

明胶/PEG 制备多孔块状 SiO₂ 载体及葡萄糖淀粉酶的固定

王彦芳¹ 陈 奇^{*,1,2} 叶蕊芳³ 宋 鹂² 张金朝² 候凤珍²

(¹ 华东理工大学超细材料制备与应用教育部重点实验室, 上海 200237)

(² 华东理工大学无机材料系, 上海 200237)

(³ 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 本文通过溶胶-凝胶法, 以正硅酸乙酯、聚乙二醇和明胶为主要原料, 制得了孔径约为 20 nm 的生物酶载体用多孔 SiO₂ 块状材料, 并着重研究了热处理温度对多孔 SiO₂ 载体的结构和酶活力的影响。明胶的加入能有效地防止 SiO₂ 表面羟基在烧结过程中的失活现象, 提高了多孔材料的吸附能力。制备过程中未加入明胶样品(G0)的酶吸附量和初始酶活力回收率的最高值分别为 90 mg·g⁻¹ 和 11%; 加入质量分数为 15% 明胶的样品(G15)的酶吸附量和初始酶活力回收率分别提高到 115 mg·g⁻¹ 和 38% 以上。经过 5 次重复使用后, G15 载酶块体所显示的酶活力还高于 G0 载酶块体的初始酶活力。600 °C 热处理后所制得的 G15 样品表现出较好的综合性能, 此类多孔块体材料便于酶的回收、保存和再利用。

关键词: 多孔 SiO₂; 明胶; 溶胶-凝胶; 酶载体

中图分类号: O613.72; TQ171

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2007)11-1959-06

Synthesis and Glucoamylase Immobilization of SiO₂ Monolithic Carriers by Addition of Gelatin/PEG

WANG Yan-Fang¹ CHEN Qi^{*,1,2} YE Rui-Fang³ SONG Li² ZHANG Jin-Chao² HOU Feng-Zhen²

(¹ Key Laboratory for Ultrafine Materials of Ministry of Education, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

(² Department of Inorganic Materials, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

(³ State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: Mesoporous SiO₂ monoliths with pore diameter of ~20 nm for enzyme immobilization were synthesized via sol-gel route by using tetraethoxysilane (TEOS), polyethylene glycol (PEG) and gelatin as raw materials. Effect of heating temperature on the structure and enzyme activity of porous SiO₂ monoliths was studied. Gelatin was added to prevent hydroxyl groups on pore surface of SiO₂ monolith from deactivation in heating process, and therefore to retain the strong absorption ability of SiO₂ monoliths. The maximums of glucoamylase loading and activity retention were 90 mg·g⁻¹ and 11% for sample without adding gelatin (G0), whereas the minimums of glucoamylase loading and activity retention of the sample with 15wt% gelatin content (G15) were 115 mg·g⁻¹ and 38%. The enzyme activities of G15 samples after reuse for 5 times was still higher than the primary enzyme activities of G0 samples. Sample G15 heated at 600 °C exhibits better overall performance and such SiO₂ porous monoliths for enzyme immobilization are easy to reclamation, reservation and recycle.

Key words: porous SiO₂; gelatin; sol-gel; enzyme carrier

收稿日期: 2007-07-16。收修稿日期: 2007-09-11。

上海市科委科技攻关项目(No.0252NM006)。

*通讯联系人。E-mail: qichen@ecust.edu.cn

第一作者: 王彦芳, 女, 25 岁, 硕士; 研究方向: 固定生物酶用多孔材料的合成。

0 引言

酶作为专一、高效的生物催化剂在生物反应工程、食品工业、医药等领域具有非常广泛和良好的应用前景^[1,2]。由于酶价格昂贵、反应条件苛刻、缺乏长期稳定性,游离酶存在难以回收利用等缺点^[3],将酶进行有效的固定化一直是酶工程领域的研究热点。固定化酶既能够保持游离酶的高度专一性及高催化活性,同时还具有使酶得到重复利用、产物分离纯化简便等优点。

多孔材料由于比表面积大,应用为酶载体能有效地提高单位体积载酶量以及酶活性^[4]。多孔有机酶载体具有丰富的表面功能团^[5],但高聚物本身易于被微生物污染、重复利用性差,且高分子材料耐高温和化学稳定性较差。无机载体有很好的热、化学稳定性,孔结构较易控制,并具有良好的生物相容性^[6]。

目前合成固定酶无机载体材料的研究集中在介孔粉体材料,如 SBA-15(孔径为 2.6 nm)^[7]、MCM-41(孔径为 6.4 nm)^[8]等,但这些材料孔径较小,不利于酶的固定。另一方面,粉体材料如果应用在工业连续化生产上,不易分离,而且易流失,在一定程度上会影响酶的回收利用。因此,块状多孔载体材料应用在酶固定方面将会有较好的实用价值,但迄今这方面的研究甚少。

前期研究表明^[9,10],用聚乙二醇作造孔剂,可以制备出孔径较大的 SiO₂ 块状多孔材料。这种块状材料易于回收和再利用,适合于工业化批量生产。SiO₂ 多孔材料具有吸附能力是由于其表面的羟基基团^[11,12],然而羟基基团在高温下(>400 °C)会由于相互间不可逆的脱水作用,形成桥氧结构,从而影响 SiO₂ 材料对酶的吸附能力。因此希望通过引入分解温度较高的有机物在烧结过程中保护 SiO₂ 表面羟基,从而进一步提高该类材料的载酶量及酶活力,目前此方面的研究还鲜见报道。

本文在有机无机杂化的基础上^[9],以正硅酸乙酯为初始原料,用聚乙二醇作介孔造孔剂,并首次以明胶作为烧结过程中的辅助材料,通过溶胶-凝胶法使有机/无机相杂化达到分子级均匀,凝胶后经过模压成型、中温热处理去除造孔剂和明胶后制得多孔 SiO₂ 块状材料。由于明胶的分解温度为 300~600 °C^[13],同时无毒、廉价、易得^[14,15],因此可作为较理想的烧结过程中的辅料。另外,选择工业中常用

的酶——糖化酶,利用物理吸附法进行固定。研究了明胶的引入以及热处理温度对于多孔样品的结构、水热稳定性及对葡萄糖淀粉酶活力的影响。

1 实验部分

1.1 多孔 SiO₂ 块体的制备

正硅酸乙酯(TEOS, 98%)为分析纯,由上海凌峰化学试剂有限公司生产;N,N-二甲基甲酰胺(DMF)为分析纯,由上海试剂一厂生产;无水乙醇(EtOH)为化学纯,由上海振兴化工一厂生产;聚乙二醇 2000(PEG)和明胶(Gelatin)均为化学纯,由国药集团化学试剂有限公司生产。

首先在室温下将 TEOS、H₂O、DMF 和 EtOH 按照物质的量比 $n_{\text{TEOS}}:n_{\text{H}_2\text{O}}:n_{\text{DMF}}:n_{\text{EtOH}}=1:10:0.86:1$ 进行配制,搅拌 1 h 后,加入 PEG 与乙醇的混合液,其中 $w_{\text{PEG}}/w_{\text{TEOS}}=15/85$,得到透明均匀的溶胶液。然后放入 50 °C 烘箱至溶胶的粘度达到 16 mPa·s 时,再将质量分数为 10% 的明胶水溶液添加到上述预凝胶中,其中明胶的加入量为 $w_{\text{Gelatin}}:w_{(\text{TEOS}+\text{PEG})}=15:100$ 。磁力搅拌 30 min 后,放入 80 °C 烘箱中至凝胶。然后取出磨粉、压块成型,最后在不同的温度下热处理 2 h。制备过程中不加明胶的样品定义为 G0,加入 15% 明胶的样品定义为 G15。

1.2 样品表征

采用上海市天平仪器厂 WRT-1 型热失重分析仪对凝胶进行热失重(TG)分析,氮气气氛,升温速率为 10 °C·min⁻¹;使用 Nicolet IR58SXC Fourier 变换红外光谱仪以 KBr 压片法测试了样品的 FTIR 谱,测试范围为 4 000~400 cm⁻¹;使用 Micromeritics ASAP2010 型物理自动吸附仪(BET)以及 Micromeritics AutoPore IV9500V1.06 型压汞仪对多孔块材的比表面积、孔体积和孔径分布进行测定。

1.3 载酶样品的制备

本实验所用的葡萄糖淀粉酶是由无锡赛德生物工程有限公司提供,酶活力为 100 000 U。样品经 130 °C 干燥后称重,然后浸泡在稀释 10 倍的酶液中,于 40 °C 恒温水槽中振荡 24 h,取出后用湿布擦去表面酶液再称重,根据质量差计算出样品对酶液的吸附量(浸泡前后酶液浓度没有变化)。载酶样品放入 5 °C 冰箱中保存待用。

1.4 酶活力的测定^[16]

固定化酶活力定义:在 pH=4.6、温度为 40 °C 时,1 mL 固定化葡萄糖淀粉酶液每小时水解 $w=2\%$

的淀粉所产生的葡萄糖毫克数表示为 U。

反应液是由 10 mL 的 $w=2\%$ 的淀粉溶液和 5 mL 的 pH=4.6 的醋酸缓冲液混合而成。在 40 ℃ 水浴中加热 10 min 后,加入载酶块体,在 40 ℃ 恒温反应 10 min。反应结束后,取出块体,然后立刻将反应液在沸水中煮沸 10 min,终止酶反应。生成的葡萄糖量采用 3,5-二硝基水杨酸法,使用上海棱光技术有限公司 Spectrumlab 54 紫外可见分光光度计(UV-Vis Spectrophotometers)进行测定。

2 结果与讨论

2.1 样品的结构

图 1 为 G0 和 G15 样品的热失重曲线。G0 和 G15 样品在 100 ℃ 之前的失重是吸附水和乙醇挥发引起的。G0 样品在 170~250 ℃ 范围内出现的失重,是样品中 PEG 分解所致,PEG 在 300 ℃ 之后已经分解完全。G15 样品在 250~590 ℃ 的范围内仍有失重,这是加入的明胶分解引起的;600 ℃ 之后 G15 热失重曲线趋于水平,明胶已经基本分解完全。

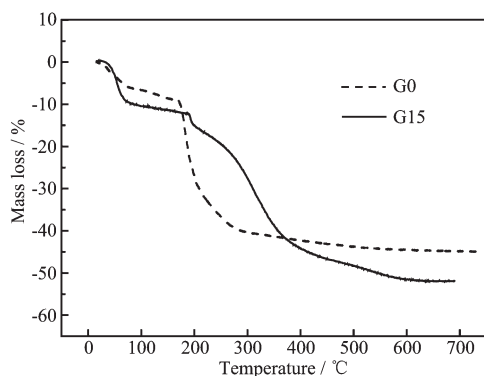


图 1 G0 和 G15 干凝胶的热失重曲线

Fig.1 TG curves of G0 and G15 dried gels

图 2 为 G15 样品经过不同温度处理、G0 样品经过 600 ℃ 处理以及纯明胶的红外图谱。在纯明胶(Gelatin)的红外图谱中,1 650、1 550、1 460 cm⁻¹ 处的振动吸收是由明胶中酰胺(-CONH₂)引起的^[17],3 100~3 600 cm⁻¹ 处宽广的吸收峰是明胶中氨基之间形成氢键引起的。在 50 ℃ 的 G15 样品的红外图谱中存在明显酰胺(-CONH₂)的特征吸收峰,另外在 960 cm⁻¹ 处存在 Si-OH 振动吸收峰,在 1 220、1 098、800、460 cm⁻¹ 处存在 Si-O-Si 的振动吸收峰^[18]。G15 样品在经过 400、500、600、700 ℃ 热处理后,红外图谱中 1 550、1 460 cm⁻¹ 吸收峰消失,说明明胶中蛋白质在高温作用下已经变质;同时 1 650 cm⁻¹ 处吸收峰变

窄,明胶在高温热处理下已逐渐烧失,此处为水的振动吸收峰。同 600 ℃ 热处理后的 G0 样品的红外图谱相比,G15 经过 400、500、600 ℃ 热处理的样品在 960、3 310 cm⁻¹ (H₂O)处存在明显的吸收峰。这是因为纯 SiO₂ 表面羟基在经过高温(>400 ℃)烧结后,会由于相互间的脱水作用,形成桥氧结构^[11,12],这个过程是不可逆的。因此,经过高温烧结 SiO₂ 表面羟基会失去活性,表面吸附性能下降;而加入明胶后,明胶分解温度较之 PEG 高,当 PEG 分解形成孔洞后,明胶依然包覆在 SiO₂ 孔表面,随着温度继续升高,明胶继续分解直至 600 ℃ 基本分解完全。在这个过程中,明胶保护了 SiO₂ 表面羟基,使其能在高温烧结后,依然保持活性。由图 2 可见,700 ℃ 热处理后的 G15 样品中,960 cm⁻¹ 的 Si-OH 峰相比经过 400、500、600 ℃ 热处理的 G15 样品减弱,这是由于在 700 ℃ 的热处理温度下,明胶早已烧失, SiO₂ 表面羟基裸露在外,因而相互间发生脱水作用。

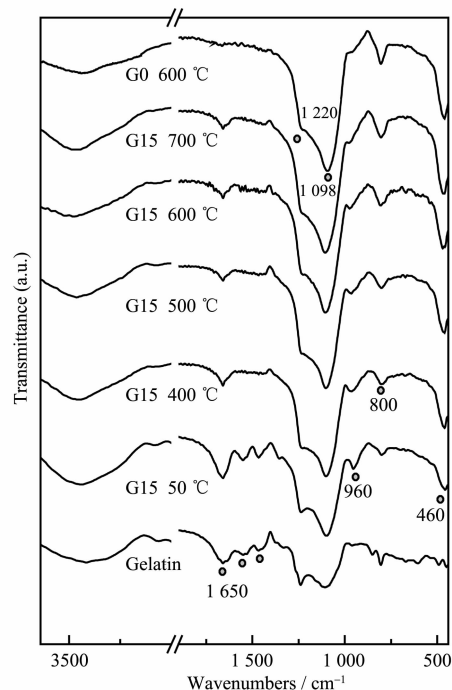


图 2 明胶以及 G0、G15 样品不同热处理温度下的红外图谱

Fig.2 IR spectra of gelatin, G0 sample heated at 600 ℃ and G15 samples after heat-treatment at different temperatures

图 3 为 G0 和 G15 样品经过 600 ℃ 处理后测得的氮气吸附-脱附等温线和孔径分布图。2 个样品的吸附-脱附等温线同属于 IV 型等温线,并且有相似的滞后环,说明样品都具有狭缝状孔道,明胶的加

人对介孔孔型基本没有影响。此外,从孔径分布图中可以看出,明胶的加入对介孔孔径分布也影响不大。表 1 是通过 BET 方法测得的 G0 和 G15 样品的孔结构数据。明胶的加入略微的增加了平均孔径,同时降低了孔体积和比表面积。

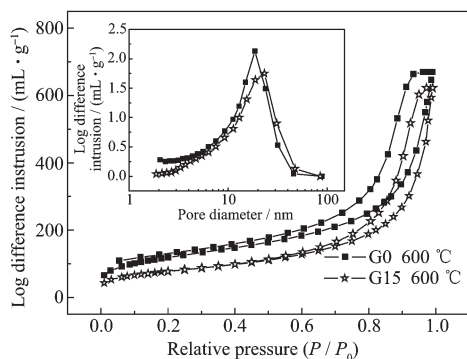


图 3 600 °C 处理后 G0 和 G15 样品的氮气脱附-吸附曲线和孔径分布图

Fig.3 Pore diameter distribution of G0 and G15 samples after heat-treatment at 600 °C measured by BET method

图 4 和表 2 分别为压汞法测得的 G15 样品经过不同温度热处理后的孔径分布曲线和孔结构数

据。所有样品的介孔都集中在~20 nm,这些孔是样品中 PEG 烧失形成的。从表 2 可以看出,样品的平均孔径随着热处理温度的提高出现了先减小后增大的趋势。随着烧结温度的增高,样品不断的致密化,平均孔径有所下降;同时孔表面包覆的明胶不断分解,孔径又有所提高。样品的比表面积在 G15 600 °C 时出现最大值,此时的孔体积也较大。

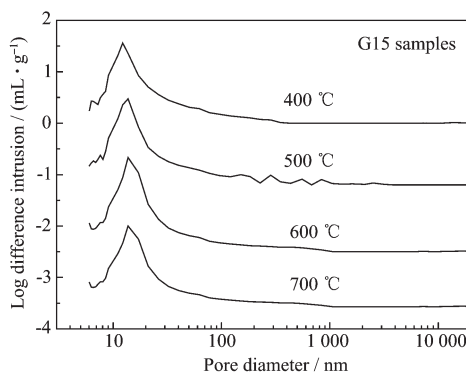


图 4 G15 样品经过不同温度处理后利用压汞法测得的孔径分布图

Fig.4 Pore diameter distributions of G15 samples after heat-treatment at different temperatures measured by mercury intrusion porosimetry

表 1 BET 方法测得的 G0 和 G15 样品经过 600 °C 处理后孔结构数据

Table 1 Pore structure of G0 and G15 samples after heat-treatment at 600 °C measured by BET method

Sample	Pore volume / (cm ³ ·g ⁻¹)	Specific pore area / (m ² ·g ⁻¹)	Average pore diameter / nm
G0 600 °C	0.85	424	10.0
G15 600 °C	0.72	311	12.4

表 2 压汞法测得的 G15 样品经过不同温度热处理后的孔结构数据

Table 2 Pore structure of G15 samples after heat-treatment at different temperatures measured by mercury intrusion porosimetry

Sample	Pore volume / (cm ³ ·g ⁻¹)	Specific pore area / (m ² ·g ⁻¹)	Average pore diameter / nm
G15 400 °C	1.06	202	21
G15 500 °C	1.00	218	18
G15 600 °C	1.04	232	18
G15 700 °C	1.03	216	20

2.2 样品的酶活力

图 5 为 G0 和 G15 样品经过不同温度热处理后的载酶量。经过不同温度热处理后,G15 样品的载酶量均大大高于 G0 样品,这归因于明胶加入后 SiO₂ 表面吸附能力的提高(见图 2)。G15 样品的载酶量在 500 °C 热处理温度时出现最大值,600、700 °C 递减,这是由于明胶分解完全后,SiO₂ 表面羟基裸露在外,烧结温度越高,失活现象越严重。图 6 为不同样品的初始酶活力回收率。固定化酶活力回收率

是指固定化酶所显示的酶活性占被固定的等当量游离酶总活性的百分数。G15 经过不同温度热处理后样品的固定化酶初始酶活力回收率均高于 G0 样品。这是由于 G0 样品载酶量较低,单个酶分子通过多个活性基团与载体发生吸附,从而降低了酶分子与底物的结合能力。

对于固定化酶来说,其最重要的性能之一就是重复使用性,这将有效的降低工业生产中的费用。为了评估这一性能,固定化酶载体在使用后从反应

液中取出,用湿布将块体表面液体擦去后,放入冰箱中保存,每隔 1 d 取出,重新置入新的反应液中测定其酶活性。这个过程连续 5 次。图 7 是载酶块体重复使用对于酶活力的影响图。载酶块体经过多次使用后,由于蛋白质的变性导致的酶失活以及固定化酶的流失,载酶块体的酶活力会逐渐降低。经过 5 次重复使用后,G15 载酶块体所显示的酶活力还高于 G0 载酶块体的初始酶活力,这归因于明胶在烧结过程中对 SiO_2 表面活性羟基的保护作用。在制备过程中加入明胶,经过热处理过程后 SiO_2 表面仍存在具有吸附活性的羟基,通过氢键吸附的酶越牢固,故经过多次使用后保持的酶活力也会相应越高。对于 700°C 热处理后的 G15 样品,块体在第二次使用时酶活力大大下降。这是由于明胶在 600°C 已经分解完全, 700°C 的热处理温度下, SiO_2 表面羟基失活,固定化酶在第一次使用时脱落很严重。

酶反应一般是在液相中进行的,载体材料需要浸没在反应液中,因此对载体材料的耐水性有一定的要求。评估这一性能,不同明胶含量的块体经过

80°C 烘箱中干燥 24 h 后称重,放入 80°C 恒温水中静置 7 d,其中块体表面积和浸水容积比为 0.07 cm^{-1} 。取出后,放入 80°C 烘箱中干燥 24 h 后再称重,利用单位面积的失重来衡量样品的水热稳定性。图 8 是不同样品失重图。所有样品的质量损失均很小,显示所得样品具有良好的水热稳定性。明胶的加入,略微地增加了样品的失重,这是明胶烧结后剩余的微量残渣溶于水造成的。G15 样品随着热处理温度的提高,由于 SiO_2 网络结构的加强,失重量略微减小。

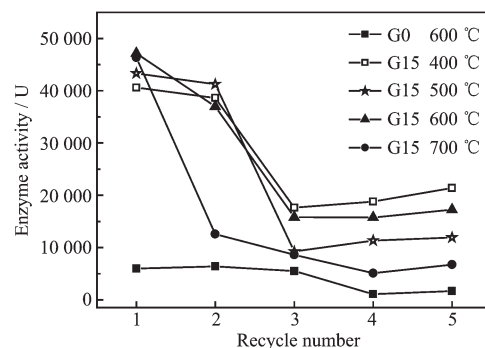


图 7 不同样品固定化酶的重复使用性

Fig.7 Reuse stability of glucoamylases immobilized on different samples

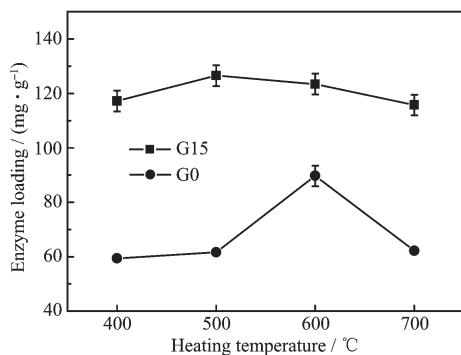


图 5 G0 和 G15 样品经过不同温度热处理后的载酶量

Fig.5 Glucoamylases loading of G0 and G15 samples after heat-treatment at different temperatures

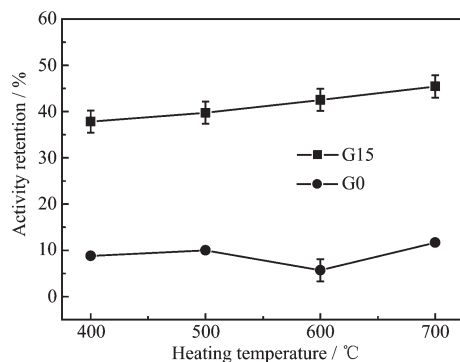


图 6 不同样品固定化酶的酶活力回收率

Fig.6 Activity retention of glucoamylases immobilized on different samples

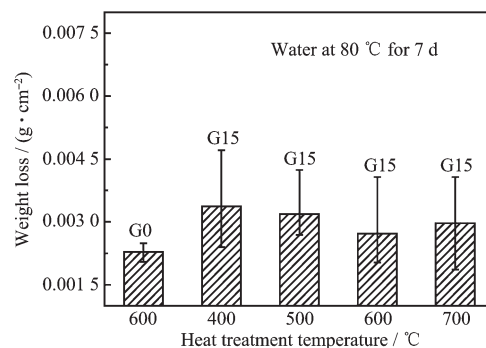


图 8 载体的水热稳定性

Fig.8 Hydrothermal stability of different samples

3 结 论

以正硅酸乙酯为初始原料,用聚乙二醇作介孔造孔剂,明胶作为烧结过程中的辅助材料,通过溶胶-凝胶法制得了孔径约为 $\sim 20\text{ nm}$ 的多孔 SiO_2 块状材料。明胶的加入对材料的孔型和孔径基本没有影响,但能有效地防止 SiO_2 表面羟基在烧结过程中的失活现象。

明胶的引入有效地增加了 SiO_2 的吸附能力,从而提高了载酶量和酶活性。G0 样品的酶吸附量和初始酶活力回收率的最高值分别为 $90\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和

11%; G15 样品的酶吸附量和初始酶活力回收率分别提高到 $115 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 38% 以上。经过 5 次重复使用后, G15 载酶块体所显示的酶活力还高于 G0 载酶块体的初始酶活力。说明此种方法制得的多孔块体材料便于酶的回收、保存和再利用。

参考文献:

- [1] Galante Y M, Formantici C. *Curr. Org. Chem.*, **2003**, **7**:1399~1422
- [2] Katchalski-Katzir E, Kraemer D M. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2000**, **10**:157~176
- [3] Bornscheuer U T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, **42**:3336~3337
- [4] Hartmann M. *Chem. Mater.*, **2005**, **17**:4577~4593
- [5] Boller T, Meier C, Menzler S. *Org. Process Res. Dev.*, **2002**, **6**:509~519
- [6] Tortajada M, Ramón D, Beltrán D, et al. *J. Mater. Chem.*, **2005**, **15**:3859~3868
- [7] Nowak I. *Colloid. Surface. A*, **2004**, **241**:103~111
- [8] Gómez J M, Deere J, Goradia D, et al. *Catal. Lett.*, **2003**, **88**:183~186
- [9] WANG Xiu-Quan(汪秀全), YANG Hong-Bin(杨洪斌), CHEN Qi(陈奇), et al. *Guisuanyan Xuebao(J. Chin. Ceram. Soc.)*, **2005**, **33**:975~979
- [10] YANG Hong-Bin(杨洪斌), CHEN Qi(陈奇), SONG Li(宋鹏), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2007**, **23**:164~168
- [11] Zhuravlev L T. *Langmuir*, **1987**, **3**:316~318
- [12] Kirkbir F, Murata H, Meyers D, et al. *J. Sol-gel Sci. Techn.*, **1996**, **6**:203~217
- [13] Zheng J P, Li P, Yao K D. *J. Mater. Sci. Lett.*, **2002**, **21**:779~781
- [14] Ye P, Xu Z K, Wu J, et al. *Biomaterials*, **2006**, **27**:4169~4176
- [15] Bele M, Gaberscek M, Drofenik J, et al. *Progr. Colloid. Polym. Sci.*, **2001**, **118**:177~179
- [16] Varavinit S, Chaokasem N, Shobsngob S. *World J. Microb. Biot.*, **2001**, **17**:721~725
- [17] Barreto P L M, Pires A T N, Soldi V. *Polym. Degrad. Stabil.*, **2003**, **79**:147~152
- [18] Vong M S W, Bazin N, Sermon P A. *J. Sol-gel Sci. Techn.*, **1997**, **8**:499~505