## 专论 Perspectives

# 固定化羰基还原酶在连续流合成中的研究进展

胡 畔[1]，吴小凡[2,3]，黄则度[2,3]*，陈芬儿[1,2,3,4]*

（1. 武汉工程大学化工与制药学院，绿色化工过程教育部重点实验室，湖北武汉 430205；2. 复旦大学化学系，手性分子催化与合成工程中心，上海 200433；3. 上海手性药物工业不对称催化工程技术研究中心，上海 200433；4. 江西师范大学化学与材料学院，连续流动化学与工程研究院，江西南昌 330022）

**摘要**：作为绿色、环保和可持续的技术，酶固定化和连续流合成被广泛应用于有机合成。近年来，基于固定化酶的连续流生物催化受到越来越多的关注和应用，因为其有效整合了二者的优点。羰基还原酶催化潜手性酮的不对称还原是合成手性醇的有效方法之一。该文综述了固定化羰基还原酶在连续流合成中的研究进展，为开发高效、经济和可持续的连续流生物催化方法提供了参考。

**关键词**：手性醇；连续流合成；酶固定化；羰基还原酶；研究进展

**中图分类号**：TQ460.6; R914.5 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2025)04-0421-14

**引用**：胡 畔, 吴小凡, 黄则度, 等. 固定化羰基还原酶在连续流合成中的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2025, 56(4): 421-434. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.04.001

# Research Progress of Immobilized Ketoreductase in Continuous Flow Synthesis

HU Pan[1], WU Xiaofan[2,3], HUANG Zedu[2,3]*, CHEN Fener[1,2,3,4]*

(*1. Key Lab. of Green Chemical Engineering Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205; 2. Engineering Center of Catalysis and Synthesis for Chiral Molecules, Dep. of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433; 3. Shanghai Engineering Research Center of Industrial Asymmetric Catalysis of Chiral Drugs, Shanghai 200433; 4. Institute of Flow Chemistry and Engineering, College of Chemistry and Materials, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022*)

**ABSTRACT**: As environmentally benign and sustainable technologies, enzyme immobilization and continuous flow synthesis have been widely applied to organic synthesis. In recent years, immobilized enzyme based flow biocatalysis has received increasing attention and application, because it possesses the integrated advantages of the both. Ketoreductase-catalyzed asymmetric reduction of prochiral ketones is one of the most effective methods for the synthesis of chiral alcohols. This paper summarizes the research progress of immobilized ketoreductase in continuous flow synthesis, and provides certain reference for developing efficient, economic, and sustainable flow biocatalysis approaches.

**Key Words**: chiral alcohol; continuous flow synthesis; enzyme immobilization; ketoreductase; research progress



【专家介绍】黄则度，复旦大学化学系副教授，博士生导师。主要研究方向为新颖、高效的酶催化技术创制及其在重要手性药物不对称合成中的应用研究，合成生物学等。主持国家重点研发计划青年科学家项目、国家自然科学基金面上项目和青年基金等科研项目 5 项。近 5 年，以共同通信作者在 *ACS Catalysis*、*Chemical Science*、*Green Chemistry* 等期刊发表论文 20 多篇，获授权中外发明专利 16 项。入选上海市青年科技英才扬帆计划，担任 *Green Synthesis and Catalysis*、*Pharmaceutical Fronts* 及《中国医药工业杂志》等期刊的（青年）编委。

生物催化是利用分离的酶或整个微生物细胞，将底物转化为所需产物的催化方法[1]。20 世纪以来，随着环保兴起以及绿色化学及其 12 项原则的提出[2—3]，研究人员致力于寻求可持续的生产方法，并最大限度地减少废物产生。生物催化因其环保、可持续的特性，受到化学工业界的广泛关注[4—6]。羰基还原酶（ketoreductase）是以还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide，NADPH）或还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADH）为辅酶、催化还原潜手性酮生成手性醇的一类酶[7—8]，因其选择性优异和底物谱宽泛等优点，受到学术界和工业界的广泛关注。目前，羰基还原酶催化酮不对称还原的技术已成为合成手性醇及其衍生药物的首选方法。

酶的工业应用往往因合成过程中的苛刻条件而变性、失活，导致工艺稳定性欠佳；另外，游离酶在水中为均相催化剂，较难回收利用，增加了生产成本。为了解决上述问题，酶固定化技术脱颖而出，即通过吸附、包埋、亲和力结合、交联及形成共价键等固定化方法[9]，将生物催化剂固定在特定载体上。固定化酶催化反应后，反应介质可通过沉降或过滤方法简便地与固定化酶分离，实现循环再利用。固定化酶还可以提高生物催化剂在苛刻反应条件下的稳定性[10]，且同样适用于非水相反应，扩大了应用范围。

近年来，流动化学发展迅速，连续流反应器可实现高效传热、传质[11]。连续流反应是将含有物料的溶液通过管道和 / 或微通道（孔径为毫米级甚至微米级），连续泵送至反应器进行的化学反应[12—15]。连续流技术可将不同反应步骤的流动组分连接或直接串联到下一步骤，并实施在线分离及后处理，最终实现连续制造[16—22]。其中，泵送系统可精准地控制反应条件，并实时在线优化，最大限度地提高效率[23—25]。此外，封闭式的反应体系可更好地处理危险化合物[26—29]；反应组分的混合更均匀，更有利于反应进行[30]。

固定化酶与连续流技术相结合已成为绿色化学和可持续化学的发展新方向。连续流生物催化避免了机械搅拌力对固定化载体的冲击，提高了固定化酶的稳定性；同时，实现了酶的回收及循环利用，大大降低了生产成本。本文按照不同的固定化方法，归纳了固定化羰基还原酶在连续流合成中的应用研究进展，为开发更高效、经济和可持续的连续流生物催化方法提供参考。

## 1　通过吸附法制备的固定化羰基还原酶在连续流合成中的应用

吸附固定化方法主要依靠物理吸附将羰基还原酶固定在载体上，是一种可逆的固定化方法[9]。常见的用于吸附的固定化载体包括离子交换树脂、氧化铝、活性炭等[31]。吸附固定化羰基还原酶仅需较少的操作步骤，所用试剂少，是一种经济、简单的固定化方法[9]。

2020 年，POZNANSKY 等[32]报道可在 4 ℃用吸附法将乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）和甲酸脱氢酶（formate dehydrogenase，FDH）通过简单吸附共固定在炭载体上，无需进一步修饰载体或酶，并且可用得到的固定化酶将丙酮酸（**1**）催化还原为乳酸（**2**），成功应用于连续流反应中（图 1）。LDH 和 FDH 的固定化产率分别达 99%和 82%。这项研究中，选用了 Black Pearls 2000 微粒为固定化载体，这是一种无定型炭黑材料，可聚集形成具有高纳米级孔隙率的较大聚集体。

研究人员将固定化酶与玻璃珠（直径 1 mm）混合并填充至玻璃柱（内径 6.6 mm）中，作为填充床反应器，有效增加了反应器中固体载体的体积。这对于在泵的流速范围内实现 10 ～ 30 min 的理想保留时间至关重要。另外，在填充床反应器中使用与

**收稿日期**：2024-10-31

**基金项目**：国家重点研发计划项目（2021YFA0911400）、国家自然科学基金（22071033、21801047）

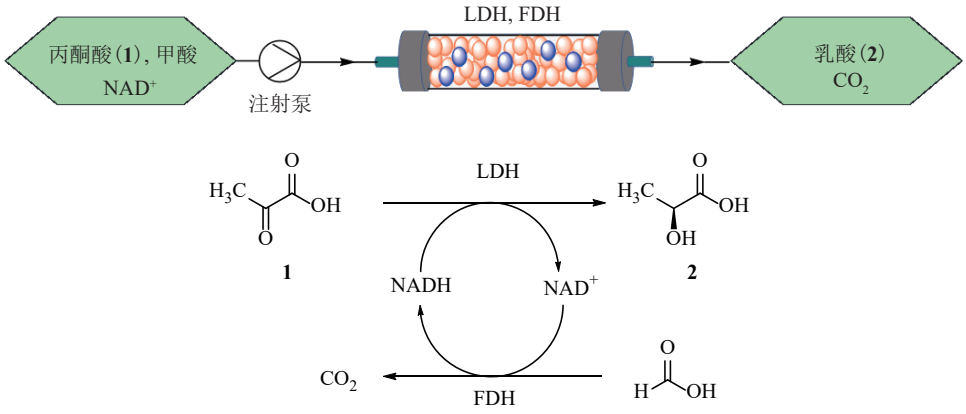
**项目作者简介**：胡　畔（1986—），男，博士研究生，专业方向：生物化工。

**通信作者**：黄则度（1986—），男，副教授，博士生导师，从事生物催化及合成生物学研究。

E-mail：huangzedu@fudan.edu.cn

陈芬儿（1958—），男，中国工程院院士，教授，博士生导师，从事精细有机化工原料药制造技术及工程化的研究。

E-mail：rfchen@fudan.edu.cn




注：$NAD^+$ 为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide）

**图 1 生物催化丙酮酸转化为乳酸的连续流工艺**

Fig.1 Biocatalytic Conversion of Pyruvic Acid to Lactate in Continuous Flow Process

非均相催化剂混合的基质材料（玻璃珠），是降低反应体系压降的常用方法，尤其是在催化剂颗粒非常小的情况下。连续流反应采用含有底物丙酮酸钠、辅酶 $NAD^+$ 和甲酸钠的 Tris-HCl 缓冲液的单一液体进料模式，在最佳反应条件下实现了底物（50 mmol）的完全转化。同时对连续流系统进行了连续运行考察，在运行 30 h 后，仍然保持 100%的转化率。另外，在相同的反应参数下比较了釜式反应的效率，结果其 24 h 转化率为 96%，略低于连续流反应。釜式反应得的时空产率为 0.23 g·(L·h)$^{-1}$，而连续流反应的时空产率为 11.2 g·(L·h)$^{-1}$，是前者的 48.7 倍。该结论提示扩大固定化酶在连续流合成中的应用可实现更高的生产效率。

2021 年，PORCAR 等[33]报道了将来自红球菌（*Rhodococcus ruber*）的醇脱氢酶（alcohol dehydrogenases，ADH，同样能催化醇和酮 / 醛之间的相互转化，与羰基还原酶功能相同），通过简单吸附作用固定在负载离子液体相（supported ionic liquid-like phases，SILLP）上的方法。这种固定化方法能将烷基咪唑基团接枝到高负载的 Merrifield 凝胶型树脂［凝胶型聚苯乙烯 - 二乙烯基苯（divinylbenzene，DVB），交联度 2%，2% DVB］上，同时用亲水性的氯离子制备得到固定化载体[34—35]（图 2）。

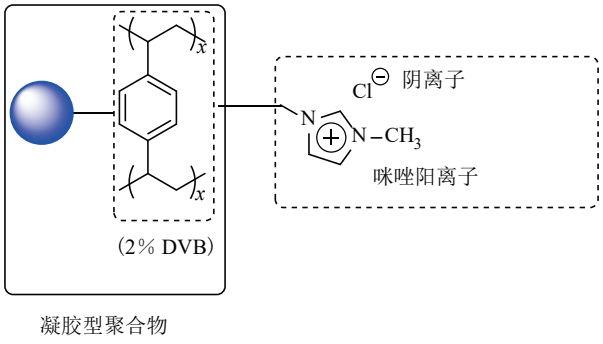



**图 2 固定化载体 SILLP-Cl**

Fig.2 The Immobilized Carrier SILLP-Cl

将载体与 ADH 冻干细胞的水悬浮液孵育，使表达 ADH 的冻干细胞简单吸附到 SILLP 上，可得到固定化酶。基于不同的 SILLP 负载模式、咪唑鎓取代和阴离子性质，可调节相应生物催化剂的效率。使用基于亲水性阳离子（咪唑鎓阳离子）和阴离子（氯离子）的高负载树脂（ADH-SILLP-Cl），对模板底物苯乙酮（**3a**）进行催化还原，可得目标产物（*S*）-*α*-苯乙醇（**4a**），转化率 88%，*ee* 值大于 99%。ADH-SILLP-Cl 体系可将不同的芳香族和脂肪族酮还原为相应的手性醇（图 3），转化率较高（60%～88%），选择性优异（*ee* 值大于 99%）。此外，该体系对有机溶剂的耐受性较强，如在 DMSO 和水（体积比 30 ∶ 70）的环境中，固定化酶仍保留了 78%的活性。

ADH-SILLP-Cl 体系用于连续流反应，转化率约

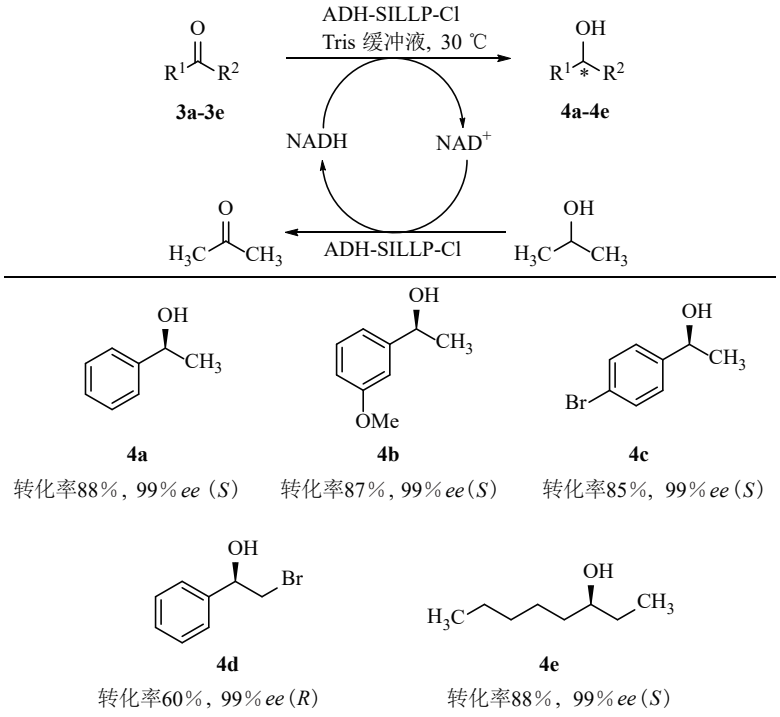



**图 3　ADH-SILLP-Cl 体系对不同酮底物进行立体选择性还原的反应结果**

Fig.3　Results of Stereoselective Bioreduction of Different Ketone Substrates using ADH-SILLP-Cl

90%，与釜式反应下的转化率相当（图 4）[33]。连续流反应的时空产率［22.6 g·(L·h)$^{-1}$］远高于釜式反应［2.0 g·(L·h)$^{-1}$］，再次证明固定化酶在连续流反应中的运用有助于提高生产效率。

该系统显示出良好的稳定性。在至少 5 d 的连续使用后仍保持了约 70%的转化率；固定化酶在室温贮存 12 d 后转化率仍高达 87%，贮存 25 d 后转化率为 68%。值得注意的是，SILLP 作为非传统的固定化材料在固定化羰基还原酶的研究中展现出优异性能，为连续流生物催化提供了新的研究方向。

## 2　通过包埋法制备的固定化羰基还原酶在连续流合成中的应用

包埋法是一种不可逆的固定化过程，是通过共价或非共价键方式将酶限制在具有晶格结构或聚合物膜的载体材料或纤维内 [36—37]。包埋法允许反应内容物（底物或产物）在固定化酶中自由进出 [38]。在包埋法中，酶不与固定化载体反应，因此保留了大部分活性。

2021 年，陈芬儿课题组 [39] 报道采用包埋法成功地将羰基还原酶 (KRED) 和开菲尔乳杆菌来源的醇脱氢酶 (*Lactobacillus kefiri* alcohol dehydrogenase，*Lk*ADH) 共固定到 PVA 颗粒中。获得的固定化酶 KRED/*Lk*ADH@PVA 不仅表现出高催化活性，而且具有优异的物理和机械稳定性，可以循环使用至少 6 次。此外，还发现 KRED/*Lk*ADH@PVA 可耐受高达 234 g/L 的底物浓度，是游离酶的 2.34 倍。最后，将 KRED/*Lk*ADH@PVA 填入固定床反应器中，与在线微流体液 - 液萃取和膜分离单元耦合，以 3- 羰基 -5- 己烯酸叔丁酯 (**5**) 为起始物，开发了合成他汀类药物关键手性中间体 (3*R*)-3- 羟基 -5- 己烯酸叔丁酯 (**6**) 的连续流工艺（图 5）。与釜式反应相比，该连续流合成在连续操作 24 h 后，分离收率达 93%，立体选择性极佳 (*ee* 值 >99.9%)，时空收率为 22.03 g·(L·h)$^{-1}$。

值得指出的是，在该项研究中，研究人员用傅里叶变换红外光谱仪在线监测和 GC-MS 分析对连续流反应进行了快速优化，并且采用连续多级逆流萃取和膜分离技术，大大降低了萃取溶剂和能量的消耗，最大限度地提高了整体工艺效率。该研究为他

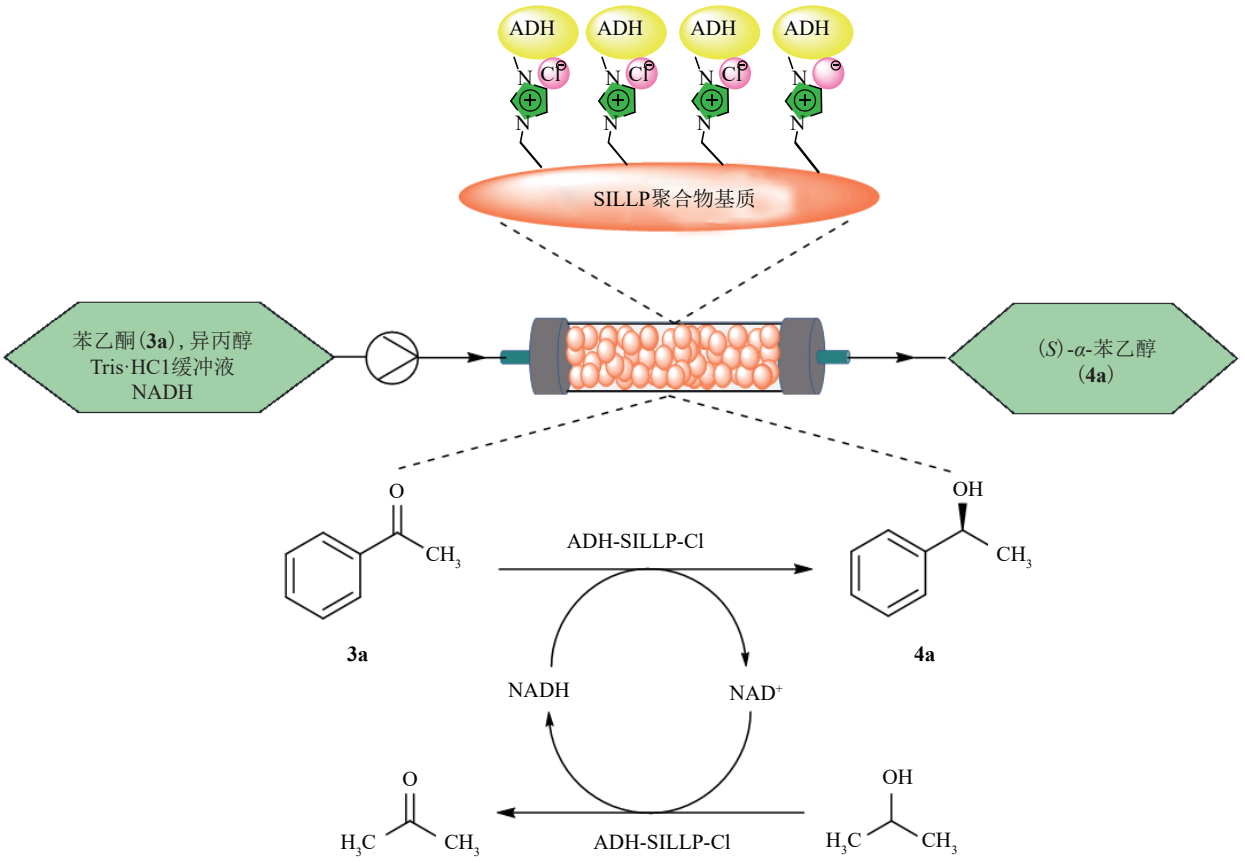
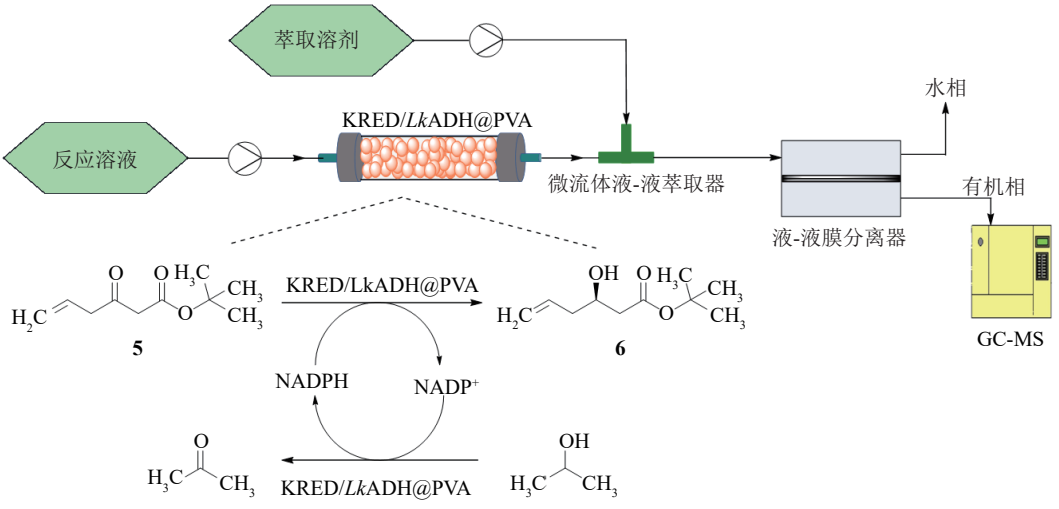



**图 4 连续流工艺中使用 ADH-SILLP-Cl 对苯乙酮进行立体选择性还原**

Fig.4 Stereoselective Bioreduction of Acetophenone using ADH-SILLP-Cl in Continuous Flow Process




注 :$NADP^+$ 为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate）

**图 5 KRED/*Lk*ADH@PVA 催化还原的连续流反应**

Fig.5 KRED/*Lk*ADH@PVA Catalyzed Reduction in Continuous Flow

汀类药物的绿色制造提供了可行的连续流工艺。

2023 年，CHEN 等[40]报道通过包埋法将源自嗜热厌氧菌（*Thermoanaerobacter brockii*）的羰基还原酶（*Tb*SADH）和辅因子 NADPH，在 3- 甲基 -1,2,4- 三唑（3-methyl-1,2,4-triazole，Hmtz）和镁离子的作用下制成多孔粗酶组装水凝胶固定化酶（图 6，图片使用已取得授权）。首先将粗酶液（crude enzyme）和 Hmtz 混合，进行预凝胶化，再进一步与 $Mg^{2+}$ 混合，随后进行凝胶化。通过调整延迟环的长度以控制生长时间，从而确保进入微反应器的凝胶颗粒尺寸适合在通道中原位堆叠。预凝胶化 15 min 后再凝胶化 120 min，可在微通道中成功生成粗酶液的水凝胶（crude enzyme assembled hydrogels，cEAG）单体。再将阀门切换至 NADPH 通道，将辅因子泵送至 cEAG 单体内，得到 NADP@cEAG 单片微反应器（图 7，图片使用已取得授权）。

单片微反应器的特征尺寸取决于形成的单片孔结构，而不是通道尺寸[41]。酶和辅因子共固定化的方法为流动生物催化提供了新的技术改进方向，无需额外的载体材料或拆卸反应器，并且可通过流动进料补充酶或辅因子的损失。在用 NADP@cEAG 单片微反应器进行的连续流生物催化还原 **3a** 的反应中，可在 10 μL/min 的流速下合成（*R*）- 苯乙醇，转化率 94.8%，*ee* 值大于 99%，时空产率 46.3 $g·(L·h)^{-1}$。于 25 ℃贮存 30 d 后，粗酶液和 $NADP^+$ 混合物的残余活性仅 42.18%，而在相同条件下 NADP@cEAG 的残余活性高达 88.76%，表明固定化酶和辅因子在水凝胶状态下的稳定性得到显著提升。在连续运行 12 h（160 个反应器体积）后，$NADP^+$ 的总周转数超过 4 800，是同一反应中使用游离辅因子周转数的 7.6 倍。由此可见，NADP@cEAG 单片微反应器在连续流合成中对辅因子的高效使用具有突出优势，为辅因子依赖型生物催化反应提供了新的思路。

## 3　通过亲和力结合制备的固定化羰基还原酶在连续流合成中的应用

亲和固定化是利用酶在不同条件下对固定化载体的特异性识别，发生亲和偶联而与载体结合[42]。亲和固定化通常利用聚合物表面上的螯合基团与预加载的金属离子（如 $Ni^{2+}$、$Zn^{2+}$、$Fe^{2+}$、$Co^{2+}$ 和 $Cu^{2+}$ 等）产生亲和力。金属离子对酶表面的组氨酸基团具有强亲和力，因此制备的固定化酶具有高固定化产率和增

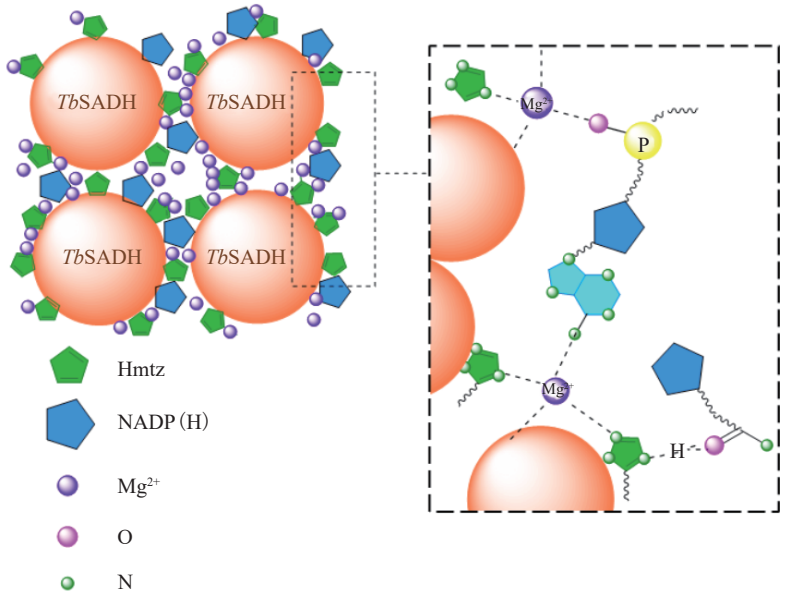



**图 6　NADP@cEAG 的组成及其对 NADP（H）的束缚作用示意图**[40]

Fig.6　Schematic Diagram of the Composition of NADP@cEAG and Its Tethering Effect on NADP (H)[40]

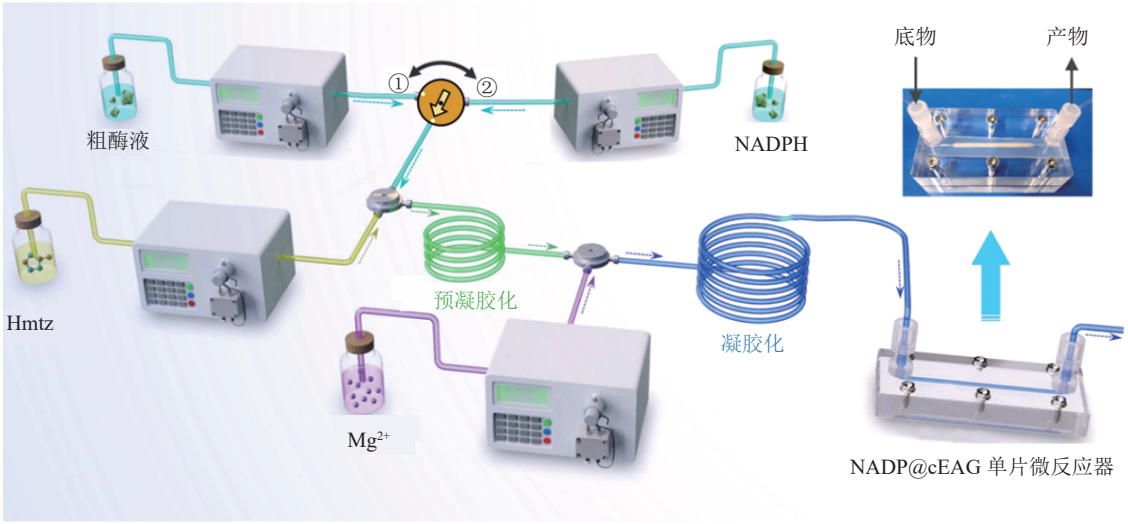



**图 7 NADP@cEAG 单片微反应器制备示意图** [40]

Fig.7 Schematic Overview of the Preparation of NADP@cEAG Monolithic Chip Microreactor[40]

加酶活性的优点[43]。通过亲和力进行的结合是可逆的，常用于酶的纯化[44]。重组蛋白的 N 端或 C 末端含有 6 ～ 9 个连续的组氨酸残基，即 His 标签，因此酶在特定缓冲条件下能够将 His 标签中的组氨酸咪唑基团结合到固定的过渡金属离子上[45]。

2019 年，PESCHKE 等[46]报道将含 His 标签的源自短乳杆菌的高立体选择性醇脱氢酶（*Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase，*Lb*ADH）与葡萄糖脱氢酶（glucose dehydrogenase，GDH）相结合来实现辅因子的连续再生，并在装载酶功能化磁珠的小型填充床反应器中开展连续流生物催化反应。利用 His/$Co^{2+}$ 系统可以简单地将 *Lb*ADH 和 GDH 通过亲和力结合到超顺磁性微珠（magnetic beads，MB）上，制得固定化酶 His-*Lb*ADH@MB-$Co^{2+}$ 和 GDH-His@MB-$Co^{2+}$。随后，将磁珠悬浮液注入隔室微流体填充床反应器（图 8，图片使用已取得授权）中，该反应器包含 1 个聚甲基丙烯酸甲酯（polymethylmethacrylate，PMMA）材质的芯片，芯片内有 4 个微通道，每个通道的体积约为 10 μL，可以方便地装载酶功能化超顺磁性微珠。

芯片内每个通道均装有 4.5 mg 的上述微珠混合物，其中含有 0.5 mg 的 His-*Lb*ADH@MB-$Co^{2+}$ 和 4 mg 的 GDH-His@MB-$Co^{2+}$，以 5- 硝基壬烷 -2,8- 二酮（**7**）为底物进行连续流反应（图 9）。

30 ℃下，该反应器以 1 μL/min 的流速连续运行 109 h，能高立体选择性地合成（2*R*,8*R*）-5- 硝基壬

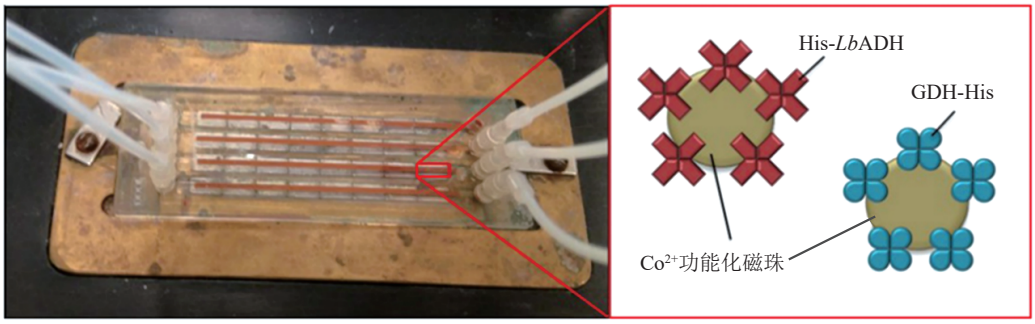



**图 8 隔室微流体填充床反应器** [46]

Fig.8 Compartmentalized Microfluidic Packed-bed Reactor[46]

烷 -2,8- 二醇（**8**）（*dr* 值为 99 ∶ 1），平均转化率大于 90%。在运行过程中未发现结合蛋白泄漏，表明基于亲和力结合的固定化酶微反应器具有较高的工艺稳定性。

## 4　通过共价结合制备的固定化羰基还原酶在连续流合成中的应用

共价结合是指酶蛋白与载体材料以共价键的形式高度稳定、牢固地结合，是一种不可逆的固定化方法，技术相对成熟[9]。这种方法得到的固定化酶即使在高浓度底物或强缓冲溶液的环境中，发生酶泄漏的可能性也很低。共价结合的方式提高了酶的稳定性，所得产物可回收利用[47]。

ARMANI 等[48]报道将某商业化羰基还原酶（EMIN028）固定化后作为生物催化剂，在（*S*）-1-[3,5- 二（三氟甲基）苯基]乙醇[（*S*）-1-[3,5-*di*(trifluoromethyl)phenyl]ethanol，（*S*）-BTPE，**10**]的不对称合成中具有高效催化作用。止吐药卡索匹坦（casopitant）可用于治疗化疗和术后引起的恶心和呕吐，而（*S*）-BTPE 是其合成的关键中间体。此外，（*S*）-BTPE 也是合成对预防和 / 或治疗免疫疾病具有显著作用的降脂新药前蛋白转换酶枯草杆菌蛋白酶 / kexin 9 型（proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9，PCSK9）抑制剂的关键中间体[49]。

研究人员选择了 5 种不同的市售载体进行固定化研究。其中，短链氨基官能化树脂 ECR8309M 与 EMIN028 共价结合所得的固定化酶在 4 ℃贮存条件下显示出了较高的稳定性，在贮存 15 d 后仍保持高达 88%的活性；而游离酶贮存 3 d 后仅有 25%的残留活性，15 d 后完全失活。在釜式反应中，5 种载体制备的固定化酶在 5 h 内的转化率均高于 85%，并在 24 h 后完成转化。固定在氨基官能化树脂上的 EMIN028 表现出较佳性能，3 h 内可实现底物［3,5- 二（三氟甲基）苯乙酮，BTAP，**9**］的完全转化，得目标产物（*S*）-BTPE，*ee* 值大于 99%。随后，构建了由填充不同固定化酶样品的聚醚醚酮（polyetheretherketone，PEEK）柱组成的生物反应器，进行连续流反应（图 10）。结果表明，含有由短链氨基官能化树脂制备得到的固定化酶体系反应效果较佳，4 h 后转化率大于 90%，24 h 后完成完全转化，所得产物（*S*）-BTPE 的 *ee* 值大于 99%，且未发现蛋白浸出。此外，该连续流反应器能够连续运行至少 10 d，固定化酶的催化活性并未降低。

SAHLIN 等[50]报道了一种多层包裹的以二氧化硅纳米粒子为载体的固定化酶，并应用于连续流反应。以正硅酸乙酯（tetraethyl orthosilicate，TEOS）为二氧化硅前体、十六烷基三甲基氯化

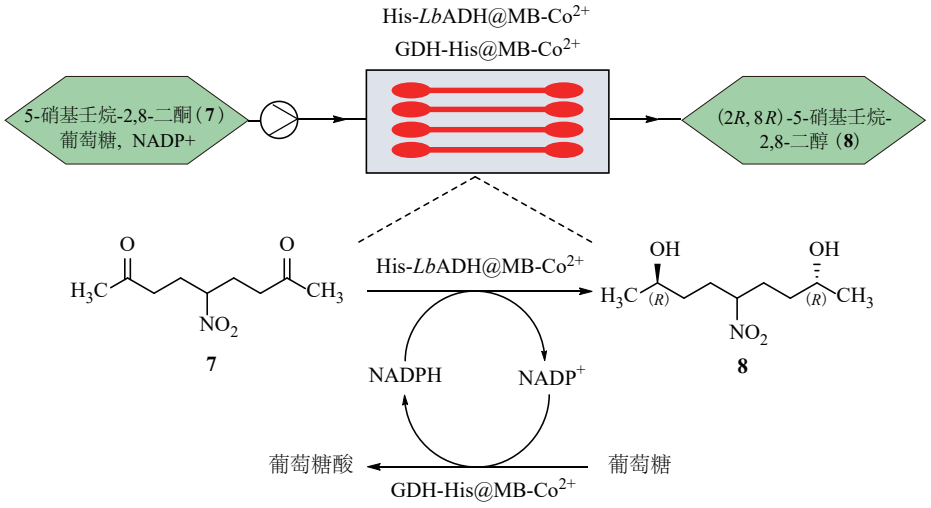



**图 9　His-*Lb*ADH@MB-Co$^{2+}$ 催化还原的连续流工艺**

Fig.9　His-*Lb*ADH@MB-Co$^{2+}$ Catalyzed Reduction in Continuous Flow Process

铵（cetyltrimethylammonium chloride，CTAC）为形成模板的表面活性剂，制备高孔隙率的介孔二氧化硅纳米粒子（mesoporous silica nanoparticle，MSN）。MSN 与（3-氨基丙基）三乙氧基硅烷［(3-aminopropyl) triethoxysilane，APTES］反应，得到表面氨基改性的 MSN-$NH_2$。然后以乙二醇-双（琥珀酸 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯）［ethylene glycol-*bis*(succinic acid *N*-hydroxysuccinimide ester)，EGS］为交联剂，形成酶支撑层，同时加入来自嗜热厌氧乙醇杆菌（*Thermoanaerobacter ethanolicus*）的醇脱氢酶突变体 TeSADH W110A，将酶以共价结合的方式固定在载体上得到 $MSN_{ENZ}$。最后，通过 TEOS 和 APTES 的作用，在外部形成保护层，再加入辅因子 $NADP^+$，制备得到包裹辅因子的固定化酶（$MSN_{ENZ\text{-}S}$），如图 11（图片使用已取得授权）所示。

在每 1 mg MSN 中固载 30 μg 的 TeSADH W110A，可保留 70%的酶活性。4 ℃下贮存 30 d，$MSN_{ENZ\text{-}S}$ 仍保留了 57 % 的活性；而 $MSN_{ENZ}$ 或游离酶 TeSADH W110A 则完全丧失活性。这一结果首次证明，屏蔽有机硅层对酶具有稳定作用。随后，将该固定化酶用于釜式反应，以底物苄基丙酮（**11**）为例，考察了采用 4 种溶剂（甲基叔丁醚、乙酸乙酯、甲苯和庚烷）时的转化率，结果分别为 90%、20%、74%和 98%。上述结果表明溶剂对反应效率具有重要影响。一般，溶剂的疏水性越强，纳米生物催化剂的催化效率越高[51]。然而，甲基叔丁醚是个例外，其转化率高于甲苯。这可能归因于酶附近储水器的存在，以及有机硅层维持了酶的三维结构。随后，将 140 mg 的 $MSN_{ENZ\text{-}S}$ 填入 831 μL 的填充床反应器中，进行连续流反应研究（图 12）。在含 **11**（30 mmol）和异丙醇（3 mol）的甲基叔丁基醚体系中，以 10 μL/min 的流速进行反应，可高立体选择性（*ee* 值 98%）地得到（*S*）-(+)-4-苯基-2-丁醇（**12**），转

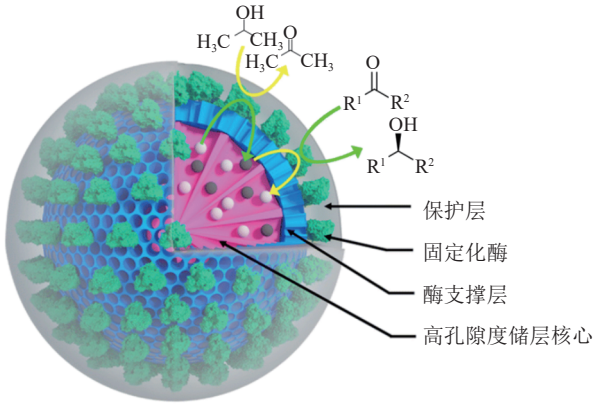



**图 11 固定化酶 $MSN_{ENZ\text{-}S}$ 的示意图**[50]

Fig.11 Schematic Diagram of $MSN_{ENZ\text{-}S}$[50]

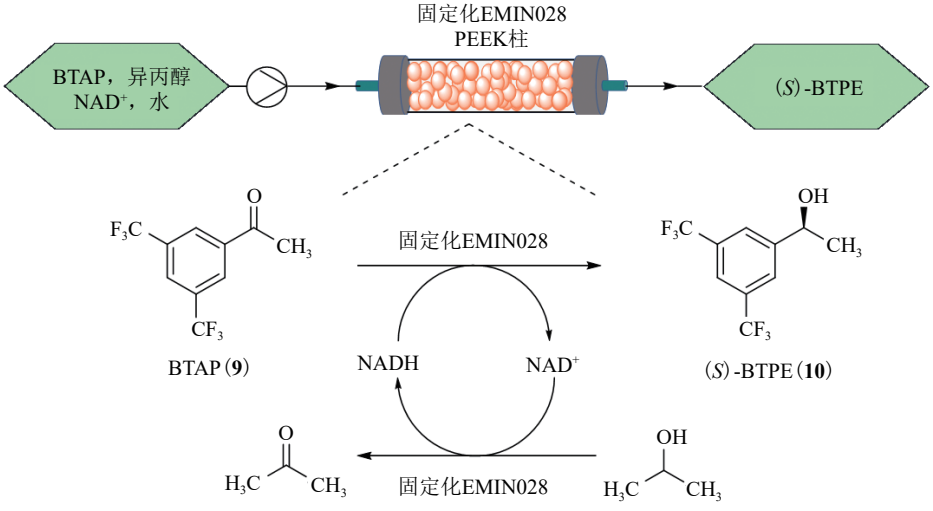



**图 10 生物催化 BTAP 转化为（*S*）-BTPE 的连续流反应**

Fig.10 Biocatalytic Conversion of BTAP to (*S*)-BTPE in Continuous Flow

化率达 98%。

WILLIAMS 等[52]报道了通过共价结合的方法，将源自巴氏醋杆菌（*Acetobacter pasteurianus* 386B）的羰基还原酶 *ap*KRED-9 固定在 2 种载体上，制得 2 种固定化酶。后将所得固定化酶分别用于合成（*R*）- 四氢噻吩 -3- 醇（**14**，是合成磺胺类抗菌药的关键中间体）的釜式反应和连续流反应。一方面以氨基官能化树脂（LX1000HA）作为载体，先用戊二醛进行活化，然后以共价结合的方式连接羰基还原酶 *ap*KRED-9，制得固定化酶 *ap*KRED-9-LX1000HA，在 50 g 级的放大反应中催化四氢噻吩 -3- 酮（**13**）生成 **14**；结果转化率大于 99%，*ee* 值大于 99.5%。另一方面，采用无载体的固定化技术，用辅因子 $NAD^+$ 富集的 PEI 进行酶的共聚集，后通过戊二醛进行交联，制得共价结合的交联酶聚集体（cross-linked enzyme aggregates，CLEA），即 *ap*KRED-9-CEP，用以催化合成 **14**；结果同样是转化率大于 99%，*ee* 值大于 99.5%。当底物负载量为 500 mg/g 时，固定化酶循环使用 10 次，转化率无明显降低。在中试规模的 *ap*KRED-9-CEP 催化釜式反应中，产物 **14** 的总收率为 76.3%，GC 纯度 99.9%，*ee* 值 99.9%。在 4 ℃长期贮存条件下，保存 5 个月的 2 种固定化酶均保持了 90% 的反应转化率。将固定化酶 *ap*KRED-9-LX1000HA 填充在夹套不锈钢柱中，用作填充床反应器进行连续流反应（图 13），在流速 0.2 mL/min、停留时间 200 min 的条件下，可稳定运行 64 h，转化率大于 98%，时空收率达 720 $g \cdot (L \cdot d)^{-1}$。

2023 年，郑裕国课题组[53]在研究来源于马克斯克鲁维酵母的羰基还原酶（*Kluyveromyces marxianus* aldo-keto reductases，*Km*AKR）和葡萄糖脱氢酶（*Bacillus megaterium* glucose dehydrogenase，*Bm*GDH）时，以戊二醛活化的氨基官能化树脂为载体，也采用共价结合的固定化方法制备固定化酶。但在共固定化过程中，*Km*AKR 的活性急剧下降。试验显示，经 PEI 修饰的树脂表面可通过静电相互作用吸附 *Km*AKR；与共价结合相比，静电吸附固定化的方法可有效减少酶活性的损失。因此，他们提出了在 PEI 功能化的非均相树脂微球上共固定 *Km*AKR 和 *Bm*GDH 的策略。先将 *Bm*GDH 固定在戊二醛修饰的树脂上，然后表面用 PEI 处理，形成一层带电荷的保护层，最后将 *Km*AKR 通过静电吸附作用固定在树脂上，得到固定化酶（*Km*AKR&*Bm*GDH@amino resin-PEI），具体如图 14 所示。该固定化酶可用于他汀类药物关键手性中间体 6- 氰基 -（3*R*,5*R*）- 二羟基己酸叔丁酯（**16**）的连续流合成研究。

将固定化酶填入玻璃管中作为填充床反应器，通过

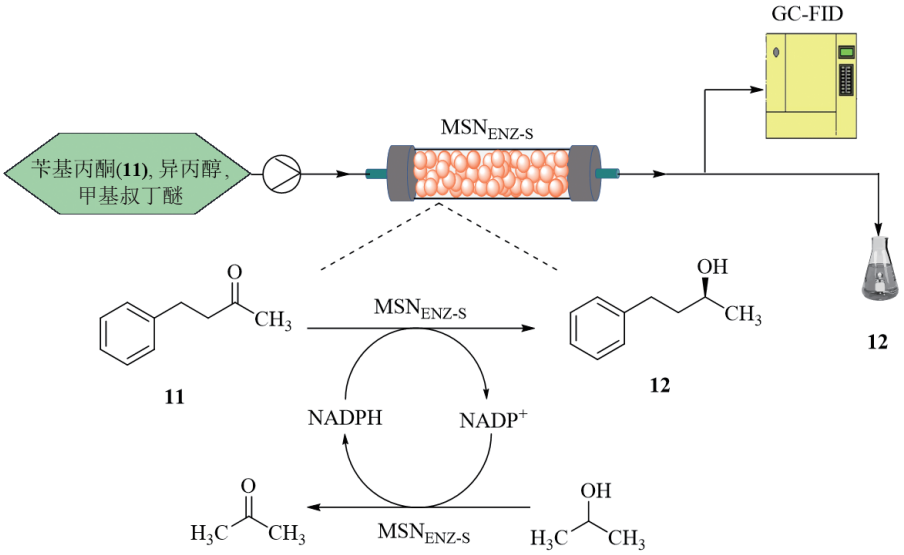



**图 12　MSN$_{ENZ-S}$ 催化还原的连续流工艺**

Fig.12　MSN$_{ENZ-S}$ Catalyzed Reduction in Continuous Flow Process

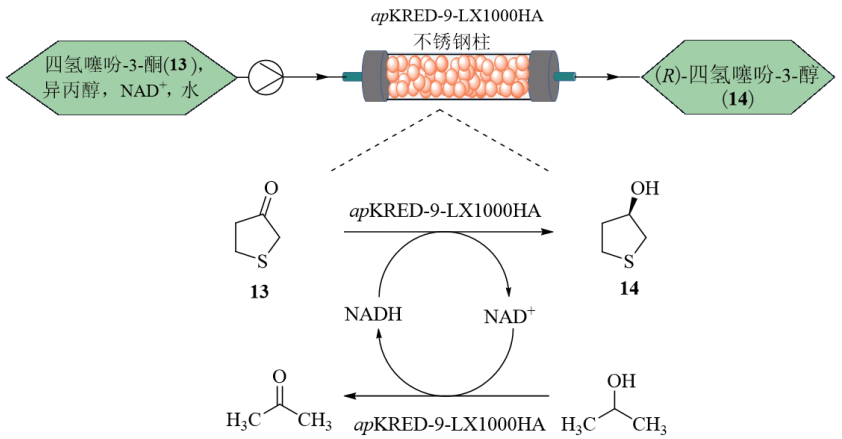



**图 13 *ap*KRED-9-LX1000HA 催化还原的连续流工艺**

Fig.13 *ap*KRED-9-LX1000HA Catalyzed Reduction in Continuous Flow Process

流速和柱体积的优化，确定了连续流反应的最佳条件（图 15）。该连续流反应的时空产率为 374.1 g·(L·d)$^{-1}$，比釜式反应提高 3.7 倍；连续运行 90 h，转化率保持在 95%以上，*de* 值大于 99.5%。这种双酶介导的

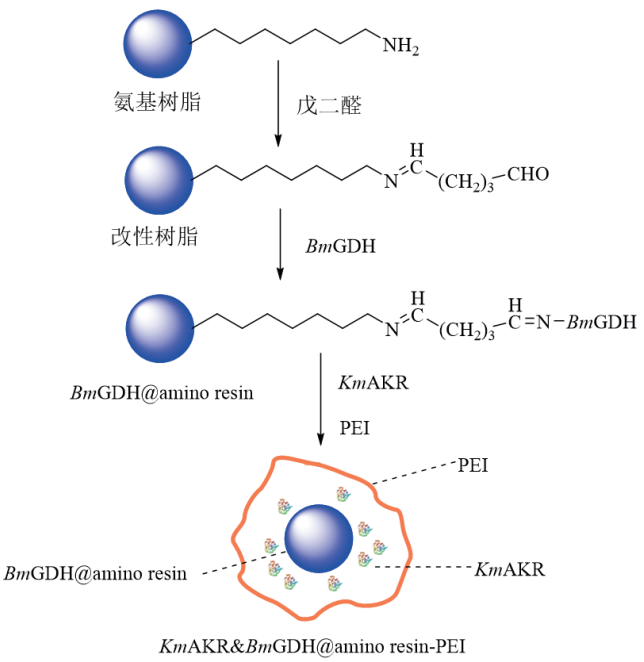



**图 14 固定化酶 *Km*AKR&*Bm*GDH@amino resin-PEI 的示意图**

Fig.14 Schematic Diagram of *Km*AKR&*Bm*GDH@amino resin-PEI

连续合成体系具有易于扩大规模的优点，在工业化生产降血脂药物阿托伐他汀上具有良好的应用前景。

## 5 结语

酶固定化与连续流的结合产生了协同效应，提供了一种高效、绿色和可持续的合成新策略。固定化可提高羰基还原酶的活性，使酶在连续流系统中的活性保持得更久，并且一次性制备的固定化酶可长期使用。随着微反应器和微通道反应的应用，反应所需的设备和场地缩小，“掌上”实验室正在兴起。

然而，酶固定化与连续流的结合还需在以下方面进行改进。①连续流生物催化反应的底物浓度往往较低，需运行很长时间才能累积一定量的产品。过低的产品浓度不利于后续分离、富集。②连续流生物催化反应的流速较低，这对多步连续流合成是个挑战。提高流速将带来压力升高等潜在问题，对固定化酶的强度和稳定性提出了更高的要求。③目前已知的连续流生物催化反应器多为填充床反应器，限制了应用范围。对于其他类型反应器（如动态管式反应器、盘管式反应器、连续搅拌式反应器和管中管式反应器等）的使用，也是今后研究的重点。④与新技术的结合应用也是完善连续流生物催化反应的重要策略。在线结晶技术、膜分离技术、在线分析技术、芯片技术、自动化和人工智能等新技术与连续流生物催化的结合，将是未来研究的发展趋势。

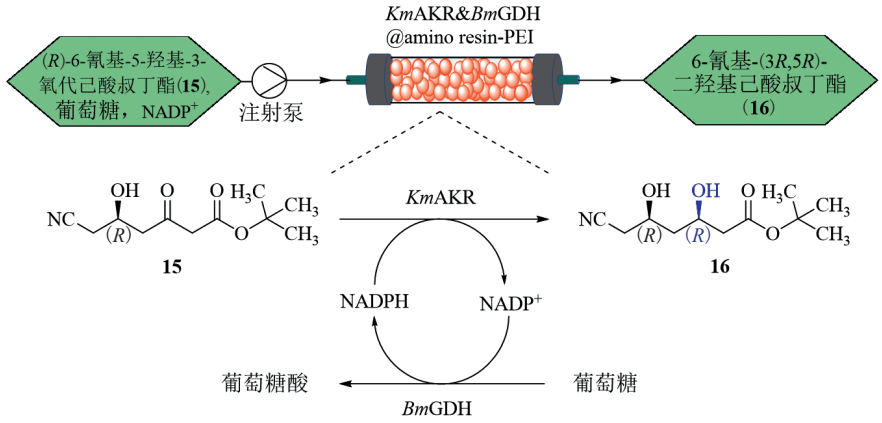



**图 15　*Km*AKR&*Bm*GDH@amino Resin-PEI 催化还原的连续流工艺**

Fig.15　*Km*AKR&*Bm*GDH@amino Resin-PEI Catalyzed Reduction in Continuous Flow Process

## 参考文献：


[1] SHELDON R A, BRADY D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope [J]. *Chem Commun*, 2018, **54**(48): 6088-6104.

[2] SHELDON R A. Why green chemistry and sustainability of resources are essential to our future [J]. *J Environ Monit*, 2008, **10**(4): 406-407.

[3] SHELDON R A. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art [J]. *Green Chem*, 2014, **16**(3): 950-963.

[4] SHELDON R A, WOODLEY J M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry [J]. *Chem Rev*, 2018, **118**(2): 801-838.

[5] ANASTAS P, EGHBALI N. Green chemistry: principles and practice [J]. *Chem Soc Rev*, 2010, **39**(1): 301-312.

[6] KRÜGER A, SCHÄFERS C, SCHRÖDER C, *et al*. Towards a sustainable biobased industry-highlighting the impact of extremophiles [J]. *N Biotechnol*, 2018, **40**: 144-153.

[7] LI Z, YANG H, LIU J, *et al*. Application of ketoreductase in asymmetric synthesis of pharmaceuticals and bioactive molecules: an update (2018-2020) [J]. *Chem Rec*, 2021, **21**(7): 1611-1630.

[8] 汤佳伟, 陈　浩, 张露文, 等. 羰基还原酶酶库的构建及其在手性醇制备中的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(9): 1337-1344.

[9] MAGHRABY Y R, EL-SHABASY R M, IBRAHIM A H, *et al*. Enzyme immobilization technologies and industrial applications [J]. *ACS Omega*, 2023, **8**(6): 5184-5196.

[10] NARAMITTANAKUL A, BUTTRANON S, PETCHSUK A, *et al*. Development of a continuous-flow system with immobilized biocatalysts towards sustainable bioprocessing [J]. *React Chem Eng*, 2021, **6**(10): 1771-1790.

[11] LI J H, ZHOU Y B, ZHOU H Q, *et al*. Continuously stirred tank reactor for pharmaceutical and chemical applications [J]. *Pharmaceut Fronts*, 2024, **6**(4): e382-e393.

[12] THOMPSON M P, PEñAFIEL I, COSGROVE S C, *et al*. Biocatalysis using immobilized enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemicals [J]. *Org Process Res Dev*, 2018, **23**(1): 9-18.

[13] SHELDON R A, PELT S V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how [J]. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(15): 6223-6235.

[14] HARTMAN R L, MCMULLEN J P, JENSEN K F. Deciding whether to go with the flow: evaluating the merits of flow reactors for synthesis [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2011, **50**(33): 7502-7519.

[15] JENSEN K F. Flow chemistry-microreaction technology comes of age [J]. *AIChE J*, 2017, **63**(3): 858-869.

[16] GÉRARDY R, MORODO R, ESTAGER J, *et al*. Sustaining the transition from a petrobased to a biobased chemical industry with flow chemistry [J]. *Top Curr Chem*, 2018, **377**(1): 1.

[17] GéRARDY R, DEBECKER D P, ESTAGER J, *et al*. Continuous flow upgrading of selected $C_2$-$C_6$ platform chemicals derived from biomass [J]. *Chem Rev*, 2020, **120**(15): 7219-7347.

[18] 高 锋, 戴佳炜, 王俊峰, 等. 氯沙坦的连续流合成工艺研究[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(7): 1060-1064.

[19] 张 振, 肖雯婷, 郭艳丽, 等. 连续流微反应器在盐酸伊伐布雷定关键中间体合成中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(10): 1433-1435.

[20] ADAMO A, HEIDER P L, WEERANOPPANANT N, *et al*. Membrane-based, liquid-liquid separator with integrated pressure control[J]. *Ind Eng Chem Res*, 2013, **52**(31): 10802-10808.

[21] YANG L, WEERANOPPANANT N, JENSEN K F. Characterization and modeling of the operating curves of membrane microseparators[J]. *Ind Eng Chem Res*, 2017, **56**(42): 12184-12191.

[22] KHOSITANON C, ADPAKPANG K, BUREEKAEW S, *et al*. Continuous-flow purification of silver nanoparticles and its integration with flow synthesis[J]. *J Flow Chem*, 2020, **10**(1): 353-362.

[23] 杨曦林, 苏为科, 罗贵华, 等. *N*-苄基-对甲苯磺酰胺的连续流合成工艺的贝叶斯优化[J]. 中国医药工业杂志, 2024, **55**(5): 652-657.

[24] ZHANG Y, SU W K. A review of inline infrared and nuclear magnetic resonance applications in flow chemistry[J]. *Pharmaceut Fronts*, 2023, **5**(4): e209-e218.

[25] SHEN R, SU W K. A review of the applications of artificial intelligence in the process analysis and optimization of chemical products[J]. *Pharmaceut Fronts*, 2023, **5**(4): e219-e226.

[26] ALFANO A I, PELLICCIA S, ROSSINO G, *et al*. Continuous-flow technology for chemical rearrangements: a powerful tool to generate pharmaceutically relevant compounds[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2023, **14**(3): 326-337.

[27] HOCK K J, KOENIGS R M. The generation of diazo compounds in continuous-flow[J]. *Chem Eur J*, 2018, **24**(42): 10571-10583.

[28] O'MAHONY R M, LYNCH D, HAYES H L D, *et al*. Exploiting the continuous in situ generation of mesyl azide for use in a telescoped process[J]. *Eur J Org Chem*, 2017, **2017**, (44): 6533-6539.

[29] ZHU R, ZHOU Y B, ZHOU H Q, *et al*. The application of peroxide for organic synthesis in continuous flow chemistry[J]. *Pharmaceut Fronts*, 2023, **5**(4): e243-e253.

[30] PLUTSCHACK M B, PIEBER B, GILMORE K, *et al*. The hitchhiker's guide to flow chemistry[J]. *Chem Rev*, 2017, **117**(18): 11796-11893.

[31] JESIONOWSKI T, ZDARTA J, KRAJEWSKA B. Enzyme immobilization by adsorption: a review[J]. *Adsorpt*, 2014, **20**(5): 801-821.

[32] POZNANSKY B, THOMPSON L A, WARREN S A, *et al*. Carbon as a simple support for redox biocatalysis in continuous flow[J]. *Org Process Res Dev*, 2020, **24**(10): 2281-2287.

[33] PORCAR R, LAVANDERA I, LOZANO P, *et al*. Supported ionic liquid-like phases as efficient solid ionic solvents for the immobilisation of alcohol dehydrogenases towards the development of stereoselective bioreductions[J]. *Green Chem*, 2021, **23**(15): 5609-5617.

[34] BURGUETE M I, GARCíA-VERDUGO E, LUIS S V, *et al*. Preparation of polymer-supported gold nanoparticles based on resins containing ionic liquid-like fragments: easy control of size and stability[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, **13**(33): 14831-14838.

[35] GIACALONE F, GRUTTADAURIA M. Covalently supported ionic liquid phases: an advanced class of recyclable catalytic systems[J]. *ChemCatChem*, 2016, **8**(4): 664-684.

[36] WON K, KIM S, KIM K J, *et al*. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads[J]. *Process Biochem*, 2005, **40**(6): 2149-2154.

[37] KHARE S, PRAKASH O. Applicability of nanomatrices immobilized α-amylase in biotechnology[J]. *IJTIR* (*HCTL Open International Journal of Technology Innovations and Research*), 2015, **14**: 1-9.

[38] CHITRADON L, MAHAKHAN P, BUCKE C. Oligosaccharide synthesis by reversed catalysis using α-amylase from *Bacillus licheniformis*[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2000, **10**(1): 273-280.

[39] HU C, HUANG Z, JIANG M, *et al*. Continuous-flow asymmetric synthesis of (3*R*)-3-hydroxyl-5-hexenoates with co-immobilized ketoreductase and *Lactobacillus kefir* dehydrogenase integrating greener inline microfluidic liquid-liquid extractors and membrane separators[J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2021, **9**(27): 8990-9000.

[40] CHEN Q, WANG Y, LUO G. Recycling of cofactors in crude enzyme hydrogels as co-immobilized heterogeneous biocatalysts for continuous-flow asymmetric reduction of ketones[J]. *ChemSusChem*, 2023, **16**(3): e202201654.

[41] XIE Y, CHEN Q, HUANG G, *et al*. Scaling up microreactors for kilogram-scale synthesis of piperacillin: experiments and

computational fluid dynamics simulations [J]. *AIChE J*, 2021, **67**(6): e17231.

[42] SARDAR M, ROY I I, GUPTA M N. Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer EudragitTM L-100 [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2000, **27**(9): 672-679.

[43] THOMPSON M P, DERRINGTON S R, HEATH R S, *et al*. A generic platform for the immobilisation of engineered biocatalysts [J]. *Tetrahedron*, 2019, **75**(3): 327-334.

[44] HO L F, LI S Y, LIN S C, *et al*. Integrated enzyme purification and immobilization processes with immobilized metal affinity adsorbents [J]. *Process Biochem*, 2004, **39**(11): 1573-1581.

[45] SHELDON R A, BASSO A, BRADY D. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy [J]. *Chem Soc Rev*, 2021, **50**(10): 5850-5862.

[46] PESCHKE T, BITTERWOLF P, RABE K S, *et al*. Self-immobilizing oxidoreductases for flow biocatalysis in miniaturized packed-bed reactors [J]. *Chem Eng Technol*, 2019, **42**(10): 2009-2017.

[47] FERNÁNDEZ-LORENTE G, TERRENI M, MATEO C, *et al*. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, **28**(4/5): 389-396.

[48] ARMANI D, PICCOLO O, PETRI A. Biocatalytic asymmetric synthesis of (*S*)-1-[3,5-*bis*(trifluoromethyl)-phenyl]ethanol by an immobilized KRED in batch and flow conditions [J]. *ChemCatChem*, 2023, **15**(19): e202300809.

[49] TADAAKI O, TAKAESHI M, KATSUTOSHI M, *et al*. Optically active dibenzylamine derivative, and method for preparing thereof: US, 2013225814A1 [P]. 2013-08-29.

[50] SAHLIN J, WU C, BUSCEMI A, *et al*. Nanobiocatalysts with inbuilt cofactor recycling for oxidoreductase catalysis in organic solvents [J]. *Nanoscale Adv*, 2023, **5**(18): 5036-5044.

[51] MUSA M M, ZIEGELMANN-FJELD K I, VIEILLE C, *et al*. Xerogel-encapsulated W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* performs asymmetric reduction of hydrophobic ketones in organic solvents [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, **46**(17): 3091-3094.

[52] WILLIAMS V, CUI Y, ZHAO J, *et al*. Highly efficient production of optically active (*R*)-tetrahydrothiophene-3-ol in batch and continuous flow by using immobilized ketoreductase [J]. *Org Process Res Dev*, 2022, **26**(7): 1984-1995.

[53] ZHANG W, LI S F, ZHU J Q, *et al*. Constructing a continuous-flow bioreactor with co-immobilized *Km*AKR and *Bm*GDH for synthesizing *tert*-butyl 6-cyano-(3*R*,5*R*)-dihydroxyhexanoate [J]. *Biochem Eng J*, 2023, **197**: 108964.