

一种球形纤维素/钛白粉扩张床吸附剂的研究 ——组成对性能的影响*

雷引林^{1,2} 林东强¹ 姚善泾^{1**} 朱自强¹

(¹ 浙江大学化学工程与生物工程系 杭州 310027)

(² 浙江大学宁波理工学院生物与制药工程系 宁波 315100)

摘 要 采用反相悬浮再生法,以超细钛白粉颗粒作增重剂,包埋于纤维素骨架之中,经环氧氯丙烷活化后与二乙胺连接,制得一种球形扩张床吸附剂.研究表明,吸附剂的密度、机械强度和孔结构可以随钛白粉用量的变化而改变;钛白粉颗粒的掺入有利于基质的活化,活化后环氧基含量可达 220 $\mu\text{mol/mL}$. 吸附剂具有良好的扩张床性能,扩张床中的蛋白质吸附行为与填充床中相似,吸附容量为 48.9 mg 牛血清白蛋白/mL 吸附剂.

关键词 纤维素, 钛白粉, 复合微球, 扩张床吸附, 蛋白质

扩张床吸附(Expanded bed adsorption, EBA)技术能直接从发酵液、细胞培养液或匀浆液中捕获目标产物,集固液分离、浓缩和初期纯化于一个操作单元之中,近年来在生物工程下游过程中的应用十分广泛^[1,2]. 吸附剂是 EBA 过程的关键,为达到接近于填充床的分离效率,必须确保吸附剂颗粒在扩张床内能够适度膨胀,并停留在各自特定的位置.因此,需要对扩张床吸附剂进行特殊的设计,譬如密度、粒径及其分布、功能基团种类及其数量等^[3].

纤维素是自然界中最丰富的天然高分子,价格低廉,由此制备出的球形基质具有良好的亲水性和大孔特征,易于活化、衍生出各类吸附剂,在生物工程领域应用十分广泛^[4]. Gilchrist 等^[5]曾采用纤维素作基质骨架,复合钛白粉微粒制备出扩张床吸附剂,但这种基质系经过研磨、筛分而得,具有不规则的形状,这将降低过程的稳定性,并可能导致重复性不佳的洗脱行为.

我们曾采用经典的“反相悬浮热再生”法,以超细钛白粉作增重剂,包混于纤维素黄原酸酯黏胶之中,再生得到了纤维素/钛白粉复合微球,并研究了它在扩张床中的流体力学性能^[6]. 本文拟以此微球为 EBA 的基质,经环氧氯丙烷活化后与二乙胺偶联,制备出一种扩张床吸附剂,然后测试该吸附剂的扩张床性能和蛋白质吸附能力,为随后的实际应用提供必要的数据.经典的纤维素两

相共存学说认为,纤维素结构中存在分子链紧密排列的结晶区和分子链疏松堆砌的无定形区,两相的化学反应能力悬殊^[7]. 超细钛白粉颗粒的掺入有可能影响再生纤维素的两相结构,因此本文还将讨论钛白粉用量对微球活化反应的影响.

1 实验部分

1.1 材料

纤维素黄原酸酯黏胶,粘度 $4 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$ cSt,纤维素含量 7.5% (W/W),自制;钛白粉,金红石型,0.2 ~ 0.4 μm ,华东理工大学气流粉碎中心;牛血清白蛋白(BSA)、Tris,上海生工生物工程有限公司;Streamline DEAE,瑞典 Amersham Biosciences 公司;其余均为市售化学纯.

1.2 微球制备

取 100 g 黏胶和一定量的钛白粉,混合均匀,加入到含有 200 mL 氯苯和 400 mL 泵油的三口烧瓶中,搅拌分散 0.5 h,升温至 90 $^{\circ}\text{C}$,保温 1.5 h 固化成球.热水洗涤微球数次,并于醋酸-甲醇溶液中充分再生,水洗后筛取 100 ~ 300 μm 组分.

1.3 活化与偶联

取 6 mL 微球,加入 12 mL 3.0 mol/L NaOH 溶液和 2.4 mL 环氧氯丙烷,25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 8 h;反应物经丙酮抽提后测定环氧基含量^[8]. 取活化微球 6 mL,加入 18 mL 二氧六环和 18 mL 二乙胺,55 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h,得到扩张床吸附剂 Cell-Ti DEAHP

* 2003-01-06 收稿,2003-03-06 修稿;国家自然科学基金资助项目(基金号 20206029)和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目;

** 通讯联系人

(Diethylaminohydroxypropyl). 制备路线如图 1 所示.

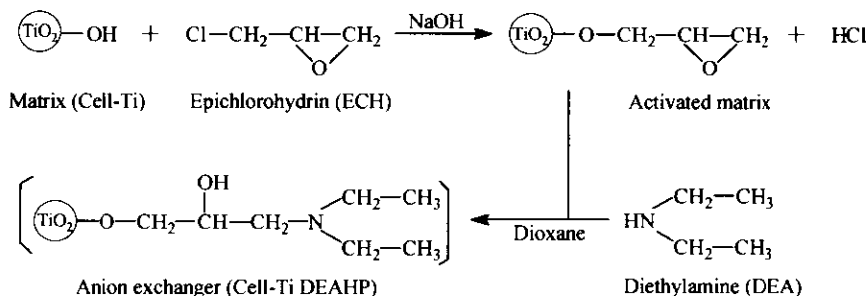


Fig. 1 Preparation scheme of anion adsorbent Cell-Ti DEAHP

1.4 吸附等温线

取 14 mL 吸附剂,用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)缓冲液平衡,分为 7 等分,各加入 50 mL 不同 BSA 浓度的缓冲液,30℃下振荡 8 h,测定蛋白质浓度,根据物料衡算绘制出吸附等温线.

1.5 扩张床性能

实验采用 Streamline 25 扩张床 (Amersham biosciences).扩张率 E 定义为床层扩张高度 H 与填充高度 H_0 之比.测定一系列流速下的扩张率,以衡量吸附剂的扩张床性能.

1.6 蛋白质吸附曲线

分别取 20 mL 和 75 mL 吸附剂,注入到 XK 16/20 层析柱和 Streamline 25 扩张床中,用缓冲液平衡后进样,测定流出液中的蛋白质浓度,得到吸附曲线.

1.7 表征方法

离子交换容量测定采用 HCl-NaOH 滴定法;湿真密度(ρ_p)测定采用水替换法;烘干收缩率(Sr)定义为 $Sr = (V_1 - V_2)/V_2$,其中 V_1 、 V_2 分别为烘干前后微球的体积;孔比表面积(S)测定采用次甲基蓝吸附法^[9];湿态孔度(P)和孔容(V)由含水率(ω)、水密度(ρ_w)及 ρ_p 计算而得^[10]: $P = \rho_p \times \omega / \rho_w$, $V = \omega / (1 - \omega)$;红外图谱分析采用 KBr 压片法.

2 结果与讨论

2.1 钛白粉用量对基质物理性质的影响

首先研究了复合微球的一些物理性质随制备时钛白粉添加量的影响,结果如图 2 所示.研究表明,随着钛白粉用量的增加,微球的密度几乎成线性增加,说明钛白粉颗粒能有效地包埋到纤维素骨架之中,确实起到了增重的作用.而微球的含水率、孔度、孔容和收缩率则随钛白粉用量的增加而

下降,这主要是由于钛白粉颗粒占据了微球的一部分空间,另外还起到了一定的支撑作用,阻碍了纤维素高分子链失水时进一步收缩.值得关注的是比表面积存在一个峰值,暗示出在钛白粉用量较少时,再生纤维素高分子链可以包附在超细颗粒周围,导致大量微孔的形成;而钛白粉用量过大反而会占据一部分孔道,导致比表面积的下降.

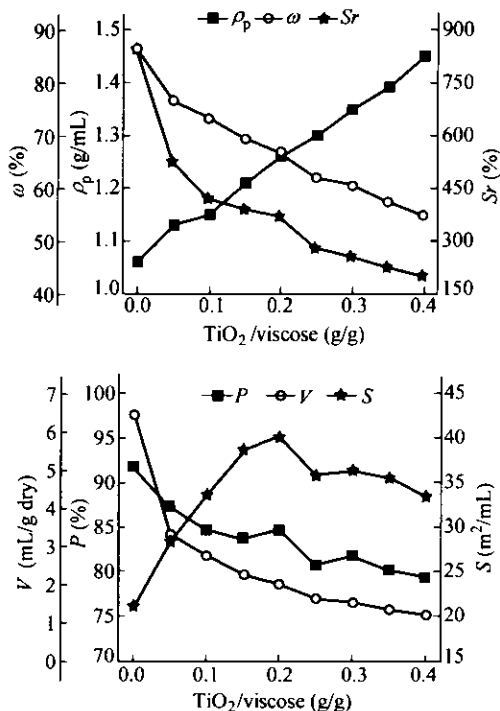


Fig. 2 Effects of TiO₂ dosage on physical properties of composite beads

a) ω , ρ_p and Sr ; b) V , S and P

2.2 钛白粉用量对活化反应的影响

如前所述,钛白粉超细颗粒的掺入,可能会改变再生纤维素的“两相结构”的比例,进而影响到环氧活化时的反应能力.先固定钛白粉的用量为

黏胶重量的 10%，并以不加钛白粉时的纤维素微球作对照，考察了在相同反应条件下活化效果随反应时间的变化(图 3)。结果显示钛白粉的掺入导致活化微球的环氧基含量大幅增加，达到最大活化量所需的反应时间也缩短 1~2 h，说明超细颗粒的加入使再生纤维素中产生了更多的“无定形区”，有助于活化反应的进行。图 4 进一步比较了不同钛白粉用量时的活化效果(反应时间为 8 h)，结果表明环氧基含量随钛白粉用量的变化也存在一个峰值，这与微球比表面积随钛白粉用量的变化规律是一致的。因此，本文选取 TiO_2 与黏胶重量比为 0.1 作为最佳条件进行偶联反应制备吸附剂。

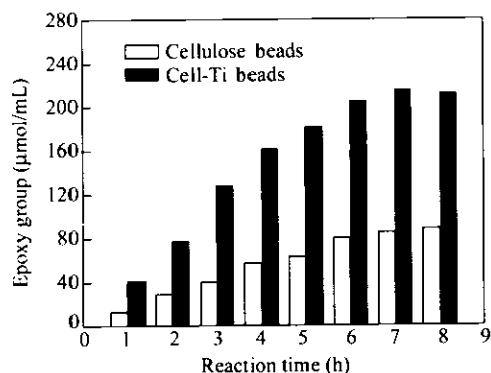


Fig. 3 Activation results at serial reaction times

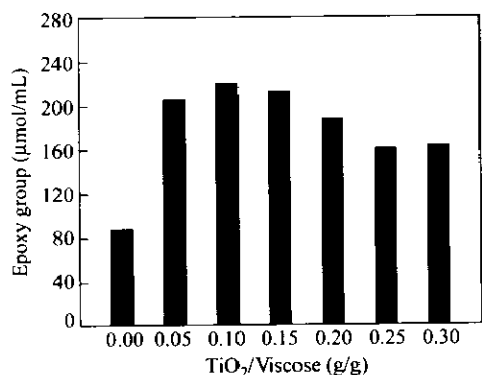


Fig. 4 Effect of TiO_2 dosage on activation reaction

2.3 红外图谱

对比纤维素微球 (Cellulose)、复合微球 (Cell-Ti)、活化微球 (Cell-Ti ECH) 和吸附剂 (Cell-Ti DEAHP) 的红外吸收图谱(图 5)，发现 Cell-Ti 在 682 cm^{-1} 处有强烈的吸收，这主要是 $\text{Ti}-\text{O}$ 的伸缩振动引起的；Cell-Ti ECH 在 1244 、 937 和 852 cm^{-1} 处有吸收峰，这是环氧基的特征峰；而

Cell-Ti DEAHP 在这些位置没有吸收峰，间接说明了环氧基在与二乙胺反应时消耗殆尽(三级胺中 $\text{C}-\text{N}$ 的吸收峰易与 $\text{C}-\text{C}$ 的吸收峰重叠)。因此，红外图谱分析印证了制备过程中各阶段反应的有效性。

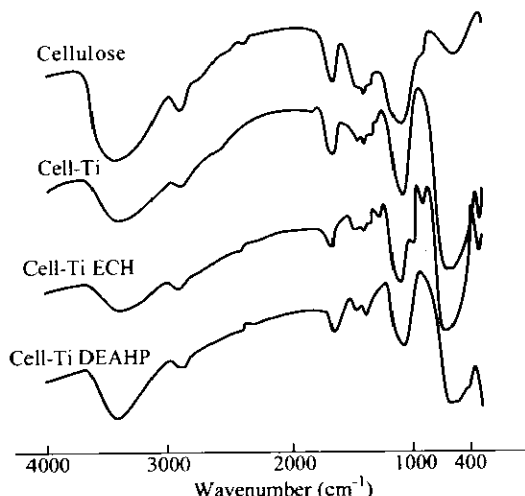


Fig. 5 Infrared spectra of beads at various stages

2.4 吸附等温线

表 1 列出了所制备的两种吸附剂的理化性质，并与商用扩张床吸附剂 Streamline DEAE 作比较。其中，Cell-Ti-2 DEAHP 由于具有更高的纤维素含量，可使更多的羟基被活化、利用，因而其交换容量比 Cell-Ti-1 DEAHP 高。进而研究了上述 3 种吸附剂对 BSA 的吸附等温线，结果发现三者都符合 Langmuir 等温式(图 6)。对实验数据进行拟合，求出 Cell-Ti-1 DEAHP 的平衡吸附容量 Q_m 为 47 mg/mL ，解离常数 K_d 为 0.35 mg/mL ；Cell-Ti-2 DEAHP 的 Q_m 为 61 mg/mL ， K_d 为 0.11 mg/mL ，与 Streamline DEAE 的 $Q_m = 69\text{ mg/mL}$ 、 $K_d = 0.04\text{ mg/mL}$ 相差不大，说明适当增加基质中纤维素的含量可以制备出吸附容量更高的吸附剂。

2.5 扩张床性能

在一系列流速下测试了吸附剂的扩张率(图 7)，流动相为蒸馏水，起始床层高度 $H_0 = 15.0\text{ cm}$ 。结果证明吸附剂具有很好的扩张床性能；应该指出，当扩张率为 2.5 时，Cell-Ti-2 DEAHP 的操作流速为 480 cm/h ，高于 Streamline DEAE 的 340 cm/h ，说明前者能够满足更高操作流速的需要。

2.6 蛋白质吸附曲线

比较了 Cell-Ti-2 DEAHP 和 Streamline DEAE

Table 1 Physicochemical properties of adsorbents

Adsorbent	ρ_p (g/mL)	ω (%)	S_r (%)	P (%)	V (mL/g)	S (m ² /mL)	Ion capacity (meq./mL)
Streamline DEAE	1.16	74.3	345	86.4	2.89	45.7	0.22
Cell-Ti-1 DEAHP	1.16	75.2	435	87.5	3.03	—	0.17
Cell-Ti-2 DEAHP	1.18	74.1	420	87.4	2.86	33.6	0.20

Note: TiO₂/viscose (W/W) = 10/100, cellulose in viscose 6.0% for Cell-Ti-1 and 7.5% for Cell-Ti-2

在填充床和扩张床中的蛋白质吸附行为,结果见图 8(BSA 浓度 $c_0 = 1.0$ mg/mL).发现在相同的操作流速下,两者的扩张床吸附行为与填充床中的情形都很相似,证实了扩张床内的流动性能接近于填充床.定义 10% 穿透时的吸附容量为 Q_{b1} ,

100% 穿透时的吸附容量为 Q_{b2} ,将两者的吸附曲线进行比较,结果列于表 2,说明 Cell-Ti-2 DEAHP 的扩张床吸附性能与商用吸附剂相当.

综合上述实验结果,通过反相悬浮热再生法,将超细钛白粉包埋于纤维素骨架之中,经环氧

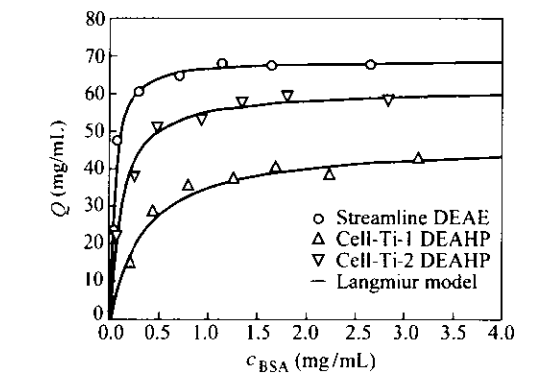


Fig. 6 BSA adsorption isotherms

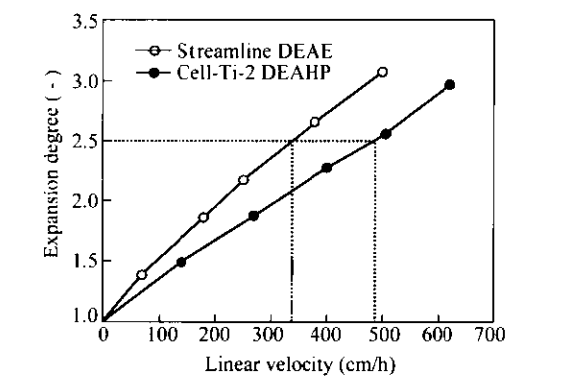


Fig. 7 Expansion degrees at serial flow rates

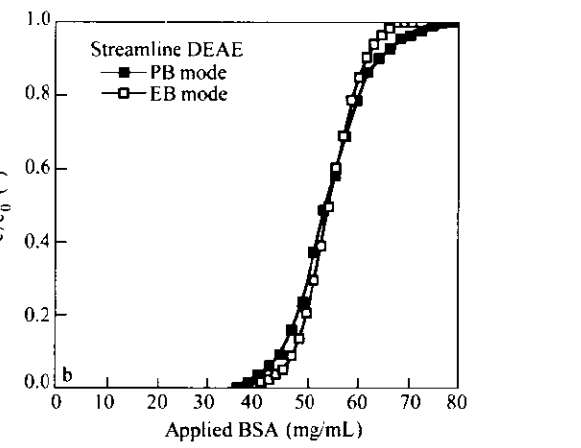
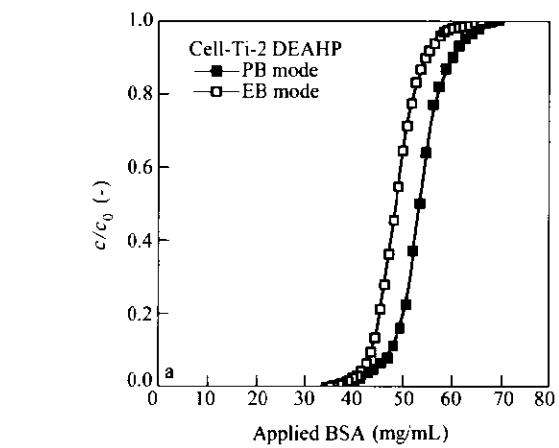


Fig. 8 BSA breakthrough curves in packed and expanded beds
a) Cell-Ti-2 DEAHP; b) Streamline DEAE

Table 2 Comparison of breakthrough capacities in packed and expanded beds

Adsorbent	U (cm/h)	Mode	Q_{b1} (mg/mL)	Q_{b2} (mg/mL)	Q_{b1}/Q_{b2}	Q_{b1}/Q_m
Streamline DEAE	270	PB	45.0	54.0	0.83	0.65
		EB	47.0	54.2	0.87	0.68
Cell-Ti-2 DEAHP	410	PB	47.0	53.4	0.88	0.77
		EB	42.6	48.9	0.87	0.70

Note: PB-packed bed; EB-expanded bed

氯丙烷活化后与二乙胺反应,制得了一种球形扩张床吸附剂.研究表明,钛白粉颗粒不仅起到了增加基质密度的目的,还有利于基质的活化;适当增加基质中纤维素的含量,可以得到交换容量更大

的吸附剂.钛白粉与黏胶重量比为 0.1,黏胶中纤维素含量为 7.5% 时,所制备的吸附剂具有很好的扩张吸附性能,能够满足扩张床过程较高操作流速的需要.

REFERENCES

- 1 Hjorth R. Trends Biotechnol, 1997, 15: 230 ~ 235
- 2 Hu H B(胡洪波), Lin D Q(林东强), Ye Z J(叶子坚), Mei L H(梅乐和), Yao S J(姚善泾), Zhu Z Q(朱自强). J Chem Eng Chinese Univer (高等学校化学学报), 2000, 14: 139 ~ 144
- 3 Lei Y L(雷引林), Yao S J(姚善泾), Liu Z Z(刘坐镇), Zhu Z Q(朱自强). J Funct Polym(功能高分子学报), 2002, 15: 219 ~ 224
- 4 Štamberg J. Sep Purif Methods, 1988, 17: 155 ~ 183
- 5 Gilchrist G R, Burns M T, Lyddiatt A. Solid phases for protein adsorption in liquid fluidized beds. In: Pyle D L eds. Separations for Biotechnology 3. London: Royal Society of Chemistry, 1994. 186 ~ 192
- 6 Lei Y L, Lin D Q, Yao S J, Liu Z Z, Zhu Z Q. Chinese J Chem Eng, 2003, 11(2): 141 ~ 145
- 7 Gao J(高洁), Tang L G(汤烈贵). Cellulose Science(纤维素科学). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1996. 64 ~ 67
- 8 Sundberg L, Porath J. J Chromatogr, 1974, 90: 87 ~ 98
- 9 Kaewprasit C, Hequet E, Abidi N, Gourlot J P. J Cotton Sci, 1998, 2: 164 ~ 173
- 10 Zhang L N, Zhou J P, Yang G, Chen J H. J Chromatogr A, 1998, 816: 131 ~ 136

A SPHERICAL CELLULOSE/TiO₂ ADSORBENT FOR EXPANDED BED ADSORPTION — EFFECTS OF COMPOSITION ON PROPERTIES

LEI Yinlin, LIN Dongqiang, YAO Shanjing, ZHU Ziqiang

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Expanded bed adsorption (EBA) is a novel bioseparation technique, which integrates solid-liquid separation, clarification, and initial purification into a single unit. One of the key points in EBA processes is the choice of a suitable matrix. In this paper, a new type of spherical cellulose-TiO₂ composite matrix for EBA was prepared through the method of water-in-oil suspension thermal regeneration. After activated by epichlorohydrin and attached with diethylamine, the matrix was derivated to function as an anion exchanger for EBA. The effects of the contents of TiO₂ and cellulose in matrix on its properties were investigated in details. It was found that TiO₂ not only acted as a densifier to impart an increased density to the matrix, but also benefited the activation reaction by epichlorohydrin, giving the activated matrix an epoxy group content of 220 μmol/mL adsorbent. The prepared adsorbent showed a favorable expanded bed performance and could be used with higher linear velocity than that of the commercial Streamline DEAE. The similar protein adsorption behavior both in expanded bed and in packed bed was found with the maximum dynamic adsorption capacity of 48.9 mg bovine serum albumin (BSA)/mL adsorbent. The results indicate the custom-made adsorbent can be applied to the expanded bed adsorption of proteins.

Key words Cellulose, Titanium oxide, Composite microsphere, Expanded bed adsorption, Protein