

知识介绍

纳米载体固定化酶的研究

尹艳丽¹, 王爱玲², 曹 健¹, 张慧茹¹

(1. 河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要:介绍了纳米载体固定化酶的研究, 包括纳米载体材料的种类及分类、纳米载体固定化酶的主要方法及应用现状、纳米载体固定对酶活力、稳定性、特异性、结构和功能等的影响, 对该技术的研究做了分析和展望。

关键词:纳米载体; 固定化; 酶

中图分类号: TQ426.97; TQ426.65

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)09-0067-04

Nanoparticles carrier for immobilized enzymes

YIN Yan-li¹, WANG Ai-ling², CAO Jian¹, ZHANG Hui-ru¹

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: The recent research of immobilized enzyme by nanometer carrier is reviewed in this paper. The sorts and classifications of nanomaterial carriers, the primary immobilization methods and actual application, the influence of immobilization on activity, stability, selectivity, structure and function are described. The effort exerted on this technology has also been analyzed and prospected.

Key words: nanoparticle carrier; immobilization; enzyme

纳米材料由于其结构的特殊性, 表现出许多独特的理化性能和生物学特性, 被广泛应用于生命科学的许多领域, 如酶的固定、蛋白质的分离纯化、药物载体、核酸载体、核酸的分离纯化、生物传感器等^[1-2]。用纳米材料作为酶的载体, 较传统的载体而言, 具有一些显著的优点: 良好的生物相容性; 较大的比表面积, 能有效地提高载酶量; 较小的颗粒直径, 具有很小的扩散限制, 在溶液中能稳定存在; 易于在其表面偶联一些特异性的配体, 调控酶的结构和功能。纳米材料作为一种新型的酶固定化载体, 已成功应用于多种酶的固定化。

1 酶纳米载体的种类

用于酶固定的纳米载体按照材料的性质大致可以分为: 金属纳米载体、非金属无机纳米载体、有机纳米载体和复合物纳米载体四大类(见表 1)。在各种类型的纳米载体中, 又以目前制备技术最为成熟的颗粒型纳米载体使用得较为广泛, 而纳米膜载体、纳米管载体等则较少使用。同一种酶用不同的纳米载体固定, 固定化效果可能相差很大; 而同一种载

体, 固定不同的酶, 对酶性质的影响也会因酶而异^[10,24,28]。因此对某一具体的酶而言, 选择纳米载体应该充分考虑酶的理化性质、纳米材料的特殊性能、以及纳米材料固定酶后产生的局部微环境等各种因素。

表 1 纳米载体及固定化酶的种类

载体	固定化酶	文献
金属纳米载体		
γ -Fe ₂ O ₃ 纳米颗粒	皱褶假丝酵母脂肪酶	[1]
Fe ₃ O ₄ 纳米颗粒	酵母乙醇脱氢酶	[3]
Al ₂ O ₃ 纳米颗粒	猪胃蛋白酶	[4]
CdSe-EG ₄ ; CdSe-MUA	α -胰凝乳蛋白酶	[5]
CdS 纳米颗粒	甲醛脱氢酶	[6]
Au-TCOOH	α -胰凝乳蛋白酶	[7-8]
金纳米管阵列	辣根过氧化物酶	[9]
有机纳米载体		
固体类脂纳米颗粒	溶菌酶	[10]
PMBN/PLA 纳米颗粒	乙酰胆碱酯酶胆碱氧化酶	[11]
聚氰基丙烯酸酯纳米颗粒	天门冬酰胺酶超氧化物歧化酶	[12]

收稿日期: 2007-05-09

基金项目: 河南工业大学校基金资助项目(170183)

作者简介: 尹艳丽(1979-), 女, 硕士, 助教, 主要从事微生物酶及蛋白多糖的研究工作, yinzihust@163.com。

续表

载体	固定化酶	文献
聚乙烯基吡咯烷酮纳米颗粒	烟曲霉过敏原和抗原	[13]
聚苯乙烯纳米光纤	α -胰凝乳蛋白酶	[14]
复合物纳米载体		
Au 纳米颗粒/聚亚安酯微球	胃蛋白酶;内葡聚糖酶	[15-16]
Au 纳米颗粒/硅胶	辣根过氧化物酶	[17]
Au 纳米颗粒/PVB	葡萄糖氧化酶	[18]
Au 纳米膜/聚合物	胃蛋白酶	[19]
ZrO ₂ 纳米颗粒/甲壳素聚合物	葡萄糖氧化酶	[20]
TiO ₂ 植酸纳米膜	细胞色素 C 氧化还原蛋白	[21]
有机物/无机物交联多聚体 纳米膜	α -胰凝乳蛋白酶;胰蛋白酶	[22]
非金属无机纳米载体		
SiO ₂ 纳米颗粒	葡萄糖氧化酶	[23]
硅纳米颗粒	溶菌酶;溶菌酶突变体	[24-25]
硅纳米膜(多孔)	α -胰凝乳蛋白酶;胰岛素	[26]
富勒烯	枯草杆菌蛋白酶突变体	[27]

2 纳米载体固定酶的方法

2.1 吸附法

将制备好的纳米颗粒或其他纳米载体直接加入含有一定浓度酶液的缓冲溶液中,在合适条件下纳米载体可以通过静电作用或与氨基酸残基侧链基团之间的特异性结合而将酶分子牢固吸附到纳米载体表面,如金特异性地结合氨基酸残基侧链的巯基和氨基;镍离子特异性地结合蛋白质末端的多聚组氨酸“尾巴”^[15]。

吸附法操作简单,是目前应用得较为广泛的一种固定化方法,尤其是用于各种酶传感器的制备^[6,18]。用纳米材料制备的各种酶传感器,能显著提高生物传感器的检测极限,增强检测的特异性,缩短电极响应时间^[9,20]。

2.2 包埋法

将酶与聚合物单体在一定的条件下混合,聚合物单体之间发生聚合交联的过程中,就可以将酶分子固定到高分子聚合物中;或者是将酶分子包裹在多孔的单分子膜中,形成微胶囊型纳米颗粒。常用的包埋材料有:聚氰基丙烯酸异丁酯、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯基吡咯烷酮、水合二氧化硅、有机物/无机物交联多聚体纳米膜、硅纳米膜等^[12,22,26]。此外固体类脂也常应用于酶的包埋固定化^[10]。

酶的包埋效率与交联剂的浓度、纳米颗粒直径的大小、酶的分子质量、酶的浓度、选用的缓冲溶液等有密切的关系,在合适的条件下,酶的包埋效率可以达到 85%~90%^[13]。包埋法固定化稳定性好,酶分子与纳米载体不易解体分离,对酶结构的完整性也没有显著的影响,酶的半衰期长达 143 天^[26]。

2.3 共价结合法

酶和纳米载体以共价键的形式结合在一起,这种方法需要酶和载体都具有氨基、羧基或羟基等官能团。酶分子共价结合到纳米颗粒的表面有直接结合法和间接结合法。直接结合法的纳米载体必须携带有能与氨基酸侧链基团发生反应的相应基团,如 C₆₀ 的各种衍生物就可以直接固定各种酶蛋白;间接法是先纳米载体颗粒的表面包被上一层携带有活性基团的聚合物或者先将纳米颗粒用具有活性基团的材料胶囊化,然后再与酶分子共价连接^[3,11,27]。

共价结合法能有效地防止酶与载体的解离,从而防止酶的丢失;并且有助于防止酶的变性,增强其稳定性。但是过程中酶的活性位点被隐藏或限制了活性位点与底物的结合,将不可避免地导致酶活性一定程度的降低^[1]。

3 纳米载体固定对酶性质的影响

3.1 对酶活力和稳定性的影响

在绝大多数情况下,酶固定到各种纳米载体后,其催化活力均有不同程度的降低^[1,3]。酶活力的降低是由于酶吸附到纳米介质表面后,酶的构像、酶所携带的净电荷、电荷的位置等发生了改变;或者是酶的活性位点被隐藏或限制了活性位点与底物的结合^[1,25,28]。Bower 等^[25]发现用硅纳米颗粒固定 3 种 T₄ 溶菌酶后,酶的催化活力降低的程度与酶对温度的稳定性密切相关。酶对温度的稳定性越差,酶的催化活力降低得越严重。仅有少数个例报道,酶在纳米材料固定化后,活力略有增强^[18]。

与酶活力降低形成鲜明对比的是,在用纳米材料固定化后,几乎所有的酶对温度、pH 的稳定性都有大幅增高。自由状态的酵母乙醇脱氢酶在 25℃ 时、120 h 后残留的酶活力仅有 4.5%,但用纳米 Fe₃O₄ 共价固定后,则可达到 30%。当温度升高到 55℃ 时,自由状态的酵母乙醇脱氢酶完全失活,而固定化后的酶几乎不受影响。即使温度升高到 65℃,残留的酶活力依然可达到 90%^[3]。而当 pH 由 2.0 升到 8.0 时,自由状态下的胃蛋白酶完全失活,而固定在纳米颗粒上的酶还可以保留 40% 的酶活力。

当温度由 50℃ 升高到 60℃ 时,自由状态下的胃蛋白酶丧失 96% 的酶活,而固定后的酶仅丢失 68% 的酶活^[15]。

3.2 对酶特异性的影响

酶对底物有严格的选择性,提高或改变酶的特异性不仅能提供新颖的生物催化剂,而且能在传感器和与酶相关的生物工程中应用。若要使酶与底物高度特异性地作用,则基因突变或者侧链基团化学修饰是最主要的方法,而纳米材料巨大的比表面积、充足的表面功能化基团,尤其是单层受保护的纳米粒子,会使酶活力提高很多。

Hong 等^[7]发现在空间位阻和静电的共同作用下,结合在表面用烷基硫醇-四(乙二醇)乙酸单分子膜功能化的纳米金颗粒表面的 α -胰凝乳蛋白酶,表现出了很明显的化学选择性:对携带正电荷的底物表现出很强的亲和性,有较高的催化活力;对携带负电荷的底物仅表现很低的亲和力和催化活力;对中性底物的亲和力和催化能力居中。

3.3 对酶结构和功能的影响

一般来说,纳米材料固定化对酶结构和功能基本上没有太大的影响,都能够保持其完整性;有些可以通过在纳米材料表面偶联一些特异性的配体,调控酶的结构和功能。如 CdSe 纳米颗粒表面先用巯基十一烷酸单分子膜功能化,然后用聚乙二醇四聚体封闭单分子膜,当聚乙二醇四聚体分子末端为中性的羟基基团时, α -胰凝乳蛋白酶不能与纳米颗粒结合;当聚乙二醇四聚体分子末端为羧基基团时, α -胰凝乳蛋白酶与纳米颗粒结合并能较好地保持活性;若单分子膜不用聚乙二醇四聚体封闭, α -胰凝乳蛋白酶与纳米颗粒结合后,构像将发生改变,酶分子变性失活^[5]。

但是, T_4 溶菌酶及 T_4 溶菌酶的两突变体吸附到纳米硅表面 90 min 后,二级结构构像发生了剧烈的变化,有 9% ~ 29% 的 α -螺旋解螺旋成松散的结构,而且构像改变大小同酶对温度的稳定性高低密切相关^[28]。此外,金纳米颗粒表面用巯基十一烷酸功能化后,与 α -胰凝乳蛋白酶结合,将导致 α -胰凝乳蛋白酶变性失活^[8]。

4 结语

酶固定化载体的粒径通常在毫米和微米级,一定程度上限制了它的应用,而复合纳米载体具有比表面积大、体积小、表面自由能高、易于将酶与底物和产物分离、提高酶的生物相容性、免疫活性和稳定

性等强大而独特的优势,使固定化酶的研究发展极为迅速,已经取得了一定的成果。

然而这种复合物纳米材料的研究仍存在一些问题:要达到精确地调节和控制复合物的组成、结构特征、化学计量比及粒子的大小都还有相当大的困难;对现有制备方法的改进、发现新的合成方法、如何制备更为均一、分散的体系及如何更好地固定化酶且增强其亲和力和生物活性仍是今后研究的重点;对纳米载体的形成机理、结构和性能的关系、其与酶的结合等基础理论研究还不够,限制了该载体材料的应用,因此更深入地探索纳米材料基础理论及尽快使已经发现的实验室研究价值进入工业化应用阶段,应成为今后研究的重点。

随着计算机、高分子材料学、医学、化学、生物工程学等的进一步发展,必将推动纳米载体固定化酶的基础研究和应用研究,使之在生物传感器、有机合成、环保、医药、食品等方面展现出真正的优势。

参考文献

- [1] Dyal A, Loos K, Noto M, et al. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles[J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(7):1684 - 1685.
- [2] Aoyama Y, Kanamori T, Nakai T, et al. Artificial viruses and their application to gene delivery, size-controlled gene coating with glycocluster nanoparticles[J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(12):3455 - 3457.
- [3] Chen D H, Liao M H. Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 16(5):283 - 291.
- [4] Li J, Wang J Q, Gavalas V G, et al. Alumina-pepsin hybrid nanoparticles with orientation-specific enzyme coupling[J]. Nano Letter, 2003, 3(1):55 - 58.
- [5] Hong R, Fischer N O, Verma A, et al. Control of protein structure and function through surface recognition by tailored nanoparticle scaffolds[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(3):739 - 743.
- [6] Curri M L, Agostiano A, Leo G, et al. Development of a novel enzyme/semiconductor nanoparticles system for biosensor application[J]. Materials Science and Engineering C, 2002, 22(2):449 - 452.
- [7] Hong R, Emrick T, Rotello V M. Monolayer-controlled substrate selectivity using noncovalent enzyme-nanoparticle conjugates[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(42):13572 - 13573.
- [8] Fischer N O, Verma A, Goodman C M, et al. Reversible "irreversible" inhibition of chymotrypsin using nanoparticle receptors[J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(44):13387 - 13391.
- [9] Delvaux M, Walcarius A, Demoustier-Champagne S. Electrochemical H₂O₂ amperometric detection using gold nanotube electrode ensembles[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 525(2):221 - 230.
- [10] Almeida A J, Runge S, Müller R H. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1997, 149(2):255 - 265.

- [11] Konno T, Watanabe J, Ishihara K. Conjugation of enzymes on polymer nanoparticles covered with phosphorylcholine groups [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(2): 342 - 347.
- [12] Martins M B F, Supico A, Simões S I D, *et al.* An analytical methodology to quantify the incorporation of enzymes in polyalkylecyanoacrylate nanoparticles based on size exclusion chromatography [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, 15(6): 811 - 818.
- [13] Madan T, Munshi N, De T K, *et al.* Biodegradable nanoparticles as a sustained release system for the antigens/allergens of *Aspergillus fumigatus*: Preparation and characterization [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997, 159(2): 135 - 147.
- [14] Jia H F, Zhu G Y, Bradley V, *et al.* Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts [J]. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(5): 1027 - 1032.
- [15] Phadtare S, Kumar A, Vinod V P, *et al.* Direct assembly of gold nanoparticle "shells" on polyurethane microsphere "cores" and their application as enzyme immobilization templates [J]. *Chem Mater*, 2003, 15(10): 1944 - 1949.
- [16] Phadtare S, Vyas S, Palaskar D V, *et al.* Enhancing the reusability of endoglucanase-gold nanoparticle bioconjugates by tethering to polyurethane microspheres [J]. *Biotechnol Prog*, 2004, 20(6): 1840 - 1846.
- [17] Jia J B, Wang B Q, Wu A G, *et al.* A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(9): 2217 - 2223.
- [18] Tang F Q, Meng X W, Chen D, *et al.* Glucose biosensor enhanced by nanoparticles [J]. *Science in China (B Series)*, 2000, 43(3): 268 - 274.
- [19] Phadtare S, Vinod V P, Wadgaonkar P P, *et al.* Free-standing nanogold membranes as scaffolds for enzyme immobilization [J]. *Langmuir*, 2004, 20(9): 3717 - 3723.
- [20] Yang Y H, Yang H F, Yang M H, *et al.* Amperometric glucose biosensor based on a surface treated nanoporous ZrO₂/Chitosan composite film as immobilization matrix [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 525(2): 213 - 220.
- [21] McKenzie K J, Marken F. Accumulation and reactivity of the redox protein cytochrome c in mesoporous films of TiO₂ phytate [J]. *Langmuir*, 2003, 19(10): 4327 - 4331.
- [22] Kim J, Grate J W. Single-enzyme nanoparticles armored by a nanometer-scale organic/inorganic network [J]. *Nano Lett*, 2003, 3(9): 1219 - 1222.
- [23] Luo X L, Xu J J, Wei Z, *et al.* Glucose biosensor based on ENFET doped with SiO₂ nanoparticles [J]. *Sensors and Actuators B*, 2004, 97(2-3): 249 - 255.
- [24] Vertegel A A, Siegel R W, Dordick J S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme [J]. *Langmuir*, 2004, 20(6): 6800 - 6807.
- [25] Bower C K, Sananikone S, Bothwell M K, *et al.* Activity losses among T₄ lysozyme charge variants after adsorption to colloidal silica [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 64(3): 373 - 376.
- [26] Kim J, Lin Y H, Grate J W. Single-enzyme nanoparticles on nanostructured matrices [J]. *Biological Sciences*, 2003, 34: 1746.
- [27] Nednoor P, Capaccio M, Gavalas V G, *et al.* Hybrid nanoparticles based on organized protein immobilization on fullerenes [J]. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15(1): 12 - 15.
- [28] Billsten P, Wahlgren M, Arnebrant T, *et al.* Structural changes of T₄ lysozyme upon adsorption to silica nanoparticles measured by circular dichroism [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1995, 175(1): 77 - 82. ■

Multitec[®]可喷涂聚氨酯体系已证实其价值所在

德国拜耳材料科技公司所开发研制的 Multitec[®] 聚氨酯喷涂体系是一个经济与生态发展并非相互对立而是联合发展的典型例证。这一液态体系无论有无玻璃纤维增强功能,均能在打开或关闭的模具中喷涂以创造出具有不同几何形状的零件。这种工艺已经证实对于生产模塑制品非常有效。与利用人工层压的常规生产相比,系统具有的 3~5 min 变化的短固化时间对生产力有着非常积极的影响。此外,该体系免除了苯乙烯以及过去的能量密集型的后固化工艺。取决于现正处于讨论中的应用,生产商不论是否使用了玻璃纤维增强,可以连续进行多次喷雾操作,从而提高该强度或者产生可涂层的表面。

很多不同类型的发展很早就已经利用了这些优点。例如, Multitec[®] 增强的 ABS 制造的复杂外形模塑发动机罩已经设计用于波兰 Pronar Sp. z o. o 公司生产的新型拖拉机上。拜耳材料科技公司聚氨酯喷雾系统的专家 Marc

Schütze 博士认为:“这个例子很好地证明了聚氨酯喷雾体系也能用于商用汽车高品质部件的制造。”

在 Neoplan 汽车上也使用了玻璃纤维加固的 Multitec[®] 短纤可喷体系生产面积为 130 cm × 95 cm 的防钻撞模制品。其成型部件质量轻,能够可靠地保护上方油盘以防止散落的碎片和旋转颗粒。

Multitec[®] 短纤可喷体系在浴缸的生产中同样也证明了其珍贵价值。浴缸的形状一般是通过热成型聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)或 ABS 热塑性膜材质制造而成。为确保模制品拥有必要的稳定性,热成型膜材的背面须经过增强处理。直至现在,主要还是通过使用不饱和聚酯和短切波纤进行层压膜材的手工艺来完成,该工艺耗时且耗能。而拜耳材料科技公司的聚氨酯喷雾体系非常适合取代以前的工艺,它固化快、可以不使用苯乙烯而且薄膜基材粘附效果非常好。(俞蕊)