



(21) 申请号 201910417713.0

WO 2007/036235 A1, 2007.04.05

(22) 申请日 2019.05.07

CN 103966277 A, 2014.08.06

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 104155291 A, 2014.11.19

申请公布号 CN 110760503 A

CN 107099562 A, 2017.08.29

(43) 申请公布日 2020.02.07

刘倩倩等. 大孔树脂固定化磷脂酶D. 2016, 第46卷(第46期), 全文.

(73) 专利权人 宁波大学

审查员 张锦广

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818号宁波大学材化学院

(72) 发明人 吴嘉沁 张瑞丰 李艳 肖通虎
龙能兵

(51) Int. Cl.

C12N 11/10 (2006.01)

C12N 11/089 (2020.01)

(56) 对比文件

WO 99/53001 A1, 1999.10.21

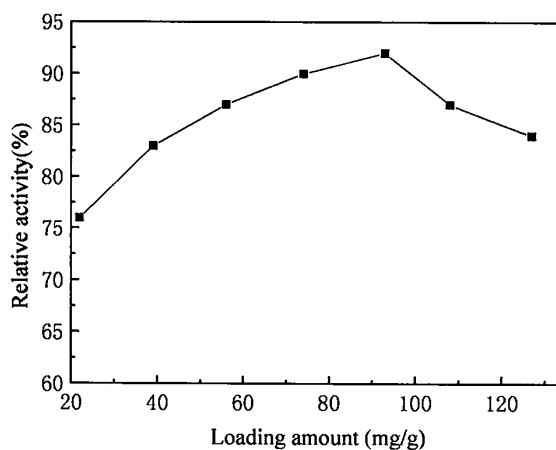
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

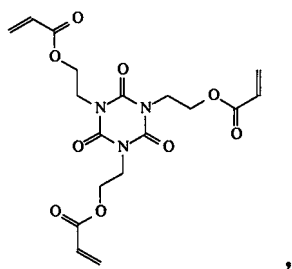
一种磷脂酶D的共交联固定化方法

(57) 摘要

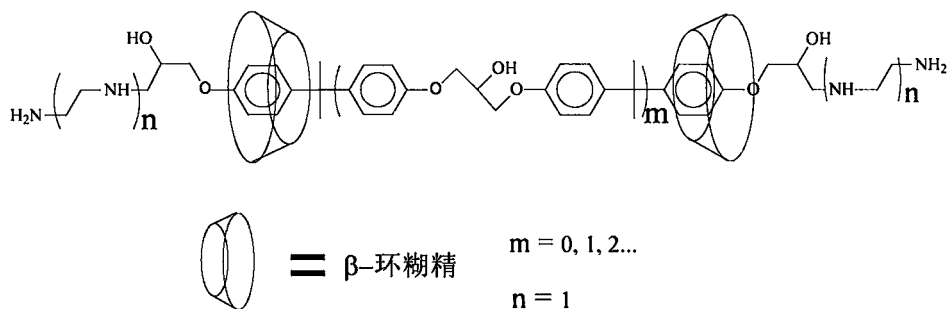
本发明是关于一种磷脂酶D的共交联固定化方法。使用油溶性的异氰脲酸三丙烯酸酯作为交联剂,水相中的反应物为含有氨基的磷脂酶D以及胺化环氧树脂与 β -环糊精形成的超分子复合物,利用双键与氨基的迈克尔加成反应,在较低的温度下发生共交联聚合反应,制备出不同负载量的固定化磷脂酶D。通过控制交联程度,提高分散性,改善其内部的传质微环境,该固定化酶具有较高的催化活性,负载量在93mg酶/g载体时具有最高的比活性,达到游离酶的92%。



1. 一种磷脂酶D共交联固定化方法,其特征在于使用水/油两相反应体系,油相是作为交联剂的异氰脲酸三丙烯酸酯,其结构如下:



水相中的反应物为磷脂酶D及结构如下的分子复合物:



所述的磷脂酶D共交联固定化方法,按以下步骤操作:

1) 将数均分子量为392的双酚A环氧树脂、甲醇和乙二胺三种组分按照2:2:0.8的质量比混合,在25~35℃范围内搅拌反应4~5小时,将混合物倒入水中,沉淀物用水反复洗涤除去甲醇和少量的胺,然后放入真空烘箱中常温干燥,得到环氧树脂胺化物;

2) 将环氧树脂胺化物与 β -环糊精按照1:2.1~1:2.3的摩尔比加入到水中,加热搅拌至环氧树脂胺化物全部转化为分子复合物而溶解在水中,保持该水溶液的总质量浓度在5~6wt.%范围;

3) 将磷脂酶D溶解在pH=7.5的磷酸钠缓冲溶液中,酶的浓度保持在1.0~7.0mg/mL范围,将不同浓度的磷脂酶D溶液与上述分子复合物水溶液按照55mL:20mL的比例混合;

4) 在搅拌下将1.2g异氰脲酸三丙烯酸酯加入到上述混合水溶液中,反应温度保持在25~30℃范围,10~15分钟后有白色凝胶颗粒形成,停止搅拌使反应体系放置4~5小时,过滤后即得到不同负载量的磷脂酶D固定化产物。

一种磷脂酶D的共交联固定化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及固定化酶生物催化技术领域,尤其是一种磷脂酶D的共交联固定化方法,该新型固定化磷脂酶D可专门用于磷脂酰丝氨酸的高效制备。

背景技术

[0002] 磷脂酶D (EC3.1.4.4) 即磷脂酰胆碱磷脂水解酶 (等电点为5.4), 属催化磷酸二酯键水解和碱基交换反应的一类酶的总称。由Hananhan在1947年首次从胡萝卜中分离得到。磷脂酶D分布在细菌到高等动植物的许多生物中, 具有宽广的底物特异性, 能广泛作用于许多磷脂及磷脂衍生物。磷脂酶D的作用不仅在于通过水解细胞膜中的磷脂而影响膜的结构、功能和稳定性, 而且在信号转导、激素作用的发挥、细胞骨架组装、胞内蛋白激酶和肌动蛋白的有序化、细胞分裂的发生、穿膜运输、分泌作用、防御反应以及种子萌发和细胞衰老中都起重要作用。

[0003] 磷脂酶D具有磷脂转移性和高度专一性两个特点, 所以对来源广泛的粗品磷脂进行转化, 就可以得到一些稀有磷脂, 既开发出了新品种, 又提高磷脂的营养价值。如: 磷脂酶D在丝氨酸存在下催化大豆磷脂合成磷脂酰丝氨酸, 还可以制备磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇等; 此外, 还可用纯度低的卵磷脂制备出高纯度的卵磷脂。磷脂酶D在农业上也大有作为, 它存在于植物体中, 它的减少标志着果实的衰败, 从而影响了产量及收成, 可见如果增加磷脂酶D的含量, 不仅可以延长果实的寿命, 而且在经济效益上也大有收获。在磷脂酶D的作用下, 对磷脂进行改性, 可以合成其他的稀有磷脂, 从而使其的营养价值、各种性能等方面大大改进和提高, 这就使磷脂在食品、医药、化妆品、纺织、皮革技术工业中的应用范围更加广泛, 使用价值更高。

[0004] 固定化酶就是通过化学手段将水溶性的游离酶变成不溶性的固体酶, 固定化有很多优点: 例如固定化的磷脂酶D可重复使用, 使酶的使用效率提高、使用成本降低; 固定化的磷脂酶D极易与反应体系分离, 简化了操作工艺; 固定化的磷脂酶D其储存稳定性和热稳定性都得到了提高; 固定化酶的催化反应过程更易控制; 固定化酶具有一定的机械强度, 可以用搅拌或装柱的方式作用于底物溶液, 便于酶催化反应的连续化和自动化操作。酶的交联是一种非常有效的固定化方法, 其所形成的产物称为交联酶聚集体。最常用的交联剂为水溶性的戊二醛, 它反应活性高, 用量难以控制, 很容易造成酶的过度交联, 使酶的活性有很大的损失, 此外, 传统的交联法往往须要在交联之前使酶分子沉淀聚集, 这样既会造成酶的浪费, 又会阻断传质通道, 无法充分发挥酶的催化效率。

[0005] 本发明专利提供一种共交联的方法用于磷脂酶D的固定, 利用磷脂酶D分子上的氨基与丙烯酸酯类交联剂发生迈克尔加成反应, 同时还引入含有 β -环糊精的结构单元, 这样既能为催化反应提供空间, 降低传质阻力, 同时还能增加亲水性, 提高酶的活性。使用这种共交联方法, 酶的负载量和催化活性高, 稳定性好, 固定化酶呈颗粒状, 催化反应容易操作。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种磷脂酶D的固定化方法,这种方法是基于磷脂酶D与另一种含有机胺的分子复合物的共交联反应,交联反应的基础是丙烯酸酯与氨基的迈克尔加成,该反应在常温下就能快速发生,因而不会对酶的整体结构造成破坏,共交联法负载效率高,稳定性好,同时还能调节固定化酶的微环境,使其保持高的催化活性。

[0007] 1、本发明解决技术问题所采用的技术方案为:一种水/油两相的交联反应,油相为交联剂异氰脲酸三丙烯酸酯,其结构如图1所示,水相中的反应物为磷脂酶D及 β -环糊精与胺化环氧树脂的超分子复合物,固定化酶的负载量是通过磷脂酶D的浓度来调节。

[0008] 非常有益的是,通过多相反应可以控制交联程度,避免酶的过度交联,同时交联剂含有多个双键,使交联产物形成支化结构,更大限度地阻止酶的聚集,增强酶的活力;

[0009] 非常有益的是, β -环糊精与胺化环氧树脂的分子复合物与酶分子产生强的亲和力,导致交联反应能使磷脂酶D能以接近100%的利用率被固定化,交联反应发生后,液相中几乎没有残留的磷脂酶D;

[0010] 非常有益的是, β -环糊精与胺化环氧树脂的分子复合物具有弯曲的刚性结构,它带来了充足的自由体积,为生物大分子与底物相互作用提供传质通道,同时为生物大分子的构象提供稳定性,从而提高了固定化酶的催化活性。

[0011] 2、本发明解决另一个技术问题所采用的技术方案为:一种上述固定化酶的制备方法,其特征步骤为:1)将双酚A环氧树脂(牌号为E-51,环氧值为0.51,数均分子量为392)、甲醇和乙二胺三种组分按照2:2:0.8的质量比混合,在25~35℃范围内搅拌反应4~5小时,将混合物倒入水中,沉淀物用水反复洗涤除去甲醇和少量的胺,然后放入真空烘箱中常温干燥,得到环氧树脂胺化物;2)将环氧树脂胺化物与 β -环糊精按照1:2.1~1:2.3的摩尔比加入到水中,加热搅拌至环氧树脂胺化物全部转化为分子复合物而溶解在水中,保持该水溶液的总质量浓度在5~6wt.%范围;3)将磷脂酶D溶解在pH=7.5的磷酸钠缓冲溶液中,酶的浓度保持在1.0~7.0mg/mL范围;4)分别将浓度为1.0mg/mL、2.0mg/mL、3.0mg/mL、4.0mg/mL、5.0mg/mL、6.0mg/mL、7.0mg/mL的磷脂酶D溶液与上述分子复合物水溶液按照55mL:20mL的比例混合,通过改变酶溶液的浓度来调节固定化酶的负载量;5)在搅拌下将1.2g异氰脲酸三丙烯酸酯加入到上述混合水溶液中,反应温度保持在25~30℃范围,10~15分钟后有白色凝胶颗粒形成,停止搅拌使反应体系放置4~5小时,过滤后即得到不同负载量的固定化磷脂酶D的产物。

[0012] 非常有益的是,交联剂中的一个双键首先与分子复合物上的氨基发生反应,形成具有乳化作用的产物,油相在反应启动后会很快分散直至消失,磷脂酶D首先通过吸附方式进入聚合物中,然后交联剂上的双键与酶上的氨基进行缓慢的反应,最终变成共交联的固定化酶产物;

[0013] 非常有益的是,利用 β -环糊精与疏水苯环的相互作用引入亲水基团,避免使用化学键,并通过交联反应使 β -环糊精无法脱离聚合物,使固定化酶的制备简化;

[0014] 非常有益的是,整个聚合过程中不加入其它有机溶剂,不需要更高的温度。

[0015] 本发明的优点在于:1)利用水/油双相反应实现酶的交联,降低了酶的交联程度;2)引入 β -环糊精分子复合物改善了固定化磷脂酶D的微环境,提高了酶的催化反应活性;3)共交联固定法能使磷脂酶D以极高的效率被固定化;4)采用多官能度的交联剂能使固定化

产物形成支化结构,阻止酶的聚集,提高酶的催化性能。

具体实施方式

[0016] 酶的固定化

[0017] 1) 将双酚A环氧树脂(牌号为E-51,环氧值为0.51,数均分子量为392)、甲醇和乙二胺三种组分按照2:2:0.8的质量比混合,在25~35℃范围内搅拌反应4~5小时,将混合物倒入水中,沉淀物用水反复洗涤除去甲醇和少量的胺,然后放入真空烘箱中常温干燥,得到环氧树脂胺化物;

[0018] 2) 将环氧树脂胺化物与β-环糊精按照1:2.1~1:2.3的摩尔比加入到水中,加热搅拌至环氧树脂胺化物全部转化为分子复合物而溶解在水中,保持该水溶液的总质量浓度在5~6wt.%范围;

[0019] 3) 将磷脂酶D溶解在pH=7.5的磷酸钠缓冲溶液中,酶的浓度保持在1.0~7.0mg/mL范围;

[0020] 4) 分别将浓度为1.0mg/mL、2.0mg/mL、3.0mg/mL、4.0mg/mL、5.0mg/mL、6.0mg/mL、7.0mg/mL的磷脂酶D溶液与上述分子复合物水溶液按照55mL:20mL的比例混合,通过改变酶溶液的浓度来调节固定化酶的负载量;

[0021] 5) 在搅拌下将1.2g异氰脲酸三丙烯酸酯加入到上述混合水溶液中,反应温度保持在25~30℃范围10~15分钟后有白色凝胶颗粒形成,同时油相消失,停止搅拌使反应体系放置4~5小时,过滤后即得到不同负载量的固定化磷脂酶D的产物。

[0022] 固定化酶的负载量测定:

[0023] 由于共交联法固定磷脂酶D后,反应残留液中测不到磷脂酶D的活性,说明经过交联后磷脂酶D全部进入到固体颗粒中,所以负载量的计算用以下公式:

$$[0024] \quad \text{负载量 (mg/g)} = \frac{C \times V}{m - C \times V \times 0.001}$$

[0025] 其中:C为共交联酶溶液的浓度(mg/mL);V为共交联酶溶液的体积(mL);m为固定化酶干态质量(g)。

[0026] 酶活力测定:

[0027] (1) 游离酶活力测定:加入适量的酶液,用2.5mL的Tris-HCl(pH8)的缓冲液和2.5mL质量含量为10%的Triton的Tris-HCl(pH8)溶液混合溶解,放入37℃恒温水浴槽预热5分钟,然后吸取100μL的磷脂酰对硝基苯酚,随着时间的变化,测定波长为405nm下的分光光度计的读数。算出每分钟吸光度的值。酶活力计算公式为:

$$[0028] \quad \text{酶活力 (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V}{K \times V_s \times t} \times 277$$

[0029] 其中:ΔA为酶促反应的吸光度变化值;V为测量试样总体积(mL);V_s为所加酶液体积(mL);K为对硝基酚标准曲线斜率;t为反应时间(min);277为转化系数。

[0030] (2) 固定化酶活力测定:准确称取0.1g固定化磷脂酶D,悬浮于预先37℃下恒温浴5min的5mL 0.05mol/L pH8.0含Triton 5%的Tris-HCl缓冲液中,加入0.1mL的磷脂酰对硝基苯酚,准确温育5min,离心,取上清,测405nm的吸光度并计算。

[0031] 相对活性:

[0032] 将固定化酶的活性与游离酶的活性之比定义为相对活性。

[0033] 实验结果：

[0034] 实验一共得到7个不同负载量的固定化磷脂酶D的样品，分别测定它们的活力，计算得到它们的相对活性。图2是相对活性与负载量的关系，当负载量为93mg酶/g载体时其相对活性达到最大值，其比活力是游离酶的92%，这个结果说明磷脂酶D在这个范围处于非常适合催化的状态。当负载量小于93mg酶/g载体时，固定化酶的活性逐渐随负载量的增加而增大，这主要是因为，酶的含量较低时，聚合物结构比较紧密，酶的催化活性不容易发挥出来，随着酶含量增加，聚合物的结构变的松散，酶与底物的接触机会增大，其相对活性也随之提高。当负载量大于93mg酶/g载体时，固定化酶的活性逐渐随负载量的增加而变小。一般来说交联反应都会使酶的构象变得僵硬，从而活性降低，本发明专利的共交联固定法能使酶的微环境得到改善，这与引入环糊精超分子结构单元有关，它使固定化酶的结构变的松散，同时还改善了内部的亲水性，此外支化程度高的交联剂还能提高酶的分散性，避免了酶的聚集，从而提高其催化活性。但是当负载量过大时，酶的聚集变得不可避免，所以其活性又会变小。

[0035] 我们以负载量为93mg酶/g载体的样品为研究对象，测定固定化酶与游离酶溶液的储存稳定性，其结果如图3所示，以时间为零的起始状态的活性为100%，在4℃，pH=7.0条件下经过28天的储存，游离酶溶液只残留37%的活性，固定化酶能残留78%的活性，所以在储存稳定性方面，固定化酶要明显优于游离酶。

附图说明

[0036] 图1交联剂的化学结构。

[0037] 图2固定化的磷脂酶D催化活性与其负载量的依赖关系。

[0038] 图3固定化与游离的磷脂酶D储存稳定性比较。

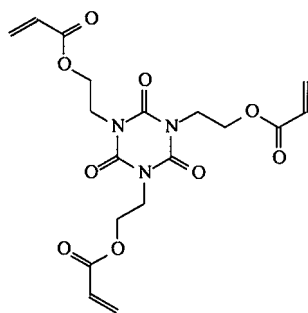


图1

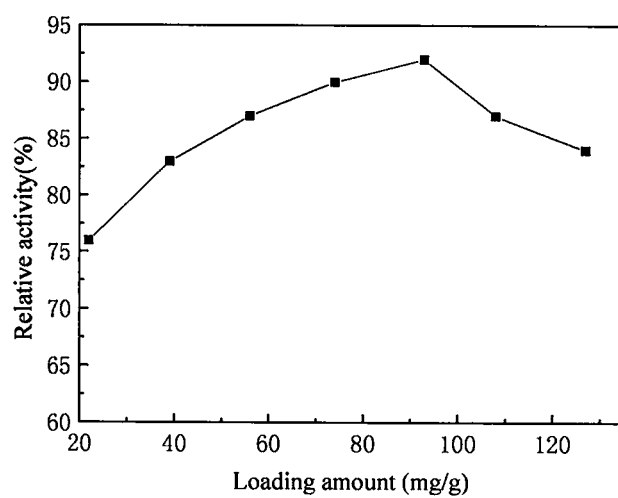


图2

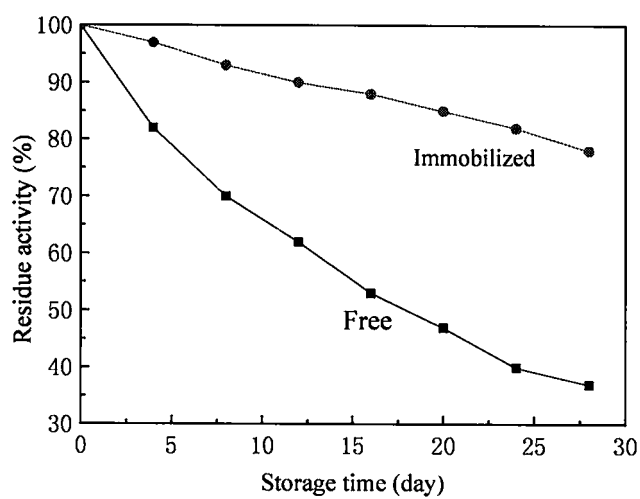


图3