

综述

化工技术

纳米级酶固定化技术的发展

刘仁霖 罗 晖 常雁红* 孙春宝

(北京科技大学环境工程系,北京 100083)

摘 要 对酶的纳米级固定化技术的研究现状进行了综述,按纳米级固定化技术的发展阶段将其划分为三类,并比较了这三类纳米级固定化法的优缺点,在此基础上对纳米级酶固定化技术的发展方向进行了分析。

关键词 酶 磁性纳米载体 固定化 超顺磁性

中图分类号 TQ468.8 文献标识码:A

酶的固定化是用固体材料将酶束缚或限制于一定区域内,使之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。按其性质分,主要有四种,即包埋法、交联法、吸附法及共价法^[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]。

酶的催化效率及选择性在很大程度上取决于所使用酶的比表面积和几何形状;如不考虑其它因素,则粒径越小,比表面积越大,催化剂的效率就越高^[3]。传统的固定化酶粒径一般为(0.1~10)mm。由于受到固定酶量少和较大传质阻力的影响,这类固定化酶的催化效率比较有限。而纳米级固定化的酶具有比表面积大、传质阻力小、固定酶量多和催化效率高等优点,这使得酶的纳米级固定化技术^[4]受到越来越广泛的关注。

对酶的纳米级固定化技术的研究主要包括以下三个方面:(1)利用反胶团为酶模拟“自然环境”,将酶限制在反胶团中进行催化反应,反应结束通过膜

反应器将酶和表面活性剂截留下来回收利用;(2)利用反胶团作为“微反应器”(microreactor)进行纳米级的聚合,以所得纳米高分子材料作为固定酶的载体;(3)高分子聚合物中引入纳米级磁核,得到可在磁场下快速分离的磁性高分子微球载体,并进行酶的固定化。

1 反胶团对酶的固定化

反胶团(束)[(10~100)nm]是表面活性剂溶解在非极性溶剂中形成的、围绕一个极性核的纳米级聚集体,是一种低水含量的油包水(W/O)微乳液。与普通乳状液(几百甚至上千纳米以上)不同,反胶团溶液是透明的、热力学稳定的体系^[5]。

20世纪80年代末,Haering等人^[6]发现W/O微乳液体系可以发生胶凝作用,并对微乳液凝胶性质进行了初步表征。90年代初,Rees等人^[7]开始尝试利用这一现象来固定脂肪酶,并对固定化酶的酶学性质进行了大量研究之后,便有用微乳液凝胶固定化脂肪酶进行有机相合成与对应体拆分的研究报道。反胶团(束)能在分子水平上把酶分散在有机介质中,亲水性的酶定位在极性水腔中,周围是一个水层和一个表面活性剂层,酶不与有机溶剂直接接触,所以避免了失活;而相对疏水的酶,则定位在水

2006年11月22日收到 北京市科技新量计划(2006B22)资助
第一作者简介:刘仁霖(1981—),男,重庆市人,硕士研究生,研究方向:生物化工。

*通信作者简介:常雁红,女,E-mail: yhchang0512@yahoo.com.cn

池与表面活性剂之间的界面上。因为界面的疏水性小于水池,这样在此体系中大多数酶能保持催化活性和稳定性,有的甚至表现出超活性(superactivity),使得反胶团技术也被看成是生物催化剂的固定化新方法^[8]。这种固定化方法与传统固定化法不同的是它没有严格意义上的载体。随着反胶团技术发展和酶催化反应研究不断深入,一个新的研究领域——胶束酶学(Micellar enzymology)开始产生和兴起^[9]。

目前,胶束酶学大多数研究主要集中在反胶束定位和结构、酶催化反应动力学特征、酶催化活性和稳定性等基础研究方面,但少量研究已开始向应用方面过渡,如辅酶的再生、脂肪酶的催化反应、肽和氨基酸的合成、高分子材料的合成以及有毒物质的降解等^[10],其中应用最广泛的当属脂肪酶的催化反应^[11-13]。

反胶团作为一种微乳体系对酶的固定化具有诸多优势:(1)组成的灵活性。大量的不同类型的表面活性剂、有机溶剂甚至是不同极性的物质都可用于构建适于酶反应的反胶团体系。(2)热力学稳定性和光学透明性。反胶团是自发形成的,因而不像一般乳液那样需要机械混合,有利于规模化制备。(3)反胶团有非常高的界面积/体积比,远高于有机溶剂/水两相体系,使底物和产物的相转移变得极为有利。(4)产物回收可通过相调变实现。反胶团的相特性随温度而变化,这一特性可用于产物回收。

当然,作为一项新技术,反胶团固定化法还有很多有待解决的问题:(1)反胶团所构成的微环境不利于大分子底物的扩散,其应用领域有一定局限性;(2)各成分的选用与酶活密切相关,如果成分选用或配比不当,不但不能提高酶的活性,反而会使酶活降低;(3)产物易被表面活性剂污染,不易做到连续生产。

2 纳米级有机或无机载体对酶的固定化

固定化酶常用的有机高分子载体材料一般可分为两大类^[14]:天然高分子材料和人工合成高分子材料。第一类载体材料一般无毒性,传质性能好,但强度较低,在厌氧条件下易被微生物分解,寿命较短;

第二类载体一般强度较大,但传质性能较差,在进行细胞固定时对细胞活性有影响。这些新载体的种类很多,而且经过人们不断地研究开发,已有许多人工合成的高分子材料应用于酶的固定化。

制备纳米级高分子载体的常用方法是利用反胶团进行聚合,反胶团在这里扮演的是“微反应器”(microreactor)的角色。由于反胶团是纳米级的,所以在其中进行聚合反应有利于控制高分子产物的粒径大小以及分布。

人们利用反胶团聚合法制备纳米级高分子载体,然后再通过共价交联或吸附的方法对酶进行固定化。郭刚军等^[15]以碘酸盐为氧化剂,通过氧化-迈克耳加成反应,由邻苯二酚和4,4'-亚甲基苯胺合成了一种新的功能聚合物——芳香胺邻醌聚合物。这种聚合物表面由分布均匀的纳米颗粒和孔穴构成。由于这种聚合物分子含有疏水骨架、羰基和胺基的有序分布,以及独特的纳米微观颗粒和孔穴结构,使其成为吸附法固定化酶的良好载体。

除了对有机高分子材料以外,人们还对无机纳米载体进行了制备及研究。如纳米微球^[16-18]、纳米介孔材料^[19-21]和纳米纤维^[22-24]等。

3 纳米磁性微球对酶的固定化

纳米级的固定化酶的载体粒径小,分离十分困难,如果能将纳米高分子载体带上磁、电等物理特性,使其能在磁场或电场中分离,将大大拓展酶的纳米级固定化载体的适用范围。而这也是近来研究者普遍关注无机-有机混合材料载体,即磁性高分子微球的原因。

磁性高分子微球是指通过适当的方法使有机高分子与无机磁性物质结合起来形成的、具有一定磁性及特殊结构的微球。因磁性高分子微球同时兼具高分子微球的众多特性和磁响应性,不仅能通过共聚及表面改性等方法赋予其表面功能基(如-OH、-COOH、-CHO、-NH₂、-SH等),还能在外加磁场下方便、迅速地分离。因此,自20世纪70年代以来,磁性高分子微球作为一种新型的功能材料,在磁性材料、生物医学(临床诊断、靶向药物、酶标)、细胞学(细胞标记、细胞分离等)和生物工程(酶的固

定化)以及分离工程等诸多领域显示出强大的生命力^[25]。

磁核的化学制备方法主要有几种:共沉淀法^[26]、沉淀氧化法^[27]、乳液法^[28]和溶胶凝胶法^[29]。共沉淀法制备的纳米 Fe_3O_4 粒径分布范围宽、易团聚、重现性差;乳化法制备的纳米 Fe_3O_4 晶型不均一。微乳液法制备纳米材料是最近几年发展起来的新方法,由于粒子表面包裹一层表面活性剂分子,使粒子间不易聚结;同时,通过选择不同的表面活性剂分子,可对粒子表面进行修饰。油包水(W/O)型微乳液中的水核是一个“微型反应器”,化学反应被限制在水核内,故最终得到的微粒粒径将受到水核大小的控制,从而可以控制微粒的大小。当制备出来的磁核粒径达到 20 nm 以下时,就具有了超顺磁性;粒径为 13 nm 时超顺磁性最佳。这样的磁核在外加磁场撤去后,微球不再具有剩磁,且易于回收和在溶液中重新分散。

磁性高分子微球的制备方法主要有:包埋法^[30]、单体聚合(乳液聚合^[31]、分散聚合^[32]、悬浮聚合^[33])和化学转化法^[34](原位法)。

按以上方法制备出来的磁性高分子微球的组成结构可以分为三类^[35]:一类是由磁性材料组成核,聚合物组成壳层,即核壳型^[36,37](酶的固定化载体以此类为多);另一类是将聚合物作为核,磁性材料作为壳,即壳核型^[38,39](一般被用于医药方面,如靶向药物);还有一种是内外层是聚合物,中间是磁性材料的多层微球^[40,41]。

磁性微球对酶的固定化可通过以下几种途径实现^[42]:

- (1) 直接的物理吸附,或用双功能基试剂交联(如戊二醛)^[43]。
- (2) 吸附非特定蛋白质在磁性微球上,用戊二醛交联后,将酶共价偶合到蛋白质上^[44]。
- (3) 硅烷化的磁性微球通过共价偶合^[45]。
- (4) 过渡金属(如 Ti、Zr)与酶的螯合作用^[46]。
- (5) 带有可与酶共价偶合的功能基的聚合物作为磁性微球的壳层^[47]。

在固定化酶体系中,利用磁性高分子微球作为结合酶的载体有着很多优点^[48]:有利于固定化酶从反应体系中分离和回收,操作简单、易行;对于双酶反应体系,当一种酶的失活较快时,就可以用

磁性材料来固载另一种失活较慢的酶,回收后可反复使用,降低成本;利用外部磁场可以控制磁性材料固定化酶的运动方式和方向,替代传统的机械搅拌方式,提高固定化酶的催化效率;可以改善酶的生物兼容性、免疫活性、亲疏水性;提高酶的稳定性。

4 展望

反胶团固定化法三类纳米级固定化法中制备过程最简单的,其它两种方法需要进行一系列的化学反应才能制备出固定化载体,还要通过交联、吸附等多种手段对酶进行固定。所以,反胶团固定化法的成本相对较低,但其可控性较差,酶和产物的回收相对较难。要实现酶的重复利用及产物分离,就必须构建合适的反应器,如膜反应器就是一种很有前景的反胶团固定化酶的反应器,可以将酶保留在反应器内,并有实现连续化操作的潜力;但这方面的研究还很少,今后的研究方向主要包括^[49]:(1)探索加入新的作用,如电场、磁场等,以改善膜的渗透性能;(2)新的反胶团体系及反应物系的开发;(3)各种反胶团体系在膜反应器中的应用;(4)改变膜两侧介质性质以优化反应器操作;(5)膜反应器连续操作的动力学研究。

纳米级有机载体和无机载体的优势是表面富含活性基团,但制备载体以及对酶进行固定化的工艺相对复杂。虽然固定化载体的粒径越小比表面积越大,有利于固载酶量的增加,但同时也增加了分离回用的难度,可控性仍然需要通过研究提高。所以,人们开始普遍关注无机-有机复合功能材料研制^[50]。

磁性高分子微球作为一种新型的复合功能材料,在纳米级固定化载体中有着显著的性能优势和巨大的应用潜力。它可控性好,反应的时候用磁场控制酶在反应釜中的走向,可以替代机械搅拌;催化结束后在磁场中又可以很方便地分离回用,反应批次的增加以及酶回收率的提高可以大大降低酶的使用成本,其卓越的稳定性及操作性使其成为纳米级固定化的最佳方法。近年来,国内外都对磁性高分子微球的制备方法及其物理性质做了很多研

究,发现仍有一些的问题有待解决^[51]: (1)合成粒径小且磁响应性强的微球;(2)改善磁性高分子微球的生物相容性;(3)改进和拓展微球表面的功能性及其应用范围;(4)提高磁性高分子微球的稳定性;(5)发展和完善磁性高分子微球的形成机理。

过去 10 年,生物催化技术发展十分迅猛,已成为开发经济、高效生产医药和精细化学品技术的重要工具。而纳米级酶固定化是纳米技术与生物技术结合的产物,是一个崭新的研究领域,在生物催化领域具有很好的应用前景。纳米级固定化酶虽然目前还存在着制备方法复杂、成本较高等问题,但可以考虑首先将其应用于某些附加值较高的生化产品的生产中,并以此为契机加快推进纳米级酶固定化技术工业应用的步伐。

参 考 文 献

- 李彦锋,李军荣,伏莲娣. 固定化酶的制备及应用. 高分子通报, 2001; (2): 13—17
- 李伟,孙建中,周其云. 适用于酶包埋的高分子载体材料研究进展. 功能高分子学报, 2001; 14(3): 365—369
- 丁素丽,朱以华,杨晓玲. 纳米明胶粒子的制备及其表面改性. 华东理工大学学报, 2004; 30(5): 523—526
- 吴金川, Hayashi Y, Talukder M M R. 反胶团酶催化研究新进展. 化学工程, 2002; 30(6): 41—43
- Haering G, Luisi P L. Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions. *J Phys Chem*, 1986; 90(22): 5892—5895
- Rees G D, Nascimento M G, Jenta T R J, et al. Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organogels. *Biochim biophys Acta*, 1991; 1073: 493—501
- 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2002: 345
- Martinek K, Levashov V, Klyachko N L, et al. Micellar enzymology. *Eur J Biochem* 1986; 155: 453—468
- 夏仕文,俞耀庭,董明容. 反胶束中的酶催化研究进展. 化学通报, 1998; 2: 11—12
- 宋少芳,栾玉霞,路福绥. 微乳液凝胶固定化脂肪酶催化单硬脂酸甘油酯水解反应活性. 应用化学, 2006; 23(2): 188—192
- 卢红,范培昌. 脂肪酶在反相胶囊中的催化行为的研究. 生物化学与生物物理学报, 1999; 31(4): 469—471
- 周国伟,黄锡荣,李越中,等. 脂肪酶在微乳液和微乳液凝胶中催化辛酸辛醇的酯化反应. 生物工程学报, 2001; 17(2): 224—227
- 薛屏,卢冠忠,郭杨龙. 高分子载体材料对青霉素酰化酶的固定化作用. 功能高分子学报, 2005; 18(2): 340—346
- 郭刚军,马林,毛学圃,等. 新型芳香胺-邻醌聚合物的合成及其作为纳米固定化酶载体的研究. 化学学报, 2002; 60(3): 499—503
- 喻湘华,卓仁禧,冯俊,等. 纳米级固定化猪胰脂肪酶催化三亚甲基碳酸酯的开环聚合研究. 高等学校化学学报, 2005; 26(5): 978—981
- 张娟,徐静娟,陈洪渊. 基于 SO₂ 纳米粒子固定辣根过氧化物酶的生物传感器. 高等学校化学学报, 2004; 25(4): 614—617
- 宗,陈英文,祝社民. 基于酶和无机金属纳米颗粒组装的生物复合催化剂. 化工学报, 2006; 57(8): 1776—1781
- 薛屏,卢冠忠,郭杨龙,等. 青霉素酰化酶在含铁 MC-M-41 介孔分子筛上的固定化研究. 化学通报, 2003; 10: 681—
- Han Yongjin, Watson T, Galen D. Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002; 17: 1—
- Zhang Xin, Guan Renfeng, Wu Danqi, et al. Enzyme immobilization on an inunctionalized mesostructured cellular foam surfaces, characterization and catalytic properties. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005; 33—43
- 姚冬生,文圣梅,刘大岭,等. 多壁碳纳米管固定化生物酶修饰电极检测杂色曲霉素的初步研究. 生物工程学报, 2004; 20(2): 601—605
- 许鑫华,任光雷,刘强,等. 聚乙烯醇静电纺丝法固定葡萄糖氧化酶. 天津大学学报, 2006; 39(7): 857—860
- 郭小天,孟洁,孔桦,等. 单壁碳纳米管无纺膜表面的 PEG 修饰及蛋白质吸附研究. 中国生物医学工程学报, 2005; 24(6): 763—783
- 张珊,游长江,陶潜,等. 磁性高分子微球的制备及其应用. 广州化学, 2004; 29(2): 45—56
- 林本兰,沈晓冬,崔升. 纳米 Fe₃O₄ 磁流体的制备及其影响因素研究. 润滑与密封, 2006; 10: 137—140
- 王全胜,刘颖,王建华. 沉淀氧化法制备 Fe₃O₄ 的影响因素研究. 北京理工大学学报, 1994; 14(02): 200—205
- 宋丽贤,卢忠远,廖其龙. 双微乳液法制备纳米磁性 Fe₃O₄ 粉体的研究. 功能材料, 2005; 11(36): 1762—1768
- 周洁,马明,张宇,等. 不同尺寸 Fe₃O₄ 磁性颗粒的制备和表征. 东南大学学报, 2005; 35(4): 615—618
- 安小宁,苏致兴. 高磁性壳聚糖微粒的制备与应用. 兰州大学学报, 2001; 37(2): 100—104
- 谢钢,张和鹏,张秋禹,等. 细乳液聚合法制备磁性复合微球及其表征. 高分子学报, 2003; 5: 626—630
- 洪小平,彭图治. 功能高分子磁性微球的制备及分析应用. 分析化学, 2003; 7(31): 789—793
- 朱开梅,顾生玖,李锦山. 甲基丙烯酸甲酯-丙烯酸共聚物磁性微球的制备及其应用. 合成橡胶工业, 2006; 29(3): 22—25
- 吴雪辉,李琳,郭祀远. 影响磁性阳离子交换树脂制备的主要因素. 华南理工大学学报, 1999; 27(10): 17—51

- 35 Gomez- Lopera S A, Plaza R C, Plaza, *et al* Synthesis and characterization of spherical magnetite/biodegradable polymer composite particles *Colloid Interface Sci*, 2001; 240: 40—47
- 36 邱广亮, 邱广明, 胡 玲. $Fe_3O_4/P(S-CBA)$ 核壳磁性复合微球的制备及性质. *精细化工*, 2001; 18(5): 274—277
- 37 陈 捷, 薛 博, 白 妹. 新型磁性亲和载体的制备及其对溶菌酶的吸附. *天津大学学报*, 2001; 34(1): 103—106
- 38 阎立峰, 谭 琳, 杨 帆. 壳核型磁性纳米纤维素微球的超声制备及表征. *化学物理学报*, 2004; 17(6): 762—766
- 39 Moore LR, Nakamura, M, *et al* The use of magnetite - doped polymeric microspheres in calibrating cell tracking velocimetry. *Biochem Biophys Methods*, 2000; 44: 115—130
- 40 郭红霞, 赵晓鹏. $Fe_3O_4/PSt/TD_2$ 多层包覆电磁响应微球的制备. *功能材料*, 2003; 1(34): 34—36
- 41 Hidehiro Kumazawa, Wang Zhifeng, Zhou Lanxiang Preparation of pycnosium ferrite/polyacrylamide magnetic composite microsphere and its characterization *Journal of Rare Earths*, 2005; 23(3): 262—267
- 42 丁小斌, 孙宗华, 万国祥. 磁性高分子微球的制备和应用研究进展. *化学通报*, 1997; (1): 1—6
- 43 Jiang D S, Long S Y, Huang J, *et al* Immobilization of *Pycnoporus Sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres *Biochem Eng J*, 2005; (25): 15—23
- 44 Yang C L, Guan Y P, Xing J M, *et al* Synthesis and protein immobilization of monodisperse magnetic spheres with multifunctional groups *React Funct Polym*, 2006; (66): 267—273
- 45 Liu X Q, Guan Y P, Shen R, *et al* Immobilization of lipase onto micron- size magnetic beads *J Chromatogr*, 2005; (822): 91—97
- 46 刘琳琳, 曾力希, 刘 婷. 金属螯合载体定向固定化木瓜蛋白酶的研究. *生物工程学报*, 2005; 21(5): 789—793
- 47 Demirel D, Özdural A R, Mutlu M, *et al* Preparation and characterization of magnetic diolitepolystyrene composite particles for enzyme immobilization *J Food Eng*, 2004; (62): 203—208
- 48 任广智, 李振华, 何炳林. 磁性高分子微球用于固定化酶的研究进展. *离子交换与吸附*, 2000; 16(4): 380—384
- 49 姚传义, 吴金川, 何志敏. 反胶团酶膜反应器研究进展. *膜科学与技术*, 1997; 17(5): 1—6
- 50 曹 渊, 陶长远, 刘作华, 等. 纳米无机物/高分子磁功能复合材料研究进展. *压电与声光*, 2006; 28(1): 56—59
- 51 王丽娟, 刘 峥. 磁性高分子微球的制备及在分析化学中的应用进展. *材料导报*, 2006; 20(6): 36—40

Research Progress of Nanometer- scale Immobilization of Enzyme

LU Ren- lin, LUO Hui, CHANG Yan- hong^{*}, SUN Chun- bao

(Department of Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing,

Beijing 100083, P. R. China)

[Abstract] The research progress of nanometer- scale immobilization of enzyme was discussed. The advantages and disadvantages of three primary types of preparation were compared. On this basis, the direction of the development of nanometer immobilization of enzyme was analyzed.

[Key words] enzyme magnetic nanoparticle immobilization superparamagnetic