

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102747066 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 24

(21) 申请号 201210267418. X

(22) 申请日 2012. 07. 31

(71) 申请人 信阳职业技术学院

地址 464000 河南省信阳市大庆路中段信阳
职业技术学院

(72) 发明人 王宇 王永芬 任传忠

(74) 专利代理机构 郑州红元帅专利代理事务所
(普通合伙) 41117

代理人 黄军委

(51) Int. Cl.

C12N 11/14 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶

(57) 摘要

本发明提供一种基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,该固定化蛋白酶由以下制备方法制得:将蛋白酶溶解在液体介质中,得到蛋白酶溶液;再将膨化珍珠岩或者表面经改性后的膨化珍珠岩与所述蛋白酶溶液均匀混合,并在 20℃—40℃ 条件下处理 3-6 个小时,以使所述蛋白酶溶液中的蛋白分子与膨化珍珠岩内部微孔内表面充分接触;最后,以离心或过滤的方法除去液体介质,进行干燥,即得到固定化蛋白酶。本发明固定化蛋白酶以膨化珍珠岩或者经过表面改性后的膨化珍珠岩为载体材料,其具有稳定性强和酶活性高的特点,与现有方法制作得到的固定化蛋白酶相比,该固定化蛋白酶的活性达到 80U/mg 以上,提高了 25% 左右。

1. 一种基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其特征在于:将蛋白酶溶解在液体介质中,得到蛋白酶溶液;再将膨化珍珠岩或者表面经改性后的膨化珍珠岩与所述蛋白酶溶液均匀混合,并在 20℃ --40℃ 条件下处理 3-6 个小时,以使所述蛋白酶溶液中的蛋白分子与膨化珍珠岩内部微孔内表面充分接触;最后,以离心或过滤的方法除去液体介质,进行干燥,即得到固定化蛋白酶。

2. 根据权利要求 1 所述的基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其特征在于:所述液体介质是蒸馏水、缓冲液、甲醇、丙酮或乙醚。

3. 根据权利要求 1 所述的基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其特征在于:所述处理是指震荡处理、水浴处理、搅拌处理、过滤吸附处理中的一种或者几种的组合。

4. 根据权利要求 1 所述的基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其特征在于:所述干燥是指真空干燥或冰冻干燥。

5. 根据权利要求 1 所述的基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其特征在于:将 10-30mg 的膨化珍珠岩与 1 毫升的所述蛋白酶溶液均匀混合。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其特征在于:所述液体介质为磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液,所述磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液的 PH 值为 5.3、离子浓度为 1/15M。

7. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其特征在于:将猪胰脂肪酶按 10mg/ml 溶解到 PH 值为 5.3、离子浓度为 1/15M 的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液中,得到猪胰脂肪酶溶液;再按照每毫升猪胰脂肪酶溶液加入 20mg 膨化珍珠岩的比例将两者混合均匀,然后在 30℃ 水浴中震荡 3 个小时;最后,离心除去液体介质,真空干燥,即得到该固定化猪胰脂肪酶。

基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶

技术领域

[0001] 本发明涉及一种固定化蛋白酶,具体的说,涉及了一种基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶。

背景技术

[0002] 由于酶催化的高效性、专一性,将酶催化技术应用在生产实践上必然可以带来单位时间产品产量的提高和副产物的减少。在生产中,如果直接使用酶作为催化剂,因为酶是蛋白质,其生物活性受环境因素的影响很大,温度、压力、氧化、还原、有机溶剂、金属离子、PH 等环境因素均会使酶的活性减弱或消失,即使是在最适宜的条件下,酶的生物活性也会逐渐去;同时,由于酶催化的性质,当反应进行到一定时间后,反应速度会逐渐下降;在反应完成后,酶无法回收,对于一些要求高的行业,如医药行业,可能存在不利的影响。以上的原因限制了酶在工业生产中的应用,而采用固定化酶技术则可以解决这些问题。

[0003] 固定化酶技术和基于固定化酶设计各类生物反应器是当前生物技术工业应用的研究热点之一,其中重要的研究方向是寻找适宜的固定化方法或固定化载体。对于固定化酶载体材料的要求一般认为是不破坏酶的活性及专一性,有一定的机械强度,与酶结合稳定,不与产物、废物、反应液发生化学反应,花费成本低等。

[0004] 目前的固定化酶方法主要是以物理吸附、共价结合、交联和包埋四种方法为主。以这四种方法为基础,分别适用于不同的固定化载体。包埋法是将酶蛋白包裹在如明胶、海藻酸钠、琼脂等载体中,处理过程相对复杂,而且固定化酶失去活性以后便无法再生。交联法是用交联剂,如戊二醛,处理酶形成网格化结构的固定化酶的方法,其反应比较激烈,酶分子失活比较严重。共价结合法是用试剂处理载体,如 DEAE 葡聚糖凝胶、纤维素等,使之表面形成活性基团后再与酶分子结合,处理过程复杂,载体材料成本较高。物理吸附法固定化酶的载体材料有大孔树脂类、硅藻土、铝矾土等,其中,大孔树脂类使用成本高,前期预处理过程复杂,硅藻土、铝矾土等化学成分比较复杂,稳定性也相对差。

[0005] 为了解决以上存在的问题,人们一直在寻求一种理想的技术解决方案。

发明内容

[0006] 本发明的目的是针对现有技术的不足,从而提供一种稳定性强、酶活性高、分离回收容易和能反复多次使用的基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,用于制备该固定化蛋白酶的制备方法具有操作连续可控、工艺简便、固定化率高的优点。

[0007] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:一种基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其由以下制备方法制得:将蛋白酶溶解在液体介质中,得到蛋白酶溶液;再将膨化珍珠岩或者表面经改性后的膨化珍珠岩与所述蛋白酶溶液均匀混合,并在 20℃—40℃ 条件下处理 3-6 个小时,以使所述蛋白酶溶液中的蛋白分子与膨化珍珠岩内部微孔内表面充分接触;最后,以离心或过滤的方法除去液体介质,进行干燥,即得到固定化蛋白酶。

[0008] 基于上述,所述液体介质是蒸馏水、缓冲液、甲醇、丙酮或乙醚。

[0009] 基于上述,所述处理是指震荡、搅拌或过滤吸附。

[0010] 基于上述,根据权利要求 1 所述的基于膨化珍珠岩载体的固定化蛋白酶,其特征在于:所述处理是指震荡处理、水浴处理、搅拌处理、过滤吸附处理中的一种或者几种的组合。

[0011] 基于上述,所述干燥是指真空干燥或冰冻干燥。

[0012] 基于上述,将 10-30mg 的膨化珍珠岩与 1 毫升的所述蛋白酶溶液均匀混合。

[0013] 基于上述,所述液体介质为磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液,所述磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液的 PH 值为 5.3、离子浓度为 1/15M。

[0014] 基于上述,将猪胰脂肪酶按 10mg/ml 溶解到 PH 值为 5.3、离子浓度为 1/15M 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中,得到猪胰脂肪酶溶液;再按照每毫升猪胰脂肪酶溶液加入 20mg 膨化珍珠岩的比例将两者混合均匀,然后在 30℃水浴中震荡 3 个小时;最后,离心除去液体介质,真空干燥,即得到该固定化猪胰脂肪酶。

[0015] 膨化珍珠岩是一种酸性玻璃质火山熔岩,经破碎、加热、焙烧处理后体积迅速膨胀数倍乃至数十倍,从而形成白色轻质具有蜂窝状结构的膨化珍珠岩。大多数膨化珍珠岩含硅量高、多孔,具有吸附性强、容重小、热导率低、化学稳定性好、吸水率相对较低、无毒、无味、不燃烧等特点。膨化珍珠岩在生产过程中经过高温处理,易于祛除杂质。经试验证明,市售膨化珍珠岩产品经过简单清洗处理后即可以使用,是一种理想的固定化酶载体。

[0016] 本发明固定化蛋白酶以膨化珍珠岩或者经过表面改性后的膨化珍珠岩为载体材料,其具有稳定性强和酶活性高的特点,与现有方法制作得到的固定化蛋白酶相比,该固定化蛋白酶的活性达到 80U/mg 以上,提高了 25% 左右;而且其不仅可以催化水溶液介质的生化反应,而且还可以应用在有机介质中发生的酶催化反应。

具体实施方式

[0017] 进行酶的固定化的温度可以根据酶的特性决定,但最好是不引起酶失活的 0-60℃,特别最好是 20-40℃。在固定化时使用的酶溶液的液体介质可举出蒸馏水、缓冲液、甲醇、丙酮、乙醚等。酶溶液的 PH 值,只要是不引起酶的改性的范围即可,但 PH 值最好是 3-9,为了维持该 PH 值,较好的方法是使用缓冲液。作为酶溶液,为了使蛋白分子能与膨化珍珠岩内部微孔内表面充分接触,根据需要可以使用诸如震荡、搅拌、过滤吸附等物理、化学处理手段。

[0018] 下面以猪胰脂肪酶的固定化为例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。当然,本发明方法同样适用于其它蛋白酶,而且同样收到很好的技术效果。

[0019] 实施例 1

该固定化蛋白酶由以下制备方法制得:将猪胰脂肪酶按 10mg/ml 溶解到 PH 值为 5.3、离子浓度为 1/15M 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中,4000rpm 离心 15 分钟后取上清液,即为猪胰脂肪酶溶液,再按照每毫升猪胰脂肪酶溶液加入 20mg 膨化珍珠岩的比例将两者混合均匀,然后在 30℃水浴中震荡 3 个小时;最后,用 4℃以下保存的丙酮溶液清洗,4000rpm 离心 15 分钟后弃上清液,重复清洗三次,真空干燥 20 小时后即得到该固定化猪胰脂肪酶。

[0020] 用橄榄油乳化法测定猪胰脂肪酶溶液活性为 385U/ml ;用橄榄油乳化法测得膨化珍珠岩固定化猪胰脂肪酶的活性为 105U/mg,在 4℃冰箱中保存 6 个月以后,测得固定化猪胰脂肪酶的活性为 85U/mg。

[0021] 通过橄榄油乳化法测定猪胰脂肪酶溶液活性实验得知,该固定化蛋白酶具有很高的活性,达到了 80U/mg 以上,与现有的固定化蛋白酶的活性相比提高了 31%,该固定化蛋白酶还具有很好的贮存稳定性。

[0022] 实施例 2

本实施例与实施例 1 的区别是:采用的载体材料为表面经改性后的膨化珍珠岩,其它步骤及参数与具体实施例 1 相同。

[0023] 用橄榄油乳化法测定猪胰脂肪酶溶液活性为 385U/ml,测得膨化珍珠岩固定化猪胰脂肪酶的活性为 106U/mg,在 4℃冰箱中保存 6 个月以后,测得固定化猪胰脂肪酶的活性为 86U/mg。

[0024] 本实施例中,该固定化蛋白酶的活性提高了 32%,同时还具有很好的贮存稳定性。

[0025] 实施例 3

本实施例与实施例 1 的区别是:所述液体介质采用甲醇溶液,其它步骤及参数与实施例 1 相同。

[0026] 用橄榄油乳化法测得猪胰脂肪酶溶液活性为 383 U/ml,测得膨化珍珠岩固定化猪胰脂肪酶的活性为 104U/mg,在 4℃冰箱中保存 6 个月以后,测得固定化猪胰脂肪酶的活性为 83U/mg。

[0027] 本实施例中,该固定化蛋白酶的活性提高了 28%,同时还具有很好的贮存稳定性。

[0028] 实施例 4

本实施例与实施例 1 的区别是:按照每毫升猪胰脂肪酶溶液加入 30mg 膨化珍珠岩的比例将两者混合,其它步骤及参数与实施例 1 相同。

[0029] 用橄榄油乳化法测得猪胰脂肪酶溶液活性为 385U/ml,测得膨化珍珠岩固定化猪胰脂肪酶的活性为 105U/mg,在 4℃冰箱中保存 6 个月以后,测得固定化猪胰脂肪酶的活性为 85U/mg。

[0030] 本实施例中,该固定化蛋白酶的活性提高了 31%,同时还具有很好的贮存稳定性。

[0031] 实施例 5

本实施例与实施例 1 的区别是:反应所用的方法为在 20℃条件下搅拌 4 个小时,其它步骤及参数与实施例 1 相同。

[0032] 用橄榄油乳化法测得猪胰脂肪酶溶液活性为 385 U/ml,测得膨化珍珠岩固定化猪胰脂肪酶的活性为 100U/mg,在 4℃冰箱中保存 6 个月以后,测得固定化猪胰脂肪酶的活性为 80U/mg。

[0033] 本实施例中,该固定化蛋白酶的活性提高了 23%,同时还具有很好的贮存稳定性。

[0034] 实施例 6

本实施例与实施例 1 的区别是:采用的干燥方法为冰冻干燥 12 小时,其它步骤及参数与实施例 1 相同。

[0035] 用橄榄油乳化法测得猪胰脂肪酶溶液活性为 385 U/ml,测得膨化珍珠岩固定化猪胰脂肪酶的活性为 104U/mg,在 4℃冰箱中保存 6 个月以后,测得固定化猪胰脂肪酶的活性

为 84U/mg。

[0036] 本实施例中,该固定化蛋白酶的活性提高了 29%,同时还具有很好的贮存稳定性。

[0037] 最后应当说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其限制;尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明,所属领域的普通技术人员应当理解:依然可以对本发明的具体实施方式进行修改或者对部分技术特征进行等同替换;而不脱离本发明技术方案的精神,其均应涵盖在本发明请求保护的技术方案范围当中。