

紫外辐射共聚制备含环氧基团的多孔聚合物及其在 固定化酶上的应用

李 澧^{1,2} 冯 敏¹ 毕晓东² 朱佳廷¹

¹ (江苏省农业科学院农业设施与装备研究所 南京 210014)

² (南京大学化学化工学院 南京 210014)

摘要 以乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂,甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)为功能单体,聚乙二醇200(PEG 200)为致孔剂,采用紫外辐射共聚一步法制备了含有环氧基团的多孔聚合物。光电子能谱(SEM)分析表明,紫外辐射共聚法制备的聚合物表面含有环氧基团;扫描电镜结果表明:共聚过程中致孔剂的存在,能够在聚合物内形成多孔结构。采用共价结合法固定辣根过氧化酶(HRP),多孔结构有效增加了辣根过氧化酶的结合量,平均每克共聚物最高可以结合29.6 mg 辣根过氧化酶。

关键词 紫外辐射共聚, 环氧基团, 辣根过氧化酶, 多孔聚合物

中图分类号 O631.3+4, O632.12

辣根过氧化酶(HRP)是从植物辣根菜中提取出来的一种糖蛋白复合酶,含有亚铁血红素辅基,能够在较宽的pH值、温度、底物浓度、盐度范围内保持对酚类和胺类化合物的催化活性^[1,2]。除了应用在构筑传感器进行免疫测定、分析检测^[3,4]外,HRP还能够催化工业废水中的多种酚类、胺类芳香物质的分解,在水环境保护方面具有特殊的作用^[5-7]。因此,HRP的固定化技术(包括固定化载体与固定方法),备受国内外学者的关注^[8,9]。

含有环氧基团的载体,其表面的环氧基团与蛋白质大分子链上的多种基团(氨基、巯基、酚羟基等)都很容易发生反应,无需任何链接分子即可与生物大分子形成稳定的共价键。因此,无论是实验室研究还是工业规模的实际应用,含有环氧基团的材料都是共价结合法固定化酶的理想载体^[10,11]。但是,聚合物表面的环氧当量决定了酶的固定化效率。如何有效的增加聚合物表面的环氧当量成为了固定化酶的研究重点。

本研究从增大聚合物的比表面积着手,采用紫外辐射诱导聚合的方法,在交联剂与单体的共聚过程中引入致孔剂,一步得到多孔结构的共聚物。研究表明,通过引入致孔剂,可以得到大比表面积的聚合物,有效地增加了环氧基团与生物大分子的接触面积。固定化酶的实验结果表明,平均每克

聚合物最高可以固定29.6 mg 的辣根过氧化酶(HRP)。该聚合物性能稳定,制备流程简单,是一种固定化酶产业化的良好载体。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

辣根过氧化酶(HRP, 250 U/mg, 北京博奥森生物技术有限公司),生化试剂;乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA),聚乙二醇200(PEG 200),甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA),南京曙光化工集团有限公司,分析纯;安息香二甲醚(Irgacure 651),瑞士汽巴公司,化学纯;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),南京探求生物试剂有限公司,色原试剂;其它试剂均为市售分析纯试剂;实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 仪器

光电子能谱(XPS):美国Thermo公司ESCALAB 250型;扫描电镜(SEM):日本Hitachi公司FE-SEMS 4800型;紫外-可见分光光度计(UV-VIS):美国Beckman公司DU720型;紫外灯:天津英泽科技有限公司1000 W。

国家自然科学基金(20727004)资助

第一作者:李澧,女,1978年9月出生,2007年于中山大学获博士学位,助理研究员,主要从事光固化功能材料研究
E-mail: muzishuiqudou@163.com

收稿日期:初稿2012-07-02,修回2012-11-15

1.3 共聚物的制备

将 EDMA、GMA、PEG 200 按一定比例量装入试管中,同时加入交联剂(EDMA)质量 1%的安息香二甲醚(引发剂),搅拌均匀。置于 1000 W 紫外灯下 30 cm 处,曝光 10 min,得到聚合物。以甲醇为溶剂在索氏提取器中抽提 24 h,吸掉未聚合的单体、交联剂和致孔剂,真空干燥 24 h,得到含有环氧基团的多孔共聚物。

1.4 共聚物的表征

1.4.1 元素分析 聚合物压片后,ESCALAB 250 型光电子能谱分析聚合物表面的功能基团。

1.4.2 微观形貌 把聚合物固定在铜片上,喷金 100 s,FE-SEMS 4800 型扫描电镜观测所得聚合物粒子的形貌。

1.5 酶的固定

1.5.1 HRP 的固定 称取 0.2 g 聚合物,分别加入 500 μ L 不同浓度的 HRP 磷酸盐溶液(pH=8.5),常温下振荡 10 h。吸取 50 μ L 上层清液,加入 500 μ L TMB 显色液,静置 15 min,450 nm 处测定 TMB 显色后溶液中残余酶的吸光值。

1.5.2 TMB 显色液的配制 醋酸钠 0.136 g,柠檬酸 0.016 g,30%双氧水 3 μ L,TMB 1.5 mg,蒸馏水加至 5 mL。该显色液使用前现配。

2 结果与分析

2.1 聚合物的反应过程

紫外辐射共聚,属于低温光引发剂引发自由基聚合,而环氧基团的开环聚合属于热引发聚合。因此在紫外辐射共聚过程中,交联剂 EDMA 和功能单体 GMA 中的双键自由基聚合;而受温度调控聚合的环氧基团(功能单体 GMA 中的环氧基团)不发生开环聚合反应^[12],反应方程见图 1。

为了验证聚合物表面是否含有环氧基团,对其进行了光电子能谱(XPS)的检测。图 2A 表明,聚合物中仅含有 C 和 O 两种元素(光电子能谱不能检测 H 元素)。C1s 的去卷积高斯拟合结果(图 2B)显示,284.4 eV 对应为 C-C/C-H/C=C 键,285.3 eV 对应为 C-O 键,286.3 eV 对应为环氧基团,288.4 eV 对应为 O-C=O^[13-15]。该结果表明聚合物的表面含有环氧功能基团,与反应方程式吻合。同时,该结果也证实了之前的假设:紫外辐射引发自由基聚合,不会引发环氧开环聚合。

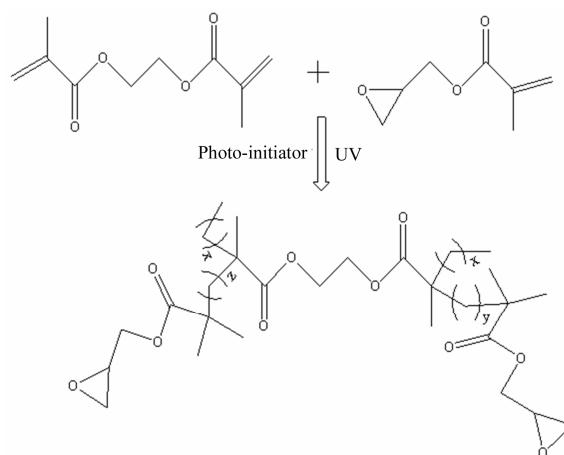


Fig. 1 The polymerization reactions between the molecules of EDMA and GMA

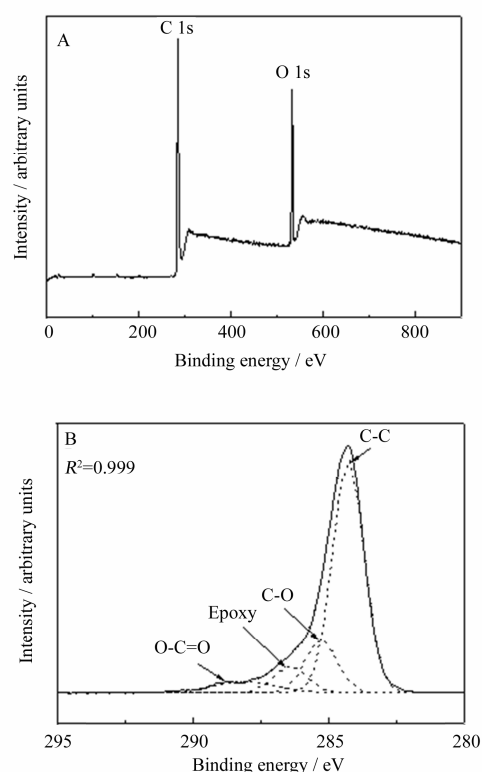


Fig. 2 XPS spectra of poly(EDMA-co-GMA): A, overview spectra; B, C1s core-level spectra

2.2 聚合物的结构分析

紫外辐射聚合在本质上属于沉淀聚合^[16-18],聚合的主要原理为:首先,单体、交联剂、引发剂、致孔剂在反应前形成稳定的均相反应体系;其次,反应体系受到紫外光辐射,引发剂分解诱导聚合开始反应,最先形成低分子量的聚合物,反应一定程度后形成高分子量的聚合物链;随后,高分子量的聚合物链从溶液中沉降出来形成稳定的分散体系,并进一步聚合、交联形成直径约为 1 μ m 左右的小

颗粒；接着，这些小颗粒以化学键互相连接形成较大的“簇”（Cluster）；最后，这些“簇”最终堆积形成了完整的聚合物。

因此，聚合物内同时存在三种孔结构：小颗粒与小颗粒之间形成的小孔；小颗粒与“簇”之间形成的中孔；“簇”与“簇”之间形成的大孔。

2.3 致孔剂对聚合物形貌的影响

致孔剂一般是选择一种良溶剂，对单体、交联剂、及引发剂有较好的溶解效果；另一种为不良溶剂，对单体、交联剂有较差的溶解效果，通过调节两种或多种溶剂的比例可以制得合适孔径的聚合物^[19]。

在本实验中，功能单体 GMA 对交联剂和引发剂有良好的溶解效果，因此本文详细研究了 PEG 200 与 GMA 的比例，对聚合物内部微结构的影响（见图 3）。SEM 结果表明，聚合过程中引入 PEG 200 能够在聚合物内形成多孔结构。图 3 中 A、C、E、G 的放大倍数为 5000 倍，而 B、D、F、H 的放大倍数为 10000 倍。图 3A 和图 3B 显示，当 GMA 与 PEG 200 的体积比为 1:1 时，聚合物很致密，几乎看不见孔洞结构。当 GMA 与 PEG 200 的体积比为 1:2 时，聚合物内出现大量纳米级的小孔和小部分的大孔和中孔，孔分布得不太均匀（图 3C、图 3D）。当 GMA 与 PEG 200 的体积比达到 1:3 时，

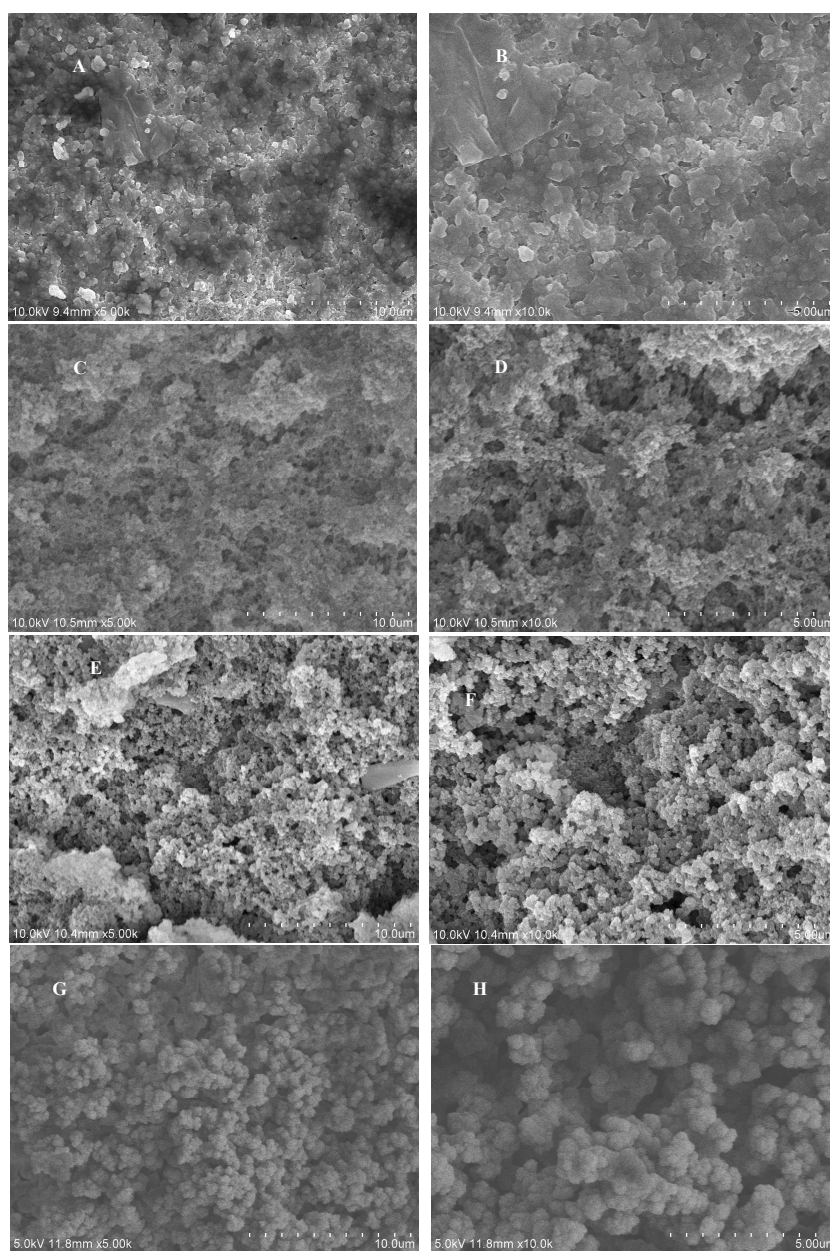


Fig. 3 SEM image of poly(EDMA-co-GMA) (A, B) the corresponding ratio of GMA and PEG 200 is 1: 1; (C, D) the corresponding ratio of GMA and PEG 200 is 1: 2; (E, F) the corresponding ratio of GMA and PEG 200 is 1: 3; (G, H) the corresponding ratio of GMA and PEG 200 is 1:4

聚合物内纳米级的小孔减少,大量 100–300 nm 的中孔出现,孔分布比较均匀(图 3E、图 3F)。随着 PEG 200 的继续增加,当 GMA 与 PEG 200 的体积比达到 1:4 时,聚合物内的小颗粒继续长大,相互堆砌成 1 μm 左右的孔。此时,聚合物内出现中孔内接着小孔,大孔内呈现孔连着孔的独特形貌(图 3G、图 3H)。

2.4 聚合物固定化酶的吸附曲线

聚合物的微观形貌,直接影响生物大分子的固定。聚合物中微米级的大孔能够有效地吸附、渗透样品溶液,保证液体中的生物大分子能够与聚合物表面充分接触;而聚合物内的中孔则提供固定生物分子所需的表面积。

因此,在 pH=8.5 的条件下,我们进行了多孔聚合物固定辣根过氧化物酶(HRP)的实验。图 4 给出了聚合物在 10、20、30、40、50、60 $\mu\text{g/mL}$ HRP 磷酸盐溶液(pH=8.5)中的吸附曲线。吸附曲线(图 4)表明,环氧基多孔共聚物能够吸附 HRP。其中 3 号聚合物(功能单体 GMA 与致孔剂 PEG 200 的体积比为 1:3)吸附的 HRP 最多,平均每克多孔共聚物最多能够吸附 29.6 mg HRP。

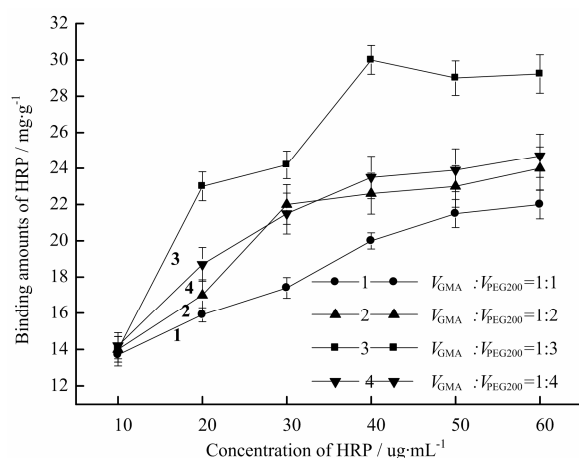


Fig. 4 Binding curves of HRP. The points represent mean values of three measurements

3 结论

采用紫外辐射共聚法,一步制备了乙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸缩水甘油酯的多孔共聚物。光电子能谱显示,该聚合物表面含有大量的环氧基团。扫描电镜结果表明,在共聚过程中致孔剂能够在聚合物内形成多孔结构。随着 PEG 200 的增加,聚合物内纳米级小孔减少,大孔、中孔出现。在此基础上采用共价结合法固定辣根过氧化物酶 HRP。平均每克多孔聚合物(功能单体 GMA 与

致孔剂 PEG 200 的体积比为 1:3),最多能够吸附 29.6 mg HRP。该多孔聚合物性能稳定,制备方法简单,是一种规模制备固定化酶的良好载体。

参考文献

- Cheng J, Yu S M, Zuo P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater [J]. Water Research, 2006, **40**: 283-290
- Vasileva N, Godjevargova T, Ivanova D, *et al.* Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, **44**: 190-194
- Ding C F, Zhao F, Ren R, *et al.* An electrochemical biosensor for α -fetoprotein based on carbon paste electrode constructed of room temperature ionic liquid and gold nanoparticles [J]. Talanta, 2009, **78**: 1148-1154
- Wang X, Lin J M, Liu M L, *et al.* Flow-based luminescence-sensing methods for environmental water analysis [J]. Trends Anal Chem, 2009, **28**(1): 75-87
- Zhang J B, Ye P, Chen S, *et al.* Removal of pentachlorophenol by immobilized horseradish peroxidase Original [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2007, **59**: 307-314
- Lai Y C, Lin S C. Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution [J]. Process Biochemistry, 2005, **40**: 1167-1174
- Alemzadeh I, Nejati S. Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, **166**: 1082-1086
- Bayramoğlu G, Arica M Y. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, **156**: 148-155
- Dalal S, Gupta M N. Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering [J]. Chemosphere, 2007, **67**: 741-747
- Bayramoğlu G, Akgöl S, Bulut A, *et al.* Covalent immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system [J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, **14**: 117-126
- Arica M Y, Bayramoğlu G, Bicak N. Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl

- methacrylate-based reactive microbeads [J]. *Process Biochemistry*, 2004, **39**: 2007-2017
- 12 刘红波, 张武英, 林峰, 等. 聚氨酯改性丙烯酸环氧单酯的光-热固化性能[J]. *辐射研究与辐射工艺学报* 2011, **29**(5): 275-279.
LIU Hongbo, ZHANG Wuying, LIN Feng, *et al.* Properties of UV-heat cured films of polyurethane-modified epoxy monoacrylates [J]. *J Radiat Res Radiat Process*, 2011, **29**(5): 275-279
- 13 Ma W X, Zhao C, Okubayashi S, *et al.* A novel method of modifying poly (ethylene terephthalate) fabric using supercritical carbon dioxide [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, **117**: 1897-1907
- 14 Hurley C R, Ducker R E, Leggett G J, *et al.* Fabrication of submicrometer biomolecular patterns by near-field exposure of plasma-polymerized tetraglyme films [J]. *Langmuir*, 2010, **26**(12): 10203-10209
- 15 Tang L Z, Lee N Y. A facile route for irreversible bonding of plastic-PDMS hybrid microdevices at room temperature [J]. *Lab Chip*, 2010, **10**: 1274-1280
- 16 Fujimoto C, Kino J, Sawada H. Capillary electrochromatography of small molecules in polyacrylamide gels with electroosmotic flow [J]. *Journal of Chromatography A*, 1995, **716**: 107-113
- 17 Fujimoto C. Charged polyacrylamide gels for capillary electrochromatographic separations of uncharged, low-molecular-weight compounds [J]. *Anal Chem*, 1995, **67**: 2050-2053
- 18 Fujimoto C, Fujise Y, Matsuzawa E. Fritless packed columns for capillary electrochromatography: Separation of uncharged compounds on hydrophobic hydrogels [J]. *Anal Chem*, 1996, **68**: 2753-2757
- 19 Svec F, Frechet J M J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid-chromatography separation media [J]. *Anal Chem*, 1992, **64**: 820-822

UV irradiated copolymerization route for fabrication of epoxy-functionalized porous polymer and its applications for immobilization of horseradish peroxidase

LI Li^{1,2} FENG Min¹ BI Xiaodong² ZHU Jiating¹

¹(Institute of Facilities and Equipment in Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

²(School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

ABSTRACT The epoxy-functionalized porous polymer was synthesized by UV irradiated copolymerization using ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as the crosslinker, glycidyl methacrylate (GMA) as the functional monomer, and PEG 200 as the porogen. The X-rays photoelectron spectroscopy analysis shows that epoxy groups were confirmed on the prepared copolymer. The SEM images results show that the copolymer exhibited a porous structure. The horseradish peroxidase (HRP) was immobilized by chemical bonding methods. The micro pores in the polymer could significantly promote the amount of the immobilized HRP. The binding capacity of the polymer for HRP is approximately equivalent to 29.6 mg / g.

KEYWORDS UV irradiated copolymerization, Epoxy groups, Horseradish peroxidase, Porous materials

CLC O631.3+4, O632.12