



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110760502 B

(45) 授权公告日 2023.03.21

(21) 申请号 201910417655.1

CN 105462953 A, 2016.04.06

(22) 申请日 2019.05.07

CN 106811458 A, 2017.06.09

US 6406876 B1, 2002.06.18

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110760502 A

邓寒梅等. 漆酶的来源及固定化漆酶载体研究进展. 2017, 第33卷(第33期), 全文.

(43) 申请公布日 2020.02.07

审查员 张锦广

(73) 专利权人 宁波大学

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 11/096 (2020.01)

(56) 对比文件

CN 103450496 A, 2013.12.18

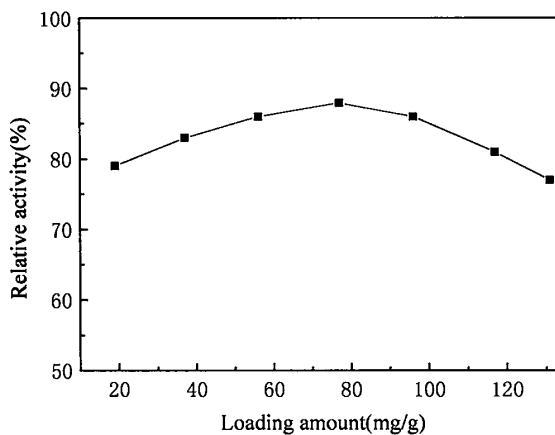
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

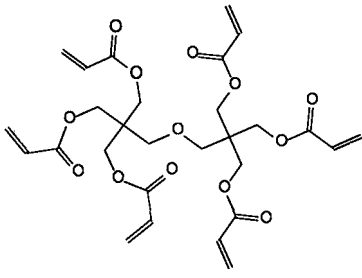
一种漆酶的共交联固定化方法

(57) 摘要

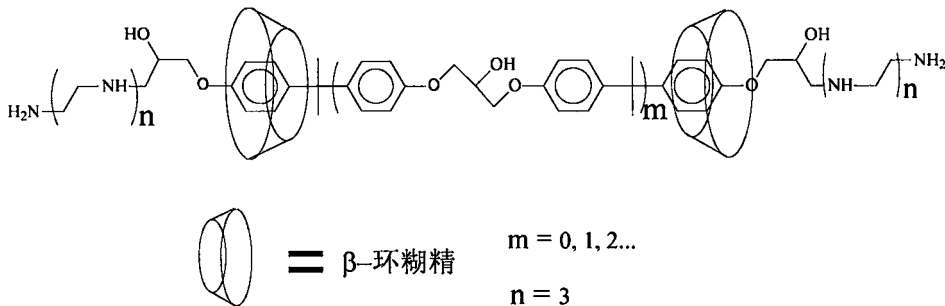
本发明是关于一种漆酶的共交联固定化方法。使用油溶性的双季戊四醇六丙烯酸酯作为交联剂,水相中的反应物为含有氨基的漆酶以及胺化环氧树脂与β-环糊精形成的超分子复合物,利用双键与氨基的迈克尔加成反应,在较低的温度下发生共交联聚合反应,制备出不同负载量的固定化漆酶。通过控制交联程度,提高分散性,改善其内部的传质微环境,该固定化酶具有较高的催化活性,负载量在77mg酶/g载体时具有最高的活性,达到游离酶的88%。



1. 一种漆酶共交联固定化方法,其特征在于使用水/油两相反应体系,油相是作为交联剂的双季戊四醇六丙烯酸酯,其结构如下:



水相中的反应物为漆酶及结构如下的分子复合物:



所述的漆酶共交联固定化方法,按以下步骤操作:

- 1) 将数均分子量为454的双酚A环氧树脂、甲醇和三乙烯四胺三种组分按照2:2:1.5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) 将漆酶溶解在pH=6.5的磷酸缓冲溶液中,酶的浓度保持在1.0~7.0mg/mL范围,将不同浓度的漆酶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双季戊四醇六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3~4小时,过滤后即得到不同负载量的漆酶固定化产物。

## 一种漆酶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,尤其是一种漆酶的共交联固定化方法,该新型固定化漆酶可专门用于水中酚类物质的去除。

### 背景技术

[0002] 漆酶(EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶(等电点为5.0),是一种典型的氧化还原酶,它大量的分布于自然环境中,主要分为真菌漆酶和漆树漆酶,其平均分子量在50000~100000之间,漆酶的肽链通常由500~550个相应的氨基酸组成。不同种类漆酶的差异一般是因为漆酶蛋白中有不同含量或种类的糖基。典型的漆酶内存在4个铜离子,这4个铜离子构成其催化中心。漆酶的催化底物十分广泛,且对底物的专一性和稳定性较好。其底物主要有羧酸及其衍生物、酚类及其衍生物、芳香胺及其衍生物、甾体激素和生物色素金属有机化合物等其他非酚类底物共六类化合物。

[0003] 近年来,漆酶在催化反应过程中,由于反应底物广泛,催化效率高等优点,因此被大量的应用于食品、造纸、纺织、环保等方面。在食品工业方面,漆酶是食品、饮料生产过程中广泛应用的酶之一,在造纸方面,漆酶在纸浆的生物漂白、改善纸浆纤维质量、净化造纸污水等方面具有重要的作用;同时在造纸的生产过程中,漆酶可以在温和的条件下,快速催化分解木质素等材料,而对纤维素和半纤维素的影响较小,因此使造纸的效率得到极大的提高。在环境保护方面,漆酶主要集中在环境废水漂白、酚类有毒物质的催化降解、环境监测等方面。废水中通常含有大量的酚类和醌类等致癌污染物,这些污染物严重的影响着人们的身体健康,漆酶的特殊结构和相关性能能够快速催化降解上述污染物。

[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:例如固定化的漆酶可重复使用,使酶的使用效率提高、使用成本降低;固定化的漆酶极易与反应体系分离,简化了操作工艺;固定化的漆酶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漆酶的固定,利用漆酶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 $\beta$ -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漆酶的固定化方法,这种方法是基于漆酶

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,油相为交联剂双季戊四醇六丙烯酸酯,其结构如图1所示,水相中的反应物为漆酶及 $\beta$ -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漆酶的浓度来调节。

[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, $\beta$ -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,导致交联反应能使漆酶能以接近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漆酶;

[0010] 非常有益的是, $\beta$ -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-44,环氧值为0.44,数均分子量为454)、甲醇和三乙烯四胺三种组分按照2:2:1.5的质量比混合,在25~35°C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 $\beta$ -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)将漆酶溶解在pH=6.5的磷酸缓冲溶液中,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的漆酶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双季戊四醇六丙烯酸酯加入到上述混合水溶液中,反应温度保持在25~30°C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3~4小时,过滤后即得到不同负载量的固定化漆酶的产物。

[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,漆酶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 $\beta$ -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 $\beta$ -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,控制了交联程度;2)引入 $\beta$ -环糊精分子复合物改善了固定化漆酶的微环境,提高了酶的催化反应活性;3)共交联固定法能使漆酶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-44,环氧值为0.44,数均分子量为454)、甲醇和三乙烯四胺三种组分按照2:2:1.5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) 将漆酶溶解在pH=6.5的磷酸缓冲溶液中,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的漆酶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双季戊四醇六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3~4小时,过滤后即得到不同负载量的固定化漆酶的产物。

[0022] 固定化酶的负载量测定:

[0023] 由于共交联法固定漆酶后,反应残留液中测不到漆酶的活性,说明经过交联后漆酶全部进入到固体颗粒中,所以负载量的计算用以下公式:

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

[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:吸取1mL漆酶溶液(1g/L)与1mL磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH=6)置于50mL离心管中,摇匀后再将3mL浓度为5mmol/L的邻联甲苯胺溶液,将带塞离心管置于恒温水浴摇床中(25℃)反应5min,冰浴终止反应以减少实验误差。采用酶标仪测定波长为630nm处溶液的吸光度。每分钟催化氧化1μmol邻联甲苯胺所需的酶量为1个酶活单位为游离漆酶酶活(U/g)。实验设置3个平行样,空白实验为3mL去离子水代替邻联甲苯胺。

[0028] (2) 固定化酶活力测定:称取0.1g固定化漆酶(干重)置于50mL的带塞离心管中,加入4mL磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH 6),再加入4mL浓度为5mmol/L的邻联甲苯胺溶液,摇匀,将带塞离心管置于恒温水浴摇床(25℃)中反应5min,冰水浴终止反应,采用酶标仪测定溶液在630nm处的吸光度变化值,计算固定化漆酶的酶活。实验设置3个平行样,空白实验为0.1g灭活的固定化漆酶(干重)代替未灭活的固定化漆酶,5mL去离子水代替邻联甲苯胺溶液。固定化漆酶的酶活为每克内含漆酶所具有的酶活(U/g),其计算如下:

$$[0029] U = \frac{\Delta A \times V \times 10^6}{6340 \times \Delta t \times m}$$

[0030] 式中： $\Delta A$ 为在 $\Delta t$ 时间内反应溶液在630nm处吸光度的变化值； $V$ 为反应体系的体积(mL)；6340为邻联甲苯胺的摩尔消光系数(L/(mol·cm))； $\Delta t$ 为反应时间(min)； $m$ 为游离酶、固定化漆酶的质量(g)。

[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漆酶的样品，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77mg酶/g载体时其相对活性达到最大值，其比活力是游离酶的88%，这个结果说明漆酶在这个范围处于非常适合催化的状态。当负载量小于77mg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77mg酶/g载体时，固定化酶的活性逐渐随负载量的增加而变小。一般来说交联固定法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，所以其活性又会下降。

[0035] 我们以负载量为77mg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44%的活性，固定化酶能残留79%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固定化的漆酶催化活性与其负载量的依赖关系。

[0038] 图3固定化与游离的漆酶储存稳定性比较。

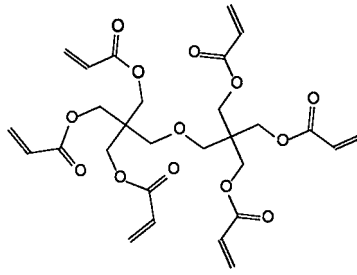


图1

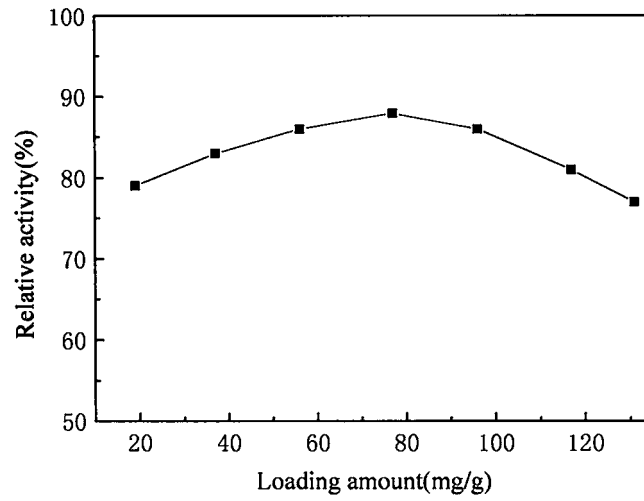


图2

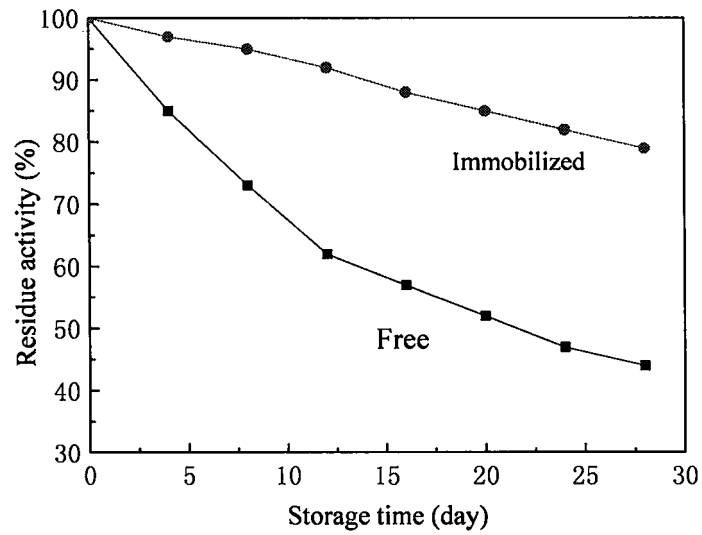


图3