

静电纺苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物纳米纤维膜固载 过氧化物酶及处理多酚性能研究*

潘 超** 栾忠奇 王小娇 马 玲

(大连海洋大学 理学院 大连 116023)

摘 要 首先采用无皂乳液聚合法获得了含有羧基官能团的聚苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物 (poly(styrene-co-methacrylic acid), PSMAl), 然后利用静电纺丝技术制备了 PSMAl 纳米纤维. 并以酰胺结合的方式, 在 PSMAl 纤维表面固载辣根过氧化物酶 (HRP). 采用 SEM、FTIR 等手段表征了 PSMAl 纤维的表面微观形貌和化学特性. 研究了 HRP 在纤维表面的固载时间与酶活性的定量关系, 对比分析了酶固载前后的热稳定性, 存储稳定性和 PH 稳定性. 并以邻甲氧基苯酚作为水体污染的模式物, 考察了固载 HRP 对邻甲氧基苯酚的去除效率. 结果表明固载后的 HRP 相比游离 HRP 环境适应性能有较大提升. 固载化 HRP 对邻甲氧基苯酚 (OMP) 催化反应 120 min 去除效率达 80.2%, 明显高于自由 HRP 去除效率 (50%), 有望应用于酚类水体污染的治理.

关键词 无皂乳液聚合, 静电纺丝, 纳米纤维, 辣根过氧化物酶, 固载化, 邻甲氧基苯酚

辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 作为生物催化剂, 具有催化效率高、专一性强、反应条件温和、无污染等优点, 在资源、能源和环保等领域上有着巨大的应用潜力. 但是 HRP 酶的高级结构对环境十分敏感, 如对热、酸碱、有机溶剂等, 因此, 在实际应用中还需要解决诸多问题. 20 世纪 50 年代兴起的固定化酶技术 (enzyme immobilization) 为解决酶在实际应用中的问题提供了有效手段. 生物酶固定化技术是采用化学或物理方法, 将游离细胞定位于限定的区域内, 使其保持活性并可反复利用的技术. 这种技术具有生物酶密度高、作用时间长、抗不良环境能力强、生物酶流失少等优点. 因此固定化酶技术为酶的应用开拓了广阔的前景^[1-4], 已成为当今优先发展的高科技领域之一.

载体材料是酶固定化技术中的关键因素之一. 包括两方面内容: 一是自身的物性是否适合做载体材料; 二是材料的微观形貌. 在众多的酶固载基底中, 聚苯乙烯 (PS) 因其廉价、易用而成为最常用的固相载体之一, 但一方面由于聚苯乙烯表面具有一定的疏水性和生物相容性较差, 作为载体材料时和酶之间易发生某些非生物特异性的相

互作用, 从而导致酶蛋白变异影响固定化酶的活性, 极大地制约了聚苯乙烯材料在酶固定化技术中的进一步推广应用. 因此, 为改善 PS 板对生物分子的吸附性能, 有必要对 PS 板基底加以修饰处理^[5-9], 以期达到较为理想的效果. 另一方面, 常见的聚苯乙烯载体形貌多为二维平板式, 与固定化酶的接触面积小, 导致与酶结合的位点容易达到饱和, 使空间位阻也增大, 因而酶的固载量大大受限^[10].

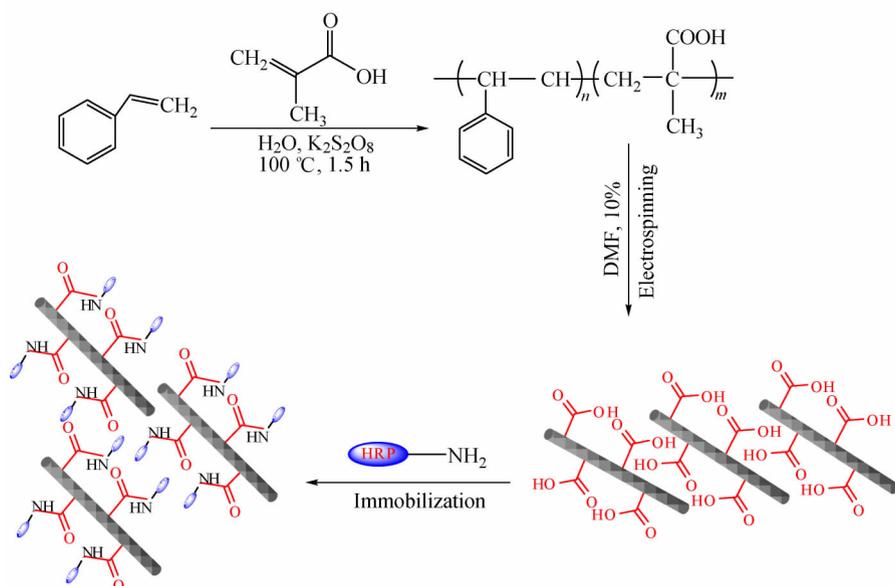
静电纺丝技术^[11-14]为酶固定化在新型基底材料的选择上提供了有力支撑. 将静电纺纳米纤维膜作为固定化酶的载体, 有利于酶与底物充分接触, 能有效提高酶的催化效率和重复利用性, 因此它被人们认为是一种潜在的具有广阔应用前景的酶固定化基质, 目前已经成为静电纺丝纳米纤维膜应用研究领域的研究热点之一^[15-19].

本文采用无皂乳液法对苯乙烯分子进行功能化, 使其带有羧基便于与酶的识别吸附. 在此基础上结合静电纺丝技术制备了具有三维交叉网络结构的高吸附容量的苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物纳米纤维膜 (如示意式 1 所示). 并以过氧化物酶作为模型酶进行高效固载化, 研究了固定化过氧化

* 2013-04-02 收稿, 2013-05-15 修稿; 国家自然科学基金 (基金号 21102033)、辽宁省教育厅基金 (基金号 L2011122) 和国家海洋局海洋溢油鉴别与损害评估重点实验室开放基金 (基金号 201205) 资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: panchao@dlou.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.13107



Scheme 1 Chemical route for synthesis of styrene-co-methacrylic acid copolymer and subsequent electrospinning nanofibers attachment of HRP

物酶对水体中的邻甲氧基苯酚的处理能力。

1 实验部分

1.1 试剂

四氢呋喃 (THF)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、过硫酸钾、过氧化氢 (30%)、磷酸、磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠、重铬酸钾、硝酸钴、戊二醛、邻甲氧基苯酚、考马斯亮兰, 购于国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯, 使用前未经纯化。辣根过氧化物酶 (HRP)、牛血清蛋白 (BSA) 购于上海 Sigma 有限公司。甲基丙烯酸、苯乙烯为分析纯, 使用前经 5% NaOH 洗涤后干燥, 在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 下减压蒸馏而得。二次蒸馏水实验室自制。

1.2 苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物 (SMAI) 的合成

苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物由本实验室合成。合成过程如下: 在带搅拌及回流冷凝管的三口瓶中加入 100 mL 水及单体 25 mL 苯乙烯、1.0 mL 甲基丙烯酸, 搅拌速度为 150 rpm, 待加热沸腾 5 min 后加入 0.1 g 引发剂过硫酸钾, 反应 1.5 h, 离心分离、洗涤后再在 $70\sim 80\text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥, 即得到共聚物粉末。

1.3 PSMAI 纳米纤维的制备

将 PSMAI 缓慢添加到 DMF 溶剂中, 室温下搅拌 2 h, 制得浓度为 10% 的聚合物电纺溶液, 在自制静电纺丝机上纺丝得到 PSMAI 纳米纤维膜。将上述纤维置于 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 电热真空干燥箱中干燥处

理, 备用。

1.4 PSMAI 纳米纤维膜固载化过氧化物酶

将 PSMAI 纳米纤维膜放置于 1% 的牛血清蛋白 (BSA) 溶液中浸泡 70 min, 经二次蒸馏水浸泡、清洗两次后, 将纳米纤维膜浸泡在过氧化物酶溶液中, 冰浴条件下固定, 固载 HRP 的 PSMAI 纳米纤维膜取出后用 $\text{pH} = 7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次, 置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中待用, 样品记作 PSMAI-HRP。

1.5 吸附容量检测

采用 Bradford 方法检测 HRP 在纤维表面的吸附容量。通过紫外-可见光谱仪测定考马斯亮蓝在 595 nm 处的吸收强度, 利用朗伯-比尔定律推算 HRP 在溶液中的浓度, 并采用公式 (1) 计算吸附容量 q 。

$$q = \frac{(c_0 - c)V}{m} \quad (1)$$

式中 q 为 HRP 在纤维表面的吸附容量, mg/g ; c_0 和 c 分别是 HRP 在溶液中的初始浓度和即时浓度, mg/mL ; V 是 HRP 溶液的体积, mL ; m 是 PSMAI 纤维的质量, g 。

1.6 表征

纤维形貌及直径采用 S-3000N (HITACHI, Japan) 型扫描电镜观察; 聚合物化学结构的红外光谱用 IFS66/S 型 (德国 BRUKER 公司) 时间分辨红外光谱仪测定。

1.7 HRP 活性测定

1.7.1 游离 HRP 酶活测定

采用沃辛通 (Worthington) 法测定 HRP 的活性^[20,21]. 实验通过简述如下: 取 1.4 mL 苯酚和 4-氨基安替比林 (4-AAP) 的混合溶液 (苯酚和 4-AAP 浓度分别为 0.172 mol/L, 2.46×10^{-3} mol/L)、1.5 mL 的过氧化氢磷酸盐缓冲液 (浓度为 1.76×10^{-3} mol/L) 置于 1 cm 比色皿中, 然后加入游离 HRP, 混合后迅速放入紫外-可见分光光度计中, 检测 3 min 内 510 nm 处吸光度每 1 min 的增大值 (以蒸馏水为参比), 并取平均以计算酶活.

1.7.2 PSMAI-HRP 酶活测定

前期步骤同游离 HRP 酶活测定, 当加入固定化 HRP 反应 3 min 后, 迅速过滤分离出固定化过氧化物酶以终止反应, 取清液置于 1 cm 比色皿中在 510 nm 下测定溶液的吸光度.

1.8 催化处理多酚评测

采用愈创木酚法测定 HRP 催化处理邻甲氧基苯酚 (OMP) 的活性. OMP 去除率 P 根据公式 (2) 计算.

$$P(\%) = \frac{Q_0 - Q_s}{Q_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中 Q_0 为初始 OMP 量, mg; Q_s 为反应终止 OMP 量, mg.

实验过程如下: 取 PSMAI-HRP ((20 ± 1) mg); 膜或等量自由 HRP 至 15 mL 具塞试管中, 依次加入 8.06×10^{-3} mol/L 邻甲氧基苯酚 1 mL、蒸馏水 6.9 mL, 充分混合后, 加入 5.30×10^{-2} mol/L H_2O_2 1 mL, 摇匀并计时. 反应一定时间后取样, 并加入 0.1 mL 0.658 mol/L 偏磷酸, 终止反应, 以不加 H_2O_2 的空白管调零在 470 nm 下比色. 根据酶促反应计算出反应终止时的 OMP 的量.

2 结果与讨论

2.1 纤维形貌表征

静电纺丝制备的 PSMAI 纳米纤维和固载 HRP 后的纳米纤维如图 1 所示. 图 1(a) 为 PSMAI 纳米纤维, 从图中可以看出纤维平直, 表面光滑, 直径在 (250 ± 20) nm. 图 1(b) 为固载 HRP 后的纳米纤维, 从图中可以看出纤维柔性弯曲并粘连在一起, 直径在 (280 ± 20) nm. 这表明纤维经 HRP 固载后形态有所变化, 从平直趋向于弯曲,

纤维直径略有增加. 这是由于纳米纤维在过氧化物酶溶液浸泡和干燥过程中局部应力变化而引起的弯曲变形.

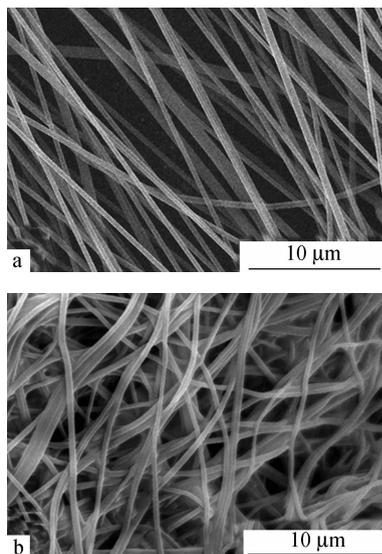


Fig. 1 Morphologies of (a) original PSMAI nanofibers and (b) PSMAI nanofibers after immobilization HRP
PSMAI concentration in the spinning solution: 15 wt%

2.2 共聚物 FTIR 表征

无皂乳液聚合法合成的苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物红外谱图如图 2 中, 对比 PS, 可以看出在 PSMAI 谱图中的 1698.97 cm^{-1} 位置处出现了羰基的伸缩振动峰, 这说明所合成的共聚物中含有羰基官能团.

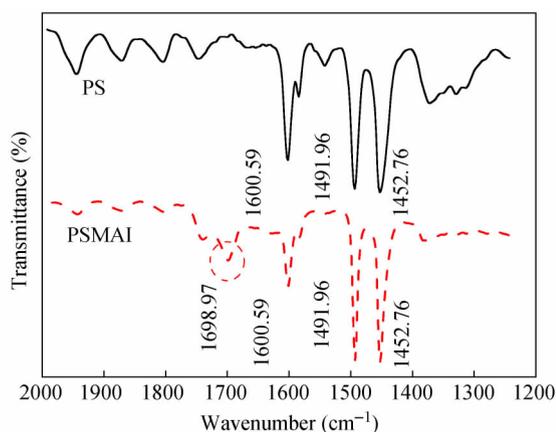


Fig. 2 FTIR spectrum of PSMAI copolymer

2.3 固定化时间对 HRP 吸附容量和活性影响

将 PSMAI 纳米纤维膜浸于 1.0 mg/mL 的 pH 值为 7.0 的 HRP 溶液中, 考察固定时间对 HRP 在纤维表面的吸附容量和活性的影响, 结果如图 3 所示.

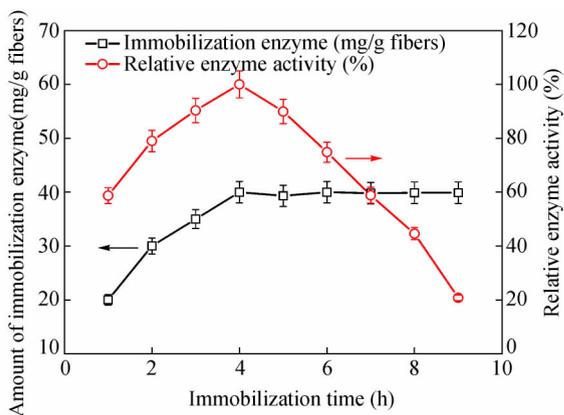


Fig. 3 Effect of immobilization time on enzyme loading capacity

由图 3 可见,载酶量随时间的增加而增加,吸附时间 4 h 时,吸附容量达到最大 40 mg/g,相比于 1 h 增加了近 1 倍.之后继续增加吸附时间,酶吸附容量不再随时间变化,说明酶在纤维表面的吸附已经达到饱和. HRP 活性在前 4 个小时同样出现较快增长,4 h 时达到最大,之后随固定时间的进一步增加,酶的活性逐渐下降.这主要是由于固定化时间延长,固定化过程会影响酶构象,从而降低活性.因此,从实验结果来看,酶固定最佳时间为 4 h.

2.4 热稳定性

从图 4 可以看出,固定化酶的最佳活性温度为 40 °C,相比于游离酶提高了 5 °C.游离酶和固定化酶在温度低于 35 °C 时,随着温度的提升相对酶活均有所增加,固定化酶比游离酶相对活性有所提高.当温度大于 40 °C,游离酶和固定化酶的相对酶活随着温度的增加而降低,当温度达到 70 °C 时,游离酶的活性几乎完全失活,而固定化酶仍保持近

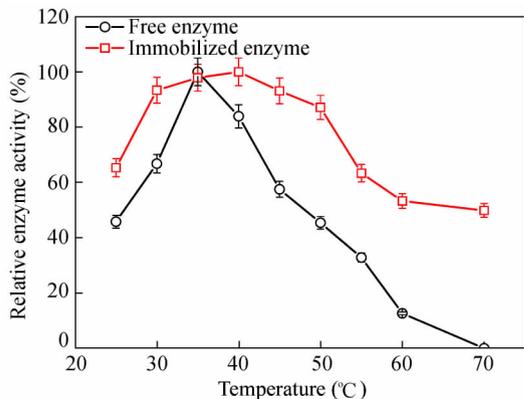


Fig. 4 Effect of temperature on the activity of free and immobilized HRP

50% 的活性,耐热性能明显增强.这是由于固定化的酶与纤维之间的相互作用减少了酶空间结构的自由度,从而保护 HRP 在高温时失活.

2.5 存储稳定性

从图 5 发现,游离酶和固载酶的活性均随着放置时间的增加而降低,经过 20 天的室温放置,游离酶的活性只保留 40%,而固定化酶的活性保留高达 60%,提高了近 20%,这说明固定化酶的放置稳定性好于游离酶,更利于存储.这可归结于经 PSMAl 纳米纤维膜固定化限制了酶的空间构象的改变,从而增加了放置时间的稳定性^[22].

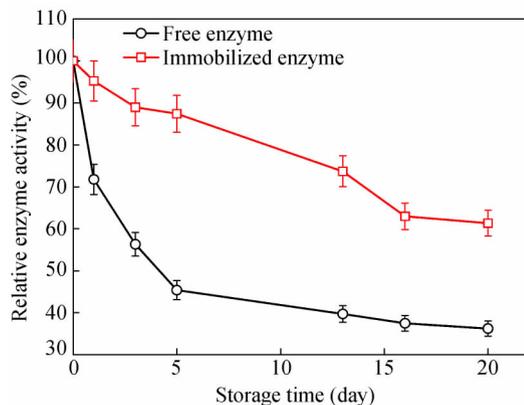


Fig. 5 Storage stability of free and immobilized HRP

2.6 pH 稳定性

从图 6 可以看出,pH 值为 6.0 时,游离酶和固定化酶酶活均达到最大,而对于其它 pH 值固载化酶的活性均高于游离酶. pH 为 2.0 时,游离酶完全失活,而固定化酶保留了 30% 的酶活.这说明将 HRP 固载于 PSMAl 纳米纤维载体上可有效降低酶的 pH 敏感性^[23].

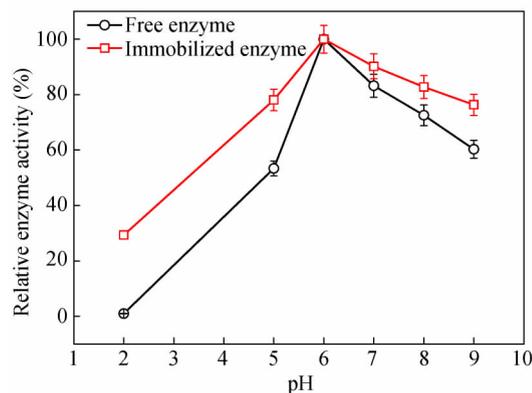


Fig. 6 Effect of pH on the activity of HRP

2.7 HRP 去除邻甲氧基苯酚性能

从图 7 中可以看出在初始反应的 30 min 内

自由 HRP 和 PSMAI-HRP 的去除效率快速增加,但随着时间的延长,去除效率减缓并达到稳定.在 120 min 内 PSMAI-HRP OMP 的去除效率达到了 80.2%,而自由 HRP 效率只有 50.0%,说明 PSMAI-HRP 具有比自由 HRP 更好的去除效率.这可能是由于两方面原因:一方面,三维多孔 PSMAI 纳米纤维膜对 OMP 的吸附作用;另一方

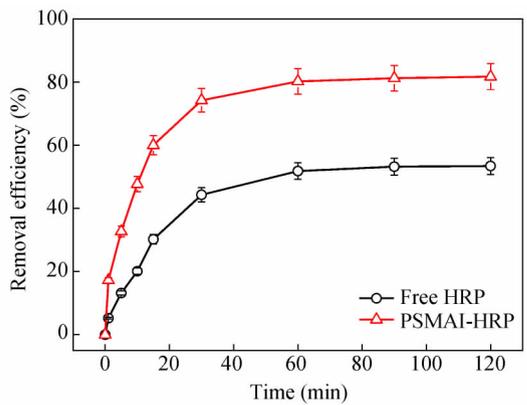


Fig. 7 Degradation kinetics of OMP by free HRP and PSMAI-HRP

面,固定在 PSMAI 纤维表面的 HRP 酶高效催化降解 OMP.

4 结论

(1) 采用无皂乳液聚合法对苯乙烯单体进行改性,得到了具有羧基官能团的苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物.并结合静电纺丝技术成功制备了直径在 250 nm 的聚苯乙烯-甲基丙烯酸纳 (PSMAI) 米纤维.

(2) 以 PSMAI 纳米纤维为载体,通过化学吸附的方法在纤维表面固载 HRP.最佳固载时间为 4 h.经与自由 HRP 相对比,实验结果证明固载化的 HRP 具有更好的热稳定性,存储稳定性和较低的 pH 值敏感性,更适合于在复杂环境下的应用.

(3) 采用 PSMAI 纳米纤维固载化的 HRP 处理污水中的邻甲氧基苯酚,效率高达 80.2%.这表明固载化 HRP 在污水治理中具有广阔的应用前景.

REFERENCES

- Sheldon R A, Schoevaart R, Langen L M V. *Biocatal Biotransfor*, 2005, 23(3-4): 141 ~ 147
- Sheldon R A. *Adv Synth Catal*, 2007, 349(8-9): 1289 ~ 1307
- Tischer W, Wedekind F. *Top Curr Chem*, 2009, 200: 95 ~ 126
- Nisha S, Arun K S, Gobi N. *Chem Sci Rev Lett*, 2012, 1(3): 148 ~ 155
- Ince A, Bayramoglu G, Karagoz B, Altintas B, Bicak N, Arica M Y. *Chem Eng J*, 2012, 189-190(1): 404 ~ 412
- Li D X, Jia D M, Zhou P. *J. South China Univ Tech*, 1998, 26(8): 63 ~ 67
- Michele P, Teodora B, Claudio C, Daniela U, Massimo P, Dario P. *Polym Int*, 2012, 61(11): 1611 ~ 1618
- Nurşen S, Esin A, Dilek N, Nurdan K Y. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11870 ~ 11880
- Katja H, Björn H, Matthias B. *Anal Biochem*, 2008, 378: 184 ~ 189
- Boonwanich W, Charoensirawatana W. B. *Depart Med Sci* 2012, 41(3): 263 ~ 270
- Feng Z Q, Chu X H, Huang N P, Wang T, Wang Y C, Shi X L, Ding Y T, Gu Z Z. *Biomaterials*, 2009, 30: 2753 ~ 2763
- Pan C, Ge L Q, Gu Z Z. *Compos Sci Technol*, 2007, 67: 3271 ~ 3277
- Shao Linjun(邵林军), Wu Jian(吴健), Xu Zhikang(徐志康). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (11): 1283 ~ 1287
- Miao Yuee(缪月娥), Liu Tianxi(刘天西). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2012, (8): 801 ~ 811
- Dai Yunrong(代云容), Niu Junfeng(牛军峰), Yin Lifeng(殷立峰), Liu Jia(刘佳), Jiang Guoxiang(蒋国翔) *Progress In Chemistry(化学进展)*, 2010, 22(9): 1808 ~ 1818
- Han D, Filocomo S, Kirby R, Steckl A J. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2011, 3: 4633 ~ 4639
- Sun K, Li Z H. *Express Polym Lett*, 2011, 5(4): 342 ~ 361
- Daniel N T, Kenneth J B J. *Top Catal* 2012, 55: 1057 ~ 1069
- Navid A, Saede M, Seyed-Omid R S, Mohammadreza K, Kaveh N, Vida A. *Fiber Polym*, 2012, 13(8): 994 ~ 998
- Nicell J A, Wright H A. *Enzyme Microb Tech*, 1997, 21: 302 ~ 310
- Wang Cui(王翠), Jiang Yanjun(姜艳军), Zhou Liya(周丽亚), Gao Jing(高静). *Journal of Chemical Industry and Engineering(化工学报)*, 2011, 62(7): 2026 ~ 2032
- Nursel P, Bekir S, Olgun G. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 21: 273 ~ 282
- Sinan A, Nevra O, Adil D. *J Appl Polymer Sci*, 2009, 114: 962 ~ 970

**IN SITU IMMOBILIZATION OF HORSERADISH PEROXIDASE ON
ELECTROSPUN POLY(STYRENE-*co*-METHACRYLIC AICD)
NANOFIBROUS MEMBRANE FOR CATALYTIC
TREATMENT OF POLYPHENOL**

Chao Pan, Zhong-qi Luan, Xiao-jiao Wang, Ling Ma

(College of Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract Poly(styrene-*co*-methacrylic acid) (PSMAI) nanofibers with carboxyl groups was prepared by a combination of the soap-free emulsion polymerization method and electrospinning technique, which were employed as solid support to immobilized horseradish peroxidase (HRP) enzyme through the amide bond formation between COOH of PSMAI-cell and NH₂ of HRP molecules. Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the morphology and diameter of the nanofibers. Surface carboxyl of these fibers was confirmed by FTIR spectroscopy. The parameters about immobilizing HRP on the PSMAI nanofibers were studied and influence on the activity of the HRP was discussed. This study showed that soap-free emulsion polymerization method is an ideal technology to modify the polystyrene and ultimately achieve enzyme immobilization on electrospun PSMAI nanofibers surface. The immobilized HRP showed better resistance to pH and temperature than that of free form, and the storage stabilities, reusability of immobilized HRPs were significantly improved. Immobilized HRP equipped in biological reactor is applied to treat the polyphenol waste water. The catalytic removal efficiency of immobilized HRP for removal of *o*-methoxyphenol (OMP) remained above 80.2% for 120 min. Immobilized HRP equipped in biological reactor is applied to treat the phenol waste water.

Keywords Soap-free emulsion polymerization, Electrospun nanofibers, Horseradish peroxidase, Enzyme immobilization, *O*-methoxyphenol degradation