

核苷酸超滤纯化技术的优化*

谢全灵¹, 夏海平¹, 刘嘉¹, 丁马太¹, 黄桂辉², 何旭敏¹, 蓝伟光^{1,2}

(1. 厦门大学 化学化工学院, 福建 厦门 361005; 2. 三达膜科技(厦门)有限公司, 福建 厦门 361022)

摘要: 从膜通量、蛋白去除率、核苷酸收率、膜污染和膜清洗等方面考察了5种不同型号的 Ultra-flo™ 超滤膜过滤 RNA 酶解液的效果。实验表明 3# (MWCO 30 kD, CA) Ultra-flo™ 超滤膜同时具有高收率(96.4%)、高蛋白去除率(81.3%)、高膜通量(65.6 L·m⁻²·h⁻¹)、易清洗(水通量恢复 99%)的优点, 不仅可以替代通常使用的中空纤维膜, 且通量大、污染小、易清洗, 使该过程得到优化。

关键词: RNA; 核苷酸; 超滤; 膜分离

中图分类号: TQ028.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-9731(2005)08-1226-03

1 引言

核苷酸由碱基、戊糖与磷酸组成, 是核糖核酸的组成单位。它是一类在代谢上极为重要的生化物质, 几乎参与细胞的所有生化过程^[1]。工业化生产核苷酸, 主要有酶解法和发酵法。酶解法包括 RNA 酶解法和菌体自溶法。啤酒酵母细胞质 RNA 含量达 4.5%~8.3%^[2], 可以作为原料提取 RNA, 并通过酶催化反应和分离纯化分别获得 5'-腺苷酸(5'-AMP), 5'-鸟苷酸(5'-GMP), 5'-胞苷酸(5'-CMP) 和 5'-尿苷酸(5'-UMP) 等 4 种 5'-核苷酸。近些年来, 市场对核苷酸量的需求和纯度要求不断地提高, 核苷酸正越来越广泛地用于饲料、医药原料及中间体、食品添加剂、保健品及化妆品等领域。

一些利用啤酒酵母生产核苷酸的工厂采用中空纤维膜去除 RNA 酶解液中蛋白、菌体、酵母提取物等大分子杂质, 该分离装置具有投资和操作成本低、可反冲洗等优点, 但自身存在诸如流道窄、易堵塞, 耐压差、易断丝, 膜材质(如聚砜、聚醚砜)亲水性不强、易受蛋白污染, 膜通量小, 膜使用寿命短等许多不足。本实验通过选择合适的 Ultra-flo™ 超滤膜代替该分离过程中的中空纤维膜, 结果表明, 前者和后者相比较, 具有通量大、污染小、易清洗等优点。

2 实验

2.1 实验材料

Ultra-flo™ 超滤膜片及设备均由三达膜科技(厦门)有限公司提供, Ultra-flo™ 超滤设备是一种锯齿状

的平板膜装置(它通过形成凹凸不平的膜表面来有效减轻膜污染和浓差极化), 膜面积 0.042m², 不同型号膜的截留分子量(MWCO)、膜材质及亲水性情况详见表 1。RNA 酶解液由国内某核苷酸生产企业提供。JC2000A 静滴接触角/界面张力测量仪。

表 1 不同型号膜的相关性

Table 1 Properties of different ultrafiltration membranes

膜型号	1#	2#	3#	4#	5#
MWCO(kD)	8	10	30	50	80
膜材质	C	PS	CA	PES	PVDF
亲水性*	很强	较弱	很强	中等	较弱

注: C 为再生纤维素; CA 为醋酸纤维素; PVDF 为聚偏二氟乙烯; PES 为聚醚砜; PS 为聚砜; * 由生产厂商提供

2.2 实验装置和方法

Ultra-flo™ 超滤工艺流程见图 1。RNA 酶解液经离心泵加压后进入超滤膜组件, 透析液进清液储罐, 浓缩液经热交换器冷却后(料液温度升高主要由泵的运行引起, 到达 40℃ 时启用热交换器将温度稳定在此范围)送回料罐进一步浓缩。在料液浓缩到一定程度后, 用一定量的去离子水透滤(diafiltration), 将浓缩液中的待分离组分充分洗涤出来。实验中每隔 15min 测定一次过滤速度, 并换算成膜通量。

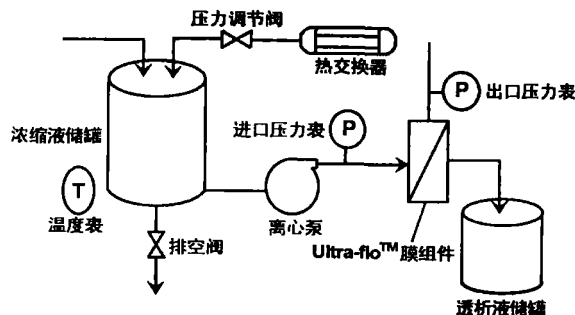


图 1 超滤工艺流程图

Fig 1 Diagram of ultrafiltration process

3 结果与讨论

3.1 接触角与亲水性

接触角又称润湿角, 是在固、液、气三相交界处自固-液界面经过液体内部到气-液界面之间的夹角。接触角的大小, 可以反映液体对固体表面的润湿情况, 接触角越小, 润湿得越好, 因此, 它既是界面张力的重要

* 基金项目: 福建省科技重点资助项目(2000-I-015); 福建省青年科技人才创新资助项目(2001J065)

收到初稿日期: 2005-12-18 www.cnki.net 收到修改稿日期: 2005-02-26

通讯作者: 何旭敏

作者简介: 谢全灵 (1979-), 男, 福建武平人, 在读硕士, 师承蓝伟光教授, 从事膜分离技术和应用研究。

参数,也是物质亲疏水性能的重要判据^[3]。水滴在固体表面上所形成的接触角越小,表明固体表面的亲水性越强,疏水性越弱;相反,所形成接触角越大表示亲水性越弱,疏水性越强。完全理想的亲水表面的接触角是 0° ^[4]。

从表2看出,1[#]和3[#]膜的接触角分别为 14° 和 13° ,远小于其它3种材质膜的接触角。其它3种膜材质的亲水性强弱顺序是:PS>PES≈PVDF。虽然,膜表面的粗糙度(包括孔隙率)对于接触角的测定有所影响,致使接触角数值不能十分精准地反映膜材质亲水性的强弱^[5],但从本实验接触角的测量结果与生产厂家提供的膜片亲水性资料(表1)基本符合来看,接触角还是具有可靠的定性价值的。

表2 不同型号膜片的接触角大小

Table 2 Contact angles of different ultrafiltration membranes

膜型号	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]
膜材质	C	PS	CA	PES	PVDF
接触角($^{\circ}$)	14	72	13	65	73

3.2 亲水性、截留分子量与膜通量

从图2可以看出,5种不同材质的 Ultra-floTM超滤膜,其通量随时间的变化均可分为4个阶段。第一阶段:一方面由于离心泵运转导致温度上升使膜通量增大;另一方面膜污染和浓差极化使膜通量降低。当温度升高的正面影响占主导地位时,膜通量表现为增大趋势(如1[#]);而当膜污染与浓差极化的负面影响占主导地位时,膜通量表现为下降趋势(如2[#]、3[#]、4[#]、5[#])。第二阶段:启动热交换器使操作温度稳定在 40°C 左右,由于料液的不断循环浓缩而浓度增大、流动性变差、膜污染加重,膜通量下降。第三阶段:加水透滤降低了料液浓度,黏度减小,膜通量有所升高。第四阶段:透滤停止,料液因最后浓缩而浓度增大,膜通量下降。5种 Ultra-floTM超滤膜在加水透滤之前所表现膜通量下降趋势并不一样,表明其抗污染性能有所差别。其中1[#](MWCO 8 kD, C)和3[#]膜(MWCO 30kD, CA)的膜通量变化比较平稳,抗污染能力最好;2[#](MWCO 10kD, PS)和5[#]膜(MWCO 80kD, PVDF)的膜通量下降最明显,抗污染能力最差;4[#]膜(MWCO 50 kD, PES)抗污染能力介于其之间。这实验结果,与上述接触角的测定结果相吻合,即亲水性越强的膜,其抗蛋白质污染能力越强。此外,截留分子量较小时,膜通量的下降也较慢。

表1显示,5种 Ultra-floTM超滤膜截留分子量的大小顺序为:5[#](MWCO 80kD)>4[#](MWCO 50kD)>3[#](MWCO 30kD)>2[#](MWCO 10kD)>1[#](MWCO 8kD)。但是,这一顺序与图3所显示的5[#]>3[#]>4[#]>1[#]>2[#]的平均膜通量顺序并不完全一致。1[#]截留分子量虽小于2[#],但因其材质(C)亲水性远比2[#]膜材质(PS)好,所以其平均膜通量($52.8\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)仍

远>2[#]($17.5\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)。3[#]截留分子量也<4[#],但其材质(CA)的亲水性也优于4[#]膜材质(PES),所以其平均膜通量($65.6\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)也>4[#]($53.5\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)。可见膜通量是由截留分子量大小与膜材料性质共同决定的。截留分子量越大,膜材质的亲水性越强,膜通量也越大。

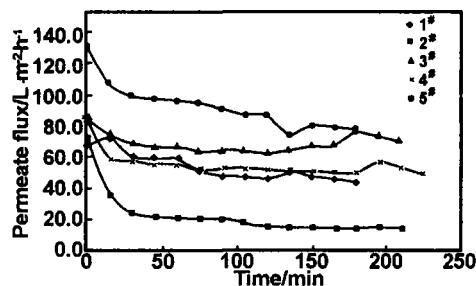


图2 不同型号膜的膜通量曲线

Fig 2 Flux curves of different membranes

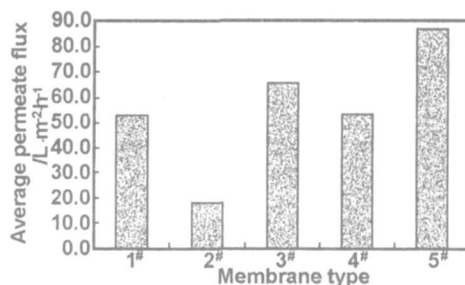


图3 不同型号膜的平均膜通量

Fig 3 Average permeate flux of different membranes

3.3 亲水性、截留分子量与蛋白去除率

从图4可以得出, Ultra-floTM超滤膜对RNA酶解液蛋白去除率的顺序为:2[#]>1[#]>3[#]>5[#]>4[#],也并不与膜的截留分子量顺序完全构成相反的关系。虽然2[#]的截留分子量虽然比1[#]大,但2[#]蛋白去除率(89.5%)反而比1[#](87.6%)稍高些,可能是因为2[#]膜材质(PS)比1[#]膜材质(C)的疏水性强,抗蛋白污染的能力较差,容易在膜表面上形成“第二层膜”而有助于截留更多蛋白的截留。同样可以解释5[#]的截留分子量虽然比4[#]的大,但其蛋白去除率(71.6%)却比4[#](61.3%)高。可见,蛋白去除率也是由膜的截留分子量和膜材质共同决定的。截留分子量越小,膜材质的疏水性越强(亲水性越弱),蛋白去除率越大。

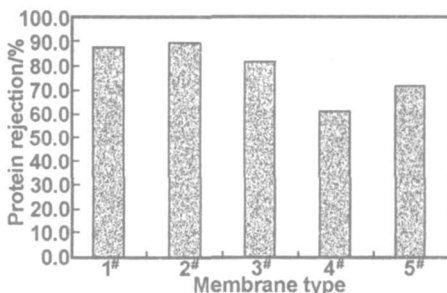


图4 不同型号膜的蛋白去除率

Fig 4 Protein rejection of different membranes

3.4 核苷酸收率

从图5可以看出,5种 Ultra-floTM超滤膜的核苷

酸收率都非常接近且都在 96% 以上,这是因为 4 种核苷酸的分子量都只有 400D 左右,而 5 种膜的截留分子量为 8~80kD,两者相差甚远,不管哪一个型号的超滤膜都不可能核苷酸有明显的截留。

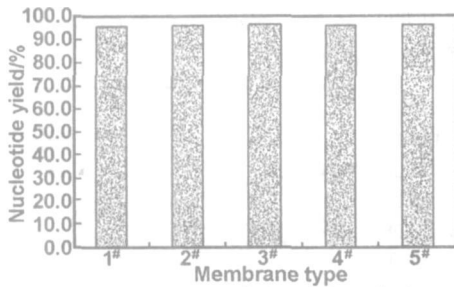


图 5 不同型号膜的核苷酸收率

Fig 5 Nucleotide yield of different membranes

从理论上说,可以通过添加足量的去离子水充分洗涤滤渣而使核苷酸的膜滤收率达到 100%,但透滤水量的增加,会导致滤液中核苷酸浓度的降低,从而增大后续柱分离的处理量,致使生产成本提高,因此加水量要适宜。实验表明,在 Ultra-flo™ 超滤实验中控制加水点浓缩倍数 10 倍,最终浓缩倍数 15 倍,加水倍数 0.2 倍,则核苷酸收率可以达到 96%。

注:

$$\text{加水点浓缩倍数} = \frac{\text{进料体积}}{\text{进料体积} - \text{加水点透析液体积}}$$

$$\text{最终浓缩倍数} = \frac{\text{进料体积}}{\text{进料体积} + \text{加水体积} - \text{透析液总体积}}$$

$$\text{加水倍数} = \frac{\text{加水体积}}{\text{进料体积}}$$

3.5 亲水性、截留分子量、膜污染和膜清洗

从图 6 可以看出,污染膜经去离子水清洗后,其水通量恢复与清洗剂清洗后的水通量恢复具有相同的趋势。越容易用去离子水清洗恢复通量的,也越容易用清洗剂清洗恢复通量。但水通量恢复顺序与截留分子量的顺序并不完全一致。Ultra-flo™ 超滤膜水通量恢复程度顺序为:1# > 3# > 4# > 5# > 2#。截留分子量最小、亲水性最强的 1# 膜,其水冲洗和清洗剂清洗水通量恢复都最容易,截留分子量适中、亲水性较强的 3# 膜的两种清洗和水通量恢复也比较理想,2# 膜材质的疏水性最强,膜清洗水通量恢复最困难。

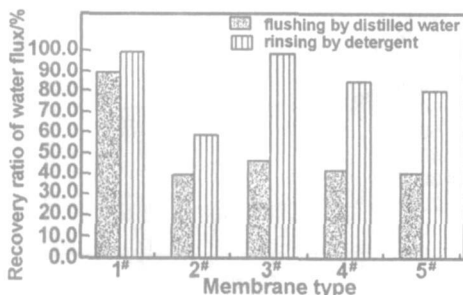


图 6 不同型号膜的水通量恢复

Fig 6 Recovery ratio of water flux of different mem-

branes
主要是由膜污染的情况决定的。(1)从截留分子量的角度考虑:膜的截留分子量越小,就有越多的可溶性大分子污染物(尤其是可溶性蛋白)被截留在膜表面,它们进入膜内的可能性就越小,即膜内污染程度就越小,膜清洗水通量恢复就越容易;相反,膜的截留分子量越大,就有越多可溶性大分子污染物可能进入膜内而使内污染加重,膜清洗水通量恢复就越困难。(2)从膜材质的角度考虑:膜材质亲水性越强,膜抗蛋白污染的能力就越强,膜清洗水通量恢复就越容易;相反,膜材质疏水性越强,抗膜污染性能就越差,尤其是抗蛋白污染的能力就越差,膜清洗水通量恢复就越困难。

4 结 论

5 种不同材质 Ultra-flo™ 超滤膜对于 RNA 酶解液的过滤都具有较高的核苷酸收率(96% 以上),且没有明显的差别。因此,最适合膜型号的选择,主要考虑因素是蛋白去除率、膜通量、膜污染和膜清洗。亲水性强、分子量适中的 3# Ultra-flo™ 超滤膜(MWCO 30kD, CA)在对于 RNA 酶解液的超滤中,同时兼具较高蛋白去除率(81.3%)、高膜通量(65.6L · m⁻² · h⁻¹)、易清洗(水通量恢复 99%)的优点,不但可以完全替代通常使用的中空纤维膜,且通量大、污染小、易清洗,使这一超滤过程得以优化。

在利用啤酒酵母生产核苷酸的实际生产过程,为了最大程度减小蛋白、色素等大分子杂质对分离柱中树脂的污染,提高了树脂的利用率和使用寿命,可以考虑在 Ultra-flo™ 超滤之后在进行二级超滤,以进一步去除可溶性蛋白及部分大分子色素。

参考文献:

- [1] 苏庆辉, 吴晓丹, 马兴胜, 等. [J]. 酿酒, 2004, 31(3): 30-32.
- [2] 廖鲜艳, 李永仙, 李 崎, 等. [J]. 酿酒, 2002, 29(2): 84-85.
- [3] 许 岗, 杨觉明, 陈 平. [J]. 西安工业学院学报, 2004, 24(1): 65-69.
- [4] Jucker C, Clark M M. [J]. Journal of Membrane Science, 1994, 97: 37-52.
- [5] Nakae H, Inui R, Hirata Y, et al. [J]. Acta Mater, 1998, 46(7): 2313-2318.

由图 5 可以看出,固相含量为 55% (体积分数) 的压电陶瓷烧结体比固相含量为 45% (体积分数) 烧结体的气孔少,致密度高。这是由于随着固相含量的增加,单位体积内的颗粒数目增加,使陶瓷颗粒在烧结致密化阶段能有更多机会相互扩散长大,因而其结构更加致密。测试结果表明,两种固相含量的样品,烧结体的密度均为理论密度的 95% 以上,基本能满足实际应用对密度的要求。

4 结 论

(1) 研究表明,适量分散剂的加入可使浆料粘度达到最低,分散剂用量过高或过低均会导致粘度增加。随着固相体积含量的增加,获取最低粘度所需分散剂用量有下降趋势。

(2) 浆料的 pH 值对粘度也有明显影响,当 pH 值在 11 左右时,浆料粘度最低。

(3) 浆料的粘度随固相含量的增加而增加,凝胶注模技术制备的 PMN-PZT 压电陶瓷浆料固相含量可高达 55% (体积分数)。

(4) 通过配制高固相、低粘度的浆料,最终可获

得结构致密的 PMN-PZT 压电陶瓷,密度均为理论密度的 95% 以上。

参考文献:

- [1] Omatete O O, Janney M A, Strehlow R A. [J]. Ceramic Bulletin, 1991, 70(10):1641-1649.
- [2] Janney M A, Omatete O O. [P]. USA, 5145, 908, 1992-09-08.
- [3] 许兴利, 马利国, 等. [J]. 材料工程, 2001, (3):35-36.
- [4] Bleier A, ORNL/TM Rept. No. 11843 [R]. Oak Ridge, TN, Oak Ridge National Laboratory, 1991.
- [5] Prabhakaran K, Pavithran C. [J]. J Eur Ceram Soc, 2000, 20:1115-1119.
- [6] 沈 钟, 王果庭. 胶体与表面化学 第 2 版[M]. 北京:化学工业出版社, 1997. 78.
- [7] 胡云香, 周东祥, 龚树萍, 等. [J]. 电子元件与材料, 2000, 12:12-14.
- [8] Sun J, Gao L. [J]. Metall Sinica, 1996, 9(6):480-492.
- [9] Albert C Y, Ogbemi O O, Mark A J, et al. [J]. J Mat Sci, 1991, 74(3):612-618.

Gelcasting for piezoelectric ceramics of PMN-PZT

DU Jing-hong¹, SI Qing-nan¹, YAN Ji-kang¹, SUN Jia-lin²

(1. Faculty of Materials and Metallurgical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China;
2. Kunming Institute of Precious Metals, Kunming 650221, China)

Abstract: In this paper, gelcasting was applied to preparation of PMN-PZT piezoelectric ceramics. The effects of dispersant, pH value and solid volume on viscosity of slurry were investigated. The piezoelectric ceramics suspension with 55vol% solid loading and below 1Pa · s viscosity was prepared. And the piezoelectric ceramics with compact structure was produced by using this slurry.

Key words: gelcasting; piezoelectric ceramics; PMN-PZT; viscosity; slurry

(上接第 1228 页)

Optimization of ultrafiltration technology for purification of nucleotide

XIE Quan-ling¹, XIA Hai-ping¹, LIU Jia¹, DING Ma-tai¹,
HUANG Gui-hui², HE Xu-min¹, LAN Wei-guang^{1,2}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Suntar Membrane Technology (Xiamen) Co. Ltd., Xiamen 361022, China)

Abstract: The filtration performances of enzymatic RNA degradation liquid with five different Ultra-flo™ ultrafiltration membranes have been studied by comparing flux, protein rejection, nucleotide yield, membrane fouling and membrane cleaning. The results show that 3# Ultra-flo™ ultrafiltration membrane (MWCO 30kD) was the optimum, having a high nucleotide yield (96.4%), high protein rejection (81.3%), high flux (65.6L · m⁻¹ · h⁻¹), high recovery ratio of water flux (99%). This characteristic of high flux, low fouling and easy cleaning leads us to conclude that 3# Ultra-flo™ ultrafiltration membrane was a good candidate for replacing the commonly used hollow fiber membrane to achieve an optimized filtration of enzymatic RNA degradation liquid.

Key words: RNA; nucleotide; ultrafiltration; membrane separation