



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1914316 B

(45) 授权公告日 2012.08.29

(21) 申请号 200580003521.1

(22) 申请日 2005.01.27

(30) 优先权数据

2004/0685 2004.01.28 ZA

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.07.28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2005/000192 2005.01.27

(87) PCT申请的公布数据

W02005/080561 EN 2005.09.01

(73) 专利权人 CSIR 公司

地址 南非比勒陀利亚

(72) 发明人 弗朗西斯·肖恩·穆尔曼

迪安·布雷迪

阿瓦西里·沙姆帕克西·塞韦尔

海丁·罗尔夫斯 贾斯廷·霍尔达纳

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

代理人 薛俊英 王维玉

(51) Int. Cl.

C12N 9/96 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 0120019 A2, 2001.03.22, 全文.

P. Lacute

opez-Serrano ET-AL. Cross-linked

enzyme aggregates with enhanced

activity: application to. 《Biotechnology

Letters》. 2002, 第 24 卷 1379-1383.

Peter Walde, Sosaku Ichikawa. Enzymes

inside lipid vesicles: preparation,

reactivity and. 《Biomolecular

Engineering》. 2001, 第 18 卷 143-177.

J. M. Bezemer ET-AL. Microspheres for

protein delivery prepared from amphiphilic

multiblock copolymers - 1. Influence

of preparation techniques on particle

characteristics and protein delivery.

《Journal of Controlled Release》. 2000, 第 67

卷 233-248.

审查员 于娜

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

酶的稳定化

(57) 摘要

本发明涉及一种产生酶结构的方法,所述方法包括提供分散于第二液相中第一液相的液滴的乳状液。一种液相为亲水相,而另一液相为与亲水相不混溶的疏水相。酶分子处于液滴与第二液相的界面分界处或界面分界内。将各液滴的酶分子交联,由各液滴形成单个的酶结构,所述酶结构稳定,且酶在其中被固定,其中酶的大多数活性位点向内取向或向外取向。



1. 一种生产酶结构的方法,所述方法包括

提供分散于第二液相中的第一液相的液滴的乳状液,其中一种液相为亲水相,另一液相为与亲水相不混溶的疏水相,以及其中酶分子处于液滴与第二液相的界面分界处或界面分界内;

将交联剂加到所述亲水相和 / 或所述疏水相和 / 或所述乳状液中;

向所述亲水相和 / 或所述疏水相和 / 或所述乳状液中加入三丁酸甘油酯作为临时保护剂;

通过交联剂使各液滴的酶分子交联,所述临时保护剂在交联中占据活性位点,因此可抑制交联剂占据活性位点或者与活性位点反应,由各液滴形成单个的酶结构,所述酶结构稳定,且酶在其中被固定,其中酶的大多数活性位点向内取向或向外取向;

从所述第二液相中回收单个的酶结构;以及

其中所述酶为脂肪酶。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的单个的酶结构具有开口,使所述液相可以出入所述结构。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的单个的酶结构是液体不能渗透的。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中包括向所述亲水相和 / 或所述疏水相和 / 或所述乳状液中加入用于改变酶的疏水性和 / 或电荷的改性剂。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述脂肪酶选自洋葱假单胞菌脂肪酶、荧光假单胞菌脂肪酶、产碱假单胞菌脂肪酶、皱褶假丝酵母脂肪酶、南极假丝酵母脂肪酶 A、南极假丝酵母脂肪酶 B、产脲假丝酵母脂肪酶、嗜热真菌脂肪酶、米黑根霉脂肪酶、黑曲霉脂肪酶、米曲霉脂肪酶、青霉脂肪酶、爪哇毛霉脂肪酶、米黑毛霉脂肪酶、少根根霉脂肪酶、戴尔根霉脂肪酶、日本根霉脂肪酶、雪白根霉脂肪酶以及猪胰脂肪酶。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中通过将所述酶溶解于亲水相或 W 相中,并通过将含有所述酶的亲水相与疏水相或 O 相混合形成乳状液,从而实现乳状液的制备。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中当所述乳状液为疏水相液滴分散于连续的亲水相中的 O/W 型乳状液时,选择性地使酶沉淀在所述界面处,或者当所述乳状液为亲水相液滴分散于连续的疏水相中的 W/O 型乳状液时,选择性地促使酶沉淀在液滴内。

8. 如权利要求 6 所述的方法,其中包括向乳状液中加入氨基酸以抑制单个酶结构的团聚。

9. 如权利要求 6 所述的方法,其中包括从所述酶结构中萃取第一液相。

10. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述亲水相含有水以及任选的在水中含有缓冲液。

11. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述亲水相含有聚乙二醇以及任选的含有与聚乙二醇混合的水。

12. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述疏水相含有油、碳氢化合物、醚或酯。

13. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述乳状液为亲水相液滴分散于连续疏水相中的 W/O 型乳状液,在所述亲水相中存在第二种酶、协同因子和 / 或介体。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其中可被脂肪酶水解的甘油三酸酯用作疏水相,疏水相液滴分散于连续的亲水相中,形成 O/W 型乳状液,以及在交联反应期间和交联反应后,交联结构内所含有的分散的疏水相被脂肪酶水解。

15. 如权利要求 6 所述的方法,其中形成疏水相液滴分散于连续的亲水相中的初始 O/W 型乳状液,所述方法包括在进行交联之前,将所述乳状液离心和从稀的亲水相中分离浓缩的乳状液以提高脂肪酶的纯度;以及通过加入具有更低 HLB 值的表面活性剂,将其转化以形成亲水相液滴分散于连续的疏水相中的 W/O 型乳状液。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其中向亲水相和 / 或疏水相和 / 或所述乳状液中加入改性剂以赋予所述酶结构特定的性质。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述的改性剂为可提高酶活性和改善乳状液稳定性的表面活性剂。

18. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述的改性剂为将酶沉淀在乳状液界面上的沉淀剂。

19. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述的改性剂为用于调节所述乳状液和 / 或所述酶结构的 pH、离子强度、粘度、磁性、团聚趋势和 / 或 ζ 电势的添加剂。

酶的稳定化

技术领域

[0001] 本发明涉及酶的稳定化。更具体地,本发明涉及生产稳定酶结构的方法、所述稳定的酶结构以及所述稳定酶结构的用途。

背景技术

[0002] 许多工业如化学、药学和化妆品工业普遍需要酶作催化剂。然而与化学催化剂不同,由于酶的不稳定性,其应用和保存限期受到限制。酶对温度和 pH 是极其相关的,因此其在许多工艺中的应用很困难。此外,可溶性的酶不易于从水相中回收,并且在储存或加工期间酶的活性通常会降低,因此而限制了酶作为催化剂在化学工艺中的应用。

[0003] 酶用作催化剂的商业应用可通过酶的固定化而增强,酶的固定化提供了双重优势:使酶更为刚性(通过将酶固定在固相上或固相中)而提高酶的稳定性,以及提高催化剂的整体尺寸使其回收更为容易。

[0004] 因此,通常的做法是使酶固定于固体载体上,以实现稳定酶和使酶可重复使用而降低成本的目的。然而,固定化的酶显示出局限性,其中最重要的是由于仅有固定体积的一小部分构成活性催化剂(酶)而使每个单元反应器的酶活性降低。本申请人已知以交联酶晶体(cross-linked enzyme crystal, CLEC)和交联酶团(cross-linked enzyme agglomerate, CLEA)形式存在的自支撑固定化酶(self-supported immobilized enzymes)。并已要求保护上述两者增加的比活性。此外, CLEC 和 CLEA 交联酶在反应介质中稳定,并能容易地分离和重复使用。与 CLEC 需要耗时的结晶化过程相比, CLEA 提供了更便宜、更有效的方法。然而, CLEC 和 CLEA 都由于酶的一些活性位点没有暴露而受到限制,因此为发挥特殊的功能,利用 CLEC 或 CLEA 的方法需要过量酶催化剂(以及随之增加的成本)以克服上述问题。此外,这些方法不易控制颗粒尺寸和不易在宽范围颗粒尺寸内控制形态。

发明内容

[0005] 因此,本发明的目的在于提供一种用于生产适于用作催化剂的稳定的酶结构的方法,由此至少使上述缺陷得以减轻。

[0006] 因此,根据本发明的第一方面,本发明提供一种生产酶结构的方法,所述方法包括

[0007] 提供分散于第二液相中的第一液相的液滴的乳状液,其中一种液相为亲水相,而另一液相为与亲水相不混溶的疏水相,以及其中酶分子处于液滴与第二液相的界面分界处或界面分界内;以及

[0008] 将各液滴的酶分子交联,由各液滴形成单个的酶结构,所述酶结构稳定,且酶在其中被固定,其中酶的大多数活性位点向内取向或向外取向。

[0009] 在乳状液中,因为不混溶的第一液相的液滴通常为球状,所述结构因此通常为中空球形,其中球形结构的里面或内部是空的或是被填充。换句话说,每一酶结构含有交联固定化酶分子的球壁、中空的中心区和可以是空的或者是含有液体即被填充的内芯或内

部,这将在下文说明。

[0010] 本发明的一种实施方式中,所述的各个结构可以具有开口,使所述液相可以出入这些结构。然而,本发明的另一实施方式中,所述结构可以是液体不能渗透的,即它们可以是胶囊形式,其中使第一液相被包封于胶囊内,即填充胶囊的中空内芯。如果这种稳定的酶胶囊随后用于液相反应体系中,例如用于催化反应体系,它们可以很容易地与反应体系的其它组分分离,例如通过选择具有合适密度的第一液相通过浮选分离。然而,当用于这样的体系时,它们不必一定只通过浮选分离,因为事实是所述的稳定酶结构是自支撑的,也就是说它们可以容易地从反应体系的其它组分中分离出来并重复使用或再利用。

[0011] 酶分子通常含有亲水和疏水端或面。当使用这种酶时,它们在液滴与第二液相的界面分界处的聚集和/或取向将会使其作用增强或得以保证。可以对天然酶进行修饰以增强这类性质。因此,可将用于改变酶的疏水性和/或电荷的添加剂加入到亲水相和/或疏水相和/或乳状液中。可用于此目的的添加剂或改性剂的例子包括特定的氨基酸、氨基化合物、蛋白质、长链烃醛,和以共价或其它方式与酶结合的其它改性剂。

[0012] 尽管所述的酶可以选自各类酶,如酯酶、蛋白酶、腈水解酶、腈水合酶、氧腈酶、环氧化物水解酶、卤代醇脱卤素酶、多酚氧化酶(如虫漆酶)、青霉素酰胺酶、酰化氨基酸水解酶、脲酶、尿酸酶、溶菌酶、天冬酰胺酶、弹性蛋白酶,但优选脂肪酶。

[0013] 所述脂肪酶可选自微生物、动物或植物来源,包括下列任意一种:洋葱假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas cepacia* lipase)、荧光假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas fluorescens* lipase)、产碱假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas alcaligenes* lipase)、皱褶假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase)、南极假丝酵母脂肪酶A(*Candida antarctica* lipaseA)、南极假丝酵母脂肪酶B(*Candida antarctica* lipase B)、产脲假丝酵母脂肪酶(*Candida utilis* lipase)、嗜热真菌脂肪酶(*Thermomyces lanuginosus* lipase)、米黑根霉脂肪酶(*Rhizomucor miehei* lipase)、黑曲霉脂肪酶(*Aspergillus niger* lipase)、米曲霉脂肪酶(*Aspergillus oryzae* lipase)、青霉脂肪酶(*Penicillium* sp lipase)、爪哇毛霉脂肪酶(*Mucor javanicus* lipase)、米黑毛霉脂肪酶(*Mucor miehei* lipase)、少根根霉脂肪酶(*Rhizopus arrhizus* lipase)、戴尔根霉脂肪酶(*Rhizopus delemere* lipase)、日本根霉脂肪酶(*Rhizopus japonicus* lipase)、雪白根霉脂肪酶(*Rhizopus niveus* lipase)以及猪胰脂肪酶(*Porcine Pancreatic* lipase)。

[0014] 当使用脂肪酶时,所述的稳定的脂肪酶结构尤其可用于水解、酸解、醇解、酯化、酯交换、互酯化、氨水解(ammoniolysis)、氨解、全水解(perhydrolysis)反应。其它酶类应用于与其功能特异的其它反应机理。

[0015] 更具体地,可以通过将所述酶溶解或增溶于亲水相中(此处也可称为“水相”或简称为“W”),并通过将含有所述酶的亲水相与疏水相(此处也可称为“油相”或简称为“O”)混合而得到所述乳状液。因此,所述乳状液可以是O/W型(即油相或疏水相液滴分散于连续的水相或亲水相中)、W/O型(即水相或亲水相液滴分散于连续的油相或疏水相中)、O/W/O型或W/O/W型等。

[0016] 所述方法可以进一步包括例如通过增加水相中存在的盐浓度(“盐析”),选择性地促使酶沉淀在界面处(对O/W型乳状液)或液滴内(对W/O型乳状液)。

[0017] 可以通过交联剂实现所述酶分子的交联。所述方法可以包括将交联剂加到所述亲

水相和 / 或所述疏水相和 / 或所述乳状液中。通常选择交联剂使其仅在所述乳状液形成后的足够长时间内,实现交联作用,以使酶的取向在相界面处进行。

[0018] 当使用交联剂时,所述交联剂是一种多官能的试剂,即具有两个或更多官能团或反应位点的分子,可与酶的基团发生反应形成交联的大分子,即所述的稳定结构。所述交联剂可以选自下列物质:异氰酸酯如六亚甲基二异氰酸酯或甲苯二异氰酸酯;醛如戊二醛、丁二醛和乙二醛;环氧化物;或酸酐等。各种交联试剂的使用可用于改变球体的物理和 / 或化学性质。

[0019] 可以通过加入能够在交联中占据活性位点的临时保护剂,来防止酶的活性位点被交联剂占据或与交联剂反应。对脂肪酶来说,所述保护剂可以是例如三丁酸甘油酯。三丁酸甘油酯是水溶性的,可以在水中很容易地洗涤除去。特定的酶(甚至特定的种类)需要不同的保护剂以使交联过程中的活性损失降至最低或得以阻止。

[0020] 如果稳定的酶结构或球体存在团聚问题时,可通过在交联后加入氨基酸来减轻或抑制上述问题。这些氨基酸可以与残余的游离交联剂基团反应,因此改变交联的球体的物理性质。氨基酸对球体的改性作用也可以通过控制球体的表面性质增强酶对于特定底物的活性。例如,苯基甘氨酸可以加入到交联的球体中以改善球体的疏水性,而天冬氨酸的改性作用是将改善球体的亲水性。

[0021] 所述方法可以包括通过例如浮选、过滤、离心或磁力分离(magnetism)等方式从第二液相中回收或分离所述的稳定酶结构。如需要,可以洗涤由此回收的稳定酶结构,如需要,还可以随后干燥所述的稳定酶结构。所述稳定酶结构的干燥可以通过喷雾干燥、真空干燥或冻干(冷冻干燥)来实现。

[0022] 如需要,所述方法还可以进一步包括使用适宜的溶剂如己烷或超临界二氧化碳(用于疏水液体)或水(用于亲水液体),通过诸如干燥、冷冻干燥或萃取,从所述的稳定酶结构中萃取第一液相。因此,当欲从稳定的酶胶囊中萃取第一液相(通常为油相)时,可以通过使能够溶解第一液相的有机溶剂接触稳定的酶胶囊,或使用适宜的表面活性剂与水的混合物接触所述胶囊,以实现所述的萃取。另外,随后可以通过超临界流体萃取法萃取所述第一液相。所述流体优选使用超临界二氧化碳。二氧化碳的临界点(31.2°C和73.8bar)足够低,使萃取过程不损害所述的稳定酶结构。

[0023] 尽管溶解酶的亲水相可以仅包括水,但是确信如果所述亲水相中含有适宜的缓冲液,可以获得改进的结果。应该选择便于酶分子交联的缓冲液,同时确保酶的稳定性。因此,例如所述亲水相可以含有 pH7-8 的缓冲液。这样的缓冲液可以是磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液,含三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)缓冲液的水溶液或 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 溶液。

[0024] 另外,所述亲水相可以包括或含有聚乙二醇(PEG)。当使用低分子量的聚乙二醇如 PEG400 或 PEG100 时,所述聚乙二醇可单独使用,即所述亲水相由低分子量的聚乙二醇组成。然而,可任意使用较高分子量的聚乙二醇作为代替,其中所述较高分子量的聚乙二醇溶于水形成亲水相。当异氰酸酯用作油包水型乳状液中的交联剂时,所述交联剂与 PEG 以及所述酶反应,导致形成增强的稳定酶胶囊,该胶囊含有掺入酶的膜及内在的水凝胶载体。另外,可以使丙烯酸胺聚合以提供相似的载体。上述做法可以有利地改善所述胶囊的机械强度,例如改善对剪切伤害的抵抗力。

[0025] 与水不混溶的相,即疏水相,可以含有油如矿物油、加州希蒙得木油(jojoba oil)

或鳄梨油 (avocado oil) ;碳氢化合物如癸烷、庚烷、己烷或异十二烷 ;醚如二辛醚、二苯醚等 ;酯如甘油三酸酯、棕榈酸异丙酯或肉豆蔻酸异丙酯等。确信本发明方法中使用的乳状液通常为油包水型或 W/O 型乳状液 ;然而,如前所述,可以替代使用水包油型或 O/W 型,或油包水包油型即 O/W/O 型,或水包油包水型即 W/O/W 型乳状液。因此,例如当酶为脂肪酶时,可以使用油包水型乳状液以确保脂肪酶的大多数的疏水活性位点向外取向,从而提高了所述结构的总有效活性。

[0026] 进一步地,当使用油包水乳状液时,有利于第二种酶溶解于水溶液或亲水相中。如果所述第二种酶也具有聚积在液滴 / 第二液相界面的能力时,得到的交联酶结构将含有两种酶。或者,当选择第二种酶使其不聚积在所述界面时,将得到以一种酶为结构的主要组分的交联酶结构,而第二种酶被包封 或位于所述结构的内部。这样的复合酶结构可有利地用于例如在单一的反应步骤中催化多个反应。此外,所述液滴可以包含起修饰作用或其它作用的协同因子或反应介体,例如,为了在球体中再次产生第二种氧化还原酶,可以将氧化还原酶和适宜的介体一起加入球体中。

[0027] 在本发明的一个特定实施方案中,能被脂肪酶水解的甘油三酸酯可用作疏水相或油相,形成 O/W 型乳状液 ;在交联反应期间和交联反应后,位于稳定的交联结构或球体内的分散相或油相即甘油三酸酯被脂肪酶水解。水解产物通常是水溶性的,容易地被沥滤出来,因此生产本发明稳定结构所需要的工艺步骤的数目被最小化或减少。

[0028] 在本发明的另一个实施方案中,可以形成初始的 O/W 乳状液。通过上述操作,脂肪酶发生了一定程度的纯化,因为其中存在的杂质不能与脂肪酶同等程度地在界面边界处聚集。在进行交联之前,所述方法包括将所述乳状液离心和从稀的水相中分离浓缩的乳状液。随后,使用浓缩的乳状液可以形成进一步的 O/W 乳状液。如需要需要,该步骤可以重复进行一次或多次以提高酶的纯度。在最终纯化步骤后,通过加入具有更低 HLB 值的表面活性剂,可以将乳状液转化以形成 W/O 乳状液,所述 HLB 值为 3-10,优选 4-6。这确保了脂肪酶活性位点优先向分散相液滴的外部取向。随后可以进行如上文所述的脂肪酶的交联。

[0029] 当使用聚集在界面处的酶和 W/O 乳状液时,可以通过调整水相中溶解的酶浓度控制内部交联酶球体的形态。例如,通过使用降低的酶浓度,可以形成中空的酶球体,并且由于对底物的平均扩散距离降低,按重量计算的酶活性将得以提高。

[0030] 可以向亲水相中和 / 或疏水相中和 / 或所述乳状液中加入改性剂以赋予稳定酶结构特殊性质。为此可加入下列的一种或多种改性剂 :表面活性剂、沉淀剂和添加剂。

[0031] 如需要,可以使用表面活性剂以赋予增强的酶活性 (关于其在随后催化反应中的使用) 和改善的乳状液稳定性。所述表面活性剂可以是阴离子、阳离子、非离子、两性离子、聚合的表面活性剂或两种或多种上述 表面活性剂的混合物。当使用阴离子表面活性剂时,可以使用烷基硫酸盐如十二烷基硫酸钠或十二烷基醚硫酸钠 (sodium laureth sulphate),或烷基醚硫酸盐。当使用阳离子表面活性剂时,可以使用十六烷基三甲基氯化胺 (centrimonium chloride)。当使用非离子表面活性剂时,可以使用乙氧化烷基苯酚如聚氧乙烯 (10) 异辛基环己基醚 (TritonX100) 或聚氧乙烯 (9) 壬基苯基醚 (Nonoxynol-9)。当使用两性离子或两性分子表面活性剂时,可以使用癸基甜菜碱。当使用聚合表面活性剂时,可以使用环氧乙烷 - 环氧丙烷 - 环氧乙烷的三嵌段共聚物,也称为泊洛沙姆 (poloxamer),如购自 BASF 的商品名为 Pluronic 的产品,或可以是环氧丙烷 - 环氧乙烷 - 环氧丙烷的三

嵌段共聚物,也称为 meroxapol。

[0032] 如需要,可以使用沉淀剂以将酶沉淀在乳状液界面上。当存在沉淀剂时,其可以是无机盐例如硫酸铵;有机溶剂如 1,2- 二甲基乙烷或丙酮;或可溶的聚合物。

[0033] 使用添加剂或辅料以赋予乳状液和 / 或稳定酶结构所需的性质。可以通过使用这些添加剂调整的性质包括:通过使用例如缓冲液调整的 pH;通过使用例如盐调整的离子强度;通过使用例如 PEG 调整的粘度;通过使用例如铁盐调整的磁性;通过使用例如具有位阻性质的表面活性剂调整的团聚趋势;以及通过使用例如阴离子表面活性剂调整的 ζ 电势。

[0034] 根据本发明的第二方面,本发明提供了一种酶结构,所述酶结构含有交联的酶分子,使得所述结构稳定,其中所述结构中空,所述酶固定在其中,所述酶的大多数活性位点向内取向或向外取向。

[0035] 所述酶结构可以参考本发明第一方面的如前所述的结构。

[0036] 根据本发明的第三方面,本发明提供了进行反应的方法,所述方法包括在许多如前所述的酶结构存在下,使反应介质进行反应,其中所述反应被所述酶结构催化。

[0037] 下面将结合以下的非限制性实施例和附图对本发明进行更详细地说明。

附图说明

[0038] 图 1 表示根据实施例 1 制备的交联脂肪酶胶囊的光学显微照片;

[0039] 图 2 表示根据实施例 1 制备的交联脂肪酶胶囊的颗粒尺寸分布;

[0040] 图 3 表示根据实施例 2 制备的交联脂肪酶胶囊的光学显微照片;和

[0041] 图 4 表示根据实施例 2 制备的交联脂肪酶胶囊的颗粒尺寸分布。

具体实施方式

[0042] 实施例 1 (未优化) 从油包水型乳状液制备交联或稳定的脂肪酶球体 (结构)

[0043] 将 1g 脂肪酶 AmanoAK 加到 195g 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 溶液 (pH7.8) 和 5g 矿物油 (Castrol) 中。使用 SilversonL4R 实验室用转子-定子匀浆机以 6000rpm 的速度匀浆 5 分钟,以使所述混合物均匀。将 1.5g 六亚甲基二异氰酸酯 (Merck Schuchardt) 加到所述乳状液中,然后在室温下将所述乳状液搅拌 2 小时。随后使用 0.45 μ m 的滤纸过滤回收所述交联的酶结构,并使用 PBS 洗涤 5 次,每次使用 50ml 的 PBS (共 250ml PBS)。图 1 显示根据所述方法得到的典型的稳定酶球体或结构。使用激光光散射 (Malvern Mastersizer 2000) 测定颗粒尺寸,得到的沙脱平均直径 (Sautermean diameter),为 49.4 μ m (见图 2)。

[0044] 使用如 Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. & Erdmann, H. (1992), "Comparison of lipases by different assays", Enzyme Microb. Technol., 14, 631-639; 以及 López-Serrano P., Cao L., van Rantwijk & Sheldon R. A. (2002), "Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases", Biotechnology Letters., 24, 1379-1383 所记载的乙酸对硝基苯酯测定法测定所述的稳定酶 (脂肪酶) 结构的活性。

[0045] 所述方法测量了从脂肪酸的对硝基苯基酯中释放的对硝基苯酚。所述反应在 pH 7.4, 37°C 下进行,并在 410nm 测量释放的对硝基苯酚。得到的活性是 63U/g 脂肪酶,此处的 U 为 μ mol/min。

[0046] 实施例 2 从油包水型乳状液制备交联或稳定的脂肪酶球体（结构）

[0047] 在 100mM Tris-Cl[三（羟甲基）氨基甲烷]缓冲液（pH 8.0）中再悬浮皱褶假丝酵母脂肪酶（*Candida rugosa* lipase）（Altus Biologics, Inc）制备脂肪酶溶液，最终浓度为 100mg/ml。使用 3 倍体积的 100mM Tris-Cl 缓冲液（pH 8.0）在装有 10K 聚醚砜膜（Microsep(Pty)Ltd, PO Box 391647, Bramley2018, South Africa）的 Amicon 超滤装置中透析过滤所述酶样品。

[0048] 使用如下体积的下列试剂制备脂肪酶球体：200 μ l 皱褶假丝酵母脂肪酶溶液（如上制备）；50 μ l nonoxynol-4；50 μ l 三丁酸甘油酯；5ml 矿物油。所述混合物在 1500rpm 下搅拌 1 分钟进行乳化。向上述溶液中加入 40 μ l 戊二醛（gluteraldehyde）（25%的水溶液），并进一步搅拌 10 分钟。所述乳状液在 4℃放置 12 小时。

[0049] 交联后，使用装有 JA 20.1 转子的 Beckman J2-21ME 离心机将所述乳状液在 10000rpm 下离心 5 分钟，然后除去油相。所述小球用 10ml 100mM Tris-Cl 缓冲液（pH 8.0）洗涤两次并使用如上所述的离心方法回收所述小球。洗涤后，使用 1ml 的缓冲液再悬浮所述小球，并用于酶活性的测定，图 3 显示了得到的酶球体。所述球体在大约 10 μ m 和 100 μ m 之间具有窄的粒径分布（图 4）。

[0050] 使用如 Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. & Erdmann, H. (1992), “Comparison of lipases by different assays”, *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 631-639；以及 López-Serrano P., Cao L., van Rantwijk & Sheldon R. A. (2002), “Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases”, *Biotechnology Letters.*, 24, 1379-1383 所记载的棕榈酸对硝基苯酯和丁酸对硝基苯酯测定法测定稳定酶（脂肪酶）结构的活性。

[0051] 所述方法测量从脂肪酸的对硝基苯基酯中释放的对硝基苯酚。所述反应在 pH 8.0, 37℃下进行，并在 410nm 测量释放的对硝基苯酚。相对于水溶液中最初的游离酶的活性，没有三丁酸甘油酯作为添加剂的活性为 0.11%（对于棕榈酸对硝基苯酯）。出人意料的是，当三丁酸甘油酯作为添加剂时，相对于水溶液中最初的游离酶的活性，得到的活性在约 5%（对于棕榈酸对硝基苯酯）到 124%（对于丁酸对硝基苯酯）的范围内。

[0052] 实施例 3 葡聚糖醛（dextran aldehyde）作为交联剂

[0053] 重复实施例 2，只是所使用的交联剂为来自于明串珠菌种（*leuconostoc* species）的平均分子量为 20kDa 的活化葡聚糖（葡聚糖醛），油相为植物油，脂肪酶溶液与 Tris 缓冲液的比例为 1：1，并且没有使用表面活性剂之外，重复实施例 2。如 Hong, T., Guo, W., Yuan, H., Li, J., Liu, Y., Ma, L., Bai, Y., & Li, T. (2004) “Periodate oxidation of nanoscaled magnetic dextran composites”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 269, 95-100 所述，葡聚糖醛通过葡聚糖和过量的偏高碘酸钠反应制备。相对于水溶液中最初的游离酶的活性，得到的活性为 7.5%（对于棕榈酸对硝基苯酯）。

[0054] 实施例 4 从水包油乳状液制备的交联酶的球体

[0055] 除了通过改变液相和表面活性剂的比例来得到水包油乳状液外，重

[0056] 复实施例 2。

[0057] 实施例 5 不同的酶类（虫漆酶）

[0058] 重复实施例 3，只是所使用的酶为来自于如 Jordaan, J., Pletschke, B. I. & Leukes,

W.D. (2004) "Purification and partial characterization of athermostable laccase from an unidentified basidiomycete", *Enz Microb Technol.* 34, 635-641 所述的 UD4 物种的虫漆酶, 和使用丁香酸 (乙醇的饱和溶液) 代替三丁酸甘油酯。

[0059] 使用 100mM、pH4.5 的琥珀酸盐 - 乳酸盐缓冲液平衡所述的球体。按照 Jordaan, J. & Leukes, W.D. (2003) "Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus". *Enz Microb Technol.* 33(2/3), 212-219 所述的方法, 以 ABTS 作为底物, 在 25°C 测试了所述球体的虫漆酶活性, 随后在 420nm 处对所述产物进行光度测量。

[0060] 实施例 6 蛋白浓度

[0061] 将实施例 2 (无三丁酸甘油酯) 中的脂肪酶浓度降低一半, 导致以按重量计脂肪酶的活性提高了 100% 以上。

[0062] 对较低的蛋白浓度获得的活性提高 (相对于较高的蛋白浓度), 一种可能的解释是: 所述蛋白 (在此情况下为脂肪酶) 优先聚积在水 - 油界面处。较低的脂肪酶浓度将会导致形成中空的球体。基于单位重量的考虑, 因为对于反应底物和产物来说中空的球体具有较短的平均扩散距离, 因此相对于 "填充的" 球体, 中空的球体可望具有更高的活性。

[0063] 实施例 7 沉淀剂的加入

[0064] 将丙酮作为沉淀剂加到实施例 2 (无三丁酸甘油酯) 的乳状液中, 使活性提高了 114%。

[0065] 实施例 8 油相的选择

[0066] 在实施例 2 (无三丁酸甘油酯) 的方法中, 用植物油代替矿物油, 使活性增加 4 倍, 但从产物溶液中回收难度增加, 这可能是由于存在水解油 (hydrolysed oil) 的原因。

[0067] 实施例 9 保护剂的加入

[0068] 如实施例 2 讨论的那样, 相对于最初的游离酶浓度, 加入三丁酸甘油酯作为保护剂, 使皱褶假丝酵母脂肪酶的活性 (对于棕榈酸对硝基苯酯) 从 0.14% 增加为 5%。这种 "保护能力" 并不是对所有的酶都起作用。例如, 相对于最初的游离酶, 加入三丁酸甘油酯作为保护剂, 使来自米根霉菌 (*Rhizopus oryzae*) 的脂肪酶的活性 (对于丁酸对硝基苯酯) 从 4.17 降为 0.35%, 降低了 12 倍)。

[0069] 实施例 10 与残余游离交联剂基团结合以降低聚集

[0070] 通过向最终产物中添加氨基酸, 使球体的聚集降低。这被认为是由于氨基酸与球体表面上的残余游离交联剂基团结合的原因。出人意料的是, 相对于没有使用氨基酸的对照物, 使用氨基酸, 尤其是使用苯基甘氨酸时, 还观察到活性的改善。相对于实施例 2 (无三丁酸甘油酯) 的常规方法, 对脂肪酶球体活性的改善约为大约 100% (对于棕榈酸对硝基苯酯和丁酸对硝基苯酯均是如此)。

[0071] 实施例 11 虫漆酶交联球体的重复使用

[0072] 根据实施例 5 的方法制备虫漆酶球体。所述球体与底物 2,2'-连氨基 - 双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 反应六次, 并在每次反应之间进行回收与洗涤。虫漆酶经过六次重复使用后, 其活性与所述球体的最初活性相当。

[0073] 实施例 12 用于 NEE 的交联脂肪酶球体的重复使用

[0074] 根据实施例 2 的方法制备脂肪酶球体。所述球体与底物萘普生乙酯 (NEE) 在 40°C

反应三次,并在每次反应之间进行回收与洗涤。交联的脂肪酶球体经过三次重复使用后,其活性降低约 70% (相同酶的 CLEC 显示出相似的活性损失。Brady, D., Steenkamp, L., Skein, E., Chaplin, J.A. 和 Reddy, S. (2004) "Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethylester using ChiroCLEC-CR", *Enz. Microb. Technol.* 34. 283-291)。

[0075] 实施例 13 用棕榈酸对硝基苯酯交联的脂肪酶球体的重复使用

[0076] 根据实施例 2 的方法制备脂肪酶球体。所述球体与底物棕榈酸对硝基苯酯反应,并在每次反应之间进行回收与洗涤。在最后的重复使用中,脂肪酶交联球体的活性降低为初始脂肪酶球体活性的 79.6%。

[0077] 实施例 14 回收的脂肪酶球体活性与 CLEA 的比较

[0078] 根据实施例 2 的方法制备皱褶假丝酵母脂肪酶球体。根据 Cao, L. 和 Elzinga, J. 的美国专利申请 20030149172 的实施例 8 制备皱褶假丝酵母脂肪酶 CLEA,其中戊二醛与乙二胺的比为 1 : 7.88。

[0079] 以棕榈酸对硝基苯酯作为底物,与 CLEA 相比,测量的球体的活性保留对于脂肪酶球体为 2.7%,对于 CLEA 为 3.4%,而以丁酸对硝基苯酯作为底物,测量的活性对于脂肪酶球体为 53.7%,对于 CLEA 为 6.5%。

[0080] 实施例 15 水包油和油包水乳状液的比较 (脂肪酶的取向)

[0081] 根据实施例 2 的方法制备油包水的皱褶假丝酵母脂肪酶球体。除了油的体积降为 0.2ml 以及缓冲液的体积增加为 5ml 外,根据实施例 2 的方法制备水包油的皱褶假丝酵母脂肪酶球体。以丁酸对硝基苯酯作为底物,油包水乳状液得到的比活性比水包油乳状液得到的比活性高 136.0%,从水包油乳状液的 8.9U/mg 提高到油包水乳状液的 26.0U/mg。

[0082] 实施例 16 通过机械搅拌影响球体尺寸的控制

[0083] 除了使用 Silverson 匀浆机而非搅拌方法制备乳状液外,根据实施例 2 的方法制备皱褶假丝酵母脂肪酶球体。仅仅通过改变匀浆机的转速设定,即分别设定为 1000rpm 和 3000rpm,进行了两个实验。测定颗粒粒径分布,结果表明使用 1000rpm 和 3000rpm 产生的球体的平均直径分别为 52.0 μm 和 20.6 μm ,比较而言,对棕榈酸对硝基苯酯和丁酸对硝基苯酯作为底物的比活性分别提高了 28% 和 83%。

[0084] 本发明因此提供了使用乳状液作为载体,通过交联稳定酶的方法。本发明还涉及当所述结构用作后续反应的催化剂时,就单位体积的所述结构而言,酶以最大的表面积进行接触。此外,所述的稳定酶结构易于重复使用,比大多数固定酶产品更为便宜,将会在许多工艺中作为催化剂得以广泛应用。

[0085] 此外,由于脂肪酶在亲水 / 疏水相界面处的选择取向,所述脂肪酶将会在此浓缩。因此,当在水包油乳状液的实例中应用此方法时,同时会从细胞溶解液粗品中纯化想要的脂肪酶。对于具有外部疏水区域的其它酶,包括许多膜结合性的酶,也产生同样的作用。

[0086] 脂肪酶在相界面处的交联将会使脂肪酶固定于活性 (开启 (lid open)) 状态。

[0087] 应用水包油乳状液可以产生单层脂肪酶球体,因此提供了一种相对于酶的质量可以产生最大表面积的交联方法。

[0088] 应用油包水乳状液将产生更密集的、多层的酶球体。

[0089] 这种酶的固定化形式可以实现酶的回收和重复使用。

[0090] 可以相信,本发明的方法提供了稳定的酶的中空球体结构,当所述结构随后用于催化反应时具有如下优点:

[0091] 1. 催化剂的接触表面积最大(球形的中空胶囊);

[0092] 2. 可以控制催化剂的浮力,例如可以从反应介质中容易地分离漂浮颗粒。

[0093] 3. 可通过控制乳状液的粒径分布来控制所形成的固定化酶颗粒的平均尺寸(直径)。

[0094] 4. 通过利用许多脂肪酶和一些其它酶在溶剂界面的特性自取向,可按一种受控方式产生所述的固定酶球体,以使得活性位点的大多数按照需要向内腔取向或向外取向。

[0095] 5. 由于存在亲水/疏水界面,诸如脂肪酶等的酶以活性形式被固定。

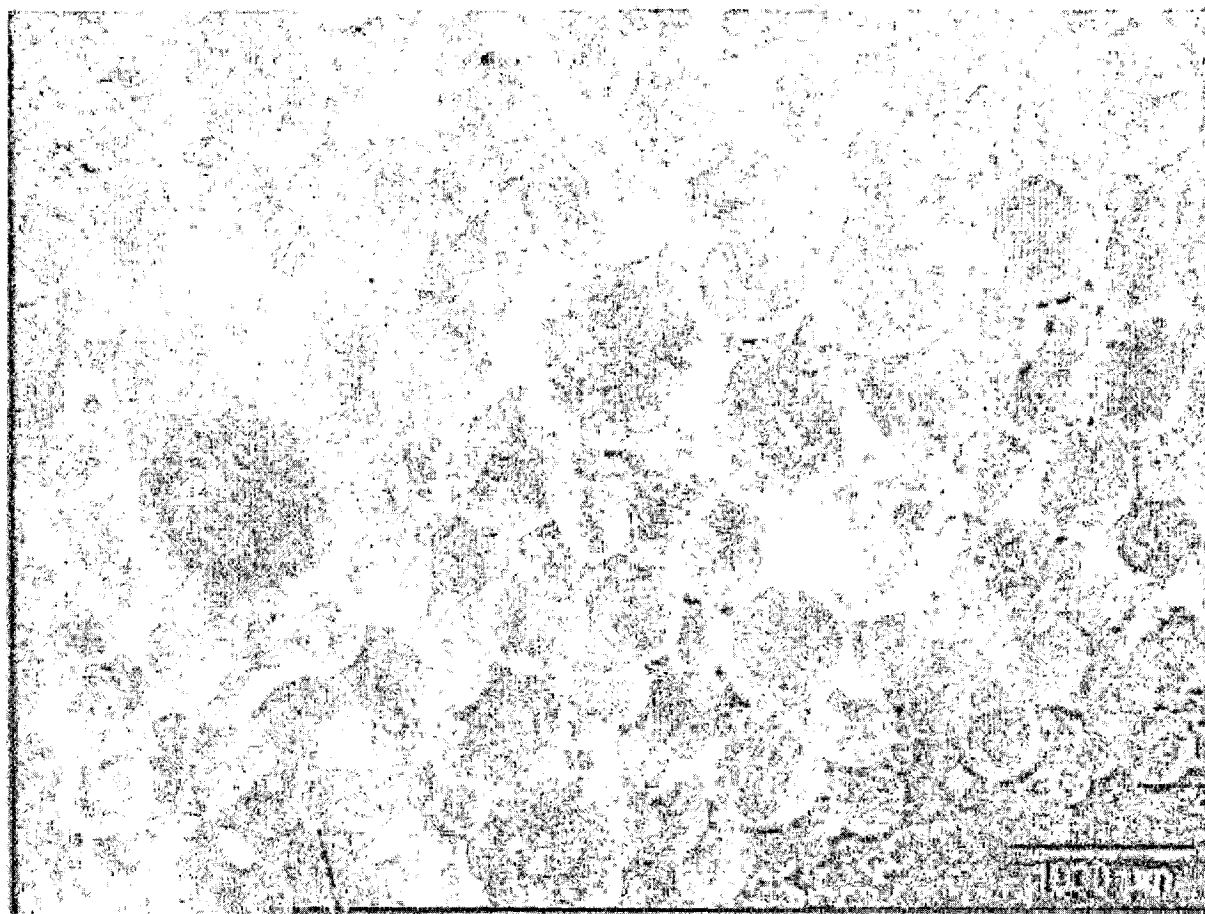


图 1

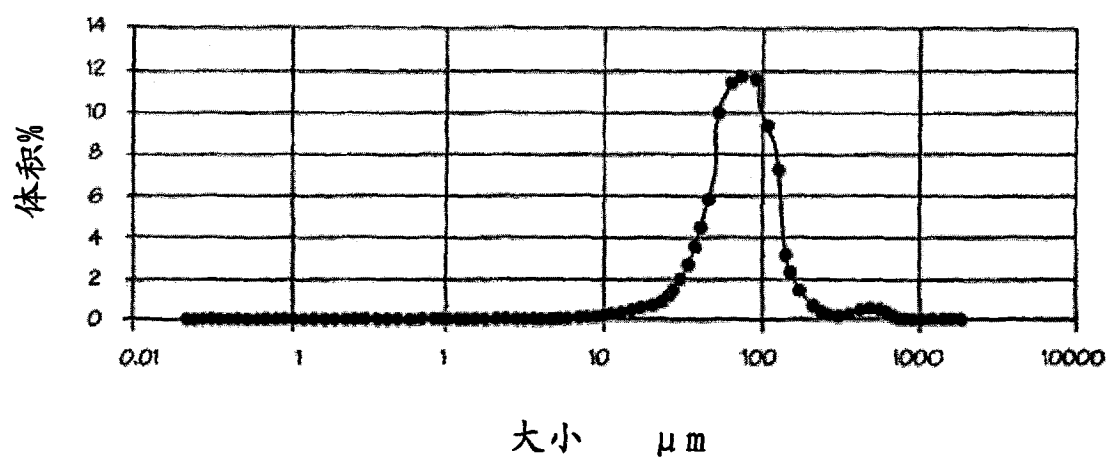


图 2

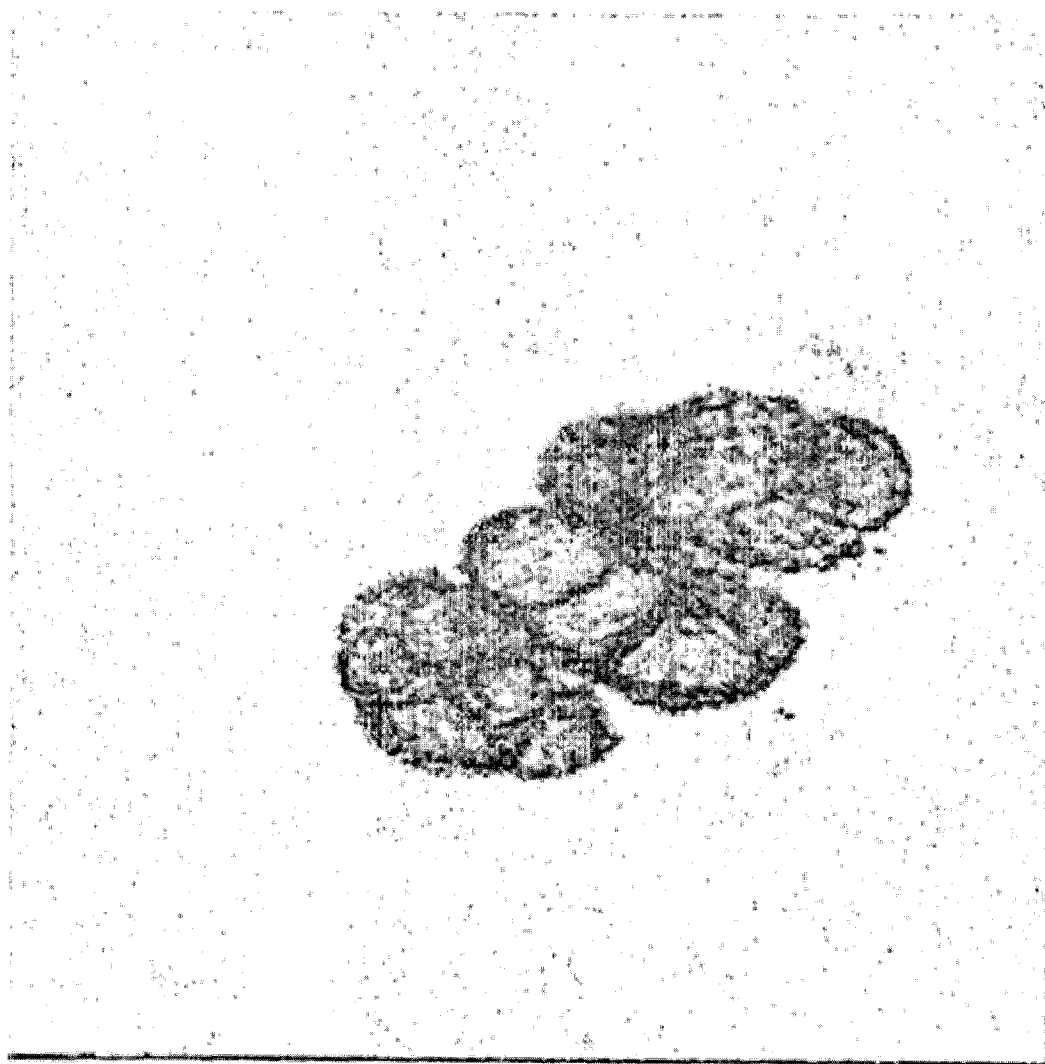


图 3

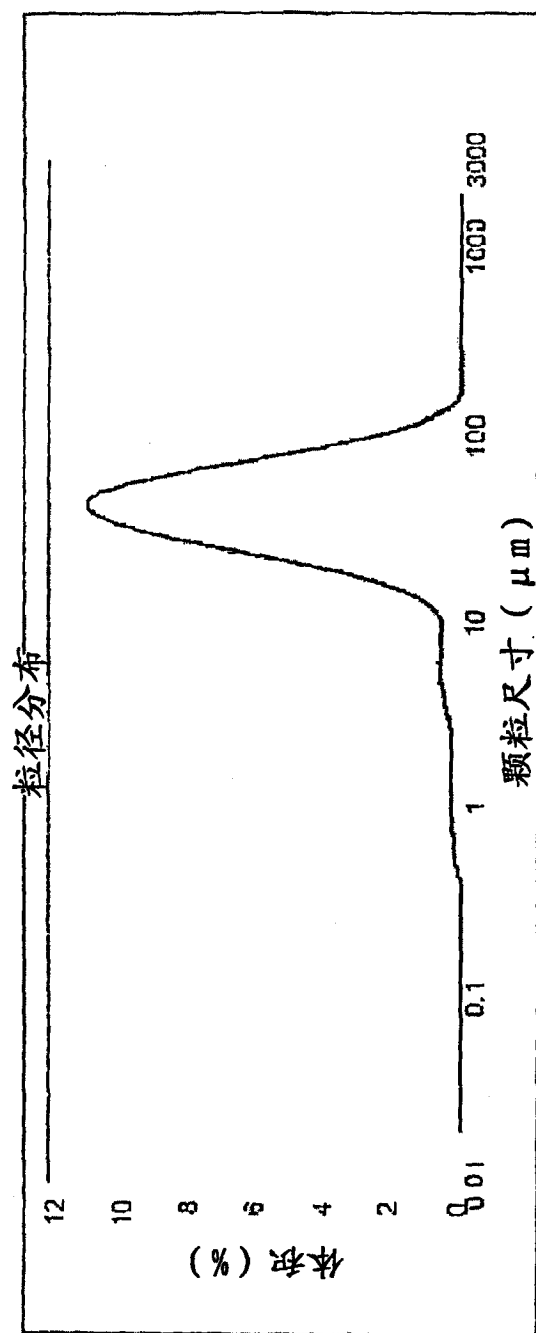


图 4