

学校编码: 10384
学号: 20620141151400

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于石墨烯二维材料的固定化氧化还原酶研究

**Immobilization of Oxidoreductase Based on
Two-Dimensional Graphene Materials**

林 鹏

指导教师姓名: 王世珍 副教授

专业名称: 生物化工

论文提交日期: 2017 年 月

论文答辩时间: 2017 年 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

氧化还原酶 (Oxidoreductase) 是重要的生物催化剂, 其催化的氧化还原反应具有反应条件温和、立体选择性强等优点, 但依赖 NADH (NADPH) 的氧化还原酶需要昂贵的辅酶参与反应。甲酸脱氢酶 (Formate Dehydrogenase, FDH) 在辅酶酶法再生中具有明显优势, 甲酸/甲酸脱氢酶再生体系的明显优势在于其唯一副产物 CO_2 对酶的活性没有影响, 且易于从反应体系中逃逸出来。苯丙氨酸脱氢酶 (Phenylalanine Dehydrogenase, PheDH), 在临床上可用于苯丙酮尿症的检测, 且可与甲酸脱氢酶耦联合成苯丙氨酸。

氧化石墨烯 (Graphene Oxide, GO) 具有独特的片层结构, 其表面和边缘分布着羟基、环氧基和羧基含氧功能性基团。氧化石墨烯的高比表面积和良好的生物相容性, 使其成为酶固定化的优良载体。本研究构建了基于氧化石墨烯衍生物的不同载体, 用于氧化还原酶的固定化, 目的在于提高酶的稳定性。本文的主要研究内容和结果如下:

一、运用 Hummers 改良法制备氧化石墨烯, 用 X 射线晶体衍射 (XRD)、紫外-可见光谱 (UV-Vis)、傅里叶红外光谱 (FT-IR)、荧光光谱 (Fluorescence Spectra) 对产物进行表征。分析结果表明在强氧化的过程中引入羟基、环氧基和羧基含氧功能性基团。

二、构建了镍离子配位氧化石墨烯新型载体 (GO-Ni), 用于甲酸脱氢酶 (FDH) 固定化。与氧化石墨烯 (GO) 直接吸附相比, 载体 GO-Ni 的酶负载能力提高了 5.2 倍, 固定化酶 GO-FDH 和 GO-Ni-FDH 的酶活回收率分别为 73.3% 和 86.7%。在 60°C 下温育 3 h, GO-FDH 和 GO-Ni-FDH 的相对酶活为 18.2% 和 40.9%, 而游离 FDH 剩余酶活仅为 2.78%, 固定化酶的热稳定性得到明显提高。且 GO-Ni-FDH 呈现更好的储藏稳定性和重复利用稳定性, 在 4°C 的条件下储藏 20 天后, 相对酶活为 31.4%, 经过 8 次的重复使用之后, 其相对酶活为 63.8%。利用圆二色谱和扫描电子显微镜对固定化酶的二级空间结构和形态进行表征和分析。固定化过程中, 蛋白酶的二级结构发生了改变, 载体 GO-Ni 与 FDH 之间存在着多层次多用力, 可形成规则的晶体结构。

三、构建了支链聚乙烯亚胺接枝氧化石墨烯载体 (GO-PEI), 用于固定化甲

酸脱氢酶。相对于 GO, 载体 GO-PEI 的酶负载能力提高了 2.4 倍, 与 FDH 和 GO-FDH 相比, 固定化酶 GO-PEI-FDH 的热稳定性、储藏稳定性和重复使用稳定性增强。在 4℃ 条件下储藏 20 天后, GO-PEI-FDH 的相对酶活为 24.9%, 经过 8 次的重复使用后, 其相对酶活为 47.4%。利用圆二色谱和扫描电子显微镜对 GO-PEI-FDH 进行表征和分析, 考察了其固定化机理, 发现静电相互作用是酶固定化的主要作用力。

四、运用化学还原的方法对氧化石墨烯进行还原, 得到还原时间为 2 h、4 h、6 h 和 12 h 的还原氧化石墨烯 CRGO-2、CRGO-4、CRGO-6 和 CRGO-12, 比较不同还原时间对于 CRGO 载酶能力的影响, 发现还原时间越长, 还原程度越大, 蛋白负载能力增强, 分别为 0.278、0.362、0.521 和 0.587 mg/mg。固定化酶 CRGO-2-FDH、CRGO-4-FDH、CRGO-6-FDH 和 CRGO-12-FDH 的酶活回收率分别为 88.6%、90.2%、90.3% 和 90.6%。相对于固定化酶 GO-FDH, CRGO-12-FDH 显现更好的热稳定性和重复使用稳定性, 在 60℃ 温育 3 h 后, 剩余酶活为 20.8%, 经过 8 次的重复利用, 相对酶活为 70.4%。利用圆二色谱和扫描电子显微镜对 CRGO-12-FDH 进行表征和分析。

五、用氧化石墨烯固定化苯丙氨酸脱氢酶 (PheDH), GO 改变了 PheDH 的最适反应 pH 和最适反应温度。固定化酶 GO-PheDH 的酶活回收率为 75.8%, 经过 8 次的重复反应后, 剩余酶活为 13.2%。初步探究氧化石墨烯材料对苯丙氨酸脱氢酶的适用性。

关键词: 甲酸脱氢酶; 固定化; 氧化石墨烯; 聚乙烯亚胺; 苯丙氨酸脱氢酶

Abstract

Oxidoreductase is one of the most important biocatalysts, which can catalyze reactions with high efficiency and stereoselectivity in mild conditions, but the expensive cofactor is an indispensable part of the reactions. Formate dehydrogenase (FDH) is suitable for the regeneration of cofactor NADH. It has many advantages, namely, favorable thermodynamic equilibrium, the inertness of the substrate and reaction product (CO_2) which can be removed easily from the main product of the reactions. Phenylalanine dehydrogenase (PheDH) can be used in the detection of phenylketonuria (PKU) as well as the production of chiral amino acid by coupling with FDH.

Graphene oxide (GO) has a unique planar structure with hydroxyl, epoxy, and carboxyl groups distributed on the basal and edge of the plane. GO is an ideal immobilization support for enzymes because of its large surface area and good biocompatibility. In this work, we constructed different scaffolds based on graphene oxide derivatives to immobilize oxidoreductase. The details in this study are summarized as follows:

Firstly, graphene oxide was prepared by the Modified Hummers Method, and was characterized by XRD, UV-Vis, FT-IR, and fluorescence spectra. The results showed that the process of strong oxidation introduced functional groups including hydroxyl, epoxy, and carboxyl.

Secondly, nickel-coordinated graphene oxide composites (GO-Ni) were prepared as a novel supporter for formate dehydrogenase immobilization. Compared with GO, the loading capacity of GO-Ni increased by 5.2 folds. The relative enzyme activity of GO-FDH and GO-Ni-FDH is 73.3% and 86.7%, respectively. The immobilized enzyme showed good thermal stability, the activity of GO-FDH and GO-Ni-FDH remained 18.2% and 40.9% after 3 h at 60°C , respectively, while FDH remained 2.78%. GO-Ni-FDH exhibited a better storage stability, which showed 31.4% relative activity after 20 days' storage at 4°C . After eight times of use, GO-Ni-FDH

maintained 63.8% activity. Moreover, circular dichroism (CD) and SEM were used to analyze the structure and morphology of immobilized enzyme. The structure of enzyme changed in the process of immobilization, GO-Ni-FDH formed uniform crystal structure because of the multi-layer interactions between GO-Ni and FDH.

Thirdly, branched polyethyleneimine (PEI) grafting graphene oxide was applied as a functional material for formate dehydrogenase immobilization. Compared to GO, the enzyme loading capacity of GO-PEI was enhanced by 2.4 folds. The relative activity of immobilized enzyme GO-PEI-FDH remained about 24.9% after 20 days storage at 4°C. After eight times reaction, the residue activity was 47.4%. The mechanism of GO-PEI immobilization was studied, in which electrostatic interaction plays an important role.

Fourthly, CRGO was prepared by reducing GO with L-ascorbic acid (L-AA). The reduction degree of the CRGO was controlled by the reaction time. The loading capacity of CRGO-2, CRGO-4, CRGO-6 and CRGO-12 is 0.278, 0.362, 0.521 and 0.587 mg/mg, respectively, and the relative activity of immobilized enzyme CRGO-2-FDH, CRGO-4-FDH, CRGO-6-FDH and CRGO-12-FDH is 88.6%, 90.2%, 90.3% and 90.6% , respectively. Compared with GO-FDH, CRGO-12-FDH exhibited better thermostability and reusability. The enzyme activity CRGO-12-FDH remained 20.8% after 3 h at 60°C. After eight times use, CRGO-12-FDH maintained 70.4% activity. Moreover, circular dichroism (CD) and SEM were used to analyze the structure of immobilized enzyme.

Finally, graphene oxide was used for phenylalanine dehydrogenase immobilization by adsorption, the optimum pH and temperature of PheDH changed in the process of immobilization. The relative enzyme activity of GO-PheDH is 75.8%, after 8 times use, the activity remained 13.2%. Explore the possibility of PheDH immobilization based on graphene oxide materials.

Key Words: Formate Dehydrogenase; Immobilization; Graphene Oxide ; Polyethyleneimine; Phenylalanine Dehydrogenase

目 录

第一章 绪论	1
1.1 氧化还原酶	1
1.1.1 甲酸脱氢酶.....	2
1.1.2 苯丙酸脱氢酶.....	4
1.2 酶的固定化	5
1.2.1 固定化酶的应用.....	5
1.2.2 固定化载体.....	6
1.2.3 固定化方法.....	6
1.3 石墨烯纳米材料	8
1.3.1 石墨烯.....	8
1.3.2 氧化石墨烯.....	9
1.3.3 氧化石墨烯的功能化.....	10
1.4 基于氧化石墨烯材料的酶固定化	12
1.4.1 固定化机制.....	12
1.4.2 应用与挑战.....	13
1.5 本课题思路与研究内容	13
第二章 镍离子配位氧化石墨烯固定化甲酸脱氢酶	15
2.1 引言	15
2.2 实验材料	16
2.2.1 主要仪器.....	16
2.2.2 主要试剂与缓冲液.....	17
2.3 实验方法	20
2.3.1 氧化石墨烯 GO 的制备.....	20
2.3.2 氧化石墨烯的表征.....	20
2.3.3 甲酸脱氢酶的制备.....	21
2.3.4 固定化酶 GO-Ni-FDH 制备	24

2.4 结果与讨论	28
2.4.1 GO 晶体衍射	28
2.4.2 GO 紫外-可见光谱	29
2.4.3 GO 红外光谱	29
2.4.4 GO 荧光光谱	30
2.4.5 FDH 凝胶电泳	31
2.4.6 金属离子对 FDH 酶活的影响	32
2.4.7 GO 吸附金属离子能力	33
2.4.8 GO-Ni 负载能力	34
2.4.9 酶活回收率	35
2.4.10 最适反应 pH	35
2.4.11 最适反应温度	36
2.4.12 温度稳定性	37
2.4.13 储藏稳定性	38
2.4.14 重复利用稳定性	39
2.4.15 耐有机溶剂稳定性	40
2.4.16 动力学参数	42
2.4.17 圆二色谱	44
2.4.18 SEM 表征	45
2.5 本章小结	46
第三章 聚乙烯亚胺接枝氧化石墨烯固定化甲酸脱氢酶	47
3.1 引言	47
3.2 实验材料	48
3.2.1 主要仪器	48
3.2.2 主要试剂与缓冲液	48
3.3 实验方法	48
3.3.1 载体 GO-PEI 的制备	48
3.3.2 固定化酶 GO-PEI-FDH 的制备	48
3.3.3 载体负载能力测定	49

3.3.4 反应体系和酶活测定.....	49
3.3.5 最适反应温度.....	49
3.3.6 最适反应 pH.....	49
3.3.7 动力学参数.....	50
3.4 结果与讨论	50
3.4.1 GO-PEI 负载能力	50
3.4.2 酶活回收率.....	50
3.4.3 最适反应 pH.....	51
3.4.4 最适反应温度.....	52
3.4.5 温度稳定性.....	53
3.4.6 储藏稳定性.....	54
3.4.7 重复利用稳定性.....	55
3.4.8 动力学参数.....	56
3.4.9 圆二色谱.....	57
3.4.10 SEM 表征	58
3.5 本章小结	59
第四章 还原氧化石墨烯固定化甲酸脱氢酶.....	60
4.1 引言	60
4.2 实验材料	61
4.2.1 主要仪器.....	61
4.2.2 主要试剂与缓冲液.....	61
4.3 实验方法	61
4.3.1 载体 CRGO 的制备	61
4.3.2 固定化酶 CRGO-FDH 制备	62
4.3.3 载体负载能力测定.....	62
4.3.4 反应体系和酶活测定.....	62
4.3.5 最适反应温度.....	62
4.3.6 最适反应 pH.....	62
4.3.7 动力学参数.....	62

4.4 结果与讨论	62
4.4.1 载体 CRGO 负载能力	62
4.4.2 pH 对 CRGO 载酶量的影响.....	63
4.4.3 酶活回收率.....	64
4.4.4 温度稳定性.....	65
4.4.5 重复利用稳定性.....	66
4.4.6 动力学参数.....	67
4.4.7 圆二色谱.....	68
4.4.8 SEM 表征	69
4.5 本章小结	70
第五章 氧化石墨烯固定化苯丙氨酸脱氢酶	71
5.1 引言	71
5.2 实验材料	71
5.2.1 主要仪器.....	71
5.2.2 主要试剂与缓冲液.....	71
5.3 实验方法	71
5.3.1 苯丙氨酸脱氢酶的制备.....	71
5.3.2 固定化酶 GO-PheDH 的制备.....	71
5.3.3 反应体系和酶活测定.....	72
5.3.4 最适反应温度.....	72
5.3.5 最适反应 pH.....	72
5.4 结果与讨论	72
5.4.1 酶活回收率.....	72
5.4.2 最适反应 pH.....	73
5.4.3 最适反应温度.....	74
5.4.4 重复使用稳定性.....	74
5.5 本章小结	75
第六章 总结与展望	77
6.1 结论	77

6.2 特色和创新点	78
6.3 展望	78
参考文献	80
在读期间发表论文	88
致 谢	90

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 Oxidoreductase	1
1.1.1 Formate dehydrogenase	2
1.1.2 Phenylalanine dehydrogenase	4
1.2 Enzyme immobilization	5
1.2.1 The application of immobilized enzyme.....	5
1.2.2 Immobilization carriers	6
1.2.3 Methods of immobilization.....	6
1.3 Graphene-based materials	8
1.3.1 Graphene	8
1.3.2 Graphene oxide	9
1.3.3 Functionalization of graphene oxide.....	10
1.4 Enzyme immobilization based on GO	12
1.4.1 Immobilization mechanism.....	10
1.4.2 Application and challenge.....	10
1.5 Contents of the thesis	13
Chapter 2 Nickel-coordinated graphene oxide for FDH immobilization	15
2.1 Introduction	15
2.2 Materials	16
2.2.1 Main instruments	16
2.2.2 Main reagents.....	17
2.3 Methods	20
2.3.1 Preparation of GO	20
2.3.2 Characterization of GO	20
2.3.3 Preparation of FDH.....	21
2.3.4 Preparation of GO-Ni-FDH	24

2.4 Results and discussion	28
2.4.1 XRD of GO	28
2.4.2 UV-Vis of GO	29
2.4.3 FT-IR of GO	29
2.4.4 Fluorescence spectra of GO	30
2.4.5 SDS-PAGE of FDH	31
2.4.6 The effect of metal ions on FDH	32
2.4.7 Metal ions adsorption ability of GO	33
2.4.8 Loading capacity of GO-Ni	34
2.4.9 Recovery of enzyme activity	35
2.4.10 Optimum pH	35
2.4.11 Optimum temperature	36
2.4.12 Thermostability	37
2.4.13 Storage stability	38
2.4.14 Reuse stability	39
2.4.15 Tolerance of organic solvents.....	40
2.4.16 Kinetic parameters	42
2.4.17 Circular dichroism	44
2.4.18 SEM	45
2.5 Summary	46
Chapter 3 Polyethyleneimine grafted graphene oxide for FDH immobilization ..	47
3.1 Introduction	47
3.2 Materials	48
3.2.1 Main instruments	48
3.2.2 Main reagents.....	48
3.3 Methods	48
3.3.1 Preparation of GO-PEI.....	48
3.3.2 Preparation of GO-PEI-FDH	48
3.3.3 Loading capacity of GO-PEI	49
3.3.4 Enzyme assay.....	49

3.3.5 Optimum temperature	49
3.3.6 Optimum pH	49
3.3.7 Kinetic parameters	50
3.4 Results and discussions	50
3.4.1 Loading capacity of GO-PEI	50
3.4.2 Recovery of enzyme activity.....	50
3.4.3 Optimum pH	51
3.4.4 Optimum temperature	52
3.4.5 Thermostability	53
3.4.6 Storage stability.....	54
3.4.7 Reuse stability	55
3.4.8 Kinetic parameters	56
3.4.9 Circular dichroism.....	57
3.4.10 SEM	58
3.5 Summary.....	59
Chapter 4 FDH immobilization based on chemically reduced graphene oxide ...	60
4.1 Introduction.....	60
4.2 Materials	61
4.2.1 Main instruments.....	61
4.2.2 Main reagents.....	61
4.3 Methods.....	61
4.3.1 Preparation of CRGO	61
4.3.2 Preparation of CRGO-FDH	62
4.3.3 Loading capacity of CRGO	62
4.3.4 Enzyme assay.....	62
4.3.5 Optimum temperature	62
4.3.6 Optimum pH	62
4.3.7 Kinetic parameters	62
4. 4 Results and discussions.....	62
4.4.1 Loading capacity of CRGO	62

4.4.2 The effect of pH on loading capacity of CRGO	63
4.4.3 Recovery of enzyme activity.....	64
4.4.4 Thermostability	65
4.4.5 Reuse stability	66
4.4.6 Kinetic parameters	67
4.4.7 Circular dichroism.....	68
4.4.8 SEM	69
4.5 Summary.....	70
Chapter 5 Phenylalanine dehydrogenase immobilization on GO	71
5.1 Introduction.....	71
5.2 Materials	71
5.2.1 Main instruments	71
5.2.2 Main reagents.....	71
5.3 Methods.....	71
5.3.1 Preparation of PheDH	71
5.3.2 Preparation of GO-PheDH.....	71
5.3.3 Enzyme assay.....	72
5.3.4 Optimum temperature	72
5.3.5 Optimum pH	72
5.4 Results and discussions	72
5.4.1 Recovery of enzyme activity.....	72
5.4.2 Optimum pH	73
5.4.3 Optimum temperature	74
5.4.4 Reuse stability	74
5.5 Summary.....	75
Chapter 6 Conclusions and prospects	77
6.1 Conclusions.....	77
6.2 Inovations.....	78
6.2 Future prospects.....	78
Reference	80

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库