

甲酸脱氢酶和分子伴侣基于金属有机框架 ZIF-8 载体的共固定化研究

邹赫凯, 刘建国, 王志鹏, 张彩玥, 管娇娇, 张浩川

(中国石油大学(华东)化学化工学院, 山东 青岛 266580)

摘要:酶的固定化技术能够在一定程度上提高酶的稳定性,且易于实现酶的循环利用,但在固定化过程中出现的酶活损失问题,目前仍是酶工程领域的研究难点。本研究以嗜热毁丝菌 *Myceliophthora thermophila* 来源的甲酸脱氢酶为研究对象,采用分子伴侣共固定化技术,成功将该酶基于 ZIF-8 固定化过程的酶活损失从 27.8% 降至 2.4%。另外,研究结果还表明,分子伴侣的共固定化又进一步提高了固定化甲酸脱氢酶的热稳定性、贮存稳定性和循环使用性能,使其在 60 °C 孵育 0.5 h、4 °C 贮存 30 d 和循环使用 15 次后的剩余活性分别提高了 18.7%、53.3% 和 23.1%。

关键词:甲酸脱氢酶;分子伴侣;ZIF-8;共固定化

中图分类号:Q936

文献标志码:A

Co-immobilization of formate dehydrogenase and molecular chaperone based on metal organic framework ZIF-8 carrier

ZOU Hekai, LIU Jianguo, WANG Zhipeng, ZHANG Caiyue, GUAN Jiaojiao, ZHANG Haochuan

(College of Chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum, Qingdao 266580, China)

Abstract: The immobilization of enzymes can improve their stability to a certain extent and facilitate their recycling. However, the issue of enzyme activity loss during immobilization remains a research challenge in the field of enzyme engineering. Focusing on the formate dehydrogenase from *Myceliophthora thermophila* and using the technology of molecular chaperone co-immobilization, this study successfully reduced the enzyme activity loss based on ZIF-8 immobilization process from 27.8% to 2.4%. The experimental results also showed that the co-immobilization of molecular chaperone further improved the thermal stability, storage stability, and reusability of immobilized formate dehydrogenase, enabling its residual activity increased by 18.7%, 53.3%, and 23.1% respectively after the incubation at 60 °C for 0.5 h, storage at 4 °C for 30 d, and 15 cycles of use.

Key words: formate dehydrogenase; molecular chaperone; ZIF-8; co-immobilization

自工业革命以来,火力发电、交通运输等行业排放了大量的二氧化碳,人类面临全球变暖、极端天气等日趋严重的环境问题^[1]。为了降低大气中的二氧化碳含量,人们开发了二氧化碳捕获、储存和利用等多种技术。其中,生物酶催化二氧化碳制备高需求化学品(如甲醇)被认为是缓解二氧化碳累积和补充化石燃料的“双重收益”过程,在国际上受到广泛关注^[2]。

甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)能够将二氧化碳还原为甲酸,而甲酸作为重要的氢能载体和化工原料,可进一步转化为甲醇或直接用于燃料电池^[3]。当前,利用甲酸脱氢酶催化二氧化碳制甲酸

收稿日期:2025-08-27

基金项目:国家自然科学基金项目(21473256)

作者简介:邹赫凯(1998—),男,山东济南人,硕士研究生,主要从事酶固定化方面的研究。

刘建国(1976—),男,山东临清人,教授,博士,主要从事生物分离工程和酶工程方面的研究。

E-mail: jianguoliu@upc.edu.cn

的工业应用受到该酶热稳定性差(50 ℃时的半衰期 <2 h)、pH 耐受范围窄(7.0~9.0)等问题的严重制约^[4]。为了提高酶的热稳定性,人们通常采用固定化技术,即通过吸附、包埋或形成化学键等方式,将酶固定在某些非水溶性载体上。该方法虽然能够在一定程度上提高酶的热稳定性,并实现酶的循环利用,但在固定化过程中,酶的微观构象会发生改变,同时增加了底物、产物的传质阻力,最终表现为酶的活性损失。如 Bolivar 等^[5]曾利用交联法固定化甲酸脱氢酶用于催化二氧化碳还原制甲酸,结果发现:与游离酶相比,固定化甲酸脱氢酶的活性损失高达 87%。因此,如何解决酶在固定化过程中出现的活性损失问题,目前仍是酶工程领域的研究难点。

分子伴侣是一类能够辅助蛋白质正确折叠和组装的蛋白质,广泛存在于原核和真核细胞中^[6]。目前,分子伴侣在酶工程领域主要用于提高蛋白质的表达水平和包涵体的复性效率等^[7-8],但在降低固定化酶活性损失方面的应用却鲜有报道。因此,本研究选择嗜热毁丝菌 *Myceliophthora thermophila* 来源的甲酸脱氢酶(简称为 MtFDH)作为研究对象^[9],采用嗜热球菌 *Thermococcus* KS-1 来源的分子伴侣(*Thermococcus* KS-1 chaperone, TKcpn)与该酶的共固定化技术^[10],以降低 MtFDH 在固定化过程中的活性损失,并为其他酶的固定化提供科学依据。

1 实验材料及方法

1.1 甲酸脱氢酶和分子伴侣的制备

使用的甲酸脱氢酶和分子伴侣的基因分别来自嗜热毁丝菌 *Myceliophthora thermophila*^[9] 和嗜热球菌 *Thermococcus* KS-1^[10]。两个基因均由天津中合基因科技有限公司商业合成获得,并在大肠杆菌中分别表达为含有组氨酸标签的蛋白质,然后利用亲和和色谱进行分离纯化。蛋白质的表达和纯化过程可参见课题组之前的工作^[11]。纯化后的蛋白质经冷冻干燥后制成粉末样品,4 ℃ 储存。

1.2 ZIF-8 固定化酶的制备

ZIF-8 是一种由 Zn^{2+} 与 2-甲基咪唑通过自组装形成的金属有机骨架材料,具有多孔网络结构和较高的比表面积,故可作为酶的固定化载体。

甲酸脱氢酶的固定化采用 Guo 等^[12]报道的共沉淀法,但对部分工艺参数进行了优化。具体过程为:将 0.367 g 的醋酸锌和 0.160 g 的甲酸脱氢酶溶解于 90 mL 磷酸钠缓冲液(50 mM, pH 7.4)中,再向混合溶液中滴加 10 mL 的 2-甲基咪唑溶液(80 mM),25 ℃ 搅拌 4 h,以 15 000 r/min 离心 15 min 后,收集沉淀。用超纯水洗涤沉淀物 3 次,最后进行冷冻干燥处理,所得粉末即为甲酸脱氢酶基于 ZIF-8 的单一固定化酶(MtFDH@ZIF-8)。

甲酸脱氢酶与分子伴侣的共固定化,将上述制备过程中的甲酸脱氢酶换成甲酸脱氢酶和分子伴侣的混合物(总质量仍为 0.160 g,二者的质量比为 3:1),保持制备工艺不变,可制得甲酸脱氢酶与分子伴侣基于 ZIF-8 的共固定化酶(MtFDH-TKcpn@ZIF-8),制备过程参见图 1。

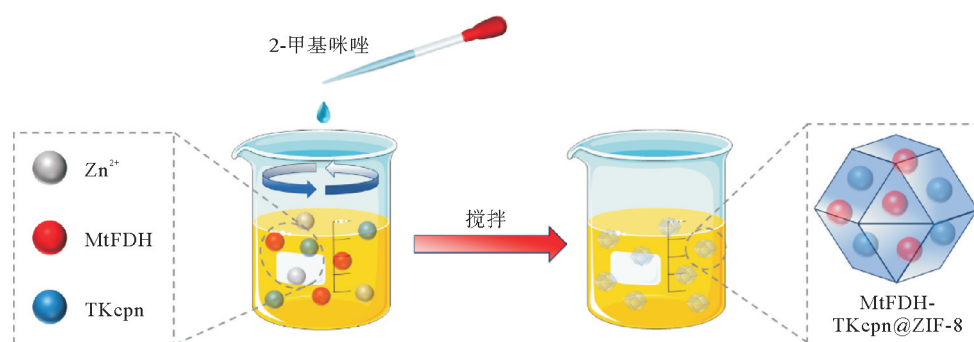


图 1 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的制备示意图

Fig. 1 Preparation schematic diagram of MtFDH-TKcpn@ZIF-8

固定化率根据式(1)计算:

$$Y = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:Y为固定化率, C_0 是固定化前酶溶液的蛋白质浓度, C_1 是固定化后离心所得上清液中剩余蛋白质的浓度。 C_0 和 C_1 是以牛血清白蛋白为标准,采用Bradford法测定获得^[13]。

1.3 ZIF-8和固定化酶的形貌结构表征

ZIF-8、单一固定化酶MtFDH@ZIF-8和共固定化酶MtFDH-TKcpn@ZIF-8的形貌、晶体结构及化学组成分别采用日本Hitachi SU-8200型扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、荷兰PANalytical Empyrean型X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD)和美国Nicolet 6700型傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)进行表征。

1.4 甲酸脱氢酶的活性测定

游离甲酸脱氢酶的测活体系包括:1.5 mL的碳酸氢钠溶液(20 mM)、1.5 mL的Tris-HCl缓冲溶液(50 mM, pH 7.4)、300 μ L的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)溶液(5 mM)和200 μ L的甲酸脱氢酶溶液(0.25 mg/mL)。25 $^{\circ}$ C反应10 min,利用紫外分光光度计(UV-2450型, SHIMADZU, 日本)记录340 nm处的吸光度变化。单位酶活的定义为:在25 $^{\circ}$ C、pH 7.4的反应条件下,每分钟消耗1 μ mol的NADH所需要的酶量。

固定化酶(MtFDH@ZIF-8和MtFDH-TKcpn@ZIF-8)的活性测定方法与上述测活过程基本一致,只需将游离酶更换为含有相同质量甲酸脱氢酶的固定化酶。

1.5 甲酸脱氢酶的酶学性质分析

为了考察分子伴侣的共固定化对甲酸脱氢酶性质的影响,对游离甲酸脱氢酶MtFDH、单一固定化酶MtFDH@ZIF-8和共固定化酶MtFDH-TKcpn@ZIF-8的酶学性质进行分析和比较,这些性质包括最适催化条件、热稳定性、贮存稳定性和循环使用性等。

1) 最适催化条件

根据1.4部分描述的酶活性测定方法,分别在20~70 $^{\circ}$ C和pH 3.0~12.0范围内,测定游离甲酸脱氢酶和固定化甲酸脱氢酶(MtFDH@ZIF-8和MtFDH-TKcpn@ZIF-8)的活性,将最高酶活设定为100%,计算不同温度、pH条件下的相对活性。

2) 热稳定性和贮存稳定性

热稳定性的测定方法:先将酶溶液置于不同温度下(20~70 $^{\circ}$ C,间隔为5 $^{\circ}$ C)孵育0.5 h,然后测定样品的活性,将未孵育样品的活性定义为100%,计算不同温度孵育后各样品的相对活性。

贮存稳定性的测定方法:将酶的冻干粉样品置于4 $^{\circ}$ C冰箱中贮存30 d,期间,每5 d测定一次样品的活性,将初始样品的活性定义为100%,计算不同贮存时间后样品的相对活性。

3) 固定化酶的循环使用性

为了探究单一固定化酶MtFDH@ZIF-8和共固定化酶MtFDH-TKcpn@ZIF-8的可重复使用性,在酶催化反应结束后,通过离心法(4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min,离心15 min)将固定化酶从反应体系中分离出来,并用Tris-HCl缓冲液(50 mM, pH 7.4)洗涤3次,再进行下一次的循环使用,共循环使用15次。将第1次催化反应的活性设定为100%,计算每次循环使用后的相对活性。

2 结果与讨论

2.1 甲酸脱氢酶和分子伴侣样品的SDS-PAGE电泳分析

为了检测制备的甲酸脱氢酶和分子伴侣的纯度,对二者进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析,实验结果如图2(a)和图2(b)所示。图中, M为标准蛋白Marker; I和II分别为纯化后的甲酸脱氢酶MtFDH和分子伴侣TKcpn。

由图2可见,纯化后的甲酸脱氢酶MtFDH和分子伴侣TKcpn分别在42.5 kDa和58.0 kDa附近出现了明显条带,这与二者的理论分子量(42.0 kDa和59.06 kDa)基本一致^[9-10]。另外,经过凝胶成像系统

分析得知,甲酸脱氢酶 MtFDH 和分子伴侣 TKcpn 的纯度(即目标蛋白质条带的灰度占有蛋白质条带灰度的百分比)分别为 98.6% 和 96.4%,满足后续实验的要求。

2.2 ZIF-8 和固定化酶的形貌结构表征

1) SEM 分析结果

图 3(a)和图 3(b)分别是 ZIF-8 和甲酸脱氢酶单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 的 SEM 结果。可以看出,合成的 ZIF-8 呈现六边形,直径约为 320 nm,这与文献[14]中报道的 ZIF-8 的典型特征相符。而固定了甲酸脱氢酶之后的 ZIF-8(即 MtFDH@ZIF-8),表面光滑,依然为六边形,但直径却减小至约 260 nm,这可能是受甲酸脱氢酶的影响所致,文献[15]中也有类似现象的报道。另外,由于共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的 SEM 结果与图 3(b)非常接近,因此不再重复给出。

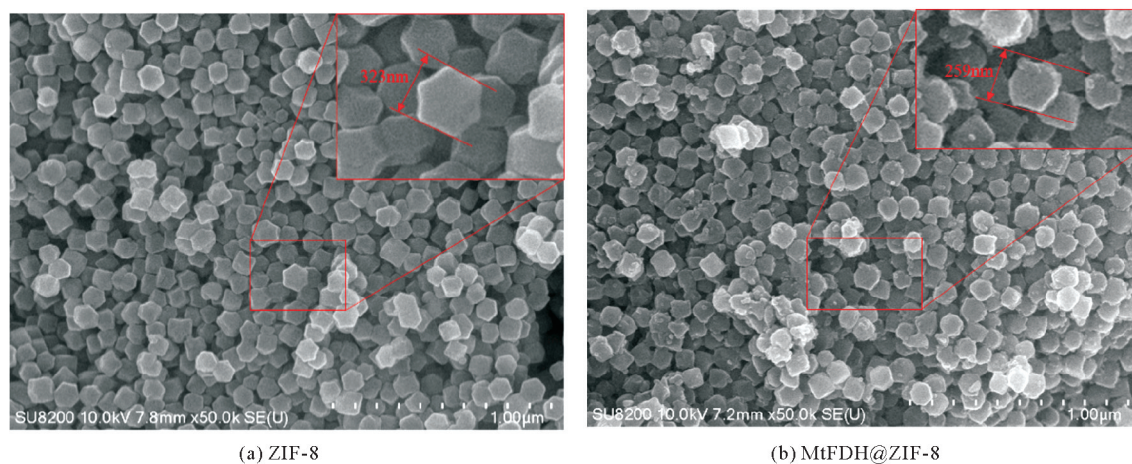


图 3 ZIF-8 和 MtFDH@ZIF-8 的 SEM 图像

Fig. 3 SEM images of ZIF-8 and MtFDH@ZIF-8

2) XRD 分析结果

为了检测 ZIF-8、单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 和共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的晶体结构,本研究对 3 种样品进行了 XRD 分析,实验结果如图 4 所示。图中的 3 条谱线都在 7.36° 、 12.7° 和 18° 处出现 ZIF-8 的 3 个特征峰^[15],且两种固定化酶(MtFDH@ZIF-8 和 MtFDH-TKcpn@ZIF-8)的谱线与 ZIF-8 的谱线没有显著差异。另外,通过活性测定得知,单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 和共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的比酶活分别为 228.3 U/mg 和 308.6 U/mg。这些结果表明,基于 ZIF-8 制备的两种固定化酶(MtFDH@ZIF-8 和 MtFDH-TKcpn@ZIF-8)保持着 ZIF-8 晶体结构的完整性。

3) FT-IR 分析结果

为了进一步证实甲酸脱氢酶和分子伴侣被固定在 ZIF-8 中,对 ZIF-8、单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 和共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 进行了 FT-IR 分析,实验结果如图 5 所示。如图 5 所示, 425 cm^{-1} 的吸收峰归因于 Zn—N 弯曲振动, $600\sim 900\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带是由芳香族的 C—H 拉伸振动引起, $900\sim 1250\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带对应于 C—N 键的拉伸振动,而 $1350\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 的谱带由甲基咪唑环的伸缩振动引起^[16]。此外,单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 和共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的 FT-IR 谱图在

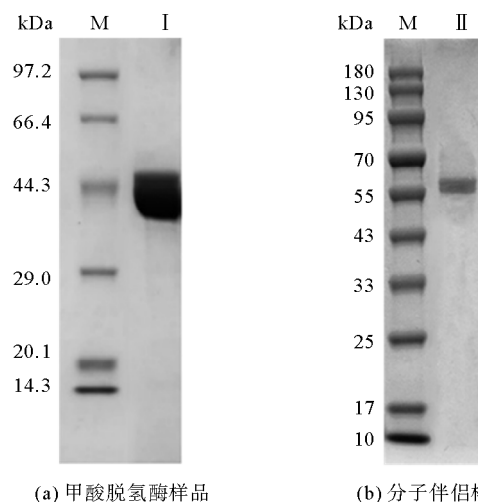


图 2 甲酸脱氢酶和分子伴侣样品的 SDS-PAGE 结果

Fig. 2 SDS-PAGE results of formate dehydrogenase sample and molecular chaperone sample

1 670 cm^{-1} 处出现蛋白质的特征峰,属于 C—O 伸缩振动^[15]。

因此,上述所有表征结果均证实基于 ZIF-8 的两种固定化酶(MtFDH@ZIF-8 和 MtFDH-TKcpn@ZIF-8)制备成功。

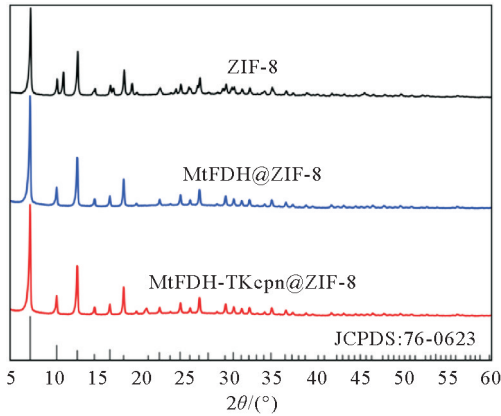


图 4 ZIF-8 和固定化甲酸脱氢酶的 XRD 结果

Fig. 4 XRD patterns of ZIF-8 and immobilized MtFDHs

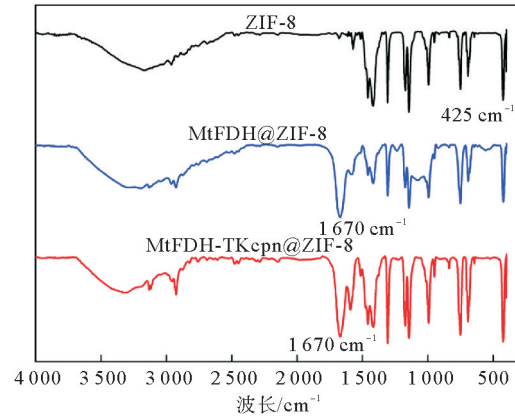


图 5 ZIF-8 和固定化甲酸脱氢酶的 FT-IR 结果

Fig. 5 FT-IR results of ZIF-8 and immobilized MtFDHs

2.3 甲酸脱氢酶的酶学性质分析

1) 最适催化条件

酶的最适催化条件包括最适 pH 和最适温度,因此分别在 pH 为 3.0~12.0 和 20~70 $^{\circ}\text{C}$ 范围内考察了 pH、温度对游离甲酸脱氢酶 MtFDH、单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 和共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 活性的影响,结果如图 6(a)和图 6(b)所示。

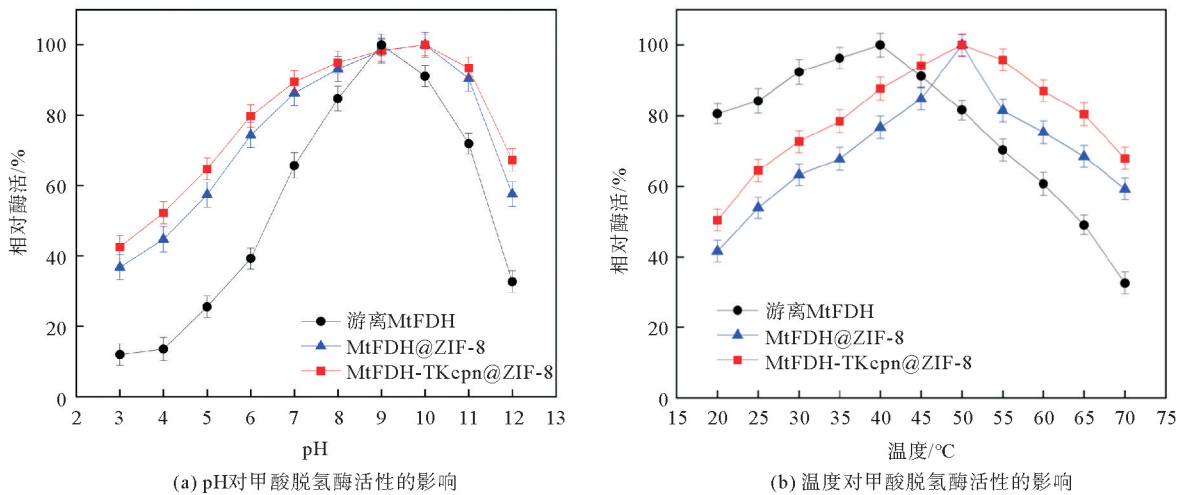


图 6 pH 和温度对甲酸脱氢酶活性的影响

Fig. 6 Effects of pH and temperature on the activity of MtFDHs

由图 6 可知,游离甲酸脱氢酶 MtFDH 的最适催化条件为 pH 9.0 和 40 $^{\circ}\text{C}$,而两种固定化甲酸脱氢酶(MtFDH@ZIF-8 和 MtFDH-TKcpn@ZIF-8)的最适催化条件为 pH 10.0 和 50 $^{\circ}\text{C}$,即与游离酶 MtFDH 相比,固定化甲酸脱氢酶的最适 pH 和最适温度分别提高了 1 个 pH 单位和 10 $^{\circ}\text{C}$ 。据文献^[17]报道,二氧化碳的吸收和转化利用大多在强碱性条件下($\text{pH} > 9.0$)进行。因此,固定化甲酸脱氢酶更有利于催化二氧化碳转化制甲酸反应的进行;而且固定化甲酸脱氢酶最适温度的升高,同样有利于上述酶促反应在更高温度和更快速率下进行。

此外,从图 6 中还可以发现两点:一是固定化甲酸脱氢酶在 pH 3.0~12.0(不含 pH 9.0)和高温条件

(50~70 °C)下的相对活性明显高于游离酶 MtFDH,使其使用范围更加宽广;二是分子伴侣的加入没有改变固定化甲酸脱氢酶的最适催化条件,但使得共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的相对活性高于单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8。

2) 热稳定性和贮存稳定性

酶的热稳定性和贮存稳定性是影响其工业应用的两个重要性质,因此对甲酸脱氢酶的热稳定性和贮存稳定性进行了考察,结果列于图 7(a)和图 7(b)。从图 7(a)可以看出,随着孵育温度的升高,游离甲酸脱氢酶 MtFDH 和固定化甲酸脱氢酶(MtFDH@ZIF-8 和 MtFDH-TKcpn@ZIF-8)的相对活性都逐渐降低,这意味着部分酶已经发生了热变性^[16]。但在同一孵育温度下,如 60 °C 时,单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 的相对活性为 51.7%,该数值远高于游离甲酸脱氢酶 MtFDH 的相对活性(9.4%),这说明基于 ZIF-8 的固定化提高了甲酸脱氢酶的热稳定性。另外,与单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 相比,分子伴侣 TKcpn 的加入又使得共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的热稳定性获得进一步提高,使其在 60 °C 孵育 0.5 h 后的相对活性高达 70.4%,比单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 又提高了 18.7%,这可能是由于分子伴侣 TKcpn 对该酶的热变性具有一定的抑制作用^[10]。

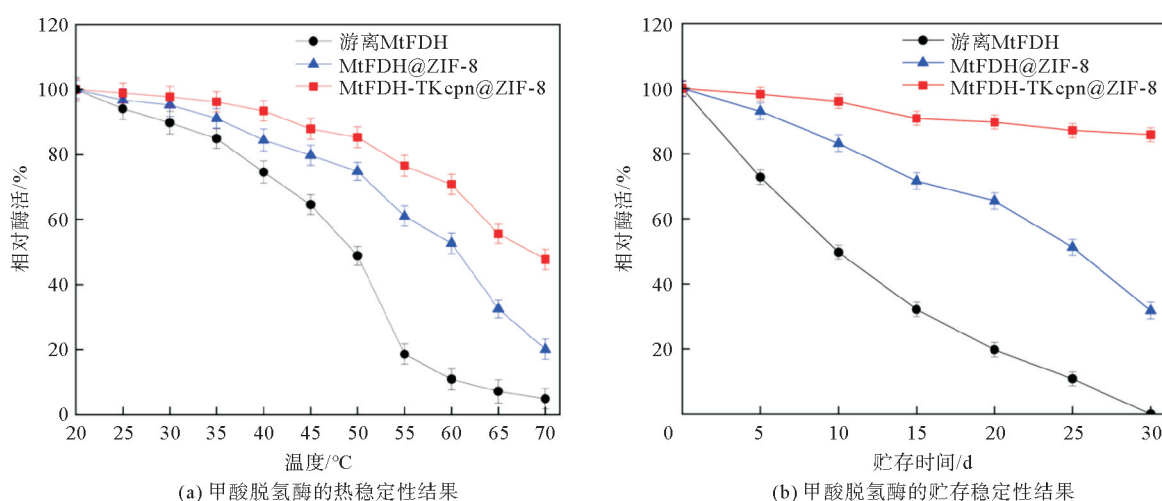


图 7 甲酸脱氢酶的热稳定性和贮存稳定性实验结果

Fig. 7 Experimental results on thermal stability and storage stability of MtFDHs

由图 7(b)可以看出,随着贮存时间的延长,游离甲酸脱氢酶 MtFDH 和单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 的相对活性都呈现出明显的下降趋势,而共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的相对活性则下降非常缓慢。例如,在 4 °C 贮存 30 d 后,游离甲酸脱氢酶完全失活,单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 的相对活性仅为 32.5%,而共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的相对活性仍高达 85.8%。这些结果同样说明,基于 ZIF-8 的固定化提高了甲酸脱氢酶的贮存稳定性,而分子伴侣 TKcpn 的加入,又进一步提高了共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的贮存稳定性。另外,针对共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 进行了长达半年的贮存实验,结果发现,在 4 °C 贮存 6 个月之后,其相对活性依然能够达到 47% 左右,表现出优异的贮存稳定性。

3) 固定化酶的循环使用性

相对于游离酶而言,固定化酶的主要优点在于其可多次循环使用,这也是工业上用酶的重要参考因素之一^[5]。因此,本研究考察了单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 和共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的循环使用性,实验结果如图 8 所示。可以看出,随着循环使用次数的增加,两种固定化甲酸脱氢酶的相对活性逐渐下降,但共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 相对活性的下降幅度明显小于单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8。例如,在循环使用 15 次后,单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 的相对活性损失了 46.9%,而共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的相对活性仅损失了 23.8%,这同样是因为分子伴侣 TKcpn 对甲酸脱氢酶的稳定作用^[10]。

2.4 甲酸脱氢酶固定化前后的性质比较

为了更为直观地展示基于 ZIF-8 的固定化、与分子伴侣 TKcpn 的共固定化对甲酸脱氢酶性质的影响,将游离甲酸脱氢酶 MtFDH、单一固定化酶 MtFDH@ZIF-8 和共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的性质汇总于表 1。

从表 1 的比酶活数据变化可以看出,甲酸脱氢酶 MtFDH 经 ZIF-8 固定化之后,比酶活损失了约 27.8%,而该酶与分子伴侣 TKcpn 共固定化之后,比酶活的损失仅为 2.4%,与游离酶非常接近。另外,由于固定化过程的工艺参数(含蛋白质总浓度)保持不变,也使得计算出的两种固定化过程(甲酸脱氢酶的单一固定化和甲酸脱氢酶与分子伴侣的共固定化)的固定化率基本相同,约为 78.5%。更为重要的是,在甲酸脱氢酶 MtFDH 固定化过程中加入分子伴侣 TKcpn,可以使共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的热稳定性、贮存稳定性和循环使用性都获得较大幅度的改善,这对该酶的工业化应用极为有利。另外,与 Lin 等^[18]采用氧化石墨烯固定化甲酸脱氢酶的结果相比,本研究制备的共固定化酶 MtFDH-TKcpn@ZIF-8 的热稳定性、贮存稳定性和循环使用性更是高出至少 52%,同样说明酶与分子伴侣共固定化的显著优点。

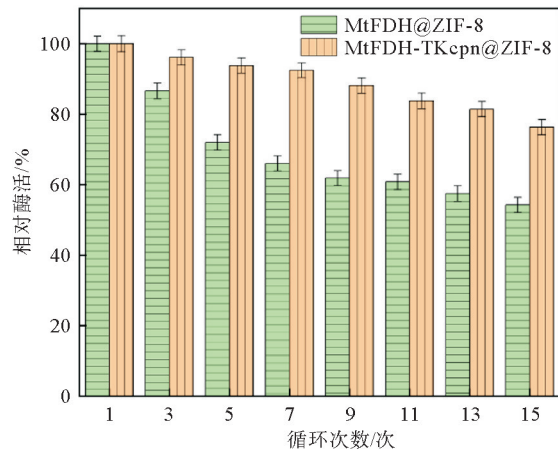


图 8 循环使用次数对甲酸脱氢酶活性的影响
Fig. 8 Effect of cycle usage on the activity of immobilized MtFDHs

表 1 不同状态下甲酸脱氢酶的性质比较

Table 1 Comparison of the properties of formate dehydrogenase in different states

性质	MtFDH	MtFDH@ZIF-8	MtFDH-TKcpn@ZIF-8	文献[18]中的固定化 FDH ^d
最适 pH	9.0	10.0	10.0	10.0
最适温度/°C	40	50	50	60
比酶活/(U/mg)	316.2	228.3	308.6	—
固定化率/%	—	78.3	78.5	—
60 °C 孵育 0.5 h 后的相对活性 ^a /%	9.4	51.7	70.4	18.2
贮存 20 d 后的相对活性 ^b /%	20.1	64.3	88.5	24.9
循环使用 8 次后的相对活性 ^c /%	—	61.7	86.4	27.3

注:a—将未经过孵育处理的酶样品的活性定义为 100%;b—将开始贮存的酶样品的活性定义为 100%;c—将第 1 次使用时的酶样品的活性定义为 100%;d—固定化载体为氧化石墨烯。

3 结论

采用共沉淀法制备了基于 ZIF-8 的固定化甲酸脱氢酶,并重点研究了分子伴侣 TKcpn 的加入对该固定化酶性质的影响。SEM、XRD 和 FT-IR 分析结果表明,两种固定化甲酸脱氢酶(MtFDH@ZIF-8 和 MtFDH-TKcpn@ZIF-8)制备成功。酶学性质分析结果表明,分子伴侣 TKcpn 的加入没有改变固定化甲酸脱氢酶 MtFDH@ZIF-8 的最适催化条件,反而使其酶活损失从 27.8%降低至 2.4%。另外,分子伴侣 TKcpn 的加入还大幅度提高了固定化甲酸脱氢酶 MtFDH@ZIF-8 的热稳定性、贮存稳定性和循环使用性,使其在 60 °C 孵育 0.5 h 后、4 °C 贮存 30 d 后和循环使用 15 次后的相对活性分别提高了 18.7%、53.3%和 23.1%。这些酶学性质的改善说明,分子伴侣与酶的共固定化是解决固定化酶的活性损失和进一步提高其稳定性的可靠方法。

参考文献:

- [1] ROUF S, GREISH Y E, AL-ZUHAIR S. Immobilization of formate dehydrogenase in metal organic frameworks for enhanced conversion of carbon dioxide to formate[J/OL]. *Chemosphere*, 2021, 267. DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.128921.
- [2] CALZADIAZ-RAMIREZ L, MEYER A S. Formate dehydrogenases for CO₂ utilization[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 73:95-100.
- [3] REN S Z, CHEN R X, WU Z F, et al. Enzymatic characteristics of immobilized carbonic anhydrase and its applications in CO₂ conversion[J/OL]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 204. DOI:10.1016/j.colsurfb.2021.111779.
- [4] MOON M, PARK G W, LEE J-P, et al. Recent progress in formate dehydrogenase (FDH) as a non-photosynthetic CO₂ utilizing enzyme: A short review[J/OL]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2020, 42. DOI:10.1016/j.jcou.2020.101353.
- [5] BOLIVAR J M, WILSON L, FERRAROTTI S A, et al. Evaluation of different immobilization strategies to prepare an industrial biocatalyst of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 540-546.
- [6] 唐宇琦, 叶松涛, 刘嘉, 等. 分子伴侣作用下的蛋白质稳定与进化[J]. *合成生物学*, 2022, 3(3):445-464.
TANG Yuqi, YE Songtao, LIU Jia, et al. Molecular chaperones promote protein stability and evolution[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(3):445-464.
- [7] 蔡逸安, 张轶群, 杨子璇, 等. 分子伴侣增强蛋白酶 K 在毕赤酵母中的表达及对羊毛鳞片层的作用分析[J]. *生物技术通报*, 2024, 40(7):307-313.
CAI Yian, ZHANG Yiqun, YANG Zixuan, et al. Enhanced expression of protease K in *Pichia pastoris* through molecular chaperones and analysis of its effects on wool scale layer[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(7):307-313.
- [8] 林景也, 李森. 具有分子伴侣功能的抗体[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(5):1030-1041.
LIN Jingye, LI Sen. Antibodies with chaperone function[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2023, 50(5):1030-1041.
- [9] ALTAS N, ASLAN A S, KARATAS E, et al. Heterologous production of extreme alkaline thermostable NAD⁺-dependent formate dehydrogenase with wide-range pH activity from *Mycelophthora thermophila* [J]. *Process Biochemistry*, 2017, 61:110-118.
- [10] KOHDA J, KAWANISHI H, SUEHARA K-I, et al. Stabilization of free and immobilized enzymes using hyperthermophilic chaperonin[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(2):131-136.
- [11] LI J, LI Z Y, GONG H, et al. Identification and characterization of a novel high-activity amylosucrase from *Salinispirillum* sp. LH10-3-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107:1725-1736.
- [12] GUO F, XU Z H, ZHANG W D, et al. Facile synthesis of catalase@ZIF-8 composite by biomimetic mineralization for efficient biocatalysis[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44:1309-1319.
- [13] SEDMAK J J, GROSSBERG S E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250 [J]. *Analytical Biochemistry*, 1977, 79:544-552.
- [14] SHOMAL R, ABDELKAREEM M A, OLABI A G, et al. Macro porous ZIF-8 beads: Promising supports for enzyme immobilization[J/OL]. *Materials Today Sustainability*, 2024, 25. DOI:10.1016/j.mtsust.2023.100632.
- [15] OU J, YUAN X, LIU Y, et al. Lipase from *Pseudomonas cepacia* immobilized into ZIF-8 as bio-catalyst for enantioselective hydrolysis and transesterification[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 102:132-140.
- [16] LIU J G, JIANG X J, ZHENG Y R, et al. Expression, characterization, and immobilization of a novel D-lactate dehydrogenase from *Salinispirillum* sp. LH 10-3-1[J/OL]. *Processes*, 2024, 12. DOI:10.3390/PR12071349.
- [17] ROUF S, GREISH Y, BRUGGEN B, et al. CO₂ hydrogenation to formate by immobilized formate dehydrogenase: Challenges and opportunities[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2025, 142:1067-1074.
- [18] LIN P, ZHANG Y H, YAO G X, et al. Immobilization of formate dehydrogenase on polyethylenimine-grafted graphene oxide with kinetics and stability study[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2020, 20:104-111.

(责任编辑:吕海亮)