BSA-NH₂/PNIPAAm 缀合物单层膜的制备及对脂肪酶催化反应的调控

孙照玲[†], 林幼萍[†], 王磊^{*}

哈尔滨工业大学化工与化学学院, 新能源转换与储存关键材料技术工业和信息化部重点实验室, 哈尔滨 150001

[†] 同等贡献

^{*} E-mail: leiwang_chem@hit.edu.cn

收稿日期: 2020-03-06; 接受日期: 2020-05-08; 网络版发表日期: 2020-06-18

国家自然科学基金(批准号: 51703043)、黑龙江省自然科学基金(批准号: F2018014)和中国博士后基金(编号: 2016M600247)资助项目

摘要 生物酶催化反应, 因其高效的催化活性、良好的生物相容性和催化反应特异性, 已引起研究者们广泛关注和深入探索. 由于生物酶在反应中的剂量对产物性能和反应过程均有重要影响, 因此, 如何在反应过程中有效地调控生物酶的加入剂量从而调控反应进程依旧是亟待优化和解决的科学难题. 智能响应性的膜材料, 由于其具有选择透过性, 为调控生物催化反应进程提供了可能性. 基于此, 本文利用油水界面自组装的方法制备出一种具有温度响应性的蛋白质-聚合物缀合物(BSA-NH₂/PNIPAAm)单层膜材料. 结合AFM, SEM, TEM等表征技术, 证明该膜材料具有连续和稳定的单层膜结构. 通过调控基元中聚合物分子量, 可以制备具有不同截留分子量(10~70 kDa)的膜材料, 从而对截留不同分子量的大分子提供了更多选择. 此外, 基于该膜材料的温度响应功能, 实现温度调控的膜孔开/关, 由此准确地调控了脂肪酶加入反应的剂量, 从而调节了催化甘油三丁酯的反应进程. 本研究不仅提供了一种制备单层智能响应性膜材料的方法, 还为未来药物分离筛选、模拟细胞的选择透过性膜和调控生物反应进程等领域提供了新的思路.

关键词 蛋白质-聚合物缀合物, 自组装单层膜, 无支撑膜, 温感智能材料, 生物催化反应

1 引言

生物催化, 也称酶催化或生物转化, 是利用生物酶催化反应的过程^[1-3]. 鉴于生物酶具有高效的催化活性、良好的生物相容性、反应的特异性及对环境的友好性, 生物酶被广泛应用于医药合成^[4]、精细化工^[5,6]、石油化工^[7,8]、食品检测^[9,10]和环境监控^[11,12]等

领域. 鉴于反应过程中生物酶的用量对产品的性能和结构有重要影响^[13-15], 以及考虑到生物酶的成本等因素, 如何精确有效地调控生物酶的剂量来实现低成本、高效率的生物催化反应成为了科学家们的研究重点. 目前报道的在反应过程中精确调控生物酶剂量的方法主要有以下几种. (1) 微液滴技术^[16], 这是利用微液滴反应器进行生物催化的方法, 可以通过动态地调

引用格式: 孙照玲, 林幼萍, 王磊. BSA-NH₂/PNIPAAm 缀合物单层膜的制备及对脂肪酶催化反应的调控. 中国科学: 技术科学, 2020, 50: 947-956
Sun Z L, Lin Y P, Wang L. Single-layer BSA-NH₂/PNIPAAm membrane with modulated lipase biocatalytic reaction (in Chinese). Sci Sin Tech, 2020, 50: 947-956, doi: 10.1360/SST-2020-0075

控流速等参数改变微液滴的体积,从而调节反应过程中的生物酶的用量和浓度。但微液滴技术需要繁琐的芯片制备过程,并且属于微量化反应,严重地限制了该方法的大规模实际应用。(2) 分段加入法^[15],即在反应过程中多次加入生物酶,但该方法操作相对繁琐且难以实现较低浓度条件下的准确调控。(3) 可控释放法^[17],该方法能够将生物酶装载到纳米载体中,通过外界刺激实现可控的释放。此方法虽然能够在一定程度上提高酶稳定性,但是由于纳米材料对酶的吸附作用,使其释放率较低,并且难以实现回收利用。因此设计能够在反应过程中简便、快速地调控生物酶剂量的方法依旧是亟待解决的科学问题。

近年来,智能响应性的膜材料,由于其具有可控的分子透过性,能够为反应过程中精确调控生物酶的加入剂量提供新的思路。关于智能响应性膜材料的制备方法,目前报道的主要是直接合成法^[18]和表面修饰法^[19]。其中直接合成法是指直接合成具有响应性的聚合物,然后通过后续工艺来制作成膜;而表面修饰法包括孔-填充法^[20,21]、表面接枝法^[22]、表面镀膜法^[23]等。然而,以上关于智能膜材料的研究存在制备方法复杂、步骤繁琐、成本较高等缺点,严重阻碍了智能膜材料的广泛应用。此外,以上方法制备的膜材料很难达到单分子层的厚度要求。所以,设计研发一种简便、廉价、可控的制备单分子层智能膜材料的方法已经成为本领域亟待解决的问题。

为解决以上问题,基于课题组现有制备两亲性蛋白质-聚合物缀合物的成熟体系^[24],本课题利用油水界面自组装法实现该两亲性基元的有序自组装,通过交联反应,制备出蛋白质-聚合物缀合物的单层膜,从而简化了制备智能膜材料的过程和步骤。其次,通过调控基元中聚合物的分子量,可以制备具有不同截留分子量的(10~70 kDa)的膜材料,从而为分离筛选不同分子量的生物大分子材料提供了更多选择。此外,基于该膜材料的温度响应功能,即温度调控的膜孔开/关,我们准确地在反应过程中调控了加入脂肪酶的剂量,从而调节了催化甘油三丁酯的反应进程。最后,利用该膜材料的选择透过性,不仅可以实现反应过程中酶的选择透过,并且还可以提高回收率。综上,本研究不仅提供了一种制备单层智能膜材料的方法,还为未来药物分离筛选、模拟细胞的选择透过性膜等领域提供了新的研究思路。

2 实验

2.1 试剂和仪器

实验试剂:牛血清白蛋白(BSA, 98%), 2-十二烷基硫代羰基硫代-2-甲基丙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(RAFT试剂), 异硫氰酸荧光素-葡聚糖(Dex-FITC), 异硫氰酸罗丹明B-葡聚糖(Dex-Rb), 葡萄糖氧化酶均购于Sigma中国分公司;丁二酸酐, 异辛醇, 偶氮二异丁腈(AIBN), 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二胺盐酸盐(EDAC), N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm), 乙腈, 戊二醛(GA), 异辛醇, 脂肪酶购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 1,6-己二胺购于天津市科密欧化学试剂有限公司, 脲胺二盐酸盐购于萨恩化学技术有限公司, 此外该实验中还用到了氢氧化钠, 氢氧化钾, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 乙醚, 石油醚, 甘油三丁酯, 无水乙醇等常规试剂。除特别说明外,试剂均为分析纯可直接使用。本实验中所用的水均为去离子水。

实验仪器:电子天平(UTP-313), 分析天平(ML204/02)与pH计(S210), 超声波清洗机(KQ-400KDB, 昆山市超声仪器有限公司), 电热鼓风干燥箱(101-1A, 天津市泰斯特仪器有限公司), 磁力搅拌器(BIG SQUID, 德国艾卡), 真空冷冻干燥机(FD-1A-50, 北京博医康实验仪器有限公司), 真空泵(RV8, 英国爱德华), 荧光分光光度计(LS 55, 珀金埃尔默股份有限公司), 原子力显微镜(实验室自搭建), 扫描电子显微镜(SU8000, 日立有限公司), 透射电子显微镜(JEM-1400, 日电有限公司), DLS测试仪(Nano ZS90, 英国马尔文)。

另本实验还用到了锥形瓶、三口瓶、滴定管、玻璃反应器等玻璃仪器。

2.2 实验过程

2.2.1 合成聚合物(PNIPAAm)

称取AIBN 1 mg, RAFT^[24]试剂7 mg, 经提纯后的NIPAAm单体240 mg于三口瓶中, 将4 mL乙腈溶剂滴入三口瓶中, 在三口瓶中通入氮气除氧30 min。然后, 将充分除氧的试剂瓶密封放置于65℃左右油浴中反应~8 h。待反应完全, 用乙醚/石油醚(体积比1:2)的混合溶剂除去未反应的单体, 将得到絮状白色沉淀, 即为产物聚N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)。通过调整合成过程中单体的用量, 可以制备不同分子量的PNIPAAm。将

得到的聚合物于真空干燥箱中烘干, 冷冻保存备用。

2.2.2 牛血清白蛋白的氨基化(BSA-NH₂)

用天平准确称取1,6-己二胺1.5 g配制水溶液, 用5 mol/L浓盐酸将该水溶液调整pH至6.5。随后将pH=6.5的溶液缓慢滴加到含200 mg BSA的水溶液中, 加入EDAC 100 mg后搅拌并进行反应~5 h, 再次加入EDAC 50 mg反应~8 h, 最终将得到氨基化的牛血清白蛋白(BSA-NH₂)溶液。将产物用滤器除掉未溶杂质, 然后透析3天除去未反应的己二胺。过滤冷冻干燥后便得到BSA-NH₂粉末。

2.2.3 合成BSA-NH₂/PNIPAAm缀合物

用磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH=8.0)配制浓度为2000 mg/L的BSA-NH₂溶液5 mL, 然后缓慢滴加5 mL浓度为2000 mg/L的PNIPAAm水溶液, 搅拌反应12 h后用滤器过滤混合溶液, 除掉未溶杂质, 然后透析、过滤、冷冻干燥后便得到BSA-NH₂/PNIPAAm缀合物^[24]。

2.2.4 自组装成膜

将2.2.3节中制备的BSA-NH₂/PNIPAAm加入去离子水中配制成水相溶液, 将得到的水相溶液置于用APTES处理过的玻璃反应容器中。将交联剂5% GA加入油相溶剂(异辛醇)当中, 配制成油相溶液。将油相溶液加入到玻璃反应容器水相溶液中, 油水两相分层, 静置反应~4 h, 使BSA-NH₂/PNIPAAm在油水两相溶液界面中自组装成膜。

2.2.5 BSA-NH₂/PNIPAAm缀合物单层膜调控脂肪酶催化甘油三丁酯

首先, 在用APTES处理过的玻璃反应器中加入含有0.1 mL甘油三丁酯的石蕊水溶液(500 mg/L), 加入1 mL BSA-NH₂/PNIPAAm缀合物(8 mg/L), 观察其水溶液的颜色及测量pH。然后, 在溶液上方加入油相溶液, 静置~4 h后, 逐级稀释移除上层油相溶液, 加入0.2 mL脂肪酶溶液(1 g/L)。最后, 调节溶液温度, 观测溶液颜色变化并拍摄照片, 同时测量溶液pH, 以及上层和下层溶液的荧光发射光谱。

2.2.6 BSA-NH₂/PNIPAAm缀合物单层膜的选择透过性

在用APTES处理过的玻璃反应器中加入含有

0.1 mL甘油三丁酯的石蕊水溶液(500 mg/L), 加入含有浓度为8 mg/L BSA-NH₂/PNIPAAm缀合物1 mL, 观察其水溶液的颜色。然后在溶液上方加入油相溶液, 静置~4 h后, 逐级稀释移除上层油相溶液, 加入FITC标记葡萄糖氧化酶(1 g/L)和未用FITC标记脂肪酶溶液(1 g/L)。调节溶液温度, 观测溶液颜色变化并拍摄照片, 同时测量溶液pH, 以及上层和下层溶液的荧光发射光谱。

2.2.7 脂肪酶水解甘油三丁酯的方法及转换率的计算

在锥形瓶中加入一定量的含有甘油三丁酯的水溶液和一定量的脂肪酶, 调节pH后在一定温度下振荡酶解, 反应结束后沸水浴灭酶10 min, 测定酸值。转化率计算公式如下:

$$\text{转化率} = (\text{AV} - \text{AV}_0) / (\text{SV} - \text{AV}_0) \times 100\%,$$

式中, AV为水解后的酸值, mg KOH/g; AV₀为水解前的酸值, mg KOH/g; SV为甘油三丁酯的皂化值, mg KOH/g。其中, 甘油三丁酯酸值的测定参照GB/T 5530-2005《动植物油脂酸值和酸度的测定》; 甘油三丁酯皂化值的测定参照GB/T 5534-2008《动植物油脂皂化值的测定》。

2.2.8 测试与表征

本实验利用原子力显微镜(AFM)、扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)、荧光光谱仪和动态光散射仪(DLS)等仪器对合成的BSA-NH₂/PNIPAAm基元和产物膜材料的组成、结构和形态, 膜的截留分子量以及调控生物催化反应等进行了表征。

其中AFM与SEM的制样方法为: 将交联后的自组装膜材料转移到洁净的硅片基底表面, 在真空干燥箱中干燥1天即可。TEM的制样方法与之类似, 不同的是将样品置于铜网上进行观察。DLS试验中, 将一定量的不同分子量的BSA-NH₂/PNIPAAm缀合物, 荧光葡聚糖或脂肪酶配制成水溶液加入到检测池中, 将DLS仪器激光入射波长设定为633 nm, 功率为4.0 mW, 测量溶液中粒子的流体力学半径。

3 结果与讨论

利用两亲性BSA-NH₂/PNIPAAm缀合物为基元在油水界面进行自组制备无支撑蛋白质-聚合物缀合物单层膜(简称蛋白质膜), 如图1所示。首先制备一定

图1 (网络版彩图)BSA-NH₂/PNIPAAm蛋白质-聚合物缀合物单层膜材料的制备方法及其调控生物催化反应的示意图

Figure 1 (Color online) Preparation of BSA-NH₂/PNIPAAm protein-polymer conjugate single-layer membrane and its schematic diagram for regulating biocatalytic reaction.

浓度的BSA-NH₂/PNIPAAm水溶液, 取500 μ L加入到内壁修饰APTES的玻璃反应器底部, 然后将溶有5% GA交联剂的异辛醇油相溶液缓慢滴加到该水相溶液上层(图1(a)). 在室温条件下, 静置反应~4 h后, BSA-NH₂/PNIPAAm基元在油水界面通过自组装形成与玻璃反应器连接的蛋白质膜(图1(b)). 采用逐级稀释法, 利用乙醇水溶液(75%, 50%, 25%和0%, 乙醇体积浓度)将上层油相缓慢地稀释并移除, 直至上下两层均为水相溶液时, 即可得到无支撑的BSA-NH₂/PNIPAAm蛋白质膜(图1(c)). 鉴于PNIPAAm的温度响应性, 可以通过改变溶液温度实现对该单层膜上微孔开/关的调节, 从而实现对透过分子量和加入反应剂量的调控, 因此能够用于相对准确地调控生物催化反应的进程(图1(d)和(e)).

为了优化制备油水界面蛋白质单层膜的条件, 我们首先利用单一变量法, 固定BSA-NH₂/PNIPAAm基元中聚合物的分子量(13 kDa), 研究了基元浓度对蛋白质膜厚度的影响, 其中基元浓度包括4, 6, 8, 15, 30 mg/L等. 鉴于膜厚度是衡量所得膜材料是否为单分子层的重要参数, 因此我们利用AFM技术对蛋白质膜的厚度进行了表征. 当基元浓度为4和6 mg/L时, 未能

得到膜材料; 而当浓度提高到8 mg/L时, 通过AFM扫描图可以看到油水界面自组装形成的蛋白质膜具有连续的膜结构, 厚度比较均一(图2(a)). 而当基元浓度继续增加至15 mg/L(图2(b))和30 mg/L(图2(c))时, 可以看到膜表面出现一些颗粒状团聚体, 且浓度为30 mg/L(图2(c))时更加明显. 从AFM高度测量图(图2(d))可以看出蛋白质单层膜的厚度为~4 nm(图2(d)实线), 这与我们利用动态光散射方法(图2(d)插图)检测得到的BSA-NH₂/PNIPAAm基元在水溶液中的尺寸(~5 nm)相符合, 从而证明该自组装膜为单层膜. 而图2(b)和(c)其对应的厚度约为12 nm(图2(d)点线)和13 nm(图2(d)点划线), 样品应为多层膜. 这主要是因为增大BSA-NH₂/PNIPAAm基元的浓度, 使得油水界面上的分子数量增多, 自组装和交联过程中难以得到均匀的单层蛋白质膜. 由此可见, 蛋白质膜的厚度与基元浓度成正相关. 鉴于基元浓度为4和6 mg/L时, 无法得到样品, 因此8 mg/L是可以制备单层膜的最佳浓度.

为了进一步确认制备样品的微观结构, 我们对所得样品(BSA-NH₂/PNIPAAm基元中聚合物的分子量为13 kDa, 浓度为8 mg/L)进行了SEM和TEM表征. 从SEM图(图2(e))中可以看到, 蛋白质膜在干燥后依然能

图 2 (网络版彩图) BSA-NH₂/PNIPAAm基元浓度对制备蛋白质膜厚度的影响. (a)~(c) 不同BSA-NH₂/PNIPAAm浓度((a) 8 mg/L, (b) 15 mg/L, (c) 30 mg/L)制得蛋白质膜的AFM图; (d) 对应(a)~(c)((a) 实线, (b) 点线, (c) 点划线)中白线位置高度图; (e), (f) 蛋白质膜的SEM和TEM图

Figure 2 (Color online) Concentration effect of BSA-NH₂/PNIPAAm on the thickness of prepared protein membrane. (a)~(c) AFM graphs of membranes prepared with different BSA-NH₂/PNIPAAm concentrations ((a) 8 mg/L, (b) 15 mg/L, (c) 30 mg/L); (d) the height profile corresponding to the position of the white lines in (a)~(c) ((a) solid line, (b) dot line, (c) dash dot line); (e), (f) SEM and TEM images of the membrane structure.

够保持膜的完整性, 蛋白膜表面展示出光滑平整且连续的结构, 在膜的边缘位置可以看到与中间位置的蛋白质膜的形态不同, 出现明显的褶皱, 进一步放大可以更清晰地观察到蛋白质膜的褶皱形态(图2(e)插图), 这都证明了该材料具有连续稳定的膜结构. 类似地, TEM照片(图2(f))也能清晰地证明以上结论.

为了更加精确地调控生物催化反应的进程, 即生物酶的剂量调控和生物酶的选择性加入, 我们需要准确地调控生物反应中分子的透过性. 因此, 我们开展

了针对单层膜的截留分子量调控的实验. 鉴于基元中的聚合物部分, 不仅对制备的单层膜的厚度有影响, 而且还会影响膜上的孔径, 从而影响膜的截留分子量, 因此, 我们首先研究聚合物分子量对蛋白质膜厚度的影响, 其中聚合物分子量包括13, 25和96 kDa. 通过AFM表征, 从图3(a)~(c)中可以看到, 在同一浓度条件下(8 mg/L), 虽然改变了聚合物的分子量, 所制得的蛋白质膜仍然具有连续的膜结构, 厚度相对均一. 当基元中的PNIPAAm分子量为13 kDa(图3(a))时, 其成膜对应的厚度为~4 nm(图3(d)实线); 而当其分子量分别增加为25 kDa(图3(b))和96 kDa(图3(c))时, 所成膜的厚度分别为~13 nm(图3(d)点线)和~17 nm(图3(d)点划线), 这与DLS检测所得的基元尺寸较为接近(图3(d)插图), 证明在此浓度下, 虽然增大了聚合物的分子量, 制得的蛋白质膜依旧为单层膜. 然而, 增大聚合物分子量能够明

图 3 (网络版彩图) BSA-NH₂/PNIPAAm基元中聚合物分子量对蛋白质膜厚度的影响. (a)~(c) 不同分子量((a) 13 kDa, (b) 25 kDa, (c) 96 kDa)的BSA-NH₂/PNIPAAm基元制得蛋白质膜的AFM图; (d) 对应(a)~(c)((a) 实线, (b) 点线, (c) 点划线)中白线位置高度图. 所有基元浓度均为8 mg/L

Figure 3 (Color online) The polymer molecular weight effect on the protein membrane thickness. (a)~(c) AFM images of protein membranes prepared by BSA-NH₂/PNIPAAm with different molecular weights ((a) 13 kDa, (b) 25 kDa, (c) 96 kDa); (d) the height profile corresponding to the position of the white lines in (a)~(c) ((a) solid line, (b) dot line, (c) dash dot line). The concentration of the building blocks is 8 mg/L.

显增加蛋白质单层膜的厚度并且影响膜的均匀性。例如, 当聚合物分子量增大到25 kDa时, 膜上出现一些颗粒状聚集体(图3(b)), 这可能是由于大分子量的PNIPAAm在自组装过程中引发的团聚现象。

通过以上实验, 我们成功地制备了基于不同聚合物分子量的BSA-NH₂/PNIPAAm的蛋白质膜。为了明确基元中聚合物分子量对形成蛋白质膜截留分子量的影响, 我们在40℃条件下, 探究了利用不同聚合物分子

量基元制备的膜材料的截留分子量。首先, 我们选取了6种不同分子量的荧光染料作为标记物, 其中70 kDa的荧光染料为Dex-Rb; 7, 10, 20, 40和150 kDa的荧光染料为Dex-FITC。如图4(a)插图所示, 分别将以上6种荧光染料加入到聚合物分子量为13 kDa的蛋白质膜上方的水溶液中, 只有大于70 kDa分子量的荧光染料没有透过蛋白质膜材料, 而被截留在上层溶液。而小于70 kDa分子量的荧光染料透过蛋白质膜材料, 使得下

图4 (网络版彩图) BSA-NH₂/PNIPAAm基元中聚合物分子量对蛋白质膜截留分子量的影响。(a)~(d) 不同基元(基元中聚合物分子量不同)所成膜的截留分子的荧光发射光谱;(e) 不同基元(基元中聚合物分子量不同)与截留分子量关系图;(f) 不同基元(基元中聚合物分子量不同)与截留粒径关系图。BSA-NH₂/PNIPAAm基元浓度均为8 mg/L

Figure 4 (Color online) The effect of building block polymer molecular weight on the cut-off molecular weight of the protein membrane. (a)~(d) Fluorescence spectra of the cut-off molecules; (e) relationship between different building blocks and the cut-off molecular weight; (f) the relationship between the building block molecular weight and the cut-off particle size. The concentration of BSA-NH₂/PNIPAAm is 8 mg/L.

层溶液出现荧光. 我们利用荧光光谱仪对蛋白质膜下层水溶液进行了进一步的确认, 发现加入 70 kDa 荧光分子的下层溶液在 520~620 nm 范围内均没有明显的荧光发射峰(图4(a)), 故当基元中聚合物分子量为 13 kDa 时, 蛋白质单层膜截留分子量约为 70 kDa. 类似地, 当基元中聚合物分子量为 25, 42 和 96 kDa 时, 对应的截留分子量分别约为 40, 20 和 10 kDa. 利用透过之后下层溶液的荧光强度对比加入溶液前的荧光总量, 得到的透过率均大于 97.3%, 从而也体现出单层膜具有较高透过率的优势. 而在 20℃ 条件下开展同样的探究, 发现每一种基元所成的膜的下层水溶液在 520~620 nm 范围内都检测不到荧光吸收, 因为此时蛋白质单层膜处于完全的闭合状态. 这主要是因为随着聚合物分子量的增长, 聚合物的柔性链变长, 能够遮挡住蛋白质膜中的微孔, 从而使得透过分子量逐渐降低. 而温度可以影响蛋白质单层膜的开关是因为 PNIPAAm 是一种温敏型高分子, 它在 32℃ 以下时, 聚合物链段会由于酰胺键与水分子强烈的氢键相互作用而水合膨胀; 当外界温度高于 32℃ 时, 聚合物链段又会因为链段之间非极性的增加而剧烈收缩. 即 32℃ 为其最低临界溶解温度(LCST)^[25]. 在低温下, 聚合物由于强烈的氢键作用水合膨胀, 导致膜上的孔“关闭”, 阻止了渗透物质的通过; 但是在高温下, 聚合物由于非极性作用链段收缩, 从而使膜上的孔“打开”, 这时, 渗透物质便可以自由通过^[26]. 为了明确不同聚合物分子量对制备蛋白质膜的微孔直径的影响, 我们分别测量了不同分子量荧光染料的 DLS 粒径(图4(f)插图), 从而间接统计截留粒径. 对比图4(e), 可以总结出, 当基元中聚合物分子量为 13 kDa 时, 其对应的截留粒径为 ~28 nm; 随着聚合物分子量增长至 25, 42 和 96 kDa 时, 对应的截留粒径逐步下降至 17, 14 和 8 nm(图4(f)). 以上结果能够为下一步选择性地调控生物酶催化反应进程奠定基础.

可控地调节生物反应剂量和催化过程在诸多领域具有重要的意义, 因此我们将制备好的该蛋白质膜材料用于调控脂肪酶催化甘油三酯的反应进程中. 实验中采用的脂肪酶分子量为 39 kDa, 因此我们以 8 mg/L, 聚合物分子量为 13 kDa 的基元来构筑蛋白质膜材料. 鉴于聚合物 PNIPAAm 的温度响应性, 我们首先对蛋白质膜的温度响应性进行探究. 在 20℃ 温度条件下, 当 FITC 标记的脂肪酶加入到蛋白质膜材料的上层溶液

中时, 检测蛋白质膜下层水溶液的荧光光谱, 并没有明显的荧光发射峰; 而当温度升为 40℃ 时, 溶液下层出现明显的绿色荧光和对应的荧光发射峰(图5(a)).

以上实验结果表明, 通过温度变化, 能够有效地调控该蛋白质膜的透过分子量. 为了实现对脂肪酶剂量的精准调控, 我们采用高、低温循环的方式, 调节蛋白质膜孔的开/关, 实现了对脂肪酶高温时(40℃)透过与低温时(20℃)被截留的效果, 从而使得下层水溶液的荧光强度能够随着膜孔开/关状态的改变而逐步升高(图5(b)), 证明该蛋白质膜可以准确地控制脂肪酶透过进程, 即参与催化反应体系的剂量. 为了更好地探究该膜材料对酶催化反应进程的调控, 以及将该过程可视化, 我们在玻璃反应器下层溶液中加入含有甘油三丁酯液滴的石蕊水溶液(pH=7.4), 显蓝色; 而上层为 FITC 标记的脂肪酶水溶液(黄绿色). 当刚刚加入上层溶液时, 在 20℃ 时, 脂肪酶不能够透过蛋白质膜进而催化下层的甘油三丁酯, 溶液颜色无变化(图5(c)-1); 当温度升为 40℃ 时, 脂肪酶能够透过蛋白质膜, 催化下层溶液中的甘油三丁酯液滴分解为甘油和丁酸, 从而降低了 pH(图5(d), 方点), 使得石蕊水溶液变红(图5(c)-2; 图5(d), 三角点), 蓝色逐渐减弱(图5(d), 圆点). 10 min 后, 小分子的丁酸和石蕊溶液扩散到溶液上方, 使得反应器中整体呈现出红色, 可见蛋白质膜对小分子没有截留作用, 而是对大分子具有温感的可调控透过性, 从而精准地调控了脂肪酶的催化反应. 反应结束后, 经计算, 酶催化反应中甘油三丁酯的转化率约为 53.7%; 此外, 将截留在上层溶液中的脂肪酶回收检测其催化活性, 相比于正常储存的脂肪酶其催化效率没有明显下降, 说明该温度变化范围和调控过程对脂肪酶的稳定性影响较小.

类似地, 为了进一步研究蛋白膜材料的选择透过性, 在溶液上层加入脂肪酶与 FITC 标记的葡萄糖氧化酶的混合溶液. 结果表明, 在低温 20℃ 时, 溶液颜色无变化; 当温度升为 40℃ 时, 石蕊水溶液变红. 脂肪酶透过蛋白质膜进入下层溶液, 催化甘油三丁酯液滴分解为甘油和丁酸. 荧光检测结果表明, 在下层溶液中未检测到明显荧光, 而在上层溶液中检测到荧光. 证明在脂肪酶催化过程中, 葡萄糖氧化酶被截留在膜上方, 而未透过蛋白质膜, 从而证明该蛋白质膜可以实现酶的选择透过性. 此外, 将被截留的葡萄糖氧化酶回收测量其荧光强度, 回收率达到 92.7%.

图 5 (网络版彩图)温度控制单层膜孔开关过程和反应调控的表征。(a) 蛋白质膜材料温度响应前后下层溶液的荧光曲线图, 插图为蛋白质膜材料所在溶液的照片; (b) 不同时间条件下, 温度调节蛋白质膜材料开/关, 调控脂肪酶透过率之后下层溶液的荧光强度数据图; (c) 不同反应时间时, 脂肪酶催化甘油三丁酯反应的数码照片图; (d) 脂肪酶催化甘油三丁酯反应过程中溶液颜色强度变化曲线图和pH变化曲线图

Figure 5 (Color online) Characterization of temperature-controlled pore switching process of the mono-layer membrane and the reaction regulation. (a) Fluorescence curves of the lower layer solution before and after the response of the membrane, the insets are photos of the solution where the protein membrane material is located; (b) under different time conditions, the temperature adjusts the switching protein membrane, after adjusting the lipase permeability data graph of the fluorescence intensity of the lower solution; (c) digital photo of the lipase-catalyzed tributyl glycerol reaction at different reaction times; (d) the color intensity curve and pH change plots of lipase-catalyzed tributyl glycerol solution.

4 讨论与结论

本文利用两亲性蛋白质-聚合物缀合物在油水界面自组装的方法成功地制备了单层BSA-NH₂/PNI-PAAm膜。该蛋白质-聚合物缀合物膜具有单分子层的厚度(~4 nm), 从而能够实现较高的透过率。通过调节

蛋白质-聚合物缀合物中聚合物的分子量, 该膜材料的截留分子量可以得到有效调控, 从而为大分子的分离提供了帮助。此外, 基于该膜材料的温度响应功能, 我们成功地对脂肪酶催化甘油三丁酯的反应进程实现了准确调控, 这将在调控生物催化反应和模拟生物膜材料等领域具有广泛的应用。

致谢 感谢哈尔滨工业大学化工与化学学院黄鑫教授、机器人技术与系统国家重点实验室谢晖教授和张号同学在AFM表征方面的讨论和技术支持。

参考文献

- Sheldon R A, Pereira P C. Biocatalysis engineering: The big picture. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 2678–2691
- Wang W H, Wen P F, Xu K L, et al. Research progress of catalytic behavior and adaptive transformation of enzyme proteins in industrial

- environments (in Chinese). *Chin J Bioeng*, 2019, 35: 1857–1869 [王文豪, 闻鹏飞, 许孔亮, 等. 工业环境下酶蛋白的催化行为与适应性改造研究进展. *生物工程学报*, 2019, 35: 1857–1869]
- 3 Yang L R. Research status and development trend of biocatalysis technology (in Chinese). *Biotech Business*, 2016, 4: 22–26 [杨立荣. 生物催化技术研究现状和发展趋势. *生物产业技术*, 2016, 4: 22–26]
- 4 Yang L, Chen Z, Jiang S Q, et al. Research and application of enzymes and their biocatalysis technology (in Chinese). *Biotech Business*, 2019, 3: 25–35 [杨林, 陈志, 姜水琴, 等. 酶及其生物催化技术的研究与应用. *生物产业技术*, 2019, 3: 25–35]
- 5 Wang L, Hortelao A C, Huang X, et al. Lipase-powered mesoporous silica nanomotors for triglyceride degradation. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 7992–7996
- 6 Wang L, Lin Y P, Zhou Y T, et al. Autonomic behaviors in lipase-active oil droplets. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 1067–1071
- 7 Li B, Wang J, Zhou J L. Application of biocatalysis in pesticide synthesis (in Chinese). *China Petrol Chem Stand Qual*, 2018, 38: 113–114 [李博, 汪娟, 周建林. 生物催化在农药合成中的应用. *中国石油和化工标准与质量*, 2018, 38: 113–114]
- 8 Bao M X, Yin Y P, Zhang Y. Research and application of biological enzyme gel breaking process in low temperature reservoir (in Chinese). *Petrochem Ind Appl*, 2019, 38: 49–51 [包敏新, 殷玉平, 张裕. 低温储层生物酶破胶工艺研究与应用. *石油化工应用*, 2019, 38: 49–51]
- 9 Lan H O, Ke Y Q, Ma X Y, et al. Application of recombinase polymerase isothermal amplification technology in the field of food safety inspection (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2019, 14: 233–238 [兰海鹞, 柯义强, 马咸莹, 等. 重组酶聚合酶等温扩增技术在食品安全检测领域的应用. *食品与发酵工业*, 2019, 14: 233–238]
- 10 Wang R Q, Chen D Z, Wei S S, et al. Research progress and application of enzymes in the food industry (in Chinese). *China Condiment*, 2019, 4: 184–186 [王瑞琴, 陈德昭, 韦尚升, 等. 酶在食品工业中的研究进展及应用. *中国调味品*, 2019, 4: 184–186]
- 11 Huang C E. Exploring the application of modern biotechnology in environmental testing (in Chinese). *Sci Tech Innov*, 2014, 11: 154–155 [黄春娥. 探析环境检测中现代生物技术的应用. *科技与创新*, 2014, 11: 154–155]
- 12 Zhang Q. Application of modern biotechnology in environmental testing (in Chinese). *Sci Tech*, 2013, 22: 322 [张青. 现代生物技术在环境检测中的应用. *科技与企业*, 2013, 22: 322]
- 13 Liu Y P, Zhang Y, Jiang H, et al. Effect of lipase treatment on the surface properties of wheat straw fiber (in Chinese). *J Northeast Forest Univ*, 2009, 37: 46–47 [刘艳萍, 张洋, 江华, 等. 脂肪酶处理对麦秸纤维表面性能的影响. *东北林业大学学报*, 2009, 37: 46–47]
- 14 Peng G F. Effect of enzyme dosage on the performance of enzyme treatment of Masson bleach bleached sulfate pulp (in Chinese). *Paper Sci Tech*, 2009, 28: 23–27 [彭贵福. 酶用量对酶处理马尾松漂白硫酸盐浆性能的影响. *造纸科学与技术*, 2009, 28: 23–27]
- 15 Tian C, Shi Y, Zhai B Y, et al. Cellulase and xylanase treatment to improve the performance of dissolving pulp (in Chinese). *China Pulp Paper*, 2018, 37: 1–6 [田超, 石瑜, 翟丙彦, 等. 纤维素酶和聚木糖酶处理改善溶解浆性能的研究. *中国造纸*, 2018, 37: 1–6]
- 16 Zhang F, Wang H, Jiang B, et al. Droplet microfluidic enzyme catalysis of mulberry flavonoid rutin directed sugar modification (in Chinese). *Sci Sericul*, 2019, 45: 0732–0739 [张凡, 王华, 江波, 等. 桑树黄酮苷芦丁定向糖基改造的液滴微流控酶催化研究. *蚕业科学*, 2019, 45: 0732–0739]
- 17 Li H, Pan Y, Farmakes J, et al. A sulfonated mesoporous silica nanoparticle for enzyme protection against denaturants and controlled release under reducing conditions. *J Colloid Interface Sci*, 2019, 556: 292–300
- 18 M'Bareck C O, Nguyen Q T, Alexandre S, et al. Fabrication of ion-exchange ultrafiltration membranes for water treatment. *J Membrane Sci*, 2006, 278: 10–18
- 19 Zhang K, Huang H Y, Yang G C, et al. Characterization of nanostructure of stimuli-responsive polymeric composite membranes. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 1248–1255
- 20 Hu K, Dickson J M. Development and characterization of poly(vinylidene fluoride)-poly(acrylic acid) pore-filled pH-sensitive membranes. *J Membrane Sci*, 2007, 301: 19–28
- 21 Tong G S, Liu T, Zhao L, et al. Supercritical carbon dioxide-assisted preparation of polypropylene grafted acrylic acid with high grafted content and small gel percent. *J Supercritical Fluids*, 2009, 48: 261–268
- 22 Abu Seman M N, Khayet M, Bin Ali Z I, et al. Reduction of nanofiltration membrane fouling by UV-initiated graft polymerization technique. *J Membrane Sci*, 2010, 355: 133–141
- 23 Guo H, Ulbricht M. Preparation of thermo-responsive polypropylene membranes via surface entrapment of poly(N-isopropylacrylamide)-containing macromolecules. *J Membrane Sci*, 2011, 372: 331–339
- 24 Huang X, Li M, Green D C, et al. Interfacial assembly of protein-polymer nano-conjugates into stimulus-responsive biomimetic protocells. *Nat*

[Commun](#), 2013, 4: 2239

- 25 Zhou P, Liu X, Wu G, et al. Programmable modulation of membrane permeability of proteinosome upon multiple stimuli responses. [ACS Macro Lett](#), 2016, 5: 961–966
- 26 Jiang P, Wu Y Q. Preparation and application of temperature and pH responsive polymer smart membrane (in Chinese). *Sci Tech Rev*, 2016, 36: 22–30 [江萍, 吴义强. 温度和pH响应型高分子智能膜的制备及应用. *科技导报*, 2016, 36: 22–30]

Single-layer BSA-NH₂/PNIPAAm membrane with modulated lipase biocatalytic reaction

SUN ZhaoLing, LIN YouPing & WANG Lei

MIIT Key Laboratory of Critical Materials Technology for New Energy Conversion and Storage, School of Chemistry & Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology (HIT), Harbin 150001, China

Biocatalysis, utilizing enzymes or live microbial cultures to catalyze or speed up specific or cascade reactions, has broad applications in the manufacturing of fine chemicals, pharmaceuticals, and agrochemical intermediates. However, how to effectively adjust the biocatalytic process and the dose of enzymes during the reaction becomes one intriguing issue to be addressed. Smart porous membranes are desirable candidates for regulating substance permeability, which provides the possibility to adjust the biocatalysis. Herein, inspired by the temperature-sensitive stomatal size of plant leaves, we prepare a free-standing single-layer membrane through the self-assembly at oil-water interface, which is composed of thermosensitive amphiphilic protein-polymer conjugates, i.e., BSA-NH₂/PNIPAAm (poly(N-isopropylacrylamide)). The membrane thickness is only about 4 nm, with a wide range of molecular cut-offs by tuning the molecular weight of PNIPAAm. Moreover, by virtue of the property of PNIPAAm, the pore size of the membrane could be tunable by changing temperature, through which the catalytic reaction of triglyceride by lipase was successfully controlled. Taken together, this work not only provides a simple method for preparing single-layer protein hybrid membranes, but also offers great potential applications in the controlled biocatalysis, smart gating systems and molecular separation.

protein-polymer conjugate, self-assembled membrane, free-standing membrane, thermosensitive materials, biocatalysis

doi: [10.1360/SST-2020-0075](https://doi.org/10.1360/SST-2020-0075)