

· 研究简报 ·

聚乙烯—葡萄糖氧化酶膜的制备和性能研究*

朱如瑾 殷弘浩 刘永盛 黄家湛

(高分子材料国家重点实验室成都科技大学高分子研究所 成都 610065)

关键词 聚乙烯, 等离子体, 固定化酶, 葡萄糖氧化酶

固定化酶是60年代发展起来的生物工程技术^[1]。酶的固定化方法主要有包埋法, 吸附法和共价键结合法^[2,3]。为了开发酶的固定化新方法, 80年代 Hoffman 等用 γ 射线辐照接枝的聚合物作为固定化酶的载体制得了具有生物活性的膜材料^[4]。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蛋白质和酶的固定化载体的方法愈来愈受到关注^[5,6]。

本文主要介绍用经空气等离子体处理的聚乙烯膜与丙烯酸进行接枝反应, 然后与氯化亚砷反应制得的膜用作葡萄糖氧化酶固定化载体的方法。

1 实验

1.1 主要原材料: 商品低密度聚乙烯(PE)膜, 厚0.095 mm; 丙烯酸(AA), 化学纯, 使用前经减压蒸馏; 葡萄糖氧化酶(GOD) 23.9U/mg, 美国Sigma公司; 氯化亚砷, 分析纯; 磷酸二氢钾和磷酸氢二钠, 分析纯。

1.2 等离子体处理设备与方法: 采用吉林农安广播电视电子仪器厂制造的JGB-300型晶控高频电源发生器, 输出频率为13.56 MHz, 功率300瓦。自制钟罩式等离子体处理室。将30×32 mm的PE膜用丙酮萃取1h, 干燥, 称至恒重, 然后放入等离子体处理室中进行空气辉光放电处理。

1.3 丙烯酸接枝聚合: 将等离子体活化处理的PE膜放入盛有丙烯酸水溶液的三颈瓶中, 在高纯氮气保护下反应数小时。取出接枝膜, 在蒸馏水中清洗, 用丙酮萃取, 干燥后, 用十万分之一天平称至恒重。根据PE膜接枝反应前后的重量变化, 求出单位面积的接枝AA量。

1.4 接枝膜的酰氯化反应与GOD固定化: 将接枝膜放入10~15%的氯化亚砷三氯甲烷溶液中反应数小时, 取出膜用丙酮洗至中性, 然后放入1ml磷酸盐缓冲液(pH=5.6)含5mg GOD溶液中于室温下反应数小时。用缓冲液和蒸馏水洗涤该膜, 风干后测定其活力。

1.5 分析测试: 用酸碱滴定法测定固定化GOD活力^[7]。按下式分别计算固定化酶和单位面积固定化酶的活力单位:

$$\text{固定化 GOD 活力单位 (U)} = (Q - P) \times N \times 1000 \div t$$

* 1994-07-06 收稿; 国家自然科学基金资助项目

单位面积固定化 GOD 活力单位 = $\frac{U}{A}$

mol/l 为盐酸当量浓度，Q 和 P 分别为空白试验和固定化 GOD 所消耗的盐酸毫升数，t 为反应时间，A 为固定 GOD 膜的面积。

用日本 ErmaG-1 型接触角测定仪，测定水对改性 PE 膜的接触角。用美国 NICOL-IT200SXV 型红外光谱仪 (IR) 和国产 MP-1 型 X 射线光电能谱仪 (XPS) 分析接枝膜和固定化 GOD 膜的结构与组成。

2 结果与讨论

2.1 等离子体处理参数对 PE 膜润湿性的影响：未经等离子体处理的聚乙烯膜对水的接触角为 92.5°。经空气等离子体处理后的 PE 膜，其接触角随等离子体处理功率和处理时间的增加而降低，然后出现极限值 (表 1 所示)。这一结果说明 PE 表面引入了极性基团，由憎水性膜变成了亲水性膜，从而有利于丙烯酸的接枝反应。

Tab-1 The contact angles of treated PE

Treatment powers (w)*	Contact angles (°)	Treated time (min)**	Contact angles (°)
0	92.5	0	92.5
40	55	2	52
60	42	5	42
80	40	10	38
100	38	15	36

* Plasma treatment 10pa, 10 min; ** Plasma treatment 10pa, 60w

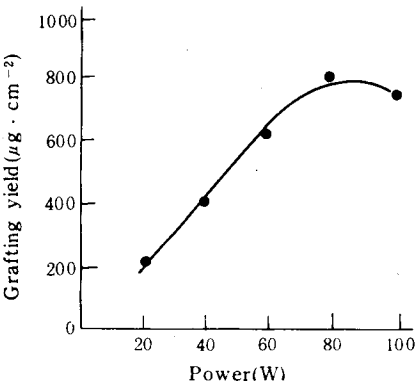


Fig.1 The effect of plasma treatment power on grafting yield of AA (plasma treatment: 10pa, 10min; grafting 30% AA aqueous solution, 55℃, 5h)

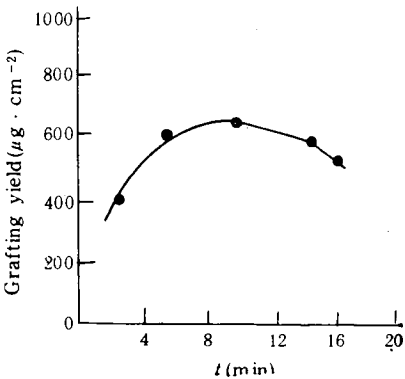


Fig.2 The effect of plasma treatment time on grafting yield of AA (plasma treatment: 10pa, 60w; grafting 30% AA aqueous solution, 55℃, 5h)

2.2 等离子体处理参数对 PE 接枝 AA 量的影响：图 1、2 表明，接枝量随等离子体的处理功率和处理时间的增加而增加，但出现最大值。通常处理功率和处理时间增加，产

生的高能粒子密度大和高能粒子与 PE 表面反应机率增加，聚乙烯表面形成的自由基增多，有利于 AA 在 PE 上发生接枝反应。处理功率和时间超过一定值后，聚乙烯表面将产生较多的低分子自由基或过氧化物。这些吸附在 PE 表面的低分子物在进行接枝反应时，将脱离表面进入 AA 溶液中，引发 AA 产生均聚的机率大于 PE 接枝 AA 的机率，从而使 PE 接枝 AA 量降低。

2.3 接枝反应条件对 PE 接枝 AA 量的影响：图 3 表明，单体浓度对接枝量有很大的影响，因为 AA 浓度增大，活性 PE 膜与 AA 接触的机率增加，使接枝量升高。但当 AA 浓度超过 40% 时，单体极易发生自聚和凝胶化现象，反而使接枝量迅速降低。AA 浓度为 50% 时其接枝量仅为 $60\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。为使 PE 膜上的过氧化物在接枝反应中分解产生自由基，通常提高接枝反应温度和时间对接枝反应有利。本实验接枝反应的温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$ ，反应时间 5h。

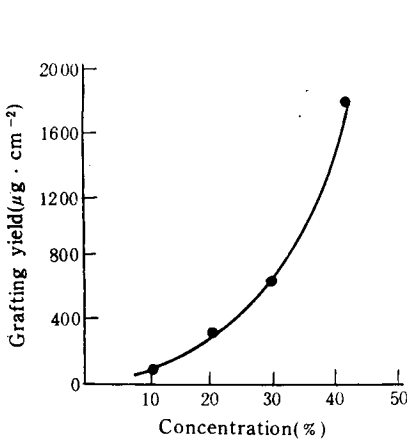


Fig.3 The effect of concentration of AA on grafting yield of AA (plasma treatment: 10 pa. 60 w. 10 min; grafting: $55\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h)

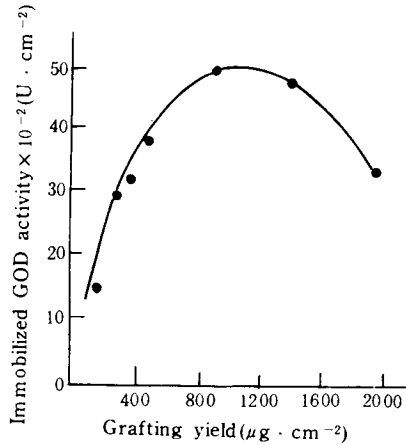


Fig.4 The relationship between grafting yield of AA and activity of immobilized GOD

2.4 PE 接枝 AA 量与固定化 GOD 活力关系：PE 固定化 GOD 的活力随 AA 接枝量增加而升高，但出现最大值。因为接枝量增加，PE 单位面积固定的 GOD 量增多。但是接枝量太多，由于丙烯酸刚性链的位阻效应，妨碍了葡萄糖氧化酶大分子的固定化反应和固定化 GOD 的催化作用，导致固定化 GOD 活力降低。

2.5 固定化 GOD 的贮存稳定性：同一 PE 固定化 GOD 膜放在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 左右冰箱中连续贮存不同天数分别测定其与葡萄糖反应的活力。结果表明该膜贮存 15 天后，固定化 GOD 活力无多大变化，说明有较好的贮存稳定性。

2.6 IR 和 XPS 分析：由图 6(a) 和 (b) 比较可以看出，PE 接枝 AA 膜在 1714 cm^{-1} 处

有强的 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—}$ 吸收峰，在 $2400\text{—}3600\text{ cm}^{-1}$ 处上部吸收峰谱带加宽，这是一 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—OH}$ 中羟基 (—OH) 伸展峰所引起。证实 PE 已接枝上了羧基。PE 固定化 GOD 膜 (c) 在

1541 cm^{-1} 处出现了一 $\text{C}=\text{O}-\text{NH}-$ 酰胺吸收峰, 这是葡萄糖氧化酶的胺基与聚乙烯膜上的羧基反应的结果, 证明 GOD 通过共价键连接在 PE 膜上.

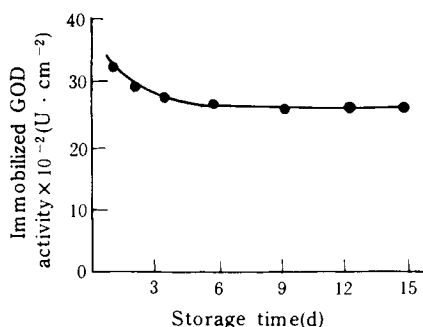


Fig.5 The relationship between storage time and activity for immobilized GOD

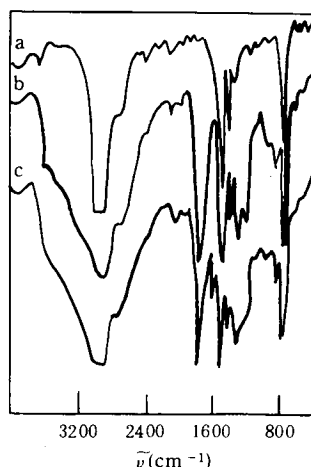


Fig.6 IR spectra (a: PE film, b: PE-g-AA film, c: PE immobilized GOD membrane)

Tab.2 XPS data of PE

Sample	Binding energy (eV)	Assigned atom	Relative content (%)
PE film	287.99	C	100
	535.50	O	0
		N	0
PE-g-AA film	288.67	C	51.1
	536.38	O	48.9
		N	0
PE-GOD membrane	287.97	C	53.4
	535.02	O	25.2
	403.08	N	21.3

根据 XPS 分析数据 (表 2) 可以看出, PE 接枝 AA 膜出现了明显的结合能为 536.38eV

的 O_{1s} 峰, 这是一 $\text{C}=\text{O}-\text{OH}$ 引起的, 说明 PE 膜上接枝了羧基. 在 PE 固定化 GOD 膜上,

除了有 O_{1s} 峰外, 又增加了结合能为 403.08eV 的 N_{1s} 峰, 这是一 $\text{C}=\text{O}-\text{NH}-$ 产生的. 证明葡萄糖氧化酶成功地通过共价键固定在聚乙烯膜载体上.

致谢 感谢中科院院士徐僖教授在学术上的指导与帮助.

参 考 文 献

- [1] Carr P W, Bowers L D. *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*. New York: John Wiley, 1980
- [2] 李福绵译. 功能高分子, 北京: 科学出版社, 1983
- [3] 陈陶声, 屈乃虎, 陈石根编著. 固定化酶理论及应用, 北京: 轻工出版社, 1987
- [4] Allans Hoffman. *Radiat Phy Chem* 1986, 27(4): 265
- [5] 朱如瑾, 黄 枫, 刘永盛等. 高分子材料科学与工程, 1994, 2: 116
- [6] Wang Y J. *J Membrane Sci*, 1990, 53: 275
- [7] 中山大学生物系编. 生化技术导论, 北京: 人民教育出版社, 1978, 60

A STUDY ON PREPARATION AND PROPERTIES OF POLYETHYLENE-GLUCOSE OXIDASE MEMBRANE

ZHU Rujin, YIN Honghao, LIU Yongsheng, HUANG Jiazhan

(Polymer Research Institute, Chengdu University of Science and Technology, Chengdu 610065)

Abstract A method which was used to prepare polyethylene-glucose oxidase membrane by plasma technique was presented. The effects of plasma treatment parameter and grafting condition on the wettability of modified PE film, grafting yield of AA, and the activity of immobilized GOD membrane were studied. IR and XPS were used to analyze the structure and composition of grafted film and immobilized GOD membrane.

Key words Plasma, Polyethylene, Glucose oxidase, Immobilization enzyme