

• 综 述 •

## 酶的固定化技术最新研究进展

柯彩霞, 范艳利, 苏枫, 徐莉, 闫云君

华中科技大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074

柯彩霞, 范艳利, 苏枫, 等. 酶的固定化技术最新研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(2): 188–203.

Ke CX, Fan YL, Su F, et al. Recent advances in enzyme immobilization. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 188–203.

**摘 要:** 酶是一种高效、绿色、应用广泛的生物催化剂, 因其固定化形态在多种性质上均优于游离态, 酶固定化技术应运而生并不断发展。我国固定化技术研究始于 20 世纪 70 年代, 目前固定化酶在食品、医疗、能源、环境治理等领域得到了广泛的应用, 但现有固定化技术仍存在适用范围小、成本较高等缺陷。因此, 在较为成熟的传统固定化技术基础上, 研究者们对新型固定化技术的研究与创新进行了大量尝试, 形成了一批以固定化载体和固定化方式为核心的新型固定化技术。文中作者结合团队十余年对固定化技术的研究和理解, 归纳介绍了新型酶固定化技术的发展方向和应用趋势, 并阐述了对固定化技术未来发展的理解和建议。

**关键词:** 酶, 固定化技术, 生物技术, 生物材料

## Recent advances in enzyme immobilization

Caixia Ke, Yanli Fan, Feng Su, Li Xu, and Yunjun Yan

*School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China*

**Abstract:** Enzyme is an efficient and green biocatalyst, and widely used in many areas. Immobilized enzyme is superior to its free form in a variety of properties. Enzyme immobilization studies started in the 1970s in China. Till now, immobilized enzymes are widely applied in the fields of food, medical, energy, environmental management, among others. However, there are still some defects such as no universal method and the high cost. Therefore, based on the relatively mature traditional immobilization technologies, efforts have been made to innovate immobilization technologies. As a result, many new immobilization technologies focusing on new carriers and methods are continuously generated. Coupling with more than ten years' study on enzyme immobilization, we present here recent development and application of new immobilization technologies, as well as suggestions to future development of immobilization technology.

**Keywords:** enzyme, immobilization technology, biotechnology, biomaterials

**Received:** April 19, 2017; **Accepted:** July 26, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31070089, 31170078, J1103514), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2011AA02A204, 2013AA065805).

**Corresponding author:** Yunjun Yan. Tel/Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@hust.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31070089, 31170078, J1103514), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2011AA02A204, 2013AA065805) 资助。

网络出版时间: 2017-09-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170906.1513.004.html>

酶的固定化技术是指将天然的游离酶限定在一定空间内或完全附着在某固态结构上而不能自由移动的一种生物技术,是一种常用、有效、便捷的生物酶修饰手段,对酶的催化活性和操作稳定性具有极大的改善和提升。图 1 直观地展示了相比于游离酶而言,固定化酶在催化反应中所具有的优势<sup>[1]</sup>。

最早被发现的固定化形式是天然存在的生物膜系统,它们存在于河流中的石块、人类的牙齿、水管等天然环境中<sup>[2]</sup>。20 世纪 70 年代以来,人类对生物膜的认识逐渐加深并将其利用于生产生活和社会改造中,固定化技术便由此诞生并逐步发展起来<sup>[3]</sup>。固定化技术对生物酶的改造效果受多方面因素的影响,如固定化载体、反应介质、制备条件、酶分子性质及有机溶剂等;对于不同的固定化对象,目前没有普适性的策略,需要根据酶的特性以及应用需求来选择合适的固定化方法<sup>[4]</sup>。近 10 年来,本团队对酶的固定化技术进行了大量研究<sup>[5-7]</sup>,发现多数传统固定化技术所使用的方法策略均较为成熟且相似,在酶的催化特性改善上取

得了一些成果,但其发展仍受到普适性低、工业成本高等因素的限制。随着现代生物技术的不断发展以及学科间的相互渗透,酶的固定化技术研究取得了一定的突破,新型固定化技术的探索研究已成为领域内的热点与难点,涌现了多种新型固定化载体与技术<sup>[8]</sup>。

## 1 传统固定化技术概况

经过几十年的发展,传统的固定化技术主要分为吸附、共价结合、包埋和交联四大类。

吸附法是最简单的固定化方式,它利用酶与载体间的弱作用力,如范德华力、疏水作用力和表面张力等,因而极易发生酶的脱吸附。大孔树脂、多孔硅玻璃、分子筛等材料是传统固定化技术的优良载体,也是第一代工业用固定化酶研发的热点材料。吸附法制备固定化酶的优点在于操作简单、酶活回收率高、载体易回收、成本低、见效快、不需要化学修饰,但同时也伴随固定化酶不稳定、酶蛋白易流失、载体会对产物造成一定吸附等缺点<sup>[9]</sup>。

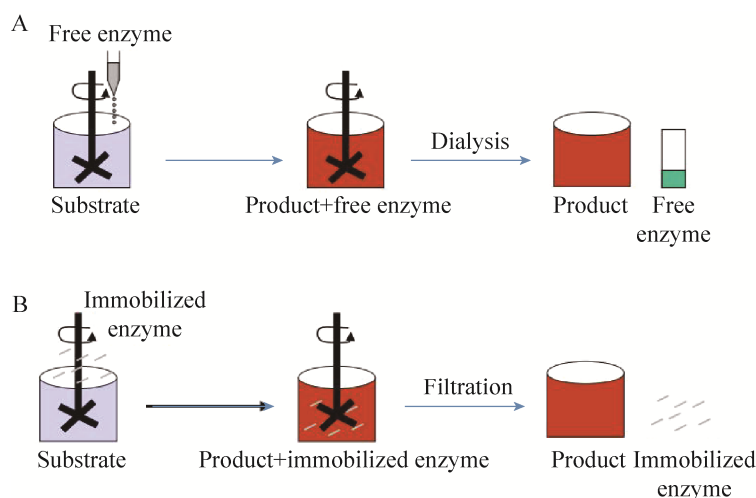


图 1 游离酶 (A) 和固定化酶 (B) 反应示意图<sup>[1]</sup>(游离酶催化反应,反应完成后通常需要透析等复杂方法将产物与游离酶分离;而对于固定化酶,简单的过滤等方法即可分离产物与催化剂)

Fig. 1 The illustration of reactions catalyzed by free (A) and immobilized enzyme (B)<sup>[1]</sup>. In the reaction of free enzyme, the enzyme has to be separated via dialysis from the product. However, immobilized enzyme can be separated through the simple filtration.

共价结合法是通过共价键将酶表面的氨基酸残基与载体表面活性基团连接而形成的一种稳定的固定化策略。这种方法通常要求载体上包含有较多的化学基团或具有较强的可修饰性,以便与酶分子产生化学键偶联,常见的化学键有异脲键、重氮键、环氧基、烷基、羧基等。多步法固定化是一种加强共价结合稳定性的固定化技术, Mateo 等<sup>[10]</sup>提出了一种“订制”功能性环氧树脂固定化酶的方法,主要分为两步,首先是对酶分子和固定化载体进行物理或化学的预处理,使其带上后续反应所需的官能团;然后利用酶分子表面的亲核官能团与载体上的环氧基团发生强烈的多重共价反应,从而实现酶的共价固定。共价结合法制备固定化酶具有较强的稳定性,与吸附法相比几乎没有酶分子泄漏,通常能在一定程度上提高其热稳定性,但在共价反应的过程中,酶分子易发生构象改变,导致活性降低。

包埋法是指利用具有格子结构的凝胶材料或具有多功能的半透膜,使酶分子被固定于特定的结构之中,如卡拉胶、聚乙烯亚胺、聚丙烯酰胺等聚离子聚合物材料<sup>[11]</sup>。这种固定化方法具有固定化率高、可用于多种目的分子的共固定等优点;但其主要缺陷在于,若催化反应发生较快,反应产物的积累难以很快地透过胶膜释放到反应溶剂中,从而降低反应速率甚至导致胶膜材料的破裂。

交联法是一种无载体固定化策略,它利用双功能或多功能的交联剂(如戊二醛、二羧酸、己二酰亚胺酸二甲酯等)使酶分子之间发生化学连接,形成一种大型的复杂三维结构,且获得疏水性而可从溶液中分离出来,从而得到固定化酶。由于交联反应的无序性,可能在酶的活性中心发生交联而使酶活降低或失活,大大降低固定化酶的酶活回收率。同时,由简单交联形成的固定化酶交联体的机械性能较差,因此交联法很少被单独应用于酶的固定化,通常与其他固定化方法结合,以巩固或提高原有固定化策略的效果。

Jancsik 等<sup>[12]</sup>采用先包埋后交联的方法,分别将 $\beta$ -半乳糖苷酶、青霉素酰化酶和醛缩酶包埋于聚乙烯醇膜内,然后用戊二醛对三种酶进行交联,在减少包埋蛋白损失的同时提高交联酶的机械性能。

## 2 新型固定化酶技术

在新型固定化技术的探索研究中,固定化载体的选择与研发十分重要,其一般具有优异物化特性,例如多孔性、疏水/亲水性、物化稳定、表面活性等。合适的固定化载体能有效提高固定化率和催化效率,因而许多新型固定化技术的研究都围绕着载体材料展开。另一方面,为了让新型载体的优势得到最大发挥,同时弥补其存在的缺陷,研究者们对固定化技术的方法策略也进行了大量的创新研究<sup>[13-15]</sup>。

### 2.1 基于新型固定化载体的固定化酶技术

#### 2.1.1 基于材料创新的固定化技术

随着生物技术与材料、化学等学科的不断交叉发展,新的载体修饰方法和新型材料不断涌现,丰富了固定化技术研究的载体来源,涌现一批围绕新型载体展开的固定化策略研究<sup>[16-18]</sup>。这一类载体通常有表面积大、具有多孔性空间结构、底物/产物亲和性等特征,可主要分为新型纳米材料载体、磁性材料载体、传统材料经改造修饰而成的复合新型载体 3 大类。

新型纳米载体是指具有纳米级结构的材料,这类材料拥有极大的表面积和良好的分散性,能极大地提高固定化率和反应催化效率,主要包含有多孔纳米金颗粒<sup>[19]</sup>、纳米管<sup>[20]</sup>、石墨烯<sup>[21]</sup>等。使用纳米材料载体制备的固定化酶多应用于电极和生物传感器领域,研究结果显示这类生物传感器能产生更强的信号,拥有更大的检测范围和更高的敏感度。其中,碳纳米管是最具代表性的新型纳米材料之一,1991 年被日本学者发现以来,极大地推动了材料制备领域的发展,2010 年

以来碳纳米管在固定化酶技术中的应用不断涌现,目前在脂肪酶、水解酶、漆酶和多种氧化还原酶的固定化研究中均有大量应用。本团队利用多壁碳纳米管吸附固定化洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶<sup>[22]</sup>,并将其应用于手性拆分 1-苯乙醇反应,发现该固定化酶的催化效率得到了极大的提升,是游离酶的 54 倍,拆分反应平衡所需的时间从几天缩短至 10 min,表明纳米材料制备的固定化酶在生物催化应用中具有极大的发展潜力。

磁性材料是利用铁、锰、钴及其氧化物等化合物制备的一类具有磁性的材料,其最大优点在于可通过磁力吸引而迅速分离固定化酶,且固定化方法简单,能有效减少资本和工程投入<sup>[23]</sup>。单一的磁性颗粒一般不直接用于酶的固定化,通常与其他有机高分子聚合物或多孔性无机材料联合使用,以获得较高的固定化率,同时使固定化酶具有磁性,便于分离回收。在我国固定化酶研究领域内,磁性颗粒早在 20 世纪 80 年代就被应用于固定化酶的研究工作中,21 世纪以来得到了大量应用,至今仍是固定化酶制备的常用材料之一,如 Hou、Song、Fortes 等的工作<sup>[24-26]</sup>,利用磁性颗粒结合其他固定化材料制备固定化酶,大大简化了回收利用操作过程。本团队利用树状分子修饰的磁化多壁碳纳米管作为载体固定化米赫根毛霉脂肪酶 (*Rhizomucor miehei* lipase),获得了催化活性高、结构稳定、操作简便的固定化酶,并将其成功应用于生物柴油的制备反应<sup>[27]</sup>。

基于传统材料进一步改造修饰的固定化载体通常有较为繁杂的化学修饰,但这种方法具有较强的目的性和方向性,常应用于定向固定化和共固定复合酶的研究中<sup>[28-29]</sup>。一些性能优良的传统载体,如多孔硅材料、大孔树脂、分子筛、天然多糖等,经过长期的实验研究已被证明具有较大的固定化潜力,但仍具有部分缺陷,如稳定性差、不易回收利用等,通过针对性的改造与修饰

克服其应用阻碍,制备出新型的二代载体以促进固定化酶走向工业化应用,是当前固定化领域内的研究热点之一。以琼脂糖材料为例,早在 1975 年便有研究使用琼脂糖珠固定化胰蛋白酶<sup>[30]</sup>,而在 Rueda 等<sup>[31]</sup>2016 年的工作当中,利用辛基谷氨酸对琼脂糖珠进行修饰并固定化了 5 种不同的脂肪酶,不仅大幅提高了脂肪酶催化活力,还能利用离子交换将固定化酶洗脱而回收利用载体,提出了一种可逆固定化技术。

由以上 3 类基于材料创新组成的固定化酶技术具有催化效果好、固定化率高等特点,其主要优势在于对新兴载体的应用,使该技术具有极大的发展潜力与可塑性。另一方面,由于载体的选择和预处理等过程是必要的,该技术的操作过程一般比较复杂,固定化酶的物理形态和适用环境受载体材料的影响极大。

### 2.1.2 金属有机骨架化合物介导的固定化

金属有机骨架 (MOF) 也称多孔配位聚合物 (PCPs),是一类有多孔结构杂化晶体,由无机分子和有机络合基团 (羧酸盐、偶氮、膦酸盐等) 连接构成<sup>[32]</sup>。MOF 含有大量孔隙结构,在气体储存、催化、检测、生物医学等众多领域中均有较大应用潜力。2006 年,Psiklak 最早将 MOF 应用于固定化酶技术,直至 2011 年,Ma 等的工作发表,该固定化技术开始得到广泛的应用。MOF 或 PCPs 固定化酶技术可分为 3 类,即物理吸附、化学连接和牢笼包埋<sup>[33]</sup>;其中牢笼包埋法固定化酶利用载体的牢笼结构,通过简单混合孵育即可使酶分子束缚于其牢笼结构内,并发生一定的结构变化,此时酶的结构与游离状态下不同,但也并未损伤活性。Lykourinou 等<sup>[34]</sup>合成了多孔 MOF (Tb-TATB, 铽-三氨基三硝基苯,如图 2) 并固定化微过氧化物酶-11 (MP-11),将其氧化 3,5-二叔丁基儿茶酚 (DTBC) 的底物转化率提高至 48.7%,而之前大孔树脂固定化的 MP-11 转化率只有 17.0%。

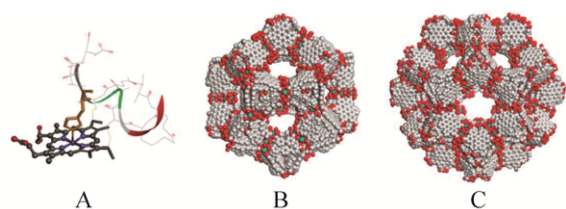


图2 MP-11 的结构示意图 (A)、3.9 nm 直径时的多孔 MOF (B)、4.7 nm 直径时的多孔 MOF (C)<sup>[34]</sup>

Fig. 2 Structure of MP-11 (A), Tb-TATB in 3.9 nm diameter cage (B), Tb-TATB in 4.7 nm-diameter cage (C)<sup>[34]</sup>.

MOF 介导的固定化技术能显著提高固定化酶的稳定性,甚至能在一定程度上适应一些非自然的恶劣环境,在固定化率最大化的同时最小化酶蛋白的流失。清华大学戈钧团队制备了酶-金属有机骨架复合物<sup>[35]</sup>,将皱褶假丝酵母脂肪酶固定其中,将所得固定化酶和天然酶分别暴露于二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、甲醇、乙醇等对蛋白结构具有一定破坏性的有机溶剂中,金属有机骨架固定化酶具有极好的有机溶剂耐受性,几乎完全保留了其初始酶活。

### 2.1.3 纳米花型杂交晶体固定化

纳米花型固定化酶指的是酶分子直接与无

机盐晶体杂交形成具有类似天然花卉形态结构的复合体。这一概念由 Ge 等<sup>[36]</sup>2012 年在 *Nature Nanotechnology* 发表的一篇文章中首次报道,并通过改变缓冲液浓度而模拟了固定化酶“开花”的过程 (图 3),酶蛋白与无机盐在反应初始阶段发生聚合,随后逐渐形成花瓣、花朵的形态。

该固定化的发生伴随了无机盐沉淀形成的过程,利用低浓度的缓冲液减缓无机盐形成速率,在反应中引入酶分子,使沉淀依附其上而缓慢形成,一定程度上对其进行了包埋,以实现酶的固定化。近年来,Altinkaynak 等<sup>[37]</sup>也进行了相关研究工作,本团队利用无机磷酸钙缓慢形成的过程,制备了一种具有纳米花型态的固定化脂肪酶,如图 4 所示<sup>[38]</sup>,在含有酶的反应溶液中,磷酸钙沉淀由原来的片层结构转化为纳米花结构。实验发现,虽然这种制备方法合成的固定化酶在结构稳定性上有一定的缺陷,但其能有效提高脂肪酶的催化效率,并且操作简单,制备环节较少,相比其他固定化技术,纳米花型固定化酶技术只需要一步反应便能完成载体合成和酶的固定化,具有极大的发展和应用潜力。

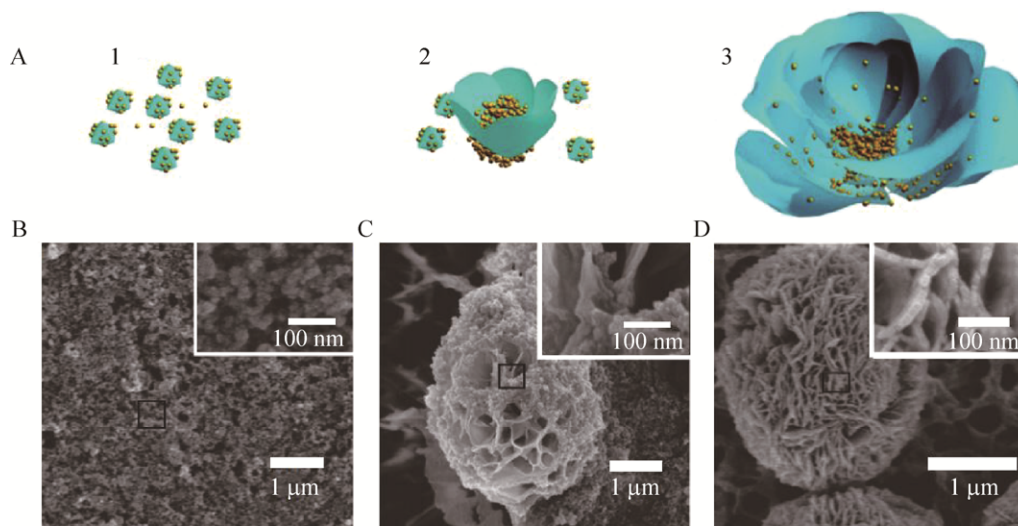


图3 纳米花型杂交晶体. (A) 纳米花形成过程机制的推断示意图. (B-D) 分别为纳米花合成反应 2 h、12 h 和 3 d 后的 SEM 图像<sup>[36]</sup>

Fig. 3 Nanoflower hybrid crystal. (A) Proposed mechanism of nanoflowers formation. SEM images of nanoflowers after 2 h (B), 12 h (C) and 3 d (D) reaction<sup>[36]</sup>.



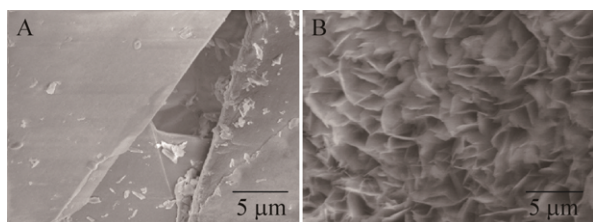


图 4 空白对照磷酸钙沉淀 (A) 与固定化酶 BCL-磷酸钙沉淀 (B) 的 SEM 图像<sup>[38]</sup>

Fig. 4 SEM images of the synthetic products without lipase (A) and with lipase (B)<sup>[38]</sup>.

## 2.2 新型固定化酶制备技术

### 2.2.1 单酶纳米颗粒的制备

单酶纳米颗粒 (Single enzyme nanoparticles, SENs) 是指每个酶分子均被一种纳米级的有机或无机多孔网状聚合物所包围而形成的纳米固定化酶颗粒。该技术于 2003 年被首次提出, Kim 等<sup>[39]</sup>将两种胰蛋白酶固定于一种多孔有机-无机材料之中, 每个酶分子如同被单独封锁于一个纳米级“集装箱”中。由于包埋层非常薄, 具有多孔性结构, 且有纳米级尺寸的特性, 可以很好地分散在溶剂中, 因而形成的单酶纳米颗粒与反应底物之间的传质阻力十分小, 有效提升了固定化酶的催化活性。单酶纳米颗粒具有良好的催化稳定性和环境抗逆性, 且有多种反应形式, 可以单独或混合具有协同效应的多种酶进行催化反应。由于其单体尺寸较小而不易进行回收分离, 在应用中可以与其他多孔性材料联合使用, 如用磁性颗粒吸附 SENs<sup>[40]</sup>, 使其带有磁性以简化其回收利用操作。而随着单酶纳米颗粒技术的发展, Cai 等<sup>[41]</sup>制备了一种新型纳米人工酶, 如图 5 所示, 通过两步法合成了氢氧化铜 3D 牢笼结构纳米颗粒, 其本身便具有高于天然辣根过氧化物酶的催化活性。

### 2.2.2 微波辐射辅助的固定化技术

由于不同载体和酶自身的亲水性、溶解性等物化性质不同, 固定化过程中存在一定的分散与

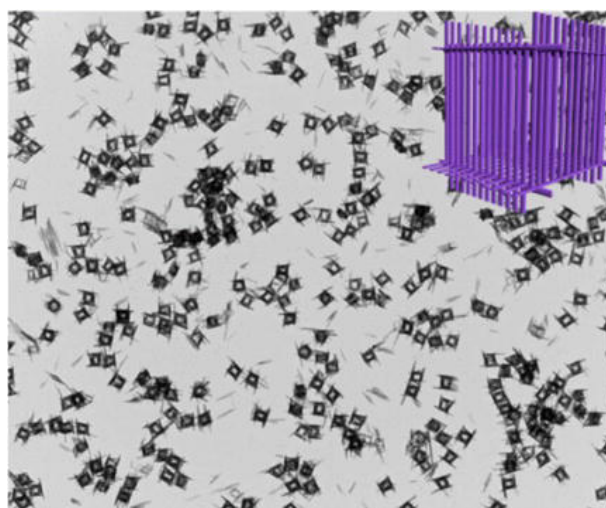


图 5 氢氧化铜 3D 牢笼结构人工单酶纳米颗粒<sup>[41]</sup>

Fig. 5  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  3D supercage as an single artificial enzyme nanoparticle<sup>[41]</sup>.

接触性障碍, 微波辐射辅助固定化技术指的是在固定化反应原液准备和固定化反应过程中, 对溶液进行微波辐射处理以辅助固定化过程的发生。1997 年, Penafiel 等<sup>[42]</sup>发现微波辐射能影响酶的结构与活力, 在之后的研究中微波辐射常用于反应溶液的均匀分散过程, 2005 年, Vukova 等<sup>[43]</sup>通过研究发现辐射强度对处理效果有很大的影响, 说明了微波辐射各参数优化的必要性。在固定化研究中, 许多多孔性材料都有着由于亲/疏水性而造成的扩散限制, 使得酶分子很难与其发生吸附或共价结合, 阻碍了其在固定化领域中的应用, 而在某些固定化酶制备的过程中, 使用微波辐射对固定化过程辅助可以很好地解决这一扩散限制<sup>[44]</sup>。例如木瓜蛋白酶和青霉素酰基转移酶<sup>[45]</sup>, 两者的蛋白结构尺寸均较大而难以被固定化, 通过微波辐射辅助, 这两种大分子蛋白酶均能成功且迅速地固定于中细胞硅质泡沫上, 并且其蛋白活性也得到了较好的保留。研究表明, 对于一些具有固定化需求、在常规固定化过程中又存在较大传质阻力的反应, 微波辐射是一种有效的辅助技术, 且在多类固定化或催化反应中表现出极大的

应用潜力<sup>[46-49]</sup>。另一方面,微波辐射在一定程度上会影响酶与载体的结合,导致某些吸附固定化酶发生蛋白脱落,因此在固定化酶的制备过程中应有选择性地应用此技术。

### 2.2.3 无载体固定化技术

无载体固定化是指在没有载体材料存在的情况下,酶分子通过交联或聚集而形成不溶于水的聚合物,使其能够从水溶液中分离实现固定化(图 6)<sup>[50]</sup>。在传统固定化技术中,一般使用交联法来制备含单一酶交联酶晶体(Cross-linked enzyme crystal, CLEC)或包含多种酶交联酶聚集体(Cross-linked enzyme aggregates, CLEAs)。2001 年以后,在传统技术的基础上,Cao 等<sup>[51]</sup>对此技术进行了扩展研究,形成了一种新型无载体交联固定化技术,该技术被 Sheldon 团队<sup>[52]</sup>不断研究发展,最后被 CLEA Technologies (Netherlands) 公司商业化。在此基础上,关于酶的自固定化概念被提出,即利用含有酶的水溶液与含有表面活性剂的非水相溶液混合,并加入双功能交联剂,通过超声或物理乳化的方法形成微乳化体系。在自固定化的过程中,酶倾向于分布在油水界面上,通过交联剂能使分布在微乳球表面的酶发生聚集而获得疏水性,然后除去有机试剂即可获得自固定化的酶颗粒,且由于界面激活效应,得到的固定化酶通常处于激活态而拥有较高的催化活力。该方法在脂肪酶、漆酶以及多种复合酶蛋白等固定化应用中均取得了成功,Molawa 等<sup>[53]</sup>利用聚乙烯亚胺和戊二醛结合交联法,成功制备了碱性蛋白酶球形颗粒,并结合 PVA 包埋法大幅提高了固定化酶的催化稳定性。对比于传统交联固定化技术,新型无载体固定化技术一定程度上克服了固定化酶活性低、易变性、稳定性差的缺点,但相比其他新型固定化酶技术,该方法的性价比仍然无法接近实际工业应用的需求。

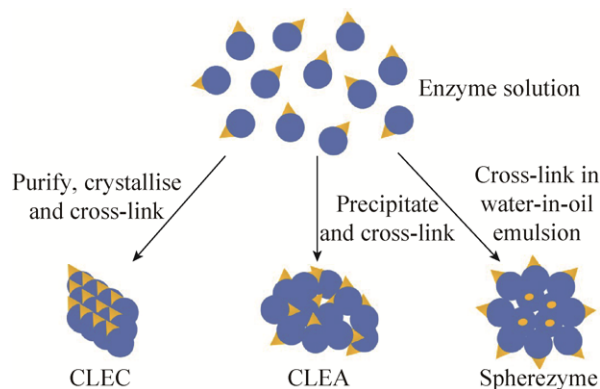


图 6 脂肪酶无载体固定示意图<sup>[50]</sup>

Fig. 6 Lipase immobilization without carriers<sup>[50]</sup>.

## 2.3 酶的定向固定化技术

### 2.3.1 生物酶介导的定向固定化技术

在当今人们环保意识不断增强的时代背景下,使用绿色化学、环境友好型生物技术取代对环境造成巨大污染的传统化学手段是现代工业面临的一个重点难题。在固定化技术中,研究者们提出一种新型的固体蛋白制剂,通过酶促反应使标记蛋白与目的蛋白结合,在不使用其他化学交联剂的情况下,实现酶的共价固定化<sup>[54]</sup>。2007 年,一种转氨酶 Sortase A 介导的蛋白修饰技术被提出<sup>[55]</sup>,很快便在固定化酶技术中得到应用<sup>[56]</sup>,利用 Sortase A 可将目的蛋白连接到氨基修饰的载体上,实现酶的定向固定化。由此,生物酶介导的定向固定化技术的研究不断发展。其中,增强的绿色荧光蛋白 (EGFP) 和谷胱甘肽转移酶 (GST) 是一类模型蛋白,在其 C 末端用中性 Gln 供体底物肽作为标签标记,可通过酶促反应固定在含有酪蛋白涂层的聚苯乙烯表面<sup>[57]</sup>。另一类则是以 SNAP 自聚标签为代表的融合标签酶固定化策略,如图 7 所示<sup>[58-59]</sup>,将目标酶与 SNAP 标签蛋白融合表达,可利用标签与载体表面的特定残基形成稳定的共价结合以实现固定化。

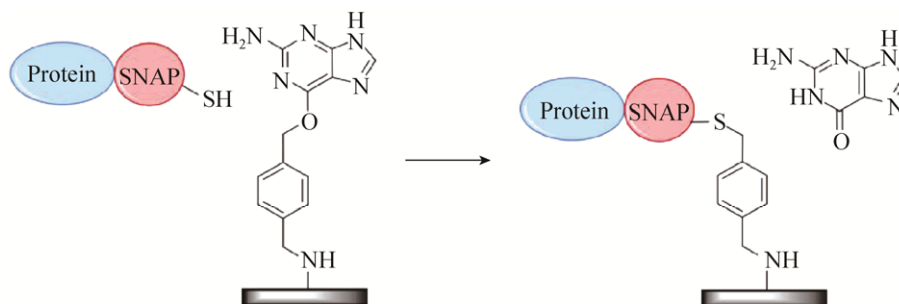


图7 SNAP自聚标签融合酶蛋白与 $O^6$ -苄基鸟嘌呤定向共价固定化策略<sup>[58-59]</sup>

Fig. 7 Immobilization by an enzyme self-labeling tag: the SNAP-tag reacts with  $O^6$ -benzylguanine<sup>[58-59]</sup>.

这一类新型固定化技术也被称为酶促固定化酶技术 (Enzymatic immobilization of enzyme)<sup>[60]</sup>, 其本质是通过蛋白融合而实现酶蛋白的定向共价固定化, 具有设计性强、选择性高等特点, 但技术操作相对复杂, 目前主要被应用于生物传感器、生物电极的制备领域, 该方法在各类生物酶中的普适性和催化应用性还有待进一步研究。

### 2.3.2 化学修饰介导的定向固定化技术

定向固定化的实现主要依靠对酶与载体表面的分析修饰, 与上文提及的蛋白融合标签法相比, 化学修饰介导的固定化是指在酶分子表面氨基酸残基上引入特定基团, 使修饰后的酶能与载体表面的功能团发生特定的化学结合, 实现酶的定向固定化。在过去几十年中, 生物正交反应研究不断发展<sup>[61]</sup>, 促进了一些固定化酶策略的形成, Je等<sup>[62]</sup>利用该策略将糜蛋白酶固定化于纤维素纳米纤维上, 得到了一种环境友好且活性较高的固定化酶。目前比较常用的修饰功能团有醛基、叠氮、炔烃等, 图8显示的是一种常见的点击反应, 经炔烃修饰的酶分子能与含有叠氮化物功能团的载体发生1,3-偶极环加成反应, 形成稳定的化学共价键, Cu(I)是这类化学修饰介导的固定化酶反应中常用的催化剂<sup>[63]</sup>。化学修饰策略的优势在于, 可应用于固定化表面缺乏相应共价结合功能团的酶, 但这一方法易造成酶蛋白结构改变而影响其催化活性, 通过预测修饰位点以及

选取条件较温和的反应方式能有效减少固定化酶催化活性的损失。

### 2.3.3 基于表面展示技术的酶固定化

表面展示技术指的是利用蛋白融合技术, 使目的蛋白与微生物表面的锚定蛋白结合而展示在微生物体表面, 并保持一定的结构稳定性和功能活性, 利用这一技术将酶融合展示于细胞表面的固定化技术也属于一种全细胞催化剂制备策略。1985年, Smith等提出了一种噬菌体表面展示技术, 由此开始了表面展示技术的研究与发展<sup>[64-65]</sup>。根据展示主体材料的不同, 目前表面展示技术主要可分为3类, 即噬菌体、细菌、酵母表面展示系统。Shibasaki等于1997年首次公开了一种工程酵母蛋白展示技术<sup>[66]</sup>, 体现了酵母系统细胞结构清晰、遗传操作简单、容错性强以及可进行复杂大分子蛋白融合展示的优良特性。此后, 通过多种酵母 (如酿酒酵母、毕赤酵母、解脂耶氏酵

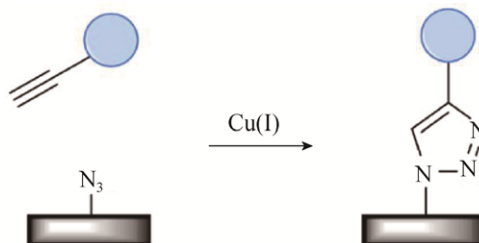


图8 Cu(I)催化叠氮炔环加成反应<sup>[63]</sup>

Fig. 8 Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction<sup>[63]</sup>.



母等)开展的表面展示技术研究成为了该领域的研究热点之一。多数酵母表面展示技术是通过 GPI 锚定残基来实现的, GPI 能同时与酵母细胞壁蛋白和外源蛋白结合;如图 9 所示<sup>[67]</sup>, GPI 残基主要有 4 种融合的模式,即通过凝集素蛋白的 C 末端、N 末端或 Flo1 的 C 末端、N 末端以融合目的蛋白。

表面展示固定化酶技术从化学本质上看是一种共价结合固定化,当结合位点离催化活性中心较近时,易造成酶的结构变化导致失活或活性降低。因此,利用表面展示技术固定化酶时,通常需要预先分析酶的氨基酸序列与三维空间结构,选择距离活性中心较远的氨基酸残基进行修饰,尽量降低酶与锚定蛋白的结合对酶分子构象和催化活性造成的影响。这一预先分析选择重要性在本团队 2010 年发表的工作中得到了有力的证明与强调<sup>[68]</sup>,通过对

Cwp2、Flo1 和凝集素蛋白 3 种不同锚定蛋白直接融合 Lip2,将其展示于酵母细胞表面,图 10 以 Flo1 锚定蛋白融合 Lip2 表面展示为例,简述了该技术原理。对成功展示的工程菌(即固定化酶)进行催化活性检测分析,对比发现 3 种展示途径对催化活力均发生了较大程度的抑制;而通过结构预测选择远离活性中心的锚定位点以展示 Lip7、Lip8 和黑曲霉脂肪酶均得到了较高的酶活回收率,其温度稳定性和操作稳定性也得到了改善。

表面展示技术的主要优势在于定向结合性强、固定化酶结合稳定、获得的工程菌即为全细胞催化剂,因而具有较高的工业应用潜力。但其操作较复杂,从蛋白结构预测到基因的编辑和表达、最后收集发酵产物等一系列流程的投入较高,在实际应用之前,需对工程菌的稳定性和催化活性进行大量的测试与评估。

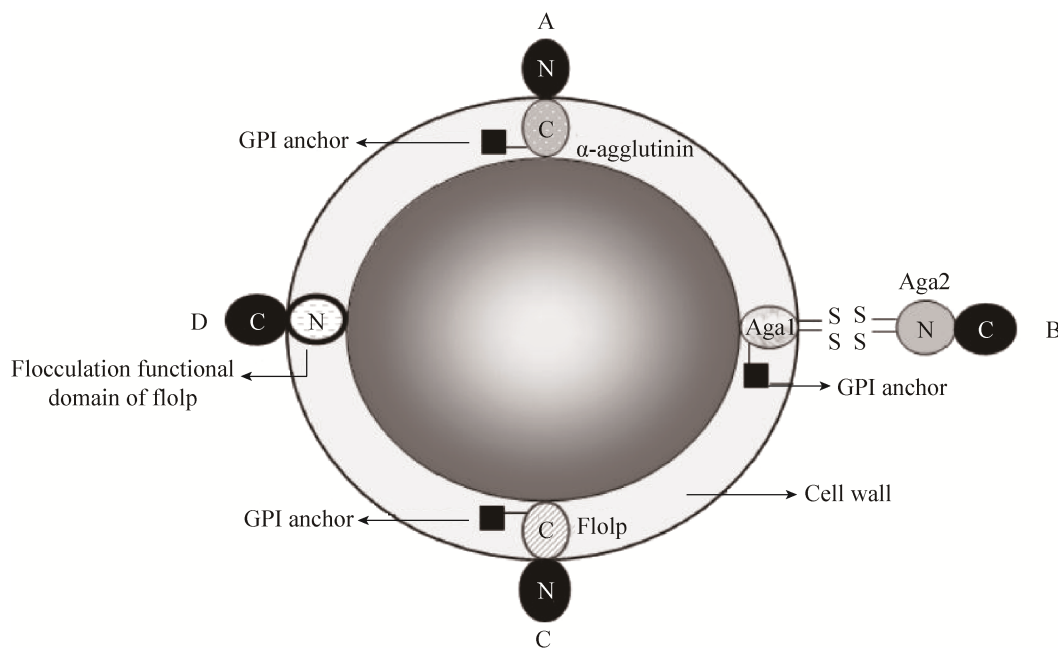


图 9 酵母表面展示系统:  $\alpha$ -凝集素 C 末端系统 (A)、 $\alpha$ -凝集素 N 末端系统 (B)、Flo1p C 末端系统 (C) 和 Flo1p N 末端系统 (D)<sup>[67]</sup>

Fig. 9 Yeast surface display systems:  $\alpha$ -agglutinin C terminal system (A),  $\alpha$ -agglutinin N terminal system (B), Flo1p C terminal system (C) and Flo1p N terminal system (D)<sup>[67]</sup>.

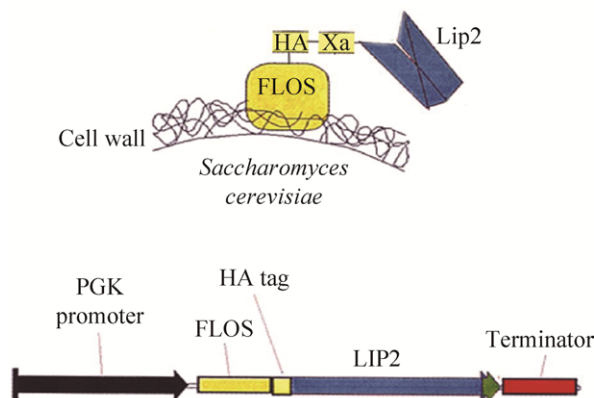


图 10 Flos 锚定蛋白在酵母表面融合展示 Lip2<sup>[68]</sup>

Fig. 10 Yeast surface display Lip2 via anchored protein Flos<sup>[68]</sup>.

### 2.3.4 界面聚合微囊固定化技术

界面聚合指的是一种反应发生在两种互不相容的界面之间的缩聚反应, 该反应具有不可逆性; 将目的酶溶解在相应的体系中, 通过缩聚能形成微囊或微球颗粒将酶蛋白包裹而实现固定化<sup>[69]</sup>。界面聚合最初主要集中于化学合成研究, 在 2001–2002 年间, 大量乳液体系中的界面聚合微囊技术涌现<sup>[70–71]</sup>, 由此开启了界面聚合微囊制备的研究。2015 年, Qu 等<sup>[72]</sup>将脂肪酶固定于界面聚合获得的三维胶质体上, 由于其油水界面的特性, 固定化酶活力是游离酶的 8 倍。油/水 (O/W) 乳液体系是界面聚合微囊固定化技术的经典模型, 可分为水包油、油包水和油包油三种类型, 其中应用最多的是油包水微囊技术, 如图 11 所示, 酶多数分布于油水界面上, 其活性结构被激活, 从而具有更高的酶活<sup>[69]</sup>。因此, 界面聚合微

囊固定化技术最大的优势在于对固定化酶的激活, 但微囊的储存和重复利用稳定性仍需进一步增强。

在苏枫等<sup>[73]</sup>报道的固定化研究中, 选用了聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI) 作为聚合单体, 在交联剂癸二酰氯的作用下通过界面聚合得到脂肪酶微囊, 利用共聚焦显微镜观察其显微结构, 发现 PEI 聚合物与酶蛋白均分布于微囊表面 (图 12)。此后, 利用碳纳米管进行修饰, 使得油水界面得到强化, 降低了 PEI 携带的正电荷, 大大提高了脂肪酶的催化活力。

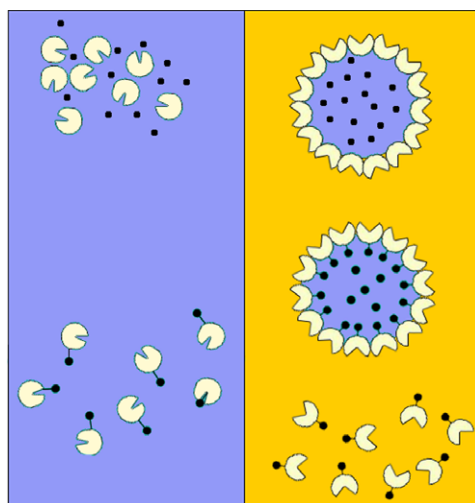


图 11 油包水微囊示意图<sup>[69]</sup> (黑点与白块分别表示亲水与疏水结构, 蓝色与黄色分别表示水相与油相, 位于油水界面的酶, 其活性结构被激活, 如图所示白色缺口打开变大)

Fig. 11 Water in oil emulsion<sup>[69]</sup>. Black point: hydrophilic structure; white block: hydrophobic structure.

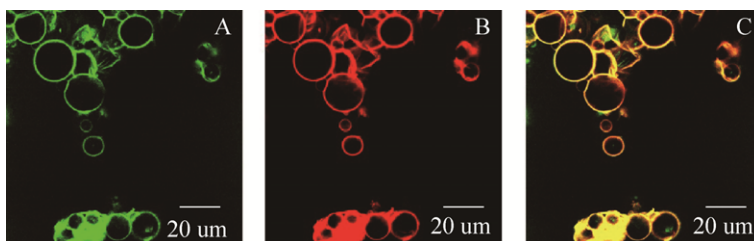


图 12 微囊内部的蛋白质分布<sup>[73]</sup>

Fig. 12 The distribution of protein in microcapsule<sup>[73]</sup>. (A) PEI. (B) Protein. (C) Overlapped.

## 2.4 其他新型固定化技术

随着固定化技术研究的发展创新,除了以上几种公认分类之外,还有一些新提出的固定化技术,策略独特且具有极大的发展应用潜力。以“智能固定化”技术为例,这种固定化技术利用智能高聚物材料为固定化载体,所制备得到的固定化酶继承了载体所拥有的特性。智能高聚物材料也叫作高分子智能材料,在其所处环境条件(温度、pH、压力、磁场等)发生变化而产生刺激时,其物理性质和/或化学性质会发生一定的变化,例如一些聚合物在温度较低时呈液态,而当温度升高则逐渐固化且具有极强的物理抗性。如图 13 所示, Cirillo 等<sup>[74]</sup>将胃蛋白酶共价连接在其热应答水凝胶网状结构的侧链上,所得固定化酶具有良好的操作稳定性和热稳定性,在重复使用 6 次后,其酶活回收率仍在 80% 以上。

新型固定化技术的研究种类繁多,很难将其进行精准的分类,通常以固定化酶主要展现出的性质或制备过程中的典型工艺为分类依据。目前新型固定化技术的研究目标主要集中于进一步提高酶活,增强固定化酶环境耐受性、操作稳定性,以及实现酶的精准定向固定化。但新型固定化技术的研究容易陷入制备过程繁琐、生产投入较高的缺陷之中,需要大量基础研究和优化手段来完善,应适当选择一些工业应用潜力较大的固定

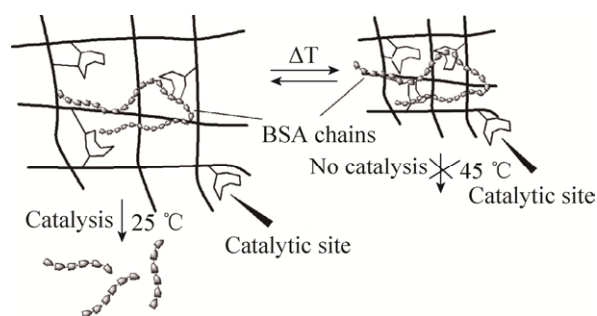


图 13 热应答水凝胶“按需”催化示意图<sup>[74]</sup>

Fig. 13 Schematic representation of “on-demand” catalysis by thermo-responsive hydrogels<sup>[74]</sup>.

化技术进行小规模或中等规模的制备与应用测试,逐步实现固定化酶的实际生产应用。

## 3 固定化酶的应用

生物酶制剂具有催化效率高、反应类型多样、绿色、环境友好等优良特性,已经被广泛应用于许多实际工业生产中。固定化酶最早被应用于食品行业,最典型的应用是固定化乳糖酶在乳制品生产中的应用,鲜奶中一般都有较高含量的乳糖,一些乳糖不耐症患者在摄入后可发生胃痉挛、腹泻等症状,且乳糖在低温环境中易结晶,影响一些低温乳制品的口感和风味,在乳制品的生产过程中,利用固定化的乳糖酶对乳制品进行充分处理,能有效解决上述问题。除此之外,固定化酶在生物传感器、医疗诊断、药物制备、环境治理和生物能源等领域也有着大量的应用<sup>[75-76]</sup>。生物传感器由于其简单、快速、灵敏、专一且成本较低的特点,使其成为了目前传感器研发领域的热点<sup>[77]</sup>。新型固定化技术进一步提高了生物酶制剂的催化活力和操作稳定性,简化了回收过程,能大大减少酶制剂的生产成本,对生物酶的实际工业应用具有重大意义。

在生物能源应用中,大量研究报道了固定化酶在生物柴油制备中的应用,而反应体系以油相为主,粘度较大,使得固定化酶易发生蛋白脱落,并且酶与底物分离困难而重复利用性差。相比于用天然沸石、壳聚糖等为载体的传统固定化方法,范艳利等<sup>[27]</sup>利用磁化的树状分子定向固定化了米赫根毛霉脂肪酶,该固定化酶结合稳定,且具有磁性,可利用磁场作用力实现固定化酶与反应体系的快速分离,操作简单且反应稳定,能有效解决传统固定化技术的应用障碍。

酶促手性拆分药物中间体是酶制剂在药物制备领域内的重要应用之一。Hara 等<sup>[78]</sup>利用凝胶交联法制备了固定化洋葱伯克霍德菌脂肪酶

(BCL), 其催化 1-苯乙醇到达反应平衡所需时间在 24 h 以上, 而本团队利用新型固定化载体碳纳米管吸附固定化 BCL, 其催化拆分 1-苯乙醇平衡反应时间只需要 10 min<sup>[22]</sup>, 表明新型固定化材料对酶催化效率的提高具有极大探索价值和应用潜力。

在环境治理应用上, 漆酶在废水处理和有毒化合物降解中有着广泛的应用。20 世纪 80 年代以来, 漆酶的降解能力被逐步研究和发现, 其早期固定化研究主要集中于海藻酸钠包埋、壳聚糖吸附、凝胶杂化等方法, 其操作稳定性和重复利用性均较低。庞仕龙<sup>[79]</sup>合成了两种带有羧酸基团的金属有机骨架多孔材料 Cu-MOF 和 Zr-MOF, 并用其吸附固定化漆酶, 所得固定化酶的重复性好, 且在水相中储存 3 周后, 酶活回收率仍能保持在 55% 以上, 表明其具有良好的操作稳定性, 体现了新型固定化技术的发展优势。

## 4 总结与展望

近年来, 固定化技术的创新研究已经受到了众多领域内研究人员的关注, 大量的探索研究不断涌现, 取得了一定的进步与创新。但固定化技术仍存在一个关键性的问题, 即缺乏普适性, 对于不同的酶、不同的载体、不同的反应, 其最佳固定化方法都不尽相同。另一方面, 研究人员对固定化技术影响酶催化效率的深层机理仍缺乏足够的理解, 在固定化技术的研究中, 缺乏细节性设计。结合本团队十余年对固定化技术研究的理解, 对其未来的发展主要提出以下 3 点建议:

1) 建立一个包含固定化酶、载体和方法的数据库; 使研究人员在针对某种酶分子设计固定化方法时能够有充分、可靠、便捷的技术平台支持。

2) 增强技术创新与生物信息学、材料学和化学等相关学科的交叉合作; 利用生物信息模拟和预测技术结合现代物理化学的表征手段, 对固定

化影响酶分子的机理进行深入探究, 以期加强固定化技术的设计性和可预测性。

3) 学术型科研团队应与相关企业或工厂研发团队合作; 使在实验室阶段取得成功的固定化技术能够及时受到实际应用的检验, 通过企业或工厂研发团队进行中等规模、大规模制备与应用尝试和优化, 加快固定化酶在实际生产生活中的应用。同时, 能及时对固定化技术的研究方向与重点给出有效的反馈与建议。

随着现代生物技术和材料、化工等相关学科不断发展, 酶的固定化技术的发展正逐步由粗放转向精细, 由定性转向定量, 由无序转向定向, 在未来的固定化技术研究中, 研究策略的目的性、设计性以及预测性将是新兴技术的特点与亮点所在, 而高品质固定化酶的获取与有效应用仍是该领域内研究人员追求的最终目标。

## REFERENCES

- [1] Elnashar MMM. Review article: immobilized molecules using biomaterials and nanobiotechnology. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2010, 1(1): 61–77.
- [2] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 49–79.
- [3] Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*, 2003, 112(10): 1466–1477.
- [4] Yang XY, Tian G, Jiang N, et al. Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy Environ Sci*, 2012, 5(2): 5540–5563.
- [5] Su F, Li GL, Zhang HJ, et al. Enhanced performance of *Rhizopus oryzae* lipase immobilized on hydrophobic carriers and its application in biorefinery of rapeseed oil deodorizer distillate. *BioEnergy Res*, 2014, 7(3): 935–945.
- [6] Xu L, Ke CX, Huang Y, et al. Immobilized *Aspergillus niger* lipase with SiO<sub>2</sub> Nanoparticles in



- Sol-Gel Materials. Catalysts, 2016, 6(10): 149.
- [7] Liu T, Liu Y, Wang XF, et al. Improving catalytic performance of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on macroporous resin NKA. J Mol Catal B Enzym, 2011, 71(1/2): 45–50.
- [8] Xie T, Wang AM, Huang LF, et al. Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. Afr J Biotechnol, 2009, 8(19): 4724–4733.
- [9] Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption. Adsorption, 2014, 20(5/6): 801–821.
- [10] Mateo C, Grazu V, Palomo JM, et al. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1022–1033.
- [11] Tielmann P, Kierkels H, Zonta A, et al. Increasing the activity and enantioselectivity of lipases by sol-gel immobilization: further advancements of practical interest. Nanoscale, 2014, 6(12): 6220–6228.
- [12] Jancsik V, Beleznaï Z, Keleti T. Enzyme immobilization by poly (vinyl alcohol) gel entrapment. J Mol Catal, 1982, 14(3): 297–306.
- [13] Zhao FH, Wang Q, Dong JJ, et al. Enzyme-inorganic nanoflowers/alginate microbeads: an enzyme immobilization system and its potential application. Process Biochem, 2017, 57: 87–94.
- [14] Cao Y, Wen LY, Svec F, et al. Magnetic AuNP@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as reusable carriers for reversible enzyme immobilization. Chem Eng J, 2016, 286: 272–281.
- [15] Vaghari H, Jafarizadeh-Malmiri H, Mohammadlou M, et al. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. Biotechnol Lett, 2016, 38(2): 223–233.
- [16] Yang D, Wang XY, Shi JF, et al. *In situ* synthesized rGO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites as enzyme immobilization support for achieving high activity recovery and easy recycling. Biochem Eng J, 2016, 105: 273–280.
- [17] Liu LH, Shih YH, Liu WL, et al. Enzyme immobilized on nanoporous carbon derived from metal-organic framework: a new support for biodiesel synthesis. Chem Sus Chem, 2017, 10(7):1364–1369.
- [18] Zucca P, Fernandez-Lafuente R, Sanjust E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. Molecules, 2016, 21(11): 1577.
- [19] Yang Y, Zeng H, Zhang Q, et al. Direct electron transfer and sensing performance for catechin of nano-gold particles-polymer nano-composite with immobilized laccase. Chem Phys Lett, 2016, 658: 259–269.
- [20] Suroviec AH. Layer-by-layer assembly of glucose oxidase on carbon nanotube modified electrodes. Methods Mol Biol, 2017, 1504: 203–213.
- [21] Qu FJ, Ma XY, Hui YC, et al. Preparation of close-packed silver nanoparticles on graphene to improve the enzyme immobilization and electron transfer at electrode in glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell. Chin J Chem, 2017, doi: 10.1002/cjoc.201600824.
- [22] Ke CX, Li X, Huang SS, et al. Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on modified multi-walled carbon nanotubes. RSC Adv, 2014, 4(101): 57810–57818.
- [23] Liu T. Lipases oriented-immobilized on magnetic nanoparticles and its application[D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology, 2013 (in Chinese).  
刘涛. 磁性纳米颗粒定向固定化脂肪酶及其应用研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [24] Hou C, Wang Y, Zhu H, et al. Construction of enzyme immobilization system through metal-polyphenol assisted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/chitosan hybrid microcapsules. Chem Eng J, 2016, 283: 397–403.
- [25] Song JY, Su P, Yang Y, et al. DNA directed immobilization enzyme on polyamidoamine tethered magnetic composites with high reusability and stability. J Mater Chem B, 2016, 4(35): 5873–5882.
- [26] Fortes CCS, Daniel-Da-Silva AL, Xavier AMRB, et al. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. Chem Eng Process, 2017, 117: 1–8.
- [27] Fan YL, Wu GY, Su F, et al. Lipase oriented-immobilized on dendrimer-coated magnetic multi-walled carbon nanotubes toward catalyzing biodiesel production from waste vegetable oil. Fuel, 2016, 178: 172–178.

- [28] Yang Y, Li YF, Bai YX, et al. Progress in carrier materials employed in immobilization of enzymes. *Chemistry*, 2007, 70(4): 257–263 (in Chinese).  
杨勇, 李彦锋, 拜永孝, 等. 酶固定化技术用载体材料的研究进展. *化学通报*, 2007, 70(4): 257–263.
- [29] Wu LT, Wu SS, Xu Z, et al. Modified nanoporous titanium dioxide as a novel carrier for enzyme immobilization. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 59–66.
- [30] Sinha NK, Light A. Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on Agarose beads. *J Biol Chem*, 1975, 250(22): 8624–8629.
- [31] Rueda N, dos Santos CS, Rodriguez MD, et al. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: a mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. *J Mol Catal B Enzym*, 2016, 128: 10–18.
- [32] Wu XL, Hou M, Ge J. Metal-organic frameworks and inorganic nanoflowers: a type of emerging inorganic crystal nanocarrier for enzyme immobilization. *Catal Sci Technol*, 2015, 5(12): 5077–5085.
- [33] Gkaniatsou E, Sicard C, Ricoux R, et al. Metal-organic frameworks: a novel host platform for enzymatic catalysis and detection. *Mater Horiz*, 2017, 4(1): 55–63.
- [34] Lykourinou V, Chen Y, Wang XS, et al. Immobilization of MP-11 into a mesoporous metal-organic framework, MP-11@mesoMOF: a new platform for enzymatic catalysis. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(27): 10382–10385.
- [35] Wu XL, Yang C, Ge J. Green synthesis of enzyme/metal-organic framework composites with high stability in protein denaturing solvents. *Bioresour Bioprocess*, 2017, 4(1): 24.
- [36] Ge J, Lei J, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7(7): 428–432.
- [37] Altinkaynak C, Tavlasoglu S, Yzdemir N, et al. A new generation approach in enzyme immobilization: organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 93–94: 105–112.
- [38] Ke C, Fan Y, Chen Y, et al. A new lipase-inorganic hybrid nanoflower with enhanced enzyme activity. *RSC Adv*, 2016, 6(23): 19413–19416.
- [39] Kim J, Grate JW. Single-Enzyme Nanoparticles armored by a nanometer-scale organic/inorganic network. *Nano Lett*, 2003, 3(9): 1219–1222.
- [40] Yang ZP, Si SH, Zhang CJ. Magnetic single-enzyme nanoparticles with high activity and stability. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(1): 169–175.
- [41] Cai R, Yang D, Peng SJ, et al. Single nanoparticle to 3D supercage: framing for an artificial enzyme system. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(43): 13957–13963.
- [42] Penafiel LM, Litovitz T, Krause D, et al. Role of modulation on the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity in L929 cells. *Bio Electro Magnetics*, 1997, 18(2): 132–141.
- [43] Vukova T, Atanasov A, Ivanov R, et al. Intensity-dependent effects of microwave electromagnetic fields on acetylcholinesterase activity and protein conformation in frog skeletal muscles. *Med Sci Monit*, 2005, 11(2): BR50–BR56.
- [44] Wang AM, Liu MQ, Wang H, et al. Improving enzyme immobilization in mesocellular siliceous foams by microwave irradiation. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(3): 286–291.
- [45] van Langen LM, Janssen MHA, Oosthoek NHP, et al. Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 79(2): 224–228.
- [46] Wang AM, Wang MZ, Wang QY, et al. Stable and efficient immobilization technique of aldolase under consecutive microwave irradiation at low temperature. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 469–474.
- [47] Zhang YH, Xia XX, Duan MH, et al. Green deep eutectic solvent assisted enzymatic preparation of biodiesel from yellow horn seed oil with microwave irradiation. *J Mol Catal B Enzym*, 2016, 123: 35–40.
- [48] Kamble MP, Chaudhari SA, Singhal RS, et al. Synergism of microwave irradiation and enzyme catalysis in kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol by cutinase from novel isolate *Fusarium ICT SAC1*. *Biochem Eng J*, 2016, 117: 121–128.
- [49] Plagemann R, Von Langermann J, Kragl U. Microwave-assisted covalent immobilization of

- enzymes on inorganic surfaces. *Eng Life Sci*, 2015, 14(5): 493–499.
- [50] Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(11): 1639–1650.
- [51] Cao LQ, Langen LM, Janssen MHA, et al. Crosslinked enzyme aggregates: European, 1088887. 2001-04-04.
- [52] Sheldon RA, Schoevaart R, van Langen LM. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): a novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal Biotransform*, 2005, 23(3/4): 141–147.
- [53] Molawa L, Jordaan J, Limson J, et al. Modification of Alcalase SphereZyme™ by entrapment in LentiKats® to impart improved particle stability. *Biocatal Biotransform*, 2013, 31(2): 71–78.
- [54] Stempfer G, Höll-Neugebauer B, Kopetzki E, et al. A fusion protein designed for noncovalent immobilization: stability, enzymatic activity, and use in an enzyme reactor. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(4): 481–484.
- [55] Popp MW, Antos JM, Grotenbreg GM, et al. Sortagging: a versatile method for protein labeling. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(11): 707–708.
- [56] Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(1): 1–10.
- [57] Tanaka Y, Tsuruda Y, Nishi M, et al. Exploring enzymatic catalysis at a solid surface: a case study with transglutaminase-mediated protein immobilization. *Org Biomol Chem*, 2007, 5(11): 1764–1770.
- [58] Shigetomi E, Jackson-Weaver O, Huckstepp RT, et al. SNAP-tag as a tool for surface immobilization. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(30): 5443–5448.
- [59] Meldal M, Schoffelen S. Recent advances in covalent, site-specific protein immobilization. *F1000Res*, 2016, 5: 2303.
- [60] Kong WQ, Chen ZW. Research advance of enzymatic immobilization in enzyme electrode. *Life Sci Instrum*, 2010, 8(5): 38–42 (in Chinese). 孔维琴, 陈志伟. 酶电极中酶固定化方法研究进展. *生命科学仪器*, 2010, 8(5): 38–42.
- [61] Carell T, Vrabel M. Bioorthogonal chemistry-introduction and overview. *Top Curr Chem*, 2016, 374(1): 9.
- [62] Je HH, Noh S, Hong SG, et al. Cellulose nanofibers for magnetically-separable and highly loaded enzyme immobilization. *Chem Eng J*, 2017, 323: 425–433.
- [63] Sonawane MD, Nimse SB. Surface modification chemistries of materials used in diagnostic platforms with biomolecules. *J Chem*, 2016, 2016: 9241378.
- [64] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228(4705): 1315–1317.
- [65] Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, 249(4967): 386–390.
- [66] Shibasaki S, Maeda H, Ueda M. Molecular display technology using yeast-arming technology. *Anal Sci*, 2009, 25(1): 41–49.
- [67] Tafakori V, Torktaz I, Doostmohammadi M, et al. Microbial cell surface display; its medical and environmental applications. *Iran J Biotechnol*, 2012, 10(4): 231–239.
- [68] Liu WS. Surface display of lipases in *Saccharomyces cerevisia*[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2010 (in Chinese). 刘文山. 脂肪酶在酿酒酵母中的表面展示研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.
- [69] Cui SB, Lu ZY, Liu DC, et al. Interfacial polymerization and its applications. *Chem Ind Eng Prog*, 2006, 25(1): 47–50 (in Chinese). 崔绍波, 卢忠远, 刘德春, 等. 界面聚合技术及其应用研究进展. *化工进展*, 2006, 25(1): 47–50.
- [70] Cho JS, Kwon A, Cho CG. Microencapsulation of octadecane as a phase-change material by interfacial polymerization in an emulsion system. *Colloid Polym Sci*, 2002, 280(3): 260–266.
- [71] Alexandridou S, Kiparissides C, Mange F, et al. Surface characterization of oil-containing polyterephthalamide microcapsules prepared by interfacial polymerization. *J Microencapsul*, 2001, 18(6): 767–781.
- [72] Qu YN, Huang RL, Qi W, et al. Interfacial polymerization of dopamine in a pickering emulsion: synthesis of cross-linkable colloidosomes and enzyme

- immobilization at oil/water interfaces. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(27): 14954–14964.
- [73] Su F, Li GL, Fan YL, et al. Enhanced performance of lipase via microcapsulation and its application in biodiesel preparation. Sci Rep, 2016, 6: 29670.
- [74] Cirillo G, Nicoletta FP, Curcio M, et al. Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand. React Funct Polym, 2014, 83: 62–69.
- [75] Khan AA, Alzohairy MA. Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. Res J Biol Sci, 2012, 5(8): 565–575.
- [76] Ansari SA, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. Biotechnol Adv, 2012, 30(3): 512–523.
- [77] Shi JG, Li YW, Zhang XE. Research advances and development of biosensors in China. Shandong Sci, 2015, 28(1): 28–35 (in Chinese).
- 史建国, 李一苇, 张先恩. 我国生物传感器研究现状及发展方向. 山东科学, 2015, 28(1): 28–35.
- [78] Hara P, Hanefeld U, Kanerva LT. Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. J Mol Catal B Enzym, 2008, 50(2/4): 80–86.
- [79] Pang SL. Immobilization of laccase onto mesoporous MOFs composite and the application of immobilized laccase[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016 (in Chinese).
- 庞仕龙. 介孔金属有机骨架复合材料固定化漆酶及应用[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.

(本文责编 郝丽芳)