

酶型生物改性抗菌材料的研究进展

唐亚丽^{1,2}, 王立苹¹, 卢立新^{1,2}, 潘 嘹^{1,2}, 丘晓琳^{1,2}

(1. 江南大学 机械工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省先进食品制造装备技术重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 细菌微生物感染是食品、药品、生物医疗等研究领域亟待解决的难题。抗生素的出现缓解了人们对抗菌材料的需求, 但也导致耐药细菌的产生。因此, 开发具有抗菌活性强、生物安全性高的天然抗菌剂和抗菌材料非常有意义。目前, 抗菌酶在医疗器械、食品、药品、化妆品等领域具有广泛的应用前景, 用于对抗微生物和生物膜的形成具有研究意义。该文综述了几种常见的酶型生物改性抗菌材料用的抗菌酶和抗菌酶系统, 以及将抗菌酶与材料结合得到的酶型释放杀菌材料和酶型接触杀菌材料的研究进展, 并对酶型生物改性抗菌材料的未来研究方向进行了总结和展望。

关键词: 抗菌酶; 生物改性; 抗菌材料; 固定化酶; 抗菌性能

中图分类号: Q814; TB34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 03-0465-13

Research progress on enzymatic modification of antibacterial materials

TANG Yali^{1,2}, WANG Liping¹, LU Lixin^{1,2}, PAN Liao^{1,2}, QIU Xiaolin^{1,2}

(1. School of Mechanical Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Advance Food Manufacturing Equipment & Technology, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Bacterial infection is a difficult problem urgently needed to be solved in the field of food, medicine and biomedics. The discovery of antibiotics has alleviated the demand for antimicrobial materials, but also led to the emergence of drug-resistant bacteria. Therefore, it is of great significance to develop natural antimicrobial agents and antibacterial materials with strong antibacterial activity and high biological safety. At present, antibacterial enzyme shows promising application potential in medical machinery, food, medicine, cosmetics and so on, and it is of research significance to employ them against the formation of microorganisms and biofilms. Herein, several common antibacterial enzymes and enzyme systems were introduced, followed by discussions on the research progress in combining antimicrobial enzymes with materials to produce enzyme release bactericidal materials and enzymatic contact bactericidal materials. Finally, the future development of enzyme modified antibacterial materials was summarized and prospected.

Key words: antibacterial enzyme; biological modification; antibacterial materials; immobilized enzyme; antibacterial properties

从古至今, 细菌病原体一直是人类生命和健康生活的一大威胁, 因为它们可以通过污染食物、饮用水、医疗器械等攻击人体的正常生命活动, 诱发各种细菌感染性疾病, 包括细菌性肺炎、尿路感染、伤口感染和性传播感染^[1]等。这些由细菌病原体引起的传染病在全世界范围内的发病率和死亡率都很高, 尽管抗生素的出现大大缓解了细菌感染的发病

率和死亡率, 但正如青霉素的发现者亚历山大·弗莱明所预言的那样, 抗生素伴随着细菌耐药现象, 并在病原菌中传播^[2]。抗生素在医学、畜牧业、食品中的广泛应用甚至滥用, 加剧了细菌对抗菌剂的耐药性, 使传染病的预防和控制变得困难, 对人类健康和生态安全构成严重威胁^[3-4]。根据奥尼尔委员会的估计, 到 2050 年, 将有超过 1000 万人的生命

被剥夺，对抗生素耐药性的成本将达到 100 万亿美元^[5]。此外，抗生素很可能在宿主体内引起不良反应^[6]。因此，迫切需要开发具有广谱抗菌效果的天然抗菌剂以及新型抗菌材料。

抗菌酶是能缓解细菌耐药性的一种天然抗菌剂，其对细菌病原体以及微生物生物膜的抑制作用引起学者的广泛关注，从而研发出新的抗菌技术^[7]。但抗菌酶结构不稳定，在高温、高压、强酸、强碱和有机溶剂中容易失活，极端环境使抗菌酶的长期操作稳定性差的问题限制了其应用。目前，已经研发出多种应用抗菌酶的抗菌技术，例如：将抗菌酶和壳聚糖、金属离子协同抗菌以增加抗菌效果，或将酶固定到载体表面通过接触杀菌的方式达到抗菌效果。将抗菌酶固定化在材料内部或表面，能提高酶的稳定性、延长使用寿命，并且能回收再利用，进而明显降低生产成本，显著拓宽了抗菌酶的应用领域。

随着 2020 年新冠肺炎疫情的爆发，细菌病原体与人类生活的矛盾不断加剧，抗菌酶的应用范围将会越来越广，以抗菌酶为抗菌剂的抗菌材料会逐渐成为人们日常生活中的一部分。酶固定化技术为用抗菌酶抑制微生物生长的酶型生物改性抗菌材料提供了可能，良好的固定化载体和先进的固定化技术是将抗菌酶与载体材料结合的关键。固定化酶技术最早用于免疫学中分离蛋白质和吸附抗体，此后逐步建立起以吸附法和包埋法为主流的物理固定化技术。在中期发展中，研究人员不断开发固定化酶的载体，除了无机载体外，相继研究了天然聚合物及其衍生物以及合成聚合物等几大类载体。并且随着固定化酶技术（共价法、吸附法、包埋法、微囊化法、交联法五大基本技术）的发展，现如今固定化酶技术趋向高效化、合理化，运用集成度和精密度更高的固定化酶技术解决问题（图 1）。

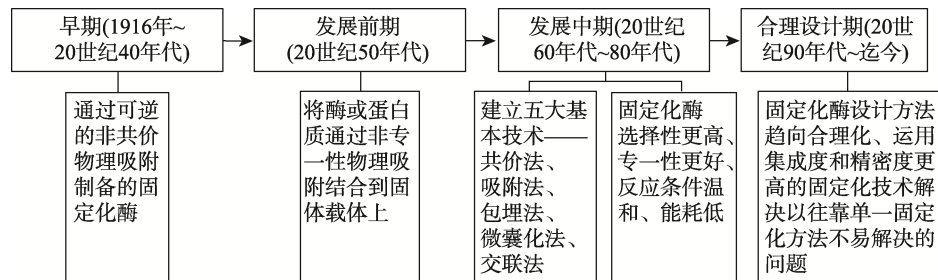


图 1 固定化酶技术发展过程概述图

Fig. 1 Summary of immobilized enzyme technology development process

本文总结了常见的抗菌酶以及抗菌机制(图 2)，详细描述了抗菌酶应用于抗菌材料中的方法和载体，同时分析了以抗菌酶为抗菌剂存在的问题。

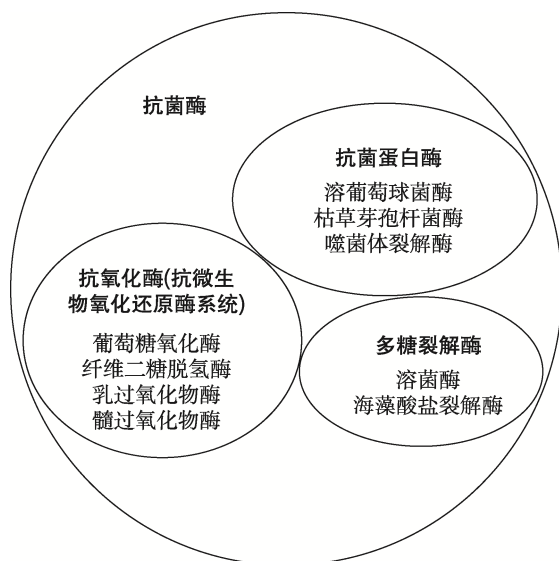


图 2 构建生物改性抗菌材料的抗菌酶分类图

Fig. 2 Classification diagram of antimicrobial enzymes of biologically modified antibacterial materials

并提出了运用基因工程或化学修饰改变酶结构，使用具有较高活性和高比表面积的载体，同时将多种固定化酶技术组合应用，解决目前出现的酶型改性抗菌材料存在的稳定性差、抗菌效果不好、成本较高等问题。

1 酶型生物改性抗菌材料的几种抗菌酶

1.1 抗菌蛋白酶

抗菌蛋白酶是一种水解酶，通过催化肽键的水解（蛋白水解），从而产生蛋白质片段甚至单个氨基酸。蛋白酶在原核和真核细胞中普遍存在，并在多种代谢过程中发挥作用。根据催化位点的不同结构和酶促作用的不同机制，蛋白水解酶可分为以下几类：（1）半胱氨酸蛋白酶，活性中心半胱氨酸的硫醇基团可作为亲核试剂，组氨酸的咪唑环负责质子化/去质子化；（2）苏氨酸蛋白酶，活性中心苏氨酸的羟基残基充当亲核试剂；（3）天冬氨酸蛋白酶，活性位点的两个天冬氨酸残基是肽键水解的关键，在酸性环境中具有高活性；（4）谷氨酸蛋白酶，活性位点有一个谷氨酸残基，在低 pH 下仍有活性；（5）

金属蛋白酶, 活性中心具有二价阳离子—— Zn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mg^{2+} ; (6) 丝氨酸蛋白酶, 其中丝氨酸的羟基残基与组氨酸的咪唑环和天冬氨酸的羟基均位于活性中心^[8]。还可以按照抗菌膜肽键断裂的部位分为外肽酶和内肽酶。此外, 还可以按照蛋白酶在广泛 pH 范围内的最大活性, 分为亲碱性、中性和嗜酸性蛋白酶^[9]。

1.1.1 溶葡萄球菌酶

溶葡萄球菌酶按肽链断裂的位置属于内肽酶, 并且分子中含有二价金属离子, 又属于金属蛋白酶。溶葡萄球菌酶对葡萄球菌属的细菌具有特异性, 能切断葡萄球菌细胞壁肽聚糖中的五甘氨酸肽键桥结构, 迅速溶解和杀灭葡萄球菌属^[10], 但是不能水解含有甘氨酸和甘氨酸肽键的细胞壁^[7]。溶葡萄球菌酶的纯生物特性, 以及独特的生物杀菌机制不会产生耐药性和毒副作用, 使其在医疗卫生方面有广泛的应用, 并且已有的动物实验和人体实验数据均表明, 溶葡萄球菌不宜引发不良反应和过敏反应。

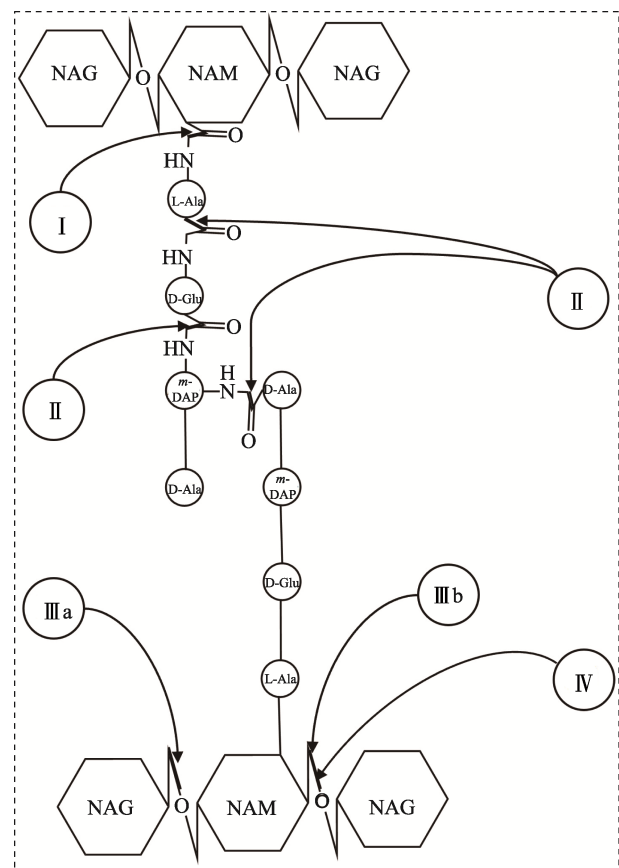
1.1.2 枯草芽孢杆菌酶

枯草芽孢杆菌酶按在广泛 pH 范围内的最大活性区分属于中性蛋白酶, 又因其酶活性中心有起激活或保护作用的金属离子, 如 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 属于金属蛋白酶^[11]。枯草芽孢杆菌酶是由枯草芽孢杆菌分泌的酶组成, 能促进肠道消化、体表消毒; 除此之外, 在蚊虫、蜚蚤和寄生虫的清除以及降解养殖水体有机质方面具有良好的应用效果。枯草芽孢杆菌分泌的多种酶能适应高温密闭环境、有较强的免疫原性, 对有毒有害物质的生成具有抑制作用, 并且可以减少面源污染^[12]。枯草杆菌素可以分解黏附素(附着在固体载体和其他细菌上所必需的细菌蛋白质), 从而防止微生物的共聚, 这是一种使细菌与其他细菌交流并参与多物种生物膜形成的条件^[13]。XIANG 等^[14]从蓝莓发酵液中获得了一种新的细菌素 JS17, 其对革兰氏阳性和阴性细菌都具有抗菌活性, 并且耐酸碱和高温。枯草芽孢杆菌分离得到的细菌素具有广谱抗菌性, 且化学稳定性良好, 耐酸碱和耐高温, 因为天然枯草芽孢杆菌细菌素具有安全无毒的特性, 使其能在食品、医疗卫生、生物防治等方面具有良好的应用前景。

1.1.3 噬菌体裂解酶

噬菌体裂解酶是利用分解细菌细胞壁肽聚糖层中的关键化学键来杀灭微生物的。如图 3 所示, 按照作用肽聚糖化学键的位置不同^[15]噬菌体裂解酶可以分为: *N*-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶 (I)、内肽酶 (II)、 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (III a)、*N*-乙酰胞壁糖苷酶 (III b) 和溶菌糖基转移酶 (IV)^[7]。噬菌体裂解酶具有广谱抑菌效果, 能抑制革兰氏阳性

菌中金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和革兰氏阴性菌中肠沙氏门菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌的生长繁殖, 且对耐药细菌包括鲍曼不动杆菌、大肠杆菌等微生物的生长也存在抑制作用^[2]。噬菌体裂解酶具有广谱抗菌性, 在食品病原生物控制方面具有广泛的应用^[16]。OBESO 等^[17]通过纯化金黄色葡萄球菌噬菌体中的抗菌素, 纯化的蛋白质能迅速杀灭生长在巴氏杀菌牛奶中的金黄色葡萄球菌, 37 °C 下孵育 4 h 后仍未检测到病原菌。利用噬菌体裂解酶的生产成本低, 高通量的 DNA 测序和遗传物质操作技术将推进其在抗菌方面应用。目前, 以噬菌体裂解酶为抗菌剂的乳品工业应用处于领先地位。



抗菌素目标裂解位点以箭头形式表示; 糖单元分别以六边形 NAG 和 NAM 表示; 以圆圈表示的氨基酸分别为: L-丙氨酸 (L-Ala), D-谷氨酸 (D-Glu), 内消旋二氨基庚二酸 (*m*-DAP), D-丙氨酸 (D-Ala)

图 3 大肠杆菌肽聚糖结构及不同噬菌体抗菌素切割位点^[2]

Fig. 3 Structure of *E. coli* peptidoglycan and cut sites of different phage endolysins^[2]

蛋白酶通过水解黏附素或其他蛋白质防止细菌滋生黏附, 达到抗菌的目的。除了溶葡萄球菌酶、枯草芽孢杆菌酶和噬菌体裂解酶在医疗行业广泛应用外, 其他不同来源的抗菌蛋白酶也是应用于食品、药品、医疗等方面的天然抗菌剂, 包括木瓜蛋白酶、

胰蛋白酶等。

1.2 多糖裂解酶

复合多糖如琼脂、海藻酸盐、果胶、甲壳素、木聚糖等在海藻和甲壳类动物中大量存在。这些多糖的降解归因于微生物酶，如海藻酸裂解酶、果胶酶、几丁质酶等^[18]。大多数多糖降解酶中，溶菌酶、海藻酸盐裂解酶、褐藻胶裂解酶、淀粉酶等在抵抗致病菌及细菌生物膜的应用中比较常见。

1.2.1 溶菌酶 (Lys)

Lys 是一种小的球状蛋白，广泛存在于哺乳动物的奶水、禽蛋清、唾液和泪液中的“绿色”抗菌剂。Lys 是通过催化 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖残基和 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖残基之间的 β -1,4-糖苷键水解的^[19]。然而，由于细菌细胞壁的结构和性质不同，革兰氏阳性细菌对 Lys 更敏感^[20]。Lys 中最常见的一种是蛋清溶菌酶 (HEWL)，它是由 129 个氨基酸残基组成，对金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性细菌具有抑菌作用^[21]。由于革兰氏阴性菌含有由脂蛋白和脂多糖组成的保护性外膜，是阻止 Lys 移动到肽聚糖及其水解键的物理障碍^[22]。Lys 对肠杆菌科和假单胞菌科等革兰氏阴性菌的抑制作用较弱。到目前为止，HEWL 是一种允许在食品行业使用的 Lys^[23]，因此，国内外正在利用 Lys 开发一些用于食品和保健行业的生物活性产品。

1.2.2 海藻酸盐裂解酶

海藻酸盐裂解酶是一种多糖裂解酶，其来源广泛，可以从海藻、海洋软体动物、海洋及陆地细菌、真菌和病毒中^[24]分离出来。海藻酸盐裂解酶通过去除羧酸盐阴离子上的负电荷、C-5 上质子的提取、裂解 β -1-*O*-糖苷键 3 个步骤的作用裂解细菌海藻酸聚合物。海藻酸盐裂解酶用来制备海藻酸盐低聚物，并通过有效降解细菌生物膜中的胞外多糖来辅助治疗慢性细菌感染^[25]。例如：大多数海藻酸盐裂解酶具有抗假单胞菌生物膜的活性^[26]，因此，海藻酸盐裂解酶被广泛用于食品、农业和医药领域^[27]。

除了 Lys 和海藻酸盐裂解酶外，淀粉酶和分散蛋白 B 也是目前常用的多糖裂解酶，淀粉酶和分散蛋白 B 在对抗细菌和微生物膜上具有良好的应用效果。Lys 和海藻酸盐裂解酶的来源广泛、分离制备工艺成熟，多用于制备酶型生物改性抗菌材料应用于食品保鲜、药品包装等行业。

1.3 抗氧化酶 (抗微生物氧化还原酶系统)

抗氧化酶与抗菌蛋白酶的杀菌机制不同，抗氧化酶不能直接杀灭微生物，但能与特殊底物发生反应，产生具有细胞毒性的物质，这些物质能使微生物的蛋白变性而阻碍微生物生长繁殖。例如：使用过氧化氢酶将卤化物 (溴、氯、碘) 和异氰酸酯氧

化成更有效的抗微生物化合物，对入侵的病原体具有抗菌活性^[27]。过氧化氢被过氧化氢酶分解形成的天然抗菌化合物存在于奶水、眼泪和唾液中^[28]。

1.3.1 葡萄糖氧化酶 (GOX)

GOX 的来源很多，其广泛存在于昆虫、藻类、水果以及各种真菌中^[29-30]。GOX 以分子氧为电子受体，催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸和过氧化氢^[30]，过氧化氢通过对细菌细胞膜的过氧化和破坏作用、清除氧和氧化硫醇以及中断蛋白质合成而杀死细菌细胞^[7]。GOX 能催化葡萄糖和氧气反应生成葡萄糖酸，已成功地用于去除食品和饮料中的残余氧，以延长货架期^[31]。

1.3.2 纤维二糖脱氢酶

纤维二糖脱氢酶是一种氧化还原酶，由担子菌门 (I 类) 和子囊菌门 (II 类和 III 类) 双核真菌门的一些真菌产生，通过氧化纤维低聚糖 (包括纤维二糖) 和其他寡糖产生过氧化氢^[32]。过氧化氢能破坏细菌细胞膜，清除氧和氧化硫醇以及中断细菌蛋白质的合成引起细菌死亡。此外，纤维二糖脱氢酶氧化纤维素低聚糖会产生纤维二酸，从而降低 pH，为细菌创造一个不利的生长环境^[33]。纤维二糖脱氢酶作为一种抗菌和抗生物膜系统是一个很好的候选材料，在生物材料、医学、化妆品、食品等生物技术领域具有重要的应用价值^[34]。

1.3.3 乳过氧化物酶 (LPO)

LPO 是从奶水中分离出来的过氧化物酶，是自然界中大量存在的一种抗菌酶，主要存在于人类和哺乳动物体内^[35]，是乳中天然含有的一种酶，一些植物中也含有乳过氧化物酶。LPO 与过氧化氢 (H_2O_2)、硫氰酸盐阴离子形成具有较强抑菌功能的乳过氧化物酶系统^[36]。乳过氧化物酶催化硫氰酸盐的过氧化，产生亚硫氰酸盐和其他破坏细菌代谢功能的产物^[37]。LPO 已用作食用和药品中的防腐剂^[38]。LPO 系统具有广泛的抗菌谱，可用于食品包装，尤其用于延长牛奶的保质期，也可用于化妆品保存、卫生产品等^[37]。

1.3.4 髓过氧化物酶 (MPO)

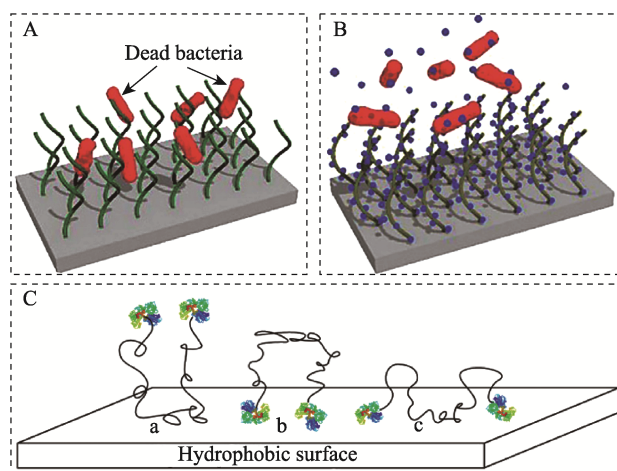
MPO 是中性粒细胞的一种衍生酶^[39]，MPO 通过催化过氧化氢和氯化物反应形成氧化剂次氯酸 ($HOCl$)，它也能和其他卤素离子形成次卤酸 (HOX , $X=Cl, Br, I$)^[40]， HOX 比 H_2O_2 具有更强的抗微生物的作用。MPO 主要存在于人类和动物体内，是一种生物体内抗菌酶，MPO 多用于临床医学及生物传感器方面的研究应用。

抗微生物氧化还原系统是动物体内的一种独特的防御病菌的系统，但是抗微生物氧化还原系统需要特殊底物支持进行抗菌作用，但其优越的

抗菌性能使越来越多的研究模仿这种抗菌系统开发出新型抗菌材料, 应用于食品、环境、健康行业以及个人保健产品^[7]。

2 酶型释放杀菌材料

酶型抗菌材料是指以抗菌酶为抗菌剂的抗菌材料。目前, 研究人员主要研究的抗菌材料表面的作用机理可分为三类: (1) 杀菌表面, 用于杀灭附着在生物材料表面的细菌, 如图 4A 所示; (2) 释放杀菌表面, 用于减少细菌与材料表面的黏附, 如图 4B 所示, 并通过外力释放抗菌剂杀灭附着在表面上的细菌^[41]; (3) 抗菌附着表面, 用于防止细菌的初始黏附, 如图 4c 所示。酶型抗菌材料主要是建立释放细菌表面和接触杀菌表面起到抑菌的作用。酶型释放杀菌材料主要是酶通过吸附、包埋等固定化酶的方式与载体材料结合。以下根据抗菌材料表面的抗菌原理对酶型抗菌材料进行介绍。



C 图中, a—溶菌酶与嵌段共聚物形成刷子, 聚氧乙烯附着在表面; b—溶菌酶通过吸附的方式固定到载体表面; c—溶菌酶和嵌段共聚物都附着在表面

图 4 接触杀菌抗菌材料表面 (A)、释放杀菌抗菌材料表面 (B)^[41]及抗菌附着表面 (C)^[42]作用机理示意图

Fig. 4 Antibacterial mechanism of contact-based bactericidal biomaterial surfaces (A), release-based bactericidal biomaterial surfaces (B)^[41], and anti-adhesion based antibacterial biomaterial surfaces (C)^[42]

2.1 抗菌酶与高分子复合物释放杀菌

酶型抗菌材料的载体选择会决定固定化抗菌酶的性能, 如活力、选择性、稳定性, 也会决定其应用范围。载体的物理性质包括载体的空间特性, 如载体表面、形状、大小以及内部孔状结构 (大小、分布、弯曲状态) 都会影响固定化酶的性能。将抗菌酶与各种高分子材料复合, 得到酶型抗菌复合材料。酶与天然有机高分子化合物 (如淀粉、纤维素、蛋白质、天然橡胶等) 复合得到可降解、无毒害的

抗菌材料。酶也可直接作为抗菌剂加入到复合膜的成膜过程中, 也可以通过吸附、涂覆的方法与载体材料结合。一些抗菌酶如 Lys, 可以直接涂膜于食品物料的表面, 这种涂膜在有效保护食品的同时又不会影响物料的食品效果。

2.1.1 固定化抗菌酶的壳聚糖抗菌材料

壳聚糖 (CS) 是一种天然高分子化合物, 具有良好的抗菌活性、生物相容性、生物降解性、无毒害性等优良的生物学特性^[43]。壳聚糖具有 3 种类型的活性官能团, 即氨基、伯羟基和仲羟基 (分别为 C-6 和 C-3 位), 这些活性官能团能通过化学修饰进行接枝共聚反应, 包括碳二亚胺偶联法、酶催化接枝法、自由基介导法和电化学法^[44]。这些化学修饰法通常是共价固定化酶的常用方法, 抗菌酶与壳聚糖释放杀菌材料主要采用吸附、包埋、自组装等物理固定化酶方法。ZHANG 等^[45]采用离子凝胶法将纤维素纳米晶添加到负载 Lys 的 β -壳聚糖纳米粒子中, 通过持续释放 Lys, 增强和扩展了负载 Lys 的 β -壳聚糖纳米粒子的抗菌性能, 可用作延长货架期的包装材料。YU 等^[46]采用释放杀菌的方式, 将 Lys 外涂在含有银的壳聚糖/银/羟基磷灰石薄膜表面, 制备了具有层次化纳米结构的抗菌涂层, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率分别为 95.42% 和 97.46%。WU 等^[47]制备了含有溶菌酶的壳聚糖/海藻酸钠水凝胶, 释放溶菌酶的相对活性为 $87.72\% \pm 3.96\%$, 并且对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的清除率均为 100%。壳聚糖本身带有正电荷的氨基与带有负电荷的微生物细胞表面结合导致微生物死亡。但是, 壳聚糖的成膜性较差, 不宜单独使用。层状硅酸盐与壳聚糖复合能提高其成膜性, 并且层状硅酸盐具有良好的吸附性。LI 等^[48]在壳聚糖溶液中加入 Lys 和累托石, 然后用流延法制备薄膜, 得到了具有较强抗菌性能的复合材料, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制率分别为 45.12% 和 92.67%。

除此之外, 壳聚糖也可以形成凝胶来达到固定化酶的目的。YANG 等^[49]采用溶胶-凝胶法在常温下将壳聚糖与四甲氧基硅烷偶联, 制备了壳聚糖-二氧化硅多孔凝胶, 将 GOX 固定到多孔凝胶中, 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}=5.6$ 时与游离酶活性相同。壳聚糖纳米粒子也是壳聚糖的衍生物, 保持壳聚糖良好特性的同时具有更小的粒径, 更大的比表面积, 能附着更多的酶, 在固定化酶方面具有广泛的应用。TAN 等^[50]将纤维二糖脱氢酶和脱氧核糖核酸酶 I 共同固定在带正电荷的壳聚糖纳米粒子上, 形成了一种靶向生物膜基质和微生物的双功能纳米粒子, 该纳米粒子对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和两种混合菌种生

物膜的抑制率分别为 98.8%、88.8%和 90.5%。MELO 等^[51]将辣根过氧化物酶 (HRP) 固定化壳聚糖纳米粒子和壳聚糖/聚乙二醇纳米粒子上, 固定化效率分别为 65.8%和 51.7%, 活性回收率分别为 76.4%和 60.4%, 表明壳聚糖纳米粒子作为固定化辣根过氧化物酶的载体的可行性以及在生物医学应用方面的可行性。

壳聚糖具有较强的抗菌性, 将抗菌酶与壳聚糖结合, 二者协同抗菌使固定化抗菌酶的壳聚糖抗菌材料具有高活性和强抗菌性。但是, 壳聚糖自身成膜性差, 抗菌酶单独与壳聚糖成膜较难应用, 一般将壳聚糖与其他材料如层状硅酸盐共同固定化抗菌酶, 或者将壳聚糖制成凝胶状、纳米粒子形态以增大壳聚糖的比表面积, 增大固定化酶的负载率, 达到高效抗菌的目的。因此, 得到固定化酶壳聚糖抗菌材料在满足抗菌酶具有高负载率和高活性的前提下, 既需要考虑抗菌酶与载体的结合方式, 也要考虑壳聚糖的形态结构。

2.1.2 固定化抗菌酶的纤维素抗菌材料

纤维素是植物细胞壁的主要结构部分, 是自然界中大量存在的天然生物高分子材料, 具有广泛的适用性^[52]。通过对纤维素进行羧基化改性^[53]、硝化改性^[54]、酯化改性^[55]、接枝改性等^[56]得到纤维素改性材料, 其中包括纤维素基复合材料、纤维素衍生物^[57]、纤维素纳米纤维等^[58], 生物降解高分子材料是固定化酶的良好载体。ZHANG 等^[59]将带正电荷的 Lys 和带负电荷的果胶用逐层 (LBL) 自组装技术交替沉积在纤维素纳米纤维垫的表面上, 该抗菌衬垫对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长抑制区的平均直径分别为 6.7 和 8.6 mm。同样, ZHOU 等^[60]也通过 LBL 技术将带负电的金纳米粒子 (GNPs) 和带负电的 Lys 交替沉积在带负电的纤维素垫上, 其制备工艺示意图如图 5 所示。复合纳米纤维抗菌垫的层数达到 5.5 层时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长抑制区平均直径分别达到 10 和 12 mm。HU 等^[61]将 Lys 添加到羧甲基纤维素薄膜中, 与纯羧甲基纤维素薄膜相比拉伸强度可提高 25.4%, 耐水性提高了 15.38%, 并对两种常见食源性病原菌具有抑制作用。

将抗菌酶添加到纤维素溶液中得到的酶型释放杀菌材料, 抗菌酶的添加除了会增加纤维素材料的抗菌性, 也会提高纤维素材料的机械性能。但是这种以物理方法固定化抗菌酶的纤维素抗菌材料不能控制抗菌酶的负载量与分散效果, 进而无法确定固定化抗菌酶纤维素抗菌材料的抗菌效果, 以及抗菌时效性。因此, 需要进一步探讨抗菌酶负载性与纤维素抗菌材料性能之间的关系。

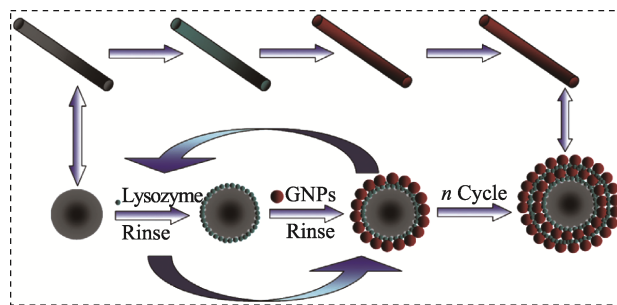


图 5 LBL 薄膜涂层纤维素垫的制作流程示意图^[60]

Fig. 5 Schematic diagram of manufacturing process of LBL film coated cellulose pad^[60]

2.1.3 固定化抗菌酶的淀粉抗菌材料

淀粉是一种可再生的、可降解的碳水化合物, 主要存在于植物中, 植物通过光合作用形成淀粉^[62]。天然淀粉在性能上并不能满足市场的需求, 为了让淀粉具有更好的性能和广泛的用途, 需要对天然淀粉进行一些特定的化学、物理或酶解的改性处理, 如乙酰化淀粉、改性淀粉、羧甲基淀粉^[63]等。改性淀粉更能满足固定化酶的需要, 是一种天然固定化酶载体。MOHAMED 等^[64]使用 S-1-氨基-3-氯丙烷-2-醇为醚化试剂使淀粉醚化生成醚键, 得到阳离子玉米淀粉 (CMS), 以吸附的方式固定 HRP。固定化效率最高可达 91%, 固定化酶重复使用 10 次, 剩余活性 65%。CMS 是一种化学改性淀粉, 具有与天然淀粉不同的理化性质, 并且具有一定的抗菌性能^[65]。EL-NAGGAR 等^[66]以 3-氯-2-羟基丙胺为醚化剂制备阳离子化微孔淀粉 (CMPS), 同样以吸附的方式固定 HRP。在 pH=6.0 和 100 个单位酶量 (在最适条件下, 1 min 内将 1 μmol 底物转化为产物的酶量定义为 1 个单位) 的条件下, 100 mg CMPS 的固定化效率最高 (86%)。重复使用 10 次后, HRP 保留了初始活性的 66%。CHEN 等^[67]用葡糖淀粉酶和 α -淀粉酶处理玉米淀粉制备微孔淀粉生物吸附剂, 然后固定天然生物活性的漆酶, 微孔淀粉的吸附率为 10%~38%。

目前, 以淀粉为固定化抗菌酶载体的研究不多, 但是淀粉自身优异的性能使得淀粉在固定化抗菌酶上具有良好的应用前景。但是淀粉的耐水性和机械性能差, 根据现有研究报道, 天然淀粉或者改性淀粉仍不能满足工业中固定化酶的生产 and 应用要求, 需要进一步研究改性淀粉作为固定化抗菌酶载体对其抗菌性能和抗菌酶活性的提升。

2.1.4 固定化抗菌酶的海藻酸盐抗菌材料

海藻酸盐是一种多酸的阴离子盐, 由两个酸残基 α -L-古洛糖醛酸和 β -D-甘露糖醛酸通过 1,4-糖苷键连接而成^[68-69]。由海藻酸盐制成的凝胶具有生物相容性、生物可降解性、无毒、低成本等优点。海藻

酸盐已作为食品添加剂得到了广泛的认可,并在医学、制药和生物技术领域有多种应用。MOLAYI 等^[38]制备了海藻酸盐-乳清蛋白涂层,将不同浓度的 LPO 添加到涂层中,应用于延长鸡大腿肉的保质期,结果表明,该海藻酸盐-乳清蛋白涂层中添加质量分数为 8%的 LPO,细菌的生长抑制作用最大。海藻酸盐可以通过滴入含有 Ca^{2+} 盐溶液形成凝胶化的海藻酸盐基质。URREA 等^[70]将含有 HRP 的海藻酸钠溶液滴加到含 Ca^{2+} 盐溶液中,瞬时界面聚合产生内部带有固定化酶的凝胶化的海藻酸盐珠,通过释放 HRP 的方式达到抗氧化抗菌的目的。

海藻酸盐作为固定化抗菌酶的载体因为它温和的交联条件不会对抗菌酶的活性产生负面影响而具有较好的优势。但海藻酸盐是通过与二价离子的交联形成凝胶载体包埋抗菌酶,这种方法也无法确定包埋的抗菌酶浓度与抗菌效果之间的关系。海藻酸盐固定化抗菌酶适用于制药行业的药物输送或其他生物相关行业,除了传统的包埋方法外,也需要进一步研究其他合适的固定化酶方法。

2.1.5 固定化抗菌酶的其他聚合物抗菌材料

聚合物固定化抗菌酶具有用于水处理、食品制造和生物医学应用的潜力。聚合物通过与抗菌酶的物理固定化酶方法(如包埋、吸附等)来构建抗菌复合材料。聚合物可通过表面改性增加抗菌效果,也可通过与不同化学基团功能化后与酶进行共价结合达到接触杀菌的目的。以物理固定化抗菌酶的聚合物抗菌材料稳定性不如以化学键连接的方式固定化抗菌酶的聚合物抗菌材料。ZHANG 等^[71]将 Lys 自组装薄膜黏附在两种常用的包装聚合物薄膜上,即聚乙烯和聚丙烯,复合膜具有更好的阻隔性,且在 2 d 内对存在于巴氏杀菌奶中金黄色葡萄球菌每毫升奶液中含有的菌落总数减少 1 个对数值。XIA 等^[72]通过吸附的方式将 GOX 固定在金纳米粒子聚集体沉积的聚苯乙烯(PS)微球上,连续反应 5 个周期后固定化 GOX 仍具有 50%的活性,但游离 GOX 不具有活性。这种新型结构对 GOX 生物传感、GOX 固定和抗菌等方面具有广泛的应用前景,对新型复合材料和生物学的多学科研究具有重要意义。CEBRIÁN 等^[73]将 Lys 静电结合到带负电的交联聚甲基丙烯酸缩水甘油酯(c-PGMA)大分子组装体中,与纯 c-PGMA 相比,负载 Lys 的 c-PGMA 14 d 后对大肠杆菌的抑菌圈面积可达 100 mm^2 ,对金黄色葡萄球菌的抑菌圈面积可达 180 mm^2 。石油基聚合物种类繁多,以自组装、吸附、包埋等方法固定化抗菌酶的活性较高,也具有广泛的用途,但这些方法固定化抗菌酶不稳定,很难通过释放杀菌保持长时间的抑菌性。

以吸附、包埋等物理固定化酶的方式将抗菌酶固定化到聚合物材料中,抗菌酶通过释放杀菌的形式抑制微生物的生长繁殖。天然聚合物来源广泛,但大多数天然聚合物的机械性能较差,不能满足固定化酶载体的需求,需要对天然聚合物进行物理化学改性,提高载体的机械性能的同时提高固定化抗菌酶的负载率。一些石油基聚合物^[71-73]是固定化酶的良好载体,为了提高固定化抗菌酶的负载率也会对聚合物进行物理化学改性,通过增大载体比表面积以达到提高负载率的目的。

2.2 抗菌酶与无机载体复合抗菌材料

2.2.1 固定化抗菌酶的金属粒子复合抗菌材料

酶与金属载体结合起来是一种常用的固定化酶的手段。金属纳米粒子具有独特的催化、光学和电学特性,可以通过调整它们的大小、形状和表面来与抗菌酶结合^[72]。BANG 等^[74]采用振荡法(室温, 15 r/min)将蛋清中分离的溶酶体酶固定化在 TiO_2 颗粒上,发现固定化后的溶酶体酶相较游离溶酶体酶提高了 25%的抗菌活性,并且固定化溶酶体酶 33 d 后仍保持初始活性的 85%。BATOOL 等^[75]将 GOX 固定在氧化锌纳米颗粒(ZnO NPs)上,然后悬浮在缓冲液中以制备 GOX/ ZnO NPs 的喷雾溶液,固定化葡萄糖氧化酶的活力 $[(23.3 \pm 2.08) \text{ U/mL}]$ 高于游离酶的活力 $[(18.1 \pm 0.33) \text{ U/mL}]$ 。将 GOX/ ZnO NPs 喷雾溶液对桃子进行采后处理,结果表明,对于保持水果生理外观、质量、硬度、可溶性固形物和 1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)自由基清除活性均有良好的效果,GOX/ ZnO NPs 是延长桃采后货架期的良好抗菌材料。金属粒子自身有抗菌性,且很容易通过物理化学途径改变金属粒子的形貌,提高抗菌酶的表面负载率,进而在不影响抗菌酶活性的同时提高材料的抗菌性能。

2.2.2 固定化抗菌酶的氧化石墨烯复合抗菌材料

石墨烯是一种二维六边形结构材料,在具有两个碳原子的晶胞的蜂巢晶格中,与单层原子厚度类似的多环芳烃链共价键合^[76]。石墨烯具有多孔结构、导电性、耐化学性、光学活性和比表面积大的独特性质^[77]。基于石墨烯的金属氧化物——氧化石墨烯纳米粒子同样具有比表面积大、化学特性优越、成本低廉、可重复使用性好的优点^[78]。石墨烯以及氧化石墨烯是固定化酶的常见载体。氧化石墨烯通过物理吸附的方法固定蛋清溶菌酶,不仅会阻断活性位点,也会影响周围残基的灵活性,更容易出现热不稳定性^[79]。HAO 等^[21]将聚多巴胺(PDA)黏附氧化石墨烯(GO),再浸入蛋清溶菌酶,得到 PDA/rGO-蛋清溶菌酶薄膜,该膜对大肠杆菌 18 h 后抑菌率达到 91.4%。氧化石墨烯的强吸附作用除了能固定抗

菌酶外,也能固定醇脱氢酶^[80]、纤维素酶^[81]、过氧化物酶^[82]等。

2.2.3 固定化抗菌酶的硅酸盐复合抗菌材料

层状硅酸盐(也称为水合层状聚硅酸盐、层状硅酸或层状碱金属硅酸盐)包括尖晶石、镁钛矿、钾镁矿、正硅酸盐和镁闪锌矿,这些化合物具有明确的层状排列结构,它们的相容性、低毒性及其热稳定性和机械稳定性促使研究人员加大力度将这些有趣的特性与其他无机或有机物质结合起来^[83]。KAWAI 等^[84]研究了 Lys 固定化在层状硅酸盐 RUB-15 和改性化合物 RUB-15 纳米粒子上的性能,结果表明,溶菌酶吸附量分别约为 1.4 和 1.7 mg,但吸附后的溶菌酶活性仅为天然溶菌酶的 9.8%。除了层状硅酸盐是固定化酶的常用材料外,介孔二氧化硅材料也常用作载体,其具有纳米级的可调孔径、大比表面积和孔体积的特点,并且介孔二氧化硅的表面硅烷醇基团也能与生物分子的表面电荷之间产生静电相互作用^[85]。具有多孔结构的沸石也是一种固定化酶的良好载体,沸石具有复杂的孔隙结构、可调节的表面性质、优异的热稳定性、相对较低的成本和良好的环境相容性,可以提高固定化酶的稳定性^[86]。

酶型释放杀菌抗菌材料大多数以物理固定化酶的方式将抗菌酶固定化在载体上,其中天然高分子材料来源广泛,也是固定化抗菌酶的良好载体,但是大多数天然高分子材料存在机械性能较差的问题,石油基聚合物较天然聚合物具有更好的机械性能,但存在环境污染的问题,以二者为载体的固定化酶释放杀菌材料抗菌效果较好,但是存在酶泄漏和抗菌时效性差的问题。无机载体具有高孔隙率和大比表面积的特点,能负载更多抗菌酶,拥有较好的机械性能和稳定性,但是不易直接作为抗菌材料,一般作为抗菌粒子通过释放的方式达到杀菌的目的。

3 酶型接触杀菌材料

酶型接触杀菌材料是将抗菌酶以化学键连接的方式固定到载体材料上,主要的固定化酶方式是共价结合固定化酶和交联固定化酶。酶和载体材料之间以共价结合或者交联结合的方式固定化酶具有不可逆性,酶与载体间的化学键结合会使酶构象的空间变化受到限制(多点附着作用)以及化学性质的改变(化学修饰作用)。与其他方法(吸附、包埋、微囊化)固定化酶或游离酶相比,共价结合固定化酶的活力、选择性以及稳定性等性能都有所提高。由于酶型接触杀菌材料是通过有效的化学键连接将抗菌酶固定化在载体表面,所以其对载体的化学性

质、酶与载体间的间隔臂的性质和化学微环境有一定的要求,也需要根据载体材料的物理化学性质考虑其应用范围。下面以两种不同固定化酶方式介绍酶型接触杀菌材料。

3.1 共价结合固定化抗菌酶

共价结合固定化酶是将酶蛋白以化学键结合的方式固定到一个合适的载体上。而共价结合固定化酶能在酶蛋白与载体材料之间形成一种结合力,使酶蛋白不能游离于环境中。酶与载体之间通过化学键相连,即酶表面的活性氨基残基与载体表面的活性官能团发生反应,达到有效的共价连接。抗菌酶通过共价结合固定到载体材料上,固定化酶具有良好的稳定性和重复使用性,并且不迁移到环境中。共价结合固定化酶的载体选择与物理方法固定化酶不同,物理方法固定化酶需要载体具有较大的比表面积,而共价结合固定化酶既需要较大的比表面积也需要载体表面具有能与酶发生化学反应的官能团,二者决定了共价结合固定化酶的最大有效负载量。固定化抗菌酶的最大有效负载量与抗菌酶最小抑菌浓度相关,所以载体的选择在接触抗菌材料上具有重要意义。

3.1.1 聚合物共价结合固定化抗菌酶

壳聚糖(CS)在物理固定化抗菌酶上具有广泛的应用,除此之外,壳聚糖具有的氨基、伯羟基和仲羟基 3 种活性官能团能通过化学修饰进行接枝共聚反应,包括碳二亚胺偶联法、酶催化接枝法、自由基介导法和电化学法^[44]等化学反应,因此,壳聚糖在共价固定化抗菌酶和交联法固定化酶方面同样具有广泛的应用。PARK 等^[87]采用静电纺丝法制备了壳聚糖纳米纤维,通过交联酶聚集体(CLEA)将蛋清溶菌酶固定在壳聚糖纳米纤维上,固定化的溶菌酶-CLEA 在连续使用 100 次后仍保持 76%以上的活性。经 10 次循环后,固定化溶菌酶-CLEA 的 CS 纳米纤维对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、福氏志贺氏菌和铜绿假单胞菌的抑菌率分别为 82.4%、79.8%、83.4%和 84.1%。纤维素表面具有大量的羟基,可以通过化学改性增强载体表面活性,同时纤维素具有较大的比表面积,是一种共价结合固定化酶的良好载体。XUE 等^[88]用 1,2,3,4-丁烷四羧酸(BTCA)对核壳结构磁性纤维素微球(MCMS)进行表面修饰,再将 Lys 共价固定到 MCMS 上,固定化溶菌酶具有较高的储存和热稳定性,且具有良好的重复使用性,6 次循环使用后活性为 51.9%±2.2%。

壳聚糖、纤维素这种表面具有活性官能团的聚合物能通过共价结合的方式固定化抗菌酶,一些表面惰性的聚合物可以通过表面功能化的方法获得活性官能团,经过双功能交联剂连接抗菌酶和功能化

载体, 以达到共价结合固定化酶广泛应用的目的。AGRIC 等^[89]通过共价连接的方式将 Lys 固定到两种不同的乙烯-乙醇共聚物 (EVOH29 和 EVOH44) 上, 固定化溶菌酶的薄膜对单核细胞增生李斯特菌的抗菌活性与游离酶相似。AGNIESZKA 等^[42]合成了中心为聚环氧丙烷 (PPO) 嵌段和两个末端为聚氧化乙烯 (PEO) 链段的三嵌段共聚物 Pluronic F-127, 溶菌酶的共价结合是通过将醛官能化 PEO 嵌段和蛋白质中赖氨酸残基的还原胺化进行的。溶菌酶的表面覆盖率达到 42%, 并且三嵌段共聚物与溶菌酶的生物偶联组成了刷子型涂层具有双重功能, 即聚合物刷子与溶菌酶间的抗菌活性以及产生的抗黏附活性。硅橡胶是一种主链由硅氧原子交替构成的硅氧聚合物。硅橡胶具有优异的耐低温和高温性能、良好的透气性能以及生理惰性, 使其在医用、食品领域具有广泛的应用。FLORES-ROJAS 等^[90]通过伽马射线辐射硅橡胶后与聚乙二醇二甲基丙烯酸酯-共缩水甘油基甲基丙烯酸酯 (EGDMA-co-GMA) 接枝, 然后对硅橡胶薄膜进行化学改性以提供甲酰基, 通过共价固定 Lys, 赋予其抗菌性能, 结果表明, 表面固定化溶菌酶硅橡胶薄膜 pH 在 6~11 内保持良好的活性, 并且能重复使用多次。FLORES-ROJAS 等^[91]通过接枝共聚和化学活化将 Lys 固定到硅橡胶薄膜上, 固定化溶菌酶的耐高温、耐酸碱性和稳定性都有所提升, 在食品、医疗等行业上具有广泛的应用前景。

3.1.2 金属共价结合固定化抗菌酶

将抗菌酶通过共价连接的方式固定到金属或金属纳米粒子上得到金属基抗菌材料。一些金属自身具有良好的抗菌特性, 如银能与抗菌酶协同抗菌制成具有释放杀菌的抗菌材料^[45], 同样, 一些金属通过共价连接抗菌酶能得到金属基抗菌材料。YUAN 等^[92]用仿生的多巴胺锚链活化不锈钢 (SS) 表面得到活性氨基, 然后以戊二醛 (GA) 为双功能交联剂共价固定壳聚糖, 再以 *N,N'*-羰基二咪唑为双功能交联剂将 Lys 接枝到壳聚糖上, 得到金属基抗菌材料 (SS-CS-溶菌酶)。SS-CS-溶菌酶表面与革兰氏阳性金黄色葡萄球菌接触 4 h 后, 95% 以上的金黄色葡萄球菌细胞不再存活, 表明与固定化溶菌酶表面接触对革兰氏阳性菌有较高的抗菌效果。以金属为载体的固定化抗菌酶抗菌材料能解决医疗设备中, 细菌微生物黏附引起的细菌感染性疾病问题, 降低死亡率, 同时也是良好的食品包装材料。

3.2 交联结合固定化抗菌酶

交联法固定化酶是一种使用双功能或多功能试剂将酶固定到载体上的方式, 所使用的交联剂能分别与载体材料和酶分子表面活性基团进行有效的化学连接形成固定化酶。常见的交联剂有戊二醛、对

甲苯二异氰酸酯、顺丁烯二酸酐、己二胺、碳二亚胺等。交联剂应根据酶与载体材料的种类进行选择。ASANARONG 等^[93]以戊二醛为交联剂, 将木瓜蛋白酶固定到细菌纤维素薄膜上, 该薄膜完全抑制了大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌在伤口敷料中的生长, 是一种很有前途的生物医学材料。CHEN 等^[94]通过使用戊二醛交联剂将纤维素酶和 Lys 共同固定在氨基官能化磁性纳米颗粒 (MNPs) 的表面, 由于双酶共固定化过程中的协同效应, 活性回收率最高 (纤维素酶 78.9%, 溶菌酶 69.6%), 共固定化酶的热稳定性是游离酶的 3 倍, 共固定化酶在循环使用 6 次后保留了初始活性的 60%。CERÓN 等^[95]以戊二醛为交联剂, 将 Lys 固定到壳聚糖微球上, 固定化酶的负载效率为 67%。通过 SEM 图 (图 6) 可以观察到, 溶菌酶在壳聚糖微球表面的固定化, 也可以看出壳聚糖用戊二醛处理促进了壳聚糖颗粒聚集体的形成, 溶菌酶-壳聚糖微球的平均尺寸增加。当固定化溶菌酶壳聚糖微球添加量为 50 mg 时, 对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和铜绿假单胞菌抗菌活性分别为 100.00%、100.00%、90.96%。交联法可使酶固着较为牢固, 不易脱落, 可有效保证重复使用次数, 但固定化时往往会发生蛋白质之间的交联反应, 破坏部分酶蛋白结构, 降低酶的整体活性以及降低热振动和构象灵活性。为了防止酶变性和展开, 通过降低交联剂的浓度或适当减少交联时间可降低酶活性的损失率^[96]。

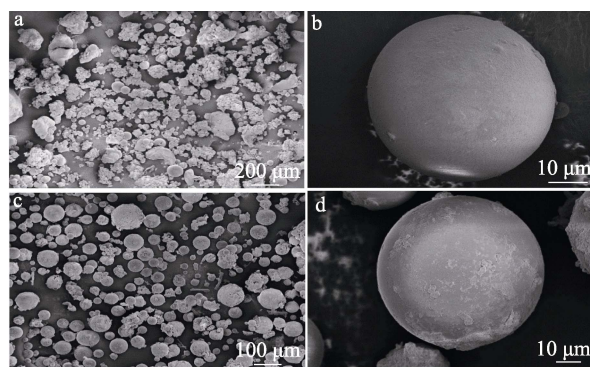


图 6 壳聚糖微球 (a, b) 及固定化溶菌酶壳聚糖微球 (c, d) 的 SEM 图^[95]

Fig. 6 SEM images of chitosan microspheres (a, b) and immobilized lysozyme chitosan microspheres (c, d)^[95]

酶型接触杀菌材料的两种固定化酶方式通常可以联用 (表 1) 以获得更高酶载量、高活性、高稳定性的固定化酶抗菌材料。酶型接触杀菌材料大多数以共价结合和交联结合的方式固定化抗菌酶, 抗菌酶的蛋白质氨基末端与载体间通过间隔臂或者通过交联剂结合, 既能保留抗菌酶的抗菌活性, 又能

增强抗菌酶的耐酸碱和耐高温的性能。但也会带来空间位阻以及化学性质的改变,降低抗菌酶的活性。因为酶型接触杀菌材料的时效性和稳定性较好,其在医疗设备、医用敷料等生物医学材料上具有更好的应用前景。酶型释放杀菌材料大多数以物理固定

化酶的方式固定抗菌酶,存在机械性能差、酶泄漏、抗菌时效性差的问题。但是以吸附和包埋等方法固定化抗菌酶具有高负载率,并且能更好地保留酶活性和抗菌效果。因此,酶型释放杀菌材料可作为食品保鲜材料和生物医学材料。

表 1 同时采用共价固定化方式和交联固定化方式固定抗菌酶

Table 1 Immobilization of antimicrobial enzymes by both covalent immobilization and cross-linking immobilization

载体材料	交联剂	抗菌酶	固定化酶效果	
不锈钢	戊二醛、 <i>N,N'</i> -羰基二咪唑	溶菌酶	在中性 pH 条件下,固定化溶菌酶的 SS 底物与金黄色葡萄球菌接触 4 h 后,95%以上的金黄色葡萄球菌细胞不再存活	[92]
细菌纤维素薄膜	戊二醛	木瓜蛋白酶	能完全抑制了大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌在伤口敷料中的生长	[93]
磁性纳米颗粒	戊二醛	溶菌酶和纤维素酶	纤维素酶和溶菌酶回收率分别为 78.9%、69.6%,共固定化酶的热稳定性是游离酶的 3 倍,其在循环使用 6 次后仍保留初始活性的 60%	[94]

4 结束语与展望

与传统化学抗菌剂相比,具有生物活性的抗菌酶在食品制造、医疗卫生和环境保护中具有较大的应用价值,但是目前抗菌酶在对抗微生物和微生物膜上仍然存在以下几个问题:

(1) 抗菌酶是生物活性抗菌剂,与传统化学抗菌剂相比,酶的稳定性较差。抗菌酶在抗微生物和微生物膜中需要考虑到抗菌酶的耐高温、耐酸碱性能,必须保持酶具有一定的活性,达到有效抗菌的目的。

(2) 抗菌酶对微生物和微生物膜的抗菌效果的影响因素较多。抗菌酶的抗菌效果与酶浓度有关,抗菌酶只有达到细菌的最小抑菌浓度才会起到抑菌效果。酶型改性抗菌材料需要考虑到抗菌酶的附着率,不同固定化酶的方法得到的酶型改性抗菌材料的抗菌效果不同,固定不同抗菌酶的酶型改性抗菌材料对不同微生物也有特异性。目前,学者考虑将多种酶协同抗菌,或将抗菌酶与传统抗菌剂合用起到对抗微生物和微生物膜的作用。

(3) 酶型生物改性抗菌材料的使用成本比传统抗菌剂抗菌材料高。首先需要对所使用的抗菌酶进行提纯,再进行固定化,二者提高了该抗菌材料的使用成本。目前,只有 HEWL 和 GOX 具有较完善的提纯工艺。虽然酶型改性抗菌材料在一定程度上提高了抗菌酶的耐高温、耐酸碱性能,但其使用的时效性以及不完备的制备工艺决定了其不宜进行商业应用。

酶型释放杀菌材料,采用物理固定化酶的方式将抗菌酶固定化到载体材料上,赋予载体材料抗菌性。采用吸附、包埋等物理固定化酶的反应条件温和,固定化过程中催化抗菌酶固定到适当的位置,

对酶的空间结构影响最小,这表明对固定化抗菌酶活性更高,也更易于回收。但是,物理固定化酶普遍存在酶泄漏和扩散限制的问题,对抗菌酶的杀菌效果产生一定的影响。在载体上物理固定化酶不能准确地控制固定化抗菌酶的负载率,也无法确定释放杀菌的时效性,进而抗菌酶的浓度与抗菌性能的关系也无法确定。酶型释放杀菌抗菌材料多用于食品包装中,在短期内具有良好的抗菌效果,用于提高产品货架期。酶型接触杀菌材料,采用化学键连接的方法将抗菌酶的氨基残基与载体表面活性官能团结合,牢固的化学键使抗菌酶具有良好的稳定性和重复利用性,但是由于化学键的形成会对酶的空间结构产生影响,进而降低抗菌酶的活性,影响其抗菌性能。但这种酶型接触杀菌材料具有更长时间的抗菌性,满足长期抗菌的要求,抗菌表面具有更加普遍的应用,除了食品包装方面,还可以应用于医用敷料和其他生物医学领域。

若要解决上述问题,需要开发一种固定化抗菌酶的新方法,能获得更高的酶负载量、更高的酶活性。因此,在未来发展中需要考虑具有特定化学特性和物理特性,即具有化学活性基团和适当几何特性的载体,使得载体既能在温和特性下与抗菌酶结合,又能保持酶负载量和酶活性。也可以考虑采用多种固定化酶技术的组合,解决单一固定化酶不能解决的问题,如:采用共价结合和交联结合两种方法固定化抗菌酶,使其具有更加稳定的化学微环境,应对极端环境的变化。对于固定化抗菌酶的活性和成本问题,可从基因工程入手,通过改变抗菌酶的结构、选择性来提高抗菌酶的耐高温性、耐酸碱性能,并具有较高的抗菌活性。

近年来,病原性微生物引起的发病率不断提高,

在新型冠状病毒肺炎疫情的影响下, 开发新型抗菌材料具有重要意义。新型酶型生物改性材料在食品工业、医疗卫生、生物工程、制药等方面将会有广泛的应用。

参考文献:

- [1] YE L, CAO Z M, LIU X M, *et al.* Noble metal-based nanomaterials as antibacterial agents[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2022, 904: 164091.
- [2] RAOWSKI Ł G, LEPEK K, STASIŁOJC M, *et al.* Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents[J]. *Microbiological Research*, 2021, 248: 126746.
- [3] TANG L, TONG D Q, ZHANG Y L, *et al.* A simple judgment method for joint action of antibacterial agents on bacterial resistance[J]. *MethodsX*, 2022, 9: 101700.
- [4] DOYLE A A, STEPHENS J C. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents[J]. *Fitoterapia*, 2019, 139: 104405.
- [5] ZHANG N, MA S. Recent development of membrane-active molecules as antibacterial agents[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 184: 111743.
- [6] YAN Y H, LI Y Z, ZHANG Z W, *et al.* Advances of peptides for antibacterial applications[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 202: 111682.
- [7] THALLINGER B, PRASETYO E N, NYANHONGO G S, *et al.* Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms[J]. *Biotechnology Journal*, 2013, 8(1): 97-109.
- [8] BURCHACKA E, PIĘTA P, LUPICKA-SŁOWIK A, *et al.* Recent advances in fungal serine protease inhibitors[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 146: 112523.
- [9] MAHMOUD A, KOTB E, ALQOSAIBI A I, *et al.* *In vitro* and *in silico* characterization of alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* D9 recovered from Saudi Arabia[J]. *Heliyon*, 2021, 7(10): e08148.
- [10] LU H R (陆海荣). Study on the mechanism of efficient lysis of bacterial cell wall by lysostaphin[J]. Shanghai: Fudan University (复旦大学), 2013.
- [11] ZHANG X Y (张晓燕), GUO L D (国立东), LIU X Y (刘晓艳). Research progress of neutral protease from *Bacillus subtilis*[J]. *Chinese Brewing (中国酿造)*, 2018, 37(4): 12-15.
- [12] ZHANG R Z (张荣宗), JIANG D W (江丁文), CHEN J X (陈锦香). Analysis of protease structure and expression vector of *Bacillus subtilis*[J]. *Agricultural Technology and Equipment (农业技术与装备)*, 2021, (7): 60-61, 64.
- [13] WEI Z H, SHAN C J, ZHANG L X, *et al.* A novel subtilin-like lantibiotics subtilin JS-4 produced by *Bacillus subtilis* JS-4, and its antibacterial mechanism against *Listeria monocytogenes*[J]. *LWT*, 2021, 142: 110993.
- [14] XIANG Y Z, LI X Y, ZHENG H L, *et al.* Purification and antibacterial properties of a novel bacteriocin against *Escherichia coli* from *Bacillus subtilis* isolated from blueberry ferments[J]. *LWT*, 2021, 146: 111456.
- [15] LU H, XIONG W B, LI Z, *et al.* Activity of the lyases lysSSE1 and HolSSE1 against common pathogenic bacteria and their antimicrobial efficacy in biofilms[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 116: 105322.
- [16] WANG Z H, ZHAO X. The application and research progress of bacteriophages in food safety[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133(4): 2137-2147.
- [17] OBESO J M, MARTÍNEZ B, RODRÍGUEZ A, *et al.* Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage Φ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128(2): 212-218.
- [18] IMRAN M, SANJEEV C, GHADI S C. Chapter 2-Genome sequence analysis for bioprospecting of marine bacterial polysaccharide-degrading enzymes[M]. Amsterdam: *Advances in Biological Science Research*, 2019.
- [19] SHOW P L, OOI C W, LEE X J, *et al.* Batch and dynamic adsorption of lysozyme from chicken egg white on dye-affinity nanofiber membranes modified by ethylene diamine and chitosan[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 1711-1724.
- [20] HAMDANI A M, WANI I A, BHAT N A, *et al.* Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 1201-1209.
- [21] HAO X, CHEN S, ZHU H, *et al.* The synergy of graphene oxide and polydopamine assisted immobilization of lysozyme to improve antibacterial properties[J]. *Chemistry Select*, 2017, 2(6): 2174-2182.
- [22] LEŚNIEWSKI G, YANG T Y. Lysozyme and its modified forms: A critical appraisal of selected properties and potential[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 107: 333-342.
- [23] WU T T, JIANG Q Q, WU D, *et al.* What is new in lysozyme research and its application in food industry: A review[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 698-709.
- [24] CHENG D Y, JIANG C C, XU J C, *et al.* Characteristics and applications of alginate lyases: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 1304-1320.
- [25] DONG F, XU F, CHEN X L, *et al.* Alginate lyase aly36B is a new bacterial member of the polysaccharide lyase family 36 and catalyzes by a novel mechanism with lysine as both the catalytic base and catalytic acid[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(24): 4897-4909.
- [26] DABOOR S M, ROHDE J R, CHENG Z Y, *et al.* Disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate lyase enhances pathogen eradication by antibiotics[J]. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2021, 20(2): 264-270.
- [27] HU F, CAO S S, LI Q, *et al.* Construction and biochemical characterization of a novel hybrid alginate lyase with high activity by module recombination to prepare alginate oligosaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 1272-1279.
- [28] HILL K J, KASZUBA M, CREETH J E, *et al.* Reactive liposomes encapsulating a glucose oxidase-peroxidase system with antibacterial activity[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1997, 1326(1): 37-46.
- [29] MANO N. Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications[J]. *Bioelectrochemistry*, 2019, 128: 218-240.
- [30] LI X J, XIE X F, XING F G, *et al.* Glucose oxidase as a control agent against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in postharvest strawberry[J]. *Food Control*, 2019, 105: 277-284.
- [31] GE L, ZHAO Y S, MO T, *et al.* Immobilization of glucose oxidase in electrospun nanofibrous membranes for food preservation[J]. *Food Control*, 2012, 26(1): 188-193.
- [32] NYANHONGO G S, THALLINGER B, GUEBITZ G M, *et al.* Cellobiose dehydrogenase-based biomedical applications[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 59: 37-45.
- [33] THALLINGER B, ARGIROVA M, LESSEVA M, *et al.* Preventing microbial colonisation of catheters: Antimicrobial and antibiofilm activities of cellobiose dehydrogenase[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2014, 44(5): 402-408.
- [34] SULEJ J, OSIŃSKA-JAROSZUK M, JASZEK M, *et al.* Antimicrobial and antioxidative potential of free and immobilised cellobiose dehydrogenase isolated from wood degrading fungi[J]. *Fungal Biology*, 2019, 123(12): 875-886.
- [35] BUYS E M, SEIFU E. Enzymes indigenous to milk: Lactoperoxidase[M]. 3rd edition. Amsterdam: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2022.
- [36] ZHANG W L, RHIM J W. Functional edible films/coatings

- integrated with lactoperoxidase and lysozyme and their application in food preservation[J]. *Food Control*, 2022, 133(B): 108670.
- [37] MAZRI C, SÁNCHEZ L, RAMOS S J, *et al.* Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin[J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 234: 813-819.
- [38] MOLAYI R, EHASANI A, YOUSEFI M. The antibacterial effect of whey protein-alginate coating incorporated with the lactoperoxidase system on chicken thigh meat[J]. *Food Sci Nutr*, 2018, 6: 878-883.
- [39] BEKHIT M, GORSKI W. Biosensing with myeloperoxidase: Mechanism, activity, and determination of SCN⁻[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 331: 129469.
- [40] JOKUMSEN K V, HUHLE V H, DAVIES M J, *et al.* Characterisation of protein iodination and chlorination generated by myeloperoxidase[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2021, 177: S121.
- [41] WANG Y M, WANG F, ZHANG H, *et al.* Antibacterial material surfaces/interfaces for biomedical applications[J]. *Applied Materials Today*, 2021, 25: 101192.
- [42] AGNIESZKA K M, HENK J B, ANDREAS H, *et al.* Pluronic-lysozyme conjugates as anti-adhesive and antibacterial bifunctional polymers for surface coating[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(26): 6333-6341.
- [43] TIAN B R, LIU Y M. Chitosan-based biomaterials: From discovery to food application[J]. *Polym Adv Technol*, 2020, 31: 2408-2421.
- [44] NUNES C, COIMBRA M A, FERREIRA P, *et al.* Tailoring functional chitosan-based composites for food applications[J]. *The Chemical Record*, 2018, 18(7/8): 1138-1149.
- [45] ZHANG H C, FENG M M, CHEN S S, *et al.* Incorporation of lysozyme into cellulose nanocrystals stabilized β -chitosan nanoparticles with enhanced antibacterial activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 236: 115974.
- [46] YU W Z, ZHANG Y Z, LIU X M, *et al.* Synergistic antibacterial activity of multi components in lysozyme/chitosan/silver/hydroxyapatite hybrid coating[J]. *Materials & Design*, 2018, 139: 351-362.
- [47] WU T T, HUANG J Q, JIANG Y Y, *et al.* Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 361-369.
- [48] LI X, TU H, HUABG M T, *et al.* Incorporation of lysozyme-rectorite composites into chitosan films for antibacterial properties enhancement[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 789-795.
- [49] YANG Y M, WANG J W, TAN R X. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-SiO₂ gel[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(2): 126-131.
- [50] TAN Y L, MA S, LEONHARD M, *et al.* Co-immobilization of cellobiose dehydrogenase and deoxyribonuclease I on chitosan nanoparticles against fungal/bacterial polymicrobial biofilms targeting both biofilm matrix and microorganisms[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 108: 110499.
- [51] MELO M N, PEREIRA F M, ROCHA M A, *et al.* Immobilization and characterization of horseradish peroxidase into chitosan and chitosan/PEG nanoparticles: A comparative study[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 98: 160-171.
- [52] AMBAYE T G, VACCARI M, PRASAD S, *et al.* Preparation and applications of chitosan and cellulose composite materials[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 301: 113850.
- [53] KASSAB Z, SYAFRI E, TAMRAOUI Y, *et al.* Characteristics of sulfated and carboxylated cellulose nanocrystals extracted from *Juncus* plant stems[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1419-1425.
- [54] GOLUBEV A E, KUVSHINOVA S A, BURMISTROV V A, *et al.* Modern advances in the preparation and modification of cellulose nitrates[J]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2018, 88(2): 368-381.
- [55] TRACHE D, KHIMECHE K, ABDERRAHMANE M, *et al.* Physicochemical properties of microcrystalline nitrocellulose from alfa grass fibres and its thermal stability[J]. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2016, 124: 1485-1496.
- [56] TANG Y, TANG S, ZHANG T. Homogeneous preparation of aerocellulose grafted acrylamide and its CO₂ adsorption properties [J]. *Cellulose*, 2020, 27(6): 3263-3275.
- [57] GONG C, NI J P, TIAN C, *et al.* Research in porous structure of cellulose aerogel made from cellulose nanofibrils[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 172: 573-579.
- [58] TIAN W G, GAO X X, ZHANG J M, *et al.* Cellulose nanosphere: Preparation and applications of the novel nanocellulose[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 277: 118863.
- [59] ZHANG T T, ZHOU P H, ZHAN Y F, *et al.* Pectin/lysozyme bilayers layer-by-layer deposited cellulose nanofibrous mats for antibacterial application[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 117: 687-693.
- [60] ZHOU B, LI Y, DENG H B, *et al.* Antibacterial multilayer films fabricated by layer-by-layer immobilizing lysozyme and gold nanoparticles on nanofibers[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 116: 432-438.
- [61] HU X X, LIU Y F, ZHU D D, *et al.* Preparation and characterization of edible carboxymethyl cellulose films containing natural antibacterial agents: Lysozyme[J]. *Food Chemistry*, 2022, 385: 132708.
- [62] PFLUG E E, BUCHMANN N, SIEGWOLF R T W, *et al.* Resilient leaf physiological response of European beech (*Fagus sylvatica* L.) to summer drought and drought release[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 187.
- [63] LIN D R, MA Y, QIN W, *et al.* The structure, properties and potential probiotic properties of starch-pectin blend: A review[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 129: 107644.
- [64] MOHAMED S A, ELARABY N M, ABDEL-ATY A M, *et al.* Improvement of enzymatic properties and decolorization of azo dye: Immobilization of horseradish peroxidase on cationic maize starch[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 38: 102208.
- [65] SARAK S, BOONSUK P, KANTACHOTE D, *et al.* Film coating based on native starch and cationic starch blend improved postharvest quality of mangoes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 209(A): 125-131.
- [66] EL-NAGGAR M E, ABDEL-ATY A M, WASSEL A R, *et al.* Immobilization of horseradish peroxidase on cationic microporous starch: Physico-bio-chemical characterization and removal of phenolic compounds[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 181: 734-742.
- [67] CHEN X C, ZHOU Q Z, LIU F M, *et al.* Performance and kinetic of pesticide residues removal by microporous starch immobilized laccase in a combined adsorption and biotransformation process[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 21: 101235.
- [68] JIANG Z D, ZHANG X W, WU L Y, *et al.* Exolytic products of alginate by the immobilized alginate lyase confer antioxidant and antiapoptotic bioactivities in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 116976.
- [69] RAI S K, KAUR H, SINGH A, *et al.* Production of D-tagatose in packed bed reactor containing an immobilized L-arabinose isomerase on alginate support[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 38: 102227.
- [70] URREA D A M, GIMENEZ A V F, RODRIGUEZ Y R, *et al.* Immobilization of horseradish peroxidase in Ca-alginate beads: Evaluation of the enzyme leakage on the overall removal of an azo-dye and mathematical modeling[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2021, 156: 134-143.
- [71] ZHANG Z, ZHOU X, WANG D, *et al.* Lysozyme-based composite membranes and their potential application for active packaging[J]. *Food Bioscience*, 2021, 43: 101078.
- [72] XIA Y, LI J, JIANG L, *et al.* A new strategy for the controlled

- deposition of gold nanoparticle aggregates on two-dimensional polystyrene arrays and its application in glucose oxidase immobilization[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 367(1): 34-39.
- [73] CEBRIÁN M P, VILA L V, AMARIEI G, *et al.* Poly(glycidyl methacrylate) macromolecular assemblies as biocompatible nanocarrier for the antimicrobial lysozyme[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 603: 120695.
- [74] BANG S H, JANG A, YOON J, *et al.* Evaluation of whole lysosomal enzymes directly immobilized on titanium (IV) oxide used in the development of antimicrobial agents[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49(3): 260-265.
- [75] BATOOL R, KAZMI S A R, KHURSHID S, *et al.* Postharvest shelf life enhancement of peach fruit treated with glucose oxidase immobilized on ZnO nanoparticles[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130591.
- [76] AJALA O J, TIJANI J O, BANKOLE M T, *et al.* A critical review on graphene oxide nanostructured material: Properties, synthesis, characterization and application in water and wastewater treatment, environmental nanotechnology[J]. *Monitoring & Management*, 2022, 18: 100673.
- [77] PRIYADHARSHINI S D, MANIKANDAN S, KIRUTHIGA R, *et al.* Graphene oxide-based nanomaterials for the treatment of pollutants in the aquatic environment: Recent trends and perspectives-A review[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 306: 119377.
- [78] BERA S, DHAR J, DASGUPTA R, *et al.* Molecular features of interaction involving hen egg white lysozyme immobilized on graphene oxide and the effect on activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120(B): 2390-2398.
- [79] GAO W H, CHEN Y S, XI J, *et al.* A novel electrochemiluminescence ethanol biosensor based on tris(2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) and alcohol dehydrogenase immobilized in graphene/bovine serum albumin composite film[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 41: 776-782.
- [80] PAZ-CEDENO F R, CARCELLER J M, IBORRA S, *et al.* Magnetic graphene oxide as a platform for the immobilization of cellulases and xylanases: Ultrastructural characterization and assessment of lignocellulosic biomass hydrolysis[J]. *Renewable Energy*, 2021, 164: 491-501.
- [81] KIRAN, RATHOUR R K, BHATIA R K, *et al.* Fabrication of thermostable and reusable nano biocatalyst for dye decolorization by immobilization of lignin peroxidase on graphene oxide functionalized $MnFe_2O_4$ superparamagnetic nanoparticles[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 1317: 24020.
- [82] MOKHTAR A, ABDELKRIM S, HACHEMAOUI M, *et al.* Layered silicate magadiite and its composites for pollutants removal and antimicrobial properties: A review[J]. *Applied Clay Science*, 2020, 198: 105823.
- [83] ESSA H, MAGNER E, COONEY J, *et al.* Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 49(1/2/3/4): 61-68.
- [84] KAWAI A, URABE Y, ITOH T, *et al.* Immobilization of lysozyme on the layered silicate RUB-15[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2010, 122(1): 269-272.
- [85] DEKA J R, SAIKIA D, LAI Y S, *et al.* Roles of nanostructures and carboxylic acid functionalization of ordered cubic mesoporous silicas in lysozyme immobilization[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2015, 213: 150-160.
- [86] ZHANG H X, JIANG Z B, XIA Q H, *et al.* Progress and perspective of enzyme immobilization on zeolite crystal materials[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 172: 108033.
- [87] PARK J M, KIM M, PARK H S, *et al.* Immobilization of lysozyme-clea onto electrospun chitosan nanofiber for effective antibacterial applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 54: 37-43.
- [88] XUE F, CHEN Q, LI Y L, *et al.* Immobilized lysozyme onto 1, 2, 3, 4-butanetetracarboxylic (BTCA)-modified magnetic cellulose microsphere for improving bio-catalytic stability and activities[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 131: 109425.
- [89] AGRIC J. Covalent immobilization of lysozyme on ethylene vinyl alcohol films for nonmigrating antimicrobial packaging applications[J]. *Food Chem*, 2013, 61(27): 6720-6727.
- [90] FLORES-ROJAS G G, PINO-RAMOS V H, LÓPEZ-SAUCEDO F, *et al.* Improved covalent immobilization of lysozyme on silicone rubber-films grafted with poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-glycidylmethacrylate)[J]. *European Polymer Journal*, 2017, 95: 27-40.
- [91] FLORES-ROJAS G G, LÓPEZ-SAUCEDO F, BUCIO E, *et al.* Covalent immobilization of lysozyme in silicone rubber modified by easy chemical grafting[J]. *MRS Communications*, 2017, 7: 904-912.
- [92] YUAN S J, YIN J, JIANG W, *et al.* Enhancing antibacterial activity of surface-grafted chitosan with immobilized lysozyme on bioinspired stainless steel substrates[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 106: 11-21.
- [93] ASANARONG O, QUAN V M, BOONRUNGSIMAN S, *et al.* Bioactive wound dressing using bacterial cellulose loaded with papain composite: Morphology, loading/release and antibacterial properties[J]. *European Polymer Journal*, 2021, 143: 110224.
- [94] CHEN Q T, LIU D, WU C C, *et al.* 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.
- [95] CERÓN A A, NASCIFE L, NORTE S, *et al.* Synthesis of chitosan-lysozyme microspheres, physicochemical characterization, enzymatic and antimicrobial activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 185: 572-581.
- [96] OUYANG J, PU S J, WANG J Z, *et al.* Enzymatic hydrolysate of geniposide directly acts as cross-linking agent for enzyme immobilization[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 99: 187-195.