



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1908166 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 23

(21) 申请号 200610030360. 1

(22) 申请日 2006. 08. 24

(73) 专利权人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路 130 号

(72) 发明人 王筠松 石变芳 卢冠忠 郭杨龙

王艳芹 郭耘 刘晓晖 张志刚

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

31001

代理人 吴宝根

(51) Int. Cl.

C12N 11/08 (2006. 01)

(56) 对比文件

程凡亮. 微球与离子螯合微球的制备及应用
于固定木瓜蛋白酶研究. 中国优秀博硕士学位论文
全文数据库(硕士)基础科学辑, 2004, 摘要第 3

段、第 10 页第 3 段、第 13-14 页、第 17-18 页 2、载
体的游离氨基含量.

A. S. Maria Chong, et al.. Functionalized
nanoporous silicas for the immobilization
of penicillin acylase. Applied Surface
Science 237. 2004, 398-404.

审查员 徐莉

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种制备高活性固定化青霉素酰化酶杂化载
体的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种制备高活性固定化青霉素
酰化酶杂化载体的方法, 包括下列步骤: 将环己
烷、聚乙二醇辛基苯基醚和正己醇混合均匀, 在搅
拌下加入氨水, 配制成透明澄清的反相微乳液, 搅
拌 15min 后向其中加入正硅酸乙酯, 搅拌 30min
后加入硅烷化试剂, 正硅酸乙酯和硅烷化试剂的
体积比 $V_{\text{正硅酸乙酯}} : V_{\text{硅烷化试剂}} = 0.5 \sim$
 $9.5 : 0.5 \sim 9.5$, 水解缩合反应 22h, 用丙酮洗
涤, 室温真空干燥后, 得到所述高活性固定化青霉
素酰化酶杂化载体。本发明制备的杂化载体, 富含
有机基团, 采用适宜的活化负载方式, 可将青霉素
酰化酶以共价方式或吸附方法固定在载体上, 从
而获得高于其他载体制备的固定化酶的活性, 并
且具有良好地操作稳定性和贮存稳定性。



1. 一种制备高活性固定化青霉素酰化酶杂化载体的方法,包括下列步骤:将环己烷、聚乙二醇辛基苯基醚和正己醇混合均匀,在搅拌下加入氨水,配制成透明澄清的反相微乳液,搅拌 15min 后向其中加入正硅酸乙酯,搅拌 30min 后加入硅烷化试剂,正硅酸乙酯和硅烷化试剂的体积比 $V_{\text{正硅酸乙酯}} : V_{\text{硅烷化试剂}} = 0.5 \sim 9.5 : 0.5 \sim 9.5$,水解缩合反应 22h,用丙酮洗涤,室温真空干燥,得到所述高活性固定化青霉素酰化酶杂化载体;所述硅烷化试剂为 γ -氨丙基三乙氧基硅烷。

一种制备高活性固定化青霉素酰化酶杂化载体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备催化剂载体的方法,更具体地说是涉及一种制备高活性固定化青霉素酰化酶杂化载体的方法。

背景技术

[0002] 酶是一种生物催化剂,其化学本质是蛋白质。由于它具有催化活性高、选择专一性强、反应条件温和等特点,酶已被广泛地应用于生物化工、医药化工、食品工业、轻工等领域。目前,已发现的酶达数千种。尽管水溶性酶有许多其他催化剂不能比拟的优点,但由于水溶性酶是根据生物自身的需要产生的,因而在实际应用中受到很大限制,其主要缺点是:

[0003] (1) 提取纯化繁琐,价格昂贵;

[0004] (2) 反应后,回收重复利用,在技术上有一定的困难;

[0005] (3) 产物分离提纯困难,提高了生产成本;

[0006] (4) 不能在有机溶剂中、强酸、强碱或者高温下使用,稳定性较差,有些酶在温和的条件下使用也会失去活性。

[0007] 固定化酶能克服上述大多数的缺点,因此人们对固定化酶的应用越来越感兴趣。1971 年在美国新罕布什尔州 Henniker 召开的首届酶工程会议上将“固定化酶”这个术语定义为:被局限在某表面的特定区域上的、并且保留了它们的催化活力,可以反复、连续使用的酶。与水溶性酶相比固定化酶的优点体现在:

[0008] (1) 可以在较长时间内进行反复分批反应和装柱连续反应;

[0009] (2) 极易将酶与底物、产物分开;

[0010] (3) 可以提高酶的稳定性;

[0011] (4) 反应过程可以加以严格控制;

[0012] (5) 产物溶液中没有酶的残留,简化了提纯工艺;

[0013] (6) 可以提高产物质量;

[0014] (7) 酶的使用效率提高;

[0015] (8) 转化过程基本无三废排出。

[0016] 鉴于固定化酶上述优点以及近年来固定化酶技术的发展,使酶的大规模工业应用得以实现。因此,酶的固定化研究已成为近年来酶工程研究的一个重要方向。迄今为止,固定化酶的制备方法可大致分为以下主要四种,即吸附法、共价结合法、交联法和包埋法。吸附法分为物理吸附法和离子吸附法;酶与载体间以离子键、范德华力等结合;二者之间的结合力较弱,因此酶易流失,但此种方法具有酶活性中心不易被破坏和酶高级结构变化较少等优点。共价结合法是将酶以共价键结合于载体上,具体操作是将载体表面的有关基团活化,然后与酶分子中的有关基团偶联,或在载体表面连接双功能试剂,然后将酶偶联上去,此方法制得的固定化酶与载体结合牢固、不易脱落,但此法反应条件苛刻,操作复杂,且剧烈的反应条件容易引起酶蛋白高级结构变化,破坏部分活性中心,因此往往不能得到活

性较高的固定化酶。交联法是指先将酶吸附于不溶性载体上,然后使用双功能或多功能试剂,使酶分子之间进行分子间交联,形成交联网状结构而使酶固定化的方法,此种方法也存在反应条件剧烈、酶活损失等不足。包埋法是将酶包埋于微囊中。此法制备的固定化酶不宜使用大分子反应物(底物),且酶容易失活,必须巧妙设计反应条件,一般用于制备固定化细胞。四种方法各有优缺点,在工业化应用中,为了降低固定化酶的成本,要求制备的固定化酶有良好的操作稳定性,可以反复分批反应。因此,综合上述四种方法,用共价法制备或交联法制备,所得固定化酶可以满足操作稳定性这一要求,而用吸附法制备的固定化酶活性较高。

[0017] 青霉素酰化酶是催化青霉素 G 钾盐裂解制备 6-氨基青霉烷酸(6-APA)的催化剂。6-APA 是合成半合成青霉素的关键中间体,在 6-APA 的氨基上接上某些侧链,可获得高效、广谱、服用方便的半合成青霉素,如氨苄青霉素、甲氧苄青霉素、羟氨苄青霉素和羧苄青霉素等。由于这些半合成青霉素在临床上的广泛应用,使 6-APA 的需要量日益增长。目前,6-APA 的制备方法主要有化学裂解法和酶法。由于化学法存在反应条件苛刻、收率低、副反应多以及三废污染等问题,现国际上主要以酶法生产 6-APA。但是,若使用游离酶催化青霉素的水解过程,则由于游离酶的弱点,在经济上无法与化学法竞争。近年来,由于固定化技术的发展,人们利用固定化青霉素酰化酶水解青霉素 G 钾盐产生 6-APA。由于固定化青霉素酰化酶具有稳定性高、容易分离、可实现连续操作等问题,在工艺上、经济上均可与化学法竞争。CN 1279287A 发明了一种多元共聚多孔微珠,作为固定青霉素酰化酶的载体,但高聚物本身的结构及性质决定了它存在如下弱点:控制聚合物的孔结构及表面功能性基团的数量及其分布非常困难;有些功能性基团处于高聚物的高度交链网格中,尽管经过溶剂的溶胀后情况有所改善,但仍可能难以被反应物分子接近,从而降低载体表面的利用率;高聚物载体的热稳定性、机械稳定性及耐溶剂性较弱;高聚物载体废弃后处理较为困难。针对高聚物载体的弱点,人们开发使用了一些无机类载体,如 CN 1320688A 将 MCM-41 作为固定青霉素酰化酶的载体,但制备的固定化酶活性不高,而且主要靠吸附方式结合,所以固定化酶的操作稳定性不好。为了提高固定化酶的稳定性,通常对无机载体进行表面修饰,嫁接功能性基团,但用此类方法修饰的载体,具有功能性基团数量有限和分布不均匀等诸多缺点。因此,要制备活性较高、稳定性较好、可用于工业化的固定化青霉素酰化酶需要克服以下问题:(1)载体表面应具有可与青霉素酰化酶发生共价作用的有机基团,确保固定化酶具有良好的操作稳定性;(2)载体比表面积应较高,可使其表面尽量暴露更多的有机基团;(3)载体表面的功能性基团不仅数量及其分布应适当,而且要容易接近;(4)载体应具有足够的化学稳定性和机械稳定性,在化学反应过程中(如酶催化反应)载体表面基团不参与反应,而且在反应条件下保持结构不变;(5)载体的粒度应适当,便于反应后与产物的分离。

发明内容

[0018] 本发明所要解决的技术问题是提供一种制备高活性固定化青霉素酰化酶杂化载体的方法。该方法制备的杂化载体,富含有机基团,采用了适宜的活化负载方式,成功地实现了青霉素酰化酶的共价固定化和吸附固定化,能够获得高于其他载体所得固定化酶的活性,并且具有良好操作稳定性和贮存稳定性。

[0019] 本发明采用的技术方案:一种制备高活性固定化青霉素酰化酶杂化载体的方法,

包括下列步骤：将环己烷、聚乙二醇辛基苯基醚和正己醇混合均匀，在搅拌下加入氨水，配制成透明澄清的反相微乳液，搅拌 15min 后向其中加入正硅酸乙酯，搅拌 30min 后加入硅烷化试剂，正硅酸乙酯和硅烷化试剂的体积比 $V_{\text{正硅酸乙酯}} : V_{\text{硅烷化试剂}} = 0.5 \sim 9.5 : 0.5 \sim 9.5$ ，水解缩合反应 22h，用丙酮洗涤，室温真空干燥，得到所述高活性固定化青霉素酰化酶杂化载体；所述硅烷化试剂选自 γ -氨丙基三乙氧基硅烷。将该载体直接与青霉素酰化酶进行吸附固定化，或采用戊二醛预活化载体，然后与青霉素酰化酶以共价键结合，即通过共价方式进行固定化，可进一步得到被载体固化的高活性青霉素酰化酶。例如：在所述载体中加入 $\text{pH} = 8.0$ 的磷酸缓冲溶液并与稀释的青霉素酰化酶液混合，在 30°C 水浴振荡器中振荡固定 24h，再用去离子水充分洗涤，可进一步得到被载体固化的青霉素酰化酶。在所述载体中加入 $\text{pH} = 8.0$ 的磷酸缓冲液，然后加入戊二醛活化 2h，抽滤；抽滤后的载体再加入 $\text{pH} = 8.0$ 的磷酸缓冲溶液并与稀释的青霉素酰化酶液混合，在 30°C 水浴振荡器中振荡固定 24h，再用去离子水充分洗涤，可进一步得到被载体固化的青霉素酰化酶。

[0020] 本发明制备的载体基质为无机二氧化硅，其表面含有有机官能团，部分硅键连接该有机官能团形成有机-无机杂化载体。所述的有机官能团包括氨丙基、环氧基、巯丙基、乙烯基、苯基和丁腈基。

[0021] 本发明制备的载体，还可作为胰蛋白酶、淀粉酶、拉根过氧化酶、细胞色素 C 和脂肪酶的固定化载体。

[0022] 本发明的有益效果，本发明提供了一种具有独特结构的用于青霉素酰化酶固定化的杂化载体，利用该载体富含的有机基团，采用适宜的活化负载方式，成功地实现了青霉素酰化酶的共价固定化和吸附固定化，而且获得高于其他载体所得固定化酶的活性，并且具有良好操作稳定性以和贮存稳定性。本发明载体的优点之一在于，其结构是以二氧化硅为基质，部分硅键连接氨丙基的有机-无机杂化载体。本发明载体的优点之二在于，制备的固定化酶活性高达 2214U/g。本发明的优点之三在于，在反相微乳液中一步制备固定化青霉素酰化酶杂化载体。本发明的优点之四在于，反相微乳液的配置比例、正硅酸乙酯和 γ -氨丙基三乙氧基硅烷的投料比在一定范围内的改变，可影响到载体表面氨基的含量和比表面积等特性，从而影响固定化酶的活性。本发明的优点之五在于，其表面有一定数量的羟基和氨丙基，从而具有很强的亲水性。本发明的优点之六在于，载体为大小均匀的球形颗粒，属无定形结构。本发明载体的优点之七在于，其具有良好的热稳定性、耐酸性、耐溶剂性和一定的耐碱性（强碱除外）。本发明载体的优点之八在于，其表面在酶催化反应过程中表现惰性。本发明的优点之九在于，通过改变硅烷化试剂的种类，可合成一系列类似的杂化载体，分别含有不同的官能团，如环氧基、巯丙基、乙烯基、苯基和丁腈基等。

附图说明

[0023] 图 1 是载体的 ^{29}Si NMR 表征图；

[0024] 图 2 是载体的 ^{13}C NMR 表征图；

[0025] 图 3 是载体的 SEM 表征图；

[0026] 图 4 是载体的 TEM 表征图；

具体实施方式

[0027] 下面通过附图对本发明进一步详细描述：一种制备高活性固定化青霉素酰化酶杂化载体的方法，包括下列步骤：采用反相微乳法将有机相、表面活性剂和助表面活性剂在磁力搅拌下混合均匀，加入氨水，配制成透明澄清的反相微乳液，搅拌 15min 后向其中加入有机硅源，搅拌 30min 后加入硅烷化试剂，水解缩合反应 22h，用丙酮洗涤，室温真空干燥，即得固定化青霉素酰化酶杂化载体。其中所述的有机相包括环己烷、所述的表面活性剂包括聚乙二醇辛基苯基醚、所述的助表面活性剂包括正己醇、所述的有机硅源包括正硅酸乙酯、所述的硅烷化试剂包括 γ -氨丙基三乙氧基硅烷、 γ -缩水甘油氧丙基三甲（乙）氧基硅烷、 γ -巯丙基三甲（乙）氧基硅烷、苯基三甲（乙）氧基硅烷、乙烯基三甲（乙）氧基硅烷或 4-三甲（乙）氧基硅烷丁腈。正硅酸乙酯和硅烷化试剂的体积比 $V_{\text{正硅酸乙酯}} : V_{\text{硅烷化试剂}} = 0.5 \sim 9.5 : 0.5 \sim 9.5$ 。可以将该载体直接与青霉素酰化酶进行吸附固定化，也可以采用戊二醛预活化载体，然后与青霉素酰化酶以共价键结合，即通过共价方式进行固定化，可进一步得到被载体固化的高活性青霉素酰化酶。例如：在所述载体中加入 pH = 8.0 的磷酸缓冲溶液并与稀释的青霉素酰化酶液混合，在 30℃ 水浴振荡器中振荡固定 24h，再用去离子水充分洗涤，可进一步得到被载体固化的青霉素酰化酶。在所述载体中加入 pH = 8.0 的磷酸缓冲液，然后加入戊二醛活化 2h，抽滤；抽滤后的载体再加入 pH = 8.0 的磷酸缓冲溶液并与稀释的青霉素酰化酶液混合，在 30℃ 水浴振荡器中振荡固定 24h，再用去离子水充分洗涤，可进一步得到被载体固化的青霉素酰化酶。本发明制备的载体基质为无机二氧化硅，其表面含有有机官能团，部分硅键连接该有机官能团形成有机-无机杂化载体。所述的有机官能团包括氨丙基、环氧基、巯丙基、乙烯基、苯基和丁腈基。本发明制备的载体，还可作为胰蛋白酶、淀粉酶、拉根过氧化酶、细胞色素 C 和脂肪酶的固定化载体。本发明固定化酶活性采用碱滴定法测定。所得载体的形貌为分布均匀的球形，粒径大小为 100nm 左右，属无定型结构，载体表面有大量的氨基。

[0028] 实施例 1

[0029] 按 24mL 环己烷：9.4mL Triton X-100：6mL 正己醇：12mL 氨水的比例配置反相微乳液，TEOS 和 APTES 的体积都为 6mL 的条件制备载体。分别称取 0.5g 此载体采用吸附法和共价法制备固定化酶，得到固定化酶的活性分别为 1046U/g 和 1616U/g，在重复操作三次之后，活性分别保留初始活性的 59% 和 74%。

[0030] 实施例 2

[0031] 按 24mL 环己烷：12mL Triton X-100：12mL 正己醇：10mL 氨水的比例配置反相微乳液，TEOS 的体积为 4mL 和 APTES 的体积为 6mL 的条件制备载体，所得载体氨基含量为 5.52mmol/g，比表面积为 7m²/g。用此载体进行共价固定青霉素酰化酶，所得固定化酶的活性为 1478U/g，在重复操作 5 次之后活性保留 94%，于 4℃ 下储存 48 天后，固定化酶活性保留 89%。

[0032] 实施例 3

[0033] 按 24mL 环己烷：12mL Triton X-100：12mL 正己醇：10mL 氨水的比例配置反相微乳液，TEOS 的体积为 0.5mL 和 APTES 的体积为 9.5mL 的条件制备载体，用此载体进行共价固定青霉素酰化酶，所得固定化酶的活性为 872U/g。

[0034] 实施例 4

[0035] 按 24mL 环己烷：12mL Triton X-100：12mL 正己醇：10mL 氨水的比例配置反相

微乳液, TEOS 的体积为 9.5mL 和 γ -巯丙基三乙氧基硅烷的体积为 0.5mL 的条件制备载体, 用此载体进行共价固定青霉素酰化酶, 所得固定化酶的活性为 623U/g。

[0036] 实施例 5

[0037] 按 24mL 环己烷 : 12mL Triton X-100 : 12mL 正己醇 : 10mL 氨水的比例配置反相微乳液, TEOS 和 APTES 的体积分别为 5mL 的条件制备载体, 所得载体的氨基含量为 4.84mmol/g, 比表面积为 23m²/g。用此载体进行共价固定青霉素酰化酶, 所得固定化酶的活性高达 2214U/g, 在重复操作 5 次之后活性保留 96%, 于 4℃ 下储存 48 天后, 固定化酶活性保留 98%。对实施例 1 ~ 5 制备的载体分别做 NMR、SEM 和 TEM 表征, 结果分别见图 1、图 2、图 3、图 4。

[0038] 以上所述内容仅为本发明构思下的基本说明, 而依据本发明的技术方案所作的任何等效变换, 均应属于本发明的保护范围。

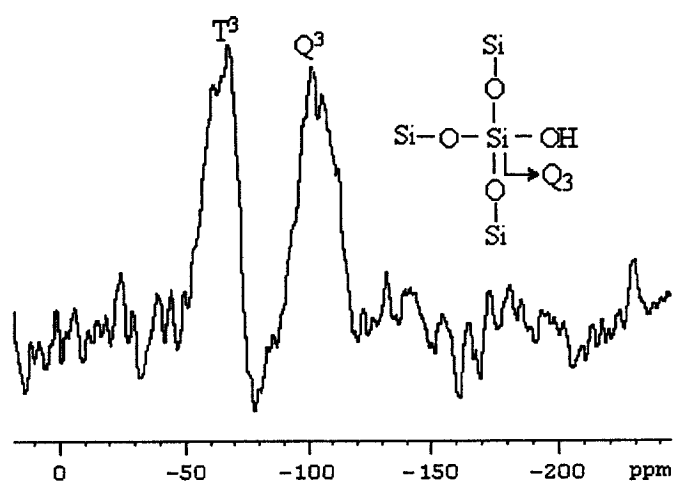


图 1

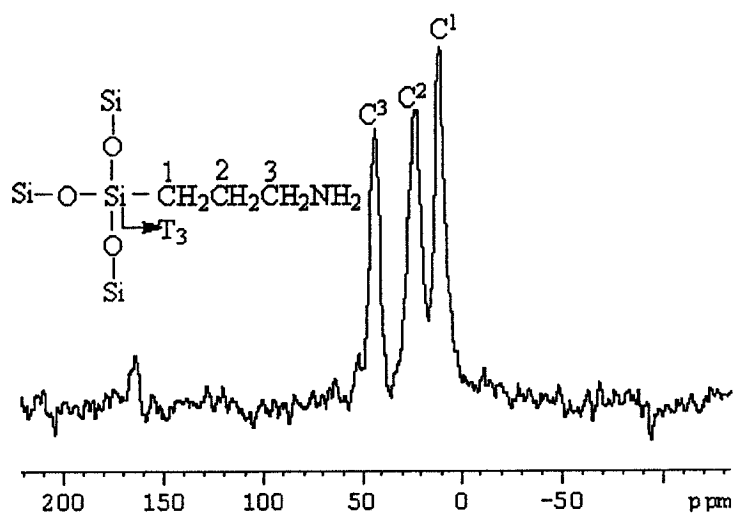


图 2



图 3

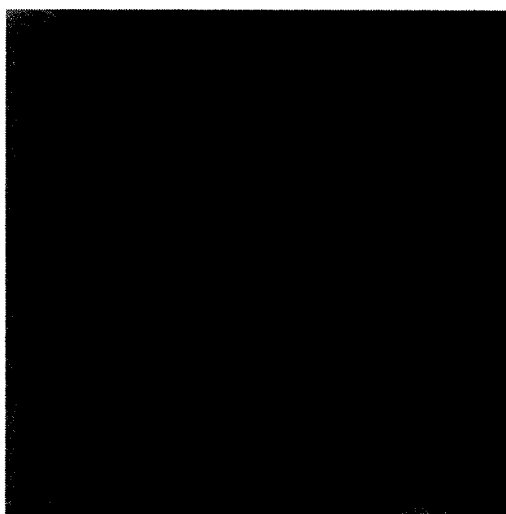


图 4