

酶固定化研究进展

刘 茹^{1,2}, 焦成瑾^{1,2}, 杨玲娟^{2,3}, 赵菲佚^{1,2*}

(1. 天水师范学院生物工程与技术学院, 天水 741001; 2. 天水师范学院硫生物技术研究所, 天水 741001;
3. 天水师范学院化学工程与技术学院, 天水 741001)

摘 要: 由于酶催化的特异性、高效性和温和性, 酶的工业化利用一直是酶工程领域的研究热点。酶固定化是酶工程发展的必然趋势。固定化酶已在众多工业生产中发挥越来越重要的作用, 围绕酶固定的载体材料开发与固定技术研究进展很快。传统酶固定化主要包括吸附、包埋、结合或化学交联等技术, 然而固定化酶的稳定性、牢固性及催化效率等与工业实际应用仍具有很大差距。近年来, 随着纳米技术、高分子材料化学、表面化学、蛋白质结构分析及分子生物学等学科快速发展, 新型载体材料和固定化技术不断涌现。以纳米载体材料、纳米磁性材料、金属有机骨架复合材料为代表的新型固定载体以及以定向化学修饰研究为代表的固定化技术取得了显著进展。本文重点对酶固定的纳米载体、金属有机骨架材料以及定向修饰固定技术进行了简要综述, 同时对研究前景作了简要展望。

关键词: 酶固定化; 纳米载体; 金属有机骨架材料; 定向固定技术

Advances of enzyme immobilization

LIU Ru^{1,2}, JIAO Cheng-Jin^{1,2}, YANG Ling-Juan^{2,3}, ZHAO Fei-Yi^{1,2*}

(1. College of Biological Engineering and Technology, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China; 2. Institute of Sulfur Biotechnology, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China; 3. School of Chemical Engineering and Technology, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China)

ABSTRACT: Due to the specificity, high efficiency and mildness of enzyme catalysis, the industrial utilization of enzymes has always been a research hotspot in the field of enzyme engineering. Enzyme immobilization is an inevitable trend in the development of enzyme engineering. Immobilized enzymes have played an increasingly important role in many industrial productions. The great progressions have been made in the development of carrier materials and technologies for enzyme immobilization. Traditional technologies of enzyme immobilization mainly include such as adsorption, embedding, binding, and chemical cross-linking. However, the stability, firmness, and catalytic efficiency of immobilized enzymes still lag far behind industrial applications. In recent years, with the rapid development of disciplines such as nanotechnology, polymer material chemistry, surface chemistry, protein structure analysis, and molecular biology, the novel carrier materials and immobilization technologies have continued to emerge. Significant progress has been made in new types of immobilization carriers represented by nano-carrier materials, nano-magnetic materials, and metal-organic framework composite materials, as well as immobilization

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260568, 31660153)、天水师范学院 2019 年研究生创新引导项目(TYCX1906)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260568, 31660153) and the Tianshui Normal University 2019 Postgraduate Innovation Guidance Project (TYCX1906)

*通信作者: 赵菲佚, 博士, 教授, 主要研究方向为植物生物反应器。E-mail: tspaulzhao@tsnu.edu.cn

*Corresponding author: ZHAO Fei-Yi, Ph.D, Professor, School of Chemical Engineering and Technology, Tianshui Normal University, Shiyuan Road, Qinzhou District, Tianshui 741001, China. E-mail: tspaulzhao@tsnu.edu.cn

technologies represented by directional chemical modification research. This paper focused on a brief overview of enzyme-immobilized nanocarriers, metal-organic framework materials, as well as directional modification and immobilization technologies. Finally, a brief outlook on the research prospects was also presented.

KEY WORDS: enzyme immobilization; nanocarriers; metal organic framework materials; directional immobilization technology

0 引言

生物酶催化效率高、专一性强,通常在常温、常压等温和条件下发挥催化作用^[1]。然而离开细胞及其特定环境,其稳定性差,工业生产中酶也很难重复利用,因此固定化酶的研究作为重要的生物工程技术内容很快兴起。1916年 NELSON^[2]首次报道吸附在木炭上的转化酶很好地保持了它的催化活性,由此拉开酶固定化研究的序幕。

酶固定化技术指将游离酶束缚在一定空间或一不溶性载体上,进而限制游离酶自由流动,使其可长时间发挥催化作用并可回收利用的生物技术^[3]。酶固定后,与固定基团间相互作用可能会改变酶催化活性中心以外的空间结构,由此改善酶在强 pH、高温或有机溶剂中的稳定性,同时还可以从酶反应体系中分离目标产物。这样,固定化酶可通过简单的机械分离或离心被移除,从而不再需要使用复杂的透析等产物分析技术。酶固定化最大优势在于可产生一种新的酶系统,该系统可在连续催化反应循环中重复使用,降低生产成本^[4-7]。

由于固定化酶的一系列优势,现已广泛应用于医药、食品、能源、水处理、纺织等许多产业领域。迄今,在传统酶固定化技术如吸附法、包埋法、结合法和交联法等的基础上,伴随材料科学发展及各工程技术之间的交叉融合,近年来涌现出的一系列新型酶固定化载体和技术^[8-13]。本文重点对酶固定的纳米载体、金属有机骨架材料以及定向修饰固定技术进行了综述,以期对酶固定化技术的应用开发提供参考。

1 传统酶固定化方法

早期酶固定方法可分为物理法和化学法两大类。物理法主要包括吸附法和包埋法;化学法主要包括结合法和交联法。吸附法也称为非共价法,主要是通过氢键、范德华力、疏水作用力以及离子键等一些非共价键相互作用将酶与吸附介质结合在一起的固定方法,常用的无机吸附材料有硅胶、氧化铝、多孔玻璃、硅藻土等,有机材料主要包括天然的海藻酸盐、几丁质、壳聚糖、纤维素、淀粉,合成的有机材料有聚氨酯、大孔树脂等^[14]。包埋法是将游离酶包埋在特定凝胶等介质的孔隙中而固定,如用聚丙烯酰胺、海藻酸钙等凝胶介质进行的包埋。该方法简单,包埋的酶蛋白结构可基本保持不变,酶活力损失也比较少,但

存在一定的缺点,如酶组分的泄露和酶失活^[15]。如果调整包埋聚合物的浓度,可以大大减少酶的流失。本课题组最近用聚丙烯酰胺凝胶和海藻酸钙凝胶包埋 β -氨基丙氨酸合成酶均取得了不错的效果,2种包埋方法对酶的活性均影响不大,但酶的稳定性增加,常温下保存的时间显著延长。结合法即为共价固定化,是基于载体材料有效官能团与酶相关官能团(如氨基、羧基、巯基、羟基等酶蛋白侧链基团)间的反应而相互结合。共价固定化使酶和载体之间的结合更强,这种酶与载体间产生的强化学键可显著减少酶的散失,提高酶的重复利用率^[16]。如通过酶蛋白侧链的巯基与载体材料相应的巯基形成可逆的二硫键是常见的一类共价固定法。介质事先硫醇化引入活性巯基基团,然后再与目标酶侧链巯基二硫化进行固定,如用 2-吡啶基二硫化琼脂糖对 β -半乳糖苷酶的固定^[17]。交联法是指通过双功能或多功能试剂(交联试剂)在酶分子之间、酶分子与载体间进行交联反应,形成共价键进行酶固定的一类方法。常用的交联试剂有戊二醛、己二胺、顺丁烯二酸酐、双偶氮苯等^[18]。利用交联剂将酶交联而形成的无载体酶聚合物(cross-linked enzyme aggregates, CLEA)研究得相对比较充分,如苯丙氨酸氨裂合酶的 CLEA 化固定和蔗糖磷酸化酶 CLEA 化固定^[19]。

早期传统酶固定方法虽然有不少缺陷,如吸附固定的酶容易流失,包埋固定后酶的底物及产物不易扩散,共价结合法容易导致酶失活,而交联酶的机械性能比较差等。但传统的方法简单,成本低,对酶活力的影响相对较小。许多方法单独或与新型固定方法结合仍然在酶工业中广泛使用,如共价结合法,将酶共价结合在人工合成的各种无机或有机骨架材料上已越来越普遍^[20]。因此,传统方法是现代新型酶固定化技术的基础。

2 新型酶固定化技术

进入新世纪以来,材料科学的发展为酶固定化工业应用提供了前所未有的发展空间。石墨烯等一些碳基材料、磁性材料、膜材料、金属配合物骨架材料以及高分子聚合物材料的开发,以及与新型纳米技术、新型合成技术等结合诞生了丰富的酶固定化载体材料和酶固定技术^[21-22]。

目前,新型酶固定化技术的研究主要集中在 2 个方面。一是新型固定化材料的开发研究,如纳米材料、磁性材料、金属有机骨架材料等固定载体的开发与应用^[3,22]。

二是固定化新技术的开发及传统固定技术的改进, 如微波辐射辅助固定化技术、膜固定化技术等的应用^[21,23]。

2.1 新型酶固定化载体

新型酶固定化载体主要包括碳基纳米及石墨烯材料、新型无机材料、高分子聚合材料、杂合复合材料以及传统载体的改进材料等几大类(见下表 1)。其中纳米材料载体和金属有机物骨架材料载体的开发研究近年来一直是热点^[25]。

2.1.1 纳米载体

纳米载体是指由纳米级尺寸构成的各种无机及有机材料载体的统称, 主要以无机材料, 尤其是碳基材料为主, 粒径较小, 一般<100 nm。因此, 比表面积较大、表面结合力强, 易与酶形成稳定结构^[28]。根据其物理形态差异可分为纳米粒^[29]、纳米纤维^[30]和纳米膜^[31]等。常用于酶固定化的是纳米颗粒, 主要包括磁性纳米颗粒和非磁性

纳米颗粒^[32]。

磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs), 是一类利用磁力和磁场的改变来控制粒子运动轨迹的新型材料, 这一特性不仅便于游离酶与载体结合和分离, 同时也便于固定化酶的分离与回收^[33]。酶固定化中最常用的磁性载体材料是磁性高分子微球, 该微球是将磁性粒子和有机高分子相结合, 并在其表面连接多种活性基团, 如羟基(OH)、羧基(COOH)、醛基(CHO)和巯基(SH)等, 从而实现酶的固定化^[23]。XIE 等^[26]将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)固定在一聚乙二醇化磁性复合微球上。固定化 HRP 的负载量高达 139.82 mg/g。在稳定性、贮存能力和可重用性等方面都有良好的改善, 并可用于苯酚的降解。在最佳反应条件下, 相较于游离 HRP, 固定化 HRP 在 10 min 内对苯酚的降解率可达到 94.4%, 表明固定化 HRP 对苯酚的降解更具优势。

表 1 代表性新型酶固定化载体材料
Table 1 Representative new enzyme immobilized carrier materials

材料名称	固定化酶	参考文献
生物素-链霉亲和素	原核表达酶等	[12]
介孔氧化硅	碳酸酐酶、淀粉酶、丙氨酸消旋酶、纤维素酶等	[14,24]
纳米颗粒	溶菌酶、 α -胰凝乳蛋白酶等	[24]
聚合物包衣纳米颗粒	胰凝乳蛋白酶、脂肪酶、氯过氧化物酶	[24]
碳纳米管	α -半乳糖苷酶等	[13]
石墨烯纳米片	β -半乳糖苷酶、柚皮苷酶等	[13]
纳米纤维	辣根过氧化物酶、过氧化氢酶等	[21,26]
磁性纳米颗粒	内酰胺酶、脂肪酶、葡萄糖氧化酶、碳酸酐酶等	[24-25]
单壁碳纳米管	枯草杆菌蛋白酶、辣根过氧化物酶、蛋白酶 K 等	[24]
多壁碳纳米管	脂肪酶、水解酶、漆酶及多种氧化还原酶类等	[3,24]
金属有机骨架	乙酰胆碱酯酶、葡萄糖苷酶、漆酶、脂肪酶等	[22]
还原氧化石墨烯	辣根过氧化物酶等	[25]
聚醚砜膜	内酯酶等	[25]
聚乙烯醇纳米纤维	脂肪酶、磷酸三酯酶等	[25]
聚己内酯纳米纤维	过氧化氢酶等	[25]
聚苯胺-聚丙烯腈复合材料	葡萄糖氧化酶	[25]
壳聚糖-藻酸盐复合微珠	淀粉葡萄糖苷酶	[25]
氧化石墨烯-Fe ₃ O ₄ 复合材料	葡糖淀粉(糖化)酶	[25]
聚丙烯腈多壁碳纳米管	过氧化氢酶	[25]
CaCO ₃ -金纳米微粒	辣根过氧化物酶	[25]
壳聚糖纳米胶囊	脂肪酶、漆酶等	[3,27]
聚苯乙烯纳米微粒	漆酶、水解酶等	[3,27]

非磁性纳米颗粒是以天然或人工合成高分子制备的纳米级载体材料,常用的非磁性纳米载体有多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotube, MWCNT)^[27]、壳聚糖纳米胶囊、聚苯乙烯纳米微粒、聚苯烯纳米微粒等,其中, MWCNT 的应用最为广泛。MWCNT 在 1991 年被日本科学家首次制备,随着合成及修饰技术的发展,其应用也更加广泛,已用于对脂肪酶、水解酶、漆酶及多种氧化还原酶的固定化研究中^[3]。2018 年 AHMAD 等^[27]采用碳二亚胺偶联的方法将黑曲霉纤维素酶固定在功能化的 MWCNT 上,优化条件后所产生的固定化纤维素酶保持了 85% 的催化活性。在 70 °C 时半衰期是游离酶的 4 倍, Km 值测定显示,固定化纤维素酶对底物的亲和力提高了 2 倍,经重复使用 10 次后,酶活力基本无损失,显著降低生产成本。

随着纳米技术与化学技术的发展,出现了一种新的纳米载体——纳米花型杂交晶体。该载体是一种无机晶体材料,在形态上类似于花的形状,具有良好的刚性结构,因此在酶的固定化中对酶分子可起到一定的保护作用,提高酶的稳定性^[34]。LI 等^[35]采用该载体对辣根过氧化物酶(HRP)和葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)进行固定化。固定化反应过程中,对反应进行有目的调控,使 GOD 固定在载体表面,HRP 固定在载体内部。结果显示:固定化 HRP 和 GOD 的活性相较于游离酶的活性提高了 3 倍,并且将双酶与载体在常温下保存 7 d 后,其酶活性可保持在 90% 以上,而在相同环境下保存的游离双酶 1 d 后活性丧失近乎 80%。随后 LI 等^[36]又对南极假丝酵母脂肪酶 B 进行固定,在研究过程中加入保护剂聚乙烯吡咯烷酮以保护酶的活性,最终得到的固定酶活性可维持在 82%。

2.1.2 改性传统载体

改性载体是对传统载体进行化学修饰改造,以有效改善其在酶固定中的不足,该载体在定向固定化酶和共价固定化酶中有较多应用^[37]。在传统载体中,琼脂糖是应用较早的一种天然载体材料。早在 1975 年 SINHA 等^[38]利用琼脂糖珠对胰蛋白酶的固定化进行了研究。2016 年 RUEDA 等^[39]再次利用琼脂糖珠对 5 种不同的脂肪酶进行了固定化研究,研究中先利用辛基谷氨酸对琼脂糖珠进行修饰改造,然后再进行酶固定化。结果表明,固定化脂肪酶不仅提高了酶活力,使用离子交换树脂进行洗脱,还可有效回收,显著降低成本。

2.1.3 金属有机骨架材料载体

金属有机骨架化合物(metal organic framework, MOFs),又称多孔配位聚合物(porous coordination polymers, PCPs),是一类杂合且具有周期性孔结构的结晶,它可以由有机配体和金属离子在溶液中自发组装形成孔径、构型均不相同的立体骨架,也可以根据游离酶的特性对其进行有目的的设计^[40]。该技术最早出现于 20 世纪 90 年代中期,后通过技术改进,合成的 MOFs 孔隙率和稳定

性均大幅提高。利用 MOFs 对酶的固定化可分为两类:原位合成法和后合成法。

原位合成法是在合成 MOFs 过程中将酶加入到 MOFs 合成体系中,再经过离心、洗涤、干燥等过程得到酶与 MOFs 复合物,从而伴随着 MOFs 的生长,将酶包埋在其内部^[41]。2015 年 SHIEH 等^[42]利用原位合成技术进行了过氧化氢酶(catalase, CAT)在类沸石咪唑骨架材料(ZIF-90)上的固定化研究。结果表明, CAT 与 ZIF-90 的复合物中酶的负载量为 5% 左右,在 ZIF-90 的保护下酶表现出更强的稳定性。

后合成法是在完成 MOFs 合成再加入游离酶,并通过表面吸附、共价结合或扩散的方式将游离酶固定在 MOFs 上,从而得到酶与 MOFs 复合物。对于一些性能较好且合成条件优越的 MOFs,在合成时也要考虑其合成条件对酶活性的影响,如温度、压强、有机试剂、溶液 pH 值等。其优势在于 MOFs 的选择范围广,合成条件可超过拟固定酶的变性范围^[43-45],促进了利用后合成法对酶固定化的发展。PANG 等^[46]利用锆金属有机骨架(zirconium-MOF, Zr-MOF)表面吸附固定漆酶,该研究中将预先制备好的 Zr-MOF 与酶溶液混合进行 MOFs 的表面固定。结果表明, Zr-MOF 对酶吸附量高于介孔材料的吸附量,并且固定化漆酶与游离酶相比,其所适温度和 pH 范围更广,稳定性更高。MEHTA 等^[47]利用共价连接原理将有机磷水解酶固定于代号为 UiO-66-NH₂ 的 Zr-MOF 表面。结果显示:与游离酶相比,固定酶活性提高了约 37%,可至少重复使用 8 次,并且在长期储存(至少 60 d)时也稳定的。LYKOURINO 等^[48]利用孔道扩散的原理对微过氧化酶(microperoxidase-11, MP-11)固定在介孔金属有机骨架材料(mesoporous metal-organic framework, mesoMOF)。结果显示:在水溶状态下,游离 MP-11 易聚集且失活,而固定化 MP-11 与游离 MP-11 相比活性增强、利用率更高。研究中制备的 Tb-mesoMOF 的钛基骨架材料,其孔径足以容纳 MP-11。根据 MP-11 的大小,MP-11 可能进入 Tb-mesoMOF 中 3.0 nm 和 4.1 nm 的孔,而 0.9 nm 的孔可与 MP-11 上的活性中心接触。该研究组用 Tb-mesoMOF 包被固定肌红蛋白(myoglobin, Mb)的实验进一步研究酶活性增强的机理,发现大分子底物不能通过 0.9 nm 的孔进入金属有机骨架中与酶接触,而小分子可与酶进行接触,从而解释了固定化酶在金属基的 mesoMOF 中的活性比在二氧化硅基的 mesoMOF 中增强的原因^[49]。

2.2 新型酶固定化技术

新型酶固定化技术基本是从传统的方法衍生来的。目前,基于传统的吸附、共价结合、包埋、胶囊封包以及交联等方法,许多新的固定化技术不断涌现,产生了许多具有时代特征的新技术^[13,25]。

2.2.1 微波辐射辅助固定化技术

微波辐射辅助固定化酶技术是在制备固定化酶的过程中加以微波辐射辅助的新固定化技术。1997 年 PENAFIEL 等^[50]发现微波辐射会对酶的结构和活性产生影响, 随后微波辐射被用于反应溶液均匀分散的过程中。多孔性材料载体因其亲水性和疏水性对扩散造成一定程度的限制, 阻碍了该类载体在酶固定化中的应用, 但在有些酶的固定化过程中利用微波辐射可以有效地解决这一问题^[3], 如木瓜蛋白酶、脂肪酶、青霉素酰化酶和辣根过氧化物酶的固定化已通过微波辅助辐射很容易实现^[18]。青霉素酰基转移酶因结构较大而难以固定, VAN 等^[51]利用微波辐射辅助对青霉素酰基转移酶进行固定, 结果发现利用该技术不仅可以将该酶很好地固定还对酶活性有一定的保护作用。在酶的固定化研究中微波辐射只是起到一个辅助作用, 但该辅助作用可有效消除传质阻力, 减少对酶固定化的影响。显著促进固定效率。

2.2.2 膜固定化技术

膜固定化技术是将生物酶固定在膜载体上的一类综合技术。应用了包括吸附、共价交联、包埋等一系列技术。常用于生物反应器。可分为无机膜(如 α -氧化铝膜)和有机膜(如聚酰胺膜), 其选择及性能(孔径大小、官能团的存在、亲水性和表面电荷)对酶的催化活性和稳定性有着至关重要的影响^[52]。其优势是固定化的膜系统只需要少量酶, 并可快速方便将酶从反应体系中分离出来, 从而选择性地去除产物^[53]; 可克服空间位阻效应和界面限制现象。ABEJON 等^[54]利用平均孔径为 1.4 μm 的陶瓷膜(表面存在大量的羟基)对漆酶进行固定化, 然后将该膜应用于连续酶生物反应器中处理废水中的四环素。结果表明, 固定化漆酶的降解效率强烈依赖于固定化漆酶数量。当选择适当的酶量时, 四环素的去除率为 75%。LEWAŃCZUK 等^[55]采用漆酶膜反应器对酸性蓝 62(AB62)染料进行降解实验。在连续运行模式下, 固定化漆酶降解染料 4 d, AB62 转化率可达 98%以上, 并且固定化酶在没有额外曝气的情况下在连续 6 个反应周期中仍能保持良好的稳定性。

酶的膜固定化技术目前并未成熟, 因为膜的稳定性以及制备成本比较高。然而其发展趋势非常好。固定化后形成的催化膜在产品分离、在线检测、生物传感器等领域有着巨大的应用前景^[56]。

2.2.3 毛细管柱固定化技术

毛细管柱固定化技术是将酶与经过预处理后的毛细管柱内壁或其内部填充物相连接固定在一起的技术, 与毛细管电泳结合具有分析时间短、效率高、样品消耗少、多种检测器灵活组合等优点。根据酶固定的位置不同可分为 2 种: 一种在毛细管柱内壁, 如开管柱固定化酶微反应器(open tubular column immobilized enzyme microreactor, OTC-IMER), 另一种在整体柱内, 如整体柱式固定化酶微

反应器(monolithic column immobilized enzyme microreactor, MC-IMER)^[1]。WEI 等^[57]将 β -葡萄糖苷酶固定于毛细管内壁。制备的 OTC-IMER 在 50 °C、pH = 4.8 的条件下, 以 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速连续运行 10 h 以上, 可溶性底物纤维二糖消化转化率最高可达 76%。此相同 pH 值和温度条件下, 常规间歇消化纤维二糖的转化率 56%形成明显对比。PETERSON 等^[58]制备了胰蛋白酶固定化多孔聚合物整体柱。聚合混合物形成多孔聚合物整体柱, 整体柱上进一步引入 2-乙基-4,4-二甲基内酯, 以实现胰蛋白酶的后续固定化。SAKAI-KATO 等^[59]用溶胶-凝胶法制备了胰蛋白酶包裹的整体柱。首先用甲基丙烯酸酞氧丙基三甲氧基硅烷对毛细管进行预处理, 以防止凝胶从毛细管中渗出, 然后将四甲氧基硅烷在酸性溶液中水解, 在水解后的硅烷溶液中加入胰蛋白酶溶液, 再将以上得到的混合物引入毛细管得到胰蛋白酶包裹整体柱。该研究组还用相同的技术流程制备了胃蛋白酶包裹的整体柱^[60], 使固定酶比游离酶的催化活性和重复使用效果显著改善。

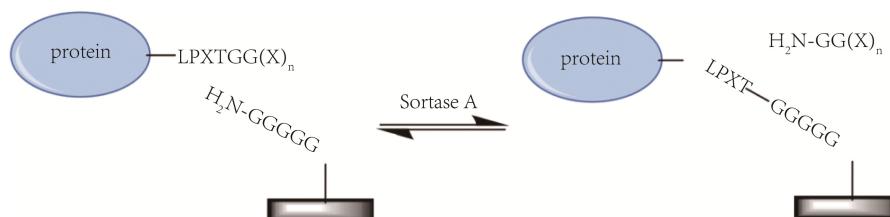
2.3 酶定向固定化技术

传统固定技术中, 酶与载体之间的连接或结合大多是随机的。因此, 很难保证固定后不影响酶催化中心基团。定向固定化酶, 指定向连接酶与载体, 此方法可弥补传统固定化酶方法中酶与载体随机位点结合的缺点, 有利于保护酶活性中心基团, 同时还可提高酶的固定量^[61]。目前, 常用的定向固定化酶技术主要包括生物酶介导、化学修饰介导和界面聚合微囊固定化技术等^[3]。

2.3.1 生物酶介导的酶定向固定化技术

早在 1999 年, 人们发现金黄色葡萄球菌分选酶 A(sortase A)具有转肽酶活性。其通过 LPXTG 基序识别一组结构和功能多样的底物, 并切割苏氨酸(T)和甘氨酸(G)之间的肽键, 将切割的肽链的 C 端连接到 N 末端具有连续 5 个甘氨酸的多肽上。POPP 等^[62]后来利用了这种酶的特异性转肽功能开发了由其介导的蛋白修饰技术。PROFT^[63]将此技术应用于酶的固定化中, 成功将目标蛋白连接到了连续甘氨酸修饰的载体上(见图 1)。通过此酶的介导, 人们已将粘附蛋白连接在荧光标记的微球上, 也可连接在绿色荧光蛋白修饰脂质体上, 以及将抗体与酶固定在纤维素纳米晶体上等^[64-66]。

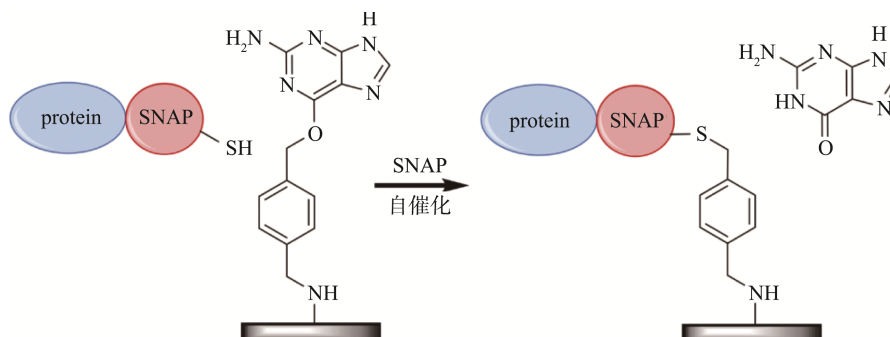
另一类是具有自催化功能的 SNAP 标签蛋白, 此蛋白为人源 DNA 修复酶——O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶(AGT)的突变体, SNAP 上的巯基可与载体表面上的 O⁶-苄基鸟嘌呤残基反应, 将 SNAP 的巯基连接在苄基上得以固定(见图 2)。进行酶固定时, 先将目标酶蛋白与 SNAP 融合表达, 可不经纯化直接将目标蛋白融合体通过上述方法定向固定在载体上^[65-66]。定向固定的细胞因子被证明在细胞培养中具有充分的信号传导能力^[66]。



注: 添加 LPXTG 序列的目标蛋白(蓝色)在分选酶转肽作用下固定在 GGGGG 修饰的载体表面。

图 1 由分选酶 A 介导的蛋白固定模式图^[63]

Fig.1 Pattern of protein fixation mediated by sortase A^[63]



注: SNAP(红色)通过自催化将融合蛋白(蓝色)固定在苯基鸟嘌呤修饰的载体表面。

图 2 由催化性标签蛋白 SNAP 介导的蛋白固定模式图^[65-66]

Fig.2 Pattern of protein fixation mediated by the catalytic SNAP tag protein^[65-66]

相对于分选酶 A, SNAP 标签蛋白更多用于细胞中蛋白的荧光标记, 而用于酶固定的研究还不多。但由于 SNAP 标签蛋白反应的特异性很强, 且反应不可逆。因此, 用于酶固定的前景广阔。

2.3.2 化学修饰介导的酶定向固定化技术

对于表面无特征官能团的蛋白或酶, 通过化学修饰使游离酶表面产生活性官能团, 然后与载体表面特定基团反应实现定向固定化^[3]。2003 年 BERTOZZI 提出的生物正交反应(bioorthogonal reaction)策略为蛋白质甚至活细胞靶结构引入活性基团奠定了基础。目前应用比较多且技术比较成熟是在温和条件下向蛋白质或游离酶表面引入炔基, 在 Cu(I)的催化下, 与载体功能基团——叠氮发生炔-叠氮之间的 1,3-偶极环加成反应(Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC), 从而形成稳定的共价键, 将蛋白或细胞固定在载体上^[67]。

最近, 通过 CuAAC 反应, 人们将成纤维细胞生长因子与琼脂糖微珠的位点特异性结合。固定化的生长因子仍然保留诱导细胞增殖的能力。用同样的反应, 将 T4 溶菌酶固定在超顺磁珠上, 与以随机方式固定在环氧修饰的磁珠上的酶相比, CuAAC 介导的位点特异性固定提高了酶对冻融循环和变性尿素的稳定性^[66,68]。

2.3.3 界面聚合微囊固定化技术

界面聚合指 2 种互不相容液体界面间发生的不可逆缩聚反应, 同时在该界面形成微囊或微球颗粒。现已经开

发了多种方法, 包括对微乳液进行改性, 从而优化酶的固定化和活化^[69]。QU 等^[70]对该种方法固定脂肪酶的研究结果显示, 油水界面固定脂肪酶的活性是游离酶的 8 倍。SU 等^[69]以聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)为聚合单体, 在加入癸二酰氯(交联剂)的情况下利用界面聚合技术制备脂肪酶微囊, 并用共聚焦显微镜观察期结构, 发现 PEI 聚合体和酶蛋白在微囊表面均匀分布。用碳纳米管对其进行修饰以强化水油界面, 降低 PEI 正电荷, 进一步提高酶的催化活性。

3 展望

根据 Business Communication Company Research (BCC)的数据, 全球工业酶市场预计将从 2018 年的 55 亿美元增长到 2023 年的 70 亿美元。这与该行业不断发展的趋势相一致, 以发展更加可持续的经济流程。在化学中使用酶可支持工业向更加生态的经济过渡。

目前, 酶固定化的研究及应用已为食品、医药、水处理、能源以及合成工业产生了重要影响。有些成熟的酶固定技术已在医学诊断和工业生产中广泛应用。同时, 材料科学尤其是高分子合成与纳米技术的交叉诞生的各种基质的纳米载体材料为酶固定化技术提供了极为丰富的载体材料。另外, 新的固定化技术的开发应用, 为定向固定酶提供了前所未有的技术手段。这些成果为酶的工业化应用创造了巨大的机会。

然而, 已有的大部分酶固定化仍然是一种经验技术, 它会产生大量难以比较的数据, 无法用于进一步实验。另外, 固定后酶结构及活性的变化仍然是巨大的挑战。因此, 对载体材料与固定技术进行进一步优化研究迫在眉睫。酶固定化科学要求新的方案, 以确保在工业反应条件下, 制备性能比可溶性酶更好的多相生物催化剂。这项重要任务需要结合材料科学、表面化学、蛋白质化学、生物物理学、分子生物学、生物催化和化学工程等多门学科的交叉融合。而且优势明显的载体材料如纳米载体材料必须与遗传工程技术手段结合, 更加详细、系统的研究固定化酶的综合性质, 以便开发容量更大、制备更容易、价格更低廉的酶固定化新技术。

参考文献

- [1] LIU DM, CHEN J, SHI YP. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization [J]. Trends Anal Chem, 2018, 102: 332–342.
- [2] NELSON JM, GRIFFIN EG. Adsorption of invertase [J]. J Am Chem Soc, 1916, 38(5): 1109–1115.
- [3] 柯彩霞, 范艳利, 苏枫, 等. 酶的固定化技术最新研究进展[J]. 生物工程学报, 2018, 34(2): 188–203.
KE CX, FAN YL, SU F, *et al.* Recent advances in enzyme immobilization [J]. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 188–203.
- [4] ZDARTA J, MEYER AS, JESIONOWSKI T, *et al.* Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2018, 258: 1–20.
- [5] GONG W, RAN Z, YE F, *et al.* Lignin from bamboo shoot shells as an activator and novel immobilizing support for α -amylase [J]. Food Chem, 2017, 228: 455–462.
- [6] DEFAEI M, TAHERI-KAFRANI A, MIROLIAEI M, *et al.* Improvement of stability and reusability of α -amylase immobilized on naringin functionalized magnetic nanoparticles: A robust nanobiocatalyst [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 113: 354–360.
- [7] MARDANI T, KHIABANI MS, MOKARRAM RR, *et al.* Immobilization of α -amylase on chitosan-montmorillonite nanocomposite beads [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120: 354–360.
- [8] SIRISHA VL, JAIN A, JAIN A. Enzyme immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes [J]. Adv Food Nutr Res, 2016, 79: 179–211.
- [9] MEHTA J, BHARDWAJ N, BHARDWAJ SK, *et al.* Recent advances in enzyme immobilization techniques: Metal-organic frameworks as novel substrates [J]. Coord Chem Rev, 2016, 322: 30–40.
- [10] VERMA ML, PURI M, BARROW CJ. Recent trends in nanomaterials immobilised enzymes for biofuel production [J]. Crit Rev Biotechnol, 2014, 36(1): 1–12.
- [11] KHOSHNEVISAN K, VAKHSHITEH F, BARKHI M, *et al.* Immobilization of cellulase enzyme onto magnetic nanoparticles: Applications and recent advances [J]. Mol Catal, 2017, 442: 66–73.
- [12] SASTRE DE, REIS EA, NETTO CGCM. Strategies to rationalize enzyme immobilization procedures [J]. Method Enzymol, 2020, 630: 81–110.
- [13] TAHERI-KAFRANI A, KHARAZMI S, NASROLLAHZADEH M, *et al.* Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries [J]. Crit Rev Food Sci Nutri, 2020, (3): 1–37.
- [14] TREVAN MD. Enzyme immobilization by adsorption: A review [J]. Adsorption, 2014, 20(5-6): 801–821.
- [15] NEERAJ G, RAVI S, SOMDUTT R, *et al.* Immobilized inulinase: A new horizon of paramount importance driving the production of sweetener and prebiotics [J]. Crit Rev Biotechnol, 2018, 38(3): 409–422.
- [16] SHAKERIAN F, ZHAO J, LI SP. Recent development in the application of immobilized oxidative enzymes for bioremediation of hazardous micropollutants-A review [J]. Chemosphere, 2020, 239: 124716.
- [17] OVSEJEVI K, MANTA C, BATISTA-VIERA F. Reversible covalent immobilization of enzymes via disulfide bonds [J]. Method Molecul Biol, 2013, 1051: 89.
- [18] DEVASIA VLA, KANCHANA R, VASHIST P, *et al.* Technological advancements in industrial enzyme research [J]. Adv Biol Sci Res, 2019: 85–102.
- [19] GUISAN JM, BOLIVAR JM, FERNANDO LÓPEZ-GALLEGO, *et al.* Immobilization of enzymes and cells methods and protocols: Methods and protocols [J]. Method Molecul Biol, 2020, DOI: 10.1007/978-1-0716-0215-7.
- [20] OLIVEIRA FD, FRANA ADS, CASTRO AMD, *et al.* Enzyme immobilization in covalent organic frameworks: Strategies and applications in biocatalysis [J]. Chem Plus Chem, 2020, 85(9): 2051–2066.
- [21] DARWESH OM, ALI SS, MATTER IA, *et al.* Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications [J]. Method Enzymol, 2019, 630: 481–502.
- [22] XIA H, LI N, ZHONG X, *et al.* Metal-organic frameworks: A potential platform for enzyme immobilization and related applications [J]. Front Bioeng Biotech, 2020, 8: 695.
- [23] 吴兆明, 杨敏, 孙颖, 等. 酶固定化载体材料的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(5): 1031–1037.
WU ZM, YANG M, SUN Y, *et al.* Research progress of immobilized enzyme carrier materials [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(5): 1031–1037.
- [24] GUPTA MN, KALOTI M, KAPOOR M, *et al.* Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization [J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2011, 39(2): 98–109.
- [25] JAKUB Z, ANNE M, TEOFIL J, *et al.* A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility [J]. Catalysts, 2018, 8(2): 92.
- [26] XIE XQ, LUO P, HAN J, *et al.* Horseradish peroxidase immobilized on the magnetic composite microspheres for high catalytic ability and operational stability [J]. Enzyme Microb Technol, 2019, 122: 26–35.
- [27] AHMAD R, KHARE SK. Immobilization of aspergillus niger cellulase on multiwall carbon nanotubes for cellulose hydrolysis [J]. Bioresour Technol, 2018, 252: 72–75.
- [28] ANSARI SA, HUSAIN Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review [J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(3): 512–523.
- [29] YANG Y, ZENG H, ZHANG Q, *et al.* Direct electron transfer and sensing performance for catechin of nano-gold particles-polymer nano-composite with immobilized laccase [J]. Chem Phys Lett, 2016, 658: 259–269.
- [30] SUROVIEC AH. Layer-by-layer assembly of glucose oxidase on carbon

- nanotube modified electrodes [J]. *Method Mol Biol*, 2017, 1504: 203–213.
- [31] QU FJ, MA XY, HUI YC, *et al.* Preparation of close-packed silver nanoparticles on graphene to improve the enzyme immobilization and electron transfer at electrode in glucose/O₂ biofuel cell [J]. *Chin J Chem*, 2017, 35(7): 1098–1108.
- [32] 陈静, 冷鹃, 杨喜爱, 等. 磁性纳米粒子固定化酶技术研究进展[J]. *生物技术进展*, 2017, 7(4): 284–289.
CHEN J, LENG J, YANG XA, *et al.* Progress on magnetic nanoparticles immobilized enzymes [J]. *Current Biotechnol*, 2017, 7(4): 284–289.
- [33] XIA TT, LIU CZ, HU JH, *et al.* Improved performance of immobilized laccase on amine-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles modified with polyethylenimine [J]. *Chem Eng J*, 2016, 295: 201–206.
- [34] 白云岫, 曹逊, 戈钧. 高分子修饰/无机晶体固定化酶研究进展[J]. *生物加工过程*, 2018, 16(1): 12–18.
BAI YX, CAO X, GE J. Advances in enzyme-polymer conjugates and enzyme-inorganic crystal composites [J]. *Chin J Bioproc Eng*, 2018, 16(1): 12–18.
- [35] LI Z, ZHANG YF, SU YC, *et al.* Spatial co-localization of multi-enzymes by inorganic nanocrystal-protein complexes [J]. *Chem Commun*, 2014, 50(83): 12465–12468.
- [36] LI ZX, DING Y, WU XL, *et al.* An enzyme-copper nanoparticle hybrid catalyst prepared from disassembly of an enzyme-inorganic nanocrystal three-dimensional nanostructure [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(25): 20772–20776.
- [37] WU LT, WU SS, XU Z, *et al.* Modified nanoporous titanium dioxide as a novel carrier for enzyme immobilization [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 59–66.
- [38] SINHA NK, LIGHT A. Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on Agarose beads [J]. *J Biol Chem*, 1975, 250(22): 8624–8629.
- [39] RUEDA N, DOS SANTOS CS, RODRIGUEZ MD, *et al.* Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2016, 128: 10–18.
- [40] LI P, MOON SY, GUELTA MA, *et al.* Nanosizing a metal-organic framework enzyme carrier for accelerating nerve agent hydrolysis [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(10): 9174–9182.
- [41] 范铮, 唐咸昌, 张旭, 等. 金属有机骨架材料载体用于酶固定化的研究进展[J]. *化工进展*, 2019, 38(10): 4606–4613.
FAN Z, TANG XC, ZHANG X, *et al.* Progress of on enzyme immobilization with metal-organic frameworks [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2019, 38(10): 4606–4613.
- [42] SHIEH FK, WANG SC, YEN CI, *et al.* Imparting functionality to biocatalysts via embedding enzymes into nanoporous materials by a de novo approach: Size-selective sheltering of catalase in metal-organic framework microcrystals [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(13): 4276–4279.
- [43] 解婷婷, 迟莉娜, 刘瑞婷, 等. 金属有机骨架固定化酶及其在环境中的应用[J]. *化工进展*, 2019, 38(6): 2889–2897.
XIE TT, CHI LN, LIU RT, *et al.* Immobilization of enzymes on metal-organic frameworks and its application in environmental fields [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2019, 38(6): 2889–2897.
- [44] DOONAN C, RICCÒ R, LIANG K, *et al.* Metal-Organic at the biointerface: Synthetic strategies and applications(article) [J]. *Acc Chem Res*, 2017, 50(6): 1423–1432.
- [45] HERNANDEZ K, FERNANDEZ-LAFUENTE R. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48(2): 107–122.
- [46] PANG SL, WU YW, ZHANG XQ, *et al.* Immobilization of laccase via adsorption onto bimodal mesoporous Zr-MOF [J]. *Proc Biochem*, 2016, 51(2): 229–239.
- [47] MEHTA J, DHAKA S, PAUL AK, *et al.* Organophosphate hydrolase conjugated UiO-66-NH₂ MOF based highly sensitive optical detection of methyl parathion [J]. *Environ Res*, 2019, 174: 46–53.
- [48] LYKOURINOU V, CHEN Y, WANG XS, *et al.* Immobilization of MP-11 into a mesoporous metal-organic framework, MP-11@mesoMOF: A new platform for enzymatic catalysis [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(27): 10382–10385.
- [49] CHEN Y, LYKOURINOU V, HOANG T, *et al.* Size-Selective biocatalysis of myoglobin immobilized into a mesoporous metal-organic framework with hierarchical pore sizes [J]. *Inorg Chem*, 2012, 51(17): 9156–9158.
- [50] PENAFIEL LM, LITOVITZ T, KRAUSE D, *et al.* Role of modulation on the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity in L929 cells [J]. *Bioelectromagnetics*, 1997, 18(2): 132–141.
- [51] VAN LLM, JANSSEN MHA, OOSTHOEK NHP, *et al.* Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 79(2): 224–228.
- [52] ZDARTA J, MEYER AS, JESIONOWSKI T, *et al.* Multi-faceted strategy based on enzyme immobilization with reactant adsorption and membrane technology for biocatalytic removal of pollutants: A critical review [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(7): 107401.
- [53] KONOVALOVA V, GUZIKOVICH K, BURBAN A, *et al.* Enhanced starch hydrolysis using α -amylase immobilized on cellulose ultra-filtration affinity membrane [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 152: 710–717.
- [54] ABEJÓN R, DE CM, BELLEVILLE MP. Large-scale enzymatic membrane reactors for tetracycline degradation in WWTP effluents [J]. *Water Res*, 2015, 73: 118–131.
- [55] LEWAŃCZUK M, BRYJAK J. Continuous decolorization of acid blue 62 solution in an enzyme membrane reactor [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 177(1): 237–252.
- [56] LUO J, SONG S, ZHANG H, *et al.* Biocatalytic membrane: Go far beyond enzyme immobilization [J]. *Eng Life Sci*, 2020, 20(11): 441–450.
- [57] WEI C, ZHOU Y, ZHUANG W, *et al.* Improving the performance of immobilized β -glucosidase using a microreactor [J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, 125(4): 377–384.
- [58] PETERSON DS, ROHR T, SVEC F, *et al.* Dual-function microanalytical device by in situ photolithographic grafting of porous polymer monolith: Integrating solid-phase extraction and enzymatic digestion for peptide mass mapping [J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 5328–5335.
- [59] SAKAI-KATO K, KATO M, TOYO'OKA T. On-line trypsin-encapsulated enzyme reactor by the sol-gel method integrated into capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 2002, 74: 2943–2949.
- [60] KATO M, SAKAI-KATO K, JIN H, *et al.* Integration of on-line protein digestion, peptide separation, and protein identification using pepsin-coated photopolymerized sol-gel columns and capillary electrophoresis/mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(7): 1896–1902.

[61] 张萍, 侯红萍. 新型酶固定化技术研究进展[J]. 酿酒科技, 2010, (6): 82-85.
ZHANG P, HOU HP. Research progress in newly-developed enzyme immobilization techniques [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2010, (6): 82-85.

[62] POPP MW, ANTOS JM, GROTENBREG GM, *et al.* Sortagging: A versatile method for protein labeling [J]. Nat Chem Biol, 2007, 3(11): 707-708.

[63] PROFT T. Sortase-mediated protein ligation: An emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization [J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(1): 1-10.

[64] TANAKA Y, TSURUDA Y, NISHI M, *et al.* Exploring enzymatic catalysis at a solid surface: A case study with transglutaminase-mediated protein immobilization [J]. Org Biomol Chem, 2007, 5(11): 1764-1770.

[65] ENGIN S, FICHTNER D, WEDLICH D, *et al.* SNAP-tag as a tool for surface immobilization [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(30): 5443-5448.

[66] MELDAL M, SCHOFFELEEN S. Recent advances in covalent, site-specific protein immobilization [J]. Food Res, 2016, 5: 1-11.

[67] DIGAMBAR SM, BALASAHEB NS. Surface modification chemistries of materials used in diagnostic platforms with biomolecules [J]. J Chem, 2016, 2016: 1-19.

[68] JE HH, NOH S, HONG SG, *et al.* Cellulose nanofibers for magnetically-separable and highly loaded enzyme immobilization [J]. Chem Eng J, 2017, 323(1): 425-433.

[69] SU F, LI G, FAN YL, *et al.* Enhanced performance of lipase via microcapsulation and its application in biodiesel preparation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 1-12.

[70] QU Y, HUANG R, QI W, *et al.* Interfacial polymerization of dopamine in a pickering emulsion: Synthesis of cross-linkable colloidosomes and enzyme immobilization at oil/water interfaces [J]. ACS Appl Mater Inter, 2015, 7(27): 14954-14964.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



刘 茹, 主要研究方向为发酵与产物分离工程。
E-mail: 13121376636@163.com

赵菲佚, 博士, 教授, 主要研究方向为植物生物反应器。
E-mail: tspaulzhao@tsnu.edu.cn



“食品保鲜与贮藏”专题征稿函

随着生活水平的逐渐提高, 人们对食品的质量有了更高的要求。因此, 保鲜技术被广泛应用于食品的加工流通过程中。如何保持食品的新鲜度以及食品在储藏过程中的安全性成为目前研究的重点。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品保鲜与贮藏”专题, 由浙江大学 罗自生 教授 担任专题主编, 主要围绕 (1)果蔬、粮食、水产品、禽肉制品等食品保鲜方法、技术; (2)食品在储藏中的生理、生化变化; (3)食品腐败以及控制方法等或您认为有意义的领域展开讨论, 计划在 2021 年 6 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊主编国家风险评估 吴永宁 研究员 及浙江大学 罗自生教授 特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2021 年 4 月 19 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式(注明专题): 食品保鲜与贮藏

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com