

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2220520133

多酶级联生物催化膜构建及其性能研究

CONSTRUCTION AND PROPERTIES OF MULTI-ENZYME
CASCADE BIOCATALYTIC MEMBRANES

学 生 姓 名 :	陈胜现
校 内 导 师 :	赵世光 (副教授)
校 外 导 师 :	罗建泉 (研究员)
专 业 学 位 类 别 :	生物与医药
研 究 方 向 :	生物催化与转化

论文提交日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：陈胜现

日期：2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：陈胜现

指导教师签名：李世光

日期：2025 年 5 月 15 日

日期：2025 年 5 月 15 日

多酶级联生物催化膜构建及其性能研究

摘 要

酶是一种绿色高效的生物催化剂，是实现绿色生物制造的核心“芯片”。然而，生物酶结构脆弱、稳定性差、难以回收限制了其大规模工业化应用。分离膜作为一种优异的酶固定化载体和分离介质，将酶固定在膜内构建生物催膜不仅能提高酶的稳定性和可回收性，同时还可以实现对流传质为主导的连续流动反应-分离过程高效协同，但是生物催化膜仍然存在催化效率低，传质与反应不匹配的问题。针对上述问题，本研究通过构建不同空间维度的生物催化膜，优化底物分子在催化膜中的传质路径、速率和传质空间尺寸，实现底物分子与酶的碰撞频率和机率同时提高，强化传质-反应协同过程，打破了传质通量与催化转化率间的博弈效应，实现酶催化反应催化效率和转化率的共同提升。另外，基于氧化石墨烯（GO）二维膜优异的催化性能，本研究通过简单改变 GO-酶混合液的沉积顺序将转化酶（Inv）、葡萄糖氧化酶（GOx）和辣根过氧化物酶（HRP）分区固定在催化膜内，提高反应有序性，避免不同反应体系之间的相互干扰。同时，GO 膜内二维纳米流道可以促进底物定向传递，降低中间产物无效耗散，使得多酶级联催化效率大幅提升。具体研究内容如下：

（1）探究底物分子的传质行为对不同维度的生物催化膜性能的影响

将 Inv 共价接枝在经单宁酸和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷（TA-

APTES)涂层改性后的一维纳米管膜、二维 GO 膜和三维聚合物膜上构建不同维度生物催化膜 (E@1DM、E@2DM 和 E@3DM), 优化底物分子在催化膜中的传质路径、速率和传质空间尺寸。通过 SEM、FTIR、XPS、CLSM 等手段对生物催化膜进行表征, 证明 Inv 成功共固定在功能化的基膜载体上。结果显示, GO 二维生物催化膜 (E@2DM) 在流动模式下表现出最优的催化活性和稳定性。具体而言, 限域空间尺寸的减小、传质路径的简化以及传质速率的提升, 可显著提高底物与酶的可及性, 并抑制酶结构舒展失活, 从而增强生物催化膜的催化效率和稳定性。

(2) 构建自适应 GO 二维生物催化膜并对其性能进行动力学研究

基于 GO 二维膜优异的性能, 将 Inv、GOx 和 HRP 与 GO 片层通过共沉淀法构建二维 GO 生物催化膜 (E@GO)。通过 XRD、SEM、TEM 和粒径分析等手段对膜的结构进行了表征, 结果表明三种酶都均匀分散在 GO 片层中, 且 GO 膜具有自调节的纳米流道结构, 能够根据分子量大小动态调整层间距。在进行动力学参数验证后, 催化膜内固定化酶的催化效率显著高于游离酶, 表现出更高的底物亲和力和催化活性。

(3) 构建级联生物催化膜并进行性能对比

通过共固定和顺序逐层固定两种策略实现了双酶 (Inv、GOx) 和三酶 (Inv、GOx、HRP) 在 GO 二维纳米流中的高效组装。结果表明, GO 限域结构显著提升了酶的催化性能: 双酶级联催化中, 膜固定化

体系的反应速率较游离酶提升了 1300 倍以上；三酶级联催化中，顺序逐层固定策略实现有效的底物通道，并最大限度地减少相互的干扰，进一步减少了中间产物（如 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ ）对酶的抑制作用，催化效率较共固定策略更高。

关键词：生物酶，生物催化膜，酶固定化，级联催化，反应-传质耦合过程

CONSTRUCTION AND PERFORMANCE STUDY OF MULTI-ENZYME CASCADE BIOCATALYTIC MEMBRANES

ABSTRACT

Enzymes are green and efficient biocatalysts, serving as the core "chips" for achieving sustainable biomanufacturing. However, the fragile nature, poor stability, and difficulty in recovery of enzymes limit their large-scale industrial applications. Membrane is an excellent enzyme immobilization substrate and separation media. By immobilizing enzymes in/on the membrane, the biocatalytic membrane can not only enhance its stability and recyclability but also enable convective mass transfer-driven continuous flow with efficient reaction-separation synergy. However, it still suffers from low catalytic efficiency and mismatched mass transfer and reaction. Herein, this work aims to construct biocatalytic membranes with different spatial dimensions to optimize the mass transfer pathways, rates, and spatial dimensions of substrate molecules within the catalytic membrane. The collision frequency and probability between substrate molecules and enzymes are simultaneously increased and thus enhance the

synergistic effect of mass transfer-reaction. This approach mitigates the trade-off effect between mass transfer flux and catalytic conversion efficiency, thereby improving both the catalytic efficiency and conversion rate of enzymatic reactions. Furthermore, leveraging the excellent catalytic properties of graphene oxide (GO)-based two-dimensional (2D) membranes, invertase (Inv), glucose oxidase (GOx), and horseradish peroxidase (HRP) are compartmentalized within the catalytic membrane by simply tuning the deposition sequence of the GO-enzyme mixture. The compartment enhances reaction order and prevents interference between different reaction systems. Additionally, the 2D nanochannels within the GO membrane facilitate directional substrate transport, reducing the ineffective dissipation of intermediate products, and thereby sufficiently improving catalytic efficiency. The detailed results are as follows:

(1) Investigating the impact of substrate molecule mass transfer behavior on biocatalytic membrane performance

Inv was covalently grafted onto three types of TA-APTES-modified 1D nanotube, 2D GO, and 3D polymer membranes to construct biocatalytic membranes of varying dimensionalities (E@1DM, E@2DM, and E@3DM). Mass transfer pathways, rates, and spatial dimensions of substrate molecules within the catalytic membranes were optimized. Characterization via SEM, FTIR, XPS, and CLSM confirmed the successful covalent immobilization of Inv on the functionalized substrates.

Results revealed that the 2D GO biocatalytic membrane (E@2DM) exhibited optimal catalytic activity and stability under flow conditions. Specifically, the simplification of mass transfer pathways, reduction of confined spatial dimensions, and enhancement of mass transfer rates significantly improved substrate accessibility to enzymes, thereby enhancing catalytic efficiency and stability.

(2) Constructing adaptive 2D GO biocatalytic membranes and conducting kinetic studies

Leveraging the outstanding properties of 2D GO membranes, Inv, GOx, and HRP are co-precipitated with GO nanosheets to fabricate 2D GO biocatalytic membranes (E@GO). Structural characterization via XRD, SEM, TEM, and particle size analysis demonstrates uniform dispersion of enzymes within the GO nanosheets. The GO membrane exhibits self-adjusting nanochannels capable of dynamically tuning interlayer spacing based on molecular weight. Kinetic parameter validation confirms that the catalytic efficiency of immobilized enzymes within the membrane significantly surpassed that of free enzymes, exhibiting higher substrate affinity (lower K_m) and catalytic activity (higher V_{max}).

(3) Constructing cascade biocatalytic membranes and performance evaluation

Dual-enzyme (Inv, GOx) and triple-enzyme (Inv, GOx, HRP) systems are efficiently assembled within GO 2D nanochannels using co-

immobilization and sequential layer-by-layer immobilization strategies. Results demonstrated that the GO confinement structure markedly enhanced enzymatic catalytic performance. In triple-enzyme cascade catalysis, the sequential layer-by-layer immobilization strategy enables effective substrate channeling while minimizing mutual interference, thereby further reducing the inhibitory effects of intermediate products (e.g., H_2O_2 and $\cdot\text{OH}$) on the enzymes. This results in higher catalytic efficiency compared to the co-immobilization strategy.

Chen Shengxian (Biology and Medicine)

Supervised by Zhao Shiguang

KEY WORDS: enzyme, biocatalytic membrane, enzyme immobilization, cascade catalysis, reaction-mass transfer coupling process

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 酶固定化.....	1
1.1.1 酶固定化方法.....	1
1.1.1.1 吸附法.....	1
1.1.1.2 包埋法.....	2
1.1.1.3 共价结合法.....	2
1.1.1.4 化学交联法.....	3
1.1.2 酶固定化载体.....	3
1.1.2.1 微球.....	3
1.1.2.2 介孔二氧化硅.....	4
1.1.2.3 金属有机框架.....	5
1.1.2.4 分离膜.....	5
1.2 生物催化膜.....	6
1.2.1 生物催化膜的原理及制备.....	6
1.2.2 生物催化膜的应用.....	7
1.2.2.1 微污染物去除.....	7
1.2.2.2 生物检测.....	8
1.2.2.3 CO ₂ 捕获和转化.....	9
1.2.3 级联生物催化膜.....	10
1.2.4 生物催化膜面临的问题和挑战.....	11
1.3 课题的提出和主要研究内容.....	11
1.3.1 研究背景与意义.....	11
1.3.2 主要研究内容.....	12
第 2 章 多维度生物催化膜制备及性能对比.....	14
2.1 引言.....	14
2.2 实验材料与仪器.....	14

2.3 实验方法.....	15
2.3.1 生物催化膜的制备方法.....	15
2.3.1.1 E@1DM 的制备.....	15
2.3.1.2 E@2DM 的制备.....	16
2.3.1.3 E@3DM 的制备.....	16
2.3.2 Inv 在膜中的分布.....	16
2.3.3 表征测试.....	17
2.3.4 膜通量的测定.....	17
2.3.5 膜载酶量的测定.....	17
2.3.6 固定化酶的活性测定.....	18
2.3.7 全原子模拟.....	18
2.3.8 生物催化膜的稳定性测试.....	19
2.3.8.1 长期使用稳定性.....	19
2.3.8.2 长期储存稳定性.....	19
2.4 结果和讨论.....	19
2.4.1 一维生物催化膜.....	19
2.4.1.1 SEM 图谱分析.....	19
2.4.1.2 FT-IR 和 XPS 图谱分析.....	20
2.4.1.3 EDX 图谱分析.....	20
2.4.1.4 CLSM 图谱分析.....	21
2.4.1.5 传质行为对 E@1DM 催化性能影响.....	21
2.4.2 二维、三维生物催化膜.....	23
2.4.2.1 SEM 图谱分析.....	23
2.4.2.2 FT-IR 和 XPS 图谱分析.....	24
2.4.2.3 XRD 图谱分析.....	24
2.4.2.4 CLSM 图谱分析.....	25
2.4.3 E@1DM、E@2DM 和 E@3DM 的性能对比.....	25
2.4.3.1 基础性能.....	25
2.4.3.2 催化性能.....	26
2.4.4 E@1DM、E@2DM 和 E@3DM 的稳定性测试.....	27
2.5 小结.....	27
第 3 章 自适应 GO 二维生物催化膜的构建及其性能研究.....	29

3.1 引言.....	29
3.2 实验试剂与仪器.....	29
3.3 实验方法.....	30
3.3.1 不同尺寸 GO 片层分散液的制备	30
3.3.2 GO 膜和 E@GO 生物催化膜的制备	30
3.3.3 表征测试.....	31
3.3.4 GO 膜基础性能测试	31
3.3.4.1 膜截留率的测定.....	31
3.3.4.2 膜通量的测定.....	31
3.3.4.3 膜载酶量的测定.....	31
3.3.5 GO 膜催化性能测试.....	31
3.3.5.1 Inv 动力学测试	31
3.3.5.2 GOx 动力学测试.....	32
3.3.5.3 HRP 动力学测试.....	32
3.4 结果和讨论.....	33
3.4.1 表征	33
3.4.1.1 SEM 图谱分析	34
3.4.1.2 XRD 和粒径分析	34
3.4.1.3 TEM 图谱分析	35
3.4.2 GO 膜基础性能	35
3.4.2.1 截留率.....	35
3.4.2.2 膜通量.....	36
3.4.2.3 载酶率.....	36
3.4.3 GO 膜催化性能	37
3.4.3.1 Inv@GO 催化效果.....	37
3.4.3.2 Inv、GOx 和 HRP 动力学测试.....	38
3.5 小结.....	40
第 4 章 GO 二维级联生物催化膜的构建及其性能研究.....	41
4.1 引言.....	41
4.2 实验试剂与仪器.....	41
4.3 实验方法.....	41
4.3.1 双酶级联 GO 生物催化膜的制备	41

4.3.1.1 共固定策略.....	41
4.3.1.2 顺序逐层固定策略.....	42
4.3.2 三酶级联生物催化膜的制备	42
4.3.2.1 共固定策略.....	42
4.3.2.2 顺序逐层固定策略.....	42
4.3.3 表征	42
4.3.4 级联生物催化膜性能测试	42
4.3.4.1 双酶级联催化.....	42
4.3.4.2 三酶级联催化.....	43
4.4 结果与讨论.....	43
4.4.1 SEM.....	43
4.4.2 双酶级联催化	44
4.4.3 三酶级联催化	45
4.5 小结.....	46
第 5 章 结论与展望.....	47
5.1 结论.....	47
5.2 展望.....	48
参考文献.....	49
致谢.....	58

第 1 章 绪论

1.1 酶固定化

1.1.1 酶固定化方法

生物酶是一类由生物体合成的具有高效催化功能的蛋白质分子。然而，游离态酶在环境条件下易变性失活，其稳定性受温度、pH 值、离子强度等多种环境因素的显著影响^[1]，这一特性严重制约了酶制剂的工业化生产和实际应用。因此，在实际应用中通常将酶作固定化处理。为改善酶的稳定性和回收利用率，研究学者们采用多种化学和物理方法将游离酶固定在载体上^[2]。基于不同的作用机制，酶固定化方法主要包含四种：吸附法、包埋法、共价结合法和交联法（图 1-1）。在具体应用中，需综合考虑酶的特性、载体性能以及使用环境等参数，以确定最优的固定化策略。

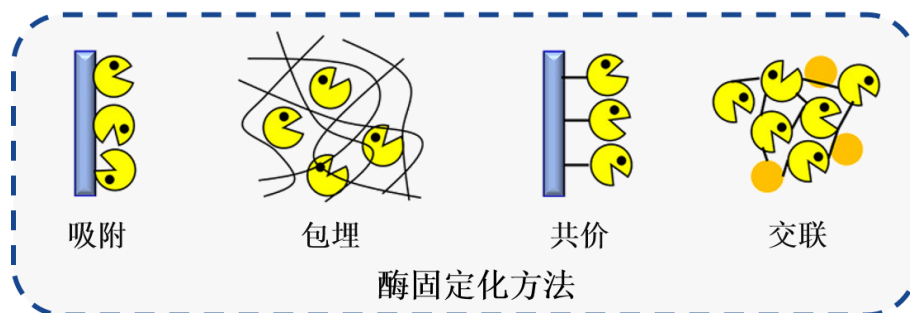


图 1-1 酶固定化方法

Figure 1-1 Enzyme immobilization methods

1.1.1.1 吸附法

吸附法固定是指游离酶和载体之间通过范德华力、氢键、 π - π 相互作用达到固定的效果^[3]。例如，Qin 等^[4]通过物理吸附将荧光假单胞菌脂肪酶固定在聚苯胺纳米纤维上。研究显示，固定化酶的活性达到游离酶的 8 倍，并且具有易于分离、可重复使用超过 6 次以及在 75°C 以上高温条件下保持稳定等优势。Mahdizadeh 等^[5]利用多孔纳米二氧化硅作为载体，通过物理吸附法固定葡萄糖氧化酶（GOx）和过氧化氢酶（CAT）双酶体系，成功应用于水相溶解氧的脱除。在最佳反应条件下，该系统 1 min 内的脱氧效率高达 97.5%。长期稳定性测试显示，6 天连续运行后酶活性保留率为 70%。采用吸附法固定酶的主要优点是工艺

简单,且能最大限度保持酶的天然结构和催化功能,使酶活损失最小化。但该方法的局限性在于结合力较弱,固定化酶容易从载体上脱落,导致实际应用中操作稳定性不佳。

1.1.1.2 包埋法

包埋法是将游离酶物理包裹在多孔载体材料(如高分子凝胶、微胶囊或无机基质)的三维网络结构中,酶分子不与载体发生化学键合,而是被限制在载体内部孔隙或微环境中,从而达到固定化的目的。例如,Hao等^[6]利用ZIF-8作为载体,将普鲁士蓝和头孢菌素酶(AmpC)进行共同包封,用于头孢菌素的酶促降解。结果显示,与游离酶相比,其降解动力学速率提高了4.5倍,且降解效率高达96%。经过6次循环使用后,固定化酶的催化活性仅损失了约10%。Cheng等^[7]开发了一种新型双功能纳米反应器,通过将脲酶(Ur)和牛血红蛋白(BHb)封装于ZIF-90中,实现了尿素检测功能。该纳米反应器在5次重复使用后仍能维持97.7%的初始活性,且在35℃长期(35天)储存中表现出优异稳定性,活性损失控制在3.9%以内。包埋法的核心优势体现在能够较好地维持酶活性、操作成本低廉,并促进酶与底物的有效接触,同时增强机械强度^[8]。然而,该方法也存在明显的局限性,会因载体包埋效应而增大传质阻力,影响底物向酶的输送^[9];此外,孔径过大会引发酶泄漏问题,而载体材料的机械磨损也会降低其负载性能^[10]。故而,提高固定化酶催化效率的核心策略是:在保证酶不流失的前提下,优化包埋结构的内部环境以促进底物和产物的传输。

1.1.1.3 共价结合法

共价结合是指酶的侧链基团与载体表面的基团发生反应形成共价键,利用共价键将酶固定在载体上^[11]。常见的用于共价结合的官能团包括:氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)、巯基(-SH)、羟基(-OH)、酚基、咪唑基等。此外,共价结合法由于化学键的形成,容易使酶的蛋白质构象发生改变,从而降低酶活性。Li等^[12]报道了一种新型固定化方法:首先采用静电纺丝法制备聚丙烯腈(PAN)纳米纤维膜,再通过脲化反应活化后共价固定假丝酵母脂肪酶。固定化酶保持87.5%的原始活性,能有效催化大豆油水解,且在20次重复使用后仍保留65%的初始转化效率。Chen及其合作者^[13]将纤维素酶和溶菌酶共价固定在氨基修饰的磁性纳米颗粒上,用于微藻细胞壁的酶法破碎和脂质回收。固定化酶表现出增强的热

稳定性和更广的 pH 适应范围, 经过 6 次重复使用后仍保留 60% 的初始催化活性。

1.1.1.4 化学交联法

依靠双官能或多官能试剂使酶分子之间发生交联, 形成网状结构实现酶固定化的方法称为化学交联法^[14], 主要用到的交联剂有戊二醛、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC)、二醛淀粉和二醛纤维素^[15-17]等。例如, Chen 等^[18]以戊二醛作为交联剂制备了一种具有超顺磁性的固定化漆酶 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Lac}$, 实验数据显示, 该固定化酶在热稳定性、储存稳定性、有机溶剂耐受性和重金属耐受性等关键性能指标上均明显优于游离漆酶。此外, 在重复使用 10 个批次后, 对 2, 4-二氯苯酚 (2, 4-DCP) 和 2, 4, 6-三氯苯酚 (2, 4, 6-TCP) 的降解率仍旧有 54.9% 和 68.7%。Wang 等^[19]利用戊二醛作为交联剂, 将纤维素酶固定在聚酰胺胺树枝分子 (PAMAM) 修饰的硅球载体上。该固定化酶相较于游离酶, 不仅稳定性增强、酶活回收率提高, 还在三次重复实验后, 其催化活性仍可达到初始酶活的 82% 以上。与其他酶固定化方法相比, 交联法的优点在于可以引入具有特定功能的基团或分子, 从而赋予材料多种功能。然而, 化学交联法酶活保留率低, 且过度交联可能导致材料内部形成过于紧密的网络结构, 导致其机械稳定性差。基于上述原因, 化学交联法通常作为辅助固定化手段, 与吸附或包埋等方法联合使用, 其主要作用是增强酶与载体间的结合力或提高酶的固定化量, 从而优化整体固定化效果。

1.1.2 酶固定化载体

在酶固定化工艺中, 载体选择 (如材料类型、形态结构) 和固定化方法的差异都可能导致酶分子构象改变或活性位点受损, 从而削弱其催化能力。因此, 探索高效、可行的固定化载体以提升固定化酶的催化性能始终是固定化酶研究领域的核心课题之一。自 1916 年固定化酶技术问世以来, 多种载体材料已广泛应用于酶的固定化研究, 例如微球^[20]、介孔二氧化硅^[21]、金属有机框架^[22]、无机/有机分离膜^[23]、纳米颗粒^[24]、碳纳米管^[25]和 DNA/蛋白质支架^[26]等。以下主要介绍了微球、介孔二氧化硅、金属有机框架和分离膜四类酶固定化载体。

1.1.2.1 微球

微球载体因其制备成本低廉、操作简便灵活、分散性能优异以及回收便利等

优势，在酶固定化领域显示出广阔的应用前景，已成为该领域最具发展潜力的载体材料之一。当前，广泛应用于固定化酶领域的微球基质主要包括两大类：合成高分子聚合物微球（如聚乳酸 PLA、聚苯乙烯 PST 等）和天然多糖微球（如葡甘聚糖、琼脂糖等）。此外，基于孔隙结构的差异可分为无孔和多孔两种类型。无孔微球有利于酶与底物的直接接触，但受限于较小的比表面积，载酶效率不高。多孔微球虽然能提供更大的比表面积来增加载酶量，但孔隙结构会阻碍物质扩散。因此，精确调控孔径参数是实现高载酶量和高催化活性的关键因素。例如，彭^[27]通过三聚磷酸钠交联法制备了氨基多糖微球，并采用 CaCO_3 （质量比为 1:1）对其进行处理，成功获得了表面呈现蜂窝状结构的多孔微球载体。实验数据显示，无孔微球载体与多孔微球载体对脲酶的固定化效率分别为 51.5% 和 68%，且对 300 mg/L 尿素溶液的转化率分别达到 91.8% 和 99.99%。Yang 等^[28]制备一种具有核-壳结构的浅孔微球载体固定化菊粉酶，保留了游离酶 73% 的初始活性，经过 10 次循环使用后活性保持率达 77.93%。此外，稳定性也显著提升，半衰期延长至游离酶的 22 倍。张等^[29]基于聚乙烯醇微球为载体固定化脂肪酶，在重复 10 次酶催化水解反应后相对酶活仍维持在 70% 以上。

1.1.2.2 介孔二氧化硅

由于高比表面积、高化学纯度、高稳定性、化学惰性、无毒和易于修饰等优良特性，介孔二氧化硅已经成为近年来备受关注的酶固定化载体之一^[30]。例如，Mesa 等^[31]采用席夫碱反应将半乳糖苷酶共价固定在介孔二氧化硅材料表面，有效避免了酶的渗漏问题，使其载酶率高达 80%。且固定化后，酶活性的保留率为 50%~80%，在 pH 为 6.0、温度为 55℃ 的环境下其催化效率是游离酶的 370 倍。Ali 等^[32]成功合成了具有 20~50 nm 中孔结构的介孔二氧化硅磁性材料，并将其用于固定皱褶假丝酵母脂肪酶。研究表明，该介孔二氧化硅材料展现出优异的酶负载能力，可达 797 mg/g，同时其比活力达到 1503 U/g。Qiu 等^[33]开发的纳米复合材料通过羧基功能化将 SBA-15 与壳聚糖结合，实现了 75.3% 的漆酶固定化效率。结果表明，固定化漆酶稳定性显著增强，35 h 后对 2, 4-DCP 的去除率仍高达 90%。但 SBA-15 的制备存在一定局限性，包括原料成本较高，且需在浓盐酸的强酸性环境中合成^[34]。此外，其机械强度较低、扩散限制等不足也需要通过进一步的材料优化和工艺改进来克服。

1.1.2.3 金属有机框架

金属有机框架(MOFs)是一类由金属离子或金属簇(次级构筑单元, SBUs)与多齿有机配体通过配位键自组装形成的结晶性多孔材料, 在化学领域也被称为多孔配位聚合物(Porous Coordination Polymers, PCPs)^[35]。MOFs 因其独特的结构特征和优异的物理化学性质而备受关注, 例如其具有极高的比表面积、规整的孔道分布以及可调控的孔径尺寸等优势^[36]。这些特性使其成为生物催化剂固定化领域的研究热点, 吸引了众多科研工作者的广泛关注。例如, Zhong 等^[37]采用表面活性剂模板法制备了介孔 Cu-MOF 材料, 并将其应用于漆酶的固定化研究。通过精确控制 CTAB 模板剂与 EDTA 洗脱剂的用量比, 实现了 Cu-MOF 孔径尺寸的精准调控。性能测试表明, 所制备的 Cu-MOF 材料具有 1153.8 m²/g 的高比表面积, 漆酶的负载效率达 88%, 且固定化后仍保持 95.9%的初始酶活性。Ge 课题组^[38]创新性地运用原位合成技术将细胞色素 C (Cyt C) 封装于 ZIF-8 框架内。为维持 Cyt C 在甲醇溶液中的结构稳定性, 实验采用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)作为保护剂和分散介质, 成功制备了 Cyt C@ZIF-8 复合材料, 并将其应用于 ABTS 的催化反应。实验数据显示, Cyt C@ZIF-8 复合材料相较于游离 Cyt C 展现出更强的底物结合能力, 其催化效率提升了 10 倍。Cheong 等^[39]采用胺基功能化的 ZIF-8 (AnZIF-8) 作为载体, 通过多点氢键作用实现了脂肪酶的固定化。结果显示, 通过添加亲水性 AnZIF-8, 脂肪酶@An-ZIF-8 在油水界面的分散性能获得显著提升, 使酶活性中心更易与底物接触, 因而能够保持较高的催化效率。在酯类水解和酯交换反应中, 该固定化酶经过 10 次循环使用后仍能保持 80%的初始酶活性。

1.1.2.4 分离膜

分离膜是一种具有选择性渗透特性的薄膜材料, 能够根据物质的物理或化学性质(如分子大小、电荷、极性或溶解度等)实现混合物的高效分离^[40]。当前分离膜材料种类繁多, 从材质角度可分为无机陶瓷膜^[41]与有机聚合物膜^[42]; 按分离精度则可分为微滤^[43]、超滤^[44]及纳滤^[45, 46]等不同类型。以分离膜作为酶固定化材料是一种高效且多功能的生物工程技术, 通过分离膜独特的多孔结构与酶的催化活性相结合所制备得到的生物催化膜, 可以实现高效催化与分离的一体化, 广泛应用于生物催化、环境治理、生物传感器等领域。(下面将在 1.2 进行详述)

1.2 生物催化膜

1.2.1 生物催化膜的原理及制备

生物催化膜是在传统分离膜基础上,通过多种固定化技术将酶分子负载于膜表面或孔道内的功能化复合膜材料。这种设计不仅增强了酶的稳定性和可循环利用性,还能实现反应与分离的同步进行,有效避免产物抑制(图 1-2)。此外,不同于传统扩散控制的固定化酶系统,生物催化膜通过对流操作模式有效克服了传质阻力,使得催化效率大幅提高。基于基膜材料和酶的性质差异,研究者可以灵活的选择固定化方式,包括表面接枝^[47]、静电吸附^[45]或反向过滤封装^[48]等策略。例如,Cao 等^[49]创新性地采用逆向过滤技术将漆酶包埋于纳滤膜支撑层中,并利用聚多巴胺仿生涂层实现酶的封装,使得生物酶的催化作用突破了传统吸附工艺的饱和限制。Mahlicli 等^[50]通过共价键合和离子键合两种方式将超氧化物歧化酶(SOD)/CAT 固定在聚乙烯亚胺(PEI)改性膜表面,研究发现,共价键合法固定的酶具有更优异的稳定性。Ji 等^[51]分别采用物理吸附和化学交联法将漆酶固定在碳纳米管(CNTs)改性聚偏氟乙烯(PVDF)上,结果显示,物理吸附法制备的生物催化膜具有优异的可重复装载优势,经过 4 次漆酶重新固定后,其酶活力仍可保持初始固定化酶活性的 70%。Kim 等^[52]开发了一种结合吸附、沉淀和交联的方法,成功将酰化酶固定在 CNTs 上,随后通过聚多巴胺(PDA)涂层将其稳定在 PVDF 膜表面。研究发现,每种酶固定化工艺都具有其独特的优势与实施难点,而多种技术的合理组合可能开发出性能更优越的催化膜材料。

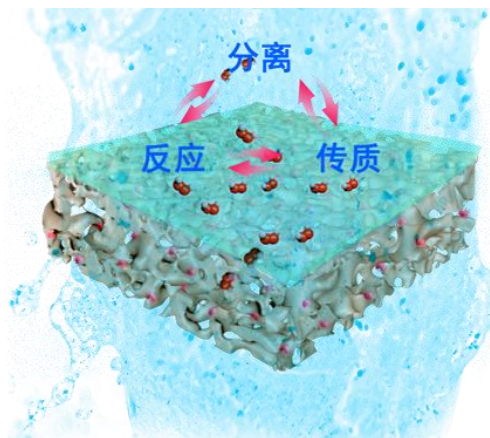


图 1-2 生物催化膜

Figure 1-2 Biocatalytic membrane

1.2.2 生物催化膜的应用

凭借反应条件温和、选择性高、反应效率高和可循环使用等显著优势，生物催化膜在微污染物处理^[53]、生物检测以及 CO₂ 捕获转化等领域展现出广阔的应用前景，受到研究者的广泛关注。以下将对这几个应用方向进行简要概述。

1.2.2.1 微污染物去除

虽然工业废水中的微量有机污染物浓度不高，但其对生态系统和人体健康的长期危害不容小觑。现有的物理化学处理技术虽然应用广泛，却常常无法实现完全降解。生物催化膜技术的快速发展为这一环境难题的解决开辟了新途径。如图 1-3 所示，Ren 等^[54]采用“3D 改性”制造高效、稳定的生物催化膜，用于高渗透性的微污染物降解。研究团队通过静电吸附将 PEI 引入膜分离层以固定漆酶，同时 MOF 的加入和 PDA 涂层的修饰共同提升了该膜的吸附性能，使得所制备的生物催化膜对双酚 A（BPA）的去除率高达 92%。

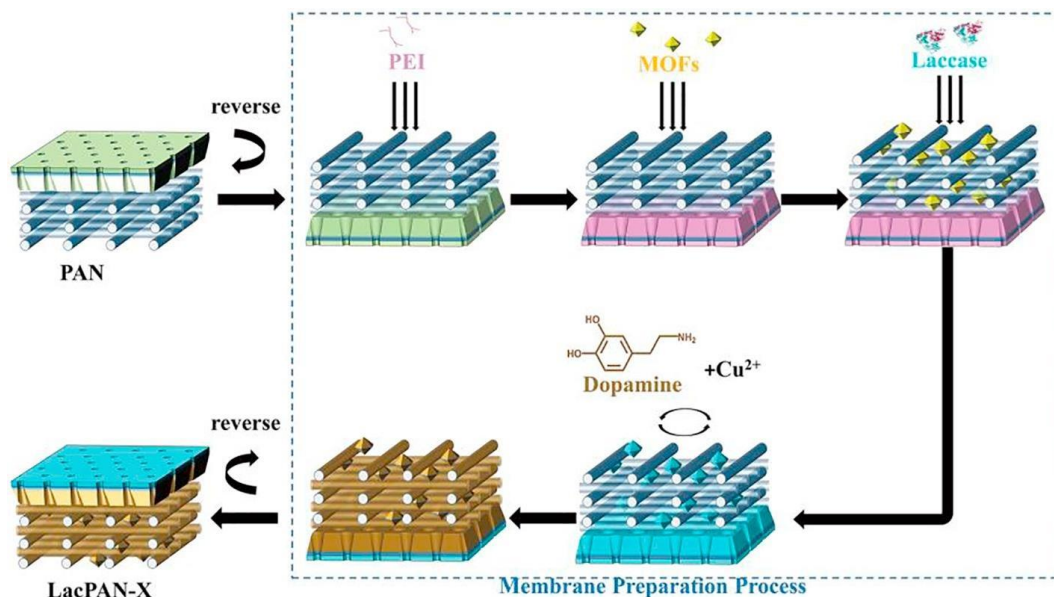
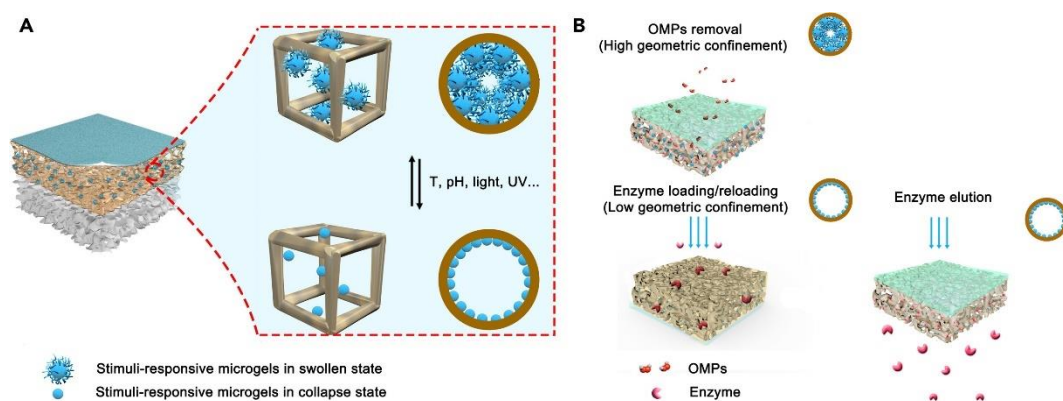


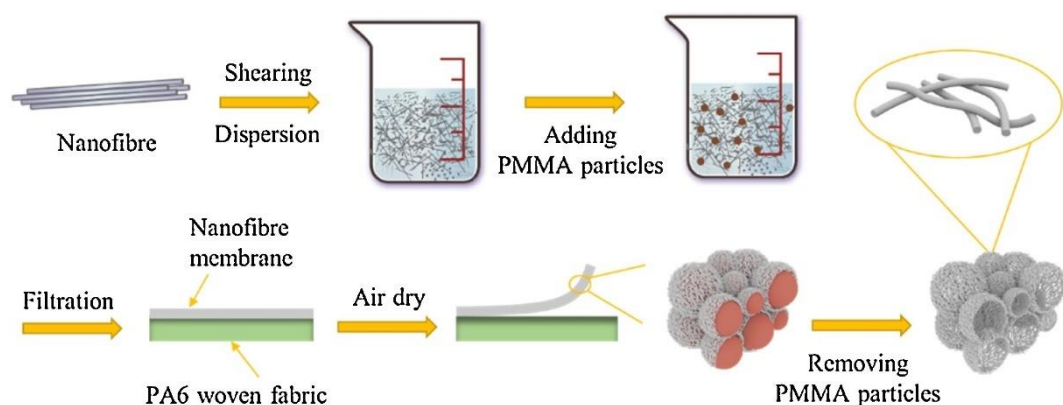
图 1-3 “3D”膜改性方法示意图^[54]

Figure 1-3 Diagram of "3D" membrane modification method^[54]

如图 1-4 所示，Zhang 等^[55]创新性地采用聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)微凝胶对膜支撑层进行修饰，成功构建了温度响应型智能催化膜。该膜利用 PNIPAM 的“膨胀-收缩”可逆转变特性，动态调控支撑层孔径和表面性质。在处理微污染物时，微凝胶膨胀使孔隙收缩，既能防止漆酶泄漏又提供亲水环境；当酶失活时，微凝胶收缩扩大孔隙，便于失活酶洗脱和新酶加载。因此，这种动态调控使该膜对 BPA 的去除率持续高达 80%。

图 1-4 温度响应型催化膜示意图^[55]Figure 1-4 Schematic diagram of a temperature-responsive catalytic membrane^[55]

如图 1-5 所示, Luo 等^[56]通过创新方法构建了具有三维分级多孔结构的纳米纤维膜, 其中成功整合了漆酶杂化纳米花, 对靛蓝胭脂红、酸性黄 76、酸性蓝 25 和活性蓝 2 的降解效率分别为 99.5%、90.2%、86.35%和 83.59%。此外, 该生物催化膜在重复使用 14 次后对靛蓝胭脂红的降解率从 99.48%降至 98.52%, 基本保持不变。

图 1-5 分层多孔纳米纤维膜的制造^[56]Figure 1-5 Fabrication process of the hierarchically porous nanofibrous membrane^[56]

1.2.2.2 生物检测

基于生物催化膜的多功能特性, 其在蛋白质消解和葡萄糖检测等领域已得到广泛研究与应用^[57,58]。例如, Tan 等^[59]通过优化膜结构参数, 在提高单位面积酶固定化密度的同时降低膜厚度, 利用毫秒级停留时间有效抑制了蛋白质降解。这种改进使得质谱分析中 BSA 酶解产物的大分子肽段 (3-10 kDa) 序列覆盖率显著提升, 从 2 s 停留时间下的 53%提高到 0.05 s 停留时间下的 82% (图 1-6)。Chu 等^[60]设计了一种新型普鲁士蓝基生物催化膜, 其分离层具有密集的微孔结构, 而传感层则包含松散的大孔结构, 能够同步实现血液分离与检测功能。Chen 等^[61]

报道了一种新型针电极的制备方法：首先在聚苯胺纳米纤维膜上沉积铂纳米颗粒，随后固定 GOx。铂纳米颗粒不仅通过静电作用固定 GOx，还提供了高导电性和大比表面积，维持了 GOx 的电催化活性。采用多孔 PVDF 和纳米球 Nafion 生物相容复合涂层（图 1-7），既调控了葡萄糖扩散又抑制了干扰吸附，大幅提升了传感器的体内使用寿命，该传感器可在生理环境下稳定运行超过 3 周，且重现性良好。

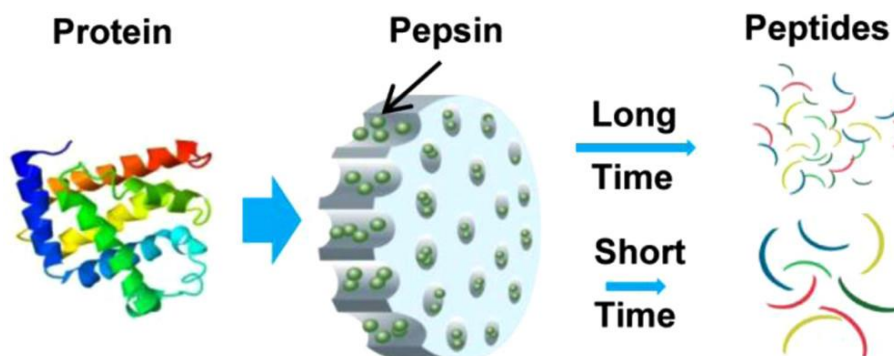


图 1-6 酶膜反应器(固定化胃蛋白酶)——控制样品停留时间以限制蛋白质消解^[59]

Figure 1-6 Enzymatic membrane reactor(immobilized pepsin)——regulating sample retention time to control protein digestion^[59]

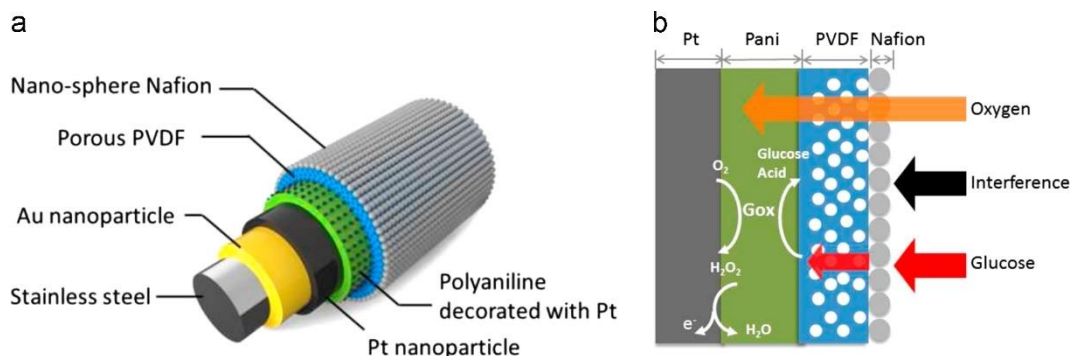


图 1-7 葡萄糖检测针电极^[61]

Figure 1-7 Glucose sensing needle. (a) Multilayered structures. (b) Operation principle^[61]

1.2.2.3 CO₂ 捕获和转化

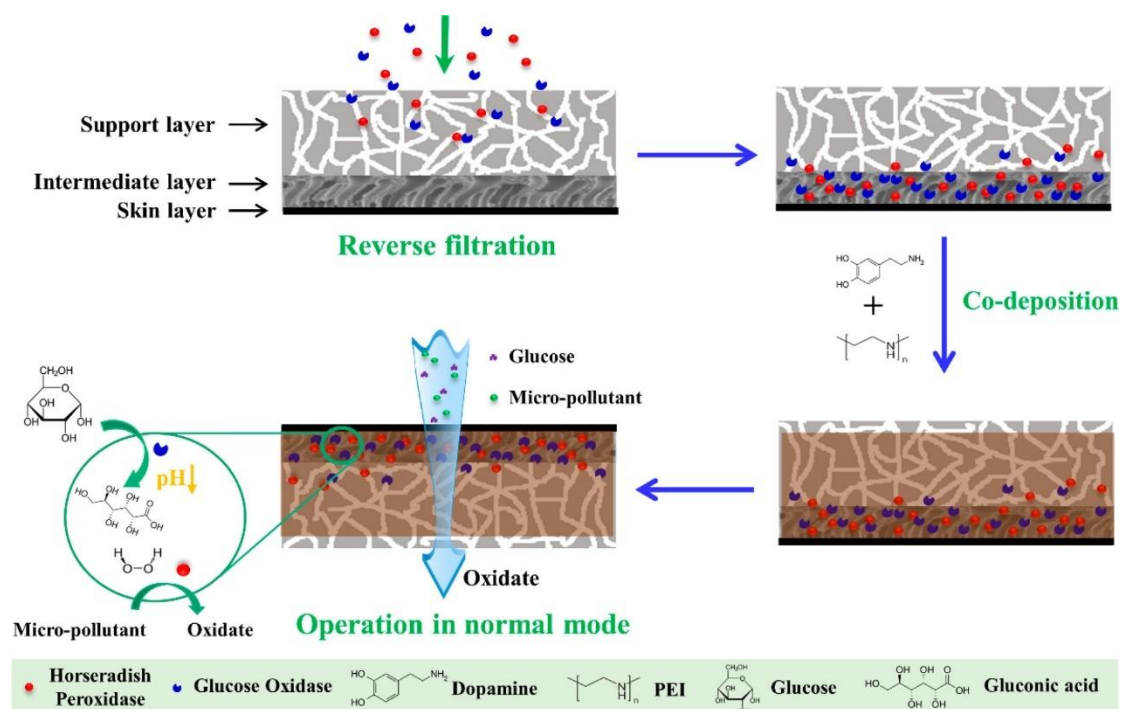
在自然界中，CO₂ 固定发生在碳酸酐酶（CA）催化水合反应的叶子中。受光合作用机制的启发，越来越多的研究者开始关注 CA 的固定化技术及其在 CO₂ 捕获中的应用研究。例如，Yang 等^[62]将 CA 固定在功能化聚丙烯腈（PAN）纳米纤维膜上。结果显示，该仿生催化膜表现出优异的性能，实现了 CO₂ 到 HCO₃⁻ 的高效转化，促进了 CaCO₃ 矿化。它达到了每克膜活性单位（WAU）11.77 mg CaCO₃ 的沉淀效率，并在 5 周内的 5 个循环中保持了 63.12% 的初始 CaCO₃ 生成量。Fu 等^[63]制备了一种 Janus 膜，该膜包括一个直径约 18 nm 的密堆积阵列，其直径为

8 nm 的亲水孔可通过毛细管冷凝作用稳定水,并精确地容纳 CA。亲水性层中高浓度的 CA 催化 CO_2 和水快速相互转化为碳酸,从而加速 CO_2 通过膜的渗透,提高 CO_2/N_2 和 CO_2/H_2 的选择性。此外,罗等^[64]首次利用反向过滤技术,成功将甲酸脱氢酶(FDH)、甲醛脱氢酶(FaldDH)和醇脱氢酶(ADH)共固定在聚合物膜中,所开发构建的生物催化膜实现了 CO_2 到甲醇(0.5 mM)的高效生物转化。

1.2.3 级联生物催化膜

由于生命体中的催化反应往往需要多种酶共同参与多步反应并实现协同作用,这使得多酶级联反应的研究显得尤为重要^[3,65]。这类反应通过有序连续的催化过程完成物质转化和能量转移,其优势在于:缩短底物传递时间、降低中间产物损耗、抑制副反应发生^[65,66],从而在节约物料和能源投入的同时,显著提升了整体反应的经济性。受这种多酶协同工作的启发,研究者们通过将多种酶固定在膜上或膜内制备多酶级联生物催化膜,以实现反应步骤的顺序耦合,从而提高催化效率、简化操作流程。并且随着材料科学和酶工程技术的进步,级联生物催化膜已经在复杂生物转化过程中发挥越来越重要的作用。

Zhang 等^[67]报道了一种新型级联生物催化膜,其制备方法涉及反向过滤和 PDA/PEI 共沉积,从而在聚酰胺纳滤膜上共固定 GOx 和 HRP (图 1-8)。该体系利用 GOx 原位产生的有机酸/电子供体,结合液-固界面的分离与反应协同作用,显著提升了 HRP 的催化性能,实现 BPA 的完全降解(100%去除率)。Barricella 等^[68]将 GOx 和 HRP 通过 PDA 和 PEI 的共沉积在聚醚砜超滤(UF)膜中空间划分。PDA/PEI 纳米层减少了酶的渗漏,分别保留了约 98%和约 70%的 GOx 和 HRP,并且空间限定的级联体系表现出优异的催化活性,与游离的 GOx 和 HRP 相比,分别增加了 1.48 倍和 3 倍。Li 等将 GOx 和 HRP 固定在 MOF 中,构建了一个多空间区室纳米反应器以提高级联催化效率^[69]。通过精确调控中间运输路径,解决了酶不稳定和催化干扰的问题,使催化效率比溶液中的游离酶提高了 $\approx 5.8\sim 13.5$ 倍。将多孔纳米材料作为化学催化剂和酶载体嵌入膜中进行级联反应,可以大大减轻膜的通透性损失。例如,Oh 等^[70]通过双连续纳米多孔膜构建了一个 GOx/CAT 的级联分隔系统介导葡萄糖氧化。此外,该分隔系统还具有多种生物活性和屏障特性,包括过氧化氢解毒、原位产氧和蛋白酶排除。

图 1-8 生物催化膜的制备和级联催化原理图^[67]Figure 1-8 Schematic diagram of biocatalytic membrane preparation and cascade catalysis^[67]

1.2.4 生物催化膜面临的问题和挑战

生物催化膜虽具有巨大发展潜力，但距离实际工业应用仍有较大差距，主要存在以下瓶颈：（1）催化效率低下。膜内固定化酶时，空间位阻效应、酶分子刚性化及活性位点遮蔽等问题会严重削弱酶的催化能力。（2）长期稳定性不足。一方面，酶固定化不牢固导致泄漏；另一方面，反应微环境动态变化（如产物抑制）加速酶失活。（3）多酶协同效率不足。不同酶之间的反应速率不匹配，导致中间产物积累或反应瓶颈。（4）传质与反应不匹配，即对流传质通量越高，虽然酶的比催化活性会上升，但由于反应停留时间减少，导致单次过滤底物转化率显著下降。为了解决上述问题，我们必须深入研究酶与膜界面间的相互作用规律，从材料设计、结构优化、反应动力学调控等多方面入手，解析生物催化膜的反应-传质耦合过程，以增强两者的协同作用。

1.3 课题的提出和主要研究内容

1.3.1 研究背景与意义

为了解决游离酶普遍存在的结构脆弱、稳定性差、难以回收等缺陷，利用多孔材料构建限域空间是提升酶稳定性和重复使用率的可行方案，但其主要以扩散传质为主导，本体溶液和限域空间之间分子动态交换效率低，因而限制了酶催化

效率。而将酶和膜结合所构建的生物催化膜以对流传质主导，可以促进产物原位移除，提高产物的产率和选择性，因而被广泛用于构建兼具催化与分离功能的生物催化膜。但研究发现，目前所制备的生物催化膜普遍存在活性较低的问题。酶固定化后虽能提升酶的稳定性，但存在活性位点被覆盖，底物传质阻力高，酶结构改变等原因造成活性损失。同时，除了催化剂自身的状态，底物分子在催化膜内的传质行为会对催化膜活性也会产生重要的影响。

因此，本研究通过构建不同维度（1D 纳米管、2D 纳米片、3D 多孔聚合物）的生物催化膜，系统探究传质路径、空间尺寸及速率对酶催化性能的影响机制。构建自适应 GO 二维生物催化膜，实现多酶级联反应的高效协同。该研究不仅为优化生物催化膜的结构设计提供了理论依据，还通过创新性构建自适应 GO 二维级联体系，解决了传统固定化技术中酶活性损失、传质受限及稳定性不足等难题，具有显著的学术价值与工程实践意义。

论文的技术路线如图 1-9。

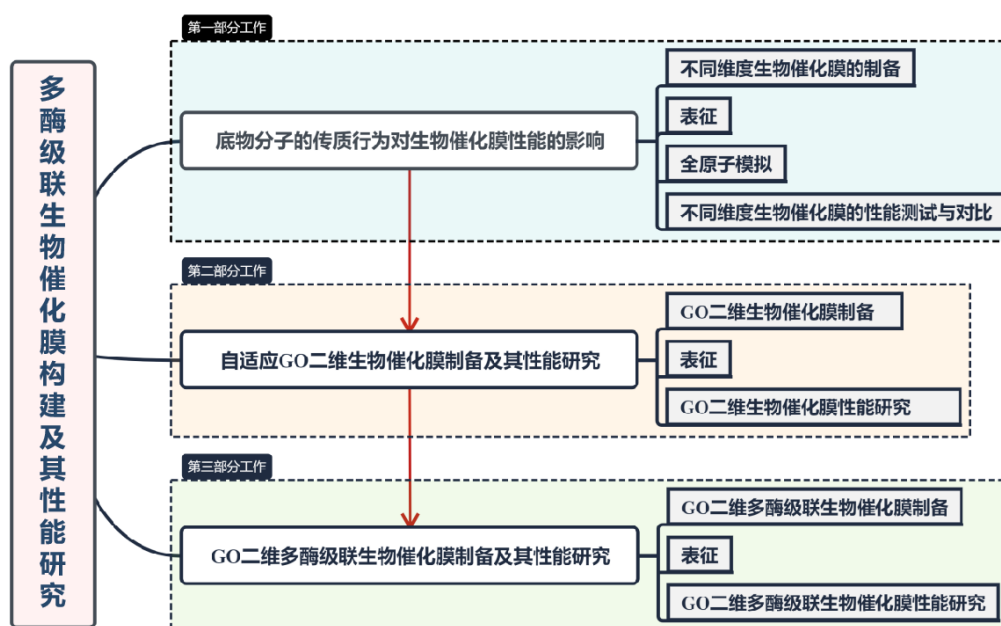


图 1-9 技术路线

Figure 1-9 Technology route

1.3.2 主要研究内容

本论文分为三个部分，具体内容如下。

（1）探究底物分子的传质行为对不同维度的生物催化膜性能的影响机制。

以游离蔗糖 Inv 为催化剂，利用 TA-APTES 贻贝仿生涂层构建不同维度的生物催

化膜 (E@1DM、E@2DM、E@3DM)。通过 SEM、FTIR、XPS 和 CLSM 等手段进行表征验证；通过优化底物分子在生物催化膜中的传质路径、速率和传质空间尺寸，探究底物分子的传质行为对生物催化膜性能的影响机制。

(2) 构建自适应 GO 二维生物催化膜并对其性能进行动力学研究。以 GO 二维纳米片为载体，制备 GO 生物催化膜 E@GO。通过 DLS、XRD、SEM 和 TEM 等手段进行表征验证；以模型酶 (Inv、GOx、HRP) 研究测试膜的动力学参数 (K_m 、 V_{max})、酶负载效率、固定化酶稳定性等，探究 GO 二维生物催化膜中限域传质和催化效率的协同作用机制。

(3) 构建 GO 二维级联生物催化膜并对其性能进行研究。在固定化单酶的基础上，采用两种固定化策略 (共固定和顺序逐层固定) 制备多酶级联生物催化膜，并与游离酶催化效率进行对比。初步探究两种级联固定化策略对 GO 多酶级联生物催化膜的影响机制。

第 2 章 多维度生物催化膜制备及性能对比

2.1 引言

酶作为绿色生物催化剂，凭借其高催化效率和精准立体选择性，在制药、食品加工及生物燃料合成等领域展现出巨大潜力，然而生物酶结构脆弱、稳定性差、难以回收限制了其大规模工业化应用。分离膜作为一种优异的酶固定化载体和分离介质，将其与酶结合构建生物催化膜，不仅能改善酶的稳定性和可回收性，还可以实现对流质为主导的连续反应分离过程，提高产物选择性和产率。然而，目前所制备的生物催化膜仍然普遍存在传质和催化转化率难以匹配的问题。目前，利用涂层改性技术调控酶膜界面特性（亲水性、电荷分布、拓扑结构）可以有效提高酶的催化效率，但传质和催化转化率之间的博弈效应仍然难以解决^[49,54]。此外，生物催化膜的催化活性不仅与酶的本征活性密切相关，底物分子在膜内传质速率、路径和空间尺寸也会影响底物与酶的可及性，成为影响系统性能的关键制约因素。

因此，为有效解决生物催化膜中传质-催化动态耦合失衡的问题，本部分实验以游离 Inv 为催化剂，利用 TA-APTES 贻贝仿生涂层分别构建 1D 纳米管（AAO）、2D 纳米片（GO）、3D 多孔聚合物（PES）生物催化膜（E@1DM、E@2DM、E@3DM）。通过精密调控生物催化膜的微纳结构，优化底物分子在催化膜中的传质路径、速率和传质空间尺寸，深入研究传质效率与催化性能的构效关系，阐明多尺度条件下反应与传质协同作用机理。

2.2 实验材料与仪器

表 2-1 实验材料
Table 2-1 Experimental material

名称	纯度	供应商
蔗糖	AR	阿拉丁
单宁酸（TA）	AR	西格玛
（3-氨基丙基）三乙氧基硅烷（APTES）	AR	阿拉丁
乙醇	GR	上海安耐吉
异硫氰酸荧光素（FITC）	AR	麦克林
二甲基亚砜（DMSO）	AR	阿拉丁

续表 2-1 实验材料

Table 2-1 Experimental material

名称	纯度	供应商
乙酸（冰醋酸）	AR	国药集团
无水乙醇	AR	国药集团
无水乙酸钠	AR	国药集团
磷酸氢二钠	AR	国药集团
磷酸二氢钠	AR	国药集团
转化酶（Inv）	VI 级， $\geq 300\text{U/mg}$	西格玛
牛血清白蛋白（BSA）	/	北京索拉
Bradford 试剂	/	西格玛
阳极氧化铝模板（AAO）	/	合肥普元
尼龙膜	/	柏丞科技
聚醚砜微孔滤膜（PES）	/	海宁德滤
单层氧化石墨烯分散液（GO）	/	先丰纳米

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental instruments

名称	型号	供应商
电子天平	GL1241-1SCN	广州深华
酸度计	Seven Compact S220	瑞士梅特勒
紫外可见分光光度计	UH5300	日本日立
真空干燥箱	DZF-6020	上海恒科
超声波清洗机	KQ-100DE	昆山超声
恒温磁力搅拌器	85-2 型	上海司乐
离心机	4-16K	美国西格玛
恒温振荡器	HZ-9211KB	太仓华利达
高效液相色谱仪	RID-10A	日本岛津
冷场发射扫描电子显微（SEM）	JSM-6700F	日本电子
能量色散 X 射线光谱仪（EDX）	X-MaxN50	英国牛津
傅里叶变换红外光谱仪（FT-IR）	NICOLET iS 50	美国 Thermo
X 射线光电子能谱仪(XPS)	AXIS SUPRA+	英国岛津
X 射线衍射仪（XRD）	Rigaku SmartLab 9 kW	日本理学株式会社
超分辨共聚焦显微镜	Leica SP8 STED 3X	德国徕卡

2.3 实验方法

2.3.1 生物催化膜的制备方法

2.3.1.1 E@1DM 的制备

首先，将 TA 溶解在醋酸缓冲液（pH 3.6，50 mM）中制备 TA 溶液（2 g/L）。将 APTES 溶解在无水乙醇中制备 APTES 溶液（10 g/L）。将孔径为 30、50 和 70 nm 的 AAO 膜（记为 1DM-1、1DM-2 和 1DM-3）用 50% 的乙醇彻底润湿 30 s，

然后浸入 20 mL TA/APTES 体积比为 8:1 的均匀涂覆溶液中。涂覆过程在 25°C 和 120 rpm 下进行 30 min (分别记为 1DM-1-coated、1DM-2-coated 和 1DM-3-coated)。随后, 将膜在去离子水中洗涤 2 h, 然后浸入在从醋酸缓冲液 (pH 6.0, 10 mM) 中制备的 Inv 溶液 (0.125 g/L, 20 mL) 中, 在 25°C 和 120 rpm 下浸泡 2 h。固定化后, 用去离子水彻底冲洗膜以去除膜表面未结合或弱结合的酶。最终得到一维生物催化膜, 分别命名为 E@1DM-1、E@1DM-2 和 E@1DM-3。

2.3.1.2 E@2DM 的制备

首先将 0.8 mg GO 与 TA 溶液 (2 g/L) 混合 30 min (20 mL, 25°C, 120 rpm) 以获得 TA 涂覆的 GO 纳米片。然后, 将 Inv 溶液 (20 mL, 0.125 g/L) 加入 GO 溶液中, 并用醋酸缓冲液 (pH 6.0, 10 mM) 将体积调整至 60 mL。将混合物在 25°C 和 120 rpm 下混合 1 h。随后, 将混合溶液 (60 mL) 过滤到尼龙膜上, 制备二维生物催化膜, 记为 E@2DM。制备的生物催化膜在流动模式下用去离子水彻底洗涤, 以去除未结合或弱结合的酶。

2.3.1.3 E@3DM 的制备

将 PES 膜 (记为 3DM) 用 50% 的乙醇彻底润湿 30 s, 然后浸入 20 mL TA/APTES 涂覆溶液中。涂覆过程在 25°C 和 120 rpm 下进行 30 min, 得到涂覆膜 (记为 3DM-coated)。将膜在去离子水中洗涤 2 h。随后, 将膜浸入 Inv 溶液 (20 mL, 0.125 g/L) 中, 在 25°C 和 120 rpm 下浸泡 2 h 进行酶固定化。最后, 用去离子水彻底冲洗膜以去除未结合或弱结合的酶。最终得到三维生物催化膜, 记为 E@3DM。

2.3.2 Inv 在膜中的分布

将 FITC 标记的 Inv 按照第 2.3.1 节中描述的相同方法固定在三种不同维度的膜中。获得的生物催化膜通过 Leica SP8 STED 3X 系统进行共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 分析酶分布。FITC 标记的 Inv 通过以下步骤制备: 首先将 5 mg/mL 的 Inv 酶溶液溶解于 50 mM pH 9.0 的碳酸盐缓冲液 (配制方法: 7.36 g NaCl、1.06 g Na₂CO₃ 和 7.56 g NaHCO₃ 溶于 1 L 去离子水)。同时, 用 DMSO 配制 1 mg/mL FITC 溶液。随后将 FITC 溶液缓慢滴加至 Inv 溶液中, 4°C 搅拌反应 4~8 h。加入 2 mL 50 mM NH₄Cl 水溶液终止反应后, 最后用 50 mM pH 7.0 的磷酸盐缓冲液透析 72 h 去除多余的 FITC。

2.3.3 表征测试

使用 JSM-6700F 场发射扫描电子显微镜 (SEM) 在 5 kV 操作电压下观察膜表面的微纳结构特征及截面层状结构；为获得更全面的元素组成信息，同步采用能量色散 X 射线光谱仪 (EDS) 进行面扫分析，在 15 kV 加速电压下获取 C、O、N 和 S 特征 X 射线的元素分布图谱；通过傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR) 采集 4000~400 cm^{-1} 波数范围内的红外吸收光谱，分辨率为 4 cm^{-1} ，累计扫描 64 次，重点分析膜材料表面官能团（如-OH、C=O、C-N 等）的特征振动峰；利用射线光电子能谱仪 (XPS) 测定膜材料的表面化学性质，采用单色化 Al K α 射线 (1486.6 eV)，以 0.1 eV 步长采集高分辨谱，通过 CasaXPS 软件进行分峰拟合确定各元素的化学环境；通过 X 射线衍射仪 (XRD) 测量二维膜的层间距，扫描范围 5-60° (2 θ)，扫描速度 8° /min，通过 Bragg 方程计算膜的层间距；使用共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 观察生物催化膜中酶的固定化分布，选用 488 nm 氩离子激光激发荧光标记的酶分子 (FITC 标记)，以 1 μm 步长进行 Z 轴层扫，通过 ImageJ 软件获得酶在膜中的空间分布信息。

2.3.4 膜通量的测定

使用死端过滤池测试膜的通量。首先，将膜在 2 bar 下预压 30 min，直到其性能稳定。然后测试其在不同操作阶段中通量的变化，包括原膜、涂层之后、固定化之后。收集一定渗透体积的滤液并记录时间，至少测试三次，取平均值。膜的通量 (L_p , $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$) 可以通过以下公式计算：

$$L_p = \frac{V_p}{A_m \times t \times TMP}$$

其中， V_p 为一定时间后的渗透体积， A_m 为有效过滤面积 ($13.4 \times 10^{-4} \text{ m}^2$)，TMP 为跨膜压力。

2.3.5 膜载酶量的测定

采用 Bradford 法测定样品的蛋白质浓度^[71]。取 1 mL 酶溶液样品与 1 mL Bradford 试剂混合。5 min 后，记录 595 nm 处的吸光度。该方法的蛋白质检测限为 20 $\mu\text{g/L}$ 。根据质量平衡，固定化蛋白质的量可以计算为：

$$M_{IMM} = C_F \times V_F - C_R \times V_R - C_W \times V_W$$

其中， M_{IMM} 为固定化蛋白质的量， C_F 、 C_R 和 C_W 分别为进料、残留和洗涤溶液中的蛋白质浓度。 V_F 、 V_R 和 V_W 分别为进料、残留和洗涤溶液的体积。

2.3.6 固定化酶的活性测定

流动模式（包括对流和扩散传质）：使用蔗糖溶液（3 g/L）作为底物测定 Inv 的活性。将 40 mL 底物溶液倒入装有生物催化膜的死端过滤池中。使用不同的压力控制对流流速。收集到的渗透液通过高效液相色谱（HPLC）测定蔗糖、葡萄糖和果糖的浓度。色谱柱为 Bio-Rad Amine®HPX-87N，300 mm×7.8 mm。进样量为 20 μ L，流动相为超纯水，流速为 0.6 mL/min。色谱柱温度为 60°C，示差检测器（RID）温度为 50°C。按以下公式计算催化速率（ v ， $\mu\text{M s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ）：

$$v = \frac{C_0 - C_1}{t \times M_{\text{IMM}}}$$

其中， C_0 为底物溶液中蔗糖的初始浓度； C_1 为反应结束时蔗糖的残留浓度； t 为膜内的停留时间； M_{IMM} 为固定化酶的量。

浸泡模式（扩散传质）：使用蔗糖溶液（3 g/L）作为底物测定 Inv 的活性。将制备的生物催化膜浸入 40 mL 底物溶液中。在反应 30 s、60 s、90 s、120 s 和 150 s 时，取出 2 mL 溶液并煮沸 3 min 以终止反应。随后，通过 HPLC 测定不同反应时间后蔗糖、葡萄糖和果糖的浓度。催化速率的计算方法与上述相同。

2.3.7 全原子模拟

本工作所使用的模拟均采用 GROMACS 2023.2 软件和 AMBER 力场执行。在两个长方形盒子中间分别随机填充 50 个和 100 个蔗糖分子。然后，在水盒子两边放入石墨烯板，两块石墨烯板之间的距离分别为 23.10 nm 和 43.43 nm。接着使用 SPC 水模型进行溶剂化过程，盒子具有周期性边界条件。采用 NaCl 离子平衡体系内的电荷，使得体系保持电荷中性。然后，采用最速下降法对体系进行能量最小化处理，以消除体系中的空间冲突。之后，分别在 NVT 和 NPT 系综下使用位置限制分子动力学模拟平衡 100 ps。最后在 NPT 系综下模拟 20 ns 用于数据分析，时间步长为 2 fs。在模拟过程中采用蛙跳积分法(Leap-frog Integration)求解牛顿运动方程。同时，采用 V-rescale 恒温器和 Parrinello-Rahman 恒压器对体系的温度、压力进行控制，使体系保持在 298 K、1 bar 的条件下，松弛时间为 1 ps。并且，采用 Lincs 方法约束体系的共价键。模拟采用 Particle Mesh Ewald 方法计算了体系中的长程静电相互作用的倒易空间部分，网格空间为 1.6 Å。短程相互作用则采用截断方法计算，截断半径为 1.0 nm。平衡后，进行 20 ns 的无偏模拟，每 10 ps 保存一次轨迹。

2.3.8 生物催化膜的稳定性测试

2.3.8.1 长期使用稳定性

根据上述方法通过测定生物催化膜的催化活性和床层体积来评估其长期使用稳定性。床层体积 (Bed volume) 是指过滤实际底物料液体积与膜组件中催化活性区域的体积比, 计算公式如下:

$$\text{Bed volume} = \frac{V_{\text{总}}}{A \times d}$$

其中, $V_{\text{总}}$ 为过滤实际底物料液体积 (cm^3); A 为有效膜面积 (cm^2); d 为催化层厚度 (cm), 需通过 SEM 或截面显微测量获得。

将底物溶液过滤至催化膜, 每过滤 15 mL 收集一次。将第一个收集的 15 mL 测得的酶活性定义为 100%, 并计算后续收集液中固定化酶的相对酶活性。

2.3.8.2 长期储存稳定性

根据上述方法通过测定生物催化膜的催化活性来评估其长期储存稳定性。将生物催化膜在 4°C 的冰箱中储存 15 天。每三天测量一次酶的催化效率。储存当天 (第 0 天) 的酶催化效率定义为 100%, 并计算出各储藏天数的相对酶活。

2.4 结果和讨论

2.4.1 一维生物催化膜

2.4.1.1 SEM 图谱分析

1DM 以及改性后的不同孔径膜的表面及横截面 SEM 结构如图 2-1 所示, 可以观察到其呈现出均匀有序的六边形网状纳米孔隙排列, 1DM-1, 2, 3-coated 的实际孔径分别为 23.10、43.43 和 61.95 nm, 以及孔隙率分别为 28.46%、44.67% 和 48.20%。这种高度有序的多孔结构可以大大提高 AAO 膜的实际表面积^[72-74], 可产生较大的比表面积和分散度, 可以增加酶的附着位点, 有利于提高材料对酶的固定化性能, 同时增大与催化底物的接触位点。同时, 1DM-1 膜改性前后孔径变化不大, 说明超薄 TA-APTES 涂层可以基本保持膜本身形貌。

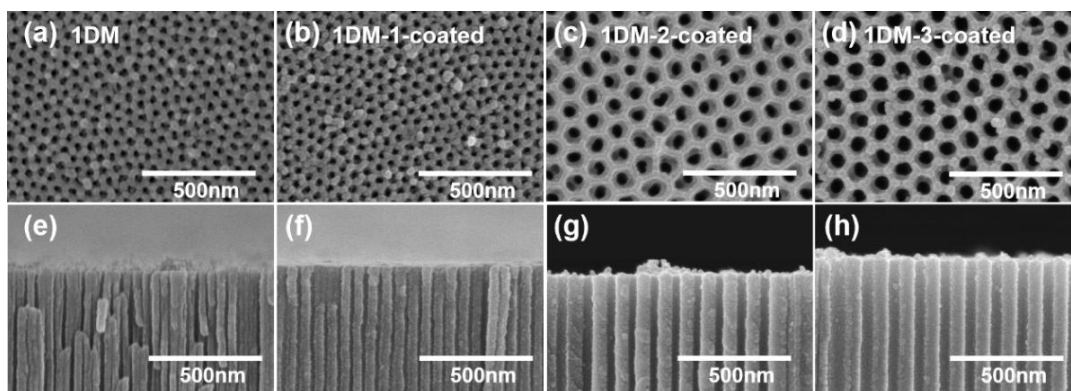


图 2-1 SEM: 1DM-1 和 1DM-1, 2, 3 改性后膜的表面 (a-d) 和断面 (e-h)

Figure 2-1 SEM: surface (a-d) and cross section (e-h) of 1DM-1 and 1DM-1, 2, 3 modified films

2.4.1.2 FT-IR 和 XPS 图谱分析

为了进一步证明 1DM 被成功涂层以及确定样品表面的元素组成, 对膜表面进行了 FT-IR 和 XPS 分析。结果见图 2-2, 1DM 经 TA/APTES 涂层改性后, 位于 1705 cm^{-1} 处的峰归因于 C=O 拉伸振动, 这是由于 TA 分子中酚羟基被氧化成醌基引起的^[75,76], 对应 XPS 的 C1s 谱中 288.86 eV 处的 C=O 峰明显增强。1210 cm^{-1} 处 C-O 伸缩振动是酯基 (-COO-) 存在的特征峰, 对应 XPS 的 C1s 谱中 286.62 eV 处的 C-O 峰明显增强。此外, 出现在 1097 cm^{-1} 和 1506 cm^{-1} 的峰分别为 Si-O-Si 的反对称拉伸振动和 N-H 弯曲振动^[77,78]。表明 1DM 表面形成了涂层。

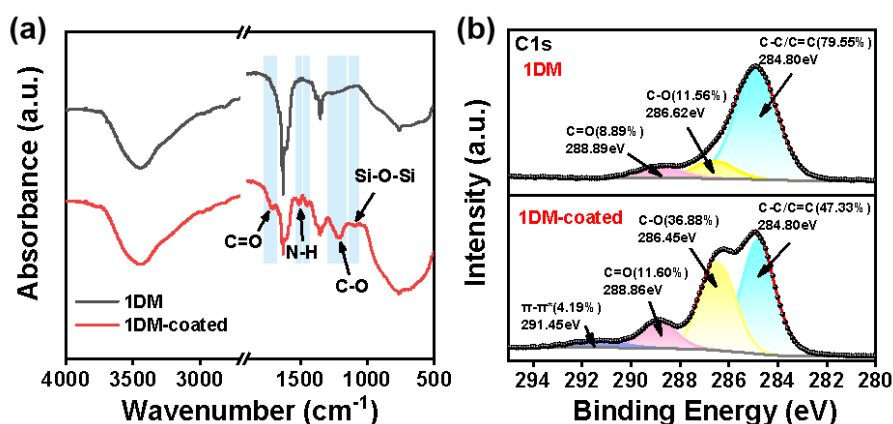


图 2-2 1DM 和 1DM-coated: FTIR (a) 和 XPS (b)

Figure 2-2 1DM and 1DM-coated: FTIR (a) and XPS (b)

2.4.1.3 EDX 图谱分析

采用 EDX 对 1DM 和 E@1DM 的横截面进行元素表征分析。结果见图 2-3, 与原始 1DM 膜相比, E@1DM 中检测到 N 元素的分布特征, 经 EDX 半定量分析显示 N 原子含量约为 1.53%; 此外, E@1DM 中 S 原子含量增加了 0.6%, 这

归因于膜内共价接枝的酶蛋白。这些结果证实 Inv 已成功固定在分离膜上。

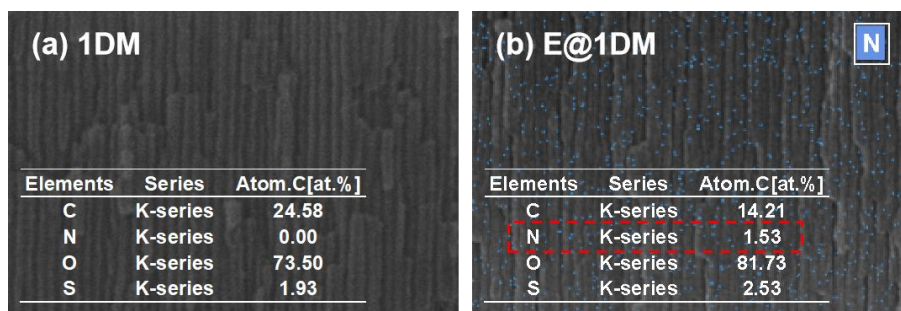


图 2-3 EDX 与 SEM 结合进行膜的元素映射：(a) 1DM 和 (b) E@1DM

Figure 2-3 EDX and SEM were combined to map the elements of the membrane: (a) 1DM; (b) E@1DM

2.4.1.4 CLSM 图谱分析

经异硫氰酸荧光素 (FITC) 染色后, Inv 显示黄绿色荧光, 结果如图 2-4 所示, E@1DM 生物催化膜表面和内部均呈现明显的黄绿荧光积累, 且从 X-Z 和 Y-Z 轴的切面可以看出 Inv 在 1DM 孔道内分布较为均匀。进一步证明 Inv 被成功固定在分离膜上。

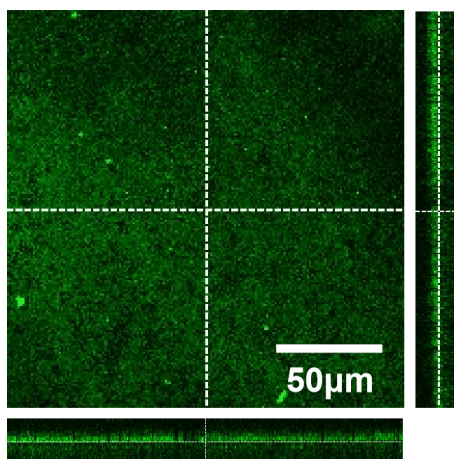


图 2-4 E@1DM 荧光图谱

Figure 2-4 E@1DM fluorescence spectrum

2.4.1.5 传质行为对 E@1DM 催化性能影响

AAO 模板通过电化学自组织生长形成, 其独特的结构优势体现在: 孔径尺寸高度均一 (CV 值<8%)、孔道呈六方密排结构 (长程有序性>10 μm)、垂直取向度优异 (倾斜角<1°), 且具有从几十纳米到数百纳米的可调孔径范围及高达 65% 的孔隙率^[79]。因此, 本研究先以 1DM 为例, 从传质空间尺寸和传质速率两方面探究传质行为对膜催化性能的影响。

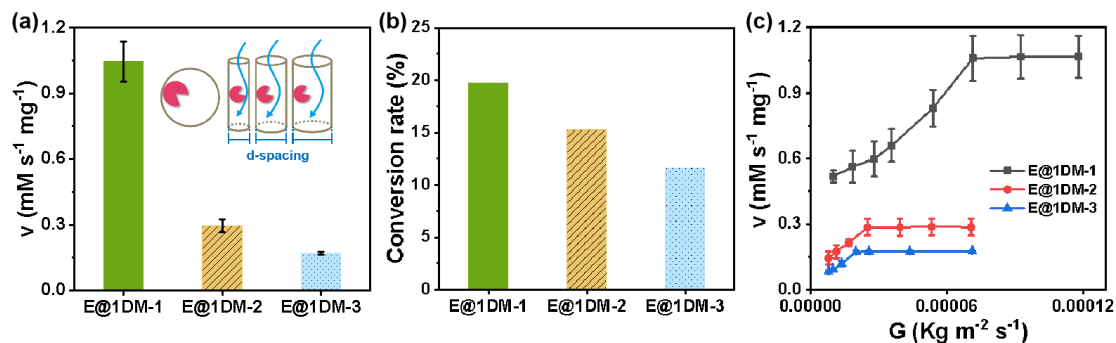


图 2-5 膜内纳米通道尺寸对 (a) 比催化效率和 (b) 转化率的影响; (c) 传质速率对比催化效率的影响

Figure 2-5 The effect of nanochannel size on (a) specific catalytic efficiency and (b) conversion rate of biocatalytic membrane; (c) The effect of convective mass transfer rates on specific catalytic efficiency

图 2-5 (a) 为不同孔径 E@1DM 的比催化速率对比, 结果表明, 孔径越小其比催化速率反而越高, E@1DM-1 的比催化速率是 E@1DM-2 的 3.5 倍, 是 E@1DM-3 的 6 倍。同时, 孔径越小, 对底物的转化率也最高 (图 2-5 b)。通过分子动力学模拟可以看出, 当孔径越小时, 纳米通道内蔗糖分子和壁面碰撞的频率和概率都显著提升, 这是使得催化膜比催化速率和转化率同时提升的原因 (图 2-6)。

传质速率对催化速率的影响如图 2-5 (c) 所示, E@1DM 的催化速率随质量流速的增加均逐渐增加。是由于当传质是整个反应的控制步骤时, 随着对流速率的增加, 传质阻力逐渐减小, 底物与酶的接触机会增多, 催化速率会随之增加。此外, 在较小孔径条件下, 需实施更高的对流速度以确保通道内维持足够的底物浓度来满足催化平衡需求。因此孔径越小, 反应动力学曲线拐点出现的越滞后。而当传质速率提升至超越某一阈值 (即不再成为限速因素) 时, 化学反应本身的速率就成为了控制步骤, 此时即使进一步提高传质速率, 由于化学反应本身的速率限制, 催化速率也不会再增加。

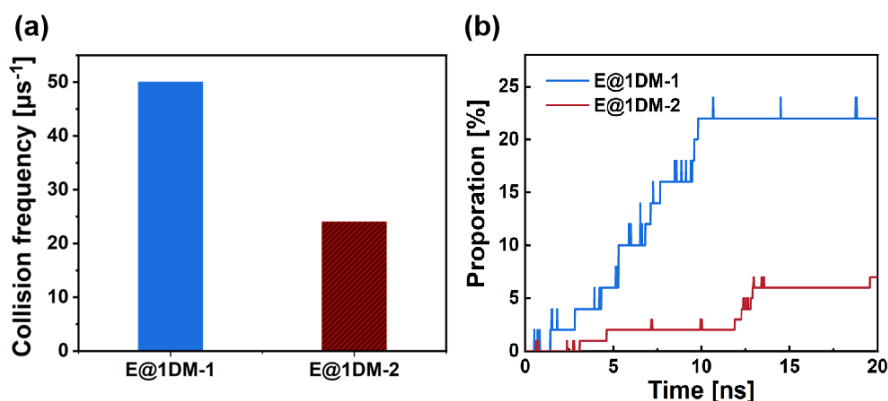


图 2-6 分子模拟计算纳米通道内蔗糖分子与壁面碰撞的 (a) 频率和 (b) 概率

Figure 2-6 The (a) frequency and (b) probability of collisions between sucrose molecules and the nanochannel by molecular simulations

2.4.2 二维、三维生物催化膜

2.4.2.1 SEM 图谱分析

通过 SEM 观察 2D 和 3D 膜形态。图 2-7 (a) 显示 2DM 及其改性后和酶固定化后的膜横截面形态,其分离层均呈现出规则的 GO 片堆叠片层结构。2DM 经过 TA 改性后,分离层厚度从 285 nm 增加到 328 nm。加入 Inv 后,厚度增加到 766 nm。且随着 TA 和酶的嵌入,使膜面变得更加平滑,是因为小尺寸的 TA 和酶分子可以与 GO 二维纳米片的堆叠来覆盖不平整的区域^[80]。图 2-7 (b) 显示 3D 原膜、改性后、酶固定化后的膜横截面形态,其膜孔径变化不大,说明超薄 TA-APTES 涂层可以基本保持膜本身形貌,能在不改变材料外观和基本物理性质的前提下实现功能化修饰。

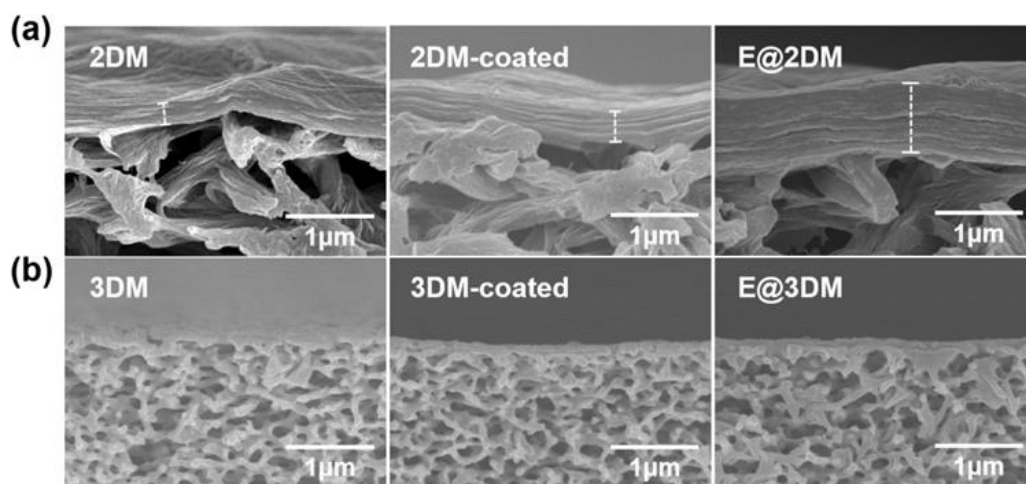


图 2-7 原膜、改性后、酶固定化后的横截面 SEM 图: (a) 2DM; (b) 3DM

Figure 2-7 SEM images of the original membrane, modified membrane and immobilized enzyme: (a) 2DM; (b) 3DM

2.4.2.2 FT-IR 和 XPS 图谱分析

图 2-8 (a) 显示了 2D 和 3D 原膜、改性后和酶固定化后的 FT-IR 图谱。与原膜相比, 改性后的膜在 $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ 处出现的 -OH 和 -NH_2 的拉伸振动峰明显增加^[81], 在 1706 cm^{-1} 处有一个清晰的新的 -C=O 拉伸振动峰, 这是由 TA 分子^[82]氧化产生的醌引起的。图 2-8 (b) 为对应的 XPS 的 C1s 谱图, 膜在经过改性处理后, C=O 基团的含量明显增加, 这充分证明了基膜已成功实现改性。而当 Inv 固定到膜上后, C=O 峰强度降低, 这表明 TA-APTES 涂层上的残留醌基由于与 Inv 的氨基发生共价反应而被消耗^[83], 证明已成功实现酶固定化。

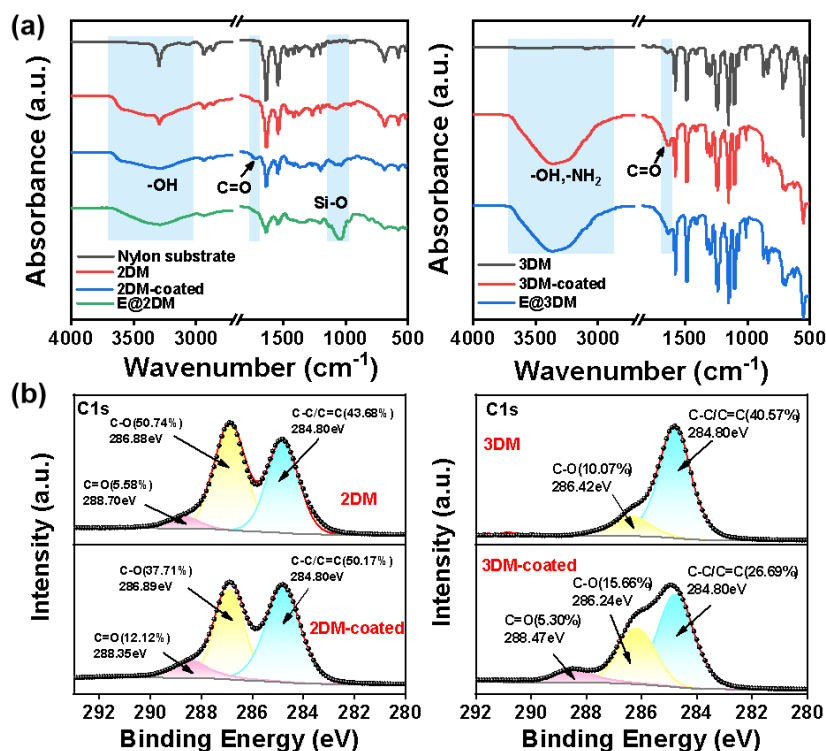


图 2-8 2DM 和 3DM: FTIR (a) 和 XPS (b)

Figure 2-8 2DM and 3DM: FTIR (a) and XPS (b)

2.4.2.3 XRD 图谱分析

图 2-9 所示为 2DM、2DM-coated 和 E@2DM 的 XRD 图谱。在 2DM 的 XRD 图谱中, 观察到 12.09° 处的衍射峰, 根据布拉格定律计算得出层间距为 $7.31\text{ \AA}$, 这与已报道的 GO 膜的层间距相似^[84]。2DM-coated 由于 TA 分子的嵌入提高了膜的层间距, 从原膜的 $7.31\text{ \AA}$ 增加至改性后的 $7.71\text{ \AA}$ 。但 E@2DM 未能检测出该峰, 分析可能是由于晶面间距过大, 衍射角小于广角测试范围; 或者样品晶体结构发生相变, 无规律性导致。因此, 结合图 2-7 的 SEM 结果计算 E@2DM 平均片层间距为 $30.20\text{ \AA}$ 。

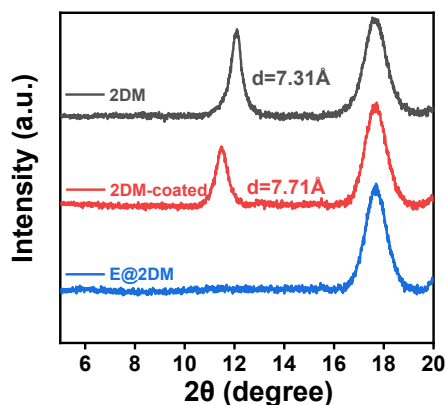


图 2-9 2DM 的 XRD 图谱

Figure 2-9 XRD pattern of 2DM

2.4.2.4 CLSM 图谱分析

图 2-10 所示为 E@2DM 和 E@3DM 的 CLSM 图谱。Inv 用 FITC 染色处理后，在荧光显微镜中呈黄绿色荧光且均匀分散在 E@2DM 和 E@3DM 内部，证明酶的成功固定。E@2DM 所显示的荧光信号更为强烈，分析是由于 2DM 具有大比表面积和规则的层状结构使其有更多吸附位点利于酶的分布，因此其荧光强度会更加强烈。

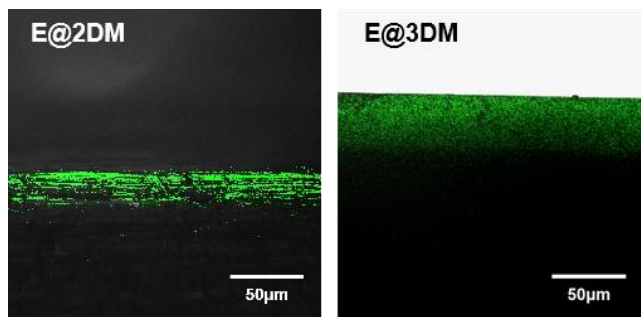


图 2-10 E@2DM 和 E@3DM 的横截面荧光图谱

Figure 2-10 Cross-sectional fluorescence spectra of E@2DM and E@3DM

2.4.3 E@1DM、E@2DM 和 E@3DM 的性能对比

2.4.3.1 基础性能

三种膜的通量变化结果如图 2-11 (a) 所示，1DM 和 3DM 随着改性和酶固定化过程的进行，由于膜孔变窄和堵塞，使得水通量都有小幅下降。2DM 由于 TA 和酶的嵌入提高了膜的层间距，所以通量呈现逐步上升的趋势。图 2-11 (b) 为三种膜的载酶量对比，由图可知，E@2DM 的载酶量最高，可达 480 mg/cm^3 ，E@1DM 和 E@3DM 的酶固定量都较少，这是因为 2DM 可用于酶固定化的比表面积更大；同时，GO 纳米片原子层间通过范德华力或静电力可以将酶稳定限域在二维流道内，抑制酶的泄漏，同时也可保证酶的高分散性^[85]。

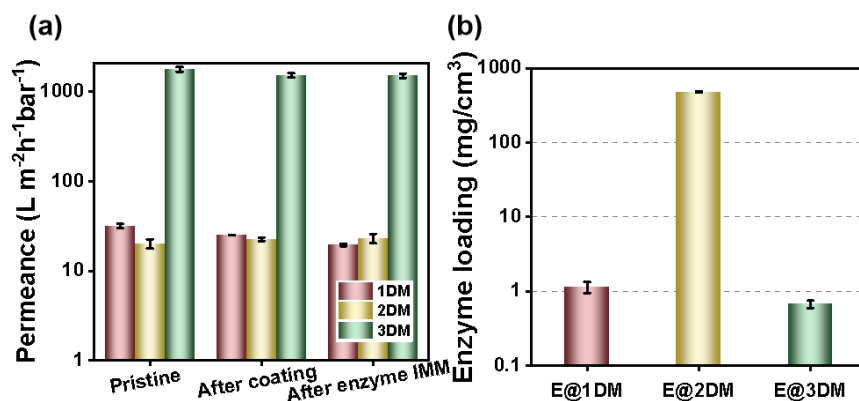


图 2-11 1DM、2DM 和 3DM：通量变化 (a) 和载酶量 (b)

Figure 2-11 1DM, 2DM, and 3DM: Flux variation (a) and enzyme load (b)

2.4.3.2 催化性能

在浸泡模式下，三种膜的比催化活性由高到低依次为 3D>1D>2D（图 2-12 a），这是因为浸泡模式底物主要以扩散传质为主导，较大的膜孔径有利于底物快速扩散进入膜内与固定化酶或催化剂接触。而 E@2DM 层间间距在 3 nm 左右，远低于 E@1DM 和 E@3DM。同时 E@3DM 的孔隙率和比表面积远高于 E@1DM，更有利于底物扩散，所以 E@3DM 的催化效率更高。

在流穿模式下，三种膜的催化性能由高到低依次为 2D>1D>3D（图 2-12 b），与浸泡模式正好相反。流穿模式主要是在压力驱动下，底物以对流传质为主导，而此时由于 E@2DM 层间间距小，且反应-传质维度较低，大幅提高了底物与酶的可及性，因此催化速率远高于 E@1DM 和 E@3DM。对于 E@3DM 来说，底物传质路径复杂，底物可及性低。同时，部分固定有酶的位置可能阻力更高，而流动过程底物更倾向于选择膜阻力更低的位置通过，造成酶的利用率低下，从而导致其比催化速率最低。E@1DM 膜传质路径单一，在相同孔径条件下，比 E@3DM 底物可及性更高，所以催化效率高于 E@3DM。可以发现，流穿模式下酶的催化速率要远高于浸泡模式，说明传质效率的高低对催化膜催化性能影响很大。

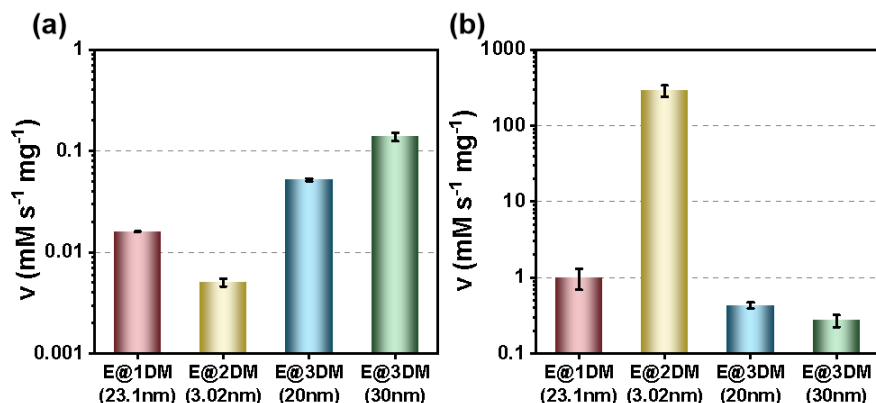


图 2-12 E@1DM、E@2DM 和 E@3DM 在浸泡模式 (a) 和流穿模式 (b) 下的催化活性
Figure 2-12 E@1DM, E@2DM, and E@3DM for their catalytic activity in immersion mode (a) and penetration mode (b)

2.4.4 E@1DM、E@2DM 和 E@3DM 的稳定性测试

三种催化膜的稳定性由高到低依次为 2D>1D>3D (图 2-13)。由长期使用稳定性的结果可知, 三种催化膜的效率降低比例均低于 5% (图 2-13 a), 说明所采用的超薄涂层具有优异的稳定性, 可以很好的抑制由于涂层脱落或者酶脱落造成的活性损失。其中, E@2DM 由于较高的限域强度有利于将酶高效稳定的固定在膜内, 可以抑制酶分子储存期间构象发生变化。此外, 固定化酶的活性位点可以被载体材料保护, 这也有助于提高储存稳定性^[86]。

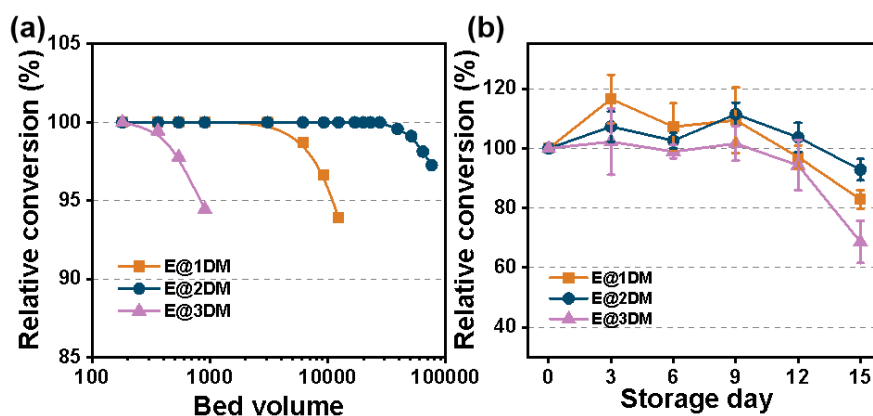


图 2-13 E@1DM、E@2DM 和 E@3DM 的长期使用稳定性 (a) 和长期储存稳定性 (b)
Figure 2-13 Long-term use stability (a) and long-term storage stability (b) of E@1DM, E@2DM and E@3DM

2.5 小结

通过构建不同维度 (1D 纳米管、2D 氧化石墨烯、3D 多孔聚合物) 的生物催化膜, 深入探究了底物传质行为对生物催化膜性能的影响机制。研究结果表明,

传质路径的简化、限域空间尺寸的减小以及传质速率的提升，显著提高了底物与酶的可及性，从而增强了生物催化膜的催化效率。其中，E@2DM 表现出最优的催化性能，其层间距小且反应-传质维度低，极大地提高了底物与酶的接触效率，同时，因其较高的限域强度有利于将酶高效稳定的固定在膜内。该结果为后续的实验工作奠定实验基础。

第 3 章 自适应 GO 二维生物催化膜的构建及其性能研究

3.1 引言

近年来，国内外学者围绕自适应二维生物催化膜展开了大量研究。二维层状材料如氧化石墨烯（GO）、过渡金属碳化物（Mxene）、二氧化钛（TiO₂）及二硫化钼（MoS₂）凭借其高比表面积、尺寸可调控性以及可调控的纳米通道等优势，已成为跨化学、材料科学和生命科学等多个学科的研究前沿。现有研究表明，二维材料的层间通道可实现底物与产物的快速传质，其表面丰富的官能团为酶的固定化提供了多样的结合位点，有效提升酶的负载量与稳定性。同时，通过表面功能化修饰，二维生物催化膜能够响应环境变化（如 pH、温度、离子浓度），动态调节催化活性，展现出“自适应”催化优势。

然而，目前该领域仍存在诸多挑战：一是不同二维材料对酶活性的影响机制尚不明确，二是规模化制备工艺的普适性与可控性亟待提升，三是膜内传质与催化效率的协同作用规律尚未明晰。基于第二章的研究成果，我们发现相较于一维和三维生物催化膜，GO 二维生物催化膜可通过层间限域效应精确调控传质路径，同时其独特的片层结构不仅为酶提供了稳定的微环境，还可通过 π - π 堆积、氢键等相互作用优化酶的空间构象，从而有效延缓酶的失活速率。

因此，本章节继续以 GO 二维纳米片为载体材料，通过超声分散-离心法制备得到尺寸均一化的 GO 纳米片后，将几种模型酶（Inv、GOx 和 HRP）分别与 GO 片通过共沉淀法压滤到尼龙支撑层上得到 GO 生物催化膜（E@GO），系统验证该制备方法的普适性。同时，借助 XRD、SEM 和 TEM 等表征技术深入解析材料结构，结合酶学特性测试与动力学分析，揭示膜内限域传质与催化效率的协同作用机制。

3.2 实验试剂与仪器

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagents

名称	纯度	供应商
葡萄糖	AR	阿拉丁
果糖	AR	阿拉丁

续表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagents

名称	纯度	供应商
2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS)	AR	西格玛
过氧化氢 (H ₂ O ₂)	AR	西格玛
4-氨基安替比林 (4-AAP)	AR	麦克林
苯酚	AR	阿拉丁
葡萄糖氧化酶 (GOx)	100U/mg	阿拉丁
辣根过氧化物酶 (HRP)	≥250U/mg	阿拉丁

其他试剂同表 2-1

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental instruments

名称	纯度	供应商
马尔文粒径仪	Nano ZS	英国 Malevern
高分辨透射电子显微镜 (TEM)	JEM-F200(cyrot)	日本电子株式会社

其他仪器同表 2-2

3.3 实验方法

3.3.1 不同尺寸 GO 片层分散液的制备

准备两支 50 mL 的 EP 管，取 60 mL 单层氧化石墨烯分散液 (2 mg/mL) 分装在两支 EP 管中，超声 30 min，频率 40。接着用 DI 水将两支离心管配平，14000 rpm，10 min，25°C。弃上清，加入适量 DI 水，混匀，配平，14000 rpm，10 min，25°C。（同样操作，用 DI 水洗涤三次即可）

区分大、中、小 GO 片层：两支离心管中加入适量 DI 水，混匀，配平，4000 rpm，10 min，25°C，沉淀即为大尺寸片层；上清液配平，8000 rpm，10 min，25 °C，沉淀即为中尺寸片层；上清液即为小尺寸片层。最后将分离出的大、中、小尺寸的 GO 片均加 DI 水至 60 mL，预估出三者的片层浓度，放置 4°C 冰箱备用。

3.3.2 GO 膜和 E@GO 生物催化膜的制备

配制终浓度为 20 mg/L 的 GO 片溶液 60 mL，在 25°C 和 120 rpm 下混合 1 h。随后，将混合溶液 (60 mL) 压滤到尼龙膜上，制备得到原始 GO 膜。

配置终浓度为 20 mg/L 的 GO 片溶液分别与终浓度为 10mg/L 的 Inv、GOx 和 HRP 酶溶液共 60 mL。将混合物在 25°C 和 120 rpm 下混合 1 h。随后，将混合溶液 (60 mL) 过滤到尼龙膜上，制备得到 GO 生物催化膜，记为 Inv@GO、GOx@GO 和 HRP@GO。

3.3.3 表征测试

使用 SEM 在 5 kV 操作电压下检查膜横截面的形态和厚度；薄膜样品装样后进行 XRD 图谱分析，测试时扫描速度 $8^\circ/\text{min}$ ，衍射角 $5\sim 60^\circ$ ，测量 GO 二维膜的层间距；通过马尔文粒径仪测量三种模型酶蛋白的粒径分布；通过 TEM 观察 GO 二维片层纳米结构以及酶蛋白在 GO 片层中的分散情况。

3.3.4 GO 膜基础性能测试

3.3.4.1 膜截留率的测定

将 50 mL 进料溶液加入死端过滤池中，并在 2 bar、120 rpm 和室温（ 25°C ）条件下通过 GO 膜过滤，直到收集到 40 mL 渗透液来测量。截留率通过以下公式计算：

$$R = \left(1 - \frac{C_P}{C_Y}\right) \times 100\%$$

其中， C_P 和 C_Y 分别是渗透液和进料溶液中的溶质浓度。

3.3.4.2 膜通量的测定

测试方法同第二章 2.3.4。

3.3.4.3 膜载酶量的测定

测试方法同第二章 2.3.5。

3.3.5 GO 膜催化性能测试

3.3.5.1 Inv 动力学测试

以 Linweaver-Burk 双倒数作图法^[87]求动力学常数：

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

按照以上的基本公式，该直线纵截距 $=1/V_{\max}$ ，横轴截距 $= -1/K_m$ 。

（1）测试固定化 Inv（Inv@GO）的 K_m 和 $V_{\max}$ 值

在 GO 膜内固定 0.0014 mg 的 Inv 制备 Inv@GO 生物催化膜，过滤 10、20、40、80 和 160 mg/L 的蔗糖溶液，并且在 0.3、0.5、1、1.5、2 bar 的压力下收集渗透液，通过 HPLC 检测并记录不同停留时间下还原糖的浓度。而后采用双倒数法计算得到固定化 Inv 的 K_m 和 $V_{\max}$ 值。

（2）测试游离 Inv 的 K_m 和 $V_{\max}$ 值

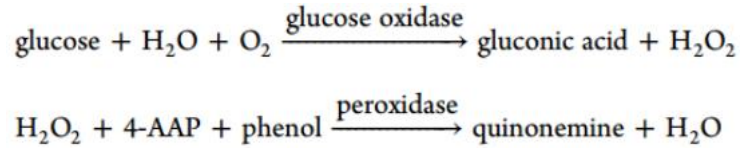
蔗糖酶含量 0.14 mg，分别于 0.75、1.5、3、9、12 和 15 g/L 的蔗糖溶液（40 ml）中反应，在反应 10 s、20 s、30 s、40 s、60 s 时加强碱终止反应，记录不同

反应时间下还原糖的浓度 (DNS 法)。而后采用双倒数法计算得到游离 Inv 的 K_m 和 V_{max} 值。

3.3.5.2 GOx 动力学测试

(1) 测试固定化 GOx 的 K_m 和 V_{max} 值

在 GOx 的存在下, 葡萄糖被氧化为葡萄糖酸和 H_2O_2 。同时, 在 HRP 存在下, H_2O_2 与苯酚和 4-AAP 反应形成粉红色奎宁染料, 该染料在 505 nm 处具有最大吸收。



配制不同浓度的葡萄糖溶液, 测试并纪录不同压力下流经 GOx@GO 生物催化膜的渗透液在 505 nm 下的 OD 值, 带入 H_2O_2 标曲后计算生成的 H_2O_2 产物浓度。而后采用双倒数法计算得到固定化 GOx 的 K_m 和 V_{max} 值。

(2) 测试游离 GOx 的 K_m 和 V_{max} 值

将葡萄糖氧化酶(40 μg)加入 20 mL 葡萄糖溶液中, 该溶液含有 300 μg HRP、4-AAP (0.4 mM) 和苯酚 (40 mM)。反应在室温下持续 5 min, 每 1 min 记录一次吸光度。使用以下方程式计算 H_2O_2 的浓度:

$$C = \frac{OD_{505nm}}{\varepsilon \times \frac{1}{2} \times L} \times 1000$$

其中 ε 是 4-AAP 在 505 nm 处的摩尔消光系数, 等于 $12.88 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, L 是所用比色杯的有效宽度, 因子 1/2 对应于减少 1 mol 4-AAP 所需的 2 mol H_2O_2 。而后采用双倒数法得到游离 GOx 的 K_m 和 V_{max} 值。

3.3.5.3 HRP 动力学测试

(1) 测试固定化 HRP 对底物 ABTS 的 V_{max} 和 K_m 值

将 HRP 液与 GO 片溶液采用共沉淀法压滤制备 HRP@GO 生物催化膜, 将 40 mL 底物溶液 (固定 H_2O_2 : 1.225 mM, ABTS: 200 μM 、300 μM 、400 μM 、500 μM) 在不同的压力下过滤至催化膜的渗透液在 420 nm 处的吸光度值并记录。酶活性估计为 ABTS 的转化率:

$$\text{Conversion} (\%) = \left(\frac{A_p}{A_{max}} \right) \times 100$$

其中 A_p 和 A_{max} 分别实际反应液和原液完全氧化后 ($ABTS^+$) 在 420 nm 处的吸光度。 $ABTS^+$ 在 420 nm 处的摩尔吸收率为 $\varepsilon_{420}=36 \cdot (mM \cdot cm)^{-1}$ 。而后采用双倒数法得到固定化 HRP 对底物 ABTS 的 V_{max} 和 K_m 。

(2) 测试固定化 HRP 对底物 H_2O_2 的 V_{max} 和 K_m 值

将 HRP 液与 GO 片溶液采用共沉淀法压滤制备 HRP@GO 生物催化膜, 将 40 mL 底物溶液 (固定 ABTS: 150 μM ; H_2O_2 : 61.25 μM 、36.75 μM 、24.5 μM 、16.33 μM) 在不同的压力下过滤至催化膜的渗透液在 420 nm 处的吸光度值并记录。酶活力测试方法同上。而后采用双倒数法得到固定化 HRP 对底物 H_2O_2 的 V_{max} 和 K_m 。

(3) 测试游离 HRP 对底物 ABTS 的 V_{max} 和 K_m 值

在 25°C、pH 6.0, 将 20 μL 0.0264 mg/L 左右的 HRP 液加入 2 mL 底物溶液 (H_2O_2 : 1.2 mM; ABTS: 165.02 μM 、123.76 μM 、99.01 μM 、74.26 μM 、49.50 μM) 内, 每分钟测定 420 nm 处的吸光度值并记录。酶活力测试方法同上。而后采用双倒数法得到游离 HRP 对底物 ABTS 的 V_{max} 和 K_m 。

(4) 测试游离 HRP 对底物 H_2O_2 的 V_{max} 和 K_m 值

在 25°C、pH 6.0, 将 20 μL 0.0264 mg/L 左右的 HRP 液加入 2 mL 底物溶液 (ABTS: 99.01 μM ; H_2O_2 : 1212.87 μM 、808.58 μM 、539.05 μM 、359.37 μM) 内, 每分钟测定 420 nm 处的吸光度值并记录。酶活力测试方法同上。而后采用双倒数法得到游离 HRP 对底物 H_2O_2 的 V_{max} 和 K_m 。

3.4 结果和讨论

3.4.1 表征

受细胞膜内嵌入蛋白质构象开关的启发, 以及基于 GO 纳米片层间的界面结合相互作用, 我们设计构建了具有自适应的 GO 二维生物催化膜, 嵌入 GO 纳米流体通道中的酶蛋白结构如图 3-1 所示, 即酶蛋白稳定包埋在柔性 GO 夹层内。以下将通过 SEM、XRD、粒径测试和 TEM 这些形态学表征分析提供 GO 纳米流体通道内酶蛋白均匀包埋整合的证据。

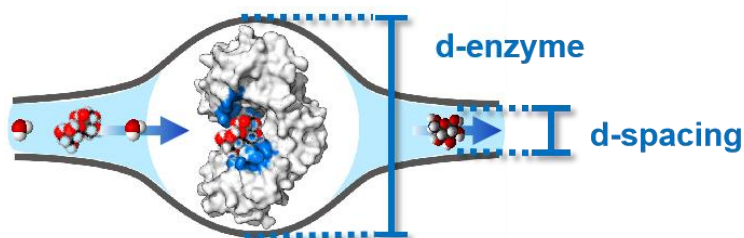


图 3-1 具有自适应的 GO 生物催化膜层间结构示意图

Figure 3-1 Diagram of GO biocatalytic membrane interlayer structure with adaptive

3.4.1.1 SEM 图谱分析

图 3-2 显示 GO 原膜和 Inv@GO 生物催化膜的横截面形态, 其分离层均呈现出均匀的多层微结构, 酶蛋白的嵌入没有破坏超薄 GO 片层的有序堆叠结构。接着通过 ImageJ 测算可知, GO 纳米片加入一定量的 Inv 后, 分离层的厚度由 327.8 nm (图 3-2 a) 增加到 411.6 nm (图 3-2 b)。证明酶蛋白已被成功嵌入 GO 片层间。

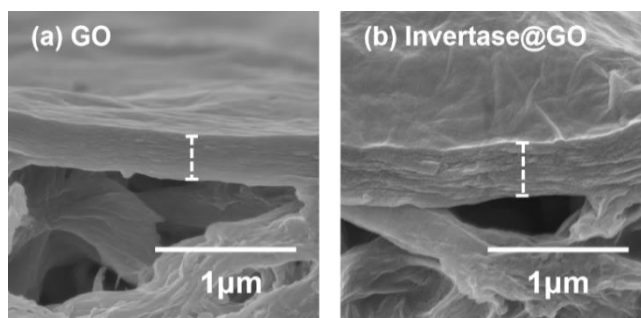


图 3-2 横截面的 SEM 图: GO (a) 和 Inv@GO (b)

Figure 3-2 SEM images of cross sections: GO (a) and Inv@GO (b)

3.4.1.2 XRD 和粒径分析

GO 和过滤葡萄糖、蔗糖、葡聚糖 1000 后 GO 膜的 XRD 结果如图 3-3 (a) 所示, GO 初始片层间距为 8.04 Å, 但随着过滤分子的分子量增大, GO 片层间距逐渐增加, 证明所制备的 GO 二维膜片层间距具有自调节功能。但三种 E@GO 催化膜均未能直接检测出片层间距 (图 3-3 b)。以 Inv@GO 为例, 已知 GO 的片层间距大约为 8 Å, 而单层氧化石墨烯片的厚度为 0.8~1.2 nm, 结合上述的 SEM 表征结果, 通过计算可以得出一张 GO 膜的片层数大约有 183 层。当蔗糖酶插入 GO 片层后, Inv@GO 的片层间距较 GO 初始层间距平均增加了 4.36 Å。此外, 由图 3-3 (c) 粒径测试结果可知, Inv、GOx 和 HRP 的水合尺寸分别为 11.53 nm、9.37 nm 和 4.16 nm。GO 片层中所包埋的酶蛋白的粒径尺寸远远大于所测得的 E@GO 催化膜的片层间距, 因此可以推测我们所构建的 E@GO 膜为酶蛋白嵌入

自适应的柔性 GO 纳米通道结构。

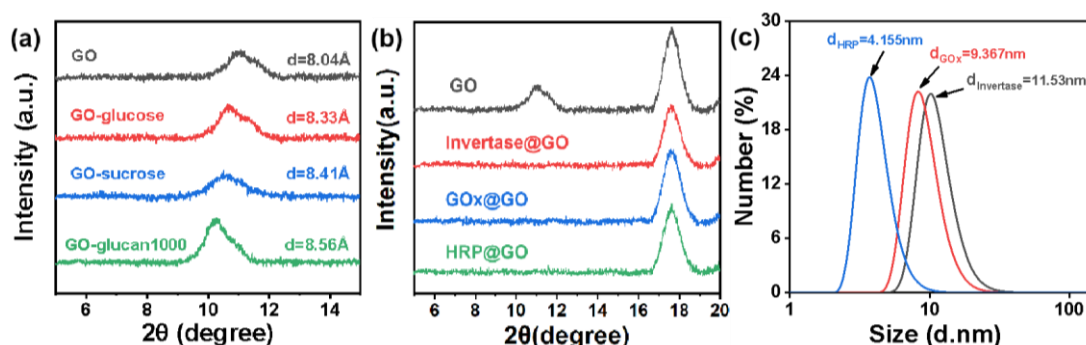


图 3-3 GO (a) 和 E@GO (b) 的 XRD 图谱；三种酶的粒径分布图 (c)

Figure 3-3 XRD patterns of GO (a) and E@GO (b); Particle size distribution of three enzymes (c)

3.4.1.3 TEM 图谱分析

通过透射电子显微镜 (TEM) 对样品进行了表征, 结果如图 3-4 所示。从图 3-4 (a) 中可以观察到, GO 呈现单层分散的二维片层纳米结构。进一步利用负染色技术对 Inv 蛋白进行观察, 结果显示其粒径约为 10 nm (图 3-4 b), 这一结果与前述粒径分析数据吻合。此外, 从图 3-4 (c, d) 可以看出, 当 GO 片层与 Inv 蛋白混合后, 酶蛋白均匀地分布在 GO 片层之间, 形成了良好的分散状态。

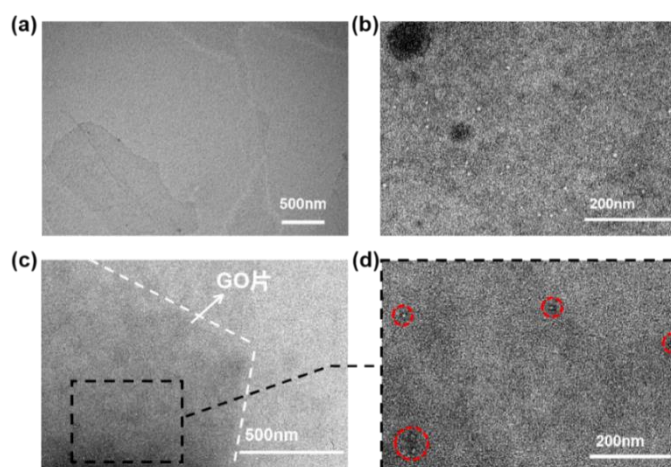


图 3-4 GO 纳米片 (a)、Inv (b) 和 GO/Inv (c, d) 的 TEM 图

Figure 3-4 TEM images of GO nanosheets (a), Inv (b) and GO/Inv (c, d)

3.4.2 GO 膜基础性能

3.4.2.1 截留率

图 3-5 展示了所制备的 GO 膜对不同分子量物质的截留性能。实验结果表明, 该膜对分子量低于 1000 Da 的小分子几乎不具备截留能力。在过滤初期, 截留率相对较高, 这可能是由于膜表面吸附作用与截留效应的共同作用所致。随着过滤的进行, 后续渗透液的截留率显著降低, 这可能是由于膜表面吸附位点达到饱和,

同时小分子插入 GO 层间, 导致层间距扩大, 使得相同尺寸的分子能够顺利通过。这一现象充分证明了所构建的 GO 二维纳米通道具有自调节特性, 能够允许特定范围内 (<1000 Da) 的分子自由通过。

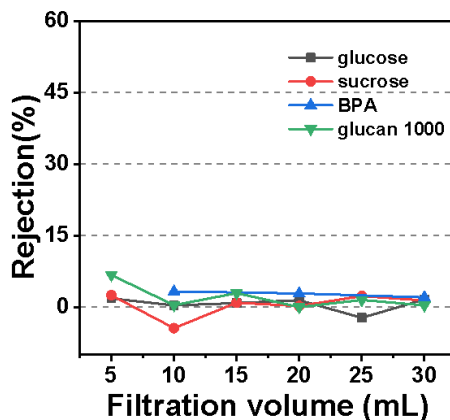


图 3-5 GO 膜对于不同分子的截留率

Figure 3-5 The retention rate of GO membrane for different molecules

3.4.2.2 膜通量

对 GO-原膜和 Inv@GO 生物催化膜的过滤通量变化进行测试对比, 结果如图 3-6 所示。酶蛋白在 GO 片层结构中的有效负载使得催化膜渗透性能显著提升, 相较于原始 GO 膜通量增幅达约 40%, 且通量稳定性显著增强, 衰减速率明显降低。这一现象可归因于酶分子在 GO 纳米限域结构中的均匀分散促使传质通道有效扩张, 从而扩大了可用的传输间距, 增加了膜的渗透率。

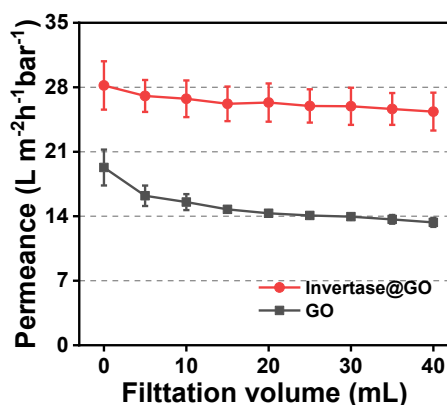


图 3-6 GO 和 E@GO 的过滤通量变化

Figure 3-6 Filter flux changes of GO and E@GO

3.4.2.3 载酶率

GO 膜对于三种模型酶 (Inv、GOx 和 HRP) 的载酶率结果如图 3-7。三种酶的载酶率均在 95 % 以上, 说明 GO 纳米片可以成功将酶包埋在纳米片中。GO 的表面富有很多的功能性基团, 包括环氧化物、羟基和羧基^[88-90], GO 片层之间可

以通过范德华力、静电作用力、 $\pi - \pi$ 作用等实现酶的稳定包埋，而不需要添加交联剂或进行额外的表面改性。此外，酶蛋白的分子量越大其载酶率越高，主要是由于酶蛋白分子量越大其空间位阻效应更强，难以通过 GO 纳米流道的狭窄间隙；同时，其表面积越大越容易被 GO 片层吸附，从而减少酶的泄漏。

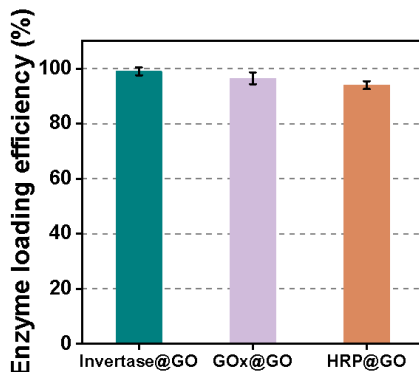


图 3-7 GO 膜的载酶率

Figure 3-7 Enzyme loading efficiency of GO membrane

3.4.3 GO 膜催化性能

3.4.3.1 Inv@GO 催化效果

15 mg/L 的蔗糖溶液在 Inv@GO 催化膜内的转化结果如图 3-8 所示，底物在 GO 催化膜内仅停留 < 0.2 s，转化率便可达 100 %。根据 SEM 表征结果可知（图 3-2 b），Inv@GO 催化膜的分离层仅仅只有几百纳米，因此微量的酶蛋白由于被限制在及其狭窄的体积内而达到极高浓度。此外，在纳米限域效应的影响下，纳米限域催化膜能够通过富集反应物、促进传质以及加强电子相互作用显著提升体系的催化降解性能，实现反应速率常数的数量级提升^[91-94]。同时，由于 GO 二维限域流道，使得反应体系从 3D 转为 2D，从而提高了反应物与酶的碰撞频率，催化效率大大提高。

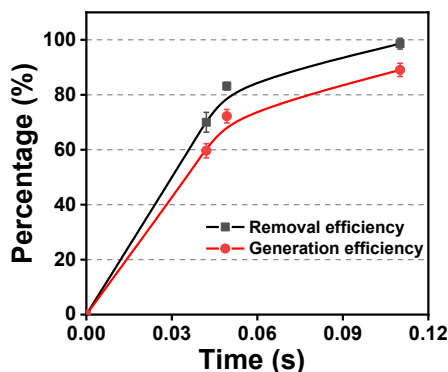


图 3-8 15mg/L 的蔗糖溶液在 Inv@GO 内的转化率

Figure 3-8 Conversion of 15mg/L sucrose solution in Inv@GO

3.4.3.2 Inv、GOx 和 HRP 动力学测试

为了探究 GO 膜固定化酶后对酶催化反应的影响,进行游离酶与膜固定化酶的动力学参数测定,实验结果如图 3-9 和表 3-3 所示。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法得出游离和 GO 膜固定化酶 K_m 值分别为 41.73、1.99 mM (Inv); 14.17、3.09 mM (GOx); 0.661、0.93 mM (HRP, ABTS); 0.067、0.023 mM (HRP, H_2O_2)。 V_{max} 值分别为 0.222、3.37 mM s^{-1} (Inv); 0.0016、2.11 mM s^{-1} (GOx); 9.9、 $1.05 \times 10^4 \mu M \min^{-1}$ (HRP, ABTS); 1.2、 7.6×10^3 (HRP, H_2O_2)。结果显示,GO 基二维纳米限域通道固定的酶系统展现出更低的 K_m 值和更高的 V_{max} 值,这从酶动力学角度证实了该固定化体系能有效消除传统载体中常见的传质限制效应。纳米限域空间不仅通过物理约束作用维持了酶分子的活性构象,还增强了底物分子在纳米流道内的定向传输效率^[95],从而显著提升了酶催化反应的动力学性能。也为后续构建多酶级联生物催化膜奠定了基础。

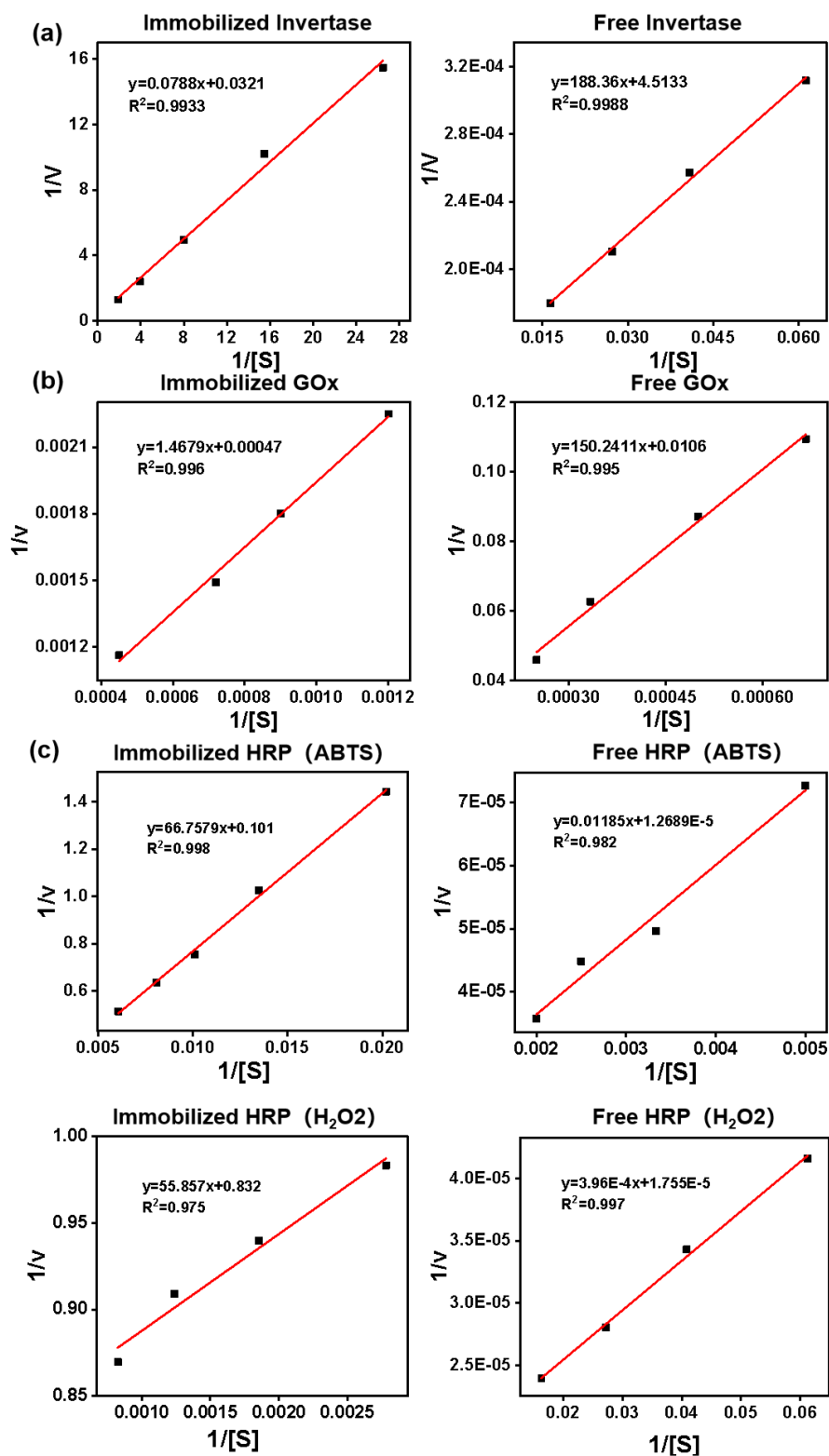


图 3-9 固定化酶和游离酶的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Figure 3-9 Lineweaver-Burk double reciprocal diagram of immobilized and free enzymes

表 3-3 固定化酶和游离酶的动力学参数
Table 3-3 Kinetic parameters of immobilized and free enzymes

samples	free Invertase	immobilized Invertase	free GOx	immobilized GOx
K_m[mM]	41.73	1.99	14.17	3.09
V_{max}[mM·s⁻¹]	0.222	3.37	0.0016	2.11
samples	free HRP (ABTS)	immobilized HRP (ABTS)	free HRP (H₂O₂)	immobilized HRP (H₂O₂)
K_m[mM]	0.661	0.93	0.067	0.023
V_{max}[μM·min⁻¹]	9.90	1.05×10⁴	1.2	7.6×10³

3.5 小结

该部分工作以 GO 为载体，通过超声分散-离心法制备了尺寸均一的 GO 纳米片，并将 Inv、GOx 和 HRP 与 GO 片层通过共沉淀法构建二维 GO 生物催化膜 (E@GO)。通过 XRD、SEM、TEM 和粒径分析等手段对膜的结构进行了表征，结果表明酶蛋白均匀分散在 GO 片层中，且 GO 膜具有自调节的纳米流道结构，能够根据分子量大小动态调整层间距。实验证明，固定化酶的催化效率显著高于游离酶，表现出更高的底物亲和力和催化活性，这是由于 GO 二维限域流道能够有效富集反应物，提高酶与底物的碰撞频率，从而显著提升催化效率。该研究为开发高效、稳定的生物催化膜提供了新的思路和方法。

第 4 章 GO 二维级联生物催化膜的构建及其性能研究

4.1 引言

级联催化 (Cascade Catalysis) 作为一种高效的多步反应串联策略, 在多个领域展现出重要应用价值, 例如手性药物制备、生物燃料合成以及污染物降解等等。其核心优势在于将多个催化反应整合为连续过程, 减少中间体分离步骤, 提高原子经济性。因此, 受到多酶协同工作的启发, 级联生物催化膜通过结构创新与功能集成, 正成为生物制造、环境治理等领域的关键技术。其制备核心在于实现多催化剂/酶的高效协同、传质与反应的动态匹配以及长期运行稳定性的平衡。目前, 研究学者们普遍所采用的级联固定化方法包括利用金属有机框架将多酶进行包封^[96], 设计 DNA 链连接多酶^[97]等将多酶进行近距离空间排布, 但它们都存在催化活性不高, 级联通量低以及操作工艺复杂困难等问题。而 GO 纳米片凭借其自发层状堆叠特性, 可通过简单的逐级自组装实现多酶的分区固定, 提高反应有序性的同时避免相互干扰; 同时纳米限域流道促进底物分子定向传递, 模拟天然酶复合物的底物通道效应。

基于此, 本部分工作在固定化单酶的基础上, 将三种模型酶 (Inv、GOx 和 HRP) 通过共固定化与顺序固定化 (LbL 逐层自组装) 两种策略构建 GO 多酶级联生物催化膜, 旨在初步解析两种固定化策略对 GO 级联生物催化膜的影响机制, 为生物催化领域的发展提供新的思路和方法, 推动相关技术在更多领域的广泛应用。

4.2 实验试剂与仪器

所用的实验试剂与仪器同表 2-1、2-2、3-1 和 3-2。

4.3 实验方法

4.3.1 双酶级联 GO 生物催化膜的制备

4.3.1.1 共固定策略

取预先配制的 GO 片溶液与浓度为 10 mg/L 的 Inv、GOx 溶液混合共 60 mL。将混合物在 25°C 和 120 rpm 下混合 1 h。随后, 将混合溶液 (60 mL) 压滤到尼

龙膜上，制备得到级联共固定 GO 生物催化膜，记为 Inv/GOx@GO。

4.3.1.2 顺序逐层固定策略

取预先配制的 GO 片溶液分别与浓度为 10 mg/L 的 Inv、GOx 溶液混合各 30 mL。将混合物在 25°C 和 120 rpm 下混合 1 h。随后，先将 GOx 与 GO 的混合液（30 mL）进行压滤。待压滤结束后空压一段时间，再将 Inv 与 GO 的混合液（30 mL）进行压滤，制备得到级联顺序逐层固定 GO 生物催化膜，记为 Inv-GOx@GO。

4.3.2 三酶级联生物催化膜的制备

4.3.2.1 共固定策略

取预先配制的 GO 片溶液与浓度为 10 mg/L 的 Inv、GOx、HRP 溶液混合共 60 mL。将混合液在 25°C 和 120 rpm 下共混 1 h。随后，将混合溶液（60 mL）压滤到尼龙膜上，制备得到级联共固定 GO 生物催化膜，记为 Inv/GOx/HRP@GO。

4.3.2.2 顺序逐层固定策略

取预先配制的 GO 片溶液分别与浓度为 10 mg/L 的 Inv、GOx、HRP 溶液混合各 20 mL。将混合物在 25°C 和 120 rpm 下混合 1 h。随后，先将 HRP 与 GO 的混合液（20 mL）进行压滤，待压滤结束后空压一段时间，再将 GOx 与 GO 的混合液（20 mL）进行压滤，待压滤结束后空压一段时间，最后将 Inv 与 GO 的混合液（20 mL）进行压滤。制备得到级联顺序逐层固定 GO 生物催化膜，记为 Inv-GOx-HRP@GO。

4.3.3 表征

取 0.5 cm×0.5 cm 的薄膜样品放置于测试台的导电胶带上，进行喷金预处理，接着使用 JSM-6700F 场发射扫描电子显微镜在 5 kV 操作电压下检查级联催化膜的横截面形态。

4.3.4 级联生物催化膜性能测试

4.3.4.1 双酶级联催化

（1）膜固定化酶：

将 20 mL 20 mg/L 的蔗糖溶液以不同的压力下过滤到 Inv/GOx@GO 和 Inv-GOx@GO 级联催化膜，收集液通过比色法测试产生的 H_2O_2 浓度来对比两种级联催化膜的催化效果。

(2) 游离酶:

称取与膜固定化酶同等量的 Inv/GOx, 于 20 mg/L 的蔗糖溶液 (20 mL) 中反应, 每隔一分钟记录波长在 505 nm 处的吸光度来测试游离体系下产生的 H_2O_2 浓度, 测试游离体系中双酶级联催化效果。

4.3.4.2 三酶级联催化

(1) 膜固定化酶:

将配制的 20 mL 底物溶液 (蔗糖: 20 mg/L 和 ABTS: 100 μM) 以不同的压力下过滤到 Inv/GOx/HRP@GO 和 Inv-GOx-HRP@GO 级联催化膜, 收集液在 420 nm 处的吸光度来计算产生的 ABTS^+ 浓度, 测试比两种级联催化膜的催化效果。

(2) 游离酶:

称取与膜固定化酶同等量的 Inv/GOx/HRP, 于 20 mg/L 的蔗糖溶液 (20 mL) 中反应, 每隔 20 s 记录波长在 420 nm 处的吸光度来计算游离体系下产生的 ABTS^+ 浓度, 测试游离体系中三酶级联催化效果。

4.4 结果与讨论

4.4.1 SEM

图 4-1 显示了两种固定化策略所构建的双酶和三酶 GO 级联生物催化膜的横截面形态, 其分离层均呈现出高度有序的层层堆叠结构, 且两种固定化方式所构建的催化膜在形态上没有太大的差异。接着通过 ImageJ 测算可知, Inv/GOx@GO 和 Inv-GOx@GO 的分离层厚度分别为 485.5 nm 和 525.8 nm; Inv/GOx/HRP@GO 和 Inv-GOx-HRP@GO 的分离层厚度分别为 567.7 nm 和 609.7 nm。虽然不同固定策略的膜厚度存在约 8.3%~9.2% 的差异, 但其层间间距分布的变异系数均低于 5%, 表明两种固定化方式在维持层状结构规整性方面具有等效性。而顺序逐层固定策略导致的膜厚增量可能与组装过程中分子间作用力 (包括 $\pi-\pi$ 堆积、氢键及静电相互作用) 的累积效应有关。

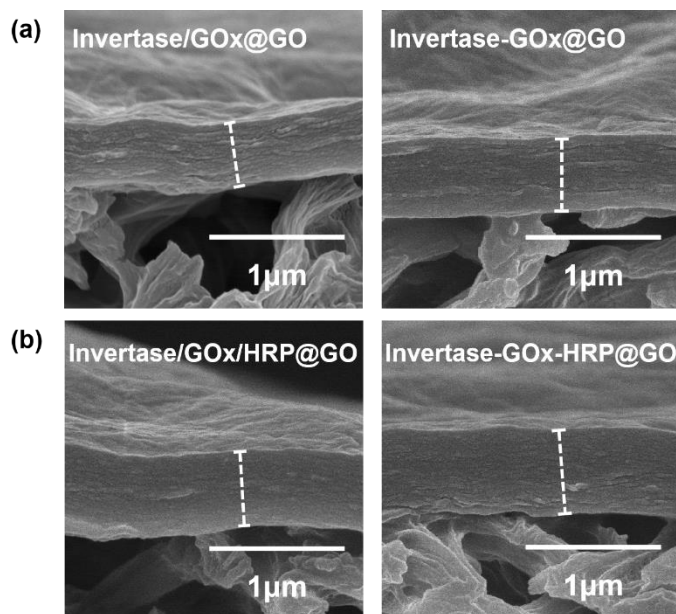


图 4-1 横截面的 SEM 图: Inv/GOx@GO 和 Inv-GOx@GO (a); Inv/GOx/HRP@GO 和 Inv-GOx-HRP@ (b)

Figure 4-1 SEM diagram of cross section: Inv/GOx@GO and Inv-GOx@GO (a);
Inv/GOx/HRP@GO and Inv-GOx-HRP@ (b)

4.4.2 双酶级联催化

双酶级联催化的结果如图 4-2 所示, 当底物 (蔗糖) 实现完全转化时 (图 4-2), 两种膜固定化酶体系的催化效率显著优于游离酶体系, 其反应速率较游离体系分别提升了 1467 倍 (共固定) 和 1364 倍 (顺序逐层固定)。同时, 由图 4-2 (b) 可知, 两种膜固定化双酶的方法对于级联催化的第二个反应也具有明显的促进作用。在游离体系下, Inv/GOx 级联催化蔗糖需要 10 min 才产生 $5 \mu\text{M}$ 的 H_2O_2 , 而两种双酶级联固定化策略催化蔗糖产生等量 H_2O_2 所需的反应时间大幅缩短, 均 $< 0.5 \text{ s}$ 。且共固定和顺序逐层固定策略的级联催化效果相近, 证明所构建的 GO 二维限域流道为底物的传输提供了特定的路径和空间, 能够促进底物的定向传递, 从而替代两个共固定级联酶由于邻近效应和定向效应而自发产生的底物通道。

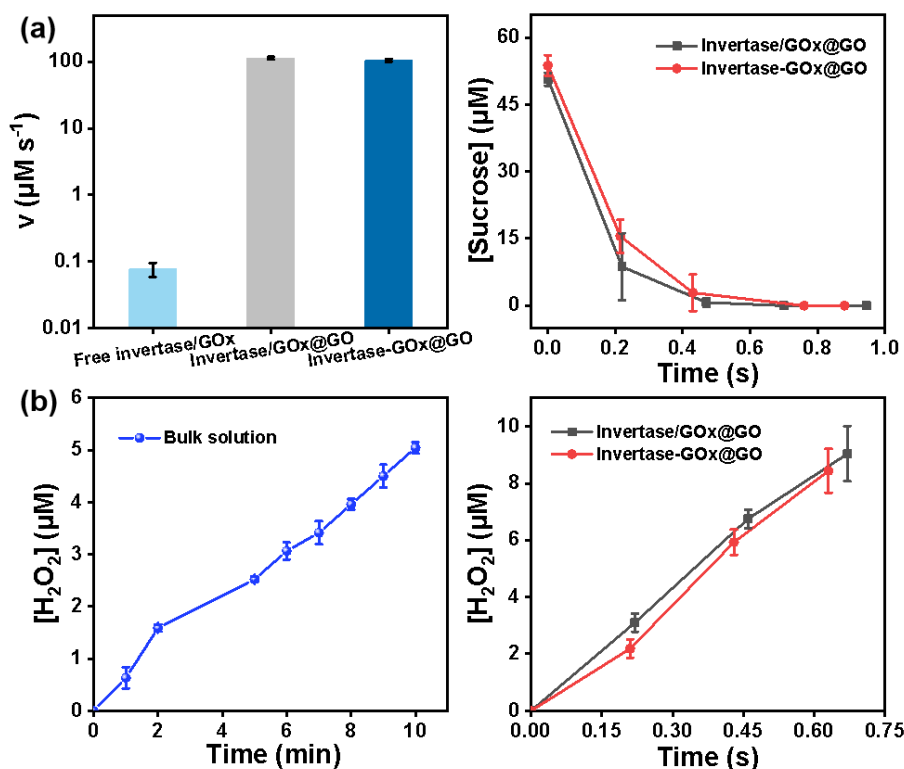


图 4-2 (a) 游离双酶和两种膜固定化双酶对底物(蔗糖)的催化速率和效果对比; (b) 游离双酶和两种膜固定化双酶级联催化产生 H_2O_2 浓度的对比

Figure 4-2 (a) Comparison of catalytic rates and effects of free double enzymes and two membrane immobilized double enzymes on the substrate (sucrose); (b) Comparison of H_2O_2 concentration produced by cascade catalysis of free double enzymes and two membrane immobilized double enzymes

4.4.3 三酶级联催化

三酶级联催化的结果如图 4-3 (a) 所示, 两种膜固定化三酶级联策略的催化效果依旧显著优于游离酶体系, 生成 $2 \mu\text{M}$ 的 ABTS^+ , 在游离体系下需要 90 s, 但在级联固定化体系下仅 <0.8 s。原则上, 共固定化体系可以高效地完成催化, 因为中间体在原位被酶消耗(即低产物抑制)^[3]。然而, 三酶顺序逐层固定化比三酶共固定化的催化效率更高, 分析是由于把酶分区逐层固定的策略可以避免中间产物对其他酶的干扰。在游离体系下进行验证, 结果如图 4-3 (b) 所示, 当底物溶液加入 H_2O_2 和 HRP 后其反应速率明显下降, 且对于 GOx 的催化速率影响更大。因此, 当三酶共固定级联催化时, 由于 HRP 催化 H_2O_2 产生 $\cdot\text{OH}$ 会攻击 Inv 和 GOx 使两者的催化效率下降, 而分区逐层固定化能有效地将酶隔离在它们各自的区间内, 从而实现有效的底物通道并最大限度地减少相互的干扰, 从而促进级联反应的高效运行。目前, 通过文献调研发现, 空间动力学效应在级联催化反应中的调控机制远比传统理论模型预测的更为复杂。本研究构建的具有高效催

化性能的 GO 二维级联生物催化膜可能存在新型的空间协同机制。

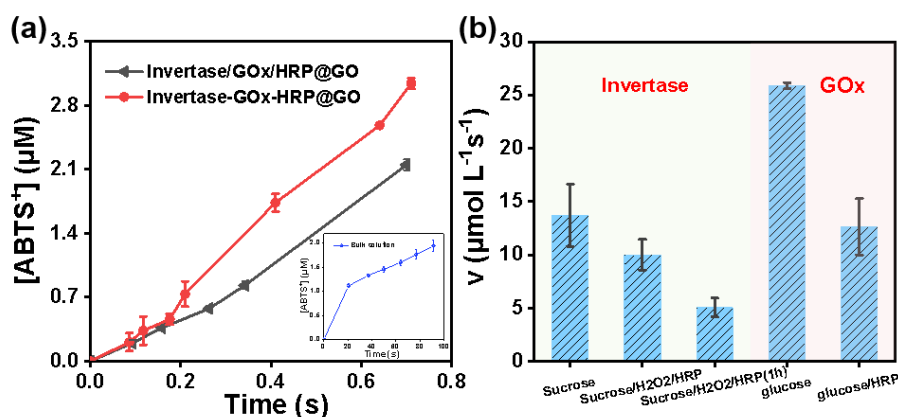


图 4-3 (a) 游离三酶和两种膜固定化三酶级联催化产生 $ABTS^+$ 浓度的对比; (b) 游离体系下, HRP 催化 H_2O_2 反应对 Inv 和 GOx 催化速率的影响 (Inv 的底物分别为: sucrose、sucrose/ H_2O_2 /HRP 共混立即反应和 sucrose/ H_2O_2 /HRP 共混 1h 后反应; GOx 的底物分别为: glucose, glucose/HRP)

Figure 4-3 (a) Comparison of $ABTS^+$ concentration produced by cascade catalysis of free trienzymes and two membrane immobilized trienzymes; (b) The effect of H_2O_2 reaction catalyzed by HRP on the catalytic rates of Inv and GOx in the free system (the substrates of Inv are sucrose, immediate reaction of sucrose/ H_2O_2 /HRP blend and reaction of sucrose/ H_2O_2 /HRP blend for 1h; The substrates of GOx were glucose, glucose/HRP.

4.5 小结

本部分工作系统构建了基于 GO 二维纳米限域通道的多酶级联生物催化膜, 通过共固定和顺序逐层固定两种策略实现了双酶 (Inv、GOx) 和三酶 (Inv、GOx、HRP) 的高效组装。SEM 表征显示, 两种策略构建的催化膜均具有高度有序的层状结构, 层间间距变异系数低于 5%, 表明结构稳定性优异。此外, 研究还发现, 游离体系中 HRP 催化产生的活性氧会显著抑制 Inv 和 GOx 的活性, 而膜固定化策略通过空间隔离有效缓解了这一现象。本工作不仅证实了 GO 纳米限域结构在提升酶稳定性与催化效率中的关键作用, 还揭示了多酶空间排布对级联反应路径的优化现象。为进一步阐明其高效催化的本质, 还需采用多尺度分子动力学模拟与微区原位表征技术 (如超分辨荧光关联光谱、扫描电化学显微镜) 相结合的研究策略, 重点解析酶-载体界面作用对中间产物传输路径及活化能垒的调控规律。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

首先,进行了多维度生物催化膜制备与性能对比,从底物分子在催化膜中的传质路径、速率和传质空间尺寸探究传质行为对生物催化膜性能的影响。其中,E@2DM 具备极高的催化活性和稳定性,在此基础上进一步展开对 GO 二维生物催化膜的酶学性质探究以及表征测试。同时在单酶催化的基础上采用两种级联固定化策略进行 GO 多酶(双酶、三酶)级联生物催化膜的构建,并对比催化性能,所得结论如下所述:

(1) 将 Inv 共价接枝在经 TA-APTES 贻贝仿生涂层修饰的三种不同维度的基膜(一维 AAO 膜,二维 GO 膜,三维 PES 膜)上,构建不同维度生物催化膜(E@1DM、E@2DM 和 E@3DM),通过 FTIR、SEM、XPS、CLSM 等表征结果,证明 Inv 被成功固定在三种基膜中。研究了生物催化膜的酶学性质,发现对流传质为主导的流穿模式催化效率远高于扩散传质为主导浸泡模式。同时,传质路径越简单,限域空间尺寸越小,酶与底物可及性高,催化活性越高。E@2DM 因其独有的二维限域层间结构而具有极高的载酶量,使得其催化速率远高于 E@1DM 和 E@3DM。同时,E@2DM 也具备较高的储存稳定性和可重复性,在 4℃条件下储存 15 天后仍保留约 90%的活性,且重复 5 次循环后,还可以保持 95%的活性。

(2) 基于 GO 二维膜优异的性能,将 Inv、GOx 和 HRP 与 GO 片层直接共混,而不添加任何交联剂,采用共沉淀法构建 GO 二维生物催化膜(Inv@GO、GOx@GO 和 HRP@GO),通过 XRD、SEM、TEM 和粒径分析等手段对膜的结构进行了表征,结果表明酶蛋白均匀分散在 GO 片层中。通过过滤不同分子量(<1000Da)的物质证明了 GO 膜具有自调节的纳米流道结构,能够根据分子量大小动态调整层间距。此外,GO 膜对于三种模型酶的载酶率均在 95%以上。15 mg/L 的蔗糖溶液在 Inv@GO 膜内仅停留<0.2 s,转化率便可达 100%。对三种膜固定化酶进行动力学参数验证,结果显示,催化膜内固定化酶的催化效率显著高于游离酶,表现出更高的底物亲和力(K_m)和催化活性(V_{max})。为后续构建

多酶级联生物催化膜奠定了基础。

(3) 通过共固定和顺序逐层固定两种策略实现了双酶 (Inv、GOx) 和三酶 (Inv、GOx、HRP) 在 GO 二维纳米流中的高效组装。结果表明, GO 限域结构显著提升了多酶的级联催化性能: 双酶级联催化中, 膜固定化体系的反应速率较游离酶提升了 1300 倍以上; 三酶级联催化中, 顺序逐层固定策略优化了多酶的空间排布, 实现了有效的底物通道并进一步减少了中间产物 (如 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$) 对酶的抑制作用, 使得催化效率较共固定策略更高。

5.2 展望

尽管本研究在 GO 二维级联生物催化膜的设计与性能优化方面取得了显著进展, 未来仍需在以下方向深入探索:

(1) 材料与结构优化: 开发具有动态响应功能的智能 GO 复合材料, 通过光、热或 pH 刺激精准调控层间距与酶微环境, 进一步提升催化膜的环境适应性。

(2) 多酶协同机制解析: 结合原位表征技术 (如超分辨荧光显微镜、微区电化学分析) 与分子动力学模拟, 揭示限域空间内多酶级联反应的分子协同机制及中间产物传输路径。

(3) 实际应用场景拓展: 针对工业废水处理、 CO_2 生物转化等复杂体系, 研究催化膜的长期稳定性、抗污染性及规模化制备工艺。

(4) 仿生系统集成: 借鉴生物膜结构特征, 构建仿生多酶-辅酶共固定系统, 实现能量传递与物质转化的高效耦合, 推动生物催化膜向“人工细胞工厂”方向发展。

这些研究将推动生物催化膜从实验室走向工业化应用, 为绿色制造与可持续发展提供关键技术支撑。

参考文献

- [1] 曲莹. 略述影响酶活性的因素[J]. 福建轻纺, 1999, (10): 1-3.
- [2] Sheldon R A, Van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how [J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(15): 6223-6235.
- [3] Jia F, Narasimhan B, Mallapragada S. Materials-based strategies for multienzyme immobilization and co-localization: A review [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 111(2): 209-222.
- [4] Soni S, Dwivedee BP, Banerjee UC. Facile fabrication of a recyclable nanobiocatalyst: immobilization of Burkholderia cepacia lipase on carbon nanofibers for the kinetic resolution of a racemic atenolol intermediate [J]. Royal Society of Chemistry Advances, 2018, 8: 27763-27774.
- [5] Mahdizadeh F, Eskandarian M. Glucose oxidase and catalase coimmobilization on biosynthesized nanoporous SiO₂ for removal of dissolved oxygen in water: Corrosion controlling of boilers [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2014, 20(4): 2378-2383.
- [6] Hao Y, Deng S, Wang R, etc. Development of dualenhancer biocatalyst with photothermal property for the degradation of cephalosporin [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 429: 128294.
- [7] Cheng Y, Chen T, Fu D, etc. A molecularly imprinted nanoreactor based on biomimetic mineralization of bienzymes for specific detection of urea and its analogues [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 350: 130909.
- [8] Shen Q, Yang R, Hua X, etc. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(8): 1565-1571.
- [9] Gkaniatsou E, Sicard C, Ricoux R, etc. Metal-organic frameworks: A novel host platform for enzymatic catalysis and detection [J]. Materials Horizons, 2017, 4(1): 55-63.
- [10] Mohamad N R, Marzuki N H C, Buang N A, etc. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015, 29(2): 205-220.

- [11] 杨月珠, 李章良, 吕源财, 等. 漆酶的固定化技术及固定化漆酶载体材料研究进展[J]. 净水技术, 2022, 41(09): 8-17.
- [12] Li S, Wu W. Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 45(1): 48-53.
- [13] Chen Q, Liu D, Wu C, etc. Co-immobilization of cellulase and lysozyme on amino-functionalized magnetic nanoparticles: An activity-tunable biocatalyst for extraction of lipids from microalgae [J]. Bioresource Technology, 2018, 263: 317-324.
- [14] 张璟譔, 高兵兵, 何冰芳. 生物催化中的酶固定化研究进展[J]. 生物加工过程, 2022, 20(1): 9-19.
- [15] 王慧杰, 张宜鹏, 廖辉荣, 等. 化学交联高密度聚乙烯的结构与性能[J]. 塑料, 2024, 53(05): 28-32+37.
- [16] Qiao W, Zhang Z, Qian Y, etc. Bacterial laccase immobilized on a magnetic dialdehyde cellulose without cross-linking agents for decolorization [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2022, 632: 127818.
- [17] Yang X, Chen Y, Yao S, etc. Preparation of immobilized lipase on magnetic nanoparticles dialdehyde starch [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 218: 324-332.
- [18] Chen Z, Yao J, Ma B, etc. A robust biocatalyst based on laccase immobilized superparamagnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ nanoparticles and its application for degradation of chlorophenols [J]. Chemosphere, 2022, 291: 132727.
- [19] Wang S, Su P, Ding F, etc. Immobilization of cellulase on polyamidoamine dendrimer-grafted silica [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 89:35-40
- [20] Smeets V, Baaziz W, Ersen O, etc. Hollow zeolite microspheres as a nest for enzymes: a new route to hybrid heterogeneous catalysts [J]. Chemical Science, 2020, 11(4): 954-961.
- [21] Wang F, Hu Y, Guo C, etc. Enhanced phenol degradation in coking wastewater by immobilized laccase on magnetic mesoporous silica nanoparticles in a magnetically stabilized fluidized bed [J]. Bioresource Technology, 2012, 110: 120-124.
- [22] Liang S, Wu X, Xiong J, etc. Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization: An update review [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2020, 406: 213149.
- [23] Xu H, Sun X, Wang S, etc. Development of laccase/graphene oxide membrane for enhanced synthetic dyes separation and degradation [J]. Separation and Purification Technology, 2018,

204: 255-260.

- [24] Gebreyohannes A Y, Dharmjeet M, Swusten T, etc. Simultaneous glucose production from cellulose and fouling reduction using a magnetic responsive membrane reactor with superparamagnetic nanoparticles carrying cellulolytic enzymes [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 263: 532-540.
- [25] Shi J, Zhang S, Deng Q, etc. A versatile biocatalytic nano-platform based on Fe₃O₄-filled and zirconia shrunk holey carbon nanotubes [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 402(11): 125737.
- [26] Liu J L, Zabetakis D, Breger J C, etc. Multi-Enzyme Assembly on T4 Phage Scaffold [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 571.
- [27] 彭虹旒, 陈西广, 孟祥红, 等. 氨基多糖多孔微球载体制备及其脲酶固定化特性[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2004, (04): 582-588.
- [28] Yang Y, Yu H, Zhou X, etc. Shallow porous microsphere carriers with core-shell structure based on glass beads cross-linking chitosan for immobilizing inulinase [J]. *Molecular Catalysis*, 2020, 486: 110871.
- [29] 张晓慧, 蔡青青, 贾佳, 等. 基于聚乙烯醇微球为载体固定化脂肪酶的研究[J]. *化工新型材料*, 2019, 47(02): 215-218.
- [30] Niculescu V C. Mesoporous Silica Nanoparticles for Bio-Applications [J]. *Frontiers in Materials*, 2020, 7: 36.
- [31] Bernal C, Sierra L, Vesa M. Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 84: 166-172.
- [32] Ali Z, Tian L, Zhang B, etc. Synthesis of fibrous and non-fibrous mesoporous silica magnetic yolk-shell microspheres as recyclable supports for immobilization of *Candida rugosa* lipase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 103: 42-52.
- [33] Qiu X, Qin J, Xu M, etc. Organic-inorganic nanocomposites fabricated via functional ionic liquid as the bridging agent for Laccase immobilization and its application in 2,4-dichlorophenol removal [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 179: 260-269.
- [34] Schobing J, Cesario M, Dorge S, etc. CuO supported on COK-12 and SBA-15 ordered mesoporous materials for temperature swing SO_x adsorption [J]. *Fuel Processing Technology*,

- 2021, 211: 106586.
- [35] Suh M P, Cheon Y E, Lee E Y. Syntheses and functions of porous metallosupramolecular networks [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2008, 252(8/9): 1007-1026.
- [36] Ashworth C. Metal-organic frameworks: molten MOFs [J]. Nature Reviews Materials, 2017, 2(11): 17074.
- [37] Zhong Z, Pan S, Wu Y, etc. Synthesis and characterization of mesoporous Cu-MOF for laccase immobilization [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2017, 92(7): 1841-1847.
- [38] Lyu F, Zhang Y, Zare R N, etc. One-pot synthesis of proteinembedded metal-organic frameworks with enhanced biological activities [J]. Nano Letters, 2014, 14(10): 5761-5765.
- [39] Cheong L Z, Wei Y, Wang H, etc. Facile fabrication of a stable and recyclable lipase@amine-functionalized ZIF-8 nanoparticles for esters hydrolysis and transesterification [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2017, 19: 280.
- [40] 谷大建, 徐巍. 膜分离技术的应用及研究进展[J]. 中国药业, 2008, (06): 58-59.
- [41] De Cazes M, Belleville M P, Mougél M, etc. Characterization of laccase-grafted ceramic membranes for pharmaceuticals degradation [J]. Journal of Membrane Science, 2015, 476: 384-393.
- [42] Maryšková M, Ardao I, García-González C A, etc. Polyamide 6/chitosan nanofibers as support for the immobilization of Trametes versicolor laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016, 89: 31-38.
- [43] Fan J, Luo J, Wan Y. Aquatic micro-pollutants removal with a biocatalytic membrane prepared by metal chelating affinity membrane chromatography [J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 327: 1011-1020.
- [44] Hou J, Dong G, Ye Y, etc. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes [J]. Journal of Membrane Science, 2014, 452: 229-240.
- [45] Li S, Luo J, Wan Y. Regenerable biocatalytic nanofiltration membrane for aquatic micropollutants removal [J]. Journal of Membrane Science, 2018, 549: 120-128.
- [46] 程荣, 邓佳幸, 陈海鹰, 等. 纳滤技术处理放射性废水的研究进展[J/OL]. 工业水处理, 1-15.
- [47] Wang P, Qi C, Yu Y, etc. Covalent immobilization of catalase onto regenerated silk fibroins via

- p>tyrosinase-catalyzed cross-linking [J].
- Applied Biochemistry and Biotechnology*
- , 2015, 177(2): 472-485.
- [48] Luo J, Meyer A S, Mateiu R V, etc. Functionalization of a membrane sublayer using reverse filtration of enzymes and dopamine coating [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(24): 22894-22904.
- [49] Cao X, Luo J, Woodley J M, etc. Bioinspired multifunctional membrane for aquatic micropollutants removal [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8 (44): 30511-30522.
- [50] Mahlicli F Y, Şen Y, Mutlu M, etc. Immobilization of superoxide dismutase/catalase onto polysulfone membranes to suppress hemodialysis-induced oxidative stress: A comparison of two immobilization methods [J]. *Journal of Materials Science*, 2015, 479: 175-189.
- [51] Ji C, Hou J, Chen V. Cross-linked carbon nanotubesbased biocatalytic membranes for micro-pollutants degradation: performance, stability, and regeneration [J]. *Journal of Membrane Science*, 2016, 520: 869-880.
- [52] Kim T H, Lee I, Yeon K-M, etc. Biocatalytic membrane with acylase stabilized on intact carbon nanotubes for effective antifouling via quorum quenching [J]. *Journal of Membrane Science*, 2018, 554: 357-365.
- [53] Xu R, Si Y, Wu X, etc. Triclosan removal by laccase immobilized on mesoporous nanofibers: Strong adsorption and efficient degradation [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 255: 63-70.
- [54] Ren Z, Luo J, Wan Y. Highly permeable biocatalytic membrane prepared by 3D modification: Metal-organic frameworks ameliorate its stability for micropollutants removal [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 348: 389-398.
- [55] Zhang H, Luo J, Wan Y. Regenerable temperature-responsive biocatalytic nanofiltration membrane for organic micropollutants removal [J]. *Iscience*, 2022, 25(1): 103671.
- [56] Luo M, Li M, Jiang S, etc. Supported growth of inorganic-organic nanoflowers on 3D hierarchically porous nanofibrous membrane for enhanced enzymatic water treatment [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 381: 120947.
- [57] 张晋瑄, 罗建泉, 任重远, 等. 膜技术在生物检测中的应用研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2019, 35(12): 2257-2268.
- [58] Zhao H, Xiu X, Li M, etc. Programming Super DNA-Enzyme Molecules for On-Demand

- Enzyme Activity Modulation [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62, 14, 1433-7851.
- [59] Tan Y, Wang W, Zheng Y, etc. Limited proteolysis via millisecond digestions in protease-modified membranes [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(19): 8357-8363.
- [60] Chu Z, Li L, Liu G, etc. A novel membrane with heterogeneously functionalized nanocrystal layers performing blood separation and sensing synchronously [J]. *Chemical Communications*, 2016, 52, 12706-12709.
- [61] Chen D, Wang C, Chen W, etc. PVDF-nafion nanomembranes coated microneedles for in vivo transcutaneous implantable glucose sensing [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 74: 1047-1052.
- [62] Yang S, Lin J, Li P, etc. Functionalized polyacrylonitrile nanofiber membranes with carbonic anhydrase for enhanced carbon dioxide capture and conversion: A performance study [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2025, 213, 109570.
- [63] Fu Y, Jiang Y, Dunphy D, etc. Ultra-thin enzymatic liquid membrane for CO₂ separation and capture [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 990.
- [64] Luo J, Meyer A, Mateiu R, etc. Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO₂ to methanol [J]. *New Biotechnology*, 2015, 32, 319-327.
- [65] Ren S, Li C, Jiao X, etc. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 373: 1254-1278.
- [66] Zhang Y H P. Simpler is better: High-yield and potential low-cost biofuels production through cell-free synthetic pathway biotransformation (SyPaB) [J]. *ACS Catalysis*, 2011, 1(9): 998-1009.
- [67] Zhang H, Zhang H, Luo J, etc. Enzymatic cascade catalysis in a nanofiltration membrane: engineering the microenvironment by synergism of separation and reaction [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(25): 22419-22428.
- [68] Barricella S, Fuertes J M, Putera K H, etc. Spatially confined enzymatic tandem system with GOx and HRP compartmentalized in ultrafiltration membrane [J]. *Membrane Science*, 2024, 690: 122214.
- [69] Man T, Xu C, Liu X, etc. Hierarchically encapsulating enzymes with multi-shelled metal-

- p>organic frameworks for tandem biocatalytic reactions [J].
- Nature Communications*
- , 2022, 13:305.
- [70] Oh W, Jeong D, Park J-W. An artificial compartmentalized biocatalytic cascade system constructed with enzyme-caged reticulate nanoporous membranes [J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2023, 10: 2300185.
- [71] Carlsson N, Borde A, Wölfel S, etc. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers [J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 411: 116-121.
- [72] Lee W, Park S J. Porous anodic aluminum oxide: anodization and templated synthesis of functional nanostructures [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(15): 7487-7556.
- [73] Li F, Zhang L, Metzger R M. On the growth of highly ordered pores in anodized aluminum oxide [J]. *Chemistry of Materials*, 1998, 10(9): 2470-2480.
- [74] Diggle J W, Downie T C, Goulding C W. Anodic oxide films on aluminum [J]. *Chemical Reviews*, 1969, 69(3): 365-405.
- [75] Lai J, Luo J, Zhang N, etc. Tannic Acid Induced Self-Assembly of Three-Dimensional Graphene with Good Adsorption and Antibacterial Properties [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4, 1404-1413.
- [76] Wang Z, Kang H, Zhao S, etc. Polyphenol-induced cellulose nanofibrils anchored graphene oxide as nanohybrids for strong yet tough soy protein nanocomposites [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 180, 354-364.
- [77] Zhang Z, Wu H, Li Y, etc. Heterostructured graphene oxide membranes with tunable water-capture coatings for highly selective water permeation [J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2021,9, 7903-7912.
- [78] Zhou F, Luo J, Song S, etc. Nanostructured polyphenol-mediated coating: a versatile platform for enzyme immobilization and micropollutant removal [J]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2020, 59, 2708-2717.
- [79] Keller F, Hunter M S, Robinson D L. Structural Features of Oxide Coatings on Aluminum [J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 1953, 100, 411.
- [80] Liu G, Guo L, Zhao L, etc. A GO-based biocatalytic membrane prepared by one-step pressure-assisted self-assembly for micropollutants removal [J]. *Chemical Engineering Science*, 2023,

275: 118740.

- [81] Xu H, Sun X, Wang S, etc. Development of laccase/graphene oxide membrane for enhanced synthetic dyes separation and degradation [J]. Separation and Purification Technology, 2018, 204: 255-260.
- [82] Wang Z, Han M, Zhang J, etc. Designing preferable functional materials based on the secondary reactions of the hierarchical tannic acid (TA)-aminopropyltriethoxysilane (APTES) coating [J]. Chemical Engineering, 2019, 360: 99-312.
- [83] Zhang J, Zhou F, Li S, etc. Surface functionalization of nanofiltration membrane by catechol-amine codeposition for enhancing antifouling performance [J]. Membrane Science, 2021, 635: 119451.
- [84] Huang H, Song Z, Wei N, etc. Ultrafast viscous water flow through nanostrand-channelled graphene oxide membranes [J]. Nature Communications, 2013, 4: 2979.
- [85] Pang S, Peng D, Hao Y, etc. Regulating interlayer spacing of aminated graphene oxide membranes for efficient flow reactions [J]. Matter, 2023, 6(4): 1173-1187.
- [86] Aricov L, Leonties A, Gîfu I, etc. Enhancement of laccase immobilization onto wet chitosan microspheres using an iterative protocol and its potential to remove micropollutants [J]. Environmental Management, 2020, 276: 111326.
- [87] 邹国林, 朱汝藩. 酶学[M]. 武汉大学出版社. 1997: 94.
- [88] Zhang M, Mao Y, Liu G, etc. Molecular bridges stabilize graphene oxide membranes in water [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59: 1689-1695.
- [89] Wang Z, Zhu J, Xu S, etc. Graphene-like MOF nanosheets stabilize graphene oxide membranes enabling selective molecular sieving [J]. Membrane Science, 2021, 633: 119397.
- [90] Cheng P, Chen Y, Gu Y, etc. Hybrid 2D WS₂/GO nanofiltration membranes for finely molecular sieving [J]. Membrane Science, 2019, 591: 117308.
- [91] Zhang S, Sun M, Hedtke T, etc. Mechanism of heterogeneous Fenton reaction kinetics enhancement under nanoscale spatial confinement [J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(17): 10868-10875.
- [92] Zhang W, Zhang S, Meng C, etc. Nanoconfined catalytic membranes assembled by cobalt-functionalized graphitic carbon nitride nanosheets for rapid degradation of pollutants [J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2023, 322:122098.

- [93] Zhang S, Hedtke T, Wang L, etc. Engineered nanoconfinement accelerating spontaneous manganese-catalyzed degradation of organic contaminants [J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(24): 16708-16715.
- [94] Zhang S, Hedtke T, Zhu Q, etc. Membrane-confined iron oxychloride nanocatalysts for highly efficient heterogeneous Fenton water treatment [J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(13): 9266-9275.
- [95] Bie C, Yang J, Zeng X, etc. Nanoconfinement Effects in Electrocatalysis and Photocatalysis [J]. *Small* 2025, 2411184.
- [96] Zhang Y, Xu L, Ge J. Multienzyme System in Amorphous Metal–Organic Frameworks for Intracellular Lactate Detection [J]. *Nano Letters*, 2022, 22: 5029-5036.
- [97] Chu G, Li W, Han X, etc. Co-Immobilization of GOD & HRP on Y-Shaped DNA Scaffold and the Regulation of Inter-Enzyme Distance [J]. *Small* 2023, 19, 23014.

致谢

行文至此落笔终，始于初秋终于夏。我的硕士生涯已悄然步入尾声，站在学术旅程的重要节点上，心中满是感恩与感慨。谨以此致谢，向所有陪伴我成长、给予我指引的师长、亲友与同仁致以最诚挚的谢意。

“桃李不言，下自成蹊。”首先我要衷心感谢我的两位导师—赵世光和罗建泉老师。从论文的选题立意到框架搭建，从文献梳理到方法设计，从初稿成型到终稿打磨，每一个环节都凝聚着导师的心血。导师严谨的治学态度、渊博的知识储备和敏锐的学术洞察力，一直激励着我不断追求卓越。在中科院过程工程研究所学习期间，我也深深感谢一直教导我做实验的张昊老师，每当我因实验挫败而焦虑时，您又以“科研需耐得住寂寞”的谆谆教诲让我重拾信心。您对科学问题的深刻见解、对细节精益求精的追求，让我深刻领悟到科研工作者的责任与坚守。

“春晖寸草，亲情如磐。”我也要感恩我的父母。二十余载求学路，你们始终以无私的爱为我筑起避风港。每通电话中“别太累，注意身体”的叮咛，每次归家时餐桌上热气腾腾的饭菜，都是支撑我砥砺前行力量。

“同窗共济，幸甚至哉。”感谢实验室的兄弟姐妹们：汪丹、袁菊萍、肖诗雨、韩金龙、崔腾宇，与你们并肩作战的日夜是我最珍贵的回忆。难忘实验瓶颈期大家的头脑风暴，更难忘论文攻坚阶段毫无保留的经验分享。特别感谢刘露露、王育堃、曾婉茹师姐们在仪器使用与数据分析中的倾力支持，专业而高效的帮助为我的实验研究扫清了诸多障碍。此外，感谢室友与好友们的包容与陪伴，是你们让枯燥的科研生活充满欢声笑语。我还要感谢学校的各位老师，如钱森和老师、薛正莲老师、王洲老师。是你们的辛勤教导，让我在知识的海洋里畅游，为我的学术研究打下了坚实的基础。

“以梦为马，不负韶华。”最后，感谢那个在无数个深夜与实验数据“较劲”的自己。感谢你在失败时选择坚持，在迷茫时保持清醒，在孤独中沉淀成长。硕士生涯不仅赋予我专业知识，更教会我以理性思辨探索未知、以坚韧之心直面挑战。硕士生涯的结束，对我而言并不是终点，而是一个新的起点。我将带着这份感恩和责任，继续前行，努力为社会做出自己的贡献。

纸短情长，辞浅恩深。谨以此文献给所有照亮我前行之路的人！