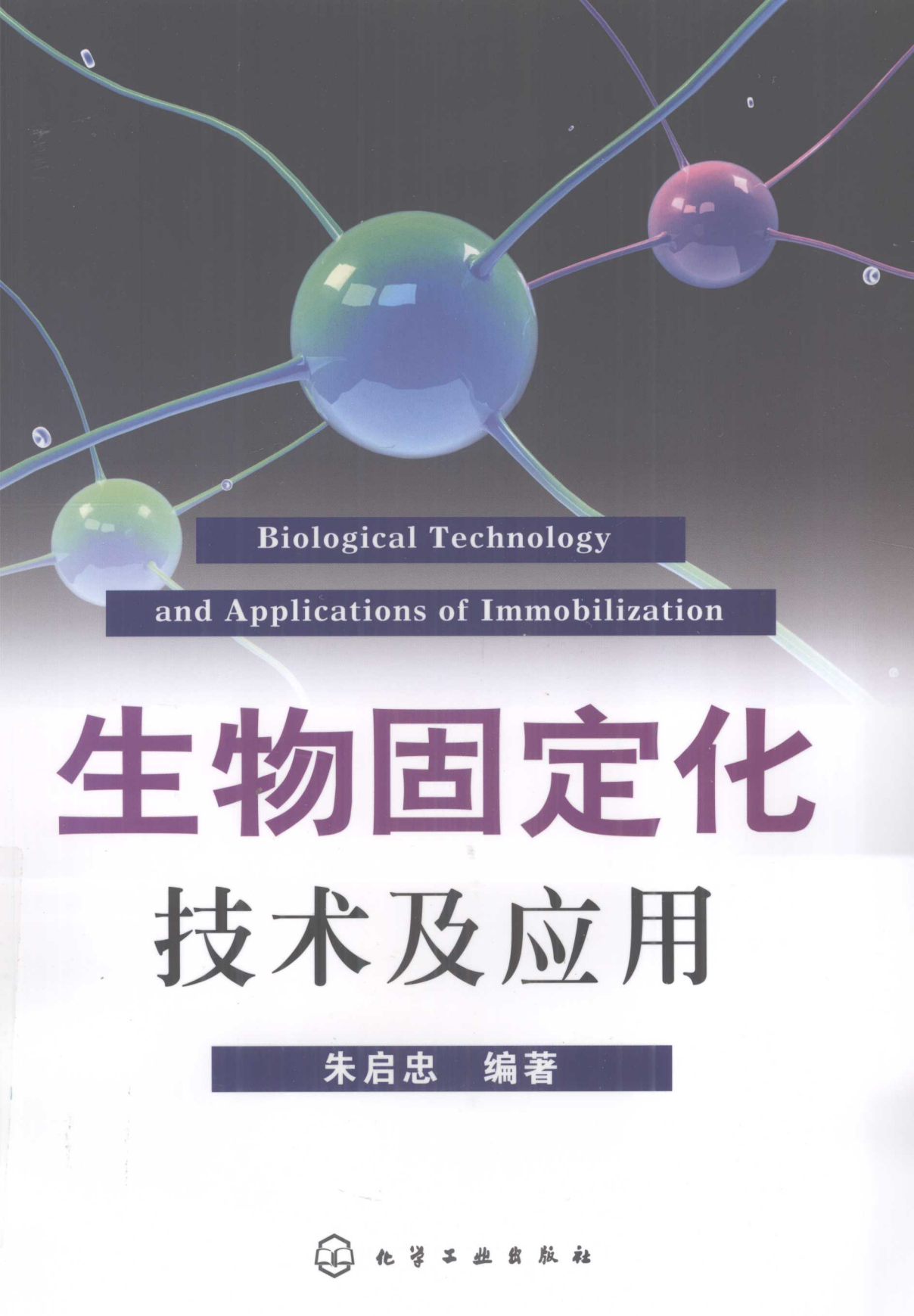




Biological Technology

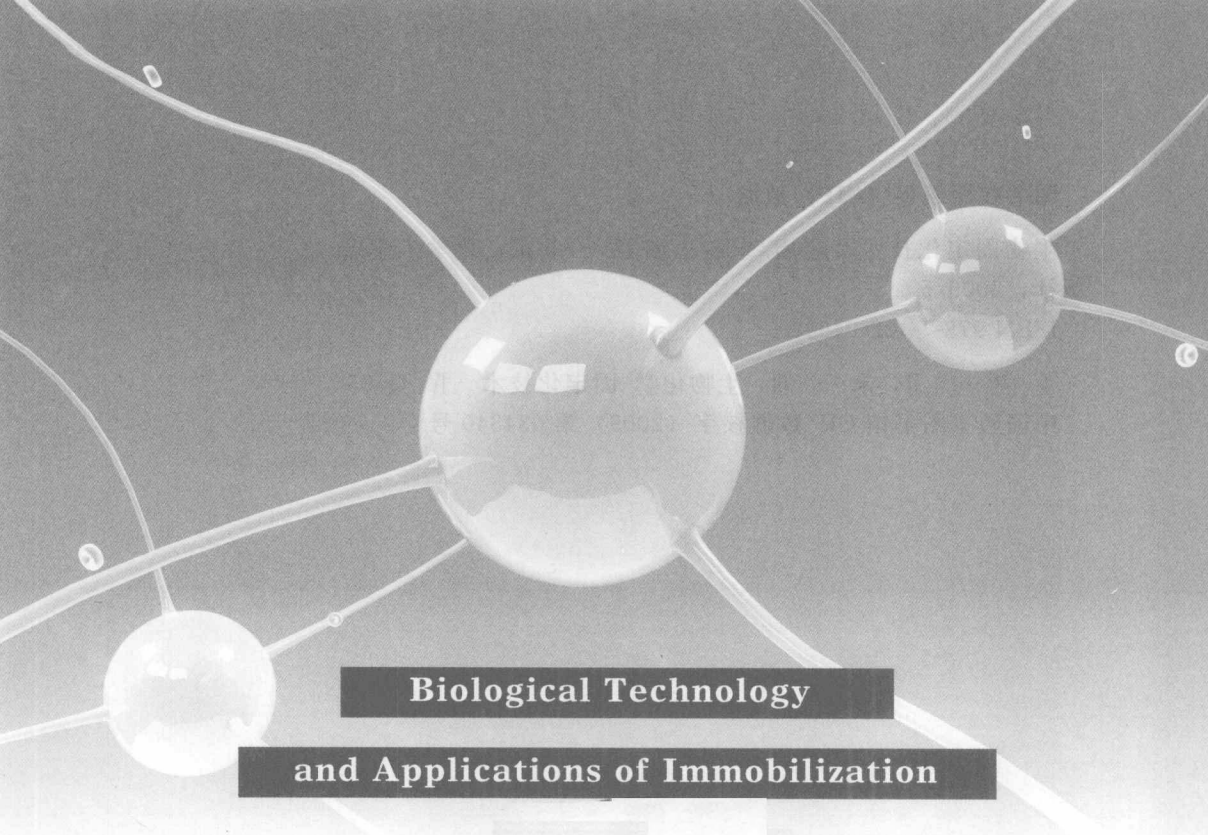
and Applications of Immobilization

生物固定化 技术及应用

朱启忠 编著



化学工业出版社



Biological Technology

and Applications of Immobilization

生物固定化 技术及应用

朱启忠 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

定价：25.00元

ISBN 7-03-01343-0

图书在版编目 (CIP) 数据

生物固定化技术及应用/朱启忠编著. —北京: 化学工业出版社, 2009. 5

ISBN 978-7-122-04999-5

I. 生… II. 朱… III. 生物化学-固定化技术 IV. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 034340 号

责任编辑: 傅四周 郎红旗

文字编辑: 张春娥

责任校对: 王素芹

装帧设计: 刘丽华

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印刷: 北京云浩印刷有限责任公司

装订: 三河市宇新装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 17 $\frac{1}{4}$ 字数 315 千字

2009 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 78.00 元

版权所有 违者必究

前 言

生物固定化技术 (immobilization of biological technology) 是现代生物工程领域中的一项新兴技术, 它是固定化酶或固定化细胞 (微生物细胞、动植物细胞等) 得到更广泛、更有效使用的一种重要手段。酶或细胞通过物理或化学方法固定化后, 其稳定性和催化性均得以改善, 使用效率大大提高, 从而降低生产成本。因此, 固定化酶和固定化细胞的研究目前如雨后春笋般迅猛发展, 其技术已由原来的单一固定化酶和固定化微生物细胞发展到固定化动植物细胞、固定化细胞器、固定化原生质体、固定化微生物分生孢子等。而其应用研究已涉及食品工业、发酵工业、化学合成工业、医药工业、医疗诊断、环境污染治理与检测以及能源开发等各个领域, 充分展示了固定化酶或固定化细胞美好的发展和应用前景。另外, 固定化酶和固定化细胞反应器及传感器的成功研制, 开辟了固定化酶和固定化细胞实际应用的新篇章。

本书包括生物固定化技术概论、酶学概论、酶的固定化原理和方法、细胞的固定化原理和方法、固定化生物反应器和传感器以及生物固定化技术的应用等六章内容。该书将酶的基本原理、酶和细胞的固定化原理和方法以及固定化生物反应器与传感器归纳在一本书中进行了详细的介绍, 同时就其应用概况也进行了较为详尽的阐述, 与国内其他同类书籍相比, 具有以下特点。

① 内容编排丰富、新颖。作者查阅整理了国内外相关的大量研究论文、著作、专利, 并加入了自己的最新研究成果, 内容涉及生物固定化技术的两大领域, 即固定化酶和固定化细胞; 并与其实际应用的生物反应器和传感器结合阐述, 形成了一个从酶 (细胞) 的制备→固定化→反应器 (传感器)→生产 (检测) 的综合技术系统, 便于学习者系统学习和运用。

② 理论与实用并重。既重视了基础理论的探讨, 又重视了技术方法的介绍, 无论是固定化方法, 还是在生产上的应用, 本书都给出了大量实际操作的实例, 并且很多固定化方法是作者在实践中应用或经过作者实验验证的, 实用性较强。

③ 应用面较广泛。本书不仅较全面地介绍了目前生物固定化技术的两大块内容, 即固定化酶和固定化细胞的理论、方法及其应用, 而且还涉及了酶的基础理论, 同时辅以大量的具体实例。因此适合于轻化工业、环境保护和检测、食品工业、医药工业、临床检测、化学分析、生化工程和能源生产等相关研究领域的科技人员及高等院校相关专业师生参考。

作者长期从事生物化学和酶工程的教学和研究工作, 对生物固定化有着浓厚的兴趣, 先后在学术期刊上发表了多篇有关固定化的文章, 并一直从事着固定化应用

方面的研究。为使更多人了解生物固定化技术，进而能使生物固定化技术得到更广泛、更深入的研究，并能更多更快地应用于实际生产中，本人借助于前人和同行的宝贵资料（这里表示深深谢意），并结合本人的研究工作经验编写了此书，供热爱于生物固定化技术的人士参考和利用。

本书的完成得到了化学工业出版社和我院领导的大力支持和帮助，我的研究生董学卫、徐国英、赵坊、吕新萍等在资料的检索与收集方面给予了大力协助，在此一并表示感谢。

限于本人学识和水平，再加上该领域的研究日新月异，所以书中定有许多不足之处，恳请同行、专家多多指正及不吝赐教。

朱启忠

：2009年5月

目 录

第一章 生物固定化技术概论	1
第一节 生物固定化技术的发展概况	1
一、生物固定化技术的产生与发展	1
二、固定化技术研究的新进展	8
第二节 酶和细胞的固定化方法分类	12
一、固定化方法分类	12
二、固定化方法比较	12
第三节 酶和细胞的固定化机理	14
第四节 固定化酶和细胞的优越性及其应用领域	14
一、固定化酶和细胞的优越性	15
二、固定化酶和细胞的应用领域	15
第五节 生物固定化技术的应用现状及展望	16
第二章 酶学概论	18
第一节 酶及作用特点	18
一、酶的起源与发展	18
二、酶的作用特点	18
第二节 酶的化学组成和结构	19
一、酶的化学本质	19
二、酶的组成和结构	20
第三节 酶的作用原理	21
一、分子过渡态和分子活化能	21
二、中间产物学说	22
三、诱导契合学说	22
四、使酶高效率的因素	23
第四节 酶反应动力学	25
一、温度的影响	25
二、pH 的影响	26
三、酶浓度的影响	27
四、底物浓度的影响	27
五、激活剂对酶反应速度的影响	31
六、抑制剂对酶反应速度的影响	31

第五节 酶分析法	34
一、酶活力测定	34
二、酶活力测定方法	39
三、酶法分析	45
第六节 酶的分离工程	46
一、酶蛋白质分离纯化的一般规律	47
二、酶溶液制备过程	48
三、酶分离纯化的基本过程	53
四、根据分子大小轻重建立的分离纯化方法	57
五、调节溶解度的分离方法	63
六、按电荷正负性设计的分离方法	65
七、根据亲和作用建立的纯化方法	72
八、酶的高效液相色谱分离法	75
第七节 酶的工业化生产实例	78
一、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的提取	78
二、超氧化物歧化酶的制备	80
三、牛凝血酶的制备	82
 第三章 酶的固定化原理和方法	84
第一节 固定化酶概述	84
一、固定化酶的概念	84
二、固定化酶的优缺点	85
第二节 固定化酶的制备原则	85
第三节 酶的固定化方法	86
一、吸附法	86
二、共价法	89
三、交联法	95
四、包埋法	98
五、新的固定方法	103
六、各种常规固定化酶方法的优缺点比较	106
第四节 固定化酶的性质和评价指标	106
一、固定化酶的性质	106
二、固定化对酶反应系统的影响	111
三、固定化酶的评价指标	112
第五节 影响固定化酶性质的因素	114
一、质量传递效应	115

二、支持物产生的（静态的）和反应产生的（动态的）质子梯度	116
三、固定化酶的稳定性和产率	118
第六节 辅酶的固定化	119
一、辅酶的定义及分类	119
二、辅酶的固定化方法	120
三、辅酶的再生	121
第四章 细胞的固定化原理和方法	123
第一节 概述	123
一、固定化细胞的分类	124
二、固定化细胞的形态特征	124
三、固定化细胞的生理状态	125
四、固定化细胞的酶学性质	128
第二节 固定化微生物细胞载体的选择及制备方法	129
一、固定化细胞载体的选择及固定化机理	130
二、固定化细胞常用载体	132
三、固定化微生物细胞的制备方法	137
第三节 动植物细胞的固定化	153
一、植物细胞的固定化	153
二、动物细胞的固定化	156
第四节 固定化细胞的性质和评价指标	157
一、目的产物的产量	157
二、克隆基因产物的表达	157
三、质粒的遗传稳定性	157
四、培养条件对质粒稳定性、菌体量、克隆基因产物的影响	158
第五节 影响固定化细胞性能的因素	159
一、影响载体物理和化学性能的因素	159
二、细胞生理	162
第五章 固定化生物反应器和传感器	164
第一节 固定化生物反应器	164
一、生物反应器概述	164
二、固定化生物反应器的类型及特点	166
三、固定化生物反应器类型的选择	174
四、固定化酶反应器的操作	176
五、固定化生物反应器开发的趋势与未来发展的方向	178

第二节 生物传感器	178
一、生物传感器的基本原理和分类	179
二、生物传感器的特点	181
三、生物传感器的制备和性能	182
四、常见传感器特性介绍	185
五、生物传感器的应用与发展方向	194
第六章 生物固定化技术的应用	198
第一节 固定化生物技术在轻化工业中的应用	198
一、应用范围简介	199
二、应用概况	202
三、实例	226
第二节 固定化酶和细胞在医药与临床诊断方面的应用	230
一、应用范围简介	230
二、应用概况	231
三、实例	238
第三节 固定化技术在环境保护和能源开发方面的应用	239
一、应用范围简介	239
二、应用概况	240
三、实例	245
第四节 固定化技术在食品工业中的应用	250
一、应用范围简介	250
二、应用概况	252
三、实例	255
第五节 固定化酶和细胞在生物反应器及传感器方面的应用	258
一、在反应器方面的应用	258
二、在传感器方面的应用	263
第六节 固定化植物细胞的应用	264
一、固定化植物细胞的优点和用途	264
二、固定化植物细胞的应用概况	264
三、用于固定化植物细胞的生物反应器	267
参考文献	268

第一章

生物固定化技术概论

第一节 生物固定化技术的发展概况

一、生物固定化技术的产生与发展

1. 生物固定化技术的产生背景

生物固定化技术 (immobilized biotechnology) 是从 20 世纪 60 年代开始迅速发展起来的一项新技术, 它是通过化学或物理的手段将游离细胞或酶定位于限定的空间区域内, 使其保持活性并可反复利用。70 年代以后, 固定化微生物技术直接从固定化酶技术发展而来, 固定化微生物技术具有微生物密度高、反应迅速、微生物流失少、产物易分离以及反应过程易控制等优点, 是一种高效低耗、运转管理容易和具有应用前途的新技术。

早期的固定化是以 Nelson 和 Griffin (1916) 的蔗糖酶吸附于骨碳微粒为开端的, 随后, 人们为了更有效地利用酶, 积极进行了各种固定化方法的研究。例如, 1956 年 Mita 利用离子键合法将过氧化氢酶固定在 DEAE-纤维素上; 1958 年, Grubborfer 和 Schleith 利用重氮共价结合法将不同的酶固定在聚氨基苯乙烯树脂上; 1963 年, Bernfeld 和 Wan 利用聚丙烯酰胺包埋法固定了很多酶; Quioco 和 Richards 利用戊二醛作交联剂固定了羧肽酶 (1964); 1969 年千佃一郎用固定化氨基酰化酶拆分 DL-氨基酸, 并投入工业生产中, 由此开创了将固定化酶技术应用于工业生产中。

我国科研工作者从事固定化酶的研究开始于 1970 年。中科院上海生物化学研究所及微生物研究所相继把染料工业中使用的双功能试剂对 β -硫酸酯乙砷基苯胺 (SESA) 引入固定化酶领域, 它与多糖如甘蔗渣纤维、交联琼脂、葡聚糖凝胶等反应, 得到了各种带有苯氨基的载体, 然后在十分温和的条件下与酶共价偶联。1972 年, 中科院上海生物化学研究所 (现为中科院上海生物化学

与细胞生物化学研究所)用这类载体 ABSE (对氨基苯磺酰乙基)-葡聚糖凝胶共价结合红酵母的 3'-核糖核酸酶生产 3'-核苷酸试剂。1973 年,中科院微生物研究所成功地将黑曲霉葡萄糖淀粉酶吸附到 DEAE-SephadexA 50 上,随后,应用 SESA 与甘蔗渣纤维进行醚化反应得到 ABSE-纤维素,通过载体苯氨基重氮化偶联葡萄糖淀粉酶。此外,我国科研工作者还用这类载体共价结合了多种酶,这些固定化酶都得到了满意的结果,从而将该方法发展成为颇具我国特点的固定化方法。1977 年底,中科院上海生物化学研究所与江门甘蔗化工厂、上海啤酒厂协作将固定化 5'-磷酸二酯酶用于 5'-核苷酸的生产中,这使世界上应用于工业中的固定化酶又增添了新的一员。中国科学院微生物研究所使用固定化多核苷酸磷酸化酶稳定地制备多聚核苷酸,已在 1978 年下半年进行了鉴定。

在随后的几十年中,固定化酶和固定化微生物细胞技术得到了迅速发展和广泛应用。现在此项技术已由原来的单一固定化酶、固定化微生物细胞发展到动植物细胞、组织器官、微生物孢子以及细胞与酶、好氧微生物细胞与厌氧微生物的混合固定化等。

固定化酶、固定化微生物细胞、固定化动植物细胞、生物传感器以及生物反应器研究的迅速发展,形成了一个范围广泛的固定化生物催化剂研究领域。20 世纪 80 年代初,国内外开始应用固定化生物技术来处理工业废水和分解难以被生物降解的有机污染物,取得了阶段性进展。近年来,固定化生物技术一直是轻化工业、食品工业、医药卫生、环境保护及水处理领域的研究热点,并充分显示了其美好前景。

2. 生物固定化技术的发展

(1) 生物固定化技术的传统方法 生物固定化技术的传统方法大致有吸附法、共价结合(偶联)法、交联法和包埋法四大类。

① 吸附法。吸附法是依据带电的酶或微生物细胞与载体之间的静电作用,使酶和微生物细胞固定的方法,可分为物理吸附法和离子吸附法两种。前者使用具有高吸附能力的硅胶、活性炭、多孔玻璃、石英砂和纤维素等吸附剂将酶和细胞吸附到表面上使之固定化。这是一种最古老的方法,操作简单,反应条件温和,载体可以反复利用,但结合不牢固,细胞易脱落。后者是根据细胞在解离状态下可因静电引力(即离子键合作用)而固着于带有相反电荷的离子交换剂上。

② 共价结合法。共价结合(偶联)法是基于细胞或酶表面上的功能团与固相支持物表面的反应基团之间形成共价连接,从而成为固定化细胞或酶。该法的特点是:细胞或酶与载体之间的连接键很牢固,使用过程中不会发生脱落,稳定性良好,但反应剧烈、操作复杂、控制条件苛刻。

③ 交联固定法。交联固定法是利用双功能或多功能试剂直接与细胞或酶表面的反应基团发生反应，使其彼此交联形成网状结构的固定化细胞或酶。由于交联固定法化学反应比较激烈，固定化微生物和酶的活力在多数情况下较脆弱。另外，这种方法所用的交联剂价格较贵，因而限制了该方法的广泛应用。

④ 包埋固定法。包埋固定法是将微生物细胞或酶用物理的方法包埋在各种载体之中。这种方法既操作简单又不会明显影响生物活性，是一种比较理想的方法，目前应用最多，特别是在固定化细胞中应用较多。但在该方法中，使用的包埋材料（即载体）往往会在一定程度上阻碍底物和氧的扩散，影响作用效果。对于包埋法，理想的固定化载体应是：对微生物细胞或酶无毒性；传质性能好，性质稳定，不易被生物分解；强度高、寿命长；以及价格低廉等。

在各传统方法中，除了单独使用外，目前应用较多的是两种方法结合运用，如吸附-交联、包埋-交联等。

(2) 固定化技术研究中的最新方法 随着天然酶的开发和工程菌的改造，传统固定化方法不断被应用到新酶的固定化研究中，同时酶固定化技术也不断取得进展，一些新技术如磁性技术、分子沉淀技术及辐射技术等不断运用于固定化酶载体的制备中。传统固定化技术的研究目前虽然已经非常深入，但在方法的运用中不同程度地存在着这样或那样的缺点，所以新技术的研究与开发一直是固定化技术的重要任务，人们在此方面也做了大量的工作，主要进行的系统研究归纳如下。

① 溶胶-凝胶固定化。溶胶-凝胶固定化是将酶或细胞包埋于多孔的光学通透性凝胶中。该固定化过程条件温和，被包埋于溶胶-凝胶体系中的酶或细胞可继续保持其原有的结构、活性和功能，底物也可以通过体系中的孔道与酶接触反应；该体系的孔径大小具有一定的可控性，进一步提高了生物反应的选择性。酶在经溶胶-凝胶法包埋后，其四级结构几乎不发生改变，催化效率几乎和溶液中的相同；用此方法包埋细胞，可不损伤其组织活性，如 Carturan 将酿酒酵母包埋于溶胶-凝胶中，其生物活性可维持一年。Youichi Kurokawa 等用溶胶-凝胶法制备的固定化 β -半乳糖苷酶在含有高浓度 K^+ 、 Mg^{2+} 的溶液和磷酸盐缓冲液中无任何变化；在装柱后进行的连续反应过程中无挤压现象发生。M. T. Reetz 等利用此技术制成的含有脂肪酶的固定化酶在催化酯化反应的过程中，其相对活力是传统有机相反应的 5~80 倍。

② 膜固定化。膜作为固定化载体得到了越来越多的应用，现已被证实具有克服传统技术中存在的严重的限制传质的能力。近年来的研究表明，固定化酶膜具有很好的应用前景。W. C. Lee 等开发了一种成本低廉、操作简单、条件温和、无内扩散影响且具有良好生物相容性载体的生物催化剂的膜固定化方

法,为膜固定化技术的发展提供了很好的参考。对乳液膜技术的研究表明,乳液膜技术除具有其他酶固定化技术的优点外,其在消除产物及底物抑制方面也是其他方法所无法比拟的;还由于物质在液体中的扩散速度比其在固体中的扩散速度快得多,故可以根据需要在膜相中添加载体以促进底物的传递,从而有利于反应速度的提高。然而,稳定性问题成为影响乳液膜技术工业化应用的主要障碍。另外,由于乳液膜的最适条件往往与酶促反应的最适条件不符,将乳液膜用于反应的偶合分离时,往往会对乳液膜系统造成很多不利的影响,并且内水相的物质积累也会给膜的稳定性带来一定的影响。

③ 超微载体固定化。微载体的概念最早由 Van Wezel 提出。多孔微载体的内部网状结构使细胞免受(或降低)外界环境改变所带来的影响,但这种多孔结构亦使反应过程中依然存在很强的传质阻力。采用无孔微载体虽消除了内扩散的影响,但也会使酶的比活率下降。Bailey、Arica 等在对微载体材料研究的基础上提出的超微载体材料的出现则解决了上述问题。这种载体材料尺寸更小(直径为几百纳米),没有生物分子能够进入的孔隙和通道,生物分子只能固定在载体表面,因此消除了由于孔隙存在所造成的内扩散影响;由于吸附表面积大,使生物分子极易吸附固定于载体表面,因此可以获得具有很高比活性且稳定的固定化酶。Joon-Taek Oh 等采用无孔聚苯乙烯/聚苯乙烯磺酸钠微球(直径为 280nm)作为固定化载体,成功地固定了淀粉葡萄糖苷酶,所得的固定化酶不仅消除了内扩散的影响,而且具有很高的比活性。

④ 无载体固定化。人们早已发现,某些微生物细胞具有自絮凝(self-flocculating)形成颗粒的能力,利用这种细胞自絮凝形成的颗粒作为一种固定化细胞的方法,是固定化细胞技术中全新的概念。与各种载体固定化细胞技术相比,无载体固定化细胞技术具有非常突出的优点,主要体现在:a. 细胞的固定化方法非常简单,一般在摇瓶培养阶段就可以快速形成絮凝颗粒,培养液澄清透明,而后絮凝细胞颗粒可以在生物反应器中逐级扩大培养,不产生细胞固定化过程的附加成本。b. 不使用细胞生长和代谢产物生物合成所需营养物质以外的其他任何化学物质,细胞的生理和生态环境不受外来物质的干扰和影响,有利于目标代谢产物的顺利合成。c. 自絮凝细胞颗粒内部结构呈松散型,传质阻力很小,而且其颗粒内部表面不断自我更新,颗粒整体活性非常好。d. 在生物反应器中一定的生理、生态、物理、化学和流体力学条件下,小颗粒的絮凝和大颗粒的解离可以呈动态平衡,不存在载体固定化细胞的强度问题。在自絮凝细胞颗粒形成过程中,还可以形成适宜的微生态环境,使之有利于各细胞代谢过程之间的协调。

絮凝剂产生菌一般有两个来源:一是从天然菌株中筛选出具有良好絮凝特

性的菌株并进行诱变处理；另一种方法是利用原生质体融合技术，将絮凝剂产生菌中的产絮凝剂基因导入所需的工业菌株中去。无载体细胞固定化技术所具有的众多优点显示了该工艺在传统发酵工业如酒精发酵、味精发酵、有机酸发酵、环境工程如污水处理等领域均具有广阔的应用前景，同时在现代生物工程领域如动植物细胞培养生产次级代谢产物的过程中也具有应用价值。

⑤ 亲和配基固定化。此方法是利用生物分子与其配基之间具有特异性吸附的特点，可以解决传统化学固定化方法中存在的问题。配基与生物分子之间的亲和吸附牢固，结合位置单一，对酶分子来说是理想的固定化结合位点。Xiao Lin Huang 等以抗生物素蛋白结合的多孔玻璃作为固定化载体，将谷氨酰胺转移酶生物素酰化后与之结合达到固定化的目的。在 Srivatsa V. Rao 等的研究中，该方法得到了进一步的发展，实现了酶的多层固定化。配基的结合位点通常位于大分子内部或大分子表面的裂隙深处，如果配基固定时是直接贴附于载体表面，则由于空间位阻而导致亲和力下降甚至丧失。因此，在配基与载体之间接入适当长度的“手臂”，也称为连接臂，就能解决这一问题。Shing-Yi Suen 等研究了固定化溶菌酶时使用的最佳“手臂”长度，结果表明使用 1,10-二氨基癸烷作为“手臂”时，配基的吸附能力最强，利用效率最高。

⑥ 絮凝吸附固定化。La Mer 等在早期的理论研究中提出了比较完善的高分子聚合物絮凝机理。与其他固定化方法相比，该方法条件温和，絮凝体系中通常没有使生物物质失活的化学物质存在，不会有传统固定化过程中存在的酶活力损失问题。酶（细胞）分子之间通过絮凝剂分子“架桥”连接，絮凝剂在固定化过程中起“骨架”作用，酶分子处在固定化颗粒外侧，在反应中可直接与底物接触，消除了内扩散的影响。絮凝形成的“架桥”结构既可以保证固定化生物催化剂整体结构的稳定性，又可以保证生物催化剂个体具有一定的自由度，有利于保持生物活性。以上这些优点使得该固定化方法在生物催化转化领域具有良好的应用前景。Long Margarete 成功地采用絮凝法对含有葡萄糖异构酶的菌株进行固定化，并申请了专利，我国目前在应用絮凝剂对生物催化剂进行固定化研究方面的报道甚少。

⑦ 组合固定化技术（偶合固定化技术）。固定化技术组合应用具有十分广泛的意义，其目的是为了克服单一固定化技术本身所固有的缺点，如采用吸附-交联固定化方法，既提高了固定化酶的酶活力保留率，又增加了固定化酶的稳定性。将固定化技术与其他技术如反应器技术组合应用，使组合体系不仅可以克服固定化技术单独使用时所表现出来的缺点，而且使组合体系拥有全新的特点。例如将絮凝固定化技术与膜生物反应器技术组合应用，使得在该体系中，不仅两种技术的优点均得以发挥，而且由于生物催化剂（尤其是小分子

酶)固定化后的体积增大,这样即使增大了膜的选择范围,仍可以使生物催化剂得到有效截留,进而使得生物催化剂在得到截留的同时还可以提高底物和产物(尤其是大分子底物和产物)的透膜传输速率。由此可以看出,组合固定化技术具有实际应用价值,可对固定化技术的研究产生很大的影响。

(3)载体的改型与新型载体的研究 随着生物固定化技术的发展,固定化酶和固定化细胞新型载体的研究越来越重要。新型载体的研制异常活跃,如纤维素、淀粉、黄原胶、几丁质、海藻酸盐、壳聚糖、虾青素、琼脂糖、戊二醛、血纤维原、磁性高分子聚合物、离子交换树脂、水合氧化钛和膜等广泛应用于各种酶或细胞的固定,并对其进行改性以适应不同对象的需求。如酶在生物医学和手性化合物的合成中得到广泛应用,但这两方面的应用对酶的定向性有很高的标准,一般载体固定酶很难达到使用标准,科研人员通过研究,以磁性高分子微球为载体来固定酶,从而为酶在这些方面的应用奠定了基础。

磁性高分子微球是指内部因含有磁性金属或金属氧化物(如铁、钴、镍及其氧化物)的超细粉末,从而具有磁响应性的高分子微球。用其作固定化酶载体有以下优点:①固定化酶从反应体系中分离和回收简便,对于双酶体系,当一种酶失活时,可以用磁性材料再固载另一种酶,回收后反复使用。②磁性载体固定化酶放入磁场稳定的流动床反应器中,可以减少反应体系中的操作,适合大规模连续化生产。③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,提高固定化酶的催化效率。主要合成方法是利用天然高分子材料包埋磁性微粒,或在磁流体存在下进行聚合反应,均可得到纳米级的磁性微球。

另外在以下方面对载体进行了研究。

①天然高分子载体的研究。壳聚糖(chitosan)是甲壳素的脱乙酰化产物,是一种氨基多糖。由于壳聚糖具有良好的机械性能以及稳定的化学性质,同时又易于接枝而改性,再加上其来源丰富、成本低廉、制备简单,已成为开发固定化酶载体材料的重要原料。利用壳聚糖上的氨基与戊二醛发生Schiff反应,再与酶形成Schiff碱而固定化酶。以甲壳胺与羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸的两种氢键复合物为载体固定葡萄糖氧化酶(GOD)和纤维素酶,并用透射电镜观察其结构,整个复合物固定化酶分子呈纤维状,且微结构中有供酶存在的空间。最近,在室温下采用溶胶-凝胶法聚合制得了壳聚糖-SiO₂混合物,用于固定葡萄糖氧化酶,在pH5.6时,酶活力最高,为1585U/g。30℃下保存10d后,酶活力仍保持86%,而游离酶在同样条件下5d已失活。Ehab Taqieddin等报道了生物相容性的硅藻盐和壳聚糖核壳型复合载体,将 β -半乳糖苷酶固定在硅藻盐上,催化对硝基苯酚的合成,壳聚糖壳起着滤网的作用,限制着底物

和产物的进出。此外,其他类天然高分子经改性也可用作固定化酶的载体。

② 合成高分子类载体的研究

a. 聚碳酸乙烯酯 (PVCA) 载体的研究。自 Chen 等将聚碳酸乙烯酯 (PVCA) 用双端氨基环醚和乙醇胺进行交联制备酶载体后,聚碳酸乙烯酯 (PVCA) 载体也得到了较好的研究。黄家贤工作组先合成具有良好生物组织相容性、不易降解且易于由肾脏排出的 α, ω -双端氨基聚乙醇 ($\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{NH}_2$), 将其与 PVCA 进行交联反应, 得亲水性显著改善的球状载体, 载体再与胰蛋白酶进行偶联反应制备了固定化胰蛋白酶, 当 (PVCA)/($\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{NH}_2$) 为 0.5 时, 酶蛋白的比活及其与载体的结合量均到达最高值。

b. 甲基丙烯酸类载体的研究。通过自由基沉淀聚合反应合成甲基丙烯酸-丙烯酰胺-顺丁烯二元酸酐三元共聚物, 利用共聚物上的酸酐基团直接进行木瓜蛋白酶的固定化。这种固定化酶可通过调节体系的 pH 值来改变其沉淀-溶解状态。研究表明, 共聚物组成不同, 转变的临界 pH 值也不同 ($\text{pH}=2\sim4$), 这样就得到具有游离酶和固定酶两者优点的新型固定化酶制剂。利用甲基丙烯酸缩水甘油酯- N, N' -亚甲基双丙烯酰胺共聚物载体固定青霉素酰化酶, 可得到高活性的生物催化剂。Tahsin Bahar 等报道了用悬浮聚合法合成聚甲基丙烯酸羟丙酯/甲基丙烯酸水凝胶颗粒, 以此为载体共价固定 α -胰凝乳蛋白酶。最优条件下固定化酶与游离酶相比, 热稳定性显著提高, 且 K_m 常数是游离酶的 2 倍多。用悬浮聚合法合成聚乙烯二甲基丙烯酸乙二醇酯/二乙氧基甲基丙烯酸酯 P (EGDMA/HEMA) 非多孔微球, 以此为载体固定尿素酶。选用含有活性环氧基团的甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) 和亲水的 N -乙烯吡咯烷酮 (NVP) 两种单体, 以 N, N' -亚甲基双丙烯酰胺 (MBAA) 为交联剂, 通过反相悬浮聚合合成了亲水性大孔 GMA-NVP-MBAA 三元聚合物载体 (GNM)。将巨大芽孢杆菌青霉素酰化酶共价偶联在平均孔径为 16.5nm 的 GNM 载体上, 制成固定化酰化酶, 其表观活性高达 625U/g。该固定化酶在 4℃ 可保存 40d, 且可多次使用。

③ 其他共聚物高分子载体的研究。根据水溶性大分子间可通过次级键合力如氢键、静电力和疏水相互作用等形成水不溶性大分子复合物沉淀的性质, 研究了利用这种大分子复合物作为酶的载体, 得到沉淀-溶解性可调节的固定化酶载体。如在二乙烯基苯交联下, 丙烯酸胺 (AM)、丙烯腈 (AN) 的摩尔比为 1:3 时, 在 65℃ 经悬浮聚合 24h 所得三元共聚物, 以其为载体对牛血清白蛋白有最大结合量 209.3mg/g (干)。通过其他的方法也可以得到不同的载体材料, 如以 AOT [二 (2-乙基己基) 琥珀酸酯磺酸钠] / 正庚烷/水/明胶组成的反相微乳凝胶可作为脂肪酶的固定化载体。在室温下, 固定化脂肪酶催化棕榈酸和十六醇的酯化反应, 固定化脂肪酶可重复使用 16 次, 平衡转化率仍可

达 90%。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。该聚合物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。以 *N*-异丙基丙烯酰胺等合成了温敏型载体聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (NIP) 及其衍生物,采用该类载体代替传统载体,可在 37℃ 的生理温度下进行反应,进一步提高了免疫分析反应的速度和效率。

④ 无机载体的研究。无机硅藻土或多孔玻璃比有机载体更耐微生物降解,具有更高的热稳定性以及更低的价格,因此也受到了固定化酶工作者的重视。通过烷基胺与对甲基苯甲酸反应,直接生成芳胺的衍生物,该过程比常用方法缩短了一步。然后用重氮化法固定木瓜蛋白酶,酶量为 240mg/g 载体。用这种方法合成的载体固定化酶,其热稳定性、操作稳定性及产率都比较理想。在温和条件下,将氯化过氧化酶共价固定在功能化硅胶上,制成了氯化生物催化剂,该酶催化剂与游离酶相比,表现出良好的催化性,且固定化酶的稳定性不受 pH 值和氧化剂浓度的影响。以共价法将 α -淀粉酶固定在粒径为 0.5~10 μ m 的硅胶颗粒上,在低于淀粉凝胶化温度下水解 24h,可使浓度为 100mg/mL 的淀粉溶液 90% 地发生水解。值得一提的是,有文献报道将柠檬酸裂解酶等固定在传质交互式媒介单片载体上,为固定化酶载体的研制开发提供了新的思路。

⑤ 新型载体。设计新型载体和运用当代高新技术,并将二者有机结合起来,是固定化酶研究的最新动向。科研人员发现,导电聚合物作为酶固定化载体时可用于酶电极类生物传感器的制备,当光敏性单体聚合物包埋固定化酶或带光敏性基团的载体共价固定化酶时,条件温和,可获得酶活力较高的固定化酶。*N*-异丙基丙烯酰胺及其衍生物共聚可得到温敏型水凝胶载体,用于固定嗜热菌蛋白酶时可实现均相催化和异相分离的统一。

二、固定化技术研究的新进展

前已叙及,近 30 多年来,固定化技术发展非常迅速,它已由原来的单一固定化酶、固定化微生物细胞发展到固定动植物细胞、组织器官、微生物孢子、细胞和酶,以及好氧微生物与厌氧微生物的混合固定化等。其应用已涉及发酵食品、化工、分析、医疗、生化、环境净化等各个领域,展示了广阔的发展前景,并且人们在固定化技术的各个方面也进行了更为深入的探讨。

1. 改善固定化颗粒的成型

聚丙烯酰胺、聚乙烯醇 (PVA)、光聚合树脂等作为固定化载体具有机械强度好、抗微生物分解、经久耐用等优点,但都存在成型难或成型不易控制等问题。经研究,在其固定化过程中引入少量多糖类物质则能很好地解决这一问题。角野立夫采用添加海藻酸盐,解决了聚丙烯酰胺凝胶包埋过程中成球难的