

介孔 SiO₂ 的改性及对诺维信漆酶的交联固定化

王 磊¹ 陈 诚¹ 田美娟¹ 杨宇翔^{*,1} 罗健辉² 丁 彬² 王平美²

(¹ 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237)

(² 中国石油集团科学技术研究院, 北京 100083)

摘要: 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为模板剂, 四乙氧基硅烷(正硅酸乙酯, TEOS)为硅源, 硝酸为催化剂来制备介孔 SiO₂, 并采用后嫁接法对介孔 SiO₂ 进行氨基化改性。利用红外光谱(IR), X 射线粉末衍射(XRD), 差热-热重分析(DTA-TG), 扫描电镜(SEM), 元素分析, 微电泳法及 N₂ 吸附-脱附方法对改性前后的产物进行表征。结果表明氨基已成功嫁接到介孔 SiO₂ 孔道中, 改性后的介孔 SiO₂ 有序度有所下降, 但仍为介孔材料; 改性之后介孔材料的孔径、比表面积、孔体积均变小。等电点由原来的 2.74 变为 4.75。本文还以氨基修饰的介孔 SiO₂ 为载体, 通过交联剂戊二醛固定诺维信(Novozymes)工业级漆酶, 并采用正交设计法对固定化条件进行了优化。研究表明漆酶经固定化后, 其操作稳定性比游离酶高。

关键词: 介孔 SiO₂; 嫁接法; 改性; 固定化; 酶

中图分类号: O613.72; Q814.2; X592

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2013)04-0677-12

DOI: 10.3969/j.issn.1001-4861.2013.00.118

Modified Mesoporous Silica: Synthesis and Immobilization Function for Novozymes Laccase

WANG Lei¹ CHEN Cheng¹ TIAN Mei-Juan¹ YANG Yu-Xiang^{*,1}

LUO Jian-Hui² DING Bin² WANG Ping-Mei²

(¹Department of Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

(²Research Institute of Petroleum Exploration & Development (RIPE), CNPC, Beijing 100083, China)

Abstract: Mesoporous silica was prepared by using hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) as the template, tetraethoxysilane (tetraethylorthosilicate, TEOS) as the silicon source and nitric acid as the hydrolysis catalyst. The obtained sample was then modified via post grafting method. The mesoporous silica before and after modification was characterized by IR, DTA-TG, XRD, SEM, elemental analysis, micro-electrophoresis and N₂ adsorption-desorption. The results show that the mesoporous silica has been modified by amino-groups, the material after modification still belongs to a family of mesoporous materials in spite of a slight decrease in the order degree. The surface area, pore size and pore volume become smaller, and the isoelectric point is decreased from 2.74 to 4.75 after the modification. The commercial Novozymes laccase is successfully immobilized in the inner surface of amino-functionalized mesoporous silica in this work by using glutaraldehyde as the crosslinking agent. The conditions of immobilization on amino-functionalized mesoporous silica were optimized by means of orthogonal experimental designs. The results show that the operational stability of the immobilized enzyme is significantly improved in comparison with the free enzyme.

Key words: mesoporous silica; post-synthesis grafting method; modification; enzymes; immobilization

收稿日期: 2012-09-04。收修改稿日期: 2012-12-12。

中国石油天然气集团公司科学研究与技术开发项目《纳米级智能化学驱油剂研制》(2011A-1001)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: yxyang@ecust.edu.cn, Tel: (021)64253294

0 引言

介孔二氧化硅材料具有较大的比表面积,孔径连续可调和分布窄,较高的热稳定性和机械稳定性,表面可进行基团官能化,与酶亲和力强,负载酶量大,常被用作载体应用于酶的固定化。基于不同孔道结构的 MCM-41, MCM-48, M41S 和 BAS 已被用于酶的固定化^[1]。

介孔 SiO₂ 材料的表面含有 3 种硅醇键,即自由硅醇键、双羟基硅醇键和水合硅醇键^[2-3],其中前两者具有高的化学反应活性,而水合硅醇键则没有化学活性,不能发生化学反应,但水合硅醇键受热可以转变成自由硅醇键,具有化学活性的硅醇键是介孔材料表面化学改性的基础。对介孔材料表面进行有机硅烷修饰改性主要有 2 种途径:即原位法和后嫁接法。原位法需考虑带官能团的和不带官能团烷氧基硅烷的缩合情况,如 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)和四乙氧基硅烷(正硅酸乙酯,TEOS)的缩合,它们须保持相似的水解速率,否则不能形成均相的凝胶,接上的官能团也不能均匀分布,反应不易控制,表面活性剂不能完全通过溶剂萃取去除掉,接上官能团的比率不高。后嫁接法是将氨基嫁接到经过煅烧及酸活化的介孔分子筛,避免了表面活性剂对固定化酶的失活作用^[4]。经过氨基改性的介孔 SiO₂ 因其高密度的氨基官能团和均匀的孔道,可作为合适的载体固定生物大分子,应用于分离,催化和传感器等领域^[5-6]。

自 1996 年诺维信(Novozymes)第一个推出需要媒质介入的漂白用工业级漆酶(DeniLite®)以来,已经成为全球最大的工业酶制剂公司。漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,属于蓝色多铜氧化酶家族^[7]。铜离子位于漆酶的活性中心,在催化氧化过程中起决定作用。由于漆酶在传递电子的介体(ABTS)帮助下具有氧化非酚型的木素模型化合物,吸引了许多科学家研究漆酶的纸浆及印染的生物漂白。漆酶在工业中主要用于造纸及纺织业。如在造纸业用漆酶进行脱除木质素及进行纸浆的无氯漂白;在印染行业用漆酶对染色或印花废水进行脱色处理。但游离漆酶在使用过程中易随环境的变化变性失活,且不易从反应体系中分离重复使用,这在一定程度上限制了漆酶的工业化应用。

酶固定化技术是实现酶重复连续使用和改善其稳定性的有效手段,因此漆酶的固定化研究引起

了人们的广泛关注。Zhu 等^[8]以磁性介孔二氧化硅为载体,采用共价交联法固定化漆酶,并研究了其性质。结果表明,固定化漆酶热稳定性、操作稳定性均较高,并且降低了对 pH 值变化的敏感性。Osiadacz 等^[9]使用聚丙烯酰胺凝胶包埋来源于 T.Versicolor 的漆酶,固定化酶的活性回收率为 40%,它可以较高的效率催化氧化分解 4-甲基-3-羟基邻氨基苯甲酸和丁香醛连氮。Lei 等^[10]研究了棒状的 SBA-15、传统的 SBA-15、蜂窝状的 MMM 和片状的 MM 等 4 种形态结构对溶菌酶固定化的影响,但对其它形貌对漆酶固定化的影响均未见报道。

本工作采用后嫁接法对介孔 SiO₂ 进行改性,以改性后的介孔 SiO₂ 为载体,采用甲基磺酸活化,用戊二醛做交联剂,使 Novozymes 工业级漆酶得以固定,对固定化条件进行了优化,并研究了固定酶稳定性和载体表面性质对固定酶活性的影响,系统地研究了圆盘状、圆球状,椭球与毛虫混合形状,绳状、球状、囊泡、管状等 6 种形貌对漆酶固定化的影响。对 Novozymes 工业级漆酶固定化研究的结果表明,管状介孔结构的 SiO₂ 为载体固定酶的活力最好,固定酶比自由酶具有更好的热稳定性、贮存稳定性和操作稳定性。

1 实验部分

1.1 试剂

十四烷基三甲基溴化铵,十六烷基三甲基溴化铵,十八烷基三甲基溴化铵,硝酸,甲苯,无水乙醚,甲烷磺酸,四乙氧基硅烷(tetraethoxysilane,即正硅酸乙酯,TEOS),水杨醛,3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),无水乙酸,无水醋酸钠,二甲氧基酚(以上均为 A.R.级,国药集团化学试剂有限公司),漆酶(工业一级,中国 Novozymes 公司),戊二醛(BR(Biological reagent)级,上海凌峰试剂有限公司)。

1.2 仪器

X 射线粉末衍射(XRD)用日本 Rigaku D/max 2550 VB/PC 型 X 射线衍射仪(Cu 靶 K α 线, $\lambda=0.154\ 18\ \text{nm}$,工作电压为 40 kV,电流为 40 mA,扫描范围 2 θ 为 0°~10°,扫描速率 1°(2 θ)·min⁻¹)测定。样品的红外光谱采用 KBr 压片法,Nicolet 510P FT 红外光谱仪测定,波数范围为 4 000~400 cm⁻¹,分辨率为 2 cm⁻¹。样品的热分析采用 NETZSCH STA 449C 型热分析仪(空气气氛,20~800 °C,升温速率为 10 °C·min⁻¹),样品的形貌和尺寸采用日本 Hitachi s4800 场发射

扫描电子显微镜在加速电压为 15.0 kV 进行测定。用 ASAP2405N 物理吸附仪测定介孔 SiO₂ 的表面积和孔径分布,其表面积通过 p/p_0 在 0.05~0.3 范围内的吸附数据,并用 BET 方程计算而获得。煅烧后介孔 SiO₂ 的孔结构分布则根据 BJH 法由吸附等温线计算得到。

1.3 介孔 SiO₂ 的合成和改性

1.3.1 不同链长模板剂在酸性条件下合成介孔

SiO₂

用 TEOS 为硅源,长链烷基三甲基溴化铵(C_nTMABr, $n=14, 16, 18$)为模板剂,硝酸为水解催化剂,室温条件下反应。分别将一定量的长链烷基三甲基溴化铵(C_nTMABr, $n=14, 16, 18$)溶解在适量去离子水中,然后加入 6.25 mL 浓度为 2 mol·L⁻¹ 的 HNO₃ 溶液。在 30 ℃ 下混合搅拌至溶液澄清。接着缓慢滴加 1.74 mL TEOS,继续搅拌 24 h 后,将产生的白色固体沉淀过滤、冲洗、室温下干燥。在 550 ℃ 下煅烧 6 h,升温速率为 2 ℃·min⁻¹,得到白色粉末,样品分别命名为 C₁₄, C₁₆, C₁₈。另一种除模板方法是取 1 g 介孔 SiO₂,加入 100 mL 无水乙醇与浓盐酸体积比为 9:1 的混合液中,95 ℃ 回流 2 h,抽滤,重复一次萃取,分别命名为 C₁₄-萃取, C₁₆-萃取, C₁₈-萃取。

1.3.2 介孔 SiO₂ 的活化

取 1 g C₁₆ 样品于 50 mL 质量分数分别为 0%, 10%, 30%, 50%, 70% 的甲基磺酸水溶液中回流反应 4 h,停止反应后抽滤,洗涤至中性,真空干燥 2 h,所得产品分别对应为 C₁₆-A₀、C₁₆-A₁、C₁₆-A₂、C₁₆-A₃、C₁₆-A₄。C₁₄, C₁₈ 样品分别用 30% 甲基磺酸水溶液活化,产品分别对应 C₁₄-A₂, C₁₈-A₂。

1.3.3 介孔 SiO₂ 的改性

取 1 g C₁₄-A₂、C₁₆-A₀、C₁₆-A₁、C₁₆-A₂、C₁₆-A₃、C₁₆-A₄、C₁₆-萃取、C₁₈-A₂ 样品于 50 mL 干甲苯溶液中,缓慢滴加 1 mL APTES 后,在 125 ℃ 下搅拌回流 24 h 抽滤,固体粉末用无水乙醇洗涤,60 ℃ 下真空干燥 2 h。所得产品分别命名为 C₁₄-A₂-NH₂, C₁₆-A₀-NH₂, C₁₆-A₁-NH₂, C₁₆-A₂-NH₂, C₁₆-A₃-NH₂, C₁₆-A₄-NH₂, C₁₆-萃取-NH₂, C₁₈-A₂-NH₂。流程图如图 1 所示。

1.4 漆酶的固定化

在 25 ℃,称取 0.1 g 介孔 SiO₂ 样品与 10 mL 4% 的戊二醛反应 8 h,离心分离,洗去未反应的戊二醛,加入 1.5 g·L⁻¹ 的 10 mL 漆酶溶液和 10 mL pH=5.4 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液振荡反应 6 h 后,离心分离,洗涤,制得固定化漆酶,低温冷藏备用。

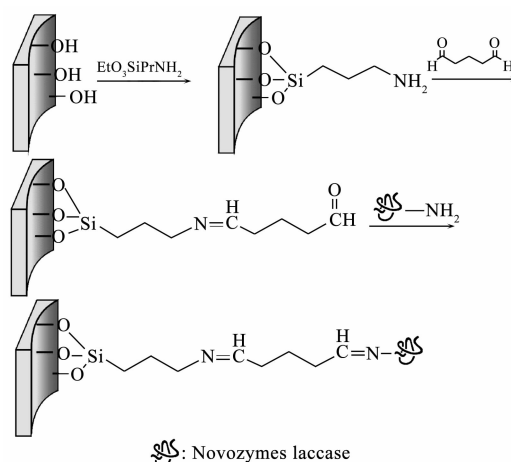


图 1 后嫁接法改性介孔 SiO₂ 和固定化酶流程图

Fig.1 Scheme for post grafting functionalization of mesoporous silica and enzyme immobilization

1.5 酶活力的检测

分别取 1 mL 新配制的漆酶溶液和 0.1 g 固定酶于 5 mL 4 mmol·L⁻¹ 愈创木酚溶液中,加入 5 mL pH=5.4 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液,在 30 ℃ 下恒温反应 30 min,反应后用高速离心机分离 1 min,用针筒吸取 5 mL 上层清液,注入比色皿,在 465 nm 下测其吸光度。参比溶液为 1 mL 煮沸酶液依次加入上述物质,在相同条件下反应 30 min。

$$\text{酶活力} = 1000X/t \quad (1)$$

X 为溶液吸光度, t 为酶促反应时间,单位为 min。

固定化酶的比活力可以按式(1)计算出来。

固定化酶比活力 = 固定酶的总活力 / 固定化酶的干质量

(2)

2 结果与讨论

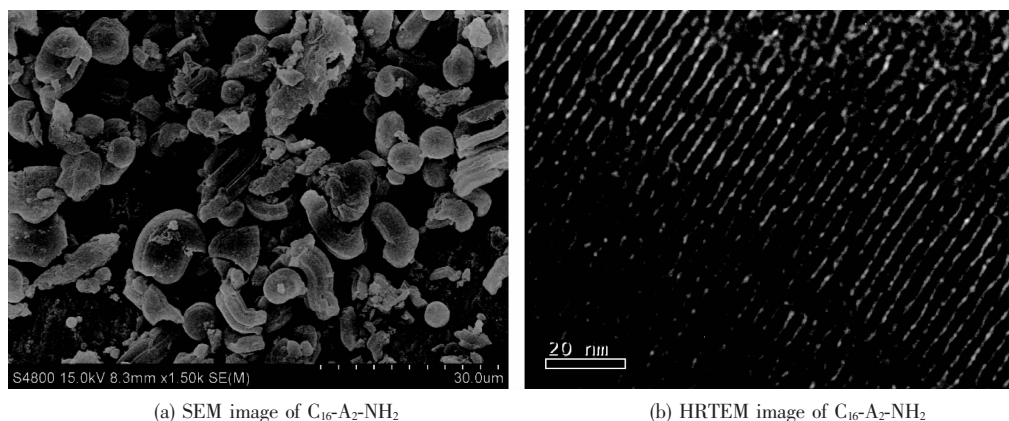
2.1 介孔 SiO₂ 的形貌及孔道结构

图 2a、2b 分别为介孔 SiO₂ 的扫描电镜图和高倍透射电镜图。从图 2a 可以看出介孔 SiO₂ 形貌为圆球状,椭球状和毛虫状的混合态,呈不均匀分布。从图 2b 可以看出,样品具有六方状排列的长程有序的介孔孔道结构,同时也有一些扭曲的非平行孔道,这些可能是因为形成了微米级圆球状,椭球状和毛虫状的介孔 SiO₂。

2.2 介孔 SiO₂ 载体的改性

2.2.1 改性前后介孔 SiO₂ 的红外光谱

图 3 是改性前(a)、后(b)介孔 SiO₂ 的红外图谱。由图 3 可看出改性前(谱 a)的介孔 SiO₂ 在 3460 cm⁻¹

(a) SEM image of $C_{16}-A_2-NH_2$ (b) HRTEM image of $C_{16}-A_2-NH_2$ 图 2 $C_{16}-A_2-NH_2$ 的 SEM 图和 HRTEM 图Fig. 2 SEM image and HRTEM image of $C_{16}-A_2-NH_2$

处的强而宽的峰为羟基的伸缩振动, $1\ 635\ cm^{-1}$ 处的峰为介孔 SiO_2 的自由吸附水的 H-OH 弯曲伸缩振动峰, $1\ 095\ cm^{-1}$ 和 $957\ cm^{-1}$ 处的峰为 Si-O-H 键的对称伸缩振动, 因此改性前的介孔 SiO_2 表面含有大量的羟基; $803\ cm^{-1}$ 和 $470\ cm^{-1}$ 处的峰为 Si-O-Si 键的对称伸缩振动和弯曲振动。

改性后的介孔 SiO_2 (谱 b) 在 $2\ 940\ cm^{-1}$ 处出现

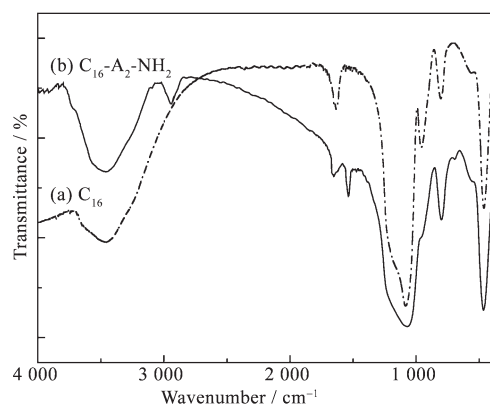
图 3 改性前后介孔 SiO_2 的红外图谱

Fig. 3 IR spectra of unmodified and modified mesoporous silica

了一个弱吸收峰, 为亚甲基的吸收峰, 这是由于介孔 SiO_2 表面的硅羟基与 APTES 上的三乙氧基发生脱羟基反应, 形成 $-Si-O-Si-CH_2CH_2CH_2-NH_2$ 。在 $1\ 652\ cm^{-1}$ 和 $1\ 537\ cm^{-1}$ 处出现了吸收峰, 为氨基的特征峰; 而在 $1\ 095\ cm^{-1}$ 的峰变弱, 同时 $957\ cm^{-1}$ 处的峰消失, 这是由于有机基团接到了介孔 SiO_2 颗粒上造成了 Si-O-H 键的分解; 在 $2\ 940\ cm^{-1}$ 处出现了较弱的 CH_2 的不对称伸缩振动峰。这些进一步说明了 APTES 的氨丙基接到了 SiO_2 上。

2.2.2 改性前后介孔 SiO_2 的热重分析

图 4 是改性前后 SiO_2 的 DTA-TG 图。表 1 是改性前后介孔 SiO_2 差热热重数据分析表。由图 4 和表 1 可知, 温度从室温升到 $200\ ^\circ C$ 左右, 介孔 SiO_2 孔道中自由吸附的水分子逐渐脱出, 对应的 TG 曲线, 改性前介孔 SiO_2 约有 6.78% 的失重, 改性后介孔 SiO_2 约有 $3.11\%\sim 3.41\%$ 失重。随着温度升高, $200\sim 600\ ^\circ C$ 区间改性样品失重约 $13.07\%\sim 13.45\%$, 是介孔 SiO_2 结合水脱出, 表面键合的氨丙基官能团从介孔孔壁脱出并在空气中氧化释放能量, 因此 DTA 在此区间出现了一个较强的放热峰, 同时相对于未

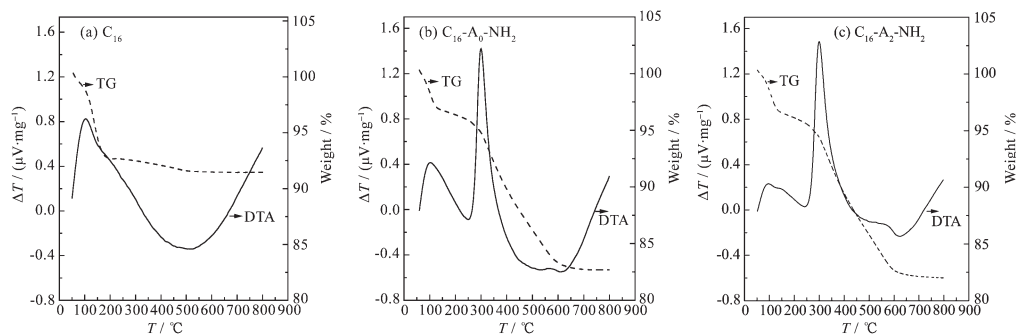
图 4 改性前后介孔 SiO_2 的 DTA-TG 图

Fig. 4 DTA-TG curves of unmodified and modified mesoporous silica

表 1 改性前后介孔 SiO₂ 差热重数据分析
Table 1 TG-DTA data of unmodified and modified mesoporous silica

Sample	Reaction	<i>T</i> / °C	Weight loss/%	Content/(mmol·g ⁻¹)
C ₁₆	SiO ₂ , H ₂ O			Physically absorbed water
	↓ -H ₂ O (adsorbed water)	80~200	6.78	3.77
	SiO ₂			Amount of residue 15.54
C ₁₆ -A ₀ -NH ₂	SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH ₂ , H ₂ O			Physically absorbed water
	↓ -H ₂ O (adsorbed water)	80~200	3.11	1.73
	SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH ₂			Loadings of amino groups
	↓ +O ₂	200~600	13.07	1.11
	SiO ₂ , CO ₂ , NH ₃			Amount of residue 13.88
C ₁₆ -A ₂ -NH ₂	SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH ₂ , H ₂ O			Physically absorbed water
	↓ -H ₂ O (adsorbed water)	80~200	3.41	1.89
	SiO ₂ -(CH ₂) ₃ NH ₂			Loadings of amino groups
	↓ +O ₂	200~600	13.45	1.14
	SiO ₂ , CO ₂ , NH ₃			Amount of residue 13.78

改性样品,其失重值增加,表明介孔 SiO₂ 表面接上有机基团。而未改性样品没有出现模板分子分解的失重峰,证明模板剂已经完全除去。当温度大于 600 °C 时,超过了介孔 SiO₂ 骨架收缩承受的最高温度,骨架逐渐破坏,吸收热量用于硅氧键的断裂,此区间样品质量趋于稳定。

2.2.3 改性前后介孔 SiO₂ 的 XRD 及组分分析

图 5 改性前 a、后 b 介孔 SiO₂ 的 XRD 衍射图。由图 a 可见改性前介孔 SiO₂ 在 2θ=2.5° 处有一个明显的衍射峰,在 2θ=4.3° 处又出现了一个弱的肩峰。这些峰分别为 SiO₂ 晶体的(100)面和(110)面产生的

衍射峰,这些衍射峰的存在说明合成的介孔 SiO₂ 具有较好的介孔结构,这与文献报道的具有六角对称特征典型介孔分子筛 MCM-41 的特征衍射峰相符合。这表明样品中的无机骨架是具有 MCM-41 特征的六方介孔结构^[11]。经过改性之后(图 b)发现 2θ=4.3° 的峰消失,2θ=2.5° 处的衍射峰仍然存在,这说明改性之后的样品仍为有序介孔材料,但是与未改性之前相比,有序度有所下降。这是由于硅烷化试剂覆盖在孔道内壁,对孔道有一定的破坏作用,引起晶格缺陷增多;同时也表明氨基已成功地修饰了材料孔道的内表面^[12]。

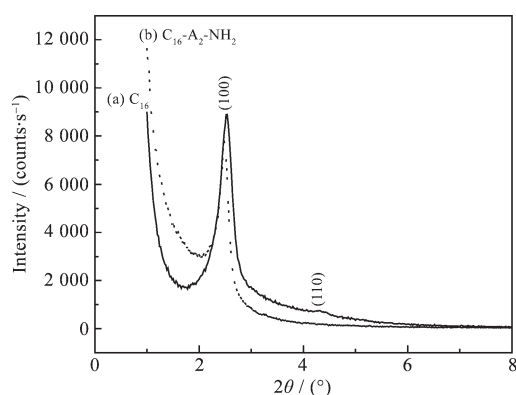
图 5 改性前后介孔 SiO₂ XRD 图

Fig.5 XRD pattern of unmodified and modified mesoporous silica

在对 SiO₂ 进行改性之前, 先对介孔 SiO₂ 进行了活化处理, 因介孔 SiO₂ 煅烧后, 硅羟基会缩水环氧化, 在酸的水溶液条件下回流, 环氧键又会重新打开, 使 SiO₂ 表面上的水合硅醇键转变为自由的硅醇键。我们采用甲基磺酸对介孔 SiO₂ 进行活化^[13], 因为甲基磺酸是一种催化能力较强的酸, 沸点较高, 反应温度下不挥发, 活化反应完毕后滤出的甲基磺酸溶液可重复使用。当甲基磺酸质量分数分别为 0%, 10%, 30%, 50%, 70% 时, 采用元素分析法测得氮元素的含量分别为 2.23%, 2.46%, 2.96%, 2.60%, 2.34% (图 6)。可以看出甲基磺酸的浓度升高到 30% 时, 得到的产物含氮量最高, 为 2.45 mmol·g⁻¹ SiO₂, 表明此条件下, 产物表面氨基含量达到最高。甲基磺酸的浓度大于 30% 以后, 氮元素的含量开始下降, 表明在此条件下, 产物表面氨基含量反而降低。这是由于甲基磺酸的浓度达到一定限度后, SiO₂ 表面的硅羟基数也达到最大值; 当甲基磺酸的浓度超过一定限度后, 多余的甲基磺酸能够提供 H⁺ 使 SiO₂ 表面的硅羟基发生缩合, 形成缩合的硅羟基^[14],

降低了 SiO₂ 表面硅羟基的活性, 实质上使 SiO₂ 表面的硅羟基数降低, 故导致了 SiO₂ 表面氨基含量的降低。本文中我们均采用 30% 的甲基磺酸对介孔 SiO₂ 进行活化。

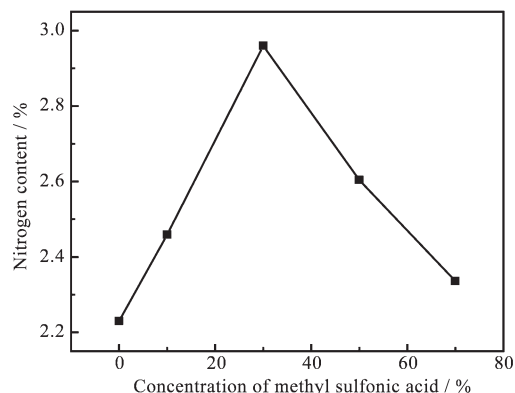


图 6 甲基磺酸浓度对氮元素含量的影响

Fig.6 Effect of methyl sulfonic acid concentration on the N content

2.2.4 改性前后比表面积、孔径分布和等电点变化

我们对改性得到的产物利用 N₂ 吸附-脱附方法检测 (图 7 I), 由图可见 C₁₆ 样品的 BET 面积为 1 260 m²·g⁻¹, 孔体积为 0.67 cm³·g⁻¹, 利用 BJH 法测得其孔径为 2.64 nm; C₁₆-A₂-NH₂ 样品的 BET 面积为 566 m²·g⁻¹, 孔体积为 0.39 cm³·g⁻¹, 利用 BJH 法测得其孔径为 2.30 nm。比对上述结果发现, 经过氨基改性后的介孔 SiO₂ 的比表面积、孔体积、孔径均变小。这是因为介孔 SiO₂ 经过修饰后, 有机官能团分别接合到了介孔材料的孔内壁和材料的外表面上, 导致一部分孔体积和表面被有机官能团占据, 所以 C₁₆-A₂-NH₂ 材料的比表面积、孔体积、孔径均变小。

我们利用微电泳法测试了改性前后的介孔 SiO₂ 表面 ζ 电位随 pH 值变化的曲线 (见图 7 II), 当 ζ 电位等于零时, 所对应的 pH 值即为等电点。依次

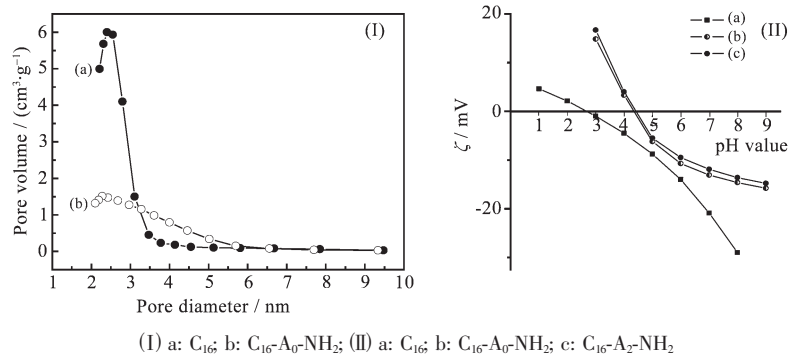
图 7 改性前后介孔 SiO₂ 的孔径分布(I)和 ζ 电位~pH 曲线图(II)

Fig.7 Pore size distributions (I) and ζ~pH curve(II) of unmodified and modified mesoporous silica

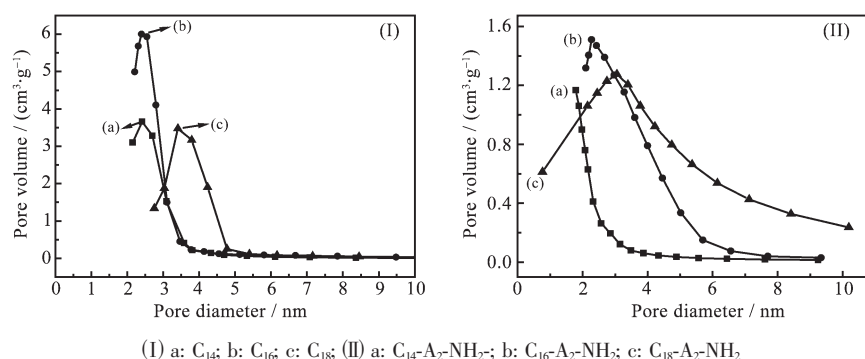


图8 不同链长表面活性剂制得样品(I)和改性样品(II)的孔径分布图

Fig.8 Pore size distributions of samples (I) and modified samples (II) prepared using surfactants with different carbon chain lengths

可以推算出,样品 C_{16} 的等电点为 2.74, 未经酸活化的 $\text{C}_{16}\text{-A}_0\text{-NH}_2$ 样品的等电点为 4.35, 而经过酸活化 $\text{C}_{16}\text{-A}_2\text{-NH}_2$ 样品的等电点为 4.75。相对于未经酸活化的 $\text{C}_{16}\text{-A}_0\text{-NH}_2$ 样品, 酸活化后样品的等电点明显向碱性方向移动, 这是因为经过酸活化的样品表面硅羟基数含量较高, 故表面氨基含量也较高, 导致其等电点变大。

图 8 为由不同链长表面活性剂制得样品的孔径分布图。从图 8 可看出, 由不同链长表面活性剂合成的介孔 SiO_2 对其孔径影响较大。用 C_{18}TMBR 制得的 C_{18} 具有大的最可几直径 3.41 nm, C_{18} 经过氨基改性后的 $\text{C}_{18}\text{-A}_2\text{-NH}_2$ 具有大的最可几直径 3.05 nm; 由 C_{14}TMBR 制得 C_{14} 发生毛细凝聚相对压力的位置靠前, 滞后环小, 相对应具有较小的孔径, 其最可几直径为 2.41 nm, C_{14} 经过氨基改性后的 $\text{C}_{14}\text{-A}_2\text{-NH}_2$, 其最可几直径为 1.98 nm; 由 C_{16}TMBR 得到 C_{16} 孔径介于二者之间, 最可几直径 2.64 nm, C_{16} 经过氨基改性后的 $\text{C}_{16}\text{-A}_2\text{-NH}_2$, 最可几直径 2.30 nm。综上所述, 可看出随着表面活性剂链长的增长, 制得

样品的孔径增大。

2.3 固定化酶条件的选择

2.3.1 戊二醛浓度和漆酶浓度对固定化酶活力的影响

图 9a 是固定化酶比活力随戊二醛浓度变化图。从图 9a 可看出, 当戊二醛浓度为 4% 时, 固定化酶的比活力达到最大。而当戊二醛浓度低于或高于 4% 时, 固定化酶的比活力均较低。这是由于戊二醛的两个醛基能与载体上的氨基和酶分子的氨基、羟基、巯基发生交联反应, 从而能够固定化酶。戊二醛浓度小于 4% 时, 由于交联度低, 这时介孔 SiO_2 上面的悬挂醛基量较少, 所结合的酶分子数量少, 所以固定化酶的比活力比较低; 当戊二醛浓度大于 4% 时, 交联介孔 SiO_2 上面悬挂的醛基量较多, 固定化反应剧烈, 悬挂醛基与酶分子上的氨基发生多点结合, 使漆酶的构象发生变化, 致使部分漆酶失活; 同时过量的戊二醛本身发生羟醛缩合, 固化成不规则物附在介孔 SiO_2 表面, 影响微球的表面孔结构, 阻止了酶分子与载体的结合。

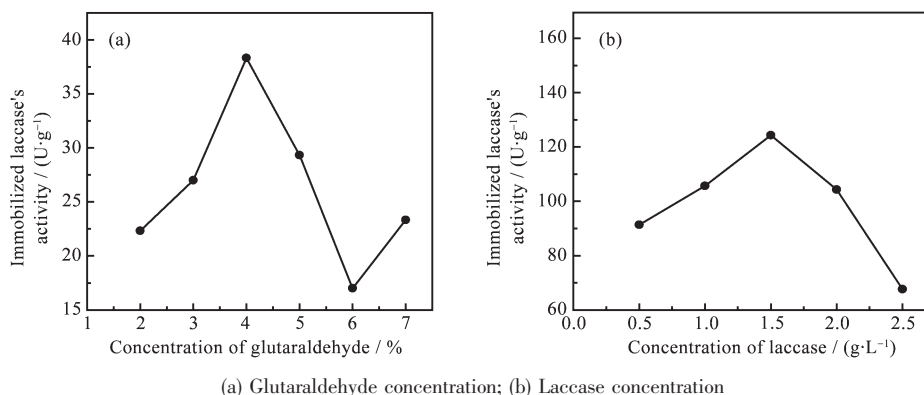


图9 戊二醛浓度、漆酶浓度与固定化酶活力的关系图

Fig.9 Relationship between glutaraldehyde concentration, laccase concentration and immobilized laccase's activity

图 9b 是固定化酶的比活力随着漆酶浓度变化图。从图 9b 可看出,固定化酶的比活力随着漆酶浓度的增加而增加,当浓度为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,比活力达到最大值,浓度继续增大,固定化酶的比活力反而下降。这是因为载体上面的活性基团数是一定的,在其结合位点未被饱和之前,固定化酶比活力随给酶量增加而增大,当结合位点被饱和后,有些酶分子进入载体孔深处,使底物扩散相对困难,因而,酶分子发挥作用的能力减弱,增加给酶量、却不增加酶活力。另一方面,当载体负载的酶量达到一定量后,如果继续增加给酶量,酶分子开始紧密聚集,相互之间空间重叠,造成酶活性中心空间结构发生变化,使之与底物结合时的空间阻碍增大,制得的固定化酶的比活力不会增加反而降低^[15]。这表明介孔 SiO_2 载体对酶蛋白的吸附、交联有一定的限度。

2.3.2 交联时间和固定时间对固定酶活力的影响

图 10a, 10b 分别为固定化酶活力与交联时间, 固定化时间的关系图。由图 10a 可知,当交联时间为 8 h, 固定化酶的比活力达到最大;交联时间小于或大于 8 h, 固定化酶的比活力均较低。戊二醛具有双功能基团,其一侧醛基与介孔 SiO_2 载体上的氨基

偶联后,就在载体表面出现游离醛基,当交联时间较短时,由于戊二醛不能充分与介孔 SiO_2 上面的氨基反应,致使载体表面的游离醛基含量较少,因而结合的酶分子数量也较少,所制得固定酶的比活力也较低。随着交联时间增加,载体表面醛基的含量明显增加,但是由于载体的氨基数量是一定的,所以结合的醛基数量达到一定程度后则趋于平衡,酶的固定量也相应地达到饱和不再增加,同时过多的醛基也会对酶产生毒害作用。

从图 10b 可以发现,当固定化时间为 6 h, 固定化酶比活力达到最大。而当固定化时间低于或高于 6 h, 固定化酶比活力均较小。这是因为固定化反应时间较短时,只有很少的游离酶被固定。在固定化时间为 6 h, 载体上面的游离醛基与酶分子接触的机会增大,反应进行的比较充分,所得的固定化酶的比活力开始增大。当继续增加反应时间时,由于载体上酶量的增多而使酶分子相对集中,空间位阻增大,酶活性位点受到限制,故影响了酶与底物的有效接触以及产物在溶液中的扩散,造成固定酶的比活力下降^[16];同时随着时间的延长,酶在该固定化环境中的失活比例增高,所以虽然固定化时间增加,而酶活却不增加。

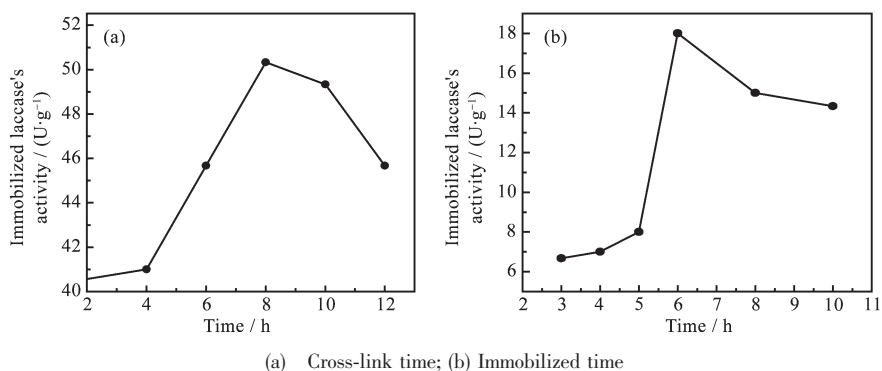


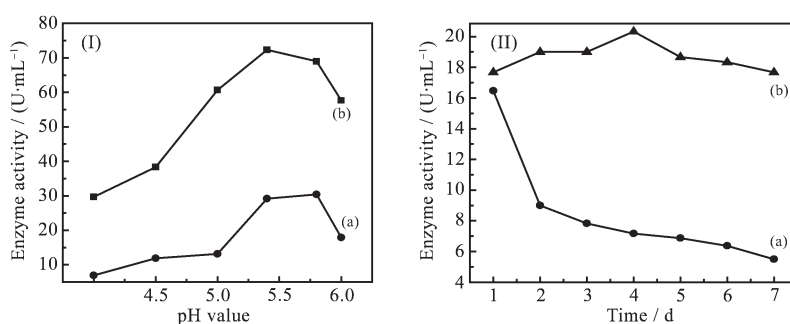
图 10 固定化酶活力与交联时间、固定化时间的关系图

Fig.10 Relationship between cross-link time, immobilized time and immobilized laccase's activity

2.3.3 固定化酶的最佳工作 pH 值

固定化反应过程中,溶液的 pH 值影响着载体和漆酶的离子化状态,从而影响着载体与酶的结合程度,造成固定化酶活力的差别。这是因为载体和漆酶间具有一定的静电作用,溶液的酸性影响载体表面带电基团的电性,也对漆酶所带电荷有一定影响,从而影响漆酶在载体上的固定量。同时,酶作为一种蛋白质,当溶液的 pH 值超过一定范围时,微观结构会发生变化,引起酶的失活。由文献^[17]可知,当

$\text{pH} \geq 7$, 漆酶将失活。酸度对漆酶活力的影响见图 11(I)。从图 11(I)可见,自由漆酶的最佳工作 pH 值为 5.8(见曲线 a),固定酶的最佳工作 pH 值为 5.4(见曲线 b),制得的固定酶的活力最大,固定酶的最佳工作 pH 值向酸性方向移动。这是由于介孔 SiO_2 表面具有游离的氨基,使得固定化酶周围的微环境呈弱碱性,因而要求溶液具有较自由漆酶最适作用低的 pH 值才能达到固定化酶的最适作用 pH 值;同时固定化后酶的空间结构受到载体的影响,更降低



(a) Free laccase, enzyme activity ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$); (b) Immobilized laccase, immobilized laccase specific activity ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

图 11 自由漆酶和固定酶的最佳工作 pH(I)及操作稳定性(II)

Fig.11 Optimal pH value of free laccase (I) and immobilized laccase (II)

了固定化酶对 pH 值变化的敏感性。

2.3.4 固定酶的操作稳定性

自由酶溶液和湿态固定酶在 4 °C 下保存 7 d 后,其活力变化见图 11(II)。由曲线 a 可见,随工作时间的延长自由酶溶液的活力明显下降,7 d 后活力仅为最初的 33.39%;而固定化酶的活力(曲线 b)明显高于自由酶,并且随工作时间的延长,固定化酶比活力虽然稍有波动,但基本上保持不变。这说明漆酶经 C₁₆-A₂-NH₂ 固定后,稳定性明显提高,克服了自由漆酶不稳定,易失活的缺点,使固定酶在实际操作中的重复使用成为可能。

综上所述,介孔固定漆酶的最佳反应条件为:在室温下,0.1 g C₁₆-A₂-NH₂ 样品与 10 mL 4%的戊二醛反应 8 h 制得交联载体,再与 10 mL 1.5 g·L⁻¹ 的漆酶溶液在 pH=5.4 的酸性环境中反应 6 h,制得的固定化酶比活力最高。介孔固定化漆酶有较高的操作稳定性,在 4 °C 下保存 7 d 后,酶活力基本保持不变。

2.4 载体的结构、表面性质对固定化酶活性的影响

2.4.1 载体的物理参数对固定酶活性的影响

由表 2 可知,随着表面活性剂链长的增加,样品的孔径,孔体积均增加,比表面、等电点降低,导致对漆酶的吸附量不同,从而固定化酶活力也不同。C₁₈-A₂-NH₂ 样品比表面积为 832 m²·g⁻¹,孔径为

3.05 nm,比 C₁₄-A₂-NH₂ 和 C₁₆-A₂-NH₂ 样品要大,较大的孔径与漆酶分子较为匹配,故有利于漆酶进入孔道吸附,所以其吸附量最大,酶活最高;而 C₁₄ 样品其孔径(1.98 nm)虽然较小,但其比表面积要比 C₁₆-A₂-NH₂ 大,这样可以有更多的外表面来吸附漆酶,所以其吸附量稍大于 C₁₆-A₂-NH₂;C₁₆ 样品其孔径介于其它两样品之间,比表面积最小,而漆酶分子的尺寸大于 C₁₆ 样品的孔径,因而难进入其孔道,而且 C₁₆ 样品的比表面积又小于 C₁₄ 样品,故其吸附量为最小,酶活最低。另外,酶的吸附量还与吸附剂的等电点有关。我们通过用微电泳仪测定样品 C₁₄、C₁₆、和 C₁₈ 在不同 pH 值下的 ξ 电位,求得样品的等电点分别为 5.90、4.75 和 3.48。样品的等电点值越小,酸强度越大,表面的羟基数就越多,使样品与漆酶中的 OH、NH₂ 或 C=O 基团作用增强,从而导致吸附量增加^[18],所以由此也可推出样品对漆酶的吸附量顺序为:C₁₈-A₂-NH₂>C₁₄-A₂-NH₂>C₁₆-A₂-NH₂,这个结果与固定酶活结果一致。

2.4.2 介孔材料表面氨基含量对固定酶活性的影响

由表 3 可知,当 C₁₆-A₂-NH₂ 样品(用 30% 甲基磺酸活化后接氨基),固定酶的活力最大,达到 102.88 U·g⁻¹。表面氨基含量越高,固定酶以离子键的形式结合的位点最多,固定的酶量越大,酶活越大。

表 2 不同链长表面活性剂制得样品物理参数对固定酶活影响

Table 2 Effect of physical properties of C₁₄, C₁₆, and C₁₈ on immobilized laccase's activity

Sample	C _n TMBBr ^a :H ₂ O: HNO ₃ :TEOS ^b	S _{BET} / (m ² ·g ⁻¹)	V _p / (cm ³ ·g ⁻¹)	Pore size / nm	Isoelectric point	Laccase's activity / (U·g ⁻¹)
C ₁₄ -A ₂ -NH ₂	1:1 828:9:5	583	0.29	1.98	5.90	76.53
C ₁₆ -A ₂ -NH ₂	1:1 963:9:5	566	0.39	2.30	4.75	65.93
C ₁₈ -A ₂ -NH ₂	1:2 094:9:5	832	0.43	3.05	3.48	135.23

^a C_nTMBBr, n=14, 16, 18; ^b Samples were synthesized with different C_nTMBBr:H₂O:HNO₃:TEOS molar ratios.

表 3 介孔材料表面氨基含量对固定酶活性的影响

Table 3 Effect of surface amino content of mesoporous SiO₂ on immobilized laccase's activity

Sample	C ₁₆ -A ₀ -NH ₂	C ₁₆ -A ₁ -NH ₂	C ₁₆ -A ₂ -NH ₂	C ₁₆ -A ₃ -NH ₂	C ₁₆ -A ₄ -NH ₂	C ₁₆ -extract-NH ₂
Surface amino content / (mmol·g ⁻¹)	1.85	2.04	2.45	2.16	1.93	1.74
Immobilized laccase's activity / (U·g ⁻¹)	65.93	75.57	102.88	73.03	30.93	25.63

而样品经煅烧后,直接嫁接氨基或者经甲基磺酸活化后嫁接氨基的酶活均比萃取后再嫁接氨基的酶活高,因为乙醇萃取除去模板剂后,介孔 SiO₂ 孔道中会保留有大量的表面硅羟基,形成氢键缔合的表面硅羟基^[14],实质上使 SiO₂ 表面的活性硅羟基数降低,故导致了 SiO₂ 表面氨基含量的降低。因而其比表面积会较焙烧后低,孔容和孔径小。这些硅羟基经过改性后接上氨基,孔容和孔径变的更小,因为阻碍了酶进入孔道,故吸附的酶量少,酶活较低。

2.4.3 不同形貌介孔材料对固定酶活性的影响

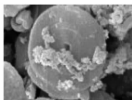
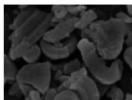
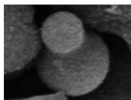
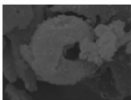
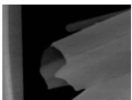
我们根据不同的方法合成了不同形貌的介孔 SiO₂,并研究了不同形貌的介孔 SiO₂ 对固定酶活性的影响。我们分别参考本课题组发表的论文合成了圆盘结构^[11]、绳状结构^[19]、球状^[8]、囊泡结构^[20]、管状结构^[11]等形貌的介孔 SiO₂,这些介孔 SiO₂ 都经过 30% 甲基磺酸活化后再接氨基,样品分别命名为 Y-A₂-NH₂,S-A₂-NH₂,Q-A₂-NH₂,N-A₂-NH₂,G-A₂-NH₂。

由表 4 可知,不同形貌的介孔 SiO₂ 对固定酶活的影响很大。其中管状介孔 SiO₂ 的酶活力最大,高达 838.17 U·g⁻¹,囊泡状介孔 SiO₂ 次之,圆盘状介孔 SiO₂ 酶活最小,只有 10.72 U·g⁻¹。影响酶的吸附量、活性和操作稳定性的因素很多,如酶分子的大小是否介孔材料的孔径相匹配、溶液的 pH 值、酶分子的等电点(pI)、载体表面性质以及介孔材料的形貌等对固定化酶的表现活性都有影响。酶的固定化要求介孔材料的孔径要与酶分子大小相匹配,载体对酶的负载量较高,固定化酶才具有较高的催化活性。

Yadav 等^[21]研究了多种脂肪酶在同一种六方型介孔材料中的固定。研究表明,CALB 脂肪酶的尺寸为 3.0 nm×4.0 nm×5.0 nm,其在介孔材料中的固定量最高为 62%,而固定化酶活性却只有 26%。这表明,CALB 的固定量虽大,其固定酶活性并不一定最高,但可能因为固定酶量继续增加,会引起酶分子在孔道内的多层排列和酶分子的重排,这样会导致孔道堵塞,使孔道内的酶分子的活性无法表现出来,同样也会引起固定化酶活性降低。Zimmerman 等^[22]研究发现漆酶的尺寸为 15 nm(长)×4 nm(直径),而我们合成的圆盘状介孔 SiO₂,表面几乎无微孔,酶分子无法进入分子筛孔道内,只能通过圆盘外表面以及其间隙组成的微孔进行吸附,故对酶的吸附量较小^[11]。绳状介孔 SiO₂ 孔径为 3.41 nm,虽然与漆酶分子的尺寸接近,随着酶固定量继续增加,会引起酶分子在孔道外表面吸附,从而导致孔道堵塞,使孔道内的酶分子的活性无法表现出来,导致固定化酶活性降低。C₁₆-A₂-NH₂ 形貌为圆球,椭球与毛虫混合形状,体积较大,比表面减小,吸附量明显比管状和囊泡状介孔 SiO₂ 小的多。球状 SiO₂ 因其具有几何体最小的表面积,比表面较大,分散性好,尽管孔径较小,仍具有较高的酶活。囊泡结构的 SiO₂ 形貌为中空球形状,还有弯曲卷起的层状,因其孔径较大(4.04 nm),间隙体积大,吸附酶量高。管状介孔 SiO₂ 呈长短不一、粗细不等的管状结构,其长度 11~18 μm,孔直径 1.1~1.9 μm^[11],管口开口较大,介孔孔道入口能与酶充分接触,酶容易进入孔道,能快速吸附固定酶,吸附量大,进入孔道的酶分子再沿长轴方向聚集,致使固定酶量较大。再经戊二

表 4 不同形貌介孔材料对固定酶活性的影响

Table 4 Effect of morphology of mesoporous SiO₂ on immobilized laccase's activity

	Y-A ₂ -NH ₂	S-A ₂ -NH ₂	C ₁₆ -A ₂ -NH ₂	Q-A ₂ -NH ₂	N-A ₂ -NH ₂	G-A ₂ -NH ₂
Morphology	Disk	Rope	Sphere, ellipse and caterpillar	Sphere	Vesicle	Tube
SEM						
Laccase's activity / (U·g ⁻¹)	10.72	47.20	60.90	66.43	449.40	838.17

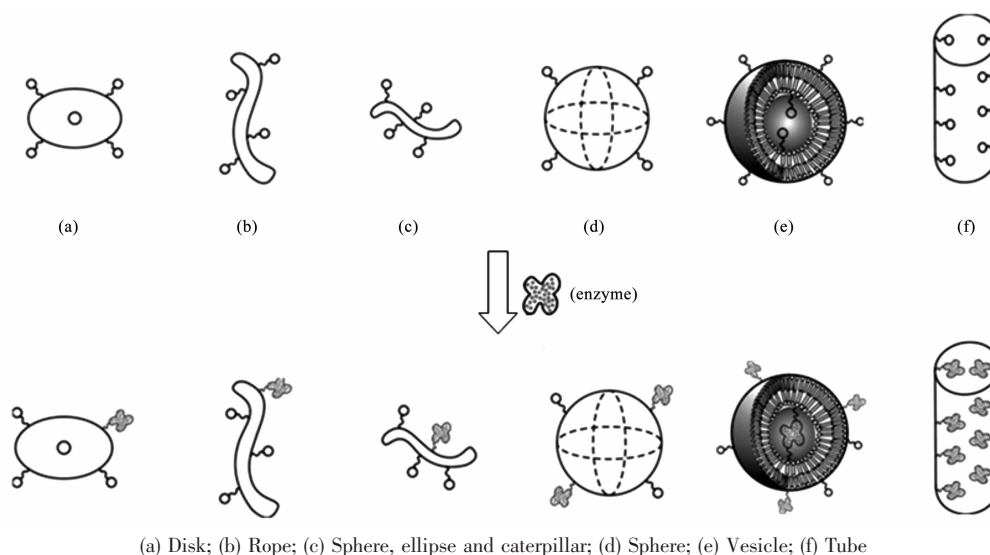
图 12 不同形貌介孔 SiO₂ 固定酶示意图

Fig.12 Scheme for immobilization of enzyme to mesoporous silica with different morphologies

醛交联后,可进一步防止酶的泄漏^[10]。

2.5 固定化酶性质的表征

2.5.1 固定化酶的红外光谱分析

图 13 是载体、经戊二醛交联后的载体和固定漆酶后的载体的红外光谱图。由图 13 可见,在交联载体和固定酶的光谱图上,在 3 400 cm⁻¹ 处均出现

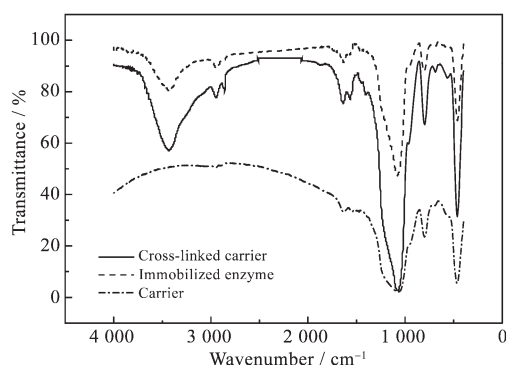
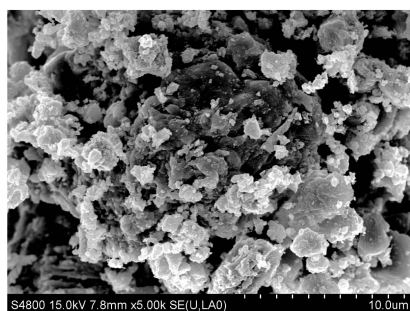
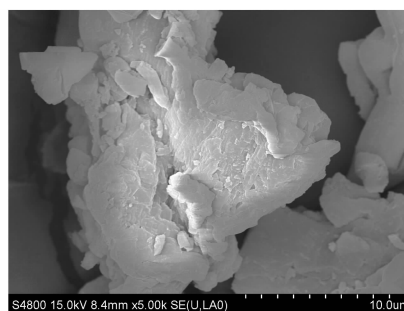


图 13 载体与固定酶的红外光谱图

Fig.13 IR spectra of carriers and immobilized laccase

(a) C₁₆A₂NH₂ sample cross-linked by glutaraldehyde

(b) immobilized laccase

图 14 交联载体固定酶前后的高倍扫描电镜图

Fig.14 HRSEM image of cross-linked carrier and cross-linked carrier immobilized laccase

的强而宽的峰是氨基和羟基的伸缩振动峰;2 940 cm⁻¹ 处出现的峰为 -CH₂ 的伸缩振动峰;与载体相比,经戊二醛交联后的载体在红外光谱图上在 2 870 cm⁻¹ 处出现了吸收峰,这是游离的醛基产生的伸缩振动峰,同时在 1 650 cm⁻¹ 处出现了 Schiff 碱的特征吸收峰,这是由于戊二醛一侧的醛基和载体的氨基发生反应,生成了 Schiff 碱,从而也为载体引入了游离的醛基。游离的醛基与酶上的氨基发生反应后,生成 Schiff 碱,所以在固定酶的红外光谱图上可以发现在 1 650 cm⁻¹ 处也出现了 Schiff 碱的特征吸收峰,这进一步证明了载体上游离的醛基和酶分子上的氨基发生了反应,将酶分子通过共价键固定到载体的表面上。

2.5.2 固定酶及载体的表面分析

图 14a,14b 分别为经戊二醛交联后的 C₁₆-A₂-NH₂ 样品和固定化漆酶的高倍扫描电镜图。

由图 14 可以看出,未固定酶的先交联戊二醛的

载体 SiO_2 (见图 14a) 表面呈现不规则的絮状, 孔隙较 $\text{C}_{16}\text{-A}_2\text{-NH}_2$ 样品 (见图 2a) 小。载体固定漆酶后 (见图 14b), 介孔 SiO_2 表面的孔隙被漆酶填充, 载体表面的孔隙变少。

3 结 论

利用 30% 的甲基磺酸对介孔 SiO_2 进行活化, 用 APTES 进行处理得氨基修饰的介孔 SiO_2 。改性后的介孔 SiO_2 有序度有所下降, 但仍为介孔材料; 改性之后介孔材料的孔径、比表面积、孔体积均变小; 等电点增大。

以氨基修饰的介孔 SiO_2 为载体, 戊二醛为交联剂固定化 Novozymes 漆酶, 通过红外光谱研究发现, 载体上游离的醛基和酶分子上的氨基发生了反应, 将酶分子通过共价键固定到载体的表面上。研究发现酶固定化的最佳条件为: 室温下, 戊二醛的浓度为 4%, 偶联时间为 8 h, 漆酶的浓度为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 固定化时间为 6 h, 反应 pH 值为 5.4。比较自由酶和固定化酶在 4 °C 的贮存稳定性, 发现固定化酶活力比较稳定, 表明漆酶经固定化后, 稳定性显著提高。

同时还发现以 C_{16}TAB 为模板剂合成的介孔 SiO_2 固定化酶活比 C_{14}TAB 和 C_{18}TAB 为模板剂合成的介孔 SiO_2 高。表面氨基含量越高, 固定的酶量越大, 酶活力越大。不同形貌的介孔 SiO_2 对固定酶活力的影响很大, 其中管状介孔 SiO_2 的酶活力最大, 高达 $838.17 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$; 囊泡状介孔 SiO_2 次之; 圆盘状介孔 SiO_2 酶活力最小, 只有 $10.72 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。由此可见材料本身的性质 (表面物理性质和形貌), 酶的性质 (分子的大小和等电点等) 以及固定化的环境 (溶液的 pH 值) 等对固定化酶的表现活性都有影响。

参考文献:

- [1] Zhang X, Guan R F, Wu D Q, et al. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2005**, **33**:43-50
- [2] Zhao X S, Lu G Q, Whittaker A K, et al. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, **101**(33):6525-6531
- [3] Jal P K, Patel S, Mishra B K. *Talanta*, **2004**, **62**:1005-1028
- [4] Yiu H H P, Wright P A. *J. Mater. Chem.*, **2005**, **15**:3690-3700
- [5] Deere J, Magner E, Wall J G, et al. *Chem. Commun.*, **2001**, **5**:465-466
- [6] Yokoi T, Yoshitake H, Tatsumi T. *J. Mater. Chem.*, **2004**, **14**:951-957
- [7] Hakulinen N, Kiiskinen L L, Kruus K, et al. *Nat. Struct. Boil.*, **2002**, **9**(8):601-605
- [8] Zhu Y F, Kaskel S, Shi J L, et al. *Chem. Mater.*, **2007**, **19**:6408-6413
- [9] Osiadacz J, Al-Adhami A J H, Bajraszewska D, et al. *J. Biotechnol.*, **1999**, **72**:141-149
- [10] Lei J, Fan J, Yu C, et al. *Microporous Mesoporous Mater.*, **2004**, **73**:121-128
- [11] WANG Zhi-Yin (汪志银), DING Hai-Jun (丁海军), YANG Yu-Xiang (杨宇翔), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2011**, **27**(3):409-420
- [12] MA Qian (马骞), MAO Xue-Feng (毛学峰), WEI Hong-Guang (魏宏广), et al. *J. Northwest Normal Univ. Natural Science (Xibei Shifan Daxue Xuebao: Ziran Kexue Ban)*, **2003**, **39**(4):54-56
- [13] Han D, Jia W, Liang H. *J. Environ. Sciences*, **2010**, **22**(2):237-241
- [14] YUAN Peng (袁鹏), WU Da-Qing (吴大清), CHEN Zhong (陈忠), et al. *Chinese Science Bull. (Kexue Tongbao)*, **2001**, **46**(4):342-344
- [15] JIANG De-Sheng (姜德生), LONG Sheng-Ya (龙胜亚), HUANG Jun (黄俊), et al. *Acta Microbiol. Sinica (Wei Shengwu Xuebao)*, **2005**, **45**(4):630-633
- [16] Ayhan F, Doğaç Y I, Ayhan H, et al. *Hacettepe J. Biol. Chem.*, **2011**, **39**(3):241-251
- [17] Bollag J M, Shuttleworth K L, Anderson D H. *Appl. Environ. Microbio.*, **1988**, **54**(12):3086-3091
- [18] YANG Yu-Xiang (杨宇翔), WANG Peng (王鹏), WU Jie-Da (吴介达), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **1998**, **14**(1):47-52
- [19] Yang Y X, Ying H P, Shao J G, et al. *J. Am. Ceram. Soc.*, **2007**, **90**(11):3460-3467
- [20] Yang Y X, Huang Z, Deng W J, et al. *Microporous Mesoporous Mater.*, **2008**, **116**:267-276
- [21] Yadav G D, Jadhav S R. *Microporous Mesoporous Mater.*, **2005**, **86**:215-222
- [22] Zimmerman A R, Goyne K W, Chorover J, et al. *Org. Geochem.*, **2004**, **35**:335-375