

共固定化纳米酶的制备及其在级联催化反应中的应用研究进展

刘英语^{1,2}, 程爱迪¹, 吴西芝², 韩帅², 彭飞^{1*}

(1. 南昌大学食品学院, 江西南昌 330047) (2. 上海中侨职业技术大学食品药品学院, 上海 201514)

摘要: 级联酶复合体可通过构建底物通道的方式加快催化效率, 已经成功应用在合成医药、化妆品、功能性食品等不同工业领域。生物酶可参与的催化反应种类丰富而且是现代合成化学中的绿色经济型可持续生产工具, 但在工业化生产中, 固定化级联酶复合体更适合大规模生产, 因为固定化技术不仅能够提高酶催化反应效率, 还有利于提高酶稳定性以及简化生物催化剂的回收使用。最值得注意的是, 酶催化性能、固定化方法、相关反应动力学特性均是酶复合体的活性和稳定性的关键影响因素。综合生物学和材料学领域的研究进展, 如兼具纳米特性和稳定性能的载体材料的研发, 级联酶共固定化技术将充分平衡各催化组分, 从而设计出理想的酶复合体催化机器。因此, 该研究结合键联方式和载体材料就近年来多酶的共固定化技术研究发展和相关领域应用进行了综述。

关键词: 多酶级联; 共固定化; 生物催化; 纳米酶

文章编号: 1673-9078(2022)11-358-366

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0925

Research Progress on Preparation of Co-immobilized Nanoenzymes and Their Application in Cascade Bioreactions

LIU Yingyu^{1,2}, CHENG Aidi¹, WU Youzhi², HAN Shuai², PENG Fei^{1*}

(1.College of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

(2.Food and Drug College, Shanghai Zhongqiao Vocational and Technical University, Shanghai 201514, China)

Abstract: Cascading enzyme complexes can enhance cascade enzymatic activity through substrate channeling, which succeed in industrial process development, such as synthesis of pharmaceutical, cosmetic, and functional foods. The variety of reactions provided by enzyme has promoted biocatalysts been as a green economic sustainable production tool in modern synthetic chemistry. Nevertheless, co-immobilized cascading enzyme complexes are favorable to large-scale industrial manufacture. The advantages of using immobilization include not only improved cascade enzymatic activity but also enhanced enzyme stability and ease of recovery for reuse. Most noteworthy, characteristics of enzyme catalysis, immobilization methods, corresponding reaction kinetics are the key factors for activity and stability of enzyme complexes. As to sufficient coordination, the development in biology and materials science, such as the research and development of loading materials with nano characteristics and more stable properties, probably has provided for design of ideal multienzyme complexes devices. Based on different bonding methods and loading materials, recent advanced in bioreactions via co-immobilized multi-enzyme were described in this review.

Key words: multi-enzyme cascade; co-immobilization; biocatalysis; nanoenzymes

引文格式:

刘英语,程爱迪,吴西芝,等.共固定化纳米酶的制备及其在级联催化反应中的应用研究进展[J].现代食品科技,2022,38(11):358-366

LIU Yingyu, CHENG Aidi, WU Youzhi, et al. Research progress on preparation of co-immobilized nanoenzymes and their application in cascade bioreactions [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 358-366

收稿日期: 2022-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32101894); 上海市晨光计划项目 (19CGB26)

作者简介: 刘英语 (1989-), 男, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 食品科学, E-mail: 15921097061@163.com

通讯作者: 彭飞 (1990-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: pengf0129@foxmail.com

生物催化反应因符合“绿色化学”原则而备受关注^[1]。反应历程中所使用的生物酶是以降低反应的活化能而使反应顺利进行,是生物催化的核心要素。因酶催化具有高效性、专一性、条件温和性的优势,其高附加值化工产品,食品药品,造纸等领域占据重要地位^[2,3]。然而在实际的生产中,通常需要两种或两种以上的生物酶串联共同发挥作用。多酶催化反应可独立开展,即将此反应得到的产物分离提纯后用于后续生物反应中,一直等到目标产物出现为止。这种方式的优势在于不需要协调不同种类生物酶催化反应中条件难相容的问题,但是实际操作复杂,产物的时空产率偏低以及增加“三废”排放^[4,5],这不利于生态环境的保护和经济效益的提高。鉴于此,多酶级联催化的策略在生产中更加备受青睐。多酶级联催化法(“一锅法”)无需分离纯化中间产物,是直接将反应历程中所需的生物酶加入到体系中,由最初的底物按照酶级联反应顺序直接合成目标产物^[6,7]。

然而参与级联反应的游离型生物酶催化剂存在着稳定性较差、分离回收困难、重复利用率低等问题^[8,9]。因此可将其进行固定化操作,实现微环境下的保护,即酶共固定化,不但大大增加了酶稳定性和提高回收利用率,还进一步缩短了酶分子之间的距离,构建物质传输通道,提升生物催化反应速率^[10-12]。此外,基于纳米材料的固定化策略可以制备得到比表面积较大的生物催化剂,进一步增大底物与酶催化位点的结合机率,这也是提高固定化酶催化性能的一种对策。因此,本文以酶和固定化材料间的作用方式作为归类标准进行总结评价和展望,以期对生物催化的多酶固定化领域的发展提供参考依据。

1 基于非特异性非共价结合的共同固定化纳米酶

典型的有吸附法,它基本是通过酶分子与载体间的氢键、分子间作用力、离子间配位与疏水性等作用力制备共同固定化酶^[13]。吸附制备操作简单、制备环境温和,不易损伤酶催化活力。事实上吸附法固定化酶的性能主要取决于载体材料和吸附方式,其中理想的载体材料应具备良好的生物相容性和稳定性、化学稳定性和机械强度。由于非特异作用强度较低,吸附法固定化酶在实际反应中却会面临酶泄露的问题,因此减少或避免酶蛋白的泄露则成为科研工作者的工作重心。吸附法涉及到的载体种类繁多,有二氧化硅、活性炭、琼脂、淀粉等^[14]。Pescador 等^[15]以葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase, GOD)和辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)组合作为实验模型,探究其在负载聚合电解质的二氧化硅纳米粒子表面静

电吸附共固定化的可行性,结果表明分布在同一层的共固定化酶催化葡萄糖氧化的速率高出分布在不同层面的固定化酶的 2.5 倍,究其原因可能是分子在薄膜间的传输效率不同。Cui 等^[16]以介孔二氧化硅为载体材料原位合成共固定化酶:将谷胱甘肽合成酶吸附在介孔中,再将多聚磷酸盐激酶借助多巴胺黏附在材料表面,以此完成多酶的共同固定化。制备得到的固定化酶活力较游离酶显著提升至少两倍,在循环催化 7 次后其催化活性仍保留有 80%。催化活性的提高归因于介孔材料对酶蛋白分子的截留,以略微小于酶分子直径的材料对酶进行固定化可减少或阻止酶蛋白的泄露。

酶与载体材料依靠微弱的非特异性吸附作用结合常会使制备得到的固定化酶出现崩解的现象,研究人员后期则设法对载体材料进行官能团修饰(-OH、-NH₂、-COOH),以此显著加强载体与酶蛋白间的作用力^[17-19],从而提升酶稳定性^[20]。同时科研人员的研究结果表明多种作用方式协同共同固定化生物酶较单一固定化方式更能够显著提高酶的性能,例如将吸附法与共价结合法或包埋法相结合。Solé 等^[21]在研究中首先表明以不同基团修饰的载体材料制备的固定化酶之间的性能存在显著差异,其中氨基化琼脂糖的固定化酶性能最佳,因为由细胞色素 P450 和葡萄糖脱氢酶构成的共同固定化酶的亲和性更强。在此实验中,双酶首先以吸附作用固定在氨基化琼脂糖,继而以零长度交联剂 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基-碳二亚胺交联制备固定化双酶,得到的共同固定化酶在重复 4 个循环催化反应后残余酶活仍>20%。Henriques 等^[22]将脂肪酶蛋白吸附固定在 SDS 功能化的疏水磁性纳米粒子,结果显示脂肪酶活性得到 4 倍提高。随后通过对脂肪酶表面上的羧基进行化学胺化,因而 β -半乳糖苷酶可借助离子相互作用与已被吸附脂肪酶实现共固定化,再以戊二醛交联加固,最终得到双酶共同固定化磁性纳米粒子,结果表明制备的共同固定化酶热稳定性和 pH 值稳定性均显著得到提高。

蛋白-无机复合纳米花固定化技术在 2012 年由 Ge 等^[23]报道,该团队发现酶蛋白、金属阳离子(Cu²⁺)与磷酸根阴离子的配位结合可构成表面花状的固定化酶。酶蛋白-无机物晶体复合纳米花的生成主要分为三个步骤:成核、聚集、各向异性生长^[24]。以蛋白分子的-NH₂与金属离子结合形成的复合物作为晶体核心;酶-金属复合物从金属离子的结合位点不断生长沉积形成纳米花的花瓣;最后酶蛋白复合物不断向各向异性生长。蛋白-无机纳米花固定化技术实操简便,所需反应条件温和。固定化纳米花不仅具有比表面积高、传质阻力小、绿色温和等优点,同时还可以根据金属离

子或制备方式的不同构造出多形态的纳米花。由于杂化技术中运用到金属，固定化金属离子的生物酶因此可以依赖反应环境中的金属离子增强自身酶活，其中典型案例则是漆酶的固定化^[25]。蛋白-无机杂化技术现已广泛运用到酶固定化^[26,27]，酶催化辅因子 ADP 再生体系^[28]、生物传感器^[29,30]等多方面。

Sun 等^[31]制备了氧化还原多酶纳米花用作葡萄糖检测的高灵敏度比色传感器，是将 GOD 和 HRP 混合后加入到 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液，25 °C 组装 3 d 得到共固定化酶 GOD&HRP- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 。固定化酶分子之间的距离被缩短，因此共固定化酶催化葡萄糖氧化的活性高于游离型混合酶约 4 倍，比单酶纳米花级联催化反应速率加快 60%。与此同时，Li 等^[32]的关于 GOD 和 HRP 共固定化的研究表明多酶固定化顺序对复合纳米花共固定化酶催化活性具有重要影响。这是由酶促级联反应中底物传输顺序导致的。因此多酶级联反应历程也为纳米花组装有序化的研究提供了新思考。由于纳米花的沉积生长时间较长，一般需要 2~3 d，因此学者们尝试将传统超声法与蛋白-无机杂化技术结合，数分钟内即可合成聚合物，显著提高了生物催化剂制备效率^[33,34]。

纳米花是依赖于非共价键作用因而结合力较弱，若在较酸环境中应用或回收循环使用时稳定性较差。因此，复合纳米花反应器稳定性的提升常会融合交联法或包埋法^[35,36]。Patel 等^[37]在进行漆酶纳米花制备时引入了戊二醛，通过与交联法结合得到交联体纳米花复合物 (Cross-Linked Nanoflower, CL-NF) (图 1)。研究表明，相较于未交联纳米花或游离漆酶，CL-NF 酶活性更高且 pH、温度、储藏和操作稳定性得到加强。例如，CL-NF 和未交联纳米花催化溴酚蓝脱色重复使用 10 批次后其活分别保留 96.8% 和 85.8%。Zhao 等^[38]则通过与传统的海藻酸钙包埋技术结合制备了固定化小球 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -ALDC/Alg[($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - α -Acetolactate Decarboxylase Alginate Gel Beads)]。研究结果表明，固定化小球的酶活回收率 (98%) 明显高于传统法海藻酸钙包埋 ALDC/Alg (70%)，这得益于固定化小球内的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -ALDC 较为疏松的结构特征。此外，双酶复合纳米花催化 α -乙酰乳酸合成乙偶姻相较于单酶纳米花反应器具有更优越的操作稳定性。其在重复使用 6 批次后催化活性仍能保留 82%。由于包埋法的介入在一定程度上增大了传质阻力，Zhang 等^[39]设计通过使用结构更疏松的聚乙烯醇 [Poly(Vinyl Alcohol), PVA] 凝胶包埋法降低阻力，提高酶活力：以 PVA 包埋固定化碱性蛋白酶- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 得到纳米花凝胶酶复合物，二者的酶活回收率分别提高 9 倍和 5 倍。以催化底物

N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯水解为例，纳米花凝胶酶复合物经 12 次循环使用后其酶活回收达到 108%，但是碱性蛋白酶- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 只能重复催化 6 个批次。显而易见，多酶杂化纳米花可以借助包埋、交联等多重技术提升酶的催化能力。

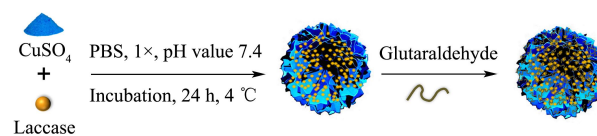


图 1 交联 laccase- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 复合纳米花的制备^[37]

Fig.1 The preparation of cross-linked laccase- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ composite nanoflowers^[37]

2 基于非特异性包埋的共固定化纳米酶

包埋固定化法是将酶蛋白约束在格子结构或者微囊结构中，与吸附法类似，包埋过程不涉及酶分子基团修饰，对酶分子的构象影响偏小，有利于酶活性的保留。使用的包埋材料生物相容性良好，包括纤维素、褐藻酸钠、琼胶素、脱乙酰甲壳素和 SiO_2 等^[40]，并且也在不断涌现出前沿材料。Petrovičová 等^[41]利用聚乙烯醇和聚乙二醇共包埋羧基还原酶和葡萄糖脱氢酶制备多酶固定化小球催化 α -丁酮酸乙酯的还原反应。试验结果显示，在反复利用 18 个批次后，该共固定化小球的酶活性仍能保留 80%。不仅如此，固定化酶的储藏稳定性远优于游离酶，例如固定化酶在储藏 10 个月后酶活保留约 80%，但游离酶在 90 h 后基本完全失活。此外，研究表明海藻酸钙固定化游离生物酶也能够显著增强酶稳定性^[42]。但是，相较于游离型生物酶，高分子材料包埋制备得到的固定化小球尺寸偏大，在反应过程中存在较大的传质阻力从而降低催化反应效率，目前此种固定化技术常用来进行微生物细胞包埋^[43]。

纳米材料因其巨大的比表面积可以有效地解决由传统包埋法引起的传质阻力增大的问题，此外据报道纳米材料的引入还可以显著地增强酶的稳定性。金属有机框架材料 (Metal Organic Frameworks, MOFs)、二氧化硅纳米粒子、超分子凝胶、纳米纤维等是目前包埋酶蛋白常用的纳米载体材料^[44-46]。

Wu 等^[47]利用金属有机框架材料沸石咪唑酯骨架材料 (Zeolitic Imidazolate Framework-8, ZIF-8) 同时包埋葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶，制备得到 GOD&HRP 共固定化酶。该技术打破了以往先合成 MOFs 的惯例，采用原位封装法合成酶-MOF 复合物，X 射线衍射 (Diffraction of X-rays, XRD) 和透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, TEM) 的结果显示新合成的 GOD&HRP/ZIF-8 持有 ZIF-8 原先的

结构和形态。酶活性研究显示 GOD&HRP/ZIF-8 催化葡萄糖氧化的活性较 GOD/ZIF-8 和 HRP/ZIF-8 混合酶提高一倍, 这主要归功于共固定化技术拉近了双酶之间的距离, 从而加快酶反应速率。Ren 等^[48]以同样的载体材料实现碳酸酐酶, 甲酸脱氢酶和葡萄糖脱氢酶的原位封装。由于聚氮杂环丙烷和辅因子 NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) 的添加, 该共固定化酶兼具辅因子自循环和催化 CO₂ 加氢合成甲酸的功能 (图 2), 且催化合成产物甲酸的得率提高 3.6 倍, 重复使用 8 批次后酶的活性仍保留一半。

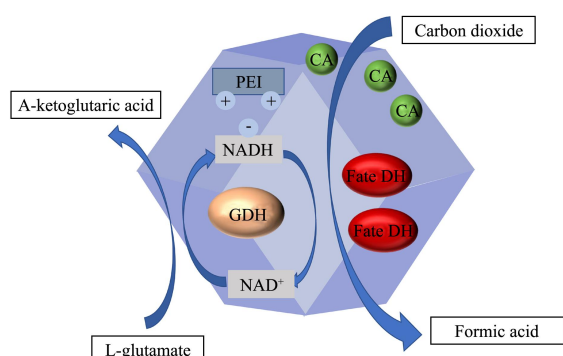


图 2 共固定化酶催化二氧化碳制备甲酸^[48]

Fig.2 The preparation of formic acid from carbon dioxide by co-immobilized enzymes^[48]

值得注意的是, 金属有机框架载体材料因孔道内径大小差异变化可影响固定化酶的催化活性, 因为通常金属有机框架材料的孔径小于 2 nm 会妨碍底物分子与腔体内酶蛋白的接触。所以, 适宜孔径的框架材料有利于底物分子穿过载体材料, 提升整体催化效率。如 Zhao 等^[49]使用了介孔孔径 (5.5 nm) 的金属有机框架材料 PCN-333 共固定化胆固醇氧化酶 (Cholesterol Oxidase from *Nocardia ery-thropolis*, ChOx) 和 HPR 制造了用于胆固醇检测的高灵敏度比色生物传感器。

具有自我组装和自我修复特性的非共价多孔配位聚合物在酶固定化技术开发中已呈现出发展的远大前景。Liang 等^[50]通过实验得出金属离子 (Zn²⁺) 与核苷酸 (腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸) 和磷酸盐具有较高的亲和力可通过配位作用形成疏松多孔的凝胶。其中, Zn²⁺ 与腺苷酸 (Adenine Nucleotides, AMP) 可制得 Zn/AMP 配位聚合物, 这本身是一种可逆的相互作用, 在机械力 (离心) 作用下, 溶胶颗粒可以重新连接形成凝胶。此外, 以 Zn/AMP 为载体同时包埋 GOD 和 HRP 制得的固定化酶活回收率接近 100% 且其储藏稳定性得到显著提升, 例如共固定化酶储存 15 d 后催化活性仍保留 70% 以上, 而游离型酶几乎完全失活^[51]。凝胶柔性好, 但本身回收程序较为繁琐, 将 Zn/AMP 依附在磁性纳米粒子或金纳米粒子等载体表面生长可

简化实际应用中固定化酶的循环利用^[52,53]。

3 基于非特性共价结合的共同固定化纳米酶

酶可以通过活性基团反应与载体以共价作用的方式结合从而实现酶蛋白固定化。此种技术通常需要固定化前处理如活化酶和载体, 一方面增加了操作复杂性, 另一方面酶在固定化后构象通常会因此发生变化而导致酶活回收率较低。但是酶与载体间的共价结合比较牢固, 不易发生酶脱离, 能在一定程度上提升酶稳定性^[54]。

对于多酶级联反应, 将多种酶同时与载体活性基团共价结合得到随机固定化酶的催化活性一般高于单固定化酶的联合催化。Chen 等^[54]将纤维素酶和溶菌酶同时与经戊二醛活化后的磁性二氧化硅纳米粒子相结合得到可降解微拟球藻细胞回收微生物油脂的随机共固定化酶。实验数据显示, 酶活回收率与单酶固定化的相接近。共固定化酶在降解微拟球藻细胞反应中循环利用 6 批次后催化能力依然能存留 60%。由于共固定化伴侣具有改变酶的微环境的作用, 过氧化物固定化酶在以过氧化氢 (Hydrogen Peroxide, H₂O₂) 为电子供体进行氧化反应时, 可用细胞色素 c 提高酶的稳定性, Sahare 等^[55]制备了过氧化物酶与细胞色素 c 的共固定化酶且确定了二氧化硅微粒子较大孔二氧化硅更有利于增强随机共固定化酶的稳定性。Lee 等^[56]对活性炭表面进行改性后通过双功能试剂戊二醛制备得到双脂肪酶共固定化催化剂。此共固定化酶可以作为大豆油和藻油等制备生物柴油燃料的催化剂, 其催化大豆油转化率达 98.5% 且重复使用 20 个循环后催化活性仍保留 80% 以上。

锁定酶在载体上的空间位置不仅有利于提高共固定化酶的催化活性和产物的产率, 还有利于提高酶稳定性^[57]。Jia 等^[58]借鉴自然界中高度协同催化机制的思路, 设计了一种仿生双功能化纳米反应器, 用以修饰的聚苯乙烯载体, 依次将模型酶 HRP 和 GOD 实现有序共固定化, 该固定化酶转化葡萄糖效率较是游离型混合酶提高一倍。García 等^[59]的研究表明被同时均匀地固定在载体孔道中的双酶催化效率显著高于分层固定的双酶, 具体表现为共定位制备的胺氧化酶和过氧化物酶复合物消除中间产物 H₂O₂ 的速率较分层固定化多酶提高七倍。由于双酶分子位置距离很短, 能够快速消耗 H₂O₂, 抑制其泄露, 所以共定位双酶降解组胺的效率得到显著提高。

共价固定化技术涉及到酶分子与载体官能团的反应, 在一定程度上会改变酶蛋白构象或阻塞底物通道增大空间位阻, 这些问题的存在将不利于制备高活性

的固定化酶。为更好地保留酶催化活性,研究人员尝试将载体与远离酶催化中心的官能团共价结合。Viswanath等^[60]首先将枯草杆菌蛋白酶上远离催化中心的氨基酸残基突变为半胱氨酸,再借助半胱氨酸与载体膜共价结合制得定向固定化酶,其催化活性是随机固定化酶的约1.7倍。Wu等^[61]利用蛋白质残基显式共价固定以增强稳定性(Protein Residue-Explicit Covalent Immobilization for Stability Enhancement, PRECISE)系统应用于模型酶T4溶菌酶,通过远离酶活性中心的亮氨酸残基将酶分子定向固定在免疫磁珠上,在变性条件下测试固定在离活性位点最近和较远位置的固定化酶的活性和稳定性,结果表明,可控方向的共价固定化技术较传统随机共价固定化技术更有优势。将此策略用于多酶固定化以此来提升生物酶催化效率。因固定化甲酸脱氢酶催化活性中心与底物的接触通道受限于活性位点附近的半胱氨酸残基从而降低了固定化甲酸脱氢酶的活性,Gao等^[62]首先使用定向进化技术获得甲酸脱氢酶的突变体的C242A/C275V/C363V/K389C解除限制。再以聚多巴胺包裹的四氧化三铁纳米粒子共固定突变体和亮氨酸脱氢酶,结果表明目标产物L-叔亮氨酸合成的产率提高至少4倍。

交联酶聚集体技术是其中一种无载体酶固定化方法,降低了对高纯酶的依赖性和减少了非催化基质的引入。该技术是酶蛋白分子在蛋白变性剂(硫酸铵、1-丙醇、二甲基酮等)的作用下发生集聚,再通过交联剂(如1,5-戊二醛)的作用将蛋白交联得到固定化酶。此后研究者也常常借助磁性粒子等制备负载型酶交联聚集体来提高固定化酶的机械性能。例如,Hu等^[63]直接利用超声破碎后的含有重组羧基还原酶和重组葡萄糖脱氢酶的粗酶液,以丙酮为变性剂、戊二醛为交联剂制备共交联酶聚集体。该聚集体可以催化潜手性酮还原合成(S)-1-(2,6-氯-3-氟)-苯基乙醇,循环7次后其催化活性仍大于80%。Periyasamy等^[64]探讨了木聚糖酶,纤维素酶和 β -1,3-葡聚糖酶的共交联酶聚集体的制备、表征与应用,制备的共交联酶聚集体可实现甘蔗渣向单糖的一锅法转化,且较游离混合酶具有更高的热稳定性,在重复使用6批次后聚集体的催化活性仍保留约90%。为提高聚集体与反应体系的分离效率,增强循环使用的实用性,Su等^[65]制备了羧基还原酶和葡萄糖脱氢酶的磁性共交联酶聚集体,该聚集体不仅具有高底物浓度的耐受性和优良的储存稳定性,而且在多批次反应中依靠外加磁场作用即可完成固定化酶的无损回收。

4 基于特异性组装的共固定化纳米酶

在自然界中存在大量的可通过非共价作用实现精确自组装的“纳米机器”,如纤维素小体机器、信号通路蛋白骨架、分子伴侣蛋白等。采用生物大分子自我识别的策略制备固定化多酶,有利于构建底物通道显著提高级联催化效率。研究者对天然“机器”的借鉴和改造已成功构造出多酶高效催化体系。

纤维小体是自然界中存在于厌氧微生物的一种多酶复合体,具有锚定-粘附功能,包括粘连接构域(Cohesin)和对接结构域(Dockerin)。两个结构域有着非常强的相互作用,Ka可达 10^9 L/mol^[66]。纤维小体具有模块化、灵活性、自组装、多重协同以及高效等优点,在生物催化领域的应用也愈加广泛。Fan等^[67]成功在酿酒酵母的细胞表面上展示微纤维素体、DocI-1、DocI-2和DocI-3与内切葡聚糖酶(Endo-1,4- β -D-Glucanohydrolase, EG),纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolase, CBH)和 β -葡糖苷酶(β -D-Glucosidase, BGL)融合,这些融合酶可通过特定位点V5锚定在酵母表面。该酵母展示系统被用来发酵微晶纤维素直接合成生物乙醇,其在前4d的发酵合成速率较快,此时反应体系中积累的乙醇浓度达到1412 mg/L,但是发酵后期产物生物乙醇被用作碳源而消耗。Tang等^[68]也构建了酵母表面展示纤维小体系统用于分解纤维素直接制备生物乙醇,是首次借助二硫键构建新型合成纤维体,是将三个融合蛋白BGL、EG和CBH通过亚基Aga1p与酵母菌表面的亚基Aga2p自组装。

寻求可设计和表征的生物构件是生物催化领域中创造新生物“机器”的发展趋势,如利用模块化结构的优势改变酶化学计量以此来解除生物催化限速步骤提高代谢通路的效率。目前用于细胞信号转导和传递通路的信号配体与受体蛋白具有特异性结合的性质,因此生物催化领域视其为理想的多酶自组装系统之一。较常见的有GBD结构域(Gelatin Binding Domain)和PDZ结构域(Postsynaptic Density Protein of 95 Kilodaltons, Disc Large, Zona Occludens-1)^[69]。Moon等^[70]在研究中以成功构建的含有自组装元件GBD、SH3(Sarcoma Homology 3)和PDZ的蛋白支架分别与醛酸脱氢酶,肌醇-1-磷酸合成酶和肌醇氧化酶靶向结合从而构建多酶级联反应器用于催化合成D-葡糖二酸。通过调控蛋白骨架上SH3和PDZ的比例与数量所构建的新型组合多酶机器在一定程度上缓解了肌醇加氧酶由于肌醇底

物浓度的影响所导致的催化限速,因此肌醇加氧酶的催化活性得到提高。该催化体系中D-葡萄糖二酸的积累量较未安装酶蛋白支架的提高约5倍。此外蛋白骨架结构的改变增强了肌醇氧化酶的稳定性。Baek等^[71]利用代谢过程改造大肠杆菌并联合合成支架蛋白共同建立一种丁酸合成途径:自组装元件GBD、SH3和PDZ的蛋白骨架与3-羟基丁酰辅酶A脱氢酶、3-羟基丁酰辅酶A脱水酶和反式烯酰辅酶A还原酶靶向结合。最终工程菌代谢葡萄糖转化为丁酸盐的产量提升3倍,采用葡萄糖流加发酵后其产量达7.2 g/L。

通过基因工程技术将CnaB2结构域拆分可得到自组装结构单元SpyCatcher和SpyTag,两个元件借助蛋白分子上的赖氨酸残基和短肽链上的天冬氨酸残基自催化形成的异肽键在自然生理条件下元件即可完成自组装^[72]。该自催化反应特异性强、反应速率快、元件以共价键耦合、对反应体系pH和温度适应性强,这使它们成为仿生催化研究中理想的操作元件^[73]。例如,Shen等^[74]将麦芽寡糖基海藻糖合酶(Maltooligosyltrehalose Synthase, MTS)和麦芽寡糖基海藻糖海藻水解酶(Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase, MTH)通过SpyCatcher和SpyTag之间形成的异肽键自组装成超分子多酶复合物(MTS-MTH)。催化结果表明蛋白质-肽相互作用自组装形成的复合酶催化效率显著高于游离混合酶。Lim等^[75]开发出一种可用于酶固定化的通用型自组装酶支架平台,即丝状伴侣蛋白(Gamma-Prefoldin, γ -PFD)。然后将SpyTag与 γ -PFD融合表达得到 γ -PFD-SpyTag,通过自组装反应与SpyCatcher-GOx和SpyCatcher-HRP共固定化。借助SpyTag与SpyCatcher共价偶联形成有序、效率高且稳定性强的超分子复合酶可作为一种通用型多酶固定化策略。但是此种寡聚酶因无载体机械性能较差,通常使用高速冷冻离心机或超滤装置实现循环使用,这不仅增加其制备成本,也加大在工业应用中的操作难度^[76]。探究负载型自组装寡聚酶技术的开发和应用能够有效地提高生物催化剂的制备效率,并在一定程度上拓宽体外多酶级联的应用范围。

5 总结与展望

医药合成、精细化学品、食品、化妆品等的工业化生产往往需要两种及以上的生物酶催化。将参与反应的多酶进行设计组合从而构建底物通道是提高生产效率的有效措施。多酶固定化技术随着蛋白质工程、代谢工程、高分子材料等领域的发展而日新月异,对高效催化体系的构建有着巨大的贡献。众多研究人员在新型固定化策略的研发过程中不断突破传统方式的

局限性,如多酶固定化方式由基于普适性思维设计的传统单一方式向多维度固定化方式发展,甚至可以根据酶特性设计出具有针对性的新型固定化方案。另外,研究者不断开发出基于纳米材料的具有较大比表面积的负载型固定化酶和无载体自组装纳米酶。由于多酶级联反应涉及酶的种类多样,在实际固定化应用中不仅需要酶结构和功能加以考虑而且酶反应顺序也不可忽略。多酶固定化发展趋势偏向“智能化”,如酶蛋白自组装技术,但是高端智能技术的发展仍需结合传统固定化技术才有利于制备得到活性更高、耐用性更好的固定化多酶催化剂。

参考文献

- [1] Cannatelli M D, Ragauskas A J. Two decades of laccases: Advancing sustainability in the chemical industry [J]. Chemical Record, 2017, 17(1): 122-140
- [2] Bornscheuer U, Huisman G, Kazlauskas R J, et al. Engineering the third wave of biocatalysis [J]. Nature, 2012, 485(7397): 185-194
- [3] Cao S, Xu P, Ma Y, et al. Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers [J]. Chinese Journal of Catalysis, 2016, 37(11): 1814-1823
- [4] Rocha-martín J, Rivas B D L, Muñoz R, et al. Rational co-immobilization of bi-enzyme cascades on porous supports and their applications in bio-redox reactions with in situ recycling of soluble cofactors [J]. Chem Cat Chem, 2012, 4(9): 1279-1288
- [5] Ren S, Li C, Jiao X, et al. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications [J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 373: 1254-1278
- [6] Kazenwadel F, Franzreb M, Rapp B E. Synthetic enzyme supercomplexes: co-immobilization of enzyme cascades [J]. Analytical Methods, 2015, 7(10): 4030-4037
- [7] Reetz M T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future [J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(34): 12480-12496
- [8] Guzik U, Hupert-kocurek K, Wojcieszynska D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases [J]. Molecules, 2014, 19(7): 8995-9018
- [9] Krishnamoorthi S, Banerjee A, Roychoudhury A. Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects [J]. Journal of Enzymology and Metabolism, 2015, 1: 1-12
- [10] Rueda N, Dos Santos J C, Ortiz C, et al. Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts:

- drawbacks and opportunities [J]. *Chemical Reviews*, 2016, 16(3): 1436-1455
- [11] Rodrigues R C, Ortiz C, Berenguer-murcia Á, et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6290-6307
- [12] Wu J, Li S, Wei H. Integrated nanozymes: facile preparation and biomedical applications [J]. *Chemical Communication*, 2018, 50(54): 6520-6530
- [13] Mohamad N R, Marzuki N H, Buang N A, et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes [J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29(2): 205-220
- [14] Gao F, Guo Y, Fan X, et al. Enhancing the catalytic performance of chloroperoxidase by co-immobilization with glucose oxidase on magnetic graphene oxide [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 143: 101-109
- [15] Pescador P, Katakis I, Toca-herrera J L, et al. Efficiency of a bienzyme sequential reaction system immobilized on polyelectrolyte multilayer-coated colloids [J]. *Langmuir*, 2008, 24: 14108-14114
- [16] Cui C, Ming H, Li L, et al. Fabrication of an in-situ co-immobilized enzyme in mesoporous silica for synthesizing GSH with ATP regeneration [J]. *Molecular Catalysis*, 2020, 486: 110870
- [17] Diaz J F, Balkus J K. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1996, 2(2-3): 115-126
- [18] Bayramoglu G, Akbulut A, Arica M Y. Immobilization of tyrosinase on modified diatom biosilica: Enzymatic removal of phenolic compounds from aqueous solution [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 244: 528-536
- [19] Yakovleva J, Davidsson R, Bengtsson M, et al. Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 19(1): 21-34
- [20] Mei S, Shi J, Zhang S, et al. Nanoporous phyllosilicate assemblies for enzyme immobilization [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2019, 2(2): 777-786
- [21] Solé J, Caminal G, Schürmann M, et al. Co-immobilization of P450 BM3 and glucose dehydrogenase on different supports for application as a self-sufficient oxidative biocatalyst [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2019, 94(1): 244-255
- [22] Henriques R O, Bork J A, Fernandez-lorente G, et al. Co-immobilization of lipases and β -d-galactosidase onto magnetic nanoparticle supports: biochemical characterization [J]. *Molecular Catalysis*, 2018, 453: 12-21
- [23] Ge J, Lei J, Zare R N. Protein-inorganic hybrid nanoflowers [J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(7): 428-432
- [24] Celik C, Tasdemir D, Demirbas A, et al. Formation of functional nanobiocatalysts with a novel and encouraging immobilization approach and their versatile bioanalytical applications [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(45): 25298-25303
- [25] Alhayali N I, Kalaycioglu özpozan N, Dayan S, et al. Catalase/Fe₃O₄@Cu²⁺ hybrid biocatalytic nanoflowers fabrication and efficiency in the reduction of organic pollutants [J]. *Polyhedron*, 2021, 194: 114888
- [26] Zhang B, Li P, Zhang H, et al. Preparation of lipase/Zn₃(PO₄)₂ hybrid nanoflower and its catalytic performance as an immobilized enzyme [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 291: 287-297
- [27] Liu Y, Shao X, Kong D, et al. Immobilization of thermophilic lipase in inorganic hybrid nanoflower through biomimetic mineralization [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 197: 111450
- [28] Sun X, Niu H, Song J, et al. Preparation of a copper polyphosphate kinase hybrid nanoflower and its application in ADP regeneration from AMP [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(17): 9991-9998
- [29] Gao J, Liu H, Wu K, et al. Biocatalyst and colorimetric biosensor of carcinoembryonic antigen constructed via chicken egg white-copper phosphate organic/inorganic hybrid nanoflowers [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, 601: 50-59
- [30] Singh A P, Balayan S, Hooda V, et al. Nano-interface driven electrochemical sensor for pesticides detection based on the acetylcholinesterase enzyme inhibition [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 3943-3952
- [31] Sun J, Ge J, Liu W, et al. Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(1): 255-262
- [32] Li Z, Zhang Y, Su Y, et al. Spatial co-localization of multi-enzymes by inorganic nanocrystal-protein complexes [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(83): 12465-12468
- [33] Batule B S, Park K S, Kim M I, et al. Ultrafast sonochemical synthesis of proteininorganic nanoflowers [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 137-142
- [34] Soni S, Dwivedee B P, Banerjee U C. An ultrafast

- sonochemical strategy to synthesize lipase-manganese phosphate hybrid nanoflowers with promoted biocatalytic performance in the kinetic resolution of beta-aryloxyalcohols [J]. *Chemnanomat*, 2018, 4(9): 1007-1020
- [35] Lee H R, Chung M, Kim M I, et al. Preparation of glutaraldehyde-treated lipase-inorganic hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzymes [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 105: 24-29
- [36] Bilal M, Asgher M, Shah S Z H, et al. Engineering enzyme-coupled hybrid nanoflowers: The quest for optimum performance to meet biocatalytic challenges and opportunities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 135: 677-690
- [37] Patel S K S, Otari S V, Li J, et al. Synthesis of cross-linked protein-metal hybrid nanoflowers and its application in repeated batch decolorization of synthetic dyes [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 347: 442-450
- [38] Zhao F, Wang Q, Dong J, et al. Enzyme-inorganic nanoflowers/alginate microbeads: An enzyme immobilization system and its potential application [J]. *Process Biochemistry*, 2017, 57: 87-94
- [39] Zhang H, Fei X, Tian J, et al. Synthesis and continuous catalytic application of alkaline protease nanoflower-PVA composite hydrogel [J]. *Catalysis Communications*, 2018, 116: 5-9
- [40] Sekoai P T, Awosusi A A, Yoro K O, et al. Microbial cell immobilization in biohydrogen production: a short overview [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(2): 157-171.
- [41] Petrovičová T, Markošová K, Hegyi Z, et al. Co-immobilization of ketoreductase and glucose dehydrogenase [J]. *Catalysts*, 2018, 8(4): 168
- [42] 孙玉英,张继泉.吸附交联法和包埋法固定化混合酶研究[J]. *淮海工学院学报(自然科学版)*, 2013, 22: 82-88
- [43] Ching S H, Bansal N, Bhandari B. Alginate gel particles-a review of production techniques and physical properties [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(6): 1133-1152
- [44] Datta S, Christena L R, Rajaram Y R. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials [J]. *3 Biotech*, 2013, 3(1): 1-9
- [45] Li P, Chen Q, Wang T C, et al. Hierarchically engineered mesoporous metal-organic frameworks toward cell-free immobilized enzyme systems [J]. *Chem*, 2018, 4(5): 1022-1034
- [46] Liu Y, Zhang Y, Li X, et al. Self-repairing metal-organic hybrid complexes for reinforcing immobilized chloroperoxidase reusability [J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(22): 3216-3219
- [47] Wu X, Ge J, Yang C, et al. Facile synthesis of multiple enzyme-containing metal-organic frameworks in a biomolecule-friendly environment [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(69): 13408-13411
- [48] Ren S, Wang Z, Bilal M, et al. Co-immobilization multienzyme nanoreactor with co-factor regeneration for conversion of CO₂ [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 110-118
- [49] Zhao M, Li Y, Ma X, et al. Adsorption of cholesterol oxidase and entrapment of horseradish peroxidase in metal-organic frameworks for the colorimetric biosensing of cholesterol [J]. *Talanta*, 2019, 200: 293-299
- [50] Liang H, Zhang Z, Yuan Q, et al. Self-healing metal-coordinated hydrogels using nucleotide ligands[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(82): 15196-15199
- [51] Liang H, Jiang S, Yuan Q, et al. Co-immobilization of multiple enzymes by metal coordinated nucleotide hydrogel nanofibers: improved stability and an enzyme cascade for glucose detection [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(11): 6071-6078
- [52] Liang H, Liu B, Yuan Q, et al. Magnetic iron oxide nanoparticle seeded growth of nucleotide coordinated polymers [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(24): 15615-15622
- [53] Li C, Jiang S, Zhao X, et al. Co-immobilization of enzymes and magnetic nanoparticles by metal-nucleotide hydrogel nanofibers for improving stability and recycling [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 179
- [54] Chen Q, Liu D, Wu C, et al. Co-immobilization of cellulase and lysozyme on amino-functionalized magnetic nanoparticles: An activity-tunable biocatalyst for extraction of lipids from microalgae [J]. *Bioresour Technol*, 2018, 263: 317-324
- [55] Sahare P, Ayala M, Vazquez-duhalt R, et al. Enhancement of peroxidase stability against oxidative self-inactivation by co-immobilization with a redox-active protein in mesoporous silicon and silica microparticles [J]. *Nanoscale Research Letters*, 2016, 11(1): 417
- [56] Lee J H, Lee J H, Kim D S, et al. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon [J]. *Bioresour Technol Rep*, 2019, 7: 100248
- [57] Shi J, Wang X, Jiang Z, et al. Constructing spatially separated multienzyme system through bioadhesion-assisted bio-inspired mineralization for efficient carbon dioxide conversion [J].

- Bioresource Technology, 2012, 118: 359-366
- [58] Jia F, Narasimhan B, Mallapragada S K. Biomimetic multienzyme complexes based on nanoscale platforms [J]. *AIChE Journal*, 2013, 59(2): 355-360
- [59] Garcia P, Rocha-martin J, Fernandez-lorente G, et al. Co-localization of oxidase and catalase inside a porous support to improve the elimination of hydrogen peroxide: Oxidation of biogenic amines by amino oxidase from *Pisum sativum* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 115: 73-80
- [60] Viswanath 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]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 60(5): 608-616
- [61] Wu J C Y, Hutchings C H, Lindsay M J, et al. Enhanced enzyme stability through site-directed covalent immobilization [J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 193: 83-90
- [62] Gao X, Ni K, Zhao C, et al. Enhancement of the activity of enzyme immobilized on polydopamine-coated iron oxide nanoparticles by rational orientation of formate dehydrogenase [J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 188: 36-41
- [63] Hu X, Liu L, Chen D, et al. Co-expression of the recombinant alcohol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and cross-linked enzyme aggregates stabilization [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 531-535
- [64] Periyasamy K, Santhalembi L, Mortha G, et al. Carrier-free co-immobilization of xylanase, cellulase and β -1,3-glucanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs) for one-pot saccharification of sugarcane bagasse [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(39): 32849-32857
- [65] Su E, Meng Y, Ning C, et al. Magnetic combined cross-linked enzyme aggregates (Combi-CLEAs) for cofactor regeneration in the synthesis of chiral alcohol [J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 271: 1-7
- [66] 朱兆静,潘虎,郭俊,等.纤维小体结构及其功能的研究进展[J]. *江苏农业科学*,2018,46(19):12-16
- [67] Tan T W. Self-surface assembly of cellulosomes with two miniscaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(33): 13260-13265
- [68] Tang H, Wang J, Wang S, et al. Efficient yeast surface-display of novel complex synthetic cellulosomes [J]. *Microbial Cell Factories* 2018, 17(1): 122
- [69] 许可,吕波,李春.无细胞的合成生物技术-多酶催化与生物合成[J].*中国科学:化学*,2015,45(5):429-437
- [70] Moon T S, Dueber J E, Shiue E, et al. Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(3): 298-305
- [71] Back J M, Mazumdar S, Lee S W, et al. Butyrate production in engineered *Escherichia coli* with synthetic scaffolds [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(10): 2790-2794
- [72] 刘璐.利用 SpyTag/SpyCatcher 构建自组装多酶复合体实现高效生物合成[D].上海:上海交通大学,2018
- [73] Vandna S, Kalyan S G. Involvement of non-polyalanine (polyA) residues in aggregation of polyA proteins: Clue for inhibition of aggregation [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2014, 53: 318-323
- [74] Shen X, Tang S, Xu Q, et al. SpyCatcher/SpyTag-mediated self-assembly of a supramolecular complex for improved biocatalytic production of trehalose [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2019, 55(6): 596-602
- [75] Lim S, Jung G A, Glover D J, et al. Enhanced enzyme activity through scaffolding on customizable self-assembling protein filaments [J]. *Small*, 2019, 15(20): 1805558
- [76] 殷亮.自组装多酶纳米反应器的设计与构建[D].上海:上海交通大学,2018