维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:1007-8924(2006)05-0081-05

中空超滤在酶纯化浓缩中的应用

刘宏波,杨昌柱*,濮文虹,顾爱玲,杨 欣

(华中科技大学 环境科学与工程学院,武汉 430074)

摘 要: 叙述了两种不同孔径的中空纤维超滤膜分别与微滤膜装置相结合,纯化、浓缩酶溶液的试验研究,开发出了一套兼有超滤、微滤、活性炭过滤器等装置于一体的工艺流程;并对该工艺进行了高倍数酶溶液浓缩的可行性探讨;分析了几种主要运行参数对整个工艺的影响.

关键词: 超滤;微滤;酶活

中图分类号: TQ028.8 **文献标识码:** A

超滤技术在酶和蛋白质分离浓缩中的应用目前已经比较成熟,它具有防止杂菌污染和热敏性物质失活等优点.其作用机理主要是按分子大小起筛分作用,但是,在选择膜的孔径大小时,不能完全按溶质分子的大小来决定.这是因为,一方面膜面的化学基团所引起的化学作用及溶质的架桥等作用,对小分子溶质的阻截作用不能忽略;另一方面,溶质分子直径的大小只能给膜孔径的选择提供一个范围,当溶质分子直径太接近膜孔径时,膜很容易被堵塞.这决定了膜孔径的大小,必须根据具体要求,通过试验来决定.

另外,溶质的浓度对膜浓缩影响也很大,浓度过高,会带来浓差极化、凝胶极化及膜堵塞等一系列问题.所以,每一套膜工艺的浓缩能力都不尽相同.本试验将原料浓缩了近10倍,酶的活性达到了约3 000个单位,收到了预期的效果.

1 材料与方法

1.1 实验设备

1) 中空纤维超滤膜组件:切割分子量为50 kD(为超滤1)和20 kD(超滤2)各一个,膜材料为聚砜(PS),超滤方式为外压式.

2) 微滤膜组件:孔径为1 μm(微滤膜1)、0.45 μm(微滤膜2)各一个.

3) 活性炭过滤器(CTO Filter)、滤布.

1.2 原料

酶样品的主要成分:外切-β-1,4葡聚糖酶、内切-β-1,4葡聚糖酶、β-1,4葡聚糖苷酶、杂蛋白(主要是酪蛋白,分子量远比酶的分子量小).

酶样品的主要性质见表4.

表1 酶样品性质

Table 1 The properties of the enzyme

酶分子量/kD	黏度/(Pa·s)	最高运行温度/℃
50~76	500	50

1.3 测定方法

蛋白质含量的测量方法:双缩脲法[1].

酶的活性测量方法:硫代硫酸钠滴定法[2].

1.4 实验内容

针对所选含有杂蛋白(以酪蛋白为主)和大颗粒杂质的葡聚糖酶溶液,利用筛网、活性炭过滤器和微滤膜组件的筛分作用,除去大颗粒杂质.然后寻找合适孔径的中空纤维超滤膜组件;截留有效酶成分,而脱除小分子酪蛋白和可溶性盐分.并经过实验,分析该工艺能否浓缩高浓度、高活性的酶产品,最后就运行参数进行了探讨,验证了本工艺的可行性.

2 结果与分析

2.1 分离膜的选择

在实际应用中,不能简单地根据切割分子量来选择膜.这是因为生产厂家确定膜的切割分子量时,

收稿日期:2005-01-30;修改稿收到日期:2005-03-22

作者简介:刘宏波(1980-),男,湖南省人,在读硕士研究生,主要从事水处理方面、腐蚀与防护的研究.

维普资讯 http://www.cqvip.com

采用的是球形非极性蛋白质分子,而实际要截留的物质并非都是球形的;另外,膜的截留特性并非为简单的分子筛作用,被过滤物质的极性特征、与膜之间的相互作用都会影响膜的截留性能.因此,膜的选择应通过试验来确定.

结合酶分子量的大小(50 000～76 000)和前期所作的中空纤维超滤膜(MWCO=10 000)的试验结果(浓缩效率不及超滤2,而且达不到分离杂蛋白的要求),这里选择超滤2作为试验分离膜,并用超滤1与之比对.

从表1可知,超滤2在进水压力(0.09 MPa)小于超滤1进水压力(0.11 MPa)的情况下,其滤液的平均流量(110 L/h)反而大于超滤1的平均流量(88 L/h).这说明超滤2更有利于产品的浓缩.同时,从浓缩液与滤液的变化情况来看,超滤1的滤液随工艺的进行而减少,浓缩液流量在增加,很明显,超滤1膜的污染比较严重.其原因,可能是酶样品中分子半径接近超滤1膜孔径的成分比较多,而这些成分很容易嵌入膜通道内,造成膜通量的下降.

表1 中空纤维超滤膜浓缩液、滤液出水流量和进水压力

Table 1 The fluxes of concentrate and permeate water of hollow fiber ultrafiltration membrane and the pressure of entering water

投运后检测时间/min	超滤膜2 流速/(L·h^{-1}) 滤液	浓缩液	进水压力/MPa	超滤膜1 流速/(L·h^{-1}) 滤液	浓缩液	进水压力/MPa
3	110	490	0.10	90	510	0.10
8	108	486	0.09	89	511	0.11
13	110	478	0.09	86	514	0.11
18	113	457	0.08	86	514	0.11

从表2来看,虽然超滤膜1滤液中蛋白质的含量(18.35 g/L)比超滤膜2滤液中蛋白质的含量(14.59 g/L)高,即前者比后者能分离出更多的小分子量杂蛋白,但从两种滤液中酶的活性(超滤膜2滤液:10 U/mL以下,超滤膜1滤液:38 U/mL)来看,超滤膜1在分离了较多的杂蛋白的同时,也损失了大量的产品酶,产品回收率太低.而且产品中允许少量的杂蛋白存在,因为它有利于保持酶分子结构的稳定.

表2 中空纤维超滤膜浓、滤出水中蛋白质的含量和酶的活性

Table 2 The content of protein and enzyme activity in the condensed and permeate water of hollow fiber ultrafiltration membrane

被测物	原水	超滤膜2 滤液	超滤膜2 浓缩液	超滤膜1 滤液	超滤膜1 浓缩液
蛋白质含量/(g·L^{-1})	69.61	14.59	139.37	18.35	94.13
酶的活性/(U·mL^{-1})	284	<10	-	38	-

结合表1、表2的数据,本试验选择切割分子量为20 000的中空纤维超滤膜为分离膜.

2.2 不同浓度酶的浓缩对工艺选择

在实际生产过程中,对酶活度和纯度的需求不是单一的,所以我们必须根据要求来选择工艺流程.针对不同的酶浓缩要求,这里将工艺流程分为3类:无回流工艺流程(见图1)、部分回流工艺流程和完全回流工艺流程(见图2).由于部分回流工艺流程只是另外两种工艺流程的折中,所以在此不予讨论.

本试验为了验证所开发工艺流程的可行性,选择完全回流浓缩液工艺作为研究对象,期望达到高倍数浓缩的目的,并将其运行工况与无回流工艺相

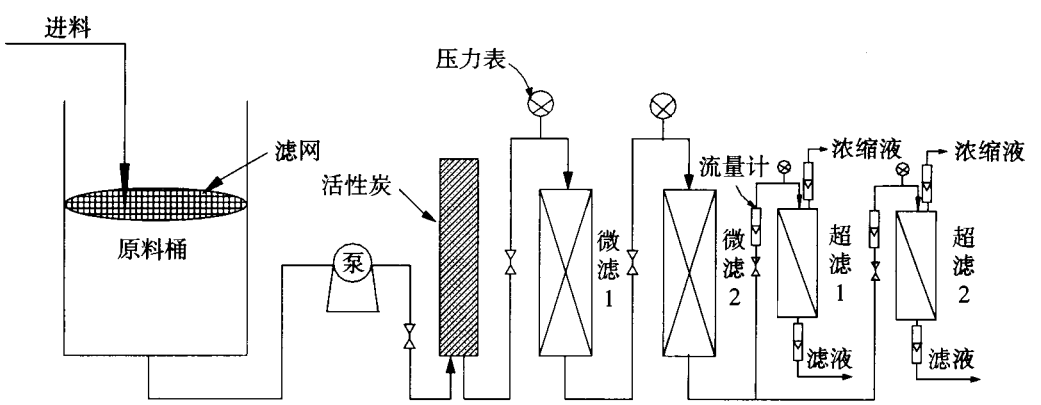


图1 无浓缩液回流工艺流程

Fig. 1 Flow diagram of concentrating without circumfluence

维普资讯 http://www.cqvip.com

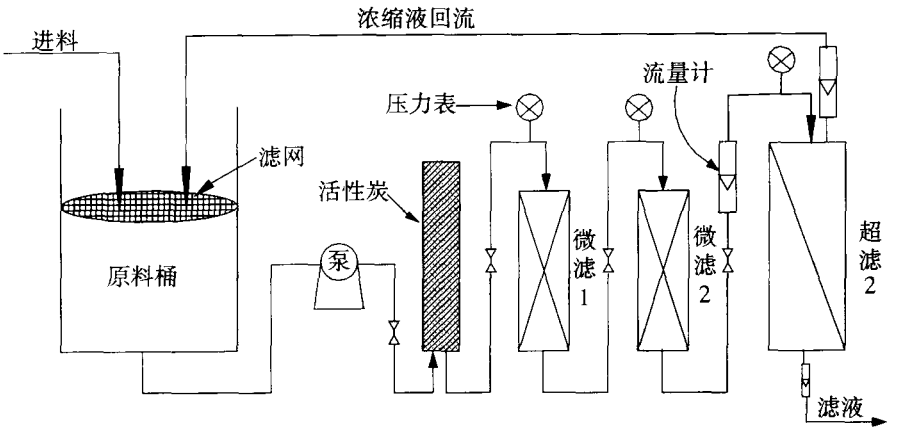


图2　完全回流浓缩液工艺流程

Fig. 2　Flow diagram of concentrating with entire circumfluence

对比，分析该工艺的可行性和运行效果。进而，在实际应用过程中，我们可以通过改变回流比或调整浓缩时间，来获得不同要求的酶产品。

首先，通过目前大量的关于中空纤维超滤膜在酶浓缩方面的应用实例报道，我们可以肯定中空纤维超滤膜对酶的无回流、低浓度浓缩工艺是可行的. 但从表3数据来看，在压力比较稳定的情况下，浓缩液和滤液的总流量在减少，可能是由于活性炭、微滤装置的截留作用造成的；同时，可以看到滤液流量下降的幅度比较大，说明超滤膜出现了轻微的堵塞，这也是可以接受的，因为溶质在液体中与在膜面上必定有一个浓度平衡的过程，即浓差极化是不能消除的.

表3　无回流低浓度中空纤维超滤膜浓液、滤液出水流量和压力

Table 3　The flux and pressure of the condensed and permeate water of hollow fiber ultrafiltration membrane in low concentration without circumfluence

检测时间	运行后 4 min	运行后 11 min	运行后 16 min	运行后 19 min
浓缩液流速/(L·h^{-1})	>250	245	245	245
滤液流速/(L·h^{-1})	75	72	64	62
进水压力/MPa	0.041	0.061	0.061	0.061

完全回流中空纤维超滤膜浓缩液、滤出水流量和压力的关系见表4。

表4　完全回流高浓度中空纤维超滤膜浓缩浓、滤出水流量和压力

Table 4　The fluxes and pressures of the concentrate and permeate water of hollow fiber ultrafiltration membrane in high concentration with circumfluence

检测时间	5 min 后	15 min 后	25 min 后	35 min 后	加原液后	45 min 后	55 min 后	65 min 后	75 min 后	85 min 后
浓缩液流速/(L·h^{-1})	145	148	150	155	153	150	150	152	155	153
滤液流速/(L·h^{-1})	56	48	40	40	38	36	35	33	31	31
进水压力/MPa	0.04	0.041	0.041	0.041	0.061	0.06	0.07	0.08	0.09	0.09

从表4来看，很明显，本次试验可以分成两个阶段——加原料之前和之后（浓缩倍数太高，所需原料量太大，而原料桶容积有限，必须补充原料，才能保证工艺的正常进行）. 这两阶段的相同之处是：虽然总流量与滤液的流量在整个过程中有所下降，但在每个阶段的第25 min之后，滤液和压力都已经趋于稳定（前阶段滤液稳定在40 L/h，后阶段为31 L/h；前阶段压力稳定在0.041 Pa，后阶段为0.09 Pa）. 分析原因，可能是因为原料中某些成分，对膜的通量的减少贡献比较大，运行一段时间后，该物质在溶液与膜面的浓度达到了平衡，其作用就表现得不是很明显了.

将表3和表4数据进行比较可知，完全回流浓缩工艺是可行的，但有必要在预处理、膜材料的选择等方面作进一步的改善. 同时，从表5可以看到，本试验将酶活提高了10倍多，达到了近3 000 U/mL. 而在应用中，对酶的要求并没有这么严格，所以可以采取部分回流或缩短浓缩时间的办法，降低产品酶的活度，进而可使表4中的数据更为理想.

2.3　操作条件的影响

2.3.1　不同压力对流量的影响分析

在膜未发生凝胶的情况下，在一定的压力范围

维普资讯 http://www.cqvip.com

表5 中空纤维超滤膜浓缩液、滤出水酶活性

Table 5 The enzyme activity of the concentrate and permeate water of hollow fiber ultrafiltration membrane

活 性	原液	超滤2滤液	超滤2浓缩液
无回流低浓度超滤2出水酶活性/(U·mL^{-1})	284	10	386
全回流高浓度超滤2出水酶活性/(U·mL^{-1})	284	23	2 930

内,滤液的流量会随压力的增加而增加[3].这里选择了两种进水压力水平:0.11 MPa和0.061 MPa,前者滤液的平均流量为110 L/h,后者为68 L/h,符合压力与流量成正比的规律.但膜的浓缩效率,前者约为0.18,后者约0.23.可见,进水压力与膜的浓缩效率不一定成正比关系.这样,滤液流量在一定的外界条件下,有一个最优值.一般超滤压力的选取,都有一定的取值范围参考,而具体压力的确定要通过试验来决定.膜的浓缩效率按下式来计算:

$$\text{浓缩效率}=\frac{\text{滤液流量}}{\text{滤液流量}+\text{浓缩液流量}}$$

2.3.2 pH的影响

pH对本工艺的影响相对较小,但其值没有特别需要应该保持在4~8之间[4].本次试验中,pH一直保持在5~6之间.

2.3.3 温度的影响

原料对本试验温度的要求是50 ℃以下.对于无回流工艺流程而言,该条件完全能达到,其运行过程中,出水水温同进水水温几乎相当.对有回流工艺流程,温度的控制就不能忽视.这要求泵的选择合理,因为泵是产热的最主要设备,在应用中,应该在保证工艺能顺利进行的情况下,尽可能选择功率较小的泵.图3是选择的水泵(流量 Q:2 m^3/h,杨程 H:98 m,N:1.5 kW)在完全回流过程中原料的温度增长

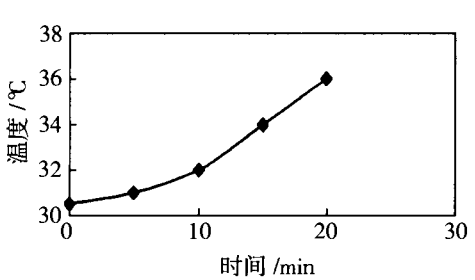


图3 完全回流过程中料液温度与时间的关系

Fig.3 The liquid temperature varying with time during ultrafiltration with entire recirculation

速度.

2.3.4 预处理设备

本实验的预处理包括筛网、活性炭过滤器、微滤,它们的作用在本次实验中尤为重要,不仅起到了保护中空纤维超滤膜的作用,也是除去大分子杂蛋白和杂质、纯化酶溶液必不可少的一部分.它们的组合也经过了仔细的筛选,曾经尝试去掉筛网,结果不到10 min,活性炭过滤器几乎完全堵塞,使后面的操作无法进行.但这里所用的微滤,采用的是死端过滤,能耗大,容易堵塞,给实验带来不便,在实用过程中,需作进一步改进.

3 结论

1) 超滤膜的作用机理主要是筛分作用,通常我们可以根据切割对象的分子量大小,来确定膜的选择范围.本试验针对所要切割酶的分子量(50 000-76 000),选取超滤膜1(MWCO=50 000)和超滤膜2(MWCO=20 000).理论上讲,超滤膜1已经能够将酶的有效组分切割下来,而且能保证最大的浓缩效率.

但试验表明,超滤膜2无论是在浓缩效率,还是在原液的回收率方面都比超滤膜1好.这就说明超滤膜面对溶质的化学作用也不能忽略.同时从膜的生产过程来看,厂家常常把切割分子作为球形非极性分子来处理,而酶的分子不可能是一个个规则的球形,所以不能完全按分离对象的分子量来选择膜的孔径,必须经过具体的试验来决定.

2) 每一套膜组件对溶液的浓缩倍数都有一个上限,浓缩倍数太高,会导致浓差极化、凝胶等问题.而且由于浓差极化作用,滤液中酶的活性太高,这样会浪费大量的酶原料.本次试验在保证工艺能顺利进行的条件下,将酶活为284 U/mL的原料浓缩到了酶活为2930 U/mL,提高了10倍多,而且出水中酶的活性(23 U/mL)也符合试验的要求.

3) 超滤方法是一种物理变化的操作,不会引起物料的相变化,因此在操作过程中,酶的活性不会遭到破坏;且浓缩和提纯可同时进行,非常适用于大规模的连续工业化生产.在本试验中,采用切割分子量为20 000的中空纤维超滤膜对葡聚糖酶溶液进行浓缩,不仅在经济上是可行的,而且同时可达到部分纯化和脱盐的目的,具有操作方便、节省时间、经济合理的优点,在我国酶制剂行业上有推广价值.

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] 黄如彬，丁昌玉，林厚怡. 生物化学实验教程[M]. 北京：世界图书出版公司，1995. 14－15.

[2] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京：中国轻工业出版社，1999.

[3] 梁国明，陆晓峰. 操作条件对膜污染及蛋白质超滤滤出速度影响的研究[J]. 净水技术，1999，(1)：7－14.

[4] 卞晓锴，陆晓峰，施柳青. 蛋白质超滤过程及超滤膜的表面改性研究现状[J]. 膜科学与技术，2001，21(4)：46－51.

Application of hollow fiber ultrafiltration membrane for purification and concentration of enzyme

LIU Hongbo, *YANG Changzhu* *, *PU Wenhong*, *GU Ailing*, *YANG Xin*

(College of Environmental Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: The concentration and purification of enzyme by using two kinds of hollow fiber ultrafiltration membranes with different MWCOS following microfiltration were investigated. A process consisting of ultrafiltration, microfiltration, activated carbon filter and so on was developed. The performance o concentrating enzyme with high concentration rate by using this process was studied. The effects of several major parameters concerning the whole process were analyzed.

Key words: ultrafiltration; microfiltration; enzyme activity

河南丁东水处理滤料厂

主要产品

● 无烟煤滤料，石英砂滤料，磁铁矿滤料，活性炭、锰砂滤料，焦炭滤料，核桃壳滤料，麦饭石滤料，铝矾土、伸缩器、卵石、砾石、果壳滤料，陶粒滤料，石榴石滤料，双层陶瓷滤砖.

● 聚合氯化铝净水剂，铝酸钙粉，软性填料，组合填料，半软性填料，立体弹性填料，串孔填料，蜂窝填料，纤维球，多面空心球，聚丙烯浮盖球，多孔悬浮球.

● 鲍尔环、阶梯环和微孔曝气器，膜片式曝气器，刚玉曝气器，ABS管道，ABS三通弯头，单旋流花篮喷头，塔型水帽，0.5吨滤水帽、1吨滤水帽；732阳树脂，717阴树脂，锅炉及循环水用常温海绵铁除氧剂.

使用范围

各种V型滤池，气水反冲洗滤池，普通滤池，滤罐，离子交换处理工业废水，水质软化，除盐、除油、高纯水设备，海水淡化工程，反渗透过滤装置使用，高纯水制备，固定床的树脂垫层，除铁、除锰过滤滤料.

常规滤料按国家建设部水处理滤料标准生产，坚持优质服务、信誉第一、平等互利的原则.

通讯地址：河南·巩义市人民东路　　**邮编**：451200　　**电子邮件**：aplbfx@public2.zzha.cn

客户服务热线：0371－64389602；64360652　　**传真**：0371－64389602　　**手机**：13803828104