



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110760498 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201910417496.5

(22)申请日 2019.05.07

(71)申请人 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 11/089(2020.01)

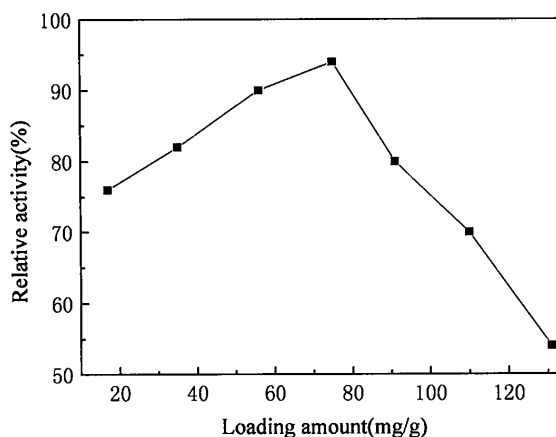
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

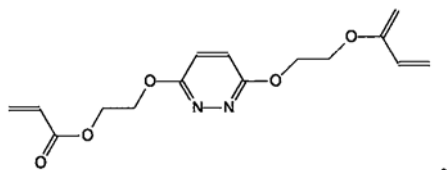
一种谷氨酸脱羧酶的共交联固定化方法

(57)摘要

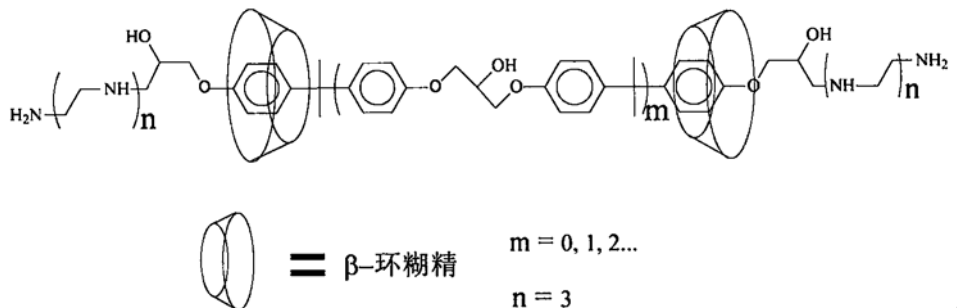
本发明是关于一种谷氨酸脱羧酶的共交联固定化方法。使用油溶性的噻嗪双丙烯酸酯作为交联剂,水相中的反应物为含有氨基的谷氨酸脱羧酶以及胺化环氧树脂与 β -环糊精形成的超分子复合物,利用双键与氨基的迈克尔加成反应,在较低的温度下发生共交联聚合反应,制备出不同负载量的固定化谷氨酸脱羧酶。通过控制交联程度,提高分散性,改善其内部的传质微环境,该固定化酶具有较高的催化活性,负载量在75mg酶/g载体时具有最高的活性,达到游离酶的94%。



1. 一种谷氨酸脱羧酶共交联固定化方法,其特征在于使用水/油两相反应体系,油相为交联剂噻嗪双丙烯酸酯,其结构如下:



水相中的反应物为谷氨酸脱羧酶及结构如下的分子复合物:



所述的谷氨酸脱羧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) 将谷氨酸脱羧酶溶解在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) 将不同浓度的谷氨酸脱羧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噻嗪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4~5小时,过滤后即得到不同负载量的谷氨酸脱羧酶固定化产物。

一种谷氨酸脱羧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,尤其是一种谷氨酸脱羧酶的共交联固定化方法,该新型固定化谷氨酸脱羧酶可专门用于 γ -氨基丁酸的高效制备。

背景技术

[0002] γ -氨基丁酸是一种四碳非蛋白组成氨基酸,被确认是哺乳动物神经中枢的一种抑制性递质,在调节哺乳动物心脑血管的活动方面起着重要的作用。在医药工业和食品工业具有广泛的用途。 γ -氨基丁酸类似物和衍生物的药物开发已经成为当前研究的热点之一。已经上市的药品有巴氯芬、米那普仑、喜保宁、吡拉西坦、奥拉西坦等。 γ -氨基丁酸还具有治疗癫痫、辅助治疗哮喘、强化记忆力、抗衰老、活化肝肾功能、解毒、预防肥胖、促进酒精代谢和除臭等功能。

[0003] 谷氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.15)是一类磷酸吡哆醛依赖性酶(等电点为5.61),是生物催化法制备 γ -氨基丁酸的唯一关键酶。 γ -氨基丁酸是由谷氨酸在谷氨酸脱羧酶作用下,脱掉 α 羧基形成的。此方法单产高,纯度较高,适合大规模工业化生产。谷氨酸脱羧酶对谷氨酸的催化作用是专一的,在催化其他氨基酸进行脱羧反应上没有作用,且作用的pH为4.0~5.0时,酶活力达到最高,但谷氨酸脱羧酶在pH高于7.0、蛋白质浓度和温度较低时,容易发生解离。

[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:例如固定化的谷氨酸脱羧酶可重复使用,使酶的使用效率提高、使用成本降低;固定化的谷氨酸脱羧酶极易与反应体系分离,简化了操作工艺;固定化的谷氨酸脱羧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谷氨酸脱羧酶的固定,利用谷氨酸脱羧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

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种谷氨酸脱羧酶的固定化方法,这种方法是基于谷氨酸脱羧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,油相为交联剂噻嗪双丙烯酸酯,其结构如图1所示,水相中的反应物为谷氨酸脱羧酶及 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谷氨酸脱羧酶的浓度来调节。

[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;

[0009] 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,导致交联反应能使谷氨酸脱羧酶能以接近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谷氨酸脱羧酶;

[0010] 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。

[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-51,环氧值为0.51,数均分子量为392)、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)将谷氨酸脱羧酶溶解在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的谷氨酸脱羧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噻嗪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4~5小时,过滤后即得到不同负载量的固定化谷氨酸脱羧酶的产物。

[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,谷氨酸脱羧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 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;

[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 β -环糊精超分子复合物改善了固定化谷氨酸脱羧酶的微环境,提高了酶的催化反应活性;3)共交联固定法能使谷氨酸脱羧酶以极高的效率被固定化。

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-51,环氧值为0.51,数均分子量为392)、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) 将谷氨酸脱羧酶溶解在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的谷氨酸脱羧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噻嗪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4~5小时,过滤后即得到不同负载量的固定化谷氨酸脱羧酶的产物。

[0022] 固定化酶的负载量测定:

[0023] 由于共交联法固定谷氨酸脱羧酶后,反应残留液中测不到谷氨酸脱羧酶的活性,说明经过交联后谷氨酸脱羧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) 游离酶活的测定:取400μL底物溶液(pH 4.8、0.2mol/L柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,含0.01mmol/L PLP、100mmol/L底物L-MSG)加入到1.5mL离心管中,置于37℃水浴中预热,然后加入20μL纯谷氨酸脱羧酶,迅速混匀,在37℃的条件下反应40min,反应结束后,取样品0.1mL加入0.9mL的NaHCO₃溶液(0.2mol/L, pH 9.8)以终止反应,离心后取上清0.5mL,再加入等量DNS-C1丙酮(8g/L)溶液,置于30℃下避光衍生1h,衍生后的样品经0.22μm微孔滤膜过滤后,采用高效液相色谱法(HPLC法)测定反应生成的GABA的含量,以测定酶活力。

[0028] (2) 固定化酶活的测定:用0.05mol/L磷酸盐(pH 5.6)缓冲液作为反应介质,加入20mg固定化谷氨酸脱羧酶,再加入0.05mol/L谷氨酸钠作为底物,以100r/min的转速于最适温度下恒温水浴振荡2h,在90℃下灭活5min,离心取上清液,定容后用高效液相色谱法(HPLC)测定溶液中γ-氨基丁酸(GABA)的含量。以每30min生成1μmol GABA作为一个酶活力单位。

[0029] 其中,HPLC法测定GABA含量时进行柱前衍生化,具体方法为:

[0030] (i) GABA柱前衍生化的方法:

[0031] 以1%2,4-二硝基氟苯的乙腈溶液(FDNB)作为衍生剂。取10000r/min转速下离心10min后的样品上清液0.2mL于2mL离心管中,再加入0.5mol/L NaHCO₃(pH=9.0)溶液0.2mL,FDNB溶液0.2mL,置于60℃水浴中暗处加热1h,取出后迅速用冷水冷却。加0.05mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.0)1.4mL,混合均匀后过0.45μm滤膜,以10000r/min的转速下离心

10min, 4℃下避光保存备用。

[0032] (ii) HPLC色谱条件:

[0033] 紫外检测波长: 360nm; 色谱柱: Lichrospher C18 (4.6×250mm, 5μm); 柱温: 35℃; 流动相: A为20mmol/L醋酸铵水溶液, B为等体积比的乙腈水溶液; 流速: 1mL/min; 进样量: 10 μL。

[0034] 相对活性:

[0035] 将固定化酶的活性与游离酶的活性之比定义为相对活性。

[0036] 实验结果:

[0037] 实验一共得到7个不同负载量的固定化谷氨酸脱羧酶的样品, 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75mg酶/g载体时其相对活性达到最大值, 其比活力是游离酶的94%, 这个结果说明谷氨酸脱羧酶在这个范围处于非常适合催化的状态。当负载量小于75mg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75mg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, 所以其活性又迅速下降。

[0038] 我们以负载量为61mg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=6.0条件下经过28天的储存, 游离酶溶液只残留57%的活性, 固定化酶能残留84%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

[0039] 图1交联剂的化学结构。

[0040] 图2固定化的谷氨酸脱羧酶催化活性与其负载量的依赖关系。

[0041] 图3固定化与游离的谷氨酸脱羧酶储存稳定性比较。

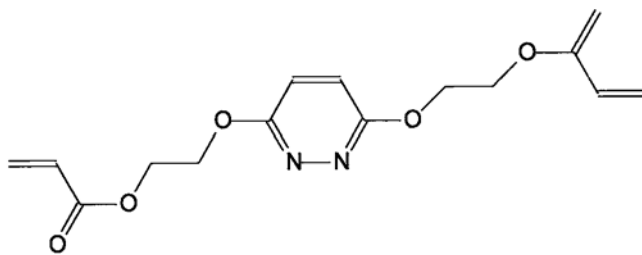


图1

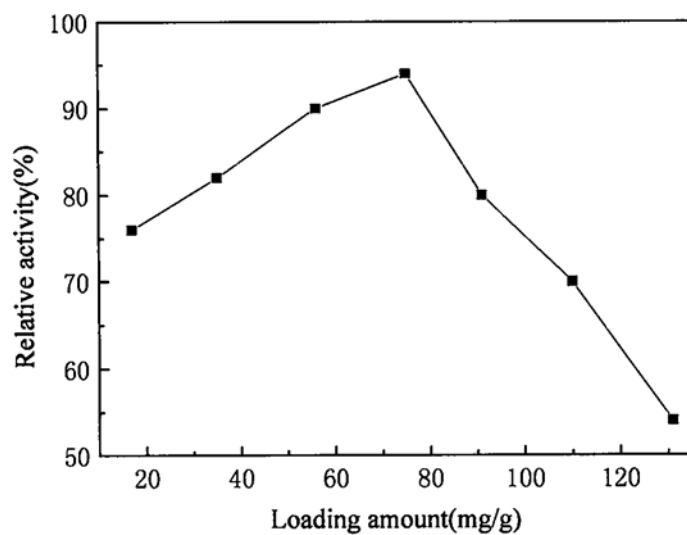


图2

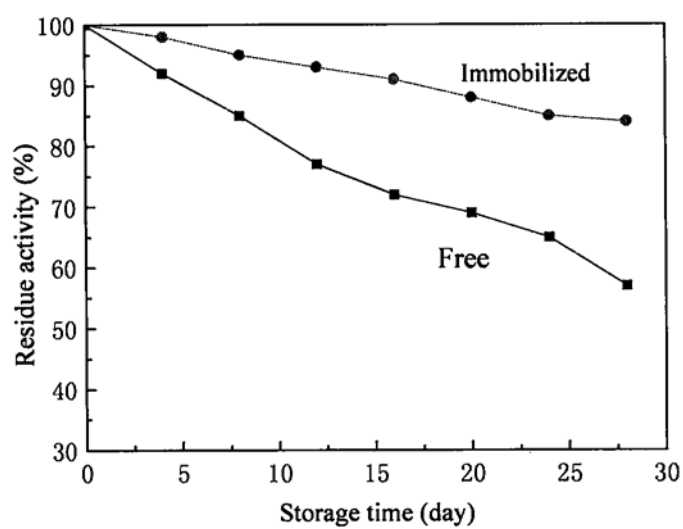


图3