

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2022040302

詹悦, 王新, 宋雨轩, 等. 碳酸酐酶的固定化及其在二氧化碳转化中的应用[J]. 环境化学, 2023, 42(9): 3157-3166.

ZHAN Yue, WANG Xin, SONG Yuxuan, et al. Immobilization of carbonic anhydrase and its application in carbon dioxide conversion[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (9): 3157-3166.

碳酸酐酶的固定化及其在二氧化碳转化中的应用*

詹悦 王新** 宋雨轩 时翔宇

(沈阳工业大学环境与化学工程学院, 沈阳, 110870)

摘要 碳酸酐酶(CA)作为生物系统中典型的含锌金属酶,可高效催化CO₂的可逆水合反应.为了提高CA在实际工业应用中的利用率,本文介绍了传统固定化方法和新型固定化方法(交联酶聚集体和纳米花),阐述了CA催化CO₂的水合机理,总结了固定化CA矿化CO₂生成CaCO₃;CA促进单一溶剂(纯水、碳酸盐溶剂和醇胺溶剂)和混合溶剂吸收、解吸CO₂;固定化多酶级联(碳酸酐酶、甲酸脱氢酶、甲醛脱氢酶、乙醇脱氢酶和谷氨酸脱氢酶)催化CO₂生产甲酸和甲醇的过程,以及其实际工业应用的最新进展.未来的研究方向应集中于从转基因生物中提取大量CA,进一步研究CAs相关基因的生理作用和代谢途径,制备高性能的载体和研发先进的固定化方法.

关键词 碳酸酐酶, 固定化, 二氧化碳转化.

Immobilization of carbonic anhydrase and its application in carbon dioxide conversion

ZHAN Yue WANG Xin** SONG Yuxuan SHI Xiangyu

(School of Environmental and Chemical Engineering, Shenyang University of Technology, Shenyang, 110870, China)

Abstract Carbonic anhydrase (CA), as a typical zinc-containing metalloenzyme in biological systems, which can efficiently catalyze the reversible hydration of CO₂. In order to improve the utilization of CA in practical industrial applications, traditional immobilization methods and novel immobilization methods (cross-linked enzyme aggregates and nanoflowers) are introduced in this paper, and the mechanism of CA-catalyzed CO₂ hydration is described. The process of immobilized CA mineralizing CO₂ to generate CaCO₃ is expounded. The procedure of CA to promote the absorption and desorption of CO₂ in single solvent (pure water, carbonate solvent and alcohol amine solvent) and mixed solvent is summarized. The procedure of immobilized multi-enzyme cascades (carbonic anhydrase, formate dehydrogenase, formaldehyde dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, and glutamate dehydrogenase) catalyzing CO₂ to produce formic acid and methanol, and the latest progress in its practical industrial application are reviewed. Future research directions should focus on extracting large amounts of CA from transgenic organisms, further studying the physiological roles and metabolic pathways of CAs-related genes, as well as preparing high-performance carriers and developing advanced immobilization methods.

2022 年 4 月 3 日收稿(Received: April 3, 2022).

* 国家自然科学基金(21976124)和辽宁省应用基础研究计划项目(2023JH2/101300059)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21976124) and Applied Basic Research Plan of Liaoning Province (2023JH2/101300059).

** 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: wangxin110870@sut.edu.cn

Keywords carbonic anhydrase, immobilization, carbon dioxide conversion.

碳酸酐酶(CA)是一种普遍存在的含锌金属酶,其主要功能是催化 CO_2 的水合反应,反应式如下所示: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, 它是目前已知的催化最快的酶之一^[1]. 由于游离 CA 在高温、强酸或强碱溶剂和化学杂质等条件下容易失活,限制了其大规模的工业应用. 因此,采用分子修饰^[2]、定向进化^[3]、酶固定化^[4] 等策略来提高其稳定性和活性. 在上述方法中,酶固定化因其操作简单、方便的特点而被广泛应用.

通过选择良好的载体和合适的固定化方法对游离 CA 进行固定是降低催化剂成本、提高稳定性和可重复使用性的有效途径^[5]. 基于固定化 CA 的生物催化剂因其低能耗和高效率被认为是转化 CO_2 的环境友好的候选方法. 固定化 CA 主要通过酶促反应吸收^[6], CO_2 矿化生成金属碳酸盐^[7] 和多酶级联反应^[8] 来进行 CO_2 转化. 吸收是目前应用最为广泛的 CO_2 捕集技术之一^[6]. 然而,吸收溶剂具有再生所需能量高、吸收速率慢和稳定性低等缺点^[9]. CA 作为促进剂可以提高 CO_2 吸收反应速率,从而降低反应器尺寸和成本. 在某些情况下,CA 还用于促进酶催化的 CO_2 转化. CA 参与的多酶级联反应用于生产甲酸盐和甲醇等高价值产品^[7].

无论 CA 是以何种方式转化 CO_2 , CO_2 转化实验始终以烟气为基础,而烟气中具有高温和其他化合物(NO_x 和 SO_x 等)^[10]. 这些可能会影响 CA 的活性和稳定性,进而减缓 CA 转化 CO_2 实际工业应用中的反应速率.

1 碳酸酐酶的性质和催化机理(Properties and catalytic mechanism of carbonic anhydrase)

1.1 碳酸酐酶的性质

CA 广泛存在于细菌、真菌和藻类等生物体内,分为不同的类别(α 、 β 、 γ 、 δ 、 ζ 、 η 和 θ)^[11]. 大多数 CA 从牛血红细胞中提取,少数 CA 从羊和猪等哺乳动物的肝脏以及重组细菌中获得^[12]. CA 是一种以锌离子作为活性位点的金属酶,在某些情况下,也可以选择其他金属原子,如 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 或 Mn^{2+} 来代替 Zn^{2+} ^[13-14], 催化各种水解反应,包括羧酸、卤化物、尿素和可水解底物的水合作用^[15]. 虽然相同的催化反应由不同的 CAs 进行,但它们既没有结构相似性,也没有其他相关性^[16].

1.2 碳酸酐酶的催化 CO_2 水合机理

在自然状态下, CO_2 的可逆水合反应十分缓慢,一级反应速率常数仅为 $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 反应步骤如下所示^[17]:

(1) CO_2 水合生成 H_2CO_3 :



(2) H_2CO_3 电离生成 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} :



反应式(1)是 CO_2 水合反应的限速步骤,也是生物系统中碳矿化和碳再利用技术的切入点^[18]. 随着 CA 的引入, K_{cat} 值可高达 $1.6 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ^[19], 说明 CA 可以高效催化 CO_2 的可逆水合反应. 与此同时, CO_2 水合反应的机制发生改变,变为以下两个步骤^[20]:

第一步是 CA 中与活性中心的 Zn^{2+} 相连的 H_2O 去质子化形成中间产物 EZnOH^- , 随后 CO_2 被 EZnOH^- 中的 OH^- 水合形成 EZnHCO_3^- , 然后 EZnHCO_3^- 中的 HCO_3^- 被水置换形成 EZnH_2O 和 HCO_3^- ;

第二步是 EZnH_2O 的去质子化: EZnH_2O 通过酶分子中的质子转运体将质子(H^+)转运至溶剂中并被还原成具有催化活性的 EZnOH^- .

2 碳酸酐酶的固定化(Immobilization of carbonic anhydrase)

酶固定化的催化活性和稳定性在很大程度上取决于载体和固定化方法的选择,首先应在固定化过程中保持酶活性^[21]. 近年来,各种材料已被用作固定化 CA 的载体,包括水凝胶^[22]、壳聚糖^[23]、二氧化硅^[19] 和金属有机框架(MOFs)^[24] 等. 酶可以通过多种方法固定在载体上,例如包埋、吸附、交联、共价结合、

交联酶聚集体(CLEAs)^[25]和纳米花型酶-无机杂化固定化酶(简称纳米花)^[26]等. CA 固定化方法优缺点如表 1 所示.

表 1 CA 固定化方法优缺点
Table 1 Advantages and disadvantages of CA immobilization methods

固定化方法 Immobilization methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 Reference
吸附	易于操作; 固定化酶构象变化小	酶易从载体中泄漏	[6]
共价结合	酶和载体之间紧密结合;提高了 固定化酶的稳定性	引起酶构象的变化;酶的活性通常在 固定化后降低	[7]
包埋	操作简单; 可以减少酶浸出和变性	酶被限制在载体材料中,减弱了酶的 表现活力	[6]
交联酶聚集体	无需载体; 对酶纯度要求不高	机械强度不高	[21]
纳米花	固定化酶具有高比表面积和高酶活性	纳米花晶体的生长时间较长	[26]

吸附是一种简单有效的固定化方法,通过氢键、疏水键、离子键和范德华力的相互作用将酶固定在载体表面.在多数情况下,与载体的温和相互作用可确保固定后酶的微小构象变化^[27],这在很大程度上取决于载体的性质. Yin 等^[24]结合了磁性材料易于回收和可重复使用性,以及 MOF 具有高孔隙率、大比表面积和良好稳定性的优点,构建了核壳磁性 ZIF-8@Fe₃O₄ 复合材料. CA 通过吸附固定在 ZIF-8@Fe₃O₄ 上. 游离 CA 和 CA@ZIF-8@Fe₃O₄ 分别在 40 ℃ 的 1 mol·L⁻¹ MDEA 中储存 9 d, CA@ZIF-8@Fe₃O₄ 的活性随着储存时间的延长而逐渐降低,但其活性始终高于等量游离 CA. 包埋是一种将酶限制在载体材料中的固定化方法,可以有效防止酶浸出和变性^[6]. Hsieh 等^[19]将二氧化硅缩合肽(R5)与硫化氢碳酸酐酶(SazCA)融合形成 R5-SazCA,再把 R5-SazCA 包埋到二氧化硅纳米颗粒(R5-SazCA-SP)中. 在 70 ℃ 培养 3 h 后, R5-SazCA 和 R5-SazCA-SP 的残余活性分别为 49% 和 60%,表明 CA 固定化后热稳定性得到改善. 增强的热稳定性通常归因于二氧化硅交联网络施加的空间约束,这有助于维持 CA 的立体结构.

共价结合是一种常用的固定化方法,可以显著增强和提高酶的稳定性. 改性载体表面的胺基、羟基、羧基或环氧基等官能团和 CA 的氨基酸残基之间可以形成共价键,从而使得酶和载体中间具有很强的相互作用^[28]. Shamna 等^[29]将 CA 通过共价结合固定在胺官能化的铝-硅氧烷气凝胶珠(BCA-Al/Si-NH₂)上. BCA-Al/Si-NH₂ 杂化珠的动力学参数与游离酶相当. 固定化 CA 具有热稳定性、pH 稳定性和储存稳定性,这是由于酶的多点附着和酶与载体之间的相互作用导致酶刚性增加,从而减少了构象变化. Sun 等^[30]将 CA 通过戊二醛(GA)共价连接到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜和聚乙烯膜(PE)的表面,这些膜固定化 CA 之前通过聚乙烯亚胺(PEI)和多巴胺(DA)的共沉淀进行了修饰. PEI/PDA-PE 的活性回收率高于 PEI/PDA-PVDF,因为 PE 具有更大的孔结构和改性后更好的亲水性,从而引起更高的酶负载量和更好的酶亲和力. 此外,固定化后,CA 的储存稳定性和可重复使用性得到很大提高.

考虑到载体材料的物理和化学性质、操作条件等,通常需要多种固定化方法的协同作用从而获得高效的固定化 CA^[6]. Chang 等^[31]将 CA 通过吸附-交联法固定在地质聚合物微球上,与游离 CA 相比,固定化 CA 的最适 pH 值从 7.5 增加到 8.0,最适温度从 25 ℃ 增加到 30 ℃. Effendi 等^[11]将 *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* CA (SyCA) 共价结合在新型聚丙烯腈(PAN)和聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)纳米纤维上,所得复合材料通过戊二醛(GA)进一步交联. 固定化粗 SyCA 在 60 ℃ 下保留了超过 100% 的相对残余活性,这归因于粗 SyCA 的胺基和纳米纤维的羟基之间的共价结合,而且固定化粗 SyCA 和 GA 之间交联也会形成共价键. 此外,测定了固定化 CA 对 SO_x 和 NO_x 的耐受性. 固定化 SyCA 在 50 mmol·L⁻¹ HNO₃ 和 H₂SO₄ 存在下的残余酶活性分别为 57.1% 和 61.6%.

CLEAs 是一种无需载体的新型固定化酶制备技术,该方法包括沉淀和交联两个主要步骤^[26]: (1)通过沉淀剂(盐、水溶性有机溶剂或非离子聚合物)在溶液中形成酶聚集体; (2)聚集体中酶分子通过交联剂交联,使它们在去除沉淀剂后不溶. 然而,对于工业应用来说, CLEA 柔软且容易断裂,为了提高 CLEA 的机械性能, Jun 等^[32]使用纳米纤维共价连接 bCA,然后交联并进行沉淀,以获得 bCA 沉淀涂层

(EPC). EPC 在剧烈摇动下 868 d 后仍保留其活性的 65.3%, EPC 的高稳定性可以通过酶沉淀和交联的结合来解释, 使酶分子之间通过化学键紧密的链接, 从而有效防止酶变性和浸出. 纳米花型酶-无机杂化固定化酶由 2012 年 Ge 等^[33] 首次提出, 通过将酶与硫酸铜在磷酸盐缓冲溶液中共沉淀, 从而形成典型的花瓣状结构. Wen 等^[22] 对此固定化方法进一步研究, 将双金属离子(Cu^{2+} 和 Zn^{2+})代替单个金属离子来固定 CA, 然后将双金属基杂化纳米花(CANF)复合材料嵌入到聚乙烯醇(PVA)/壳聚糖(CS)水凝胶膜(PVA/CS@CANF)中. 水凝胶膜在 8 个循环后仍保持其原始活性的 75% 以上, 在 60 °C 下仍有超过 80% 的相对活性. 此外, PVA/CS@CANF 膜转化 CO_2 产生的 CaCO_3 量是游离 CA 的 9 倍.

3 CA 转化 CO_2 的应用(Application of CA to CO_2 conversion)

二氧化碳排放是造成温室效应的主要原因. 当前, CO_2 捕集、利用和封存(CCUS)技术已广泛应用于减少 CO_2 排放到大气中. CCUS 技术将 CO_2 资源化, 便于运输和长期储存^[29]. 基于 CA 的生物酶法通过捕集大气或废气中的 CO_2 , 并进一步转化为高价值的工业化学品和燃料, 如金属碳酸盐、甲醇和甲酸等.

3.1 CA 在 CO_2 矿化中的应用

CA 催化的 CO_2 水合反应生成的碳酸氢盐可进一步用作碳源, 用于合成无机碳酸盐和促进藻类的生长. CA 将 CO_2 矿化生成 CaCO_3 的原理为 CA 首先催化 CO_2 水合形成碳酸氢根离子(4), 然后与添加的 Ca^{2+} 反应生成 CaCO_3 (5), CaCO_3 易于分离和储存以供进一步利用. Shamna 等^[29] 将 CA 共价连接在铝-硅氧烷气凝胶珠上, 并进一步检测了其将 CO_2 转化为 CaCO_3 的能力: 1 mg 游离 bCA 和 17 μg bCA-Al/Si- NH_2 生成 CaCO_3 质量为 32.4 mg 和 12 mg. 通过 XRD 表明 CA 转化的碳酸钙的晶相为方解石, 且 CaCO_3 的晶体结构不会因添加酶而改变. Jun 等^[32] 使用纳米纤维共价固定 bCA, 然后进行交联并沉淀, 以获得 bCA 沉淀涂层(EPC). CA 通过催化系统中鼓泡的 CO_2 的可逆水合生成碳酸氢盐, 为微藻提供光合作用的碳源. 添加 EPC 的系统与含有 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 和不含碳源的相比, 分别使微藻生长加速了 134% 和 231%. Xu 等^[34] 将 CA 与戊二醛(GA)交联并包埋在漂浮的海藻酸钙水凝胶珠中, 并将珠子保留在微藻-大气界面便于直接从空气中捕集 CO_2 . 与 $(22.7\pm 0.5)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 每天的自然生长速率相比, 游离 CA 和 CA-GA 珠粒分别将微藻的生长速率提高到 $(37\pm 3)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 每天和 $(40\pm 1)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 每天, 而且珠子容易回收和重复使用, 具有广阔的工业前景.



当前通过全细胞固定化构建了用于 CO_2 捕集的新型全细胞催化剂, 避免酶泄漏和细胞裂解从而提高酶的稳定性和可重复使用性^[7]. Sharma 等^[35] 将含 CA 的苦参棒状杆菌菌株的细胞共价固定到戊二醛功能化的角蛋白颗粒上. 含有 144 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ CA 的菌株细胞裂解物形成 65.12 mg CaCO_3 . 进行 10 次 CO_2 转化后, 固定化细胞和游离细胞 CaCO_3 的相对产量分别为 53.46% 和 22.15%. Moon 等^[36] 将周质水生弧菌 CA(hmCA)的全细胞催化剂通过包埋固定在聚氨酯泡沫上(pCA-PUF), 经 9 次循环使用后, pCA-PUF 的高相对活性没有明显下降, 并且显示出良好的可重复使用性. 使用该固定化生物催化剂将设计的填充床反应器中的 CO_2 捕集速率提高了 80%. 微生物细胞表面展示是将某一蛋白或短肽(靶蛋白)与微生物细胞的外膜蛋白(载体蛋白)以融合蛋白的形式锚定在微生物细胞表面的技术. 大肠杆菌是生产重组蛋白最常用的宿主细胞之一^[37]. Zhu 等^[38] 以大肠杆菌为宿主细胞, 通过将 SazCA 作为靶蛋白与冰核蛋白(INPN)(载体蛋白)锚定在细胞外膜上构建表面展示菌株. 工程菌株矿化 CO_2 产生的 CaCO_3 质量(241 mg)明显高于胞内表达菌株(173 mg). Tan 等^[39] 将(*Mesorhizobium loti* CA)MICA 克隆到 3 个载体中且在大肠杆菌中表达, 并将离心获得的全细胞样品固定在琼脂上. 结果表明, 全细胞生物催化剂具有良好的稳定性, 储存 40 d 后相对活性保持近 100%. 此外, 具有固定化全细胞生物催化剂的系统可在 3.5 min 内有效地将 CO_2 100% 转化为 CaCO_3 . 通过表 2 展示了固定化 CA 矿化 CO_2 性能的比较.

表 2 CA 在二氧化碳捕集中的矿化性能

Table 2 Mineralization performance of CA in carbon dioxide capture

碳酸酐酶种类 Types of carbonic anhydrase	矿化特性 Mineralization properties	CaCO ₃ 晶相 CaCO ₃ crystal phase	参考文献 Reference
牛CA(bCA)	固定化细胞比游离细胞的CaCO ₃ 产量增加了1.35倍; 固定化细胞和游离细胞的CaCO ₃ 相对产量在10个循环后分别为53.46%和22.15%	球霏石和方解石	[35]
bCA	17 μg固定化CA产生12 mg CaCO ₃	方解石	[29]
CA	CA@ZIF-8获得的CaCO ₃ 的产量是游离 CA的22倍	球霏石	[40]
硫化氢碳酸酐酶(SazCA)	固定化CA转化CO ₂ 形成碳酸钙的时间比游离CA缩短了33%	球霏石和方解石	[19]
SazCA	工程菌株矿化CO ₂ 产生的CaCO ₃ 质量(241 mg)高于细胞内表达菌株(173 mg)	—	[38]
周质水生弧菌CA(hmCA)	固定化CA将填充床反应器中的CO ₂ 捕集速率提高了80%	—	[36]
CA	PVA/CS@CANF膜转化CO ₂ 产生的CaCO ₃ 量是游离CA的9倍	—	[22]
bCA	添加EPC的系统与含有25 mmol·L ⁻¹ NaHCO ₃ 和不含碳源的对照相比, 分别使微藻生长加速了134%和231%	—	[32]
bCA	与(22.7±0.5)mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹ 的自然生长速率相比, 游离CA和CA-GA珠粒分别将微球藻的生长速率提高到(37±3)mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹ 和(40±1)mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹	—	[34]
<i>Sulfurihydrogenibium yellowstonense</i> CA(SyCA)	固定化粗CA的CaCO ₃ 总产量是游离CA的5.8倍	—	[11]
CA	固定化CA产生的CaCO ₃ 质量是空白实验的5倍	—	[31]
bCA	CA@ZIF-8和PVA/CS/CA@ZIF-8水凝胶膜获得的CaCO ₃ 产量分别为游离CA的20倍和32.6倍.	球霏石和方解石	[41]
<i>Mesorhizobium loti</i> CA(MICA)	具有固定化全细胞生物催化剂的系统可在3.5 min内有效地将CO ₂ 100%转化为CaCO ₃	—	[39]

3.2 液体吸收法捕集 CO₂

到目前为止, 已经开发了使用纯水、碳酸盐溶液(Na₂CO₃ 和 K₂CO₃ 等)和醇胺溶液等吸收二氧化碳的工艺. 常用于捕集 CO₂ 的醇胺溶液主要有伯胺(一乙醇胺, MEA)、仲胺(二乙醇胺-DEA)、叔胺(N-甲基二乙醇胺-MDEA、二异丙醇胺-ADIP 和三乙醇胺-TEA)和哌嗪(PZ)等^[42]. MEA 吸收速度快, 不易挥发, 但是溶剂在汽提塔中的解吸需要大量的能量, 导致电费成倍增加, 需要对其进行改进. 与 MEA 相比, K₂CO₃ 溶液具有低毒性, 不易腐蚀, 在高温下高效且低成本的再生等优点, 而且 MDEA 再生能耗低、吸收 CO₂ 容量大. 但是 K₂CO₃ 溶液和 MDEA 吸收速率较慢, 添加 CA 可显著促进 MDEA 和 K₂CO₃ 溶液吸收 CO₂^[17].

当前, 固定化 CA 已用于纯水中吸收二氧化碳研究. Chang 等^[31] 将 CA 通过吸附-交联法固定在地质聚合物微球上. 采用水浴设定不同温度, pH 计可监测反应溶液 pH 值随不同催化反应条件的变化, 从而评价固定化 CAs 的催化性能. 当温度为 30 ℃, 气体流速为 300 mL·min⁻¹ 时, 溶液的 pH 值明显下降. Xu 等^[43] 将 CA 通过交联固定在聚多巴胺(PDA)/聚乙烯亚胺(PEI)修饰的聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(简称 CA-m-PVDF 复合膜), 在气液膜接触器中使用速率为 0.25 m·s⁻¹ 的水作为吸收剂, CA-m-PVDF 复合膜具有较高的 CO₂ 通量值(2.5×10⁻³ mol·m⁻²·s⁻¹), 该 CO₂ 通量值比未添加 CA 时增加约 160%.

MDEA 吸收 CO₂ 的过程中形成不稳定的氨基甲酸盐和碳酸氢根离子, 加热时释放出 CO₂ 达到解吸和再生的目的. Zhang 等^[44] 将 CA 通过吸附固定到 ZIF-L-1(MOFs)上, 得到 CA/ZIF-L-1 复合材料. 由于 ZIF-L-1 和 CA 均含有 Zn²⁺, 两者之间存在协同作用, ZIF-L-1 中的咪唑基团(mIm)可以作为亲核试剂参与 CO₂ 的水合生成碳酸氢盐(6), 而且该反应能够促进 CO₂ 的液-固传质. 加入 0.05 g·L⁻¹ CA/ZIF-L-1 后, MDEA 中的 CO₂ 吸收率提高了 2.5 倍. Du 等^[45] 进行了类似的研究, 把 CA 包埋到不同粒径的 ZIF-8(CA/ZIF-8)中, 并将 CO₂ 吸收到 MDEA 中, MDEA 的吸收率增加到 2.4 倍. Xu 等^[46] 将 CA 固定在表面改性的磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒(MNP)上, 并用原位聚合合成 MNP-CA 纳米凝胶. 通过反应器测试了 MNP-CA 纳米凝胶加速 MDEA 水溶液中 CO₂ 吸收的有效性, MNP-CA 纳米凝胶在 30 ℃ 的 CO₂ 吸收率为不含 CA 时的 170%. 而且 MNP-CA 纳米凝胶的加入使湿壁柱气相中的总传质系数(K_G) 在 60 ℃ 时增加了 4.61 倍. 费潇瑶^[47] 使用共价结合法将氨基功能化介孔材料固定在 CA 上(CA/AFS)对用于 MDEA 溶液解吸 CO₂ 进行了研究, 固定化 CA 的加入对 CO₂ 平衡解吸量基本没有影响, 但 CA/AFS 的加入可

以在未达到平衡状态之前,提高CO₂的瞬时解吸量.



CO₂在碳酸盐溶液中的总反应如下所示(7),CA可有效促进二氧化碳吸收到碳酸盐溶液中^[9]. Fabbicino等^[48]将嗜热细菌的碳酸酐酶(SspCA)作为膜锚定蛋白固定在大肠杆菌细胞的外膜(INPN-SspCA)上.在碱性溶液(0.5 mol·L⁻¹ Na₂CO₃/0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃)吸收CO₂反应过程中,加入SspCA的膜细胞碎片用作生物催化剂,观察到压力值的迅速下降和比未添加催化剂时更高的CO₂吸收率. Peirce等^[49]报道了CA在高浓度碳酸盐溶液中容易失活,因此将工业级碳酸酐酶(NovoCA)固定在顺磁性Fe₃O₄纳米颗粒上进行改善,并分别在25℃和40℃的条件下,于0.5 mol·L⁻¹ Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液(pH=9.6)和10%wt K₂CO₃溶液的搅拌池反应器中进行CO₂吸收测试^[10].溶液中固定化CA的K_{cat}/K_m均在5.52×10⁻¹—5.52 L·mol⁻¹·s⁻¹之间. Qi等^[50]通过湿壁柱测定表明,在20% wt K₂CO₃溶剂中加入2 g·L⁻¹ CA后,CO₂总传质系数(K_G)提高了约5倍.当CA浓度从零增加到2.5 g·L⁻¹时,CO₂捕集效率增加了4.6倍.



Gladi等^[17]探究了在湿壁柱中对4种溶液(MEA、AMP(2-氨基-2-甲基-1-丙醇)、MDEA和K₂CO₃溶液)添加0.2% wt CA后吸收CO₂的影响.研究表明,添加CA显著增加了MDEA和K₂CO₃的液侧传质膜系数,AMP略微增加,而MEA没有变化. MDEA的反应速率随温度升高而降低,而在较低的溶剂浓度(5% wt—15 %wt)下,温度和溶剂浓度对K₂CO₃中反应速率的影响较小,但在20% wt时,温度升高会显著提高反应速率.此外,混合溶剂对CO₂进行吸收比单一溶剂表现出更高的吸收效率,因为它们结合了单一溶剂的优点. Sahoo等^[51]将CA共价固定到异质功能化载体(HFS)和锌络合物(Zn-Im)上(CA/Zn-Im; HFS),并将CA/Zn-Im; HFS加入到混合溶剂(30% wt MEA+7.5% wt PZ+15% wt K₂CO₃)中加快CO₂的吸收和解吸.含有CA/Zn-Im; HFS的混合溶剂(21.65 %wt)在20 min内CO₂的吸收量高于纯混合溶剂(13.75 %wt).含有CA/Zn-Im; HFS的混合溶剂比纯混合溶剂的CO₂相对解吸率高1.57倍.通过表3展示了CA在二氧化碳吸收中的催化性能.

表 3 CA 在二氧化碳吸收中的催化性能

Table 3 Catalytic performance of CA in carbon dioxide absorption

吸收剂成分 Absorbent ingredients	温度 Temperature	催化特性 Catalytic properties	参考文献 References
100 mg的固定化CA(固载量为2 mg·g ⁻¹)+H ₂ O	30℃	反应进行30 min, CO ₂ 吸收量G _v =1.858×10 ⁻⁴ L	[31]
CA-m-PVDF复合膜+0.25 m·s ⁻¹ H ₂ O	25℃	CA-m-PVDF复合膜CO ₂ 通量值为2.5×10 ⁻³ mol·m ⁻² ·s ⁻¹	[43]
0.05 g·L ⁻¹ CA/ZIF-L+20 mL 1 mol·L ⁻¹ MDEA	40℃	MDEA中的CO ₂ 吸收率提高了2.5倍	[44]
CA/ZIF-8+MDEA	40℃	CO ₂ 吸收到含有不同粒径的ZIF-8的MDEA溶液中, MDEA溶液的吸收率增加到2.4倍	[45]
10 mg MNP-CA纳米凝胶+100 mL 1 mol·L ⁻¹ MDEA	30℃	反应3 h后, MNP-CA纳米凝胶的CO ₂ 吸收率为不含CA时的170%	[46]
0.3 kg m ⁻³ 工业级碳酸酐酶(NovoCA)+2—3 mol·L ⁻¹ K ₂ CO ₃ (碳酸盐转化度0—40%)	25℃和40℃	当加入的酶浓度低于0.018 kg·m ⁻³ 时, K _{cat} /K _m 值介于0.50×10 ² L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹ 和0.39×10 ³ L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹ 之间	[49]
0.2×10 ⁻² —1.5×10 ⁻² kg NovoCA·m ⁻³ Fe ₃ O ₄ 纳米颗粒固定化CA+0.5 mol·L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 缓冲液(pH=9.6)	25℃和40℃	固定化CA的K _{cat} /K _m 值介于4.87—8.06 L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹ 之间	[10]
0.2×10 ⁻² —1.5×10 ⁻² kg NovoCA·m ⁻³ Fe ₃ O ₄ 纳米颗粒固定化CA+10%wt K ₂ CO ₃ 溶液(碳酸盐转化度0—40%)	25℃	固定化CA的K _{cat} /K _m 值介于3.24—6.73 L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹ 之间	[10]
嗜热细菌的全细胞固定(INPN-SspCA)+0.5 mol·L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	25℃	INPN-SspCA的K _{cat} /K _m 值介于9.94×10 ⁻¹ —3.09 L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹ 之间	[48]
2 g·L ⁻¹ CA+20% wt K ₂ CO ₃	40℃	与未添加CA相比, CO ₂ 总传质系数(K _G)提高了约5倍	[50]
0.22 g·L ⁻¹ CA+30% wt K ₂ CO ₃ (pH~11—12)	50℃	CA的K _{cat} /K _m 值为5.3×10 ⁸ L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹	[52]
0.2% wt CA+30% MDEA/15% K ₂ CO ₃	17—50℃	添加CA显著增加了MDEA和K ₂ CO ₃ 的液侧传质膜系数	[17]
0.2% wt CA+30% wt MEA + 7.5% wt PZ+15% wt K ₂ CO ₃	30℃	含有CA/Zn-Im; HFS的混合溶剂(21.65% wt)在20 min内CO ₂ 的吸收量高于纯混合溶剂(13.75% wt)	[51]
0.2% wt CA+30% wt MEA + 7.5% wt PZ+15% wt K ₂ CO ₃	90℃	含有CA/Zn-Im; HFS的混合溶剂比纯混合溶剂的CO ₂ 相对解吸率高1.57倍.	[51]

3.3 多酶复合级联催化 CO₂

CO₂ 加氢提供了一种碳再生方法, 可以通过特定的催化剂转化为甲酸盐、甲醛和甲醇等高价值化学品和燃料. 固定化酶催化因具有反应条件温和、选择性高、可多次催化和效率高等优点, 在 CO₂ 加氢中引起了广泛关注. 但是, 常压下 CO₂ 的低溶解度严重限制了酶促反应的速率^[53]. CA 不仅能够加速 CO₂ 的水合, 还用于促进酶催化的 CO₂ 转化. Wang 等^[54] 报道随着 CA 的加入, 甲酸脱氢酶的底物从 CO₂ 转化为更易溶解的 HCO₃⁻, 导致甲酸的产率提高了 4.2 倍. 此外, 多酶级联反应在 CO₂ 的多酶转化中表现出良好的应用前景. CO₂ 在 3 种不同的脱氢酶(即甲酸脱氢酶(FateDH)、甲醛脱氢酶(FaldDH)和乙醇脱氢酶(ADH))的催化下转化为甲醇. 在 NADH 的存在下, FateDH 将 CO₂ 转化为甲酸, 甲酸随后在 FaldDH 的催化下还原为甲醛, 甲醛通过 ADH 进一步转化为甲醇^[8].

甲酸本身是一种具有商业价值的化学品, 它可用作燃料电池的原料和青贮饲料防腐剂, 并且二氧化碳形成甲酸所需的能量较低^[55]. Zhai 等^[56] 把 CA 固定在聚乙烯亚胺(PEI)和聚多巴胺(PDA)的改性的二氧化硅微球(PDA/PEI-SiO₂-CA)上, 并将其添加到含有 NADH 和 FDH 的反应溶液中, 从而将 CO₂ 转化为甲酸盐. 通过改性在 SiO₂ 表面引入氨基, 氨基与 CO₂ 反应形成氨基甲酸酯和碳酸氢盐, 因此 CA 固定在 PDA/PEI-SiO₂ 表面上可产生协同效应. 在 PDA/PEI-SiO₂-CA 存在下, 初始反应速率是空白对照的 48.6 倍, 甲酸盐产量也高于空白对照. Zhang 等^[57] 通过微生物转谷氨酰胺转胺酶(MTG)充当“交联介质”将 CA 和 FateDH 交联在一起形成交联酶. 在二氧化碳转化为甲酸的实验中, 交联酶的催化效率可高达游离酶的 5.8 倍.

固定多酶体系转化 CO₂ 生产甲酸已得到广泛研究. 然而, 价格昂贵的辅因子(NADH)的再生和循环利用仍然是 CO₂ 高效转化的主要问题^[58]. Ren 等^[53] 通过将 CA、FateDH、GDH(谷氨酸脱氢酶)、PEI(阳离子聚电解质)和辅因子原位包埋到 ZIF-8 中, 构建了纳米级多酶反应器(Co-IMR). NADH 通过带正电的 PEI 和带负电的辅因子之间的离子交换被束缚在 ZIF-8 中, 并通过嵌入 ZIF-8 中的 GDH 再生. Co-IMR 在 8 次重复循环使用后仍保留其初次甲酸生产率的 50%, 表现出良好的重复使用性. 与游离多酶系统相比, Co-IMR 在 8 次重复循环使用后, 总累积甲酸产量增加了 4.6 倍. Chai 等^[55] 进行了类似研究, 制备了 ZIF-8/CA&FDH 薄膜. ZIF-8 中的咪唑基团和 CA 的协同作用使得 CO₂ 对甲酸的整体催化活性提高了 1.6 倍. Wang 等^[59] 将 CA、FateDH、GDH 包埋在聚多巴胺微胶囊上. 与游离多酶相比, 聚多巴胺微胶囊中固定化多酶体系催化产生的 HCOOH 高 4.5 倍以上, 基于 NADH 的甲酸产率为 342%. Li 等^[60] 使用胺官能化 MIL-101(Cr)作为核心, 其具有 CO₂ 气体吸附性能, 再通过包埋将 CA、FateDH 和 GDH 3 种酶固定在外层 HKUST-1 上. 胺官能化的 MIL-101(Cr)释放的 CO₂ 底物首先进入 CA 并水合为碳酸氢根离子, 然后 HCO₃⁻ 迁移到 FateDH 上转化为甲酸, 而 GDH 用于多酶系统中 NADH 的连续再生. 固定化多酶系统以储存的 CO₂ 为底物催化生成的甲酸盐产量比相应的游离酶系统以鼓泡的 CO₂ 作为底物高 13.1 倍以上.

甲醇是一种重要的化工原料及能源物质, 由合成天然气制备的甲醇程序复杂, 且成本较高^[8]. 多酶级联催化 CO₂ 甲醇化作为一种生物催化手段近年来引起了较多关注. Wang 等^[61] 把 FateDH、FaldDH 和 ADH 共固定在聚苯乙烯微粒上, 从而将 CO₂ 转化为甲醇. 在没有添加 CA 的情况下, 固定多酶体系 11 次重复循环使用后产生了 48% 的累计甲醇收率. 甲醇的收率较低, 有待进一步改进. Ji 等^[62] 通过将甲酸脱氢酶、甲醛脱氢酶、乙醇脱氢酶和谷氨酸脱氢酶四种酶和辅因子原位包埋在阳离子聚电解质掺杂的中空纳米纤维腔内, 并通过在中空纳米纤维的外表面上组装 CA 加速 CO₂ 水合, 进行了进一步研究. 对于涉及 3 种脱氢酶的 CO₂ 还原酶系统, 实现了 103.2% 的最高甲醇收率, 该反应系统 10 次重复循环使用后产生了 940.5% 的累积甲醇收率.

3.4 CA 转化 CO₂ 的工业应用

基于 CA 的生物催化系统可以有效地促进 CO₂ 的捕集和分离, 但只有少数案例与工业过程中的实际应用密切相关. 对于工业应用, CA 必须长时间在高温、高离子强度、高 pH 值和高剪切应力的条件下保持较高活性和稳定性. Lalande 等^[63] 设计并安装了含有固定化 CA 的 CO₂ 填充柱, 用于回收和循环利用来自水泥熟料生产的 CO₂. 固定化 CA 催化 CO₂ 水合形成碳酸氢根离子与添加的 CaCl₂ 反应生成的 CaCO₃ 被用作波特兰水泥厂的原料. 2015 年, 在加拿大魁北克省^[64] 进行了基于 CA 的 CO₂ 捕集工艺

的有史以来规模最大的测试. 该测试使用了添加定向进化 CA 的 20% wt 的 $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$ 溶液, 能够在 2500 h 内以 80% 的平均捕集效率每天从燃烧天然气的锅炉的燃烧气体中捕集 $1 \times 10^4 \text{ kg CO}_2$. 实验过程中仅产生少量无毒碱性废水, 无需特殊处理直接排入市政下水道. 此外, 从汽提塔装置中排出的 CO_2 气体的纯度约 99.3%, 可用于生产燃料、塑料和化学品等产品. Reardon 等^[65] 在威尔逊维尔的国家碳捕集中心(NCCC)将 CA 固定在吸收柱的内表面, 以 20% wt K_2CO_3 和非挥发性碱性盐溶液(AKM-24)作为吸收剂. 固定化 CA 使传质速率提高了 6—7 倍, 并在 40 d 3460 h 内保持了超过 80% 的烟气中 CO_2 的捕集效率. 为了评估 CA 催化的 CO_2 加速吸收到 MDEA 水溶液中, 在威尔逊维尔的 NCCC 进行中试规模的 CO_2 捕集实验. 捕集装置在连续 6 d 吸收温度 25—35 °C 和 87 °C 解吸温度之间循环, 在稳态条件下每天能够捕集多达 68.1 kg 的二氧化碳^[3]. 总而言之, 与之前的无生物催化剂过程相比, CA 介导的 CO_2 捕集过程具有显著促进作用.

4 结论与展望(Conclusions and prospects)

为了改善游离 CA 在高温、强酸或强碱溶剂和化学杂质等条件下容易失活的特性, 使用合适的载体和固定化方法对 CA 进行固定. CO_2 可通过酶促反应吸收, 或通过 CA 一步催化或级联催化转化为无机碳酸盐、甲酸和甲醇等高价产品. 固定化 CA 转化 CO_2 的应用取得了一定的成效, 但是仍存在一些技术瓶颈, 可总结为以下几个方面: (1)CA 价格昂贵. (2)CA 对烟气中存在的高温、 SO_x 和 NO_x 耐受性差. (3)固定化方法尚不完善和载体的酶负载量低导致固定化 CA 活性低.

针对上述问题, 未来的研究方向应集中于: (1)从转基因生物中提取大量 CA, 降低 CA 生产成本. (2)进一步研究 CAs 相关基因的生理作用和代谢途径, 以提高化学和热稳定性. (3)研发先进的固定化方法和制备具有良好的机械强度、稳定性和对酶亲和力高的载体, 提高固定化 CA 活性.

参考文献 (References)

- [1] SUPURAN C T. Structure and function of carbonic anhydrases [J]. The Biochemical Journal, 2016, 473(14): 2023-2032.
- [2] WEST D. Structural modification of human Carbonic anhydrase II (HCAII) and its impact on catalysis[D]. University of Florida, 2012
- [3] ALVIZO O, NGUYEN L J, SAVILE C K, et al. Directed evolution of an ultrastable carbonic anhydrase for highly efficient carbon capture from flue gas [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(46): 16436-16441.
- [4] LEE C H, JANG E K, YEON Y J, et al. Stabilization of Bovine carbonic anhydrase II through rational site-specific immobilization [J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 138: 29-36.
- [5] CUI J D, JIA S R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: Current development and future challenges [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2015, 35(1): 15-28.
- [6] MOLINA-FERNÁNDEZ C, LUIS P. Immobilization of carbonic anhydrase for CO_2 capture and its industrial implementation: A review [J]. Journal of CO_2 Utilization, 2021, 47: 101475.
- [7] REN S Z, CHEN R X, WU Z F, et al. Enzymatic characteristics of immobilized carbonic anhydrase and its applications in CO_2 conversion [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 204: 111779.
- [8] 梁珊, 宗敏华, 娄文勇. 酶法催化二氧化碳制备高附加值化学品研究进展 [J]. 化学学报, 2019, 77(11): 1099-1114.
LIANG S, ZONG M H, LOU W Y. Recent advances in enzymatic catalysis for preparation of high value-added chemicals from carbon dioxide [J]. Acta Chimica Sinica, 2019, 77(11): 1099-1114(in Chinese).
- [9] OCHEDI F O, YU J L, YU H, et al. Carbon dioxide capture using liquid absorption methods: A review [J]. Environmental Chemistry Letters, 2021, 19(1): 77-109.
- [10] PEIRCE S, RUSSO M E, PERFETTO R, et al. Kinetic characterization of carbonic anhydrase immobilized on magnetic nanoparticles as biocatalyst for CO_2 capture [J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 138: 1-11.
- [11] EFFENDI S S W, CHIU C Y, CHANG Y K, et al. Crosslinked on novel nanofibers with thermophilic carbonic anhydrase for carbon dioxide sequestration [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 152: 930-938.
- [12] CHAFIK A, EL HASSANI K, ESSAMADI A, et al. Efficient sequestration of carbon dioxide into calcium carbonate using a novel carbonic anhydrase purified from liver of camel (*Camelus dromedarius*) [J]. Journal of CO_2 Utilization, 2020, 42: 101310.
- [13] MOREL F M M, LAM P J, SAITO M A. Trace metal substitution in marine phytoplankton [J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2020, 48: 491-517.
- [14] JENSEN E L, MABERLY S C, GONTERO B. Insights on the functions and ecophysiological relevance of the diverse carbonic anhydrases in microalgae [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(8): 2922.

- [15] BOSE H, SATYANARAYANA T. Utility of thermo-alkali-stable γ -CA from polyextremophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* TSHB₁ in biomimetic sequestration of CO₂ and as a virtual peroxidase [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2017, 24(11): 10869-10884.
- [16] GÜZEL-AKDEMİR Ö, CARRADORI S, GRANDE R, et al. Development of thiazolidinones as fungal carbonic anhydrase inhibitors [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): 2960.
- [17] GLADIS A, GUNDERSEN M T, FOSBØL P L, et al. Influence of temperature and solvent concentration on the kinetics of the enzyme carbonic anhydrase in carbon capture technology [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 309: 772-786.
- [18] HOU J, LI X K, KACZMAREK M B, et al. Accelerated CO₂ hydration with thermostable *Sulfurihydrogenibium azorense* carbonic anhydrase-chitin binding domain fusion protein immobilised on chitin support [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1494.
- [19] HSIEH C J, CHENG J C, HU C J, et al. Entrapment of the fastest known carbonic anhydrase with biomimetic silica and its application for CO₂ sequestration [J]. *Polymers*, 2021, 13(15): 2452.
- [20] 温欢. 碳酸酐酶杂化纳米花及其PVA/CS凝胶酶膜在CO₂转化中应用的基础研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2020.
- WEN H. Basic research on the application of carbonic anhydrase hybrid nanoflower and its PVA/CS hydrogels enzyme membrane in CO₂ conversion[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2020(in Chinese).
- [21] WU Z H, NAN Y, ZHAO Y, et al. Immobilization of carbonic anhydrase for facilitated CO₂ capture and separation [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2020, 28(11): 2817-2831.
- [22] WEN H, ZHANG L, DU Y J, et al. Bimetal based inorganic-carbonic anhydrase hybrid hydrogel membrane for CO₂ capture [J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2020, 39: 101171.
- [23] REN S Z, JIANG S H, YAN X Y, et al. Challenges and opportunities: Porous supports in carbonic anhydrase immobilization [J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2020, 42: 101305.
- [24] YING Q, CHEN H, SHAO P J, et al. Core-shell magnetic ZIF-8@Fe₃O₄-carbonic anhydrase biocatalyst for promoting CO₂ absorption into MDEA solution [J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2021, 49: 101565.
- [25] PEIRCE S, RUSSO M E, ISTICATO R, et al. Structure and activity of magnetic cross-linked enzyme aggregates of bovine carbonic anhydrase as promoters of enzymatic CO₂ capture [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 127: 188-195.
- [26] 冯慧, 韩娟, 黄文睿, 等. 纳米花型酶-无机杂化固定化酶研究进展 [J]. *化学通报*, 2021, 84(12): 1263-1273.
- FENG H, HAN J, HUANG W R, et al. Research progress in nanoflower enzyme-inorganic hybrid immobilized enzyme [J]. *Chemistry*, 2021, 84(12): 1263-1273(in Chinese).
- [27] SHAO P J, CHEN H, YING Q, et al. Structure-activity relationship of carbonic anhydrase enzyme immobilized on various silica-based mesoporous molecular sieves for CO₂ absorption into a potassium carbonate solution [J]. *Energy & Fuels*, 2020, 34(2): 2089-2096.
- [28] ZHANG S H, LU Y Q, YE X H. Catalytic behavior of carbonic anhydrase enzyme immobilized onto nonporous silica nanoparticles for enhancing CO₂ absorption into a carbonate solution [J]. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2013, 13: 17-25.
- [29] SHAMNA I, KWAN JEONG S, MARGANDAN B. Covalent immobilization of carbonic anhydrase on amine functionalized aluminosiloxane aerogel beads for biomimetic sequestration of CO₂ [J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2021, 100: 288-295.
- [30] SUN J, WANG C H, WANG Y Z, et al. Immobilization of carbonic anhydrase on polyethylenimine/dopamine codeposited membranes [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 136(29): 47784.
- [31] CHANG S, HE Y, LI Y X, et al. Study on the immobilization of carbonic anhydases on geopolymer microspheres for CO₂ capture [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 316: 128163.
- [32] JUN S H, YANG J S, JEON H, et al. Stabilized and immobilized carbonic anhydrase on electrospun nanofibers for enzymatic CO₂ conversion and utilization in expedited microalgal growth [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(2): 1223-1231.
- [33] GE J, LEI J D, ZARE R N. Protein-inorganic hybrid nanoflowers [J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(7): 428-432.
- [34] XU X Y, KENTISH S E, MARTIN G J O. Direct air capture of CO₂ by microalgae with buoyant beads encapsulating carbonic anhydrase [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, 9(29): 9698-9706.
- [35] SHARMA T, KUMAR A. Bioprocess development for efficient conversion of CO₂ into calcium carbonate using keratin microparticles immobilized *Corynebacterium flavescens* [J]. *Process Biochemistry*, 2021, 100: 171-177.
- [36] MOON H, KIM S, JO B H, et al. Immobilization of genetically engineered whole-cell biocatalysts with periplasmic carbonic anhydrase in polyurethane foam for enzymatic CO₂ capture and utilization [J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2020, 39: 101172.
- [37] 刘亚茹. 细胞表面展示碳酸酐酶及其酶学性质研究[D]. 天津: 天津大学, 2020.
- LIU Y R. Cell surface display of carbonic anhydrase and its enzymology properties[D]. Tianjin: Tianjin University, 2020(in Chinese).
- [38] ZHU Y Z, LIU Y R, AI M M, et al. Surface display of carbonic anhydrase on *Escherichia coli* for CO₂ capture and mineralization [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2021, 7(1): 460-473.
- [39] TAN S I, HAN Y L, YU Y J, et al. Efficient carbon dioxide sequestration by using recombinant carbonic anhydrase [J]. *Process Biochemistry*, 2018, 73: 38-46.
- [40] REN S Z, FENG Y X, WEN H, et al. Immobilized carbonic anhydrase on mesoporous cruciate flower-like metal organic framework for promoting CO₂ sequestration [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 189-198.

- [41] REN S Z, LI C H, TAN Z L, et al. Carbonic Anhydrase@ZIF-8 hydrogel composite membrane with improved recycling and stability for efficient CO₂ capture [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(12): 3372-3379.
- [42] 于洋, 刘琦, 吕静, 等. 碳酸酐酶固定及在二氧化碳捕集应用研究进展 [J]. *洁净煤技术*, 2021, 27(2): 69-78.
YU Y, LIU Q, LYU J, et al. Research progress on the immobilization of carbonic anhydrase and its application in carbon dioxide capture [J]. *Clean Coal Technology*, 2021, 27(2): 69-78 (in Chinese).
- [43] XU Y L, LIN Y Q, CHEW N G P, et al. Biocatalytic PVDF composite hollow fiber membranes for CO₂ removal in gas-liquid membrane contactor [J]. *Journal of Membrane Science*, 2019, 572: 532-544.
- [44] ZHANG S H, DU M E, SHAO P J, et al. Carbonic anhydrase enzyme-MOFs composite with a superior catalytic performance to promote CO₂ absorption into tertiary amine solution [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(21): 12708-12716.
- [45] DU M E, CHEN H, YE J X, et al. One-pot synthesis of efficient carbonic anhydrase-zeolitic imidazolate framework-8 composite for enhancing CO₂ absorption [J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2020, 40: 101211.
- [46] XU W N, WANG Z Y, CHEN G, et al. Accelerating CO₂ absorption in aqueous amine solutions at high temperature with carbonic anhydrase in magnetic nanogels [J]. *Catalysis Letters*, 2018, 148(7): 1827-1833.
- [47] 费潇瑶. 碳酸酐酶的固定化及其CO₂的捕集性能[D]. 大连: 大连理工大学, 2018.
FEI X Y. Immobilization of carbonic anhydrase and the performance in CO₂ capture[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2018(in Chinese).
- [48] FABBRICINO S, PRETE S D, RUSSO M E, et al. *In vivo* immobilized carbonic anhydrase and its effect on the enhancement of CO₂ absorption rate [J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 336: 41-49.
- [49] PEIRCE S, PERFETTO R, RUSSO M E, et al. Characterization of technical grade carbonic anhydrase as biocatalyst for CO₂ capture in potassium carbonate solutions [J]. *Greenhouse Gases: Science and Technology*, 2018, 8(2): 279-291.
- [50] QI G J, LIU K, HOUSE A L, et al. Laboratory to bench-scale evaluation of an integrated CO₂ capture system using a thermostable carbonic anhydrase promoted K₂CO₃ solvent with low temperature vacuum stripping [J]. *Applied Energy*, 2018, 209: 180-189.
- [51] SAHOO P C, KUMAR M, SINGH A, et al. Accelerated CO₂ capture in hybrid solvent using co-immobilized enzyme/complex on a hetero-functionalized support [J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2017, 21: 77-81.
- [52] HU G P, SMITH K H, NICHOLAS N J, et al. Enzymatic carbon dioxide capture using a thermally stable carbonic anhydrase as a promoter in potassium carbonate solvents [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 307: 49-55.
- [53] REN S Z, WANG Z Y, BILAL M, et al. Co-immobilization multienzyme nanoreactor with co-factor regeneration for conversion of CO₂ [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 110-118.
- [54] WANG Y Z, LI M F, ZHAO Z P, et al. Effect of carbonic anhydrase on enzymatic conversion of CO₂ to formic acid and optimization of reaction conditions [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 116: 89-94.
- [55] CHAI M, RAZAVI BAZAZ S, DAIYAN R, et al. Biocatalytic micromixer coated with enzyme-MOF thin film for CO₂ conversion to formic acid [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 426: 130856.
- [56] ZHAI T T, WANG C H, GU F J, et al. Dopamine/polyethylenimine-modified silica for enzyme immobilization and strengthening of enzymatic CO₂ conversion [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(40): 15250-15257.
- [57] ZHANG X N, SHAO W X, CHEN B Q, et al. Cross-linking of carbonic anhydrase and formate dehydrogenase based on amino acid specific recognition: Conversion of carbon dioxide to formic acid [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 146: 109763.
- [58] BENÍTEZ-MATEOS A I, SAN SEBASTIAN E, RÍOS-LOMBARDÍA N, et al. Asymmetric reduction of prochiral ketones by using self-sufficient heterogeneous biocatalysts based on NADPH-dependent ketoreductases [J]. *Chemistry - A European Journal*, 2017, 23(66): 16843-16852.
- [59] WANG J, LV Y Q. An enzyme-loaded reactor using metal-organic framework-templated polydopamine microcapsule [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2021, 29: 317-325.
- [60] LI Y, WEN L Y, TAN T W, et al. Sequential co-immobilization of enzymes in metal-organic frameworks for efficient biocatalytic conversion of adsorbed CO₂ to formate [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 394.
- [61] EL-ZAHAB B, DONNELLY D, WANG P. Particle-tethered NADH for production of methanol from CO₂ catalyzed by coimmobilized enzymes [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99(3): 508-514.
- [62] JI X Y, SU Z G, WANG P, et al. Tethering of nicotinamide adenine dinucleotide inside hollow nanofibers for high-yield synthesis of methanol from carbon dioxide catalyzed by coencapsulated multienzymes [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(4): 4600-4610.
- [63] LALANDE J M, TREMBLAY A. Process and a plant for the production of Portland cement clinker. U. S. Patent 6, 908, 507[P]. 2005.
- [64] FRADETTE L, LEFEBVRE S, CARLEY J. Demonstration results of enzyme-accelerated CO₂ capture [J]. *Energy Procedia*, 2017, 114: 1100-1109.
- [65] LEIMBRINK M, LIMBERG T, KUNZE A K, et al. Different strategies for accelerated CO₂ absorption in packed columns by application of the biocatalyst carbonic anhydrase [J]. *Energy Procedia*, 2017, 114: 781-794.