

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-018

酶促生物电催化系统的设计构建与强化

崔馨予^{1,2}, 吴冉冉¹, 王园明¹, 朱之光^{1,2,3}

(¹ 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308; ² 中国科学院大学, 北京 100049; ³ 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308)

摘要: 酶促生物电催化是一种绿色高效的催化技术, 充分结合了生物酶催化和电催化的优点, 可实现化学能和电能的相互转换, 目前已在生物发电、电能存储、CO₂固定、传感与监测等方面受到广泛关注。本综述分析了酶促生物电催化的发展现状与当前面临的挑战, 从合成生物学的角度详细介绍了氧化还原酶的结构功能和酶促生物电催化系统的基本要素, 探讨了酶的改造, 包括定向进化、理性设计和引入非天然组件等, 以及通过构建多酶复合体模块和强化生物-非生物界面电子传递等方法以提高系统性能。围绕电子传递和能量转化效率等问题, 阐述了酶的定向固定方法、电子传递机制以及电极材料设计原则。此外, 总结了酶促生物电催化技术在酶燃料电池、生物传感器、化学品酶电合成等合成生物学相关领域的前沿应用。最后, 本文展望了未来前景, 并提出了从设计改造电活性生物元件、拓宽反应电势、放大反应系统等方面进一步提升酶促生物电催化系统的性能和可应用性。

关键词: 酶促生物电催化; 氧化还原酶; 酶工程; 电子传递; 酶电极

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

Construction and enhancement of enzymatic bioelectrocatalytic systems

CUI Xinyu^{1,2}, WU Ranran¹, WANG Yuanming¹, ZHU Zhiguang^{1,2,3}

(¹Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³National Synthesis of Biotechnology Innovation Center, Tianjin 300308, China)

Abstract: Enzymatic bioelectrocatalysis, as a green and efficient catalytic technology, combines the advantages of enzymatic catalysis and electrocatalysis to enable the interconversion between chemical energy and electrical energy. It has received extensive attention in the fields of bioelectricity generation, electric energy storage, CO₂ fixation, biosensing and monitoring, and so on. This review analyzes the recent developments and challenges of enzymatic bioelectrocatalysis. From the perspective of synthetic biology, the structure and function of oxidoreductases which catalyze many biological electron transfer reactions with high speed, selectivity and specificity, and the basic elements of enzymatic bioelectrocatalytic systems are introduced in detail. Strategies of enzyme engineering are discussed,

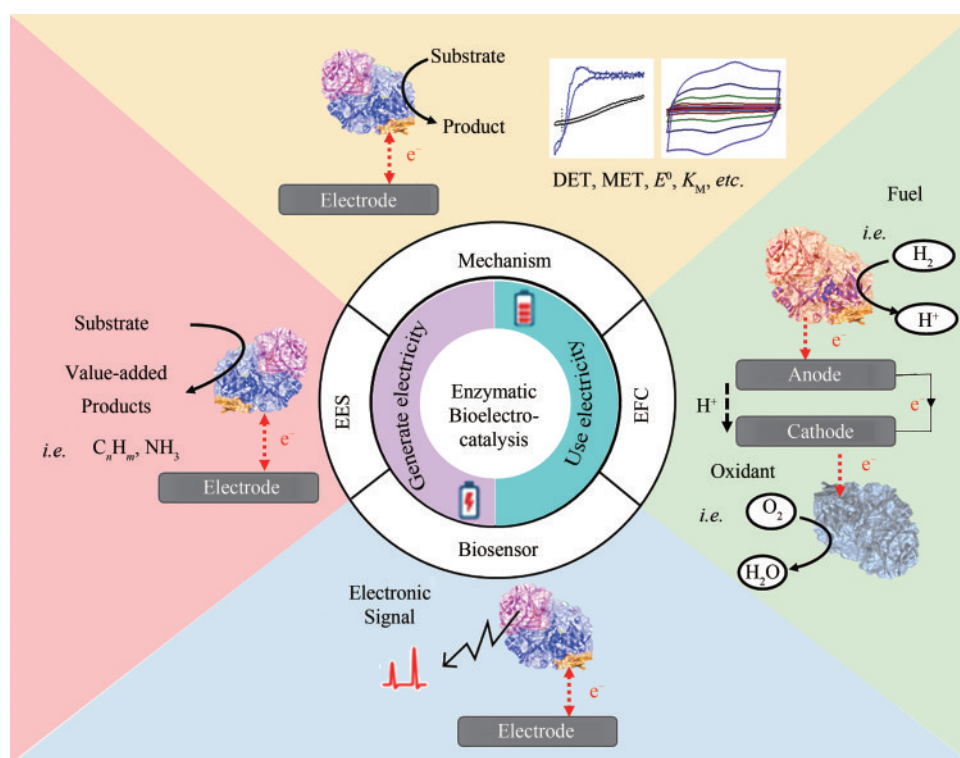
收稿日期: 2022-04-01 修回日期: 2022-06-22

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFA0910400); 国家自然科学基金 (21878324, 32101220)

引用本文: 崔馨予, 吴冉冉, 王园明, 朱之光. 酶促生物电催化系统的设计构建与强化[J]. 合成生物学, 2022, 3(5): 1006-1030

Citation: CUI Xinyu, WU Ranran, WANG Yuanming, ZHU Zhiguang. Construction and enhancement of enzymatic bioelectrocatalytic systems [J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(5): 1006-1030

including directed evolution, rational design, and the introduction of non-natural structural components. In addition, the construction of multienzyme complex modules and the enhancement of electron transfer at the biology-abiotic interface, both of which can improve the system performance, are presented. The issues of electron transfer and energy conversion efficiency are further highlighted, and the oriented immobilization of enzymes, electron transfer mechanism, and electrode material modification are discussed. Furthermore, some recent applications of enzymatic bioelectrocatalysis in the frontier fields of synthetic biology are summarized, including enzymatic fuel cells, biosensors, and enzymatic electrosynthesis. Taken together, this review proposes the future directions of engineering bioelectroactive parts, broadening reaction redox potentials, and scaling up reaction systems, in order to further boost the performance of enzymatic bioelectrocatalysis as well as increase its applicability.



Keywords: enzymatic bioelectrocatalysis; oxidoreductase; enzyme engineering; electron transfer; enzymatic electrode

酶促生物电催化 (enzymatic bioelectrocatalysis) 是指以氧化还原酶为生物催化剂, 在电极上发生的催化反应^[1-2]。在酶的催化作用下, 阳极将底物氧化, 产生电子; 阴极则可利用电子将底物还原, 生成产物 (图1)。根据电子传递方式不同, 分为直接电子传递 (direct electron transfer, DET) 和间接电子传递 (mediated electron transfer, MET)。酶促生物电催化结合了生物催化剂高活性、高选择性、温和反应条件, 以及电催化可利用可再生

电能作为电子源和高能量转换效率的优势, 已广泛应用于生物传感器和生物燃料电池的构建。此外, 酶促生物电催化在合成化学品、生物燃料和材料等方面也开辟了新的研究方向。与传统生物催化相比, 酶促生物电催化利用电极作为电子供体或受体与氧化还原酶的催化反应相耦合^[3], 无需额外添加其他酶或共底物, 还可通过改变电极电势调节催化反应的速度和方向, 具有更高的系统灵活性和便捷性。

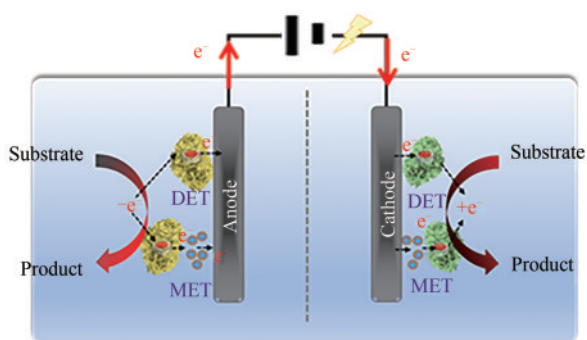


图1 酶促生物电催化系统示意图

Fig. 1 Schematic of an enzymatic bioelectrocatalytic system

Nature Catalysis 杂志2020年3月刊关于人工生物催化系统特刊中的8篇综述有3篇与生物(光)电催化相关,可见越来越多研究开始关注利用电化学、材料科学等交叉技术拓展生物催化范畴,并聚焦于可持续发展^[4-6]。目前酶促生物电催化的主要应用领域包括酶燃料电池(enzymatic fuel cell, EFC)、酶生物传感器(enzymatic biosensor)和酶电合成(enzymatic electrosynthesis, EES)^[3, 7-8]。其中,酶燃料电池利用氧化还原酶的催化作用将底物的化学能转化为电能,未来有望为便携式、穿戴式和植入式电子器件供电^[9]。酶电合成利用电能驱动相应酶元件合成目标产物,可实现废弃、冗余电能的高效存储和转化,以及为高能化学品合成提供额外的清洁能源^[10]。酶生物传感器则通过酶和目标分析物发生反应产生的电子作为可检测信号,以获得有关目标分析物类型和浓度的相关信息,在健康、环境、食品等监测领域都有应用潜力^[10]。

酶促生物电催化的特征是在电极界面上发生氧化还原反应。因此,酶的催化行为,以及酶分子内部、酶与酶之间、酶与电极之间的电子传递是影响酶促生物电催化系统性能的关键因素。本文基于合成生物学的原理和方法,重点介绍了常用的氧化还原酶元件及其设计改造策略、多酶模块组装与途径构建、固定化酶电极构建、界面电子传递强化以及相关的应用系统。在总结最新研究成果的基础上,希望为未来新型生物电催化剂的开发、生物电子传递机制的研究以及酶促生物电催化产品的拓展提供有益思路。

1 酶元件的设计改造

1.1 氧化还原酶简介

根据辅因子的不同,氧化还原酶分为两类:一类是以血红素(heme)、铁-硫簇(Fe-S)、钼、铜等为活性中心的金属酶;另一类是含有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)、黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)、吡咯喹啉酮(pyrroloquinoline quinone, PQQ)等的非金属酶^[11-16]。血红素酶的氧化还原中心由含4个亚甲基桥的吡咯环组成的卟啉环以及与中心配位的Fe(II)或Fe(III)组成^[11]。血红素b作为最常见的血红素广泛存在于肌红蛋白、血红蛋白和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP),分别具有运输氧、储存氧和催化过氧化物分解的功能。Fe-S簇氧化还原酶是借助组氨酸或半胱氨酸残基的含硫配体与铁离子配位结合的酶,例如铁氧还蛋白、氢酶和固氮酶^[17-18]。铁氧还蛋白以电子载体的形式在电子供体和受体蛋白之间传递电子,如假单胞氧还蛋白^[12]。氢酶中Fe-S簇的主要功能是通过氢氧化保护代谢过程。对于含NiFe和Fe的氢酶,经Fe-S簇底物通道将H⁺/H₂从活性位点运送到蛋白质表面,与底物进行电子交换^[19]。固氮酶通过其催化蛋白(MoFe、VFe和FeFe蛋白)与ATP水解电子转移铁蛋白(Fe蛋白)的金属蛋白复合物解离、ATP水解以及无机磷酸盐(Pi)形成来实现从N₂到氨的合成^[20-21]。含铜蛋白主要是利用电子和氧的转移来催化氧化反应,通常与氧化有机/无机自由基有关,它们几乎只在O₂或NO_x化合物的代谢过程中起作用,例如漆酶^[22]。多铜活性位点的氧化还原电位与蛋白质底物的特异性及其氧化酚底物的能力密切相关,这是由伴随分子氧还原的热力学驱动决定的^[13]。黄素酶是以FAD或FMN为辅酶的一组氧化还原酶,包括很多重要的脱氢酶。当一个电子从还原的黄素转移到氧时,会形成超氧化物和黄素自由基组成的复合物,能够催化多种氧化反应,包括羟基化、环氧化和Baeyer-Villiger氧化反应,具有很高的区域选择性和对映选择性^[23]。

PQQ 依赖型氧化还原酶通过辅因子 Ca^{2+} 与脱辅基酶进行配位后, 电子通过 PQQ 从底物转移到血红素基团, 最后转移到电子受体^[15]。与 NAD [-320 mV, 相对于标准氢电极 (standard hydrogen electrode, SHE)] 或 FAD (-450 mV) 相比, PQQ 能够在更高的氧化还原电位 (+90 mV) 下被两个电子还原^[15], 且 PQQ 氧化态的 C5 羰基对醇、氨、胺、氰化物和氨基酸等亲核试剂反应强烈^[24]。此外, 一些 PQQ 依赖型酶可以将电子直接转移到电极表面或导电聚合物^[25]。

1.2 改造方法与策略

在过去的几十年中, 氧化还原酶的蛋白质工程改造在酶促生物电催化领域取得了显著进展。采用理性设计、定向进化和组合策略可成功改善酶学性质, 包括热稳定性、最适 pH、活性/稳定性、对盐的耐受性以及辅酶偏好性等, 从而增强电催化性能^[26-28] (表 1)。

1.2.1 定向进化

定向进化是一种模拟自然选择对酶进行改造的有效方法^[52], 包括两个关键步骤: 构建含有足够多突变体的文库, 以及对文库建立筛选方法^[53]。通过定向进化, 研究人员增强了葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase, GOx) 的氧化活性并降低了其对氧气的敏感性, 使之更加适用于酶燃料电池和生物传感器^[29, 54]。Zhang 等^[30] 建立了一套基于氧化还原电势的高通量筛选方法, 利用多通道恒电位仪搭载多电极阵列对 96 孔板中表达的漆酶 (copper efflux oxidase, CueO) 进行评估, 从饱和突变文库筛选出的 D439T/L502K 突变体显著降低了阴极氧还原的过电位并将电池输出功率提高了 1.72 倍 [图 2(a)]。酶促生物电催化系统中降低阳极 pH 是构建高性能酶燃料电池的有效策略, 但低 pH 对一般酶的活性和稳定性影响较大, 不利于电池的长期运行。Ma 等^[31] 利用定向进化筛选出了耐酸的 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGDH) 和黄递酶 (diaphorase, DI), 其 pH 5.4 下的催化效率与野生型相比分别提高了 42 倍和 4 倍, 且稳定性也有所改善 [图 2(b)]。

1.2.2 理性设计

理性设计需基于蛋白质结构及催化机理的详细信息, 针对蛋白质的活性位点或结构域, 利用计算机辅助设计并且借助各种生物信息学的工具和算法预测不同位点突变后对酶活力、底物特异性以及蛋白质稳定性等方面的影响, 以改进氧化还原酶的结构和催化活性, 使其更适用于酶促生物电催化系统^[56]。例如, 将甲胺脱氢酶 (methylamine dehydrogenase, MADH) 位于底物通道具有较大空间位阻的 Phe55 残基替换为更小位阻的丙氨酸后, 对组胺的 K_m 比野生型为原来的 1/400, 其构建的组胺生物传感器检测限比野生型降低了 400%^[33]。Wegerich 等^[34] 在人细胞色素 c 血红素基团附近引入带正电荷的赖氨酸, 获得的 E66K 突变体与超氧化物的反应速率常数提高了 1 倍并显示出良好的稳定性, 使超氧化物传感器灵敏度提高了约 40%。Hiraka 等^[35] 通过计算分析 L-乳酸氧化酶 (lactate oxidase, LOx) 中氧气传递途径, 证明 A96L 突变体能够有效阻断氧通路, 极大减少氧气对传感器的干扰, 将 L-乳酸浓度响应电流的线性范围扩大了 10 倍。除了改善催化性能, 定点突变也可用于改变辅酶或电子中介体的偏好性或底物特异性, 提高酶应用于生物电催化系统的稳定性。研究表明, 将 6PGDH 与辅酶结合的相关位点突变为指定氨基酸 (N32E/R33I/T34I) 后, 辅酶特异性从 NADP 转变为 NAD, 相应电池电流密度比野生型提高约 25% [图 2(c)]^[32]。另一研究发现对葡萄糖脱氢酶 (FAD glucose dehydrogenase, FADGDH) 同源建模设计的 S326Q/S365Y 双突变体, 其对葡萄糖的特异性提高了 30 倍, 使得相应生物传感器不再受真实样品中麦芽糖的干扰^[36]。

1.2.3 非天然氨基酸的引入

天然酶元件利用氧化还原活性氨基酸残基 (Tyr、Trp、Met、Cys 等) 与辅因子作为氧化还原中心, 相对于标准氢电极, 氧化还原电位在 -700~+800 mV, 覆盖 1.5 V 的范围 [图 2(d)]^[55, 57]。近年来, 遗传密码的扩展使得一些具有新官能团和化学性质的非天然氨基酸 (unnatural amino acids, UAA) 能够被引入酶的特定位置, 以改善酶的氧化还原电势, 优化电子转移速率和人工酶的活性, 可作为改造氧化还原酶的一种新策略^[58-60]。例如, 将肌红蛋白 (myoglobin, Mb) 中的 Tyr-Cys 替换为非天然氨基酸后, 突变酶以 800 min^{-1} 的速率还

表1 酶元件设计策略及典型示例

Tab. 1 Design strategies for oxidoreductases as well as typical examples

策略	氧化还原酶	氧化还原中心	酶元件的构建	改造结果	文献
设计酶元件提高其催化性能					
定向进化	GOx	FAD	利用中介体二茂铁甲醇的筛选系统在96孔板中进行筛选	酶活性增加1.9倍,电流密度提高23%	[29]
	CueO	T1 Cu	利用多通道恒电位仪搭载多电极阵列评估氧还原过电位	降低了阴极过电位,提高1.72倍电池输出功率	[30]
	G6PDH	NADH	多轮随机诱变与双层平板筛选相结合	低pH下催化效率提高42倍,最大功率密度0.5 mW/cm ²	[31]
定点突变	6PGDH	NADP	改造与辅酶结合相关位点	辅酶偏好性从NADP ⁺ 转变为NAD ⁺ ,并实现1.75 mW/cm ² 的高功率密度	[32]
	MADH	TTQ	将Phe55替换为更小位阻的丙氨酸	K _m 为野生型的1/400	[33]
	Cyt C	heme	引入带正电荷的赖氨酸	对过氧化物的灵敏度提高40%	[34]
	LOx	FMN	设计阻断氧通路的突变位点	O ₂ 干扰减少30%,传感器检测范围扩大10倍	[35]
	GDH	FAD	预测与葡萄糖底物结合的残基构建双突变体	底物特异性提高30倍	[36]
	UAA	Mb	非天然氨基酸MtTyr替代Tyr-Cys辅助因子	还原羟胺的速率提高3倍	[37]
	P450	heme	用人工Ir代替了细胞色素P450血红素基团中的Fe	实现卡宾反应形成C—C,催化C—H功能化	[38]
	Mb	heme	人工OmeY的掺入复制了细胞色素c氧化酶的重要特征	降低了还原电位,提高2倍的周转率	[39]
设计酶元件的定向固定					
引入接头	GOx	NADH	C端添加精氨酸标记形成SAM C端与聚赖氨酸亲水链相连	将传感器检测范围扩大为0.01~100 mmol/L 将更多的中介体锚定在酶上,电流增加了2倍	[29]
	HRP	heme	C端添加了His-tag	实现DET,电子传递速率提高60%	[40]
	GDH	FAD	N端或C端添加金结合肽	实现DET,催化电流高达249 μA	[41]
定点突变	BOD	Cu	特定位置引入的半胱氨酸残基耦联形成新共价键	形成巯基,加快DET速率	[42]
	GOx	FAD	活性位点的附近突变带负电氨基酸	增加Os和酶之间的相互作用,电流增加2.4倍	[29]
化学修饰	NiFe氢酶	Fe-S	将4-甲基苄胺修饰在氨基化MWCNT上	酶空间构象改变并且在电极上重新定向固定	[43]
	CDH	FAD heme	根据静电作用构建带电的硫醇SAM	亲水性带电的硫醇SAM电流密度增加两倍	[44]
	GDH	FAD	在金电极上修饰SWCNT	实现DET和传感器110 μA·L/(mmol·cm ²)的高灵敏度	[45]
Apo-酶	GOx	FAD	PQQ作为中继单元,用配体与FAD连接作用	减少干扰物的影响,施加电位从-0.4 V减少到-0.6 V	[46]
改造酶元件以强化界面电子传递					
截短	NiFe氢酶	Fe-S	4亚基截短成2亚基	缩短电极与酶的距离,电子转移速率提高约20倍	[47]
	GDH	FAD	构建仅含有电子转移功能trβ亚基	实现DET	[48]
去糖基化	CDH	FAD heme	利用糖苷酶脱糖基化	酶尺寸的减小促进DET且电流密度增加60%	[49]
	GOx	FAD	黑曲霉表达纯化几乎完全脱糖基化	电流响应从0提高到235 μA/cm ²	[29]
辅酶再生	固氮酶	MoFe	通过ω-TA与DI升级N ₂ 固定系统	实现NADH再生,电合成手性胺浓度达到0.54 mmol/L	[50]
	FDH	NADH	与NAD构建交联体聚合物	促进电子穿梭,固定CO ₂ 法拉第效率达到22.8%	[51]

Note: G6PDH—glucose 6-phosphate dehydrogenase; GDH—glucose dehydrogenase; TTQ—tryptophan tryptophylquinone; BOD—bilirubin oxidase; CDH—cellobiose dehydrogenase; ω-TA—ω-Transaminase; FDH—formate dehydrogenase; SAM—self-assembled monolayer; MWCNT—multiwalled carbon nanotube; SWCNT—single walled carbon nanotube.

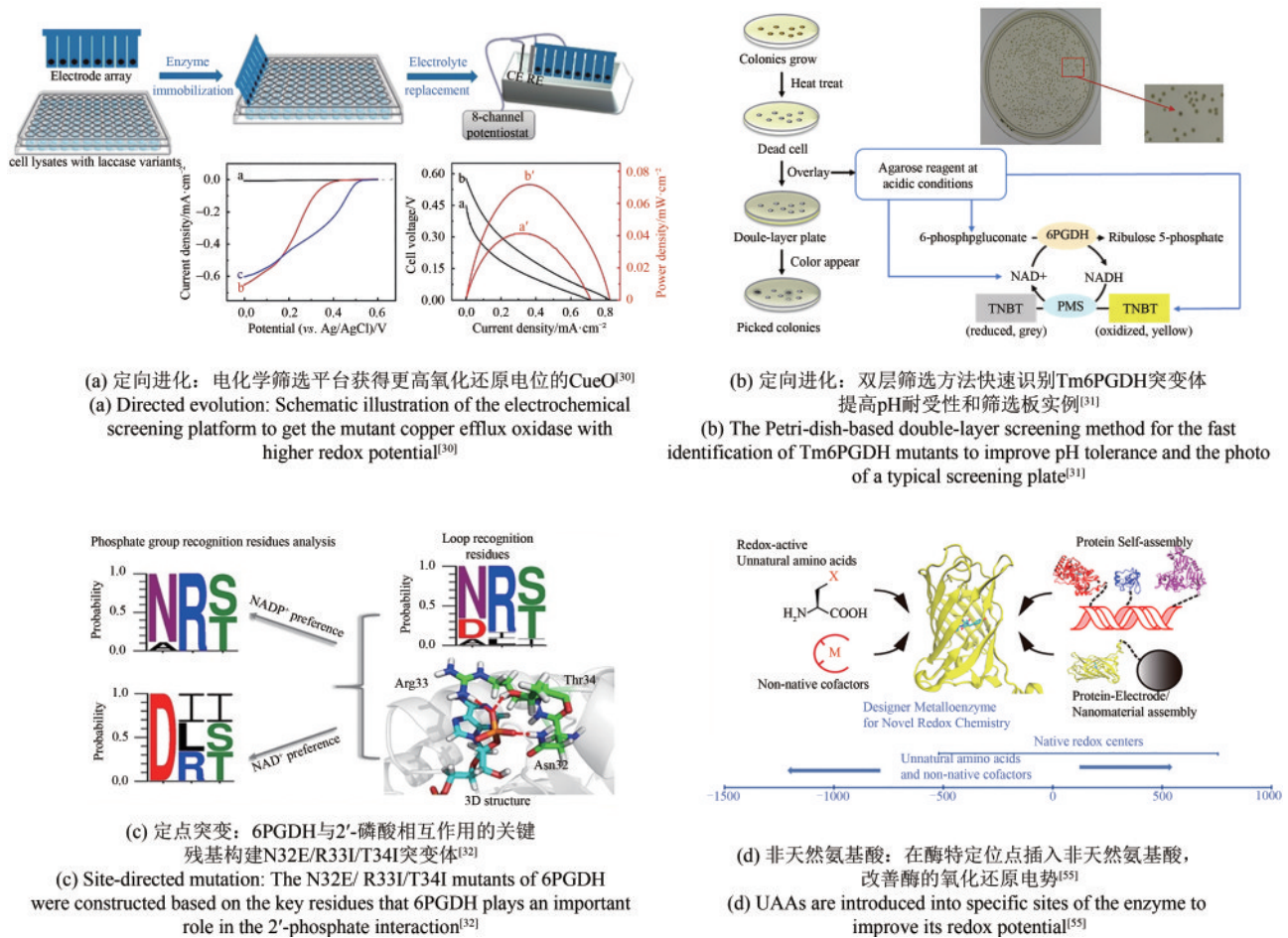


图2 氧化还原酶的改造方法与策略

Fig. 2 Methods and strategies of engineering oxidoreductases

原羟胺，比野生型提高3倍^[37]。此外，非天然氧化还原辅因子也可以替换结构相似天然辅因子，构建高活性和选择性的人工金属酶。Hartwig等^[38, 61]将含有铱等贵金属的金属卟啉作为非天然氧化还原辅因子引入肌红蛋白和P450中可进行有效的卡宾转移反应；将3-甲氧基酪氨酸OmeY整合到抹香鲸肌红蛋白功能性氧化酶中，氧化还原电位比Tyr降低179 mV，进一步揭示了调整Tyr的还原电位在氧化酶反应中的积极作用^[39]。

2 多酶模块组装与途径构建

2.1 多酶复合体模块

与单酶催化相比，多酶介导的级联反应通过模拟生物体内的多酶协同高效催化，可应用于单酶不

能有效催化的反应中，成为合成生物学的研究热点^[62]。然而，基于多酶反应的生物电催化系统由于其复杂性，也面临很大的挑战，包括每种酶的最佳操作条件不同，限速酶影响系统性能，以及难以回收所有酶。共固定化多酶可通过减少聚集、防止亚基分离、酶自溶或水解以及创造有利的微环境来提高稳定性^[63]。有效的共固定化应模拟细胞内的多酶复合体，使多种酶在空间上相互靠近，使底物或中间物从一个酶的活性中心有效地转移到另一个酶的活性中心，不仅可缩短转运和反应时间，还能减少扩散引起的中间物损失，同时产生更少的副产品和污染物。最近，多酶复合体在酶促生物电催化中被广泛应用^[64-67]，可提升系统的能量转化效率、提高反应特异性、扩展检测范围^[68-71]。

多酶复合体模块可以通过以下几种方式来组装：

(1) 交联酶复合物 (cross-linked enzyme aggregates, CLEA) 涉及蛋白质分子之间共价键的形成, 是一种通过用化学试剂来激活或耦联电极表面和多酶模块的新颖且通用的策略^[72-73]。通过使用交联的己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6PDH) 的双酶复合物氧化葡萄糖, 可提高功率密度^[74]。此外, 代谢途径的顺序酶之间的相互作用会诱导底物通道的形成并提高催化效率^[75]。例如, 通过利用 Krebs cycle 代谢区室里共价连接的多酶取代非复合体酶制备的生物电催化剂, 丙酮酸/空气酶燃料电池的电流密度可以提高49% [图3(a)]^[76]。

(2) 蛋白支架是根据蛋白相互作用, 以支架蛋白为结构核心将多种酶元件对接而成的多酶自组装体^[78]。例如, Meng等^[79]构建的纤维糊精磷酸化酶与磷酸葡萄糖变位酶双酶复合物, 通过下游酶拉动上游酶克服热力学瓶颈, 将电流密度提高了3倍。Fan等^[77]将葡糖淀粉酶和GOx通过与cohesin-dockerin相互作用共展示到酵母细胞表面构建的酶级联反应, 显著提高了酶燃料电池的最大功率密度 [图3(b)]。但由于每种酶都需要使用不同的载体进行展示, 且氧化还原酶空间种类受限, 导致酶拷贝数较低, 影响酶级联反应的有序组装^[80]。

(3) 核苷酸支架是利用DNA或RNA分子为支架结构与酶的特异性结合功能, 将多酶元件聚集到支架结构形成的高效有序酶组装系统。使用交联寡脱氧核苷酸作为支架, 将GOx-抗生物素蛋白

和HRP-抗荧光素Fab蛋白分别组装在金电极上, 可用于葡萄糖传感, 且电流信号与在电极表面核苷酸支架上的酶结合位点密切相关^[71]。然而单链DNA支架由于缺乏刚性可能导致空间结构的错误折叠, 可考虑在二维核酸“折纸”支架上进行可控共组装^[81]。

2.2 多酶催化途径的构建

基于多酶催化的生物电催化系统凭借高活性和高选择性, 可用于多步转化过程和具有复杂结构的目标产物合成。与用于物质转化的多酶催化途径相似, 用于生物电催化的多酶途径主要科学问题也在于其组成的各元件和模块之间的适配性。由于还涉及电子传递和不同形式的能量转化, 以及电极等非生物元件的参与, 该系统变得更加复杂。例如, Minteer课题组^[50]开发了一种生物电催化N₂固定的多酶系统, N₂首先由固氮酶 (MoFe nitrogenase) 以甲基紫精作为电子中介体催化生成NH₃, 再通过由黄递酶、L-丙氨酸脱氢酶和 ω -转氨酶组成的多酶级联反应, 实现了电驱动固氮合成手性胺, 最高法拉第效率达到27.6% [图4(a)]。其中, 通过条件优化实现对氧气极度敏感的固氮酶和其他电催化元件之间的协同是一个难点。Zhu等^[82]构建了含有糖磷酸化、电子生成和葡萄糖6-磷酸 (glucose 6-phosphate, G6P) 再生三大模块且不涉及ATP或CoA的多酶途径 [图4(b)]。值得注意的是, 该途径以G6P作为“通用接口”, 将3个功能模块完美对接, 通过改变底物能量激活模

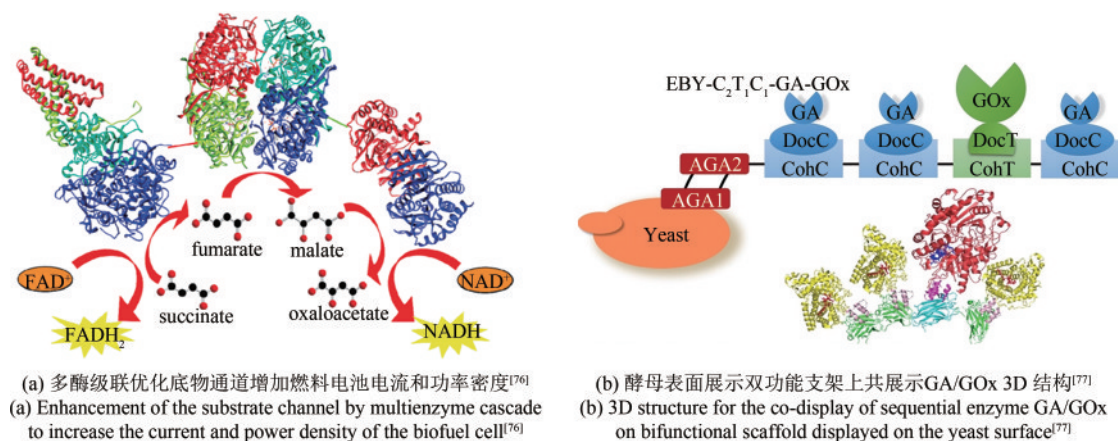


图3 多酶复合体模块组装策略

Fig. 3 Strategies of multienzyme complex assembly

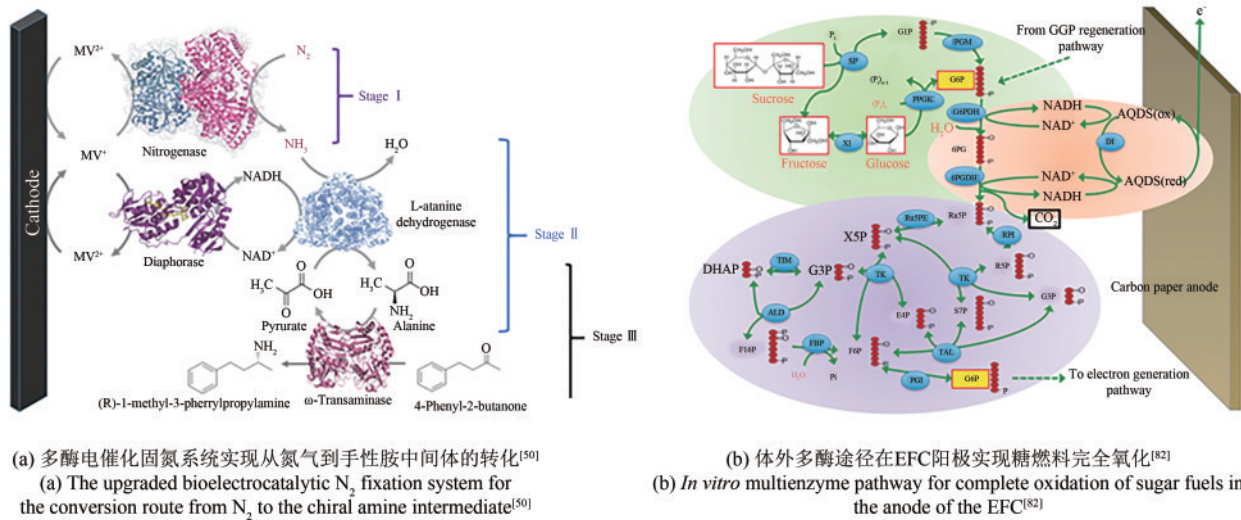


图4 基于多酶催化的产物合成途径

Fig. 4 The multienzyme-catalyzed pathways for product synthesis

块中的糖磷酸化酶,可实现对淀粉糊精、葡萄糖、果糖、蔗糖、木糖乃至生物质糖等多种糖的完全利用,体现了合成生物学模块“即插即用”的特性,大大拓展了电池的底物谱。Kim等^[83]将3种不同来源的NAD(H)依赖型醇脱氢酶、醛脱氢酶和甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)自组装进水凝胶中,可催化1分子甲醇完全氧化同时产生3分子NADH,并用这些还原力进行产电。

3 酶电极构建与生物-非生物界面电子传递强化

3.1 酶的固定

生物催化剂和电极之间的电子传递将生物反应和电化学过程相关联,因而深入研究电子传递机制对于理解氧化还原酶的构效关系至关重要,也是酶促生物电催化反应器、电极和反应过程设计的理论基础。界面电子传递速率高度依赖于酶活性位点与电极之间的表面距离,当该距离低于1.4 nm且不需要任何电子中介体(electron mediator)即可进行电子传递的方式,称为直接电子传递(DET),对于需要电子中介体的则为间接电子转移(MET)^[84]。在实际应用中,中介体的电子特性必须与目标生物电催化反应的类型相匹配,如常用的甲基紫精、葱醌和中性红等^[85-87]。

为了提高酶促生物电催化系统性能,需要维持酶的活性及在电极表面的较高浓度,使酶与电极有效耦联,往往需要将酶固定化至电极^[88]。酶固定化主要分为吸附(包括共价和亲和)、包埋、交联等。酶在电极表面的吸附本质上是依赖分子间作用力的物理结合策略,如疏水相互作用、范德华力、离子相互作用和共价作用等^[89]。常用载体有聚乙烯亚胺、聚-L-赖氨酸和聚苯胺^[90-92]。吸附法虽然保留了酶的结构和活性并与电极表面建立了良好的亲和力,但由于分子间作用力和对酶的选择性较弱,导致维持时间相对短暂。因此,可以通过对酶-电极表面修饰或酶改造提高酶-电极的亲和力^[93],例如将FDH成功吸附在功能化电极表面^[94-96]。包埋则不需要酶和聚合物结构之间的特定作用,通过共价或非共价作用可将酶包裹在聚合物结构中并固定在电极表面^[97-98]。最常用的聚合物试剂有Nafion和壳聚糖,此外包括Os电沉积聚合物、甲苯胺蓝以及聚吡咯、聚苯胺在内的导电聚合物也可以促进电极表面和酶活性氧化还原中心之间的直接电子转移^[65, 99-103]。交联法往往涉及化学试剂,可能使酶结构改变并降低其活性,可考虑掺入惰性蛋白以降低目标蛋白的失活。

氧化还原酶在电极表面的定向固定,可缩短氧化还原酶和电极间的电子传递距离,有时可以将原本不可进行DET的酶实现DET[图5(a)]。酶的改造是实现酶定向固定的有效方法之一,常

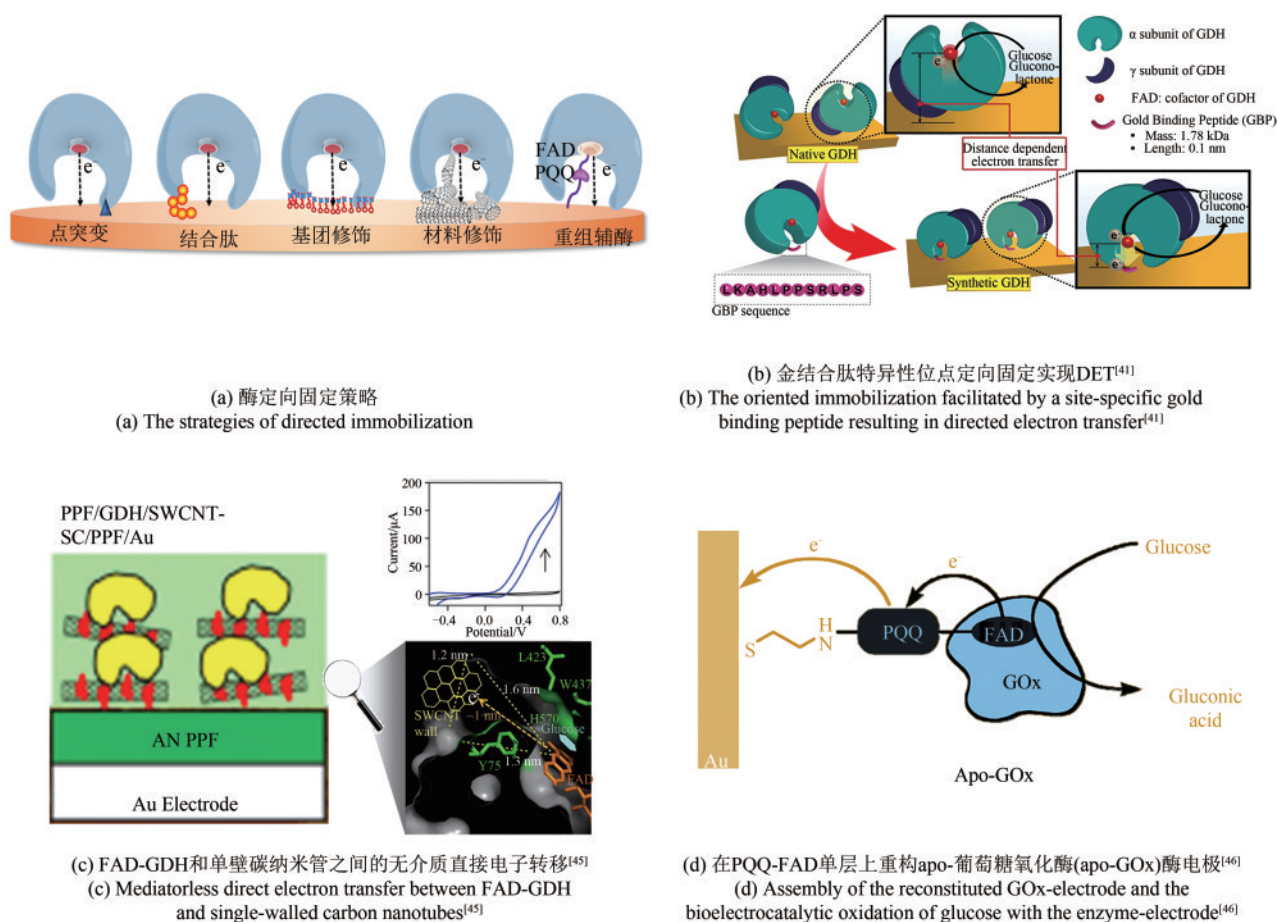


图5 氧化还原酶的定向固定

Fig. 5 Directed immobilization of oxidoreductases

用方法是给酶表面添一个接头，以提供酶在电极上的定向固定位点^[29]（表1）。例如，由C端添加了His-tag的HRP制备的酶多肽吸附金电极，显示出明显的DET特征，并且对H₂O₂的灵敏度提高了100倍以上^[40]。Lee等^[41]设计了在N端或C端带有金结合肽（gold binding peptide, GBP）的FADGDH，实现了酶在金电极上的定向固定，从而产生稳定的电流[图5(b)]。除了特异性的定向结合，小分子修饰可能会引起蛋白的构象变化，从而暴露某些结合位点以实现酶的定向固定。此外，通过定点突变引入新氨基酸从而形成新共价键，是实现酶定向固定的另一策略。例如，利用电极表面上修饰的丁烯二酰亚胺基团与在酶表面特定位置引入的半胱氨酸残基耦联形成巯基，可用于胆红素氧化酶的定向固定，并展现出更快的DET与更高的稳定性^[42]。以类似方式制备的纤维

二糖脱氢酶（cellobiose dehydrogenase, CDH）、漆酶、多铜氧化酶，极大改善了DET型酶促生物电催化的性能，提高了酶与电极的电子传递效率^[104-105]。

除了对酶进行改造，电极修饰材料的选择以及修饰活性官能团也是实现酶定向固定的方式^[106-108]。最近Muguruma等^[45]研究表明，在金电极上修饰的单壁碳纳米管（single walled carbon nanotube, SWCNT），可以靠近FAD活性中心的凹槽实现FADGDH的有效DET[图5(c)]。针对碳基电极可使用硝酸、硝酸铵、过硫酸铵、乙二胺、4-(N,N-二甲氨基)苯重氮和聚苯胺等进行化学修饰^[106-109]。Wang等^[43]将NiFe氢酶（*Pf*SHI）固定在4-甲基苄胺修饰的氨基化多壁碳纳米管（multiwalled carbon nanotube, MWCNT）上，证明*Pf*SHI靠近疏水表面时改变了空间构象并且在电

极上重新定向。对金属电极进行修饰，可以防止特定氨基酸与裸金属电极相互作用而引起的潜在酶构象变化，并降低电子传递的活化能。CDH^[44]、CueO^[110]和亚硫酸盐氧化酶^[111]的研究结果表明，金属表面形成的自组装单分子层可以调节蛋白质与电极之间的静电作用。此外，有报道将人工去除了辅因子的黄素酶（apoflavoenzymes），例如缺少了FAD的GOx，重组到具有单层辅因子膜的电极表面，制备出了高效DET酶电极[图5(d)]^[46, 112-113]。

3.2 界面生物电子传递强化

氧化还原酶的改造是常用的调控界面电子传递性能方法（表1）。酶的活性位点通常埋在蛋白质内部，通过删除在C端、N端或Loop区域不维持蛋白质功能和结构的非必需氨基酸残基，可以缩短原始电子传递途径，使活性位点更加靠近电极表面^[25]。Wang等^[47]构建了截短的只含2个亚基的P_γSHI，缩短了酶和电极之间的电子传递距离，表现出比4亚基野生型更高的电子传递速率。也有报道，通过同源建模构建截短的血红素3组成电子转移亚基的FADGDH，可以从原本不能DET变为可以DET[图6(a)]^[48]。另一种缩短活性位点与电极之间距离的有效方法是去糖基化。将一些不导电的糖基从氧化还原酶表面移除，使电极表面酶分子量变小，有助于辅基和电极的紧密接触，增强DET的能力[图6(b)]^[49]。例如，利用去糖基化后的CDH修饰的石墨电极，底物加入后的最大催化电流比野生型高40%~65%^[49]。该策略也应用在GOx和HRP中以提高DET^[114-115]。此外，可利用引入UAA的方法来在人工酶中安装氧化还原中心，以优化蛋白质结构域间或酶与电极之间的电子传递。例如，利用硼二吡咯甲烯将特异性掺入非天然氨基酸TF的甘氨酸氧化酶和L-色氨酸氧化酶连接在电极表面，可以促进电子转移实现DET，并构建出相应的生物传感器[图6(c)]^[116]。

由于很多氧化还原酶的反应需要价格昂贵的辅酶[如NAD(H)及NADP(H)]的参与，辅酶模块的有效再生也是酶促生物电催化中的关键和难点。

其再生方法主要包括酶法、电化学法和光化学法^[117]，电化学法的优势在于成本低、绿色环保、无副产物生成以及无需其他化学反应试剂等，但对还原介质的选择具有一定的局限性，反应时需要较高的电位并可能会导致辅酶二聚体的产生^[118]。例如，在生物电催化固氮系统中，阴极基于甲基紫精（methyl viologen, MV）介导了固氮酶和黄递酶的催化反应，电流密度较无MV提高了40%^[50]。构建酶-辅酶交联复合体可以拉近辅酶与酶的距离，将其限域在酶周围，有效促进电子传递和辅酶再生。Song等^[51]将FDH与NADH共价交联，固定在铜纳米颗粒修饰的电极上，酶电催化固定CO₂的法拉第效率为22.8%，比使用FDH和游离NADH高出约2.5倍[图6(d)]。最近，由含氧化还原基团的侧链及非导电主链构成的氧化还原聚合物，在电极修饰策略方面也受到了关注，可促进电子传递^[119-120]。氧化还原聚合物主要包括二茂铁和过渡金属配合物以及紫精、醌、Os和2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物等有机聚合物^[121]。Mao等^[122]设计了一种新型Os²⁺/Os³⁺复合物氧化还原水凝胶，间隔连接到聚合物主链，成功将GOx的FAD/FADH₂活性位点与电极相连，可以在低至-0.36 V的电位下氧化葡萄糖。然而，这种方法往往需要使用有毒试剂，并且对酶进行化学修饰可能会影响底物或产物的扩散速率。

酶促生物电催化系统中，电极不仅是电流收集器，还是支撑生物催化剂的基础，涉及固-液或固-液-气非均相氧化还原反应。电极材料应具备出色的导电性和稳定性、高比表面积和机械强度、低成本、环保、耐腐蚀且生物相容等^[123-125]。碳基电极是使用最广泛的电极，包括碳纸、碳布、碳网和碳纳米管等^[126]，但它赋予电极表面疏水特性，通常会限制氧化还原酶的固定效果，影响界面电子传递。因此，通常会利用金属氧化物纳米复合材料或导电性材料对电极进行表面修饰^[127]。例如，利用碳纳米管、纳米粒子等纳米材料的修饰，为酶的附着提供了3D导电框架^[123, 127]。另一个策略是改变电极的理化性质，以增强酶固定效果和界面电子传递，如通过气体^[128]、氰尿酸氯^[129]、壳聚糖^[130-131]和三聚氰胺^[132]等处理。

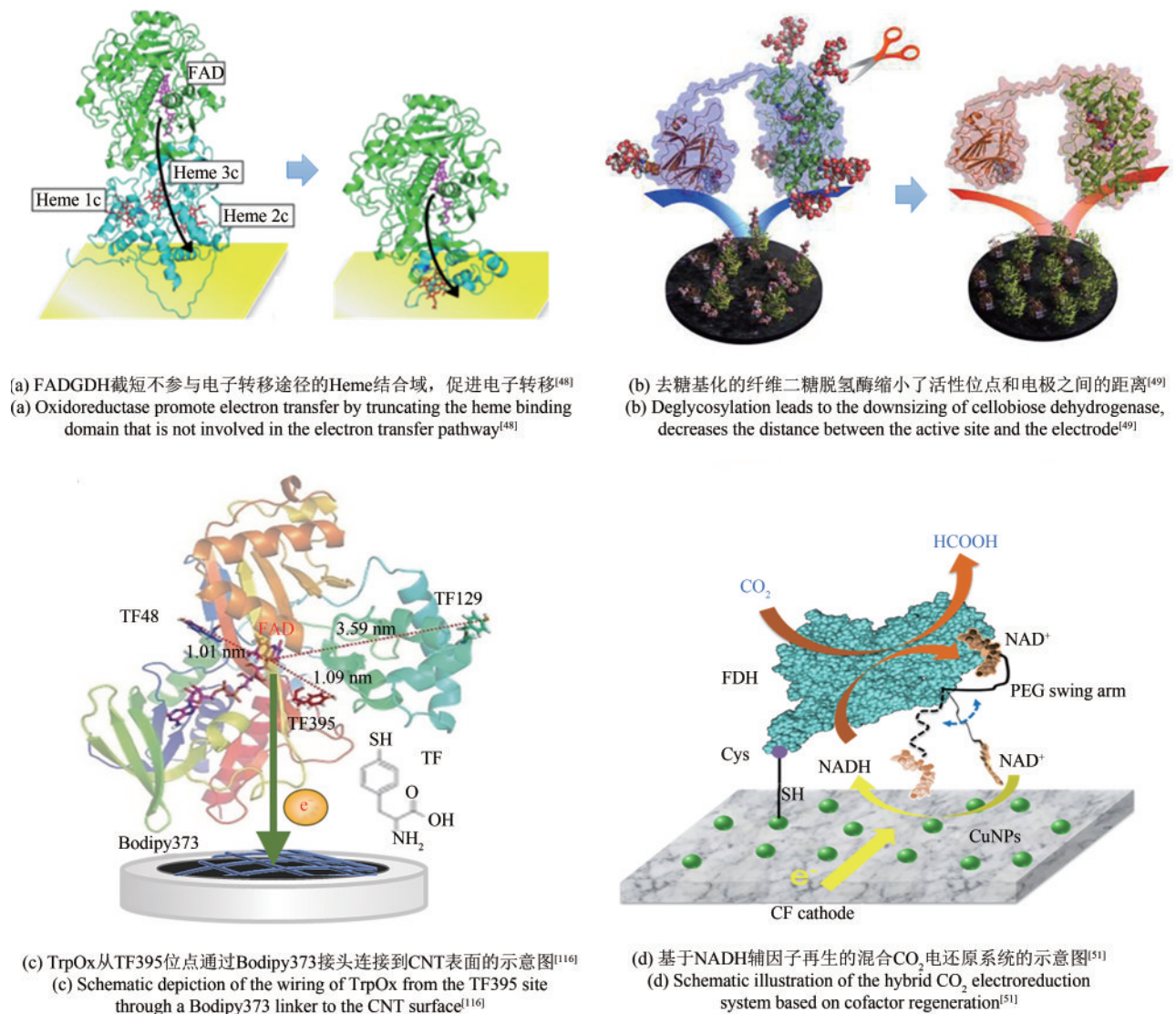


图6 界面生物电子传递强化策略

Fig. 6 Strategies of enhancing the electron transfer at the enzyme-electrode interface

4 应用系统

4.1 酶燃料电池

随着对清洁和可持续能源不断增长的需求，以及可穿戴和可植入电子设备的快速发展，绿色安全和高生物相容性的电池成为研究热点^[133-135]。EFC由于使用可再生生物催化剂和高能量密度的燃料，具有较高的生物相容性，得到广泛关注^[136-138]（表2）。EFC可以利用糖类^[146]、醇类^[147]、有机酸类^[148]和氢气^[149]等多种化合物作为燃料，这些燃料可以来自于生物体自身，或者自然界的

生物系统。例如，带有植入EFC的蜗牛将能够在自然环境中运行，可持续性激活生物电子设备，并通过蜗牛进食产生的葡萄糖实现连续运行^[150]。Rogers课题组^[151]基于EFC设计了一种自供电的无线电子传感设备，具有轻量级、小型化和低成本的优势，可同时监测葡萄糖、乳酸、pH和出汗率。该装置利用Nafion固定的LOx作为生物阳极，涂有镀铂碳的金电极作为阴极，产生的电压信号与葡萄糖浓度成正比。此外，在两天内对两名受试者检测显示，汗水和血液中的葡萄糖和乳酸浓度之间有良好的 consistency，为无创、半定量的人体健康监测奠定了基础。

表2 酶生物电催化应用系统

Tab. 2 Application systems of enzymatic bioelectrocatalysis

应用领域	主要策略	主要效果	文献
酶生物燃料电池			
MET型	基于氢酶/MV/为阳极、固氮酶/MV为阴极为的H ₂ /N ₂ 燃料电池	最大电流和功率密度分别为48.0 μA/cm ² 和1.50 μW/cm ² , OCP为0.23 V	[134]
	基于氢酶/MV/Nafion为阳极、ADO/TBO/Nafion为阴极为的H ₂ /庚醛燃料电池	最大电流密度和功率密度为25 μA/cm ² 和4.7 μW/cm ² , OCP最高达到0.6 V	[134]
	基于氢酶/MV/C为阳极、BOD/Nafion/C为阴极为的H ₂ /O ₂ 燃料电池	最大功率密度为3.6×10 ³ μW/cm ² , OCP的值为1.13 V。	[134]
	基于氢酶/MV/GCE为阳极、BOD/C为阴极为的H ₂ /O ₂ 燃料电池	最大电流密度和功率密度为6.3×10 ³ μA/cm ² 和4.4 ×10 ³ μW/cm ² , OCP最高达到1.14 V	[134]
	基于FDH/Cc-PAA/C为阳极的甲酸盐/O ₂ 燃料电池	最大电流密度62 μA/cm ² , OCP为1.28 V	[135]
	FDH/BPV-LPEI/C为阳极、Lc/MWCNT/Nafion/C为阴极为的HCOO ⁻ /O ₂ 酶燃料电池	最大电流和功率密度为17 μA/cm ² 和18 μW/cm ² , OCP为1.28 V	[136]
	FDH/MV/聚乙二醇/GCE为阳极、BOD/ABTS/GCE为阴极为的HCOO ⁻ /O ₂ 燃料电池	电流密度达到2×10 ⁴ μA/cm ² , 功率密度为1.2×10 ³ μW/cm ² , OCP为0.78 V	[136]
	基于多酶/CNT/AQDS/C阳极、Pt为阴极为的多糖燃料电池酶	最大功率密度为108 μW/cm ² , 电流密度为2.56×10 ³ μA/cm ² , 法拉第效率为95%	[136]
DET型	基于Lc/CNT/Ta高性能生物阴极组成的O ₂ 燃料电池	电流密度840 μA/cm ² , 在168 h的使用寿命期间能保持75%的电流	[137]
	GOx/对苯二酚/SWNT/Au为阴极、Lc/SWNT/Au为阳极的葡萄糖/O ₂ 燃料电池	电流密度790 μA/cm ² , 功率密度240 μW/cm ² , OCP为0.52 V, 在低pH下可有效工作	[137]
	基于Py ₂ Ox/CAT/GC为阳极、Py ₂ Ox/HRP/CNT-CMF-CC为阴极为的H ₂ /葡萄糖燃料电池	功率密度530 μW/cm ² , OCP为1.15 V, 在10 h的使用寿命期间保留50%的功率	[137]
	基于GDH/PANI/AuNP/Au为作用在人体血液中的高效生物阳极的葡萄糖燃料电池	电流密度1×10 ³ μA/cm ² , 在10 h的使用寿命期间能保持79%的电流	[137]
	GOx/NQ/MWNT为阳极、HRP/MWNT为阴极为的葡萄糖/H ₂ O ₂ 燃料电池	功率密度700 μW/cm ² , OCP为0.6 V	[137]
	基于GOx/TPA/PEI/CNT为阳极、Pt/C为阴极为的葡萄糖/O ₂ 燃料电池	电流密度78.6 μA/cm ² , 功率密度1.62×10 ³ μW/cm ² , 在672 h的使用寿命期间能保持75.8%的电流	[137]
	基于GOx/PANI/GC为阳极、Lc/PANI/GC为阴极为的葡萄糖/O ₂ 燃料电池	功率密度1.12×10 ³ μW/cm ² , OCP为0.78 V, 在336 h的使用寿命期间能保持82.9%的功率	[137]
	基于FAD-GDH/Th-AuNP/CNT/GC为阳极、BOD/GR/CNT/GC为阴极为的葡萄糖/O ₂ 燃料电池	电流密度925 μA/cm ² , 功率密度269 μW/cm ² , OCP为0.71 V	[137]
	基于GOx/Naph-SH/AgNP/PEI/CNT为阳极、Pt/C为阴极为的葡萄糖/O ₂ 燃料电池	电流密度1.46×10 ³ μA/cm ² , 在840 h的使用寿命期间能保持83%的电流	[137]
	基于GOx/3D石墨烯为阳极的葡萄糖/O ₂ 燃料电池	功率密度164 μW/cm ² , OCP为0.44 V, 在168 h的使用寿命期间能保持60%的功率	[137]
	基于GOx/PVP-RPPy/NiF为阳极、Lc/PVP-RPPy/NiF为阴极为的葡萄糖/O ₂ 燃料电池	功率密度350 μW/cm ² , OCP为1.16 V, 在336 h的使用寿命期间能保持82%的功率	[137]
	Zn为阳极、BOD/MWNT/rGO/PG为阴极为的O ₂ 燃料电池	电流密度650 μA/cm ² , 功率密度775 μW/cm ² , OCP为1.68 V	[137]
	BOD/MWCNT为阴极为的O ₂ 燃料电池	功率密度4×10 ³ μW/cm ² , 在24 h的使用寿命期间能保持73%的功率	[137]
	GDH/GO/GC为阳极、Lc/AuNP/Au为阴极为的葡萄糖/O ₂ 燃料电池	电流密度1.1×10 ³ μA/cm ² , 功率密度400 μW/cm ² , OCP为0.86 V, 在576 h的使用寿命期间能保持93%的功率	[137]
	基于NiFe氢酶/MWCNT/NQ/GCE为阴极为的H ₂ /O ₂ 燃料电池	最大功率密度为890 μW/cm ² , OCP为1.1 V	[4]

续表 2

应用领域	主要策略	主要效果	文献
自供电可穿戴电子的集成设备	基于 LOx/TTF-MDB/Pt/Co 设计的由汗液驱动	功率密度 350 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 具有良好的稳定性	[138]
电子皮肤检测乳酸	基于 LOx/CNT/1,4-NQ/GA/CHI 为阳极、Box/CNT/PPIX/Nafion 为阴极制备的电子纺织微电网	功率密度 21.5 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 电流密度 5.8 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 监测汗液中的乳酸	[138]
	基于 LOx/CNT/NQ/Pt/Cu/Nafion 检测汗液中的乳酸	可以从静止状态下指尖汗液中收集 400 mJ/cm^2 能量	[138]
	基于 LOx/NQ/液态金属组成的可伸缩电化学组件检测汗液中的乳酸浓度	最大功率密度为 270 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 和 0.50 V 的 OCP	[138]
酶生物传感器			
表皮检测	附着在皮肤上以形成皮下电化学双通道利用 GOx 检测血糖	实现无创血管内血糖测量, 具有 130.4 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$ 高灵敏度	[139]
	尿酸酶/C 制备的新型纸质智能绷带检测伤口尿酸水平	降低更换伤口敷料的频率, 检测范围为 100~800 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 精确监测伤口长达 3 d	[139]
	将 LOx 与硼酸盐形成外聚合层同 Nafion 固定在电极上检测乳酸	检测范围 0.22~0.75 mmol/L , 灵敏度为 0.1 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$	[140]
	基于 Au/rGO/PtNP/CHI/GOx 制备的葡萄糖生物传感器	汗液葡萄糖水平分析和心电图的同时监测, 检测范围 0~200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 29.1 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$	[141]
	基于 PVA/GOx/PB/C/PET 制备的触摸指尖无创血糖监测	检测范围 0~50 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 2.89 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$	[141]
	基于 GOx/PB/Au 和 LOx/PB/Au/GA/Nafion 的多功能电化学分析, 同时测量葡萄糖和乳酸	葡萄糖检测范围 1~600 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 26.3 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$, 乳酸盐检测范围 1~40 mmol/L , 灵敏度 1.49 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$	[141]
	基于紫外介导的化学电镀技术制备的 GOx/PB/Au/PET 葡萄糖传感器	检测范围 0~2.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 22.05 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$, 抗干扰性强	[141]
	基于 Nafion/GOx/PB/porous Au 制备的一次性汗液的血糖监测设备	检测范围 0~10 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 1 μL 汗液即可检测, 并实现多级透皮药物释放	[106]
	基于 GOx-CNT/PB/Au/PET 的葡萄糖传感器与 LOx-CNT/PB/Au/CHI 乳酸传感器制备的多功能微流体检测	葡萄糖检测范围为 0~200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 2.35 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$, 乳酸检测范围 0~30 mmol/L , 灵敏度 0.22 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$	[106]
	基于 GOx-CNT/PB/Au 制备的实时检测血糖设备	检测范围 0~25 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 2.1 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$	[141]
	基于化学气相沉积制备 GOx/PB/石墨烯的血糖传感器	检测范围 0~10 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 1.0 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$, 并具有经皮药物释放功能	[141]
泪液检测	GOx/水凝胶/Pt 制备的下眼睑 NovioSense 葡萄糖传感器	检测范围 0~20 mmol/L , 稳定信号长达 4.5 h	[106]
	基于 GOx/CAT/石墨烯制备的智能隐形眼镜葡萄糖传感器	检测范围 0.1~0.9 mmol/L , 灵敏度 22.72% $\cdot\text{L}/\text{mmol}$	[139]
	基于 AOx/CHI/PB/PET; GOx/PB 的眼睛生物传感器检测酒精、维生素和血糖水平	检测范围 0.011~0.08 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 9 h 的测试期间显示出高稳定性	[139]
唾液检测	基于 GOx/PB/Au/PET/CHI 制备的安抚奶嘴用于葡萄糖监测	检测范围 0.1~1.4 mmol/L , 灵敏度 0.69 $\text{nA}\cdot\text{L}/\text{mmol}$	[139]
	通过尿酸酶/PB/GA/聚邻苯二胺制备的护牙生物传感器检测尿酸	检测范围 0~600 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度为 2.45 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$	[139]
配件检测	OPH/Nafion/碳电极制备的手套传感器快速检测有机磷神经毒剂	检测范围 0~200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 平均电阻值为 480 Ω	[139]
	基于 OPH/PB/PET/碳电极制备的戒指式样传感器检测空气和液体中的爆炸性和神经毒剂威胁	气体检测范围 0~100 mL/m^3 , 灵敏度高达 4.55 $\mu\text{A}\cdot\text{m}^3/\text{mL}$; 液体检测范围 2~10 mmol/L , 灵敏度高达 1.8 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/\text{mmol}$	[139]
	GOx/LOx/COD/CHI/Au/PtNP/PPD 制备的一次性独立式智能手表, 监测久坐和高强度运动环境中个体的汗液代谢物特征	葡萄糖检测范围 0~1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 22.8 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$; 乳酸检测范围 0~20 mmol/L , 灵敏度 4.1 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$; 胆碱检测范围 0~350 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 灵敏度 9.4 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$	[139]

续表 2

应用领域	主要策略	主要效果	文献
间质液 检测	利用普鲁士蓝修饰的 GOx 传感器在低电位下检测葡萄糖	跟踪食物消耗引起的血糖水平变化,检测范围 0~100 $\mu\text{mol/L}$	[139]
	构建通过 PEG-二酰肼交联剂用 GOx 修饰的纳米纤维垫的葡萄糖生物传感器	检测范围 95~2000 $\mu\text{mol/L}$,灵敏度 0.8 $\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$,可以在 8 周内多次重复使用	[142]
	基于 GOx/PB/CHI 制备的检测食用食物后的血糖水平传感器	检测范围 0~160 $\mu\text{mol/L}$,灵敏度 300 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	[143]
	基于 PPD/AOx-CHI/Nafion/Pt 制备的微针生物传感器	检测范围 0~80 mmol/L,灵敏度 0.045 nA·L/mmol	[143]
食品检测	基于 FDHb/MPA/CMC/NPG 制备的果糖生物传感器,用于检测在天然甜味剂和饮料	检测范围 0.05~0.3 mmol/L,灵敏度 145 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$,6 天后剩余 40% 活性	[143]
	基于 CDH/PEI-AuNP/RDE 制备的乳糖传感器	检测范围 1~100 $\mu\text{mol/L}$,灵敏度 196.5 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$,电流密度为 10 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$,响应时间小于 5 s	[143]
	基于 CDH/AuNPs/BPDT/AuE 制备的乳糖传感器	检测范围 5~400 $\mu\text{mol/L}$,灵敏度 27.5 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$,20 天后仍可保持 85% 活性	[143]
	基于 CDH/AuNPs/GCE 制备的乳糖传感器	检测范围 10~300 mmol/L,灵敏度 5.4 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$,1 周后保留了约 50% 的初始活性	[143]
	基于 CDH/Co-hemin/CHI/GCE 制备的乳糖传感器	检测范围 10~100 mmol/L,灵敏度 102.3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	[143]
酶电合成			
CO ₂ 固定	基于 FNR/乙酰辅酶 A 羧化酶/MV/GCE 构建的辅因子再生系统	碳产品中间体生成速率为 160 nmol/(cm ² ·h),法拉第效率为 91%	[144]
	基于 FDH/Cc-PAA/C 氧化甲酸的生物阳极	还原甲酸盐产率为 431 nmol/h,法拉第效率高达 99%	[4]
	基于 MoFe-Fe 固氮酶/Cc/GDE/GCE 将 CO ₂ 还原为甲酸盐	电流密度 350 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$,MoFe-Fe 固氮酶法拉第效率分别为 9% 和 32%	[4]
	基于 FDH/MV/Nafion 的三室结构使二氧化碳还原为甲酸盐	在 20 mV 负向可逆电极电位下产生甲酸盐,产量高达 97%	[4]
	基于 FDH/Rh/Nafion/C 为阴极的双室反应器的 NADH 再生系统将 CO ₂ 还原为甲酸	电流密度 80 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$,法拉第效率可达到 46%	[135]
N ₂ 固定	基于氢酶/MV 为阳极,固氮酶/MV 为阴极的体系将 N ₂ 还原为 NH ₃	生成 286 nmol NH ₃ ,法拉第效率为 26.4%	[134]
	固氮酶/AlaDH/DI/HN- ω TA/MV 构建的辅酶再生系统在厌氧 H 形双室反应器生产手性胺	实现 MV 再生,反应 10 h 后,胺化产物达到 0.61 mmol/L 的最高浓度,法拉第效率为 27%	[136]
	基于 Lc/LPEI/MWCNT/C 制备的不依赖 ATP 的 DET 系统将 N ₂ 还原到 NH ₃	NH ₃ 的产量为 180 nmol,最大催化电流密度 1.88 \times 10 ³ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	[136]
	氢酶/MV 为阳极,固氮酶/MV/DI/LeuDH 为阴极制备的 H ₂ / α -酮酸燃料电池用于将 N ₂ 转化为手性氨基酸	实现了 92% 的 NH ₃ 转化率和 87.1% 的法拉第效率,OCP 为 0.25 V	[136]
增值化学 品合成	基于氢酶/MV/Nafion 为阳极,ADO/TBO/Nafion 为阴极,催化脂肪醛脱羰基化为烷烃和甲酸	最大电流密度为 25 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 在 0.6 V 下产生己烷,法拉第效率为 24%	[134]
	基于 BPV-LPEI/DH/C ₈ -LPEI/PHA/GC 再生 NADH 系统,可持续合成 PHB	NADH 再生的法拉第效率为 52%,最大电流密度为 27.9 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	[4]
	基于氢酶/MV 为阳极,Alk/TBO 为阴极利用石油衍生物生成烷烃	电流密度为 318 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$,OCP 为 0.65 V,法拉第效率为 23%,生成辛烷产率为 690 nmol/cm ²	[4]
	基于 GDH/DI/VK ₃ /CF 为阳极,利用葡萄糖生成 L-DOPA	L-DOPA 生产率为 118.3 mg/(h·L) 和 90% 的法拉第效率	[4]
	酪氨酸酶/Fe ₃ O ₄ -COOH-NP/Nafion/Ni/C 为阴极构建的微生物-酶电合成系统将废水转化为增值化学品	合成药物油酸和 CPMA 的转化率达到 78.9% 和 86.8%,法拉第效率分别达到 91% 和 102.4%	[145]

Note: MV—methyl viologen; TBO—toluidine blue O; VK₃—vitamin K₃; ADO—aldehyde deformylating oxygenase; BOD—bilirubin oxidase; GC—glassy carbon; FDH—formate dehydrogenase; Cc-PAA—cobaltocene (grafted to polyallylamine); Lc—laccase; MWNT—multi-walled carbon nanotube; ABTS—2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate); AQDS—9,10-anthraquinone-2,7-disulphonic acid; TPA—terephthalaldehyde; TTF—tetrathiafulvalene; MDB—Meldola's blue; PPD—poly(*o*-phenylenediamine); CNT—carbon nanotube; GOx—glucose oxidase; SWCNT—single-walled carbon nanotube; Py₂Ox—pyranose oxidase; CAT—catalase; HRP—horseradish peroxidase; CMF—carbon microfibers; PEI—polyethylenimine; PANI—polyaniline; FADGDH—flavin adenine dinucleotide-dependent GDH; Th—thionine; Naph-SH—naphthalene-thiol; PVP-RPPy—polyvinylpyrrolidone-rectangular polypyrrole; GDH—glucose dehydrogenase; OPH—organophosphorus hydrolase; GO—graphene oxide; rGO—reduced raphene oxide; PG—pencil graphite; NP—nanoparticles; NQ—naphthoquinone; CC—carbon cloth; GA—glutaraldehyde; CHI—chitosan; CDH—cellobiose dehydrogenase; FNR—ferredoxin NADP reductase; FDHb—D-Fructose dehydrogenase; ω -TA— ω -Transaminase; DI—diaphorase; AlaDH—L-alanine dehydrogenase; LeuDH—leucine dehydrogenase; PET—polyethylene terephthalate; PHB—polyhydroxybutyrate; C₈-LPEI—octyl-linear polyethylenimine; PHA—polyhydroxyalkanoates; Alk—alkane monooxygenase; L-DOPA—1,3,4-Dihydroxyphenylalanine; MPA—3-mercaptopropionic acid; CMC—*N*-cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate; RDE—rotating disk electrode; BPDT—biphenyl-4,4'-dithiol; GDE—gas diffusion electrode; GCE—glassy carbon electrode; AuNP—gold nano particle; PtNP—platinum nano particle; PEG—polyethylene glycol; PB—Prussian blue.

EFC的能量密度和功率密度对于其应用至关重要。大多数葡萄糖EFC基于GOx或GDH，每分子葡萄糖实际上仅产生理论24个电子中的2个^[152-153]。Zhu等^[66]通过多酶催化途径，首次实现了糖底物的完全氧化，意味着以0.15 kg/L麦芽糊精为燃料的EFC可具有596 A·h/kg的储能密度。Shi等^[154]近期还实现了生物质中的葡萄糖和木糖到电能的完全转化，意味着通过EFC有望从自然界广泛存在的生物质糖获取绿色和便捷的电能。此外，为了提高EFC的输出功率（包括电压和电流的提升），研究者从氧化还原介质开发、电极材料创制、酶定向固定等多个方面进行了一系列尝试。例如，通过结合吩噻嗪或醌类衍生物修饰的氧化还原聚合物生物阳极，可以将葡萄糖/氧气EFC的开路电压（open circuit potential, OCP）提高至0.6~0.8 V^[155]。基于萘醌作为电子中介体并替代氧化还原聚合物水凝胶，能够在低电位下促进GOx氧化葡萄糖，达到5400 μ A/cm²的最大电流密度。然而，这些氧化还原介质会影响生物相容性、稳定性和增加成本^[134, 156]。从这个角度看，开发低氧化还原电位、高生物相容性和稳定性、良好的传质渗透性和对酶高亲和力的氧化还原聚合物具有重要意义。除了导电材料，酶的结构与种类对电池性能也很关键。例如，FeFe氢酶相比于NiFe氢酶催化H₂产电的过程更加容易被氧气不可逆影响，从而使相应的EFC性能衰退^[157]。FADGDH相比于其他GDH类型会表现出较低的氧化还原电位，其EFC能实现更高的功率输出^[158-159]。此外，在氧化还原辅因子中，FAD与酶结合更紧密，不会随着时间的推移而解离，使酶的稳定性更

好，EFC稳定性也更佳^[160]。像CDH这类含有作为内置负责电子传递的细胞色素结构域从而可以DET的酶，在EFC中越来越得到关注^[161]。通过定向固定、酶工程或电极表面修饰，使酶或辅因子更接近电极表面，也是提高生物电极电流密度的重要策略。

4.2 电化学生物传感器

电化学生物传感器（electrochemical biosensor）是商业上最成功的生物传感器之一，广泛应用于临床诊断、食品工业、生物技术、环境监测等领域^[139-141]（表2）。因其低成本、相对快速和简单的分析过程以及小单元体的测量尺寸而广受欢迎^[162-166]。通常，其依赖于酶催化反应的瞬时性、对底物的高度特异性和相对稳定性，通过氧化或还原特定底物产生电子并转移至电极表面，再根据检测到的电信号将分析物浓度输出为可量化信号^[167-168]。生物传感器的类型主要分为电流式、电位式、电导式和阻抗式^[169-173]。根据其电子传递机制，生物传感器分为3代：第1代为采用氧化酶，基于氧化产生的过氧化氢形成电流响应来检测。第2代为利用合适的电子中介体在酶与电极之间通过MET来产生电流响应。如市售的FreeStyle Libre血糖仪，利用Os复合体作为电子中介体连接GOx与工作电极，在40 mV（vs. Ag/AgCl）的电位下氧化葡萄糖进行血糖监测^[174]。第3代生物传感器基于可以DET的氧化还原酶，无需电子中介体就可以在较低的电势下运行，且其特异性受抗坏血酸等电活性干扰物的影响较小。由于

并非所有的氧化还原酶都能够进行DET, 与现有的第1代和第2代生物传感器相比, 现仅存在一种市售的第3代生物传感器 (LactoSens)^[175]。

开发第3代生物传感器是现在的研究热点, 其性能关键取决于DET速率^[142-143]。DET加快可提高转化数和灵敏度及降低检测限, 还有助于减小极化电位, 从而减少工作电极上的干扰反应、提高传感器选择性。目前研究集中在含FAD、FMN、血红素、PQQ、钼、铁硫簇或铜为辅基的氧化还原酶与电极的DET上。用于过氧化氢检测的第3代生物传感器采用多晶金电极搭配重组HRP, 其灵敏度为 $1400 \mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$ ^[176]。烟草过氧化物酶与HRP相比, 具有更广pH范围的适应性及更高的灵敏度, 在硫醇修饰的金电极上固定过氧化物酶产生了高出多倍的电流^[177-178]。Shipovskov等^[179]在具有自组装单层 (self-assembled monolayer, SAM) 或Os聚合物的修饰金电极固定茶碱氧化酶, 相关生物传感器检测茶碱的灵敏度分别为 $52.1 \mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$, 检测范围为 $3.6\sim 72 \text{ mg/mL}$ 。由于CDH具有进行DET的能力且底物特异性高, 通过适当的酶改造, 除了纤维二糖, 还可用它实现乳糖的检测^[180-182]。例如, Gorton等^[180]将分散在壳聚糖溶液中的高孔碳凝胶固定在玻碳电极表面, 制备基于CDH的乳糖生物传感器灵敏度为 $133.7 \mu\text{A}\cdot\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm}^2)$ 。

4.3 酶电合成

与通过在阳极氧化燃料产生电子的EFC相反, EES通常在阴极通过电能驱动底物被酶催化还原为产物^[183], 根据电子传递不同也分为DET和MET^[184]。单酶生物电合成系统主要用于合成简单化合物或引入官能团和手性中心, 而多酶级联的生物电合成系统可执行多步转化过程和复杂结构产品的合成^[145] (表2)。

目前, EES可利用的底物包括 CO_2 、 N_2 、 NO^{2-} 、醇类等, 而产物包括甲酸盐、甲醇、 NH_3 、 H_2 和烷烃, 以及一些高附加值的化学品和药品。例如, 含有活性金属中心Mo^[185-186]或W^[187-188]的FDH可有效用于酶电催化还原 CO_2 , 能以优异的反应速率进行甲酸合成。这些酶通常来自厌氧极端微生物, 并涉及复杂的多域电子传递机制。除了甲酸, 甲醇也可通过模拟自然光合作用和依赖多

酶途径的酶促光电化学池中由 CO_2 合成^[189]。近期报道的通过钒固氮酶的VFe蛋白将 CO_2 还原形成C—C键变为乙烯和丙烯的研究, 为 CO_2 转化成碳氢化合物提供了一种新的路线^[144]。 N_2 也可作为酶促生物电催化的底物, 可通过固氮酶实现 N_2 还原为 NH_3 ^[20, 190]。例如, Lee等^[191]利用固氮酶的MoFe蛋白实现了 H^+ 到 H_2 、 N^{3-} 到 NH_3 、 NO^{2-} 到 NH_3 的生物电催化反应。鉴于EES通常需要氧化还原介质, 会导致大量的过电位和复杂的酶动力学, Hickey等^[192]设计了一个以DET模式将 N_2 生物电合成 NH_3 的系统。其他产品的EES也有相关报道。例如, 利用醛脱氢酶加氧酶从醛和醇中进行酶促电合成辛烷到丙烷的一系列烷烃^[193]。基于辅因子再生的EES应用也越来越多, 例如L-谷氨酸的光电合成^[194]、利用D-乳酸脱氢酶生产D-乳酸^[195]以及对映选择性酮还原和还原胺化反应^[196]等。EES也在生产高附加值化学品中展示了巨大潜力, 包括氨基酸^[197]、左旋多巴^[198]、R-左旋二酮^[199]、聚羟基丁酸酯^[69, 200]和R-L-苯基乙醇^[201]等。

5 前景展望

在这篇综述中, 我们讨论了酶促生物电催化的合成生物学构建及应用。蛋白质工程是提高生物电催化剂性能的有效方法。MET和DET是两种主要的电子传递机制, 对酶促生物电催化系统的设计至关重要。电极材料和修饰方法的发展提高了生物电催化器件和系统的性能。近年来, 酶促生物电催化已广泛应用于生物传感器、生物电能和化学品的合成, 虽然其潜力巨大并且取得了一些突破性进展, 但仍需要发展适用于相关工程应用的基础理论和技术方法, 以促进其市场化应用。

合成生物学作为生物化学、计算机和工程学等多学科相融合的交叉学科, 结合了生物学的研究性质和工程设计原则, 在生物医药、天然产物、生化产品和生物能源的生产等领域都有重要指导作用^[202]。虽然以氧化还原酶为催化剂的生物电催化系统已经取得了显著成果, 但在实际应用中仍然面临巨大挑战, 如电子传递速率低、酶稳定性差、成本高等。未来的研究可从以下3个方向来进行:

(1) 设计改造电活性生物元件 在酶促生物电催化系统中, 氧化还原酶是催化目标底物转化

以及电子传递的核心元件。设计改造氧化还原酶的活性中心以提高电子传递速率和效率的研究是未来的重点方向^[203]。除了通过蛋白质工程对氧化还原酶本身进行设计和改造,开发更多电活性生物元件,也有助于促进界面电子传递和关于电催化机理的深入研究^[204]。此外,需要开发更多适用于电活性生物元件的设计与改造方法,包括针对氧化还原电势的高通量筛选、基于电耦合强度计算的蛋白电子通道设计等。随着AlphaFold等新技术的涌现,更多的酶结构可被预测,也为设计电活性生物元件提供了更多可能。

(2) 拓宽反应电势/电压 受生物化学反应电势的限制,酶促生物电催化系统的实际应用也存在一些问题,例如电池输出电压小、电合成电势窗口窄等。传统燃料电池的串联组装可用于EFC的输出电压放大,同时拓展EES的电势范围,而并联连接可增加电流密度^[134]。例如通过5个独立电池串联而成的丝网印刷EFC,其产生的电压可直接点亮LED灯^[205]。然而,通过串联的系统整体性能会受最差单元的限制。因此,系统的堆叠需要可控、可重复,尤其是在材料的制备和酶的固定化方面。利用金属引线串联时,需要避免离子导电电解质引起的短路,如采用超疏水表面为电解池或电池之间建立离子隔离等。除串联外,还可通过连接电荷泵作为DC-DC转换器来提高系统输出电压。例如,采用升压转换器后,可实现将葡萄糖/O₂型EFC提供的能量较低的电子转化为能量较高的电子,并用于电解水^[206]。此外,降低电催化反应的过电势也是酶促生物电催化系统的研究重点。例如,将CO₂电还原与甘油电氧化相结合,可降低反应槽电压、节省反应耗电量、降低成本并获得高附加值还原产物^[207]。

(3) 反应器和系统放大 在酶促生物电催化系统中,生物元件、电极材料、电子中介体等共同构成了一个复杂的系统。除聚焦生物本身的特性和工程改造之外,电极材料的理化特性、表面结构、生物相容性等对酶-电极相互作用和生物电催化系统的性能也起着至关重要的作用。已开发出很多具有新结构、特性和功能的先进电极材料,可增强生物催化剂和电极之间的电学通信^[123-124, 208-209]。根据不同酶元件的结构特性,构建高生物相容性的有机/无机-生物杂合系统,可以进一步拓宽生物电催化系统在电能输出、电化学生

成、生物传感等领域的应用范围。目前,酶促生物电催化系统仍处于实验室水平,除受酶活性和稳定性、多酶催化电子传递效率等问题的限制外,最大的问题之一是反应器难以放大。扩大系统的电极面积或反应器体积,其功率无法成比例提升,反而会增大系统内阻、徒增损耗,不利于整体性能的提高。电极的三维化是提高其比表面积、增大电流的有效手段。在反应器层面,实验室规模上常用的反应器是H型两室反应器,但由于高内阻限制了扩大到中试或工业规模的可能^[210]。相比于H型池,基于膜电极组的流动型电解池具有更高的通量,可实现连续化生产,更加适用于工业化大规模应用。另一方面,随着可穿戴、柔性化等应用需求的增多,迫切需要设计和开发种类繁多的新型酶促生物电催化反应器以及合理的放大策略,以便更好地表征、建模、优化和应用于不同的系统^[211]。决定酶促生物电催化系统能否进入实际应用的另一关键因素是能量转化中的效率和成本问题。除电极材料和酶的成本需进一步降低外,随着合成生物学元件的开发和创新,采用更廉价、更稳定的仿生辅酶或开发高效的生物电催化辅酶再生的方法有望有效降低成本,简化产品分离过程,并延长系统运行时间。

参 考 文 献

- [1] HILL H A O, HIGGINS I J. Bioelectrocatalysis[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 1981, 302: 267-273.
- [2] IKEDA T, KANO K. An electrochemical approach to the studies of biological redox reactions and their applications to biosensors, bioreactors, and biofuel cells[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(1): 9-18.
- [3] CADOUX C, MILTON R D. Recent enzymatic electrochemistry for reductive reactions[J]. ChemElectroChem, 2020, 7(9): 1974-1986.
- [4] CHEN H, DONG F Y, MINTEER S D. The progress and outlook of bioelectrocatalysis for the production of chemicals, fuels and materials[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(3): 225-244.
- [5] GAJDA I, OBATA O, GREENMAN J, et al. Electroosmotically generated disinfectant from urine as a by-product of electricity in microbial fuel cell for the inactivation of pathogenic species[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 5533.
- [6] INAMUDDIN, SHAKEEL N, IMRAN AHAMED M, et al. Green synthesis of ZnO nanoparticles decorated on polyindole

- functionalized-MCNTs and used as anode material for enzymatic biofuel cell applications[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 5052.
- [7] FREGUIA S, VIRDIS B, HARNISCH F, et al. Bioelectrochemical systems: microbial versus enzymatic catalysis[J]. *Electrochimica Acta*, 2012, 82: 165-174.
- [8] HICKEY D P, MILTON R D, RASMUSSEN M A, et al. Fundamentals and applications of bioelectrocatalysis [M]// BANKS C, MORTIMER R, MCINTOSH S. *Electrochemistry: Volume 13*. Royal Society of Chemistry, 2016.
- [9] HAQUE S U, DUTEANU N, CIOCAN S, et al. A review: evolution of enzymatic biofuel cells[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 298: 113483.
- [10] WU R R, MA C L, ZHU Z G. Enzymatic electrosynthesis as an emerging electrochemical synthesis platform[J]. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2020, 19: 1-7.
- [11] VLASITS J, JAKOPITSCH C, BERNROITNER M, et al. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 500(1): 74-81.
- [12] ZHANG W, DU L, LI F W, et al. Mechanistic insights into interactions between bacterial class I P450 enzymes and redox partners[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(11): 9992-10003.
- [13] BETANCOR L, JOHNSON G R, LUCKARIFT H R. Stabilized laccases as heterogeneous bioelectrocatalysts[J]. *ChemCatChem*, 2013, 5(1): 46-60.
- [14] HUIJBERS M M E, MONTERSINO S, WESTPHAL A H, et al. Flavin dependent monooxygenases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 544: 2-17.
- [15] LAURINAVICIUS V, RAZUMIENE J, RAMANAVICIUS A, et al. Wiring of PQQ-dehydrogenases[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20(6): 1217-1222.
- [16] MAYO S L, ELLIS W R JR, CRUTCHLEY R J, et al. Long-range electron transfer in heme proteins[J]. *Science*, 1986, 233(4767): 948-952.
- [17] MEYER J. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution[J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13(2): 157-170.
- [18] LILL R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 831-838.
- [19] EVANS D J, PICKETT C J. Chemistry and the hydrogenases[J]. *Chemical Society Reviews*, 2003, 32(5): 268-275.
- [20] CAI R, MINTEER S D. Nitrogenase bioelectrocatalysis: from understanding electron-transfer mechanisms to energy applications[J]. *ACS Energy Letters*, 2018, 3(11): 2736-2742.
- [21] SEEFELDT L C, HOFFMAN B M, PETERS J W, et al. Energy transduction in nitrogenase[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2018, 51(9): 2179-2186.
- [22] SHLEEV S, TKAC J, CHRISTENSON A, et al. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20(12): 2517-2554.
- [23] ROMERO E, CASTELLANOS J R G, GADDA G, et al. Same substrate, many reactions: oxygen activation in flavoenzymes[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(4): 1742-1769.
- [24] GOODWIN P M, ANTHONY C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes [M]// POOLE R K. *Advances in microbial physiology*. Academic Press, 1998: 1-80.
- [25] RAZUMIENE J, NICULESCU M, RAMANAVICIUS A, et al. Direct bioelectrocatalysis at carbon electrodes modified with quinoxinone alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter* sp. 33[J]. *Electroanalysis*, 2002, 14(1): 43-49.
- [26] TREMEY E, STINES-CHAUMEIL C, GOUNEL S, et al. Designing an O₂-insensitive glucose oxidase for improved electrochemical applications[J]. *ChemElectroChem*, 2017, 4(10): 2520-2526.
- [27] MASAKARI Y, HARA C, ARAKI Y, et al. Improvement in the thermal stability of *Mucor prainii*-derived FAD-dependent glucose dehydrogenase via protein chimerization[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 132: 109387.
- [28] 王世珍, 刘凯泷, 詹东平. 氧化还原酶电催化反应研究进展[J]. *科学通报*, 2021, 66(10): 1240-1249.
- WANG S Z, LIU L L, ZHAN D P. Advances of bioelectrocatalysis by oxidoreductases[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(10): 1240-1249.
- [29] MANO N. Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications[J]. *Bioelectrochemistry*, 2019, 128: 218-240.
- [30] ZHANG L L, CUI H Y, ZOU Z, et al. Directed evolution of a bacterial laccase (CueO) for enzymatic biofuel cells[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(14): 4562-4565.
- [31] MA C, WU R, HUANG R, et al. Directed evolution of a 6-phosphogluconate dehydrogenase for operating an enzymatic fuel cell at lowered anodic pHs [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, 851: 113444.
- [32] CHEN H, ZHU Z G, HUANG R, et al. Coenzyme engineering of a hyperthermophilic 6-phosphogluconate dehydrogenase from NADP⁺ to NAD⁺ with its application to biobatteries[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36311.
- [33] BAO L L, SUN D P, TACHIKAWA H, et al. Improved sensitivity of a histamine sensor using an engineered methylamine dehydrogenase[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(5): 1144-1148.
- [34] WEGERICH F, TURANO P, ALLEGROZZI M, et al. Cytochrome C mutants for superoxide biosensors[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(8): 2976-2984.
- [35] HIRAKA K, KOJIMA K, LIN C E, et al. Minimizing the effects of oxygen interference on L-lactate sensors by a single amino acid mutation in *Aerococcus viridans* l-lactate oxidase[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 103: 163-170.
- [36] YAMASHITA Y, FERRI S, HUYNH M L, et al. Direct elec-

- tron transfer type disposable sensor strip for glucose sensing employing an engineered FAD glucose dehydrogenase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 52(2): 123-128.
- [37] ZHOU Q, HU M R, ZHANG W, et al. Probing the function of the Tyr-Cys cross-link in metalloenzymes by the genetic incorporation of 3-methylthiotyrosine[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(4): 1203-1207.
- [38] DYDIO P, KEY H M, NAZARENKO A, et al. An artificial metalloenzyme with the kinetics of native enzymes[J]. *Science*, 2016, 354(6308): 102-106.
- [39] YANG Y, ZHOU Q, WANG L, et al. Significant improvement of oxidase activity through the genetic incorporation of a redox-active unnatural amino acid[J]. *Chemical Science*, 2015, 6(7): 3881-3885.
- [40] PRESNOVA G, GRIGORENKO V, EGOROV A, et al. Direct heterogeneous electron transfer of recombinant horseradish peroxidases on gold[J]. *Faraday Discussions*, 2000(116): 281-289.
- [41] LEE Y S, BAEK S, LEE H, et al. Construction of uniform monolayer-and orientation-tunable enzyme electrode by a synthetic glucose dehydrogenase without electron-transfer subunit via optimized site-specific gold-binding peptide capable of direct electron transfer[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(34): 28615-28626.
- [42] AL-LOLAGE F, BARTLETT P N, GOUNEL S, et al. Site-directed immobilization of bilirubin oxidase for electrocatalytic oxygen reduction[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(3): 2068-2078.
- [43] WANG Y M, KANG Z P, ZHANG L L, et al. Elucidating the interactions between a [NiFe]-hydrogenase and carbon electrodes for enhanced bioelectrocatalysis[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(2): 1415-1427.
- [44] LAMBERG P, HAMIT-EMINOVSKI J, TOSCANO M D, et al. Electrical activity of cellobiose dehydrogenase adsorbed on thiols: influence of charge and hydrophobicity[J]. *Bioelectrochemistry*, 2017, 115: 26-32.
- [45] MUGURUMA H, IWASA H, HIDAKA H, et al. Mediatorless direct electron transfer between flavin adenine dinucleotide-dependent glucose dehydrogenase and single-walled carbon nanotubes[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(1): 725-734.
- [46] ZAYATS M, KATZ E, WILLNER I. Electrical contacting of glucose oxidase by surface-reconstitution of the apo-protein on a relay-boronic acid-FAD cofactor monolayer[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(10): 2120-2121.
- [47] WANG Y M, SONG Y H, MA C L, et al. Electrochemical characterization of a truncated hydrogenase from *Pyrococcus furiosus*[J]. *Electrochimica Acta*, 2021, 387: 138502.
- [48] OKUDA-SHIMAZAKI J, LOEW N, HIROSE N, et al. Construction and characterization of flavin adenine dinucleotide glucose dehydrogenase complex harboring a truncated electron transfer subunit[J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 277: 276-286.
- [49] ORTIZ R, MATSUMURA H, TASCA F, et al. Effect of deglycosylation of cellobiose dehydrogenases on the enhancement of direct electron transfer with electrodes[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(23): 10315-10323.
- [50] CHEN H, CAI R, PATEL J, et al. Upgraded bioelectrocatalytic N₂ fixation: from N₂ to chiral amine intermediates[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(12): 4963-4971.
- [51] SONG H Y, MA C L, LIU P, et al. A hybrid CO₂ electroreduction system mediated by enzyme-cofactor conjugates coupled with Cu nanoparticle-catalyzed cofactor regeneration[J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2019, 34: 568-575.
- [52] ZEYMER C, HILVERT D. Directed evolution of protein catalysts[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2018, 87: 131-157.
- [53] PACKER M S, LIU D R. Methods for the directed evolution of proteins[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(7): 379-394.
- [54] HORAGUCHI Y, SAITO S, KOJIMA K, et al. Engineering glucose oxidase to minimize the influence of oxygen on sensor response[J]. *Electrochimica Acta*, 2014, 126: 158-161.
- [55] YU Y, LIU X H, WANG J Y. Expansion of redox chemistry in designer metalloenzymes[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(3): 557-565.
- [56] ZHU Z G, MA C L, PERCIVAL ZHANG Y H. Co-utilization of mixed sugars in an enzymatic fuel cell based on an *in vitro* enzymatic pathway[J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 263: 184-191.
- [57] XIA L, HAN M J, ZHOU L, et al. S-click reaction for isotropic orientation of oxidases on electrodes to promote electron transfer at low potentials[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(46): 16480-16484.
- [58] 曲戈, 赵晶, 郑平, 等. 定向进化技术的最新进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(1): 1-11.
- QU G, ZHAO J, ZHENG P, et al. Recent advances in directed evolution[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(1): 1-11.
- [59] ADACHI T, KATAOKA K, KITAZUMI Y, et al. A bio-solar cell with thylakoid membranes and bilirubin oxidase[J]. *Chemistry Letters*, 2019, 48(7): 686-689.
- [60] HU C, CHAN S I, SAWYER E B, et al. Metalloprotein design using genetic code expansion[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(18): 6498-6510.
- [61] AGOSTINI F, VÖLLER J S, KOKSCH B, et al. Biocatalysis with unnatural amino acids: enzymology meets xenobiology [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(33): 9680-9703.
- [62] HU C, YU Y, WANG J Y. Improving artificial metalloenzymes' activity by optimizing electron transfer[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(30): 4173-4186.
- [63] KEY H M, DYDIO P, CLARK D S, et al. Abiological catalysis by artificial haem proteins containing noble metals in place of iron[J]. *Nature*, 2016, 534(7608): 534-537.

- [64] ARDAOI, HWANGE T, ZENGA-P. *In vitro* multienzymatic reaction systems for biosynthesis [M]// ZENG A-P. Fundamentals and application of new bioproduction systems. Berlin, Heidelberg; Springer Berlin Heidelberg. 2013: 153-184.
- [65] WU R R, SONG H Y, WANG Y M, et al. Multienzyme co-immobilization-based bioelectrode: design of principles and bioelectrochemical applications[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2020, 28(8): 2037-2050.
- [66] ZHU Z G, SUN F F, ZHANG X Z, et al. Deep oxidation of glucose in enzymatic fuel cells through a synthetic enzymatic pathway containing a cascade of two thermostable dehydrogenases[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 36(1): 110-115.
- [67] ALIM S, KAFI A K M, RAJAN J, et al. Application of polymerized multiporous nanofiber of SnO₂ for designing a bienzyme glucose biosensor based on HRP/GOx[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 1028-1034.
- [68] ZHANG L L, LIU J, FU Z L, et al. A wearable biosensor based on bienzyme gel-membrane for sweat lactate monitoring by mounting on eyeglasses[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2020, 20(3): 1495-1503.
- [69] ALKOTAINI B, ABDELLAOUI S, HASAN K, et al. Sustainable bioelectrosynthesis of the bioplastic polyhydroxybutyrate: overcoming substrate requirement for NADH regeneration[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2018, 6(4): 4909-4915.
- [70] WANG L L, GONG W C, WANG F, et al. Efficient bienzyme nanocomposite film for chiral recognition of L-tryptophan, L-phenylalanine and L-tyrosine[J]. Analytical Methods, 2016, 8(17): 3481-3487.
- [71] VARGAS E, RUIZ M A, FERRERO F J, et al. Automatic bioanalyzer using an integrated amperometric biosensor for the determination of L-malic acid in wines[J]. Talanta, 2016, 158: 6-13.
- [72] SAKAMOTO H, KOMATSU T, YAMASAKI K, et al. Design of a multi-enzyme reaction on an electrode surface for an L-glutamate biofuel anode[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(2): 235-240.
- [73] HIRANO Y, IKEGAMI M, KOWATA K, et al. Bienzyme reactions on cross-linked DNA scaffolds for electrochemical analysis[J]. Bioelectrochemistry, 2017, 113: 15-19.
- [74] HWANG E T, LEE S. Multienzymatic cascade reactions *via* enzyme complex by immobilization[J]. ACS Catalysis, 2019, 9(5): 4402-4425.
- [75] ZUCCA P, SANJUST E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms[J]. Molecules, 2014, 19(9): 14139-14194.
- [76] MOEHLNBROCK M J, MEREDITH M T, MINTEER S D. Bioelectrocatalytic oxidation of glucose in CNT impregnated hydrogels: advantages of synthetic enzymatic metabolon formation[J]. ACS Catalysis, 2012, 2(1): 17-25.
- [77] MOEHLNBROCK M J, TOBY T K, PELSTER L N, et al. Metabolon catalysts: an efficient model for multi-enzyme cascades at electrode surfaces[J]. ChemCatChem, 2011, 3(3): 561-570.
- [78] MOEHLNBROCK M J, TOBY T K, WAHEED A, et al. Metabolon catalyzed pyruvate/air biofuel cell[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(18): 6288-6289.
- [79] FAN S Q, LIANG B, XIAO X X, et al. Controllable display of sequential enzymes on yeast surface with enhanced biocatalytic activity toward efficient enzymatic biofuel cells[J]. Journal of the American Chemical Society, 2020, 142(6): 3222-3230.
- [80] BEHRENDORFF J B Y H, BORRÁS-GAS G, PRIBIL M. Synthetic protein scaffolding at biological membranes[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(4): 432-446.
- [81] MENG D D, WU R R, WANG J, et al. Acceleration of cello-dextrin phosphorolysis for bioelectricity generation from cellulosic biomass by integrating a synthetic two-enzyme complex into an *in vitro* synthetic enzymatic biosystem[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 267.
- [82] SZCZUPAK A, AIZIK D, MORAÍS S, et al. The electroosome: a surface-displayed enzymatic cascade in a biofuel cell's anode and a high-density surface-displayed biocathodic enzyme[J]. Nanomaterials, 2017, 7(7): 153.
- [83] FU J L, LIU M H, LIU Y, et al. Interenzyme substrate diffusion for an enzyme cascade organized on spatially addressable DNA nanostructures[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(12): 5516-5519.
- [84] KIM Y H, CAMPBELL E, YU J, et al. Complete oxidation of methanol in biobattery devices using a hydrogel created from three modified dehydrogenases[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2013, 52(5): 1437-1440.
- [85] PAGE C C, MOSER C C, CHEN X X, et al. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction[J]. Nature, 1999, 402(6757): 47-52.
- [86] STEINBUSCH K J J, HAMELERS H V M, SCHAAP J D, et al. Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(1): 513-517.
- [87] HATCH J L, FINNERAN K T. Influence of reduced electron shuttling compounds on biological H₂ production in the fermentative pure culture *Clostridium beijerinckii* [J]. Current Microbiology, 2008, 56(3): 268-273.
- [88] PARK D H, ZEIKUS J G. Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(8): 2403-2410.
- [89] MINTEER S D. Enzyme stabilization and immobilization[M].

- Springer, 2017.
- [90] JESIONOWSKI T, ZDARTA J, KRAJEWSKA B. Enzyme immobilization by adsorption: a review[J]. *Adsorption*, 2014, 20(5/6): 801-821.
- [91] CHRISTWARDANA M, CHUNG Y, KWON Y. Co-immobilization of glucose oxidase and catalase for enhancing the performance of a membraneless glucose biofuel cell operated under physiological conditions[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(5): 1993-2002.
- [92] WU R R, MA C L, YONG Y C, et al. Composition and distribution of internal resistance in an enzymatic fuel cell and its dependence on cell design and operating conditions[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(13): 7292-7300.
- [93] SHARMA S K, SINGHAL R, MALHOTRA B D, et al. Biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene) for detection of galactose in human blood[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(8): 645-647.
- [94] MOHAMAD N R, MARZUKI N H C, BUANG N A, et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes[J]. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 2015, 29(2): 205-220.
- [95] DENG L, SHANG L, WEN D, et al. A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26(1): 70-73.
- [96] ZHU Z G, MA C L, PERCIVAL ZHANG Y H. Co-utilization of mixed sugars in an enzymatic fuel cell based on an *in vitro* enzymatic pathway[J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 263: 184-191.
- [97] MACAZO F C, MINTEER S D. Enzyme cascades in biofuel cells[J]. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2017, 5(1): 114-120.
- [98] DATTA S, CHRISTENA L R, RAJARAM Y R S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials[J]. *3 Biotech*, 2013, 3(1): 1-9.
- [99] VAN NGUYEN K, MINTEER S D. Investigating DNA hydrogels as a new biomaterial for enzyme immobilization in biobatteries[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(66): 13071-13073.
- [100] SATOMURA T, HORINAGA K, TANAKA S, et al. Construction of a novel bioanode for amino acid powered fuel cells through an artificial enzyme cascade pathway[J]. *Biotechnology Letters*, 2019, 41(4/5): 605-611.
- [101] HYUN K, KANG S, KIM J, et al. New biocatalyst including a 4-nitrobenzoic acid mediator embedded by the cross-linking of chitosan and genipin and its use in an energy device[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(20): 23635-23643.
- [102] CHANG H C, WOHLSCHLAGER L, CSARMAN F, et al. Real-time measurement of cellobiose and glucose formation during enzymatic biomass hydrolysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(21): 7732-7738.
- [103] WANG F, GONG W C, WANG L L, et al. Enhanced amperometric response of a glucose oxidase and horseradish peroxidase based bienzyme glucose biosensor modified with a film of polymerized toluidine blue containing reduced graphene oxide[J]. *Microchimica Acta*, 2015, 182(11/12): 1949-1956.
- [104] GRIJALVA-BUSTAMANTE G A, EVANS-VILLEGAS A G, DEL CASTILLO-CASTRO T, et al. Enzyme mediated synthesis of polypyrrole in the presence of chondroitin sulfate and redox mediators of natural origin[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 63: 650-656.
- [105] SO K, KITAZUMI Y, SHIRAI O, et al. Direct electron transfer-type dual gas diffusion H₂/O₂ biofuel cells[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2016, 4(22): 8742-8749.
- [106] TAKAMURA E, OHNISHI T, SAKAMOTO H, et al. Promoting of direct electron transfer of multicopper oxidase by control of enzyme molecule density on multi-walled carbon nanotube[J]. *Journal of Physics: Energy*, 2021, 3(1): 014006.
- [107] LAI B, TANG X H, LI H R, et al. Power production enhancement with a polyaniline modified anode in microbial fuel cells[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 28(1): 373-377.
- [108] SAITO T, MEHANNA M, WANG X, et al. Effect of nitrogen addition on the performance of microbial fuel cell anodes[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 395-398.
- [109] ZHU N W, CHEN X, ZHANG T, et al. Improved performance of membrane free single-chamber air-cathode microbial fuel cells with nitric acid and ethylenediamine surface modified activated carbon fiber felt anodes[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 422-426.
- [110] ZHOU M H, CHI M L, WANG H Y, et al. Anode modification by electrochemical oxidation: a new practical method to improve the performance of microbial fuel cells[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 60: 151-155.
- [111] CHUMILLAS S, MAESTRO B, FELIU J M, et al. Comprehensive study of the enzymatic catalysis of the electrochemical oxygen reduction reaction (ORR) by immobilized copper efflux oxidase (CueO) from *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6: 358.
- [112] KALIMUTHU P, BELAIDI A A, SCHWARZ G, et al. Chitosan-promoted direct electrochemistry of human sulfite oxidase[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2017, 121(39): 9149-9159.
- [113] WILLNER I, KATZ E, WILLNER B. Electrical contact of redox enzyme layers associated with electrodes: routes to amperometric biosensors[J]. *Electroanalysis*, 1997, 9(13): 965-977.
- [114] KATZ E, WILLNER I. Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics [J]. *ChemPhysChem*, 2004, 5(8): 1084-1104.
- [115] COURJEAN O, GAO F, MANO N. Deglycosylation of glu-

- cose oxidase for direct and efficient glucose electrooxidation on a glassy carbon electrode[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(32): 5897-5899.
- [116] PRÉVOTEAU A, COURJEAN O, MANO N. Deglycosylation of glucose oxidase to improve biosensors and biofuel cells[J]. *Electrochemistry Communications*, 2010, 12(2): 213-215.
- [117] LEE H J, LEE S H, PARK C B, et al. Coenzyme analogs: excellent substitutes (not poor imitations) for electrochemical regeneration[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(46): 12538-12540.
- [118] SONG H Y, MA C L, ZHOU W, et al. Construction of enzyme-cofactor/mediator conjugates for enhanced *in vitro* bioelectricity generation[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2018, 29(12): 3993-3998.
- [119] BARSAN M M, GHICA M E, BRETT C M A. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 881: 1-23.
- [120] KUMAR S A, CHEN S M. Electroanalysis of NADH using conducting and redox active polymer/carbon nanotubes modified electrodes-a review[J]. *Sensors*, 2008, 8(2): 739-766.
- [121] YUAN M W, MINTEER S D. Redox polymers in electrochemical systems: from methods of mediation to energy storage[J]. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2019, 15: 1-6.
- [122] MAO F, MANO N, HELLER A. Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme "wiring" hydrogels[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(16): 4951-4957.
- [123] WALCARIUS A, MINTEER S D, WANG J, et al. Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(38): 4878-4908.
- [124] ZHAO C E, GAI P P, SONG R B, et al. Nanostructured material-based biofuel cells: recent advances and future prospects[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(5): 1545-1564.
- [125] SABOE P O, CONTE E, FARELL M, et al. Biomimetic and bioinspired approaches for wiring enzymes to electrode interfaces[J]. *Energy & Environmental Science*, 2017, 10(1): 14-42.
- [126] MAZURENKO I, DE POULPIQUET A, LOJOU E. Recent developments in high surface area bioelectrodes for enzymatic fuel cells[J]. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2017, 5(1): 74-84.
- [127] HOLZINGER M, LE GOFF A, COSNIER S. Carbon nanotube/enzyme biofuel cells[J]. *Electrochimica Acta*, 2012, 82: 179-190.
- [128] LAHEÄÄR A, DELPEUX-OULDRIANE S, LUST E, et al. Ammonia treatment of activated carbon powders for supercapacitor electrode application[J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2014, 161(4): A568-A575.
- [129] FRANZOI A C, VIEIRA I C, DUPONT J, et al. Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride[J]. *The Analyst*, 2009, 134(11): 2320-2328.
- [130] CAVALCANTI I T, SILVA B V M, PERES N G, et al. A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection[J]. *Talanta*, 2012, 91: 41-46.
- [131] WANG L, ZHENG Y L, LU X P, et al. Dendritic copper-cobalt nanostructures/reduced graphene oxide-chitosan modified glassy carbon electrode for glucose sensing[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 195: 1-7.
- [132] XIE Y E, MA Z K, SONG H H, et al. Melamine modified carbon felts anode with enhanced electrogenesis capacity toward microbial fuel cells[J]. *Journal of Energy Chemistry*, 2017, 26(1): 81-86.
- [133] WINDMILLER J R, WANG J. Wearable electrochemical sensors and biosensors: a review[J]. *Electroanalysis*, 2013, 25(1): 29-46.
- [134] XIAO X X, XIA H Q, WU R R, et al. Tackling the challenges of enzymatic (bio)fuel cells[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(16): 9509-9558.
- [135] HERNÁNDEZ-IBÁÑEZ N, GOMIS-BERENQUER A, MONTIEL V, et al. Fabrication of a biocathode for formic acid production upon the immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* on a nanoporous carbon[J]. *Chemosphere*, 2022, 291(Pt 3): 133117.
- [136] CHEN H, SIMOSKA O, LIM K, et al. Fundamentals, applications, and future directions of bioelectrocatalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2020, 120(23): 12903-12993.
- [137] YU S, MYUNG N V. Recent advances in the direct electron transfer-enabled enzymatic fuel cells[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 8: 620153.
- [138] PARRILLA M, DE WAEL K. Wearable self-powered electrochemical devices for continuous health management [J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(50): 2107042.
- [139] MINJ H, SEMPIONATTOJ R, TEYMOURIANH, et al. Wearable electrochemical biosensors in North America[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 172: 112750.
- [140] XUAN X, PÉREZ-RÀFOLS C, CHEN C, et al. Lactate biosensing for reliable on-body sweat analysis[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(7): 2763-2771.
- [141] YOON S, YOON H, ZAHED M A, et al. Multifunctional hybrid skin patch for wearable smart healthcare applications[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 196: 113685.
- [142] KEMP E, PALOMÄKI T, RUUTH I A, et al. Influence of enzyme immobilization and skin-sensor interface on non-invasive glucose determination from interstitial fluid obtained by magnetohydrodynamic extraction[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 206: 114123.
- [143] SCHACHINGER F, CHANG H C, SCHEIBLBRANDNER S,

- et al. Amperometric biosensors based on direct electron transfer enzymes[J]. *Molecules*, 2021, 26(15): 4525.
- [144] CAIR, MILTON R D, ABDELLAOUIS, et al. Electroenzymatic C-C bond formation from CO₂[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(15): 5041-5044.
- [145] WU R R, YU Y Y, WANG Y M, et al. Wastewater-powered high-value chemical synthesis in a hybrid bioelectrochemical system[J]. *iScience*, 2021, 24(12): 103401.
- [146] UEKI T, WALKER D J F, TREMBLAY P L, et al. Decorating the outer surface of microbially produced protein nanowires with peptides[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(8): 1809-1817.
- [147] TAN Y, ADHIKARI R Y, MALVANKAR N S, et al. The low conductivity of *geobacter uraniireducens* pili suggests a diversity of extracellular electron transfer mechanisms in the genus *geobacter*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 980.
- [148] HARTSHORNE R S, REARDON C L, ROSS D, et al. Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22169-22174.
- [149] ROSS D E, FLYNN J M, BARON D B, et al. Towards electrosynthesis in *Shewanella*: energetics of reversing the Mtr pathway for reductive metabolism[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16649.
- [150] HALÁMKOVÁ L, HALÁMEK J, BOCHAROVA V, et al. Implanted biofuel cell operating in a living snail[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(11): 5040-5043.
- [151] BANDODKAR A J, GUTRUF P, CHOI J, et al. Battery-free, skin-interfaced microfluidic/electronic systems for simultaneous electrochemical, colorimetric, and volumetric analysis of sweat[J]. *Science Advances*, 2019, 5(1): eaav3294.
- [152] SAKAI H, NAKAGAWA T, TOKITA Y, et al. A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions [J]. *Energy and Environmental Science*, 2009, 2(1): 133-138.
- [153] COSNIER S, SHAN D, DING S N. An easy compartment-less biofuel cell construction based on the physical co-inclusion of enzyme and mediator redox within pressed graphite discs[J]. *Electrochemistry Communications*, 2010, 12(2): 266-269.
- [154] SHI P K, WU R R, WANG J, et al. Biomass sugar-powered enzymatic fuel cells based on a synthetic enzymatic pathway[J]. *Bioelectrochemistry*, 2022, 144: 108008.
- [155] CHEN H, HUANG R, KIM E J, et al. Building a thermostable metabolon for facilitating coenzyme transport and *in vitro* hydrogen production at elevated temperature[J]. *ChemSusChem*, 2018, 11(18): 3120-3130.
- [156] MOEHLNBROCK M J, MINTEER S D. Extended lifetime biofuel cells[J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(6): 1188-1196.
- [157] CASTILLO-ORTEGA M M, RODRIGUEZ D E, ENCINAS J C, et al. Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(*n*-butyl methacrylate) composites[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2002, 85(1/2): 19-25.
- [158] MILTON R D, LIM K, HICKEY D P, et al. Employing FAD-dependent glucose dehydrogenase within a glucose/oxygen enzymatic fuel cell operating in human serum[J]. *Bioelectrochemistry*, 2015, 106: 56-63.
- [159] LEE I, LOEW N, TSUGAWA W, et al. The electrochemical behavior of a FAD dependent glucose dehydrogenase with direct electron transfer subunit by immobilization on self-assembled monolayers[J]. *Bioelectrochemistry*, 2018, 121: 1-6.
- [160] YOSHIDA H, SAKAI G, MORI K, et al. Structural analysis of fungus-derived FAD glucose dehydrogenase[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13498.
- [161] SCHEIBLBRANDNER S, CSARMAN F, LUDWIG R. Cellobiose dehydrogenase in biofuel cells[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 73: 205-212.
- [162] XU M, OBODO D, YADAVALLI V K. The design, fabrication, and applications of flexible biosensing devices[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 124/125: 96-114.
- [163] ROTARIU L, LAGARDE F, JAFFREZIC-RENAULT N, et al. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants-trends and perspective[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 79: 80-87.
- [164] SIN M L Y, MACH K E, WONG P K, et al. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2014, 14(2): 225-244.
- [165] GATTANI A, SINGH S V, AGRAWAL A, et al. Recent progress in electrochemical biosensors as point of care diagnostics in livestock health[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 579: 25-34.
- [166] EL HARRAD L, BOURAIS I, MOHAMMADI H, et al. Recent advances in electrochemical biosensors based on enzyme inhibition for clinical and pharmaceutical applications[J]. *Sensors*, 2018, 18(1): 164.
- [167] NGUYEN H H, LEE S H, LEE U J, et al. Immobilized enzymes in biosensor applications[J]. *Materials*, 2019, 12(1): 121.
- [168] REYES-DE-CORCUERA J I, OLSTAD H E, GARCÍA-TORRES R. Stability and stabilization of enzyme biosensors: the key to successful application and commercialization[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2018, 9: 293-322.
- [169] HAMMOND J L, FORMISANO N, ESTRELA P, et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors[J]. *Essays in Biochemistry*, 2016, 60(1): 69-80.

- [170] JAFFREZIC-RENAULT N, DZYADEVYCH S V. Conductometric microbiosensors for environmental monitoring[J]. *Sensors*, 2008, 8(4): 2569-2588.
- [171] RANDVIIR E P, BANKS C E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5(5): 1098.
- [172] GUO X W. Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review[J]. *Journal of Biophotonics*, 2012, 5(7): 483-501.
- [173] DING J W, QIN W. Recent advances in potentiometric biosensors[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 124: 115803.
- [174] GARG S K, AKTURK H K. Flash glucose monitoring: the future is here[J]. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2017, 19(S2): S1-S3.
- [175] Lactose biosensor assay kit system. [Z]. 2021. www.lactosens.com
- [176] FERAPONTOVA E E, GRIGORENKO V G, EGOROV A M, et al. Mediatorless biosensor for H₂O₂ based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16(3): 147-157.
- [177] GASPAR S, ZIMMERMANN H, GAZARYAN I, et al. Hydrogen peroxide biosensors based on direct electron transfer from plant peroxidases immobilized on self-assembled thiol-monolayer modified gold electrodes[J]. *Electroanalysis*, 2001, 13(4): 284-288.
- [178] GAZARYAN I G, GORTON L, RUZGAS T, et al. Tobacco peroxidase as a new reagent for amperometric biosensors[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 60(6): 558-566.
- [179] SHIPOVSKOV S, FERAPONTOVA E E. Biocatalysis of theophylline oxidation by microbial theophylline oxidase in the presence of non-physiological electron acceptors[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2008, 26(6): 455-465.
- [180] FORT C I, ORTIZ R, COTET L C, et al. Carbon aerogel as electrode material for improved direct electron transfer in biosensors incorporating cellobiose dehydrogenase[J]. *Electroanalysis*, 2016, 28(10): 2311-2319.
- [181] KHOKHAR S, MOHD ZIN A A, BHAYO M A, et al. Automated recognition of single & hybrid power quality disturbances using wavelet transform based support vector machine[J]. *Jurnal Teknologi*, 2016, 79(1). <https://doi.org/10.11113/jt.v79.5693>.
- [182] BOLLELLA P, GORTON L, ANTIOCHIA R. Direct electron transfer of dehydrogenases for development of 3rd generation biosensors and enzymatic fuel cells[J]. *Sensors*, 2018, 18(5): 1319.
- [183] LE BORGNE S, PANIAGUA D, VAZQUEZ-DUHALT R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and Archaea[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2008, 15(2/3): 74-92.
- [184] DOMINGUEZ-BENETTON X, SANDIPAM S, SATYAWALI Y, et al. Enzymatic electrosynthesis: an overview on the progress in enzyme-electrodes for the production of electricity, fuels and chemicals[J/OL]. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 2013, S6: 009. <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/enzymatic-electrosynthesis-an-overview-on-the-progress-in-enzyme-electrodes-for-the-production-of-electricity-fuels-and-c-8526.html>
- [185] YUAN M W, SAHIN S, CAI R, et al. Creating a low-potential redox polymer for efficient electroenzymatic CO₂ reduction[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(22): 6582-6586.
- [186] BASSEGODA A, MADDEN C, WAKERLEY D W, et al. Reversible interconversion of CO₂ and formate by a molybdenum-containing formate dehydrogenase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(44): 15473-15476.
- [187] 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.
- [188] SAKAI K, KITAZUMI Y, SHIRAI O, et al. Efficient biocatalytic CO₂ reduction on gas-diffusion-type biocathode with tungsten-containing formate dehydrogenase[J]. *Electrochemistry Communications*, 2016, 73: 85-88.
- [189] KUK S K, SINGH R K, NAM D H, et al. Photoelectrochemical reduction of carbon dioxide to methanol through a highly efficient enzyme cascade[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(14): 3827-3832.
- [190] MILTON R D, MINTEER S D. Enzymatic bioelectrosynthetic ammonia production: recent electrochemistry of nitrogenase, nitrate reductase, and nitrite reductase[J]. *ChemPlusChem*, 2017, 82(4): 513-521.
- [191] LEE Y S, RUFF A, CAI R, et al. Electroenzymatic nitrogen fixation using a MoFe protein system immobilized in an organic redox polymer[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(38): 16511-16516.
- [192] HICKEY D P, LIM K, CAI R, et al. Pyrene hydrogel for promoting direct bioelectrochemistry: ATP-independent electroenzymatic reduction of N₂[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(23): 5172-5177.
- [193] ABDELLAOUI S, MACAZO F C, CAI R, et al. Enzymatic electrosynthesis of alkanes by bioelectrocatalytic decarbonylation of fatty aldehydes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(9): 2404-2408.
- [194] NAM D H, RYU G M, KUK S K, et al. Water oxidation-coupled, photoelectrochemical redox biocatalysis toward mimicking natural photosynthesis[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2016, 198: 311-317.
- [195] LEE S M, CHOE H, CHO D H, et al. Communication-highly efficient electroenzymatic NADH regeneration by an electron-

- relay flavoenzyme[J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2016, 163(5): G50-G52.
- [196] ZOR C, REEVE H A, QUINSON J, et al. H₂-Driven biocatalytic hydrogenation in continuous flow using enzyme-modified carbon nanotube columns[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(71): 9839-9841.
- [197] LEE Y W, BOONMONGKOLRAS P, SON E J, et al. Unbiased biocatalytic solar-to-chemical conversion by FeOOH/BiVO₄/perovskite tandem structure[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4208.
- [198] WU R R, ZHU Z G. Self-powered enzymatic electrosynthesis of *l*-3, 4-dihydroxyphenylalanine in a hybrid bioelectrochemical system[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(10): 12593-12597.
- [199] SON E, LEE S, KUK S, et al. Carbon nanotube-graphitic carbon nitride hybrid films for flavoenzyme-catalyzed photoelectrochemical cells[J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 28: 1705232.
- [200] CHEN X L, CAO Y X, LI F, et al. Enzyme-assisted microbial electrosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) via CO₂ bioreduction by engineered *Ralstonia eutropha*[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(5): 4429-4437.
- [201] CHOI D S, NI Y, FERNÁNDEZ-FUEYO E, et al. Photoelectroenzymatic oxyfunctionalization on flavin-hybridized carbon nanotube electrode platform[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(3): 1563-7.
- [202] SHI T, HAN P P, YOU C, et al. An *in vitro* synthetic biology platform for emerging industrial biomanufacturing: bottom-up pathway design[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(3): 186-195.
- [203] CHEN X L, LI S B, LIU L M. Engineering redox balance through cofactor systems[J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(6): 337-343.
- [204] SHARP R E, CHAPMAN S K. Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1432(2): 143-158.
- [205] SHITANDA I, NOHARA S, HOSHI Y, et al. A screen-printed circular-type paper-based glucose/O₂ biofuel cell[J]. *Journal of Power Sources*, 2017, 360: 516-519.
- [206] SURANITI E, MERZEAU P, ROCHE J, et al. Uphill production of dihydrogen by enzymatic oxidation of glucose without an external energy source[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3229.
- [207] VERMA S, LU S, KENIS P J A. Co-electrolysis of CO₂ and glycerol as a pathway to carbon chemicals with improved techno-economics due to low electricity consumption[J]. *Nature Energy*, 2019, 4(6): 466-474.
- [208] DU J, CATANIA C, BAZAN G C. Modification of abiotic-biotic interfaces with small molecules and nanomaterials for improved bioelectronics[J]. *Chemistry of Materials*, 2014, 26(1): 686-697.
- [209] AJO-FRANKLIN C M, NOY A. Crossing over: nanostructures that move electrons and ions across cellular membranes[J]. *Advanced Materials*, 2015, 27(38): 5797-5804.
- [210] KRIEG T, MADJAROV J, ROSA L F M, et al. Reactors for microbial electrobiotechnology [M]//HARNISCH F, HOLT-MANN D. *Bioelectrosynthesis*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 231-271.
- [211] ENZMANN F, MAYER F, STÖCKL M, et al. Transferring bioelectrochemical processes from H-cells to a scalable bubble column reactor[J]. *Chemical Engineering Science*, 2019, 193: 133-143.



通讯作者: 朱之光(1985—),男,研究员,博士生导师。研究方向为体外合成生物学、生物电催化、生物燃料电池、生物电化学合成、生物传感、酶工程。
E-mail: zhu_zg@tib.cas.cn



第一作者: 崔馨予(1996—),女,博士研究生。研究方向为氧化还原酶改造、生物电子传递。
E-mail: cuixy@tib.cas.cn



第一作者: 吴冉冉(1988—),女,副研究员。研究方向为生物燃料电池、生物电化学合成、微生物电化学。
E-mail: wu_rr@tib.cas.cn

广告索引:北京华元山水生物科技有限公司(后彩一)/九天基因科技(天津)有限公司(后彩二)/诚志生命科技有限公司(封三)