



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112961379 B

(45) 授权公告日 2022.05.10

(21) 申请号 202110282557.9

C08L 5/04 (2006.01)

(22) 申请日 2021.03.16

C08L 1/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C08L 1/02 (2006.01)

申请公布号 CN 112961379 A

审查员 李忠伦

(43) 申请公布日 2021.06.15

(73) 专利权人 云南师范大学

地址 650500 云南省昆明市呈贡新区雨花
片区1号

(72) 发明人 张旭锋 田乙然 张金蒙 李昌静
包春秀

(74) 专利代理机构 广州润禾知识产权代理事务
所(普通合伙) 44446

专利代理师 郑永泉 黄洁玲

(51) Int. Cl.

C08J 3/24 (2006.01)

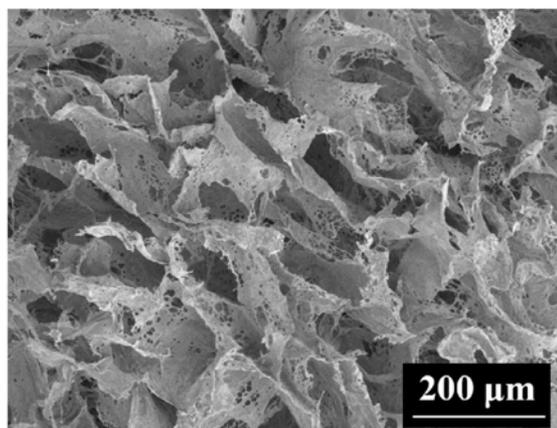
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶及其制备
方法与应用

(57) 摘要

本发明利用冷冻诱导的oxa-Michael反应来制备纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶并公开了一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶及其制备方法与应用,涉及凝胶制备技术领域。该制备方法为:将藻酸钠添加到纳米纤维素悬浮液中,搅拌至完全溶解,调节pH值为11.0~13.0,添加乙烯砜,搅拌,然后置于-12~-20℃条件下继续反应12h以上,反应完成后在室温下解冻、洗涤,即得。本发明的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶不仅具有优秀的力学性能,在制备过程中不需添加任何催化剂,制备方法简单,为设计和开发基于天然多糖的色谱介质提供了新途径。同时,该材料制备方法简单,对溶菌酶具有良好的纯化性能,具有广泛的推广应用价值。



1. 一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的制备方法,其特征在于,将藻酸钠添加到纳米纤维素悬浮液中,搅拌至完全溶解,调节pH值为11.0~13.0,添加乙烯砜,搅拌,然后置于-12~-20℃条件下继续反应12h以上,反应完成后在室温下解冻、洗涤,即得。

2. 根据权利要求1所述的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将藻酸钠添加到质量浓度为0.10~0.75 wt%的纳米纤维素悬浮液中,搅拌至完全溶解,得藻酸钠质量浓度为1.0~2.5 wt%的混合溶液;

(2) 将步骤(1)所得混合溶液的pH值调节至范围11.0~13.0,将质量浓度为1.00~1.75wt%的乙烯砜添加到混合物中,搅拌,然后将混合溶液置于-12至-20℃条件下继续反应12h以上;

(3) 待步骤(2)反应完成后,将混合物在室温下解冻、洗涤,制备得到纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

3. 根据权利要求2所述的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述纳米纤维素为纤维素纳米纤维或纤维素纳米晶。

4. 一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶,其中纳米纤维素、藻酸钠与乙烯砜进行oxa-Michael反应形成三维互连多孔结构。

5. 根据权利要求4所述的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶,其特征在于,所述纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶由权利要求1~3任一项所述的制备方法制得。

6. 一种如权利要求4~5任一项所述纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶在吸附纯化溶菌酶上的应用。

一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及藻酸钠领域,更具体地,涉及一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 目前,可以有效分离和吸附蛋白质的高性能色谱介质在生物医学和生物分离领域中起着重要的作用。传统的蛋白质分离纯化方法主要是通过凝胶微珠介质填充色谱柱进行的。然而,由于凝胶微珠介质的机械强度较弱,通常会导致高流速下的形变和堆积,严重阻碍了色谱技术的大规模应用。此外,没有高背压的情况下凝胶微珠填充色谱介质无法处理未澄清的粘性进料流,例如血液、发酵液和鸡蛋清。因此,迫切需要具有高机械强度、优异的可重复使用性和大孔结构的新型高性能色谱介质,以处理粘性进料流。整体式冰冻凝胶由于存在互连的大孔3D结构,从而具有优异的机械性能,冰冻凝胶在分离细胞(哺乳动物、细菌和酵母)、蛋白质、病毒和质粒方面表现出了巨大优势,同时,整体式冷冻凝胶还具有很高的弹性和可压缩性,可在低背压的情况下以高速进行分离。即使在高压下,冷冻凝胶的孔仍然保持打开状态,从而使进料流不阻塞地流过。当前,各种基于天然多糖的整体式冰冻凝胶由于其具有环境友好、多功能、易于获得、成本低廉等特点而引起了学术界和工业界的广泛关注。

[0003] 传统的整体式多糖基冰冻凝胶可以通过一次或循环的冻融过程来制备。冻融诱导的多糖凝胶化主要归因于分子链的物理交联,但是,物理交联的冰冻凝胶是不稳定的,严重限制了其在色谱介质中的应用。然而对于化学交联而言,化学交联的速率在冰冻凝胶的制造中起着至关重要的作用。快速交联会导致多糖在冰晶形成之前聚集和沉淀,从而形成水凝胶和颗粒;而缓慢且不充分的化学交联将导致冰冻凝胶机械性能不良。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明为克服上述现有技术存在的问题,寻找一种可控的化学交联方法以制备优异的可重复使用的大孔结构新型高性能色谱介质,尤其提供一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的制备方法。

[0005] 为了解决上述存在的技术问题,本发明采用下述技术方案:

[0006] 第一方面,一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的制备方法:将藻酸钠添加到纳米纤维素悬浮液中,搅拌至完全溶解,调节pH值为11.0~13.0,添加乙烯砜,搅拌,然后置于-12~-20℃条件下继续反应12h以上,反应完成后在室温下解冻、洗涤,即得。

[0007] 本发明通过冷冻诱导反应实现米纤维素和藻酸钠与乙烯砜交联剂的化学交联,即通过调节反应体系的pH并通过冷冻浓缩使体系pH升高,从而激活乙烯砜与纳米纤维素、乙烯砜与藻酸钠之间进行oxa-Michael反应,从而实现米纤维素和藻酸钠与乙烯砜交联剂的化学交联。在冷冻步骤中,不断增长的冰晶迫使反应物进入薄片层,化学交联发生在未冷冻/半冷冻薄片层中,约占总体积的5%,这意味着未冷冻/半冷冻域中反应物的浓度增加了十

倍以上。在使用pH调节剂的情况下,低温浓缩导致反应域的pH增加,使反应被激活,从而实现可控化学交联。

[0008] 所述纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的制备方法包括如下步骤:

[0009] (1) 将藻酸钠添加到质量浓度为0.10~0.75wt%的纳米纤维素悬浮液中,搅拌至完全溶解,得藻酸钠质量浓度为1.0~2.5wt%的混合溶液;

[0010] (2) 将步骤(1)所得混合溶液的pH值调节至11.0~13.0,添加乙烯砜直至其在混合溶液中的质量浓度为1.00~1.75wt%,搅拌,然后将混合溶液置于-12~-20℃条件下继续反应12h以上;

[0011] (3) 待步骤(2)反应完成后,在室温下解冻、洗涤,即制得所述纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0012] 在本发明一较佳实施例中,所述纳米纤维素为纤维素纳米纤维或纤维素纳米晶。

[0013] 第二方面,一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶,其中纳米纤维素、藻酸钠分别与乙烯砜进行oxa-Michael反应形成三维互连多孔结构。

[0014] 在本发明一较佳实施例中,该纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶通过上述制备方法制得。

[0015] 第三方面,一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶在吸附纯化溶菌酶上的应用。

[0016] 本发明与现有技术相比较有如下有益效果:

[0017] 1、本发明制备方法操作简单,制备过程中不需添加任何催化剂,原料价格低廉、来源广泛、环保、具有良好的生物相容性,符合可持续发展的要求。

[0018] 2、本发明将传统制备冰冻凝胶的方法进行改进,首次提出了一种乙烯砜引发的乙烯砜和纳米纤维素羟基、藻酸钠羟基之间的pH增加触发的oxa-Michael加成反应。

[0019] 3、本发明所制备的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶具有出色的水下形状恢复性和出色的抗疲劳性(200次水下压缩循环后几乎没有塑性变形)。

[0020] 4、本发明所制备的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶用于溶剂交换后在大气条件下干燥,仍能保持其3D结构,密度非常低,仅为28kg/m³。

[0021] 5、本发明还提供了上述具有优异机械性能的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶在吸附纯化溶菌酶上的应用,对溶菌酶具有良好的吸附纯化性能。在生物分离方面具有广泛的推广应用价值。

附图说明

[0022] 图1为实施例1制备的冰冻凝胶的扫描电镜图;

[0023] 图2为实施例1制备的冰冻凝胶的红外光谱图;

[0024] 图3为实施例1制备的冰冻凝胶的水下循环200次应力-应变变量关系图;

[0025] 图4为实施例1制备的冰冻凝胶的溶菌酶吸附量与1mg/mL溶菌酶溶液接触时间的变化关系图;

[0026] 图5为实施例1基础上不同藻酸钠(SA)用量下制得的冰冻凝胶对溶菌酶的吸附曲线图;

[0027] 图6为实施例1制备的冰冻凝胶从鸡蛋清溶液中连续纯化溶菌酶的循环吸附图。

具体实施方式

[0028] 在本发明一实验中,室温下,pH值为11的纳米纤维素、藻酸钠和乙烯砜的分散液未产生沉淀和胶凝现象,表明在pH值为11时不会发生oxa-Michael反应;在本发明另一实验中,通过用NaOH将分散体pH调节至13以上,将乙烯砜加入分散体中后立即在室温下观察到聚集和胶凝。在该两个实验的基础上,我们联想到冷冻诱导的化学反应,即通过冷冻浓缩使体系pH升高被激活,当pH值高于11时,实现纳米纤维素和藻酸钠与乙烯砜交联剂的化学交联。

[0029] 由此,本发明提出了一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的制备方法:将藻酸钠添加到纳米纤维素悬浮液中,搅拌至完全溶解,调节pH值为11.0~13.0,添加乙烯砜,搅拌,然后置于-12~-20℃条件下继续反应12h以上,反应完成后在室温下解冻、洗涤,即得。

[0030] 上述制备方法通过冷冻诱导反应实现米纤维素和藻酸钠与乙烯砜交联剂的化学交联,即通过调节反应体系的pH并通过冷冻浓缩使体系pH升高,从而激活乙烯砜与纳米纤维素、乙烯砜与藻酸钠之间进行oxa-Michael反应,从而实现米纤维素和藻酸钠与乙烯砜交联剂的化学交联。该反应在室温下不会或几乎不会发生,仅当在冰晶周围的冷冻多糖处发生化学交联时,才会形成具有相互连接的大孔和增强机械性能的坚固冰冻凝胶。在冷冻步骤中,不断增长的冰晶迫使反应物进入薄片层,化学交联发生在未冷冻/半冷冻薄片,约占总体积的5%,这意味着未冷冻/半冷冻域中反应物的浓度增加了十倍以上。在使用pH调节剂的情况下,低温浓缩导致反应域的pH增加,使反应被激活,从而实现可控化学交联。

[0031] 具体地,该纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的制备方法包括如下步骤:

[0032] (1) 将藻酸钠添加到质量浓度为0.10~0.75wt%的纳米纤维素悬浮液中,搅拌至完全溶解,得藻酸钠质量浓度为1.0~2.5wt%的混合溶液;

[0033] (2) 将步骤(1)所得混合溶液的pH值调节至11.0~13.0,添加乙烯砜直至其在混合溶液中的质量浓度为1.00~1.75wt%,搅拌,然后将混合溶液置于-12~-20℃条件下继续反应12h以上;

[0034] (3) 待步骤(2)反应完成后,在室温下解冻、洗涤,即制得纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0035] 优选地,其中纳米纤维素为纤维素纳米纤维或纤维素纳米晶。

[0036] 通过扫描电镜证实,上述方法制得的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶具有三维互连多孔结构,可用于处理流动的液体,十分适合于实际应用。由此,本发明进一步提出一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶,其中纳米纤维素、藻酸钠分别与乙烯砜进行oxa-Michael反应形成三维互连多孔结构。经过进一步实验证实,该纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶具有良好的再生能力和循环应用稳定性。

[0037] 此外,本发明还提出一种纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶在吸附纯化溶菌酶上的应用。

[0038] 为了让本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

[0039] 实施例1

[0040] (1) 取0.5g藻酸钠于20mL 0.75wt%纤维素纳米纤维中(藻酸钠为溶液总质量的2.5%),利用高速搅拌器搅拌至完全溶解;

[0041] (2) 将所得混合溶液的pH值调节至11.0,加入0.35mL乙烯砷(乙烯砷为溶液总质量的1.75%),搅拌,倒入模具中放置-12℃低温试验箱中反应12h;

[0042] (3) 取出冰冻凝胶在室温下解冻,并用大量蒸馏水洗涤,制备得到纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0043] 图1示出了本实施例制得纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的扫描电镜图。从扫描电镜图可以观察到数十微米的相互连接的大孔和层状孔壁,特别地,在壁上存在许多不规则的小孔,这些孔的直径约为3至7 μm ,这意味着促进了被吸附物的扩散。这种特殊的结构与二维吸附剂水凝胶的纳米多孔结构有所不同,二维吸附剂不能处理流动的液体,而三维互连多孔结构形成一个允许溶液自由流通的通道,十分适合于实际应用。

[0044] 图2示出了本实施例制得纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的红外光谱图。

[0045] 为了考察纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的机械强度,本发明进行水下循环压缩实验:取实施例1制备的样品切割成圆柱形(直径10mm,高度15mm)置于装满蒸馏水的烧杯中并在万能试验机中进行200次循环压缩实验,压缩速度为20mm/min。图3示出了纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的水下循环200次应力-应变变量关系图,由图可以看出,纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶在200次循环压缩下,几乎没有塑性变形,凸显出材料超强的抗疲劳性能。

[0046] 为了考察纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的吸附能力,本发明进行静态溶菌酶吸附实验:取0.05g实施例1的干燥样品放入30mL、1mg/mL、pH 8的溶菌酶溶液中,室温下于恒温摇床吸附4小时。图4示出了纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的溶菌酶吸附量与吸附时间的变化关系图,由图可以看出,纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶对溶菌酶吸附能力随吸附时间的延长而增加,并在2h内迅速达到平衡。

[0047] 为了考察藻酸钠用量对最终制得的纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的吸附能力的影响,我们在实施例1的基础上改变藻酸钠(SA)的用量,得到了不同藻酸钠(SA)用量下制得的冰冻凝胶,并采用这些冰冻凝胶进行静态溶菌酶吸附实验,结果如图5所示。可以看出,冰冻凝胶随藻酸钠(SA)用量的增加对溶菌酶的吸附量逐渐增加,实验吸附容量可达278mg $\cdot\text{g}^{-1}$ 。

[0048] 为了考察纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶的吸附稳定性,我们还进行了动态溶菌酶循环提取纯化实验:

[0049] (1) 将蛋清与新鲜鸡蛋分离,然后用 Na_2HPO_4 (20mM, pH 8) 稀释至50% (v/v), 然后以高于7000r/min的速度离心10~20min,得到蛋清溶液。

[0050] (2) 将实施例1制得的冰冻凝胶切割成高度为10mm的圆柱形(直径为10mm)并装入塑料注射器中,将注射器连接恒流泵,缓慢加入蛋清溶液,流速为10mL/h。随后,将冷冻凝胶用 Na_2HPO_4 (20mM, pH 8) 洗涤。之后,使用1.0M NaCl溶液洗脱吸附的溶菌酶,收集洗脱液。

[0051] 然后按此过程一共循环6次。如图6所示,冰冻凝胶的吸附性能在六个循环中保持相对稳定,表明冰冻凝胶具有良好的再生能力和循环应用稳定性。

[0052] 实施例2

[0053] (1) 取0.5g藻酸钠于20mL 0.10wt%纤维素纳米纤维中(藻酸钠为溶液总质量的2.5%),利用高速搅拌器搅拌至完全溶解;

[0054] (2) 将所得混合溶液的pH值调节至范围11.0,加入0.35mL乙烯砷(乙烯砷为溶液总质量的1.75%),搅拌,倒入模具中放置-12℃低温试验箱中反应12h;

[0055] (3) 取出冰冻凝胶在室温下解冻,并用大量蒸馏水洗涤,制备得到纳米纤维素/藻

酸钠冰冻凝胶。

[0056] 实施例3

[0057] (1) 取0.2g藻酸钠于20mL 0.75wt%纤维素纳米纤维中(藻酸钠为溶液总质量的1.0%),利用高速搅拌器搅拌至完全溶解;

[0058] (2) 将所得混合溶液的pH值调节至范围11.0,加入0.35mL乙烯砜(乙烯砜为溶液总质量的1.75%),搅拌,倒入模具中放置-20℃低温试验箱中反应16h;

[0059] (3) 取出冰冻凝胶在室温下解冻,并用大量蒸馏水洗涤,制备得到纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0060] 实施例4

[0061] (1) 取0.5g藻酸钠于20mL 0.75wt%纤维素纳米纤维中(藻酸钠为溶液总质量的2.5%),利用高速搅拌器搅拌至完全溶解;

[0062] (2) 将所得混合溶液的pH值调节至范围11.0,加入0.2mL乙烯砜(乙烯砜为溶液总质量的1.00%),搅拌,倒入模具中放置-20℃低温试验箱中反应24h;

[0063] (3) 取出冰冻凝胶在室温下解冻,并用大量蒸馏水洗涤,制备得到纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0064] 实施例5

[0065] (1) 取0.2g藻酸钠于20mL 0.75wt%纤维素纳米晶中(藻酸钠为溶液总质量的2.0%),利用高速搅拌器搅拌至完全溶解;

[0066] (2) 将所得混合溶液的pH值调节至范围13.0,加入0.3mL乙烯砜(乙烯砜为溶液总质量的1.25%),搅拌,倒入模具中放置-16℃低温试验箱中反应12h;

[0067] (3) 取出冰冻凝胶在室温下解冻,并用大量蒸馏水洗涤,制备得到纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0068] 实施例6

[0069] (1) 取0.3g藻酸钠于20mL 0.75wt%纤维素纳米晶中(藻酸钠为溶液总质量的1.5%),利用高速搅拌器搅拌至完全溶解;

[0070] (2) 将所得混合溶液的pH值调节至范围12.0,加入0.35mL乙烯砜(乙烯砜为溶液总质量的1.75%),搅拌,倒入模具中放置-12℃低温试验箱中反应30h;

[0071] (3) 取出冰冻凝胶在室温下解冻,并用大量蒸馏水洗涤,制备得到纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0072] 实施例7

[0073] (1) 取0.1g藻酸钠于20mL 0.10wt%纤维素纳米纤维中(藻酸钠为溶液总质量的1.0%),利用高速搅拌器搅拌至完全溶解;

[0074] (2) 将所得混合溶液的pH值调节至范围11.0,加入0.20mL乙烯砜(乙烯砜为溶液总质量的1.00%),搅拌,倒入模具中放置-12℃低温试验箱中反应12h;

[0075] (3) 取出冰冻凝胶在室温下解冻,并用大量蒸馏水洗涤,制备得到纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0076] 实施例8

[0077] (1) 取0.5g藻酸钠于20mL 0.75wt%纤维素纳米纤维中(藻酸钠为溶液总质量的2.5%),利用高速搅拌器搅拌至完全溶解;

[0078] (2) 将所得混合溶液的pH值调节至范围13.0,加入0.35mL乙烯砜(乙烯砜为溶液总质量的1.75%),搅拌,倒入模具中放置-20℃低温试验箱中反应12h;

[0079] (3) 取出冰冻凝胶在室温下解冻,并用大量蒸馏水洗涤,制备得到纳米纤维素/藻酸钠冰冻凝胶。

[0080] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明权利要求的保护范围之内。

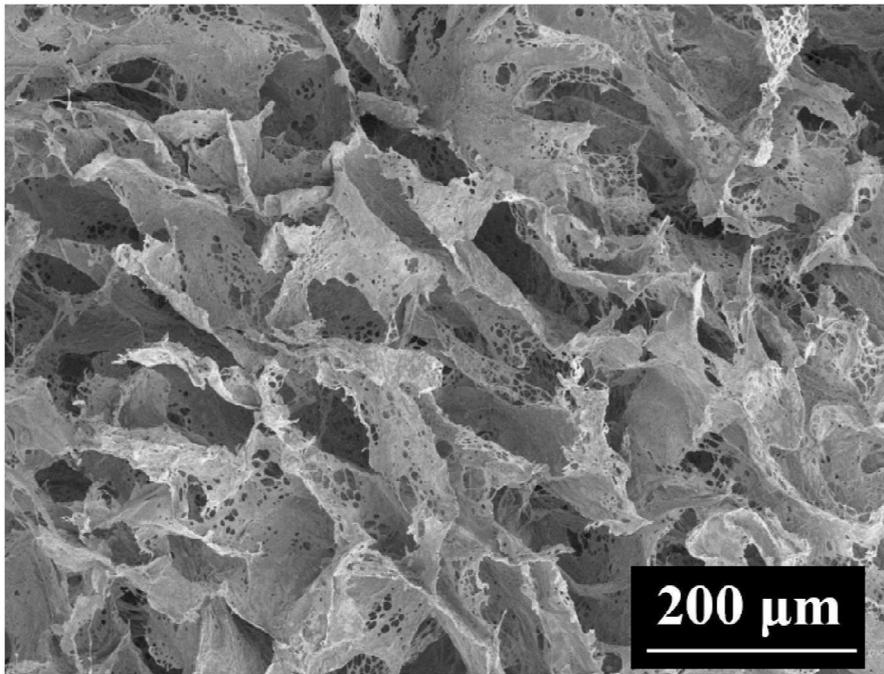


图1

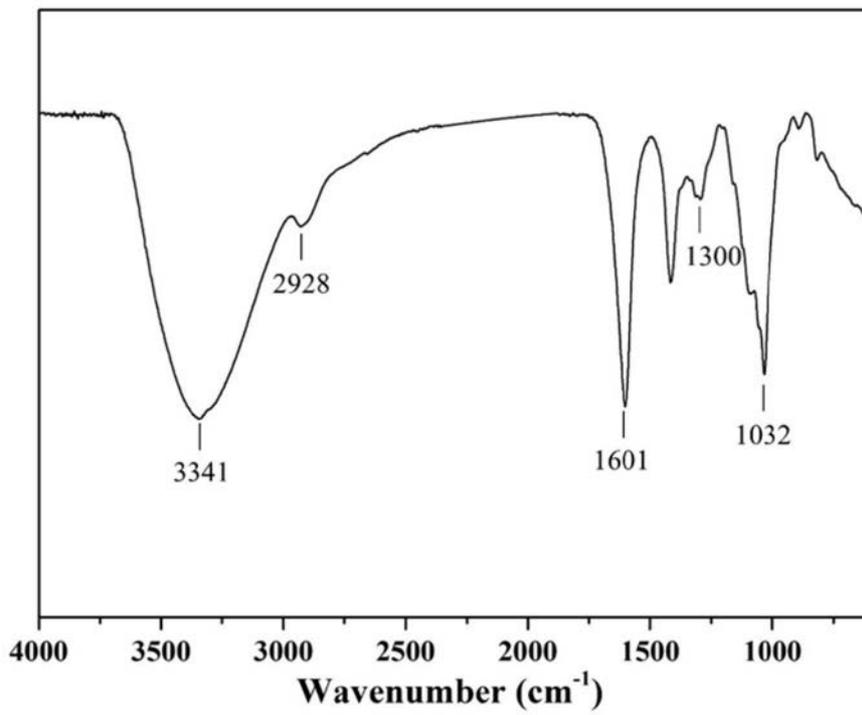


图2

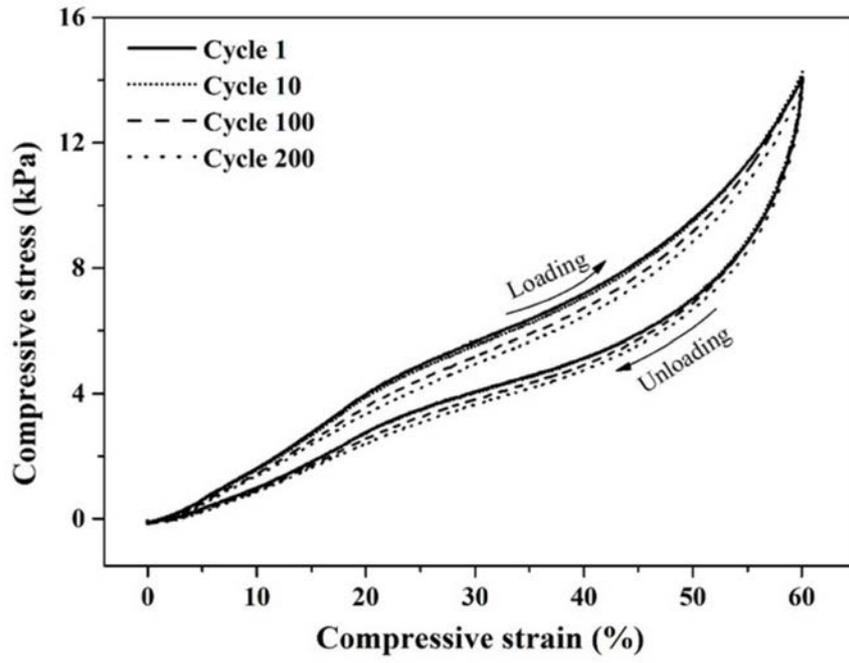


图3

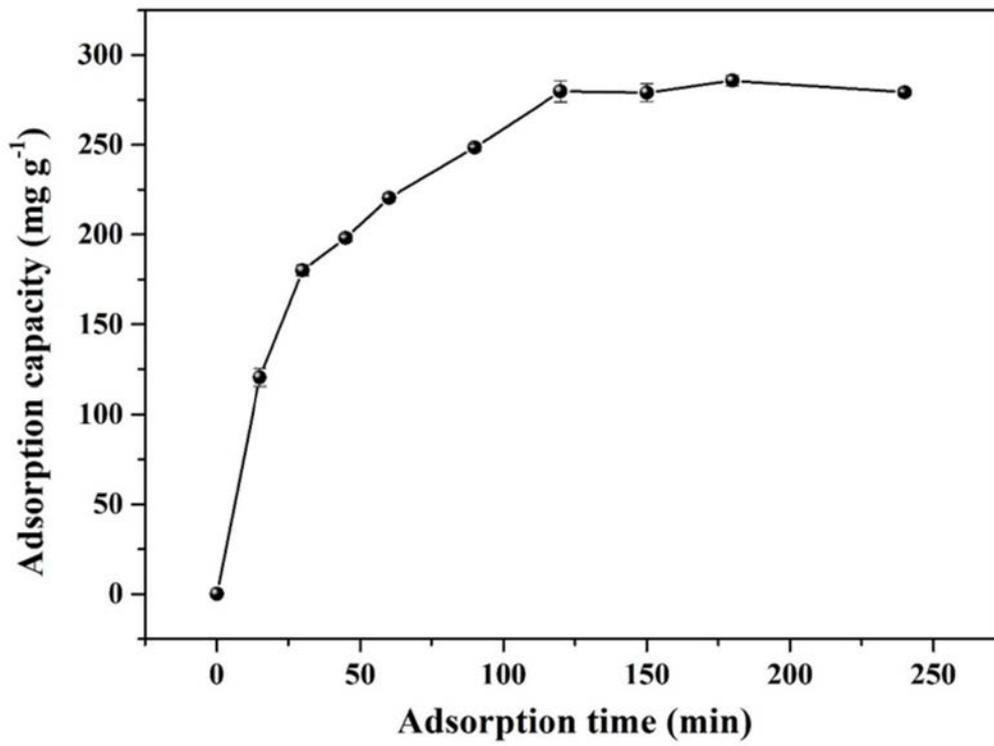


图4

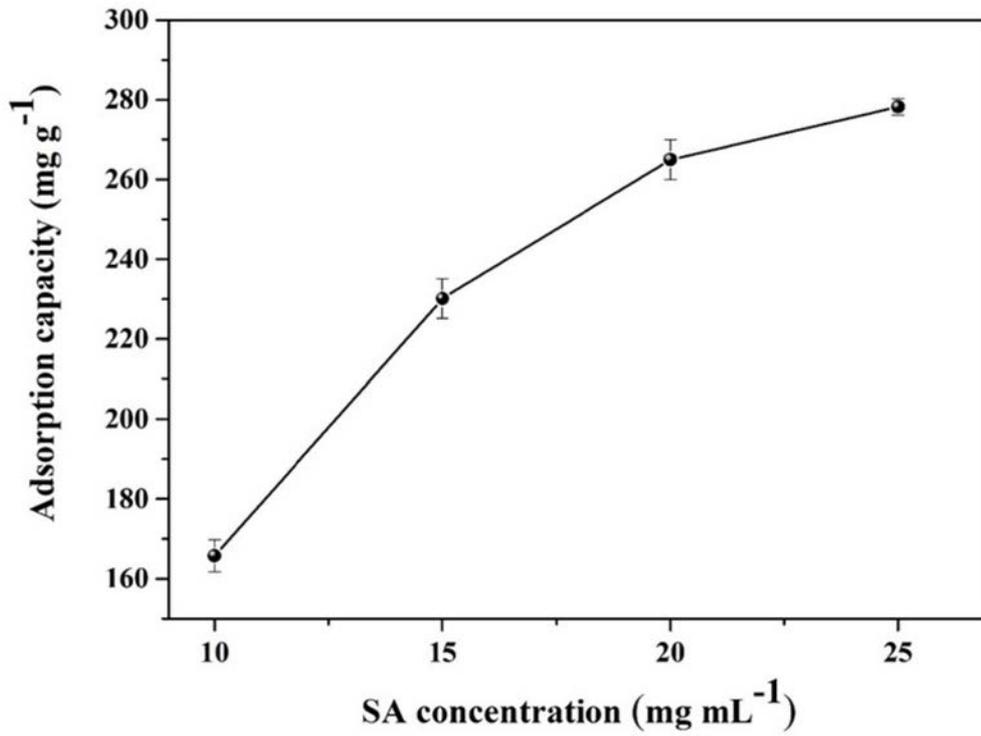


图5

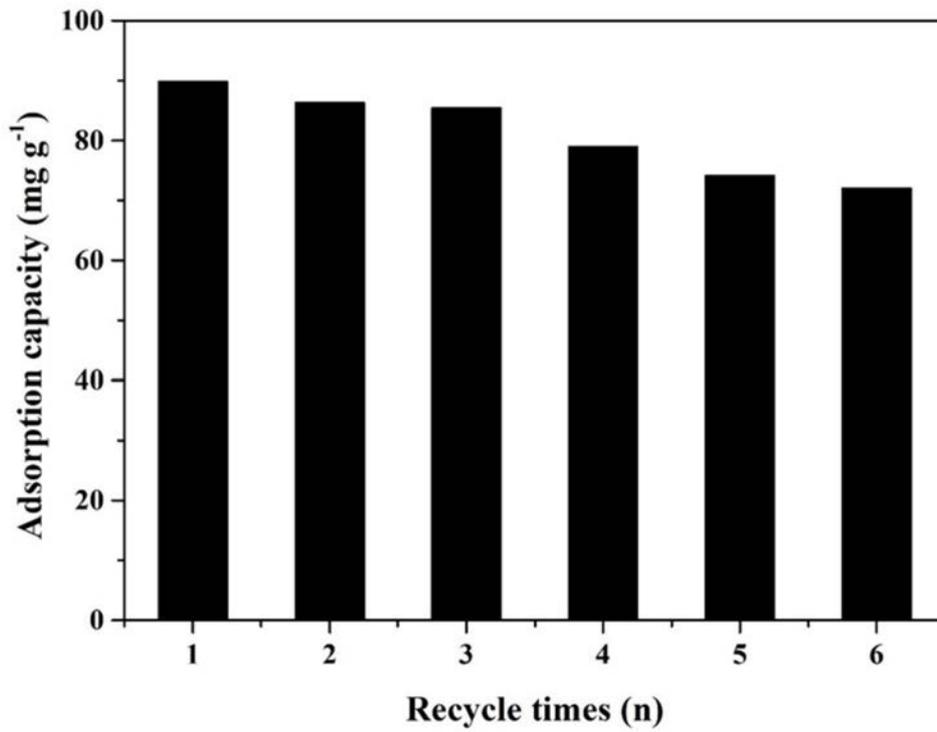


图6