

## 摘要

基于多酶级联反应体系的多酶共固定技术能够有效降低载体成本、减少反应体系中的物质和能量消耗。近年来发展起来的无载体固定化多酶技术,因避免了载体在固定中造成的空间阻力、遮蔽酶活性位点等问题,在多酶共固定中受到广泛关注。为了充分研究无载体固定化多酶技术,本研究设计使用原位固定和逐层固定两种方法进行  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -G)、葡萄糖氧化酶(GOD)和辣根过氧化物酶(HRP)三元酶的共同固定,对比研究了两种方法下固定化酶的酶学性质,并确定了无载体固定过程中的优化条件。主要内容如下:

(1)制备多酶共固定模板。添加氯化钙、碳酸钠、聚(烯丙胺盐酸)(PAH)和聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS),分别制备不同结构的碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )以及 PAH- $\text{CaCO}_3$  和 PSS- $\text{CaCO}_3$  微球。使用扫描电子显微镜进行形态表征、X 射线衍射仪进行结构分析,证明模板构建成功。

(2)进行多酶原位固定和逐层固定。研究了氯化钙和碳酸钠的浓度以及添加顺序、交联剂浓度以及模板脱除剂浓度对固定化酶载酶量和相对酶活力的影响,得到的多酶原位固定总载酶量最高为  $72.57\pm 3.63\%$ 。利用 PAH- $\text{CaCO}_3$  和 PSS- $\text{CaCO}_3$  微球分别进行 12 种自组装结构的多酶逐层固定,其中 PSS- $\text{CaCO}_3$ --PAH-- $\beta$ -G--HRP--GOD 结构中酶的载酶量和相对酶活力最高, $\beta$ -G、GOD 和 HRP 的载酶量分别为  $75.16\pm 1.97\%$ 、 $87.70\pm 4.39\%$ 、 $85.46\pm 3.24\%$ ,相对酶活力分别为  $81.80\pm 2.69\%$ 、 $93.59\pm 4.68\%$ 、 $90.64\pm 3.13\%$ 。

(3)研究固定化酶的酶学性质和动力学参数。研究了 pH 和温度对固定化酶活性的影响,发现固定后 HRP 的耐酸性提高,pH 为 5 时,在逐层固定中和原位固定中的相对酶活力分别为游离酶的 1.48 和 1.50 倍;固定后  $\beta$ -G 和 GOD 的耐热性提高,逐层固定中  $\beta$ -G 在 50-60°C 内相对酶活力均达到 100%,原位固定中 GOD 最适温度提高至 50°C。进一步研究固定化酶动力学参数,逐层固定中酶对底物的亲和力和催化效率均大于原位固定,其中逐层固定后 HRP 的  $K_m$  值大于游离酶,且  $K_{cat}/K_m$  值为游离酶的 1.49 倍,表现出良好的催化性能。

(4)研究固定化酶的重复使用性。固定化酶在 8 次重复反应后, $\beta$ -G 在原位固定和逐层固定中的剩余酶活力分别为  $96.35\pm 4.82\%$ 和  $96.69\pm 4.84\%$ ,GOD 和 HRP 分别为  $69.17\pm 3.46\%$ 和  $66.68\pm 3.33\%$ 、 $65.18\pm 3.26\%$ 和  $62.63\pm 3.13\%$ ,固定化酶表现出良好的重复使用性。逐层固定中固定化酶完成 6 次重复反应后,吸光度值最终为 0.29,是原位固定吸光度值的 1.40 倍,由此证明逐层固定具有良好的应用潜力。

关键词:多酶级联反应;逐层固定;原位固定;载酶量;酶活力

## Abstract

The multi-enzyme *co*-immobilization technology based on the multi-enzyme cascade reaction system can reduce the cost of the carrier effectively and minimize the consumption of material and energy in the reaction system. In recent years, carrier-free multi-enzyme immobilization technology has received widespread attention in multi-enzyme immobilization because of it can avoid the problems of space resistance and enzyme active site shielding caused by the carrier. In order to fully investigate carrier-free multi-enzyme immobilization technology, *in situ* immobilization and layer-by-layer immobilization was designed to immobilize the ternary enzymes of  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -G), glucose oxidase (GOD) and horseradish peroxidase (HRP) in this study. The enzymatic properties of immobilized enzymes under the two methods were compared and the optimization conditions in the process of carrier-free immobilization were determined. The main contents are as follows:

(1) Prepare the multi-enzyme *co*-immobilization templates. Calcium chloride, sodium carbonate, poly (allylamine hydrochloric acid) (PAH) and poly (sodium 4-styrene sulfonate) (PSS) were added to prepare calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) with different structures, PAH- $\text{CaCO}_3$  and PSS- $\text{CaCO}_3$  microspheres, respectively. Scanning electron microscopy was used for morphological characterization and X-ray diffractometer was used for structural analysis to confirm the successful construction of templates.

(2) Perform *in situ* immobilization and layer-by-layer immobilization. The effects of the concentrations and addition sequence of calcium chloride and sodium carbonate, crosslinking agent concentration and template removal agent concentration on the immobilized enzyme loading and relative enzyme activity were investigated. The highest total enzyme loading obtained by *in situ* immobilization of the multi-enzyme was  $72.57 \pm 3.63\%$ . 12 different self-assembled structures of layer-by-layer immobilization were prepared using PAH- $\text{CaCO}_3$  and PSS- $\text{CaCO}_3$  microspheres. The PSS- $\text{CaCO}_3$ --PAH-- $\beta$ -G--HRP--GOD structure showed the highest enzyme loading and relative enzyme activity. Enzyme loadings were  $75.16 \pm 1.97\%$ ,  $87.70 \pm 4.39\%$  and  $85.46 \pm 3.24\%$  of  $\beta$ -G, GOD and HRP, respectively, and relative enzyme activities were  $81.80 \pm 2.69\%$ ,  $93.59 \pm 4.68\%$  and  $90.64 \pm 3.13\%$  of  $\beta$ -G, GOD and HRP, respectively.

(3) Study the enzymatic properties and kinetic parameters of the immobilized enzymes. The effects of pH and temperature on the activity of immobilized enzymes were investigated. It was found that the acid resistance of HRP increased after immobilization. At pH 5, the relative enzyme activity of HRP in layer-by-layer immobilization and *in situ* immobilization was 1.48 and 1.50 times that of free enzyme, respectively. The thermostability of  $\beta$ -G and GOD increased

after immobilization. In layer-by-layer immobilization, the relative enzyme activity of  $\beta$ -G remained 100% 50-60°C and the optimum temperature of GOD was improved in the *in situ* immobilization at 50°C. Furthermore, the kinetic parameters of the immobilized enzymes were studied. The affinity and catalytic efficiency of the enzymes for substrates in layer-by-layer immobilization were higher than those of *in situ* immobilization. The  $K_m$  value of HRP in the layer-by-layer immobilization was greater than that of free enzyme, and the  $K_{cat}/K_m$  value was 1.49 times of free enzyme. These results indicated the immobilized enzymes have good catalytic performance.

(4) Study of the reusability of immobilized enzymes. After 8 repeated reactions, the residual enzyme activities of  $\beta$ -G in *in situ* immobilization and layer-by-layer immobilization was  $96.35 \pm 4.82\%$  and  $96.69 \pm 4.84\%$ , respectively. GOD and HRP were  $69.17 \pm 3.46\%$  and  $66.68 \pm 3.33\%$ ,  $65.18 \pm 3.26\%$  and  $62.63 \pm 3.13\%$ , respectively. The immobilized enzymes showed good reusability. After 6 repeated reactions of immobilized enzymes in layer-by-layer immobilization, the absorbance value was finally 0.29, which was 1.40 times of *in situ* immobilization on the absorbance value. This result proved the good potential application of multi-enzyme layer-by-layer immobilization.

Keywords: Multi-enzyme cascade reaction; Layer-by-layer immobilization; *In situ* immobilization; Enzyme loading; Enzyme activity

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 酶的固定化研究进展.....	1
1.1.1 酶的简介.....	1
1.1.2 酶的固定化.....	1
1.1.3 酶的固定化方法.....	1
1.1.4 固定化酶的性能及应用.....	2
1.2 多酶共固定.....	3
1.2.1 多酶级联反应.....	3
1.2.2 多酶共固定.....	3
1.2.3 多酶共固定的性质及应用.....	4
1.2.4 不同形式的多酶共固定.....	5
1.3 多酶固定化载体概述.....	6
1.3.1 固定化酶载体简介.....	6
1.3.2 多酶固定化的载体分类.....	6
1.3.3 无载体的多酶共固定概述.....	6
1.3.4 碳酸钙用于多酶共固定.....	7
1.4 基于级联反应体系的多酶固定化概述.....	8
1.4.1 级联反应体系中多酶的固定化.....	8
1.4.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -G)、葡萄糖氧化酶(GOD)和辣根过氧化物酶(HRP)简介.....	8
1.4.3 基于 GOD 和 HRP 级联反应体系的多酶固定化研究进展.....	9
1.5 本课题的立题意义及主要研究内容.....	9
1.5.1 本课题的立题意义.....	9
1.5.2 本课题的主要研究内容.....	10
第二章 材料与amp;方法.....	11
2.1 实验材料.....	11
2.1.1 酶的种类.....	11
2.1.2 主要试剂.....	11
2.1.3 主要仪器与设备.....	12
2.1.4 缓冲液及相关试剂.....	12
2.2 实验方法.....	13
2.2.1 制备 $\text{CaCO}_3$ 模板.....	13
2.2.2 $\text{CaCO}_3$ 原位固定酶.....	13
2.2.3 构建 PAH- $\text{CaCO}_3$ 和 PSS- $\text{CaCO}_3$ 微球.....	13

2.2.4 逐层固定多酶.....	14
2.2.5 动力学参数测定.....	14
2.2.6 最适 pH 和温度测定.....	15
2.2.7 多酶级联反应测定.....	15
2.2.8 储存稳定性测定.....	15
2.2.9 固定化酶的重复使用性测定.....	15
2.3 分析方法.....	16
2.3.1 酶活力测定.....	16
2.3.2 蛋白质含量和载酶量测定.....	17
2.3.3 Zeta 粒径与电位分析.....	17
2.3.4 扫描电子显微镜(SEM)分析.....	17
2.3.5 傅里叶红外吸收光谱分析(FTIR).....	17
2.3.6 X 射线衍射仪(XRD).....	17
第三章 结果与讨论.....	18
3.1 多酶共固定的模板构建.....	18
3.1.1 CaCO <sub>3</sub> 模板构建及形态表征.....	18
3.1.2 PAH-CaCO <sub>3</sub> 和 PSS-CaCO <sub>3</sub> 的构建与表征.....	21
3.2 酶的条件测定.....	22
3.2.1 波长选择的影响.....	22
3.2.2 测定反应时间和底物浓度对酶的影响.....	22
3.3 原位固定酶的制备.....	24
3.3.1 酶的粒径测定.....	24
3.3.2 原位固定单酶和多酶.....	24
3.3.3 原位固定化酶的形态表征.....	27
3.4 逐层固定酶的制备.....	28
3.4.1 表面电荷.....	28
3.4.2 多酶逐层固定.....	29
3.4.3 多酶逐层固定形态表征.....	32
3.5 原位固定和逐层固定酶学性质比较.....	34
3.5.1 动力学参数.....	34
3.5.2 级联反应.....	35
3.5.3 最适 pH 和最适温度.....	36
3.5.4 储存时间对固定化酶的影响.....	38
3.5.5 固定化酶的重复使用性.....	39
主要结论与展望.....	41
主要结论.....	41
展望.....	42
参考文献.....	43

附录 II: 分析方法的标准曲线.....	51
-----------------------	----

# 第一章 绪论

## 1.1 酶的固定化研究进展

### 1.1.1 酶的简介

酶是一种具有高度特异性和选择性的多功能生物分子，是催化生物体内化学反应的天然生物催化剂<sup>[1]</sup>，酶具有的主要特点是高效性、专一性、多样性、温和性、可调节性等。相比于使用传统化学催化剂进行的催化反应来说，使用酶进行的生物催化反应是一种催化效率高、可持续且经济环保的方法，酶催化反应过程所需的条件温和、产生的反应副产物少、污染小<sup>[2]</sup>。目前，酶已被广泛应用于生物燃料、食品、药物等多种生产领域当中<sup>[3-4]</sup>。但游离酶通常存在稳定性较差，易在多种环境下发生变性，且反应结束后难以回收等缺点，由此导致使用成本高、生产效率低、在工业应用中受到限制等问题<sup>[5]</sup>。因此，研究者们结合随机突变筛选酶，酶分子的定向进化，酶的固定化等技术，尝试克服游离酶的缺点并提高酶的酶学性能<sup>[6]</sup>。

### 1.1.2 酶的固定化

酶的固定化是 20 世纪 60 年代以来快速发展的一种生物技术。固定化酶通常是指通过物理或化学方法处理，使水溶性酶成为不溶于水的形态。作为一种提高酶学性能的技术，酶的固定化能在保留酶的基本生化性质基础上，提高酶的稳定性<sup>[7]</sup>、重复利用率<sup>[8]</sup>，甚至可以通过不同的固定化方法提高酶的活性，此外，固定化酶易从反应系统中进行分离，便于贮存和运输<sup>[9-10]</sup>。但固定化酶也存在缺点，例如多数酶的固定化过程会改变酶自身的微环境，影响酶自身的反应条件，导致酶活性降低<sup>[11]</sup>，另外，利用固定化酶在体外进行的一些催化反应，需要严格限定其反应条件，或是额外添加辅因子才能保证反应的正常进行，由此增加了固定化酶的使用成本，在实际生产应用中也会引起操作复杂，过程繁琐等不利因素<sup>[12-13]</sup>。

### 1.1.3 酶的固定化方法

常见的固定化方法包括吸附法<sup>[14]</sup>，包埋法<sup>[15]</sup>，交联法<sup>[16]</sup>和共价结合法等<sup>[17]</sup>，吸附法一般分为物理吸附和离子吸附，常见的载体有活性炭、硅藻土、多孔玻璃等，包埋法是利用聚合物对酶进行包埋以此实现酶的固定。吸附法和包埋法是常用的固定化方法，由于载体主要通过氢键、范德华作用、离子相互作用和疏水作用力实现酶的固定，操作简便、对酶的活性影响较小、酶的活性回收率较高，但缺点是形成的结构不稳定，容易引起酶的泄漏<sup>[18]</sup>。相比而言，共价结合法能够提高固定化酶的稳定性和重复使用性，同时降低了酶的泄漏<sup>[18]</sup>，但因为载体与酶利用化学键相连接<sup>[19]</sup>，固定之后往往会造成酶活性的降低，此外，复杂的操作和制备条件导致酶的回收率不高。交联法是指通过热处理、碱性条件、机械搅拌以及化学试剂使酶与载体形成共价键，由此实现酶的固定，其中戊

二醛(GA)是交联法中应用最广泛的交联剂<sup>[20]</sup>。

不同种类的酶需要使用不同的固定化方法，以此保证该酶最大程度发挥其催化性能，另外，为了优化单一固定化方法的缺陷，实际操作中也常将两种或两种以上方式联合使用<sup>[21-22]</sup>。不同固定化方法进行酶的固定化的部分案例如表 1-1 所示。

表 1-1 酶的固定化

Table 1-1 Immobilization of enzymes

固定化方法	固定化酶	固定化结果
吸附法 <sup>[23]</sup>	纤维素酶	50°C、pH 为 4 时酶活性保留率为 73.6%
吸附法 <sup>[24]</sup>	大豆脂肪氧合酶	酶活性保留率为 73%
包埋法 <sup>[25]</sup>	$\alpha$ -葡萄糖苷酶	10 次重复使用后酶活性保留率为 62.2%
包埋法 <sup>[26]</sup>	葡萄糖氧化酶	壳聚糖膜中的固定化酶 $K_m$ 值为 $1.67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
交联法 <sup>[27]</sup>	辣根过氧化物酶	83%的酶活性回收率
交联法 <sup>[28]</sup>	植酸酶	50°C 储存 6 h 酶活性保留率为 100%
共价结合法 <sup>[29]</sup>	过氧化氢酶	10 次重复使用后酶活性保留率为 90%
共价结合法 <sup>[30]</sup>	枯草芽孢杆菌脂肪酶	10 个周期后酶活性保留率为 90%
吸附-包埋法 <sup>[31]</sup>	脂肪酶	65°C 储存 3 h 酶活性保留率为 92%以上
吸附-交联法 <sup>[32]</sup>	乙酰胆碱酯酶	相较游离酶，固定化酶比酶活为 130%

#### 1.1.4 固定化酶的性能及应用

固定化酶的性能与固定化方法和固定化载体相关，两者共同影响固定化酶的动力学性能、生化特性、机械性能等。相比于游离酶，通常固定化酶具有以下特点：(1) 酶活性的变化。多数情况下，酶在固定化过程中，其空间构象会随之发生变化，同时产生的空间阻力、遮蔽活性位点等问题，会导致固定化酶的活性降低；(2) 酶稳定性的变化。游离酶和固定化酶的稳定性会存在差异，一般固定化酶的储存稳定性提高，对温度、pH、变性剂等的耐受性提高；(3) 最适温度和 pH 的变化。固定化方法影响酶的稳定性，由此可能间接改变了酶的最适温度和最适 pH，而载体本身的带电性质也会影响酶的反应微环境，导致酶的最适 pH 发生变化；(4) 动力学参数的变化。固定化过程会导致酶的构象发生改变，且因载体和酶的自身性质特点、载体和酶在固定化过程中的相互作用影响<sup>[33]</sup>，会引起酶与底物之间亲和力的改变，此外，反应环境中离子强度的变化引起的扩散阻碍也会导致固定化酶的动力学参数发生变化；(5) 重复使用性。固定化酶因结构稳定，且通常使用载体实现的固定化酶形态不溶于水，由此能够进行分离和提取，重复应用于催化反应过程中。

关于固定化酶在生产应用中的性能分析，一般包括固定化酶的生产产量、固定化酶的催化效率、固定化酶反应体系的整体反应速率、酶固定过程中的负载量、酶的活力回收率和固定化酶的重复使用性等<sup>[1]</sup>。在固定化过程中，还需要进一步考虑空间限制、传质阻力等因素对固定化过程产生的影响，探索一种保持高性能的固定化化方法，是固定化酶研究的主要内容。目前，固定化酶已被应用于生物传感器，生物燃料电池<sup>[34]</sup>，试剂检测，食品生产等不同领域当中。

## 1.2 多酶共固定

### 1.2.1 多酶级联反应

催化反应通常涉及到多种酶进行的多步反应，依赖于多种酶之间的相互协同作用，因此探索由多酶构成的级联反应具有重要意义<sup>[35-36]</sup>。多酶级联反应通过有序且连续的形式进行物质转化和能量传递，由此能够在整体催化反应过程中减少底物的传递时间、降低中间产物的损失、减少反应生成的副产物<sup>[36-37]</sup>，节约了整体反应的成本消耗，同时降低了物质和能量消耗。

正常的生物代谢活动依赖于由多种酶构成的多酶级联反应体系<sup>[38]</sup>，多酶级联反应体系是维持生命高效且有序进行的基础，细胞作为天然的微反应器可以将酶或其他生物活性物质包裹在细胞膜内，保护酶的基本生化特性，有助于体内级联反应的发生。而生物细胞代谢的关键之一在于多酶级联反应的空间组织<sup>[39]</sup>，多酶级联反应中的空间组织能够提高酶的局部环境稳定性，另外，级联反应过程中酶的中间产物在限定区域内定向传递，能够防止中间产物的扩散损失<sup>[40]</sup>，同时，多酶级联反应中的空间组织也有利于在活性位点搭建底物和中间体的通道，实现酶级联反应的多级信号放大，提高多酶级联反应的整体催化效率<sup>[41-42]</sup>。

受体内细胞代谢反应的启发，目前已研究了不同系统的体外多酶级联反应体系<sup>[43]</sup>。Xu<sup>[44]</sup>等通过共固定甲酸脱氢酶，甲醛脱氢酶和乙醇脱氢酶，完成二氧化碳转化为甲醇的级联反应。体外多酶级联反应体系除了能够模拟细胞内的代谢途径，还能够根据生产需要开发出人工代谢途径<sup>[45]</sup>。Zhang<sup>[46]</sup>等构建了由醇醛氧化酶 ScAldO、二羟基羧酸脱水酶、 $\alpha$ -酮酸脱羧酶和过氧化氢酶组成的多酶级联反应体系，以木糖作为底物得到的 D-3,4-二羟基丁酸产量达到  $4.55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，为理论产量的 83%。细胞内的小分子扩散速度不同于体外小分子的扩散速度，所以在常规溶液中构建多酶级联反应，无法有效反映酶和其他活性物质在细胞内的真实运作情况，因此，在研究过程中利用多酶共固定技术，尝试模拟细胞内高度组织的酶级联催化机制已成为目前体外多酶级联反应体系的研究热点。

### 1.2.2 多酶共固定

多酶共固定是指两种或两种以上的酶最终被固定在同一载体上的技术，该技术能够使酶进行有效的生物催化反应。多酶共固定是基于单酶固定化技术之上产生的固定化技术，相比于单酶固定化技术，多酶共固定可以简化产物分离步骤，在温和条件中获得产物<sup>[36]</sup>。同时，多酶共固定体系可以限制中间产物扩散到外部，减少了反应时间和反应副产物的干扰，使催化反应比单酶固定化体系更有效<sup>[47]</sup>。大多数多酶共固定是以多酶级联反应体系中的酶为对象，由于不同酶之间具有相互协同作用，因此，多酶共固定技术具有较高的原子经济性、节省载体材料、简化多步反应中的复杂操作流程等特点<sup>[48]</sup>。此外，多酶共固定减少了反应的操作步骤、降低反应成本、缩短了游离酶之间的空间距离、产生底物通道、降低扩散损失<sup>[49-50]</sup>，进而提高了整体固定化体系的催化效率。

多酶共固定方法总体可分为非特异性共固定和特异性共固定，其中非特异性共固定一般是指在酶分子的活性位点之外，载体与酶通过相互作用力进行连接实现酶的固定化，该方式有助于构建产物或底物通道，消除反应中的滞后时间，从而提高催化效率，而特异性共固定是指通过对酶分子进行理性设计和改造后引入特殊功能团，利用功能团使酶与载体定点结合实现酶的固定化，一般结合位点在酶分子的活性位点上，其中主要包括DNA定向自组装、活性位点特异性作用等。多酶共固定也面临许多研究挑战，如难以选择适合多酶体系中不同酶的载体、底物和产物积累产生的限制、整体反应速率容易受到单个酶性质的影响、级联系统的整体活性与酶之间的空间位置或酶的固定顺序影响<sup>[45]</sup>，由此迫切寻找一种通用性较高且能保持酶较高酶学性能的固定化方法。

### 1.2.3 多酶共固定的性质及应用

多酶共固定技术通过准确提取或分析体内多酶反应体系的特点，以多酶反应体系中的酶作为固定对象，在各个酶基本生化性能保持较高水平的前提下，使用无固定载体构建多元酶簇微粒或使用固定载体完成多酶共固定，研究多酶反应体系中的酶在体外的固定性能，尝试将固定化多酶在体外进行实际应用。而在具体应用中，需要进一步模拟多酶催化反应体系中的微环境，为体系中各个酶提供独立完整的反应空间，较为精准的提高每一步反应中酶的反应速率和生产效率<sup>[51]</sup>，以此，需要在研究过程中精细化调控反应条件，优化反应过程参数。多酶共固定存在的缺点主要有一般难以探索从底物到产物形成的具体过程<sup>[51]</sup>、一些共固定方式加工成本高<sup>[52]</sup>、大分子载体产生扩散阻碍等<sup>[53]</sup>，因此，选择性能稳定、通用性强、成本低的载体，使用简单快捷、重复性高且能够对多酶进行有序固定的方法是固定化多酶高效完成催化反应的关键<sup>[54]</sup>。

固定化多酶的主要性质涉及到固定化酶中各个酶的酶活性、整体结构的稳定性和重复利用性。Ren<sup>[36]</sup>等提出在多酶共固定过程中，当酶分子与固定化载体相互作用时，会抑制酶分子降解的机会，能间接提高固定化酶的稳定性，随着研究的不断发展和深入，多酶共固定技术能够广泛应用于不同酶，对稳定的生物催化剂发展起到了重要作用。固定化酶的稳定性通常高于游离酶，但是稳定性的提升往往会造成酶活性的降低，因此，合理设计出能够保持高酶活性和稳定性的具体固定化方法是多酶共固定需要主要解决的问题<sup>[55]</sup>，同时，酶的稳定性也满足了固定化酶的重复使用性需要<sup>[56]</sup>，通常稳定性越高，固定化酶的回收率越高。此外，Zhang<sup>[46]</sup>等认为在多酶固定化过程中各个酶相互接近，会影响各个酶的动力学特性，导致整体酶催化效率的改变。

生物催化反应中的多酶复合体和多酶级联反应体系已在不同领域中得到应用<sup>[3]</sup>，而共固定技术的发展其在实际生产中进一步的广泛应用成为可能。固定化多酶已应用于多种领域，在环境保护中，主要通过减少二氧化碳等温室气体<sup>[57]</sup>，处理废水<sup>[58]</sup>等方式降低环境污染；在医药领域中，主要应用于疾病检测和监控<sup>[59]</sup>、制药生产<sup>[60]</sup>、新型医疗技术等；在食品工业中，有助于提高食品类相关产品的生产效率和产品质量<sup>[61]</sup>，另外，还能以生物传感器用于农业检测、生物过程控制、免疫学分析等过程中<sup>[62]</sup>。

### 1.2.4 不同形式的多酶共固定

为提高多酶共固定的整体催化反应效率，需保持高酶活性和高载酶量，固定化酶的载体材料结构和种类决定酶的固定方式，而酶与载体材料的共固定形式会影响反应过程中的底物扩散速率、传质速率、酶的活性位点等，对固定化酶的酶学性能提升有重要的影响。根据酶与载体的共固定作用形式，可以将多酶共固定分为随机固定、分区域固定和定向固定。

当前研究中，随机固定<sup>[63]</sup>是最常见和广泛的多酶共固定形式，随机固定无需特别考虑酶相互之间或酶与载体之间的空间关系及其具体的影响因素，通常采用包埋、吸附、共价结合或交联等常用的固定化酶方法，使载体与酶直接固定。该固定化形式具有操作步骤简单快捷、易于酶的负载<sup>[64]</sup>、可选择的载体材料丰富、通用性较广、反应条件温和等特点。而随机固定主要依赖于载体材料本身的特性，例如载体比表面积和分子量的大小、环境稳定性、包含的官能团种类等，此外，随机固定能够减少操作步骤和材料消耗、降低了成本，但是，因为酶分子在载体中以随机状态分布，会存在降低多种酶协同催化的可能。随着多酶共固定中酶种类的不断增多，需要考虑体系中各个酶的生化特性<sup>[65]</sup>，同时，为了减少反应中存在的空间阻力、优化反应催化过程、减少随机固定中可能出现遮蔽酶活性位点的可能性，对酶之间的空间排列要求也会随之增加，因此有必要对酶进行分区域固定。

分区域固定减弱了酶与酶之间的相互干扰，一定程度保证了各个酶单独反应的微环境，每步反应产生的中间产物从特定区域定向传输，减少了对整体催化反应的影响，更贴近酶在生物体内反应的真实场所，分区域固定可将酶固定在不同空间位置中，也可以采用逐层固定的形式。Begum<sup>[66]</sup>等使用二氧化硅，对纤维素酶、葡萄糖激酶和磷酸葡萄糖脱氢酶进行逐层分区域固定，证明了改变酶所在的区域位置可以调控酶的催化效率。Fu<sup>[67]</sup>等利用 DNA 折纸技术对酶间距进行调节，提出酶的空间位置过于紧密易导致反应受阻、产物干扰，而过于分散则会丧失调控及反馈抑制、影响级联反应传质速率。逐层固定主要以静电相互作用作为驱动力，利用载体和酶的表面电荷特性自组装实现多酶共固定，是一种通用、便捷、温和、不损害酶高级结构的固定化形式<sup>[68]</sup>，还能够节省载体材料，减少污染，拓宽了固定化多酶的应用领域和范围。

定向固定是目前多酶共固定研究的热点，主要利用酶的特定结合位点与载体相连接，最大程度上释放单个酶的酶活性，还能够通过调整载体特性，使酶按照一定方向或位置进行特定排列，有助于酶活性位点的暴露，进一步提高多酶的反应催化效率。定向固定可分为共价定向固定和非共价定向固定，共价定向固定中载体一般与酶活性位点之外的基团连接，非共价定向固定主要利用酶的特异性结合进行固定。定向固定主要基于 DNA 技术，DNA 遵循严格的碱基配对原则，使定向固定具有较强的专一性和特异性，能在少量载体材料下保留高酶活性，但定向固定涉及的方法成本较高、结构复杂、对操作和使用条件要求较高，因此一般只用于固定化酶的机理性研究，较难实现大规模生产应用。

## 1.3 多酶固定化载体概述

### 1.3.1 固定化酶载体简介

固定化酶一般是从不断改进固定化方法或技术和完善或开发新的固定化载体材料这两方面进行研究,固定化酶载体的主要作用是为酶提供催化的稳定环境,载体的种类选择也需要契合酶本身的特性。良好的固定化载体应具备以下条件:(1)无毒无害,较好的生物相容性;(2)高的机械强度、稳定性;(3)来源广泛、价格低廉;(4)操作简便、易于固定酶;(5)良好的传质性能;(6)回收率高,可以长时间使用和重复使用;(7)比表面积大、具有高的载酶量和载酶活性,不会导致酶变性和失活。载体性能可以提高固定化酶的整体稳定性,防止酶受到外界分子的干扰,载体的粒径、孔隙率等也会影响酶的负载能力<sup>[69]</sup>,从而增加整体反应的催化效率等<sup>[70]</sup>。

### 1.3.2 多酶固定化的载体分类

酶的固定化载体材料可按照来源分为无机材料、有机材料和有机-无机复合材料。

传统的无机材料包括二氧化硅及其硅酸盐化合物为主要成分所制备的相关材料<sup>[71]</sup>、活性炭、玻璃珠、硅胶等,新型的无机材料是非金属化合物利用特殊工艺制备方式获得的人工材料,如氧化石墨烯、玻碳电极、碳纳米管、功能化无机磁珠等。无机材料作为酶的固定化载体,其主要优势是来源丰富、获取途径广泛、原料成本低廉、提取操作简单方便,大多数无机材料性能稳定,无毒无害<sup>[72]</sup>,但其结构不易调控。

有机材料主要分为天然高分子材料和合成有机材料。天然高分子材料包括海藻酸盐、壳聚糖、纤维素等,合成有机材料包括聚乙烯醇、聚环氧丙烷等。作为固定化酶材料,有机材料具有种类丰富、生物兼容性好、易于加工、多数因难溶于水而在固定化过程中易于控制等特点,此外,有机材料在构建新型复合材料中具有重要意义,蛋白质定位支架<sup>[73]</sup>、核酸支架<sup>[74]</sup>等作为新型有机材料已被用于多酶共固定中。

相较于无机和有机材料,复合材料通过共同使用无机和有机材料,能够克服部分无机材料用于固定化酶导致的重复使用性低和酶漏失现象,以及有机材料稳定性低,分子复杂造成固定化酶空间阻力较大的问题,由此复合材料一定程度上增加了固定化酶的应用范围,减少了酶固定化过程中的条件限制。

### 1.3.3 无载体的多酶共固定概述

载体的引入除了导致生产应用中成本的增加,载体的本身性能也会造成多酶共固定中分子相互影响,由此研究者们尝试设计简单的固定化方法,能够在保留高酶活性的基础上,无需引入载体固定或利用载体充当模板,用于降低生产消耗和减少载体的影响,而构建交联酶聚集体在此过程中应用而生<sup>[36]</sup>。

无载体固定化酶的生物催化体系具有成本低廉、保持较高的酶负载量、降低传质阻力等特点<sup>[75]</sup>。无载体酶固定化的形式主要包括交联酶(CLEs),交联酶晶体(CLECs),交联酶聚集体(CLEAs),交联喷雾干燥酶(CSDE)<sup>[36]</sup>,交联酶晶体是直接在游离酶中加入交

联剂之后通过收集得到，交联酶聚集体则是在完成酶分子的非变性沉淀后，再加入交联剂收集得到。CLEs 在工业化过程中易造成酶活性的丧失，并不通用于多酶共固定过程中，CLECs 具有较高的机械活性、稳定性<sup>[76]</sup>，能在生产中进行有效应用，但通常需要高纯度的酶作为原料，由此造成了时间和操作成本的增加<sup>[77]</sup>，此外，选择合适的晶体用于提高 CLECs 的整体性能也是该固定化方法的技术瓶颈<sup>[78]</sup>。而 CLEAs 能作为一种良好的固定化方法，克服 CLECs 制备和应用中的缺点，目前，CLEs 和 CLECs 已逐步被 CLEAs 固定化技术代替<sup>[77]</sup>。

CLEAs 通过改变交联条件来调节晶体大小和改变酶的活性<sup>[75]</sup>，有较高的回收率和重复利用性，由于 CLEAs 由酶蛋白构成，单位质量酶活性高，在操作前也无需酶的纯化。在一定程度上，外部的 CLEA 颗粒能够保护酶的内部，防止酶失活<sup>[79]</sup>，另外，CLEAs 通常与其他固定化技术联合使用，例如吸附和包埋之后交联，在交联过程中酶分子的三维结构不发生改变，酶的活性被保留，但缺乏载体的酶结构可能在重复使用过程中不够稳定，环境条件的限制也会影响酶的催化特性<sup>[80]</sup>，为进一步解决缺乏载体的影响，Voberkova<sup>[81]</sup>等提出固载化 CLEAs 技术，即载体充当模板，在有孔载体内部中形成 CLEAs，随后脱除载体，构建高性能的无载体固定化酶<sup>[82]</sup>。

#### 1.3.4 碳酸钙用于多酶共固定

固载化 CLEAs 技术能够利用构建中空微球实现酶的固定化，中空微球的合成方法一般包括模板法，乳液法和喷雾干燥法，乳液法操作条件复杂，难以控制过程，喷雾干燥法获得的固定化酶粒径较大且不均一，而模板法合成的中空微球结构稳定、重复性使用性高，同时，模板法适用性广泛，可以制备用于固定不同种类的酶。

碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )能够作为模板<sup>[83]</sup>实现固载化 CLEAs 技术， $\text{CaCO}_3$  是自然界十分充足的原料之一，可以从贝壳、骨骼等常见物质中分离获得，在基础研究和工业生产上都有广泛应用<sup>[84]</sup>。 $\text{CaCO}_3$  结构简单，粒径小，比表面积大，材料通用性高，此外，通过改变温度、溶剂浓度等条件，能得到不同晶体结构和孔径大小的  $\text{CaCO}_3$ 。Weber<sup>[85]</sup>等通过在两种介孔分子筛上固定 P450 BM-3 分离的血红素结构域，证明了载体和酶的孔径、载体的结构都会影响酶的负载量。在形成固定化酶簇微粒后，可以使用金属螯合剂脱除  $\text{CaCO}_3$ <sup>[86-87]</sup>，减少固定化酶反应的传质阻力。方解石、球霏石和文石是  $\text{CaCO}_3$  常见的三种晶体形态<sup>[88]</sup>，使用碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )和氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )为原料，能够直接合成  $\text{CaCO}_3$  微粒用于酶的固定<sup>[89]</sup>，同时，可以对  $\text{CaCO}_3$  进行功能化修饰，例如加入多种添加剂如聚电解质<sup>[90-91]</sup>、多肽<sup>[92]</sup>等，制备更多具有特殊功能且不同形态的  $\text{CaCO}_3$  微粒。

$\text{CaCO}_3$  具体的合成机理较复杂，在制备过程中主要受到离子浓度、反应温度、pH 值、添加剂等条件的多种影响<sup>[93]</sup>，通过控制不同制备条件可以具体改变  $\text{CaCO}_3$  的结构特点，由此应用于酶的固定化过程中时，能够实现固定化酶的高载酶量。目前， $\text{CaCO}_3$  作为模板或载体，已在骨修复、伤口愈合、生物成像分析、药物传递<sup>[94]</sup>、重金属处理等不同领域中得到实际应用。

## 1.4 基于级联反应体系的多酶固定化概述

### 1.4.1 级联反应体系中多酶的固定化

多酶构成的级联催化反应通常是指利用两种或两种以上酶，催化初始底物进行两步及以上的反应过程，最终得到目的产物的过程。多酶固定化通常基于生物催化级联反应体系，将生物催化级联反应体系中涉及的多种酶进行共固定，得到的固定化酶能够持续应用于催化反应当中。

目前按照空间形式已将多酶级联反应分为体内级联催化反应和体外级联催化反应，两者催化反应中涉及到的多酶都能够通过不同方式进行固定化。Yu<sup>[13]</sup>等直接从细胞裂解液中共固定有组氨酸标记的 3-奎宁酮还原酶和葡萄糖脱氢酶，获得的三维多孔杂化球在转化(R)-3-奎宁醇过程中表现出良好的催化效率和重复使用性。但体内反应中的酶受到细胞代谢途径消耗，且细胞内酶的所处微环境复杂，通常难以直接进行酶的固定，而体内多种酶的完整提取过程也具有一定难度，因此，在体外进行多酶反应体系中酶的固定，并将获得的固定化酶在特定体系中进行催化反应，是一种操作方便、稳定性高、调控过程快速、反应高效的方式。体外进行的多酶级联催化反应除了可以通过提取体内酶，模拟体内代谢通路的反应过程，也可以利用不同酶之间的协同作用，直接设计和构建能进行实际应用的多酶级联反应。

### 1.4.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -G)、葡萄糖氧化酶(GOD)和辣根过氧化物酶(HRP)简介

$\beta$ -G 属于纤维素酶，是纤维素酶反应体系中的限速酶，广泛存在于自然界的植物、真菌和细菌中<sup>[95]</sup>，主要应用于纤维素的分解、合成糖苷类化合物、激活植物激素、在食品中用作增香剂等方面。GOD 广泛存在于动植物和微生物当中，主要以青霉和黑曲霉作为生产菌株提取得到，可广泛应用于食品工业，纺织和检测工业。在有氧条件下，GOD 对  $\beta$ -D-葡萄糖具有特异性催化反应，能将  $\beta$ -D-葡萄糖转化为葡萄糖酸内酯和过氧化氢( $H_2O_2$ )。HRP 是一种从辣根中提取出，以铁卟啉为辅基的过氧化物酶，其自身的比活性高、性质稳定、价格低廉，目前已具备了成熟的提取工艺，在  $H_2O_2$  或其他过氧化物存在时，HRP 能够快速进行催化氧化反应。HRP 常应用于生化检测、生物传感器、食品生产等领域<sup>[96]</sup>。

$\beta$ -G、GOD 和 HRP 可构建为完整的三元酶级联反应体系。该体系的整体反应过程是以纤维二糖作为反应底物， $\beta$ -G 将纤维二糖分解生成葡萄糖，葡萄糖通过 GOD 转化为葡萄糖酸和  $H_2O_2$ ，HRP 分解  $H_2O_2$  产生氧气和水<sup>[97]</sup>。可在反应中添加显色剂，如愈创木酚、2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)等，氧气氧化显色剂发生显色反应，显色现象可证明该级联反应是否顺利进行。选择该级联反应体系中的酶作为多酶共固定的研究对象，该固定化多酶在反应过程中，其中间产物和终产物都能被收集用于其他领域当中。生成的葡萄糖酸及其盐类，可用于食品<sup>[98]</sup>、制药和纺织工业<sup>[99]</sup>等， $H_2O_2$  适用于医用伤口消毒、漂白、去除异味、作为化合物合成的基本原料等。此外，基于该级联反

应体系为基础的多酶固定化研究发展,也能够为设计纤维二糖生物传感器等应用开发提供更多参考思路。

### 1.4.3 基于 GOD 和 HRP 级联反应体系的多酶固定化研究进展

在目前研究中, GOD 和 HRP 能够通过载体和无载体进行随机固定、分区域固定和定向固定,随着定量分析的研究发展,基于固定化 GOD 和 HRP 进行的多酶级联催化反应,已被广泛应用于生物传感器、血糖检测、医用探针等领域,该级联反应在实际应用中表现出了较好的稳定性、重复利用性、反应高效性和检测精准性。表 1-1 总结了部分目前使用 GOD 和 HRP 共固定的例子,而在目前固定化研究当中,基于 GOD 和 HRP 两种酶的级联反应体系较多,与  $\beta$ -G 相结合进行三元酶级联反应的体系研究较少,且固定形式多数为随机固定,但以此为基础的三元酶固定化研究较少,同时,缺乏使用分区域固定或定向固定且能够保持较高载酶量和酶活力的三元酶及以上共固定研究成果。

表 1-2 GOD/HRP 共固定

Table 1-2 GOD/HRP *co*-immobilization

共固定策略	固定材料	固定化酶	固定化结果
随机固定	介孔材料 <sup>[100]</sup>	GOD/HRP	比活力 $0.4 \pm 0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
	二氧化硅 <sup>[101]</sup>	GOD/HRP	保存 7 天后吸光度保留率 90%
	多孔纳米纤维 <sup>[102]</sup>	GOD/HRP	检测线性响应范围为 $5\text{-}100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
	纳米凝胶 <sup>[103]</sup>	$\beta$ -半乳糖苷酶/GOD/HRP	保存 30 天后酶活性保留率 71%
	碳纳米管(CNT) <sup>[104]</sup>	GOD/聚乙烯亚胺/HRP	保存 4 周后酶活性保留率 81%
	杂化纳米花 <sup>[105]</sup>	GOD/HRP	保存 75 天后传感灵敏度保留率 75%
	氧化石墨烯(GO) <sup>[106]</sup>	GOD/HRP	65°C 酶活性保留率 60-80%
	金属有机框架 <sup>[107]</sup>	GOD/HRP	保存 4 周后电流响应值保留率 78%
	共价有机框架 <sup>[108]</sup>	GOD/HRP/乙酰胆碱酯酶	测定葡萄糖浓度下限为 $0.85 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
分区域固定	磁性纳米粒子 <sup>[109]</sup>	GOD/HRP/HKUST-1	比活力 $79 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$
	DNA “折纸技术” <sup>[67]</sup>	GOD/HRP	酶活性超出游离酶 15 倍
定向固定	聚苯胺支架 <sup>[110]</sup>	GOD/HRP	催化效率为游离酶的 24 倍
	DNA 支架 <sup>[111]</sup>	葡萄糖转化酶/GOD/HRP	65°C 保存 60 min, 整体活性为 70%

## 1.5 本课题的立题意义及主要研究内容

### 1.5.1 本课题的立题意义

构建体外多酶催化反应体系是涉及生物催化、代谢工程与材料科学的重要研究方向,随着酶固定化技术的日渐成熟,多酶共固定技术因其具有能解决游离酶稳定性差、节省载体材料、简化多步反应的复杂流程、提高整体催化效率等特点,已成为多酶催化反应体系的技术研究热点。多酶固定化体系的整体催化效率除受酶自身的影响外,还取决于固定化方法和固定化载体。采用固载化 CLEAs 技术进行多酶随机固定,能够增加固定化酶稳定性和重复使用性,同时提高整体催化反应效率,但此过程未对酶之间的空间关系进行有效研究。此外,利用逐层固定形式模拟酶的有序负载过程,并优化固定中的多

种条件以保持固定化酶的高酶活和高载酶量的研究也处于初级阶段。

本文研究了以  $\beta$ -G、GOD 和 HRP 作为固定对象，使用  $\text{CaCO}_3$  为模板、GA 为交联剂进行原位固定，并以聚(烯丙胺盐酸)(PAH)和聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)构建的 PAH- $\text{CaCO}_3$  与 PSS- $\text{CaCO}_3$  微球进行多酶逐层固定，对比研究不同形式固定化多酶的酶学性质，通过优化固定过程条件，成功提出一种保持高酶活和高载酶量的多酶共固定策略，以期为其他以级联反应为基础的多酶共固定提供研究思路。

### 1.5.2 本课题的主要研究内容

本文主要研究内容如下：

- (1) 构建原位固定化  $\text{CaCO}_3$  模板和逐层固定化 PAH- $\text{CaCO}_3$  和 PSS- $\text{CaCO}_3$  微球模板；
- (2) 原位固定  $\beta$ -G、GOD 和 HRP，研究固定过程中不同条件对酶学性质的影响；
- (3) 逐层固定  $\beta$ -G、GOD 和 HRP，筛选高酶活和高载酶量的逐层固定结构；
- (4) 对比两种固定化方法以及固定化前后的酶学性质，考察固定化酶的稳定性、重复使用性等性能。

本文主要技术路线如图 1-1 所示。

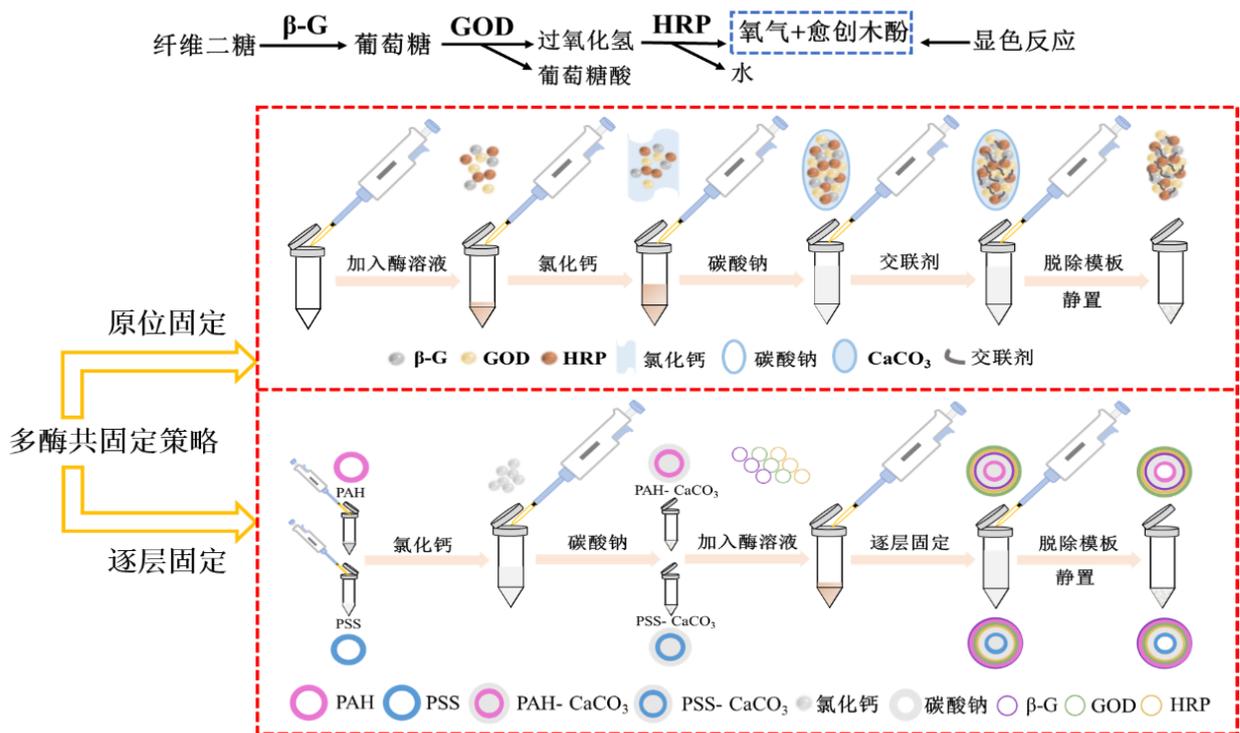


图 1-1 技术方案图

Fig. 1-1 Technology scheme diagram

## 第二章 材料与amp;方法

## 2.1 实验材料

## 2.1.1 酶的种类

表 2-1 酶

Table 2-1 Enzyme

酶种类	酶来源
$\beta$ -G (EC 3.2.1.21, 来源于杏仁, 冻干粉, 活性 $\geq 100,000 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	北京百灵威科技有限公司
GOD (EC 1.1.3.4, 来源于黑曲霉, 冻干粉, 活性 $> 180 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	上海阿拉丁试剂有限公司
HRP (EC 1.11.1.7, 来源于辣根, 冻干粉, 活性 $> 200 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	上海麦克林生化科技有限公司

## 2.1.2 主要试剂

实验所用的主要试剂如表 2-2 所示。

表 2-2 主要试剂

Table 2-2 Main reagents

药品	药品来源
磷酸二氢钾	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸, 柠檬酸钠	国药集团化学试剂有限公司
盐酸, 氢氧化钠	国药集团化学试剂有限公司
碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )	国药集团化学试剂有限公司
过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%)	国药集团化学试剂有限公司
戊二醛(GA, 25%)	国药集团化学试剂有限公司
乙二胺四乙酸二钠(EDTA, 二水)	国药集团化学试剂有限公司
磷酸氢二钾, 三水	上海泰坦科技股份有限公司
无水氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )	上海泰坦科技股份有限公司
无水碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 葡萄糖	上海泰坦科技股份有限公司
聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)	上海阿拉丁试剂有限公司
D-纤维二糖	上海阿拉丁试剂有限公司
愈创木酚	上海麦克林生化科技有限公司
牛血清蛋白	生工生物工程(上海)股份有限公司
考马斯亮蓝染色剂 G250	生工生物工程(上海)股份有限公司
聚(烯丙胺盐酸)(PAH)	上海易恩化学技术有限公司
4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(p-NPG)	上海易恩化学技术有限公司

### 2.1.3 主要仪器与设备

实验所用的主要仪器与设备如表 2-3 所示

表 2-3 主要仪器与设备

Table 2-3 Main instruments and equipment

主要仪器设备名称	生产厂家
全波长酶标仪	美国 BioTek 仪器有限公司
小型高速离心机	德国 Eppendorf 公司
台式高速冷冻离心机	上海卢湘仪仪器有限公司
4°C, -20°C 冰箱	海尔集团公司
立式高压蒸汽灭菌锅	美国 Zealway 有限公司
pH 计	瑞士 Mettler-Toledo 公司
数显恒温水浴锅	上海博讯实业有限公司
DSHZ-300A 水浴摇床	太仓市强乐设备有限公司
可见光分光光度计	上海菁华科技仪器有限公司
分析天平	上海奥豪斯仪器有限公司
Zeta 电位分析仪	英国马尔文仪器有限公司
扫描电子显微镜	荷兰 Fei 公司
冷场发射扫描电子显微镜	日本日立有限公司
X 射线衍射仪	德国 Bruker 公司
傅里叶变换红外光谱仪	美国尼高力仪器公司

### 2.1.4 缓冲液及相关试剂

#### (1) 缓冲液配制

磷酸盐缓冲液：使用无水磷酸二氢钾和磷酸氢二钾，配制浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液(pH 适用范围为 5.5-9.0)，保存在  $4^\circ\text{C}$  条件下备用。

柠檬酸缓冲液：使用柠檬酸和柠檬酸钠，配制浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 适用范围为 3.5-5.5)，保存在  $4^\circ\text{C}$  条件下备用。

#### (2) 酶溶液配制

原位固定的酶溶液配制：1 mg  $\beta$ -G 溶解于 1 mL 浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸缓冲液中 (pH 值为 5.0)；1 mg GOD 溶解于 1 mL 浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸缓冲液中 (pH 值为 4.0)；1 mg HRP 溶解于 1 mL 浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液中 (pH 值为 7.0)。

逐层固定的酶溶液配制：1 mg  $\beta$ -G 溶解于 1 mL 浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸缓冲液 (pH 值为 5.0)；1 mg GOD 溶解于 1 mL 浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (pH 值为 5.5)；1 mg HRP 溶解于 1 mL 浓度为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (pH 值为 6.0)。考虑在保持酶最佳酶活力范围内，调节酶表面所带电荷用于逐层固定，因此逐层固定中酶溶液配制方法不同于原位固定。

### (3) 相关试剂配制

CaCl<sub>2</sub> 水溶液：分别配制浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的 CaCl<sub>2</sub> 水溶液；

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液：分别配制浓度为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5 mol·L<sup>-1</sup> 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液；

GA 水溶液：分别配制浓度为 2%、3%、4%、5% 和 6% 的 GA 水溶液；

EDTA 水溶液：分别配制浓度为 0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 mol·L<sup>-1</sup> 的 EDTA 水溶液。

p-NPG 水溶液：分别配制浓度为 2、5、10、15、20、25 mmol·L<sup>-1</sup> 的 p-NPG 水溶液。

葡萄糖水溶液：分别配制浓度为 35、40、45、50、55、60、65 mmol·L<sup>-1</sup> 的葡萄糖水溶液。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液：分别配制浓度为 30、60、90、120、150、180 mmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 制备 CaCO<sub>3</sub> 模板

使用 CaCl<sub>2</sub> 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 作为模板制备原料，通过两者共沉淀可得到 CaCO<sub>3</sub> 模板。取 0.5 mL 浓度为 0.30 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>，混合摇匀后快速加入 1 mL 浓度为 0.15 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液，充分混合 1 min。共沉淀物在冷冻离心机 4°C 8000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 7 min，离心去上清后加入去离子水，4°C 8000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 5 min 洗涤 3 次，即得到 CaCO<sub>3</sub> 模板，CaCO<sub>3</sub> 模板在 37°C 真空干燥箱进行干燥收集。

### 2.2.2 CaCO<sub>3</sub> 原位固定酶

(1) 量取依照原位固定配制的游离酶溶液各 1 mL，充分混合三种游离酶溶液。

(2) 常温条件下，取 0.5 mL 浓度为 0.30 mol·L<sup>-1</sup> 的 CaCl<sub>2</sub> 水溶液和 0.5 mL 的混合酶液，均匀混合后，快速加入 1 mL 浓度为 0.15 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液后混合 1 min，在 4°C 8000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 7 min 后去上清，沉淀物去离子水洗涤 3 次，得到共沉淀颗粒。

(3) 共沉淀颗粒中加入浓度为 3% 的 GA 水溶液，常温条件下静置 3 h 用于交联，随后相同条件下离心去上清，去离子水洗涤沉淀物 3 次，得到交联后的共沉淀颗粒。

(4) 交联后的共沉淀颗粒中加入 0.25 mol·L<sup>-1</sup> EDTA 水溶液(pH 值为 7.5)，25°C 下震荡 30 min 用于去除 CaCO<sub>3</sub>，随后离心去上清，沉淀物去离子水洗涤 3 次，最终得到原位固定化酶聚集体微粒。

### 2.2.3 构建 PAH-CaCO<sub>3</sub> 和 PSS-CaCO<sub>3</sub> 微球

PAH-CaCO<sub>3</sub> 微球：配制 4 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度的 PAH 水溶液，PAH 是带正电荷的聚电解质。取 0.5 mL 0.3 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 水溶液，0.5 mL PAH，均匀混合后快速加入 1 mL 0.15 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液，常温条件下搅拌 1 min，沉淀 3 min，将共沉淀颗粒 4°C 8000 r·min<sup>-1</sup> 离心 7 min，得到共沉淀颗粒，去离子水洗涤 3 次，即得到 PAH-CaCO<sub>3</sub> 微球。

PSS-CaCO<sub>3</sub> 微球：配制 2 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度的 PSS 水溶液，PSS 是带负电荷的聚电解质。取 0.5 mL 0.3 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 水溶液，0.5 mL PAH，均匀混合后快速加入 1 mL 0.15 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液，常温条件下搅拌 1 min，沉淀 30 min，将共沉淀颗粒 4°C 8000 r·min<sup>-1</sup> 离心 7 min，得到共沉淀颗粒，去离子水洗涤 3 次，PSS-CaCO<sub>3</sub> 微球。

#### 2.2.4 逐层固定多酶

利用静电相互作用力进行多酶的逐层固定，使用 PAH-CaCO<sub>3</sub> 微球和 PSS-CaCO<sub>3</sub> 微球作为固定模板，多酶级联反应中酶的固定顺序影响整体体系的催化反应效率，而催化效率很大程度上取决于级联反应中每种酶的动力学性能，因此根据酶的电荷特性，建立了 12 种多酶逐层自组装的结构。

以 PAH-CaCO<sub>3</sub> 微球为模板，采用以下 6 种结构：(1) PAH-CaCO<sub>3</sub>--β-G--HRP--GOD；(2) PAH-CaCO<sub>3</sub>--β-G--PAH--GOD--HRP；(3) PAH-CaCO<sub>3</sub>--GOD--HRP--β-G；(4) PAH-CaCO<sub>3</sub>--GOD--PAH--β-G--HRP；(5) PAH-CaCO<sub>3</sub>--PSS--HRP--GOD--PAH--β-G；(6) PAH-CaCO<sub>3</sub>--PSS--HRP--β-G--PAH--GOD。

以 PSS-CaCO<sub>3</sub> 微球为模板，采用以下 6 种结构：(1) PSS-CaCO<sub>3</sub>--HRP--GOD--PAH--β-G；(2) PSS-CaCO<sub>3</sub>--HRP--β-G--PAH--GOD；(3) PSS-CaCO<sub>3</sub>--PAH--GOD--HRP--β-G；(4) PSS-CaCO<sub>3</sub>--PAH--GOD--PAH--β-G--HRP；(5) PSS-CaCO<sub>3</sub>--PAH--β-G--HRP--GOD；(6) PSS-CaCO<sub>3</sub>--PAH--β-G--PAH--GOD--HRP。

以 PAH-CaCO<sub>3</sub> 微球为模板，(1) 结构为例子，进行逐层固定的具体步骤为：

(1) 在 PAH-CaCO<sub>3</sub> 微球中加入 1 mL β-G，均匀震荡混合 15 min，4°C 8000 r·min<sup>-1</sup> 离心 7 min 后去上清，去离子水洗涤共沉淀颗粒 3 次；

(2) 添加浓度为 3% 的 GA 水溶液静置交联 2 h，同条件下震荡并离心、洗涤 3 次，加入 1 mL HRP，均匀震荡混合 15 min，4°C 8000 r·min<sup>-1</sup> 离心 7 min 后去上清，洗涤 3 次；

(3) 添加浓度为 3% 的 GA 水溶液静置交联 2 h，同条件下震荡并离心、洗涤 3 次。以相同的方式固定 GOD。

(4) 按照结构完成逐层固定后，得到的共沉淀微粒中加入 0.25 mol·L<sup>-1</sup> EDTA 水溶液，25°C 下震荡洗涤 30 min，离心去上清，沉淀物洗涤 3 次，最终得到逐层固定化酶聚集体颗粒。在逐层固定中 PAH (2 mg·mL<sup>-1</sup>) 和 PSS (4 mg·mL<sup>-1</sup>) 作为聚电解质，同样可以作为电荷补充添加在固定结构中，添加 PAH 或 PSS 层时，不需要添加 GA 进行交联。此外，使用 PSS-CaCO<sub>3</sub> 为固定模板时，每一步骤震荡后，静置 30 min。

#### 2.2.5 动力学参数测定

分别配制 1、2、5、7.5、10、15、20 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度的 p-NPG 水溶液，加入 0.2 mL 的 p-NPG，0.6 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 值为 5.0)和 0.2 mL β-G，在 55°C 条件下反应 1 h，测定 β-G 酶活力随 p-NPG 浓度的变化曲线。反应结束后，立刻加入 2.5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应，测定吸光度值 A<sub>400</sub>。

分别配制 35、40、45、50、55、60、65 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度的葡萄糖水溶液。加入 1 mL 葡

葡萄糖水溶液、0.1 mL 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 愈创木酚水溶液、0.05 mL HRP 和 0.05 mL GOD 均匀混合，测定 GOD 酶活力随葡萄糖浓度的变化曲线。

分别配制浓度为 30、60、90、120、150、180 mmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液。加入 2.8 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)、0.1 mL 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 愈创木酚水溶液、0.05 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 0.05 mL HRP 均匀混合，测定 HRP 酶活力随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的变化曲线。

根据 Lineweaver-Burk 作图法，分别获得 β-G、GOD 和 HRP 的动力学常数  $K_m$  值和  $V_{max}$  值。计算得到  $K_{cat}$  值和  $K_{cat}/K_m$  值。 $K_{cat}$  (s<sup>-1</sup>)计算公式：

$$\frac{\text{酶的分子量} \times V_{max}}{60} \quad (1)$$

(1)式中

$V_{max}$ ：最大反应速率(mmol·min<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>)。

### 2.2.6 最适 pH 和温度测定

在缓冲液中进行游离酶和固定化酶中 β-G、GOD 和 HRP 的最适 pH 和最适温度测定，由于三种酶的酶学性质具有差异性，因此选择不同的数值范围进行测定。

其中 β-G 的 pH 测定范围为 3-9，温度为 30-70℃；GOD 的 pH 测定范围为 3.5-8.5，温度为 20-60℃；HRP 的 pH 测定范围为 5-9，温度为 15-45℃。将最高酶活力定为 100%，以百分比计算出其他条件下的相对酶活力。

### 2.2.7 多酶级联反应测定

β-G、GOD 和 HRP 三种酶能够构建多酶级联反应体系，其具体的反应过程为：纤维二糖作为反应底物，通过 β-G 催化生成葡萄糖，葡萄糖在 GOD 作用下生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，HRP 分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生氧气，氧气氧化愈创木酚可得到黄棕色产物。该级联反应为显色反应，根据有无显色出现，可判断级联反应是否正常进行，同时可根据显色程度，判断反应速率。

取 0.6 mL 酶溶液，0.3 mL 纤维二糖水溶液，其中游离酶需提前稀释与固定化酶相同倍数。混合溶液在 55℃水浴锅中预热 1 h，随后降温保存至 40℃，继续反应 10 min，反应结束后将混合溶液冷却至 25℃，加入愈创木酚显色试剂，测定 2 min 吸光度 A<sub>470</sub>。

### 2.2.8 储存稳定性测定

将固定化酶重悬于磷酸盐缓冲液中并稀释相同倍数，放置在 4℃条件下进行 7 天短期储存，测定 7 天内的酶活力变化，同时，将固定化酶放置-20℃条件下进行 30 天长期储存，测定 30 天内的酶活力变化。将初始酶活力定为 100%，测定的残余酶活力除以初始酶活力，通过百分比计算得到剩余酶活力。其中，-20℃下冷冻的固定化酶溶液，在测定前需在常温下解冻，随后通过水浴进行加热，在酶的最适温度条件下进行酶活力测定。

### 2.2.9 固定化酶的重复使用性测定

分别测定固定化酶的重复使用性以及整体进行级联反应的重复使用性验证。

固定化酶的重复使用性测定：分别测定固定化多酶中三种酶的酶活力，第一次测定结

束后, 将所有得到的反应溶液通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 固定化酶截留在滤膜上, 在 37°C 真空干燥箱中进行干燥, 随后收集截留的固定化酶, 进行下一轮的酶活力测定。将初始酶活力定为 100%, 测定的残余酶活力除以初始酶活力, 通过百分比计算得到剩余酶活力。以此表示固定化酶的可重复使用性。

重复使用固定化酶进行级联反应测定: 依照级联反应测定方式, 在完成第一次级联反应之后, 将所有反应溶液通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 以此截留固定化酶, 随后 37°C 下干燥滤膜并收集固定化酶, 进行下一轮的级联反应测定, 该测定结果以吸光度数值  $A_{470}$  表示。

## 2.3 分析方法

### 2.3.1 酶活力测定

根据参考文献并进行修改测定  $\beta\text{-G}$  的酶活力<sup>[112]</sup>。取 0.6 mL 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH=5.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 0.2 mL 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  p-NPG, 0.2 mL 稀释酶液充分混合, 混合溶液 55°C 下水浴 1 h, 反应结束后, 立即加入 2.5 mL 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 随后测定吸光度值  $A_{400}$ 。每次测定 3 个平行实验, 同时做空白对照, 空白对照将酶液更换为去离子水, 根据对硝基苯酚标准曲线求得反应所生成的对硝基苯酚量。 $\beta\text{-G}$  的酶活单位(U)定义为每分钟水解生成 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚所需要的酶量。

对硝基苯酚标准曲线的绘制: 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液作为溶剂, 分别配制浓度为 2、5、10、15、20、25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的对硝基苯酚标准溶液, 每次测定 3 个平行实验, 同时做空白对照实验。横坐标为对硝基苯酚浓度, 纵坐标为吸光度值  $A_{400}$ 。

根据参考文献并进行修改测定 GOD 的酶活力<sup>[113]</sup>。取 1 mL 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  葡萄糖水溶液、0.1 mL 0.02  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  愈创木酚水溶液、0.05 mL 25°C 下储存的 HRP 和 0.05 mL 40°C 下储存的 GOD 均匀混合, 测定 1 min 的吸光度值  $A_{436}$ 。GOD 的酶活单位(U)定义为每分钟催化葡萄糖生成 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  所需要的酶量。酶活力( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )计算公式:

$$\frac{\Delta A_{436} \times V_t \times \text{酶稀释倍数}}{25.5 \times t \times V_s} \quad (2)$$

(2)式中

25.5: 愈创木酚在 470 nm 时摩尔吸光系数;

$V_t$ : 反应液总体积(mL);

t: 反应测定时间(min);

$V_s$ : 反应液中酶液体积(mL)。

根据参考文献测定 HRP 的酶活力<sup>[114]</sup>。取 2.8 mL 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液(pH=7.0)、0.1 mL 0.02  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  愈创木酚水溶液、0.05 mL 90  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  和 0.05 mL HRP 均匀混合, 测定 2 min 的吸光度值  $A_{470}$ 。HRP 的酶活单位(U)定义为每分钟内  $A_{470}$  变化 0.01 所需要的酶量。酶活力( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )计算公式:

$$\frac{4 \times \Delta A_{470} \times V_t \times \text{酶稀释倍数}}{26.6 \times t \times V_s} \quad (3)$$

(3)式中

26.6: 愈创木酚在 470 nm 时摩尔吸光系数;

$V_t$ : 反应液总体积(mL);

$t$ : 反应测定时间(min);

$V_s$ : 反应液中酶液体积(mL)。

### 2.3.2 蛋白质含量和载酶量测定

蛋白质含量测定使用 Bradford 法, 利用全波长酶标仪进行测定。取 50  $\mu\text{L}$  酶液, 加入 250  $\mu\text{L}$  考马斯亮蓝溶液试剂, 反应 3 min, 测定吸光度值  $A_{595}$ , 每组做 3 次平行实验, 通过牛血清蛋白标准曲线计算蛋白质含量。初始总酶蛋白含量与未固定酶蛋白含量之差除以初始的总酶蛋白含量, 通过百分比计算得到载酶量。

### 2.3.3 Zeta 粒径与电位分析

在 Zeta 分析仪上可分别进行物质的粒径和电位测定, 测定样品为水溶液配制的体系, 样品测定前需通过 0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜过滤。

### 2.3.4 扫描电子显微镜(SEM)分析

使用 SEM 测定样品的表面形态, 在 10 kV 电压条件下, 拍摄不同倍数下的样品图。

### 2.3.5 傅里叶红外吸收光谱分析(FTIR)

本实验对固定化酶去除模板前后的样品分别通过 FTIR 测定, 采集谱图并进行比对。用于测定的固定化酶, 需提前在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行真空干燥。

### 2.3.6 X 射线衍射仪(XRD)

使用 XRD 测定物质的晶体结构, 对物质结构进行定性分析。检测参数为: 初始电压 30 kV, 电流 10 mA, 最大扫描速度 10  $\text{deg} \cdot \text{min}^{-1}$ , 扫描范围 5-90 $^{\circ}$ 。数据通过 MDI Jade 6 进行结果数据分析。

## 第三章 结果与讨论

### 3.1 多酶共固定的模板构建

模板的选择和制备方式影响了后续固定化酶的相关性能，本研究先对  $\text{CaCO}_3$  模板和以  $\text{CaCO}_3$  为载体构建的微球方法分别进行探索，尝试通过分析模板合成的条件因素，进一步控制模板的形成过程以及形态特征。

#### 3.1.1 $\text{CaCO}_3$ 模板构建及形态表征

通过调整  $\text{CaCO}_3$  的制备条件，能够获得不同孔径、不同结构的  $\text{CaCO}_3$ <sup>[88]</sup>， $\text{CaCO}_3$  的合成过程受到温度、pH、合成底物浓度等影响，此外， $\text{CaCO}_3$  的结构会影响固定化过程中酶的负载量、传质速度，进而影响到固定化酶的酶学性能、催化效率等<sup>[93]</sup>，因此有必要对  $\text{CaCO}_3$  模板的构建过程进行初步研究。本研究使用  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  作为合成  $\text{CaCO}_3$  的原料，以共沉淀法制备出球霏石型  $\text{CaCO}_3$  和方解石型  $\text{CaCO}_3$ ，具体制备条件如表 3-1 所示：

表 3-1 制备球霏石型  $\text{CaCO}_3$  和方解石型  $\text{CaCO}_3$  的条件

Table 3-1 The conditions for preparing calcite and vaterite  $\text{CaCO}_3$

	球霏石型	方解石型
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$0.30 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2$	$0.30 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.30 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
混合搅拌时间	1 min	10 min
制备温度	$40^\circ\text{C}$	$25^\circ\text{C}$
离心条件	$10^\circ\text{C}$	$4^\circ\text{C}$

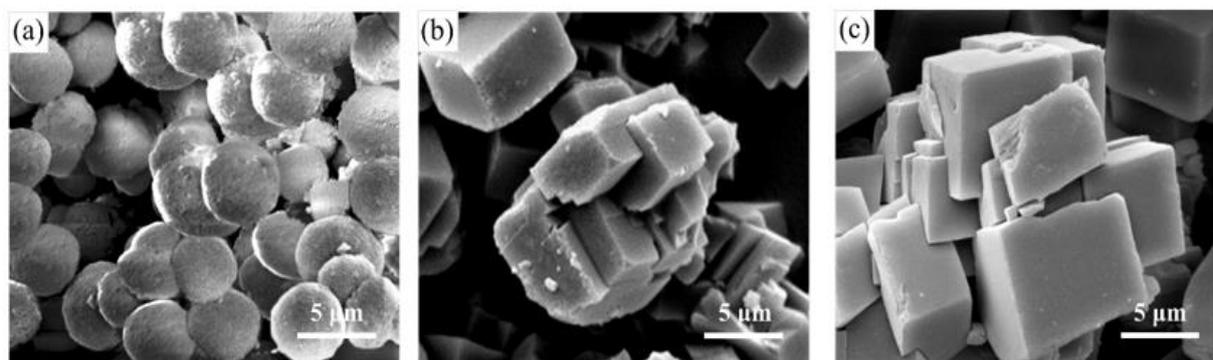


图 3-1 球霏石型  $\text{CaCO}_3$  和方解石型  $\text{CaCO}_3$  SEM 图

Fig. 3-1 SEM diagrams of vaterite  $\text{CaCO}_3$  and calcite  $\text{CaCO}_3$

注：(a)为球霏石型  $\text{CaCO}_3$ ；(b)为方解石型  $\text{CaCO}_3$ ；(c)为商品  $\text{CaCO}_3$

通过 SEM 测定两种结构得到的形态表征如图 3-1 所示。通过探究的不同条件能够有效得到两种  $\text{CaCO}_3$  晶体结构,且晶体结构形态完整,如 3-1 (a)所示,单一的球霰石型  $\text{CaCO}_3$  呈明显的球体形态,形态完整且表面光滑,整体结构紧凑,单一的方解石型  $\text{CaCO}_3$  呈尺寸稍大的立体形态,整体结构相较球霰石型结构分散。在制备过程中,球霰石型  $\text{CaCO}_3$  条件要求较为严格,需要在  $40^\circ\text{C}$  的温度环境下才能够显现完整的、较均一的晶体形态。此外,通过观察发现,当球霰石型  $\text{CaCO}_3$  放置在常温条件下,会在一定时间之后转变为方解石型  $\text{CaCO}_3$  的晶体结构。3-1 (c)所示为在常温状态下的商品  $\text{CaCO}_3$  晶体结构,其结构呈清晰的立体形态,对比 3-1 (b)所示制备的方解石型  $\text{CaCO}_3$  结构,两者结构相似,但制备得到的方解石型  $\text{CaCO}_3$  晶体尺寸略小,同时也进一步说明方解石型是  $\text{CaCO}_3$  长期储存的稳定结构<sup>[115]</sup>。

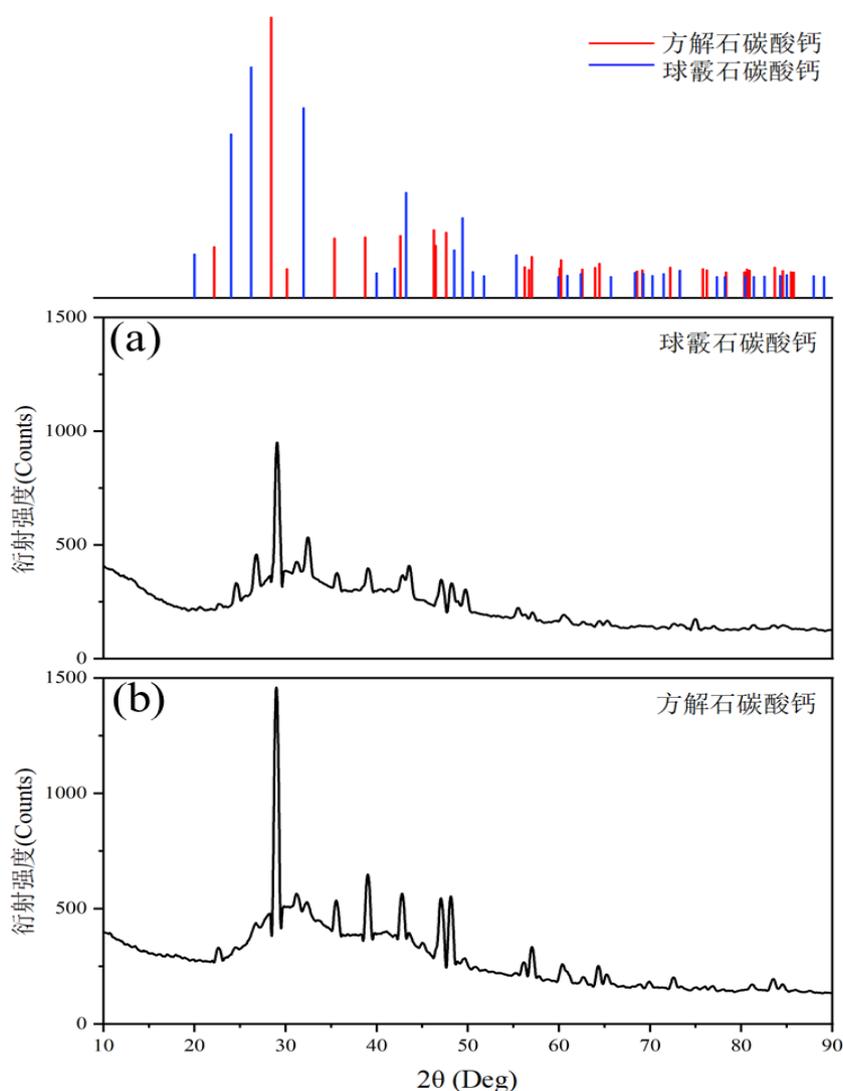


图 3-2 球霰石型  $\text{CaCO}_3$  和方解石型  $\text{CaCO}_3$  XRD 图

Fig. 3-2 XRD diagrams of vaterite  $\text{CaCO}_3$  and calcite  $\text{CaCO}_3$

注: (a)为球霰石型  $\text{CaCO}_3$ ; (b)为方解石型  $\text{CaCO}_3$

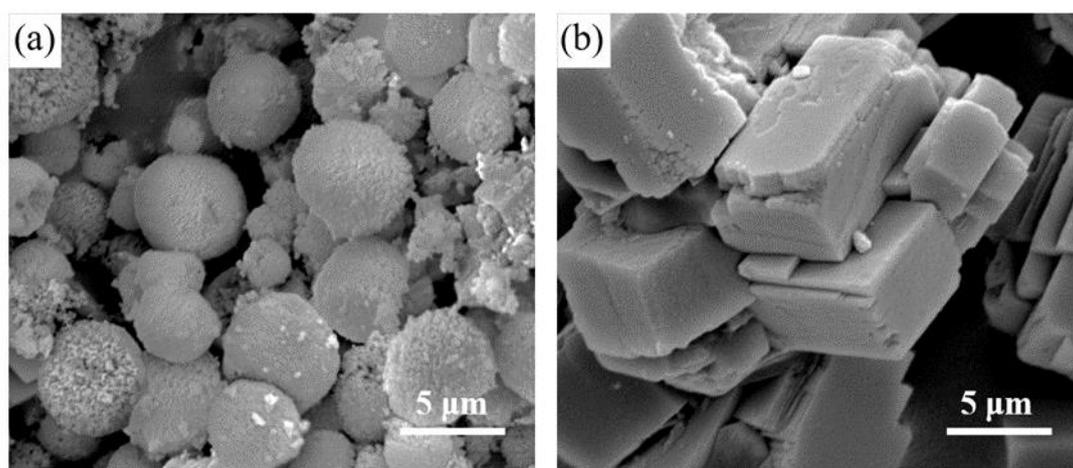
通过 XRD 测定两种结构得到的晶体分析结果如图 3-2 所示。XRD 分析结果证实了制备的两种  $\text{CaCO}_3$  晶体结构符合方解石和球霰石晶体的衍射峰值,在  $2\theta$  处测定到方解石

的特征衍射峰值为 23.02 (012), 29.18 (104), 36.06 (110), 39.38 (113), 43.21 (202), 47.03 (024), 48.20 (116), 验证了能够根据实验条件得到方解石型  $\text{CaCO}_3$ , 同时, 在  $2\theta$  处测定到球霏石的特征衍射峰值为 24.87 (100), 27.03 (101), 32.71 (102), 42.56 (004), 43.80 (110), 验证了根据实验条件可获得球霏石型  $\text{CaCO}_3$ 。另外, 在  $2\theta$  为 29.18 (104) 处球霏石也出现明显特征峰, 说明其结构中含有方解石型结构, 进一步证实了部分球霏石在常温保存后会转换为方解石结构<sup>[115]</sup>。使用两种晶体结构  $\text{CaCO}_3$  进行单酶和多酶的原位固定, 分别测定载酶量, 结果如表 3-2 所示。结果表明, 不论是固定化单酶或多酶, 方解石型  $\text{CaCO}_3$  的载酶量均高于球霏石型  $\text{CaCO}_3$  的载酶量, 其中 GOD 的载酶量最高, 在方解石型  $\text{CaCO}_3$  和球霏石型  $\text{CaCO}_3$  中 GOD 的载酶量分别为  $67.34\pm 3.37\%$  和  $58.94\pm 2.95\%$ , 而 HRP 的载酶量最低, 在球霏石型  $\text{CaCO}_3$  中载酶量仅为  $16.42\pm 0.82\%$ , 由此说明球霏石型  $\text{CaCO}_3$  不适用于本实验中涉及的酶的固定化。

表 3-2 球霏石型和方解石型  $\text{CaCO}_3$  的载酶量Table 3-2 Enzyme loading of vaterite  $\text{CaCO}_3$  and calcite  $\text{CaCO}_3$ 

结构类型	$\beta$ -G	GOD	HRP	混合多酶
方解石型	$43.96\pm 2.20\%$	$67.34\pm 3.37\%$	$29.70\pm 1.49\%$	$55.40\pm 2.77\%$
球霏石型	$38.45\pm 1.92\%$	$58.94\pm 2.95\%$	$16.42\pm 0.82\%$	$41.68\pm 2.08\%$

随后研究了两种  $\text{CaCO}_3$  晶体结构的稳定性, 结果如图 3-3 所示。两种  $\text{CaCO}_3$  结构同时进行 14 天储存, 14 天后如图 3-3 (b) 所示, 方解石型  $\text{CaCO}_3$  出现了堆叠现象, 表面有少量破碎, 但整体结构趋于完整, 而球霏石型  $\text{CaCO}_3$  (3-3 (a)) 出现破碎, 大部分结构从内部塌陷, 且发生粘连现象。因此, 通过对比测定, 本实验选择使用方解石型  $\text{CaCO}_3$  的制备方式用于固定化酶的模板制备。

图 3-3 14 天储存后的球霏石型  $\text{CaCO}_3$  和方解石型  $\text{CaCO}_3$  SEM 图Fig. 3-3 SEM diagrams of vaterite  $\text{CaCO}_3$  and calcite  $\text{CaCO}_3$  after 14 days of storage

注: (a)为球霏石型  $\text{CaCO}_3$ ; (b)为方解石型  $\text{CaCO}_3$

### 3.1.2 PAH-CaCO<sub>3</sub> 和 PSS-CaCO<sub>3</sub> 的构建与表征

为有效利用静电相互作用力实现多酶的逐层固定，选择以 CaCO<sub>3</sub> 和不同电荷性质的聚电解质为原料，分别构建 PAH-CaCO<sub>3</sub> 和 PSS-CaCO<sub>3</sub> 微球作为逐层固定模板。已有研究表明，PSS、PAH 和 CaCO<sub>3</sub> 在形成微球的过程中，并不完全包埋于 CaCO<sub>3</sub> 结构内部，而是有一部分 PSS 和 PAH 能够保留在 CaCO<sub>3</sub> 结构表面上<sup>[91]</sup>，由此可使整体的 CaCO<sub>3</sub> 微球带有不同的电荷特性，有助于进行后续多酶逐层固定的相关实验。

构建的 PAH-CaCO<sub>3</sub> 和 PSS-CaCO<sub>3</sub> 结构形态表征如图 3-4 所示。由图显示可说明制备 PAH-CaCO<sub>3</sub> 和 PSS-CaCO<sub>3</sub> 的方法具有可行性，能够得到形态完整的 PAH-CaCO<sub>3</sub> 和 PSS-CaCO<sub>3</sub> 微球结构，其中 PAH-CaCO<sub>3</sub> 成明显的立体形态，其整体结构分散均匀，单一结构形态相似，无破碎和发生粘连现象。而 PSS-CaCO<sub>3</sub> 结构呈明显的球体形态，表面均匀且结构分散，有小部分单一结构发生黏连现象，且表面较粗糙有颗粒脱落，但未对单一结构形态造成较大影响。

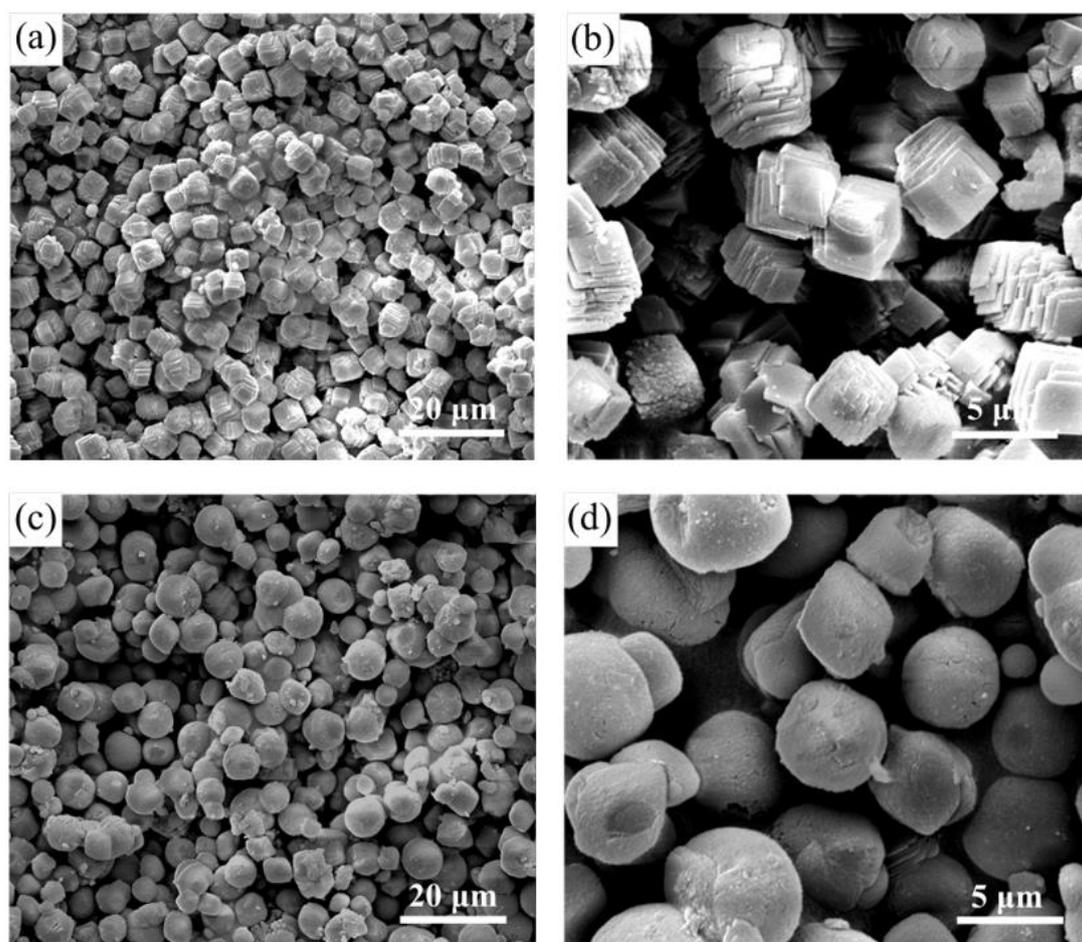


图 3-4 PAH-CaCO<sub>3</sub> 和 PSS-CaCO<sub>3</sub> 结构形态表征

Fig. 3-4 Characterization of PAH-CaCO<sub>3</sub> and PSS-CaCO<sub>3</sub> structures

注：(a)为 PAH-CaCO<sub>3</sub> 3000 倍 SEM 图；(b)为 PAH-CaCO<sub>3</sub> 10000 倍 SEM 图  
(c)为 PSS-CaCO<sub>3</sub> 3000 倍 SEM 图；(d)为 PSS-CaCO<sub>3</sub> 10000 倍 SEM 图

## 3.2 酶的条件测定

### 3.2.1 波长选择的影响

已有研究表明,不同波长的选择会影响  $\beta$ -G 酶活力测定的精确程度<sup>[95]</sup>,由此本研究选择在 390-420 nm 波长范围内研究不同波长与  $\beta$ -G 反应吸光度值的线性相关性,结果如图 3-5 所示。

对不同波长测定条件下得到的吸光度值进行数据线性拟合,对硝基苯酚在 400 nm 处标准曲线的线性回归方程为  $y=3.5889x+0.0264$ ,  $R^2=0.99$ ,是测定结果中线性拟合程度最高的波长测定条件,因此选择在 400 nm 波长下进行后续  $\beta$ -G 酶学性质的测定。

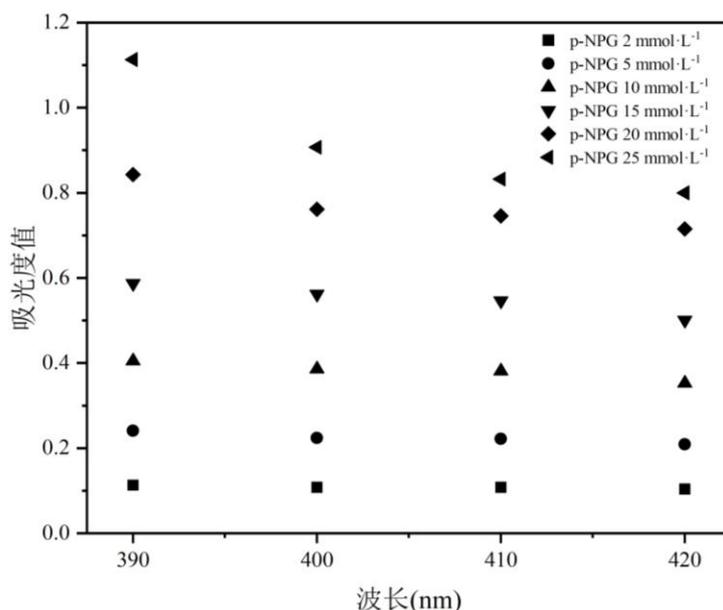


图 3-5 不同波长对  $\beta$ -G 吸光度的影响

Fig. 3-5 Absorbance of  $\beta$ -G solutions at different wavelengths

### 3.2.2 测定反应时间和底物浓度对酶的影响

在 400 nm、436 nm、470 nm 波长条件下使用分光光度计分别进行不同反应时间和底物浓度对  $\beta$ -G、GOD 和 HRP 的影响测定,实验结果如图 3-6 所示。 $\beta$ -G 在整体体系中反应 60 min 后,吸光度变化趋于平稳。GOD 反应速度较快,对其进行 180 s 连续吸光度的测定,反应 1 min 之后,吸光度值趋于平稳。HRP 反应整体过程相对稳定,吸光度随反应时间增加,在反应 2 min 后,吸光度变化开始趋于平稳。由此分别选择 60 min、1 min 和 2 min 作为  $\beta$ -G、GOD 和 HRP 后续酶活力测定的优化条件。

底物浓度已被证实会影响酶活性<sup>[114]</sup>。 $\beta$ -G、GOD 和 HRP 分别受底物 p-PNG、葡萄糖和  $H_2O_2$  浓度的影响。当 p-PNG 的浓度在 2-20 mmol·L<sup>-1</sup> 范围内, $\beta$ -G 不易受底物的抑制,吸光度随底物浓度变化不断增长,底物浓度大于 15 mmol·L<sup>-1</sup> 后,增长曲线速率减小。当葡萄糖浓度为 50 mmol·L<sup>-1</sup> 时,GOD 反应吸光度最高,  $A_{436}$  为 0.843,而当浓度大于 50 mmol·L<sup>-1</sup> 时,GOD 反应受到底物抑制,在浓度为 65 mmol·L<sup>-1</sup>,吸光度降低为 0.741。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/735133004003011114>