

# 负载酶/ $\text{CaCO}_3$ 颗粒的聚合物凝胶球的制备及其催化性能研究

詹彩珍<sup>1</sup>, 潘大伟<sup>1</sup>, 刘 壮<sup>1,2</sup>, 汪 伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 四川大学化学工程学院, 四川 成都 610065;  
2. 四川大学高分子材料工程国家重点实验室, 四川 成都 610065)

**摘要:**通过微通道悬滴乳化法构建内含酶/ $\text{CaCO}_3$  的单体液滴并将其作为模板制备负载酶/ $\text{CaCO}_3$  颗粒的聚合物凝胶球。该凝胶球的水凝胶高分子网络结构及其内部的介孔结构  $\text{CaCO}_3$  颗粒具有良好的传质性能, 可为  $\text{CaCO}_3$  颗粒中所封装的酶分子提供有效保护, 在赋予其良好催化活性的同时增强其稳定性和环境耐受性。以醇脱氢酶为典型酶分子在凝胶球中进行封装, 并利用醇脱氢酶将甲醛催化转化为甲酸的反应评估该凝胶球的酶固定化性能。结果表明, 由于具有良好的固定保护和传质性能, 该凝胶球可展现出与游离酶相当的酶催化活性; 分别经 80℃ 热水和紫外光照等苛刻条件处理后, 该凝胶球仍能有效保持酶催化活性, 展现出了良好的稳定性和环境耐受性。

**关键词:** 酶固定化; 酶催化; 载体; 颗粒; 凝胶

中图分类号: TQ317

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2023)04-0143-06

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.04.027

## Preparation of polymer gel spheres loaded with enzyme/ $\text{CaCO}_3$ particles and study on their catalytic performance

ZHAN Cai-zhen<sup>1</sup>, PAN Da-wei<sup>1</sup>, LIU Zhuang<sup>1,2</sup>, WANG Wei<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. State Key Laboratory of Polymer Materials Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** Monomer droplets containing enzyme/ $\text{CaCO}_3$  are constructed through micro-channel suspension emulsification method, and used as templates to prepare polymer gel spheres loaded with enzyme/ $\text{CaCO}_3$  particles. The hydrogel polymer network structure of the spheres and the mesoporous structures of  $\text{CaCO}_3$  particles loaded in the spheres endow the spheres with excellent mass transfer, and can supply good protection to enzyme molecules immobilized in  $\text{CaCO}_3$  particles, thus providing the enzymes with excellent enzymatic catalytic property, enhanced stability and environmental tolerance. Through encapsulating alcohol dehydrogenase in the polymer gel spheres, the enzyme immobilization performance of the spheres is evaluated in catalytic conversion of formaldehyde to formic acid. It is verified from the results that these spheres can deliver similar catalytic activity as that of free alcohol dehydrogenase due to their good protection and mass transfer properties. After treated with hot water (80℃) and UV irradiation, these spheres still remains their catalytic activity effectively, showing good stability and environmental tolerance.

**Key words:** enzyme immobilization; enzymatic catalysis; carriers; particles; gel

酶作为一种环保、高效的催化剂, 在生物<sup>[1]</sup>、食品<sup>[2]</sup>、医药<sup>[3]</sup>、能源<sup>[4]</sup>、环境<sup>[5-6]</sup>等诸多领域具有重要用途。然而, 天然游离酶容易受 pH、温度等因素影响, 存在着易失活、稳定性差等问题。将酶结合到载体上, 可以通过载体对酶分子的固定化作用, 减弱外界环境条件变化对酶催化活性的影响, 增强酶的稳定性<sup>[7-10]</sup>。同时, 相比于游离酶, 固定化酶便于回收和重复利用, 从而减少了酶的使用成本<sup>[11-12]</sup>。将酶结合到颗粒载体内, 可利用其对酶的封装保护抵御外界环境因素的影响, 更有效地保持酶催化活性和稳定性<sup>[13-16]</sup>。通过将酶封装到实心和中空结构

的颗粒中, 可以提升酶的催化活性和重复利用性<sup>[17-19]</sup>。然而, 这些颗粒载体难以有效限制酶的空间结构变化, 在高温、紫外照射等苛刻条件下环境耐受性差, 仍存在易失活、稳定性差的问题, 限制了其应用范围。相比之下, 利用有机金属框架物 (MOF) 纳米颗粒等材料的微孔结构来封装酶分子, 通过其微孔结构对酶进行限域封装和固定, 从而限制酶分子在环境条件变化时的空间结构变化, 有效保持酶催化活性和稳定性<sup>[20-23]</sup>。然而, 这些 MOF 颗粒的微孔结构限制了酶催化反应过程中的物质传递, 导致其酶催化反应速率缓慢。因此, 仍需开发具有良

收稿日期: 2022-04-28; 修回日期: 2023-02-06

基金项目: 国家自然科学基金 (21922809)

作者简介: 詹彩珍 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微流控技术与功能材料, 1361607957@qq.com; 汪伟 (1984-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为微流控技术、化工新材料, 通讯联系人, wangwei512@scu.edu.cn。

好传质性能和封装保护性能的新型酶固定化颗粒载体,以实现固定化酶的良好催化活性和环境耐受性。

笔者制备了一种具有良好酶催化活性和环境耐受性的负载酶/ $\text{CaCO}_3$  颗粒的聚合物凝胶球。该凝胶球主要通过微通道液滴模板合成法来制备,凝胶球的水凝胶网络结构中有封装酶的  $\text{CaCO}_3$  颗粒。该凝胶球经过  $80^\circ\text{C}$  热水、紫外光照等苛刻条件处理后,仍能有效保持其酶催化活性,展现出了良好的环境耐受性。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

二甲基硅油 PMX-200(黏度:  $10 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ )、2-羟基-2-甲基苯丙酮(HMPP,分析纯)、还原型辅酶 I 二钠( $\beta$ -NADH,纯度:95%)、磷酸盐缓冲溶液(PBS,  $0.1 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH}=6.8$ )、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA,  $M_n=575$ )、醇脱氢酶(ADH,30KU)、RSN-749、牛血清白蛋白(BSA,纯度:98%)。

BX61 型工业光学显微镜,日本奥林巴斯公司生产;TM3030 型扫描电子显微镜,日立有限公司生产;高速自动比表面与孔隙度分析仪,安东帕康塔仪器公司生产;X 射线衍射仪,荷兰帕纳科分析仪器公司生产;傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技公司生产;Leica TCS SP5-II 激光共聚焦显微镜,德国徕卡仪器公司生产;UV-2700 型紫外光谱仪,日本岛津公司生产。

### 1.2 ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球的制备

ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球主要通过内含 ADH/ $\text{CaCO}_3$  的单体溶液液滴为模板来制备。在制备 ADH/ $\text{CaCO}_3$  颗粒时,将  $5.25 \text{ mg}$  ADH 加入到  $2 \text{ mL}$   $0.01 \text{ mol/L}$   $\text{CaCl}_2$  溶液中;然后,快速加入  $2 \text{ mL}$   $0.01 \text{ mol/L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,振荡至其混合均匀,制得 ADH/ $\text{CaCO}_3$  颗粒。接着,将产物通过离心从反应液中分离,再经冻干  $36 \text{ h}$  后置于干燥柜中储存待用。

在制备 ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球时,采用微通道悬滴乳化法,以含 ADH/ $\text{CaCO}_3$  颗粒的单体液滴为模板,以含 ADH/ $\text{CaCO}_3$  颗粒、20% PEGDA 和 1% HMPP 的水溶液作为分散相,通过注射泵将其由针头微通道中挤出并在出口端形成液滴(如图 1 所示)。用含 4% RSN-749 的 PMX-200 溶液作为接收液收集形成的单体溶液液滴,再经紫外光照引发液滴内单体发生聚合,从而制得内含 ADH/ $\text{CaCO}_3$  颗粒的 ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球。将制得的凝胶球清洗,置于  $\text{pH}=6.8$  PBS 中,并放置于  $2\sim 8^\circ\text{C}$  冰

箱中储存待用。

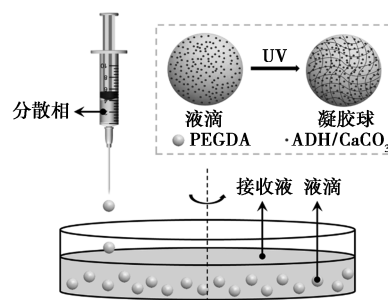


图 1 微通道液滴模板合成法制备 ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球的示意图

### 1.3 ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球的形貌结构和组成表征

利用 SEM 和 XRD 分别表征  $\text{CaCO}_3$  和 ADH/ $\text{CaCO}_3$  颗粒的微观结构和晶体结构。利用 FT-IR 表征其化学组成;利用 CLSM 对经 RhB 荧光标记的 ADH(RhB-ADH)和含 RhB-ADH 的  $\text{CaCO}_3$ (RhB-ADH/ $\text{CaCO}_3$  颗粒)进行表征,激发波长为  $590 \text{ nm}$ 。

利用 XPS 对冻干后的 ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球进行元素分析。利用工业显微镜表征液滴及凝胶球的形貌结构,并测量分析得到粒径分布图。液滴及凝胶球的偏差系数  $CV$  的计算式为:

$$CV = \left\{ \sum_{i=1}^N [(D_i - \bar{D}_n)^2 / (N - 1)]^{1/2} / \bar{D}_n \right\} \times 100\% \quad (1)$$

其中: $D_i$  为第  $i$  个样品的直径,  $\mu\text{m}$ ;  $\bar{D}_n$  为样品平均直径; $N$  为总样品数。一般认为  $CV < 5\%$  时具有良好单分散性。

### 1.4 ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球酶固定化效率测定

利用考马斯亮蓝法测定凝胶球中的 ADH 含量。以 BSA 为标准蛋白加入到考马斯亮蓝溶液中,测定不同浓度 BSA 在  $595 \text{ nm}$  处的吸光值,制作标准曲线。以该标准曲线测定凝胶球洗涤液中的 ADH 量,再结合液滴模板中所含 ADH 量计算得到凝胶球中所封装的 ADH 量。计算凝胶球中酶固定化效率:

$$E = [(m_0 - cv) / m_0] \times 100\% \quad (2)$$

其中: $m_0$  为加入的酶质量,  $\text{mg}$ ;  $c$  为凝胶球洗涤液中的酶质量浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $v$  为洗涤液体积,  $\text{mL}$ ;  $E$  为固定化效率,  $\%$ 。

### 1.5 ADH/ $\text{CaCO}_3$ @PEGDA 凝胶球的催化性能研究

在 ADH 催化转化甲醛为甲醇的过程中,  $\beta$ -NADH 作为还原剂在反应中提供电子,每生成  $1 \text{ mol}$  甲醇会消耗  $1 \text{ mol}$   $\beta$ -NADH;在 ADH 作用下, NADH

失去电子变为 NAD<sup>+</sup>。因此,通过测定  $\beta$ -NADH 浓度变化可得 ADH 的催化转化效率,以评估其催化性能。测定  $\beta$ -NADH 标准曲线时,配制不同浓度  $\beta$ -NADH 溶液,测定其在 340 nm 处的吸光值,以  $\beta$ -NADH 浓度为横坐标、吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

利用 ADH 催化甲醛生成甲醇的反应测试 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒和 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球的催化性能。对于 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒,首先将 3 mg ADH/CaCO<sub>3</sub> 加到 10 mL PBS (2 mg/mL  $\beta$ -NADH) 中,再加入 100  $\mu$ L 甲醛溶液,然后将体系置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中反应。在反应过程中,取少许反应液测试其在 340 nm 处的吸光值,计算得到其浓度,并计算  $\beta$ -NADH 转化率:

$$X_{\beta\text{-NADH},t} = [(c_{\beta\text{-NADH},0} - c_{\beta\text{-NADH},t}) / c_{\beta\text{-NADH},0}] \times 100\% \quad (3)$$

其中: $X_{\beta\text{-NADH},t}$  为反应时间为  $t$  时的  $\beta$ -NADH 转化率; $c_{\beta\text{-NADH},0}$  为反应开始时的  $\beta$ -NADH 浓度; $c_{\beta\text{-NADH},t}$  为反应时间为  $t$  时的  $\beta$ -NADH 浓度。

类似地,采用上述方法测试 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球(取样 2 g)和 ADH(取样 2.29 mg)的催化性能。

### 1.6 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球的环境耐受性能研究

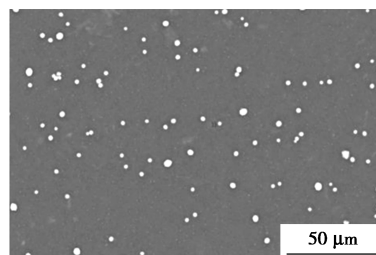
利用 ADH 将甲醛转化为甲醇的反应测试 ADH、ADH/CaCO<sub>3</sub> 纳米颗粒和 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球经 80 $^{\circ}$ C 热水和 UV 照射等苛刻条件处理后的酶催化性能,以评估其环境耐受性能。称取 2.29 mg ADH、3 mg ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒和 2 g ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球分散在 10 mL PBS 中,将 3 份溶液分别经 80 $^{\circ}$ C 恒温水浴处理 30 min 和 UV 照射 30 min 后,再于常规条件下反应 1 h。采用 1.5 节所述方法测试样品中的  $\beta$ -NADH 转化率,以表征其对高温和紫外环境的耐受性。

## 2 结果与讨论

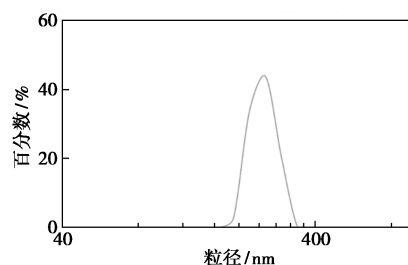
### 2.1 ADH/CaCO<sub>3</sub> 纳米颗粒的合成

ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒主要在含 CaCl<sub>2</sub> 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的反应体系中加入 ADH 来进行制备。ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 SEM 图如图 2(a)所示。从图 2(a)中可看出,ADH/CaCO<sub>3</sub> 呈现颗粒状结构,但由于 SEM 制样干燥过程中颗粒发生了团聚,因而 SEM 图中的 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒尺寸稍大。进一步利用 DLS 测试 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的粒径,结果如图 2(b)所示。从图 2(b)中可以看出,ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒呈正态分布,且

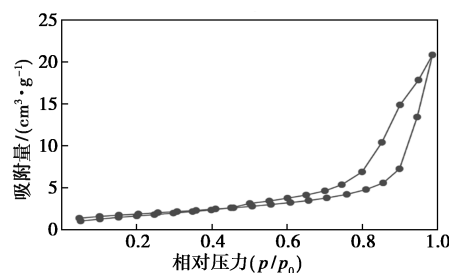
平均粒径约为 249.6 nm。实验中利用 BET 表征了 CaCO<sub>3</sub> 的多孔结构,结果如图 2(c)所示。从图 2(c)中可以看出,其 N<sub>2</sub> 吸附-脱附等温线为 III 型等温线,且平均孔径为 3.840 nm,表明其具有介孔结构。



(a) ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 SEM 图



(b) ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 DLS 图



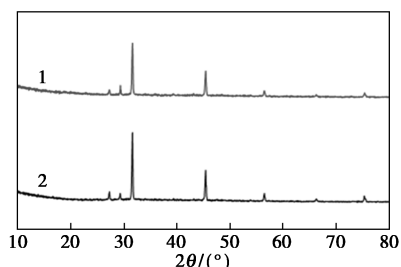
(c) CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 BET 图

图 2 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的形貌结构表征

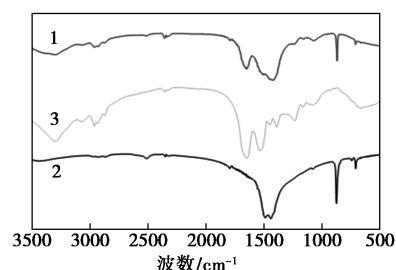
ADH/CaCO<sub>3</sub> 和 CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 XRD 表征结果如图 3(a)所示。从图 3(a)中可以看出,ADH/CaCO<sub>3</sub> 衍射特征峰的出峰位置与 CaCO<sub>3</sub> 的衍射峰基本吻合,说明 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒与 CaCO<sub>3</sub> 颗粒具有相同晶胞构成。而 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的衍射峰在  $2\theta$  为 29.35 $^{\circ}$  处强度稍高 CaCO<sub>3</sub> 的衍射峰,其他衍射峰处 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒强度均弱于 CaCO<sub>3</sub>,说明 ADH/CaCO<sub>3</sub> 晶形结构较为圆整。

ADH、CaCO<sub>3</sub> 颗粒和 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 FT-IR 图如图 3(b)所示。从图 3(b)中可以看出,CaCO<sub>3</sub> 和 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的特征峰出现在 712、876、1 445、1 494  $\text{cm}^{-1}$  和 1 798  $\text{cm}^{-1}$  处。712  $\text{cm}^{-1}$  和 876  $\text{cm}^{-1}$  处为 C—O 键的弯曲振动吸收峰,1 445  $\text{cm}^{-1}$  和 1 494  $\text{cm}^{-1}$  处为 C—O 键的不对称伸缩振动吸收峰,1 798  $\text{cm}^{-1}$  处为 C=O 振动峰。相比于 CaCO<sub>3</sub> 颗

粒,ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒和 ADH 在 1 652、2 874、2 963 cm<sup>-1</sup> 处出现吸收峰;其中,2 874 cm<sup>-1</sup> 和 2 930 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰为 CH<sub>2</sub> 和 CH<sub>3</sub> 的伸缩振动峰,而 1 652 cm<sup>-1</sup> 处的特征吸收峰为酶 ADH 中的羰基峰。FT-IR 分析结果表明成功合成了 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒。



(a) CaCO<sub>3</sub> 和 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 XRD 图

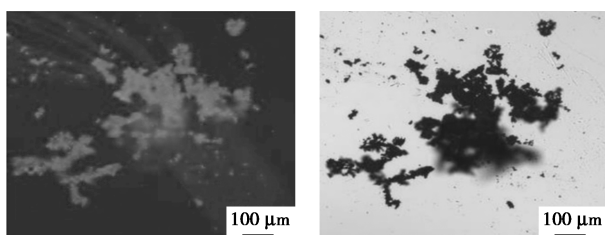


(b) CaCO<sub>3</sub>、ADH 和 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 FT-IR 图

1—ADH/CaCO<sub>3</sub>; 2—CaCO<sub>3</sub>; 3—ADH

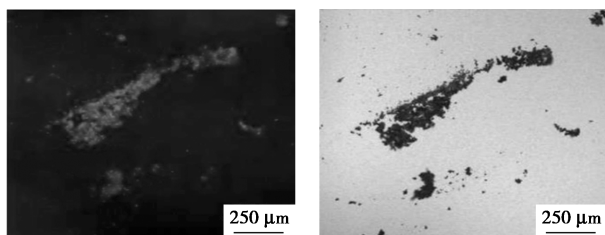
图 3 ADH/CaCO<sub>3</sub> 的 SEM 图及 FT-IR 图

RhB-ADH 以及 RhB-ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 CLSM 图如图 4 所示。从图 4(a)、图 4(b)中可以看出,虽然 RhB-ADH 在溶液中出现了团聚,但其团聚



(a) RhB-ADH 的 CLSM 荧光场图像

(b) RhB-ADH 的 CLSM 叠加场图像



(c) RhB-ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 CLSM 荧光场图像

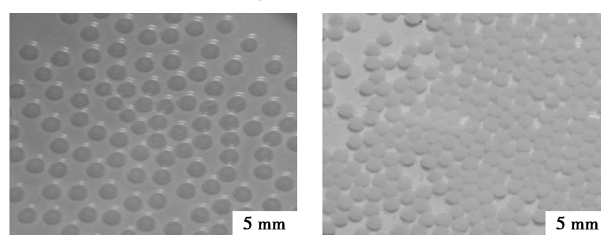
(d) RhB-ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 CLSM 叠加场图像

图 4 RhB-ADH 和 RhB-ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒的 CLSM 图

物呈现红色荧光,说明 RhB 成功地对 ADH 进行了荧光标记。同时,从图 4(c)、图 4(d)中可以看出,ADH-RhB/CaCO<sub>3</sub> 颗粒亦呈现出红色荧光,结合图 3 表征结果表明,ADH-RhB 成功地封装进了 CaCO<sub>3</sub> 中。

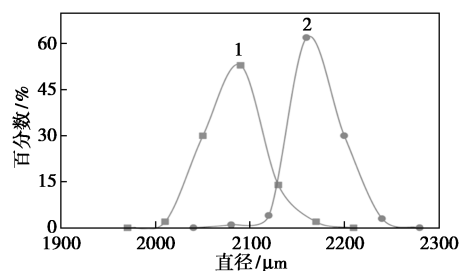
## 2.2 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球的制备

ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球主要通过微通道液滴模板合成法来制备。采用液滴作为合成颗粒的模板,可通过调控液滴尺寸和组成来可控构建具有相应尺寸和组成的功能颗粒<sup>[24-25]</sup>。PEGDA 液滴和 PEGDA 凝胶球的光学照片及粒径分布如图 5 所示。从图 5(a)、图 5(b)中可以看出,PEGDA 液滴呈现出尺寸均一的球形形状,而经紫外光照聚合所得的 PEGDA 凝胶球亦呈现均一球形结构。同时,从图 5(c)中可以看出,液滴及凝胶球的平均粒径分别约为 2 175 μm 和 2 086 μm,其 CV 值分别为 1.07% 和 1.38%,均小于 5%。说明使用微通道悬滴乳化法制得的液滴及凝胶球均具有良好单分散性。进一步在 PEGDA 单体溶液中加入 ADH/CaCO<sub>3</sub> 颗粒,再由微通道悬滴乳化法制得单体溶液液滴模板,由紫外光照聚合制得了 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球。内含 ADH/CaCO<sub>3</sub> 的 PEGDA 液滴和 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球的光学图片如图 6 所示。由图 6 中可以看出,该液滴和凝胶球均呈现出尺寸均一的球形形状。说明利用微通道液滴模板合成法可制得尺寸均一的 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球。



(a) PEGDA 液滴的光学照片

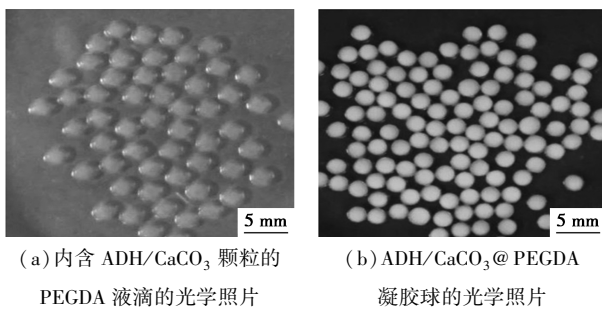
(b) PEGDA 凝胶球的光学照片



1—凝胶球; 2—液滴

(c) 粒径分布图

图 5 PEGDA 液滴和 PEGDA 凝胶球的光学照片及粒径分布

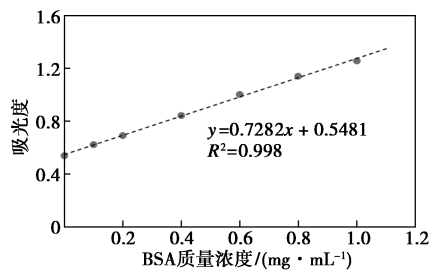


(a)内含ADH/CaCO<sub>3</sub>颗粒的PEGDA液滴的光学照片  
(b)ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球的光学照片

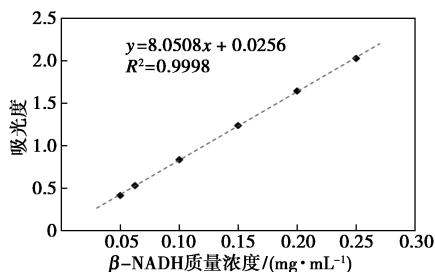
图6 内含ADH/CaCO<sub>3</sub>颗粒的PEGDA液滴和ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球的光学照片

### 2.3 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球的酶催化活性

利用考马斯亮蓝法测得的不同质量浓度标准BSA溶液的标准曲线如图7(a)所示。拟合得到的标准曲线回归方程为: $y = 0.7252x + 0.5481$  ( $R^2 = 0.998$ ),说明在所测质量浓度范围内BSA质量浓度与吸光值具有良好线性关系。利用上述标准曲线测定用于洗涤凝胶球的洗涤液中ADH的浓度,可得到凝胶球中所封装的ADH量。通过式(2)计算得到凝胶球中ADH封装率 $E$ 为87.24%。而 $\beta$ -NADH溶液的标准曲线如图7(b)所示,其拟合得到的 $\beta$ -NADH标准曲线回归方程为: $y = 8.0508x + 0.0256$  ( $R^2 = 0.9998$ ),该曲线说明 $\beta$ -NADH质量浓度范围内具有良好线性关系。



(a)BSA质量浓度随吸光度变化的标准曲线



(b) $\beta$ -NADH质量浓度随吸光度变化的标准曲线

图7 BSA和 $\beta$ -NADH的标准曲线

ADH可在 $\beta$ -NADH作为还原剂提供电子的情况下将甲醛催化转化为甲醇。通过测定 $\beta$ -NADH转化率来表征了ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA的催化性能。ADH、ADH/CaCO<sub>3</sub>颗粒、未负载ADH/CaCO<sub>3</sub>

颗粒的PEGDA凝胶球和ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球在反应过程中 $\beta$ -NADH的转化率随时间的变化情况如表1所示。其中,PEGDA凝胶球在反应过程中的 $\beta$ -NADH转化率随时间几乎无明显变化,说明其不具备催化转化性能。相比之下,ADH、ADH/CaCO<sub>3</sub>颗粒和ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球在催化过程中 $\beta$ -NADH的转化率均随时间而增加。结果表明,经ADH/CaCO<sub>3</sub>颗粒和ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球封装的ADH展现出与游离ADH相当的催化活性,说明CaCO<sub>3</sub>颗粒的多孔结构以及PEGDA凝胶球的水凝胶高分子网络结构具有良好传质特性,有利于酶反应过程中底物和产物分子的传递,从而保证了酶催化反应的良好进行。

表1 凝胶球在催化过程中 $\beta$ -NADH的转化率

时间/h	随时间的变化情况				/%
	ADH	ADH/CaCO <sub>3</sub>	ADH/CaCO <sub>3</sub> @PEGDA	PEGDA	
1	30.69	35.43	32.03	0.36	
2	38.91	41.48	44.18	5.98	
3	47.15	49.01	56.73	4.62	
4	55.03	55.07	64.92	3.10	
5	61.01	60.77	71.15	2.26	
6	67.02	65.48	77.03	2.60	

### 2.4 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球的环境耐受性

ADH、ADH/CaCO<sub>3</sub>颗粒和ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球在常温存放后以及分别经80℃热水处理30 min和紫外照射30 min后,于37℃条件下反应1 h所得的 $\beta$ -NADH转化率如表2所示。从表2中可看出,经过80℃热水处理后,ADH和ADH/CaCO<sub>3</sub>颗粒转化率远低于常温条件下的反应转化率,说明ADH和ADH/CaCO<sub>3</sub>中封装的ADH均部分失活;相比之下,ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球与其在常温保存条件下的活性相当;当经过紫外照射30 min后,ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA与在常温保存条件下的活性相当。结果表明,与游离ADH相比,CaCO<sub>3</sub>颗粒对所封装的ADH具有一定保护作用;而在CaCO<sub>3</sub>颗粒和PEGDA凝胶球的共同保护下,能更有效保护ADH,大大减弱外界苛刻环境对酶活性的影响。因此,ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA凝胶球具有良好环境耐受性。

表2 凝胶球在不同环境下的 $\beta$ -NADH转化率

酶	37℃水浴	80℃水浴	紫外光照
ADH	30.69	7.84	2.02
ADH/CaCO <sub>3</sub>	35.43	10.57	8.73
ADH/CaCO <sub>3</sub> @PEGDA	32.03	37.44	34.07

### 3 结论

利用微通道液滴模板合成法可控制备了尺寸均一的 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球。该凝胶球的 PEGDA 高分子网络结构及其内部的介孔结构 CaCO<sub>3</sub> 颗粒具有良好的传质性能,且可为 CaCO<sub>3</sub> 颗粒中所封装的 ADH 提供有效保护。该 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球展现出与游离酶相当的酶催化活性;同时,与游离酶相比,该凝胶球在分别经 80℃ 热水和紫外光照等苛刻条件处理 30 min 后,仍能有效保持其酶催化活性。因此,该 ADH/CaCO<sub>3</sub>@PEGDA 凝胶球具备良好的酶催化活性和环境耐受性。该研究结果为具有良好酶催化活性和环境耐受性的新型酶固定化颗粒载体的设计制备提供了新策略。

### 参考文献

- [1] Bernal C, Rodriguez K, Martinez R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(5): 1470-1480.
- [2] Yushkova E D, Nazarova E A, Matyuhina A V, et al. Application of immobilized enzymes in food industry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(42): 11553-11567.
- [3] Tang S S, Zhang F Y, Gong H, et al. Enzyme-powered Janus platelet cell robots for active and targeted drug delivery[J]. *Science Robotics*, 2020, 5(43): 6137-6147.
- [4] Kant B S, Kant B R, Jeon J M, et al. An overview on advancements in biobased transesterification methods for biodiesel production: Oil resources, extraction, biocatalysts, and process intensification technologies[J]. *Fuel*, 2021, 285: 119117-119136.
- [5] Shakerian F, Zhao J, Li S P. Recent development in the application of immobilized oxidative enzymes for bioremediation of hazardous micropollutants-A review[J]. *Chemosphere*, 2020, 239: 124716-124727.
- [6] Zubair M, Adnan Ramzani P M, Rasool B, et al. Efficacy of chitosan-coated textile waste biochar applied to Cd-polluted soil for reducing Cd mobility in soil and its distribution in moringa (*Moringa oleifera* L.)[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 284: 112047-112061.
- [7] 柯彩霞, 范艳利, 苏枫, 等. 酶的固定化技术最新研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(2): 188-203.
- [8] Ariaeenejad S, Motamedi E, Hosseini Salekdeh G. Application of the immobilized enzyme on magnetic graphene oxide nano-carrier as a versatile bi-functional tool for efficient removal of dye from water[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124228-124236.
- [9] Zhu D, Ao S, Deng H, et al. Ordered coimmobilization of a multi-enzyme cascade system with a metal organic framework in a membrane: Reduction of CO<sub>2</sub> to methanol[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(37): 33581-33588.
- [10] Luo J, Meyer A S, Mateiu R V, et al. Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO<sub>2</sub> to methanol[J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(3): 319-327.
- [11] Zhang Y W, Jeya M, Lee J K. Enhanced activity and stability of L-arabinose isomerase by immobilization on aminopropyl glass[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(5): 1435-1442.
- [12] Bilal M, Zhao Y P, Noreen S, et al. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: A review from immobilization strategies viewpoint[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2019, 37(3): 159-182.
- [13] Jo S M, Wurm F R, Landfester K. Biomimetic cascade network between interactive multicompartmental systems organized by enzyme-loaded silica nanoreactors[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(40): 34230-34237.
- [14] Mo H D, Qiu J H, Yang C, et al. Preparation and characterization of magnetic polyporous biochar for cellulase immobilization by physical adsorption[J]. *Cellulose*, 2020, 27(9): 4963-4973.
- [15] Tahmasbi L, Sedaghat T, Motamedi H, et al. Mesoporous silica nanoparticles supported copper(II) and nickel(II) Schiff base complexes: Synthesis, characterization, antibacterial activity and enzyme immobilization[J]. *Journal of Solid State Chemistry*, 2018, 258: 517-525.
- [16] Huang Y, Ran X, Lin Y, et al. Self-assembly of an organic-inorganic hybrid nanoflower as an efficient biomimetic catalyst for self-activated tandem reactions[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(21): 4386-4389.
- [17] Tan H L, Guo S, Dinh N D, et al. Heterogeneous multi-compartmental hydrogel particles as synthetic cells for incompatible tandem reactions[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 663-672.
- [18] Wang X L, Li Z, Shi J F, et al. Bioinspired approach to multi-enzyme cascade system construction for efficient carbon dioxide reduction[J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(3): 962-972.
- [19] Peters R J R W, Marguet M, Marais S, et al. Cascade reactions in multicompartmentalized polymersomes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(1): 146-150.
- [20] Phipps J, Chen H, Donovan C, et al. Catalytic activity, stability, and loading trends of alcohol dehydrogenase enzyme encapsulated in a metal-organic framework[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(23): 26084-26094.
- [21] Wu X L, Ge J, Yang C, et al. Facile synthesis of multiple enzyme-containing metal-organic frameworks in a biomolecule-friendly environment[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(69): 13408-13411.
- [22] 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 Letters*, 2014, 14(10): 5761-5765.
- [23] Zhang Y, Wang B C, Wang P, et al. Microfluidic fabrication of hydrogel microparticles with MOF-armoured multi-enzymes for cascade biocatalytic reactions[J]. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2022, 7: 275-283.
- [24] 汪伟, 苏瑶瑶, 刘壮, 等. 微流控法可控构建微尺度功能材料[J]. *化工进展*, 2019, 38(1): 421-433.
- [25] 苏瑶瑶, 李平凡, 汪伟, 等. 微流控液滴模板法可控构建功能微颗粒材料[J]. *化工学报*, 2021, 72(1): 42-60. ■