

# ATRP 法合成 AC-g-PSSStNa 及其对辣根过氧化物酶固定化的影响

毕淑娴\*, 刘欢欢, 马保军, 詹海娟, 刘万毅

(宁夏大学化学化工学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:**以活性炭(AC)为原料,利用原子转移自由基聚合法(ATRP)合成了 AC-g-PSSStNa 有机无机杂化材料,并对其进行 FT-IR、SEM、XPS 表征。以 AC-g-PSSStNa 为载体对辣根过氧化物酶(HRP)进行固定化,比较游离酶和固定化酶的 pH 稳定性、热稳定性及储存稳定性。结果表明,Ac-g-PSSStNa 固定化 HRP 的 pH 稳定性及热稳定性均强于游离酶,特别是在高温范围内表现出高的催化活性;在碱性环境中固定化酶的活性比游离酶高。可见 AC-g-PSSStNa 复合材料可有效地应用于固定化 HRP。

**关键词:**活性炭;原子转移自由基聚合;辣根过氧化物酶;固定化酶

中图分类号:X703

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2017)08-0090-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2017.08.021

## Synthesis of AC-g-PSSStNa by ATRP method and its influence on horse radish peroxidase immobilization

BI Shu-xian\*, LIU Huan-huan, MA Bao-jun, ZHAN Hai-juan, LIU Wan-yi

(School of Chemistry & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** Organic inorganic hybrid AC-g-PSSStNa is synthesized by atom transfer radical polymerization method (ATRP) and using activated carbon as raw material. And then it is characterized by FT-IR, SEM, and XPS. The horse radish peroxidase (HRP) enzyme is immobilized on the Ac-g-PSSStNa hybrid materials. The immobilized HRP is compared with free HRP on aspects of pH stability, thermal stability and storage stability. The HRP immobilized by Ac-g-PSSStNa reveals better pH and thermal stabilities, in particular, it shows higher catalytic activity in the range of high temperature and higher activity in alkaline environment. It illustrates that the Ac-g-PSSStNa hybrid material can be effectively used to immobilize HRP.

**Key words:** activated carbon; atom transfer radical polymerization; horse radish peroxidase HRP; immobilized enzyme

宁夏地区拥有丰富的活性炭(AC)资源,AC 制备工艺简单,具有良好的稳定性和吸附性,因此,广泛应用于生产、生活当中<sup>[1]</sup>。在水处理方面,AC 主要作吸附剂吸附废水中的污染物质,但活性炭在水中 and 有机溶剂中的分散性较差,表面基团调节范围窄,吸附选择性较差,为了使活性炭能够满足更广泛的应用要求,通常对其进行表面改性,使改性后的活性炭在物理和化学性质方面较之前有所突破。通过聚合的方法在其表面接枝聚合物,引入更多的活性基团,使其拥有更高的应用价值<sup>[2-3]</sup>。

辣根过氧化物酶(HRP)价格便宜、性质稳定,具有特殊的催化性能,在过氧化氢存在的条件下可催化氧化芳香类化合物,能在较大的温度、pH 和浓度范围内保持其高效的催化活性。因此,HRP 广泛应用于废水处理、生物传感器、有机合成、食品工业

等领域<sup>[4-7]</sup>。但由于游离酶的稳定性差,无法重复利用等缺点,限制了其在工业方面的应用。固定化酶可重复利用,并能有效地提高酶的稳定性以及对环境的耐受性,具有游离酶无法比拟的优势<sup>[8-9]</sup>。

笔者利用 ATRP 法对 AC 进行表面接枝改性合成有机无机杂化材料,并将其作为载体对 HRP 进行固定化,考察了固载酶和游离酶的酶促反应的最适 pH、温度及存储稳定性。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

活性炭(AC),工业级原材料;对苯乙烯磺酸钠水合物(SSStNa)、2-溴异丁酰溴(BiBB)、辣根过氧化物酶(HRP)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、氯化钙(CaH<sub>2</sub>)、阿拉丁生产;2,2-联吡啶(bpy),天津市凯

通化学试剂有限公司生产;三乙胺(TEA)、硫酸铝钾( $KAl(SO_4)_2$ ),北京化学试剂公司生产;过硫酸铵( $(NH_4)_2S_2O_8$ )、铁氰化钾( $K_3[Fe(CN)_6]$ )、4-氨基安替比林( $C_{11}H_{13}N_3O$ )、磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ )、磷酸二氢钠( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )、碳酸氢钠( $NaHCO_3$ ),天津市大茂化学试剂厂生产;四氢呋喃(THF),上海晶纯试剂有限公司生产;苯酚( $C_6H_5OH$ ),湖北巨胜科技有限公司生产;溴化亚铜( $CuBr$ ),自制。

## 1.2 复合材料的制备

### 1.2.1 材料的预处理

用天平称取 0.5 g AC 样品于烧杯中,加入 100 mL 去离子水,超声处理 30 min 使 AC 分散,离心分离;重复上述步骤 3 次得到样品,烘干备用。在 100 mL 圆底烧瓶中加入 0.5 g 预处理过的 AC,浓度为 2 mol/L 的过  $(NH_4)_2S_2O_8$  与 1 mol/L 的  $H_2SO_4$  各 10 mL,60℃ 恒温搅拌反应 3 h;冷却至室温后,用布氏漏斗抽滤得到固体,去离子水洗涤至滤液为中性,烘箱烘干后即得氧化后的 AC 样品。

### 1.2.2 ATRP 大分子引发剂的合成

在 100 mL 圆底烧瓶中加入 0.5 g 氧化处理过的 AC,除水的四氢呋喃(THF) 10 mL,DMAP 0.03 g (0.24 mmol),TEA 560  $\mu$ L (4 mmol),超声分散 30 min,在冰浴条件下缓慢滴加 210  $\mu$ L BiBB 与 5 mL 无水 THF 混合溶液,控制滴加速率,大约 1 h 滴完;混合液在室温下搅拌 48 h,产品用布氏漏斗抽滤,去离子水和 THF 反复洗涤至没有 BiBB 残留,产物烘干备用。

### 1.2.3 接枝产物的合成

$CuBr$  的制备:将 9 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  和 12 g  $KBr$  溶于 120 mL 去离子水,过滤除去不溶物;将 14.4 g  $Na_2SO_3$  溶于 80 mL 去离子水,搅拌,待大量  $Na_2SO_3$  溶解后将其煮沸,沸腾后立即取出冷却至室温并过滤。向  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  和  $KBr$  混合液中缓慢滴加

$Na_2SO_3$  溶液并搅拌,直至有白色物质析出。将所得溶液抽滤并用醋酸和乙醚淋洗,立刻将样品放在表面皿中并置于真空干燥箱 50℃ 干燥过夜,收集所得样品,真空保存。

AC-g-PSSStNa 的合成:在 25 mL 聚合管中加入 0.3 g 引发剂,6 mL 溶剂 [ $V(水):V(甲醇) = 3:1$ ],超声处理 30 min。加入 SStNa 539 mg (mmol),bpy 41.1 mg (mmol),混合均匀。通  $N_2$  30 min 排除空气,加入  $CuBr$  19.2 mg (mmol),在  $N_2$  氛围下室温反应 3 h,到达预定时间后将体系暴露于空气中终止反应,去离子水反复洗涤除去杂质,离心分离,烘干后即得到 AC-g-PSSStNa 复合材料。

## 1.3 固定化酶的研究

### 1.3.1 制备交联载体

称取 0.8 g Ac-g-PsstNa 复合材料,加入 5 mL 5% 的戊二醛溶液,磁力搅拌 4 h 后静置,洗涤 35 次,洗去多余的戊二醛。过滤,80℃ 烘干,研磨得到交联的 Ac-g-PSSStNa 载体。

### 1.3.2 HRP 活性测定

采用沃辛通(Worthington)法测定 HRP 活性<sup>[10]</sup>,定义一个过氧化物酶单位(1U)相当于在规定的底物浓度条件下每分钟分解 1  $\mu$ mol 过氧化氢时所需的酶量。

计算式为:

$$U/mg = (E_{510} \times V) / (6.58 \times E_w) \quad (1)$$

式中: $E_{510}$  为 510 nm 处每分钟吸光度的增大值; $V$  为反应液总体积; $E_w$  为每 0.1 mL 酶液中含有酶的质量;6.58 为 1 个单位能在 1 min 内使吸光度增大 6.58。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AC-g-PSSStNa 复合材料的表征

#### 2.1.1 AC-g-PSSStNa 复合材料红外谱图

AC、AC-Br、AC-g-PSSStNa 的红外吸收光谱图

thane/polyvinyl alcohol composite surface sizing agent in the specialty paper[J].Journal of Functional Materials,2014,45(18):18148-18152.

[11] Jiang G C, Tuo X L, Wang D R. Preparation characterization and properties of fluorinated polyurethanes[J].Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,2009,47(13):3248-3256.

[12] 付建萍,赖小娟,李小瑞.无溶剂型有机氟改性聚氨酯/丙烯酸酯乳液的制备及性能[J].功能材料,2016,47(1):1234-1238.■

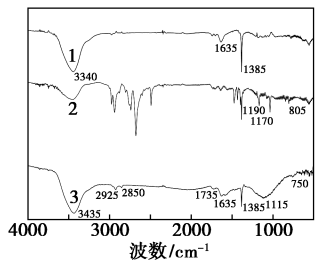
(上接第 89 页)

[8] 何彦萱,刘金华,郭玉良.含氟丙烯酸酯乳液整理剂的合成及其在织物防水防油整理中的应用[J].印染助剂,2014(11):38-40.

[9] Li P Z, Yang X W, Luo Q L. Study on the preparation and performance of perfluoroalkyl waterborne polyurethane-polyacrylate paper oil-resistant agent[J].Journal of Functional Materials,2013,44(17):2477-2480.

[10] Fei G Q, Wang Y C, Wang H H. Application of water-borne polyure-

如图 1 所示。从图 1 中可以看出,AC-Br 与 AC 相比,1 190  $\text{cm}^{-1}$  和 1 170  $\text{cm}^{-1}$  处 C 出现振动峰,是  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  骨架的振动吸收峰,805  $\text{cm}^{-1}$  处有 C-Br 振动峰存在,表明 AC 表面成功接枝  $\alpha$ -溴异丁酰溴。AC-g-PSSStNa 的谱图中,2 920、2 850  $\text{cm}^{-1}$  处出现聚合物中甲基和亚甲基的吸收峰,1 115、750  $\text{cm}^{-1}$  处出现磺酸基的特征峰。



1—AC;2—AC-Br;3—AC-g-PSSStNa

图 1 AC、AC-Br 和 AC-g-PSSStNa 的红外光谱图

2.1.2 复合材料扫描电镜图

复合材料的 SEM 图如图 2 所示。

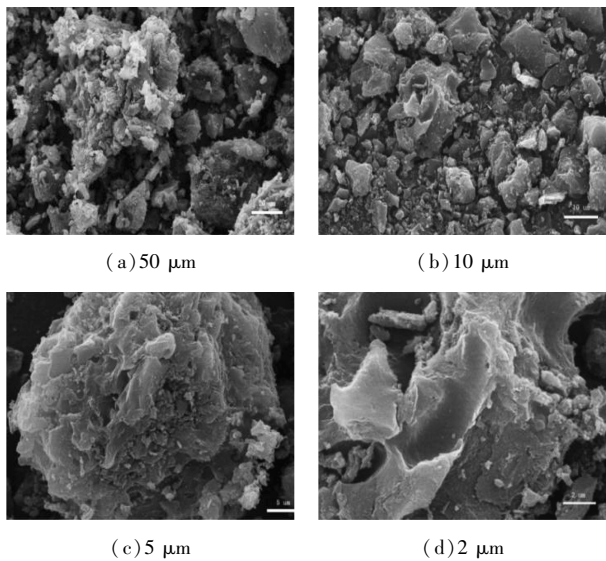


图 2 复合材料的 SEM 图

从图 2 中可以看出,活性炭表面拥有许多形状、大小各异的孔洞结构,这些孔洞结构大大增加了其比表面积,使其拥有十分优异的吸附性能。

2.1.3 AC-g-PSSStNa 复合材料的光电子能谱图

光电子能谱元素分析结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,AC-Br、AC-g-PSSStNa 表面含有 C 和 O 元素,其中 O 1s 元素的质量分数分别为 8.81% 和 19.94%,C 1s 元素的质量分数分别为 83.21% 和 80.50%。其中,AC-Br 检出 Br 元素,表明 AC 成功与  $\alpha$ -溴异丁酰溴反应,制备出大分子引发剂;AC-g-PSSStNa 检出 Na 元素,表明成功将对苯乙烯磺酸

钠接枝到 AC。

表 1 复合材料光电子能谱元素分析

	质量分数/%			
	O 1s	C 1s	Br 3p	Na 1s
AC-Br	8.81	83.21	2.24	0
AC-g-PSSStNa	19.94	80.50	0	0.44

复合材料的高分辨波谱如图 3 所示。

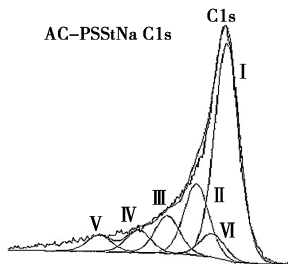


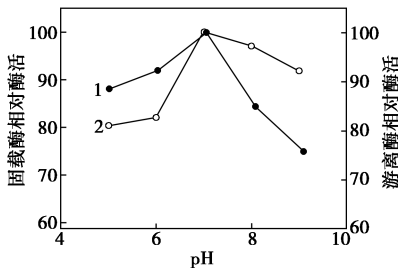
图 3 复合材料的高分辨波谱

由图 3 可以看出,AC-g-PSSStNa 拆分后,C 共有 6 个峰: I 为石墨化的碳原子峰; II 为与酚类、醇类、醚类相连接的峰; III 为羰基中的碳; IV 为羧基或酯基中的碳; V 为吸附的  $\text{CO}_2$  或  $\text{CO}$  中的碳; VI 为脂肪烃中的碳。由表 1 可以看出,在用 BiBB 处理后,AC-Br 上成功接入 Br,但是聚合后,Br 元素消失,这是因为聚合物将活性中心包埋或者稀释。AC-g-PSSStNa 相比于 AC-Br,其氧元素质量分数均有明显增加,这是含氧基团被接枝在其表面所引起的,由此可知,SStNa 成功接枝到 AC 表面。

2.2 固定化 HRP 的酶学性质研究

2.2.1 固载酶的 pH 稳定性

不同 pH 下游离酶及固载酶的活性如图 4 所示。



1—游离酶;2—Ac-g-PsstNa 固载酶

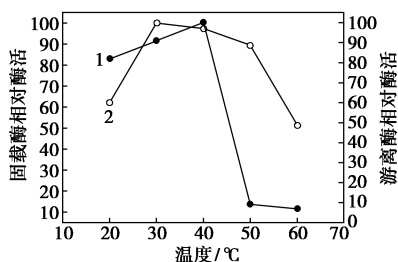
图 4 不同 pH 下游离酶及固载酶的活性

由图 4 可以看出,游离酶和 Ac-g-PsstNa 固载酶在 pH=7 时酶活性最高。在 pH 为 9 时游离酶活性降至 75.82%,而 Ac-g-PsstNa 固载酶仍保持 91.85% 的活性。固载酶在酸性体系中稳定性不如

游离酶,在碱性体系中的稳定性与游离酶相比有了提高。溶液的 pH 影响到载体表面所带基团的电性,使其解离状态受到影响,导致底物不能与酶蛋白结合,或者是由于形成了酶-底物络合物,无法有效的生成催化产物,因此使得酶活性降低。尽管酸性条件下固载酶活性不如游离酶,但总体来说,固载后 HRP 对 pH 的适应范围变大,有利于提高酶在实际应用中对不同体系的适应程度,从而提高催化效率。

### 2.2.2 固载酶的热稳定性

不同温度下游离酶及固载酶的活性如图 5 所示。



1—游离酶;2—Ac-g-PsstNa 固载酶

图 5 不同温度下游离酶及固载酶的活性

由图 5 可以看出,相比于固载酶,游离酶的活性对温度更加敏感,在 40°C 达到最高活性后,继续升温其活性急剧下降,温度达到 60°C 时基本失去活性。而固载酶活性受温度的影响较小,在 40°C 同样达到最大活性,之后继续升温其活性逐渐减小。但相比于游离酶,固载酶表现出很好的热稳定性。60°C 时固载酶大约还具有最高活性的 75%,这说明固载后的 HRP 热稳定性得到了提高。

### 2.2.3 固载酶时间稳定性的考察

储存时间对固载酶活性的影响如图 6 所示。

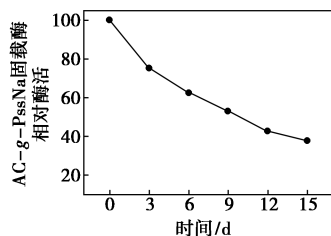


图 6 储存时间对固载酶活性的影响

由图 6 可以看出,Ac-g-PsstNa 固载酶保存 15 d 后活性降为原来的 37.81%。这是由于交联时戊二醛过量所造成的。过量的戊二醛会影响 HRP 空间结构的稳定性,甚至扭曲 HRP 的特定活性位

点,导致酶的构象发生变化,造成酶活性的下降,还会影响载体表面结构,导致酶不易被固定<sup>[11]</sup>。

## 3 结论

以 CuBr/PMDETA 为催化体系,CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 为溶剂,SSStNa 为单体,AC-Br 作引发剂,在室温下利用 ATRP 聚合得到以活性炭(AC)为原料的 AC-g-PsstNa 复合材料。以此材料作载体固定 HRP。固载酶在碱性环境中的活性比游离酶具有较好的 pH 稳定性。固载酶受温度的影响程度低于游离酶,在 60°C 时游离酶只有 6.82% 的活性,但 Ac-g-PsstNa 固载酶的活性却保持在 51.48%,显示出较好的热稳定性。

## 参考文献

- [1] Kienle H, Bader E. 活性炭及其工业应用[M]. 魏同成译. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
- [2] Liu P, Wang T M. Surface-initiated atom transfer radical polymerization of hydroxyethyl acrylate from activated carbon powder with homogenized groups[J]. *Review and Letters*, 2007, 14(2): 269-275.
- [3] Krzysztof Matyjaszewski. Atom transfer radical polymerization (ATRP): Current status and future perspectives[J]. *Macromolecules*, 2012, 45(10): 4015-4039.
- [4] 王翠, 姜艳军, 周丽亚, 等. 纳米氧化硅固定辣根过氧化物酶处理苯酚废水[J]. *化工学报*, 2011, 62(7): 2026-2032.
- [5] 左鹏, 于少明, 杨杰茹, 等. HRP 固定化载体材料的研究进展[J]. *材料导报*, 2007, 21(11): 46-49.
- [6] Zhang Baoliang, Li Peitao, Zhang Hepeng, *et al.* Preparation of lipase/Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hybrid nanoflower and its catalytic performance as an immobilized enzyme[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, (291): 287-297.
- [7] Virendra Kumar, Nilanjali Misra, Narender Kumar Goel, *et al.* A horseradish peroxidase immobilized radiation grafted polymer matrix: A biocatalytic system for dye wastewater treatment[J]. *RSC Advances*, 2016(6): 2974-2981.
- [8] 赵康, 邱琴剑, 邓利, 等. 吸附-交联固定化酶的制备及表征[J]. *现代化工*, 2016, 36(12): 63-68.
- [9] Shen Yajing, Zhang Ye, Zhang Xiang, *et al.* Horseradish peroxidase-immobilized magnetic mesoporous silica nanoparticles as a potential candidate to eliminate intracellular reactive oxygen species[J]. *Nanoscale*, 2015(7): 2941-2950.
- [10] Stellmach B. 酶活的测定方法(钱嘉渊)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 271-278.
- [11] 张锋, 王辉, 赵立芳. 层状氢氧化氨基甲酸锌固定辣根过氧化物酶及其催化性质[J]. *石油化工*, 2015, 44(3): 332-338. ■