

核壳型钕铁硼琼脂糖载体的制备及其膨胀床特性

佟晓冬, 孙彦

(天津大学化工学院生物化工系, 天津 300072)

摘要:利用油水乳化法以琼脂糖为壳层材料包埋钕铁硼合金颗粒, 制备得到一种新型高密度核壳型钕铁硼琼脂糖载体, 并且与商品化膨胀床介质 Streamline SP 进行了比较. 结果表明, 这种载体在膨胀床内的膨胀行为可以用 Richardson-Zaki 方程来描述. 流速和填充高度的增加都会引起床内轴向混合程度的降低, 钕铁硼琼脂糖载体在膨胀床内的轴向混合程度小于 Streamline SP.

关键词:高密度吸附剂; 钕铁硼; 琼脂糖; 膨胀床; 膨胀性能; 轴向混合程度

中图分类号: TQ935 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2002)03-0199-05

1 前言

膨胀床是 1990 年前后出现的一种新型集成生物分离技术, 它综合了固定床和流化床的优点, 集澄清、浓缩和初步纯化等单元操作于一体. 目前膨胀床的应用主要侧重于对原料液中目标蛋白质的纯化^[1, 2], 而开发适用于膨胀床的分离介质则是这项技术实际应用的关键. 新型分离介质的发展方向是^[3, 4]: 既要具有高吸附容量、吸附选择性好、传质速度快等特点, 又应有较高的密度和一定粒径、密度分布. 核壳型载体可通过包埋高密度的惰性材料来增加密度, 通过改变壳层的厚度来缩短扩散路径, 提高传质速度, 还可通过壳层或内核材料的选择来满足不同的分离要求.

作者采用一种密度较高的永磁性材料—钕铁硼合金作为内核, 琼脂糖为壳层材料, 通过油水乳化法制备得到一种可用于膨胀床和磁稳流化床的新型核壳型钕铁硼琼脂糖载体. 本工作重点研究其在膨胀床中的膨胀性能以及流速、填充高度等因素对轴向混合程度的影响. 通过与 Streamline SP 比较, 为新型高密度介质在膨胀床中的应用提供有用的基础数据.

2 实验

2.1 实验材料

琼脂糖(A4018)、牛血清白蛋白(BSA)、辛巴蓝购自 Sigma 公司; 钕铁硼合金(Nd-Fe-B)为天津三环乐喜新材料公司提供的永磁性材料(未充磁), 具有强磁响应性, 体积平均粒径为 43 μm , 密度 7.4 g/cm^3 ; 大豆色拉油购自当地超市; Span 80 购自天津大学化工实验厂; Streamline SP 是 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供的阳离子交换吸附介质, 内核为石英砂, 外包 6%的琼脂糖; 环氧氯丙烷、硼氢化钠和丙酮为国产分析纯试剂.

2.2 钕铁硼琼脂糖载体的制备

在 90°C 温度下, 取 4%的琼脂糖溶液 60 ml 与 30 g 钕铁硼合金颗粒均匀混合, 将混合液缓慢加到含 1% Span 80 的色拉油中, 搅拌 30 min 后, 在 15°C 下冷却 20 min. 在磁场下沉降的载体, 用丙酮、去离子水反复洗涤, 直到将油相洗净, 即得到钕铁硼琼脂糖载体, 称为 NFBA 载体.

收稿日期: 2001-07-25, 修回日期: 2001-10-17

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(编号: 20025617)

作者简介: 佟晓冬(1974-), 男, 辽宁沈阳市人, 博士研究生, 生物化工专业; 孙彦, 通讯联系人.

上述的钕铁硼琼脂糖载体需要经过交联和还原后才能实际应用. 步骤如下: 在室温下, 取一定体积的钕铁硼琼脂糖载体与等体积的 1 mol/L NaOH(含 10 g/L 的 NaBH_4)混合, 反应 30 min. 再加入占总体积 2% 的环氧氯丙烷, 反应 6 h 后, 加入蒸馏水反复洗涤, 直到中性. 然后将载体与等体积的 2 mol/L NaOH(含 10 g/L 的 NaBH_4)混合, 煮沸 2 min.

用标准筛进行筛分, 得到两种粒径范围的载体: 50~165 μm 和 140~300 μm , 分别记为 NFBA-S 和 NFBA-L.

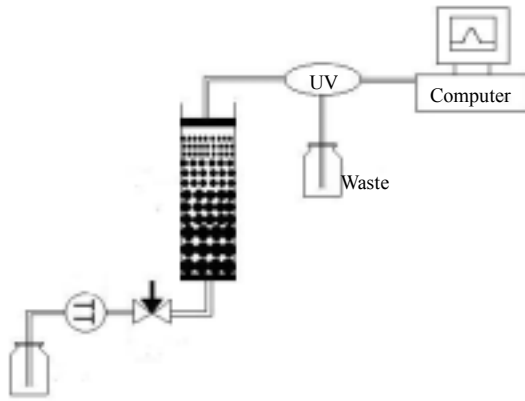


图 1 膨胀床装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of expanded bed apparatus

2.3 膨胀床实验装置

实验所用膨胀床装置见图 1, 主要由玻璃柱(直径 9.5 mm)、GJ-605F 型高压注射进样阀(中国科学院大连化学物理研究所)、分布器(300 目不锈钢丝网)、Series IV 型高效液相色谱泵(Scientific Systems Inc., 美国)、8823A 型紫外检测仪(北京新技术应用研究所)和数据采集系统等组成.

2.4 分离介质膨胀性能的测定

从膨胀床顶部加入一定量的分离介质, 使其自由沉降, 测定沉降高度 H_0 . 流体由底部经过分布器泵入, 分离介质开始膨胀. 在每个流速下稳定膨胀 20 min 后测定其膨胀高度 H , 同时记录流速, 重复 3 次取平均值.

2.5 停留时间分布(RTD)的测定

用丙酮为示踪剂, 采用脉冲方式进样^[5]. 具体实验方法为: 取 25% 的丙酮 200 μl 注入进样环内, 待床层稳定膨胀后迅速由底部加入, 通过紫外检测仪在 280 nm 下检测出口丙酮浓度随时间的分布. 实验均在 20°C 下进行, 流动相为去离子水.

2.6 停留时间分布的数学描述

采用脉冲方式进样, 丙酮在出口处的浓度分布近似高斯分布, 通过计算停留时间分布和方差, 得到无因次方差 σ_0^2 . 利用多釜串联模型和边界条件为闭闭式的一维扩散模型模拟, σ_0^2 用下式表示:

$$\sigma_0^2 = \frac{2}{Bo} - \frac{2}{Bo^2} (1 - e^{-Bo}), \quad (1)$$

其中, Bo 为 Bodenstein 准数, 是表示膨胀床内流体混合程度的准数. 需特别指出, 上述无因次方差是减去膨胀床柱外死体积后得到的值^[6].

3 结果与讨论

3.1 核壳型钕铁硼琼脂糖载体的理化性质

通过显微镜观察可以发现, 利用油水乳化法制备的钕铁硼琼脂糖载体具有明显的壳-核结构, 其中 NFBA-S 载体大部分只包裹着 1 个钕铁硼合金颗粒, 而 NFBA-L 载体一般包裹着几个甚至十几个钕铁硼合金颗粒. 因此, 核壳型钕铁硼琼脂糖载体在磁场下具有强磁响应性, 可以实现瞬间分离. 本实验所用的 3 种分离介质通过 Malvern 粒度分析仪测定的粒径分布如图 2 所示, 其体积平均粒径与密度见表 1.

表 1 三种膨胀床介质的理化性质和 Richardson-Zaki 参数
Table 1 Physical properties and Richardson-Zaki parameters of the three matrices

Matrix	Mean size ¹⁾ (μm)	ρ_s ²⁾ (g/ml)	n	Re_t	U_t (mm/s)	
					Experimental	Theoretical
NFBA-S	102	1.88	5.89	0.24	3.21	4.97
NFBA-L	215	2.04	5.92	2.74	12.2	17.1
Streamline SP	195	1.20	5.50	0.75	3.83	4.08

Note: 1) Volumetric average particle size; 2) Measured with densitometry.

钕铁硼琼脂糖载体通过修饰辛巴蓝,对蛋白质有很高的吸附容量,满足分离纯化的要求.以对 BSA 的吸附为例,在溶液离子强度为 0.11 mol/L 时,修饰密度为 12.5 $\mu\text{mol/ml}$ 的 NFBA-S 载体的吸附容量是 53.1 mg/ml;修饰密度为 12.6 $\mu\text{mol/ml}$ 的 NFBA-L 载体的吸附容量是 51.5 mg/ml.

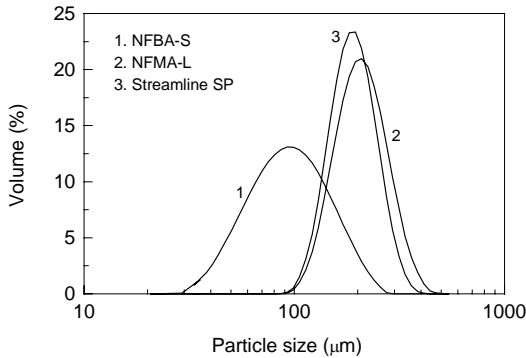


图 2 三种分离介质的粒径分布
Fig.2 Particles size distributions of the three media

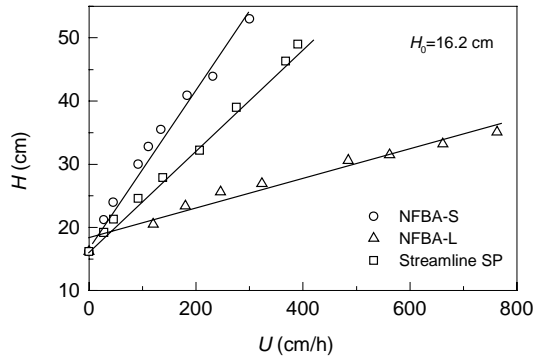


图 3 三种介质在膨胀床中的膨胀性能
Fig.3 Bed expansion characteristics for the three media in expanded bed

3.2 钕铁硼琼脂糖载体的膨胀性能

分离介质的膨胀性能是考察其是否适合膨胀床操作的一个重要指标.床层膨胀率可以定义为床层膨胀高度与填充高度的比值.膨胀率过低会造成原料液中固体颗粒通过困难,过高的膨胀率会造成吸附介质吸附容量的下降,因此一般膨胀床操作的膨胀率控制在 2~3 之间.

图 3 描述了 NFBA-S, NFBA-L 和 Streamline SP 三种分离介质的膨胀率与流速间的关系.由图可见,膨胀率与流速呈线性关系,流速增加,膨胀率增加.当膨胀高度为填充高度的 2 倍时, NFBA-S, NFBA-L 和 Streamline SP 3 种分离介质所需要的流速分别为 154, 660 和 206 cm/h.

Richardson-Zaki 方程是用来描述膨胀床膨胀性能的经典方程^[7],方程式如下:

$$U = U_t \varepsilon^n, \tag{2}$$

其中,床层空隙率 ε 可以用经验式计算:

$$\varepsilon = 1 - (1 - \varepsilon_0) H_0 / H, \tag{3}$$

式中 ε_0 为填充床的空隙率.用量筒测定的自制的 NFBA-S 和 NFBA-L 载体的 ε_0 值分别为 0.36 和 0.41,而 Streamline SP 的 ε_0 值取为 0.4^[8].

对式(2)取对数作图 4,可以拟合得到分离介质的终端沉降速度 $U_t(\text{exp.})$ 和 Richardson-Zaki 指数 n , 列于表 1.

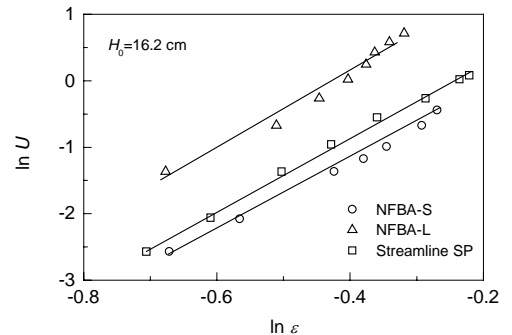


图 4 由式(2)关联的 3 种介质的膨胀性能
Fig.4 Richardson-Zaki plot of the three media in expanded bed

在 $Re_t < 1$ 的层流条件下, 终端沉降速度 U_t 可用 Stokes 方程计算:

$$U_t = \frac{d_p^2(\rho_s - \rho)g}{18\mu} \quad (4)$$

在 $Re_t > 1$ 的过渡区条件下, 终端沉降速度 U_t 可用 Allen 方程计算:

$$U_t = 0.27[d_p(\rho_s - \rho)Re_t^{0.6}/\rho]^{1/2}, \quad (5)$$

其中, $Re_t = d_p U_t \rho / \mu$. 如表 1 所示, NFBA-S 和 Streamline SP 的 $Re_t < 1$, NFBA-L 的 $Re_t > 1$, 因此, 分别用 Stokes 和 Allen 方程计算出 3 种介质的终端沉降速度.

由表 1 可见, 本实验所用的 3 种介质的 Richardson-Zaki 指数都接近理论值 4.8^[7]. 但是自制的钹铁硼琼脂糖载体, 通过实验得到的终端沉降速度与理论计算值相差较大, 而 Streamline SP 的实验与理论计算值比较接近. 这是因为自制的钹铁硼载体的密度、粒径分布比较广, 而利用测定的平均密度和粒径值来计算终端沉降速度会与实验值有很大的偏差.

3.3 膨胀床的流动性能

流速和填充高度是影响膨胀床内轴向混合程度的重要因素. 从图 5、6 可见, 在相同的初始填充高度下, 随着流速增加, Bo 准数增加, 轴向混合程度降低; 维持流速不变, 随着填充高度增加, Bo 准数增加, 轴向混合程度降低. 这与胡洪波等^[9]的实验结论相似.

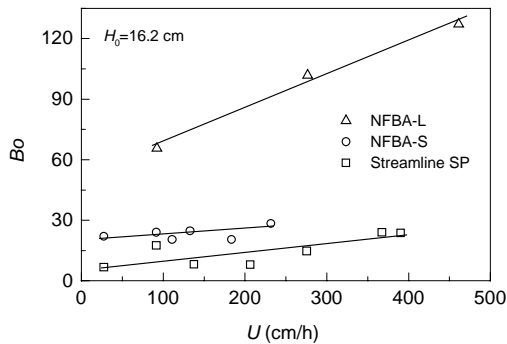


图 5 Bo 准数与流速的关系

Fig.5 Effect of flow rate on the Bo number

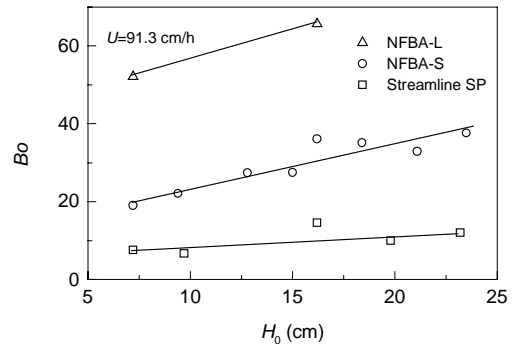


图 6 Bo 准数与 H_0 的关系

Fig.6 Effect of H_0 on the Bo number

在相同的流速和填充高度下, NFBA-L 和 NFBA-S 的 Bo 值都大于 Streamline SP, 其中 NFBA-L 的最大. 这说明本工作制备的核壳型钹铁硼琼脂糖载体的流动性能优于 Streamline SP, 但原因尚待深入研究. 另外, 由于其强磁响应性, 可望在磁稳流化床中得到应用, 是今后的研究课题.

4 结论

利用油水乳化法制备了高密度钹铁硼琼脂糖载体, 研究了其在膨胀床内的膨胀性能以及流速、填充高度对轴向混合程度的影响. 结果表明, 钹铁硼琼脂糖载体具有较高的密度和合适的粒径分布, 在膨胀床内有良好的膨胀性能; 通过与 Streamline SP 的比较可以看出, 自制的高密度钹铁硼琼脂糖载体在膨胀床中轴向混合程度较低, 更加适合膨胀床操作. 因此, 通过包埋高密度的钹铁硼合金制备的核壳型载体, 在膨胀床操作中有良好的应用前景.

符号表:

Bo	Bodenstein 准数	d_p	吸附剂的粒径 (m)	D_{ax}	轴向混合系数 (m^2/s)
H	膨胀后床高 (cm)	H_0	沉降高度 (cm)	n	Richardson-Zaki 指数
Re_t	雷诺准数	U	流体表观流速 (mm/s)	U_t	终端沉降速度 (mm/s)
ε	膨胀床的空隙率	ε_0	填充床的空隙率	μ	流体的粘度 (Pa·s)
ρ	流体的密度 (g/L)	ρ_s	吸附剂的密度 (g/L)	σ_0^2	无因次方差

参考文献:

- [1] Clemmitt R H, Chase H A. Facilitated Downstream Processing of a Histidine-tagged Protein from Unclarified *E. coli* Homogenates Using Immobilized Metal Affinity Expanded-bed Adsorption [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 67(2): 206–216.
- [2] Thömmes J, Halfer M, Lenz S, et al. Purification of Monoclonal Antibodies from Whole Hybridoma Fermentation Broth by Fluidized Bed Adsorption [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, 45(3): 205–211.
- [3] 刘坐镇, 陈士安, 邬行彦. 扩张床吸附技术 [J]. *离子交换与吸附*, 1999, 15(3): 279–288.
- [4] 金业涛, 冯小黎, 苏志国. 扩张床吸附技术及其在生物化工中的应用 [J]. *化工进展*, 1998, (4): 45–50.
- [5] 戚以政, 汪叔雄. 生物反应动力学与反应器 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1996. 253–278.
- [6] Pålsson E, Nandakumar M P, Mattiasson B, et al. Miniaturised Expanded-bed Column with Low Dispersion Suitable for Fast Flow-ELISA Analyses [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2000, 22: 245–250.
- [7] Richardson J F, Zaki W N. Sedimentation and Fluidization: Part I [J]. *Trans. Int. Chem. Eng.*, 1954, 32: 35–53.
- [8] Chang Y K, Chase H A. Development of Operating Conditions for Protein Purification Using Expanded Bed Techniques: The Effect of the Degree of Bed Expansion on Adsorption Performance [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 49(5): 512–526.
- [9] 胡洪波, 林东强, 叶子坚, 等. 膨胀床的膨胀特征和流体混合性能 [J]. *高校化学工程学报*, 2000, 14(2): 139–144.

Preparation and Characterization of Nd–Fe–B Alloy-densified Agarose Matrices for Expanded-bed Operation

TONG Xiao-dong, SUN Yan

(Dept. Biochem. Eng., School of Chem. Eng. & Technol., Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Novel dense composite matrices have been prepared by coating 4% agarose gel onto Nd–Fe–B alloy particles by a water-in-oil emulsification method, and Nd–Fe–B alloy-densified agarose (NFBA) gels with different size distributions and densities, NFBA–S (50~165 μm , 1.88 g/ml) and NFBA–L (140~300 μm , 2.04 g/ml), were obtained. The expansion characteristics of the expanded bed with new matrices were found in accordance with the Richardson–Zaki equation. It allowed flow rate up to 154 cm/h for the NFBA–S and 660 cm/h for the NFBA–L to reach twofold bed expansion. Liquid-phase dispersion behavior in the expanded bed was examined by measurements of residence time distribution. It is shown that the axial dispersion level decreased with increasing flow rate or settled bed height. Moreover, the beds with the NFBA matrices have smaller axial dispersion level compared with that of Streamline SP. The results indicate that the NFBA gels exhibited promising properties for expanded bed operation.

Key words: dense matrix; Nd–Fe–B alloy; agarose; expanded bed; bed expansion; liquid-phase dispersion