

树脂填充聚醚砜纤维吸附剂对牛血清蛋白吸附性能的研究*

张玉忠^{1,2**} Borneman Z² Koops G-H² Wessling M²

(¹天津工业大学中空纤维膜材料与膜过程教育部重点实验室 天津 300160)

(²Membrane Technology Group, Twente University, The Netherlands)

摘要 重点研究树脂填充聚醚砜(PES)纤维吸附剂与模型蛋白质牛血清蛋白(BSA)之间的吸附与脱附行为.结果表明,蛋白质BSA在树脂填充PES纤维吸附剂中的平衡吸附过程较好地符合朗格缪尔吸附模型,树脂Lewatit CNP80ws填充PES吸附剂的最大吸附容量约为139 mg BSA/g 吸附剂.表面具有开孔结构的树脂填充PES纤维吸附剂的吸附速率较快,在不同结构纤维吸附剂中BSA的扩散系数在 $1.82 \times 10^{-14} \sim 8.7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ 范围内变化.另外,考察了BSA溶液的pH与洗脱剂等因素对吸附剂吸附与脱附性能的影响,研究结果对蛋白质的实际分离纯化具有重要的参考价值.

关键词 纤维吸附剂,膜吸附剂,填充膜,聚醚砜,牛血清蛋白

膜色谱是膜技术与固定床色谱技术二者交叉结合的产物,由一张或多张功能性膜片构成的,其功能相当于短而粗的色谱柱.由于以多孔膜作为基质材料,膜色谱具有很多的特点.例如,料液流动快、溶质停留时间短、膜色谱柱的跨膜压差较低、具有较高蛋白质吸附容量、膜色谱可以线性规模放大,并可以进行就地清洗(clean in place)操作等等^[1-6].然而,应用膜色谱技术需要对料液进行预处理,须除去料液中的不溶性颗粒与类脂等物质,否则这些物质将使膜受到污染,造成膜色谱分离效率降低^[7].

采用纤维吸附剂作为分离介质,通过调整分离过程的工艺条件,有可能解决操作过程中膜色谱易被污染的问题^[8].为了提高纤维吸附剂的传质效率,本课题组制备了表面具有开孔结构的离子交换型树脂填充PES纤维吸附剂,并对纤维吸附剂形态结构的调控进行了研究^[8].纤维吸附剂作为一种蛋白质分离介质,对其与蛋白质的吸附过程进行研究是很有必要的.因此,本文以牛血清蛋白(BSA)为模型物,研究树脂填充PES纤维吸附剂与蛋白质之间的吸附与脱附行为.

1 实验部分

1.1 原材料

基质材料,聚醚砜(PES),型号为

Ultrason® E6020P,其重均分子量约为50000,由BASF制造.功能性微粒,Lewatit大孔型弱酸阳离子交换树脂,型号为CNP80ws,树脂粉末平均粒径约10 μm,其交换容量为4.3 eq/L.该树脂功能团为一COO⁻,使用前将其转化为H⁺形式,该树脂由Bayer公司提供.聚乙二醇400(PEG400)(合成级)被用作添加剂,由Merck公司提供.溶剂为N-甲基吡咯烷酮(NMP),其纯度99%,购自Acros Organics公司.蛋白质模型物,牛血清蛋白(BSA),Fraction V, Sigma提供.新鲜的缓冲溶液用超纯水配制,超纯水是用Millipore公司Milli-Q plus单元制造的,其电阻率为18MΩ·CM.

以上所有物品未进一步纯化直接使用.

1.2 树脂填充纤维吸附剂的制备

将不同量的Lewatit离子交换树脂粉末(CNP80ws)缓慢加入到浓度为10%~20% PES的NMP溶液中,搅拌均匀后,静止放置过夜.PEG400等作为添加剂调节纤维的形态结构.

纺丝液从两孔喷丝板的中心管挤出,纺丝液细流经过高度为20mm的空气间隙后直接进入水浴沉淀并发生相分离.所制备的纤维经水洗去除添加剂与溶剂后在空气中干燥存放.纺丝操作条件,纺丝液温度、水浴温度及外部液体温度均为20℃;室内相对湿度为40%;纤维缠绕速度为6~12 m/min.本研究使用的纤维吸附剂性能如表1所示.

* 2004-11-23 收稿,2005-01-19 修稿;天津市应用基础重点资助项目(项目编号 043803911),国家自然科学基金(基金号 50473025)资助项目;

** 通讯联系人,Email: zhangyz@tjpu.edu.cn

Table 1 Properties of resin mixed PES fibrous adsorbents

Polymer substrate	Resin		Fiber		Structure of fibrous adsorbent	
	Type	Loading (%)	Form	Diameter (mm)	AIRGAP*	DEGMEE*
PES	Lewatit CNP80ws	50	Solid fiber	0.5 ~ 0.6	Dense skin	Open pore skin

* AIRGAP as one type of fibrous adsorbents was prepared without any external liquid used; DEGMEE (another type of fibrous adsorbents) was prepared with the external liquid diethyl glycol monoethyl ether.

1.3 纤维吸附剂的表征

1.3.1 纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量

纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量可用牛血清蛋白的间歇实验确定. 已知量的吸附剂样品在 BSA 缓冲溶液中浸泡平衡后, 测量 24 h 单位重量样品的牛血清蛋白吸附量.

在吸附试验中缓冲溶液采用 pH = 4.5, 100 mmol/L 的醋酸缓冲液, 此 pH 低于蛋白质的等电点, 使蛋白质呈正电, 而纤维吸附剂荷负电, 蛋白质被包裹在纤维基体内阳离子交换树脂吸附, 结果造成了本体中蛋白质浓度降低. 通过测量牛血清蛋白浓度的变化计算吸附剂的蛋白质吸附量, 单位为 mg/g.

BSA 浓度在 280nm 波长下用 Philips PU 8720 UV/VIS 紫外可见光谱仪测定.

1.3.2 纤维吸附剂的蛋白质脱附率

吸附蛋白后的样品首先用 pH4.5, 100 mmol/L 的醋酸缓冲液快速冲洗 3 次, 然后浸入 pH 高于蛋白质等电点的洗脱剂中使蛋白质脱附. 在此 pH 下蛋白质净电荷转变为负值, 由于电荷排斥作用蛋白质从多孔纤维基体内吸附点上脱附扩散进入本体溶液中. 洗脱步骤的 BSA 浓度也用上述的方法在 280nm 检测.

所有的吸附与脱附试验均在 20℃ 恒温水浴振荡机内完成的.

1.3.3 纤维吸附剂的最大吸附容量 (q_m)

在相同而恒定的温度下, 将相同重量的纤维吸附剂浸入起始浓度不同的 BSA 溶液中至不同的平衡浓度, 通过测量纤维吸附剂的吸附量与蛋白质溶液中 BSA 平衡浓度, 即可得到纤维吸附剂的等温吸附曲线.

假设此吸附符合朗格缪尔等温吸附曲线, 依据方程(1)用 $1/q^*$ 对 $1/c^*$ 做图并线性模拟, 便可决定蛋白质的解离系数 (K_d) 和吸附剂的最大吸附容量 (q_m)^[9].

$$\frac{1}{q^*} = \frac{1}{q_m} + \frac{K_d}{q_m} \times \frac{1}{c^*} \quad (1)$$

式中 q^* 为吸附剂的吸附量, c^* 为本体溶液中蛋

白质平衡浓度. 吸附剂的吸附量与蛋白质浓度的测试方法同 1.3.1 所述.

1.3.4 有效扩散系数 (\bar{D})

对于实心纤维, 在初始阶段蛋白质的扩散系数可从 Fick 第二定律推导的方程式(2)估计出来^[10]. 由方程式(2)可知, 如果对时间平方根作图, 吸附曲线应为直线.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{\frac{\bar{D} \cdot t}{r^2}} \quad (2)$$

式中 r 为纤维的半径, M_t 与 M_∞ 分别为时间 t 和无限长时蛋白质在吸附剂上的吸附量, \bar{D} 为有效扩散系数. 吸附剂的吸附量测试方法同 1.3.1 所述.

2 结果与讨论

2.1 树脂填充聚醚砜纤维吸附剂的等温吸附曲线

当吸附过程处于平衡状态时, 料液中 BSA 浓度与树脂填充纤维吸附剂吸附容量的关系如图 1 所示. 当料液中 BSA 浓度较低时, 吸附剂的吸附容量增加较快. 图 2 表明该等温吸附曲线符合朗格缪尔吸附模型. 根据方程(1)计算的最大吸附容量 q_{max} 与蛋白质-吸附剂复合物的解离系数 K_d 列于表 2, 从该表可知, AIRGAP 类型纤维吸附剂的 q_{max} 和 K_d 大于其它类型. 图 3 指出 AIRGAP 类型纤维吸附剂具有较为致密的表皮而 DEGMEE 类型纤维吸附剂具有较为粗糙而开孔的表面结构. 由此可见, 表皮较为致密的纤维吸附剂在平衡状态下其吸附容量及蛋白质的解离性都较高. 然而, 由于吸附剂的致密表皮结构造成的吸附动力学限制, 在较低的料液 BSA 浓度下, AIRGAP 类型纤维吸附剂的吸附容量低于 DEGMEE 类型的吸附剂.

Table 2 The maximum adsorption capacity (q_{max}) and the dissociation constant (K_d) of resin Lewatit CNP80ws mixed PES fibrous adsorbents

Type of adsorbent	q_{max} (mg/g)	K_d (mg/g)
AIRGAP	138.9	0.395
DEGMEE	101.0	0.141

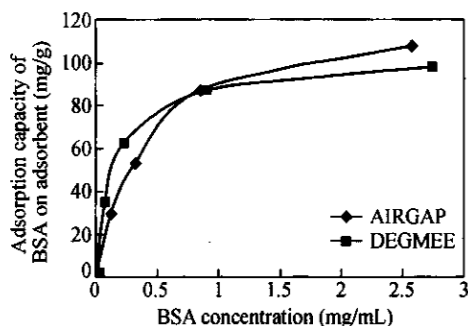


Fig. 1 The adsorption of resin Lewatit CNP80ws mixed PES fibrous adsorbents with different concentration of BSA in feed

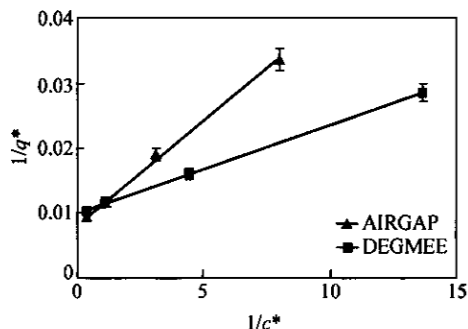


Fig. 2 Langmuir model fitting curve for adsorption of resin Lewatit CNP80ws mixed PES fibrous adsorbents with BSA

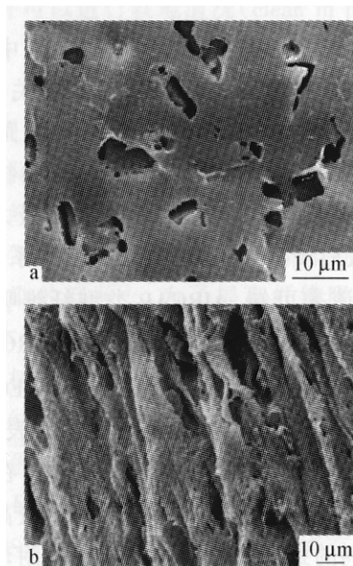


Fig. 3 The SEM photos of surfaces of resin Lewatit CNP80ws mixed PES fibrous adsorbents

a) AIRGAP; b) DEGMEE

2.2 有效扩散系数

树脂填充 PES 纤维吸附剂的吸附容量与时间的关系如图 4 所示,这种关系可用来描述蛋白质吸附动力学.由于在初始阶段吸附主要发生在树脂表面以及多孔纤维基体内,所以在初始阶段

吸附剂的吸附容量增加较快,在这个阶段控制步骤是蛋白质从本体扩散到树脂表面;在中后期蛋白质从树脂表面扩散到树脂孔隙内的吸附点则是控制步骤.

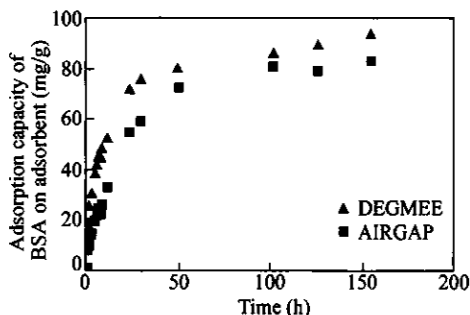


Fig. 4 The adsorption capacity of resin Lewatit CNP80ws mixed PES fibrous adsorbents versus time

图 5 是不同类型结构纤维吸附剂扩散动力学的模拟结果,它们都较好地符合 Fick 第二定律,表明初始阶段树脂填充 PES 纤维吸附剂的吸附过程是由在吸附剂多孔基体内或树脂空隙内的扩散过程来控制的.依据扩散方程(2)可计算出不同情形下吸附剂的扩散系数,如表 3 所示.与已报道的吸附剂相比,BSA 在纤维吸附剂内扩散系数具有一定的可比性.例如,BSA 在不同离子交换树脂内的扩散系数在 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ 范围内变化^[11-17],BSA 在树脂 Lewatit CNP80ws 填充 EVAL 板式膜吸附剂中有效扩散系数约为 $3.4 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ ^[18].与 BSA 在其溶液中的自由扩散系数 ($5.3 \times 10^{-11} \sim 7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)^[9] 相比,BSA 在树脂 Lewatit CNP80ws 填充 PES 纤维吸附剂的有效扩散系数约低 3 个数量级,这可能是由于蛋白质在吸附剂多孔基体内或树脂空隙内扩散阻力所致.由于影响 BSA 在树脂填充 PES 纤维吸附剂中扩散过程的因素较多如吸附剂的结构因素(如孔径、孔隙率、孔的弯曲度、亲水性等)、树脂的特性(如离子交换容量、孔隙尺寸、孔隙率、离子基团大小等)以及树脂填充量等等,对表面具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂吸附动力学的规律还需深入研究.

Table 3 The effective diffusion coefficient (\bar{D}) of BSA in resin Lewatit CNP80ws mixed PES fibrous adsorbents

Type of adsorbent	State of fiber	Radius (mm)	q_{\max}^* (mg/g)	\bar{D} (m^2/s)
AIRGAP	Dry	0.3	138.9	$1.82\text{E-}14$
DEGMEE	Dry	0.27	101.0	$8.70\text{E-}14$

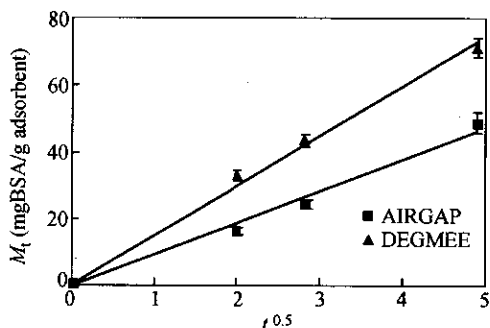


Fig. 5 The adsorption capacity of resin Lewatit CNP80ws mixed PES fibrous adsorbents versus the square root of time

2.3 BSA 溶液 pH 对树脂填充 PES 纤维吸附剂吸附性能的影响

蛋白质与离子交换树脂的相互作用可分为电荷之间的静电相互作用、极性基团之间的氢键作用以及疏水部分的疏水作用等。在不同 pH 条件下,各种因素对 BSA 与吸附剂的相互作用影响是不同的:从图 6 可知,当 BSA 溶液 pH 高于 BSA 等电点($pI = 4.8 \sim 5.2$)时,吸附剂的吸附容量急剧降低,其原因是此条件下 BSA 的净电荷为负值,并且树脂 CNP80ws 中的交换基团—COOH 的解离随溶液 pH 提高而变大,由于同性电荷静电排斥作用,使得吸附剂对 BSA 吸附能力大大减弱。

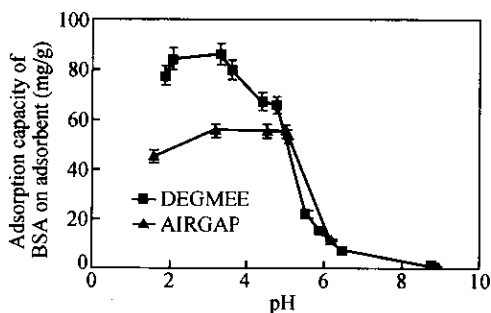


Fig. 6 Effect of pH of BSA solution on the adsorption capacity of resin Lewatit CNP80ws mixed PES fibrous adsorbents

Feed: 2 mg/mL BSA buffer solution

当 BSA 缓冲溶液的 pH 很低时,由于低于树脂 Lewatit CNP80ws 的等电点($pI = 4.0$)^[19],使得树脂 CNP80ws 的净电荷接近于 0。在这种情况下,氢键作用对 BSA 与吸附剂吸附作用的贡献高于其它类型作用。此外,PES 基质本身所带净电荷也随缓冲溶液 pH 和离子强度的变化而变化,文献报道 PES 超滤膜的等电点在 2.2~3.1 范围内^[20-22],因此,当 pH 低于 PES 的 pI 时 PES 基质材料对 BSA 的吸附作用减弱。另外,在如此低的 pH 条件

下, H^+ 再生作用也促进 BSA 从树脂的吸附点上解离。所有这些因素导致了在较低 pH 下吸附剂的吸附容量反而较低的结果。

当 BSA 溶液的 pH 接近 BSA 的 pI 时,情况较为复杂。由于在此条件下 BSA 的净电荷接近于零,氢键作用与疏水作用变得突出,但是这两种类型的作用对 pH 并不十分敏感,所以在 pI 附近出现了一个吸附平台。

2.4 洗脱液的选择

吸附在吸附剂上的蛋白质可通过洗脱的方法解离,如直接洗脱、分步洗脱、梯度洗脱、酸碱再生处理等。但需注意的是,在洗脱操作过程中应尽量避免造成蛋白质的变性。对于离子交换类型吸附剂,洗脱液的 pH 和离子强度是重要的参数。这是因为当溶液 pH 从低于蛋白质等电点到高于其等电点时,蛋白质的净电荷发生了转化,所以通过调整洗脱液 pH 使蛋白质的净电荷发生转变的方法,可实现蛋白质从蛋白质-树脂复合体的脱附。洗脱液离子强度对蛋白质洗脱也有较大影响,一般来讲,较高的离子强度有利于蛋白质从吸附点解离。对于阳离子交换树脂类型吸附剂,由于 BSA 等电点在 4.8~5.2 范围,所以洗脱液的 pH 应高于 BSA 等电点。表 4 表明,洗脱液 pH 较高,蛋白质的脱附率较大;当洗脱液 pH 为 4.5 时,蛋白质的脱附率极低。另外,洗脱液加入 1 mol/L NaCl 提高了蛋白质的脱附率,其原因是 NaCl 的加入增大了缓冲溶液离子强度,减弱了 BSA 与吸附点的相互作用,促使蛋白质从吸附点脱附。但由于 PES 基质材料与 BSA 形成的复合体较难解离,造成该类型吸附剂的脱附率还不高。降低基质材料对蛋白质的非特异性吸附将是今后研究的重点。

Table 4 Desorption versus pH of eluents

pH of Eluent	Desorption (%)	
	5 (h)	24 (h)
4.45	3.7	3.2
7.28	28.7	34.9
8.00	40.3	53.0
9.00	43.4	55.4
9.00 (1 mol/L NaCl in eluent)	45.7	60.1

Type: DEGMEE; Feed: 2 mg/mL BSA buffer solution

综上所述,蛋白质 BSA 在树脂 Lewatit CNP80ws 填充 PES 纤维吸附剂中的平衡吸附过程较好地符合朗格缪尔吸附模型。表面具有开孔结构的树脂填充 PES 纤维吸附剂的吸附速率较快,在纤维吸附剂中 BSA 的扩散系数在 1.82×10^{-14}

$\sim 8.7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ 范围内变化. 吸附过程中 BSA 溶液 pH 是一个非常重要的参数. 当 BSA 溶液 pH 高于 BSA 的等电点时, 两种不同结构类型纤维吸

附剂的吸附容量均较低. 对于具有阳离子交换吸附功能的纤维吸附剂来讲, 吸附过程中 BSA 溶液 pH 应略低于其等电点.

REFERENCES

- 1 Thommes J, Kula M R. *Biotechnol Prog*, 1995, 11: 357 ~ 367
- 2 Klein E. *Journal of Membrane Science*, 2000, 179 : 1 ~ 27
- 3 Charcosset C. *Journal of Chem Technol Biotechnol*, 1998, 71: 95 ~ 110
- 4 Ghosh R. *Journal of Chromatography A*, 2002, 952: 13 ~ 27
- 5 Roper D K, Lightfoot E N. *Journal of Chromatography A*, 1995, 702: 3 ~ 26
- 6 Lingeman H. *J Chromatography B*, 1997, 689: 221 ~ 237
- 7 Ulber R, Plate K, Weiss T, Demmer W, Buchholz H, Scheper T. *Acta Biotechnol*, 2001, 21 : 27 ~ 34
- 8 Zhang Yuzhong(张玉忠). Study on Resins Mixed Fibrous Adsorbents(树脂杂化纤维吸附剂的研究). Doctoral Dissertation of Tianjin polytechnic university(天津工业大学博士学位论文), 2003
- 9 Do D D. *Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics*. London: Imperial College Press, 1998. 40 ~ 60
- 10 Crank J. *The Mathematics of Diffusion*. London: Oxford Clarendon Press, 1979. 69 ~ 82
- 11 Miyabe K, Guiochon G. *J Chromatography A*, 2000, 866: 147 ~ 171
- 12 Tsai A M, Englert D, Graham E E. *J Chromatography A*, 1990, 504: 89 ~ 95
- 13 Fernandez M A, Laughinghouse W S, Carta G. *J Chromatography A*, 1996, 746: 185 ~ 198
- 14 Gutsche R, Yoshida H. *Chem Eng Sci*, 1994, 49: 179 ~ 188
- 15 Miyabe K, Guiochon G. *Biotechnol Prog*, 1999, 15: 740 ~ 752
- 16 Hunter A K, Carta G. *J Chromatography A*, 2000, 897: 81 ~ 97
- 17 Fernandez M A, Carta G. *J Chromatography A*, 1996, 746: 169 ~ 183
- 18 Avramescu M. *Membrane Adsorbents Development and Applications*. Doctoral Dissertation of University of Twente, 2002, 75 ~ 96
- 19 Ladish M R. *Bioseparation Engineering. Principles, Practice and Economics*. New York: Wiley-Interscience, 2001, 500 ~ 550
- 20 Burns B, Zydney A. *J Membrane Sci*, 2000, 172: 39
- 21 Ricq L, Pierre A, Bayle S, Reggiani J C. *Desalination*, 1997, 109: 253
- 22 Pontie M, Chasseray X, Lemordant D, Laine J M. *J membrane Sci*, 1997, 129: 125

STUDIES OF ADSORPTION OF BOVINE SERUM ALBUMIN ON RESIN MIXED PES FIBROUS ADSORBENTS

ZHANG Yuzhong^{1,2}, BORNEMAN Z², KOOPS G-H², WESSLING M²

(¹ Key Lab of Hollow Fibre Membrane Materials & Membrane Process (Tianjin Polytechnic University), Ministry of Education, Tianjin 300160)

(² Membrane Technology Group, Twente University, The Netherlands)

Abstract The resin mixed PES-based fibrous adsorbents with open pore structure on the surface were prepared, and their adsorption behavior with BSA was studied. The adsorption isotherm demonstrated that the adsorption was well fitting the Langmuir model. The maximum adsorption capacity was about 139 mg BSA/g adsorbent. The resin Lewatit CNP80ws mixed PES-based fibrous adsorbent with more open pore structure on its surface had much more adsorption capacity with high adsorption rate for BSA. The effective diffusion coefficient of BSA in different resin mixed PES-based fibrous adsorbents was in the range of $1.82 \times 10^{-14} \sim 8.7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$. The values of diffusion coefficient of BSA in these fibrous adsorbents were comparable with those in resins reported in the literatures. The influence of operation parameters on the behavior of adsorption and desorption of BSA for the weak acidic type cation exchange resin mixed PES-based fibrous adsorbent in different structures was also investigated in this work. The pH of BSA buffer solutions was a very important parameter when the ion-exchange adsorbent was used for separation of proteins. The result indicated that the adsorption capacity was very low when the pH of BSA solutions was above the isoelectric point of BSA.

Key words Fibrous adsorbent, Membrane adsorber, Mixed membrane matrix, PES, BSA