

交联酶聚集体的生物催化

赵贵兴^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:对一种崭新的无载体酶固定化技术——聚集体(Cross-linked Enzyme Aggregates, CLEAs)技术进行了文献综述。CLEAs 技术是一种将蛋白质先沉淀后交联形成不溶性的、稳定的固定化酶。交联酶聚集体技术现已用于大量的合成反应。在沉淀和交联所需但具有潜在致变性化学品缺失的情况下, 融合蛋白会将目的酶的相对选择性聚集体或其自组系统转为不溶性微粒, 因而具有强劲的发展动力。在选定的生物转化中, 用于多轮间歇式反应不溶蛋白颗粒的回收已经得到论证。然而, 对于全连续生物催化过程应用来说, 低耐机械应力和高压缩性依然是无载体酶颗粒所需要考虑的问题。

关键词:生物催化; 无载体; 固定化; 交联酶聚集体; 下拉域; 自组系统

中图分类号:Q814

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)01-0120-05

酶作为一类重要的生物催化剂, 具有催化效率高、专一性强、反应条件温和和无污染等特点, 被广泛应用于制药、环保、食品和酿造等领域^[1]。固定化酶(immobilized enzyme)又称固相酶, 是将酶固定于水不溶性载体, 即将酶锁闭于一定空间内, 使其不溶于水溶液。固定化酶是 21 世纪发展起来的一项新技术, 1916 年 Nelson 和 Griffin 最先发现了酶的固定化现象后, 科学家们就开始了固定化酶的研究工作。固定化酶的制备方法主要有 3 种: 载体结合法、包埋法和交联法。目前应用得比较多的是载体结合法与交联法^[2]。随着生物技术产业化的迅猛发展, 酶的研究和应用日益广泛。酶应用领域存在的一个主要问题是: 缺少在广泛的 pH 和温度范围内保持稳定, 对有机溶剂具有高度耐受性的固定化酶; 且固定化使用的试剂和载体成本高昂、固定效率偏低, 真正投入工业化应用的固定化酶不多。溶性酶制剂对于工业生物转化是一种有用的催化剂。与可溶性酶相比, 不溶性酶更易于分离和循环利用, 且有利于连续过程的开发, 因此往往是规模化生产操作过程的首选催化剂。原本可溶性的酶通常将其附着在不溶性载体的表面, 使其成为不可溶性酶, 这个过程称为固定化。由于不同的可用载体和各种固定化策略, 因此固定化方法在一般程序的基础上衍发了许多其它方法。将酶包埋在有机凝胶或无机

凝胶中, 成为对载体介导固定化酶的一种特殊模式。关于载体约束不溶性酶, 一个经常被提及的问题是, 与基本制剂相比, 其特异活性降低, 但在可操作条件下可以提高其寿命和稳定性。尽管最近有一些相关方面的显著成果, 但现在依然不清楚固定化酶活性和稳定性增加或减少的分子依据。可惜的是, 为优化催化性能而对酶固定化进行设计时, 在很大程度依然依靠经验^[3-5]。

固定化不溶性酶还有两个主要的缺点。大量的非催化物质(大约占生物催化剂总量的 90%)被应用于固定化酶反应器, 但是当所采用的酶特异活性很低的时候, 就可能产生很严重的问题; 此外, 所采用的载体通常比要固定的酶价格更昂贵。因此, 如果将酶沉淀制成不溶性颗粒, 并且能很好地保留可溶性酶的特异活性, 同时能有效地应对机械应力, 这样就可以获得异种生物催化剂, 而由固体载体产生的难题也可以部分消除。该文综述了无载体固定化酶方法的最新研究进展。根据酶蛋白聚合过程中生物的识别和特异性, 对所报道的方法进行区分。

1 交联酶聚集体

制备固体制剂主要通过沉淀或结晶的方法。通常与双功能试剂相连接, 如戊二醛, 以使得在应用中来稳定不溶物, 使之处于悬浮状态。交联酶晶体和聚集体已广泛地应用于生物催化。

交联酶晶体方法(CLECs)出现于 20 世纪 60 年代, 已经应用到有限几种酶上, 包括核糖核酸酶 A、枯草杆菌酶、羧肽酶、乙醇脱氢酶及一些脂肪酶。CLECs 对于由加热、有机溶剂和蛋白质水解

收稿日期: 2012-11-19

作者简介: 赵贵兴(1978-), 男, 吉林省永吉县人, 在读博士, 副研究员, 从事大豆加工及品质分析研究。E-mail: zhaoguxing@163.com。

引起的变性,通常表现出良好的抗性。在某些情况下,可以通过改变结晶和交联的条件,来调节结晶大小和剩余特异活性。通过鼻疽菌脂肪酶已经表明,以表面活性剂或 β -环糊精为 CLECs 涂层,可以进一步提高酶使用寿命和操作稳定性。当前 CLEC 技术使用范围主要受到(纯)酶成功结晶需求的限制^[6-7]。

不溶性催化剂也可以在溶液中直接交联进行制备(CLEs)。但是由此产生的酶制剂很难处理,并且具有机械不稳定性。沉淀要求许多工艺参数的微妙平衡(蛋白质和交联剂浓度、pH、温度、离子强度、混合的时间、混合程度等),因此通常是不可再现的。

认识到 CLECs 和 CLEs 的局限性后,提出交联酶聚集体技术,并对其进行商业化。原本的缩写 CLEA,现在也已登记为商标名称。CLEAs 最初用于青霉素 G 酰化酶,随后应用于大量其它酶(如脂肪酶、蛋白酶、酰胺酶、酯酶、植酸酶和氧氟酶)。制备 CLEAs 的一般程序涉及酶(微)聚集体或多酶结合体的盐诱导或溶剂诱导,然后通过化学交联得到稳定的全蛋白沉淀。例如,硫酸铵、叔丁基酒精或聚乙二醇有助于引起青霉素 G 酰化酶的聚集。同样根据所采用的特定酶要求,交联试剂也会有所不同,但最常用的还是戊二醛。CLEAs 很适合于有机溶剂中的生物催化。两种或更多的酶原则上可以共同聚合,形成所谓的 CLEAs 化合物。含有果胶酶、木聚糖酶和纤维素酶活性的 CLEAs 化合物制剂便是一个显著的成功例子。CLEAs 化合物可能会成为所需的多用途催化剂,也可能会有助于实现多步生物催化转化。

虽然 CLEAs 可以不必将所需酶进行结晶,但仍然有其本身的不足,即对于每种酶,必须精确建立酶和交联剂之间的联系。这也就意味着必须作出很大的努力来用于条件优化。此外,在大多数情况下,一些粗蛋白需要在沉淀之前对其进行纯化^[8-9]。

2 聚集和交联的条件

在 CLEAs 制备过程中,通过高通量实验有利于不同的相互作用工艺参数(沉淀剂及其浓度和交联剂等)的优化。最大程度保持可溶性酶的特异活性是所需考虑的最主要问题。但是,像结构特性、孔隙率和抗机械应力也同等重要。沉淀剂的最适选择通常要以实验为依据,但也可以利用蛋白质纯化中长期积累的经验,一些研究强调了 CLEAs 制备过程中沉淀剂的重要性。

虽然高活性小分子戊二醛被广泛应用于蛋白质交联,但它通常也会造成酶活性的严重损失。在使用高浓度戊二醛的时候,这种现象尤其突出。其原因为必需功能基团的化学修饰或者由其衍生诱导的一般变性,因此在交联过程中通过添加底物或配体可以提供有益的保护。商业化聚合体聚醛由葡聚糖氧化得到,长度约 100~200 kDa,可以用其来替代戊二醛。由青霉素 G 酰化酶表明,由于存在尺寸排阻,所以与戊二醛相比,右旋糖酐聚醛对酶的渗透受到限制,酶的活力保持也可能随之显著改善。一些酶在 CLEA 的过程中会因戊二醛的使用而失活,但却可以通过右旋糖酐聚醛进行成功交联,如乙醇脱氢酶、部分腈水解酶和腈水合酶等。

在交联过程中,添加牛血清白蛋白(BSA)或聚乙炔亚胺有 2 个作用,一是稳定酶活性;二是提供与戊二醛反应的氨基。有牛血清白蛋白存在的条件下,用交联的方法制备某脂肪酶、青霉素 G 酰化酶及漆酶的 CLEA 制剂,其特异活性和抗高温及化学变性等性能有显著提高。氨基戊二酰化酶的表面缺乏氨基,这不利于应用“常规”方法来制备 CLEAs。使用聚乙烯来提供额外的交联的位点,可以得到这种酶的稳定 CLEAs^[10-11]。

至少对于部分 CLEAs 来说,其分子大小依然起重要作用,而由此产生的结构特性与过程优化密切相关。说明,藁香念珠菌脂肪酶颗粒 CLEAs 的最适活性,颗粒直径约为 40~50 LM。CLEA 的大小控制很困难,因为所有工艺参数本质上的(可能)影响都必须加以考虑。用 CO₂ 膨胀逆转胶束来制备树突状胰蛋白酶 CLEAs 制剂成为当前令人感兴趣的进展,CO₂ 膨胀逆转胶束可以由二(2-乙基己基)磺酸钠和异辛烷进行制备得到。在提高 CO₂ 压力条件下,逆转胶束中的胰蛋白酶沉淀可以随后与戊二醛进行交联。由此产生的 CLEAs 大小在 7~38 nm,并可通过调节水/表面活性剂比率和酶浓度来调整其大小。在某些例子中,树突状 CLEAs 特异活性超过了常规制备 CLEAs。

3 操作稳定性

已发表的有关 CLEAs 的文章主要关注于生物催化在有机合成方面的应用,而 CLEAs 在其(连续)过程中的详细生物工程分析则比较欠缺。一些作者们已经认识到 CLEAs 对机械应力抵抗力弱的问题,例如采用搅拌。青霉素 G 酰化酶 CLEAs 被包埋在由聚氯乙烯制备的聚合物基体内,也就是所谓的 LentiKats。由此得到的酶制

剂在摇动的条件下,在缓冲里相当稳定(50 d),并且在双氧水(70%的 V/V)中抵抗细菌滋生达数百个小时。包埋可导致酶活降低到自由 CLEAs 的 60%。另一种稳定 CLEA 以抵抗机械应力的方法是将其包埋到分层有序介孔硅胶中。在严格的摇动条件下 α -糜蛋白酶和脂肪酶的稳定性提高了十倍以上。

总之,CLEAs 已经在生物催化领域被广泛认知,并证明了其在小规模有机合成制备方面的作用。如果进行适当的优化,这种技术将具有广阔的应用范围,而且原则上可适用于任何酶。然而还有一点目前尚不清楚,那就是在工业规模的生物转化中,常规方法准备的 CLEAs 是否足以与载体约束不溶性酶制剂进行竞争,例如 β -内酰胺类抗生素的工业转化。但 CLEAs 很适合现有的包埋技术,这可以使其对于操作压力因素有更好的抵抗性能。至于将 CLEAs 应用在连续操作过程的固定床或流化床,这一点还需要在以后进一步论证。某具有热稳定性的 C-内酰胺酶 CLEAs 最近被应用于由毛细管柱微构建的流动微反应器。这个高度微型化的反应体系可应用于底物筛选和酶动力学描述,并且 CLEA 微反应器在连续过程条件下呈现出良好的稳定性。微流化反应器所包含的固定化酶也许以 CLEAs 形式存在,该反应器很可能成为有助于生物催化过程开发的一般工具^[12]。

4 选择性下拉域

CLEA 生产的一个显著改善是聚合过程的分子设计,能够体现其生物识别和特异性的原理。这样不仅不必优化酶的沉淀条件,也使得在不溶性蛋白形成过程中,酶活保持和最终颗粒大小更加易于控制。

有些酶在生产重组蛋白的条件下易于聚集(以包涵体形式),一个广泛应用的方法是将其融合到一种高可溶性蛋白,以提高目的蛋白的溶解度。如麦芽糖结合蛋白,作者建议采用反向途径来生产酶聚集体。从概念上讲,嵌合蛋白是将目的酶融合到一种低溶解性蛋白,如纤维素结合的噬纤维杆菌(CcCBM)。蛋白质在异源宿主(如大肠杆菌)中进行表达,往往会通过 CcCBM 分子间的自我聚集来诱导折叠的嵌合蛋白进行选择性地下拉。当然,至于包涵体中的酶具有催化活性的观点,并不是首次提出。关于包涵体蛋白质沉积动力学的重大研究表明,在这种聚集体蛋白中生物功能依然保持的这一现象实际上是相当普遍的。

下拉域的首例应用是采用来源于三角酵母属

变种(TvDAO)的二聚体黄素酶 D-氨基酸氧化酶。CcCBM 结合到酶的 N 端后,在大肠杆菌 BL 21(DE3)中合成的 TvDAO 几乎完全转变为胞内蛋白颗粒。在相同条件下生产重组蛋白时,酶缺陷型 CcCBM 几乎完全溶解可溶性,这表明下拉域有效地完成了所预期的溶解度开关功能。CcCBM-TvDAO 显示出可溶性纯氧化酶的约 40% 特异活性。氧化酶聚集体的高水平活性之所以显著的原因主要有 2 个,首先,尽管 TvDAO 结构很复杂,但 CcCBM 对其折叠和功能影响很小;其次,聚集体的整体催化活性并没有因传质效应而受到严重损害,或者换句话说,这种不溶性酶更容易接近其底物 D-氨基酸和 O_2 。利用 SDS-PAGE 分析表明,分离出的 CcCBM-TvDAO 制剂主要含目的蛋白。在鼓泡生物反应器中进行 D-甲硫氨酸转化时,CcCBM-TvDAO 显示对微晶纤维素的弱亲和力,而且实际上比可溶性氧化酶更加稳定。将 CcCBM-TvDAO 包埋会提高其额外稳定性^[13]。

Nahalka 和他的同事已经论证了 CcCBM 多功能下拉域的范围。最近他们制得一些具有催化活性的聚合体,包括麦芽糊精磷酸化酶(焦酚火球菌)、唾液酸醛缩酶(SAA;大肠杆菌 K-12)和聚激酶(PPK;Silicibacter pomeroyi),并且很好地保持了各自可溶性酶的特异活性(C83%)。CcCBM-SAA 颗粒可以进一步包埋到与戊二醛交联稳固的海藻酸钠水凝胶中。不溶性 SAA 催化剂仍然具有部分活性(51%),而且在合成神经氨酸的重复分批生产(20 轮转化)中显示出很高的操作稳定性和良好的回收率。它可以冷冻干燥,并且重新水合后几乎可以保持全部活性。在这个例子中,其与 CcCBM-PPK 的共同作用还显示了目的酶可选择性下拉域的另一个重要优势,通过对不溶性蛋白组分的简单清洗,就可以有效消除大肠杆菌背景对磷酸酶活性的污染。在一个最近与生物催化无关的研究中,CcCBM 被应用于制备不同凝集素的功能聚集体。一种酶标平板检测法最近正发展起来,在这种方法中不溶性凝集素以高通量形式应用于糖蛋白识别。在检测条件下,2 种结合唾液酸的凝集素之间的 CcCBM 融合表现呈“粘合”(沉淀)唾液酸化蛋白,这将使得在凝集素多价结合发生时,会有积极的响应读出。

总之,作为下拉域融合到 CcCBM 似乎是用来生产不溶性、高活性各种酶聚集体的一种通用方法。将 CcCBM 酶非共价吸附于纤维素上有利于从液体中进行分离。然而,可能需要更多的加工步骤(包埋、交联)来最终获得运作稳健的生物

催化剂。由于在域的控制下,聚集体不可能提高酶的内在稳定性。如果极端的工艺条件(如高温或高盐等)不会引起不必要的降解,应用(热)稳定催化剂具有明确的潜在可能性^[14]。

5 自组系统

自组系统以脂类和非天然聚合物而被熟知,对于越来越多的蛋白质来说,自组成不溶性有序结构成为其特点。在嵌合蛋白中,将目的酶融合到具有自组能力的模块中,这样可能得到的酶便于界定,或许是类结晶交联状态。自组系统性能的开发会实现对酶颗粒大小和形状相对精确的控制。虽然其它蛋白或肽链(从目的酶上分离得到)也作为所需要的产物,但在这里不作考虑。

6 融合到细胞表层蛋白

细胞表层(S-层)是古细菌和细菌细胞膜结构中常见的“蛋白隔膜”。它们有类格子外观,是通过自组过程形成的。在悬浮液和不同界面上,分离得到的天然 S-层蛋白单位能够再结晶成为精确的单层形式。S-层蛋白的这些属性极大地促进了(纳米)生物技术应用的范围。虽然融合到 S-层蛋白被应用于蛋白质序列开发及其它分析目的,但也有一些例子显示 S-层技术可应用于酶固定化和生物催化剂的开发。然而,各种 S-层融合有一个需要注意的共同特点,即嵌合蛋白各组份原有功能的保持,也就是指自组系统性能和各自生物活性。

将嗜热多糖酶(LamA,焦球菌)融合到芽孢杆菌 S-层蛋白 SbpA,在大肠杆菌中制成不溶性聚集体,可惜的是没有进行特征化。然而,经过化学展开溶解和复性,SbpA-LamA 融合已成功地固定在不同载体上。脂质体具有酶和 S-层蛋白自组融合的特征,成为一种获得潜在有用生物催化剂的可行性方法。脂质体大小易于调节,这使得固定化酶制剂的设计具有灵活性。将 1-磷酸-葡萄糖胸苷酸转移酶融合到了嗜热脂肪的芽孢杆菌 S-层蛋白 SgsE 的 C 端,Schaffer 等也证明了不溶性脂质体载体催化剂回收的可能性。

需要注意的是,在大肠杆菌或其它宿主(酿酒酵母或 HeLa 细胞)中生产 S-层融合蛋白时,通常会产生由胞内自组系统或聚集引起的不溶性产物。这些“包涵体”可能会有助于制备无载体不溶性酶。

7 融合到其它骨架蛋白

形成高分子量组件的蛋白质,已用来显示不溶性超分子结构表面的催化模块。相关例子有白

杨(欧洲山杨)的长 145.8 kDa 的应激蛋白 SP1,SP1 构成环状同十二基,对极端条件具有高耐性,如低和高 pH、高温、有机溶剂和各种蛋白酶。将 SP1 融合到黑曲霉葡萄糖氧化酶(Gox),在大肠杆菌中产生不溶性聚集体结构,因此与天然氧化酶相比,沉淀酶在本质上极大地改善了其稳定性。葡萄糖氧化酶-SP1 的非催化物质仅占总颗粒的 10%(重量/重量)。将葡萄糖氧化酶-SP1 组装成纳米管结构,每管含有数百个酶分子。

在另一正在初步准备的例子中,南极假丝酵母脂肪酶 B 的蛋白颗粒设计是将其连接到马铃薯病毒衣壳蛋白上。通过在烟草中进行融合蛋白与原衣壳蛋白的共同表达来获得不溶性病毒蛋白,其显示出以对硝基苯酚己酸为底物的酯酶催化活性^[15]。

8 融合到弹性蛋白样多肽

不同长度的弹性蛋白样多肽(ELPs)含有五肽重复序列 Val-Pro-Gly-Xxx-Gly,其 Xxx 可以是任何氨基酸,弹性蛋白样多肽超过转变温度加热会发生可逆沉淀。许多 ELP 融合开发目的是通过从宿主细胞粗提取物中选择性沉淀,以利于重组蛋白的下游处理。该技术在生物催化方面有良好前景,但尚未在该领域广泛应用。设想的一般过程是首先形成 ELP-酶聚集体,然后通过交联进行稳定。弹性蛋白样多肽的交联方法在文献中已有提及。

9 融合到蛋白质结合聚羟基脂肪酸酯颗粒

聚羟基脂肪酸酯(PHAs)是天然聚酯纤维,存在于各种以其为能量储存的细菌中。大量生物塑料材料可以由 PHA 制备。PHAs 值得关注和开发的一个特点是生物合成酶(PHA 合成酶)依然会与聚酯颗粒保持共价结合。PHA 合成酶可以在许多宿主生物体中进行表达。因此,含有活性 PHA 合成酶的融合蛋白会在重组生产过程中产生 PHA,并同时将其自身附着在聚酯颗粒上。使用 B-半乳糖苷酶-PHA 合成酶融合蛋白可以说明此概念(用于生物催化)。 β -半乳糖苷酶与聚酯颗粒间三明治式结合也已得到说明,其显示了 PHA 与抗 β -半乳糖苷酶 scFv(抗体的单链可变区)之间的融合。虽然也可能有助于分析,但就目的酶连接到 PHAs 所用的简单步骤而言,似乎更适应于生物催化。

通过与种子凝集素融合可能是替代 PHAs 固定化酶的一种方法。种子凝集素是小分子(14-

30 kDa) 双性蛋白,是与 PHA-颗粒相关蛋白质组的主要成分。编码与种子凝集素融合和 PHA 生物合成酶相关基因的共同表达,会使得固定于 PHA 颗粒上的所需酶具有活性。

10 (自动)仿生硅胶包埋

硅藻筒藻中的亲硅酸多肽可以诱导二氧化硅从单硅酸溶液中沉淀。亲硅酸多肽的重复单位 R5 肽 ($\text{H}_2\text{N-SSKKSGSYSGSKGSKRRIL-COOH}$),可用以固定丁酰胆碱酯酶。高活性和稳定性的生物硅球也已经可以制备得到。在室温和温和化学反应条件下,向含有酶和硅酸的溶液中添加 R5 多肽,可以提高其生物亲硅酸性。最近通过使用 R5 融合,可以在大肠杆菌中将磷酸二酯酶和有机磷水解肽制成固定化酶制剂。每种融合蛋白都由硅缩聚开始,且酶的活性(69%~97%)均保留在由此产生的硅微球体中。添加络合多肽(His)₆-tag 的金属离子会使得硅化不溶晶体可以从粗细胞提取物中直接回收,D-氨基酸氧化酶也同样适用。

参考文献:

- [1] 胥成浩,农向.纤维素酶固定化的最新研究进展[J].吉林农业,2011,249(11):46.
- [2] 谭碧君.固定化酶制备及应用的研究进展[J].上海畜牧兽医通讯,2011(1):12-15.
- [3] Aytar B S,Bakir U. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates[J]. Process Biochem,2008,43:125-131.
- [4] Betancor L,Luckarift H R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis [J]. Trends Biotechnol, 2008, 26: 566-572.
- [5] Cabiroi F L,Tan P L,Tay B, et al. Linum usitatissimum hydroxynitrile lyase crosslinked enzyme aggregates;a recyclable enantioselective catalyst[J]. Adv Synth Catal,2008, 350:2329-2338.
- [6] Fujita Y,Mie M,Kobatake E. Construction of nanoscale protein particle using temperature-sensitive elastin-like peptide and polyaspartic acid chain[J]. Biomaterials,2009,30: 3450-3457.
- [7] Hanefeld U,Gardossi L,Magner E. Understanding enzyme immobilization[J]. Chem Soc Rev,2009,38:453-468.
- [8] Hickey A M,Ngamsom B,Wiles C, et al. A microreactor for the study of biotransformations by a cross-linked c-lactamase enzyme[J]. Biotechnology J.,2009,4:510-516.
- [9] Kim MI,Kim J,Lee J, et al. Cross-linked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica;a simple and effective method for enzyme stabilization[J]. Biotechnol Bioeng,2007,96:210-218.
- [10] Poulsen N,Berne C,Spain J, et al. Silica immobilization of an enzyme through genetic engineering of the diatom *Thalassiosira pseudonana* [J]. Angew Chem, 2007, 119: 1875-1878.
- [11] Rajan A,Abraham T E. Studies on crystallization and cross-linking of lipase for biocatalysis[J]. Bioprocess Biosyst Eng,2008,31:87-94.
- [12] Rajendhran J,Gunasekaran P. Application of crosslinked enzyme aggregates of *Bacillus badius* penicillin G acylase for the production of 6-aminopenicillanic acid[J]. Lett Appl Microbiol,2007,44:43-49.
- [13] Schoevaart R,Wolbers M W,Golubovic M, et al. Preparation,Optimization and structures of Cross-linked Aggregates (CLEAs)[J]. Biotechnol Lett,2010,32:341-349.
- [14] Schwarz A,Thomsen M S,Nidetzky B. Enzymatic synthesis of b-glucosylglycerol using a continuous-flow microreactor containing thermostable b-glycoside hydrolase CelB immobilized on coated microchannel walls[J]. Biotechnol Bioeng,2009,103:865-872.
- [15] Zhao L,Zheng L,Gao G, et al. Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via cross-linked aggregates of *Pseudomonas* sp. lipase[J]. J Mol Catal B,2008,54:7-12.

Cross-Linked Enzyme Aggregates by Biological Catalysis

ZHAO Gui-xing^{1,2}

(1. Harbin University of Commerce, Harbin, Heilongjiang 150076; 2. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Firstly, a new carrier-free immobilized enzyme technology-aggregates (Cross-linked Enzyme Aggregates, CLEAs) technology has been reviewed. CLEAs technology is a kind of protein deposited before cross-linking to form insoluble, stability of the immobilized enzyme. Cross-linked enzyme aggregates technology is now used in a large number of synthesis reaction. In the precipitation and cross-linking required but has potential mutagenicity of chemicals is absent, fusion protein will turn objective enzyme relatively selective aggregates or even its self-organizing systems into insoluble particles, which has a strong development momentum. In selected biotransformation, for many rounds of intermittent type reaction insoluble protein particles recycling has been demonstrated by. However, for the continuous biocatalytic process applications, low resistance to mechanical stress and high compressibility are still the question that carrier-free enzyme particles need to consider.

Key words: biological catalysis; carrier-free; immobilization; cross-linked enzyme aggregates; drop domain; self-organized system