文章编号: 1001-3555(2020)04-0378-19

多孔材料固定化脂肪酶的研究进展

张 灿,姜国芳*,杨江楠,陈国庆,谢宗波,乐长高* (东华理工大学应用化学系,江西南昌 330013)

摘要:在有机合成中,脂肪酶是一种符合绿色化学理念、能显著提高催化效率和对生化工业具有重要意义的生物 催化剂,它的研究和应用涉及很多领域.然而,在众多有机反应中,脂肪酶容易受水、温度、pH值、酶液浓度、底 物浓度、酶的激活剂或抑制剂等许多因素的影响,导致失活,产率降低.为了解决这一问题,酶的固定化技术引起 了广大科研工作者的浓厚兴趣,并发现了很多酶的固定化载体.其中,多孔材料类固定化载体颇受青睐,它具有 孔隙率高、比表面积大、相对密度低、吸附性能较佳、渗透性能较好和精确的分子识别功能等优点.实验证明,多 孔材料固定化酶比游离酶的应用效果更佳,多次循环利用后仍旧保持较高的酶活性.我们主要对多孔材料在固定 化脂肪酶方面的应用和固定化酶的催化效果做了一个总结,多孔材料主要包括纳米多孔材料、大配体多孔材料、 碳骨架多孔材料、氧化硅骨架多孔材料、聚合物类多孔材料等.

关键词:脂肪酶;固定化;多孔材料;研究进展

中图分类号: 0643.32 文献标志码: A

随着各种研究方法和技术的不断进步和发展, 不论是化学基础研究还是与其相关的化工^[1]、能 源^[2]、环境^[3]、医药^[4]等各大领域都对有机合成的 发展及其应用提出了较高的要求.有机合成研究内 容主要包括反应路线的设计,合成机理的探究,催 化剂的催化效率,物质的分离纯化以及结构表征 等.其中,关于催化剂的研究^[5]一直以来都广受科 技工作者的关注,它不论是在实验室基础研究中还 是在工业生产活动中都具有加快反应速率、提高产 率、缩短时间和降低成本的作用.但是,传统催化 剂像酸^[6]、碱^[7]、过渡金属催化剂^[8]等,存在反应 温度高、难溶于有机溶剂、易腐蚀反应容器、难分 离、后处理麻烦、催化效率低、污染严重等问题.因 此,设计和寻找新型催化剂^[5,9]成为当下的热门研 究领域.

生物催化剂^[10]作为一种新型催化剂引起了科 学家浓厚的研究兴趣.它是利用酶、微生物细胞或 者动植物细胞催化的有机反应,是一种绿色催化 剂,与非生物催化剂相比,具有易于在常温常压下 反应、反应速率快、催化作用专一、成本低廉等优 势,广泛应用于食品加工^[11]、医药^[12]、纺织物^[13]、 生物传感器^[14]、生物柴油^[15]等工业生产中^[16].还 与生命科学[17]的发展密切相关. 脂肪酶[18] 是一类 重要的生物催化剂,又叫甘油酯水解酶,属于羧酸 酯水解酶类,能够分解或者合成由高级脂肪酸和丙 三醇形成的甘油三酸酯酯键,同时脂肪酶还是一类 特殊的酯键水解酶,只在异相系统发生催化,即只 在油水界面上催化^[19],而且只有当底物以微粒,小 聚合分散状态或呈乳化颗粒时,脂肪酶对底物的水 解才有显著的催化作用. 主要的来源^[20]包括动植物 和微生物,植物中含脂肪酶较多的是油料作物的种 子,如蓖麻籽、油菜籽,动物体内酶则是高等动物 的胰脏和脂肪组织,在肠液中也含有少量的脂肪 酶,来源于微生物的脂肪酶一般都是分泌性的胞外 酶,主要的发酵微生物有黑曲霉,假丝酵母等.脂 肪酶具有较高的催化活性,比没有催化剂时快100 倍以上: 脂肪酶在温和的反应条件下(低温和低压 下, pH 值介于 5~8 之间)具有较高活性, 还能减少 副反应的发生: 酶具有较高的区域选择性和对映体 选择性,能够催化很多反应类型^[21].比如,脂肪酶 能够催化酯的合成^[22]、水解^[23]、酯交换^[24]、醇 解^[25]和酸解^[26]等反应. 但由于受到温度、pH 值、

收稿日期: 2020-06-16; 修回日期: 2020-06-22.

* 通讯联系人, gfjiang@ecut.edu.cn; zhgle@ecut.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金(No. 21462001),江西省科技计划项目(Nos. 20192BBH80012)(National Natural Science Foundation of China (No. 21462001), Jiangxi Provincial Science and Technology Project (Nos. 20192BBH80012)).

作者简介: 张灿(1995-), 硕士生, 主要从事生物催化研究(Can Zhang (1995-), master student, mainly engaged in biocatalysis research).

酶液浓度、溶剂等因素的影响,游离酶的催化活性 很低甚至容易失活.为提高脂肪酶的稳定性和催化 活性,1916年首次报道^[27]的固定化酶技术成功的 解决了这个问题,极大地促进了酶与底物的结合, 该方法在过去几十年中也有了显著的发展,这对工 业过程中使用几种酶的经济可行性产生了巨大的经 济和科学影响.随着对固定化酶的深入研究发现, 固定化酶还存在一些关键问题,即脂肪酶固定化在 载体上容易堆积从而导致与底物的接触面积减小; 在水相催化中催化三联体的 α-螺旋盖处于封闭状 态,致使活性中心未能有效地与底物接触;固定化 酶循环利用次数较少,回收固定化酶后仍检测到部 分游离酶;均相或者多相催化体系中依旧能检测到 失活固定化酶.这些问题对固定化酶的推广使用及 生产成本提出了新的挑战.

多孔材料^[28]的出现引起了广大科研工作者的 关注,多孔材料是指由封闭或者开放的孔洞构成的 平面或立体网络结构的新材料. 多孔材料具有很多 的优势,包括较大的比表面积和吸附性能,可以固 定数量较多的酶,提高酶的荷载量进而提高催化活 性,比如微球或者壳聚糖:稳定的化学性质,较高 的水热稳定性,能够提高酶对温度的耐受性,比如 沸石:骨架的组成可以进行改性调整,这为设计固 定化效果较好的固定化材料提供了条件,如 MOFs^[29]、COFs^[30];较高的吸附量和可控制的吸附 性能, 在采用吸附法固定化酶的同时还能将亲水材 料调控为疏水材料,打开α-螺旋盖,使活性中心与 底物充分接触,比如分子筛^[31]、二氧化硅^[32];孔 道规则、大小范围正好在多数分子尺寸范围内,这 对脂肪酶的固定化甚至是生物催化[33-35]的发展具 有重要的指导意义,同时也为工业生产的实用性、 经济性提供了有力的技术条件支撑. 我们将从各类 多孔材料的特性跟固定化酶的效果来进行简要的总 结(Fig.1).





多孔材料主要包括纳米多孔材料、大配体多孔 材料、碳骨架多孔材料、氧化硅骨架多孔材料和聚 合物类多孔材料等.我们将从以上几个方面系统介 绍多孔材料固定化酶的方法、固定化酶活性测定及 其固定化酶的催化性能.

多孔材料对酶的固定化方式主要是吸附和共价 键接,交联剂主要用的是戊二醛.第一步是对表面 修饰或未修饰过的多孔材料进行处理,即称取一定 质量的多孔材料加入到 79~100 mL 的磷酸盐缓冲 液 PBS(0.1 mol/L, pH 值为 7.0~7.5)或三(羟甲 基)氨基甲烷-盐酸 Tris -HCl 缓冲溶液(50 mmol/L, pH 值为 8.0)和 25~50 mL 的戊二醛溶液(20%, w/ v)中, 一般以磷酸盐缓冲溶液用的多, 在 250 mL 锥形烧瓶中经超声处理 2~5 min, 然后在 30~35 ℃ 的振荡培养箱中以 180~200 r/min 的转速培养0.5~ 2 h; 第二步是酶的固定化,称取几十到几百毫克质 量的脂肪酶加入到已经处理过的多孔材料缓冲溶液 中,将混合物溶液放在振荡器中培养 12 h,转速在 160~200 r/min 之间,温度为 37 ℃.随后,将培养 液通过真空过滤,再用蒸馏水重复洗涤 3 次,得到 固定化酶.最后,将该固定化酶在 25~35 ℃的真空 烘箱中干燥过夜,或者使用真空冷冻干燥技术得到 粉末沉淀,并在冰箱中以4 ℃低温保存,以供后续 用于活性测试、催化反应.

固定化脂肪酶中蛋白质的量一般通过 Bradford 法^[36]测定,由未固定化的脂肪酶的量来计算固定 的脂肪酶中蛋白质的量,负荷百分比则通过质量平 衡方程式计算:

Percentage immobilization = [(CiVi - CoVo)/ CiVi] × 100%

Ci =初始蛋白质含量(mg / mL)

Vi =反应混合物的初始体积(mL)

Co = 最终蛋白质含量(mg / mL)

Vo =反应混合物的终体积(mL)

该方法和公式也适用于固定化蛋白酶中的蛋白 质量的计算.

而游离和固定化脂肪酶的活性测定是通过将 30 mg 固定化脂肪酶(或 100 mg 游离脂肪酶)添加 到 1 mL 0.1 mol/L PBS(pH 7.0)的试管中, 里面还 盛有1mL0.5%的对硝基苯基棕榈酸酯和乙醇溶液 (w/v),将试管放置在搅拌器上,设定温度为37 ℃, 且以 160 r/min 的转速反应 5 min, 再加入 1 mL 25 g/L Na₂CO₃溶液终止反应. 取出试管在 5000 r/ min 下冷冻离心 10 min, 然后取1 mL 上清液并用蒸 馏水稀释,并通过紫外可见分光光度计检测该稀释 液在 410 nm 处的吸光度值. 根据朗伯-比尔定律 (Beer-Lambert Law),在与上述相同的条件下,摩尔 吸收系数(410 nm)为14 519 mol/L. 一单位活性 (U)定义为在以上条件下每分钟可水解1 mmol 对 硝基苯基棕榈酸酯的酶的量. 从其他条件获得的活 性定义为相对活性,我们假设在最佳条件下固定化 和游离脂肪酶的最大活性值为100%.在 pH 7.0 下, 研究了温度(30、40、50、60、70 和 80 ℃) 对游离和 固定化脂肪酶活性的影响,反应时间为1h.同样 的,在 37 ℃下,研究了 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、 7.0 和 8.0) 对游离和固定化脂肪酶活性的影响时 间,也是1h,每个样品处理重复3遍.

固定化蛋白酶的活性测定则是通过 Badhe 等人 描述的 Folin -Lowery 方法进行测定,并作了一些修 改. 在 5 mL 磷酸盐缓冲液 (pH = 8)中,添加 0.5 mg 固定的蛋白酶和 0.5 mL 酪蛋白溶液,在 35 ℃的 振荡培养箱中以 180 r/min 的转速培养 30 min. 然 后,加入 5 mL 三氯乙酸(0.11 mol/L)以终止反应, 最后将反应混合物过滤. 过滤后,再将 5 mL 碳酸钠 和 0.5 mL Folin 试剂加入到滤液中,震荡 30 min. 在 35 ℃下,通过使用 UV 分光光度计(UV-1800, Shimadzu)在 420 nm 的波长下测量溶液的吸光度. 固 定化蛋白酶活性(U)的一个单位定义为在最佳实验 条件下产生 1 μ g · mL⁻¹ · min⁻¹酪氨酸所需的固定 化酶的量.

固定化脂肪酶的热稳定性测定是通过将生物催 化剂加入到 0.1 mol/L PBS(pH 7.0)中,在 0 到 180 min 的时间范围内,以 50 ℃的条件进行恒温培育, 每 30 min 抽取一次该催化剂,并用于水解 *p*-NPP, 计算水解活性,而残余活性表示为初始活性的百分 比(热培养前的水解活性).

固定化脂肪酶的可重复使用性则通过以下步骤 测定,即在 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液中,保 持 37 ℃的温度不变,将 30 mg 固定化脂肪酶加入 到 *p*-NPP 的乙醇溶液中温和搅拌 5 min. 在每批反 应中,通过冷冻离心收集固定化的脂肪酶,用无水 乙醇洗涤 3 次,氮气吹扫干燥,再用于下一个循环, 最后通过以上方法计算固定化脂肪酶活性.

1 纳米多孔材料

1.1 磁性纳米多孔材料

1.1.1 磁性纳米粒子 磁性纳米粒子是一种跟酶 具有较好生物相容性的多孔材料.同时,磁性 Fe₃O₄ 具有较高的类似酶的高催化活性,其较大的比表面 积在固定化酶时能提供更多的接触位点,从而提高 固定化酶的量.由于具有磁性,能够采用更清洁且 处理过程简便的物理方法进行分离,更便于回收 利用.

1.1.1.1 磁性纳米粒子固定化脂肪酶 2017年, Chen 课题组^[37]通过聚乙烯基氯(PVBC)对 Fe_3O_4 进行修饰,开发了一种 Fe_3O_4 @ PVBC(Fe_3O_4 @ 聚乙烯基氯)磁性纳米粒子,能够提高脂肪酶的催化活性和稳定性.Bradford 法分析结果表明, Fe_3O_4 @ PVBC 纳米颗粒上脂肪酶的负载量为 162.5 mg 蛋白/g 颗粒.固定化脂肪酶的催化活性高达约 99.6%,而游离酶活性为 3.3%,这主要是由于 Fe_3O_4 @ PVBC 纳米颗粒对脂肪酶有较好的界面活化作用.此外,固 2019年, Lyu 课题组^[38]利用醛标记的枯草芽 泡杆菌脂肪酶 A 通过共价连接方式被固定在Fe₃O₄ 单分散磁铁矿微球上,固定化效率超过 90%,而重 复反应 10 次后,固定化脂肪酶的活性仍能保持在 90%.此外,还大大提高了酶的热稳定性、溶解度并 降低了酶凝聚在一起的可能性.通过进一步研究发现,枯草芽孢杆菌脂肪酶 A(BsLA)突变体包含 8 个 改变的氨基酸,从而提高了酶的溶解度并降低了酶 凝的可能性.BsLA8M 带有 LCTPSR 标签,用于引入 醛基.通过席夫碱反应使磁性粒子与 BsLA8M 共价 键合.固定化效率超过 90%,固定化脂肪酶的活性 增强(Scheme 1).



图式 1 LipaseA@ Fe₃O₄生物复合材料催化酯水解反应 Scheme 1 LipaseA@ Fe₃O₄ biocomposite catalyzed ester hydrolysis

2020年, Mosayebi 课题组^[39]以辛基对磁性氧 化石墨烯进行了功能化修饰,将纳米复合材料 GO-Fe₃O₄用于玫瑰假丝酵母脂肪酶(CRL-7)的固定化, 随后用于催化对硝基苯基棕榈酸酯与 2-丙醇的酯 交换反应.结果表明,固定化脂肪酶的活性为游离 酶(34.5 U/mg 脂肪酶)的 94.7%,催化酯交换反应 的产率为 89%,循环 10 次后的保留活性为 63%,

并提高了热稳定性. 另外, 采用(3-氨丙基)三甲氧 基硅烷、(3-巯丙基)三甲氧基硅烷和(3-辛基)三甲 氧基硅烷功能化 GO-Fe₃O₄ 纳米复合材料后, GO-Fe₃O₄固定化 CRL7 的量分别从未功能化前的 187.4 mg/g纳米复合材料增加到 328.6、265.3 和 413.2 mg/g(Scheme 2).



图式 2 CRL-7@ GO-Fe₃O₄生物复合材料催化酯交换反应 Scheme 2 CRL-7@ GO- Fe₃O₄ biocomposite catalyzed transesterification

1.1.1.2 磁性纳米粒子固定化蛋白酶 2015 年, Butt 课题组^[40]报道了将灰链霉菌蛋白酶共价交联 固定化在磁性纳米颗粒(NMP)上的研究,该磁性纳 米粒子经修饰后表面含有多个羟基.通过戊二醛固 定化后,分别形成了单层的(MNPs-GA-Pro)和多簇 的 MNPs-PGMA-Pro 的生物复合催化剂.与 MNPs-GA-Pro 相比, MNPs-PGMA-Pro 颗粒在较宽的温度 和 pH 范围内均显示出较优的酶活性和稳定性.与 游离酶相比,单层和多簇的 MNPs 表现出优异的酶 活性.当用于对寄生线虫的杀线虫活性测定时,多 簇的 MNPs-PGMA-Pro 的生物复合催化剂在7个磁 分离循环中保持了较高的活性.该生物催化剂可用 于水处理,且具有易磁分离,可重复使用和降低处 理成本的优点.

2017年, Neto 课题组^[41]报道了将金黄色青 霉蛋白酶固定在磁性纳米粒子上的研究,并利用 聚苯胺包被该生物催化剂,用于水解抗氧化剂肽 中的牛酪蛋白.固定的最佳条件是:时间 2 h,固 定化蛋白质的量为 200 μg/mL, pH 为 6.3,活化 时间为 7.3 h. 重复水解牛酪蛋白 5 次后,还能保 留其原始活性的 74%以上,水解产物的 ROS 清 除活性是非水解酪蛋白的 2.5 倍以上,验证了固 定化的蛋白酶能够开发对功能性食品具有很大 应用潜力的天然成分,该成分由酪蛋白衍生 而来.

1.1.2 磁性纳米花 磁性纳米花主要由磁性 Fe₃O₄ 核和花状有机硅径向皱纹壳组成,作为固定化酶载 体,磁性 Fe₃O₄核周围所具有的花状有机硅径向褶 皱壳层可以减少磁性纳米粒子的不可避免的聚 集^[42-44];较大面积的褶皱层不仅增大了与底物的 接触面积,还能有效地减少固定化酶的流失;有机 硅的疏水性可以促进脂肪酶的催化性能,即脂肪酶 中的两亲性 α-螺旋盖子,可以将活性中心从底物上 遮挡起来或在疏水环境中去除,使活性中心暴露在 底物上^[45]. 2018年, Du 等^[46]利用磁性有机硅纳米花固定 化南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB),并用来作为对 甘油(GL)和碳酸二甲酯(DMC)反应合成碳酸甘油 (GC)的生物催化剂,当GL与DMC的摩尔比为 1:20,分子筛添加量为0.2g,温度为50℃并反应 24 h为模板反应条件时,催化剂的催化性能最佳 (GC 收率 88.66%,GL转化率 94.24%),循环7次 后,CALB 和纳米花生物复合材料还保留初始活性 的79%以上,GC 产率为70.31%.此外,由于具有 磁性,可以很方便的利用磁铁对固定化酶复合材料 进行回收利用(Scheme 3).



图式 5 CALB@ Nanoflower 生物发行 材料推花 ha 文操反应 Scheme 3 CALB@ Nanoflower biocomposite catalyzed transesterification

同年, Ren 课题组^[47]报道了一种壳聚糖复合水 凝胶(PVA-NPC),该复合水凝胶是由聚乙烯醇 (PVA)与壳聚糖(NPC)通过反复冷冻和融化进行 物理交联而形成,进而提高酶-无机杂化纳米花机 械强度、催化活性并使其易于分离.用 PVA-NPC 修 饰磁性纳米花,即纳米花-PVA-NPC 复合材料,再 用于对脂肪酶的固定化.水凝胶以网络结构均匀地 包覆在脂肪酶-Cu₃(PO₄)₂ · 3H₂O 纳米花表面,底 物和产物可以自由移动.水凝胶出色的机械性能有 效地保护了脆弱的纳米花免受外部压力,从而防止 酶活性降低.与游离脂肪酶(97.28 U / g)相比,纳 米花-PVA-NPC3 在 37 $^{\circ}$ C和 pH 7.4 下表现出更高的 酶促活性(146.12 U / g),同时反应结束后易于分 离(Scheme 4).



图式 4 Lipase@ PVA-NPC 生物复合材料催化酯交换反应 Scheme 4 Lipase@ PVA-NPC biocomposite catalyzed transesterification

2019 年, Ren 课题组^[48]采用共沉淀法成功的 将脂肪酶固定化在新型磁性纳米花 Cu₃(PO₄)₂上, 即 Lipase@ MNFs. 该磁性纳米花由花状磷酸铜骨架 和磁性氧化铁心组成,在外加磁场的作用下,磁性 纳米花可以快速有效地从反应体系中分离出来. 与 游离脂肪酶相比, Lipase@ MNFs 具有较高的酶活性 (92.63 U/g, 37 ℃和 pH 7.4),更好的热稳定性和 较佳的 pH 稳定性(60 ℃和 pH 10.0).磁性纳米花 的设计为提高脂肪酶的催化活性和稳定性以及简化 酶的分离过程开辟了新的途径(Scheme 5).





1.2 非磁性纳米多孔材料

纳米多孔金(NPG)在固定化酶方面也是具有 代表性的材料^[49],对固定化酶有如下优势:(1)作 为一种具有微观结构的大体积材料,固定化酶后, 易于回收利用;(2)具有开放的三维立体结构和较 高的表面积,能够增加固定化酶的空间选择性和固 定化效率,有利于提高酶的吸附性和荷载量; (3)孔径大小范围介于几纳米到几微米之间,可调 控的孔隙率能够对不同大小的酶进行固定化,对具 有特定功能的多种酶分子有较好的选择性;(4)具 有良好的生物相容性、清洁性和表面活性,能够减 小酶的表面张力,增加载体与酶的亲和性,并有效 减缓酶变性.与其他介孔材料相比,NPG具有良好 的表面化学特性,能够提高其功能利用率和导电 性,在多相催化、电催化、燃料电池技术和生物分子传感方面具有广阔的应用前景^[50-53].

2013年, Du 课题组^[54]把脂肪酶固定化在纳米 多孔金上,并将 CALB@ NPG 生物复合材料用于催 化对硝基苯基棕榈酸酯(pNPP)的水解反应.结果 表明, Lipase@ NPG 具有较佳的催化活性和显著的 可重复使用性.循环 10 次以后, Lipase@ NPG 生物 复合材料的催化活性没有降低,回收后发现并没有 酶从 NPG 中浸出.此外,与游离脂肪酶相比, Lipase@ NPG生物复合材料在更宽的 pH 范围和更 高的温度下均具有高催化活性.因此, NPG 中酶的 包封对于开拓具有新功能的固定化酶技术具有潜在 的价值,并将在不同化学工艺中得到广泛应用 (Scheme 6).





2019年, Chronopoulou Laura 课题组^[55]提出了 将酶固定在纳米载体上的想法,该方法具有提高酶 活性、维持生物催化剂稳定性、促进回收和循环利 用的优点.用纳米金和银颗粒(AuNP或AgNP)分别 与反式-[二硫代双(三丁基膦)二铂(II)4,4'-二乙 炔基联苯](Pt-DEBP)以及有机二硫醇4,4'-二硫 醇-联苯(BI)配合生成反式有机金属双核配合物. 生成的配合物都能在3D网络中与纳米金属颗粒相 连接,随后把荧光假单胞菌脂肪酶通过吸附的方式 固定化在该纳米金属材料上.在效果最佳的载体 AgNPs-PtDEBP上固定化的荧光假单胞菌脂肪酶, 在很宽的温度范围(25~55 ℃)下有较佳的热稳定 性;与可溶形式使用的脂肪酶相比,该固定化酶在 水性介质(50%)和有机介质中均能较好地保留酶 活性(Scheme 7).



图式 / Lipase@ NP 生物发音材料催化酯交换反应 Scheme 7 Lipase@ NP biocomposite catalyzed transesterification

2 大配体多孔材料

2.1 金属有机框架材料(MOFs)

金属有机框架材料(MOFs)能够在均相体系中 参与反应,且具有较高的选择性和活性而受到广泛 关注.在这几类多孔材料中,其具有较多数量的催 化位点以及大小可调的孔径,很大程度上提高了固 定化酶的效率.组成 MOFs 的有机配体大多以极性 较强的官能团为主,例如羰基、羧基、醛基、碳-碳 双键、氨基等基团,这与组成酶的氨基酸中的肽键 有相似的结构,能够有效的固定化酶.另外,其稳 定的结构能够在强酸、强碱环境中保护酶的活性; 同时,较小的密度和较高的疏水性能够有效打开脂肪酶的"盖子",使活性中心暴露,增强催化活性. 此外,不论是共价键合、表面附着、孔道包封和共 沉淀^[50]几种固定化方式都能适用于 MOFs.

2016年, Cao 课题组^[56]首次报道了将枯草芽 泡杆菌脂肪酶(BSL2)固定化在 Cu-BTC 的层级多孔 金属有机骨架材料中的研究.固定化的 BSL2 在酯 化反应过程中具有很高的酶促活性和重复使用性. 在 10个循环后,固定化的 BSL2 仍显示出其初始酶 活性的 90.7%和其初始转化的 99.6%.这是在有机 溶剂中脂肪酶固定在 MOFs 材料上的首次报道 (Scheme 8).





2017年,Liu 课题组^[57]报道了一种由金属有 机骨架衍生的纳米孔碳(NPC)材料,其中最主要 的材料是 cMII 100(Al)(经羧基修饰后在不同温 度下热解的 NPC),并成功用于固定化洋葱伯克 霍尔德氏菌脂肪酶. 该介孔 NPC 修饰的氧化铝提高了酶的负载率和大豆油酯交换反应的催化性能,为绿色且可持续的工业应用技术提供了新的方向(Scheme 9).



图式 9 BCL@ cMIL 100(Al) 生物复合材料催化酯交换反应 Scheme 9 BCL@ cMIL 100 (Al) biocomposite catalyzed transesterification

2019年, Samui 课题组^[58]报道了通过吸附法一步将假丝酵母脂肪酶固定在 Zn-(NH₂-BDC)金属有 机骨架(MOFs)上的研究,固定化结束后,观察到

假丝酵母脂肪酶在 Zn-(NH₂-BDC) MOF 上的负载量 为 280 mg/g, 酶载量效果较为理想. 固定化后的酶 用于催化对硝基苯基丁酸酯的水解反应, 显示出优

异的稳定性和催化活性.最重要的是,固定化后的 假丝酵母脂肪酶在重复使用 10 次后仍保留其初始 活性的 79% (Scheme 10).





2020 年, Li 课题组^[59] 报道了将嗜热脂肪酶 (QLM) 成功地固定化在生物基金属有机骨架 (MOF)上的研究. 该 MOF 通过仿生矿化的方法将 乙酸锌与腺嘌呤进行反应从而合成该金属有机框架 材料,以对硝基苯基辛酸酯的水解为模型反应,利 用该 QLM@ MOF 在高温、碱性条件以及金属离子 存在下进行反应,结果显示出较高的催化活性和稳定性.最后,固定化酶成功地应用于生物柴油的制备,转化率>60%,且具有优异的可回收性,在使用3个循环后未观察到晶体结构和形态的变化(Scheme 11).





2.2 共价有机框架材料(COFs)

共价有机框架材料(COFs)具有大范围的网状 结构、较大的比表面积值(可达 4000 m²/g)、较高 的热稳定性(400~500 ℃)以及很多开放位点,这为 形成大量稳定的固定化酶提供了最佳的平台.与 MOFs 相比,使用 COFs 固定化酶的优势是通过使用 特定的构建块能更精确地控制其化学结构,由于其 难溶于水,与绝大多数有机溶剂不反应,将酶固定 化在其表面后,显著提高了其在水介质和有机溶剂 中的稳定性^[60].在固定化酶时,对酶具有较好亲和 力的交联剂能够利用 COFs 构建块的多功能性对酶 进行修饰,进而提高了与特定酶的亲和力,并可以 设计出与特定酶亲和力更高的框架,也为开发新的 酶固定化策略提供了新的方向.

2017 年, Sun 课题组^[60]首次报道了将脂肪酶 (PS)固定化在 COF 上的研究,该 COF 具有独特的介 孔结构和可调节的表面化学性质.结果表明,该 COF 对酶具有很高的亲和力和负载效率,与其他类型的 多孔材料相比,该 COF 能很好地保持酶的活性并表 现出数量级的催化活性,且易回收(Scheme 12).



图式 12 PS@ COF 生物复合材料催化酯交换反应 Scheme 12 PS@ COF biocomposite catalyzed transesterification

2019年,Oliveira 课题组^[61]通过一个亚胺连接的共价有机框架材料,采用3种固定化酶方法将南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB)固定到该共价有机框架上,包括表面物理吸附、表面官能团的共价固定和合成后添加的连接体的共价固定.将该固定化酶用于油酸和乙醇的酯化反应中,发现该固定化材料

负载的 CALB 具有较高的比活性,在 58~283 U/mg 之间,是游离酶的 2.6~12.7 倍.实验表明,该材料 是一种对酶合适的固定化载体,可以显著提高酶活 性,增强热稳定性,并使生物催化剂能够再循环使 用(Scheme 13).



Scheme 13 CALB@ PPF-2 biocomposite catalyzed esterification

2.3 多孔有机共聚物材料(POPs)

多孔有机共聚物具有质量较轻、比表面积较高,以及有较多稳定的分子网络结构的优势,也广 泛应用于酶的固定化.

2018年, Silva 课题组^[62]成功合成了聚(苯乙 烯-共-二乙烯基苯),并通过聚合乳液磁化磁铁矿 (STY-DVB-M)进行磁化,从而形成用于脂肪酶固 定化的磁珠. 该磁珠具有较好的物理吸附和高固定 化率(>70%)和水解活性(大约1850 U/g),并固 定化了两种微生物脂肪酶(伯克霍尔德菌脂肪酶和 荧光假单胞菌脂肪酶).研究表明,两种固定化的脂 肪酶都能够催化椰子油与乙醇的酯交换反应以产生 脂肪酸乙酯(FAEE),而且固定化酶循环使用7次 后而仍保持其活性,半衰期为970 h.

2019年, Weltz 课题组^[63] 报道了将枯草芽 孢杆菌脂肪酶 A(LipA)固定化在聚(磺基甜菜 碱甲基丙烯酸甲酯)(PSBMA)上的研究,在最 佳温度条件下,酶活性得到了显著提高.催化性能 的显著提高主要是由于 LipA 的结构稳定性以及 使用单分子 Foster 共振能量转移测量 LipA 的构 象动力学变化,而且周转频率提高了 100 倍 (Scheme 14).



图式 14 LipA@ PSBMA 生物复合材料催化酯水解反应 Scheme 14 LipA@ PSBMA biocomposite catalyzed ester hydrolysis

同年,Li 课题组^[64]利用聚乙二醇(PEG)对聚 乳酸(PLA)进行修饰形成生物相容性良好的 PLA/ PEG 膜,再利用 1,6-六亚甲基二胺和戊二醛作为交 联剂,将假丝酵母脂肪酶固定化在 PLA/PEG 膜 上,随后以异辛烷为溶剂用于催化橄榄油的水解反 应.并用扫描电镜和傅里叶红外光谱对脂肪酶的固 定化性能进行了表征.结果表明,假丝酵母脂肪酶 已成功固定在生物相容性 PLA/PEG 膜上.另外, 1,6-六亚甲基二胺可以保持酶的最大活性.此外, 固定化酶的最佳温度从 45 变为 50 ℃,固定化脂肪 酶的 pH 值从 6.5 变为 7.5. 热灭活实验表明,固定 化的脂肪酶在 50 ℃的缓冲液中处理 120 min 后,保 留的原始活性高达 63%,显著高于对照组.与游离

脂肪酶保持其初始活性的 23%相比,固定化脂肪酶 在储存 30 d 后可以成功保留高达 70%的活性.最 后,固定化酶在经过 6 个循环后仍具有 82%的 活性.

2020年, Cejudosanches 等^[65] 报道了通过吸附 将根瘤菌根霉脂肪酶(RML)固定化在辛基琼脂糖 上的研究,并进一步用聚烯丙基胺(PAA)涂覆在 RML上,研究结果发现, PAA 层仅能发挥约4倍的 稳定作用,而与醛-葡聚糖的进一步交联则大大提 高了其稳定作用.与固定化的可溶性酶相比,在 55℃和pH7下,新衍生物固定化RML的稳定性比 未涂覆的固定化RML高440倍以上,并且催化活 性高出7倍(Scheme 15).



图式 15 Lipase@ RML-PAA 生物复合材料催化酯水解反应 Scheme 15 Lipase@ RML-PAA biocomposite catalyzed ester hydrolysis

3 碳骨架多孔材料

3.1 碳多孔材料

碳多孔材料具有较高的孔隙率,吸附能力,以及 对酸和碱较佳的耐受性,使得它对于酶的固定化也 非常有价值^[66-68].碳多孔材料具有较高的比表面积, 这为负载更多质量的酶提供了条件.碳多孔材料上含 有羟基和羧基、内酯和酚基,它们允许离子相互作 用,而且易于与交联剂形成稳定的共价键,能够有效 的防止固定化酶的流失,这为共价固定化酶提供先 决条件^[69].碳的疏水性促进了对脂肪酶的快速吸附, 从而产生界面活化现象^[70-72].即当脂肪酶达到脂/水 界面时,界面活化的特征是活性迅速增加.脂肪酶会 被吸附到疏水界面上,从而导致酶内部结构的变化, 使α-螺旋盖打开,活性中心暴露在底物上.

2006年, Dong 等^[73]报道了一种预处理过的米 根霉脂肪酶被固定化在硅胶表面的新方法. 固定化 前, 先用 0.1%大豆油预处理米根霉脂肪酶, 以防止 在共价固定过程中失去其活性. 结果表明, 大豆油 预处理过的固定化脂肪酶比用其他材料预处理的固 定化脂肪酶具有更好的活性, 为 630 U/g, 是固定 化非预处理脂肪酶活性的 20 倍. 另外, 该预处理的 固定化脂肪酶活性在重复使用 10 次后仍保持在其 原始活性的 90%以上.

2018年, Reichardt 课题组^[74]以多孔混凝土 (PCM-1)和硅胶(PCM-2和PCM-3)作为固定化载 体,将绵羊热霉菌脂肪酶(TLL)通过N-(3-二甲氨 基丙基)-N-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)分别共价固 定化在3种多孔碳材料上,得到了重复性较好、稳 定性较佳、活性较高的固定化产物,然后用于催化 对硝基苯基棕榈酸酯(pNPP)的水解反应;结果表 明,共价结合的TLL-PCM保持了100%的初始活 性,还具有12个月长的储存期.这为脂肪酶的固定 化提供了一种新的载体(Scheme 16).





3.2 碳纳米管(CNT)

碳纳米管具有较小的传质阻力,导致不论从外 部还是内部都能对酶进行固定化,进而显著提高酶 的负载量,而且其内部可以采用包覆的方式对酶进 行固定化,有效的保护和防止酶的流失.同时,其 较为理想的孔隙率碳结构能够大幅度提高酶与底物 的接触面积.此外,最吸引人的是对于在碳纳米管 外不能发生的反应都能在内部发生,为反应提供了 一个稳定的容器.

2011年, Tan 课题组^[75]报道了通过浸渍方法 将磁性氧化铁纳米颗粒负载到多壁碳纳米管 (MWNTs)上的研究. 在将解脂耶氏酵母脂肪酶共价 固定化在该磁性纳米管上后,利用磁性多壁碳纳米 管-脂肪酶拆分庚烷溶剂中的(*R*,*S*)-1-苯基乙醇, 与天然脂肪酶相比,该固定化脂肪酶在庚烷中拆分 (*R*,*S*)-1-苯基乙醇中具有较高的酶活性,且易回 收.此外,发现在超声处理该固定化脂肪酶长达 30 min后,磁性多壁碳纳米管-脂肪酶的催化作用几 乎不受影响,而天然脂肪酶的催化活性随超声处理时间的延长而降低(Scheme 17).



图式 17 Lipase@ M-MWNT 生物复合材料催化酯化反应 Scheme 17 Lipase@ M-MWNT biocomposite catalyzed esterification

2016年, Cao 课题组^[76] 报道了将血浆修饰的 多壁碳纳米管用作固定脂肪酶载体的研究;结果表 明,在最佳条件下,血浆修饰的多壁碳纳米管固定 化脂肪酶时吸附量可达 0.15 g/g,固定化脂肪酶的 最大酶活性为 520 U/g. 此外,在聚乙二醇(PEG)-脂肪族酯的合成中, MWNTs-脂肪酶产生的酯化率 约为 47%.

2019年, Socka 课题组^[77]将南极假丝酵母脂肪 酶 B(CALB)通过非共价固定化在多壁碳纳米管上,

并在基于纳米生物催化剂和1,5-戊二醇的新型催化/ 引发体系下,利用 CALB-CNT 制备 *ε*-己内酯(CL)和 碳酸三亚甲基酯(TMC)的无金属(共)聚合物.通过 核磁共振碳谱研究它们的微观结构,同时通过差示 扫描热量法研究其热性能.研究表明 CALB-CNT 复合 材料催化剂在连续 5 个循环中均未显示出明显的活 性损失.无毒催化剂在制备聚合物中的研究对工业和 生物医学应用具有重要意义,碳纳米管固定化脂肪 酶的出现解决了这一重大难题(Scheme 18).



图式 18 CALB@ MWCNT 生物复合材料催化聚合反应 Scheme 18 CALB@ MWCNT biocomposite catalyzed polymerization

4 氧化硅骨架多孔材料

4.1 分子筛

分子筛具有很多可用于固定化脂肪酶的优势, 有清晰、高度有序的孔道分布和极高的内表面积 (可高达 600 g/m²),孔径单一,孔径大小的可调控 范围较宽,这不仅能够有选择性的对特定大小的酶 进行有效的固定化,防止固定化过程中酶的流失, 还能提高负载量.分子筛的主要成分是硅酸盐,在 PBS 缓冲溶液中固定化酶时对酶的吸附性能较佳, 反应过程中,能够减少极性溶剂对酶的解吸附作

用,防止酶的流失.

2002年, Pires 课题组^[78]报道了利用 MCM-41 和 Al-MCM-41 分子筛固定化几种脂肪酶的研究,并用 于乙酸与乙醇的气相酯化反应.研究结果表明,酯化 反应中截留在 MCM-41 和 Al-MCM-41 孔中的酶的活 性顺序为 OF(根瘤菌脂肪酶)<FAP-15(米根霉脂肪 酶)<LEX(爪哇毛霉菌脂肪酶)<PS(假单胞菌洋葱脂 肪酶)<AK(荧光假单胞菌脂肪酶),而且在 25 和 45 ℃之间进行的实验表明该固定化脂肪酶的活性不 受温度影响,这表明酶被有选择性地固定在分子筛 孔中,能够有效避免失活或自溶等问题(Scheme 19).

 $CH_{3}COOH + HOCH_{2}CH_{3} \xrightarrow{\text{Bio Cat.}} CH_{3}COOCH_{2}CH_{3} + H_{2}O$ gas phase $25 \degree C 1 h$

图式 19 Lipases@ MCM 生物复合材料催化气相酯化反应

Scheme 19 Lipases@ MCM biocomposite catalyzed gas-phase esterification

2010年, Raghuvanshi 等^[79]报道了以戊二醛作 为交联剂,用分子筛固定化脂肪酶的研究,在55 ℃条件下反应2h后,酶活力只损失了12%,同时 催化对4-硝基苯基棕榈酸酯(4-NPP)的水解反应, 在 8 个循环后仍能保持 85%的酶活力. 与游离酶相比,该固定化酶在 pH 7.5~9.0 范围内稳定,用有机溶剂洗涤后没有变性,很大程度上提高了酶的稳定性(Scheme 20).



图式 20 Lipase@ Zeolites 生物复合材料催化酯交换反应 Scheme 20 Lipase@ Zeolites biocomposite catalyzed transesterification

4.2 二氧化硅

二氧化硅固定化酶的方法主要是先通过伯胺对 其表面进行修饰,再通过戊二醛两端的醛基分别于 该氨基和酶中氨基进行共价连接,进而达到固定化 酶的目的.具有无化学反应性^[80]和吸附性能良好的 优点,还可以采用吸附方式固定化酶.

2013年, Zhang 课题组^[81]报道了将猪胰腺脂肪 酶(PPL)共价固定化在多孔二氧化硅颗粒(PSP)表 面上的研究,该颗粒被不同表面活性基团修饰过, 在每克载体上可以获得 86.2~158.2 mg 的天然 PPL 偶联收率.此外,在更高的温度下,该固定化 PPL (IPPL)能够在离子液体介质中成功催化聚己内酯 (PCL)和聚(5,5-二甲基-1,3-二恶烷-2-酮)(PDTC) 的合成反应,而且具有长期高温稳定性,有助于固 定化和离子液体效果的良好结合.然而,天然 PPL 不能用于合成任何聚合物,这表明 IPPL 具有比天 然 PPL 较高的催化活性.还显示了在离子液体介质 中的 IPPL 对聚合反应的催化活性与固定化酶和环 状单体的性质都有十分密切的关系(Scheme 21).





2018年, Zhang 课题组^[82]利用吸附法将猪胰脂 肪酶(PLL)固定在纳米 SiO₂上, 然后在最佳 pH 7.6 和温度 40~50 ℃条件下催化橄榄油的水解反应.在 固定化脂肪酶重复催化反应 8 次后,还具有初始活 性的 73.5%,而游离脂肪酶活性在 2 d 内损失了 50%;这证明了固定化酶在连续多次循环利用后, 仍保持有较高的活性,提高了酶的稳定性.

4.3 多孔陶瓷材料

多孔陶瓷材料的固定化原理跟二氧化硅一样, 多孔陶瓷的主要成分也含有硅酸盐,且具有较大孔 径,能够较好的吸附酶,其较高的开口气孔率能够 为酶的固定化提供较多进入路径,进而提高固定化 酶的量.同时,在强酸、强碱和有机介质中也有较 好的稳定性,能够保护酶失活和防止被污染.此外, 多次使用后,再用气体或者液体洗涤,依旧能够恢 复其原来的过滤性能和清洁性,这无疑有利于回收 利用.

2000年, Masanobu 等^[83]报道了将脂肪酶(PS) 固定化在多孔陶瓷载体(TN-M)上的研究, 该陶瓷 材料以高岭石矿物为原料, 采用水热法制备. 与其 他工业固体载体相比, TN-M 载体对脂肪酶的固定 化具有较高的稳定性和选择性, PS@TN-M 对有机 底物的催化活性均高于游离粗酶, 还能从粗酶中选 择性地富集脂肪酶蛋白(Scheme 22).



图式 22 PS@ TN-M 生物复合材料催化酯交换反应 Scheme 22 PS@ TN-M biocomposite catalyzed transesterification

2005年, Ruckenstein 等^[84]报道了使用多孔陶 瓷固定化脂肪酶(PS-CII)的研究,并用于催化乙 酸乙烯酯在丙酮中低温拆分 5-羟甲基-3-苯基-2-异 恶唑啉(±)-1 的反应.结果表明,与游离 PS-CII 的 对映体选择性相比较低(E=5.9),而较固定化 PS-C

Ⅱ的对映体选择性得到显著提高,最高可达 249 (60 ℃),进一步扩大了低温方法的应用范围.此 外,这是第一例报道的脂肪酶催化拆分异恶唑啉衍 生物(±)-1,具有实际可行性和较高的对映选择性 (Scheme 23).



Scheme 23 PS-C II biocomposite catalyzed transesterification

2015年, Gao 课题组^[85]通过戊二醛将假丝酵母脂肪酶固定化在多孔陶瓷块 Man-8上,并作为甘露醇和脂肪酸乙烯基酯制备油凝剂的催化剂,还对固定化脂肪酶的活性和稳定性进行了研究.结果表明,与天然脂肪酶相比,固定化脂肪酶的稳定性明显提高.此外,在固定化脂肪酶的催化下,经过48

h 的反应,该油胶凝剂的产率可达 78% 以上;第5 次循环利用后,收率仍可保持在 50% 以上.该研究 不仅为制备稳定的脂肪酶生物催化剂提供了一种方 法,而且还为油胶凝剂的工业化生产提供了新的途 径(Scheme 24).





Scheme 24 Lipase@ Man biocomposite catalyzed transesterification

5 聚合物类多孔材料

5.1 大孔树脂(MPR)

大孔树脂是一类吸附性能良好的有机高分子聚 合物材料.大孔树脂由三维立体孔结构组成,孔径和 比表面积较大,热稳定性较高,在水溶液和非水溶液 中都能利用,这更有利于酶活性的提高.最重要的是 其优良的吸附性能和筛选原理能够选择性地固定吸 附能力和分子量大小不同的物质,固定化效果极佳, 并通过洗脱剂洗涤而达到分离目的.此外,由于较高 的孔隙率,能够可调控的固定化脂肪酶^[86].

2011年, Wang 课题组^[87]报道了将假丝酵母脂 肪酶通过京尼平交联固定化到两种中孔树脂中的研 究. 在最佳条件下, 当京尼平浓度为 0.5%时, 在树 脂 NKA-9 上固定化的脂肪酶的活性回收率可达到 96.99%,对于含量为 0.2%的 S-8 则可达到 86.18%. 与使用戊二醛作为交联剂相比较,使用京尼平交联 固定化的脂肪酶具有较高的 pH 和热稳定性,储存 稳定性和可重复使用性.此外,在 6 个水解循环后, 使用京尼平作为交联剂的固定化脂肪酶的残留活性 保持其初始活性的 60%以上,而使用戊二醛作为交 联剂则仅保留约 35%的活性.

2013年,Li课题组^[88]报道了利用一种固定化 效果较好的大孔树脂(MPR-NKA)固定化脂肪酶 (BCL)的研究.以1-苯基乙醇与乙酸乙烯酯的外消 旋酯交换反应作为模型反应,进行催化.与游离酶 相比,固定化 BCL 的酶活性和对映体选择性(ee) 得到了显著的提高,在10到65℃范围内显示出较 理想的热稳定性和较高的催化效率.在连续使用 30 多个批次后,固定化脂肪酶仍保持其大部分活性.

与其他固定化脂肪酶相比,固定化BCL还具有更好的催化效率(Scheme 25).





2019年, Feng 课题组^[89]将黑曲霉脂肪酶 (ANL)固定化在6种不同的大孔丙烯酸树脂上,并 把6种不同的ANL-丙烯酸树脂复合材料用于催化 高酸酱油的渣油(SSR),脱酸生成二酰基甘油.树 脂 MARE 具有较低孔隙率,较高堆积密度和中等疏 水性的优点,且由于具有最佳热稳定性和可重复使 用性,因而被选为脂肪酶的最佳固定化载体,与固 定化的南极洲念珠菌脂肪酶(Novozym435)相比, ANL-MARE 生物复合材料不仅具有较高的脱酸活 性和良好的热稳定性,而且可以连续重复使用 15 个循环,仍有良好的活性,还提高了酶的温度范围. 5.2 多孔壳聚糖材料

壳聚糖是一类比较受关注的固定化材料,它具 有较好的生物降解性、生物相容性和生物效应.另 外,壳聚糖的C2位分别被氨基和乙酰胺取代,还有 羟基,从而具有较好的化学修饰、活化、偶联性能, 这为在共价交联中有效固定化酶和提高酶活性提供 了基础,也因此具有较好的吸附性、吸湿性和保湿 性,溶解后易形成凝胶.此外,壳聚糖在有机溶剂中 稳定性较强,能够在有机溶剂中很好的保护酶.

2011年, Palla 课题组^[90]报道了将根瘤菌脂肪

酶(RM)固定化在不同的改性壳聚糖微球上的研究,并用于催化向日葵油与棕榈酸、硬脂酸中游离的脂肪酸之间的酸解反应.研究结果表明,改性的壳聚糖颗粒比未改性的壳聚糖颗粒更大,疏水性更高.活性最高的壳聚糖固定化 RM 使棕榈酸和硬脂酸的组成发生了变化,从原油中的 9.6% 值变化到最终结构化脂质中的 49.1% 值,超过了几乎 3 倍的酶活化效果.在重复使用 7 个周期(总共 168 h)后仍旧保持了较高的转化率.结果表明,经修饰后的壳聚糖对于吸附和过度活化 RM 是有效的.

2019年, Pinheiro 课题组^[91]找到一种交联性能 比戊二醛更好的物质-二乙烯基砜(DVS)),并作为 固定化酶的交联剂^[92-93],将南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB)固定化在壳聚糖上.随后,研究了固定化酶 在 pH 5.0、7.0 和 10.0 的稳定性,发现在 pH 10.0 时催化性能最佳.最后,利用该脂肪酶-壳聚糖复合 材料对已酸乙酯的水解进行生物催化,并在 pH 5.0 下表现出 14 520.37 U/g 固定化脂肪酶的活性.这些 结果表明,使用二乙烯基砜活化的壳聚糖对脂肪酶 进行固定化是具有不错的前景,并且所提出的方案 能够成功提高酶的稳定性(Scheme 26).



图式 26 CALB@ Chitosan-DVS 生物复合材料催化酯水解反应 Scheme 26 CALB@ Chitosan-DVS biocomposite catalyzed ester hydrolysis

同年, Pinheiro 课题组^[94]报道了一种新型的固定化酶载体,即壳聚糖-二乙烯基砜(DVS).在 pH 值分别为 10.0、12.5 和 14.0 下用 DVS 激活壳聚糖,并将壳聚糖-二乙烯基砜作为南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB)的固定化载体.研究发现,在用 pH 10.0 使用 DVS 活化壳聚糖过程时,可获得最高的热稳

定性. 与戊二醛作为载体活化剂时相比, 固定化效 果更好. 随后将壳聚糖-二乙烯基砜固定化的 CALB 用于己酸乙酯的水解, 并在 pH 5.0 下表现出 14 520.37 U/g固定化脂肪酶的活性. 这些结果表 明, 用二乙烯基砜活化的壳聚糖是酶固定化良好载 体, 能够较好提高脂肪酶的稳定性(Scheme 27). CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂COOCH₂CH₃

Bio Cat.

pH 5.0

Scheme 27 CALB@ Chitosan-DVS biocomposite catalyzed ester hydrolysis

6 总结

我们主要从多孔材料所具有的比表面积和孔隙 率较高,稳定性较佳,吸附性能良好等优势来阐述 了其在固定化脂肪酶领域的应用,多孔材料能够有 效地解决固定化酶中存在的易失活、难回收利用、 催化活性低以及成本高昂等问题. 同时还通过举例 说明纳米多孔材料、大配体多孔材料、碳骨架多孔 材料、氧化硅骨架多孔材料和聚合物多孔材料等在 固定化脂肪酶方面的应用,表明了多孔材料对固定 化脂肪酶的良好效果. 但从现实情况和固定化酶的 长远发展来看,仍然有很多挑战.一方面,大多数 固定化酶的载体主要研究的是脂肪酶,而对蛋白酶 类、氧化还原酶类、转移酶类、裂合酶类和合成酶 类的报道相对较少;而且对酶结构信息的研究也不 深入、不完善. 另一方面, 很多固定化酶的材料合 成成本和条件相对较高,比如 MOFs 和 COFs 材料, 这是科研工作者无法避免的现实问题. 不过随着科 研人员综合素质的不断提高和各种基础研究设施的 完善以及方法条件的改进,均可为以上问题的解决 提供一定的条件支撑.此外,随着研究的深入,合 成生物杂化催化剂以及酶与其他催化剂的协同催化 反应具有较高的研究价值和发展前景,这为生物催 化的发展提供了更多的可能,进而也能更好地为医 药、工业生产、纺织和材料制造业等服务.

参考文献:

- [1] Fitzpatrick D, Ley S V. Engineering chemistry for the future of chemical synthesis [J]. *Tetrahedron*, 2017, 74 (25): 3087-3100.
- [2] Cherie, Turner. Review of chemistry of sustainable energy[J]. J Chem Edu, 2015, 92(4): 601-602.
- [3] Caruso T, De Vries F T, Bardgett R D, et al. Soil organic carbon dynamics matching ecological equilibrium theory
 [J]. Ecology Evolution, 2018, 8(22): 11169–11178.
- [4] Maccoss M, Baillie T A. Organic chemistry in drug discovery [J]. Science, 2018, 303(5665): 1810-1813.
- [5] Gates B C. Concluding remarks: Progress toward the design of solid catalysts [J]. Faraday Discuss, 2016, 188:

591-602.

- [6] Veluru Ramesh Naidu, Shengjun Ni, Johan Franzen. The carbocation: A forgotten lewis acid catalyst [J]. Chemcatchem, 2015, 7(13): 1896–1905.
- [7] Bajus S, Agel F, Kusche M, et al. Alkali hydroxidemodified Ru/γ-Al₂O₃ catalysts for ammonia decomposition[J]. Appl Catal Gen, 2015, 510(2016): 189–195.
- [8] Takeuchi D. Recent progress in olefin polymerization catalyzed by transition metal complexes: New catalysts and new reactions [J]. Dalton Trans, 2009, 39(2): 311-328.
- [9] Wang Z, Wang H F, Hu P. Possibility of designing catalysts beyond the traditional volcano curve: A theoretical framework for multi-phase surfaces[J]. *Chem Sci.*, 2015, 6(10): 5703-5711.
- [10] Madhavan A, Sindhu R, Binod P, et al. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications
 [J]. Biore Technol, 2017, 245: 1304–1313.
- [11] Yushkova E D, Nazarova E A, Matyuhina A V, et al. Application of immobilized enzymes in food industry[J]. J Agr Food Chem, 2019, 67(42): 11553-11567.
- Shakya, Akhilesh, Kumar, et al. An update on smart biocatalysts for industrial and biomedical applications [J]. Biore Technol, 2018, 245(15): 1304-1313.
- [13] Fang Z, Yong Y C, Zhang J, et al. Keratinolytic protease: A green biocatalyst for leather industry[J]. Appl Micro & Biotechnol, 2017, 101(21): 7771-7779.
- [14] Yeom S J, Kim M, Kwon K K, et al. A synthetic microbial biosensor for high-throughput screening of lactam biocatalysts[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5053.
- [15] Fan X, Niehus X, Sandoval G. Lipases as biocatalyst for biodiesel production [J]. Methods Mol Biol, 2012, 861: 471-483.
- [16] Choi J, Han S, Kim H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects [J]. Biotechnol Adv, 2015, 33(7): 1443–1454.
- [17] Meyer H, Eichhorn E, Hanlon S P, et al. The use of enzymes in organic synthesis and the life sciences: Perspectives from the Swiss Industrial Biocatalysis Consortium (SIBC) [J]. Catal Sci & Technol, 2013, 3(1): 29-40.
- [18] Casas-Godoy L, Gasteazoro F, Duquesne S, et al. Lipases: An overview [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1835:

3-38.

- [19] Lv L, Dai L, Du W, et al. Effect of water on lipase NS81006-catalyzed alcoholysis for biodiesel production [J]. Process Biochem, 2017, 58: 239-244.
- [20] Patel N, Rai D, Shivam, et al. Lipases: Sources, production, purification, and applications [J]. Recent Pat Biotechnol, 2019, 13(1): 45-56.
- [21] Azerad R. ChemInform abstract: Application of biocatalysts in organic synthesis [J]. Cheminform, 2010, 26 (31): 17-51.
- [22] Lee H Y, Kimura S, Iwata T. Lipase-catalyzed regioselective synthesis of dextrin esters [J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(2): 705-711.
- [23] Chiplunkar P P, Zhao X, Tomke P D, et al. Ultrasoundassisted lipase catalyzed hydrolysis of aspirin methyl ester [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 40: 587-593.
- [24] Jahangiri A, Moller A, Danielsen M, et al. Hydrophilization of bixin by lipase-catalyzed transesterification with sorbitol[J]. Food Chem, 2018, 268: 203-209.
- [25] Qin J, Zou X, Lv S, et al. Influence of ionic liquids on lipase activity and stability in alcoholysis reactions [J]. RSC Adv, 2016, 6(90): 87703-87709.
- [26] Chen J, Li Z Y. Lipase catlyzed synthesis of epoxy-fatty acids[J]. Chin J Chem, 2000, 18(2): 247-248.
- [27] Nelson J M. Adsorption of invertase[J]. J Am Chem Soc, 1916, 38(5): 1109–1115.
- [28] Barton T J, Bull L M, Klemperer W G, et al. Tailored porous materials [J]. Chem Mater, 1999, 11 (10): 2633-2656.
- [29] Pascanu V, Miera G G, Inge A K, et al. Metal-organic frameworks as catalysts for organic synthesis: A critical perspective [J]. J Am Chem Soc, 2019, 141 (18): 7223-7234.
- [30] Yuan G, Jiang H, Zhang L, et al. Metallosalen-based crystalline porous materials: Synthesis and property [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2017, 378: 483-499.
- [31] Shao P J, Chen H, Ying Q, et al. Structure-activity relationship of carbonic anhydrase enzyme immobilized on various silica-based mesoporous molecular sieves for CO₂ absorption into a potassium carbonate solution [J]. Energy & Fuels, 2020, 34(2): 2089–2096.
- [32] Shun-Ichi M, Manami C, Tatsuo T, et al. Enzyme immobilization in mesoporous silica for enhancement of thermostability[J]. J Nanosci & Nanotechnol, 2018, 18(1): 104-109.
- [33] Bommarius, Andreas S. Stabilizing biocatalysts [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(15): 6534-6565.

- [34] Mileti N, Nastasovi A, Loos K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications [J]. *Bioresource Technol*, 2012, 115(11): 126-135.
- [35] Sulman E M, Matveeva V G, Bronstein L M. Design of biocatalysts for efficient catalytic processes [J]. Curr Opin Chem Eng, 2019, 26: 1-8.
- [36] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(12): 248-254.
- [37] Chen Z, Liu L, Yang R. Improved performance of immobilized lipase by interfacial activation on Fe₃O₄@ PVBC nanoparticles [J]. RSC Adv, 2017, 7(56): 35169 – 35174.
- [38] Lyu J, Li Z, Men J, et al. Covalent immobilization of Bacillus subtilis lipase A on Fe₃O₄ nanoparticles by aldehyde tag: An ideal immobilization with minimal chemical modification[J]. Process Biochem, 2019, 81: 63-69.
- [39] Mosayebi M, Salehi Z, Doosthosseini H, et al. Amine, thiol, and octyl functionalization of GO-Fe₃O₄ nanocomposites to enhance immobilization of lipase for transesterification[J]. Renew Energy, 2020, 154: 569-580.
- [40] Butt A, Farrukh A, Ghaffar A, et al. Design of enzymeimmobilized polymer brush-grafted magnetic nanoparticles for efficient nematicidal activity [J]. RSC Adv, 2015, 5 (95): 77682-77688.
- [41] Duarte Neto J M W, Maciel J D C, Campos J F, et al. Optimization of penicillium aurantiogriseum protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment [J]. Prep Biochem Biotechnol, 2017, 47(7): 644-654.
- [42] Hou C, Wang Y, Ding Q, et al. Facile synthesis of enzyme-embedded magnetic metal-organic frameworks as a reusable mimic multi-enzyme system: Mimetic peroxidase properties and colorimetric sensor[J]. Nanoscale, 2015, 7(44): 18770-18779.
- [43] Pashangeh K, Akhond M, Karbalaeiheidari H R, et al. Biochemical characterization and stability assessment of Rhizopus oryzae lipase covalently immobilized on aminofunctionalized magnetic nanoparticles [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 105: 300-307.
- [44] Patel S K, Choi S H, Kang Y C, et al. Eco-friendly composite of Fe₃O₄-reduced graphene oxide particles for efficient enzyme immobilization [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(3): 2213–2222.
- [45] Zisis T, Freddolino P L, Turunen P, et al. Interfacial

activation of Candida antarctica lipase B: Combined evidence from experiment and simulation [J]. *Biochem*, 2015, **54**(38): 5969–5979.

- [46] Du Y, Gao J, Kong W, et al. Enzymatic synthesis of glycerol carbonate using a lipase immobilized on magnetic organosilica nanoflowers as a catalyst [J]. ACS Omega, 2018, 3(6): 6642-6650.
- [47] Ren W, Fei X, Tian J, et al. Multiscale immobilized lipase for rapid separation and continuous catalysis [J]. New J Chem, 2018, 42(16): 13471-13478.
- [48] Ren W, Li Y, Wang J, et al. Synthesis of magnetic nanoflower immobilized lipase and its continuous catalytic application[J]. New J Chem, 2019, 43(28): 11082-11090.
- [49] Ding Y, Erlebacher J. Nanoporous metals with controlled multimodal pore size distribution [J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(26): 7772-7773.
- [50] Doonan C J, Ricco R, Liang K, et al. Metal-organic frameworks at the biointerface: Synthetic strategies and applications [J]. Accounts Chem Res, 2017, 50 (6): 1423-1432.
- [51] Qiu Hua-jun, Xu Cai-xia, Huang Xi-rong, et al. Adsorption of laccase on the surface of nanoporous gold and the direct electron transfer between them [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2008, 112(38): 14781-14785.
- [52] Qiu H, Xue L, Ji G, et al. Enzyme-modified nanoporous gold-based electrochemical biosensors [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(10): 3014-3018.
- [53] Racheli R, Emir H, Adi S. Nanoporous metallic networks: Fabrication, optical properties, and applications
 [J]. Adv Mater, 2018, 30(41): e1706755.
- [54] Du X, Liu X, Li Y, et al. Efficient biocatalyst by encapsulating lipase into nanoporous gold [J]. Nanoscale Research Letters, 2013, 8(1): 180.
- [55] Chronopoulou L, Scaramuzzo F A, Fioravanti R, et al. Noble metal nanoparticle-based networks as a new platform for lipase immobilization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 146: 790-797.
- [56] Cao Y, Wu Z, Wang T, et al. Immobilization of bacillus subtilis lipase on a Cu-BTC based hierarchically porous metal-organic framework material: A biocatalyst for esterification [J]. Dalton Transactions, 2016, 45 (16): 6998-7003.
- [57] Liu L H, Shih Y H, Liu W L, et al. Enzyme immobilized on nanoporous carbon derived from metal-organic framework: A new support for biodiesel synthesis [J]. *ChemSusChem*, 2017, 10(7): 1364–1369.

- [58] Samui A, Chowdhuri A R, Sahu S K. Lipase immobilized metal - organic frameworks as remarkably biocatalyst for ester hydrolysis: A one step approach for lipase immobilization[J]. Chem Select, 2019, 4(13): 3745-3751.
- [59] Li Q, Chen Y X, Bai S W, et al. Immobilized lipase in bio-based metal-organic frameworks constructed by biomimetic mineralization: A sustainable biocatalyst for biodiesel synthesis [J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2020, 188: 7.
- [60] Sun Q, Fu C W, Aguila B, et al. Pore environment control and enhanced performance of enzymes infiltrated in covalent organic frameworks[J]. J Am Chem Soc, 2018, 140(3): 984–992.
- [61] Oliveira F L, Souza S P, Bassut J, et al. Enzyme decorated covalent organic frameworks as nanoporous platforms for heterogeneous biocatalysis [J]. Chemistry - A European Journal, 2019, 25(69): 15863-15870.
- [62] Silva M V C, Aguiar L G, de Castro H F, et al. Optimization of the parameters that affect the synthesis of magnetic copolymer styrene-divinilbezene to be used as efficient matrix for immobilizing lipases [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2018, 34(11): 169.
- [63] Weltz J S, Kienle D F, Schwartz D K, et al. Dramatic increase in catalytic performance of immobilized lipases by their stabilization on polymer brush supports[J]. ACS Catal, 2019, 9(6): 4992-5001.
- [64] Li S, Zhao S, Hou Y, et al. Polylactic acid (PLA) modified by polyethylene glycol (PEG) for the immobilization of lipase [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 190(3): 982-996.
- [65] Cejudosanches J, Orrego A H, Jaimemendoza A, et al. High stabilization of immobilized rhizomucor miehei lipase by additional coating with hydrophilic crosslinked polymers: Poly-allylamine/aldehyde-dextran[J]. Process Biochem, 2020, 92: 156-163.
- [66] Luangon B, Siyasukh A, Winayanuwattikun P, et al. Flow-through immobilization of candida rugosa lipase on hierarchical micro-/macroporous carbon monolith [J]. J Mol Catal: Enzymatic, 2012, 75: 80-85.
- [67] Olaf K, Nina D, Matti D, et al. Synthesis of porous carbon monoliths using hard templates [J]. Materials, 2016, 9(3): 214.
- [68] Stoica L. Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods [J]. *Electrochimica Acta*, 2012, 82 (12): 218–223.

- [69] Bedin K C, Martins A C, Cazetta A L, et al. KOH-activated carbon prepared from sucrose spherical carbon: Adsorption equilibrium, kinetic and thermodynamic studies for Methylene Blue removal [J]. Chem Eng J, 2016, 286: 476-484.
- [70] Bernal C, Illanes A, Wilson L. Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: Application to lactulose palmitate synthesis[J]. *Langmuir*, 2014, **30**(12): 3557–3566.
- [71] Manoel E A, Santos J C S D, Freire D M G, et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 71: 53-57.
- [72] Mathesh M, Luan B, Akanbi T O, et al. Opening lids: Modulation of lipase immobilization by graphene oxides
 [J]. ACS Catal, 2016, 6(7): 4760-4768.
- [73] Dong H L, Kim J M, Shin H Y, et al. Optimization of lipase pretreatment prior to lipase immobilization to prevent loss of activity[J]. J Micro & Biotechnol, 2007, 17(4): 650–654.
- [74] Reichardt C, Utgenannt S, Stahmann K P, et al. Highly stable adsorptive and covalent immobilization of thermomyces lanuginosus lipase on tailor-made porous carbon material[J]. Biochem Eng J, 2018, 138: 63-73.
- [75] Tan H, Feng W, Ji P. Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes [J]. Bioresource Technology, 2012, 115: 172-176.
- [76] Cao X, Zhang R, Tan W M, et al. Plasma treatment of multi-walled carbon nanotubes for lipase immobilization
 [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2016, 33
 (5): 1653-1658.
- [77] Socka M, Sitko M, Boncel S, et al. Nanobiocatalyst from lipase non-covalently immobilized on multiwalled carbon nanotubes for copolymerization of ε-caprolactone and trimethylene carbonate [J]. Polymer Degradation and Stability, 2019, 170: 1-9.
- [78] Pires E L, Miranda E A, Valenca G P. Gas-phase enzymatic esterification on immobilized lipases in MCM-41 molecular sieves[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2002, 98 (1): 963-976.
- [79] Raghuvanshi S, Gupta R. Advantages of the immobilization of lipase on porous supports over free enzyme [J].
 Protein Pept Lett, 2010, 17(11): 1412-1416.
- [80] Wang Z, Yang X, Yang J, *et al.* Peroxidase-like activity of mesoporous silica encapsulated Pt nanoparticle and its application in colorimetric immunoassay [J]. *Analytica*

Chimica Acta, 2015, 862: 53-63.

- [81] Zhang Z, He F, Zhuo R. Immobilized lipase on porous silica particles: Preparation and application for biodegradable polymer syntheses in ionic liquid at higher temperature[J]. Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic, 2013, 94: 129-135.
- [82] Zhang Q, Qian J, Guo H, et al. Utilization of nano-SiO₂ as a supporting material for immobilization of porcine pancreatic lipase[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2018, 18 (8): 5837-5841.
- [83] Kamori M, Hori T, Yamashita Y, et al. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2000, 9: 269-274.
- [84] Ruckenstein E, Wang X. Lipase immobilized on hydrophobic porous polymer supports prepared by concentrated emulsion polymerization and their activity in the hydrolysis of triacylglycerides[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 42 (7): 821-828.
- [85] Gao J, Feng K, Li H W, et al. Immobilized lipase on porous ceramic monoliths for the production of sugar-derived oil gelling agent [J]. RSC Adv, 2015, 5(84): 68601-68609.
- [86] Li X, Li D, Wang W, et al. Immobilization of SMG1-F278N lipase onto a novel epoxy resin: Characterization and its application in synthesis of partial glycerides [J]. Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic, 2016, 133: 154-160.
- [87] Wang W, Jiang Y, Zhou L, et al. Comparison of the properties of lipase immobilized onto mesoporous resins by different methods [J]. Appl Biochem & Biotechnol, 2011, 164(5): 561-572.
- [88] Li X, Huang S, Xu L, et al. Improving activity and enantioselectivity of lipase via immobilization on macroporous resin for resolution of racemic 1- phenylethanol in non-aqueous medium [J]. Bmc Biotechnol, 2013, 13 (1): 92.
- [89] Feng K, Huang Z, Peng B, et al. Immobilization of aspergillus niger lipase onto a novel macroporous acrylic resin: Stable and recyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil [J]. Bioresource Technology, 2020, 298: 1-37.
- [90] Palla C A, Pacheco C, Carrin M E. Preparation and modification of chitosan particles for rhizomucor miehei lipase immobilization [J]. *Biochem Eng J*, 2011, 55 (3): 199–207.

- [91] Pinheiro B B, Rios N S, Rodríguez Aguado E, et al. Chitosan activated with divinyl sulfone: A new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from Candida antarctica [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 130: 798-809.
- [92] Dos Santos J C S, Rueda N, Barbosa O, et al. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin [J]. RSC Adv, 2015, 5(27); 20639-20649.
- [93] Santos J C S D, Rueda N, Barbosa O, et al. Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment[J]. Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic, 2015, 117: 38-44.
- [94] Pinheiro B B, Rios N S, Aguado E R, et al. Chitosan activated with divinyl sulfone: A new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from Candida antarctica[J], Int J Biol Macromol, 2019, 130: 798-809.

Research Progress of Immobilized Lipase on Porous Materials

ZHANG Can, JIANG Guo-fang^{*}, YANG Jiang-nan, CHEN Guo-qing, XIE Zong-bo, LE Zhang-gao^{*}

(Department of Applied Chemistry, East China University of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract: In organic synthesis, lipase is a biocatalyst that conforms to the concept of green chemistry, can significantly improve catalytic efficiency, and is of great significance to the biochemical industry. However, in many organic reactions, lipases are easily affected by many factors such as water, temperature, pH value, enzyme solution concentration, substrate concentration, enzyme activator or inhibitor, etc., leading to inactivation and reduced yield. In order to solve this problem, the enzyme immobilization technology has aroused great interest of the scientific research workers, and found many enzyme immobilized carriers. Among them, porous material immobilized carriers are favored. It has the advantages of high porosity, large specific surface area, low relative density, better adsorption performance, good permeability and accurate molecular recognition function. The experiments showed that the immobilized enzyme in porous materials is better than the free enzyme, and it still maintains a high enzyme activity after multiple recycling. This article mainly summarizes the application of porous materials in immobilizing lipase and the catalytic effect of immobilized enzyme. Porous materials mainly includenanoporous materials, large ligand porous materials, carbon skeleton porous materials, silicon oxide skeleton porous materials and polymer porous materials.

Key words: lipase; immobilized; porous materials; research progress