



(21) 申请号 201910417451.8

JP 2008104359 A, 2008.05.08

(22) 申请日 2019.05.07

US 6060268 A, 2000.05.09

(65) 同一申请的已公布的文献号

高磊章;金利群.青霉素G酰化酶的固定化研究进展.2016,(第01期),第55-60页.

申请公布号 CN 110760496 A

Chao-Meng Fan等.Studies on

(43) 申请公布日 2020.02.07

Immobilization of Penicillin G Acylase to Epoxy Resin.2012,第512-515卷卷第1699-1711页.

(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

审查员 李丹阳

(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

CN 1995339 A, 2007.07.11

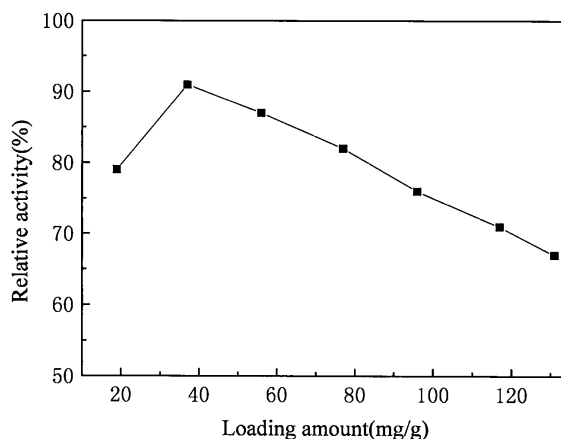
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

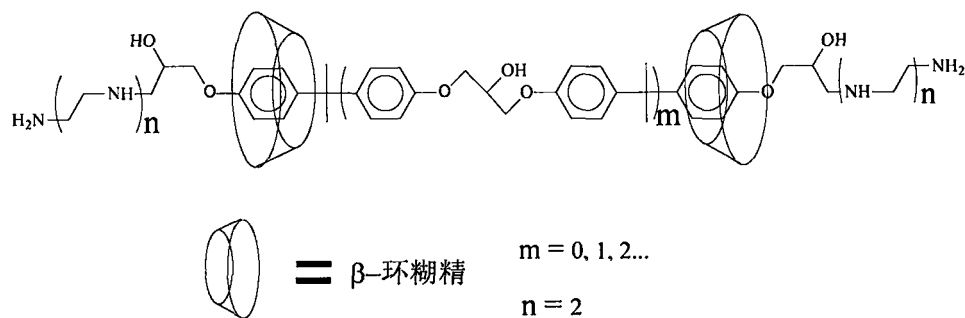
一种青霉素G酰化酶的共交联固定化方法

(57) 摘要

本发明是关于一种青霉素G酰化酶的共交联固定化方法。使用油溶性的丁二醇双丙烯酸酯作为交联剂,水相中的反应物为含有氨基的青霉素G酰化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青霉素G酰化酶。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37mg酶/g载体时其相对活性达到游离酶的91%。



1. 一种青霉素G酰化酶共交联固定化方法,其特征在于使用水/油两相反应体系,油相为交联剂丁二醇双丙烯酸酯,水相中的反应物为青霉素G酰化酶及结构如下的分子复合物:



所述的青霉素G酰化酶共交联固定化方法,按以下步骤操作:

1) 将数均分子量为392的双酚A环氧树脂、甲醇和二乙烯三胺三种组分按照2:2:1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) 将青霉素G酰化酶溶解在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) 将不同浓度的青霉素G酰化酶溶液与上述分子复合物水溶液按照55mL:20mL的比例混合;

5) 在搅拌下将1.2g丁二醇双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6~7小时,过滤后即得到不同负载量的青霉素G酰化酶固定化产物。

一种青霉素G酰化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,尤其是一种青霉素G酰化酶的共交联固定化方法,该新型固定化青霉素G酰化酶可专门用于多种反应的特异性催化剂。

背景技术

[0002] 青霉素G酰化酶(EC 3.5.1.11)又名青霉素氨基水解酶,属于氨基水解酶类,可以特异性地将酰胺键水解,是一种重要的工业用酶。青霉素G酰化酶属于分子量较大的球蛋白,其三维结构由含有催化位点的大亚基和含有侧链结合位点的小亚基(通过氢键结合而成。该酶等电点约在6.5~6.7。青霉素G酰化酶由 α 、 β 两个亚基组成, α 或 β 亚基单独存在时均不具有酶活性,当二者通过氢键结合以后才有活性。 α 亚基可与青霉素G的侧链发生特异性结合,从而决定酶的底物专一性; β 亚基含有催化位点和与催化有关的残基-丝氨酸残基,因而青霉素酰化酶与丝氨酸蛋白酶有相似之处,均可通过丝氨酸残基来催化反应。青霉素G酰化酶也是一种多功能酶,具有广泛的底物谱、高区域选择性、化学选择性和对映体选择性,能够催化多种反应。青霉素G酰化酶在手性化学品合成中应用广泛,主要可以分为6-氨基青霉烷酸(6-APA)和7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(7-ADCA)的制备、 β 内酰胺抗生素的合成。此外,作为生物催化剂的青霉素酰化酶在很多反应中有潜在的价值,如在肽的合成过程中用于保护氨基和羟基,以及用于拆分手性化合物的外消旋混合物等,具有反应速度快、条件温和、对环境的污染小等优势。手性化合物的拆分、前手性化合物的不对称水解和多肽合成5个方面。

[0003] 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:例如固定化的青霉素G酰化酶可重复使用,使酶的使用效率提高、使用成本降低;固定化的青霉素G酰化酶极易与反应体系分离,简化了操作工艺;固定化的青霉素G酰化酶的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。

[0004] 本发明专利提供一种共交联的方法用于青霉素G酰化酶的固定,利用青霉素G酰化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 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

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种青霉素G酰化酶的固定化方法,这种方法

是基于青霉素G酰化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。

[0006] 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,油相为交联剂丁二醇双丙烯酸酯,水相中的反应物为青霉素G酰化酶及 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青霉素G酰化酶的浓度来调节。

[0007] 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;

[0008] 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,导致交联反应能使青霉素G酰化酶能以接近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青霉素G酰化酶;

[0009] 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。

[0010] 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)、甲醇和二乙烯三胺三种组分按照2:2:1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)将青霉素G酰化酶溶解在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的青霉素G酰化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丁二醇双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6~7小时,过滤后即得到不同负载量的固定化青霉素G酰化酶的产物。

[0011] 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,青霉素G酰化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;

[0012] 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;

[0013] 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。

[0014] 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 β -环糊精分子复合物改善了固定化青霉素G酰化酶的微环境,提高了酶的催化反应活性;3)共交联固定法能使青霉素G酰化酶以极高的效率被固定化。

具体实施方式

[0015] 酶的固定化

[0016] 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)、甲醇和二乙烯三胺三种组分按照2:2:1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;

[0017] 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;

[0018] 3) 将青霉素G酰化酶溶解在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;

[0019] 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的青霉素G酰化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;

[0020] 5) 在搅拌下将1.2g丁二醇双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6~7小时,过滤后即得到不同负载量的固定化青霉素G酰化酶的产物。

[0021] 固定化酶的负载量测定:

[0022] 由于共交联法固定青霉素G酰化酶后,反应残留液中测不到青霉素G酰化酶的活性,说明经过交联后青霉素G酰化酶全部进入到固体颗粒中,所以负载量的计算用以下公式:

$$[0023] \quad \text{负载量 (mg/g)} = \frac{C \times V}{m - C \times V \times 0.001}$$

[0024] 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)。

[0025] 酶活力测定:

[0026] (1) 游离酶活的测定:将1mL酶液与1mL青霉素G钾盐(4%w/v)混合,在37℃下,于摇床反应5min,取出1mL反应液加入1mL PDAB(0.25%) 和3mL HAc-NaAc(pH=2.5)缓冲液,室温下避光反应10min,在415nm下测吸光值。由标准曲线计算席夫碱浓度。

[0027] (2) 固定化酶活的测定:利用碱滴定法。用100mL烧杯装入pH=7.8的磷酸缓冲液20mL,按2%的量加入青霉素G钾盐0.4g,放入水浴锅中预热5min使底物溶液的温度维持在37℃,然后用0.1mol/L氢氧化钠溶液调pH到pH 8.0以上,最后加入超声破碎的待测酶液,然后再用0.1mol/L氢氧化钠溶液调pH到pH 8.0以上一点,当溶液pH降至pH 8.0时开始计时。反应过程中用被邻苯二甲酸氢钾标定过的0.1mol/L标准氢氧化钠溶液将底物溶液pH维持在pH 8.0左右,使反应时间维持5min,当溶液pH再次降为pH 8.0时,停止反应,立即记录反应时间和消耗的氢氧化钠溶液体积。

$$[0028] \quad U = \frac{10^3 \times C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}}{t \times V_1}$$

[0029] 式中:U是待测青霉素G酰化酶溶液的酶活力(U/mL); C_{NaOH} 是氢氧化钠溶液的物质

的量浓度 (mol/L); V_{NaOH} 是消耗的氢氧化钠溶液体积 (mL); t 是反应时间 (min); V_1 是 PGA 酶液的体积或固定化酶干重 (mL 或 g)。

[0030] PGA 酶活力定义: 在 1min 内单位体积的 PGA 酶液催化青霉素 G 钾盐分解生成 $1\mu\text{mol}$ 的 6-APA 所使用的酶量即为 1 个酶活力单位 (U)。

[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青霉素 G 酰化酶的样品, 分别测定它们的活力, 计算得到它们的相对活性。图 1 是相对活性与负载量的关系, 当负载量在 37mg 酶/g 载体范围时, 固定化酶具有最高的活力, 其比活力达到游离酶的 91% 以上, 这个结果说明青霉素 G 酰化酶在这个范围处于非常适合催化的状态。当负载量大于 37mg 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引入环糊精超分子结构单元, 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, 此外共交联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, 所以其活力会随负载量的增加而迅速下降。

[0035] 我们以负载量为 37mg 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 2 所示, 以时间为零的起始状态的活性为 100%, 在 4°C , $\text{pH}=7.5$ 条件下经过 28 天的储存, 游离酶溶液残留 36% 的活性, 固定化酶残留 83% 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 固定化的青霉素 G 酰化酶催化活性与其负载量的依赖关系。

[0037] 图 2 固定化与游离的青霉素 G 酰化酶储存稳定性比较。

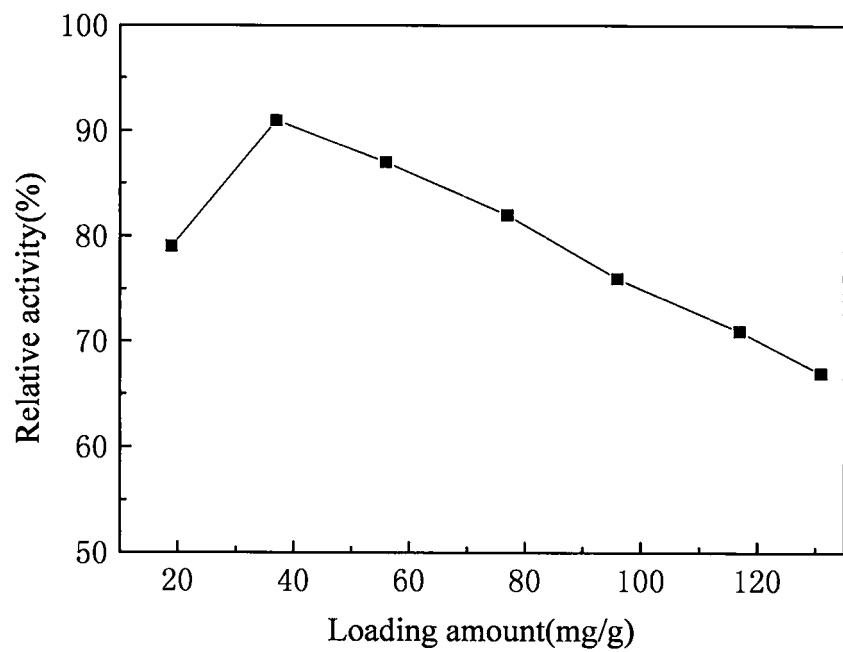


图1

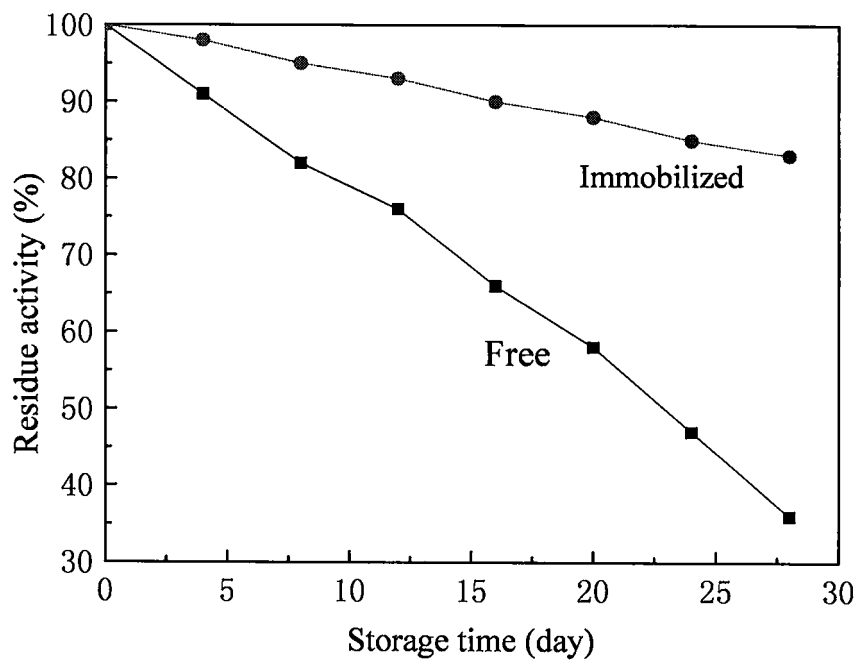


图2