

# 碳酸酐酶在四氧化三铁上固定化及其性能表征研究

李娟, 周心澄, 张琳, 周磊, 杨林军

(东南大学能源热转换及其过程测控教育部重点实验室, 南京 210096)

**摘要:** 以四氧化三铁为载体, 利用共价结合和交联法相结合的方法制备固定化碳酸酐酶(CA), 通过单因素试验, 得出CA最佳固定化条件, 并对固定化酶进行性能表征. 结果表明, 在最优的固定化条件下, 固定化酶的酶活回收率可达到66.90%, 且其pH值稳定性、操作稳定性、热稳定性和贮藏稳定性明显高于同等条件下的游离酶, 该固定化酶经5次催化水解底物后仍能保持62.58%的相对酶活.

**关键词:** 碳酸酐酶(CA) 固定化; CO<sub>2</sub> 捕集; 四氧化三铁; 性能表征

**中图分类号:** x511 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1349-06

## An investigation of the immobilization of carbonic anhydrase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and its performance characterization

LI Juan, ZHOU Xin-Cheng, ZHANG Lin, ZHOU Lei, YANG Lin-Jun

(Key Lab of Energy Thermal Conversion and Control of Ministry of Education, Southeast University, Nanjing 210096, China)

**Abstract:** Carbonic anhydrase (CA) was immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> by means of the covalent bonding and crosslinking method. The conditions of single factor, such as pH, temperature, time, shaker speed, enzyme dose, glutaraldehyde dose, and glutaraldehyde time, were studied. And then the optimum conditions and properties of immobilization CA were obtained. The results showed that the rate of enzyme activity recovery of immobilized enzyme is 66.90% under the optimum conditions. And the pH stability, operational stability, thermal stability and storage stability of immobilized CA are significantly higher than that of the free CA. Particularly, the immobilized CA could keep 62.58% relative enzyme activity after 5 times of catalytic hydrolysis with the substrate.

**Keywords:** Carbonic anhydrase (CA); Immobilization; CO<sub>2</sub> capture; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; Performance

## 1 引言

随着生物技术的飞速发展, 利用碳酸酐酶(CA)的仿生技术实现二氧化碳捕集和封存(CCS)逐渐成为人类研究的热点问题. CA是目前发现促进CO<sub>2</sub>水合反应最为有效的生物催化剂<sup>[1, 2, 3]</sup>, 且其水合产物HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>易与金属离子形成热力学稳定

的金属碳酸盐, 这一仿生技术被认为是具有重要应用前景的实现环境友好型且具有可行性的碳封存技术<sup>[4, 5]</sup>. 但由于游离态CA存在稳定性差、不易回收、易变性失活等缺点, 使得酶的工业化应用受到很大的限制. 为解决上述问题, 需要对酶进行固定化处理<sup>[6, 7]</sup>, 固定化酶运行的稳定性, 是决定其能否在工业上应用的重要因素<sup>[8, 9, 10]</sup>. CA固定化

收稿日期: 2016-04-15

基金项目: 高等学校博士点专项科研基金(20130092110005); 国家自然科学基金(51176034); 东南大学优秀博士学位论文基金(YBJJ11508)

作者简介: 李娟(1990-), 女, 南京人, 硕士研究生, 主要研究方向为CO<sub>2</sub>捕集和封存.

通讯作者: 杨林军, E-mail: ylj@seu.edu.cn

载体种类很多,主要有丙烯酰胺聚合物、壳聚糖、海藻盐、介孔氧化硅和天然高分子等<sup>[11, 12, 13, 14]</sup>. 国内外对 CA 的固定化研究已有很多,张亚涛<sup>[15]</sup>以多孔结构的聚丙烯-丙烯酰胺、水滑石纳米复合凝胶为 CA 的固定化载体,不足之处在于载体制备过程繁琐,凝胶层增大了反应器的传质阻力;Zhu<sup>[16]</sup>等以戊二醛为交联剂,将 CA 固定到海藻酸钠聚合物上,但由于海藻酸盐在高浓度电解质溶液中稳定性差,阳离子易脱落,使得载体变软,甚至溶解,固定化酶回收问题限制了其在工业上的应用. 目前,固定化酶的回收方式多以过滤,离心为主,但这两种分离方式较为繁琐和昂贵. 因此不溶性的磁性载体逐渐受到研究人员关注,其固定化产物可直接用简单而有效的外部磁场进行分离<sup>[17, 18]</sup>,是一类工业上广泛应用的载体材料.

本文首先制得磁性载体四氧化三铁,并通过共价结合法将羧基引入表面,制得表面羧基化的四氧化三铁;再利用交联剂戊二醛将 CA 通过共价结合法和交联法相结合固定到载体表面,进行 CA 固定化实验,考察各单因素条件对酶活力的影响,并对固定化酶进行了性能表征实验研究,从而得到最优的固定化条件.

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

CA,购自南京都莱生物技术有限公司;FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 25% 浓氨水, 油酸, KMnO<sub>4</sub>, 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 对硝基乙酸苯酯, 戊二醛, 盐酸, 均为分析纯.

### 2.2 实验方法

2.2.1 载体材料的制备 将 8.182g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 溶于 150 ml 超纯水中, 搅拌加热至 70 °C, 再加入 4.012 g FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 在 1000 r/min 机械搅拌下, 快速加入 25% 的浓氨水, 使反应体系 pH 达到 11.1 min 后逐滴加入 5.3 ml 油酸, 于 70 °C 下继续快速搅拌 1h, 反应结束后, 得到黑色胶状物质, 用乙醇洗涤数次去除多余的油酸, 再用超纯水洗涤至 pH=7. 然后加入 1.608 g KMnO<sub>4</sub>, 在 200 r/min 下继续搅拌 8 h, 用超纯水冲洗至澄清, 磁力分离后在 30 °C 真空干燥下至恒重<sup>[19, 20]</sup>. 研磨, 过 100 目筛, 即制得固定化 CA 的载体材料.

2.2.2 固定化 CA 的制备 取 30 mg 上述表面羧基化的四氧化三铁, 加入一定量含酶液的 Tris-HCl 缓冲溶液, 恒温摇床反应一段时间, 再加入一

定量的戊二醛进行交联反应, 磁力分离, 用相同 pH 值的缓冲溶液洗涤数次, 真空室温干燥至恒重, 即制得固定化酶, 置于 4 °C 冰箱中冷藏备用.

2.2.3 酶活力测定 对于 CA, 底物为乙酸对硝基苯酯(p-NPA), 其水解产物对硝基苯酚是一种透明黄色物质, 能选择性地吸收 348 nm 波长的光, 进而测定其酶活性<sup>[21]</sup>.

游离酶活力测定: 在离心管中依次加入 8.9 ml Tris-HCl (50 mmol/L, pH = 8.0) 缓冲液、1ml 酶液 (CA 溶于缓冲溶液中, pH = 8.0, 0.1 mg/mL) 和 0.1 mL 乙酸对硝基苯酯 (溶解于乙腈中, 100 mmol/L), 室温下反应 3 min 后, 用 UV-1800 型紫外分光光度计测定其在 348 nm 处的吸光度值, 以不加酶溶液的样品作为空白对照.

固定化酶活力测定: 采用游离酶活力测定相似的步骤, 将 30 mg 固定化碳酸酐酶加入含有 9.9 mL Tris-HCl 缓冲溶液 (pH=8.0, 50 mmol/L) 的离心管中, 再加入 0.1 mL 乙酸对硝基苯酯溶液, 室温下反应 3 min, 磁力除去固定化碳酸酐酶, 剩余液体用分光光度计于波长 348 nm 下测定吸光度值, 以不固定化酶的样品作为空白对照.

2.2.4 固定化酶活性评价指标 本文通过 2 个指标评价固定化酶的活性: 酶活回收率 (又称偶联效率, 活力保留百分数) 和相对酶活.

$$\text{酶活力回收率} = \frac{\text{固定化酶总活力}}{\text{被固定化游离酶总活力}} \times 100\%$$

$$\text{相对酶活} = \frac{\text{任一固定化酶活性}}{\text{相同条件下最优的固定化酶活性}} \times 100\%$$

## 3 结果与讨论

### 3.1 固定化条件对固定化 CA 活性的影响

3.1.1 pH 值的影响 酶最适 pH 值主要取决于固定方法和载体的选择<sup>[22]</sup>. 选取 pH 值为 7.1、7.5、8.0、8.5、9.0 的缓冲溶液进行碳酸酐酶固定, 其他条件分别为固定化时间 4 h, 固定化温度 30 °C, 摇床转速 250 rpm, 酶用量 1 ml (CA 溶于 Tris-HCl 缓冲溶液中, 0.1 mg/mL), 载体量=30 mg. 在此条件下测定固定化酶活, 结果如图 1 所示. 可见, 当 Tris-HCl 缓冲液 pH 值为 8.5 时, 碳酸酐酶的固定化效果最好, 酶活回收率达到 48.28%. 当 pH 值较低时, 缓冲溶液的酸碱度影响了磁性载体和游离酶的电离状态, 使碳酸酐酶和载体之间不能够有效的结

合,进而影响了酶在磁性载体上的固定效果.此外,随着碱性的增强,酶的活性又受到抑制.

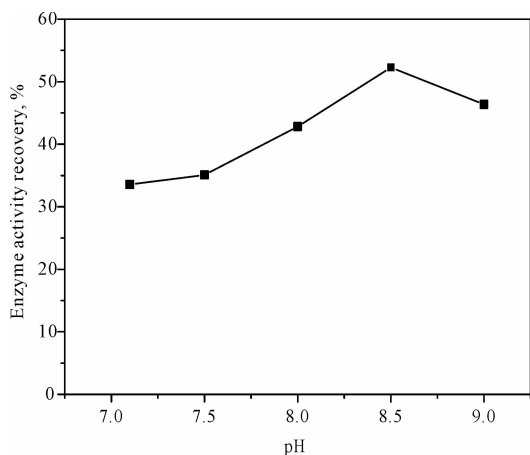


图1 pH值对固定化酶活力的影响

Fig. 1 The effect of pH on enzyme activity

3.1.2 固定化时间的影响 选取上述实验得到的最优pH值下的Tris-HCl缓冲溶液,分别选用1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h的固定化反应时间,其他条件不变,对CA进行固定化实验,试验考察固定化反应时间对酶固定化的影响,结果如图2所示.可知,固定化酶活回收率随着固定化时间的增加呈现先上升后下降的趋势.固定化时间较短时,反应未达到平衡,酶活力随着固定化时间的延长而升高;当固定化时间为4h,固定化酶活力最高.之后,随着固定化时间进一步延长,酶活回收率呈现下降趋势,可能是由于当反应达到平衡后,长时间的搅拌反而会导致部分酶变性失活或者酶在载体上的浸出.

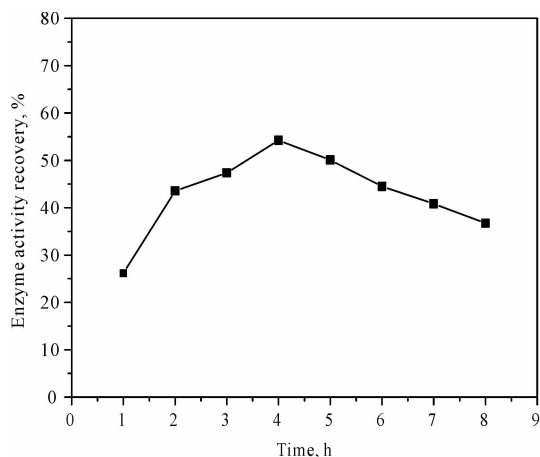


图2 固定化时间对固定化酶活力的影响

Fig. 2 The effect of immobilization time on enzyme activity

3.1.3 固定化温度的影响 分别选取20℃、25℃、30℃、35℃、40℃进行CA固定化实验,其他条件不变,测定固定化酶活回收率,结果如图3

所示.可见,CA的最适固定化温度为30℃,温度降低,酶促反应减弱,酶活回收率降低;温度升高,酶分子空间结构发生变化,破坏载体和酶分子活性中心的结合,造成酶的变性失活.

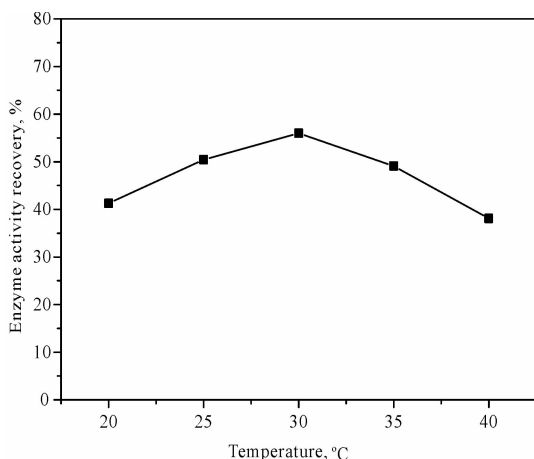


图3 固定化温度对固定化酶活力的影响

Fig. 3 The effect of immobilization temperature on enzyme activity

3.1.4 摇床转速的影响 分别选取210、230、250、270、290 rpm的摇床转速进行固定化实验,其他条件不变,结果如图4所示.可知,摇床转速会影响载体与酶分子在缓冲溶液中的分布与结合,当摇床转速为250 r/min时,固定化酶活回收率最高.摇床转速过低,磁性载体在液相中分布不均匀,酶分子不能跟载体充分接触,且低转速条件下,酶分子与载体所受的剪切力小,相互之间缠绕得不够紧密,致使固定化酶活回收率较低;随着摇床转速进一步增加,虽然增大了反应体系的湍动程度,降低了传质阻力,但部分酶分子从载体表面脱落,酶负载量的下降,致使酶活回收率下降.

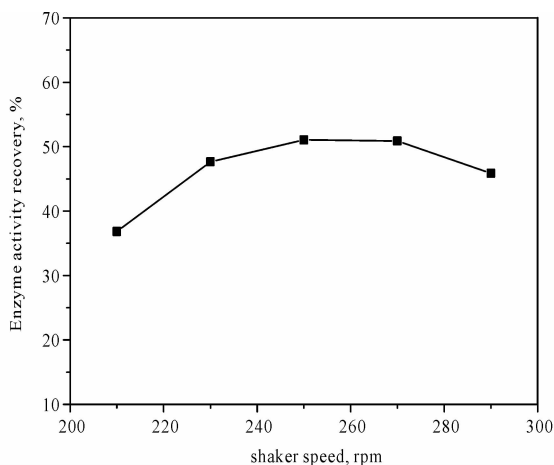


图4 摇床转速对固定化酶活力的影响

Fig. 4 The effect of shaker speed on enzyme activity

3.1.5 游离酶用量的影响 游离酶的添加量对固定化酶活性也有一定的影响,如图 5 可见,随着游离酶添加量的增加,固定化酶活回收率呈现先上升后下降的趋势,加酶量达到 1.0 mL,酶活回收率最高.加酶量较低时,酶分子与载体共价酶活回收率越高;但随着加酶量进一步增加,载体可结合的活性位点减少,酶分子到达结合位点需要克服的传质阻力增大,致使酶与载体结合的速率变慢.且过大的加酶量,会使酶分子更易于集聚,不利于分子向载体方向延伸,使得部分酶分子无法与载体充分接触,导致酶活力下降.

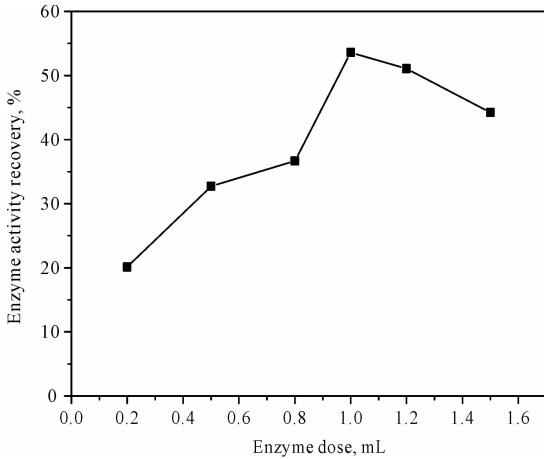


图 5 酶用量对固定化酶活力的影响

Fig. 5 The effect of enzyme on enzyme activity

3.1.6 交联剂浓度的影响 分别选取不同戊二醛浓度进行 CA 固定化实验,浓度分别为:0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%,交联时间 1 h,戊二醛用量 1 mL,其他条件是上述单因素实验最佳的固定化条件,结果如图 6 所示.固定化 CA 活力随戊二醛浓度的增加呈现先上升后下降的趋势,且当浓度为 0.4% 时,固定化效果最好.戊二醛浓度较低时,酶与载体之间交联作用不能达到饱和状态,酶分子在载体上易脱落,致使固定化酶活回收率较低.交联作用达到饱和,酶分子不易从磁性载体上脱落,固定化酶活回收率较高.由于戊二结合的数目有限,此时,随着加酶量的增大,醛是一种双功能试剂,含有 2 个醛基,当戊二醛浓度过高时,过多的醛基与酶反应,引起酶构像的变化,导致酶活力降低.

3.1.7 交联时间的影响 图 7 为交联时间对固定化 CA 活力影响的试验结果;可见,随着交联时间的增加,固定化酶活回收率呈现先升高后降低的趋势.当交联时间较短时,酶分子与戊二醛反应未达

到反应平衡;经过 1 h 的交联,酶蛋白与戊二醛的交联反应基本完成;随着交联时间进一步延长,固定化酶活力逐渐下降,这是由于戊二醛上可发生交联反应的官能团数目有限,长时间的交联反应反而会导致酶丧失一部分的活性.

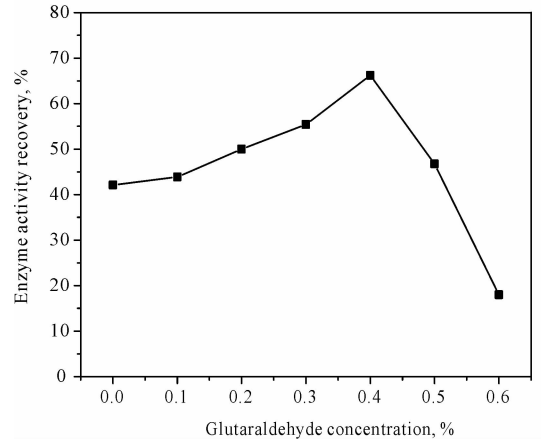


图 6 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

Fig. 6 The effect of glutaraldehyde concentration on enzyme activity

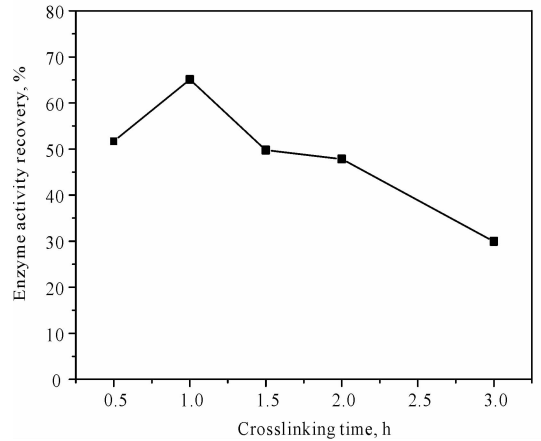


图 7 交联时间对固定化酶活力的影响

Fig. 7 The effect of crosslinking time on enzyme activity

综上所述,制得的表面羧基化四氧化三铁固定 CA 的最优条件为:Tris-HCl 缓冲溶液 pH 值为 8.5,固定化温度 30 °C,固定化时间为 4 h,摇床转速 250 rpm,加酶量 1 mL 酶液(0.1 mg/mL)/30 mg 载体,交联剂浓度 0.4%,交联时间 1 h,在此条件下获得的最佳固定化酶活回收率可达到 66.90%.

### 3.2 固定化 CA 性能表征

3.2.1 固定化酶 pH 稳定性 将游离酶和固定化酶分别加到不同 pH 值(5.0~10)的 Tris-HCl 缓冲溶液中,于 30 °C 水浴 1 h 后测定其活力,结果如图 8 所示.可知,与游离酶相比,固定化酶的活力

在不同 pH 值的 Tris-HCl 缓冲溶液中变化相对较为平缓,并适宜在弱碱性环境下运作. 这主要是因为, pH 值变化改变了酶分子的空间构象,影响酶的催化基团和结合基团的解离,同时由于反应产物为酸性,产物扩散受到限制而积累在固定化酶所处的催化区域内,使此区域内的 pH 值降低,必须提高周围反应液的酸碱度,才能达到酶所需要的 pH 值,使得固定化酶的最适 pH 值比游离酶要高一些(向碱性方向转移).

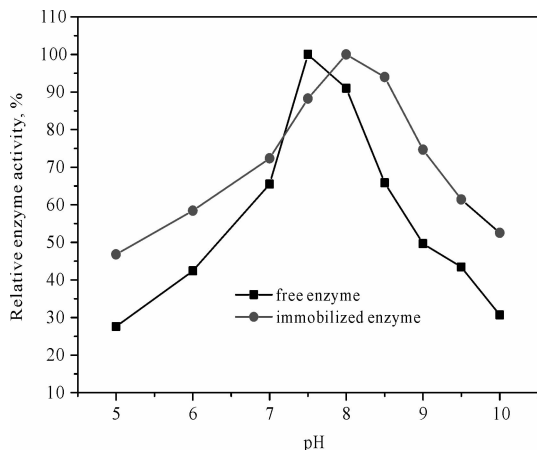


图8 固定化酶和游离态酶的 pH 值稳定性

Fig. 8 pH stability of immobilized and free enzyme

**3.2.2 固定化酶操作稳定性** 将 30 mg 固定化酶与 0.1 mL 乙酸对硝基苯酯 (100 mmol/L) 在 30 °C 连续反应 5 次,每次反应时间 3 min,反应后用 Tris-HCl 缓冲溶液冲洗数次,将固定化酶回收并测定酶活力,结果如图 9 所示. 可见,固定化 CA 经 5 次重复催化水解底物乙酸对硝基苯酯后仍能保持 62.58% 的相对活性,表明其具有较好的操作稳定性. 这是因为酶在经过固定化后可以使酶活力得以缓慢释放,并且在酶与载体结合后,酶分子间失去了相互作用的机会,能够抑制酶的自降解,从而使固定化酶在多次重复使用后仍能维持较强活力.

**3.2.3 固定化酶的热稳定性** 图 10 为将游离酶和固定化酶分别于 20~60 °C 水浴中存放 1h 后测定的活力,结果表明在 60 °C 水浴存放 1h 后,固定化酶仍能保持 21.95% 的相对活性,而游离态酶只能保持 12.41% 的相对活性,说明将 CA 固定于磁性四氧化三铁载体上可显著提高酶的热稳定性. 这可能是由于酶在经过固定化后,酶分子与载体多点连接,防止了酶分子的伸展变形,增强了对温度的抵抗力.

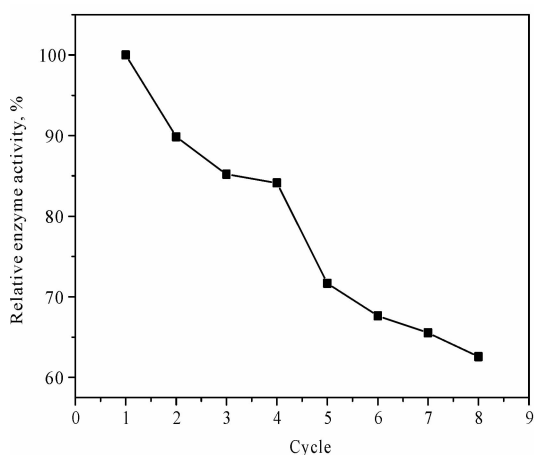


图9 固定化酶的操作稳定性

Fig. 9 Operational stability of immobilized enzyme

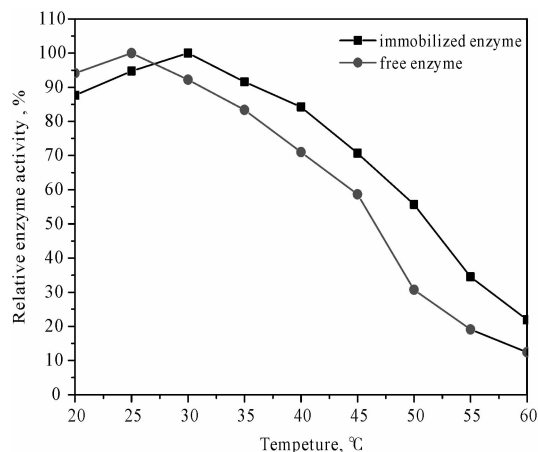


图10 固定化酶和游离态酶的温度稳定性

Fig. 10 Thermal stability of immobilized and free enzyme

**3.2.4 固定化酶的贮藏稳定性** 各取游离态酶和固定化酶一份,分别于室温与 4 °C 下放置一段时间后测定其活力,结果如图 11 所示. 可知,固定化酶在 4 °C 下放置 30 d 后仍能保持 68.65% 的相对活力,活力损失量少,而游离态酶在同样条件下仅能保持 20.22% 的相对活力;在室温条件下保存,固定化酶能保持 50.97% 的相对活力,而游离酶仅能维持 13.67% 的相对酶活,这表明酶在经过固定化后增强了贮藏稳定性,增强了对环境变化的抵抗力.

## 4 结论

本实验以表面羧基化的四氧化三铁为载体,共价结合与交联法相结合实现 CA 的固定,从而确定最优的 CA 固定化条件: Tris-HCl 缓冲溶液 pH 值为 8.5,固定化温度 30 °C,固定化时间为 4 h,摇床转速 250 rpm,加酶量 1 mL 酶液 (0.1 mg/mL)/30 mg 载体,交联剂浓度 0.4%,交联时间 1h,在此条

件下获得的最佳固定化酶活力 1672.5 units/mg, 酶活回收率最大可达到 66.90%. 与游离酶相比, 固定化酶具有更好的 pH 稳定性、操作稳定性、热稳定性以及贮藏稳定性.

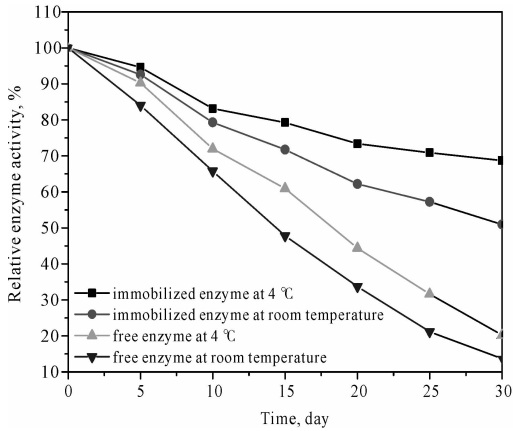


图 11 固定化酶和游离态酶的贮藏稳定性

Fig. 11 Storage stability of immobilized and free enzyme

在全球气候变化的大环境下, CA 固定化研究的目的是为了实现  $\text{CO}_2$  的催化吸收, 因此需进一步研究固定化 CA 对  $\text{CO}_2$  催化性能的影响, 寻求最佳的固定化 CA 催化吸收  $\text{CO}_2$  的工艺条件, 揭示传质-反应机理, 进而为实现工业废气  $\text{CO}_2$  捕集,  $\text{CO}_2$  原位封存技术提供试验与理论依据.

#### 参考文献:

[1] Mirjafari P, Asghari K, Mahinpey N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for  $\text{CO}_2$  sequestration purposes [J]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2007, 46: 921.

[2] Daniel D, Gross K B, Gorski R A, *et al.* Feasibility study of using brine for carbon dioxide capture and storage from fixed sources [J]. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2006, 56: 1631.

[3] 潘富军, 周作明. 碳酸酐酶固定化技术研究与应用进展 [J]. *化学工程*, 2014, 42: 11.

[4] Ning L, Bond G M, Abel A, *et al.* Biomimetic sequestration of  $\text{CO}_2$  in carbonate form: Role of produced waters and other brines [J]. *Fuel Processing Technology*, 2005, 86: 1615.

[5] Ki-Ha M, Ryeo G S, Mi-Ran K, *et al.* High expression and biosilica encapsulation of alkaline-active carbonic anhydrase for  $\text{CO}_2$  sequestration system development [J]. *Chemosphere*, 2015, 143: 128.

[6] 金杰, 杨艳红, 吴克, 等. 中性脂肪酶在凹凸棒石表面固定条件优化及其活性 [J]. *太阳能学报*, 2010, 31: 556.

[7] Russo M E, Olivieri G, Marzocchella A, *et al.* Post-combustion carbon capture mediated by carbonic anhydrase [J]. *Separation and Purification Technology*, 2013, 107: 331.

[8] Fernandes A I, Gregoriadis G. Synthesis, characterization and properties of sialylated catalase [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1996, 1293(1): 90.

[9] 袁定重, 张秋禹, 侯振宇, 等. 固定化酶载体材料的最新研究进展 [J]. *材料导报*, 2006, 20: 69.

[10] Kanth B K, Lee J, Pack S P. Carbonic anhydrase: its biocatalytic mechanisms and functional properties for efficient  $\text{CO}_2$  capture process development [J]. *Engineering in Life Sciences*. 2013, 13: 422.

[11] Carlsson N, Gustafsson H, Th? rn C, *et al.* Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical-chemical perspective [J]. *Advances in Colloid & Interface Science*, 2014, 205: 339.

[12] 李丽娟, 马贵平, 赵林果. 固定化酶载体研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35: 105.

[13] 万晓梅, 张川, 余定华, 等. 碳纳米管固定化酶 [J]. *化学进展*, 2015, 27: 1251.

[14] Robert D C, Joseph M A, Poulouse A J, *et al.* Industrial use of immobilized enzymes [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42: 6437.

[15] 张亚涛. 纳米复合凝胶固定化酶膜反应器去除低浓度  $\text{CO}_2$  的研究 [D]. 浙江: 浙江大学, 2009.

[16] Zhu Y L, Li W Y, Sun G Z, *et al.* Enzymatic properties of immobilized carbonic anhydrase and the biocatalyst for promoting  $\text{CO}_2$  capture in vertical reactor [J]. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2016, 49: 290.

[17] Sahoo P C, Jang Y N, Lee S W. Immobilization of carbonic anhydrase and an artificial Zn(II) complex on a magnetic support for biomimetic carbon dioxide sequestration [J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2012, 82: 37.

[18] 邓涛, 余旭亚, 徐军伟. 磁性高分子微球固定化脂肪酶的研究进展 [J]. *化工新型材料*, 2013, 41: 4.

[19] 杨兆壬. 表面羧基化  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性微球固定化 CA 酶的制备与研究 [D]. 福建: 华侨大学, 2014.

[20] Zhao Y. Preparation and analysis of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic nanoparticles used as targeted-drug carriers [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2008, 16: 451.

[21] 袁美华, 蒋彦, 杨毅. 咪塞米对碳酸酐酶的抑制效应再研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50: 887.

[22] Wanjari S, Prabhu C, Satyanarayana T, *et al.* Immobilization of carbonic anhydrase on mesoporous aluminosilicate for carbonation reaction [J]. *Microporous & Mesoporous Materials*, 2012, 160: 151.