

固定化酶的制备及应用

李彦锋^{1*}, 李军荣¹, 伏莲娣²

(1. 兰州大学化学化工学院, 兰州大学材料科学与工程研究所, 兰州 730000;

2. 甘肃省科学院自然能源研究所, 兰州 730000)

摘要:酶的固定化及其酶促反应是最具发展前景的生物技术前沿领域之一。固定化酶已经广泛应用于生物化学、生物技术与工程、生物医学工程、化学化工等方面, 将在人类社会可持续发展中发挥重要作用。本文综述了近期固定化酶制备及应用研究的进展。

关键词:酶; 固定化酶; 酶促反应; 生物技术; 生物工程

酶的固定化(Immobilization of enzymes)是用固体材料将酶束缚或限制于一定区域内, 仍能进行其特有的催化反应、并可回收及重复使用的一类技术^[1]。与游离酶相比, 固定化酶在保持其高效、专一及温和的酶催化反应特性的同时, 还呈现贮存稳定性高、分离回收容易、可多次重复使用、操作连续及可控、工艺简便等一系列优点^[2], 不仅在化学^[3~5]、生物学及生物工程^[6~8]、医学及生命科学^[9~12]等学科领域得到迅速发展, 而且因为具有节省资源与能源、减少或防治污染的生态环境效应而符合可持续发展的战略要求^[13]。

依据酶的性质及用途, 可通过包埋法、交联法、吸附法及共价结合法来实现酶的固定化^[1,2]。包埋法分为网格型和微囊型两类, 其制备工艺简便且条件较为温和、可获得较高的酶活力回收。交联法亦称架桥法, 游离酶的氨基酸残基与双官能团或多功能团交联剂反应而被固定化、可得酶蛋白单位浓度较高的固定化酶。吸附法包括物理吸附和离子结合法, 工艺简便及条件温和是其显著特点, 可供选择的载体涉及天然或合成的无机与有机高分子材料、有时酶的纯化与固定化尚可同时实现。共价结合法因酶分子与载体之间的共价结合而呈现良好的稳定性及重复使用性, 是目前研究最为活跃的一类酶固定化方法^[14]。诚然, 前述各种酶固定化方法亦有各自的不足, 如包埋法中高分子凝胶或半透膜的分子尺寸选择性不利于大分子底物与产物的扩散, 交联法与共价结合法因为较激烈的共价反应而使酶活力损失较大, 吸附法中由离子键、氢键、偶极键及疏水键固定的酶易受反应介质 pH、离子强度等的影响而从载体上脱落。这些不足限制了固定化酶的广泛应用, 成为急待解决的主要问题。因此, 开发简便、温和、适用的固定化方法, 设计合成性能优异且可控的载体, 以及应用工艺的优化研究等使固定化酶及其酶促反应研究至今方兴未艾, 仍是目前研究热点之一。

1 新型固定化技术的开发

运用当代高新技术、设计合成新型载体以及两者的有机结合是引人注目的研究动向。利用超

基金项目:兰州大学中青学术骨干基金资助项目(LD810718);

作者简介:李彦锋(1954—), 男, 甘肃省秦安县人, 现任兰州大学化学化工学院副教授、兰州大学材料科学与工程研究所副所长·理学博士·多年从事高分子学科的教学与科研, 研究方向为功能高分子和高分子材料, 内容涉及反应性高分子、生物医用高分子、耐高温高分子材料及农业节水微灌器材等;

* 通讯联系人。

声波使高分子主链均裂产生自由引发功能性单体聚合成嵌段共聚物载体固定化酶的结果表明^[15], 借助现代技术可使一般性聚合物经功能化改性成为新的酶固定化载体。磁性体 Fe_3O_4 与聚苯乙烯、含醛基聚合物一起溶解混合后再除去溶剂时可获得磁性载体, 其固定化葡萄糖氧化酶在适宜条件下的酶活力回收可高达 70%^[8], 磁性载体固定化酶由于 Fe_3O_4 的磁响应性而能借助外部磁场简便地回收, 已引起人们的极大研究兴趣^[16~18]。导电聚合物作为酶固定化载体时特别有利于酶电极类生物传感器的制备^[11, 19~21], 这里研究较多的是葡萄糖氧化酶、应用最广泛的是聚吡咯^[22]、应用目标主要是生物医学检测^[11]。 γ 射线引发丙烯醛与聚乙烯膜接枝聚合后, 活性醛基可共价固定化葡萄糖氧化酶并呈现良好结果^[23]; ^{60}Co 辐照冰冻态水溶性单体与酶的水溶液混合体时将使单体聚合与酶固定化同步完成, 其回到常温时因冰融化而形成的多孔结构非常有利于底物与产物的扩散、并可提高酶活性^[24]。等离子体活化处理聚丙烯膜接枝丙烯酸后可用于固定化胰蛋白酶^[25], 而等离子体引发丙烯酰胺聚合包埋固定化的葡萄糖氧化酶用于麦芽糖的酶促转化时, 运转 20 天也未发现酶活性损失现象^[26]、显示出优良的操作稳定性。光敏性单体聚合包埋固定化酶^[27]或带光敏性基团的载体共价固定化酶时^[28], 由于条件温和可获得酶活力较高、稳定性良好的固定化酶。*N*-异丙基丙烯酰胺与丙烯酰胺及其衍生物共聚可得到温敏性水凝胶载体, 其固定化嗜热菌蛋白酶时可实现均相催化与异相分离的统一^[29], 温敏载体的较低临界液相温度(LCST)可通过改变 *N*-取代丙烯酰胺的结构予以调整^[30]。温敏载体是环境敏感性载体的一种, 类似地酸敏性载体固定化酶时亦可达到良好效果^[31], 这是一类设计新颖、应用独特的新型固定化技术。此外, Parthasarathy 等^[32]应用模板聚合合法制备了一种阵列式聚吡咯微囊固定化酶, 具有酶活力高、稳定性良好的特点, 可做生物传感器和生物反应器而在水及有机介质中应用, 其研究思路颇具启发性。

2 传统固定化技术的改进

保持各种传统固定化方法的优点并改进其不足一直是固定化酶研究的重要内容。将酶吸附于离子交换树脂上后再用多功能基化合物交联时可提高固定化胰蛋白酶的活性及稳定性^[33], $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或水溶性聚乙二醇存在时会大幅度提高疏水性载体对酶的吸附率^[34], 在底物反应液中加入维生素 C 时可提高固定化葡萄糖氧化酶的使用性能^[35], 调节 pH 值则能使酶固定化及固定化酶处于一个最佳微环境中^[36], 戊二醛类双官能团偶联剂的一端保护后活化载体、再脱保护并固定化酶时可大幅度提高酶活力回收^[37], 这些结果表明通过改进传统固定化方法而改善固定化酶性能是可行的。载体结构与性能研究是传统固定化技术改进的重要方面。考虑到生物大分子酶及某些大分子底物与产物的传质和扩散的需要, 李彦峰等^[38]采用线型聚合物致孔法合成了球状特大孔丙烯腈-醋酸乙烯酯共聚物(MR-AV 树脂)、再转化为聚丙烯脒胺-聚乙烯醇载体固定化嗜热菌蛋白酶时, 结果表明固定化酶活性随载体孔径的增大而提高; MR-AV 树脂与含水乙二胺反应生成聚 *N*-氨基乙丙烯酰胺-聚乙烯醇载体时亲水性进一步增强, 其固定化前列腺素合成酶^[39]及木瓜蛋白酶^[40]时皆可获得良好结果。增加载体活性侧基的空间悬臂(Spacer)的长度有利于减少空间阻碍而提高载酶量及固定化酶活性^[41], 如用不同链长的二元胺活化聚丙烯酸甲酯^[42]及聚氯乙稀^[43]大孔球状载体时, 固定化酶的活力则随活化侧基的链长增加而提高。膜载体具有组装连续运转生物反应器的优势^[23, 25, 44], 如 β -半乳糖苷酶被聚甲基丙烯酸羟乙酯膜固定化后, 可高效催化乳糖水解、且连续运行 30h 的酶量损失 < 10%, 显示出良好的操作稳定性^[45]。琼脂糖制成珠状并固定化胰蛋白酶、糜蛋白酶后可高产率地从牛肺提取液中制备高比活力抑肽酶^[46], 甲基苯磺酰活化的粉状琼脂

糖及玉米蕊载体固定化脂肪酶时其酶促活性及稳定性得到显著改善^[47],废蚕丝经功能化处理后固定化脂肪酶的活力回收 $>52\%$ 、操作半衰期达到 250h ^[48],球形交联状壳聚糖固定化 α -淀粉酶的比活力达 820U/g 、具有良好的稳定性^[49]。Tiller等^[50]用对苯二胺活化甲基苯磺酸纤维素酯制备的超分子结构载体在固定化葡萄糖氧化酶、过氧化物酶及乳酸酯氧化酶时,固定化酶的比活力可高达 660U/g 、且具有良好的稳定性及分析应答性。天然载体既具有适宜的生物相容性及亲水性,又多为可再生资源,故应予以足够重视。

3 应用研究得到进一步发展

以应用为着眼点并在应用中不断完善及发展是固定化酶研究的鲜明特色。琼脂糖固定化牛胰核糖核酸酶能很好地催化合成重要的寡核苷酸^[51],壳聚糖固定化胰蛋白酶制备具有多种药用价值的高比活抑肽酶已显示出工业化应用前景^[52],纤维素固定化胰蛋白酶的活力回收达 57.5% 、酶解半衰期达 480h 且能制备出符合质量标准的医用玻璃酸^[53]。前列腺素衍生物是20世纪重要的药物发现之一,用大孔聚 N -氨乙基丙烯酰胺固定化前列腺素合成酶并酶促合成前列腺素衍生物 E_1 时,固定化酶显示出良好的贮存稳定性及活性^[39]。水解蛋白酶固定化后亦可用于肽及有机化合物的酶促合成^[54],如硅藻土固定化木瓜蛋白酶可在乙酸乙酯介质中催化合成 Leu -脑啡肽前体 Boc-Phe-Leu-OMe 、产率高达 90% 以上^[55];固定化嗜热菌蛋白酶可高产率及专一性催化合成高甜度低热量的二肽甜味剂 Aspartame 的前体 $Z\text{-}L\text{-Asp-L-Phe-OMe}$ 、并可同时实现天冬甜精的生物合成与 DL -苯丙氨酸甲酯的光学拆分^[38,56]。微囊固定化过氧化氢酶具有良好的酶活性及稳定性,将在临床检测及卫生防疫方面具有广泛用途^[57]。药用酶可通过固定化提高稳定性及缓释性、并可除去免疫原性^[58],甚至葡聚糖磁性毫微粒固定化 L -天冬酰胺酶具有通过血液注射治疗急性淋巴白血病的医用前景^[17]。这些研究将为现代医学的发展提供强有力支持。酶固定化技术的发展使生物传感器应运而生^[11,12],如利用活蚕液状丝素蛋白的变性作用制备的葡萄糖氧化酶传感器具有酶活性损失小、稳定性高、响应速率快及使用寿命长等优点^[59],葡萄糖氧化酶被固定化在纳米微带金电极上可得能用于活体检测的微型生物传感器^[60];聚吡咯固定化脲酶传感器在脲浓度为 $(5.0\times 10^{-5}\sim 1.0\times 10^{-2})\text{mol}$ 范围内具有良好的电化学响应性^[61]。自动化及连续化快速检测是生物传感器的临床检测特点,但酶电极的制备较复杂且需专用仪器配套方可。当用烷基胺玻璃珠固定化葡萄糖氧化酶测定血糖时,则可用普通分光光度计于 $\lambda 520\text{nm}$ 处方便测定,其回收率、直线性及精度等皆达到实用要求,且多次重复使用6个月以上仍有 80% 的保留活力^[12]。这些结果表明生物学及生物工程、医学及生命科学仍是固定化酶应用的重要场合。

固定化酶在化学及化工领域中的应用研究也是人们感兴趣的课题^[3,4],通过反相悬浮聚合制备的聚丙烯酰胺原位固定化碱性蛋白酶水凝胶球体可直接用于洗涤剂制备、且具有潜在的应用前景^[62]。脂肪酶既能催化天然油脂及酯类的水解,也能在有机介质中催化酯的合成、交换、氨解及肽合成而具有重要工业价值,故固定化脂肪酶的研究颇受重视^[42,47,48,63]。淀粉酶及糖化酶能催化淀粉转化为葡萄糖,是较早研究并仍在研究的固定化生物催化剂^[8,18,49], α -淀粉酶与糖化酶的共固定化实现了淀粉的液化与糖化两步反应的合二为一、淀粉一步水解为葡萄糖且操作半衰期可达 920h ^[64],而当 α -淀粉酶、糖化酶及葡萄糖异构酶共固定化时又可使淀粉转化果糖^[65],不仅如此,酶尚可与细胞等其它生物分子构成共固定系统^[66]。两种或多种有联系的酶共固定化构成更为复杂的生物转化系统,却又能将复杂的生物反应过程简单化,这是一种颇具新意的研究思路。其次,淀

粉及纤维素是地球上贮量丰富的可再生资源,通过固定化酶催化水解实现其高附加值转化符合社会经济可持续发展的时代要求^[13],如固定化蜗牛酶就对纤维素的降解具有良好的酶催化活性^[67]。随环境污染的日趋严重及其治理的日益迫切,固定化酶在环境科学领域将具有重要用途^[68],固定化胆碱酯酶对有机磷化合物具有较高的检测灵敏度,可用于食品、环境及军事侦察等领域中微量有机磷化合物的检测^[69],固定化多酚氧化酶对酚类化合物具有特异性催化功能,可用于废水中酚类物质的检测及除去、已引起环境科学界的高度重视^[70],这是一个值得注意的固定化酶应用领域。

4 结 束 语

综上所述,酶的固定化及应用研究已得到长足进展,开发新型固定化技术、改进传统固定化方法和注重天然高分子载体改性是酶固定化研究的主要趋势,生物学及生物工程、医学及生命科学仍是固定化酶应用的重要场合,适于化学化工及环境科学领域应用的固定化酶具有生态环境材料的鲜明特征、应给予足够重视。打破部门限制,减少低层次重复,建立基础研究、技术研究及应用研究三位一体的协作机制,将是众多固定化酶研究成果转化为高新技术产业的重要保证,这也是社会经济可持续发展的客观要求。

参 考 文 献:

- [1] Chibata I. Immobilized Enzymes, New York, London, Sydney, Toronto, John Wiley and Sons, 1978.
- [2] 陈陶声,居乃琥,陈石根. 固定化酶理论与应用. 北京:北京轻工业出版社,1987.
- [3] 李树本. 分子催化, 1987, 1(2):120.
- [4] Bislone Jr R G, Bilyk A, Feirheller S H. J Am Oil Chem Soc, 1991, 68(2):95.
- [5] 吴国琪,凌达仁,王忱,等. 离子交换与吸附, 1999, 15(1):71.
- [6] Shoemaker S G, Hoffman A S, Priest J H. Appl Biochem Biotechnol, 1987, 15:11.
- [7] Lozano P, Avellaneda A, Iborra T. Biocatal Biotransform, 1996, 13:255.
- [8] Bahar T, Celebi S S. J Appl Polym Sci, 1999, 72(1):69.
- [9] 邱蔚然,张小来,张涛铸. 生物化学与生物物理学报, 1990, 22(2):185.
- [10] Alvaro G, Fernandez-Lafuente R, Blanco R M, et al. Biochem Biotechnol, 1990, 26(2):181.
- [11] 马建标. 高等学校化学学报, 1997, 18(7):1127.
- [12] Kalia A, Goyal L, Pundir C S. 生物工程学报, 1998, 14(3):336.
- [13] 左铁镛. 兰州大学学报(自然科学版), 1996, 32(环境材料专辑):1.
- [14] Furusaki S. J Chem Eng Japan, 1988, 21(3):219.
- [15] Jiang B, Xiang M. Eur Polym J, 1992, 28(7):827.
- [16] Alves da Silva M, Burrows H P. Mater Lett, 1991, 11(3-4):96.
- [17] 徐慧显,李民勤,潘再群,等. 生物化学杂志, 1996, 12(6):744.
- [18] 邱广亮,栗淑媛,郝翠秀,等. 生物化学杂志, 1997, 13(2):240.
- [19] Umana M, Waller J. Anal Chem, 1986, 58:2979.
- [20] Teasdale P R, Wallace G G. Analyst, 1993, 118(4):329.
- [21] Contractor A Q, Sureshkuma T N, Narayanan R. Electrochim Acta, 1994, 39(8-9):1321.
- [22] 傅谊,马建标,何炳林. 功能高分子学报, 1997, 10(3):443.
- [23] Miller Ewa, Sugiev Henryk. Starch/Staerke, 1991, 43(6):238.
- [24] Kaetsu I, Kumakura M, Yoshida M. Biotechnol Bioeng, 1979, 21(5):847.
- [25] 朱如瑾,黄枫,刘永盛,等. 高分子材料科学与工程, 1994, 10(2):116.
- [26] Haraguchi T, Hatanaka D, Ide S, Nishimiyu K, et al. J Appl Polym Sci, Appl Polym Symp (Plasma Polym, Interact Polym Mater), 1990, 46:385.

- [27] Ichimura K. *J Polym Sci-Chem*, 1984, 22(11); 2817.
- [28] 朱天民, 白强, 袁中一. *生物化学与生物物理学报*, 1990, 22(4); 407.
- [29] Liu F, Zhuo R X. *Biotechnol Appl Biochem*, 1993, 18(1); 58.
- [30] Liu H Y, Zhu X X. *Polymer*, 1999, 40(24); 6985.
- [31] Dinnella C, Lonzarini G, Ercolessi P. *Process Biochem (Oxford)*, 1995, 30(2); 151.
- [32] Parthasarathy R V, Martin C R. *Nature*, 1994, 369(6478); 298.
- [33] Yamashi F, Kamata Y. *JP*, 90 200 183, 1990.
- [34] Hayashida M, Kise S. *JP*, 90 92 283, 1990.
- [35] 李丽霞, 俞耀庭, 鲁格. *生物工程学报*, 1987, 3(2); 207.
- [36] 孔维, 周慧, 刘惟, 等. *生物工程学报*, 1992, 8(2); 212.
- [37] Tao G L, Furusaki S. *Polymer J*, 1995, 27(2); 111.
- [38] 李彦锋, 陶国良, 卓仁禧. *分子催化*, 1992, 6(6); 440.
- [39] Li Y F, Mang Y F, Fu L D, et al. *Wuhan International Symposium on Biomaterials and Reactive Polymers (Preprints)*, Wuhan; Chinese Chem Soc, 1994, 214.
- [40] Li Y F, Li J R, Fu L D, et al. *Chinese J Polym Sci*, 2000, 18(1); 25.
- [41] Jayakumari V G, Pillai V N R. *J Appl Polym Sci*, 1991, 43(3); 583.
- [42] 谢志东, 暴奉维, 李民勤, 等. *离子交换与吸附*, 1995, 11(1); 24.
- [43] 陶国良, 李彦锋, 卓仁禧. *应用化学*, 1993, 10(2); 9.
- [44] Bhardwaj A, Lee J, Glauner K, et al. *J Memb Sci*, 1996, 119; 241.
- [45] Arica M Y, Baran T, Denizli A. *J Appl Polym Sci*, 1999, 72(10); 1367.
- [46] 徐浩大, 姚仁杰, 叶学海. *生物化学杂志*, 1992, 8(4); 418.
- [47] Arroyo M, Moreno J M, Sinisterra J V. *J Mol Catal*, 1993, 83(1-2); 261.
- [48] 曹国民, 黄杰, 高广达. *生物工程学报*, 1997, 13(1); 88.
- [49] 张所信, 王为国, 江龙法, 等. *现代化工*, 1997, 17(4); 29.
- [50] Tiller J, Berlin P, Klemm D. *Macromol Chem Phys*, 1999, 200(1); 1.
- [51] 姚曼华. *生物化学与生物物理学报*, 1984, 16(2); 193.
- [52] 宋杨, 赵辉, 侯司, 等. *中国生化药物杂志*, 1999, 20(4); 180.
- [53] 应国清, 杨汉强. *中国医药工业杂志*, 1999, 30(6); 243.
- [54] Sinisterra J V, Alcantara A R. *J Mol Catal*, 1993, 84(3); 327.
- [55] 王旭, 张学忠, 陈松明, 等. *生物化学杂志*, 1995, 11(5); 622.
- [56] 陶国良, 卓仁禧, 陈震华. *高等学校化学学报*, 1993, 14(4); 574.
- [57] 刘持标, 黄葵, 余益民, 等. *生物化学杂志*, 1997, 13(4); 478.
- [58] Torchilin V P. *Adv Drug Delivery Rev*, 1987, (1); 191.
- [59] 方跃, 邵正中, 邓家祺, 等. *科学通报*, 1991, (4); 327.
- [60] 蔡称心, 鞠煜先, 陈洪渊. *化学学报*, 1995, 53(3); 281.
- [61] 程发泉, 莫金垣, 戴晓云. *高分子学报*, 1999, (4); 417.
- [62] Kiatkamgornwong S, Siwarungson N, Nganbunsi N. *J Appl Polym Sci*, 1999, 73(11); 2273.
- [63] 徐慧显, 李民勤, 何炳林. *生物化学杂志*, 1996, 12(2); 201.
- [64] 郭桥, 罗贵民, 孙启安, 等. *生物化学杂志*, 1994, 10(3); 259.
- [65] 李春华, 唐晓松. *四川大学学报(自然科学版)*, 1990, 27(1); 73.
- [66] Mansfold J, Foerter M, Dautzenberg H, et al. *Biochem Eng*, 3, Int Symp, 3rd, 1995, 55.
- [67] 黄月文, 罗宣干, 卓仁禧. *功能高分子学报*, 1996, 9(4); 523.
- [68] Dodgson K S, White G F. *Topic Enzyme Ferment Biotechnol*, 1983, 7; 90.
- [69] 郭胜清, 曹树桂, 马林, 等. *生物化学杂志*, 1994, 10(4); 439.
- [70] 林健巧, 王炜军, 穆虹, 等. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(4); 663.

- [22] Wang Qihua, Xu Jinfen, Shen Weichang, et al. *Wear*, 1996, 196, 82~86.
- [23] Ovaert T C. *Tribology Transactions*, 1995, 38(1), 27~34.
- [24] Hanchi J, Eiss N S Jr. *Wear*, 1996, 200, 105~121.
- [25] 路新春, 李诗卓. *摩擦学学报*, 1993, 13(2), 97~104.
- [26] Yu Laigui, Bahadur S, Xue Qunji. *Wear*, 1998, 214, 54~63.
- [27] Zhao Q, Bahadur S. *Wear*, 1998, 217, 62~72.
- [28] 丛培红, 李同生, 等. *摩擦学学报*, 1997, 17(3), 220~226.
- [29] Fusaro R L. *ASLE Trans*, 1982, 25(4), 456~477.
- [30] Fusaro R L. *Lubrication Engineering*, 1980, 36(3), 143~153.
- [31] Fusaro R L. *Lubrication Engineering*, 1986, 42(11), 668~675.
- [32] Sliney H E. *Lubrication Engineering*, 1985, 41(10), 592~598.
- [33] Fusaro R L. *Tribology International*, 1990, 23(2), 105~122.

Development in Self-lubricating Composites of Heat-resisting Polymer

YAN Hong-xia, NING Rong-chang, MA Xiao-yan

(*Department of Chemistry Engineering, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China*)

Abstract: We review the recent development in self-lubricating composites of heat-resisting polymer such as PTFE, PEEK, PPS and PI in this paper. Some Suggestions for future study of these self-lubricating composites are proposed as well.

Key words: Heat-resisting polymer; Self-lubricating composites; Friction; Wear

(上接第 17 页)

Preparation and Application of Immobilized Enzymes

LI Yan-feng¹, LI Jun-rong¹, FU Lian-di²

(1. *College of Chemistry & Chemical Engineering, Institute of Materials Science & Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*; 2. *GNERI, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*)

Abstract: Enzyme immobilization was considered as one of very promising biotechnology, immobilized enzyme has been widely employed in the biochemistry, biotechnology, bioengineering, biomedical engineering and so on, it would play an important part in the sustainable development of human society. This paper would review the recent progress in the preparations and applications of immobilized enzymes.

Key words: Enzymes; Immobilized enzymes; Enzymatic reaction; Biotechnology; Bioengineering