

多孔 St/DVB 共聚微球用于静电自组装脂肪酶

尚元艳, 朱以华, 杨晓玲

(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)

摘要: 将酶与带相反电荷的聚电解质在单分散疏水多孔 St/DVB 共聚微球表面交替吸附静电自组装多层脂肪酶膜。确定了静电自组装单层酶膜的最佳条件为酶与载体的质量比 3:1, 吸附时间 0.5 h, pH 5.5。在上述条件下静电自组装 3 层脂肪酶膜, 结果表明, 当最外层为酶层时, 组装 2 层酶的活性比单层酶提高 24%, 组装 3 层酶的活性比 2 层酶的活性稍有增加。在酶液 pH 7.5 的条件下, 考察了聚电解质中的离子强度对静电自组装各层酶活力的影响, 结果表明, 当最外层为酶层或聚电解质层时, 酶的活力随层数增加而下降。

关键词: 多孔 St/DVB 微球; 静电自组装; 脂肪酶

中图分类号: Q550

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2005)06-0613-04

1 前言

脂肪酶是一类特殊的酰基水解酶, 是目前被重点研究的酯催化剂^[1], 但游离的脂肪酶在工业应用中许多不利之处, 如产物提纯困难、酶的使用效率低等, 故希望将其固定化。物理吸附法在脂肪酶的固定化中应用较为广泛, 具有方法简单、酶活力回收高、载体可重复利用等特点, 但无论是物理吸附法还是其他固定化方法, 都只能在载体表面固定化单层酶, 因此固定化酶活力受载体表面积大小所限制。

1991 年, Decher 等^[2]提出了用带电荷基板吸附离子型表面活性剂制备有机复合膜新方法, 并用有机两亲性阴阳离子(或聚电解质)在带电的基片表面上交替沉积, 制备了有机分子的多层超薄膜。由于酶液在 pH 高于或低于其等电点时带负电荷或正电荷, 因此可以利用酶与带相反电荷的聚电解质进行自组装, 从而实现酶的固定化。Caruso 等^[3]研究了 β -葡萄糖苷酶(β -GLS)在聚苯乙烯(PS)胶粒上的组装及其催化活性。通过静电作用组装 β -GLS/苯乙烯磺酸钠(PSS)多层酶膜, 催化反应研究表明, 当最外层为 PSS 时, 组装酶 β -GLS 的层数越多, 催化产物十二烷醇葡萄糖产量越高。葛玉斌等^[4]用自组装技术在多孔三甲胺基聚苯乙烯载体上成功地固定化了 2 层葡萄糖异构酶, 单位质量的固定化酶活力及蛋白载量成倍增加。

本工作采用多孔苯乙烯/二乙烯苯共聚微球疏水载体, 利用多孔疏水性载体为催化作用提供界面从而增加酶的使用效率、有利于脂肪酶的固定化的特点^[5], 结合静电自组装技术, 固定化了 3 层脂肪酶膜, 研究比较了

固定化多层酶与单层酶的活性。

2 实验

2.1 材料

脂肪酶(Type II, 来源于猪胰脏, 含 25%蛋白质), 等电点为 5.0 左右, Sigma 公司; 聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDADMAC, 平均分子量 200000~350000, 20%水溶液), 美国 Adrich 公司; 聚 4-苯乙烯磺酸钠(PSS, 平均分子量 70000, 20%水溶液), 美国 Adrich 公司; 多孔 St/DVB 共聚微球为自制。其他均为国产分析纯或化学纯试剂。

2.2 多孔 St/DVB 共聚微球的制备

首先用分散聚合法制备出 PS 种子(引发剂为 AIBN, 分散剂为 PVP), 然后将 PS 种子用氯代十二烷的 SDS 乳化液进行一次溶胀, 再加入 St, DVB, BPO 及甲苯的 SDS 乳化液进行二次溶胀后, 加入一定量的 PVA 水溶液升温聚合、多次洗涤, 用二氯甲烷提取致孔剂, 得到多孔 St/DVB 共聚微球。

2.3 静电自组装酶

用 0.1 mol/L 一定 pH(>5)的磷酸盐缓冲液配制脂肪酶液(10 mg/L), 酶液带负电荷, 使用时摇匀。静电自组装酶在 7 mL 离心管中进行。将 10 mg 单分散多孔 St/DVB 微球加入 0.5 mL 无水乙醇中超声分散后, 加入一定量的酶液, 室温下在摇床上吸附一段时间, 离心, 用缓冲液洗涤, 除去未吸附的酶, 再加入 0.1 mol/L 的聚电解质 PDADMAC(NaCl 0.5 mol/L), 在摇床中吸附 30 min, 离心, 缓冲液洗涤, 除去未吸附的聚电解质。重复以上步骤, 依次组装 3 层酶膜, 且最外层为酶层。

收稿日期: 2004-10-21, 修回日期: 2005-01-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20276019); 上海市纳米专项基金资助项目(编号: 0359nm001)

作者简介: 尚元艳(1978-), 女, 安徽省蚌埠市人, 硕士研究生, 从事功能高分子材料研究; 朱以华, 通讯联系人, E-mail: yhzhu@ecust.edu.cn.

2.4 固定化酶的酶活测定

固定化酶的酶活采用改进的文献[6]的方法测定。取 50 mL 锥形瓶 2 个, A, B 瓶中分别加入橄榄油乳化液 5 mL 和 0.1 mol/L, pH 7.5 的磷酸盐缓冲液 4 mL, 置于 40°C 水浴中, 磁力搅拌, 预热 5 min. 将上述固定化酶加入 A 瓶中, 准确计时, 开始反应 15 min 后, 分别向 2 瓶中各加入 95% 的无水乙醇 15 mL 终止反应. 用 0.0486 mol/L 的 NaOH 滴定, 酚酞为指示剂, 由被测样与空白样对 NaOH 的消耗量差值计算出酶活.

酶活力单位定义为在 pH 7.5 及 40°C 条件下, 1 g 固定化酶释放出 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 脂肪酸为 1 个酶活单位(U/g).

实验数据均为至少 3 次以上实验数据的平均值.

3 结果与讨论

3.1 多孔 St/DVB 共聚微球载体

图 1 为自制多孔 St/DVB 共聚微球的 SEM 照片. 从图可见, 多孔微球呈单分散性, 粒径 4.5 μm 左右, 由 BET 法测得比表面积为 19.9 m^2/g , 平均孔径为 18.2 nm.



图 1 多孔 St/DVB 共聚微球的 SEM 照片
Fig.1 The SEM image of porous St/DVB microspheres

多孔 St/DVB 共聚微球不易在水溶液中分散, 从其红外谱图(图 2)在 1600 与 1500 cm^{-1} 处出现的苯环上骨

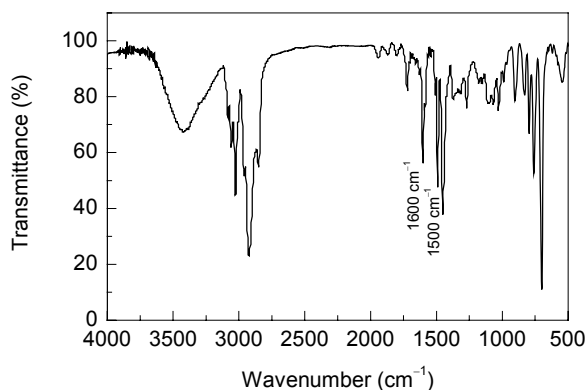


图 2 多孔 St/DVB 共聚微球的红外谱图
Fig.2 IR spectrum of porous St/DVB microspheres

架振动峰可以看出, 多孔微球表面具有疏水性, 为此, 在组装第 1 层酶时需要在酒精中分散. 疏水性载体有利于保持固定化酶的稳定性^[7].

3.2 固定化条件对静电自组装单层酶的影响

3.2.1 给酶量的影响

图 3 给出了在 pH 7.5、固定化时间 2 h 时给酶量的变化对固定化酶活力的影响. 由图可见, 固定化酶的活力随给酶量的增大而提高, 但当给酶量增大到一定程度后, 固定化酶的活力开始下降. 这可能是由于载体表面吸附了大量的酶, 一部分较小的孔道被堵塞, 从而影响了酶与底物的接触^[8], 所以固定化酶的活性降低. 酶的最佳用量为 3 mL, 即 30 mg, 酶与载体的质量比为 3:1.

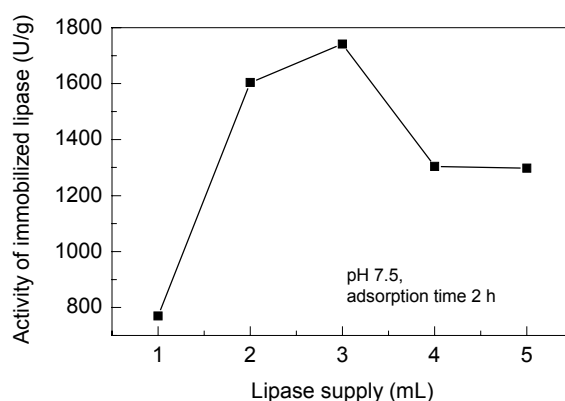


图 3 给酶量对固定化酶活力的影响
Fig.3 Effect of lipase loading on the activity of immobilized lipase

3.2.2 固定化时间的影响

图 4 给出了在 pH 7.5、给酶量为 3 mL 时, 固定化时间对固定化酶活力的影响. 一般情况下, 固定化酶的活力随时间的延长呈上升趋势, 在达到最大值后酶的活力呈下降趋势. 本实验的结果显示, 吸附时间超过 0.5 h 后, 固定化酶活力随吸附时间的延长而呈下降趋势, 这

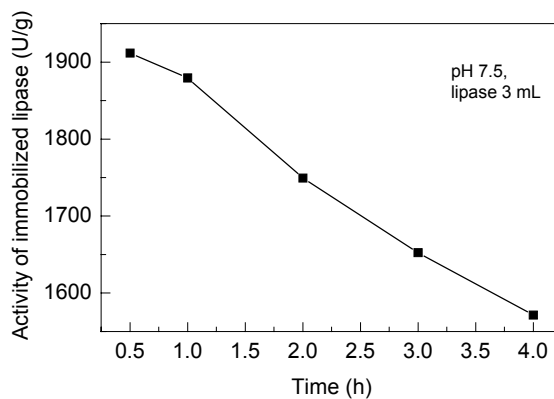


图 4 固定化时间对固定化酶活性的影响
Fig.4 Effect of adsorption time on activity of immobilized lipase

说明静电力使吸附能在较短的时间内达到平衡, 但随着时间的延长, 固定化酶活性就会受到损伤而下降, 这可能与固定化的环境有关. 考虑到吸附时间过短会影响酶吸附量, 因此本实验的固定化时间选择为 0.5 h.

3.2.3 pH 值对固定化酶的影响

在给酶量 3 mL、固定化时间为 0.5 h 时, 考察了 pH 值变化对固定化酶活性的影响. 如图 5 所示, 酶在 pH<7 的情况下固定可得到较高的活性, 并且在 pH 向等电点靠近时活性逐渐增大; 在 pH>7 的情况下, 固定化酶的活性迅速下降, 这是由于酶在碱性条件下易变性失活造成的. 为此, 本实验固定化酶的 pH 选择为 5.5.

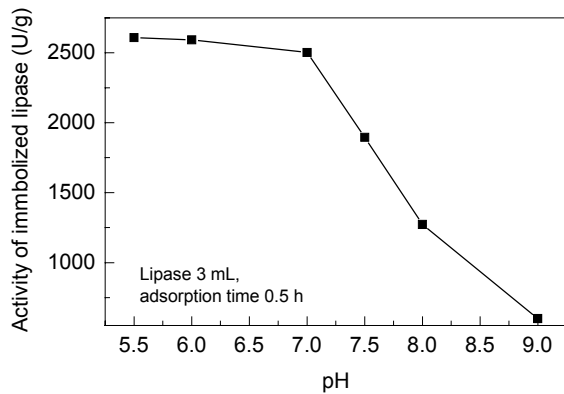


图 5 pH 值对固定化酶活性的影响
Fig.5 Effect of pH on the activity of immobilized lipase

3.3 静电自组装 3 层酶

3.3.1 静电自组装各层酶之间的活力比较

上述条件下, 通过酶与 PDADMAC 之间的静电吸附组装 3 层酶膜, 且最外层为酶层. 从图 6 各层的 Zeta 电位(1, 3, 5 层为酶层, 2, 4 层为聚电解质层)可以看出, 酶与 PDADMAC 交替组装到载体上, 而且随着层数的增加, 静电引力逐渐减小, 这说明多孔微球用于吸附的比表面积在减少, 因此载体对酶与聚电解质的吸附量逐渐减少.

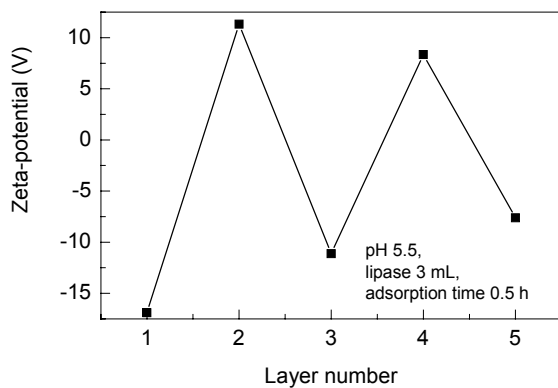


图 6 静电自组装各层酶之间的 Zeta 电位
Fig.6 Zeta-potential vs. layer number of selfassembly of lipase

图 7 为用 NaCl 配制的 PDADMAC 溶液 A(pH 5.5, NaCl 0.5 mol/L)各层固定化酶的活力. 由图可知, 当最外层为酶层时, 2 层酶的活性比单层酶的活性增加了 24%, 这说明底物可以透过聚电解质层与内层的酶作用. 固定化酶的活性没有随层数增加而大幅度增长, 一方面是由于聚电解质层产生了阻碍, 另一方面是由于多孔载体的孔道被部分堵塞, 这两种因素共同阻碍了内层的酶分子与底物接触. 随着层数的增加, 这种作用更为明显, 因此 3 层酶的活性比 2 层酶的活性略有增加.

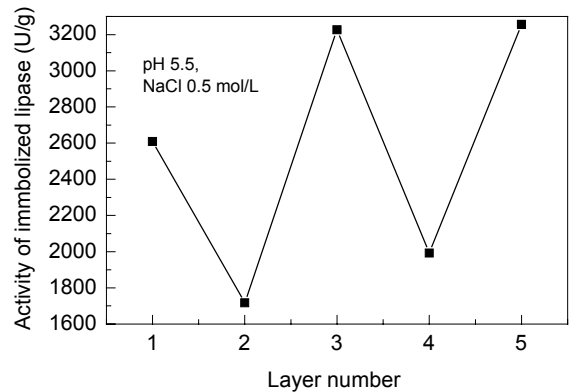


图 7 静电自组装酶各层的酶活力
Fig.7 Lipase activity vs. layer number of selfassembly lipase

3.3.2 聚电解液中离子强度对静电自组装酶的影响

在 pH=7.5 的酶液静电自组装酶过程中, 用磷酸盐缓冲溶液配制的 PDADMAC 溶液 C (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0.1 mol/L)与用 NaCl 配制的 PDADMAC 溶液 B (NaCl 0.5 mol/L)对静电自组装酶各层之间酶活力的影响结果如表 1 和图 8 所示. 从第 2 层开始, 溶液 C 中各层的酶活力均比溶液 B 中低, 这与聚电解质中的离子强度有关^[9]. 当离子强度较大时, 聚电解质的链呈紧密结构, 当这种高度卷曲聚集的大分子被吸附到带相反电荷的表面时, 卷曲构象很难打开, 难以平铺在表面上, 表面呈非均匀形态, 聚电解质层中有较大的空隙, 有利于底物向内层的扩散; 当离子强度较小时, 聚电解质的链呈伸展结构, 吸附到载体表面时, 平铺在载体表面, 聚电解质层较为紧密, 不利于底物向内层扩散. 且随着层数增加, 当最外层为酶层或聚电解质层时, 溶液 C 中酶的活力都下降, 这说明一方面聚电解质严重阻碍了底物向内层扩散, 另一方面酶的吸附量不断减小.

表 1 不同情况下自组装酶膜的活性
Table 1 Activity of selfassembly lipases under different conditions (U/g)

Layer number	A	B	C
1	2608.2	1895.4	1895.4
3	3227.0	2203.2	1101.6
5	3256.2	1620.0	882.9

Note: A. pH=5.5, NaCl 0.5 mol/L; B. pH=7.5, NaCl 0.5 mol/L; C. pH=7.5, NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0.1 mol/L.

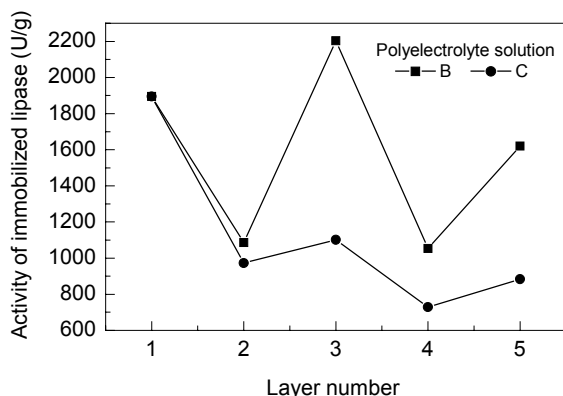


图8 聚电解溶液中离子强度对各层酶活力的影响
Fig.8 Effect of ion strength of polyelectrolyte solution on lipase activity of different layer number

4 结论

以自制的表面疏水的单分散多孔 St/DVB 共聚微球为载体, 静电自组装单层酶膜的较佳条件为酶与载体质量比 3:1, 吸附时间 0.5 h, pH 5.5. 在此条件下, 用聚电解质与酶交替吸附在多孔微球表面组装 3 层酶, 当最外层为酶层时, 组装 2 层酶的活性比单层酶提高 24%, 组装 3 层酶的活性比 2 层酶的活性稍有增加. 另外, 在 pH 为 7.5 的情况下, 聚电解液中的离子强度对静电自组装

酶各层酶活力都有影响, 当最外层为酶层或聚电解质层时, 酶的活力随层数增加而下降.

参考文献:

- [1] 王智, 高仁钧, 杨硕, 等. 有机相中脂肪酶催化拆分环氧丙醇的研究 [J]. 吉林大学自然科学学报, 2001, (1): 81-84.
- [2] Decher G, Hong J D. Makomol Building of Ultrathin Multiplayer Films by a Self-assembly Process: Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles on Charged Surfaces [J]. Chem. Macromol. Symp., 1991, 46: 321-324.
- [3] Caruso F, Fiedler H K. Assembly of β -Glucosidase Multilayers on Spherical Colloidal Particles and Their Use as Active Catalysts [J]. Colloid. Surf. A, 2000, 169(1-3): 287-293.
- [4] 葛玉斌, 沈家骢. 葡萄糖异构酶的固定化及其性质研究 [J]. 高等化学学报, 1996, 17(5): 735-738.
- [5] Malcata F X, Reyes H R. Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipase [J]. Enzyme Microb. Technol., 1992, 14(6): 426-446.
- [6] 刘红霞. 层状材料-水性滑石固定化酶的研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2002. 26.
- [7] 黎刚. 固定化技术进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(5): 45-48.
- [8] 谢志东, 暴奉维, 李民勤. 聚丙烯酸甲酯类大孔树脂对猪胰脂肪的固定化研究 [J]. 离子交换与吸附, 1995, 11(1): 24-29.
- [9] Kim D K, Ham S W, Kim C H, et al. Morphology of Multilayers Assembled by Electrostatic Attraction of Oppositely Charged Model Polymers [J]. Thin Solid Films, 1999, 350: 153-160.

Porous St/DVB Copolymer Microspheres for Immobilization of Lipase by Layer-by-Layer Selfassembly

SHANG Yuan-yan, ZHU Yi-hua, YANG Xiao-ling

(Key Laboratory for Ultrafine Materials, Ministry of Education, East China Univ. Sci. & Technol., Shanghai 200237, China)

Abstract: Lipase layers, being separated by polyelectrolyte [poly(diallyldimethylammonium chloride)] with opposite electric charges each by each (PDADMAC), were deposited onto porous S/DVB copolymer microspheres with hydrophobic surface using layer-by-layer selfassembly. The optimal conditions for the selfassembly of single lipase layer were determined as pH 5.5, adsorption time 0.5 h, ratio of lipase to carriers 3:1 (mass ratio). Three lipase layers were assembled onto porous St/DVB copolymer microspheres based on the above optimal conditions. The experimental results showed that the activity of two lipase layers increased 24% comparing with that of single lipase layer and the activity of three lipase layers increased slightly comparing with that of two lipase layers when the outermost layer was lipase. In addition, under the pH of lipase solution of 7.5, the influence of ion strength of PDADMAC solution on the different layer of selfassembly of lipase was also investigated. The result showed that the activity of lipase decreased with the increase of layer number when the outermost layer was either lipase or PDADMAC.

Key words: porous St/DVB copolymer microspheres; layer-by-layer selfassembly; lipase