

DOI: 10.20098/j.cnki.1001-5132.2022.1023

纳米复合载体固定酪氨酸酶合成左旋多巴

汪定林, 张瑞丰*

(宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用模板法制备大孔 SiO_2 材料, 而后借助水热合成法在孔道中生长 ZnO 纳米线, 得到新型纳米复合材料(SiO_2/ZnO NWs). 采用静电吸附法将酪氨酸酶(TYR)固定在纳米复合载体上, 用于 L-多巴合成. 从扫描电子显微镜中观察到 ZnO 纳米线在孔道中呈现无规线团形貌, 且分布均匀. TYR 在 SiO_2/ZnO NWs 上的最大负载量高达 $162.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 约是纯大孔 SiO_2 载体 3 倍, 且远高于其他固定化 TYR 系统. 利用固定化 TYR 进行 L-多巴合成, 在最优反应条件(35°C 、 $\text{pH} 6.0$ 、L-抗坏血酸浓度 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下催化 1.5 h, L-多巴的产率可达 70.2%. 固定化 TYR 展现良好的储存稳定性, 储存 28 d 仍保持 78.6% 的相对活性, 远高于游离状态 TYR, 并可重复使用, 经历 10 个循环后仍能保持 42.1% 的 L-多巴产率.

关键词: 纳米复合材料; 酪氨酸酶; 固定化酶; 左旋多巴

中图分类号: TQ464.8

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2023) 04-0033-09

L-多巴作为人体大脑中神经递质多巴胺的前体物质, 可以穿过大脑中的血脑屏障转化为多巴胺, 故其成为治疗帕金森病(一种因神经递质多巴胺含量降低的神经变性疾病)最有效的药物. 据研究^[1], 每年全球 L-多巴市场规模约 250 t, 总容量 $1.01 \times 10^{11} \text{ t}$, 其中大部分都是通过化学合成工艺生产, 但化学工艺生产存在程序复杂、催化剂昂贵、转化率低等问题^[2]. 考虑到生物合成可能是化学合成工艺有前景的替代方法, 近年来采用生物合成 L-多巴研究不断升温. 文献[3-5]报道了利用微生物法(如酵母、细菌和真菌)对目标产物进行合成, 但该方法缺点明显, 如对细胞生长过程中所需碳源要求苛刻、合成周期长(包含细胞培养期, 一般在 10 d 以上)、价格昂贵(产物的纯化需要去除细胞产生的激素和蛋白质)等; 由于酪氨酸酶(TYR)工艺(以 TYR 为催化剂)从 L-酪氨酸转化为 L-多巴可在数小时内完成, 产物转化率较高, 且不需要进行纯化, 因此 TYR 逐渐成为合成 L-多巴酶促路线的主角^[6]. 然而游离 TYR 重复使用性差、稳定性低、成

本高等不足阻碍了其应用^[7]. 固定化酶是解决这些问题的有效方式^[8-9]. 固定化酶载体对固定化酶特性有决定性作用, 因此选择合适的载体意义重大.

近年来, 介孔二氧化硅因其比表面积大、可调节孔隙面积和大小, 因而在固定化酶领域备受关注^[10-11]. 这些材料借助物理或化学方法负载大量的酶, 同时孔隙为酶分子提供了抵抗酸碱、温度和高盐浓度的有利环境^[12-14]. 但是酶分子被限制在介孔或较小孔中会出现明显的传质阻力, 导致酶活性降低^[15]. 而通过增加载体孔径大小(如介孔到大孔), 可以预期底物的扩散速率会增加, 且酶分子在孔穴内会具有更高的灵活性, 从而产生更高的酶活.

之前我们已通过模板法制备出一种三维大孔 SiO_2 载体, 具有高孔隙率(93%)、低密度, 以及热、化学和机械稳定性良好的优点^[16-18]. 但 SiO_2 骨架呈现电子中性, 会导致严重的酶泄漏问题^[19], 同时比表面积小限制其应用. 这也是纯大孔 SiO_2 被用于固定化酶载体鲜有报道的一个原因. 针对该问

收稿日期: 2022-10-31.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY15B010002).

第一作者: 汪定林(1997-), 男, 安徽安庆人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 固定化酶. E-mail: 1538726613@qq.com

*通信作者: 张瑞丰(1967-), 男, 浙江宁波人, 研究员, 主要研究方向: 无机多孔材料及其纳米复合与功能化. E-mail: zhangruifeng@nbu.edu.cn

题, 我们尝试了将 ZnO 纳米线与大孔 SiO_2 相结合得到纳米复合材料, 以解决单一材料带来的不足. ZnO 纳米线的引入不仅增大了载体的比表面积, 而且因其高等电点(9.50)赋予载体正电荷特性, 有利于生物酶分子的固定化. 此外, ZnO 热稳定性好, 在高温环境下其化学和形态能保持不变, 所以只需通过高温煅烧就能去除被载体吸附的有机化合物, 从而实现载体的重复使用, 避免其他固定化系统繁琐的表面修饰.

本文通过一种特殊的水热合成方法, 在大孔 SiO_2 中原位生长 ZnO 纳米线制备一种大孔 SiO_2/ZnO 纳米线的复合材料(SiO_2/ZnO NWs), 由于 ZnO 纳米线的结构为开放型, 因此不会出现底物和酶被孔壁隔离的情况, 从而可以避免传质限制. 使用 X 射线衍射仪(XRD)和扫描电子显微镜(SEM)对材料的结构以及形貌进行表征, 并以此作为静电吸附 TYR 的载体, 得到生物催化剂(SiO_2/ZnO NWs-TYR), 将其应用于 L-酪氨酸合成 L-多巴的催化反应. 系统考察酶溶液浓度和 pH 值对 TYR 负载量的影响, 并对固定化条件进行优化, 以此探究 L-抗坏血酸(催化反应所需的还原剂)的用量、反应时间, 以及不同 pH 值和温度对固定化 TYR 合成 L-多巴的影响, 研究固定化 TYR 的储存稳定性以及可重复性.

1 材料与方法

1.1 纳米复合载体的制备

1.1.1 大孔 SiO_2 的制备

称取 28.0 g 聚乙二醇(PEG1000)、16.0 g 双酚 A 型环氧树脂和 4.0 g 聚乙二醇(PEG2000)于烧杯中, 边加热边搅拌, 同时迅速加入 4.0 g 固化剂(二乙烯三胺), 混合均匀后 70°C 固化 3 h, 得到白色块状物重复浸泡在清水中, 达到去除 PEG 的目的. 而后在常温真空环境下进行干燥, 得到一种具有三维骨架的聚合物模板. 将模板浸泡于正硅酸四乙酯中 3 h, 完全湿润, 接着取出模板, 并在 30°C 下熏氨 12 h, 使正硅酸四乙酯充分水解为 SiO_2 . 最后取出复合物, 60°C 干燥 2 h, 在马弗炉中设置 $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升温至 800°C 煅烧, 去除聚合物后获得与模板尺寸、外形相同的大孔 SiO_2 材料. 具体步骤可参见文献[16].

1.1.2 ZnO 纳米线在大孔 SiO_2 孔道内的水热生长

ZnO 纳米线的原位生长可分两步完成. (1) ZnO 晶种在大孔 SiO_2 孔壁原位形成: 将大孔 SiO_2 浸泡在 PEG600、 $\text{Zn}(\text{Ac})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 以及水混合溶液 3 h, 取出置于 100°C 干燥箱中干燥 1 h, 烘干水分, PEG600 仍存留于孔道中; 接着在马弗炉(200°C)下持续煅烧 1 h, 使 $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ 充分水解为 ZnO; 然后设置 $7.5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温速率, 达到 650°C , 恒温 20 min, 除去有机物. (2) ZnO 纳米线的生长: $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶入过量氨水, 得到 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Zn 源溶液, 将步骤(1)得到的已植入 ZnO 晶种大孔 SiO_2 材料浸泡 6 h 后取出, 置于密闭容器中发生水热反应; 反应容器中提前放置经硫酸溶液浸泡的硅胶, 以吸收反应过程中产生的氨气; 水热反应先在 90°C 下持续反应 6 h, 然后温度升至 100°C 持续反应 12 h; 载体在反应结束后自然冷却再取出, 经清水浸泡、自然干燥, 即得到 SiO_2/ZnO NWs 载体材料(图 1).

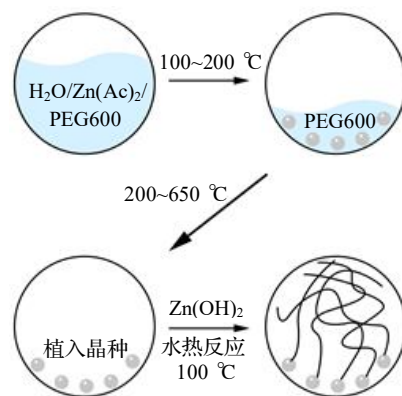


图 1 大孔 SiO_2 中原位生长 ZnO NWs 示意图

1.2 酪氨酸酶在复合载体上的固定

通过静电吸附法将酪氨酸酶固定在复合载体上(图 2). 控制 pH 值介于 TYR 等电点(5.92)和 ZnO 纳米线等电点(9.50)之间, TYR 将带有负电荷, 因此 TYR 可以被富集和吸附在 ZnO 纳米线上. 此外, ZnO 纳米线的结构为开放型, 因此不会出现底物和酶被孔壁隔离的情况, 从而避免了传质限制. 具体操作如下: 将适量的酪氨酸酶冻干粉加入 20 mL $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液中(pH 7.0), 配置一系列不同浓度的酶溶液; 然后将混合物持续摇动 20 min, 25°C 离心 10 min, 用移液枪收集上清液, 得到酪氨酸酶溶液. 将 0.2 g 复合载体与大孔 SiO_2 分别切成 $2\text{ mm}\times 2\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ 的块状; 随后置于 15 mL 不同质

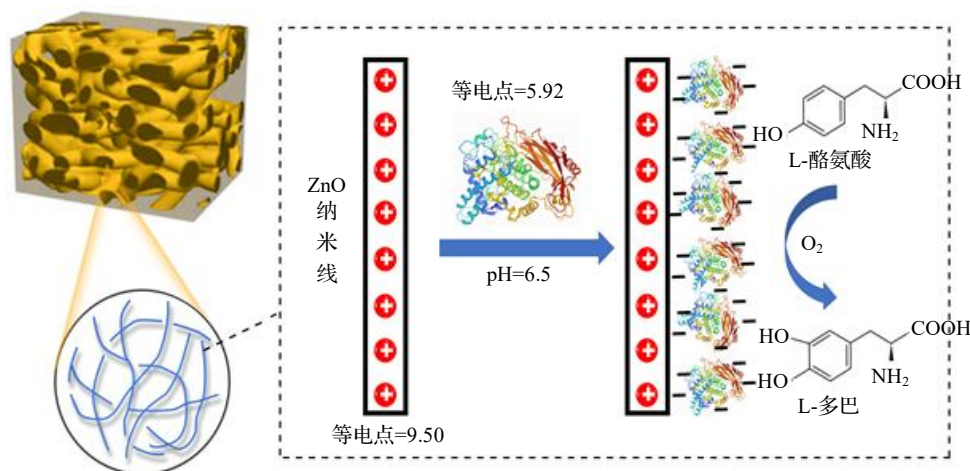


图2 固定化 TYR 及催化合成 L-多巴示意图

量浓度(0.5~4.0 g·L⁻¹)酪氨酸酶溶液中浸泡 5 h 以上, 温度控制在 15 ℃; 之后使用缓冲溶液和去离子水对样品进行洗涤, 最后将固定化酪氨酸酶置于 4 ℃ 冰箱中储存备用。

1.3 酶载酶量测定

该体系的载酶量指单位质量 SiO₂/ZnO 纳米线的复合载体固定化酪氨酸酶的含量。利用固定化实验前后酪氨酸酶浓度差计算该值, 根据 Bradford 法^[20], 载酶量的计算公式为:

$$P_0 = \frac{(C_1 - C_2)V_1 - C_3V_2}{m}, \quad (1)$$

式中: P_0 为载体的载酶量, mg·g⁻¹; C_1 为固定化前 TYR 溶液质量浓度, g·L⁻¹; C_2 为固定化后 TYR 溶液质量浓度, g·L⁻¹; C_3 为清洗样品所用缓冲溶液中 TYR 溶液的质量浓度, g·L⁻¹; V_1 为固定化实验加入的 TYR 溶液体积, mL; V_2 为清洗样品所用缓冲溶液的体积, mL; m 为进行固定化实验的载体材料质量, g。

为探究载体吸附稳定性, 将 SiO₂/ZnO NWs-TYR 和 SiO₂-TYR 置于 30 mL 磷酸盐缓冲溶液(0.1 mmol, pH 7.0)持续浸泡搅拌一段时间, 取出样品, 测定缓冲溶液中 TYR 浓度, 计算酶的泄漏量。剩余酶量计算公式为:

$$P_t = P_0 - C_t V / m, \quad (2)$$

式中: P_t 为经浸泡固定时间后的载酶量, mg·g⁻¹; C_t 为浸泡样品一段时间后 TYR 溶液质量浓度, g·L⁻¹; V 为浸泡样品所用缓冲溶液的体积, mL。

1.4 酪氨酸酶活性测定

酪氨酸酶活性以 L-多巴为反应底物, 利用分

光光度法进行测定。具体操作为: 首先将 L-多巴溶液(0.8 mL, 10 mmol·L⁻¹)与磷酸缓冲溶液(2.1 mL, 0.1 mol·L⁻¹, pH 7.0)混合, 通入氧气 1 min, 然后添加含游离酪氨酸酶 0.1 mg 溶液 0.1 mL, 或载酶量 0.1 mg 的固定化酶, 持续摇荡 1 min, 借助 UV-2600 紫外分光光度计(岛津企业管理有限公司)检测并记录波长 475 nm 处吸光度。固定化酶实验组活性检测大体同上, 不同在于反应液检测前需迅速分离出固定化酶, 因此 1 min 内产生 1 μmol 多巴色素所需要的酶量为一个酶活力单位(式(3))。实验重复 3 次, 取均值。

$$U = \frac{\Delta A \times V}{t \varepsilon b} \times 10^3, \quad (3)$$

式中: U 为酶活力, μmol·min⁻¹; ΔA 为吸光值变化量; V 为反应体系溶液总体积, mL; t 为反应时间, min; ε 为多巴色素摩尔吸光系数, L·(mol·cm)⁻¹; b 为比色皿厚度, cm。

1.5 生物催化合成 L-多巴

L-酪氨酸在 TYR 催化作用下转化为 L-多巴, 而 L-多巴不稳定, 易被进一步氧化为多巴醌, 所以为了得到产物 L-多巴, 需向反应体系中添加 L-抗坏血酸(图 3)。为探究影响合成反应产物 L-多巴的诸多单因素(反应时间、反应温度、溶液 pH 值、L-抗坏血酸浓度), 称取 10 mg 固定化酶, 加入含有 L-酪氨酸(2 mmol·L⁻¹)的不同 pH 值磷酸缓冲液配置的 10 mL 底液, 反应体系在恒温震荡培养箱中反应。反应体系的 pH 值通过缓冲溶液调节, 温度通过设置培养箱调节。利用控制变量法, 逐一改变反应时间、pH 值、温度、L-抗坏血酸浓度, 得出最优合

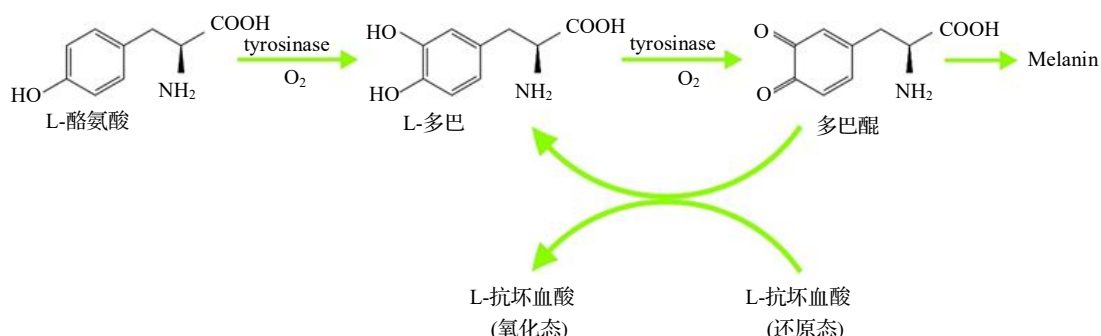


图3 酪氨酸酶催化合成 L-多巴

成 L-多巴条件. L-多巴产率(Y)的计算公式为:

$$Y = C_D / C_T \times 100\%, \quad (4)$$

式中: C_D 为反应结束 L-多巴浓度, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; C_T 为反应加入的 L-酪氨酸浓度, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.6 HPLC 检测分析

将待测液经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 利用高效液相色谱仪(SPD-10A 检测器和 LC-10AT 泵, 岛津企业管理有限公司)对反应体系中的目标产物 L-多巴和反应底物 L-酪氨酸含量进行测定. 色谱柱: 反向 C18 柱($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$), 柱子温度为 27°C ; 洗脱剂 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{磷酸}}:V_{\text{去离子水}}$ 为 19.5:1.0:979.5; 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 $10 \mu\text{L}$; 检测波长为 282 nm .

1.7 储存稳定性

在最优固定化条件下检测 TYR 的相对活性, 探究游离状态和固定化 TYR 的储存稳定性能. TYR 活性根据 1.4 节中描述的催化 L-多巴氧化生成多巴色素的速率计算. 设定测试数据中固定化 TYR 和游离 TYR 的最高酶活力为 100%.

1.8 重复使用性

在最佳酶促反应条件下连续循环 10 次合成 L-多巴, 记录每次循环结束对应的 L-多巴产率, 以此考察固定化 TYR 的重复使用性能. 每次循环反应结束后, 从上一反应体系中分离回收固定化 TYR, 同时用磷酸缓冲液($\text{pH } 7.0$)对其洗涤 3 次, 然后用于下一次循环.

2 结果与讨论

2.1 载体的结构与形貌表征

图 4(a)为大孔 SiO_2 形貌, 主体是 SiO_2 弯曲超薄层, 厚度 $20 \sim 30 \text{ nm}$, 内部三维相互贯通, 孔径尺寸 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$. 该结构使其具有快速渗透性、高孔隙率、良好机械性能, 而且为 ZnO NWs 原位合成

创造了有利场所. 图 4(b)~(d)为 SiO_2/ZnO NWs 复合载体的形貌, 相较于敞开环境下生长的纳米线, 在狭窄的大孔 SiO_2 孔道中生长的纳米线直径要小很多, 直径 $15 \sim 25 \text{ nm}$, 但形貌呈现出罕见的无规则盘绕状, 有利于 ZnO NWs 发挥其优良的吸附性能. 同时, 纳米线团充满孔道内的大部分空间, 且相互间并未聚集, 分布均匀, 这种形态可能比多孔结构更有利于物质的传递和扩散.

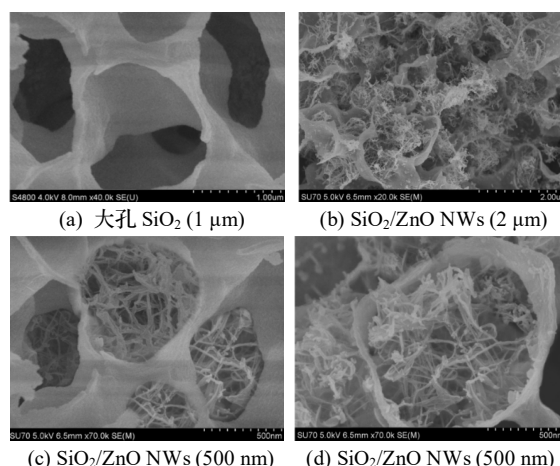
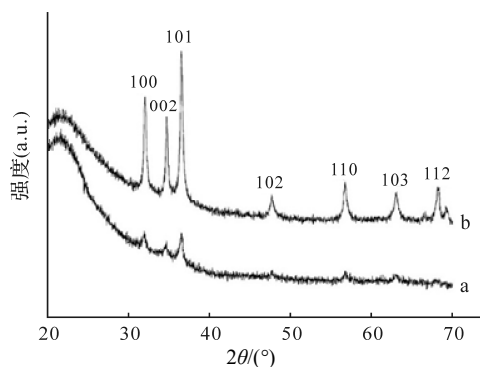


图4 复合材料的 SEM 图

图 5 是大孔 SiO_2 孔道中植入 ZnO 晶种和生长 ZnO 纳米线的 XRD 图.

图5 大孔 SiO_2 有 ZnO 晶种(a)和 ZnO 纳米线(b)XRD 图谱

从图5可见, (a)衍射峰位置与 ZnO 晶种相同, 峰强度较弱, (b)衍射峰位置与 ZnO 纳米线保持一致, 峰强度较前者强很多, 这是由于 ZnO 纳米线的质量分数远大于 ZnO 晶种含量. (b)衍射峰的强度和位置显示与所查 JCPDS 标准卡片中 N0.361451 数据保持一致, 说明本研究合成的纳米线为氧化锌的六方纤锌矿型晶体^[21-22].

2.2 产物分析

图6显示了 SiO₂/ZnO NWs-TYR 催化 L-酪氨酸生成 L-多巴的生物催化系统取样检测的高效液相(HPLC)图谱, 目标产物和反应底物的特征峰出现时间分别为 3.4、4.4 min, 与 L-多巴(图 6(a))和 L-酪氨酸(图 6(b))标准样本保留时间吻合. 说明 SiO₂/ZnO NWs-TYR 参与催化 L-酪氨酸生成 L-多巴反应.

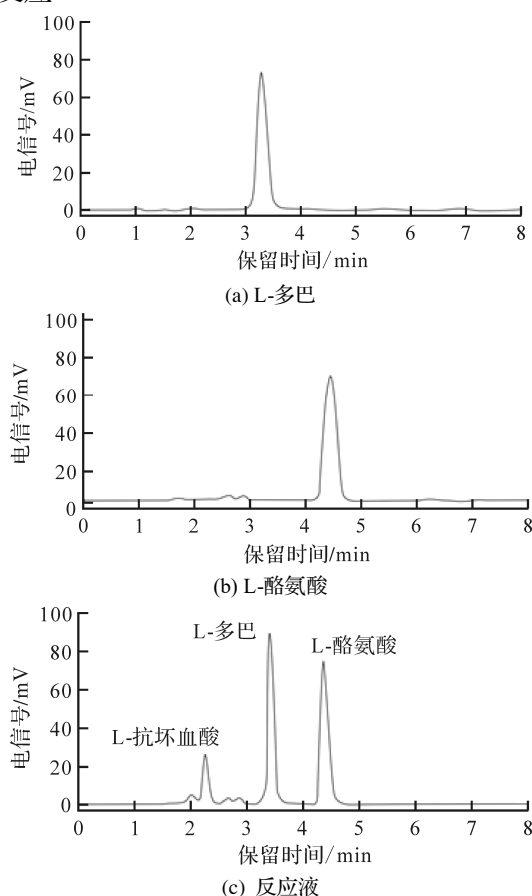


图6 HPLC 检测 282 nm 处电信号色谱

2.3 固定化条件优化

2.3.1 溶液 pH 值对负载量的影响

图7展示了溶液 pH 值与载酶量的关系. TYR 等电点约为 5.92, ZnO 纳米线等电点为 9.50, 因此

控制 pH 值范围 6.0~9.0 进行吸附操作. 结果显示, 酪氨酸酶在纳米复合载体的吸附与 pH 值具有显著关联. TYR 负载量在 pH 值 6.0~6.5 时随 pH 值升高而增大, 当 pH 值进一步扩大时, TYR 负载量会有所下降. 这可能是由于当 pH 值接近 TYR 等电点时, TYR 在溶液中的溶解度会下降, 导致负载量降低. 而在 pH 值 6.5~9.0 范围内, pH 值增大会导致 ZnO 纳米线的正电荷逐渐减少; 同时 TYR 分子之间携带越来越多的负电荷会产生自身的静电排斥, 对静电吸附产生消极影响. 因此最佳 pH 值为 6.5.

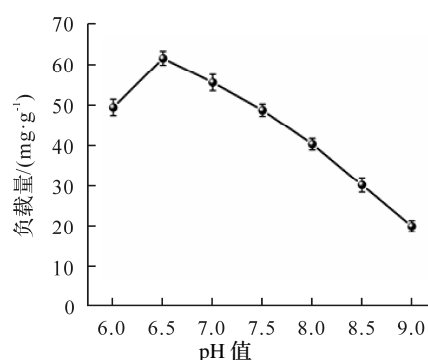


图7 溶液 pH 值对负载 TYR 量的影响

2.3.2 TYR 浓度对负载量和比活力的影响

图8为负载量、比活力与 TYR 浓度之间的关系.

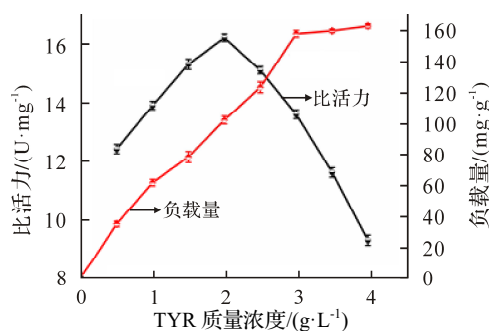


图8 TYR 质量浓度对负载 TYR 量和比活力的影响

当 TYR 质量浓度未超过 3 g·L⁻¹ 时, 负载量随浓度的增加而迅猛上升, 当质量浓度超过 3 g·L⁻¹ 时负载量趋于平稳, 这是由于高浓度 TYR 分子之间存在斥力, 从而限制更多 TYR 被吸附. TYR 质量浓度为 4 g·L⁻¹, 负载量高达 162.3 mg·g⁻¹, 表明复合载体对 TYR 固定化有效. 固定化 TYR 的比活力变化表现为宽钟形, 在曲线的中心位置达到最高点, 此时对应 TYR 质量浓度为 2 g·L⁻¹, 负载量为 102.1 mg·g⁻¹. 曲线两边比活力数值显现轻微下降趋势. 在曲线左边, 酶处于低浓度时, 酶分子为了与载体

表面形成最大接触可能变形和延伸,从而引起构象改变,导致酶比活力降低^[23]。在曲线右边,高浓度的酶可能会引起不可避免的聚集,导致酶比活力降低。为了酶比活力的最大化,将 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为固定化 TYR 的最佳质量浓度。

2.4 大孔 SiO_2 和 SiO_2/ZnO NWs 载体材料的吸附稳定性对比

设定在最佳固定化条件下 2 种载体的最高负载量分别为 100%,而后测得剩余载酶量(步骤见 1.3 节),并除以最高负载量得到载酶量的保持率(图 9)。从图 9 可见, SiO_2/ZnO NWs-TYR 在缓冲溶液中浸泡 48 h 后负载量改变不明显,而 SiO_2 -TYR 浸泡后出现明显的脱落,浸泡 48 h 后载酶量的保持率仅为 60.2%。 SiO_2/ZnO NWs-TYR 负载量稳定性的提高可归结为两方面: (1)复合载体因 ZnO 纳米线的存在而使其比表面积高于纯大孔 SiO_2 材料,大比表面积为 TYR 提供更多的附着点。(2)ZnO 纳米线的高等电点(9.50)使复合载体具有正电荷特性,其与 TYR 之间的静电作用有利于吸附固定。同时也表明, TYR 和 ZnO 纳米线之间的静态作用力要比纯大孔 SiO_2 提供的作用力更为牢固。

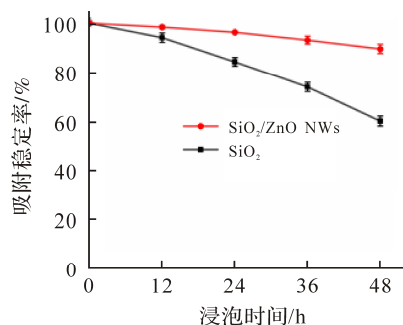


图 9 大孔 SiO_2 和 SiO_2/ZnO NWs 对 TYR 的吸附稳定性

2.5 反应条件的优化

2.5.1 反应时间

对反应时间的研究有利于在最短时间内得到最高产率,从而降低反应成本。图 10 为固定化 TYR 催化合成 L-多巴时产率随时间的变化。从图 10 可见,从 0 至 1.5 h, L-多巴产率逐渐增大,但增速逐渐减小。这是因为随着反应的进行, L-多巴生成量逐渐增多会抑制 TYR 的羟基化反应,从而减缓 L-多巴的生成速度,这与文献[24]得到的结论相一致。随着反应时间的推进, L-多巴产率迅速下降,取样检测表明,其原因是 L-抗坏血酸被消耗殆尽。

因此,最优反应时间为 1.5 h。

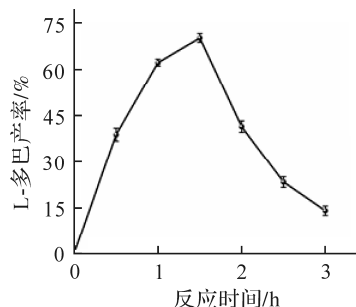


图 10 反应时间对固定化 TYR 合成 L-多巴的影响

2.5.2 反应温度

图 11 为温度对固定化 TYR 合成 L-多巴的影响。从图 11 可见,当反应温度控制在 $25\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围, L-多巴的产率随温度的提高而逐渐增高,但在 $35\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围则表现相反趋势。在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, L-多巴的产率仅为 21.4%,原因可能是高温下 TYR 不可逆的变性所致。选择 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作为酶促反应合成 L-多巴的最佳温度,该温度也是高于游离 TYR 的最佳活性温度($30\text{ }^{\circ}\text{C}$)^[25-26]。表明 SiO_2/ZnO NWs 为 TYR 提供了耐热的微环境,使其最佳活性温度升高。

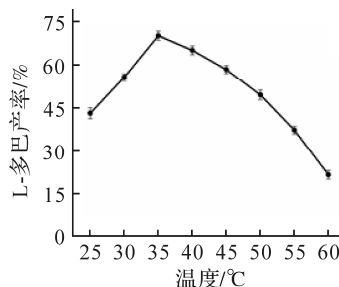


图 11 温度对固定化 TYR 合成 L-多巴的影响

2.5.3 溶液 pH 值

图 12 显示在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 $4.0\sim 9.0$ 时, L-多巴产率的变化。

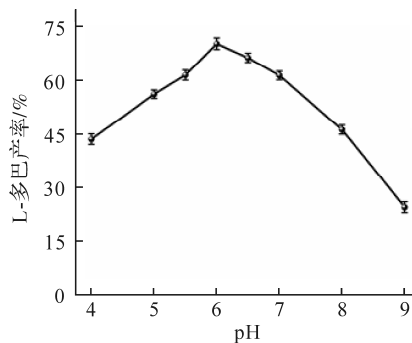


图 12 pH 值对固定化 TYR 合成 L-多巴的影响

有研究表明^[25],游离 TYR 最佳活性 pH 值为中

性条件. 而本研究的固定化系统在 pH 值为 6.0 条件下, L-多巴产率最大. 造成最佳 pH 值向酸性条件偏移的原因是 ZnO 纳米线的正电荷特性吸附溶液中的氢氧根离子, 导致固定化酶微环境相对于缓冲溶液偏向于碱性, 从而引起最佳活性 pH 值向左偏移. 选定 pH 6.0 为最佳反应条件, 对应 L-多巴产率为 70.2%.

2.5.4 L-抗坏血酸浓度

在 35 °C、pH 6.0、L-抗坏血酸浓度 4~14 mmol·L⁻¹ 条件下, 探究 L-抗坏血酸浓度对 L-多巴产率的影响, 结果如图 13 所示.

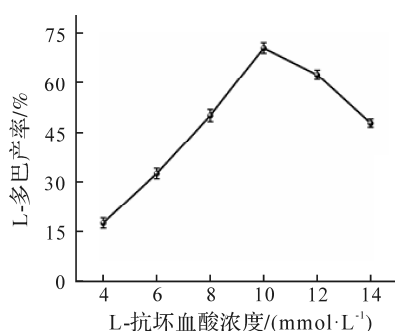


图 13 L-抗坏血酸浓度对固定化 TYR 合成 L-多巴的影响

作为还原剂, L-抗坏血酸可将多巴醌转换为 L-多巴, 然而酪氨酸酶的甲酚酶活性(L-酪氨酸转化为 L-多巴)通常要比其儿茶酚酶活性(L-多巴转化为多巴醌)速度慢^[27]. 因此, 当还原剂不足时, 儿茶酚酶会主导 TYR 酶促反应, 造成 L-多巴产率降低. 所以 L-抗坏血酸浓度在 4~10 mmol·L⁻¹ 范围增大的同时 L-多巴产率有所提高. 在 L-抗坏血酸浓度为 10 mmol·L⁻¹ 条件下, L-多巴产率高达 70.2%. 随着 L-抗坏血酸浓度的进一步增大, L-多巴产率则出现相反趋势. 据文献记载^[28-29], 关于 L-抗坏血酸对酪氨酸酶活性的影响一直存在争议. 一些研究者认为 L-抗坏血酸可能会成为 TYR 抑制剂^[30], L-抗坏血酸的存在会引起反应体系 pH 值的降低, 从而会对酶促反应合成 L-多巴不利. 为了在最少用量 L-抗坏血酸的同时获得最高 L-多巴产率, 采用 10 mmol·L⁻¹ 作为最佳 L-抗坏血酸浓度.

2.6 储存稳定性

通过测试游离状态和固定化 TYR 在固定时间间隔内酶的相对活性, 以考察其储存稳定性. 活力测试步骤见 1.4 节, 设定储存前的酶活力为 100%, 实验结果如图 14 所示. 相较于游离状态 TYR, 固

定化 TYR 展现了优异的储存稳定性. 经过 28 d 储存, 游离状态 TYR 仅保持初始活性的 22.1%, 而固定化 TYR 仍旧保持 78.6% 的初始活性. 表明游离态酶分子经固定化后可以有效减少酶活性损失, 类似现象在文献[31-32]中也有报道. 因此认为 TYR 与刚性结构的纳米线之间的静态作用力可能是提高储存稳定性的根本所在.

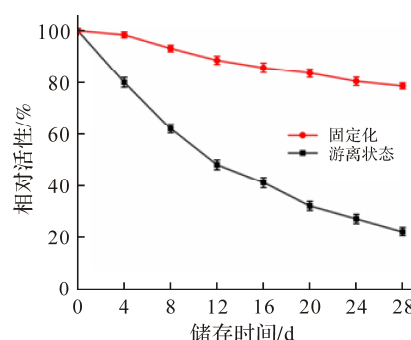


图 14 游离状态和固定化 TYR 的储存稳定性

2.7 重复使用性

在工业应用中, 操作稳定性在降低运行成本方面起着重要作用. 为了研究固定化 TYR 的可重复使用性, 将同一批固定化酶循环用于催化 L-多巴合成, 并记录每次循环结束后 L-多巴产率. 实验结果如图 15 所示.

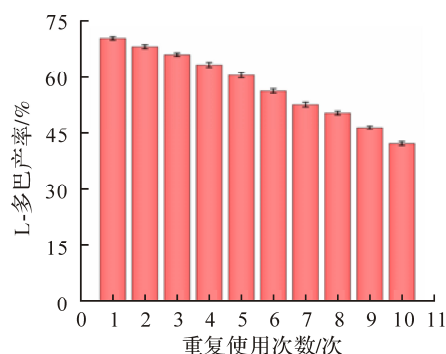


图 15 固定化 TYR 循环使用次数与 L-多巴产率的关系

从图 15 可见, 固定化 TYR 在 10 个循环后仍能保持 42.1% 的 L-多巴产率, 为初始催化活性的 59.98%. 有研究表明^[33], TYR 以交联酶聚集体 (CLEAs) 形式固定化应用于 L-多巴的合成, 在循环使用 7 个周期后, 只保留了初始催化活性的 16.2%. 另一项研究表明^[34], 酪氨酸酶-磷酸铜杂化复合材料 (TCHCs) 的生物催化剂在循环使用 5 个周期后仅保持了初始催化活性的 15.8%. 经对比发现, TYR 在纳米复合材料载体上的吸附是提高固定化 TYR

可重复使用性能和催化性能的有效途径。

3 结语

通过在大孔 SiO_2 孔道中引入 ZnO 纳米线合成了 SiO_2/ZnO NWs 材料, 作为静电吸附 TYR 载体, 考察 pH 值和 TYR 浓度对负载量的影响。结果表明: SiO_2/ZnO NWs 在 pH 6.5、TYR 质量浓度 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下, 最高负载量达 $162.3\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。与纯大孔 SiO_2 负载 TYR 相比, SiO_2/ZnO NWs 固定化 TYR 彰显更高的负载量和吸附稳定性。在最优固定化条件 (pH 6.5, TYR 质量浓度 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 下, SiO_2/ZnO NWs-TYR 比活力为 $16.2\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 保持了游离 TYR 时 84.2% 比活力。在最优催化条件下, L-多巴产率最高达 70.2%, 表明 SiO_2/ZnO NWs-TYR 是 L-酪氨酸合成 L-多巴的高效催化剂。同时, 在考察 SiO_2/ZnO NWs-TYR 储存稳定性与重复使用性中发现, 固定化 TYR 比游离 TYR 具有明显的储存稳定性, 且在重复使用 10 次时仍能保持 42.1% 的 L-多巴产率。

参考文献:

- [1] Koyanagi T, Katayama T, Suzuki H, et al. Effective production of 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 115(3):303-306.
- [2] 陈五九, 曹鹏, 宋国田, 等. 左旋多巴的合成研究新进展[J]. 广西科学, 2018, 25(3):274-278.
- [3] Surwase S N, Jadhav J P. Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by a novel bacterium *Bacillus* sp. JPJ[J]. Amino Acids, 2011, 41(2):495-506.
- [4] Krishnaveni R, Rathod V, Thakur M S, et al. Transformation of L-tyrosine to L-DOPA by a novel fungus, *Acremonium rutilum*, under submerged fermentation[J]. Current Microbiology, 2009, 58(2):122-128.
- [5] Mahmoud D A R, El Bendary M A. Production of 3, 4-dihydroxy phenyl-L-alanine (L-DOPA) by Egyptian halophilic black yeast[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(1):39-46.
- [6] Min K, Park K, Park D H, et al. Overview on the biotechnological production of L-DOPA[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(2):575-584.
- [7] Sheldon R A, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how[J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(15):6223-6235.
- [8] DiCosimo R, McAuliffe J, Poulouse A J, et al. Industrial use of immobilized enzymes[J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(15):6437-6474.
- [9] Tran D N, Balkus K J Jr. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes[J]. ACS Catalysis, 2011, 1(8):956-968.
- [10] Goddard J M, Hotchkiss J H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds [J]. Progress in Polymer Science, 2007, 32(7):698-725.
- [11] 董思圳, 秦风, 贾文敬, 等. 介孔二氧化硅载体在酶蛋白固定化中的应用[J]. 化学与生物工程, 2021, 38(1):1-4.
- [12] Carlsson N, Gustafsson H, Thörn C, et al. Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical-chemical perspective[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2014, 205:339-360.
- [13] Hudson S, Cooney J, Magner E. Proteins in mesoporous silicates[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2008, 47(45):8582-8594.
- [14] Lee C H, Lin T S, Mou C Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes[J]. Nano Today, 2009, 4(2):165-179.
- [15] 叶丽芳, 邬泉周. 有序大孔二氧化硅孔壁聚合物功能化修饰及葡萄糖淀粉酶固载化[J]. 应用化学, 2018, 35(11):1309-1316.
- [16] Zhang R F, Long N B, Zhang L L. Preparation of 3-dimensional SiO_2 structures via a templating method[J]. Thin Solid Films, 2009, 517(24):6677-6680.
- [17] 龙能兵, 张瑞丰. 大尺寸 $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ 大孔材料的制备及光降解性能[J]. 无机化学学报, 2009, 25(7):1153-1158.
- [18] 李文丽, 张瑞丰, 王文钦, 等. 大孔 SiO_2/ATO 电极的制备及其电化学性能研究[J]. 无机化学学报, 2010, 26(8):1382-1388.
- [19] Saikia D, Deka J R, Wu C E, et al. pH responsive selective protein adsorption by carboxylic acid functionalized large pore mesoporous silica nanoparticles SBA-1[J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 94:344-356.
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2):248-254.
- [21] Cheng B, Samulski E T. Hydrothermal synthesis of one-dimensional ZnO nanostructures with different aspect ratios[J]. Chemical Communications, 2004(8):986-987.
- [22] Liu X M, Zhou Y C. Seed-mediated synthesis of uniform ZnO nanorods in the presence of polyethylene glycol[J]. Journal of Crystal Growth, 2004, 270(3/4):527-534.
- [23] Bosley J A, Peilow A D. Immobilization of lipases on

- porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997, 74(2):107-111.
- [24] Ho P Y, Chiou M S, Chao A C. Production of L-DOPA by tyrosinase immobilized on modified polystyrene[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003, 111(3): 139-152.
- [25] Chuang G S, Chao A C, Chiou M S, et al. Immobilization of tyrosinase on chitosan – An optimal approach to enhance the productivity of L-DOPA from L-tyrosine[J]. Journal of the Chinese Chemical Society, 2005, 52(2): 353-362.
- [26] Yang Z, Yue Y J, Huang W C, et al. Importance of the ionic nature of ionic liquids in affecting enzyme performance[J]. Journal of Biochemistry, 2009, 145(3): 355-364.
- [27] Lontie R. Copper Proteins and Copper Enzymes[M]. Boca Raton: Chemical Rubber Company Press, 1984.
- [28] Golan-Goldhirsh A, Whitaker J R. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32(5):1003-1009.
- [29] Ros J R, Rodríguez-López J N, García-Cánovas F. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase[J]. Biochemical Journal, 1993, 295(1):309-312.
- [30] Baruah P, Swain T. The effect of L-ascorbic acid on the *in vitro* activity of polyphenoloxidase from potato[J]. The Biochemical Journal, 1953, 55(3):392-399.
- [31] Zhang Q D, Qian J Q, Guo H, et al. Utilization of nano-SiO₂ as a supporting material for immobilization of porcine pancreatic lipase[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2018, 18(8):5837-5841.
- [32] Jiang Y J, Sun W Y, Zhou L Y, et al. Improved performance of lipase immobilized on tannic acid-templated mesoporous silica nanoparticles[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 179(7):1155-1169.
- [33] Xu D Y, Chen J Y, Yang Z. Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of L[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 63:88-94.
- [34] Wei Y X, Wei C M, Li S F, et al. Novel biocatalyst for efficient synthesis of catecholic products[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(32): 12277-12285.

Synthesis of L-DOPA by tyrosinase immobilized on nano-composite carriers

WANG Dinglin, ZHANG Ruifeng*

(Faculty of Material Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The macroporous SiO₂ material is prepared using the template method, while ZnO nanowires are grown in the pores assisted using hydrothermal synthesis method to obtain new nano-composites (SiO₂/ZnO NWs). TYR is effectively immobilized on nano-composited support by electrostatic adsorption and used for the synthesis of L-DOPA. From the scanning electron microscopy (SEM), we observe that the ZnO nanowires show a random wire cluster morphology with uniform distribution in the pores. The maximum loading of TYR on SiO₂/ZnO NWs is up to 162.3 mg·g⁻¹, which is approximately three times more than the pure macroporous SiO₂ support and much higher than other immobilized TYR systems. The immobilized TYR is used for the synthesis of L-DOPA. The optimized reaction conditions are identified and the yield of L-DOPA reaches 70.2% in 1.5 h of catalysis under these conditions. The immobilized TYR also shows good storage stability, maintaining 78.6% relative activity after 28 days of storage, which is also much higher than that of the free TYR. As for the reusability, the L-DOPA yield of 42.1% can be maintained after 10 cycles.

Key words: nano-composites; tyrosinase; immobilized enzyme; L-DOPA

(责任编辑 史小丽)