

磁性固定化辣根过氧化物酶脱除玉米赤霉烯酮的研究

屈岩峰^{1,2,3,4}, 于殿宇^{2*}

¹哈尔滨学院 哈尔滨 150086

²东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030

³九三粮油工业集团有限公司 哈尔滨 150090

⁴屈岩峰高技能人才(劳模)创新工作室 哈尔滨 150086)

摘要 本文制备了磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH}$ 复合载体作为固定化载体,共价固定辣根过氧化物酶(HRP),应用于玉米赤霉烯酮(ZEN)的降解。利用傅里叶红外光谱、X-射线衍射分析、扫描电镜等表征方法对固定化 HRP 进行表征,验证了 HRP 被成功固定在载体上。制备的纳米级载体 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH}$ 具有均匀的尺寸和形状,良好的分散性和较强的磁性,饱和磁化值为 25.80 emu/g,平均粒径为 103.15 nm。与游离酶相比,固定化 HRP 具有更高的耐酸碱性和热稳定性,最适 pH 值从 6.5 提高到 7.0,最适温度从 30 ℃提升到 35 ℃。将磁性固定化 HRP 应用于 ZEN 降解,利用单因素实验,探究反应温度、过氧化氢浓度、溶液 pH 值和反应时间与 ZEN 降解率的关系。结果表明:在反应温度 35 ℃,过氧化氢浓度 26 mmol/L,溶液 pH 7.0,反应时间 480 min 条件下,ZEN 的脱除效率为 68%,固定化 HRP 具有良好的重复使用性,循环 5 次后相对酶活力仍保持在 79.85%以上。研究表明磁性固定化 HRP 对 ZEN 具有良好的降解能力。

关键词 辣根过氧化物酶; 磁性固定化; 玉米赤霉烯酮; 脱除效率; 重复使用

文章编号 1009-7848(2023)07-0229-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.024

玉米赤霉烯酮(ZEN)是一种著名的 F_2 毒素,由镰刀菌产生^[1-2],主要污染玉米、小麦、大麦、燕麦等谷物及其制品,是世界上分布最广泛的霉菌毒素之一^[3-5],不仅影响食品安全,而且在食物链中积累,对动物甚至人类造成严重伤害^[6-7]。

目前 ZEN 的脱除方法主要有物理^[8]、化学^[9]和生物法^[10],以削除或削弱其中毒性。然而,物理和化学方法具有选择性弱、成本高、不可回收等缺点^[11]。生物酶法由于具有低毒、高效的优点,因此过氧化物酶如辣根过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶的氧化降解被认为是一种潜在环保的方法^[12]。辣根过氧化物酶(HRP)是一种血红素酶,具有易得和高比活性的优点,在过氧化氢作用下,能够催化氧化多种化合物^[13],如芳香胺化合物、酚类化合物、吡啶类和有毒物质的催化氧化^[14]。Sabrina 等^[15]利用从米糠中提取并纯化的辣根过氧化物酶,成

功应用于呕吐毒素的降解。然而,游离酶具有在高温和强酸碱条件下容易失活,重复使用性低,应用条件苛刻等问题,严重制约了其广泛使用。

固定化是克服以上问题的常用方法。近几年,酶的固定化被广泛应用于生物催化中,酶经过固定化后,有效提高了酶的热稳定性和重复使用性,拓宽了 pH 使用范围。Mirjana 等^[16]将辣根过氧化物酶固定在生物炭上,用于去除水中的苯酚,洗涤 4 次后,辣根过氧化物酶的活性保持在 79%以上。二氧化硅因较小的扩散限制,较高的单位质量表面积和酶负载能力,故常作为固定化酶的载体^[17]。近期,具有核壳结构的磁性纳米粒子被广泛作为载体并应用于生物催化剂。磁性载体具有超顺磁性,磁响应强,毒性低等优势,可实现快速分离和回收。Reza 等^[18]将漆酶共价固定在核壳结构的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$,并将其作为高效非均相催化剂,成功应用于芝麻油中酚类物质的生物降解,降解效率为 74.5%。

磁性纳米粒子在长期使用过程中可能会发生聚集或沉淀,可以通过修饰表面的化学基团的方法来提高其生物相容性和化学稳定性。一种有效的方法是用亲水聚合物,如聚丙烯酸、聚酰胺酸和

收稿日期: 2022-07-09

基金项目: 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2020ZX08B01); 哈尔滨市科技计划自筹经费项目(2022ZCZJCG033)

第一作者: 屈岩峰,男,博士,副教授

通信作者: 于殿宇 E-mail: dyu2000@126.com

超支链聚甘油(HPG)改性到纳米粒子表面。HPG是具有高度支化结构的高分子材料,属于第4代生物相容性聚合物,含有大量的活性羟基,良好的水溶性和易用性^[19]。近几年,羧基化磁性载体被广泛应用于酶的固定化,羧基可与酶上的氨基共价结合,解决了传统固定化方法的固定化位点随机,固定化后酶活性大幅降低的问题。Kazenwadel等^[20]将葡萄糖氧化酶的-NH₂定向固定化在经过EDC活化的磁性载体上,制备的定向固定化酶相对酶活力比非定向固定化酶高36%。

本试验将制备的Fe₃O₄-SiO₂-HPG-COOH作为载体,并将HRP共价固定在磁性纳米颗粒上,对固定化酶进行表征分析,应用于ZEN的降解,并测试固定化HRP的稳定性和重复使用性,以ZEN降解效率为指标,研究固定化HRP对模型溶液中ZEN的降解作用。利用单因素实验确定反应温度、溶液pH值、过氧化氢浓度、反应时间等最佳条件,为连续性去除ZEN提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辣根过氧化物酶(HRP,酶代码EC 1.11.1.7,酶活性>300 units/mg),上海麦克林生化科技有限公司;ZEN标准品(纯度>99%)、缩水甘油、愈创木酚、乙二醇、FeCl₃·6H₂O、FeCl₂·4H₂O、丁二酸酐、H₂O₂(30%),甲醇钾(CH₃OK),氨水(NH₃·H₂O),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),美国Sigma-Aldrich公司;乙腈(色谱级),甲醇(色谱级),氯仿(色谱级),其它化学试剂均为分析纯级,无需进一步纯化即可使用。

1.2 仪器与设备

AXTD5A型台式离心机,盐城市安信实验仪器有限公司;MixPlus型旋涡震荡器,合肥艾本森科学仪器有限公司;SB25-12DT型超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司;MTN-28000D型氮吹浓缩装置,天津奥德赛恩斯仪器有限公司;TQZ-312型恒温振荡培养箱,上海精宏有限公司;Agilent-7104型高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;F-7100型荧光检测器,日本日立公司;BRUKERTENSOR-27型红外光谱仪,德国布鲁克公司;JSM-6610型扫描电子显微镜,日本岛津公

司;NANOPHOX型振动样品磁强计,美国MicroSense公司;Siemens D5005型X射线衍射仪,美国FEI公司;CJB-DS型数显定时磁力搅拌器,郑州南北仪器设备有限公司;HYL-1076型激光粒度分布仪,丹东市皓宇科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 Fe₃O₄-SiO₂的HPG活化与羧基修饰 按照Deng等^[21]的方法制备Fe₃O₄-SiO₂磁性纳米粒子,并稍作修改。将Fe₃O₄-SiO₂进行HPG活化,具体步骤如下:将0.1 g Fe₃O₄-SiO₂加入30 μL CH₃OK和2.5 mL二甲基酰胺溶液中,在50℃,100 r/min条件下搅拌反应1 h,加入10 mL无水二氧六环,于95℃反应,然后缓慢向溶液中滴加2.0 g缩水甘油,并将混合物保持搅拌4 h,加入甲醇分散,利用磁铁分离,用甲醇反复冲洗,得到的固体颗粒在真空烘箱中干燥12 h。接着用琥珀酸酐修饰Fe₃O₄-SiO₂-HPG,将0.1 g Fe₃O₄-SiO₂-HPG加入100 mg三乙胺和10 mL二甲基甲酰胺混合溶液中,加入70 mL丁二酸酐,将该混合体系在氮气气氛及黑暗中搅拌5 h。随后,通过施加外部磁铁收集产物,并用甲醇冲洗3次。固体物质在真空干燥箱中干燥12 h^[22]。

1.3.2 辣根过氧化物酶的固定化 取1 g上述制备好的载体在50 mL PBS缓冲溶液(100 mmol/L)中浸泡24 h,磁分离后,缓慢加入25 mg/mL的EDC,在温度50℃,转速为100 r/min的条件下搅拌2 h。再加入400 U/mL HRP溶液。随后以50 r/min的转速在45℃下搅拌,反应5 h后,利用磁铁分离收集纳米颗粒。用磷酸盐缓冲溶液洗涤固定化HRP除去未结合的酶,得到的固定化酶在4℃条件下贮藏备用。

1.3.3 载体表征方法

1.3.3.1 扫描电子显微镜(SEM) 参考苏鹏飞等^[23]的方法。取适量样品粉末,经过冻干后分散在导电胶上,经过真空条件对样品进行镀金处理,利用日本岛津公司生产的JSM-6610进行扫描电镜观察磁性样品固定化前、后的形貌变化。

1.3.3.2 傅里叶红外光谱分析(FTIR) 参考Fang等^[24]的方法使用蒸馏水洗涤样品,放在55℃真空干燥箱中干燥至恒重,使用研钵将干燥后的200 mg KBr粉末和2 mg上述制备的样品(200℃下脱

水处理 24 h)混合研磨均匀,在 10 kPa 的压力下将其制成 1 mm 厚,直径为 13 mm 的透明薄片,使用红外光谱仪在室温(25 ℃)条件下,于 400~4 000 cm^{-1} 波长范围内扫描 32 次收集样品光谱信息。

1.3.3.3 X-射线衍射分析(XRD) 参照马云辉等^[25]的方法预先将样品在 55 ℃真空烘干至恒重,研磨 100 mg 样品制成粉末后压成平面,X 射线衍射仪在 Cu 靶,Ni 滤波,Si-Li 探测器,40 kV×40 mA,扫描范围:15~80°,扫描速度:2°/min,测试制得的磁性载体和磁酶颗粒内分子排列结构。

1.3.3.4 粒径分析 参照 Xia 等^[26]的方法,取适量上述制备的样品放在容器中,使用乙醇作为分散剂,超声 10 min 进行分散,将分散均匀的样品放入激光衍射仪中进行检测。

1.3.3.5 磁性能 参照李梅基^[27]的方法,将上述制备的磁性载体和磁性固定化酶以比饱和磁化强度作为磁强度检测的指标,分析样品的磁性能。热封住一段 7 mm 带棉签的塑料管的一端,将样品压实在其中,用棉花将另一端塞住。通过振荡样品磁强计进行测定。

1.3.4 酶活力的测定 按照 Tonami 等^[28]的方法测定辣根过氧化物酶的催化活性,并计算酶的相对活性。用紫外可见分光光度计在波长 510 nm 处测定酶活性。一个酶活力单位表示为:30 ℃时 1 min 催化氧化 1 μmol 愈创木酚所消耗的酶量。

$$\text{酶的相对活性}(\%) = \frac{\text{固定化酶的酶活力}}{\text{游离酶的酶活力}} \times$$

100 (1)

1.3.5 酶学特性的研究 研究了不同温度和 pH 值条件下游离酶和固定化酶活性的差异。以温度为影响因素,在最适 pH 值的条件下,将游离酶和固定化酶分别在不同温度下(20,30,40,50,60 ℃)贮藏 1 h。溶剂为磷酸盐缓冲溶液(100 mmol/L, pH 7.0),得到了不同温度下酶活性的效应曲线;以 pH 值为影响因素,在最适温度下,在不同 pH 值(4~8)的磷酸盐缓冲液(100 mmol/L)中进行酶活性试验,得到不同 pH 值下酶活性的效应曲线。

1.3.6 固定化酶降解 ZEN 的单因素实验 首先用乙腈制备质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ZEN 作为储备溶液。然后用乙腈梯度稀释至一定浓度,在-20 ℃避光保存。为实现 ZEN 的高效降解,对反

应条件(反应温度、溶液 pH 值、过氧化氢浓度、反应时间)进行优化。具体操作如下:将磷酸盐缓冲液(100 mmol/L)、水和一定浓度的过氧化氢组成模型溶液,将 ZEN 标准溶液在氮气气氛中蒸发溶剂,然后与模型溶液涡旋搅拌 30 s 并超声 3 min 使其完全溶解,搅拌后加入 0.6 U/mL 的固定化酶。将模型溶液置于 TQZ-312 型恒温振荡培养箱中,在 150 r/min 的轨道搅拌下反应,分别选取反应温度 25,30,35,40,45 ℃,过氧化氢浓度 13,26,39,52,65 mmol/L,溶液 pH 值 4.0,5.0,6.0,7.0,7.5,反应时间 0,30,60,90,120,150,210,320,480,1 440 min,研究对 ZEN 降解率的影响。

反应结束后通过磁铁分离固定化酶来终止反应,用 0.5 mL 氯仿加入到 1 mL 样品中,并涡旋搅拌 2 min,用氯仿重复萃取 3 次,每次收集有机相。然后超声 20 min,将样品中的氯仿用氮吹仪吹干,并用 1 mL 乙腈复溶,经过 0.45 μm 有机滤膜过滤,溶液通过高效液相色谱荧光检测器(HPLC-FL)进行检测和定量。测定不同条件下 ZEN 的降解率,所有试验重复 3 次。

ZEN 的脱除效率 $E(\%)$ 通过公式(2)计算:

$$E(\%) = \frac{Z_i}{Z_f} \times 100 \quad (2)$$

式中, Z_i ——反应溶液中 ZEN 的初始质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); Z_f ——反应溶液 ZEN 的最终质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.3.7 ZEN 检测和方法验证 ZEN 含量测定参考《食品安全国家标准-食品中玉米赤霉烯酮的测定》(GB 5009.209-2016)^[29]并稍作修改,利用 HPLC-FL 测定样品中 ZEN 含量。

色谱条件:色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 柱,柱长 100 mm×4.6 mm;流动相:乙腈:甲醇:水(46:46:8,V/V);流动相流速:1 mL/min;进样量:10 μL ,柱温:35 ℃;运行时间:7 min;荧光检测器的激发波长:270 nm,发射波长:455 nm。ZEN 测定的验证参数为线性度、分析曲线、相关系数、检测限(LD)、定量限(LQ)和精度。

1.3.8 固定化酶的可重复使用性 为考察固定化酶的可重复性,对酶活性进行 7 次重复测定。每次借助外部磁铁得到固定化酶,然后用去离子水和磷酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0)洗涤 3 次,以

去除反应中留下的溶液,根据上述最佳方法测量酶活性。

1.4 数据统计分析

所有试验一式三份,结果表示为“平均值±标准偏差”。数据采用 Origin 2018 进行分析和绘制。使用 SPSS 26.0 进行方差分析,并进行 Duncan's test ($P < 0.05$) 以评估数据差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 纳米复合材料的表征

2.1.1 FTIR 分析 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH-HRP}$ 、HRP 的傅里叶红外光谱如图 1 所示, 575 cm^{-1} 处的谱带对应于 Fe_3O_4 中 Fe-O 的伸缩振动, 3420 cm^{-1} 处为 -OH 的吸收峰,证明 Fe_3O_4 组分存在,这和 Feng 等^[30]的研究一致。 799 cm^{-1} 和 1089 cm^{-1} 处分别为 Si-OH 和 Si-O-Si 的对称和不对称伸缩振动吸收峰,说明 SiO_2 包覆良好。经过超支化聚合后,曲线 (b) 中 2860 cm^{-1} 和 2927 cm^{-1} 处出现了 HPG 的亚甲基的吸收峰,证明 HPG 已成功改性。并且在 1730 cm^{-1} 处出现了羧基中 C=O 的吸收峰,证明羧基已经成功修饰到载体表面。

曲线 (d) 中 2959 cm^{-1} 处的条带代表了 HRP-NH₂ 的拉伸振动。在 1655 cm^{-1} 和 1310 cm^{-1} 处的特征峰与酰胺 I 和酰胺 II 振动的拉伸带有关。辣根过氧化物酶固定在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH}$ 后,曲线 (c) 在 1393 cm^{-1} 处出现较弱的酰胺特征峰,表明 HRP 成功固定在载体上,这和 Basem 等^[31]的研究一致。

2.1.2 XRD 分析 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH-HRP}$ 的 XRD 谱如图 2 所示。3 种纳米粒子的衍射峰位置和强度结果都与粉末衍射标准联合委员会数据库 (JCPDS-19-0629) 的标准数据相一致,分别在 30° 、 36° 、 42.5° 、 53.5° 、 57.3° 、 62.7° 出现尖锐的特征峰。该现象证明 3 种磁性纳米粒子均含有 Fe_3O_4 。同时也表明在包覆 SiO_2 、改性及固定化 HRP 的过程中,纳米粒子的晶型依然保持稳定,然而由于改性剂和酶涂层具有一定厚度,样品的结晶度略有降低^[32]。

2.1.3 SEM 分析 如图 3a 所示,合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}$

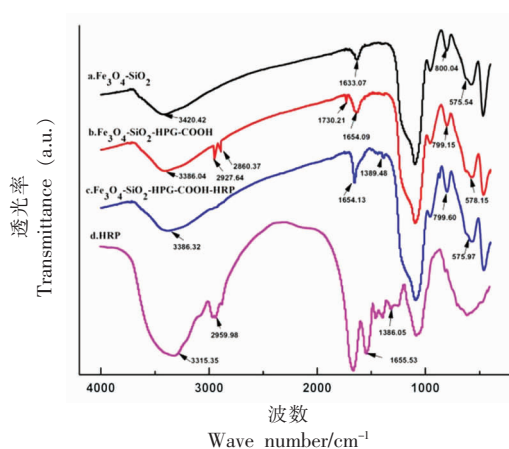


图 1 样品的 FTIR 光谱图像

Fig.1 The FTIR spectra of the samples

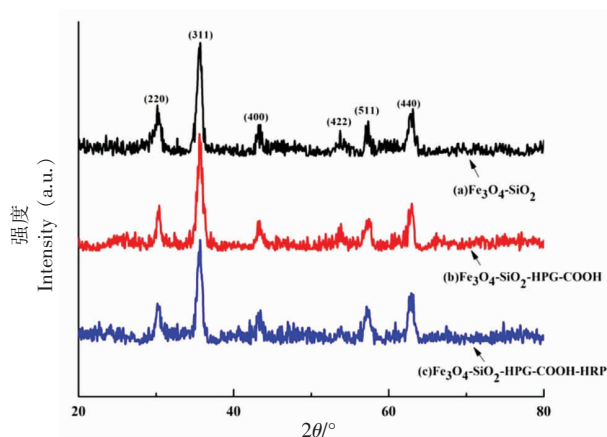
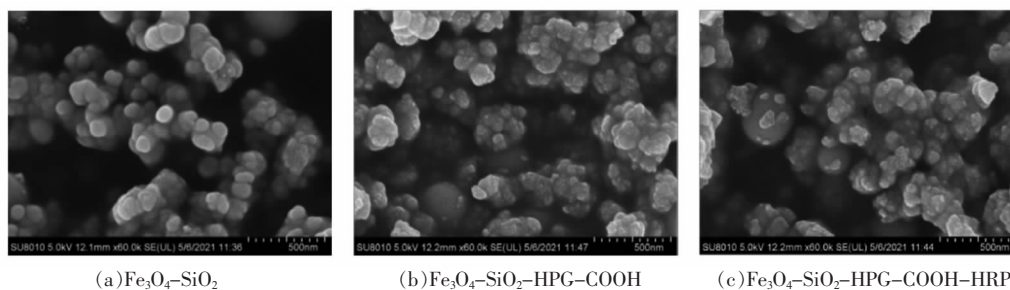


图 2 样品的 XRD 图

Fig.2 XRD images of the samples

SiO_2 纳米粒子为球形,粒径一般在 $90\sim 120\text{ nm}$ 左右,表面较为光滑,分散性略差,这与二氧化硅表面存在羟基有关,羟基之间的氢键作用降低了纳米粒子之间的分散性。图 3b 为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH}$ 载体的表面形态,从图中可以看出载体分散情况较好,有少数团聚现象,这可能是由于磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH}$ 复合载体表面引入了羧基;具有较为均一的粒径,载体表面较为粗糙且凹凸不平,磁性载体的表面积增大,有利于固定化。由图 3c 所示,HRP 经固定化后部分发生团聚^[33],这可能是由于固定化过程中载体与酶的交联作用,而整体仍保持良好的分散性,有利于固定化酶和底物发生反应。

2.1.4 磁性能 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 、磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-}$



(a)Fe₃O₄-SiO₂

(b)Fe₃O₄-SiO₂-HPG-COOH

(c)Fe₃O₄-SiO₂-HPG-COOH-HRP

图 3 样品的 SEM 图像

Fig.3 SEM images of the samples

HPG-COOH 复合载体、磁性固定化 HRP 的磁性性能如图 4 所示,Fe₃O₄-SiO₂ 的饱和磁强度为 (31.70±0.60)emu/g,而磁性复合 Fe₃O₄-SiO₂-HPG-COOH 载体和磁性固定化 HRP 的饱和磁强度分别为 (25.80±0.60)emu/g 和 (24.60±0.80)emu/g。3 种磁性纳米颗粒剩磁和矫顽力均为 0,磁滞回归线呈现“S”型,符合闭合的特征均具有超顺磁性^[34]。结果表明 Fe₃O₄-SiO₂ 经过改性和固定化 HRP 后,其饱和磁化值略有降低,而负载酶后仍可以在外加磁场下被很好的磁化,在反应体系中均可以被快速而简单的分离出来。

2.1.5 粒径分析 磁性复合载体和磁性固定化 HRP 的粒径测定结果如图 5 所示。由图 5a 可知,磁性 Fe₃O₄-SiO₂-HPG-COOH 复合载体平均粒径为 (103.15±1.90)nm,分布范围为 79.40~118.88 nm,粒径均较小,且分布范围较窄,较小的粒径有利于提高固定化酶的比表面积,有利于酶和底物的接触,促进反应的进行^[35]。由图 5b 可知,磁性固定化 HRP 的粒径分布是均匀的,粒径分布范围为

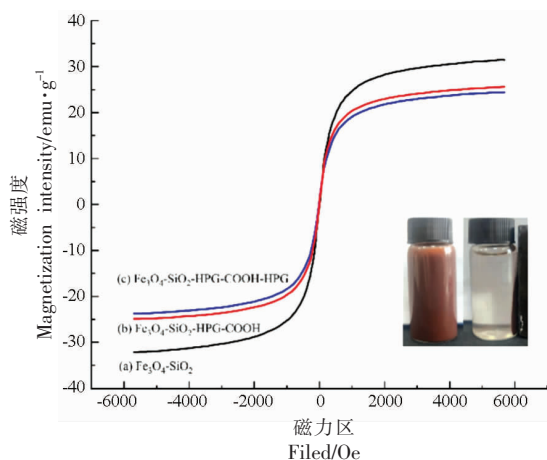


图 4 样品的磁性性能分析

Fig.4 Analysis of magnetic properties of samples

93.02~131.03 nm,平均粒径为 (109.20±1.10)nm。酶经固定化后平均粒径增大,粒径分布也向右移动,粒径变化表明 HRP 已经成功负载到磁性载体上。

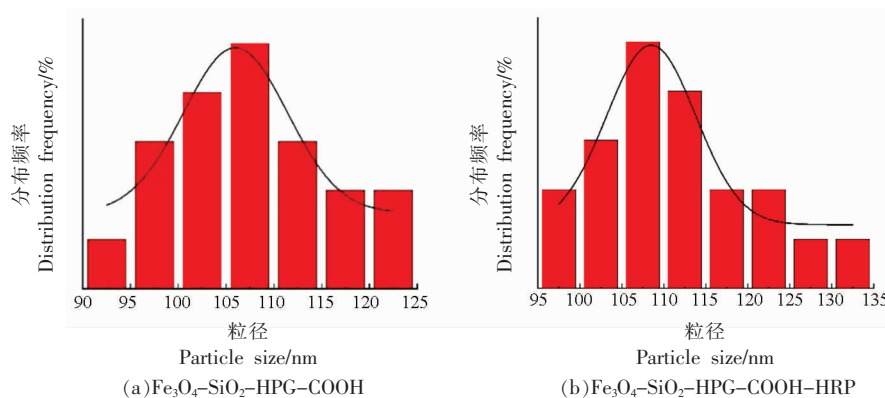


图 5 样品的粒径分析

Fig.5 Particle size analysis of samples

2.2 酶学性质分析

2.2.1 最适温度 温度对游离和固定化酶活性的影响如图6所示。游离酶的最适温度为30℃,经固定化后温度转移到35℃,酶是一种蛋白质,高温可导致酶失活。从图中可知,当温度超过30℃时,游离HRP的活性急剧下降,而固定化HRP的活性则缓慢下降。固定化HRP的最适温度较游离酶高,主要是由于酶与磁性载体共价结合后,降低了HRP分子的运动活性,以及构象的自由变化^[36],因此固定化酶比游离酶具有更好的热稳定性。

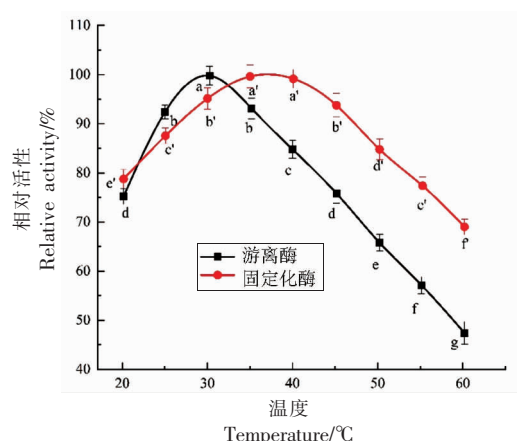
2.2.2 最适 pH pH对游离和固定化辣根过氧化物酶相对活性的影响如图7所示。从图中可以看出,当酸性或碱性过强时,游离酶和固定化酶的相对活性降低。在pH值为6.5和7.0时,游离酶和固定化酶表现出最大的催化活性。与pH值为6.5和7.0相比,pH值为8时,游离HRP和固定HRP的最大活性分别显著降低了约30%和10%。酶在磁性载体上固定后,固定化HRP在更宽的pH值范围内表现出更高的酶活性,这是因为固定化酶对酶的构象有一定限制,从而保护了酶的空间结构,此结论与Clarissa等^[37]的研究一致。

2.3 固定化辣根过氧化物酶降解模型溶液中ZEN单因素实验结果

2.3.1 反应温度对玉米赤霉烯酮降解率的影响 模型溶液中固定化酶添加量为0.6 U/mL,过氧化氢浓度为26 mmol/L,溶液pH值为7.0,反应时间为480 min的条件下,反应温度对ZEN降解率的影响见图8。

如图8所示,ZEN降解率随着温度的升高呈先升高后降低的趋势。当温度在25~35℃时,ZEN降解率随着温度的升高而增大,这是因为温度升高使得自由能水平增加而导致反应活化能降低,从而增大降解效率^[38],当温度为35℃时,降解率最高为64.35%。当温度超过35℃后,随着反应温度的升高,ZEN的降解率反而下降,这是由于温度过高导致酶部分发生变性,因此选择模型溶液温度为35℃。

2.3.2 过氧化氢浓度对玉米赤霉烯酮降解率的影响 模型溶液中固定化酶添加量为0.6 U/mL,反应温度为35℃,溶液pH值为7.0,反应时间为480 min的条件下,过氧化氢浓度对ZEN降解率



注:数据用“平均值±SD”表示。不同小写字母表示有显著性差异($P < 0.05$),下同。

图6 游离酶和固定化酶的最适温度

Fig.6 Optimal temperature for the free and immobilized enzymes

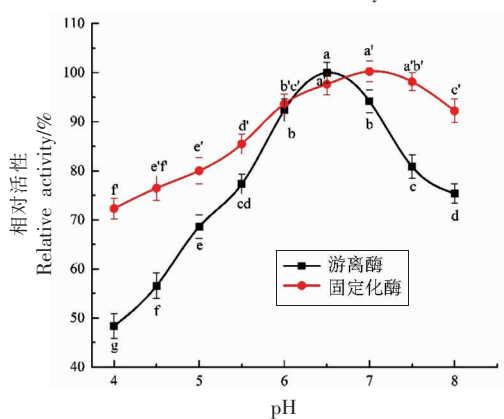


图7 游离酶和固定化酶的最适 pH

Fig.7 Optimal pH for the free and immobilized enzymes

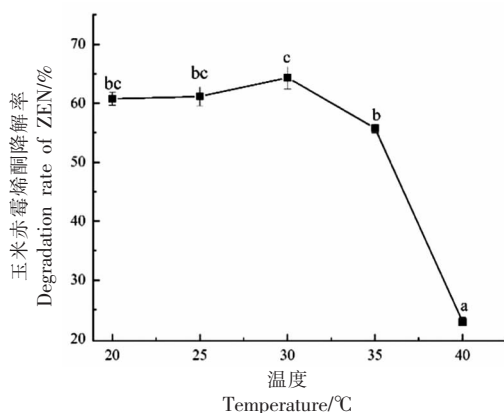


图8 反应温度对ZEN降解率的影响

Fig.8 Effect of temperature on the degradation of ZEN

的影响见图9。

如图9所示,随着过氧化氢浓度的增加,ZEN

降解率呈先升高后降低的趋势。当过氧化氢浓度为 26 mmol/L 时,ZEN 降解率最高为 65.67%。当过氧化氢浓度超过 26 mmol/L 后,ZEN 降解率逐渐下降。过氧化氢促使酶促反应过程中产生过氧化物酶中间体,然而当过氧化氢浓度过高时,过氧化氢可以通过氧化或破坏 HRP 的天然构象而使酶失去活性^[39],因此模型溶液中过氧化氢最佳浓度为 26 mmol/L。

2.3.3 溶液 pH 值对玉米赤霉烯酮降解率的影响

模型溶液中固定化酶添加量为 0.6 U/mL,反应温度为 35 ℃,过氧化氢浓度为 26 mmol/L,反应时间为 480 min 的条件下,溶液 pH 值对 ZEN 降解率的影响见图 10。

如图 10 所示,ZEN 的降解效率随溶液 pH 值的变化趋势为先快速升高后趋于平稳。当 pH 值小于 7.0 时,ZEN 降解率随溶液 pH 值的增加而显著升高;当溶液 pH 值为 7.0 时,ZEN 的降解率最高为 63.96%,随溶液 pH 值继续增加,ZEN 降解率趋于稳定,并没有显著变化。造成这种现象的原因可能是由于 pH 值的变化会影响酶的相对活性和酶活性中心氨基酸链的电离形式,继续增加 pH 值会导致固定化酶的活性降低^[40],因此模型溶液的最佳 pH 值为 7.0。

2.3.4 反应时间对玉米赤霉烯酮降解率的影响 模型溶液中固定化酶添加量为 0.6 U/mL,反应温度为 35 ℃,过氧化氢浓度为 26 mmol/L,溶液 pH 值为 7.0 的条件下,反应时间对 ZEN 降解率的影响见图 11。

由图 11 所示,当反应时间小于 480 min 时,随着反应时间的延长,ZEN 降解率呈逐渐升高的趋势,在 480 min 后降解率最高为 67.37%,磁性固定化 HRP 与 ZEN 几乎达到完全反应。随着反应时间持续延长,酶解反应达到平衡,ZEN 降解率的变化较小,降解率趋于平衡可能是由于反应产物对酶反应产生抑制或部分酶发生失活,继续增大反应时间并不能取得更好的结果,因此固定化 HRP 降解 ZEN 的最佳时间为 480 min。

2.4 重复使用性

与游离酶相比,固定化酶可以通过施加外部磁场使其很容易的从反应溶液中分离。如图 12 所示,酶的相对活性随使用次数增加呈下降趋势。重

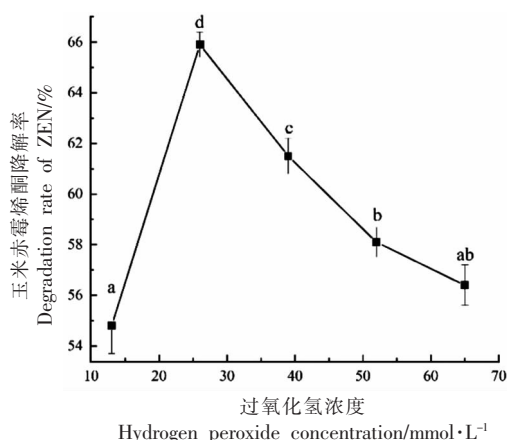


图 9 过氧化氢浓度对 ZEN 降解效率的影响

Fig.9 Effect of hydrogen peroxide concentration on the degradation of ZEN

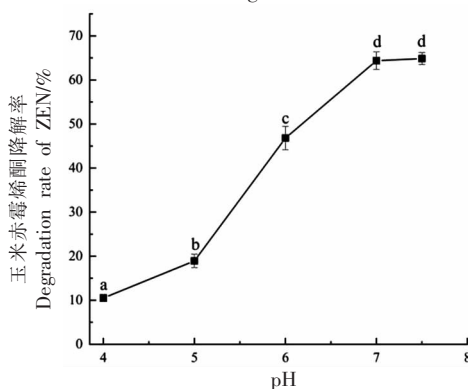


图 10 溶液 pH 值对 ZEN 降解效率的影响

Fig.10 Effect of solution pH value on the degradation of ZEN

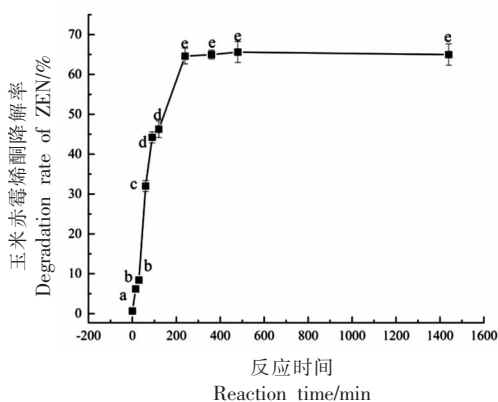


图 11 反应时间对 ZEN 降解率影响

Fig.11 Effect of reaction time on the degradation of ZEN

复使用 5 次后,HRP 的相对活性仍保持了 79.85% 的催化活性。酶活性减少的原因可能是由于酶经过反复洗涤,不可避免的导致了酶从载体上部分

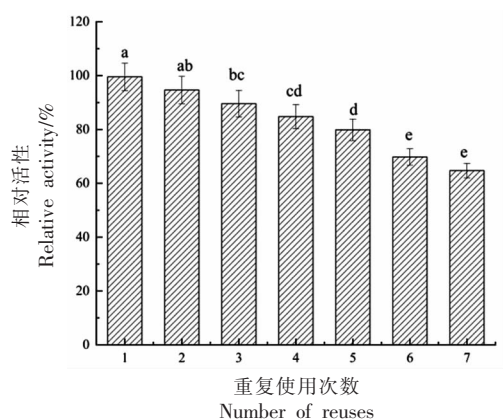


图 12 固定化 HRP 的重复使用性
Fig.12 Reusability of immobilized HRP

脱落^[41]。此外,酶的活性中心附近反应产物的增加,也会导致酶活性降低。由此可知,HRP 经过固定化后,具有良好的重复使用性。

2.5 液相色谱分离谱图

采用高效液相色谱法对反应溶液进行分析,ZEN 的液相色谱图如图 13 所示,图 13a 表示 ZEN 标准溶液质量浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$ 时的色谱图,ZEN 的出峰时间为 1.2 min 。如图 13b 所示,经固定化 HRP 酶解后,ZEN 的含量明显下降,并在 1.0 min 附近出现了新的峰。结果表明,在过氧化氢的存在下,过氧化物酶可以有效催化 ZEN 的降解。由于 ZEN 的检测和定量浓度较低,为了确保精确的结果,使用的高效液相色谱结合荧光检测器检测 ZEN 定量方法的验证参数见表 1,结果表明,曲线方程的相关系数 R^2 为 0.9982 ,其值可用于微量元素的分析。因此,经过验证该方法可以可靠地用于监测模型溶液中 HRP 对 ZEN 的降解作用。

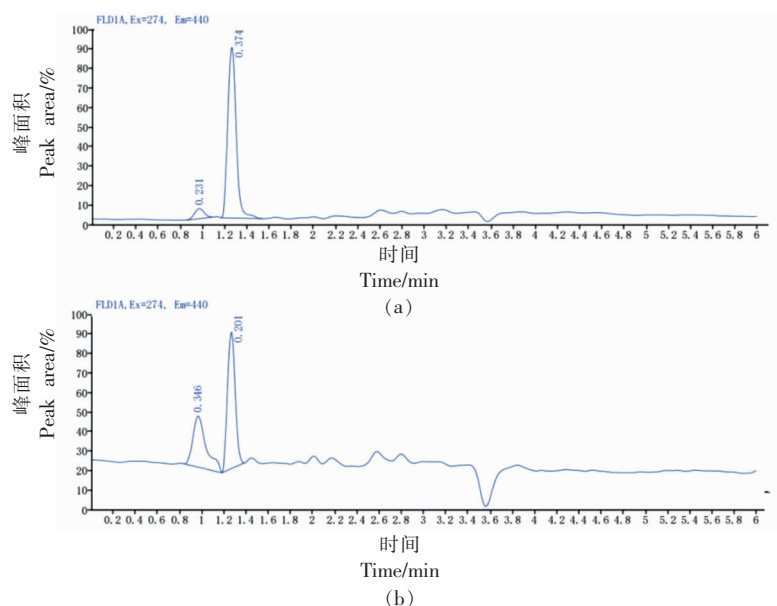


图 13 ZEN 标准品 (a) 和酶解产物 (b) 的色谱图

Fig.13 Chromatograms of ZEN standard (a) and enzymolysis product (b)

表 1 HPLC-FL 评价 ZEN 分析方法的验证参数

Table 1 Validation parameters of the analytical method evaluated in HPLC-FL for ZEN detection

项目	曲线方程	线性/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	相关系数	仪器检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	方法检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
ZEN	$y = 3.3337x + 74.659$	0.01~2	0.9982	4	1

3 结论

本试验提供了一种降低 ZEN 的方法,将游离 HRP 共价固定在磁性复合载体 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-HPG-COOH}$ 上,酶与磁性载体结合后,平均粒径为纳米

级,呈现超顺磁性。固定化酶的 pH 耐受性和热稳定性均高于游离酶。ZEN 降解试验表明在固定化酶浓度为 0.6 U/mL ,反应温度为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,过氧化氢浓度为 26 mmol/L ,溶液 pH 值为 7.0 ,反应时间为

480 min 的最优条件下,ZEN 降解效率为 68%,高效液相色谱显示经磁性固定化 HRP 处理后模型溶液 ZEN 含量明显降低。磁性固定化 HRP 具有良好的重复使用性,经 5 次循环后,固定化 HRP 的相对活性仍较高。本试验研究表明磁性固定化 HRP 可实现对模型溶液中 ZEN 的有效降解,为促进 HRP 在真菌毒素降解中的应用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] ZHU L, YUAN H, GUO C, et al. Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3- and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227(5): 1814-1820.
- [2] 裴娅晓. 玉米油中玉米赤霉烯酮的控制和脱除方法研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2016.
PEI Y X. Research on control and removal effects of zearalenone in maize oil[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2016.
- [3] KIM D H, HONG S Y, KANG J W, et al. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in cereal grains collected from south Korea by LC/MS/MS[J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(3): 106.
- [4] RAI A, DIXIT S, SINGH S P, et al. Presence of zearalenone in cereal grains and its exposure risk assessment in Indian population[J]. *J Food Sci*, 2018, 83(10): 3126-3133.
- [5] CHILAKA C A, De B M, ATANDA O O. The status of *Fusarium mycotoxins* in sub-Saharan Africa: A review of emerging trends and post-harvest mitigation strategies towards food control [J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(1): 19.
- [6] 王秩凡. 玉米赤霉烯酮的臭氧降解产物分析及其处理前后的安全性评价[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
WANG Y F. Elucidation of zearalenone ozonolytic products and safety evaluation of pre- and post-treated zearalenone[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [7] MINERVINI F, DELLAQUILA M E. Zearalenone and reproductive function in farm animals[J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9(12): 2570-2584.
- [8] 郑婷婷, 刘玉兰, 王戡东, 等. 淡碱蒸胚消减玉米胚及其毛油中真菌毒素的研究[J]. *食品科学*, 2020, 41(13): 8-13.
- [9] ZHENG T T, LIU L Y, WANG J D, et al. Degradation of mycotoxins in corn germ and crude corn oil by steaming corn germ with dilute alkali[J]. *Food Science*, 2020, 41(13): 8-13.
- [9] 李理, 王锦, 陈晋莹, 等. 二氧化氯对玉米中真菌毒素的降解研究[J]. *粮食储藏*, 2021, 50(5): 24-27.
- [10] LI L, WANG J, CHEN J Y, et al. Study on the degradation of mycotoxins in maize by chlorine dioxide[J]. *Grain Storage*, 2021, 50(5): 24-27.
- [10] LONG M, LI P, ZHANG W, et al. Removal of zearalenone by strains of *Lactobacillus* sp. isolated from Rumen *in vitro*[J]. *Journal of Animal & Veterinary Advances*, 2012, 11(14): 2417-2422.
- [11] JIANG S, YANG Z, YANG W, et al. Physiopathological effects of zearalenone in post-weaning female piglets with or without montmorillonite clay adsorbent [J]. *Livestock Science*, 2010, 131(1): 130-136.
- [12] LUONG N N, JASON P V D M, FAISAL I H, et al. Laccase-syringaldehyde-mediated degradation of trace organic contaminants in an enzymatic membrane reactor: Removal efficiency and effluent toxicity[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 200: 477-484.
- [13] MARTARTINA L, FRANCESCA F, VANIA C, et al. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives[J]. *Toxins*, 2017, 9(4): 111.
- [14] LIU X P, XUE P, JIA F, et al. A novel approach to efficient degradation of indole using co-immobilized horseradish peroxidase-syringaldehyde as biocatalyst- ScienceDirect[J]. *Chemosphere*, 2021, 262: 128411.
- [15] SABRINA O, GARCIA A, CARLA P, et al. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2018, 35(9): 1819-1831.
- [16] MIRJANA P, SANJA P, SASA S, et al. Characterization and application of biochar-immobilized crude horseradish peroxidase for removal of phenol from water [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 208: 112038-112038.
- [17] XIE W L, ZANG X Z. Immobilized lipase on core-shell structured Fe₃O₄-MCM-41 nanocomposites as a magnetically recyclable biocatalyst for interesterification of soybean oil and lard [J]. *Food Chemistry*,

- 2016, 194: 1283–1292.
- [18] REZA A, ALIREZA K, WOLFGANG B, et al. Degradation of sesame oil phenolics using magnetic immobilized laccase[J]. *Catalysis Letters*, 2020, 150(9): 3086–3095.
- [19] 张丽锋, 詹宁宁, 秦立娟, 等. 超支化聚缩水甘油甲基丙烯酸酯作为 O/W 型乳状液的破乳剂[J]. *化工进展*, 2021, 40(6): 3435–3443.
- ZHANG L F, ZHAN N N, QIN L J, et al. Methacrylated hyperbranched polyglycerol demulsifier for O/W emulsion[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2021, 40(6): 3435–3443.
- [20] KAZENWADEL F, FRANZREB M, RAPP B E. Synthetic enzyme supercomplexes: Coimmobilization of enzyme cascades[J]. *Analytical Methods*, 2015, 7: 4030–4037.
- [21] DENG Y, WANG C, HU J, et al. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol-gel approach[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005, 262(1): 87–93.
- [22] SEYED M S, MOHAMMAD A N. Methylene dipyrindine nanoparticles stabilized on Fe₃O₄ as catalysts for efficient, green, and one-pot synthesis of pyrazolophtalazinyl spirooxindoles[J]. *Catalysis Today*, 2013, 217(11): 80–85.
- [23] 苏鹏飞, 陈国, 赵珺. 表面羧基化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子的快捷制备及表征[J]. *高等学校化学学报*, 2011, 32(7): 1472–1477.
- SU P F, CHEN G, ZHAO J. Convenient preparation and characterization of surface carboxyl-functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2011, 32(7): 1472–1477.
- [24] FANG J M, FOWLER P A, TOMKINSON J, et al. The preparation and characterisation of chemically modified potato starches[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2002, 47(3): 245–252.
- [25] 马云辉, 陈国, 赵珺. 壳聚糖包覆磁性纳米粒子的制备和表征以及蛋白质吸附特性[J]. *高分子学报*, 2013, 11: 1369–1375.
- MA Y H, CHEN G, ZHAO J. Preparation and characterization of chitosan coated magnetic nanoparticles and their bsa adsorption properties[J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2013, 11: 1369–1375.
- [26] XIA G H, LIU W, JIANG X P, et al. Surface modification of Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles for immobilization of lipase[J]. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology*, 2017, 17(1): 370–376.
- [27] 李梅基. 壳聚糖亲和磁性微球的制备、表征及其对凝血酶纯化性能的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
- LI M J. Preparation and characterization of chitosan affinity magnetic microspheres and study of its properties for thrombin purification[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2010.
- [28] TONAMI H, UYAMA H, NAGAHATA R, et al. Guaiacol oxidation products in the enzyme-activity assay reaction by horseradish peroxidase catalysis[J]. *Chem Lett*, 2004, 33(7): 796–797.
- [29] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准, 食品中玉米赤霉烯酮的测定: GB 5009.209–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 4–6.
- China Food and Drug Administration of the State Commission of Microbiology and family planning of the People's Republic of China. National Standards for food safety, Determination of zearalenone in food: GB 5009.209–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 4–6.
- [30] FENG J, YU S, LI J, et al. Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles[J]. *Chem Eng J*, 2015, 286(20): 216–222.
- [31] BASEM E K, ALI G, ABEER K. Impacts of horseradish peroxidase immobilization onto functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a biocatalyst for dye degradation[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 13: 6633–6645.
- [32] YU D Y, CHEN K R, LIU J R, et al. Application of magnetic immobilized papain on passivated rice bran lipase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 157(15): 51–59.
- [33] ALEH M, MAJED H A, YASSER Q, et al. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, 27(2): 84–90.
- [34] YUE Y X, CHEN K R, LIU J Y, et al. Numerical simulation and deacidification of nanomagnetic enzyme conjugate in a liquid-solid magnetic fluidized bed[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 90: 32–43.
- [35] JIANG Y Y, CHEN G, XIA H S, et al. Magnetic

- nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, 58(1/2/3/4): 103–109.
- [36] ZHAO G H, WANG J Z, LI Y F. Reversible immobilization of glucoamylase onto metal–ligand functionalized magnetic SBA–15 [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 68: 159–166.
- [37] CLARISSA M, TIM O, AKRAM A, et al. Immobilization and characterization of *E. gracilis* extract with enriched laminaribiose phosphorylase activity for bienzymatic production of laminaribiose [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 182(1): 197–215.
- [38] JUN L Y, MUBARAK N M, YON L S, et al. Immobilization of peroxidase on functionalized MWCNTs–buckypaper/polyvinyl alcohol nanocomposite membrane[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2215.
- [39] ARNAO M B, ACOSTA M, DEL R J A, et al. Kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide [J]. *Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1990, 1041(1): 43–47.
- [40] 于殿宇, 马莺, 刘晶, 等. 高碘酸钠氧化法固定化磷脂酶 A1 的研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(7): 188–190.
- YU D Y, MA Y, LIU J, et al. Study on immobilization of phospholipase A1 by sodium periodate oxidation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(7): 188–190.
- [41] QING C, JIANG G D, TANG H Q, et al. Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase immobilized on superparamagnetic Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite[J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2015, 36(7): 961–968.

Studies on the Removal of Zearalenone from Maize Using Magnetic Immobilized Horseradish Peroxidase

Qu Yanfeng^{1,2,3,4}, Yu Dianyu^{2*}

(¹Harbin University, Harbin 150086

²College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030

³Jiusan Oils and Grains Industries Group Co., Ltd., Harbin 150090

⁴High-skilled Talents (Model Worker) Innovation Studio of Qu Yanfeng, Harbin 150086)

Abstract In this paper, magnetic nanoparticles Fe₃O₄–SiO₂–HPG–COOH was prepared as immobilized carrier to covalently immobilize horseradish peroxidase (HRP), and applied to the degradation of zearalenone (ZEN). The immobilized HRP was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, X–ray diffraction and scanning electron microscopy, which verified that HRP was successfully immobilized on the carrier. The prepared nanoscale carrier Fe₃O₄–SiO₂–HPG–COOH has uniform size and shape, good dispersion and strong magnetic properties. The saturation magnetization value was 25.80 emu/g, and the average particle size was 103.15 nm. Compared with free enzyme, the magnetically immobilized HRP indicated higher acid–base tolerance and thermal stability, the optimal pH value was increased from 6.5 to 7.0, the optimal temperature was increased from 30 °C to 35 °C. Magnetic immobilized HRP was applied to ZEN degradation, and the relationship between solution pH, reaction temperature, hydrogen peroxide concentration and reaction time with ZEN degradation rate was investigated using single–factor experiments. The results showed that under the conditions of reaction temperature of 35 °C, hydrogen peroxide concentration of solution 26 mmol/L, pH 7.0 and reaction time 480 min, the removal efficiency of ZEN was 68%. The immobilized HRP had good repeatability, and the relative enzyme activity remained above 79.85% after 5 cycles. This research shows that magnetic immobilized HRP has good degradation ability to ZEN.

Keywords horseradish peroxidase; magnetic immobilization; zearalenone; removal efficiency; reuse