

单宁酸功能化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子固定化微泡菌褐藻胶裂解酶的工艺条件优化

焦晓佳¹, 吴利洋¹, 陈艳红^{1,2}, 姜泽东^{1,2}, 倪辉^{1,2}, 李清彪^{1,2}, 朱艳冰^{1,2*}

(1.集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

(2.福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建厦门 361021)

摘要: 该研究探讨单宁酸功能化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子固定化微泡菌褐藻胶裂解酶的工艺条件。以单宁酸功能化磁性纳米粒子 (TA-MNPs) 作为固定化酶的载体, 通过测定固定化酶的活力和酶活回收率优化微泡菌褐藻胶裂解酶的固定化条件, 并利用傅里叶变换红外光谱和透射电镜对固定化酶的结构进行了表征。结果表明, 固定载体量为 10 mg 时, 微泡菌褐藻胶裂解酶的最佳固定化条件如下: 戊二醛浓度为 1.00%, 交联时间为 2 h, 固定化温度为 5 °C, 固定化时间为 8 h, 固定化 pH 为 8.00, 加酶量 1.20 U, 在此条件下固定化酶的活力和酶活回收率达到最大, 分别为 36.56 U/g 和 30.55%。傅里叶变换红外光谱分析显示, 微泡菌褐藻胶裂解酶成功固定在 TA-MNPs 表面。透射电镜结果显示, TA-MNPs 分散性良好, 呈规则球状; 固定化酶有明显的聚集现象, 粒径变化不大。与游离酶相比, 固定化酶的温度稳定性、pH 稳定性和存储稳定性提高。微泡菌褐藻胶裂解酶的固定化条件优化研究为该酶的固定化酶制备及应用打下良好的基础。

关键词: Fe₃O₄ 磁性纳米粒子; 单宁酸功能化; 褐藻胶裂解酶; 固定化酶

文章编号: 1673-9078(2022)02-79-86

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0533

Immobilization of Alginate Lyase from *Microbulbifer* sp. with Tannic Functionalized Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles

JIAO Xiaojia¹, WU Liyang¹, CHEN Yanhong^{1,2}, JIANG Zedong^{1,2}, NI Hui^{1,2}, LI Qingbiao^{1,2}, ZHU Yanbing^{1,2*}

(1.College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

(2.Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China)

Abstract: The immobilization conditions of alginate lyase from *Microbulbifer* sp. were explored in this study. Tannic acid functionalized magnetic nanoparticles (TA-MNPs) were used as the immobilized carrier to optimize the immobilization conditions of alginate lyase by determining the specific activity and activity recovery of the immobilized enzyme. Then the immobilized enzyme was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and transmission electron microscope (TEM). When the carrier amount was determined to be 10 mg, the optimized immobilization conditions for the alginate lyase were determined as follows: glutaraldehyde concentration 1.00%, cross-linking time 2 h, immobilization temperature 5 °C, immobilization time 8 h, immobilization pH 8.00, and enzyme dosage 1.20 U. The immobilization effect was the best under these conditions with the specific activity and activity recovery of 36.56 U/g and 30.55%, respectively. The results of FTIR showed that the alginate lyase was successfully immobilized on the surface of TA-MNPs. The results of TEM showed that TA-MNPs had

引文格式:

焦晓佳,吴利洋,陈艳红,等.单宁酸功能化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子固定化微泡菌褐藻胶裂解酶的工艺条件优化[J].现代食品科技,2022,38(2):79-86

JIAO Xiaojia, WU Liyang, CHEN Yanhong, et al. Immobilization of alginate lyase from *Microbulbifer* sp. with tannic functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 79-86

收稿日期: 2021-05-20

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2020J01679); 福建省海洋经济发展补助资金项目 (FJHJF-L-2020-1)

作者简介: 焦晓佳 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物化学, E-mail: 290424986@qq.com

通讯作者: 朱艳冰 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物化学, E-mail: yanbingzhu@jmu.edu.cn

good dispersion and were regular spherical. After immobilization by TA-MNPs, the immobilized enzyme showed the obvious aggregation and little change in particle size. Compared with the free alginate lyase, the immobilized enzyme enhanced thermal stability, pH stability, and storage stability. Optimization of the immobilization conditions of *Microbulbifer* sp. alginate lyase laid a good foundation for the preparation and application of the immobilized enzyme.

Key words: magnetic nanoparticles; tannic acid functional; alginate lyase; immobilized enzyme

褐藻胶又名海藻酸钠 (alginate), 分子式为 $(C_6H_7NaO_6)_n$, 它是一类从海带和巨藻等藻体中分离提取的线性多糖^[1]。褐藻胶寡糖是褐藻胶降解的低分子聚合物, 它由古罗糖醛酸和甘露糖醛酸两种结构单元组成。由于其分子量低、水溶性好、稳定性高、安全无毒、生物活性突出^[2-7]等特点, 近年来受到研究人员的高度关注。褐藻胶的降解途径主要包括酶法、化学法、物理法等^[8]。褐藻胶寡糖的酶法制备由于具有良好的生物活性且不易被破坏、反应环境条件温和、产物得率高等特点而得到广泛运用。

褐藻胶裂解酶, 是多糖裂解酶的一种, 它可通过 β -消除反应将褐藻胶降解为在非还原端具有双键的不饱和寡糖^[9]。游离酶存在热稳定性差、使用寿命短、回收重复利用难等缺点。固定化酶是利用化学或者物理方法将游离酶与载体结合, 使其固定在有限空间内, 是一种能够保持催化活性且实现可重复使用的酶, 在一定程度上可解决上述问题^[10]。共价结合法、吸附法、包埋法和交联法作为酶固定化的主要方法被广泛报道^[11]。磁性纳米粒子作为一种吸附材料, 不仅具有比表面积大、毒性低、粒径小、生物相容性好等纳米材料的优点, 而且更具有独特的磁学性质, 外加磁场, 易于磁液分离, 操作简便快捷, 可作为酶固定化的载体^[12]。然而, 磁性纳米颗粒的应用因其在水介质中的聚集性而受到限制, 改性对抑制磁性纳米粒子的聚集具有重要作用^[13]。通过适当的表面修饰, 磁性纳米颗粒可以被特殊基团功能化, 有助于防止载体的聚集和氧化, 促进载体与酶分子的有效结合。单宁酸是一种天然的低成本且分子量较高的多酚类物质, 常用作磁性纳米颗粒改性剂^[14]。目前对于褐藻胶裂解酶的研究多数集中在酶的制备、酶学性质表征和发酵工艺优化等方面^[15,16], 对该酶的固定化研究较少。该文以固定化酶的酶活力和酶活回收率为指标, 探索单宁酸功能化 Fe_3O_4 磁性纳米粒子固定化褐藻胶裂解酶的优化工艺条件, 并对固定化酶进行微观结构表征和酶学性质鉴定, 以期对固定化褐藻胶裂解酶的工业应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

$NH_3 \cdot H_2O$ 、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、单宁酸、戊二醛、PEG 6000 等试剂均为分析纯, 购于上海国药集团有限公司。含微泡菌褐藻胶裂解酶基因的大肠杆菌基因工程菌^[17]由集美大学海洋食品与生物工程学院食品生物技术团队构建与保藏。

1.2 仪器与设备

JEOL JEM2100F 透射电镜, 日本 Electronics-Corporation; 8400S 傅里叶变换红外光谱仪, 日本岛津公司; 冷冻干燥仪, 美国 Thermo Fisher 公司; FE20K pH 计, Mettler Toledo 公司; KQ5200DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的制备

载体的制备参考 Atacan 等^[18]的方法, 略加以修改。按 $Fe^{2+}/Fe^{3+}=3/5$ 的比例, 在 400 mL 去离子水中加入 4.17 g 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.02 mol/L) 和 6.76 g 的 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.03 mol/L)。将混合溶液通入 N_2 , 80 °C、200 r/min 搅拌 1 h, 然后迅速加入 40 mL $NH_3 \cdot H_2O$, 反应 30 min 后, 加入 5 g 表面活性剂 PEG 6000, 在 N_2 下再搅拌反应 1 h, 然后冷却至室温。用热水洗涤获得的 Fe_3O_4 纳米粒子 5 次, 期间用磁性分离法分离, 最后在 70 °C 真空干燥箱中干燥过夜。

1.3.2 单宁酸功能化 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的制备

在 40 mL 蒸馏水中加入 2 g Fe_3O_4 磁性纳米粒子并超声 15 min, 得到均匀分散的磁性纳米粒子, 通入 N_2 , 200 r/min、40 °C 持续搅拌 1 h 后加入 2.50% (m/V) 单宁酸溶液, 接着通入 N_2 , 200 r/min、40 °C 持续搅拌 2 h, 将混合物冷却至室温。磁铁收集制备的单宁酸功能化 Fe_3O_4 磁性纳米粒子, 收集物先后用乙醇和去离子水洗涤三次。最后在 70 °C 真空干燥箱中干燥过夜。

1.3.3 褐藻胶裂解酶粗酶液的制备

将已经活化好的重组褐藻胶裂解酶大肠杆菌基因工程菌液按 1.20% 的接种量接种到含有 50 mg/mL 卡那霉素的 250 mL LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 摇动培养至 OD_{600} 值达到 0.60~0.80, 加入 25 μ L 0.50 mol/L 的异丙基- β -D-吡喃半乳糖苷 (IPTG) 溶液, 在

18 ℃、180 r/min 条件下诱导表达 20 h 后。将诱导的菌液置于 4 ℃离心 (8000 r/min、10 min), 取菌体沉淀物重悬于 15 mL 50 mmol/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 8.00) 缓冲液。在低温条件下对菌体进行细胞超声破碎处理 (300 W、10 min), 然后在 4 ℃条件下, 10000 r/min 离心 20 min。取上清液低温保存, 上清液即为褐藻胶裂解酶液。

1.3.4 褐藻胶裂解酶的固定化条件优化

固定单宁酸功能化磁性纳米粒子为 10 mg, 戊二醛交联时间为 3 h、固定化温度为 5 ℃、固定化时间为 3 h、固定化 pH 为 7.00、加酶量为 0.60 U, 以固定化酶活力和酶活回收率为测定指标, 研究不同戊二醛浓度 (V/V, 0.00%、1.00%、2.00%、3.00%、4.00%)、不同戊二醛交联时间 (1、2、3、4 和 5 h)、不同酶固定化温度 (5、15、25、35、45 ℃)、不同酶固定化时间 (1、2、4、6、8 和 10 h)、不同酶固定化 pH (4.00、5.00、6.00、7.00、8.00、9.00 和 10.00)、不同加酶量 (0.60、1.20、1.80、2.40、3.00 和 3.60 U) 对褐藻胶裂解酶固定化的影响。保持其他因素不变, 逐一进行单因素试验, 每个因素最优结果用于下一个单因素试验。

1.3.5 固定化褐藻胶裂解酶的制备

在 50 mL 磨口具塞锥形瓶中加入 0.50 g 单宁酸功能化磁性纳米粒子和浓度为 1.00% 的戊二醛溶液, 超声处理 5 min 后于室温下交联 2 h。反应结束后进行磁分离, 利用去离子水对载体进行清洗, 然后加入 10 mL 溶于 50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 8.00) 缓冲液的褐藻胶裂解酶粗酶液 (60 U), 5 ℃下反应 8 h, 磁分离后, 用去离子水清洗固定化褐藻胶裂解酶, 真空冷冻干燥后, 4 ℃贮藏备用。

1.3.6 酶学性质测定

1.3.6.1 褐藻胶裂解酶的活力测定

利用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法可以测定褐藻胶裂解酶固定化前后的酶活力^[19]。游离酶的活力测定: 取 20 μL 褐藻胶裂解酶粗酶液加入到 180 μL 5 mg/mL 海藻酸钠溶液 (以 pH 8.00、50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液配制海藻酸钠溶液) 中, 混合物在 35 ℃反应 10 min 后, 加入 400 μL DNS 溶液终止反应, 沸水浴 10 min, 在 540 nm 处测吸光度值。固定化酶的活力测定: 用 10 mg 固定化褐藻胶裂解酶替代 20 μL 的游离褐藻胶裂解酶粗酶液, 其余操作同游离酶的活力测定。褐藻胶裂解酶的活力定义: 在上述条件下每分钟生成 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{固定化酶的酶活回收率}/\% = \left(\frac{\text{固定化酶活力}}{\text{加入的游离酶活力}} \right) \times 100\%$$

1.3.6.2 温度对酶活性和稳定性的影响

测定游离酶、固定化酶在不同温度 (25、35、45、55、65 ℃) 条件下的酶活力, 研究温度对酶活性的影响。将游离酶、固定化酶在 35 ℃下温育 1 h 后, 测定酶的残余活力, 表示酶在 35 ℃下的稳定性, 以未经处理的酶活力为 100%。

1.3.6.3 pH 对酶活性和稳定性的影响

分别以 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-柠檬酸}$ 缓冲液 (pH 4.00~6.00)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH 7.00~8.00)、巴比妥钠缓冲液 (pH 8.50~9.00) 和 Gly-NaOH 缓冲液 (pH 9.50~11.00) 作为底物缓冲液, 测定游离酶、固定化酶在不同 pH 条件下的酶活力, 研究 pH 对酶活性的影响。将游离酶、固定化酶在 pH 8.0 下温育 1 h 后, 测定酶的残余活力, 表示酶在 pH 8.0 下的稳定性, 以未经处理的酶活力为 100%。

1.3.6.4 酶的存储稳定性测定

将游离酶和固定化酶分别在 4 ℃条件下贮存 30 d, 每隔 5 d 取样测定酶的残余活力, 计算酶活力的半衰期, 研究酶的存储稳定性。

1.3.6.5 固定化酶的操作稳定性测定

将 10 mg 固定化酶加入 200 μL 5 mg/mL 海藻酸钠底物溶液 (底物溶于 pH 9.50、50 mmol/L Gly-NaOH 缓冲液中), 35 ℃反应 10 min 后, 将固定化酶与反应液进行磁分离, 反应液加入 400 μL DNS 溶液, 沸水浴 10 min, 在 540 nm 处测吸光度值, 测定固定化酶的活力。分离的固定化酶利用去离子水洗涤 3 次后, 进行下一次催化反应。固定化酶连续重复使用 5 次, 研究酶的操作稳定性。

1.3.7 固定化酶的透射电子显微镜和傅里叶红外变换光谱分析

利用透射电子显微镜观察固定化褐藻胶裂解酶、单宁酸功能化 Fe_3O_4 磁性纳米粒子载体的形态。样品用 KBr 压片法制样, 用傅里叶红外变换光谱仪进行检测, 测试范围 4000~400 cm^{-1} 。

1.3.8 数据处理

为保证数据的准确性, 上述各项实验均重复 3 次, 结果用均值 \pm 标准偏差的方式来表示。使用 Excel 365 软件对数据进行分析、Origin 9.00 软件对数据进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 单因素对褐藻胶裂解酶固定化的影响

2.1.1 戊二醛浓度对酶固定化的影响

戊二醛因使用过程简便高效而成为酶固定化中常

用的交联剂之一。戊二醛可以促进酶和载体之间产生多点共价连接,可以减少外部因素对其构象变化造成的干扰,因此提高了酶的稳定性^[20,21]。本研究利用戊二醛作为固定化酶制备的交联剂,研究不同戊二醛浓度对褐藻胶裂解酶固定化的影响。由图1可见,在戊二醛浓度达到1.00%时,褐藻胶裂解酶的固定化效率最高,酶活力和酶活回收率分别达到13.68 U/g和23.08%。交联剂浓度为零时,酶可以通过物理作用吸附在载体表面,但通过物理吸附形成的固定化酶酶活力低于通过戊二醛交联形成的固定化酶的酶活力^[22]。在一定的浓度范围内,随着戊二醛浓度的增加,载体与交联剂会形成戊二醛聚合物,可以使固定化效率提高,固定化酶活力增大^[23];但随着戊二醛浓度的逐渐增大,会导致酶活回收率和酶活力降低,可能是戊二醛分子和载体之间出现交联体,使得酶分子的构象出现变化^[24]。Jiang等^[25]和Chang等^[26]在固定化漆酶、 β -葡萄糖苷酶研究中发现最佳戊二醛浓度分别为8.00%、4 g/L,载体和酶的差异导致最佳条件与本文不同,但在不同戊二醛浓度下,酶的固定化效率与本研究趋势一致。因此本研究确定戊二醛最优的使用浓度为1.00%。

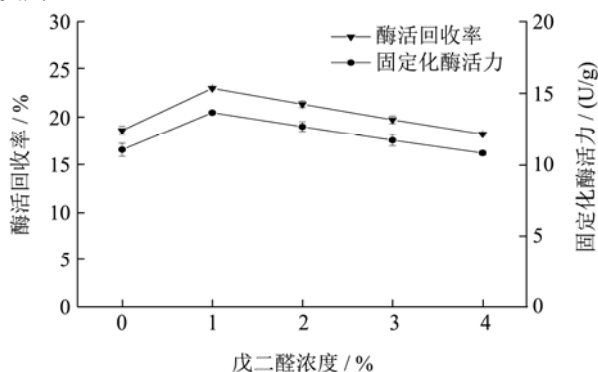


图1 戊二醛浓度对褐藻胶裂解酶固定化的影响

Fig.1 Effects of glutaraldehyde concentration on the immobilization of alginate lyase

2.1.2 交联时间对酶固定化的影响

由图2可见,载体经戊二醛交联2 h后与褐藻胶裂解酶进行固定化,褐藻胶裂解酶的固定化效率最高,酶活力和酶活回收率分别达到15.11 U/g和24.81%。随着交联时间的增加,固定化酶的活力有所降低,可能是因为戊二醛暴露在空气中的时间变长导致其稳定性较差,因为戊二醛的稳定性受到温度、氧气含量等外界因素的影响^[27]。另外,当戊二醛以游离态存在时,所占体积小,容易扩散,很容易与酶分子进行交联;反应过程中形成的戊二醛二聚物可能会导致固定化酶活力的下降^[28]。因此本研究确定戊二醛最优的交联时间为2 h。

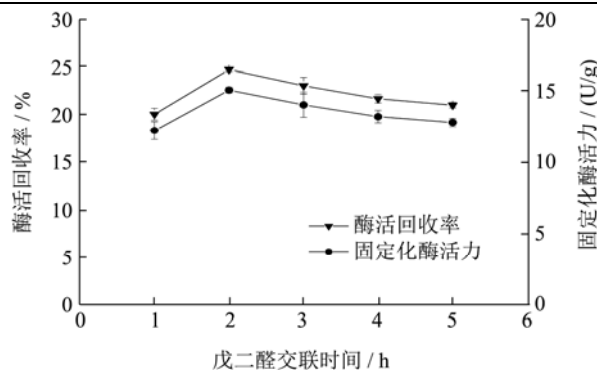


图2 戊二醛交联时间对褐藻胶裂解酶固定化的影响

Fig.2 Effects of glutaraldehyde cross-linking time on the immobilization of alginate lyase

2.1.3 温度对酶固定化的影响

由图3可见,酶的固定化在低温条件下进行比较有利,在5℃下对褐藻胶裂解酶进行固定化,酶活力和酶活回收率达到最大,分别为16.50 U/g和27.09%。随着固定化温度的逐渐变高,褐藻胶裂解酶固定化的效果变差,这是因为较高的温度会使酶活力下降,进而使得固定化酶活力降低。因此本研究确定最优的固定化温度为5℃,肖琼等^[29]报道琼胶酶固定化最佳温度条件与本研究一致。

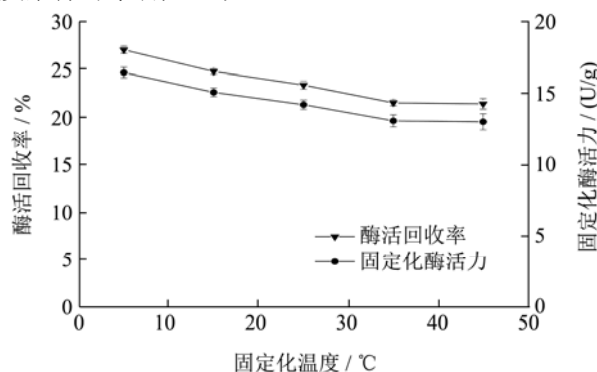


图3 固定化温度对褐藻胶裂解酶固定化的影响

Fig.3 Effect of temperature on the immobilization of alginate lyase

2.1.4 固定化的时间对酶固定化的影响

由图4可见,当褐藻胶裂解酶与载体的固定化时间达到8 h时,酶活力和酶活回收率最大,分别为18.38 U/g和27.98%。这可能是因为固定化时间较短时,酶和载体结合不充分;时间过长,固定上去的酶较多,酶活性中心被掩埋,产生的位阻效会导致固定化酶活力下降。此外,随着固定化时间的延长,游离酶活力下降也是导致酶活回收率和固定化酶活力下降的原因,因此本研究确定最优的固定化时间为8 h。相关研究也有报道随着固定化时间的延长,固定化效率出现先增后降的趋势^[30,31]。另外,阮贵华等以戊二醛为交联剂,在研究磁性纳米粒子对胰蛋白酶固定化时间影

响时发现最佳固定化时间为 4 h, 陈萧萧等利用海藻酸钠固定化脂肪酶与蛋白酶, 确定最佳固定化时间为 30 min。可见固定化载体、固定化酶的种类不同都会对固定化时间造成影响。

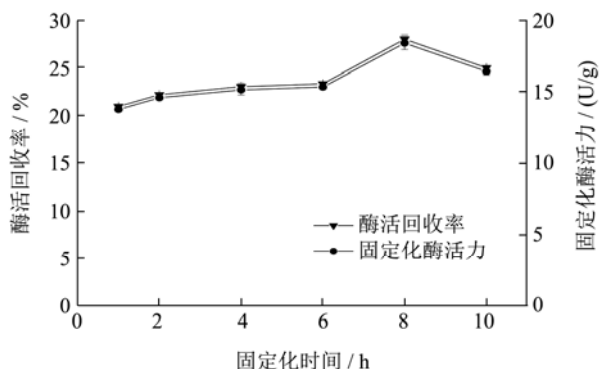


图 4 固定化时间对褐藻胶裂解酶固定化的影响

Fig.4 Effect of immobilization time on the immobilization of alginate lyase

2.1.5 固定化体系 pH 值对酶固定化的影响

pH 值对酶的稳定性和催化性能有一定的影响^[32]。由图 5 可见, 随着 pH 的逐渐增大, 固定化褐藻胶裂解酶的酶活力和酶活回收率呈现先上升后下降的趋势, 说明过酸或者过碱均可能导致固定化酶的活力下降, 固定化酶在微碱环境下酶活力相对较高。这是因为 pH 值影响物质的电离状态, 进而对固定化褐藻胶裂解酶的活力产生了影响。当固定化体系的 pH 值为 8.00 时, 酶活力和酶活回收率均达到最大, 分别为 19.66 U/g 和 29.92%, 因此本研究确定最优的固定化体系 pH 值为 8.00。游离褐藻胶裂解酶^[17]的最适反应 pH 与本研究最优固定化体系 pH 一致, 说明在游离酶最适 pH 条件下进行固定化, 有利于褐藻胶裂解酶固定化效率的提高。

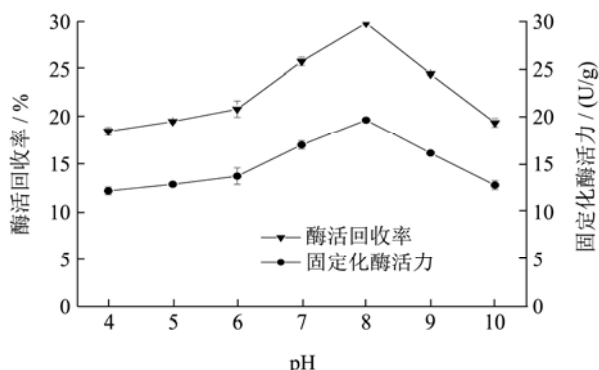


图 5 固定化体系 pH 值对褐藻胶裂解酶固定化的影响

Fig.5 Effect of pH value on the immobilization of alginate lyase

2.1.6 加酶量对酶固定化的影响

由图 6 可见, 当加酶量从 0.60 U 增加到 3.60 U 时,

固定化褐藻胶裂解酶的酶活力和酶活回收率呈现先上升后下降的趋势。当加酶量为 1.20 U 时, 酶活力和酶活回收率均达到最大, 分别为 36.56 U/g 和 30.55%。固定化酶活力及酶活回收率在一定范围内与加酶量呈现正相关性, 可能是因为载体固定的酶量有限, 在低浓度范围内, 随着加酶量的增加, 酶分子与戊二醛的连接几率变大; 继续增加游离酶的量, 酶活力和酶活回收率反而呈下降趋势, 可能是因为游离酶的浓度逐渐变大, 使得载体表面结合的酶趋于饱和, 部分酶分子相互聚集使其活性中心互相掩埋, 影响酶与底物的结合^[33]。因此针对 10 mg 的单宁酸功能化磁性纳米粒子载体, 本研究确定最优的加酶量为 1.20 U。

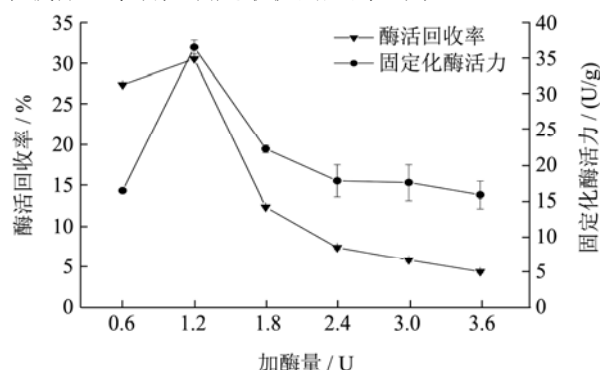


图 6 加酶量对褐藻胶裂解酶固定化的影响

Fig.6 Effect of enzyme concentration on the immobilization of alginate lyase

2.1.7 褐藻胶裂解酶固定化前后酶学性质比较

褐藻胶裂解酶的游离酶和固定化酶的酶学性质比较见表 1 所示。固定化操作没有改变褐藻胶裂解酶的最适反应温度。游离酶的最适反应 pH 为 8.00, 固定化酶的最适反应 pH 为 9.50。在 35 °C 处理 1 h 后, 固定化酶的残余酶活力为 90.10%, 游离酶的残余酶活力为 4.90%。褐藻胶裂解酶在 pH 8.00 条件下处理 1 h 后, 固定化酶的残余酶活力为 94.80%, 游离酶的残余酶活力为 72.30%。上述结果表明, 固定化操作显著提高了褐藻胶裂解酶的温度稳定性和 pH 稳定性。存储稳定性和操作稳定性也是评价固定化酶应用价值的重要指标。本研究中, 固定化酶和游离酶在 4 °C 条件下酶活力半衰期分别约为 25 d、7 d。固定化酶重复使用次数为 5 次后, 酶的相对活力为 66%。上述结果表明, 固定化褐藻胶裂解酶具有良好的存储稳定性和操作稳定性。与 Li 等^[34]的介孔氧化钛颗粒固定化褐藻胶裂解酶研究结果相比, 本文研究的单宁酸功能化的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒固定化褐藻胶裂解酶除了具有相似的酶学性质, 还具有良好的存储稳定性。

表 1 褐藻胶裂解酶固定化前后的酶学性质比较

Table 1 Comparison of enzymatic properties of alginate lyase before and after immobilization

项目	最适反应温度/°C	35 °C 处理 1 h 后酶的相对活力/%	最适反应 pH	pH 8.00 处理 1 h 后酶的相对活力/%	4 °C 下酶活力的半衰期/d
游离酶	35	4.90	8.00	72.30	7
固定化酶	35	90.10	9.50	94.80	25

2.2 固定化酶的透射电子显微镜分析

透射电子显微镜分析显示，单宁酸功能化的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子的粒径均匀，纳米粒子间空隙较多，呈疏松蓬松状（图 7a 和 b）。褐藻胶裂解酶固定化后，固定化酶连接紧密，空隙减少，呈不规则层叠状（图 7c 和 d）。这些结果表明，载体和酶之间产生连接作用，形成的酶聚集体可以提高固定化酶的稳定性。

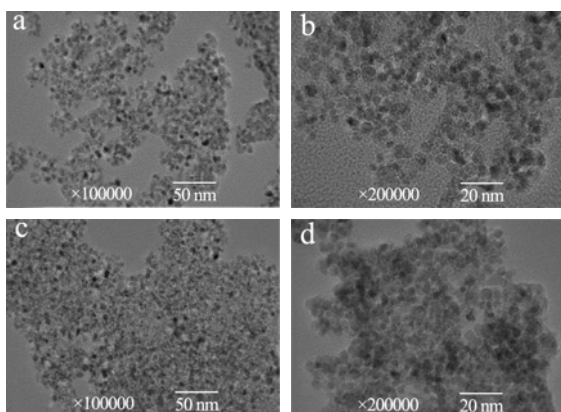


图 7 磁性纳米粒子载体 (a 和 b) 与固定化褐藻胶裂解酶 (c 和 d) 的透射电子显微镜分析

Fig.7 TEM analysis of tannic acid-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles (a, b) and immobilized alginate lyase (c, d)

注: a: 单宁酸功能化的磁性纳米粒子载体 (×100000); b: 单宁酸功能化的磁性纳米粒子载体 (×200000); c: 固定化褐藻胶裂解酶 (×100000); d: 固定化褐藻胶裂解酶 (×200000) 的透射电子显微镜分析。

2.3 固定化酶的傅里叶红外变换光谱分析

利用傅里叶变换红外光谱仪分析磁性纳米粒子固定化前后红外吸收峰的变化情况，从而判断褐藻胶裂解酶是否成功固定在功能化载体表面。图 8 中所示的是单宁酸功能化的磁性纳米粒子 (a) 与固定化褐藻胶裂解酶 (b) 的傅里叶红外变换光谱。图 8a 显示，565 cm⁻¹ 处出现的峰是 Fe₃O₄ 的特征吸收峰，1610 cm⁻¹ 附近的吸收峰代表羰基的存在。在 1500 cm⁻¹ 和 1430 cm⁻¹ 处出现的两个吸收峰对应着羧酸盐的 -COO⁻ 吸收特征谱带，这表明单宁酸经氧化后形成的羧酸基与粒子表面发生了化学键合^[35]。在 3159 cm⁻¹ 附近的吸收峰代表

羟基的存在，表明该载体已经成功被单宁酸修饰。由图 8b 可看出，除了具有 Fe₃O₄ 的特征吸收峰外，固定化褐藻胶裂解酶还出现新的吸收峰，1450 cm⁻¹ 附近的吸收峰代表 -NH₂ 伸缩振动；1657 cm⁻¹ 附近的吸收峰代表 -CONH 伸缩振动，常见于蛋白质的红外图谱中^[36]。以上结果表明，褐藻胶裂解酶成功地固定在单宁酸功能化的 Fe₃O₄ 磁性纳米载体上。

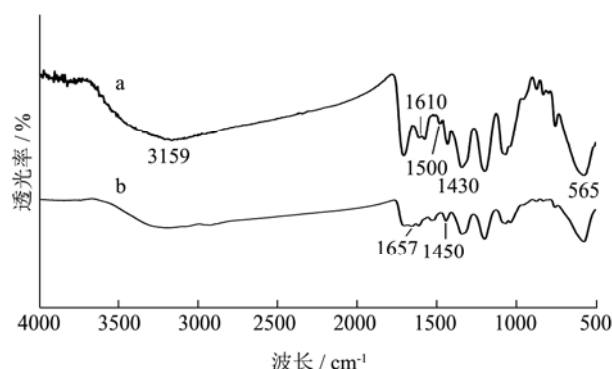


图 8 磁性纳米粒子载体 (a) 与固定化褐藻胶裂解酶 (b) 的傅里叶变换红外光谱分析

Fig.8 FT-IR spectra of tannic acid-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles (a) and immobilized alginate lyase (b)

3 结论

本文以单宁酸功能化的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子 (TA-MNPs) 作为固定化酶的载体，对微泡菌褐藻胶裂解酶进行了固定化工艺优化，获得了包含戊二醛浓度为 1.00%、交联时间为 2 h、固定化温度为 5 °C、固定化时间为 8 h、固定化 pH 为 8.00 和加酶量为 1.20 U 的最适固定化条件，最适条件下处理的固定化酶活力和酶活回收率分别达到 36.56 U/g 和 30.55%。微泡菌褐藻胶裂解酶固定化后，酶的温度稳定性、pH 稳定性和存储稳定性显著提高。良好的酶学性质使该酶在相关领域具有应用潜力。傅里叶红外变换光谱和透射电子显微镜分析结果表明，单宁酸修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒是微泡菌褐藻胶裂解酶固定化的良好载体。

参考文献

[1] WANG L, Shelton R M, Cooper P R, et al. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(20): 3475-3481

- [2] Falkeborg Mia, Cheong Lingzhi, Gianfco Carlo, et al. Alginate oligosaccharides: enzymatic preparation and antioxidant property evaluation [J]. Food Chemistry, 2014, 164: 185-194
- [3] CHEN Jiayu, HU Yu, ZHANG Lirong, et al. Alginate oligosaccharide DP5 exhibits antitumor effects in osteosarcoma patients following surgery [J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 623
- [4] FANG Weishan, BI Decheng, ZHENG Ruijin, et al. Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1663
- [5] HAO Jiejie, HAO Cui, ZHANG Lijuan, et al. OM2, α novel oligomannuronate-chromium (III) complex, promotes mitochondrial biogenesis and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes via the AMPK-PGC1 α pathway [J]. Plos One, 2015, 10(7): e0131930
- [6] HU Yi, FENG Zhe, FENG Wenjing, et al. AOS ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by restraining the activation of P-selectin/ p38MAPK/ NF- κ B pathway in rats [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 109: 1319-1326
- [7] Pritchard Manon F, Jack Alison, Powell Lydia C, et al. Alginate oligosaccharides modify hyphal infiltration of *Candida albicans* in an *in vitro* model of invasive human candidosis [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 625-636
- [8] 孙哲朴,刘辉,武欣雨,等.褐藻胶寡糖制备和生物活性的研究进展[J].食品工业,2019,40(2):284-289
- SUN Zhepu, LIU Hui, WU Xinyu, et al. Research progress on preparation and bioactivity of alginate oligosaccharides [J]. The Food Industry, 2019, 40(2): 284-289
- [9] ZHU Benwei, YIN Heng. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications [J]. Bioengineered Bugs, 2015, 6(3): 125-131
- [10] Sheldon R. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance [J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2007, 349(8-9): 1289-1307
- [11] 余冲,孙秀丽,王东旭,等.酶固定化载体及固定化方法最新研究进展[J].广东化工,2021,48(2):60-62,78
- YU Chong, SUN Xiuli, WANG Dongxu, et al. Recent research progress of enzyme immobilization vectors and immobilization methods [J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(2): 60-62, 78
- [12] ZHANG Qikun, KANG Junqing, YANG Bing, et al. Immobilized cellulase on Fe₃O₄ nanoparticles as a magnetically recoverable biocatalyst for the decomposition of corn cob [J]. Chinese Journal of Catalysis, 2016, 37(3): 389-397
- [13] CAO Miao, LI Zhonghong, WANG Jianlong, et al. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: enzyme immobilization, protein purification, and food analysis [J]. Trends in Food Science & Technology, 2012, 27(1): 47-56
- [14] Mahdis Pourabhari Langeroudi, Ehsan Binaeian. Tannin-APTES modified Fe₃O₄ nanoparticles as a carrier of methotrexate drug: kinetic, isotherm and thermodynamic studies [J]. Materials Chemistry and Physics, 2018, 218: 210-217
- [15] ZHU Yanbing, WU Liyun, CHEN Yanhong, et al. Characterization of an extracellular biofunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates [J]. Microbiological Research, 2016, 182: 49-58
- [16] 刘彩琴,王楠,陈薇青,等.一株明亮发光杆菌产褐藻胶裂解酶的培养基优化[J].食品工业科技,2017,8:156-160
- LIU Caiqin, WANG Nan, CHEN Weiqing, et al. Optimization of medium for alginate lyase production by a strain of luminescent bacilli [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 8: 156-160
- [17] JIANG Zedong, GUO Yuxi, WANG Xinxia, et al. Molecular cloning and characterization of AlgL17, a new *exo*-oligoalginate lyase from *Microbulbifer* sp. ALW1 [J]. Protein Expression and Purification, 2019, 161: 17-27
- [18] Atacan Keziban, Özacar Mahmut. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles [J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2015, 128(5): 227-236
- [19] Miller, Gail-lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Biochemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [20] Betancor Lorena, López-Gallego Fernando, Hidalgo A, et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2006, 39(4): 877-882
- [21] Tukul S Seyhan, Alptekin Ozlem. Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate [J]. Process

- Biochemistry, 2004, 39(12): 2149-2155
- [22] López-Gallego Fernando, Betancor Lorena, Mateo Cesar, et al. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports [J]. Journal of Biotechnology, 2005, 119(1): 70-75
- [23] Monsan P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization [J]. Journal of Molecular Catalysis, 1978, 3(5): 371-384
- [24] López-Gallego Fernando, Betancor Lorena, Hidalgo Aurelio, et al. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sephabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2005, 37(7): 750-756
- [25] JIANG Desheng, LING Shengya, HUANG Jun, et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 25(1): 15-23
- [26] CHANG Minyun, Juang Ruey-shin. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 35(1): 93-98
- [27] Gillett Roy, Gull Keith. Glutaraldehyde - its purity and stability [J]. Histochemistry and Cell Biology, 1972, 30(3): 162-167
- [28] Monsan P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization [J]. Journal of Molecular Catalysis, 1978, 3(5): 371-384
- [29] 肖琼.酶法辅助提取琼胶及琼胶寡糖制备与固定化琼胶酶工艺[D].厦门:集美大学,2015
- XIAO Qiong. Study on agar enzyme-assisted extraction and agar-oligosaccharides enzymolysis production and agarase immobilization [D]. Xiamen: Jimei University, 2015
- [30] 阮贵华,刘玉花,陈正毅,等.Fe₃O₄ 磁性纳米粒子固定化胰蛋白酶[J].桂林理工大学学报,2012,32(4):569-574
- RUAN Guihua, LIU Yuhua, CHEN Zhengyi, et al. Trypsin immobilized by Fe₃O₄ magnetic nanoparticles [J]. Journal of Guilin University of Technology, 2012, 32(4): 569-574
- [31] 陈萧萧,黄敏玲,汪薇,等.共固定化酶的制备及其在奶香基料制备中的应用[J].食品工业,2018,39(5):136-141
- CHEN Xiaoxiao, HUANG Minling, WANG Wei, et al. Preparation of co-immobilized enzyme and its application in the preparation of milk flavor base material [J]. The Food Industry, 2018, 39(5): 136-141
- [32] 廖春燕,方美秋.D301 大孔阴离子树脂固定化 β -淀粉酶的研究[J].安徽农业科学, 2009,33:16218-16220
- LIAO Chunyan, FANG Meiqiu. Study on the immobilization of β -amylase by D301 macroporous anion resin [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 33: 16218-16220
- [33] Fopase Rushikesh, Nayak Suman, Mohanta Monalisha, et al. Inhibition assays of free and immobilized urease for detecting hexavalent chromium in water samples [J]. 3 Biotech, 2019, 9(4): 124
- [34] LI Qian, HU Fu, WANG Mingyang, et al. Elucidation of degradation pattern and immobilization of a novel alginatelyase for preparation of alginate oligosaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 146: 579-587
- [35] CAO Linqiu, Rantwijk Fred-van, Sheldon Roger A. Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase [J]. Organic Letters, 2000, 2(10): 1361-1364
- [36] Pawar Omkar, Deshpande Neelima, Dagade Sharda, et al. Green synthesis of silver nanoparticles from purple acid phosphatase apoenzyme isolated from a new source *Limonia acidissima* [J]. Journal of Experimental Nanoscience, 2015, 11(1): 28-37

(上接第 205 页)

- [43] 鲁加惠,张雨露,梁进,等.3 种干燥方式对香菇挥发性物质及感官特性的影响[J].食品工业科技,2019,40(24):262-269
- LU Jiahui, ZHANG Yulu, LIANG Jin, et al. Effects of three drying processes on volatile substances and sensory characteristics in *Lentinus edodes* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(24): 262-269
- [44] 李爱民,夏凯,郝俊冉,等.不同干燥方式与粉碎粒度对玛咖活性成分和气味影响的研究[J].食品与发酵工业,2018,44(2):121-128
- LI Aimin, XIA Kai, HAO Junran, et al. Effects of drying methods and grinding size on the bioactive components and smell of maca [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(2): 121-128
- [45] 曲清莉,傅茂润,陈庆敏,等.利用 GC-MS 和电子鼻研究超微粉碎对姜风味物质的影响[J].中国调味品,2016,41(12):20-24
- QU Qingli, FU Maorun, CHEN Qingmin, et al. Effect of superfine grinding on flavor substances in ginger using GC-MS and electronic nose [J]. China Condiment, 2016, 41(12): 20-24