国家重点实验室, 南京大学化学与生物医药创新研究院, 南京大学化学化工学院, 南京 210023

摘要: 立足光酶催化合成和酶的理性改造等研究前沿, 设计了一例光酶催化的反式脂肪酸高选择性脱羧去除实验。具体地, 本实验借助分子对接技术, 理性设计脂肪酸光脱羧酶CvFAP的突变体V453E-CvFAP, 并实验验证该突变体能够选择性地催化反油酸的脱羧反应, 从而实现顺式脂肪酸的富集。实验涉及培养细胞、诱导酶表达、提取酶液、设计反应以及产物的定性、定量分析等内容, 非常适合在化学生物学实验或综合化学实验课程中开设。

关键词: 酶的理性改造; 脂肪酸光脱羧酶CvFAP; 反式脂肪酸; 光酶催化; 脱羧反应

中图分类号: G64; O6

Rational Evolution of a Fatty Acid Photodecarboxylase for Highly Selective Photodecarboxylation of *trans* Fatty Acid

Senhai Zeng, Yuyan Bao, Ao Cao, Xiaoqiang Huang *

State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Chemistry and Biomedicine Innovation Center, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China.

Abstract: Photoenzymatic synthesis and rational engineering of enzymes are among the most emerging research areas. Herein, a highly selective photodecarboxylation of *trans* fatty acid was achieved by rational repurposing of the photodecarboxylase. Specifically, *via* molecular docking, a mutant of the photodecarboxylase CvFAP, namely V453E-CvFAP, was rationally designed, constructed and subjected to the photoactivated decarboxylation of fatty acids. It turned out that the mutant was highly selective towards elaidic acid, thereby enriching oleic acid. Experimental trainings like cells culturing, protein expression, reaction design, and qualitative and quantitative analysis of products were included. The experiment is easy to conduct and safe for undergraduate chemistry experiment.

Key Words: Rational evolution of enzyme; Photodecarboxylase CvFAP; *Trans* fatty acid; Photobiocatalysis; Decarboxylation

1 引言

1.1 光酶催化反应和酶的理性设计引入化学类本科实验教学的意义

酶催化具有高效高选择性和绿色可持续等优点, 不仅是化学生物学等学科的前沿研究热点, 也有望部分替代传统石油化学经济、满足国家绿色发展需求。然而在相对滞后的本科生化学实验课程中, 酶催化反应还缺乏应有的关注。特别地, 光酶催化综合了可见光催化多样的反应性和酶催化的优势, 成为了扩展酶催化功能的重要策略^[1]。光酶催化在诸多应用领域都有非常好的发展前景, 如光脱羧酶可以催化生物质来源的脂肪酸转化为有机燃料^[2]、高选择性地催化反式脂肪酸脱

收稿: 2022-10-04; 录用: 2022-12-11; 网络发表: 2023-01-16

*通讯作者, Email: huangx513@nju.edu.cn

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(22277053); 江苏省自然科学基金青年科学基金项目(BK20220760)

羧^[3]等。

另一方面, 定向进化通过连续迭代的基因多样化和蛋白库的筛选过程, 在实验室试管中加速模拟了自然界的进化过程, 已成为最强大的生物学工具之一, 被广泛地应用于合成生物学元件、代谢通路和整个基因组的设计改造^[4]。2018年诺贝尔化学奖的1/2授予加州理工的Frances H. Arnold, 以表彰其在定向进化领域的突出贡献。然而, 传统的定向进化手段依赖于随机突变和高通量筛选, 需要耗费大量人力、物力、财力。理性设计对酶的结构进行精确地调控, 来获得具有所需催化活性的新酶, 成为了人们的新选择^[5]。

将光酶催化和酶的理性改造这样的新理论、新方法、新技术引入化学类本科实验教学, 不仅可以让教学内容更贴近实际、贴近前沿, 提高实验教学的新颖性、创新性和趣味性, 让学生接触前沿的理论和技能, 培养学生的实验技能, 同时可以让本科生更直观地感受光酶催化和酶的理性改造的优越性和先进性, 培养学生从事相关研究的兴趣。

1.2 实验项目及背景情况

随着科技进步和和社会发展, 全人类更加关注生命健康相关问题。习近平总书记也曾作出“科技事业发展要面向人民生命健康”这一重要指示。因此, 面向生命健康的化学研究尤为重要。食用油是日常生活中必不可少的一项烹饪用品, 目前大众食用的植物油主要由饱和脂肪酸(棕榈酸、硬脂酸等)和不饱和脂肪酸(油酸、亚油酸等)组成。研究表明, 过量摄入饱和脂肪酸会增加心血管疾病的风险^[6], 与饱和脂肪酸相比, 不饱和脂肪酸更健康, 它可以预防心律失常, 并可能降低血压^[7]。然而, 并非所有不饱和脂肪酸都是健康的, 研究表明, 反式脂肪酸对人类有一些显著的副作用, 如诱发心脏病、导致代谢功能障碍等^[7]。2006年, 美国食品药品监督管理局(FDA)规定, 所有食品和保健品的标签必须标明反式脂肪酸的含量^[8]。《中国居民膳食指南》也建议每日摄入反式脂肪酸不超过2 g^[9]。因此, 将反式脂肪酸从不饱和脂肪酸混合物中去除是一个非常重要的食品安全研究课题。

生物催化具有反应选择性高、条件温和、绿色环保等优点^[5], 被认为是解决此问题的有效方法。2017年, Bession及其同事^[10]报道了一种来自小球藻NC64A的脂肪酸光脱羧酶(CvFAP), 其在特定光照下, 可将长链脂肪酸转化为相应烃类。2021年, Bession及其同事^[11]揭示CvFAP的催化功能依赖于位于酶活性中心的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)辅基的激发态化学转化。Hollmann及其同事^[12,13]利用CvFAP和其他酶开发了一系列级联反应以获得有价值的有机物。

2021年, 浙江大学吴起/徐鉴团队^[3]报道了光酶催化选择性消除反式脂肪酸的新颖转化, 他们发现, 野生型CvFAP对反式脂肪酸选择性不高, 几乎无法实现从混合物中选择性去除反式脂肪酸。该团队通过理性改造获得了CvFAP的突变体, 成功实现了选择性的脱羧消除反式脂肪酸, 扩大了CvFAP的应用范围。

为了将光酶催化和酶的理性改造技术引入本科实验教学, 本实验以该团队报告的CvFAP选择性消除反式脂肪酸为基础, 对光脱羧酶催化的反应条件做了进一步的探究, 使其更加适合本科实验教学。

本实验采用大肠杆菌作为模型细胞, 将含有CvFAP基因的菌种进行扩大培养和诱导表达, 获取粗酶溶液。本实验为1 mL (100 μ L 甲醇溶液+ 900 μ L 粗酶溶液)反应体系, 反应底物为油酸(oleic acid)和反油酸(elaidic acid), 底物溶剂为甲醇与缓冲液, 底物浓度3.50 mmol·L⁻¹, 酶浓度5.00 μ mol·L⁻¹, 于30 °C下, 蓝光(450–460 nm)照射搅拌反应1 h (图1)。再用FAD标准曲线测定酶浓度^[14]、内标法测定反应转化率, 并计算反应的转化数(TON)。

1.3 解决问题的方法和思路

为了让学生更直观地感受酶的理性改造和光酶催化的优越性, 并让实验更适合本科教学, 我们设计了以野生型酶(WT-CvFAP)或突变体酶(V453E-CvFAP)为催化剂, 以油酸或反油酸为反应底物的教学实验。本实验为24 h化学生物学实验或综合化学实验, 具体安排如表1、图2所示。

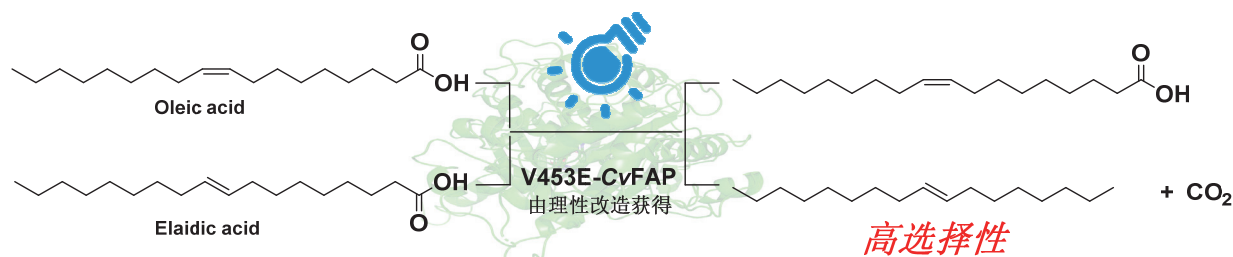


图1 反应总括示意图

表1 实验课时安排

课时	实验内容
第一次课	1) 接种WT-CvFAP、V453E-CvFAP菌种、扩大培养、诱导表达；
8 h	2) 使用AutoDock分子对接，理解突变位点的选择；
	3) 菌体收集
第二次课	1) 获得粗酶溶液；
8 h	2) 用FAD辅基定量分析酶浓度；
	3) 光酶反应，并使用GC-MS进行表征
第三次课	1) 绘制底物标准曲线，计算转化率；
8 h	2) 自主探索实验条件对结果的影响；
	3) 对实验结果和分子对接结果分析讨论

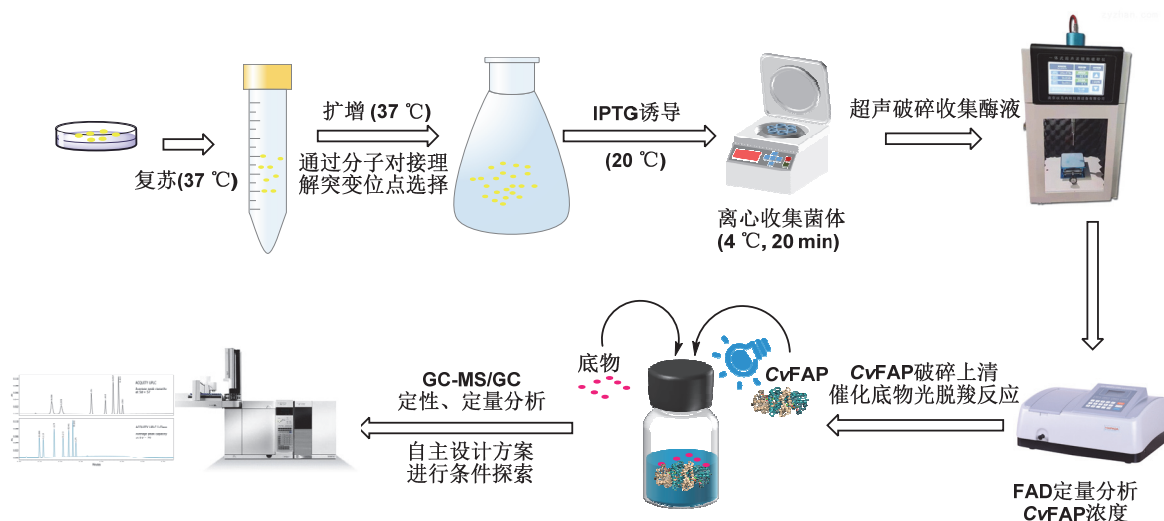


图2 实验流程图

2 实验部分

2.1 实验目的

- 1) 接触化学生物学前沿理论与技术，了解酶的理性改造，学习分子对接；
- 2) 了解光酶催化，学习脂肪酸光脱羧酶催化脱羧的方法；
- 3) 学习FAD辅基定量分析酶浓度、内标法定量反应转化率、TON衡量酶活性等。

2.2 实验原理

脂肪酸光脱羧酶CvFAP, 可以将长链脂肪酸脱羧转化为相应烃类, 其催化活性依赖于黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)辅基。其机理是: 在蓝光照射下, FAD吸收光子, 激发态FAD与羧酸底物发生单电子转移, 接着脱羧形成烷基自由基R[•]、CO₂、FAD^{•-}, 随后烷基自由基R[•]进一步生成相应烷烃^[11]。

但野生型CvFAP对油酸和反油酸均具有较强催化脱羧效果。为了提高光脱羧酶的选择性, 需要合理选择突变位点, 对其进行理性改造。文献表明, 将453位的缬氨酸突变为谷氨酸后, 酶对反油酸的结合能力增强而对油酸的结合能力下降^[3], 从而能实现对反式脂肪酸的选择性脱羧。

反应方程式如图3所示。

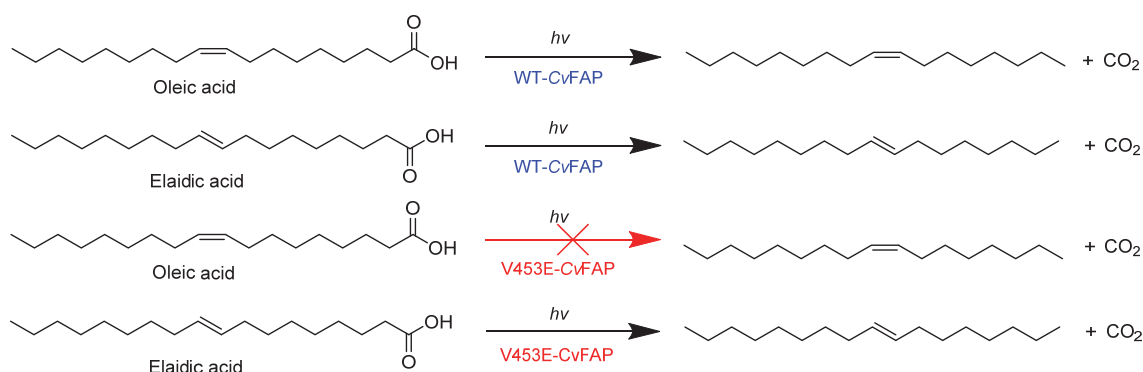


图3 反应式

2.3 实验步骤

2.3.1 TB培养基制备

(1) 称量2.40 g胰蛋白胨, 4.80 g酵母粉, 0.80 mL甘油, 2.46 g K₂HPO₄·3H₂O, 0.44 g KH₂PO₄, 加水定容至200 mL。摇动容器使溶质完全溶解, 分装在两个500 mL摇菌瓶中。

(2) 将上述溶液于0.1 MPa高压下蒸汽灭菌20 min, 备用。

2.3.2 接种WT-CvFAP、V453E-CvFAP菌种

(1) 取两个10 mL细胞培养管, 标为WT-CvFAP、V453E-CvFAP。在超净工作台进行无菌操作: 向每个细胞培养管内移取4 mL LB培养基, 4 μL 50 mg·mL⁻¹卡那霉素溶液(1 : 1000), 80 μL对应菌种(1 : 50)。

(2) 将细胞培养管置于37 °C 200 rpm摇床中摇动生长16 h。

2.3.3 扩大培养、诱导表达

(1) 取出已配制好的TB培养基, 分别标明WT-CvFAP和V453E-CvFAP, 再各加入100 μL 50 mg·mL⁻¹卡那霉素溶液(1 : 1000)。

(2) 取出含有活化菌种的LB培养基, 分别取2 mL加入对应TB培养基中, 在37 °C、220 rpm摇床中生长3–4 h, 至OD₆₀₀达到0.6–0.8。

(3) 向TB培养基中加入20 μL 1 mol·L⁻¹ IPTG溶液(终浓度为0.2 mmol·L⁻¹), 在20 °C、220 rpm摇床中诱导蛋白表达20 h。

(4) 离心(10 min, 4 °C, 7000 rpm)收集细胞。

2.3.4 用AutoDock Vina进行分子对接

(1) 使用Pymol、AutoDockTools准备野生型酶及其突变体的分子对接文件。

(2) 使用ChemDraw、Chem3D软件准备油酸和反油酸的分子对接文件。

(3) 使用AutoDockTools进行分子对接。

(4) 使用Pymol分析对接结果。

2.3.5 配制Tris-HCl缓冲液

配制Tris-HCl缓冲液($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.5): 称取1.97 g三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, 加去离子水溶解至200 mL, 用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH调节pH至8.5, 并定容至250 mL。

2.3.6 获得酶的破碎上清

用Tris-HCl缓冲液洗涤细胞并离心, 将细菌沉淀以1:2质量体积比重悬于稀释缓冲液中($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl缓冲液、 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 和10%甘油)。超声破碎(50% amp, 5 min, 5 s on, 5 s off), 离心12000 rpm, 20 min获得粗酶上清, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.3.7 用FAD测定酶浓度

- (1) 配制10 mL脱FAD溶液($2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KBr, $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素, 溶剂: Tris-HCl缓冲液)。
- (2) 取一定体积的粗酶液, 用脱FAD溶液稀释至2 mL, 使得混合后样品在450 nm处的吸光度在满足Beer-Lambert定律的线性范围内。取相同体积的空载大肠杆菌破碎上清, 用脱FAD溶液稀释相同倍数, 混合均匀作为背景吸收。冰上孵育2 h。
- (3) 配制50 mL $0.200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FAD标准溶液, 用其梯度稀释配制10 mL浓度分别为0、0.0500、0.0750、0.100、0.125、0.150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的FAD标准溶液。用紫外分光光度计测定标准品和样品在450 nm的特征吸收, 制作标准曲线, 计算酶浓度^[14]。

2.3.8 光酶反应的搭建

- (1) 按照表2配制底物溶液, 取100 μL 脂肪酸的甲醇溶液, 加入4个装有磁子的玻璃制反应管中, 分别加入对应酶液与Tris-HCl缓冲液, 使反应液体积为1 mL, 酶浓度为 $5.00\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表2 底物溶液的配制

组别	<i>m</i> (油酸)/mg	<i>m</i> (反油酸)/mg	<i>V</i> (MeOH)/mL	酶液
第一组	10.11	0	1.00	WT-CvFAP
第二组	0	9.97	1.00	WT-CvFAP
第三组	10.11	0	1.00	V453E-CvFAP
第四组	0	9.97	1.00	V453E-CvFAP

- (2) 将反应管置于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中, 45 W蓝光照射, 120 rpm磁力搅拌反应1 h。
- (3) 反应完毕后, 将反应液转移至2 mL EP管中。向EP管中加入980 μL MTBE, 20 μL $2\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 正十二烷的MTBE溶液, 振荡混合均匀。
- (4) 转速12000 rpm, 离心2 min。取出上层有机相, 加入无水硫酸钠干燥15 min。离心, 取200 μL 上清用于GC-MS(或GC)分析。

2.3.9 内标法绘制底物的标准曲线

分别配制1 mL油酸/反油酸浓度为0、2、4、6、8、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MTBE溶液, 分别加入20 μL $2\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 正十二烷的MTBE溶液。分别用GC-MS(或GC)做油酸和反油酸的标准曲线。

3 结果与讨论

3.1 分子对接结果分析

对接结果显示底物的双键位置与酶453位氨基酸残基非常接近, 说明酶453位的突变很可能改变酶的反应性和选择性。得到分子对接图像后, 分别测量油酸和反油酸羧基氧原子和野生型酶、突变体酶中FAD中的N5原子之间的最小距离(如表3所示), 分析可知野生型酶与油酸和反油酸的距离大致相近(如图4)。而突变体酶与油酸和反油酸的距离却不相同, 油酸的最小距离为5.1 Å ($1\text{ Å} = 0.1\text{ nm}$)左右, 反油酸的最小距离为4.5 Å左右(如图4)。突变体酶与反油酸距离更近, 单电子氧化活性更高, 可能有更高的选择性。

表3 底物羧基氧和FAD中的N5原子之间的距离

底物	酶	$d^*/\text{\AA}$
油酸	野生型	5.3
反油酸	野生型	5.2
油酸	突变体	5.1
反油酸	突变体	4.5

*羧基O与FAD N5距离

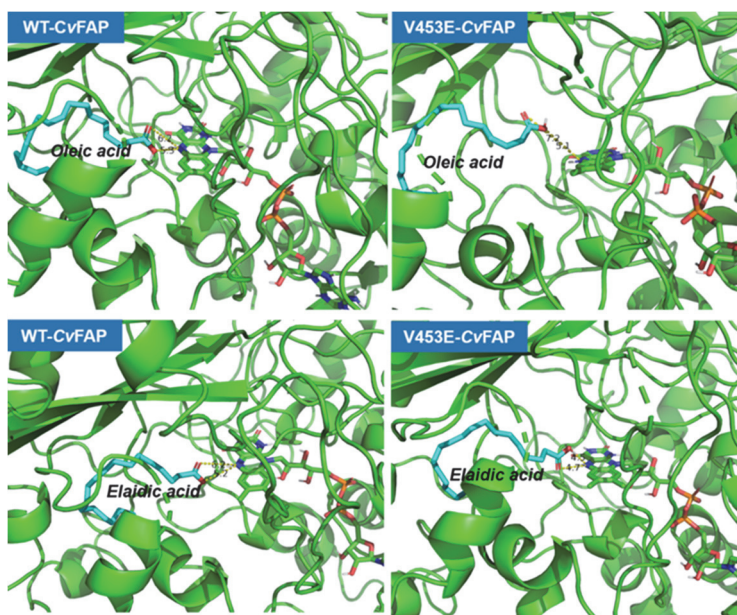


图4 AutoDock Vina分子对接结果

3.2 酶浓度测定

反应采用粗酶液直接进行催化,含有一定量的杂蛋白,故不能采用常规蛋白质定量方法测定酶浓度。FAD为脂肪酸光脱羧酶的辅基,且FAD在450 nm存在特征吸收,因此可以使酶脱出FAD辅基,再测其在450 nm的特征吸收,并扣除相同条件下培养的空载大肠杆菌的破碎上清在450 nm处的吸光度,通过FAD标准曲线(如图5)测定酶浓度^[14]。

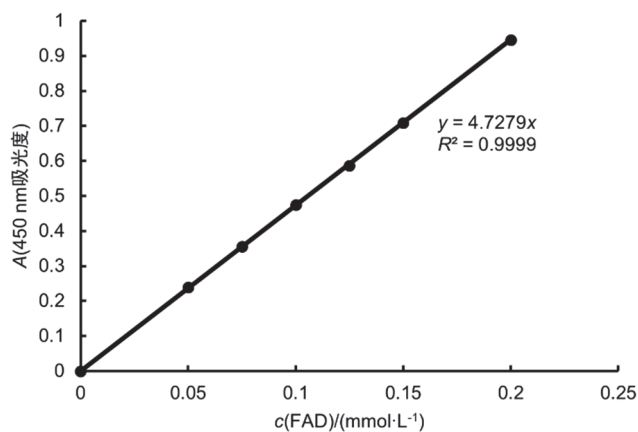


图5 FAD标准曲线

实验结果如表4所示。

表4 粗酶浓度的测定^a

酶液	A^b	A_0^c	$A - A_0$	$c(\text{FAD})/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$c(\text{粗酶})/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$
WT-CvFAP	0.742	0.647	0.095	0.0201	0.100
V453E-CvFAP	0.764	0.647	0.117	0.0247	0.124

^a粗酶液使用脱FAD溶液稀释5倍；^b粗酶液450 nm吸光度；^c空载大肠杆菌450 nm吸光度

3.3 萃取方式探究

根据反应液的性质，需要选用合适的萃取剂。实验室常用的萃取剂是乙酸乙酯，但考虑到MTBE的极性小于乙酸乙酯，对长链脂肪烃、长链脂肪酸的萃取效果更佳，因此本实验使用MTBE做萃取剂。

3.4 反应后物质定性定量探究

该反应为微量反应，且脂肪酸与烃类分离较为复杂，故采用GC-MS/GC进行分析。对于产物的分析，从定性的角度，质谱显示反应主产物为顺/反-8-十七烯，和预期产物一致。从定量的角度，由于主产物获取成本高，故以原料油酸和反油酸作标准曲线(如图6、7)，以正十二烷为内标，通过计算底物的剩余量，得到底物的转化率 α 。

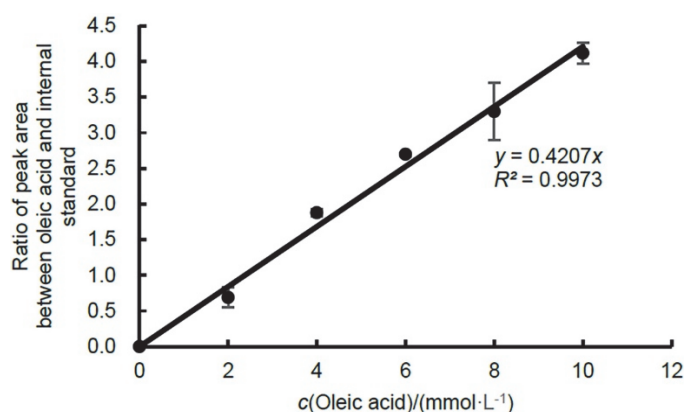


图6 油酸标准曲线

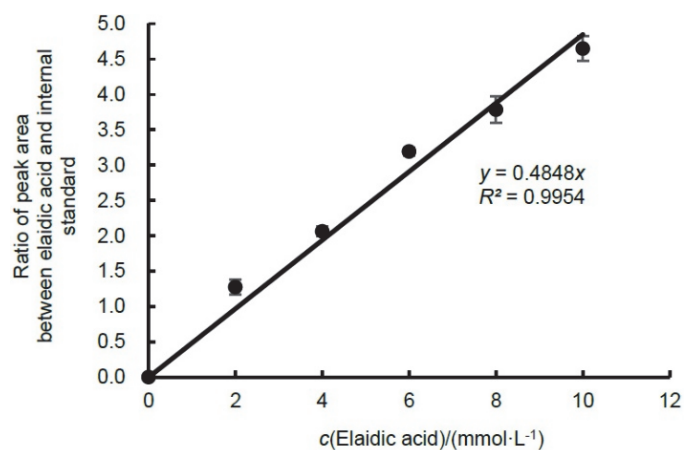


图7 反油酸标准曲线

3.5 酶用量的探究

光酶催化反应的结果往往与酶浓度密切相关。当使用浓度为50.0 μmol·L⁻¹的酶液搭建反应时，突变体酶对油酸和反油酸均有很强的催化效果。因而需要对酶液进行稀释，探索最佳酶用量。经过对突变体酶的浓度探究，得到如表5、图8的结果。

探究发现，酶浓度稀释至5.00 μmol·L⁻¹时，突变体酶对反油酸有很好的催化效果，但几乎不催化油酸脱羧，达到了选择性脱除反式脂肪酸的目的。为了统一条件，野生型酶的浓度也定为5.00 μmol·L⁻¹。野生型酶在该浓度下对油酸和反油酸均能完全催化脱羧。

表5 酶浓度的探究结果

酶液	c(酶) ^a /(μmol·L ⁻¹)	底物	c(底物) ^a /(mmol·L ⁻¹)	α ^b /%	TON ^c
V453E-CvFAP	30.0	反油酸	3.53	100	118
V453E-CvFAP	30.0	油酸	3.58	78.1	93
V453E-CvFAP	22.5	反油酸	3.53	100	157
V453E-CvFAP	22.5	油酸	3.58	50.2	80
V453E-CvFAP	10.0	反油酸	3.53	100	353
V453E-CvFAP	10.0	油酸	3.58	12.1	43
V453E-CvFAP	5.00	反油酸	3.53	97.3	697
V453E-CvFAP	5.00	油酸	3.58	3.40	26
V453E-CvFAP	2.00	反油酸	3.53	28.7	505
V453E-CvFAP	2.00	油酸	3.58	0.3	6.3
WT-CvFAP	5.00	反油酸	3.53	100	706
WT-CvFAP	5.00	油酸	3.58	100	716

^a最终反应体系中的浓度；^b底物的转化率；

^c TON，酶的转换数 = (反应物浓度×反应转化率)/酶浓度

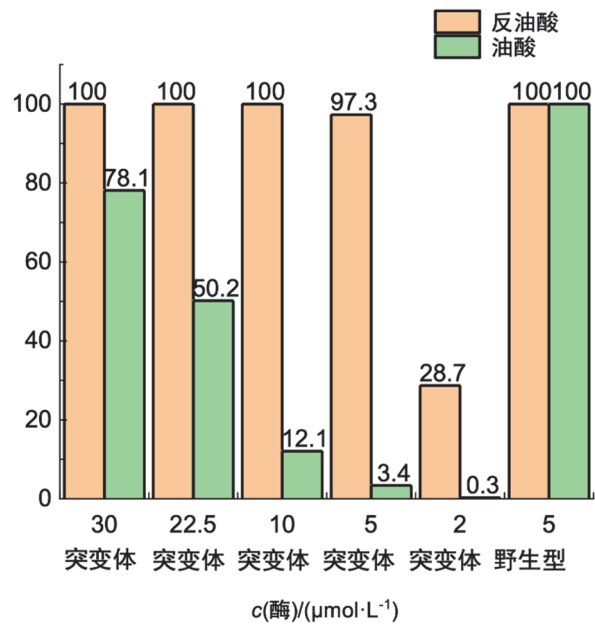


图8 酶浓度对反应转化率的影响

3.6 反应结果分析

本实验反应条件为酶液浓度 $5.00\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $30\ ^\circ\text{C}$ 水浴, 45 W蓝光照射搅拌反应1 h。当称取的油酸质量为10.11 mg ($3.58\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 反油酸质量9.97 mg ($3.53\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)时, 采用内标法分析反应物转化率, 结果如表6所示。

表6 光酶催化反应结果

酶液	$c(\text{酶})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	底物	$c(\text{底物})/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$\alpha/\%$	TON
WT-CvFAP	5.00	反油酸	3.53	100	706
		油酸	3.58	100	716
V453E-CvFAP	5.00	反油酸	3.53	97.3	697
		油酸	3.58	3.40	26

由实验结果可知, 野生型酶对油酸和反油酸都具有较强的催化效果, 没有选择性。而突变体酶几乎不催化油酸的脱羧, 只催化反油酸的脱羧, 因此可以高选择性地实现反式脂肪酸的脱羧, 实现了顺式脂肪酸的富集。

4 结语

经过对“理性改造脂肪酸光脱羧酶用于反式脂肪酸选择性脱羧”这一反应的酶用量等实验条件的探究, 得出在反应时间1 h, 酶浓度 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $30\ ^\circ\text{C}$, 蓝光照射下, 反应结束后用MTBE进行萃取、离心, 最后利用GC-MS/GC进行定性定量分析的条件下, 能够得到较好的实验结果。该实验填补了本科教学中光酶催化实验方面的空白, 其中还包括诸多化学生物学实验操作, 能够更好地锻炼本科生的实验技能。同时, 实验条件温和, 时长合适, 安全有效, 可操作性强, 从实验操作角度、反应条件、实验过程来看, 非常适合作为光酶催化技术与其他催化技术的对比教学实验。同时学生可自主设计探索实验条件和方案, 比如酶的用量、反应时间、底物混合方式等条件的变化对结果的影响, 培养学生的批判性思维。综上, 本实验适合被引入本科阶段化学综合实验教学。

致谢: 特别感谢浙江大学吴起/徐鉴团队无偿提供的菌种以及南京大学化学实验教学中心的支持。

参 考 文 献

- [1] Schmermund, L.; Jurkaš, V.; Özgen, F. F.; Barone, G. D.; Büchsenstschütz, H. C.; Winkler, C. K.; Schmidt, S.; Kourist, R.; Kroutil, W. *ACS Catal.* **2019**, *9* (5), 4115.
- [2] Amer, M.; Wojcik, E. Z.; Sun, C.; Hoeven, R.; Hughes, J. M. X.; Faulkner, M.; Yunus, I. S.; Tait, S.; Johannissen, L. O.; Hardman, S. J. O.; *et al.* *Energy Environ. Sci.* **2020**, *13* (6), 1818.
- [3] Li, D.; Han, T.; Xue, J.; Xu, W.; Xu, J.; Wu, Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (38), 20695.
- [4] Wang, Y.; Xue, P.; Cao, M.; Yu, T.; Lane, S. T.; Zhao, H. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (20), 12384.
- [5] Harrison, W.; Huang, X.; Zhao, H. *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55* (8), 1087.
- [6] Orsavova, J.; Misurcova, L.; Ambrozova, J. V.; Vicha, R.; Mlcek, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (6), 12871.
- [7] Micha, R.; Mozaffarian, D. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2009**, *5* (6), 335.
- [8] Visvalingam, J.; Vahmani, P.; Rolland, D. C.; Dugan, M. E. R.; Yang, X. *Lipids* **2017**, *52* (7), 651.
- [9] 中国营养学会. 中国居民膳食指南(2016). 北京: 人民卫生出版社, 134.
- [10] Sorigué, D.; Légeret, B.; Cuiné, S.; Blangy, S.; Moulin, S.; Billon, E.; Richaud, P.; Brugière, S.; Couté, Y.; Nurizzo, D.; *et al.* *Science* **2017**,

- 357 (6354), 903.
- [11] Sorigué, D.; Hadjidemetriou, K.; Blangy, S.; Gotthard, G.; Bonvalet, A.; Coquelle, N.; Samire, P.; Aleksandrov, A.; Antonucci, L.; Benachir, A.; *et al. Science* **2021**, 372 (6538), eabd5687.
- [12] Zhang, W.; Ma, M.; Huijbers, M. M. E.; Filonenko, G. A.; Pidko, E. A.; van Schie, M.; de Boer, S.; Burek, B. O.; Bloh, J. Z.; van Berkel, W. J. H.; *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141 (7), 3116.
- [13] Cha, H.-J.; Hwang, S.-Y.; Lee, D.-S.; Kumar, A. R.; Kwon, Y.-U.; Voß, M.; Schuiten, E.; Bornscheuer, U. T.; Hollmann, F.; Oh, D.-K.; *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59 (18), 7024.
- [14] Xu, J.; Hu, Y.; Fan, J.; Arkin, M.; Li, D.; Peng, Y.; Xu, W.; Lin, X.; Wu, Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58 (25), 8474.