

# 固定化酶微反应器

——制备与应用

◎申刚义 / 编著



中央民族大学出版社  
China Minzu University Press

# 固定化酶微反应器

——制备与应用

◎ 申刚义 / 编著

Immobilized Enzyme Micro-Reactor  
*Preparation and Application*



中央民族大学出版社  
China Minzu University Press

## 图书在版编目(CIP)数据

固定化酶微反应器——制备与应用/申刚义编著. —北京:  
中央民族大学出版社, 2018.5 (重印)

ISBN 978 - 7 - 5660 - 0820 - 6

I. ①固… II. ①申… III. ①固定化酶—反应器—研究  
IV. ①Q814.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 214068 号

## 固定化酶微反应器——制备与应用

---

编 著 申刚义

责任编辑 李 飞

封面设计 布拉格

出 版 者 中央民族大学出版社

北京市海淀区中关村南大街 27 号 邮编:100081

电话:68472815(发行部) 传真:68932751(发行部)

传真:68932218(总编室) 68932447(办公室)

发 行 者 全国各地新华书店

印 刷 者 北京建宏印刷有限公司

开 本 787 × 1092(毫米) 1/16 印张:10

字 数 200 千字

版 次 2018 年 5 月第 2 次印刷

书 号 ISBN 978 - 7 - 5660 - 0820 - 6

定 价 40.00 元

---

版权所有 翻印必究

教育部

“长江学者和创新团队发展计划”

资助出版

(IRT\_13R63)

(Supported by Program for Changjiang Scholars and Innovative  
Research Team in University PCSIRT)

# 目 录

第1章 绪论	1
1.1 固定化酶	1
1.1.1 酶	1
1.1.2 固定化酶	2
1.2 固定化酶微反应器	4
1.2.1 固定化酶反应器	4
1.2.2 固定化酶微反应器	5
1.3 固定化酶微反应器酶的类型	6
1.4 固定化酶微反应器的分类	6
1.4.1 酶膜微反应器	7
1.4.2 柱酶微反应器	7
1.4.3 微流控芯片酶反应器	8
1.5 固定化酶微反应器性能评价	10
1.5.1 催化性能	10
1.5.2 稳定性	11
1.5.3 再生性	11
参考文献	12
第2章 固定化酶微反应器载体	14
2.1 概述	14
2.2 无机材料	15
2.2.1 硅材料	15
2.2.2 碳材料	21
2.2.3 金属材料	24
2.2.4 其他无机材料	26

2.3 有机材料 .....	27
2.3.1 天然有机材料 .....	27
2.3.2 高分子聚合物材料 .....	28
2.4 复合材料 .....	31
2.4.1 混合掺杂基质的石墨烯复合材料 .....	31
2.4.2 杂化整体柱材料 .....	32
参考文献 .....	34
<b>第3章 基于物理吸附法的固定化酶微反应器 .....</b>	<b>39</b>
3.1 概述 .....	39
3.2 单层吸附的固定化酶微反应器 .....	39
3.2.1 毛细管酶微反应器 .....	40
3.2.2 微流控芯片酶反应器 .....	41
3.3 层层组装的固定化酶微反应器 .....	43
3.3.1 层层组装法简介 .....	43
3.3.2 毛细管酶微反应器 .....	45
3.3.3 微流控芯片酶反应器 .....	47
参考文献 .....	51
<b>第4章 基于共价键合法的固定化酶微反应器 .....</b>	<b>52</b>
4.1 概述 .....	52
4.1.1 酶的功能基团 .....	52
4.1.2 载体的功能基团 .....	52
4.1.3 功能连接臂 .....	53
4.1.4 键合方法 .....	53
4.1.5 反应条件的选择 .....	54
4.2 基于希夫碱的固定化酶微反应器 .....	54
4.2.1 填充柱酶微反应器 .....	55
4.2.2 毛细管酶微反应器 .....	55
4.2.3 整体柱酶微反应器 .....	55
4.2.4 芯片酶反应器 .....	58
4.3 基于酰胺键的固定化酶微反应器 .....	60
4.3.1 毛细管酶微反应器 .....	60
4.3.2 微流控芯片酶反应器 .....	62
4.3.3 磁性载体酶微反应器 .....	63

4.4	基于碳氮键的固定化酶微反应器	65
4.5	基于点击化学的固定化酶微反应器	67
4.5.1	点击化学简介	67
4.5.2	整体柱酶微反应器	68
4.6	其他类型的固定化酶微反应器	71
	参考文献	72
<b>第5章</b>	<b>基于络合法的固定化酶微反应器</b>	<b>74</b>
5.1	概述	74
5.2	配位络合法特点	74
5.3	常见的固定化酶微反应器	75
5.3.1	酶膜反应器	75
5.3.2	毛细管酶微反应器	75
5.3.3	整体柱酶微反应器	79
5.3.4	微流控芯片酶反应器	81
5.4	基于金属螯合法酶的定向固定	84
5.4.1	金属螯合法简介	85
5.4.2	融合蛋白	86
5.4.3	酶的定向固定	87
	参考文献	91
<b>第6章</b>	<b>基于生物亲和法的固定化酶微反应器</b>	<b>93</b>
6.1	概述	93
6.2	抗原-抗体相互作用的酶固定法	93
6.3	生物素-亲和素系统的酶固定法	95
6.3.1	生物素-亲和素系统简介	95
6.3.2	毛细管酶微反应器	96
6.3.3	微流控芯片酶反应器	97
6.3.4	酶图案化芯片反应器	98
6.4	DNA杂交的酶固定法	98
6.4.1	DNA杂交酶固定简介	98
6.4.2	毛细管酶微反应器	99
6.4.3	酶微阵列芯片反应器	101
6.5	其他方法	102
6.5.1	BAS联合DNA杂交的酶固定法	102

6.5.2	基于酶催化的酶固定法	102
6.5.3	基于内含肽介导自我剪切反应的酶固定法	104
6.6	含特殊亲和位点酶固定法	104
6.6.1	糖蛋白酶固定法	104
6.6.2	磷酸化蛋白酶固定法	109
	参考文献	113
<b>第7章</b>	<b>基于包埋法的固定化酶微反应器</b>	<b>116</b>
7.1	概述	116
7.2	硅胶凝胶包埋的固定化酶微反应器	116
7.2.1	溶胶-凝胶法简介	116
7.2.2	整体柱酶微反应器	118
7.2.3	微流控芯片酶反应器	119
7.3	氧化铝凝胶包埋的固定化酶微反应器	123
7.3.1	芯片酶反应器	123
7.4	水凝胶包埋的固定化酶微反应器	124
7.4.1	酶微阵列芯片反应器	124
7.5	介孔材料包埋的固定化酶微反应器	126
	参考文献	129
<b>第8章</b>	<b>固定化酶微反应器的应用</b>	<b>131</b>
8.1	概述	131
8.2	在蛋白质组学中的应用	131
8.3	在药物筛选中的应用	138
8.4	在生物转化中的应用	142
8.5	在生物传感检测中的应用	143
8.6	在新能源开发中的应用	144
8.7	在生物性能评价中的应用	145
	参考文献	146
<b>第9章</b>	<b>展望</b>	<b>150</b>



# 第 1 章 绪 论

## 1.1 固定化酶

### 1.1.1 酶

酶是一类具有生物催化功能的蛋白质分子，生物体的每个运动瞬间和进程都离不开它。一旦体内的酶受到影响和破坏，将会随即产生一系列非正常性生理反应。轻则引起各种疾病，重则导致死亡。可以毫不夸张地说，没有酶就没有生命运动的存在；失去了酶，也就失去了整个活体世界。因此，深入开展酶的研究对于阐明生命本质具有重要的科学意义和现实意义。

酶研究主要包括两个方向：基础理论研究和应用研究。基础理论研究涉及酶结构、催化功能等理化性质的研究。应用研究即酶工程研究，侧重于借助酶的催化功能进行开发和应用研究。

酶相关的基础理论在众多文献里已有详细介绍<sup>[1-4]</sup>，不再赘述。这里主要谈及它的应用研究。

人类对酶的应用在几千年前就有记载。据文献显示，早在 4000 年以前的古代中国就利用酵母来发酵酿酒，3000 年以前已开始利用含淀粉酶的麦曲将淀粉酶解为麦芽糖来制备饴糖<sup>[5]</sup>。真正对酶进行现代科学意义上的应用研究则始于 19 世纪工业革命时期。比较典型的事例是 1808 年罗门利用胰酶制备皮革，1917 年法国人利用枯草菌产生的淀粉酶作为纺织工业上的褪浆剂<sup>[5]</sup>。这些探索与实践大大推动了酶的应用研究。

酶作为一种生物活性催化剂，如何在应用过程中实现其催化效率最优化和使用效率的最大化始终是研究者所关注的核心。

游离酶，也称自由溶液酶，是一种均相酶体系，也是酶应用中最常见的一种存在形式。虽然其可以发挥酶的生物催化性能，但它与反应体系互为一相。后续分离困难，难以回收和反复使用，极易造成浪费和引发污染等问题。

因此，如何构建一种既能发挥酶的催化功能又可反复利用的酶存在形式，是酶工程研究的重点之一。

如果把酶束缚于某种液体不溶性固相载体上，使之与作用对象所处的液相分隔开。同时束缚后的酶仍有类似自由酶的生物活性，可与底物或反应物进行相互作用。类似液相色谱技术，这种被固定的酶不但可以像固体催化剂一样反复利用，实现酶反应的高效催化，还易于与反应物及产物等分离，利于生产工艺的连续化、自动化和在线耦合化。

总之，这种被固定的酶既能弥补均相反应体系中游离酶无法回收和反复利用的不足，又具有功能拓展性的特点，优势明显。固定化酶正是基于这一理念而发展起来的。

### 1.1.2 固定化酶

固定化酶 (Immobilized enzyme)，顾名思义，不同于游离酶或自由溶液酶，是酶的另一存在形式。通常是指固定或束缚在某一不溶性载体或特定区域上的、拥有并能发挥其生物活性且可以重复使用的酶。

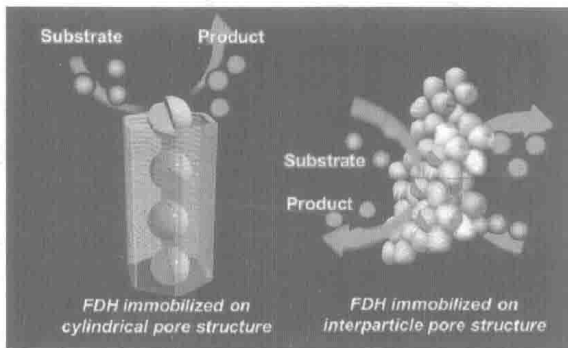


图1 固定化甲醛脱氢酶 (FDH) 示意图<sup>[6]</sup>

左侧：FDH 固定于介孔二氧化硅载体材料的圆柱形孔道内；

右侧：FDH 固定于介孔二氧化硅材料的粒间空隙中

1916年，Nelson 和 Griffin<sup>[7]</sup>首次发现了具有催化活性的固定化蔗糖酶，但没有引起研究者重视。直至20世纪50年代，国外才陆续开始了固定化酶技术的研究和应用。该技术真正引起重视的是20世纪60年代末期。1969年Tosa等<sup>[8]</sup>利用固定化酰胺酸水解酶从混合氨基酸中选择性制备提取L-氨基酸，首次实现了固定化酶的工业化应用。研究者此刻才意识到固定化酶的重要性，并预测它将会在酶工程甚至于整个生物工程领域中起到巨大作用。由此开启了固

定化酶研究的新时代<sup>[9-14]</sup>。

固定化酶最初是将水溶性的酶结合于水不溶性载体上，因此刚开始被称为水不溶性酶（Water insoluble enzyme）和固相酶（Solid phase enzyme）。1971年，第一届国际酶工程会议正式建议采用“固定化酶”这一专业术语<sup>[15]</sup>。

酶与载体的固定可通过多种手段和方法实现。常见的固定酶方式主要有物理吸附、共价结合、交联、包埋法、生物法等，如图2所示<sup>[16]</sup>。

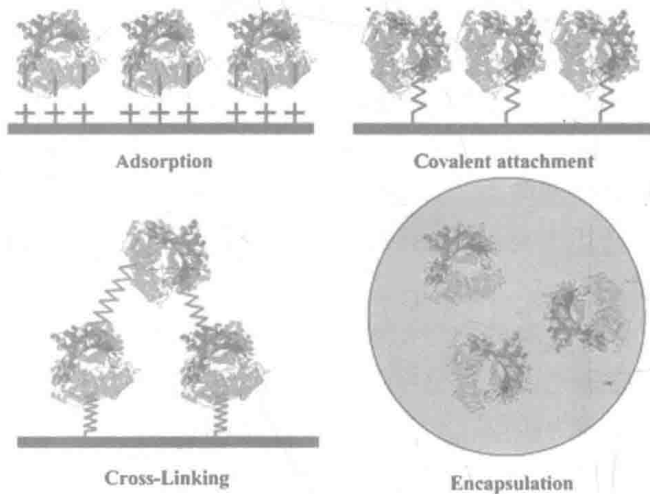


图2 四种典型的固定化酶方式<sup>[16]</sup>

据不完全统计，截至目前有关固定化酶技术的专利、文献已超过5000篇，有上百种的酶以不同固定化形式加以应用。特别是其中的12种固定化酶已在工业生产中广泛使用，成为不可或缺的工业催化剂<sup>[17]</sup>。

我国的固定化酶研究始于20世纪70年代，以中科院微生物所和上海生化所的研究者为代表开始了相关研究<sup>[18-20]</sup>，如黎等<sup>[18]</sup>对葡萄糖淀粉酶的固定化性能进行了研究。目前，国内众多的科研工作者已在固定化酶领域做了大量深入研究<sup>[21-24]</sup>。

固定化酶之所以如此受到广泛重视，与其独有优势密切相关。具体来说，固定化酶除了具有游离酶的高效、专一、温和及活性可调控等催化反应特性之外，还具有下列显著优点：

- (1) 易与底物、产物等其他反应体系分开，利于后续处理，可简化工艺流程；
- (2) 可在较长时间内进行重复分批反应和连续反应，酶的使用效率大大提高，成本显著降低；

- (3) 可进一步提高酶的稳定性;
- (4) 酶反应过程更易调控;
- (5) 更适合于多酶反应且不相互干扰;
- (6) 可增加产物的产率, 提高产物的质量;
- (7) 功能可拓展性强, 可与多种设备在线耦合, 实现生产工艺的自动化、多功能化等。

总之, 利用固定化酶的特有优势, 可加快酶反应的催化效率、简化工艺流程、提高效率、增加效益。

不可避免的是, 酶被固定的同时也会引发一些新的问题:

- (1) 酶的活性可能有所损伤;
- (2) 如果酶来自细胞内, 需先进行分离提纯后才可固定;
- (3) 一般只适用于可溶性的底物反应, 而且是分子量小的底物, 对于大分子底物不适宜。

即便如此, 固定化酶的优势相对是显著的。经过半世纪的研究和发展, 固定化酶技术不但在理论研究上取得了迅猛发展, 在实际应用上也显示出强大优势。以固定化酶技术为核心, 已发展建立了包括酶催化反应器、酶生物电极传感器、酶芯片等多种类型的酶生物反应器新技术。固定化酶已成为化学、物理、生物等多学科有机结合并共同关注的亮点。

## 1.2 固定化酶微反应器

### 1.2.1 固定化酶反应器

固定化酶反应器 (Immobilized enzyme reactor, IMER), 亦称固定化酶生物反应器 (Immobilized enzyme bioreactor), 是利用固定化酶代替游离酶作为固相催化剂单元实现生产反应的装置。固定化酶反应器可实现生产工艺的自动化操作, 从而降低成本、提高效率, 在生产应用中显示出了巨大的优势。

固定化酶反应器依据酶的性能可分为: 单一酶反应器、复合酶反应器和细胞反应器等。

依据其运转模式、基质和产品的流动性能, 可分为: 填充床酶反应器、恒流搅拌罐反应器、酶膜反应器、流化床反应器、空心纤维酶反应器和喷射式酶反应器等。

图3~4显示了两种常见类型的固定化酶反应器装置。

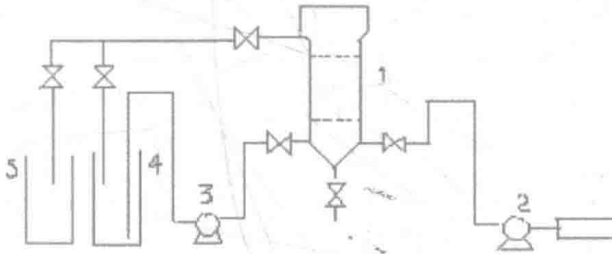


图3 固定化漆酶反应器装置流程图<sup>[25]</sup>

1 小型反应器；2 空气泵；3 恒流泵；4, 5 储液瓶

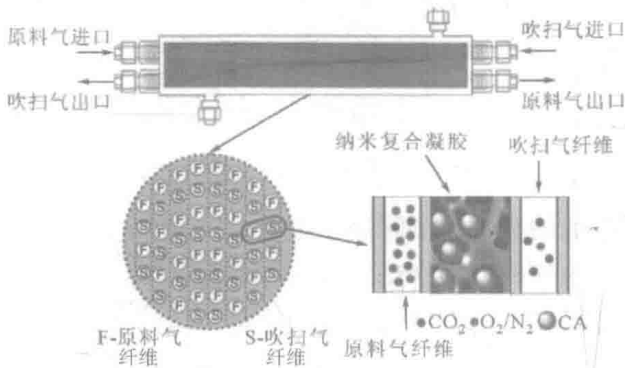


图4 中空纤维CA酶膜反应器构造<sup>[26, 27]</sup>

### 1.2.2 固定化酶微反应器

固定化酶反应器从样品的处理量可分为生产制备型的大中型反应器和固定化酶微反应器（Immobilized enzyme micro-reactor, IEMR）。

固定化酶微反应器，简称酶微反应器，它的“微”主要体现在两个方面：仪器构造的微型化和分析对象的微量化。这两个方面决定了该类仪器的目的主要是围绕微量物质进行分析研究，因此属于分析型仪器。

在现代分析科学研究中，存在一系列极具挑战的方法学问题，如在体原位追踪、痕量检测、无损活体分析等。其中首要难以回避的问题是分析对象的量。众所周知，酶作用的底物多数是生命体的各种生物分子，而这些组分在生命体内的含量低且制备难。

因此，发展建立灵敏、快速、高效的分析方法，以便实现微量生物样品的高效催化、高灵敏识别、高浓度富集以及快速检测，是当前所面临的主要问题

之一。

固定化酶微反应器的出现则为解决这一问题提供了新的方法。固定化酶微反应器的优势在于它是固定化酶及微量分析的有机结合体，具备稳定性强、可重复利用、易分离等优点，是一种低耗、高效且易于自动化的酶反应工具。

此外，固定化酶微反应器还具有功能拓展性强的优点。除了可构建不同类型的微反应器外，它还能与多种分析仪器装置有效耦合，实现在线化、通量化、集成化和自动化操作。因此，在蛋白质酶解、生物转化、抑制剂筛选、临床检测等多方面应用中具有独特优势。

鉴于此，固定化酶微反应器无论是理论研究还是应用研究，都受到了广泛关注，已成为一种非常重要的生化微分析方法和技术<sup>[16, 28-33]</sup>。

### 1.3 固定化酶微反应器酶的类型

依据酶催化反应的类型，国际酶学委员会（IEC）把酶分为6大类：氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶和连接酶。

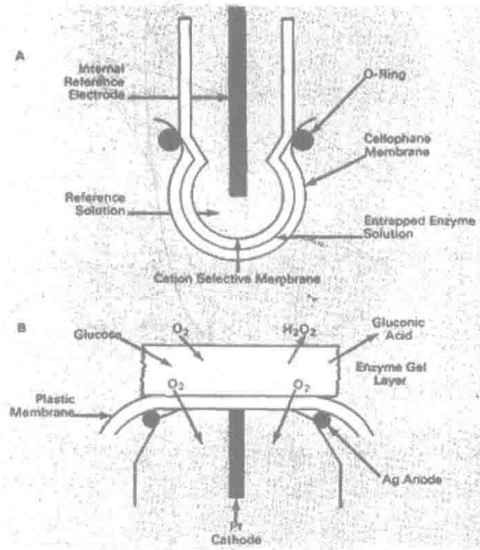
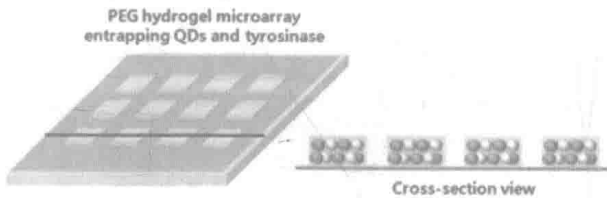
理论上，上述类型的酶都可以实现固定化。但据文献不完全统计及分析可知，酶微反应器领域中研究和应用最多的主要是以胰蛋白酶为代表的水解酶、以葡萄糖氧化酶为代表的氧化还原酶两大类。这反映了目前该技术的研究方向主要集中在蛋白质酶解和生物传感检测两大方向。

### 1.4 固定化酶微反应器的分类

固定化酶微反应器因酶的类型、固定方法、载体材料、反应器的构造、应用范围或使用对象的差异，有不同的分类。

广义上讲，任何能实现固定化酶生物功能（包括酶催化、酶识别、酶吸附等）的微装置，都可称为酶微反应器。基于此，可分为：用于样品酶解等传统类型的固定化酶微反应器；用于样品分析检测的酶电极生物传感器，如图5所示；用于样品特异性富集的固定化酶亲和和层析；用于相互作用的酶微阵列反应器等，如图6所示。

从狭义上讲，固定化酶微反应器通常专指上述第一类，即用于酶解样品、抑制剂筛选和生物转化等的酶反应器。基于此，固定化酶微反应器主要包括酶

图5 酶电极生物传感器结构<sup>[9]</sup>图6 酶微阵列反应器示意图<sup>[34]</sup>

膜微反应器、柱酶微反应器、微流控芯片酶反应器三大类。

#### 1.4.1 酶膜微反应器

酶膜微反应器是指酶与底物之间的反应主要在膜平面进行的一类反应器，如图7所示。该类反应器可缩短底物与酶的作用距离，增加作用时间。还可使酶的在线反应和产物分离同步进行，加速反应速率和提高转化率。并且装置简单、便于更换。

#### 1.4.2 柱酶微反应器

柱酶微反应器是指酶与底物的反应主要在柱体空间内进行的一类反应器。

柱酶微反应器结合了固定化酶的可反复使用和色谱法高效分离的优点，可使反应后的混合体系有效分离，是目前使用最多的一类酶微反应器。

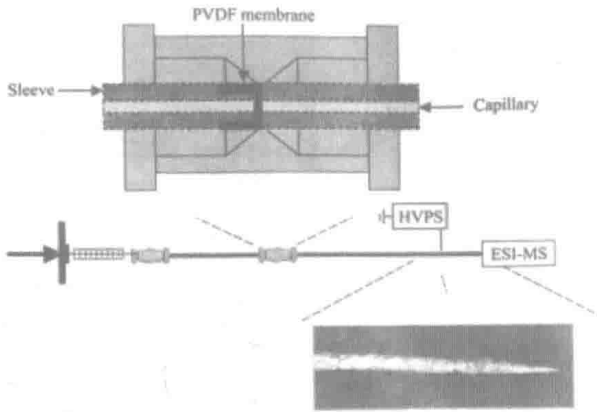


图 7 酶膜微反应器示意图<sup>[35]</sup>

常见柱酶微反应器主要包括填充柱酶微反应器、开管柱酶微反应器、整体柱酶微反应器等。

填充柱酶微反应器类似于液相色谱中的填充型色谱柱，固相微颗粒介质作为固酶载体。酶构筑于柱内填充的固相载体上发挥催化作用，如图 8 所示。

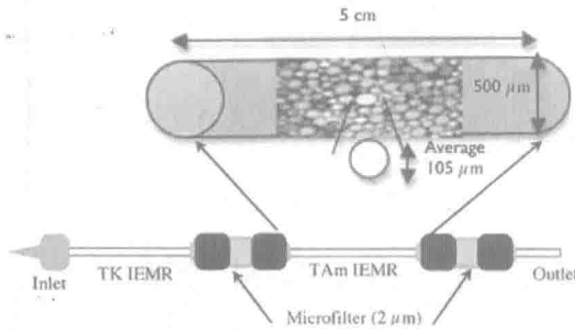


图 8 填充柱酶微反应器示意图<sup>[36]</sup>

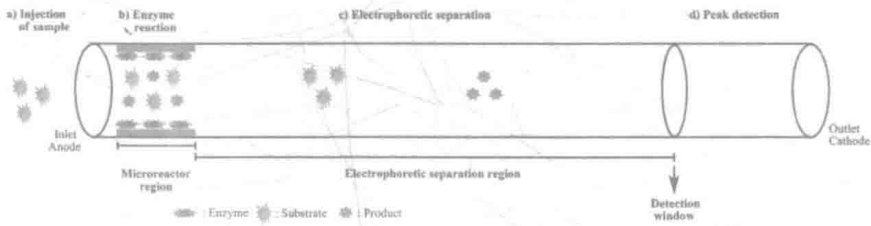
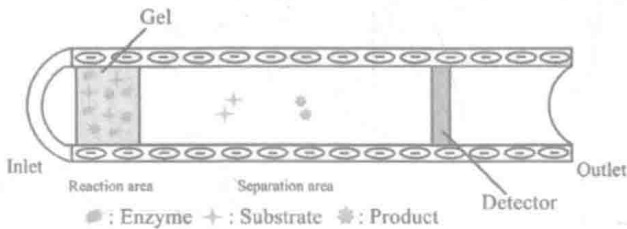
开管柱酶微反应器类似液相色谱中的空心色谱柱，酶固定于柱内壁上，反应器内壁作为固酶载体。常见的是毛细管酶微反应器，如图 9 所示。

整体柱酶微反应器类似液相色谱中的整体柱色谱柱，固定化酶一般包埋于反应器内构筑的整体柱载体上，如图 10 所示。

### 1.4.3 微流控芯片酶反应器

微流控芯片酶反应器是指在微流控芯片的网络微通道中构建了可实现固定化酶催化反应单元的微分析装置。



图9 毛细管酶微反应器示意图<sup>[16]</sup>图10 整体柱酶微反应器示意图<sup>[16]</sup>

微流控芯片 (Micro fluidic chip), 是以分析化学和生物分析为基础, 以微机电加工技术为依托, 以微管道网络为结构特征, 把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米 (甚至更小) 的芯片上, 用以取代常规生物或化学实验室各种功能的一种技术。其基本特征是多种单元技术在微小平台上的灵活组合和大规模集成<sup>[37-39]</sup>。鉴于此, 微流控芯片已成为当前最前沿的科技领域之一。

微流控芯片作为实现微量样品的全分析平台, 其微型化、高效化、集成化特点为酶的固定、催化和样品快速检测和处理提供了理想场所。微流控芯片酶反应器把酶的生物功能和全微分析有机集成在一起, 代表了酶微反应器发展的方向, 是当前固定化酶微反应器研究最多的一类。图 11 是一种常见的微流控芯片酶反应器的构造图。

微流控芯片酶反应器的制作主要包括微流控芯片的加工和酶的固定化两块。微流控芯片因材质的不同而制作工艺千差万别。具体制作可参考相关专著<sup>[39, 40]</sup>。酶通常固定于芯片特定区域的微通道内, 固定方法和其他反应器类似。

图 12 是集自动化进样、在线酶解、分离、检测于一体的微流控芯片酶反应器装置。

固定化酶微反应器还可根据酶与载体的结合方式进行分类, 详细内容将在后续章节介绍。