



氧化还原酶电催化反应研究进展

王世珍*, 刘凯洸, 詹东平

厦门大学化学化工学院, 厦门 361005

* 联系人, E-mail: szwang@xmu.edu.cn

2020-10-15 收稿, 2020-11-12 修回, 2020-12-25 接受, 2021-01-22 网络版发表

国家自然科学基金(21776233, 22078273)、福建省自然科学基金(2018J01013)和中央高校基本科研业务费专项(20720200038, 20720170033)资助

摘要 由于选择性好、效率高、无副产物和绿色环保等优点, 生物电催化合成反应备受关注. 氧化还原酶分子内部及其与电极界面间的电子传递效率, 决定了生物电化学合成的效率. 本文对近年来酶电催化的相关研究进行总结, 聚焦氧化还原酶分子内的电子传递机制, 阐述氧化还原酶共进化电子传递网络改造、分子开关设计、导电模块组装等酶分子内电子传递的调控策略; 同时, 以优化酶分子与电极界面间的电子传递为导向, 通过蛋白质工程获得新型高效氧化还原酶, 构建酶电催化还原反应器, 实现高效生物电催化还原制备手性化合物, 推动绿色生物制造发展.

关键词 氧化还原酶, 生物电催化, 辅酶再生, 分子开关, 共进化, 电子传递

生命活动包含了诸多氧化还原过程, 涉及不同尺度的电子传递, 例如氨基酸残基间传递、呼吸链中多个蛋白间传递以及微生物直接种间电子传递. 氧化还原酶催化过程中分子内电子传递是生命体系电子传递的基础. 利用先进电化学技术研究氧化还原酶的电子转移规律, 不仅可深入揭示生命过程中的催化机制, 也为开发高效生物电催化体系奠定基础. 目前生物电化学主要集中于生物传感器及其分析检测应用, 而生物电催化合成及其反应器优化设计的研究还处于起步阶段^[1].

生物电催化合成无副产物、选择性高, 以其高效和绿色环保等优势受到关注^[2]. 设计和改造获得新型氧化还原酶以适应生物电催化还原反应体系是实现绿色生物制造的关键. 目前生物电催化主要集中于微生物电合成系统. 微生物电合成是微生物利用阴极电子在细胞内被转化为还原当量, 作为还原力将CO₂、葡萄糖或其他底物还原为各种化学品的过程. 酶电催化还原反应研究较少且集中于CO₂固定化以及固氮酶等领

域^[3]. 而对高附加值的手性化合物, 如非天然手性氨基酸、手性胺、手性醇等为产物的不对称电还原研究较少.

最近发表的与生物电化学相关的综述从不同角度对生物电催化进行了总结. Wu等人^[4]总结了近年多酶耦联体系电催化发展. Mazurenko等人^[5]从酶电极表面修饰材料促进电子直接传递的角度进行综述. Xiao等人^[6]阐述酶燃料电池的进展和挑战. Kornienko等人^[7]综述了酶电极界面设计和修饰的新进展. Chen等人^[8,9]综述了生物电催化合成化学品等相关进展. Wu等人^[10]总结了近两年酶电催化合成平台构建和新体系.

然而, 目前研究侧重对电极修饰材料性能的提升, 而以优化电化学催化性能为导向的酶设计和改造研究较少. 能高效电催化并具有良好的稳定性的抗逆氧化还原酶的挖掘和改造成为生物电催化的瓶颈问题. 目前对无直接电子传递的氧化还原酶的机理研究及应用报道较少, 酶分子内电子传递机制有待进一步阐明. 因此, 本文围绕生物电催化, 从氧化还原酶分子内电子传递

引用格式: 王世珍, 刘凯洸, 詹东平. 氧化还原酶电催化反应研究进展. 科学通报, 2021, 66: 1240–1249

Wang S Z, Liu K L, Zhan D P. Advances of bioelectrocatalysis by oxidoreductases (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 1240–1249, doi: [10.1360/TB-2020-1313](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1313)

机理研究,以及酶结构改造、辅酶电再生等方面对近年来的相关文献进行综述,分析总结并提出展望。

1 氧化还原酶电催化还原

1.1 高附加值产品电催化还原体系

目前研究较多的酶电催化还原体系是利用甲酸脱氢酶进行电催化固碳^[11]。而利用生物电催化还原制备高附加值的手性化合物,例如手性胺、手性醇、手性氨基酸,特别是非天然手性氨基酸的生物电催化研究较少(图S1)。

Mao课题组^[12]构建了以谷氨酸合成酶为识别元件的生物电化学传感界面。在酶和电极之间引入低式量电位甲基紫精,可实现酮戊二酸和谷氨酰胺的酶催化电合成谷氨酸。高式量电位铁氰化钾的引入可以逆转反应方向,实现酶催化谷氨酸的电化学氧化,有效调控其电催化的方向。Vulcu等人^[13]通过金纳米颗粒固定亮氨酸脱氢酶,利用生物电催化将 α -酮异己酸的还原胺化为L-亮氨酸,并实现辅酶再生。Schlager等人^[14]将醇脱氢酶通过海藻-硅胶复合材料固定在碳纸电极上,提高酶稳定性实现电催化丁醛还原制备丁醇。Jayabalan等人^[15]利用黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)改性高孔隙率的碳布作为工作电极,固定化乳酸脱氢酶电催化丙酮酸还原为乳酸,并实现烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)电化学再生。Bulutoglu等人^[16]改造来源于*Pyrococcus furiosus*的耐高温乙醇脱氢酶(AdhD),基于模拟计算出笼形蛋白(O3-33)。进而将三聚体形式的O3-33-AdhD融合蛋白固定在生物电极上,催化2,3-丁二醇氧化,电化学操作稳定性提高了1倍。目前酶电催化还原存在的问题主要为酶在电极表面负载量少、稳定性差、催化效率偏低等。因此,需要提高酶稳定性、增加酶电极的负载量以及强化界面电子传递。烟酰胺辅酶(NAD(P)H)依赖型脱氢酶在生物电催化还原制备手性化合物领域具有广阔的应用前景。开发新型稳定高效的脱氢酶,并设计、优化生物电化学反应器以提高电催化效率的策略有待进一步发展。表S1归纳了近些年发表的具有代表性的高附加值化合物的生物电催化合成文献^[12~20]。

1.2 辅酶电化学再生

烟酰胺辅酶依赖型脱氢酶在生物电催化还原制备手性化合物领域具有广阔的应用前景。该类型酶催化

还原的过程通常需要辅酶NAD(P)H参与反应,作为天然电子中介体。由于NAD(P)H价格昂贵,绿色且高效的实现辅酶还原再生是关系到氧化还原酶工业应用的关键,也是酶催化研究中的热点和难点^[21]。辅酶再生方法包括酶法、均相催化法、光化学法、化学法、电化学法和非均相催化法等^[22]。与生物催化中常用的酶法辅酶再生比较,电化学法具有再生成本低、无需其他化学反应试剂、无副产物生成等优势。但反应过程需要的电位较高,还原介质的选择存在较大的局限性并可导致辅酶二聚体的产生^[23]。

多功能凝胶可有效提升辅酶电化学再生的效率。Yu等人^[24]合成了以NAD⁺作为对离子的离子液体,利用该离子液体、亚甲基绿分子与单壁碳纳米管制备多功能导电凝胶。电子中介体与离子液体(ILs)结合对NADH的电催化具有协同作用。ILs较高的导电性可加速NADH与电极之间的电子转移。将电子中介体固定在与离子液体复合的电极表面,有利于酶与辅酶、辅酶与电催化剂之间形成有效电子传递。SWNTs加入提高制备凝胶的导电性,促进亚甲基绿的电子转移。同时,多样化的离子液体提供了功能化阴阳离子的组合设计与特性选择,可用于制备多类型具有生物相容性的导电凝胶用于固定化酶和电极修饰^[17]。

利用柔性大分子将辅酶连接到氧化还原酶上,可减少辅酶扩散,实现辅酶原位再生。Song等人^[25]构建了一种酶催化电还原二氧化碳的系统,用聚乙二醇将辅酶NADH共价结合在甲酸脱氢酶(FDH)上。进而将脱氢酶固定在含有铜纳米颗粒(CuNPs)的电极上并实现辅酶的再生,比单独使用FDH高出约2.5倍。Barin等人^[26]研究了电纺聚苯乙烯纳米纤维(EP SNF)固定化甲酸脱氢酶催化CO₂生成甲酸盐的反应,在铜泡沫电极上直接电化学还原实现辅酶再生。并考察在间歇和半连续两种生产模式下的甲酸盐生产,发现两种体系的再生辅酶浓度几乎相同(0.5 mmol/L),表明该电化学再生系统即使在半连续运行模式中也可高效运行。表1归纳了部分具有代表性的辅酶电再生体系。

2 氧化还原酶分子内电子传递机制

对于酶氧化还原中心电子传递过程的研究表明,电子转移是生物体能量交换及传输的主要途径。单步的隧穿机制(tunneling)和多步的跳跃机制(hopping)是两种较为主流的电子转移机制,二者之间的竞争和转换受到电子授受体之间距离的影响。转移机制与电场

表 1 辅酶电再生体系

Table 1 Cofactor regeneration by electro-chemical method

底物	产物	酶	电极	外势	电子中介体	辅酶再生效率或 TTN	文献
4-氯乙酰乙酸乙酯	R(-)-4-氧基-3-羟基丁酸乙酯	黄递酶、S型醇脱氢酶	碳布电极	N.A.	Cc-PAApolymer	15 min再生NADH 600 μmol/L	[27]
二氧化碳	甲酸盐	甲酸脱氢酶	FDH-NAD ⁺ /CuNPs修饰碳毡电极	-1.0(V vs. Ag/AgCl)	CuNPs	~82.3%	[25]
二氧化碳	甲酸盐	甲酸脱氢酶	铜泡沫电极	-1.1 V(vs. Ag AgCl KCl3M)	N.A.	0.5 mmol/L NADH	[26]
二氧化碳	甲酸盐	甲酸脱氢酶	铜箔电极	1.0 V vs. Ag/AgCl	[Cp*Rh(bpy)Cl]Cl	96.5%	[28]
二氧化碳	甲酸盐	甲酸脱氢酶	铜泡沫电极	-1.1 V(vs. Ag AgCl KCl3M)	N.A.	77.7%±2.0%	[29]
二氧化碳	甲酸盐	甲酸脱氢酶	铜纳米棒玻碳电极	-1.0 V (vs. Ag/AgCl)	[Cp*Rh(bpy)Cl]Cl 复合物(Rh(III))	100%	[30]

驱动力、授受体间的距离等因素密切相关。对电子转移来讲, 适宜的电正性基团、蛋白模块是实现电子跳跃的重要前提。但是, 蛋白质与DNA不同, 没有高度有序的结构骨架, 在活性位间也缺乏有效的桥联单元来支撑电子传递。因此, 大部分脱氢酶的氧化还原位点之间缺乏有效的耦合^[31]。

目前对含有金属辅基的蛋白电子传递机理有较深入的研究和认识, 例如细胞色素P450酶(Cytochrome P450)、漆酶和铁硫蛋白等。含有血红素(Heme)的P450, 是一类广泛存在于各种生物体的金属酶, 参与许多天然产物的合成和药物代谢。Zhang等人^[32]解析了来源于*Tepidiphilus thermophiles*的P450酶CYP116B46的晶体结构, 并分析了结构域的排列与电子传递方向。[2Fe-2S]和Heme的直线距离达25.3 Å, 无法实现有效直接电子传递。将[2Fe-2S]与Heme之间的氨基酸侧链基团分别突变成丙氨酸, 考察其对于CYP116B46酶活的影响。结果显示R388、R718、E723、S726和E729的丙氨酸突变体活性明显下降, 表明此P450酶的电子传递方向是从NAD(P)H经过FMN以及[2Fe-2S]到Heme。Zhang等人^[33]发现, 漆酶CueO中的第5个Cu结合位点碳纳米管上的电催化氧还原活性, 该位点被Cu占据时的电流是未被Cu占据时的7.2倍。对第5个Cu周围的配体环境(M355、D360、D439和M441)进行了饱和突变并筛选出11个有益突变体, 催化电流提高均在2.5倍以上。通过点突变构造了电子传递路线可为今后酶改造提供借鉴。

目前对于蛋白内电子传递的模拟主要基于量子计算的方法, 利用传统的分子动力学模拟无法获得电子传递信息。通过分子动态动力学模拟获得氨基酸残基

的带电状态、静电势能的动态变化, 并结合氨基酸残基导电性能分析, 可以用于界定电子传递路径^[34]。

3 分子开关的界定与设计

自然界大量生物酶催化的氧化还原反应中, 电子的转移经常伴随着质子的同步迁移^[35]。这种现象称为质子耦合电子转移(proton-coupled electron transfer, PCET), 在促进酶分子内部电子传递、质子迁移和生物质能量转换等方面均有重要作用。PCET过程具有类似二极管的效应, 如果没有耦合质子传递, 电子无法传递, 酶的活性就会“关闭”。氧化还原酶催化过程中的质子耦联电子转移反应, 会改变氧化态或还原态中心离子质子化过程的静电作用。因此, 具有电子传递性能的结构域可作为“分子开关”(molecular switch), 通过设计分子开关结构域的构象变化引发响应单元的功能, 促进或者阻碍电子传递^[36]。目前, 大部分关于酶分子开关调控研究集中于脂肪酶的“盖子”开合和激酶别构信号传导方面。而关于依赖氧化还原酶分子开关鲜见报道。Zhang等人^[37]研究了依赖NADH的醛脱氢酶对氧化还原势响应的分子开关。该开关由一对半胱氨酸残基组成, 其中一个位于在催化活性中心, 另一个在活性中心外围与之形成二硫键, 可对反应体系中的氧化还原电势位进行响应并调控电子传递。Han等人^[38]开展辣根过氧化物酶单分子酶催化的研究, 采用磷脂双层膜修饰的纳米电极, 通过循环伏安法测定了辣根过氧化物酶催化双氧水还原的“开关”电化学行为, 通过碰撞模式测定了单个辣根过氧化物酶的催化速率(即turnover number)。

如何界定脱氢酶内氧化还原位点之间的电子传递

路径, 定位关键氨基酸, 并设计分子开关是难点(图1). 酶家族在长期进化过程中, 酶分子中具有相互作用和功能协同的残基形成了一种“共进化”模式, 即当一个残基发生变异时, 与其有功能协同的其他残基也相应发生变异, 形成共进化相互作用网络, 作为信号、能量和电子传递的耦合通路^[39,40]. 共进化相互作用网络不仅是酶的动态结构与功能的基础, 并调控氧化还原反应过程中的质子交换与电子传递的耦合(图2).

Raanan等人^[35]分析了硝酸盐还原酶结构, 按照其与金属离子共进化的关系划分为多个直接电子传递模块(module), 进一步基于传递模块构建空间相邻网络(spatial adjacency network, SPAN). Evans等人^[41]从进

化的角度对酶的电化学性能进行综述, 提出氧化还原酶倾向进化为减少过电势以节省Gibbs能量用于质子传递(proton pumping). Wu等人^[42]研究了金属酶的分子开关, 发现铁氧还蛋白可以接受与2Fe-2S模块配位的四半胱氨酸(tetracysteine)模体内或者附近的插入外来模块, 调控电子传递效率. 但不含金属离子的氧化还原酶的电子传递共进化模块研究鲜见报道.

研究非金属蛋白质内电子高效长程传递的分子机制与调控机理具有重要意义和挑战性. 研究难点在于如何在蛋白复杂的结构中确定分子开关关联的氨基酸残基^[43]. 关于蛋白内电子传递路径的共进化机制尚不明确. 在自然选择多种约束下的进化, 共进化并不意味着

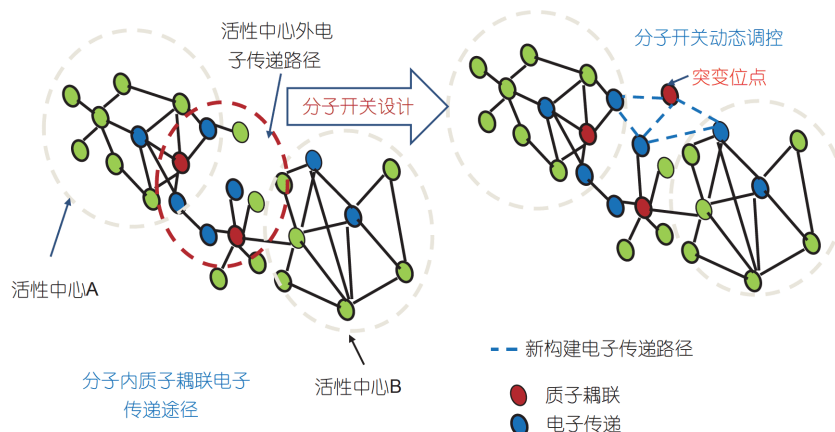


图1 分子内PCET电子传递路径与分子开关设计

Figure 1 Intramolecular PCET transfer pathway and molecular switch design

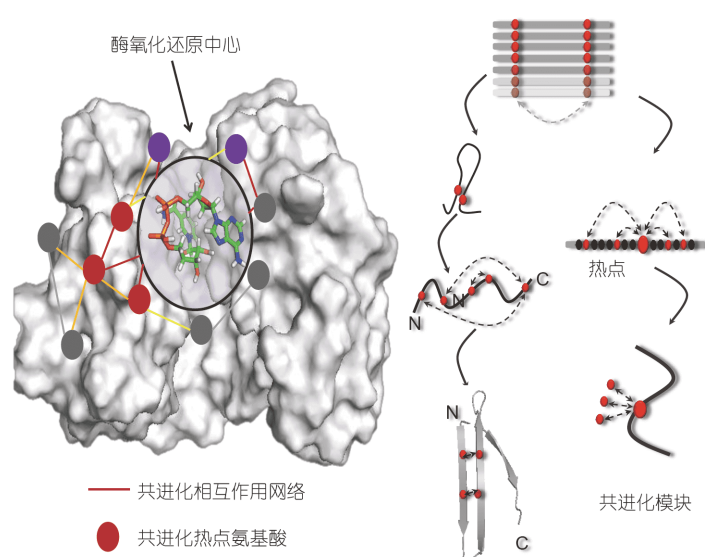


图2 共进化机理与共进化氨基酸相互作用网络

Figure 2 Co-evolution mechanism and co-evolved interaction networks of amino acids

着每个特性都达到最优化,大多数情况下是多种功能的权衡.因此,还需要结合分子模拟计算和电子传递测定技术发展新的研究策略.

4 酶结构改造提高电子传递性能

经过亿万年自然进化的氧化还原酶,氧化还原中心一般位于蛋白内部,通过特定的电子传递路径与蛋白表面连接,以防止无序的电子传递耗能^[44].基于酶分子内电子传递机制,可通过定点突变、共进化导电网络改造、导电模块组装等方法改变酶活性中心酶表面,乃至与电极界面的电子传递性能.通过定向固定化等方法可调控酶分子与电极界面的相互作用,提高电子传递性能.

4.1 金属离子结合模块设计

蛋白质的氧化还原电位可通过改变金属辅基以及与其作用的氨基酸残基来实现. Lu课题组^[45]以细菌蛋白天然azurin(称为WTAz)作为研究体系.该蛋白含有1个Cu辅助因子,其电位为+0.265 V.通过改造获得3个增加了Cu结合位点疏水性的突变和2个改变了关键的氢键相互作用的突变,使其电位变为+0.972 V.用Ni替换了Cu,其-0.950~+0.972 V的电位范围可较大覆盖了生理条件下的氧化还原电位范围(+1~-1 V).Hartwig课题组^[46]通过降低大肠杆菌培养基中铁盐的含量并保持较低的温度,以抑制血红素的合成,得到了含铁量低于5%的血红蛋白(apo-PIX).将该蛋白与不同的金属离子混合得到多种M-PIX(M为各种金属离子).比较了不同金属核心的酶催化卡宾的C-H键插入反应及芳香烯烃加成反应的活性,表明Ir(Me)-PIX蛋白的催化活性最好.进一步对PIX结合位点附近的重要氨基酸逐一作了突变,筛选后表明93号为关键氨基酸,将其突变为甘氨酸(93G)后,可催化卡宾的C-H键插入反应和不活泼烯烃加成反应.反应对映选择性、催化剂转换数TON较高. Lu课题组^[47]通过将铁硫簇基团引入细胞色素C过氧化物酶(cytochrome c peroxidase, CcP)蛋白骨架,通过改造金属和底物结合位点的二级配位区域的氨基酸残基,设计和合成了可还原亚硫酸盐的人工合成金属酶.比较了合成酶、天然亚硫酸盐还原酶和CcP与氧根离子的结合能力,以及三者存在时亚硫酸钠对电子传递介质甲基紫精的氧化能力.进一步对合成蛋白中与铁硫簇及血红素相互作用的二级配位区域氨基酸进行优化,使合成酶活性较最初版本提高63倍.该研究表明,

金属模块的改造可以调控蛋白质的氧化还原电势和电子传递速率.

4.2 分子内导电网络设计与改造

蛋白中一些氨基酸残基可作为电子转移的中继站来调节长程电子跳跃转移.例如,具有质子化碱性支链的氨基酸、含芳香性基团的氨基酸残基等可作为空穴转移的中继站.中性的羟基及酰胺基团也可有效地俘获结合游离电子.咪唑、苯基团、 α -螺旋C端、 n - π 相互作用的酰胺单元,也可作为有效的空穴载体,在蛋白质空穴跳跃转移中扮演中继站.肽链、螺旋、结构水簇等诸多结构模块均可扮演电子跳跃“中继站”来辅助实现电子长程转移^[48].自然界存在高导电性能的蛋白二级结构模块.例如,整合蛋白(integrin)中的alphaVbeta3的结构域,连接在两个电极之间可测得非常高的电子传导率^[49].然而,与漆酶等氧化酶相比,绝大部分脱氢酶分子内的氧化还原中心深埋在蛋白内部,且在活性位点之间缺乏有效的桥联单元支持电子传递.由于大部分氧化还原位点之间缺乏有效的耦联,使得酶分子内电子传递的低效性成为氧化还原反应的限制因素^[50].

酶的定点突变是常用调控电子传递的方法. Zhang等人^[51]利用酶定向进化技术改造漆酶,提高了漆酶的催化活性,并利用多通道恒电位仪搭载多电极阵列,实现了对96孔板里漆酶变体活性的快速高效筛选.漆酶CueO D439T/L502K突变对氧气还原的催化电位正移了0.12 V,大大降低了漆酶电催化反应的过电势,提高了葡萄糖/氧气生物燃料电池的开路电位.如何寻找催化位点和结合位点之外、潜在的起耦联作用的关键氨基酸残基,并进行设计改造提高酶分子内电子传递效率,是十分重要且艰巨的任务.

4.3 导电多肽模块组装

多肽具有来源广泛、生物兼容性好、易于修饰等特点,且有良好的力学和电学性能,在催化、物质分离、生物电子器件等领域受到重视^[52].基于电子传递理论可设计不同导电多肽,调控其刚柔性和亲疏水性,形成 α -螺旋、 β -折叠等不同的二级结构,构建电子远程传递通道^[53].通过设计多类型导电多肽,组装构建衔接酶分子内与表面的人工电子传递链促进界面电子传递,可以提高氧化还原酶的催化效率和催化速率(图3).

天然P450单加氧酶及其电子传递链体系中的生物

功能模块被相继鉴定,为高效电子传递链的体外构建奠定基础。P450的底物结合区具有高度可塑性,通过酶工程改造可以改变底物谱,在重要精细化学品和药物中间体制造方面具有应用潜力。通过分子克隆及重组表达技术,可构建高效维持重组P450酶活性的体外人工体系。Zernia等人^[54]研究了多种导电多肽对P450电催化的影响,发现合适的导电多肽可使酶在电极上实现直接电化学催化反应。Zheng课题组^[55]针对细胞色素P450酶系利用模块组装技术构建高效的电子传递链,

提高P450单加氧酶的催化效率。Ma和Ludwig^[56]报道采用多肽接头GSGYGSG,将酶与分子量较小的细胞色素Heme结合的多肽模块连接,可改善电子转移效率。导电多肽设计也可实现酶定向固定化,进一步缩短酶与电极的电子传递路径,提高催化效率。Ranieri等人^[57]研究了含Heme蛋白电极固定化机理和应用。多肽氨基酸序列、理化性质以及与氧化还原酶的组装方式,包括组装位置、结构相容性和动态协调性等与活性功能之间的复杂关系有待进一步研究。表2整理了部分目前报

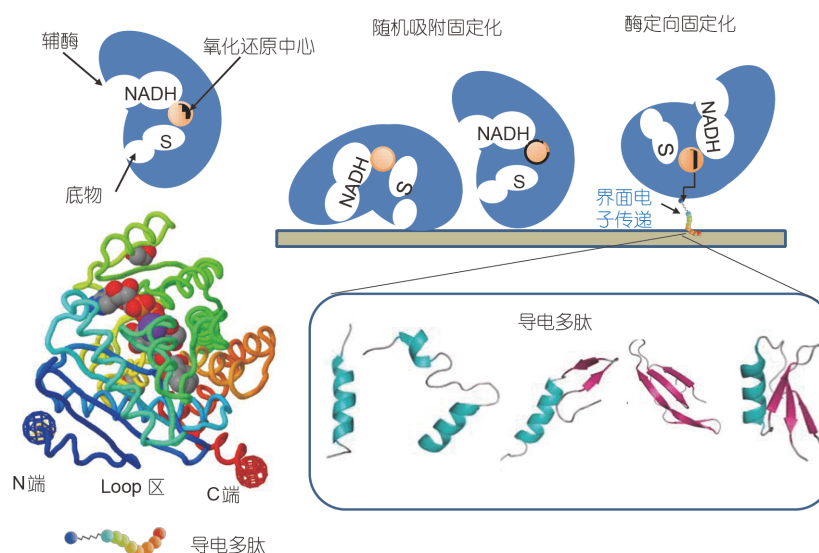


图3 导电多肽模块组装与酶定向固定化

Figure 3 Assembly of conductive peptides for oriented immobilization of enzyme

表2 导电多肽的序列

Table 2 Sequence of conductive peptide

多肽	序列	文献
P450相关多肽	(RTHRK) ₄	[54]
	KAKELAEKLAELKA-(RTHRK) ₄	
	(KAKELAEKLAELKA) ₂ -(RTHRK) ₄	
	YPYDVDPYA	
	YPYDVDPYA-(RTHRK) ₄	
ALF3W	VGGLGWW	[58]
R5T3W	SVNVTQVGFGWW	
R5T3Y	SVNVTQVGFGYYY	
ACC-HEX	ELKAIAQEFKAIAKEFKAIAFEFKAIAQK	[59]
与金纳米粒子结合的多肽	CAALPDGLAAC	[60]
导电多肽	ASGGGSGGGSGGG	[61]
	PSPSTDQSPS	
	GSGGGSGGGSGGAS	
	VLHRHQPVTIGEPAAAR	
	VLHRHQPVSPIHSRTIG	

道的导电多肽序列。

5 总结与展望

酶分子内电子传递和电极界面的电子传递效率直接影响生物电化学合成的效率。依赖NAD(P)H的脱氢酶在生物电催化不对称还原具有重要作用。目前存在的瓶颈问题包括辅酶再生困难, 酶在电极表面稳定性差、酶负载量低以及难以规模化放大等问题。如何优化酶分子内与界面电子传递, 设计、改造获得新型高效氧化还原酶, 构建酶电催化还原反应器, 是实现高效生物电催化制备手性化合物, 推动绿色生物制造发展的关键。从以下几个方面提出对生物电催化的展望: (1) 挖掘新型抗逆酶。挖掘来源于极端环境的具有嗜热、嗜盐、嗜碱等特性的氧化还原酶用于生物电催化。加强氧化还原酶对电子中介体、有机溶剂和离子液体的耐受性, 提高氧化还原酶在生物电催化反应器中的热稳定性和操作稳定性, 增强酶催化效率和辅酶再生效率。(2) 改造优化酶电化学性能。通过酶家族共进化分析可从遗传进化的角度提供界定酶电子传递关键路

径的新方法。基于蛋白质导电功能模块协同进化的分析, 进而工程化设计、组装导电模块, 可为调控酶电子传递元件提供设计模板和指导。(3) 微纳电化学与酶工程交叉。基于微电极构筑技术与酶催化相结合制备微纳酶电化学器件, 实现单分子酶催化性能的高通量测试和高效生物电催化还原, 优化生物电催化合成工艺。例如采用基于扫描电化学显微镜(SECM)的三维(3D)打印微电极构筑技术和高通量组合成像技术, 构筑生物酶催化微电极阵列, 通过多通道循环伏安法和SECM反馈模式, 高通量测定酶催化的反动力学性质, 筛选高效酶电催化体系^[62]。(4) 多酶体系的仿生电催化。在多酶耦联体系的定向固定化和多酶表面展示技术的基础上, 进一步建立多酶氧化还原位点间的电子传递路径。通过模拟自然界存在的多酶复合物中的高效电子传递通道, 提高生物电催化还原制备手性化合物的效率^[63]。(5) 开发生物相容性好的功能性导电材料。新型导电材料可促进酶电催化效率提升。例如, 导电金属-有机骨架材料(MOFs)具有多尺度的孔容、超高的比表面积和易于进行功能修饰化等优点, 可提高氧化还原酶稳定性、增加电极的负载量。

参考文献

- 1 Zeng A P. New bioproduction systems for chemicals and fuels: Needs and new development. *Biotechnol Adv*, 2019, 37: 508–518
- 2 Harnisch F, Rosa L F M, Kracke F, et al. Electrifying white biotechnology: Engineering and economic potential of electricity-driven bioproduction. *ChemSusChem*, 2015, 8: 758–766
- 3 Hitaishi V P, Mazurenko I, Harb M, et al. Electrostatic-driven activity, loading, dynamics, and stability of a redox enzyme on functionalized-gold electrodes for bioelectrocatalysis. *ACS Catal*, 2018, 8: 12004–12014
- 4 Wu R, Song H, Wang Y, et al. Multienzyme co-immobilization-based bioelectrode: Design of principles and bioelectrochemical applications. *Chin J Chem Eng*, 2020, 28: 2037–2050
- 5 Mazurenko I, Hitaishi V P, Lojou E. Recent advances in surface chemistry of electrodes to promote direct enzymatic bioelectrocatalysis. *Curr Opin Electrochem*, 2020, 19: 113–121
- 6 Xiao X, Xia H Q, Wu R, et al. Tackling the challenges of enzymatic (bio)fuel cells. *Chem Rev*, 2019, 119: 9509–9558
- 7 Kornienko N, Ly K H, Robinson W E, et al. Advancing techniques for investigating the enzyme-electrode interface. *Acc Chem Res*, 2019, 52: 1439–1448
- 8 Chen H, Dong F, Minter S D. The progress and outlook of bioelectrocatalysis for the production of chemicals, fuels and materials. *Nat Catal*, 2020, 3: 225–244
- 9 Chen H, Simoska O, Lim K, et al. Fundamentals, applications, and future directions of bioelectrocatalysis. *Chem Rev*, 2020, 120: 12903–12993
- 10 Wu R, Ma C, Zhu Z. Enzymatic electrosynthesis as an emerging electrochemical synthesis platform. *Curr Opin Electrochem*, 2020, 19: 1–7
- 11 Nicolas B, Victoria F. Functional Electrodes for Enzymatic and Microbial Electrochemical Systems. London: World Scientific Press, 2018
- 12 Wu F, Yu P, Yang X, et al. Exploring ferredoxin-dependent glutamate synthase as an enzymatic bioelectrocatalyst. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 12700–12704
- 13 Vulcu A, Grosan C B, Muresan L, et al. The reductive amination of α -ketoisocaproic acid using a leucine dehydrogenase-modified gold electrode. *Particul Sci Technol*, 2016, 34: 96–102
- 14 Schlager S, Neugebauer H, Haberbauer M, et al. Direct electrochemical addressing of immobilized alcohol dehydrogenase for the heterogeneous bioelectrocatalytic reduction of butyraldehyde to butanol. *ChemCatChem*, 2015, 7: 967–971

- 15 Jayabalan R, Sathishkumar M, Jeong E S, et al. Immobilization of flavin adenine dinucleotide (FAD) onto carbon cloth and its application as working electrode in an electroenzymatic bioreactor. *Bioresour Technol*, 2012, 123: 686–689
- 16 Bulutoglu B, Macazo F C, Bale J, et al. Multimerization of an alcohol dehydrogenase by fusion to a designed self-assembling protein results in enhanced bioelectrocatalytic operational stability. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 20022–20028
- 17 Zappi D, Gabriele S, Gontrani L, et al. Biologically friendly room temperature ionic liquids and nanomaterials for the development of innovative enzymatic biosensors: Part II. *Talanta*, 2019, 194: 26–31
- 18 Chen H, Prater M B, Cai R, et al. Bioelectrocatalytic conversion from N_2 to chiral amino acids in a H_2/α -keto acid enzymatic fuel cell. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 4028–4036
- 19 Wu R, Zhu Z. Self-powered enzymatic electrosynthesis of *L*-3,4-dihydroxyphenylalanine in a hybrid bioelectrochemical system. *ACS Sustain Chem Eng*, 2018, 6: 12593–12597
- 20 Morra S, Valetti F, Sarasso V, et al. Hydrogen production at high Faradaic efficiency by a bio-electrode based on TiO_2 adsorption of a new [FeFe]-hydrogenase from *Clostridium perfringens*. *Bioelectrochemistry*, 2015, 106: 258–262
- 21 Wang X, Saba T, Yiu H H P, et al. Cofactor NAD(P)H regeneration inspired by heterogeneous pathways. *Chem*, 2017, 2: 621–654
- 22 Liu W, Hu W, Yang L, et al. Single cobalt atom anchored on carbon nitride with well-defined active sites for photo-enzyme catalysis. *Nano Energy*, 2020, 73: 104750
- 23 Song H, Ma C, Zhou W, et al. Construction of enzyme-cofactor/mediator conjugates for enhanced *in vitro* bioelectricity generation. *Bioconjugate Chem*, 2018, 29: 3993–3998
- 24 Yu P, Zhou H, Cheng H, et al. Rational design and one-step formation of multifunctional gel transducer for simple fabrication of integrated electrochemical biosensors. *Anal Chem*, 2011, 83: 5715–5720
- 25 Song H, Ma C, Liu P, et al. A hybrid CO_2 electroreduction system mediated by enzyme-cofactor conjugates coupled with Cu nanoparticle-catalyzed cofactor regeneration. *J CO_2 Util*, 2019, 34: 568–575
- 26 Barin R, Biria D, Rashid-Nadimi S, et al. Investigating the enzymatic CO_2 reduction to formate with electrochemical NADH regeneration in batch and semi-continuous operations. *Chem Eng Process*, 2019, 140: 78–84
- 27 Dong F, Chen H, Malapit C A, et al. Biphasic bioelectrocatalytic synthesis of chiral β -hydroxy nitriles. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 8374–8382
- 28 Kim S, Kim M K, Lee S H, et al. Conversion of CO_2 to formate in an electroenzymatic cell using *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *J Mol Catal B-Enzym*, 2014, 102: 9–15
- 29 Barin R, Biria D, Rashid-Nadimi S, et al. Enzymatic CO_2 reduction to formate by formate dehydrogenase from *Candida boidinii* coupling with direct electrochemical regeneration of NADH. *J CO_2 Util*, 2018, 28: 117–125
- 30 Kim S H, Chung G Y, Kim S H, et al. Electrochemical NADH regeneration and electroenzymatic CO_2 reduction on Cu nanorods/glassy carbon electrode prepared by cyclic deposition. *Electrochim Acta*, 2016, 210: 837–845
- 31 Bostick C D, Mukhopadhyay S, Pecht I, et al. Protein bioelectronics: A review of what we do and do not know. *Rep Prog Phys*, 2018, 81: 026601
- 32 Zhang L, Xie Z, Liu Z, et al. Structural insight into the electron transfer pathway of a self-sufficient P450 monooxygenase. *Nat Commun*, 2020, 11: 2676
- 33 Zhang L, Cui H, Dhoke G V, et al. Engineering of laccase CueO for improved electron transfer in bioelectrocatalysis by semi-rational design. *Chem Eur J*, 2020, 26: 4974–4979
- 34 Sampaio R N, Piechota E J, Troian-Gautier L, et al. Kinetics teach that electronic coupling lowers the free-energy change that accompanies electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 7248–7253
- 35 Raanan H, Pike D H, Moore E K, et al. Modular origins of biological electron transfer chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 1280–1285
- 36 Filip-Granit N, Goldberg E, Samish I, et al. Submolecular gates self-assemble for hot-electron transfer in proteins. *J Phys Chem B*, 2017, 121: 6981–6988
- 37 Zhang Y, Wang M, Lin H. A regulatory cysteine residue mediates reversible inactivation of NAD^+ -dependent aldehyde dehydrogenases to promote oxidative stress response. *ACS Chem Biol*, 2020, 15: 28–32
- 38 Han L, Wang W, Nsabimana J, et al. Single molecular catalysis of a redox enzyme on nanoelectrodes. *Faraday Discuss*, 2016, 193: 133–139
- 39 Campbell E, Kaltenbach M, Correy G J, et al. The role of protein dynamics in the evolution of new enzyme function. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 944–950
- 40 Anishchenko I, Ovchinnikov S, Kamisetty H, et al. Origins of coevolution between residues distant in protein 3D structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 9122–9127
- 41 Evans R M, Siritanaratkul B, Megarity C F, et al. The value of enzymes in solar fuels research—Efficient electrocatalysts through evolution. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 2039–2052
- 42 Wu B, Atkinson J T, Kahanda D, et al. Combinatorial design of chemical-dependent protein switches for controlling intracellular electron transfer. *AIChE J*, 2020, 66: e16796

- 43 Taylor S S, Meharena H S, Kornev A P. Evolution of a dynamic molecular switch. *IUBMB Life*, 2019, 71: 672–684
- 44 Sharp R E, Chapman S K. Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins. *Biochim Biophys Acta-Protein Struct Molec Enzym*, 1999, 1432: 143–158
- 45 Hosseinzadeh P, Marshall N M, Chacón K N, et al. Design of a single protein that spans the entire 2-V range of physiological redox potentials. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 262–267
- 46 Key H M, Dydio P, Clark D S, et al. Abiological catalysis by artificial haem proteins containing noble metals in place of iron. *Nature*, 2016, 534: 534–537
- 47 Lancaster K M. Revving up an artificial metalloenzyme. *Science*, 2018, 361: 1071–1072
- 48 Ing N L, El-Naggar M Y, Hochbaum A I. Going the distance: Long-range conductivity in protein and peptide bioelectronic materials. *J Phys Chem B*, 2018, 122: 10403–10423
- 49 Zhang B, Song W, Pang P, et al. Observation of giant conductance fluctuations in a protein. *Nano Futures*, 2017, 1: 035002
- 50 Wang H, Liu F, Dong T, et al. Charge-transfer knowledge graph among amino acids derived from high-throughput electronic structure calculations for protein database. *ACS Omega*, 2018, 3: 4094–4104
- 51 Zhang L, Cui H, Zou Z, et al. Directed evolution of a bacterial laccase (CueO) for enzymatic biofuel cells. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 4562–4565
- 52 Yu J, Horsley J R, Abell A D. Peptides as bio-inspired electronic materials: An electrochemical and first-principles perspective. *Acc Chem Res*, 2018, 51: 2237–2246
- 53 Sung T, Namgung S D, Lee J, et al. Effects of proton conduction on dielectric properties of peptides. *RSC Adv*, 2018, 8: 34047–34055
- 54 Zernia S, Frank R, Weiße R H J, et al. Surface-binding peptide facilitates electricity-driven NADPH-free cytochrome P450 catalysis. *ChemCatChem*, 2018, 10: 525–530
- 55 Ke X, Sun J, Zheng Y G. Construction and application of the high efficient electron transfer chain for cytochrome P450 (in Chinese). *Chem Life*, 2015, 35: 733–740 [柯霞, 孙骏, 郑裕国. P450酶系中高效电子传递链的构建及应用. *生命的化学*, 2015, 35: 733–740]
- 56 Ma S, Ludwig R. Direct electron transfer of enzymes facilitated by cytochromes. *ChemElectroChem*, 2019, 6: 958–975
- 57 Ranieri A, Bortolotti C A, Di Rocco G, et al. Electrocatalytic properties of immobilized heme proteins: Basic principles and applications. *ChemElectroChem*, 2019, 6: 5172–5185
- 58 Kalyoncu E, Ahan R E, Olmez T T, et al. Genetically encoded conductive protein nanofibers secreted by engineered cells. *RSC Adv*, 2017, 7: 32543–32551
- 59 Ing N L, Spencer R K, Luong S H, et al. Electronic conductivity in biomimetic α -helical peptide nanofibers and gels. *ACS Nano*, 2018, 12: 2652–2661
- 60 Lévy R, Thanh N T K, Doty R C, et al. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 10076–10084
- 61 Aalbers F S, Fraaije M W. Enzyme fusions in biocatalysis: Coupling reactions by pairing enzymes. *ChemBioChem*, 2019, 20: 20–28
- 62 Han L, Hu Z, Sartin M M, et al. Direct nanomachining on semiconductor wafer by scanning electrochemical microscopy. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 21129–21134
- 63 Gnanndt D, Koslowski T. Long-range electron-electron interaction and charge transfer in protein complexes: A numerical approach. *Phys Chem Chem Phys*, 2019, 21: 18595–18604

补充材料

图S1 生物电催化还原制备手性化合物

表S1 生物电催化制备高附加值化合物

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “氧化还原酶电催化反应研究进展”

Advances of bioelectrocatalysis by oxidoreductases

Shizhen Wang^{*}, Kailong Liu & Dongping Zhan

College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

^{*} Corresponding author, E-mail: szwang@xmu.edu.cn

Bioelectrocatalysis attracts much attention with the advantages of high selectivity, high efficiency, no byproduct and environmental friendliness. Electrification of industrial biotechnology is challenging for the different operating conditions and catalysts of electrochemical and biochemical reactions. In this review, we present the state-of-the-art information on enzymatic electrosynthesis for the production of fine chemicals.

Multidisciplinary strategies of electrode surface modification and enzyme immobilization have been integrated in electrocatalytic devices with various applications in biosensors and bioelectrocatalysis. However, the efficiency of bioelectrosynthesis is determined by the intramolecular electron transfer rate, and interfacial electron transfer rate between the oxidoreductases and electrode. This review aims to summarize recent progresses on the mechanism studies of intramolecular electron transfer of redox proteins, including tunneling, hopping, proton-coupled electron transfer, etc. Modular origin of electron transfer chain was also discussed from the perspective of the evolution of spatial adjacency network.

Novel and efficient oxidoreductases with enhanced intramolecular and interfacial electron transfer rate can be obtained by protein engineering. The strategies for facilitating intramolecular electron transfer are addressed, which includes the regulation of co-evolved electron transfer network, the designs of molecular switch and the assembly of conductive modules. Oxidoreductases are engineered to improve their biocatalytic performance by using the tools of molecular evolution, modeling, structure prediction, and mutation. Co-evolved molecular switches control proton-coupled electron transfer and regulate electron transfer inside the multi-center redox proteins. Assembly of surface-binding conductive peptides to oxidoreductases facilitates electricity-driven catalysis. Moreover, the modifications of oxidoreductases allow their predictable immobilization on functionalized electrode surface with improved stability, controlled orientation, surface coverage and enhanced electron transfer. After that, electron transfer within a series of well-defined peptides with orientation-controlled and surface-confined enzymes was addressed.

Strategies also developed to increase the biocompatible active surface of electrodes and to promote charge transfer reactions. Nano- and macroporous electrodes based on metal nanoparticles, nanocarbon tubes, graphene, and metallic inverse opals have been designed and fabricated with predictable surface functionalities and electrochemical properties. Electrode/mediator/cofactor/enzyme conjugates can enhance the *in vitro* bioelectricity generation of cofactor. Screening of redox mediators for electrochemical regeneration of NADH was also summarized. Multifunctional surfaces of nano or meso-porous electrodes, where oxidoreductases were bounded to structured electrodes with necessary components (e.g., mediators, cofactor, etc.) with tailored properties, were summarized. Optimizations of functional electrode materials and surfaces can improve the efficiency of cofactor regeneration in the electrochemical reactor modules.

Key challenges and future research for better bioelectrocatalysis are discussed and expected briefly. Mining and engineering of novel and robust enzymes from genomic and metagenomic libraries would benefit the bioelectrocatalysis. Based on genome mining, discovery of novel oxidoreductases from extreme microorganism provide thermophilic, alkalophilic, halophilic and organic solvent tolerant oxidoreductases. Reactors for bioelectrocatalysis are optimized to provide a platform for the production of chiral chemicals, which brings great promises for biomanufacturing. Further study of bio-inspired multi-enzyme immobilization which mimics quick electron transfer in multi-enzyme complex is suggested.

A variety of approaches for bioelectrocatalysis have been successfully applied for the synthesis of chiral chemicals which are intermediates of fine chemicals and pharmaceuticals. Bioelectrosynthesis processes could replace many chemically catalyzed routes in the future, and aims to construct a new platform for more efficient and green biomanufacturing.

oxidoreductase, bioelectrocatalysis, cofactor regeneration, molecular switch, co-evolution, electron transfer

doi: [10.1360/TB-2020-1313](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1313)