生物-化学复合纳米催化剂体系应用基础研究

戈钧

清华大学化学工程系, 北京 100084

E-mail: junge@mail.tsinghua.edu.cn

2016-10-28 收稿, 2016-11-20 修回, 2016-11-22 接受, 2016-12-02 网络版发表

国家重点研发计划纳米科技重点专项(青年科学家项目)(2016YFA0204300)资助

摘要 细胞具有精确、高效的分子合成能力, 细胞内复杂的多酶体系具有纳米尺度多层次构建的基本特征, 纳米邻近效应、区域化效应、限域效应等是其高效催化的重要基础。“去细胞之复杂, 取细胞之精华”, 提取细胞生物催化关键元件, 并以化学催化替代其中的局限步骤, 模拟细胞内多级结构和纳米效应, 设计简单、高效、稳定的生物-化学复合纳米催化剂, 有望再现甚至超越细胞的催化能力, 为传统工业生物催化提供革新技术。本项目以化学工业可持续发展的需求为导向, 重点研究生物-化学复合纳米催化剂构筑及其工业化应用中的重要科学问题, 并探索应用于手性化合物制备的工业催化过程。

关键词 生物催化, 生物-化学复合催化, 手性合成

生物技术的发展已经使得人们可以根据需要来便捷地设计、构建、表达并且规模化生产酶, 为酶催化更加广泛地应用于药品生产、医学检测、食品制造和精细化工等领域提供了有力的支持。将自然界所进化出的催化功能丰富的酶及其所展现出的高催化活性和立体选择性运用于化学工业制备手性化合物将有望提高产品纯度、缩短生产工艺、简化产品分离。例如, 利用转氨酶催化合成治疗糖尿病药物磷酸西他列汀^[1], 一步即可合成99.95% e.e.的手性中间体, 产率提高13%, 产量提高53%, 同时减少废物排放19%, 可替代原有的高压加氢还原和手性分离的较为复杂的制备工艺。相对于酶催化的单一反应, 细胞催化利用胞内复杂的多酶催化反应, 具有更为精确、高效的分子合成能力^[2]。但工业上直接利用细胞作为催化载体存在成本较高、杂酶副反应干扰、细胞壁导致传质受限、细胞乳化影响产品分离等一些缺点。如何认识细胞高效的催化系统, 并以此为基础来设计人工多酶/酶-化学催化系统一直以来是生物催化领

域研究的重要问题。随着分子生物学、结构生物学的快速发展, 人们已经认识到细胞内复杂的多酶体系具有纳米尺度多层次构建的一些基本特征, 纳米邻近效应、区域化效应、限域效应等是细胞高效催化的重要基础^[3~5]。另一方面, 随着近年来纳米科技尤其是纳米催化的快速进步, 无机纳米催化剂能够非常高效地催化丰富的非天然化学反应, 并且可以简捷地实现电子传递、光电转换等自然界复杂的物化过程。将生物催化剂和无机纳米催化剂相结合为人工实现自然界复杂的催化过程提供了新的可能性, 也为生物化学制造中能量和物质的高效利用提供了新途径, 成为催化领域研究的热点, 并有望为绿色可持续发展的化学工业提供新的催化技术。例如, 采用高效光捕集CdS 纳米晶体光敏化非光合作用细菌, 使其利用二氧化碳在光照下生成乙酸, 为人工光合作用固碳用于绿色制造提供了新途径^[6]; 采用CdS 纳米晶体介导的光驱动钼铁蛋白将氮气还原生产无机氨, 为人工固氮提供了新思路^[7]; 利用无机纳米催化

引用格式: 戈钧. 生物-化学复合纳米催化剂体系应用基础研究. 科学通报, 2016, 61: 3924–3929

Ge J. Biocatalyst and nanocatalyst integrated systems for chemical production (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 3924–3929, doi: 10.1360/N972016-01164

剂光驱动催化辅因子还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的循环再生,并且实现人工光合作用制备化学品等^[8~11]。“去细胞之复杂,取细胞之精华”,提取细胞生物催化的关键元件(例如酶、多酶),并以化学催化替代生物催化反应中的局限步骤,模拟细胞内多级结构和纳米效应,设计简单、高效、稳定的生物-化学复合纳米催化剂,有望再现甚至超越细胞的催化能力,为传统工业生物催化提供颠覆性的革新技术。多种精准调控的协同自组装方法构建生物纳米复合结构^[12~17],为设计生物-化学复合纳米催化剂提供了可能的方法和启发;纳米酶/多酶催化领域的许多杰出工作也逐渐展示了酶/多酶体系在纳米限域空间中的催化规律^[18~28],也为开展生物-化学复合纳米催化的研究积累了基础。通过完成国家重点研发计划纳米科技重点专项“生物-化学复合纳米催化剂体系应用基础研究”(青年科学家项目),在生物-化学复合纳米催化剂设计和构建上做出具有国际影响的原创性成果,形成生物-化学复合纳米催化剂的设计、制备和应用技术平台,开发应用于手性化合物制备的生物-化学复合纳米催化工艺,凝聚和培养具有国际影响的多学科交叉青年研究人才和团队。

1 研究内容

细胞内多酶体系经过长期自然进化,其微观纳米结构具有必然的功能性作用。模拟细胞催化的高效性,在体外构筑人工催化体系,需要认识细胞内多酶体系的多层次纳米结构和多重纳米效应的科学原理,研究其体外作用规律。这一过程中无疑会存在很多复杂的科学难题。本项目的科学目标是探索细胞内多重纳米效应在人工生物-化学复合纳米催化剂构筑中表现的作用机制等相关科学规律。围绕这一核心目标,以下关键科学问题值得深入研究(图1): (1) 细胞内纳米效应的体外作用规律及其对生物-化学复合催化过程的影响机制; (2) 生物-化学复合纳米催化剂体系的自组装原理、适配机制及其工业应用的实现策略。除上述关键科学问题外,设计制备生物-化学复合纳米催化剂,并进一步应用于手性化合物制备的工业催化实际过程,还存在着以下需要重点解决的关键技术问题(图1): (1) 生物-化学复合纳米催化剂的宏量制备技术; (2) 生物-化学复合纳米催化过程的工程放大技术和反应器设计。

手性化合物的制备,例如手性胺拆分和手性醇合成具有重要的工业应用价值,也是典型的工业生物催化研究体系。利用脂肪酶手性拆分和纳米金属催化剂外消旋化的耦联可以实现动态动力学拆分,提高光学纯对映体的收率;利用醛酮还原酶不对称催化和纳米光催化剂驱动辅因子再生的耦联可以实现手性醇合成,避免因使用辅酶和辅底物造成的额外物耗及能耗。分别采用上述两种酶和纳米催化耦合体系有望开发针对手性胺和手性醇的高效制备方法。将“柔性”酶催化剂的立体选择性优势和“刚性”无机纳米催化剂简单、高效、稳定的特点相结合,可设计和构建出“刚柔并济”的生物-化学复合纳米催化剂,并且依靠酶与无机纳米催化剂结合物-支架蛋白-金属有机骨架复合物的三级有序结构来激发多重纳米效应的协同作用,同时借助于化学和热稳定的金属有机骨架材料的限域包埋提高催化剂结构以及酶的催化稳定性,从而最终利用纳米技术解决生物学方法难以克服的典型工业生物催化过程的关键问题,以期实现纳米技术在工业生物催化领域应用的重大突破。为实现上述目标,需要重点开展以下4方面研究(图2): (1) 设计原理: 生物-化学催化纳米效应的作用规律研究; (2) 精准构筑: 关键元件的结构设计、分子进化、可控制备和复合纳米催化剂的组装适配; (3) 宏量制备: 生物-化学复合纳米催化剂的一步批量制备技术; (4) 催化应用: 生物-化学复合纳米催化手性化学品中试规模制备。

图1 (网络版彩色)生物-化学复合纳米催化剂制备和应用中需要解决的关键科学和技术问题

Figure 1 (Color online) Key scientific and technical problems in the preparation and application of biocatalyst and nanocatalyst integrated systems

图 2 (网络版彩色)生物-化学复合纳米催化剂的制备和催化应用

Figure 2 (Color online) Preparation and application of biocatalyst and nanocatalyst integrated systems

(i) 设计原理. 利用水溶液共沉淀包埋技术, 将酶和无机纳米催化剂分别或同时包埋于金属有机骨架(MOF)材料中, 通过该方法可以建立复合催化剂的基本模型, 包括纳米限域效应、邻近效应和区域化效应模型等. 通过催化动力学、计算化学等手段研究模型中纳米限域效应、邻近效应和区域化效应的单一作用规律, 并且深入探讨MOF的化学组成、孔道结构和微环境等对各种纳米效应的影响机制, 为复合催化剂设计和构建提供理论依据.

(ii) 精准构筑. 首先通过基因工程设计黏合域融合蛋白(支架蛋白)、酶-锚定域融合蛋白的分子结构, 在此基础上结合基因随机突变和微流控液滴高通量筛选来实现重组酶的定向进化和高效表达. 采用原位合成法和化学耦联法制备酶-无机纳米催化剂结合物, 基于黏合域-锚定域间的分子识别作用可以

在溶液中形成酶-无机纳米催化剂结合物与支架蛋白的复合体. 再进一步基于蛋白和金属离子的间配位作用, 可以实现复合体与MOF的自组装. 在这样一个生物-化学多元、多级的单步协同组装过程中, 各组装元件之间的适配规律、可调节性是需要深入研究的主要内容, 通过对该内容的研究最终构建具有高催化效率的生物-化学复合纳米催化体系, 通过各关键元件的调节也实现对各种纳米效应的精确调控.

(iii) 宏量制备. 在精准构筑研究的基础上, 将各关键元件溶液通过喷雾干燥技术实现快速混合、溶剂挥发组装, 宏量制备复合纳米催化剂. 深入研究微尺度快速混合下多级纳米结构的组装行为, 通过对温度、液流、气流、液滴大小、混合模式等关键因素考察, 来探索快速制备对纳米催化剂结构性能的影响规律, 从而开发出满足要求的宏量制备技术.

(iv) 催化应用. 针对手性醇、手性胺这两个工业生物催化产品生产中的现有技术难题, 进一步研究生物-化学复合纳米催化的应用. 手性胺酶催化动力学拆分过程中, 单步酶催化收率很低(仅有50%理论收率), 而采用脂肪酶-金属纳米颗粒动态动力学拆分则可以显著提高产率(100%理论收率). 手性醇的醛酮还原酶催化合成过程中, 单步酶催化往往需要大量添加昂贵的辅因子, 而采用醛酮还原酶催化结合光催化可在手性醇化合物合成的同时实现辅因子的再生和循环使用. 通过多重纳米效应协同作用以及酶分子进化的调控手段可以使得上述两个实际体系达到理想的催化效率、选择性和稳定性, 评价多重纳米效应在生物-化学复合纳米催化剂体系中的协同作用. 进一步针对复合纳米催化剂的反应特征, 设计批式反应器以及加热/光照管式反应器, 并耦合膜分离过程, 实现反应过程强化, 进行重要手性胺和手性醇产品的生物-化学级联催化制备.

上述研究内容具有化学化工相协同、纳米技术与生物技术相结合、基础研究和工业应用相贯通的典型特征, 在化学法构建纳米生物催化剂、基因工程手段设计酶纳米组装体、微液滴技术酶分子进化和高通量

筛选、复合纳米催化生产精细化学品工业应用方面开展具体工作, 有望形成生物-化学复合纳米催化剂的设计原理、精准构筑、宏量制备和催化应用的全链条一体化研究.

2 结语与展望

生物-化学复合纳米催化剂构建新方法的研究有望利用多级有序的生物-化学复合纳米催化剂的精准构筑来实现细胞内生物催化过程纳米效应的体外化, 提高生物-化学复合催化效率, 为均相催化、多相催化和酶催化的融合提供新策略和新思路. 手性化合物在医药、精细化工、农药、功能材料等领域具有广泛应用. 手性醇与手性胺是两类重要且基本的手性化合物, 是构建许多复杂手性分子的基本砌块. 本项目制备生物-化学复合纳米催化剂, 将金属催化消旋化与酶催化拆分相结合制备手性胺, 将光驱动辅因子再生应用于羰基还原催化合成手性醇, 期望解决现有化学法和生物法制造手性化合物的关键技术难题, 形成手性醇、手性胺产品的工业催化合成新方法, 在技术开发方面有助于提升生物催化合成手性醇与手性胺的竞争力, 实现手性化合物制备工业的产业升级.

参考文献

- 1 Savile C K, Janey J M, Mundorff E C, et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science*, 2010, 329: 305–309
- 2 Nielsen J. Yeast cell factories on the horizon. *Science*, 2015, 349: 1050–1051
- 3 Hyde C C, Ahmed S A, Padlan E A, et al. Three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 1988, 263: 17857–17871
- 4 An S, Kumar R, Sheets E D, et al. Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science*, 2008, 320: 103–106
- 5 Medalia O, Weber I, Frangakis A S, et al. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*, 2002, 298: 1209–1213
- 6 Sakimoto K K, Wong A B, Yang P. Self-photosensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production. *Science*, 2016, 351: 74–77
- 7 Brown K A, Harris D F, Wilker M B, et al. Light-driven dinitrogen reduction catalyzed by a CdS:nitrogenase MoFe protein biohybrid. *Science*, 2016, 352: 448–450
- 8 Yadav R K, Oh G H, Park N J, et al. Highly selective solar-driven methanol from CO₂ by a photocatalyst/biocatalyst integrated system. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 16728–16731
- 9 Yadav R K, Baeg J O, Oh G H, et al. A photocatalyst-enzyme coupled artificial photosynthesis system for solar energy in production of formic acid from CO₂. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 11455–11461
- 10 Kim J H, Nam D H, Park C B. Nanobiocatalytic assemblies for artificial photosynthesis. *Curr Opin Biotech*, 2014, 28: 1–9
- 11 Kim D, Sakimoto K K, Hong D, et al. Artificial photosynthesis for sustainable fuel and chemical production. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 3259–3266
- 12 Kim Y, Macfarlane R J, Jones M R, et al. Transmutable nanoparticles with reconfigurable surface ligands. *Science*, 2016, 351: 579–582
- 13 Auyeung E, Li T, Senesi A J, et al. DNA-mediated nanoparticle crystallization into Wulff polyhedra. *Nature*, 2014, 505: 73–77

- 14 Macfarlane R J, Jones M R, Lee B, et al. Topotactic interconversion of nanoparticle superlattices. *Science*, 2013, 341: 1222–1225
- 15 Li M, Harbron R L, Weaver J V M, et al. Electrostatically gated membrane permeability in inorganic protocells. *Nat Chem*, 2013, 5: 529–536
- 16 Huang X, Li M, Green D C, et al. Interfacial assembly of protein-polymer nano-conjugates into stimulus-responsive biomimetic protocells. *Nat Commun*, 2013, 4: 2239
- 17 Koga S, Williams D S, Perriman A W, et al. Peptide-nucleotide microdroplets as a step towards a membrane-free protocell model. *Nat Chem*, 2011, 3: 720–724
- 18 Ge J, Lei J, Zare R N. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 428–432
- 19 Liu J, Bai S, Jin Q, et al. Enhanced thermostability of enzymes accommodated in thermo-responsive nanopores. *Chem Sci*, 2012, 3: 3398–3402
- 20 Wang X, Li Z, Shi J, et al. Bioinspired approach to multienzyme cascade system construction for efficient carbon dioxide reduction. *ACS Catal*, 2014, 4: 962–972
- 21 Chen Z, Zhou L, Bing W, et al. Light controlled reversible inversion of nanophosphor-stabilized pickering emulsions for biphasic enantioselective biocatalysis. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 7498–7504
- 22 Ji X, Su Z, 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. *ACS Nano*, 2015, 9: 4600–4610
- 23 Lyu F, Zhang Y, Zare R N, et al. One-pot synthesis of protein-embedded metal-organic frameworks with enhanced biological activities. *Nano Lett*, 2014, 14: 5761–5765
- 24 Shieh F K, Wang S C, Yen C I, et al. Imparting functionality to biocatalysts via embedding enzymes into nanoporous materials by a de novo approach: Size-selective sheltering of catalase in metal-organic framework microcrystals. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 4276–4279
- 25 Liang K, Ricco R, Doherty C M, et al. Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules. *Nat Commun*, 2015, 6: 7240
- 26 Feng D, Liu T, Su J, et al. Stable metal-organic frameworks containing single-molecule traps for enzyme encapsulation. *Nat Commun*, 2015, 6: 5979
- 27 Li P, Moon S Y, Guelta M A, et al. Encapsulation of a nerve agent detoxifying enzyme by a mesoporous zirconium metal-organic framework engenders thermal and long-term stability. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 8052–8055
- 28 Li P, Moon S Y, Guelta M A, et al. Nanosizing a metal-organic framework enzyme carrier for accelerating nerve agent hydrolysis. *ACS Nano*, 2016, 10: 9174–9182

Biocatalyst and nanocatalyst integrated systems for chemical production

GE Jun

Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

The development of biotechnology has made it possible to easily design and produce enzyme as needed, providing a powerful tool for the wide application of enzymatic catalysis in the fields of pharmaceutical production, bioanalysis, food manufacturing and fine chemicals industry. Enzymes with abundant catalytic functions and high catalytic activity and stereo-selectivity in the preparation of chiral compounds in the chemical industry are expected to improve the purity of the products, shorten the production process and simplify the separation of products. The cells which containing multiple enzymes inside have the ability of accurate and highly efficient synthesis. The multi-enzyme complex in cells has the characteristics of nano-scale and multi-level construction. The nano-proximity effect, compartmentalization effect and confinement effect are the important basis of efficient enzymatic catalysis in cells. However, the direct use of cells as catalysts in industry may cause a high cost, complex interference within the multiple enzymatic reactions, limited mass transfer within cell walls, difficulty in product separation due to the emulsion effect of cells and other shortcomings. On the other hand, with the rapid progress of nanotechnology, especially nanocatalysis in recent years, inorganic nanocatalysts can catalyze abundant non-natural reactions very efficiently, and can easily realize the physical and chemical processes of electron transfer and photo-electric conversion. The combination of biocatalysts and inorganic nanocatalysts opens new possibilities to mimic the complex catalysis processes in nature, and also provides a new way for the efficient utilization of energy and matter in biochemical manufacturing. It is an emerging and promising topic in the field of catalysis and is expected to provide new catalytic technologies for the green and sustainable chemical industry. Inspired by the intracellular multi-level organization and nano-effects of biocatalytic machines of cells and based on the concept of “Simply the complexity of cells, and take the essence of cells”, we aim at extracting the key building blocks of biocatalytic machines of cells, replacing the limitations of biocatalytic processes by chemical catalysis, and then constructing simple, highly efficient and stable biocatalyst and nanocatalyst integrated systems. The biocatalyst and nanocatalyst integrated systems are expected to reproduce and even beyond the catalytic capability of cells, which would provide an innovative way to produce chemicals compared to traditional industrial biocatalysis. The project is based on the needs of sustainable development of chemical industry of China and focuses on the following major scientific issues: (1) the role of intracellular nano-effects in biocatalyst and nanocatalyst integrated systems, (2) the self-assembly principle, the adaptation mechanism and the realization strategy of industrial application of such biocatalyst and nanocatalyst integrated systems. Based on the research into the above key scientific problems, the project also targets to the following key technological challenges: (1) the massive preparation of biocatalyst and nanocatalyst integrated systems, (2) the large-scale catalytic process and reactor design using biocatalyst and nanocatalyst integrated systems as catalysts.

biocatalysis, chemo-enzymatic catalysis, asymmetric synthesis

doi: 10.1360/N972016-01164