

可用于二氧化碳捕获过程的微生物碳酸酐酶的挖掘与改造

蔡丽希, 楚云猛, 张光亚

华侨大学 化工学院 生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

蔡丽希, 楚云猛, 张光亚. 可用于二氧化碳捕获过程的微生物碳酸酐酶的挖掘与改造. 生物工程学报, 2019, 35(1): 1–12.

Cai LX, Chu YM, Zhang GY. Mining and engineering of microbial carbonic anhydrases for biomimetic carbon dioxide sequestration. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 1–12.

摘 要: 二氧化碳排放量的急剧上升引起全球温室效应加剧。碳酸酐酶是地球上反应速率最快的几种酶之一, 可以大幅提高 CO_2 捕获和生物矿化的效率, 从而降低大气中 CO_2 的排放量。但捕获过程在高温条件, 而 CO_2 生物矿化形成 CaCO_3 的过程则需要碱性条件。因此, 迫切需要筛选出既嗜热又耐碱的碳酸酐酶以用于 CO_2 捕获, 极端微生物是这类酶的重要来源之一。文中系统、深入地介绍了目前从极端微生物或利用蛋白质工程技术获取嗜热、耐碱的碳酸酐酶的最新研究进展, 同时简要介绍了一些新型固定化碳酸酐酶的方法。最后指出当前研究的重点应致力于拓宽寻找碳酸酐酶的范围, 改良蛋白质工程改造技术, 研发高效廉价、易于放大的固定化方法, 为减轻温室效应、延缓全球变暖这一迫切需要解决的问题提供新思路。

关键词: 碳酸酐酶, 极端微生物, 生物矿化, 嗜热耐碱酶, 酶固定化

Mining and engineering of microbial carbonic anhydrases for biomimetic carbon dioxide sequestration

Lixi Cai, Yunmeng Chu, and Guangya Zhang

Department of Bioengineering and Biotechnology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China

Abstract: The increasing atmospheric carbon dioxide levels have been correlated with global warming. Carbonic anhydrases (CA) are the fastest among the known enzymes to improve carbon capture. The capture of carbon dioxide needs high temperature and alkaline condition, which is necessary for CaCO_3 precipitation in the mineralization process. In order to use CAs for biomimetic carbon sequestration, thermo-alkali-stable CAs are, therefore, essential, and polyextremophilic microbes are one of the important sources of these enzymes. The current review focuses on both those isolated by thermophilic organisms from the extreme environments and those obtained by protein engineering techniques, and the industrial application of the immobilized CAs is also briefly addressed. To reduce the greenhouse effect and delay global warming, we think further research efforts should be devoted to broadening the scope of searching for carbonic anhydrase, modifying the technology of

Received: March 26, 2018; **Accepted:** August 13, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21376103), Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2017J01065).

Corresponding author: Guangya Zhang. Tel: +86-592-6162302; E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21376103), 福建省自然科学基金 (No. 2017J01065) 资助。

网络出版时间: 2018-09-30

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20180928.1518.001.html>

protein engineering and developing highly efficient immobilization strategies.

Keywords: carbonic anhydrase, polyextremophilic microbes, biomineralization, thermo-alkali-enzyme, enzyme immobilization

自工业革命以来,人类主要依赖应用煤炭、石油与天然气等化石燃料,导致大气中 CO_2 的浓度急剧上升,加重地球表面的温室效应,引起全球气候变暖,海平面不断上升和病虫害增多等现象^[1-3]。火力发电是目前最大的人为 CO_2 排放源^[4]。到 2014 年为止,全球火力发电比例仍然占了总供电量的 66.7%,而且短期内这一比重并不会有所变化。在这样一个高度依赖化石燃料发电模式的大环境下,碳捕获和封存技术 (Carbon capture and storage, CCS) 在近些年来一直是碳减排等研究领域中的一个备受关注的热点问题^[2,5-6]。

碳捕获和封存技术指的是将 CO_2 从火力发电厂、钢铁厂、化工厂等排放源头分离出来,输送到封存地点并与大气长期隔绝的过程。主要分为捕集、运输、封存和监测四部分^[7]。燃烧前 CO_2 捕集技术 (PCC),特别是化学胺法捕集 CO_2 技术是目前公认的最适合于捕集火电厂烟气中 CO_2 的手段。 CO_2 捕集一般常见于碱性溶液的吸收和随后的高温解吸塔解吸并压缩和封存,然而此过程面临一些技术挑战,首要问题是 CO_2 解吸过程中高热能的损失^[8]。可仿生矿化 CO_2 的碳酸酐酶具有解决热能损失的潜力,嗜热又耐碱的碳酸酐酶可以加速 CO_2 在高温化学吸收剂的吸收速率,并催化 CO_2 转化为 HCO_3^- ,最终模拟地质学过程并生物矿化形成 CaCO_3 沉淀,其终产物在整个地质学周期内性质非常稳定,对环境友好,因此利用碳酸酐酶的生物矿化 CO_2 法是目前最具前景的 CO_2 减少排放技术手段之一^[9]。本文先简要介绍了碳酸酐酶,再从碳酸酐酶的挖掘、改造及固定化 3 个方面综述了国内外最新研究进展。

1 碳酸酐酶简介

碳酸酐酶 (Carbonic anhydrases, CA,

EC4.2.1.1)是一类能高效催化二氧化碳与水与碳酸与氢质子之间的可逆反应的锌金属酶,pH 值介于 4-9 之间,且在温度低于 65 °C 的条件下可以保持较高的活性和稳定性^[10]。它是 1933 年由 Meldrum 和 Roughton 从牛红细胞中发现的第一个锌金属酶。在人类和动物的血液中,碳酸酐酶是红细胞中含量与功能重要性仅次于血红蛋白的最主要的蛋白质组分。碳酸酐酶是目前为止反应速率最快的几种酶之一,它的反应速率受到底物的扩散速率限制。不同家族的碳酸酐酶的催化速率为 10^4 - $10^6/\text{s}$ ^[11]。CA 在真核生物体中几乎是无所不在的,主要在生物体内起二氧化碳浓缩、光合作用、离子交换、呼吸作用以及 pH 稳定等作用。

到目前为止,已发现碳酸酐酶有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ζ 、 η 等 6 个不同家族,每个家族之间的氨基酸序列无明显同源性,是趋同进化的典型代表^[7]。六大家族的碳酸酐酶的特点见表 1, α -CA 常见于哺乳动物、原生动物、藻类、植物、细菌、真菌、古菌的胞浆中,所有动物来源的碳酸酐酶都出自 α -CA,是现今研究最透彻的家族,人体中含有分布于多种器官中的 α -碳酸酐酶,其中催化活性最高且研究最为透彻的为人碳酸酐酶 II (hCA II); β -CA 首先发现在高等植物的叶绿体中,随后又在细菌、真菌、藻类、古菌中找到,在植物光合作用中,主要起 CO_2 固定及维持 CO_2 浓度等作用; γ -CA 则主要存在于一些细菌和古菌中; δ -CA 与 ζ -CA 主要存在于海洋的硅藻中; η -CA 是近年来才发现的类型,主要存在于疟原虫中。这六大家族的酶结构虽然相似度不高,但每种酶的活性中心都会结合一个对催化过程起着重要作用的金属离子。其中加快 CO_2 水合的核心机理就是金属离子对 CO_2 的亲核攻击^[9]。

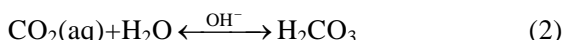
碳酸酐酶生物矿化本质是催化 Ca^{2+} 与水

CO₂ 之间发生的反应^[7]。反应历程可以用如下方程式描述:

1) 气态的 CO₂ 溶于水, 形成松散的水化 CO₂ 状态:



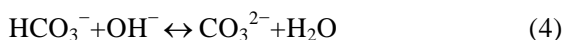
2) 在碱性条件下, CO₂ 与水反应生成 H₂CO₃:



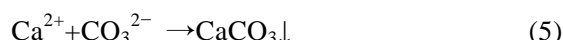
3) H₂CO₃ 电离为质子和 HCO₃⁻:



4) 在碱性条件下, HCO₃⁻ 进一步电离形成 CO₃²⁻ 和 H₂O:



5) 在 Ca²⁺ 存在的情况下, 生成 CaCO₃ 沉淀:



该反应的限速步骤为第 2 步 CO₂ 与水反应生成 H₂CO₃。在自然界, CO₂ 的水合反应速率相当缓慢^[16-17], 其转化数仅为 1.3×10⁻¹/s^[18], 当碳酸酐酶催化上述反应时, CO₂ 水合转化数显著提高至 1.4×10⁷/s, 约是自然界的 10⁷ 倍。但 CA 矿化过程中极度依赖反应液 pH 值, 当 pH<8 时, 反应 2 中

CA 活性明显降低, 培养液中无机碳主要以 CO₂ 形式存在^[19]。当 pH>8 时, 由于反应液中含有 OH⁻, 反应 2 速率加快, HCO₃⁻ 与 CO₃²⁻ 不断生成促成 CaCO₃ 沉淀。

因此, 微生物在仿生生成碳酸盐的过程中需要在碱性条件下进行, 碳酸酐酶在 pH 值大于 8 的情况下才能保持较高的活性。而火电厂排出的烟气温度较高, 接近 60℃, 一般的碳酸酐酶在高热与高碱下稳定性与活力较差, 这极大地限制了碳酸酐酶的应用。有 3 种方法解决这个问题: 1) 从极端微生物(环境)中筛选出能够在温度高于 50℃ 且 pH>8 条件下稳定发挥功能的碳酸酐酶; 2) 使用蛋白质工程技术改造现有酶, 使它变成热、碱稳定性酶^[20], 3) 通过固定化技术提高酶稳定性及增加重复使用性, 降低成本。

2 微生物来源的嗜热、耐碱碳酸酐酶

近年来, 极端微生物来源的碳酸酐酶因其独特的优势引起了广泛关注。极端微生物主要来源

表 1 六大家族碳酸酐酶的性质与特点

Table 1 Properties and characteristics of the six classes of carbonic anhydrases

Characteristics	Occurrence	Molecular weight	Active site	Function	Inhibitor	References
α-CA	Mammal, protozoa, plants, algae, archaea, bacteria, fungi	Monomer, dimer, trimer, tetramer	His-94, His-96, His-119	CO ₂ mineralization, calcification, pH homeostasis, biosynthesis, ion exchange,	Highly sensitive to sulfonamides	[10-11]
β-CA	Bacteria, archaea, fungi, plants, algae	Dimer, can form various oligomers (45-200 kDa)	Cys-38, His-96, Cys-99	Cyanate ester reduction, CO ₂ fixation, CO ₂ concentration	Highly sensitive to sulfonamides	[12]
γ-CA	Bacteria, archaea, fungi, plants	Homotrimer	His-81, His-122, His-117	Participate in the catabolism of acetate, the oldest carbonic anhydrase	Highly sensitive to sulfonamides	[13]
δ-CA	<i>Thalassiosira weissfogii</i>	Dimer	—	—	—	[8,14]
ζ-CA	Cyanobacteria, chemoautotrophic bacteria, <i>Thalassiosira weissfogii</i>	Dimer	—	Superoxide dismutase	—	[8,14-15]
η-CA	<i>Plasmodium falciparum</i>	—	His-94, His-96, His-118	—	—	[9,15]

于深海、上下对流层、火山、矿井等极端环境,地球上的极端环境孕育了丰富的极端微生物资源,这成为嗜热耐碱碳酸酐酶的重要来源。目前文献报道的已筛选到的嗜热、耐碱碳酸酐酶及其酶学性质见表 2。其中几个比较有趣的碳酸酐酶描述如下。

2012 年分离自美国黄石公园温泉的 *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP1 的碳酸酐酶 (SspCA) 是热稳定性最高的几种酶之一^[21],以 CO_2 为底物时,当温度为 20 °C、pH 为 7.5 时,酶的动力学参数为 $k_{\text{cat}}=9.35\times 10^5/\text{s}$; $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}=1.1\times 10^8/((\text{mol/L})\cdot\text{s})$,同时 SspCA 具有酯酶活性,最适 pH 为 9.6,最适温度为 95 °C^[22]。酶的热稳定性实验表明 SspCA 在 40 °C 与 70 °C 的半衰期分别为 53 d 与 8 d。SspCA 的晶体结构显示了该酶高热稳定性的机理,如图 1A 所示,SspCA 具有 α -CA 典型的二聚体结构,每个单体含有一个三角锥活性中心,由 Zn^{2+} 与 His89、His91、His108 组成畸变四面体,其中使二氧化碳水化的机理核心便是 Zn^{2+} 对于 CO_2 的亲核攻击。乙磺酰唑胺 (AZM) 为活性中心共价结合的抑制剂。SspCA 组成一个具有大界面区域特征的二聚体。主要由周围环绕着 α -螺旋和小 β -折叠的 10 个平行的 β -折叠组成,活性中心位于从蛋白质表面至中心的一个圆锥体腔里,其蛋白质表面含有较多的带电氨基酸,形成一个较复杂的离子网络,这就是为什么相比与其他常温 CA 其热稳定性更高的原因。

从来自亚速尔群岛温泉极端微生物 *Sulfurihydrogenibium azorense* 中分离的碳酸酐酶 (SazCA) 是世界上现今为止催化活力最高的,它是典型的 α -CA。以 CO_2 为底物时,在 20 °C、pH 为 7.5 条件下,酶动力学参数分别为 $k_{\text{cat}}=4.40\times 10^6/\text{s}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}=3.5\times 10^8/((\text{mol/L})\cdot\text{s})$,最适 pH 为 9.6,可以在 0–100 °C 范围内保持活力。阴离子抑制实验表明 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 均对酶无明显的抑制作

用。SazCA 既嗜热又耐碱,酶活力又高,若能进一步提高其热稳定性,将是一个极具潜力的可应用于工业 CO_2 捕集的碳酸酐酶^[22-23]。

2015 年,Simone 课题组^[38]揭示了 SazCA 的晶体结构,丰富了来自极端微生物的 α -CA 的结构信息。如图 1B 所示,SazCA 的单体结构主要是由 10 个平行的 β -折叠组成,周围环绕着 3 个 α -螺旋、3₁₀-螺旋和小 β -折叠。由 Cys24 与 Cys178 所组成的二硫键在不同来源的 α -CA 中相对保守。SazCA 与 SspCA 的结构具有 61.3% 的相似度,SspCA 上的 Glu2 和 Gln207 残基被 SazCA 的 His2 和 His207 取代,这种取代可能影响了 His64 的 pKa 值进而增强其质子穿梭能力,这些结构信息为设计高催化活性的 α -CA 提供了诱人的前景。

Littlechild 课题组报道了一个现今催化活性居第二的碳酸酐酶 (TaCA),该酶源于 *Thermovibrio ammonificans*,热稳定性较高^[24]。当温度为 25 °C、pH 为 7.5 时,酶的动力学参数为 $k_{\text{cat}}=1.6\times 10^6/\text{s}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}=1.6\times 10^8/((\text{mol/L})\cdot\text{s})$,TaCA 在 40 °C 与 60 °C 的半衰期分别为 152 d 与 77 d。而且在保温 60 d 后,酶在 40 °C 与 60 °C 的残余活性分别为 91% 与 62%。与其他 α -CA 不同,TaCA 具有特殊的四聚体结构,由 2 个与 SspCA 和 SazCA 结构相似的二聚体以二硫键连接形成,值得提及的是,形成分子间二硫键的 2 个保守的 Cys 残基 Cys202 和 Cys47 在 SspCA 和 SazCA 中未出现,四聚体结构可能是其保持高热稳定性的原因^[24]。分析这些热稳定性 CA 的结构,一方面可以了解它们高热稳定性的分子机理,同时也为碳酸酐酶的改造提供了重要信息和方向。

上述基于微生物培养筛选的嗜热、耐碱的碳酸酐酶取得了长足进步,但从环境样品中 (宏基因组) 获取该酶的研究非常匮乏。最近,本课题组从几个深海热液口样品的宏基因组中筛选到 16 个疑似碳酸酐酶的基因,序列比对结果显示,其

表 2 嗜热、耐碱的微生物碳酸酐酶的特性

Table 2 Characteristic features of the thermostable and alkaliblle of microbial carbonic anhydrases

Enzyme	Organism	Class	Subunit number	pH	Temperature and other characteristic features	K_m	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($L/(mol \cdot s)$)	PDB No.	References
SspCA	<i>Sulfurihydrogenibium yellowstonense</i> YO3AOP1	α	Dimer	The optimal pH is 9.6	Stable at 100 °C for 3 h, the optimal temperature is 95 °C	8.4	9.35×10^5	1.1×10^8	4G7A	[21]
SazCA	<i>Sulfurihydrogenibium azorense</i>	α	Dimer	The optimal pH is 9.6	53 days and 8 days of half-life at 50 °C and 70 °C, the optimal temperature is 80 °C	12.5	4.40×10^6	3.5×10^8	4X5S	[22–23]
TaCA	<i>Thermovibrio ammonificans</i>	α	Tetramer	–	77 days of half-life at 60 °C, the optimal temperature is 75 °C	9.9	1.60×10^6	1.6×10^8	4C3T	[24]
PmCA	<i>Persephonella marina</i> EX-HI	α	Dimer	–	The optimal temperature is 84.5 °C, 29 days of half-life at 60 °C, retain 75% and 50% of activity for 2 hours at 90 and 100 °C	10.7	3.2×10^5	3.0×10^7	–	[25]
pACA1	<i>Helicobacter pylori</i>	α	Dimer	The optimal pH is 8.9	The optimal temperature is 25 °C	17	2.4×10^5	1.4×10^7	4YGF	[26]
VchCA	<i>Vibrio cholerae</i>	α	–	–	The optimal temperature is 70 °C	11.8	8.23×10^5	7.0×10^7	–	[27]
BhCA	<i>Bacillus halodurans</i>	α	–	Thermo-alkali-table (pH 6–11)	Stimulated in the presence of SO _x , stable with EDTA	–	–	–	–	[28]
HC-aCA	<i>Hahella chejuensis</i>	α	–	The optimal pH is 10.0	The optimal temperature is 50 °C	–	–	–	–	[29]
HpaCA	<i>Helicobacter pylori</i> J99	α	–	–	–	16.6	2.5×10^5	1.5×10^7	–	[30]
NgCA	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	α	Dimer	–	–	12.4	1.1×10^6	8.9×10^7	1KOP	[25,31]
PCA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	β	–	The optimal pH is 8.4	–	10.8	7.4×10^5	6.5×10^7	–	[32]
CabCA	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	β	Tetramer	The optimal pH is 8.5	The optimal temperature is 65 °C, remained active in 75 °C for 15 min	2.8	1.7×10^4	5.9×10^6	1G5C	[33]
VchCA β	<i>Vibrio cholerae</i>	β	–	The optimal pH is 8.3	–	8.1	3.34×10^5	4.1×10^7	5CXX	[34]
PhCamH	<i>P. horikoshii</i>	γ	–	–	The optimal temperature is 98 °C	–	–	–	1V3W	[35]
MtCam	<i>Methanosarcina thermophila</i> (expressed in <i>E. coli</i> and purified aerobically)	γ	Tripolymer	–	Remained active in 55 °C for 15 min	21.9	6.8×10^4	3.1×10^6	1QRG	[36]
MtCam	<i>Methanosarcina thermophila</i> (expressed in <i>E. coli</i> and purified anaerobically)	γ	Tripolymer	–	Remained active in 55 °C for 15 min	45	24.3×10^4	5.4×10^6	1QRG	[36]
MtCam	<i>Methanosarcina thermophila</i> (expressed in <i>M. acetivorans</i> and purified anaerobically)	γ	Tripolymer	–	Remained active in 55 °C for 15 min	59.2	23.1×10^4	3.9×10^6	1QRG	[36]
ApCA	<i>Aeribacillus pallidus</i>	γ	–	Thermo-alkali-table (pH 8–11)	Stimulated in the presence of SO _x and NO _x	–	–	–	–	[37]

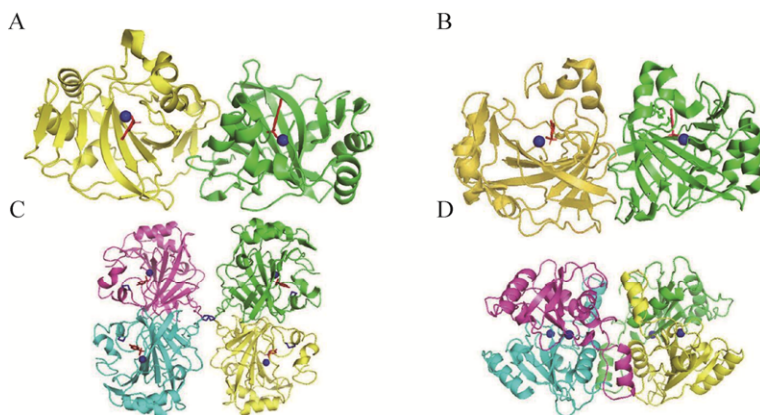


图1 四种典型的极端碳酸酐酶的四级结构(蓝色为锌离子,红色为抑制剂AZM)。(A) SspCA的二聚体结构,一个单体以黄色表示,另一个单体以绿色表示。(B) SazCA的二聚体结构。(C) TaCA的四聚体结构,四个单体分别以洋红色、绿色、蓝绿色和黄色表示。(D) VaCA的四聚体结构。

Fig. 1 The four typical quaternary structure of carbonic anhydrase. The zinc ion display in blue, and the inhibitor AZM are also shown in red. (A) The dimer structure of SspCA with one monomer shown in yellow, the other one in green. (B) The dimer structure of SazCA. (C) The tetramer structure of TaCA with four monomers shown in magenta, green, cyan and yellow respectively. (D) The tetramer structure of VaCA with four monomers.

中1个与目前数据库中实验验证的碳酸酐酶相似度为46.9%,可能是一些新的嗜热碳酸酐酶并命名为VaCA。通过在线服务器SWISS-MODEL以*Streptococcus mutans* (PDBID: 3LAS)为模板同源建模,发现VaCA是一个相比TaCA结构较小但相对致密的四聚体结构,每个单体由1个类似右手的5个相互平行的 β -折叠组成,周围环绕着3个 α -螺旋和1个 3_{10} -螺旋,分子内没有二硫键连接。目前正在进行相关的实验验证。从宏基因组中获取CA将进一步拓展其来源,为挖掘性能更佳的CA提供了可能。

3 蛋白质工程技术

尽管目前已经从自然界筛选到了大量的新型碳酸酐酶,但仍不能有效地满足环境应用与工业化生产中的迫切需求。蛋白质工程技术的发展,让研究者可以按照预期来调整并设计蛋白质的结构与功能^[39]。蛋白质工程大致可分为定向进化和理性设计两大类。定向进化无需事先了解蛋白质

的结构和功能,在实验室条件下模拟自然进化过程,通过随机突变和定向筛选获得更加适应环境压力的新的蛋白质^[40-41]。Newman等^[42]通过定向进化技术获得的碳酸酐酶突变体在工业条件下的CO₂捕获能力提高了25倍,热稳定性提高了1000万倍,突变体可在50℃、4.2 mol/L浓度下的N-甲基-二烷酰胺(MDEA)下保持稳定,在75℃和4.2 mol/L MDEA下半衰期为20 h。这种策略可用来获得嗜热又耐碱的碳酸酐酶的高效催化酶。Alvizo等^[43]对来自*Deulfovibrio vulgaris*中的 β -CA进行定向进化来增加热稳定性,经过10轮的突变与筛选获得的碳酸酐酶可耐受107℃、pH大于10.0和4.2 mol/L浓度下MDEA等严苛环境,热稳定性与碱耐受性相比野生型酶提高了400万倍,同时CO₂水合酶的能力也提高了24倍。这个热稳定性CA可以在高温(87℃)下用于CO₂的生物矿化。Protelica公司启动使用定向进化改造的碳酸酐酶用于碳捕获与封存这个项目(<http://www.protelica.com/Carbonicanhydrase>),旨

在挖掘可耐受严苛的工业环境下的嗜热耐碱型碳酸酐酶。

理性设计基于已知蛋白质结构和功能的机理,并应用它们对突变位点进行设计,最终获得的突变体具有所预期的功能^[44]。有研究者把常温 CA 改造成嗜热嗜碱型酶并获得成功。美国专利^[45](专利号:7521217)调整人碳酸酐酶 II (hCA II) 分子表面的氨基酸,分别使 Ala65、Phe93、Gln136、Lys153、Leu198、Ala247 各自突变成 Thr、Leu、His/Tyr、Asn、Met 和 Thr。使酶突变为极端嗜热酶,能在 90 °C 稳定保持活性 24 h。二氧化碳解决方案公司 (CO₂ Solutions Inc.) 将这个嗜热型碳酸酐酶投放至洗涤器的预分离高温烟气中,其 CO₂ 吸收率是以往技术的 40 倍 (<http://www.CO2solutions.com/en/the-process>)。Fisher 等^[46]在保证人碳酸酐酶 II (hCA II) 原有的高酶活性和溶解性的情况下突变远离活性中心的表面氨基酸,将分子表面的氨基酸 Tyr7、Leu224、Leu100、Leu240、Asn67 和 Asn62 各自突变为 Phe、Ser、His、Pro、Glu 和 Leu。使疏水性氨基酸突变成亲水性氨基酸来增加热稳定性,突变体融解温度上升 6 °C。Kanth 等^[18]将 *Persephonella marina* EX-H1 的碳酸酐酶 (PmCA) 的信号肽去除后在大肠杆菌表达,获得的无信号肽的同源二聚体 PmCA (sp-) 其碱耐受性增强,热稳定性也大幅提高,在 100 °C 中其半衰期为 88 min,融解温度为 84.5 °C。Luca 等^[47]以现今发现催化活性很高的碳酸酐酶 SazCA 为模本,在其 N 端引入热稳定性最高的 SspCA 中所独有的 6 个 His,准备设计 1 个超级碳酸酐酶 SupCA。然而,SupCA 的催化活性与热稳定性比原有两种酶均低,这可能是由于过多 His 的引入破坏了活性中心周围的氢键网络,SupCA 的设想虽然失败,但也为后继酶设计提供一定的参考。Jo 等^[25]利用来源于淋病奈瑟氏菌 *Neisseria gonorrhoeae* 中的 NgCA 开展全细菌细

胞催化分析,从 *E. coli* 中筛选,全细胞催化在低 pH 下稳定,即使在 pH 值小于 HCO₃⁻ 与 CO₃²⁻ 的 pKa 下,全细胞催化系统可以有效地矿化 CO₂。因此,可以降低用于维持高 pH 值的费用。应用以上策略调整 CA 的结构可以有效地捕获 CO₂,但是改造成功并获得应用的例子较少。

在蛋白质工程改造探索过程中,也有研究者们从不同角度与层次分别对 CA 的热稳定性机制进行了颇有价值的研究和探索。文中通过对现有研究结果进行总结和分析,得出以下可能因素:

- 1) 二硫键可稳定 CA 的结构,降低解旋状态下 CA 的构象熵以维持其热稳定性^[57]。二硫键能够维持 CA 的热稳定性机制已通过实验获得验证,如 Jo 等^[48]在 NgCA 中成功引入二硫键后,使得该酶的融解温度较引入二硫键之前提高了 7.8 °C,热稳定性也得到相应的提高。
- 2) CA 热稳定性主要取决于其分子构象的刚性程度,生物信息学揭示酶的刚性越强其热稳定性越强,而在 CA 表面的连接 α -螺旋与 β -折叠的 loop 圈具有很大的柔性,蛋白质的稳定性可以通过添加脯氨酸残基提高表面 loop 圈的刚性,或者通过减少 loop 圈的方式来增强蛋白质的表面致密性,因此,Boone 等^[49]用脯氨酸取代 hCA II 表面 loop 圈的 Glu234,设计出新颖的 hCA II 突变体,热稳定性分析表明该突变体的融解温度相比野生型提高了 3 °C。另一方面,包含 230–240 个氨基酸残基的区域形成了一个舒展的 loop 圈,具有特殊的热不稳定特征。删除后其热稳定性增高,这一影响因素在热稳定性高的 SspCA 中得到了进一步的支持。其蛋白质的表面致密性较高,且无此 loop 圈。这一发现对改善野生型酶的融解温度具有一定的指导意义。
- 3) 温度 B 因子 (B-factor) 的影响, B-factor 是理性改造酶热稳定性的一个重要指标,氨基酸的 B-factor 值越大,它的柔性就越大,不利于 CA 的热稳定性,因此 Jo 等^[48]利用从头设计的方法在

NgCA 中计算出温度 B 因子 (B-factor) 与氨基酸残基对柔韧性大于 25 的 3 对氨基酸残基, 各自突变成 3 对 Cys, 成功引入二硫键并形成 3 个突变体, 其中 1 个突变体的热动力学与热稳定性都大幅增强, 这可能归功于 B-factor 与二硫键的引入。

4 碳酸酐酶的固定化

除了通过筛选和改造获得嗜热、耐碱的碳酸酐酶外, 对 CA 进行固定化也可以一定程度上达到上述目的。而且, 游离酶在强酸碱、高温、高压、有机溶剂等条件下易失活, 且由于直径过小 (接近于 50 Å), 很难从吸收塔中回收, 其工业化应用被大大地限制了。但固定化技术不仅有利于酶稳定性的提高, 也有助于酶的分离, 且固定化酶具有不溶性和一定的机械强度, 可循环应用于反应器中^[50-51]。

近年来, 采用固定化 CA 仿生法来捕集 CO₂ 的技术成为了研究热点, 国内外众多学者对固定化材料、固定化酶的制备方法和 CO₂ 的矿化效率展开了研究, 为常温 CA 在工业上的应用提供了更具潜力的方法^[52]。Prabhu 等^[53]将来源于短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* 常温 CA 吸附在壳聚糖的表面, 固定化酶对热和抑制剂作用的稳定性均有所提高, 在 50 °C 同等条件保温 90 d 后, 固定化酶可保持 60% 的初始酶活, 而游离酶只有 30%, 同时在 5 min 内 CaCO₃ 沉淀生成速率是游离酶的 2 倍。Ozdemir 等^[54]将来源于牛的碳酸酐酶 (BCA) 固定在聚氨酯 (PU) 泡沫上, 固定化酶相比游离酶的动力学参数有所下降, K_m 由 12.2 mmol/L 下降至 9.6 mmol/L, 但固定化酶的热稳定性明显增强, 在反应器中连续工作 7 个循环后或在室温贮存 45 d 后, 还可保持 100% 的酶活性, 而游离酶即使在 4 °C 贮存 45 d 后完全失活。Vinoba 等^[55]将 BCA 固定到经化学处理的磁性微球上, 该固定化酶在反应器工作 30 个循环后, 其 CO₂ 捕获能力是游

离酶的 26 倍。且固定化酶在室温贮存 30 d 后, 仍能保持 82% 的初始酶活性。Yadav 等^[56]将 BCA 包埋于 3 种不同粒径海藻酸钠微球上, 结果显示: 粒径最小的微球上酶活性最高, 相比游离酶, 固定化酶热稳定性显著增强, 其最适温度提高了近 10 °C, 固定化酶在工作 42 d 后仍能保持 67% 的初始酶活。Capasso 等^[57]将 SspCA 固定在聚氨酯 (PU) 泡沫上, 其热稳定大大增强, 可以在 100 °C 下存活 48 h, 在 70 °C 下长期工作, 并可用于火电厂高温捕获 CO₂ 的反应器中。酶在载体上的固定化往往会让酶发生一定程度的构象变化, 与底物的接触效率降低, 促使催化活性降低。科学家发现纳米颗粒可以克服以上问题。Shanbhag 等^[58]将 BCA 溶解于自组装肽 P₁₁4 中形成 50–200 nm 的纳米颗粒, 粒径越小, 酶越不容易发生构象变化, 该固定化酶可保持 98% 水化酶活性, 并在低温 ((22±2) °C) 和高温 (50 °C) 下保持自组装状态。近年来, 基于 R5 介导的二氧化硅纳米球的仿生制备原理, 国内外学者做了二氧化硅为基质的酶自固定化研究^[59]。Jo 等^[60]成功地将 R5 和目标酶基因融合, 经表达和纯化后, 由 R5 介导的二氧化硅纳米球自固定化酶, 固定化后的碳酸酐酶可在 50 °C 贮存 5 d 后仍保持 80% 的活性, 且在 60 °C 时酶活性是 25 °C 的 11 倍, 这有利于应用于后继工业化生产。

我们课题组将 CA 和类弹性蛋白多肽 (Elastin-like polypeptides, ELPs) 融合表达, 借助 ELPs 自分离技术经离心纯化目标酶, 通过 ELPs 独特的仿生硅化能力, 在形成二氧化硅粒子的同时实现 CA 的自固定化, 固定化酶的最适温度较游离酶提高了 10 °C, 可达 80 °C, 其热稳定性大幅提高, 但酶催化效率略有下降, 酶活回收率为 64.9%, 固定化过程工艺参数仍有较大的优化空间。制备的固定化碳酸酐酶在酶浓度达到 9 mg/mL 时, 封装率达到 91%, 在 4 °C 放置 72 h 后, 泄漏

的酶蛋白仅为 0.96%。由于 ELPs 介导的仿生硅化现象尚未见报道,其介导仿生硅化的分子机制及所得载体对酶活性影响规律仍有待深入,本课题组也将会持续探究。

5 展望

综上所述,在 CO₂ 浓度居高不下、全球温室效应加剧,但各项碳捕集技术尚不完善且成本较高的今天,碳酸酐酶作为一种新型的高效生物催化剂应用于 CCS 的前景格外引人注目。而极端微生物的挖掘、蛋白质工程技术和酶固定化技术的发展又恰恰为碳酸酐酶的工业化应用提供了诱人的前景。然而,当前大数据显示地球极端生境中还存在大量的 CA 基因等着被发现。这些大多是不可培养的微生物。宏基因组学与生物信息学工具在基因识别方面具备独特能力,一旦识别出新型的 CA 编码基因,就容易在不同的微生物宿主中克隆并表达,从而研究它们的性质及在二氧化碳碳生物矿化中的潜在用途。目前,尚未发现的数据很多,甚至有可能存在目前发现的 6 个家族之外的新的 CA。与此同时,碳酸酐酶固定化可实现其重复利用,提高了操作稳定性,降低了运行成本。但是传统的固定化方法往往会导致酶活力降低或催化性能的下降。因此,拓展搜寻碳酸酐酶的范围,改良蛋白质工程改造技术,研发廉价、高效的固定化方法仍是后续研究的重点,这些技术和方法的创新将为减轻温室效应、延缓全球变暖这一迫切需解决的问题提供新思路。

REFERENCES

- [1] Pires JCM, Alvim-Ferraz MCM, Martins FG, et al. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. *Renew Sust Energ Rev*, 2012, 16(5): 3043–3053.
- [2] Savile CK, Lalonde JJ. *Biotechnology for the acceleration of carbon dioxide capture and sequestration*. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(6): 818–823.
- [3] Rayalu S, Yadav R, Wanjari S, et al. Nanobiocatalysts for carbon capture, sequestration and valorisation. *Top Catal*, 2012, 55(16/18): 1217–1230.
- [4] Shekh AY, Krishnamurthi K, Mudliar SN, et al. Recent advancements in carbonic anhydrase-driven processes for CO₂ sequestration: mini review. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2012, 42(14): 1419–1440.
- [5] Sahoo PC, Jang YN, Lee SW. Immobilization of carbonic anhydrase and an artificial Zn(II) complex on a magnetic support for biomimetic carbon dioxide sequestration. *J Mol Catal B Enzym*, 2012, 82: 37–45.
- [6] Ma XZ. The expression and enzymology properties of thermostable recombinant carbonic anhydrase[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2014 (in Chinese).
马晓舟. 耐热型重组碳酸酐酶的表达及酶学性质研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2014.
- [7] Supuran CT. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem J*, 2016, 473(14): 2023–2032.
- [8] Fiore DA, Alterio V, Monti SM, et al. Thermostable carbonic anhydrases in biotechnological applications. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7): 15456–15480.
- [9] Simone DG, Fiore DA, Capasso C, et al. The zinc coordination pattern in the η -carbonic anhydrase from *Plasmodium falciparum* is different from all other carbonic anhydrase genetic families. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 1385–1389.
- [10] Cuesta-Seijo JA, Borchert MS, Navarro JC, et al. Structure of a dimeric fungal alpha-type carbonic anhydrase. *Febs Lett*. 2011, 585: 1042–1048.
- [11] Boone CD, Pinard M, McKenna R, et al. Catalytic mechanism of alpha-class carbonic anhydrases: CO₂ hydration and proton transfer. *Subcell Biochem*, 2014, 75: 31–52.
- [12] Maresca A, Vullo D, Scozzafava A, et al. Inhibition of the alpha- and beta-carbonic anhydrases from the gastric pathogen *Helicobacter pylori* with anions. *J Enzym Inhib Med Chem*,

- 2013, 28(2): 388–391.
- [13] Ferry JG. The gamma class of carbonic anhydrases. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804, 374–381.
- [14] Lapointe M, MacKenzie TDB, Morse D. An external δ -carbonic anhydrase in a free-living marine dinoflagellate may circumvent diffusion-limited carbon acquisition. *Plant Physiol*, 2008, 147(3): 1427–1436.
- [15] Prete DS, Vullo D, Fisher GM, et al. Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*—The η -carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(18): 4389–4396.
- [16] Aquilano D, Otálora F, Pastero L, et al. Three study cases of growth morphology in minerals: halite, calcite and gypsum. *Prog Cryst Growth Charact Mater*, 2016, 62(2): 227–251.
- [17] Hirmas DR, Amrhein C, Graham RC. Spatial and process-based modeling of soil inorganic carbon storage in an arid piedmont. *Geoderma*, 2010, 154(3/4): 486–494.
- [18] Kanth BK, Min K, Kumari S, et al. Expression and characterization of codon-optimized carbonic anhydrase from *Dunaliella* species for CO₂ sequestration application. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 167(8): 2341–2356.
- [19] Achal V, Pan XL. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Curr Microbiol*, 2011, 62(3): 894–902.
- [20] Bose H, Satyanarayana T. Microbial Carbonic anhydrases in biomimetic carbon sequestration for mitigating global warming: prospects and perspectives. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1615.
- [21] Capasso C, de Luca V, Carginale V, et al. Biochemical properties of a novel and highly thermostable bacterial α -carbonic anhydrase from *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP1. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2012, 27(6): 892–897.
- [22] de Luca V, Vullo D, Scozzafava A, et al. An α -carbonic anhydrase from the thermophilic bacterium *Sulphurihydrogenibium azorense* is the fastest enzyme known for the CO₂ hydration reaction. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(6): 1465–1469.
- [23] Peirce S, Russo ME, Luca VD, et al. Immobilization of carbonic anhydrase for biomimetic CO₂ capture in a slurry absorber as cross-linked enzyme aggregates (CLEA). *Chem Eng Trans*, 2015, 43: 259–264.
- [24] James P, Isupov MN, Sayer C, et al. The structure of a tetrameric α -carbonic anhydrase from *Thermovibrio ammonificans* reveals a core formed around intermolecular disulfides that contribute to its thermostability. *Acta Cryst*, 2014, 70(10): 2607–2618.
- [25] Jo BH, Kim IG, Seo JH, et al. Engineered *Escherichia coli* with periplasmic carbonic anhydrase as a biocatalyst for CO₂ sequestration. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(21): 6697–6705.
- [26] Chirica LC, Elleby B, Lindskog S. Cloning, expression and some properties of α -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*. *Biochim Biophys Acta Prot Struct Mol Enzymol*, 2001, 1544(1/2): 55–63.
- [27] del Prete S, Isik S, Vullo D, et al. DNA cloning, characterization, and inhibition studies of an α -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. *J Med Chem*, 2012, 55(23): 10742–10748.
- [28] Faridi S, Satyanarayana T. Novel alkalistable α -carbonic anhydrase from the polyextremophilic bacterium *Bacillus halodurans*: characteristics and applicability in flue gas CO₂ sequestration. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23(15): 15236–15249.
- [29] Ki MR, Min K, Kanth BK, et al. Expression, reconstruction and characterization of codon-optimized carbonic anhydrase from *Hahella chejuensis* for CO₂ sequestration application. *Bioproc Biosyst Eng*, 2013, 36(3): 375–381.
- [30] Nishimori I, Minakuchi T, Morimoto K, et al. Carbonic anhydrase inhibitors: DNA cloning and inhibition studies of the α -Carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*, a new target for developing sulfonamide and sulfamate gastric drugs. *J Med Chem*, 2006, 49(6): 2117–2126.
- [31] Kim IG, Jo BH, Kang DG, et al. Biomineralization-based conversion of carbon

- dioxide to calcium carbonate using recombinant carbonic anhydrase. *Chemosphere*, 2012, 87(10): 1091–1096.
- [32] Burghout P, Vullo D, Scozzafava A, et al. Inhibition of the β -carbonic anhydrase from *Streptococcus pneumoniae* by inorganic anions and small molecules: toward innovative drug design of anti-infectives? *Bioorg Med Chem*, 2001, 19(1): 243–248.
- [33] Smith KS, Ferry JG. A plant-type (β -class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Bacteriol*, 1999, 181(20): 6247–6253.
- [34] Ferraroni M, del Prete S, Vullo D, et al. Crystal structure and kinetic studies of a tetrameric type II β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. *Acta Cryst*, 2015, 71(12): 2449–2456.
- [35] Jeyakanthan J, Rangarajan S, Mridula P, et al. Observation of a calcium-binding site in the γ -class carbonic anhydrase from *Pyrococcus horikoshii*. *Acta Cryst*, 2008, 64(10): 1012–1019.
- [36] Tripp BC, Bell CB, Cruz F, et al. A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 2004, 279(8): 6683–6687.
- [37] Bose H, Satyanarayana T. Suitability of the alkalistable carbonic anhydrase from a polyextremophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* TSHB1 in biomimetic carbon sequestration. *Bioproc Biosyst Eng*, 2016, 39(10): 1515–1525.
- [38] Simone DG, Monti SM, Alterio V, et al. Crystal structure of the most catalytically effective carbonic anhydrase enzyme known, SazCA from the thermophilic bacterium *Sulfurihydrogenibium azorense*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(9): 2002–2006.
- [39] Jakob F, Martinez R, Mandawe J, et al. Surface charge engineering of a *Bacillus gibsonii* subtilisin protease. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(15): 6793–6802.
- [40] Kries H, Blomberg R, Hilvert D. *De novo* enzymes by computational design. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(2): 221–228.
- [41] Martinez R, Jakob F, Tu R, et al. Increasing activity and thermal resistance of *Bacillus gibsonii* alkaline protease (BgAP) by directed evolution. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(3): 711–720.
- [42] Newman LM, Clark L, Ching C, et al. Carbonic anhydrase polypeptides and uses thereof: US, 12684800. 2010-08-19.
- [43] Alvizo O, Nguyen LJ, Savile CK, et al. Directed evolution of an ultrastable carbonic anhydrase for highly efficient carbon capture from flue gas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(46): 16436–16441.
- [44] Lutz S. Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21(6): 734–743.
- [45] Daigle R, Desrochers M. Carbonic anhydrase having increased stability under high temperature conditions. US, 7521217. 2009-04-21.
- [46] Fisher Z, Boone CD, Biswas SM, et al. Kinetic and structural characterization of thermostabilized mutants of human carbonic anhydrase II. *Protein Eng Des Select*, 2012, 25(7): 347–355.
- [47] De Luca V, Prete DS, Carginale V, et al. A failed tentative to design a super carbonic anhydrase having the biochemical properties of the most thermostable CA (SspCA) and the fastest (SazCA) enzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015, 30(6): 989–994.
- [48] Jo HB, Park T, Park JH, et al. Engineering *de novo* disulfide bond in bacterial α -type carbonic anhydrase for thermostable carbon sequestration. *Sci Rep*, 2016, 6: 29322.
- [49] Boone CD, Rasi V, Tu C, et al. Structural and catalytic effects of proline substitution and surface loop deletion in the extended active site of human carbonic anhydrase II. *FEBS J*, 2015, 282(8): 1445–1457.
- [50] Schoffelen S, van Hest JCM. Multi-enzyme systems: bringing enzymes together *in vitro*. *Soft Matter*, 2012, 8(6): 1736–1746.
- [51] Schoffelen S, van Hest JCM. Chemical approaches for the construction of multi-enzyme reaction systems. *Curr Opin Struc Biol*, 2013, 23(4): 613–621.
- [52] Pan FJ, Zhou ZM. Research and application progress of carbonic anhydrase-immobilized technology.

- Chem Eng, 2014, 42(3): 11–17, 58 (in Chinese).
潘富军, 周作明. 碳酸酐酶固定化技术研究与应用进展. 化学工程, 2014, 42(3): 11–17, 58.
- [53] Prabhu C, Wanjari S, Gawande S, et al. Immobilization of carbonic anhydrase enriched microorganism on biopolymer based materials. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, 60(1/2): 13–21.
- [54] Ozdemi RE. Biomimetic CO₂ sequestration: 1. Immobilization of carbonic anhydrase within polyurethane foam. *Energy Fuel*, 2009, 23(11): 5725–5730.
- [55] Vinoba M, Bhagiyalakshmi M, Jeong SK, et al. Carbonic anhydrase immobilized on encapsulated magnetic nanoparticles for CO₂ sequestration. *Chem-Eur J*, 2012, 18(38): 12028–12034.
- [56] Yadav RR, Mudlia SN, Shekh AY, et al. Immobilization of carbonic anhydrase in alginate and its influence on transformation of CO₂ to calcite. *Process Biochem*, 2012, 47(4): 585–590.
- [57] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*, 2012, 6(8): 1621–1624.
- [58] Shanbhag KB, Liu BY, Fu J, et al. Self-assembled enzyme nanoparticles for carbon dioxide capture. *Nano Lett*, 2016, 16: 3379–3384.
- [59] Karplus M. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Acc Chem Res*, 2002, 35(2): 321–323.
- [60] Jo BH, Seo JH, Yang YJ, et al. Bioinspired silica nanocomposite with autoencapsulated carbonic anhydrase as a robust biocatalyst for CO₂ sequestration. *ACS Catal*, 2014, 4(12): 4332–4340.

(本文责编 郝丽芳)