

# 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

王琛<sup>1,2</sup> 陈杰蓉<sup>1</sup> 杨靖<sup>1,2</sup> 刘小冲<sup>2</sup>

(1. 西安交通大学生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049;

2. 西安工程科技学院纺织与材料学院, 陕西 西安 710048)

**摘要:** 运用等离子体聚合或表面处理技术改变载体材料的表面性质, 进而固定酶蛋白的方法主要有 4 类: 等离子体表面处理、等离子体聚合、等离子体接枝共聚和等离子体化学气相沉积。综述了近年来用等离子体优化修饰技术处理载体材料进行固定化酶研究的新进展, 指出今后应加强等离子体体系表面改性规律及机理、等离子体单体气体种类、放电条件及底衬材料等方面的研究。

**关键词:** 等离子体; 固定化酶; 载体材料; 表面改性

**中图分类号:** TQ426.97; O539

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2004)12-0020-03

## Recent progress of carrier materials used for immobilized enzyme by plasma optimization and modification technology

WANG Chen<sup>1,2</sup>, CHEN Jie-rong<sup>2</sup>, YANG Jing<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-chong<sup>2</sup>

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

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

**Abstract:** There are four ways to immobilize enzyme by using plasma polymerization or surface treatment to modify the surface properties of carrier materials. They are plasma surface treatment, immobilized enzyme being wrapped or crosslinked by the plasma polymerization, plasma graft copolymerization, plasma chemical vapor deposition, respectively. Recent progress of carrier materials used for immobilized enzyme is reviewed, with the plasma optimization and modification technology. It is pointed out that the research should be concentrated on the action mechanism of plasma surface modification, category of plasma monomer gas, discharging conditions, base materials, and so on.

**Key words:** plasma; immobilized enzyme; carrier materials; surface modification

### 1 制备固定化酶载体的等离子体优化修饰技术

固定化酶技术是 20 世纪 60 年代发展起来的一项生物工程技术, 是使生物酶得到更广泛且有效利用的一个重要手段。制备固定化酶的前提条件就是要有恰当的载体。理想的载体应具备符合操作需要的形状、粒度和机械强度, 同时, 其表面应具有一定数量与酶蛋白结构及固定化方法相匹配的官能团。已有的材料往往不能同时很好地满足上述条件, 寻求新型的固定化载体就成为固定化酶领域中的一个重要研究课题。

采用等离子体辉光放电技术处理聚合物时, 产生的各种能量粒子与固体表面作用, 在表面引入羟基、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。采用等离子体优化修饰技术对聚合物材料表面进行改性有许多优点: 与传统“湿式”处理相比, 等离子体技术是“干式”操作, 具有成本低、操作简便、单体选择范围大等优点; 利用等离子体反应的特点赋予改性表面各种优异性能; 表面改性层厚度极薄(从几纳米到数百纳米), 只改变材料的表面性质, 基体的整体性质不变; 可制得超薄、均匀、连续和无孔的高功能薄膜, 且该膜在底基上有强的粘着力, 便于各种载体的表面成膜。等离子体技术具有的独特表面改性效果为制备酶的固定化载体提供了一条新思路<sup>[1-4]</sup>。

### 2 等离子体处理载体及其在固定化酶中的应用

目前, 用等离子体处理的载体材料以聚合物为主, 如聚乙烯、聚丙烯、聚氨酯、聚苯乙烯、聚酯、聚四

收稿日期: 2004-07-14; 修回日期: 2004-10-09

基金项目: 陕西省教育厅自然科学基金资助项目(02JK056)

作者简介: 王琛(1963-), 女, 博士生, 副教授, 硕士生导师, 主要从事环境友好材料方面的研究, 029-82330861, wangchen2231@yahoo.com.cn。

氟乙烯等。等离子体和材料之间主要有 2 种类型的反应:等离子体聚合和等离子体表面处理。等离子体聚合是将高分子材料暴露于聚合性气体中,将聚合性单体转化成等离子态,产生各类活性物种(自由基),由活性物种相互间或活性物种与单体间发生加成反应,在材料表面沉积镀膜。等离子体表面处理是将材料暴露在非聚合性气体(如  $O_2$ 、 $N_2$  或其他惰性气体)的等离子体中,能量粒子和活性物种与材料表面反应,使其表面产生特定的官能团(如  $-OH$ 、 $-NH_2$  等)。以上 2 种类型反应都能改变被处理材料的表面成分和结构,达到材料表面改性的目的,哪种反应占据优势将取决于采用气体或蒸汽的组成、底衬材料以及反应器的结构和放电条件<sup>[5-10]</sup>。在固定化酶中,运用等离子体聚合或表面处理技术改变载体材料的表面性质,进而固定酶蛋白的方法主要有 4 类,下面具体评述。

### 2.1 等离子体表面处理

通过等离子体表面处理形成具有新化学性质的表面的方法,在固定化酶中的应用一般可分为 2 类:一类是利用等离子体处理可使材料表面形成一定数量的活性基团,如羟基、羧基、胺基等,然后通过这些活性基团或者这些活性基团的衍生物,进而对酶进行固定化。

Gancarz 等<sup>[11]</sup>采用远程微波氨、*n*-丁基胺和烯丙基胺等离子体,在试样与等离子体源之间不同距离条件下改性聚砜膜,对改性膜表面的分析表明存在极性的胺基。在等离子体反应器内充入氩气可以使等离子体系更稳定。他们通过双官能团试剂——戊二醛成功地将葡萄糖异构酶固定在等离子体处理膜上,并发现固定化酶的活性与膜表面 C—H 键的量有关,用烯丙基胺/氩等离子体、在距等离子体源较远的边缘位置上处理的改性酶膜的酶活性最大。

Martinez 等<sup>[12]</sup>使用肼等离子体处理赛咯吩表面,发现处理后的表面存在酰胺和胺基,在改性的赛咯吩上可以直接固定化胰凝乳蛋白酶或通过连接较大的分子后再固定化酶。

Ganapathy 等<sup>[13-14]</sup>用氧气和二氯硅甲烷混合气体低温等离子体对聚乙烯、玻璃、聚酯和聚苯乙烯表面进行处理,然后就地进行衍生化反应并固定化木瓜蛋白酶及胰凝乳蛋白酶。他们发现底物(如聚乙烯)的构型不会明显影响酶的活性,但是如果底物和酶之间嵌入较长的空间链分子则会明显增加酶的活性(与自由酶相比)。根据底物-空间链分子的计算机辅助构象模型进行计算,发现酶与底物之间存在

一个酶活性最大的最佳空间链分子间距,而实验数据也验证了这一结果。

另一类等离子体表面处理方法则是通过等离子体对载体材料的表面处理,改变其吸附性能,利用物理吸附固定化酶。改性处理可以增强或降低表面对酶蛋白的吸附,通过这种方式吸附固定的酶蛋白往往不够稳定,所以较少使用。

### 2.2 等离子体聚合将酶蛋白“包裹”或交联固定化

该法是利用等离子体放电产生的自由基引发溶液聚合。将酶和有机单体混合后进行等离子体聚合反应,聚合后蛋白被包裹在其中。也有研究者提出先将蛋白物理吸附在载体表面,再用等离子体放电处理,将蛋白直接“键合”在载体表面。然而,这些方法的实施过程难以控制,并对蛋白质的损伤太大,因此,采用的人也不多<sup>[15]</sup>。

### 2.3 等离子体接枝共聚

等离子体接枝共聚是指先对材料进行等离子体处理,利用表面产生的活性自由基引发具有功能性的单体在材料表面进行接枝共聚,进而固定化酶。用这种方法制备固定化酶的效果较好,因此越来越受到重视。

Alvarez 等<sup>[16]</sup>使用氩和二氯硅甲烷混合气体的等离子体对聚乙烯膜的表面进行预处理,就地与 1,2-二胺基丙烷进行胺基化反应,然后再与乙二酰氯反应,接枝形成复杂的空间链分子,在氰基硼氢化钠的存在下,共价键固定化过氧化山葵酶。空间链分子和固定化酶膜的结构通过 X 射线光电子能谱(XPS)和衰减全反射-傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)进行了解析。使用固定化过氧化山葵酶作为合成聚苯胺的催化剂,可以在任何底物表面上直接合成可控厚度的聚苯胺膜,并且固定化酶的催化活性高,寿命长。

Lon<sup>[17]</sup>与 Kang<sup>[18]</sup>等对聚苯胺和聚吡咯用氩等离子体处理,近紫外光引发丙烯酸进行接枝共聚,进而共价固定化胰蛋白酶。表面接枝丙烯酸的量随丙烯酸单体的浓度和近紫外光照射时间的增加而增加,但却随氩等离子体处理时间的延长而减少,接枝共聚使得聚苯胺和聚吡咯的质子化程度提高。在接枝共聚后的聚苯胺、聚吡咯上共价固定化胰蛋白酶,使用水溶性的碳二亚胺中间体(WSC)可以使实验变得简单。酶的活性开始随着接枝丙烯酸浓度的增加而增加,但在一定浓度时达到饱和,此后随浓度的增加开始降低。

Kang 等<sup>[19-20]</sup>用氩等离子体预处理聚四氟乙烯

膜,然后在近紫外光诱发下用亲水性环氧单体(如丙烯酸、苯乙烯磺酸钠和 N,N-二甲基丙烯酰胺等)进行接枝共聚。通过 XPS 分析接枝共聚膜上的表面组成和微结构,发现表面上层的接枝率比表面下层的高,并具有层状的表面微结构。在与功能单体的接枝共聚反应中,接枝率随着等离子体预处理时间以及单体浓度的增加而增加。经接枝共聚后的聚四氟乙烯膜被赋予了一些新的功能,其中之一就是可以进行共价固定化酶,如胰蛋白酶。

Delden 等<sup>[21]</sup>对聚苯乙烯用氩等离子体预处理再与十一碳烯酸进行接枝共聚反应,在聚苯乙烯表面引入功能化羧基,然后在聚苯乙烯上使用水溶性的碳二亚胺共价固定血红蛋白和肝素的共轭体。

#### 2.4 等离子体化学气相沉积

等离子体化学气相沉积技术是气态物质在低温等离子体中发生化学反应,在基体上生成新固体薄膜的方法。它从根本上改变了反应体系的能量供给方式,有效地利用了非平衡等离子体反应的特点,实现了薄膜沉积的低温化。现在等离子体化学气相沉积技术已经被引入了固定化酶中,但实际应用中仍较少。

Ida 等<sup>[22-23]</sup>采用表面电晕放电引发丙胺等离子体气相沉积技术,在陶瓷表面引入新的功能基团——胺基。实验证明引入的胺基量,可以通过不同的表面改性条件,如对组分的吸附时间、反应的放电时间以及表面修饰量等来加以控制。此外,经过表面修饰的陶瓷膜,由于引入了胺基,可以有效地将葡萄糖淀粉酶固定化。固定化酶的量随表面修饰量的增加而增加,在表面修饰量到达某一最大值时达到饱和,固定化酶的操作稳定性也随着表面修饰量的增加而增加,固定化后的酶相对于通常共价键合的固定化酶有相当高的活性。

Gancarz 等<sup>[24]</sup>采用远程微波等离子体聚合丙烯酸醇在聚砷膜上沉积,可改善膜的亲水性,在距等离子体源较远的边缘处,经过处理的膜具有最好的亲水性,但羟基的量不是最大。同时使用二乙烯基砷活化沉积在膜上的羟基,然后固定化木糖异构酶,结果表明在距等离子体源较远的边缘处,经过处理的改性膜最适宜作为固定化酶的载体。

Chen 等<sup>[25]</sup>把等离子体气相沉积与光引发接枝共聚相结合,在无机材料上沉积膜后与丙烯酰胺或丙烯酸进行接枝共聚,然后进行酶蛋白的固定。

### 3 结语

等离子体技术用于固定化酶具有操作简单、条

件温和、单位面积固定化酶的量增多、酶结合牢固等优点,经等离子体技术处理的固定化酶膜适用于制备医用诊断仪、生物传感器和酶膜反应器,从而大大提高了仪器的灵敏性、生物电极的应用范围和酶的利用率<sup>[26-30]</sup>。

国内外对等离子体技术已有较多的研究及应用,但将该技术与酶固定化技术相结合的工作报道不多。我们预期,通过对等离子体体系表面改性规律及机理、等离子体单体气体种类、放电条件及底衬材料等方面更深入系统的研究,将会不断制备出一些带有不同种类和数量的活性官能团的固定化新载体,并广泛地应用于酶的固定化。

#### 参考文献

- [1] Tischer W, Wedekind F. [J]. *Topics in Current Chemistry*, 1999, 200 (1): 95 - 101.
- [2] Gonzalez-Saiz J M, Pizarro C. [J]. *European Polymer Journal*, 2001, 37 (2): 435 - 440.
- [3] Chen Y J, Kang E T, Neoh K G, *et al.* [J]. *European Polymer Journal*, 2000, 36(10): 2095 - 2103.
- [4] Lei Ying, Kang E T, Neoh K G. [J]. *Journal of Membrane Science*, 2002, 208(2): 361 - 374.
- [5] 陈杰塔. 低温等离子体化学及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] Inagaki N, Tasaka S, Narushima K, *et al.* [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2002, 85(14): 2845 - 2852.
- [7] Park Y W, Tasaka S, Inagaki N. [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2002, 83(6): 1258 - 1267.
- [8] 李笃信, 贾德民. [J]. *高分子材料科学与工程*, 1999, 15(3): 172 - 175.
- [9] 肖梅, 凌一鸣. [J]. *东南大学学报(自然科学版)*, 2001, 31(1): 114 - 118.
- [10] 张卫华, 梁红军, 侯晓淮. [J]. *化学通报*, 1999, 62(8): 26 - 31.
- [11] Gancarz I, Bryjak J, Poniak G, *et al.* [J]. *European Polymer Journal*, 2003, 39(11): 2217 - 2224.
- [12] Martinez A J, Manolache S, Gonzalez V, *et al.* [J]. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, 2000, 11(4): 415 - 438.
- [13] Ganapathy R, Manolache S, Sarmadi M, *et al.* [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, 78(10): 1783 - 1796.
- [14] Ganapathy R, Manolache S, Sarmadi M, *et al.* [J]. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, 2001, 12(9): 1027 - 1049.
- [15] 蔡谨. [J]. *材料科学与工程*, 1997, 15(3): 58 - 60.
- [16] Alvarez S, Manolache S, Denes F. [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2003, 88(2): 369 - 379.
- [17] Loh F C, Tan K L, Kang E T, *et al.* [J]. *Surface and Interface Analysis*, 1996, 24(9): 597 - 604.
- [18] Kang E T, Neoh K G, Tan K L, *et al.* [J]. *Synthetic Metals*, 1997, 84 (1-3): 59 - 60.
- [19] Kang E T, Tan K L, Kato K, *et al.* [J]. *Macromolecules*, 1996, 29 (21): 6872 - 6879.

(下转第 24 页)

控制反应所选择 Si 的标准。此方法是对 Si 进行切片,表面打磨,在显微镜下观察其表面的形态,并从结构因素来计算得到一个表面积结构参数。该参数为 18~60 的 Si 具有的反应活性最高。反应产率与该参数是相关的,当该参数为 29.55 时, M2 的生成速率为  $103.28 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{min})$ ; 而当该参数为 2.34 时, M2 的生成速率只有  $50.70 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{min})$ 。

Hutchings 等<sup>[4]</sup>报道了硅表面氧化膜对反应活性和选择性的影响。只有氧化膜的厚度为 0.5~2.5 nm 时,硅表面氧化膜对反应活性有较大影响,但对选择性影响不大。硅粉表面的氧化膜由 X 射线光电波谱(XPS)定量测量。日本信越(Shin-Etsu)化学公司专利<sup>[5]</sup>据此报道,认为硅粉的活性与其表面的氧化膜的厚度及含量有直接关系。采用惰性气体熔化炉氧气分馏法,分别测定硅粉和原料硅的氧含量,两者的差值就是表面氧含量。由硅表面氧含量来定量评定硅的规格,认为表面氧含量(质量分数)至多为 0.05% (即每平方米硅表面含 0.001 g 氧)的硅粉适宜被采用。

Yilmaz 等<sup>[6]</sup>采用椭圆光度法和俄歇电子能谱仪(AES)测定硅表面氧化层厚度。研究了不同氧化层厚度对反应活性和选择性的影响。结果表明,氧化膜厚度增加, Si 和 Cu 接触面积减少, M2 生成速率降低,诱导期延长。随氧化层厚度增加, Si 和催化触体接触反应面积减小。

由电镜发现反应前的硅粉表面很平坦,反应后的硅粉表面出现了很多几十到上百微米的凹陷。此反应为气-固-固催化反应,形成了硅铜合金的地方就是进行催化反应的活性中心。硅随着反应的不断进行而消耗,而反应后硅铜合金中剩下的铜则不断地与下层的硅再形成硅铜合金。经过一段时间后,每个形成硅铜合金的地方就形成凹陷。硅的消耗并

不是一层层均匀反应掉的,而是在某些点上不断地向硅的中心深入。

## 2 催化剂触体改性

### 2.1 用磷改性催化剂触体

20 世纪 80 年代以来,四元触体 Si、Cu、Zn、Sn 已广泛应用,但 80 年代中期以后,陆续演变成了五元触体 Si、Cu、Zn、Sn、P。常规的 P 添加剂包括磷化合物、磷合金、氧化磷、磷化铜、磷化铝、 $\text{PCl}_3$  等。磷的作用是可以提高选择性,但却会降低产率,因此需要在活性和组成选择性之间达到平衡。

美国道康宁(Dow Corning)公司 1985 年<sup>[7]</sup>将质量分数  $(25 \sim 2500) \times 10^{-6}$  的磷化合物加入触体中,其在反应器中可以形成纯磷,时空产率和 M2 选择性均提高,但存在磷的燃烧危险问题和原料的成本增加问题。1987 年该公司以 P-Ca 合金、磷化铝、磷化钙和磷化亚铜等作为磷的来源<sup>[8]</sup>。随着 P 的引入, M2 选择性有所提高,但硅粉转化率却随着 P 的增加而呈下降趋势。1995 年该公司采用纯磷和 Zn 混合引入触体<sup>[9]</sup>。

而德国拜耳(Bayer)公司<sup>[10]</sup>则认为以 Cu-P 形式引入,存在 Si 转化率低,磷的利用率不高,难以控制磷的含量等问题。其采用含有溶解 P 的冶金硅结晶体,可提高 M2 选择性。

美国通用电气(GE)公司的 Lewis 和 Ward<sup>[11]</sup> 2002 年发表的研究结果表明,当铜锌质量比小于 10 时,磷的质量分数对于选择性几乎没有影响,而当铜锌质量比为 30 时,添加磷可以使选择性提高 4%,当铜锌质量比为 100 时,可以使选择性提高 9%。

Shin-Etsu 化学公司在 2001 年申请了多项专利<sup>[12-14]</sup>,提出了采用多聚有机磷化合物,如三苯基磷和各种磷基烷等引入触体,或采用质量分数

(上接第 22 页)

- [20] Kang E T, Neoh K G, Tan K L, *et al.* [J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 1997, 8(11): 683 - 692.
- [21] Delden C J, Lens J P, Kooyman R P, *et al.* [J]. *Materials*, 1997, 18(2): 845 - 852.
- [22] Ida Jun-ichi, Matsuyama Tatsushi, Yamamoto Hideo. [J]. *Journal of Electrostatics*, 2000, 49(1-2): 71 - 82.
- [23] Ida Jun-ichi, Matsuyama Tatsushi, Yamamoto Hideo. [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 5(3): 179 - 184.
- [24] Gancarz Irena, Bryjak Jolanta, Bryjak Marek, *et al.* [J]. *European Polymer Journal*, 2003, 39(8): 1615 - 1622.
- [25] Chen Ko-Shao, Yang Mu-Rong, Lin Shuen-Fuh. [J]. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, 1997, 9(3): 172 - 176.

- [26] Zhang Y Q, Zhu J, Gu R A. [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, 75(2-3): 215 - 233.
- [27] Hiratsuka A, Kojima K, Suzuki H, *et al.* [J]. *Analyst*, 2001, 126(5): 658 - 663.
- [28] Biederman H, Boyaci I H, Bilkova P, *et al.* [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 81(6): 1341 - 1352.
- [29] Muguruma Hitoshi, Karube Isao. [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry: Personal Edition*, 1999, 18(1): 62 - 68.
- [30] Muguruma Hitoshi, Hiratsuka Atsunori, Karube Isao. [J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(11): 2671 - 2675. ■