

溶胶-凝胶法固定化酶的问题与解决途径

黄淑芳¹, 姜忠义^{*1,2}, 吴 洪¹, 许松伟¹

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072;

2. 天津大学一碳化学化工国家重点实验室, 天津 300072)

摘要:综述了溶胶-凝胶固定化酶由于凝胶化时间过长, 凝胶孔径偏小以及凝胶机械强度低等问题的存在引起酶构象改变、屏蔽, 底物与产物的扩散速率慢以及酶与底物的不易接触。并提出了相应的解决办法: 选择适宜的前驱体及固定化条件可以缩短凝胶化时间; 加入聚乙二醇改性剂、非表面活性剂模板剂可以调大凝胶的孔径; 微波快速干燥, 加入添加剂则可以提高凝胶的机械强度。同时也提出可以避免酶变性的其他一些途径, 如对凝胶老化阶段的特殊处理, 选择合适的缓冲液等。

关键词:溶胶-凝胶; 酶; 固定化; 问题; 解决途径

引言

酶作为专一、高效的生物催化剂具有非常广泛和良好的应用前景。由于酶的价格昂贵, 游离酶难以回收利用, 将酶进行有效的固定化一直是酶工程领域的研究热点^[1]。

迄今为止, 已经开发出的传统的酶固定化技术有物理吸附、共价键合、交联以及包埋于有机聚合物基质中。吸附法操作简便, 但要求基质孔径与被包埋分子尺寸相匹配, 且酶与固体表面结合力弱, 易造成流失。共价键合法要求酶具有与基质能发生反应的特殊的官能团, 且固定化后的酶分子的取向是固定的, 使底物与酶反应位点间的接触受到一定限制。此外, 共价键合和交联过程所发生的剧烈化学反应对酶的存活十分不利。而将酶包埋于有机聚合物基质中则会导致酶的生物活性丧失。相比之下, 溶胶-凝胶(sol-gel)法具有独特的技术优势。sol-gel 法是物理包埋过程, 凝胶网络是围绕酶逐渐形成的, 对酶的尺寸无特殊要求; 温和的反应条件和凝胶的非晶态结构都有利于保持酶的结构完整性和表面微观结构的各向同性; 常用的基质材料如二氧化硅比有机聚合物材料更具有化学和热稳定性、良好的坚固性和抗磨性。另外, 由于基质含有足够的水, 生物酶处于水溶液的微环境中, 保持了它的活性和稳定性, 与在水溶液中有相似的行为。

早在 20 世纪 80 年代中期, 人们就已经发现利用 sol-gel 法可以将有机物分子掺杂于无机基质中, 并可保持有机物分子的物理化学性质不变。但当时人们普遍认为前驱体的高反应活性, 过程中醇的释放以及凝胶化过程导致的压力变化可能会破坏有机物分子的构象和活性。所以, 利用 sol-gel 法将有机物分子掺杂于 sol-gel 基质领域的研究工作进展一直较为缓慢。直到 1990 年以色列的 Braun 等^[2]利用 sol-gel 法成功地将碱性磷酸酶引入了 SiO₂ 基质中。从此, sol-gel 法固定化酶技术的开发进入了一个迅速发展的阶段。迄今为止, 许多生物酶如脂肪酶、脱羧酶、胰蛋白酶、天冬酰胺酶

基金项目:国家自然科学基金(20176039)、教育部跨世纪优秀人才培养计划、教育部优秀青年教师资助计划;

作者简介:黄淑芳, 女, (1979—), 在读硕士, 主要从事酶工程研究;

* 通讯联系人。

以及单氨氧化酶等均能被包埋在 sol-gel 基质中,并能在一定操作条件下保持较高的构象完整性、催化活性和热稳定性。

理想的 sol-gel 法固定化酶的过程应具备以下主要特征:(1)酶的空间构象维持率高,固定化酶具有尽可能高的活性回收率;(2)底物与产物能够自由扩散;(3)底物与酶能充分接触;(4)简便可控。然而,由于 sol-gel 法固定化酶的研究历史较短,尚存在以下方面的问题。

1 sol-gel 法固定化酶过程中存在的若干问题

从最终结果来看,大多数酶在固定化以后,它们的活性低于相同条件下溶液酶的活性。有报道^[1]指出,酸性磷酸酶,碱性磷酸酶及胰蛋白酶经 sol-gel 法固定化后的酶活性为溶液酶活性的 30%~60%。Li 等^[3]发现,sol-gel 法固定化后的乳酸脱氢酶的酶活性为溶液酶活性的 10%左右。另外,底物和产物的扩散速率也普遍较低^[4],底物与酶的不易接触^[5],影响酶反应效率。

凝胶化时间过长导致了酶与基质间的相互作用时间过长,过大的酸碱度以及醇的存在则破坏了适宜酶生存的微环境。而酶与凝胶基质间的相互作用以及酶微环境的变化,引起酶的构象改变和屏蔽,是导致固定化酶活性降低的主要因素。

传统的 sol-gel 材料的微孔性质^[6](典型孔径 $\leq 1.5\text{nm}$,孔体积 $\leq 0.25\text{cm}^3/\text{g}$)或由于凝胶机械强度低引起的孔坍塌,造成孔径小或孔道堵塞,使得底物与产物的扩散阻力大,底物分子较低的扩散速率和酶的不易接触,从而使酶反应效率降低。此外,凝胶材料与底物的带电情况、相互作用以及酶分子的大小也影响底物和酶接触的充分性。

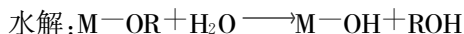
针对上述问题,研究者们相继提出了一些解决方法。

2 避免固定化酶活性降低的途径

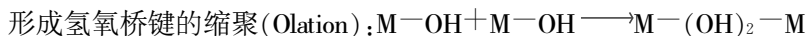
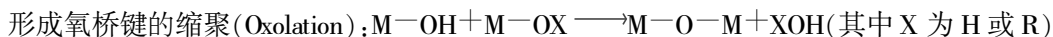
2.1 缩短凝胶化时间

由于酶与溶胶粒子表面存在范德华力等相互作用,引起酶活性降低。Liu 等^[7]研究发现,由于 SiO_2 溶胶粒子与酶的多肽链之间存在微弱的相互作用,引起了酶活性的降低。因此缩短凝胶化时间可以减少酶与溶胶粒子的作用时间,有利于酶保持良好的构象和活性。

2.1.1 选择适宜的前驱体 sol-gel 过程是无机聚合过程,包括水解和缩聚两个过程。



水解形成的羟基化合物 $\text{M}-\text{OH}$ 具有缩合性,通常缩聚具有两种途径:



水解和 Oxolation 属于双分子亲核取代 $\text{S}_\text{N}2$, Olation 属于双分子亲核加成 $\text{A}_\text{N}2$ 。

在双分子亲核加成 $\text{A}_\text{N}2$ 中,亲核性基团直接进入金属粒子的未饱和的配位层,不需要进行质子转移和小分子的释放,所以其动力学较双分子亲核取代 $\text{S}_\text{N}2$ 快。通常在金属原子中心配位未得到满足时发生的。亲核加成的反应性除了与亲核亲电作用的强弱有关外,还与金属中心的配位扩张能力有关,而配位扩张能力可用配位不饱和性 $\text{N}-\text{Z}$ (N 为金属总配位数; Z 为金属氧化物价态数)表示。 $\text{N}-\text{Z}$ 数越大表示金属原子中心的配位不饱和程度越大,进行亲核加成的能力越强。

表 1 常见四价金属/半金属原子的电负性 E_N , 部分电荷 δ_M , 离子半径 r , 不饱和度 $N-Z$, 最高配位数 N

金属醇盐	E_N	r/nm	δ_M	N	$N-Z$
Si(OR) ₄	1.74/1.90	0.040	+0.32	4	0
Sn(OR) ₄	1.89/1.93	0.060		6	2
Ti(OR) ₄	1.32/1.54	0.064	+0.60	6	2
Zr(OR) ₄	1.29/1.33	0.087	+0.64	7	3
Ce(OR) ₄	1.17/1.12	0.102	+0.75	8	4
Al(OR) ₄	/1.61			6	3

R 为异丙基

由表 1^[8] 数据可知, 过渡金属的四配体醇盐一般具有较高的配位不饱和度, 其水解缩合反应较硅的易发生, 反应速度快。如 $\text{Ti}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ 的水解速度约是 $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ 水解速度的 5 倍^[9]。但是电负性更小的铈的醇盐对潮湿非常敏感, 必须在干燥的条件下保存, 否则一遇水分就会有沉淀生成, 该醇盐的水解过程难以控制。因此, 选择电负性适中的过渡金属(如钛, 锆等)的醇盐作为前驱体可加速水解缩聚速度, 且使其维持在可控范围之内。但由于二氧化硅的一些优异特性, 使得硅的醇盐即烷氧基硅烷也成为普遍采用的前驱体, 由于其较小的水解速度则须加入催化剂以促进水解反应。

此外, 前驱体中烷氧基的空间结构也对凝胶化速率有很大影响。例如, 由于位阻效应, 在相同条件下, 正硅酸甲酯(TMOS)的凝胶化时间明显比正硅酸乙酯(TEOS)及正硅酸丁酯(TBOS)的要短。具体数据见表 2^[10]。

表 2 不同前驱体的凝胶化时间 t_g

前驱体	溶剂	t_g/h
TMOS	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	152
TEOS	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	242
TBOS	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	243

另外, Gill I 等^[11] 合成出一类生物相容的新型水溶性前驱体, 即硅酸盐和硅烷的聚甘油酯, 如聚甘油硅酸盐[poly (glyceryl silicate), PGS]。这类物质在水溶液中无需催化剂几分钟即可水解, 水解和缩聚速率较 TMOS 快 6~23 倍。

2.1.2 选择适宜的催化剂类型及其用量 目前普遍采用的烷氧基硅烷前驱体 sol-gel 过程都需要催化剂以促进水解反应。如在 TEOS 的乙醇水溶液中加入 0.05% 的 HCl 即可将凝胶化时间由 1000h 缩短到 92h^[12]。sol-gel 过程所采用的催化剂主要是酸和碱, 常用的有盐酸、氢氟酸、乙酸、琥珀酸、马来酸等酸性和氨水类碱性物质^[13]。酸或碱对金属醇盐的 sol-gel 过程的催化机理不同^[14]。在酸性条件下, 水解反应过程首先是 H_3O^+ 进攻 Si 原子, 硅烷的水解速率随着 pH 的降低而加快, 此时的水解速率大于缩合速率。在碱性条件下, OH^- 进攻 Si 原子, 随着 pH 升高, 水解速率加快, 此时的水解速率也大于缩合速率。而在中性条件下, SiO_2 粒子的溶解程度加剧, 同时还导致粒子的去质子化的表面电荷增加, 从而使团聚和凝胶化过程延迟, 凝胶化时间增加。因此, 较低 pH(酸催化)或较高 pH(碱催化)都可以加速 sol-gel 反应, 缩短凝胶化时间^[15]。但是, 由于生物酶的生理环境的 pH 多为 5~8^[16]。因此, 酸催化时一般控制 pH 不低于 5, 而碱催化时控制 pH 不高于 8。

2.1.3 确定适宜的水/前驱体含量比($R=[\text{H}_2\text{O}]/[\text{前驱体}]$) R 是影响凝胶化过程的一个重要参数, R 太小, 前驱体不能完全水解, R 太大, 虽然可在凝胶网络中提供更多的微环境水, 有利于酶活性的保持, 但同时会使溶胶的凝胶化过程延长。袁道强等^[16]以 TEOS 为前驱体, 对葡萄糖氧化酶 (GOD) 进行固定化。在 $R=7$ 左右时, GOD 在 sol-gel 体系中的活性得到最大的保持, 为游离酶活性的 80% 左右。另外, Reetz 等^[17]在对脂肪酶的 sol-gel 固定化研究中也发现 R 对固定化酶的活性影响很大。 R 较低时, 脂肪酶浓度较高会引起团聚, 造成活性降低; R 增加到 8~10 时, 活性逐渐提高, 之后活性又下降。因此, 对于不同的前驱体、催化剂及酶须选择不同的 R , 既能使前驱体完全水解, 又不会使凝胶化时间过长, 使酶活性得以较好的保持。

2.1.4 适当提高反应温度 凝胶化时间与温度的关系符合阿累尼乌斯方程^[18]: $1/t_g = A\exp(-E^*/RT)$ 。对于特定体系的 sol-gel 过程, 其表观活化能 E^* 可以确定, 因此升高温度可以有效缩短凝胶化时间。表 3^[19]给出了以 TEOS 为前驱体, 以 HCl 和 HF 为催化剂时, 温度对凝胶化时间的影响。需要指出的是, 对于固定化酶的 sol-gel 过程, 升温幅度要兼顾酶的最适反应温度, 使体系的操作温度尽可能在酶的最适温度附近。而各种酶的最适反应温度各不相同。如甲酸脱氢酶和甲醛脱氢酶的最适温度为 37℃, 甲醇脱氢酶的最适温度为 25℃。因此, 必须根据凝胶化时间和酶的最适温度共同确定适宜的反应温度。

表 3 不同温度下 HCl、HF 催化的凝胶化时间 t_g

温度/℃	t_g/h (HCl 为催化剂)	t_g/h (HF 为催化剂)
25	380	9.2
50	70	1.25
70	20	0.30

2.2 避免老化引起的酶变性

聚合反应在凝胶的老化阶段仍在进行, 聚合形成的新键使凝胶网络收缩 10%~30%^[5], 凝胶孔径缩小约 25%, 孔中的水等液体被挤出, 从而造成包埋酶的微环境及基质内部结构发生改变, 导致酶变性。Flora 等^[20]提出以下建议: 发生凝胶化以后的样品应首先在湿态下老化至少 3 天, 并用缓冲溶液洗涤凝胶以除去醇; 经老化处理后, 凝胶保存于湿环境中, 防止水分的进一步蒸发, 从而减小基质内部结构的进一步改变, 避免酶活性降低。

2.3 选择适宜的缓冲溶液及 pH 值

在溶胶中加入酶之前, 先加入具有一定缓冲能力的缓冲溶液, 维持体系的酸度在生物酶适宜的范围, 避免生物酶的失活和自聚。

周纪宁等^[21]采用壳聚糖作为载体进行 L-天门冬酰胺酶固定化, 考察了不同缓冲溶液(磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、乙酸缓冲液和 Tris-HCl 缓冲液)及 pH 值对固定化酶活性的影响, 其中固定化酶活性回收率最低的是 pH 值为 6.0 的磷酸盐缓冲液, 仅为 8.6%, 而 pH 值为 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液有最高的酶活性回收率, 为前者的 2 倍。由此可见缓冲液及 pH 值对酶活性的影响是显著的。对于不同的固定化体系须选择各自适合的缓冲液及 pH 值, 然而它们之间的最佳匹配有待进一步系统地研究。

2.4 尽量避免醇类物质引起的酶变性

传统的 sol-gel 过程中产生的醇以及在反应初始阶段作为互溶剂加入的醇都将导致酶的失活。

这主要是因为醇会引起酶蛋白的折叠、结块从而使蛋白质的二级和三级结构遭到一定程度的破坏。一个典型的例子是 Miller 等^[22]报道了利用 TMOS 作为前驱体制备凝胶,由于体系中存在 5% 的醇,使得酶活性丧失 70%。但一般情况下,引起酶变性的醇浓度 $\geq 35\%$ (v/v)^[5]。

因此建议对传统的 sol-gel 过程加以如下改进:(1)由于甲醇对酶的危害小于其它高级醇^[23],所以水解前驱体一般采用 TMOS,而不用 TEOS;(2)起始反应溶液中不加入醇,采用超声波振荡,促进前驱体的溶解,提高多组分体系的均一分散度和凝胶化速度,用水解生成的醇作互溶剂无需再外加醇。本实验组采用微型旋涡混合仪混合也可达到同样的效果;(3)在水解后的溶胶中加入缓冲溶液调节 pH 值,同时稀释水解过程中产生的醇,创造更适宜酶的固定化环境;(4)将水解过程中产生的醇通过旋转蒸发及时分离出去;(5)在凝胶老化阶段,经常用适当 pH 值的缓冲溶液洗涤凝胶,以洗去老化过程中产生的醇等有害杂质。

3 提高底物与产物分子扩散速率的途径

传统的 sol-gel 材料的微孔性质及凝胶孔坍塌引起的孔道堵塞,导致底物与产物分子较低的扩散速率,从而使酶反应效率降低,因此应调大凝胶的孔径及调控有序的孔道结构,以使分子自由进出,尽可能减小扩散阻力^[24],同时也可以达到改善分配效应的目的。

3.1 调大凝胶孔径

3.1.1 添加聚乙二醇(PEG)改性剂 溶胶在凝胶化过程中颗粒的生长分为三个过程,即:溶胶粒子的形成与生长;小簇团的生长和大簇团的生长;凝胶化。而 PEG 的加入,一方面限制了溶胶粒子本身的生长,另一方面又促进了经 PEG 包覆的粒子簇团之间的团聚和交联,使簇团颗粒间的交联有序化,逐步形成环状网络结构(见图 1)。

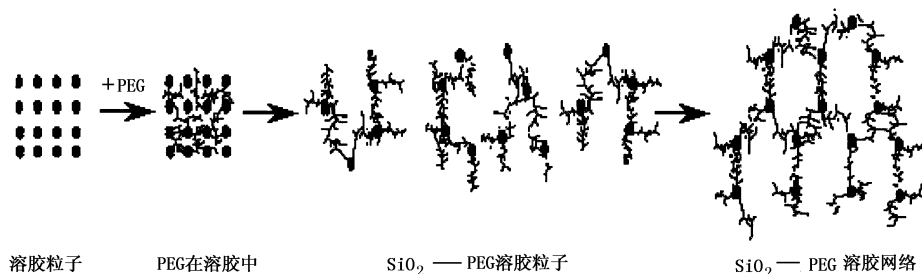


图 1 PEG 对 SiO₂ 溶胶粒子的作用模型^[25]

凝胶的孔径可以通过改变 PEG 的分子量(200, 400, 600)和添加量(1%, 5%, 10%)即 PEG 与前驱体的摩尔百分比来调控^[26]。对以 TEOS 为前驱体,添加 PEG 改性剂的 sol-gel 过程的研究表明,添加 5% 的 PEG400 时,凝胶的最可几孔径和孔体积最大,此时孔径为 9nm,孔体积为 4cm³/g,且形成的凝胶具有均匀有序的环状网络结构。

PEG 的添加量和分子量对凝胶网络结构的影响可以通过 PEG 与水分子和 SiO₂ 溶胶粒子的相互作用来认识。体系中的水可能以结合水、束缚水和自由水 3 种形式存在:在 PEG 链上,以氢键形式吸附的水为结合水,使得 PEG 链式结构变得疏松,从而可以提供足够的空间容纳水分子,这部分水称为束缚水,剩余的水称为自由水。当 PEG 添加量较小时,结合水和束缚水较少,自由水较多,对 TEOS 的水解缩聚过程影响不大,PEG 只起到分散剂的作用。当 PEG 添加量较大时,结合水和束缚水较多,自由水较少,PEG 在一定程度上限制了 TEOS 的水解反应,而且由于 PEG 链式结构对溶

胶粒子表面的包覆作用,所形成的溶剂化层厚度增加,因而簇团之间不可能形成有规律的孔道。因此,控制 PEG 量,使水解缩聚过程能在一种温和的条件下进行,有利于形成均匀的环状网络结构以及集中的孔分布。

随着 PEG 分子量增大,凝胶孔径增大,孔分布趋于集中。但当 PEG 分子量超过 400 时,由于 PEG 的链长增加,在溶液中的扭曲程度严重,因此它吸附的结合水和容纳的束缚水反而减少,自由水增加,对 TEOS 水解缩聚过程的影响减弱。同时由于链长增加,对溶胶粒子表面的包覆作用增强,限制了溶胶粒子的生长。PEG 单位链长上所吸附的溶胶粒子增多,空间位阻效应加强,因此不能形成较大的有规律的网络结构。所以,此时随着 PEG 分子量增大,凝胶孔径反而减小。

此外,加入的 PEG 可优先于酶吸附在凝胶表面,减弱了酶与凝胶之间的相互作用;而且 PEG 具有良好的生物相容性,与其他有机聚合物相比,可以使酶活性得到较好的保持。因此加入 PEG 不仅可以调控凝胶的孔结构,而且不会破坏酶的微环境,使酶活性得以较好的保持。

3.1.2 添加非表面活性剂模板 采用有机大分子作模板剂控制材料的结构是近年来 sol-gel 化学发展的新动态。通过调变聚合物的大小和修饰胶体颗粒表面能够有效地控制凝胶的孔径^[27,28]。

最初,人们利用对 sol-gel 化学的认识采用表面活性剂作模板对水解缩聚反应过程和溶胶表面进行修饰以达到在一定范围内获得可控结构和可控粒度的凝胶材料。但是由于大部分表面活性剂模板含有破坏酶的试剂,因此可用非表面活性剂代替表面活性剂作模板。如在用 TEOS 或 TMOS 包埋碱性磷酸酶的过程中加入 D-葡萄糖、D-麦芽糖、二苯甲酰酒石酸等非表面活性剂作为模板剂^[24],得到的凝胶孔约 3nm,孔体积约 0.6cm³/g,比传统的凝胶孔(孔径≤1.5nm,孔体积≤0.25cm³/g)大。同时得到相互连通的孔道结构,且互连着的孔尺寸小,可防止酶的泄漏。这样既有利于酶与底物之间的充分接触,同时也有助于底物与产物的扩散,从而达到提高反应效率的目的;另外它与碱性磷酸酶以及其它酶相容性好,可以避免酶活性的显著降低。

3.2 提高凝胶机械强度

凝胶的机械强度高主要体现在凝胶的干燥阶段。与老化过程类似,在干燥阶段,孔中的液体蒸发出来,使凝胶不断收缩,一些大孔被移空而小孔中仍存在着液体,由此而产生的毛细管力导致凝胶碎裂,甚至坍塌。从而凝胶孔径和比表面积减小,甚至堵塞孔道。虽然包埋有酶的凝胶在干燥过程的收缩率约 62%,小于没有包埋酶的凝胶的收缩率约 85%^[7],但是包埋有酶的 sol-gel 过程同样存在上述问题。Buelna G 等^[29]研究发现微波快速干燥可以减小干燥过程中产生的毛细管力,提高凝胶机械强度,避免孔坍塌,并且可以得到疏松的凝胶结构,孔径增大。李清文等^[30]建议在 sol-gel 过程中加入一定量的有机添加剂如 Triton, 甲酰胺等可以降低表面张力防止凝胶的碎裂。然而,有机添加剂的加入可能引起酶的变性。因此针对具体实验方案应衡量加入有机添加剂所带来的正反两方面的影响。另外,用超临界干燥代替蒸气干燥可以减小干燥过程的毛细管力,提高凝胶机械强度,且被凝胶固定化后的酶活性提高^[31]。

4 提高底物与酶接触充分性的途径

底物与酶的不易接触,影响酶反应效率。底物与酶接触的充分性在很大程度上取决于凝胶孔径、凝胶材料以及底物的带电情况和相互作用(静电作用、氢键作用和疏水作用等)^[5]。其中调大凝胶孔径使底物能有效、快速地扩散到凝胶内部,与固定化于凝胶中的酶进行接触。调大凝胶孔径的具体方法已在上述谈及。

当凝胶材料与底物分子带异种电荷时,底物因为被吸附于凝胶材料表面,难以快速到达凝胶内

部与酶接触,但是只要时间足够长,平衡时凝胶内部的底物浓度可能高于主体溶液中的浓度,此时,底物与酶能充分接触。能与凝胶材料形成氢键的极性物质也是如此。当凝胶材料与底物分子带同种电荷时,底物被排斥在凝胶材料之外,不能到达凝胶内部与酶接触。当底物分子不带电时,底物分子能顺利到达凝胶内部。如对带负电荷的凝胶材料包埋的 Zn^{2+} -细胞色素 c 与 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+}$, O_2 和对苯醌的氧化还原反应研究发现,在低离子强度下, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 因为静电作用被排斥在带有负电荷的凝胶材料之外。 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+}$ 能在凝胶孔中扩散,但由于凝胶材料的静电吸附作用,扩散速度很慢,但只要扩散时间足够长,达到平衡时凝胶内部该离子的浓度反而高于其在主体溶液中的浓度,底物与酶能充分接触。而对于不带电的中性物质 O_2 和对苯醌,可以顺利到达凝胶内部。总之,决定底物与酶能否充分接触的主要因素是底物和凝胶之间的静电作用。可以通过选择合适的前驱体(根据带电情况,亲水、疏水性等),预先加入带电聚合物,以及控制老化时间等使得底物与酶充分接触。另外,酶分子的大小也影响其与底物充分接触的程度^[19]。一般情况下,分子体积小的酶分子容易与底物接触^[19]。

5 结束语

sol-gel 化学在固定化酶上的应用是一项崭新而又富有挑战性的课题,越来越多的研究结果表明,固定于 sol-gel 基质中的酶能保持良好的催化性能,从而昭示着酶的 sol-gel 固定化技术具有乐观的发展前景。但酶的 sol-gel 固定化技术仍处于起步阶段,许多问题还有待于在今后大量研究的基础上加以解决。

参考文献:

- [1] 张宇,陈年友,朱龙根.高等学校化学学报,2000,21(5):675~680.
- [2] Braun S, Rappoport S, Zusman R, et al. J Mater Lett., 1990, 10(1/2):1~5.
- [3] Li C I, Lin Y H, Shih C L. Biosensors & Bioelectronics, 2002, 17:323~330.
- [4] Persson M, Mladenoska I, Wehtje E. Enzyme and Microbial Technology 2002, 31:833~841.
- [5] Jin W, Brennan J D. Analytica Chimica Acta. 2002, 461:1~36.
- [6] Wei Y, Xu J, Feng Q, et al. Materials Letters, 2000, 44:6~11.
- [7] Liu D M, Chen I W. Acta Mater, 1999, 47(18):4535~4544.
- [8] 王家芳,章文贡.化学世界,2001,1:47~51.
- [9] Livage J, Henry M, Sanchez C. Prog Solid State Chem, 1988, 18:259.
- [10] Chen K C, Tsuchiya T, Mackenzie J D. J Non-Crystalline Solids, 1986(81):227~237.
- [11] Gill I, Ballesteros A. J Am Chem Soc, 1998, 120:8587~8598.
- [12] Brinker C J, Scherer G W. New York: Academic Press Inc, 1990.
- [13] 吴洪,姜忠义,黄淑芳.现代化工,2002,22(7):60~63.
- [14] 余锡宾,吴虹.无机材料学报,1996,11(4):703~707.
- [15] Huang W L, Liang K M, Gu S H. J Solids, 1999, 258:234~238.
- [16] 袁道强,舒友琴,张荷丽.郑州牧业工程高等专科学校学报,2000,20(3):164~166.
- [17] Reetz M T, Zonta A, Simpelkamp J. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 49:527~534.
- [18] Colby M W, Osaka A, Mackenzie J D. J Non-Crystalline Solids 1988, 99:129~139.
- [19] Mary W C, Osaka A, Mackenzie J D. J Non-Crystalline Solids, 1986, 82:37~41.
- [20] Flora K K, Dabrowski M A, Musson S P. Can J Chem, 1999, 77:1617~1625.
- [21] 周纪宁,江体乾,高媛,等.功能高分子学报 1998, 11(1):76~82.

- [22] Miller J M, Dunn B, Valentine, et al. *J Non-Crystalline Solids*, 1996, 202, 279~280.
- [23] Obert R, Dave B C. *J Am Chem Soc*, 1999, 121, 12192~12193.
- [24] 姜忠义, 吴洪, 许松伟, 等. *催化学报*, 2002, 23(2), 162~164.
- [25] 孙继红, 张晔, 范文浩, 等. *化学进展*, 1999, 11(1), 80~85.
- [26] 孙继红, 巩雁军, 范文浩, 等. *高等学校化学学报*, 2000, 21(1), 95~98.
- [27] Zhmud B V, Sonnefeld J. *J Solids*, 1996, 195, 16~27.
- [28] Hoshino Y, Mackenzie J D. *J Sol-Gel Sci&Tech*, 1995, 5, 83~92.
- [29] Buelna G, Lin Y S. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2001, 42, 67~76.
- [30] 李清文, 王义明, 罗国安. *化学通报*, 2000, 5, 14~19.
- [31] Pierre A, Buisson P. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 11, 639~647.

Problems and Solutions of Enzyme Encapsulation through Sol-gel Process

HUANG Shu-fang¹, JIANG Zhong-yi^{1,2}, WU Hong¹, XU Song-wei¹

(1. School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. State Key Laboratory of C1 Chemical Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The typical problems encountered in enzyme encapsulation through sol-gel process, such as too long gelation time, small gel pore size, low gel mechanical strength and so on, are briefly outlined. These problems can result in three dimensional conformation alteration and the active site shielding of the immobilized enzyme, the slow diffusion rate and the inaccessibility of substrate to the immobilized enzyme. The corresponding tentative solutions are presented herein; the gelation time can be considerably shortened by the appropriate screening of precursors and encapsulation conditions. The gel pore size can be enlarged and structure can be tailored with the introduction of chemical modifiers such as polyethylene glycol, glucose, cyclodextrin and other nonsurfactants. The mechanical strength of gel can be increased by the suitable drying process and drying control additives. In addition, other approaches are also mentioned to avoid enzyme denaturation, such as the special treatment during the aging stage and the suitable selection of buffer solution.

Key words: Sol-gel; Enzyme; Immobilization; Problems; Solutions

(上接第 74 页)

Development and Applications of Polymer Materials for Improving Soil Structure

LI Jian-fa, SONG Zhan-qian

(Institute of Chemical Industry of Forest Products, Chinese Academy of Forestry, Nanjiang 210042, China)

Abstract: The development and major kinds of polymer materials for improving soil structure were introduced, as well as their performing mechanisms. Their application prospects on combating desertification, controlling water loss and soil erosion, and in the construction of irrigation works and roads were proposed.

Key words: Polymer material; Soil-structure improving agent; Soil stabilizing agent; Soil improvement