



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109068659 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780023930.0

(22)申请日 2017.04.05

(30)优先权数据

62/323,663 2016.04.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/026086 2017.04.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/180383 EN 2017.10.19

(71)申请人 齐姆特罗尼克斯催化系统股份有限公司

地址 美国纽约

(72)发明人 S·科尔吉耶 R·谢里尔

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 王贵杰

(51)Int.Cl.

A01N 63/02(2006.01)

B01J 31/02(2006.01)

B01J 31/06(2006.01)

B01J 35/00(2006.01)

B01J 35/04(2006.01)

B01J 37/02(2006.01)

B01J 37/36(2006.01)

C12N 11/04(2006.01)

C12N 11/14(2006.01)

C12N 11/18(2006.01)

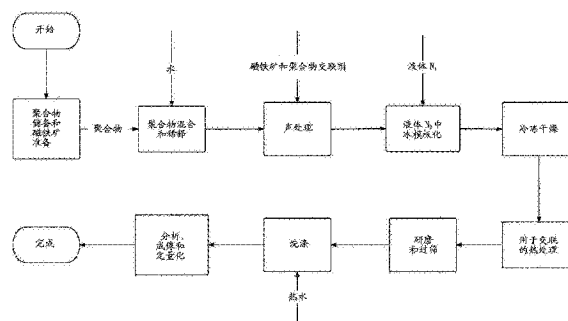
权利要求书2页 说明书26页 附图11页

(54)发明名称

用于固定生物纳米催化剂的磁性大孔聚合物杂化支架

(57)摘要

本发明提供用于支持和增强生物纳米催化剂(BNC)的有效性的磁性大孔聚合物杂化支架。新型支架包含交联的水不溶性聚合物和近似均匀分布的包埋的磁性微粒(MMP)。交联聚合物包含聚乙烯醇(PVA)和任选的其它聚合物材料。在制备支架期间,支架可以通过使用铸型而采取任何形状。或者,可以将支架研磨成微粒以用于生物催化反应。或者,支架可以成形为用于生物催化剂反应的珠粒。还提供了制备和使用支架的方法。



1. 磁性大孔聚合物杂化支架,包含交联的水不溶性聚合物和近似均匀分布的包埋的磁性微粒(MMP);其中所述聚合物包含聚乙烯醇(PVA);其中所述MMP为约50至500nm大小;其中所述支架包含约1至约50 μm 大小的孔;其中所述支架包含约20%-95%w/w的MMP;其中所述支架包含用于掺入生物纳米催化剂(BNC)的有效表面积,其总计为约1-15 m^2/g ;其中用于掺入酶的总有效表面积为约50-200 m^2/g ;其中所述支架具有约0.01至约10 g/ml 的堆积密度;且其中所述支架具有约 1.0×10^{-3} 至约 $1 \times 10^{-4} \text{m}^3 \text{kg}^{-1}$ 的质量磁化率。

2. 权利要求1的磁性大孔聚合物杂化支架,包含所述支架与水的接触角,其为约0-90度。

3. 权利要求1的磁性大孔聚合物杂化支架,还包含聚合物,其选自聚乙烯,聚丙烯,聚苯乙烯,聚丙烯酸,聚丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸,聚甲基丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸甲酯,聚乙酸乙烯酯,聚氟乙烯,聚偏二氟乙烯,聚四氟乙烯,酚醛树脂,间苯二酚甲醛树脂,聚酰胺,聚氨酯,聚酯,聚酰亚胺,聚苯并咪唑,纤维素,半纤维素,羧甲基纤维素(CMC),2-羟乙基纤维素(HEC),乙基羟乙基纤维素(EHEC),木聚糖,壳聚糖,菊粉,葡聚糖,琼脂糖,藻酸,藻酸钠,聚乳酸,聚乙醇酸,聚硅氧烷,聚二甲基硅氧烷和聚磷腈。

4. 权利要求3的磁性大孔聚合物杂化支架,其中所述支架包含PVA和CMC。

5. 权利要求3的磁性大孔聚合物杂化支架,其中所述支架包含PVA和藻酸盐。

6. 权利要求3的磁性大孔聚合物杂化支架,其中所述支架包含PVA和HEC。

7. 权利要求3的磁性大孔聚合物杂化支架,其中所述支架包含PVA和EHEC。

8. 权利要求1-7任一项的磁性大孔聚合物杂化支架,其中所述支架形成为整料形状。

9. 权利要求1-7任一项的磁性大孔聚合物杂化支架,其中所述支架形成为适合于特定生物催化过程的形状。

10. 权利要求1-7任一项的磁性大孔聚合物杂化支架,其中所述支架是粉末形式,其中所述粉末包含约150至约1000 μm 大小的颗粒。

11. 权利要求1-7任一项的磁性大孔聚合物杂化支架,还包含生物纳米催化剂(BNC)。

12. 权利要求11的磁性大孔聚合物杂化支架,其中所述BNC包含磁性纳米颗粒(MNP)和选自水解酶,羟化酶,过氧化氢产生酶(HPP),脲水解酶,水合酶,脱氢酶,转氨酶,烯还原酶(EREDS),亚胺还原酶(IREDs),氧化酶,氧化还原酶,过氧化物酶,氧脲酶,异构酶和脂肪酶的酶。

13. 制备水不溶性大孔聚合物杂化支架的方法,包括:

a. 混合水溶性聚合物与水与磁性微粒(MMP)以形成约3至50cP的悬浮液;

b. 将交联试剂加入到所述混合物中;

c. 超声处理所述混合物;

d. 在约-200至0 $^{\circ}\text{C}$ 温度下冷冻所述混合物;

e. 冷冻干燥所述混合物;和

f. 交联所述水溶性聚合物;

其中所述交联步骤产生水不溶性聚合物。

14. 权利要求13的方法,其中所述交联步骤通过暴露于紫外光、在约60至500 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下加热所述混合物或其组合来实现。

15. 权利要求13的方法,还包括在所述超声处理步骤后施加磁场的步骤,以便通过校正

所述MMP的磁矩来组织所述MMP。

16. 权利要求13的方法,其中所述水溶性聚合物是聚乙烯醇(PVA)。

17. 权利要求13的方法,还包括聚合物,其选自聚乙烯,聚丙烯,聚苯乙烯,聚丙烯酸,聚丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸,聚甲基丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸甲酯,聚乙酸乙烯酯,聚氟乙烯,聚偏二氟乙烯,聚四氟乙烯,酚醛树脂,间苯二酚甲醛树脂,聚酰胺,聚氨酯,聚酯,聚酰亚胺,聚苯并咪唑,纤维素,半纤维素,羧甲基纤维素(CMC),2-羟乙基纤维素,乙基羟乙基纤维素,木聚糖,壳聚糖,菊粉,葡聚糖,琼脂糖,藻酸,藻酸钠,聚乳酸,聚乙醇酸,聚硅氧烷,聚二甲基硅氧烷和聚磷腈。

18. 权利要求17的方法,其中所述聚合物包含PVA和CMC。

19. 权利要求17的方法,其中所述聚合物包含PVA和藻酸盐。

20. 权利要求17的方法,其中所述聚合物包含PVA和HEC。

21. 权利要求17的方法,其中所述聚合物包含PVA和EHEC。

22. 权利要求13的方法,其中所述交联试剂选自柠檬酸、所有钙盐、1,2,3,4-丁烷四羧酸(BTCA)、戊二醛和聚(乙二醇)。

23. 权利要求22的方法,其中所述交联试剂是柠檬酸。

24. 权利要求13-23任一项的方法,其中所述冷冻步骤产生为整料形状的水溶性大孔聚合物杂化支架。

25. 权利要求13-23任一项的方法,其中所述所述冷冻步骤产生为适合于特定生物催化过程的形状的水溶性大孔聚合物杂化支架。

26. 权利要求13-23任一项的方法,还包括将所述水不溶性大孔聚合物杂化支架研磨成约10至约1000 μm 大小的粉末。

27. 权利要求13-23任一项的方法,其中使所述水不溶性大孔聚合物杂化支架成形为约500至约5000 μm 大小的珠粒。

28. 催化多个底物之间的反应的方法,包括在其中所述BNC催化所述底物之间的所述反应条件下使所述底物暴露于权利要求11的磁性大孔聚合物杂化支架。

29. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造药物产品。

30. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造药剂。

31. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造食品。

32. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造衣服。

33. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造洗涤剂。

34. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造燃料产品。

35. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造生物化学产品。

36. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造纸产品。

37. 权利要求28的方法,其中所述反应用于制造塑料产品。

38. 权利要求28的方法,其中所述反应用于从溶液中除去污染物的方法中。

39. 权利要求38的方法,其中所述溶液是水溶液。

用于固定生物纳米催化剂的磁性大孔聚合物杂化支架

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2016年4月16日提交的美国临时申请号62/323,663的权益,其作为引用完整地并入本文。

发明领域

[0002] 本发明提供用于支持和增强生物纳米催化剂(BNC)的有效性的磁性大孔聚合物杂化支架。新型支架包含交联的水不溶性聚合物和近似均匀分布的包埋的磁性微粒(MMP)。交联聚合物包含聚乙烯醇(PVA)和任选的其它聚合物材料。在制备支架期间,支架可以通过使用铸型而采取任何形状。在某些实施方案中,支架可以成形为用于生物催化剂反应的珠粒。在替代实施方案中,可以将支架研磨成微粒以用于生物催化反应。还提供了制备和使用支架的方法。

发明背景

[0003] 磁性酶固定涉及将酶捕获于在酶周围自组装的中孔磁性团簇中。固定化效率取决于许多因素,这些因素包括酶和纳米颗粒的初始浓度、酶表面的性质、酶的静电势、纳米颗粒表面性质以及接触时间。在生物催化过程中用于工业目的的酶应该是高效的,在该过程之前和期间是稳定的,可在数个生物催化循环内重复使用并且是经济的。

[0004] 磁性纳米颗粒的中孔聚集体可以到掺入连续或颗粒状大孔支架中。支架可以是磁性的或可以不是磁性的。这类支架在W02014/055853和Corgie等人,Chem.Today 34(5):15-20(2016)中讨论,所述文献作为引用整体并入本文。

发明概述

[0005] 本发明提供用于支持和增强生物纳米催化剂(BNC)的有效性的磁性大孔聚合物杂化支架。新型支架包含交联的水不溶性聚合物和近似均匀分布的包埋的磁性微粒(MMP)。交联聚合物包含聚乙烯醇(PVA)和任选的其它聚合物材料。在制备支架期间,支架可以通过使用铸型而采取任何形状。或者,可以将支架研磨成微粒以用于生物催化反应。或者,支架可以成形为用于生物催化剂反应的珠粒。还提供了制备和使用支架的方法。

[0006] 因此,本发明提供磁性大孔聚合物杂化支架,其包含交联的水不溶性聚合物和近似均匀分布的包埋的磁性微粒(MMP)。该聚合物至少包含聚乙烯醇(PVA),具有约50至500nm大小的MMP,约1至约50 μ m大小的孔,约20%至95%w/w的MMP,其中所述支架包含用于掺入生物催化剂(BNC)的有效表面积,其总计为约1-15m²/g;其中掺入酶的总有效表面积为约50-200m²/g;其中所述支架具有约0.01至约10g/ml的堆积密度;且其中所述支架具有约1.0x10⁻³至约1x10⁻⁴m³kg⁻¹的质量磁化率。在一个优选的实施方案中,磁性大孔聚合物杂化支架包含支架与水的接触角,其为约0-90度。

[0007] 在优选的实施方案中,交联的水不溶性聚合物基本上是聚乙烯醇(PVA)。在更优选的实施方案中,支架还包含聚合物,其选自聚乙烯,聚丙烯,聚苯乙烯,聚丙烯酸,聚丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸,聚甲基丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸甲酯,聚乙酸乙烯酯,聚氟乙烯,聚偏二氟乙烯,聚四氟乙烯,酚醛树脂,间苯二酚甲醛树脂,聚酰胺,聚氨酯,聚酯,聚酰亚胺,聚苯

并咪唑,纤维素,半纤维素,羧甲基纤维素(CMC),2-羟乙基纤维素(HEC),乙基羟乙基纤维素(EHEC),木聚糖,壳聚糖,菊粉,葡聚糖,琼脂糖,藻酸,藻酸钠,聚乳酸,聚乙醇酸,聚硅氧烷,聚二甲基硅氧烷和聚磷腈。

[0008] 在其它更优选的实施方案中,磁性大孔聚合物杂化支架包含PVA和CMC,PVA和藻酸盐,PVA和HEC,或PVA和EHEC。

[0009] 在一些实施方案中,磁性大孔聚合物杂化支架形成为整料形状。在其它实施方案中,支架形成为适合于特定生物催化过程的形状。在其它实施方案中,支架为粉末形式,其中所述粉末包含大小为约150至约1000 μm 的颗粒。

[0010] 本发明提供如本文所公开的磁性大孔聚合物杂化支架,其还包含生物纳米催化剂(BNC)。在一些实施方案中,BNC包含磁性纳米颗粒(MNP)和选自水解酶,羟化酶,过氧化氢产生酶(HPP),腈水解酶(nitrilase),水合酶,脱氢酶,转氨酶,烯还原酶(EREDS),亚胺还原酶(IREDs),氧化酶,氧化还原酶,过氧化物酶,氧脲酶,异构酶和脂肪酶的酶。

[0011] 本发明提供一种制备水不溶性大孔聚合物杂化支架的方法,所述方法包括将水溶性聚合物与水 and 磁性微粒(MMP)混合以形成约3至50cP的悬浮液;向所述悬浮液混合物中加入交联试剂;超声处理所述混合物;在约-200至0 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下冷冻所述混合物;冷冻干燥所述混合物;和交联所述水溶性聚合物;其中所述交联步骤产生水不溶性聚合物。

[0012] 在一些实施方案中,该方法交联步骤通过暴露于紫外光、在约60至500 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下加热混合物或其组合来实现。在优选的实施方案中,该方法还包括在超声处理步骤之后施加磁场的步骤,以便通过校正所述MMP的磁矩来组织所述MMP。

[0013] 在该方法的一些实施方案中,水溶性聚合物是聚乙烯醇(PVA)。在其它实施方案中,水溶性聚合物还包含聚合物,其选自聚乙烯,聚丙烯,聚苯乙烯,聚丙烯酸,聚丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸,聚甲基丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸甲酯,聚乙酸乙烯酯,聚氟乙烯,聚偏二氟乙烯,聚四氟乙烯的聚合物,酚醛树脂,间苯二酚甲醛树脂,聚酰胺,聚氨酯,聚酯,聚酰亚胺,聚苯并咪唑,纤维素,半纤维素,羧甲基纤维素(CMC),2-羟乙基纤维素,乙基羟乙基纤维素,木聚糖,壳聚糖,菊粉,葡聚糖,琼脂糖,藻酸,藻酸钠,聚乳酸,聚乙醇酸,聚硅氧烷,聚二甲基硅氧烷和聚磷腈。

[0014] 在更优选的实施方案中,所述聚合物包含PVA和CMC,PVA和藻酸盐,PVA和HEC,或PVA和EHEC。

[0015] 在一些实施方案中,交联试剂选自柠檬酸,所有钙盐,1,2,3,4-丁烷四羧酸(BTCA),戊二醛和聚(乙二醇)。在优选的实施方案中,交联试剂是柠檬酸。

[0016] 在一些实施方案中,冷冻步骤产生水溶性大孔聚合物杂化支架,其为整料形状。在其它实施方案中,冷冻步骤产生水溶性大孔聚合物杂化支架,其为适合于特定的生物催化过程的形状。在其它实施方案中,将水不溶性大孔聚合物杂化支架研磨成约10至约1000 μm 大小的粉末。

[0017] 本发明提供催化多个底物之间的反应的方法,所述方法包括在其中BNC催化底物之间的反应的条件将底物暴露于磁性大孔聚合物杂化支架。在优选的实施方案中,该反应用于制备药物产品,药剂,食品,服装,洗涤剂,燃料产品,生物化学产品,纸制品或塑料产品。

[0018] 本发明的一些实施方案提供了形成水不溶性大孔聚合物杂化支架的方法,所述支

架被成形为约500至约5000 μm 大小的珠粒。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明提供催化多个底物之间的反应的方法,所述方法包括在其中BNC催化底物之间的反应的条件将底物暴露于磁性大孔聚合物杂化支架,且该反应用于从溶液中除去污染物的方法中。在优选的实施方案中,溶液是水溶液。

附图简述

[0020] 图1显示磁性支架生产过程的示例性框图。

[0021] 图2A显示磁性支架M032 (1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和13.75mL过量水)的扫描电子显微照片(SEM)图像。

[0022] 图2B显示磁性支架M032-50- μm (1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%高粘度羧甲基纤维素(CMC)和43.75mL过量水)的SEM图像。

[0023] 图3A显示包含83%磁铁矿干固体质量的磁性支架M032 (1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和13.75mL过量水)的SEM图像。

[0024] 图3B显示包含40%磁铁矿干固体质量的磁性支架M048 (0.90g磁铁矿、11mL 10%聚(乙烯醇)、3.71mL 6%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和23.2mL过量水)的SEM图像。

[0025] 图4A显示包含83%磁铁矿干固体质量的磁性支架M032-40 (1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和33.75mL过量水)的SEM图像,在冷冻的同时施加约2G磁场,其垂直于液氮浴槽。

[0026] 图4B显示包含83%磁铁矿干固体质量的磁性支架M032-40 (1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和33.75mL过量水)的SEM图像,在冷冻的同时施加约2G的均匀磁场,其平行于液氮浴槽。

[0027] 图5表明与普通磁铁矿粉末相反,支架的表面结垢可能性降低。

[0028] 图6A显示如用氨量化法通过荧光方式测定的固定化脲水解酶的活性。比较三个样品:(1)游离脲水解酶;(2)由pH 6的脲水解酶/pH 3的磁铁矿纳米颗粒BNC组成的BMC,具有在磁性大孔聚合物杂化支架M032-40上模板化的20%载量;和(3)由pH 6的脲水解酶/pH 3的磁铁矿纳米颗粒BNC组成的BMC,具有在简单的磁铁矿粉末(50-100nm)上模板化的20%载量,且具有9.5%的最终有效载量。

[0029] 图6B显示通过分光光度法测定的固定化 ω -转氨酶的活性,其中在245nm处具有苯乙酮吸光度。比较三个样品:(1)游离 ω -转氨酶;(2)由pH 7.15的 ω -转氨酶/pH 3的磁铁矿纳米颗粒BNC组成的BMC,具有在磁性大孔聚合物杂化支架M032-40上模板化的20%载量;和(3)由pH 7.15的 ω -转氨酶/pH 3的磁铁矿纳米颗粒BNC组成的BMC,具有在简单的磁铁矿粉末(50-100nm)上模板化的20%载量,且具有6.2%的有效载量。因为对于简单的磁铁矿粉末的酶固定化效率低于100%,所以除去未捕获的酶并用适量的水替代,以消除游离酶对固定化酶结果的贡献。

[0030] 图6C显示了通过基于荧光pH的方法测定的固定化碳酸酐酶的活性。比较三个样品:(1)游离碳酸酐酶;(2)由pH 6的碳酸酐酶/pH 11的磁铁矿纳米颗粒BNC组成的BMC,具有在磁性大孔聚合物杂化支架M032-40上模板化的20%载量;和(3)由pH 6的碳酸酐酶/pH 11的磁铁矿纳米颗粒BNC组成的BMC,具有在简单的磁铁矿粉末(50-100nm)上模板化的20%载量,且具有9.5%的有效载量。

[0031] 图6D显示采用分光光度法测定的固定化辣根过氧化物酶的活性,其中在500nm处

具有醌亚胺染料配合物吸光度。显示三个样品：(1) 游离辣根过氧化物酶 (HRP)；(2) 由 pH 5 的辣根过氧化物酶/pH 11 的磁铁矿纳米颗粒 BNC 组成的 BMC，具有在磁性大孔聚合物杂化支架 MO32-40 上模板化的 5% 载量；和由 pH 5 的辣根过氧化物酶/pH 11 的磁铁矿纳米颗粒 BNC 组成的 BMC，具有在简单的磁铁矿粉末 (50-100nm) 上模板化的 5% 载量，且具有 3% 的有效载量。

[0032] 图7显示固定化和非固定化氯过氧化物酶 (CPO) 的活性。使用肾上腺色素报告反应，在 490nm 处用分光光度法测定 (R)-柠檬烯到 (1S,2S,4R)-(+)-柠檬烯-1,2-二醇的生物催化转化。

[0033] 图8显示固定化和游离脂肪酶的活性。在 pH 4 下，在 314nm 处通过分光光度法测定月桂酸对硝基苯酚酯到对硝基苯酚和月桂酸酯的生物催化转化。

发明详述

[0034] 本发明提供了用于支持和增强 BNC 的有效性的组合物和方法。这首次使用本文公开的磁性大孔聚合物杂化支架实现。新型支架包含交联的水不溶性聚合物和近似均匀分布的包埋的磁性微粒 (MMP)。交联聚合物包含聚乙烯醇 (PVA) 和任选的其它聚合物材料。在制备支架期间，支架可以通过使用铸型而采取任何形状。或者，可将支架研磨成大颗粒并筛分至规定的大小以进行生物催化反应。还提供了制备和使用支架的方法。

[0035] 包含包埋酶的自组装中孔纳米团簇具有高活性和稳健性。该技术是生物化学，纳米技术和生物工程在三个综合组织层面的强大组合：1级是酶与磁性纳米颗粒 (MNP) 的自组装，用于合成磁性中孔纳米团簇。该水平使用分子自捕获机制来固定和稳定酶。2级是将 MNP 稳定到其它基体中。3级是产品调节和包装，用于 1+2 级递送。吸附到酶的磁性纳米颗粒的组装在本文中也称为“生物纳米催化剂” (BNC)。

[0036] MNP 允许更宽范围的操作条件，例如温度，离子强度和 pH。(MNP 的大小和磁化强度影响 NP 的形成和结构，所有这些都对捕获的酶的活性具有显著影响。由于它们在各种反应条件下具有令人惊讶的弹性，因此 MNP 可用作改进的酶或催化剂，其中目前使用其它此类试剂。此外，它们还可用于其中酶还尚未被考虑或被认为适用的其它应用中。

[0037] BNC 含有中孔，所述中孔是磁性纳米颗粒之间的间隙空间。酶优选包埋或固定在 BNC 的至少一部分中孔内。如本文所用，术语“磁性”包括所有类型的有用的磁特性，包括永磁，超顺磁，顺磁，铁磁和亚铁磁行为。

[0038] 磁性纳米颗粒或 BNC 具有纳米级的大小，即通常不超过 500nm。如本文所用，术语“大小”可以指磁性纳米颗粒为近似或基本上球形时的磁性纳米颗粒的直径。在磁性纳米颗粒不是近似或基本上球形 (例如，基本上卵圆形或不规则形) 的情况下，术语“大小”可以指磁性纳米颗粒最长的尺寸或三个维度的平均值。术语“大小”还可以指磁性纳米颗粒群体的平均大小 (即“平均大小”)。

[0039] 在不同的实施方案中，磁性纳米颗粒具有精确地、大约、至多或小于例如 500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、50nm、40nm、30nm、25nm、20nm、15nm、10nm、5nm、4nm、3nm、2nm 或 1nm 的大小，或在限于上述示例性大小的任意两个范围内的大小。

[0040] 在 BNC 中，单独的磁性纳米颗粒可以被认为具有上文提供的任何大小的初级纳米颗粒 (即，初级微晶)。BNC 中的纳米颗粒的聚集体在大小上大于纳米颗粒，并且通常具有至少约 5nm 的大小 (即，次级大小)。在不同的实施方案中，所述聚集体具有精确地、大约、至

多或小于例如5nm、8nm、10nm、12nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm或800nm的大小，或在限于上述示例性大小的任意两个范围内的大小。

[0041] 典型地，初级和/或聚集的磁性纳米颗粒或其BNC具有大小分布，即它们通常按照大小分散，或者狭窄或者宽泛地分散。在不同的实施方案中，任何范围的初级或聚集大小可构成初级或聚集大小的总范围的主要或次要比例。例如，在一些实施方案中，特定范围的初级粒度（例如，至少约1、2、3、5或10nm并且至多约15、20、25、30、35、40、45或者50nm）或特定范围的聚集粒度（例如，至少约5、10、15或20nm并且至多约50、100、150、200、250或300nm）构成至少或高于的初级粒度总范围的约50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%。在其它实施方案中，特定范围的初级粒度（例如，小于约1、2、3、5或10nm，或大于约15、20、25、30、35、40、45或50nm）或特定范围的聚集粒度（例如，小于约20、10或5nm，或大于约25、50、100、150、200、250或300nm）构成不大于或小于初级粒度总范围的约50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%。

[0042] 磁性纳米颗粒的聚集体（即“聚集体”）或其BNC可具有任何程度的孔隙率，包括基本上缺乏孔隙率，这取决于它们由其制成的单个初级微晶的量。在特定的实施方案中，通过含有间隙中孔（即，位于初级磁性纳米颗粒之间的中孔，通过填充排列形成），聚集体是中孔的。中孔通常为至少2nm且至多50nm的大小。在不同的实施方案中，中孔可具有精确或大约的孔径，例如，2、3、4、5、10、12、15、20、25、30、35、40、45或50nm，或孔径在由前述示例性孔径中的任何两个限定的范围内。类似于颗粒大小的情况，中孔通常具有大小分布，即它们通常按照大小分散，或者狭窄或者宽泛地分散。在不同的实施方案中，任何范围的中孔大小可构成中孔大小的总范围或总孔体积的主要或次要比例。例如，在一些实施方案中，特定范围的中孔大小（例如，至少约2、3或5，并且至多8、10、15、20、25或30nm）构成至少或高于中孔大小的总范围或总孔体积的约50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%。在其它实施方案中，特定范围的中孔大小（例如，小于约2、3、4或5nm，或大于约10、15、20、25、30、35、40、45或50nm）构成不大于或小于中孔大小的总范围或总孔体积的约50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%。

[0043] 磁性纳米颗粒可具有本领域已知的任何组成。在一些实施方案中，磁性纳米颗粒是或包括磁性的零价金属部分。这种零价金属的一些实例包括钴、镍和铁，以及它们的混合物和合金。在其它实施方案中，磁性纳米颗粒是或包括磁性金属的氧化物，例如钴、镍或铁的氧化物，或其混合物。在一些实施方案中，磁性纳米颗粒具有不同的核心和表面部分。例如，磁性纳米颗粒可具有由元素铁、钴或镍组成的核心部分和由钝化层组成的表面部分，例如金属氧化物或贵金属涂层，例如金层，铂层，钯层或银层。在其它实施方案中，金属氧化物磁性纳米颗粒或其聚集体涂覆有一层贵金属涂层。贵金属涂层可以例如减少磁性纳米颗粒表面上的电荷数量，这可以有利地增加溶液中的分散性并且更好地控制BNC的尺寸。贵金属涂层保护磁性纳米颗粒免于氧化，免于通过浸出或当螯合有机酸，例如柠檬酸盐，丙二酸盐或酒石酸盐用于生化反应或过程时通过螯合而溶剂化。钝化层可以具有任何适合的厚度，并且特别地，至少、至多或者低于例如约0.1nm、0.2nm、0.3nm、0.4nm、0.5nm、0.6nm、0.7nm、0.8nm、0.9nm、1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm或10nm，或由这些值中的任何两个限定的范围内的厚度。

[0044] 可用于本发明的磁性材料在本领域中是众所周知的。非限制性实例包含铁磁和铁磁材料,包括矿石,例如铁矿石(磁铁矿或极磁铁矿),钴和镍。在其它实施方案中,使用稀土磁体。非限制性实例包括钆,钆,镱,钆-钆,钆-铁-硼等。在更进一步的实施方案中,磁体包含复合材料。非限制性实例包括陶瓷,铁氧体和铝镍钴磁钢磁体。在优选的实施方案中,磁性纳米颗粒具有氧化铁组成。氧化铁组成可以是本领域已知的任何磁性或超顺磁性氧化铁组成,例如磁铁矿(Fe_3O_4),赤铁矿($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$),磁赤铁矿($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)或式 AB_2O_4 的尖晶石铁氧体,其中A是二价金属(例如 Xn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 或其组合),且B是三价金属(例如 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 或其组合)。

[0045] 单个磁性纳米颗粒或其聚集体或其BNC具有任何适合的磁性程度。例如,磁性纳米颗粒、BNC或BNC支架组件可具有至少或至多约5、10、15、20、25、30、40、45、50、60、70、80、90或100emu/g的饱和磁化强度(Ms)。磁性纳米颗粒、BNC或BNC-支架组件优选具有不超过(即,至多)或低于5emu/g的永久磁化强度(Mr),且更优选具有至多或低于4emu/g、3emu/g、2emu/g、1emu/g、0.5emu/g或0.1emu/g的永久磁化强度(Mr)。磁性纳米颗粒、BNC或BNC-支架组件的表面磁场可以为约或至少例如0.5、1、5、10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000高斯(G),或在由前述任何两个值限定的范围内的磁场。如果包括微粒,则微粒也可具有任何上述磁强度。

[0046] 根据应用的不同,可以使磁性纳米颗粒或其聚集体吸附适当量的酶,至多或低于饱和水平,以产生所得的BNC。在不同的实施方案中,磁性纳米颗粒或其聚集体可以吸附大约、至少、至多或低于例如1、5、10、15、20、25或30pmol/m²的酶。或者,磁性纳米颗粒或其聚集体可以吸附大约、至少、至多或小于例如约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%饱和水平的酶量。

[0047] 磁性纳米颗粒或其聚集体或其BNC具有任意适合的孔体积。例如,磁性纳米颗粒或其聚集体可具有大约、至少、至多或小于例如约0.01、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95或1cm³/g的孔体积,或在由前述任何两个值限定的范围内的孔体积。

[0048] 磁性纳米颗粒或其聚集体或其BNC具有任意适合的比表面积。例如,磁性纳米颗粒或其聚集体可具有大约、至少、至多或小于例如约50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200m²/g的比表面积。

[0049] W02012122437和W02014055853中描述了MNP、其结构、组织、适合的酶和用途,所述文献作为引用完整地并入本文。

[0050] 本发明的一些实施方案包含水解酶。通过使用水作为底物,水解酶催化许多类型的化学键的水解。底物典型地在断裂键的位置具有氢和羟基。水解酶在酶的EC编号分类中被分类为EC 3。基于它们作用的键,水解酶可以进一步分为几个亚类。示例性水解酶和它们水解的键包括EC 3.1:酯键(酯酶:核酸酶,磷酸二酯酶,脂肪酶,磷酸酶),EC 3.2:糖(DNA糖基化酶,糖苷水解酶),EC 3.3:醚键,EC 3.4:肽键(蛋白酶/肽酶),EC 3.5:除肽键外的碳-氮键,EC 3.6酸酐(酸酐水解酶,包括解旋酶和GTP酶),EC 3.7碳-碳键,EC 3.8卤化物键,EC 3.9:磷-氮键,EC 3.10:硫-氮键,EC 3.11:碳-磷键,EC 3.12:硫-硫键和EC 3.13:碳-硫键。

[0051] 在一些优选的实施方案中,水解酶是糖苷水解酶。这些酶具有多种用途,包括植物材料的降解(例如用于将纤维素降解为用于乙醇生产的葡萄糖的纤维素酶),食品制造(例

如糖转化,麦芽糖糊精生产)和纸生产(从纸浆中除去半纤维素)。

[0052] 在一些优选的实施方案中,水解酶是立扑莱斯(lipolase)100L(EC 3.1.1.3)。它用于合成普瑞巴林(由Pfizer作为**Lyrica**[®]销售),即一种用于神经性疼痛、焦虑症和癫痫的抗惊厥药物。这些病症影响了全世界约1%的人口。发现立扑莱斯100L可将所需原料减少39%,并将每单位废物减少80%。

[0053] 在一些优选的实施方案中,水解酶是 γ -内酰胺酶(例如EC 3.1.5.49)。它被用来制造Vince内酰胺,即一种阿巴卡韦生产的中间体(一种治疗HIV/AIDS的抗逆转录病毒药物)。发现从化学计量过程变为催化流程将单元操作的数量从17减少到12并且将废物减少了35%。另外,使有毒物质氯化氰的使用最小化。

[0054] 在一些优选的实施方案中,水解酶是乳糖酶(例如EC 3.2.1.108)。这些酶将牛奶中的乳糖分解成单糖,以产生不含乳糖的牛奶。这种重要的产品用于世界上大约15%的乳糖不耐受人群。

[0055] 在一些优选的实施方案中,水解酶是青霉素酰胺酶(例如EC 3.5.1.11)。这些酶将青霉素分成羧酸盐和6-氨基青霉烷酸(6-APA)。6-APA是天然和合成青霉素衍生物的核心结构。这些酶用于生产针对特定感染而定制的半合成青霉素。

[0056] 在一些优选的实施方案中,水解酶是腈水解酶(例如EC 3.5.5.1)。这些酶将腈裂解成羧基。腈水解酶用于制造阿托伐他汀(由Pfizer以**Lipitor**[®]销售)。它催化内消旋-3-羟基戊二腈与(R)-4-氰基-3-羟基丁酸乙酯的反应,后者形成阿托伐他汀的核心。

[0057] 水解酶在如下参考文献中讨论,其作为引用完整地并入本文:Anastas, P.T. Handbook of Green Chemistry. Wiley-VCH-Verlag, 2009; Dunn, Peter J., Andrew Wells和Michael T. Williams, eds. Green chemistry in the pharmaceutical industry. John Wiley&Sons, 2010; Martinez等人, Curr. Topics Med. Chem. 13(12):1470-90(2010); Wells等人, Organic Process Res. Dev. 16(12):1986-1993(2012)。

[0058] 在一些实施方案中,本发明提供过氧化氢产生(HPP)酶。在某些实施方案中,HPP酶可以是EX 1.1.3亚属的氧化酶。在特定实施方案中,氧化酶可以是EC 1.1.3.3(苹果酸氧化酶),EC 1.1.3.4(葡萄糖氧化酶),EC 1.1.3.5(己糖氧化酶),EC 1.1.3.6(胆固醇氧化酶),EC 1.1.3.7(芳基-醇氧化酶),EC 1.1.3.8(L-古洛糖酸内酯氧化酶),EC 1.1.3.9(半乳糖氧化酶),EC 1.1.3.10(吡喃糖氧化酶),EC 1.1.3.11(L-山梨糖氧化酶),EC 1.1.3.12(吡哆醇4-氧化酶),EC 1.1.3.13(醇氧化酶),EC 1.1.3.14(儿茶酚氧化酶),EC 1.1.3.15(2-羟基酸氧化酶),EC 1.1.3.16(蜕皮激素氧化酶),EC 1.1.3.17(胆碱氧化酶),EC 1.1.3.18(仲醇氧化酶),EC 1.1.3.19(4-羟基扁桃酸氧化酶),EC 1.1.3.20(长链醇氧化酶),EC 1.1.3.21(甘油-3-磷酸氧化酶),EC 1.1.3.22,EC 1.1.3.23(硫胺素氧化酶),EC 1.1.3.24(L-半乳糖酸内酯氧化酶),EC 1.1.3.25,EC 1.1.3.26,EC 1.1.3.27(羟基氰酸酯氧化酶),EC 1.1.3.28(核苷氧化酶),EC 1.1.3.29(N-酰基己糖胺氧化酶),EC 1.1.3.30(聚乙烯醇氧化酶),EC 1.1.3.31,EC 1.1.3.32,EC 1.1.3.33,EC 1.1.3.34,EC 1.1.3.35,EC 1.1.3.36,EC 1.1.3.37D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶),EC 1.1.3.38(香草醇氧化酶),EC 1.1.3.39(核苷氧化酶,形成H₂O₂),EC 1.1.3.40(D-甘露糖醇氧化酶)或EC 1.1.3.41(木糖醇氧化酶)。

[0059] 本发明的一些实施方案可包含羟化酶。羟化是将羟基(-OH)引入有机化合物中的化学过程。羟化是空气中有机化合物氧化降解的第一步。羟化通过将亲脂性化合物转化为更容易排泄的亲水性产物而在解毒中起作用。一些药物(例如类固醇)通过羟化被活化或失活。羟化酶在本领域中是众所周知的。示例性的羟化酶包括脯氨酸羟化酶、赖氨酸羟化酶和酪氨酸羟化酶。

[0060] 本发明的一些实施方案包含腈水解酶(NIT)。它们是水解酶(EC 3.5.5.1),其催化腈水解成具有高对映体纯度的手性羧酸和氨。可以通过监测扁桃腈转化为(R)-扁桃酸来测定NIT活性。这导致可以通过分光光度法监测的pH下降。腈水解酶用于从3-氰基吡啶产生烟酸,其也称为维生素B3或尼克酸。烟酸是食品中的营养补充剂和药物中间体。示例性工业化用途在Gong等人, *Microbial Cell Factories*, 11 (1), 142 (2012) 中讨论,该文献作为引用完整地并入本文。

[0061] 本发明的一些实施方案包含水合酶。它们是催化添加或去除水的元素的酶。水合酶(也称为水解酶或水化酶)可以催化C-O键的水合或脱水。

[0062] 本发明的一些实施方案包含氧化还原酶。这些酶催化电子从一个分子转移到另一个分子。这涉及H和O原子或电子从一种物质转移到另一种物质。它们通常使用NADP或NAD⁺作为辅因子。

[0063] 在本发明的一些优选实施方案中,氧化还原酶用于污染物例如多氯联苯和酚类化合物的分解,煤的降解,以及木材水解产物发酵的增强。本发明还包括它们在生物传感器和疾病诊断中的用途。

[0064] 在一些优选的实施方案中,氧化还原酶是脱氢酶(DHO)。该组氧化还原酶通过还原反应氧化底物,所述还原反应将一种或多种氢化物(H⁻)转移至电子受体,通常为NAD⁺/NADP⁺或黄素辅酶例如FAD或FMN。示例性的脱氢酶包括醛脱氢酶,乙醛脱氢酶,醇脱氢酶,谷氨酸脱氢酶,乳酸脱氢酶,丙酮酸脱氢酶,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,山梨醇脱氢酶,异柠檬酸脱氢酶, α -酮戊二酸脱氢酶,琥珀酸脱氢酶,和苹果酸脱氢酶。

[0065] 在一些优选的实施方案中,氧化还原酶是酮还原酶(EC 1.1.1.184),即一种用于制备阿托伐他汀的氧化还原酶(由Pfizer以**Lipitor**[®]销售)。这种生物催化过程在商业上很重要,因为它显著地减少了原料,限制了有机溶剂的使用,并提高了废物流的生物降解性。

[0066] 在一些优选的实施方案中,氧化还原酶是葡萄糖脱氢酶(例如EC 1.1.99.10)。它们被制药公司用于回收用于药物生产的辅因子。它们催化葡萄糖转化为葡萄糖酸盐。NADP⁺被还原成NADPH。这用于Avastan生产。

[0067] 在一些优选的实施方案中,氧化还原酶是P450(EC 1.14.14.1)。它在制药工业中用于难以进行的氧化。P450降低了与天然辅因子(例如,NADPH/NADP⁺)相关的成本、不一致性和低效率。

[0068] 在一些优选的实施方案中,氧化还原酶是过氧化氢酶,例如EC 1.11.1.6。它用于食品工业中,用于在干酪生产之前从牛奶中除去过氧化氢,以及用于生产酸性调节剂如葡萄糖酸。过氧化氢酶还用于纺织工业中以从织物中除去过氧化氢。

[0069] 在一些优选的实施方案中,氧化还原酶是葡萄糖氧化酶(例如,Notatin, EC 1.1.3.4)。它催化葡萄糖氧化成过氧化氢和D-葡萄糖酸- δ -内酯。例如,它用于产生过氧化

氢作为用于过氧化氢消耗酶如过氧化物酶的氧化剂。

[0070] 在一些实施方案中,本发明包括自由基产生(FRP)酶。在一些实施方案中,FRP是过氧化物酶。过氧化物酶广泛存在于生物系统中并形成氧化还原酶的子集,其将过氧化氢(H_2O_2)还原为水,以氧化从苯酚到芳族胺的多种芳族化合物。过氧化物酶是非常有效的酶,但由于在过量过氧化物存在下的强烈抑制作用而在工业环境中众所周知地难以有效地利用。本发明提供增加的反应周转和减少的抑制。因此,诸如辣根过氧化物酶(HRP)的酶可以以工业规模使用。

[0071] 过氧化物酶属于EC 1.11.1亚属。在某些实施方案中,EC 1.11.1酶是EC 1.11.1。酶可以更具具体地为,例如,EC 1.11.1.1(NADH过氧化物酶),EC 1.11.1.2(NADPH过氧化物酶),EC 1.11.1.3(脂肪酸过氧化物酶),EC 1.11.1.4,EC 1.11.1.5(细胞色素c过氧化物酶),EC 1.11.1.6(过氧化氢酶),EC 1.11.1.7(过氧化物酶),EC 1.11.1.8(碘化物过氧化物酶),EC 1.11.1.9(谷胱甘肽过氧化物酶),EC 1.11.1.10(氯化物过氧化物酶),EC 1.11.1.11(L-抗坏血酸过氧化物酶),EC 1.11.1.12(磷脂-氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶),EC 1.11.1.13(锰过氧化物酶),EC 1.11.1.14(二芳基丙烷过氧化物酶),或EC 1.11.1.15(硫氧还原蛋白过氧化物酶)。

[0072] 辣根过氧化物酶(EC 1.11.1.7)是在辣根植物*A.rusticana*的根中发现的含血红素的氧化还原酶。它通常用作生化信号放大器和示踪剂,因为它通常与过氧化氢一起作用于生色底物,以产生颜色鲜艳的产物复合物。它改善了目标分子的分光光度检测能力。辣根过氧化物酶(HRP)的这种特征已经应用于啮齿动物神经系统毛细血管的通透性研究。在本发明的一些实施方案中,HRP由于其降解各种芳族化合物的能力而用作酚类废水的可能的修复策略的一部分。参见Duan等人,ChemPhysChem,15(5),974-980(2014),该文献作为引用完整地并入本文。

[0073] 在其它实施方案中,过氧化物酶还可以通过功能进一步说明,例如木质素过氧化物酶,锰过氧化物酶或通用过氧化物酶。过氧化物酶也可以指定为真菌,微生物,动物或植物过氧化物酶。过氧化物酶也可以指定为I类,II类或III类过氧化物酶。过氧化物酶还可以指定为髓过氧化物酶(MPO),嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO),乳过氧化物酶(LP),甲状腺过氧化物酶(TPO),前列腺素H合酶(PGHS),谷胱甘肽过氧化物酶,卤代过氧化物酶,过氧化氢酶,细胞色素c过氧化物酶,辣根过氧化物酶,花生过氧化物酶,大豆过氧化物酶,芜菁过氧化物酶,烟草过氧化物酶,番茄过氧化物酶,大麦过氧化物酶或过氧蛋白(Peroxidasin)。在特定的实施方案中,过氧化物酶是辣根过氧化物酶。

[0074] 乳过氧化物酶/葡萄糖氧化酶(LP/GOX)抗微生物系统天然存在于体液中,例如乳,唾液,泪液和粘液(Bosch等人,J.Applied Microbiol.,89(2),215-24(2000))。该系统使用硫氰酸盐(SCN^-)和碘化物(I^-),这两种天然存在的化合物对哺乳动物和高等生物体无害(Welk等人,Archives of Oral Biology,2587(2011))。在过氧化氢(H_2O_2)存在下,LP分别催化硫氰酸盐和碘离子氧化成次硫氰酸盐($OSCN^-$)和次碘酸盐(OI^-)。该系统中的 H_2O_2 由GOX在氧气存在下对 β -D-葡萄糖的活性提供。这些自由基化合物进而氧化微生物细胞膜中的巯基(Purdy,Tenovuo等人,Infection and Immunity,39(3),1187(1983);Bosch等人,J.Applied Microbiol.,89(2),215-24(2000),导致膜渗透性受损(Wan,Wang等人,Biochemistry Journal,362,355-362(2001))和最终导致微生物细胞死亡。

[0075] 本发明的一些实施方案包括转移酶。“转移酶”是指将特定官能团从一个分子转移到另一个分子的一类酶。转移的基团的实例包括甲基和糖基。转移酶用于处理化学致癌物质和环境污染物等物质。此外，它们还用于对抗或中和人体内发现的有毒化学物质和代谢物。

[0076] 在一些优选的实施方案中，转移酶是转氨酶。转氨酶或氨基转移酶催化氨基酸和 α -酮酸之间的反应。它们在氨基酸的合成中是重要的。在转氨作用中，一个分子上的 NH_2 基团与来自另一个分子上的另一个基团（例如酮基）的 $=\text{O}$ 交换。

[0077] 在更优选的实施方案中，转氨酶是 ω -转氨酶（EC 2.6.1.18）。其中，它用于合成西格列汀（由Merck and Co.以**Januvia**[®]即一种抗糖尿病药物销售）。发现改造的 ω -转氨酶改善了生物催化活性，例如，改善25,000倍，导致西格列汀收率增加13%，且总工艺废物减少19%。

[0078] 由于它们对底物的高立体选择性和产物的立体特异性，所以 ω -转氨酶可用于制备非天然氨基酸和光学纯的手性胺或酮酸（Mathew&Yun, ACS Catalysis 2(6), 993-1001 (2012)）。 ω -转氨酶还可用于活性药物中间体的生物催化手性拆分，从而简化了常规化学方法内的工艺。（Schätzle等人, Anal. Chem. 81(19): 8244-48 (2009)。）前述内容通过引用整体并入。

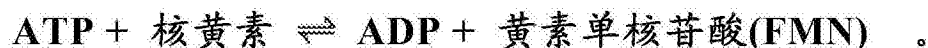
[0079] 在一些优选的实施方案中，转移酶是胸苷酸合成酶（例如EC 2.1.1.45）。这些酶用于制造糖核苷酸和寡糖。它们催化例如以下反应：



[0080] 在一些优选的实施方案中，转移酶是谷胱甘肽S-转移酶（例如EC 2.5.1.18）。这些酶将谷胱甘肽催化成其它三肽。它们在食品工业中用作氧化剂以及制药工业中用于制备抗衰老药物和皮肤制剂。

[0081] 在一些优选的实施方案中，转移酶是葡糖激酶（例如EC 2.7.1.2）。这些酶促进葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸。它们用于食品工业中以降低其生产流程中的葡萄糖浓度，并且如在制药工业中用于制造糖尿病药物。

[0082] 在一些优选的实施方案中，转移酶是核黄素激酶（例如EC 2.7.1.26）。在更优选的实施方案中，核黄素激酶用于在食品工业中产生黄素单核苷酸（FMN）。FMN是一种橙红色食品色素添加剂，并且是一种分解多余核黄素（维生素B₂）的试剂。核黄素激酶催化例如以下反应：



[0083] 本发明的一些实施方案包含烯还原酶（EREDS）。这些酶以NAD(P)H依赖性方式催化烯烃还原。烯还原酶的实例包括含有FMN的旧黄色酶（OYE）氧化还原酶家族（EC 1.6.99），梭菌二烯酸还原酶（EnoRs, C 1.3.1.31），黄素独立性中间链脱氢酶/还原酶（MDR; EC 1.3.1），短链脱氢酶/还原酶（SDR; EC 1.1.1.207-8），白三烯B₄脱氢酶（LTD），醌（QOR），孕酮5 β -还原酶，大鼠长叶薄荷酮还原酶（PGR），烟草双键还原酶（NtDBR），氰基细菌（Cyanobacterial）OYE，来自干酪乳杆菌（Lactobacillus casei）的LacER，来自无色杆菌属（Achromobacter sp.）JA81的Achr-OYE4和酵母OYE。

[0084] 本发明的一些实施方案包含亚胺还原酶（IREDS）。亚胺还原酶（IRED）催化光学纯

的仲环胺的合成。它们可以将酮或醛底物和伯或仲胺底物转化成仲胺或叔胺产物化合物。示例性 IRED 是来自类芽孢杆菌 (*Paenibacillus elgii*) B69、番薯链霉菌 (*Streptomyces ipomoeae*) 91-03、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) KT2440 和伍氏醋酸杆菌 (*Acetobacterium woodii*) 的那些。IRED 在国际公开号 W02013170050 中有详细讨论,其全部内容通过引用并入本文。

[0085] 在本发明的一些实施方案中,所述酶是裂解酶。它们催化消除反应,其中通过除水解或氧化之外的过程从底物除去一组原子。通常会生成新的双键或环结构。存在七种亚类的裂解酶。在优选的实施方案中,果胶裂解酶用于将高度酯化的果胶(例如在果实中)降解成小分子。本发明的其它优选实施方案包括氧脞酶(也称为扁桃酸酐酶或脂族(R)-羟基脞裂解酶)。它们将扁桃脞裂解成氰化氢+苯甲醛。

[0086] 在一个优选的实施方案中,裂解酶是羟基脞裂解酶(例如 EC 4.1.2,杏仁裂解酶的突变体)。羟基脞裂解酶催化脞的形成,脞可用作广泛的化学和酶促反应的通用构件。它们用于在较低 pH 下提高酶通量和稳定性,并用于生产氯吡格雷(**Plavix[®]**)。反应过程描述于 Glieder 等人, *Chem. Int. Ed.* 42:4815 (2003) 中,其全部内容通过引用并入本文。

[0087] 在另一个优选的实施方案中,裂解酶是 2-脱氧-D-核糖磷酸醛缩酶 (DERA, EC 4.1.2.4)。它用于形成他汀类药物侧链,例如,在立普妥生产中。

[0088] 在另一个优选的实施方案中,裂解酶是 (R)-扁桃脞裂解酶 (HNL, EC 4.1.2.10)。它用于合成苏型-3-芳基-2,3-二羟基丙酸,即一种用于生产地尔硫卓的前体脞。地尔硫卓是一种治疗高血压和胸痛(心绞痛)的心脏药物。降血压可降低中风和心脏病发作的风险。它是钙通道阻滞剂。地尔硫卓及其生产描述于 ACS Catal. 1:1121-49 (2011) 和 Aehle W. 2008. *Enzymes in Industry*, Wiley-VCH Verlag, GmbH Weinheim 中,两者均通过引用整体并入本文。

[0089] 在另一个优选的实施方案中,裂解酶是脞水合酶 (EC 4.2.1)。它在商业上用于将 3-氰基吡啶转化为烟酰胺(维生素 B3, 尼克酰胺)。它还用于制备左乙拉西坦,这是 **Keppra[®]** 中的活性药物成分。

[0090] 在另一个优选的实施方案中,裂解酶是苯基磷酸酯羧化酶。它们例如用于在室温和低于大气压的 CO₂ 压力下使苯酚磷酸化。这些酶催化苯酚和 CO₂ 合成 4-OH 苯甲酸,选择性为 100%。4-OH 苯甲酸用于制备其酯。在更优选的实施方案中,所述酶用于生产对羟基苯甲酸酯,其用作化妆品和眼用溶液中的防腐剂。

[0091] 在本发明的一些实施方案中,酶是碳酸酐酶(例如 EC 4.2.1.1)。碳酸酐酶是存在于每种生物体中的普遍存在的金属酶。它们是已知的最有效的酶,并且具有多种生理作用,包括 CO₂ 交换、pH 调节和 HCO₃⁻ 分泌。碳酸酐酶在二氧化碳隔离和方解石生产方面也具有潜在的工业化应用。参见 Lindskog & Silverman, (2000), *The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases* EXS 90:175-195 (W.R. Chegwidden 等人, eds. 2000); In *The Carbonic Anhydrases: New Horizons* 7th Edition pp.175-95 (W.R. Chegwidden 等人, eds. 2000); McCall 等人, *J. Nutrition* 130:1455-1458 (2000); Boone 等人, *Int'l J. Chem. Engineering* Volume 2013:22-27 (2013)。上述文献作为引用整体并入。

[0092] 在本发明的一些实施方案中,所述酶是异构酶。异构酶催化分子异构化,即将一种

异构体转化为另一种异构体的反应。它们可以促进分子内的重排,其中键被破坏和形成,或者它们可以催化构象变化。异构酶在本领域中是众所周知的。

[0093] 在优选的实施方案中,异构酶用于制糖。在更优选的实施方案中,异构酶是葡萄糖异构酶EC 5.3.1.18。在其它实施方案中,葡萄糖异构酶由米苏里游动放线菌(*Actinoplanes missouriensis*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)或链霉菌属(*Streptomyces*)物种产生。葡萄糖异构酶将D-木糖和D-葡萄糖转化为D-木酮糖和D-果糖,这是高果糖玉米糖浆和生物燃料部门生产中的重要反应。

[0094] 在另一个优选的实施方案中,异构酶是马来酸盐顺-反异构酶(EC 5.2.1.1)。它催化马来酸转化为富马酸。富马酸对于生物催化生产L-天冬氨酸,L-苹果酸,聚酯树脂,食品和饮料添加剂以及染料的媒染剂是重要的。

[0095] 在另一个优选的实施方案中,异构酶是亚油酸顺-反异构酶(EC 5.2.1.5)。它催化共轭亚油酸(CLA)的异构化。据报告,CLA在治疗肥胖症,糖尿病,癌症,炎症和动脉粥样硬化方面具有许多潜在的健康益处。CLA的不同异构体可以发挥不同的生理作用。因此,该酶用于制备单一异构体。

[0096] 在本发明的另一个优选实施方案中,异构酶是磷酸三糖异构酶(EC 5.3.1.1)。它催化D-甘油醛-3-磷酸和磷酸二羟丙酮的相互转化。与转酮酶或醛缩酶组合,磷酸丙糖异构酶用于各种糖或糖类似物的立体选择性多聚酶合成。优选的实施方案是D-木酮糖-5-磷酸的单罐法酶制备。该合成开始于D-果糖1,6-二磷酸醛缩酶(EC 4.1.2.13)对1,6-二磷酸果糖的反醛醇裂解。以下外消旋化、磷酸丙糖异构酶促进产生两当量的D-甘油醛3-磷酸酯,其通过转酮酶转化为5-磷酸木酮糖(EC 2.2.1.1)。

[0097] 在本发明的其它实施方案中,所述酶是连接酶。这些酶催化将两个分子连接在一起的共价键的形成,与核苷-三磷酸的水解相结合。连接酶在本领域中是众所周知的,并且通常用于重组核酸应用。在优选的实施方案中,DNA连接酶是EC 6.5.1.1。

[0098] 在一个优选的实施方案中,连接酶是乙酰辅酶A羧化酶(EC 6.4.1.2,ACC)。ACC在脂质合成和氧化途径的连接处起作用。它与本文公开的发明一起用于临床目的,例如抗生素的生产,糖尿病疗法,肥胖和代谢综合征的其它表现。

[0099] 在另一个优选的实施方案中,连接酶是丙酰辅酶A羧化酶(PCC,EC 6.4.1.3)。它催化丙酰辅酶A的生物素依赖性羧化以在线粒体基质中产生D-甲基丙二酰辅酶A。甲基丙二酰辅酶A是许多有机化合物生物合成的重要中间体,也是碳同化过程中的重要中间体。

[0100] 在一些实施方案中,本文所述的方法使用表达本发明中使用的酶的重组细胞。重组DNA技术是本领域已知的。在一些实施方案中,用表达载体转化细胞,例如表达酶的质粒。在其它实施方案中,载体具有一种或多种遗传信号,例如用于转录起始,转录终止,翻译起始和翻译终止。在此,可以将编码酶的核酸克隆到载体中,使得它们在适当转化到适合的宿主生物中时表达。适合的宿主细胞可以源自细菌,真菌,植物或动物,如本领域众所周知的。

[0101] 尽管BNC(1级)提供了大量的酶固定能力,但它们有时过小而不易被标准强度的磁体捕获。因此,亚微米级磁性材料(2级)用于提供体积磁化(bulk magnetization)和增加稳定性至1级。市售的游离磁铁矿粉末(其具有的粒度范围为50-500nm)具有高度亲水性并且易于粘附于塑料和金属表面,其随着时间的推移会降低给定反应器系统中酶的有效量。此外,粉状磁铁矿非常致密,从而增加了运输成本。它也相当昂贵—特别是在粒径小于100nm

的情况下。为了克服这些限制,已经开发出由磁铁矿,非水溶性交联聚合物如聚(乙烯醇)(PVA)和羧甲基纤维素(CMC)组成的低密度杂化材料。这些材料通过冷冻浇铸和冷冻干燥水溶性聚合物然后交联而形成。这些材料降低了对外表面的附着力,需要较少的磁铁矿,并且实现了至少与纯磁铁矿粉末相当的1级捕获。

[0102] 在一个实施方案中,连续大孔支架具有交联的聚合物组合物。聚合物组合物可以是本领域已知的任何固体有机、无机或杂化有机-无机聚合物组合物,并且可以是合成的或用作粘合剂的生物聚合物。优选地,聚合物大孔支架在水或其它预期使用分级催化剂的介质中不溶解或降解。合成有机聚合物的一些实例包括乙烯基加成聚合物(例如,聚乙烯,聚丙烯,聚苯乙烯,聚丙烯酸或聚丙烯酸盐,聚甲基丙烯酸或聚甲基丙烯酸酯,聚(甲基丙烯酸甲酯),聚乙酸乙烯酯,聚乙烯醇等),含氟聚合物(例如,聚氟乙烯,聚偏二氟乙烯,聚四氟乙烯等),环氧化物(例如酚醛树脂,间苯二酚-甲醛树脂),聚酰胺,聚氨酯,聚酯,聚酰亚胺,聚苯并咪唑及其共聚物。生物聚合物的一些实例包括多糖(例如,纤维素,半纤维素,木聚糖,壳聚糖,菊粉,葡聚糖,琼脂糖和藻酸),聚乳酸和聚乙醇酸。在纤维素的特定情况下,纤维素可以是微生物-或藻类-衍生的纤维素。无机或杂化有机-无机聚合物的一些实例包括聚硅氧烷(例如,通过溶胶凝胶合成制备,例如聚二甲基硅氧烷)和聚磷腈。在一些实施方案中,上文提供的任何一种或多种类别或特定类型的聚合物组合物被排除为大孔支架。

实施例1-大孔聚合物杂化支架粉末的制备

[0103] 为了制备前体溶液,首先制备聚合物的储备溶液。将聚(乙烯醇)(PVA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), MW=89,000-98,000, 99%水解的)于70°C下溶解在Milli-Q水中至10%w/w的储备浓度。将HEC(Sigma-Aldrich), MW=250,000)、CMC(通用低粘度, Sigma)和EHEC(EHM 300, Bermocoll)各自在Milli-Q水中溶解至2%w/v的储备浓度。接下来,称出具有两种不同的粒度分布(“细”(F), 50-100nm和“中”(M), 100-500nm)的1.56-3.00g磁铁矿粉末(Sigma-Aldrich), 并且放置。每种试剂的用量根据所需的磁铁矿与聚合物的比例以及冷冻干燥后所需的干燥固体浓度而变化。加入过量的水以降低粘度并增加冷冻浇铸过程中冰生长和孔形成的程度。

[0104] 当溶液准备冷冻浇铸时,将磁铁矿与固体粉末柠檬酸(用于未来的PVA交联步骤)一起加入聚合物溶液中,至终浓度为250mM。立即以35%振幅(1/8”尖端)对混合物进行声处理3分钟。声处理后,将溶液直接在液氮浴中冷冻,然后在-10°C和0.01托下冷冻干燥过夜或直至干燥。为了引发PVA交联,将形成的干燥整料置于130°C的烘箱中60-120分钟。最后,用60°C的水洗涤整料,以除去过量的交联剂,并在Waring商业混合器中研磨30-60秒。

[0105] 在该实施例中,将支架浇铸成管状整料的形状。“M0”指两种整料前体溶液。紧跟M0后的第一组数字表示制剂编号。因此,上述优化的整料是第32种整料制剂的变体。连字符后面的第二组数字表示稀释。未稀释的整料(例如M032)缺少该数值,并且相当于溶解特定固定质量的磁铁矿、PVA和CMC的总体积20mL,如上文所计算的。M032-30表示相同的固体质量,但溶解在30mL的总体积中,M032-40表示稀释至40mL等。前体溶液粘度在A&D Company Vibro Viscometer SV-10(Toshima-ku, Tokyo, Japan)上在室温测定。“Hi μ ”表示用高粘度(~2000至3800cP)CMC制成的整料。此处缺少标签表示使用低粘度(<50cP)CMC制成的整料。

[0106] M032(1.875g磁铁矿粉末(50-100nm)、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素[CMC]和13.75mL水,与0.96g柠檬酸交联)-总体积~20mL。前体溶液在室

温的粘度为3.85cP。

[0107] M032-30 (1.875g 磁铁矿粉末 (50-100nm)、3.125mL 10% 聚(乙烯醇)、3.125mL 2% 低粘度羧甲基纤维素[CMC]和23.75mL水,与0.96g 柠檬酸交联)-总体积~30mL。前体溶液在室温的粘度为2.33cP。

[0108] M032-40-hiμ (1.875g 磁铁矿粉末 (50-100nm)、3.125mL 10% 聚(乙烯醇)、3.125mL 2% 高粘度羧甲基纤维素[CMC] (来自Ashland的Aqualon 7H3SXFPH) 和33.75mL水,与0.96g 柠檬酸交联)-总体积~40mL。前体溶液在室温的粘度为3.65cP。

[0109] M032-50-hiμ (1.875g 磁铁矿粉末 (50-100nm)、3.125mL 10% 聚(乙烯醇)、3.125mL 2% 高粘度羧甲基纤维素[CMC], 来自Ashland的Aqualon 7H3SXFPH) 和43.75mL水,与交联 0.96g 柠檬酸)-总体积~50mL。前体溶液的粘度为3.59cP在室温。磁铁矿的质量和细度表明每种制剂中使用的Sigma供应的磁铁矿的特征。用于交联PVA的柠檬酸的质量相当于如前所述的250mM当量浓度,并且基于通过下式使用的PVA的质量计算(等式1):

$$m_{CA} = (m_{PVA}/0.3125) (0.02 c_{CA} M_{CA}) \quad (1)$$

其中

m_{CA} 是以克计的所需柠檬酸质量;

m_{PVA} 是以克计的PVA在溶液中的总质量;

c_{CA} 是以mol/L计的目标柠檬酸浓度(此处我们使用0.25M);

M_{CA} 是柠檬酸的分子量192.2克/mol。

[0110] 磁铁矿和柠檬酸的体积与样品总体积相比可以忽略不计,并且在计算中忽略。

[0111] 低柠檬酸与聚合物之比(低于1:1)和固化期限(小于1小时)导致差的交联。差交联材料部分地溶于水且失去其孔和表面结构。

[0112] 通过平行冷冻六个50mL管,将四种制剂成功地按比例放大至300mL溶液。由于给定所需的整料 m_T 的目标总干质量,所以通过应用以下公式可以容易地扩大溶液的生产:

$$\text{磁铁矿 } m_{Fe_3O_4} = 5m_T/6 \quad (2)$$

$$\text{PVA } m_{PVA} = 5m_T/36 = c_{PVA,s} V_{PVA,s} \quad (3)$$

$$\text{CMC } m_{CMC} = m_T/36 = c_{CMC,s} V_{CMC,s} \quad (4)$$

$$\text{水(如果使用干储备聚合物)} V_W = f m_T / 2.25 \quad (5)$$

$$\text{水(如果使用储备聚合物水溶液)} V_W^t = \frac{f m_T}{2.25} - V_{PVA,s} - V_{CMC,s} \quad (6)$$

其中:

表1

m_T 是以克计的目标生产质量;

$m_{Fe_3O_4}$ 是以克计的所需磁铁矿质量;

m_{PVA} 是以克计的 PVA 总质量;

m_{CMC} 是以克计的 PVA 在溶液中的总质量;

$c_{PVA,s}$ 是以克/mL 计的 PVA 储备浓度;

$c_{CMC,s}$ 是以克/mL 计的 CMC 储备浓度;

$VPVA,s$ 是以 mL 计的所需 PVA 储备溶液的体积;

$V_{CMC,s}$ 是以 mL 计的所需 CMC 储备溶液的体积;

VW 是以 mL 计的所需水的总体积, 条件是干燥的聚合物粉末用于制备前体溶液;

VW' 是所需水的额外体积, 条件是储备溶液在 $c_{PVA,s}$ 浓度下, 和使用 c_{CMC} ; 且

f 是稀释因子(对于未稀释的 $f=20$, 对于 MO32-30 为 30, 对于 MO32-40 为 40 等)

[0113] 完整的整料是大孔的。MO32-30 具有 68.07% 的孔隙率, 且 MO32-50 的孔隙率为 67.7%, 孔径分别为 449 和 3.85 μ m。骨架密度分别为 0.86 和 0.71g/ml, 如通过水银孔隙率测定法 (Micromeritics, Norcross, GA, USA) 测定的。

[0114] 在冰模板化之前, 使用更高水含量、更粘稠的聚合物来维持颗粒状磁铁矿的良好悬浮。通过使用具有较低取代度的水溶性聚合物调节粘度, 同时保持固体总量恒定。当聚合物的取代度较低时, 溶液更粘稠。

[0115] 整料材料主要是具有亚微米大孔的大孔 (图 2), 但没有中孔。研磨后, 由于大孔的损失, 大孔隙率降低。在研磨期间总表面积是保守的, 因为大孔的内表面变成由破碎的孔隙晶格产生的颗粒的外表面。通过研磨和筛分的强度控制粒度。来自整料 M32 的未筛分的粉末具有 2.67m²/g 的测量表面积 (Langmuir 表面积)。来自整料 M32-30 的未筛分的粉末具有 2.8m²/g 的测量表面积 (Langmuir 表面积)。

[0116] 对于 50% 的 BNC 载量到 MO32 粉末上, 由于 BNC 的中孔结构, 计算的孔隙率从 2.8m²/g 增加到 75m²/g。

[0117] 可以通过调节系统中的水量、可交联聚合物的量和前体溶液的粘度来调节研磨材料的总孔隙率和堆积密度。这些参数控制冰晶的形成。

[0118] 为了确定材料的磁化率, 首先使用 Quantum Design (San Diego, CA, USA) 物理性质测量系统 (PPMS) 单元在不同的磁场强度 (H) 下测量磁矩 (μ) (即, 进行磁滞回线实验)。为了比较, 还测量了纯 50-100nm 磁铁矿粉末的磁性。然后将这些磁矩标准化为总样品质量 m 。确定 μ 与 H 之间的关系非常接近线性 ($R^2 > 0.985$), 磁场强度在 -500 至 5000e 之间 (-39,790A/m 至 39,790A/m)。基于该高度线性域中的磁滞曲线的斜率计算质量磁化率 $x(m)$, 即 $x(m) = \mu / (m \cdot H)$ 。

[0119] 分别将纯50-100nm磁铁矿粉末和粉末支架M032、M032-30、M032-40和M032-50-hip的质量磁化率计算为 $9.23 \cdot 10^{-4}$ 、 $6.34 \cdot 10^{-4}$ 、 $5.63 \cdot 10^{-4}$ 、 $6.14 \cdot 10^{-4}$ 和 $6.16 \cdot 10^{-4} \text{m}^3/\text{kg}$ 。这与磁铁矿和其它类似磁性矿物的典型报告值一致。此外,因为聚合物具有可忽略的磁响应,所以所报告的杂化材料磁化率值与支架中剩余的磁铁矿的近似质量分数非常一致(典型地为40-90质量%)。

[0120] 图1显示用于生产整体材料和研磨粉末的方框图形式的示例性生产方法。如本文所公开的,该方法可包括更大范围的条件和材料。

[0121] 图2-4显示了在各种条件下生产的整体材料的扫描电子显微照片(SEM)图像。所描绘的所有整料都是冷冻浇铸、冷冻干燥并在高温下交联。随着冰晶在冷冻浇铸过程中生长,它们产生层状通道结构,形成由混合聚合物(SEM图像中的光滑表面)和磁铁矿(SEM图像中的小立方晶体)组成的排除材料(excluded materials)的薄壁。这种生长也产生了1-50 μm 范围内的大孔。尽管不希望受理论束缚,但在前体溶液中使用的较高稀释度和前体溶液的粘度越低,将形成的孔越大。

[0122] 图2A显示磁性支架M032(1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和13.75mL过量水)的扫描电子显微照片(SEM)图像。

[0123] 图2B显示磁性支架M032-50-hip(1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%高粘度羧甲基纤维素(CMC)和43.75mL过量水)的SEM图像。比较图2A和2B显示表观孔径随前体溶液中的稀释度增加(更多水)而增加。

[0124] 图3A显示磁性支架包含83%磁铁矿干固体质量的M032(1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和13.75mL过量水)的扫描电子显微照片(SEM)图像。

[0125] 当在冷冻浇铸期间发生聚合物和磁铁矿之间的最小相分离时,发生最佳的整料生产。当研磨成粉末时,多孔层状网络在热处理、研磨和分散在水中后保留。图3B显示失效磁性支架M048(0.90g磁铁矿、11mL 10%聚(乙烯醇)、3.71mL 6%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和23.2mL过量水)的SEM图像,其仅含有40%的干燥固体物质的磁铁矿。两种试验的聚(乙烯醇)与CMC的质量比相同。在将支架加热至130 $^{\circ}\text{C}$ 交联1小时后取2个图像。注意含有83%磁铁矿(3(a))的整料如何在热处理后保持冰模板化通道结构和孔网络,而40%磁铁矿整料(3(b))熔化并且孔融合。由于在100 $^{\circ}\text{C}$ 以上的温度下聚合物的相变和相分离,磁铁矿含量的减少导致在交联步骤期间孔结构的完全损失。由于整料在固化过程中显著收缩,因此在宏观水平上也观察到孔隙率的损失。相反,在较高浓度的磁铁矿中,排列的颗粒充当支架,当聚合物与柠檬酸交联时聚合物在该支架上熔化。在这种情况下,材料的大孔和整体结构得以保留。这表明,需要最小比例的磁铁矿作为内部骨架,聚合物可在其上正确交联并形成大量的、分布均匀的网状结构。

[0126] 图4A显示含有83%磁铁矿干固体物质的磁性支架M032-40(1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和33.75mL过量水)的SEM图像,在施加约2G的垂直于液氮浴的均匀磁场的同时冷冻。

[0127] 图4B显示含有83%磁铁矿干固体物质的磁性支架M032-40(1.875g磁铁矿、3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和33.75mL过量水)的SEM图像,在施加约2G的平行于液氮浴的均匀磁场的同时冷冻。有关样品位置,请参阅每张

图左侧的示意性圆柱体。

[0128] 可以通过向冷冻容器施加外部磁场B(平行或垂直)来控制通道形成和磁铁矿排列的方向。磁铁矿颗粒的初始取向和排列可以在整料冻结期间约束冰晶成核和定向生长。宏观观察显示了层状材料的整料组织中的差异。在冷冻时外部磁场的平行取向导致材料非常脆并且垂直剥离。冷冻时外部磁场的垂直取向导致材料更坚固并且水平剥离。外部磁场可用于在材料中引入优先的裂开计划。

[0129] 所得的交联的材料在溶液中稳定,并且具有与磁铁矿粉末不同的表面性质。图5显示了与普通磁铁矿粉末相比,支架的表面结垢可能性降低。图片显示两个管。左边的管含有1mL纯磁铁矿粉末(50-100nm),为2.5mg/mL水溶液。右边的管含有1mL的研磨磁性支架M032,也是2.5mg/mL水溶液。在中心是一个钕磁体,其吸引溶液中的磁性材料,而不是粘附在管壁上的磁性材料。两个管在2个月内都是间歇性但同样地搅拌。左边的管显示出显著的捕获。右边的管显示实际上无捕获。

[0130] 由于非特异性表面吸附,所以可以通过液体转移容易地移液或处理最细的整料粉末(大小<100 μ m)而不损失材料或固定化酶。支架的磁化率取决于包埋的磁铁矿的数量、质量和密度。

实施例2-磁性支架在生物催化中的用途

[0131] 来自研磨的整体材料的粉末用于固定BNC,并与常规的磁铁矿粉末比较固定的酶活性。表2总结了固定在BNC中的酶、它们的固定化效率和有效载量百分比。

[0132] 将BMC酶载体(在粉末上模板化的BNC)的总表面积对于50%载量的BNC模板化到50%的粉末上估计为约80m²/克材料,其中95%的表面积来自BNC且5%来自支架材料。BNC固定在整料粉末上越多,则表面积和中孔体积越大。

表2

酶	BMC 支架	固定化效率	有效载量(%)
腓水解酶	磁铁矿粉末(50-100nm)	95%	9.5
	MO32-40	>99%	10
ω -转氨酶	磁铁矿粉末(50-100nm)	62%	6.2
	MO32-40	>99%	10
碳酸酐酶	磁铁矿粉末(50-100nm)	95%	9.5
	MO32-40	95%	9.5
辣根过氧化物酶	磁铁矿粉末(50-100nm)	>99%	3.0
	MO32-40	>99%	3.0

[0133] 将固定化效率定义为固定化酶的质量与固定化前酶的总初始质量之比。将有效载量定义为固定前酶的总初始质量与所用磁性支架的总质量之比乘以固定化效率。将固定化效率在等式7中定义:

$$\text{固定化效率} = \eta_I = \frac{m_{IE}}{m_E} \quad (7)$$

[0134] 将有效载量定义在等式8中:

$$\text{有效载量} = L_E = \frac{\text{实际固定化的酶质量}}{\text{磁性支持物的总质量}} = \frac{\eta_I m_E}{m_{MP}} = \frac{m_{IE}}{m_{MP}} \quad (8)$$

[0135] 在本文中,也可以使用术语载量(无修饰语)或标称载量。这些术语不同于有效载量,并且将其定义在等式9中:

$$\text{(标称)载量} = L_E' = \frac{\text{推定100\%捕获率固定化的酶质量}}{\text{磁性支持物的总质量}} = \frac{m_E}{m_{MP}} = \frac{L_E}{\eta_I} \quad (9)$$

其中:

- m_{IE} 是成功固定化的酶质量;
- m_E 是初始存在的游离酶的总质量;
- m_{MP} 是使用的所有磁性支持物的总质量—这包括磁铁矿纳米颗粒的质量和次级支架的质量(如果适用);
- η_I 是在完成蛋白质定量后测定的固定化效率;
- L_E 是有效酶质量载量;且
- L_E' 是标称酶质量载量。

固定化脲水解酶

[0136] 在20%载量($L_E' = 0.2$)下合成含有脲水解酶(14个相同的亚单元,每个具有MW=41kDa, pI=8.1)和磁铁矿纳米颗粒的BNC,然后模板化为磁性大孔聚合物杂化支架或纯磁铁矿粉末,形成具有10%总有效载量的BMC($L_E = 0.1$)。优化的固定化条件导致相对于用于合成烟酸的游离酶保留95%的活性。

[0137] 材料和试剂.在大肠杆菌(*E. coli*)中表达的重组脲水解酶(Sigma-Aldrich目录号04529,批号BCBL7680V)、3-氰基吡啶(3-cyanopyridine)、邻苯二甲醛、2-巯基乙醇、BICINE-KOH和乙醇购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)。盐酸、氯化铵和氢氧化钾来自Macron Fine Chemicals(Center Valley,PA,USA),在康奈尔大学化学库房(Ithaca,NY,USA)采购。Quick Start™ Bradford Protein Assay购自Bio-Rad(Hercules,CA,USA)。如上所述,磁铁矿纳米颗粒以及磁性大孔聚合物杂化支架在ZYMtronix Catalytic Systems(Ithaca,NY,USA)中在室内合成。在用Barnstead™ Nanopure™纯化的18.2MΩ-cm水中制备储备溶液。使用应用Gen5™软件操作的Biotek® Synergy™ H1平板读数器,在Corning Costar® 3925黑底荧光微量培养板中测量荧光强度。

[0138] 方法.将冻干的脲水解酶溶解在水中。在100%乙醇中制备邻苯二甲醛(OPA)储备溶液(75mM)并保持在冰上或在4℃下储存。还在使用之前立即在100%乙醇中制备2-巯基乙醇(2-ME)储备溶液(72mM)。通过将450mL上述溶液加入9.1mL 200mM pH 9.0 BICINE-KOH缓冲液中来制备缓冲的OPA/2-ME试剂。将缓冲的试剂保持在冰上直至使用前,此时使其平衡至室温(21℃)。

[0139] BNC中脲水解酶固定化:通过利用水中的纳米颗粒悬浮液和游离酶溶液合成脲水解酶BNC,其pH值用100mM HCl和NaOH调节。将游离脲水解酶原液稀释至250μg/mL并调节至

pH 6.使用Fisher Scientific FB-505Sonic Dismembrator在40%功率设置下用1/4"探头声处理5mL 1250 μ g/mL NP悬浮液1min。将分散良好的NP悬浮液调节至pH 3。用等体积的酶溶液和NP悬浮液(各500 μ L)制备20%标称载量BNC混合物,在2mL微量离心管中合并并通过倒置混合。将BNC混合物在旋转器上适度搅拌10min。

脲水解酶BNC在BMC支架上的模板化:将25 μ L 50mg/mL充分混合的BMC支架悬浮液(磁性大孔聚合物杂化物或简单磁铁矿粉末)加入到1mL BNC溶液中,然后在旋转器上适度搅拌1小时,以形成10%标称载量BMC。

[0140] 脲水解酶反应和活性测定.脲水解酶(NIT)反应和活性测定方法均基于Banerjee, Biotechnol. Appl. Biochem. 37 (3) : 289-293 (2003),其全部内容通过引用并入本文。简言之,脲水解酶通过释放氨催化3-氰基吡啶水解成烟酸。通过荧光测定法测定酶活性,通过形成异吲哚荧光染料来检测氨。脲水解酶反应在50 $^{\circ}$ C下在2mL微量离心管中进行23h,使用总反应体积为1mL,其含有50mM 3-氰基吡啶、87.5mM BICINE-KOH, pH 9.0和218nM游离或固定化脲水解酶(NIT)。通过将13.35 μ L 100mM HCl加入到等体积的脲水解酶反应混合物中终止反应。固定化的NIT磁性沉淀;在沉淀后,其上清液也用HCl处理。通过定量在脲水解酶反应中形成的氨来确定活性。将缓冲试剂(624 μ L)加入到上清液中并在室温下温和混合20分钟。温育后,向该溶液中加入150 μ L 100mM HCl以增加荧光信号。使用412nm激发、467nm发射测量荧光强度,相对于具有最高强度的孔自动调节增益。每个荧光读数包括在内部线性NH₄Cl标准曲线中($R^2 > 0.99$)。将脲水解酶活性的单位(U)定义为在50 $^{\circ}$ C下在87.5mM BICINE-KOH (pH 9.0)中每分钟释放1 μ mol NH₃。

[0141] 蛋白质定量.将BMC磁性地沉淀,并使用Bradford, Anal. Biochem., 72 (1-2) : 248-254 (1976)中的方法,包括线性NIT标准曲线($R^2 > 0.99$),测定上清液中的蛋白质含量。该方法量化了未固定化酶的量,其允许确定固定化效率和有效载量。

[0142] 结果.对照显示没有未催化的氨释放。脲水解酶BNC模板化在磁性大孔聚合物杂化支架上,其中对于10%的BMC有效载量存在>99%的固定化效率。这与在简单的磁铁矿粉末(50-100nm)上模板化的脲水解酶BNC相差无几。BMC支架具有95%的固定化效率和9.5%的有效载量(表2)。相对于游离脲水解酶,脲水解酶杂化支架和磁铁矿粉末BMC的活性也大部分保留(>95%) (图6A)。

固定化 ω -转氨酶

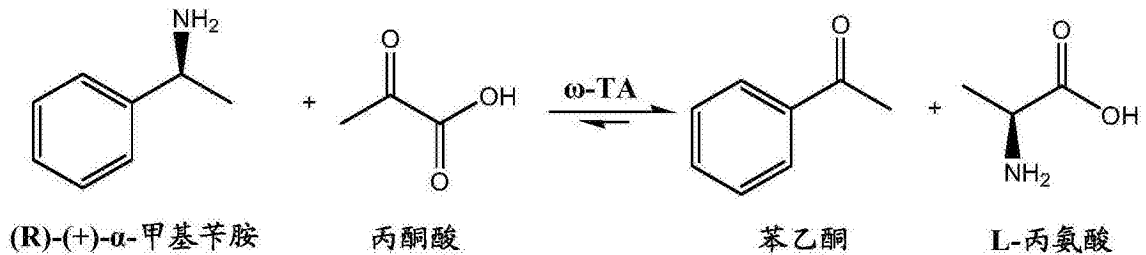
[0143] 合成具有20%载量($L_E' = 0.2$)的含有 ω -转氨酶(MW=195kDa)和磁铁矿纳米颗粒的BNC,然后模板化为磁性大孔聚合物杂化支架或纯磁铁矿粉末,形成具有10%总有效载量的BMC($L_E = 0.1$)。优化的固定化条件导致相对于用于由(R)-(+)- α -甲基苄基胺合成苯乙酮的游离酶保留95%的活性。

[0144] 材料和试剂.来自在大肠杆菌(E. coli)中表达的Mycobacterium vanbaaleni的重组 ω -转氨酶(ω TA)、(R)-(+)- α -甲基苄基胺(MBA)、丙酮酸钠和苯乙酮(AP)来自Sigma (St. Louis, MO, USA)。二甲亚砜(DMSO)购自Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)。盐酸、氢氧化钠和磷酸缓冲盐来自Macron Fine Chemicals (Center Valley, PA, USA)。磁铁矿纳米颗粒和磁性大孔聚合酶杂化支架如上所述合成。Quick StartTM Bradford Protein Assay购自Bio-Rad (Hercules, CA, USA)。用通过BarnsteadTM NanopureTM纯化的18.2M Ω -cm水制备储备溶液。使用应用Gen5TM软件操作的Biotek EpochTM平板读数器,在CostarTM

3635UV-透明微量培养板中一式三份测量荧光强度。

[0145] 方法. 将冻干的 ω TA 溶解在水中。(R) - (+) - α - 甲基苄胺 (MBA) 储备溶液通过将 12.78 μ L MBA 溶解在 100 μ L DMSO 中, 然后用水将总体积加至 10 mL, 最终浓度为 10 mM 来制备。通过将丙酮酸钠粉末溶解在水中制备 45 mM 的丙酮酸钠原液。通过将 12 μ L AP 溶解在水中来制备苯乙酮储备溶液。所有储备溶液都保存在冰上。在测定中恰在使用前制备稀释液, 并且允许使其平衡至室温 (21 $^{\circ}$ C)。

[0146] ω - 转氨酶活性测定. ω TA 活性测定方法基于 Schätzle (2009) 描述的适用于微量培养板的方法。简言之, ω TA 催化氨基从 MBA (胺供体) 转移至丙酮酸, 分别形成 AP 和丙氨酸:



[0147] 由于 AP 的形成, 通过 245 nm 处吸光度的增加来测量酶活性。 ω TA 反应在 21 $^{\circ}$ C 下在 2 mL 微量离心管中进行 1 h, 使用总反应体积为 1 mL, 其含有 50 mM pH 8.0 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、0.1 mM MBA、1 mM 丙酮酸盐和 349 nM ω - 转氨酶。将固定化的 ω TA 磁性沉淀并读取其上清液的吸光度。使用含有 0-0.1 mM AP 和 0-0.1 mM 丙氨酸的线性标准曲线定量 AP ($R^2 > 0.99$)。将一个单位 (U) 的 ω - 转氨酶活性定义为在 21 $^{\circ}$ C 下在 50 mM PBS (pH 8.0) 中每分钟形成 1 μ mol AP。

[0148] BNC 中 ω - 转氨酶固定化: 使用水中的纳米颗粒悬浮液和游离酶溶液合成 ω TA BNC, 其 pH 值用 100 mM HCl 和 NaOH 调节。将游离 ω TA 稀释至 250 μ g/mL 并调节至 pH 7.15。使用 Fisher Scientific FB-505 Sonic Dismembrator 在 40% 功率设置下用 1/4" 探头声处理 5 mL 1250 μ g/mL NP 悬浮液 1 分钟。将分散良好的 NP 悬浮液调节至 pH 3。20% 标称载量 BNC 混合物用等体积的酶溶液和 NP 悬浮液 (各 500 μ L) 混合, 在 2 mL 微量离心管中混合并通过倒置混合。将 BNC 混合物在旋转器上适度搅拌 10 min。

[0149] BMC 支架上 ω - 转氨酶 BNC 模板化: 将 25 μ L 50 mg/mL 充分混合的 BMC 支架悬浮液 (磁性大孔聚合物杂化物或简单磁铁矿粉末) 加入到 1 mL BNC 溶液中, 然后在旋转器上适度搅拌 1 h 以形成 10% 标称负载 BMC。

[0150] 蛋白质定量. 将 BMC 磁性沉淀, 并使用 Bradford 方法测定上清液中的蛋白质含量, 包括线性 ω TA 标准曲线 ($R^2 > 0.99$)。该方法量化了未固定化酶的量, 其允许确定固定化效率和有效载量。

[0151] 对照显示没有未催化的苯乙酮形成。 ω - 转氨酶 BNC 在磁性大孔聚合物杂化支架上模板化, 对于 10% 的 BMC 有效载量具有 >99% 的固定化效率。磁性大孔支架的固定化效率远优于简单磁铁矿粉末 (50-100 nm) BMC 支架的等效质量 (>99% 与 62% ω TA 固定化效率和 10% 与 6.2% 有效载量)。参见表 2 相对于游离 ω - 转氨酶, ω - 转氨酶磁性大孔聚合物杂化支架和磁铁矿粉末 BMC 的活性大部分保留 (>95%) (图 6B)。

固定化氨基酸酐酶

[0152] 合成具有 20% 载量 ($L_E' = 0.2$) 的含有牛碳酸酐酶 II (CAN) (MW = 30 kDa) 和磁铁矿

纳米颗粒的BNC,然后模板化为磁性大孔聚合物杂化支架或纯磁铁矿粉末,形成BMC,其中总有效载量为9.5% ($L_E=0.095$)。优化的固定化条件导致相对于游离酶保留 $96\pm 9\%$ 的活性以使碳酸氢盐脱水为二氧化碳。

[0153] 材料和试剂.来自牛红细胞的碳酸酐酶II (CA或CAN)、BICINE-KOH、HEPES-KOH和8-羟基-苊-1,3,6-三磺酸盐(荧光黄)购自Sigma (St.Louis,MO,USA)。盐酸、氯化铵和氢氧化钾来自Macron Fine Chemicals (Center Valley,PA,USA),在康奈尔大学化学库房 (Ithaca,NY,USA) 采购。Quick Start™ Bradford Protein Assay购自Bio-Rad (Hercules, CA, USA)。如上所述,磁铁矿纳米颗粒以及磁性大孔聚合物杂化支架在ZYMtronix Catalytic Systems (Ithaca,NY,USA) 中在室内合成。用通过Barnstead™ Nanopure™纯化的 $18.2\text{M}\Omega\text{-cm}$ 水制备储备溶液。使用应用Gen5™软件操作的带有试剂注射系统的 **Biotek®** Synergy™ H1平板读数器,在Corning **Costar®** 3925黑底荧光微量培养板中测量荧光强度。

[0154] 方法.将冻干的CAN溶于水。试剂A包含 2mM KHCO_3 和 0.5mM BICINE-KOH 缓冲液pH 8。试剂B包含 500pM 碳酸酐酶、 100nM 荧光黄和 0.5mM HEPES-KOH 缓冲液pH 6。

[0155] 碳酸酐酶活性测定.CAN可以可逆地催化碳酸脱水成二氧化碳和水。使用Wilbur和Anderson (J.Biol.Chem 176:147-154 (1948))的测定法测量标准碳酸酐酶活性。测定由二氧化碳形成碳酸氢盐引起的缓冲的 CO_2 -饱和溶液中pH值从8.3降至6.3的速率。如先前由Shingles&Moroney (Anal.Biochem.252 (1):731-737 (1997))使用替代的基于荧光pH的测定法。简言之,荧光黄用作荧光pH指示剂;由于碳酸氢盐的脱水引起的pH增加反映在荧光强度的增加上。通过混合等体积的试剂A和B引发反应。用样品注射系统将试剂A加入到微量培养板中的试剂B中,立即开始荧光读数。由于高反应速度,所有样品读数一次一个孔地进行,一式三份。使用pH敏感 (F_s) 和不敏感 (F_{is}) 激发波长(分别为 466nm 和 413nm) 和 512nm 发射波长测量荧光。使用每个平板上包括的缓冲标准品 (pH 6-10) 的 F_s/F_{is} 对pH的线性校准曲线将荧光强度转换为pH(Shingles&McCarty,Plant Physiol.106 (2):731-37 (1994)) 将CAN活性的一个单位 (U) 定义为在上述条件下测定前10秒期间每秒pH的变化。前述内容通过引用整体并入本文。

[0156] BNC中碳酸酐酶固定化:使用水中的纳米颗粒悬浮液和游离酶溶液形成CAN BNC,其pH值用 100mM HCl 和 NaOH 调节。将游离CAN稀释至 $250\mu\text{g/mL}$ 并调节至pH 6。使用Fisher Scientific FB-505 Sonic Dismembrator在40%功率设置下用 $1/4$ "探头声处理 $5\text{mL } 1250\mu\text{g/mL NP}$ 悬浮液1分钟。将分散良好的NP悬浮液调节至pH 11。20%标称载量BNC混合物用等体积的酶溶液和NP悬浮液(各 $500\mu\text{L}$) 混合,在 2mL 微量离心管中合并并通过倒置混合。将BNC混合物在旋转器上适度搅拌10min。

[0157] BMC支架上碳酸酐酶BNC模板化:将 $25\mu\text{L } 50\text{mg/mL}$ 充分混合的BMC支架悬浮液(磁性大孔聚合物杂化物或简单磁铁矿粉末) 加入到 1mL BNC 溶液中,然后在旋转器上适度搅拌1h以形成10%标称负载BMC。

[0158] 蛋白质定量.将BMC磁性地沉淀,并使用Bradford方法测定上清液中的蛋白质含量,包括线性CAN标准曲线 ($R^2>0.99$),为 $2.5\text{-}10\mu\text{g/mL}$ 。该方法量化了未固定化酶的量,其允许确定固定化效率和有效载量。

[0159] 结果.对照显示因非特异性反应而不存在pH改变。将CAN BNC模板化在磁性大孔聚

合物杂化支架上,其中对于9.5%BMC的有效载量存在95%的固定化效率。这与简单磁铁矿粉末(50-100nm)BMC支架上模板化的HRP BNC的固定化效率相差无几,其也具有95%固定化效率和9.5%有效载量(表2)。碳酸酐酶杂化支架和磁铁矿粉末BMC的活性相对于游离碳酸酐酶也几乎被保留(>95%) (图6C)。

固定化辣根过氧化物酶

[0160] 以5%标称载量($L_E' = 0.05$)合成含有辣根过氧化物酶(MW=44kDa)和磁铁矿纳米颗粒的BNC,然后模板化到磁性大孔聚合物杂化支架或纯磁铁矿粉末上,形成具有3%总有效载量($L_E = 0.03$)的BMC。优化的固定化条件导致对于苯酚与4-氨基安替比林(4-AAP)复合的酶活性相对于游离酶改善4-至5-倍。

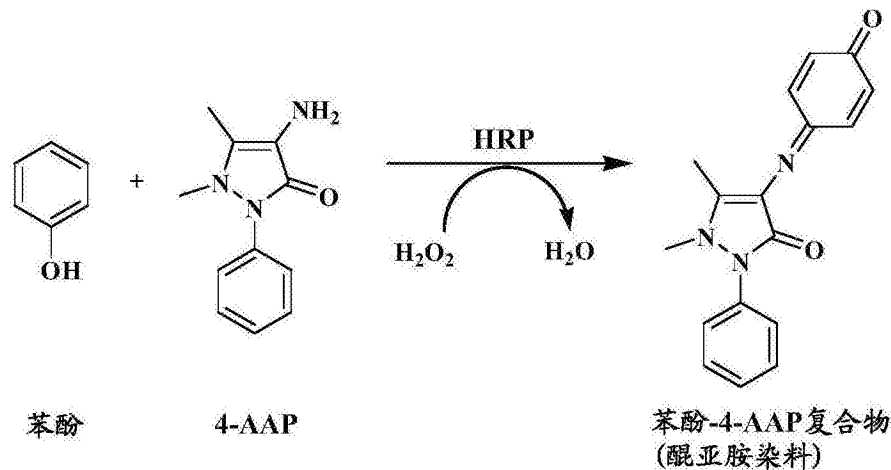
[0161] 材料和试剂.来自*A.rusticana*根的辣根过氧化物酶(HRP)、苯酚和4-氨基安替比林(4-AAP)购自Sigma(St.Louis,MO,USA)。过氧化氢、盐酸、氢氧化钠和磷酸缓冲盐来自Macron Fine Chemicals(Center Valley,PA,USA),在康奈尔大学化学库房(Ithaca,NY,USA)采购。Quick Start™ Bradford Protein Assay购自Bio-Rad(Hercules,CA,USA)。如上所述,磁铁矿纳米颗粒以及磁性大孔聚合物杂化支架在ZYMtronix Catalytic Systems(Ithaca,NY,USA)中在室内合成。储备溶液由通过Barnstead™ Nanopure™纯化的18.2MΩ-cm水制备。使用应用Gen5™软件操作的Biotek Epoch™平板读数器,在Costar™ 3635UV-透明微量板中一式三份测量吸光度。

[0162] 方法.将冻干的HRP溶解在水中以形成储备溶液。制备新鲜的HRP试剂,其含有122mM pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)缓冲液、0.61mM苯酚和0.61mM 4-AAP水溶液。将该溶液储存在4℃并保持在黑暗中直至即刻使用前,此时它平衡至达到室温。

[0163] BNC中辣根过氧化物酶固定化:使用磁铁矿纳米颗粒(NP)在水中的悬浮液和游离酶溶液形成辣根过氧化物酶(HRP)BNC,其pH值用100mM HCl和NaOH调节。将游离HRP稀释至250μg/mL并调节至pH 5。使用Fisher Scientific FB-505Sonic Dismembrator在40%功率设置下使用1/4"探头声处理5mL 5000μg/mL NP悬浮液1min。将充分分散的NP悬浮液调节至pH 11。用等体积的酶溶液和NP悬浮液(各525μL)制备5%标称载量BNC混合物,在2mL微量离心管中合并,并通过倒置混合。将BNC混合物在旋转器上适度搅拌10min。

[0164] BMC支架上辣根过氧化物酶BNC模板化:将250μL 2.5mg/mL充分混合的BMC支架悬浮液(磁性大孔聚合物杂化物或简单磁铁矿粉末)加入到500mL BNC溶液中,然后在旋转器上适度搅拌1h以形成3%标称载量HRP BMC。

[0165] 辣根过氧化物酶活性测定.HRP使用过氧化氢作为引发剂不可逆地催化苯酚和4-AAP的自由基复合:



[0166] 所得产物是亮粉红色-红色醌亚胺染料,在 $\lambda=500\text{nm}$ 处具有显著的吸光度。标准的辣根活性测定-Emerson-Trinder方法的生物催化形式(48th Purdue University Industrial Waste Conference Proceedings, 423-430 (1993) 将 $\lambda=500\text{nm}$ 处由于形成的酚类染料产物的吸光度增加率与酶活性相关联。固定化和游离HRP的HRP分批反应在5mL离心管中于21 $^{\circ}\text{C}$ 进行30分钟,最初使用含有50mM pH 7.4磷酸盐缓冲盐水(PBS)、0.25mM苯酚、0.25mM 4-AAP、15nM HRP和0.3mM H_2O_2 的3mL总反应体积开始反应。适度搅拌批次反应体系。在指定的时间点(1、3、30min),在 $\lambda=500\text{nm}$ 处读取三次吸光度读数。还制备了含有相应量的固定化和游离酶的空白,以减去BMC和背景物质的吸光度贡献。因为BMC在反应容器和含BMC的空白中非常稀,所以与PBS中的游离酶和单独的水具有相同的吸光度。

[0167] 使用消光系数在500nm($12\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)定量产物染料(Sigma Chemical Corporation and Kessey, J. (1994) Enzymatic Assay of Choline Oxidase (EC 1.1.3.17). https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/c5896enz.pdf.) 将1个单位的(U)HRP活性定义为在21 $^{\circ}\text{C}$ 下在50mM PBS (pH 7.4)中酶分钟形成1mmol醌亚胺染料。

[0168] 蛋白质定量. 将BMC磁性沉淀,并使用Bradford方法测定上清液中的蛋白质含量,包括线性HRP标准曲线($R^2>0.99$),为2.5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。该方法量化了未固定化酶的量,其允许确定固定化效率和有效载量。

[0169] 结果. 对照显示不存在未催化的染料形成。将HRP BNC模板化在磁性大孔聚合物杂化支架上,其中对于3%BMC的有效载量存在>99%的固定化效率。这与简单磁铁矿粉末(50-100nm)BMC支架上模板化的HRP BNC的固定化效率相差无几,其也具有>99%固定化效率和3%有效载量(表2)。杂化支架和磁铁矿粉末BMC上HRP的活性相对于游离HRP改善4-至5-倍(400-500%) (图6(d))。

固定化氯过氧化物酶

[0170] 以4%标称载量($L_E'=0.04$)合成含有氯过氧化物酶($MW=42\text{kDa}$)和磁铁矿纳米颗粒的BNC,然后模板化到磁性大孔聚合物杂化支架上,形成具有0.8%总有效载量($L_E=0.008$)的BMC。这种固定化条件导致对于柠檬烯氧化成(1S,2S,4R)-(+)-柠檬烯-1,2-二醇,酶活性相对于游离酶改善1.6倍,正如高碘酸钠测定-肾上腺素报告反应所测定的。

[0171] 材料和试剂. 来自Caldariomyces fumago的氯过氧化物酶(CPO)得自Bio-Research Products, Inc. (North Liberty, IA, USA)。过氧化氢、盐酸、氢氧化钠和磷酸缓冲

盐来自Macron Fine Chemicals (Center Valley, PA, USA)。(R)-柠檬烯、来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)的葡萄糖氧化酶(GOX)、高碘酸钠(NaIO_4)、来自牛肝的过氧化氢酶、二甲亚砜和肾上腺素购自Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)。D-葡萄糖得自Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA)。**BERMOCOLL**[®]EHM 300取代的纤维素得自AkzoNobel (Amsterdam, Netherlands)。Quick Start[™] Bradford Protein Assay购自Bio-Rad (Hercules, CA, USA)。如上所述,磁铁矿纳米颗粒以及磁性大孔聚合物杂化支架M032-40(在3.125mL 10%聚(乙烯醇)、3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和33.75mL水中的1.875g 50-100nm磁铁矿,与250mM柠檬酸交联)在Zymtronix Catalytic Systems (Ithaca, NY, USA)中在室内合成。用通过Barnstead[™] Nanopure[™]纯化的18.2M Ω -cm水制备储备溶液。使用应用Gen5[™]软件操作的Biotek Epoch[™]平板读数器,在Costar[™] 3635UV-透明微量板中一式三份测量吸光度。

[0172] 方法.将浓缩的CPO溶液在水中稀释以形成储备溶液。制备新鲜的初级试剂混合物,其含有pH 6的100mM磷酸盐缓冲液(PB)、100mM葡萄糖、用0.016m/v% **BERMOCOLL**[®]EHM 300乳化的100mM柠檬烯和1v/v%二甲亚砜(DMSO)的水溶液。制备含有400 μM NaIO_4 和10mM PB pH 6的次级报告混合物,以及溶解在HCl中的5mM肾上腺素—分别保存 NaIO_4 和肾上腺素溶液。将所有反应混合物储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 并保持在黑暗中直至即刻使用前,此时平衡至达到室温。

[0173] BNC中氯过氧化物酶固定化:使用磁铁矿纳米颗粒(NP)在水中的悬浮液和游离酶溶液形成氯过氧化物酶(CPO)BNC。将游离CPO稀释至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。使用Fisher Scientific FB-505 Sonic Dismembrator在40%功率设置下用1/4"探头声处理5mL 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP悬浮液1分钟。将充分分散的NP悬浮液调节至pH 11。用等体积的酶溶液和NP悬浮液(各550 μL)制备4%标称载量BNC混合物,在2mL微量离心管中混合并通过手动倒置混合30s。

[0174] BMC支架上氯过氧化物酶BNC模板化:然后将1mL BNC溶液加入到5mg磁性聚合物支架M032-40上,然后涡旋1h以形成0.8%标称载量CPO BMC。

[0175] 氯过氧化物酶活性测定.CPO使用过氧化氢作为引发剂催化(R)-柠檬烯氧化成(1S,2S,4R)-(+)-柠檬烯-1,2-二醇。为了证明在模拟工业过程中使用磁性聚合物支架材料,使用相对高(50mM)浓度的柠檬烯。为了避免高过氧化物浓度导致过量的CPO失活,实施葡萄糖氧化酶(GOX)-葡萄糖系统以原位递增地产生 H_2O_2 。为了量化形成的二醇,实施了使用 NaIO_4 和肾上腺素(肾上腺素)的两步报告反应。当 NaIO_4 和肾上腺素单独组合时,所得产物是肾上腺色素,即一种明亮的橙色种类,在 $\lambda=490\text{nm}$ 处具有显著的吸光度。但是,如果初级反应混合物中存在任何二醇,则它会将高碘酸钠还原为碘酸钠,从而降低可用于肾上腺素利用的 NaIO_4 的量,从而降低490nm处的吸光度。二醇实际上与肾上腺素“竞争”与 NaIO_4 反应。初级和报告反应均如在Aguila等人,Green Chemistry 10(52):647-653(2008)和Sorouraddin等人,Biomedical Analysis 18:883-888(1998)中所描述,两篇文献作为引用完整地并入。

[0176] 对柠檬烯的CPO活性与 $\lambda=490\text{nm}$ 处吸光度的降低直接相关,这是由于相对于仅有底物的对照肾上腺色素形成减少所致。固定化和游离CPO的初级分批反应在22 $^{\circ}\text{C}$ 下在2mL离心管中进行20小时,使用总反应体积为1mL,其含有终浓度为50mM的pH 6磷酸盐缓冲液、用

0.008m/v% **BERMOCOLL**[®]EHM 300乳化的50mM柠檬烯、50mM葡萄糖、50nM CPO、5nM游离GOX和0.5v/v% DMSO。将分批反应体系和适当的对照在黑暗中以18rpm适度翻滚。在20h时,稀释初级反应混合物以准备报告步骤。

[0177] 为了定量形成的二醇,进行250 μ L报告反应,其由400 μ M NaIO₄、10mM, pH 6磷酸盐缓冲液、0.6v/v%初级反应混合物和100nM过氧化物酶(以清除任何剩余的H₂O₂)组成。使该报告-初级混合物反应1分钟。然后,每250 μ L报告-初级混合物加入20 μ L 5mM肾上腺素。再过一分钟后,在490nm的波长处一式三份读取吸光度。根据相对于不含酶和不含底物的对照和适合的标准曲线所得橙色种类(肾上腺色素)的减少来确定酶活性。

[0178] 蛋白质定量.将BMC磁性地沉淀,并使用Bradford方法测定上清液中的蛋白质含量,包括线性CPO标准曲线($R^2 > 0.99$),为2.5-25 μ g/mL。该方法量化了未固定化酶的量,其允许确定固定化效率和有效载量。在这种情况下,确定相对于0.8%标称载量CPO在BMC上的0.8%有效载量,表明酶捕获率为100%。

[0179] 结果.无酶对照显示存在约20% (10mM)未催化的产物形成。校正该基线转化,相对于游离CPO,在杂化支架BMC上CPO对柠檬烯的转化率改善60%(图7)。与游离CPO的25mM相比,这转化为固定化CPO的约32mM的总(基线+酶促)乙二醇形成。推定,如图6D中所示,BMC上过氧化物酶的活性相对于游离酶增强,这归因于较高的稳定性和来自H₂O₂较少的抑制。

固定化脂肪酶

[0180] 以40%标称载量($L_E' = 0.40$)合成含有脂肪酶(MW=45kDa)和磁铁矿纳米颗粒的BNC,然后模板化到磁性大孔聚合物杂化支架上,形成具有3.78%总有效载量($L_E = 0.038$)的BMC。这种固定化条件导致相对于游离酶100%保留活性,用于将月桂酸对硝基苯酯分解为对硝基苯酚和月桂酸酯。

[0181] 材料和试剂.来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)的脂肪酶(LIP)的得自Indo World Trading Corporation(New Delhi,India)。盐酸、氢氧化钠和磷酸盐缓冲盐来自Macron Fine Chemicals(Center Valley,PA,USA)。对月桂酸硝基苯酯、对硝基苯酚、牛血清白蛋白(BSA)和二甲亚砜购自Sigma-Aldrich(St.Louis,Mo,USA)。Quick Start[™] Bradford Protein Assay购自Bio-Rad(Hercules,CA,USA)。磁铁矿纳米颗粒合成为聚合物杂化支架M032-40(1.875g 50-100nm磁铁矿,3.125mL 10%聚(乙二醇),3.125mL 2%低粘度羧甲基纤维素(CMC)和33.75mL水,与250mM柠檬酸交联)。储备溶液在由通过Barnstead[™] Nanopure[™]纯化的18.2M Ω -cm水中制备。使用应用Gen5[™]软件操作的Biotek Epoch[™]平板读数器,在Costar[™]3635UV-透明微量板中一式三份测量吸光度。

[0182] BNC中脂肪酶的固定化:将粉末状脂肪酶溶解在水中并离心。上清液用于形成储备溶液。使用磁铁矿纳米颗粒(NP)在水中的悬浮液和游离酶溶液形成脂肪酶(LIP)BNC。将游离LIP储备溶液稀释至500 μ g/mL并调节至pH 7.4。使用Fisher Scientific FB-505 Sonic Dismembrator在40%功率设置下用1/4"探头声处理5mL 1250 μ g/mL NP悬浮液1min。将充分分散的NP悬浮液调节至pH 3。40%标称载量BNC混合物用等体积的酶溶液和NP悬浮液(各750 μ L)制成,在塑料深孔微量培养板中合并并通过涡旋混合60s。

[0183] BMC支架上的脂肪酶BNC模板化:然后将1.5mL BNC溶液加入到6.56mg磁性聚合物支架M032-40中,然后涡旋1h以形成5%标称载量LIP BMC。

[0184] 脂肪酶活性测定.LIP催化月桂酸对硝基苯酯(或任何类似的脂肪酸衍生物)水解

成对硝基苯酚和月桂酸酯。脂肪酶活性通过Gupta等人, *Analytical Biochemistry* 311: 98-99 (2002)的方法测定,但修改为使用棕榈酸对硝基苯酯(16-碳脂肪酸),其通过引用整体并入本文。为了量化释放的硝基苯酚,将反应维持在pH 4并且在 $\lambda=314\text{nm}$ 处取得吸光度读数。在该pH下,>99%的对苯二酚处于质子化形式,其为浅黄色物质,具有约314-320nm的最大吸光度。

[0185] LIP对月桂酸对硝基苯酯的活性与 $\lambda=314\text{nm}$ 处吸光度的增加直接相关。固定化和游离LIP的分批反应在2mL离心管中在45°C下进行30min,使用反应体积为0.25mL,其包含终浓度为100mM的pH 4磷酸盐缓冲盐水、0.5mM月桂酸对-硝基苯酯、0.5mg/mL LIP和2.2v/v% DMSO。将批量反应和适当的对照适度涡旋。在30min时,取 $\lambda=314\text{nm}$ 处的三次吸光度读数。将酶活性与不含酶和不含底物的对照以及在pH 4下的适当硝基苯酚标准曲线进行比较。

[0186] 蛋白质定量.将BMC磁性地沉淀,并使用Bradford方法测定上清液中的蛋白质含量,包括线性BSA标准曲线($R^2>0.99$),为2.5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。该方法量化了未固定化酶的量,其允许确定固定化效率和有效载量。在这种情况下,确定相对于5%标称载量LIP在BMC上的3.78%有效载量,表明酶捕获率为75.6%。

[0187] 结果.无酶对照显示存在约4.2% (21 μM)未催化的产物形成。校正该基线转化,相对于游离LIP,保持LIP在杂化支架BMC上的对硝基苯基月桂酸酯的转化(图8)。这转化为固定化和游离CPO的约170 μM 的总(基线+酶促)硝基苯酚形成,证明本文所述的固定方法和材料显然不会对所用脂酶的活性产生不利影响。

[0188] 在此披露或提及的所有公开和专利文件都通过引用以其全部内容结合。已经仅出于说明和描述的目的呈现了前述描述。该描述不旨在将本发明限制为所披露的精确形式。旨在本发明的范围将由随附的权利要求书限定。

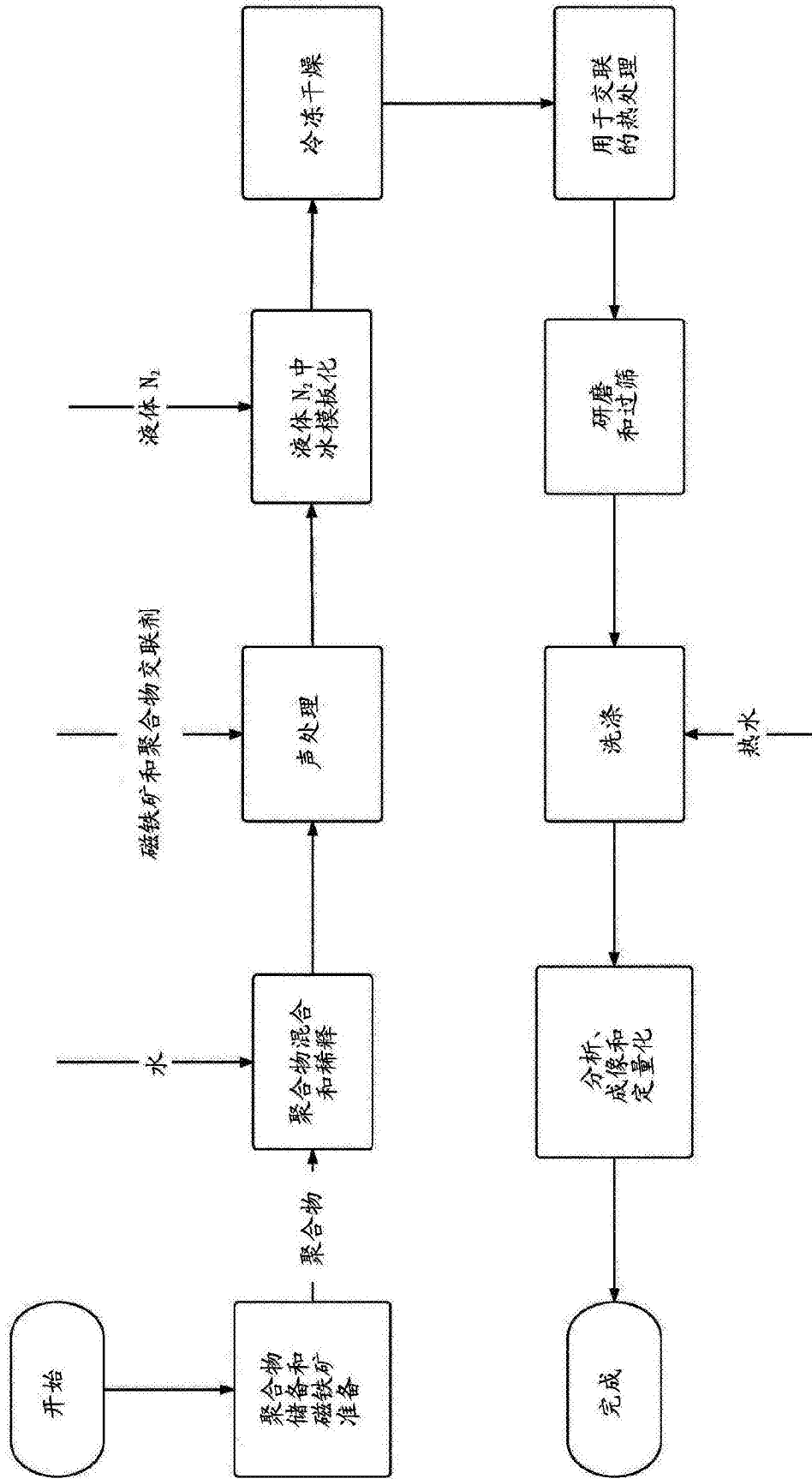


图1

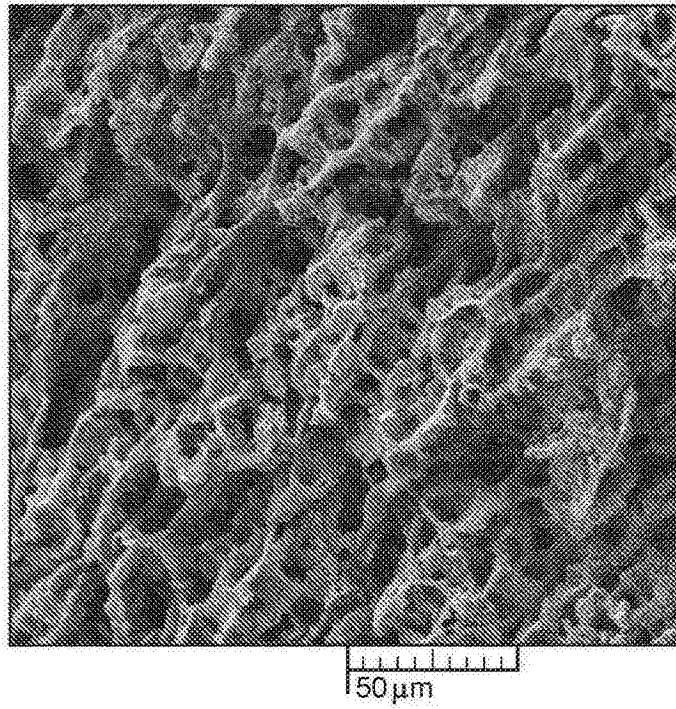


图2A

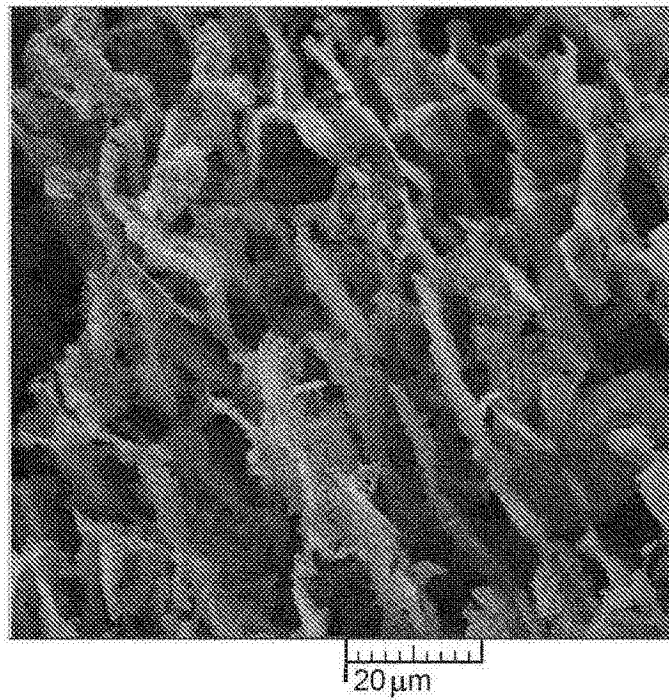


图2B

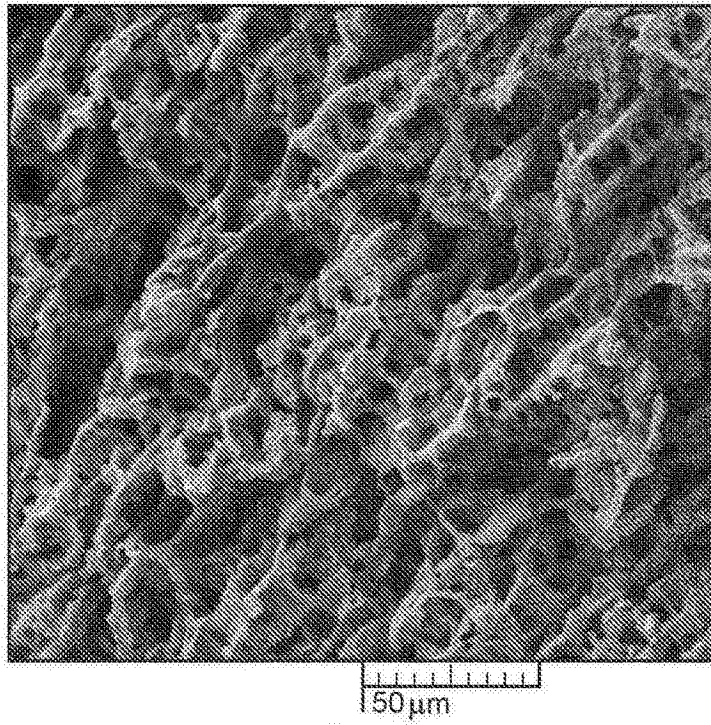


图3A

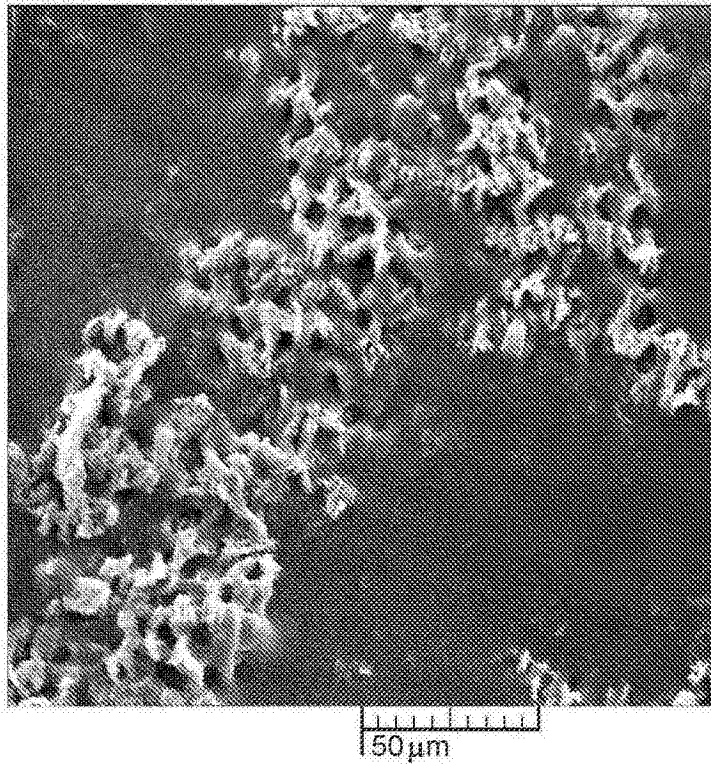


图3B

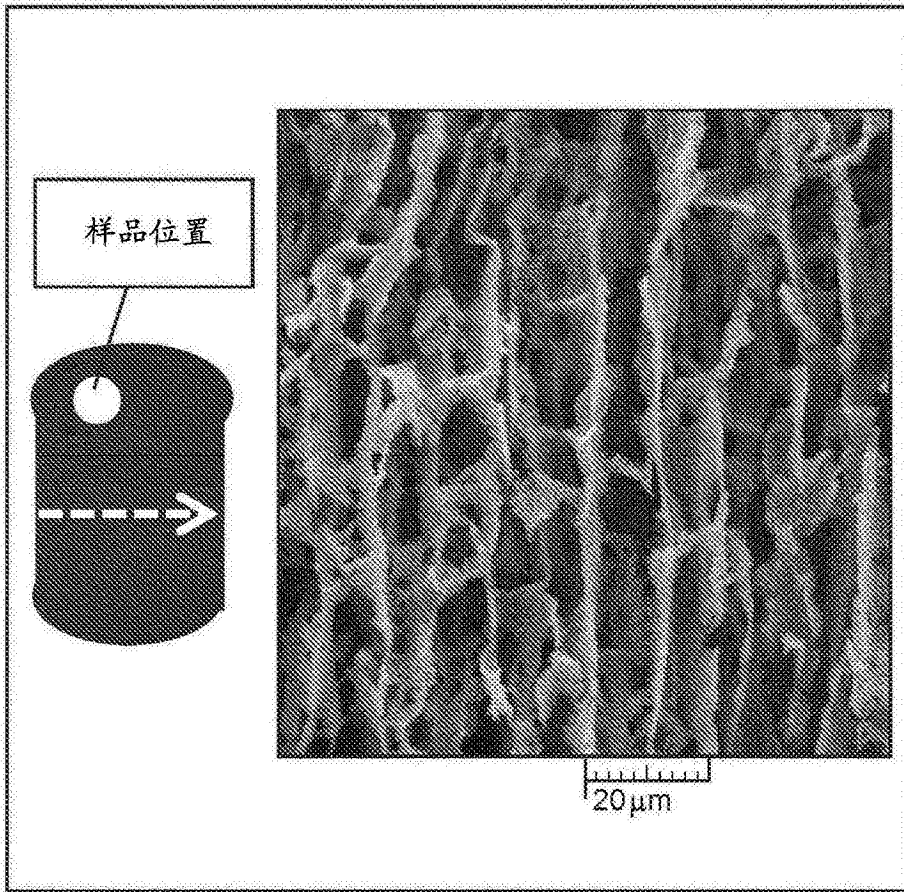


图4A

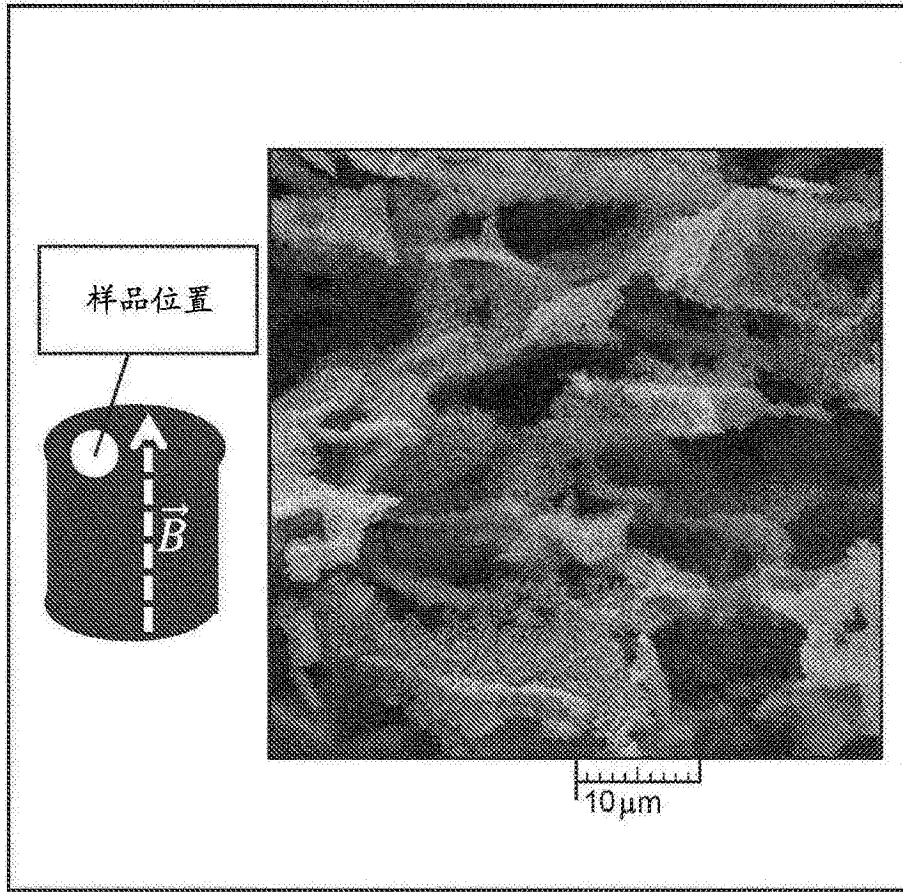


图4B

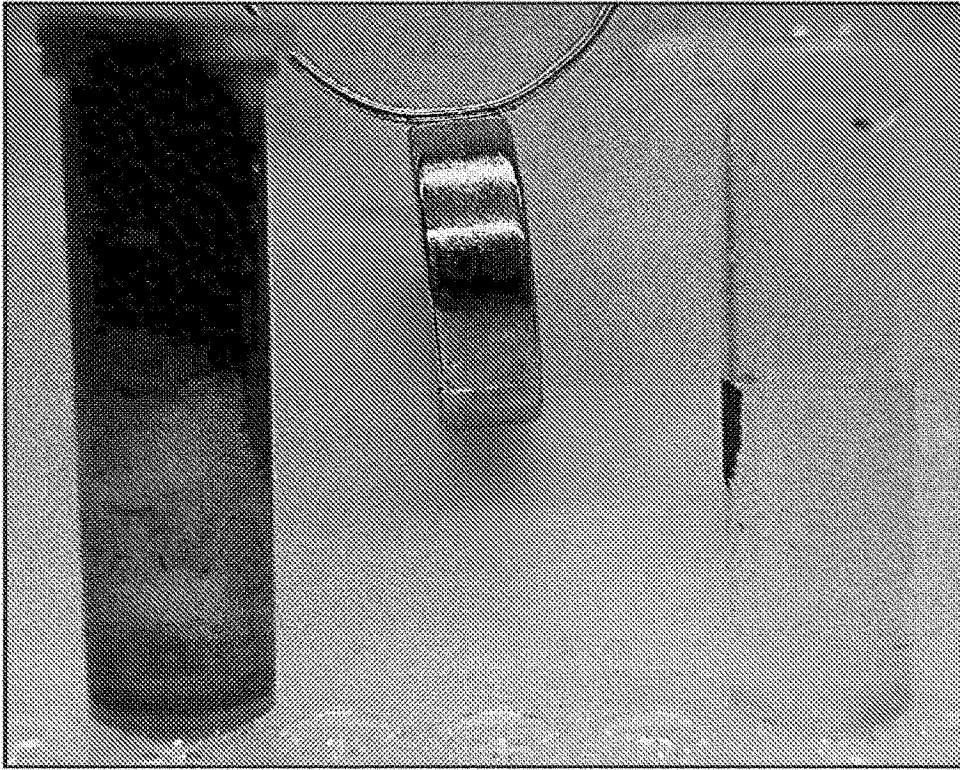


图5

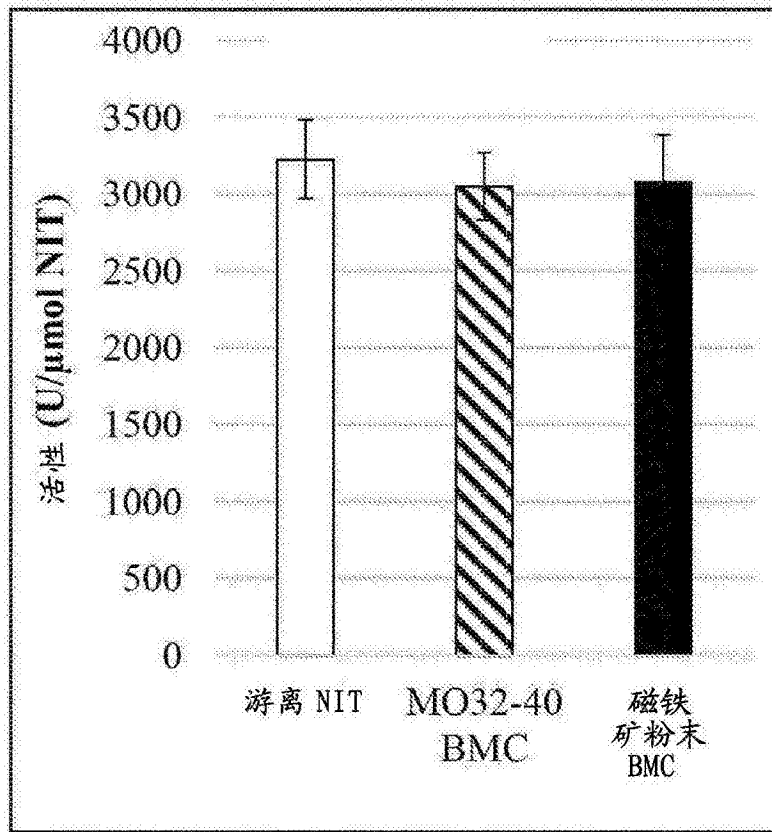


图6A

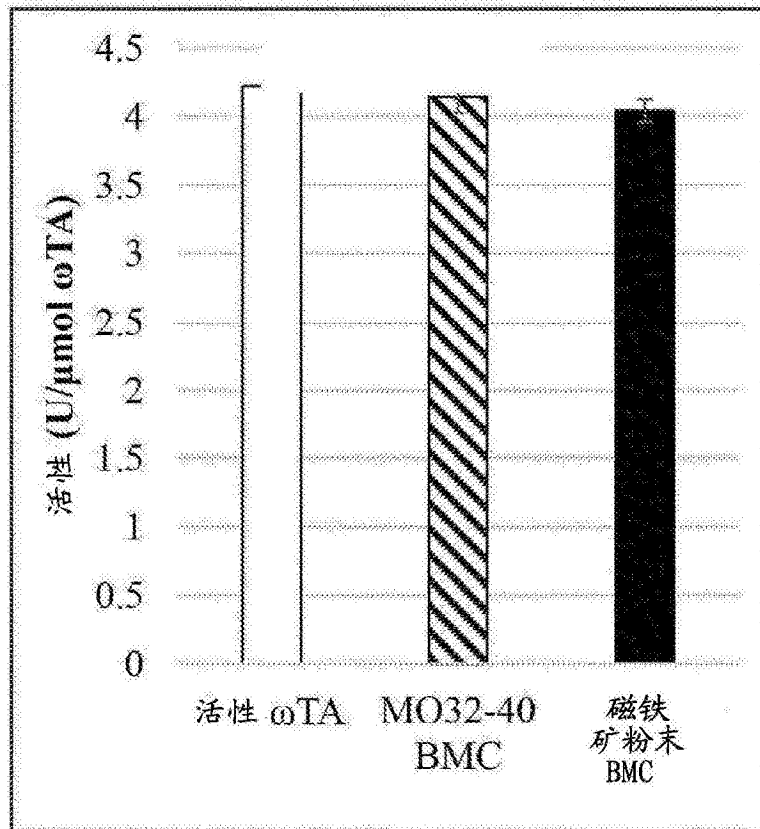


图6B

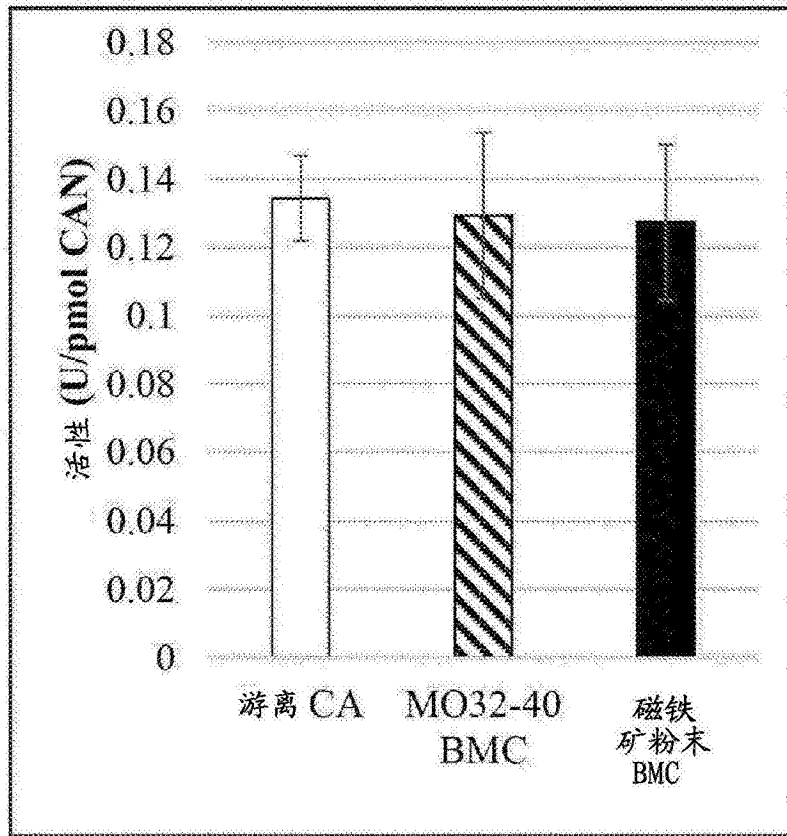


图6C

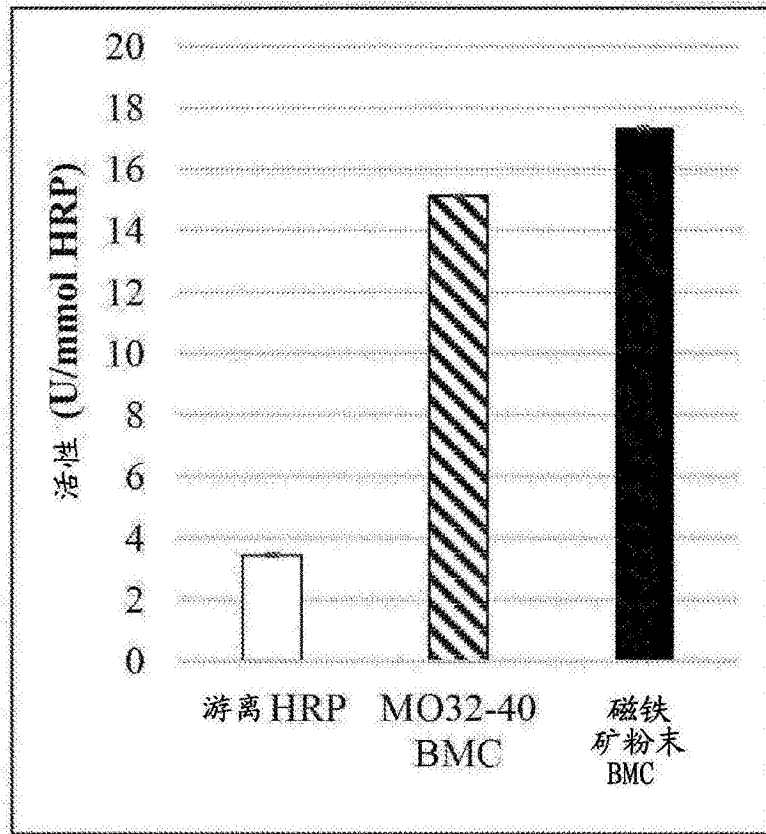


图6D

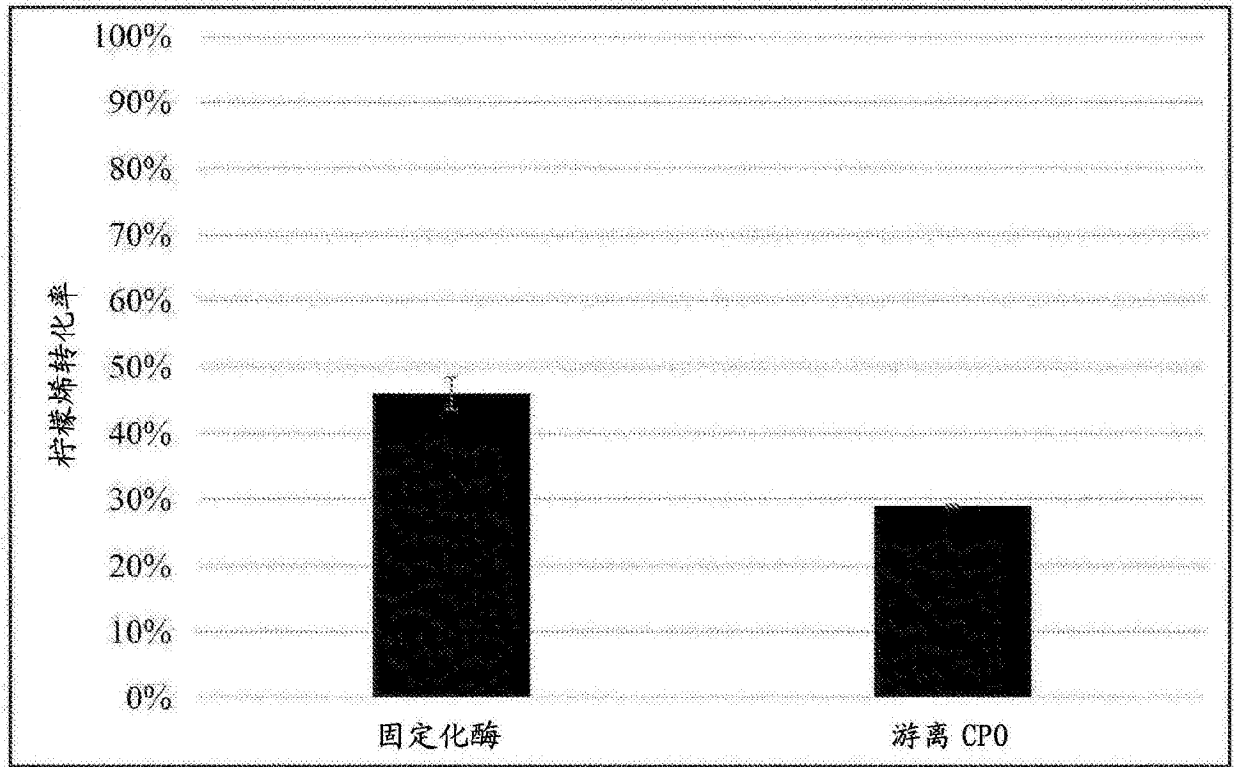


图7

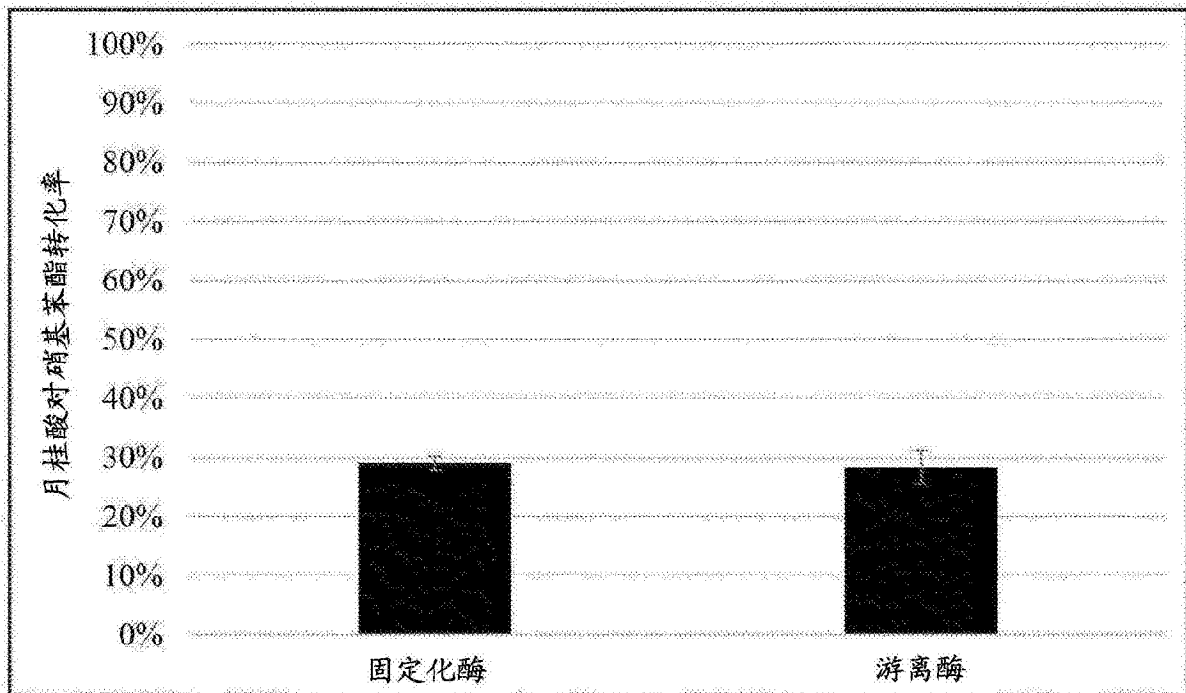


图8