

科研与开发

固定化漆酶的复合载体丙烯酸酯类聚合物的合成

赵林果, 季永新, 李 强

(南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要:利用悬浮聚合技术合成了一种含活性炭的丙烯酸酯类聚合物。其合成的适宜工艺条件为:引发剂用量占单体用量的 0.6%~0.7%,反应温度为 75~85℃,GMA、MMA、DVB、活性炭用量分别占单体总量的 40%、30%、30%、15%,水油比为 3.5:1,致孔剂与单体的质量比为 3.0:1。在此条件下合成的共聚物有利于酶的固定化。添加的活性炭既能利用本身的吸附性能进行染料脱色,又能以吸附的形式固定一部分酶,从而对固定化酶的染料脱色起到促进作用。采用所固定的漆酶连续降解染料 Acid Violet 43 时,第 8 轮的脱色率仍然能达到 90.1%。

关键词:悬浮聚合;丙烯酸酯类聚合物;活性炭;固定化;漆酶

中图分类号:TQ426.97

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2008)12-0038-04

Synthesis of polyacrylic copolymer as carrier for immobilization of laccase

ZHAO Lin-guo, JI Yong-xin, LI Qiang

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: A new kind of acrylic copolymer with acticarbon is synthesized by the suspension polymerization. The optimal conditions are obtained as follows: GMA (glycidyl methacrylate), MMA (methyl methacrylate), DVB (ortho-divinylbenzene), active carbon and the initiator which are 40%, 30%, 30%, 15% and 0.6% - 0.7% of the total monomers' quantity, respectively; the temperature is 75 - 85 °C; the aqueous phase is the solution of CaCl₂ with the volume ratio of aqueous phase to oil of 3.5:1; the quantity ratio of porogenic agent to monomer is 3.0:1. Under the optimal conditions the prepared polymer is propitious to the immobilization of enzyme. The added active carbon can decolor the dye by physical absorption, and also can improve the decoloration rate by absorbing enzyme on itself. In the repeated batch process of treating wastewater containing Acid Violet 43 with the laccase immobilized on the copolymer, the decolorization rate can reach 90.1% after 8 batches.

Key words: suspension polymerization; composite carrier; acticarbon; immobilization; laccase

酶固定化技术是实现酶重复连续使用和稳定性改善的有效手段^[1],适宜载体的选择尤为重要^[2]。在合成类高分子树脂材料的载体中,聚丙烯酸酯类树脂的机械性能优越,其颗粒度、孔径、比表面积等参数都可根据要求在合成时进行调控,因而可适应不同生物酶的固定化要求^[3-6]。近年来国内外对真菌漆酶的固定化进行了比较深入的研究,使用的载体包括硅藻土、高岭土、硅胶、葡聚糖类、纤维素类、亲水性微滤膜和壳聚糖等^[7-8],但以丙烯酸酯类树脂作为漆酶固定化载体的研究还未见报道。笔者以固定化漆酶处理印染废水为研究目标,通过悬浮聚合首次合成了一种含有活性炭的丙烯酸酯类聚合物,为开发新型高效固定化漆酶载体以及推动漆酶

的工业化应用提供参考。

1 实验部分

1.1 主要原料及试剂

甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、甲基丙烯酸甲酯(MMA),工业级;丙酮、邻二乙烯基苯(DVB)、正庚烷、乙醇、无水氯化钙、偶氮二异丁腈(AIBN),均为化学纯;活性炭的比表面积 2 500 m²/g,堆积密度 0.4 g/cm³,孔径 10~50 nm,由本校化工学院林产化学工程系提供。酸性染料 Acid Violet 43 (C₂₁H₁₄NNaO₆S,分子质量 431.89 g/mol, CAS 号: 4430-18-6),紫黑色粉末,工业级,宁波龙欣精细化工有限公司。

收稿日期:2008-08-11

基金项目:南京林业大学“十五”人才基金(163030007);南京林业大学留学回国人员科研基金(163030009)资助

作者简介:赵林果(1965-),男,博士,副教授,主要研究方向为生物化工,025-85427962,lg.zhao@163.com。

1.2 实验方法

1.2.1 聚合反应方法

在装有搅拌器、球形冷凝管、温度计的四口烧瓶中,加入 CaCl_2 溶液和活性炭,升温至 45°C ,投入所需的甲基丙烯酸缩水甘油酯、邻二乙烯基苯、甲基丙烯酸甲酯单体及致孔剂正庚烷,以偶氮二异丁腈为引发剂进行悬浮聚合反应。 55°C 反应 1 h, 70°C 反应 3 h, $80\sim 85^\circ\text{C}$ 反应 4 h, 制得灰黑色粉末状固体。抽滤,热水洗涤 3 次,丙酮洗涤 2 次,再用水洗 1~2 次,真空干燥后备用。无活性炭的共聚物的制备过程及工艺同上,仅为不添加活性炭。

1.2.2 漆酶的固定化

准确称取适量的载体与一定量的酶液(漆酶用量为 100 U/mL , 相对于混合液总体积)及 50 mmol/L pH 5.0 的 NaAc-HAc 缓冲溶液混合,在 30°C 、 120 r/min 条件下固定反应 24 h,抽滤。用 50 mmol/L pH 5.0 的 NaAc-HAc 缓冲溶液洗涤载体,直到没有游离酶被洗出时为止,然后置于 4°C 冰箱中保存。

1.2.3 固定化漆酶脱色降解 Acid Violet 43 溶液

取 1% (质量分数) Acid Violet 43 溶液 0.3 mL , 用 50 mmol/L pH 5.0 的 NaAc-HAc 缓冲溶液定容至 20 mL , 加入适量的固定化酶后置于自制的带过滤装置的反应器中,在 50°C 、 100 r/min 的恒温振荡器中进行脱色降解。每批次降解时间为 4 h。降解结束后,滤出的液体用于分析,用适量的缓冲溶液洗涤留在容器中的固定化酶,再次加入相同浓度和体积的 Acid Violet 43 溶液,并在相同的条件下进行新一轮的降解实验。重复使用次数为 8 次。

1.2.4 脱色率的计算

将含染料的溶液稀释到吸光值与染料浓度成线性的范围内,用分光光度计在可见光区测量该染料最大吸收峰处的吸光值,再乘以稀释倍数,即为该样品的理论吸光值 A 。

1.2.5 共聚物结构性能的测定

共聚物红外光谱采用 KBr 压片法测定,美国 Nicolet 公司 FT-IR-360 傅里叶变换红外光谱仪;共聚物表面结构采用电子扫描电子显微镜拍照观察, Philips SEM-505 扫描电子显微镜;共聚物环氧基团含量的测定采用盐酸-丙酮法^[9];共聚物溶胀性能的测定参考文献^[9]。

2 结果与讨论

2.1 复合载体丙烯酸酯类聚合物的合成

实验采用的悬浮聚合反应中,单体由 GMA、

DVB、MMA 组成。影响复合载体丙烯酸酯类聚合物合成反应的主要因素有 GMA 用量(相对于单体总质量的百分比,下同)、DVB 用量、活性炭用量、水油比、致孔剂用量、引发剂用量、温度。根据初步实验可知,引发剂的适宜用量为单体用量的 $0.6\% \sim 0.7\%$, 较佳反应温度为 $75\sim 85^\circ\text{C}$ 。在此基础上制定如表 1 所示的 5 因素 4 水平的正交实验方案。同时将不同条件下制备的固定化酶应用于染料 Acid Violet 43 的多轮脱色,以第 8 次的脱色率作为衡量合成载体性能好坏的指标,结果如表 2 所示。可知 5 个因素的极差大小关系为 $A > C > B > E > D$, 共聚物合成的适宜工艺条件可初步确定为 $A_4B_2C_3D_2E_2$ 。

表 1 合成实验因素与水平

因素	水平			
	1	2	3	4
GMA 用量(A)/%	25	30	35	40
DVB 用量(B)/%	20	30	40	50
活性炭用量(C)/%	5	10	15	20
水相体积与油相体积比(D)	3:1	3.5:1	4:1	4.5:1
致孔剂用量(E)	2.5:1	3:1	3.5:1	4:1

表 2 正交实验结果分析

实验号	各因素与水平					第 8 次脱色率/%
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	59.3
2	1	2	2	2	2	73.5
3	1	3	3	3	3	70.2
4	1	4	4	4	4	60.9
5	2	1	2	3	4	60.1
6	2	2	1	4	3	68.3
7	2	3	4	1	2	78.6
8	2	4	3	2	1	80.3
9	3	1	3	4	2	83.8
10	3	2	4	3	1	83.1
11	3	3	1	2	4	78.2
12	3	4	2	1	3	72.8
13	4	1	4	2	3	79.3
14	4	2	3	1	4	90.1
15	4	3	2	4	1	80.6
16	4	4	1	3	2	80.1
均值 K_1 /%	65.98	70.63	71.48	75.20	75.83	
均值 K_2 /%	71.83	78.75	71.75	77.83	79.00	
均值 K_3 /%	79.48	76.90	81.1	73.37	72.65	
均值 K_4 /%	82.53	73.53	75.48	73.40	72.33	
极差 R /%	16.55	8.13	9.63	4.45	6.68	

在正交实验基础上,分别对正交实验中的各因素进行了进一步单因素实验(数据略)和分析,结果表明:①GMA 用量对载体固定化漆酶的效果起着至关重要的作用,GMA 用量增大,所合成的载体对漆酶的固定化能力增强,固定化漆酶对染料 Acid Violet 43 的脱色降解能力提高,可以重复使用的次数增加。但用量超过 40%,脱色率增加幅度有限,而合成成本无疑加大。②活性炭的加入促进了载体的固定化酶效果,大大提高了固定化酶的脱色能力。当活性炭用量为 15% 时,载体固定化漆酶后的脱色率达到最大值,之后随着活性炭用量增加,脱色率反而有所下降。③随着交联剂 DVB 用量的增加,所得载体固定化酶后的脱色率增加,当 DVB 用量达到 30% 时,脱色率达到最大值。④随着致孔剂用量的增加,所合成的共聚物固定化酶后对染料液的脱色率上升。但随着水油比变大,所合成的共聚物固定化酶后对染料液的脱色率有小幅上升,变化不明显。综合考虑以上各因素对载体固定化酶效果及其生产成本,进一步确立了共聚物合成的最佳工艺条件应为 A₄B₂C₃D₂E₂。即 GMA、DVB、活性炭用量分别占单体总量的 40%、30% 和 15%,水油比为 3.5:1,致孔剂与单体的质量比为 3.0:1。此时甲基丙烯酸甲酯(MMA)的用量占单体总质量的 30%。

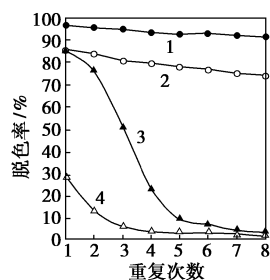
按照该条件进行载体的合成,在相同条件下固定化漆酶并进行染料 Acid Violet 43 的脱色重复实验,固定化漆酶在循环使用至第 8 次时,样品 1 和样品 2 的脱色率分别为 90.3%、90.1%。在此条件下合成的固定化酶载体性能优越,重复性好。

2.2 共聚物性能分析

2.2.1 共聚物中活性炭的作用

分别以含和不含活性炭的丙烯酸酯类聚合物在相同条件下进行漆酶的固定,比较它们对染料 Acid Violet 43 脱色效果,并以未固定化酶但含活性炭的共聚物、以及未固定化酶也不含活性炭的共聚物作为空白对照。重复使用实验样品 8 次,计算每一次的脱色率。结果如图 1 所示。含有活性炭的固定化酶对 Acid Violet 43 的脱色效果最好,重复使用 8 次后脱色率仍然有 91.4%。不含活性炭的固定化酶对 Acid Violet 43 的脱色效果仅次于含有活性炭的固定化酶,也有着很强的可重复利用性,但其每一次的脱色率都低于含有活性炭的固定化酶。在未固定化酶的 2 种材料中,含有活性炭的共聚物由于活性炭本身具有较强的吸附性能,因而在第一次使用时脱色率能达到 85%,但随后脱色率开始迅速下降。不

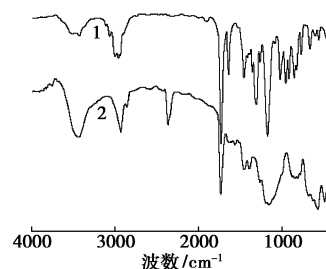
含活性炭的共聚物也有一定的吸附性能,但是为一种物理吸附,不具有可重复利用性。以上结果表明,活性炭的加入既能利用本身的吸附性能进行脱色,又能以吸附的形式固定一部分酶,从而对酶的固定化起到促进作用。



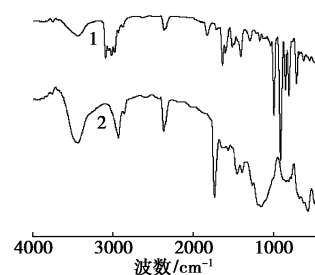
1—含炭固定化酶;2—含炭固定化载体;3—不含炭固定化酶;
4—不含炭固定化载体

图 1 不同实验样品对 Acid Violet 43 脱色率的影响

2.2.2 共聚物的红外谱图分析



1—GMA;2—共聚物
(a)GMA



1—DVB;2—共聚物
(b)单体 DVB

图 2 固定化酶后的共聚物与单体的红外光谱

图 2 为固定化酶后的共聚物与单体 GMA、DVB 红外光谱图。从图 2(a)可知,GMA 单体在 1721 cm^{-1} 处有酯基吸收峰,在 909、845、816 cm^{-1} 处有环氧基的吸收峰;而固定化酶后的共聚物红外谱图中,在 1725 cm^{-1} 处有酯基吸收峰,在 909、845、816 cm^{-1} 处的环氧基吸收峰消失,表明 GMA 参加共聚,且酶已与载体上的环氧基团反应。从图 2(b)中可知,

DVB单体在 $989、905\text{ cm}^{-1}$ 处有单取代双键吸收峰,在 707 cm^{-1} 处有苯环吸收峰,在 $1\ 629\text{ cm}^{-1}$ 处有苯环上取代的双键伸缩振动吸收峰,在 $3\ 085、3\ 011\text{ cm}^{-1}$ 处有苯环上取代的双键上的碳氢吸收峰;固定化酶后的共聚物红外谱图中,在 706 cm^{-1} 处有取代苯的吸收峰,在 $989、905、1\ 629、3\ 085、3\ 011\text{ cm}^{-1}$ 处的双键碳氢吸收峰均都完全消失,说明了 DVB 也参与了共聚反应。

2.2.3 共聚物表面结构的测定

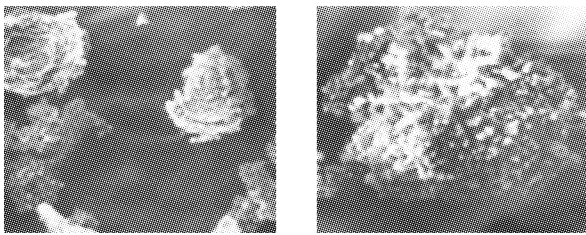


图3 共聚物载体的 SEM 照片

图3(a)、(b)为共聚物的电子显微照片。所制得的共聚物表面多孔,孔径适合,比表面积丰富,其形态结构有利于漆酶的固定化。

2.2.4 共聚物表面环氧基团的含量

采用盐酸-丙酮法测定含不同 GMA 共聚物的环氧基团含量,当 GMA 用量(相对于单体总质量)为 25%、30%、35%、40% 时,表面环氧基含量分别为 0.93、1.07、1.38、1.8 mmol/g,表面环氧基团含量随着 GMA 用量的增加而增大。这是因为共聚单体 GMA 含有环氧基团,其用量增大,共聚物中环氧基团的含量必然增加。

2.2.5 共聚物的溶胀性能

表3 交联剂用量对共聚物溶胀性能的影响

交联剂 用量/ %	不同溶剂中的溶胀率/%							
	水 (23.4)	甲醇 (14.5)	乙醇 (12.7)	DMF (12.1)	丙酮 (9.9)	四氢呋喃 (9.9)	甲苯 (8.9)	正庚烷 (7.6)
20	0	24	21	67	55	58	25	0
30	0	23	21	54	41	45	25	0
40	0	20	17	33	26	29	20	0
50	0	18	16	24	23	24	19	0

注:溶剂后的括号内为溶度参数 δ^* 。

当单体用量一定时,交联剂用量对共聚物溶胀性能的影响如表3所示。可知共聚物的溶胀性能随着交联剂 DVB 用量的增加而逐渐减小。因为单体

用量一定时,随着交联剂 DVB 用量的增加,其交联度提高,交联点之间的分子链变短,生成的共聚物网格变得更加致密,从而使得共聚物的空隙率、孔容和平均孔径减小,结果共聚物溶胀性能下降。表中还表明,共聚物在溶度参数为 12.1 ~ 9.9 之间的溶剂中具有较好的溶胀性能,在溶度参数大于 12.1 或小于 9.9 的溶剂中,其溶胀度均较低。

3 结语

复合载体丙烯酸酯类聚合物合成的适宜工艺条件为,引发剂的用量为单体用量的 0.6% ~ 0.7%,反应温度为 $75 \sim 85^\circ\text{C}$,GMA、MMA、DVB、活性炭用量分别占单体总量的 40%、30%、30%、15%,适宜的水油比为 3.5:1,适宜的致孔剂与单体的质量比为 3.5:1。加入适量活性炭既能利用活性炭本身的吸附性能进行脱色,又能以吸附的形式固定一部分酶,从而对固定化酶的染料脱色起到促进作用。利用所固定的漆酶连续降解染料 Acid Violet 43 时,第 8 轮的脱色率仍然能达到 90.1%。

参考文献

- [1] Ahmed F A, Mona Y O, Mohamed A A. Production and immobilization of cellulase from *Aspergillus niger* A20[J]. Chemical Engineering Journal, 1997, 68: 189 - 196.
- [2] 陈陶声, 居乃虎. 固定化酶理论与应用[M]. 北京: 轻工业出版社, 1987.
- [3] Elliott J E, Macdonald M, Nie J, et al. Structure and swelling of poly (acrylic acid) hydrogels: Effect of pH, ionic strength, and dilution on the crosslinked polymer structure[J]. Polymer, 2004, 45(5): 1503 - 1510.
- [4] Bianchi D, Golini P, Bortolo R, et al. Immobilization of penicillin G acylase on aminoalkylated polyacrylic supports[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 18(8): 592 - 596.
- [5] 乌云高娃, 卢冠中, 郭杨龙, 等. 大孔聚甲基丙烯酸缩水甘油酯固定化酶载体的合成及性能研究[J]. 化学学报, 2002, 60(3): 504 - 508.
- [6] 王艳芳, 王杰, 宋锡瑾. 脂肪酶在聚乙二醇二丙烯酸酯交联聚合物上的固定化[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2004, 31(5): 557 - 559.
- [7] Reyes P, Pickard M A, Vazquez D R. Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase[J]. Biotechnol Lett, 1999, 21(10): 875 - 880.
- [8] 肖亚中, 张书祥, 胡乔彦, 等. 壳聚糖固定化真菌漆酶及其用于处理酚类污染物的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 245 - 250.
- [9] 何炳林, 孙越, 郭贤权. 大孔交联甲基丙烯酸缩水甘油酯的合成及结构性能的研究[J]. 中国科学: B 辑, 1995, 25(5): 487 - 492. ■