



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109251924 A

(43)申请公布日 2019.01.22

(21)申请号 201811157297.7

(22)申请日 2018.09.30

(71)申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

(72)发明人 陈敬华 米哈伊尔·巴尔博尤
张燕 王睿

(74)专利代理机构 大连理工大学专利中心
21200

代理人 梅洪玉 刘秋彤

(51)Int.Cl.

C12N 9/96(2006.01)

C08G 65/331(2006.01)

C08G 65/333(2006.01)

C08G 81/00(2006.01)

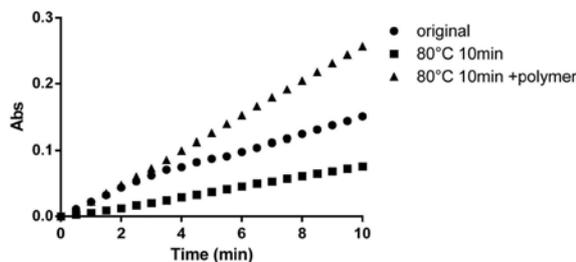
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种动态键聚合物的制备方法及其在提高酶热稳定性方面的应用

(57)摘要

本发明提供一种动态键聚合物的制备方法及其在提高酶热稳定性方面的应用,属于高分子材料领域。该动态键聚合物由芳香醛、氨基封端的聚合物,以及含不同功能基团的胺,经亚胺生成反应聚合而成。该动态键聚合物提高酶热稳定性的方式有两种:1)将动态键聚合物直接加入酶的催化体系中,当反应条件升至原来可使酶失活的温度时,由于动态键聚合物的存在,酶的活性得以保持;2)将动态键聚合物加入因高温而活性显著减低的酶的催化体系中,一段时间后动态键聚合物能够恢复并提高酶的活性。



1. 一种动态键聚合物在提高酶热稳定性方面的应用,其特征在於,应用方法如下:

首先,根据不同目标酶的特性,将动态键聚合物溶液加入目标酶催化反应体系中,逐步提高反应温度;然后,通过调整不同温度和不同动态键聚合物溶液的添加量,并与未加动态键聚合物体系中目标酶的活性进行对比,考量动态键聚合物对目标酶活化的最适合用量及最适高温温度范围。

2. 一种动态键聚合物在提高酶热稳定性方面的应用,其特征在於,应用方法如下:

首先,逐渐升高目标酶催化体系的温度,至目标酶的活性显著降低;然后在室温条件下,将动态键聚合物溶液加入目标酶催化反应体系中,静置10~60min后重新测量目标酶的活性,通过对比不同动态键聚合物溶液的添加量,得到动态键聚合物的最适合用量。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在於,所述动态键聚合物的制备方法如下:

1) 将芳香醛、氨基封端的聚合物以及含功能基团的胺在有机溶剂中混合,在60~80℃回流3~4天,进行亚胺生成反应;其中,芳香醛与氨基封端的聚合物的摩尔量之比为1:2~2:1;芳香醛与含功能基团的胺的质量之比2:1~10:1;

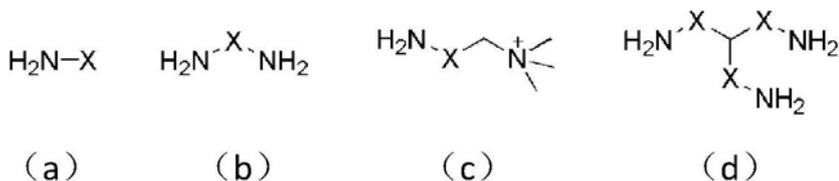
2) 用减压蒸馏去除亚胺生成反应后体系中的溶剂,并加入蒸馏水,制备得到浓度为10~20mM的动态键聚合物溶液。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,动态键聚合物的制备方法中,所述的芳香醛为均苯三甲醛、邻苯二甲醛、对苯二甲醛或间苯二甲醛。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,动态键聚合物的制备方法中,所述的氨基封端的聚合物为氨基封端的聚乙二醇、聚醚胺、聚四氢呋喃、壳聚糖或氨基修饰的透明质酸。

6. 根据权利要求4所述的应用,其特征在於,动态键聚合物的制备方法中,所述的氨基封端的聚合物为氨基封端的聚乙二醇、聚醚胺、聚四氢呋喃、壳聚糖或氨基修饰的透明质酸。

7. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,动态键聚合物的制备方法中,所述的含功能基团的胺为PAMAM树枝状聚合物,或包含1~3个伯胺、嵌有0-5个相同或不同的烷氧基、酰胺基、羟基亚甲基或仲胺基功能基团的烃链,烃链的碳数为2-12;结构式依次为(a)、(b)、(c)和(d):



其中,X为碳数2-12的、嵌有0-5个相同或不同的烷氧基、酰胺基、羟基亚甲基或仲胺基在内的功能基团的烃链。

8. 根据权利要求4、5或6所述的应用,其特征在於,动态键聚合物的制备方法中,所述的含功能基团的胺为PAMAM树枝状聚合物,或包含1~3个伯胺、嵌有0-5个相同或不同的烷氧基、酰胺基、羟基亚甲基或仲胺基功能基团的烃链,烃链的碳数为2-12;结构式依次为(a)、(b)、(c)和(d):

一种动态键聚合物的制备方法及其在提高酶热稳定性方面的应用

技术领域

[0001] 本发明属于高分子材料领域,涉及到酶催化合成,特别涉及到一种动态键聚合物的制备方法及其在提高酶热稳定性方面的应用。

背景技术

[0002] 生物酶因为催化反应条件温和、过程高效、选择性高,在有机合成、制药、食品等方面应用广泛。然而酶的催化反应常有其最适合的温度和酸碱条件,在超出这一范围的高温环境中,酶的活性大大降低,甚至造成酶蛋白的不可逆失活,极大程度影响了酶的工业应用。因此,如何提高酶的热稳定性、提高催化效率和酶利用率是生物催化中的重要问题。

[0003] 近年来,多种方法被用于提高酶的热稳定性,主要包括:1) 蛋白质工程,如定向进化等基因手段。然而,该方案一般需要较长的筛选周期和大量的人力、物力;2) 酶固定化,包括采用吸附、交联等方法将包裹或连接于载体上,但固定化酶的活性通常有所降低;3) 添加稳定剂,例如通过加入表面活性剂、多元醇等而影响酶的构象稳定性,但在苛刻条件下其效果较为有限。

[0004] 动态键聚合物是由超分子作用或可逆共价反应连接的聚合物,是一种新型可适应性高的分子材料。其最大的特点是聚合物结构组成可由外界刺激调控,例如有生物酶存在时,该类聚合物会在酶周围形成与酶表面作用最优的结构。有文献报道,将带有功能基团、亚胺连接的动态键聚合物直接加入酶催化反应体系中,酶的活性得到显著增强(Chem. Commun. 2016, 52, 4053, Chem. Commun. 2016, 52, 13768)。该类聚合物在提高酶热稳定性方面也应有潜在应用,但尚未得到有效开发。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种动态键聚合物的制备方法及其在提高酶热稳定性方面的应用,该动态键聚合物由芳香醛、氨基封端的聚合物,以及含不同功能基团的胺,经亚胺生成反应聚合而成。该动态键聚合物提高酶热稳定性的方式有两种:1) 将动态键聚合物直接加入酶的催化体系中,当反应条件升至原来可使酶失活的温度时,由于动态键聚合物的存在,酶的活性得以保持;2) 将动态键聚合物加入因高温而活性显著减低的酶的催化体系中,一段时间后动态键聚合物能够恢复并提高酶的活性。

[0006] 本发明的技术方案:

[0007] 一种动态键聚合物的制备方法,步骤如下:

[0008] 1) 将芳香醛、氨基封端的聚合物以及含功能基团的胺在有机溶剂中混合,在60~80℃回流3~4天,进行亚胺生成反应;其中,芳香醛与氨基封端的聚合物的摩尔量之比为1:2~2:1;芳香醛与含功能基团的胺的质量之比2:1~10:1;

[0009] 2) 用减压蒸馏去除亚胺生成反应后体系中的溶剂,并加入蒸馏水,制备得到浓度为10~20mM的动态键聚合物溶液。

[0018] 方式二、逐渐升高目标酶催化体系的温度,至目标酶的活性显著降低。在室温条件下,将制得的动态键聚合物溶液加入目标酶催化反应体系中,静置10~60min后重新测量目标酶的活性,通过对比不同动态键聚合物溶液的添加量,得到动态键聚合物的最适合用量。

[0019] 本发明的有益效果:动态键聚合物的制备过程简单,对酶的热稳定性增强效果明显。相对其他基因改造、酶固定化等手段,该方法简单易行、见效周期短,并且具有一定的多种酶的普遍适用性,而并不局限于某一种酶的热稳定性与活性。

附图说明

[0020] 图1为脂肪酶在不同条件下对对硝基苯酚的水解效果图。

[0021] 图2为碳酸酐酶在不同条件下对对硝基苯酚的水解效果图。

具体实施方式

[0022] 下面将结合具体实施例和附图对本发明的技术方案进行进一步的说明。

[0023] 实施例1:一种基于疏水性动态键聚合物对脂肪酶热稳定性增强的方法,包括如下步骤:

[0024] 1) 称取16.2mg (0.1mmol) 均苯三甲醛,112.5mg (0.075mmol) 氨基封端聚乙二醇 (mw = 1500),以及15.0mg (0.075mmol) 1,12-二氨基十二烷,依次加入含20mL甲醇溶液的圆底烧瓶中,并置于60℃回流3天,进行亚胺生成反应。

[0025] 2) 反应结束,用减压蒸馏法除去所有溶剂,并加入5mL蒸馏水,获得浓度为20mM的动态键聚合物溶液待用。

[0026] 3) 将10mg脂肪酶(来源于猪胰腺,EC 3.1.1.3)溶于1mL蒸馏水,平行制备三份。一份室温静置10min,一份在80℃下放置10min,另一份加入50μL步骤2)所得动态键聚合物,并在80℃下放置10min。

[0027] 4) 利用紫外分光光度计法,测量高温处理过的脂肪酶在室温对底物对硝基苯酚的水解速率。底物由2.5mg对硝基苯酚溶于4mL乙腈所得。具体检测时,依次将20μL脂肪酶溶液、1.78mL(第一、二份脂肪酶溶液)或1.73mL(第三份脂肪酶溶液)磷酸缓冲盐溶液(pH 7.0),以及200μL对硝基苯酚溶液加入比色皿,并每间隔0.5min连续检测前10min混合溶液在400nm的紫外吸收,观察动态键聚合物对酶活性的影响。

[0028] 图1是脂肪酶本身、80℃高温破坏后,以及加入疏水性动态键聚合物并80℃高温破坏后的活性情况。通过紫外分光光度法实时监测前10min对对硝基苯酚的水解情况,结果表明,加入疏水性动态键聚合物并80℃高温破坏后的脂肪酶活性较未被高温破坏的原始脂肪酶的活性还要高,说明该方法制备的动态键聚合物能够保持并提高酶的活性。

[0029] 实施例2:一种基于多酰胺键的动态键聚合物恢复碳酸酐酶热稳定性的方法,包括如下步骤:

[0030] 1) 称取16.2mg (0.1mmol) 均苯三甲醛,112.5mg (0.075mmol) 氨基封端聚乙二醇 (mw = 1500),以及109.3mg (0.015mmol) PAMAM树枝状聚合物(1.0代,20wt.%于甲醇),依次加入含20mL甲醇溶液的圆底烧瓶中,并置于60℃回流3天,进行亚胺生成反应。

[0031] 2) 反应结束,用减压蒸馏法除去所有溶剂,并加入5mL蒸馏水,获得浓度为20mM的动态键聚合物溶液待用。

[0032] 3) 将3.0mg碳酸酐酶(来源于牛红细胞,EC 4.2.1.1)溶于1mL蒸馏水,利用紫外分光光度计法,测量碳酸酐酶在室温对对硝基苯酚的水解速率,作为酶的活性指标。此后,将该碳酸酐酶水溶液在80℃下放置10min,并用同样方法测量酶对对硝基苯酚的水解速率,发现活性明显降低。

[0033] 4) 将50μL步骤2) 所得动态键聚合物加入活性明显降低的碳酸酐酶水溶液中,室温静置0min、20min、40min、60min后分别测量碳酸酐酶对对硝基苯酚的水解速率,发现20min后其活性恢复到高温破坏之前的情况,并随着时间的延长,活性有进一步提高。

[0034] 附图2是因高温而失活的碳酸酐酶在加入含多酰胺键的动态键聚合物后,其活性随时间得到恢复的情况,通过紫外分光光度法记录其对对硝基苯酚的水解情况,结果显示,静置20min后,碳酸酐酶的活性恢复到原始碳酸酐酶的活性水平,之后活性继续提高,直至60min时,对对硝基苯酚的水解速率是原始碳酸酐酶的活性的3倍;说明该方法制备的动态键聚合物能够恢复并大幅度提高酶的活性。

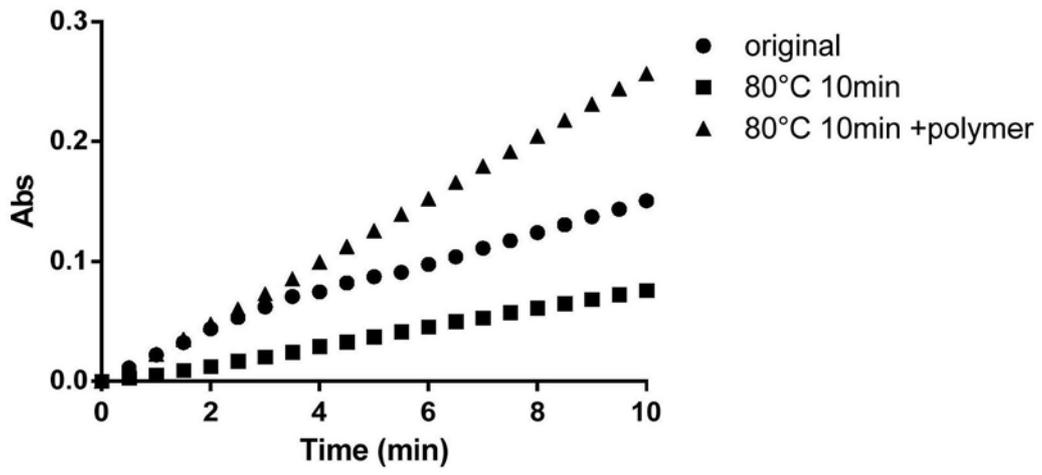


图1

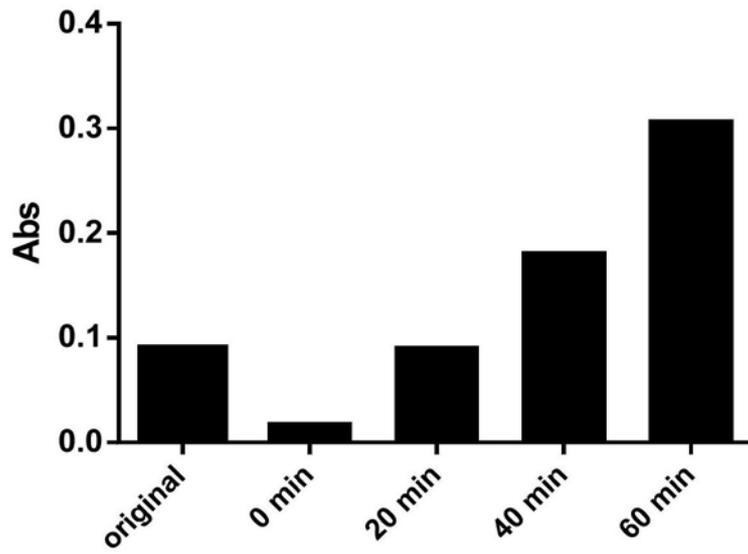


图2