

# 纤维素金属螯合亲和膜的制备及其对牛血清白蛋白的吸附研究

张亚辉, 杨严俊

(江南大学食品学院食品科学与安全教育部重点实验室, 无锡 214036)

**摘要:**以纤维素分析滤纸为载体、环氧氯丙烷(EPI)为交联活化剂、亚氨基二乙酸(IDA)为配基、铜离子为金属螯合离子,可制得 $\text{Cu}^{2+}$ -IDA型固定化金属螯合膜。实验表明,滤纸先用4mol/L的NaOH浸润45min,再在75℃水浴中活化反应45min,所得亲和膜环氧基密度可达 $3.97\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ 。最佳配基偶联反应条件为:25mg IDA/ $\text{cm}^2$ 膜,60℃、15h时可获得对 $\text{Cu}^{2+}$ 最大螯合量。牛血清白蛋白(BSA)等温吸附线基本符合Langmuir形式,经曲线拟合得最大吸附量为59.52mg/g干膜。

**关键词:**膜,纤维素,金属螯合,牛血清白蛋白(BSA),等温吸附

**Abstract:**Using epichlorohydrin (EPI) as crosslinking and activation agent, iminodiacetic acid (IDA) as ligand and copper ion as chelated metal ion immobilized  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA metal-chelated affinity membrane was successfully prepared with cellulose analysis filter paper as the support. The results showed when filter paper was soaked in 4mol/L NaOH for 45 min, and then activated at 75℃ water for 45 min, the epoxy density of membrane could achieve  $3.97\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ . The best condition for IDA linkage was 25mg IDA/ $\text{cm}^2$  membrane, at 60℃ for 15h, the quantity of chelated copper ion could come to the highest. The isothermal adsorption for bovine serum albumin (BSA) could be expressed by the Langmuir adsorption model, and the maximum capacity of affinity membrane was 59.52mg/g dry membrane.

**Key words:** membrane; cellulose; cellulose-chelated; bovine serum albumin (BSA); isothermal adsorption

中图分类号: TS251.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2005)03-0089-04

固定化金属螯合亲和色谱(IMAC)是用于分离纯化生物大分子的有效方法之一,它具有螯合介质制备简单方便,吸附容量大,选择性及通用性较好,易于再生等优点,是由Porath于1975年引入的<sup>[1]</sup>,其根本原理是在不同条件下配位键的形成和解离。

蛋白质表面的组氨酸、色氨酸、半胱氨酸这一类电子供体可与过渡金属离子形成配位复合物<sup>[2,3]</sup>,因

而连接上过渡态金属离子的载体可以选择性地吸附含咪唑基或巯基的肽或蛋白质,而亲和力的大小在很大程度上由蛋白质分子表面咪唑基、巯基的稠密程度所决定。另外,不同金属离子对亲和力大小也有一定的影响,对于分别螯合有 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 的IDA型亲和柱来说, $\text{Cu}^{2+}$ -IDA对蛋白质或氨基酸的亲和力最强<sup>[4]</sup>。因此,若将金属离子固定于层析介质上,则能制成金属螯合亲和吸附剂,可用于纯化蛋白质等生物大分子物质。

传统亲和介质多为凝胶,但凝胶颗粒易压缩变形,蛋白质在颗粒间扩散传质慢,分离操作只能在低流速下进行<sup>[5]</sup>,这些缺陷限制了其在实际应用中的规模和工作效率。近年来,人们结合亲和膜色谱特异性高和膜技术分离快、处理量大的优点,研制成功了亲和膜<sup>[6,7]</sup>,使得大体积、低含量的生物工程产品的大规模分离纯化成为可能。目前,用于生化分离的膜色谱介质多数是将一般的过滤膜进行化学改性,连接所需功能团进行分离。而商品膜受孔径大小、可活化基团数量、膜强度的限制,使制备不易根据需要进行控制,从而限制了在分离中的应用。

有报道,以纤维素滤纸为材料制备固定化金属亲和膜用于Cu/Zn-SOD等的分离,并取得了理想的效果。本文在参考相关文献的基础上,以纤维素分析滤纸为材料制备IDA型金属螯合膜,对其制备反应条件进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

纤维素分析滤纸 杭州新华造纸厂;环氧氯丙烷(EPI)、亚氨基二乙酸(IDA)、牛血清白蛋白(BSA) 上海试剂公司;乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 等均为国产分析纯试剂。

752紫外光栅分光光度计,UNICO2000可见分光光度计,DSHZ-300多用途水浴恒温振荡器,电热恒温水浴锅等。

收稿日期: 2004-08-02

作者简介: 张亚辉(1976-),女,硕士,研究方向:食品生物技术。

## 1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质浓度测定 紫外吸收法<sup>[8]</sup>。

1.2.2 环氧基密度测定 硫代硫酸钠滴定法<sup>[9]</sup>。

1.2.3  $\text{Cu}^{2+}$ -EDTA 测定 取少量整合膜,干燥后绞碎,用 0.05mol/L EDTA 解析整合的  $\text{Cu}^{2+}$ 。解析液离心后,以 0.05mol/L EDTA 为空白,于 740nm 用标准曲线法测定  $\text{Cu}^{2+}$  含量<sup>[2,6,10]</sup>。

1.2.4 滤纸的交联活化 将纤维素分析滤纸放入 4mol/L NaOH 中,经碱溶胀 45min 后,再加入 5mL EPI,5mL DMSO,放入 70℃ 水浴中反应 45min。将活化后的膜用大量去离子水冲洗至无残余的 EPI,并取出少量测环氧基密度<sup>[11,12]</sup>。

1.2.5 配基偶联 称取 1.5g IDA,用 10mL 1.5mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶解,放入 10 张活化好的膜,于 60℃ 反应 15~16h。将偶联好配基的膜用去离子水洗至中性<sup>[5]</sup>。

1.2.6  $\text{Cu}^{2+}$  螯合膜 将偶联有 IDA 的膜浸入 0.05mol/L  $\text{CuSO}_4$  溶液中<sup>[5]</sup>,2h 后取出水洗至无残余的  $\text{Cu}^{2+}$ 。

1.2.7 BSA 等温吸附曲线 称取一定量的干膜介质 8 份,分别加入一定体积不同浓度的 BSA 溶液,固定于摇床上,120r/min 吸附 2h 后,测上清液中 BSA 的浓度  $C^*$ ,并按下式计算平衡吸附量<sup>[6,13]</sup>:

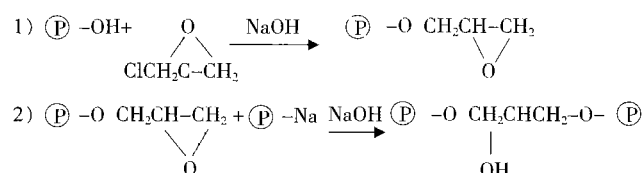
$$Q^* = (C_0 - C^*)V/G$$

式中  $Q^*$ :平衡时膜对 BSA 的吸附量(mg/g); $C_0$ :BSA 的初始浓度(mg/mL); $C^*$ :吸附平衡时上清液中 BSA 浓度(mg/mL); $V$ :吸附溶液体积(mL); $G$ :膜介质干重(g)。以  $C^*$  为横坐标, $Q^*$  为纵坐标绘制等温吸附曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 活化反应条件的确定

纤维素进行交联活化时,活化剂环氧氯丙烷(EPI)一般为过量,此时碱的浓度则成为影响此步反应较为关键的因素。纤维素与碱液相互作用可生成碱纤维素,碱纤维素具有高度的反应性,可以制备各种纤维素衍生物,其交联活化的反应历程可由下式来表示<sup>[12,14]</sup>:



2.1.1 碱浓度的选择 每份取 10 张滤纸,分别用不同浓度的 NaOH 溶液 10mL 进行溶胀 45min,再按 1.2.4 中步骤进行活化反应。反应结束后,取出少量测定环氧基密度。

由表 1 可知,当碱浓度较低时,膜的环氧量少,制得膜结构很松散,随着碱浓度的增大,纤维素溶胀程度加深,使可发生衍化的可及区域增多。浓度为 4.0、5.0mol/L 时,纤维素不仅可以结合较多的环氧基,同时也具有一定的交联度,大大强化了膜的松散网状结构;当浓度达到 6.0mol/L 时,由于碱的浓度过高,使纤维素发生降解反应,环氧量大为降低,所以,选择 4.0mol/L 作为活化反应的碱液浓度较为合适。

图 1、图 2 分别为活化反应处理后的滤纸和原滤纸的扫描电镜图。从图中可以看出,滤纸中有大量的自由纤维,结构散乱,而碱处理可以除去纤维中不均匀的短链部分,只剩下均匀粗大的纤维,再经过交联活化后,纤维被共价键限制在固定的位置上,大大强化了其松散的网状结构,且膜的孔径在 10~50 $\mu\text{m}$  之间,因此能够满足快速传质的要求<sup>[6]</sup>。

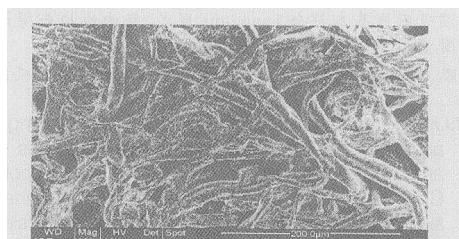


图 1 活化反应后的纤维素分析滤纸

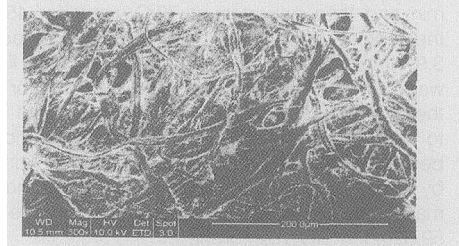


图 2 纤维素分析滤纸

2.1.2 活化反应温度的选择 取 7 份滤纸,分别加入一定量 4.0mol/L 的 NaOH 溶液,室温进行溶胀处理 45min,再按 1.2.4 中步骤分别在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 的条件下进行活化反应,并测定环氧基密度。

从图 3 中可看出,随着温度升高,环氧量也在逐渐增大,在 70℃ 附近达到最大值,当温度继续升高

表 1 NaOH 浓度对活化反应的影响

NaOH 浓度(mol/L)	质量密度( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\times 100$	环氧基密度( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ )	外观
1.0	0.94	0.33	碱溶胀时滤纸基本无变化
2.0	0.84	0.71	碱溶胀时有微融现象,活化后膜变柔软,部分边缘裂开、分层
3.0	1.34	4.33	碱溶胀时有收缩、浆糊状现象,活化后膜变小、松软,边缘开裂
4.0	1.66	3.50	碱溶胀时有收缩现象,活化后膜变小,膜表面紧质、较平整
5.0	1.69	2.79	碱溶胀时有收缩现象,活化后膜变小,膜表面紧质、较平整
6.0	0.80	很少	碱溶胀时有降解现象,活化后膜基本无收缩,柔软,边缘裂开

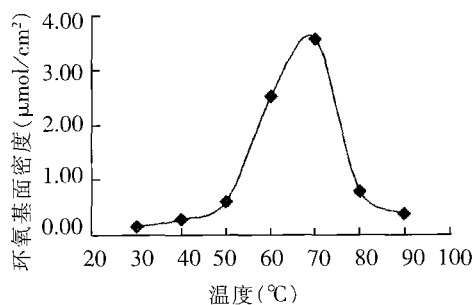


图3 活化反应温度的选择

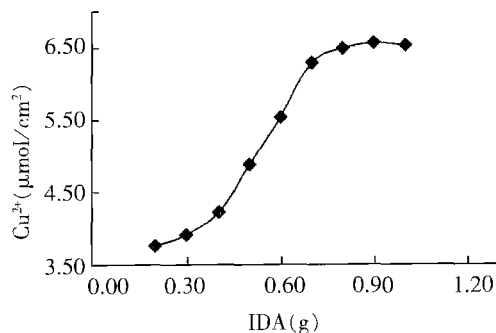


图5 IDA用量的选择

时,环氧基密度又快速下降。这是因为温度对碱纤维的自动氧化降解有极大的影响<sup>[4]</sup>,20°C时较慢,从40~50°C起逐渐加快,温度过高,纤维素发生降解反应,从而使得环氧基密度大幅度降低。而纤维素发生交联反应也需要在较高温的条件下进行,因此可选70°C为活化反应的最佳温度。

2.1.3 活化反应时间的选择 于70°C设置不同的反应时间,其他同上。由图4可知,反应初期,随着反应时间的增加,膜的环氧基密度逐渐增大,约45min时达到最大值,此后随着时间的进一步增加,环氧基密度反而降低。这是因为随着时间的延长,碱纤维素被氧化降解的量也在增加,从而降低了纤维素的衍生化反应性。所以反应时间可选为45min。

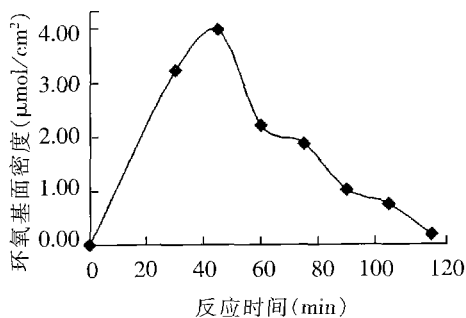


图4 活化反应时间的选择

2.2.2 偶联反应温度的选择 取7份活化好的膜,参照1.2.5和2.2.1,在不同的温度下进行反应,考察温度对配基偶联反应的影响。从图6中可看出,随着温度的升高,IDA的结合量逐渐增大,60°C附近时达到最大值。此后随着温度的继续升高,Cu²⁺整合的量有下降趋势,当配基反应温度超过90°C时,膜变浆糊状,这是因为随着温度的增高,碱纤维素降解程度也在增大,因此选60°C作为配基偶联反应温度较为适合。

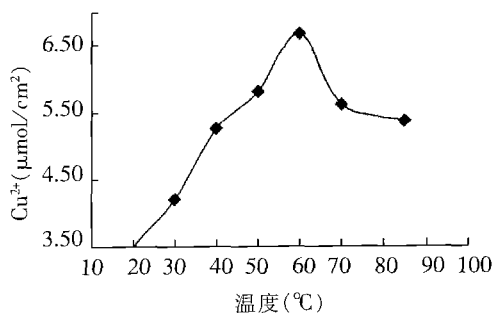


图6 配基反应温度的选择

## 2.2 配基偶联反应条件的确定

IDA作为螯合配基,在膜上的结合量直接关系到对过渡态金属离子的螯合量,从而影响到对蛋白质的吸附。其中IDA的用量、反应时间和温度对IDA的结合量有很大的影响,可通过比色法测定结合的Cu²⁺量,间接地观察IDA在膜上的结合量<sup>[2]</sup>。

2.2.1 IDA用量的选择 分别称取一定量的IDA,按1.2.5方法进行配基偶联反应。反应结束后将膜取出并水洗至中性,再放入0.05mol/L CuSO₄中浸泡2h,水洗至无残余的Cu²⁺。取少量测定Cu²⁺的量,方法如1.2.4。

由图5可知,Cu²⁺螯合量随着IDA用量的增加而增加,对于5张活化好的膜,当IDA用量为0.80g时,Cu²⁺螯合量达最大值,此后趋于平缓,即IDA用量为25mg IDA/cm²膜。

2.2.3 偶联反应时间的选择 于60°C设定不同反应时间,其他同2.2.2,考察时间对配基偶联反应的影响。图7表明,随着反应时间的延长,Cu²⁺螯合量增大,当反应进行到15h时,Cu²⁺螯合量基本趋于平稳,因此可选择15h作为配基偶联反应时间。

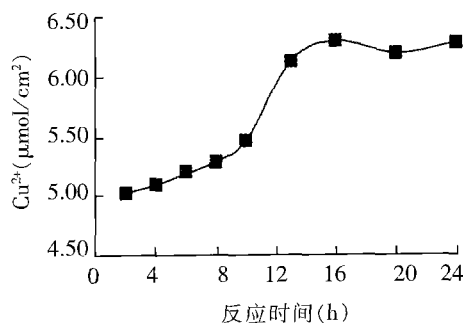


图7 配基反应时间的影响

## 2.3 BSA等温吸附线

称取一定量螯合有Cu²⁺的干膜介质,共8份,分别加入4mL一定浓度的BSA溶液,于25°C水浴中,120r/min,等温吸附4h。按1.2.8中方法绘制BSA等温吸附线,如图8所示。

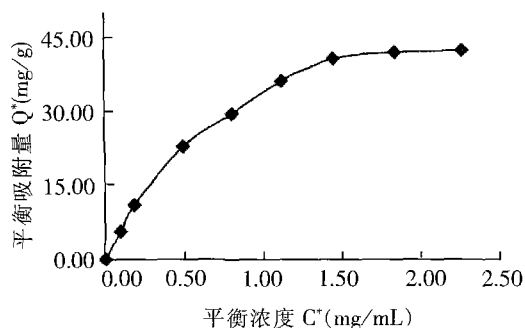


图8 BSA等温吸附曲线

由等温吸附线可看出,  $\text{Cu}^{2+}$  螯合膜介质对 BSA 的平衡吸附量  $Q^*$  随着平衡时溶液中游离 BSA 浓度  $C^*$  的增加而增加,  $Q^*$  增加的速度随着  $C^*$  的增大减慢, 并趋向吸附最大值。此膜介质对 BSA 的等温吸附线基本符合 Langmuir 形式, 经曲线拟合可知最大吸附容量  $Q_m$  为 59.52mg/g 干介质。

### 3 结论

以纤维素分析滤纸作为亲和膜介质, 通过碱处理、环氧活化、配基偶联、金属离子螯合, 可制成 IDA 型金属离子螯合膜。此法制得的膜孔径较大, 通透性好, 对蛋白质的吸附容量较高, 使大规模、快速地分离生物大分子物质成为可能。

#### 参考文献:

- [1] Porath J, Carlsson J, Olsson I, et al. Metal chelate affinity chromatography: A new approach to protein fractionation[J]. Nature, 1975, 258(5536): 598-599.
- [2] 王雪峰, 杨龙寿, 陈天, 亮聚糖为载体金属亲和吸附剂的制备及性质[J]. 功能高分子学报, 2003, 16(9): 327-331.
- [3] Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials: Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions[J]. Biochemistry, 1983, 22: 1621-1630.
- [4] Rassi Z E, Horvath C. Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminodiacetic acid-bonded stationary phases on silica support[J]. Chromatography, 1986, 359: 241-253.
- [5] 魏琪, 姚汝华, 鲍时翔. 固定化金属螯合亲和膜色谱柱的制备及纯化铜锌超氧化物歧化酶的研究[J]. 色谱, 2000, 28(4): 361-363.
- [6] 杨利, 贾凌云, 等. 复合纤维素金属螯合膜色谱介质的制备及其分离生物大分子的研究[J]. 中国科学(B辑), 1998, 28(4): 353-360.
- [7] Serfica G C, Pimbley J, Belfort G, et al. Protein fractionation using fast flow immobilized metal chelate affinity membranes[J]. Membrane Science, 1994, 88: 292-300.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1983. 166-168.
- [9] 付春晓, 陈长治, 俞耀庭. 以琼脂凝胶固定热聚 IgG 制备类风湿关节炎免疫吸附剂的研究[J]. 功能高分子学报, 1999, 12(2): 145-148.
- [10] 赵元臣译. EDTA 及同类化合物的分析应用[M]. 北京: 地质出版社, 1982. 172-173.
- [11] 郭为, 商振华, 等. 染料膜亲和色谱法中膜堆的制备及应用[J]. 色谱, 1996, 14(3): 168-171.
- [12] 朱伯儒, 史作清, 何炳林. 大孔球形纤维素离子交换剂的制备及其对蛋白质的吸附富集性能研究. II. 球形纤维素的交联活化及功能基化研究[J]. 离子交换与吸附, 1997, 13(1): 37-42.
- [13] 天津大学物理化学教研室. 物理化学(下册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001. 164-169.
- [14] 许冬生, 等. 纤维素衍生物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 1-31.

## 美国发明乳清食品外衣

美国科学家发明了一种利用乳品副产品保存新鲜食品的新方法, 这一发现将为食品工业节约资金, 并减少包装损耗。加州大学食品科学家 John Krochta 已发明一种用乳品副产品乳清生产的可食用食品外衣, 他认为这种既可以提供光滑外衣, 又可以提供轻薄、象塑料一样外衣的保护层能用于帮助各种食品抗损坏, 减少需要的包装数量, 实现了目前被丢弃或低价处理的副产品的有效再利用。

John Krochta 认为他的可食用乳清外衣能用于覆盖坚果, 保证其在包装中的新鲜度, 还能防止巧克力条中的坚果腐臭。这种包装材料的其他用途还包括覆盖易碎食品如早餐谷物食品、密封食品如三文鱼或火鸡肉片等, 起到抗菌效果。

(中国食品网)

## 俄罗斯利用葡萄渣成功提取食用纤维

俄罗斯利用葡萄汁加工或酿造葡萄酒后的产物葡萄渣提取食用纤维, 产品含多聚糖、木质素、含氮物质, 性能接近于小麦麦麸食用纤维, 可广泛应用于饮料与糕点生产。

提取食用纤维工艺是将种子分离后, 用 3 种方法处理: (1) 用 96℃ 热水, 用水率 10%, 分别经 30、60、90、120 分钟, 过滤并烘干食用纤维; (2) 用 1.7% 的硫酸水溶液, 按 (1) 法处理后, 用氢氧化钠中和到 pH5.5, 用水冲洗, 过滤烘干; (3) 用 2% 氢氧化钠水溶液, 96℃ 热水, 用水率 10%, 经 60 分钟, 冷却, 冲洗, 再用 2% 盐酸溶液中和食用纤维, 用水冲洗过滤烘干。制得的食用纤维达 75% 左右。

(中国食品产业网)