

综 述

超临界流体在生物工程中的应用

王秀道 章克昌

(山东轻工业学院, 济南 250100) (无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

0 前 言

超临界流体技术, 被誉为孕育百年的发明^[1]。早在1897年, Hannay 和 Horgarth 就发现 Agcl 在高压状态的乙醇中溶解度有异常增加的现象。但是超临界流体萃取(Supercritical Fluid Extraction 简称 SFE) 作为一种新型分离技术出现并在工业上应用, 却是近20年的事情。

所谓超临界流体, 是指温度和压力都处于临界点以上的流体。处于超临界状态的流体非液相非气相, 但却有气相那样强的扩散度, 又同时具有液相那样强的萃取能力, 因此被用作萃取剂。由超临界状态变成气态或液态时, 并不象通常那样发生态变和吸收大量的热, 因此超临界状态被称为“无相之境”; 意指它分离十分方便且节能。

目前超临界流体研究方向主要有4个:

- 1) 超临界流体热力学和物理化学的基础研究;
- 2) 超临界流体应用于色谱分析的研究;
- 3) 超临界流体萃取;
- 4) 超临界流体中的化学反应研究。

本文中着重介绍超临界流体在生物工程中进行萃取分离和在生化反应方面的应用进展。首先介绍一下常见的各种流体的临界参数。某些流体的临界参数见表1。

表1 某些流体的临界状态参数

流体名称	临界温度 K	临界压力 MPa	临界密度 g/ cm ³	流体名称	临界温度 K	临界压力 MPa	临界密度 g/ cm ³
二氧化碳	304. 1	7. 38	0. 469	丙 烯	364. 9	4. 60	0. 232
氙	289. 7	5. 84	1. 109	甲 醇	512. 6	8. 09	0. 272
乙 烷	305. 4	4. 88	0. 203	乙 醇	513. 9	6. 14	0. 276
乙 烯	282. 4	5. 04	0. 125	异丙醇	508. 3	4. 76	0. 273
丙 烷	369. 8	4. 25	0. 127	氨	405. 5	11. 35	0. 235
环己烷	553. 5	4. 07	0. 273	水	647. 3	22. 12	0. 315
苯	562. 2	4. 89	0. 302				

表1中所列的最后4种流体为极性流体。由于它们的极性和氢键的作用, 因而具有很高的

临界温度和临界压力。

表1所列第一种流体是大家所熟悉的二氧化碳(CO_2)。它是典型的非极性流体,按照相似相溶的原理,它的溶解能力与正己烷相当。如果要溶解其他物质,可在二氧化碳中添加改性剂或夹带剂(entrainer)。

由于 CO_2 本身所具有的特点: 廉价、易得、无毒、不燃烧、有隔氧作用、临界温度和临界压力低、易分离、可循环使用、不污染产品、对环境无污染等。因而特别适用于提取有生理、生化活性的物质,因此 CO_2 SFE 是研究得最活跃的。

1 超临界 CO_2 在生物活性物质和生物制品提取中的应用

传统的萃取方法一般是以有机溶剂萃取原料中的可溶物。溶剂萃取法所需萃取时间长,萃取效率受溶剂粘度的制约,脱溶剂时需要加热,不仅耗能高,亦会使热敏性物质和活性物质受到破坏。

而超临界流体的密度和介电常数较大,对物质的溶解度也较大,并且随压力和温度的变化急剧变化。因此对某些物质的溶解能力强且有选择,溶剂和萃取物在常温下极容易分离。

超临界 CO_2 萃取特别适合脂溶性高沸点热敏性物质的提取。已见报道的部分提取物见表2。

表2 CO_2 SFE 提取的部分产品表

原 料 名 称	产物名称	备 注	原 料 名 称	产物名称	备 注
月见草籽	月见草油	已工业化	豆 子	豆油精炼油	已工业化
小麦胚芽	小麦胚芽油	已工业化	啤酒花	酒花精油 α -酸、 β -酸等	已工业化
沙棘籽	沙棘油	已工业化	茉莉花	净 油	
紫 草	紫草宁		熏衣草	精 油	
银杏叶	银杏内酯		当 归	精 油	
青 蒿	青蒿素		黑胡椒	精油+ 生物碱	
菊花根	除虫菊酯	已工业化	生 姜	精油+ 姜辣素	
罂粟茎叶	生物碱		小荷香	精 油	
金黄色被包霉菌体	γ -亚麻酸	已工业化	芫荽子	油树脂	
辣 椒	辣椒红色素	已工业化	薄 荷	精 油	
花 生	精炼油	已工业化			

采用超临界 CO_2 萃取精馏,可以代替分子蒸馏技术精制混合油脂。如用含 EPA 和 DHA 总量约60%的鱼油为原料,经 CO_2 超临界萃取精馏可得到纯度达90% 的 EPA 和 DHA^[2]。

2 超临界条件下的酶促反应

以酶为催化剂的反应具有特异性、反应条件温和等特点。但迄今为止,工业上应用酶来生产一般化学品和化学药物的还很少。原因之一是选择一个不易使酶失活,而又易于将酶、反应物和产物三者分离的反应介质比较困难。目前开展的非水体系的酶促反应就是为了要解决上述难题。

超临界 CO_2 是一种特殊的非水相反应溶剂。近年来受到越来越多的关注。用超临界 CO_2

作为反应介质有许多优点:

- 1) 与水相比较, 脂溶性反应物和产物可溶于超临界 CO₂ 中, 而酶作为蛋白质不溶解, 有利于三者的分离;
- 2) 产品回收时, 不需要处理大量的稀水溶液, 可解决环境污染问题;
- 3) 与有机溶剂体系相比, CO₂ 无毒, 不燃烧、廉价、无有机溶剂残留之虞;
- 4) CO₂ 超临界体系中, 传质速度快, 且在临界点附近, 溶解能力和介电常数对温度和压力敏感, 故反应速度提高。亦可以控制反应速率和反应平衡;
- 5) 可简化产物的分离, 有可能将反应和分离过程耦合。

已对10多种酶反应进行了研究, 主要是酯化反应、酯交换反应、酯水解反应和氧化反应。反应条件温和, 反应温度低于50℃, 部分酶催反应见表3^[3]。

表3 某些在超临界 CO₂ 条件下的酶催化反应

反应名称	酶 类	载 体	反应器	反应介质和条件	
p-硝基磷酸苯酯的水解	碱性磷酸酶	/	间歇	CO ₂	35℃ 10MPa
p-甲酚和 p-氯酚的氧化	多酚氧化酶	62~149μm 玻璃珠	间歇、连续	CO ₂ / O ₂ CHF ₃ / O ₂	36℃ 34MPa 34℃ 34MPa
甘油三酸酯与硬脂酸的酸解	脂肪酶	444μm 离子交换树脂和硅藻土	间 歇	CO ₂	50℃ 30MPa
乙酸乙酯与异戊醇醇解	脂肪酶	444μm 离子交换树脂和硅藻土	连 续	CO ₂	60℃ 10MPa
胆甾醇的氧化	胆甾醇氧化酶	玻璃珠	间歇连续	CO ₂	35℃ 10MPa
甘油三辛酸酯与油酸的酸解	脂肪酶	444μm 离子交换树脂	间 歇	CO ₂	60℃ 10MPa
N-乙酰-L-苯丙氨酸与乙醇的酯	枯草溶菌素	/	间 歇	CO ₂	45℃ 15MPa

当然, 以超临界 CO₂ 为反应介质可能有不利的一面, 主要是在高压下 CO₂ 分子会大量溶解于酶周围的水膜中, 使局部 pH 降低, 从而影响酶的活性^[4]。

作为一种非水反应介质, 对于生物催化反应, 超临界流体有着巨大的潜力。但由于实验技术上的困难, 目前对它的认识还不充分。深入研究其内在的作用机理, 揭示其内在的规律, 对于指导今后的研究工作以及这一技术的推广应用都有重要的意义。

3 超临界水中纤维素水解转化法制备葡萄糖

纤维素被认为是非常有应用潜力的可再生资源, 等待人们去开发利用。以此为原料, 可以生产能源、化学品、食品和药物等。但关键是纤维素如何水解转化制备葡萄糖。

通常纤维素水解是在高温下用酸水解。但这种方法有许多问题, 主要是反应速度慢, 腐蚀性强、产生大量需要处理的酸性废水。

超临界水中纤维素的非催化转化过程, 是一个可以避免这些问题的新方法。在水的超临界或亚临界条件下, 水本身高度离子化, 可作为一种酸催化剂, 对纤维素的转化起催化作用。如前所述, 在临界点附近水的物理性质和化学性质可由压力来控制, 从而可控制反应产物的分布。在超临界条件下($t = 473 \sim 650\text{K}$, $P = 25\text{MPa}$) 纤维素迅速转化, 在没有酸催化剂的条件下, 总反应速率比通常的酸催化水解过程快10~100倍。温度为673°K时, 在不到15s 的时间内纤维素几乎100% 转化。

4 超临界流体的细胞破壁技术(CFD)

细胞破壁是生物工程下游技术处理过程中回收胞内酶和重组 DNA 蛋白的重要步骤。微生物细胞通常有坚硬的细胞壁。用机械方法如高压匀浆、高速球磨或超声波破碎都会产生大量的热,从而使某些生物活性物质受到破坏。用非机械方法破碎,如酶法、化学法和渗透压法,则处理量少,而且不可避免地引进一些杂质,使本来就复杂的体系变得更为复杂化。

Bio-Eng-lnc 于1988年开发了超临界流体细胞碎壁技术^[5],用超临界 CO₂作为介质。由于超临界 CO₂易于渗透到细胞内,所以很快就可以达到细胞内外的压力平衡;然后再突然降压,此时细胞因胞内外压差较大,剧烈膨胀而发生破裂。超临界细胞破碎技术主要是利用了超临界流体的如下性质:

1) 超临界流体在临界点附近,其压力的微小变化会使体积发生很大变化,产生的能量很大。因而超临界 CO₂可以破坏较厚的细胞壁。如常见的酵母,甚至对酵母浆都可以得到很好的破碎效果。

2) 超临界 CO₂对细胞壁中的脂类有萃取作用,会破坏细胞壁的化学结构。造成细胞壁在某些位置上的破坏。此性质使细胞在细胞破碎时仅在一定的位置破裂,而不是整个细胞的“粉碎”,破碎后的细胞壁碎片较大,使下游分离过程变得简单容易。

3) CO₂节流膨胀是吸热过程,在破壁过程中温度迅速下降,可防止通常破碎过程升温引起的热敏性物质破坏。

表4 常见的微生物破壁效果

菌种(浓度)	蛋白质释放率	核酸释放率
酵母(68 g/L)	27%	67%
E. Coli(69 g/L)	17%	51%
枯草杆菌(93 g/L)	/	21%

CFD 过程,有良好的调节性能。调节温度、压力、停留时间、膨胀速度,以适应破碎各类细胞壁。几种常见的微生物破壁效果见表4。

5 生化药物的超临界流体重结晶(GAS)过程

传统的生化药物提纯、干燥与造粒方法有喷雾干燥、研磨、冻干等。这些方法对于热敏性、易变性的生化药物来说,存在着较多问题。喷雾干燥产生的颗粒粒径可在5 μm 以下,但由于需要加高温,在干燥过程中生物活性物质易失活,使产品品质下降。

研磨产生的颗粒在10~50 μm 之间,粒径分布较宽,并且研磨过程产生的热量使蛋白质等变性。

虽然气流粉碎可产生粒径范围为1~10 μm 的微粒,但是此过程需要使用高度压缩的流体,粉碎噪音很大,而且使蛋白质带电。此外此法仅对硬而易碎的材料有效,对松软的蛋白质并不理想。

冻干过程,投资费用高,能耗大。虽可产生理想的粒径范围,但粒径分布宽,而且会使部分蛋白质变性。

利用如乙醇、丙酮等有机溶剂作为反萃剂进行反萃取(Stripping back extraction)^[6]可使药物从水溶液中沉淀出来。不过有机溶剂易使蛋白质变性,且粒径不易控制,需要进一步干燥去除残留的溶剂,有机溶剂不易除尽。

近年来生物技术在食品发酵行业中进展不大,但在医药工业领域却大放异彩。因而受到各国高度重视。目前已有19种从自然产物中提取的含量极微且难以获得的活性因子推向工

业化与临床应用。正在临床试验,不久将被有关国家政府批准上市的生物药物还有近20种,而处于试验阶段的品种则更多^[7]。据此,开发新型生物药物的提纯干燥与造粒技术就显得非常重要。

利用超临界流体(SCF)作为稀释剂的重结晶(GAS Anti-Solvent)过程,开创了超临界流体应用的新领域,以SCF-CO₂作为稀释剂重结晶提纯制备微粒干粉生化药物的方法,有传统方法无法比拟的优点,因而受到关注。

生物药物多为蛋白质,易与有机溶剂互溶。而生物药物在超临界流体中的溶解度很小,当超临界流体进入溶液中时,使溶液稀释膨胀。降低了原溶剂对溶质的溶解能力,因而在较短的时间内形成较大的过饱和度,使溶质结晶析出,形成纯度高,粒径分布均匀的微细颗粒。

采用此技术对溶于二甲基亚砷(DMSO dimethylsulfoxide)的胰岛素(insulin)进行重结晶试验研究,结果得到的胰岛素90%的颗粒直径小于4 μm ,10%的颗粒直径小于1 μm 。动物活体对照实验表明,经过重结晶过程的胰岛素生物活性没有变化。

蔡建国^[9]等人以DMSO溶剂溶解胆红素,在超临界流体中试验胆红素重结晶,获得微细蓬松的胆红素,其质量分数从30%提高到90%以上。

此外,还有文献报道过采用反萃取技术对抗生素脱溶剂的实验^[9]。

6 结 语

从本文中的简要介绍,可见超临界流体技术在生物工程领域应用潜力之一斑,尽管人们在超临界领域对其热力学过程等基础理论的研究还有待深入探讨。

超临界流体技术在生物工程领域的应用还不止本文中所叙述的这些内容。在制造纳米级超细颗粒以用于色谱载体,在缓释药物造粒,在超临界水氧化(SCWO)法处理污水,在生物制品(如血浆制品)的灭菌等诸方面均能有所建树。随着科学技术的发展,相信超临界流体技术会在生物工程领域有更加广泛的应用。

参 考 文 献

- 1 王秀道,尹卓容. 发酵2T 二氧化碳的回收和应用. 北京:中国轻工业出版社,1996
- 2 陈执中,章月华. 中国药学杂志,1994,29(1):12
- 3 Nakanura K, Chi Y M, Yamada Y, et al. Chem. Eng. Commun. 1986, 45:207~212
- 4 Marty A, Chulalaksananukul W, Willemot R M, et al. Biotechnol. Bioeng. 1992, 39:273~280
- 5 Castor T F, Hong G T. Proc. 2nd Int. Symp. on Supercritical Fluids, McHugh, M. A., Ed., Boston. 1991. 139~142
- 6 顾翼东. 化学词典. 上海辞书出版社,1992
- 7 张致平,蔡年生. 药物生物技术,1994,1(1):56
- 8 蔡建国,杨中文,周展云. 中国生化药物杂志,1994,15(3):209
- 9 谷口正之. 发酵工学会志,1989,67(5):439

(责任编辑:秦和平)