

ZIF-8 原位合成法固定化脂肪酶 CRL

苏伟¹,李青云^{1,2},刘幽燕^{1,2},黄绘倩¹,唐爱星^{1,2}

(1. 广西大学化学化工学院, 南宁 530004; 2. 广西生物炼制重点实验室, 南宁 530004)

摘要:以 ZIF-8 为固定化载体,通过原位合成法固定褶皱假丝酵母脂肪酶(CRL),研究了不同固定化条件对固定化酶活力的影响以及固定化酶的稳定性,并对固定化酶进行了结构表征。结果表明:在 10 mL 40 mmol/L 硝酸锌溶液、10 mL 160 mmol/L 2-甲基咪唑溶液、2-甲基咪唑溶液初始 pH 8、酶添加量 2.75 mg、-48℃ 冷冻干燥条件下,获得的固定化酶 CRL@ZIF-8 蛋白回收率为 93%,比活力为 1.08 U/mg;底物的分子大小对固定化酶的催化性能有明显影响,在以相对小分子的乙酸对硝基苯酯为底物时,重复使用 9 次后固定化酶仍保持 72.8% 的相对活力;通过对固定化酶进行场发射扫描电镜和氮气吸附脱附表征,表明脂肪酶 CRL 在载体表面和内部均有分布,固定化酶颗粒粒径约 400 nm。

关键词:褶皱假丝酵母脂肪酶(CRL);ZIF-8;原位合成法;固定化

中图分类号:Q814.2;O627.23 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)02-0107-07

Immobilization of lipase CRL on ZIF-8 by in situ synthesis

SU Wei¹, LI Qingyun^{1,2}, LIU Youyan^{1,2}, HUANG Huiqian¹,
TANG Aixing^{1,2}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Key Laboratory of Guangxi Biorefinery, Nanning 530004, China)

Abstract: ZIF-8 was employed as the support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* (CRL) through in situ synthesis. The effects of different immobilization conditions on the activity of immobilized lipase and the stability of immobilized lipase were studied, and the structure of the immobilized lipase was characterized. The results showed that under the conditions of 10 mL 40 mmol/L zinc nitrate, 10 mL 160 mmol/L 2-methylimidazol, initial pH 8.0, lipase dosage 2.75 mg and freeze drying at -48℃, the protein recovery rate and specific activity of the immobilized lipase(CRL@ZIF-8) were 93% and 1.08 U/mg, respectively. Besides, it was demonstrated that the size of substrates had a significant impact on the catalytic property of the immobilized lipase. With *p*-nitrobenzene acetate as the substrate, the relative activity of immobilized lipase was 72.8% after nine times of reuse. According to the field emission scanning electron microscopy (FSEM) and BET, the lipase CRL was found to embed both on the surface and in the interior of ZIF-8. The diameter of the immobilized lipase was about 400 nm.

Key words: lipase from *Candida rugosa*(CRL); ZIF-8; in situ synthesis; immobilization

收稿日期:2020-05-12;修回日期:2020-11-17

基金项目:国家自然科学基金(21966007);广西自然科学基金(2018GXNSFAA281278)

作者简介:苏伟(1994),男,在读硕士,研究方向为酶催化和固定化、烯烃转化(E-mail)suwei1122@outlook.com。

通信作者:唐爱星,讲师,博士(E-mail)aistar2000@163.com。

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一种重要的工业用酶,能催化酯化、酯交换、对映选择性水解^[1]、聚合物合成、外消旋体的动力学拆分等反应^[2],在食品、能源、洗涤剂、医药、皮革、纺织、化妆品^[3]和造纸等行业都有广泛应用。由于酶催化剂造价相对昂贵,结构不稳定且不易回收的特点,限制了脂肪酶进一步

工业化应用。酶固定化不仅可以解决酶催化剂重复利用难的问题,同时能够维持酶的构象稳定,增强酶对极端温度环境的耐受性,是解决酶催化剂应用困难的重要手段。将酶催化剂负载到性能优良的载体材料上是固定化技术常用的手段。

除了应用较多的分子筛、硅藻土、壳聚糖等,目前又有一些性能优良的载体被开发出来,并用作固定化平台,取得了良好效果。金属有机骨架(MOF)因具有可调的孔径、大的比表面积和优异的物理化学性能而备受关注。MOF具有易合成、易修饰,以及能为酶提供稳定的微环境的特点,在酶固定化领域具有很大吸引力^[4]。MOF由金属离子或团簇以及有机分子组成。由于金属节点和有机配体具有很多的选择,因此MOF具有很强的结构多样性和丰富的功能^[5]。Pisklak等^[6]首次报道用MOF材料通过吸收法固定微过氧化物酶(MP-11),获得的酶-MOF复合材料的催化能力比游离酶更高。Chen等^[7]通过吸收法将肌红蛋白固定到介孔MOF中,获得的复合材料催化能力具有底物分子大小选择性。

目前,随着对酶-MOF复合材料的开发,出现了一些新颖的固定化策略,其中Lyu等^[8]首次开发了原位合成法固定化技术,在MOF合成的同时直接加入酶,一步得到酶-MOF复合材料。区别于传统的合成后修饰技术,原位合成法是基于MOF材料开发的一种新的封装技术。MOF的前体分子通过静电、氢键、疏水等相互作用吸附在客体分子表面,然后进行自组装,从而实现客体分子的固定。该方法合成迅速、实验条件温和,有利于减少固定化过程中酶活力的损失;而且,原位合成法具有很高的酶封装效率,合成后的固定化酶蛋白不易流失,使得固定化酶具有很好的稳定性和重复使用性。由于MOF材料为微孔或者介孔材料,因此合成的固定化酶还具有底物分子大小选择性,有利于固定化酶的选择性催化。另外,原位合成法具有不限于客体分子大小的特点,甚至可以用来固定化细胞^[9],极大地拓展了其应用范围。

ZIF-8是一种被广泛研究的MOF材料,其原材料价格低廉,合成条件简单且易改进,因而十分适用于固定化酶的开发。褶皱假丝酵母脂肪酶(Lipase from *Candida rugosa*, CRL)是常用的工业脂肪酶之一,MOF原位合成法固定化脂肪酶CRL的研究未见报道。本文使用ZIF-8为载体通过原位合成法固定脂肪酶CRL(标记为CRL@ZIF-8)。考察原料比例、pH、静置时间、酶添加量、干燥方式等对固定化酶蛋白回收率和比活力等指标的影响,研

究了最适条件下的CRL@ZIF-8生物催化剂的稳定性,并对固定化酶的结构进行了表征,印证了固定化酶中酶的镶嵌位置,以期拓展脂肪酶CRL的固定化思路,为其进一步工业化应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

脂肪酶CRL, Sigma-Aldrich公司(美国);2-甲基咪唑,分析纯,阿拉丁试剂公司;棕榈酸对硝基苯酯(*p*-NPP)、丁酸对硝基苯酯(*p*-NPB)和乙酸对硝基苯酯(*p*-NPA),均为分析级,西格玛奥德里奇贸易有限公司(上海);六水合硝酸锌,分析纯,西陇科学股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

分析天平,小型离心机, Beckman Coulter大型冷冻离心机,旋涡振荡器,磁力搅拌器, BioTek酶标仪,酸度计,真空干燥箱,冷冻干燥机, Hitachi SU8220型场发射扫描电镜, ASAP 2460型氮气吸附脱附仪,上海智城 ZWY-113H4F型平行合成仪。

1.2 实验方法

1.2.1 底物溶液的配制

称取一定量的底物(*p*-NPA, *p*-NPB和*p*-NPP),分别加入50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH为7.5)中,配成0.4 mmol/L的底物溶液^[10]。

1.2.2 锌离子和2-甲基咪唑对酶活力的影响

分别配制25 mL六水合硝酸锌(40 mmol/L)和2-甲基咪唑溶液(160 mmol/L),然后将3 mL CRL溶液(8 mg/mL)加入上述溶液中,同时以水作为参照,置于平行合成仪中,在室温条件下振荡10 min。振荡结束后,取20 μ L样品与180 μ L 0.4 mmol/L *p*-NPA底物溶液混合,在酶标仪中,410 nm波长下测定酶活力。将CRL的初始相对活力定义为100%。

1.2.3 CRL@ZIF-8的制备

配制10 mL 40 mmol/L硝酸锌溶液,加入2.75 mg CRL。配制10 mL 160 mmol/L的2-甲基咪唑溶液,用硝酸将pH调至8.0,然后加入到硝酸锌和酶溶液中,振荡10 min。所得产品在8 000 g下离心10 min,用去离子水清洗3次,-48 $^{\circ}$ C冷冻干燥,得到CRL@ZIF-8。

以此工艺参数为基础,通过改变某参数进行单因素实验,考察其对酶固定化效果的影响。

1.2.4 蛋白回收率的测定

蛋白含量采用Bradford法测定^[11],蛋白回收率和蛋白固载率分别按式(1)和式(2)计算。

$$y_1 = \frac{M-m}{M} \times 100\% \quad (1)$$

$$y_2 = \frac{M-m}{Q} \times 100\% \quad (2)$$

式中: y_1 为蛋白回收率; M 为总蛋白量, mg; m 为溶液中残余蛋白量, mg; y_2 为蛋白固载率; Q 为制备的固定化酶总质量, mg。

1.2.5 固定化酶比活力和酶活回收率的测定

取一定质量的固定化酶与 1.9 mL 0.4 mmol/L p -NPA 底物溶液反应 5 min, 然后在 8 000 g 下离心 1 min, 取上清液在 410 nm 处测定吸光度。

酶活力定义: 每分钟生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量为 1 个活力单位(U)。

固定化酶比活力和酶活回收率分别按式(3)和式(4)计算。

$$A_s = \frac{A}{q \times y_2} \quad (3)$$

$$A_R = \frac{A_s \times (M-m)}{A_T} \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_s 为固定化酶比活力, U/mg; A 为固定化酶活力, U; q 为固定化酶质量, mg; A_R 为酶活回收率; A_T 为添加的酶的总酶活力, U。

1.2.6 固定化酶的重用性测定

取一定质量的固定化酶与 1.9 mL 0.4 mmol/L p -NPA 底物溶液反应 5 min, 然后在 8 000 g 下离心 1 min, 取上清液在 410 nm 下测定吸光度, 离心所得固定化酶用 1.9 mL 磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 继续进行下次反应。将第一次反应固定化酶的相对活力定义为 100%。

1.2.7 CRL@ZIF-8 结构表征

将制得的 CRL@ZIF-8 在 325 $^{\circ}$ C 下煅烧 12 h^[8], 冷却后得到热处理的固定化酶。然后用场发射扫描电镜(加速电压 5.0 kV)对热处理前后的固定化酶进行形貌观察, 并在 77 K 下用氮气吸附脱附仪测定孔径分布。

2 结果与讨论

2.1 锌离子和 2-甲基咪唑对酶活力的影响

酶是一种十分脆弱的催化剂, 容易受到环境的影响, 比如重金属、酸碱和有机化合物等。原位合成法需要将酶置于含有金属离子和有机配体的溶液中, 有可能导致酶活力的损失。为了减少脂肪酶在合成过程中的活力损失, 研究了 ZIF-8 两种原料对脂肪酶 CRL 的抑制作用, 从而确定脂肪酶 CRL 的添加时机, 结果见图 1。

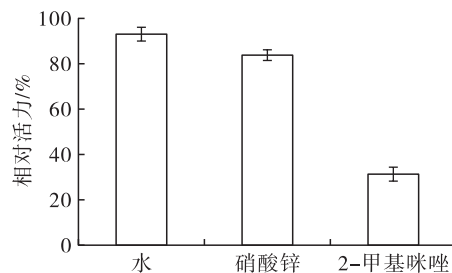


图1 原材料对酶活力的影响

由图 1 可知, 经过水浸泡过的脂肪酶, 其活力没有明显损失。这表明脂肪酶可以在非缓冲溶液系统中保持一定时间的结构稳定。经过硝酸锌溶液和 2-甲基咪唑溶液浸泡过的脂肪酶, 其相对活力分别为 83.7% 和 31.2%。金属离子对酶的抑制作用已经被广泛的报道证实^[12]。Hadizadeh Shirazi^[13]指出, 对于过氧化物酶, 锌离子会通过非竞争性作用抑制酶的活力, 并且在低于 0.3 mol/L 的硝酸锌溶液中, 酶可以保持一半以上的活性。本文的脂肪酶 CRL 受锌离子的影响可能与过氧化物酶类似。2-甲基咪唑溶液对酶活力的影响很大程度上可能是由于溶液的碱性导致的。对 160 mmol/L 2-甲基咪唑溶液进行测定, 发现其 pH 高于 11。强酸性或强碱性溶液是导致酶失活的一个主要原因^[14], 虽然少数酶对强酸或强碱有出色的耐受力, 但是脂肪酶 CRL 却不属于此例。研究表明, CRL 的最适 pH 在 7 左右, 在 pH 大于 9 的环境下容易变性失活^[15]。因此, 为了保持酶的活力, 在固定化酶合成过程中脂肪酶 CRL 先与硝酸锌溶液混合, 再加入 2-甲基咪唑溶液。

2.2 单因素实验

2.2.1 2-甲基咪唑溶液初始 pH 对固定化效果的影响

由 2.1 可知, 2-甲基咪唑溶液的初始 pH 会对脂肪酶活力产生影响, 因此考察了 2-甲基咪唑溶液初始 pH 对固定化效果的影响, 结果见图 2。

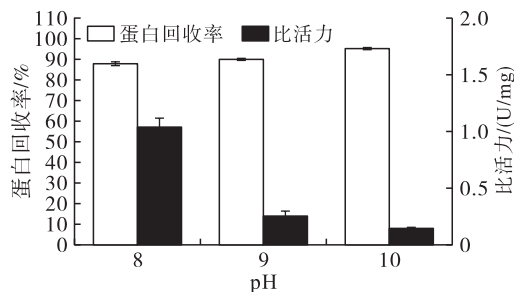


图2 2-甲基咪唑初始 pH 对固定化效果的影响

由于 ZIF-8 需要在碱性环境下才能合成, 所以选择 pH 的考察范围为 8~10。由图 2 可知, 在 pH 8~10 范围内, 固定化酶的蛋白回收率在 88%~

95%,并随 pH 的上升有轻微的上升趋势,但总体变化程度较低,意味着 2-甲基咪唑溶液初始 pH 对蛋白回收率的影响较弱。然而,在 pH 8 条件下制备的固定化酶,其比活力(1.04 U/mg)明显高于 pH 9 和 pH 10 条件下制备的固定化酶,说明 2-甲基咪唑溶液初始 pH 会显著影响固定化酶的活力。因此,选择在 pH 8 的条件下制备固定化酶。

2.2.2 原料比例对固定化效果的影响

在 ZIF-8 合成过程中,原料比例会影响 ZIF-8 的比表面积、粒径等结构参数,可能会影响固定化酶的催化性能和蛋白回收率。以锌离子的浓度 40 mmol/L 为基准,按照锌离子与 2-甲基咪唑的比例配制不同浓度的 2-甲基咪唑溶液。将锌离子溶液和 2-甲基咪唑溶液各 10 mL 与 2.75 mg 酶混合,制备得到 4 种不同原料比例(锌离子与 2-甲基咪唑摩尔比)的固定化酶,考察原料比例对固定化效果的影响,结果如图 3 所示。

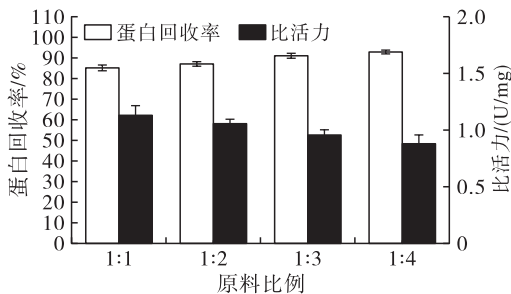


图 3 原料比例对固定化效果的影响

由图 3 可知,固定化酶的蛋白回收率在 85% ~ 93% 范围变化,并随原料比例升高有上升趋势,但是变化不明显,表明在上述原料比例范围内脂肪酶 CRL 都能较好地被 ZIF-8 封装。而随着原料比例的上升,固定化酶的比活力出现了轻微的下落,这可能与高原料比例(1:4)条件下合成的 ZIF-8 结构更完整^[16],底物扩散阻力有所增加有关。另外,测定了原料比例分别为 1:1 和 1:4 所制备的固定化酶的重用性,结果见图 4。

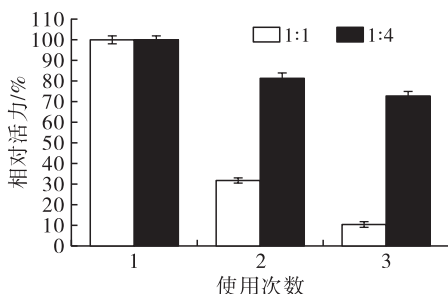


图 4 原料比例对重用性的影响

由图 4 可知,在高原料比例(1:4)下合成的固定化酶在第 3 次使用时仍具有 74.4% 的相对活力,

而低原料比例(1:1)下制备的固定化酶只残留 10.4% 的相对活力,这表明高原料比例(1:4)条件下制备的固定化酶结构更稳定。尽管这种结构会导致底物扩散阻力增加,但是对于维持固定化酶的稳定性是必需的。综合考虑原料比例对固定化酶蛋白回收率、比活力及重用性的影响,选择 1:4 的原料比例制备 CRL@ZIF-8。

2.2.3 酶添加量对固定化效果的影响

考察了酶添加量对固定化效果的影响,结果见图 5。由图 5 可知,在酶添加量为 0.55 ~ 2.75 mg 范围内,蛋白回收率在 89% ~ 93% 之间浮动,总体变化不大,表明 ZIF-8 对 CRL 有很高的容纳量,大部分 CRL 可以被固定到 ZIF-8 上。固定化酶的比活力随着酶添加量的增加先升高,在添加量为 1.1 mg 时,比活力最高,达到 1.01 U/mg,然后逐步降低,但总体仍然能保持在 0.90 U/mg 以上。随着酶添加量的增加,可能导致部分酶的聚集,从而使比活力有所降低。考虑到比活力降低幅度较低,为了保证固定化酶具有更高的蛋白固载量,选择以 2.75 mg 的酶添加量制备固定化酶。

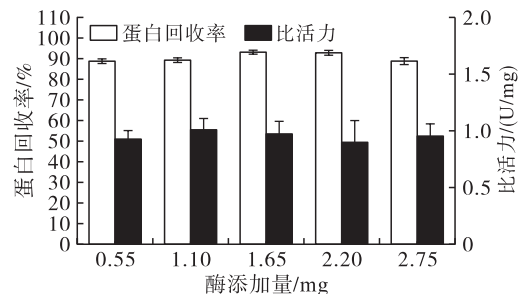


图 5 酶添加量对固定化效果的影响

2.2.4 静置时间对固定化效果的影响

为了进一步确认延长固定化时间是否有助于提高固定化酶的性能,对混合振荡后的反应液进行静置,考察静置时间对固定化效果的影响,结果见图 6。

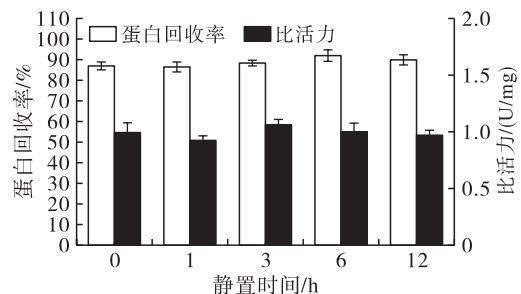


图 6 静置时间对固定化效果的影响

由图 6 可知,在不同的静置时间下,蛋白回收率在 86% ~ 92% 范围内波动,说明 ZIF-8 对脂肪酶有很高的封装效率,延长静置时间,对提高蛋白回收

率意义不大。研究表明,ZIF-8对酶分子的快速封装是因为两者之间的相互作用^[17]。Adnan等^[18]研究指出,酶分子对ZIF-8的有机/无机组分具有很高的亲和力,这种亲和性来源于分子间氢键和疏水相互作用^[19]。另外,不同静置时间下固定化酶比活力一直维持在1 U/mg左右,说明静置时间对固定化酶比活力没有明显的影响,其原因一定程度上是因为脂肪酶CRL在较短的时间内被固定,从而保护了其比活力。为了提高固定效率,选择不静置。

2.2.5 干燥方式对固定化效果的影响

固定化酶的干燥方式是影响酶活力的一个因素。考察了-48℃冷冻干燥和50℃真空干燥两种常用的干燥方式对CRL@ZIF-8比活力的影响,结果如表1所示。由表1可知,以未处理的CRL@ZIF-8比活力(1.59 U/mg)为参考,经冷冻干燥(1.08 U/mg)和真空干燥(0.81 U/mg)的固定化酶分别保持67.9%和50.9%的相对活力,表明两种干燥方式都对酶活力造成了一定的损失,干燥时的温度可能是影响酶活力的主要原因,过高或过低的温度都会导致酶失活^[20]。另外,测定冷冻干燥得到的固定化酶蛋白回收率为93%。

表1 干燥方式对固定化效果的影响

干燥方式	比活力/(U/mg)
未处理	1.59 ± 0.02
冷冻干燥	1.08 ± 0.03
真空干燥	0.81 ± 0.04

为了进一步评估干燥方式对CRL@ZIF-8的影响,测定了固定化酶重用性,结果见图7。由图7可知,冷冻干燥的固定化酶使用9次后保持72.8%的相对活力,经真空干燥的固定化酶残留78.3%的相对活力,这表明不同的干燥方式对固定化酶的重用性影响不显著。综上所述,对固定化酶的干燥处理选择冷冻干燥方式。另外,通过对比其他文献^[21-22],CRL@ZIF-8具有良好的批次重用性。

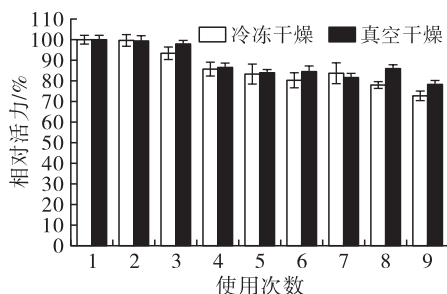


图7 干燥方式对重用性的影响

2.3 底物分子大小对固定化酶催化性能的影响

MOF固定化酶表现出许多优异的特性,其中之

一就是对底物的选择。通过分子筛作用,MOF固定化酶可以选择催化分子大小小于某一值的底物,实现选择性催化。本文通过酶活回收率来侧面反映能够接触到底物的酶量。分别以棕榈酸对硝基苯酯(*p*-NPP)、丁酸对硝基苯酯(*p*-NPB)和乙酸对硝基苯酯(*p*-NPA)作为反应底物按1.2.5测定固定化酶的催化性能,结果见表2。由表2可知,以*p*-NPA为底物时,酶活回收率可以达到18.4%,而以*p*-NPP为底物时,酶活回收率只有3.6%,说明大分子的底物难以进入CRL@ZIF-8参与反应。由此推断,载体的孔径限制了固定化酶活力表达,导致酶活回收率下降。通过灵活调节孔径来提高固定化酶对特定底物的催化能力是一个有效的解决途径。另外,载体材料本身的亲疏水性也会导致该固定化酶的酶活回收率下降^[23]。

表2 底物分子大小对固定化酶催化性能的影响

底物	CRL		CRL@ZIF-8	
	比活力/(U/mg)	比活力/(U/mg)	比活力/(U/mg)	酶活回收率/%
<i>p</i> -NPA	5.2 ± 0.1	1.08 ± 0.03	1.08 ± 0.03	18.4 ± 0.4
<i>p</i> -NPB	14.2 ± 0.3	2.34 ± 0.05	2.34 ± 0.05	15.5 ± 0.3
<i>p</i> -NPP	74.5 ± 0.5	2.85 ± 0.14	2.85 ± 0.14	3.6 ± 0.4

另外,分别以*p*-NPA和*p*-NPP作为反应底物,按1.2.6考察了底物分子大小对固定化酶重用性的影响,结果见图8。由图8可知,在以*p*-NPA为底物时,CRL@ZIF-8重复使用9次后还有72.8%的相对活力,而以*p*-NPP为底物时,CRL@ZIF-8只能重用5次并且几乎完全丧失了活性。这可能是因为底物分子能够通过分子间作用力(比如氢键、疏水作用力)留在CRL@ZIF-8中从而堵塞孔道,阻止内部与外部的物质交换,而大分子底物(如高级脂肪酸和多支链脂肪酸)更难进入同时也更难出来。

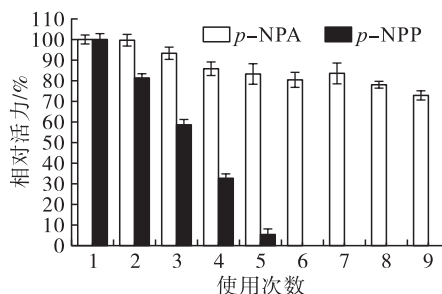


图8 底物分子大小对重用性的影响

2.4 CRL@ZIF-8 结构表征

对固定化酶CRL@ZIF-8的结构进行了初步的测定,CRL@ZIF-8和325℃热处理后的CRL@ZIF-8的扫描电镜图见图9。

由图9A可知,固定化酶 CRL@ZIF-8 颗粒呈12面体形状,粒径约为400 nm。由图9B可知,热处理后的 CRL@ZIF-8 的粒长增大到1 μm 左右,这一变化趋势与文献[8]报道一致。另外,热处理后的 CRL@ZIF-8 表面出现了较多不规则的凹陷,这是由于酶蛋白热分解引起的,从而可以确定一部分蛋白质分子嵌在 ZIF-8 晶体的表面区域。

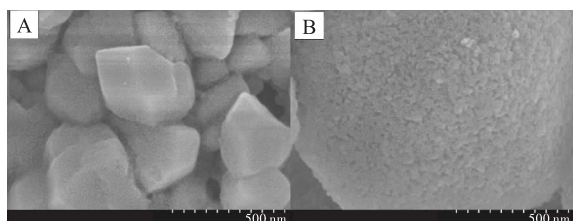


图9 CRL@ZIF-8(A)和325 °C热处理后的 CRL@ZIF-8(B)的扫描电镜图

对固定化酶进行了氮气吸附脱附测试,孔径分布通过BJH方法计算而得,此方法适合于介孔孔径(2~50 nm)的计算^[8]。CRL@ZIF-8 和325 °C热处理后的 CRL@ZIF-8 氮气吸附的等温吸/脱附曲线(A)和孔径分布(B)见图10。

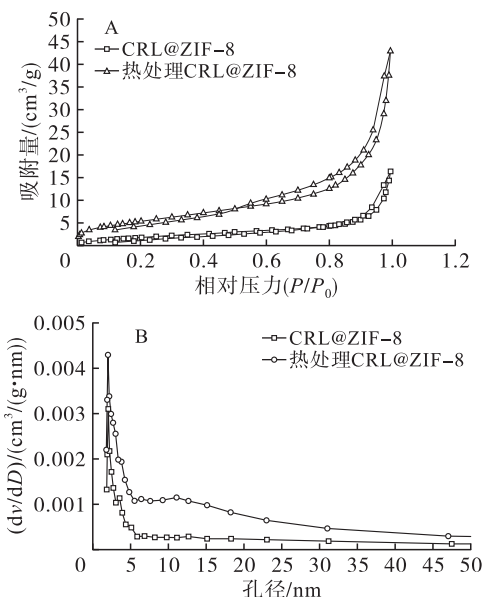


图10 CRL@ZIF-8 和325 °C热处理后的 CRL@ZIF-8 氮气吸附的等温吸/脱附曲线(A)和孔径分布(B)

CRL是一种大分子生物物质,当内嵌于ZIF-8的CRL热分解时会形成介孔孔径的空腔。由图10A可知,固定化酶呈现第二类等温吸附过程,且在中低压段吸附量较低,这意味固定化酶具有较低的比表面积,这个结果与文献报道相似。Pitzalis等^[24]研究了ZIF-8固定化两种脂肪酶(Lipase AK from *Pseudomonas fluorescens* 和 Lipase RM from *Rhizomucor miehei*),发现两种固定化脂肪酶都呈现第二类等温吸附过程;而且在原料比例1:4时制备

的固定化酶,虽然比表面积较低(79 m^2/g),但是能更好地保持固定化酶的活力和蛋白回收率。由图10B可知,热处理后的 CRL@ZIF-8 在8~50 nm范围内 dv/dD 出现了明显的上升,说明8~50 nm的孔量增加,这是由于CRL在ZIF-8中热分解导致的,说明一部分脂肪酶CRL被包埋在ZIF-8内部。另外,从介孔孔径的空腔分布范围来看,有大于CRL理论粒径(64.9 \AA \times 97.5 \AA \times 175.6 \AA)的空腔存在,这说明在原位合成时,CRL会发生团聚现象,因此出现了一定量20 nm以上的空腔直径。Liou等^[25]对CRL的团聚行为研究发现,当蛋白质的质量浓度高于3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时CRL存在部分团聚行为。

3 结论

通过对CRL@ZIF-8合成过程的因素考察,发现在10 mL 40 mmol/L硝酸锌溶液、10 mL 160 mmol/L 2-甲基咪唑溶液、2-甲基咪唑溶液初始pH 8、酶添加量2.75 mg、-48 °C冷冻干燥条件下,合成的CRL@ZIF-8蛋白回收率为93%,比活力为1.08 U/mg,并且其重复使用9次仍能保持72.8%的相对活力。同时,合成的CRL@ZIF-8对底物分子大小具有选择性,在进行低级酯的合成和酯交换等小分子底物催化时可能更具有优势,而不适用于催生物柴油等高级酯类的酯化或酯交换反应。场发射扫描电镜和氮气吸附脱附表征表明,脂肪酶CRL在载体表面和内部均有分布,固定化酶颗粒粒径约为400 nm。MOF原位合成法固定化脂肪酶,其突出的优势是合成迅速、蛋白回收率高、固定化酶稳定性好。虽然也存在MOF原料对酶活力造成损失的问题,但是可以通过改变加料顺序和调节原料的初始pH来降低影响。

参考文献:

- [1] 卢建芳,黎克纯,雷福厚,等. 磁性松香基高分子固定化交联脂肪酶聚集体的制备及性质研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(7): 128-134.
- [2] RIOS N S, PINHEIRO M P, DOS SANTOS J C S, et al. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (*R,S*)-phenylethyl acetate[J]. J Mol Catal B: Enzym, 2016, 133:246-258.
- [3] KHAN N R, RATHOD V K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review [J]. Process Biochem, 2015, 50(11): 1793-1806.
- [4] LIAN X Z, FANG Y, JOSEPH E, et al. Enzyme-MOF (metal-organic framework) composites [J]. Chem Soc Rev, 2017, 46(11): 3386-3401.

- [5] ZHU Q L, XU Q. Metal – organic framework composites [J]. Chem Soc Rev, 2014, 43(16): 5468 – 5512.
- [6] PISKLAK T J, MACÍ AS M, COUTINHO D H, et al. Hybrid materials for immobilization of MP – 11 catalyst [J]. Top Catal, 2006, 38(4): 269 – 278.
- [7] CHEN Y, LYKOURINO V, HOANG T, et al. Size – selective biocatalysis of myoglobin immobilized into a mesoporous metal – organic framework with hierarchical pore sizes[J]. Inorg Chem, 2012, 51(17): 9156 – 9158.
- [8] LYU F J, ZHANG Y F, ZARE R N, et al. One – pot synthesis of protein – embedded metal – organic frameworks with enhanced biological activities[J]. Nano Lett, 2014, 14(10): 5761 – 5765.
- [9] LIANG K, RICHARDSON J J, DOONAN C J, et al. An enzyme – coated metal – organic framework shell for synthetically adaptive cell survival [J]. Angew Chem Int Ed, 2017, 56(29): 8510 – 8515.
- [10] GASCON V, CARUCCI C, JIMENEZ M B, et al. Rapid in situ immobilization of enzymes in metal – organic framework supports under mild conditions [J]. Chem Cat Chem, 2017, 9(7): 1182 – 1186.
- [11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein – dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248 – 254.
- [12] PRAKASH J, KODANKO J J. Metal – based methods for protein inactivation[J]. Curr Opin Chem Biol, 2013, 17(2): 197 – 203.
- [13] HADIZADEH SHIRAZI N. Inhibition kinetic and thermal inactivation of horseradish peroxidase in the presence of Zn^{2+} ion[J/OL]. J Food Biochem, 2019, 43(2):12724 [2020 – 05 – 12]. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12724>.
- [14] GUZIK U, HUPERT – KOCUREK K, WOJCIESZYNSKA D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties – application to oxidoreductases[J]. Molecules, 2014, 19(7): 8995 – 9018.
- [15] SAMUI A, CHOWDHURI A R, MAHTO T K, et al. Fabrication of a magnetic nanoparticle embedded NH_2 – MIL – 88B MOF hybrid for highly efficient covalent immobilization of lipase [J]. RSC Adv, 2016, 6(71): 66385 – 66393.
- [16] ZHANG Y Y, JIA Y, LI M, et al. Influence of the 2 – methylimidazole/zinc nitrate hexahydrate molar ratio on the synthesis of zeolitic imidazolate framework – 8 crystals at room temperature[J/OL]. Sci Rep, 2018, 8(1):9597 [2020 – 05 – 12]. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-28015-7>.
- [17] NADAR S S, RATHOD V K. Encapsulation of lipase within metal – organic framework (MOF) with enhanced activity intensified under ultrasound[J]. Enzyme Microb Technol, 2018, 108:11 – 20.
- [18] ADNAN M, LI K, WANG J H, et al. Hierarchical ZIF – 8 toward immobilizing *Burkholderia cepacia* lipase for application in biodiesel preparation [J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5):1424 [2020 – 05 – 12]. <https://doi.org/10.3390/ijms19051424>.
- [19] LIANG K, RICCO R, DOHERTY C M, et al. Biomimetic mineralization of metal – organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules [J/OL]. Nat Commun, 2015, 6: 8240 [2020 – 05 – 12]. <https://doi.org/10.1038/ncomms8240>.
- [20] PERDANA J, FOX M B, SCHUTYSER M A I, et al. Enzyme inactivation kinetics: coupled effects of temperature and moisture content[J]. Food Chem, 2012, 133(1): 116 – 123.
- [21] 李笑迎, 白文静, 陶凯, 等. 大孔/介孔多级孔 SiO_2 的制备及其在固定化脂肪酶中的应用[J]. 材料导报, 2018, 32(5): 1695 – 1700.
- [22] 谭艳丽, 王玉军, 孙海涛, 等. 在 PVDF – SiO_2 复合微球上的脂肪酶固定化[J]. 过程工程学报, 2012, 12(3): 472 – 477.
- [23] BELLEZZA F, CIPICIANI A, COSTANTINO U. Esterase activity of biocomposites constituted by lipases adsorbed on layered zirconium phosphate and phosphonates: selective adsorption of different enzyme isoforms [J]. J Mol Catal B Enzym, 2003, 26(1): 47 – 56.
- [24] PITZALIS F, CARUCCI C, NASERI M, et al. Lipase encapsulation onto ZIF – 8: a comparison between biocatalysts obtained at low and high zinc/2 – methylimidazole molar ratio in aqueous medium [J]. Chem Cat Chem, 2018, 10(7): 1578 – 1585.
- [25] LIU Y C, MARANGONI A G, YADA R Y. Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase [J]. Food Res Int, 1998, 31(3): 243 – 248.