

二氧化碳还原用甲酸脱氢酶的研究进展

史红玲^{1,2}, 王瑶¹, 袁书玮³, 姚伦广¹, 唐存多^{1*}, 薛闯^{2*}

(1. 南阳师范学院 生命科学与农业工程学院, 河南 南阳 473061; 2. 大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024; 3. 河南师范大学 化学化工学院, 河南 新乡 453007)

摘要: CO₂ 的还原和资源化利用是缓解温室效应的重要手段。生物催化剂对反应和底物具有高选择性, 因此被用于构建高效的 CO₂ 还原系统。其中, 甲酸脱氢酶 (FDH), 特别是某些烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 依赖型/金属辅因子 (W 或 Mo) 的甲酸脱氢酶, 能够可逆地将 CO₂ 还原成甲酸。该文首先介绍了甲酸脱氢酶的特性及分类, 其次综述了 CO₂ 还原用甲酸脱氢酶的活性位点及催化机制、FDH 的分子改造、全细胞生物催化 CO₂ 还原为甲酸盐的最新进展, 为 CO₂ 还原用生物催化剂的研究提供了启示, 为以 CO₂ 为原料构建可行的 CO₂ 还原系统来生产增值的燃料和化学品提供了理论基础。

关键词: 甲酸脱氢酶; CO₂ 还原; 酶工程; 全细胞催化; 甲酸盐

中图分类号: X701; TQ426.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 10-2089-09

Advances in formate dehydrogenase for carbon dioxide reduction

SHI Hongling^{1,2}, WANG Yao¹, YUAN Shuwei³, YAO Lunguang¹,
TANG Cunduo^{1*}, XUE Chuang^{2*}

(1. College of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China; 2. School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China)

Abstract: The reduction and resource utilization of CO₂ are important means to alleviate greenhouse effects. Biocatalysts, with high selectivity for reactions and substrates, are used to build efficient CO₂ reduction systems. Among them, formate dehydrogenase (FDH), especially those β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent/metal cofactor (W or Mo) FDH are able to reversibly reduce CO₂ to formate. Herein, the characteristics and classification of formate dehydrogenase were summarized. The active sites and catalytic mechanism of formate dehydrogenase for CO₂ reduction, molecular modification of the enzyme, and the latest progress in the whole-cell biocatalysis were discussed. The review provides a great enlightenment and guidance for the future research of FDH for CO₂ reduction, as well as a theoretical basis for the construction of feasible CO₂ refining systems with CO₂ as raw materials to produce value-added fuels and chemicals.

Key words: formate dehydrogenase; CO₂ reduction; enzyme engineering; whole cell catalysis; formate

自工业革命以来, 热力发电、交通运输等行业排放了大量的 CO₂, 从而导致气候变化和全球变暖。为了降低大气 CO₂ 水平, 不仅实施了《巴黎气候协定》等法规, 还开发了包括 CO₂ 捕获、储存和利用在内的新技术^[1-2]。CO₂ 是一种廉价、丰富和可再生的碳原料, 可用于燃料和化学品的合成, 如甲酸、

甲醇、乙醇等^[3]。因此, 将 CO₂ 转化为燃料和化学品为缓解全球变暖和促进可再生能源利用提供了一种双赢战略^[4]。

在过去的几十年里, 人们对 CO₂ 的转化进行了深入的研究, 包括化学转化、电化学转化和光化学转化^[5-7]。然而, 这些方法都存在各自的缺陷, 阻碍

收稿日期: 2022-12-15; 定用日期: 2023-02-23; DOI: 10.13550/j.jxhg.20221145

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31900916); 河南省青年人才托举工程项目 (2021HYTP036); 河南省高校科技创新人才 (21HASTIT041); 南阳师范学院青年项目 (2023QN007)

作者简介: 史红玲 (1988—), 女, 博士生, E-mail: shihonglingwu2006@163.com。联系人: 唐存多 (1987—), 男, 副教授, 硕士生导师, E-mail: tcd530@nynu.edu.cn; 薛闯 (1982—), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: xue.l@dlut.edu.cn。

了大规模的应用。化学转化通常在高温高压等条件下进行，需要使用价格昂贵的催化剂，进而导致高能源消耗和高成本。光化学转化需要光敏剂长时间光照，具有不稳定和下游产物难分离的问题^[6]。电化学转化通常存在选择性低、产物种类多、电流密度低、效率低的问题^[8]。与上述方法相比，酶法转化 CO₂ 是一种很有前途的解决方案，它可以在温和和环保的条件下实现高选择性和高效率的 CO₂ 还原^[9]。酶法 CO₂ 转化是利用甲酸脱氢酶 (FDH)、甲醛脱氢酶 (FaldDH) 和醇脱氢酶 (ADH) 等多酶级联反应来生产一些重要的化学品和燃料，CO₂ 伴随着还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 的氧化分别还原为甲酸、甲醛和甲醇，如图 1 所示^[10-11]。

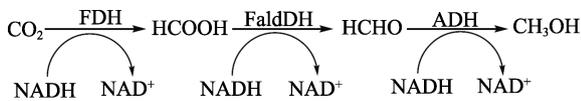


图 1 3 种脱氢酶催化 CO₂ 合成甲醇的反应路线示意图^[11]
Fig. 1 Synthesis route of methanol from CO₂ catalyzed by three kinds of dehydrogenase^[11]

长期以来，人们认为 FDH 是一种几乎不可逆催化甲酸氧化成 CO₂ 的酶^[12-13]。最新研究表明，某些 FDH 能够可逆地将 CO₂ 还原成甲酸盐^[4]，也有学者致力于开发电酶法 CO₂ 精炼系统生产甲酸盐，将 CO₂ 转化为一种重要的化工原料^[14]。

本文综述了 CO₂ 还原用甲酸脱氢酶的最新研究进展，讨论了最近发现的甲酸脱氢酶（作为 CO₂ 还原酶）的 CO₂ 还原活性及其机制、酶分子的改造、全细胞生物催化和多酶级联反应。基于对 CO₂ 还原

酶的研究，可以构建可行的、非光合作用的 CO₂ 还原系统，从而利用 CO₂ 生产增值的燃料和化学品。

1 甲酸脱氢酶的特性及分类

FDH 作为一种生物催化剂，催化甲酸盐氧化为 CO₂，将电子传递给氧化型辅酶 (S_{ox})，或者反向将 CO₂ 还原为甲酸，将电子传递给还原型辅酶 (S_{red})，如式 (1) 所示^[15]。



根据所依赖的辅酶类型，FDH 分为四类：烟酰胺 [NAD(P)⁺或 NAD(P)⁺/金属辅因子] 依赖型、细胞色素 (细胞色素 b1 或细胞色素 c553) 依赖型、醌辅酶依赖型和 NAD⁺-铁氧还蛋白依赖型。此外，根据是否含有金属辅因子，FDH 又可分为单纯 NAD(P)⁺依赖型和 NAD(P)⁺/金属辅因子依赖型。单纯 NAD(P)⁺依赖型 FDH 在活性中心不包含金属簇；NAD(P)⁺/金属辅因子依赖型 FDH 的活性中心有一个金属簇，这些 FDH 不仅可以利用天然辅因子 [NAD(P)⁺/NAD(P)H] 进行甲酸盐氧化/CO₂ 还原，而且可以利用人工电子受体/供体进行反应。NAD(P)⁺依赖型 FDH、醌型 FDH 和 NAD(P)⁺-铁氧还蛋白依赖型 FDH 3 种酶在酶的国际系统分类编号分别为 EC1.17.1.9、EC1.17.5.3 和 EC1.17.1.11，而细胞色素依赖型 FDH 分为两种：细胞色素 b1 依赖型 FDH (EC1.2.2.1) 和细胞色素 c553 依赖型 FDH (EC1.17.2.3) ^[15]。

在此对目前已报道的一些具有 CO₂ 还原活性的 FDH 进行了比对分析，结果如表 1 所示。

表 1 具有 CO₂ 还原活性 FDH 的性能比较
Table 1 Property comparison of FDH with CO₂ reduction activity

Source	Type	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$K_{\text{m}}/(\text{mmol/L})$	Substrate	Product	Productivity/ (mmol/h)	Ref.
<i>Thiobacillus</i> sp. KNK65MA	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.32 ^①	9.23 ^①	CO ₂	甲酸盐	0.37	[16]
		1.77 ^②	16.24 ^②	甲酸钠	CO ₂	—	
<i>Candida boidinii</i>	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.015 ^①	31.28 ^①	CO ₂	甲酸盐	0.065	[16]
		1.08 ^②	8.55 ^②	甲酸钠	CO ₂	—	
<i>Chaetomium thermophilum</i>	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.025 ^①	0.35 ^①	HCO ₃ ⁻	甲酸	—	[17]
		2.039 ^②	3.3 ^②	甲酸钠	CO ₂	—	
<i>Candida methylca</i>	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.008 ^①	0.78 ^①	HCO ₃ ⁻	甲酸	—	[17]
		1.31 ^②	7.01 ^②	甲酸钠	CO ₂	—	
<i>Myceliophthora thermophile</i>	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.1 ^①	0.43 ^①	HCO ₃ ⁻	甲酸盐	—	[18]
		0.32 ^②	7.2 ^②	甲酸钠	CO ₂	—	
<i>Chaetomium thermophilum</i> (Asn120Cys)	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.162 ^①	2.27 ^①	HCO ₃ ⁻	甲酸盐	—	[19]
		— ^②	— ^②	—	—	—	
<i>Chaetomium thermophilum</i> (Asn256Asp)	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.115 ^①	1.81 ^①	HCO ₃ ⁻	甲酸盐	—	[19]
		— ^②	— ^②	—	—	—	
<i>Chaetomium thermophilum</i> (Gly93His/Ile94Tyr)	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.07 ^①	0.2 ^①	CO ₂ 和 HCO ₃ ⁻	甲酸盐	—	[20]
		— ^②	— ^②	—	—	—	
<i>Chaetomium thermophilum</i> (Gly93His/Ile94Arg)	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.05 ^①	0.7 ^①	CO ₂ 和 HCO ₃ ⁻	甲酸盐	—	[20]
		— ^②	— ^②	—	—	—	

续表 1

Source	Type	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$K_{\text{m}}/(\text{mmol/L})$	Substrate	Product	Productivity/ (mmol/h)	Ref.
<i>Chaetomium thermophilum</i> (Arg259Cys)	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.09 ^① — ^②	4.7 ^① — ^②	CO ₂ 和 HCO ₃ ⁻ —	甲酸盐 —	—	[20]
<i>Chaetomium thermophilum</i> (Gly93His/Ile94Tyr/Arg259Cys)	NAD(P) ⁺ 依赖型	0.04 ^① — ^②	8.4 ^① — ^②	CO ₂ 和 HCO ₃ ⁻ —	甲酸盐 —	—	[20]
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	0.08 ^① — ^②	0.05 ^① — ^②	CO ₂ —	甲酸 —	—	[21]
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	46.6 ^① 543 ^②	0.016 ^① 0.057 ^②	CO ₂ 和 H ₂ 甲酸钠	甲酸盐 CO ₂	0.4 —	[22-23]
<i>Cupriavidus necator</i>	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	11 ^① 140 ^②	2.7 ^① 0.082 ^②	CO ₂ 甲酸钠	甲酸 CO ₂	— —	[12]
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	1.48 ^① 36.48 ^②	— ^① 281 ^②	CO ₂ 甲酸钠	甲酸盐 CO ₂	— —	[24]
<i>Escherichia coli</i>	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	1 ^① 4 ^②	8.3 ^① — ^②	CO ₂ 甲酸钠	甲酸盐 CO ₂	— —	[25]
<i>Rhodobacter aestuarii</i>	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	0.81 ^① 0.26 ^②	— ^① — ^②	CO ₂ 和 HCO ₃ ⁻ 甲酸钠	甲酸盐 CO ₂	— —	[1]
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	500 ^① 1500 ^②	— ^① — ^②	CO ₂ 甲酸钠	甲酸盐 CO ₂	— —	[26]
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	315 ^① 1310 ^②	0.42 ^① 0.017 ^②	CO ₂ 甲酸钠	甲酸盐 CO ₂	— —	[27]
<i>Clostridium ljundahlii</i>	NAD(P) ⁺ /金属辅因子 依赖型	0.73 ^① 14.77 ^②	7.27 ^① 1.4 ^②	CO ₂ 甲酸钠	甲醇 CO ₂	1.31 —	[28-30]

注: k_{cat} 为催化常数, 值越大, 表示酶的催化效率越高; K_{m} 为米氏常数, 即反应速率达到最大反应速率一半时的底物浓度; ①CO₂ 还原反应; ②甲酸盐氧化反应; “—”代表文献中未给出数据。*Thiobacillus* sp. 为硫杆菌; *Candida boidinii* 为布氏念珠菌; *Chaetomium thermophilum* 为嗜热链球菌; *Candida methylica* 为甲基念珠菌; *Myceliophthora thermophila* 为嗜热菌丝体; *Chaetomium thermophilum* 为嗜热毛壳菌; *Clostridium carboxidivorans* 为梭状芽孢杆菌; *Desulfovibrio desulfuricans* 为脱硫弧菌; *Cupriavidus necator* 铜绿假单胞菌; *Rhodobacter capsulatus* 为荚膜红杆菌; *Escherichia coli* 为大肠杆菌; *Rhodobacter aestuarii* 为埃斯图里红杆菌; *Syntrophobacter fumaroxidans* 为富马酸合成杆菌; *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 为希尔登伯勒普通硫弧菌; *Clostridium ljundahlii* 为艾氏梭状芽孢杆菌。Asn120Cys 为 120 位天冬酰胺突变为半胱氨酸, Asn256Asp 为 256 位天冬酰胺突变为天冬氨酸; Gly93His/Ile94Tyr (G93H/194Y) 为 93、94 位甘氨酸、异亮氨酸分别突变为组氨酸、酪氨酸; Gly93His/Ile94Arg (G93H/194R) 为 93、94 位甘氨酸、异亮氨酸分别突变为组氨酸、精氨酸; Arg259Cys (R259C) 为 259 位精氨酸突变为半胱氨酸; Gly93His/Ile94Tyr/Arg259Cys (G93H/194Y/R259C) 为 93、94、259 位甘氨酸、异亮氨酸、精氨酸分别突变为组氨酸、酪氨酸、半胱氨酸。

由表 1 可知, 与 NAD(P)⁺/金属辅因子依赖型 FDH 相比, NAD(P)⁺依赖型 FDH 对 CO₂ 还原的催化效率相对较低。此外, FDH 催化甲酸盐氧化的效率通常高于其还原 CO₂ 的效率。从 *Candida boidinii* 中获得的 NAD⁺依赖型的 CbFDH 已被广泛用于各种光诱导 CO₂ 还原制备甲酸的反应中, 而 CbFDH 主要通过 NAD⁺还原偶联的方式催化甲酸盐氧化生成 CO₂^[16]。相比之下, CHOE 等^[16]报道了一个来源于 *Thiobacillus* sp. KNK65MA 的 TsFDH 具有优异的催化 CO₂ 还原的活性, 其对 CO₂ 还原的催化效率 ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 值, 下同) 为 0.035 L/(mmol·s), 而 CbFDH 为 0.0005 L/(mmol·s), 是后者的 70 倍。分别用 TsFDH 和 CbFDH 催化 CO₂ 气体制取甲酸盐, TsFDH 的甲酸盐产率是 CbFDH 的 5.7 倍。序列和结构比较表明, 具有较高催化 CO₂ 还原活性的 FDH 具有较长的 N-末端和 C-末端^[16,31]。此外, 1 个来源于 *Myceliophthora thermophila* 的 MFDH, 尽管它催化甲酸盐氧化的 k_{cat}

值高于 CO₂ 还原的值, 但是它催化 CO₂ 还原的 K_{m} 值显著低于其催化甲酸盐氧化的 K_{m} 值, 因此, 其 CO₂ 还原的催化效率 [0.23 L/(mmol·s)] 是甲酸盐氧化效率 [0.04 L/(mmol·s)] 的 5.8 倍^[18]。

在 NAD(P)⁺/金属辅因子依赖型 FDH 中, 一些来自大肠杆菌、坏死杯状菌和脱硫弧菌等含金属辅因子的 FDH, 对 CO₂ 还原的转化率没有对甲酸盐氧化的转化率高^[12,22,24-25]。但是, MIN 等^[1]从 *Rhodobacter aestuarii* 中发现了一种新型含钼的 RaFDH, 其对于 CO₂ 还原和甲酸盐氧化的 k_{cat} 值分别为 0.81 和 0.26 s⁻¹, 表明该酶驱动的 CO₂ 还原速率超过了该酶驱动甲酸盐氧化的速率^[1]。1 个来源于 *Syntrophobacter fumaroxidans* 的 SFDH 对 CO₂ 还原表现出了较高 k_{cat} 值 (500 s⁻¹)^[26]。ÇAKAR 等^[28]报道了来源于 *Clostridium ljundahlii* 的 FDH (C/FDH), 其在钨和钼的存在下, 活性分别比不含钨和钼的情况下提高了 2.8 倍和 5.6 倍。因此, C/FDH 可能是一种 NAD(P)⁺/金属辅因子依赖型酶。KUK 等^[29]

进行了随机 ICP-MS 分析, 证明每个 C/FDH 亚单位有 1.28 个钨, 说明 C/FDH 是一种依赖 NAD⁺ 并且含金属钨的酶。OLIVEIRA 等^[27] 根据 *Desulfovibrio vulgaris* Hidenborough 中的 DvFDH, 构建了一个重组的含钨的甲酸脱氢酶 (FdhAB, 含有两个不同亚基 A 和 B 的 FDH), 表现出显著的 O₂ 稳定性。此外, DvFDH 表现出非常高的 CO₂ 还原活性, 其 k_{cat} 值为 315 s⁻¹, k_{cat}/K_m 值为 750 L/(mmol·s)。

根据文献报道, 一些 NAD⁺ 依赖型 FDH 的 T_m 值 (即热处理后初始酶活性损失 50% 时的温度) 在 45~65 °C 之间, 与酵母和植物来源的 FDH 相比, 细菌来源的 FDH 更稳定^[32-34]。细菌 FDH 的 N 端有一个较长的 Loop 环, 但酵母和植物 FDH 中没有。该 Loop 环包含大量的脯氨酸残基, 刚性较强, 该区域与亚单位的多种相互作用是细菌 FDH 热稳定性较高的原因^[18]。

由表 1 可见, CO₂ 还原效率较高的 3 个来源于

S. fumaroxidans、*D. vulgaris* 和 *D. desulfuricans* 的甲酸脱氢酶均是 NAD(P)⁺/金属辅因子依赖型 FDH。因此, 后续研究如果是 CO₂ 固定还原为目标的工作, 可以重点围绕金属辅因子依赖型 FDH 开展。

2 甲酸脱氢酶的活性位点及其催化机制

近年来, 许多科研工作者都在尝试通过基因工程和酶工程的手段对 FDH 进行定向改造, 以提高其 CO₂ 的还原活性。而充分了解 FDH 的结构和催化机制, 可大大提高酶改造效率。对于 NAD⁺ 依赖型 FDH, 其活性中心仅由氨基酸残基组成。如图 2a 所示, 其活性中心通常由 8 个氨基酸 (Ile、Asn、Thr、Arg、Asp、Gln、His 和 Ser, 其中 Ile 为异亮氨酸; Asn 为天冬酰胺; Thr 为苏氨酸; Arg 为精氨酸; Asp 为天冬氨酸; Gln 为谷氨酰胺; His 为组氨酸; Ser 为丝氨酸) 构成底物和辅因子结合位点^[35]。

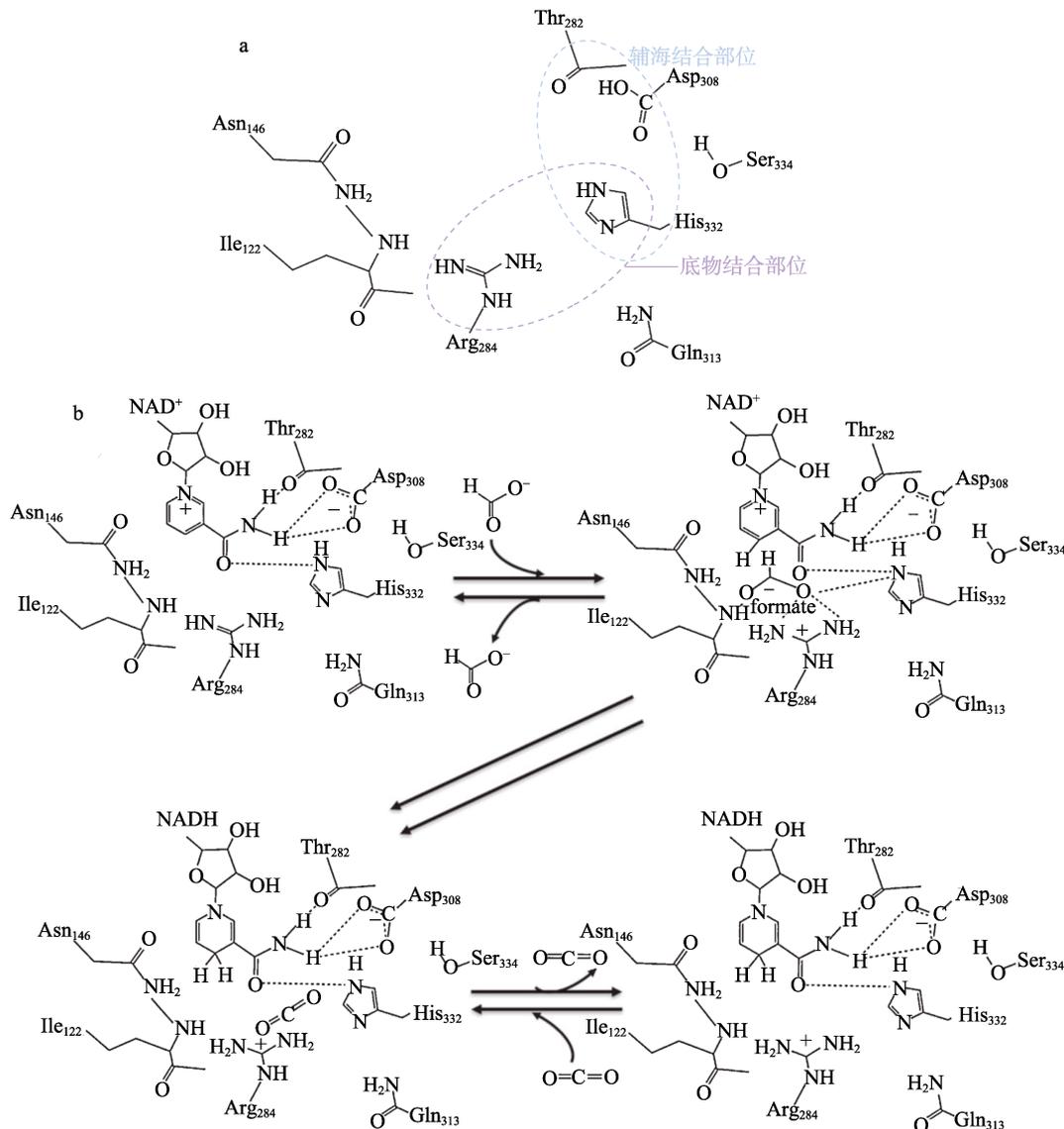


图 2 NAD⁺ 依赖型 FDH 的可能活性位点 (a) 和作用机制 (b) ^[15]
 Fig. 2 Possible active sites (a) and mechanism (b) of NAD⁺-dependent FDH^[15]

碱性氨基酸残基(组氨酸和精氨酸)形成甲酸或 CO_2 的结合部位, 苏氨酸、天冬氨酸和组氨酸等氨基酸残基通过氢键形成 NAD^+ 或 NADH 的结合位点^[35-36]。 NAD^+ 依赖型 FDH 通过捕获 NAD^+ 的胺基上的氢和羰基氧来启动甲酸盐氧化。然后, 带正电荷的 Arg 和带负电荷的甲酸盐被静电俘获, 活性中心催化甲酸盐氧化为 CO_2 , NAD^+ 还原为 NADH ^[15,37], 见图 2b。

金属辅因子依赖型 FDH 通常含有高度保守的活性位点, 其中包括 1 个 Mo (或 W) 配位中心, 由两个钼蝶呤二核苷酸分子、1 个硫化物和 1 个硒-半胱氨酸配体组成。此外, 在第二配位中心还有组氨酸和精氨酸残基^[38]。图 3a 和 b 分别是含钼和含钨的金属辅因子依赖型 FDH 活性中心的可能结构。在甲酸盐氧化和 CO_2 还原反应中, 金属辅因子依赖型 FDH 活性中心结构有所不同。对于甲酸盐氧化反应, Mo 或 W 的价态为六价, Mo 或 W 与硫化物的键合状态为 “ $\text{X}=\text{S}(\text{X}=\text{Mo}$ 或 $\text{W})$ ”。相反, 在 CO_2 还原反应中, Mo 或 W 的价态为四价, Mo 或 W 与硫化物的键合状态为 “ $\text{X}-\text{SH}(\text{X}=\text{Mo}$ 或 $\text{W})$ ”^[15,39]。

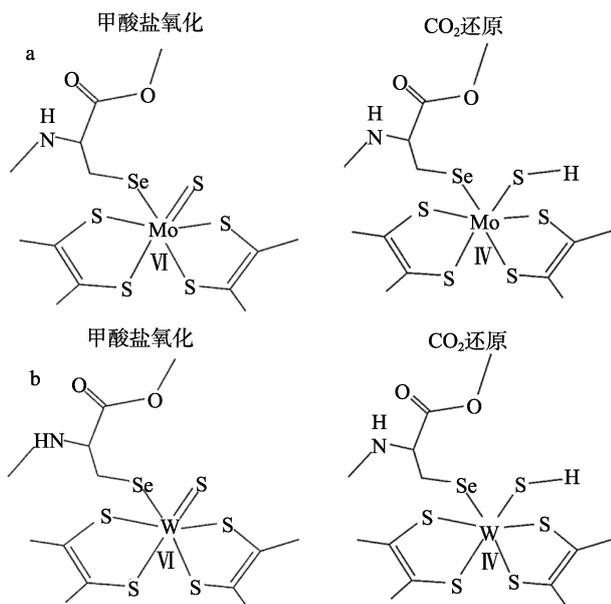


图 3 金属辅因子依赖型 FDH 活性中心含 Mo (a) 和 W (b) 的可能结构^[15]

Fig. 3 Possible structures of metal cofactor-dependent FDH active sites containing Mo (a) and W (b)^[15]

对于金属辅因子依赖型 FDH, 甲酸盐氧化反应的可能机制如图 4a 所示。首先, 带负电荷的甲酸盐被带正电荷的精氨酸残基静电捕获。其次, 甲酸的氢攻击与金属 ($\text{X}=\text{Mo}$ 或 W) 结合的硫原子, 从而使金属 X 的价态从六价降为四价。最后, 基于释放的质子和 CO_2 , 金属 X 的价态从四价氧化为六价, 活性中心恢复到原来的状态。 CO_2 还原反应的可能

机制如图 4b 所示。首先, CO_2 被带正电荷的精氨酸残基静电捕获。其次, 与金属 ($\text{X}=\text{Mo}$ 或 W) 结合的硫醇的氢攻击被精氨酸残基捕获的 CO_2 , 从而金属 X 的价态从四价氧化为六价。最后, 由于接受质子和电子并且释放出甲酸盐, 金属 X 的价态从六价又还原为四价, 活性中心恢复到原来的状态^[38]。从催化机制可以推测, 金属辅因子依赖型 FDH 中金属 X 价态的变化有助于活性中心催化残基的电子传递, 能够显著提高活性中心催化残基的催化效率, 进而表现出比非金属辅因子依赖型 FDH 更高的二氧化碳还原效率。

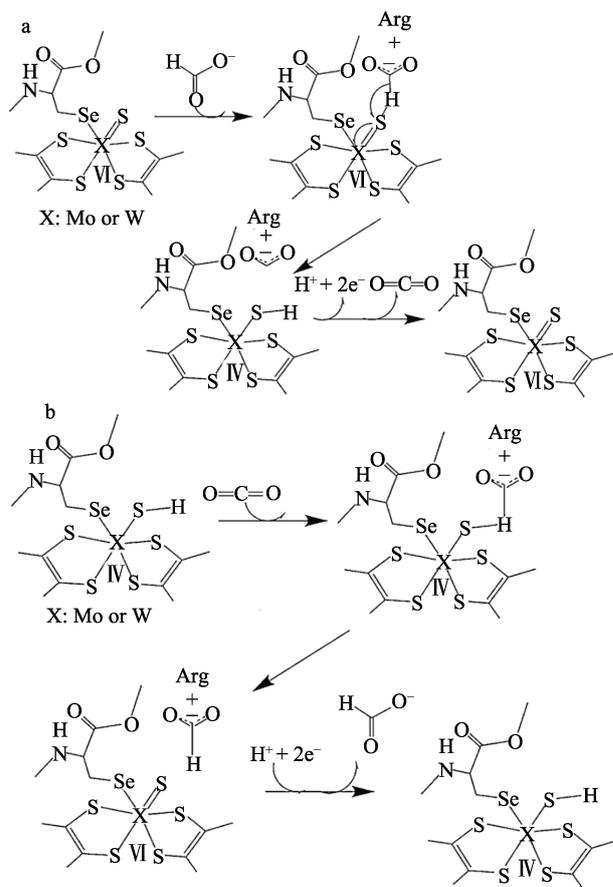


图 4 金属辅因子依赖型 FDH 可能的氧化还原机制: 甲酸盐氧化 (a)、 CO_2 还原 (b)^[15]

Fig. 4 Possible mechanism of oxidation and reduction of metal cofactor-dependent FDH: Formate oxidation (a) and CO_2 reduction (b)^[15]

3 甲酸脱氢酶的分子改造

在 CO_2 还原为甲酸盐的各种反应途径中, 利用 FDH 生物催化是最好的选择。然而, FDH 操作稳定性不好, 限制了其在 CO_2 还原反应中的应用。为此, 研究者试图对 FDH 进行分子改造, 旨在提高其化学和热稳定性、催化活性、辅酶专一性以及在大肠杆菌中的表达效率。本节简要介绍了通过分子改造获

得高效突变体的最新成果,并提出了未来可继续开展的工作设想。

WU 等^[40]对 *Candida boidinii* 来源的 FDH 进行了 Asp195、Tyr196 和 Gln197 残基的定点饱和突变,获得了两个 NADP⁺依赖型 FDH 突变体。对 NADP⁺的催化效率分别为 1.14×10^4 和 2.9×10^3 L/(mol·s),这两个突变体的催化效率高于来自 *C. boidinii* 的通过顺序诱变获得的突变体。说明这些残基对 FDH 辅因子的特异性有重要影响,该研究向着开发高效 NADP⁺依赖型 FDH 目标更进一步。PALA 等^[19]报道了一种来源于 *Chaetomium thermophilum* 的 NAD⁺依赖型 FDH (*Ct*FDH),通过活性位点突变增强了 CO₂ 还原活性。突变体 N120C 具有完全灭活的甲酸盐氧化活性,其对 HCO₃⁻的还原比活是野生型(未突变)的 4.7 倍。突变体的催化转化率(k_{cat} 值)是野生型的 6.5 倍,但底物结合能力(K_m 值)降低了 6.5 倍,总体上对 HCO₃⁻的还原具有相同的催化效率。通过分子模拟解析突变体活性增强的分子机制,结果表明:(1)突变体放松了对底物定位和活性中心构象柔性的严格控制,从而导致底物亲和力减弱;(2)突变体与底物 HCO₃⁻之间的氢键改善了氢化物转移机制,从而提高了催化转化率^[19]。ÇAKAR 等^[20]通过对 *Ct*FDH 进行定向进化,获得了 4 株能提高 HCO₃⁻催化转化率的突变体。突变体 G93H/I94Y 表现出较高的催化转化率和较强的底物结合能力,总体上其催化效率比野生型高 5.4 倍。突变体 G93H/I94R 的催化转化率是野生型的 2.6 倍,但底物亲和力比野生型低 2.3 倍,因此,突变体和野生型的催化效率相差不大。突变体(R259C 和 G93H/I94Y/R259C)的催化转化率有所提高,但底物亲和力显著减弱,从而导致催化效率低于野生型。将突变酶与底物进行分子对接,结果表明,突变体(G93H/I94Y)引起了辅因子位置的轻微变化,这可能导致氢从 NADH 快速转移到 HCO₃⁻(如图 5 所示),从而提高了催化转化率和总催化效率。此外,ÇAKAR 等还证实了突变体 G93H/I94Y 可与醇脱氢酶共同用于 NAD⁺的再生系统^[20]。

迄今为止,针对 NAD⁺依赖型 FDH 的分子改造研究并不多,改造效果也并未达到可用于生产的水平。在今后研究中,可以基于大数据分析,充分利用 AlphaFold 2.0、ProtENN 深度学习等人工智能技术,进一步提高甲酸脱氢酶三维结构模拟的精确度、准确度和速度,为甲酸脱氢酶的辅酶选择性、稳定性和催化活性的理性改造提供坚实的基础。再借助全质粒扩增、无缝克隆等现代分子生物学技术,快速实现甲酸脱氢酶特定位点的定点突变,高效获得性能优良的甲酸脱氢酶突变体,显著提高其还原

CO₂ 的能力,助力实现“碳中和、碳达峰”的“双碳”目标。

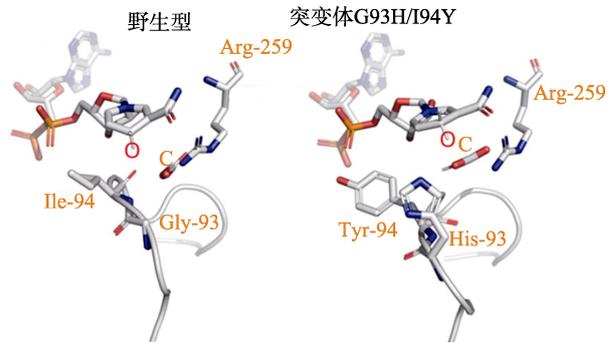


图 5 HCO₃⁻在野生型和突变体 G93H/I94Y 的活性中心的位置^[20](HCO₃⁻的受体碳原子用 C 表示,离开的氢化物在红色圆圈中用灰色条表示)

Fig. 5 Positions of HCO₃⁻ in the active site of wild type and mutant G93H/I94Y^[20](The acceptor carbon of HCO₃⁻ is marked with character C and the leaving hydride is shown by grey stick at the red circle)

4 全细胞生物催化 CO₂ 还原为甲酸盐

基于对 FDH 的研究,人们还尝试了全细胞生物催化法利用 CO₂ 生产甲酸盐。SCHUCHMANN 等^[41]报道了来自 *Acetobacterium woodii* 的一个依赖 H₂ 的含钼甲酸脱氢酶,在其催化下以合成气为原料,生产了 25 mmol/L 的甲酸盐,催化 CO₂ 还原所需电子由 H₂ 氧化提供。酶催化生产甲酸盐的产量比用碳酸氢钠、CO₂ 和 H₂ 混合物的产量低^[23,42-43],可能是由于合成气中 CO 和其他成分的抑制作用。ALISSANDRATOS 等^[42]试图在大肠杆菌 JM109 中过量表达来自 *Clostridium carboxidovorans*、*Methanobacterium thermoformicum* 或 *Pyrococcus furiosus* 的 FDH,以制备用于生产甲酸盐的全细胞生物催化剂。在建立的大肠杆菌工程菌中,过量表达 *Pj*FDH 的菌株利用碳酸氢钠和气态氢生产出 44 mmol/L 的甲酸盐,其产率为 22.7 mmol/(L·h)^[42]。为了开发一种将 CO₂ 转为甲酸盐的生物工艺,MOURATO 等^[23]发现了一种 *D. desulfuricans* 菌株表现出很高的催化性能,在批量反应器中生产出 12 mmol/L 的甲酸盐,产率为 0.09 mmol/(L·h)。他们接下来构建了一个利用 CO₂ 生产甲酸盐的连续反应器,实现了 45 mmol/L 的甲酸盐产量,产率为 0.4 mmol/(L·h)。并且提出了一个生产甲酸盐的代谢途径,胞质中的甲酸脱氢酶(FdhAB)利用氢化酶(HydAB)驱动的 H₂ 氧化所产生的电子催化 CO₂ 还原为甲酸盐(见图 6)^[23]。所提出的代谢途径有助于进一步设计工程菌株,以从 CO₂ 中高效生产甲酸盐。

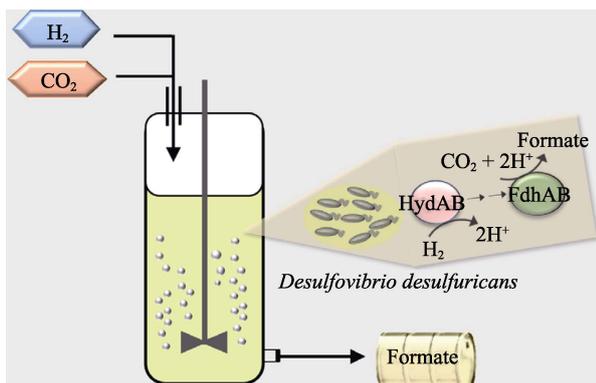


图 6 外周 FDH 利用 H_2 氧化所产生的电子催化 CO_2 还原为甲酸盐^[23]

Fig. 6 Peripheral FDH catalyzing the reduction of CO_2 to formate by electron produced by H_2 oxidation^[23]

最近, SCHWARZ 等^[44]从 *Thermoanaerobacter kivui* 中分离并鉴定了 1 个嗜热且依赖 H_2 的甲酸脱氢酶, 在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 下, CO_2 还原和甲酸盐氧化的转化率分别为 9.6×10^6 和 $9.9 \times 10^6\text{ h}^{-1}$ 。进一步采用该酶全细胞生物催化 CO_2 还原制备甲酸盐, 产量达 130 mmol/L , 产率高达 $270\text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 并且不产生任何副产物^[43]。该酶良好的热稳定性使其成为一种非常有前景的全细胞生物催化剂, 可进一步应用于储氢和工业废气转化为甲酸盐。

5 多酶级联系统的开发

早期, OBERT 等^[11]报道一种通过 3 种脱氢酶将 CO_2 转化为甲醇的多酶级联反应方法, 该酶促级联系统由甲酸脱氢酶 (FDH)、甲醛脱氢酶 (FaldDH) 和醇脱氢酶 (ADH) 组成, 并以 NADH 作为终端电子供体^[45]。这种多酶级联生物催化 CO_2 的还原非常

有吸引力, 不但能减少 CO_2 的排放, 还可以生产出由石油衍生的化学品。此外, 该反应可以在温和的条件下进行, 尤其可以在低温下进行。然而, 由于酶促级联系统中每步反应都需要 1 mol 的辅因子 NADH, 大大增加了生产成本。因此, 需要通过各种技术实现辅因子的再生, 包括将酶系统纳入化学和光化学^[46]、电化学^[47]或生物电化学^[48-49]系统中。其中, 实现 NADH 再生最常见的方法是通过添加第二种酶和第二种底物, 将辅因子由氧化形式 (NAD^+) 转化为还原形式 ($NADH$)^[50-51]。除了能降低成本外, 辅因子的回收可以防止辅因子对酶的抑制^[52]。MARPANI 等^[53]在 CO_2 转化为甲酸的多酶级联系统的最后一步 ADH 的催化反应中, 选择了原位 NADH 辅因子再生。该研究联合使用了两个系统: 系统 I 包含 ADH 和葡萄糖脱氢酶 (GDH), 系统 II 包含 ADH 和木糖脱氢酶 (XDH), 见图 7。每个系统循环反应得到的产品 (分别为葡萄糖酸和木糖酸) 都是合成高价值化学品和燃料很关键的前体物^[54]。该系统为 CO_2 转化的研究提供了一个基础, 以促进对酶法转化 CO_2 的进一步探索。

由于游离酶稳定性较差, 需要对多酶系统进行固定化, 以实现其持续和重复使用性。WANG 等^[55]构建了一个微胶囊内腔, 包含固定化甲酸脱氢酶 (FDH, E1)、共价键合的甲醛脱氢酶 (FaldDH, E2) 和固定化醇脱氢酶 (ADH, E3)。通过微细胞工厂级联反应实现了 CO_2 在温和条件下转化为甲醇 (见图 8)。XU 等^[45]通过将 3 种脱氢酶包裹在新鲜的海藻酸盐-二氧化硅 (ALG- SiO_2) 复合材料中, 在自然 pH、低温和低压下, 将 CO_2 生物转化为甲醇。

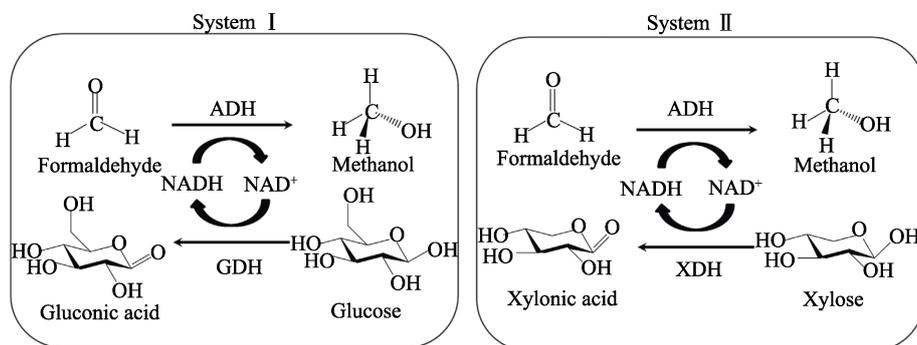


图 7 甲酸到甲醇的转化与原位 NADH 辅因子的再生^[53]

Fig. 7 Conversion of formic acid to methanol and regeneration of NADH cofactor^[53]

EL-ZAHAB 等^[56]对酶-辅因子固定化系统进行了研究, 通过辅因子原位再生将 CO_2 转化为甲醇。将甲酸脱氢酶、甲醛脱氢酶、醇脱氢酶和谷氨酸脱氢酶 (GDH) 4 种酶和辅因子共固定化, 反应 30 min 后, 甲醇产率为 $0.02\text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。REN 等^[57]将碳酸

酐酶 (CA)、FDH、辅因子 (NADH) 和 GDH 包埋在 ZIF-8 分子筛中, 构建了一个纳米级的多酶反应器。与游离多酶体系相比, 该体系有更强的 CO_2 转化能力, 甲酸盐产量比游离酶提高了 4.6 倍。SINGH 等^[30]在多酶级联反应中, 通过磷酸盐脱氢酶实现

NADH 的再生, 甲醇产量为 7.9 mmol/L。BACCOUR 等^[58]利用来源于 *Methylobacterium extorquens* 的甲酸脱氢酶 MeFDH 和磷酸盐脱氢酶的突变体, 构建了 1 个流通式双酶反应器, 在自然条件下利用 CO₂ 生产甲酸盐, 产率达到 1.7 g/(L·h)。

尽管科研工作者做了大量工作, 也取得一些进

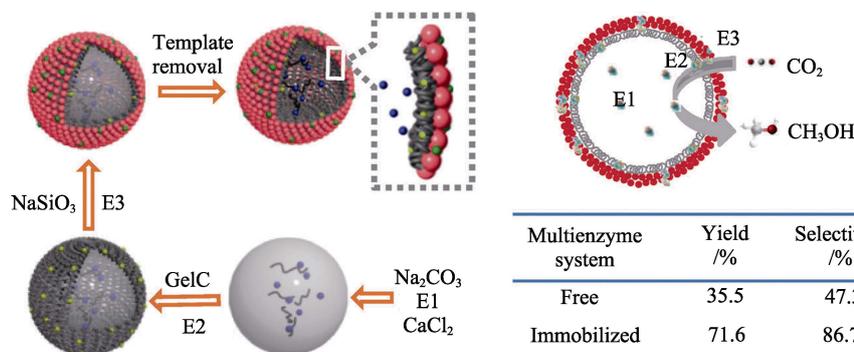


图 8 微细胞工厂级联反应将 CO₂ 转化为甲醇 (GelC 代表用儿茶酚基团修饰的明胶)^[55]

Fig. 8 Conversion of CO₂ to methanol by cascade reaction in microcell factory (GelC represents gelatin modified with catechol groups)^[55]

6 结束语与展望

大气及工业产生的 CO₂ 提供了大量的碳源, 为捕捉 CO₂ 而开发的技术促进了“碳达峰、碳中和”目标的实现, 也是缓解全球变暖, 以可持续经济取代化石经济所必需的。以 CO₂ 为原料的生物转化法是第三代生物制造路线, 可有效降低生物制造业的成本, 降低对化石资源的过分依赖, 引起人们的高度重视^[59-60]。通过生物催化途径来固定还原大气中的 CO₂ 极具吸引力和前景。然而, 由于 CO₂ 本身十分稳定, 催化它的还原需要较高的活化能以克服其能量壁垒。

围绕促进 CO₂ 固定还原的目标, 本文重点讨论了甲酸脱氢酶的分类及催化机制、酶分子改造及在 CO₂ 固定还原中的应用情况, 并提出未来发展方向:

(1) 通过对 FDH 的分类及催化机制相关研究发现, 金属辅因子依赖型 FDH 具有更高的 CO₂ 还原活性, 其催化活性较非金属辅因子依赖型 FDH 高出 4~5 个数量级, 这为将来挖掘新型 CO₂ 还原用 FDH 指明了方向。若要获得高 CO₂ 还原活性的 FDH, 应该以金属辅因子依赖型 FDH 为主要研究对象。(2) 通过对 FDH 分子改造相关研究发现, 尽管科研工作者做了大量研究工作, 但在其辅酶选择性、稳定性及还原活性方面仍有较大的提升空间。在今后研究中, 可基于大数据分析, 充分利用人工智能方法, 进一步提高 FDH 三维结构的可及性及可信度, 为 FDH 的辅酶选择性、稳定性和催化活性的理性改造提供坚实的基础。(3) 通过对 FDH 在 CO₂ 固定还原中应用研究发现, 单纯依靠 FDH 本身的酶催化, CO₂ 固定

还原效率较低, 难以实现工业化生产。今后工作中, 可以充分发挥光电催化的优势, 将酶催化与光电催化紧密结合, 取长补短, 有望取得更好的 CO₂ 固定还原效率。

还原效率较低, 难以实现工业化生产。今后工作中, 可以充分发挥光电催化的优势, 将酶催化与光电催化紧密结合, 取长补短, 有望取得更好的 CO₂ 固定还原效率。

参考文献:

- [1] MIN K, PARK Y S, PARK G W, *et al.* Elevated conversion of CO₂ to versatile formate by a newly discovered formate dehydrogenase from *Rhodobacter aestuarii*[J]. *Bioresour Technol*, 2020, 305: 123155.
- [2] SHARMA T, SHARMA S, KAMYAB H, *et al.* Energizing the CO₂ utilization by chemo-enzymatic approaches and potentiality of carbonic anhydrases: A review[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 247: 119138.
- [3] KONDRATENKO E V, MUL G, BALTRUSAITIS J, *et al.* Status and perspectives of CO₂ conversion into fuels and chemicals by catalytic, photocatalytic and electrocatalytic processes[J]. *Energy & Environmental Science*, 2013, 6(11): 3112-3135.
- [4] ZHANG Z, ZHANG X, JI X. Developing and regenerating cofactors for sustainable enzymatic CO₂ conversion[J]. *Processes*, 2022, 10(2): 230.
- [5] YU F, WEI P, YANG Y, *et al.* Material design at nano and atomic scale for electrocatalytic CO₂ reduction[J]. *Nano Materials Science*, 2019, 1(1): 60-69.
- [6] WANG C C, ZHANG Y Q, LI J, *et al.* Photocatalytic CO₂ reduction in metal-organic frameworks: A mini review[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2015, 1083: 127-136.
- [7] GUPTA P, VERMA N. Conversion of CO₂ to formate using activated carbon fiber-supported g-C₃N₄-NiCoWO₄ photoanode in a microbial electrosynthesis system[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 446: 137029.
- [8] AL-TAMREH S A, IBRAHIM M H, EL-NAAS M H, *et al.* Electroreduction of carbon dioxide into formate: A comprehensive review[J]. *ChemElectroChem*, 2021, 8(17): 3207-3220.
- [9] SATO R, AMAO Y. Curious effect of isotope-labelled substrate/co-enzyme on catalytic activity of CO₂ reduction by formate dehydrogenase from *Candida boidinii*[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2022, 95(4): 556-558.
- [10] LIAO Q, LIU W, MENG Z. Strategies for overcoming the limitations of enzymatic carbon dioxide reduction[J]. *Biotechnol Adv*, 2022, 60: 108024.

- [11] OBERT R, DAVE B C. 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.
- [12] YU X, NIKS D, MULCHANDANI A, et al. Efficient reduction of CO₂ by the molybdenum-containing formate dehydrogenase from *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*)[J]. J Biol Chem, 2017, 292(41): 16872-16879.
- [13] ZHANG Z H (张振华), XIE Y L (解玉丽), WANG T J (王铁军), et al. Directed evolution for catalytic activity of formate dehydrogenase and its overexpression[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry (应用化学), 2021, 38(6): 704-712.
- [14] OTTO A, GRUBE T, SCHIEBAHN S, et al. Closing the loop: Captured CO₂ as a feedstock in the chemical industry[J]. Energy & Environmental Science, 2015, 8(11): 3283-3297.
- [15] AMAO Y. Formate dehydrogenase for CO₂ utilization and its application[J]. Journal of CO₂ Utilization, 2018, 26: 623-641.
- [16] CHOE H, JOO J C, CHO D H, et al. Efficient CO₂-reducing activity of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA for formate production from CO₂ gas[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e103111.
- [17] ASLAN A S, VALJAKKA J, RUUPUNEN J, et al. *Chaetomium thermophilum* formate dehydrogenase has high activity in the reduction of hydrogen carbonate (HCO₃⁻) to formate[J]. Protein Engineering Design & Selection, 2017, 30(1): 47-55.
- [18] ALTAŞ N, ASLAN A S, KARATAŞ E, et al. Heterologous production of extreme alkaline thermostable NAD⁺-dependent formate dehydrogenase with wide-range pH activity from *Myceliophthora thermophila*[J]. Process Biochemistry, 2017, 61: 110-118.
- [19] PALA U, YELMAZER B, CORBACIOGLU M, et al. Functional effects of active site mutations in NAD⁺-dependent formate dehydrogenases on transformation of hydrogen carbonate to formate[J]. Protein Eng Des Sel, 2018, 31(9): 327-335.
- [20] CAKAR M M, RUUPUNEN J, MANGAS-SANCHEZ J, et al. Engineered formate dehydrogenase from *Chaetomium thermophilum*, a promising enzymatic solution for biotechnical CO₂ fixation[J]. Biotechnol Lett, 2020, 42(11): 2251-2262.
- [21] ALISSANDRATOS A, KIM H K, MATTHEWS H, et al. *Clostridium carboxidivorans* strain P7T recombinant formate dehydrogenase catalyzes reduction of CO₂ to formate[J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(2): 741-744.
- [22] MAIA L B, FONSECA L, MOURA I, et al. Reduction of carbon dioxide by a molybdenum-containing formate dehydrogenase: A kinetic and mechanistic study[J]. J Am Chem Soc, 2016, 138(28): 8834-8846.
- [23] MOURATO C, MARTINS M, DA SILVA S M, et al. A continuous system for biocatalytic hydrogenation of CO₂ to formate[J]. Bioresour Technol, 2017, 235: 149-156.
- [24] HARTMANN T, LEIMKUHNER S. The oxygen-tolerant and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is able to catalyze the reduction of CO₂ to formate[J]. FEBS J, 2013, 280(23): 6083-6096.
- [25] BASSEGODA A, MADDEN C, WAKERLEY D W, et al. Reversible interconversion of CO₂ and formate by a molybdenum-containing formate dehydrogenase[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(44): 15473-15476.
- [26] REDA T, PLUGGE C M, ABRAM N J, et al. 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.
- [27] OLIVEIRA A R, MOTA C, MOURATO C, et al. Toward the mechanistic understanding of enzymatic CO₂ reduction[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(6): 3844-3856.
- [28] CAKAR M M, MANGAS-SANCHEZ J, BIRMINGHAM W R, et al. Discovery of a new metal and NAD(+)-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium ljungdahlii*[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2018, 48(4): 327-334.
- [29] KUK S K, GOPINATH K, SINGH R K, et al. NADH-free electroenzymatic reduction of CO₂ by conductive hydrogel-conjugated formate dehydrogenase[J]. ACS Catalysis, 2019, 9(6): 5584-5589.
- [30] SINGH R K, SINGH R, SIVAKUMAR D, et al. Insights into cell-free conversion of CO₂ to chemicals by a multienzyme cascade reaction[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(12): 11085-11093.
- [31] CHOE H, HA J M, JOO J C, et al. Structural insights into the efficient CO₂-reducing activity of an NAD-dependent formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA[J]. Acta Crystallographica, 2015, 71(Part 2): 313-323.
- [32] TISHKOV V I, POPOV V O. Protein engineering of formate dehydrogenase[J]. Biomol Eng, 2006, 23(2/3): 89-110.
- [33] YZGÜN G, KARAGÜLER N G, TURUNEN O, et al. Characterization of a new acidic NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 122: 212-217.
- [34] NIKOLAOS E, LABROU D J R. Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase[J]. Biochemical Journal, 2001, 354: 455-463.
- [35] SHI J F, JIANG Y J, JIANG Z Y, et al. Enzymatic conversion of carbon dioxide[J]. Chem Soc Rev, 2015, 44(17): 5981-6000.
- [36] CASTILLO R, OLIVA M, MARTI S, et al. A theoretical study of the catalytic mechanism of formate dehydrogenase[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(32): 10012-10022.
- [37] MOON M, PARK G W, LEE J P, et al. Recent progress in formate dehydrogenase (FDH) as a non-photosynthetic CO₂ utilizing enzyme: A short review[J]. Journal of CO₂ Utilization, 2020, 42: 101353.
- [38] MAIA L B, MOURA I, MOURA J J G. Molybdenum and tungsten-containing formate dehydrogenases: Aiming to inspire a catalyst for carbon dioxide utilization[J]. Inorganica Chimica Acta, 2017, 455: 350-363.
- [39] ROBINSON W E, BASSEGODA A, REISNER E, et al. Oxidation-state-dependent binding properties of the active site in a molybdenum-containing formate dehydrogenase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(29): 9927-9936.
- [40] WU W, ZHU D, HUA L. Site-saturation mutagenesis of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* creating effective NADP⁺-dependent FDH enzymes[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 61(3/4): 157-161.
- [41] SCHUCHMANN K, MUELLER V. Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase[J]. Science, 2013, 342(6164): 1382-1385.
- [42] ALISSANDRATOS A, KIM H K, EASTON C J. Formate production through carbon dioxide hydrogenation with recombinant whole cell biocatalysts[J]. Bioresour Technol, 2014, 164: 7-11.
- [43] SCHWARZ F M, MULLER V. Whole-cell biocatalysis for hydrogen storage and syngas conversion to formate using a thermophilic acetogen[J]. Biotechnol Biofuels, 2020, 13: 32.
- [44] SCHWARZ F M, SCHUCHMANN K, MUELLER V. Hydrogenation of CO₂ at ambient pressure catalyzed by a highly active thermostable biocatalyst[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 237.
- [45] XU S W, LU Y, LI J, et al. Efficient conversion of CO₂ to methanol catalyzed by three dehydrogenases co-encapsulated in an alginate-silica (ALG-SiO₂) hybrid gel[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006, 45(13): 4567-4573.
- [46] DIBENEDETTO A, STUFANO P, MACYK W, et al. Hybrid technologies for an enhanced carbon recycling based on the enzymatic reduction of CO₂ to methanol in water: Chemical and photochemical NADH regeneration[J]. Chemsuschem, 2012, 5(2): 373-378.
- [47] ALISSANDRATOS A, EASTON C J. Biocatalysis for the application of CO₂ as a chemical feedstock[J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2015, 11: 2370-2387.
- [48] SRIKANTH S, ALVAREZ-GALLEGO Y, VANBROEKHOVEN K, et al. Enzymatic electrosynthesis of formic acid through carbon dioxide reduction in a bioelectrochemical system: Effect of immobilization and carbonic anhydrase addition[J]. Chemphyschem, 2017, 18(22): 3174-3181.
- [49] ZHANG L, ONG J, LIU J, et al. Enzymatic electrosynthesis of formate from CO₂ reduction in a hybrid biofuel cell system[J]. Renewable Energy, 2017, 108: 581-588.
- [50] LUO J, MEYER A S, MATEIU R V, et al. Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO₂ to methanol[J]. New Biotechnology, 2015, 32(3): 319-327.