

# 乳酸氧化酶在复合功能铝膜中的固载研究\*

付文升, 罗兴萍, 黄俊菲, 曹梨梨, 黄小龙, 谭裕玲, 贺 娇

(重庆师范大学 化学学院, 重庆 400047)

**摘要:**在有序多孔的阳极氧化铝膜腔体内,以 F127 为表面活性剂,采用压力诱导的方法制备出孔径约为 12 nm 的介孔二氧化硅-一维纳米材料。制得的复合功能性铝膜,先用烧结的方法除去表面活性剂 F127,然后将 3-胺基丙基-三甲氧基硅( APTMS)固定到介孔的表面上,通过戊二醛( GA)的交联作用使乳酸氧化酶( LOD)固载,制备出具有生物催化活性的复合功能性铝膜。实验结果表明,复合功能性铝膜催化乳酸溶液时,当其流速很慢( 0.3 mL/min)且浓度较低( 5  $\mu$ M)时可以获得 83.8% 左右的较高的转化率。

**关键词:** 阳极氧化铝膜; 乳酸氧化酶; 介孔二氧化硅; 合成

中图分类号: O611.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2010)04-0061-04

生物酶是一种催化效率高,选择性好,反应条件温和的生物催化剂,被广泛地应用于化学分析以及工业生产等领域中。酶是水溶性分子,为使其与产物较好地分离,最好的方法是将其固定于载体上<sup>[1-3]</sup>。在无机材料中,由于介孔硅材料具有孔径大且尺寸均一,比表面积大和骨架结构可控等特点,并且具有吸附性能高、热稳定性好、化学性质稳定、机械强度高性质,因此是固定化酶的理想载体<sup>[4]</sup>。

1996年,Diaz和Balkus等<sup>[5]</sup>第一次成功地把生物酶固载到介孔材料 MCM41 上,但是由于 MCM 型介孔硅孔径较小,通常仅适合半径小的酶分子的固载且负载量较低。Zhao<sup>[6]</sup>及 Schmidt Winkel 等<sup>[7]</sup>通过三嵌段表面活性剂以及膨化试剂的选取,合成出了孔道尺寸较大的 SBA 和 MCF 型介孔材料,极大地提高了酶的负载量。这使得用介孔硅材料固载生物酶的研究迅速发展起来。

近些年来,以电化学的手段制备有序的阳极氧化铝膜的方法日趋成熟,很多科学家开始探索在铝膜腔体内介孔材料的合成<sup>[8-9]</sup>。中科院的杨振忠研究员和美国 Tulane 大学化工系卢云峰教授首先提出以多孔阳极氧化铝膜为模板,结合无机物的溶胶/凝胶和三嵌段共聚物聚环氧乙烷-聚环氧丙烷-聚环氧乙烷( PEO-PPO-PEO)的自组装过程,制备了一维纳米孔结构的二氧化硅纤维和管及其阵列体系,实现了产物形貌和纳米孔结构的可控调节<sup>[10]</sup>。Ter-

amae 研究小组以 CTAB 为表面活性剂,通过压力诱导的方法在铝膜的腔体内合成了具有一维纳米通道的介孔硅 MCM41<sup>[11]</sup>。Stucky 研究小组又系统地介绍了复合硅材料在不同孔道半径铝膜中的自组装过程的研究<sup>[12]</sup>。

虽然在铝膜腔体内介孔材料的制备研究进展迅速,但是相关的应用研究却一直很少有人报道。2007年,作者研究小组分别用 P123 和 F127 为表面活性剂,采用压力诱导的方法在铝膜腔体内合成了一维、一维三维混合和三维的介孔硅材料<sup>[13]</sup>。在新材料合成的同时,把葡萄糖氧化酶固定在介孔硅的表面,很好地保留了酶的活性<sup>[14]</sup>,拓展了这类材料在生物领域中的应用。本文介绍了以 F127 为表面活性剂,结合溶胶凝胶技术,在铝膜孔道内形成了孔径大小约为 12 nm,具有三维结构的介孔硅材料;同时,采用化学键合的固定方法在孔道表面进行了乳酸氧化酶( LOD)的固定,考察了生物酶固载前后介孔硅孔道的变化;研究了固化后的生物酶的催化效率以及贮藏时间等因素对酶活性的影响。

## 1 实验

### 1.1 试剂与仪器

乳酸氧化酶( Aldrich 公司),正硅酸乙酯( Aldrich 公司),乙醇( Aldrich 公司),三嵌段表面活性剂 F127 (Fluca 公司),盐酸( Fluca 公司),铝膜( Whatman 公

\* 收稿日期 2009-10-20 修回日期 2009-12-11

资助项目: 国家自然科学基金( No. 20801062),重庆市自然科学基金( No. CSTC2009BB4055)

作者简介: 付文升,男,教授,博士,研究方向为无机合成。

司)水为去离子水。

ASAP2010 型快速比表面孔径分析仪, JEM-200EX 型透射电子显微镜, JASCO-FP6000 荧光分光光度计。

## 1.2 方法

1.2.1 复合铝膜的制备 采用压力诱导的合成方法, 将由正硅酸乙酯水解得到的前驱液<sup>[14]</sup>抽入铝膜的微孔内, 至前驱液完全抽干, 室温下干燥 24 h。将复合铝膜夹在两片平板玻璃之间, 从室温程序升温至 600°C, 使表面活性剂完全除去, 然后缓慢冷却至室温。

1.2.2 LOD 的固载 9 mL 无水甲醇和 1 mL 三氨丙基三甲氧基硅烷于圆底烧瓶中充分混合, 将上一步制得的复合铝膜浸入到混合溶液中, 然后在 60°C 加热 4 h。缓慢冷却至室温, 取出铝膜, 并用无水甲醇反复洗涤, 最后用减压法干燥 2 h。干燥后的铝膜放在抽滤装置上, 取 1 mL 2.5% 的戊二醛溶液滴加到铝膜表面, 在一定压力的作用下将其缓慢地抽过铝膜, 然后用 0.01 M 的磷酸盐缓冲溶液反复清洗铝膜以除去残留的戊二醛, 铝膜浸入到 1 mL 乳酸氧化酶 (0.5 mg/mL) 溶液当中, 在摇床上以 80 rpm 的速度振荡 20 h, 得到具有生物功能性的复合铝膜。

1.2.3 催化活性的检测 将复合功能性铝膜放置在真空抽滤装置上, 用移液器移取一定量的乳酸溶液于铝膜上方, 通过控制体系的真空度使溶液缓慢地从铝膜孔道内流过, 将反应后的产物小心地收集起来, 用显色法检测酶的催化活性。检测体系涉及到两步酶的催化反应, 首先是固定的乳酸氧化酶催化乳酸使其转变为丙酮酸和双氧水, 然后用过氧化物酶催化双氧水氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯二胺, 使其显色, 通过分光光度计检测双氧水的转化率, 进而计算出乳酸的转化率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固载乳酸氧化酶前后二氧化硅的孔道变化

固载乳酸氧化酶前后的氮气吸附曲线(如图 1a 所示)可知, 实验制得的 SBA-16 纳米纤维呈现标准的 IV 型吸附等温线(如图 3 所示), 意味着它们都是具有均一孔道的介孔材料。根据吸附等温线吸附的数据, 由 BJH 方法计算得到固载乳酸氧化酶前材料的孔容为 0.033 cm<sup>3</sup>/g, 比表面积是 19.79 m<sup>2</sup>/g。而固载了酶分子之后, 材料的孔容和比表面积明显减小(图 1b), 分别为 0.018 cm<sup>3</sup>/g 和 10.56 m<sup>2</sup>/g。

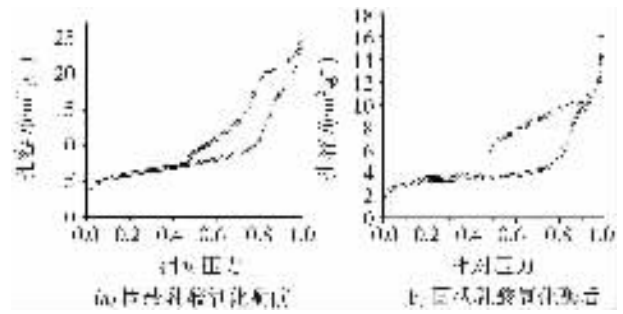


图1 固载乳酸氧化酶前后复合铝膜的氮气吸脱附曲线

从透射电子显微(TEM)照片可以看到, 介孔二氧化硅的孔道在固载生物膜分子前后有着十分明显的变化(如图 2, 图中的标尺为 20 nm)。在以化学键和的方法固载生物分子前, 可以从图 2a 上清楚地观测到材料的孔道, 孔的直径约为 12 nm。在固载了生物酶分子后, 原本十分清晰的孔道变得很模糊(如图 2b)。这些结果表明生物酶分子很好地固定到介孔硅的孔道中。

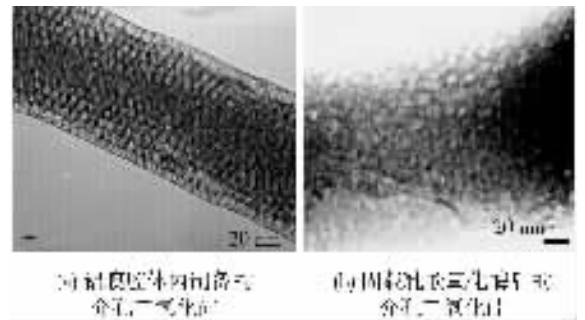


图2 介孔二氧化硅的透射电镜照片

### 2.2 乳酸浓度对铝膜催化效率的影响

分别将浓度为 5、10、15 和 20 μM 的 1 mL 乳酸溶液倾倒在复合功能铝膜表面, 通过调整体系的真空度来调节乳酸的流速, 使其以相同的速率流过铝膜, 利用分光光度计来检测乳酸的转化率。由图 3 可知, 当乳酸的浓度为 5 μM 时, 其转化率最高, 为 83.8%, 随着溶液浓度的升高, 乳酸的转化率降低很快, 这可能是由于乳酸氧化酶在介孔硅表面覆盖率较低, 当乳酸浓度过高时来不及与酶进行反应造成的。

### 2.3 反应底物流速对铝膜催化效率的影响

同时研究发现乳酸溶液流经复合铝膜的速度对其转化率有一定的影响。将 1 mL 浓度为 5 μM 的乳酸溶液倾倒在铝膜上方, 通过调节体系的真空度来调整溶液的留下速度。当流速为 0.3 mL/min 时, 乳酸的转化率最高, 如图 4 所示, 转化率随着流速的增大呈明显的下降趋势。这表明适当的流速有利于

提高乳酸的转换效率。

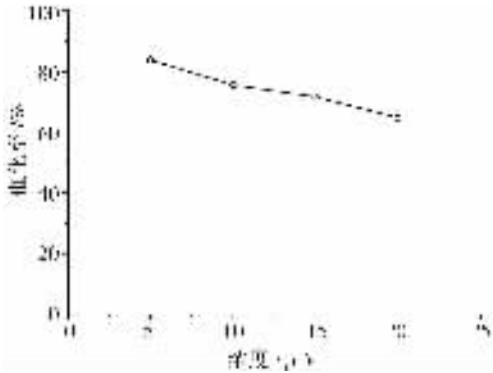


图3 不同浓度的乳酸溶液在相同流速下的转化率

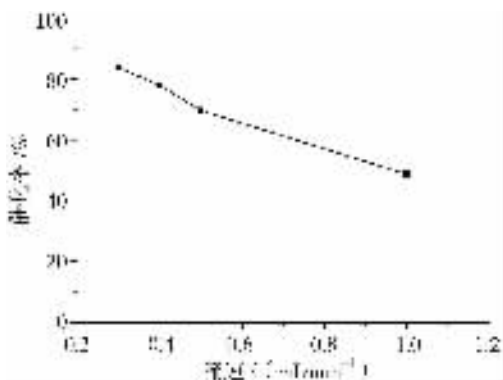


图4 不同流速下乳酸溶液的转化率

#### 2.4 贮藏时间对铝膜催化效率的影响

对于固定化酶来说,贮藏时间对催化效率的影响是膜功能性的一个非常重要的参数。在温度4℃下,将复合功能性铝膜储藏在磷酸钠的缓冲溶液中,检测时间变化对复合功能性铝膜催化效率的影响。随着时间的延长,复合铝膜催化效率呈现出明显递减的趋势(如图5所示),储存3d后,复合铝膜的催化效率仅为初始时催化效率的33%,一个原因是乳酸氧化酶不稳定,在复合铝膜中很快失去活性,从而使得复合铝膜的催化活性降低很快;另外一个原因可能是一部分游离的乳酸氧化酶从铝膜上脱落下来。

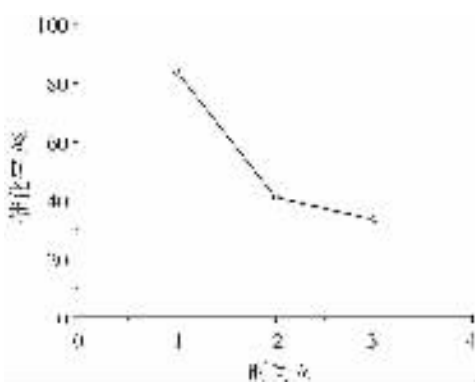


图5 乳酸氧化酶的催化活性随贮藏时间的变化

本文在铝膜的腔体内合成一维介孔二氧化硅的基础上,通过化学键合的方法将乳酸氧化酶分子固载到介孔材料的表面,试验测试了生物酶分子在固载后其生物活性的变化。结果表明,复合功能性铝膜催化乳酸溶液时,当其流速很慢且浓度较低时可以获得较高的转化率。这种固化酶分子的方法相比于用传统的粉末介孔硅材料固载生物酶方法有明显的优势。首先,克服了传质阻力的影响,使用复合功能性铝膜进行催化反应时,可以将反应底物“抽过”铝膜,大大降低了传质阻力的影响;另外,催化反应完成后,不必再将铝膜与溶液分离也是复合功能性铝膜区别于粉末硅材料的特色之一。因此这种功能性复合铝膜在固定床反应器等领域的应用有着巨大的价值。

#### 参考文献:

- [1] Koeller K M, Wong C H. Enzymes for chemical synthesis [J]. Nature 2001, 409: 232-240.
- [2] Schmid A, Dordick J S, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow [J]. Nature 2001, 409: 258-268.
- [3] Luckarift H R, Spain J C, Naik R R, et al. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22: 211-213.
- [4] Fan J, Yu C, Gao F, et al. Cubic mesoporous silica with large controllable entrance sizes and advanced adsorption properties [J]. Angew Chem Int Ed 2003, 42: 3146-3150.
- [5] Diaz J F, Balkus K J J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1996, 2: 115-126.
- [6] Zhao D, Huo Q, Feng J, et al. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered hydrothermally stable mesoporous silica structures [J]. J Am Chem Soc 1998, 120: 6024-6036.
- [7] Winkel S P, Lukens W W, Zhao D, et al. Sticky mesocellular siliceous foams with uniformly sized cells and windows [J]. J Am Chem Soc 1999, 121: 254-255.
- [8] Wang D, Kou R, Yang Z, et al. Hierarchical mesoporous silica wires by confined assembly [J]. Chem Commun 2005: 166-167.
- [9] Lu Q, Gao F, Komarneni S, et al. Ordered SBA-15 nanorod arrays inside a porous alumina membrane [J]. J Am Chem Soc 2004, 126: 8650-8651.
- [10] Yang Z, Niu Z, Cao X, et al. Template synthesis of uniform one dimensional mesostructured silica materials and their arrays in anodic alumina membranes [J]. Angew Chem Int Ed 2003, 42: 4201-4203.

- [ 11 ] Yamaguchi A ,Uejo F ,Yoda T ,et al. Teramae ,self-assembly of silica-surfactant nanocomposite in porous alumina membrane [ J ]. *Nat Mater* 2004 ,3 : 337-341.
- [ 12 ] Wu Y ,Cheng G ,Katsov K ,et al. Stucky ,composite mesostructures by nano-confinement [ J ]. *Nat Mater* ,2004 ,3 : 816-822.
- [ 13 ] Yamaguchi A ,Kaneda H ,Fu W ,et al. Structural control of surfactant-templated mesoporous silica formed inside columnar alumina pores [ J ]. *Adv Mater* 2008 ,20 : 1034-1037.
- [ 14 ] Fu W ,Yamaguchi A ,Kaneda H ,et al. Enzyme catalytic membrane based on a hybrid mesoporous membrane [ J ]. *Chem Commun* 2008 : 853-855.

## Immobilization of Lactate Oxidase Within a Hybrid Mesoporous Membrane

*FU Wen-sheng , LUO Xing-ping , HUANG Jun-fei , CAO Li-li , HUANG Xiao-long ,  
TAN Yu-ling , HE Jiao*

( College of Chemistry , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China )

**Abstract :** The hybrid mesoporous membrane was prepared by using Pluronic F127 ( ( PEO )<sub>106</sub>( PPO )<sub>70</sub>( PEO )<sub>106</sub> ) as a structure-directing agent. Columnar mesoporous silica was formed inside the anodic aluminium membrane ( AAM ) pores and had a length of ca. ( 50 ± 2 ) μm. Nano-fiber with the diameters of the pores being about 12 nm was aligned along the long axis of the AAM pore walls. The lactate oxidase ( LOD ) encapsulation was done by covalent attachment on the inner wall of the silica mesopores. After removing of Pluronic F127 inside the silica mesopores by calcination , the 3-aminopropylethoxysilane ( APTMS ) was immobilized on the inner pore surface. Then , the LOD was covalently attached via a linker of glutaraldehyde ( GA ) and the LOD-M was obtained. The resulting LOD-M was applied for conversion of lactic acid to pyruvic acid. The LOD-M can be used for conversion of lactic acid by using a conventional filtration apparatus. The proposed scheme allows conversion of lactic acid without separation of the mesoporous silica host from the reaction media. We compared the morphology of the mesoporous material after immobilization of enzyme by TEM and isotherm. The effect on enzyme activity , such as concentration of L-lactate , flow speeds and storage time , was also tested.

**Key words :** anodic aluminium membrane ; lactate oxidase ; mesoporous silica ; synthesis

( 责任编辑 欧红叶 )