

亲水性交联聚合物载体的合成表征及其固定化 α -淀粉酶

蔡莉, 廖洋, 柴岚岚, 万芳, 马玉洁, 赵仕林¹⁾

(四川师范大学 化学与材料科学学院, 四川 成都 610066)

摘要: 选用丙烯酰胺(AM)、N-羟基琥珀酰亚胺为单体(NHS), 以N, N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)为交联剂, 以乙醇水溶液为制孔剂条件下进行反相悬浮聚合, 得到珠状共聚物载体, 该载体是一种新的酶载体形式, 在国内外的相关文献中均未见报道. 用红外光谱、扫描电子显微镜测定其结构和表观活性. 结果表明, 在固定单体配比 $[W(\text{AM})/W(\text{NHS}) = 10: 1]$ 和致孔剂用量的情况下, 测得交联剂用量为4%时, 交联聚合物载体的溶胀性最好(287.5%); 交联剂用量为5%时, 交联聚合物载体固定化 α -淀粉酶表现出高的表观活性(522.53 U/g). 测得固定化酶载体表现出良好的操作稳定性. 比较固定化酶和游离态酶的最适反应温度发现, 固定化酶的最适反应温度(70℃)比游离态酶高20℃; 固定化酶的最适反应pH值范围较游离态酶广.

关键词: 聚合物载体; 反向悬浮聚合; 固定化酶; α -淀粉酶

中图分类号: O643.3

文献标识码: A

近几十年来, 固定化酶技术取得了很大的发展, 固定化酶不但被广泛应用于食品、医药、精细化工等部门, 在临床医学、化学分析、污水处理以及有机合成等领域, 固定化酶的应用也越来越普遍^[1, 2]. 可用于固定化酶的材料很多, 合成树脂可以经受住微生物、酸碱环境中化学物质的作用, 有着出色的机械性能, 因而备受人们的重视^[3, 4], 其中聚丙烯酰胺凝胶因有亲水性能、理化性质稳定以及结构参数易控制等优点, 成为人们常用的固定化酶载体之一^[5, 6]. 酶的固定化方法有多种, 其中共价键结合法具有酶与载体结合较为牢固, 酶不易脱落及稳定性高, 易于重复循环使用等特点^[7]. 研究表明, 含有活性酯基的高分子聚合物, 可以与酶分子的氨基在温和条件下共价结合^[8], 降低固定化过程对酶活力的损失, 因而十分适用于工业固定化酶的生产.

α -淀粉酶是生物化工中广泛使用的生物酶, 常用于食品、酿造、发酵、纺织品和医药工业. 国内外关于 α -淀粉酶固定化的报道不少, 选用的载体有: 人造有机聚合物微球、高分子聚合物、有机分子筛等.

我们以丙烯酰胺、N-羟基琥珀酰亚胺为单体, 以N, N'-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 以乙醇水溶

液为制孔剂条件下进行反相悬浮聚合, 合成大孔珠状丙烯酰胺-N-羟基琥珀酰亚胺-N, N'-亚甲基双丙烯酰胺三元聚合物载体. 该载体有较强的亲水性、机械稳定性、溶胀性, 有利于酶的固定化. 该三元聚合物载体是一种新的载体形式, 在国内外的相关文献中均未见报道. 通过对于交联剂用量的改变, 测定交联聚合物载体的溶胀性和酶的表观活性的变化规律, 探讨N, N'-亚甲基双丙烯酰胺类高分子有机固定化载体的合成及其对 α -淀粉酶活性影响因素作了研究, 为新的固定化酶载体的合成及其应用提供了理论依据; 同时比较了固定化酶与游离态酶稳定性, 以及最佳反应温度、pH值等条件.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器 260-50型红外光谱仪(日本日立公司), SHY-2型恒温水浴振荡器(江苏金坛环保仪器厂), 721分光光度计(上海第三分析仪器厂), 恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂), KYKY-1000BSEM电子扫描显微镜(中国科学仪器厂).

1.1.2 主要试剂 丙烯酰胺(AM)(化学纯, 成都科龙化工试剂厂), N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(分析纯, 上海伯实生物科技有限公司), N, N'-亚甲基

收稿日期: 2005-12-19; 修回日期: 2006-05-19.

作者简介: 蔡莉, 女, 1977年生, 硕士.

1) 通讯联系人, E-mail: sys1997@163.com, Tel: (028)66139086.

双丙烯酰胺 (MBAA) (化学纯, 成都科龙化工试剂厂), Span 85 (企标, 浙江省温州市东升化工试剂厂), 过硫酸铵 (化学纯, 成都化学试剂厂), α-淀粉酶 (1000 U/g) (北京中科奥生物技术有限责任公司); 淀粉 (化学纯, 北京中科奥生物技术有限责任公司); 其它试剂均为分析纯或化学纯.

1.2 实验方法

1.2.1 载体合成 在装有搅拌器、导气管、温度计、冷凝管的四口瓶中, 加入一定量的复合分散剂 Span 85 和悬浮剂煤油, 再加入致孔剂乙醇水溶液和一定比例的 AM、NHS、MBAA, 以过硫酸铵为引发剂, 在氮气保护下进行反相悬浮聚合. 反应 10 h 后得到乳白色半透明珠体, 用乙醇充分洗涤抽提, 再用去离子水充分洗涤, 在室温下真空干燥至恒备用. 共聚合物用 GG(w) 表示, 其中 w 表示交联剂 MBAA 占单体总量的质量百分数.

1.2.2 红外光谱测定 用 KBr 压片法制样.

1.2.3 扫描电子显微镜对载体表面结构分析 分别对载体和固定化 -淀粉酶表面结构作电镜分析.

1.2.4 载体溶胀性的测定 精确称取 0.5 g 载体, 用 100 mL 去离子水浸泡 24 h. 将载体与水分离, 并除去吸附在载体表面的水, 精确称量. 载体的含水量可如下式计算^[9]:

$$\alpha\% = \frac{(W_w - W_d)}{W_d} \times 100\%$$

式中: W_w 为湿态的载体重量, W_d 为干态的载体重量.

1.2.5 α-淀粉酶的固定化 将 30 mg 干燥载体用 3 mL pH 值为 6.20 的 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液溶胀 24 h. 吸干吸附在载体上的液体后加入 α-淀粉酶溶液 (用 pH 值为 5.80, 0.2 mol/L 醋酸盐缓冲溶液配制), 于 50 °C 水浴中搅拌振荡反应 24 h^[10]. 固定化酶用 pH 值为 5.80, 0.2 mol/L 醋酸盐缓冲溶液洗 4 次, 吸干液体以备活力测定.

1.2.6 固定化 α-淀粉酶的活力测定 用紫外-可见分光光度法, 通过 3, 5-二硝基水杨酸对还原糖进行显色反应来测定固定化 -淀粉酶的活力. 以 0.1 mol/L, pH 为 5.60 的柠檬酸缓冲液为反应介质, 以 1% 淀粉溶液为反应原料, 在 40 °C 恒温水浴反应 30 min. 以每分钟水解淀粉产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活单位. 文中固定化酶表现活性以固定化酶的干重计算.

$$P = \frac{A_{520} \times V \times n}{w \times t}$$

式中: P 为每克固定化酶的活力单位 (U/g); A_{520} 为反应液在 520 nm 处的吸光度; V 为反应液的体积 (mL); n 为反应液稀释的倍数; w 为固定化酶干重的质量 (g); t 为酶促反应的保温时间 (min).

1.2.7 固定化酶的活力回收的计算 移取用于固定化酶的原始酶溶液 1 mL, 测定其活力, 据此可计算出固定化酶的原始酶溶液的总活力. 测定相应的固定化酶活力, 活力回收按下式计算:

$$ARA = \frac{u}{u'} \times 100\% = \frac{A_{520}}{t \times v \times c \times G}$$

式中: ARA 为固定化酶的活力回收, u 表示固定化酶总活力, u' 表示加入酶液的总活力, A_{520} 为测试上层清液的吸光度, t 为酶促反应的保温时间 (min), G 为酶粉的比活力, v 为酶原液体积 (mL), c 为酶原液浓度 (mg/mL).

1.2.8 固定化酶的重复使用性 采用交联度为 4.5% 的共聚合物载体与 -淀粉酶搅拌振荡反应 24 h 后, 将固定化酶与 1% 淀粉溶液反应 15 min. 反应混合物与固定化酶分离, 用少量缓冲液洗涤固定化酶. 将反应产物显色, 测其吸光度. 洗后的固定化载体继续同底物反应, 重复上述操作.

2 结果与讨论

2.1 载体的红外光谱图

图 1 是 AM 与 NHS 质量比 10: 1、交联剂

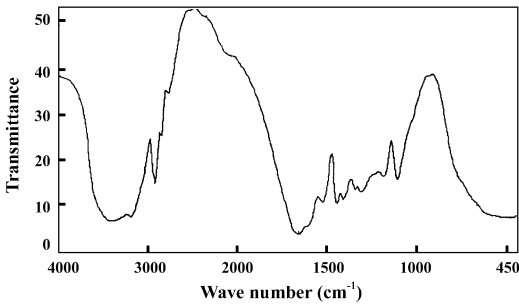


图 1 GG(4.5) 的红外光谱图

Fig. 1 FT-IR spectrum of GG(4.5) copolymer

MBAA 用量为 4.5% 所得共聚合物 GG(4.5) 的 FT-IR 图谱. 图谱中 AM 的特征吸收峰有 NH_2 剪式振动 ($1\,640\,cm^{-1}$) 和 NH_2 反对称和对称伸缩振动 ($3\,200\,cm^{-1}$), 表明 AM 参与了聚合. NHS 的特征吸收峰有 C = O 伸缩振动 (由于环状化合物张力效应和空间位阻效应使 C = O 振动频率提高到 $1\,670\,cm^{-1}$)

和 N-O 伸缩振动($1\,414\text{ cm}^{-1}$), 表明 NHS 参与了聚合. MABB 的酰胺基团有两个特征吸收峰(由 C=O 伸缩振动引起的酰胺谱带 $1\,600\text{ cm}^{-1}$ 和 CONH 的 N-H 键弯曲振动引起的酰胺谱带 $1\,528\text{ cm}^{-1}$), 表明 MABB 也参与了共聚反应. GG(4.5) 图谱中

$2\,100\sim 2\,800\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带归属于聚合物骨架主链 C-H 的振动吸收谱带.

2.2 SEM 分析

图2是对干燥后的载体以及固定化酶表面结构所作的电镜分析. 由图所见GG(4.5)共聚物有较好

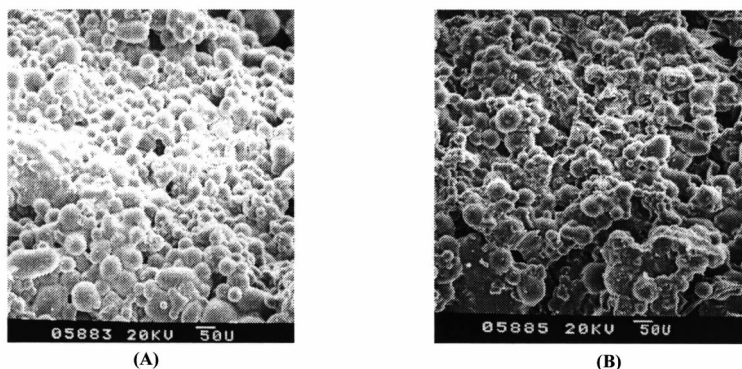


图 2 载体和固定化酶的 SEM 图

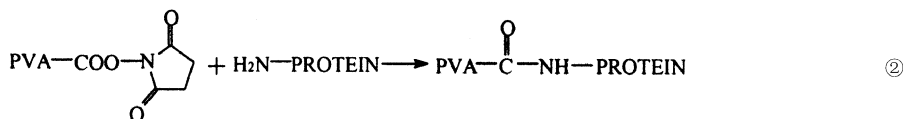
Fig. 2 SEM photographs of copolymer

(A) carrier, (B) immobilized α -amylase

的球形度, 根据 SEM 图比例尺, 聚合物粒径在 $0.375\sim 0.625\text{ mm}$ 之间. 比较固载前后载体表面有明显变化, 说明载体与酶之间有很好的结合.

2.3 载体固定化酶方法讨论

丙烯酸胺与交联剂 N, N'-亚甲基双丙烯酸胺发生交联反应, 然后在接入了 N-羟基琥珀酰亚胺形成活性酯基.



更为彻底. 在聚合物中加入一定量的交联剂, 可以形成不溶性的网状结构, 能有效改善共聚物载体的性能. 固定两种单体的配比 $[\text{W}(\text{AM})/\text{W}(\text{NHS}) = 10: 1]$ 和致孔剂的用量, 交联剂的用量对固定化酶载体溶胀性的影响情况如图 3.

由图 3 可知, 随着交联剂用量的增大, 共聚物载体在水中的溶胀性呈现先增加后减少的变化规律. 在交联剂质量分数为 4% 时, 载体的溶胀性达到最高值(287.5%). 在交联度低于 4% 时, 聚合物载体的机械强度很低, 几乎为凝胶, 其孔容和平均孔径均很小, 水分子不易进入其中, 从而导致聚合

根据文献[8]对于 N-羟基琥珀酰亚胺酯的合成条件、基本特性的研究, 以及聚合物 N-羟基琥珀酰亚胺酯可在温和条件下与蛋白反应, 使蛋白以共价键结合方式固定在聚合物上, 且包被时间短, 包被量大的结论. 按 1.2.4 中的方法将 α -淀粉酶固定化.

2.4 交联剂用量对固定化酶载体溶胀性的影响

作为固定化酶载体, 需要具有良好的亲水性, 使它在水溶液中能够充分溶胀, 使分子链松散, 有利于酶分子进入载体网络与载体上的活性基团发生反应; 另一方面, 溶胀性较好的载体还有利于大分子底物由载体表面向内部扩散, 使酶促反应进行得

物载体的溶胀性较低. 在交联度大于 4% 以后, 随着交联剂用量的增加, 一方面亲水性单体的用量相对减少, 使共聚物在水中的亲水性下降, 因而水中的溶胀性能也随之下降; 另一方面, 随着交联剂用量的增加, 出现相分离所用的时间延长, 分子链相互缠绕, 共聚物内部网状结构趋于致密^[11], 分子链在水中不易伸展, 其溶胀性能也就越低. 几种因素综合作用使得 GG 共聚物在交联度为 4% 时, 在水中的溶胀性处于最高值.

2.5 交联剂用量对固定化酶活性的影响

固定两种单体的配比 $[\text{W}(\text{AM})/\text{W}(\text{NHS}) =$

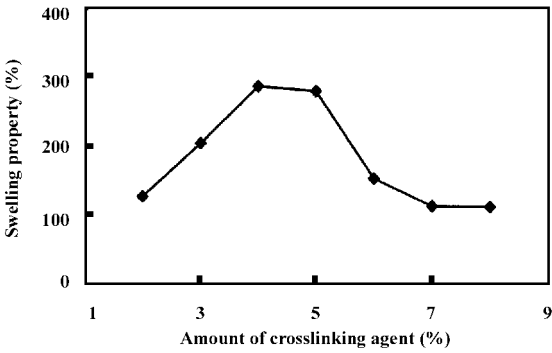


图3 交联剂用量对载体溶胀性能的影响

Fig.3 Influence of the amount of crosslinking agent on swelling property of W(AM)/W(NHS) = 10: 10: 1]和致孔剂的用量,交联剂的用量对固定化酶活性的影响情况如图4.由图4可知,随着交联剂

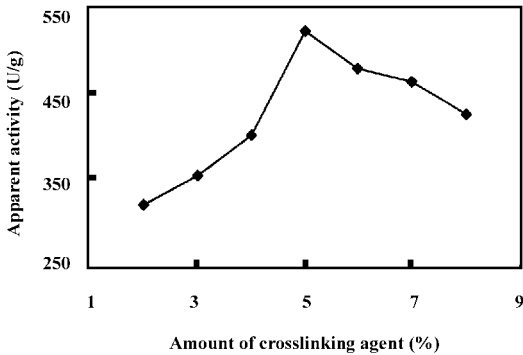


图4 交联剂用量对固定化酶活性的影响

Fig.4 Influence of the amount of crosslinking agent on the apparent activity of W(AM)/W(NHS) = 10: 1 用量的增大,固定化酶表观活性呈现先增加后减少的变化规律,当交联剂的用量为5%时,载体固定化酶表观活性达到最高值(522.53 U/g).其变化趋势同交联剂的用量对固定化酶载体溶胀性的影响趋势基本吻合.这种变化趋势可能是由于理论上改变交联剂用量,共聚物的平均孔径和孔容会随着交联剂用量的增加而减少,而比表面积会随之增大的原因.当交联剂用量低于5%时,聚合物有较大的孔径,较低的比表面积,表面的活性酯基团密度较高,酶分子与载体结合后,可能与多个活性酯基团结合,形成多点连接,引起酶失活,导致在交联剂用量较低时固定化酶的活性较低.当交联剂的用量高于5%时,共聚物的比表面积较大,但孔径较小,一方面不利于固定化酶载体与底物分子接触,另一方面随表面积增加,表面的活性酯基团数目也偏低,同时在水中的溶胀性也偏低,使得固定化酶的活性下降.

2.6 温度对固定化酶活性的影响

将游离态酶和固定化酶与底物在不同温度下反应,测定酶的活性,结果如图5.游离态酶相对活

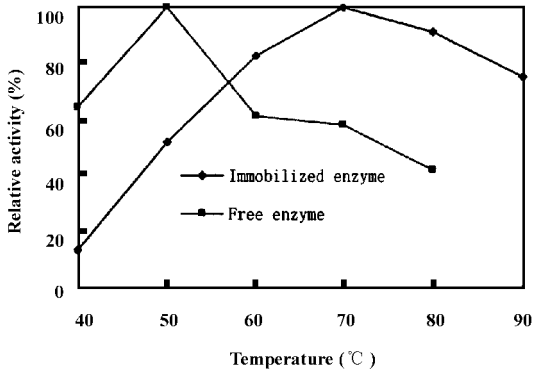


图5 温度对固定化酶和游离酶活性的影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on the enzyme activity 力为100%时的酶活为750 U,固定化酶相对活力为100%时的酶活为525 U.游离态酶的最适反应温度为40~50℃周围,当超过50℃,其活性迅速下降.固定化酶的最适反应温度为70℃左右,比游离态酶提高了20℃.这可能是由于α-淀粉酶被共价交联在载体上,使其刚性增加,为使其更好地发挥活性与底物分子结合,就必须提高温度以增加其柔性.

2.7 pH 值对固定化酶活性的影响

在70℃条件下,将游离态酶和固定化酶与底物在不同pH值条件下反应,测定酶的活性,结果如图6.游离态酶相对活力为100%时的酶活为750

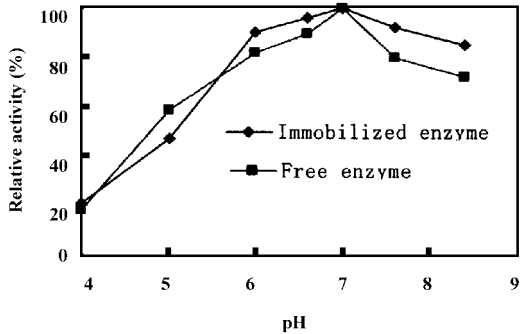


图6 pH 值对固定化酶和游离酶活性的影响

Fig.6 Effect of pH on the immobilized enzyme and free enzyme on the support U,固定化酶相对活力为100%时的酶活为503 U.实验表明,在本文的测试条件下,游离态α-淀粉酶的最适pH值为6.97,与文献相符.固定化酶的最适pH值与游离态α-淀粉酶的最适pH值基本一致.

同时从图 6 中可明确地看出, 在 pH 值 6.0 ~ 8.4 范围内, 固定化酶的相对活性明显高于游离态酶, 说明固定化酶的最适 pH 值范围比游离态酶宽.

2.8 酶溶液浓度对固定化的影响

用 0.1 mol/L pH 7 的磷酸缓冲溶液配置不同酶

浓度的溶液, 再按照 1.2.5 中的方法将其固定化. 测试结果表明, 将酶浓度升高, 相应的酶活力也升高, 但活力回收降低(见表 1). 这可能的由于酶溶液浓度升高使酶分子上的氨基同聚合物载体上的活性酯基的反应平衡移动, 使树脂上可以固定更多的

表 1 酶溶液浓度对固定化的影响

Table 1 Effect of enzyme concentration on the activity of immobilized enzyme on GG(4.5)

[E] (mg · mL ⁻¹)	t (h)	Activity of immobilized enzyme (U · g ⁻¹)	Retention of activity (%)
2.0	20	112	52.0
4.0	20	196	47.6
6.0	20	340	44.5
8.0	20	390	31.9
10.0	20	425	17.2

酶. 对于较高浓度的酶液, 载体网络结合酶蛋白的绝对值固然增大, 但对于整个酶液, 结合量却相对降低. 正是由于结合酶蛋白的总量在增加, 酶的活力才有所提高. 但固定化酶的活力回收则呈下降趋势, 这是因为在较高酶蛋白结合量的情况下, 载体网络上酶分子间较为拥挤, 并不是每一个固载酶分子都有机会与底物结合, 因此导致固定化酶活力回收下降^[6]. 一般来说, 固定化酶的表现活性主要影响催化效率, 活力回收主要影响催化成本. 从实验结果综合考虑将酶液浓度控制在 4 mg/ml 时效果最佳.

2.9 酶的热稳定性

将游离态酶和固定化酶置于 0.1 mol/L pH 7 的磷酸缓冲液中, 分别在不同温度下保温 5 h 后, 迅速置于冰水中冷却至相同温度. 再将游离态酶和固定化酶与底物在 70 °C 条件下反应 30 min 测定其活性, 结果见图 7. 游离态酶相对活力为 100% 时的酶活为 750 U, 固定化酶相对活力为 100% 时的酶活为 505 U. 游离态酶在 50 °C 以下可以保持较好的稳定性, 当温度高于 50 °C 时, 其活性迅速下降. 固定化酶的稳定性随温度的增加变化幅度较小, 在 80 °C 保温处理后仍可以保持 75% 的活力. 在热稳定性方面固定化较游离态酶好. 这是因为固定化后酶分子之间、以及酶和载体分子之间的相互作用使得酶分子结构刚性增强, 因而抗热变形能力增强, 游离

酶由于缺乏这些作用力, 因此热稳定性较差^[12].

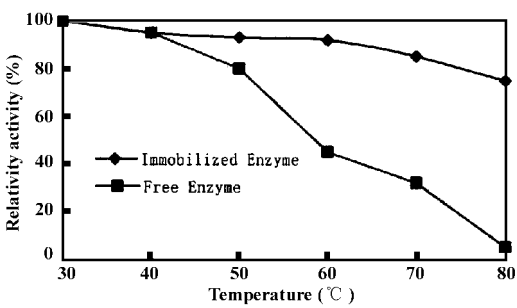


图 7 固定化酶和游离酶热稳定性比较

Fig. 7 Thermal stability of immobilized enzyme and free enzyme

3 结 论

以丙烯酰胺、N-羟基本琥珀酰亚胺为单体, 以 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 以乙醇水溶液为制孔剂条件下进行反相悬浮聚合, 得到大孔珠状聚合物生物催化剂的载体, 其交联剂的用量对固定化酶载体的溶胀性和固定化酶的活性有较大影响. 通过多次实验发现, 在单体的配比 W (AM)/W (NHS) = 10: 1 和致孔剂用量一定的情况下, 交联剂用量为单体总量的 4% 时, 其溶胀性最好; 交联剂用量为单体总量的 5% 时, 固定化酶表现活性最强; 说明交联剂的用量对聚合物载体的性能有较大的影响. 在对于固定化酶和游离态酶最适反应温度

和 pH 值比较中, 固定化酶均表现出更优越的性能. 从工业应用的角度考虑, 生产过程中采用廉价、无毒的煤油作为悬浮剂, 乙醇水溶液作为制孔剂, 整个生产过程绿色、环保, 在制备工艺、成本以及环境影响方面有较强的竞争力.

参考文献:

- [1] TanaKa A, Tosa T, Kaboyashi T. Industrial Application of Immobilized Biocatalysts [M], Marcel Dekker, New York, 1993
- [2] Faber K. Biotransformation in Organic Chemistry, 3rdEdn[R], Springer Verlag, Berlin, 1997, 345
- [3] Jolanta B, Andrzej T, Andrzyzj N. *J. Chem. Technol. Biotechnol*[J], 1993, **57**(1): 73
- [4] Maria Chong A S, ZhaoX. S. *Catal. Today*[J], 2004, **93** ~ **95**: 293 ~ 299
- [5] WuYun Gao-Wa(乌云高娃), Lu Guan-Zhong(卢冠忠), Guo Yun-Long(郭杨龙), *et al. Acta. Chim. Sin.* (化学学报)[J], 2002, **60**(3): 504 ~ 508
- [6] Gong Wei-Zhong(龚伟中), Wei Jia-Qian(魏甲乾), Zhou Jian-ping(周剑平), *et al. J. Mol. Catal.* (分子催化)[J], 2004, **18**(4): 291 ~ 294
- [7] Xue Ping(薛屏), Lu Guan-Zhong(卢冠忠), Guo Yun-Long(郭杨龙), *et al. Chem. J. Chin. Univer.* (高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(2): 361 ~ 365
- [8] Hu Zi-wen(胡子文), Xie Jia-li(谢家理), Wang Ke-tai(王科太), *et al. J. Sichuan Univer.* (四川大学学报)[J], 2002, **40**(2): 310 ~ 3 014
- [9] Huang Jia-xian(黄家贤), Li Yue(李悦), Huo Yan-li(霍岩丽), *et al. Chem. J. Chin. Univer.* (高等学校化学学报)[J], 2002, **23**(8): 1 605 ~ 1 609
- [10] Chen Yu-quan(陈毓荃). Method and Technique of Biochemistry experment(生物化学实验方法和技术)[M]. Beijing: Press of science, 2002, 8
- [11] Xue Ping(薛屏), Lu Guan-zhong(卢冠忠), Guo Yun(郭耘), *et al. Chin. J. Catal.* (催化学报)[J], 2003, **24**(10): 733 ~ 738
- [12] Jiang De-sheng(姜德生), Long Shen-ya(龙胜亚), Xiao Hai-yan(肖海燕), *et al. Chin. J. Appl. Chem.* (应用化学)[J], 2005, **22**(10): 1 122 ~ 1 126

Synthesis and Properties of Hydrophilic Copolymer Support for α -amylase

CAI Li, LIAO Yang, CHAI Lan-lan, WAN Fang, MA Yu-jie, ZHAO Shi-lin
(College of chemistry and material, Sichuan normal university, Chengdu 610066, China)

Abstract: Reactive, macroporous and beaded acrylamide(AM)-N-hydroxysuccinimide(NHS)-N, N'-methylene-bis acrylamide(MBAA) copolymers carrier of widely varying densities were synthesized with solution of ethanol as porogenic agent by inverse suspension copolymerization. This carrier has not been reported until now in the literature. The support structure and pore distribution were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscope. At fixed conditions of monomer [W(AM)/W(NHS) = 1: 10] and porogenic agent, immobilized enzyme swelling property of 287.5% was obtained with a polymer with ω = 4% crosslinking agent; immobilized enzyme activity of 522.53 U/g was obtained with a polymer with ω = 5% crosslinking agent. The activity of the immobilized enzyme reached a relatively steady value after the immobilized enzyme was used for 4 times. The effects of hydrolyzation condition such as pH, temperature on apparent activity of the immobilized enzyme were investigated. The results showed that the properties of immobilized enzyme were markedly better than that of free enzyme. The appropriate temperature of hydrolyzation of immobilized enzyme was 20 °C over that of free enzyme; while the appropriate pH of immobilized enzyme was wider.

Key words: Carriers of polymer; Inverse suspension copolymerization; Immobilized enzyme; α -amylase