

仿生硅化-磁性 Fe_3O_4 固定化木瓜蛋白酶的性质

周冉¹,常明¹,王飞¹,孙耀冉¹,胡瑞省¹,张炜^{2,*}

(1.石家庄学院化工学院,河北石家庄 050035;

2.河北工业大学材料学院,天津 300130)

摘要:将木瓜蛋白酶(papain)交联固定在经氨基修饰过的磁性粒子上,通过papain诱导仿生硅化使磁性粒子(MNPS)表面包覆一层氧化硅,并将papain同时包埋于其中,制备出磁性氧化铁(Fe_3O_4)-氧化硅载体。红外光谱仪的测定表明,仿生硅化作用所形成的氧化硅能很好地包覆在磁性粒子交联酶(EMNPS)表面。当酶浓度为 $7.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,酶的载量为 $0.24\text{mg papain}\cdot\text{mg}^{-1}$ MNPS,此时EMNPS和EMNPS/ SiO_2 的活性分别 3.72 和 $3.66\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ MNPS。EMNPS/ SiO_2 的pH稳定性、温度稳定性、重复操作稳定性均优于EMNPS。与游离papain相比,EMNPS与底物的亲和力略有升高,而EMNPS/ SiO_2 与底物的亲和力降低。EMNPS和EMNPS/ SiO_2 的米氏常数 K_m 分别为 1.39 、 $2.31\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大反应速度 V_m 分别为 0.04 、 $0.038\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

关键词:仿生硅化,氧化硅,木瓜蛋白酶,磁性氧化铁,固定化

Property of papain immobilized on magnetic ferroferric oxide by biosilicification

ZHOU Ran¹, CHANG Ming¹, WANG Fei¹, SUN Yao-ran¹, HU Rui-sheng¹, ZHANG Wei^{2,*}

(1.School of Chemical Engineering, Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, China;

2.School of Materials Science and Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract: An approach combining biomimetic mineralization with Fe_3O_4 magnetic particles (MNPS) was proposed to prepare immobilized papain that was easily separated from reaction mixture. The results from FT-IR spectra showed that aminosilane-modified MNPS was synthesized, and EMNPS was coated with biosilica by biomimetic silicification. When the concentrate of papain was $7.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the loading of papain was $0.24\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ MNPS and the activity of EMNPS and EMNPS/ SiO_2 were 3.72 and $3.66\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ MNPS, respectively. Furthermore, the pH stability, thermal stability and reusability of EMNPS/ SiO_2 were better than EMNPS. Compared with free papain, EMNPS has slightly higher affinity, and EMNPS/ SiO_2 has lower affinity with substrate. The Michaelis constant (K_m) for hydrolysis of casein by EMNPS and EMNPS/ SiO_2 were 1.39 and $2.31\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The maximum velocity (V_m) of EMNPS and EMNPS/ SiO_2 were 0.04 and $0.038\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively.

Key words: biosilicification; silica; papain; magnetic ferroferric oxide; immobilization

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)12-0180-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.12.030

木瓜蛋白酶(papain, PA)大量存在于番木瓜的未成熟果实中,是一种含巯基(-SH)的肽链内切酶,对动植物蛋白、多肽、酯、酰胺等具有强的水解能力,因而被广泛应用在医药工业、食品、美容、制革等方面^[1-2]。虽然木瓜蛋白酶具有催化能力强,作用底物专一,反应条件温和等优点,但稳定性差,容易变性失活,而且木瓜蛋白酶一般都是在水溶液中与底物反应,难以回收利用。这种一次性使用酶的方式,不仅

成本较高,而且难以连续化生产。因此,对酶的固定化将能有效降低酶的可溶性从而解决以上问题。

近年来,仿生方法固定化酶一直是国内外的研究热点,以生物模板仿生合成的纳米氧化硅载体为固定化酶提供了新技术^[3-8]。但是由于采用仿生硅化法制备的氧化硅载体多为纳米级,虽然有利于传质,但会给后期固定化酶的分离造成困难。而磁性纳米粒子由于超顺磁性质,常常被用于生物分离和固定化酶载体等领域。另外,磁性粒子毒副作用小,易于进行修饰,可通过表面修饰连接上功能基团,从而可进行磁性颗粒与生物活性物质(如蛋白、DNA)的偶联,一方面保证这些生物活性物质可在反应介质中进一步识别相应的特异性物质,另一方面依靠磁性

收稿日期: 2013-09-10 * 通讯联系人

作者简介: 周冉(1981-),女,博士,讲师,研究方向: 药物载体与药物制剂。

基金项目: 河北省科技计划项目(12272701);国家自然科学基金(51102075)。

颗粒的独特性能,利用磁场对颗粒的操纵性,达到易分离的目的。目前关于酶自诱导仿生固定化酶的研究相对较少,没有系统的分析酶的活性和稳定性的报道。

本文以木瓜蛋白酶为诱导剂,在其诱导催化生成纳米氧化硅的同时将其自身包埋于氧化硅颗粒之中,形成固定化木瓜蛋白酶。并在仿生硅化固定化酶的基础上,引入磁性 Fe_3O_4 载体,选用硅烷偶联剂3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)对 Fe_3O_4 纳米粒子表面进行氨基化修饰,再与木瓜蛋白酶进行交联,将磁性粒子与木瓜蛋白酶相结合共包埋于氧化硅中,实现磁性载体与仿生硅化在固定化酶应用上的有效结合。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木瓜蛋白酶(papain, $400\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) Genview公司; 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES) 北京市申达精细化工有限公司,分析纯; $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、三氯乙酸、聚乙二醇(PEG)、氨水 天津市江天化工技术有限公司,分析纯;酪蛋白(干酪素) 天津福晨化学试剂厂,分析纯;L-酪氨酸 Sigma公司, BR; 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES) 北京市申达精细化工有限公司,分析纯。

Nexu-870型傅里叶变换红外光谱仪 美国Nicolet公司; JY96-II型超声波细胞粉碎机 宁波市新芝科技研究所; SHA-B型恒温水浴振荡器 天津市华北实验仪器有限公司; QT6150型超声波清洗机 天津市瑞谱电子仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 磁性载体的制备

1.2.1.1 磁性粒子(MNPS)的制备 采用共沉淀法制备 Fe_3O_4 粒子:在250mL三颈圆底烧瓶中分别加入2.5g $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1g $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和100mL蒸馏水,在 N_2 保护下,加入1.8g聚乙二醇(PEG),快速搅拌并加入8mL氨水,控制反应液pH为9.4~9.5, 25°C 温水浴18min,再升温至 70°C 熟化30min,反应液以磁铁分离并取沉淀,每次用50mL蒸馏水清洗,至无明显氨味,真空干燥备用。

1.2.1.2 氨基化磁性粒子(NH_2 -MNPS)的制备 将以上MNPS溶于150mL乙醇/水(体积比1:1)溶液中,超声制得 Fe_3O_4 悬浊液。将 Fe_3O_4 悬浊液转入250mL三颈圆底烧瓶中, N_2 保护下,搅拌,加入0.4mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES), 40°C ,搅拌1h后冷却至室温,磁铁收集沉淀,并用50mL乙醇洗涤,蒸馏水洗涤3次,真空干燥,可得 NH_2 -MNPS,即磁性载体。

1.2.2 固定化酶的制备

1.2.2.1 磁性载体交联酶(EMNPS)的制备 取10mg NH_2 -MNPS于离心管中,加入1.5mL, $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 木瓜蛋白酶(用pH7.0、 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS配制), 200r/min, 30°C 恒温振荡,孵化20min后,使得游离酶吸附于磁性粒子上,然后加入1%戊二醛1.5mL,于 30°C , 200r/min振荡下,孵化30min。磁分离,取固定化酶,分别用Tris-HCl (pH8.0, $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 洗涤一次, PBS (pH8.0, $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 洗涤2次,磁分离得交联上木瓜蛋白酶的

磁性粒子,即EMNPS。

1.2.2.2 EMNPS表面包覆 SiO_2 (EMNPS SiO_2)的制备 应用木瓜蛋白酶自诱导仿生硅化原理^[9],在EMNPS外包裹一层 SiO_2 ,得到EMNPS/ SiO_2 ,以防止酶的脱落。具体步骤:取上述制得的EMNPS,加入1.5mL pH6.6的PBS,再加入0.1mL硅前驱体溶液,反应15min,磁分离取沉淀,得EMNPS/ SiO_2 。

1.3 测定方法

1.3.1 酶的特征和性质测定 固定化酶和游离酶粉末分别在红外灯照射下和干燥的KBr粉末一起研细混匀,压片后用Nexu-870型傅里叶变换红外光谱仪测其FT-IR谱。固定化酶的最佳反应温度、最佳反应pH和米氏 K_m 值参照文献[10]测定。

1.3.2 木瓜蛋白酶的活性测定 取制得的固定化酶,加入6mL磷酸缓冲溶液(pH7.0),酪蛋白溶液6mL(已恒温),开始计时, 40°C 水浴振荡,并开始计时,反应30min。加入6mL、20%的三氯乙酸溶液,强力振摇混匀,终止反应,继续在水浴中静置20min使蛋白完全沉淀,离心取上清液,用紫外分光光度计在波长273nm下测其吸光度。在测定条件下,每分钟催化酪蛋白水解生成 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸所需的木瓜蛋白酶的量为一个酶活单位(U)。相对酶活为各处理条件下的各酶活与其最大酶活的比值。

1.3.3 酶促反应动力学参数的测定 木瓜蛋白酶催化反应动力学,通过米氏方程(见式1)的双倒数形式,即Lineweaver-Burke plot(见式2),来测定酶促反应中的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{\max} 。

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{式(1)}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max}[S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{式(2)}$$

式中, V_0 为反应初速度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$); $[S]$ 为底物浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。 V_0 通过papain催化不同浓度酪蛋白为底物的反应来测定。

2 结果与分析

2.1 酶浓度对固定化效果的影响

初始固定化酶浓度既影响单位质量固定化酶中酶分子含量,又会影响到固定化酶的形成,从而影响固定化酶的酶活。因此,酶浓度对酶载量、EMNPS和EMNPS/ SiO_2 活性的影响如表1所示。

表1 不同酶浓度下固定化酶载量和酶活

Table 1 Loading and activity of the immobilized enzyme under different initial enzyme concentration

酶浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	载量 ($\text{mg酶}/\text{mg MNPS}$)	酶活性(U/mg MNPS)	
		EMNPS	EMNPS/ SiO_2
1.0	0.15	1.62	1.35
2.5	0.20	2.69	2.29
5.0	0.23	3.55	3.23
7.5	0.24	3.72	3.66
10.0	0.23	3.56	3.61

由表1可以看出,当酶浓度较低时,固定化酶载量和活性均呈升高趋势,而当酶浓度继续增加时,

酶的载量基本无变化,但酶活略有下降。这主要是因为对于一定量的磁性载体,加入的酶量已经达到饱和,过量的酶无法被固定于载体上,且酶浓度太高易使酶分子发生团聚,从而使得酶活有所降低。而EMNPS/SiO₂的活性比EMNPS有所降低,可能是因为包覆氧化硅的过程中,一部分交联不牢固的酶分子脱落和氧化硅对酶催化反应的传质阻力作用的影响。因此,在酶浓度为7.5mg·mL⁻¹时固定化效果较好。

2.2 载体及固定化酶的表现结果

2.2.1 磁性载体的照片 图1为磁性载体被磁铁吸引的照片,由图1可以看出,实验制得的磁性粒子具有较好的磁性,易于后续反应过程中对固定化酶的分

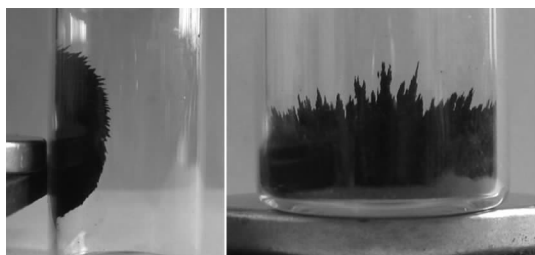


图1 磁性粒子被磁铁吸引的照片

Fig.1 Photos of different samples dispersed in water

2.2.2 红外谱图分析 通过红外光谱中磁性载体和固定化酶相关特征基团的变化,分析制得载体和固定化酶的性质和机理,结果如图2和图3所示。

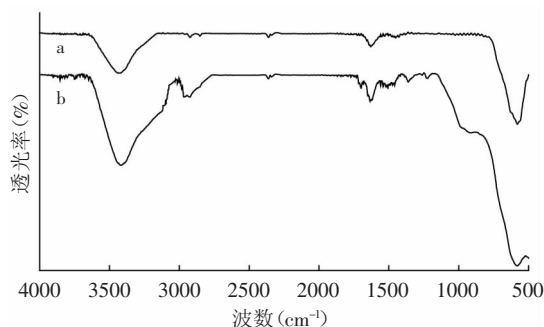


图2 样品红外光谱图

Fig.2 FTIR spectra of sample

注:a: Fe₃O₄纳米粒子;b: 氨基化的Fe₃O₄粒子。

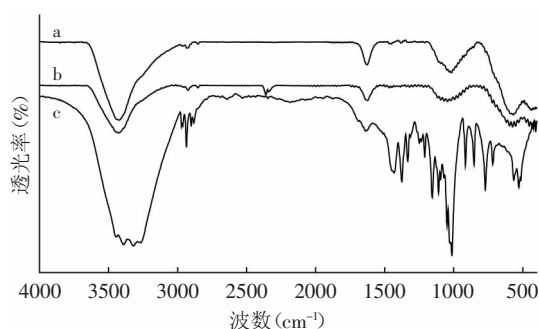


图3 样品红外光谱图

Fig.3 FTIR spectra of sample

注:a: EMNPS/SiO₂; b: EMNPS; c: 木瓜蛋白酶。

图2是Fe₃O₄纳米粒子氨基功能化前后的红外谱图。由图2可以看出, NH₂-Fe₃O₄载体存在位于3424cm⁻¹附近的强吸收峰,这可能是N-H伸缩振动与-OH的伸缩振动峰发生了重叠; 2923cm⁻¹和2853cm⁻¹处出现的CH₂及C-H伸缩振动峰,较未修饰的Fe₃O₄强度有所增加,这主要来自于APTES中含有的大量-CH₂; Fe-O键的伸缩振动峰位于580cm⁻¹,与未修饰的Fe₃O₄相比,修饰后的磁性载体Fe-O吸收峰发生蓝移。这主要是由于APTES与Fe₃O₄粒子表面发生反应形成Fe-O-Si键,与Fe₃O₄表面的Fe-O-H相比, Si原子比H原子有更强的电负性,通过静电诱导作用,增加了Fe-O的键力常数,使Fe-O基团频率向高波数移动。由以上分析可得, Fe₃O₄纳米粒子表面成功修饰上了氨基功能基团。

由图3可见,谱线c为木瓜蛋白酶的红外光谱,其中有6个特征吸收峰: 3418cm⁻¹处为N-H伸缩峰,峰带较宽; 2934cm⁻¹处为C-H伸缩峰; 1650cm⁻¹波数左右为酰胺I带, C=O伸缩峰,峰带较窄; 1500cm⁻¹波数左右为酰胺II带, N-H弯曲峰; 1450~1250cm⁻¹波数为酰胺III带, C-H伸展振动和N-H弯曲振动的混合峰; 1062cm⁻¹波数左右为C-O伸缩峰。另与图2中的谱线b对比,图3中的谱线b在1000cm⁻¹处出现的宽峰,说明木瓜蛋白酶已被固定在载体之上。与谱线b比较,谱线a在1100cm⁻¹附近的吸收峰增强且变尖,这主要是由于样品a表面包覆有由仿生硅化作用所形成的氧化硅,其中的Si-O-Si的非对称伸缩振动峰出现在1100cm⁻¹处,使得该处吸收峰的形态发生变化。

2.3 固定化酶的酶学性质

2.3.1 储存稳定性 游离酶、EMNPS和EMNPS/SiO₂在室温(25℃)下储存33d,储存稳定性结果如图4所示。结果表明,包裹有氧化硅的EMNPS/SiO₂在经过33d的储存后相对酶活保持在75%以上。而只是交联固定化的EMNPS,相对活性降到了30%以下。在储存10d内,两种固定化酶的稳定性均好于游离酶,说明木瓜蛋白酶经过固定化抑制了自降解,提高了稳定性。随着储存时间的继续延长,EMNPS的酶活快速降低,而EMNPS/SiO₂仍保持很高的活性,原因是,包裹的氧化硅层的微孔结构,能有效阻止微生物进入微孔内部降解酶,从而使EMNPS/SiO₂酶活性在长时间内得以保持。

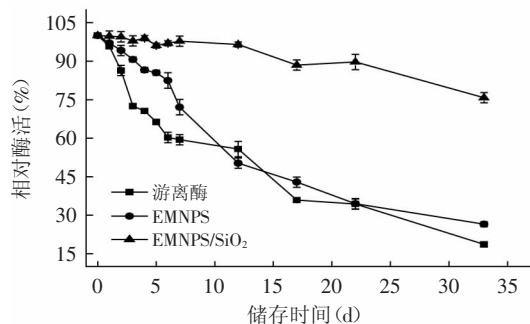


图4 游离酶、EMNPS和EMNPS/SiO₂的储存稳定性

Fig.4 Storage stability of free enzyme, EMNPS and EMNPS/SiO₂

2.3.2 pH稳定性 在pH稳定性实验中,三种形态的

酶被置于不同pH的缓冲溶液中,预先孵化4h,然后测定木瓜蛋白酶的活性。游离酶、EMNPS和EMNPS/SiO₂在pH3.0~10.0条件下储存的相对活性,如图5所示。三种形态酶的pH稳定性由高到低依次为:EMNPS/SiO₂、EMNPS、游离酶。实际上,酶分子结构的稳定性主要取决于分子内部的氢键,而氢键是由酶分子中一个氨基酸残基上的氢原子与另一个氨基酸残基上的氧原子通过静电引力而形成的,所以外界pH的改变将对氢键产生显著的影响,从而影响酶的空间构象,影响酶的活性。EMNPS/SiO₂的氧化硅微孔的笼效应可有效束缚木瓜蛋白酶,避免酶分子内部氢键受到极端pH条件的影响而发生构象转变,使得酶的活性得到保持。

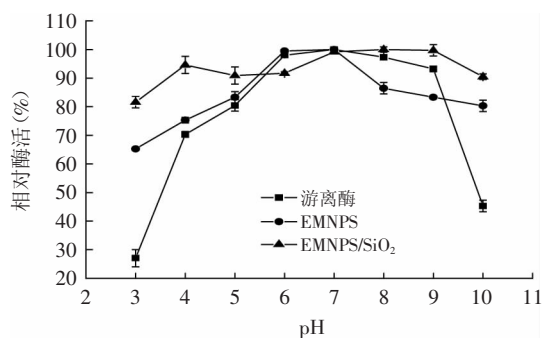


图5 游离酶、EMNPS和EMNPS/SiO₂的pH稳定性

Fig.5 pH stability of free enzyme, EMNPS and EMNPS/SiO₂

2.3.3 温度稳定性 游离酶、EMNPS和EMNPS/SiO₂在温度30~90℃条件下储存时的相对酶活,如图6所示。与游离酶相比,EMNPS和EMNPS/SiO₂均具有良好的温度稳定性。当低于70℃时EMNPS的温度稳定性最好。这是因为,通过交联固定化后的酶与载体通过交联剂实现了多点连接,温度升高时,可防止酶分子发生伸展变形,同时,酶活力也可以实现缓慢释放。而温度继续升高,EMNPS/SiO₂稳定性优于EMNPS,原因是经由氧化硅包覆后,酶被紧紧束缚在一定的空间内,在受热时也很难发生构象转变,酶活得以保持。这可称为笼效应,类似于酶分子在天然细胞中的空间排斥效应。另外,木瓜蛋白酶分子在氧化硅微孔中受到束缚,其表面水分子层结构难以破坏,也有效地抑制了酶分子变性失活,从而提高了酶的温度稳定性。

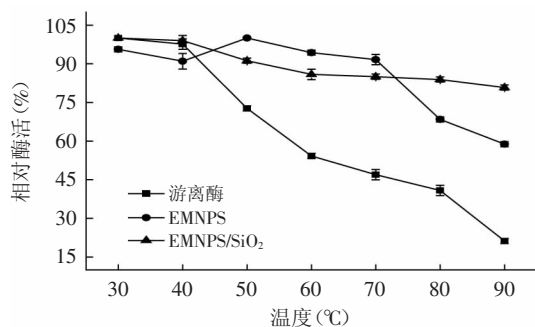


图6 游离酶、EMNPS和EMNPS/SiO₂热稳定性

Fig.6 Thermal stability of free enzyme, EMNPS and EMNPS/SiO₂

2.3.4 EMNPS和EMNPS/SiO₂的重复使用稳定性 如图7所示,经过5次重复使用,EMNPS/SiO₂的相对活性仍在60%以上,而EMNPS的相对活性已降到20%以下。结果说明EMNPS/SiO₂的使用稳定性要优于EMNPS。EMNPS为表面交联固定化酶,在反应过程中易出现酶脱落的问题,此外,大量对酶分子有抑制作用反应底物和水分子都会对酶活性产生严重影响;EMNPS/SiO₂固定化酶在原有的交联酶外层包裹氧化硅,而这层氧化硅在反应中能有效防止酶分子的流失,且反应底物要通过氧化硅的空隙与酶分子接触,不会造成大量底物对酶活性结构的损害,对酶分子起到一定的保护作用。因此,EMNPS/SiO₂固定化酶的使用稳定性要比EMNPS好。

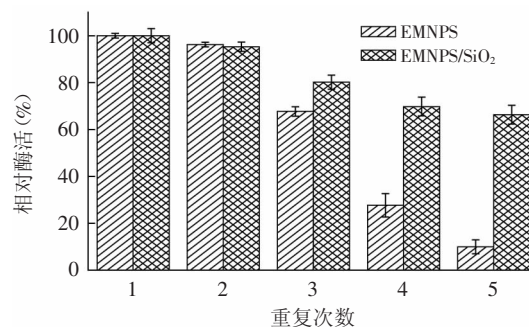


图7 EMNPS和EMNPS/SiO₂的重复使用性

Fig.7 Reusability of the EMNPS and EMNPS/SiO₂

2.3.5 酶促反应动力学参数的测定 为了进一步探讨木瓜蛋白酶催化反应动力学,通过米氏方程(见式1)的双倒数形式,即Lineweaver-Burke plot(见式2),来测定酶促反应中的米氏常数K_m和最大反应速度V_{max}。将1/V₀对1/[S]作图,即可得到一条直线,该直线在Y轴的截距即为1/V_{max},在X轴上的截距即为1/K_m的绝对值,如表2所示。

表2 游离酶和固定化酶的酶反应动力学参数

Table 2 Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) of free and immobilized enzyme

酶	游离酶	固定化酶	
		EMNPS	EMNPS/SiO ₂
K _m (mg·mL ⁻¹)	1.52	1.39	2.31
V _{max} (mg·mL ⁻¹ ·min ⁻¹)	0.043	0.040	0.038

结果表明,与游离酶的1.52mg·mL⁻¹比较,EMNPS的K_m值降低至1.39mg·mL⁻¹,说明磁性载体交联固定化酶与底物之间的亲和力略有升高。而经过包裹氧化硅后,K_m值升高,其原因可能是包裹的氧化硅对酶造成立体阻碍,使底物较不容易与酶的催化中心接触,导致包裹有氧化硅的固定化酶与底物的亲和力降低。三种形态的酶的V_{max}变化不大,说明固定化对酶的V_{max}影响较小。

3 结论

将木瓜蛋白酶交联固定在氨基修饰过的磁性粒(下转第187页)

赤酵母。为川西北高原地区传统发酵牦牛酸奶中蕴含的大量原始微生物菌种资源的保护及研究提供菌株,为该地区传统发酵牦牛酸奶中微生物组成多样性研究以及发酵毕赤酵母菌的遗传多样性研究提供参考。

参考文献

- [1] 吴春生,李健,骞宇,等. 牦牛乳及牦牛酸乳营养价值的研究现状[J]. 乳业科学与技术,2012,35(3):43-46.
- [2] ZHANG Guo-qiang, MA Chang-zhong, LI Ya-hui, *et al.* Chemical and microbiological composition analyses of yak milk in tibet[J]. Food Research and Development,2011,30(2):4-7.
- [3] Heping Zhang, Jie Xua, Junguo Wang, *et al.* A survey on chemical and microbiological composition of kurut, naturally fermented yak milk from Qinghai in China[J]. Food Control,2008,19(6):578-586.
- [4] Xiao-He Wu,Zhang Luo,Li Yu,*et al.* A survey on composition and micro biota of freshand fermented yak milk at different Tibetan altitudes[J]. Dairy Sci Technol,2009,89(2):201-209.
- [5] 苟钰姣,丁路明,王玉鹏. 牦牛乳及乳制品、犏牛和黑白花奶牛乳的脂肪酸组成分析[J]. 草业科学,2013,30(2):274-280.
- [6] 梁春年,阎萍,郭宪. 牦牛乳的特性及利用现状[C]. 第四届中国乳业发展大会论文集,2010.
- [7] Koichi Watanabe. Diversity of lactic bacteria and yeasts in Airag and Tarag,traditional fermented milk products of Mongolia[J]. Microbiol Biotechnol,2008,24(8):1313-1325.
- [8] 吴春生,舒畅,李健,等. 牦牛酸乳中乳酸菌的研究进展及前景展望[J]. 食品工业,2012,33(9):129-133.
- [9] Mu Z, Yang X, Yuan H. Detection and identification of wild yeast in Koumiss[J]. Food Microbiol,2012,31(2):301-308.

- [10] Qing M,Bai M,Zhang Y,*et al.* Identification and biodiversity of yeasts from Qula in Tibet and milk cake in Yunnan of China[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao,2010,50(9):1141-1146.
- [11] Chen TH,Wang SY,Chen KN,*et al.* Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains[J]. J Dairy Sci,2009,92(7):3002-3013.
- [12] Wang SY,Chen HC,Liu JR,*et al.* Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese Kefir and Viili starters[J]. J Dairy Sci,2008,91(10):3798-3805.
- [13] Mei Bai,Manjun,Qing Zhuang Guo,*et al.* Occurrence and dominance of yeast species in naturally fermented milk from the Tibetan Plateau of China[J]. Canadian Journal of Microbiology,2010,56(9):707-714.
- [14] Cletus P. Kurtzman, Christie J Robnett. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit(26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie Van Leeuwenhoek,1998,73(4):331-371.
- [15] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义[J]. 菌物系统,2002,21(1):27-32.
- [16] Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, *et al.* Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeast as determined by large-subunit rDNA D₁/D₂ domain sequence analysis[J]. Int J Syst Evol Microbiol,2000,50:1351-1371.
- [17] Cletus P. Kurtzman, Christie J. Robnett. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces Complex' determined from multigene sequence analyses[J]. FEMS Yeast Research,2003(3):417-432.

(上接第183页)

子上,通过木瓜蛋白酶诱导使磁性粒子(MNPS)表面包覆一层氧化硅,并同时将其包埋于其中,可实现温和固定化和高效分离的有效结合。研究发现磁载体最大载酶量为 $0.24\text{mg papain}\cdot\text{mg}^{-1}$ MNPS,此时EMNPS和交联酶后包覆氧化硅(EMNPS/SiO₂)的活性分别 3.72 、 $3.66\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ MNPS。由于氧化硅提供了适宜的微环境,不仅固定化酶的热稳定性、pH稳定性、储存稳定性和操作稳定性均有明显提高,而且可借助外加磁场方便快速地回收,提高酶的重复使用性,降低成本。因此,采用仿生法能够制备出良好的磁性Fe₃O₄-氧化硅载体,不仅为固定化酶技术提供了新的方法,而且进一步拓展了仿生矿化的应用。

参考文献

- [1] 王丽彬,张波,王旻. 高纯度木瓜蛋白酶的分离纯化和性质研究[J]. 中国生化药物杂志,2006,27(3):159-163.
- [2] 熊华. 木瓜蛋白酶的应用研究进展[J]. 四川食品与发酵,2005(4):9-11.
- [3] Lu Z, Zhang J, Ma Y Z, *et al.* Biomimetic mineralization of calcium carbonate / carboxymethylcellulose microspheres for lysozyme immobilization[J]. Materials Science and Engineering C,2012,32:1982-1987.

- [4] Tian F M, Wu W J, Broderick M, *et al.* Novel microbiosensors prepared utilizing biomimetic silicification method[J]. Biosensors and Bioelectronics,2010,25:2408-2413.
- [5] Kuan I C, Wu J C, Lee S L, *et al.* Stabilization of d-amino acid oxidase from Rhodospiridium toruloides by encapsulation in polyallylamine-mediated biomimetic silica[J]. Biochemical Engineering Journal,2010,49:408-413.
- [6] Luckarift H R, Spain J C, Naik R R, *et al.* Enzyme immobilization in a biomimetic silica support[J]. Nat Biotechnol,2004,22:211-213.
- [7] Zhu Y N, Jiang Y J, Gao J, *et al.* Immobilization of glucose oxidase in liposome-templated biomimetic silica particles[J]. Chinese Journal of Catalysis,2013,34:741-750.
- [8] Betancor L, Luckarift H R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis[J]. Trends Biotechnol,2008,26:566-572.
- [9] Bassindale A R, Taylor P G, Abbate V, *et al.* Simple and mild preparation of silica-enzyme composites from silicic acid solution[J]. J Mater Chem,2009,19(41):7606-7609.
- [10] Chen N. Enzyme Engineering[M]. Beijing:China Light Ind Press,2005:83.
- [11] Bradford M M. A dye binding assay for protein[J]. Anal Biochem,1976,72:248-254.