

# 启动子筛选优化碳酸酐酶异源表达及其酶学性质与固碳性能

姚丹丹<sup>1,2,3</sup>, 李赟卉<sup>1,4</sup>, 付兴佳<sup>1,2,3</sup>, 王辉<sup>1,2,3</sup>, 刘云<sup>1,2,3\*</sup>

1 中国科学院土壤研究所 土壤与农业可持续发展全国重点实验室, 江苏 南京 211135

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 中国科学院大学南京学院, 江苏 南京 211135

4 扬州大学 环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225000

姚丹丹, 李赟卉, 付兴佳, 王辉, 刘云. 启动子筛选优化碳酸酐酶异源表达及其酶学性质与固碳性能[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1588-1604.

YAO Dandan, LI Yunhui, FU Xingjia, WANG Hui, LIU Yun. Optimization of promoter screening for heterologous expression of carbonic anhydrase and characterization of its enzymatic properties and carbon sequestration performance[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1588-1604.

**摘要:** 本研究通过高通量启动子筛选, 优化了百脉生根瘤菌碳酸酐酶(*Mesorhizobium loti* carbonic anhydrase, MICA)的异源表达, 以降低碳捕获与储存(carbon capture and storage, CCS)成本。为简化传统载体的复杂性, 构建了超级折叠绿色荧光蛋白(superfolder green fluorescent protein, sfGFP)与 MICA 的融合蛋白表达系统, 并利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)合成启动子库进行一次性高效筛选。通过检测琼脂平板上菌落的荧光强度筛选出 143 个单克隆, 形成不同表达水平的文库。筛选出荧光强度最高的前 4 个重组子。使用启动子 342042/+ 的 MICA 表现出最高酶活性, 比活性达到 34.6 Wilbur-Anderson units (WAU) /mg。优化实验表明, MICA 在 pH 7.0、40 °C 条件下培养 4 d 表现最佳, 其 CO<sub>2</sub> 水合反应的米氏常数( $K_{m \cdot \text{hdy}}$ )和最大反应速率( $V_{\text{max} \cdot \text{hdy}}$ )分别为 62.46 mmol/L 和 0.164 mmol/(s·L), 酯酶水解  $K_m$  和  $V_{\text{max}}$  分别为 639.8 mmol/L 和 0.035 mmol/(s·L)。MICA 可在 9 min 内、较低 pH 值及室温条件下, 促进 CO<sub>2</sub> 矿化为 CaCO<sub>3</sub>。扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)分析和 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析证实沉淀物为方解石。本研究为 CCS 提供了一种低成本、环保的替代方案。

**关键词:** 高通量启动子筛选; 碳酸酐酶; 异源表达; 催化机理; 碳捕集与储存

资助项目: 江苏省碳达峰碳中和科技创新专项(BK20220004)

This work was supported by the Jiangsu Province Carbon Peak and Carbon Neutrality Science and Technology Innovation Special Program (BK20220004).

\*Corresponding author. E-mail: yliu@issas.ac.cn

Received: 2024-10-10; Accepted: 2025-02-06; Published online: 2025-02-06

# Optimization of promoter screening for heterologous expression of carbonic anhydrase and characterization of its enzymatic properties and carbon sequestration performance

YAO Dandan<sup>1,2,3</sup>, LI Yunhui<sup>1,4</sup>, FU Xingjia<sup>1,2,3</sup>, WANG Hui<sup>1,2,3</sup>, LIU Yun<sup>1,2,3\*</sup>

1 State Key Laboratory of Soil & Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 211135, Jiangsu, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Nanjing 211135, Jiangsu, China

4 College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225000, Jiangsu, China

**Abstract:** In this study, high-throughput promoter screening was employed to optimize the heterologous expression of *Mesorhizobium loti* carbonic anhydrase (MICA) in order to reduce the costs associated with carbon capture and storage (CCS). To simplify the complexity of traditional vectors, a fusion protein expression system was constructed using superfolder green fluorescent protein (sfGFP) and MICA. The synthetic promoter library in *Escherichia coli* was utilized for efficient one-step screening. Based on fluorescence intensity on agar plates, a total of 143 monoclonal colonies were identified, forming a library with varying expression levels. The top four recombinants with the highest fluorescence intensity were selected, among which MICA driven by the promoter 342042/+ exhibited the highest enzymatic activity, with a specific activity of the 34.6 Wilbur-Anderson units (WAU)/mg. Optimization experiments revealed that MICA exhibited the best performance when cultured for 4 days under pH 7.0 and 40 °C conditions. The Michaelis constant ( $K_{m\cdot hdy}$ ) and maximum reaction rate ( $V_{max\cdot hdy}$ ) for CO<sub>2</sub> hydration were determined to be 62.46 mmol/L and 0.164 mmol/(s·L), respectively. For esterase hydrolysis, MICA showed the  $K_m$  and  $V_{max}$  of 639.8 mmol/L and 0.035 mmol/(s·L), respectively. MICA accelerated the CO<sub>2</sub> hydration process, promoting CO<sub>2</sub> mineralized into CaCO<sub>3</sub> within 9 min at low pH and room temperature conditions. Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD) analyses confirmed that the precipitated product was calcite. This study provides a low-cost and environmentally friendly alternative for future CCS applications.

**Keywords:** high-throughput promoter screening; carbonic anhydrase; heterologous expression; catalytic mechanism; carbon capture and storage

为应对气候变化, 全球各国必须采取有效措施减少全球 CO<sub>2</sub> 的排放<sup>[1]</sup>。据国际能源署 (International Energy Agency, IEA) 研究, 2022 年全球 CO<sub>2</sub> 排放量超过 368 亿 t, 达到历史新高<sup>[2]</sup>。联合国政府间气候变化专门委员会 (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) 的研究指出, 如果要将全球气温升高控制

在 1.5 °C 以内, 到 2030 年全球温室气体排放量必须比 2010 年减少 45%<sup>[3]</sup>。这一目标需要全球各国立即采取紧急行动减少碳排放, 碳捕获与储存 (carbon capture and storage, CCS) 技术被认为是实现这一目标的重要途径<sup>[4]</sup>。化学吸收法为典型的碳捕获技术<sup>[5]</sup>, 如单乙醇胺作为化学吸收法中的基准溶剂, 表现出良好的 CO<sub>2</sub> 吸收

能力<sup>[6]</sup>以及较快的反应动力学[反应速率常数为  $4.8\text{--}5.5 \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{mol})$ ]<sup>[7]</sup>。然而,单乙醇胺吸收法仍然存在一些缺陷,如高再生能耗、热稳定盐的形成降低吸收效率,且可能造成设备腐蚀等。因此,研究人员开始聚焦于开发能效更高、更加环保的替代工艺和溶剂<sup>[8]</sup>。甲基二乙醇胺因其吸收热较低等优势(仅为单乙醇胺的 65%),被认为是单乙醇胺的潜在替代品,然而,甲基二乙醇胺同样存在不可避免的缺陷,如  $\text{CO}_2$  负荷能力较低、动力学较慢<sup>[9]</sup>。

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是一种存在于大多数生物体中的高效酶,可高效、特异地催化  $\text{CO}_2$  和  $\text{HCO}_3^-$  之间的相互转化,其酶促周转率可达  $10^4\text{--}10^7 \text{ L/s}$ <sup>[10]</sup>。这使其成为生物过程中至关重要的参与者,涉及光合作用、呼吸作用、离子转运和酸碱平衡等多种生化和生理过程<sup>[11]</sup>。这类酶在 CCS 领域中被认为具有广泛的应用潜力。然而,工业规模化的应用需要大量的 CA,高昂成本阻碍了商品化 CA 在实际中的应用,例如,赛默飞世尔科技公司供应的 CA 每 mg 售价高达 6.7 美元 ( $\geq 3\ 000 \text{ U/mg}$  干重)。为此,异源表达技术成为解决这一问题的关键方法。通过在廉价且生长迅速的宿主[如大肠杆菌(*Escherichia coli*)]中高效表达目的蛋白,可以突破原始生物表达的限制,同时大幅降低成本。已有研究成功在 *E. coli* 中表达了多种来源的 CA,如海洋产氢弧菌(*Hydrogenovibrio marinus*)<sup>[12]</sup>、产氨热弧菌(*Thermovibrio ammonificans*)<sup>[13]</sup>、亚速尔硫氢生菌(*Sulfurihydrogenibium azorense*)<sup>[14]</sup>等。尤其是黄石硫氢杆菌(*Sulfurihydrogenibium yellowstonense*)的 CA 蛋白在 J23100 启动子与分子伴侣蛋白(GroEL-GroES chaperonin system, GroELS)共表达系统中,可溶性蛋白的产量提高了 1.4 倍,酶活性增加了 1 倍;并且,融合标签的加入并

未对蛋白的功能产生负面影响<sup>[15]</sup>。BRENDA 酶数据库的数据显示,来自 *Mesorhizobium loti* 的碳酸酐酶(MICA)具有较高的比活性,达  $1\ 914\ 000 \text{ }\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。研究人员通过将 MICA 基因转入到 *E. coli* 或微藻等微生物中<sup>[16-17]</sup>,成功实现了重组酶的高效表达,增强了  $\text{CO}_2$  的捕获和转化能力。这些案例表明,通过基因工程优化 *E. coli* 表达 CA,能够显著提高其产量和活性,为  $\text{CO}_2$  生物封存提供了一条可行的技术路径。然而,大多数研究仍主要集中在基因来源或载体的开发上,而载体本身是一个复杂的多元件系统,不能实现对蛋白质表达的精确调控。

蛋白质的产生受转录、翻译和翻译后调控等多个层面的共同影响。为实现高效的染色体整合蛋白质表达,启动子在转录水平上起着至关重要的作用,因其直接影响 mRNA 的合成效率<sup>[18]</sup>。启动子通常分为 3 大类:诱导型启动子、稳定期特异性启动子和组成型启动子。其中, T7 启动子作为由 T7 噬菌体衍生的强大启动子,其活性高度可控,通常通过外源系统(如 IPTG)进行诱导,广泛应用于分子生物学和基因表达系统。由于 T7 启动子具有操作简单、表达量高以及目标基因表达受严格调控等特点,非常适用于重组蛋白表达和工业发酵生产<sup>[19]</sup>。此外,稳定期特异性启动子( $P_{y1b}$ )通过单拷贝表达盒整合,能实现高水平蛋白质表达,如  $\beta$ -半乳糖苷酶表达量增加了 26 倍,超级折叠绿色荧光蛋白(superfolder green fluorescent protein, sfGFP)表达量提高了 185 倍<sup>[20]</sup>。Sri Wahyu Effendi 等<sup>[21]</sup>也发现,强和弱启动子的组合(如 HSP70A 和 J23109)显著增强了 hCAII 的表达水平,从而促进  $\text{CO}_2$  高效转化,转化率达 95.7%,并成功用于合成戊二胺和  $\text{CaCO}_3$ 。然而,启动子具有一定的特异性,强启动子并不总能带来高表达

水平,甚至可能对宿主细胞造成负担和毒性。同一启动子对不同蛋白质的作用效果也可能不同<sup>[22]</sup>,因此,当前的研究趋势是通过高通量筛选技术选择最适合目标基因的启动子。高通量测序技术的进步使得一次性筛选数百个启动子成为可能。例如,通过测量单细胞中 sfGFP 的表达水平,研究人员能够快速筛选出高效生产蛋白的启动子<sup>[23]</sup>。虽然这种技术为提高蛋白表达效率提供了重要的工具和方法,但在 CA 异源表达中的应用仍相对较少。

本研究将 sfGFP 基因作为报告基因,基于 pSB1C3 载体构建了合成启动子库,旨在探究其在 MICA 启动子转录调控中的作用;筛选出表达量最高的前 4 个启动子(Top 1-4),并将其质粒转化至 *E. coli* 中,随后诱导、纯化并比较其活性;通过催化 CO<sub>2</sub> 水合反应和对硝基苯乙酸酯(p-nitrophenyl acetate, p-NPA)水解反应计算重组酶的  $k_{cat}$  和  $V_{max}$ ,深入探究其催化机理;进一步研究了重组酶在不同时间、温度、pH 值及不同阴阳离子条件下的稳定性,并测试其在 CO<sub>2</sub> 水合反应中形成碳酸钙(CaCO<sub>3</sub>)的效果,以期构建高效表达的 *E. coli* 载体提供丰富的基因元件,也为未来 CA 的大规模工业生产提出低成本、环境友好的策略。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、生长培养基及质粒

本研究所用的百脉根中生根瘤菌的碳酸酐酶基因 MICA 的序列(678 bp),由 I-Son Ng 教授提供。大肠杆菌 DH10B (NCBI 分类号: 316385)用于所有常规克隆。大肠杆菌 BL21 (DE3) (NCBI 分类号: 469008)用于蛋白质表达。菌株繁殖使用 LB 培养基(g/L: 胰蛋白胨 10、氯化钠 10 和酵母提取物 5)。SOC 培养基(g/L: 胰蛋白胨 20、酵母提取物 5.0、葡萄糖 5.0、NaCl 0.5、KCl

0.186、MgSO<sub>4</sub> 1.2)用于转化恢复。

质粒结构如下:将 MICA、sfGFP 编码基因、合成启动子库、核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS) BBa\_B0034 和终止子 BBa\_B0015 通过 GoldenGate Assembly 分子克隆方法组装到 pSB1C3 载体中。分离出单个菌落用于进一步鉴定,并用 20 bp 寡核苷酸(5'-ATAGGCGTATCACGAGGCAG-3')进行 Sanger 测序。本研究中使用的 96 个启动子的合成启动子文库由 Ailurus Biotech 公司设计和合成。启动子有多种类型,BBa 类代表从 iGEM 注册表中选择的启动子,如 BBa\_R1075 可从 iGEM 的官方网站([http://parts.igem.org/Main\\_Page](http://parts.igem.org/Main_Page))上获取。T7 类代表 T7 启动子的突变修饰,按照其序列号进行命名,如 T7\_459。从大肠杆菌基因组中选取的启动子,使用编号表示其在基因组中的具体位置,例如 4599580/-。本研究中使用的启动子库、质粒以及其他生物元件等的具体信息已提交到国家微生物科学数据中心,编号为 SUB1738177777862。

质粒库由 2 步拼装而成。使用 BsaI-HF<sup>®</sup>v2 (NEB 公司)和 T4 DNA Ligase (NEB 公司)这 2 种酶将启动子库、RBS、超折叠绿色荧光蛋白(sfGFP)、终止子(terminator)依次插入 pSB1C3 载体中,使用的程序为: 37 °C 5 min, 16 °C 5 min, 60 个循环。反应产物经 TIANquick Midi Purification Kit [Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd.]纯化后,使用 Bio-Rad 电转仪转化至 100 μL Invitrogen electro MAX DH10B 感受态细胞中,复苏后的菌液随后转移至含有 30 ng/μL 氯霉素的 250 mL LB 培养基中,过夜培养。使用 TIANprep Mini Plasmid Kit [Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd.]试剂盒从过夜培养的菌液中提取质粒。随后,使用 FastDigest Bpi I (Thermo Scientific 公司)酶切,并使用 T4 DNA Ligase (NEB 公司)将编码 MICA 蛋白的基因插入至

RBS 和 sfGFP 之间。使用的 Golden Gate 程序为: 37 °C 5 min, 16 °C 5 min, 60 个循环。将得到的产物转化到 100  $\mu$ L *E. coli* BL21 (DE3) 化学感受态(TransGen Biotech Co., Ltd.)中, 然后接种到含有 LB+2%琼脂的平板上, 37 °C 培养过夜。培养后的平板 4 °C 保存。

## 1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III, CloneJET PCR Cloning Kit, BCA Protein Assay Kit, 购自 Thermo Scientific 公司; Phusion 高保真 DNA 聚合酶, 购自 NEB 公司; 6 $\times$ His-Tagged Protein Purification Kit, 购自北京康为世纪生物科技有限公司; ClonExpress II One Step Cloning Kit, 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。触摸 PCR 控温系统, 购自 Bio-Rad 公司; 恒温振荡器, 购自上海一恒科学仪器有限公司。

## 1.3 绿色荧光蛋白报告测试

从平板上挑取 192 个单克隆, 分别接种到 0.75 mL 带有 30 ng/ $\mu$ L 氯霉素的液体 LB 培养基中, LB 培养基提前放置在 2 个 2 mL 96 深孔板中, 深孔板使用可透气的微孔板密封膜封口, 37 °C、180 r/min 培养过夜。将过夜菌液按 1:325 稀释至 750  $\mu$ L 带有 30 ng/ $\mu$ L 氯霉素的 LB 培养基中, 深孔板使用可透气的 NuncSeals 封口, 37 °C、1 000 r/min 培养 3 h 之后, 将处于对数期的菌液按 1:225 稀释至 750  $\mu$ L 带有 30 ng/ $\mu$ L 氯霉素的 LB 培养基中; 吹打混匀后, 每孔取 100  $\mu$ L 菌液转移至 3 个标准的 96 微孔板中, 设 3 个重复, 96 微孔板使用 NuncSeals (Thermo Scientific 公司)封口, 37 °C、180 r/min 培养 16 h。每孔取 10  $\mu$ L 过夜菌液, 转移至装有 90  $\mu$ L PBS (Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.)的黑色透明底 96 孔细胞培养板中。使用 Spark<sup>®</sup>Multimode microplate Reader 测试 600 nm 处的光密度( $OD_{600}$ )和荧光激发值(激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm)。测试空白样本得

到  $OD_{600}$  和荧光值的背景信号, 从每个测量值中去除本底。 $OD_{600}$  未显著大于背景信号的样本数据被弃去。蛋白表达水平通过荧光值(A.U.)的均值除以对应的  $OD_{600}$  值得到。

## 1.4 去除 sfGFP 的质粒编辑与重组构建

为去除 sfGFP 的影响, 进行了质粒的精准编辑。首先, 设计并合成去除 sfGFP 的目标片段, 该片段两端包含与质粒载体首尾区域互补的序列。其次, 通过限制性内切酶对质粒载体进行酶切, 去除 sfGFP 部分, 并回收线性化载体。接着, 利用首尾引物对目标片段进行 PCR 扩增, 并通过 T4 DNA 连接酶将扩增片段直接与线性化载体连接, 构建闭环重组质粒。随后, 将重组质粒转化至 *E. coli* 感受态细胞, 在含抗生素的平板上筛选阳性克隆。然后, 通过菌液 PCR 检测片段插入情况, 进一步验证质粒的正确性。最后, 提取阳性克隆质粒并进行 Sanger 测序, 确认 sfGFP 成功去除且目标序列正确无误。通过上述步骤, 成功构建了正确表达目标蛋白(MICA)的重组质粒。

## 1.5 重组酶的诱导表达

在添加了相应抗生素的 LB 培养液中培养含有质粒的细胞。将过夜培养物以 1:100 的比例稀释在含有抗生素的新鲜 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养。用  $OD_{600}$  光密度来测量生物量, 以监测生长情况。当  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时, 使用最终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导重组 MICA, 22 °C 振荡培养 12 h。

## 1.6 蛋白浓度和活性测定

蛋白浓度测定采用比色法结合标准曲线进行。首先使用 1 mg/mL 的 BSA 标准品配制不同浓度的标准溶液(如 0、1、2、4、8、12、16、20  $\mu$ g), 分别加样至 96 孔板中, 每孔加 10–25  $\mu$ L, 同时加入待测样品。随后, 按照所用试剂盒的说明加入 Bradford 染料, 在室温下孵育 10–30 min, 使用酶标仪在 595 nm 波长下

读取吸光度, 绘制标准曲线。

酶活性使用威尔伯-安德森测定法(Wilbur-Anderson units, WAU)<sup>[24]</sup>进行测定: 在 20 mL 样品瓶中, 将 200  $\mu\text{L}$  酶液添加到 9 mL 冰冷的 Tris-HCl (20 mmol/L, pH 8.3) 中, 再加入 6 mL 冰冷的饱和  $\text{CO}_2$  溶液(冰浴条件下将纯  $\text{CO}_2$  气体通入超纯水中至少 1 h 制得), 同时磁力搅拌, 记录 pH 从 8.3 降至 6.3 的时间, 整个反应在冰上进行。活性按照公式(1)计算:

$$\text{WAU}=(T_0-T)/T \quad (1)$$

其中:  $T_0$  和  $T$  分别是未添加 CA 和添加 CA 时 pH 从 8.3 下降到 6.3 所需的时间(s)。

### 1.7 重组酶催化动力学

为获得动力学数据, 在 25  $^\circ\text{C}$  下将 20  $\mu\text{L}$  重组酶加入到 970  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 缓冲液中 (40 mmol/L, pH 8.0), 随后加入 10  $\mu\text{L}$  不同浓度的 p-NPA 溶液(浓度范围为 2–250 mmol/L), 使总反应体积达到 1 000  $\mu\text{L}$ 。对照组(CK)不添加重组酶, 而是以 990  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 缓冲液替代。最终, 所有数据均采用 Michaelis-Menten 模型进行拟合, 并根据以下方程计算  $V_{\max}$  和  $K_m$  (公式 2)以及催化常数  $k_{\text{cat}}$  (公式 3)。

$$v=(V_{\max} \cdot [S])/(K_m+[S]) \quad (2)$$

其中:  $v$  是反应速率[mmol/(s·L)];  $V_{\max}$  是最大反应速率[mmol/(s·L)];  $[S]$  是底物浓度(mmol/L);  $K_m$  是米氏常数(mmol/L), 表示酶对底物的亲和力。

$$k_{\text{cat}}=V_{\max}/[E] \quad (3)$$

其中:  $k_{\text{cat}}$  为催化速率常数(L/s);  $V_{\max}$  为最大反应速率[mmol/(s·L)];  $[E]$  为酶浓度(mol/L), 通过分子量(g/mol)/酶质量浓度(g/L)计算得出。

### 1.8 重组酶在不同条件下的稳定性

为研究 MICA 的性质, 评估了其随时间变化的稳定性, 以及 pH 值和温度对其活性的影响。首先, 将 MICA 在 25  $^\circ\text{C}$ 、未调整 pH 的条件下储存, 7 d 内定期测量其活性。其次, 为探讨温度对 MICA 活性的影响, 将样品分别在

20–70  $^\circ\text{C}$  的不同温度下孵育 30 min, 以 0  $^\circ\text{C}$  下的活性作为对照。最后, 在 pH 4.0–11.0 范围内的 Tris-HCl 缓冲液(使用 Tris 碱和 HCl 调节 pH) 中测定 MICA 的 pH 耐受性, 同时, 将样品与不同的阳离子( $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Sn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ )和阴离子( $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{Br}^-$ )混合 30 min, 每种离子的最终浓度为 1 mmol/L, 以评估离子对重组酶活性的影响。

### 1.9 重组酶促进 $\text{CO}_2$ 矿化和 $\text{CO}_2$ 水合动力学

通过  $\text{CaCO}_3$  沉淀的积累来评价 CA 对  $\text{CO}_2$  的矿化能力。实验在 1.5 mL 离心管中进行, 反应体系由 700  $\mu\text{L}$  含有 0.025 mol/L  $\text{CaCl}_2$  的 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH 9.0)和 50  $\mu\text{L}$  重组酶组成。随后, 加入 600  $\mu\text{L}$  饱和  $\text{CO}_2$  溶液, 室温下反应 9 min。通过离心分离沉淀的  $\text{CaCO}_3$ , 对照(CK)实验则不添加重组酶。

沉淀加入 1%  $\text{HNO}_3$ , 稀释 40 倍后, 利用电感耦合等离子体(inductively coupled plasma, ICP)测定钙离子的浓度。将白色粉末沉积在石英零背景样品架上, 在 D8 Advance X 射线衍射仪(Bruker)上进行粉末 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)测试,  $2\theta$  测试范围为  $5^\circ$ – $45^\circ$ , 并减去背景以提取衍射峰。沉淀在 70  $^\circ\text{C}$  的烘箱中干燥, 最后, 通过扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)在加速电压 15 kV 下进行观察。

$\text{CO}_2$  水合动力学实验使用不同稀释度的  $\text{CO}_2$  饱和底物溶液, 在 25  $^\circ\text{C}$  条件下进行。根据亨利常数计算, 饱和  $\text{CO}_2$  溶液中含有 77 mmol/L 的溶解  $\text{CO}_2$ 。实验中, 将 10  $\mu\text{L}$  重组酶加入到 600  $\mu\text{L}$  含 50  $\mu\text{mol/L}$  酚红(pH 指示剂)的 Tris-HCl 缓冲液(40 mmol/L, pH 8.0)中, 随后加

入 400  $\mu\text{L}$  不同浓度的  $\text{CO}_2$  溶液(3.8–9.6 mmol/L)。通过监测 560 nm 吸收带的变化速率,分析  $\text{CO}_2$  水合反应的动力学参数( $V_{\text{hyd}}$ )。在不同  $\text{CO}_2$  浓度下,考虑吸光度初始衰减的前 20 s,计算各浓度条件下的初始反应速率。所有动力学实验均持续 2 min,以确保反应达到平衡并完成。初始反应速率通过以下公式[公式(4)和(5)]计算,并通过将  $V_{\text{hyd}}$  与  $\text{CO}_2$  浓度的数据拟合至 Michaelis-Menten 模型,进一步确定  $\text{CO}_2$  水合反应的动力学参数( $k_{\text{cat-hyd}}$  和  $K_{\text{m-hyd}}$ ):

$$V_{\text{hyd}}=Q(A_0-A_e)[d(\ln(A-A_e))/d_t]_{t \rightarrow 0} \quad (4)$$

$$Q=C_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}}/\Delta\text{pH} \quad (5)$$

其中,  $Q$  为缓冲因子,其计算基于向 10 mL Tris-HCl 缓冲液(40 mmol/L, pH 9.0)中逐步加入 20  $\mu\text{L}$  6 mol/L HCl 溶液,观察到 pH 由 9.0 降至 8.3。经计算,得出  $Q$  为  $1.43 \times 10^{-4}$  mol/pH unit。此外,  $A_0$  和  $A_e$  分别表示初始吸光度值和最终吸光度值。

### 1.10 数据处理与统计分析

本研究的数据处理采用 Office Excel 2021 完成,图表绘制及方差分析使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行,以检验不同处理间的显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于启动子高通量筛选策略优化 MICA 的异源表达

利用 ClustalX 和 MEGA 6.0 对不同微生物来源的 CA 氨基酸序列进行系统进化分析(图 1)。结果表明, MICA 与 *Mesorhizobium* sp. STM 4461 (GenBank 登录号: WP006329183) 以及 *Mesorhizobium* (GenBank 登录号: WP02703342.1) 来源的 CA 具有显著的相似性。为实现高效表达,设计了一种包含 sfGFP 融合 MICA (sfGFP-MICA) 的质粒骨架。此质粒配备了氯霉素抗性标记、ColE1 复制起源、强 RBS

(BBa\_B0034) 和双终止子(BBa\_B0015),确保了蛋白质表达的精确调控(图 2A)。通过合成启动子库的筛选,观察到不同启动子驱动的蛋白质表达水平最高值与最低值可相差 12 倍,进一步证明这些启动子能影响 CA 的表达水平(图 2B)。在对 143 个单克隆样本的绝对 A.U. 与  $OD_{600}$  归一化分析后,量化了 MICA 蛋白的表达水平,筛选出表现最突出的 4 个启动子,依次为 T7\_445、342042/+、T7\_845 和 mut\_8。T7\_445 和 T7\_845 启动子以其优异的转录效率著称,主要得益于其高度特异性,它们只与 T7 RNA 聚合酶结合,从而避免了宿主细胞背景的非特异性转录,确保了精确的基因表达。T7 启动子系统广泛应用于多种宿主(如细菌、酵母和哺乳动物细胞)中,已成为分子克隆和蛋白质表达的理想工具<sup>[25]</sup>。具体来说,T7-大肠杆菌表达系统由 2 个关键部分组成:一是携带目的基因的表达质粒,其表达由 T7 启动子调控;二是 T7 表达宿主(如 *E. coli*),其染色体中整合了受 lac UV5 启动子控制的 T7 RNA 聚合酶基因。

### 2.2 重组酶 MICA 的诱导纯化

将筛选出的表达水平较高的前 4 个启动子作为候选,分别命名为 Top1–Top4 启动子,对应构建的重组质粒记为 Top1–Top4 质粒,转化所得的大肠杆菌菌株分别命名为 Top1–Top4 菌株。将 Top1–Top4 启动子分别构建至表达 MICA 蛋白的质粒中,并转入 *E. coli* 进行重组表达验证(图 3A)。1 mmol/L IPTG 诱导后,所纯化的重组酶展示了酶活性(图 3B)。其中,使用启动子 342042/+ 的重组酶 MICA (Top 2 重组酶)活性最高,达 34.6 WAU/mg,蛋白浓度为 0.82 mg/mL,与此前报道的重组酶 Ecah 和 Pcah 的活性(42.6–47.6 WAU/mg)相当<sup>[26]</sup>,显著高于碳酸酐酶的比活性(3 WAU/mg)<sup>[27]</sup>。SDS-PAGE 分析结果进一步显示,Top 2 重组酶出现了明显的条带,

分子量大小约 50 kDa, 与 sfGFP-MICA 融合蛋白的理论大小(52.59 kDa)相符, 且未检测到其他污染物(图 3C), 表明该融合蛋白在 *E. coli* 中成功表达。使用蛋白质三维结构预测数据库 (<https://swissmodel.expasy.org/>)进行结构建模,

预测重组酶为同源二聚体的构型(图 3C), 与该类酶的预期结构特性一致。此外, 为了排除 sfGFP 的影响, 在去除 sfGFP 后对重组酶进行了 SDS-PAGE 分析(图 4A)。Top 2 重组酶在 27 kDa 左右出现明显的条带, 与预期一致。然而, 由

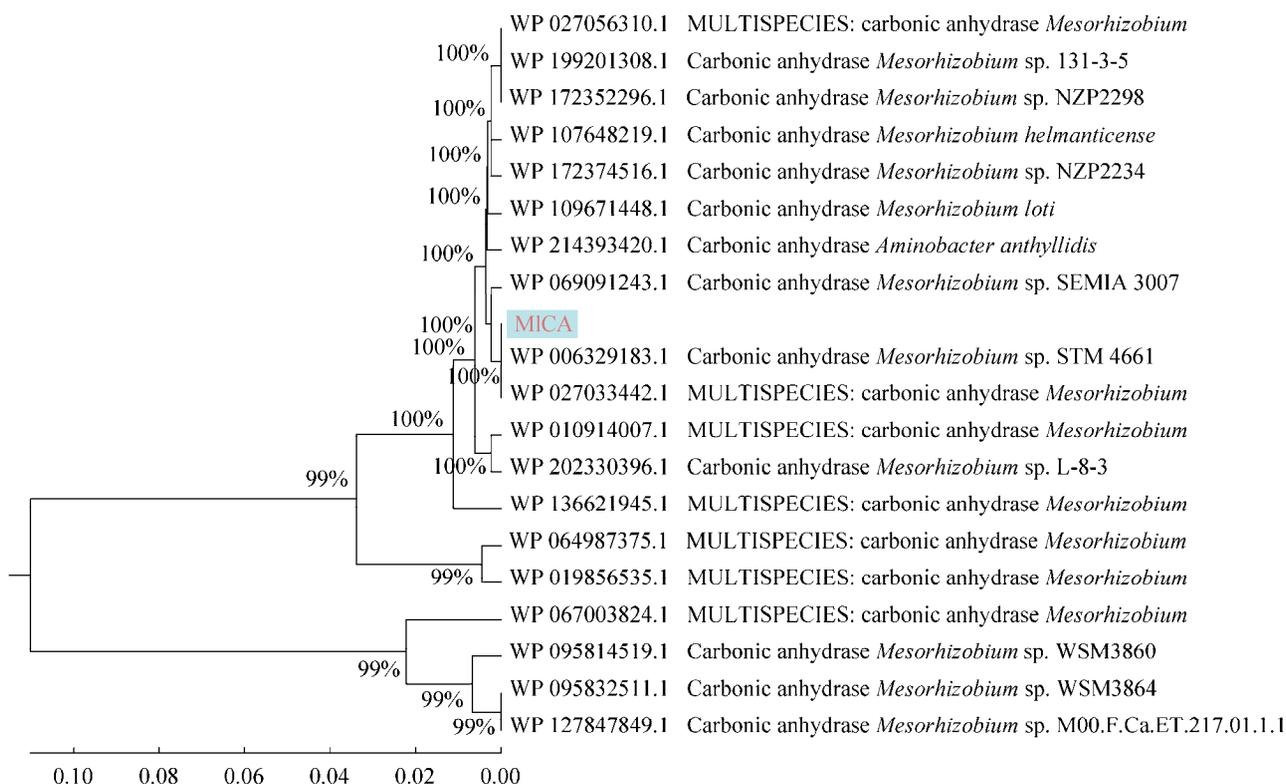


图 1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences.

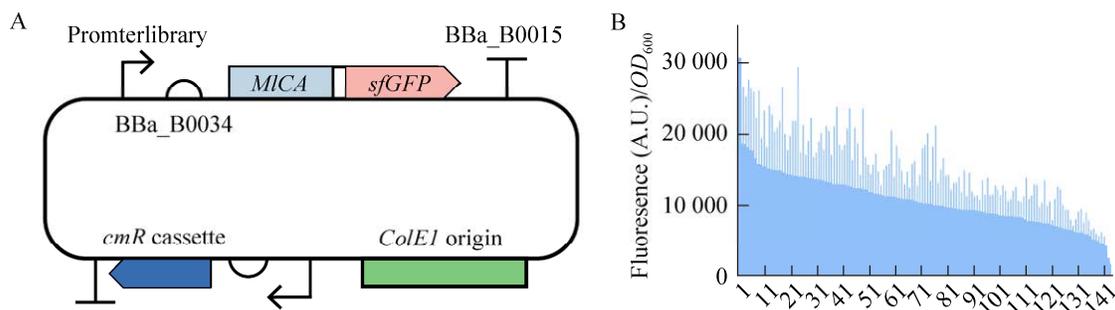
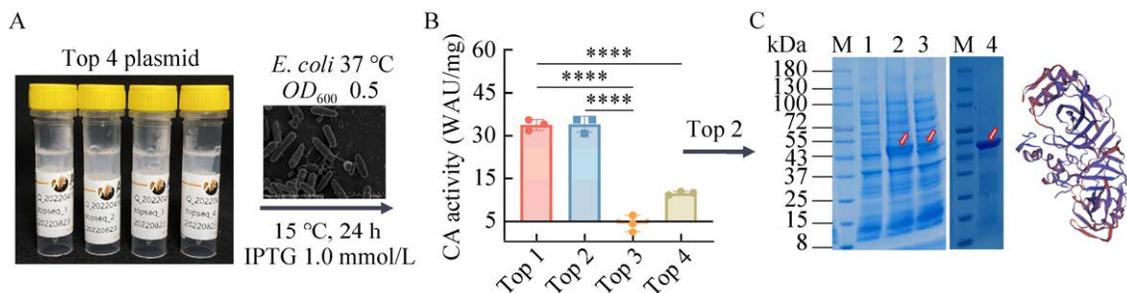


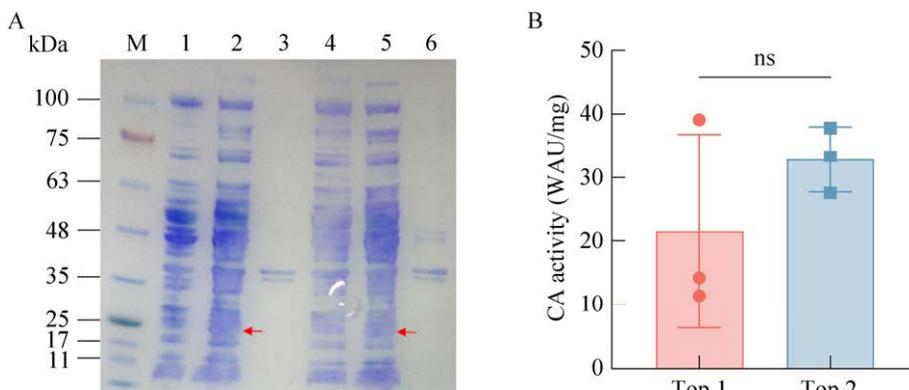
图 2 高通量启动子筛选增强 MICA 的异源表达 A: 质粒结构; B: *E. coli* 中不同启动子下 MICA 蛋白的表达。1-143 代表基于启动子的单克隆筛选结果。

Figure 2 High throughput promoter screening enhanced MICA heterologous expression. A: Plasmid structure; B: Expression of MICA protein under different promoters in *E. coli*. 1-143 represents monoclonal screening results based on promoter.



**图 3 重组酶 MICA 的表达与纯化分析** A: 将排名前四的重组质粒分别转入 *E. coli*。B: 经 IPTG 诱导纯化后, 4 株重组菌株表达的 MICA 酶活性比较。\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。C: SDS-PAGE 分析重组 MICA 的表达及纯化情况。泳道 M、1、2、3、4 分别表示蛋白 marker、IPTG 诱导前、诱导后上清液、细胞破碎后的沉淀以及使用 100 mmol/L 咪唑缓冲液纯化后的目标蛋白。

Figure 3 Expression and purification analysis of recombinant enzyme MICA. A: The top four recombinant plasmids were transformed into *E. coli* strains. B: Enzymatic activity of recombinant MICA expressed by the four *E. coli* strains after IPTG induction and purification. \*\*\*\* $P < 0.0001$ . C: SDS-PAGE analysis of the expression and purification of recombinant MICA. Lane M, 1, 2, 3, and 4 represent the protein marker, pre-IPTG induction, supernatant after induction, precipitated portion of the broken cells, and the target protein purified with 100 mmol/L imidazole buffer, respectively.



**图 4 在 Top 2 启动子驱动下表达去除 sfGFP 的重组 MICA 并测量其活性** A: SDS-PAGE 分析。B: 重组酶活性。M、1、2、3、4、5、6 分别表示: 蛋白 marker、Top 1 菌株在 IPTG 诱导前的样品、Top 1 菌株上清液、Top 1 菌株沉淀部分、Top 2 菌株在 IPTG 诱导前的样品、Top 2 菌株上清液和 Top 2 菌株沉淀部分中目标蛋白。“ns”代表无显著差异( $P > 0.05$ )。

Figure 4 Recombinant MICA with sfGFP removed was expressed under the Top 2 promoter, and its activity was measured. A: SDS-PAGE analysis. B: Recombinant enzyme activity after co-transfer of Top 2 promoters and sfGFP-free MICA gene into *E. coli*. M, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 represent the marker, Top 1 sample pre-IPTG induction, Top 1 supernatant, Top 1 precipitate, Top 2 sample pre-IPTG induction, Top 2 supernatant and Top 2 precipitate of target protein, respectively. “ns” represents no significant difference ( $P > 0.05$ ).

于目标蛋白分子量较小, 容易发生降解, 导致整体表达量相对较低。尽管如此, Top 2 重组酶依然表现出最高的催化活性, 达到 32.8 WAU/mg (图 4B), 对应的蛋白浓度为 0.80 mg/mL。

### 2.3 重组酶 MICA 的催化动力学及催化机理

重组酶 MICA 的  $\text{CO}_2$  水合反应动力学和酯酶水解催化动力学均与 Michaelis-Menten 模型

高度拟合( $R^2=0.93-0.99$ ), 进一步证明了该重组酶具有类似于天然酶的催化行为。具体而言,  $\text{CO}_2$  水合反应实验结果(图 5A)显示, MICA 显著提升了  $\text{CO}_2$  的水合反应动力学效率, 与对照组[CK,  $0.022 \text{ mmol}/(\text{s}\cdot\text{L})$ ]相比, 重组酶的  $V_{\text{max}\cdot\text{hyd}}$  提升至  $0.164 \text{ mmol}/(\text{s}\cdot\text{L})$ ,  $k_{\text{cat}\cdot\text{hyd}}$  为  $0.55\times 10^4 \text{ L/s}$ ,  $K_{\text{m}\cdot\text{hyd}}$  为  $62.46 \text{ mmol/L}$ , 催化效率( $k_{\text{cat}\cdot\text{hyd}}/K_{\text{m}\cdot\text{hyd}}$ )达到  $88.81 \text{ mmol}/(\text{s}\cdot\text{L})$ (表 1)。此外, CA 通常具有酯酶活性, 可通过测定 p-NPA 水解生成的对硝基酚(p-nitrophenol)在  $402 \text{ nm}$  处的吸光度进行检测<sup>[28]</sup>。随着 p-NPA 浓度的增加, 初始速率( $V_0$ )在较低浓度下迅速提升, 但在较高浓度下趋于平稳(图 5B)。与对照组[CK,  $0.0003 \text{ mmol}/(\text{s}\cdot\text{L})$ ]相比, 重组酶的  $V_{\text{max}}$  达到  $0.035 \text{ mmol}/(\text{s}\cdot\text{L})$ , 提升了 2 个数量级。重组酶的  $k_{\text{cat}}$  为  $0.12\times 10^3 \text{ L/s}$ ,  $K_{\text{m}}$  为  $639.8 \text{ mmol/L}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  为  $0.19 \text{ mmol}/(\text{s}\cdot\text{L})$  (表 2)。这些结果表明, 重

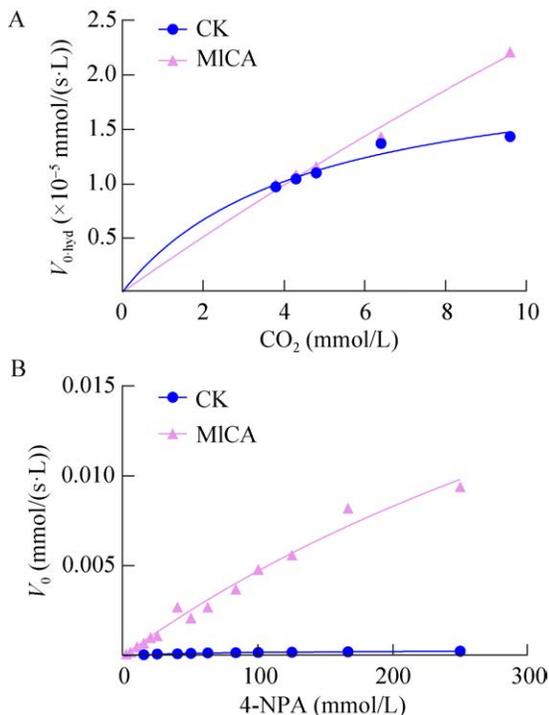


图 5 重组酶存在时  $\text{CO}_2$  水合初始速率( $V_{0\cdot\text{hyd}}$ ) (A)和 p-NPA 水解初始速率( $V_0$ ) (B)

Figure 5 Initial rates of  $\text{CO}_2$  hydration ( $V_{0\cdot\text{hyd}}$ ) (A) and p-NPA hydrolysis ( $V_0$ ) in the presence of MICA (B).

表 1 MICA 生物催化剂的  $\text{CO}_2$  水合动力学参数  
Table1 Kinetic parameters of  $\text{CO}_2$  hydration of MICA biocatalysts

| Treatments | $k_{\text{cat}\cdot\text{hyd}} (\text{s}^{-1})$ | $V_{\text{max}\cdot\text{hyd}} (\text{mmol}/(\text{s}\cdot\text{L}))$ | $K_{\text{m}\cdot\text{hyd}} (\text{mmol/L})$ | $k_{\text{cat}\cdot\text{hyd}}/K_{\text{m}\cdot\text{hyd}} (\text{mmol}/(\text{s}\cdot\text{L}))$ |
|------------|---|---|---|---|
| CK         | —   | 0.022   | —   | —   |
| MICA       | $0.55\times 10^4$                               | 0.164   | 62.46   | 88.81   |

CK 为不添加重组酶的阴性对照, MICA 为添加重组酶 (sfGFP-MICA) 的实验组。

CK represents the negative control without the addition of recombinant enzyme, while MICA refers to the experimental group with the addition of recombinant enzyme (sfGFP-MICA).

表 2 MICA 生物催化剂的 p-NPA 水解动力学参数  
Table2 Kinetic parameters of p-NPA hydrolysis of MICA biocatalyst.

| Treatments | $k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$ | $V_{\text{max}} (\text{mmol}/(\text{s}\cdot\text{L}))$ | $K_{\text{m}} (\text{mmol/L})$ | $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} (\text{mmol}/(\text{s}\cdot\text{L}))$ |
|------------|----------------------------------|--|--------------------------------|---|
| CK         | —                                | 0.0003   | —                              | —   |
| MICA       | $0.12\times 10^3$                | 0.035  | 639.8                          | 0.19  |

CK 为不添加重组酶的阴性对照, MICA 为添加重组酶 (sfGFP-MICA) 的实验组。

CK represents the negative control without the addition of recombinant enzyme, while MICA refers to the experimental group with the addition of recombinant enzyme (sfGFP-MICA).

组酶在水解反应中的催化性能显著优于对照组, 展现出较高的催化活性。 $K_{\text{m}}$  值是酶动力学中的一个重要参数,  $K_{\text{m}}$  值越低, 表示酶与底物的亲和力越高。本研究中的  $K_{\text{m}}$  值低于其他研究中基于载体 PET32a(+) 的 MICA 全细胞  $K_{\text{m}}$  值 [ $1330 \text{ mmol}/(\text{s}\cdot\text{L})$ ]<sup>[17]</sup>。此外, 另有研究在  $\text{CO}_2$  浓度为  $6-24 \text{ mmol/L}$  时, 通过不同缓冲液和 pH 条件下测定古细菌  $\beta$ -CA 的动力学特征; 在 N-3-(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸缓冲液 (pH 8.5) 中,  $K_{\text{m}}$  为  $4.8 \text{ mmol/L}$ , 而在 2-(N-吗啉基)乙磺酸 (pH 6.5) 缓冲液中,  $K_{\text{m}}$  为  $12.7 \text{ mmol/L}$ <sup>[29]</sup>。本研究中的  $K_{\text{m}}$  均高于上述文献报道中的  $K_{\text{m}}$ , 这些差异可能是由体系、缓冲液类型、浓度及 pH 等因素引起的, 它们会影响酶的离子化状态、底物的电荷状态, 以及酶活性位点上氨基酸侧链的

质子化或去质子化,从而影响底物的结合能力。

## 2.4 重组酶 MICA 的储存、pH、温度稳定性及离子的影响

储存稳定性、pH 稳定性和热稳定性是 CA 应用中优先考虑的关键因素,因为这些因素会显著影响基于酶的 CCS 技术的整体效率和成本。为此,通过测定 MICA 在室温(25 °C) 7 d 内的剩余活性,检测了其储存稳定性(图 6A)。结果表明,MICA 活性在 7 d 内逐渐下降,但在前 4 d 仍能保持 80%以上的活性,直到第 7 天才降至约 40%。图 6B 表明,MICA 的最适 pH 为 7.0,相对活性达到 110%。即使在偏酸性或弱碱性的条件下(pH 5.0–8.0),其相对活性依旧能保持在 80%以上。然而,在强碱性条件(pH>9.0)下,活性显著下降,尤其在 pH 11.0 时降至约 40%。图 6C 显示,MICA 在温度 20–40 °C 范围内活性保持在 80%以上,并在 40 °C 时达到峰值,接近 100%。随着温度逐步升高至 50–60 °C,活性逐渐降低,但仍能维持在 30%–68%的水平。然而,当温度达到 70 °C 时,酶活性显著下降至 20%左右的最低值。在高温环境(如 60–70 °C)下,酶活性的降低可能会限制其在 CCS 工艺中的应用。但后续可通过酶工程手段(如定点突变或酶结构优化)进一步提高其在较高温度下的热稳定性。因此,MICA 在常规工业操作温度范围内(<50 °C)展现出一定的热稳定性,但在 60–70 °C 范围内其热稳定性和活性仍有改进空间,需进一步探索优化策略以拓展其工业应用潜力。

不同离子对 MICA 的相对活性影响如表 3 所示。在 1.0 mmol/L 浓度下, $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $SO_3^{2-}$ 、 $HCO_3^{-}$ 、 $I^{-}$ 、 $F^{-}$ 、 $Br^{-}$  对酶的活性几乎没有显著抑制作用,酶的相对活性保持在接近 100%或更高,尤其是  $Sn^{2+}$ 、 $SO_4^{2-}$  和  $CO_3^{2-}$  分别使活性提高至 126.4%、124.6%

和 105.2%,这些结果与前人的研究一致<sup>[30]</sup>,表明这些离子通过促进 CA 活性,进一步增强了  $CO_2$  的吸收效率。

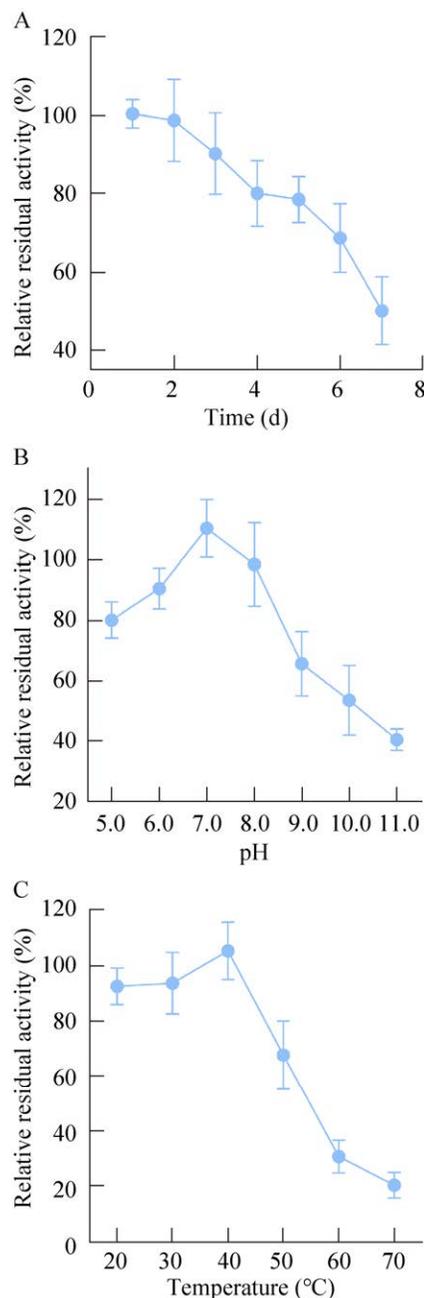


图 6 重组酶 MICA 的储存稳定性(A)以及 pH (B) 和温度(C)对酶活性的影响

Figure 6 Effects of recombinant enzyme MICA on storage stability (A), pH (B) and temperature (C).

## 2.5 重组酶 MICA 在温和条件下促进 $\text{CO}_2$ 矿化的可行性

为研究重组酶 MICA 促进  $\text{CO}_2$  矿化的可行性,通过研究  $\text{CaCO}_3$  沉淀的能力对其进行验证,并通过 ICP 分析不同处理组在 9 min 内沉淀生成的量。在室温条件下,重组酶处理组与对照组(CK)相比, $\text{CaCO}_3$  生成量显著提升,从 8.12 mg/L 增至 14.73 mg/L(图 7A)。通过 XRD 和 SEM 分析(图 7B),确认沉淀物的主要成分为方解石,进一步证明了 MICA 在  $\text{CO}_2$  矿化固定中的潜力。这一发现与此前的研究相一致,表明方解石是 CA 存在下的主要沉淀相<sup>[31]</sup>。

通常, $\text{CaCO}_3$  沉淀生成的先决条件是足够的  $\text{CO}_3^{2-}$ ,这需要在高 pH 条件下实现。因为  $\text{HCO}_3^-$  的解离常数(pKa)高达 10.3<sup>[31]</sup>,使得必须在接近 pH 11.0 的条件下,无机碳( $\text{CO}_2$  和  $\text{HCO}_3^-$ )才能有效转化为  $\text{CO}_3^{2-}$ 。但过高的碱性条件对环境不利,矿化过程最好在接近自然环境条件下进行。本研究在 pH 9.0 条件下实现了  $\text{CaCO}_3$  的沉淀。这不仅降低了维持溶液高 pH 所需的成本,还有效保持了重组酶的活性(图 6B),防止过高 pH 导致酶失活。

表 3 阴离子和阳离子对粗酶 MICA 活性的影响  
Table 3 Effects of anions and cations on activity of crude enzyme MICA

| Ion types          | Concentration (mmol/L) | Residual activity (%) |
|--------------------|------------------------|-----------------------|
| $\text{Mg}^{2+}$   | 1.0                    | 99.0±0.6              |
| $\text{Zn}^{2+}$   | 1.0                    | 100.0±0.0             |
| $\text{Hg}^{2+}$   | 1.0                    | 27.0±4.5              |
| $\text{Co}^{2+}$   | 1.0                    | 45.5±1.3              |
| $\text{Cu}^{2+}$   | 1.0                    | 38.8±4.5              |
| $\text{Mn}^{2+}$   | 1.0                    | 100.0±0.8             |
| $\text{Ca}^{2+}$   | 1.0                    | 97.9±6.5              |
| $\text{Ni}^{2+}$   | 1.0                    | 30.3±2.8              |
| $\text{Fe}^{3+}$   | 1.0                    | 24.6±0.2              |
| $\text{Fe}^{2+}$   | 1.0                    | 28.1±2.6              |
| $\text{Sn}^{2+}$   | 1.0                    | 126.4±2.5             |
| $\text{Pb}^{2+}$   | 1.0                    | 100.0±0.0             |
| $\text{Ba}^{2+}$   | 1.0                    | 100.0±0.0             |
| $\text{Na}^+$      | 1.0                    | 100.0±0.2             |
| $\text{SO}_4^{2-}$ | 1.0                    | 124.6±4.8             |
| $\text{SO}_3^{2-}$ | 1.0                    | 100.4±0.2             |
| $\text{HCO}_3^-$   | 1.0                    | 100.2±6.1             |
| $\text{CO}_3^{2-}$ | 1.0                    | 105.2±5.6             |
| $\text{Cl}^-$      | 1.0                    | 98.2±4.2              |
| $\text{I}^-$       | 1.0                    | 103.5±4.5             |
| $\text{F}^-$       | 1.0                    | 101.7±4.6             |
| $\text{Br}^-$      | 1.0                    | 102.2±3.9             |

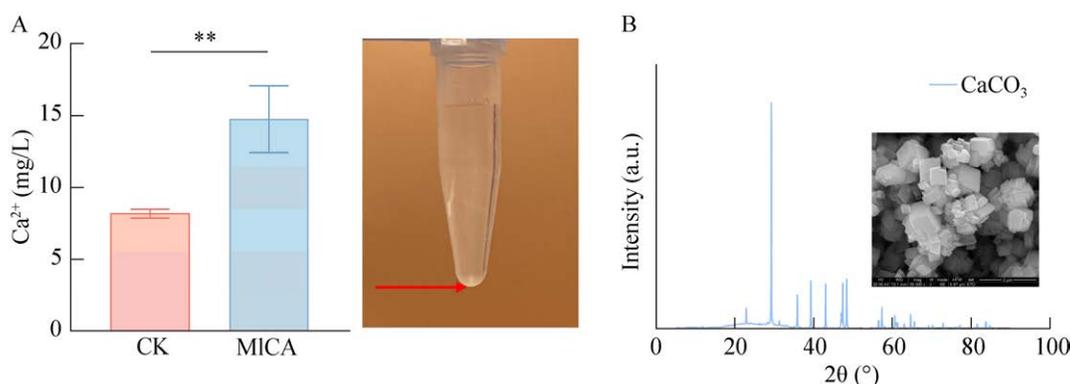


图 7 重组酶 MICA 促进  $\text{CaCO}_3$  的形成与表征 A:  $\text{CaCO}_3$  中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度。 \*\*  $P < 0.01$ 。 B:  $\text{CaCO}_3$  的 XRD 和 SEM 图谱。

Figure 7 Recombinant enzyme MICA-promoted formation and characterization of  $\text{CaCO}_3$ . A:  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in  $\text{CaCO}_3$ . \*\*  $P < 0.01$ . B: XRD and SEM of  $\text{CaCO}_3$ .

### 3 讨论与结论

启动子作为调控基因表达的核心元件, 直接影响蛋白的表达水平。因此, 通过启动子筛选调控合成途径, 实现代谢调控, 是提高目标产物产量最直接且高效的策略。IPTG 诱导通过调控质粒中的乳糖阻遏物和 T7 溶菌酶(T7 RNA 聚合酶的天然抑制剂)实现对 T7 表达的精确调节<sup>[32]</sup>。此外, IPTG 诱导系统在大肠杆菌中对重组蛋白表达的精确控制, 主要依赖正交 T7 RNA 聚合酶和乳糖操纵子调控的 T7 系统<sup>[33]</sup>。而 mut\_8 启动子通过特定突变进一步增强了其与 RNA 聚合酶的亲和力, 提升了表达效果。大肠杆菌基因组中选取的启动子 342042/+ 同样表现出优异的蛋白质表达能力, 这可能归因于多个因素。首先, 该启动子可能源自大肠杆菌中高表达的基因区域<sup>[34]</sup>, 相关基因经过进化优化, 能够在天然条件下实现高效转录和翻译。其次, 启动子中可能存在顺式调控元件如增强子或调控蛋白的结合位点, 这些元件能够增强启动效率、降低背景噪音、提高蛋白质产量<sup>[35]</sup>。

MICA 催化酯类水解的机制类似于其 CO<sub>2</sub> 水合作用的机制, 因此可以通过 CO<sub>2</sub> 水合作用深入探讨其催化机理。MICA 的高效性依赖于金属离子(Zn<sup>2+</sup>)的作用以及质子转移网络的协同作用, 确保催化循环的快速进行。Kim 等<sup>[36]</sup>通过使用不同的二价过渡金属离子验证了金属离子对 CA 催化机制的影响; 研究表明, 不同金属离子的特征性配位几何结构会显著影响催化效率; 例如, Zn<sup>2+</sup>通常形成四面体配位, 而 Co<sup>2+</sup>会从四面体转化为八面体, Ni<sup>2+</sup>则形成稳定的八面体配位, Cu<sup>2+</sup>表现为三角双锥几何结构。正是这些几何结构的变化直接调节了催化效率, 凸显了金属离子在酶催化过程中的重要性。CA 活性位点通常分为 3 个区域, 包括疏水区、

亲水区及二者之间的入口通道; 它们分别负责底物结合、质子转移以及在催化过程中底物、产物和水的交换<sup>[37]</sup>。活性位点的 Zn<sup>2+</sup>通过 3 个组氨酸残基(His-94, His-96, His-119)咪唑基团中的氮原子以四面体配位, 剩余的四面体位点由溶剂分子占据, 根据 pH 值不同, 溶剂分子可以是水或氢氧根离子<sup>[38]</sup>。围绕该四面体的疏水口袋由 Val-143、Val-121、Trp-209 和 Leu-198 残基组成, 帮助固定 CO<sub>2</sub> 分子。Thr-199 和 His-64 残基则提供了质子转移通道。Zn<sup>2+</sup>作为路易斯酸, 能够将 Zn<sup>2+</sup>结合水的 pKa 从 10 降低至 7<sup>[39]</sup>, Zn<sup>2+</sup>通过极化配位的水分子促使水失去质子(H<sup>+</sup>), 形成活性的 OH<sup>-</sup>, 作为亲核试剂参与催化反应。CO<sub>2</sub> 分子结合到酶的活性位点, 靠近 OH<sup>-</sup>, 发生催化反应生成 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup><sup>[40]</sup>。生成的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>随后从活性位点释放, 同时活性位点重新结合水分子完成质子转移(W<sub>zn</sub>→W1→W2→His 64)<sup>[36]</sup>, 此处的质子受体 B 可以是来自溶液的外源质子受体, 或是酶自身的残基, 质子最终被转移到溶液中。整个过程恢复到初始状态, 以便进行下一轮催化反应<sup>[40]</sup>。

MICA 在较宽泛的 pH 范围和较高的温度条件下仍能保持一定活性, 并对部分金属离子具有良好的耐受性, 这为其在 CCS 工艺中的应用奠定了基础。这一趋势与以往的研究结果一致, 已有报道表明, MICA 在 pH 5.0–8.0 之间能维持较高的活性<sup>[41]</sup>。此外, 另一项研究显示, 重组酶 LdCA 在相同 pH 范围内表现出相似的稳定性<sup>[31]</sup>。在燃烧后的 CCS 工艺中, CA 在温度 40–60 °C 范围内的稳定性尤为关键<sup>[31]</sup>。MICA 在 20–40 °C 范围内活性保持在 80% 以上, 并在 40 °C 达到峰值, 但在 50–60 °C 范围内逐渐下降至 30%–68%, 70 °C 时降至约 20%, 虽在常规工业温度(<50 °C)下, MICA 仍具有一定热稳定性, 但在 60–70 °C 时需通过酶工程优化其热

稳定性以拓展 CCS 工艺应用。

金属阳离子( $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ )明显抑制了酶活性(表 3),特别是  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$ , 可分别使酶活性降低至 27.0%、24.6% 和 28.1%,  $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  则使活性下降至 45.5% 和 38.8%。这种金属离子的影响与 CA 活性位点的特性有关。作为一种锌辅基酶, 仅有约 0.3% 的  $\text{Zn}^{2+}$  (相当于 0.05 mmol/L) 能够紧密地与配位原子结合, 过量的无机过渡金属离子(如  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$ ) 在较高浓度下会与水分子配位, 形成复合物并降低酶活性<sup>[17]</sup>。总体来看, 适量浓度(1 mmol/L)的离子, 如  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  等, 对 MICA 的活性影响甚微, 而  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  等金属离子则显著抑制其活性, 这也与前人的研究结果相一致<sup>[17]</sup>。值得注意的是,  $\text{CO}_2$  封存需要大量水作为吸收剂, 而海水由于成本较低(盐度为 3%–4%), 成为一个备受关注的选择<sup>[41]</sup>。上述提及的金属离子在海水中的浓度通常低于 10  $\mu\text{g/L}$ <sup>[41]</sup>。在本研究中,  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  对酶活性仅产生轻微影响(表 3), 酶活性保持在 98.2%–100%。此前的研究也表明, 即使在高达 6% 盐度的环境中, MICA 仍能保持较高的耐盐性, 酶活性仅下降约 10%<sup>[41]</sup>, 这为使用重组酶在海水中进行碳封存提供了可能。此外, 工业烟气鼓泡的水中同样含有微量金属离子如  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  等<sup>[42]</sup>, 而这些金属离子在本研究中对重组酶的活性几乎无影响。这也进一步表明, MICA 在处理工业排放气体中的  $\text{CO}_2$  封存中具有应用潜力。综上, MICA 表现出良好的稳定性和耐受性, 具备在海水及工业烟气的 CCS 中应用的潜力。

在  $\text{CO}_2$  矿化过程中, pH 值对  $\text{CaCO}_3$  的沉淀速率和酶催化活性起着关键作用。类似研究在 pH 范围 7.5–9.5 内进行, 结果显示, 纯化的 CA 在 pH 9.2 时仅用 15 s 便成功促进  $\text{CaCO}_3$  的

沉淀, 而无 CA 条件下的反应在 90 s 后才出现可见沉淀<sup>[43]</sup>, 并且其他 pH 条件下, 与未添加 CA 相比, CA 催化反应存在时均表现到更高的  $\text{CaCO}_3$  沉淀速率。Favre 等<sup>[44]</sup>的研究也表明, 20 °C 条件下, 在不同 pH 值(7.0、8.4、9.4、10.5) 的 Tris-HCl 缓冲液中进行  $\text{CO}_2$  矿化实验时, pH 9.4 时 CA 显著加速了  $\text{CaCO}_3$  初期(第 1 分钟)的沉淀速率; 值得注意的是, 在 pH 8.4 时, 未添加 CA 处理的初始沉淀速率  $V_0$  比 CA 处理过更快, 表明该 pH 值接近  $\text{CaCO}_3$  形成的临界点。随着缓冲液 pH 降至 8.3 以下, 无论是否存在 CA,  $\text{CaCO}_3$  的沉淀几乎停止, 这是由于  $\text{CO}_3^{2-}$  离子的生成在此 pH 下受限<sup>[45]</sup>。因此, 在 CA 催化的  $\text{CO}_2$  矿化应用中, 更接近自然环境的 pH 对于酶的活性和  $\text{CaCO}_3$  的沉淀效率至关重要。

此外, 本研究表明, 在室温(25 °C)条件下, 重组酶能够在短时间内显著加速  $\text{CO}_2$  矿化。然而, 大多数研究倾向于在较高或较低的温度条件下进行矿化实验<sup>[17]</sup>, 例如, 对 3 种微生物来源的 CA: 莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)、里拉微球菌(*Micrococcus lylae*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* 2)以及商用牛碳酸酐酶(bovine carbonic anhydrase, BCA)的矿化效率进行研究; 结果显示, 在 35–45 °C 的温度范围内, 来源于 *Micrococcus luteus* 2 的 CA 表现出最高的稳定性和最佳的矿化性能<sup>[43]</sup>。另一项研究在 0 °C、30 °C 和 50 °C 的条件下进行矿化实验, 数据表明, 0 °C 时使用 6  $\mu\text{mol/L}$  BCA 处理的沉淀量最高, 达到 0.21 g; 30 °C 时次之, 沉淀量为 0.13 g; 而在 50 °C 时, 沉淀量最少, 仅为 0.10 g<sup>[46]</sup>。还有一项研究也得到类似结论, 在 5 °C 时, 加入 CA 后  $\text{CaCO}_3$  的初始沉淀速率增加了 10 倍以上<sup>[44]</sup>。综上, 温度调控虽然能够提升矿化效率, 但也会显著增加成本, 本研究为在开放的非均质碳酸盐系统中应用 CA 技术进行高效  $\text{CO}_2$  矿化提

供了新的可能性。

综上,本研究成功利用了高通量启动子筛选方法,该方法基于荧光强度对来源于 *M. luti* 的碳酸酐酶基因 *MICA* 进行快速、高效评估,成功筛选出多种具有不同活性水平的启动子序列。相较于传统方法,本研究中的方法加速了启动子的优化和筛选过程,为合成生物学和代谢工程技术提供了强有力的基因元件工具库。通过该方法筛选得到了活性最高的重组酶 *MICA*,展现了该酶在催化  $\text{CO}_2$  水合及酯酶水解方面的高效性,并进一步阐明了其催化机理。此外, *MICA* 不仅具有良好的储存稳定性和一定的热稳定性,还在较广的 pH 范围内和不同离子中具有显著的抵抗能力。更为重要的是, *MICA* 在室温和较低 pH 条件下即可有效促进  $\text{CaCO}_3$  的沉淀生成。总之, *MICA* 优越的理化性质为其实际应用提供了巨大的潜力,有望在各种生物催化实际应用中推广,进一步扩大 CCS 和其他碳减排技术的可行性。

## 作者贡献声明

姚丹丹:数据管理、方案设计、实验操作、初稿写作;李赟卉、付兴佳:实验操作;王辉:监督指导;刘云:方案设计、经费支持、监督指导、稿件润色修改。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## REFERENCES

- [1] 姚炜珊,侯雅磊,魏国强,张声森,杨希贤,邓丽芳,许仕博. 二氧化碳资源化利用研究进展[J]. 新能源进展, 2024, 12(2): 182-192.  
YAO WS, HOU YL, WEI GQ, ZHANG SS, YANG XX, DENG LF, XU SB. Research progress of carbon dioxide resource utilization[J]. Advances in New and Renewable Energy, 2024, 12(2): 182-192 (in Chinese).
- [2] KIRK AP. Progress report on the global energy

- system[R]. Paris: International Energy Agency, 2023.
- [3] MASSON-DELMOTTE V, ZHAI P, PÖRTNER H-O. Global warming of 1.5 °C[J]. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2019, 1: 93-174.
  - [4] 李东方,黄增阳,陈旭杨,郑张,曾燕平. 基于二氧化碳矿化固定的碳利用技术研究[J]. 河南科技, 2024, 51(5): 87-90.  
LI DF, HUANG ZY, CHEN XY, ZHENG Z, ZENG YP. Review of carbon utilization technology based on carbon dioxide mineralization fixation[J]. Henan Science and Technology, 2024, 51(5): 87-90 (in Chinese).
  - [5] RISSMAN J, BATAILLE C, MASANET E, ADEN N, MORROW WR, ZHOU N, ELLIOTT N, DELL R, HEEREN N, HUCKESTEIN B, CRESKO J, MILLER SA, ROY J, FENNELL P, CREMMINS B, KOCH BLANK T, HONE D, WILLIAMS ED, deLa RUE du CAN S, SISSON B, et al. Technologies and policies to decarbonize global industry: review and assessment of mitigation drivers through 2070[J]. Applied Energy, 2020, 266: 114848.
  - [6] 詹悦,王新,宋雨轩,时翔宇. 碳酸酐酶的固定化及其在二氧化碳转化中的应用[J]. 环境化学, 2023, 42(9): 3157-3166.  
ZHAN Y, WANG X, SONG YX, SHI XY. Immobilization of carbonic anhydrase and its application in carbon dioxide conversion[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42(9): 3157-3166 (in Chinese).
  - [7] EL HADRI N, QUANG DV, GOETHEER ELV, ABU ZAHRA MRM. Aqueous amine solution characterization for post-combustion  $\text{CO}_2$  capture process[J]. Applied Energy, 2017, 185: 1433-1449.
  - [8] De OLIVEIRA MACIEL A, CHRISTAKOPOULOS P, ROVA U, ANTONOPOULOU I. Carbonic anhydrase to boost  $\text{CO}_2$  sequestration: improving carbon capture utilization and storage (CCUS)[J]. Chemosphere, 2022, 299: 134419.
  - [9] SHARIF M, GE CL, WANG T, ZHANG W, FANG MX, GAO X. Computational investigation of co-solvent influence on  $\text{CO}_2$  absorption and diffusion in water lean solvents[J]. Processes, 2024, 12(8): 1588.
  - [10] SHARMA T, SHARMA S, KAMYAB H, KUMAR A. Energizing the  $\text{CO}_2$  utilization by chemo-enzymatic approaches and potentiality of carbonic anhydrases: a review[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 247: 119138.
  - [11] YAO DD, WU LY, TAN D, YU YJ, JIANG Q, WU YH, WANG H, LIU Y. Enhancing  $\text{CO}_2$  fixation by microalgae in a photobioreactor: molecular mechanisms with exogenous carbonic anhydrase[J]. Bioresource Technology, 2024, 408: 131176.
  - [12] JO BH, IM SK, CHA HJ. Halotolerant carbonic anhydrase with unusual N-terminal extension from marine *Hydrogenovibrio marinus* as novel biocatalyst for carbon sequestration under high-salt environments[J]. Journal of  $\text{CO}_2$  Utilization, 2018, 26: 415-424.

- [13] PARRA-CRUZ R, LAU PL, LOH HS, PORDEA A. Engineering of *Thermovibrio ammonificans* carbonic anhydrase mutants with increased thermostability[J]. Journal of CO<sub>2</sub> Utilization, 2020, 37: 1-8.
- [14] de SIMONE G, MONTI SM, ALTERIO V, BUONANNO M, de LUCA V, ROSSI M, CARGINALE V, SUPURAN CT, CAPASSO C, Di FIORE A. Crystal structure of the most catalytically effective carbonic anhydrase enzyme known, SazCA from the thermophilic bacterium *Sulfurihydrogenibium azorense*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015, 25(9): 2002-2006.
- [15] EFFENDI SSW, NG IS. The prospective and potential of carbonic anhydrase for carbon dioxide sequestration: a critical review[J]. Process Biochemistry, 2019, 87: 55-65.
- [16] LIN JY, SRI WAHYU EFFENDI S, NG IS. Enhanced carbon capture and utilization (CCU) using heterologous carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* for lutein and lipid production[J]. Bioresource Technology, 2022, 351: 127009.
- [17] TAN SI, HAN YL, YU YJ, CHIU CY, CHANG YK, OUYANG S, FAN KC, LO KH, NG IS. Efficient carbon dioxide sequestration by using recombinant carbonic anhydrase[J]. Process Biochemistry, 2018, 73: 38-46.
- [18] NIE ZH, LUO H, LI JF, SUN HX, XIAO Y, JIA RQ, LIU TJ, CHANG YH, YU HM, SHEN ZY. High-throughput screening of T7 promoter mutants for soluble expression of cephalosporin C acylase in *E. coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 190(1): 293-304.
- [19] TING WW, NG IS. Tunable T7 promoter orthogonality on T7RNAP for *cis*-aconitate decarboxylase evolution *via* base editor and screening from itaconic acid biosensor[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(10): 3020-3029.
- [20] ZHOU CY, YE B, CHENG S, ZHAO LZ, LIU YX, JIANG JD, YAN X. Promoter engineering enables overproduction of foreign proteins from a single copy expression cassette in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 111.
- [21] SRI WAHYU EFFENDI S, LIN JY, NG IS. Simultaneous carbon dioxide sequestration and utilization for cadaverine production using dual promoters in engineered *Escherichia coli* strains[J]. Bioresource Technology, 2022, 363: 127980.
- [22] MUTALIK VK, GUIMARAES JC, CAMBRAY G, MAI QA, CHRISTOFFERSEN MJ, MARTIN L, YU A, LAM C, RODRIGUEZ C, BENNETT G, KEASLING JD, ENDY D, ARKIN AP. Quantitative estimation of activity and quality for collections of functional genetic elements[J]. Nature Methods, 2013, 10(4): 347-353.
- [23] LI SN, LI X, HO SH. How to enhance carbon capture by evolution of microalgal photosynthesis?[J]. Separation and Purification Technology, 2022, 291: 120951.
- [24] WILBUR KM, ANDERSON NG. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1948, 176(1): 147-154.
- [25] TING WW, TAN SI, NG IS. Development of chromosome-based T7 RNA polymerase and orthogonal T7 promoter circuit in *Escherichia coli* W3110 as a cell factory[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2020, 7(1): 54.
- [26] 侯娟, 李俐珩, 张海若, 李玫锦, 陈鹏宇, Mauryc Daroch. 嗜热蓝细菌碳酸酐酶基因的异源表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 450-458.
- HOU J, LI LH, ZHANG HR, LI MJ, CHEN PY, DAROCH M. IPTG-induced, heterologous expression and characterization of carbonic anhydrase from *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 450-458 (in Chinese).
- [27] SMITH KS, FERRY JG. A plant-type (beta-class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(20): 6247-6253.
- [28] NILOUYAL S, KARAHAN HE, NG EWH, YAMAGUCHI D, ITO MMM, QIN DT, HIRAO H, SIVANIAH E, GHALEI B. Nanobiomineralization of carbon dioxide by molecularly engineered metal: histidine complex nanozymes[J]. Chemistry of Materials, 2023, 35(4): 1610-1623.
- [29] SMITH KS, COSPER NJ, STALHANDSKE C, SCOTT RA, FERRY JG. Structural and kinetic characterization of an archaeal beta-class carbonic anhydrase[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(23): 6605-6613.
- [30] ZHANG SH, LU H, LU YQ. Enhanced stability and chemical resistance of a new nanoscale biocatalyst for accelerating CO<sub>2</sub> absorption into a carbonate solution[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(23): 13882-13888.
- [31] LI CX, JIANG XC, QIU YJ, XU JH. Identification of a new thermostable and alkali-tolerant  $\alpha$ -carbonic anhydrase from *Lactobacillus delbrueckii* as a biocatalyst for CO<sub>2</sub> biomineralization[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2015, 2(1): 44.
- [32] YE J, LI YJ, BAI YQ, ZHANG T, JIANG W, SHI T, WU ZJ, ZHANG YPJ. A facile and robust T7-promoter-based high-expression of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9(1): 56.
- [33] HU RE, LEU WC, LIN YC, NG IS. A novel heat-inducible plasmid-driven T7 system for enhancing carbonic anhydrase in engineered *Escherichia coli* strains[J]. Process Biochemistry, 2024, 145: 302-310.
- [34] MAEDA M, SHIMADA T, ISHIHAMA A. Strength and regulation of seven rRNA promoters in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144697.
- [35] PANIGRAHI A, O'MALLEY BW. Mechanisms of enhancer action: the known and the unknown[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 108.

- [36] KIM JK, LOMELINO CL, AVVARU BS, MAHON BP, McKENNA R, PARK S, KIM CU. Active-site solvent replenishment observed during human carbonic anhydrase II catalysis[J]. *IUCrJ*, 2018, 5(1): 93-102.
- [37] KIM JK, LEE C, LIM SW, ADHIKARI A, ANDRING JT, McKENNA R, GHIM CM, KIM CU. Elucidating the role of metal ions in carbonic anhydrase catalysis[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4557.
- [38] LILJAS A. Carbonic anhydrase under pressure[J]. *IUCrJ*, 2018, 5(Pt 1): 4-5.
- [39] McCALL KA, HUANG CC, FIERKE CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes[J]. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130(5): 1437S-1446S.
- [40] SILVERMAN DN, McKENNA R. Solvent-mediated proton transfer in catalysis by carbonic anhydrase[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2007, 40(8): 669-675.
- [41] LEE JW, KANG YT. CO<sub>2</sub> absorption enhancement by Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles in NaCl aqueous solution[J]. *Energy*, 2013, 53: 206-211.
- [42] ASLAM A, THOMAS-HALL SR, MUGHAL T, ZAMAN QU, EHSAN N, JAVIED S, SCHENK PM. Heavy metal bioremediation of coal-fired flue gas using microalgae under different CO<sub>2</sub> concentrations[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 241: 243-250.
- [43] SHARMA A, BHATTACHARYA A. Enhanced biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> into CaCO<sub>3</sub> using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 67(1/2): 122-128.
- [44] FAVRE N, CHRIST ML, PIERRE AC. Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 60(3/4): 163-170.
- [45] 蔡丽希, 楚云猛, 张光亚. 可用于二氧化碳捕获过程的微生物碳酸酐酶的挖掘与改造[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(1): 1-12.
- CAI LX, CHU YM, ZHANG GY. Mining and engineering of microbial carbonic anhydrases for biomimetic carbon dioxide sequestration[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(1): 1-12. (in Chinese).
- [46] MIRJAFARI P, ASGHARI K, MAHINPEY N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2007, 46(3): 921-926.