

辅因子NAD⁺再生方法的研究进展

肖汀, 陈建华*

中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京

收稿日期: 2024年3月19日; 录用日期: 2024年4月18日; 发布日期: 2024年4月28日

摘要

辅因子在酶进行高效催化反应中扮演着不可或缺的角色, 辅因子再生是指将在氧化还原酶催化过程中消耗的氧化型辅酶或还原型辅酶之间进行相互转化, 以维持辅酶剂量水平的相对稳定, 从而不断地促进底物分子朝着目的产物转化。鉴于辅因子的高成本、化学计量使用和物理不稳定性, 合适的辅因子再生方法对于实际应用至关重要。因此, 越来越多的研究人员着力开发多种高效经济的辅因子再生方法, 以期更好地提高催化反应效率。本文主要对目前辅因子NAD⁺再生方法的研究进展进行综述, 分析讨论各种方法的特点和研究现状, 为辅因子在工业生产及医药应用领域的研究提供参考。

关键词

生物催化, NAD⁺再生

Advances in Cofactor NAD⁺ Regeneration Methods

Ting Xiao, Jianhua Chen*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Mar. 19th, 2024; accepted: Apr. 18th, 2024; published: Apr. 28th, 2024

Abstract

Cofactors play an indispensable role in the efficient catalytic reactions carried out by enzymes, and cofactor regeneration refers to the interconversion of oxidized or reduced cofactors consumed in the catalytic process of redox enzymes to maintain a relatively stable coenzyme dose level, thus continuously facilitating the conversion of substrate molecules toward the target products. Given the high cost, stoichiometric use and physical instability of cofactors, suitable cofactor regeneration methods are crucial for practical applications. Therefore, more and more research-

*通讯作者。

文章引用: 肖汀, 陈建华. 辅因子 NAD⁺再生方法的研究进展[J]. 生物医学, 2024, 14(2): 260-266.

DOI: 10.12677/hjbm.2024.142029

ers are focusing on the development of various efficient and economical cofactor regeneration methods in order to better improve the efficiency of catalytic reactions. In this paper, we mainly review the current research progress of cofactor NAD^+ regeneration methods, analyze and discuss the characteristics and current research status of various methods, and provide a reference for the research of cofactor in industrial production and pharmaceutical applications.

Keywords

Biocatalysis, NAD^+ Regeneration

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

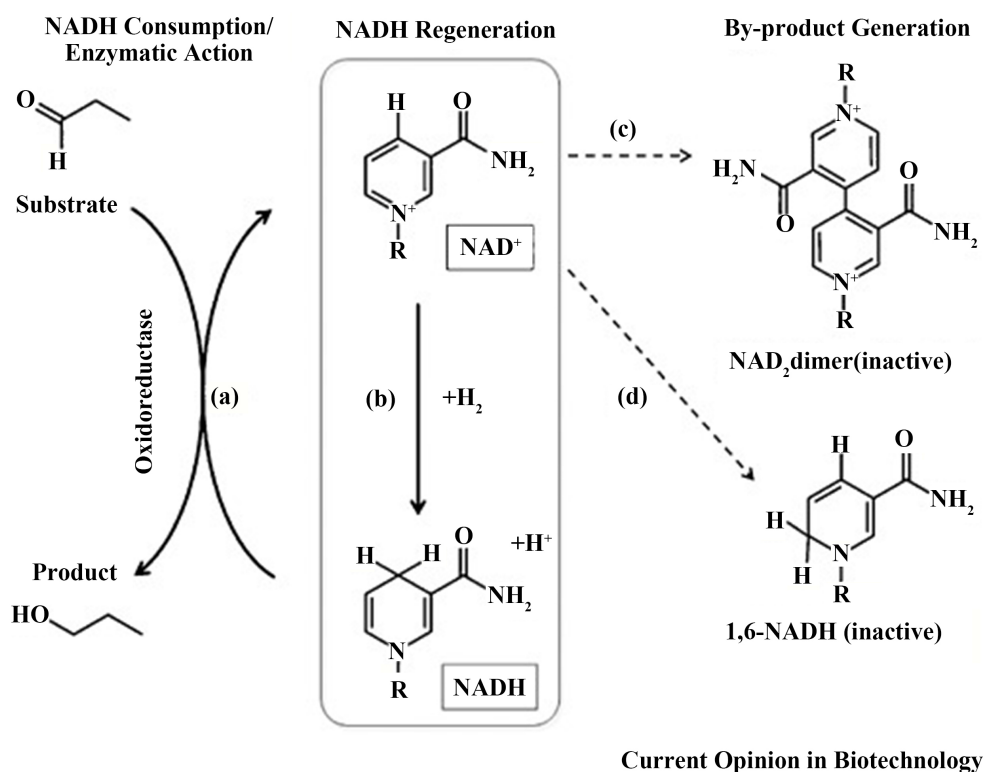


Figure 1. Conversion pathway of NADH to NAD^+ [5]

图 1. NADH 与 NAD^+ 的转换途径[5]

酶是生物催化反应中的重要组成部分, 在催化过程中具有良好的特异性和选择性, 在医药生产和工业制造领域被广泛应用。在酶学分类的六大酶类中, 氧化还原酶是最大的一类酶, 其反应通常需要辅因子的参与和促进。目前已知氧化还原酶类以 NAD (H) 作为辅因子的占 80%, 以 NADP (H) 为辅因子的占 10%, 剩余的则以 FMN 、 PQQ 、 AMP/ADP/ATP 等为辅因子进行催化反应[1], 因此本文只对辅因子 NAD^+ 的再生方法进行讨论。由于酶催化反应的高度专一性, 导致酶的催化反应与辅因子基本为一一对应的关

系, 而这类辅因子在反应过程中被不断消耗, 加之辅因子高昂的价格[2], 较难实现大规模合成。为维持反应的持续进行, 需不停投入辅因子, 由此大大增加了氧化还原酶类的生产成本, 辅酶的高效经济再生方法亦成为工业应用中急需解决的难题。

NAD^+ 是氧化还原反应中的关键辅因子, 参与广泛的酶促反应。从不断增长的全球制药市场来看, 这些反应非常重要, 其中多种药物生产过程的关键中间体严重依赖生物催化反应[3]。鉴于 NAD^+ 的高昂成本, 有效的再生方法至关重要。辅因子再生不仅可以大大降低反应成本, 还可以提高反应效率, 辅因子再生过程与合成反应耦联形成的连续生产体系可以省去辅因子的复杂分离程序如图 1。建立的辅因子再生体系可有效解决工业催化中 NAD^+ 大量消耗的难题而备受关注, 迄今为止, 研究人员对多种再生方法深入探索, 其中包括化学法、电化学法、光化学法以及酶法等。在实际应用中, 需要根据适用性和操作条件选择恰当的再生方法。通常根据总周转数(turnover number, TTN)来衡量方法的适用性[4], TTN 定义为在反应过程中消耗 1 mol NADH 所形成的产物的摩尔数, 理想的再生方法应具有较高的 TTN。

2. 化学法

化学法主要是利用无机盐如亚甲基蓝、硼氢化钠、连二亚硫酸钠对 NAD^+ 或 NADH 进行还原或者氧化来实现辅酶再生的过程。无机盐在生产中无法回收利用, 因而消耗大、成本高、环境污染大。此法特异性差, 辅酶再生效率低[4]。并且在高浓度的盐溶液中, 酶容易失活而无法进行辅酶再生[6]。因此, 利用无机盐进行辅酶的化学再生目前在工业规模上的可行性较差。

在化学辅因子再生中, 一种化合物被引入到反应系统中, 它负责电子从一个辅因子转移到另一个辅因子。化学试剂的选择必须保证反应环境的均匀性, 并使扩散限制最小化。此外, 添加的化学物质必须与辅因子可逆结合。这种化合物的一个例子是黄素单核苷酸(FMN), 它将电子从 NADH 传输到氧化反应物(即电子受体, 例如 O_2), 从而形成 NAD^+ 。这种方法的缺点是, 在体外装置中, 氧化还原反应不一定与能量生成反应相结合, 因此, 需要使用浓缩试剂。化学辅助因子再生系统也可以含有作为氢化物脱除剂的邻苯二酚类介质。再生过程中使用的介质必须在氧化和还原形式下都是稳定的, 并且应该易于溶解在水溶液中。

化学法辅因子再生方法相对便宜, 大多数不产生副产物, 并且可以很容易地监测, 以提供快速和简单的测量反应效率。虽然这些方法是最简单的, 但它们并不特定于活性辅因子的形成, 通常与酶系统不相容, 甚至有酶失活的风险。此外, 使用上述方法时, 辅因子的周转数(TTN)相对较低(<100)且高浓度的还原剂盐会导致酶失活[7]。

3. 电化学法

电化学法再生辅因子是通过电极提供的再生能量来实现的, 被认为是一种潜在且强大的方法, 可以利用较低成本的电作为再生试剂[8]。如图 2 利用电能, 不需要其他试剂的参与, 就能实现 NAD^+ 的再生, 反应过程能够被轻松监控, 并且可以操控电能以充分发挥其再生效率[9]。电化学法再生可以通过裸电极和修饰电极上的直接电化学来实现, 也可以借助氧化还原介体促进 NAD^+ 还原的介导电化学来实现。 NAD^+ 在阴极的直接还原是由两个单电子还原组成的过程[10], 第一个还原步骤是可逆的, 其中 NAD^+ 被还原形成 NAD 自由基。后者在第二步还原中进一步还原, 被质子化并产生 1,4- NADH 。在第二步中, NAD 自由基的形成也可能被还原为酶促无活性副产物 1,6- NADH 和 NAD 二聚体, 导致每个再生循环后的辅酶损失 40% [11]。

通过电化学方法, NADH 通过在电极上的阴极电位下还原溶液中的 NAD^+ 实现辅因子再生, 该法具有使用清洁可再生电能, 易于产品隔离等优点[12]。然而, 由于电极对辅酶 NAD^+ 强吸附作用, 电极易污

染, 其氧化过程也会受到影响, 造成再生过程缓慢[13]。此外, 因为不涉及复杂的氧化还原机制, 直接电化学再生方法具有巨大前景。众多金属在辅因子再生方面表现出良好的性能, 但需要高阴极电位才能达到 100%回收率, 这同时也限制了裸电极的实际使用[14]。在较高的阴极电位下, 更利于析氢反应, 导致辅因子的再生效率急剧下降。由于裸电极需要非常高的电势并且涉及副反应, 因此目前研究人员正在开发修饰电极, 其中包括用于直接再生的纳米结构和用于介导再生的化学氧化还原分子[15]。NADH 在阳极的直接电流氧化也是一个由于过电位而面临酶活性和辅酶严重损失的过程。电极结垢是另一个需要解决的问题, 这些限制可以通过改进电极结构或通过含有电子介体的化学改性电极来解决[16]。尽管已经探索许多材料, 电化学再生方法仍有改进的余地。直接化学再生需要高阴极电位, 介导再生的基本基础尚未建立, 基于介导的电极始终存在不稳定、毒性和泄露的问题[17]。

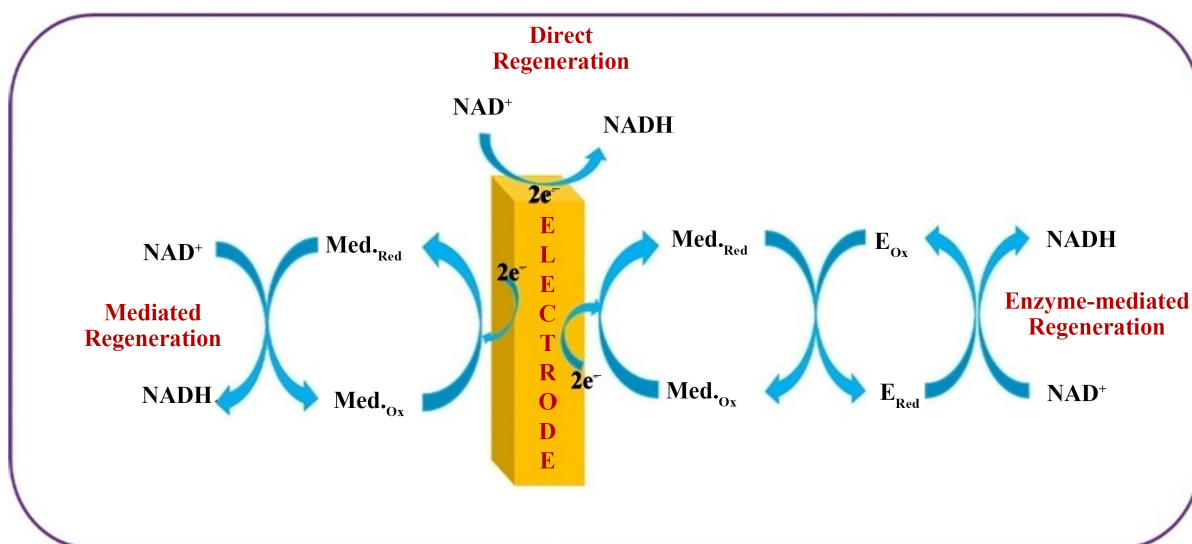


Figure 2. Electrochemical cofactor regeneration pathway [18]

图 2. 电化学辅因子再生途径[18]

4. 光化学法

光化学再生作为一种相对较新的再生方法, 因其利用廉价、丰富、清洁的太阳能而受到越来越多的关注。自然界本身具有一个巨大的 NADH 再生周期, 绿色植物对太阳能的利用是通过光收集光合作用完成的, 这种光合作用吸收可见光范围内的太阳能, 从而产生储存在 NADH 中的高能电子, 高能电子存储于 NADH 中以合成碳水化合物, 用于卡尔文循环中 CO_2 和 H_2O 合成生命所需的碳水化合物[19]。但可见光区域的转换效率很低, NADH 高效光化学再生面临的挑战是寻找稳定的光敏剂, 特别是可见光光敏剂和高效的电子介质[20]。

光化学再生系统包括光敏剂、电子载体、电子供体和酶分子。不稳定的光敏剂是限制光化学再生 NADH 的因素, 尤其是可见光光敏剂[21]。低聚噻吩、卟啉或含金属的卟啉、曙红等作为光敏剂已经被研究, 但是都缺乏长期使用的稳定性[22]。二氧化钛及改性的二氧化钛具有长时间的操作稳定性和制备简便等优点而被广泛研究。使用碳掺杂的二氧化钛用于 NADH 的再生, 在 H_2 存在下, 巯基乙醇作为电子给体, 实现了 NAD^+ 向 NADH 的转化。但该再生方法体系成分复杂、再生效率低, 至今还未能实际中应用。光化学再生辅因子可用于生物合成[23]、生物传感器[24]和能量储存[25], 我们有很大的空间去探索太阳能的合理利用, 但可见光光催化剂的开发始终是最重要的研究问题之一。

5. 酶法

辅因子高昂的价格限制了许多氧化还原酶作为工业催化剂的应用, 然而, 人们对于在新的可持续反应中使用酶类的兴趣浓厚, 这与开发新颖且更高效的生物催化系统的需求直接相关。辅因子在催化系统中发挥着重要作用, 因此, 开发有效的辅因子再生方法持续受到关注。在开发酶法再生体系时应该考虑与催化主反应工艺条件的兼容性, 方法体系的经济实用性, 并且能够提供较高的周转数(TTN)。此外, 再生反应过程不应产生中间体, 额外的底物或副产物不应影响主反应的催化[26]。迄今为止, 酶法再生具有最高的 TTN, 而化学法和电化学方法显示出最低的 TTN 值。与上述三种再生方法相比, 酶法再生是目前应用最普遍的再生方法, 此方法具有一定的优越性, 最重要的两种酶法再生方法如图 3 所示[27]。确定合适的高效再生酶、构建合理的反应路线和开发高效的分离技术是实际应用的三个前提[28]。

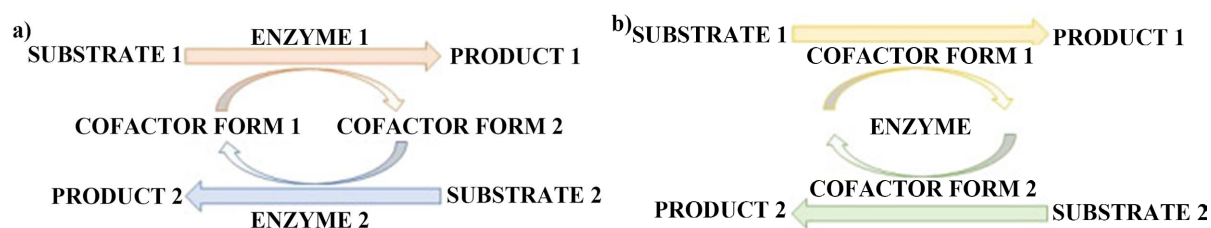


Figure 3. Two enzymatic cofactor regeneration systems: (a) enzyme coupled and (b) substrate coupled

图 3. 两种酶法再生体系: (a) 酶偶联和(b) 底物偶联

5.1. 酶偶联法

酶偶联法是指利用两种不同的氧化还原酶构建多酶偶联体系, 其中一种酶催化目的化合物的合成, 另一种酶催化 NAD^+ 的再生。氢离子和电子可以直接在偶联体系中直接转移, 无需任何介质。这种再生体系的再生策略是在系统中应用第二种底物和第二种酶, 进行平行反应, 同时进行主反应中消耗的辅因子再生[29]。假设再生反应不可逆, 两个平行反应的同时进行可以为反应提供较高的热力学驱动力, 从而实现目标辅因子的有效再生[29]。因此, 辅因子和辅助底物的巧妙选择在该再生系统中尤为重要, 此外还应考虑酶的高特异性和活性, 以及额外底物的廉价易得。在建立一个高效的再生路线应同时考虑多种因素, 包括酶和辅酶的稳定性、反应条件、转化效率、多酶多步催化反应速率的匹配性以及分离纯化的便捷性[26]。

该方法要求两种酶的底物互不影响以避免两种酶的催化过程相互干扰。另外, 由于系统需要加入多种酶催化剂, 酶偶联反应体系及催化过程的控制相对复杂。酶促反应与辅因子再生过程相结合, 可用于广泛的有机合成, 特别是手性化合物的合成[30]。目前已开发的用于 NAD^+ 辅因子再生酶有乳酸脱氢酶、烯酸还原酶、甲酸脱氢酶[26]和 NADH 氧化酶[31]等。

5.2. 底物偶联法

底物偶联法是指在催化反应过程中添加一定量的共底物, 在同一种酶的催化作用下实现辅酶的持续再生。这类辅酶再生方法相对简单, 但要求所选择的几种氧化还原酶可同时催化两种底物的转化。除了高浓度共底物对酶的催化活力的影响, 可溶性共底物也大幅增加产物分离的复杂性。这种辅因子再生体系中必须保证酶能够使用辅因子的还原形式和氧化形式, 并且还应该能够催化与第二底物不同的产物形成[32]。然而, 该体系需同时满足两个不同反应的热力学有利条件是有难度的。最常见的解决方法是通过增加主要底物的浓度来克服这个问题, 因此, 开发这些生物催化系统的一个主要问题是底物和共底物之间酶活性位点的竞争。不过, 这种方法最大的好处是可以轻松扩大规模并简化下游回收以及酶的重复利用[3]。

6. 总结

生物催化过程要在经济上可行, 需要满足许多要求, 要根据给定的经济阈值, 需要最低的反应产率、产物浓度和体积生产率[33]。同样, 生物催化剂和辅因子也有最大允许消耗量[34]。辅因子再生系统的成功取决于以下因素: 热动力学和动力学应该是有利的, 并且系统应该易于与合成反应的适当条件兼容。同样重要的是, 必须以低成本获得必要的材料和设备, 这样可以轻松实现产物分离[35]。

在这篇综述中, 我们着重介绍了目前应用于辅因子 NAD^+ 再生的方法, 分析讨论了每种方法的原理及目前研究中存在的问题, 期待能为该领域研究提供新的思路。大量的研究论文报道了各种生物催化反应和涉及辅因子再生的方法, 但工业应用很少。而且通常只在小规模生产中[36]。为了使这些过程在经济上可行, 所使用的方法必须能够多次再生辅因子。高效的辅因子再生系统需要超过 90% 的转化效率[37], 所进行的再生必须在动力学上是有利的, 因此在开发高效经济环保的辅因子再生方法和搭建再生系统的研究上, 我们还有很长远的路要走。

参考文献

- [1] Monti, D., Ottolina, G., Carrea, G., *et al.* (2011) Redox Reactions Catalyzed by Isolated Enzymes. *Chemical Reviews*, **111**, 4111-4140. <https://doi.org/10.1021/cr100334x>
- [2] Ali, I., Ullah, N., McArthur, M.A., *et al.* (2018) Direct Electrochemical Regeneration of Enzymatic Cofactor 1,4-NADH on a Cathode Composed of Multi-Walled Carbon Nanotubes Decorated with Nickel Nanoparticles. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **96**, 68-73. <https://doi.org/10.1002/cjce.22886>
- [3] Wang, X., Saba, T., Yiu, H.H.P., *et al.* (2017) Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. *Chem*, **2**, 621-654. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.04.009>
- [4] Wu, H., Tian, C., Song, X., *et al.* (2013) Methods for the Regeneration of Nicotinamide Coenzymes. *Green Chemistry*, **15**, 1773-1789. <https://doi.org/10.1039/c3gc37129h>
- [5] Wang, X. and Yiu, H.H.P. (2016) Heterogeneous Catalysis Mediated Cofactor NADH Regeneration for Enzymatic Reduction. *ACS Catalysis*, **6**, 1880-1886. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b02820>
- [6] Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., *et al.* (2007) Biocatalytic Ketone Reduction—A Powerful Tool for the Production of Chiral Alcohols—Part I: Processes with Isolated Enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**, 237-248. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1002-0>
- [7] Raunio, R. and Lilius, E.M. (1971) Effect of Dithionite on Enzyme Activities *in Vivo*. *Enzymologia*, **40**, 360-368.
- [8] Lee, Y.S., Gerulskis, R. and Minter, S.D. (2022) Advances in Electrochemical Cofactor Regeneration: Enzymatic and Non-Enzymatic Approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, **73**, 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.013>
- [9] Wichmann, R. and Vasic-Racki, D. (2005) Cofactor Regeneration at the Lab Scale. In: Kragl, U., Ed., *Technology Transfer in Biotechnology: From Lab to Industry to Production*, Springer, Berlin, 225-260. <https://doi.org/10.1007/b98911>
- [10] Ali, I., Gill, A. and Omanovic, S. (2012) Direct Electrochemical Regeneration of the Enzymatic Cofactor 1,4-NADH Employing Nano-Patterned Glassy Carbon/Pt and Glassy Carbon/Ni Electrodes. *Chemical Engineering Journal*, **188**, 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.02.005>
- [11] Torres Pazmiño, D.E., Winkler, M., Glieder, A., *et al.* (2010) Monooxygenases as Biocatalysts: Classification, Mechanistic Aspects and Biotechnological Applications. *Journal of Biotechnology*, **146**, 9-24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.021>
- [12] Wichmann, R. and Vasic-Racki, D. (2005) Cofactor Regeneration at the Lab Scale. In: Kragl, U., Ed., *Technology Transfer in Biotechnology*, Springer, Berlin, 225-260. <https://doi.org/10.1007/b98911>
- [13] McQuillan, R.V., Stevens, G.W. and Mumford, K.A. (2018) The Electrochemical Regeneration of Granular Activated Carbons: A Review. *Journal of Hazardous Materials*, **355**, 34-49. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.079>
- [14] Narbaitz, R.M. and Cen, J. (1994) Electrochemical Regeneration of Granular Activated Carbon. *Water Research*, **28**, 1771-1778. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90250-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90250-X)
- [15] Mohammed, F.M., Roberts, E.P.L., Hill, A., *et al.* (2011) Continuous Water Treatment by Adsorption and Electrochemical Regeneration. *Water Research*, **45**, 3065-3074. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.023>
- [16] Damian, A. and Omanovic, S. (2006) Electrochemical Reduction of NAD^+ on a Polycrystalline Gold Electrode. *Jour-*

- nal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **253**, 222-233. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2006.03.020>
- [17] Kim, Y.H. and Yoo, Y.J. (2009) Regeneration of the Nicotinamide Cofactor Using a Mediator-Free Electrochemical Method with a Tin Oxide Electrode. *Enzyme and Microbial Technology*, **44**, 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.10.019>
- [18] Immanuel, S., Sivasubramanian, R., Gul, R., *et al.* (2020) Recent Progress and Perspectives on Electrochemical Regeneration of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). *Chemistry—An Asian Journal*, **15**, 4256-4270. <https://doi.org/10.1002/asia.202001035>
- [19] Kim, J.H., Lee, M., Lee, J.S., *et al.* (2012) Self-Assembled Light-Harvesting Peptide Nanotubes for Mimicking Natural Photosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **51**, 517-520. <https://doi.org/10.1002/anie.201103244>
- [20] Shi, Q., Yang, D., Jiang, Z., *et al.* (2006) Visible-Light Photocatalytic Regeneration of NADH Using P-Doped TiO₂ Nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **43**, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.06.005>
- [21] Liao, H.X., Jia, H.Y., Dai, J.R., *et al.* (2021) Bioinspired Cooperative Photobiocatalytic Regeneration of Oxidized Nicotinamide Cofactors for Catalytic Oxidations. *ChemSusChem*, **14**, 1687-1691. <https://doi.org/10.1002/cssc.202100184>
- [22] Lee, S.H., Nam, D.H. and Park, C.B. (2009) Screening Xanthene Dyes for Visible Light-Driven Nicotinamide Adenine Dinucleotide Regeneration and Photoenzymatic Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **351**, 2589-2594. <https://doi.org/10.1002/adsc.200900547>
- [23] Taglieber, A., Schulz, F., Hollmann, F., *et al.* (2008) Light-Driven Biocatalytic Oxidation and Reduction Reactions: Scope and Limitations. *ChemBioChem*, **9**, 565-572. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700435>
- [24] Wang, G.-L., Xu, J.-J. and Chen, H.-Y. (2009) Dopamine Sensitized Nanoporous TiO₂ Film on Electrodes: Photoelectrochemical Sensing of NADH under Visible Irradiation. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 2494-2498. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.12.031>
- [25] Hamburger, M., Kodis, G., Vaughn, M.D., *et al.* (2009) Solar Energy Conversion in a Photoelectrochemical Biofuel Cell. *Dalton Transactions*, **45**, 9979-9989. <https://doi.org/10.1039/b912170f>
- [26] Liao, Q., Liu, W. and Meng, Z. (2022) Strategies for Overcoming the Limitations of Enzymatic Carbon Dioxide Reduction. *Biotechnology Advances*, **60**, Article ID: 108024. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108024>
- [27] Uppada, V., Bhaduri, S. and Noronha, S.B. (2014) Cofactor Regeneration—An Important Aspect of Biocatalysis. *Current Science*, **106**, 946-957.
- [28] Hummel, W. (1999) Large-Scale Applications of NAD(P)-Dependent Oxidoreductases: Recent Developments. *Trends in Biotechnology*, **17**, 487-492. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01207-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01207-4)
- [29] Marpani, F., Pinelo, M. and Meyer, A.S. (2017) Enzymatic Conversion of CO₂ to CH₃OH via Reverse Dehydrogenase Cascade Biocatalysis: Quantitative Comparison of Efficiencies of Immobilized Enzyme Systems. *BioChemical Engineering Journal*, **127**, 217-228. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.011>
- [30] Weckbecker, A., Gröger, H. and Hummel, W. (2010) Regeneration of Nicotinamide Coenzymes: Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compounds. In: Wittmann, C. and Krull, R., Eds., *Biosystems Engineering I: Creating Superior Biocatalysts*, Springer, Berlin, 195-242. https://doi.org/10.1007/10_2009_55
- [31] Riebel, B.R., Gibbs, P.R., Wellborn, W.B., *et al.* (2002) Cofactor Regeneration of NAD⁺ from NADH: Novel Water—Forming NADH Oxidases. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **344**, 1156-1168.
- [32] Shah, S., Agera, R., Sharma, P., *et al.* (2018) Development of Biotransformation Process for Asymmetric Reduction with Novel Anti-Prelog NADH-Dependent Alcohol Dehydrogenases. *Process Biochemistry*, **70**, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.016>
- [33] Peng, T., Tian, J., Zhao, Y., *et al.* (2022) Multienzyme Redox System with Cofactor Regeneration for Cyclic Deracemization of Sulfoxides. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **61**, E202209272. <https://doi.org/10.1002/anie.202209272>
- [34] Rehn, G., Pedersen, A.T. and Woodley, J.M. (2016) Application of NAD(P)H Oxidase for Cofactor Regeneration in Dehydrogenase Catalyzed Oxidations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **134**, 331-339. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.09.016>
- [35] Kratzer, R., Woodley, J.M. and Nidetzky, B. (2015) Rules for Biocatalyst and Reaction Engineering to Implement Effective, NAD(P)H-Dependent, Whole Cell Bioreductions. *Biotechnology Advances*, **33**, 1641-1652. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.006>
- [36] Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J.C., *et al.* (2021) Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, **60**, 88-119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>
- [37] Wang, Z., Sundara Sekar, B. and Li, Z. (2021) Recent Advances in Artificial Enzyme Cascades for the Production of Value-Added Chemicals. *Bioresource Technology*, **323**, Article ID: 124551. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124551>