

知识介绍

溶胶-凝胶法包埋生物活性分子

吴 洪¹ 姜忠义^{1,2} 黄淑芳¹ 许松伟¹

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 天津大学一碳化学化工国家重点实验室, 天津 300072)

摘要:溶胶-凝胶法以其温和的反应条件、广泛的适用性、高的生物分子结构和活性维持率等突出优点成为生物活性分子包埋的高效方法。围绕溶胶-凝胶法包埋生物活性分子基本过程、原理特点、主要影响因素等方面对该领域的应用和研究现状进行了评述,并对未来发展趋势进行了简要预测。

关键词:溶胶-凝胶法;生物活性分子;固定化;包埋

中图分类号:TQ427

文献标识码:A

Encapsulation of bioactive molecules by sol-gel processWU Hong¹, JIANG Zhong-yi^{1,2}, HUANG Shu-fang¹, XU Song-wei¹

(1. School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. State Key Laboratory of C1 Chemical Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Sol-gel process has become a new and efficient technique for biomolecule encapsulation because of its mild gel-forming condition, wide suitability, good preservation ability of structure and activity of immobilized bioactive molecules. Present situation of researches and applications are discussed according to the followings: basic principles, characteristics, and major affecting factors. Future development tendency is briefly previewed.

Key words: sol-gel; bioactive molecules; immobilization; encapsulation

许多生物大分子都具有特定的识别和催化功能而具有重要的应用价值。为使生物活性分子能够高效、稳定和反复的应用,需要找到适宜的固定化材料和方法。传统的生物材料固定方法包括物理吸附、共价键合、交联到一定的载体基质上或包埋于有机聚合物的基质中。吸附是最容易实现的方法,但要求基质孔径与被包埋分子尺寸相匹配,且生物分子与吸附剂间的作用力往往很弱,易造成流失。共价键合法要求生物分子具有与基质能发生反应的特殊的官能团,且固定化后的生物分子的取向是固定的,使底物与生物分子反应活性点间的接触受到一定限制。另外,共价键合和化学交联过程所发生的剧烈化学反应往往对生物分子的存活是极其不利的。相比之下,溶胶-凝胶法(sol-gel)具有独特的技术优势。

Sol-gel 法是指以有机或无机化合物(通常为烷氧化物,如正硅酸甲酯 TMOS 和正硅酸乙酯 TEOS)为原料,经水解、缩聚反应,由溶胶状态逐渐固化,形成具有三维网络结构的氧化物凝胶的过程。该方法

的突出优点是反应条件温和、易控,制得的材料均匀性好、纯度高,可制成薄膜、块状、纤维等多种形式。

Sol-gel 法在生物分子固定化领域的研究和应用起源于 1990 年, Braun 等人^[1]采用 sol-gel 法首次将碱性磷酸酶(ALP)包埋于 SiO₂ 玻璃中,为生物分子的包埋和 sol-gel 技术的应用开辟了新的途径。此后这一领域作为集生物化学、材料学、无机化学、催化化学、分析化学等多学科知识于一身的交叉性学科成为人们的研究热点。至今许多种类的生物分子,包括酶、其他蛋白质、细胞等都被成功引入 sol-gel 基质中,并获得了多种具有特殊功能的生物活性材料。有观点认为 sol-gel 法包埋生物分子的成功在无机化学和生物化学间架起了一座桥梁^[2],它将成为连接生物界和非生物界的纽带, sol-gel 学也将为信息技术、环境技术和生物技术等高新技术领域的发展作出重大贡献。下文将介绍 sol-gel 法包埋生物分子的基本过程、影响因素、应用及研究现状等。

1 Sol-gel 法包埋生物分子基本过程

Sol-gel 法包埋生物分子的基本过程可参见图 1。

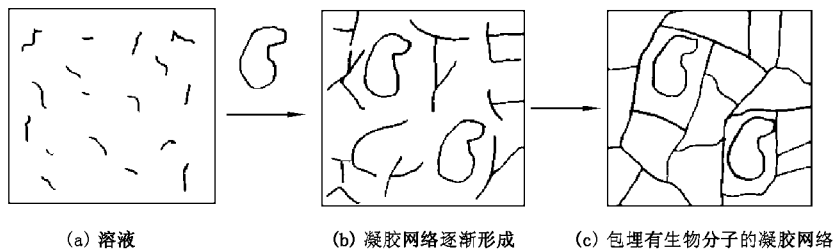


图 1 Sol-gel 法包埋生物分子过程示意图

首先,前驱体在催化剂作用下发生水解,形成均一的溶胶溶液,此时加入生物分子,随着凝胶网络结构的形成和固化,生物分子被逐步包埋于凝胶孔中。

Sol-gel 法是物理包埋过程,凝胶网络是围绕生物分子逐渐形成的,对生物分子尺寸无特殊要求;温和的反应条件和凝胶的非晶态结构都有利于保持生物分子的结构完整性和表面微观结构的各向同性;常用的基质材料 SiO_2 比有机聚合物具有更好的化学和热稳定性,且坚固、抗磨,不易变形。另外,sol-gel 中含有足够多的间隙水(interstitial water),可以为生物分子提供与水溶液环境相同的微环境,从而保持生物分子的反应活性^[3]。Sol-gel 包埋生物分子(如酶)用于实际反应(如酶促反应)时,反应效果不仅取决于生物分子的活性,还与凝胶网络微观结构密切相关^[4]。作为催化剂的酶是被束缚在固体中的,底物分子必须扩散到含酶的凝胶表面和内部才能与酶接触并发生反应,同样,生成的产物也要不断扩散出凝胶。因此反应效果还取决于底物和产物在溶液和基质间的分配以及底物到达酶处和产物离开基质的扩散阻力。

Sol-gel 法在基质结构设计和裁剪方面具有巨大的优势。通过调节反应条件,sol-gel 法形成的基质孔大小可被控制在适宜的尺寸,既可将生物分子牢固地束缚在凝胶网络中,又便于底物和产物的扩散以及底物与生物分子间的反应。但目前这一方面的研究大多还只停留在工艺水平,缺乏定量的理论指导。

针对传统 sol-gel 过程在生物分子包埋方法的缺陷,人们提出了如下改进措施^[2,5]:①采用超声波促进前驱体的溶解,提高多组分体系的均一分散度和凝胶化速度而无须再外加醇作共溶剂;②在水解后的溶胶中加缓冲溶液调节 pH 值,同时稀释水解过

程中产生的醇,创造更适宜生物分子的包埋环境;③在低温下老化。

通过这些改进,至今已有许多种类的酶和其他

蛋白质被包埋于 sol-gel 法形成的基质中,如葡萄糖氧化酶^[6-8]、铜锌超氧化物歧化酶^[9]、细胞色素 C^[9]、肌红蛋白^[3,9,10]、血红蛋白^[10]、过氧化氢酶^[10]、脂肪酶^[11]、大豆过氧化酶^[12]、脲酶^[13]等,研究表明包埋生物分子的活性得到了很大提高,一般可达到未包埋时的 30% ~ 100%^[4,14],甚至超过了相同条件下

在溶液中的活性^[11]。

2 Sol-gel 法包埋生物分子的主要影响因素

2.1 前驱体

Sol-gel 前驱体的选择直接影响着整个反应过程、凝胶的结构和包埋效果。理想的 sol-gel 前驱体应具有良好的生物相容性。具体而言,其水溶性要好,无需再添加对生物分子有害的助溶剂;在水溶液中可自行水解,而无需加酸/碱催化剂;水解产生的醇最好对生物分子无害或具有保护作用。另外,对于某些具特殊性质的生物分子,还应注意针对具体情况作具体选择。目前在生物分子包埋上常用的是烷氧基硅烷及其衍生物,其中以 TMOS 和 TEOS 最常见。TMOS 水解产生的甲醇与水极性相近,对蛋白质的破坏作用相对 TEOS 产生的乙醇要小,但其价格较 TEOS 昂贵得多,在研究和应用上受到一定限制。

不同前驱体对 sol-gel 过程的影响已有大量研究报告^[15,16],笔者仅针对生物分子包埋 sol-gel 前驱体的近期研究状况介绍。

针对烷基硅酸盐和烷氧基硅酸盐前驱体需要另加共溶剂和催化剂以促进溶解和水解,而水解生成的醇会降低生物分子的活性,醇的挥发又会导致凝胶收缩率增大和孔塌陷等缺点,Iqbal Gill 等人^[17]合成出一类新型生物相容的水溶性前驱体,即硅酸盐和硅烷的聚甘油酯,如聚甘油硅酸盐(PGS)。这类物质在水溶液中无须催化剂几分钟即可水解,水解和缩聚速率较 TMOS 快 6 ~ 23 倍。对细胞色素 C、葡萄糖氧化酶、rugosa 脂肪酶、马心过氧化酶的包埋实验研究表明,PGS 包埋酶活性维持率和包埋率分别可达到 83% ~ 98% 和 88% ~ 98%。Rimple B. Bhatia 等人以硅酸钠为前驱体,开发了新型水相 sol-gel 法

包埋酶、抗体和细胞等生物分子^[4]。整个过程在中性和室温下进行,无副产物醇产生。对马心过氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的包囊化收率均接近 100%,酶促反应遵循 Michaelis-Menten 动力学,活性分别达到了游离酶的 73% 和 36%。D. M. Liu 等人采用 SiO₂ 胶体和酸性硅酸钠的混合溶液为前驱体,通过水相胶体 sol-gel 过程制备出透明多孔硅胶基质用于细胞色素 C、过氧化氢酶、肌红蛋白、血红蛋白的包埋,过程亦无醇产生^[10]。包埋蛋白质的稳定性和活性好于传统烷氧化物基凝胶包埋效果。针对脂肪酶的疏水性,T. R. Manfred 等人以 TMOS 和烷基取代的硅烷 RSi(OCH₃)₃ 作前驱体,制备疏水性硅基质包埋脂肪酶^[11],发现其活性随疏水硅烷的含量和烷基链长度的增加而显著增加。

2.2 催化剂

目前普遍采用的烷氧基硅烷前驱体 sol-gel 过程都需加催化剂以促进水解反应,大幅度缩短凝胶化时间,如在 TEOS 的乙醇水溶液中加入 0.05% 的 HCl 即可将凝胶化时间由 1 000 h 缩短到 92 h^[18]。常用的催化剂有盐酸、氢氟酸、乙酸、琥珀酸、马来酸等酸性和氨水类碱性物质。M. A. Fardad 研究了不同酸性催化剂对 SiO₂ sol-gel 膜结构的影响^[19],结果发现用 CH₃COOH 或 NH₃·H₂O 作催化剂时,无法成膜,而用 HCl、H₂SO₄、HNO₃ 或 C₂H₂O₄ 作催化剂形成的膜则具有较好的光学性质和微观结构。另有不少学者也就这方面作了大量工作,研究结果表明催化剂的种类、强度、浓度和催化机理对 sol-gel 过程和凝胶特性有很大影响^[20,21]。目前用于生物分子包埋的 sol-gel 过程的催化剂几乎采用的都是 HCl。对于其他催化剂的效果和应用还有待进一步的研究。

2.3 添加剂

在包埋生物活性分子的实践中,人们发现对于某些生物分子,添加剂的作用不容忽视。Manfred T. Reeta 在对脂肪酶的 sol-gel 包埋实验中发现,添加高分子聚合物后,酶的稳定性提高^[11],这可能是由于高聚物的加入有效保护了酶免受 sol-gel 过程中由于硅烷的存在、凝胶性质(如孔隙率、孔径)的变化和在有机溶剂中稳定性的变化而造成的变性。

2.4 老化及干燥

凝胶网络的结构和性质在凝胶化发生后依然会继续变化,直到凝胶孔中的溶剂被完全干燥掉,这是由于聚合反应仍在进行的缘故。在此老化和干燥阶段,聚合形成的新键使凝胶网络收缩,凝胶孔缩小,孔中的液体被挤出,凝胶强度增加。Kulwinder K.

Flora 等人^[5]以 TEOS 为前驱体,通过测定形成的凝胶的荧光光谱和红外光谱,研究了凝胶化和老化过程中凝胶内部环境的变化,并提出了以下几点建议:在凝胶化过程中,建议采用尽可能高的水/硅烷比,以降低醇浓度,减小醇对蛋白质的不利影响;发生胶凝后,样品应首先在湿态下老化至少 3 天,并用缓冲溶液冲洗以去除凝胶中的醇;经老化处理后,凝胶应保存于湿环境中,以防止水分的进一步蒸发,这样可以减小基质内部结构的进一步改变,从而提高蛋白质的稳定性。

2.5 其他

除以上因素外,水/硅烷含量比、温度、共溶剂加入量等^[11,21,22]也是 sol-gel 过程的重要影响因素。Manfred T. Reeta 等人^[11]在对脂肪酶的 sol-gel 包埋研究中就发现水/硅烷含量比对包埋酶活性影响很大。水/硅烷比较低时,脂肪酶浓度较高会引起团聚,造成活性降低;水/硅烷比增加到 8~10 时,活性逐渐提高;之后活性又下降。在实际生物分子包埋中,应综合考虑各因素的影响,同时尽可能避免温度过高和外加溶剂。

3 研究方向展望

Sol-gel 包埋生物分子技术虽然只有十几年的发展历史,但其良好的应用前景已经吸引了科研界和工业界的广泛兴趣,并取得了不少可喜的进展。从整体上来说,此领域尚处于起步阶段,许多基础和应用研究需要进一步开展。今后研究工作的重点可能会集中在下述方面:sol-gel 包埋过程的反应机制(热力学、动力学)有待进一步的理论揭示和定性描述;为提高生物材料的活性,除 SiO₂ 基质外,其他各种基质也会引入,有机改性的硅胶基质和各种杂化材料基质会逐步得到应用;随着纳米科学的发展,基质的微观结构调控也会获得更为有效的手段(如模板的使用^[23]);生物活性材料逐步向实用化的方向发展。

参考文献

- [1] Braun S, Rappoport S, Zusman R, et al. Biochemically active sol-gel glass: the trapping of enzymes[J]. *Mater Lett*, 1990, 10(1/2): 1~5
- [2] Zarzycki J. Past and present of sol-gel science and technology[J]. *J Sol-gel Science and Technology*, 1997, 8: 17~22
- [3] Dave B C, Dunn B, Valentine J S, et al. Sol-gel encapsulation methods for biosensors[J]. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(22): 1120A~1127A
- [4] Bhatia R B, Brinker C J. Aqueous sol-gel process for protein encapsulation[J]. *Chem Mater*, 2000, 12: 2434~2441

- [5] Flora K K, Dabrowski M A, Musson S P. The effect of preparation and aging conditions on the internal environment of sol-gel derived materials as probed by 7-azaindole and pyranine fluorescence[J]. *Can J Chem*, 1999, 77: 1617 ~ 1625
- [6] Braun S, Shtelzer S, Rappoport S, et al. Biocatalysis by sol-gel entrapped enzymes[J]. *J Non-Crystalline Solids*, 1992, 147/148: 739 ~ 743
- [7] Shtelzer S, Braun S. An optical biosensor upon glucose oxidase immobilized in sol-gel silicate matrix[J]. *Biotech Appl Biochem*, 1994, 19: 293 ~ 305
- [8] Li J, Chia L S, Goh N K, et al. Renewable silica sol-gel derived carbon composite based glucose biosensor[J]. *J Electroanalytical Chemistry*, 1999, 460: 234 ~ 241
- [9] Ellerby L M, Nishida C R, Nishida F, et al. Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method[J]. *Science*, 1992, 255: 1113 ~ 1115
- [10] Liu D M, Chen I W. Encapsulation of protein molecules in transparent porous silica matrices via an aqueous colloidal sol-gel process[J]. *Acta Mater*, 1999, 47(18): 4535 ~ 4544
- [11] Reeta M T, Zonta A, Sempelkamp J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 49: 527 ~ 534
- [12] Bingquan Wang, Bin Li, Zhenxin Wang, et al. Sol-gel thin-film immobilized soybean peroxidase biosensor for the amperometric determination of hydrogen peroxide in acid medium[J]. *Anal Chem*, 1999, 71: 1935 ~ 1939
- [13] Narang U, Prasad P N, Bright F V. A novel protocol to entrap active urease in a tetrathoxysilane-derived sol-gel thin-film architecture[J]. *Chem Mater*, 1994, 6: 1596 ~ 1598
- [14] Avnir D, Braun S, Lev O, et al. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chem Mater*, 1994, 6: 1605 ~ 1614
- [15] Wagh P B, Begag R, Pajonk G M, et al. Comparison of some physical properties of silica aerogel monoliths synthesized by different precursors[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 1999, 57: 214 ~ 218
- [16] Chen K C, Tsuchiya T, Mackenzie J D. Sol-gel processing of silica. I. The role of the starting compounds[J]. *J Non-Crystalline Solids*, 1986, 81: 227 ~ 237
- [17] Gill I, Ballesteros A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: an efficient and generic approach[J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 8587 ~ 8598
- [18] Brinker C J, Scherer G W. Sol-gel science. The physics and chemistry of sol-gel processing[M]. New York: Academic Press Inc, 1990
- [19] Fardad M A. Catalysts and the structure of SiO₂ sol-gel films[J]. *J Mater Science*, 2000, 35(7): 1835 ~ 1841
- [20] Pope E J A, Mackenzie J D. Sol-gel processing of silica. II. The role of the catalyst[J]. *J Non-Crystalline Solids*, 1986, 87: 185 ~ 198
- [21] Colby M W, Osaka A, Mackenzie J D. Effects of temperature on formation of silica gel[J]. *J Non-Crystalline Solids*, 1986, 82: 37 ~ 41
- [22] 王剑华, 郭玉忠, 刘荣佩. 溶胶-凝胶法制备 SiO₂ 薄膜的研究[J]. *材料科学与工艺*, 1999, 7(3): 1 ~ 5
- [23] Wei Yen, Xu Jigeng, Feng Qiuwei, et al. Encapsulation of enzymes in mesoporous host materials via the nonsurfactant-templated sol-gel process[J]. *Materials Letters*, 2000, 44: 6 ~ 11 ■

(上接第 59 页)

表 4 印度塑料需求和预测 万 t

	1990年	2000年	2010年	增长率/%	
				1990~2000年	2000~2010年
PP	15.7	102.5	536.4	21	18
PS	5.2	17.3	70.0	13	15
PE	38.8	137.7	436.3	14	12
PVC	29.5	72.0	186.7	9	10
合计	89.2	329.5	1229.4	14	14

自 1980 年印度石化公司 (IPCL) 和国家有机化学工业公司 (NOCIL) 主宰印度石化工业以来, 竞争格局已有了很大变化。1997 年, 信赖工业公司投建 75 万 t/a 乙烯装置, 使印度乙烯能力翻了 1 倍多。此后, 印度天然气管理局和 Haldia 石化公司也建设乙烯装置, IPCL 公司也增加了产能。据美国化学系统公司预计, 到 2010 年, 印度乙烯需求年增长率约为 10%, 许多衍生物进口仍有增加, 这将使乙烯消费量 2010 年增加到 500 万 t。2010 年印度乙烯供应短缺将达 260 万 t/a 以上, 将需要建设三四套世界规

模级乙烯装置, 并使现有能力翻番。2010 年石化产品的供应短缺大致为: 乙烯 260 万 t/a, PP 270 万 t/a, PE 220 万 t/a, PTA 120 万 t/a, PVC 80 万 t/a, 对二甲苯 40 万 t/a, PS 25 万 t/a。印度塑料需求和预测见表 4。

近年, 外国公司投资印度石化业已有一些案例: 三菱化学公司 2000 年在哈尔迪亚新建 35 万 t/a PTA 装置; 巴斯夫公司投资 PS 产业, 并于 2000 年兼并 Pushpa 聚合物公司 (能力 6 万 t/a); 2001 年, Schnectady 国际公司兼并 Herdillia 石化公司 (印度主要的苯和苯酚生产商)。1991 ~ 1999 年, 印度吸引国外直接投资总额达 140 亿美元, 但低于中国 2 830 亿美元、泰国 290 亿美元。印度化学工业吸引国外直接投资仅占总额的 15%。印度两家生产商也与阿曼石油公司组建合资企业 OMIFCO, 建设化肥装置, 利用阿曼的原料, 服务于印度市场。

亚洲各国 (或地区) 石化工业将根据各自实情, 或继续扩能增产, 或加快产业结构调整, 利用亚洲化工业千载难逢的发展机遇, 寻求新的经济增长点。 ■