

生物酶的固定化及其应用

刁颖辉 付时雨* 余惠生

(中科院广州化学研究所纤维素化学开放实验室 广州 510650)

摘 要 固定化酶有利于实现生物酶与反应物的分离及酶的反复利用,有很好的应用前景。笔者从固定化酶的方法类别、用于固定化的功能基团、固定化后传质作用的影响等方面进行综述,并介绍了固定化酶近些年在生物传感器、有机反应、环境保护领域的应用。

关键词 固定化酶 生物酶载体 传质作用

Progress in the Studies of Enzyme Immobilization and Applications of Immobilized Enzyme

Diao Yinghui, Fu Shiyu, Yu Huisheng

(Laboratory of Cellulose and Lignocellulosics Chemistry, Guangzhou Institute of Chemistry Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650)

Abstract Enzyme immobilization benefits the separation of reactant from enzyme and the reuse of enzyme. Some research developments on enzyme immobilization including the methods, functional groups useful for immobilization and mass transfer effect are reviewed. Some applications of immobilized enzyme on biosensor, organic reaction and environmental protection have also been discussed.

Key words Immobilized enzyme, Enzyme carrier, Mass transfer effect

生物酶是一类分子量适中的蛋白质,存在于活细胞中,是一种天然高分子催化剂。在性质上,由于酶与反应物之间多是专一性的反应,与化学合成的催化剂比较,显示出:(1)催化效率高;(2)选择性好,副产物少;(3)反应条件温和等优点。然而酶是水溶性的,在酶促催化反应后,不使酶变性而回收酶相当困难。若将酶固定于载体上,即可克服上述缺点。固定化的生物酶最主要的优点是:(1)生物酶与反应体系中的反应物或产物易分离;(2)生物酶可反复使用。尽管曾经有少数学者在这一领域进行了探索,但直到 60 年代末期,人们才真正意识到固定化酶的巨大潜力。一些用纯化学方法难以实现的合成借助固定化酶的催化作用得到了解决;在资源综合利用、节能、环境保护、食品、医用等方面,都显示出引人注目的前景。近年来,有关固定化酶的研究报告已有大量报道^[1~3],有关综述和专著也很多^[4~6]。本文主要是介绍固定化酶原理及其主要应用近些年的发展动向。

1 固定化酶的方法

大分子生物酶的固定化就是要限制酶的流动性,从原理上讲有四种固定化方法。(1)酶固定于载体之前,先使酶活化。但是这种方法要用高活性的化学试剂与酶反应,可能会改变催化活性位

刁颖辉 女, 24 岁, 硕士生, 现从事生物化学与环境化学的研究。*联系人 E-mail:fusy@mail.gic.ac.cn

广东省自然科学基金资助项目(2KM064035, 990745)

2001-08-03 收稿, 2001-11-07 修回

的结构,引起酶失活。而且有可能发生酶分子间或分子内的交联;(2)先将载体活化,再将生物酶固定于载体上,这是一种最常用的方法;(3)直接将载体与酶进行交联,通过一个双官能团或多官能团试剂连接载体与酶,并调节它们之间的作用。这种方法也会引起酶自身的交联;(4)DNA 重组技术使酶产生一种带有生物特异性的蛋白,再利用生物亲和力和力将酶吸附在载体上。

从这几种基本方法又发展出很多方法,总结如表 1。

表 1 固定化酶方法分类

载 体	酶	方法分类	文献
聚(甲基丙烯酸甲酯-丙烯酸)	α -淀粉酶	共价结合	[7]
氧化铝	蒜氨酸酶	共价结合	[8]
复合膜	脲酶	共价结合	[9]
氧化还原高聚物/氧化还原纳米结构薄膜	葡萄糖酶/乳酸酶	离子键结合	[10]
非孔性聚苯乙烯-聚苯乙烯磺酸钠	淀粉葡萄糖酶	吸附	[11]
介孔分子筛 MCM-41	青霉素酰化酶	吸附	[12]
纤维素	有机磷水解酶	亲和吸附	[13]
无载体	脂肪酶	结晶交联	[14]
硅铝土	乳糖	共交联	[15]
壳聚糖	纤维素酶	共交联	[16]
聚氨酯水凝胶	L-赖氨酸	膜结构包埋	[17]
聚乙烯醇,海藻酸钠	漆酶	微球包埋	本组实验

近些年来,由于材料科学的发展,一些新型的载体材料和固定化方法产生了。溶胶-凝胶法固定化酶的研究很活跃。这种方法反应条件温和、载体多孔、表面积大,对固定化很有利。Ogura 等将原硅酸四乙酯酸解,形成的溶胶与脲酶混合,通过红外光谱检测到这种固定化酶的红外谱图就是硅溶胶-凝胶及脲酶谱图的叠加,没有影响酶的化学结构。这种固定化酶溶胶涂覆于电极形成薄膜,可检测尿素的含量^[18]。还可以将多孔的硅载体接上活性臂三甲氧基硅烷基丙醛,这种溶胶利用醛基来固定化糜蛋白酶,发现固定化酶在 40℃的半衰期大于 2300min,而游离酶在相同条件下只有 2.5min;对于有机溶剂的抵抗能力大大增强,如将固定化酶存放于无水甲醇中,2.5h 后还保留 35%的活性,而游离酶 1min 后就几乎全部失活^[19]。还有一些如憎水 SiO_2 、Au 纳米颗粒与聚乙烯醇缩丁醛构成的复合固膜基质^[20]、聚甘油硅酸酯^[21]通过溶胶-凝胶法包埋固定化酶,也取得了很好的效果。溶胶-凝胶法性能优越,但现在的研究仍是探索阶段,要达到最佳的固定化效果,还需要进一步深入的研究。除了研究较多的水溶胶外,一种由表面活性剂覆盖的微小气泡—气溶胶也可作为固定化材料。O'Connell 等制备的双-(2-乙基-己基)磺化琥珀酸钠气溶胶在 pH=4.0 时,因为 $\text{pH} > \text{pK}_a$,而使表面活性剂带负电;而脂肪酶的 $\text{pI}=4.6$,所以带正电,这种利用电荷吸引固定化酶是非常有前景的^[22]。

还有利用多酶系统^[23]、电化学聚合制成的新型高分子膜^[24]、高分子配位法^[25],也可以制得性能良好的固定化酶。这些新的材料和方法尽可能的避免酶结构的改变,最大限度的保留酶的活性,和传统的共价结合法比较,有很强的优越性。

对于大部分的固定化方法,都涉及到将酶连接到载体上的反应,这就需要酶具备可用于固定化的功能基团。

2 用于固定化酶的功能基团

2.1 天然存在的活性基团

酶是由大量的氨基酸链通过肽键组成的、具有多功能基团、多电荷的三维结构大分子,可用于固定化酶的功能基团主要是氨基酸侧链和与酶相连接的碳水化合物结构。一些研究表明:只有几种氨基酸侧链是具有活性的。在 20 种蛋白氨基酸中,疏水性的烷基侧链在任何情况下都不具备化学活性;苏氨酸和丝氨酸中的脂肪羟基结构与水的结构相似,在与大量水共存时,就不会表现出高活性。只有九种氨基酸侧链是有活性的,分别是精氨酸的胍基、谷氨酸和天冬氨酸的 γ -和 β -羟基、半胱氨酸的巯基、组氨酸的咪唑基、赖氨酸的 ϵ -氨基酸、甲硫氨酸的硫醚结构、色氨酸中的吲哚基以及酪氨酸的酚羟基。

酶修饰反应主要是亲核反应,特别是 S_N2 型的反应。按照亲核能力的强弱,半胱氨酸的巯基是最强的亲核基团。尽管氨基中氮的亲核能力不是很强,但它在蛋白质中含量丰富,所以氮在酶化学修饰反应中占的比例是最大的。而一些巯基反应的产物往往不够稳定。

许多分泌产生的酶都附着有碳水化合物,碳水化合物如果含有 $C=C$ 结构,就可以用一些氧化剂将 $C=C$ 氧化成醛,再与载体上的亲核基团反应(主要是一级氨基),形成席夫碱。

2.2 合成功能基团

通过适当的化学修饰也可以在酶分子上引入活性基团。将碳酸转变成胺,使亲核性增强,并且可以改变其表面的电场。比较常用的活化试剂有碳二亚胺^[26]。但这种方法直接改变酶脂肪酸结构,往往会导致酶的失活,所以这种化学修饰试剂的用量很重要,不能太多,否则会影响到酶的活性位。

近年来,研究工作者改变了思路,将载体活化,更有利于固定化。Aksoy 等将载体上的羧基用碳二亚胺活化,使载体形成活性酯基,这种活性酯基再和酶的氨基反应,有很好的固定化效果^[7]。

在酶上引入乙烯基也是一种很好的固定化方法。用含有酰基或烷基的烯烃利用亲核反应将酶酰基化或烷基化,这种含有乙烯基单体的酶再用丙烯酸胺聚合成弹性不规则形状的材料,这种共聚过程产生较稳定的工业催化剂,可用于需强烈搅拌的反应装置中。

酶经固定化后,其反应性能与游离酶的区别主要是传质作用的影响。

3 传质作用对固定化酶的影响

酶的固定化就是把酶限制在一个特定的区域内,酶经固定化后,它的催化活性往往会降低,使一些酶反应速度减慢。有很多因素都会影响固定化酶的催化活性,这些因素统称为传质作用,主要有扩散作用,分配作用等。

3.1 孔隙扩散

固定化酶的催化反应不仅是一个化学过程,还是一个底物在载体内部及外部扩散的过程,所有的固定化酶反应都要同时遵守酶的催化原理和传质定律。当聚合载体的孔径小于底物分子时,就会影响底物与酶的接触,反应就无法进行。

扩散效应会引起束缚酶的微环境和含自由酶的本体溶液中浓度的差异。在酶与载体形成的微环境中,底物与产物的浓度不断变化,进入固定化酶的底物的浓度逐渐减少,而产物的浓度增大。固定化酶与底物一旦混合,底物就要扩散到载体颗粒中,反应速度就决定于与酶直接接触到的底

物的浓度。当底物扩散到载体颗粒中酶所在位置的速度与酶的反应速度相等, 反应效率就比较高。但是底物从进入载体开始, 它的扩散速度并不是恒定的, 而是进入越深, 速度越慢。如果底物浓度较大, 这种速度的差别就不是很大。为了避免扩散效应的局限, 可以采取一些方法, 如增加搅拌速度排除外部扩散; 减小颗粒体积, 增加底物的浓度, 避免载体颗粒中心底物的空白; 增加缓冲溶液的浓度避免 pH 的移动。以下是一些实用的方法可提高固定化酶的效率: (1) 减小颗粒载体的尺寸。一般来说, 为了在大型酶反应器中的筛网上使用, 最低尺寸是 100 μm ; (2) 用高活性的酶代替低活性的酶, 减少酶的负载量。一些酶由于不纯, 和一些杂质和失活酶共存, 如果将这种酶固定在载体上, 是一种酶活的降低^[27]; (3) 尽量使酶固定于载体的表面, 酶固定于载体小球占半径 10% 的外壳上, 就可增加固定化效率^[28]。

3.2 质子的影响

酶经固定化后, 其最适 pH 往往会升高, 这可能有两种原因造成: (1) 载体表面负电荷会吸引一些正离子(如 H^+), 使得载体附近(酶附近)的 H^+ 浓度较本体溶液中大些; (2) 一些水解反应会产生 H^+ , 增加了体系的 H^+ 浓度。

第一种情况可以通过增加缓冲溶液的浓度(离子强度)来改善, 而后一种情况就更为严重些。很多水解酶如脂肪酶、酯酶、酰胺酶都属于这一类, 一般可采用以下对策: (1) 减少载体的密度与体积; (2) 增加缓冲溶液的浓度 ($>0.05\text{mol/L}$), 不能低于弱酸的 pK_a , 也不能低于酶的最适 pH; (3) 可固定一种消耗 H^+ 的酶, 如脲酶通过生成氨就可以中和 H^+ ^[29]。

4 固定化酶在应用方面的进展

固定化酶在很多领域都有所应用, 虽然真正投入工业化应用的不是很多, 但是研究工作者还是做出了不懈的努力, 而且取得了长足的进步, 下面就固定化酶的主要应用方向作一介绍。

4.1 固定化酶在生物传感器研究中的应用

生物传感器是利用生物物质作为识别元件, 将被测物的浓度与可测量的电信号关联起来。生物传感器中研究最多的是酶传感器, 而其基本方法仍是一种固定化技术。

Chen 等将高聚物聚乙二醇二缩水甘油醚、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸等作成薄膜, 将葡萄糖氧化酶(GO_x)固定在金电极上, 测定葡萄糖含量。在对麻醉后小鼠的皮下组织区域进行试验后, 发现这种传感器的稳定性很强, 而且动力学范围也有所增加, 但是其选择性有些下降。这是因为在电极的活性位上只能容纳较少的葡萄糖, 这就要求增加葡萄糖的转移区域来加以改进^[30]。通过烷基硫醇结构的自组装, 在金电极上形成一层薄膜, 利用硫碳酸的静电吸引, 可吸附 D-果糖脱氢酶, D-葡萄糖脱氢酶及 L-乳糖脱氢酶, 并研制出了一种果糖生物传感器^[31]。

随着人们对纳米粒子研究的深入, 用纳米材料制作成载体也被引入生物传感器的研制中。唐芳琼等^[20]用纳米憎水 SiO_2 颗粒、憎水 Au 颗粒、亲水 Au 颗粒以及 Au 和 SiO_2 混合与聚乙烯醇缩丁醛(PVB)构成复合固酶膜基质, 用溶胶-凝胶法固定葡萄糖氧化酶(GOD), 组成生物传感器。大大提高了固定化酶的催化活性, 响应电流从几十纳安增加到几千纳安。这种传感器利用纳米颗粒比表面积大, 表面自由能高, 更有效地固定化酶。憎水 SiO_2 颗粒是存在于反胶束中, GOD 水溶液很容易部分增溶到反胶团内部, 为酶吸附到纳米颗粒表面提供良好的反应场所, 增加了固定化酶的稳定性和活性; 亲水 Au 纳米颗粒则是利用 Au 的良好的导电性能, 减小了电子在给体和受

体间的距离; 憎水 Au 纳米颗粒就同时具备良好的导电性能和反胶团两种作用。

用电化学聚合高分子固定生物敏感元件也是一种近年来备受重视的新方法, 关于这方面的报道很多^[32,33]。颜流水等^[24]研制出一种电聚合吡咯固定化酪氨酸酶电极, 对甲基酚有良好的响应。因为吡咯电聚合要在酸性、中性溶液中进行, 而酪氨酸的等电点是 4.7, 在实验条件下(pH=6.6)带负电, 与电聚合过程中形成的阳离子自由基 PPy^+ 或 Py^+ 存在静电作用和氢键作用, 因此酶分子可嵌聚在吡咯链中。而且通过 SEM 观察, 酶分子在膜内有比较自由的微环境, 有利于维持高催化活性。

用 β -环糊精聚合物(β -CDP)与亚甲基蓝间的超分子作用及 β -CDP 与戊二醛间的缩聚作用, 将电子媒介体和辣根过氧化物酶共同固定在电极上。 β -CD 疏水性空腔与介体分子中疏水基团包结, 形成稳定的包合物。由于固定化作用基于超分子作用力, 使得介体的电化学性质不被改变。同时, β -CDP 的多孔性质为过氧化氢和质子的传递提供了有利的微环境^[34]。这是一种非常新的、罕见报道的固定化技术。

4.2 固定化酶在有机合成方面的应用

Yoon 等将尼龙 6 粉末悬浮在 CH_2Cl_2 和乙基氧四氟硼酸盐中, 先后与甲醇、聚 1, 2-亚乙基亚胺、戊二醛反应, 最后将 β -半乳糖苷酶固定在这种活性载体上, 他们利用这种固定化酶合成了 *N*-乙酰基乳糖胺。尽管这种固定化酶反应比自由酶的产率低, 但它可反复使用多次, 酶的活性在较长时间内也不会下降, 有很好的应用前景^[35]。脱乙酰酶可以固定在 DEAE-纤维素树脂上, 用乙烯乙酸酯(盐)作为酰基给体, 催化 10-脱乙酰浆果赤霉素生成浆果赤霉素的反应, 不需要在保护 7 位的羟基, 产率达 51%^[36]。应国清等以纸纤维为载体, 对 β -硫酸酯乙磺基苯胺为活化剂, 以共价偶联法固定化胰蛋白酶, 可去除鸡冠浸提液中的结合蛋白, 制备高纯度的玻璃酸^[37]。刘立建等用多孔硅球固定化胰凝乳蛋白酶, 拆分 DL-苯丙氨酸甲酯得 L-苯丙氨酸, 拆分收率 92.3 %, 光学纯度 96.2%^[38]。生物酶由于其反应的专一性, 能高效地实现一些化学方法难以完成的反应, 尤其是一些酶对生物大分子结构有特异的转化效果, 可被应用在生物医学方面; 酶通过固定化实现了与反应物的分离, 使这种应用更具有实用价值。

4.3 固定化酶在环保方面的应用

固定化酶一个很大的用途是处理一些废物中的有毒有害物质, 洁净环境, 其中漆酶的固定化应用较广泛。酚类化合物是废水中一类含量很高的污染源, 漆酶可以催化氧化酚类化合物而且不用加入过氧化物酶^[39]。将漆酶先吸附, 再用戊二醛共价结合在壳聚糖载体上, 可以有效地去除废水中的酚类化合物^[40]。Eupergit[®]C 是一种环氧活化的聚丙烯酸载体, 它被广泛用于酶的固定化。*Lentinula edodes* 分泌的漆酶固定于 Eupergit[®]C 上, 酶对温度和 pH 的稳定性提高, 对微生物蛋白酶的抵抗能力也大大提高(经过 24h, 在同样的链霉菌蛋白酶存在下, 固定化酶保持 38% 的活性, 而自由酶只保留了 6% 的活性)。用这种固定化酶可去除废水中大部分的酚类化合物, 可用于厌氧消化处理废水的预步骤^[41]。Oh 等将羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)活化, 产生活性酯基, 然后与酶形成共价键, 利用蛋白酶在不同的 pH 条件下溶解度的不同来制备固定化酶。这种固定化酶可用于废虾、蟹壳上蛋白质的去除^[42]。

- [1] Fernandez-Lafuente R, Guisan J M, Ali S et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 26:568~573.
- [2] Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R et al. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2000, 26:509~515.
- [3] Lamb S B, Stuckey D C. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2000, 26: 574~581.
- [4] Tischer W, Kasche V. Immobilized enzymes: crystals or carriers. *Trends in Biotechnology*, 1999, 17:326~335.
- [5] 卓仁禧, 罗毅, 陶国良. 离子交换与吸附, 1994,5:447~451.
- [6] Svec F, Frechet J M. *Science*, 1996, 273(5272):205~211.
- [7] Aksoy S, Turturk H, Hasirci N. *J. Biotechnol.*, 1998, 60:37~46.
- [8] Milka P, Krest I, Keusgen M. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 69(3):344~348.
- [9] Chen J P, Chiu S H. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2000, 26:359~367.
- [10] Sirkar K, Revzin A, Pishko M V. *Anal. Chem.*, 2000, 72:2930~2936
- [11] Oh J T, Kim J H. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2000, 27:356~361.
- [12] 李晓芬, 何静, 马润宇等. *化学学报*, 2000, 58(2):167~171.
- [13] Richins R D, Mulchandani A, Chen W. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 69(6):591~596.
- [14] Khalaf N, Govardhan C P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 5494~5495.
- [15] Ladero M, Santos A, Garcia-Ochoa F. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2000, 27:583~592.
- [16] 陈盛, 黄智跃, 刘艳如. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(3):250~253.
- [17] Olschowski H, Erlenkötter A, Zaborosch C et al. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2000, 26:537~543.
- [18] Ogura K, Nakaoka K, Nakayama M et al. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 384:219~225.
- [19] Wang P, Dai S, Waezsada S D et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 74(3):249~255.
- [20] 唐芳琼, 孟宪伟, 陈东等. *中国科学(B辑)*, 2000, 30(2):119~124.
- [21] Gill I, Ballesteros A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120:8587~8598.
- [22] O'Connell P J, Varley J. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 74(3):264~269.
- [23] Velde Fred van de, Lourenco N D, Bakker M et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 69(3):286~291.
- [24] 颜流水, 魏洽, 王乘宜等. *电化学*, 2000, 6(2):222~226.
- [25] 雷福厚. *林产化学与工业*, 2000, 20(2):23~26.
- [26] Kurzer F, Douraghi-Zadeh K. *Chem. Rev.*, 1967, 67:107.
- [27] Schmidtko J L, Wescott C R, Klivanov A M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118:3360~3365.
- [28] Horvath C, Engaser J M. *Ind Eng. Chem. Fundam.*, 1973, 12:229~235.
- [29] Liou J K, Rajora P. *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, 28:1582~1589.
- [30] Chen T, Friedman K A, Lei L et al. *Anal. Chem.*, 2000, 72:3757~3763.
- [31] Darder M, Casero E, Pariente F et al. *Anal. Chem.*, 2000, 72:3784~3792.
- [32] 穆绍林, 薛怀国. *化学学报*, 1995, 53:521~525.
- [33] 郑智敏, 吴辉煌, 周绍民. *物理化学学报*, 1991, 7(2):163~167.
- [34] 韩树波, 朱敏, 袁倬斌. *高等学校化学学报*, 1999, 20(7):1036~1039.
- [35] Yoon J H, Rhee J S. *Carbohydrate Research*, 2000, 327:377~383.
- [36] Patel R N, Banerjee A, Nanduri V. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2000, 27:371~375.
- [37] 应国清, 杨汉强. *中国医药工业杂志*, 1999, 30(4):243~246.
- [38] 刘立建, 杨平, 卓仁禧. *中国医药工业杂志*, 1997, 28(8):342~344.
- [39] Roy-Arcand L, Archibald F S. *Enzyme. Microb. Technol.*, 1991, 13:194~203.
- [40] D'Annibale A, Stazi S R, Vinciguerra V et al. *Process Biochemistry*, 1999, 34: 697~706.
- [41] D'Annibale A, Stazi S R, Vinciguerra V et al. *Journal of Biotechnology*, 2000, 77: 265~273.
- [42] Oh Y S, Shih I L, Tzeng Y M et al. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2000, 27:3~10.