

TiO₂ 纳米酶絮凝动力学

王芬 吴敏* 秦艳涛 苗春存 周少红 倪恨美 孙岳明

(东南大学化学化工学院 南京 211189)

摘要 以聚丙烯酰胺(PAM)为絮凝剂, 纳米 TiO₂ 为固定化酶载体材料, 木瓜蛋白酶为酶模型制备纳米絮凝酶。结合粒度分析、SEM、EDS 等表征手段, 考察 PAM 种类、加量及体系 pH 对高分子凝胶絮凝与沉降动力学的影响。结果表明通过氢键、静电吸附和架桥等作用, 纳米酶和 PAM 间产生有效的絮凝。TiO₂ 纳米酶的絮凝沉降速度、体系浊度、絮团大小和紧实程度随 PAM 用量不同而改变。适量的 PAM 产生高沉降速度, 低浊度, 稳定、大絮团的强絮凝, 其中 nPAM 絮凝酶的沉降速度最快, 絮团最大。过量的絮凝剂导致絮团脱稳。调控体系酸碱度亦可有效调控 PAM 絮凝动力学行为。比较 nPAM 和 cPAM, 发现 nPAM 絮凝体对 pH 有较高稳定性, cPAM 絮凝体受 pH 影响显著。故可以根据酶结构与特性, 调节絮凝剂加量和体系酸碱度设计出微纳尺度可调的固定化酶。

关键词 絮凝动力学; 沉降速度; 粒度分布; 纳米 TiO₂; 形貌

Flocculation Kinetics of TiO₂-enzyme Microflocules

Wang, Fen Wu, Min* Qin, Yantao Miao, Chuncun Zhou, Shaohong
Ni, Henmei Sun, Yueming

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 211189)

Abstract TiO₂-enzyme microflocules were prepared by using titanium dioxide nanoparticles as immobilizing carriers, three kinds of polyacrylamide (nonionic, cationic and anionic polyacrylamide) as flocculants and papain as a model of enzyme. The effects of pH values, dosage and types of polyacrylamide (PAM) on the flocculation and sedimentation behaviour of TiO₂-enzyme microflocules were investigated. The SEM, EDS and particle size analyzer were used to characterize the morphology of TiO₂-enzyme microflocules. The results showed that an effective flocculation was formed among TiO₂, papain and different types of PAM flocculant by hydrogen bonding interactions, electrostatic attractions, adsorption bridging action, etc. It was noted that the settling rate of TiO₂-enzyme microflocules, turbidity of the supernatant, floc size and compactness of resulting flocules were highly dependent on the PAM dosage. For three kinds of PAM, similar trends of flocculation kinetics were observed, a general increase in settling rates were relevant to decrease in turbidity. Attributed to high settling rates, strong flocculation with big size and stable floc occurred with the function of optimum PAM concentrations. But the optimum dosages were different. When the concentration was in the range of 75 mg·L⁻¹ to 175 mg·L⁻¹, nonionic PAM (nPAM) displayed the best flocculant performance in all kinds of PAM with a rapid settling rate and large floc size. Moreover, under excessive dosage condition, breakup of floc then occurred. Flocculation kinetics of TiO₂-enzyme microflocules also could be effectively controlled by changing the pH value of reaction system. Compared nPAM with cationic PAM (cPAM), the microflocules by using nPAM displayed a high stability and compactness in a wide range of pH values. The settling rate and floc size by using cPAM showed a strong dependence on pH values. It indicated that the immobilized enzyme size could be regulated by the PAM dosage and pH value according to the enzyme structure and properties. Such porous and flexible microstructure was expected to provide the free space as much as possible for the access of substrate molecules to enzyme.

Keywords flocculation kinetics; settling rate; particle size distribution; nano TiO₂; morphology

1 引言

工业生物催化是以酶工程和改善的酶制造新技术为核心, 将生物催化与纳米技术、材料科学相交叉, 开发新一代纳米酶高效酶催化剂, 是酶催化工程的前沿领域^[1-6]。将自身是纳米结构的酶与纳米多孔载体相组装

而成的纳米酶催化技术, 大大改善和提高了酶的催化性能^[7-10]。无机纳米载体在固定化方面有较大的优势, 如 SiO₂、TiO₂、磁性纳米酶粒子和金不仅生物相容性好、表面性质可调控, 而且在生物反应体系中充分发挥了小尺寸效应^[11-15]。

但纳米材料尺度的小尺寸也导致了其难以回收、无法达到重复利用的缺点, 为弥补此不足可以用聚丙烯酰

* E-mail: wuminnj@sohu.com. Tel: 025-52090619

Received March 25, 2012; published September 11, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 51073035), and Educational Commission of Jiangsu Province (No. JHB2011-2). 项目受国家自然科学基金(No. 51073035)和江苏省教育厅高校科研成果产业化推进项目(No. JHB2011-2)资助。

胺(PAM)为絮凝剂,制备纳米絮凝酶^[5,16],将纳米尺度的固定化酶体系扩展到微米尺度.絮凝剂 PAM 根据解离官能团的特性,可分为阴离子型(aPAM)、阳离子型(cAPM)和非离子型(nPAM),平均分子量从数千到数千万以上^[17]. PAM 能与分散于溶液中的悬浮纳米粒子通过吸附、架桥、静电作用,形成絮团,是非常重要的凝胶絮凝剂.体系的总作用势能 $U = \text{吸引作用能 } U_A + \text{静电排斥能 } U_{el}$,其絮凝过程中涉及如下动力学过程^[18]: I 高分子絮凝剂扩散; II 吸附纳米酶,达吸附平衡; III 颗粒间相互吸引、碰撞,总作用能下降(如图 1); IV 表面 ζ 电位(Zeta Potential)降低,从而势垒降低; V 粒子电中和、架桥作用,粒子越过能垒(图 1 中总作用能最高处); VI 粒子之间脱稳; VII 发生凝聚,形成絮团体.已有文献^[19~21]表明絮凝剂种类、絮凝剂用量、介质 pH 等因素,影响絮团体的形成.当絮凝剂浓度较低时,颗粒之间存在很强的排斥力,能垒高,不易形成颗粒的团聚和絮凝,如图 1 插图 a; 增加絮凝剂的浓度,降低了 ζ 电位,减少了颗粒之间的排斥力,能垒降低,出现弱絮凝,如图 1 插图 b, c. 继续增加絮凝剂的浓度,使表面电位为零时,粒子脱稳,出现如图 1 插图 d 的强絮凝.微粒稳定是由于总势能曲线上能垒的存在,若能垒为零,发生快速强絮凝;若有能垒,絮凝剂浓度由低而高,悬浊液由不絮凝转为慢速弱絮凝.此外过量的高分子絮凝剂,在微粒表面形成吸附层,从空间阻碍了微粒相互接近,颗粒因位阻效应而分散,阻碍了凝聚.并且这类再次分散稳定作用是在高浓度下出现,在低浓度下发生絮凝.

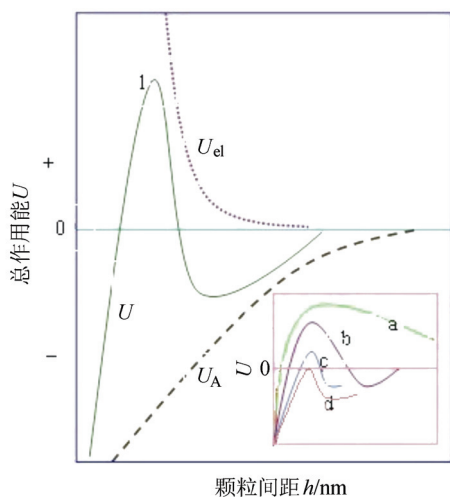


图 1 异质凝聚总作用能曲线示意图, U_{el} 静电排斥能, U_A 吸引作用能, 主要为范德华力

Figure 1 Curves diagram of total interaction energy for heterogeneous flocculation. U_{el} , electrostatic repulsion energy; U_A , attractive energy. Inset illustration is critical phase change excited by interaction of heterogeneous particles. a, strong electrostatic rejection against flocculation; b and c, weak flocculation with high energy base; d, strong flocculation

基于以上背景,本文以木瓜蛋白酶(papain)作为模型酶,纳米 TiO_2 作为固定化酶载体材料, PAM 为絮凝剂,制备凝胶絮凝酶.着重考察絮凝剂种类、加量、体

系 pH 因素对高分子凝胶絮凝体沉降速度、浊度的不同影响,结合粒度分布曲线, SEM、EDS 表征,调控凝胶絮凝过程,进行凝胶团微结构及形貌控制,为纳米酶的实际应用和新一代纳米酶高效酶催化剂的理性设计提供技术支撑.

2 结果与讨论

2.1 PAM 加量对絮凝和沉降动力学行为的影响

不同非离子聚丙烯酰胺加量对絮凝体沉降速度和体系浊度的影响见图 2. 随着 nPAM 浓度的增加,絮凝酶沉降速度显著增加,在 nPAM 的浓度为 $75 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内,絮凝酶沉降速度最快,达到 $1.443 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. 此后随着 nPAM 浓度的进一步增加,絮凝酶沉降速度下降. 对应此变化过程体系浊度呈现了先减后增的趋势,在 nPAM 的浓度为 $75 \sim 175 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,浊度最低,体系澄清,絮凝效果显著. 此后,随着 nPAM 浓度的增加,絮团的稳定性变差,体系浊度略有增加,絮凝效果减弱.

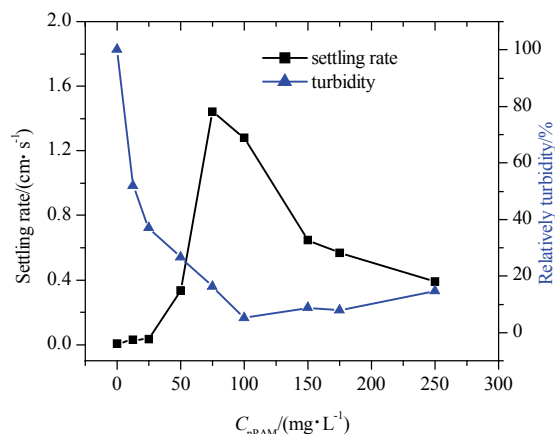


图 2 不同浓度下 nPAM 沉降速度及相对浊度

Figure 2 Settling rate and turbidity at pH 7 and different nPAM dosages

图 3 为不同浓度非离子聚丙烯酰胺作用纳米酶的絮凝效果图,图中可以看出,随着 nPAM 浓度的增加,絮凝体粒度逐渐变大,对应沉降速度也变大,体系浊度也减小,界面逐渐清晰,说明适当浓度的 nPAM 对 TiO_2 纳米酶有很好的包裹、絮凝效果. 但当 nPAM 的浓度过大时,絮团颗粒虽然仍在增大,但体系脱稳,絮凝效果已变差,对应浊度增加,说明过量的絮凝剂产生了胶体保护,絮团的稳定性越差^[18,19].

采用 Acoustic Spectrometer DT 1200 高浓度粒径分析仪对絮凝酶的粒度分布分析结果见图 4 和表 1, 当未添加 nPAM 时, TiO_2 纳米酶粒径 11 nm 左右,同时存在二次团聚的粒子,粒径 82 nm . 文献报道 TiO_2 的等电点在 5.5 附近^[22], 酶的等电点 8.75 ^[23], 因此在 pH 为 7 时, TiO_2 表面带负电,木瓜蛋白酶表面带正电,二者静电吸附. 当 nPAM 浓度较低时,发生弱絮凝,把纳米酶粒子



图3 不同浓度非离子聚丙烯酰胺作用 TiO_2 纳米酶的絮凝沉降图
Figure 3 Digital photograph of flocculation and sedimentation behaviour of TiO_2 -enzyme microflocules at different concentrations of nPAM

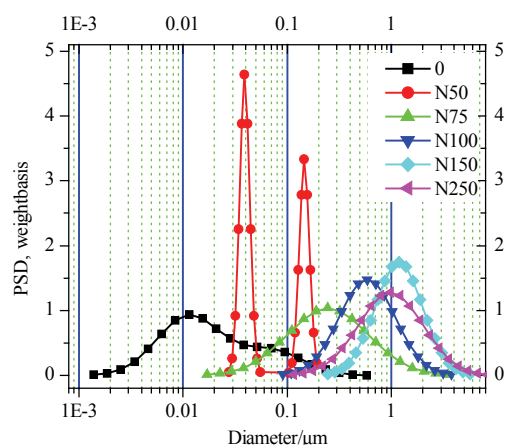


图4 nPAM 不同浓度下粒度分布(N50 表示 nPAM 在絮凝溶液中的浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Figure 4 The particle size distribution at different nPAM dosages (N50 means concentration of nPAM in solution is $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

表1 各 PAM 不同浓度下粒度分布^a

Table 1 The particle size distribution at different PAM dosages

	Diameter/ μm	
	Small	Large
0	0.011	0.082 (29%)
N50	0.039	0.146 (42%)
N75		0.2465
N100		0.5869
N150		1.1817
N250		0.985
C25		0.106
C75		0.5975
C100		0.6055
C150		0.7679
C200		0.7043
A50	0.05	0.27 (29%)
A100	0.062	0.826 (26%)
A150		1.045
A200		0.8916
A250	0.07	0.864 (26%)

^a N50 means concentration of nPAM in solution is $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C25 means concentration of cPAM in solution is $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, A50 means concentration of aPAM in solution is $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

联结成网状松散的絮团; 随着 nPAM 浓度的增加, 线性高分子的桥键作用增强, 颗粒粒度增加, 絮团逐渐变大、牢固稳定. 与图1 沉降速度和浊度实验结果结合, 当 nPAM 的浓度在 75 至 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 沉降速度最大, 浊度最小, 絮团稳定. 进一步增加 nPAM 的浓度, 絮团粒径虽增大, 但絮凝速度反而小, 说明形成了大而松散的结构, 直至 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 絮团脱稳, 粒度反而小于 nPAM 浓度为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的粒度. 原因在于过量的絮凝剂吸附在粒子表面, 产生的空间位阻使粒子分散, 絮团脱稳.

实验结果表明, 适当浓度的 nPAM 对 TiO_2 纳米酶有很好的包裹、絮凝效果. 随着 nPAM 浓度的增加, 颗粒粒度由纳米级增加到微米级, 有利于纳米酶的回收再利用. 通过调节絮凝剂的浓度, 可调节絮凝体的粒度大小与微絮体形貌, 从而有望控制酶反应中的扩散与传质.

图5 是阳离子聚丙烯酰胺对 TiO_2 纳米酶的絮凝能力. 从图中可以看出, 随着絮凝剂浓度的增加, 沉降速度和浊度出现了与 nPAM 相同的增减趋势, 并且在 $50 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内沉降速度最快, 达到 $1.033 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; 但略低于 nPAM 的最高沉降速度 $1.443 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. 浊度在 $75 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间最低, 体系澄清, 絮凝效果最好. 此后随着 cPAM 浓度的增加, 絮团的稳定性变差, 体系浊度略有增加, 絮凝效果减弱. 不同浓度 cPAM 作用纳米酶的絮凝效果图与 nPAM 相似.

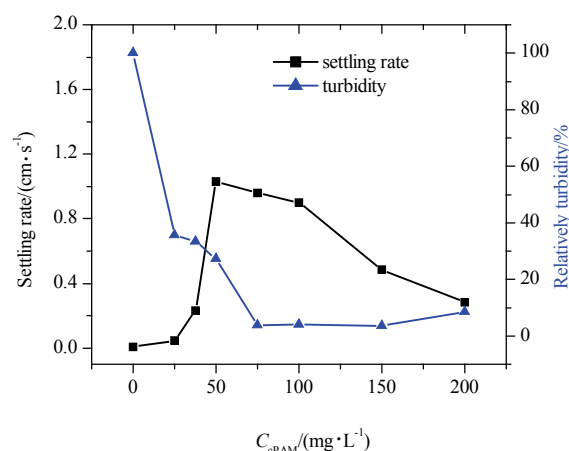


图5 不同浓度下 cPAM 沉降速度及浊度

Figure 5 Settling rate and turbidity at pH 7 and different cPAM dosages

对 cPAM 絮凝酶进行粒度分布分析结果见表1, 粒度分布显示随着 cPAM 浓度的增加, 体系由弱絮凝转至强絮凝, 絮团逐渐变大、牢固. 与图5 沉降速度和浊度实验结果结合, 当 cPAM 的浓度在 50 至 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 沉降速度最大, 浊度最小, 絮团紧密而稳定. 之后增加 cPAM 的浓度, 粒径虽增大, 但絮凝速度反而减小, 亦说明形成了大而松散的絮团.

实验结果表明, 与 nPAM 相似, 适当浓度的 cPAM 可有效地将 TiO_2 纳米酶牵连在一起. 随着 cPAM 浓度的

增加, 颗粒粒度也可以由纳米级增加到微米级, 获得微纳尺度可调的固定化酶。

阴离子聚丙烯酰胺对 TiO_2 纳米酶溶液的絮凝能力见图 6。随着 aPAM 浓度的增加, 体系沉降速度和浊度变化与 nPAM 和 cPAM 趋势相同, 在 $150 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内, 沉降速度最快, 可达到 $1.038 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 与 cPAM 相近, 略低于 nPAM 的最高沉降速度 $1.443 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; 不同的是, aPAM 加量高于 nPAM 和 cPAM。aPAM 的浓度在 $100 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 絮凝后溶液浊度最低, 近乎澄清。

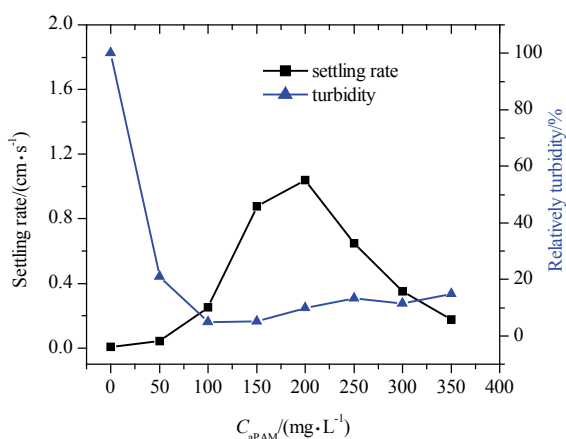


图 6 不同浓度下 aPAM 沉降速度及浊度

Figure 6 Settling rate and turbidity at pH 7 and different aPAM dosages

对 aPAM 絮凝酶进行粒度分布分析结果见表 1。粒度分布显示, 随着 aPAM 浓度的增加, 体系表现出更明显的弱絮凝至强絮凝再至弱絮凝的变化趋势。与图 5 沉降速度和浊度实验结果相对应, 当 aPAM 的浓度在 $150 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 沉降速度最大, 浊度最小, 絮团牢固稳定。随着 aPAM 浓度增加, 絮凝体粒径减小至纳米级, 絮凝速度也减小, 说明稍高浓度的 aPAM 即可使纳米酶絮团脱稳破碎。aPAM 对纳米 TiO_2 -酶的絮团牢固稳定性低于 nPAM 和 cPAM。

综合以上实验结果可知, 三种 PAM 对纳米酶的絮凝过程都符合以下规律(如图 7)。在纳米 TiO_2 悬浊液中纳米 TiO_2 相对分散, 很难沉降, 如 I。这是由于 TiO_2 粒径小、自身的 ξ 电位使粒子之间排斥力占主导。当加入了木瓜蛋白酶后, 纳米 TiO_2 粒子吸附酶分子, 降低其表面电位, 粒子得以相互靠近, 产生一定的团聚, 如 II。但这种团聚仍然是细小分散的, 难沉降。当在纳米 TiO_2 酶溶液中加入絮凝剂后, PAM 高分子链的吸附、架桥、静电作用能力使得纳米酶颗粒絮凝成团, 如 III。

不同的 PAM 用量对 TiO_2 纳米酶的包裹能力、絮团大小及其紧实程度都有不同。如图 7c 所示, 当 PAM 用量较少时, 产生松而小的弱絮凝; PAM 适量时, 产生紧而大的强絮凝(图 7d), 当 PAM 过量时, 产生大而松甚至

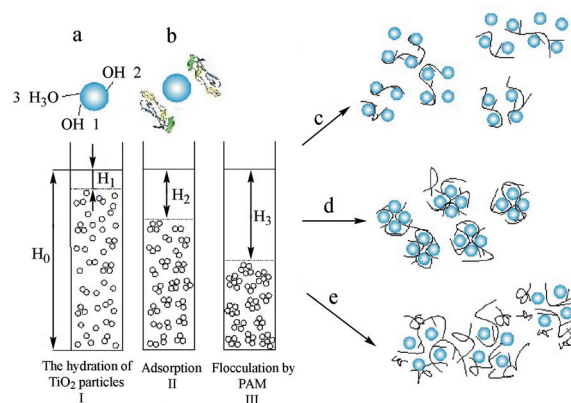


图 7 絮凝剂加量对絮凝行为作用影响示意图

Figure 7 Schematic diagram of floc behavior as a function of flocculant's dosage

(a) model of the functional groups on the surface of TiO_2 . (1) alkaline tail, (2) hydroxyl groups bridged by acid, (3) water molecules adsorbed by Lewis acid field; (b) TiO_2 -enzyme; (c) flocculation with low dosage; (d) flocculation with appropriate dosage; (e) flocculation with high dosage (Note: Blue circles represent nano- TiO_2 , lines represent PAM)

松散破碎的弱絮凝(图 7e)。说明调控 PAM 加量是一种能对固定化酶反应的扩散与传质进行有效调控的手段。对比三种 PAM 对 TiO_2 纳米酶絮凝动力学的调控能力, 依次为 nPAM 强于 cPAM 强于 aPAM, nPAM 絮凝酶的沉降速度最大, 絮团牢固稳定。

2.2 介质 pH 条件对絮凝动力学行为的影响

介质 pH 条件对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 cPAM 沉降速度和浊度的影响见图 8。结果表明, 介质 pH 对 cPAM 絮凝动力学影响显著, 在 pH 为 5 时沉降速度最快, 可以达到 $1.290 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 对应浊度也低; 到 pH 为 10、11 时, 沉降速度显著下降, 分别只有 $0.0408 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $0.0242 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 浊度也随之迅速增加, 此时 TiO_2 纳米酶与 cPAM 之间絮凝作用甚微。这是由于 cPAM 自身的 ξ 电位随 pH 变化很大^[20], 在高碱性 pH 时, cPAM、纳米 TiO_2 以及酶均带负电, 故溶液中粒子排斥力占主导, 能垒较高, 难以

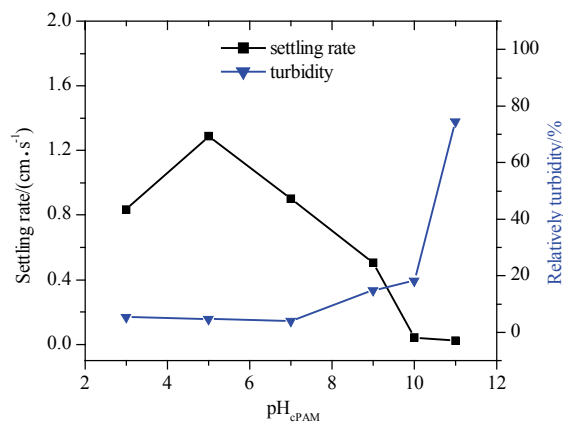


图 8 在不同 pH 下 cPAM 的沉降速度和浊度

Figure 8 Settling rate and turbidity of cPAM at different pH

絮凝. 随着 pH 的减小, PAM, 纳米 TiO_2 以及酶的 ξ 电位均由负电位转为零电位, 使得溶液中粒子得以相互碰撞, 发生絮凝^[19].

所以调控反应体系酸碱度, 可有效调控 cPAM 絮凝动力学行为, 获得尺度可调的纳米酶絮凝体, 即可以根据酶结构与特性, 设计出微纳尺度可调的固定化酶.

介质 pH 条件对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 nPAM 沉降速度和浊度的影响见图 9. 结果表明不同 pH 下的 nPAM 絮凝动力学行为变化不显著, 原因是 nPAM 的大分子链上不含解离基团, 其 ξ 电位值几乎不随 pH 条件而改变, 但 pH 改变了纳米 TiO_2 以及酶分子的 ξ 电位, 故沉降速度及浊度受介质 pH 影响不大, 只在 pH 为 7 时沉降速度略高. 与 cPAM 絮凝动力学相比, nPAM 絮凝体的 pH 适用稳定性更好, 而 cPAM 絮凝动力学受 pH 影响显著, 随 pH 变化可以更有效调节固定化酶颗粒大小. aPAM 絮团松散, 碱性条件下絮凝动力学行为的 pH 稳定性差.

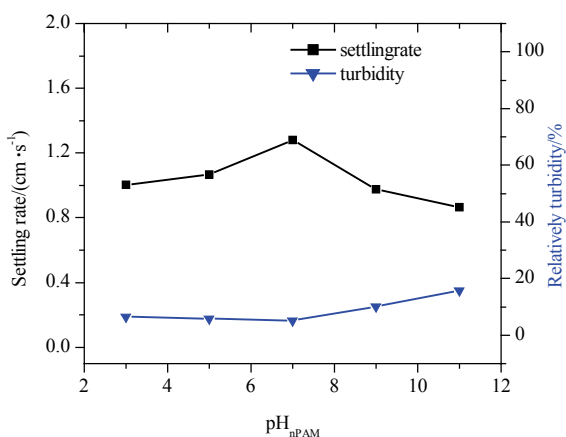


图9 nPAM 在不同 pH 下的沉降速度和浊度
Figure 9 Settling rate and turbidity of nPAM at different pH

2.3 絮凝体微结构扫描电镜及 EDS 面扫描能谱

图 10A 为纳米 TiO_2 扫描电镜图, 可以看出纳米 TiO_2 粒径较小, 在 10 nm 左右. 其较高的比表面积使得与酶分子具有更大的接触面积. 图 10B 为 cPAM 在 pH 7 时絮凝的纳米 TiO_2 -木瓜蛋白酶的扫描电镜图, 由图可以看出, 絮凝体微结构成疏松多孔状, 大小均匀, 与单独 TiO_2 颗粒相比, 絮凝体内部具有多孔结构, 团聚不明显, 说明 TiO_2 纳米酶颗粒在 PAM 吸附架桥作用下, 并没有因为大的表面能而发生团聚, 能很好的分布在高分子 PAM 凝胶网络中, 这种疏松多孔载体, 扩散限制小, 有利于酶促反应传质.

此外对 cPAM 絮凝酶中酶蛋白 S、N 元素进行 EDS 面扫描能谱检测, 结果显示存在酶蛋白特有的 S 元素, 说明通过静电吸附纳米 TiO_2 对酶有很好的负载. 并且 N、S 元素两者都能够非常均匀的分散, 说明絮凝形成的架桥结构在固定化过程中起骨架的作用, 酶分子与载体很好的结合在一起, 并且在载体介质中均匀分布, 絮凝

酶固定化技术为利用纳米材料和微纳结构进行酶固定化提供了新途径.

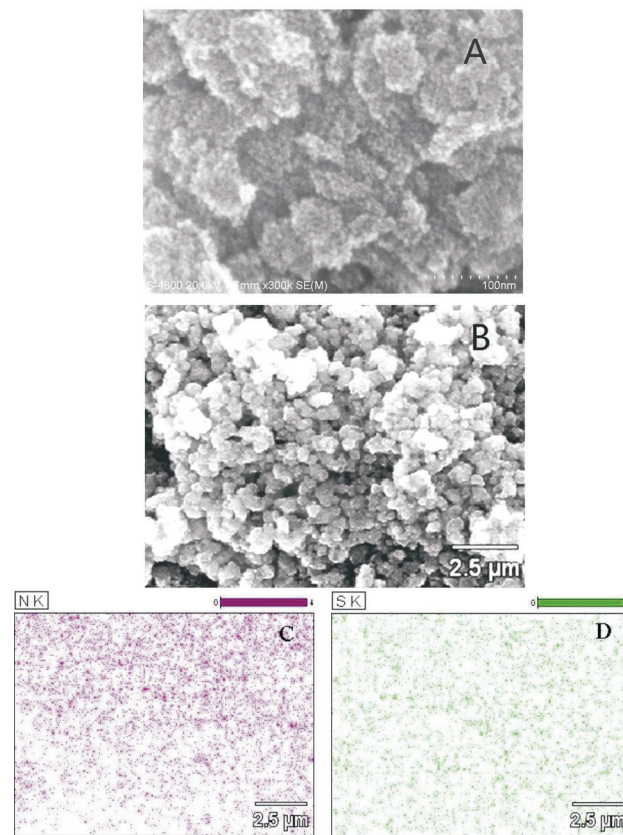


图10 TiO_2 (A), cPAM 絮凝酶(B) SEM 和絮凝酶中元素 N (C), S (D) 的 EDS 能谱检测分布图

Figure 10 SEM images of TiO_2 (A), TiO_2 -enzyme microfloccules (B) and element distribution of N (C) and S (D) in TiO_2 -enzyme microfloccules detected by EDS

3 结论

对比不同种类 PAM、不同 PAM 加量以及介质 pH 对 TiO_2 纳米酶絮凝动力学行为的影响, 并利用 SEM, EDS 及粒度分布表征了絮凝酶形貌、尺寸及分散性. 结果表明: 调控 PAM 加量, 是一种能对固定化酶反应的扩散与传质进行有效调控的手段. PAM 的用量不同, 对 TiO_2 纳米酶的絮凝沉降速度、体系浊度, 絮团大小、紧实程度都不同. 当 PAM 用量较少时, 产生弱絮凝, 浊度大, 沉降速度慢, 絮团粒径小; PAM 适量时, 产生强絮凝, 浊度小, 沉降速度快, 絮团粒径大、牢固稳定. 当 PAM 过量时, 絮团脱稳产生大而松甚至破碎的絮团. 对比三种 PAM 对 TiO_2 纳米酶絮凝动力学的调控能力, nPAM 絮凝酶的沉降速度最大, 絮团牢固稳定.

适量的絮凝剂 PAM, 可有效地将 TiO_2 纳米酶牵连在一起, 有利于纳米酶的回收再利用. 通过调节絮凝剂的加量, 可调节絮凝体的粒度大小与紧致程度, 从而有望调控酶反应中的扩散与传质.

调控反应体系酸碱度,同样可有效调控 PAM 絮凝动力学行为,颗粒粒度也可以由纳米级增加到微米级,获得尺度可调的纳米酶絮凝体,即可以根据酶结构与特性,设计出微纳尺度可调的固定化酶. aPAM 絮凝动力学的 pH 稳定性较差. 与 cPAM 絮凝动力学相比, nPAM 絮凝体的 pH 适用稳定性更好,但是 cPAM 絮凝动力学受 pH 影响显著,随 pH 变化,可以更有效调节固定化酶颗粒大小.

SEM 与 EDS 分析表明,絮凝形成的架桥结构在固定化过程中起骨架的作用,酶分子在载体中均匀分布,絮凝酶固定化技术为利用纳米材料和微纳结构进行酶固定化提供了新途径.

4 实验部分

4.1 实验材料与仪器

木瓜蛋白酶(E.C. 3.4.22.2, pI 8.75, BR); 纳米 TiO₂ (10 nm, 自制); 非离子聚丙烯酰胺(nPAM, $M_n = 12 \times 10^6$), 阳离子聚丙烯酰胺(cPAM, $M_n = 12 \times 10^6$), 阴离子聚丙烯酰胺(aPAM, $M_n = 12 \times 10^6$), 安徽赛科环科技惠赠; 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、柠檬酸、磷酸氢二钠、氢氧化钠(AR, 购自国药集团); 实验用水为二次蒸馏水.

Acoustic Spectrometer DT 1200 高浓度粒径分析仪(USA, Beckman-Coulter); S-4800 型扫描电子显微镜(日本日立), 场发射能谱面扫描, 低加速电压 1000~5000 kV, 本实验样品未经喷金处理; PHS-3C 精密 pH 计; 752N 紫外可见分光光度计.

4.2 实验方法

4.2.1 TiO₂ 纳米酶制备

称取一定质量的纳米 TiO₂ 粉末^[16,24], 加入一定 pH 的缓冲溶液超声 2 h, 加入相应 pH 的木瓜蛋白酶溶液, 摇匀, 静置吸附 30 min, 制备 TiO₂ 纳米酶溶液. TiO₂ 纳米酶溶液中含 8% (w/w) 纳米 TiO₂ 和 8 mg·mL⁻¹ 酶蛋白.

4.2.2 粒度实验

取上述 pH 7 的 TiO₂ 纳米酶溶液 50 mL 置于锥形瓶中, 磁力搅拌 1 min, 分别加入 pH 7 的不同浓度的阴、阳、非离子聚丙烯酰胺溶液 50 mL. 用 Acoustic Spectrometer DT 1200 高浓度粒径分析仪测定粒度.

4.2.3 沉降实验和浊度实验

于 100 mL 锥形瓶中加入 pH 7 的上述 TiO₂ 纳米酶溶液 25 mL, 磁力搅拌 1 min, 再分别加入 pH 7 的不同

浓度的 nPAM 溶液 25 mL, 磁力搅拌 1 min. 转移至内径为 1 cm 的长玻璃管中. 记录沉降高度随时间的变化. 取上清液静置 2 h, 比浊法测定浊度.

按上述步骤测定加入不同浓度 pH 7 的 aPAM、cPAM 絮凝酶沉降速度和浊度以及固定浓度 100 mg·L⁻¹ 不同 pH 下的 nPAM、cPAM 絮凝酶沉降速度和浊度. 其中缓冲溶液为 pH3 (Na₂HPO₄-柠檬酸)、pH5 (Na₂HPO₄-柠檬酸)、pH7 (Tris-HCl)、pH9 (Tris-HCl)、pH11 (Na₂HPO₄-NaOH).

References

- [1] Liao, H.-D.; Yuan, L.; Tong, C.-Y.; Zhu, Y.-H.; Li, D.; Liu, X.-M. *Chem. J. Chin. Univ.* **2008**, 29(8), 1564. (廖红东, 袁丽, 董春义, 朱咏华, 李杜, 刘选明, 高等学校化学学报, **2008**, 29(8), 1564.)
- [2] Hermann, B. G.; Patel, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, 136, 361.
- [3] Wu, M.; He, Q.; Shao, Q. F.; Zuo, Y. G.; Wang, F.; Ni, H. M. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, 3, 3300.
- [4] Jiang, Y. J.; Gao, Q. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 716.
- [5] Zong, J.; Chen, Y.-W.; Zhu, S.-M.; Wang, A.-M.; Shen, S.-B.; Ouyang, P.-K. *Chin. J. Chem. Eng.* **2006**, 57(8), 1776. (宗璟, 陈英文, 祝社民, 王安明, 沈树宝, 欧阳平凯, 化工学报, **2006**, 57(8), 1776.)
- [6] Chen, S. H.; Yen, Y. H.; Wang, C. L.; Wang, S. L. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 33, 643.
- [7] Kim, J.; Grate, J. W. *Nano Lett.* **2003**, 3, 1219.
- [8] Vertegel, A.; Siegel, R.; Dordick, J. *Langmuir* **2004**, 20, 6800.
- [9] Wang, Z.-J.; Li, X.; Wang, C.-C.; Tang, Y.; Zhang, Y.-H. *Chem. J. Chin. Univ.* **2011**, 32, 753. (王周俊, 李翔, 王琛琛, 唐晖, 张亚红, 高等学校化学学报, **2011**, 32, 753.)
- [10] Yan, M.; Ge, J.; Liu, Z.; Ouyang, P. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11008.
- [11] Kim, J. B.; Grate, J. W.; Wang, P. *Trends Biotechnol.* **2009**, 26(11), 639.
- [12] Wang, P. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, 17, 574.
- [13] Hu, R.-Q.; Yu, J.-B.; Song, F.-B.; Xia, C.-T.; Li, Q.-Z. *Acta Chim. Sinica* **2000**, 58, 1211. (胡仁其, 于家波, 宋富兵, 夏春雄, 李全芝, 化学学报, **2000**, 58, 1211.)
- [14] Liu, W. F.; Zhang, S. P.; Wang, P. *J. Biotechnol.* **2009**, 139, 102.
- [15] Jia, H. F.; Zhu, G. Y.; Wang, P. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 84, 406.
- [16] Wu, M.; He, Q.; Zuo, Y.-G.; Wang, F.; Sun, Y.-M. *Acta Chim. Sinica* **2011**, 69, 1475. (吴敏, 何琴, 左勇刚, 王芬, 孙岳明, 化学学报, **2011**, 69, 1475.)
- [17] Lu, C.-X.; Du, Z.-W.; Li, H.-R. *Acta Chim. Sinica* **2009**, 67(3), 238. (卢翠香, 杜竹玮, 李浩然, 化学学报, **2009**, 67(3), 238.)
- [18] Xu, X. J. *The Principle of Chemical Flocculant*, Science Press, Beijing, **2005**, pp. 74~76.
- [19] Nasser, M. S.; James, A. E. *Sep. Purif. Technol.* **2006**, 52, 241.
- [20] Solberg, D.; Wagberg, L. *Colloids Surf. A* **2003**, 219, 161.
- [21] Taylor, M. L.; Morris, G. E.; Self, P. G.; Smart, R. S. C. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, 250, 28.
- [22] Qiu, Y.-L.; Chen, H.-L.; Wang, X.-Z.; Xu, N.-P. *J. Chem. Eng. Chin. Univ.* **2005**, 19, 129. (丘永樑, 陈洪龄, 汪效祖, 徐南平, 高校化学工程学报, **2005**, 19, 129.)
- [23] Sahoo, B.; Sahu, S. K.; Bhattacharya, D.; Dhara, D.; Pramanik, P. *Colloids Surf. B* **2013**, 101, 280.
- [24] Chu, R. H.; Yan, J. C.; Lian, S. Y.; Wang, Y. H.; Yan, F. C.; Chen, D. W. *Solid State Commun.* **2004**, 130, 789.

(Cheng, B.; Lu, Z.)