

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880023233.6

[51] Int. Cl.

H01M 4/86 (2006.01)

H01M 4/88 (2006.01)

H01M 8/16 (2006.01)

H01M 8/02 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

H01M 4/90 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101689638A

[22] 申请日 2008.5.5

[21] 申请号 200880023233.6

[30] 优先权

[32] 2007.5.4 [33] US [31] 60/916,274

[32] 2008.4.27 [33] US [31] 61/048,202

[86] 国际申请 PCT/US2008/062658 2008.5.5

[87] 国际公布 WO2008/137846 英 2008.11.13

[85] 进入国家阶段日期 2010.1.4

[71] 申请人 埃克民公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 N·L·埃克斯 J·S·麦克拉伦

S·D·明特尔 W·热莱

M·凯斯迈兹 R·兹沃舍茨

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

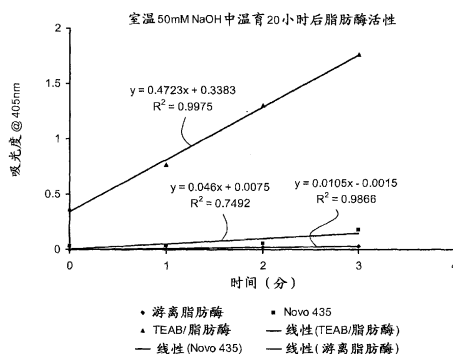
权利要求书9页 说明书57页 附图19页

[54] 发明名称

固定化酶及其用途

[57] 摘要

本发明涉及固定化酶的用途。固定化酶可以用于各种化学转化、分离和纯化，并且可以在传感器和诊断中使用。



1. 在能够固定且稳定酶的胶束或反胶束固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的, 当暴露于至少约 65°C 至少约 18 小时时, 该被稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 12% 活性。

2. 在能够固定且稳定酶的非天然或非细胞的胶体固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的, 当暴露于至少约 65°C 至少约 18 小时时, 该被稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 12% 活性。

3. 在能够固定且稳定酶的胶束或反胶束固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的, 当暴露于至少约 95°C 至少约 18 小时时, 该被稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 1% 活性。

4. 在能够固定且稳定酶的非天然或非细胞的胶体固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的, 当暴露于至少约 95°C 至少约 18 小时时, 该被稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 1% 活性。

5. 在能够固定且稳定酶的胶束或反胶束固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的, 当暴露于大于约 12.5 的 pH 至少约 18 小时时, 该被稳定的酶保留暴露于最适 pH 相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 9% 活性。

6. 在能够固定且稳定酶的非天然或非细胞的胶体固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的, 当暴露于大于约 12.5 的 pH 至少约 18 小时时, 该被稳定的酶保留暴露于最适 pH 相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 9% 活性。

7. 在能够固定且稳定酶的胶束或反胶束固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的, 其中, 当暴露于小于约 2 的 pH

时,当连续催化化学转化时,该被稳定的酶保留至少约10%的其起始生物电催化活性至少约1小时。

8. 在能够固定且稳定酶的非天然或非细胞的胶体固定化材料中固定的酶,所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的,其中,当暴露于小于约2的pH时,当连续催化化学转化时,该被稳定的酶保留至少约10%的其起始生物电催化活性至少约1小时或更长时间。

9. 权利要求1或2的固定化酶,其中所述被稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70%或更多活性。

10. 权利要求3或4的固定化酶,其中所述被稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约1.2、1.4、1.6、1.8、2、3、4、5、6、7、8、9、10%或更多活性。

11. 权利要求5或6的固定化酶,其中所述被稳定的酶保留暴露于最适pH相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80%或更多活性。

12. 权利要求7或8的固定化酶,其中所述被稳定的酶保留至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90%或更多的其起始生物电催化活性至少约1、2、3、4、8、12、16、20、24、36、48、60、72、96、120、144、168、192、216或240小时或更长时间。

13. 粒子,其包含由权利要求1-12中任一项的固定化酶包覆的核芯。

14. 固定化酶用于催化反应的用途,其中所述酶固定在固定且稳定所述酶的酶固定化材料中,所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的,并且其中所述酶固定化材料是胶束疏水改性多糖。

15. 固定化酶用于检测分析物的用途,其中所述酶固定在固定且稳定所述酶的酶固定化材料中,所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的,并且其中所述酶固定化材料是胶束疏水改性多糖。

16. 固定化酶用于催化反应的用途,其中所述酶固定在固定且稳定所

述酶的酶固定化材料中，所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的，并且其中所述催化的反应选自

- (a) 二氧化碳至碳酸的转化；
- (b) 有机底物的对映选择性氧化或还原伴任选的辅因子再生；
- (c) 一种或多种组分自混合物中的反应性分离；
- (d) 羧酸与醇的酯化；
- (e) 玉米或其他谷物的液化；
- (f) 玉米或其他谷物的糖化以将淀粉转化成糖；
- (g) 葡萄糖至果糖的异构化；
- (h) 手性化合物的合成；
- (i) 油的酯交换；
- (j) 油的脱胶；
- (k) 废水处理（反应）；
- (l) 果汁澄清；
- (m) 通过淀粉工艺生产葡萄糖；
- (n) 从乳糖生产葡萄糖和半乳糖；
- (o) 合成具有肽键的化合物；
- (p) 从青霉素 G 生产 6-氨基青霉酸；
- (q) 糖转化成醇；
- (r) 从石油馏分中去除硫；
- (s) 丙烯腈转化成丙烯酰胺；
- (t) 3-氰基吡啶转化成烟酰胺；和
- (u) 降解衣物污物中的污渍。

17. 在选自下述的酶催化反应中的改进：二氧化碳至碳酸的转化、有机底物的对映选择性氧化或还原伴任选的辅因子再生、羧酸与醇的酯化、玉米或其他谷物的液化、玉米或其他谷物的糖化以将淀粉转化成糖、葡萄糖至果糖的异构化、手性化合物的合成、油的酯交换、油的脱胶、废水处理、果汁澄清、通过淀粉工艺生产葡萄糖、从乳糖生产葡萄糖和半乳糖、

合成具有肽键的化合物、从青霉素 G 生产 6-氨基青霉酸、糖转化成醇、从石油馏分中去除硫、丙烯腈转化成丙烯酰胺、3-氰基吡啶转化成烟酰胺、或降解衣物污物中的污渍，所述改进包括将酶固定在固定且稳定酶的酶固定化材料中，所述材料对于比酶小的化合物是可渗透的。

18. 固定化酶用于检测分析物的用途，其中所述酶固定在固定且稳定酶的酶固定化材料中，所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的，并且其中所述检测的分析物包括尿素、尿酸、胆固醇、农药、毒素或微生物。

19. 固定化酶用于自混合物中分离或去除物质的用途，其中所述酶固定在固定且稳定酶的酶固定化材料中，所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的。

20. 权利要求 19 的用途，其中所述混合物是外消旋混合物、石油产品、废水、生物质或食物。

21. 固定化酶在化学活性膜表面中的用途，所述化学活性膜表面与接触该膜表面的至少一种物质反应，其中所述酶固定在固定且稳定酶的酶固定化材料中，所述材料对于比所述酶小的化合物是可渗透的。

22. 权利要求 21 的用途，其中所述活性膜具有自洁净表面。

23. 权利要求 21 的用途，其中所述活性膜降解毒性化合物。

24. 权利要求 21 的用途，其中所述活性膜杀死细菌。

25. 权利要求 16-24 中任一项的粒子或用途，其中所述固定化材料是非天然的胶体固定化材料。

26. 权利要求 16-25 中任一项的粒子或用途，其中所述固定化材料是非细胞的胶体固定化材料。

27. 权利要求 16-26 中任一项的粒子或用途，其中所述固定化材料是胶束或反胶束固定化材料。

28. 权利要求 16-27 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述酶包括脂肪酶、葡萄糖异构酶、腈水解酶、葡萄糖氧化酶、蛋白酶、碳酸酐酶、胃蛋白酶、淀粉酶、真菌淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶、纤维素酶、乳糖酶、酯酶、糖酶、半纤维素酶、戊聚糖酶、木聚糖酶、支链淀粉酶、 $\beta$ -葡

聚糖酶、乙酰乳酸脱羧酶、 $\beta$ -葡糖苷酶、谷氨酰胺酶、青霉素酰基转移酶、氯过氧化物酶、天冬氨酸 $\beta$ -脱羧酶、环糊精糖基转移酶、枯草杆菌蛋白酶、氨基酸酰基转移酶、醇脱氢酶、氨基酸氧化酶、磷脂酶、脲酶、胆固醇酯酶、脱亚磺酸酶、木质素过氧化物酶、果胶酶、氧化还原酶、葡聚糖酶、葡糖苷酶、半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、麦芽糖酶、蔗糖酶、转化酶、柚皮苷酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、肽酶、凝乳酶、嗜热菌蛋白酶、胰蛋白酶、甘油三酯酶、pregastric 酯酶、磷酸酶、植酸酶、酰胺酶、谷氨酰胺酶、溶菌酶、过氧化氢酶、脱氢酶、过氧化物酶、裂解酶、延胡索酸酶、histadases、氨基转移酶、连接酶、环化酶、消旋酶、变位酶、氧化酶、还原酶、木质素酶、漆酶、氯过氧化物酶、卤代过氧化物酶、氢化酶、固氮酶、醇腈酶或其组合。

29. 权利要求 1-28 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述固定化材料是阳离子改性的全氟磺酸-PTFE 共聚物。

30. 权利要求 1-28 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述固定化材料包含阳离子改性的全氟磺酸-PTFE 共聚物。

31. 权利要求 1-28 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述固定化材料包含藻酸盐。

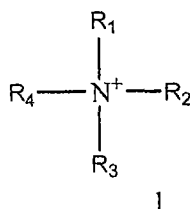
32. 权利要求 31 的固定化酶、粒子或用途，其中所述藻酸盐是阳离子改性的藻酸盐。

33. 权利要求 30 或 31 的固定化酶、粒子或用途，其中所述阳离子改性的全氟磺酸-PTFE 共聚物或阳离子改性的藻酸盐用比  $\text{NH}_4^+$  大的疏水性阳离子进行改性。

34. 权利要求 33 的固定化酶、粒子或用途，其中所述疏水性阳离子包括基于铵的阳离子、季铵阳离子、烷基三甲基铵阳离子、磷阳离子、三苯基磷、吡啶鎓阳离子、咪唑鎓阳离子、十六烷基吡啶鎓、乙锭、紫罗碱、甲基紫罗碱及苜基紫罗碱、双(三苯基磷)亚铵、金属络合物、二联吡啶基金属络合物、基于菲咯林的金屬络合物、 $[\text{Ru}(\text{二联吡啶})_3]^{2+}$  或  $[\text{Fe}(\text{菲咯啉})_3]^{3+}$ 。

35. 权利要求 33 的固定化酶、粒子或用途，其中所述疏水性阳离子包括四乙基铵、四丙基铵 (T3A)、四戊基铵 (T5A)、四己基铵 (T6A)、四庚基铵 (T7A)、trimethylcosylammonium (TMICA)、三甲基十八烷基铵 (TMODA)、三甲基十六烷基铵 (TMHDA)、三甲基十四烷基铵 (TMTDA)、三甲基辛基铵 (TMOA)、三甲基十二烷基铵 (TMDDA)、三甲基癸基铵 (TMDA)、三甲基己基铵 (TMHA)、四丁基铵 (TBA)、三乙基己基铵 (TEHA) 及其组合。

36. 权利要求 33 的固定化酶、粒子或用途，其中所述疏水性阳离子包含式 1 所示的季铵阳离子：



其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  独立地是氢、烃基、取代的烃基或杂环，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中至少一个不是氢。

37. 权利要求 36 的固定化酶、粒子或用途，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  独立地是氢、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、或癸基，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  中的至少一个不是氢。

38. 权利要求 36 的固定化酶、粒子或用途，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基或己基。

39. 权利要求 36 的固定化酶、粒子或用途，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  和  $R_4$  是乙基。

40. 权利要求 1-28 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述酶固定化材料是脱盐的四烷基铵改性的全氟磺酸-PTFE 共聚物，其具有大小足以将酶限制于其中的孔。

41. 权利要求 40 的固定化酶、粒子或用途，其中所述孔与所述酶具有基本上相同的大小和相同的形状。

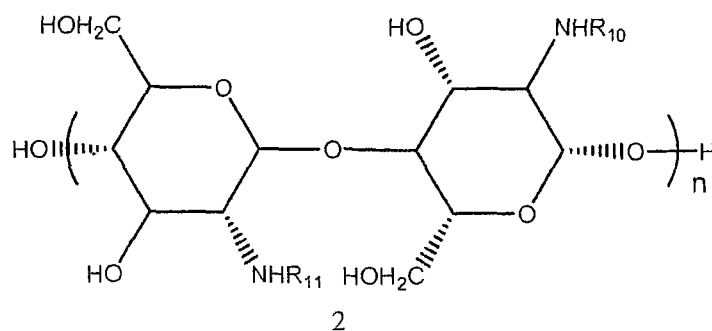
42. 权利要求 40 或 41 的固定化酶、粒子或用途，其中所述四烷基铵

离子包括烷基三甲基铵阳离子或烷基三乙基铵阳离子。

43. 权利要求 1-28 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述固定化材料是胶束疏水改性多糖。

44. 权利要求 43 的固定化酶、粒子或用途，其中所述多糖包含壳聚糖。

45. 权利要求 43 或 44 的固定化酶、粒子或用途，其中所述胶束疏水改性多糖对应于式 2:



其中  $n$  是整数;

$R_{10}$  独立地是氢、烃基、取代的烃基或疏水氧化还原介体; 和

$R_{11}$  独立地是氢、烃基、取代的烃基或疏水氧化还原介体。

46. 权利要求 45 的固定化酶、粒子或用途，其中  $R_{10}$  独立地是氢或烷基， $R_{11}$  独立地是氢或烷基。

47. 权利要求 45 的固定化酶、粒子或用途，其中  $R_{10}$  独立地是氢或己基， $R_{11}$  独立地是氢或己基。

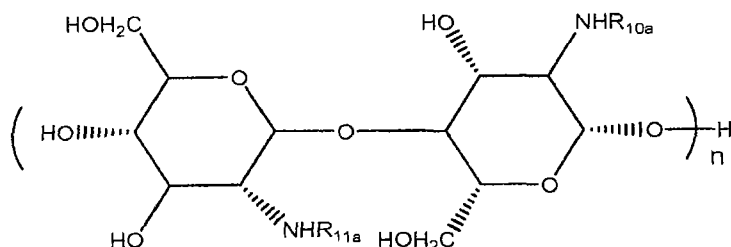
48. 权利要求 45 的固定化酶、粒子或用途，其中  $R_{10}$  独立地是氢或辛基， $R_{11}$  独立地是氢或辛基。

49. 权利要求 45 的固定化酶、粒子或用途，其中  $R_{10}$  独立地是氢或丁基， $R_{11}$  独立地是氢或丁基。

50. 权利要求 45 的固定化酶、粒子或用途，其中  $R_{10}$  独立地是氢或疏水氧化还原介体， $R_{11}$  独立地是氢或疏水氧化还原介体。

51. 权利要求 43-50 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述酶固定化材料是胶束疏水改性壳聚糖，其中该壳聚糖的至少约 10% 胺官能基被疏水基团改性。

52. 权利要求 43-51 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述酶固定化材料是具有对应于式 2A 的结构胶束疏水氧化还原介体改性的壳聚糖



2A

其中  $n$  是指数；

$R_{10a}$  独立地是氢或疏水氧化还原介体；和

$R_{11a}$  独立地是氢或疏水氧化还原介体。

53. 权利要求 1-52 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述固定化酶或所述酶溶液进一步包含电子介体。

54. 权利要求 53 的固定化酶、粒子或用途，其中所述电子介体是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 ( $NAD^+$ )、黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)、吡咯并喹啉醌 (PQQ)、吩嗪硫酸甲酯、二氯酚靛酚，短链泛醌，铁氰化钾，蛋白质，金属蛋白，漆树蓝蛋白、有机金属化合物、取代的醌、萘、蒽、并四苯、四甲基苯二胺、烟酰胺、腺苷、细胞色素和血红素、或其组合。

55. 在酶固定化材料中固定的酶，其中：所述酶包含消耗淀粉的淀粉酶，并且所述酶固定化材料包含悬浮于叔戊醇中的丁基壳聚糖；或所述酶包含消耗麦芽糖的淀粉酶，并且所述酶固定化材料包含中等分子量的癸基改性壳聚糖。

56. 权利要求 1-55 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述酶包括脂肪酶、葡萄糖异构酶、胍水解酶、蛋白酶、碳酸酐酶、胃蛋白酶、淀粉酶、真菌淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶、纤维素酶、乳糖酶、酯酶、糖酶、半纤维素酶、戊聚糖酶、木聚糖酶、支链淀粉酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、乙酰乳酸脱羧酶、 $\beta$ -葡糖苷酶、谷氨酰胺酶、青霉素酰基转移酶、氯过氧化物酶、

天冬氨酸 $\beta$ -脱羧酶、环糊精糖基转移酶、枯草杆菌蛋白酶、氨基酸酰基转移酶、氨基酸氧化酶、磷脂酶、脲酶、胆固醇酯酶、脱亚磺酸酶、木质素过氧化物酶、果胶酶、葡聚糖酶、葡糖苷酶、半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、麦芽糖酶、蔗糖酶、转化酶、柚皮苷酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、肽酶、凝乳酶、嗜热菌蛋白酶、胰蛋白酶、甘油三酯酶、pregastric酯酶、磷酸酶、植酸酶、酰胺酶、谷氨酰胺酶、溶菌酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、裂解酶、延胡索酸酶、histadases、氨基转移酶、连接酶、环化酶、消旋酶、变位酶、木质素酶、漆酶、氯过氧化物酶、卤代过氧化物酶、氢化酶、固氮酶、醇腈酶、或其组合。

57. 权利要求 1-55 中任一项的固定化酶、粒子或用途，其中所述酶包括脂肪酶。

## 固定化酶及其用途

### 发明领域

一般地，本发明涉及固定化酶用于各种化学转化和分析的用途。

### 发明背景

在应用、更特别地在生物技术中，已知酶、产生酶的微生物、细胞和细胞组分可以固定至某些载体，特别是当它们用作生物催化剂时。这个过程一般称为固定化。因为贮存或应用过程中的生物、化学或物理作用，天然酶的活性会发生降低，所以考虑到其高生产成本，存在使酶稳定的需要。通过固定化，酶可以重复使用。使用后，酶易于从反应混合物中分离。以这种方式，它们可以在各种工艺条件下使用。希望地，底物和反应特异性以及酶反应性不应由于固定化而丧失。

固定化酶尤其可以用于商业上重要的生物技术过程中。在食品工业中，葡萄糖异构酶使葡萄糖转变成果糖的用途是重要的。脂肪酶用于食用油的转酯作用的用途是另一个标准工艺。在其他工业性工艺中，固定化酶被应用于生产氨基酸和将青霉素 G 分裂成 6-氨基青霉酸。

固定化酶和细胞系统不仅在生物技术生产过程中使用，还在分析例如所谓的生物传感器中使用。使用固定化系统进行分析的原理基础是待测底物与固定化酶的反应，其中能够例如通过几种偶联方法（例如，酶电极）跟踪产物、底物和共底物浓度的改变。

然而，用于固定酶用于这些用途的目前酶固定化材料不能够显著地稳定酶防止变性作用。因此，需要增加酶在所公开用途中的稳定性的酶固定化材料。

### 发明概述

在本发明的各个方面中涉及在能够固定且稳定酶的胶束(micellar)或

反胶束(inverted micellar)固定化材料中固定的酶,所述材料对于比酶更小的化合物是可渗透的。当暴露于至少约 65°C 至少约 18 小时时,稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 12% 活性。在各种实施方案中,稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少 11% 或至少约 12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 或 75% 或更多活性。

另一个方面是在能够固定且稳定酶的非天然或非细胞(acellular)的胶体固定化材料中固定的酶,所述材料对于比酶更小的化合物是可渗透的。当暴露于至少约 65°C 至少约 18 小时时,稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 12% 活性。在各种实施方案中,稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少 11% 或至少约 12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 或 75% 或更多活性。

另外一个方面是在能够固定且稳定酶的胶束或反胶束固定化材料中固定的酶,所述材料对于比酶更小的化合物是可渗透的。当暴露于至少约 95°C 至少约 18 小时时,稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 1% 活性。在各种实施方案中,稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少 0.8 或 0.9% 或至少约 1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10% 或更多活性。

本发明的一个进一步方面是在能够固定且稳定酶的非天然存在或非细胞的胶体固定化材料中固定的酶,所述材料对于比酶更小的化合物是可渗透的。当暴露于至少约 95°C 至少约 18 小时时,稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 1% 活性。在各种实施方案中,稳定的酶保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少 0.8 或 0.9% 或至少约 1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10% 或更多活性。

另一个方面是在能够固定且稳定酶的胶束或反胶束固定化材料中固定的酶,所述材料对于比酶更小的化合物是可渗透的。当暴露于大于约 12.5

的 pH 至少约 18 小时时, 稳定的酶保留暴露于最适 pH 相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 9% 活性。在各种实施方案中, 稳定的酶保留暴露于最适 pH 相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少 7.5 或 8% 或至少约 9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 或 75% 或更多活性。

一个进一步方面是在能够固定且稳定酶的非天然存在或非细胞的胶体固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比酶更小的化合物是可渗透的。当暴露于大于约 12.5 的 pH 至少约 18 小时时, 稳定的酶保留暴露于最适 pH 相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 9% 活性。在各种实施方案中, 稳定的酶保留暴露于最适 pH 相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少 7.5 或 8% 或至少约 9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 或 75% 或更多活性。

另一个方面是在能够固定且稳定酶的胶束或反胶束固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比酶更小的化合物是可渗透的。当暴露于小于约 2 的 pH 时, 当连续催化化学转化时, 稳定的酶保留至少约 10% 的其起始生物电催化活性至少约 1 小时。在各种实施方案中, 当连续催化化学转化时, 稳定的酶保留至少约 10% 的其起始生物电催化活性至少约 1、2、3、4、8、12、16、20、24、36、48、60、72、96、120、144、168、192、216 或 240 小时或更久。在这些实施方案中, 当连续催化化学转化时, 在该时间段, 稳定的酶保留至少约 9% 或至少约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95% 的其起始生物电催化活性。

一个进一步方面是在能够固定且稳定酶的非天然存在或非细胞的胶体固定化材料中固定的酶, 所述材料对于比酶更小的化合物是可渗透的。当暴露于小于约 2 的 pH 时, 当连续催化化学转化时, 稳定的酶保留至少约 10% 的其起始生物电催化活性至少约 1 小时。在各种实施方案中, 当连续催化化学转化时, 稳定的酶保留至少约 75% 的其起始生物电催化活性至少约 1、2、3、4、8、12、16、20、24、36、48、60、72、96、120、144、168、192、216 或 240 小时或更久。在这些实施方案中, 当连续催化化学

转化时, 经过该时间段, 稳定的酶保留至少 9% 或至少约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95% 的其起始生物电催化活性。

在本发明的各个方面中涉及固定化酶用于催化反应的用途, 其中酶固定在酶固定化材料中。酶固定化材料固定且稳定酶, 对于比酶更小的化合物是可渗透的, 并且是胶束疏水改性的多糖。

其他方面涉及固定化酶用于检测分析物的用途, 其中酶固定在酶固定化材料中。酶固定化材料固定且稳定酶, 对于比酶更小的化合物是可渗透的, 并且是胶束疏水改性多糖。

另外其他的方面涉及固定化酶用于催化反应的用途, 其中酶固定在酶固定化材料中。酶固定化材料固定且稳定酶并且对于比酶更小的化合物是可渗透的。所催化的反应选自 (a) 二氧化碳至碳酸的转化; (b) 有机底物的对映选择性氧化或还原以及任选的辅因子再生; (c) 羧酸与醇的酯化; (d) 玉米或其他谷物的液化; (e) 玉米或其他谷物的糖化以使淀粉转化成糖; (f) 葡萄糖至果糖的异构化; (g) 手性化合物的合成; (h) 油的酯交换; (i) 油的脱胶; (j) 处理废水 (反应); (k) 使果汁澄清; (l) 通过淀粉工艺生产葡萄糖; (m) 从乳糖生产葡萄糖和半乳糖; (n) 合成具有肽键的化合物; (o) 从青霉素 G 生产 6-氨基青霉酸; (p) 使糖转化成醇; (q) 从石油馏分中去除硫; (r) 使丙烯腈转化成丙烯酰胺; (s) 使 3-氰基吡啶转化成烟酰胺; (t) 从混合物中反应分离一种或多种组分; 和 (u) 降解衣物污物中的污渍。

一个进一步的方面是选自下述的酶催化反应的改善: 羧酸与醇的酯化、玉米或其他谷物的液化、玉米或其他谷物的糖化以使淀粉转化成糖、葡萄糖至果糖的异构化、手性化合物的合成、油的酯交换、油的脱胶、废水处理、果汁澄清、通过淀粉工艺生产葡萄糖、从乳糖生产葡萄糖和半乳糖、合成具有肽键的化合物、从青霉素 G 生产 6-氨基青霉酸、使糖转化成醇、从石油馏分中去除硫、使丙烯腈转化成丙烯酰胺、使 3-氰基吡啶转化成烟酰胺、或降解衣物污物中的污渍。所述改善包括将酶固定在酶固定化材料

中，所述酶固定化材料固定且稳定酶并且对于比酶更小的化合物是可渗透的。

其他方面是固定化酶用于检测分析物的用途，其中酶固定在酶固定化材料中。酶固定化材料固定且稳定酶并且对于比酶更小的化合物是可渗透的。检测的分析物包括尿素、尿酸、胆固醇、药物、过氧化物、溶解的气体（例如，氧、二氧化碳等）、农药、毒素或微生物。

另外其他的方面是固定化酶用于自混合物中分离或除去物质的用途，其中酶固定在酶固定化材料中。酶固定化材料固定且稳定酶并且对于比酶更小的化合物是可渗透的。

进一步的方面是固定化酶在化学活性膜表面中的用途，所述化学活性膜表面与接触膜表面的至少一种物质反应，其中酶固定在酶固定化材料中。酶固定化材料固定且稳定酶并且对于比酶更小的化合物是可渗透的。

在下文中部分地彰显和部分地指出了其他目的和特征。

#### 附图简述

图 1 是用四戊基铵离子改性的低分子量藻酸盐的荧光显微照片。

图 2 是在改性的 Nafion®膜中固定的醇脱氢酶处形成的 NADH 的一系列荧光显微照片，所述改性的 Nafion®膜在 pH 7.15 磷酸盐缓冲液中用  $\text{NAD}^+$  和乙醇进行处理，其中 (a) 是未改性的 Nafion®膜、(b) 是四甲基溴化铵/ Nafion®膜、(c) 是四乙基溴化铵/ Nafion®膜、(d) 是四丙基溴化铵/ Nafion®膜、(e) 是四丁基溴化铵/ Nafion®膜、和 (f) 是四戊基溴化铵/ Nafion®膜。

图 3 是在四丁基溴化铵/ Nafion®膜中固定的退火的(annealed)醇脱氢酶的荧光显微照片，所述四丁基溴化铵/ Nafion®膜在 pH 7.15 磷酸盐缓冲液中用  $\text{NAD}^+$  和乙醇溶液进行处理。

图 4 是在四戊基溴化铵/ Nafion®膜中固定的醛脱氢酶的荧光显微照片，所述四戊基溴化铵/ Nafion®膜在 pH 7.15 磷酸盐缓冲液中用  $\text{NAD}^+$  和乙醛溶液进行处理。

图 5 是乙醇传感器的电流对时间曲线图。

图 6 显示  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$  中疏水改性的壳聚糖的代表性荧光显微照片。

图 7 显示在异硫氰酸荧光素 (FITC) 中浸泡的疏水改性的壳聚糖膜的代表性荧光显微照片。

图 8 显示通过疏水改性的壳聚糖的咖啡因流量的  $\text{KD}^{1/2}$  值, 显示为改性剂的烷基链长和重悬浮聚合物的溶剂的函数。

图 9 显示  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$  通过疏水改性的壳聚糖膜转运的  $\text{KD}^{1/2}$  值。

图 10 是包覆有电子介体 (electron mediator)、酶 (具有 2 个亚基) 和酶固定化材料的粒子的示意图。

图 11 是喷枪将混合物喷雾干燥到聚碳酸酯屏上的示意图。

图 12 是线性扫描伏安图 (linear sweep voltammogram), 表明制成碳复合电极的如实施例 11 所述的包封的醇脱氢酶的活性保留。

图 13 是固定在各种酶固定化材料中的消耗淀粉的淀粉酶的相对酶活性图。

图 14 是固定在各种酶固定化材料中的消耗麦芽糖的淀粉酶的相对酶活性图。

图 15 是游离脂肪酶、Novozym® 435 固定的脂肪酶和己基改性的壳聚糖固定的脂肪酶在室温孵育 24 小时后的酶活性图。

图 16 是游离脂肪酶、Novozym® 435 固定的脂肪酶和己基改性的壳聚糖固定的脂肪酶在 65°C 温育 24 小时后的酶活性图。

图 17 是游离脂肪酶、Novozym® 435 固定的脂肪酶和四乙基铵改性的 Nafion® 固定的脂肪酶在 50mM NaOH 溶液中温育 20 小时后的酶活性图。

图 18 是游离脂肪酶、Novozym® 435 固定的脂肪酶和己基改性的壳聚糖固定的脂肪酶在 50mM NaOH 溶液中温育 24 小时后的酶活性图。

图 19 是使用在阴极具有漆酶电极的半电池得到的电势对电流密度图。

## 发明详述

申请人已鉴定固定在酶固定化材料中的酶的新用途, 所述酶固定化材

料固定且稳定酶。本文描述的酶固定化材料具有针对变性或其他降解作用显著地稳定固定化酶的作用。在某些实施方案中，酶被稳定，从而酶保留至少约 75% 的其催化活性至少 7 天到 1095 天或更多天。在各种实施方案中，酶被稳定，从而酶保留至少约 75% 的其催化活性至少 30 天到 1095 天或更多天。在对酶实施高温（即，至少约 65°C）的实施方案中，酶被稳定，从而当暴露于至少约 65°C 至少约 18 小时时，它们保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 12% 活性。此外，在其他实施方案中，酶被稳定，从而当暴露于至少约 95°C 至少约 18 小时时，它们保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 1% 活性。在对酶实施高碱性条件（即，pH 大于 12.5）的情况下，酶被稳定，从而当暴露于至少约 12.5 的 pH 时，它们保留暴露于最适 pH 相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 9% 活性。这些酶固定化材料具有使酶保留在孔内同时允许比酶更小的各种物质接触孔内的酶的孔和通道大小。这些酶固定化材料可以具有 6 nm 至 1  $\mu$ m 的孔径直径，可以在 0-14 的 pH 范围操作，可以允许改变通道大小以改变底物扩散或选择性，并且可以在多种溶剂中维持酶固定化材料的稳定性和酶活性。

本发明的固定化酶可以使得酶可重复使用、使酶针对 pH 或温度的变化具有稳定性，允许酶从溶液中容易地移出以快速终止化学反应，简化反应产物纯化，或使酶对产物的污染降到最低。由这些优点带来的益处一般包括降低酶成本（例如，由于重复使用），增强工艺控制，和使纯化步骤花费更少。

如下文更详细地描述的，固定化酶的各种用途一般包括作为化学转化的催化剂，作为检测各种分析物的催化剂，和作为在各种分离和纯化过程中使用的催化剂。

如本文更详细地描述的，固定化酶可以为膜、粒子、在基质（例如，网、金属线、电极、惰性粒子等）上的涂层等形式。

为了本发明的目的，“游离酶”是溶解在缓冲溶液中的酶。游离酶是未固定的。此外，酶的最适 pH 是已知酶在该 pH 具有最佳活性的 pH。当最

适 pH 是范围时，最适 pH 是该范围的中点 $\pm 0.2$  pH 单位。

### 固定化的酶或细胞器粒子

本发明的多个方面涉及包含包覆有固定化酶的核芯的粒子。核芯可以是固定化酶层提供载体的材料，所述固定化酶层包覆在核芯上。固定化酶层包含酶、酶固定化材料和任选的电子介体。这些粒子的组分在下文更详细地描述。

本发明的此多个方面中的另一个方面是用于制备由固定化酶包覆的粒子的方法。该方法包括使包含酶的溶液与包含至少一种载体粒子、固定化材料和液体介质的悬浮液混合，以形成混合物。这种混合物随后进行喷雾干燥以产生被包覆的粒子。

如图 10 中所示，所产生的粒子可以包括核芯、任选的电子介体、酶和酶固定化材料（例如，聚合物基质）。作用在于稳定酶和将酶固定至载体的聚合物基质可以是下文描述的各种酶固定化材料。此外，除了酶之外，还可以在基质中加入辅助酶功能的各种化合物。例如，可以固定电子介体、辅因子和辅酶，使之在接触或反复洗涤后不浸出到液体中。

在各种优选实施方案中，酶不共价附着或吸附至核芯。此外，优选地，酶不从酶固定化材料浸出到与固定化酶层接触的液体介质中。一般地，固定化酶粒子包含约 0.1 wt.% 至约 25 wt.% 的核芯和约 0.1 wt.% 至约 70 wt.% 的涂层，并且涂层包含约 0.1 wt.% 至约 29 wt.% 的酶，约 0.1 wt.% 至约 43 wt.% 的酶固定化材料，高达约 29 wt.% 的电子介体。一般地，酶和电子介体的总重量百分比可以高达涂层的 57 wt.%。

### 酶

酶用于催化所需反应。一般地，可以固定天然酶、人工制造的酶、人工酶和修饰的天然酶。此外，可以使用已通过自然进化或定向进化改造的改造酶。换言之，在本发明的实施方案中可以使用模拟酶性质的有机或无机分子。尽管与未经历自然或定向进化的相同酶比较，这些改造酶可能具

有更大的稳定性，但改造酶可以通过用本发明的酶固定化材料固定而以本文描述的方式被进一步稳定。因此，固定在对酶无稳定作用的材料中或其上的改造酶不在本发明的范围内。可以固定的酶包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、连接酶或其组合。可以使用的其他酶可以通过常用的重组遗传方法例如易错 PCR 和基因改组来获得。此外，其他合适的酶可以通过从各种环境例如土壤中采掘 DNA 来获得。

在各种优选实施方案中，固定的酶是脂肪酶、葡萄糖异构酶、腈水解酶、葡萄糖氧化酶、蛋白酶（例如，胃蛋白酶）、淀粉酶（例如，真菌淀粉酶、产麦芽糖淀粉酶）、纤维素酶、乳糖酶、酯酶、糖酶、半纤维素酶、戊聚糖酶、木聚糖酶、支链淀粉酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、乙酰乳酸脱羧酶、 $\beta$ -葡糖苷酶、谷氨酰胺酶、青霉素酰基转移酶、氯过氧化物酶、天冬氨酸 $\beta$ -脱羧酶、环糊精糖基转移酶、枯草杆菌蛋白酶、氨基酸酰基转移酶、醇脱氢酶、氨基酸氧化酶、磷脂酶、脲酶、胆固醇酯酶、脱亚磺酸酶、木质素过氧化物酶、果胶酶、氧化还原酶、葡聚糖酶、葡糖苷酶、半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、麦芽糖酶、蔗糖酶、转化酶、柚皮苷酶(naringanases)、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、肽酶、凝乳酶、嗜热菌蛋白酶、胰蛋白酶、甘油三酯酶(triglyceridases)、pregastric 酯酶、磷酸酶、植酸酶、酰胺酶、谷氨酰胺酶、溶菌酶、过氧化氢酶、脱氢酶、过氧化物酶、裂解酶、延胡索酸酶、histadases、氨基转移酶、连接酶、环化酶、消旋酶、变位酶、氧化酶、还原酶、木质素酶(ligninase)、漆酶、氯过氧化物酶、卤代过氧化物酶(haloperoxidase)、氯化酶、固氮酶、醇腈酶(oxynitrilase)（杏仁腈裂解酶）、或其组合。

在多种实施方案中，酶催化其中产生葡萄糖的反应。在一个系统中， $\beta$ -葡糖苷酶可以用于将纤维二糖水解成葡萄糖。此外，纤维素酶催化纤维素水解为葡萄糖，淀粉酶催化淀粉或麦芽糖水解为葡萄糖。复合糖是最丰富的生物分子并且是良好的底物来源，但葡萄糖具有比复合糖更广泛的用途，因此碳水化合物优选分解成低分子量组分，如葡萄糖。纤维素是最丰富的复合糖，它由葡萄糖亚单位形成。它可以通过水解糖苷键的纤维素酶

而容易地分解。复合底物至其低分子量组分的生物再形成可以通过用酶催化而达到。这些酶可以用于将多糖（淀粉和纤维素）和二糖（蔗糖和乳糖）消化成可以在更多反应中使用的碳水化合物个体。

## 细胞器

细胞器中的酶或一组酶可以催化各种反应。这些包括底物的氧化。可以将包含催化期望化学转化的酶和/或酶和电子介体的任何细胞器固定和包覆在核芯粒子上，以制备本发明的粒子。特别地，乙醛酸循环体、过氧化物酶体、线粒体、线粒体质(mitoplast)、类囊体、叶绿体、氢化酶体及其组合可以固定且用于制备由固定的细胞器包覆的粒子。在多种优选实施方案中，细胞器是线粒体、线粒体质、类囊体、叶绿体或其组合。

细胞器包含各种酶。例如，线粒体或线粒体质包含柠檬酸循环所需的酶，其使通过糖酵解产生的丙酮酸氧化成 ATP、NADH、FADH<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>。线粒体质是外膜被去除的线粒体。一般地，这些线粒体酶是顺乌头酸酶、延胡索酸酶、苹果酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、琥珀酰 CoA 合成酶、异柠檬酸脱氢酶、酮戊二酸脱氢酶和柠檬酸合酶。线粒体和线粒体质包含三羧酸循环和电子传递链的酶和辅酶，因此，理想地它们被设计用于完全氧化常见燃料流体，但与微生物不同，由于更小的扩散距离、无生物膜形成且无需跨细胞壁转运燃料，所以它们具有更少的转运限制。

乙醛酸循环体中包含的酶包括苹果酸合酶、苹果酸脱氢酶、柠檬酸(Si)-合酶、顺乌头酸水合酶和异柠檬酸裂解酶。此外，过氧化物酶体中包含的酶包括过氧化氢酶、D-氨基酸氧化酶和尿酸氧化酶。

一般地，叶绿体内包含的酶包括 RuBisCO、磷酸甘油酸激酶、G3P 脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、醛缩酶、果糖-1,6-二磷酸酶、转酮醇酶、S1,7BPase、差向异构酶、核糖异构酶和磷酸核酮糖激酶。氢化酶体内的酶包括琥珀酰 CoA 合成酶。

细胞器特别是线粒体可能比分离的酶更难以固定。细胞器需要模拟细胞中的渗透压的特别范围的渗透压，以便细胞器不会膨大或收缩至损害细

胞器的程度。此外，因为所使用的细胞器一般具有膜，燃料流体到催化氧化作用的酶(一种或多种)的传质(mass transport)被最大化，因此生物燃料电池的电流密度不降低。

在多种实施方案的某些中，细胞器从细胞中分离。换言之，这些细胞器从细胞中被提取出来，并且仅包含由其特定膜包围的特定细胞器内容物。例如，当固定的细胞器是线粒体时，具有2层膜的单独线粒体细胞器被固定在固定化材料内。这些细胞器不包含在细胞中或不固定在细胞内。

### 电子介体

电子介体起着接受或提供一个或多个电子的作用，容易从氧化形式转变成还原形式。电子介体可以与细胞器和氧化还原酶一起用于其中介导电子转移的化学转化。多种酶也可能需要辅因子例如镁或钙离子，以便使酶具有活性。电子介体是可以掺入固定化材料内的化合物。示例性电子介体是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $\text{NAD}^+$ )、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)、吡咯并喹啉醌(PQQ)、每一个的等价物、及其组合。其他示例性电子介体是吩嗪硫酸甲酯，二氯酚靛酚，短链泛醌，铁氰化钾，蛋白质，金属蛋白，stellacyanin(漆树蓝蛋白)，钒、钕、铁、镍、铈、镧或钴与1,10-菲咯啉(phen)、2,2'-二联吡啶(bpy)或2,2',2''-三联吡啶(terpy)的过渡金属络合物，亚甲绿，亚甲蓝，聚(亚甲绿)，聚(亚甲蓝)，鲁米诺，硝基芴酮衍生物，吡嗪，钒菲咯啉二酮，儿茶酚-侧基(pendant)三联吡啶，甲苯蓝，甲酚蓝，尼罗蓝，中性红，吩嗪衍生物，硫堇，天青A，天青B，甲苯胺蓝O，苯乙酮，金属酞菁，尼罗蓝A，改性的过渡金属配位体，1,10-菲咯啉-5,6-二酮，1,10-菲咯啉-5,6-二醇， $[\text{Re}(\text{phen-二酮})(\text{CO})_3\text{Cl}]$ ， $[\text{Re}(\text{phen-二酮})_3](\text{PF}_6)_2$ ，聚(金属酞菁)，聚(硫堇)，苯醌类，二亚胺类，二氨基苯类，二氨基吡啶类，吩噻嗪，吩噻嗪，甲苯胺蓝，亮甲酚蓝，3,4-二羟基苯甲醛，聚(丙烯酸)，聚(天青I)，聚(尼罗蓝A)，聚苯胺，聚吡啶，聚吡咯，聚噻吩，聚(噻吩并[3,4-b]噻吩)，聚(3-己基噻吩)，聚(3,4-亚乙基二氧吡咯)，聚(异硫茛)，聚(3,4-

亚乙基二氧噻吩), 聚(二氟乙炔), 聚(4-二氰基亚甲基-4H-环戊[2,1-*b*; 3,4-*b'*]二噻吩), 聚(3-(4-氟苯基)噻吩), 聚(中性红)或其组合。备选地, 具有  $0.0V \pm 0.5V$  的标准还原电位的可逆氧化还原偶用作电子介体。

### 酶或细胞器固定化材料

酶或细胞器固定化材料可以用于固定且稳定酶或细胞器。对固定化材料的此讨论适用于酶固定化材料以及细胞器固定化材料。在各种实施方案中, 酶固定化材料对于比酶或细胞器更小的化合物是可渗透的, 由此可以通过固定化酶或细胞器催化期望反应。

一般地, 酶用于催化各种反应, 并且该酶被固定在能够固定且稳定酶的酶固定化材料中。为了本发明的目的, 酶或细胞器是被“稳定”的, 如果它: (1) 当连续催化化学转化时, 保留至少约 75% 的其起始催化活性至少约 30 天; (2) 当连续催化化学转化时, 保留至少约 75% 的其起始催化活性至少约 5 天; (3) 当暴露于至少约 65°C 至少约 18 小时时, 它保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 12% 活性; (4) 当暴露于至少约 95°C 至少约 18 小时时, 它保留暴露于室温相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 1% 活性; (5) 当暴露于大于约 12.5 的 pH 至少约 18 小时时, 它保留暴露于最适 pH 相同时间量的在其他方面相同的游离酶的至少约 9% 活性; 或 (6) 当暴露于小于约 2 的 pH 时, 当连续催化化学转化时, 稳定化的酶保留至少约 10% 的其起始生物电催化活性至少约 1 小时。一般地, 在溶液中的游离酶在数小时到数天内丧失其催化活性, 而适当固定且稳定的酶可以保留其催化活性至少约 5 天到约 1095 天。因此, 酶的固定化在稳定性方面提供显著优势。催化活性的保留定义为酶或细胞器具有至少约 75% 的其起始活性, 这可以通过化学发光、电化学、UV-Vis、放射化学或荧光测定法进行测量, 其中测量在起始时间时性质的强度。一般地, 荧光测定法用于测量酶或细胞器活性。在各种实施方案中, 在酶或细胞器连续催化化学转化时, 酶或细胞器保留至少约 75% 的其起始活性。

就稳定酶或细胞器而言, 酶固定化材料可以提供化学和机械屏障以阻

止或阻碍酶变性。为此，酶固定化材料在物理上限制酶，阻止酶解折叠。酶从折叠的三维结构解折叠的过程是酶变性的机制之一。

在某些实施方案中，酶固定化材料稳定酶或细胞器，从而使得酶或细胞器保留其催化活性至少约5天到约730天。在其他实施方案中，固定化酶或细胞器保留至少约75%的其起始催化活性至少约30、45、60、75、90、105、120、150、180、210、240、270、300、330、365、400、450、500、550、600、650、700、730、800、850、900、950、1000、1050、1095天或更多天。在各种实施方案中，固定化酶或细胞器保留至少约75%、80%、85%、90%、95%或更多的其起始催化活性至少约5、7、10、15、20、25、30、45、60、75、90、105、120、150、180、210、240、270、300、330、365、400、450、500、550、600、650、700、730、800、850、900、950、1000、1050、1095天或更多天。

在各种实施方案中，如上所述，当活跃催化化学转化时，具有更高温度或pH稳定性的酶也可以保留至少约75%的其起始催化活性至少约5天。

在其他实施方案中，当暴露于小于约2的pH时，当连续催化化学转化时，稳定化的酶保留至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95%的其起始生物电催化活性至少约1、2、3、4、8、12、16、20、24、36、48、60、72、96、120、144、168、192、216或240小时或更久。更特别地，如下表中所示的，当连续催化化学转化时，稳定化的酶可以保留一定百分比的起始生物电催化活性至少一段时间，其中下表中的“X”表示选择经过至少规定时间段由稳定化的酶保留的特定百分比的起始生物电催化活性。

时间 (小时)	起始生物电催化活性 %																	
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
24	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
36	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
48	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
72	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
120	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
144	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
168	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
192	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
216	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
240	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

此外，在各种实施方案中，相对于酶在固定前的活性，酶在固定在酶固定化材料中后保留至少约 0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95 或更多的其起始活性。

固定化的酶是物理上被局限在酶固定化材料的某个区域中并同时保持其催化活性的酶。存在各种酶固定化方法，包括载体-结合、交联和截留。载体-结合是酶结合到不溶于水的载体上。交联是酶通过双官能或多官能试剂的分子之间交联。截留是将酶掺入半透性材料的栅格内。酶固定化的具体方法并不关键重要，只要酶固定化材料能（1）固定酶和（2）稳定酶。在各种实施方案中，酶固定化材料还可透过比该酶小的化合物。

固定化的细胞器是物理上局限在固定化材料的某个区域中并同时保持其活性的细胞器。

就固定化材料对于比酶或细胞器小的各种化合物的透过性而言，固定化材料允许底物、燃料流体或氧化剂化合物通过它移动，由此使得化合物可以接触到酶或细胞器。可以制备固定化材料，使其包含内部孔、通道、孔隙或其组合，从而允许化合物可以在整个固定化材料中运动，但将酶或细胞器限制在固定化材料内的基本相同空间。这种限制使得酶或细胞器可以保持其催化活性。在各种优选的实施方案中，将酶或细胞器限制在与酶或细胞器具有基本上相同的尺寸和形状的空间中，在其中该酶或细胞器保持其基本上全部的催化活性。所述孔、通道、孔隙具有满足以上要求的物理尺寸，并且该物理尺寸取决于待固定化的特定酶或细胞器的尺寸和形状。

在一个实施方案中，酶或细胞器优选位于固定化材料的孔内，并且化合物通过转运通道出入固定化材料。孔和转运通道的相对大小可以是这样的，即，使得孔足够大以固定酶或细胞器，但转运通道对于酶或细胞器太小而不能通过其移动。此外，转运通道优选具有至少约 10 nm 的直径。在另外一个实施方案中，孔直径与转运通道直径之比是至少约 2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1 或更大。在另一实施方案中，优选转运通道的直径至少约 2 nm，孔直径与转运通道直径之比至少约 2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1 或更大。

在某些实施方案中，固定化材料具有胶束或反胶束结构(inverted micellar structure)。一般地，构成胶束的分子是两性的，这意味着它们包含极性亲水性基团和非极性疏水性基团。这些分子可以聚集形成胶束，其中极性基团在聚集体的表面上，而非极性基团被隔绝在聚集体内部。反胶束具有取向相反的极性基团和非极性基团。构成该聚集体的两性分子可以以各种方式排列，只要极性基团彼此邻近并且非极性基团彼此邻近即可。而且，这些分子可以形成具有彼此对着的非极性基团和彼此背离的极性基团的双层。备选地，可以形成如下双层，其中极性基团可以在双层中彼此对着而非极性基团彼此背离。

### 改性的 Nafion®

在一个优选的实施方案中，胶束固定化材料是改性的全氟磺酸-PTFE 共聚物（或改性的全氟化离子交换聚合物）（改性的 Nafion® 或改性的 Flemion®）膜。全氟化离子交换聚合物膜可以用比较离子 ( $\text{NH}_4^+$ ) 大的疏水阳离子改性。该疏水阳离子起到（1）规定膜的孔尺寸和（2）充当帮助保持孔的 pH 水平的化学缓冲剂的双重作用，这两者都具有稳定酶的作用。

关于疏水阳离子的第一作用，通过全氟磺酸-PTFE 共聚物（或全氟化离子交换聚合物）与疏水阳离子的混合物的流延产生改性的全氟磺酸

-PTFE 共聚物(或改性的全氟化离子交换聚合物)(Nafion®或 Flemion®)膜,可以提供其中孔尺寸取决于疏水阳离子的尺寸的固定化材料。由此,疏水阳离子越大,孔尺寸越大。疏水阳离子的这种作用使得可以通过改变疏水阳离子的尺寸而将孔尺寸做大或做小,以与特定酶或细胞器相匹配。

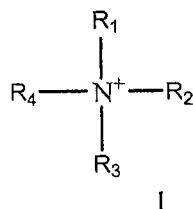
关于疏水阳离子的第二作用,全氟磺酸-PTFE 共聚物(或全氟化离子交换聚合物)膜的性质可以通过疏水阳离子与质子交换作为全氟磺酸-PTFE 共聚物膜上 $-\text{SO}_3^-$ 基团(或全氟化离子交换聚合物上的阴离子)的反荷离子来改变。这种反荷离子的变化提供了 pH 缓冲作用,因为疏水阳离子比质子对 $-\text{SO}_3^-$ 位点具有大得多的亲和力。膜的这种缓冲作用使得孔的 pH 保持基本不随溶液 pH 变化而变化;换言之,孔的 pH 能抵抗溶液 pH 的变化。此外,该膜提供了机械屏障,这进一步保护了固定化酶或细胞器。

为制备改性的全氟磺酸-PTFE 共聚物(或全氟化离子交换聚合物)膜,第一步骤是将全氟磺酸-PTFE 共聚物(或全氟化离子交换聚合物),特别是 Nafion®, 的悬浮液与疏水阳离子的溶液一起流延形成膜。接着提取出膜中过量的疏水阳离子及其盐,并将膜重新流延。重新流延时,膜包含与全氟磺酸-PTFE 共聚物(或全氟化离子交换聚合物)膜的 $-\text{SO}_3^-$ 位点结合的疏水阳离子。从膜中移除疏水阳离子的盐得到更稳定且可重复制作的膜;如果不移除这些盐,则过量盐可能被截留在孔中或在膜中造成空隙。

在一个实施方案中,改性的 Nafion®膜通过将 Nafion® 聚合物的悬浮液与疏水阳离子的盐如溴化季铵的溶液流延而制得。从膜中在除去过量的溴化季铵或溴化氢后,将膜再流延形成脱盐膜。膜的脱盐会使季铵阳离子保持存在于磺酸交换位点,但消除了由于过量盐可能被截留在孔中或可能在平衡后的膜中造成空隙而导致的复杂情况。脱盐后的膜的化学和物理性质在酶固定化之前用伏安法、离子交换容量测量术和荧光显微术表征。示例性的疏水阳离子是铵基阳离子、季铵阳离子、烷基三甲基铵阳离子、烷基三乙基铵阳离子、有机阳离子、磷阳离子、三苯基磷、吡啶鎓阳离子、咪唑鎓阳离子、十六烷基吡啶鎓、乙锭(ethidium)、紫罗碱(viologen)、甲基紫罗碱、苜基紫罗碱、双(三苯基磷)亚铵(iminium)、金属络合物、二联

吡啶基金属络合物、菲咯林基金属络合物、 $[\text{Ru}(\text{二联吡啶})_3]^{2+}$  和 $[\text{Fe}(\text{菲咯啉})_3]^{3+}$ 。

在一个优选实施方案中，疏水阳离子是铵基阳离子。特别地，疏水阳离子是季铵阳离子。在另一实施方案中，季铵阳离子由下式 1 表示：

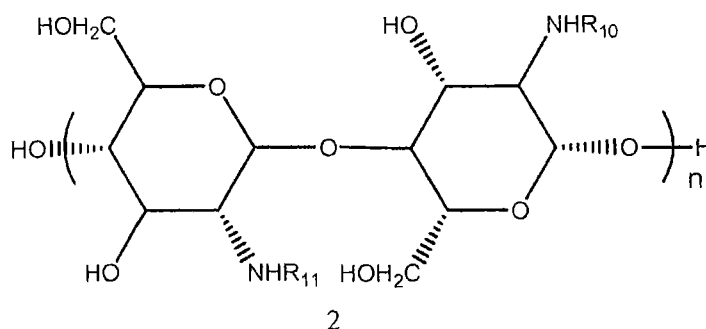


其中  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  独立地是氢、烃基、取代的烃基或杂环，其中  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  中至少一个不是氢。在另一实施方案中，优选  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  独立地是氢、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基或十四烷基，其中  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  中至少一个不是氢。在另一实施方案中， $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  相同并且是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基或己基。在另一实施方案中，优选  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  是丁基。在另外一个实施方案中，优选地， $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  是乙基。优选地，季铵阳离子是四乙基铵 (T2A)、四丙基铵 (T3A)、四戊基铵 (T5A)、四己基铵 (T6A)、四庚基铵 (T7A)、trimethylicosylammonium (TMICA)、三甲基十八烷基铵 (TMODA)、三甲基十六烷基铵 (TMHDA)、三甲基十四烷基铵 (TMTDA)、三甲基辛基铵 (TMOA)、三甲基十二烷基铵 (TMDDA)、三甲基癸基铵 (TMDA)、三甲基己基铵 (TMHA)、四丁基铵 (TBA)、三乙基己基铵 (TEHA)、及其组合。

### 疏水改性多糖

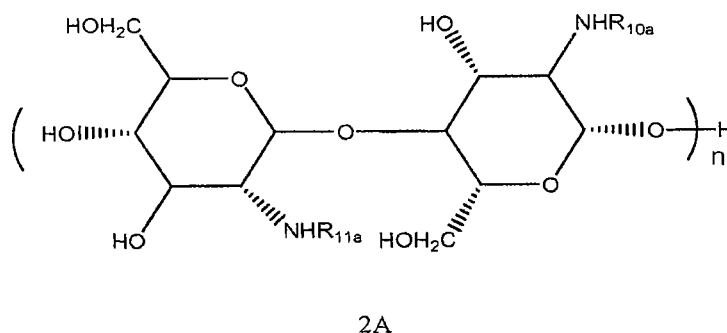
在其它各种实施方案中，示例性胶束或反胶束固定化材料是疏水改性多糖，这些多糖选自壳聚糖、纤维素、几丁质、淀粉、直链淀粉、藻酸盐、糖原及其组合。在各种实施方案中，胶束或反胶束固定化材料是聚阳离子聚合物，特别是疏水改性的壳聚糖。壳聚糖是聚 $[\beta\text{-}(1\text{-}4)\text{-}2\text{-氨基-}2\text{-脱氧-D-}]$

吡喃葡萄糖]。壳聚糖通常通过几丁质(聚[ $\beta$ -(1-4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖])脱乙酰化制得。典型的商用壳聚糖约 85% 脱乙酰化。这些脱乙酰化的或游离的胺基团可以进一步用烃基,特别是烷基官能化。因而,在多种实施方案中,胶束疏水改性壳聚糖对应于式 2 结构:



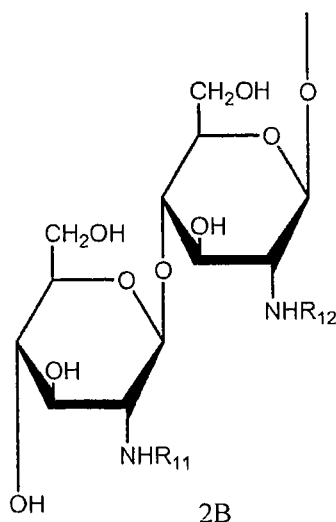
其中  $n$  是整数;  $R_{10}$  独立地是氢、烃基、取代的烃基或疏水氧化还原介体;  $R_{11}$  独立地是氢、烃基、取代的烃基或疏水氧化还原介体。在本发明的某些实施方案中,  $n$  是使得聚合物的分子量为约 21,000-约 500,000, 优选约 90,000 -约 500,000, 更优选约 150,000-约 350,000, 更优选约 225,000-约 275,000 的整数。在许多实施方案中,  $R_{10}$  独立地是氢或烷基,  $R_{11}$  独立地是氢或烷基。此外,  $R_{10}$  独立地是氢或己基,  $R_{11}$  独立地是氢或己基。或者,  $R_{10}$  独立地是氢或辛基,  $R_{11}$  独立地是氢或辛基。

在其它多种实施方案中,胶束疏水改性壳聚糖是对应于式 2A 的胶束状疏水氧化还原介体改性的壳聚糖:



其中  $n$  是整数;  $R_{10a}$  独立地是氢或疏水氧化还原介体;  $R_{11a}$  独立地是氢或疏水氧化还原介体。

此外,在多种实施方案中,胶束状疏水改性的壳聚糖是对应于式 2B 的改性壳聚糖或氧化还原介体改性的壳聚糖:



其中  $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $n$  如式 2 中的定义。在某些实施方案中， $R_{11}$  和  $R_{12}$  独立地是氢或直链烷基或支链烷基，优选氢、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基或十二烷基。在各种实施方案中， $R_{11}$  和  $R_{12}$  独立地是氢、丁基或己基。

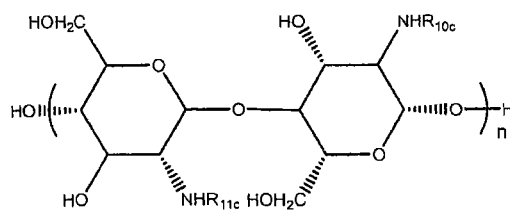
胶束状疏水改性的壳聚糖可以用疏水基团进行不同程度的改性。疏水改性的程度可以按被疏水基团改性的游离胺基团相对于未改性壳聚糖中游离胺基团的数目的百分比确定。疏水改性程度可以根据酸碱滴定和/或核磁共振 (NMR) 特别是  $^1\text{H}$  NMR 数据来评估。该疏水改性程度可以宽范围变化，并且至少约 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、32、24、26、28、40、42、44、46、48% 或更高。优选地，疏水改性程度为约 10%-约 45%，约 10%-约 35%，约 20%-约 35%，或约 30%-约 35%。

在其它多种实施方案中，式 2A 的疏水氧化还原介体是铈、钒、铁、镍、镉、镱或钴与 1,10-菲咯林 (phen)、2,2'-二联吡啶 (bpy) 或 2,2',2''-三联吡啶 (terpy) 的过渡金属络合物 (complex)、亚甲绿、亚甲蓝、聚(亚甲绿)、聚(亚甲蓝)、鲁米诺、硝基芴酮衍生物、吡嗪类、菲咯林二酮铈、儿茶酚-侧基三联吡啶、甲苯蓝、甲酚蓝、尼罗蓝、中性红、吩嗪衍生物、硫堇、天青 A、天青 B、甲苯胺蓝 O、苯乙酮、金属酞菁、尼罗蓝 A、改性的过渡金属配位体、1,10-菲咯林-5,6-二酮、1,10-菲咯林-5,6-二醇、 $[\text{Re}(\text{phen-二酮})(\text{CO})_3\text{Cl}]$ 、 $[\text{Re}(\text{phen-二酮})_3](\text{PF}_6)_2$ 、聚(金属酞菁)、聚(硫堇)、苯醌

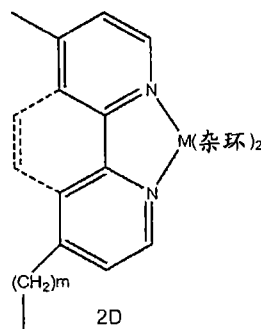
类、二亚胺类、二氨基苯类、二氨基吡啶类、吩噻嗪、吩噁嗪、甲苯胺蓝、亮甲酚蓝、3,4-二羟基苯甲醛、聚(丙烯酸)、聚(天青 I)、聚(尼罗蓝 A)、聚苯胺、聚吡啶、聚吡咯、聚噻吩、聚(噻吩并[3,4-b]噻吩)、聚(3-己基噻吩)、聚(3,4-亚乙基二氧吡咯)、聚(异硫茛)、聚(3,4-亚乙基二氧噻吩)、聚(二氟乙炔)、聚(4-二氰基亚甲基-4H-环戊[2,1-b;3,4-b']二噻吩)、聚(3-(4-氟苯基)噻吩)、聚(中性红)，或其组合。

优选地，疏水氧化还原介体是  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{+2}$ 、 $\text{Fe}(\text{phen})_3^{+2}$ 、 $\text{Os}(\text{phen})_3^{+2}$ 、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{+2}$ 、 $\text{Cr}(\text{phen})_3^{+2}$ 、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ 、 $\text{Os}(\text{bpy})_3^{+2}$ 、 $\text{Fe}(\text{bpy})_3^{+2}$ 、 $\text{Co}(\text{bpy})_3^{+2}$ 、 $\text{Cr}(\text{bpy})_3^{+2}$ 、 $\text{Os}(\text{terpy})_3^{+2}$ 、 $\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 、 $\text{Co}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 、 $\text{Cr}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 、 $\text{Fe}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 、 $\text{Os}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$  或其组合。更优选地，疏水氧化还原介体是  $\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 、 $\text{Co}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 、 $\text{Cr}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 、 $\text{Fe}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 、 $\text{Os}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$  或其组合。在各种优选实施方案中，疏水氧化还原介体是  $\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-甲基-4'-(6-己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 。

对于具有疏水氧化还原介体作改性剂的固定化材料，疏水氧化还原介体通常共价键合到壳聚糖或多糖主链上。通常，在壳聚糖情况下，疏水氧化还原介体通过-N-C 键共价键合到壳聚糖的一个胺官能基上。在金属络合物氧化还原介体情况下，金属络合物通过从壳聚糖的胺基至连接在金属络合物的一个或多个配位体上的烷基的-N-C 键而结合到壳聚糖上。对应于式 2C 的结构是结合到壳聚糖上的金属络合物的例子：



2C



2D

其中  $n$  是整数,  $R_{10c}$  独立地是氢或对应于式 2D 的结构,  $R_{11c}$  独立地是氢或对应于式 1D 的结构,  $m$  是 0-10 的整数,  $M$  是 Ru、Os、Fe、Cr 或 Co, 杂环是二联吡啶基、取代的二联吡啶基、菲咯林、乙酰丙酮及其组合。

用于改性壳聚糖的疏水基团起到双重作用: (1) 规定固定化材料的孔尺寸和 (2) 改变壳聚糖的电子环境以保持可接受的孔环境, 这两者都使酶或细胞器稳定化。关于该疏水基团的第一作用, 疏水改性的壳聚糖提供其中孔尺寸取决于疏水基团尺寸的固定化材料。因此, 疏水基团的尺寸、形状和对壳聚糖的改性程度影响孔的尺寸和形状。疏水基团的这种作用使得可以通过改变疏水基团的尺寸和分支情况而将孔尺寸做大或做小或做成不同形状, 以适应(fit)特定酶或细胞器。

关于该疏水阳离子的第二作用, 疏水改性的壳聚糖膜的性质可以通过用疏水基团改性壳聚糖来改变。壳聚糖的这种疏水改性可以通过增加可用质子交换位点的数目来影响孔环境。除了影响材料的 pH 以外, 壳聚糖的疏水改性也提供了作为机械屏障的膜, 这进一步保护了固定化酶。

表 1 示出了疏水改性的壳聚糖膜的可用质子交换位点的数目。

表 1: 每克壳聚糖聚合物的可用质子交换位点数

膜	每克的交换位点( $\times 10^{-4}$ mol $\text{SO}_3/\text{g}$ )
壳聚糖	10.5 $\pm$ 0.8

丁基改性的	226±21
己基改性的	167±45
辛基改性的	529±127
癸基改性的	483±110

此外，这种聚阳离子聚合物能够固定酶或细胞器，并相对于在缓冲溶液中的相同酶或细胞器的活性，增加固定在其中的酶的活性。在各种实施方案中，聚阳离子聚合物是疏水改性多糖，特别是疏水改性壳聚糖。例如对于所提及的疏水改性，已经测量了葡萄糖氧化酶的酶活性。观察到悬浮于叔戊醇中的己基改性壳聚糖中的葡萄糖氧化酶具有最高酶活性。与酶在缓冲液中相比，这些固定化膜表现出了 2.53 倍的葡萄糖氧化酶活性增加。表 2 针对一系列疏水改性壳聚糖列出了葡萄糖氧化酶活性。

**表 2: 改性壳聚糖的葡萄糖氧化酶活性**

膜/溶剂	酶活性 (单位/gm)
缓冲液	103.61 ± 3.15
未改性壳聚糖	214.86 ± 10.23
己基壳聚糖	
氯仿	248.05 ± 12.62
叔戊醇	263.05 ± 7.54
50% 乙酸	118.98 ± 6.28
癸基壳聚糖	
氯仿	237.05 ± 12.31
叔戊醇	238.05 ± 10.02
50% 乙酸	3.26 ± 2.82
辛基壳聚糖	
氯仿	232.93 ± 7.22
叔戊醇	245.75 ± 9.77
50% 乙酸	127.55 ± 11.98
丁基壳聚糖	
氯仿	219.15 ± 9.58
叔戊醇	217.10 ± 6.55

50% 乙酸

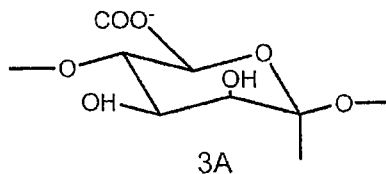
127.65 ± 3.02

为制备本发明具有烷基作为改性剂的疏水改性壳聚糖，将壳聚糖凝胶悬浮在乙酸中，接着加入醇溶剂。向该壳聚糖凝胶中加入醛（例如丁醛、己醛、辛醛或癸醛），接着加入氰基硼氢化钠。通过真空过滤分离所得产物，并用醇溶剂洗涤。接着将改性壳聚糖在真空炉中于 40℃ 干燥，并得到层状白色固体。

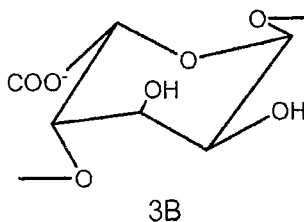
为制备本发明具有氧化还原介体作为改性剂的疏水改性壳聚糖，通过将 4,4'-二甲基-2,2'-二联吡啶与二异丙基胺锂接触，接着加入二卤代烷烃以生成 4-甲基-4'-(6-卤代烷基)-2,2'-二联吡啶，而衍生化氧化还原介体配位体。接着使该配位体与  $\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2\text{Cl}_2$  水合物在无机碱存在下接触并在水-醇混合物中回流，直至耗尽  $\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2\text{Cl}_2$ 。接着用六氟磷酸铵，或任选高氯酸钠盐或钾盐沉淀产物，随后重结晶。接着将衍生的氧化还原介体（ $\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2(4\text{-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ ）与脱乙酰化壳聚糖接触并加热。接着使氧化还原介体改性的壳聚糖沉淀并重结晶。

疏水改性壳聚糖膜具有有利的乙醇不溶性。例如，上述壳聚糖酶固定化材料一般在有高达约 99 wt.% 或 99 体积% 以上乙醇的溶液中具有固定并稳定酶的功用。在多种实施方案中，壳聚糖酶固定化材料在具有 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或更高 wt.% 或体积% 乙醇的溶液中有功能。

在其它实施方案中，胶束或反胶束固定化材料是聚阴离子聚合物，例如疏水改性多糖，特别是疏水改性藻酸盐。藻酸盐是包含  $\beta$ -(1-4)-连接的 D-甘露糖醛酸和  $\alpha$ -(1-4)-连接的 L-古洛糖醛酸残基的线性不分支聚合物。 $\beta$ -(1-4)-连接的 D-甘露糖醛酸的未质子化形式对应于式 3A 结构：



$\alpha$ -(1-4)-连接的 L-古洛糖醛酸的未质子化形式对应于式 3B 结构：



藻酸盐是由甘露糖醛酸残基的聚合物嵌段和古洛糖醛酸残基的聚合物嵌段组成的杂(heterogeneous)聚合物。

藻酸盐聚合物可以用各种方式改性。一种类型是用比铵离子( $\text{NH}_4^+$ )大的疏水阳离子改性的藻酸盐。该疏水阳离子起到(1)规定聚合物的孔尺寸和(2)充当帮助保持孔的pH水平的化学缓冲剂的双重作用,这两者都使酶或细胞器稳定化。关于该疏水阳离子的第一作用,用疏水阳离子改性藻酸盐得到其中孔尺寸取决于疏水阳离子尺寸的固定化材料。因此,疏水阳离子的尺寸、形状和对藻酸盐的改性程度影响孔的尺寸和形状。疏水阳离子的这种作用使得可以通过改变疏水阳离子的尺寸和分支而将孔尺寸做大或做小或做成不同形状,以与特定酶或细胞器相匹配。

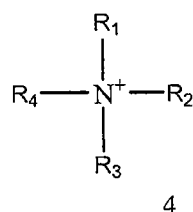
关于该疏水阳离子的第二作用,藻酸盐聚合物的性质可以通过疏水阳离子交换质子作为藻酸盐上 $-\text{CO}_2^-$ 基团的反荷离子来改变。这种反荷离子的变化提供了pH缓冲作用,原因是疏水阳离子比质子对 $-\text{CO}_2^-$ 位点具有大得多的亲和力。藻酸盐膜的这种缓冲作用使得孔的pH保持基本不随溶液pH变化而变化;换言之,孔的pH抵抗溶液pH的变化。此外,该藻酸盐膜提供了机械屏障,这又保护了固定化的酶或细胞器。

为制备改性的藻酸盐膜,第一步骤是将藻酸盐聚合物的悬浮液与疏水阳离子的溶液一起流延以形成膜。接着从膜中抽提出过量的疏水阳离子及其盐,并将膜再流延。再流延时,膜包含与藻酸盐膜的 $-\text{CO}_2^-$ 位点结合的疏水阳离子。从膜中移除疏水阳离子的盐得到更稳定且可复制的膜;如果不移除这些盐,则过量盐可能被截留在孔中或在膜中造成空隙。

在一个实施方案中,改性的藻酸盐膜通过将藻酸盐聚合物的悬浮液与疏水阳离子盐如溴化季铵的溶液流延而制得。在移除膜中的过量溴化季铵或溴化氢后,将膜再流延形成脱盐膜。膜的脱盐会使季铵阳离子保持存在

于羧酸交换位点，但消除了因过量盐可能截留在孔中或可能在平衡后的膜中造成空隙而造成的复杂情况。示例性的疏水阳离子是铵基阳离子、季铵阳离子、烷基三甲基铵阳离子、烷基三乙基铵阳离子、有机阳离子、磷阳离子、三苯基磷、吡啶鎓阳离子、咪唑鎓阳离子、十六烷基吡啶鎓、乙锭、紫罗碱、甲基紫罗碱、苜基紫罗碱、双(三苯基磷)亚铵、金属络合物、二联吡啶基金属络合物、菲咯林基金属络合物、 $[\text{Ru}(\text{二联吡啶})_3]^{2+}$  和  $[\text{Fe}(\text{菲咯林})_3]^{3+}$ 。

在一个优选实施方案中，疏水阳离子是铵基阳离子。特别地，疏水阳离子是季铵阳离子。在另一实施方案中，季铵阳离子由下式 4 表示：



其中  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  独立地是氢、烷基、取代的烷基或杂环，其中  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  中至少一个不是氢。在另一实施方案中，优选  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  独立地是氢、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基或十四烷基，其中  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  中至少一个不是氢。在另一实施方案中， $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  相同并且是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基或己基。在另一实施方案中，优选  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  是丁基。在另一实施方案中，优选  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  是乙基。优选地，季铵阳离子是四乙基铵，四丙基铵(T3A)，四戊基铵(T5A)、四己基铵(T6A)、四庚基铵(T7A)、三甲基 icosyl 铵(TMICA)、三甲基辛基癸基铵(TMODA)、三甲基己基癸基铵(TMHDA)、三甲基十四烷基铵(TMTDA)、三甲基辛基铵(TMOA)、三甲基十二烷基铵(TMDDA)、三甲基癸基铵(TMDA)、三甲基己基铵(TMHA)、四丁基铵(TBA)、三乙基己基铵(TEHA)及其组合。

已研究孔的特性，并且该膜的孔结构对于酶固定化是理想的，因为这些孔疏水，具有胶束结构，能缓冲外部 pH 变化，并且具有高的孔间互连

性(pore interconnectivity)。

在另一实验中，将超低分子量的藻酸盐和十二烷基胺置于 25% 乙醇中，并回流，通过羧酸基团酰胺化生成十二烷基改性的藻酸盐。各种烷基胺可以替代十二烷基胺而生成具有连接到藻酸盐结构的不同数量反应性羧酸基团上的 C<sub>4</sub>-C<sub>16</sub> 烷基的烷基改性藻酸盐。在各种实施方案中，至少约 1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48% 或更多羧酸基团与烷基胺反应。

疏水改性藻酸盐膜具有有利的乙醇不溶性。例如，上述藻酸盐酶固定化材料一般在具有至少约 25 wt.% 或 25 体积% 乙醇的溶液中有固定和稳定酶的功用。在多种实施方案中，藻酸盐酶固定化材料在具有 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或更多 wt.% 或体积% 乙醇的溶液中有功用。

为评价对于特定酶或细胞器最有利的固定化材料，可以将所选定的酶或细胞器固定在各种固定化材料中，沉积在电子导体上，并用在缓冲溶液中含有用于该特定酶的电子介体（如 NAD<sup>+</sup>）和/或底物的溶液处理。得到荧光显微照片，当固定化之后固定在特定固定化材料中的酶或细胞器仍是具有催化活性的酶时，该照片显示出荧光。酶活性也可以通过任何标准的光谱测定法确定。这是确定特定固定化材料是否能固定和稳定酶或细胞器且同时保持酶或细胞器的催化活性的一种方式。例如，对于消耗淀粉的淀粉酶，通过将酶固定在悬浮于叔戊醇的丁基壳聚糖中，可以提供给出最大相对活性的酶固定化材料。对于消耗麦芽糖的淀粉酶，最大相对活性可以通过将酶固定在中等分子量癸基改性的壳聚糖中来提供。

### 核芯组分

核芯是任何能够为固定化酶层提供支持且能够被喷雾干燥的粒子。例如，核芯粒子可以是聚合物粒子、碳粒子、沸石粒子、金属粒子、陶瓷粒子、金属氧化物粒子、或它们的组合。在一些实施方案中，核芯粒子是惰性核芯粒子。在多种实施方案中，核芯粒子不是聚合物粒子。优选的核芯

粒子不会对酶的稳定性或者酶参与的化学转化有不利的影 响。在一些实施方案中，核芯粒子具有约 200 nm - 约 100  $\mu$ m 的平均直径，这取决于被固定化酶包覆后的粒子的预期用途。

### 制备包覆粒子的方法

通过将包含酶或细胞器的溶液与包含至少一种核芯粒子、固定化材料、和液体介质的悬浮液混合，并对所得混合物进行喷雾干燥，可以制备包覆粒子(coated particles)。下面具体描述该溶液、悬浮液和喷雾干燥步骤。

包括酶和溶剂的酶溶液可以用于包覆过程。或者，在包覆过程中可以使用包括细胞器和溶剂的细胞器溶液。酶与溶剂组合并混合直到形成溶液。上面已具体描述了可接受的酶和细胞器。溶剂可以是水溶液，优选是缓冲溶液，例如乙酸盐缓冲溶液或磷酸盐缓冲溶液。缓冲溶液的 pH 被设计来提供对于待固定化的特定的酶或细胞器来说可接受的 pH 值。此外，在多种实施方案中，酶溶液可以包括如上所述电子介体。

通过将核芯粒子、所需的固定化材料和液体介质混合，制备悬浮液。前面已经描述了示例性的核芯粒子和固定化材料。液体介质可以是溶剂或缓冲溶液，例如乙酸盐缓冲溶液或磷酸盐缓冲溶液。当使用缓冲溶液作为液体介质时，缓冲溶液的 pH 被选择来提供对于待固定化和包覆的特定的酶或细胞器来说可接受的 pH 值。

在酶或细胞器溶液和悬浮液制备好后，将它们合并在一起并充分混合。然后干燥所得混合物。优选的干燥方法是喷雾干燥，因为这种干燥方法还导致固定化酶层对核芯粒子的包覆。在本发明的方法中可以使用常规的喷雾干燥技术。作为喷雾干燥的替代方案包括用于形成包覆粒子的其它常规工艺，例如流化床造粒、喷雾干燥造粒、旋转造粒 (Rotogranulation)、流化床/喷雾干燥造粒、挤出和滚圆等。

在一些实施方案中，溶液包括约 0.1 wt% - 约 15 wt% 的酶或细胞器和约 85 wt% - 约 99.1 wt% 的溶剂，悬浮液包括约 0.1 wt% - 约 50 wt% 的核芯粒子、约 4 wt% - 约 10 wt% 的酶固定化材料、和约 50 wt% - 约 75 wt

%的液体介质。制备流延溶液的其它方法包括将粒子与酶或细胞器在缓冲溶液中混合在一起形成悬浮液,然后加入溶解的固定化材料以完成混合物;或者一次性混合所有材料以形成悬浮液。

在多种优选实施方案中,酶、酶固定化材料、和任选地,电子介体的混合物可以通过喷涂/干燥技术包覆到支持粒子上。例如,可以使用喷枪(例如,Paasche VL系列)来产生混合物组分的气溶胶并将它们朝靶推进。参见图 2.2。气溶胶通过使用调节在约 25 psi 的压缩氮气产生。混合物被喷枪喷雾到诸如聚碳酸酯屏的表面上,从喷枪头端到屏的距离为约 40 cm。喷枪可以以光栅模式移动,同时以锯齿模式沿聚碳酸酯靶垂直向下移动,而施加流延溶液。利用该工艺可以使干燥时屏上的涂层厚度最小化并使粒子与粒子之间的相互作用最小化。流延溶液在屏上干燥约 20 分钟,之后通过大抹刀/刮刀收集。

## 基质

一旦酶已固定在酶固定化材料内,可以将该固定化酶沉积在基质上。基质可以是提供所选用途所需的期望机械支持的材料。例如,当固定化酶用作催化剂用于化学转化时,基质可以是滤纸、金属丝网等。此外,基质可以是用于生物传感器的电子传导材料。

## 应用和用途

固定化酶可以用作催化剂用于各种化学转化。酶可以使用本文描述的方法固定在酶固定化材料中并且沉积在各种基质上。这些固定化酶随后可以接触反应混合物并且催化所需化学转化。

特别地,固定化酶可以用于催化反应,其中酶固定化材料固定且稳定酶,对于比酶小的化合物是可渗透的并且是胶束疏水改性多糖。在各种优选实施方案中,胶束疏水改性多糖是疏水改性的壳聚糖或疏水改性的藻酸盐。

再有,固定化酶可以用于检测分析物。酶固定化材料固定且稳定酶,

对于比酶小的化合物是可渗透的，并且是胶束疏水改性多糖。在各种优选实施方案中，胶束疏水改性多糖是疏水改性的壳聚糖或疏水改性的藻酸盐。

例如，碳酸酐酶可以用于将二氧化碳转化成碳酸，所述碳酸随后自发地转化成碳酸氢盐和碳酸盐。在调整 pH 以有利于碳酸盐形成后，加入无机离子（例如， $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$ ）以沉淀容易贮存的碳酸盐。以这种方式，可以从气体中选择性去除二氧化碳，并且由此将它隔离。备选地，可以将由二氧化碳形成的碳酸加入碳酸盐浆中，形成可以在大洋中沉积且具有很少的环境影响的碳酸氢盐。二氧化碳来自各种来源，包括化石燃料燃烧、石灰石煅烧成石灰和各种工业废水。此外，使用碳酸酐酶将二氧化碳转化成碳酸盐和碳酸氢盐的这种转化可以用于自封闭环境中去除二氧化碳，所述封闭环境例如宇宙飞船、航天服、行星基地和表面巡视器。此类反应也可以用于通过从环境隔离二氧化碳，并且使用隔离的碳作为碳源用于生物的生长，而使各种光合生物的生长最大化。在一个系统中，生物是可以合成氢的蓝细菌。使用碳酸酐酶的碳隔离系统的各种用途在美国专利号 6,348,347; 6,602,703; 6,908,507; 和 7,132,090 中描述；这些专利引入本文作为参考。

对于各种寡糖的制备，可以固定糖基水解酶，例如几丁质酶、壳聚糖酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶、 $\beta$ -岩藻糖苷酶和糖基转移酶。依赖于所使用的酶，可以产生各种单糖和二糖。

例如，酶可以被用于降解衣物污物中的污渍，例如在洗涤剂中分解并从衣物除去蛋白质。一般地，用于洗涤剂中的酶是蛋白酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、和脂肪酶。这些酶可以在本文描述的酶固定化材料内被固定并稳定，并分散于洗涤剂中或水性载体中来提供衣物污物处理。这些酶固定化材料可以使酶在洗涤剂的其它组分中稳定并改善存储稳定性。多种含酶洗涤剂产品被描述在美国专利 7,179,780、6,894,013、和 6,827,795 中，这些专利文献通过引用被包括在这里。

此外，酶可以用于废水处理来分解水流中的各种废物。例如，除了细菌之外还可以使用脂肪酶、纤维素酶、淀粉酶、和蛋白酶来去除各种废物。

本领域技术人员已知具体废水流的组分和用于降解这种废水流的合适的酶。例如美国专利 7,053,130、6,802,956、5,531,898、和 4,882,059 公开了多种用于废水处理的酶，这些专利文献通过引用被包括在这里。

酶的工业应用的另一个例子是用于将玉米或其它谷物转化为高果糖玉米糖浆。酶被用于高果糖玉米糖浆的三个加工步骤中，这些步骤是：玉米或谷物的液化、玉米或其它谷物的糖化以将淀粉转化为糖、和葡萄糖至果糖的异构化。特别地，葡萄糖异构酶被用于将葡萄糖转化为果糖。可以将这些使用的酶有利地固定于本文描述的酶固定化材料中。酶的这种固定化是有利的，因为酶会被稳定而不发生因时间、温度或不适 pH 引起的变性，而且酶可以容易地被去除从而导致工艺更可控。同样，固定化酶可以容易地从高果糖玉米糖浆产品中分离出去。这些加工步骤更详细地描述在美国专利 5,593,868 和 4,567,142 中，这些专利文献通过引用被包括在这里。

此外，酶还可以用于食物加工中，因为这些工艺需要酶催化蛋白质的多种反应。例如，在烘焙工艺中，真菌淀粉酶、半纤维素酶、戊聚糖酶、木聚糖酶、蛋白酶、支链淀粉酶和酸性蛋白酶被用于各种目的。在一种工艺中，真菌淀粉酶被用于改性面粉来适于烘焙并生产出更均一的面团和产品。此外，产麦芽糖淀粉酶被用于延长多种类型面包的货架期，支链淀粉酶被用作烘焙产品中的保鲜剂。在酿造工艺中，淀粉酶、蛋白酶、 $\beta$ -葡聚糖酶和乙酰乳酸脱羧酶被用于多个步骤。对于啤酒来说，这些酶中的一些可以被加入到麦芽中促进淀粉转化成可发酵糖，去除啤酒冷混浊（chill haze）和改善过滤。对于干酪和乳清的生产，蛋白酶（例如，胃蛋白酶）和脂肪酶被用于奶的凝化和干酪的熟化步骤，乳糖酶被用于生产乳清糖浆。此外， $\beta$ -葡萄糖苷酶转化豆奶中的异黄酮植物雌激素。这些酶中的每一种都可以通过本文描述的方法固定并有利地用作这些反应的催化剂。这些工艺更详细地描述在美国专利 7,014,878、6,936,289、6,830,770、4,358,462 和 6,372,268 中，这些专利文献通过引用被包括在这里。

多种化学合成工艺利用酶来进行酯化、手性合成、和油的酯交换及脱胶。例如，多种羧酸化合物（包括具有羧酸侧基(pendant group)的聚合物）

可以利用多种酶被醇酯化。用于催化酯化反应的酶通常是水解酶，特别是脂肪酶、蛋白酶和酯酶。示例性的酶包括南极假丝酵母 (*Candida antarctica*) 脂肪酶 B (由 Novozyme 生产)、米黑毛霉 (*Mucor meihei*) 脂肪酶 IM、洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas Cepacia*) 脂肪酶 PS-30、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 脂肪酶 PA、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 脂肪酶 PF、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 脂肪酶、和来自猪胰腺脂肪酶的柱状假丝酵母 (*Candida cylindracea*) 脂肪酶。这些反应的更具体的细节描述在美国专利 7,183,086 和 6,924,129 中，这些专利文献通过引用被包括在这里。

对于化学合成来说，多种酶可以催化多种化学转化。例如，谷氨酰胺酶被用于将谷氨酰胺转化为谷氨酸；青霉素酰基转移酶被用于化学合成；氯过氧化物酶被用于类固醇合成；天冬氨酸  $\beta$ -脱羧酶被用于从 L-天冬氨酸制造 L-丙氨酸；环糊精糖基转移酶被用于从淀粉制造环糊精。此外，多种手性化合物的合成也使用酶。枯草杆菌蛋白酶被用于化学化合物或药物的手性拆分；氨基酸酰基转移酶可以光学拆分氨基酸；醇脱氢酶被用于化学产品的手性合成；氨基酸氧化酶被用于外消旋氨基酸混合物的拆分。这些反应的一些的更具体的细节描述在美国专利 6,036,983、5,358,860、6,979,561、5,981,267、6,905,861 和 5,916,786 中，这些专利文献通过引用被包括在这里。

可以极大地得益于酶的固定化和稳定化的另一个反应类型是使用氧化还原酶用于对映选择性还原以及化学、区域和对映选择性氧化的电极系统。当在设计以提供酶偶联的辅因子再生的电极处使用时，这些反应是特别有用的。此种电极已开发用于  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADP}^+$  依赖性酶。这些反应和电极在美国专利号 6,991,926 和美国专利申请公开号 2007/0231871 中更详细地描述；这个专利和公开申请引入本文作为参考。

利用多种酶，可以进行油的酯交换或脱胶。例如，酶促酯交换反应是控制食用油和脂肪的熔融特性的有效方法。这是通过控制转化/反应的程度来实现的。这个方法中不使用化学品，并且不会如其它生产工艺中一样产

生反式脂肪。固定化的脂肪酶可以用于在生产人造黄油和起酥油的油和脂肪上进行脂肪酸的酯交换。此外，酶促方法可以用于除去植物油中的胶质；这个方法一般被称为脱胶。使用磷脂酶的酶促脱胶可以将不能水合的卵磷脂（胶质）转化为水溶性的溶血卵磷脂，溶血卵磷脂可以通过离心分离。这些工艺描述在美国专利 6,162,623、6,608,223、7,189,544 和 6,001,640 中，这些专利文献通过引用被包括在这里。

此外，固定化脂肪酶可以用于生产生物柴油。各种动物和植物脂肪包含甘油三酯，其可以与醇类（例如，甲醇或乙醇）发生转酯，形成甘油三酯的脂肪酸的酯。这些酯可以用作燃料。这种转酯过程一般非常慢，但脂肪酶催化剂可以加速这个反应以产生生物燃料而无需使用严苛的化学试剂。

此外，固定化酶可以用于生物传感器。一般地，这些生物传感器用于诊断方法中检测复杂混合物（例如体液和工业混合物）中的各种待分析物。例如，多种传感器可以用于检测各种体液中的尿素、尿酸和胆固醇。美国专利 5,714,340 中描述了多种传感器，该专利文献通过引用被包括在这里。本发明的固定化酶或细胞器可以代替在生物传感器中使用的酶，以延长生物传感器的使用寿命。

固定化酶可以用于多种检验方法，用于测定体液（例如，唾液、血液、或尿液）中多种化合物或生物体的存在和/或浓度。这些检验方法使用各种酶与待分析物和酶抑制剂相互作用；这些相互作用允许从检测的一个或几个待分析物分子或生物体形成或转化成大量分子。而，酶活性与待分析物的浓度成比例，并且允许检测低浓度的待分析物。待分析物可以是小分子农药和其它毒素到微生物。可以使用具有高特异性的各种检验探针对特定待分析物进行捕获和检测。使用酶放大的检验方法在美国专利 6,171,802、6,383,763 和 4,067,774 中有所描述，这些专利文献通过引用被包括在这里。

此外，固定化酶可以用于物质的纯化和混合物中组分的分离。例如，酶可以用于从外消旋混合物中分离手性分子和异构体；用于从油、气体和其它工业材料中除去硫；用于从植物中分解和分离木质纤维素组分；用于

处理和净化废水；和用于加工食物除去不想要的化合物。

此外，固定化酶可以用于催化各种分离。在此种反应过程中，酶可以催化转化以帮助分离混合物的组分。例如，碳酸酐酶可以用于与空气中的二氧化碳反应，并且将其转化成随后可以反应以形成碳酸盐的碳酸。这些碳酸盐可以容易地与空气的其他组分分离。此外，固定化漆酶可以与空气中的氧反应，以形成过氧化物，并随后形成水。水可以容易地与空气组分分开。对于这些提取，可以使用在膜中的固定化酶。此外，该提取可以是液/液或气/液提取。

油、气体和其他工业材料的脱硫可以使用各种酶。这些酶一般称为脱硫酶。一种重要的脱硫酶是脱亚磺酸酶。这些脱硫酶分解各种石油产品中的噻吩，并且在原料油燃烧之前从中除去硫原子。这些工艺在美国专利号 6,461,859 和 7,045,314 中描述；这些专利引入本文作为参考。

来自多种植物的木质素可以被木质素过氧化物酶降解。木质素过氧化物酶可以催化多种氧化反应，得到各种裂解产物和其它氧化产物。这些氧化反应包括木质素的丙基侧链的碳碳键断裂、苄型 (benzylic) 亚甲基的羟基化、苄基醇氧化为相应的醛或酮、和酚氧化。这些过程的细节描述在美国专利 7,049,485 中，该专利文献通过引用被包括在这里。

果汁可以使用果胶酶、淀粉酶和纤维素酶进行加工，所述酶分解果实细胞的各种结构，并且增强汁液萃取过程。在果实加工过程中从细胞中释放的多糖在汁液中是不可溶的，并且使得汁液混浊。为了使汁液澄清，果胶酶和淀粉酶用于分解这些不溶性多糖，以产生可溶糖。这个过程导致澄清汁液，其由于加入的可溶糖而变甜。这些过程在美国专利号 5,585,128、5,419,251 和 4,971,811 中更详细地描述；这些专利引入本文作为参考。

活性表面膜 (Active surface film) 是包括反应性物质和/或酶的涂层，其能与不想要的污染物反应以进行自清洁或从表面除去各种毒素。例如，活性表面膜可以包括在食品包装、纤维、表面层、绷带或过滤器中来分解毒素或杀菌。例如，可以将能够降解各种毒素的酶包括在纤维中以破坏用作生物武器的毒素。此外，这种纤维可以用能杀死或破坏细菌的酶涂覆，

从而使穿着者免受细菌感染。

此外，可以固定一种以上的酶或细胞器，以提供能催化一种以上反应的多功能材料。例如，上面描述的酶或细胞器的组合可以被固定化于一种或多种酶固定化材料中，从而提供能催化多于一种的产品的反应。

本发明已详细描述，显而易见的是可以进行各种修饰和变化而不背离后附权利要求中限定的本发明范围。

## 实施例

### 实施例 1: 固定化酶

如下所述制备用于制造 Nafion®和溴化季铵盐的混合物-流延膜的流延溶液。

采用下述溴化季铵盐：溴化铵 (Fisher)、四甲基溴化铵 (Aldrich)、四乙基溴化铵 (Fisher)、四丙基溴化铵 (Aldrich)、四丁基溴化铵 (Eastman)、和四戊基溴化铵 (Aldrich)。

通过将 5 wt% Nafion®悬浮液 (Solution Technologies, Inc.) 与溴化季铵盐共流延，形成掺入了溴化季铵盐的 Nafion®膜。通过将溴化季铵盐加入该 5 重量% 悬浮液中来制备混合物-流延溶液。制备所有混合物-流延溶液时，使溴化季铵盐的浓度相对于 Nafion®悬浮液中的磺酸位点的浓度过量。优化后，确定了最稳定和可复制的膜具有 3 倍于交换位点浓度的溴化季铵浓度。

将 1 毫升混合物-流延溶液放置在称重皿中，使之干燥。先前研究已显示引入膜内的所有溴离子在将膜浸泡在水中后从膜中排出。因此，将 7.0 mL 18 MΩ 水加入称重皿中且允许浸泡过夜。去除水，用 18 MΩ 水充分清洗膜并干燥。随后将脱盐膜重悬浮于 1.0 mL 低级脂族醇中。

对具有 2:1 的酶与 TBAB 比 (通常为 1200 μL 的 1.0 μM 酶 : 600 μL) 和 0.03g NAD<sup>+</sup>的酶/Nafion®流延溶液进行涡旋，预备用于包覆在电极上。用吸管将溶液加到电极上，允许浸入碳毡电极内并干燥。

图 2-4 显示在各种改性的全氟磺酸-PTFE 共聚物膜中固定的酶的荧光

显微照片, 所述全氟磺酸-PTFE 共聚物膜在 pH 7.15 磷酸盐缓冲液中用  $\text{NAD}^+$  和燃料流体溶液进行处理。显示荧光的荧光显微照片说明固定在该特定改性全氟磺酸-PTFE 共聚物膜中的酶在固定后仍是具有催化活性的酶。这是确定特定酶固定化材料是否能够固定且稳定酶并同时保留酶的催化活性的一种方法。下表 3 详述了制备的酶和膜以及酶在固定后是否保留催化活性。当表显示“是”时, 酶在膜中固定后保留其催化活性, 而当表显示“否”时, 酶在膜中固定后未保留其催化活性。

表 3

膜	醇 DH	醛 DH	甲酸盐 DH	葡萄糖 DH	乳酸 DH	甲醛 DH
Nafion®	否	否	否	否	否	否
AmmoniumBr	否	否	否	否	否	否
TMABr	否	否	否	否	否	否
TEABr	否	否	否	否	否	否
TPropABr	是	否	否	否	是	否
TBABr	是	是	是	是	是	是
TPentABr	否	是	是	是	是	否

### 实施例 2: 酶传感器

玻璃碳电极用亚甲绿进行改性, 所述亚甲绿通过化学或电化学方法进行聚合。使用上文实施例 1 中描述的操作, 将醇脱氢酶固定在四丁基溴化铵改性的 Nafion®膜中, 并且使固定化酶在改性的玻璃碳电极上形成层并干燥。在改性的玻璃碳电极干燥后, 将它放置在 1.5 mL pH 7.15 磷酸盐缓冲液中, 进行平衡。平衡后, 在 -0.4V 电势下执行电流传感。在确立基线读数后, 将 1 mL 在磷酸盐缓冲液中的 8 mM 乙醇溶液注入溶液内。图 5 显示该电流型传感器的电流-时间图。

### 实施例 3: 固定酶的脱盐膜的制备

### Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion I 的制备

为了制备 Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion I 脱盐膜 (“Nafion I”), 将 0.15 毫摩尔 Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup> 加入 4ml Nafion® 中, 通过涡旋和在恒温水浴中使用超声波破碎仪(Sonicator)充分混合~3 到 4 小时。随后将混合物倾入称重皿内以干燥过夜。干燥后, 通过使用涡旋将 Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion® 混合物浸泡入去离子水中, 随后离心, 对 Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion® 混合物进行脱盐。当所有盐都被提取出来后, 提取后的溶液从橙色变澄清。清洗和干燥脱盐的膜, 然后再溶解于 4 ml 80% 乙醇中 (可以再溶解于包含高达 30% 水的低级脂族醇的混合物中)。

通过下述操作将酶固定在 Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion I 脱盐膜中。将约 1 mg 电子介体和约 0.5 到 1 mg 该阴极酶加入 100 ml Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion III 脱盐膜 (同上) 中且充分混合 (在这种情况下, 涡旋 20 分钟)。

### Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion II 的制备

为了制备 Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion II 脱盐膜 (“Nafion II”), 将 0.3 毫摩尔四丁基溴化铵 (TBAB) (0.09672g) 加入各 1ml Nafion® 中, 随后通过涡旋混合 10 分钟。随后将混合物倾入称重皿内以干燥过夜。(在这时, 膜混合物为浅黄色。) 干燥后, 将 TBAB 处理的 Nafion® 浸泡在去离子水中 24 小时, 随后用去离子水清洗三 (3) 次, 之后干燥。(在这时, 膜混合物是澄清的。) 干燥的该脱盐层随后在 Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup> 溶液 (溶解于缓冲液、水或电解液中的 1 mM Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>) 中浸泡过夜, 允许干燥, 然后再溶解于 1 ml 乙醇中。根据上文阐述的方案将酶固定在该改性的膜中。

### Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion III 的制备

为了制备 Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>/Nafion III 脱盐膜 (“Nafion III”), 将 0.3 毫摩尔四丁基溴化铵 (TBAB) (0.09672g) 加入各 1ml Nafion® 中, 随后通过涡旋混合 10 分钟。随后将混合物倾入称重皿内以干燥过夜。(在这时, 膜混合物为浅黄色。) 干燥后, 将 TBAB 处理的 Nafion® 浸泡在去离子水中 24 小时, 随后用去离子水清洗三 (3) 次, 并干燥。(在这时, 膜混合物是澄清的。) 干燥的脱盐层然后再溶解于 1 ml 乙醇中。根据上文阐述的方案

将酶固定在该改性的膜中。通过流延,将包含固定的胆红素氧化酶的 TBAB 改性 Nafion® 加到电极上,干燥,随后在  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$  溶液(同上)中浸泡高达 48 小时;优选地,在测试前 2-3 小时。

#### 实施例 4: 烷基改性壳聚糖的制备

通过快速搅拌将中等分子量的壳聚糖(可从 Aldrich 获得)(0.500 g)溶解于 15 mL 1% 乙酸中。这导致粘稠的凝胶样溶液,并且随后加入 15 mL 甲醇。搅拌壳聚糖凝胶约 15 分钟,随后将 20 mL 醛(丁醛、己醛、辛醛或癸醛)加入壳聚糖凝胶中,随后加入 1.25 g 氰基硼氢化钠。连续搅拌凝胶直至悬浮液冷却至室温。通过真空过滤分离所得到的产物,并且用 150 mL 增量的甲醇洗涤 3 次。改性的壳聚糖随后在真空干燥箱中在 40°C 干燥 2 小时,得到薄片状白色固体。在 50% 乙酸、氯仿和叔戊醇中形成各聚合物的 1 重量% 悬浮液。

#### 实施例 5: $\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2(4\text{-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 改性的壳聚糖的制备

$\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2(4\text{-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$  改性的壳聚糖的制备从取代的二联吡啶——4-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶的合成开始。为了制备取代的二联吡啶,经过 30 分钟将包含 1.69 g 4,4'-二甲基-2,2'-二联吡啶的 50 mL THF 逐滴加入包含 9.1 mmol 二异丙胺锂的 4.1 mL THF 中。搅拌混合物 1.5 小时,随后冷却至 0°C,随后搅拌下逐滴加入 9.2 mmol 期望链长的二溴代烷。搅拌混合物 1.5 小时,用冰水猝灭,并且用乙醚萃取。残余物从乙酸乙酯中重结晶 3 次。制备 4-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶后,通过使 1.315 g  $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ (以其水合物形式)、0.8201 g 4-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶和 0.76 g 碳酸氢钠在 60 mL 2:3 甲醇-水溶液中回流,直至  $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$  耗尽,从而反应形成  $\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2(4\text{-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 。通过 UV-Vis 吸收数据测定  $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$  的耗尽。通过加入 4 mL 3 M 六氟磷酸铵(或

高氯酸钠或钾盐)使所得到的复合物沉淀,随后由丙酮/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 重结晶。此反应顺序产生 77%  $\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2(4\text{-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$ 。

在其制备后,将 137 mg  $\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2(4\text{-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$  溶解于 5 mg 脱乙酰化壳聚糖在 1% 乙酸和 DMF(1:1, 1mL) 中的混合物中。在 90°C 加热混合物 12 小时。反应期后,加入乙腈以沉淀  $\text{Ru}(\text{二联吡啶})_2(4\text{-甲基-4'-(6-溴己基)-2,2'-二联吡啶})^{+2}$  改性的壳聚糖。收集沉淀物并且通过溶解于 1% 乙酸中进行纯化,随后在甲醇中重结晶并且减压干燥。

#### 实施例 6: 疏水改性的壳聚糖的荧光成像

通过流延将每种聚合物悬浮液(2  $\mu\text{L}$ )加到玻璃显微镜载玻片(Fisher)上,并且在干燥器中干燥。通过吸管将 20  $\mu\text{L}$  体积的 0.01 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  或 0.01 mM FITC 加到聚物流延上并浸泡 2 分钟。浸泡后,用 18 M $\Omega$  水清洗载玻片,在干燥器中干燥。使用 Olympus BX60M 落射荧光显微镜(Melville, NY)对聚合物进行成像。用摄像机(Sony SSC-DC50A)在 40x 超长工作距离透镜下观察聚合物。用水银灯激发荧光。使用图像采集卡(Integral Technologies, Inc., Indianapolis, IN)获取图像,并且使用 SPOT 软件(Diagnostic Instruments, Inc.)在 Dell PC 上分析图像。对在  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  和荧光素中的每种疏水改性的聚电解质进行荧光成像,以确定疏水改性的形态学效应。图 6 是疏水改性的壳聚糖在  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  中的代表性荧光显微照片。可以看出聚集体在疏水改性的壳聚糖内形成并且形态随烷基链长而改变。丁基改性的壳聚糖看起来具有小的、纤维状互连,而已基改性的壳聚糖具有包含较小胶束域的大域。随着烷基链长增加,胶束域的数目减少,但域的尺寸增加。未改性的壳聚糖的荧光显微照片未显示出明显的域,故对于未改性的壳聚糖未观察到胶束结构。图 7 是在 FITC 中浸泡的疏水改性壳聚糖膜的代表性荧光显微照片。用阳离子或阴离子荧光染料可以观察到相同的形态学改变。

### 实施例 7: 疏水改性的壳聚糖的电化学测量

玻璃碳工作电极(直径 3mm, CH Instruments)在 Buehler 抛光布上用 0.05 微米氧化铝进行抛光,并且在 18 MΩ 水中清洗。将每种聚合物悬浮液(2 μL)在玻璃碳电极表面上流延,在真空干燥器中干燥直至使用。循环伏安法用于测量通过电极表面的聚合物膜的氧化还原剂物类(redox species)的流量。允许工作电极连同铂网反电极在包含 0.1 M 硫酸钠作为支持电解质的 1.0 mM 氧化还原剂物类溶液中平衡,并且相对于饱和甘汞参比电极进行测量。所研究的氧化还原剂物类是咖啡因、铁氰化钾和 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>。收集数据,并且在与 810 型 CH Instruments 恒电势器连接的 Dell 计算机上分析。以 0.05 V/s 至 0.20 V/s 的扫描速度执行循环伏安法。所有实验一式三份地进行,并且报告相应于 1 个标准差的误差。

根据疏水改性的烷基链长进行 2 种疏水改性的聚电解质的循环伏安法研究。所有循环伏安法实验显示线性  $i_p$  对  $v^{1/2}$  图,意味着转运受限的电化学。因为如等式 2 中所示,电化学流量是浓度的函数,所以  $KD^{1/2}$  值在这个文件中报告为独立于比较流量的方法的浓度。

$$\text{流量} = i/nFA = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} AC^* v^{1/2} KD^{1/2}/nFA \quad \text{式 2}$$

其中  $i$  是峰电流,  $n$  是转移的电子数目,  $F$  是法拉第(Faraday's)常数,  $A$  是电极面积,  $C^*$  是氧化还原剂物类的浓度,  $v$  是扫描速度,  $K$  是提取系数(extraction coefficient), 并且  $D$  是扩散系数。图 8 显示根据改性剂的烷基链长和重悬浮聚合物的溶剂,通过疏水改性的壳聚糖的咖啡因流量的  $KD^{1/2}$  值。溶剂决定聚合物在再流延过程中的溶胀程度。关于壳聚糖和壳聚糖衍生物的大多数文献研究采用乙酸作为溶剂用于重悬浮,然而,重要的是从  $KD^{1/2}$  值注意到氯仿提供了更高的平均流量。未改性的壳聚糖仅在乙酸溶液中是可溶的。对于未改性壳聚糖,咖啡因的  $KD^{1/2}$  值是  $5.52 (\pm 0.14) \times 10^{-3}$ 。显然,壳聚糖的疏水改性可以减少咖啡因的流量,而不能造成可感觉到的流量增加。

另一方面,孔结构/尺寸的小变化能够对大的、疏水性离子如 Ru(bpy)

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$  的转运造成极大的影响。图 9 显示  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$  通过疏水改性壳聚糖膜转运的  $\text{KD}^{1/2}$  值。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$  通过未改性壳聚糖转运的  $\text{KD}^{1/2}$  值是  $2.17 (\pm 0.33) \times 10^{-4}$ 。显然，壳聚糖的疏水改性在所有情况下均增加  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$  的转运，对于重悬浮于叔戊醇中的辛基改性壳聚糖膜，增加多达 11.1 倍。

#### 实施例 8: 电极的制备

将 2 wt.% 疏水改性的壳聚糖聚合物溶液悬浮于叔戊醇中，并且加入葡萄糖氧化酶溶液。用吸管将这种溶液加到电极材料上。该电极材料典型地是碳布或其他碳材料。

#### 实施例 9: 关于疏水改性壳聚糖的葡萄糖氧化酶活性测试

葡萄糖氧化酶 (GOx) 催化  $\beta$ -D-葡萄糖氧化成 D-葡萄糖酸- $\delta$ -内酯，并同时释放过氧化氢。它对于  $\beta$ -D-葡萄糖是高度特异性的，并且不作用于  $\alpha$ -D-葡萄糖。在过氧化物酶的存在下，在涉及对羟基苯甲酸和 4-氨基安替比林的测定中，过氧化氢进入第二个反应，定量形成醌亚胺染料复合物，该染料复合物可以在 510 nm 测量。在每种疏水改性的 Nafion® 和壳聚糖膜中测量了 GOx 酶的活性。在将 GOx 酶固定在疏水改性的壳聚糖膜中并将其流延在塑料小瓶中后，相对于水在 510 nm 测量吸光度。所有实验一式三份地进行，并且报告相应于 1 个标准差的误差。

如上文所述和表 2 中列出的，对于在悬浮于叔戊醇中的己基改性壳聚糖中的葡萄糖氧化酶观察到最高酶活性。这些固定化膜显示 GOx 酶活性超过缓冲液中的酶的 2.53 倍增加。

#### 实施例 10: 壳聚糖-丁基电极

葡萄糖脱氢酶。电极由  $1 \text{ cm}^2$  AvCarb™ 碳布制备。通过以 0.05 V/s 的扫描速度对于 12 个扫描段 (sweep segment) 从 -0.3 V 到 1.3 V 执行循环伏安法，在 0.4 mM 亚甲绿、0.1 M 硝酸钠和 10 mM 硼酸钠中对电极进行电聚合。随后清洗之，并在真空干燥器中完全干燥。通过使 0.01 g 疏水改性的

壳聚糖（丁基、己基、辛基或癸基）与 1 mL Nafion® DE 520 混合，并且与混合珠一起涡旋 1 小时，制备壳聚糖混合物。随后将 40  $\mu$ L 等分试样的壳聚糖/Nafion®混合物与 20  $\mu$ L 等分试样的葡萄糖脱氢酶（1 mg 酶在 10 mL pH 7.15 磷酸盐缓冲液中）混合 1 分钟。用吸管将壳聚糖/酶混合物加到阳极上，在真空干燥器中完全干燥。

**醇脱氢酶。**以醇脱氢酶代替葡萄糖脱氢酶，使用上文关于葡萄糖脱氢酶描述的相同操作，制备包含醇脱氢酶的电极。

### 实施例 11: 壳聚糖-丁基电极

**胆红素氧化酶。**通过将 0.01 g 疏水改性的壳聚糖（丁基、己基、辛基或癸基）与 1 mL Nafion® DE 520 混合，并且与混合珠一起涡旋 1 小时，制备壳聚糖混合物。随后使 40  $\mu$ L 等分试样的壳聚糖/Nafion®混合物与 20  $\mu$ L 等分试样的胆红素氧化酶（1 mg 酶在 10 mL pH 7.15 磷酸盐缓冲液中）混合 1 分钟。将壳聚糖/酶混合物吸取到 1 cm<sup>2</sup> 碳布片上以制造电极，使之在真空干燥器中完全干燥。

### 实施例 12: 烷基改性的藻酸盐的制备

通过共同流延溴化季铵盐与 3 wt.% 藻酸盐悬浮液来形成掺入溴化季铵盐的藻酸盐膜。所使用的聚合物是超低、低或中等分子量的藻酸盐。通过将溴化季铵盐加入该 3 wt.% 悬浮液中来制备混合物-流延溶液。制备所有混合物-流延溶液，使溴化季铵盐浓度相对于藻酸盐悬浮液中的羧酸位点的浓度过量。优化后，确定了最稳定和可复制的膜具有 3 倍于交换位点浓度的溴化季铵盐浓度。

将 1 毫升流延溶液放置在称重皿中，并且允许干燥。将 7.0 mL 18 M $\Omega$  水加入称重皿中，浸泡过夜。去除水，用 18 M $\Omega$  水充分清洗膜，干燥。随后将膜重悬浮于 1.0 mL 甲醇中。四丙基铵（T3A）、四戊基铵（T5A）、四己基铵（T6A）、四庚基铵（T7A）、trimethylcosylammonium（TMICA）、三甲基十八烷基铵（TMODA）、三甲基十六烷基铵（TMHDA）、三甲基

十四烷基铵 (TMTDA)、三甲基辛基铵 (TMOA)、三甲基十二烷基铵 (TMDDA)、三甲基癸基铵 (TMDA)、三甲基己基铵 (TMHA)、四丁基铵 (TBA)、三乙基己基铵 (TEHA) 的溴化铵盐用作藻酸盐改性剂, 以察看何种产生最佳胶束结构。胶束结构对于酶的有效固定是重要的。

为了测定孔特征, 随后将每种聚合物各 3 滴放置在载玻片上, 干燥。完全干燥后, 将它们浸泡于在乙醇中的  $1\text{mM Ru}(\text{bpy})^{+2}$  中至少 3 小时。用乙醇清洗后, 使聚合物干燥, 用荧光显微镜成像, 以察看胶束结构。结构的例子显示于图 1 中。

在另一个实验中, 将超低分子量的藻酸盐和十二烷基胺放置在 25% 乙醇中, 并且回流以通过羧酸基团的酰胺化产生十二烷基改性的藻酸盐。

### 实施例 13: 藻酸盐电极的制备

将实施例 12 中所述的用疏水性铵阳离子改性的 3 wt.% 藻酸盐聚合物溶液悬浮于叔戊醇中, 加入酶 (例如, 醇脱氢酶、葡萄糖脱氢酶、胆红素氧化酶、葡萄糖氧化酶) 溶液。将这种溶液吸取到电极材料上。这种电极材料一般是碳布或其他碳材料。

### 实施例 14: CuPCTSA-TBAB 包覆的聚(苯乙烯-共-二乙烯基苯)

在该实施例中, 将聚(苯乙烯-共-二乙烯基苯)粒子包覆上四丁基溴化铵 (TBAB) 改性的 Nafion® 固定化材料和水溶性染料的混合物, 该染料充当氧化酶促还原成水的电子介体。为制备这些粒子, 将 0.080 g 四磺酸酞菁铜 (II)(CuPCTSA) 在 4.00 mL TBAB 改性 Nafion® (5 wt%) 的乙醇溶液中的染料溶液与 2.00 g 聚(苯乙烯-共-二乙烯基苯)粒子在 4.00 mL 0.5 M 磷酸缓冲液 pH 7.2 中的粒子悬浮液合并。将染料溶液加到粒子悬浮液中, 并涡旋混合几秒, 直至得到基本均匀的混合物。接着将整个混合物用喷枪喷到聚碳酸酯屏上。将混合物在屏上干燥 20 分钟, 随后收集并干储存在闪烁管中。

所得包覆粒子是蓝色, 通过将包覆粒子装填到柱子中并使几百毫升水通过它来核实染料的保留。在从柱子洗脱的流动相中没有发现可检测水平

的染料。覆层的厚度设计为 0.07 微米厚，粒子在包覆之前的平均直径为 8 微米。粒子的表面积(包覆之前)计算为  $0.75 \text{ m}^2/\text{g}$ 。所得的电子介体载量为 4 wt%。

#### 实施例 15: 醇脱氢酶-TBATFB 包覆的掺杂的聚吡咯/炭黑复合物

用四氟硼酸四丁基铵 (TBATFB)改性的 Nafion®固定化材料与醇脱氢酶的混合物包覆掺杂的聚吡咯/炭黑复合物(Sigma,目录号 530573)粒子。制备 0.080 g 冷冻干燥的醇脱氢酶 (ML57) 和 2.00 mL 0.5 M 磷酸缓冲液 (pH 7.2)的溶液。制备 4.00 mL 在乙醇中的 TBATFB 改性 Nafion (5 wt%)、1.00 g 掺杂的聚吡咯/炭黑复合物和 4.00 mL 0.5 M 磷酸缓冲液(pH 7.2)的悬浮液。接着将酶溶液和悬浮液涡旋混合几秒，直至得到基本均匀的混合物。接着将整个混合物在类似实施例 14 的工艺中用喷枪喷到聚碳酸酯屏上。将所得产物干储存在 4℃的闪烁管中。

所得包覆粒子是黑色，利用标准分光光度测定试验和电化学评测来核实酶活性的保留。评测相对于标准氢参比电极(NHE)进行。见图 12。所得酶载量为 6.25 wt%。

#### 实施例 16: 醇脱氢酶-Ru(II)(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>-TBATFB 包覆的掺杂的聚吡咯/炭黑复合物

用 TBATFB 改性的 Nafion®、醇脱氢酶和 Ru(II)(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub> 的混合物包覆掺杂的聚吡咯/炭黑复合物粒子(Sigma,目录号 530573)。Ru(II)(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub> 是用于乙醇酶促氧化的电子介体。制备含 0.080 g 冷冻干燥的醇脱氢酶 (ML59) 、0.100 g Ru(II)(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub> 和 4.00 mL 0.5 M 磷酸缓冲液 (pH 7.2)的溶液。还制备含 6.00 mL 0.5 M 磷酸缓冲液(pH 7.2)、2.00 mL 在乙醇中的 TBATFB 改性 Nafion (5 wt%)和 2.00 g 掺杂的聚吡咯/炭黑复合物的悬浮液。将溶液和悬浮液合并并涡旋混合几秒以形成基本均匀的混合物。接着将整个混合物在类似实施例 1 的工艺中用喷枪喷到聚碳酸酯屏上。将所得产物干储存在 4℃的闪烁管中。

所得包覆粒子是黑色,利用标准分光光度测定试验核实酶活性的保留。由于粒子表面积未知,没有计算覆层厚度。所得酶载量和电子介体载量分别为 10.3 wt%和 12.8 wt%。

#### 实施例 17: 消耗淀粉的淀粉酶的酶活性

用于淀粉葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.3)的酶试验由 Sigma 公布,并且从 <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/18200/Amyloglucosidasel.pdf> 上可得;它基于 Bergmeyer, H.U., Gawehn K.和 Grassl, M. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U.编辑)第 2 版,第 I 卷,434-435 中所述的文献方法。对该方法稍作更改:用期望的酶固定化材料固定淀粉葡萄糖苷酶于小杯底部,而不是将淀粉葡萄糖苷酶加入溶液。所测试的酶固定化材料是用四丙基溴化铵(TPAB)、四丁基溴化铵(TBAB)、三乙基己基溴化铵 (TEHA)、三甲基己基溴化铵(TMHA)、三甲基辛基溴化铵 (TMOA)、三甲基癸基溴化铵(TMDA)、三甲基十二烷基溴化铵 (TMDDA)、三甲基十四烷基溴化铵(TMTDA)、三甲基十六烷基溴化铵 (TMHDA)、三甲基十八烷基溴化铵(TMODA)改性的 Nafion®,悬浮在乙酸缓冲液中的丁基改性壳聚糖 (Chitosan AB)和悬浮在叔戊醇中的丁基改性壳聚糖(Chitosan TB)。为消耗淀粉的淀粉酶提供最大相对活性的酶固定化材料是悬浮在叔戊醇中的丁基改性壳聚糖(Chitosan TB)。见图 13。

#### 实施例 18: 消耗麦芽糖的淀粉酶的酶活性

使用实施例 17 中所述的方法测定消耗麦芽糖的淀粉酶固定在各种酶固定化材料中的活性。所公布的方法如实施例 17 中所述经过修改,并且还将淀粉替换为麦芽糖。受试的酶固定化材料是用四丙基溴化铵(T3A)、四丁基溴化铵(TBAB)、四戊基溴化铵(T5A)、三乙基己基溴化铵(TEHA)、三甲基己基溴化铵(TMHA)、三甲基辛基溴化铵(TMOA)、三甲基十四烷基溴化铵(TMTDA)改性的 Nafion®,中等分子量癸基改性的壳聚糖(Decyl M)、低分子量丁基改性的壳聚糖(Butyl L)、低分子量辛基改性的壳聚糖

(Octyl L)和中等分子量丁基改性的壳聚糖(Butyl M)。为消耗麦芽糖的淀粉酶提供最大相对活性的酶固定化材料是中等分子量癸基改性的壳聚糖(Decyl M)。见图 14。

#### 实施例 19: 固定化脂肪酶的温度和 pH 耐受性

用于包覆在聚(苯乙烯共二乙烯基苯)珠上的四丁基溴化铵(TBAB)改性 Nafion 固定的脂肪酶的方法。将脂肪酶(5 mg)溶解于 5 mL 50 mM Tris-HCl 缓冲(pH 7.2)溶液中。制备这种 1 mg/mL 脂肪酶溶液后,将它转移到 20 mL 容量的聚丙烯样品小瓶内。将 8 个 3 mm 直径氧化锆珠加入聚丙烯小瓶中,以帮助在涡旋步骤过程中的搅动(8 个氧化锆珠足以提供总体积高达 20 mL 液体的良好搅动)。将四丁基溴化铵(TBAB)改性的 Nafion(3.0 mL; 在乙醇中 5 wt %)转移到小瓶内,并且使这种酶/聚合物悬浮液与氧化锆珠一起涡旋 2 分钟。此第一次添加后,加入另外 3.0 mL TBAB 改性的 Nafion 溶液(在乙醇中 5%),并且涡旋 2 分钟。分小部分地加入总共 6 mL TBAB 改性的 Nafion 溶液,以防止酶的醇休克。在这时,酶被固定并且已经准备好放置到载体材料上。聚(苯乙烯共二乙烯基苯)(PS-co-DVB)珠(8  $\mu\text{m}$  平均粒子大小, Sigma Cat. #: 468312-100G)(1.00 g)与固定化酶溶液混合,且与氧化锆珠一起涡旋 3 分钟,以均匀包覆 PS-co-DVB 珠。用固定化酶包覆珠后,室温将混合物喷雾干燥到玻璃片上,将玻璃片留置于环境空气下干燥。

用于包覆在聚(苯乙烯共二乙烯基苯)珠上的四乙基溴化铵(TEAB)改性 Nafion 固定的脂肪酶的方法。将脂肪酶(25 mg)溶解于 5 mL 50 mM Tris-HCl 缓冲(pH 7.2)溶液中。制备这种 5 mg/mL 脂肪酶溶液后,将它转移到 20 mL 容量的聚丙烯样品小瓶内。将 8 个 3 mm 直径氧化锆珠加入聚丙烯小瓶中,以帮助在涡旋步骤过程中的搅动(8 个氧化锆珠足以提供总体积高达 20 mL 液体的良好搅动)。将四乙基溴化铵(TEAB)改性的 Nafion(2.5 mL; 在乙醇中 5 wt %)转移到小瓶内,并且使这种酶/聚合物悬浮液与氧化锆珠一起涡旋 2 分钟。在此第一次添加后,加入另外 2.5 mL

TEAB 改性的 Nafion 溶液 (在乙醇中 5%), 并且涡旋 2 分钟。分小部分地加入总共 5 mL TEAB 改性的 Nafion 溶液, 以防止酶的醇休克 (由于极端局部环境改变, 这甚至可能使酶变性)。在这时, 酶已固定并且准备好放置到载体材料上。聚(苯乙烯共二乙烯基苯)(PS-co-DVB)(1.00 g) 珠 (8  $\mu\text{m}$  平均粒子大小, Sigma Cat. #: 468312-100G) 与固定化酶溶液混合, 且与氧化锆珠一起涡旋 3 分钟, 以均匀包覆 PS-co-DVB 珠。用固定化酶包覆珠后, 室温喷雾干燥到玻璃片上。喷雾后, 玻璃片在环境空气中干燥。

用于包覆在聚(苯乙烯共二乙烯基苯)珠上的己醛改性壳聚糖固定的脂肪酶的方法。将脂肪酶 (25 mg) 溶解于 5 mL 50 mM Tris-HCl 缓冲 (pH 7.2) 溶液中。制备这种 5 mg/mL 脂肪酶溶液后, 将它转移到 20 mL 容量的聚丙烯样品小瓶内。将 8 个 3 mm 直径氧化锆珠加入聚丙烯小瓶中, 以帮助在涡旋步骤过程中的搅动 (8 个氧化锆珠足以提供总体积高达 20 mL 液体的良好搅动)。将己醛改性的壳聚糖 (2.5 mL; 在专利溶剂混合物中 1 wt %) 转移到小瓶内, 并且使这种酶/聚合物悬浮液与氧化锆珠一起涡旋 2 分钟。在该第一次添加后, 加入另外 2.5 mL 己醛改性的壳聚糖 (在专利溶剂混合物中 1 wt %), 并且涡旋 2 分钟。小部分小部分地加入总共 5 mL 己醛改性的壳聚糖 (在专利溶剂混合物中 1 wt %) 溶液, 以防止酶的溶剂休克 (由于极端局部环境改变, 这甚至可能使酶变性)。在这时, 酶已固定并且准备好放置到载体材料上。聚(苯乙烯共二乙烯基苯)(PS-co-DVB) 珠 (8  $\mu\text{m}$  平均粒子大小, Sigma Cat. #: 468312-100G) (1.00 g) 与固定化酶溶液混合, 且与氧化锆珠一起涡旋 3 分钟, 以均匀包覆 PS-co-DVB 珠。用固定化酶包覆珠后, 室温喷雾干燥到玻璃片上。喷雾后, 玻璃片于环境空气下干燥。

**脂肪酶固定化活性测定方案。** 研究南极假丝酵母脂肪酶 B (CAL-B) 的温度耐受性。测试游离脂肪酶 (在溶液中游离的 Novozyme 的 CAL-B) 以及各种实验固定化脂肪酶 (TBAB/Nafion、TEAB/Nafion、和/或己醛改性的壳聚糖)。作为比较, Novozyme/Codexis 版本的固定化酶标记为 Novozym® 435 (下文 Novo 435)。所有脂肪酶样品进行称重, 以在每个样

品中包含 5 mg/ml 脂肪酶。在总共 2.0 mL 反应体积中，在溶解于 100% 二甲亚砜 (DMSO) [0.1mL] 中的 12 mM 丁酸对硝基苯基酯、10% 脱氧胆酸钠 (以清除混浊) [0.4mL]、和游离脂肪酶、Novozym® 435 固定化脂肪酶或实验固定化脂肪酶 [0.1mL] 的存在下，在 pH=7.2 (50mM Tris-HCl) [1.4mL] 进行所有脂肪酶活性测定。经过 3-5 分钟的时间跨度在分光光度计中在 405 nm 测量由于酶活性引起的吸光度改变。所有酶活性在室温测定。表现出酶活性的样品从 0 分钟时间点起显示增加的吸光度改变，并且反应颜色从无色变成明黄色。

**温度耐受性。**如下表中所示，使酶样品在室温、65°C 和 95°C 温育 2-64 小时。一般地，酶样品温育 2-4 小时和 18-24 小时，在温育期后测量酶活性。

**pH 耐受性。**在室温和 pH=12.5 (50mM NaOH) 或 pH=1.1 (50mM HCl) 孵育酶样品。

表 4. 酶样品在 50mM HCl (pH 1.1) 中室温温育 1 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	TEAB/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.001	0.061	0.272
1	0.028	0.158	0.739
2	0.064	0.261	1.3
3	0.104	0.351	1.761
$\Delta$ Abs.405nm	0.103	0.29	1.489

表 5. 酶样品在 50mM HCl (pH 1.1) 中室温温育 1 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	TEAB/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.056	0.009	0.33
1	0.07	0.03	0.959
2	0.087	0.05	1.668
3	0.103	0.083	2.125
$\Delta$ Abs.405nm	0.047	0.074	1.795

表 6. 酶样品在 50mM NaOH (pH 12.5) 中室温温育 2 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.012	0	0.137
1	0.018	0.017	0.184
2	0.03	0.037	0.255
3	0.045	0.066	0.345
$\Delta$ Abs.405nm	0.033	0.066	0.208

表 7. 酶样品在 50mM HCl (pH 1.1) 中室温温育 2 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.073	0.006	0.335
1	0.946	0.018	0.355
2	1.768	0.033	0.366
3	2.161	0.051	0.391
$\Delta$ Abs.405nm	2.088	0.045	0.056

表 8. 酶样品在 50mM NaOH (pH 12.5) 中室温温育 4 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	TEAB/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.025	0.044	0.362
1	0.027	0.058	0.991
2	0.04	0.081	1.635
3	0.054	0.124	2.043
$\Delta$ Abs.405nm	0.029	0.08	1.681

表 9. 酶样品在 50mM HCl (pH 1.1) 中室温温育 4 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	TEAB/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.004	0	0.182
1	0.023	0.023	0.387
2	0.053	0.042	0.731
3	0.083	0.069	1.096
$\Delta$ Abs.405nm	0.079	0.069	0.914

表 10. 酶样品在 50mM NaOH (pH 12.5) 中室温温育 20 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	TEAB/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0	0.031	0.363
1	0.007	0.039	0.766
2	0.019	0.058	1.298
3	0.031	0.178	1.76
$\Delta$ Abs.405nm	0.031	0.147	1.397

表 11. 酶样品在 50mM HCl (pH 1.1) 中室温温育 20 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	TEAB/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0	0.024	0.217
1	0.012	0.277	0.401
2	0.039	0.561	0.709
3	0.061	0.84	1.093
$\Delta$ Abs.405nm	0.061	0.816	0.876

表 12. 酶样品在 50mM NaOH (pH 12.5) 中室温温育 24 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0	0.013	0.162
1	0.012	0.025	0.195
2	0.025	0.042	0.255
3	0.042	0.06	0.303
$\Delta$ Abs.405nm	0.042	0.047	0.141

表 13. 酶样品在 50mM HCl (pH 1.1) 中室温温育 24 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.085	0.033	0.457
1	0.832	0.045	0.467
2	1.539	0.063	0.487
3	2.012	0.081	0.513
$\Delta$ Abs.405nm	1.927	0.048	0.056

表 14. 酶样品室温温育 2 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0	0.093	0.165
1	2.24	0.688	1.002
2	完结的	1.257	1.706
3	完结的	1.74	2.135
$\Delta$ Abs.405nm	2.24	1.647	1.97

表 15. 酶样品在 65°C 温育 2 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.06	0	0.229
1	0.2	0.028	1.07
2	0.362	0.058	1.776
3	0.529	0.087	2.166
$\Delta$ Abs.405nm	0.469	0.087	1.937

表 16. 酶样品在 95°C 温育 2 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.04	0.006	0.195
1	0.052	0.013	0.197
2	0.075	0.019	0.231
3	0.101	0.026	0.276
$\Delta$ Abs.405nm	0.061	0.02	0.081

表 17. 酶样品室温温育 24 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.09	0.313	0.252
1	1.826	0.907	1.371
2	2.234	1.454	2.122
3	完结的	1.846	完结的
$\Delta$ Abs.405nm	2.144	1.533	1.87

表 18. 酶样品在 65°C 温育 24 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0	0.004	0.23
1	0.023	0.069	0.599
2	0.051	0.135	1.065
3	0.08	0.206	1.533
$\Delta$ Abs.405nm	0.08	0.202	1.303

表 19. 酶样品在 95°C 温育 24 小时。

样品	游离脂肪酶	Novo 435	壳聚糖/脂肪酶
时间 (分钟)			
0	0.003	0.025	0.24
1	0.005	0.025	0.24
2	0.01	0.026	0.248
3	0.019	0.032	0.254
$\Delta$ Abs.405nm	0.016	0.007	0.014

表 20. 酶样品在指示温度温育 18 小时。

样品	游离脂肪酶 在 RT	游离脂肪酶 在 65°C	游离脂肪酶 在 95°C
时间 (分钟)			
0	0.232	0.001	0.001
1	1.643	-0.001	0.004
2	2.265	0.004	0.005
3	2.317	0.008	0.006
4	2.317	0.007	0.006
5	2.317	0.004	-0.008
405 nm 的 $\Delta$ Abs	2.085	0.003	-0.009
0-3 分钟的 405 nm $\Delta$ Abs	2.085	0.007	0.005

样品	固定化 435 脂肪酶在 RT	固定化 435 脂肪酶在 65°C	固定化 435 脂肪酶在 95°C
时间 (分钟)			
0	0.001	-0.026	-0.001
1	0.267	0.004	0.001
2	0.514	0.04	0.01
3	0.77	0.078	0.005
4	1.021	0.114	0.01
5	2.12	0.209	0.02
405 nm 的 $\Delta$ Abs	2.119	0.235	0.021
0-3 分钟的 405 nm $\Delta$ Abs	0.769	0.104	0.006
样品	TEAB/脂肪酶在 RT	TEAB/脂肪酶在 65°C	TEAB/脂肪酶在 95°C
时间 (分钟)			
0	0.244	0.252	0.4
1	0.93	0.451	0.431
2	1.782	0.7	0.469
3	2.223	1.015	0.518
4	2.298	1.395	0.558
5	2.308	1.726	0.594
405 nm 的 $\Delta$ Abs	2.064	1.474	0.194
0-3 分钟的 405 nm $\Delta$ Abs	1.986	0.763	0.118

表 21. 酶样品在指示温度温育 64 小时。

样品	TEAB/脂肪酶在 RT	TEAB/脂肪酶在 65°C	TEAB/脂肪酶在 95°C
时间 (分钟)			
0	0.3	0.269	0.25
1	0.61	0.34	0.25
2	1.087	0.44	0.25
3	1.604	0.563	0.25
4	2.037	0.715	0.25

5	2.287	0.849	0.25
405 nm 的 $\Delta$ Abs	1.987	0.58	0
样品	游离脂肪酶 在 RT	固定化 435 脂肪 酶在 65°C	
时间 (分钟)			
0	0.24	0.006	
1	1.74	0.015	
2	2.345	0.022	
3	2.377	0.033	
4	N/A	0.051	
5	N/A	0.093	
405 nm 的 $\Delta$ Abs	2.137	0.087	

通过使用下式可以将数据转换成酶活性单位

酶单位 =  $((405 \text{ nm 的 } \Delta \text{ 吸光度} / \# \text{ 分钟}) \times 0.002 \text{ L}) / (1 \text{ cm} \times 0.0178 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$   
 其中对硝基苯酚的摩尔吸光系数是  $1.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 对硝基苯酚的  $\mu$  摩尔吸光系数是  $0.0178 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

表 22. 对各实验的总结, 其中酶活性以酶单位 (EU) 表示

酶	RT 18 小时	65°C 18 小时	95°C 18 小时	65 的 % RT	95 的 % RT
游离脂肪酶	0.078089888	0.000262172	0.000187266	0.33573141	0.2398082
Novo 435	0.028801498	0.003895131	0.000224719	4.98800959	0.2877698
TEAB/脂肪酶	0.074382022	0.028576779	0.004419476	36.5947242	5.6594724
酶	RT 24 小时	65°C 24 小时	95°C 24 小时	65 的 % RT	95 的 % RT
游离脂肪酶	0.080299625	0.002996255	0.000599251	3.73134328	0.7462687
Novo 435	0.05741573	0.007565543	0.000262172	9.42164179	0.3264925
壳聚糖/脂肪酶	0.070037453	0.048801498	0.000524345	60.7742537	0.6529851
酶	pH=12.5 20 小时	12.5 的 % 最佳			
游离脂肪酶	0.001161049	1.486810552			
Novo 435	0.005505618	7.050359712			
TEAB/脂肪酶	0.052322097	67.00239808			

酶	pH=12.5 24 小时	12.5 的 %最佳			
游离脂肪酶	0.001573034	1.958955224			
Novo 435	0.0017603	2.192164179			
壳聚糖/脂肪酶	0.005280899	6.576492537			

对于表 22, 前 3 行使用 0-3 分钟的 405 nm  $\Delta$ Abs, 而不是 0-5 分钟的 405 nm  $\Delta$ Abs 测定酶活性(EU)。标记为“65 的 % RT”或“95 的 % RT”的数据列按照下式进行计算:

$$(\text{酶样品的 EU}) / (\text{室温相同时间量的游离脂肪酶的 EU}) \times 100 \%。$$

标记为“12.5 的 % 最佳”的数据列按照下式进行计算:

$$(\text{酶样品的 EU}) / (\text{室温相似时间量的游离脂肪酶的 EU}) \times 100 \%。$$

#### 实施例 20: 固定化漆酶的 pH 耐受性

用 PVP-TBAB 和 BP460 填充剂 (pH 1.78) 涂布的 DS Elat 电极。将聚(4-乙烯吡啶)(PVP)(29.4 mg)、410  $\mu$ L 19.6% 四丁基溴化铵 (TBAB) 改性的 Nafion® (在 EtOH 中)、360 mg Black Pearls 碳填充剂和 Nafion® 离聚物 (1.4 mL 5% 溶液) 混合, 并且在小瓶中进行超声处理, 将该浆料涂布在 DS Elat 碳电极上。电极室温于室内空气下干燥 40 分钟。切下 1 cm<sup>2</sup> 电极片, 用于半电池测试。在半电池测试过程中, 将此 1 cm<sup>2</sup> 电极部分地浸没在 0.2 M 磷酸盐缓冲 (pH 1.78) 溶液中。

DS Elat 电极 PVP-TBAB 和 BP 460 填充剂以及游离酶在缓冲溶液 (pH 1.78) 中。将聚(4-乙烯吡啶)(PVP)(29.4 mg)、410  $\mu$ L 19.6% 四丁基溴化铵 (TBAB) 改性的 Nafion® (在 EtOH 中)、360 mg Black Pearls 碳填充剂和 1.4 mL 5% Nafion® 离聚物混合, 在小瓶中超声处理, 将此浆料涂布在 DS Elat 碳电极上。电极在室温于室内空气中干燥 40 分钟。切下 1 cm<sup>2</sup> 电极片, 用于半电池测试。在半电池测试过程中, 将此 1 cm<sup>2</sup> 电极部分地浸没在包含 0.5 mg 漆酶的 0.2 M 磷酸盐缓冲 (pH 1.78) 溶液中。

用 PVP-TBAB 包封剂固定的 Sigma Lac 和 BP 460 填充剂碳(pH 1.78)涂布的 DS Elat 电极。将聚(4-乙烯吡啶)/TBAB 固定的漆酶(120 mg)、360 mg Black Pearls 碳填充剂和 1.8 mL 5% Nafion® 离聚物混合,在小瓶中超声处理,将这个浆料涂布在 DS Elat 碳电极上。电极在室温于室内空气中干燥 40 分钟。切下 1 cm<sup>2</sup> 电极片,用于半电池测试。在半电池测试过程中,将该 1 cm<sup>2</sup> 电极部分地浸没在 0.2 M 磷酸盐缓冲(pH 1.78)溶液中。

DS Elat 电极 PVP-TBAB 和 BP 460 填充剂以及游离酶在缓冲溶液(最适 pH; pH 5)中。将聚(4-乙烯吡啶)(PVP)(29.4 mg)、410 μL 19.6% 四丁基溴化铵(TBAB)改性的 Nafion®(在 EtOH 中)、360 mg Black Pearls 碳填充剂和 1.4 mL 5% Nafion® 离聚物混合,在小瓶中超声处理,将这个浆料涂布在 DS Elat 碳电极上。电极室温于室内空气中干燥 40 分钟。切下 1 cm<sup>2</sup> 电极片,用于半电池测试。在半电池测试过程中,将此 1 cm<sup>2</sup> 电极部分地浸没在包含 0.5 mg 漆酶的 1 M 磷酸盐缓冲(pH 5)溶液中。

使用 CH Instruments Potentiostat 获得极化曲线。用铂网反电极和 Ag/AgCl 参比电极完成半电池测试。使用在阴极处具有漆酶电极的半电池得到的电势对电流密度图显示于图 19 中,其中该图中的所有电势均是相对于 NHE 而言的。此图比较了在 pH 1.78 工作的固定化漆酶与不包含漆酶的在其他方面相同的电极、在 pH 1.78 工作的游离漆酶、或在最适 pH 5 工作的游离漆酶。在这个系统中,固定化漆酶具有比游离漆酶大得多的活性(如由电流密度所显示的)。

当介绍本发明或其一个或多个优选实施方案的要素时,冠词“a”、“an”、“the”和“所述”旨在指存在一或多个此要素。术语“包含”、“包括”和“具有”旨在是涵盖性的,指可以存在所列要素之外的其它要素。

从上可以看出,本发明的几个目的已经达到并且获得了其他有利结果。

由于无需背离本发明的范围即可在上述组合物和方法中进行各种改变,所以上文说明书中包含的和附图中显示的所有内容应解释为举例说明性的而不是限制性的。

本申请的说明书和权利要求详述了本发明的每个特征的各种替代方

---

式，可以理解这些特征各自可以以任何可能的组合方式进行组合，并且因此，每个特征的每种替代方式可以与一些或所有其他特征的任何或所有替代方式组合，并且因此每个组合都已经在本文中公开。

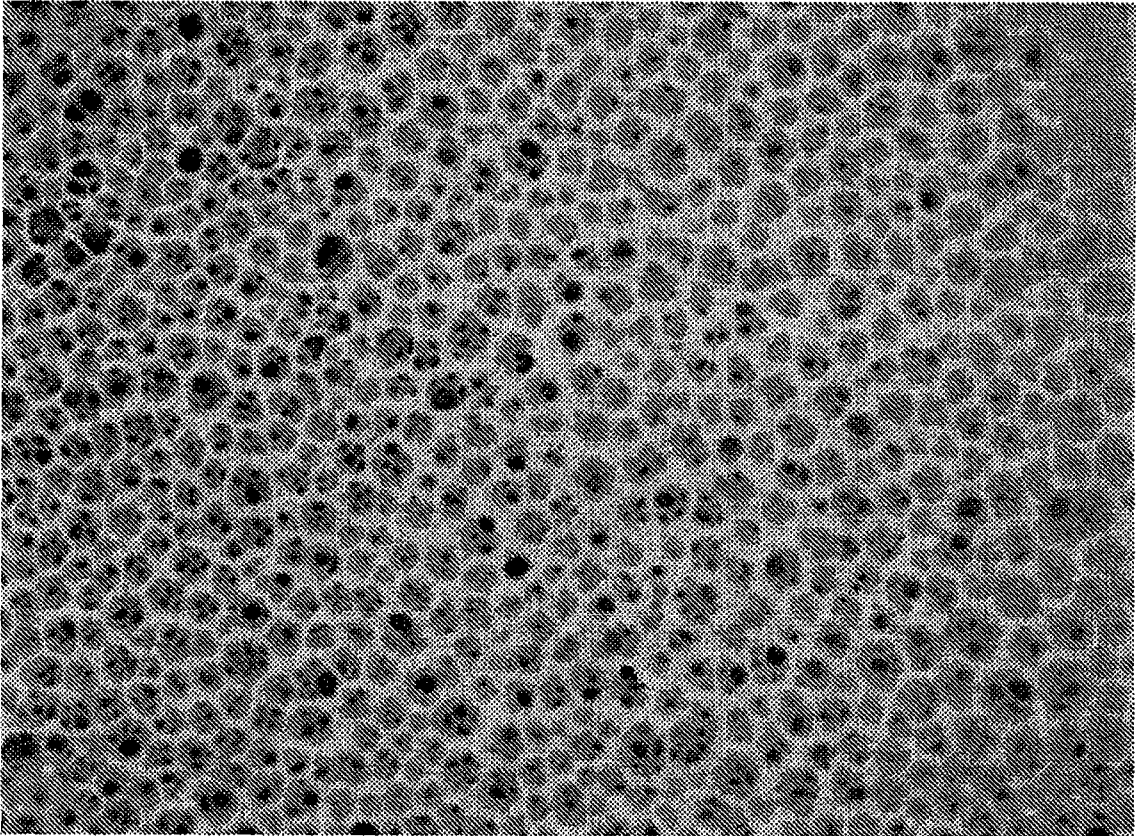


图 1

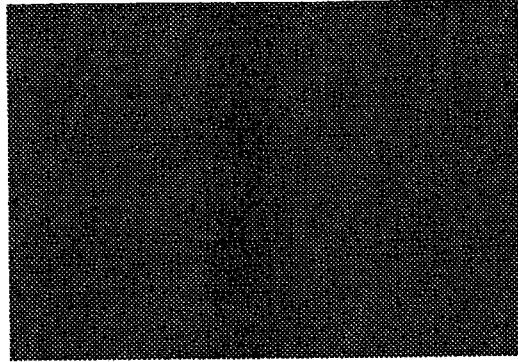


图 2A

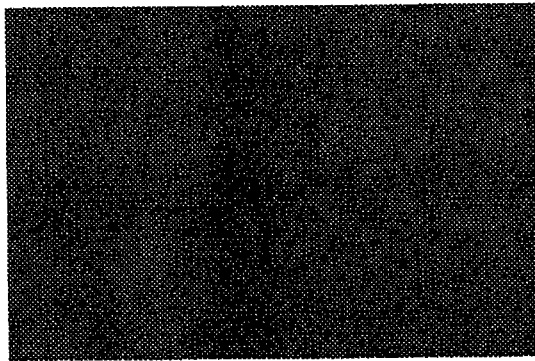


图 2B

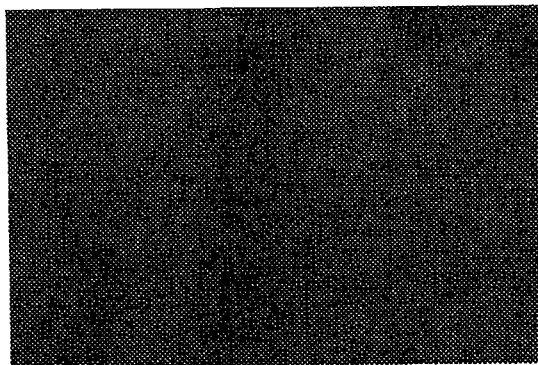


图 2C

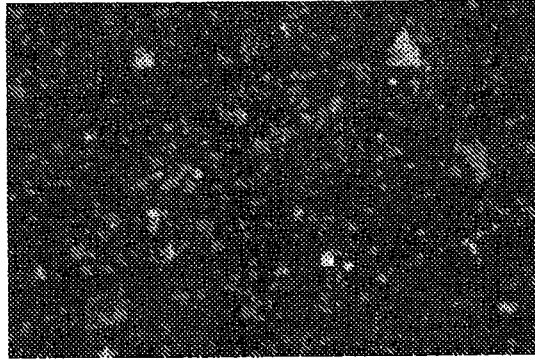


图 2D



图 2E



图 2F

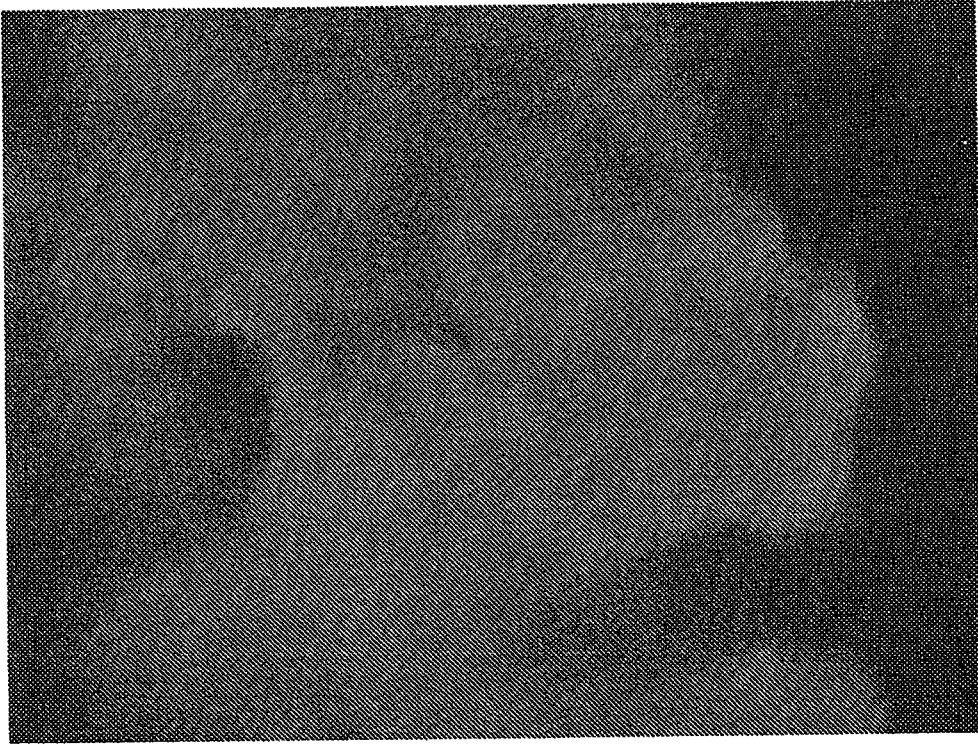


图 3

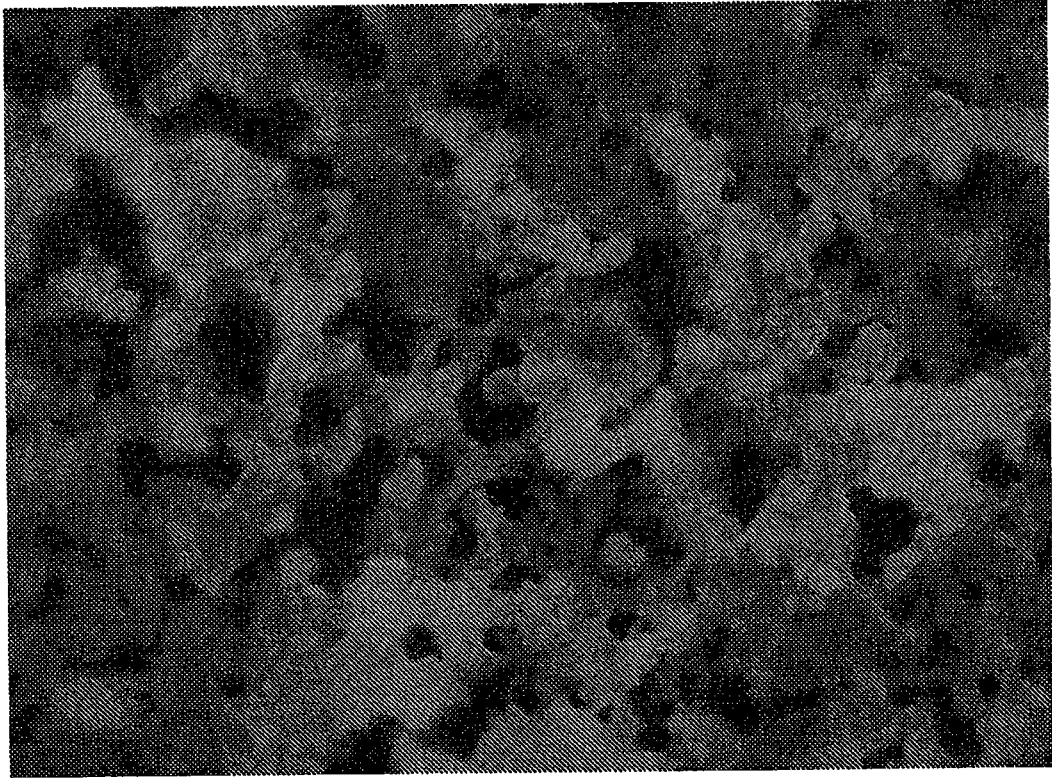


图 4

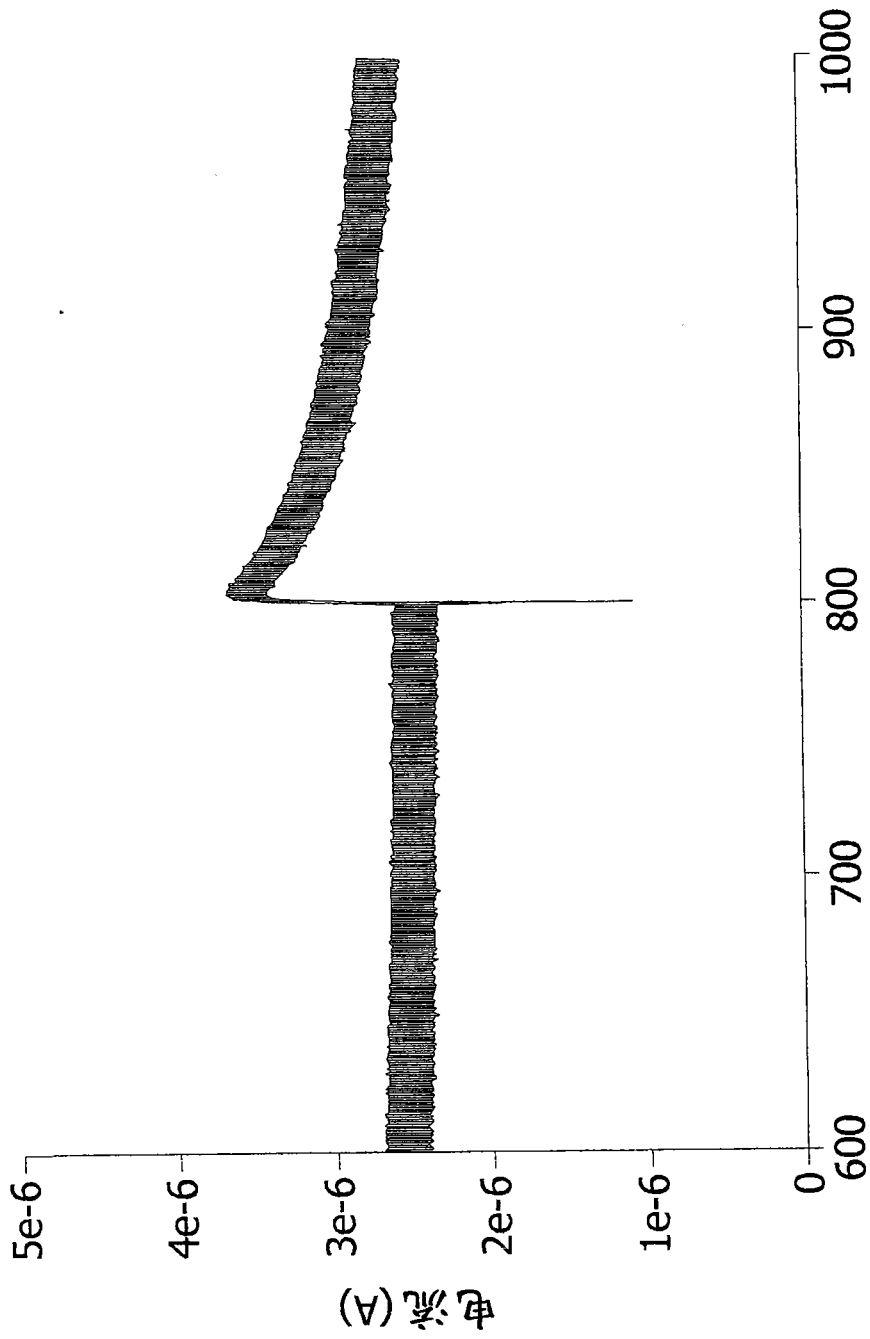


图 5

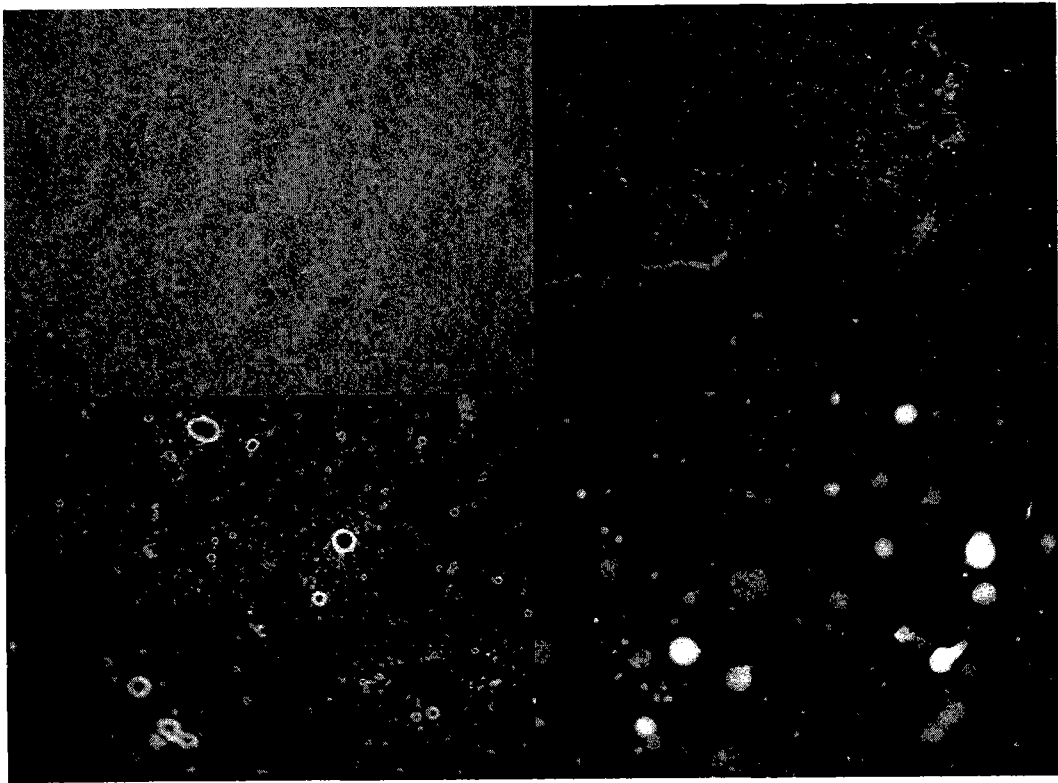


图 6

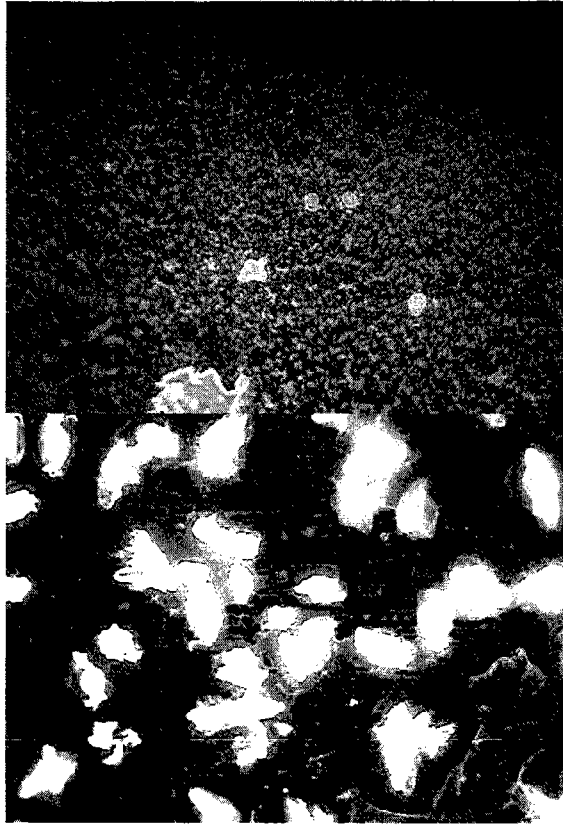


图 7

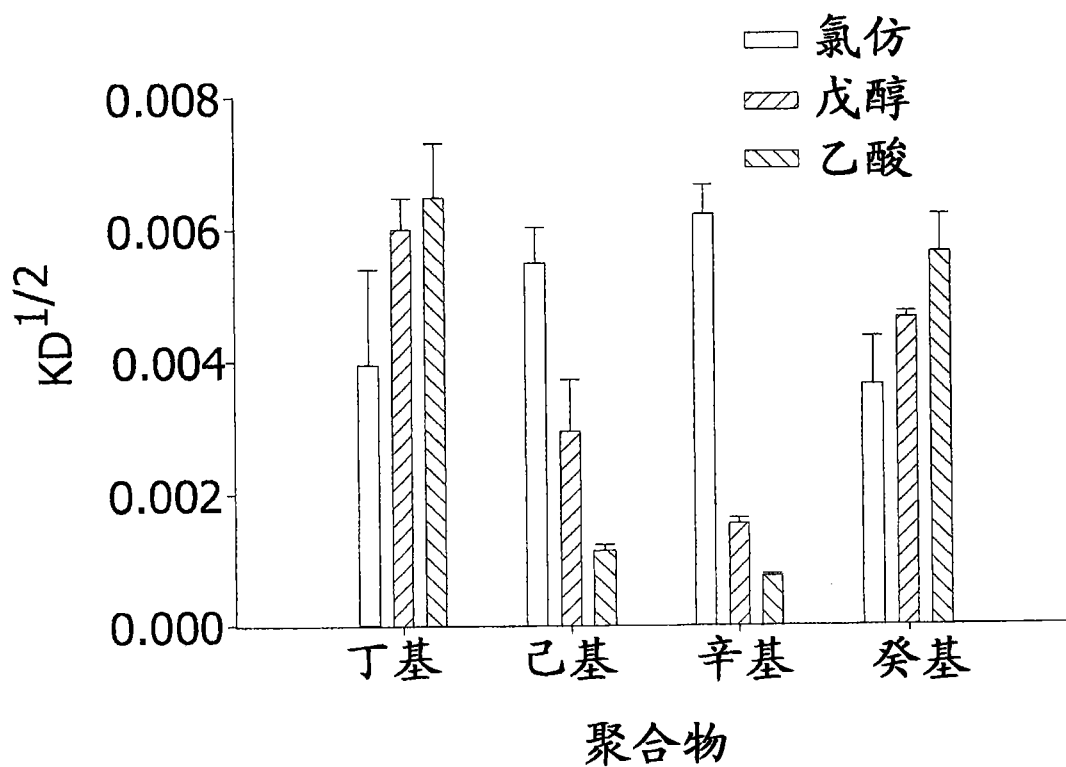


图 8

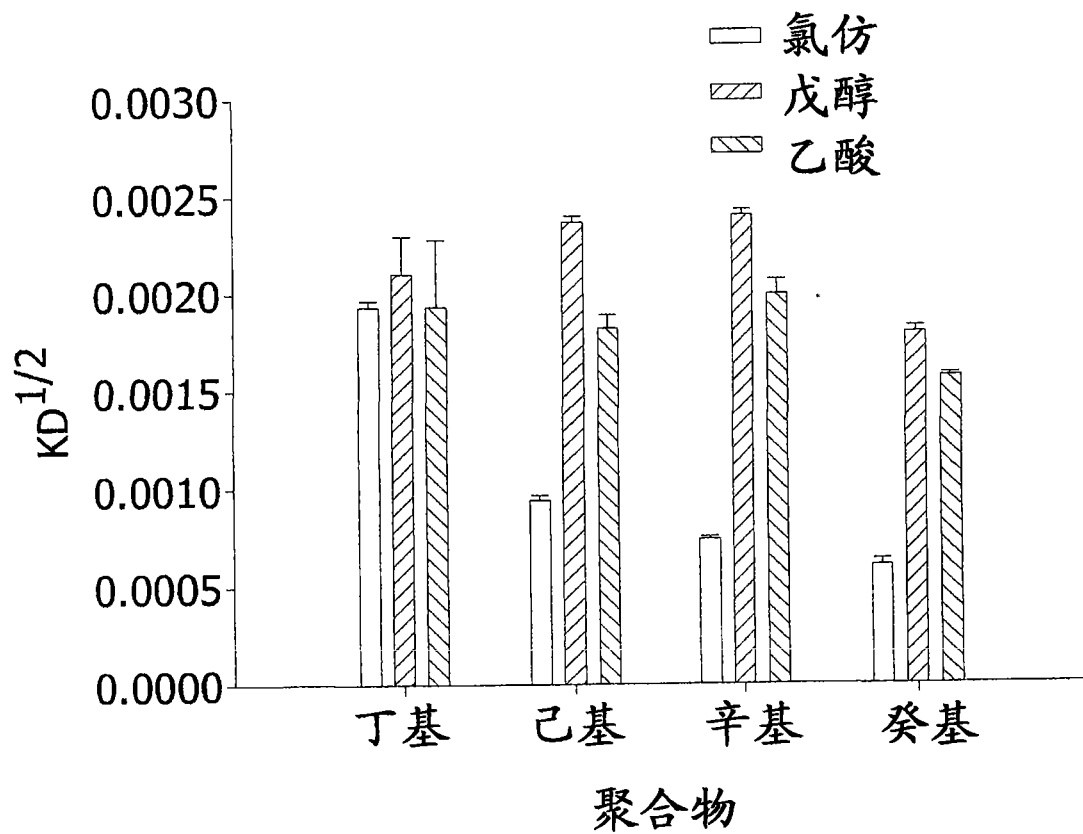


图 9

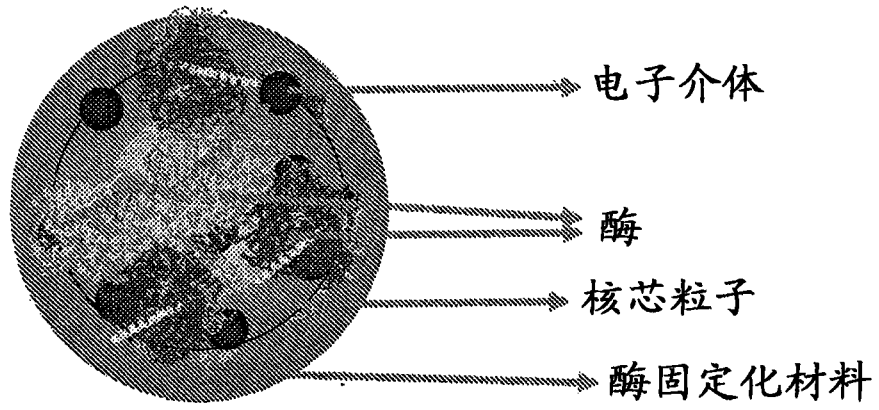


图 10

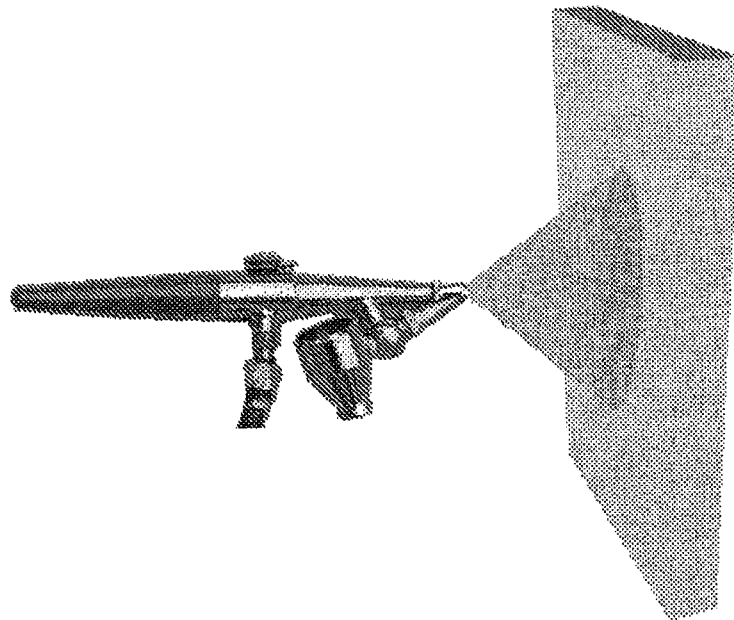


图 11

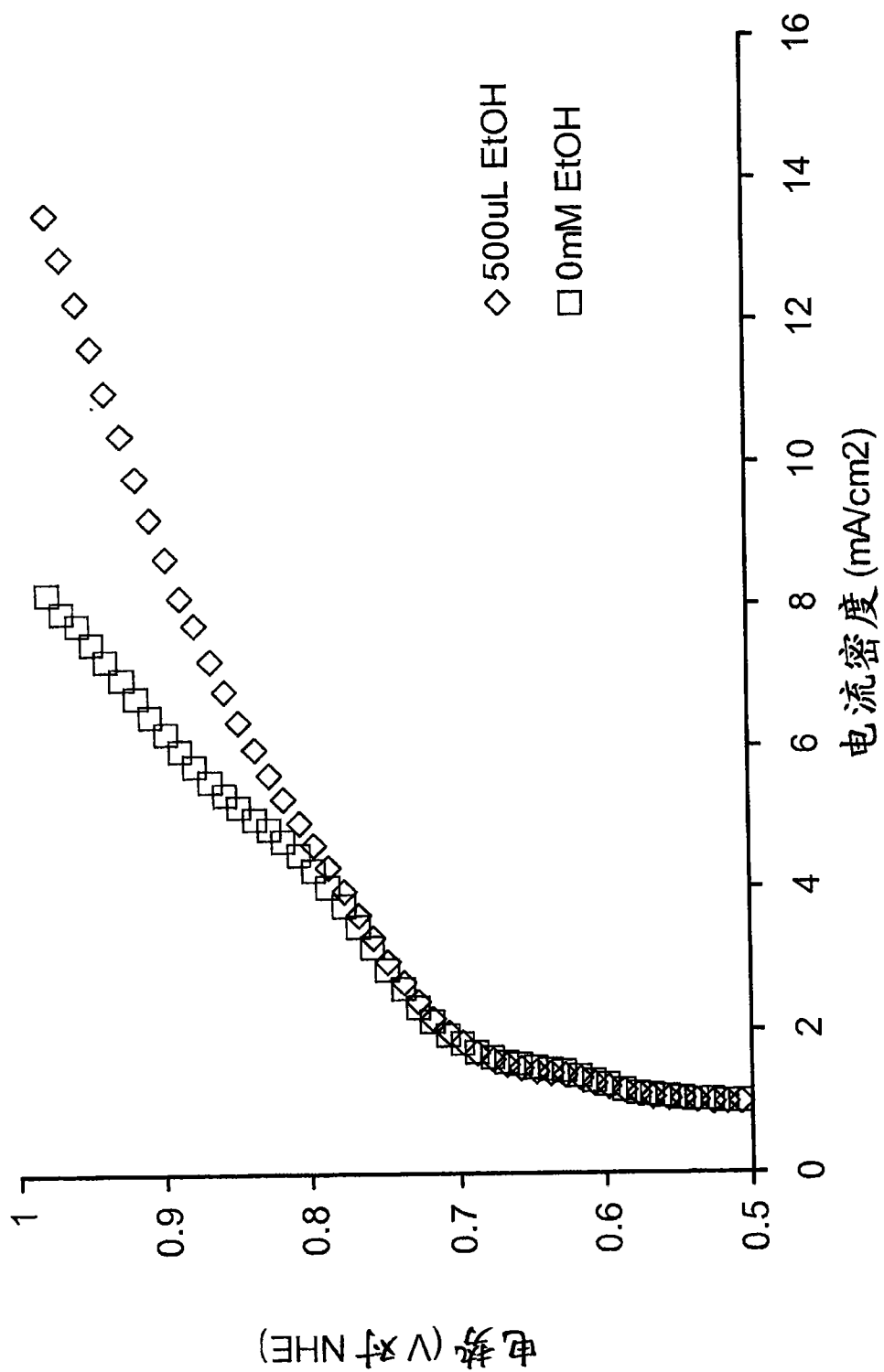


图 12

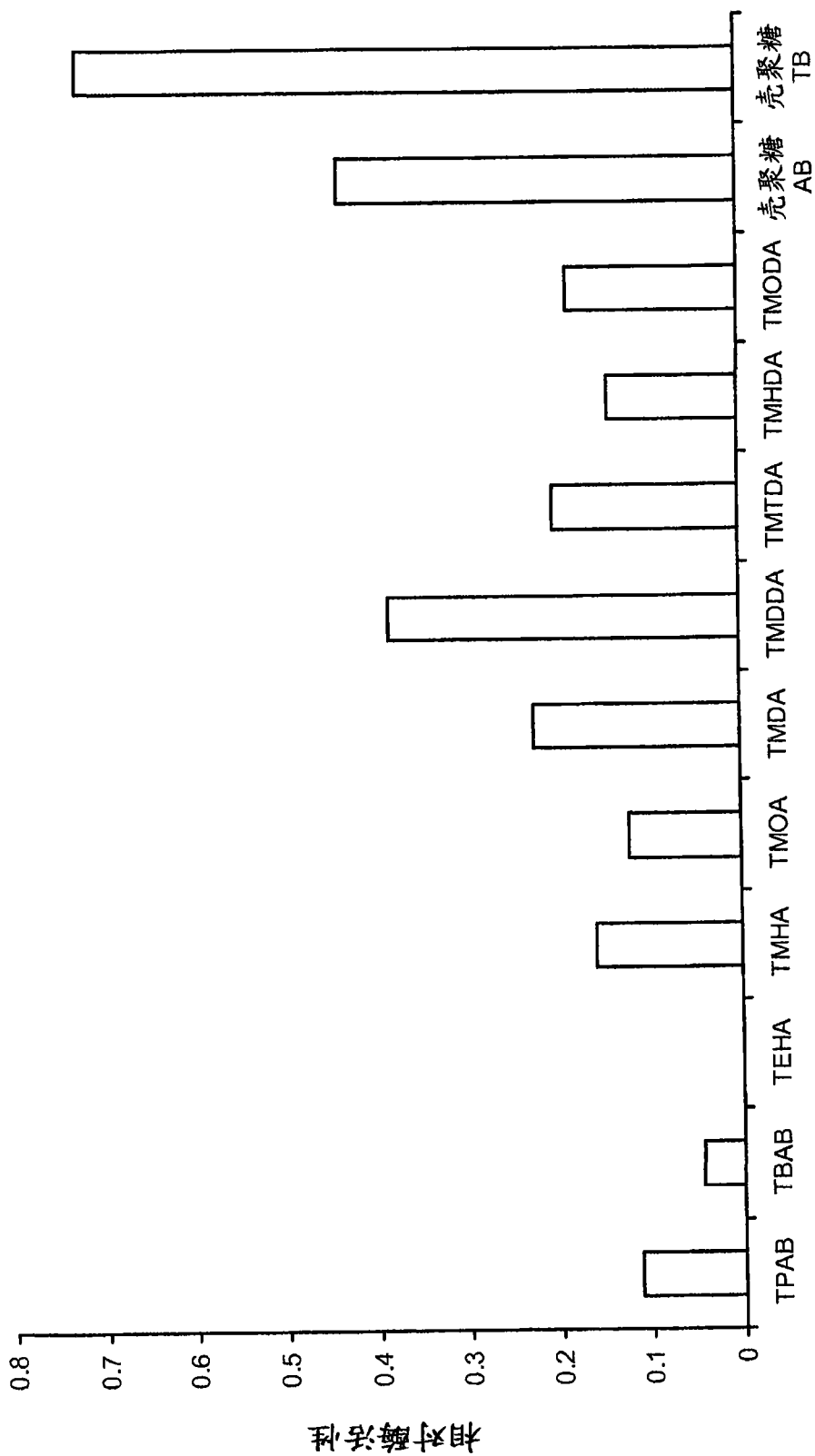


图 13

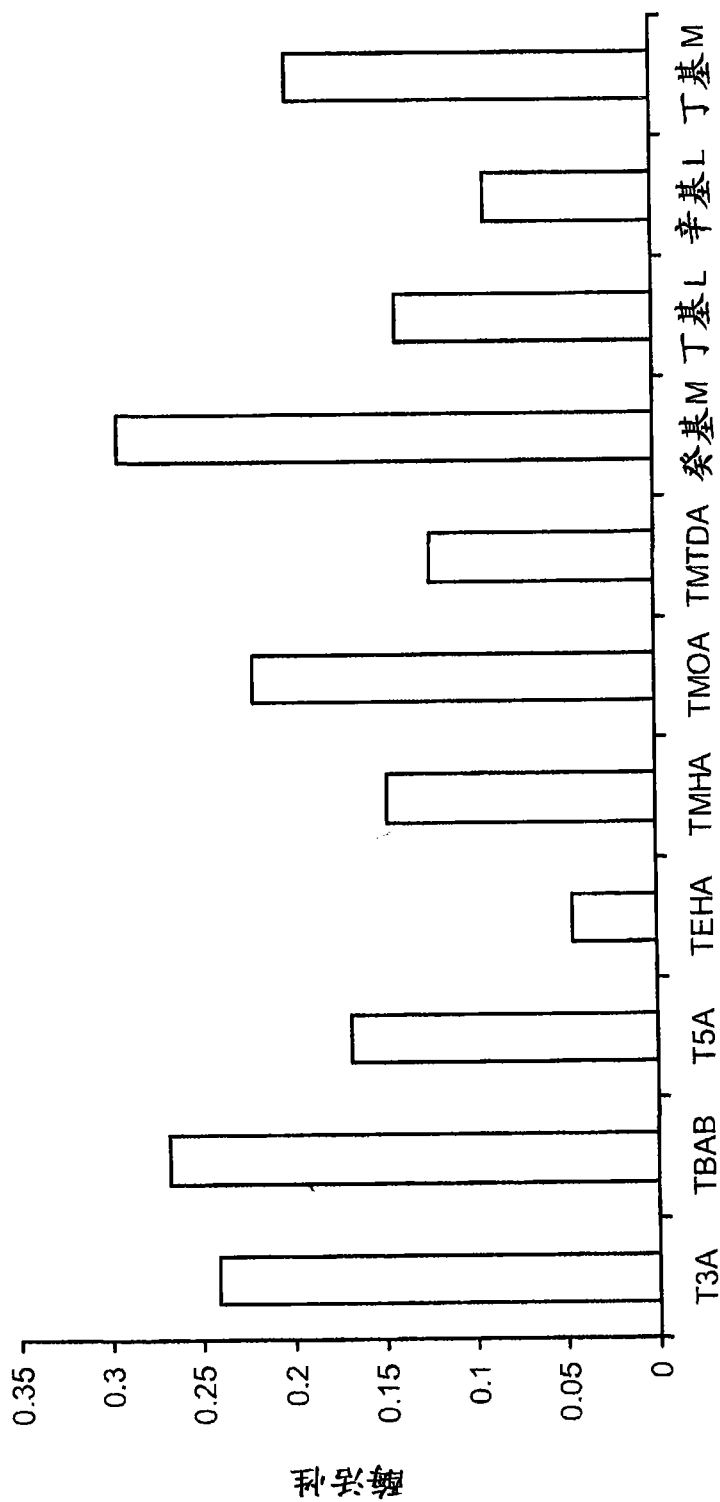


图 14

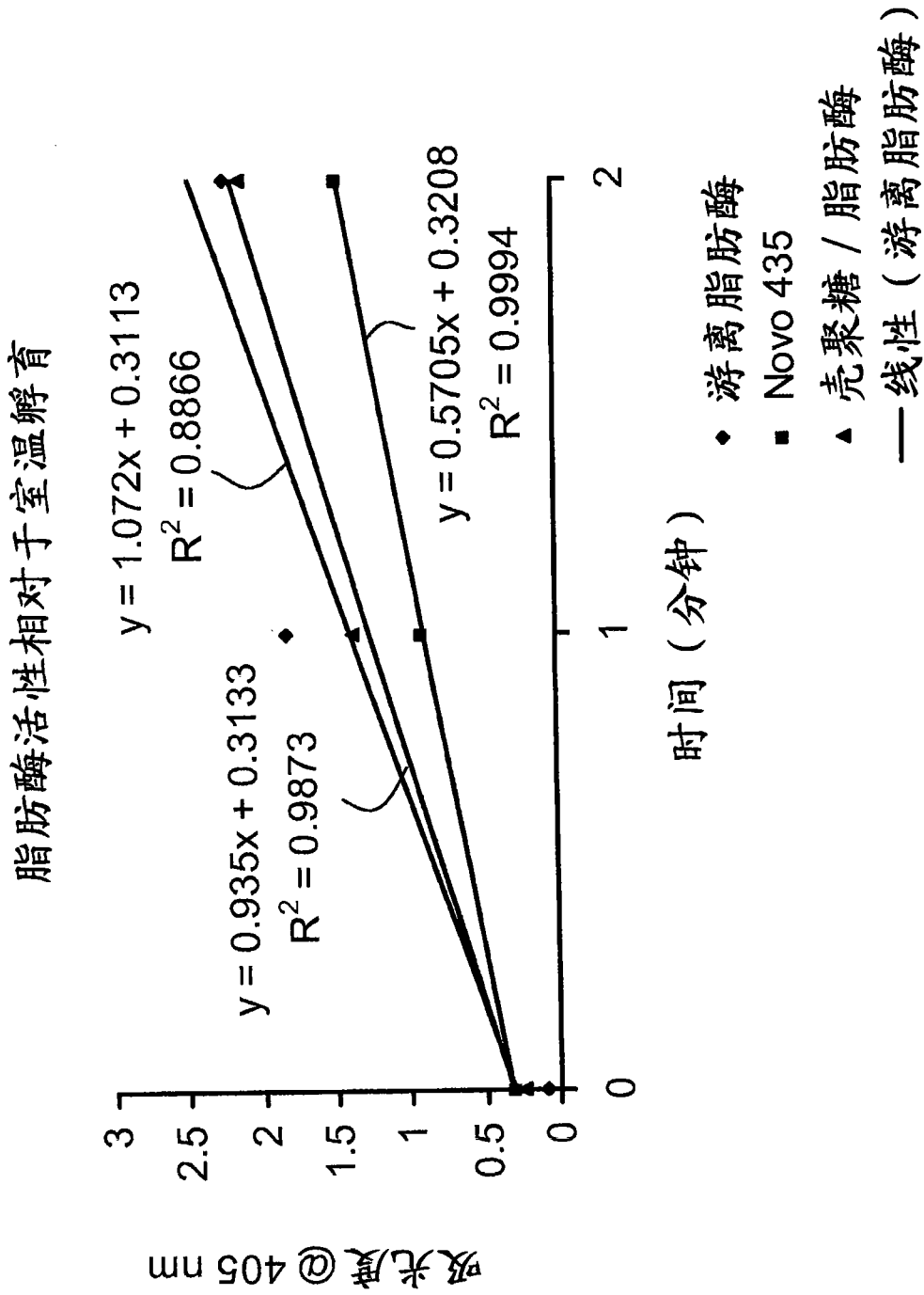


图 15

脂肪酶活性相对于65°C温育24小时后

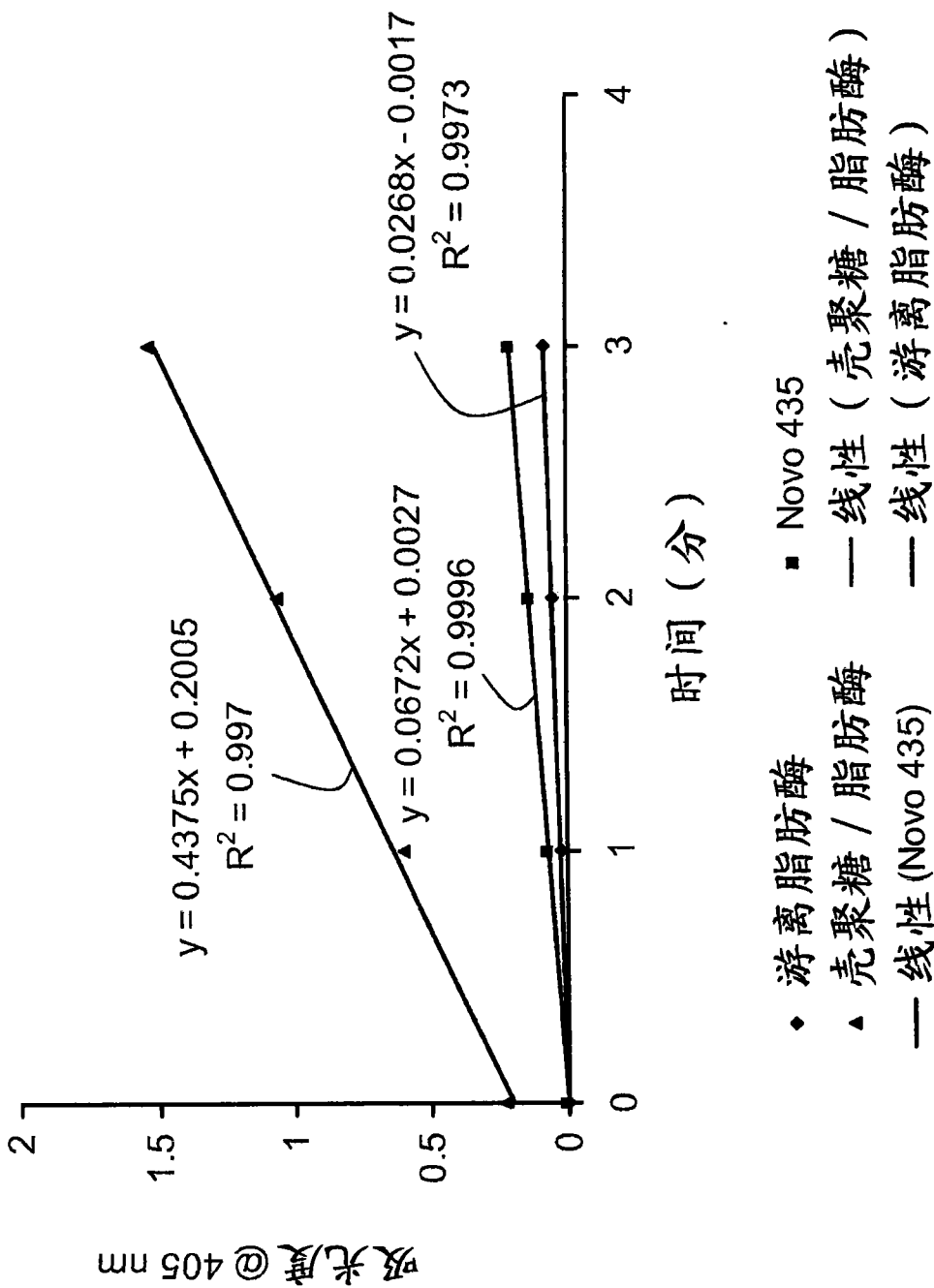


图 16

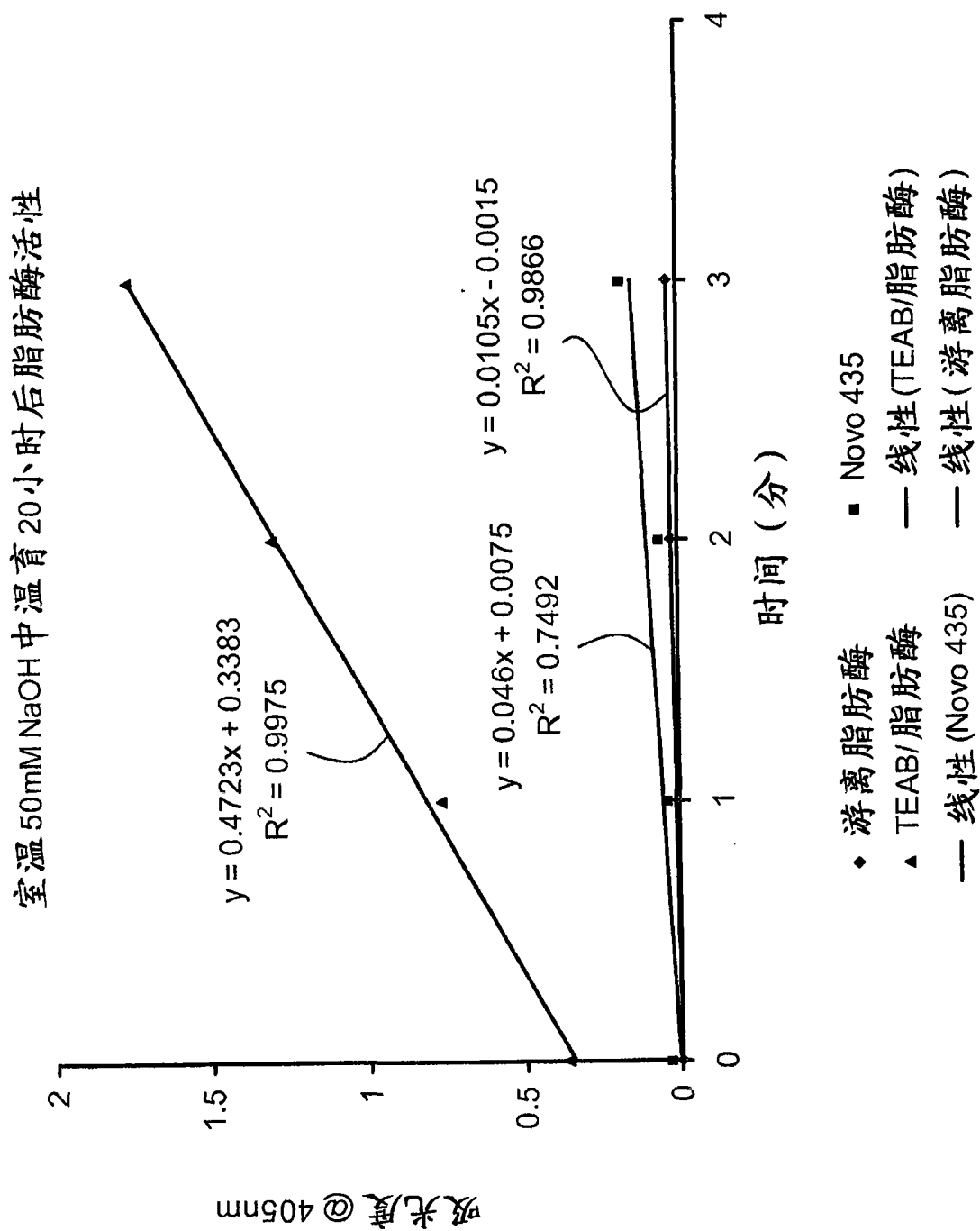


图 17

24小时孵育后脂肪酶活性对 pH 耐受性 (50mM NaOH pH=12.5)

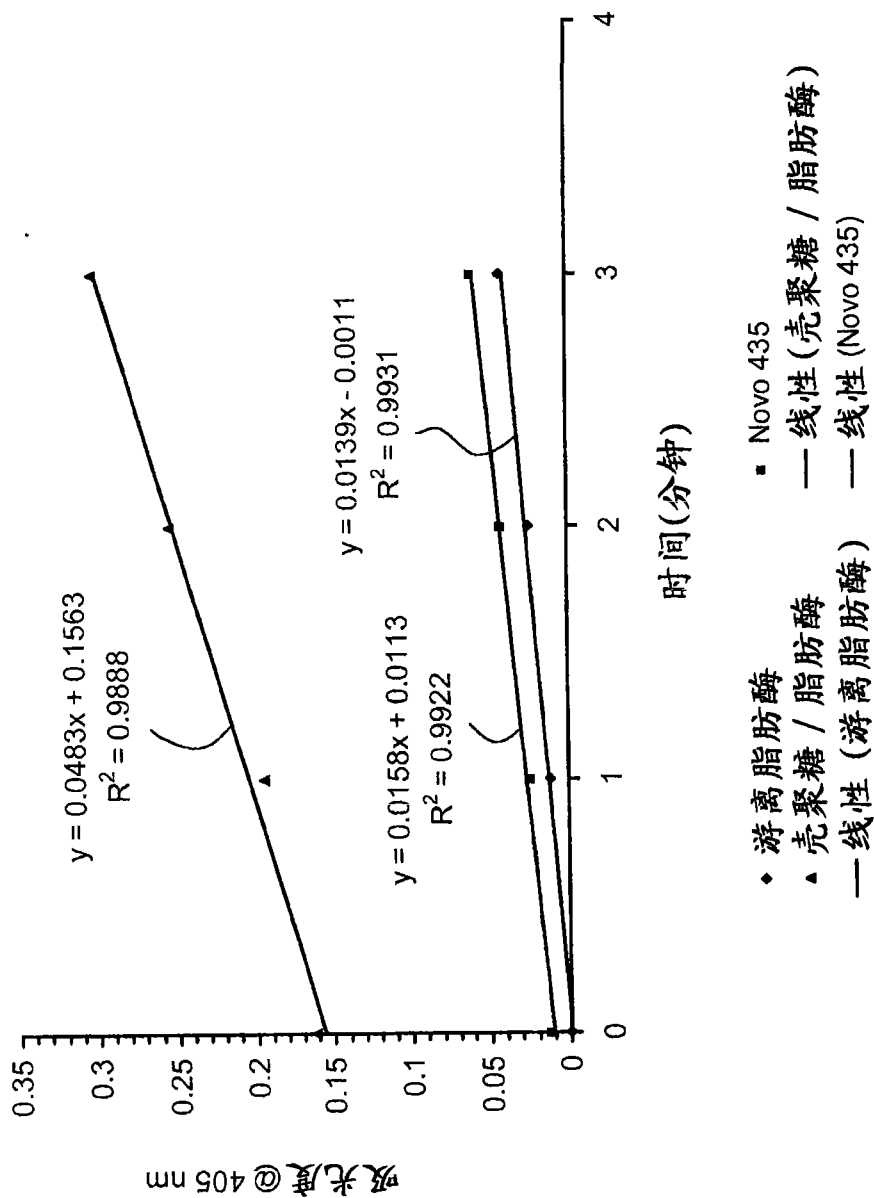


图 18

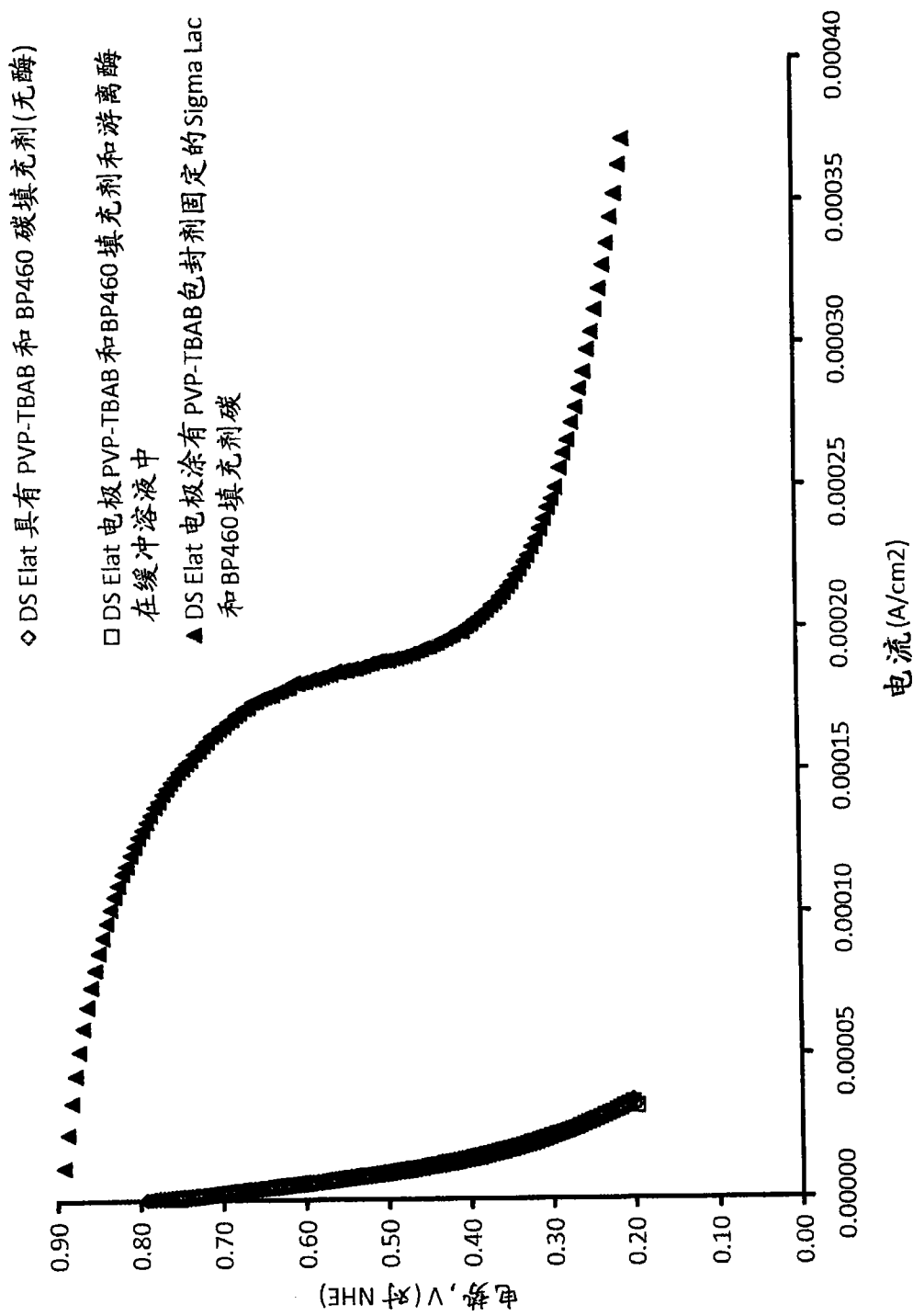


图 19