

酶的固定化及其应用

李 晔

(北京科技大学 应用科学学院 化学系, 北京 100083)

关 键 词: 酶的固定化; 固定化酶的应用

中图分类号: O643.3 **文献标识码:** A

酶的固定化研究始于 1960 年代中期, 从 1970 年代初开始酶的固定化技术研究发展很快, 至 1980 年代初, 每年约发表 1 000 篇以上的文献和近 200 篇专利, 所报道的固定化方法达 100 种以上^[1]. 1980 年代中以后, 酶和细胞固定化研究的发展速度开始减慢, 从而有人认为, 对酶的固定化技术应予以重新评价, 理由是尽管已经做了大量研究工作, 但工业中实际应用的案例尚少^[2]. 经过近 20 年的研究, 真正能获得规模应用的固定化酶, 还仅局限于葡萄糖异构酶、葡萄糖氧化酶和青霉素酰化酶等为数不多的几个酶种. 尽管如此, 随着生物、信息和纳米技术的发展, 以及对环境保护意识的增强, 人们还在根据传统酶固定化技术存在的问题, 不断探索改进、完善和发展新的酶固定化方法^[3]. 作为生物、化学、材料、能源和环境等多学科的交叉点之一, 酶的固定化研究仍不失为一个活跃的研究领域.

酶是一类具有催化功能的蛋白质, 和化学催化剂相比具有反应速度快(约快 $10^6 \sim 12$ 倍), 化学、立体和分子部位选择性好, 反应条件温和, 底物专一性强, 可在水溶液和中性 pH 下操作等优点, 同时酶本身可以被微生物降解, 符合绿色化学的要求. 已在食品、医药、轻工和农业等许多领域得到广泛的应用^[4], 但和多相催化过程相比, 酶在能源和化工中的应用还存在如下问题.

(1) 酶一旦从细胞中分离出来, 其活性迅速下降, 并且在实际应用中对外界因素非常敏感, 容易因反应条件的变化和杂质的毒化作用而失活.

(2) 酶的分离和纯化手续繁杂, 大规模制备和

应用成本较高.

(3) 酶是溶于水的, 在水溶液中进行反应, 会导致酶和底物、产物从水中分离的困难, 不利于循环使用.

(4) 由于反应产物是酶的排泄物, 对酶催化反应有抑制作用, 限制了产物浓度的提高, 因此生产强度低.

酶的固定化技术就是为了克服上述缺点, 使酶催化反应能像化学催化剂一样在多相反应过程中稳定操作, 并易于回收和反复使用而发展起来的一项酶化学与酶工程技术.

1 酶的固定化方法

酶的固定化 (enzyme immobilization) 是指采用有机或无机固体材料作为载体 (carrier or support), 将酶包埋起来或束缚、限制于载体的表面和微孔中, 使其仍具有催化活性, 并可回收及重复使用的酶化学方法与技术^[5]. 不使用固体材料作为载体, 通过酶分子之间的相互交联形成聚集体, 也可将酶固定化, 称为无载体酶固定化. 1990 年代初报道的交联酶晶体 (cross-linked enzyme crystals, CLEC) 就属于无载体固定化酶^[6, 7]. 如果按照存在状态来进行分类, 酶大致可分为天然酶和化学修饰酶, 从生物体内直接分离的酶称为天然酶, 固定化酶应属于化学修饰酶. 在化学修饰酶中, 除固定化酶外, 还包括经过化学修饰的水溶性酶或应用分子生物学技术构建的基因重组酶等.

目前已报道的酶固定化方法超过百种以上, 归纳起来大致可以分为三种方法: 表面担载法、交联

法和包埋法。

1.1 表面担载法

表面担载法是通过物理或化学过程, 将酶担载到非水溶性载体上的方法^[8, 9]。它在固定化酶的制备中是使用最早的方法, 有关这方面的报道也最多。用这种方法制备固定化酶时, 必须按酶的种类和性质, 选择合适的载体和固载方法。因为所选用的载体种类和固载方法对酶的担载量和反应性能影响很大。载体的化学组成、表面形貌、颗粒度、孔径和孔结构、表面积、亲水性基团等是主要考虑因素。一般而言, 载体的亲水性基团越多, 表面积越大, 担载的酶量就越高, 所制得的固定化酶活性也就越高。因为酶是生物大分子, 通常首选纤维素、葡聚糖、琼脂糖、多糖类衍生物和聚丙烯酰胺凝胶等有机高分子载体, 也可根据酶的性质和固定化方法选择合适的无机载体, 如 Al_2O_3 、 SiO_2 、 TiO_2 、 ZrO_2 和分子筛等, 因为它们相对比较便宜, 机械强度高, 流体力学性质好, 使用中不容易溶胀(表 1-1)。根据结合形式不同, 担载法又可分为共价结合法、离子结合法及物理吸附法。

(1) 共价结合法: 共价结合法是指酶蛋白分子的功能团和载体表面上的反应基团之间以共价键相互连接, 形成固定化酶。常用载体包括天然高分子(纤维素、琼脂糖、淀粉、葡萄糖凝胶、胶原及衍生物等)、合成高聚物(尼龙、多聚氨基酸、乙烯-顺丁烯二酸酐共聚物等)和无机载体(多孔玻璃、金属氧化物等)。此法的优点是酶与载体间连接牢固, 即使用高底物浓度或离子强度的溶液进行反应, 也不会导致酶和载体分离。因此具有良好的稳定性及重复使用性, 成为目前研究最为活跃的一类酶固定化方法^[8b]。缺点是反应条件的控制, 要求比较苛刻。在反应剧烈, 操作复杂的条件下, 常常会引起酶蛋白高级结构发生变化, 并导致活性中心受到破坏, 从而难于保证制备的重复性, 不是每次都能获得高活力的固定化酶。

(2) 离子结合法: 此法是通过离子效应, 将酶固定到具有离子交换基团的非水溶性载体上。能用于离子结合法的载体, 除具有离子交换基团的多糖类以外, 聚电解质, 如离子交换树脂等合成高分子衍生物也可用作载体。离子结合法与前述的共价结合法比较, 操作更加简便, 处理条件比较温和, 而且酶的高级结构和活性中心的氨基酸很少发生变性, 因而可以得到较高活性的固定化酶。但这种方

法与共价结合等化学方法比较, 载体和酶的结合是依靠库仑相互作用, 因而不够牢固, 易受所使用的缓冲溶液限制和反应溶液 pH 值影响。在溶液离子强度较高的情况下, 由于去屏蔽效应, 会使酶从载体上脱落下来。

(3) 物理吸附法: 这种方法是将酶蛋白通过范德华力等弱相互作用, 吸附到不溶于水的载体表面上而使酶固定化。此法与前述的离子结合法比较, 酶蛋白的活性中心不易受破坏, 酶的高级结构变化也不明显, 从载体对酶的适应性来看, 这个方法是好的, 但其缺点是酶与载体的相互作用较弱, 因而被吸附的酶极易从载体表面上脱落下来。其载体除活性炭, 多孔玻璃, 酸性白土, 漂白土, 高岭土, 矾土, 硅胶, 膨润土, 氟基磷灰石、磷酸钙凝胶等无机载体外, 也可利用淀粉, 谷蛋白这类生物大分子。

1.2 交联法

交联法是采用双功能团试剂或多功能团试剂进行酶分子之间的交联, 使酶分子和双功能团试剂或多功能团试剂之间形成共价键, 得到三维的交联网状结构。除了酶分子之间发生交联外, 还存在一定的分子内交联, 根据使用条件和添加材料的不同, 可制备不同物理性质的固定化酶。常用交联剂有戊二醛、双重氮联苯胺-2, 2-二磺酸等。此法的优点是酶之间连接牢固, 具有良好的稳定性及重复使用性, 缺点是有时难以很好的控制反应条件, 反应剧烈时, 常常引起酶蛋白的高级结构发生变化, 并导致活性中心受到破坏, 从而难于保证每次都能制得高活力的样品。

1.3 包埋法

顾名思义, 包埋法是将酶包裹于凝胶形成的网络结构中, 或半透膜聚合物的超滤膜内使其固定化。包埋法可分为网络型和微囊型两种。前者是将酶包埋于高分子凝胶细微网络内; 而后者是将酶包埋在高分子半透膜中制备成微囊型。包埋法一般不需要与酶蛋白的氨基酸残基进行结合反应, 很少改变酶的空间构象, 酶活回收率较高, 因此可以应用于许多酶的固定化。但是包埋法制备的固定化酶, 只适合于小分子底物和产物的酶催化反应, 因为只有小分子反应底物或产物, 才可以通过高分子凝胶的网络进行扩散。此外, 由这种固定化方法产生的扩散阻力, 还会使固定化酶的动力学行为发生改变, 从而降低酶活力。

总之，酶可以通过各种不同的方法进行固定化，但不管是通过物理的弱相互作用，还是通过较强的化学键结合，都必须采用不溶于水的材料作为固定化载体。但是任何一种固定化方法或固定化载体，都不可能适用于所有的酶，要想获得较好的固定化效果，必须根据具体的酶和催化反应类型，选

择合适的固定化方法和载体。因此，和多相化学催化剂的制备一样，要想通过选择固定化方法和载体，制备出性能最佳的固定化酶，没有现成的规律可循，往往依赖于实际工作经验的积累，最后以是否能最大限度地保留酶活性和提高酶的稳定性为评价标准。下面的示意图(图 1)形象地描述了几种制

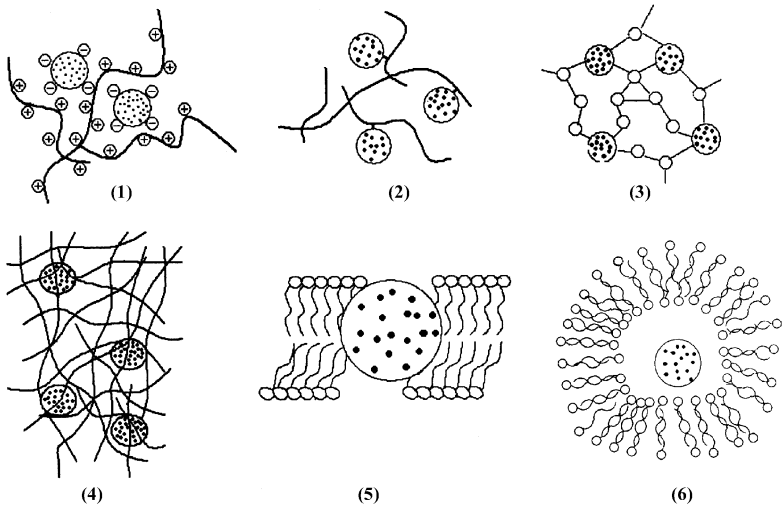


图 1 常见的酶固定化方法示意图^[10]

Fig. 1 common methods of enzyme immobilization^[10]

(1) Ionic adsorption (2) Covalent attachment (3) Crosslinking with reagent (4) Polymer entrapment
(5) Microencapsulating with lipid bilayer membranes (6) Liposome entrapment

备固定化酶的方法。

表 2.

各种载体和固定化方法的优缺点比较见表 1 和 目前一些新型固定化载体材料发展对于酶固定

表 1 常用固定化酶载体的特性比较^[11]

Table 1 Comparison of characteristics of some common support materials

Support material	Capability	Permeability	Stability	Activation ability	Cost
SiO ₂	+	+++	++	+	0
TiO ₂	+	+++	+++	+	0
ZrO ₂	+	+++	+++	+	0
Al ₂ O ₃	+	+++	+++	+	0
Polycarylamide	+++	+	++	++	++
Sephadex	+++	0	0	+++	+++
Agar	+++	0	0	+++	+++
Cellulose	++	+	+	++	++

+++ Excellent, ++ Very good, + Good, 0 Poor

化的研究也有重要的促进作用。例如聚电电解质自组装多层膜，二氧化硅介孔膜，磁性高分子纳米粒子等。聚电解质交替吸附是制备自组装多层膜的新方法^[11]。利用这一分子水平的加工技术，可将各种功能性酶引入预先设计的凝聚态物质中形成具有特定功能性的多层膜。通过改变离子强度和聚电解质浓度等，自组装多层膜的厚度和内部结构可以调

控。这些功能多层膜在新材料开发和生物传感器设计中有潜在的应用前景^[12]。介孔分子筛是一种孔径介于微孔和大孔之间，孔径在 2 ~ 50 nm 具有均匀孔道结构和狭窄孔径分布的二氧化硅材料。自 1992 年美国 Mobil 公司首次合成出了 M41S 系列介孔分子筛以来^[13]。其均一可调的孔径、高的比表面积和规整的孔道结构以及易于表面修饰等优点，使

表 2 各种固定化方法的比较

Table 2 Comparison of enzyme immobilization methods

Immobilization methods	Adsorption		Covalent attachment	Crosslinking	Entrapment
	Physical adsorption	Ionic adsorption			
Preparation	Easy	Easy	Difficult	Hard	Hard
Bonding	Weak	Moderate	Strong	Strong	Strong
Recycle ratio	High,	High	Low	Moderate	High
Regeneration	Possible	Possible	Impossible	Impossible	Impossible
Cost	Low	Low	High	Moderate	Low
Specificity on substrate	Unchanged	Unchanged	Changed	Changed	Unchanged

其在生物酶的固定化方面应用日益受到人们的重视. 例如: Diaz 等^[14]报道了用 MCM - 41 型介孔分子筛可以通过物理吸附作用固定化木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和过氧化物酶. 磁性高分子纳米粒子是由磁性粒子与有机高分子组合的一种纳米粒子. 磁性纳米材料除了具有纳米粒子一般的比表面积较大, 吸附能力强等优点外, 还具有磁性, 可方便进行分离和磁性导向^[15]. 例如: Huang 等^[16]利用共价偶联法置备了磁性颗粒固定化脂肪酶. 与游离酶相比, 该固定化脂肪酶的活性提高了 0.4 倍, 稳定性增加了 30 倍. 而且便于和底物分离.

总之, 对于不同的酶, 可以选择具体的固定化方法来提高酶的活性和稳定性. 但是一般来讲, 所有的固定化方法从分类上划分仍然可以归结为表面担载法、交联法和包埋法. 具体采用那种固定化方法还是要依据酶本身的性质^[17].

2 固定化酶的性质

2.1 固定化酶的催化活性

在水溶液中游离酶分子与底物同处于液相, 外部环境几乎相同, 而酶被固定化以后, 则处于载体的各向异性微环境中. 由于载体物理化学性质对酶与底物的作用和影响, 从而可能引起酶的性质发生变化. 和游离酶比较, 固定化酶性质的改变, 主要是由于酶处于载体的微环境中, 会引起活性中心的氨基酸残基, 高级结构和电荷状态等发生变化. 而载体对固定化酶性质的影响, 则主要表现在固定化酶周围, 会产生立体和扩散效应, 影响反应中酶和底物分子的接触. 根据大量的实验观察证明, 可归纳为空间效应、分隔效应和扩散效应: (1) 空间效应 载体的存在会对酶的活性部位或调节部位起掩蔽作用, 造成空间位阻, 影响酶的活性中心与底物的接触, 从而降低固定化酶的反应活性(图 2). 对于大分子底物, 空间效应的影响比较明显; 而小分

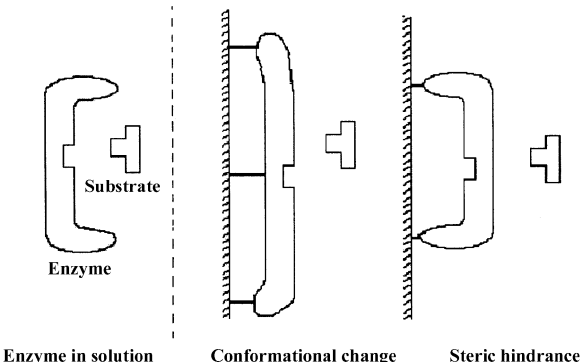


图 2 酶固定化后产生的构型变化和空间位阻^[18]

Fig. 2 Schematic illustration of conformational changes and steric hindrances^[18]

子底物, 由于容易克服载体造成的立体障碍, 与酶的活性中心进行反应, 空间效应则不明显, 对固定化酶活力的影响不大. 为了提高酶分子的空间自由度, 使固定化酶适应较大分子底物的催化反应, 可以加长载体与酶之间桥接的分子链长度, 但只有采用有机载体和共价键结合的固定化方法才能做到这一点. 在用包埋法进行酶的固定化时, 因为酶被高分子物质的半透膜所包围, 也会影响大分子底物与酶之间的相互作用, 对于小分子底物的影响则较小, 也应属于空间效应. (2) 分隔效应 在固定化酶催化反应过程中, 即使酶的分子不发生变形, 由于反应体系从均相转变为多相, 也会使固定化酶和反应液之间产生各种组分, 如氢离子、底物、产物、抑制剂、活化剂和辅酶等浓度梯度的变化. 这种变化对固定化酶活性的影响称为分隔效应. 分隔效应反映了固定化酶所处的微环境对其反应活性的影响, 早在 1970 年代初就有人对这种现象进行了理论分析^[19]. 当固定化酶载体表面带有负电荷时, 由于静电吸引作用, 靠近固定化酶表面的氢离子浓度会比溶液中高. 也就是说, 固定化酶所处微环境中的 pH 值要低于液相, 这样实测的反应最佳 pH 值

将向碱性区移动。反之，固定化酶载体表面若带有正电荷，则会对溶液中的氢离子产生排斥作用，使实测反应液的 pH 值偏低。带电固定化酶载体表面与周围溶液之间的 pH 差值可用下式表示：

$$\Delta \text{pH} = 0.43 \frac{e\psi}{kT}$$

(式 1-1).

式中 e 为电子电荷， ψ 为固定化酶的表面电势， k 为波尔兹曼常数， T 为绝对温度。实验证实，分隔效应引起的固定化酶反应最佳 pH 值的变化，最高可达 3 个单位。带电载体固定化酶与带电底物、抑制剂和其它组分之间的相互作用，也可以同样进行定性和定量的理论解释。固定化酶反应体系中组分浓度分布的不均匀性，除静电作用以外，还表现为亲水性和疏水性等其它形式。加强搅拌可以抑制分隔效应造成的不利影响。(3)扩散效应 酶的固定化使生物催化反应从均相转化为多相过程，这样就产生了反应底物从液相向固定化酶表面传递时产生的扩散阻力。多相化学催化反应过程中的经典传质理论，同样也适用于固定化酶催化反应过程^[20]。扩散阻力也可以分为外扩散和内扩散两种，外扩散是反应底物从溶液向固定化酶表面扩散时，穿过水相和固定化酶之间的边界层产生的，也称为液膜扩散阻力；内扩散是底物分子到达固定化酶表面后，向结合有酶分子的载体内孔扩散产生的阻力(图 3)。扩

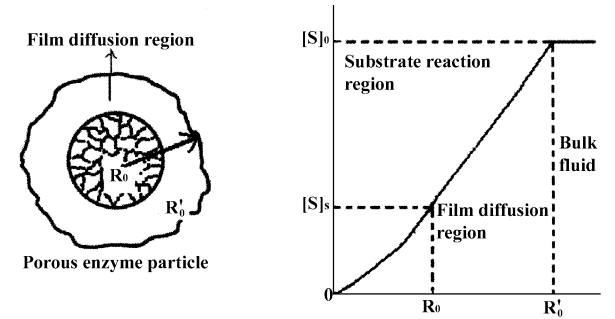


图 3 固定化酶反应体系中的传质过程^[12]

Fig. 3 Schematic representation of mass-transfer processes involved in immobilized enzyme systems^[12]

散效应可以通过适宜选择固定化载体的形状、减小粒子尺寸、提高底物浓度、强化搅拌或增加流速等加以改善或消除。

扩散效应在个别情况下也可以给酶催化反应带来好处，例如，在多酶共固定化的反应体系中，当反应为： $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow \cdots \rightarrow Z$ 时，如果中间产物在载体内部的扩散速度减慢，将有利于提高生成最

终产物 Z 的总包反应速度。

2.2 固定化酶的稳定性

稳定性是指固定化酶能否长期稳定操作和反复回收使用。由于不同催化反应体系的操作条件不尽相同，准确地测定和比较不同固定化酶的稳定性还有一定困难。目前还找不到酶的固定化方法与稳定性之间的一般规律，用来预测和评价固定化酶的稳定性。和多相化学催化剂一样，必须在最佳反应条件下，进行长时间的实验考察。从已有报道来看，大多数酶经固定化后，其稳定性都有所提高，这一点对固定化酶的工业应用非常有利。但也不是所有的酶固定化后，热稳定性都能提高，有的没有变化，有的则有所下降。从固定化方法看，凡采用物理吸附法制备的固定化酶，都有可能导致热稳定性降低，因此要提高酶的热稳定性，采用物理吸附法是不合适的。酶催化剂由于反应的活化能更低，比化学催化剂对热更敏感，温度越高反应速度就越快。但是酶是由蛋白质组成的，对热的耐受性很差，非常容易引起热失活，所以适应的温度范围很窄，一般不能在 65℃ 以上的温度下操作。将酶固定化后，其耐热性能将会得到改善，特别是采用交联法制备的固定化酶，热稳定性可以大大提高。其原因可能是固定化后，酶与载体之间形成了多点连接或酶分子间发生了交联，从而防止了酶分子的热伸展变形，同时也抑制了分子自降解反应(图 4)。固

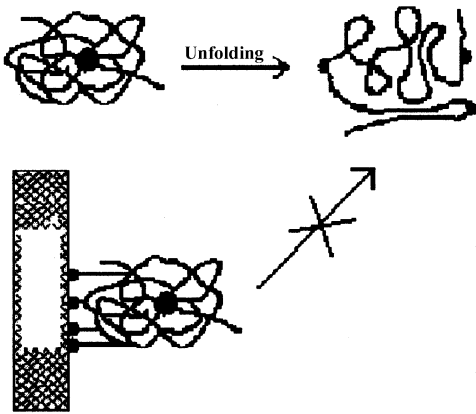


图 4 固定化酶的稳定性^[1]

Fig. 4 Schematic representation of thermal unfolding of an enzyme

定化酶的稳定性，除热稳定性以外，还应包括对各种有机试剂和酸碱的耐受性，以及长期储存的稳定性等。

2.3 最佳反应条件的变化

酶催化反应一般均在常温、常压、中性 pH 的水溶液中进行。固定化后，酶催化反应的最佳温度有时会发生变化，但在很多情况下也可能不发生变化。固定化酶最佳反应温度的变化，可能和反应活化能提高有关。在一般情况下，活化能高的催化反应，必须在较高反应温度下进行，才能得到比较好的转化率和选择性。酶催化反应的最适温度是由反应速度与酶的失活速度决定的。固定化酶的失活速度下降，最适温度也随之提高，这对固定化酶的应用非常有利。采用共价结合法制备的固定化酶，最适反应温度可比相应的游离酶提高 5 ~ 15℃。

酶是具有催化功能的蛋白质。固定化以后，酶在载体表面所处的微环境，对其催化功能影响很大。特别是载体的电性质，往往会通过前述的所谓“分隔效应”改变反应的最佳 pH 范围。所以在进行酶的固定化后，必须测定最佳反应 pH，以便进一步了解酶蛋白质的结构和作用机理，特别是蛋白质本身的电子状态和反应液 pH 范围的关系。最简单的方法是测定催化反应随 pH 变化的活性曲线。如果反应活性的最佳 pH 范围发生了变化，就说明固定化以后，受到了载体表面电荷的影响；多数情况下，最佳 pH 范围虽然有变化，但曲线的走势和形状未变，这种现象称之为最适 pH 曲线的“平行移动”。如果最适 pH 变化曲线向酸性一侧移动，就说明载体表面积聚了大量的阳离子，使酶蛋白的阳离子数增多，从而造成固定化酶微环境反应区的 pH 值比外部溶液偏碱。实际上酶催化反应是在比实测溶液 pH 偏碱的一侧进行的，从而造成最适 pH 范围移向酸性一侧的假象，反之亦反。这说明最适 pH 值的变化是由固定化载体的静电性质决定的，离子结合强度越高，分隔效应越明显，越接近固定化以前游离酶的最适 pH 值。但也有最适 pH 范围不变，而 pH-活性曲线却发生变化的例子。在某些情况下，pH 的变化是有一定的规律的，故当固定化酶本身的最适 pH 与其所处环境的 pH 不相同时，可以通过选择适当的固定化方法，根据需要调节酶反应的最适 pH，使酶活力得到最大发挥。

2.4 米氏动力学常数的变化

在定量地评价固定化酶活性时，需要测定反应的米氏动力学 (Michaelis-Menten kinetics equation) 常数 并和游离酶进行比较，从而确定固定化对酶催化反应速度的影响。一般情况下，参与酶促反应

的分子往往除酶和底物以外，还可能包括辅酶、抑制剂和活化剂等，但和酶结合进行反应主要是底物分子。因此，研究酶催化反应动力学，首先要从理论上阐明反应速度与底物浓度之间的关系。米氏动力学方程可以下式表示： $v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$ 。式中 v ：反应速度， $V_{\max}$ ——最大反应速度， $[S]$ ——底物浓度， K_m ——米氏常数。从米氏动力学方程可推导出米氏常数的一般含义， K_m 为 $v = 1/2 V_{\max}$ ，即反应速度等于最大速度 1/2 时的底物浓度^[21]。

酶固定于电中性载体后，表观米氏常数往往比游离酶的米氏常数高，而最大反应速度变小；而当底物与具有带相反电荷的载体结合后，表观米氏常数往往减小，这对固定化酶实际应用是有利的。此外，米氏动力学常数的变化还受溶液中离子强度的影响，但在高离子强度下，酶的动力学常数几乎不变。

此外，根据米氏动力学的直线表达式，用 $1/v$ 对 $1/S$ 作图，也可以定量描述酶固定化以后，扩散效应对米氏动力学常数的影响(图 5)。对于游离

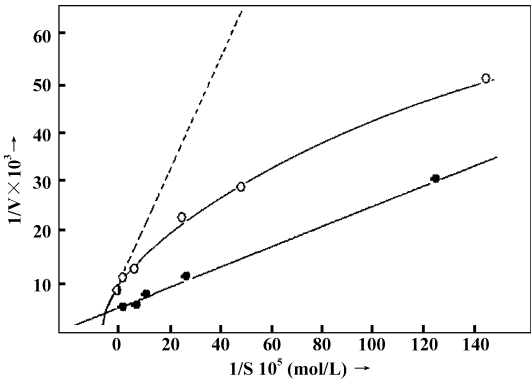


图 5 酶固定化对米氏动力学常数的影响^[22]

Fig. 5 Lineweaver-Burke plot for *B. subtilis* neutral protease with sodium caseinate as substrate

The curvature in plot for the immobilized enzyme indicates mass transfer effect

-○-○- : immobilized enzyme, $K_m = 3.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$,
-●-●- : free enzyme, $K_m = 6.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ^[22]

酶， $1/v$ 对 $1/S$ 作图为一直线， $K_m = 6.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ；而对于固定化酶，由于受传质的扩散效应影响，则变为一条曲线， $k_m = 3.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

2.5 酶的可贮存性

酶的可储存性对于酶的应用十分重要，酶在连续反应时的稳定性，是决定固定化酶能否在工业上

应用的重要因素之一。据报道,有些固定化酶,经过贮存,可以提高活性,有的则会使酶活性下降。有的酶可贮存数月,活性不降,有的酶短期储存,活性就很快下降。用无机载体制备的固定化酶,比用有机载体制备的贮存性能要好,而在无机载体固定化法中,又以偶氮基团连接的方法最好。但用有机载体制备固定化酶,其贮存性能也有相当稳定的。

2.6 蛋白质工程与基因重组

近年来,生物技术的迅速发展,对酶的生产 and 利用产生了重大影响。早期发展起来的化学修饰和固定化技术,已不能满足酶化学和酶工程发展的需求。蛋白质工程和基因重组技术,使人们在很大程度上摆脱了对天然酶的依赖,特别是当获取天然酶蛋白极其困难时,DNA 重组技术更显示出其独特的优越性。近十年来,基因工程的发展使得人们可以较容易地克隆各种各样的天然酶基因,使其在微生物中高效表达,并通过发酵进行大量生产。运用基因工程技术可以改善原有酶的各种性能,如提高酶的产量、增加酶的稳定性、根据需要改变酶反应的温度适应范围、提高酶在有机溶剂中的反应效率和稳定性、使酶在提取和应用过程中更容易操作等。运用基因工程技术,也可以将有害的、未经权威机构鉴定的微生物或生长缓慢的动植物酶基因,克隆到安全的、生长迅速的、产量很高的微生物体内,改由基因工程微生物来生产。运用基因工程技术还可以通过增加酶的基因拷贝数,来提高微生物的产酶数量。例如,通过基因工程手段,DNA 重组等,来改变酶蛋白的基本结构,强化酶在某方面的功能特性,这一方法已在酶制剂生产中成功应用。此外,人们还可以在分子水平上对酶的进行修饰,从而使酶的热稳定性,催化活性获得提高。根据蛋白质结构理论,有些蛋白质立体结构实际上是由一些结构元件组装起来的,而且它们的各种功能也与这些结构元件相对应。因此,如果想对这些蛋白质功能元件进行分解或重组来获得具有单一或复合功能的新蛋白质,就可以通过分子裁减的方法来实现。也就是对这些蛋白质功能元件的一级结构进行分解或重组,而无须从空间结构的角度上考虑。同样,对于一些功能和特性仅仅由蛋白质一级结构中某些氨基酸残基的化学特性所决定的酶,也可不经过以空间结构为基础的分子设计,直接改变或者消除这些侧链来改变它们的有关功能或特性。但是,

当这些残基的改变从空间结构上影响其它有关功能时,就必须对取代残基仔细选择或筛选。如枯草芽孢杆菌的蛋白酶,它具有氧化不稳定性,有一个容易被氧化的甲硫氨酸残基,位于活性中心 222 位。当被 19 种氨基酸替代后,大部分突变型酶的氧化稳定性都得到了明显的提高,但它们的活力都有不同程度的下降。因此,对这类蛋白酶的改造往往要经仔细的分子设计,才能实施。酶蛋白的另一种改造方法是对随机诱变的基因库进行定向的筛选和选择,使用这种方法的前提是必须有一个目的基因产物的高效检测筛选体系。如枯草杆菌蛋白酶是一种胞外碱性蛋白酶,在培养基中加入脱脂牛奶,就可通过观察培养皿中蛋白质水解圈的有无或大小来筛选蛋白酶基因阳性或表达强的菌落,然后选择所需的菌落,测定相应的 DNA 序列,找出突变位点。目前酶蛋白质工程主要集中在工业用酶的改造,因为工业用酶有较好的酶学和晶体学研究基础,酶的发酵技术(包括诱变技术和筛选方法)也比较成熟,而且其微生物的遗传工程发展较好,其次工业酶无须进行医学鉴定,能很快地投入使用。如用作洗衣粉添加酶的枯草杆菌蛋白酶,是一种天然的丝氨酸蛋白酶,它能够分解蛋白质,使衣服上的血迹和汗渍等很容易洗掉。但这种酶一般比较脆弱,在漂白剂的作用下容易被破坏而失去活性,原因是 222 位的甲硫氨酸容易被氧化成砜或亚砜。现在利用蛋白质工程技术,用丝氨酸或丙氨酸替代后,酶的抗氧化能力大大提高,可在 0.5mol/L 的过氧化氢溶液中停留 1 小时而活性丝毫未损,这样便可与漂白剂混合使用。可以预见生物工程技术和酶固定化技术可以相互补充,共同发展对酶在工业领域的应用必将起到更大的推动作用^[23]。

3 固定化酶的评价指标

游离酶被固定化以后,酶的催化性质也会发生变化。为考察它的性质,可以通过测定固定化酶的各种参数,来判断固定化方法的优劣及固定化酶的实用性,常见的评估指标有以下几项。

3.1 相对酶活力

具有相同量蛋白的固定化酶与游离酶活力的比值称为相对酶活力,它与载体结构、颗粒大小、底物分子质量大小及酶与载体的结合效率有关。

3.2 酶活力回收率

固定化酶的总活力与用于固定化的酶的总活力

之比称为酶的活力回收率. 将酶进行固定化时, 总有一部分酶没有与载体结合在一起, 测定酶的活力回收率可以确定固定化的效果. 一般情况下, 活力回收率应小于1; 若大于1, 可能是由于固定化活细胞增殖或某些抑制因素排除的结果.

3.3 固定化酶的半衰期

即固定化酶的活力下降为初始活力一半所经历的时间, 用 $t^{1/2}$ 表示, 它是衡量固定化酶操作稳定性的关键. 其测定方法与化工催化剂半衰期的测定方法相似, 可以通过长期实际操作, 也可以通过较短时间的操作来推算^[24].

4 固定化酶的应用

以应用为目的并在应用中不断完善和发展是酶固定化研究的鲜明特色. 目前已能制备多种高活性和高稳定性的固定化酶, 随着应用范围的不断扩大, 固定化酶已在常用的固体催化剂中占有重要地位. 对固定化酶反应机理及工艺与工程的研究, 已引起酶化学与工程以及催化反应与工程领域科技工作者的极大兴趣. 和传统多相催化过程相比, 在催化反应工艺中采用固定化酶, 可以使反应在常温常压下进行, 从而节省投资和能量消耗, 并使反应流程得到简化. 除大宗化学品的生产以外, 固定化酶已广泛应用于医药, 食品, 轻工等领域, 在精细有机合成、临床分析和微量有害物质检测方面的应用也在不断扩展. 和传统均相反应过程相比, 使用固定化酶, 不但有利于催化剂和产物的分离以及酶的循环使用, 而且可以使间歇过程变为连续反应, 易于实现自动化. 采用自动化、连续化生产, 不仅可以扩大生产能力、降低物耗, 还可以简化精制工艺, 对酶在化工过程中的应用十分有利. 正是由于这一点, 固定化酶在有机合成化学中的应用, 和均相多相催化反应过程一样, 正处在研究与过程开发的活跃阶段^[25].

4.1 食品工业

酶固定化在食品工业中的应用是早期发展起来的一个传统领域. 其中最著名的, 也是规模最大的过程, 就是采用固定化葡萄糖异构酶, 从葡萄糖生产高果糖浆. 其它还包括采用固定化乳糖酶去除牛乳中的乳糖、采用固定化脂肪酶通过转酯反应生产可可油替代品、采用固定化耐热蛋白酶制造甜味剂-天冬甜精, 以及应用固定化 L-天冬酶从富马酸铵生产天冬氨酸等^[26].

4.2 医学和临床分析

药用酶可通过固定化提高其稳定性及缓释性、并可除去免疫原性^[27]. 前列腺素衍生物是药物在20世纪的重要发现之一, 用大孔径 N-聚氨基丙烯酰胺为载体, 使前列腺素合成酶固定化, 合成前列腺素衍生物 E1, 显示出良好的活性及贮存稳定性^[28]. 微囊固定化过氧化氢酶具有良好的酶活性及稳定性, 在临床检测及卫生防疫方面具有广泛用途^[29]. 葡聚糖磁性纳米微粒固定化 L2 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^[30]. 固定化酶在临床分析中已得到应用, 如, SBA-4JD 型尿素氮葡萄糖分析仪的关键部件, 是由三种酶复合而成的固定化酶膜圈, 将它装配在过氧化氢电极上, 可以通过血液或尿液中尿素的变化, 检测运动后的疲劳程度. 萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase) 可以用来检测三磷酸腺苷 (ATP) 的含量. 三磷酸腺苷是所有生物能量的贮备形式, 也是细胞代谢活动的能量来源, 又是萤火虫荧光素酶催化的发光反应中不可替代的专一性底物. 如果保持萤火虫荧光素中氧和酶的数量恒定, 则荧光强度与 ATP 浓度呈正相关. 换言之, 借助荧光素发光反应中 ATP 和荧光强度之间精确的数量关系, 就能快速而准确地监测生物体因生理状态、疾病、细胞数量变动等原因导致的 ATP 含量变化. 因此, 发展基于萤火虫荧光素酶的生物传感器在医学等诸多领域有着现实的和潜在的应用前景^[31].

4.3 环境保护

固定化酶一个很大的用途是处理废水中一些有毒有害物质, 防止污染. 其中漆酶的固定化应用较为广泛, 酚类化合物是废水中一类常见的高含量污染物, 漆酶可以催化氧化酚类化合物, 而且不用加入过氧化物酶^[32]. 在废水处理中, 由于组分复杂而且经常变化, 利用单一的固定化酶, 很难收到好的处理效果. 因此, 要用多酶固定化体系组合处理, 才能使有机物完全矿化和保持无害稳定排放. 如德国有人将九种对硫磷农药降解具有活性的酶, 共价组合固定在多孔玻璃珠和硅胶上制成固定化酶, 填充到柱状反应器中, 处理含硫磷农药废水, 可获得95%以上的处理效果. 连续工作70天酶的活性没有变化. 说明多种酶的组合协同作用, 优于单一酶固定化的效果^[33]. 日本有人用固定化的淀粉酶处理淀粉废水和造纸废水. 美国科学家则报道了二氧化硅凝胶为载体的固定化酶传感器可以监测大气中

二氧化碳的含量变化^[34].

4.4 生物传感器

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的装置. 生物传感器中研究最多的是酶传感器^[10, 35~36], 其核心技术也是酶的固定化. Chen 等将高聚物聚乙二醇二缩水甘油醚、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸等做成薄膜, 用薄膜将葡萄糖氧化酶固定在金电极上, 通过检测电信号可以测定血液中的葡萄糖含量^[37]. 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, 可将 D-果糖脱氢酶、D-葡萄糖脱氢酶及 L-乳糖脱氢酶固定化, 研制成果糖生物传感器^[38]. 宋正华等将具有分子识别功能的 β -葡萄糖甙酶和发光胺, 分别固定在壳质胺和大孔阴离子交换树脂的填充柱中, 组成流动注射系统. 苦杏仁甙在 β -葡萄糖甙酶催化下分解生成的 CN^- 与溶解氧反应, 生成超氧阴离子自由基, 继而同发光胺反应产生化学发光. 因为发光强度与苦杏仁甙的含量在 $1 \sim 200 \mu\text{g}$ 之间呈现良好线性关系, 从而可以方便地确定苦杏仁甙的含量. 检出限度为 $0.3 \mu\text{g}$, 相对标准偏差为 3.1% , 并具有良好的选择性. 每次测定时间为 2 分钟, β -葡萄糖甙酶柱寿命为 6 个月, Luminol 柱可使用 200 次以上^[39].

随着人们对纳米粒子研究的深入, 将纳米材料作载体的固定化酶用于生物传感器的研制也有很多报道. 例如, 将葡萄糖氧化酶固定到纳米颗粒上能够增加酶的催化活性, 提高电极的响应电流. 首先是纳米颗粒可增强葡萄糖氧化酶在载体表面的固定化强度; 其次是对酶分子有取向作用, 使其功能有所改善; 第三, 由于金、铂纳米颗粒具有良好的导电性和宏观隧道效应, 可以作为固定化酶之间、固定化酶与电极之间有效的电子传递体, 从而使得葡萄糖氧化酶的氧化还原中心与铂电极间, 通过金属颗粒进行电子转移成为可能, 酶与电极间可以近似看作是一种由“导线”连接的通道. 这样就有效地提高了传感器的电流响应灵敏度^[40]. 又如唐芳琼等^[41]用纳米憎水 SiO_2 颗粒、憎水 Au、亲水 Au 颗粒等组成复合固酶膜基质, 用溶胶-凝胶法固定葡萄糖氧化酶制成生物传感器, 大大提高了固定化酶的催化活性. 并且可以使响应电流从几十纳安增加到几千纳安.

4.5 有机合成

Yoon 等报道了将尼龙 6 粉末悬浮在二氯甲烷

和乙氧基四氟硼酸盐中, 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, 但经过反复使用多次, 酶的活性在较长时间内也不会下降, 从而展示了很好的应用前景^[42]. 把脱乙酰酶固定在 DEAE-纤维素树脂上, 可以催化 10-脱乙酰果赤霉素生成聚果赤霉素. 优点是反应的专一性高, 从而不需要再保护反应物 7 位的羟基, 产率可以达 51% ^[43]. 应国清等以纸纤维为载体, 对-硫酸酯乙酰胺基苯胺为活化剂, 以共价偶联法制备的固定化胰蛋白酶, 可去除公鸡冠浸提液中的结合蛋白, 制备高纯度的玻璃酸^[44]. 刘立建等用多孔硅球固定化胰凝乳蛋白酶拆分 D, L-苯丙氨酸甲酯获得 L-苯丙氨酸, 拆分收率 92.3% , 光学纯度为 96.2% ^[45]. 可见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, 并且固定化的酶容易与反应物分离, 反应条件温和, 展示了广阔的应用前景.

5 结 语

综合分析固定化酶制备因素和性能的关系, 怎样才能成功地设计和制备出性能优异的固定化酶呢? 随着研究工作的不断深入和进展, 人们越来越多地把注意力集中在载体的选择, 酶与载体结合后所处微环境的变化, 特别是各种物理化学因素对反应的最适温度、最佳 pH 范围, 以及米氏动力学常数 K_m 的影响. 正是这些本质性因素的变化, 决定了固定化酶的活性、选择性和稳定性. 尽管设计和制备最佳固定化酶的方法仍然不得不更多地依赖于实践经验, 但根据酶和载体的结构因素以及目标反应的特点和要求, 深入研究酶与载体的结构、性质及其相互作用, 细心控制固定化酶制备中的各种物理化学因素, 不断总结规律仍是十分关键和必要的^[46~50].

近年来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是酶固定化研究的主要趋势. 生物技术, 特别是蛋白质工程和基因重组等分子生物学技术的发展和酶固定化技术可以相互补充, 必将对固定化酶在环境保护、食品工业、生物传感器、有机合成等领域的应用起到更大的推动作用^[51~54].

参考文献:

- [1] Rosevear A. *J. Chem. Technol. Biotechnol* [J], 1984, **34**: 127 ~ 134
- [2] Klivanov A M. *Science* [J], 1983, **219**: 722 ~ 725
- [3] 6F6g6in C. Stabilizing protein function [D]. Springer-Verlag, Berlin, 1997
- [4] 6F6g6in C. *Biochim. Biophys. Acta.* [J], 1995, **1** **252**: 1 ~ 14
- [5] Li Shunben (李树本), *J. Mol. Catal.* (分子催化) [J], 1987, **1**: 120 ~ 130
- [6] St Clair N L, Navia M A. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1992, **114**: 7 314 ~ 7 319
- [7] Tischer W, Kasche V. *Immobilized enzymes: crystals or carriers. Trends Biotech.* [J], 1999, **17**: 326 ~ 335
- [8] a. Chibata I. *Immobilized Enzymes* [D], New York, London, Sydney, Toronto: John Wiley and Sons, 1978
b. Liu Yong (刘 勇), Wumanjiang Aili (吾满江·艾力), Xamxi Kamar (夏木西卡玛尔), *et al. J. Mol. Catal.* (China) (分子催化) [J], 2006, **20** (3): 260 ~ 266
c. Chen Zhi-gang (陈志刚), Zong Min-hua (宗敏华), Lou Wen-yong (娄文勇), *et al. J. Mol. Catal.* (China) (分子催化) [J], 2007, **21** (1): 90 ~ 95
- [9] Kim J K, Park J K, Kim H K. Synthesis of silica support for biocatalyst immobilization. *Studies in Surface Science and Catalysis* [D], 2003, **146**: 513 ~ 516
- [10] Decher G. *Science* [J], 1997, **277**: 1 232 ~ 1 236
- [11] Narvaez A, Suarez G, Popescu I C, Katakis I Dominguez E. *Biosens. Bioelectron.* [J], 2000, **15**: 43 ~ 49
- [12] Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, *et al. Nature* [J], 1992, **359**: 710 ~ 712
- [13] Diaz J F, J r K J B. *J. Mol. Catal. B: Enzyme* [J], 1996, **2**: 115 ~ 126
- [14] Peniche H, Osorio A, Acosta N, *et al. J. Appl. Polym. Sci.* [J], 2005, **98**: 651 ~ 657
- [15] Huang S H, Liao M H, Chen D H. *Biotechnol Prog.* [J], 2003, **19**: 1 095 ~ 1 100
- [16] Mateo C, Palomo J M, Fernandez-Lorente G, *et al. Enzyme. Microb. Technol.* [J], 2007, **40**: 1 451 ~ 1 463
- [17] Carr P W, Bowers L D. *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry* [D]. Wiley New York, 1980
- [18] Berezin I V, Klivanov A H, Martinek K. *Russ. Chem. Rev.* [J], 1975, **44**: 17 ~ 22
- [19] Katchalski E, Silman I, Goldman R. *Adv Enzymol* [J], 1971, **34**: 445 ~ 450
- [20] Goldstein L. *Methods Enzyme* [J], 1976, **44**: 397 ~ 412
- [21] Fersht A. *Enzyme Structure and Mechanism* [D]. - 2nd ed. - San Francisco: Freeman W H and Company, 1985
- [22] Sharma B P, Pailey L F, Messing R A. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* [J], 1982, **21**: 837 ~ 842
- [23] Bencovic S. *J. Ann. Rev. Biochem.* [J], 1992, **6**: 29 ~ 54
- [24] Foster R L. *The Nature of Enzymology* [D], London: Croom Helm, 1980
- [25] Nord F F. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* [D], New York: John Wiley & Sons, 1977
- [26] Bergmeyer H U. *Methods of Enzymatic Analysis* [D], New York: Verlag Chemie, 1985
- [27] Torchilin V P. *Adv. Drug Delivery Rev.* [J], 1987, **1**: 191 ~ 199
- [28] Li Y F, Mang Y F, Fu L D, *et al.* Wuhan International Symposium on Biomaterials and Reactive Polymers [M], Chinese Chem Soc, Wuhan, 1994, 214
- [29] Liu Chi-biao (刘持标), Huang Kui (黄 葵), She Yi-Min (余益民), *et al. Chin. Biochem. J.* (生物化学杂志) [J], 1997, **13**: 110 ~ 114
- [30] Xu Hui-xian (徐慧显), Li Min-qing (李民勤), Pan Zai-qun (潘再群). *Chin. Biochem. J.* (生物化学杂志) [J], 1996, **12**: 744 ~ 746
- [31] Li Y, Yip W T. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 2005, **127**: 12 756 ~ 12 757
- [32] Arcand L R, Archibald F S. *Enzyme. Microb. Technol.* [J], 1991, **13**: 194 ~ 203
- [33] Jin W, Brennan J D. *Anal. Chim. Acta.* [J], 2002, **461**: 1 ~ 36
- [34] Bilitewski U, Turner A P F. *Biosensors in Environmental Monitoring* [M]. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000
- [35] Rogers K R, Mulchandani A, Zhou W. *Biosensor and Chemical Sensor Technology: Process Monitoring and Control* [M]. American Chemical Society, Washington DC, 1996
- [36] Ligler F S, Taitt C R. *Optical Biosensors Present and Future* [M]. Elsevier Science & Technology (Netherlands), 2002
- [37] Chen T, Friedman K A, Lei L. *Anal. Chem.* [J], 2000, **72**: 3 757 ~ 3 763
- [38] Darder M E, Pariente C F. *Anal. Chem.* [J], 2000, **72**: 3 784 ~ 3 790
- [39] Song Zhen-hua (宋正华), Zhang Zhu-jun (章竹君). *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学) [J], 2000, **28**: 964
- [40] Qian Jun-min (钱军民) Xi Xi-fen (奚西峰), Huang

- Hai-yan(黄海燕), Li Xu-xiang(李旭祥). *Petrochem. Technol. Appl.* (石化技术与应用) [J], 2002, **20**: 333 ~ 337
- [41] Tang Fang-qiong (唐芳琼), Meng Xian-wei(孟宪伟), Chen dong(陈 东). *Sci. China B.* (中国科学 B 辑) [J], 2000, **30**: 119 ~ 124
- [42] a. Yoon J H, Rhee J S. *Carbohydrate Res.* [J], 2000, **327**: 377 ~ 381
b. XU E Ping (薛 屏), LU Guan Zhong(卢冠忠), GUO Yun (郭 耘), GUO Yang Long (郭杨龙), WANG Yun Song (王筠松). *J. Mol. Catal.* (分子催化) [J], 2003, **17**: 371 ~ 375
c. Yan Xiang-hui(严祥辉), Xue Ping(薛 屏), Lu Guan-zhong(卢冠忠). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20**(5): 473 ~ 481
d. Xue Ping(薛 屏), Xu Li-dong(徐立冬). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20**(6): 579 ~ 584
- [43] Patel R N, Banerjee A, Nanduri V. *Enzyme. Microb. Technol.* [J], 2000, **27**: 371 ~ 378
- [44] Ying Guo-qing(应国清), Yang Han-qiang(杨汉强). *J. Chin. Pharma. Sci.* (中国医药工业杂志) [J], 1999, **30**: 5 ~ 8
- [45] Liu Li-jian(刘立建), Yang Ping(杨 平), Zhou Ren-xi(卓仁禧). *J. Chin. Pharma. Sci.* (中国医药工业杂志) [J], 1997, **28**: 6 ~ 8
- [46] Tanaka A, Tosa T, Kaboyashi T. *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts* [M]. Marcel Dekker, New York, 1993
- [47] Smith J E. *Biotechnology* [D], 3rd ed. Cambridge University, London, Press Wiseman A 1996
- [48] A Measurement of Protein in Food (食品中蛋白质的测定方法) [M]. GB/T 5009.5 2003
- [49] Katchalski K E. *Trends Biotechnol.* [J], 1993, **11**: 471 ~ 478
- [50] Jiang Xi-Rui(姜锡瑞). *Appl. Manual En Prepar* (酶制剂应用手册) [M] Beijing Light Industry Press (北京: 轻工出版社), 1999, 286 ~ 289
- [51] Tischer W, Kasche V. *Trends Biotechnol.* [J], 1999, **17**: 326 ~ 332
- [52] Wu Xiao-mei(吴小梅), Xing Jia-yin(辛嘉英), Zhang Yin-xing(张颖鑫), Zai Zhong-de (翟宗德), Xia Chun-gu(夏春谷). *J. Mol. Catal.* (分子催化) [J], 2004, **18**: 291 ~ 294
- [53] Xin Jia-ying(辛嘉英), Li Shu-ben(李树本), XU Yi (徐 毅), *et al.* *J. Mol. Catal.* (分子催化) [J], 1999, **13**: 23 ~ 28
- [54] Bai Zheng-wu(柏正武) Zhou Yi-kai(周宜开), Ren Shu(任 恕). *J. Mol. Catal.* (分子催化) [J], 1999, **13**: 63 ~ 66