

羧基功能化 Fe₃O₄ 固定化酶反应器的构筑及性能研究

高丰琴^{*,a,b} 刘洋^a 张引莉^a 蒋育澄^b

(^a 咸阳师范学院化学与化工学院 咸阳 712000)

(^b 陕西师范大学化学化工学院 西安 710119)

摘要 对固定化酶的载体进行功能化修饰,通过改善载体和酶的界面连接可使酶分子在载体表面形成高度有序的二维排列,从而提高酶的催化活性和操作稳定性.用柠檬酸修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子(CA-Fe₃O₄)易于磁性分离且表面富含羧基,可作为一种优良载体通过吸附法固定化氯过氧化物酶(CPO)构筑 CPO@CA-Fe₃O₄ 酶反应器、共固定化 CPO 和葡萄糖氧化酶(GOx)构筑 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 级联酶反应器.将酶反应器应用于催化氧化结晶紫染料的脱色时,两种酶反应器均显示出良好的催化活性、对底物的亲和性与专一性、热稳定性,在实际水样中也有良好的应用效果.与 CPO@CA-Fe₃O₄ 相比,GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 酶反应器因级联反应中 H₂O₂ 的原位产生而表现出更优异的催化性能.

关键词 羧基功能化四氧化三铁(CA-Fe₃O₄);氯过氧化物酶;固定化酶;级联酶反应器;酶催化;稳定性

Study on Construction and Performance of Immobilized Enzyme Reactors by Carboxyl-functionalized Fe₃O₄

Gao, Fengqin^{*,a,b} Liu, Yang^a Zhang, Yinli^a Jiang, Yucheng^b

(^a College of Chemistry and Chemical Engineering, Xianyang Normal University, Xianyang 712000, China)

(^b School of Chemistry & Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract The interface connection between carrier and enzyme can be improved by functionalizing the carrier of immobilized enzyme. This facilitates the formation of highly ordered two-dimensional arrangement of enzyme molecules on the surface of the carrier, thus improving the catalytic activity and operational stability of the enzymes. The surface of Fe₃O₄ modified with citric acid (CA-Fe₃O₄) is rich in carboxyl groups, which can be used as an excellent carrier due to its magnetic and easy separation characteristics. In this work, the adsorption method was more suitable for constructing enzyme reactors on the carrier of CA-Fe₃O₄, compared with covalent method. The CPO@CA-Fe₃O₄ reactor was constructed to immobilize chloroperoxidase (CPO) and the cascade enzyme reactor of GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ was constructed by co-immobilization of CPO and glucose oxidase (GOx). In catalytic reaction, H₂O₂ was used as oxidant for CPO@CA-Fe₃O₄, while for GOx&CPO@CA-Fe₃O₄, the *in-situ* formation of H₂O₂ was caused by the oxidation of β -D-glucose by GOx. When the molar ratio of CPO to GOx was 3 : 4 for immobilization, the effect of the cascade reaction can reach the best. When the enzyme reactors were applied to catalyze the oxidation of the decolorization of crystal violet, both enzyme reactors showed good catalytic activity, affinity and specificity for substrate. The thermal stabilities of the immobilized enzyme reactors were significantly improved. Both the enzyme reactors retained more than 55% of the activity at 70 °C for 1 h and more than 60% of the activity at 50 °C for 8 h, while the free enzyme was almost completely inactivated under the same reaction conditions. In contrast with CPO@CA-Fe₃O₄, the GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ reactor showed better catalytic performance due to the *in-situ* generation of H₂O₂ in the cascade reaction. And this advantage was particularly reflected in the application of thermal stability and actual water samples. The important application potential has been shown about the immobilization of CPO enzyme reactors on CA-Fe₃O₄ carrier as a catalyst.

Keywords carboxyl-functionalized ferromagnetic oxide (CA-Fe₃O₄); chloroperoxidase; immobilized enzyme; cascade enzyme reactor; enzyme catalysis; stability

1 引言

在酶催化领域中,固定化酶容易实现与底物或产物的分离,简化操作步骤,提高酶的操作稳定性和重复使用性,降低酶催化成本,从而提高其经济效益^[1-4].而固

定化级联酶反应器,可在同一反应体系中因两种酶的存在而实现连续反应,具有更高的催化活性和较强的操作稳定性,在生物酶催化领域也获得了广泛的关注^[5-7].但如果所涉及的酶不能以适当的方式排列,级联反应中不

* E-mail: gaofq08@126.com

Received January 18, 2023; published March 28, 2023.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by Scientific Research Program Funded by Shaanxi Provincial Education Department (Nos. 16JK1827, 22JK0605) and the Natural Science Basic Research Program of Shaanxi (No. 2023-JC-QN-0173).

项目受陕西省教育厅科研计划(Nos. 16JK1827, 22JK0605)和陕西省自然科学基金计划(No. 2023-JC-QN-0173)资助.

同步步骤的中间产物不能保持平衡,则会限制产物-底物的高效传输,很难实现级联酶的高效催化.因此,选择能保持固定化酶结构和催化活性的载体且能调节不同级联反应步骤并能提升酶效率,将是一个很有前景的研究热点^[8-10].

在固定化酶技术中,在载体表面引入氨基、巯基、羧基等功能基团对载体进行修饰,能够为载体提供一些偶联反应活性基团而有利于实现酶的固定化^[11-12].一种常用的对固定化酶载体功能化的方法是载体的羧基化处理.载体羧基化的方法常见的有伯醇和醛基氧化、CN水解、羧基修饰等.柠檬酸(Citric Acid, CA)是一种生物相容性很好的、分子内含有三个 COOH 的小分子有机酸表面修饰剂.柠檬酸分子中一个或两个羧基可与 Fe_3O_4 纳米粒子以 Fe—O 共价键结合^[13]形成 CA- Fe_3O_4 载体材料,自由的羧基可以实现磁性载体的进一步功能化;羧基官能团极性大、亲水性好,可大大提高磁性载体的水溶性; Fe_3O_4 磁性粒子由于磁性吸附使其容易团聚,但经柠檬酸修饰后其表面因带有大量负电荷纳米粒子间的静电排斥作用增强,使磁性载体的分散稳定性提高^[14].如将酪氨酸酶固定在羧基官能化的硅涂层磁性纳米颗粒上,发现固定化酪氨酸酶的可重复使用性和热稳定性显著优于游离酶,而且固定酶具有良好的磁分离能力^[15].以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CA}$ 固定脂肪酶,与游离酶相比固定化酶表现出很高的活性回收率,在 pH 为 7 时达到 144%、pH 为 7.5 时高达 323%^[16].固定化酶活性和操作稳定性的提高,是由于羧基很容易与蛋白酶中的氨基作用,凸显出 Fe_3O_4 载体进行羧基官能团修饰的优势^[17].

在印染废水的处理方法中,生物酶催化法具有反应条件温和、催化效率高、反应速度快等优点而极具应用潜力^[18-19].固定化氯过氧化物酶已成功用于苯胺蓝、酸性蓝、直接黑、酸性黑、藏花橙 G、结晶紫等染料废水的催化降解^[20-24],可将染料分子降解为小分子有机物或 CO_2 、 H_2O 等,达到去除或降低废水中污染物的目的,在染料废水处理技术方面有一定的应用前景.

在本工作中,采用“溶剂热”法合成磁性易分离的 Fe_3O_4 载体,用柠檬酸对载体表面进行修饰,使 Fe_3O_4 表面富含羧基功能基团.以柠檬酸修饰的 Fe_3O_4 为载体固定化氯过氧化物酶、共固定化葡萄糖氧化酶和氯过氧化物酶构酶反应器,将固定化酶反应器用于三苯甲烷类染料结晶紫的脱色(图 1),固定化酶尤其是级联酶反应器表现出了良好的催化活性和热稳定性,展现了其作为固定化酶催化剂的广阔应用前景.

2 结果与讨论

2.1 CA- Fe_3O_4 载体及酶反应器的表征

图 2a 为 Fe_3O_4 和 CA- Fe_3O_4 的 X-射线衍射分析(XRD)图谱.图中在衍射角 2θ 为 30.2° 、 35.7° 、 43.4° 、 53.7° 、 57.2° 和 62.8° 处出现的衍射特征峰,分别对应为

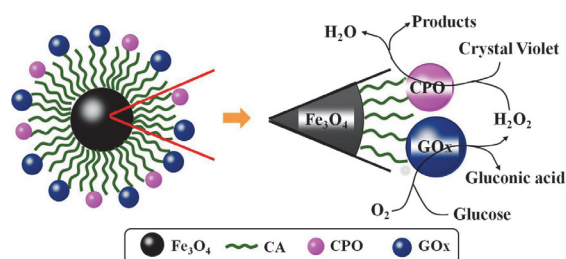


图 1 固定化级联酶催化氧化结晶紫脱色示意图

Figure 1 Schematic diagram of decolorization of crystal violet catalyzed by immobilized cascaded enzymes

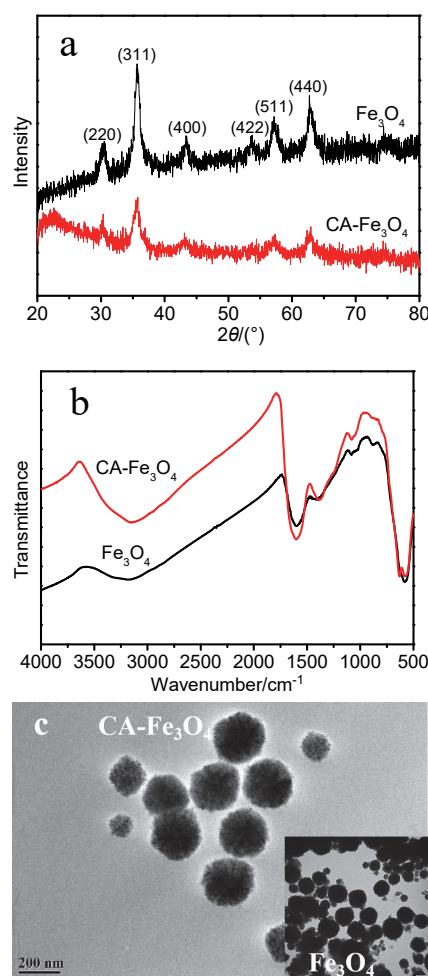


图 2 Fe_3O_4 和 CA- Fe_3O_4 的 XRD (a)、红外光谱(b)和透射电镜(c)图

Figure 2 XRD pattern (a), FT-IR spectra (b) and TEM (c) images of Fe_3O_4 and CA- Fe_3O_4

Fe_3O_4 的(220)、(311)、(400)、(422)、(511)和(440)晶面,符合标准图谱数据(JCPDS 19-0629),表明存在尖晶石型 Fe_3O_4 ,且结晶状态很好.由红外谱图(图 2b)可知, 581 cm^{-1} 处为 Fe—O 键的特征吸收峰. Fe_3O_4 中 1605 和 1409 cm^{-1} 处是 COO—Fe 键的特征峰,这可能是由于 Fe_3O_4 表面上的羟基与羧酸根阴离子反应所产生的^[25]. CA- Fe_3O_4 中 COO—Fe 键特征峰向低波数方向移动至 1603 和 1393 cm^{-1} 处,而且强度增大. Fe_3O_4 中 3181 cm^{-1} 处的

特征吸收峰为 OH 的伸缩振动,而在 CA-Fe₃O₄ 中移至 3149 cm⁻¹,可能是经羧基修饰后产生的氢键所致.图 2c 为透射电镜图.由图中看出,实验合成的 CA-Fe₃O₄ 为圆球状,尺寸大约为 100~250 nm,CA-Fe₃O₄ 纳米粒子相比 Fe₃O₄ 具有良好的分散性.由水合粒径分布图(图 S1,见支持信息)可以看出,Fe₃O₄ 和 CA-Fe₃O₄ 的粒径分布分别以 340 和 200 nm 左右居多. Fe₃O₄ 和 CA-Fe₃O₄ 在蒸馏水中的电位分别为 -18.0 和 -29.0 mV (图 S2,见支持信息),柠檬酸修饰后表面负电荷增多. Fe₃O₄ 粒径分布图中 340 nm 的粒子较多的原因可能是由于粒子间相互吸引出现团聚现象导致的,而 CA-Fe₃O₄ 表面由于负电荷增多而降低了粒子团聚的可能性.

图 S3 (见支持信息)为载体 CA-Fe₃O₄ 的 N₂ 吸附-脱附曲线和孔径分布图.载体 CA-Fe₃O₄ 比表面积为 113.4 m²/g.该曲线为第 IV 类吸附,这意味着载体中存在介孔结构^[26].为了进一步证实酶分子在载体上的固定,分别用异硫氰酸荧光素(FITC)和罗丹明 B(RhB)标记 CPO 和 GOx,用于激光共聚焦显微镜测试.如图 3b 和 3c 中显示,在固定化酶固体材料上出现绿色和红色荧光斑点.由于 CA-Fe₃O₄ 载体材料自身不是荧光材料(图 3a),故荧光斑点来自 FITC-CPO(绿色)和 RhB-GOx(红色),从而证实 CPO 和 GOx 均被固载到了 CA-Fe₃O₄ 载体材料上.由扫描电镜图(图 S4,见支持信息)可看出,载体和固定酶为均匀的圆球形,且固定化前后形貌结构并没有发生明显改变.

CA-Fe₃O₄ 和固定化酶反应器的热失重曲线(TGA)如图 3d 所示,整个失重过程基本分为三个阶段.在第一阶段的失重出现在 30~150 °C 的温度范围内,CA-Fe₃O₄ 重量损失约为 15.5%,而 CPO@CA-Fe₃O₄ 和 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 的重量损失约为 5.8%和 6.5%.这可能是由于载体和固定化酶表面上残留的水和物理吸附的柠檬酸的损失,固定化酶表面由于柠檬酸与酶分子的相互作用而使其重量损失较少.在第二阶段中,CA-Fe₃O₄ 由于表面羟基和化学吸附的柠檬酸的损失,在 150 至 450 °C 下观察到约减少 6.5%的重量;而 CPO@CA-Fe₃O₄ 和 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 的重量损失约为 13.0%和 12.4%,这主要归因为载体表面酶分子的分解和柠檬酸的损失.在第三阶段中,在 450 °C 以上,CA-Fe₃O₄ 的 2.3%的重量损失可能是由于 Fe₃O₄ 向 Fe₂O₃ 的相变^[27].而 CPO@CA-Fe₃O₄ 和 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 的重量损失约为 16.2%和 18.3%,均大于第二阶段的重量损失.可能的原因是,除了要考虑 Fe₃O₄ 向 Fe₂O₃ 的相变损失,还可能由于酶分子和柠檬酸的相互作用而提高了固定酶的整体分解温度.此外,酶分子的分解产物可能会导致 Fe₃O₄ 的还原或分解,CPO@CA-Fe₃O₄ 和 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 相比,后者因酶分子数多而造成重量损失更多也可说明这一点.CA-Fe₃O₄ 和固定化酶的热失重曲线的失重特征可表明酶分子在载体中的存在.

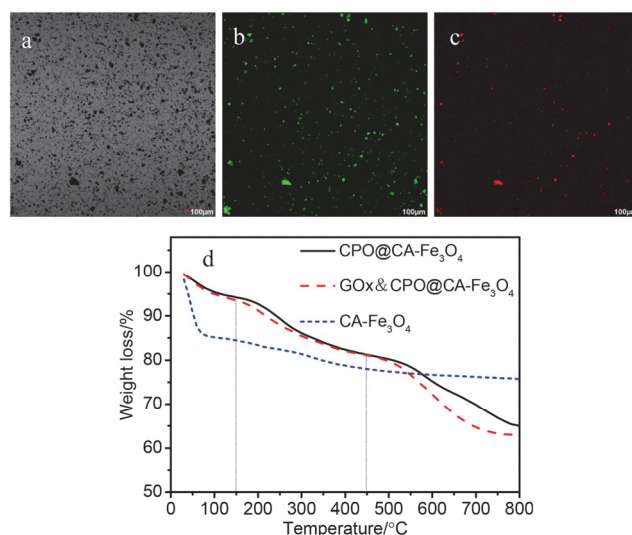


图 3 CA-Fe₃O₄ 和固定化酶的激光共聚焦图(a、b、c)和热重曲线图(d)
Figure 3 Confocal microscopy images (a, b, c) and TGA curves (d) of CA-Fe₃O₄ and enzymes@CA-Fe₃O₄

图 S5 (见支持信息)为 CA-Fe₃O₄ 及 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 在室温下的磁滞曲线. CA-Fe₃O₄ 及 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 的饱和磁化强度分别为 43.0 和 39.5 emu/g,表明载体及其固定酶在外磁场下均有良好的磁响应性.固定化酶的磁饱和强度有所下降,这是由于载体表面固定化酶所导致的. CA-Fe₃O₄ 粒子可以均匀分散在结晶紫溶液中,当施加外部磁场后,CA-Fe₃O₄ 迅速被磁铁吸引(图 S6,见支持信息).此外,由图 S6 还可以看出,CA-Fe₃O₄ 固定化酶后对结晶紫染料有一定吸附,但从结晶紫染料吸附平衡后和 CPO@CA-Fe₃O₄ 催化氧化脱色后对比可以看出,对该浓度的结晶紫染料,仅仅只有吸附是不能完全脱色的,主要是酶催化氧化降解脱色的作用.这一现象从侧面也证明 CPO 已经固定在 CA-Fe₃O₄ 载体上.

2.2 CA-Fe₃O₄ 固定化 CPO 的方法

吸附法和共价法都是常用的固定化酶的方法.对 CA-Fe₃O₄ 固定化 CPO 以共价法和吸附法进行对比考察,相关实验数据如表 1.由表 1 可知,共价法和吸附法固定化 CPO 催化结晶紫脱色均有一定效果.但吸附法中结晶紫脱色效果要比共价法好,这可能是由于吸附法固定化酶时酶分子的构象很少或基本不发生变化,因而可以保持相对较高的活性.但重复使用时,共价法在第 3 次时脱色率已经很低,虽然第 4 次脱色率下降幅度减小,但总的来说与一般共价法固定化酶的重复使用性能优

表 1 固定化方法与结晶紫脱色效果

Table 1 Immobilization method and decoloration effect of crystal violet

方法	pH	时间/h	结晶紫脱色率/%			
			第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次
共价法	3.5	1.0	76.9	55.1	39.5	32.1
吸附法	3.5	1.0	87.1	64.2	55.3	48.3

于吸附法的理论相悖. 可能的原因是, 部分柠檬酸中的羧基与 Fe_3O_4 中铁共价成键, 但还有部分羧基是通过静电作用或与 Fe_3O_4 表面的 OH 形成氢键而进行连接, 在经过载体活化和共价法固定化酶处理后, 可能会由于中间复杂的活化环节导致通过静电作用或氢键连接的柠檬酸会和固定化酶一起脱落, 从而造成活性降低的现象. 而吸附法中, $\text{CA-Fe}_3\text{O}_4$ 直接固定化酶, 中间连接少, 因而相对活性较高(图4). 因此, $\text{CA-Fe}_3\text{O}_4$ 固定化酶选择用吸附法相对较好.

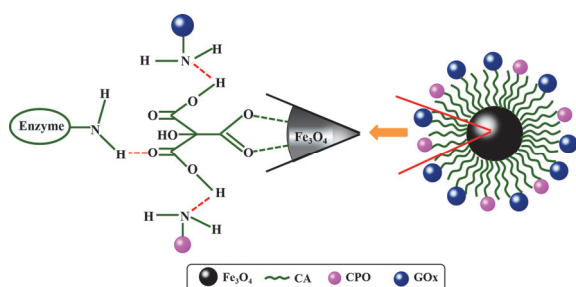


图4 $\text{CA-Fe}_3\text{O}_4$ 吸附法固定化酶示意图

Figure 4 Schematic diagram of immobilization of enzymes on the carrier of $\text{CA-Fe}_3\text{O}_4$ by adsorption

2.3 酶反应器催化结晶紫脱色反应条件

$\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 催化结晶紫染料脱色反应条件考察结果如图 S7 (见支持信息)所示. 当磷酸盐缓冲溶液 pH 在 2.5~4.5 范围时, 染料脱色率呈先增大后减小的趋势. 当溶液 pH 为 3.0 时, 染料脱色效果相对较好. 当温度在 10~35 $^{\circ}\text{C}$ 时, 染料脱色率受温度影响变化不明显, 尤其在 15~30 $^{\circ}\text{C}$ 染料脱色效果差别不大. 当在 0~30 min 内, 染料脱色率在 10 min 内即可达到较理想的效果. 当 H_2O_2 浓度在 0.33~2.0 mmol/L 范围内变化时染料脱色率变化较为缓慢, 表明在该范围内 CPO 对双氧水的耐受性较好. 但当浓度达到 1.0 mmol/L 以后, 染料脱色率有下降趋势. 因此, 在 $\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 催化结晶紫氧化脱色反应体系中, 反应最佳条件为: pH 为 3.0、反应温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间为 10 min、 H_2O_2 浓度为 1.0 mmol/L.

对于固定化双酶 $\text{GOx}\&\text{CPO}$ 催化反应体系, CPO 催化结晶紫染料脱色所需的 H_2O_2 , 是由 GOx 氧化 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 原位产生的, 级联反应示意图如图 1. 因此, 在 $\text{GOx}\&\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 催化结晶紫染料脱色反应中, 除了 pH 和温度的影响与 $\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 催化时相同(图 S8, 见支持信息), 还要考虑加入 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 浓度和时间的影响. 图 5 显示, 催化反应开始时, $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 浓度增大染料脱色率明显增大, 但当浓度达到一定值后染料脱色率有所下降, 固定化双酶催化反应中 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 最佳浓度为 16.7 mmol/L. 此外, 图中数据也表明, CPO 的活性并不总是与 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 的浓度成正比. 若 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 浓度较低, 葡萄糖氧化酶氧化 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 不能原位产生足量的 H_2O_2 氧化染料脱色, 但高浓度的 $\beta\text{-D-葡萄糖}$

对染料脱色也不利. 这可能与级联反应中原位产生的 H_2O_2 浓度过高时 CPO 失活致使其催化活性降低有关. 此外, 若 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 浓度过高, 可能会由于葡萄糖与酶分子表面糖类氨基相互作用导致蛋白质沉淀, 从而也会引起 CPO 不可逆失活^[28]. $\text{GOx}\&\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 催化反应在 20 min 内可达到最佳脱色效果, 与 $\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 脱色时间相比略有延长, 这可能与级联反应中 H_2O_2 的缓释有关.

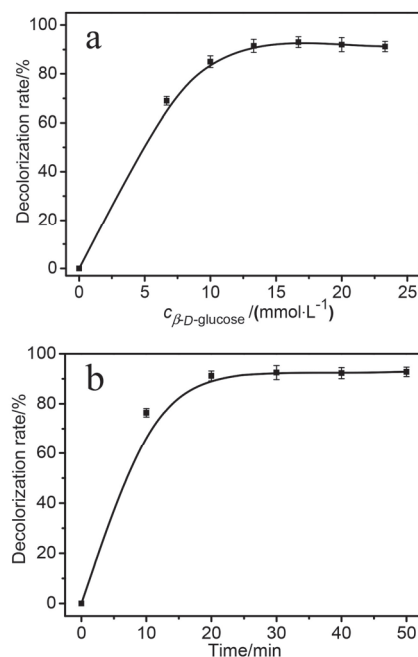


图5 $\text{GOx}\&\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 催化结晶紫脱色反应条件

Figure 5 Reaction conditions for decolorization of crystal violet catalyzed by $\text{GOx}\&\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$

在级联酶催化反应体系中, CPO 与 GOx 的物质的量比也是一个很关键的影响因素. 由于 CPO 催化氧化结晶紫脱色所需要的 H_2O_2 来自 GOx 对 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ 的氧化产生, 所以 CPO 与 GOx 固载量匹配与否直接影响染料脱色效果. 改变 CPO 与 GOx 的体积比(其中 CPO 的浓度为 0.28 mmol/L, GOx 的浓度为 29 mg/mL), 级联酶催化结晶紫脱色反应 CPO 与 GOx 的最佳物质的量比如图 S9 (见支持信息)所示. 由实验数据对比可知, 当 CPO 与 GOx 加入物质的量比约为 3 : 4 时, 结晶紫脱色效果较好.

2.4 酶催化结晶紫脱色反应动力学研究

由表 2 中数据可知, 在 0.01~0.15 mmol/L 范围内改变结晶紫的浓度, 游离 CPO、 $\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 和 $\text{GOx}\&\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 催化结晶紫染料脱色反应的 K_m 相比, 两种固定化酶反应器比游离酶的小得多, 这表明两种固定化酶反应器对底物的亲和性比游离酶大; 而两种固定化酶反应器催化反应的 V_{max} 比游离酶的要小, 可能是由于酶被固载后因载体材料的扩散限制的存在, 反应速率有所下降. $\text{CPO@CA-Fe}_3\text{O}_4$ 和 $\text{GOx}\&\text{CPO@CA-}$

表2 游离 CPO 和固定化 CPO 的酶动力学参数

Table 2 Enzymatic kinetic parameters of free CPO and immobilized CPO

Enzyme	$V_{\max}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	$K_m/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$(k_{\text{cat}}/K_m)/(\text{mmol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1})$
Free CPO	0.1003	0.03009	310.5	1.0×10^4
CPO@CA-Fe ₃ O ₄	0.07746	0.01781	239.8	1.3×10^4
GOx&CPO@CA-Fe ₃ O ₄	0.07179	0.01651	222.3	1.3×10^4

Fe₃O₄ 的 k_{cat}/K_m 值要略大于游离酶, 表明固定酶反应器对底物的专一性有所提高。

2.5 固定化酶反应器的热稳定性

酶通常在常温常压的温和条件下催化效率较高, 对高温的敏感性限制了酶在实际工业中的使用, 所以酶的热稳定性成为其实现工业化应用的一个重要参数。

在温度为 20~70 °C 条件下, 酶温育 1 h 的热稳定性结果如图 6a。从图中数据可以看出, 两种固定化酶反应器的残余活性随着温度的升高均有所下降, 但在 70 °C 时, CPO@CA-Fe₃O₄ 和 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 酶反应器仍分别保留 55% 和 60% 以上的活性, 而此时游离酶几乎失去全部活性。在 20~40 °C, 两种酶反应器均保留 95% 以上的活性, 表明在此温度区间的耐受性都比较好。但升温后两种酶反应器的催化效果都下降。可能是因为酶分子本身在高温条件下易呈现三维结构的伸展和变形, 从而导致酶催化活性降低。另外, 随着温度的升高, CA-Fe₃O₄ 与酶分子之间的非共价键相互作用减弱, 酶分子容易从载体上脱附, 脱附的酶分子在温育后会连同上清液一起磁性分离后被弃掉, 故而酶催化活性下降。在 40~70 °C 条件下, GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 比 CPO@CA-Fe₃O₄ 催化效果要好, 这可能是由于级联酶反

应器在催化过程中 H₂O₂ 原位生成使其在催化效果上占有一定优势的缘故。

图 6b 为固定化酶反应器在 50 °C 条件下温育 0~12 h 的热稳定性。随着温育时间的延长, CPO@CA-Fe₃O₄ 和 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 酶反应器的残余活性下降。温育 8 h, CPO@CA-Fe₃O₄ 和 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 酶反应器的残余活性保留在 60% 以上, 而游离酶活性在 10% 左右。而且随着温育时间延长, CPO@CA-Fe₃O₄ 的催化活性要低于 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄。因此, 在固定化 CPO 和 GOx 双酶级联反应中, H₂O₂ 原位产生的优势在高温条件下随着时间延长即可表现出来。

2.6 固定化酶反应器的重复使用性

图 7 是固定化酶反应器催化结晶紫染料脱色反应中的重复使用情况。两种酶反应器在重复使用 4 次后残余活性约 40% 左右。在重复使用第 1 次时, CPO@CA-Fe₃O₄ 相比 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 效果要好, 而在第 2 次后级联酶的催化效果要好。因此, 随着使用次数增多, GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 反应体系中 H₂O₂ 的缓释可能就成为了一种优势。

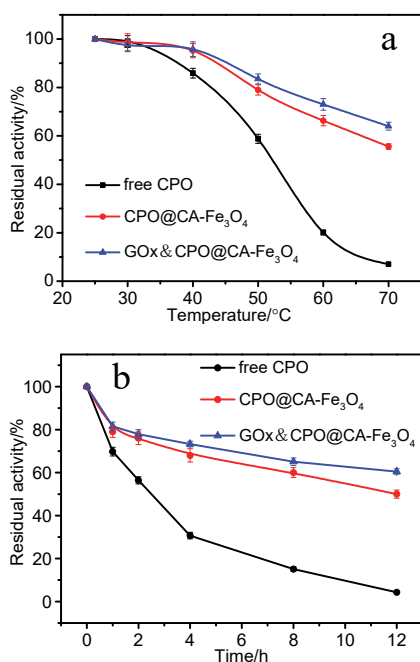


图6 游离酶和固定化酶在(a) 20~70 °C 和(b) 50 °C 下的热稳定性

Figure 6 Thermal stability of the free and immobilized enzymes: (a) at different temperatures from 20 to 70 °C and (b) at 50 °C

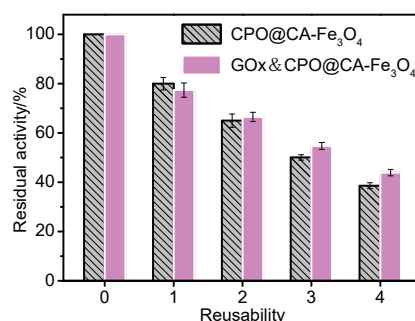


图7 固定化 CPO 的重复使用性

Figure 7 Reusability of immobilized CPO

2.7 固定化酶反应器在实际水样中催化结晶紫脱色反应研究

工业染料废水中的水往往为自来水或自然存在的水源。为考察固定化酶反应器催化氧化结晶紫染料脱色的实际应用能力, 实验选取实验室自来水和西安周边水源黑河水、沔峪口水、人工湖水作为实验水样代替缓冲溶液, 用固定化酶反应器催化氧化结晶紫脱色。如图 8, 固定化酶反应器催化氧化结晶紫脱色率均在 75% 以上。实际水样中脱色率略低于蒸馏水为介质的缓冲溶液反应体系, 可能是由于样品中存在多种金属离子或微生物等杂质, 而这些杂质会干扰 CPO 的性能。在自然水源中

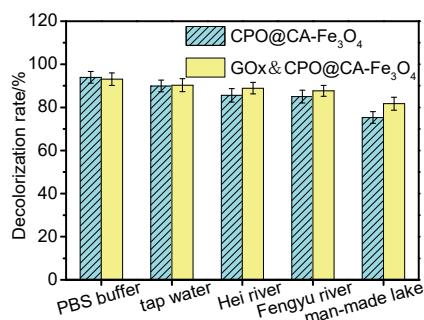


图8 在自来水和自然水源中使用固定化酶催化氧化结晶紫脱色效果(从左到右分别为缓冲溶液和自来水、黑河水、沔峪口水、人工湖水)

Figure 8 Decolorization effects of crystal violet catalyzed by immobilized enzymes in tap water and actual wastewater (From left to right, samples from buffer and tap water, Hei river, Fengyu river, a man-made lake)

CPO@CA-Fe₃O₄ 的催化活性要低于 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄, 这可能是由于 CPO@CA-Fe₃O₄ 催化过程中一次性加入的 H₂O₂ 在有金属离子等杂质存在时会部分分解, 这也充分体现出级联反应中 H₂O₂ 原位生成并缓释的优势. 但总的来说, 固定化酶反应器可以在自来水或自然水源中应用于催化氧化结晶紫脱色反应体系.

3 结论

综上所述, 该研究工作以柠檬酸对 Fe₃O₄ 进行表面功能化修饰得到富含羧基官能团的 CA-Fe₃O₄ 磁性载体. 与共价法固定化酶相比, CA-Fe₃O₄ 载体更适合通过吸附法构筑得到 CPO@CA-Fe₃O₄ 和 GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 两种固定化酶反应器. 两种酶反应器在催化结晶紫染料脱色时, 表现出优异的催化活性和热稳定性, 尤其是在温度为 70 °C 时温育 1 h 和 50 °C 下温育 8 h 仍然保留 55% 及 60% 以上的活性, 而相同反应条件下游离酶则几乎完全失活. GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 级联酶反应器因级联反应中 H₂O₂ 的原位生成和缓释, 从而表现出比 CPO@CA-Fe₃O₄ 更优异的催化性能. 基于两种酶反应器易于磁性分离、固定化方法简单和高效的催化活性, 该研究在高效生物催化剂设计上具有极大的拓展性, 可以为适用于不同领域、不同催化体系中催化剂的研究提供研究思路.

4 实验部分

4.1 CA-Fe₃O₄ 载体固定化酶

参照文献[29], 采用“溶剂热”法制备得到黑色的磁性 Fe₃O₄. 参照文献[30], 对合成的磁性 Fe₃O₄ 进行羧基化修饰, 即可得到柠檬酸修饰的 Fe₃O₄(CA-Fe₃O₄) 载体.

取 2.0 mg CA-Fe₃O₄, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤后磁性分离. 加入 10 μL 浓度为 0.28 mmol/L 的 CPO 溶液(总体积为 1.3 mL), 20 °C 下以 200 r/min 振荡. 磁性分离

后以 pH 为 5 的缓冲液洗涤, 即得到吸附法固定化 CPO(CPO@CA-Fe₃O₄).

参考文献[31], 在 2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液中使用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 *N*-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐先对载体进行活化. 活化反应结束后, 加入与吸附法等物质的量的 CPO 溶液进行固定化酶, 即得到共价法固定化 CPO(CPO@CA-Fe₃O₄).

将 2.0 mg CA-Fe₃O₄ 纳米粒子, PBS 缓冲溶液洗涤后加入浓度为 0.28 mmol/L 的 CPO 溶液和浓度为 29 mg/mL GOx 溶液(总体积为 1.3 mL), 于 25 °C 下以 200 r/min 振荡. 磁性分离后以 pH 为 5 的缓冲溶液洗涤 2 次, 即得到共固定化 CPO 和 GOx 级联酶反应器(GOx&CPO@CA-Fe₃O₄).

酶固载量的测定采用考马斯亮蓝法(Bradford)进行测定, 牛血清白蛋白作为标准蛋白. 本工作中, CPO@CA-Fe₃O₄ 中 CPO 酶固载量为 8.8 mg/g, GOx&CPO@CA-Fe₃O₄ 中总酶固载量为 55.1 mg/g.

共固定化酶的荧光标记, 参照文献[32], 分别用异硫氰酸荧光素(FITC)对 CPO、罗丹明 B(RhB)对 GOx 进行标记处理, 用 FITC-CPO 和 RhB-GOx 代替合成步骤中的 CPO 和 GOx 制备共固定化酶反应器, 进行激光共聚焦测试.

4.2 酶活性测定

向缓冲溶液中加入 60 μL 浓度为 1.0 mmol/L 结晶紫溶液和游离 CPO 或固定化的 CPO, 再加入一定浓度的 H₂O₂ 溶液(或 β-D-葡萄糖), 并将最终为 1.5 mL 的反应体系置于冷冻水浴振荡器中振荡. 利用紫外可见分光光度计对脱色前后的结晶紫溶液进行扫描, 并依据结晶紫紫外特征吸收波长处(583 nm)的吸光度值的减小来计算染料的脱色率.

脱色率的计算公式如下:

$$\text{脱色率} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%$$

公式中, A_0 和 A_t 分别为结晶紫脱色前后的吸光度值.

4.3 酶催化反应动力学参数测定

在 0.01~0.15 mmol/L 范围内通过改变结晶紫的浓度, 在保持溶液 pH、H₂O₂ 浓度或 β-D-葡萄糖浓度不变的条件下, 将等物质的量的游离和固定化 CPO 用于催化氧化结晶紫脱色, 检测结晶紫在其特征吸收峰 583 nm 处吸光度值随时间的变化, 做出时间-吸光度关系曲线, 根据 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 得到回归方程为:

$$v^{-1} = \left\{ \frac{K_m}{V_{\max}} \right\} [S]^{-1} + V_{\max}^{-1}$$

转换数 k_{cat} 根据以下公式得到:

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E_0]$$

公式中, $[E_0]$ 为酶的初始浓度.

4.4 固定化酶反应器的热稳定性和重复使用性

将游离酶和固定化 CPO 置于 pH 5.0 的 PBS 缓冲液中, 在密闭水浴环境中温育 1 h, 控制温度条件为 20~70 °C. 热稳定性用酶的残余活性来表示. 此外, 为了考察 CPO 在高温下的耐受性, 实验在 50 °C 条件下, 对游离 CPO 及固定化 CPO 的温育时间延长, 分别测定在 0~12 h 内酶的残余酶活.

对于固定化 CPO 的重复使用性, 将第一次使用固定化酶的活性看作是 100%, 并把以后每一次的活性与之相比, 以残余活性来表示. 每次反应完成后, 将反应体系磁性分离, 并将固定化酶反应器催化剂继续用于下一次的脱色反应体系.

References

- [1] Rana, H.; Sharma, A.; Dutta, S.; Goswami, S. *J. Polym. Environ.* **2022**, *30*, 4936.
- [2] Wu, H.; Mu, W.-M. *Curr. Opin. Food Sci.* **2022**, *47*, 100909.
- [3] Gao, X.; Pan, H.-B.; He, Z.-X.; Yang, K.; Qiao, C.-F.; Liu, Y.-L.; Zhou, C.-S. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 1502 (in Chinese). (高霞, 潘会宾, 贺曾贤, 杨柯, 乔成芳, 刘永亮, 周春生, 化学学报, **2021**, *79*, 1502.)
- [4] Lyu, F.-J.; Zhang, Y. F.; Zare, R. N.; Ge, J.; Liu, Z. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 5761.
- [5] Li, S.-F.; Chen, Y.; Wang, Y.-S.; Mo, H.-L.; Zang, S.-Q. *Sci. China: Chem.* **2022**, *65*, 1122.
- [6] Xiong, Y.; Tsitkov, S.; Hess, H.; Gang, O.; Zhang, Y.-F. *ACS Nano* **2022**, *16*, 10383.
- [7] Wu, X. L.; Ge, J.; Yang, C.; Hou, M.; Liu, Z. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 13408.
- [8] Qiao, J.; Zhang, X.-Y.; Qi, L. *ACS Appl. Bio Mater.* **2022**, *5*, 4264.
- [9] Matera, A.; Dulak, K.; Sordon, S.; Waśniewski, K.; Huszcza, E.; Popłoński, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *106*, 7763.
- [10] Xia, H.; Li, N.; Huang, W.-Q.; Song, Y.; Jiang, Y.-B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 22240.
- [11] Wang, Y.; Zhang, X.; Wei, Z.-H.; Jiao, Y.-J.; An, D. Y.; Huang, Y. P.; Liu, Z.-S.; Yan, C. *J. Chromatogr. A* **2022**, *1666*, 462848.
- [12] Tvorynska, S.; Barek, J.; Josypczuk, B. *Bioelectrochemistry* **2022**, *148*, 108223.
- [13] Bahadur, A.; Saeed, A.; Shoaib, M.; Iqbal, S.; Bashir, M. I.; Waqas, M.; Hussain, M. N.; Abbas, N. *Mater. Chem. Phys.* **2017**, *198*, 229.
- [14] Mukhortova, Y. R.; Pryadko, A. S.; Chernozem, R. V.; Pariy, I. O.; Akoulina, E. A.; Demianova, I. V.; Zharkova, I. I.; Ivanov, Y. F.; Wagner, D. V.; Bonartsev, A. P.; Surmenev, R. A.; Surmeneva, M. A. *Nano-Struct. Nano-Objects* **2022**, *29*, 100843.
- [15] Zhao, Y.; Yuan, L.; Bai, X.-L.; Jiang, X.-X.; Zhang, Y.; Fang, Q.; Zhang, Q.; Liao, X. *J. Sep. Sci.* **2022**, *45*, 3635.
- [16] Sarno, M.; Iuliano, M.; Polichetti, M.; Ciambelli, P. *Process Biochem.* **2017**, *56*, 98.
- [17] Lv, C.-H.; Yang, X.-W.; Wang, Z.-K.; Ying, M.; Han, Q.-G.; Li, S.-F. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 3086.
- [18] Zhang, Y.; He, S.; Simpson, B. K. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *19*, 30.
- [19] Verma, K.; Saha, G.; Kundu, L. M.; Dubey, V. K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 1011.
- [20] Cheng, H.-P.; Hu, M.-C.; Zhai, Q.-G.; Li, S.-N.; Jiang, Y.-C. *Chem. Eng. J.* **2018**, *347*, 703.
- [21] Jin, X.-Y.; Li, S.-S.; Long, N.-B.; Zhang, R.-F. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *184*, 1009.
- [22] Lu, J.; Cheng, L.; Wang, Y.; Ding, Y.; Hu, M.-C.; Li, S.-N.; Zhai, Q.-G.; Jiang, Y.-C. *Mater. Des.* **2017**, *129*, 219.
- [23] Wang, S.-J.; Ding, Y.; Chen, R.; Hu, M.-C.; Li, S.-N.; Zhai, Q.-G.; Jiang, Y.-C. *Chem. Eng. Res. Des.* **2018**, *134*, 52.
- [24] Cui, R.; Bai, C.-H.; Jiang, Y.-C.; Hu, M.-C.; Li, S.-N.; Zhai, Q.-G. *Chem. Eng. J.* **2015**, *259*, 640.
- [25] Nikazar, M.; Alizadeh, M.; Lalavi, R.; Rostami, M. H. *J. Environ. Health Sci.* **2014**, *12*, 21.
- [26] Wang, G.-S.; Geng, J.-H.; Guo, T.-L.; Qi, X.-W.; Yu, R.-T.; Zhang, Z.-X.; Wang, Y.-M.; Wang, Z.-H.; Li, Z.-Q.; Li, P.; Li, D.; Chang, G.-Q. *Ceram. Int.* **2022**, *48*, 29031.
- [27] Bahadur, A.; Saeed, A.; Shoaib, M.; Iqbal, S.; Bashir, M. I.; Waqas, M.; Hussain, M. N.; Abbas, N. *Mater. Chem. Phys.* **2017**, *198*, 229.
- [28] Jin, R.-X.; Li, C.-N.; Zhi, L.-F.; Jiang, Y.-C.; Hu, M.-C.; Li, S.-N.; Zhai, Q.-G. *Carbohydr. Res.* **2013**, *370*, 72.
- [29] Zhang, J.-F.; Li, Y.-J.; Zhang, Y.-X.; Wu, Y.-H.; Ju, J.-L.; He, W.; Li, C.-C. *Nano* **2022**, *17*, 2250062.
- [30] Li, C.-F.; Jiang, S.-H.; Zhao, X.-Y.; Liang, H. *Molecules* **2017**, *22*, 179.
- [31] Zhang, J.; Wang, Z.-J.; He, C.; Liu, X.-L.; Zhao, W.-F.; Sun, S.-D.; Zhao, C.-S. *ACS Omega* **2019**, *4*, 2853.
- [32] Zhao, R.-N.; Hu, M.-C.; Li, S.-N.; Zhai, Q.-G.; Jiang, Y.-C. *Acta Chim. Sinica* **2017**, *75*, 293 (in Chinese). (赵睿南, 胡满成, 李淑妮, 翟全国, 蒋育澄, 化学学报, **2017**, *75*, 293.)

(Cheng, F.)