

文章编号: 1000-324X(2006)05-1154-07

## 淀粉 /PEG 制备双孔块状 $\text{SiO}_2$ 载体材料及其酶活力

杨洪斌<sup>1</sup>, 陈 奇<sup>1</sup>, 宋 鹏<sup>1</sup>, 叶蕊芳<sup>2</sup>, 侯凤珍<sup>1</sup>, 陆剑英<sup>1</sup>

(1. 华东理工大学无机材料系, 上海 200237; 2. 华东理工大学生物工程系, 上海 200237)

**摘 要:** 采用溶胶-凝胶法, 以聚乙二醇为介孔造孔剂、淀粉为大孔造孔剂, 经过  $600^\circ\text{C}$  热处理, 制得介孔平均孔径为 10nm 左右、大孔平均孔径为  $8\sim 11\mu\text{m}$  的  $\text{SiO}_2$  块状材料. 样品的最小密度为  $0.34\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 最大气孔率为 76%. 引入 30% 淀粉制备多孔样品作固定葡萄糖淀粉酶的载体, 可使初始酶活力由原来的 5994U 提高至 14702U. 且连续使用五次之后仍具有一定的酶活力. 另外在  $80^\circ\text{C}$  水中浸泡 7 天之后, 多孔样品对酶的吸附量均有提高. 浸泡前后, 酶活力相差不大. 这些结果表明: 此类多孔材料在固定葡萄糖淀粉酶方面可长时间使用, 便于酶的回收、保存和再利用.

**关 键 词:** 双孔结构; 多孔块体; 溶胶-凝胶法; 酶载体

**中图分类号:** TQ171, O61; **文献标识码:** A

### 1 引言

多孔材料是当前材料科学中发展较为迅速的一种材料, 特别是孔结构可控、比表面积大的纳米级多孔材料具有许多独特的性质, 在催化、吸附固定及分离等方面有诱人的应用前景<sup>[1~4]</sup>. 酶是由生物体所合成的蛋白质, 已成为所有生物体内化学反应的催化剂. 酶固定化后, 可使反应连续化, 提高产率而且过程可以精密控制. 在固定化酶中应用的载体可分为有机高分子载体、无机载体和复合载体三大类. 无机载体材料具有以下优点: ①热稳定性高, 使用温度一般可达  $400^\circ\text{C}$  以上; ②化学稳定性好; ③抗压强度大, 适用高压条件; ④无机物的组成一般无毒, 不会产生二次污染, 清洗和再生容易; ⑤孔分布窄. 目前对固定酶载体的研究主要集中在多孔粉体材料, 如介孔材料 MCF<sup>[5]</sup>、SBA-15<sup>[6]</sup>、MCM-41<sup>[7]</sup> 等. Pandya 等<sup>[8]</sup> 研究发现, 孔径较大的 MCF(15.3nm) 在酶固定方面比孔径小的 MCM-41(2.6nm) 和 SBA-15(6.4nm) 效果好. 这是由于酶只固定在其外表面, 活性较低, 而 MCF 具有较大的孔径使得酶更易固定在孔内, 提高了酶的活性. 因此较大孔径载体材料可能有利于提高酶活力, 但这方面的工作很少, 值得深入研究. 另一方面, 粉体材料在实际应用时不易分离, 在一定程度上影响了酶的回收利用. 因此, 多孔块状载体材料应用在酶固定方面将会有一定的优点.

双孔块状材料不仅具有酶固定所需要的介孔, 还有更大的孔道便于酶的流通, 这种独特孔状结构的载体材料是否能作为新型酶载体材料很值得探索. 汪秀全<sup>[9]</sup> 和刘海荣<sup>[10]</sup> 等用聚乙二醇作造孔剂, 制备出块状介孔材料. 这种块状材料的生产工艺简单、成品率高, 适合于工业化批量生产. 本文在此基础上以正硅酸乙酯为初始原料, 用聚乙二醇作介孔造

收稿日期: 2005-10-21, 收到修改稿日期: 2005-12-22

作者简介: 杨洪斌 (1980-), 女, 硕士研究生. 通讯联系人: 陈 奇. E-mail: qichen@ecust.edu.cn

孔剂、淀粉作大孔造孔剂, 通过溶胶 - 凝胶法使有机无机杂化, 得到凝胶块体, 然后经过模压成型、中温热处理制得双孔块状 SiO<sub>2</sub> 材料. 研究了淀粉对于多孔样品的孔结构、化学稳定性及对葡萄糖淀粉酶活力的影响.

## 2 实验部分

### 2.1 样品制备

以化学纯正硅酸乙酯 (TEOS)、聚乙二醇 (PEG, 分子量为 2000)、淀粉 (Starch)、无水乙醇 (EtOH)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、氨水和去离子水为原料, 在室温下将 TEOS、H<sub>2</sub>O、DMF 和 EtOH 按照摩尔比 TEOS:H<sub>2</sub>O:DMF:EtOH=1:10:0.86:1 配好搅拌均匀, 再与聚乙二醇溶液混合配置成溶胶液, 其中 PEG/TEOS=15/85(wt%). 再将不同比例的淀粉添加到配好的溶胶液中, 待其凝胶后在 50°C 真空干燥箱中干燥 24h, 然后直接压块成型, 最后在 600°C 下热处理 2h. 样品的直径为 17mm、高度为 3mm 左右. 工作中将样品编号列为 P2KD $x$  ( $x$  代表淀粉含量, Starch:(TEOS+PEG)= $x$ :100,  $x=0$ 、5、10、15、20、25、30wt%).

### 2.2 样品表征

采用 CRY-2 型差热分析仪和 WRT-1 型热失重分析仪分别对凝胶粉和凝胶粉 / 淀粉的混合物进行差热 (DTA, Differential Thermal Analysis) 和热失重 (TG, Thermogrameter) 分析; 根据阿基米德法测定了多孔块材的开口气孔率和体积密度; 使用 ASAP2010 型物理自动吸附仪 (BET) 测定多孔块材介孔的比表面积、孔体积和孔径分布; 使用 AutoPore IV9500 V1.06 压汞仪测定样品的双孔孔径分布情况; 以 JSM-6360LV 扫描电镜观察块体样品的断面显微形貌; 在 80°C 热水中浸泡 7 天后, 采用单位表面积的失重和孔径变化来衡量多孔材料的水热稳定性 (样品的表面积与水的体积比为 0.07cm<sup>-1</sup>); 利用 S53/54 紫外可见分光光度计 (UV-Vis spectrophotometers) 测定葡萄糖淀粉酶水解产生葡萄糖的量.

### 2.3 样品对葡萄糖淀粉酶吸附及固定化酶活力

将不同淀粉含量的样品经 130°C 干燥后称重, 然后将样品浸泡在稀释 10 倍的酶液中, 恒温振荡 24h, 取出后用湿布擦去表面酶液再称重, 根据质量差计算出样品对酶液的吸附量 (浸泡前后酶液浓度没有变化). 生成葡萄糖量采用 3,5-二硝基水杨酸法测定 (以无水葡萄糖溶液为标准液, 于 520nm 处进行分光光度法的吸光度测定).

固定化酶活力定义: 在 pH=4.6, 温度为 40°C 时, 1mL 固定化葡萄糖淀粉酶液每小时水解  $w=2\%$  的淀粉所产生的葡萄糖毫克数表示为  $U^{[1]}$ .

## 3 结果和讨论

### 3.1 多孔样品的合成

图 1 是不同样品的热失重和差热曲线. 由图可见, 样品在 90°C 附近有一个明显的吸热峰, 这是由于吸附水和乙醇没有完全挥发所致, 含有淀粉的样品的失重在 10% 左右, 而不含淀粉的样品失重在 4%. 在 170~220°C 之间出现明显的放热峰, 是样品中未参加杂化反应的 PEG 分解, 质量损失在 20% 左右. 从 P2KD30 的差热曲线可以看到 300~600°C 之间仍有一个范围很宽的放热峰, 对应的失重曲线在这一阶段也有 15% 左右的质量减少, 而不含淀粉的样品在这个温度失重曲线基本保持不变, 说明这个放热峰是样品中淀粉氧化分解所致, 并且随着淀粉含量的增加样品在这一温度附近的失重逐渐增加. 600°C 之后各样品的热失

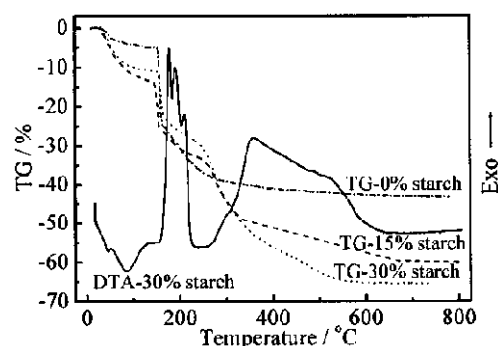


图 1 样品的热失重和差热曲线

Fig. 1 TG and DTA curves of the samples

重和差热曲线趋于水平,说明剩余有机物、聚乙二醇和淀粉基本挥发完全. 根据样品的热分析结果,样品的热处理温度可定为 600°C.

图 2 是经 600°C 热处理后不同淀粉含量样品的氮气吸附-脱附等温线和孔径分布曲线. 两个样品的吸附-脱附等温线同属于 IV 型等温线,并且有相似的 H3 型滞后环,说明样品具有狭缝状孔道<sup>[12,13]</sup>. 由图可以看出,当  $P/P_0 > 0.8$  时,氮气吸附量明显增加,说明样品的介孔孔道排列无序,孔径从小到大范围较宽. 另外从两个样品的

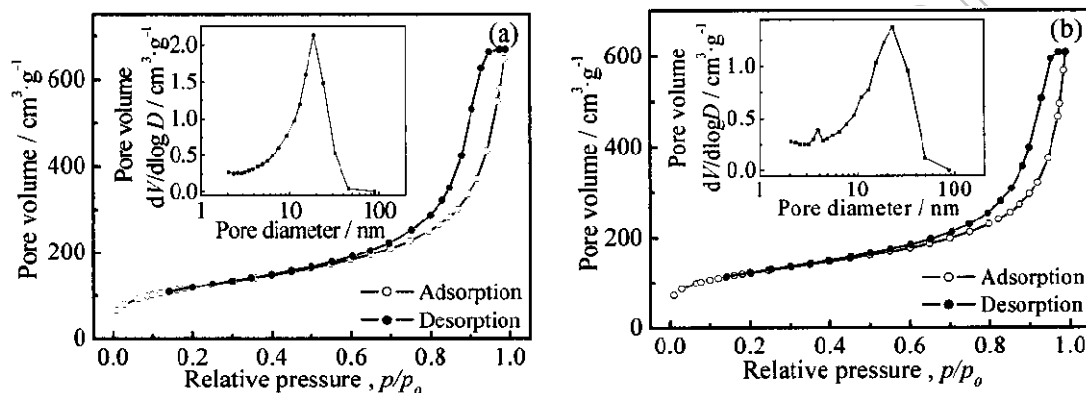


图 2 添加不同淀粉含量 (a)0%; (b)20% 制得样品的氮气吸附-脱附等温线和孔径分布曲线

Fig. 2 N<sub>2</sub> absorption-desorption and pore distribution curves of the samples prepared with different starch contents (a) 0%; (b) 20%

孔径分布曲线比较可以看出,淀粉含量的多少对样品介孔孔型影响不大,但是对介孔的孔径分布及孔体积有一定的影响,随着淀粉含量的增加,介孔孔径分布变宽.

图 3 是用压汞法测得的淀粉引入量为 20% 样品的孔径分布曲线,从图中可以看出所得块状样品具有双孔结构,其大孔主要分布在 8~11 μm 左右,介孔也在 10 nm 左右,而且孔径分布相对集中. 图 4 是扫描电镜对样品 P2KD20 大孔形貌观察. 由图 4(a) 可以看出大孔孔洞分布比较均匀; 由图 4(b) 可以看出孔洞近似圆形且大孔孔洞之间是相互连通的,大孔中贯穿着小孔,这样有利于物质的流通. 另外由图 4 也可以看出样品中大孔孔洞大小在 10 μm 左右,这与压汞法测得样品大孔孔径尺寸基本一致.

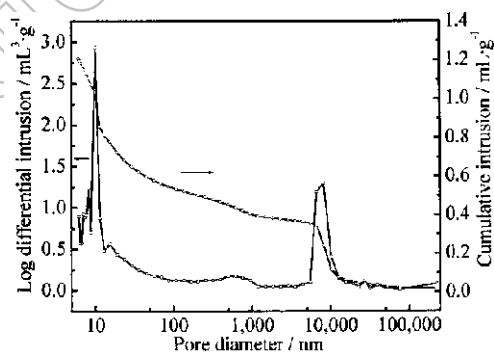


图 3 压汞法测得样品 P2KD20 孔径分布曲线

Fig. 3 Pore size distribution of the sample P2KD20 by mercury porosimetry

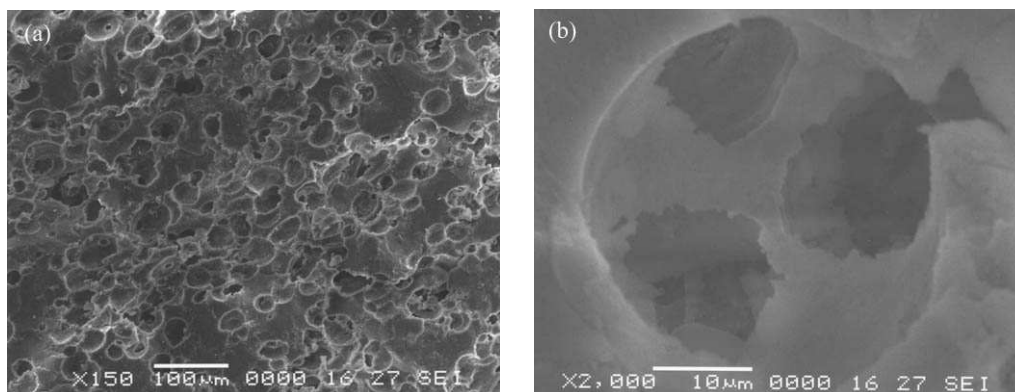


图4 经 600°C 处理后样品 P2KD20 的扫描电镜照片

Fig. 4 SEM photographs of the sample P2KD20 treated at 600°C

### 3.2 样品的水热稳定性

在实际应用过程中, 载体材料需浸泡在水溶液中, 因此对载体材料的水热稳定性有一定要求. 图 5 是样品 P2KD30 在 80°C 水中浸泡 7 天前后孔径变化和吸附 - 脱附曲线的比较.

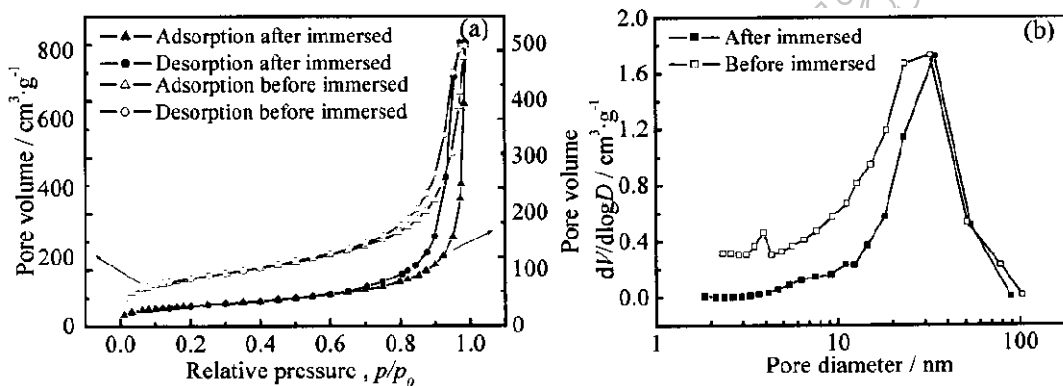


图5 在 80°C 水中浸泡 7 天前后样品吸附脱附曲线和孔径分布曲线

Fig. 5 N<sub>2</sub> absorption-desorption curves and pore distribution of the samples before and after immersed in water at 80°C for 7 days

从图 5(a) 中可以看出: 80°C 水中浸泡 7 天前后样品 P2KD30 的氮气吸附 - 脱附曲线形状基本相似, 说明介孔孔径类型没有明显变化. 另外, 从图 5(a) 还可以看出在  $P/P_0 < 0.8$  时, 浸泡前后 N<sub>2</sub> 在样品中的吸附量几乎没有变化, 当  $P/P_0 > 0.8$  时, N<sub>2</sub> 吸附量开始突然增加, 而且浸泡之后 N<sub>2</sub> 吸附量比浸泡之前有所减少. 从图 5(b) 可见, 浸泡之后孔大小主要集中在 30nm 左右, 30nm 以下的孔在浸泡之后数量降低, 说明 80°C 水浸泡后对 30nm 以下的孔略有侵蚀, 尺寸为 30nm 孔的数量基本没变. 表 1 列举了淀粉引入量为 0%、10%、20%、30% 的样品在 80°C 水中浸泡 7 天前后孔结构数据. 从表中可以看出, 样品的介孔平均孔径明显增大, 而介孔比表面大幅下降, 结合图 5 可知, 这是浸泡后孔径为 30nm 以下的孔减少造成的, 说明在 80°C 水浸泡 7 天对样品的较小的介孔有一定侵蚀. 另外浸泡前后样品的密度和孔隙率变化很小, 这说明在 80°C 水中浸泡 7 天后对样品的大孔影响不大.

图 6 是样品浸泡过程中单位面积质量损失率. 从图中可以看出: 单位面积损失的质量随淀粉的含量的增加先增大再减少, 结合图 5 和表 1 说明淀粉的引入量增加提高了大孔数

表 1 样品在 80°C 水中浸泡 7 天后孔结构数据

Table 1 Pore structure data of the samples before and after immersed in water at 80°C for 7 days

Starch content/wt%	Bulk density /g·cm <sup>-3</sup>	Porosity /%	Pore volume /cm <sup>3</sup> ·g <sup>-1</sup>	Specific surface area/m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	Average pore diameter/nm
0 (Before immersed)	0.63	69	0.85	598.7	11.0
0 (After immersed )	0.61	69	—	—	—
10 (Before immersed)	0.51	63	0.54	246.8	10.6
10 (After immersed )	0.49	62	0.60	168.4	20.4
20 (Before immersed)	0.43	70	0.72	322.0	11.2
20 (After immersed )	0.38	73	0.68	313.0	16.2
30 (Before immersed)	0.34	76	0.98	401.5	12.3
30 (After immersed )	0.32	77	0.35	120.2	26.2

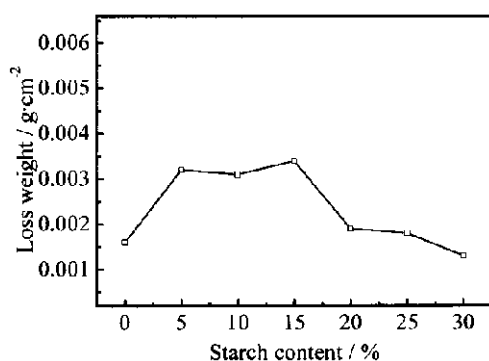


图 6 在 80°C 水中浸泡 7 天前后样品的失重曲线

Fig. 6 Loss weight curve of the samples before and after immersed in water at 80°C for 7 days

量, 水容易侵蚀样品中的介孔. 当淀粉含量增加到 20% 以后, 介孔相对数量也降低, 所以样品单位面积损失的质量开始下降. 最大损失量不超过  $0.0034\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 最小损失量低至  $0.0013\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 说明制得的多孔块状样品的水热稳定性较好.

### 3.3 样品固定葡萄糖淀粉酶的酶活力

图 7 是不同淀粉含量的样品经过 1 天恒温振荡吸附后连续使用五次的酶活力比较图. 酶 (液体酶, 浓度为  $0.1\text{mL/mL}$ ) 直接使用的酶活力为 4922U. 从图中可以看出, 未引入淀粉的样品初始酶活力仅为 5994U, 引入淀粉样品的酶活力高于二者, 说明淀粉的引入、生成大孔显著提高了酶活力. 当引入 30% 的淀粉作造孔剂, 制得的样品中具有大量的大孔, 酶活力也达到最高的 14702U, 是未引入淀粉样品的初始酶活力的两倍多. 本实验淀粉的引入量最高为 30%, 是因为淀粉含量更高的样品密度反而增大、气孔率降低, 且酶活力在淀粉含量为 25% 和 30% 变化不大. 另外从图 7 还可以看出: 使用一次之后的样品, 虽然没有再次进行酶吸附, 但第二次使用时酶活力仍高于未固定的液体酶活力, 直到第五次使用, 固定在样品上的酶仍表现出一定的酶活力. 这说明使用块状样品可以很方便地进行生物酶的多次利用.

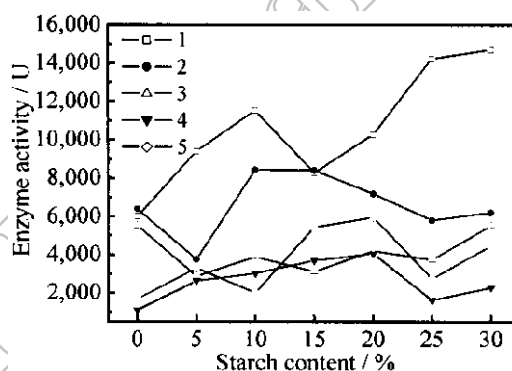


图 7 不同淀粉含量样品连续五次使用后的酶活力

Fig. 7 Enzyme activity of the samples with different starch content used continuously up to 5 times

图 8 是经 80°C 热水浸泡 7 天前后样品对酶吸附量的比较. 从图中可以看出, 引入淀粉作为成孔剂形成大孔, 有利于提高酶的吸附量. 浸泡之后, 由于孔径分布变得较集中, 对酶的吸附量随淀粉的引入量增加呈现较有规律的上升. 因此, 应用中在水液中的浸泡并不会降低酶的吸附量. 图 9 是不同淀粉含量样品在 80°C 水中浸泡 7 天前后的酶活力. 从图中可以看出: 经过 7 天浸泡的样品, 再经 1 天恒温振荡吸附葡萄糖淀粉酶, 其第一次使用的酶活力与浸泡之前第一次应用接近, 部分有所降低, 这是因为酶量吸附过多使孔道内部吸附的部分酶不能和底物接触从而导致酶活力下降. 引入淀粉样品的最小酶活力为 6432U, 与液体酶直接使用的酶活力 4922U (液体酶液浓度为 0.1mL/mL) 相比, 仍有提高. 另外, 淀粉引入量为 10% 的样品的酶活力变化较大, 从 11537U 提高到 18171U, 这是由于样品的酶活力与样品中的介孔结构和数量有关. 浸泡 7 天使用一次之后的样品, 虽然没有再次进行酶吸附, 但在第二、三次使用时仍表现一定的酶活力. 这说明样品具有好的水热稳定性, 在作酶载体方面可以长时间使用.

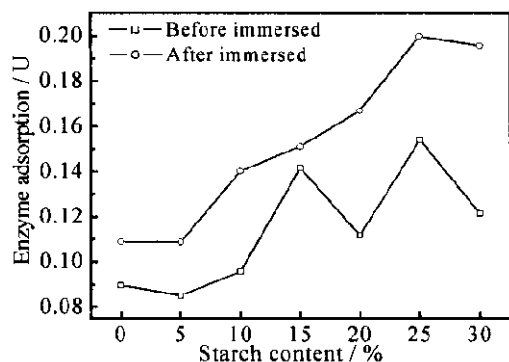


图 8 80°C 水中浸泡 7 天前后不同淀粉含量样品对酶的吸附量

Fig. 8 Enzyme absorption of the samples with different starch contents before and after immersed in 80°C water for 7 days

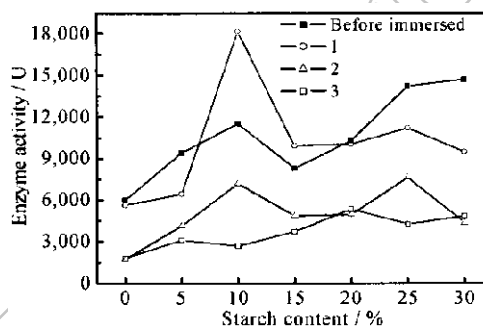


图 9 80°C 水中浸泡 7 天前后不同淀粉含量样品的酶活力

Fig. 9 Enzyme activity of the samples with different starch contents before and after immersed in 80°C water for 7 days

综上所述, 与不加大孔造孔剂的样品相比, 具有大孔 / 介孔双孔结构块状材料在固定葡萄糖淀粉酶方面, 酶活力不仅显著提高, 而且酶吸附量也很大. 目前正在进一步对酶载体材料的孔径结构和酶活力的相互关系、以及此类载体固定其他生物酶方面进行深入研究.

## 4 结论

1. 采用溶胶-凝胶法, 以聚乙二醇和淀粉分别为介孔和大孔的造孔剂, 可以制备出具有介孔平均孔径为 ~10nm、大孔孔径约为 8~11μm 的双孔结构的块状 SiO<sub>2</sub> 酶载体材料. 研究发现, 淀粉的加入量对样品的密度、气孔率、孔大小有一定影响. 淀粉加入量达 30wt% 时, 可得到最小密度为 0.34g·cm<sup>-3</sup>、最大气孔率为 76% 的样品.

2. 在 80°C 水中浸泡 7 天后, 样品的密度、气孔率和氮气吸附-脱附曲线形状基本没变, 最大失重为 0.0034g·cm<sup>-2</sup>; 由于浸泡使得孔径分布变得更加集中, 20nm 以下的孔数量减少.

3. 对比液体酶 (浓度为 0.1mL/mL, 酶活力为 4922U) 的活力, 未引入淀粉的样品初始酶活力仅为 5994U, 引入淀粉样品的初始酶活力均高于二者, 而且加入淀粉 30wt% 样品的最高初始酶活力为 14702U. 另外使用一次之后的样品, 虽然没有再次进行酶吸附, 第二次使用时

酶活力仍高于未固定的液体酶活力。直到第五次使用,固定在样品上的酶仍表现出一定的酶活力。这些说明淀粉的引入提高了酶活力,所得多孔块体材料也便于酶的回收、保存和再利用。

4. 在 80°C 水中浸泡 7 天之后,样品对酶的吸附量均有提高;样品第一次使用的酶活力与未浸泡过的样品相比,相差不大;而且淀粉引入量为 10wt% 的样品酶活力也由 11537U 提高到 18171U,说明样品可以在水中长时间使用。

## 参考文献

- [1] Lei J, Fan J, Yu C-Z, *et al.* *Microporous. Mesoporous. Mater.*, 2004, **73**: 121–128.
- [2] Sayari Abdelhamid, Hamoudi Safia, Yang Yong. *Chem. Mater.*, 2005, **17**: 212–216.
- [3] Costela A, Moreno Garcia I, Gomez C, *et al.* *J. Phys. Chem. B.*, 2005, **109**: 4475–4480.
- [4] Davis Mark E. *Nature.*, 2002, **417 (6891)**: 813–821.
- [5] Trong On Do, Kaliaguine. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**: 618–619.
- [6] Izabela Nowak. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.*, 2004, **241**: 103–111.
- [7] Gomez J M, Deere J, Goradia D, *et al.* *Catal. Lett.*, 2003, **88**: 183–186.
- [8] Pandya P H, Iasra R V, Newalkar B L, *et al.* *Microporous. Mesoporous. Mater.*, 2005, **77**: 67–77.
- [9] 汪秀全, 杨洪斌, 陈 奇, 等 (Wang Xiu-Quan, *et al.*). 硅酸盐学报 (Journal of the Chinese Ceramic Society), 2005, **33 (8)**: 975–979.
- [10] 刘海荣, 陈 奇 (LIU Hai-Rong, *et al.*). 硅酸盐学报 (Journal of the Chinese Ceramic Society), 2005, **33 (4)**: 438–442.
- [11] 胡仁其, 于家波, 宋富兵, 等. 化学学报, 2000, **58 (10)**: 1211–1215.
- [12] 雷 杰, 余承忠, 范 杰, 等. 化学学报, 2005, **63 (8)**: 739–744.
- [13] 徐如人, 庞文琴. 分子筛与多孔材料化学, 第一版. 科学出版社, 2004. 145–148.

## Synthesis and Enzyme Activity of SiO<sub>2</sub> Monolithic Carrier with Double-pore Structure by Addition of Starch/PEG

YANG Hong-Bin<sup>1</sup>, CHEN Qi<sup>1</sup>, SONG Li<sup>1</sup>, YE Rei-Fang<sup>2</sup>, HOU Feng-Zhen<sup>1</sup>, LU Jian-Ying<sup>1</sup>

(1. Department of Inorganic Materials, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Department of Biochemistry Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** SiO<sub>2</sub> monoliths with double-pore structure were successfully synthesized with polyethylene glycol as mesopore-making agent and starch as macropore-making agent *via* a sol-gel route. The porous blocks, having mesopores with about 10nm pore size and macropores with 8~11μm pore size, could be formed from the removal of polyethylene glycol and starch after heated at 600°C. The minimal density of the obtained samples was 0.34g·cm<sup>-3</sup> and the maximal porosity was 76%. The original enzyme activity was improved from 5994U to 14702U by adding 30% of starch to the bare SiO<sub>2</sub> sample. After immersed in water at 80°C for 7 days, the enzyme adsorption of the samples was increased and there was little difference between enzyme activity before and after immersion. Those results indicated that such double-pore materials with long-term stability on gluczyme immobilization should be easy to reclamation, reservation and recycle of enzyme.

**Key words** double-pore structure; porous monolithic; sol-gel; enzyme carrier