

# CO<sub>2</sub>生物转化关键酶固定体系构筑研究进展与挑战

宋少宇<sup>1,2</sup>, 纪秀玲<sup>2</sup>, 栾力焜<sup>2</sup>, 张莹<sup>1\*</sup>, 黄玉红<sup>2\*</sup>

1 沈阳化工大学化学工程学院 辽宁省无机分子基化学重点实验室, 辽宁 沈阳 110142

2 中国科学院过程工程研究所 离子液体清洁过程北京市重点实验室, 北京 100190

宋少宇, 纪秀玲, 栾力焜, 张莹, 黄玉红. CO<sub>2</sub>生物转化关键酶固定体系构筑研究进展与挑战[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3143-3168.

SONG Shaoyu, JI Xiuling, LUAN Likun, ZHANG Ying, HUANG Yuhong. Development of enzyme immobilization systems for CO<sub>2</sub> bioconversion: advances and challenges[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3143-3168.

**摘 要:** 酶催化 CO<sub>2</sub> 还原制备高值化学品对缓解全球环境和能源危机具有重要意义, 利用甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)或多酶级联还原 CO<sub>2</sub> 制备甲酸/甲醇具有选择性高、条件温和的优势, 但关键酶活性低、稳定性差和重复利用率低的问题限制了其规模化应用, 酶的固定化为这些问题提供了有效解决方案。本文总结了近年来利用膜、无机材料、金属有机框架和共价有机框架等载体对酶进行固定化的研究进展, 阐释了不同固定材料和固定方式的特点和优势; 进一步总结了固定化酶与电催化或光催化耦联反应体系对 CO<sub>2</sub> 还原的协同效果及应用, 同时指出酶固定化技术和耦联反应体系目前存在的问题并对其发展前景进行了展望。

**关键词:** 甲酸脱氢酶; 固定化; 生物催化; 级联反应; 耦联反应

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA21000000); 国家重点研发计划(2021YFC2104200); 中国科学院稳定支持基础研究领域青年团队计划(YSBR-072); 辽宁省教育厅基础研究项目(LQ2020004)

This work was supported by the Transformational Technologies for Clean Energy and Demonstration Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA21000000), the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2104200), the CAS Project for Young Scientists in Basic Research (YSBR-072), and the Department of Education Project of Liaoning Province (LQ2020004).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Ying, zhangy621@syuct.edu.cn; HUANG Yuhong, yhhuang@ipe.ac.cn

Received: 2022-12-10; Accepted: 2023-03-08

# Development of enzyme immobilization systems for CO<sub>2</sub> bioconversion: advances and challenges

SONG Shaoyu<sup>1,2</sup>, JI Xiuling<sup>2</sup>, LUAN Likun<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>1\*</sup>, HUANG Yuhong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> The Key Laboratory of the Inorganic Molecule-based Chemistry of Liaoning Province, School of Chemical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, Liaoning, China

<sup>2</sup> Beijing Key Laboratory of Ionic Liquids Clean Process, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

**Abstract:** Enzyme-catalyzed CO<sub>2</sub> reduction to value-added commodities is important for alleviating the global environmental issues and energy crises due to high selectivity and mild conditions. Owing to high energy density, formic acid or methanol produced from CO<sub>2</sub> using formate dehydrogenase (FDH) or multi-enzyme cascades are promising target chemicals for CO<sub>2</sub> utilization. However, the low activity, poor stability and low reusability of key enzymes involved in such process hampered its large-scale application. Enzyme immobilization provides an effective solution to these problems and significant progress have been made in immobilization carriers. Moreover, integration of enzyme immobilization with other catalysis techniques have been explored extensively. This review summarized the recent advances in the immobilization of enzymes using membranes, inorganic materials, metal-organic frameworks, covalent organic frameworks and other carriers, and illustrated the characteristics and advantages of different immobilization materials and immobilization methods. The synergistic effects and applications of immobilized enzymes and electrocatalytic or photocatalytic coupling reaction systems for CO<sub>2</sub> reduction were further summarized. Finally, the current challenges of enzyme immobilization technology and coupling reaction systems were pointed out and their development prospects were presented.

**Keywords:** formate dehydrogenase; immobilization; biocatalysis; cascade reactions; coupled reactions

绿色低碳是国家的重大发展战略<sup>[1]</sup>。目前, 全球气温较工业化前提高 1.1 °C, 气候影响对人类乃至整个地球的危害将越来越大<sup>[2]</sup>。随着全球平均气温升高速度逐步加快, 根据巴黎协定, 全球要在 2065–2070 年左右实现碳中和, 各国积极响应并纷纷制定碳中和目标<sup>[3]</sup>。碳中和是我国贯彻新发展理念、推动高质量发展的必然要求, 在加速我国经济 and 能源转型方面具有高瞻远瞩的意义<sup>[4]</sup>。目前我国多次就减排减碳提出规划和目标, 正在从能源革命、经济转

型和科技创新 3 个方向促进绿色转型, 技术进步将是碳中和的核心驱动力<sup>[5]</sup>。

CO<sub>2</sub> 的高效活化是提高碳原子经济性重大突破的关键。CO<sub>2</sub> 中的碳原子是八隅体的稳定结构, 具有较强的动力学惰性和较高的热力学稳定性(C=O 键能 803 kJ/mol)<sup>[6-7]</sup>。将 CO<sub>2</sub> 活化进而制备甲醇对碳捕获、利用与封存(carbon capture, utilization and storage, CCUS)产业链条的发展及拓展具有重要的支撑作用<sup>[8-9]</sup>。甲醇具有挥发性较低、化学性质稳定等特点, 可作为

直接燃料使用；另外，甲醇是常温常压液态物质中含氢量最高的氢能载体(理论载氢量为12.5 wt%)，与气态氢相比，能量密度更高、储运更安全<sup>[10]</sup>。甲醇可通过自身重整制氢的途径直接或间接为燃料电池提供氢原料，显著减少氢的逃逸<sup>[11]</sup>。此外，以CO<sub>2</sub>作为碳载体合成甲醇也是推动重要生物制造领域的关键一步。

酶催化CO<sub>2</sub>合成甲醇作为一种环境友好型洁净能源生产过程，因其条件温和、高选择性和高效性，具有实现CO<sub>2</sub>高效活化和经济性转化的潜力。CO<sub>2</sub>还原制甲醇主要涉及甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)、甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, FADH)和醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)三种酶，因此在此三酶构建的级联反应体系中，CO<sub>2</sub>的高效转化将受到每种酶催化效率的影响。尽管每一种酶的催化反应都是逆自然方向进行，但可以通过反应条件的优化，实现反应平衡常数几个数量级的转变，从而促进甲醇的生成<sup>[12]</sup>。Yoneyama团队<sup>[13-14]</sup>首次提出生物催化可以实现将CO<sub>2</sub>催化合成为甲醇的逆自然反应过程。随后Obert和Obert<sup>[15]</sup>报道的以辅酶NADH为供氢体，利用FDH/FADH/ADH级联反应催化CO<sub>2</sub>一步转化为甲醇的研究，成功证实了这一观点(图1)。同时，解决多酶级联反应体系的催化效率低问题，也是值得关注的<sup>[16]</sup>。

由于酶促反应或级联反应中酶稳定性差、多酶之间传质效率低以及在反应过程中存在难回

收和重复利用的问题，酶的固定化是解决上述问题的有效方案。酶固定化即通过物理或化学的方式将酶固定在载体表面或内部，从而实现酶的循环利用。常用的载体有膜材料、纳米颗粒、微胶囊、金属有机框架(metal-organic frameworks, MOF)和共价有机框架(covalent organic frameworks, COF)等，理想载体在酶固定过程中需要满足高酶固定效率的同时尽可能降低对酶活性的影响；同时，载体对CO<sub>2</sub>的吸附作用有利于提高底物CO<sub>2</sub>的浓度从而促进转化效率。为此，本文介绍了应用于酶固定化的各种载体及其在酶催化CO<sub>2</sub>还原生产甲酸/甲醇反应中的应用，分析了不同材料和固定化方式的特点，介绍了酶电催化和酶光催化两种耦联反应体系，并通过解释不同耦联反应体系的构建方式和催化效果，分析了未来酶催化反应体系的发展趋势。

## 1 酶固定化

### 1.1 膜固定 FDH/FADH/ADH

在CO<sub>2</sub>转化为甲醇的多酶级联反应中，由FDH催化甲酸到CO<sub>2</sub>的速率远高于CO<sub>2</sub>到甲酸的速率<sup>[17]</sup>，以来自草酸假单胞菌(*Pseudomonas oxalate*)中FDH为例，其氧化方向的亲和力指数 $K_m$  (0.5 mmol/L)远低于还原方向的 $K_m$ 值(30–50 mmol/L)<sup>[18]</sup>，即甲酸对FDH的亲和力远高于CO<sub>2</sub>；同时第2步FADH催化甲酸生产甲醛反应的氧化方向催化效率也高于还原方向<sup>[19]</sup>。通过反应动力学的研究，要加快酶催化CO<sub>2</sub>向



图1 FDH、FADH和ADH多酶级联催化CO<sub>2</sub>制备甲醇反应路径

Figure 1 CO<sub>2</sub> reduction and methanol production by multi-enzyme cascade reaction involving FDH, FADH and ADH.

甲醇方向的进行,提高底物  $\text{CO}_2$  在反应体系中的溶解度和转化效率是酶催化反应高效进行的关键之一<sup>[20]</sup>。以膜为载体将酶固定在其表面,可以提高酶利用效率的同时,极大改善底物的传质效率,促进反应的高效进行。

中空纤维膜(hollow fiber membrane, HFM)具有较高的比表面积和微米级别的孔径结构,在通气过程中可将气体剪切成微米级别的气泡以降低气液之间的传质阻力。Wang 等<sup>[21]</sup>首次将 HFM 应用于酶催化领域,并作为 FDH 的固定载体以提高酶的稳定性和重复利用性。FDH 通过共价交联的方式接枝到聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)改性的 HFM 上(图 2A)<sup>[21]</sup>,通过调整膜的孔隙率(50%)和孔径(0.625  $\mu\text{m}$ )获得最高的催化效率,在通气反应 1 h 内膜固定化 FDH 体系的甲酸产率可以达到 0.156  $\mu\text{mol/L}$ ,30 d 后 HFM 上的酶保留 83% 的活性。PAA 材质的 HFM 具有很强的疏水性,而 FDH 固定在疏水性膜上往往与其表面发生相互作用引起酶的变性<sup>[25]</sup>,所以使用 HFM 作为酶固定载体时通常需要对膜进行亲水性处理。为降低膜固定载体对酶活性的影响,Gao 等<sup>[22]</sup>受脂质双分子层结构的启发,使用聚多巴胺(polydopamine, PDA)和聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)对聚丙烯(polypropylene, PP)疏水膜进行单面亲水改性,构建了一种单面亲水/单面疏水性的 Janus 膜(图 2B)。并通过溶胶-凝胶工艺制备了包覆碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)的  $\text{TiO}_2$  纳米颗粒,FDH 则附着在颗粒的表面,最终将负载 CA 和 FDH 两种酶的纳米颗粒沉积在膜亲水性一侧。该体系  $\text{CO}_2$  的水合效率是普通酶-膜体系的 2.5 倍,甲酸转化率(89%)得到了明显的提升,且在重复使用 8 次后仍维持其最高效率。Liu WF 团队<sup>[26]</sup>将 PEI 附着在 PAA 接枝的聚乙烯(polyethylene, PE)膜表面,构建了一个集  $\text{CO}_2$  捕集和原位氢化于一体的新反应载

体(PEI-PAA-PE)。PEI-PAA-PE 体系膜表面修饰的氨基大幅提高了  $\text{CO}_2$  的捕集效率,从而加快了甲酸的催化速率[6.9  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ],反应 1 h 后,甲酸产量达到了 263  $\mu\text{mol/L}$ 。随后该团队<sup>[23]</sup>使用交联剂戊二醛将 FDH 分别固定在含丰富氨基的 PEI-PAA-PE 中空纤维膜和 PDA/PEI- $\text{SiO}_2$  微球表面(图 2C),获得 FDH-PEI-PAA-PE 和 FDH-PDA/PEI- $\text{SiO}_2$  固定体系。 $\text{CO}_2$  的还原反应中两种固定体系的初始反应速率分别比游离酶体系高出 4.3 倍和 7.4 倍,且均可用于循环反应。PEI 的柔性长链为固定载体和酶之间提供了长的间隔臂,为 FDH 提供了丰富的结合位点并赋予了其良好的构象灵活性。另外,PEI 改性载体表面的大量氨基不仅可以增加酶的固定化率,而且提高了  $\text{CO}_2$  的传质速率和载体对  $\text{CO}_2$  的吸附性能,从而提高了 FDH 在微环境中的催化效率。

另外,在  $\text{CO}_2$  转化为甲醇的多酶级联反应中,底物和产物在多酶分子间的传递路径调控至关重要,研究表明,多酶共固定化或顺序固定化是促进  $\text{CO}_2$  高效活化和转化的有效途径。为在固定过程中维持酶的活性,Luo 等<sup>[27]</sup>采用非共价“膜污染”固定的策略对 FDH、FADH 和 ADH 通过共固定和顺序固定方式在纤维素膜上进行固定。这种“膜污染”策略促进大多数酶分子在纤维素膜的表层和支撑层之间,少量酶分子被固定在膜的支撑层。与顺序固定化相比,共固定化缩短了酶之间的距离,但甲醇的产量却并没有升高。这是因为在多酶级联反应体系中底物浓度是限制催化效率的主要原因,所以需要权衡甲酸作为产物对 FDH 的抑制作用以及作为底物激活 FADH 反应的阈值。此外,FDH 还原  $\text{CO}_2$  生产甲酸的过程又极为缓慢。基于此,Zhang 等<sup>[24]</sup>将 3 种脱氢酶与用于 NADH 再生的葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase, GDH)共

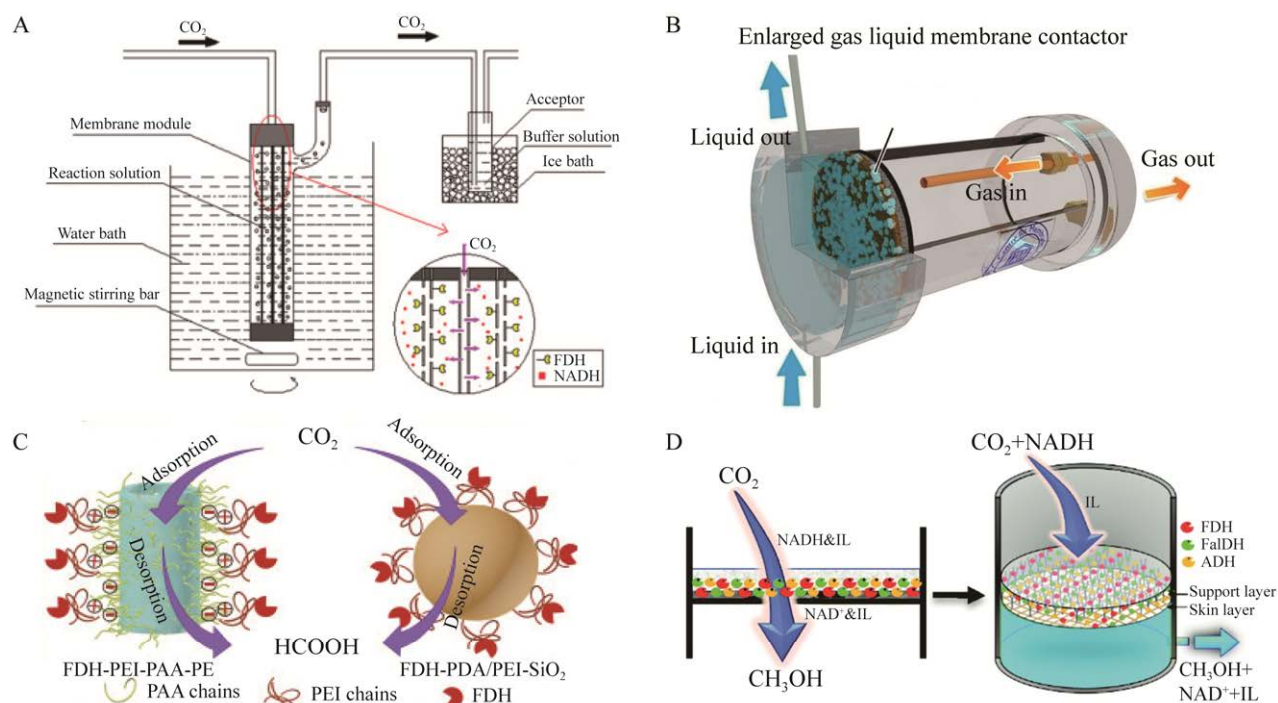


图2 不同膜材料作为酶固定化载体示意图<sup>[21-24]</sup>

A: 中空纤维膜固定 FDH 构建的微反应器. B: Janus 膜固定 FDH 构建的酶膜反应器. C: 丰富氨基修饰的 PE 膜和 SiO<sub>2</sub> 微球用于固定 FDH. D: 通过反向过滤的方式将 FDH、FADH 和 ADH 混合固定在纤维素膜表面

Figure 2 Membrane materials as carriers for enzyme immobilization<sup>[21-24]</sup>. A: Hollow fiber membrane for FDH immobilization. B: Janus membrane for FDH immobilization. C: Enriched amino-modified PE film and SiO<sub>2</sub> microsphere for FDH immobilization. D: Cellulose membrane for FDH, FADH and ADH immobilization.

固定在纤维素膜上, 并引入离子液体来提高 CO<sub>2</sub> 的水合速率, 从而提高了甲醇的产率(图 2D)。

将膜材料引入到酶催化反应中的最大优势是降低了 CO<sub>2</sub> 的传质阻力。然而膜作为酶的固定载体时因其疏水性对酶活有较大的影响, 所以往往需要对膜进行亲水改性。即使膜在酶固定过程中仅仅起到的是固定作用, 同样需要进一步考虑这种方式在反应过程中的酶浸出问题。所以对于固定载体的选择逐渐从二维材料转移到具有更高比表面积和灵活性的三维无机材料。

## 1.2 无机材料固定 FDH/FADH/ADH

无机材料最显著的特点是结构稳定、机械

强度高, 具有多种形貌和可设计的颗粒尺寸, 更重要的是其负载酶时自身的性质对酶活性影响较小, 所以无机材料如 SiO<sub>2</sub> 微球、磁性纳米颗粒、石墨烯和微胶囊等常被用作酶的固定载体, 这些材料都有着较高的比表面积和生物相容性, 保证酶固定量的同时最大程度上增加底物与酶的接触面积, 并保留酶活性, 从而实现更高的酶催化效率。

Zhai 等<sup>[28]</sup>首次将通过 PDA/PEI 共沉积法改性 SiO<sub>2</sub> 微球制得的 PDA/PEI-SiO<sub>2</sub> 材料用于 CO<sub>2</sub> 反应体系(图 3A)。SiO<sub>2</sub> 微球具有良好的亲水性和机械强度, 且具有较高的流动性和灵活性, 更适合作为酶催化反应的载体。同时在材料上



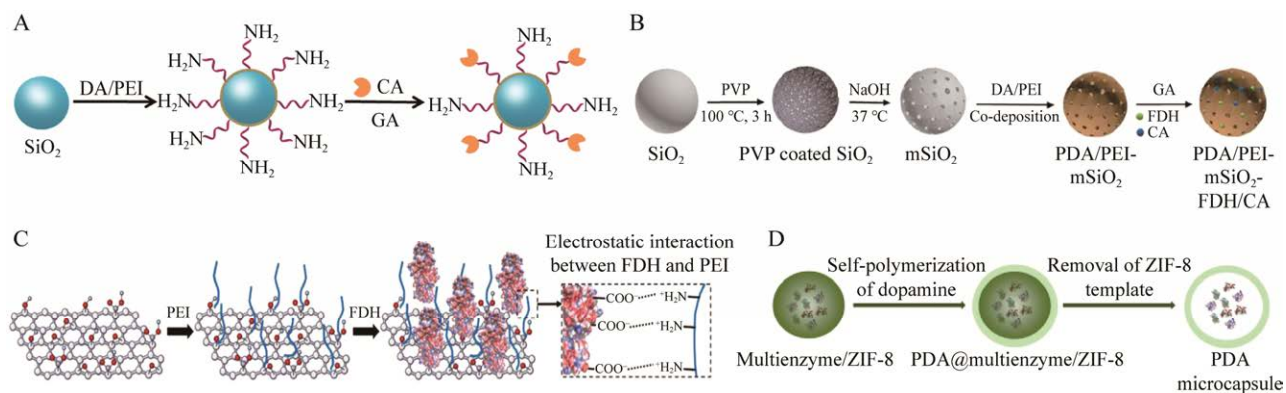


图3 不同无机材料作为酶固定化载体示意图<sup>[28-31]</sup> A: PDA/PEI 改性赋予  $\text{SiO}_2$  微球表面丰富的氨基共价固定 CA<sup>[28]</sup>. B: 表面蚀刻法制备介孔  $\text{SiO}_2$  微球共价固定 FDH、CA. C: PEI 修饰的氧化石墨烯共价固定 FDH. D: ZIF-8 为模板制备聚多巴胺微胶囊封装 FDH

Figure 3 Inorganic materials as carriers for enzyme immobilization<sup>[28-31]</sup>. A: PDA/PEI modified  $\text{SiO}_2$  microspheres with abundant amino groups on the surface for covalent immobilization of CA<sup>[28]</sup>. B: Mesoporous silicon microspheres prepared by surface etching and DA/PEI modification for covalent immobilization of FDH and CA. C: PEI-modified graphene oxide for covalent immobilization of FDH. D: ZIF-8 as a sacrificial template for the preparation of polydopamine microcapsule for immobilization of FDH.

固定 CA 来提高  $\text{CO}_2$  的水化能力和微球表面氨基的利用效率, 该反应体系在 40 min 内可产生 0.25 mmol/L 的甲酸, 循环反应 10 次后活性仍然高达 95.1%。通过协同调节 PDA/PEI- $\text{SiO}_2$  吸附  $\text{CO}_2$  和 CA 水化  $\text{CO}_2$  的动态过程, 有望快速促进  $\text{CO}_2$  的高效活化和高值化。

对普通硅基材料进行改性得到的介孔二氧化硅( $\text{mSiO}_2$ ), 具有高比表面积、可调控的介孔尺寸和丰富的表面硅羟基, 以及优异的化学/热稳定性, 在  $\text{CO}_2$  捕集和吸附方面应用广泛。Mao 等<sup>[29]</sup>通过“表面蚀刻”的方法制备了  $\text{mSiO}_2$  纳米颗粒(图 3B)。在制备过程中 PDA/PEI 共沉积可获得具有可控结构的  $\text{mSiO}_2$  纳米颗粒, 通过筛选不同纳米尺寸和蚀刻时间来选择最大比表面积的  $\text{mSiO}_2$ , 并对 FDH 和 CA 进行共固定化来验证了该固定体系在催化  $\text{CO}_2$  还原反应中的效率。 $\text{mSiO}_2$  高比表面积和 PDA/PEI 表面改性大幅提高了  $\text{CO}_2$  的吸附和解吸性能, 使得以其为载体进行固定的 FDH 催化速率是游离酶 30.8 倍;

且在经过 10 次循环后, 其活性仍能保持 86.7%; 贮存 3 周后酶活性仍维持 55.3%, 具有优良的可重复性和贮存稳定性。这为介孔材料促进酶催化还原  $\text{CO}_2$  提供了新的途径。Pietricola 等<sup>[32]</sup>利用 3 种不同孔径的  $\text{mSiO}_2$  研究了硅孔径对酶固定化的影响, 通过在  $\text{mSiO}_2$  上接枝乙醛基团来共价固定 FDH, 发现固定酶的活性随着孔径的增大而增加。Gomes 等<sup>[33]</sup>则采用硅质介孔结构蜂窝状泡沫(mesostructured cellular foams, MCF)来对  $\text{CO}_2$  还原制甲醇的 3 种酶进行了共固定化, 由于 FDH (84 kDa)<sup>[34]</sup>、FADH (170 kDa)<sup>[35]</sup>、ADH (141 kDa)<sup>[36]</sup>分子量较大, 所以选择孔径更大的介孔硅材料作为固定载体是保证其酶活性的关键。该固定体系的催化速率是游离酶体系的 4.5 倍, 最高可以达到 1.35 mmol/(L·min)的催化活性。硅基和碳基多孔材料都具有均匀、相互连接的大孔和介孔, 从而保证了它们结构上的高比表面积特点, Baccour 等<sup>[37]</sup>开发了一个流动式双酶反应体系, 将 FDH 和用于 NADH 再

生的磷酸脱氢酶(phosphite dehydrogenase, PtDH)共固定在介孔硅和碳材料中, 40 min 内甲酸的产率分别可以达到 0.032 mmol/L 和 0.192 mmol/L。这是由于双介孔结构(7 nm 和 14 nm)的碳材料<sup>[38]</sup>比表面积更大, CO<sub>2</sub> 的吸附能力更强, 更有利于酶催化反应的进行。

氧化石墨烯(graphene oxide, GO)由于独特的平面结构、大的比表面积和生物相容性, 同样被认为是固定酶的理想载体。Lin 等<sup>[39]</sup>使用 Ni 对 GO 进行修饰得到 GO-Ni, 并通过 Ni 与 FDH 的 6×His 标签形成配位键对其进行固定化, 且 FDH 与 GO-Ni 的逐层组装形成了夹层结构, 多重的相互作用可增强酶的活性和稳定性。GO-Ni-FDH 在连续进行 8 次循环实验后仍保留了 63.81% 的相对活性, 且 20 d 后活性仍保留 31.4%。由于 GO 之间的静电相互作用常会导致其在水溶液中发生堆积, 为避免此问题, Lin 等<sup>[30]</sup>采用带相反电荷的聚电解质 PEI 对 GO 进行修饰, 通过在 GO 表面的共轭交联 PEI 可以加强酶与 GO 之间的静电和疏水相互作用, 从而使酶与材料之间的结合更加牢固, 并且 PEI 提供了更丰富的结合位点(图 3C)。GO-PEI-FDH 在 8 次循环实验后仍可保留 47.4% 的相对活性, 且 20 d 后 GO-PEI-FDH 仍保留了 24.9% 的活性, 而游离酶活性仅剩 3.48%。

受贻贝中粘性蛋白成分的启发, Lee 等<sup>[40]</sup>利用多巴胺的自聚作用在无机材料或有机材料表面形成聚多巴胺薄膜, 开发出一种简单通用的表面改性方法。通过共沉淀法使无机材料与酶共同形成微球实现酶的包裹, 并利用多巴胺等材料的自聚作用在微球表面形成一层壳, 最终去除模板得到空腔包覆酶的微胶囊, 微球内部的大空腔环境保证了酶在催化过程中的自由度和活性。Wang 等<sup>[41]</sup>利用邻苯二酚对明胶进行改性, 得到可以与酶共价交联的改性明胶

(catechol-modified gelatin, GelC), 构建了一个基于超薄微胶囊的高效多酶级联系统。首先将 FDH 与 CaCO<sub>3</sub> 通过共沉淀法合成了微球模板。随后将共价交联 FADH 的 GelC 涂抹在微球表面, GelC 会诱导硅酸盐的水解和凝结, ADH 随着 SiO<sub>2</sub> 外壳的自组装而被包覆在球壳夹层中。最终使用 EDTA 去除 CaCO<sub>3</sub> 微球模板得到了含有 3 种脱氢酶的 GelCSi 微胶囊。与游离酶级联反应相比, 该反应体系大幅提高了甲醇的产量和选择性, 且在经过 9 次循环性实验后酶活性仍保留 52.6%。通过 3 种酶基于材料的顺序组装和空间效应, 创建了一种高效还原 CO<sub>2</sub> 制备甲醇的新途径。Wang 等<sup>[31]</sup>使用 ZIF-8 作为模板, 首先通过“一锅法”将 FDH、GDH、CA 包覆在 ZIF-8 当中, 随后通过多巴胺的自聚合作用在 ZIF-8 表面涂上聚多巴胺薄层, 最终在酸性环境中去除 ZIF-8 模板, 得到了外层厚度仅为 48 nm 的超薄聚多巴胺微胶囊(图 3D)。经过微胶囊包覆的酶比游离酶表现出更高效的催化效率, 1 h 内甲酸的产率达到了 2.1 mmol/L, 证明了 PDA 微胶囊作为新型酶固定载体的巨大潜力。

磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs)的最佳尺寸一般在 10–20 nm 左右, 具有比表面积大、流动性高和传质速率快等特点。更重要的是, 通过施加外部磁场, 可以实现快速的分离和回收<sup>[42]</sup>。MNPs 具有较好的生物相容性, 因此, 各种 MNPs 的改性和/或功能化方法被开发出来, 用于有效地固定各种具有工业重要性的酶和生物分子<sup>[43]</sup>。碳酸酐酶可以将 CO<sub>2</sub> 转化为 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 加快了底物的水合速率, 有利于酶催化反应的更高效进行<sup>[44]</sup>。Ali 等<sup>[45]</sup>对 MNPs 进行硅烷化处理赋予其表面丰富氨基, 并通过交联剂戊二醛实现了对人类碳酸酐酶(hCA I)的共价固定化。固定体系在反应 13 个周期后, 仍

具有 61% 的初始活性, 显示出良好的循环稳定性, 为酶催化还原  $\text{CO}_2$  生产高值化学品提供了新的思路。

### 1.3 MOF 固定 FDH/FADH/ADH

金属有机框架(MOF)材料是目前  $\text{CO}_2$  转化关键酶固定化的理想材料之一, 其超高的比表面积和孔隙率、可调节的孔径大小、结构的多样性和可设计性为酶的固定提供了更多的选择。同时一些 MOF 骨架上的活性官能团会在酶催化过程中起到协同促进作用, 如 MOF 能促进对底物  $\text{CO}_2$  的吸附从而促进反应的进行。此外, MOF 可以减少酶的团聚, 使底物更有效地接近活性部位, 从而提高酶的催化活性。MOF 也可以保护酶的构象以获得更高的催化活性。当酶处于苛刻条件下, 如极端的 pH 值、温度或有机溶剂, 酶的构象会发生变化, 导致酶的活性下降甚至失活。当酶被嵌入 MOF 时, 可有效避免酶结构的破坏, 从而提高了酶对变性条件的耐受性, 增加了酶的稳定性。

UiO-66- $\text{NH}_2$  和 ZIF-8 材料由于其结构可控、表面官能团可设计、功能性强、比表面积大和孔隙率高的特点, 非常适合作为酶的固定载体。Chai 等<sup>[46]</sup>使用 PDA/PEI 改性的聚丙烯膜作为整个酶催化反应体系的支撑体, 通过 PDA 的邻苯二酚基团与 MOF 中金属配体(Zr 或 Zn)的螯合作用, 使得 UiO-66- $\text{NH}_2$  和 ZIF-8 可以在膜表面成核并原位固定 FDH 和 CA。构筑的 FDH&CA@UiO-66- $\text{NH}_2$  和 FDH&CA@ZIF-8 体系在催化 4 h 后, 甲酸产量分别达到 13% (3.7  $\mu\text{mol}$ ) 和 22% (5.6  $\mu\text{mol}$ ), FDH&CA@UiO-66- $\text{NH}_2$  在经过 10 个循环反应后仍具有 80.6% 的催化活性, 并且在 150  $^\circ\text{C}$  的高温处理 1 h 后仍能检测到酶活性, 明显提高了 FDH 和 CA 的稳定性, 为生物处理高温废气提供了新的可能性。使用 ZIF-8 作为酶固定材料时酶催化效率会更

高, 这可能归结于 ZIF-8 中的咪唑基团对底物  $\text{CO}_2$  的水合作用, 咪唑基团可以作为亲核试剂用于 CA 将  $\text{CO}_2$  转化为  $\text{HCO}_3^-$ , 从而提高甲酸产量。基于此, Chai 等<sup>[47]</sup>在 FDH&CA@ZIF-8 工作的基础上进一步开发了一种使用具有螺纹通道的微型混合器来加强  $\text{CO}_2$  的传递速率, 并采用仿生矿化法将包裹 FDH 和 CA 的 ZIF-8 共固定在螺纹通道的表面上。这种螺纹结构的通道增加了气体和液体之间的接触面积, 从而提高了酶级联反应的底物传质速率和  $\text{CO}_2$  的水合速率, 该反应体系在 4 d 后转化率达到 91% 且趋于平稳, 甲酸的产率达到了 13 mmol/L。Ren 等<sup>[48]</sup>同样使用 ZIF-8 作为载体来固定 FDH 和 CA, 并在固定体系中首次引入用于 NADH 再生的 GDH。通过共固定化和混合固定法 2 种酶固定方式分别构建了 Co-IMR 和 Mix-IMR 两种纳米级多酶级联反应体系, 以检验不同固定方式对酶催化反应的影响(图 4A)。由于 Mix-IMR 体系中 NADH 的转移具有较高的传质阻力, 所以在实际的催化反应中 Mix-IMR 体系的催化性能远不如 Co-IMR 体系, 后者的甲酸产量是前者的 5 倍, 且 Co-IMR 体系在经过 8 次循环反应后仍保留了 50% 的催化活性, 而 Mix-IMR 仅经过 2 次循环后便失去活性。当然, ZIF-8 不仅可以作为酶的固定载体用于反应体系中, 还可以作为吸附剂提高反应体系中  $\text{CO}_2$  的浓度, Du 等<sup>[52]</sup>认为 ZIF-8 会增强  $\text{CO}_2$  在反应体系中的扩散, 从而增加了反应体系中  $\text{CO}_2$  浓度。在加入 0.03 g/L 的 ZIF-8 后, 甲酸的产量在反应 24 h 后增加了 2.1 倍。Li 等<sup>[49]</sup>则是将 CA、FDH、GDH 这 3 种酶使用逐层自组装的方法固定在可高效吸附  $\text{CO}_2$  的 MOF 材料 MIL-101 上(图 4B)。并在反应开始前对 MOF 材料进行  $\text{CO}_2$  的高压吸附处理, 反应过程中  $\text{CO}_2$  从 MIL-101(Cr) 内部逐渐释放出来时, 首先进入 CA 层并被转化为



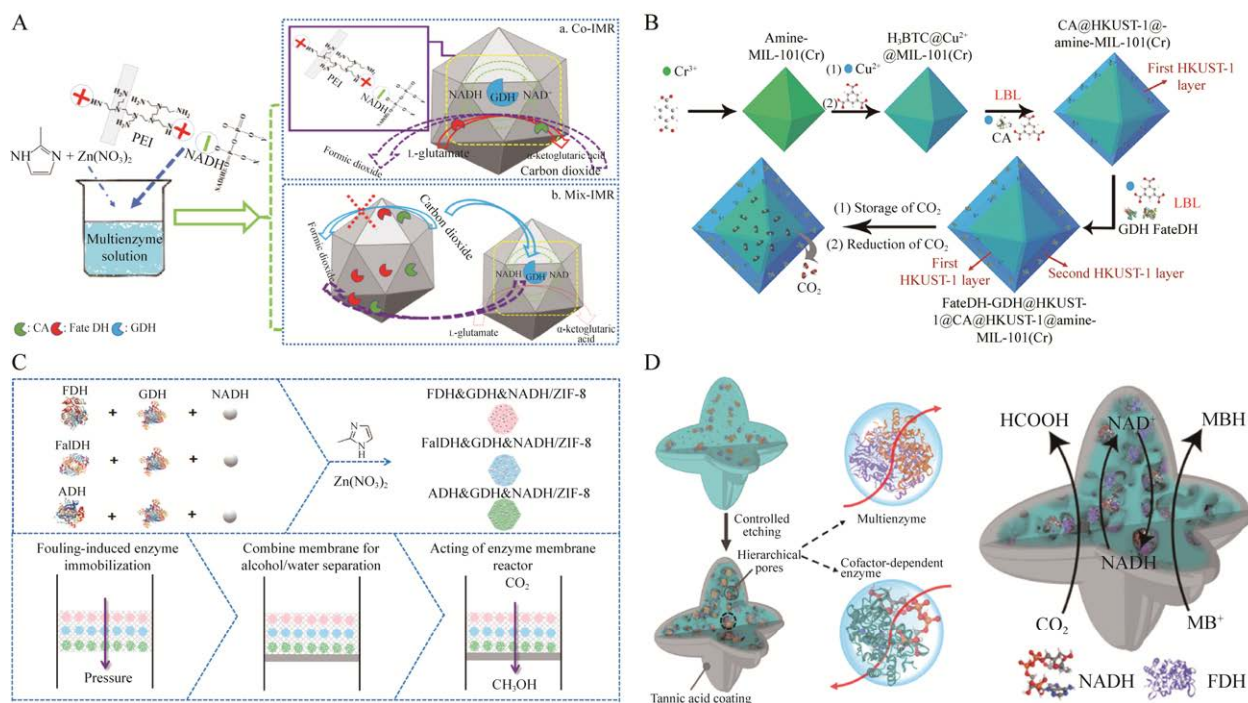


图 4 不同 MOF 材料作为酶固定化载体示意图<sup>[48-51]</sup> A: 以 ZIF-8 为载体通过共固定和混合固定的方式固定 FDH 和 GDH. B: 以 MIL-101 为载体通过逐层自组装的方式固定 CA、FDH 和 GDH. C: 以 ZIF-8 为固定载体分别固定 FDH、FADH 和 ADH, 并通过死端过滤的方式逐层分布在微孔膜中. D: 使用经单宁酸进行表面保护蚀刻处理的 ZIF-L 来固定 FDH

Figure 4 MOF materials as carriers for enzyme immobilization<sup>[48-51]</sup>. A: Co-and mixed immobilization of FDH and GDH using ZIF-8 as a carrier. B: Immobilization of CA, FDH and GDH by layer-by-layer self-assembly using MIL-101 as a carrier. C: FDH, FADH and ADH were immobilized separately using ZIF-8 and distributed layer by layer through the microporous membrane by dead-end filtration. D: Immobilization of FDH using ZIF-L treated with tannic acid for surface protection etching.

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 并进一步在 FDH&GDH 层被还原为甲酸。与使用鼓泡 CO<sub>2</sub> 作为底物的游离酶级联反应相比, 将 CO<sub>2</sub> 预先储存在 MOF 中并在反应时逐步扩散到不同酶层的过程, 甲酸的产量提高了 13.1 倍(3.52 mmol/L), 且在 10 个循环反应后, 甲酸总产量高达 30 mmol/L。Zhu 等<sup>[50]</sup>将 ZIF-8 和渗透膜相结合构建了一种 CO<sub>2</sub> 还原制甲醇有序多酶级联反应体系(图 4C), 首先将 FDH、GDH、NADH (FDH&GDH&NADH), FADH、GDH、NADH (FADH&GDH&NADH) 和 ADH、GDH、NADH (ADH&GDH&NADH) 分别嵌入 ZIF-8 中, 制得酶/ZIF-8 纳米复合材

料, 通过死端过滤的方式将 3 种酶/ZIF-8 纳米复合材料依次置于微孔膜中实现酶的有序共固定化。渗透膜的引入可以有效降低反应体系中甲醇的浓度, 促进了 CO<sub>2</sub> 朝甲醇方向反应的进行。同时, 由于酶/ZIF-8 复合材料在膜孔中有序组装, 这种空间排序会使得整个多酶级联系统的结构更稳定, 中间产物的转移路线和反应方向都得到了更精确的控制, 大大提高多酶级联反应的催化效率。此外, 在每步级联反应都引入 NADH 和用于其再生的 GDH 为 3 种酶提供反应所需的辅酶 NADH, 显著提高了级联反应的催化效率, 6 h 内甲醇的产率达到了 13 μmol/L。

以 MOF 材料作为酶固定载体时,酶的活性可能因与 MOF 发生共价连接受到影响,也可能在 MOF 原位自组装过程中结构或功能遭到破坏。此外,MOF 和酶的非特异性或特异性相互作用同样可能会改变酶的活性和稳定性。此外,大多数 MOF 内部孔径结构通常小于 2 nm,这极大限制了底物、辅酶和产物的传质速率。因此,优化设计固定载体的孔径和空间布局,有望提高底物、辅酶和产物的传质效率。目前,通过蚀刻能够改变 MOF 的孔径大小。然而,大多数的蚀刻方式仅仅改变了 MOF 的表面孔径大小,无法调控 MOF 内部结构。为了实现 MOF 内部结构的精准调控,Liang 等<sup>[51]</sup>使用弱酸性酚类化合物单宁酸(tannic acid, TA)对 MOF 进行表面保护蚀刻,并通过控制 TA 的蚀刻时间,精确调整介孔尺寸范围,获得了一种二维层状多孔材料 ZIF-L,合适的孔径结构保证了 FDH (76%)和 NADH (83%)高效的包覆(图 4D)。TA 表现出表面保护和蚀刻 MOF 的优异协同效应,在蚀刻过程中 TA 既能通过缓慢释放质子来蚀刻出 MOF 内部的大孔径结构,又能包覆并保护 MOF 的外表面,避免结构塌陷。经过 TA 蚀刻的 MOF 材料为 FDH 和 NADH 在 MOF 内以较低的表面能状态重新定向和扩散提供了足够的空间,并加速了底物和中间体的扩散,酶在经蚀刻 MOF 中的催化活性比未经蚀刻的高 6.6 倍。同时,经蚀刻的 MOF 材料对 pH 和温度的耐受性得到极大的提高。这为以后设计和修饰更加适用于酶固定的 MOF 材料提供了新的方案。

#### 1.4 COF 固定 FDH/FADH/ADH

共价有机框架(COF)是一种新兴的有机多孔结晶材料,具有高结晶度、高孔隙率、结构规则性、设计灵活和稳定性强的优点<sup>[53]</sup>。特别是二维(two-dimensional, 2D) COF 的层状结构

与有序的  $\pi$ - $\pi$  堆叠可以促进电子离域,赋予其特殊的光电特性,有利于其应用于仿生光催化领域。通过将 FDH 或 FDH/FADH/ADH 固定在 COF 材料上,不仅可以提高酶的稳定性和重复性,还能基于 COF 优异的光学性能构建起酶光耦联反应体系来实现 NADH 的再生。Singh 等<sup>[54]</sup>通过改变电子推拉效应<sup>[55-56]</sup>的策略来设计 COF 的带隙,使用三元氨基单体[4,4',4''-(1,3,5-triazine-2,4,6-triyl)tris(1,1'-biphenyl)amine, Ttba]分别与 1,3,5-三甲酰苯、2,4,6-三甲酰间苯三酚、2,4,6-三甲酰基苯酚和 2,4,6-三甲酰间苯二酚反应设计合成了一系列具有不同表面积和形貌的 COF-1、COF-2、COF-3 和 COF-4 材料。三嗪基团通过形成供体-受体结构域来提高 COF 的电荷分离效率,羟基基团的引入诱导了电子推拉效应,使 COF 具有更强大的稳定性和光催化活性。其中 COF-3 和 COF-4 优异的光学性能使其应用于酶光耦联反应体系的 NADH 再生中,反应 90 min NADH 的再生效率分别达到了 73.8%和 93.6%,甲酸产量分别达到了 0.17 mmol/L 和 0.23 mmol/L。Chen 等<sup>[57]</sup>使用介孔烯烃连接的 COF 材料 NKCOF-113 作为固定载体,将电子介质 Rh 通过配位键修饰在 COF 框架上,FDH 嵌合在材料的孔径中,构建了一个新型的人工酶光反应体系还原 CO<sub>2</sub>,反应 1 h 后甲酸的产率达到了 3.65  $\mu$ mol/L。COF 材料优异的光学性能使其在光催化领域得到了广泛的研究,酶光催化反应体系的耦联促进了光学和生物学两类学科深度的交叉融合,为酶光耦联反应提供了理论和技术支撑。

因此,本节通过介绍近年来不同种类固定载体的固定方式和固定效果,总结了不同固定体系的催化效率(表 1),为酶-电、酶-光偶联催化反应体系的构建提供了更多的载体选择和固定新方案。

表 1 不同载体固定 FDH/FADH/ADH 还原 CO<sub>2</sub> 制备甲酸/甲醇的比较  
Table 1 Comparison of various carriers for immobilizing FDH/FADH/ADH to reduce CO<sub>2</sub> to produce formic acid/methanol

Enzyme	Carriers	Loading efficiency (%)	Load capacity (mg)	NADH (mmol/L)	Reaction time (h)	Yield (mmol/L)	Relative activity (%)	Selectivity (%)	References
FDH	PE HFM	100	1.16	1.0	9.00	0.356	53.6	35.6	[21]
FDH/CA	Janus membrane	15	0.06	50.0	1.00	—	—	89.0	[22]
FDH	PEI-PAA-PE membranes	—	2.00	50.0	1.00	0.050	430.0	—	[23]
FDH	PDA/PEI-SiO <sub>2</sub> microspheres	—	2.00	50.0	1.00	0.080	740.0	—	[23]
FDH/FADH/ADH	UF membranes	60–90	2.76	50.0	5.00	1.000–1.500	—	—	[27]
FDH/FADH/ADH	UF membranes	76	2.66	5.0	3.00	1.217	—	73.0	[24]
FDH/CA	PDA/PEI-mSiO <sub>2</sub> microspheres	62.1	4.10	50.0	1.00	0.357	—	—	[29]
FDH	MCF	52.2	1.01	10.0	2.00	0.080	105.0	0.8	[30]
FDH/FADH/ADH	MCF	82–9	5.00	100.0	1.00	0.405	350.0	—	[31]
FDH/PtDH	CLEAs@Silica	—	0.50	—	0.67	0.032	—	—	[35]
FDH/PtDH	CLEAs@Carbon	—	0.50	—	0.67	0.192	125.0	—	[35]
FDH/FADH/ADH	GelCSI microcapsules	30/30/20	0.30/0.30/0.04	50.0	1.00	0.119	201.7	86.7	[40]
FDH/CA/GDH	PDA microcapsules	—	1/1/1	2.8	0.50	4.430	94.7/91.2/107.0	13.3	[41]
FDH/CA	UiO-66-NH <sub>2</sub> in membrane	20	1.40	1.0	4.00	0.185	58.7	13.0	[46]
FDH/CA	ZIF-8	44/32	0.55/0.40	1.0	6.00	0.198	—	—	[47]
FDH/CA/GDH	ZIF-8	68/74	10.23/3.72	—	8.00	13.800	62.5	—	[48]
FDH/CA/GDH	MIL-101	67/27/57	2.00/1.34/2.00	2.8	6.00	5.000	—	88.9	[50]
FDH/FADH/ADH/GDH	ZIF-8	10	0.40	10.0	6.00	0.006	—	—	[51]
FDH	ZIF-L	76	0.76	3.5	—	—	660.0	—	[52]

## 2 酶-电耦联催化 CO<sub>2</sub> 反应体系

### 2.1 电化学直接促进酶催化反应

在构建电化学与 FDH 催化还原 CO<sub>2</sub> 反应体系时, 常采用可以利用电极产生的电子的金属依赖型 FDH 参与酶电耦联反应。金属依赖型 FDH 的 Mo/W 活性位点位于蛋白质的内部, 催化过程中, 需要借助一个或多个 Fe-S 簇实现电子在外界与活性中心之间的传递, 最终电子在酶的活性中心转移给 CO<sub>2</sub> 还原生成了甲酸。在使用电极为酶催化反应提供电子的过程中, 可根据电子转移的方式分为电子直接从电极上转移到酶活性中心的直接电子转移<sup>[58]</sup> (direct electron transfer, DET) 过程和电子通过电子介质间接传递给酶的间接电子转移<sup>[59]</sup> (mediated electron transfer, MET) 过程。非金属依赖型 FDH 没有金属活性中心, 只能依靠辅酶 NADH 等来实现 MET 过程。而金属依赖型 FDH 既可以通过 DET 的方式获得电子<sup>[60]</sup>, 又可以通过氧化还原电解质等电子介质实现电子转移以促进 MET<sup>[61-62]</sup>, 所以在其应用上, 可以通过电化学的方式为酶提供电子实现酶催化反应<sup>[63-65]</sup> (表 2)。

鉴于氧化还原聚合物作为酶固定载体的稳定性及高效的负载率, 且电子可以利用其进行直接电子传递<sup>[71-72]</sup>, 所以氧化还原聚合物是酶电耦联体系的理想载体。Yuan 等<sup>[66]</sup>通过使用二

茂钴(cobaltocene, Cc)对 PAA 进行修饰获得了一种拥有替代性氧化还原电位的氧化还原聚合物(Cc-PAA), 并使用这种聚合物将金属依赖型 Mo-FDH 固定在玻璃碳电极表面, 同时完成电子传递路径。电子在氧化还原聚合物上的自我交换使得远端的 Mo-FDH 能够连接起来, 从而提供酶/氧化还原聚合物的扩展三维网络。由于 Cc 还原电位低的特性, 该固定体系可以在较低的电位下进行酶催化反应, 研究结果表明在 -0.66 V vs. SHE 的还原电位下进行了 90 min 的连续电催化反应, 法拉第效率达到 99%±5%。为克服气体反应物 CO<sub>2</sub> 的传质难题, Szczesny 等<sup>[67]</sup>采用气体扩散电极, 并使用人工电子介质紫罗碱(viologen, vio)对聚(4-苯乙烯磺酸酯-甲基丙烯酸缩水甘油酯-丙烯酸丁酯) [P(SS-GMA-BA)]进行修饰, 成功聚合物材料移植到电极上。这种带负电荷的聚合物[P(SS-GMA-BA)-vio]的氧化还原电位与 W-FDH 的氧化还原电位相同, 确保了大量 W-FDH 的有效连接(图 5A)。在 -0.59 V vs. SHE 的还原电位下反应 45 h 后, 酶固定电极仍保留 80%的活性, 电解液中甲酸的浓度可达到 41.3–56.5 μmol/L。Kuk 等<sup>[68]</sup>则通过使用导电的聚苯胺(polyaniline, PANi)纳米水凝胶作为 W-FDH 传输电子, 使用交联剂戊二醛将 W-FDH 共价交联在 PANi 水凝胶电极的三维网络上, 构建酶-电还原 CO<sub>2</sub> 体系(图 5B)。PANi 水凝胶电极

表 2 不同酶电还原 CO<sub>2</sub> 制备甲酸/甲醇体系的性能比较

Table 2 Performance comparison of different enzyme-electrocatalytic systems for reducing CO<sub>2</sub> to formic acid/methanol

Enzyme	Load capacity (mg)	Electronic mediator	Reaction time (h)	Redox potential (V vs. SHE)	Yield (μmol/L)	Faraday efficiency (%)	References
Mo-FDH	0.060 0	Cc-PAA	1.5	-0.66	431.00	99.0	[66]
W-FDH	0.095 0	P(SS-GMA-BA)-vio	48.0	-0.59	4.13–5.65	—	[67]
W-FDH	0.001 5	PANi	1.0	-0.40	1.42	92.7	[68]
FDH/FADH/ADH	2.000 0	—	20.0	-1.00	1 240.00	12.0	[69]
W-FDH	0.008 5	Benzyl viologen	1.5	-0.60	3.70	100.0	[70]

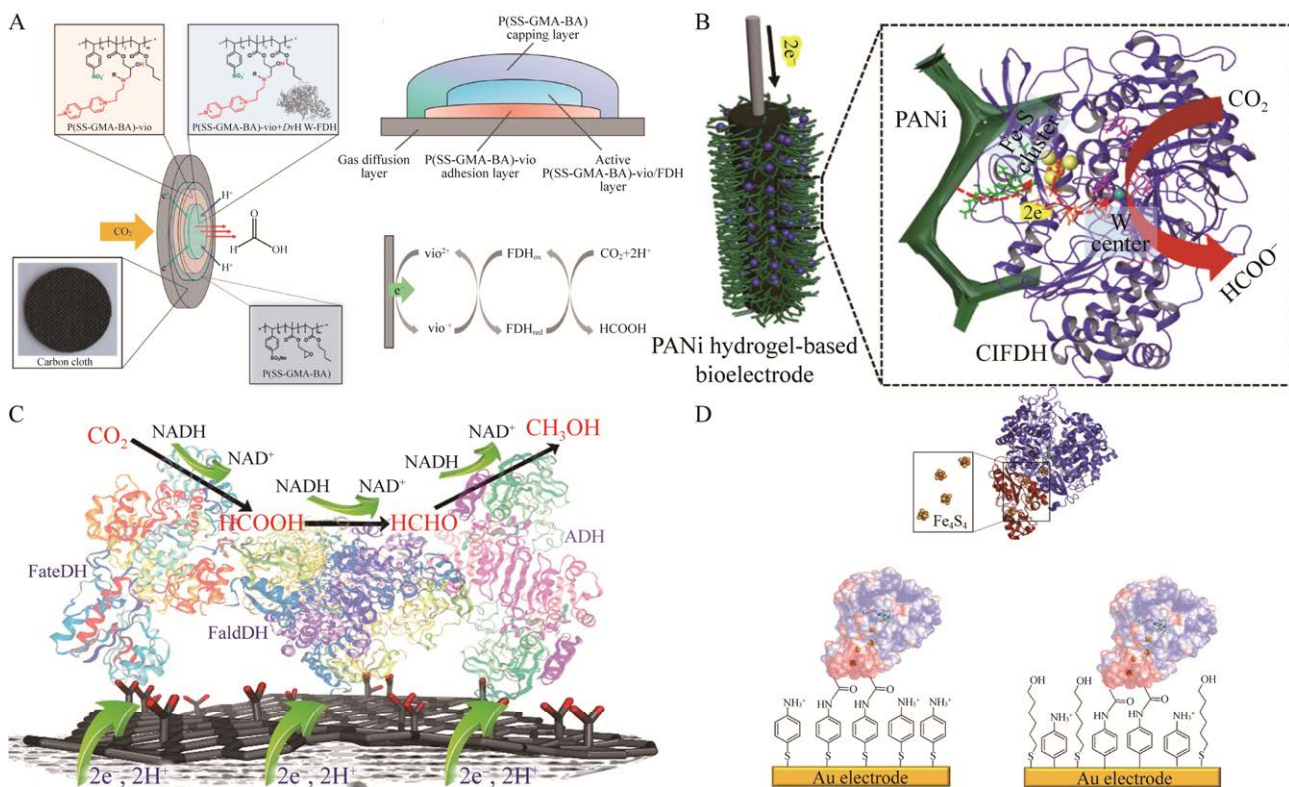


图 5 不同固定载体和构建方式的酶-电耦联反应还原  $\text{CO}_2$  生产甲酸示意图<sup>[67-70]</sup>

A: 使用聚合物/酶基气体扩散电极实现酶-电催化还原  $\text{CO}_2$ . B: CIFDH-PANi 电极利用导电 PANi 水凝胶直接电子转移到 CIFI DH, 实现酶电还原二氧化碳转化为甲酸. C: FDH、FADH 和 ADH 通过功能化石墨烯载体的直接电子转移催化  $\text{CO}_2$  还原成甲醇. D: 将 FDH 共价固定在带有 4-ATP SAM 和 AP+MH 混合层的改性金电极上

Figure 5 Enzyme-electrocatalytic reaction system for  $\text{CO}_2$  reduction with different immobilized carriers and integration methods<sup>[67-70]</sup>. A: Polymer/Enzyme-based gas diffusion layer for enzyme-electrocatalytic reduction of  $\text{CO}_2$ . B: CIFI DH-PANi electrode for the enzyme-electrocatalytic reduction of  $\text{CO}_2$  to formic acid using direct electron transfer from a conductive PANi hydrogel to CIFI DH. C: FDH, FADH and ADH were covalently immobilized on a functionalized graphene carrier to produce methanol *via* direct electron transfer. D: FDH was covalently immobilized on a modified gold electrode with a 4-ATP SAM and a mixed AP+MH layer.

由于其连续的、分层的三维纳米纤维网络结构表现出较短的电子传递路径和有效的电子传递网络,大大加快了电子传递的效率,从而在  $-0.6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  的应用电位下法拉第效率达到 92.7%,反应 1 h 内甲酸产量达到  $1.42 \mu\text{mol/L}$ 。

FDH、FADH 和 ADH 构建的三酶级联反应是  $\text{CO}_2$  还原制甲醇的有效途径<sup>[73]</sup>,而酶级联反应与电催化耦联时则需要考虑每种酶直接接受

电子的能力<sup>[63,74-75]</sup>。Seelajaroen 等<sup>[69]</sup>进一步尝试了对 3 种脱氢酶进行共固定以构建  $\text{CO}_2$  还原制甲醇电化学体系(图 5C)。首先对导电性极好的石墨烯进行羧基化修饰(G-COOH),FDH、FADH 和 ADH 通过酰胺键与羧基改性 G-COOH 共价结合。在  $-1.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  的应用电位下多酶级联固定体系的法拉第效率为 12%,甲醇的产率为  $0.6 \mu\text{mol/h}$ 。尽管这种级联体系中电子直接传递的法拉第效率较低,但相较于纯金属



电还原体系, 其具有底物选择性高和反应过电位低的优势, 同时避免了 NADH 带来的高昂成本。Alvarez-Malmagro 等<sup>[70]</sup>采用氨基修饰的金电极来固定 W-FDH 以研究其在酶-电催化 CO<sub>2</sub> 活性(图 5D)。尽管 W-FDH 可以被固定在氨基修饰的金电极表面, 但由于仅有单层 FDH 的 Fe-S 簇会与电极表面氨基发生静电相互作用, 导致酶与电极之间的 DET 效率极低, 无法实现 CO<sub>2</sub> 的还原<sup>[76]</sup>。为探究电极上酶的全部电活性, 在反应体系中引入电子介质苜蓿紫精, 电子介质引导的 MET 的催化电流约是 DET 的 3 倍。而使用比表面积更大的多孔石墨烯电极来固定 FDH 时, 则会因高酶负载量表现出比金电极高得多的催化电流。

## 2.2 电化学还原辅酶再生及 CO<sub>2</sub> 还原集成体系

在酶催化还原 CO<sub>2</sub> 制备甲酸/甲醇的过程

中, 辅酶 NADH 的高昂成本一直是限制规模应用的难题, 电化学反应体系可以为酶催化体系持续提供质子和电子以实现 NADH 的还原再生(表 3)。酶电催化反应体系构筑的前提是酶的固定化, 同时酶电反应体系中电子的传递也是至关重要的。电极材料直接作为酶固定载体参与反应是最简单直接的方式; 另外, 将酶固定载体置于电解液中也是耦联反应体系常见的固定方式。

Barin 等<sup>[77]</sup>利用双室电化学装置的阴极进行酶电催化 CO<sub>2</sub> 还原合成甲酸(图 6A 左)。选用经过改性的电纺聚苯乙烯纳米纤维(electrospun polystyrene nanofibers, EPSNF)对 FDH 进行共价固定, 同时选择泡沫铜电极实现 NADH 的电化学再生。经过硅烷化和戊二醛修饰的 EPSNF 对酶的亲和性得到了明显的改善, 这有利于提高酶的固定化效率和相对活性, 同时因为 EPSNF 多孔结构和高比表面积的特点降低了底物传质

表 3 含 NADH 再生的酶电/光反应体系还原 CO<sub>2</sub> 制备甲酸/甲醇的比较

Table 3 Comparison of formic acid/methanol production from CO<sub>2</sub> reduction by enzyme-electrocatalytic/photocatalytic reaction system containing NADH regeneration

Enzyme	Carriers	Loading efficiency (%)	Load capacity (mg)	Reaction time (h)	Yield (mmol/L)	Optimal NADH (mmol/L)	NADH regeneration efficiency (%)	TON	References
FDH	EPSNF	57.0	8.55	5.0	0.310	0.51	96.1	—	[77]
FDH	PEI@SBA-15	—	10.00	3.0	1.120	2.00	—	—	[78]
FDH	Nanoporous carbon	93.0	0.32	5.0	1.290	0.50	—	—	[79]
FDH/ADH	Carbon felt	21/36	0.85/1.45	18.0	—	5.00	95.0	—	[80]
FDH	NU-1006	—	4.80	1.0	79.000	1.00	90.0	1.3×10 <sup>4</sup>	[81]
FDH/FADH/ADH	ZIF-8	25.0	3.00	3.0	0.740	1.00	80.8	—	[82]
FDH	PAA-HFM	100.0	1.16	4.5	1.630	2.00	—	125	[83]
FDH/FADH		100.0	0.50/0.15	48.0	0.420	1.00	—	125	[84]
FDH	PCN	—	6.00	12.0	2.800	0.66	65.6	—	[85]
FDH	MIL-125-NH <sub>2</sub>	—	6.00	24.0	9.500	0.66	66.4	—	[86]
FDH	NU-1006	—	4.50	24.0	144.000	0.28	28.0	865	[87]
FDH	NKCOF-113	76.0	2.28	2.5	0.009	—	9.2	—	[57]
FDH/FADH	ZIF-8	86.0	13.00	8.0	0.008	0.75	75.0	—	[88]
FDH/CA	ZIF-8	80.0	8.00	5.0	0.240	0.80	75.2	—	[89]
FDH	MAF-7	12.3	0.92	9.0	16.750	1.00	28.0	—	[90]
FDH	NSs	32.3	—	48.0	0.260	0.50	36.0	1 360	[91]

阻力。固定化酶和 NADH 再生的铜电极都位于电池的阴极,而阳极则通过电解水为 NADH 的再生提供质子。该酶电体系在循环 8 个周期后仍保留 54% 的催化活性,并在贮存 20 d 后仍保留 41% 的活性。反应 5 h 后有 0.3 mmol/L 的甲酸生成。Barin 等<sup>[92]</sup>就产物甲酸抑制反应正向进行以及传质效率低的问题上,提出了一种半连续的工艺来提高体系的催化效率(图 6A 右)。即在反应过程中不断提取替换新的电解液,并对旧电解液中的甲酸进行萃取,最终这种半连续生产模式的甲酸产量提高了 42%。同时这种半连续操作避免了连续操作中溶液内 CO<sub>2</sub> 溶解度降低和微量甲酸萃取效果差的难题。Liu 等<sup>[78]</sup>使用 PEI 改性的介孔硅材料(SBA-15)作为酶固定载体,FDH 通过静电吸附的方式固定在 PEI@SBA-15 上,并利用电子介质中性红(neutral red, NR)中吡嗪环上氮原子的得失电子来介导电子转移,实现 NADH 的再生(图 6B)。耦联体系在反应 3 h 后可生产 1.118 mmol/L 的甲酸,是游离酶体系的 3.7 倍。

直接使用电极材料作为酶固定载体负载酶和电子介质是提高电子转移效率的有效方法。Hernández-Ibáñez 等<sup>[79]</sup>直接将 FDH 和 Rh 电子介质共同固定在多孔碳纳米电极(图 6C),研究了生物阴极的 NADH 再生性能和将 CO<sub>2</sub> 还原为甲酸的性能。Pietricola 等<sup>[80]</sup>使用乙醛基修饰的碳毡电极直接共价固定 FDH,将其用于可重复的生物阳极,并探讨了 NADH 电化学再生性能。多孔金属氧化物 TiO<sub>2</sub> 在通电环境下可以实现较高的电流密度,所以可被用作酶电催化的固定载体。Miller 等<sup>[93]</sup>选用 TiO<sub>2</sub> 作为载体构建了一种固定酶在光照条件下催化还原 CO<sub>2</sub> 的反应体系。首先选用在光的作用下能激发电子的 2 种光敏剂(三-2,2'-联吡啶钌复合物 RuP 或吡咯并吡咯二酮 DPP)对 TiO<sub>2</sub> 进行修饰,W-FDH 与其产生

强烈的静电相互作用被固定在表面。反应过程中,光激发的电子通过 TiO<sub>2</sub> 传递到 W-FDH 的钨活性位点上,催化 CO<sub>2</sub> 还原为甲酸。这种通过光激发生成电子的方式极大节省了酶催化反应中辅酶带来的高昂成本,但由于 W-FDH 对反应条件的严苛要求,该反应体系在无氧环境下 24 h 内甲酸的产率仅为 4.8 μmol/L。Farha 等<sup>[81]</sup>则将 MOF 材料的酶固定化与电化学结合构建了一种生物电催化系统(图 6D),选用孔径尺寸与 FDH 大小相匹配的 NU-1006 作为固定材料对酶进行包覆,将负载 FDH 的 NU-1006 沉积在 Rh 电子介质修饰的氟掺杂氧化锡石墨电极上,还原 CO<sub>2</sub> 的同时实现辅酶 NADH 的再生。在 -1.1 V vs. Ag/AgCl 的电位下反应 1 h,甲酸的浓度达到了 79 mmol/L (游离酶甲酸浓度为 25 mmol/L),这相当于进行了 79 次 NADH 的循环再生,即实现了  $1.3 \times 10^4$  次催化转换数(turnover number, TON)。

将固定化的 CO<sub>2</sub> 转化关键酶置于电解液中也是酶电耦联反应实现 NADH 再生的一种方式。Zhang 等<sup>[82]</sup>将 FDH、FADH、ADH 三种酶包覆在 ZIF-8 中并放置于电解液中,使用 Rh 电子介质进一步修饰被 PDA/PEI 沉积的碳毡电极,共同构建了一种多酶级联电化学耦合体系。该耦合体系在 -0.7 V 的外加电位下反应 3 h,甲醇浓度可以达到 0.742 mmol/L,同条件下游离酶体系的甲醇浓度只有 0.061 mmol/L。

酶电催化反应体系的耦联极大促进了酶电还原 CO<sub>2</sub> 的催化效率,并降低了辅酶 NADH 带来的成本。同时,酶反应体系和电反应体系的结合为生物学和电化学领域提供了新的交叉思路和技术手段。将酶催化体系高选择性与电催化体系高电子转移效率的优势有机结合,是不断探究的课题。如为实现 DET 的高效催化,利用静电定向的策略来辅助建立直接电子转移

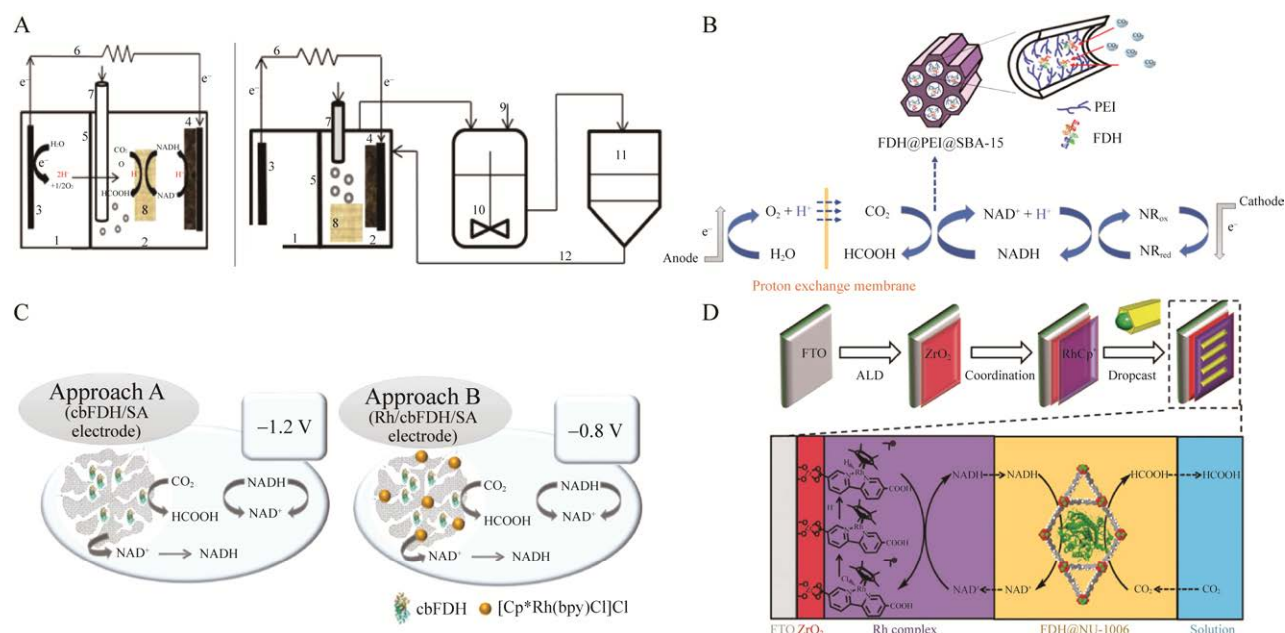


图 6 不同固定载体构建酶电耦联反应体系生产甲酸并催化 NADH 还原再生反应示意图<sup>[78-79,81,92]</sup>

A: 改性 EPSNF 固定 FDH 构建酶电耦联反应催化体系分批操作和半连续操作示意图. B: 使用介孔硅材料固定 FDH, 并利用电子介质中性红实现 NADH 的再生构建酶电催化反应体系. C: 利用介孔碳固定 FDH 和 Rh 电子介质实现酶电还原  $\text{CO}_2$  生产甲酸. D: 以孔径尺寸与 FDH 相匹配的 NU-1006 作为酶固定载体, 沉积在石墨电极上实现酶电耦联催化还原  $\text{CO}_2$  生产甲酸

Figure 6 Enzyme-electrocatalytic reaction system combining with the regeneration of NADH reduction for  $\text{CO}_2$  reduction<sup>[78-79,81,92]</sup>. A: Batch operation and semi-continuous operation for the construction of enzyme-electrocatalytic system using modified EPSNF immobilized FDH. B: Construction of enzyme-electrocatalytic reaction system using mesoporous silicon material to immobilize FDH and regeneration of NADH via NR. C: Formic acid production by enzyme-electrocatalytic reduction of  $\text{CO}_2$  using mesoporous carbon electrode immobilized with FDH and Rh complex. D: Formic acid production by enzyme-electrocatalytic reduction of  $\text{CO}_2$  using NU-1006 immobilized FDH and Rh modified FTO electrode.

路径, 通过 X 射线晶体学分析蛋白质的表面电荷区域分布, 从而对电极进行修饰, 以建立电子从电极到活性中心的最佳传递路径<sup>[94-95]</sup>。或通过对电极表面进行功能化修饰, 以模拟酶与底物之间的特性, 从而提高电子转移效率<sup>[96]</sup>。在构建间接电子传递体系的过程中, 电子的高效转移取决于电子介质的还原电位与酶的还原电位之间的电位差, 因此, 选择合适的电子介质是酶电催化反应高效进行的关键<sup>[97]</sup>。同时, 耦联反应体系的严格反应条件和复杂的作用机理目前还需进一步研究。

### 3 酶-光耦联催化 $\text{CO}_2$ 反应体系

光催化反应具有温和、清洁和可再生能源的优势, 温和的酶催化和光催化反应条件是成功构建酶光耦联体系的前提, 通过改进酶固定化体系和提高光催化再生 NADH 的效率, 可以实现酶光耦联反应体系的高效催化(表 3)。

Liu 等<sup>[83]</sup>使用 PAA 改性的 HFM 作为固定载体对 FDH 进行共价固定, 并设计了一种简单利用的 UV/ $\text{SiO}_2$  光催化辅酶再生装置(图 7A), 通过流动相将反应体系串联起来构建了一种高

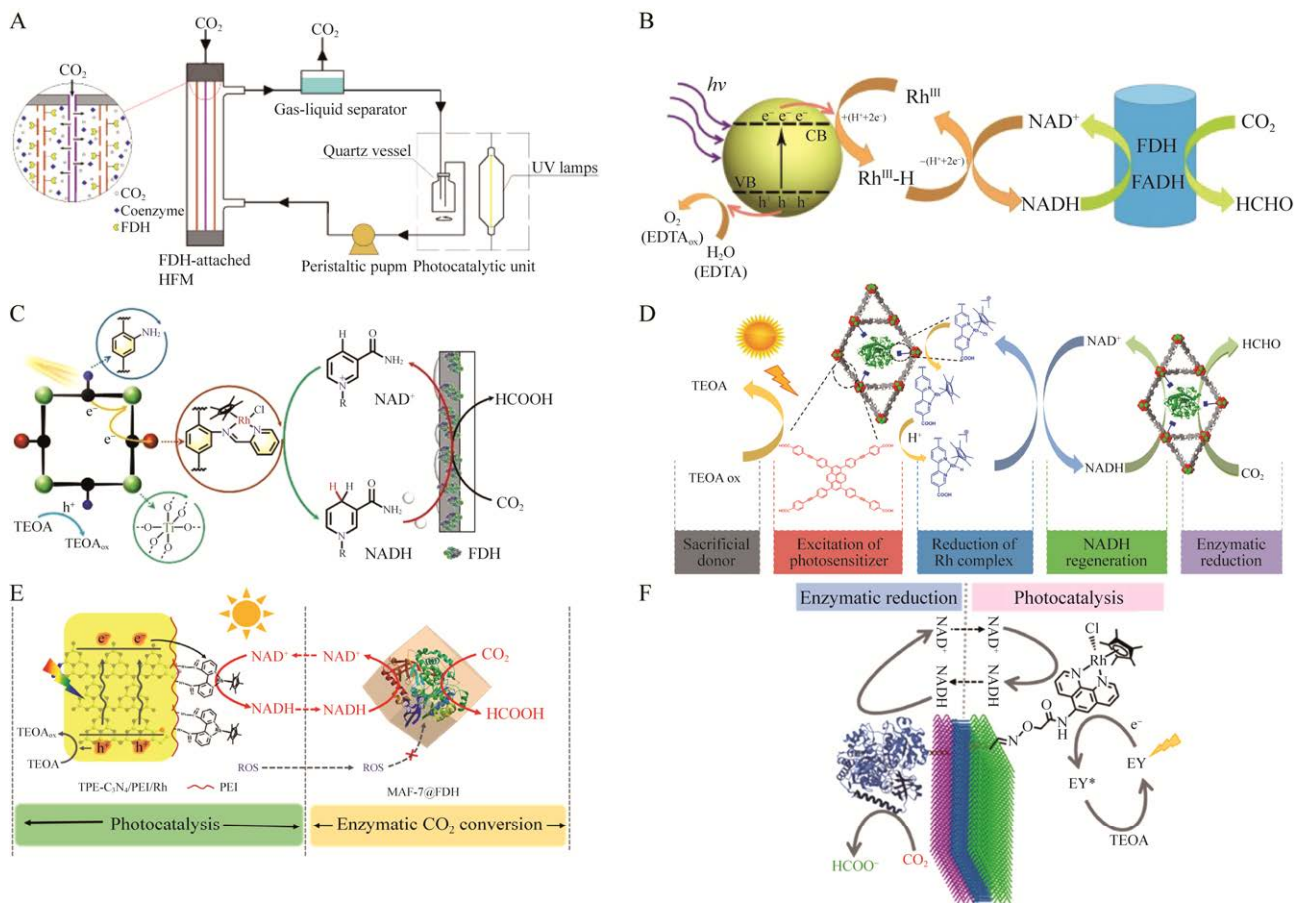


图 7 不同固定载体构建酶光耦联反应体系生产甲酸并催化 NADH 还原再生反应示意图<sup>[83-84,86-87,90-91]</sup>

A: 以 PAA 改性 HFM 作为载体共价固定 FDH, 构建流动的酶光反应体系还原 CO<sub>2</sub>. B: 以 HFM 作为载体固定 FDH、FADH, 构建酶光催化 CO<sub>2</sub> 还原制备甲醛反应体系<sup>[84]</sup>. C: 利用 Rh 电子介质掺杂 MIL-125-NH<sub>2</sub> 和疏水膜固定 FDH 共同构建酶光反应体系还原 CO<sub>2</sub>. D: 以孔径尺寸与 FDH 相匹配的 NU-1006 作为酶固定载体实现酶光耦联催化还原 CO<sub>2</sub> 生产甲酸. E: 利用噻吩修饰 C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 固定 Rh 电子介质, MAF-7 固定 FDH 构建分区化酶光耦联反应体系. F: 使用两面呈现不同 DNA 序列的 DNA 纳米片固定 Rh 电子介质和 FDH, 构建分区化酶光耦联反应体系

Figure 7 Immobilized carriers for construction of enzyme-photocatalytic reaction system combining with the regeneration of NADH reduction to convert CO<sub>2</sub> to formic acid<sup>[83-84,86-87,90-91]</sup>. A: Covalent immobilization of FDH on PAA-modified HFM as a carrier to construct a mobile enzyme-photocatalytic reaction system for CO<sub>2</sub> reduction. B: HFM as a carrier to immobilize FDH and FADH in the enzyme-photocatalytic reaction system for CO<sub>2</sub> reduction<sup>[84]</sup>. C: CO<sub>2</sub> reduction by enzyme-photocatalytic reaction system using Rh-doped MIL-125-NH<sub>2</sub> and hydrophobic membrane immobilized FDH. D: Production of formic acid by enzyme-photocatalytic reduction of CO<sub>2</sub> using NU-1006 as an enzyme immobilization carrier. E: Construction of a zoned enzyme-photocatalytic reaction system using thiophene-modified C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> immobilized with Rh complex and MAF-7 immobilized FDH. F: Construction of zoned enzyme-photocatalytic reaction system using DNA nanosheets presenting different DNA sequences on both sides to immobilize Rh complex and FDH.

效酶光催化还原  $\text{CO}_2$  的连续反应体系,使得  $\text{CO}_2$  还原制甲酸的初始反应速率提升了 7.43 倍 [ $1.04 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ], 4.5 h 后的甲酸总产量也达到了  $1.634 \text{ mmol}/\text{L}$ 。疏水型微孔 HFM 的引入有效强化了气液混合过程,加快了反应的传质效率,同时反应体系的流动循环性降低了中间产物对反应的抑制作用。该团队<sup>[84]</sup>进一步利用 HFM 对 FDH 和 FADH 两种酶进行了共价共固定,同样使用 UV/ $\text{TiO}_2$  光催化体系进行 NADH 再生(图 7B)。通过改进 FDH 和 FADH 的负载比例(1:0.3)实现反应效率的最优化,集成体系在 48 h 内的甲醛产量持续增长,最终达到  $0.42 \text{ mmol}/\text{L}$ ,同时 NADH 的 TON 值在 4.5 h 后可达到 125,集成体系明显改善 NADH 的再生效率问题,为以后开发多酶级联固定体系与光催化还原体系的集成提供了更多的可能性。Zhang 等<sup>[85]</sup>通过将 Rh 电子介质共价连接在氨基修饰的聚合氮化碳(polymeric carbon nitride, PCN)上构建了一种可以有效实现 NADH 再生的人工光催化系统,并进一步与固定 FDH 的疏水膜进行耦联,实现了酶光催化还原  $\text{CO}_2$  的高效集成,耦联体系在光照条件下反应 12 h 生成了  $2.8 \text{ mmol}/\text{L}$  的甲酸。Lin 等<sup>[86]</sup>则使用 Rh 电子介质掺杂的 MOF 材料 MIL-125- $\text{NH}_2$  构建了用于 NADH 再生的光催化体系(图 7C),使用能在酶周围形成气-液-固界面的疏水膜作为 FDH 固定载体,该耦联体系在 24 h 内甲酸的产量达到了  $9.5 \text{ mmol}/\text{L}$ 。

在酶催化与光再生集成反应过程中,将生物催化反应需要的酶和光催化辅酶再生需要的电子介质同时固定在一材料上,是一种提高 NADH 再生效率的新思路。铅基 NU-1006 是一种水稳定性良好的 MOF 材料,铅之间是由以苣为核心、4 个羧酸为连接物相连接的,同时它还是一种有效的光敏剂,能够在 LED 的照射下产

生单线态氧。Li 等<sup>[87]</sup>通过溶剂辅助配体整合(solvent-assisted ligand incorporation, SALI)<sup>[98]</sup>将 Rh 电子介质嵌入到 NU-1006 上,并将 FDH 封装在 MOF 材料的空隙之内以实现酶固定化(图 7D)。固定体系在光照反应 24 h 后甲酸的产率可达到  $0.144 \text{ mol}/\text{L}$ ,并实现了 865/h 的 TON 值。与此同时,Chen 等<sup>[57]</sup>首次使用 COF 作为载体来构建固定化酶与 NADH 再生的人工光合作用系统。该团队合成了一种由碳碳双键建立的烯烃连接的新型 COF 材料(NKCOF-113),通过配位键将 Rh 电子介质嵌合到 NKCOF-113 的骨架上,并通过静电相互作用将 FDH 封装在 COF 的空腔之内,构成了一种全新的集成光催化-酶固定的  $\text{CO}_2$  还原体系。RhCp\*-NKCOF-113 与  $\text{NAD}^+$  之间由  $\pi$  堆积作用引起的强作用力有利于 COF 与  $\text{NAD}^+$  之间的光诱导电子转移。此外,COF 的高结晶度、多孔性和合适的孔径都有利于提高底物传质速率。在可见光的照射下,NKCOF-113 被激发产生自由电子。COF 上的 Rh 电子介质可高效地捕获光产生的电子,并与  $\text{NAD}^+$  的还原电位相匹配,促进质子和  $\text{NAD}^+$  结合转化为 NADH。RhCp\*-NKCOF-113 在 420 nm 的光照下 NADH 的表观量子产率达到了 9.17%,远高于目前报道的 COF 材料中 NADH 光再生值,同时固定酶体系在可见光照射下 2.5 h 内生成了  $9 \mu\text{mol}/\text{L}$  的甲酸。

目前大部分的固定材料并不具备光催化反应中光敏剂的功能,因此在固定体系中引入高效的光敏剂是提高 NADH 再生效率的关键。受自然界植物光合作用系统的启发,许多研究人员开始利用卟啉分子进行 NADH 再生。其中 5,10,15,20-(4-羧基苯基)卟啉[5,10,15,20-(4-carboxyphenyl)porphyrin, TCPP]作为一种卟啉衍生物,作为光敏剂已被广泛应用于光催化反



应,Zhou等<sup>[88]</sup>通过MOF材料将酶催化还原CO<sub>2</sub>反应体系与光催化再生体系串联了起来,同时解决了酶以及光敏剂等的重复利用问题。首先使用聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)将光敏剂TCPP固定在ZIF-8的表面上形成了一种立方体结构,固定后的TCPP光催化效率因为光吸收的比表面积的增大而得到了提高。再将摩尔比为2:1的FDH、FADH封装在ZIF-8的空腔中组成含光再生NADH的固定酶催化体系。在反应8h后反应体系的甲醛产率达到最高的7.74 μmol/L,转化率高达77.37%。同时80h的10次循环反应实验后,反应体系酶的活性仍保留52.93%。Yu等<sup>[89]</sup>同样使用ZIF-8为载体设计了光还原耦联酶催化体系,并在反应体系中引入了光敏剂g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>和CA以提高光催化效率和CO<sub>2</sub>水合效率。他们将光敏剂和FDH、CA混合后加入到含ZIF-8的溶液中,使用“一锅法”成功构建了光还原耦联酶催化体系,2种酶被封装在ZIF-8的孔径中,包裹酶的ZIF-8则均匀生长并负载在g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>的表面。通过这种简单方法制备的体系表现出优异的催化效果,在反应5h后生成了0.24 mmol/L的甲酸,且在重复循环10次后,酶活性仍保留了80%。

尽管在酶催化与光还原NADH辅酶再生的集成体系的研究中取得了一定的进展,但仍有2个关键的限制因素制约着这些集成系统的高效率催化,即电子转移动力学差和酶的稳定性低的问题。为了解决电子转移路径长,以及由光激发过程中产生的强氧化剂和活性自由基引起的酶失活问题,Song等<sup>[90]</sup>构建了一个新型的功能分区化光还原-酶催化反应系统(图7E),使用MOF材料将以FDH为主的酶催化体系从光催化体系中分离出来,以获得更高效的酶催化体系。首先,为了实现高效的电子传递,他们通过将Rh电子介质共轭连接到噻吩修饰的

C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>(TPE-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)上,合成了一个人工光还原系统。噻吩基团对C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>的修饰显著提高了光电子-空穴对分离和光吸收效率,Rh电子介质与光敏剂C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>的共轭缩短了电子转移的路径,芳香基团的修饰和紧密集成的结构大大增强了NADH的再生能力,NADH再生率达到9.3 μmol/(L·min)。其次,将FDH封装在MOF MAF-7内,这种材料的高稳定性和特殊的孔隙结构确保了FDH免受强氧化剂和活性自由基的影响。同时由于MAF-7中的三唑连接物具有亲水性和pH缓冲的能力,为FDH提供了一个稳定的微环境,大大增强了光合作用中酶的稳定性。因此,这种功能分区化光酶集成系统在还原CO<sub>2</sub>制甲酸过程中表现出了优异的性能,经过9h的可见光照射,产生了约16.75 mmol/L的甲酸,比游离体系高3.24倍。DNA纳米结构片(DNA nanosheets, NSs)其序列特异的分子识别特性为功能材料的空间组织提供了更多的可能性<sup>[99-101]</sup>。Fard等<sup>[91]</sup>利用肽驱动的DNA-肽-DNA三嵌段共聚物形成的NSs<sup>[102]</sup>,分别在纳米片两面选择性固定了Rh电子介质和FDH,构建了一种光酶协同进行的CO<sub>2</sub>催化还原反应,酶光反应体系的分离保护了酶免受光损伤,并降低了酶的官能团对Rh电子介质的活性影响,反应体系在光照48h甲酸的产量达到了0.26 mmol/L,同时NADH的TON值达到了1360(图7F)。

酶光耦联体系的构建并非简单的叠加效应,若功能模块匹配不适对酶活造成的负面影响是极有可能发生的。因此,在未来双体系的耦合过程中,综合考虑两者的利弊是构建的前提,Jiang等<sup>[103]</sup>就此问题探讨了耦联体系中酶催化与光催化的动力学匹配问题以及两者之间的复杂相互作用,提出了消除负面相互作用的分区策略,为酶光耦联体系的协同强化提供了思路。

## 4 结论与展望

以 FDH、FADH 和 ADH 为主的酶催化  $\text{CO}_2$  还原制甲酸/甲醇反应在以绿色低碳为重大发展战略的时代下拥有巨大的潜力。另外,在  $\text{CO}_2$  转化为甲酸/甲醇的过程中,保证酶的稳定性和重复利用性是至关重要的,反应结束后对酶实现回收再利用是降低酶催化成本的关键。目前,使用不同材质的固体材料对酶进行固定化是实现催化反应稳定进行和重复使用的最佳方法。本文主要介绍了在材料发展过程中,应用于酶固定化的主要材料与固定途径,以及它们在单酶或级联反应中的应用。最初使用膜材料作为固定载体负载 FDH 提高了  $\text{CO}_2$  的传质效率,但酶-膜之间通过化学交联进行固定化对酶活性产生了极大影响,且使用膜对酶进行物理夹带固定时,不得不考虑酶泄露造成的影响。 $\text{SiO}_2$  微球等无机材料因为稳定的化学性质和较大的比表面积逐渐成为酶固定化的新载体,硅基材料、碳基材料等多孔的性质使酶固定化的方式不再局限于化学交联,通过选择不同尺寸的材料使酶包覆在合适的孔径当中,可以避免与载体产生化学键造成的活性损失,同时又保证了酶的稳定性。MOF 和 COF 等新材料的设计为酶的特异性固定提供了更多的可能。由于材料具有高度的可修饰性,通过 FDH、FADH 和 ADH 的尺寸和性质来选择与之匹配的固定载体得到了实现,同时由于绿色便捷的固定过程将酶的活性损失降到了最低。

尽管有各种材料可用于酶的固定化,还是需要根据酶的形态、催化环境、底物与产物等多重因素理性设计酶的固定载体,从而获得优异固定效率的同时发挥酶最大的催化效率。本文通过介绍各种酶电、酶光耦联体系的构建方式与促进  $\text{CO}_2$  还原生产甲酸/甲醇的优异效果,

为以后设计更加合理和多元化的耦联体系提供了参考和思路。酶电、酶光耦联反应体系的构建在提高酶的催化效率特别是 NADH 的循环再生上效果显著。电催化、光催化与酶催化反应体系的耦合为电化学、光化学和生物学提供了更多的学科交叉。

同时为促进酶对  $\text{CO}_2$  的高效转化,使其更加适应不同耦联反应体系的高催化要求,对更高效酶的改造及挖掘工作也是极为重要的,本课题组也在积极进行关于酶的工程突变工作。大多数情况下,天然酶的活性位点深埋在蛋白质内部,并通过复杂的控制机制调控电子转移<sup>[104]</sup>。为克服天然酶的限制,可通过对酶进行突变改造的方式,使其具备更高的选择性、更好的稳定性、更快的电子传输速率以及对固定载体具有更强的亲和力,从而提升酶的催化效率<sup>[105-107]</sup>。在利用由 FDH、FADH、ADH 构建的三酶催化体系还原  $\text{CO}_2$  制备甲醇的过程中,如何调解底物与反应物浓度对反应的限制,以及如何统筹多酶级联反应发挥各自最大催化效率,也是有待研究并攻克挑战。

尽管过去几年在酶催化还原  $\text{CO}_2$  的领域中取得了巨大的进步,目前仍需要对酶的固定和反应体系的完善进行优化,以使概念验证过渡到实际的应用中。所以,在酶催化反应的发展仍需关注:(1) 通过蛋白质工程对关键酶进行设计和改造,高效筛选底物亲和性强的、催化效率更高的酶突变体;(2) 对多酶级联反应体系中酶分子之间复杂物质传递机制的解析,探讨并实践多酶反应的最优催化路径;(3) 寻找或合成生物相容性更加优异的酶固定载体,固定化过程中保证酶活性最低损失的同时,努力实现固定酶在体外环境中的最大催化效率;(4) 在酶催化反应体系与电催化、光催化等反应体系的构建和设计上,遵循催化原理匹配和相互

兼容的科学基础, 发挥耦联反应体系协同催化效果。

## REFERENCES

- [1] 大力推动绿色低碳发展[EB/OL]. [2023-01-15]. <http://opinion.people.com.cn/n1/2021/0927/c1003-32237591.html>. Promote green and low-carbon development vigorously[EB/OL]. [2023-01-15]. <http://opinion.people.com.cn/n1/2021/0927/c1003-32237591.html> (in Chinese).
- [2] WMO update: 50:50 chance of global temperature temporarily reaching 1.5 °C threshold in next five years[EB/OL]. [2023-01-15]. <https://public.wmo.int/en/media/press-release/wmo-update-5050-chance-of-global-temperature-temporarily-reaching-15%C2%B0c-threshold>.
- [3] 巴黎协议[EB/OL]. [2023-01-15]. <https://www.un.org/zh/documents/treaty/FCCC-CP-2015-L.9-Rev.1>. Paris Agreement[EB/OL]. [2023-01-15]. <https://www.un.org/zh/documents/treaty/FCCC-CP-2015-L.9-Rev.1> (in Chinese).
- [4] 减碳, 中国设定硬指标[EB/OL]. [2023-01-15]. [http://www.gov.cn/xinwen/2020-09/30/content\\_5548478.htm](http://www.gov.cn/xinwen/2020-09/30/content_5548478.htm). Carbon reduction, China sets hard targets[EB/OL]. [2023-01-15]. [http://www.gov.cn/xinwen/2020-09/30/content\\_5548478.htm](http://www.gov.cn/xinwen/2020-09/30/content_5548478.htm) (in Chinese).
- [5] “十四五”, 以科技创新为主线的能源转型加速推进[EB/OL]. [2023-01-15]. <http://finance.people.com.cn/n1/2022/0426/c1004-32409017.html>. In the 14th Five-year plan, the energy transformation with science and technology innovation as the main line accelerates[EB/OL]. [2023-01-15]. <http://finance.people.com.cn/n1/2022/0426/c1004-32409017.html> (in Chinese).
- [6] ARESTA M. Carbon Dioxide as Chemical Feedstock[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2010.
- [7] ARESTA M, DIBENEDETTO A, QUARANTA E. Reaction Mechanisms in Carbon Dioxide Conversion[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016.
- [8] YAN JY, ZHANG ZE. Carbon capture, utilization and storage (CCUS)[J]. Applied Energy, 2019, 235: 1289-1299.
- [9] JIANG K, ASHWORTH P, ZHANG SY, LIANG X, SUN Y, ANGUS D. China's carbon capture, utilization and storage (CCUS) policy: a critical review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2020, 119: 109601.
- [10] OLAH GA. Beyond oil and gas: the methanol economy[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44(18): 2636-2639.
- [11] LIU HS, SONG CJ, ZHANG L, ZHANG JJ, WANG HJ, WILKINSON DP. A review of anode catalysis in the direct methanol fuel cell[J]. Journal of Power Sources, 2006, 155(2): 95-110.
- [12] BASKAYA FS, ZHAO XY, FLICKINGER MC, WANG P. Thermodynamic feasibility of enzymatic reduction of carbon dioxide to methanol[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(2): 391-398.
- [13] KUWABATA S, TSUDA R, NISHIDA K, YONEYAMA H. Electrochemical conversion of carbon dioxide to methanol with use of enzymes as biocatalysts[J]. Chemistry Letters, 1993, 22(9): 1631-1634.
- [14] KUWABATA S, TSUDA R, YONEYAMA H. Electrochemical conversion of carbon dioxide to methanol with the assistance of formate dehydrogenase and methanol dehydrogenase as biocatalysts[J]. Journal of the American Chemical Society, 1994, 116(12): 5437-5443.
- [15] OBERT R, DAVE BC. Enzymatic conversion of carbon dioxide to methanol: enhanced methanol production in silica Sol-gel matrices[J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(51): 12192-12193.
- [16] SINGH RK, SINGH R, SIVAKUMAR D, KONDAVEETI S, KIM T, LI JL, SUNG BH, CHO BK, KIM DR, KIM SC, KALIA VC, ZHANG YH PJ, ZHAO HM, KANG YC, LEE JK. Insights into cell-free conversion of CO<sub>2</sub> to chemicals by a multienzyme cascade reaction[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(12): 11085-11093.
- [17] ALPDAĞTAŞ S, TURUNEN O, VALJAKKA J, BINAY B. The challenges of using NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenases for CO<sub>2</sub> conversion[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2022, 42(6): 953-972.
- [18] RUSCHING U, MULLER U, WILLNOW P, HOPNER T. CO<sub>2</sub> reduction to formate by NADH catalysed by formate dehydrogenase from *Pseudomonas oxalaticus*[J]. European Journal of Biochemistry, 1976, 70(2): 325-330.
- [19] SCHUTTE H, FLOSSDORF J, SAHM H, KULA MR. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*[J]. European Journal of Biochemistry, 1976, 62(1): 151-160.

- [20] NABAVI ZADEH PS, DO VALLE GOMES MZ, ÅKERMAN B, PALMQVIST A. Förster resonance energy transfer study of the improved biocatalytic conversion of CO<sub>2</sub> to formaldehyde by coimmobilization of enzymes in siliceous mesostructured cellular foams[J]. *Acs Catalysis*, 2018, 8(8): 7251-7260.
- [21] WANG YZ, ZHAO ZP, LI MF, CHEN YZ, LIU WF. Development of a hollow fiber membrane micro-reactor for biocatalytic production of formate from CO<sub>2</sub>[J]. *Journal of Membrane Science*, 2016, 514: 44-52.
- [22] GAO S, MOHAMMAD M, YANG HC, XU J, LIANG K, HOU JW, CHEN V. Janus reactors with highly efficient enzymatic CO<sub>2</sub> nanocascade at air-liquid interface[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(49): 42806-42815.
- [23] GUO MY, ZHAI TT, WANG CH, MENG ZH, LIU WF. Immobilization of formate dehydrogenase on polyethyleneimine modified carriers for the enhancement of catalytic performance[J]. *Catalysis Communications*, 2021, 149: 106259.
- [24] ZHANG ZB, MUSCHIOL J, HUANG YH, SIGURDARDÓTTIR SB, von SOLMS N, DAUGAARD AE, WEI J, LUO JQ, XU BH, ZHANG SJ, PINELO M. Efficient ionic liquid-based platform for multi-enzymatic conversion of carbon dioxide to methanol[J]. *Green Chemistry*, 2018, 20(18): 4339-4348.
- [25] TALBERT JN, GODDARD JM. Enzymes on material surfaces[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 93: 8-19.
- [26] WANG YZ, CHEN YZ, WANG CH, SUN J, ZHAO ZP, LIU WF. Polyethyleneimine-modified membranes for CO<sub>2</sub> capture and *in situ* hydrogenation[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(34): 29003-29009.
- [27] LUO JQ, MEYER AS, MATEIU RV, PINELO M. Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO<sub>2</sub> to methanol[J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(3): 319-327.
- [28] ZHAI TT, WANG CH, GU FJ, MENG ZH, LIU WF, WANG YZ. Dopamine/polyethyleneimine-modified silica for enzyme immobilization and strengthening of enzymatic CO<sub>2</sub> conversion[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(40): 15250-15257.
- [29] MAO ML, ZHAI TT, MENG LD, MENG ZH, LIU WF. Controllable preparation of mesoporous silica and its application in enzyme-catalyzed CO<sub>2</sub> reduction[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 437: 135479.
- [30] LIN P, ZHANG YH, YAO GX, HUO HY, REN H, WANG YX, WANG SZ, FANG BS. Immobilization of formate dehydrogenase on polyethylenimine-grafted graphene oxide with kinetics and stability study[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2020, 20(3/4): 104-111.
- [31] WANG J, LV YQ. An enzyme-loaded reactor using metal-organic framework-templated polydopamine microcapsule[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2021, 29: 317-325.
- [32] PIETRICOLA G, TOMMASI T, DOSA M, CAMELIN E, BERRUTO E, OTTONE C, FINO D, CAUDA V, PIUMETTI M. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silicas for the immobilization of formate dehydrogenase (FDH)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 177: 261-270.
- [33] ZEZZI do VALLE GOMES M, MASDEU G, EIRING P, KUHLEMANN A, SAUER M, ÅKERMAN B, PALMQVIST AEC. Improved biocatalytic cascade conversion of CO<sub>2</sub> to methanol by enzymes co-immobilized in tailored siliceous mesostructured cellular foams[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2021, 11(21): 6952-6959.
- [34] LABROU NE, RIGDEN DJ. Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase[J]. *Biochemical Journal*, 2001, 354(2): 455-463.
- [35] TANAKA N, KUSAKABE Y, ITO K, YOSHIMOTO T, NAKAMURA KT. Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenases[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 324(3): 519-533.
- [36] RAJ SB, RAMASWAMY S, PLAPP BV. Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(36): 5791-5803.
- [37] BACCOUR M, LAMOTTE A, SAKAI K, DUBREUCQ E, MEHDI A, KANO K, GALARNEAU A, DRONE J, BRUN N. Production of formate from CO<sub>2</sub> gas under ambient conditions: towards flow-through enzyme reactors[J]. *Green Chemistry*, 2020, 22(12): 3727-3733.
- [38] YU LH, BRUN N, SAKAUSHI K, ECKERT J, TITIRICI MM. Hydrothermal nanocasting: synthesis of hierarchically porous carbon monoliths and their application in lithium-sulfur batteries[J]. *Carbon*, 2013, 61: 245-253.

- [39] LIN P, ZHANG YH, REN H, WANG YX, WANG SZ, FANG BS. Assembly of graphene oxide-formate dehydrogenase composites by nickel-coordination with enhanced stability and reusability[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2018, 18(5): 326-333.
- [40] LEE H, DELLATORE SM, MILLER W, MESSERSMITH P. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings[J]. *Science*, 2007, 318: 426-430.
- [41] WANG XL, LI Z, SHI JF, WU H, JIANG ZY, ZHANG WY, SONG XK, AI QH. Bioinspired approach to multienzyme cascade system construction for efficient carbon dioxide reduction[J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(3): 962-972.
- [42] LU A, SALABAŞ E, SCHÜTH F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(8): 1222-1244.
- [43] MARTÍNEZ SAH, MELCHOR-MARTÍNEZ EM, HERNANDEZ J, PARRA-SALDÍVAR R, IQBAL HMN. Magnetic nanomaterials assisted nanobiocatalysis systems and their applications in biofuels production[J]. *Fuel*, 2022, 312.
- [44] ADDO PK, ARECHEDERRA RL, WAHEED A, SHOEMAKER JD, SLY WS, MINTEER SD. Methanol production *via* bioelectrocatalytic reduction of carbon dioxide: role of carbonic anhydrase in improving electrode performance[J]. *Electrochemical and Solid-State Letters*, 2011, 14(4): E9-E13.
- [45] ALI AL-DHRUB AH, SAHIN S, OZMEN I, TUNCA E, BULBUL M. Immobilization and characterization of human carbonic anhydrase I on amine functionalized magnetic nanoparticles[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 57: 95-104.
- [46] CHAI M, RAZMJOU A, CHEN V. Metal-organic-framework protected multi-enzyme thin-film for the cascade reduction of CO<sub>2</sub> in a gas-liquid membrane contactor[J]. *Journal of Membrane Science*, 2021, 623: 118986.
- [47] CHAI M, RAZAVI BAZAZ S, DAIYAN R, RAZMJOU A, EBRAHIMI WARKIANI M, AMAL R, CHEN V. Biocatalytic micromixer coated with enzyme-MOF thin film for CO<sub>2</sub> conversion to formic acid[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 426: 130856.
- [48] REN SZ, WANG ZY, BILAL M, FENG YX, JIANG YH, JIA SR, CUI JD. Co-immobilization multienzyme nanoreactor with co-factor regeneration for conversion of CO<sub>2</sub>[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 110-118.
- [49] LI Y, WEN LY, TAN TW, LV YQ. Sequential co-immobilization of enzymes in metal-organic frameworks for efficient biocatalytic conversion of adsorbed CO<sub>2</sub> to formate[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 394.
- [50] ZHU DL, AO SS, DENG HH, WANG M, QIN CQ, ZHANG J, JIA YR, YE P, NI HG. Ordered coimmobilization of a multienzyme cascade system with a metal organic framework in a membrane: reduction of CO<sub>2</sub> to methanol[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(37): 33581-33588.
- [51] LIANG JY, GAO S, LIU J, ZULKIFLI MYB, XU JT, SCOTT J, CHEN V, SHI JF, RAWAL A, LIANG K. Hierarchically porous biocatalytic MOF microreactor as a versatile platform towards enhanced multienzyme and cofactor-dependent biocatalysis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(10): 5421-5428.
- [52] DU C, LI YM, HE Y, SU LM, WANG HN, YUAN WJ, BAI FW. Fixing carbon dioxide *in situ* during ethanol production by formate dehydrogenase[J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(18): 6989-6999.
- [53] GUAN Q, ZHOU LL, DONG YB. Metalated covalent organic frameworks: from synthetic strategies to diverse applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2022, 51(15): 6307-6416.
- [54] SINGH N, YADAV D, MULAY SV, KIM JY, PARK NJ, BAEG JO. Band gap engineering in solvchromic 2D covalent organic framework photocatalysts for visible light-driven enhanced solar fuel production from carbon dioxide[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(12): 14122-14131.
- [55] KLIKAR M, SOLANKE P, TYDLITAT J, BURES F. Alphabet-inspired design of (hetero)aromatic push-pull chromophores[J]. *Chemical Record*, 2016, 16(4): 1886-1905.
- [56] LIU HR, LI CZ, LI H, REN YQ, CHEN J, TANG JT, YANG QH. Structural engineering of two-dimensional covalent organic frameworks for visible-light-driven organic transformations[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(18): 20354-20365.
- [57] ZHAO ZF, ZHENG D, GUO ML, YU JY, ZHANG SN, ZHANG ZJ, CHEN Y. Engineering olefin-linked covalent organic frameworks for photoenzymatic reduction of CO<sub>2</sub>[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(12).



- [58] MAZURENKO I, HITAISHI V P, LOJOU E. Recent advances in surface chemistry of electrodes to promote direct enzymatic bioelectrocatalysis[J]. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2020, 19: 113-121.
- [59] CHAUBEY A, MALHOTRA BD. Mediated biosensors[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, 17(6/7): 441-456.
- [60] BASSEGODA A, MADDEN C, WAKERLEY DW, REISNER E, HIRST J. Reversible interconversion of CO<sub>2</sub> and formate by a molybdenum-containing formate dehydrogenase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(44): 15473-15476.
- [61] SAKAI K, KITAZUMI Y, SHIRAI O, KANO K. Bioelectrocatalytic formate oxidation and carbon dioxide reduction at high current density and low overpotential with tungsten-containing formate dehydrogenase and mediators[J]. *Electrochemistry Communications*, 2016, 65: 31-34.
- [62] DUBRAWSKI KL, SHAO XH, MILTON RD, DEUTZMANN JS, SPORMANN AM, CRIDDLE CS. Microbial battery powered enzymatic electrosynthesis for carbon capture and generation of hydrogen and formate from dilute organics[J]. *ACS Energy Letters*, 2019, 4(12): 2929-2936.
- [63] REDA T, PLUGGE CM, ABRAM NJ, HIRST J. Reversible interconversion of carbon dioxide and formate by an electroactive enzyme[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(31): 10654-10658.
- [64] DEUTZMANN JS, SAHIN M, SPORMANN AM. Extracellular enzymes facilitate electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis[J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00496-15.
- [65] LIENEMANN M, DEUTZMANN JS, MILTON RD, SAHIN M, SPORMANN AM. Mediator-free enzymatic electrosynthesis of formate by the *Methanococcus maripaludis* heterodisulfide reductase supercomplex[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 254: 278-283.
- [66] YUAN MW, SAHIN S, CAI R, ABDELLAOUI S, HICKEY DP, MINTEER SD, MILTON RD. Creating a low-potential redox polymer for efficient electroenzymatic CO<sub>2</sub> reduction[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(22): 6582-6586.
- [67] SZCZESNY J, RUFF A, OLIVEIRA AR, PITA M, PEREIRA IAC, de LACEY AL, SCHUHMANN W. Electroenzymatic CO<sub>2</sub> fixation using redox polymer/enzyme-modified gas diffusion electrodes[J]. *ACS Energy Letters*, 2020, 5(1): 321-327.
- [68] KUK SK, GOPINATH K, SINGH RK, KIM TD, LEE Y, CHOI WS, LEE JK, PARK CB. NADH-free electroenzymatic reduction of CO<sub>2</sub> by conductive hydrogel-conjugated formate dehydrogenase[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(6): 5584-5589.
- [69] SEELAJAROEN H, BAKANDRITSOS A, OTYEPKA M, ZBOŘIL R, SARICIFTCI NS. Immobilized enzymes on graphene as nanobiocatalyst[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(1): 250-259.
- [70] ALVAREZ-MALMAGRO J, OLIVEIRA AR, GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ C, VILLAJOS B, PEREIRA IAC, VÉLEZ M, PITA M, de LACEY AL. Bioelectrocatalytic activity of W-formate dehydrogenase covalently immobilized on functionalized gold and graphite electrodes[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(10): 11891-11900.
- [71] LEECH D, KAVANAGH P, SCHUHMANN W. Enzymatic fuel cells: recent progress[J]. *Electrochimica Acta*, 2012, 84: 223-234.
- [72] RUFF A. Redox polymers in bioelectrochemistry: common playgrounds and novel concepts[J]. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2017, 5(1): 66-73.
- [73] MANDLER D, WILLNER I. Photochemical fixation of carbon dioxide: enzymic photosynthesis of malic, aspartic, isocitric, and formic acids in artificial media[J]. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1988(6): 997-1003.
- [74] AMAO Y, SHUTO N. Formate dehydrogenase-viologen-immobilized electrode for CO<sub>2</sub> conversion, for development of an artificial photosynthesis system[J]. *Research on Chemical Intermediates*, 2014, 40(9): 3267-3276.
- [75] LIMA F, MAIA G. Direct electron transfer from alcohol dehydrogenase[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(43): 22575-22588.
- [76] SAKAI K, SUGIMOTO Y, KITAZUMI Y, SHIRAI O, TAKAGI K, KANO K. Direct electron transfer-type bioelectrocatalytic interconversion of carbon dioxide/formate and NAD<sup>+</sup>/NADH redox couples with tungsten-containing formate dehydrogenase[J]. *Electrochimica Acta*, 2017, 228: 537-544.
- [77] BARIN R, BIRIA D, RASHID-NADIMI S, ASADOLLAHI MA. Enzymatic CO<sub>2</sub> reduction to formate by formate dehydrogenase from *Candida boidinii* coupling with direct electrochemical

- regeneration of NADH[J]. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 2018, 28: 117-125.
- [78] LIU GH, CHEN HX, ZHAO H, CHEN R, YANG MH, GAO J, YU FS, JIANG YJ. Accelerating electroenzymatic CO<sub>2</sub> reduction by immobilizing formate dehydrogenase on polyethylenimine-modified mesoporous silica[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(1): 633-644.
- [79] HERNÁNDEZ-IBÁÑEZ N, GOMIS-BERENGUER A, MONTIEL V, ANIA CO, INIESTA J. Fabrication of a biocathode for formic acid production upon the immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* on a nanoporous carbon[J]. *Chemosphere*, 2022, 291: 133117.
- [80] PIETRICOLA G, CHAMORRO L, CASTELLINO M, MAUREIRA D, TOMMASI T, HERNÁNDEZ S, WILSON L, FINO D, OTTONE C. Covalent immobilization of dehydrogenases on carbon felt for reusable anodes with effective electrochemical cofactor regeneration[J]. *ChemistryOpen*, 2022, 11(11): e202200102.
- [81] CHEN YJ, LI P, NOH H, KUNG CW, BURU CT, WANG XJ, ZHANG X, FARHA OK. Stabilization of formate dehydrogenase in a metal-organic framework for bioelectrocatalytic reduction of CO<sub>2</sub>[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(23): 7682-7686.
- [82] ZHANG ZB, LI JJ, JI MB, LIU YR, WANG N, ZHANG XP, ZHANG SJ, JI XY. Encapsulation of multiple enzymes in a metal-organic framework with enhanced electro-enzymatic reduction of CO<sub>2</sub> to methanol[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(6): 2362-2371.
- [83] GU FJ, WANG YZ, MENG ZH, LIU WF, QIU LY. A coupled photocatalytic/enzymatic system for sustainable conversion of CO<sub>2</sub> to formate[J]. *Catalysis Communications*, 2020, 136: 105903.
- [84] GUO MY, GU FJ, MENG LD, LIAO QY, MENG ZH, LIU WF. Synthesis of formaldehyde from CO<sub>2</sub> catalyzed by the coupled photo-enzyme system[J]. *Separation and Purification Technology*, 2022, 286: 120480.
- [85] ZHANG YY, LIU J. Bioinspired photocatalytic NADH regeneration by covalently metalated carbon nitride for enhanced CO<sub>2</sub> reduction[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2022, 28(55): e202201430.
- [86] LIN G, ZHANG YY, HUA YT, ZHANG CH, JIA CC, JU DX, YU CM, LI P, LIU J. Bioinspired metalation of the metal-organic framework MIL-125-NH<sub>2</sub> for photocatalytic NADH regeneration and gas-liquid-solid three-phase enzymatic CO<sub>2</sub> reduction[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(31): e202206283.
- [87] CHEN YJ, LI P, ZHOU JW, BURU CT, ĐORĐEVIĆ L, LI PH, ZHANG X, CETIN MM, STODDART JF, STUPP SI, WASIELEWSKI MR, FARHA OK. Integration of enzymes and photosensitizers in a hierarchical mesoporous metal-organic framework for light-driven CO<sub>2</sub> reduction[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(4): 1768-1773.
- [88] ZHOU JH, YU SS, KANG HL, HE R, NING YX, YU YY, WANG M, CHEN BQ. Construction of multi-enzyme cascade biomimetic carbon sequestration system based on photocatalytic coenzyme NADH regeneration[J]. *Renewable Energy*, 2020, 156: 107-116.
- [89] YU SS, LV PF, XUE P, WANG K, YANG Q, ZHOU JH, WANG M, WANG L, CHEN BQ, TAN TW. Light-driven enzymatic nanosystem for highly selective production of formic acid from CO<sub>2</sub>[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 420: 127649.
- [90] TIAN Y, ZHOU YN, ZONG YC, LI JS, YANG N, ZHANG M, GUO ZQ, SONG H. Construction of functionally compartmental inorganic photocatalyst-enzyme system *via* imitating chloroplast for efficient photoreduction of CO<sub>2</sub> to formic acid[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(31): 34795-34805.
- [91] FARD PT, ALBERT SK, KO J, LEE S, PARK SJ, KIM J. Spatial organization of photocatalysts and enzymes on *Janus*-type DNA nanosheets for efficient CO<sub>2</sub> conversion[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(15): 9698-9705.
- [92] BARIN R, BIRIA D, RASHID-NADIMI S, ASADOLLAHI MA. Investigating the enzymatic CO<sub>2</sub> reduction to formate with electrochemical NADH regeneration in batch and semi-continuous operations[J]. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 2019, 140: 78-84.
- [93] MILLER M, ROBINSON WE, OLIVEIRA AR, HEIDARY N, KORNIENKO N, WARNAN J, PEREIRA IAC, REISNER E. Interfacing formate dehydrogenase with metal oxides for the reversible electrocatalysis and solar-driven reduction of carbon dioxide[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(14): 4601-4605.

- [94] Le GOFF A, HOLZINGER M. Molecular engineering of the bio/nano-interface for enzymatic electrocatalysis in fuel cells[J]. *Sustainable Energy & Fuels*, 2018, 2(12): 2555-2566.
- [95] HITAISHI VP, MAZURENKO I, HARB M, CLÉMENT R, TARIS M, CASTANO S, DUCHÉ D, LECOMTE S, ILBERT M, de POULPIQUET A, LOJOU E. Electrostatic-driven activity, loading, dynamics, and stability of a redox enzyme on functionalized-gold electrodes for bioelectrocatalysis[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(12): 12004-12014.
- [96] DUTTA S, PATIL R, DEY T. Electron transfer-driven single and multi-enzyme biofuel cells for self-powering and energy bioscience[J]. *Nano Energy*, 2022, 96: 107074.
- [97] MILTON RD, MINTEER SD. Direct enzymatic bioelectrocatalysis: differentiating between myth and reality[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2017, 14(131): 20170253.
- [98] DERIA P, MONDLOCH JE, TYLIANAKIS E, GHOSH P, BURY W, SNURR RQ, HUPP JT, FARHA OK. Perfluoroalkane functionalization of NU-1000 *via* solvent-assisted ligand incorporation: synthesis and CO<sub>2</sub> adsorption studies[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(45): 16801-16804.
- [99] HEMMIG EA, CREATORE C, WÜNSCH B, HECKER L, MAIR P, PARKER MA, EMMOTT S, TINNEFELD P, KEYSER UF, CHIN AW. Programming light-harvesting efficiency using DNA origami[J]. *Nano Letters*, 2016, 16(4): 2369-2374.
- [100] RAJENDRAN A, NAKATA E, NAKANO S, MORII T. Nucleic-acid-templated enzyme cascades[J]. *ChemBioChem*, 2017, 18(8): 696-716.
- [101] LI SP, JIANG Q, LIU SL, ZHANG YL, TIAN YH, SONG C, WANG J, ZOU YG, ANDERSON GJ, HAN JY, CHANG Y, LIU Y, ZHANG C, CHEN L, ZHOU GB, NIE GJ, YAN H, DING BQ, ZHAO YL. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger *in vivo*[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(3): 258-264.
- [102] ALBERT SK, LEE S, DURAI P, HU XL, JEONG B, PARK K, PARK SJ. Janus nanosheets with face-selective molecular recognition properties from DNA-peptide conjugates[J]. *Small*, 2021, 17(12): 2006110.
- [103] SUN YY, LI WP, WANG Z, SHI JF, JIANG ZY. General framework for enzyme-photo-coupled catalytic system toward carbon dioxide conversion[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 73: 67-73.
- [104] SHARP RE, CHAPMAN SK. Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1432(2): 143-158.
- [105] CAMPAS M, PRIETO-SIMON B, MARTY JL. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(1): 3-9.
- [106] OLIVEIRA AR, MOTA C, MOURATO C, DOMINGOS RM, SANTOS MFA, GESTO D, GUIGLIARELLI B, SANTOS-SILVA T, ROMÃO MJ, CARDOSO PEREIRA IA. Toward the mechanistic understanding of enzymatic CO<sub>2</sub> reduction[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(6): 3844-3856.
- [107] ALISSANDRATOS A, KIM HK, MATTHEWS H, HENNESSY JE, PHILBROOK A, EASTON CJ. *Clostridium carboxidivorans* strain P7T recombinant formate dehydrogenase catalyzes reduction of CO<sub>2</sub> to formate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(2): 741-744.

(本文责编 郝丽芳)