



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20210201

## 以 UiO-66-NH<sub>2</sub> 为载体苯丙氨酸解氨酶的 固定化及其催化性能

孙宝婷, 崔建东, 贾士儒

(天津科技大学生物工程学院, 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457)

**摘要:** 天然的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammoniolyase, PAL)存在稳定性差、可操作性低等问题,限制了其在医药、食品和生物化工领域的应用.为了提高 PAL 的催化性能,本研究将 PAL 吸附固定在金属有机骨架 UiO-66-NH<sub>2</sub> 载体上,制备出 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 固定化酶颗粒.通过优化固定化酶颗粒的制备条件, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 最大酶活回收率达到(90.01±3.18)%,比优化前提高了约 35%;并对其 pH 耐受性、温度耐受性和重复使用性等催化性能进行研究.结果表明: PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 对 pH 和温度的耐受性优于游离 PAL;在重复使用 5 次后, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 仍能保持初始酶活力的 80%左右,表现出较好的重复使用性.本研究结果可为 PAL 的工业化应用提供参考.

**关键词:** 苯丙氨酸解氨酶; 金属有机骨架; UiO-66-NH<sub>2</sub>; 酶的固定化

中图分类号: Q814.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2022)04-0009-07

## Immobilization of Phenylalanine Ammoniolase and Its Catalytic Performance by Using UiO-66-NH<sub>2</sub> as Carrier

SUN Baoting, CUI Jiandong, JIA Shiru

(College of Biotechnology, State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Natural phenylalanine ammoniolyase (PAL) has the problems of poor stability and low operability, which has limited its applications in the fields of medicine, food and biochemical industry. In order to improve the catalytic performance of PAL, in this study PAL was immobilized on the metal-organic framework UiO-66-NH<sub>2</sub> carrier by adsorption method to prepare PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> immobilized enzyme particles. By optimizing the preparation conditions of the immobilized enzyme particles, the maximum activity recovery rate of prepared PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> particles reached (90.01±3.18)%, about 35% higher than that before optimization; the catalytic performances of PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>, such as pH tolerance, temperature tolerance and reusability were also studied. The results showed that the stability of PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> particles was better than that of free PAL; after repeated use for 5 times, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> maintained about 80% of the initial enzyme activity, indicating better stability of reusability. Therefore, this study can provide a reference for the industrial application of PAL.

**Key words:** phenylalanine ammoniolyase; metal-organic framework; UiO-66-NH<sub>2</sub>; enzyme immobilization

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammoniolyase, PAL)主要分布在高等植物、部分微生物以及某些藻类中,是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶<sup>[1]</sup>. PAL 可催化苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)生成反式

肉桂酸(trans-cinnamic acids, t-CA)和氨(NH<sub>3</sub>),可用于合成苯丙氨酸,治疗部分肿瘤、苯丙酮尿症等<sup>[2-4]</sup>,在生物化工、食品和医药行业中被广泛应用.

虽然游离酶具有活力高、特异性强的优点,但游

收稿日期: 2021-10-15; 修回日期: 2022-03-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(21676069); 天津市自然科学基金重点项目(19JCZDJC38100)

作者简介: 孙宝婷(1990—),女,山东曲阜人,博士研究生; 通信作者: 崔建东,教授, jdcui@tust.edu.cn

离酶多为液态,稳定性差,对于酶的回收、重复使用、运输、储存有一定的影响,导致酶活力降低,严重影响其应用效果.因此,为了改善 PAL 的催化性能,利用固定化技术将 PAL 固定是提高天然 PAL 稳定性、操作稳定性、重复使用性以及改善 PAL 催化性能的重要方法.与游离酶相比,被固定的酶具有更强的耐受高温、变性剂和酸碱等极端条件的能力,同时也增强了酶的机械性能,提高了操作稳定性,利于回收和重复利用.例如, Cui 等<sup>[5]</sup>将 PAL 吸附交联固定在粗孔微球硅胶上,所得的固定化 PAL 表现出较好的热稳定性和操作稳定性,在一定程度上实现了 PAL 的回收并重复使用.交联剂戊二醛对 PAL 的失活作用使得固定化 PAL 的酶活回收率很低,仅有 24.68%.将 PAL 包埋固定在仿生硅颗粒中,所得固定化 PAL 同样表现出较好的热稳定性、pH 稳定性和重复使用性,但是由于 PAL 包埋在硅胶内,导致了传质阻力较高,所以固定化 PAL 的酶活力较低<sup>[6]</sup>.另外,赵雅敏<sup>[7]</sup>以碳酸钙为模板固定化 PAL,其酶活回收率仅有 15% 左右.尽管通过固定化可以改善 PAL 的部分催化性能,但现有固定化方法存在载体机械强度低、颗粒均一性差、孔径难以调控、具有较大扩散阻力等问题,导致酶的固定化效率较低.因此,选择适当的载体和固定化方法对提高 PAL 的固定化效率尤为重要.

对于酵母来源的 PAL 而言,固定化的载体所提供的环境对被固定的酶有很大的影响.大多数重金属离子对 PAL 的酶活力有抑制作用<sup>[8-9]</sup>,并且 PAL 是一种酸性蛋白,根据不同来源,其最适 pH 为 8.0 ~ 9.5<sup>[10]</sup>.因此,载体自身的 pH 环境对 PAL 的酶活力有较大影响,在选用载体时,金属离子及载体环境 pH 对 PAL 固定化后酶活力的保持有很大影响.金属有机骨架(metal-organic framework, MOF)是一种由金属离子或离子簇与有机配体通过配位作用连接而成的配位聚合物多孔材料<sup>[11-12]</sup>,具有可调节的孔隙率、高比表面积和结晶度、优良的机械稳定性和多样性<sup>[13-16]</sup>.因此,MOF 近年来被认为是一种优良的酶固定化载体<sup>[13,17-19]</sup>.作为 MOF 的一种,钪基金属有机骨架材料(UiOs 系列)不仅具有优良的酸碱耐受性、热稳定性<sup>[20]</sup>,而且具有较大的比表面积和可调控的孔径,在吸附与分离<sup>[21-24]</sup>、光催化降解<sup>[25-27]</sup>、载药<sup>[28-29]</sup>、传感器<sup>[30-32]</sup>等方面展现了广阔的应用前景,已经被用作多种酶的固定化载体<sup>[33-36]</sup>.

前人对 PAL 的固定化,多局限于交联法和包埋法,这两种方法固定化效率不高,且对酶活力损伤较

大.因此,为了提高 PAL 的催化性能,本研究以 UiO-66-NH<sub>2</sub> 为载体,采用吸附法将 PAL 吸附固定在 UiO-66-NH<sub>2</sub> 上,制备出 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 固定化酶颗粒,考察其催化性能,以期改善 PAL 对极端条件(酸、碱、变性剂、高温等条件)的耐受性和可操作性,为 PAL 的进一步应用提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

来源于重组大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 的 PAL (0.02 U/mg) 保存于本实验室; 2-氨基对苯二甲酸、氯化锆,上海阿拉丁生化科技股份有限公司; N, N-二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇、乙酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、柠檬酸、柠檬酸钠、氯化钠,福晨(天津)化学试剂有限公司; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷,北京索莱宝科技有限公司; 蛋白胨、酵母浸粉,OXOID 公司; 总蛋白(TP)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所有限公司.

FEI-Apreo 型场发射扫描电子显微镜(FESEM), FEI 公司; FV1000 型激光扫描共聚焦显微镜(LSCM),日本 Olympus 有限公司; LGJ-10 型冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司; FE20 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; UV-6100 型紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司; B15-1 型磁力搅拌器,上海思乐仪器有限公司; H2050R 型台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的合成

称取 116.5 mg 氯化锆、90.5 mg 2-氨基对苯二甲酸置于 100 mL 螺口瓶中,加入 51.05 mL DMF,再加入 11.45 mL 乙酸,涡旋振荡均匀,超声 15 min. 将以上体系转移至高温高压反应釜中,120 °C 反应 16 h 后将所得产物以 8 000 r/min 离心 10 min,沉淀后用 DMF 洗涤 3 次,甲醇洗涤 2 次,置于真空干燥机中 60 °C 过夜干燥,即得 UiO-66-NH<sub>2</sub>.

#### 1.2.2 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的制备

将实验室构建的重组大肠杆菌 BL21 接种于含 30  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 100 mL LB 培养基中,37 °C、220 r/min 培养 10 h 作为种子液.以 5% 的接种量接种于 190 mL 含 30  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,培养至  $A_{600}$  为 0.6 ~ 0.8 时,加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷,使其终浓度为 0.1 mmol/L,28 °C、180 r/min

过夜培养,6000 r/min 离心,收集得到的菌体用 0.9% 生理盐水反复洗涤 3 次;将洗涤后的菌体用 50 mmol/L pH 8.0 的 PBS 缓冲液重悬,置于冰水浴中,使用超声破碎仪破碎.破碎条件:总功率的 45%,工作 3 s,间歇 6 s,破碎液在 12000 r/min 条件下离心 20 min,取上清液加入硫酸铵,使其终质量分数为 45%;沉淀 3 h 后,8000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,沉淀用 25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)溶解,装入透析袋,用 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)透析后冻干,得 PAL 固体粉末.

称取 6 mg PAL,用 6 mL 10 mmol/L pH 8.0 的 PBS 缓冲液溶解,向装有 60 mg UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的离心管中加入 6 mL PAL 溶液(0.02 U/mg),缓慢搅拌 1 h;8500 r/min 离心 8 min,弃去上清液,沉淀用 10 mmol/L 的 PBS 缓冲液(pH 8.0)洗涤 3 次,得到 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>.

### 1.2.3 酶活力与酶活回收率的测定方法

PAL 转化 *L*-苯丙氨酸(*L*-Phe)生成的 *t*-CA 在 278 nm 处有吸光度,并且在一定范围内,*t*-CA 质量浓度与吸光度呈线性关系.采用紫外分光光度计测定 PAL 的酶活力,PAL 酶活力单位(U)定义:在一定条件下,1 min 内催化 *L*-Phe 生成 1 μmol *t*-CA 所需要的酶量.测定条件:1.5 mL 离心管中依次加入 490 μL pH 8.8 Tris-HCl、500 μL 50 mmol/L *L*-Phe 和 10 μL PAL 或 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>,40 °C 反应 10 min,然后加入 40 μL 4 mol/L HCl 终止反应,10000g 离心后,在 278 nm 紫外波长处测定上清液的吸光度.以吸光度为横坐标、*t*-CA 质量浓度为纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线方程  $y = 14.08x - 0.526$ ,  $R^2 = 0.999$ .酶活力按照式(1)计算.

$$\text{酶活力} = \frac{\rho \cdot V}{M \cdot t} \quad (1)$$

式中: $\rho$  为 *t*-CA 的质量浓度,mg/L; $V$  为反应体系的体积,mL; $M$  为 *t*-CA 的摩尔质量,148.16 g/mol; $t$  为反应时间,10 min.

固定化酶的酶活回收率按照式(2)计算.

$$\text{酶活回收率} = \frac{\text{固定化酶酶活力}}{\text{初始游离酶酶活力}} \times 100\% \quad (2)$$

### 1.2.4 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的固定化效率的测定

PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的固定化效率按照式(3)计算.

$$\text{固定化效率} = \frac{\text{初始蛋白浓度} - \text{上清液蛋白浓度}}{\text{初始蛋白浓度}} \times 100\% \quad (3)$$

### 1.2.5 UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的添加量与吸附时间对 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 酶活回收率的影响

分别称取 5、10、15、20、25 mg UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒置于 10 mL 离心管中,加入 1 mg/mL 的 PAL 溶液 1 mL,匀速搅拌 1 h;8000 r/min 离心 10 min 后,沉淀用 pH 7.4 的 10 mmol/L PBS 缓冲液洗涤 3 次;参照 1.2.3 节的方法测定酶活力,并计算酶活回收率,考察 UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的添加量对 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 酶活回收率的影响.

称取 10 mg UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒置于 10 mL 离心管中,加入 1 mg/mL 的 PAL 溶液 1 mL,匀速搅拌 0.5、1、1.5、2、2.5 h 后取 1 mL;8000 r/min 离心 10 min,沉淀用 pH 7.4 的 10 mmol/L PBS 缓冲液洗涤 3 次.参照 1.2.3 节的方法测定酶活力,并计算酶活回收率,考察吸附时间对 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 酶活回收率的影响.

### 1.2.6 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的催化性能

最适催化温度:将 10 μL 游离 PAL 和 10 μL 优化完成后的 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 悬浮液分别加入 490 μL 50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 8.8)和 500 μL 50 mmol/L *L*-Phe 反应体系中,在 20 ~ 70 °C 下参照 1.2.3 节的方法测定酶活力,确定最佳催化温度.

最适催化 pH:将 10 μL 游离 PAL 和 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 分别加入 490 μL 不同 pH 的缓冲液(pH 3.0 ~ 11.0)和 500 μL 50 mmol/L *L*-Phe 反应体系中,在 40 °C 下参照 1.2.3 节的方法测定酶活力,确定最佳催化 pH.

温度耐受性:取相同酶活力的游离 PAL 和 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 分别加入 490 μL 50 mmol/L Tris 缓冲液(pH 8.8)中,置于 50 °C 水浴锅,分别处理 10、20、30、40 和 50 min;冷却后加入 500 μL 50 mmol/L *L*-Phe 反应体系中,参照 1.2.3 节的方法测定酶活力.

pH 耐受性:取相同酶活力的游离 PAL 和 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 分别在 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 为 3.0、5.0)及 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 为 7.0、9.0、11.0)中处理 1 h 后,参照 1.2.3 节的方法测定酶活力.

重复使用性:取 0.5 mL PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>、2 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.8)和 2.5 mL 50 mmol/L *L*-Phe,40 °C 反应 10 min,10000g 离心后,参照 1.2.3 节的方法测定酶活力.将回收的 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 用去离子水洗 1 次,重新悬浮于 2.5 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.8)中,涡旋振荡使其分散均匀,加入 2.5 mL 50 mmol/L *L*-Phe 进

行酶促反应后再次测定酶活力. 重复测定 10 次, 确定 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的重复使用性.

变性剂耐受性: 取相同酶活力的游离 PAL 和 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>, 将 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 进行 8 000 r/min 离心 10 min 后, 弃去上清液, 分别加入十二烷基硫酸钠(SDS, 质量分数 2%)、盐酸胍(6 mol/L)、尿素(6 mol/L)处理 1 h, 参照 1.2.3 节的方法测定酶活力.

PAL 和 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的表观动力学: 将 50 mmol/L L-Phe 分别稀释为 2.5、5、12.5、25 mmol/L 的不同浓度进行游离 PAL、PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的催化反应, 测定其 278 nm 处的吸光度. 利用双倒数法测定米氏常数( $K_m$ )和酶促反应的最大速率( $v_{max}$ ).  $K_m$  为酶促反应速率达到最大值一半时的底物浓度, 用来检测酶与底物的亲和能力.

### 1.2.7 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的表征

利用 FEI-Apreo 型场发射扫描电子显微镜、

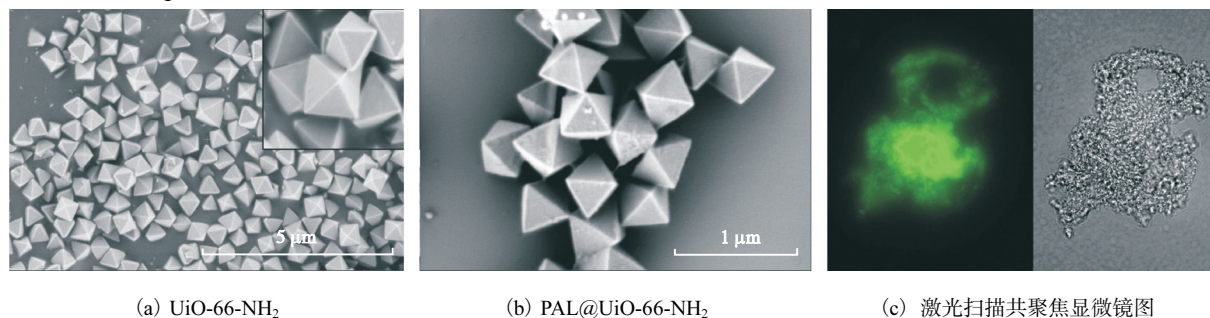


图 1 UiO-66-NH<sub>2</sub> 和 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的场发射扫描电子显微镜图及激光扫描共聚焦显微镜图  
Fig. 1 FESEM and LSCM images of UiO-66-NH<sub>2</sub> and PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>

UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒呈正八面体, 大小为 300 ~ 500 nm, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的形态与 UiO-66-NH<sub>2</sub> 一致, 仍然是正八面体. 与 UiO-66-NH<sub>2</sub> 光滑的表面相比, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 表面显得更粗糙, 这种现象可能是 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 表面吸附 PAL 后产生的. 为了进一步证明 PAL 吸附在 UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的表面, 用 FITC 标记 PAL, 在激光扫描共聚焦显微镜下进行

FV1000 型激光扫描共聚焦显微镜进行观察.

异硫氰酸荧光素(FITC)标记 PAL: 在避光条件下, 将 50 mg FITC 溶于 8 mL 二甲基亚砜(DMSO), 加入 100 mL 溶有 1 g PAL 的磷酸钠缓冲液(0.2 mol/L, pH 8.0), 室温下避光搅拌溶解 2 h; 加入无水乙醇沉淀标记好的蛋白, 离心去除多余的 FITC; 加入 100 mL 去离子水溶解沉淀, 再加入等量乙醇沉淀、离心, 直至将未标记蛋白的残留 FITC 去除.

## 2 结果与分析

### 2.1 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的表征

UiO-66-NH<sub>2</sub> 和 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的场发射扫描电子显微镜图及激光扫描共聚焦显微镜图如图 1 所示.

观察, 可以清晰地看到 UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒散发出绿色荧光, 如图 1(c) 所示. 这表明 PAL 被吸附到 UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒上, 成功制备出 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒.

### 2.2 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的添加量与吸附时间对 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 酶活回收率的影响

UiO-66-NH<sub>2</sub> 的添加量与吸附时间对酶活回收率的影响如图 2 所示.

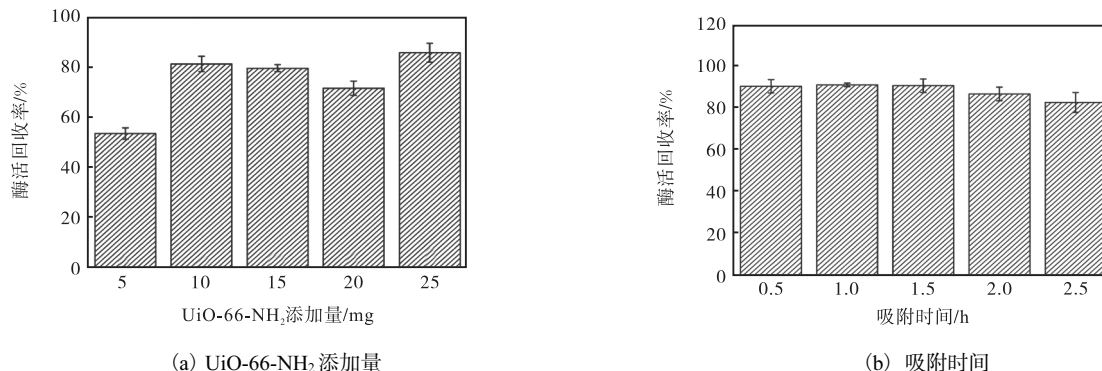


图 2 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的添加量与吸附时间对酶活回收率的影响  
Fig. 2 Effects of addition of UiO-66-NH<sub>2</sub> and adsorption time on enzyme activity recovery

由图 2(a)可知:在相同吸附时间和相同 PAL 浓度条件下, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的酶活回收率随着 UiO-66-NH<sub>2</sub> 添加量的增加而增加;当 UiO-66-NH<sub>2</sub> 添加量达到 10 mg 时,酶活回收率相对较高;继续增加 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的添加量并不能显著提高酶活回收率.因此,选择 UiO-66-NH<sub>2</sub> 添加量为 10 mg.

由图 2(b)可知:吸附时间为 0.5 ~ 1.5 h 时,酶活回收率变化不大,但 1.5 h 后,酶活回收率有所下降.这可能的原因是随着吸附时间的延长,孔隙吸附的酶分子达到了饱和,过多的酶分子相互堆积,导致酶促反应时酶分子之间的活性位点相互遮蔽,底物进入酶

分子的空间位阻也相应增大.因此,当酶分子堆积到一定程度后,随着时间的延长,酶活回收率反而下降<sup>[37-38]</sup>.考虑制备周期和成本,选用 0.5 h 为最优吸附时间.在此最优条件下,UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒对 PAL 的负载率达到了  $(91.11 \pm 1.57)\%$ . PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的酶活回收率为  $(90.01 \pm 3.18)\%$ ,比优化前提高了 35%.

## 2.3 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的催化性能

### 2.3.1 催化温度和 pH

PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 催化温度和 pH 优化结果如图 3 所示.

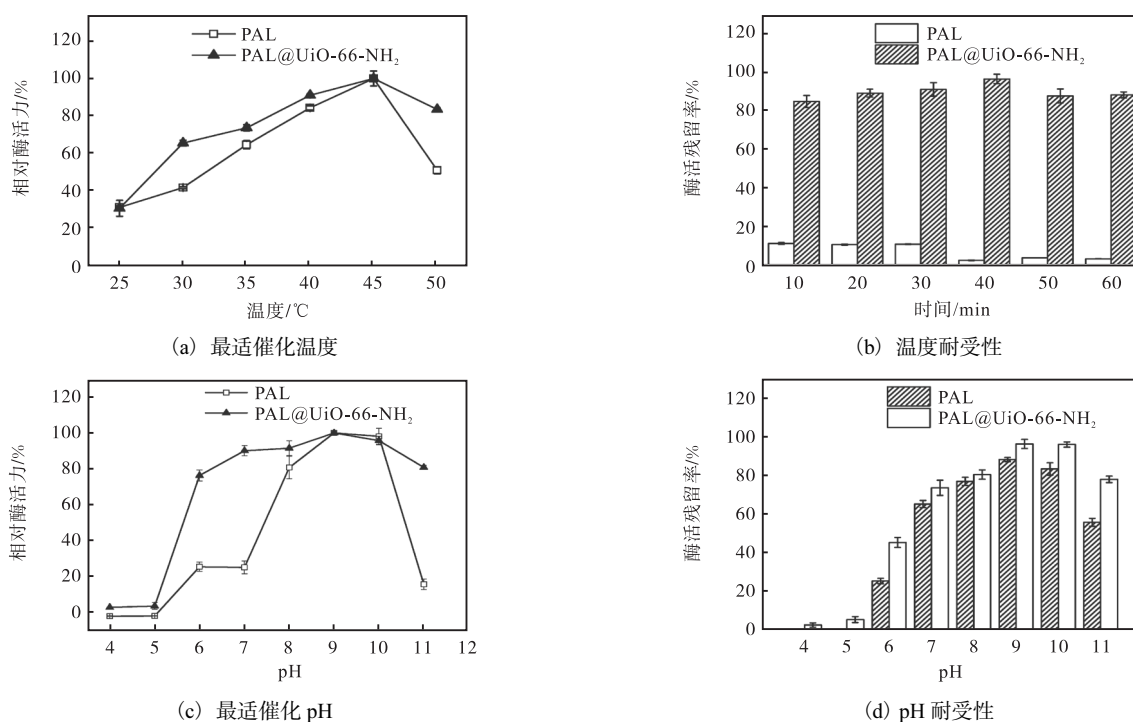


图 3 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 催化温度和 pH 优化

Fig. 3 Optimization of catalytic temperature and pH of PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>

由图 3(a)和 3(c)可知, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的最适催化温度和最佳催化 pH 与天然 PAL 的相同,都是 45 °C 和 pH 9.0. 这可能是由于 PAL 是通过较弱的吸附作用固定在 UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒上,固定化并没有影响天然 PAL 的结构,从而使其最适催化温度和 pH 没有发生变化.但是, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 在不同的温度条件下表现出比天然 PAL 更高的酶活力,表明固定化使 PAL 能适应更广泛的催化温度.由图 3(b)可知,在 50 °C 处理条件下,随着处理时间从 10 min 延长到 50 min,天然 PAL 的酶活残留率从 10% 下降至 3% 左右,而 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 仍然能保持 84% ~ 96% 的酶活残留率.由图 3(c)可知,尽管 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 表现出与天然 PAL 相同的最适催化 pH,但

是 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 在不同的 pH 条件下表现出比天然 PAL 更高的相对酶活力.由图 3(d)可知, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 在酸性和碱性条件下的酶活残留率均高于天然 PAL.这些结果表明,当天然 PAL 被吸附在 UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒上以后,由于载体对 PAL 的遮蔽保护作用,提高了 PAL 对高温和极端 pH 的耐受性,使 PAL 保持一定的酶活力.

### 2.3.2 动力学参数

PAL 与 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的表观动力学参数测定结果见表 1.

与天然 PAL 相比, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 具有较大的  $K_m$  值,表明 PAL 固定化后,由于载体的存在,形成较大的底物扩散限制效应和传质阻力,从而使底物



与 PAL 的亲合力减弱, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的  $v_{\max}$  降低. 以前的研究<sup>[39-41]</sup>也表明, 固定化后的酶比游离酶具有更大的  $K_m$  和更小的  $v_{\max}$ , 本研究的结果与之前的报道一致.

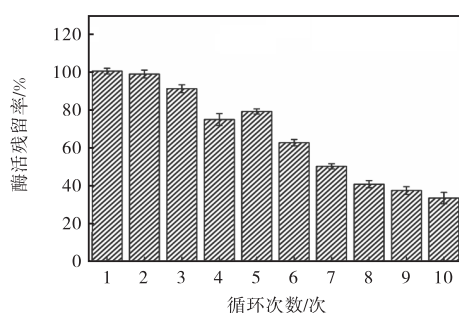
表 1 PAL 与 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的表现动力学参数

Tab.1 Comparison of apparent kinetic parameters of PAL and PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>

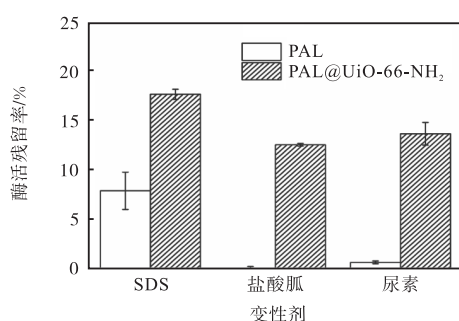
酶	$K_m/(mmol \cdot L^{-1})$	$v_{\max}/(mmol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1})$
PAL	8.328 7	$2.17 \times 10^{-5}$
PAL@UiO-66-NH <sub>2</sub>	28.714 6	$1.56 \times 10^{-5}$

### 2.3.3 重复使用性和变性剂耐受性

PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的重复使用性结果如图 4(a) 所示, 在连续重复使用 5 次后, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 仍能保持 80% 左右的初始酶活力, 表明 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 具有较好的可操作性. 由图 4(b) 可知: PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 表现出更强的变性剂耐受性, 例如在 2% SDS 处理后, 天然 PAL 只能保留 7% 的初始酶活力, 而 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 却能保留 18% 的初始酶活力.



(a) 重复使用性



(b) 变性剂耐受性

图 4 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 的重复使用性及变性剂耐受性

Fig.4 Reusability and denaturing agent tolerance of PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub>

## 3 结论

本研究使用吸附法将 PAL 固定在 UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒上, 优化的制备条件为 1 mg/mL PAL、10 mg

UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒、吸附时间 0.5 h, 在此条件下所得 PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 颗粒的酶活回收率为  $(90.01 \pm 3.18)\%$ , 比优化前提高了约 35%. 与游离 PAL 相比, PAL@UiO-66-NH<sub>2</sub> 固定化酶具有良好的 pH 耐受性、温度耐受性、变性剂耐受性, 且重复使用性良好, 连续使用 5 次之后仍能保持 80% 左右的初始酶活力.

## 参考文献:

- [1] CUI J D, SUN L M, LI L L. A simple technique of preparing stable CLEAs of phenylalanine ammonia lyase using co-aggregation with starch and bovine serum albumin[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2013, 170(8): 1827-1837.
- [2] BLAU N, VAN SPRONSEN F J, LEVY H L. Phenylketonuria[J]. The lancet, 2010, 376(9750): 1417-1427.
- [3] CHRISTENSEN R D, HENRY E, WIEDMEIER S E, et al. Identifying patients, on the first day of life, at high-risk of developing parenteral nutrition-associated liver disease[J]. Journal of perinatology, 2007, 27(5): 284-290.
- [4] WESTRUP B. Newborn individualized developmental care and assessment program (NIDCAP) [J]. Neo-reviews, 2005, 6(3): 115-122.
- [5] CUI J D, LI L L, ZHAO Y M. Simple technique for preparing stable and recyclable cross-linked enzyme aggregates with crude-pored micro spherical silica core [J]. Industrial & engineering chemistry research, 2014, 53(42): 16176-16182.
- [6] CUI J, LIANG L, HAN C, et al. Stabilization of phenylalanine ammonia lyase from rhodotorula glutinis by encapsulation in polyethyleneimine-mediated biomimetic silica[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2015, 176(4): 999-1011.
- [7] 赵雅敏. 以 CaCO<sub>3</sub> 为模板苯丙氨酸解氨酶的固定化及其催化性能的研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2016.
- [8] 杜欣谊. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 现代化农业, 2016(7): 24-26.
- [9] 贺立红, 张进标, 宾金华. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 食品科技, 2006(7): 31-34.
- [10] 徐晓梅, 杨曙光. 苯丙氨酸解氨酶研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15115-15119.
- [11] MENG J, NIU C, XU L, et al. General oriented formation of carbon nanotubes from metal-organic frameworks[J]. Journal of the American chemical society, 2017, 139(24): 8212-8221.

- [ 12 ] ZHOU H C, KITAGAWA S. Metal-organic frameworks (MOFs) [J]. *Chemical society reviews*, 2014, 43 (16) : 5415–5418.
- [ 13 ] FURUKAWA H, CORDOVA K E, O'KEEFFE M, et al. The chemistry and applications of metal-organic frameworks [J]. *Science*, 2013, 341 (6149) : 1230444.
- [ 14 ] LIN Z J, LU J, HONG M, et al. Metal-organic frameworks based on flexible ligands (FL-MOFs) : structures and applications [J]. *Chemical society reviews*, 2014, 43 (16) : 5867–5895.
- [ 15 ] SALIBA D, AMMAR M, RAMMAL M, et al. Crystal growth of ZIF-8, ZIF-67, and their mixed-metal derivatives [J]. *Journal of the American chemical society*, 2018, 140 (5) : 1812–1823.
- [ 16 ] YANG X, CHEN W, BIAN H, et al. Synthesis of mesoporous ZIF-8 nanoribbons and their conversion into carbon nanoribbons for high-performance supercapacitors [J]. *Chemistry*, 2018, 24 (43) : 11185–11192.
- [ 17 ] LIANG S, WU X L, XIONG J, et al. Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization : an update review [J]. *Coordination chemistry reviews*, 2020, 406 : 213149.
- [ 18 ] ZHONG L, FENG Y, HU H, et al. Enhanced enzymatic performance of immobilized lipase on metal organic frameworks with superhydrophobic coating for biodiesel production [J]. *Journal of colloid and interface science*, 2021, 602 : 426–436.
- [ 19 ] 葛亮, 伍斌, 王鑫, 等. MOFs 分离膜在水系分离中的应用 [J]. *化工学报*, 2019, 70 (10) : 3748–3763.
- [ 20 ] PISCOPO C G, POLYZOIDS A, SCHWARZER M, et al. Stability of UiO-66 under acidic treatment : opportunities and limitations for post-synthetic modifications [J]. *Microporous and mesoporous materials*, 2015, 208 : 30–35.
- [ 21 ] HERNANDEZ A F, IMPASTATO R K, HOSSAIN M I, et al. Water bridges substitute for defects in amine-functionalized UiO-66, boosting CO<sub>2</sub> adsorption [J]. *Langmuir*, 2021, 37 (35) : 10439–10449.
- [ 22 ] LI S, JIN Y, HU Z, et al. Performance and mechanism for U(VI) adsorption in aqueous solutions with amino-modified UiO-66 [J]. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 2021, 330 : 857–869.
- [ 23 ] LI W, WANG W, SUN J, et al. Hydrophobic modification of UiO-66 by naphthyl ligand substitution for efficient toluene adsorption in a humid environment [J]. *Microporous and mesoporous materials*, 2021, 326 : 111357.
- [ 24 ] REGO R M, SRIRAM G, AJEYA K V, et al. Cerium based UiO-66 MOF as a multipollutant adsorbent for universal water purification [J]. *Journal of hazardous materials*, 2021, 416 : 125941.
- [ 25 ] WANG X, WANG Y, CHAI G, et al. Poly (triphenylamine)-decorated UiO-66-NH<sub>2</sub> mesoporous architectures with enhanced photocatalytic activity for CO<sub>2</sub> reduction and H<sub>2</sub> evolution [J]. *Journal of CO<sub>2</sub> utilization*, 2021, 51 : 101645.
- [ 26 ] WANG Y, PENG C, JIANG T, et al. Research progress of defect-engineered UiO-66 (Zr) MOFs for photocatalytic hydrogen production [J]. *Frontiers in energy*, 2021, 15 : 656–666.
- [ 27 ] WANG Y L, ZHANG S, ZHAO Y F, et al. UiO-66-based metal organic frameworks for the photodegradation of acetaminophen under simulated solar irradiation [J]. *Journal of environmental chemical engineering*, 2021, 9 (5) : 106087.
- [ 28 ] HASHEMZADEH A, AMERIZADEH F, ASGHARZADEH F, et al. Magnetic amine-functionalized UiO-66 for oxaliplatin delivery to colon cancer cells: in vitro studies [EB/OL]. [2021–10–14]. <https://doi.org/10.1007/s10876-021-02158-6>.
- [ 29 ] ZHENG M, LIU S, GUAN X, et al. One-step synthesis of nanoscale zeolitic imidazolate frameworks with high curcumin loading for treatment of cervical cancer [J]. *ACS Applied materials & interfaces*, 2015, 7 (40) : 22181–22187.
- [ 30 ] GHOSH S, BISWAS S. Ultrafast and nanomolar level detection of H<sub>2</sub>S in aqueous medium using a functionalized UiO-66 metal-organic framework based fluorescent chemosensor [J]. *Dalton trans*, 2021, 50 (33) : 11631–11639.
- [ 31 ] WANG N, WU Y, WANG M, et al. Design of a dual-signal sensing platform for D-penicillamine based on UiO-66-NH<sub>2</sub> MOFs and APBA@Alizarin Red [J]. *Analyst*, 2021, 146 (17) : 5280–5286.
- [ 32 ] WU Y, CHEN X, LUO X, et al. Bimetallic organic framework Cu/UiO-66 mediated “fluorescence turn-on” method for ultrasensitive and rapid detection of carcinoembryonic antigen (CEA) [J]. *Analytica chimica acta*, 2021, 1183 : 339000.
- [ 33 ] AHMAD R, SHANAHAN J, RIZALDO S, et al. Co-immobilization of an enzyme system on a metal-organic framework to produce a more effective biocatalyst [J]. *Catalysts*, 2020, 10 (5) : 499.

- sential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices[J]. Journal of food protection, 2006, 69(7): 1579–1586.
- [15] LEE S B, CHA K H, KIM S N, et al. The antimicrobial activity of essential oil from *Dracocephalum foetidum* against pathogenic microorganisms[J]. Journal of microbiology, 2007, 45(1): 53–57.
- [16] ESPINA L, SOMOLINOS M, LORÁN S, et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes[J]. Food control, 2011, 22(6): 896–902.
- [17] VIUDA-MARTOS M, RUIZ-NAVAJAS Y, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, et al. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils[J]. Food control, 2008, 19(12): 1130–1138.
- [18] 王雪梅, 湛徽, 李雪姣, 等. 天然活性单萜——柠檬烯的抑菌性能研究[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 24–28.

责任编辑: 周建军

(上接第15页)

- [34] CHEN J, SUN B, SUN C, et al. Immobilization of lipase AYS on UiO-66-NH<sub>2</sub> metal-organic framework nanoparticles as a recyclable biocatalyst for ester hydrolysis and kinetic resolution[J]. Separation and purification technology, 2020, 251: 117398.
- [35] CHEN X, XUE S, LIN Y, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto a metal-organic framework, PPL@MOF: a new platform for efficient ligand discovery from natural herbs[J]. Analytica chimica acta, 2020, 1099: 94–102.
- [36] WANG B, ZHOU J, ZHANG X Y, et al. Covalently immobilize crude *D*-amino acid transaminase onto UiO-66-NH<sub>2</sub> surface for *D*-Ala biosynthesis[J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 175: 451–458.
- [37] MANSOUR E H, DAWOUD F M. Immobilization of invertase on celite and on polyacrylamide by an absorption procedure[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2003, 83(5): 446–450.
- [38] 李宇彤. PEI 接枝纳米二氧化硅载体的构建及在固定化酶领域的应用[D]. 天津: 天津大学, 2018.
- [39] BADOEI-DALFARD A, KHANKARI S, KARAMI Z. One-pot synthesis and biochemical characterization of protease metal organic framework (protease@MOF) and its application on the hydrolysis of fish protein-waste[J]. Colloids and surfaces B: biointerfaces, 2020, 196: 111318.
- [40] EL-SHISHTAWY R M, ALDHAHRI M, ALMULAIKY Y Q. Dual immobilization of alpha-amylase and horseradish peroxidase via electrospinning: a proof of concept study[J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 163: 1353–1360.
- [41] LEE C H, LEE H S, LEE J W, et al. Evaluating enzyme stabilizations in calcium carbonate: comparing in situ and crosslinking mediated immobilization[J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 175: 341–350.

责任编辑: 郎婧