

## 科研与开发

# 远程氩等离子体改性膜固定化脲酶的研究

王琛<sup>1,2</sup>, 陈杰蓉<sup>1</sup>

(1. 西安交通大学生命与科学技术学院, 陕西 西安 710049;

2. 西安工程大学纺织与材料学院, 陕西 西安 710048)

**摘要:**利用远程 Ar 等离子体技术引发聚四氟乙烯(PTFE)膜表面接枝丙烯酸,并以此膜为脲酶的固定化载体。研究表明:在放电压力 20 Pa、放电功率 100 W、放电时间 100 s 的等离子体处理条件和接枝温度 70℃、接枝时间 50 h、单体体积分数 26% 的接枝条件下,PTFE 膜表面丙烯酸接枝量为 131.7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;固定化脲酶接枝密度随 PTFE 膜接枝丙烯酸(AA)量的增加几乎呈线性上升,固定化酶活性开始随 PTFE 膜接枝 AA 量的增加而增加,随后趋于平缓增加。同时评价了固定化酶膜的稳定性,并对接枝膜和固定化酶膜的结构进行了表征。

**关键词:**远程氩等离子体;聚四氟乙烯膜;固定化;脲酶

**中图分类号:** O539; O631.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2006)07-0027-04

## Study on immobilization of urease on PTFE membrane modified with argon remote-plasma

WANG Chen<sup>1,2</sup>, CHEN Jie-rong<sup>1</sup>

(1. School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

2. College of Textile and Materials, Xi'an Engineering University, Xi'an 710048, China)

**Abstract:** Polytetrafluoroethylene(PTFE) film was treated by argon remote-plasma and grafted with acrylic acid(AA). Then urease was immobilized onto this film as immobilization carrier. It was shown that AA grafting yield onto PTFE film surface was 131.7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , after 100 W and 100 s of plasma treatment under 20 Pa, and 50 h of graft polymerization at 70℃ with 26% of AA volume fraction. The graft density of immobilized urease was a linear relationship which increased with AA graft yield on PTFE film. The activity of immobilized urease increased with AA graft yield on PTFE films and then turned to level off. The stability of immobilized urease membrane was evaluated and the structure and composition of the grafted film and immobilized urease membrane characterized.

**Key words:** argon remote-plasma; polytetrafluoroethylene film; immobilization; urease

固定化酶技术使生物酶得到了更广泛、有效的利用,而固定化酶的性能取决于固定化酶所使用的载体材料的性质和固定化方法。理想的载体应符合操作需要的形状、粒度和机械强度,同时表面应具有有一定数量与酶蛋白结构及固定化方法相匹配的官能团。等离子体辉光放电技术处理聚合物,产生各种能量粒子与固体表面作用,在表面引入如羟基、羧基、羰基、胺基等官能团,达到改变表面化学结构的目的,再通过各种化学手段将酶蛋白固定在改性的载体上,形成固定化酶,近年来用等离子体处理的聚合物与活性单体进行接枝聚合制得的膜用作固定化酶的载体的方法愈来愈受到关注<sup>[1-2]</sup>。远程等离子体技术是一种利用等离子体处理材料的新技

术<sup>[3]</sup>,与传统等离子体处理的不同,样品不是放置于放电区,而是离开放电区一段距离,这样就尽可能减少了高能活性粒子对试样的直接轰击而引起的降解反应,使官能团的引入占主导作用,可以在某种程度上实现控制功能化作用,从而获得比常规等离子体处理更有效的表面改性效果<sup>[4]</sup>。笔者使用远程 Ar 等离子体引发聚四氟乙烯(PTFE)膜接枝丙烯酸,然后用碳二亚胺(EDC)活化接枝膜作为脲酶固定化载体的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 主要原材料

聚四氟乙烯薄膜,工业品,厚度 0.05 mm,裁成

收稿日期:2006-03-27

基金项目:国家自然科学基金项目(20174030 和 30571636);高等学校博士学科点基金项目(20010698007);教育部留学回国人员启动基金项目(2001[345]);陕西省教育厅自然科学专项基金资助项目(02JK056)

作者简介:王琛(1963-),女,博士生,副教授,从事环境友好材料的研究;陈杰蓉(1949-),女,博士,教授,博士生导师,主要从事等离子体化学及高分子材料改性方面的研究,通讯联系人,029-82665347, jrchem@mail.xjtu.edu.cn.

60 mm × 30 mm 的样片,使用前用丙酮经索氏提取器清洗 24 h,贮于干燥器中备用;丙烯酸(AA),分析纯,天津市河东区红岩试剂厂,减压蒸馏去除阻聚剂;脲酶(EC3.5.1.5 500 U/mg),德国 Canavalia Ensi-formis 公司;碳二亚胺(EDC),上海丽珠东风生物技术有限公司;磷酸二氢钾和磷酸氢二钠,分析纯;Ar 气,纯度 ≥ 99.999%,梅塞尔北方工业气体有限公司西安分公司。

### 1.2 等离子体处理

使用远程等离子体发生反应装置(北京创威公司)。将 PTFE 试样置于远程等离子体区,本底压强 2.0 Pa,用质量流量计控制 Ar 气流量,待气压稳定后进行放电,将等离子体处理一定时间后停止放电,关闭电源并将试样曝露于大气中进行氧化。

### 1.3 聚四氟乙烯的丙烯酸接枝反应

将远程 Ar 等离子体处理后的 PTFE 膜浸入事先配制好的、所需浓度的丙烯酸反应溶液中(鼓氮气 15 min),密封后置于一定温度的恒温水浴中,反应一定时间后取出,用蒸馏水反复清洗,去除均聚物,真空干燥后,用十万分之一天平称至恒重。根据 PTFE 膜接枝反应前后质量的变化,求出单位面积上接枝 AA 的量。

### 1.4 脲酶的固定化

将 PTFE 接枝膜放入含有水溶性碳二亚胺(EDC)、pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中,在 4℃ 下预反应 10 min 后加入一定量的脲酶。反应 4 h 后将样品膜取出,用去离子水反复冲洗膜表面若干次,以除去吸附在膜表面的游离酶物质。在 4℃ 左右的温度下晾干保存。

### 1.5 产品测试

用称重法测定固定化脲酶的接枝密度( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ):接枝密度 =  $(m_1 - m_2)/S$ ,其中  $m_1$  为固定脲酶前 PTFE 膜质量, $m_2$  为固定脲酶后 PTFE 膜质量, $S$  为 PTFE 膜片面积。

固定化酶的活性检测采用滴定 NF VII 法<sup>[5]</sup>。在测试条件下,1 min 产生 1  $\mu\text{mol}$  氨的酶量为 1 个活性单位。本文固定化脲酶膜活力统一采用相对酶活。

固定化酶膜的贮存稳定性为测定固定化酶膜在 4℃ 条件下贮存不同天数对酶活性的影响。

衰减全反射傅里叶变换红外光谱分析(ATR-FTIR)用 NEXUS-870 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)测定,分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数 32 次,扫描范围 400 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$ 。

X 射线光电子能谱图分析(XPS)采用 ESCALAB

MK-II 多功能光电子能谱仪(英国 VG 公司),X 射线源是 Al  $K_{\alpha 1,2}$ ,功率 300 W,真空度优于  $10^{-9}$  Pa。

## 2 结果与讨论

### 2.1 远程氩等离子体处理作用机制

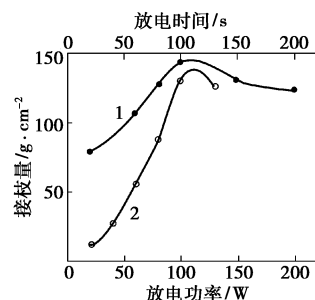
实验采用远程 Ar 等离子体活化处理 PTFE 膜,Ar 等离子体中的高能粒子轰击材料表面时传递能量,其能量一般超过 C—C、C—F 或其他含碳键的键能,因而能与材料表面发生化学或物理的相互作用,使 C—C、C—F 键打开,在材料表面产生大量自由基<sup>[6]</sup>。如聚四氟乙烯等,用惰性气体 Ar 等离子体处理后新生的自由基,由于其半衰期可达 2 ~ 3 d<sup>[7]</sup>,因此能与空气中的氧发生作用,致使氧结合到大分子链上,在聚四氟乙烯表面产生大量过氧自由基。过氧自由基主要存在于聚合物表面,它是表面接枝反应很好的引发剂,并且形成的过氧自由基能够在室温下长时间稳定存在。

单纯等离子体虽然能增加聚四氟乙烯薄膜的亲水性,但其耐久性较差。为了解决这一问题,最直接有效的方法是在膜的表面接枝上一定量的耐久性活性基团如接枝丙烯酸,从而为固定化生物材料、亲水性和粘接强度的提高提供了可能。过氧自由基  $\text{ROO}\cdot$  与丙烯酸将发生反应:



因此能在聚四氟乙烯表面产生亲水性的丙烯酸接枝层。

### 2.2 等离子体处理条件对聚四氟乙烯膜接枝丙烯酸量的影响



1—接枝量-放电时间;2—接枝量-放电功率  
等离子体处理条件:20 Pa,100 W,100 s  
接枝条件:0℃,50 h,AA 体积分数 20%

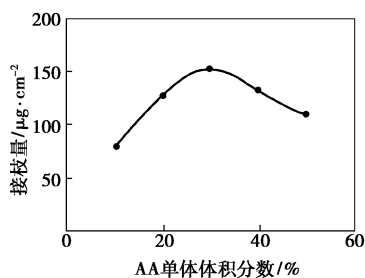
图 1 等离子体放电功率和时间对 AA 接枝量的影响

图 1 表明接枝量随等离子体放电功率和放电时间的增加而增加,直到出现最大值。这是由于随放电功率和放电时间的增加,产生的高能粒子密度大

和高能粒子与 PTFE 表面反应几率增加,从而 PTFE 表面形成的自由基增多,有利于 AA 在 PTFE 表面发生接枝反应。当放电功率和放电时间超过一定值后,将引起严重的降解反应<sup>[4]</sup>,产生一些小分子碎片附着在薄膜表面,阻止了等离子体进一步与膜表面的作用。同时这些小分子碎片还将脱离膜表面进入 AA 溶液中引起均聚反应,使接枝量下降。在放电电压 20 Pa、放电功率 100 W 和放电时间 100 s 的等离子体处理条件下,PTFE 膜表面丙烯酸接枝量最大可达 131.7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

### 2.3 接枝反应条件对聚四氟乙烯膜接枝丙烯酸量的影响

图 2 表明单体浓度对接枝量有很大的影响,这是由于丙烯酸浓度增大,活性 PTFE 膜与丙烯酸接触反应的几率增多,使接枝量升高。随着 AA 浓度继续增大,丙烯酸单体自聚和凝胶化的机会增多,接枝量反而逐渐降低。通常提高接枝反应温度和时间有利于接枝反应的进行,但是也不宜太高。当反应时间延长到一定程度后,自由基的链终止将愈来愈显著,引起自由基浓度的降低。另外反应时间延长和反应温度的提高,单体易发生均聚反应,所产生的均聚物浓度也愈来愈高,体系黏度变大,阻碍了单体与 PTFE 膜表面反应,导致接枝量下降。实验结果显示接枝量在接枝温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、接枝时间 50 h、单体体积分数 26% 的条件下达到最大。



等离子体处理条件:20 Pa,100 s,100 W  
接枝条件:70 $^{\circ}\text{C}$ ,50 h

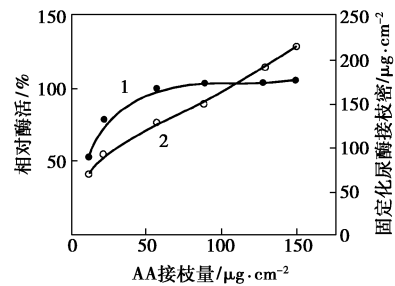
图 2 AA 单体体积分数对接枝量的影响

### 2.4 聚四氟乙烯膜接枝丙烯酸量与固定化脲酶接枝密度和活力的关系

使用水溶性碳二亚胺中间体(EDC),首先是 EDC 激活接枝表面的一COOH,然后被激活一COOH 与酶分子中的一NH<sub>2</sub> 反应,使固定化酶变得简单容易,并且可以提高固定化酶的活性<sup>[8]</sup>。

图 3 表明固定化脲酶接枝密度随 PTFE 膜接枝 AA 量的增加几乎呈线性上升。这是因为接枝 AA

量越多,为固定化脲酶提供的反应活性基团越多,固定化脲酶接枝密度就越大。还表明固定化酶活性开始随 PTFE 膜接枝 AA 量的增加而增加,随后趋于平缓增加。这主要是因为脲酶是一个大分子,具有一定的变旋方向和空间结构,随着固定化酶量的增大,就会受到空间位阻,酶分子之间也会产生相互抑止作用使酶活下降。



1—相对酶活;2—接枝密度

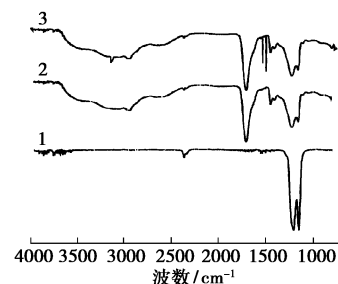
图 3 AA 接枝量与固定化脲酶的相对酶活和接枝密度的关系

### 2.5 固定化酶膜的贮存稳定性

研究了同一酶膜分别贮存不同时间对酶膜活性的影响,结果显示所制得的固定化脲酶膜贮存 20 天后其活性无太大变化,说明固定化酶膜具有较好的贮存稳定性。

### 2.6 红外光谱分析

从图 4 的 3 个试样谱图对比中发现,谱线 2 可以明显看到 1715  $\text{cm}^{-1}$  处有一COOH 的特征吸收峰出现。在 3500 ~ 2500  $\text{cm}^{-1}$  之间,由于一COOH 中的羟基伸展峰的存在使波形变宽变钝,说明经过丙烯酸接枝反应后,在 PTFE 膜表面成功地引入了一COOH 基官能团,为脲酶的固定化提供了反应活性基团。谱线 3 中可见在 1470 ~ 1500  $\text{cm}^{-1}$  范围出现了酰胺特征吸收峰,在 3100 ~ 3170  $\text{cm}^{-1}$  附近出现了 N—H 的倍频谱带<sup>[9]</sup>,这是脲酶的胺基与 PTFE 膜上接枝的羧基反应的结果,表明脲酶已成功地连接在 PTFE 膜上。



1—PTFE 膜;2—PTFE-g-AA 膜;3—PTFE-g-AA 固定化脲酶膜

图 4 3 种膜的红外光谱图

## 2.7 X 射线光电子能谱图分析

图 5 是 XPS 分析光谱,除了在 291.0 eV 位置的 C 1s 结合能峰,531.9 eV 位置的 O 1s 结合能峰,688.6 位置的 F 1s 结合能峰以外,还出现了在 400.5 eV 位置的 N 1s 结合能峰<sup>[10]</sup>。N 1s 峰的出现说明固定化酶的酰胺基的 N 已被表征出来。IR 和 XPS 分析都表明脲酶已固定在 PTFE-g-AA 膜的表面上。

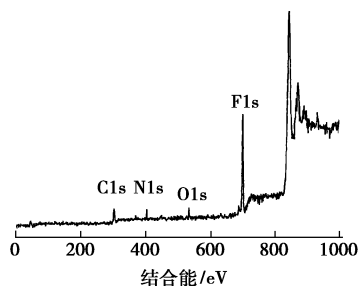


图 5 PTFE-g-AA 固定化脲酶膜的 XPS 谱图

## 3 结语

利用远程 Ar 等离子体技术引发聚四氟乙烯膜表面接枝丙烯酸,并用此膜作为脲酶的固定化载体。在放电压力 20 Pa、放电功率 100 W、放电时间 100 s 的等离子体处理条件和接枝温度 70℃、接枝时间 50 h、单体体积分数 26% 的接枝条件下,PTFE 膜表面丙烯酸接枝量为 131.7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;固定化脲酶接枝密度随 PTFE 膜接枝 AA 量的增加几乎呈线性上升,固定化酶活性开始随 PTFE 膜接枝 AA 量的增加而增加,

随后趋于平缓增加。制成的固定化酶膜具有较好的贮存稳定性。

## 参考文献

- [1] Alvarez S, Manolache S, Denes F. Synthesis of polyaniline using horseradish peroxidase immobilized on plasma-functionalized polyethylene surfaces as initiator[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2003, 88(2): 369 - 379.
- [2] 王琛,陈杰璐,杨靖,等.等离子体优化修饰技术在固定化酶载体材料中的应用进展[J].现代化工,2004,24(12):20 - 22.
- [3] Belmonte T, Czerwiec T, Michel H. Fundamentals and applications of late post-discharge processes [J]. Surface and Coating Technology, 2001, 142/143/144:306 - 313.
- [4] 王琛,刘小冲,陈杰璐,等.远程 Ar 等离子体对聚四氟乙烯膜的表面改性[J].纺织高校基础科学学报,2004,17(4):351 - 355.
- [5] Stellmath B. 酶的测定方法[M].钱嘉渊,译.北京:中国轻工业出版社,1993:333.
- [6] 赵化桥.等离子体化学与工艺[M].合肥:中国科技大学出版社,1993.
- [7] Gray J E, Norton P R, Griffiths K. Surface modification of a biomedical poly(ether)urethane by a remote air plasma[J]. Applied Surface Science, 2003, 217(1/2/3/4):210 - 222.
- [8] Kang E T, Neoh K G, Tan K L, et al. Surface modified and functionalized polyaniline and polypyrrole films[J]. Synthetic Metals, 1997, 84(1/2/3):59 - 60.
- [9] 宁永成.有机化合物结构鉴定和有机波谱学[M].北京:科学出版社,2000:332 - 333.
- [10] Briggs D. 聚合物表面分析: X 射线光电子谱和静态次级离子质谱[M].曹立礼,邓宗武,译.北京:化学工业出版社,2001:69 - 71. ■

## 采用 GE 树脂制造的高性能纺织原料和非织造物顺应飞行器内饰件应用的主流趋势

2006 年 6 月 9 日 GE 塑料集团宣布了纤维技术领域的一个重大突破——该公司生产的具备天然阻燃性的高性能 Ultem 聚醚酰亚胺(PEI)树脂有助于解决飞行器内饰件行业面临的一系列挑战。将 GE 集团的 Ultem 树脂制成纤维并在纺织原料和非织造物中使用,可以为供应商和 OEM 提供全新的解决方案,帮助他们解决一系列关键问题,包括满足更严格的阻燃性、无烟性和无毒性标准,节约系统成本,提高设计灵活性等等。

GE 集团在研究和开发树脂和复合材料领域有着多年的经验,而这些产品是制造高性能纤维的绝佳原料。

在飞行器内饰件应用中,这些 GE 材料为满足阻燃性、无烟性和无毒性方面的法规(包括禁止在阻燃剂中使用溴化添加剂的环境管制规定)提供了新的途径。

GE 塑料集团的 Ultem 具备天然的阻燃性,无需使用添加剂即可满足相关法规要求。Ultem 树脂天然的阻燃性还可以很好地保护飞行器机舱的织物和地毯,效果比用阻燃剂进行过表面处理的传统纺织原料和非织造物好得多;表面处理可能随时间流逝而被磨洗掉。使用 Ultem 树脂制造的纤维的另一个革新性应用是用于将座椅连接到机舱地板的复合板。(高俊蔚)