

文章编号: 1001—411X (2001) 02—0059—03

壳聚糖—丝素合金膜的制备及性状研究

纪平雄¹, 侯 王君¹, 徐凤彩²

(1 华南农业大学蚕业服装系, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学生物技术学院, 广东 广州 510642)

摘要: 以壳聚糖和丝素 2 种高分子物质溶液按最适比例混合, 再加入戊二醛后, 在聚乙烯薄膜上均匀涂布, 真空干燥成合金膜, 并对合金膜的外观、溶胀度、酶固定化效果等性状做了研究. 结果表明, 壳聚糖—丝素合金膜的柔韧性好, 在不同 pH 值下的溶胀度稳定, 具有亲水性强, 含游离氨基多等优点, 是固定化酶尤其是固定化荷电负性酶的优良载体.

关键词: 壳聚糖—丝素合金膜; 制备; 性状

中图分类号: Q55

文献标识码: A

壳聚糖和丝素这 2 种物质都可以作为固定化酶的载体^[1,2]. 但是, 单纯的丝素膜吸水性和机械性能较差. 特别是丝素膜的等电点在 4.5 左右, 当溶液的 pH>4.5 时, 丝素膜带负电, 不利于与荷电负性的酶相结合^[3]. 同时, 单纯的壳聚糖膜固定化酶的效果也不十分理想. 因为, 由壳聚糖结构式看, 虽含有较多的氨基和羟基, 但由于在纯壳聚糖膜中分子链间存在很强的氢键相互作用, 形成较为规整的链状结构, 自由的氨基并不多^[4]. 丝素中含有丰富的酰胺基和少量羟基, 可与壳聚糖形成氢键, 破坏壳聚糖链本身之间的氢键, 使壳聚糖中的一部分氨基得以自由. 因此, 将丝素和壳聚糖这两种天然高分子物质共混, 制成合金膜, 就可克服单一组分膜的缺点. 特别是壳聚糖中的氨基具荷正电性, 与丝素共混后可中和丝素的荷负电性, 对于固定荷电负性酶尤其具有特殊的作用. 本文报道了壳聚糖—丝素合金膜的制备方法及其性状.

1 材料与方法

1.1 材料

茧壳, 由华南农业大学蚕业服装系提供; 壳聚糖, 脱乙酰度 93.28%, 粘度 ≤ 50 mPa·s, 广州凯利生物制剂制品厂出品; φ 为 25% 戊二醛溶液, 国产分装, 上海化学试剂采购供应站分装厂分装; 其余试剂均为生化试剂或分析纯试剂.

1.2 方法

(1) 再生丝素的制备: 按黄晨等的方法稍作改进^[5]. 将茧壳剪碎, 取 1 g 置 50 mL 的 5 g/L Na_2CO_3 水溶液中加热煮沸 1 h, 取出, 用蒸馏水冲洗干净, 干燥.

脱胶率 = $[(m_{\text{茧壳}} - m_{\text{脱胶茧壳}}) / m_{\text{茧壳}}] \times 100\%$.

取脱胶后的茧丝即丝素, 1 g 在 5 mL 物质的量比为 $\text{CaCl}_2 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 2 : 8$ 的盐溶液中 80℃ 水浴溶解, 将溶解得到的丝素溶液用多层棉纱布过滤, 除去杂质, 待冷却后灌入透析袋中, 并置于流水下透析 3 昼夜脱盐. 将脱盐的丝素溶液在 2 600 r/min 离心 3 min, 除去沉淀, 冷冻干燥, 制成冻干粉, 低温防潮保存备用.

(2) 壳聚糖—丝素合金膜的制备: 壳聚糖的处理按王炜军等^[1]方法. 取一定量处理的壳聚糖于蒸馏水中搅拌溶解, 1 000 r/min 离心 3 min, 除去不溶物. 同样, 溶解一定量的再生丝素冻干粉, 按一定比例将 2 种溶液混合, 加入一定量的戊二醛, 均匀涂布在聚乙烯薄膜上, 真空干燥成膜. 在立体电镜下测定膜的厚度. 将干燥至恒质量的膜浸泡于蒸馏水中, 常温溶胀 24 h 后取出, 用吸水纸迅速擦干膜表面的液体, 称质量. 按下式计算溶胀度: 溶胀度 = $[(m_{\text{溶胀膜}} - m_{\text{干膜}}) / m_{\text{干膜}}] \times 100\%$.

2 结果

2.1 壳聚糖—丝素合金膜的制备

2.1.1 壳聚糖和丝素的浓度 将 ρ 分别为 20、40、60 g/L 的壳聚糖和丝素溶液以 5:1 的体积比混合, 加入终浓度 φ 为 0.25% 的戊二醛溶液, 搅拌均匀后倒在聚乙烯薄膜上, 真空干燥. 所成膜中, 以 ρ 为 20 g/L 混合液成膜性最好, 浓度越高所成的膜中气泡越多, 膜的柔韧性和延展性越差.

2.1.2 壳聚糖与丝素的比例 将 20 g/L 的壳聚糖 (CS) 和 20 g/L 的丝素 (FB) 溶液以体积比分别为 1:1、

2:1、3:1、4:1、5:1 的比例混合,其他条件与 2.1.1 中的成膜条件相同,制成混合比不同的合金膜载体。取等量(0.05 g)上述各载体,加入活力为 38 U/mL、蛋白质含量为 9.7 μg/mL 自制的柞蚕蛹血淋巴 SOD 制备固定化酶,测定酶活力和酶活力回收,结果见图 1。

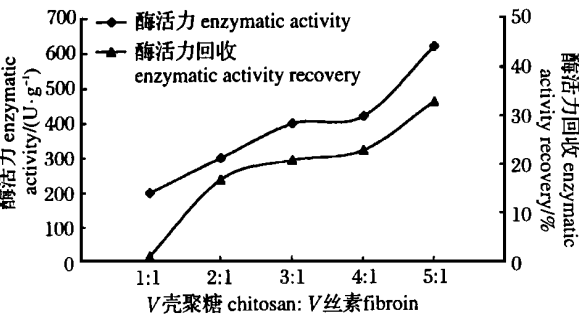


图 1 不同 FB 与 CS 比例所成膜的固定化酶活性

Fig. 1 Immobilized enzymatic activity of film made by different ratio of chitosan and fibroin

图 1 显示,随着混合液中壳聚糖成分的增多,固定化酶的酶活力和酶活力回收增高,考虑到壳聚糖所占混合液中的比例再增加后所成膜的柔韧性、延展性反而降低这一因素,以混合比为 5:1 的壳聚糖-丝素混合液成膜效果最好。

2.1.3 戊二醛的浓度 在与 2.1.1 的成膜及固定化条件相同的情况下,加入终浓度 φ 分别为 0、0.125%、0.250%、0.500%、1.000% 的戊二醛溶液,测定不同戊二醛浓度所成膜的固定化酶的酶活力和酶活力回收。图 2 可见,当 φ(戊二醛)低于 0.250% 时,固定化酶的酶活力和酶活力回收随戊二醛浓度的增高而增大。但随着戊二醛浓度的进一步升高,固定化酶的酶活力和酶活力回收均减少。由于戊二醛可破坏壳聚糖分子链间的氢键,使部分氨基得以自由,增加酶分子的吸附量,因而随戊二醛浓度的增高,固定化酶的酶活力和酶活力回收增大,直至当 φ(戊二醛)为 0.250% 时,固定化酶的酶活力和酶活力回收达到最高,分别为 91.36 U/g 载体和 49.5%。随 φ

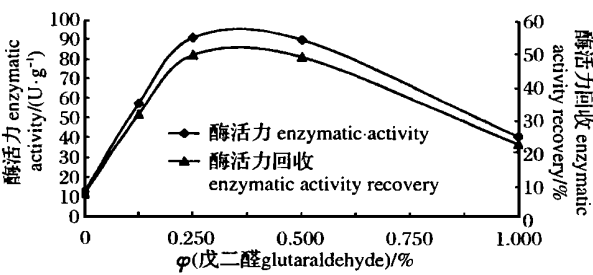


图 2 不同戊二醛浓度固定化效果

Fig. 2 The effect of enzymatic immobilization by different glutaraldehyde concentration

(戊二醛)达到 0.5% 以上时,固定化酶的酶活力和酶活力回收反而下降。这可能是一方面壳聚糖的氨基数量有限,另一方面戊二醛会使部分酶蛋白变性,导致酶活力和酶活力回收的下降。

2.2 壳聚糖-丝素合金膜的性状

2.2.1 壳聚糖-丝素合金膜的外观形态 按上述方法制得的壳聚糖-丝素合金膜为淡黄色透明薄膜,用 Olympus SZH 立体镜(2.5×300 倍)观察,膜的厚度为 1.3 μm(图 3)。



图 3 合金膜横截面照片

Fig. 3 The cross section's photograph of chitosan-fibroin blend membranes

2.2.2 壳聚糖-丝素合金膜的溶胀度 壳聚糖-丝素合金膜于蒸馏水中溶胀后测定溶胀度,结果见表 1。从表 1 可知所制得的壳聚糖-丝素合金膜的平均溶胀度为 75.1%。

表 1 壳聚糖-丝素合金膜的溶胀度

Tab. 1 Swelling ratio of chitosan-fibroin blend membranes

处理 treatment	m 干膜/ g	m 溶胀膜/ g	SR/ %
1	0.064 8	0.112 9	74. 2
2	0.059 4	0.108 7	83. 0
3	0.072 8	0.122 3	68. 0

另由 6 组各 0.05 g 壳聚糖-丝素合金膜,分别浸泡于 pH 值依次为 5.8、6.3、6.8、7.3、7.8、8.3 的缓冲液中,室温下溶胀 1 d 后,膜的溶胀度分别为 71.6%、55.2%、62.6%、56.0%、60.4% 和 62.6%,可见在这 6 种 pH 值下,膜的溶胀度在 55%~72% 之间,溶胀度比较稳定。

2.2.3 壳聚糖-丝素合金膜的粘度 用旋转式粘度计测得 20 g/L 壳聚糖的粘度为 6 mPa·s, 20 g/L 丝素的粘度为 4 mPa·s,合金膜成膜前的粘度为 9.5 mPa·s。

3 讨论

本实验以来源丰富、性能独特的壳聚糖和丝素 2 种天然高分子物质为原料,按一定比例混合后,在聚乙烯薄膜上真空干燥成膜。所制得的膜透明度好,有

一定的韧性,特别是含有较多的游离氨基,为固定化酶提供了优良的载体。

在壳聚糖-丝素合金膜的制备过程中,首先要将包裹在丝素外层的丝胶脱去,脱胶完全后,再用CaCl₂、乙醇和水的混合液溶解丝素,最后将丝素溶液制成冻干粉备用。该法制得的丝素粉可长时间存放而不会引起丝素蛋白变性,既简化了操作过程,又便于调整再生丝素溶液的浓度。为了制备柔韧性好,固定化效率高的壳聚糖-丝素合金膜,壳聚糖和丝素的浓度及它们的混合比是关键。浓度过高,膜的柔韧性差,成膜效果不好。浓度过低,混合液难以干燥,延长了实验操作时间。若壳聚糖含量过多,丝素含量少,并不能增加游离氨基的含量还造成了原料的浪费。反之,丝素含量过多,则易阻碍酶的吸附及底物与酶结合,所以在经过多次试验后,采用20 g/L的壳聚糖和20 g/L的丝素按5:1的体积比混合进行干燥。同时,在干燥前向混合液中加入 φ 为0.250%的戊二

醛,以更多地破坏壳聚糖链本身之间的氢键,获得更多的自由氨基,从而提高酶的固定化效果和固定化酶的反应能力。

参考文献:

- [1] 王炜军,徐凤彩.脱氨再生几丁质凝胶亲和柱层析纯化溶菌酶[J].华南农业大学学报,1996,17(3):59-63.
- [2] 陈建勇,刘冠峰,沈之醛.丝素膜上药物渗透量对溶液pH值的响应[J].功能高分子学报,1997,10(3):387-392.
- [3] ASAKURA T, YOSHIMIZU H, KAKIZAKI M. Study of spin-labeled silk fibroin membranes and spin-labeled glucose oxidase immobilized in silk fibroin membranes[J]. Biotechnol, 1990, 35(5): 511-517.
- [4] STANLEY W, WATERS G, KENLY S. Glucoamylase immobilized on chitin with glutaraldehyde[J]. Biotechnol, 1978, 20(1): 135-140.
- [5] 黄晨,徐新颜,黎群.丝素作为固相酶载体的研究[J].安徽农业大学学报,1996,23(1):43-46.

Studies on Preparation and Properties of Chitosan-Fibroin Blend Membranes

JI Ping-xiong¹, HOU Jun¹, XU Fen-cai²

(1 Dept. of Sericulture and Fashion Design, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstracts: Mixed with chitosan and fibroin solution in suitable volume proportion and dried together with glutaraldehyde, the blend membranes was prepared. The thickness of the membrane was 1.3 μm. Because of the good characters of pliable and tough, stability of swelling ratio and comprising abundant amino groups, the blend membranes were good carrier for immobilizing enzyme, especially those with negative charge.

Key words: chitosan-fibroin blend membranes; preparation; properties

【责任编辑 周志红】