

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230038

数字出版日期: 2023-07-20; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms2/detail/12.1355.N.20230720.1519.005.html>

杂化纳米生物催化剂 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的构建及性能

杜英杰^{1,3}, 贾晓彤¹, 罗秀艳¹, 崔建东¹, 贾士儒¹, 龚栋²

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 湖北汉江大健康产业有限公司, 十堰 442000;

3. 天津益倍生物科技集团有限公司, 天津 300457)

摘要: 以脂肪酶(lipase, CALB)为模型酶, 利用功能性纳米材料四氧化三铁纳米粒子与金属有机骨架(metal-organic framework, MOF)材料 ZIF-8 相杂化的同时, 将 CALB 包埋在杂化材料中, 制备杂化纳米生物催化剂 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8, 研究了温度、机械搅拌转速、光照条件以及 Fe₃O₄ 添加量对 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 活性的影响, 获得制备 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的最佳条件为: 温度 20 °C、转速 400 r/min、光照波长 380 nm、Fe₃O₄ 质量 5 mg。在此条件下 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的最大酶活回收率 82%, 比优化前提高了 16%。随着具有光热效应的 Fe₃O₄ 纳米粒子的加入, CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 表现出较强的光热效应, 光照(光强和光照波长)显著提高酶与底物的亲和力和反应速率, 使 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 表现出更高的酶活力。该研究为开发新型功能性纳米杂化 MOF 固定化酶生物催化剂提供参考。

关键词: 生物催化; 金属有机骨架材料; 纳米材料; 固定化酶; 光热效应

中图分类号: Q814.2; TQ426.97

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2024)01-0008-07

Construction and Properties of Catalytic Hybrid Nanobiocatalyst CALB@Fe₃O₄@ZIF-8

DU Yingjie^{1,3}, JIA Xiaotong¹, LUO Xiuyan¹, CUI Jiandong¹, JIA Shiru¹, GONG Dong²

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Hubei Hanjiang Great Health Industry Co., Ltd., Shiyan 442000, China;

3. Tianjin Ubasio Biotechnology Group Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: Lipase (CALB) was used as the model enzyme. When functional nanomaterial ferric oxide nanoparticles were hybridized with metal-organic framework (MOF) material ZIF-8, CALB was embedded in the hybrid material at the same time to prepare hybrid nanobiocatalysts CALB@Fe₃O₄@ZIF-8. The effects of temperature, mechanical stirring speed, illumination and the amount of Fe₃O₄ on the activity of CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 catalyst were investigated. The optimum conditions for preparing CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 were as follows: temperature 20 °C, rotation speed 400 r/min, illumination wavelength 380 nm and Fe₃O₄ mass 5 mg. Under these conditions, the maximum recovery rate of CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 was 82%, which was 16% higher than before optimization. At the same time, with the addition of Fe₃O₄ nanoparticles with photothermal effect, CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 showed strong photothermal effect, light intensity and wavelength could significantly improve the affinity and reaction rate of enzyme and substrate, and CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 showed higher apparent enzyme activity. This study provides a useful reference for the development of novel functional nanohybrid MOF immobilized enzyme biocatalysts.

Key words: biocatalysis; metal organic framework materials; nanomaterial; immobilized enzyme; photothermal effect

引文格式:

杜英杰, 贾晓彤, 罗秀艳, 等. 杂化纳米生物催化剂 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的构建及性能[J]. 天津科技大学学报, 2024,

收稿日期: 2023-02-24; 修回日期: 2023-05-11

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(22108206); 中国博士后科研基金面上项目(2022M722387)

作者简介: 杜英杰(1993—), 男, 河南内黄人, 副教授; 通信作者: 崔建东, 教授, jdcui@tust.edu.cn

39(1):8-14.

DU Y J, JIA X T, LUO X Y, et al. Construction and properties of catalytic hybrid nanobiocatalyst CALB@Fe₃O₄@ZIF-8[J]. Journal of Tianjin university of science & technology, 2024, 39(1):8-14.

作为生物活性大分子,游离酶具有高效性、专一性和反应条件温和的优点,但在工业中使用有易失活、回收困难、不能反复利用、不易于产物分离提纯和精制、成本高等明显缺点^[1-2]。将酶固定化可为酶提供一个相对稳定的环境,这不仅减少了酶在实际使用过程中的流失,还能提高酶的相对稳定性以及重复使用性^[3]。将酶固定在固体载体上,能更有效控制反应过程并提高酶在储存和操作条件下的稳定性。此外,固定化酶可以更容易从产品中分离出来,有效降低生产成本^[4]。

目前,固定化酶的常用方法有多种^[5-8],其中新型包埋法使用各种多孔纳米材料,如无定形磷酸钙^[9]、有机-无机杂化纳米花^[10]、金属有机骨架(metal-organic framework, MOF)^[11]等用于酶的固定化。金属有机骨架纳米材料作为酶固定化的载体具有生物亲和性高、制备过程简单、可修饰等优势,但是存在颗粒小、难回收、较低的酶负载率等问题,在一定程度上限制了其在固定化酶领域的应用。将 MOF 与其他功能纳米材料相杂化,制备复合纳米材料,不仅可以保持 MOF 材料的优良性能,还可以体现功能材料的特性,在酶的固定化领域具有较好的应用前景。ZIF-8 是 MOF 材料的一种,它是由六水合硝酸锌和 2-甲基咪唑在常温下通过有机物和无机金属离子配位合成的金属骨架材料。ZIF-8 原料价格低廉,合成条件简单易改进,因而十分适用于固定化酶的开发。当前,将大分子酶固定于 MOF 材料上实现 MOF 材料作为载体的固定化酶生物催化剂的构建已成为研究热点之一^[12-13]。然而,单一 ZIF-8 材料仍然存在一些常见问题,例如 MOF 材料的酸碱稳定性较差、颗粒小、机械强度较低等,这在一定程度上限制了它们的应用范围。因此,将 MOF 与其他功能纳米材料相杂化,制备复合纳米材料,不仅可以保持 MOF 材料的优良性能,还可以体现功能材料的特性,对于提高酶固定化载体的性能具有重要意义。

尽管 MOF 固定化酶策略能改善酶的稳定性,但往往存在较低的酶负载率、较大的传质阻力、难以简单回收并重复利用以及制备过程难以精确控制等因素,造成催化效率较低^[14]。金属纳米粒子 Fe₃O₄ 作为一种功能化材料,具有反式尖晶石结构和稳定的化学性质、良好的生物相容性、一定的光热效应和磁响应

性能,在物理、化学、生物、医药等诸多领域受到广泛关注。Hou 等^[15]在 Fe₃O₄ 表面修饰了 MOF 涂层制备固定化酶,利用 Fe₃O₄ 的磁性特性,在磁场的控制下可以使固定化酶被快速分离。Ricco 等^[16]对 Fe₃O₄ 纳米粒子进行了聚多巴胺修饰,并在其表面涂覆了 MOF 材料构建多层核壳结构材料,实现了高稳定性固定化胰蛋白酶的制备。Zhao 等^[17]在温和条件下一步包埋 Fe₃O₄ 纳米粒子和酶分子,构建 ZIF-8 基的磁性固定化酶。他们发现 Fe₃O₄ 纳米粒子的加入影响了 ZIF-8 的晶体和孔隙结构,更有利于底物的传入和产物的传出,使催化剂展示出较高的催化活力。因此,将 Fe₃O₄ 纳米粒子和酶共同包埋在 MOF 材料中,形成酶/Fe₃O₄/MOF 复合杂化生物催化剂,能够使复合杂化生物催化剂具有多波长光效应和磁响应的特点。同时,在一定光照条件下,Fe₃O₄ 纳米粒子在催化剂内部产生局部热量,提升催化剂催化微环境的温度,进而提高固定化酶生物催化剂的酶活力。开展纳米马达杂化 MOF 固定化酶的可控制备及其构效关系探究,对于开发新型高效纳米固定化酶具有重要意义。

本研究以脂肪酶(CALB)为模型酶,在功能性纳米材料 Fe₃O₄ 纳米粒子与 ZIF-8 纳米材料相杂化的同时,将脂肪酶包埋在 ZIF-8 中,制备杂化纳米生物催化剂(CALB@Fe₃O₄@ZIF-8)。采用的脂肪酶(lipase, EC3.1.1.3, 甘油酯水解酶)作为一种有专一性、高效性和环境友好性特点的催化剂^[18-19],被广泛应用于食品、化工、皮革和生物能源等工业领域。构建的新型杂化材料固定化酶与传统仅将脂肪酶包埋在 ZIF-8 中的催化剂(CALB@ZIF-8)相比,该催化剂具备以下特性:作为生物亲和性好的载体,ZIF-8 纳米材料的包埋可以为脂肪酶分子提供良好的保护作用;Fe₃O₄ 纳米粒子的光热效应可以为脂肪酶提供程度可控的微环境水平热量供给,提升酶的催化活力;同时,其磁响应特性有利于生物催化剂的回收和重复利用。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪酶来源于伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*, 货号 534641), Sigma 公司;曲拉通 X-100 (Triton X-100),北京索莱宝科技有限公司;2-甲基咪

啉(2-MeIM)、六水合硝酸锌、异硫氰酸荧光素(FITC)、棕榈酸对硝基苯酯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、无水乙醇、 $\text{NaH}_2\text{PO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 福晨(天津)化学试剂有限公司; 氮气,天津市军粮城常福气体有限公司; 盐酸,国药集团化学试剂有限公司。

CHF-XM500 型氙灯光源,北京泊菲莱科技有限公司; UV-6100 型紫外分光光度计,上海美普达仪器有限公司; EMS-20 型数显恒温磁力搅拌水浴锅,上海乔跃电子有限公司; JJ-1B 型恒速电动搅拌器,巩义市予华仪器有限公司; pHSJ-4A 型 pH 计,上海精密科学仪器有限公司; D8 Advance 型傅里叶变换红外光谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

取浓盐酸与水等体积混合,配制 6 mol/L 的盐酸溶液,用所配制的盐酸溶液滴入 50 mL 超纯水中,直到 $\text{pH} = 2.5 \sim 3.5$,将 1.67 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加入上述溶液中溶解。打开机械搅拌装置,水浴锅水温 25°C ,向三口烧瓶中加入混合溶液,三口烧瓶一口盖上玻璃塞,中间连接搅拌桨,另一口连接氮气装置,验证装置气密性后通入氮气 10 min。待排出空气后,打开搅拌装置,转速 400 r/min,打开玻璃塞,在体系中添加亚硝酸钠 0.21 g,立即密封玻璃塞,调节水浴锅温度至 40°C ,随后加入 25 mL 25% 氨水,机械搅拌 2 h。将悬浮液倒入离心管中用钕磁铁分离,回收磁性粒子,倒出废液,超纯水洗涤 2 次,无水乙醇洗涤 2 次,每次均进行磁场分离,最后保存到无水乙醇中,得 Fe_3O_4 纳米粒子分散液, 4°C 保存。

1.3 CALB@ZIF-8 及 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-8 的制备

1.3.1 CALB@ZIF-8 的制备

取 89.2 mg $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 5 mL 超纯水混合,另取 239.1 mg 2-MeIM 与 10 mL 超纯水混合,取脂肪酶 30 mg 与 10 mL 超纯水混合,得到 3 mg/mL 的酶液。在 200 r/min 机械搅拌和水浴锅 25°C 条件下,向 100 mL 三口烧瓶中加入 1 mL 酶液和 9 mL pH 为 7 的 100 mmol/L PB 缓冲液,待溶解后用移液管滴加 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 溶液;搅拌 30 min 后取出, 25°C 、8 680 r/min 离心 5 min;加入 25 mL 超纯水分散沉淀,倒入三口烧瓶中,打开机械搅拌,保持上述温度,移液管滴加制备好的 10 mL 2-MeIM 溶液,搅拌 2 h 后将反应液取出;在 10 000 r/min、 25°C 的条件下离心 10 min,收集沉淀备用^[20]。

1.3.2 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-8 的制备

取一定量的 Fe_3O_4 纳米粒子分散液,钕磁铁分离

去除无水乙醇,用去离子水洗涤 2 次,加入 1 mL PB 缓冲液(pH 7.0, 100 mmol/L)后超声 40 min 备用。在机械搅拌条件下,向 100 mL 三口烧瓶中加入 1 mL 质量浓度同 1.3.1 节中的酶液、离心后的 1 mL Fe_3O_4 纳米粒子分散液和 8 mL PB 缓冲液(pH 7.0, 100 mmol/L),其后实验步骤参照 1.3.1 节。

1.4 CALB 酶活力测定方法

CALB 酶活力测定参考 Gao 等^[21]的测定方法:将制备的固定化酶离心后所获得的沉淀溶解,为待测酶液,向 PB 缓冲液(pH 7.5, 100 mmol/L)中加入 0.4% 的乳化剂 Triton X-100。将 0.015 1 g 棕榈酸对硝基苯酯溶于 3 mL 无水乙醇中,得到 13.33 mmol/L 底物。

在 5 mL 离心管中加入 1.15 mL 上述加入乳化剂的混合溶液和 0.1 mL 底物,在 37°C 的条件下预热 3 min 后加入 0.25 mL 酶液,反应 3 min 后迅速在 410 nm 波长下以水替代酶液并加入等量底物标零,测定吸光度。

CALB 酶活力定义:在 37°C 条件下 1 min 内转化棕榈酸对硝基苯酯生成 $1\ \mu\text{mol}$ 对硝基苯酚所需的酶量为 1 U。酶活力换算公式为

$$Y = \frac{A-c}{k} \times N \quad (1)$$

式中: Y 为酶活力, U; A 为吸光度; k 为标准曲线的斜率; c 为标准曲线的截距; N 为酶液的稀释倍数。

1.5 制备条件对酶催化性能的影响

1.5.1 温度对固定化酶催化性能的影响

制备固定化酶 CALB@ZIF-8 和 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-8 时,设置温度为 15、20、25、30、 35°C ,在无光条件和 380 nm 光照条件下测定吸光度,并通过式(1)计算酶活力。

1.5.2 转速对固定化酶催化性能的影响

在上述实验基础上,分别在 200、250、300、350、400 r/min 转速下制备固定化酶 CALB@ZIF-8 和 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-8,测定酶活力,酶活力测定方法参见 1.4 节。

1.5.3 光照条件对固定化酶催化性能的影响

在上述实验基础上,将制备的固定化酶 CALB@ZIF-8 和 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-8 在无光条件、自然光条件以及 380、435、475、650 nm 下测定酶活力,酶活力测定方法参见 1.4 节。

1.5.4 Fe_3O_4 质量对固定化酶催化性能的影响

在上述实验基础上,分别称取 Fe_3O_4 纳米粒子 3、4、5、6、7 mg 制备固定化酶 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-

8,并在 380 nm 光照条件下测定酶活力,酶活力测定方法参见 1.4 节。

1.6 酶促反应动力学测定

棕榈酸对硝基苯酯的浓度分别设置为 6、8、10、12、14 mmol/L,实验开始 3 min 后读取吸光度,按照 1.4 节方法分别测定在以上不同底物浓度下脂肪酶的酶促反应速率,根据吸光度计算对硝基苯酚生成量^[21]。以 $1/c$ 为横坐标、 $1/v$ 为纵坐标,根据双倒数作图法计算 v_{\max} 和 K_m ^[24]。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}c} \quad (2)$$

式中: v 为酶促反应速率, v_{\max} 为最大酶促反应速率,单位均为 mol/(L·min); K_m 为米氏常数,mol/L; c 为底物浓度,mol/L。

2 结果与分析

2.1 四氧化三铁的透射电镜观察

为考察四氧化三铁纳米粒子的粒径和形貌,对其进行了透射电镜(transmission electron microscope, TEM)分析,结果如图 1 所示。

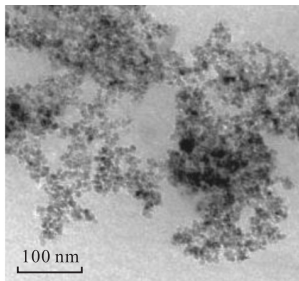


图 1 四氧化三铁透射电镜图
Fig. 1 TEM image of Fe₃O₄

由图 1 可知,四氧化三铁纳米粒子粒径约为 30 nm,但呈现部分团聚现象,这可能会造成包埋的效果不理想,因此在包埋前需要对 Fe₃O₄ 进行超声等预处理,使其更加分散。

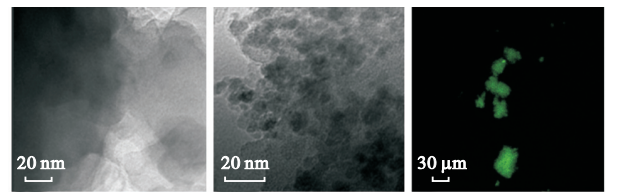
2.2 固定化 CALB 催化剂的表征

利用透射电镜考察了两种固定化酶催化剂的形貌,结果如图 2 所示。由图 2(a)和图 2(b)可知,CALB@ZIF-8 呈现为球状,CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 也呈现为球状,粒径约为 200 nm,且颗粒内部分布着的黑色斑点是小 Fe₃O₄ 纳米颗粒。由透射电镜图片可知,Fe₃O₄ 纳米颗粒被杂化到 ZIF-8 中。

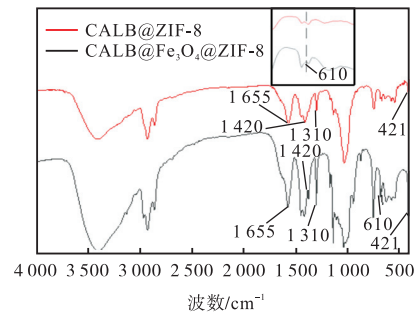
为了验证脂肪酶被固定在 ZIF-8 中,对脂肪酶用异硫氰酸荧光素进行了标记,透析后进行固定化操

作,并用激光共聚焦显微镜进行了观察,结果如图 2(c)所示。在 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 中可以观察到大量绿色荧光,表明脂肪酶被包埋固定在了 ZIF-8 中。

对两种固定化酶催化剂进行了傅里叶变换红外光谱表征,结果如图 2(d)所示。在 610 cm⁻¹ 处的吸收峰说明了 Fe—O 键的形成,在 421 cm⁻¹ 处的振动峰对应着 N—Zn 键,在 1310 cm⁻¹、1420 cm⁻¹ 处的振动峰对应着咪唑环,在 1655 cm⁻¹ 处存在酰胺键红外吸收峰,表明脂肪酶被固定,进一步证明了 Fe₃O₄ 杂化 ZIF-8 复合纳米材料的成功制备。



(a) CALB@ZIF-8 (b) CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 (c) FITC 标记的 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8



(d) 红外光谱图

图 2 固定化酶催化剂的表征结果

Fig. 2 Characterization results of immobilized enzyme catalyst

2.3 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 制备条件优化

温度、转速、光照条件和 Fe₃O₄ 质量对固定化 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 酶活力的影响如图 3 所示。

2.3.1 温度

温度作为固定化酶制备的关键条件之一,往往会影响到固定化酶的催化活力和稳定性,因此有必要对固定化过程中的温度对固定化酶酶活力的影响进行考察,从而获得最佳的固定化温度。如图 3(a)所示,在 30 °C 条件下制备的 CALB@ZIF-8 酶活力达到最高值,在无光条件下和 380 nm 光照条件下的酶活力分别是 75 U 和 85 U。相比而言,在 20 °C 条件下制备的 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的酶活力达最高值,在无光条件下和 380 nm 光照条件下的酶活力分别是 102 U 和 113 U。这可能是由于 Fe₃O₄ 的光热效应对酶分子的构象产生影响,使其更适于在较低温度下进行固定

化^[22]。在光照条件下, Fe₃O₄ 纳米粒子可以在局部空间内为酶分子提供纳米粒子的微热效应, 进而提升酶的催化活力。因此, 选择 20 °C 作为制备温度。

2.3.2 转速

在制备固定化酶的过程中, 转速也是一个重要影响因素, 适当的搅拌可以使体系混合得更均匀, 使反应平稳进行。如图 3(b) 所示, 转速条件的变化对其酶活力影响较为显著。固定化酶 CALB@ZIF-8 在 250 r/min 制备时酶活力达到最大值 191 U, 但随着转速增加, 酶活力下降, 这可能是因为过高的转速破坏了固定化酶的结构。CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的酶活力随着转速的增大而逐步提高, 在 400 r/min 时酶活力最大。这个结果表明: 功能化 Fe₃O₄ 纳米粒子与 MOF 材料的杂化可能有益于固定化酶结构的稳定。因此, 选择 400 r/min 作为制备转速。

2.3.3 光照条件

光照条件是表现本催化剂的光热效应的关键因素, 功能化 Fe₃O₄ 纳米粒子具有光热效应, 可协助实现催化剂产生局部热, 光照条件的变化会改变其局部

空间, 为酶分子提供微热效应。由图 3(c) 可知: 游离酶和 CALB@ZIF-8 受光照影响不显著, 但是 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 受光照条件影响较为显著, 其在 380 nm 下酶活力达到最高值 (149 U), 高于 CALB@ZIF-8 酶活力最高值 (128 U), 游离酶酶活力为 181 U, 最大酶活回收率为 82%, 比优化前提高了 16%。这可能是因为功能化 Fe₃O₄ 纳米粒子的光热效应带入 MOF 材料固定化酶中, 为内部酶分子带来了局部热量, 大大提高了固定化酶的酶活力^[23]。因此, 光照条件选择 380 nm。

2.3.4 Fe₃O₄ 质量

Fe₃O₄ 作为功能化纳米粒子具有光热效应, 可使金属有机骨架材料的部分原有性能增强, 甚至使复合材料集成新的性能, 形成具有优异协同性能的复合材料。由图 3(d) 可知: 酶活力随着 Fe₃O₄ 质量的增加而逐步上升, 在 5 mg 时达到最高值 (149 U), 随后逐步下降。因此, 制备固定化酶 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的最优 Fe₃O₄ 添加质量为 5 mg。

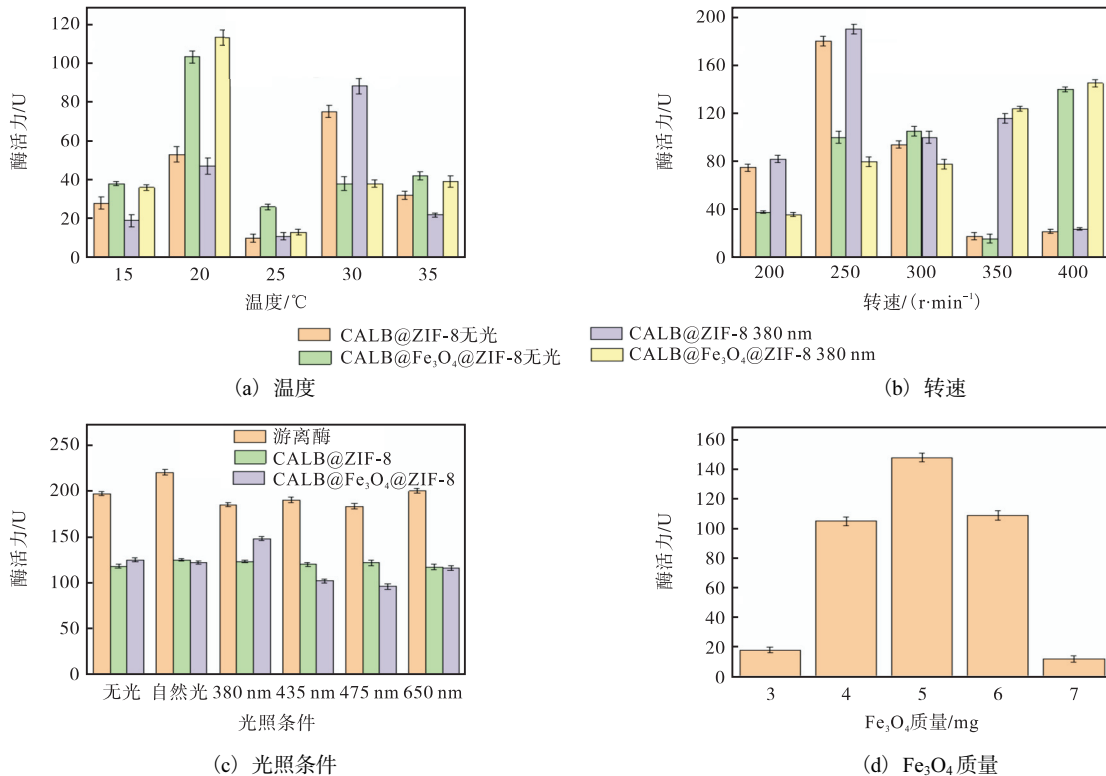


图 3 温度、转速、光照条件和 Fe₃O₄ 质量对固定化 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature, string speed, light condition and Fe₃O₄ during immobilization process on the activities of CALB@Fe₃O₄@ZIF-8

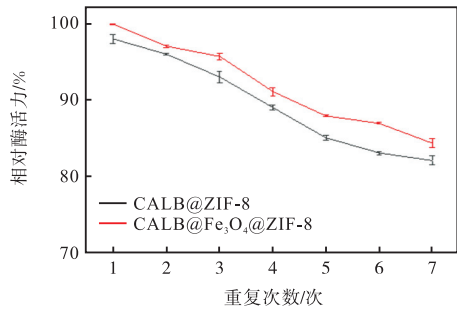
2.4 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的酶学特征

CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的重复使用性、储藏稳定性、pH 耐受性以及温度稳定性如图 4 所示。

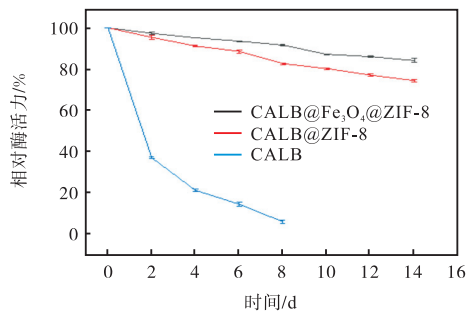
2.4.1 重复使用性

固定化酶的重复利用不仅可以为生产节约成本, 而且符合绿色生产的理念。本研究固定化酶的重复

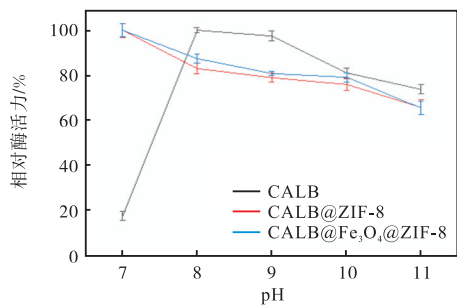
使用性结果如图 4(a)所示,合成的 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 经过 7 次重复使用后,其相对酶活力还能保持在 84.29%,而 CALB@ZIF-8 经过 7 次重复使用后,其相对酶活力保持在 82.01%。这说明合成的 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 拥有优异的重复使用性。



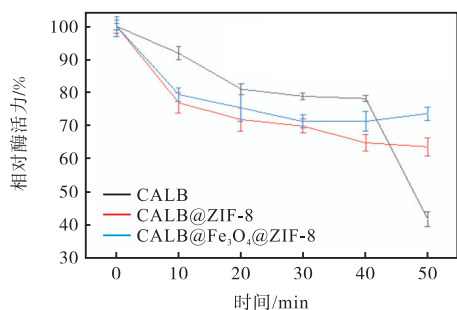
(a) 重复使用性



(b) 储藏稳定性



(c) pH 耐受性



(d) 温度稳定性

图 4 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的重复使用性、储藏稳定性、pH 耐受性以及温度稳定性

Fig. 4 Reusability, storage stability, pH tolerance and temperature stability of CALB@Fe₃O₄@ZIF-8

2.4.2 储藏稳定性

储藏稳定性是衡量固定化酶性能的重要指标,本研究固定化酶的储藏稳定性结果如图 4(b)所示, CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 在储存 14 d 后,相对酶活力还能保持 85%, CALB@ZIF-8 在储存 14 d 后,相对酶活力还能保持 79%,游离酶在储存 2 d 后相对酶活力明显下降,储存 8 d 后相对酶活力仅剩 8%,表明 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 具有较好的储藏稳定性。

2.4.3 pH 耐受性

pH 对 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 催化剂酶活力的影响结果如图 4(c)所示。CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的最适催化 pH 为 7,随着 pH 的升高酶活力下降。CALB@ZIF-8 的趋势与 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 大致相同,都有较好的 pH 耐受性,当 pH 为 11 时,还有 67% 相对酶活力,而游离酶受 pH 影响较大,pH 稳定性较差。

2.4.4 温度稳定性

CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 的温度稳定性结果如图 4(d)所示,延长高温处理时间,图中 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 在 55 °C 条件下处理 50 min 后,仍有 73% 相对酶活力,对比相同处理时间的 CALB@ZIF-8 63% 相对酶活力,游离酶在处理 50 min 后仍有 42% 相对酶活力,表明此材料具有较好的温度稳定性。

2.5 酶促反应动力学实验

生物催化剂的动力学参数见表 1。CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 在 380 nm 下的 K_m 值(3.205 5 mol/L)小于 CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 自然光下的 K_m 值(3.711 4 mol/L),也小于 CALB@ZIF-8 的 K_m 值(5.355 5 mol/L),说明在光照条件下,固定化材料与底物的亲和力增强。这可能是由于光照使得杂化纳米材料中纳米马达产生局部热效应,从而使被包埋固定在其中的脂肪酶在内部的运动增强且减少团聚,降低了传质阻力,提高了亲和力,从而导致 K_m 降低。但是,与游离脂肪酶 $v_{max} : K_m$ 值 0.003 2 min⁻¹ 相比, CALB@Fe₃O₄@ZIF-8 在 380 nm 下表现出更高的 $v_{max} : K_m$ 值(0.006 6 min⁻¹),这说明光照给了固定化材料更高的催化效率。

表 1 生物催化剂的动力学参数

Tab. 1 Kinetics parameters of biocatalysts

催化剂	$K_m /$ (mol·L ⁻¹)	$v_{max} /$ (mol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)	$v_{max} : K_m /$ min ⁻¹
游离脂肪酶	2.878 8	0.009 1	0.003 2
CALB@ZIF-8	5.355 5	0.020 6	0.038 0
CALB@Fe ₃ O ₄ @ZIF-8 自然光	3.711 4	0.020 8	0.005 6
CALB@Fe ₃ O ₄ @ZIF-8 380 nm	3.205 5	0.021 1	0.006 6

3 结 语

本文利用包埋法构建功能性 Fe_3O_4 纳米粒子杂化 ZIF-8 固定化酶催化剂,研究了温度、搅拌转速、 Fe_3O_4 添加质量对催化剂催化性能的影响,探讨了光照条件对固定化酶活力的影响。

(1) 制备 CALB@ZIF-8 最优条件为:温度 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、转速 250 r/min 、光照波长 380 nm 。制备 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-8 的最优条件为:温度 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 、转速 400 r/min 、光照波长 380 nm 、 Fe_3O_4 质量为 5 mg 。

(2) Fe_3O_4 纳米粒子的杂化显著提高了固定化酶 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-8 的酶活力,且光照对 CALB@ Fe_3O_4 @ZIF-8 酶活力的影响较为明显,特别是光强及波长对固定化酶活力有显著提高的作用。

(3) 光照后包埋 Fe_3O_4 纳米粒子的固定化酶与底物有更高的亲和力,且提高了最低酶促反应速率。

参考文献:

- [1] PATIDAR M K, NIGHOJKAR S, KUMAR A, et al. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review[J]. 3 biotech, 2018, 8(4): 199.
- [2] SHAFI A, AHMED F, HUSAIN Q. β -galactosidase mediated synthesized nanosupport for the immobilization of same enzyme: its stability and application in the hydrolysis of lactose[J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 184: 57–67.
- [3] BERNAL C, RODRIGUEZ K, MARTINEZ R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: an alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts[J]. Biotechnology advances, 2018, 36(5): 1470–1480.
- [4] 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.
- [5] 游金坤, 余旭亚, 赵鹏. 吸附法固定化酶的研究进展[J]. 化学工程, 2012, 40(4): 1–5.
- [6] WON K, KIM S, KIM K J, et al. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads[J]. Process biochemistry, 2005, 40(6): 2149–2154.
- [7] BAGI K, SIMON L M, SZAJÁNI B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase[J]. Enzyme and microbial technology, 1997, 20(7): 531–535.
- [8] DATTA S, CHRISTENA L R, RAJARAM Y R S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials[J]. 3 biotech, 2013, 3: 1–9.
- [9] LUO Y, ZHAO J, ZHANG X, et al. Size controlled fabrication of enzyme encapsulated amorphous calcium phosphate nanoparticle and its intracellular biosensing application[J]. Colloids and surfaces B: biointerfaces, 2021, 201: 111638.
- [10] SUN J, GE J, LIU W, et al. Multienzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor[J]. Nanoscale, 2014, 6(1): 255–262.
- [11] MOHAMMAD M, RAZMJOU A, LIANG K, et al. Metal-organic-framework-based enzymatic microfluidic biosensor via surface patterning and biomineralization [J]. ACS Applied materials & interfaces, 2018, 11(2): 1807–1820.
- [12] DONG M J, ZHAO M, OU S, et al. A luminescent dye@MOF platform: emission fingerprint relationships of volatile organic molecules[J]. Angewandte chemie international edition, 2014, 126(6): 1601–1605.
- [13] GU Z Y, YAN X P. Metal-organic framework MIL-101 for high-resolution gas-chromatographic separation of xylene isomers and ethylbenzene[J]. Angewandte chemie international edition, 2010, 122(8): 1519–1522.
- [14] HUANG S, KOU X, SHEN J, et al. Armoring the enzymes with metal-organic frameworks[J]. Angewandte chemie international edition, 2020, 59: 8786–8798.
- [15] HOU C, WANG Y, DING Q, et al. Facile synthesis of enzyme-embedded magnetic metal-organic frameworks as a reusable mimic multi-enzyme system: mimetic peroxidase properties and colorimetric sensor[J]. Nanoscale, 2015, 7(44): 18770–18779.
- [16] RICCO R, WIED P, NIDETZKY B, et al. Magnetically responsive horseradish peroxidase@ZIF-8 for biocatalysis[J]. Chemical communications, 2020, 56(43): 5775–5778.
- [17] ZHAO M, ZHANG X, DENG C. Rational synthesis of novel recyclable Fe_3O_4 @MOF nanocomposites for enzymatic digestion[J]. Chemical communications, 2015, 51(38): 8116–8119.
- [18] KNOWLES J R. Enzyme catalysis: not different, just better[J]. Nature, 1991, 350(6314): 121–124.
- [19] CANTONE S, FERRARIO V, CORICI L, et al. Efficient immobilization of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers (下转第 49 页)

- activated persulfate oxidation of ampicillin: kinetics, transformation products and ecotoxicity[J]. *Science of the total environment*, 2022, 846: 157378.
- [15] 廖云燕. 利用活化过硫酸盐技术去除水中阿特拉津的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2014.
- [16] REN T L, MA X W, WU X Q, et al. Degradation of imidazolium ionic liquids in a thermally activated persulfate system[J]. *Chemical engineering journal*, 2021, 412: 128624.
- [17] JI Y F, SHI Y Y, DONG W, et al. Thermo-activated persulfate oxidation system for tetracycline antibiotics degradation in aqueous solution[J]. *Chemical engineering journal*, 2016, 298: 225–233.
- [18] MONTEAGUDO J M, DURÁN A, GONZÁLEZ R, et al. In situ chemical oxidation of carbamazepine solutions using persulfate simultaneously activated by heat energy, UV light, Fe^{2+} ions, and H_2O_2 [J]. *Applied catalysis B: environmental*, 2015, 176: 120–129.
- [19] TAN C Q, ZHAO H, WANG X, et al. Feasibility of micropollutants removal by solar-activated persulfate: reactive oxygen species formation and influence on DBPs[J]. *Water research*, 2022, 210: 117981.
- [20] MA Q L, ZHANG H X, ZHANG X Y, et al. Synthesis of magnetic $\text{CuO}/\text{MnFe}_2\text{O}_4$ nanocomposite and its high activity for degradation of levofloxacin by activation of persulfate[J]. *Chemical engineering journal*, 2019, 360: 848–860.
- [21] LIU L, LIN S, ZHANG W, et al. Kinetic and mechanistic investigations of the degradation of sulfachloropyridazine in heat-activated persulfate oxidation process[J]. *Chemical engineering journal*, 2018, 346: 515–524.
- [22] ASGHAR A, RAMAN A A, DAUD W M A W. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review[J]. *Journal of cleaner production*, 2015, 87: 826–838.
- [23] HUANG H X, GUO T, WANG K, et al. Efficient activation of persulfate by a magnetic recyclable rape straw biochar catalyst for the degradation of tetracycline hydrochloride in water[J]. *Science of the total environment*, 2021, 758: 143957.
- [24] HUANG D L, ZHANG Q, ZHANG C, et al. Mn doped magnetic biochar as persulfate activator for the degradation of tetracycline[J]. *Chemical engineering journal*, 2020, 391: 123532.
- [25] OUYANG D, YAN J C, QIAN L B, et al. Degradation of 1,4-dioxane by biochar supported nano magnetite particles activating persulfate[J]. *Chemosphere*, 2017, 184: 609–617.
- [26] LUO S, GAO L W, WEI Z S, et al. Kinetic and mechanistic aspects of hydroxyl radical-mediated degradation of naproxen and reaction intermediates[J]. *Water research*, 2018, 137: 233–241.

责任编辑:周建军

(上接第14页)

- and immobilization methods[J]. *Chemical society reviews*, 2013, 42(15): 6262–6276.
- [20] DU Y, GAO J, ZHOU L, et al. MOF-based nanotubes to hollow nanospheres through protein-induced soft-templating pathways[J]. *Advanced science*, 2019, 6(6): 1801684.
- [21] GAO J, KONG W, ZHOU L, et al. Monodisperse core-shell magnetic organosilica nanoflowers with radial wrinkle for lipase immobilization[J]. *Chemical engineering journal*, 2017, 309: 70–79.
- [22] 孙宁. 磁性颗粒聚集体表面复合修饰及固定化酶研究[D]. 广州:华南理工大学, 2017.
- [23] HU Y, LIU W, SUN Y. Multiwavelength phototactic micro-motor with controllable swarming motion for “chemistry-on-the-fly”[J]. *ACS Applied materials & interfaces*, 2020, 12(37): 41495–41505.
- [24] LIU T T, SU W C, CHEN Q X, et al. The inhibitory kinetics and mechanism of glycolic acid on lipase[J]. *Journal of biomolecular structure and dynamics*, 2020, 38(7): 2021–2028.

责任编辑:郎婧