



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111471663 A

(43)申请公布日 2020.07.31

(21)申请号 202010306167.6

(22)申请日 2020.04.17

(71)申请人 湖南理工学院

地址 414000 湖南省岳阳市岳阳楼区奇家岭街道439号

(72)发明人 唐课文 张盼良 许卫凤 戴桂林

(51) Int. Cl.

C12N 9/18(2006.01)

C12N 11/02(2006.01)

C12N 11/14(2006.01)

C12P 7/42(2006.01)

C12P 41/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种金属有机框架材料固定化荧光假单胞菌脂肪酶的方法

(57)摘要

本专利介绍了一种荧光假单胞菌脂肪酶的固定化方法,尤其涉及用于手性药物拆分的脂肪酶的固定化方法。该方法中利用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的磷酸缓冲溶液活化Uio-66(Zr)MOF,然后再加入N-羟基琥珀酸亚胺,之后将荧光假单胞菌脂肪酶的磷酸缓冲液加入到上述混合液中进行共价交联,得到最终产品。根据本发明的固定化酶方法,利用金属有机框架材料固定化脂肪酶能够维持自由酶的活性和对映体选择性,同时使脂肪酶具有稳定性和重复使用性。利用该固定化酶催化拆分2-(4-羟基苯基)丙酸乙酯对映体和4-甲氧基扁桃酸对映体,制备了(R)-(-)-2-(4-羟基苯基)丙酸和(R)-4-甲氧基扁桃酸,并且展现了高的催化活性和对映体选择性,本专利为其在工业应用上提供广泛前景。

1. 一种应用于手性对映体拆分的脂肪酶的固定化方法,其特征在于所述的方法是通过共价交联剂把脂肪酶以共价键的形式连接在金属有机框架材料(MOFs)上,再将该固定化酶作为手性对映体拆分反应的催化剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,包含下述操作步骤:

选择合适浓度的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,活化一定量的Uio-66(Zr) MOF,再向反应管中加入一定浓度的N-羧基琥珀酸亚胺的溶液,最后加入一定浓度的脂肪酶溶液进行交联反应,在一定的温度下搅拌反应一定时间,反应结束后,过滤并冷冻干燥得到固定化酶。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的浓度范围为2-30 mg/mL。

4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述N-羧基琥珀酸亚胺的浓度范围为2-30 mg/mL。

5. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,脂肪酶的浓度为5-30 mg/mL。

6. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,反应温度为5°C-40°C。

7. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,交联时间为2-24 h。

一种金属有机框架材料固定化荧光假单胞菌脂肪酶的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,具体地涉及一种金属有机框架材料固定化脂肪酶的方法,特别涉及一种应用于手性对映体拆分的脂肪酶的固定化方法。

背景技术

[0002] 酶制剂作为生物工程研究的硕果之一,广泛应用于手性药物合成以及化妆品,洗涤剂,食品,香料的生产。近年来,随着手性药物市场的不断扩张以及单一手性对映体的需求急剧增加,越来越多的分离方法得到开发。其中,酶拆分法可直接将化学合成的外消旋体转化为单一对映体,并且具有条件温和,选择性高,副反应少,杂质成分少,产率高,反应操作简单等优点,并且污染少,很大程度降低了化工生产对环境造成的影响,符合绿色化学理念,具有很好的发展前景。

[0003] 脂肪酶(E.C.3.1.1.3)是丝氨酸水解酶家族中普遍存在的酶,易溶于水。酶制剂一般是以酶粉形式加入到酶催化拆分反应中,这种外源酶一旦加入就难以分离并再利用,由于酶制剂价格一般比较高,单次利用导致成本较高。另外,在水相反应体系中脂肪酶的催化活性不高,在有机体系中其容易发生团聚从而影响催化活性。酶制剂的这些不利因素导致了其应用受到一定影响。

[0004] 将脂肪酶固定化是改善上述酶制剂问题,提高催化效率的有效手段之一。固定化酶在保持其高效专一及温和的酶催化反应特性的同时,克服了游离酶的上述不足之处,呈现贮存稳定性高、分离回收容易、可多次重复使用、操作连续可控、工艺简便等一系列优点,因此酶的固定化受到研究者日益重视。

[0005] 金属有机框架材料(MOFs)是近年来新兴的材料之一,被广泛应用于气体储存、药物传递、催化、生物传感器和吸附等领域。由于其具有较高的比表面积和孔体积,易于调整孔大小,扩散极限小,易于修饰金属节点和配体等优点,MOFs满足固定化的基本要求,是一种潜在的酶固定化载体。

[0006] 本发明利用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐活化Uio-66(Zr) MOF表面的羧基,再通过共价固定的方式使得荧光假单胞菌脂肪酶上的氨基与羧基形成酰胺键,从而将脂肪酶固定在MOFs上。该固定化酶能够维持自由酶的活性和对映体选择性,同时使脂肪酶具有优异地稳定性和重复使用性。将固定化酶应用于2-(4-羟基苯基)丙酸乙酯对映体和4-甲氧基扁桃酸对映体的催化拆分反应,展现了高的催化活性和对映体选择性,成功地制备了(R)-(-)-2-(4-羟基苯基)丙酸和(R)-4-甲氧基扁桃酸。该技术所获得的固定化酶具有高活性、高稳定性等优点,在手性药物拆分领域具有工业化应用前景。

发明内容

[0007] 本发明提出了一种将脂肪酶固定在MOFs上并且应用于催化拆分手性对映体的方法。该方法操作简单,重复性好,可以大大提高固定化酶的稳定性和重复性,从而降低手性药物产业的生产成本。

[0008] 本发明的技术方案:本发明首先(1) $ZrCl_4$ 和对苯二甲酸溶解在DMF中,置于高压反应釜中加热反应,合成Uio-66(Zr);(2)将一定量的Uio-66(Zr)置于反应管中,再加入一定浓度的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,在一定温度下搅拌活化一定时间,初步得到活化的Uio-66(Zr);(2)再加入一定浓度含N-羟基琥珀酸亚胺的磷酸缓冲溶液,在上述温度下反应一定时间;(3)最后将一定浓度和一定体积的荧光假单胞菌脂肪酶溶液加入到上述含活化Uio-66(Zr)的混合液中,在一定温度下,交联一定时间后,离心分离,用去离子水洗涤,再进行冷冻干燥,得到固定化酶。

[0009] 所述步骤(1)中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的浓度为2-20 mg/mL。温度范围为10-40°C,活化Uio-66(Zr)的时间为0.5-3.0 h。

[0010] 所述步骤(2)中N-羟基琥珀酸亚胺的浓度为2-20 mg/mL,温度范围为10-40°C,活化Uio-66(Zr)的时间为0.5-3.0 h。

[0011] 所述步骤(3)中荧光假单胞菌脂肪酶的浓度为5-40 mg/mL,温度范围为5-40°C,活化Uio-66(Zr)的时间为1-10 h。

[0012] 本发明相比现有技术有如下优势:

本发明利用具有高的比表面积和孔体积,易于调整孔大小,扩散极限小,含有羧基的Uio-66(Zr) MOF作为脂肪酶固定化的良好载体,通过共价固定的方式使脂肪酶上的氨基与Uio-66(Zr)上的羧基形成酰胺键,牢固地将脂肪酶固定在Uio-66(Zr)的表面上。该固定化酶能够很好地维持自由酶的催化活性和对映体选择性,并且具有良好地稳定性和重复使用性。采用该固定化酶作为催化剂,分别在水相体系中水解拆分2-(4-羟基苯基)丙酸乙酯对映体,制备高纯度和高转化率的(R)-(-)-2-(4-羟基苯基)丙酸,同时在有机溶剂体系中酯交换拆分4-甲氧基扁桃酸对映体,制备高光学纯的(R)-4-甲氧基扁桃酸。本固定化酶的方法具有实施操作简便,固定效率高,酶不易脱落,催化活性高,选择性高和重复使用次数多等优点。

[0013] 【具体实施方案】

本发明具体的方法步骤如下:

一、测试与分析

本发明所述实施例中酶固载量采用BCA蛋白质分析法进行分析,日本岛津公司生产的酶标仪进行蛋白质浓度测定。对映体过剩量度和转化率采用美国Waters 1525高效液相色谱仪分析。

[0014] 二、实施例

实施例1

将50 mg的Uio-66(Zr)置于反应管中,再加入200 μ L浓度为10 mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,在25°C温度下搅拌活化1.5 h,初步得到活化的Uio-66(Zr);再加入200 μ L浓度为12 mg/mL含N-羟基琥珀酸亚胺的磷酸缓冲溶液,在25°C下反应1.5 h;最后将3.6 mL含35 mg的荧光假单胞菌脂肪酶溶液加入到上述含活化的Uio-66(Zr)混合液中,在一定温度下,交联4-20 h后,离心分离,用去离子水洗涤,再进行冷冻干燥,得到固定化酶。

[0015] 实施例2

将50 mg的Uio-66(Zr)置于反应管中,再加入200 μ L浓度为20 mg/mL的1-(3-二甲氨基

丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,在25℃温度下搅拌活化1.5 h,初步得到活化的Uio-66 (Zr);再加入200 μL浓度为12 mg/mL含N-羟基琥珀酸亚胺的磷酸缓冲溶液,在25℃下反应1.5 h;最后将3.6 mL含35 mg的荧光假单胞菌脂肪酶溶液加入到上述含活化MOFs的混合液中,在一定温度下,交联4-20 h后,离心分离,用去离子水洗涤,再进行冷冻干燥,得到固定化酶。

[0016] 实施例3

将50 mg的Uio-66 (Zr)置于反应管中,再加入200 μL浓度为10 mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,在25℃温度下搅拌活化1.5 h,初步得到活化的Uio-66 (Zr);再加入200 μL浓度为24 mg/mL含N-羟基琥珀酸亚胺的磷酸缓冲溶液,在25℃下反应1.5 h;最后将3.6 mL含35 mg的荧光假单胞菌脂肪酶溶液加入到上述含活化MOFs的混合液中,在一定温度下,交联4-20 h后,离心分离,用去离子水洗涤,再进行冷冻干燥,得到固定化酶。

[0017] 实施例4

将固定化酶60 mg加入到含有0.04 mmol的2-(4-羟基苯基)丙酸乙酯的反应管中,再加入2 mL的磷酸缓冲液,在45℃下,反应30 h,反应结束后,分离固定化酶,得到样品,采用HPLC进行分析,得到转化率和对映体过剩量。将固定化酶60 mg加入到含有0.06 mmol 4-甲氧基扁桃酸和0.42 mmol乙酸乙烯酯的反应管中,再加入3 mL的甲基叔丁基醚,在50℃下,反应22 h,反应结束后,分离固定化酶,得到样品,采用HPLC进行分析,得到转化率和对映体过剩量。

[0018] 以上所述实例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但其技术范围不受限于以上实施方式。对于本领域的技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,可以做各种改进并实施,这些都属于本发明的保护范围。因此,发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。