

含环氧基固定化葡萄糖氧化酶共聚载体的催化性能研究

李丕武, 李瑞瑞, 刘佃磊, 郝琼, 杨晴, 王升

(齐鲁工业大学食品与生物工程学院, 山东济南 250353)

摘要: 环氧基团可以在温和条件下与酶分子的氨基发生共价结合使其固定于载体表面。选用含有活性环氧基团的甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)为单体, N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)为交联剂, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为稳定剂, 2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂, 乙醇水溶液为分散介质, 并加入 Fe_3O_4 磁流体, 通过反相悬浮聚合成功合成了大孔 Ferrofluid-GMA-MBAA 共聚物载体(FGM)。通过调节磁流体和交联剂用量, 可调节载体比表面积, 孔径以及溶胀性能。将葡萄糖氧化酶(GOD)偶联于 GMA 含量 20%, 磁流体含量 4%, 交联剂含量 40% 的共聚物载体 4FGM (40), 制成固定化葡萄糖氧化酶, 其表观酶活高达 546.23 ± 2.33 U/g。讨论了固定化葡萄糖氧化酶的酶学性质, 在最适条件(55 °C, pH 8.0)下, 固定化酶的表观酶活回收率为 90.45%; 连续使用 15 次活性仍接近初始值的 60%; 固定化酶在 4 °C 保存 30 d, 活性保持不变。

关键词: 环氧基; 反相悬浮聚合; 固定化酶; 葡萄糖氧化酶

文章编号: 1673-9078(2013)12-2926-2930

Properties of the Hydrophilic Copolymer Supporter Containing Oxirane for Immobilized Glucose Oxidase

LI Pi-wu, LI Rui-rui, LIU Dian-lei, HAO Qiong, YANG Qing, WANG Sheng

(School of Food and Bioengineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China)

Abstract: Oxirane groups can react with the amino groups of enzyme under mild conditions so that could be immobilized on the surface of copolymer supporter. The macroporous Ferrofluid-GMA-MBAA (FGM) polymer were synthesized by inverse suspension polymerization with glycidyl methacrylate (GMA) as the reactive monomer and N,N'-methylene-bis-acrylamide (MBAA) as the cross-linking agent. Polyvinylpyrrolidone (PVP) was used as the stabilizer monomer and azodiisobutyronitrile (AIBN) was used as the initiator monomer. Fe_3O_4 was added as magnetofluid to the dispersion medium, ethanol solution. The effects of the amount of magnetofluid and crosslinking agent on the structure properties and the apparent activity of immobilized enzyme were investigated. The recovery rate of apparent relative activity of 90.45% (about 546.23 ± 2.33 U/g) was obtained when the glucose oxidase (GOD) enzyme was immobilized on FGM polymer [w (GMA) = 20%, w (ferrofluid) = 0.4%, w (MBAA) = 40%] at 55 °C and pH 8.0. The enzyme activity was nearly 60% of its initial even after being used for 15 times. After a 30-day storage at 4 °C, the immobilized enzyme showed little changes in its activity.

Key words: oxirane; inverse suspension polymerization; immobilized enzyme; glucose oxidase

葡萄糖氧化酶(GOD)是一种氧化还原酶, 在 O_2 充足条件下, 它能够快速专一地催化 β -D-葡萄糖为 β -D-葡萄糖酸和 H_2O_2 ^[1], 它广泛应用于食品、医药和饲料行业, 起到了去除葡萄糖、脱氢、杀菌的作用^[2]。而要实现该酶的工业化应用, 酶的固定化技术是关键。酶在固定化状态下可保证其高级结构和活性中心的氨基酸残基不因高温、强酸、强碱等发生变化^[3]。因此, 研制一种性能优异、价格合理的固定化载体和高活性、

高稳定性的固定化葡萄糖氧化酶(GOD)是本文的主要内容。

一般采用吸附、共价偶联、交联和包埋 4 种固定化方法来提高酶对环境的适应能力和重复利用性能。其中共价偶联法是将酶的非活性侧链基团与载体的活性官能团共价结合, 固定化后的酶具备优良的稳定性, 是目前研究最活跃的固定化方法^[4-6]。研究表明, 环氧基具有很高的反应活性和可塑性, 载体上的环氧基可在温和条件下直接与酶分子上的 $-NH_2$, $-HS$ 等非活性基团进行共价固定; 也可通过双官能团化合物为交联剂进行连接。另外, 对于一些含有多种非活性基团酶,

收稿日期: 2013-07-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA021504)

作者简介: 李丕武(1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物酶技术

环氧基可多点连接以提高酶与载体的结合强度^[7]。

本文选取含有反应性环氧基团的甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)为功能性单体, N, N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)为交联剂, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为稳定剂, 2, 2'-偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂, 乙醇水溶液为分散介质, 并加入 Fe₃O₄ 磁流体, 通过反相悬浮^[8]聚合成功合成了大孔 Ferrofluid-GMA-MBAA 共聚物载体 (FGM)。

与其他固定化材料相比, 本实验制备的高分子微球的显著特性是具备良好的磁响应性。该磁性载体易于分离而且可通过磁力搅拌进行固定化, 减小了机械摩擦, 继而增大了酶的固定化量; 而且酶在吸附固定时具有一定选择性, 一定程度上减少了传质阻力的影响。所得固定化酶连续使用 15 次以上, 剩余酶活仍在 60%, 固定化效果较国内外其他固定化材料十分显著。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

葡萄糖氧化酶 (GOD, Sigma: G-7141); 辣根过氧化物酶 (POD, Roche); 4-氨基安替比林 (国药集团化学试剂有限公司); Triton X-100 (Amresco); 葡萄糖 (潍坊盛泰药业有限公司); 甲基丙烯酸缩水甘油酯

(GAM, Aladdin); N, N'-亚甲基双丙烯酰胺 (MBAA); 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, Aladdin); 2, 2'-偶氮二异丁腈 (AIBN, Aladdin)。

1.2 聚合物的合成

按 2:3 的摩尔比称取 FeSO₄·7H₂O 和 FeCl₃·6H₂O 溶于 300 mL 蒸馏水, 加入到 1000 mL 的三角瓶, 然后加入 3 mol/L 的 NaOH 溶液并将 pH 调至 13±0.5, 于室温下快速搅拌 30 min 后升温至 80 °C 保温熟化 30 min^[9]。冷却至室温后用去离子水反复洗涤至中性, 并调固含量为 10% 即得 Fe₃O₄ 磁流体, 密封储存备用。使用前磁流体需先除水, 并用乙醇浸泡 10 min, 磁分离待用。

在装有冷凝管, 搅拌器, 导气管和水分离器的四口瓶中, 加入将稳定剂 PVP 和分散剂介质乙醇水溶液, 得混合液 A, 80 °C 搅拌完全溶解; 将磁流体加入引发剂 AIBN 的乙醇溶液, 使其充分吸附 1~2 h, 得混合液 B; 将单体 GMA 和交联剂 MBAA 置入混合液 B, 得混合液 C, 并超声处理 10 min; 然后将 C 加入 A, 55 °C 氮气保护下引发聚合。反应停止后, 微球经过抽真空过滤, 并用去离子水和乙醇浸洗, 真空干燥即得。共聚物用 x FGM(y) 表示, 其中 x, y 分别表示磁流体和交联剂的质量分数, 如表 1 所示。

表 1 样品标号

Table 1 Codes of all the samples

磁流体/MBAA	20%/(wt%)	30%/(wt%)	40%/(wt%)	50%/(wt%)	磁结合量/%
2%/(wt%)	2FGM(20)	2FGM(30)	2FGM(40)	2FGM(50)	8.67±0.13
3%/(wt%)	3FGM(20)	3FGM(30)	3FGM(40)	3FGM(50)	15.33±0.14
4%/(wt%)	4FGM(20)	4FGM(30)	4FGM(40)	4FGM(50)	18.12±0.08
5%/(wt%)	5FGM(20)	5FGM(30)	5FGM(40)	5FGM(50)	18.60±0.38 (但有磁粉剩余)

1.3 仪器与表征方法

Micromeritics ASAP2010 比表面积及孔径分布仪, 比表面积采用 BET 法测定, 平均孔径和孔容采用 BJH 法测定; JS94H 微电泳仪, 载体载酶前后表面电荷测定; 材料表面环氧基含量测定参见文献^[10]; 载体偶联酶量的测定: 以每克载体(干重)所结合的 GOD 毫克数(干重)表示, 准确称取一定量的干燥至恒重的载体, 载酶后用去离子水充分洗涤, 于真空干燥箱 40 °C 干燥至恒重, 测定载体载酶前后质量变化; 溶胀性能的测定: 选用一定浓度参数的溶剂浸泡载体 24 h, 测定载体浸泡前后的体积变化。

1.4 载体固定 GOD 后的活性测定

GOD 的固定化: 取 0.1 g 载体, 经磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.0) 洗涤溶胀; 去离子水配制 250 U/mL 的 GOD 溶液。取 1 mL 酶液与上述载体混匀, 置于 4 °C 交联反应 12~20 h。反应完毕用上述缓冲液洗涤数次以除去未固定的游离酶。最后固定化酶使用 1 mL 上述缓冲液悬浮。

连续分光光度法测定固定化 GOD 活性测定参照参考文献^[11]进行并作相应调整: 将分光光度计波长调至 500 nm。分别吸取 2.0 mL pH 4.0~9.0 的苯酚缓冲液 (50 mg/mL)、0.5 mL 10% β-D-葡萄糖溶液、0.5 mL 辣根过氧化物酶溶液 (25 U/mL) 和 0.1 mL 氨基安替比林溶液 (4 mg/mL) 至比色杯中 (光程 10 mm), 在 (25、35、45、55、65、75、85) ±0.1 °C 水浴保温 10 min, 吸干表面的水分, 擦净, 然后吸取 0.1 mL 固定化酶悬

浮液加入比色杯中并立即混合均匀。加酶时记吸光值为0,以后每隔1 min记录吸光值,连续记录8 min。酶活单位定义为每分钟氧化1 μmol 的 $\beta\text{-D}$ -葡萄糖消耗的酶量。

酶活计算公式为:

$$\text{葡萄糖氧化酶活力}(U/mL) = \frac{\Delta D_{500}}{\Delta t} \times \frac{1}{12.88 \times 1/2} \times \frac{D_m}{0.1} \times 1.339 \times 3.2$$

注: ΔD_{500} : 一定时间内吸光值变化(吸光值需对时间呈线性变化); Δt : 反应时间, min; 12.88: 靛亚胺的毫摩尔消光系数, $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; 1/2: 每摩尔 H_2O_2 生成靛亚胺的摩尔数; 3.2: 反应混合物的终体积, mL; 0.1: 固定化酶悬浮液的体积, mL; D_m : 固定化酶悬浮液的稀释倍数; 1.339: 换算成O-邻联茴香胺法的换算系数。

1.5 载体性能计算公式

偶联酶量: 偶联量 (mg/g) = (偶联后载体质量 - 偶联前载体质量) / 偶联前载体质量;

共聚物载体溶胀度: $\alpha = [(V - V_0) / V_0] \times 100\%$

其中 V_0 , V 分别为载体溶胀前后体积

环氧基含量的测定: $E = (V_1 - V_2) \times N / 10M$

其中 V_1 , V_2 分别为空白和试样组消耗 NaOH 标准溶液体积, N 为 NaOH 标准溶液浓度, M 为试样质量。

1.6 数据分析

实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其中 \bar{x} 通过5组平行实验所得。数据稳定性用变异系数 $CV(CV = s / \bar{x})$ 表示,其中 $CV > 100\%$ 为强变异; $10\% < CV < 100\%$ 为中等变异; $CV < 10\%$ 为弱变异。 CV 值越小,则数据越稳定,可信度越高。

本文所有结果统计分析和绘图由 Origin 7.5 软件辅助完成。

2 结果与讨论

2.1 磁流体加入量

对于本实验制备的磁性高分子微球,由于磁流体是壳-核结构中核的来源,因此磁流体加入势必对反应体系造成一定影响,其加入量也会影响磁性高分子微球的磁含量。由表1可以看出,随磁流体加入量增大,高分子微球平均磁含量增大,原因是增大磁流体用量,体系中 Fe_3O_4 粒子相应增多,体系中生成的磁核势必增多,这些小的磁性粒子通过碰撞,聚合并不断捕获聚合物链段或自由基而不断增大,这样最终形成的聚合物微球中包含更多 Fe_3O_4 粒子,宏观表现为磁含量增大。但是磁流体量增加到一定值(5%)后就会出现磁

浪费现象,原因可能是磁流体量过多时磁性粒子之间相互碰撞团聚现象严重,会有大量的磁流体未能包裹进去,反应结束会剩余大量磁粉悬浮在分散介质里。对于本实验,磁流体添加量不能超过4%。

2.2 功能单体 GMA 用量对载体性能影响

表2 功能单体对载体性能影响

Table 2 Influence of the amount of GMA on the properties of

FGM				
GMA 浓度 /%	偶联酶量 / (mg/g)	溶胀度 α /%	环氧基含量 / (mmol/g)	表观酶活 / (U/g)
10	88.67 \pm 0.98	232.70 \pm 3.77	0.60 \pm 0.04	328.82 \pm 4.02
15	93.33 \pm 2.31	202.42 \pm 2.91	0.78 \pm 0.05	442.29 \pm 2.98
20	110.20 \pm 1.89	158.80 \pm 1.78	0.96 \pm 0.08	546.23 \pm 2.33
25	83.66 \pm 2.03	132.55 \pm 3.45	1.12 \pm 0.08	317.60 \pm 3.66

固定磁流体和交联剂 MBAA 质量分数分别为4%和40%, GMA 配料浓度对载体固定化酶影响见表2。当 GMA 浓度高于20%,由于其亲水性低,载体在水中的溶胀度偏小,酶分子不易有效扩散至载体网络,导致载体酶偶联量偏低,故其表观酶活也较低;减小 GMA 浓度,一方面载体的亲水性进一步增强,载体在水中的溶胀度明显升高,这有利于酶的偶联和固定化酶活性的提高,另一方面 GMA 用量减少导致载体表面环氧基数目下降,偶联的酶量偏低,导致固定化酶活性降低。相同条件下处理固定化酶, GMA 浓度为20%时固定化酶酶活最高(546.23 \pm 2.33 U/g)。

2.3 交联剂 MBAA 用量对载体性能影响

固定功能单体用量为20%,当交联剂含量为20%时所得聚合物几乎为凝胶,孔容和孔径都很小,偶联酶量较少;增加交联剂用量,孔径和孔容逐渐减小,比表面积逐渐增大,偶联酶量增加。当交联剂用量大于40%后,共聚物比表面积,孔径和孔容趋于稳定,变化减小。以二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂时共聚物溶胀性能良好,这可能与共聚物和 DMF 有相似的局部结构有关。交联剂用量越高则共聚物内部网络结构越紧密,骨架内部的环氧基难以测出,导致实验值低于理论计算值。

2.4 Zeta 电位

Zeta 电位又叫电动电位或电动势,是表征分散系稳定性的重要指标。载体材料表面带负电,在外界电场存在向下向正极运动, zeta 电位为-49.7 mV (如图1a所示);载体材料与 GOD 交联反应后 zeta 电位减小为-28.8 mV (如图1b所示)。由于 GOD 表面带正电,由

此可以推断载体分子与酶分子发生交互作用，后者成功固定在载体材料上。

表 3 交联剂对载体性能影响

Table 3 Influence of the amount of crosslinking agent on the properties of FGM copolymer

名称	比表面积 /(m^2/g)	孔容 /(mL/g)	孔径 / nm	偶联酶量 /(mg/g)	溶胀度 α /%	环氧基含量 /($mmol/g$)
4FGM(20)	54.89±1.34	0.223±0.07	8.50±1.09	72.09±0.92	86.06±0.91	1.21±0.08
4FGM(30)	72.09±1.98	0.476±0.11	17.22±0.99	92.29±1.39	97.89±1.00	1.03±0.07
4FGM(40)	120.87±2.66	0.452±0.10	15.21±0.89	110.20±1.89	106.33±1.89	0.96±0.08
4FGM(50)	125.66±2.35	0.433±0.21	13.99±1.34	110.30±2.02	109.61±1.32	0.82±0.09
4FGM(60)	126.04±2.02	0.419±0.13	13.55±1.10	108.44±1.23	113.49±1.44	0.73±0.05

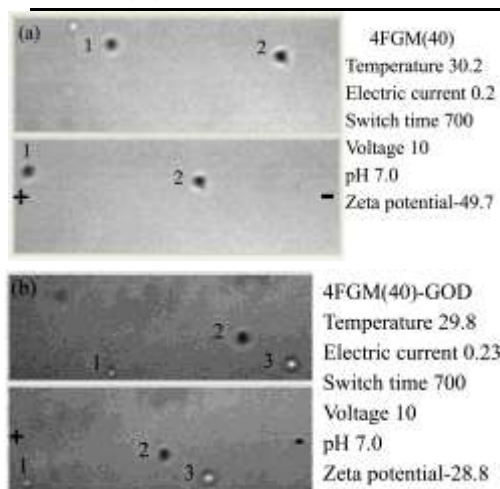


图 1 4FGM(40) 的 zeta 电位 (a), 4FGM(40)-GOD 的 zeta 电位 (b)

Fig.1 Zeta potential of 4FGM(40) (a), Zeta potential of 4FGM(40)-GOD (b)

2.5 固定化酶酶学性质分析

2.5.1 固定化酶的最适温度和 pH

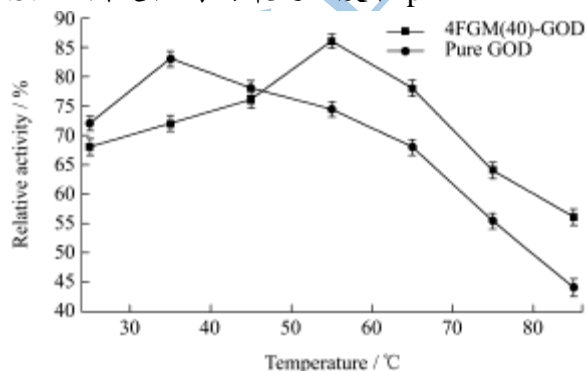


图 2 温度对固定化 GOD 酶活影响

Fig.2 Effect of temperature on the covalently immobilized GOD

游离酶和固定化酶活性与反应温度之间的关系比较如图 2 所示，前者最适反应温度为 35 °C，后者为 55 °C。同时，在低温 25~45 °C 时固定化酶活性较游离酶差；而高温 50~65 °C 时固定化酶活性较为稳定，游离酶活性则迅速下降。游离酶和固定化酶活性与 pH 之间的关系比较如图 3 所示，前者最适反应 pH 为 7.0，

后者为 8.0。与游离酶相比，固定化酶在 7.5~9.0 范围内都保持较高的催化活性，这说明固定化酶的最适反应温度和 pH 范围拓宽。原因可能是固定化酶与载体之间多点连接可避免酶分子的伸展变性；另外，酶分子与载体材料结合后，载体可阻挡高温和极端 pH 对酶结构的影响。

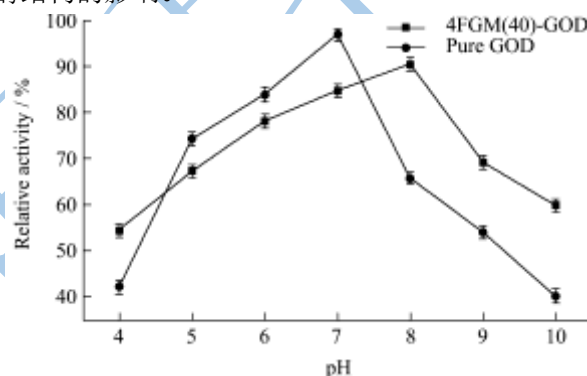


图 3 pH 对固定化 GOD 酶活影响

Fig.3 Effect of pH on the covalently immobilized GOD

2.5.2 固定化酶的热稳定性和 pH 稳定性

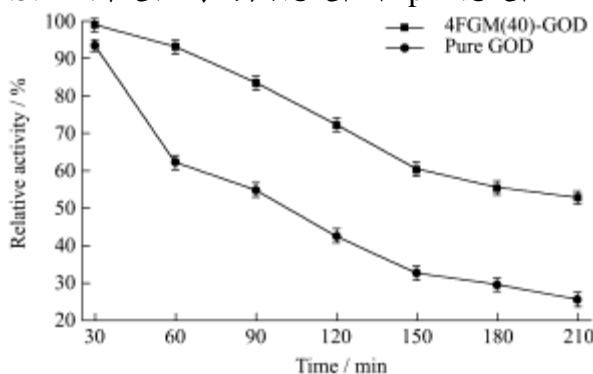


图 4 固定化 GOD 的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of covalently immobilized GOD

将游离酶和固定化酶各置于 65 °C 水浴和 pH 4.0 的磷酸盐缓冲液中处理一定时间后，测定其催化活性来研究固定化酶的热稳定性和 pH 稳定性（如图 4、5 所示）。从图中可以看出，随处理时间增长，游离酶和固定化酶活性均呈现下降趋势。但固定化酶活性下降明显较慢，两种条件处理 2 h 后固定化酶活性仍保留了

72.3%和 68.4%，而此时游离酶仅保留了 42.5%和 43.4%，这说明固定化酶的热稳定性和 pH 稳定性明显好于游离酶。原因可能是载体材料的孔道结构对酶分子的保护，避免了酶分子直接暴露于高温和极端 pH 环境中，减缓了其催化活性的丧失。本实验制备的载体材料具备较大的孔尺寸，大部分酶分子被牢固吸附在孔径表面，得到了载体的有力保护，避免了极端环境引发自身的降解。

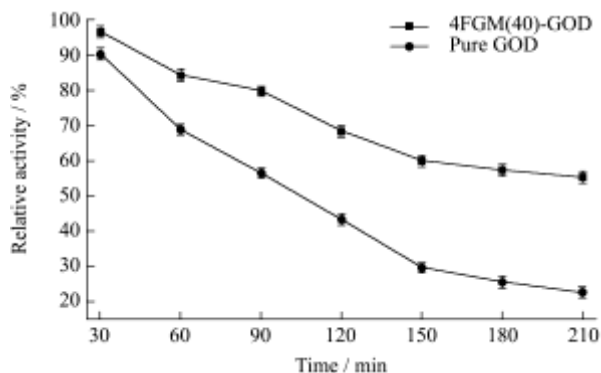


图5 固定化 GOD 的 pH 稳定性

Fig.5 pH stability of covalently immobilized GOD

2.5.3 固定化酶的重复操作稳定性

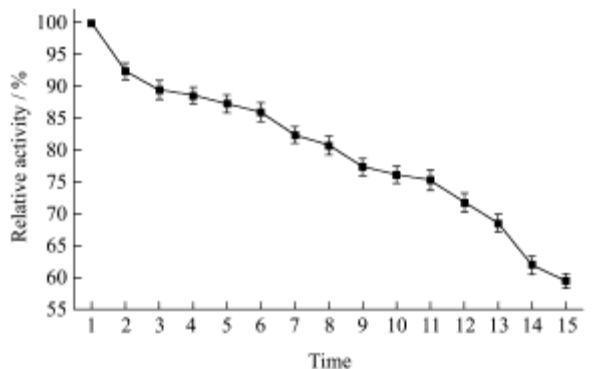


图6 固定化 GOD 的重复操作稳定性

Fig.6 Repeatable Operation stability of covalently immobilized GOD

固定化酶的储存与操作稳定性在很大程度上反映了固定化载体性能的优劣。图6为重复利用次数对固定化酶活性的影响。随重复利用次数增加，固定化酶活性不断下降，原因可能是在多次的回收利用过程中经反复的离心洗涤必然会导致酶从载体上脱落，导致酶活下降。但经15次重复利用之后，固定化酶活仍接近最初活性的60%，这说明固定化酶有较好的重复利用性。

3 结论

由于现代化工业对于环保，绿色要求很高，而酶本身具有专一、高效和无污染的优点，因此酶载体必会得到很大推广。环氧基具有很好的可塑性和温和的反应

条件，并且环氧基载体对大部分酶具有良好的固定化效果(如商业产品 Eupergit C 型载体)，因此其具有极高的商业价值。磁性环氧基载体减小了酶在吸附过程的传质阻力，并且具有回收简单、操作容易的优点，而且对去除杂质有一定优势，具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Dalgaard P, Mejiholm O, Huss H H. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1997,38: 169-179
- [2] 邢良英,王远山,郑裕国.葡萄糖氧化酶的生产及应用[J].*食品科技*,2007,24(6):24-26
XING Liang-ying, WANG Yuan-shan, ZHENG Yu-guo. Production and application of glucose oxidase [J]. *Food Science and Technology*, 2007, 24(6): 24-26
- [3] 薛屏,王居兰,李鹏.固定化酶球形高分子载体的设计与应用[J].*石油化工*,2010,39(1):7-11
XUE Ping, WANG Ju-lan, LI Peng. Design and Application of Microspherical Polymer for Enzyme Immobilization [J]. *Petrochemical Technology*, 2010,39(1): 7-11
- [4] Junqi Z, Yujun W, Guangsheng L, et al. Covalent immobilization of penicillin G acylase on aminopropyl-functionalized mesostructured cellular foams [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101:7211-7217
- [5] 薛萍,卢冠忠,郭杨龙,等.含环氧基聚合物固定化青霉素酰化酶的催化性能研究[J].*石油化工*,2004,33:1689-1691
XUE Ping, LU Guan-zhong, GUO Yang-long, et al. Properties of the Hydrophilic Copolymer Support Containing Oxirane for Immobilized Penicillin Acylase [J]. *Petrochemical Technology*, 2004, 33: 1689-1691
- [6] Gulay B, Yasemin K, Adil D, et al. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly (2-hydroxyethyl methacrylate)based hydrophilic membrane matrix [J]. *Journal of Food Engineering*, 2002, 52: 367-374
- [7] 刘文涛,段洪东,王兴建,等.环氧基固定化酶载体的研究进展[J].*山东轻工业学院学报*,2012,26(3):40-43
LIU Wen-tao, DUAN Hong-dong, WANG Xing-jian, et al. Research Progress of Carriers with Epoxy Groups in Enzymes Immobilization [J]. *Journal of Shandong Polytechnic University*, 2012, 26(3): 40-43
- [8] 乌云高娃,卢冠忠,郭杨龙,等.大孔聚甲基丙烯酸缩水甘油酯固定化酶载体的合成及性能研究[J].*化学学报*,2002,60(3): 504-508
WUYUN Gao-wa, LU Guan-zhong, GUO Yang-long, et al.

- The Studies on Synthesis and Properties of Glycidyl Methacrylate- N,N'-methylene-bis (acrylamide) Copolymer Supports of Enzyme Catalyst [J]. Acta Chemica Sinica, 2002, 60(3): 504- 508
- [9] 袁定重.分散聚合法制备固定化酶载体P(St/MAA)/Fe₃O₄的研究[D].西安:西北工业大学,2006
- YUAN Ding-zhong. Study on Preparation of P (St/MAA)/ Fe₃O₄ Applied to Immobilize Enzyme by Dispersion Polymerization [D]. Xi'an: Northwestern Polytechnical University, 2006
- [10] Sundberg L, Porath J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography: I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes [J]. J. Chromatogr, 1974, 90: 87-98
- [11] Kouassi G K, Irudayaraj J, Mccarty G. Actuvity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles [J]. BioMagnetic Research and Technology, 2005, 10: 1-10

现代食品科技