



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104164414 B

(45)授权公告日 2017.06.13

(21)申请号 201410412701.6

C12N 9/02(2006.01)

(22)申请日 2014.08.21

C12N 9/16(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 靳春鹏

申请公布号 CN 104164414 A

(43)申请公布日 2014.11.26

(73)专利权人 郑州大学

地址 450000 河南省郑州市科学大道100号

(72)发明人 张亚涛 刘金盾 段林林 董冠英
申亦佳

(74)专利代理机构 郑州红元帅专利代理事务所
(普通合伙) 41117

代理人 杨妙琴

(51)Int.Cl.

C12N 9/96(2006.01)

C12N 9/36(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物及其制备方法

(57)摘要

本发明属于新材料技术领域,具体涉及一种酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物及其制备方法。先将氧化石墨烯均匀分散于磷酸缓冲液中,然后加入酶混匀得混合液,再将铜盐水溶液加入混合液中,在恒温摇床中反应后即得所述酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物;所述的铜盐为硫酸铜、醋酸铜或氯化铜。本发明酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物能提高酶活和酶的稳定性;同时制备方法柔和环保,实验过程中没有涉及任何高温和有机试剂等,且设备非常简单,作为一种新型的有机-无机材料,其可望在酶固定、电化学、材料学、生物学等多领域有较大潜力。

1. 酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物的制备方法,其特征在于,先将氧化石墨烯均匀分散于磷酸缓冲液中,然后加入酶混匀得混合液,再将铜盐水溶液加入混合液中,在恒温摇床中反应后即得所述酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物;所述的铜盐为硫酸铜、醋酸铜或氯化铜;投料质量比为:氧化石墨烯:酶:铜盐为8-12:10-20:10-20;在恒温摇床中反应的条件为:温度20-40℃,摇床转速为100-160 rpm,反应2-3天。

2. 如权利要求1所述的酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物的制备方法,其特征在于,在恒温摇床中反应的条件为:温度25℃,摇床转速为140 rpm,反应2天。

3. 如权利要求1所述的酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物的制备方法,其特征在于,所述磷酸缓冲液的浓度为0.1-0.5 mol/L, pH控制在5.5-7.5。

4. 如权利要求1所述的酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物的制备方法,其特征在于,所述铜盐为硫酸铜,氧化石墨烯:酶:铜盐为10:15:12.8。

5. 如权利要求1所述的酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物的制备方法,其特征在于,反应后分离沉淀、洗涤并冷冻干燥。

6. 如权利要求5所述的酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物的制备方法,其特征在于,在不高于-30℃的条件下干燥4-8个小时。

7. 权利要求1-6任一所述制备方法获得的酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物。

8. 如权利要求7所述的酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物,其特征在于,复合物中各物质的质量百分含量为:氧化石墨烯25-30%,酶35-45%,磷酸铜晶体 25-35%。

酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于新材料技术领域,具体涉及一种酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物及其制备方法。

背景技术

[0002] 酶是一类具有生物催化功能的生物大分子,是一种生物催化剂,其反应速度快,选择特异性强,能完成复杂的反应过程,且反应条件温和,工艺简单,污染小。因此生物酶已经在医药、工业、食品、饲料、环保、能源等多领域得到广泛应用。然而,酶作为生物催化剂,它的生物活性常常在应用过程中丧失,导致不可恢复性的酶失活,其稳定性和重复利用率也很低。酶固定能克服一定的缺陷,但可能造成酶的构象变化,从而在一定程度上导致酶活降低,且重复利用性很弱。很多酶的生产过程不易,价格昂贵,因此,增强酶活、提高酶的稳定性和重复利用率就显得格外重要。

[0003] 氧化石墨烯(graphene oxide,GO)是石墨烯的氧化物,氧化石墨烯薄片是石墨粉未经化学氧化后的产物,它的单原子层可以在横向尺寸上扩展,其结构超越了一般化学和材料科学的尺度。因此,GO被视为一种非传统型态材料,是一种性能极其优越的新型碳材料,其比表面积较高且表面具有丰富的官能团,比如羰基、羟基、羧基和酚羟基。GO因其在热学、光学、机械力学等方面优越的表现及其突出的纳米结构,21世纪以来吸引了众多研究人员参与研究。其中,氧化石墨烯复合材料备受关注,包括聚合物类复合材料和无机物类复合材料等。改性的GO及其复合材料在能量储存、传感器、有机电化学、材料科学等众多领域均具有深远意义。

[0004] 无机材料的纳米花已经在催化和分析科学中得到广泛应用,但是有机-无机材料的杂化纳米花是2012年Ge等首次发现的,这种酶-无机杂化材料可提高酶活,提高酶稳定性和重复利用性。

[0005] 从目前的文献报道可以将酶-无机杂化纳米花的研究分为以下几类:

[0006] ①机理的研究

[0007] 有机-无机材料的杂化纳米花是2012年J. Ge (Protein-inorganic hybrid nanoflowers, Nature nanotechnology, 2012, 7, 428-432)等首次发现的,研究表明大多数酶与磷酸铜晶体杂化后的复合物呈现出“花朵”状的纳米结构,其复合物中酶的活性也都有不同程度的提高,并进一步比较了不同酶与无机材料(磷酸铜晶体)杂化纳米花的结构及酶活的提高,解释了在杂化复合材料中各个成分所起到的作用。最初磷酸铜晶体形成,蛋白质骨架上的氨基和铜离子结合形成主要的成核位点,之后大量的蛋白质分子和晶体在成核位点形成,最后,非均质的生长形成花一样的结构。此外,分析比较了不同酶形成的纳米花。

[0008] ②实验条件的研究

[0009] L. B. Wang 等人 (A New Nanobiocatalytic System Based on Allosteric Effect with Dramatically Enhanced Performance, Journal of the American

Chemical Society, 2013, 135, 1272-1275) 在J.Ge的基础上详细分析了各种条件对酶-无机材料纳米花的影响,主要包括缓冲液的浓度、pH、酶的浓度、金属离子的浓度。结果发现不同的实验条件下得到不同的纳米结构:纳米花、纳米片、平行六面体,同时还证明了纳米花中除了酶活增加以外,其稳定性和重复利用率也大大提高。K. Ghosh (Temperature-dependent morphology of hybrid nanoflowers from elastin-like polypeptides, APL Materials, 2014, 2, 021101) 研究了温度对纳米花的影响,发现不同的温度对纳米花的结构有很大影响。

[0010] ③ 多酶的研究

[0011] J. Sun 等人 (Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor, Nanoscale, 2014, 6, 255-262) 研究了多酶-无机材料杂化纳米花,其实验中复合物由两种不同的酶和无机成分复合得到。

[0012] 综上所述,就酶-无机杂化纳米材料而言,目前研究还处于探索阶段,主要的研究是围绕单一的酶-无机杂化纳米花。氧化石墨烯作为新型的无机材料虽然具有很好的性能,在酶固定中也有研究,但将酶-无机杂化材料和氧化石墨烯结合起来的研究还未见报道。

发明内容

[0013] 本发明的目的是提供一种酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物及其制备方法,所述复合物在不破坏酶和氧化石墨烯结构的情况下,酶活有所提高,稳定性增强。

[0014] 本发明采用的技术方案如下:

[0015] 酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物的制备方法,先将氧化石墨烯均匀分散于磷酸缓冲液中,然后加入酶混匀得混合液,再将铜盐水溶液加入混合液中,在恒温摇床中反应后即得所述酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物;所述的铜盐为硫酸铜、醋酸铜或氯化铜。

[0016] 复合物中各物质的质量百分含量为:氧化石墨烯25-30%,酶35-45%,磷酸铜晶体25-35%。

[0017] 其中,投料质量比为:氧化石墨烯:酶:铜盐为8-12:10-20:10-20。

[0018] 优选的,所述铜盐为硫酸铜,氧化石墨烯:酶:铜盐为10:15:12.8。

[0019] 铜盐溶液的浓度无严格要求。

[0020] 所述磷酸缓冲液的浓度为0.1-0.5 mol/L, pH控制在5.5-7.5。

[0021] 在恒温摇床中反应的条件为:温度20-40℃,摇床转速为100-160 rpm,反应2-3天;优选的,在恒温摇床中反应的条件为:温度25℃,摇床转速为140 rpm,反应2天。

[0022] 反应后分离沉淀、洗涤并冷冻干燥。

[0023] 优选的,在不高于-30℃的条件下干燥4-8个小时。

[0024] 本发明中磷酸缓冲液的pH根据具体的酶而定,先将氧化石墨烯均匀分散于磷酸缓冲液中,超声分散均匀后加入酶,摇匀,再加入铜盐溶液,放入摇床中反应,之后静置12 h,离心分离,冷冻干燥。

[0025] 冷冻干燥具体可在真空冷冻干燥仪中进行。

[0026] 其中,所述复合物是在磷酸缓冲液中加入硫酸铜、氯化铜或醋酸铜溶液,生成磷酸

铜晶体,进而和酶、氧化石墨烯发生进一步反应而得到。

[0027] 本发明将酶、氧化石墨烯在二价铜离子存在的条件下生成一种新型有机-无机杂化纳米复合物,所述复合物结构规则,实现了酶活性的提高,酶稳定性的增强,同时还具有抗菌性能、吸附性能。其中的氧化石墨烯,一方面作为酶的结合物,另一方面为酶提供载体,可将氧化石墨烯的优良性质广泛应用于工业中。制备方法简单,条件温和。作为一种具有新型功能结构的有机-无机杂化纳米复合物,将生物研究和材料科学结合在一起,可望在有关酶工程应用食品加工、发酵工程、医药科学、造纸业、污水处理、生物反应器等多方面得到广泛的应用。

[0028] 本发明与现有技术相比,具有如下优点:

[0029] 本发明酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物能提高酶活和酶的稳定性;同时制备方法柔和环保,采用摇床反应的动态反应方法,相对于现有有机-无机材料的杂化纳米花制备多采用的静态反应法而言,可以得到规则的产品,有异于静态法得到的颗粒状产品。实验过程中没有涉及任何高温和有机试剂等,且设备非常简单,作为一种新型的有机-无机材料,其可望在酶固定、电化学、材料学、生物学等多领域有较大潜力。

附图说明

[0030] 图1为实施例1获得的溶菌酶/氧化石墨烯复合物的扫描电镜图;

[0031] 图2为实施例2获得的漆酶/氧化石墨烯复合物的扫描电镜图;

[0032] 图3为实施例3获得的碳酸酐酶/氧化石墨烯复合物的扫描电镜图。

具体实施方式

[0033] 以下以具体实施例来说明本发明的技术方案,但本发明的保护范围不限于此:

[0034] 实施例1

[0035] 酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物,质量组成为:氧化石墨烯(GO) 27%;溶菌酶 41%;磷酸铜晶体 32%。溶菌酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物的扫描电镜图如图1所示,由图可知,所述复合物具有非常规则的结构。

[0036] (1)复合物的制备:

[0037] 将10mg氧化石墨烯通过超声充分溶解在pH 6.0的磷酸缓冲液(0.2 mol/L)中,加入15 mg溶菌酶混匀,再加入0.667 mL 120 mM的硫酸铜溶液,在恒温摇床中反应,条件为:温度25℃,摇床转速为140 rpm,反应48 h。之后分离沉淀、洗涤并于真空冷冻干燥仪中进行冷冻干燥,冷冻温度设置在-30℃以下,干燥6小时。

[0038] (2)复合物抑菌性能研究

[0039] 实验采用大肠杆菌ATCC25922作为试剂检验复合物的抑菌性能。

[0040] 称取牛肉膏5.0 g,蛋白胨10.0 g,氯化钠5.0 g,加入1000 mL蒸馏水,充分溶解,调pH至7.2-7.4,121℃灭菌20 min,得到液体培养基。用移液枪取20 mL液体培养基于锥形瓶中,挑取1-2环活化的菌种于液体培养基中,将锥形瓶放入37℃、160 r/min的摇床中培养24 h,制备出 10^6 数量级的大肠杆菌菌液备用。配置一定浓度的药物贮存液,所有药物为粉剂,其有效力为750 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。用分析天平精确称取药物0.6826 mg。将0.6826 mg药物溶于1 mL LB稀释液中,此稀释液的药物浓度为5120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。取无菌试管5支排成一排并依次编号,

第1管中加入1.8 mL LB,其余加入1 mL LB。取药物稀释液0.2 mL加入第1管,从第1管中吸取1 mL加入第2管,依此操作至第5管,将第5管吸取1 mL弃去。此时各管的药物浓度依此是:512、256、128、64、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。再向各管中加入 10^6 数量级的大肠杆菌菌液1 mL。对照管设置两个:只含2 mL菌液;只含2 mL LB。将各管置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 rpm的摇床中培养2 h。培养后取出试管摇匀,吸取0.5 mL菌液于4.5 mL的无菌水中稀释,该试管中菌浓度为培养后浓度的 10^{-1} ,并按此稀释,得到为稀释浓度依次是 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 。取 10^{-4} 浓度的稀释液0.1 mL于平板上,涂布均匀(此步骤做两个平行)。将平板倒置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,培养12 h后观察结果,采集图像并菌落计数,计算抑菌率(BR)。抑菌率达到90%的最小浓度即是药物的最小抑菌浓度。从上述实验中得知,溶菌酶的最小抑菌浓度为1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氧化石墨烯的最小抑菌浓度为1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$,磷酸铜晶体的最小抑菌浓度为256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (此浓度下的抑菌率为95%),而复合物最小抑菌浓度为256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (此浓度下的抑菌率为98%)。可见相同质量下同时含有氧化石墨烯、磷酸铜和溶菌酶的复合物其中溶菌酶的活性有所提高,总体复合物的抑菌性也增强。

[0041] (3) 贮藏稳定性研究

[0042] 将0.03mg/mL的溶菌酶溶液和复合物溶液分别放置一周后,测其抑菌性,复合物抑菌性保留81%,游离溶菌酶抑菌性则仅保留43%。可见,溶菌酶/氧化石墨烯杂化纳米复合物中酶的稳定性显著增强。

[0043] 实施例2

[0044] 酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物,质量组成为:GO 27%;漆酶 41%;磷酸铜晶体 32%。漆酶/氧化石墨烯复合物扫描电镜图如图2所示。

[0045] (1) 复合物的制备

[0046] 将10mg氧化石墨烯通过超声充分溶解在pH 5.7的磷酸缓冲液(0.2 mol/L)中,加入15 mg漆酶混匀,再加入0.667 mL 120 mM的硫酸铜溶液,在恒温摇床中反应,条件为:温度25 $^{\circ}\text{C}$,摇床转速为140 rpm,反应48 h。之后分离沉淀、洗涤并于真空冷冻干燥仪中进行冷冻干燥,冷冻温度设置在-30 $^{\circ}\text{C}$ 以下,干燥4小时。

[0047] (2) 复合物对染料的去除

[0048] 配置一定浓度的染料溶液,将一定量的复合物加入染料溶液中反应一段时间,离心取上清液测吸光度,计算出复合物对染料的去除率。

[0049] 0.0732 mg/mL的复合物在100 min后对200 mg/L的亚甲基蓝的去除率为65.17%,0.03 mg/mL游离漆酶在100 min后对亚甲基蓝的去除率几乎为0。0.0732 mg/mL的复合物在10 min后对200 mg/L的茜素红的去除率为88.62%,0.03 mg/mL游离漆酶在10 min后对茜素红的去除率为14.36%。

[0050] (3) 贮藏稳定性研究

[0051] 将0.03mg/mL的漆酶溶液和复合物溶液分别放置一周后,测其活性。相对于游离的漆酶,复合物则保持了较高的酶活,可达60%,而游离漆酶仅为保留37%的酶活。

[0052] 实施例3

[0053] 酶/氧化石墨烯功能型杂化纳米复合物,质量组成为:GO 27%;碳酸酐酶 41%;磷酸铜晶体 32%。碳酸酐酶/氧化石墨烯复合物扫描电镜图如图3所示。

[0054] (1) 复合物的制备:

[0055] 将氧化石墨烯通过超声充分溶解在pH 7.0的磷酸缓冲液(0.2 mol/L)中,加入15 mg碳酸酐酶混匀,再加入0.667 mL 120 mM的硫酸铜溶液,在恒温摇床中反应,条件为:温度25℃,摇床转速为140 rpm,反应48 h。之后分离沉淀、洗涤并于真空冷冻干燥仪中进行冷冻干燥,冷冻温度设置在-30℃以下,干燥6小时。

[0056] (2)复合物对二氧化碳的固定

[0057] 将复合物(3 mg)溶解在30 mL 1 M氯化钙溶液中,在冰水浴条件下,持续通入二氧化碳气体30 min。离心冷冻干燥后,在复合物的表面可看到生成的碳酸钙颗粒。

[0058] 实施例4

[0059] 将硫酸铜替换为氯化铜,加入的质量为13.6mg,其他同实施例1。

[0060] 实施例5

[0061] 将硫酸铜替换为醋酸铜,加入的质量为16mg,其他同实施例1。

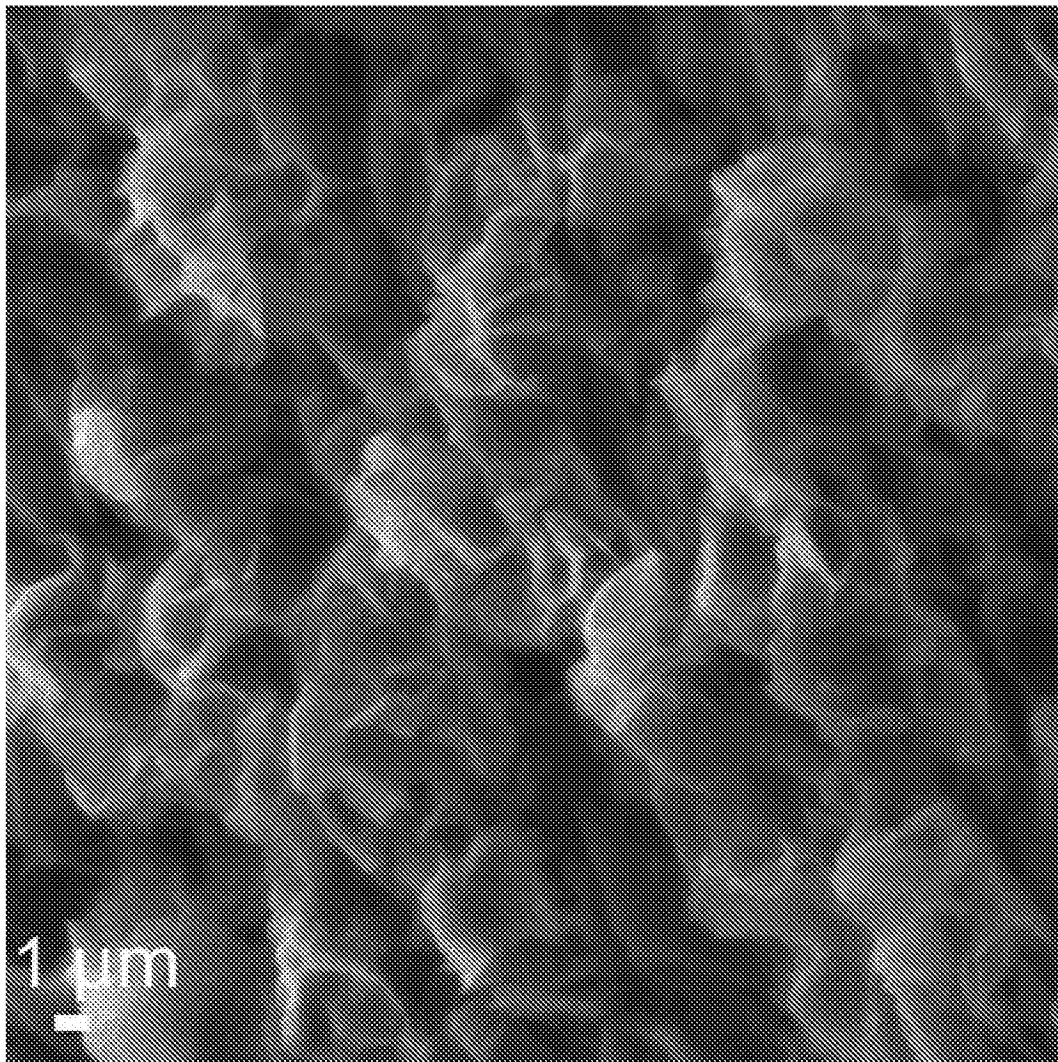


图1

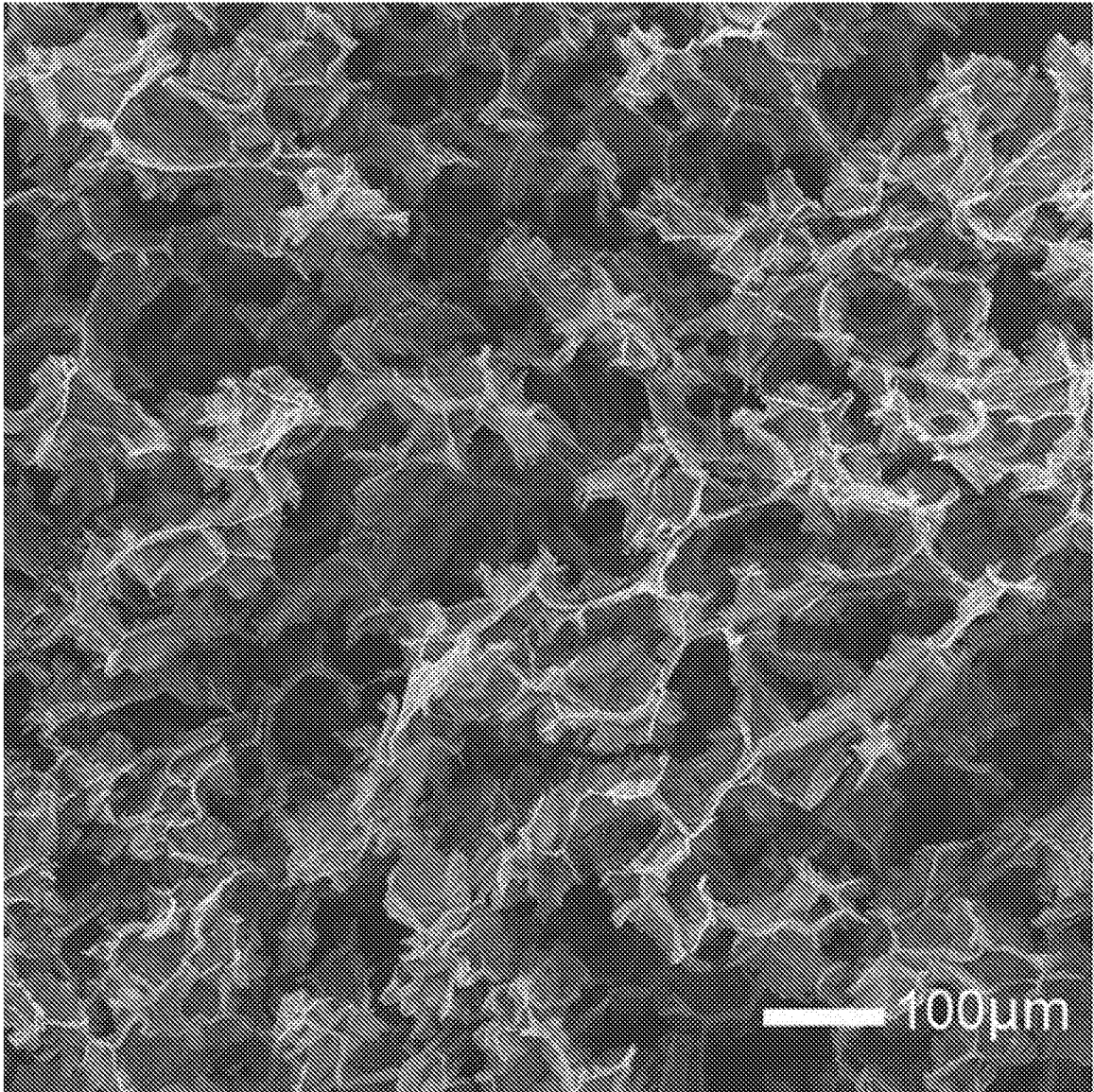


图2

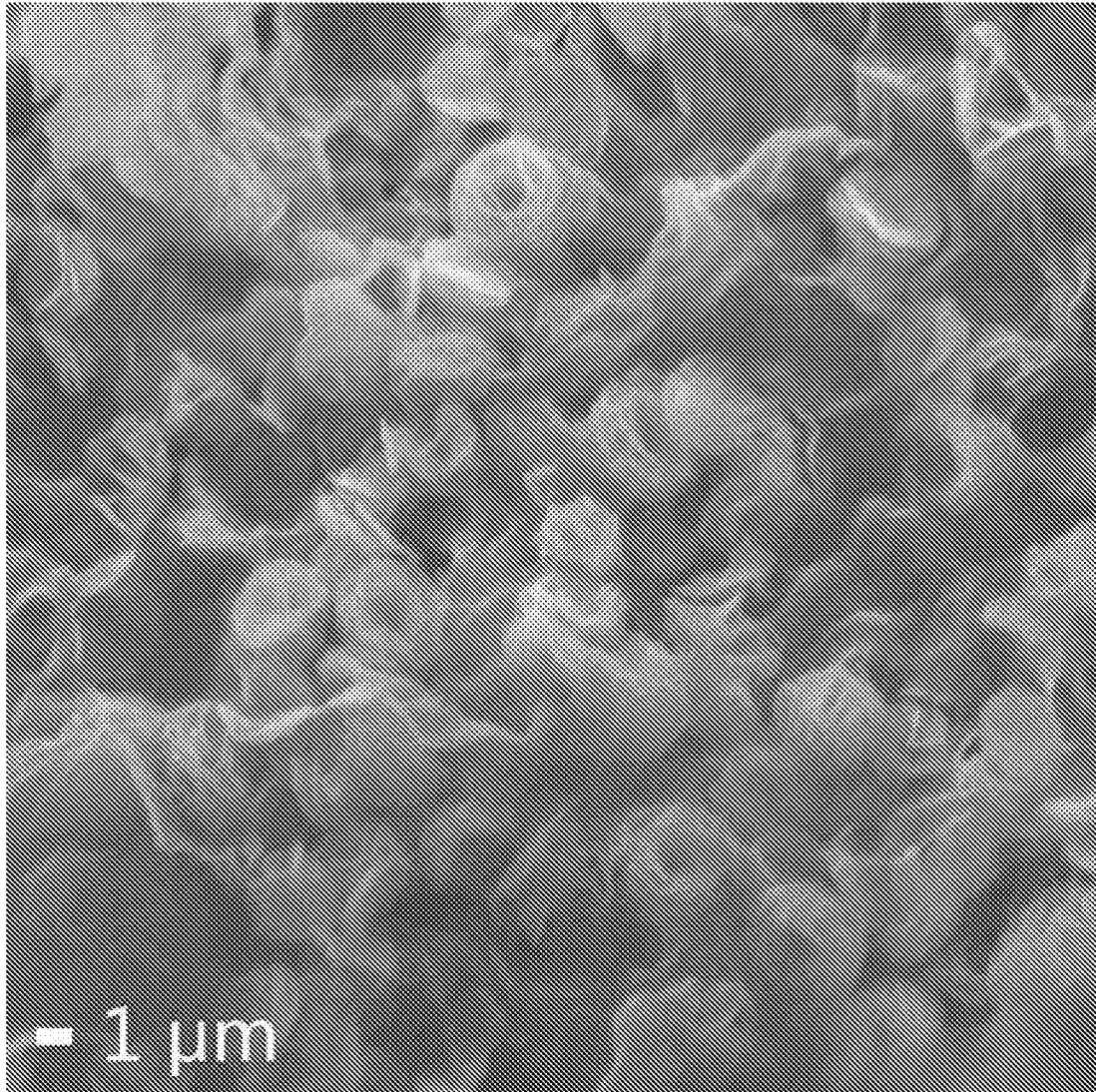


图3