

文章编号 :0253-9721(2006)07-0104-05

纤维载体固定化酶的制备及其应用

聂华丽,朱利民

(东华大学 生物科学与技术研究所,上海 200051)

摘要 介绍了以纤维为载体固定化酶的制备技术,包括传统固定化技术(物理吸附法、包埋法、离子结合法和共价结合法)和新型的固定化技术(光辐射法和生物分子法),分析了以纤维为载体的酶固定化技术在纺织领域的应用及存在的问题,展望了以纤维为载体的酶固定化技术的发展前景。

关键词 纤维;酶固定化;纺织;应用

中图分类号:TS101.4 文献标识码:A

Fiber as support for immobilized enzyme and its application

NIE Hua-li, ZHU Li-min

(Institute of Biological Sciences & Biotechnology, Donghua University, Shanghai 200051, China)

Abstract The preparation of immobilized enzyme on fiber is reviewed. The techniques of enzyme immobilization including the traditional methods: adsorption, entrapment, covalent bonding and crosslinking, and the latest ones: photochemical methods and biomimetic molecular recognition are introduced. Its application to textile, existing problems, and future prospect of the immobilized enzyme technology are discussed.

Key words fiber; enzyme-immobilization; textile; application

酶催化反应具有底物专一性、催化高效性、反应条件温和等优点,符合环保的要求,因而受到研究人员的高度重视。酶是一种由氨基酸组成的蛋白质,其高级结构对环境十分敏感,温度、pH 值、有机溶剂、金属离子等因素均有可能使酶丧失生物活力。即使在酶反应的最适条件下,酶也会失活,随着反应时间的延长,反应速度会逐渐下降,反应后不能回收,只能采用分批法进行生产,这些问题对于现代化工业来说,酶还不是一种理想的催化剂。从 20 世纪 60 年代起,研究人员把解决酶催化问题作为重要的研究对象,认为把酶固定在适合的载体上就有可能解决这些问题,从而固定化酶的研究迅速发展起来^[1]。尽管固定化酶可连续生产、提高产量、降低成本,但是工业中广泛应用固定化酶还是很少的,原因是固定化酶的成本昂贵,且将其应用于规模化的工业化生产非常困难^[2],因此发展一种便宜的、能工业

化生产的载体材料是非常有必要的。

与其它载体相比,以纤维为载体的固定化酶具有如下优势^[3]:1)纤维能以多种形态满足不同需求,包括束状、短丝、长丝、纱线、织物(机织、针织、非织造);2)由于纤维的长径比大,因而具有较大的表面积,利于催化反应的进行;3)在中空纤维中,其孔径大小的变化还可以控制反应速率;4)具有良好的机械强度和稳定性;5)和颗粒状载体相比,更容易从反应媒介中分离出来;6)纤维已工业化生产,价格便宜,易于取得,更利于固定化酶的工业化生产。因此,本文对以纤维为载体的酶固定化技术及其在纺织领域的应用加以综述。

1 制备技术

酶在纤维上的固定化有很多方法,但对任何酶

都适用的方法是有的,酶的固定化方法通常按照用于结合的化学反应的类型进行分类。

1.1 传统的固定化技术

1.1.1 非共价结合法

1.1.1.1 物理吸附法 物理吸附法是通过物理吸附将酶固定于纤维载体的一种固定化方法^[4-9]。物理吸附法具有酶活性中心不易被破坏和酶高级结构变化少的优点,因而酶活力损失较少。若能找到适当的载体,这是很好的方法。但由于酶与载体相互作用弱,酶易脱落等缺点,影响循环使用。

1.1.1.2 包埋法 包埋法是将酶包埋于纤维中以达到固定化的目的,尤其适用于中空纤维^[10]。包埋法一般不需要与酶蛋白的氨基酸残基进行结合反应,很少改变酶的高级结构,酶活回收率较高,但是在包埋时发生化学聚合反应,酶容易失活,必须巧妙设计反应条件,使之化学反应时不至于破坏酶的活性部位和活性中心。由于只有小分子可以通过纤维扩散,并且这种扩散阻力还会导致固定化酶动力学行为的改变,从而降低酶活力,因此,包埋法只适用于小分子底物和产物的酶,对于那些作用于大分子底物和产物的酶是不适合的。

1.1.1.3 离子结合法 离子结合法是酶通过离子键结合于具有离子交换基的纤维载体的固定化方法^[11,12]。离子交换纤维依靠电性排斥或体积排斥作用,既可以提高固定化酶的稳定性,又能有效地消除其它物质的干扰。离子结合法的操作简单,处理条件温和,酶的高级结构和活性中心的氨基酸残基不易被破坏,能得到酶活回收率较高的固定化酶。但是载体和酶的结合力比较弱,容易受缓冲液种类和 pH 值的影响,在离子强度高的条件下反应时,酶往往会从载体上脱落。

1.1.2 化学结合法

1.1.2.1 共价结合法 共价结合法因酶分子与载体之间的共价结合而呈现良好的稳定性及重复使用性,是目前最受关注的一类酶固定化方法。归纳起来有两类,一是将载体的有关基团活化,然后和酶中与催化活性无关的基团反应。另一种是在载体上接上一个双功能试剂,然后将酶偶联上去。可与载体共价结合的酶的功能团有 α 氨基或 ϵ 氨基, α 、 β 或 γ 位的羧基、巯基、羟基、咪唑基、酚基等。参与共价结合的氨基酸残基不应是酶催化活性所必需的,否则会造成固定后酶活力的完全丧失。

共价结合法与离子结合法和物理吸附法相比,

其优点是酶与载体结合牢固,一般不会因底物浓度高或存在盐类等原因而轻易脱落。但是该方法反应条件苛刻,操作复杂,而且由于采用了比较激烈的反应条件,会引起酶蛋白高级结构的变化,破坏部分活性中心,因此往往不能得到活力高的固定化酶,酶活回收率一般在 30% 左右,甚至底物的专一性等酶的性质也会发生变化。

常见的共价结合法有以下几种。

1) β 硫酸酯乙砒基苯胺 (SESA) 法。在碱性条件下与 β 硫酸酯乙砒基苯胺 (SESA) 反应,生成对氨基苯磺酰乙基纤维素,然后重氮化,与酶偶联^[13,14]。此法的优点是在酶分子与载体之间间隔了对氨基苯磺酰乙基 (ABSE),这样偶联在载体上的酶蛋白分子就有较大的摆动自由度,可以减少大分子载体造成的空间位阻,提供固定化酶的活力。

2) 活化酯法。含羟基的载体可先用对甲苯磺酰氯活化,然后很容易与酶的巯基或者氨基反应^[2]。

3) 芳香烃化反应。含羟基的载体在碱性条件下和均三氯三嗪等反应,在引入活泼的卤素后能直接与酶的氨基、酚羟基或巯基等反应^[8]。

4) 缩合反应。这是利用羰二亚胺的活化作用,使氨基和羧基直接偶联形成肽键的反应,适用于带羧基和带氨基的载体^[7]。在弱酸条件 (pH 值为 4.75 ~ 5) 下,羰二亚胺与羧基反应生成极活泼的酰基异脲衍生物,可立即与氨基缩合成酰胺键。

5) 重氮法。带有芳香胺基的载体,先用亚硝酸钠处理成重氮盐衍生物,然后在温和的条件下和酶分子上相应的基团如酚羟基、咪唑基或胺基进行偶联,得到固定化酶^[15]。

6) 过碘酸氧化法。纤维素葡聚糖经过碘酸氧化或用二甲基砒氧化裂解葡萄糖环,产生二醛高聚物,每个葡萄糖分子含 2 个醛基,然后和酶偶合^[16,17]。

其它共价结合法还有溴化氰法、环氧化法、叠氮法和酰氯酰化法等。

1.1.2.2 载体交联法 载体交联法是利用双功能或多功能试剂在酶分子与载体间进行交联反应,以共价键制备固定化酶的方法^[7,8,18,19]。参与交联反应的酶蛋白的官能团有 N 末端的 α 氨基、赖氨酸的 ϵ 氨基、酪氨酸的酚基、半胱氨酸的巯基和组氨酸的咪唑基等。最常用的交联剂是戊二醛,结合过程见图 1。交联法反应条件比较激烈,固定化的酶活回收率较低,但适当降低交联剂浓度和缩短反应时间有利于固定化酶比活力的提高。

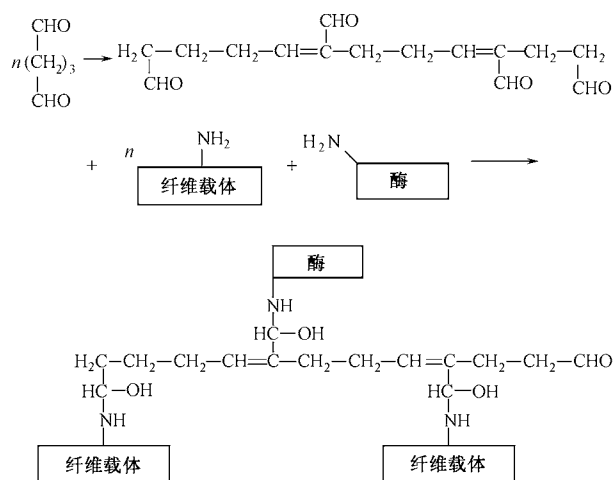


图 1 戊二醛交联法

1.2 新型的固定化技术

1.2.1 光辐射等物理技术

光辐射等物理技术应用于酶固定化,大大促进了这一领域的发展。光辐射技术在聚合物表面固定生物活性物质的研究比较活跃。光引发聚合常被用于制备固定化酶的纤维或对纤维材料进行改性,然后用于酶固定化的载体,文献[20]利用电子辐射在聚乙烯中空纤维上接枝交换基团 2-羟乙基胺基 (\$-\text{NHC}_2\text{H}_5\text{OH}\$) 和苯基,然后用此活化的载体固定 \$\alpha\$-淀粉酶,得到了较高的酶固定量,水解淀粉的速率分别是 2.5、42 kg/(h·L)。文献[21]利用紫外辐射法将过氧化氢酶固定于聚酯纤维和锦纶 66 纤维,最大的酶固定量分别为 32.2、22.0 mg/g,酶活保持率分别为 11.3%、18.3%。文献[11]利用电子辐射在中空纤维上接枝离子交换基团二乙胺基,然后通过离子吸附固定抗坏血酸维生素 C 氧化酶。这种方法操作简单,反应迅速,节约成本,但是反应在光的辐射下,酶容易失活。

1.2.2 利用生物分子实现酶的固定

利用生物分子 avidin 和 biotin 的亲和性,用 biotin 修饰载体和酶,再利用 avidin 将载体和酶连接起来,此法与载体交联法原理相似,但是处理条件更温和,减少了化学交联剂对酶活的不利影响,能得到酶活回收率高、结合牢固的固定化酶^[23]。例如 M·Amounas 利用 avidin-biotin 技术在纤维素织物上固定了脲酶,与传统的共价结合法相比,酶活力提高了近 10 倍,酶的稳定性也显著提高,延长了近 200 d^[23,24]。但是,这种方法原材料比较昂贵。

2 存在问题及采取策略

2.1 存在问题

酶在固定化过程中,最大的问题是酶的流失、失活等问题,从而限制了固定化酶的应用效率,现就存在的问题具体分析。

1) 酶固定化的过程中,失活的酶量较大。一般认为,酶活性的失去是由于酶蛋白通过几种氨基酸残基在纤维上的附着造成的,由于酶蛋白多点附着在载体上,引起了固定化酶蛋白无序定向和结构变形的增加,从而使酶失活。2) 有些酶与纤维的相容性很差而中毒失活,因为对不同类型的酶,应注意纤维材料的选择。3) 固定化酶过程中,可能存在纤维载体的污染,如溶剂、产物等的影响,从而造成酶的失活。

2.2 采取策略

解决上述问题可采取如下策略:1) 采用新载体。研制新型纤维材料,以提高纤维材料与酶分子之间的相容性,避免中毒失活。2) 采用新方法。一些新技术如磁性技术^[25]、生物大分子技术及辐射技术等不断运用于固定化酶的制备。另外,天然酶分子易受外界环境的影响而失活,用高分子物质对酶分子进行必要的修饰改性,可以增加酶与纤维材料之间的生物相容性,增加酶对有机溶剂的耐受性和环境稳定性。经研究发现,木瓜蛋白酶固定于纤维材料后,贮藏稳定性提高,但耐洗涤性很差,为改善其洗涤性能,如果将木瓜蛋白酶进行化学修饰,其耐化学试剂性和洗涤性会有所提高,对木瓜蛋白酶的化学修饰已展开研究,有望在这方面取得突破性进展,这将为开发功能性织物提供新思路。3) 采用新机理。酶的固定化技术经过几十年的研究已经发展成为酶定向固定化技术^[26,27],研究表明,已有几条途径使酶蛋白能够以有序的方式附着在载体表面,从而避免了酶蛋白的多点附着引起的无序定向和结构变形,实现了酶的定向固定化,使酶活性损失降低到最小程度。

3 在纺织领域的应用

环保是酶在纺织应用中的鲜明特色,由于具有较好的专一性、温和性和高效性等生物催化特性,酶已广泛应用于纺织工业^[28-31],从前处理到最后的织

物整理,几乎每一个湿加工过程中,酶都可以发挥其独特的作用。而以纤维材料为载体的固定化酶,不仅为功能纺织品^[23]的开发提供了新的思路,并且结合到纺织品的多孔性和其独特的物理机械性能,为开发生物活性材料提供了一种思路,如生物酶过滤膜、生物反应袋、生物反应器等。

但是,目前在纺织工业中采用的酶处理方法也存在以下缺点:1)酶的稳定性差,容易失活;2)酶催化反应后,与反应体系混在一起,难于回收,不利于连续化生产,产物分离纯化困难,产品成本较高。但必须要注意的是,酶固定化后,酶成为固定相,处理对象必须存在于流动相之中,但是纤维及其纤维制品在湿加工过程中属于固定相,对这点来说,固定化酶对于纺织加工中的某些过程是不利的。然而,在纺织工艺中有着诸多的流动处理对象,如双氧水分解处理^[8,21],纺织加工的废液处理等。在环境保护日益为人们所重视的今天,纺织废水处理的问题越来越迫切,而固定化酶在这方面将具有独特的优势。另外,将有特殊功能的酶固定在织物表面,可赋予织物特殊功能,也给功能纺织品的开发提供了新的思路。文献^[32]把脂肪酶固定于棉织物上,以期产生功能性的织物,但是在洗涤一次后,酶的活力全部丧失。在非衣料领域用酶固定化的织物是有应用前景的,如文献^[33]将有机磷的水解酶固定于棉织物上,开发了一种医疗用织物,可制成绷带、棉签、医用纱布和对伤口有疗效功能的服装。

4 结束语

综上所述,以纤维为载体的酶固定化技术及应用研究已得到长足进展,但仍有很大的发展潜力。对现有纤维材料改性,开发新的纤维材料,采用新的固定化技术及对新的理论探讨等将成为这一领域的研究方向。尤其是生物技术在这一领域的应用,将受到越来越多的重视。随着酶的固定化技术的发展,其应用前景将十分广阔。

FZXB

参考文献:

- [1] 刘春叶,王亚明.酶的固定化及化学修饰[J].云南化工,2002,29(5):29-31.
- [2] Nedim A, Shangtian Y. Immobilization of aspergillus oryzae β -galactosidase on tosylated cotton cloth[J]. Enzyme and Microbial Technology,2002,31:371-383.
- [3] Cooke T F. Fibers as supports for catalysts: a survey of the literature[J]. Journal of Polymer Engineering,1990,9(1):1-22.
- [4] Hongtao D, Zhikang X, Zhengwei D, et al. Immobilization of candida rugosa lipase on polypropylene microfiltration membrane modified by glycopolymer:hydrolysis of olive oil in biphasic bioreactor [J]. Enzyme and Microbial Technology,2005,36:996-1102.
- [5] Takoua D, Cynthia M, Liubov K, et al. Structure fiber supports for gas phase biocatalysis [J]. Enzyme and Microbial Technology,2005,36:911-916.
- [6] Moeder M, Martin C, Koeller G. Degradation of hydroxylated compounds using laccase and horseradish peroxidase immobilized on microporous polypropylene hollow fiber membranes[J]. Journal of Membrane Science,2004,245:183-190.
- [7] Renato S Freire, Nelson Duran, Lauro T Kubota. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds[J]. Talanta,2001,54:681-686.
- [8] Opwis K, Knittel D, Schollmeyer E, et al. Immobilization of catalase on textile carrier materials[J]. AATCC Review,2004,(12):25-28.
- [9] Dey G, Nagpal V, Banerjee R. Immobilization of α Amylase from Bacillus circulans GRS 313 on cocount fiber[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2002,(12):303-314.
- [10] Wenten I G, Widiasa I N. Enzymatic hollow fiber membrane bioreactor for penicillin hydrolysis [J]. Desalination,2002,149:279-285.
- [11] Tomomi K, Kyoichi S, Kazuyuki S, et al. Immobilization of ascorbic acid oxydase in multilayers onto porous hollow-fiber membrane[J]. Journal of Membrane Science,2001,191:207-213.
- [12] Shingo E, Yasuhiro M. Protease immobilization on copoly (ethylene/acrylic acid) fibre [J]. Journal of Applied Polymer Science,1990,41(11/12):2753-2767.
- [13] 彭立凤,刘新喜.棉织物上 SESA 活化法固定化脂肪酶工艺的研究[J].食品工业科技,2001,22(2):30-32.
- [14] 郭海学.纤维素载体固定化糖化酶的研究[J].扬州教育学院学报,2001,19(3):11-13.
- [15] 刘海燕,杨更亮,孙素芳,等.一种简化的重氮化法制备固定化酶的载体合成方法[J].离子交换与吸附,2003,18(3):205-210.
- [16] 刘新喜,彭立凤.棉纤维膜上高碘酸钠法固定脂肪酶[J].河北师范大学学报(自然科学版),2001,25(1):80-82,101.
- [17] 彭立凤,谭天伟.脂肪酶膜固定化方法的研究[J].中国油脂,2000,25(1):58-61.
- [18] Peng Y, Zhikang X, Zhengang W, et al. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized poly(acrylonitrile-co maleic acid) ultrafiltration

- hollow fiber membrane[J]. *Journal of Molecular Catalysis* , 2005 ,32 :115 - 121 .
- [19] Wei G, Eli R. Modified glass fiber membrane and its application to membrane affinity chromatography[J]. *Journal of Membrane Science* ,2003 ,215 :141 - 155 .
- [20] Sugura Miura , Noboru Kubota , Hidetaka . High-throughput hydrolysis of starch during permeation across α -amylase-immobilized porous hollow-fiber membranes[J]. *Radiation Physics and Chemistry* ,2002 ,63 :143 - 149 .
- [21] Opwis K, Knittel D, Bahners T, et al. Photochemical enzyme immobilization on textile carrier materials [J]. *Engineering and Life Sciences* ,2005 ,5(1) :63 - 67 .
- [22] Bhardwaj A, Lee J, Glauner K, et al. Biofunctional membranes: an EPR study of active site structure and stability of papain non-covalently immobilized on the surface of modified poly(ether) sulfone membranes through the avidin - biotin linkage [J]. *Journal of Membrane Science* , 1996 ,119 :241 - 252 .
- [23] Amounas M, Maigne V, Innocent C, et al. Elaboration and chemical reactivity of enzyme modified ion exchanging textiles[J]. *Enzyme and Microbial Technology* ,2002 ,31 : 171 - 178 .
- [24] Maigne V, Amounas M, Innocent C, et al. Enzyme textile for removal of urea with coupling process :enzymatic reaction and electrodialysis[J]. *Dedalination* ,2002 ,144 :163 - 166 .
- [25] Han L, Wei W, Lingli C, et al. The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres[J]. *Enzyme and Microbial Technology* ,2004 ,35 :15 - 21 .
- [26] Vishwanath S, Bhattacharyya D, Huang W, et al. Site-directed and random enzyme immobilization on functionalized membranes : kinetic studies and models[J]. *Journal of Membr and Science* ,1995 ,108 :1 - 6 .
- [27] Vishwanath S, Wang J, Bachas L G, et al. Site -directed and random immobilization of subtilisin on functionalized membranes : activity determination in aqueous and organic media[J]. *Biotechnol Bioeng* ,1998 ,60 :608 - 616 .
- [28] Onar N, Sariulluk M. Use of enzymes and chitosan biopolymer in wool dyeing[J]. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* ,2005 , 13 (1) :54 .
- [29] Singh M, Goel A. Effect of enzymes on the dyeing and colour fastness properties of wool fabric [J]. *Colourage* , 2004 , 51 (6) :19 - 23 .
- [30] Mishra A, Goel A. Enzyme based shrink proofing of blended woolen fabric[J]. *Journal of the Textile Association* ,2003 , 64(3) :107 - 109 .
- [31] El-Sayed H, Hamed R, Kantouch A, et al. Enzyme-based feltproofing of wool [J]. *AATCC Review* ,2002 , (1) :25 - 28 .
- [32] 何中琴,王雪良.脂肪酶在棉织物上的固定化[J].*印染译丛* ,2000 ,(8) :57 - 58 .
- [33] Grimsley J K, Waheguru P S, James R W, et al. A novel enzyme-based method for the wound-surface removal and decontamination of organophosphorus nerve agents [J]. *American Chemical Society* ,2001 ,792 :35 - 49 .