

过氧化氢酶-无机杂化纳米花的制备及催化特性

庞焦, 姜梦彤, 刘羽欣, 李明玉, 孙佳明, 王从纲, 李宪臻

大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034

庞焦, 姜梦彤, 刘羽欣, 李明玉, 孙佳明, 王从纲, 李宪臻. 过氧化氢酶-无机杂化纳米花的制备及催化特性. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4705-4718.

PANG J, JIANG MT, LIU YX, LI MY, SUN JM, WANG CG, LI XZ. Preparation and catalytic properties of catalase-inorganic hybrid nanoflowers. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4705-4718.

摘要: 过氧化氢酶 (catalase, CAT) 是一种在食品、医疗、纺织等领域广泛应用的工业酶, 具有催化效率高、专一性强、绿色环保等突出特点。工业中游离过氧化氢酶无法回收再利用, 导致以其为核心的工业生物转化过程成本较高。开发一种简单、温和、低成本并且体现绿色化学理念的方法对过氧化氢酶进行固定化有望提高其利用率并且强化酶学性能, 具有迫切的现实需求。本研究将源自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 的过氧化氢酶 KatA 在大肠杆菌中进行重组表达, 之后将分离纯化得到的纯酶以酶-无机杂化纳米花形式制备成固定化酶并进行酶学性质研究。结果显示, 利用乙醇沉淀、DEAE 阴离子交换层析、疏水层析 3 步纯化, 最终获得电泳纯的重组 KatA, 之后通过优化制备条件获得了一种新型 KatA/Ca₃(PO₄)₂ 杂化纳米花固定化酶。酶学性质研究结果显示, 游离酶 KatA 的最适反应温度为 35 °C, KatA/Ca₃(PO₄)₂ 杂化纳米花的最适反应温度为 30–35 °C, 二者最适反应 pH 值均为 11.0。游离酶 KatA 和 KatA/Ca₃(PO₄)₂ 杂化纳米花在 pH 4.0–11.0 和 25–50 °C 条件下均表现出较好的稳定性。KatA/Ca₃(PO₄)₂ 杂化纳米花显示出比游离酶 KatA 更好的储存稳定性, 在 4 °C 储存 14 d 后仍保留 82% 的酶活力, 而游离酶仅具有 50% 的酶活力。此外, 纳米花在进行 5 次催化反应后仍具有 55% 的酶活力, 表明其具有较好的操作稳定性。动力学研究结果显示, 游离酶 KatA 对底物过氧化氢的 K_m 为 (8.80±0.42) mmol/L, k_{cat}/K_m 为 (13 151.53±299.19) L/(mmol·s); 而 KatA/Ca₃(PO₄)₂ 杂化纳米花的 K_m 为 (32.75±2.96) mmol/L, k_{cat}/K_m 为 (4 550.67±107.51) L/(mmol·s)。与游离酶 KatA 相比, KatA/Ca₃(PO₄)₂ 杂化纳米花对底物过氧化氢的亲和力下降, 同时其催化效率也有所降低。综上所述, 本研究以 Ca²⁺ 作为自组装诱导剂, 成功将 KatA 以酶-无机杂化纳米花形式制备成固定化酶, 不仅对部分酶学性能实现了强化, 而且为固定化过氧化氢酶的绿色制备和规模化应用奠定了基础。

关键词: 过氧化氢酶; 固定化酶; 有机-无机杂化纳米花; 酶学性质

Received: May 13, 2022; Accepted: June 20, 2022

Supported by: Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (20180550668)

Corresponding author: WANG Conggang. E-mail: wangcg@dpu.edu.cn

基金项目: 辽宁省自然科学基金 (20180550668)

Preparation and catalytic properties of catalase-inorganic hybrid nanoflowers

PANG Jiao, JIANG Mengtong, LIU Yuxin, LI Mingyu, SUN Jiaming, WANG Conggang, LI Xianzhen

School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

Abstract: Catalase is widely used in the food, medical, and textile industries. It possesses exceptional properties including high catalytic efficiency, high specificity, and environmental friendliness. Free catalase cannot be recycled and reused in industry, resulting in a costly industrial biotransformation process if catalase is used as a core ingredient. Developing a simple, mild, cost-effective, and environmentally friendly approach to immobilize catalase is anticipated to improve its utilization efficiency and enzymatic performance. In this study, the catalase KatA derived from *Bacillus subtilis* 168 was expressed in *Escherichia coli*. Following separation and purification, the purified enzyme was prepared as an immobilized enzyme in the form of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers, and the enzymatic properties were investigated. The results indicated that the purified KatA was obtained through a three-step procedure that included ethanol precipitation, DEAE anion exchange chromatography, and hydrophobic chromatography. Then, by optimizing the process parameters, a novel KatA/Ca₃(PO₄)₂ hybrid nanoflower was developed. The optimum reaction temperature of the free KatA was determined to be 35 °C, the optimum reaction temperature of KatA/Ca₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers was 30–35 °C, and the optimum reaction pH of both was 11.0. The free KatA and KatA/Ca₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers exhibited excellent stability at pH 4.0–11.0 and 25–50 °C. The KatA/Ca₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers demonstrated increased storage stability than that of the free KatA, maintaining 82% of the original enzymatic activity after 14 d of storage at 4 °C, whereas the free KatA has only 50% of the original enzymatic activity. In addition, after 5 catalytic reactions, the nanoflower still maintained 55% of its initial enzymatic activity, indicating that it has good operational stability. The K_m of the free KatA to the substrate hydrogen peroxide was (8.80±0.42) mmol/L, and the k_{cat}/K_m was (13 151.53±299.19) L/(mmol·s). The K_m of the KatA/Ca₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers was (32.75±2.96) mmol/L, and the k_{cat}/K_m was (4 550.67±107.51) L/(mmol·s). Compared to the free KatA, the affinity of KatA/Ca₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers to the substrate hydrogen peroxide was decreased, and the catalytic efficiency was also decreased. In summary, this study developed KatA/Ca₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers using Ca²⁺ as a self-assembly inducer, which enhanced the enzymatic properties and will facilitate the environmentally friendly preparation and widespread application of immobilized catalase.

Keywords: catalase; immobilized enzymes; organic-inorganic hybrid nanoflowers; enzymatic properties

过氧化氢酶 (catalase, 简称 CAT, EC 1.11.1.6) 一种重要的工业酶, 能催化过氧化氢分解为水和氧气, 在食品、医疗、纺织、环保等领域具有重要的应用^[1-3]。如在食品烘烤过程

中,常同时添加过氧化氢和 CAT 用作食品疏松剂。在异麦芽低聚糖的制备过程中添加葡萄糖氧化酶和 CAT 可以促进产物的提纯^[4-5];在医疗领域中, CAT 可用于分解隐形眼镜消毒液中残留的过氧化氢 (H_2O_2)^[6];在纺织工业中, CAT 可替代传统化学法去除漂白工艺中残留的 H_2O_2 ,既可降低生产成本,又具备绿色环保的优势^[7];在环保工业中,用 CAT 降解工业废水中残留的 H_2O_2 可以避免化学法处理带来的二次污染^[8]。由于 CAT 在上述领域的应用势头迅猛,导致目前市场对 CAT 的需求量逐年增加。然而,以游离态存在的商品化 CAT 无法重复利用,并且稳定性不足,导致以 CAT 为核心的工业生物催化及相关保存运输过程成本较高。

利用特定技术将生物酶固载于水不溶性载体材料上,从而制备成固定化酶是一种有效提高酶的利用率和稳定性的策略。然而,固定化技术对生物酶的改造效果受多方面因素的影响,如固定化载体、反应介质、酶分子性质等。对于不同的生物酶缺少普适性的固定化策略,需要根据酶的自身特性以及应用需求来选择合适的固定化方法^[9]。目前针对 CAT 的固定化研究工作已经取得了一些进展^[10]。现有 CAT 的固定化方法主要集中于利用吸附法、包埋法、交联法和共价结合法等传统方法对其进行固载^[11],如 Alptekin 等将牛肝来源的 CAT 通过共价结合法固定在 Eupergit C 载体上,制备的固定化 CAT 不仅热稳定性相比游离 CAT 有所改善,而且储存稳定性显著提高,在 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存 28 d 后酶活力为初始酶活力的 79%,而游离 CAT 在储存 11 d 后完全失活^[12]。陈爽等将 CAT 通过戊二醛交联法固载于 Fe(III) 改性的胶原纤维,得到的固定化 CAT 与游离酶的最适反应温度和 pH 相同,比活力有所降低,但热稳定性显著提高,在 $75\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 5 h 后,仍能保留 30%的活

力^[13]。厉成宣等以高碘酸钠氧化棉织物为载体固定化 CAT,发现固定化 CAT 在偏酸性环境下稳定性较游离酶差,但在偏碱性环境下稳定性比游离酶好^[14]。因此,目前通过传统方法固定化 CAT 虽然提高了利用率,但需要额外的载体材料和固载用化学试剂,导致固定化酶制备成本和后续化学试剂的处理成本较高,对环境保护治理造成了额外的负担。因此,亟需针对 CAT 固定化酶的绿色制备和高效利用开发新的固定化策略^[12,15]。

近年来,将生物酶以有机-无机杂化纳米花形式制备成固定化酶受到了广泛关注,其具有制备成本低、过程简单、有利于酶固载后保留功能活性、体现绿色化学理念有利于可持续发展等突出优势。纳米花的形成主要是利用生物酶、金属阳离子与磷酸根阴离子通过自组装形成具有类似天然花卉形态结构的复合体。在固定化过程中,生物酶和金属离子分别作为有机组分和无机组分进行杂化^[16],仅需向含有目的蛋白的磷酸盐缓冲液中加入特定金属离子溶液并进行孵育即可制备出纳米花形式的固定化酶^[17]。自 2012 年 Ge 等首次制备了蛋白质- $Cu_3(PO_4)_2$ 杂化纳米花以来^[18],该技术的应用越发广泛。目前纳米花在生物催化、传感器制备、生物医药等领域展现出较大的应用潜力^[19-20]。Zare 等将漆酶制备成纳米花,相比游离酶表现出更好的催化活性和稳定性^[18]。Cui 等制备了脂肪酶-磷酸铜杂化纳米花,具有相比游离酶更好的催化活性和稳定性^[21]。此外,有研究报道已成功将葡萄糖氧化酶、 α -淀粉酶和脲酶等多种生物酶制备成为酶-无机杂化纳米花^[22-24]。上述研究进展表明,将生物酶制备成纳米花不仅能够实现重复利用,而且普遍表现出相比游离酶更好的稳定性和催化活性。由于与游离酶或传统方法制备的固定化酶相比,

很多单酶或多酶复合杂化纳米花表现出更高的催化活性和稳定性,因此利用有机-无机杂化纳米花制备技术对 CAT 进行固定化有望为 CAT 的高效制备和利用提供新策略。然而,目前对 CAT 以纳米花形式进行固定化的工作处于起步阶段,且采用牛肝来源的 CAT 导致制备成本较高。如 Zhang 等制备了一种过氧化氢酶-磷酸铜杂化纳米花,并且将其成功用于构建 H₂O₂ 的可视化检测平台^[25]。

本文前期工作中将源自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 的过氧化氢酶 KatA 在多种微生物宿主中进行了重组表达和酶学性质研究,发现该酶具有优良的酶学性质^[26-28]。因此,为提高 KatA 的利用率和稳定性以成功实现其规模化应用,本研究将 KatA 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中进行重组表达和分离纯化,将纯酶制备成酶-无机杂化纳米花形式的固定化酶。对影响纳米花活性的关键参数如金属离子类型和浓度、孵育时间、孵育温度进行了优化。之后将优选的 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花进行形态表征和酶学性质研究,从而为固定化过氧化氢酶的绿色制备和高效利用提供新策略,促进过氧化氢酶在工业上的规模化应用。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株和质粒

菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B、BL21(DE3) 均为本实验室保存,质粒 pET22b-*katA* 由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成。

1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素 (ampicillin, Amp)、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl-β-D-

thiogalactoside, IPTG)、二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质定量检测试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。蛋白质相对分子质量标准品购自宝生物工程 (大连) 有限公司。DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析填料、Phenyl SepharoseTM CL-4B 疏水层析填料均购自通用电气 (中国) 有限公司。其他化学试剂购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,NaCl 10 g/L,pH 为 7.25。LB 固体培养基为在 LB 液体培养基中加入终浓度为 1.5% 的琼脂。TB 培养基:胰蛋白胨 12 g/L,酵母浸粉 24 g/L,4% 甘油,170 mmol/L KH₂PO₄,720 mmol/L K₂HPO₄,pH 为 7.25。10 mmol/L 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (g/L,pH 为 7.4):NaCl 8,KCl 0.2,Na₂HPO₄ 1.44,KH₂PO₄ 0.28。缓冲液 A:Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 50 mmol/L,pH 为 7.0。

1.2 主要仪器

Milli-Q 超纯水过滤系统、Cogent μScale TFF System, Millipore 公司; HITACHI-CR21GIII 超速冷冻离心机,日立 (中国) 有限公司; TGL-16 高速台式冷冻离心机,湘仪离心机仪器有限公司; 通用型垂直电泳仪,生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Infinite F50 酶标仪,TECAN 公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; NanoVue plus 超微量紫外分光光度计、ImageQuant LAS4000 凝胶成像分析系统,通用电气 (中国) 有限公司; AKTA 蛋白纯化仪,GE 公司; 紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司; 真空干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司; 扫描电镜系统,电子株式会社。

1.3 重组工程菌的诱导表达

将重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET22b-

katA 在 LB 固体平板划线培养, 挑取单菌落接种于 5 mL 含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 14 h 得到种子液。将种子液以 2% (*V/V*) 比例转入含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 TB 培养基中进行扩大培养, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养至菌体 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养 20 h 进行诱导表达。

1.4 KatA 的分离纯化

将重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET22b-*katA* 诱导表达后的发酵液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体细胞。参考文献[29]中的方法, 利用含有精氨酸的缓冲液提取周质空间蛋白。先使用 10 倍体积的 0.4 mol/L 的精氨酸缓冲液 (pH 8.0) 重悬菌体细胞, 置于冰水混合物中孵育 45 min, 随后在 10 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液为周质空间蛋白样品。将周质空间蛋白样品在冰水混合物中充分预冷后, 缓慢加入预冷的乙醇至总体积的 80%, 继续在冰水混合物中静置 45 min 后于 10 000 r/min 离心 30 min 得到含有 KatA 的沉淀组分。之后将乙醇沉淀组分利用缓冲液 A 复溶, 将复溶后样品于 10 000 r/min 条件下离心 30 min, 去除未溶解的沉淀后利用色谱技术纯化 KatA。将乙醇沉淀复溶后样品上样于 DEAE 阴离子交换层析柱, 首先用 10 倍柱体积的缓冲液 A 充分清洗色谱柱以除去未结合的杂蛋白, 之后用含有 0–1 mol/L NaCl 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱。将洗脱样品中含有目的蛋白 KatA 的组分收集合并后进行透析以去除 NaCl。之后向含有 KatA 的样品中加入等体积的含 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的缓冲液 A, 10 000 r/min 条件下离心 40 min 去除不溶性沉淀, 之后上样于 Phenyl SepharoseTM CL-4B 疏水层析柱, 利用含 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

的缓冲液 A 清洗层析柱以除去未结合的杂蛋白, 之后利用含 0–1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱, 将含有目的蛋白的组分收集合并后利用 10 mmol/L PBS 缓冲液进行透析并利用超滤进行浓缩。利用 12% 的 SDS-PAGE 对蛋白样品进行检测。利用 BCA 法对纯酶进行定量检测。

1.5 过氧化氢酶 KatA-无机杂化纳米花的制备和表征

1.5.1 纳米花的制备

KatA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花: 取 5 mL 用 10 mmol/L PBS 溶液稀释为 0.2 mg/mL 的 KatA 纯酶, 加入 80 μL 浓度为 200 mmol/L 的 CaCl_2 溶液, 混匀后静置反应不同时间后, 12 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀并用 ddH₂O 洗涤 3 次后, 用真空干燥箱于 25 $^{\circ}\text{C}$ 干燥后储存; KatA- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花: 取 5 mL 用 10 mmol/L PBS 溶液稀释为 0.2 mg/mL 的 KatA 纯酶, 加入 234 μL 浓度为 120 mmol/L 的无水硫酸铜溶液, 混匀后静置反应不同时间后, 12 000 r/min 条件下离心 10 min 收集沉淀并用 ddH₂O 洗涤 3 次后, 用真空干燥箱于 25 $^{\circ}\text{C}$ 干燥后储存; KatA- $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花: 取 5 mL 用 10 mmol/L PBS 溶液稀释为 0.2 mg/mL 的 KatA 纯酶, 加入 400 μL 浓度为 0.05 g/mL 的乙酸锌溶液, 混匀后静置反应不同时间后, 12 000 r/min 条件下离心 10 min 收集沉淀并用 ddH₂O 洗涤 3 次后, 用真空干燥箱于 25 $^{\circ}\text{C}$ 干燥后储存。

1.5.2 Ca^{2+} 浓度优化

针对 KatA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花, 将 KatA 纯酶用 10 mmol/L PBS 溶液稀释为 0.2 mg/mL, 之后取 5 mL 稀释后纯酶分别加入 80 μL 浓度为 200、250、300 mmol/L 的 CaCl_2 溶液, 充分混匀后静置反应 24 h, 之后按 1.5.1 所述方法收集纳米花。

1.5.3 制备时间优化

针对 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花, 将 KatA 纯酶用 10 mmol/L PBS 溶液稀释为 0.2 mg/mL, 之后取 5 mL 稀释后纯酶加入 80 μL 浓度为 200 mmol/L 的 CaCl₂ 溶液, 充分混匀后静置反应 24、48、72 h 并取样按 1.5.1 所述方法收集纳米花。

1.5.4 制备温度优化

针对 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花, 将 KatA 纯酶用 10 mmol/L PBS 溶液稀释为 0.2 mg/mL, 之后取 5 mL 稀释后纯酶加入 80 μL 浓度为 300 mmol/L 的 CaCl₂ 溶液, 充分混匀后分别在 4 °C 和 25 °C 静置反应 48 h, 之后按 1.5.1 所述方法收集纳米花。

1.6 纳米花的形态结构表征

收集经真空干燥的 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花样品, 用导电胶固定在导电台上, 并对其进行喷金处理后, 在 20 kV 的加速电压下, 通过扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察其形貌及结构特征。

1.7 酶活力的测定

利用分光光度法分别检测游离酶和纳米花的酶活力^[30], 将 0.1 mL 游离酶或纳米花溶液分别加入 0.9 mL 含 10 mmol/L H₂O₂ 的 50 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液 (pH 7.0), 于 37 °C 反应 2 min, 测定 240 nm 处吸光度的变化并计算酶活力。酶活力单位的定义为: 37 °C 下每分钟分解 1 μmol H₂O₂ 所需的酶量为一个酶活力单位。

1.8 游离酶 KatA 和 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的酶学性质表征

1.8.1 最适反应 pH 和 pH 稳定性

最适反应 pH 的测定: 将 0.1 mL 纯酶或纳米花溶液分别加入 0.9 mL 含 10 mmol/L H₂O₂ 的不同 pH (pH 4.0–6.0 Na₂HPO₄-C₆H₈O₇; pH 6.0–8.0 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄; pH 8.0–9.0 Tris-

HCl; pH 9.0–10.0 Na₂CO₃-NaHCO₃; pH 10.0–11.0 NaHCO₃-NaOH; pH 11.0–12.0 Na₂HPO₄-NaOH) 缓冲液中, 于 37 °C 反应 2 min 测定酶活力, 以最高酶活力值作为 100%。pH 稳定性的测定: 将纯酶或纳米花溶液分别在 pH 4.0–12.0 不同缓冲液中孵育 30 min 后在最适反应条件下检测酶活力, 以最高酶活力值作为 100%。

1.8.2 最适反应温度和温度稳定性

最适反应温度的测定: 取 0.1 mL 纯酶或纳米花溶液加入 0.9 mL 含 10 mmol/L H₂O₂ 的 pH 11.0 的 NaHCO₃-NaOH 缓冲液中, 分别在 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C 下反应 2 min 测定酶活力, 以最高酶活力值为 100%。温度稳定性的测定: 将纯酶或纳米花溶液分别在 25–70 °C 条件下孵育 30 min, 之后迅速冰浴冷却后于最适反应条件下测定酶活力, 以最高酶活力值作为 100%。

1.8.3 动力学常数的测定

将纯酶或纳米花分别在最适反应条件下, 于不同浓度过氧化氢底物 (2.5、4、5、8、10、20、30、40、50、60、70、80 mmol/L) 中进行催化反应并计算反应初速度, 利用 GraphPad Prism5.0 基于 Michaelis-Menten 方程进行非线性拟合得到动力学参数 K_m 、 V_{max} 并计算得到 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 。

1.8.4 储存稳定性

将纯酶和纳米花分别在 50 mmol/L 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液 (pH 7.0) 中于 4 °C 储存。在不同时间点取样测定酶活力, 以初始酶活力值作为 100%。

1.8.5 操作稳定性

将 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花连续进行 5 次催化反应, 每次反应结束后于 6 000 r/min 离心收集纳米花, 并用 10 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0) 清洗一次, 按照 1.7 的方法测定酶活力, 以初

始酶活力值作为 100%。

2 结果与分析

2.1 重组 KatA 的诱导表达与分离纯化

将工程菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET22b-*katA* 进行摇瓶培养并在 16 °C 以 0.1 mmol/L 终浓度的 IPTG 进行诱导表达。提取周质空间蛋白混合物后,依次通过乙醇沉淀、DEAE 离子交换层析、疏水层析最终得到 KatA 纯酶。将纯化过程中各步骤所获蛋白样品利用 SDS-PAGE 检测,结果如图 1 所示,经过分离纯化在约 54.8 kDa 处显示相应目的条带,表明成功纯化到过氧化氢酶 KatA。

2.2 KatA-无机杂化纳米花的制备及条件优化

2.2.1 纳米花的制备

有机-无机杂化纳米花由于具有制备条件温和、操作简单、比表面积大、酶活力高等优势,目前在酶固定化领域的应用越发广泛,其中

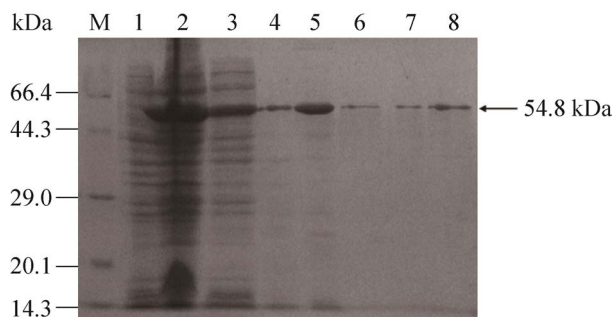


图 1 KatA 分离纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of separation and purification of KatA. M: protein marker; 1–2: *E. coli* BL21(DE3)-pET22b-*katA* samples before induction and after induction, respectively; 3: samples after arginine extraction; 4: samples after ethanol precipitation; 5: samples after DEAE-Sephrose anionic exchange chromatography; 6: samples after hydrophobic chromatography; 7: samples after dialysis; 8: samples after concentration.

Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 是应用较多的无机组分,已成功将漆酶、脂肪酶、脲酶等多种生物酶制备成酶-无机杂化纳米花^[18,21,24]。因此分别选取 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 为无机组分, KatA 为有机组分,探索了将二者进行杂化形成纳米花的可行性。首先对不同金属离子诱导 KatA 形成的纳米花进行酶活力检测,结果如图 2 所示, KatA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花具有最高酶活力,比活力达到 5 234.8 U/mg,因此选择 KatA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花进行后续研究工作。

2.2.2 Ca^{2+} 浓度优化

对 KatA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花的制备条件进行优化,首先考察 Ca^{2+} 浓度对 KatA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花酶活力的影响,分别在不同 Ca^{2+} 浓度(200、250、300 mmol/L)下制备纳米花并检测酶活力。结果如图 3 所示, Ca^{2+} 浓度为 200 mmol/L 时形成的纳米花具有最高酶活力,因此后续选择 200 mmol/L Ca^{2+} 浓度条件下制备的纳米花进行研究。

2.2.3 制备时间优化

进一步考察制备时间对 KatA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花酶活力的影响,将过氧化氢酶 KatA 与 200 mmol/L 浓度的 Ca^{2+} 混合后,分别在 25 °C

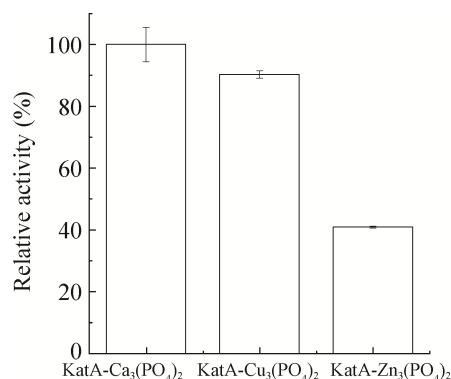


图 2 不同金属盐溶液对制备的纳米花酶活性的影响

Figure 2 Effect of different metal salt solutions on the activity of nanoflowers.

下孵育 24、48、72 h 制备纳米花, 对不同时间 (24、48、72 h) 条件下形成的纳米花进行酶活力检测, 结果如图 4 所示, 静置 48 h 形成的纳米花具有最高酶活力, 继续静置孵育到 72 h 的纳米花酶活力并未明显提高, 因此选择 48 h 进行纳米花的制备。

2.2.4 制备温度优化

研究不同制备温度对产生的 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花酶活力的影响。分别在 4 °C 和

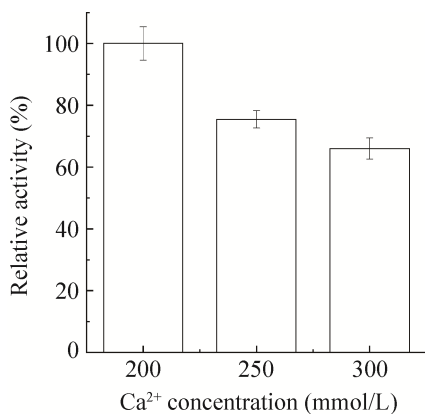


图 3 Ca^{2+} 浓度对 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花酶活性的影响

Figure 3 Effect of Ca^{2+} concentration on the activity of $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nanoflowers.

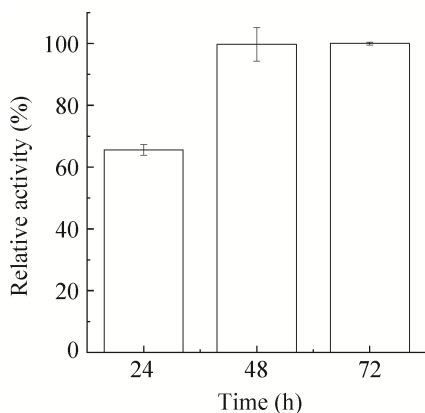


图 4 孵育时间对 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花酶活性的影响

Figure 4 Effect of incubation time on the activity of $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nanoflowers.

25 °C 下制备并收集纳米花进行酶活力测定, 结果如图 5 所示, 在 4 °C 制备的纳米花活性明显高于 25 °C 下制备的纳米花, 因此选择 4 °C 进行 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花的制备。

2.3 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花的形态结构表征

为了对纳米花的微观形貌进行分析, 采用 SEM 对不同 Ca^{2+} 浓度 (200、250、300 mmol/L) 条件下制备的 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花进行表征, 结果如图 6 所示, SEM 结果显示不同 Ca^{2+} 浓度下均形成由大量片层包围的花卉状结构, 纳米花的直径约为 1 μm 。此外, 随着 Ca^{2+} 浓度的提高, 形成的纳米花中片层堆叠更加致密。由于较大的片层间空隙有利于传质, 因此这一特点可能是 200 mmol/L 的 Ca^{2+} 相比更高浓度下制备的纳米花具有更高的酶活力的主要原因。

2.4 游离酶 KatA 和 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花的最适反应 pH 和 pH 稳定性

将游离酶 KatA 和 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花进行酶学性质表征, 首先在 pH 4.0–12.0 条件下检测二者的酶活力, 结果如图 7A 所示, 二者的最适反应 pH 均为 11.0, 并且均在 pH 4.0–12.0 范围内具有酶活力。pH 稳定性检测结果显示

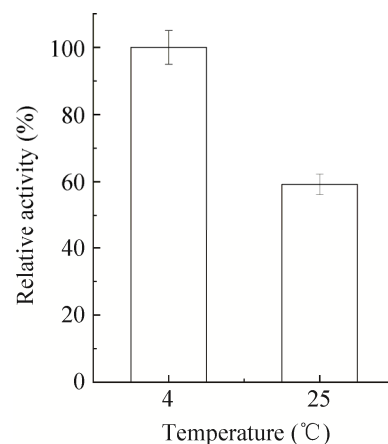


图 5 孵育温度对 $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 纳米花酶活性的影响

Figure 5 Effect of incubation temperature on the activity of $\text{KatA}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nanoflowers.

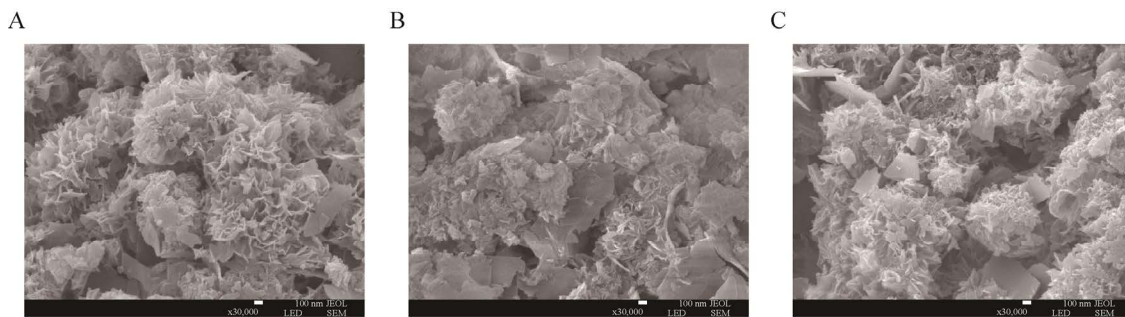


图 6 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的 SEM 图

Figure 6 SEM images of KatA-Ca₃(PO₄)₂ nanoflowers prepared with varying concentration of Ca²⁺. (A) 200 mmol/L. (B) 250 mmol/L. (C) 300 mmol/L.

(图 7B), KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花 在 pH 5.0–11.0 范围内经过孵育后具有超过 90% 的酶活力, 并且在 pH 12.0 下孵育后具有 11% 的酶活力。而

游离酶 KatA 在 pH 4.0–10.0 下孵育 30 min 后具有超过 84% 的酶活力, 在 pH 11.0 下孵育 30 min 后酶活力快速下降, 尤其在 pH 12.0 下孵育 30 min 后酶活力仅剩 3%, 因此在碱性条件下纳米花显示出比游离酶 KatA 更好的稳定性。由于在食品、医药、纺织工业中, 过氧化氢酶经常需要在碱性条件下使用, 因此耐碱性更好的 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花具有较好的应用潜力。

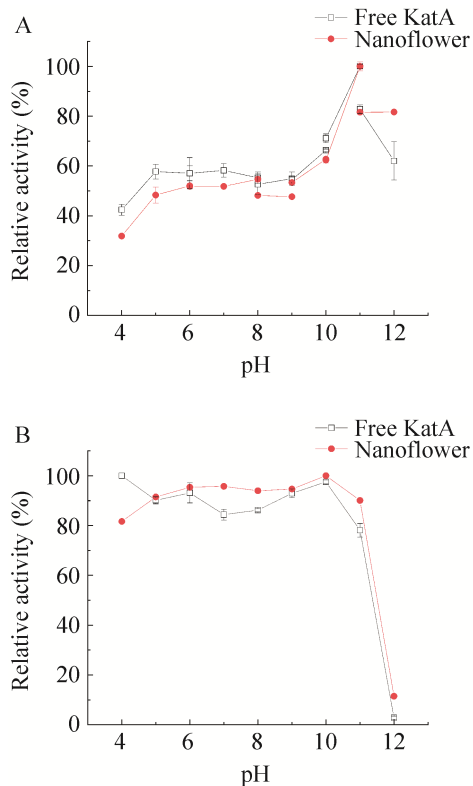


图 7 游离酶 KatA 和 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的最适 pH (A) 及 pH 稳定性 (B)

Figure 7 Optimal pH (A) and pH stability (B) of free enzyme KatA and KatA-Ca₃(PO₄)₂ nanoflowers. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

2.5 游离酶 KatA 和 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的最适反应温度和温度稳定性

将游离酶 KatA 和 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花分别在 25–70 °C 条件下进行催化反应以检测最适反应温度。结果如图 8A 所示, 纳米花的最适反应温度为 30–35 °C, 而游离酶 KatA 的最适反应温度为 35 °C, 说明纳米花在更宽的温度范围内表现出较好的酶活力。随后, 在 25–70 °C 范围进行温度稳定性检测, 结果如图 8B 所示, 游离酶在 25–50 °C 孵育 30 min 后保留超过 92% 的酶活力, 而 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花在同处理条件下保留超过 96% 的酶活力。当孵育温度高于 50 °C 后游离酶和纳米花的酶活力均迅速降低。

2.6 动力学常数的测定

在最适反应条件下分别测定游离酶 KatA

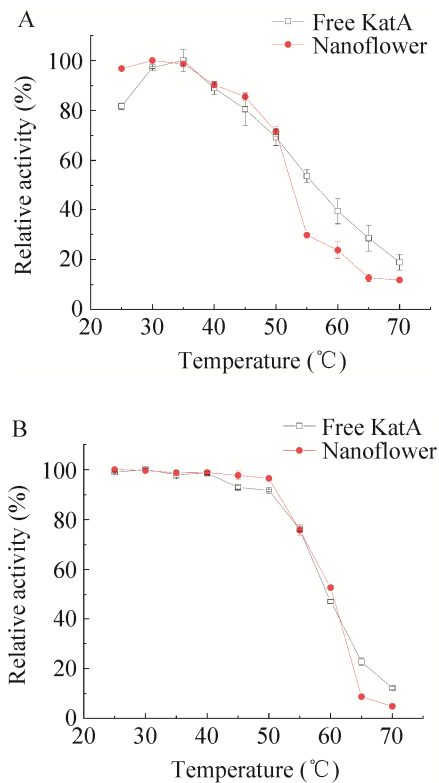


图 8 游离酶 KatA 和 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的最适温度 (A) 及温度稳定性 (B)

Figure 8 Optimum temperature (A) and temperature stability (B) of free enzyme KatA and KatA-Ca₃(PO₄)₂ nanoflowers. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

与 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花对不同浓度底物过氧化氢的催化反应初速度并进行拟合得到动力学常数。结果如表 1 所示, 游离 KatA 的 K_m 为 (8.81±0.42) mmol/L、 V_{max} 为 (4 438.00±74.28) $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 、 k_{cat} 为 (115 810.00±1 939.00) s^{-1} 、 k_{cat}/K_m 为 (13 151.53±299.19) L/(mmol·s), 而纳米花的 K_m 为 (32.75±2.96) mmol/L、 V_{max} 为 (29 535.67±697.81) $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 、 k_{cat} 为 (149 034.55±

3 521.08) s^{-1} 、 k_{cat}/K_m 为 (4 550.67±107.51) L/(mmol·s)。对比发现, KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的 K_m 值较游离酶有所增加, 表明固定化后 KatA 对底物过氧化氢的亲和力降低。这可能是由于包埋在纳米花中的 KatA 与纳米花片层材料之间的相互作用导致酶的构象发生变化, 进而影响了酶对底物的可及性, 以及底物在纳米花中的传质阻力增加影响了固定化后 KatA 对过氧化氢的结合^[31]。此外, 与游离酶相比, 纳米花的 k_{cat}/K_m 值较游离酶降低, 为游离酶的 34%。

2.7 储存稳定性

储存稳定性是评价固定化酶性能的重要指标, 因此将游离酶 KatA 与纳米花在 4 °C 保存 14 d, 在不同时间点取样检测酶活力。结果如图 9 所示, 保存至 14 d 时, 游离酶 KatA 仅剩 50% 的酶活力, 而纳米花仍具有 82% 的酶活力, 显示出比游离酶 KatA 更好的储存稳定性。纳米花具有更好储存稳定性的原因可能是由于纳米花独特的花卉状结构能够较好地保护 KatA 免受外界环境的干扰^[32], 因此以纳米花形式固定化 KatA 可以有效提高其储存稳定性, 有利于其运输和长期储存。

2.8 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的操作稳定性

相比游离酶, 可重复利用是固定化酶的突出优势, 有助于生物酶在工业中实现连续转化从而降低使用成本^[33-35]。将 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花连续进行 5 次催化反应检测酶活力, 结果如图 10 所示, 经过 1 次催化反应后酶活力明显下降, 但随后的催化循环中酶活力下降趋势明显变缓, 纳米花经过 5 次催化反应后仍具有 55%

表 1 游离酶 KatA 及 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的动力学常数

Table 1 Kinetic parameters of free enzyme KatA and KatA-Ca₃(PO₄)₂ nanoflowers

Sample	K_m (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
Free KatA	8.81±0.42	4 438.00±74.28	115 810.00±1 939.00	13 151.53±299.19
Nanoflower	32.75±2.96	29 535.67±697.81	149 034.55±3 521.08	4 550.67±107.51

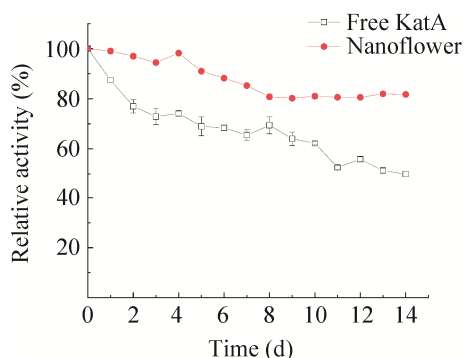


图9 游离酶 KatA 和 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的储存稳定性

Figure 9 Storage stability of free enzyme KatA and KatA-Ca₃(PO₄)₂ nanoflowers. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

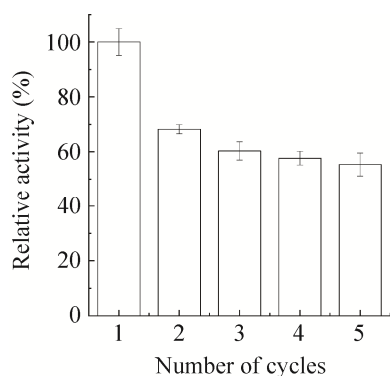


图10 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花的操作稳定性

Figure 10 Operational stability of KatA-Ca₃(PO₄)₂ nanoflowers. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

的酶活力。酶活力下降的可能原因是连续的催化反应中由于底物过氧化氢对纳米花的作用结合反复洗涤导致纳米花外层结合不牢固组分脱落, 因此首次洗涤后酶活力下降较为明显, 但余下的纳米花结构相对稳定并且可以继续催化。

3 讨论

固定化酶技术是酶工程领域的研究重点和热点。然而, 已经成功实现产业化的固定化酶相对有限, 仅葡萄糖异构酶、葡萄糖氧化酶、

青霉素酰化酶等十几种生物酶被用于工业上大规模生产和应用。近年来新型固定化酶技术被不断开发, 在食品、生物医学、环境保护等领域中显示出较好的应用潜力。其中, 将酶与金属离子在磷酸盐缓冲液中共沉淀形成纳米花形式的固定化酶, 具有制备成本低、操作简单、反应条件温和、绿色无污染等诸多优势, 已经成功用于 α -淀粉酶、脂肪酶、漆酶等生物酶的固定化, 有效提高了上述酶的利用率和稳定性^[18,23,36], 而且有研究发现将糜蛋白酶、胰蛋白酶等制备成纳米花, 酶活力较游离酶显著提高^[37-38]。因此, 本研究将具有较好应用潜力的源自枯草芽孢杆菌 168 的过氧化氢酶 KatA 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行重组表达, 利用共沉淀法制备成酶-无机杂化纳米花。并且通过优化获得了具有较好稳定性和重复利用性的 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花, 证实了通过该方法能够将 KatA 制备成具有较好稳定性和重复利用性的固定化酶, 也为进一步制备条件的精细设计优化和应用过程强化打下了基础。

目前商品化 CAT 以游离态存在, 无法重复利用且稳定性不足, 导致 CAT 相关工业生物催化和保存运输成本较高。将 CAT 制备成固定化酶有望突破相关技术瓶颈, 具有迫切的现实需求。已报道对 CAT 进行固定化的研究工作主要采用传统方法对其进行固载, 需要额外的载体材料和固载用化学试剂, 并且步骤较多, 不利于固定化 CAT 的规模化制备。如利用明胶为载体, 戊二醛为交联剂将 CAT 进行固定化, 制备的固定化酶在高温下具有更好的稳定性, 同时催化效率有所降低^[39]。Inanan 利用甲基丙烯酸羟乙酯-壳聚糖高分子聚合物固定化 CAT, 最适反应温度从 37 °C 下降为 25 °C, 但最适反应 pH 未发生变化, 同时在 4 °C 下保存 15 d 仍具有 82.1% 的酶活力, 而游离酶完全失活^[40]。与上述

固定化方法相比,应用纳米花技术固定化 KatA 制备过程简单、无需使用载体材料和偶联用化学试剂,在制备成本和环保方面具有明显优势。

尽管本研究成功制备出 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花,并且表现出较好的稳定性和重复利用性,但其酶学性能仍有进一步提高的空间。本研究制备的 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花对底物过氧化氢的 K_m 值较游离态 KatA 有所增加,并且 k_{cat}/K_m 值降低到游离态 KatA 的 34%,表明以纳米花形式固定化 KatA 导致对底物的亲和力和催化效率均有所降低。这一现象在其他研究工作中也有报道,如嗜热脂肪酶-铜杂化纳米花与游离酶相对底物的亲和力有所降低^[41]。由于酶固定化后,与载体的相互作用容易导致酶活性中心或重要调节部位的构象发生变化,此外底物在载体材料内部空隙中的传质阻力也会影响底物与酶活性中心的结合和催化,从而影响酶的催化特性。因此,尽管 ω-转氨酶^[42]、L-阿拉伯糖异构酶^[43]、木瓜蛋白酶^[44]等多种生物酶采用纳米花形式进行固定化后不仅具有较好的稳定性和重复利用性,而且催化效率相比游离酶也有所提高,但仍有很多酶,如碳酸酐酶^[45]、脂肪酶^[46]和磷酸三酯酶^[47]等在采用纳米花形式固定化后,催化效率有所降低。此外,本研究中发现 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花在重复催化过程中,酶活力有明显下降,表明在重复催化过程中,与底物的相互作用可能对纳米花载体和 KatA 产生影响。因此未来需要对不同金属离子诱导生物酶组装形成纳米花过程中的行为和机制进行解析,以强化酶-无机杂化纳米花的细节性设计,从而更加理性地提高纳米花的酶学性能并且实现过程强化。同时,未来可以针对 KatA 进行进一步地分子改造,提高其相关催化性能并且对其进行固定化从而强化固定化过氧化氢酶的使用性能。此外,提高 KatA 的表达量,

进而实现一步利用粗酶液进行固定化,将有望进一步降低 KatA 固定化酶的制备成本。

综上所述,本文对源自枯草芽孢杆菌 168 的过氧化氢酶 KatA 的重组表达和固定化研究中,成功制备了具有较好稳定性和重复利用性的 KatA-Ca₃(PO₄)₂ 纳米花,不仅为低成本、绿色、高效制备固定化过氧化氢酶提供了新策略,而且拓展了纳米花的适用范围,为进一步精细设计和性能强化奠定了基础,有利于固定化过氧化氢酶的绿色高效制备和在工业上的大规模应用。

REFERENCES

- [1] Kaushal J, Mehandia S, Singh G, et al. Catalase enzyme: application in bioremediation and food industry. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2018, 16: 192-199.
- [2] Usui S, Komeima K, Lee SY, et al. Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 2009, 17(5): 778-786.
- [3] Alaçam A, Tulunoglu O, Oygür T, et al. Effects of topical catalase application on dental pulp tissue: a histopathological evaluation. *J Dent*, 2000, 28(5): 333-339.
- [4] 方芳, 李寅, 堵国成, 张娟, 陈坚. 一株嗜热子囊菌产生的碱性耐热过氧化氢酶及其应用潜力. *生物工程学报*, 2004, 20(3): 423-428.
Fang F, Li Y, Du GC, et al. Thermo-alkali-stable catalase from *Thermoascus aurantiacus* and its potential use in textile bleaching process. *Chin J Biotech*, 2004, 20(3): 423-428 (in Chinese).
- [5] 徐小艳, 彭聪, 田兴国. 葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶复合体系提纯异麦芽低聚糖的研究. *华南农业大学学报*, 2005, 26(4): 102-105.
Xu XY, Peng C, Tian XG. Studies on purifying isomalto-oligosaccharide by combined enzyme of glucose oxidase and catalase. *J South China Agric Univ*, 2005, 26(4): 102-105 (in Chinese).
- [6] Gebicka L, Didik J. Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *J Inorg Biochem*, 2009, 103(10): 1375-1379.
- [7] 冷晒祥, 钱国坻, 华兆哲, 等. 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究. *印染*, 2006, 32(19): 1-3.

- Leng SX, Qian GD, Hua ZZ, et al. Catalase for H₂O₂ removal after cotton knits bleaching. *Dye & Finish*, 2006, 32(19): 1-3 (in Chinese).
- [8] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展. *中国农学通报*, 2005, 21(5): 223-224, 232.
Liu B, Liang CJ. Recent advances of catalase in organism. *Chin Agric Sci Bull*, 2005, 21(5): 223-224, 232 (in Chinese).
- [9] Yang XY, Tian G, Jiang N, et al. Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy Environ Sci*, 2012, 5(2): 5540-5563.
- [10] Erol K, Cebeci BK, Köse K, et al. Effect of immobilization on the activity of catalase carried by poly(HEMA-GMA) cryogels. *Int J Biol Macromol*, 2019, 123: 738-743.
- [11] Sharifi M, Sohrabi MJ, Hosseinali SH, et al. Enzyme immobilization onto the nanomaterials: application in enzyme stability and prodrug-activated cancer therapy. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 665-676.
- [12] Alptekin Ö, Tükel SS, Yıldırım D, et al. Immobilization of catalase onto eupergit C and its characterization. *J Mol Catal B Enzym*, 2010, 64(3/4): 177-183.
- [13] 陈爽, 宋娜, 廖学品, 等. 以 Fe(III) 改性胶原纤维为载体固定过氧化氢酶. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1076-1081.
Chen S, Song N, Liao XP, et al. Immobilization of catalase on Fe(III) modified collagen fiber. *Chin J Biotech*, 2011, 27(7): 1076-1081 (in Chinese).
- [14] 厉成宣, 范雪荣, 王强, 等. 应用氧化棉织物固定过氧化氢酶的研究. *印染*, 2007, 33(21): 1-4.
Li CX, Fan XR, Wang Q, et al. Immobilization of catalase on oxidized cotton fabric. *Dye & Finish*, 2007, 33(21): 1-4 (in Chinese).
- [15] Doğanç Yİ, Teke M. Immobilization of bovine catalase onto magnetic nanoparticles. *Prep Biochem Biotechnol*, 2013, 43(8): 750-765.
- [16] 徐沁蕊. 杂化纳米花固定化纤维二糖差向异构酶的制备及性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
Xu QR. The preparation and characterization of cellobiose 2-epimerase hybrid nanoflowers[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [17] Wei XL, Ge ZQ. Effect of graphene oxide on conformation and activity of catalase. *Carbon*, 2013, 60: 401-409.
- [18] Ge J, Lei JD, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotech*, 2012, 7(7): 428-432.
- [19] Shcharbin D, Halets-Bui I, Abashkin V, et al. Hybrid metal-organic nanoflowers and their application in biotechnology and medicine. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 182: 110354.
- [20] Bilal M, Asgher M, Shah SZH, et al. Engineering enzyme-coupled hybrid nanoflowers: the quest for optimum performance to meet biocatalytic challenges and opportunities. *Int J Biol Macromol*, 2019, 135: 677-690.
- [21] Cui JD, Zhao YM, Liu RL, et al. Surfactant-activated lipase hybrid nanoflowers with enhanced enzymatic performance. *Sci Rep*, 2016, 6: 27928.
- [22] Sun JY, Ge JC, Liu WM, et al. Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale*, 2014, 6(1): 255-262.
- [23] Wang LB, Wang YC, He R, et al. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(4): 1272-1275.
- [24] Somturk B, Yilmaz I, Altinkaynak C, et al. Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 86: 134-142.
- [25] Zhang MR, Yang N, Liu YX, et al. Synthesis of catalase-inorganic hybrid nanoflowers via sonication for colorimetric detection of hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Technol*, 2019, 128: 22-25.
- [26] 庞焦, 姜梦彤, 刘羽欣, 等. 融合自组装双亲短肽对重组过氧化氢酶酶学性质的影响. *微生物学报*, 2022, 62(9): 3449-3463.
Pang J, Jiang MT, Liu YX, et al. Effect of fusing a self-assembling amphipathic peptide on the enzymatic properties of recombinant catalase. *Acta Microbiol Sin*, 2022, 62(9): 3449-3463 (in Chinese).
- [27] 王从纲, 庞焦, 孙佳明, 等. 一种过氧化氢酶活性包涵体与应用: CN113789338A. 2021-12-14.
- [28] 王从纲, 姜梦彤, 庞焦, 等. 一种异源表达重组过氧化氢酶的毕赤酵母基因工程菌与应用: CN114164221A. 2022-03-11.
- [29] 李振国, 徐明波, 牛罡, 等. 大肠杆菌周质蛋白提取工艺的研究. *生物学杂志*, 2011, 28(6): 95-97.
Li ZG, Xu MB, Niu G, et al. Study on extraction of periplasmic proteins in *E. coli*. *J Biol*, 2011, 28(6): 95-97 (in Chinese).
- [30] Yu ZX, Zheng HC, Zhao XY, et al. High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in *E. coli* BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton

- fabrics bleaching. *Bioresour Technol*, 2016, 214: 303-310.
- [31] Sarı M, Akgöl S, Karataş M, et al. Reversible immobilization of catalase by metal chelate affinity interaction on magnetic beads. *Ind Eng Chem Res*, 2006, 45(9): 3036-3043.
- [32] Chen JX, Guo ZT, Xin Y, et al. Preparation of efficient, stable, and reusable copper-phosphotriesterase hybrid nanoflowers for biodegradation of organophosphorus pesticides. *Enzyme Microb Technol*, 2021, 146: 109766.
- [33] Kim JK, Abdelhamid MAA, Pack SP. Direct immobilization and recovery of recombinant proteins from cell lysates by using EctP1-peptide as a short fusion tag for silica and titania supports. *Int J Biol Macromol*, 2019, 135: 969-977.
- [34] Lage FAP, Bassi JJ, Corradini MCC, et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 84: 56-67.
- [35] Pinheiro MP, Rios NS, Fonseca TS, et al. Kinetic resolution of drug intermediates catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on immovead-350. *Biotechnol Prog*, 2018, 34(4): 878-889.
- [36] Hua XF, Xing Y, Zhang X. Enhanced promiscuity of lipase-inorganic nanocrystal composites in the epoxidation of fatty acids in organic media. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(25): 16257-16261.
- [37] Yin YQ, Xiao Y, Lin G, et al. An enzyme-inorganic hybrid nanoflower based immobilized enzyme reactor with enhanced enzymatic activity. *J Mater Chem B*, 2015, 3(11): 2295-2300.
- [38] Lin ZA, Xiao Y, Wang L, et al. Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application as an immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion. *RSC Adv*, 2014, 4(27): 13888-13891.
- [39] 杨寅, 史光明, 黄雅钦. 明胶多孔支架固定化过氧化氢酶. *明胶科学与技术*, 2011, 31(2): 70-77.
- Yang Y, Shi GM, Huang YQ. Immobilization of catalase onto porous gelatin scaffolds. *Sci Technol Gelatin*, 2011, 31(2): 70-77 (in Chinese).
- [40] Inanan T. Chitosan co-polymeric nanostructures for catalase immobilization. *React Funct Polym*, 2019, 135: 94-102.
- [41] 刘振山, 时祎, 陈剑雄, 等. 嗜热脂肪酶-无机杂化纳米花的制备及其性能研究. *食品与发酵工业*, 2022, 48(15): 1-8.
- Liu ZS, Shi Y, Chen JX, et al. Research about the preparation and characterisation of inorganic thermophilic lipase hybrid nanometer. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(15): 1-8. (in Chinese).
- [42] Cao GX, Gao J, Zhou LY, et al. Enrichment and coimmobilization of cofactors and his-tagged ω -transaminase into nanoflowers: a facile approach to constructing self-sufficient biocatalysts. *ACS Appl Nano Mater*, 2018, 1(7): 3417-3425.
- [43] Rai SK, Narnoliya LK, Sangwan RS, et al. Self-assembled hybrid nanoflowers of manganese phosphate and l-arabinose isomerase: a stable and recyclable nanobiocatalyst for equilibrium level conversion of D-galactose to D-tagatose. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2018, 6(5): 6296-6304.
- [44] Zhang BL, Li PT, Zhang HP, et al. Papain/Zn₃(PO₄)₂ hybrid nanoflower: preparation, characterization and its enhanced catalytic activity as an immobilized enzyme. *RSC Adv*, 2016, 6(52): 46702-46710.
- [45] Duan LL, Li H, Zhang YT. Synthesis of hybrid nanoflower-based carbonic anhydrase for enhanced biocatalytic activity and stability. *ACS Omega*, 2018, 3(12): 18234-18241.
- [46] Zhang Y, Sun WH, Elfeky NM, et al. Self-assembly of lipase hybrid nanoflowers with bifunctional Ca²⁺ for improved activity and stability. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 132: 109408.
- [47] 陈剑雄. 磷酸三酯酶在大肠杆菌中的表达及其纳米固定化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- Chen JX. Study on the expression of phosphotriesterase in *Escherichia coli* and its nano-immobilization[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)