

新型有机-无机纳米复合粒子的制备及其 固定化漆酶研究

黄俊, 王军涛, 李斌, 肖海燕, 刘诚, 丁莉芸, 姜德生

(武汉理工大学光纤传感技术研究中心, 光纤传感技术与信息处理教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要 制备了四氨基酞菁钴(CoTAPc)-Fe₃O₄纳米复合粒子, 用红外光谱(IR)、X射线衍射(XRD)、X射线能谱(EDS)、场发射扫描电镜(FEG-SEM)及振动样品磁强计等对其进行了表征. 结果表明, 形成了CoTAPc包覆在Fe₃O₄纳米粒子表面的纳米复合粒子. 粒子呈现不规则球形, 平均粒径为70 nm, 矫顽力为316.4 A/m, 接近超顺磁性. 以此纳米复合粒子作为载体, 通过交联法固定漆酶, 固定化酶最适反应温度为45 °C, 最适pH为3; 固定化酶比游离酶具有更好的热稳定性、贮存稳定性及操作稳定性, 且易于分离.

关键词 CoTAPc-Fe₃O₄纳米复合粒子; 漆酶; 固定化

中图分类号 O629.8; Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2006)11-2088-04

固定化酶是指固定在一定载体上并在一定空间范围内进行催化反应的酶, 它既可保持酶的催化特性, 又可增加其稳定性, 并易与反应产物分离和反复连续使用. 目前, 酶的固定化方法主要有包埋法、结合法、吸附法和交联法^[1~4], 其中用交联法固定酶具有稳定性好和酶不易脱落等特点. 载体对固定化酶的性能影响很大. 近年来, 有机-无机复合磁性材料被广泛地应用于酶的固定中^[5~7].

漆酶(Laccase, *p*-diphenoloxidase, EC1. 10. 3. 2)是一类含铜的多酚氧化酶, 可分为真菌漆酶和漆树漆酶两大类, 在生物传感器、废水处理和生物漂白等方面具有重要应用^[8~11]. 基于漆酶催化的光纤生物传感器具有重要的应用前景, 这类传感器的原理是在漆酶的催化下, 待测物被溶液中的氧气氧化, 通过检测溶液中氧的变化量实现对待测物的检测. 因此, 漆酶的催化性能直接影响传感器的性能.

本文制备了CoTAPc包覆在Fe₃O₄纳米粒子表面的CoTAPc-Fe₃O₄纳米复合粒子, 以此磁性复合粒子作为载体, 通过适当交联剂固定漆酶. 该固定化酶比游离酶具有更好的热稳定性、贮存稳定性和操作稳定性, 为研制基于漆酶催化的高性能光纤生物传感器奠定了基础.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

60SXB型傅里叶变换红外光谱仪(美国Nicolet公司); 场发射扫描电子显微镜(FEI Sirion); UV-2450型紫外光度计(日本岛津公司); D/MAX-RB型X射线衍射仪(日本理学); Model 4HF VSM振动样品磁强计(美国ADE公司); Phoenix型X射线能谱仪(美国通用公司).

2,2'-连氮-双(3-乙基并噻-6-磺酸)(ABTS, Sigma); 漆酶(血红密孔菌漆酶, 中国科学院北京微生物研究所馈赠, 分子量64 000, 纯度经电泳测试为单一谱带); 牛血清白蛋白(BSA, 进口分装, 武汉生命科技公司); 其它试剂均为分析纯, 水为双蒸水.

1.2 2,9,16,23-四氨基酞菁钴(CoTAPc)的制备

取自制的4-硝基邻苯二甲酰亚胺^[12](m. p. 198 °C, 文献值199 ~ 200 °C)、尿素、钼酸铵等, 按文献^[13]方法制备2,9,16,23-四氨基酞菁钴.

收稿日期: 2005-11-07.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 60377032)和国家自然科学基金重点项目(批准号: 60537050)资助.

联系人简介: 黄俊(1958年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事材料化学和光纤传感敏感材料研究.

E-mail: hjun@mail.whut.edu.cn

1.3 CoTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的制备

用液相法制得 0.97 g Fe₃O₄ 纳米粒子, 其平均尺寸为 10 nm 左右^[14], 用蒸馏水将 Fe₃O₄ 纳米粒子洗至中性, 再转移到合适的有机溶剂中, 超声分散. 在搅拌下, 将用 DMF 充分溶解的 0.03 g CoTAPc 缓慢加入到 Fe₃O₄ 纳米粒子中, 于室温下搅拌, 使有机溶剂挥发, 置于 45 °C 的真空干燥箱中干燥, 得固体粒子, 用 DMF 洗涤, 洗出液近似无色, 表明加入的 CoTAPc 几乎全部与 Fe₃O₄ 纳米粒子复合. 将处理后的粒子于 45 °C 真空干燥, 得 CoTAPc-Fe₃O₄ 复合粒子 (CoTAPc 的质量分数约为 3%).

1.4 共价交联法固定漆酶

将一定量的 CoTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子依次与一定浓度的戊二醛、牛血清白蛋白 (BSA)、戊二醛溶液反应, 每次反应后均用磁铁将粒子与溶液分离, 用水洗涤除去未反应的戊二醛或 BSA, 再加入漆酶溶液, 在 4 °C 和中性条件下交联反应 24 h. 再依次用 pH = 7.00 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液、0.1 mol/L 磷酸盐、0.5 mol/L NaCl 的混合溶液和双蒸水除去未交联的漆酶, 冷冻干燥, 得磁性固定化酶.

1.5 固定化漆酶固定化率及酶活力回收率的测定

利用考马斯亮蓝染色法 (Bradford 法) 分别测定固定前加入的漆酶量 M_1 和固定后洗出液中剩余的漆酶量 M_2 , 计算出漆酶的固定化率及活力回收率: 漆酶的固定化率 = $[(M_1 - M_2)/M_1] \times 100\%$; 活力回收率 = (固定化酶总活力/加入偶联液的总酶活力) $\times 100\%$.

1.6 酶活性的测定

在 25 °C 的酒石酸缓冲体系中加入 ABTS 溶液, 混匀, 恒温 10 min, 加入漆酶液 (或磁性固定化酶), 搅拌 10 s, 用 UV-2450 动力学程序追踪 420 nm 处吸光度的变化, 求出反应初速度, 以每分钟氧化 1 μmol 的 ABTS 所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位. 固定化酶的催化能力 (酶活) 以每克测试载体的酶活单位 (U/g) 表示. ABTS 消光系数 $\epsilon = 36\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2 结果与讨论

2.1 CoTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的结构分析

当 CoTAPc 与 Fe₃O₄ 纳米粒子复合后, 复合粒子的 XRD 谱以 Fe₃O₄ 的特征衍射峰为主, CoTAPc 的特征衍射峰消失, 说明在复合粒子表面 CoTAPc 是以非晶态的分子分散层形式与 Fe₃O₄ 纳米粒子复合^[15]. 由 IR 谱图可知, CoTAPc 和 CoTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子除具有 CoTAPc 的一些特征峰及 Fe₃O₄ 的特征吸收峰 (578 cm^{-1}) 外, 同时在 891 cm^{-1} 处出现一个较弱的吸收峰, 这是 Co—O 的振动吸收峰, 说明 CoTAPc 与 Fe₃O₄ 形成了一定程度的化学键, 使两者形成了有效的复合^[15].

图 1 为 CoTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的 X 射线能谱图. 可以看出, 粒子中含有 C 和 N 元素, 复合

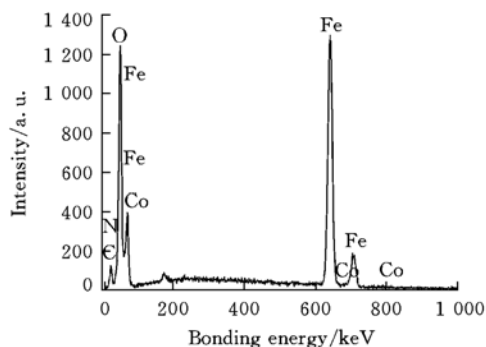


Fig. 1 EDS of CoTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite

粒子已经过 DMF 反复洗涤, 几乎无 CoTAPc 被洗出, 表明 CoTAPc 与 Fe₃O₄ 纳米粒子之间不是简单的吸附, 而是形成了一定程度的化学键, 有较强的结合作用. X 射线能谱元素含量分析结果见表 1. 测定值与理论值基本符合, 说明 CoTAPc 的质量分数为 3% 时, 几乎所有的 CoTAPc 都与 Fe₃O₄ 纳米粒子形成了有效复合.

Table 1 EDS data of CoTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite

Element	C	N	O	Fe	Co
Measured value (%)	2.26	1.17	26.19	70.09	0.29
Theoretical content (%)	1.82	0.79	26.76	70.24	0.28

2.2 CoTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的形貌与结构模型

图 2 为 CoTAPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子的 FEG-SEM 图像. 可见复合粒子呈现不规则球形, 粒子平均尺寸为 70 nm 左右. 我们曾对 NiPc-Fe₃O₄ 纳米复合粒子复合机理和结构模型进行了研究和分析^[15], 可

认为在 CoTAPc 与 Fe_3O_4 纳米粒子的复合过程中, 也有类似的复合机理和结构模型. Fe_3O_4 纳米粒子不是直接接触, 而是通过与 CoTAPc 形成化学键进行复合, 大部分 CoTAPc 复合发生在 CoTAPc- Fe_3O_4 纳米复合粒子的表面, 故可认为该复合粒子是以 CoTAPc 包覆在 Fe_3O_4 纳米粒子表面的纳米复合粒子.

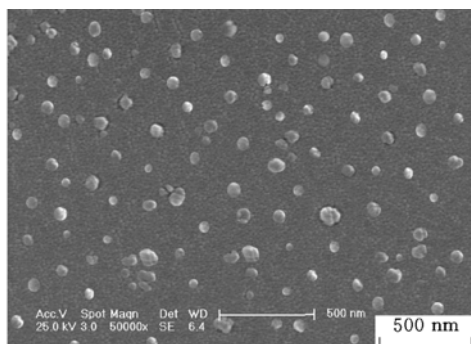


Fig. 2 FEG-SEM CoTAPc- Fe_3O_4 nanoparticles composite

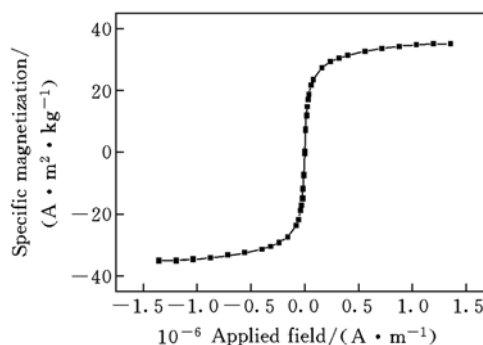


Fig. 3 Hysteresis loop of CoTAPc- Fe_3O_4 nanoparticles

2.3 CoTAPc- Fe_3O_4 纳米复合粒子的磁性能

图 3 为 CoTAPc- Fe_3O_4 纳米复合粒子的磁滞回线图. 可见, CoTAPc- Fe_3O_4 纳米复合粒子的磁滞回线基本重合, 其比饱和磁化强度为 $35.07 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$, 矫顽力为 $316.4 \text{ A}/\text{m}$. 说明复合粒子接近为超顺磁性, 这十分有利于材料的磁搅拌和磁分离.

2.4 以 CoTAPc- Fe_3O_4 纳米复合粒子为载体的固定化漆酶的性质

2.4.1 固定化漆酶的固定化率及活力回收率 利用 Bradford 法测定. 固定时加入酶的量 $M_1 = 0.498 \text{ mg}$, 固定后, 洗出液内酶的量 $M_2 = 0.305 \text{ mg}$, 漆酶的固定化率为 38.75% .

利用 15 mg 磁性载体固定漆酶, 在加入游离酶活力为 10 U 时, 得到固定化酶的活力为 2.52 U , 酶活力回收率为 25.2% . 由于漆酶的固定化率只有 38.75% , 可见漆酶被固定后仍具有较高的活性(约为游离漆酶的 65%). 此外, 由于载体具有磁性, 未固定到载体上的漆酶可与固定化酶分离后重复使用.

2.4.2 固定化酶的热稳定性 将固定化酶和游离酶置于 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中, 每隔 30 min 分别取 15 mg 固定化酶和 $8 \text{ }\mu\text{L}$ 游离酶, 测定其活力. 游离酶在 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 150 min 后, 其活力下降到最初的 75% , 360 min 后, 残余活力仅为最初的 10.1% . 而固定化酶在 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 30 min 后其活性明显变大, 到 150 min 达到最大值, 360 min 后固定化酶活性仍能保持最大值的 90% , 可见固定化酶具有更好的热稳定性. 这是因为酶与载体分子之间的相互作用使得酶分子结构刚性增强, 因而抗热变性增加.

2.4.3 固定化酶的贮存稳定性及操作稳定性 分别将固定化酶和游离酶在无底物条件下, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存 $1, 5, 10, 15$ 和 20 d 后, 测定酶活力. 以放置 1 d 后测定的漆酶的活性定为 100% , 放置 10 d 后, 固定化漆酶活力可保持在 90% 以上, 而游离酶的活力只有 60% ; 放置 20 d 后, 固定化漆酶其活力仍可保持在 80% 以上, 而游离酶的活力则下降到了约 30% , 说明固定化漆酶有良好的贮存稳定性.

操作稳定性是评价固定化酶是否具有实用性的重要指标. 固定化酶经 10 次重复使用后仍保持有 85% 以上的活性, 而游离漆酶只能使用 1 次, 这使漆酶的使用效率明显提高. 固定化漆酶稳定性提高可能有以下 3 个原因: 固定化后漆酶分子与载体多点联结, 可防止漆酶分子伸展变形而失活; 酶活力的缓慢释放; 固定化抑制了酶的自降解.

2.4.4 固定化酶的最佳使用条件 由图 4 可知, 游离酶最佳催化温度为 $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 而固定化酶的最佳催化温度为 $45 \text{ }^\circ\text{C}$, 比游离酶降低了 $15 \text{ }^\circ\text{C}$. 一般情况下, 用于临床医学检测的光纤生物传感器使用温度不高, 这有利于固定化漆酶在此类光纤生物传感

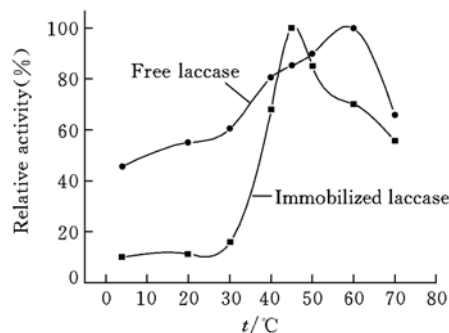


Fig. 4 Effect of temperature on activity of laccase

器上的应用.

固定化酶与游离酶的最适 pH 均为 3.0. 酶固定化后, 对底物作用的最适 pH 常常发生变化, 这主要是受微环境表面电荷性质的影响. 漆酶经交联法固定化后, 其最适使用 pH 值并没有发生改变, 说明固定化对酶分子的微环境并没有影响.

参 考 文 献

- [1] Erlenkotter A. , Kottbus M. , Chemnitz G. C. . Journal of Electroanalytical Chemistry[J], 2000, **481**: 82—94
- [2] GAO Bo(高波), ZHU Guang-Shan(朱广山), FU Xue-Qi(付学奇) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(10): 1852—1854
- [3] XUE Ping(薛屏), LU Guan-Zhong(卢冠忠), GUO Yang-Long(郭杨龙) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(2): 361—365
- [4] WANG Jie(王杰), SONG Xi-Jin(宋锡瑾), WU Ming(伍明) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 1998, **19**(7): 1104—1106
- [5] Ehab T. , Mansoor A. . Biomater. [J], 2004, **25**: 1937—1945
- [6] DING Li-Li(丁丽俐), WENG Yi(翁屹), ZHANG Yang-Rong(张阳荣) *et al.* . Prog. Biochem. Biophys. (生物化学与生物物理进展)[J], 2001, **28**(5): 691—694
- [7] Ma M. , Zhang Y. , Yu W. *et al.* . Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engl. Aspects[J], 2003, **212**: 219—226
- [8] Palonen H. , Saloheimo M. , Viikari L. *et al.* . Enzyme and Microbial Technology[J], 2003, **33**: 854—862
- [9] Suna T. , Nurdan P. , Robert P. *et al.* . Sensors and Actuators[J], 2004, **97**: 132—136
- [10] Gerd H. , Franz S. . Enzyme and Microbial Technology[J], 2000, **27**: 330—336
- [11] Patricio Peralta-Zamora, Cláudia M. Pereira, Elaine R. L. *et al.* . Applied Catalysis B: Environmental[J], 2003, **42**: 131—144
- [12] Young J. G. , Onyebuagu W. . J. Org. Chem. [J], 1990, **55**: 2155—2159
- [13] CONG Fang-Di(丛方地), DU Xi-Guang(杜锡光), ZHAO Bao-Zhong(赵宝中) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2002, **23**(12): 2221—2225
- [14] HUANG Jun(黄俊), GUAN Jian-Guo(官建国), YUAN Run-Zhang(袁润章). Acta Mater. Comp. Sinica(复合材料学报)[J], 1999, **16**(4): 35—38
- [15] HUANG Jun(黄俊), JIANG De-Sheng(姜德生), GUAN Jian-Guo(官建国) *et al.* . Acta Mater. Comp. Sinica(复合材料学报)[J], 2001, **18**(2): 81—84

Preparation of Organic-inorganic Nanoparticles Composite and Their Laccase Immobilization

HUANG Jun^{*}, WANG Jun-Tao, LI Bin, XIAO Hai-Yan, LIU Cheng, DING Li-Yun, JIANG De-Sheng
(Key Laboratory of Fiber Optic Sensing Technology and Information Processing, Ministry of Education,
Fiber Optic Sensing Technology Research Center, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract CoTAPc-Fe₃O₄ nanoparticle composites were prepared by organic-inorganic nanoparticles complex technology and characterized by IR, XRD, EDS, field emission gun scanning electron microscopy and magnetometer. It is proved that the CoTAPc could disperse randomly onto the surface of Fe₃O₄ nanoparticles. The nanoparticles composites had the shape of spheres with the mean diameter about 70 nm. They had the coercive force of 316.4 A/m and were approximately superparamagnetic. The laccase was immobilized on the surface of the composite by crosslinking method. The optimal temperature and pH for the laccase immobilization were 45 °C and pH 3.0, respectively. The immobilized laccase had better thermal, storage and operation stabilities than free laccase. This work provide a good basis for developing the fiber optic biosensor with excellent properties.

Keywords CoTAPc-Fe₃O₄ nanoparticles composite; Laccase; Immobilization

(Ed. : H, J, Z)