

酶膜生物反应器及其应用

王爱勤

(甘肃省膜科学技术研究所, 兰州)

酶膜生物反应器是生物反应器的种类之一。它是由高分子膜与酶相结合构成的, 是膜科学技术与生物技术相结合的产物, 最早是由维塔尔 (Weetal) 于 1966 年提出^[1]。众所周知, 酶是一种具有催化功能的蛋白质, 它与一般的化学催化剂相比, 具有专一性、效率高和反应条件温和等优点, 但是酶也有很多弱点, 如较脆弱、易变性失活、使用寿命短及水溶性酶在反应后不易分离, 不能重复使用等, 因此, 已往的惯例是把价格昂贵的酶只用一次即被抛弃, 这即不合理又是一种浪费。为了改变这种状况, 人们采取了种种措施, 开发了固定化酶或固定化细胞技术。目前常用的固定化技术有①物理包埋; ②用双功能(或多功能)试剂交联; ③吸附; ④共价结合于水不溶性载体; ⑤胶囊包埋等。然而, 近年来的研究发现, 将酶固定在高分子膜材料的多孔表面或内部, 可以实现细胞的发酵, 产品的浓缩分离, 酶的回收再利用, 提高了反应效率, 降低了运转和耗酶的成本, 因而显示了可观的经济效益和诱人的应用前景^[2-4]。

膜科学技术诞生于本世纪 60 年代中期, 由于它具有: ①分离过程中无相变, 能耗低; ②浓缩分离过程不需加热; ③组件结构紧凑、设备简单; ④即使在低温下也可进行分离等优点, 现已广泛应用于食品加工, 医药卫生, 制气, 水处理和环境保护等方面, 已被国际上公认为 20 世纪末至 21 世纪中叶导致革命性的重大生产技术, 目前已开发了微孔膜, 超滤膜, 反渗透膜, 气体分离膜, 渗透蒸发膜, 离子交换膜和液膜以及医用高分子膜。膜组件的构型有平板式, 卷式, 管式, 中空纤维式以及毛细管式等。事实上, 正是 70 年代各种功能高分子材料的不断开发, 才使膜科学技术的应用范围大大开拓, 而酶膜生物反应器即是在此情况下应用而生并得到逐步发展的。

(一) 酶膜生物反应器的基本原理及其制备方法

酶膜生物反应器的主要应用对象是生物工程中的酶反应过程。其组件形式主要有以下几种: ①搅拌式平面膜反应器; ②管状膜反应器, ③螺卷式反应器; ④中空纤维膜反应器; ⑤微胶囊化膜反应器。现以中空纤维膜生物反应器为例, 阐述其酶反应过程的基本原

理^[5-7]。

中空纤维膜生物反应器的关键部分是中空纤维, 它是用聚砜, 芳香聚酰胺, 醋酸纤维, 聚乙烯, 聚丙烯或其它高分子聚合物, 在特殊条件下拉丝而成。这种中空纤维呈空心管状, 内径约 200 微米, 管壁厚约 50—75 微米。用数百根或数千根这样的纤维集合成管束, 然后封存在特别的圆筒里, 再通过一定的方式将酶或细胞含浸在中空纤维管壁的微孔表面或里面, 就组成了一个新颖的中空纤维膜生物反应器, 如图 1 所示。由于中空纤维内部是空的, 纤维之间又总有缝隙, 所以在圆筒内就形成了两个空间: 每根纤维的管心成为“内屋”, 可作透出养份供应细胞生长的“粮仓”; 而管与管

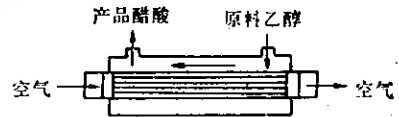


图 1 中空纤维膜生物反应器

之间的间隙, 就成了“外屋”, 微生物细胞将在这里吸取从“内屋”渗透出来的养份, 迅速生长发育。由这些细胞产生的大分子生物代谢产物, 由于体积大而无法穿透中空纤维的薄壁进入管心, 并不断地被浓缩。当需要收集这些产物时, 只要把“外屋”的总出口打开, 生物产物即可流出来。而细胞生长繁殖过程中吐出的废物, 因为是小分子, 可以穿透管壁渗入“内屋”, 最后从“内屋”总出口排出, 同时它不会对“外屋”的酶或细胞产生污染。例如, 将醋酸菌固定在中空纤维外表面上, 使空气从纤维内通过, 并透过膜供给在膜表面的醋酸菌, 培养液按图中所示方向流动的过程中, 在膜表面上将乙醇转变为醋酸。当中空纤维膜在反应器中占的体积为 5.6%, 使用 0.1MPa 的纯氧, 流速为 5ml/min, 乙醇的进口浓度为 90g/L 时, 乙醇的转化率为 80%。如果进一步提高中空纤维的体积比, 乙醇的转化率还可以提高。

酶膜生物反应器是将酶固定多孔膜上, 把反应过程和分离过程结合起来同时进行, 因而它不仅可使

反应产物通过膜不断地分离出来,减少产物的抑制作用,而且还可以简化工艺,提高效率,使反应能连续进行。目前将生物催化剂(酶或细胞)固定在膜系统中,可分为如下几种方法。

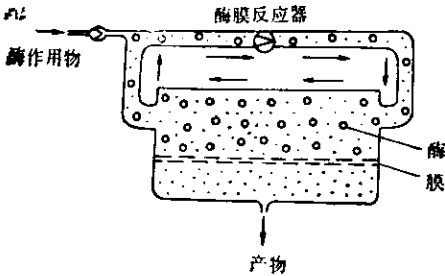


图2 连续操作膜生物反应器示意图

1. 膜对均一溶液中酶的吸附。该固定方法是指将膜置于含酶的均一溶液之中,使酶吸附在膜的高分子膜的微孔内,进而充当蛋白分子的主要截留层,再通过膜本身,使反应产物不断地被分离出来。图2是连续操作酶膜生物反应器示意图^[4]。该装置能进行均质催化。底物以恒定的速度加入循环回路,当酶通过回路中的膜反应器时,生物催化剂被膜截留,并在回路中循环;生成的低分子量产品则透过膜离开反应器。为了防止催化剂的损失,膜对催化剂必须有很高的截留值,为此,所用的膜通常为超滤膜。该类装置主要用于酶的精制。

2. 凝胶作用。如果将酶溶液加压使其通过截留酶的高分子膜,则酶势必在膜表面造成积累,并在一定条件下使膜表面上形成了凝胶层。在界面上,由于扩散与对流的传质平衡产生的酶浓度超过酶蛋白特有的凝胶作用浓度,于是便发生了凝胶作用。^[1-3]这是利用浓差极化现象进行酶固定的一种技术。如果依适当的次序在膜表面沉积几层酶凝胶,则该酶膜反应器就有可能进行多种酶反应。然而,在中空纤维、毛细管和平板膜组件的流体系统中,由于轴向液流对酶的凝胶层产生某种剪切应力,这就会丧失部分或全部酶的凝胶层。因此,该固定化技术有某种局限性,特别适用于超滤膜中酶的固定。

3. 含浸。该固定技术主要用于中空纤维膜或毛细管膜组件中。酶可以含浸在中空纤维或毛细管膜腔中,也可以含浸在膜束周围的外壳以内,或者含浸在支撑体的微孔之中。通常多孔支撑体的海绵壁薄层的厚度约为75微米,微孔大小约为5—10微米,它具有很高的透水能力,主要对半透性薄层起机械支撑作用。同时,在此海绵壁薄层上还有一活性层,厚度约为0.5微米,微孔大小为10—200Å,它对膜的分离性能起着决定性的作用。如果致密层的微孔小到足以滞留酶而同时又大到足以通过酶作用底物和产物,只要纤维外边干燥,酶就可以有效地被固定在海绵状环形部分之内,

图3为经固定化的中空纤维膜的断面模型。采用该固定化技术的酶膜生物反应器,不仅减小了传质扩散阻力,而且采用直径小的中空纤维可得到大的面积/体积比率^[7-10]。同时,膜的选择性透过作用,既可以保护酶又可以借助于渗透率选择酶作用底物。因此,这种构型尤其适用于循环流动和高浓度产物的情况。

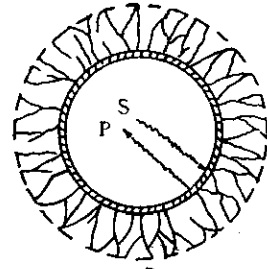


图3 固定化酶中空纤维的断面模型

4. 价键耦合。该固定方法是指将酶通过活性极强的桥链分子(如CNBr)或多功能试剂(如戊二醛)以共价键的形式耦合在膜的内壁中。由于酶的自由氨基与戊二醛的功能基团发生了反应,形成了中间的席夫碱,所以耦联是非常稳定的。因此,它可以用于连续流动反应器^[3,11]。

5. 微胶囊化。它是采用半透膜将酶包埋起来的一类固定方法^[12]。首先基质分子扩散进胶囊壁膜内,接受酶后反应;反应生成物再扩散通过膜壁从胶囊中排出。由于酶与基质溶液之间存在这一障壁——膜,基质溶液中既使混入了酶的毒害物,也极难扩散进入反应区,所以不必除去也不会给反应带来不良后果。

(二) 酶膜生物反应器的类型及其应用

酶膜生物反应器具有以下特点:①无需特别处理就可使酶固定化;②有利于进行无菌操作;③不必将酶进行化学修饰,即可在游离状态使用;④当酶以游离状态使用时,如果酶是稳定的,则不必进行改善处理;如果酶不太稳定,则可添加稳定剂。目前各种酶膜生物反应器大致可分为五类^[2,4,13,14]。

Wandrey 等人采用的反应器,是将辅酶(NAD)与聚乙二醇反应使之高分子化,以防NAD从超滤膜中漏掉,然后再与L-亮氨酸脱氢酶、甲酸脱氢酶一起被抑制在反应系统中,这样即可由4-甲基-2-羧基戊酸和铵离子生产L-亮氨酸。

西德 Degussa 公司利用这种反应器进行了氨基酸的DL分离扩大试验。他们用0.02—0.1%的15IU/mg 酰基转移酶,在反应温度为37℃,基质的停留时间为4—7小时的条件下,从N-乙酰基-D、L-蛋氨酸;N-乙酰基 D、L-苯丙氨酸中分离出L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸,其转化率约为70%。使用1437 IU/mg氨基酸的酰基转移酶,连续运转2300小时,可分别得到366

kg, 177kg 的 L-蛋氨酸和 L-苯丙氨酸, 其转化率为 82—86%。

Hob 等人采用的反应器以脂肪酶为催化剂, 由甘油和油液合成酯。首先将甘油-酶水溶液置于膜厚为 0.4—4 μm 的聚丙烯膜的一侧, 而另一侧导入油酸, 使反应在膜的表面上进行。油酸加料速度为 3.2ml/h, 在酶的存在下 (浓度为 20mg/ml 甘油水) 与甘油水溶液反应 30 小时, 转化率为 60%。若将反应生成的水控制在 7—9%, 30 小时后, 转化率可达 80%。如果在甘油-酶水溶液中加入 1% 的 CaCl_2 , 并将水控制在 3—5%, 则 70% 的转化率可维持 30 天, 所以该过程可望实现工业化。

中空纤维酶膜生物反应器具有特殊的结构和功能, 因此, 它不仅是大规模培养生物细胞的温床, 而且也是截留、浓缩、纯化生物产物的“工厂”。所以, 它在生物技术中的用途极广。目前它已用于微生物发酵, 抗生素, 维生素, 甾体激素, 生长激素, 杀虫剂, 香料, 氨基酸, 有机酸, 核酸, 酶制剂的生产和酿造酒类等方面。近年来, 人们又将它用于临床治疗, 采用共价耦联固定技术的中空纤维膜生物反应器, 已成功地将作为体外血液的去毒器, 同时, 它也可以减少白血病患者血液中的精氨酸和天门冬氨酸。

丙烯酰胺是石油化工用来处理废水和从旧油中挤油的一种化学试剂。日本化学工业公司的研究人员正致力于诺卡氏菌和棒状杆菌的研究。因为这类细菌含有丰富的酶, 一旦将它固定在膜中, 便可将丙烯腈和水转变成丙烯酰胺。采用酶膜生物反应器发酵生产各种氨基酸, 生成的氨基酸可透过膜, 而酶不能透过, 因此可保持连续的生产, 使氨基酸的产量成倍增长。实际运转对比表明: 采用酶膜生物反应器连续发酵生产酒精, 效率比常规法高 20 倍。

Larsson 等人将水的二相系统与超滤组合在一起, 实现了用淀粉进行乙醇的生产 (图 4 所示)。在 15 升

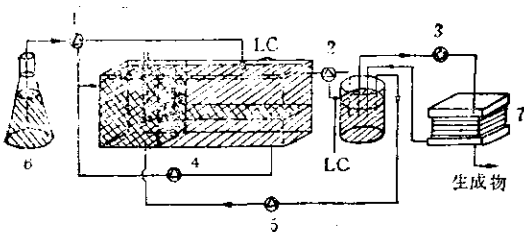


图 4 水二相酶膜反应器

1—5: 泵 6: 淀粉液 7: 膜装置 LC: 水平控制

的反应槽中加入 10% 淀粉, 7 小时后就有 80g/l 的葡萄糖产生。如果再加入 65g 酵母, 则酵母就转移到下层, 在加入后 15 个小时左右, 即可得到 50g/l 的乙醇, 此时乙醇转入上层, 转化率为 100%。将含有该反应生成物乙醇的上层物质用超滤膜过滤, 以分离聚乙二

醇、酶、醇和水, 其中聚乙二醇和酶返回反应系统以备再用。

(三) 酶膜生物反应器的发展动向

事实上, 初期的酶膜生物反应器, 实际上是把反应器与膜分离装置结合到一起的联合体后者只是单纯的起产品的分离作用^[12]。例如, 搅拌与超滤膜相结合的反应器, 就是在搅拌器出口处, 设置半透性超滤膜, 这种膜只允许产物和未曾反应的底物通过, 而大分子量的酶被截留在器内 (图 4)。为了提供较大的固定酶接触表面, 改善接触效果, 增强传质等, 人们又开发了一种新型的酶膜生物反应器——螺卷膜式生物反应器。它的结构是将含有酶的膜和支撑材料交替地缠绕于中心棒上, 然后配装于筒体内。支撑材料的作用是把相邻的两层酶膜分开, 以防止膜层相互重叠。

众所周知, 固定化酶或细胞生物反应器, 主要是以达到提高产率为目的。但是由于反馈阻力的影响, 固定化酶或细胞过程并不能使所有的产率都提高, 于是 Cho 和 Shuler 设计了多膜式生物反应器^[13], 用于生物产品的连续回收。它是以 TBP (tri-normal-butyl phosphate) 作为溶剂的, 其发酵速率有明显的提高。图 5 为多膜式生物反应器的原理示意图。它可用于阻碍反应进行的产品和气体产生的过程。三块膜形成了四个单独的空间: 第一层是气体/细胞膜, 具有憎水性, 即只允许气体通过而不允许液体通过; 第二层是细胞/营养液膜, 具有亲水特性。如果使膜孔充分小于细胞直径, 就可以把细胞截留在细胞层, 这样可保持高的细胞浓度, 而营养液通过扩散和压力作用到达细胞层; 第三层是营养液/萃取剂膜, 具有另一种憎水性, 如果保持营养液侧的压力高于萃取剂的侧压力, 但又低于临界压力, 则萃取剂可以被有效的截留而不能到达营养液层, 而又能把乙醇萃取过来。Cho 和 Shuler 对该类型反应器做了大量工作。目前他们正在研究温度及营养液输入情况对反应的影响以及膜材料的选择, 各层物料的传递情况等。可望进一步提高细胞的浓度, 增加反应器的产率, 减少产品分离的能耗。

近年来人们的进一步研究还发现^[4, 16, 17]: 利用中空纤维超滤膜反应器, 不需将酶固定在膜基质里面, 就可以用来提纯酶和培养生物细胞, 因此, 这不仅可以使产物和菌体及时得到分离, 避免了产物对生化反应的抑制, 而且也提高了产品的质量和稳定性, 克服了机械搅拌发酵罐细胞生长慢、效率低等缺点。所以, 它有可能代表着今后酶膜生物反应器的发展方向。

酶膜生物反应器在生物工程中具有很大的魅力, 但是目前仍处在基础研究和中试阶段, 还有许多问题有待解决, 如催化剂吸附在膜面上会改变膜的截留性质, 使透过膜的压差增加; 在循环流动过程中, 由于剪切力可能会引起酶的失活和蛋白质的变性等。然而,

(下转第 172 页)

(上接第187页)

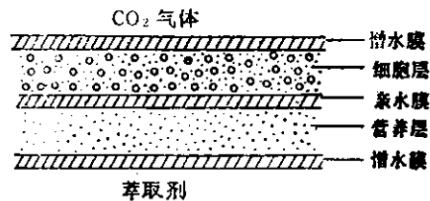


图5 多膜式生物反应器原理示意图

它以其独特的效益受到了人们的青睐。目前世界各国都竞相发展和应用酶膜生物反应器。相信今后随着膜科学技术的纵深发展和新型膜材料的不断开发，酶膜生物反应器将会在生物工程中得到广泛应用。

参 考 文 献

- [1] *Anal. Biochem.*, 14: 160, 1966.
[2] 化学装置(日), 27(4): 104, 1985
[3] Strathmann, H.: *J. Membrane Sci.*, 9: 121, 1981.
[4] 高滕英生, 别役仁士; 化学装置(日), 25(9): 70, 1983。

- [5] 永井史郎: 分离技术, 14: 218, 1984。
[6] Klei, H. E. et al.: *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, 11: 593, 1981.
[7] Capobianco, G. et al.: *J. Solid-phase Biochem.*, 2: 315, 1977.
[8] Greco, G. J. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 21: 1421, 1979.
[9] Lewis, W. and S. Middleman.: *J. AlchE*, 20: 1012, 1974.
[10] Colton, C. K. et al.: *Ultrafiltration Membrane and Application*, New York, London, p. 541—555, 1980.
[11] Weethall, H. H.: *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, New York, Academic Press, 1975.
[12] 野村男次: 膜分离技术的应用, 化学工业社, p75, 1983.
[13] Michaels, A. S.: *Desalination*, 35: 329, 1980.
[14] Hopkinson, J.: *Biotechnology*, 3: 225, 1985.
[15] Klei, H. E. et al.: *Biotechnology Process*, 2(1): 123, 1986.
[16] Scheper, T. et al.: *Proc. ISEC*, 83: 389, 1983.
[17] Iorio, G.: *J. Membrane Sci.*, 22: 317, 1985.