

引用格式:胡艺凡,李正军,刘长霞.基于磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子的固定化过氧化氢酶的制备及催化性质研究[J].北京化工大学学报(自然科学版),2023,50(2):53–62.

HU YiFan, LI ZhengJun, LIU ChangXia. Preparation and catalytic properties of catalase immobilized on magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  particles[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2023,50(2):53–62.

# 基于磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 粒子的固定化过氧化氢酶的制备及催化性质研究

胡艺凡 李正军 刘长霞\*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘 要:**采用溶剂热法合成了磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子,并对其进行  $\text{Ni}^{2+}$  离子表面修饰,得到  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ ;通过  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  上的  $\text{Ni}^{2+}$  与过氧化氢酶(CAT)中  $2 \times 6 \times \text{His}$  的咪唑基之间的金属螯合作用将 CAT 固定在  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  上,成功制得固定化酶  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$ 。通过对固定化条件进行优化,CAT 的固定化量达到 376.13 mg/g,酶活性达到 4 946 U/g。与游离 CAT 相比, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  具有较高的热稳定性和储存稳定性。采用响应面法(RSM)的 Box–Behnken 设计(BBD)对  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  的催化反应条件进行优化,得到最佳条件:反应温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ ,溶液 pH 为 6.4,底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  的浓度为 14.5 mmol/L。在最佳条件下反应 2 min, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  对底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除率可达 84.32%。重复使用 10 批次后, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除率仍保持初始  $\text{H}_2\text{O}_2$  清除率的 69.07%,表明该固定化酶具有良好的可重复利用性。

**关键词:**磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子;金属螯合作用;过氧化氢酶;固定化; $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$

**中图分类号:** Q814.2 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2023.02.007

## 引 言

过氧化氢酶(EC 1.11.1.6,CAT)是生物体内普遍存在的具有抗氧化活性的氧化还原酶,可有效地将  $\text{H}_2\text{O}_2$  转化为水和分子氧,还可以与超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等进行协同作用,通过清除细胞中过量的活性氧(ROS)而保护生物体<sup>[1–2]</sup>。目前,CAT 在食品加工杀菌消毒、纺织物和纸张漂白、药物合成生物催化剂以及医用伤口愈合等领域被广泛应用<sup>[3–4]</sup>。但是游离 CAT 稳定性差、难以重复利用,通过固定化可有效提高其热稳定性和操作稳定性,并易实现可重复使用性而降低成本<sup>[5–8]</sup>。

众所周知,固定化介质和固定化方法是影响固定化酶活性和催化性质的重要因素。磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒

子具有超顺磁性、良好的生物相容性、大的比表面积以及易于从反应体系中分离等特点,因此在酶固定化方面具有良好的应用前景<sup>[9]</sup>。Wang 等<sup>[10]</sup>通过吸附交联法使用磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -壳聚糖纳米复合材料固定 CAT,固定化量达到 82.3 mg/g,并提高了酶的稳定性和可重复使用性;Ibrahim Alhayali 等<sup>[11]</sup>将 CAT 和磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子混合后,添加含  $\text{Cu}^{2+}$  的溶液得到  $\text{CAT}/\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Cu}^{2+}$  复合粒子,用于硝基苯和有机染料的还原反应;Ali 等<sup>[12]</sup>合成了环氧功能化  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子用于共价固定 CAT,提高了酶的耐高温性能以及碱性环境下的酶活性;Wang 等<sup>[13]</sup>经  $\text{SiO}_2$  层包覆、戊二醛处理,获得醛基活化的磁性粒子  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2-\text{CHO}$ ,然后通过共价结合法固定 CAT,当其固定化量为 14.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  时,酶活性回收率可达 100%。

为了避免大分子修饰引起的粒子团聚以及提高酶固定化的选择性<sup>[14]</sup>,本研究采用溶剂热法制备了磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子,并通过小分子共价反应负载  $\text{Ni}^{2+}$  离子,获得单分散固定化介质( $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ ),制备过程中无聚合反应或大分子参与;构建了在氨基端和羧基端各修饰  $6 \times \text{His}$  的 CAT 基因工程菌并进行表

收稿日期:2022-11-29

基金项目:国家留学基金(202006885026);国家重点研发计划(2021YFC2103100)

第一作者:女,1999 年生,硕士生

\* 通信联系人

E-mail: liucx@mail.buct.edu.cn

达,然后通过  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  上的  $\text{Ni}^{2+}$  与 CAT 的 His 咪唑基之间的金属螯合作用实现选择性固定,提高了酶的固定化效果,为 CAT 固定化的进一步应用研究奠定基础。

## 1 实验部分

### 1.1 实验原料和仪器

#### 1.1.1 实验原料

六水合氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、无水乙酸钠( $\text{NaAc}$ )、乙二醇、聚乙二醇 4000(PEG-4000)、1,4-二氧六环、环氧氯丙烷(EPI)、亚氨基二乙酸(IDA)、硫酸镍( $\text{NiSO}_4$ ),均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;双氧水(30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、氯化钠( $\text{NaCl}$ )、盐酸( $\text{HCl}$ )、氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )、无水乙醇,均为分析纯,北京化工厂;蛋白 Marker、4 × 蛋白上样缓冲液,北京 Solarbio 科技有限公司;蛋白胨、酵母浸粉、咪唑,北京奥博星生物技术有限责任公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG),纯度 99%,上海源叶生物科技有限公司;限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sac* I, New England Biolabs 公司;*E. coli* BL21(DE3)、载体 pET28a 为本实验室保藏。

#### 1.1.2 实验仪器

SUPRA-55 型扫描电子显微镜(SEM),德国 ZEISS 公司;Multiskan FC 型酶标仪,Thermo Fisher 科技有限公司;DYY-10C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;UV1810 型紫外分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ 粒子的制备

对文献[14]的方法进行改进制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  粒子,主要过程如下:将 2.7 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶于 80 mL 乙二醇中,添加 7.2 g 无水乙酸钠和 2.0 g PEG-4000,磁力搅拌至均匀溶解。然后转移到聚四氟乙烯衬底的高压反应釜中,200 °C 保温 8 h。通过磁性分离获得产物,分别用去离子水和乙醇洗涤数次,于 60 °C 真空干燥过夜,得到磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子。将 0.5 g 磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒子均匀分散在 10 mL 1,4-二氧六环和 2 mL 环氧氯丙烷中,于 25 °C、180 r/min 保温 4 h,磁性分离洗涤后,与 20 mL IDA 溶液(5%, pH7.0)和 20 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液(0.1 mol/L, pH9.7)混合,并于 37 °C、250 r/min 振荡反应 24 h,用去离子水洗涤后加入到 20 mL 的 1 mol/L  $\text{NiSO}_4$  溶液中,于 30 °C、200 r/min 孵育 12 h。磁性分离后将反应

产物用去离子水洗涤数次,得到  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  粒子。

#### 1.2.2 CAT 基因工程菌的构建与表达

根据美国生物信息数据库(NCBI)提供的 CAT 的 *katE* 的 mRNA 序列,设计引物(Kat-F: AAA-CATATGATGTCGCAACATAACGAAAAGAACCCACT-ACAGC, Kat-R: AAAGAGCTCTCAGGCAGGAATT-TTGTC AATCTTAGGAATGC),以 *E. coli* BL21(DE3)基因组为模板进行 PCR 扩增,并对目的基因和载体 pET28a-His 进行 *Nde* I 和 *Sac* I 双酶切,以构建质粒 pET28a-*katE*,该质粒表达氨基端和羧基端各带有 6 × His Tag 的 CAT,即 2 × 6 × His CAT。*E. coli* BL21(DE3)用作表达该 CAT 的宿主菌。

将携带 pET28a-*katE* 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)过夜培养后接种到含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 培养基中,于 37 °C、200 r/min 振荡培养。当 600 nm 波长下测定的光密度值( $\text{OD}_{600}$ )达到 0.6 ~ 0.8 时,加入 IPTG,于 30 °C、200 r/min 培养 8 h,诱导 CAT 表达。培养结束后,3 600 × *g* 离心 30 min,收集沉淀,重悬于 pH7.0 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中。将细胞进行超声波破碎,4 500 × *g* 冷冻离心 20 min,得到的上清液即为 CAT 粗酶液,于 4 °C 保存备用。

#### 1.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT 的制备

将 15 mL CAT 溶液(1 ~ 2.25 mg/mL)在不同 pH 值(pH6.0 ~ 8.0 的溶液由 0.02 mol/L PBS 缓冲液配制,pH9.0 的溶液由 0.02 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液配制)条件下分别加入 0.025 g  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  粒子,固定化时间为 0.5 ~ 16 h。反应结束后通过磁场分离,用 pH7.0 的 0.02 mol/L PBS 洗涤数次,然后用 0.2 mol/L 咪唑缓冲液洗涤,冷冻干燥,得到固定化酶  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT。

#### 1.2.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT 的表征

采用扫描电子显微镜观察样品的微观形貌并使用 mapping 方法进行表面元素分析;采用电泳仪对样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),方法如下:配制电泳胶(5% 浓缩胶和 10% 分离胶)和电泳液,将 10  $\mu\text{L}$  游离酶、0.02 g  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT 分别与 40  $\mu\text{L}$  4 × 上样缓冲液混合,在 90 °C 水浴中加热 10 min,取样 10  $\mu\text{L}$  和 Maker 5  $\mu\text{L}$  分别上样,使用电泳仪进行 SDS-PAGE,电泳条件为 120 V、50 mA,时间为 90 min。

#### 1.2.5 CAT 固定化量的测定

采用 Bradford 法<sup>[15]</sup>检测  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT 的固

定化量。使用酶标仪测定固定化前后酶液在 595 nm 波长处的吸光度  $A_{595}$ ,按照式(1)计算 CAT 固定化量。

$$D = \frac{(A_1 - A_2)N}{km} \tag{1}$$

式中: $D$  为 CAT 固定化量, $A_1$ 、 $A_2$ 分别为固定化前后酶液的吸光度  $A_{595}$ , $k$  为蛋白标准曲线的斜率, $N$  为稀释倍数, $m$  为 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni 的质量。

1.2.6 游离 CAT 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 酶活性的测定

CAT 及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的活性检测机理为其催化降解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致在 240 nm 波长处的吸光度 ( $A_{240}$ ) 下降<sup>[16]</sup>。CAT 酶活力定义:在一定条件下,每分钟分解 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需要的酶量为 1 U。相对酶活定义为某一反应条件下酶的活性与相同反应条件下酶的最大活性的比值。

游离 CAT 活性的测定 室温条件下,将 0.3 mL CAT 溶液加入到 9.7 mL 浓度为 20 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液反应体系中,迅速混匀,倒入石英比色杯中,使用紫外可见分光光度计于 240 nm 波长处测定吸光度,每隔 0.5 min 读数 1 次,共测定 2 min。

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 活性的测定 室温条件下,将 0.025 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 加入到 10 mL 浓度为 20 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液反应体系中,迅速混匀,其他操作同“游离 CAT 活性的测定”。

1.2.7 游离 CAT 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的动力学参数测定

在 pH7.0、25 ℃ 的条件下,分别测量系列浓度 (5~30 mmol/L) 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液的反应速率,根据米氏方程(式(2))计算游离 CAT 和固定化 CAT 的动力学参数  $V_{\max}$  和  $K_m$ 。

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \tag{2}$$

式中: $V$  为 CAT 催化反应的初速度, $[S]$  为底物浓度, $V_{\max}$  为最大反应速度, $K_m$  为 Michaelis-Menten 常数。

1.2.8 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除反应条件优化

通过响应面法(RSM)优化 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 催化清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的反应条件。选取反应温度( $A$ )、溶液 pH( $B$ )和底物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度( $C$ )为影响因素,以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率作为响应值,采用 Box-Behnken 中心组合实验设计(BBD)研究 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除反应的影响,确定最佳反应条件。各因素的编码水平如表 1 所示,其中 pH5.0 的溶液由 0.02 mol/L 柠檬

酸-柠檬酸钠缓冲液配制,pH7.0 的溶液由 0.02 mol/L PBS 配制,pH9.0 的溶液由 0.02 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液配制。

表 1 各因素的编码水平

Table 1 Coding levels of the experimental factors

因素	编码水平		
	-1	0	1
反应温度( $A$ )/℃	10	30	50
溶液 pH ( $B$ )	5.0	7.0	9.0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 浓度( $C$ )/(mmol·L <sup>-1</sup> )	5	15	25

1.2.9 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率的测定

在设定的条件下,将 0.025 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni 粒子与 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液反应,测定反应前后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液在 240 nm 波长下的吸光度 ( $A_{240}$ ),按照式(3)计算 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率。

$$R = \frac{x_1 - x_2}{x_1 - b} \times 100\% \tag{3}$$

式中: $R$  为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除率, $x_1$ 、 $x_2$  分别为反应前后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液的吸光度  $A_{240}$ , $b$  为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准曲线的截距。

1.2.10 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的可重复利用性测定

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 在 40 ℃、pH6.4 的条件下催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应,然后通过磁性分离,用去离子水洗涤 3 次。将回收的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 重新添加到新鲜配制的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中进行催化反应,每批次反应时间为 2 min。

2 结果与讨论

2.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的表征结果

图 1 为 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的 SEM 图。可以看出,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (图 1(a)) 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni (图 1(b)) 的平均粒径为 200~300 nm,且均具有良好的分散性。这是因为 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 粒子经过小分子化学物质 EPI、IDA 化学修饰后键合 Ni<sup>2+</sup>,全程没有大分子参与,也无聚合反应,所以 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni 的粒径无明显变化,无团聚现象发生。由图 1(c) 可以看出,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的表面有些许附着物,也保持较好的单分散性,有利于催化反应进行。

对蛋白质的标志元素 N 进行 SEM-mapping 分析,结果如图 2 所示。可以看出,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni 仅有很弱的信号,而 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 上的 N 元素分布较多,进一步说明 CAT 固定在 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni 粒子表面。



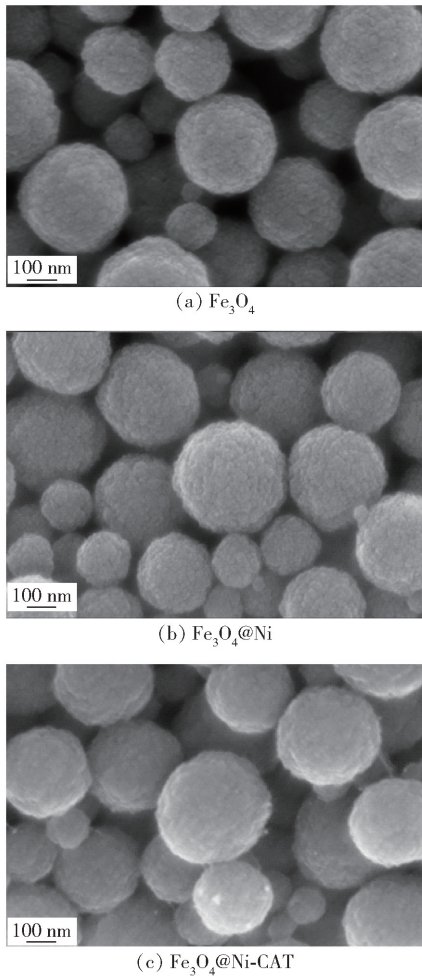


图 1  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  和  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni-CAT}$  的 SEM 图

Fig. 1 SEM images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni-CAT}$

目的基因 *katE* 的大小为 2 262 bp,加上 CAT 的氨基端和羧基端分别连接的  $6 \times \text{His}$ ,理论上表达出的蛋白分子量约为 90 kDa。对游离 CAT 和  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni-CAT}$  进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 3 所示。CAT 和  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni-CAT}$  在 90 kDa 左右出现了明显的条带,与预期结果一致,证明 CAT 成功表达并固定在  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  上。带有  $2 \times 6 \times \text{His}$  的 CAT 通过 His 上的咪唑基与  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  粒子的  $\text{Ni}^{2+}$  之间的金属螯合作用固定,使得粒子对 CAT 具有高选择性。有文献报道在分离蛋白的过程中,通过金属螯合作用可以实现对组氨酸标签蛋白很好的选择性吸附<sup>[17]</sup>。

## 2.2 CAT 固定化条件的优化

### 2.2.1 pH

在 CAT 质量浓度为 1.8 mg/mL、固定化反应时间为 14 h 的条件下,考察了 pH 对 CAT 固定化量和酶活性的影响,结果如图 4 所示。可以看出, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$

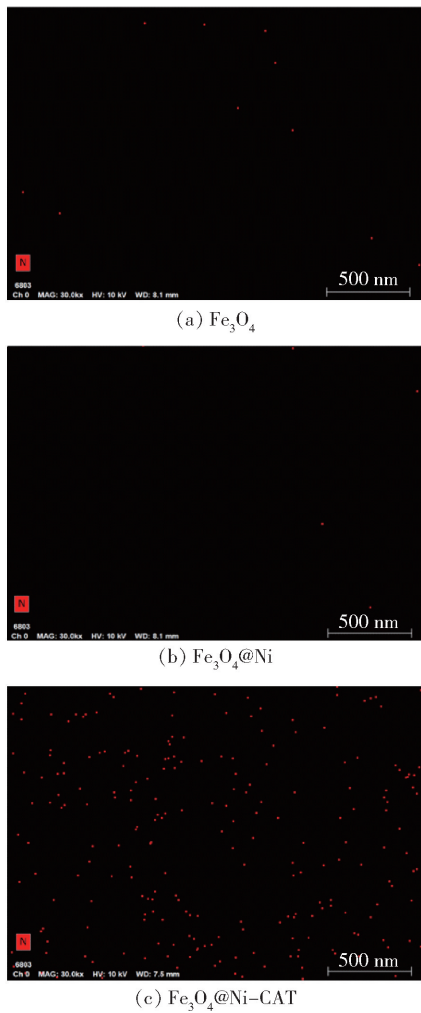


图 2  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  和  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni-CAT}$  的 N 元素 SEM-mapping 图

Fig. 2 SEM-mapping images of N element in  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni-CAT}$

$\text{Ni-CAT}$  的固定化酶量随着 pH 的增大呈现先升高后降低的趋势,在 pH 为 7.0 时固定化酶量最大。这是因为:CAT 的等电点为 6.5<sup>[18]</sup>,pH 为 7.0 时带负电的 CAT 和带正电的  $\text{Ni}^{2+}$  更容易结合,之后通过酶之间的吸附作用进行结合<sup>[18]</sup>;随着 pH 继续增大,带电荷量的增加不利于酶之间的吸附,使得固定化酶量降低<sup>[19-20]</sup>。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni-CAT}$  的酶活性在 pH 为 6.5 ~ 7.5 保持较高水平,之后酶活性随着 pH 的升高而急剧下降。这是因为:pH 值的改变会影响酶活性中心有关基团的解离程度,在偏离最适 pH 时其解离程度不利于酶和底物的结合,导致酶活性下降<sup>[21]</sup>;同时过高或过低的 pH 会影响酶本身的构像,甚至导致酶的失活<sup>[22]</sup>。综合考虑固定化酶量和酶活性,本研究选择固定化反应溶液 pH 值为 7.0。

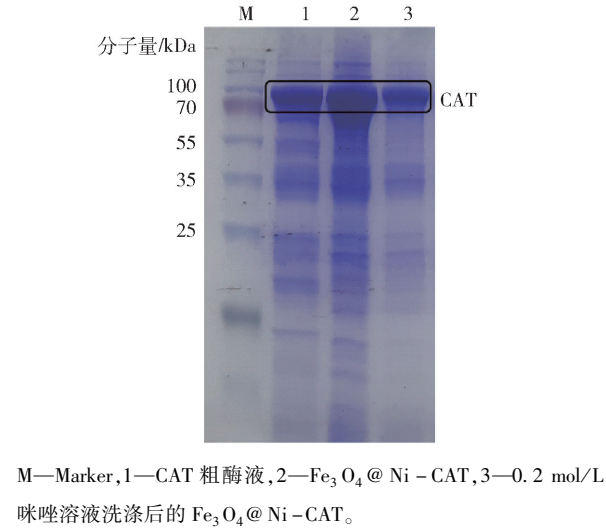


图 3 游离 CAT 和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Ni - CAT 的 SDS - PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS - PAGE electrophoretograms of free CAT and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT

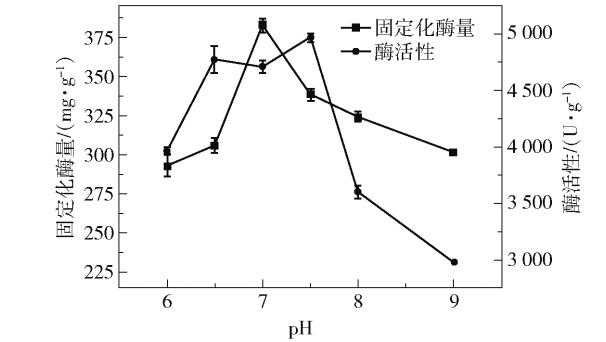


图 4 pH 对 CAT 固定化量和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT 活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on CAT immobilization amount and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT activity

2.2.2 CAT 质量浓度

在 pH 为 7.0、固定化反应时间为 10 h 的条件下,考察了 CAT 质量浓度对 CAT 固定化量和酶活性的影响,结果如图 5 所示。可以看出,随着 CAT 质量浓度的升高, $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT 的固定化酶量逐渐增大,而酶活性呈现先升高后略微下降的趋势,这是因为虽然酶质量浓度升高使固定化酶量增多,但空间位阻增加,酶活性中心难以与底物充分接触反应,从而降低了酶催化活性<sup>[23]</sup>。综合考虑酶固定化量和酶活性,本研究选择固定化反应的 CAT 质量浓度为 1.75 mg/mL。

2.2.3 固定化时间

在 pH 为 7.0、CAT 质量浓度为 1.75 mg/mL 的条件下,考察了固定化时间对 CAT 固定化量和酶活性的影响,结果如图 6 所示。可以看出,反应 30 min

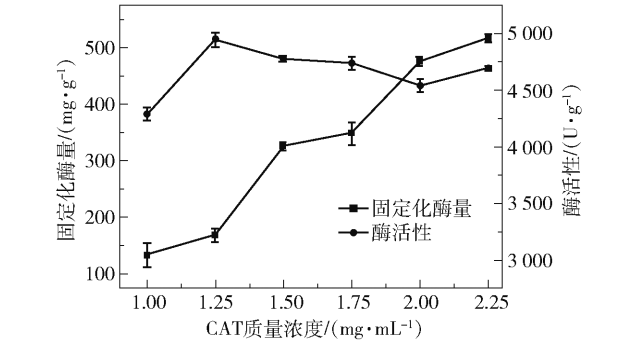


图 5 CAT 质量浓度对 CAT 固定化量和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT 活性的影响

Fig. 5 Effect of CAT mass concentration on CAT immobilization amount and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT activity

时, $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT 的固定化酶量为 168.46 mg/g,固定化酶量随着固定化时间的增加而增加,在 16 h 时达到 408.71 mg/g。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT 的酶活性也随着固定化时间的延长而增大,在 12 h 时达到最高(4946 U/g),此时 CAT 固定化酶量可达 376.13 mg/g,保持在较高水平。随着固定化时间继续延长,CAT 固定化量持续增加,但酶活性略有下降,可能的原因是:固定化时间延长会影响酶活性;随着固定化酶量增加,酶分子之间的相互作用阻碍了酶活性中心与底物分子的结合。综合考虑固定化效果,本研究选择固定化反应时间为 12 h。

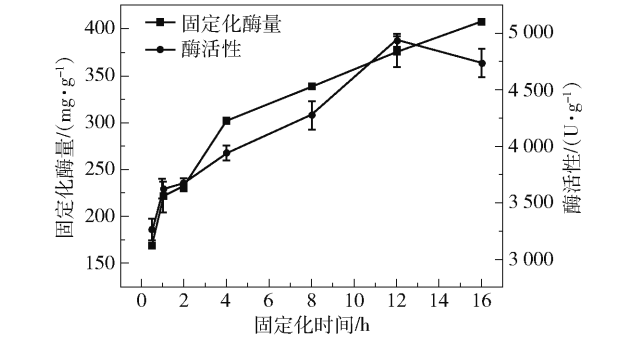


图 6 固定化时间对 CAT 固定化量和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT 活性的影响

Fig. 6 Effect of immobilization time on CAT immobilization amount and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  @ Ni - CAT activity

综上所述,通过对 CAT 固定化条件进行优化,得到最佳反应条件:反应溶液 pH 值为 7.0,CAT 质量浓度为 1.75 mg/mL,反应时间为 12 h。表 2 为本研究与文献报道的 CAT 固定化效果的比较,结果表明,本研究的 CAT 固定化效果优于目前的文献报道。

表2 本研究与文献报道的 CAT 固定化效果比较  
Table 2 Comparison of immobilization effects on CAT between this study and those reported in the literature

载体	固定化反应条件	固定化酶量/ (mg·g <sup>-1</sup> )	酶活性/ (U·g <sup>-1</sup> )	文献
TiO <sub>2</sub>	25 ℃, 4 h	150	—	[7]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -壳聚糖	0 ℃, 12 h	82.3	—	[10]
大孔/介孔 SiO <sub>2</sub>	25 ℃, 3 h 4 ℃, 12 h	300	—	[24]
聚(HEMA-GMA) <sup>a)</sup> 冷冻凝胶	25 ℃, 9 h	298.7 ± 9.9	—	[25]
胶原自组装膜	—	—	2 596	[26]
壳聚糖	—	—	4 500	[27]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Ni	25 ℃, 12 h	376.13	4 946	本研究

a—聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯-甲基丙烯酸缩水甘油酯)。

2.3 游离 CAT 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的动力学参数

图 7 为不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度下游离 CAT 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线,根据双倒数曲线得到游离 CAT 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的 K<sub>m</sub> 和 V<sub>max</sub> (表 3)。结果表明,与游离 CAT 相比,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 对底物的亲和力降低,最大反应速率减小,这是由于固定化酶分子在反应体系中的分散性降

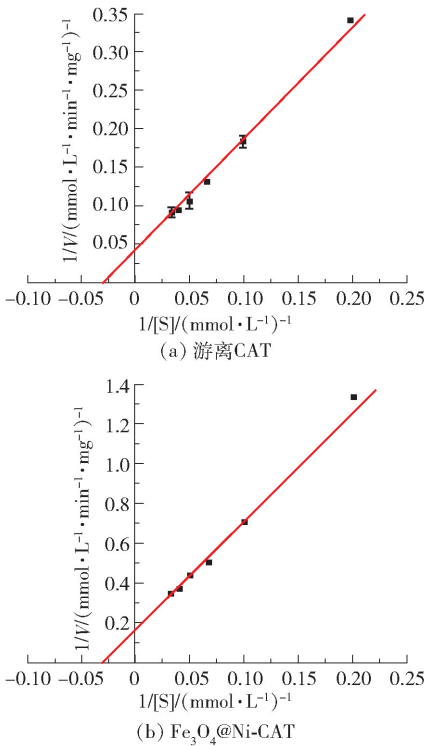


图7 游离 CAT 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的双倒数曲线  
Fig. 7 Double reciprocal curves of free CAT and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT

低,与底物分子结合的机会减少,以及与溶质之间的传质阻力造成的<sup>[7,10]</sup>。

表3 游离 CAT 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters for free CAT and Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Ni-CAT		
酶类型	K <sub>m</sub> /(mmol·L <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> /(mmol·L <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )
游离 CAT	30.90 ± 6.31	23.10 ± 2.81
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Ni-CAT	32.78 ± 4.66	6.07 ± 0.53

2.4 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的稳定性

2.4.1 热稳定性

在 10 ~ 60 ℃ 下,将 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 和游离 CAT 在 PBS 缓冲液(pH7.0,0.02 mol/L)中孵育 2 h,测定其热稳定性。分别以未经处理的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 和游离 CAT 的酶活性作为 100%,计算得到其相对酶活性,结果如图 8 所示。游离 CAT 在 20 ℃ 处理 2 h,相对活性最大,之后随着温度的升高活性逐渐下降,60 ℃ 时相对酶活性仅为 29%。而 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 在 30 ℃ 时的热稳定性最高,相对酶活性达到约 98%,在 50 ℃ 以下处理时相对酶活性均超过 85%。因此,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 比游离 CAT 具有更高的热稳定性。

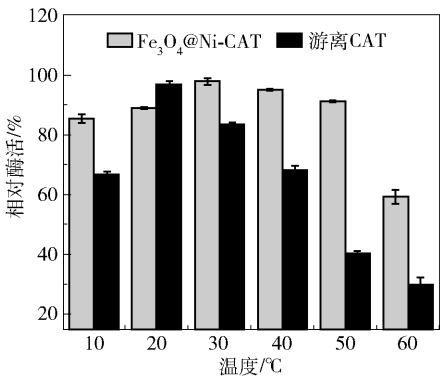


图8 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 和游离 CAT 的热稳定性比较  
Fig. 8 Comparison of thermal stability between Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT and free CAT

2.4.2 储存稳定性

将 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 和游离 CAT 在 4 ℃ 条件下储藏,每隔 2 d 测定其酶活性,评价其储存稳定性。分别以新制备的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 和游离 CAT 的酶活作为 100%,计算得到相对酶活性,结果如图 9 所示。随着储存时间延长,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 和游离 CAT 的酶活性均下降,但 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的储存稳定性明显高于游离 CAT。游离 CAT 在储存 2 d、4 d、

6 d 和 12 d 时相对酶活性分别为 86%、64%、45% 和 21%；而  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  较大程度地改善了 CAT 的储存稳定性,在储存 2 d、4 d、6 d 和 12 d 时其相对酶活性分别为 94%、84%、60% 和 43%。

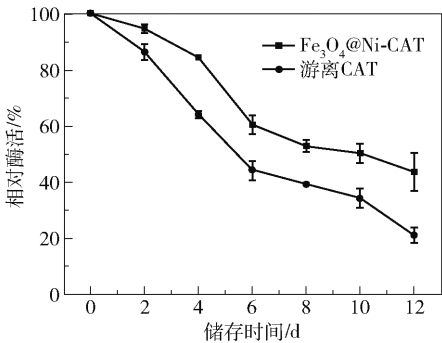


图 9  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  和游离 CAT 的储存稳定性比较  
Fig. 9 Comparison of storage stability between  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  and free CAT

2.5  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  催化反应条件的优化

通过响应面法,采用 3 因素 3 水平的优化实验研究反应温度、溶液 pH 和底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  的浓度对  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  效果的影响,结果见表 4。

表 4 响应面设计与实验结果

Table 4 Response surface design and experimental results

序号	反应温度 (A)/℃	溶液 pH (B)	$\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度 (C)/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	$\text{H}_2\text{O}_2$ 清除 率 (Y)/%
1	50	9.0	15	80.77
2	30	7.0	15	84.52
3	30	9.0	25	54.60
4	30	5.0	5	73.68
5	30	7.0	15	82.87
6	10	7.0	5	70.41
7	30	7.0	15	83.69
8	10	9.0	15	57.14
9	30	9.0	5	57.36
10	50	5.0	15	74.38
11	50	7.0	25	72.47
12	30	7.0	15	77.74
13	10	5.0	15	69.17
14	30	5.0	25	57.55
15	30	7.0	15	77.16
16	10	7.0	25	55.65
17	50	7.0	5	75.74

性检验,结果见表 5。该模型的显著性检验  $P$  值 < 0.001,说明具有统计学意义。失拟项的  $P$  值 > 0.05,说明失拟不显著,该模型选择合适。

表 5 响应面的方差分析

Table 5 Analysis of variance for response surface

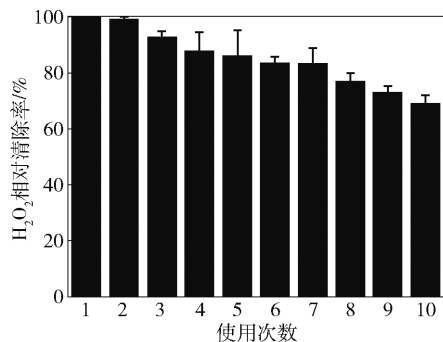
Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value	significance
Model	1 696.4	9	188.49	17.08	0.000 6	significant
A (temperature)	324.89	1	324.89	29.43	0.001 0	
B (pH)	77.63	1	77.63	7.03	0.032 8	
C (concentration)	170.5	1	170.5	15.45	0.005 7	
AB	84.82	1	84.82	7.68	0.027 6	
AC	33.05	1	33.05	2.99	0.127 2	
BC	44.65	1	44.65	4.04	0.084 2	
A <sup>2</sup>	9.85	1	9.85	0.89	0.376 3	
B <sup>2</sup>	364.03	1	364.03	32.98	0.000 7	
C <sup>2</sup>	518.48	1	518.48	46.97	0.000 2	
residual	77.27	7	11.04			
lack of fit	28.93	3	9.64	0.797 9	0.556 0	not significant
pure error	48.34	4	12.08			
cor total	1 773.66	16				

通过响应面回归分析获得多元二次方程如下:  
 $Y = 81.19 + 6.37A - 3.12B - 4.62C + 4.60AB + 4.60AC + 2.87BC - 1.53A^2 - 9.30B^2 - 11.10C^2$ , 决定系数  $R^2 = 0.956 4$ ,说明该方程的拟合性较好,可用于分析  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应的最佳条件。根据上述回归方程,得到  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  的最佳催化反应条件:反应温度为 40 ℃,溶液 pH 为 6.4,底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  的浓度为 14.5 mmol/L。在优化条件下响应面拟合出  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除率为 83.63%,通过实验测得  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除率为 84.32%,与拟合结果基本一致,说明该优化方法和结果适用于该催化反应。

2.6  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  的可重复利用性

在最佳催化反应条件下考察  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}-\text{CAT}$  催化清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  的可重复利用性。将首次测得的  $\text{H}_2\text{O}_2$  清除率设定为 100%,计算得到  $\text{H}_2\text{O}_2$  相对清除率,结果如图 10 所示。当重复利用 5 批次时, $\text{H}_2\text{O}_2$  相对清除率保持在 86.25%;当重复利用 10 批次时, $\text{H}_2\text{O}_2$  相对清除率保持在 69.07%。结果表明该固定化酶具有较好的可重复利用性。



图 10 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的可重复利用性Fig. 10 Reusability of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT

### 3 结论

本文采用溶剂热法制备了磁性 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 粒子, 通过对其表面修饰 Ni<sup>2+</sup> 得到单分散酶固定化介质 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni; 通过基因工程改造获得氨基端和羧基端各修饰一个 6 × His 的 CAT, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni 通过金属离子螯合作用与该酶选择性结合, 成功制得 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT, 并测定了其催化活性, 所得结论如下:

(1) 对 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的固定化条件进行优化, 得到最佳条件: 溶液 pH 为 7.0, CAT 质量浓度为 1.75 mg/mL, 固定化时间为 12 h。在此条件下, 固定化酶量可达 376.13 mg/g, 酶活性可达 4 946 U/g, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 表现出较高的酶负载量和良好的催化活性。

(2) 与游离 CAT 相比, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 具有较高的热稳定性和储存稳定性; 采用响应面法对 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ni-CAT 的催化反应条件进行优化, 得到最佳条件: 反应温度为 40 ℃, 溶液 pH 为 6.4, 底物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度为 14.5 mmol/L。在此条件下, 测得 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的清除率可达 84.32%, 并且该固定化酶表现出良好的可重复使用性。

### 参考文献:

- [1] ESEN E, ÖZTÜRK S, ERTUĞRUL UYGUN H D, et al. Cibacron blue F3GA incorporated immobilized metal chelate affinity sorbent as a high efficient affinity immobilization materials for catalase enzyme [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 206: 111911.
- [2] INANAN T, TÜZMEN N, KARIPCIN F. Oxime-functionalized cryogel disks for catalase immobilization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 812–820.
- [3] GRIGORAS A G. Catalase immobilization: a review [J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 117: 1–20.
- [4] 刘灵芝, 钟广蓉, 熊莲, 等. 过氧化氢酶的研究与应用新进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(3): 15–18.
- LIU L Z, ZHONG G R, XIONG L, et al. Research and application progress of catalase [J]. Chemistry & Bioengineering, 2009, 26(3): 15–18. (in Chinese)
- [5] ARABACI G, USLUOĞLU A. Catalytic properties and immobilization studies of catalase from *Malva sylvestris* L. [J]. Journal of Chemistry, 2013, 2013: 686185.
- [6] KAUSHAL J, SEEMA, SINGH G, et al. Immobilization of catalase onto chitosan and chitosan-bentonite complex: a comparative study [J]. Biotechnology Reports, 2018, 18: e00258.
- [7] WU H, LIANG Y P, SHI J F, et al. Enhanced stability of catalase covalently immobilized on functionalized titania submicrospheres [J]. Materials Science and Engineering: C, 2013, 33(3): 1438–1445.
- [8] CUI J D, FENG Y X, JIA S R. Silica encapsulated catalase@metal-organic framework composite: a highly stable and recyclable biocatalyst [J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 351: 506–514.
- [9] ALI A, ZAFAR H, ZIA M, et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles [J]. Nanotechnology, Science and Applications, 2016, 9: 49–67.
- [10] WANG H M, WANG J, WANG J W, et al. Spectroscopic method for the detection of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid based on its inhibitory effect towards catalase immobilized on reusable magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanocomposite [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 247: 146–154.
- [11] IBRAHIM ALHAYALI N, KALAYCIOĞLU ÖZPOZAN N, DAYAN S, et al. Catalase/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Cu<sup>2+</sup> hybrid biocatalytic nanoflowers fabrication and efficiency in the reduction of organic pollutants [J]. Polyhedron, 2021, 194: 114888.
- [12] ALI A O, ALI K A, SHAHEIN Y E, et al. Epoxy functionalized iron oxide magnetic nanoparticles for catalase enzyme covalent immobilization [J]. Chemical Papers, 2022, 76: 4431–4441.
- [13] WANG L, CHEN G, ZHAO J, et al. Catalase immobilization on amino-activated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles;



- loading density affected activity recovery of catalase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 133: S468 – S474.
- [14] LIU C X, YANG Y D, GUO H F, et al. Preparation and enzymatic activity of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  -IDA -Ni/NAD kinase magnetic catalyst [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2020, 37(3): 475 – 481.
- [15] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248 – 254.
- [16] BEERS R F, SIZER I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1952, 195(1): 133 – 140.
- [17] 朱音谛. 功能化磁性纳米粒子的制备及在组氨酸标签蛋白分离纯化中的应用[D]. 马鞍山: 安徽工业大学, 2020.
- ZHU Y D. Preparation of functional magnetic nanoparticles and their application in separation and purification of histidine-tagged proteins [D]. Ma' anshan: Anhui University of Technology, 2020. (in Chinese)
- [18] MÖRIKOFER-ZWEZ S, VON WARTBURG J P, AEBI H. Heterogeneity of erythrocyte catalase: variability of the isoelectric point [J]. Experientia, 1970, 26(9): 945 – 947.
- [19] 袁宇航. 铜基金属有机骨架材料固定漆酶及其催化双酚 A 的降解研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- YUAN Y H. Immobilization of laccase on Cu-based metal organic frameworks and its catalytic degradation of bisphenol A [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021. (in Chinese)
- [20] 张丽萍. 多孔壳聚糖磁性微球的制备及对固定化木聚糖酶的研究[D]. 黄石: 湖北师范学院, 2011.
- ZHANG L P. Preparation of porous chitosan magnetic microspheres and study on magnetic microspheres immobilized xylanase [D]. Huangshi: Hubei Normal University, 2011. (in Chinese)
- [21] 杨树林, 孟广荣, 曾亮亮. pH 值对纤维素酶系内切  $\beta$ -葡聚糖苷酶活力影响的酶催化动力学模型[J]. 南京理工大学学报(自然科学版), 2006, 30(1): 92 – 96.
- YANG S L, MENG G R, ZENG L L. Enzyme catalysis kinetic model of pH effect on activity of endo- $\beta$ -glucanase [J]. Journal of Nanjing University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2006, 30(1): 92 – 96. (in Chinese)
- [22] DE OLIVEIRA CARVALHO J, FRANCA ORLANDA J F. Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract [J]. Food Chemistry, 2017, 233: 159 – 163.
- [23] AKHOND M, PASHANGHEH K, KARBALAEI-HEIDARI H R, et al. Efficient immobilization of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase on amino-functionalized magnetite nanoparticles: characterization and stability evaluation of the immobilized enzyme [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 180(5): 954 – 968.
- [24] LI J, LI L S, XU L. Hierarchically macro/mesoporous silica spheres for catalase immobilization and catalysis [J]. Materials Letters, 2017, 193: 67 – 69.
- [25] EROL K, CEBECI B K, KÖSE K, et al. Effect of immobilization on the activity of catalase carried by poly (HEMA -GMA) cryogels [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 738 – 743.
- [26] HE L, LAN W T, CEN L, et al. Improving catalase stability by its immobilization on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) scale collagen self-assembly films [J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 105: 110024.
- [27] 陈军. 壳聚糖固定化过氧化氢酶在清除卷烟烟气自由基等有害物质中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- CHEN J. Application of catalase immobilized by chitosan in scavenging toxicants as free radicals in cigarette smoke [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006. (in Chinese)

## Preparation and catalytic properties of catalase immobilized on magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4$ particles

HU YiFan LI ZhengJun LIU ChangXia<sup>\*</sup>

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  particles were synthesized by a solvothermal method and modified by  $\text{Ni}^{2+}$  ions to obtain  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ . The immobilized enzyme  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT was successfully prepared by metal chelation between  $\text{Ni}^{2+}$  on  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$  and the imidazole group of  $2 \times 6 \times \text{His}$  in catalase (CAT). By optimizing the immobilization conditions, the immobilization amount of CAT reached 376.13 mg/g, and the enzyme activity reached 4 946 U/g. Compared with free CAT,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT has higher thermal stability and storage stability. The catalytic reaction conditions of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT were optimized by Box - Behnken design (BBD) of response surface methodology (RSM). The optimum conditions were as follows: the reaction temperature was 40 °C, the pH of the solution was 6.4, and the concentration of substrate  $\text{H}_2\text{O}_2$  was 14.5 mmol/L. After reaction for 2 min under optimal conditions, the removal rate of substrate  $\text{H}_2\text{O}_2$  by  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT reached 84.32%. After being reused 10 times, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  removal rate of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT was 69.07% of the initial  $\text{H}_2\text{O}_2$  removal rate, indicating that the immobilized enzyme had good reusability.

**Key words:** magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  particles; metal chelation; catalase; immobilization;  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ni}$ -CAT

(责任编辑:于少云)