

李丽娟,马贵平,夏文静. 碳纳米管固定化纤维素酶的酶学性质[J]. 江苏农业科学,2020,48(23):275-279.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.23.054

碳纳米管固定化纤维素酶的酶学性质

李丽娟¹, 马贵平¹, 夏文静²

(1. 乌兰察布医学高等专科学校, 内蒙古乌兰察布 012000; 2. 南京师范大学泰州学院, 江苏泰州 225300)

摘要:纤维素酶在环保型燃料乙醇的生产、中药成分提取、食品、饲料、酿酒、石油开采、环境保护等行业都具有一定的应用前景,但由于纤维素酶的生产成本较高、生物活力较低,使得纤维素酶的应用受到了局限。然而,固定化酶技术可以使酶重复利用,降低生产成本,克服这一技术瓶颈。研究了多壁碳纳米管固定化纤维素酶的酶学性质和重复使用性,并与游离酶的酶学性质做比较。结果表明,固定化纤维素酶的最适温度为 50 ℃,最适 pH 值为 3.0,60 ℃ 放置 120 min 仍保持 70% 以上的原酶活力;通过动力学模型研究发现,固定化酶的米氏常数(K_m)值为 0.588 mmol/L,较游离酶稍有增加;固定化酶于 4 ℃ 下放置 1 个月,酶活力仍保持原酶活力的 68% 以上;固定化酶用于连续水解羧甲基纤维素,经过 6 轮重复使用,固定化酶活力仍保持 50% 以上。与游离酶相比,固定化纤维素酶具有更宽的温度范围,更好的热稳定性及耐酸碱性,良好的储存稳定性及重复利用性。

关键词:碳纳米管;固定化;纤维素酶;固定化酶;酶学性质;酶活力

中图分类号: S188⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)23-0275-04

碳纳米管自 1991 年被发现以来,由于性质独特^[1]吸引人们的关注。碳纳米管是由石墨片卷曲而成的圆柱状结构,报道较多的有单壁碳纳米管和多壁碳纳米管^[2],单壁碳纳米管仅由 1 层石墨片围绕中心轴卷曲而成,而多壁碳纳米管由许多石墨片围绕中心轴卷取形成^[3]。相比于单壁碳纳米管,多壁碳纳米管具有优良的物理化学稳定性,且价格低廉、容易获得、毒性较低、研究应用较多^[4-5]。

碳纳米管固定化酶具有比表面积大、载酶量高、分散性好等特点^[6-7],并且碳纳米管与酶长度相似尺寸,有利于二者相互反应^[8]。此外,对碳纳米管进行功能化,有利于改变碳纳米管的疏水结构,便于酶的结合,因此表面功能化后的碳纳米管,可为酶提供更加合适的微环境^[4]。目前,研究者主要通过共价交联和非共价交联 2 种方式固定化酶,共价交联方式固定化酶与载体通过共价键进行结合,这种结合较为牢固,但酶的结构容易受到破坏^[9];非共价交联方式主要通过 $\pi-\pi$ 堆积作用力、疏水作用力、静电作用力等方式与酶结合,结合力较弱,但对酶的结构影响较小^[10]。碳纳米管固定化酶,易于从反

应体系中分离,可重复使用,便于运送和储存,稳定性好,生产成本低,有利于工业化应用^[11-13]。

微生物产纤维素酶活力较低,而且纤维素酶的生产技术较低,是限制纤维素酶在工业上大量使用的瓶颈之一^[14]。本试验通过多壁碳纳米管非共价交联方式固定化纤维素酶,研究了多壁碳纳米管固定化纤维素酶的最适温度、最适 pH 值、热稳定性、酸碱稳定性、动力学模型、储存稳定性、重复使用性等酶学性质,为纤维素酶广泛应用提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料

所用绿色木霉纤维素酶,购自上海瑞永生物科技有限公司,10 U/mg。所用多壁碳纳米管购自深圳纳米港有限公司,外径 15~30 nm,长 1.5 μm 。

1.2 试验时间及地点

于 2017 年 12 月至 2019 年 6 月在乌兰察布医学高等专科学校生物化学实验室进行试验。

1.3 多壁碳纳米管的功能化

将 0.1 g 的碳纳米管和 100 mL 硝酸和硫酸的混酸溶液(体积比为 1:3),放入容积为 200 mL 的三角瓶中,之后将其放入超声波清洗器中于 40 ℃、40 kHz 超声 4 h,待充分冷却使碳纳米管沉淀后,去上清,用蒸馏水对沉淀进行分散。通过 4 000 r/min 离心去上清,反复操作 6~7 次,直至 pH 值接近中

收稿日期:2020-04-01

基金项目:内蒙古自治区高等学校科学研究项目(编号:NJZY17574)。

作者简介:李丽娟(1984—),女,内蒙古乌兰察布人,硕士,副教授,主要从事酶工程相关研究。E-mail: lilij2002@126.com。

性为止,于 80 ℃ 真空干燥 48 h,冷却干燥 24 h,获得功能化的多壁碳纳米管^[15]。

1.4 多壁碳纳米管固定化纤维素酶

将 20 mg 的纤维素酶加入到 5 mL pH 值为 5.0 的 50 mmol/L 柠檬酸 - Na₂HPO₄ 缓冲液中,再加入 4 mg 的碳纳米管,将上述溶液在水浴箱中 40 ℃、200 r/min 孵化 3 h,3 800 r/min 离心 12 min 后,小心移去上清液,重新分散到柠檬酸 - Na₂HPO₄ 缓冲液中清洗复合物,重复上述步骤至少 4 次,移去未结合的酶,将复合物在空气中干燥 24 h 获得多壁碳纳米管纤维素酶固定化酶^[16]。

1.5 纤维素酶活的测定

以羧甲基纤维素(CMC)为底物,采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定^[17]。吸取 pH 值为 4.8 的柠檬酸 - Na₂HPO₄ 缓冲液 1.0 mL 和 1% CMC 0.5 mL,加入到 25 mL 试管中,并加入 0.5 mL 适当稀释的酶液,在 50 ℃ 水浴箱中反应 30 min,然后加入 3 mL 的 DNS 煮沸 5 min,冷却后加蒸馏水定容至 25 mL,混匀后在 540 nm 下比色测定。空白对照以 0.5 mL 蒸馏水代替酶液。固定化纤维素酶活力的测定,是将游离酶活力测定中的 0.5 mL 适当稀释的酶液用 0.5 mL 蒸馏水和一定质量的固定化酶来代替,其余步骤与游离酶活力的测定相同。

1.6 温度对纤维素酶活力的影响

将固定化酶和游离酶分别置于 30、40、50、60、70 ℃ 的水浴箱中,15 min 后取出,待冷却到室温进行酶活力测定,以温度为横坐标、相对酶活力为纵坐标作图。

1.7 纤维素酶的热稳定性研究

将固定化酶和游离酶分别置于 60 ℃ 的恒温水浴箱中,每隔 5 min 取样,待其冷却至室温测定酶活力。初始酶活力为 100%,计算酶活力随时间延长而变化的趋势,以时间为横坐标、相对酶活力为纵坐标作图。

1.8 pH 值对纤维素酶活力的影响

将固定化酶和游离酶分别加入 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的柠檬酸 - Na₂HPO₄ 缓冲液中,于 40 ℃ 水浴 15 min 后取出,以 pH 值为横坐标、相对酶活力为纵坐标作图。

1.9 纤维素酶的 pH 值稳定性研究

将固定化酶和游离酶分别加入 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的柠檬酸 - Na₂HPO₄ 缓冲液,于 4 ℃ 下放置 1 h,初始的酶活力

为 100%,计算酶活力随时间延长而变化的趋势,以 pH 值为横坐标、相对酶活力为纵坐标作图。

1.10 固定化酶和游离酶动力学模型的建立

取 6 份 0.2 g 的固定化酶和 6 份 0.5 mL 适当稀释的游离酶,分别加入 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2% CMC 0.5 mL 及 1 mL 的缓冲液,于 50 ℃ 水浴 30 min,之后加入 3 mL DNS 煮沸 5 min,于 540 nm 测吸光度,计算还原糖含量。根据米曼方程: $1/v = K_m/v_{\max} [S] + 1/v_{\max}$,以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/v$ 为纵坐标,用双倒数作图,计算固定化纤维素酶和游离酶的米氏常数(K_m)。式中: $[S]$ 表示底物浓度; v 表示不同底物浓度下的反应速率; v_{\max} 表示最大反应速率。

1.11 纤维素酶的储存稳定性

将固定化酶和游离酶置于 4 ℃ 冰箱保存 1 个月,以初始酶活力为 100%,计算酶活力随时间的变化的趋势。

1.12 固定化酶的重复使用性

将 0.2 mg 固定化酶置于 25 mL 刻度试管中,加入 0.5 mL 1% CMC 和 1 mL 柠檬酸 - Na₂HPO₄ 缓冲液,在 50 ℃ 水浴箱中反应 30 min,移出反应液测酶活力,固定化酶用柠檬酸 - Na₂HPO₄ 缓冲液清洗 3 次,装入新鲜的 CMC,再次测定固定化酶活力,多次循环使用,测定固定化酶的重复使用性。

2 结果与分析

2.1 温度对纤维素酶活力的影响

温度对酶的活力有着双重影响。低温使酶的活力降低,高温使酶蛋白变性,酶活力降低甚至丧失。图 1 显示,在低温(30~40 ℃)的条件下,固定化酶和游离酶的相对活力逐步增加;当温度大于 40 ℃ 时,游离酶的相对活力开始下降,而固定化酶的活力继续增加,直到 50 ℃,这说明相对于游离酶,固定化酶有一个更宽的温度范围。

2.2 纤维素酶的热稳定性

将固定化酶和游离酶置于 60 ℃ 水浴箱中,间隔不同时间取样测定酶活力。图 2 表明,游离酶在水浴中放置 20 min,酶活力仅剩初始酶活力的 49.59%,而固定化酶放置 60 min,酶活力保持原酶活力的 90% 以上,放置 120 min,酶活力仍保持原酶活力的 70% 以上,说明酶固定化后,热稳定性增加。这可能是由于纤维素酶被固定化到功能化的碳纳米管的孔径当中,整体是一个块状结构,因此能很好

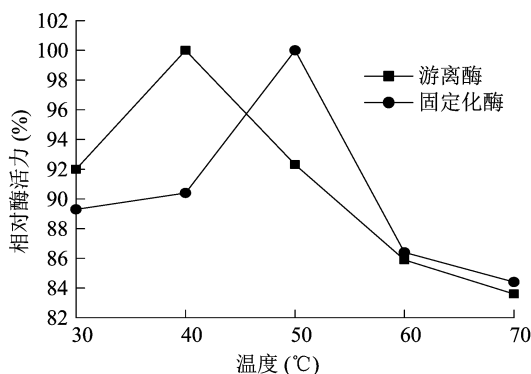


图1 温度对固定化酶和游离酶酶活力的影响

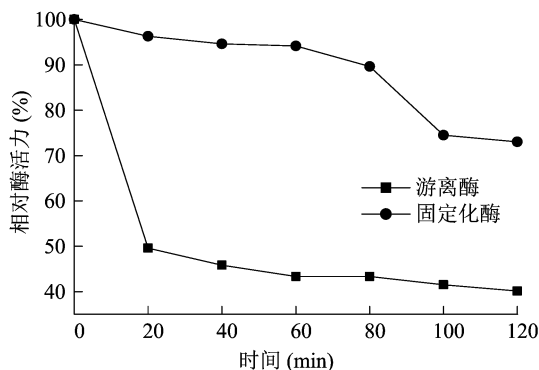


图2 固定化酶和游离酶的热稳定性

地防止酶在高温中失去活力^[18]。

2.3 pH 值对纤维素酶活力的影响

从图3可以看出,固定化酶和游离酶的最适 pH 值均低于 7.0,为酸性条件;纤维素酶在 pH 值为 2.0~3.0 的范围内较为稳定,当 pH 值大于 4.0 时,酶活力开始逐步下降,当酶处于碱性条件下,纤维素酶的相对活力大幅降低,仅为最初始活力的 20% 左右。这是由于纤维素酶表面的离子基团,受到了较强的静电排斥,导致酶活力中心发生改变,使酶活力降低,其他研究中也有相似的结论^[19]。

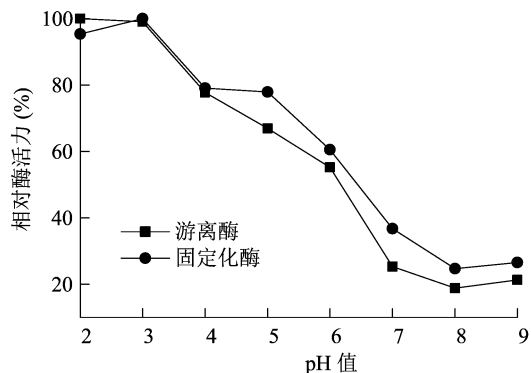


图3 pH 值对固定化酶和游离酶的影响

2.4 纤维素酶的 pH 值稳定性研究

图4显示,固定化酶和游离酶在 pH 值 2.0~3.0 条件下最稳定,随着 pH 值的升高,酶的稳定性

逐步下降,但固定化酶下降的幅度比游离酶小,说明固定化酶比游离酶有更高的稳定性^[20]。

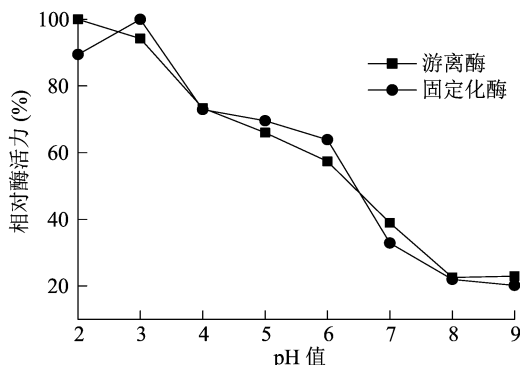


图4 固定化酶和游离酶的 pH 值稳定性

2.5 固定化酶和游离酶的动力学模型

对图5中2条直线的截距求倒数,计算出固定化酶、游离酶的 K_m , 分别为 0.588、0.436 mmol/L, 可见固定化酶的米氏常数大于游离酶,说明固定化酶与底物的亲和力减小,这可能是由于酶的一部分被固定化在载体上,其空间结构受到影响。由于本试验采用非共价交联方式固定化酶,相对于化学方式来说,对结构影响较小,因此, K_m 值增大的幅度较小,对酶与底物亲和力减小的幅度较小。

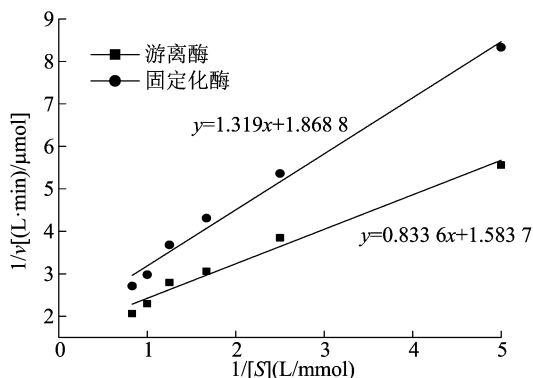


图5 固定化酶和游离酶的动力学模型

2.6 纤维素酶的储存稳定性

从图6可以看出,随着储存时间的增加,固定化酶和游离酶的相对酶活力逐步下降,但固定化酶活力的下降幅度明显低于游离酶。固定化酶储存 7 d, 酶活力仍保持原酶活力的 95% 以上,而游离酶降至原酶活力的 72.72%,固定化酶储存 30 d,酶活力保持原酶活力的 68.23%,游离酶降至原酶活力的 56.82%,说明纤维素酶经过固定化后储存稳定性得到了很大的提升,这是固定化酶进行工业应用的重要前提。

2.7 固定化酶的重复使用性

相对于游离酶,固定化酶最明显的优势是可以

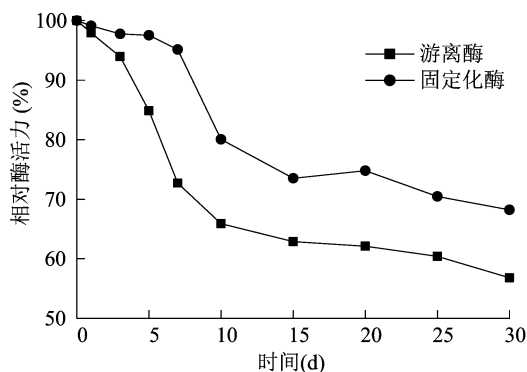


图6 固定化酶和游离酶的储存稳定性

重复利用^[21],但随着重复利用次数的增加,固定化酶的活力逐步降低。从图 7 可以看出,重复使用 6 次后固定化酶的活力仍然保持在 50% 以上;随重复次数的增加,固定化酶活力逐步减少,可能是因为非共价键的结合力比较弱,易随着使用次数的增加,逐步从碳纳米管上脱落^[22],也可能是由于功能化的碳纳米管的亲水特性,在重复使用多次后,碳纳米管的直径变大导致表面积减小,使得固定化酶活力减弱^[23]。

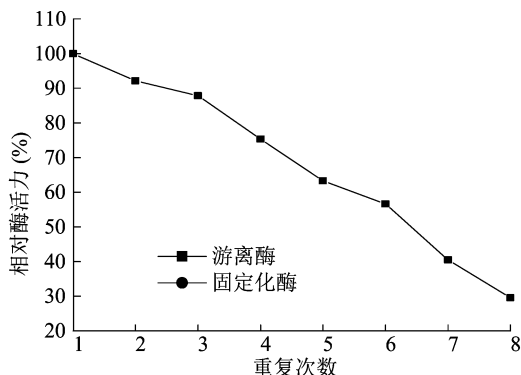


图7 固定化酶的重复使用性

3 结论

本试验通过与游离纤维素酶相比较的方式,系统地研究了固定化纤维素酶的酶学性质,得出如下结论:(1)固定化纤维素酶的最适宜温度为 50 ℃,最适 pH 值为 3.0,于 60 ℃下放置 120 min 仍能保持原酶活力的 70%,温度适宜范围更宽,热稳定性及耐酸、碱性更好,能够更好地抵抗外界恶劣的环境,应用范围更广。(2)固定化酶放置 1 个月,酶活力仍保持原酶活力的 60% 以上,固定化酶用于连续水解羧甲基纤维素,经过 6 轮重复使用,固定化酶活力仍保持 50% 以上,具有良好的储存稳定性及重复利用性,有利于减少大量游离纤维素酶的使用,可降低成本。(3)通过动力学模型研究发现,固定化酶

的 K_m 值为 0.588 mmol/L,较游离酶稍有增加,与底物的亲和力稍有降低,固定化酶不仅可以降低纤维素酶的使用成本,同时还可以使底物保持较好的亲和力,应用范围更广。

参考文献:

- [1] Huang J L, Tsai Y C. Direct electrochemistry and biosensing of hydrogen peroxide of horseradish peroxidase immobilized at multiwalled carbon nanotube/alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrode[J]. *Sensors and Actuators B*, 2009, 140(1): 267-272.
- [2] Zhang C D, Luo S M, Chen W. Activity of catalase adsorbed to carbon nanotubes: effects of carbon nanotube surface properties[J]. *Talanta*, 2013, 13: 142-147.
- [3] Feng W, Ji P J. Enzymes immobilized on carbon nanotubes[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 889-895.
- [4] Rastian Z, Khodadadi A, Vahabzadeh F, et al. Facile surface functionalization of multiwalled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: generate compatible interface for lipase immobilization[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 90: 16-26.
- [5] Yoon Mee L, Kwon O Y, Yeo Joon Y, et al. Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28: 39-43.
- [6] Apetrei I, Apetrei C. The biocomposite screen-printed biosensor based on immobilization of tyrosinase onto the carboxyl functionalised carbon nanotube for assaying tyramine in fish products[J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 149: 1-8.
- [7] Pang R, Li M Z, Zhang C D. Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on carbon nanomaterials: diffusional limitation investigation[J]. *Talanta*, 2015, 113: 38-45.
- [8] Janegitz B C, Pauliukaite R, Ghica M E, et al. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film[J]. *Sensors and Actuators B*, 2011, 158(1): 411-417.
- [9] Karimi M, Chaudhury I, Cheng J H, et al. Immobilization of endo-inulinase on non-porous amino functionalized silica nanoparticles[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 104: 48-55.
- [10] Matsuura Koji, Saito Takeshi, Okazaki Toshiya, et al. Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions[J]. *Chemical Physics Letters*, 2006, 429 (4/5/6): 497-502.
- [11] Nurroyaila M, Noraziah B, Najarat M, et al. A facile enzymatic synthesis of geranyl propionate by physically adsorbed *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 72: 49-55.
- [12] Ansari S A, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(3): 512-523.

陈帅行,马浩天,于杰,等. 基于 Fenton 氧化法预处理高氨氮废水培养斜生栅藻[J]. 江苏农业科学,2020,48(23):279-285.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.23.055

基于 Fenton 氧化法预处理高氨氮废水培养斜生栅藻

陈帅行,马浩天,于杰,徐雯,李润植,崔红利

(山西农业大学分子农业与生物能源研究所,山西太谷 030801)

摘要:大规模畜禽养殖废水的处理仍是一个亟待解决的问题。基于微藻培养系统不仅能有效净化畜禽养殖废水,而且可以极大地降低微藻生物质制备成本。但畜禽养殖废水中通常富含大量的氨氮,抑制了大多数微藻的生长,已经成为微藻净化畜禽养殖废水工艺规模化应用的限制因素。本研究旨在利用芬顿(Fenton)法预处理鸡场冲圈废水,降低氨氮含量,促进微藻有效生长。以鸡场冲圈废水为研究对象,测定其本底组成。利用 Fenton 法预处理鸡场冲圈废水降低氨氮浓度,解除高氨氮抑制微藻生长现象,使斜生栅藻可以生长。通过 Fenton 法预处理,可以有效降低氨氮的浓度,施用蒸馏水 1:1 稀释 Fenton 试剂后栅藻可有效生长。斜生栅藻无法在鸡场冲圈废水原液和 Fenton 法预处理后的废水中正常生长,但预处理之后经过与水 1 倍稀释后生长良好。这为后续建立微藻净化畜禽养殖废水联产微藻产品的生产体系奠定了技术基础。

关键词:斜生栅藻;鸡场冲圈废水;Fenton 氧化法;高氨氮去除;高氨氮废水

中图分类号: X703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)23-0279-07

随着国家政策的支持,我国的畜禽养殖业得到

了快速发展,大规模的畜禽养殖已经成为我国的主要发展方向。在畜禽养殖日常管理中产生过量的冲圈废水,而这些废水中含有大量的难以降解的有机物,处理不当或直接排放将对生态环境造成严重危害^[1-2]。

目前我国处理规模化畜禽废水有 3 种主要的基本方法,分别是自然处理模式、好氧处理模式和厌氧处理模式。厌氧发酵可制备沼气,造价低,能耗低,处理过程不需要氧气,可以有效去除有机物,是

收稿日期:2020-03-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31902394);山西省重点研发一般项目(编号:201803D31063);农业部“948”项目(编号:2014-Z39);山西省煤基重大科技专项(编号:FT-2014-01);山西省重点研发重点项目(编号:201603D312005)。

作者简介:陈帅行(1994—),男,河北邯郸人,硕士研究生,研究方向为微藻生物技术。E-mail:chenshuaihang1995@163.com。

通信作者:崔红利,博士,副教授,研究方向为微藻生物技术。E-mail:cuihongli@sxau.edu.cn。

[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(9):1251-1259.

[14] 刘晓晶,李田,霍增强. 纤维素酶的研究现状及应用[J]. 安徽农业科学,2011,39(4):1920-1924.

[15] Wang L, Wei L, Chen Y, et al. Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes[J]. Journal of Biotechnology,2010,150(1):57-63.

[16] Zhou H, Qu Y Y, Kong C L, et al. Catalytic performance and molecular dynamic simulation of immobilized C—C bond hydrolase based on carbon nanotube matrix[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,2014,116:365-371.

[17] 周振. 木聚糖酶强化纤维素酶对植物纤维的水解[D]. 南京:南京林业大学,2018.

[18] 张义芹,王正,唐爱星,等. 功能化碳纳米管固定化脂肪酶的制备及其合成生物柴油研究[J]. 可再生能源,2016,34(9):1411-1416.

[19] Liu X H, Bu C H, Nan Z H, et al. Enzymes immobilized on amine -

terminated ionic liquid - functionalized carbon nanotube for hydrogen peroxide determination[J]. Talanta,2013,105:63-68.

[20] Boncel S, Aurelia Z, Szymańska K, et al. Alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* non-covalently immobilised on pristine versus oxidised multi-wall carbon nanotubes as efficient and recyclable catalytic systems in the synthesis of solketal esters[J]. Enzyme and Microbial Technology,2013,53(4):263-270.

[21] 程龙. 辣巧过氧化物酶在多壁碳纳米管/堇青石复合载体上的固定化及含油污水处理[D]. 北京:北京化工大学,2015.

[22] Hasegawa F, Inoue H, Yano S, et al. Evaluation of reusable cellulase activity in the residue of enzymatic hydrolysis[C]//ETA - Florence Renewable Energies. Abstracts of the 20th European Conference and Exhibition,2012.

[23] Madan V, Minoo N, Colijn B, et al. Enzyme immobilisation on amion-functionalised multi-walled carbon nanotubes: structural and biocatalytic characterisation[J]. PLoS One,2013,10:1371-1382.