

固定化酶载体的研究进展

牛亚楠,侯红萍

(山西农业大学食品科学与工程学院,山西 太谷 030801)

摘要: 作为固定化酶技术的重要组成部分,载体的结构及性能在很大程度上直接影响着固定化酶的催化活性及操作稳定性。综述了近年来国内外有关固定化酶载体材料的研究现状和发展趋势。

关键词: 固定化酶; 载体; 研究进展

中图分类号:Q814

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)09-0097-03

Research Progress in Carriers of Immobilized Enzymes

NIU Ya'nan and HOU Hongping

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: As an important part of immobilized enzymes technology, the structure and the properties of carrier would influence directly catalysis activity and operation stability of immobilized enzyme. In this paper, the research progress in carrier materials for immobilized enzymes at home and abroad in recent years and its development trend were reviewed.

Key words: immobilized enzyme; carriers; research progress

载体材料的选择是决定酶能否成功固定化以及固定化酶活力高低的重要因素。酶蛋白的活性中心是酶催化活性所必需的,酶蛋白的空间结构也与酶活力密切相关,因而,在固定化的过程中,必须注意酶活性中心的氨基酸残基不受到载体的影响,而且要避免酶蛋白高级结构的破坏。

从载体材料的组成来看,固定化酶所使用的载体可以分为无机载体、高分子载体、复合载体及新型载体等。

1 无机载体材料

无机载体稳定性好、机械强度高、对酶和微生物无毒性、不易被酶和微生物分解、耐酸碱、成本较低、寿命长,如氧化硅、活性炭、氧化铁(铝)、多孔玻璃等。无机载体的不足之处在于其结构不易调控,影响传质且键合酶的能力差,但可与传统有机聚合物载体材料形成互补体系^[1]。

采用原子转移自由基聚合(ATRP)方法,在Si表面进行甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)的接枝聚合,从而在硅表面形成刷状P(GMA),并可调节P(GMA)侧链的长度。所得复合载体的传质性能良好,侧链富含能与酶共价连接的环氧基,故提高了固定化葡萄糖氧化酶(GOD)的载酶量,达到0.2 mg/cm²。

碳纤维作为固定化酶载体材料已初步显示出其应用

价值。最新研究表明,吸附在活性炭纤维上的酶的活性要比吸附在玻璃纤维上的高,在特定条件下,固定化酶表现出高度的热稳定性,可连续用于催化水解和酯交换反应。纤维结构的载体有高比表面积和较高的机械性能,碳纤维上固定的水处理用微生物不仅量很大,而且附着强度也很大,还有一定的弹性^[2]。张巍巍^[4]将脂肪酶固定在T300级碳纤维上,发现固定化酶相对于游离酶的反应pH值向碱性偏移,最适合反应温度由原来的37℃提高到50℃,并且在40~60℃能维持比较好的活性。

2 高分子载体

高分子载体又可分为天然高分子载体材料和合成高分子载体材料。

2.1 天然高分子载体材料

天然高分子材料有结构性蛋白(角质、胶原蛋白)、球状蛋白及其碳水化合物。由于原料比较易得,都比较适合作为酶的载体材料。此类材料最大的特点是无毒性,传质性能好。近年研究的比较热门的载体是壳聚糖和海藻酸钠等。

孙素芳^[5]比较了不同相对分子质量壳聚糖(50×10⁴,100×10⁴,200×10⁴)的成球情况及壳聚糖相对分子质量对固定化酶活力、酶活回收率的影响,确定了50×10⁴的壳聚糖

基金项目:山西省科技攻关项目(041030)。

收稿日期:2011-06-09

作者简介:牛亚楠(1986-),在读硕士生,研究方向:酶固定化技术。

通讯作者:侯红萍(1965-),教授,sphhp@126.com。

为最适固定化 β -半乳糖苷酶载体,并制备了毫米级壳聚糖小球,较传统方法更加简单、快速。湿润壳聚糖小球直接干燥和采用体积分数为30%的甘油处理后干燥对比实验表明,后者能够保持小球湿态时的结构,既保证了酶的固定化效果,又有利于载体的工业储存。

由于天然高分子材料强度较低,在厌氧条件下易被微生物所分解,使用寿命较短,而且天然高分子材料原料来源往往受产地所限,这在一定程度上限制了它的进一步应用。

2.2 合成有机高分子载体

合成有机高分子材料种类繁多,其化学、物理性能都有很大的可变性。理论上讲,高分子材料可以担当任何一种酶的固定化载体,而且它们对微生物的腐蚀也有较强的抵抗力。另外,与天然高分子材料相比,合成有机高分子凝胶载体还具有强度较大的优点。常用的合成高分子材料载体为聚丙烯、聚丙烯酰胺、聚丙烯腈等。缺点主要是载体的价格昂贵;多数固定化酶的活力和稳定性不高;操作的半衰期也不够长;连续化反应时,操作和装置过于复杂等,这些问题都有待于解决。王燕佳^[6]以聚丙烯酰胺类纳米粒子为固定化载体,采用共价键合的方法对脂肪酶的固定化条件及有机相中固定化酶的催化性能进行了研究,结果如下:固定化的最佳条件为,在pH10.0的缓冲液下,吸附时间为12h,温度为35~36℃。得到的固定化酶催化合成月桂酸月桂醇酯,月桂酸与十二醇的摩尔比1:2,55℃的条件下酯化反应催化效果最好。

3 复合载体材料

将有机材料和无机材料复合组成新的载体材料,可改进材料的性能。目前主要有磁性高分子微球,既可以通过共聚、表面改性等化学反应在微球表面引入多种反应性功能基团,也可通过共价键来结合酶、细胞、抗体等生物活性物质,在外加磁场的作用下,进行快速运动或分离,因而在生物工程、生物医学及细胞学等领域有着广泛的应用前景。Han Lei等^[7]采用磁性复合微球为载体来固定木瓜蛋白酶。研究表明,木瓜蛋白酶经过固定化后的pH值、热稳定性及储存稳定性均高于单体酶。与单体酶相比,固定化的木瓜蛋白酶表现出了良好的适应环境的能力。

4 新型载体

4.1 介孔材料

介孔材料是一种多孔固体材料,它具有蜂窝样的孔道,大小只有2~50nm。很多介孔材料的孔道都是规则有序排列的,包括层状、六方对称排列和立方对称排列的孔道结构。

介孔材料作为酶固定化载体的优越性表现在:①相对于微孔分子筛,介孔材料较大的孔径使其表面活性基团有较好的可接近性,孔内可负载大体积基团,适用于体积大小范围较宽的客体分子;②介孔材料的表面富含羟基基团,与酶分子发生氢键作用,加强载体与酶分子的作用力,而且羟基在表面的分布及其数量可根据目标进行调变;③具有较高的比表面积(达1000m²/g),理论负载量较高;④无机介孔材料在酶催化反应过程中呈惰性,不影响催化反应;⑤在理论研究方面,均一孔径有利于建立固定化酶的结构模型,表面性质及结构的可调变性可为酶/载体的分子水平设计与结构控制提供有意义的信息。

李艳敬^[8]以棒状介孔材料SBA-15为载体对脂肪酶进行固定化,结果表明,脂肪酶的进入并没有破坏棒状介孔材料SBA-15孔道的结构,还研究了脂肪酶催化三乙酸甘油酯水解时的催化活性、热稳定性和重复利用次数。与自由酶相比,固定酶的耐碱性和耐高温能力都有所提高。特别是在60℃条件下,固定化酶的热稳定性要比自由酶的稳定性好。邹泽昌^[9]采用水热合成法以P123为模板剂,正硅酸乙酯为硅源,在酸性(HCl)条件下合成了氧化硅介孔泡沫材料,用于固定化木瓜蛋白酶。结论为:①在4℃条件下放置60d后,固定化酶的剩余活性仍保持75%以上,而游离酶的活性只有初始活性的53.6%。操作8个批次后,酶活保留60.3%。与游离酶相比,固定化木瓜蛋白酶的pH稳定性、热稳定性、操作稳定性和储藏稳定性都有了很大程度的提高。②酶固定化效果与氧化硅介孔泡沫材料的窗口尺寸相关,当载体材料的窗口尺寸与酶分子的大小接近时,酶固定量和活力达到最大,其固定量为319mg/g MCF。介孔材料窗口尺寸是影响载体酶吸附量的关键因素。③氧化硅介孔泡沫材料经过氨基修饰后,对木瓜蛋白酶分子的固定量有了很大的提高(2.02倍),但是固定化酶的活性只有游离酶的57.3%,说明氨基修饰对酶分子的催化活性有一定的影响。

侯红萍^[10]等以介孔分子筛SBA-15为载体,戊二醛为交联剂固定糖化酶,固定化酶的活力回收率为56%,固定化酶比游离酶具有更好的耐热性,且固定化酶的K_m比游离酶有所降低,说明其对底物具有很好的亲和性,并用超声波处理了固定化酶,其活力比未处理的提高了18%。

4.2 环境敏感性载体

酶的固定化一般是将酶固定在水不溶性载体上,这样可方便有效地将酶与底物和产物分离,而且酶可以重复使用,但由于催化反应是异相反应,催化效率便受到了很大影响。若将酶固定在水溶性大分子上,催化反应则为均相反应,但所得的固定化酶难以分离和重复使用。因

此,近年来,研究开发出了结合均相催化和异相分离特点的环境敏感性材料成为固定化酶的新型载体,通过调节反应体系的温度或 pH 值实现了这一目的。将适量的聚乙二醇(PEG)接枝到壳聚糖上而制得的温敏性高分子水凝胶载体,随着温度的改变能在溶胶-凝胶之间转变^[11]。Zhu 等利用 pH 敏感性高分子载体(甲基丙烯酸-丙烯酰胺-马来酸酐三元共聚物)固定脂肪酶,这种固定化酶在临界 pH 以上为溶解状态,在临界 pH 以下则发生沉淀,因而可通过调节 pH 进行酶促反应和回收酶。P(AM-co-HEMA)是通过丙烯酰胺(AM 精制)与 2-甲基丙烯酸羟甲基酯(HEMA)共聚产生的单体,P(AM-co-HEMA)固定化 α -胰凝乳蛋白酶的最适温度为 65℃,自由酶的最适温度为 45℃,最适温度范围明显变宽,而且在 25~55℃温度范围内酶活力可以实现连续可调。P(AM-co-HEMA)固定化 α -胰凝乳蛋白酶,连续催化 8 次底物,其活力并无明显下降^[12]。

5 结语

各种固定化酶载体材料都有其各自的优缺点,相应的研究开发也得到了长足的发展,取得了许多重要成果,但仍存在很多需要解决的问题。载体材料的研究已从利用和改进质优价廉的传统载体材料发展到新型载体材料的设计和研发,根据特定酶固定化的需要来设计制备性能优良的载体,将是固定化酶载体材料的发展方向。

参考文献:

[1] 柏正武,尹传奇,吴莉.甲壳胺-硅胶复合载体的制备及其在脂

肪酶固定化中的应用[J].应用化学,2002,19(12):1194-1196.

- [2] F J Xu, Q J cai, Y L Li et al.Covalent immobilization of glucose oxidase on well-defined poly(glycidyl methacrylate)-Si(111) hybrids from surface-initiated atom-transfer radical polymerization[J]. Blomacromolecules, 2005(2):1012-1020.
- [3] Elisangela W, Elisangele M.Response surface methodology for optimization of lipase production by an immobilized newly isolated penicillium sp[J].Industrial & Engineering Chemistry Research,2008,48:9651-9657.
- [4] 张巍巍.生物碳纤维的酶固定化研究[D].北京:北京化工大学,2010.
- [5] 孙素芳,张燕,吕树芳,等.壳聚糖固定化酶载体小球的研究及制备方法的改进[J].河北大学学报,2009,29(2):168-172.
- [6] 王燕佳.聚丙烯酰胺类共聚纳米粒子固定脂肪酶的研究[D].无锡:江南大学,2008.
- [7] Han Lei,Wang Wei. The preparation and catalytically active characterlzaton of papain Immobilized on magnetic comppsite micmspheres[J].Enzyme and Microbial Techn,2004,35(1): 15.
- [8] 李艳敬.猪胰脂肪酶在介孔材料 SBA-15 中的固定化及其催化活性[D].济南:山东轻工业学院,2009.
- [9] 邹泽昌.氧化硅介孔泡沫材料的制备及其木瓜蛋白酶固定化[D].北京:北京工业大学,2009.
- [10] 侯红萍,张茜.介孔分子筛 SBA-15 固定糖化酶的研究[J].中国食品学报,2011,11(2):147-151.
- [11] N Bhattarai. H R Ramay,J Cunn et al.[J]. J.Controlled Release, 2005,103:609-624.
- [12] 张传梅,付建伟,庄银凤,等.温敏性水凝胶作为固定化酶载体的研究[J].河南科学,2006,24(5):683-686.

贵州国际红酒品鉴会在贵州饭店举办

本刊讯 2011年8月19日下午,在贵州饭店贵阳厅,新西兰葡萄酒协会与中国贵州国际酒博会执委会及叁新西兰公司协同举办贵州国际红酒品鉴会,国家商务部市场运行调节司副司长路政阁及贵州省商务厅副厅长陈泽民,14家企业及新闻媒体参加了品鉴会。此次品鉴会旨在传播葡萄酒文化,教授葡萄酒评鉴方法和知识,加强与中国的交流。

国家商务部市场运行调节司副司长路政阁说,近几年,随着经济的发展,中国的葡萄酒进口量也在逐年增加,而消费者对葡萄酒的要求也越来越高。相信通过葡萄酒文化的传播,会加强中国文化与世界文化的交流,提高中国精神文明建设,使更多的人懂得享受生活。“品葡萄酒,享美好生活”。

贵州省商务厅副厅长、酒博会副组长陈泽民说,中国是白酒大国,随着世界相互之间的交流加深,中国对红酒如何储藏、评鉴越来越感兴趣。在增进红酒的同时也能促进相互之间的经贸合作。

品鉴会由新西兰红酒品鉴师王胜主持,新西兰红酒协会会长 Mal 主讲。Mal 介绍了新西兰及新西兰葡萄酒,并讲解了多款名酒产地及相关故事、特点、制作流程等。

新西兰专业品酒师王胜讲解了霞多丽(Chardonnay)、黑皮诺(Pinot Noir)、赤霞珠(Cabernet Sauvignon)、西拉子(Shiraz)的中餐搭配方法和品鉴知识。进口葡萄酒的辨别常识与品鉴方式成为大家关心的热点。在品酒师的引导下,大家逐项体验了葡萄酒的色泽、透明度、香味、挂杯等微妙而精致的感官享受。

品鉴会在热烈的气氛中圆满结束。(小小 江砂)



品鉴会会场