

酶膜反应器及其在生物催化领域的应用

程小飞¹, 肖通虎^{1*}, 章表明^{2,3}, 姚长洪^{2,3}

(1 宁波大学材料化学与工程学院, 宁波 315211;

2 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023;

3 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 酶膜反应器是一种新型的生物催化反应设备, 它是反应与分离相耦合的装置, 集产品分离、纯化和酶回收利用于一体, 具有其它方法不可比拟的优势。在强调资源节约, 环境友好和清洁化生产技术的今天, 显示一些特别的优点, 近年来已成为热门的研究领域。本文主要介绍了酶膜反应器的基本原理、特征及其分类, 并根据分类对近年来酶膜反应器在生物催化领域的应用研究进行了概述, 同时对酶膜反应器存在的问题和发展趋势做了分析和展望。

关键词: 酶膜反应器; 特征; 分类; 生物催化; 应用

引言

酶膜反应器是膜和生物化学反应相结合的系统或操作单元, 依靠酶的专一性、催化性及膜特有的功能, 集生物反应与反应产物的原位分离、浓缩和酶的回收利用于一体, 能够改变反应过程、控制反应进程, 从而实现减少副产物的生成、提高产品收率等目的。近年来, 酶膜反应器在生物、医药、食品、化工、环境等领域得到了日益广泛的应用^[1]。随着基因工程、材料科学特别是高分子材料科学的发展, 高效固定化技术的开发以及过程设计的不断优化, 酶膜反应器的应用效率将会逐步提高, 应用领域也将会越来越广泛。本文介绍了酶膜反应器的基本原理、特征及其分类, 对近年来酶膜反应器在生物催化领域的应用研究进行了概述, 并对酶膜反应器存在的问题和发展趋势做了分析和展望。

1 酶膜反应器的基本原理

酶膜反应器是一种新型的膜反应器, 是基于选择性的半透膜来分离酶及产物(或者底物)的装置, 如图 1 所示。在酶膜反应器中, 酶通常以两种形式存在: 可溶或不溶状态, 处在膜的表面或微孔中, 通过物理吸附、包埋、共价键合和化学交联等方法将酶固定在某些媒介上(如惰性蛋白质、凝胶、脂质体等)或直接固定在膜上, 使酶处于膜的某一空间范围内。

将酶反应器和膜分离设备偶联, 利用膜两侧的推动力(化学势、压差、电势差等), 将可渗透的溶质从酶反应体系中分离出来^[2,3], 实现在酶催化的过程中同时对产物的分离, 因此提高了生产效率。

2 酶膜反应器的特征

酶膜反应器与传统反应器相比, 具有如下特征^[4,5]:

(1) 酶促反应具有较高的反应速率和选择性;

(2) 膜作为酶的固定化载体, 可以使酶在类似于生物膜的环境中高效发挥作用;

收稿: 2010-10-19; 修回: 2010-11-18;

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y407353); 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2010C31099);

作者简介: 程小飞(1983-), 女, 硕士研究生, 高分子材料化学;

*通讯联系人: Tel: 0574-87600390; E-mail: xthci@sina.com.

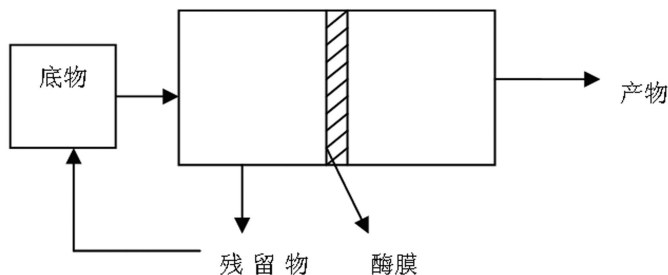


图1 酶膜反应器的结构示意图

Figure 1 Scheme of the enzyme membrane reactor(EMR)

- (3)反应产物能及时从反应区域移出,可有效地消除产物抑制和副反应;
- (4)在反应中酶可重复利用,有利于降低生产成本,提高生产效率;
- (5)对油水等多相反应系统,生物催化膜反应器可为它提供充分的接触反应界面,并在反应完后油水进行即时分离,不会带来传统反应器产生的乳化问题;
- (6)易于连续化和自动化控制,易于与反应过程集成和组合;
- (7)反应分离浓缩一体化,降低产品在下游加工中分离纯化的费用;
- (8)在实验研究中,超滤生物催化反应器是研究反应动力学产物抑制、底物抑制和酶失活的一种强有力手段。

3 酶膜反应器的分类及其在生物催化领域的研究进展

酶膜反应器是生物催化反应的设备,可以从多个角度对其进行分类:

- (1)按照膜组件与反应器的组合方式,酶膜反应器可以分为一体式和分体式膜反应器两种。

一体式酶膜反应器是现代膜分离技术与生物技术有机结合的一种新型反应器,具有反应效率高,反应分离一体化,实现自动化控制等优点,如图2(a)所示。尚雁、李娜等^[9]利用乳液酶膜反应器进行外消旋萘普生甲酯的水解反应,以制备光学纯对映体(S)-萘普生,得到固定化酶的初始反应速率为 $3.66\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$,为自由酶的20倍以上,固定化酶的对映体过剩值为99%~100%,远高于自由酶的选择性,反应同时从膜透过侧收集产物,实现反应分离一体化,表明该反应体系为脂肪酶催化拆分反应提供了良好环境。

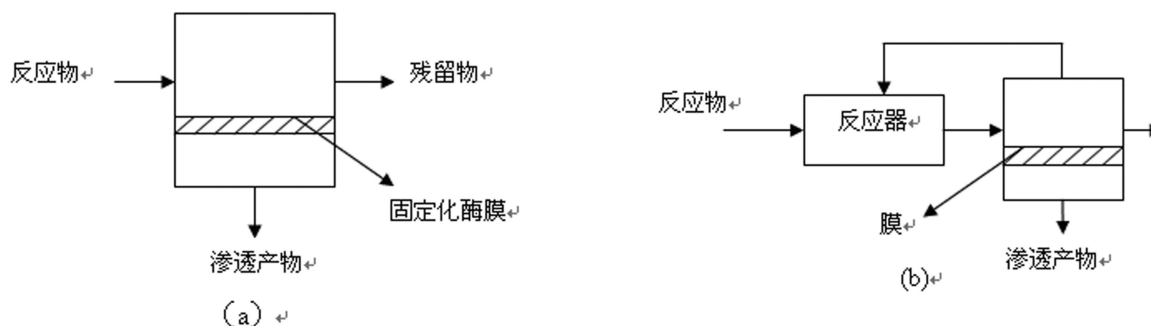


图2 酶膜反应器构型

(a)一体式和(b)分体式

Figure 2 Scheme of the integrated EMR

(a)and seperated EMR(b)

分体式酶膜反应器把反应器与膜组件分开放置,酶膜反应器的混合液经增压后进入膜组件,在压力作用下混合液中的液体透过膜得到产物,底物和酶则被截留,并随浓缩液回流到反应器内,如图1(b)所

示。杨大令、吴迪等^[7]以高性能杂萘联苯聚醚砜酮(PPEsk)中空纤维超滤膜为基础设计了分体式酶膜反应器(REMR),当 RNA 浓度为 2%(w/v),核酸酶 P1 浓度为 100mg/L, pH 为 5.2,体系温度为 65℃ 时,反应 5h 酶解率可达 85%。王魁等^[8]采用分体式中空纤维酶膜反应器,利用游离氨基酸酰化酶对 *N*-乙酰-*DL*-蛋氨酸进行了拆分,并对拆分液进行了分离。在实验所用底物浓度范围 0~0.24mol/L,拆分反应符合米氏方程,米氏常数 $K_m=0.985\text{mmol/L}$,没有出现底物抑制。

(2)按照酶膜反应器进行工业产品的生产流程不同,主要分为间歇式反应器和连续搅拌式反应器。

根据酶状态、底物特性对分离的难易及产物分子大小有无抑制性等多种因素,选择合适的工艺流程可以最大限度的发挥酶膜反应器的性能,达到理想的生产效果。德国的 Bongs、Hahn 等利用固定化转酮醇酶(transketolase)进行生产赤藓糖醇的研究,主要比较了在间歇式反应器(BSTR)和连续搅拌反应器(CSTR)中赤藓糖醇的合成能力,其结果如图 3 所示^[9,10]。分析图中的生产曲线,可见在间歇式反应器中,底物浓度由高降低,产物浓度由低升高;根据实验测定,BSTR 的时空收率为 28g/(L·d),酶活半衰期仅有 5.6h,而且批次越多,反应达到相同的转化率所用的时间也越长(由第一批的 2h 延迟到最后一批的 7h)。由此可见,在 BSTR 中,产物生成受到限制,生产能力也不稳定。而在 CSTR 中,由于底物以较低的浓度持续流入反应器,反应器中的底物浓度保持在一个较低水平,不易产生底物抑制,而产物浓度,由于底物的持续转化,能够长时间地保持在一个比较高的水平,反应平稳;结果表明,CSTR 生产赤藓糖醇的时空收率达 45g/(L·d),酶活半衰期长达 106h,酶催化转化率一直保持在 90%的水平。由此可见,酶膜反应器的生产性能与工艺流程特性也密切相关,在生产中应做为一个重要的影响因素予以考察。

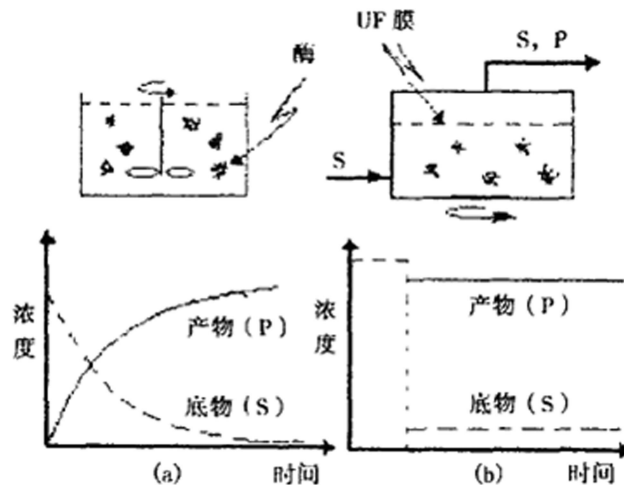


图 3 BSTR(a)和 CSTR(b)酶膜反应器中底物、产物浓度变化比较

Figure 3 Concentration change in a batch reactor

(a) compared to a continuous stirred tank reactor(b)

(3)按照运行模式进行分类,如单相膜反应器、多相膜反应器等。

当底物分子量大于产物,且两者能溶于同一溶剂时,可采用单相膜反应器,如图 4(a)所示,通过选择适当的膜孔径,使底物在膜表面反应但不透过膜,而小分子产物则能透过膜,达到纯化的目的。如果底物和产物具有不同的溶解性,则可以使用多相酶膜反应器,如图 4(b)所示。最典型的例子是脂肪酶(lipase)的催化反应。脂肪酶属于界面活性酶,特别适于在酶膜反应器中应用。在单相体系中,将酶固定在疏水高分子多孔膜上。含有底物的有机溶剂在膜的一侧通入,反应后的产物通过筛分作用通过膜孔到达另一侧。Tsai 等^[11]用三种疏水性的高分子膜通过物理吸附法固定脂肪酶,在带有搅拌的扩散反应器中进行了橄榄油水解实验,发现酶活性在 6d 左右的时间内活性下降很大,判断是由于酶的失活、产物抑制以及产物在膜与有机相界面处的吸附所致。

姜忠义等^[12]研究了用多相酶膜反应器进行二肽 *N*-Ac-L-Phe-L-Leu-NH₂ 的合成。*N*-乙酰-L-苯丙氨酸乙酯(APEE)的正辛醇溶液从中空纤维膜的管程通入并循环,L-亮氨酸胺的磷酸盐缓冲液(pH=

7. 8)从聚丙烯腈中空纤维膜的壳程通入并循环。两股进料液扩散进入膜孔后,由固定在膜中的脂肪酶催化而生成二肽,二肽依据其溶解度被分配在水相或有机相中,当超过饱和和溶解度后从液相沉淀出来,使反应过程与分离过程有效耦合。Drioli^[13]利用固定有脂肪酶的多相酶膜反应器进行了萘普生消旋混合物的拆分。膜材料采用聚酰胺,萘普生的酯类底物溶解在有机相中,生成的产物被萃取进入水相。

另外,在多相酶膜反应器中还有利用其它酶进行生物催化的研究。Duan等^[14]采用固定化的假丝酵母脂化酶在酶膜反应器中进行多相催化分离氟比洛芬(flur biprofen)取得了很好的效果,得到了高纯度的S型异构体。Matson^[15]在多相酶膜反应器领域取得了不少领先性成果,如氨基酸异构体拆分、手性药物中间体的合成等。

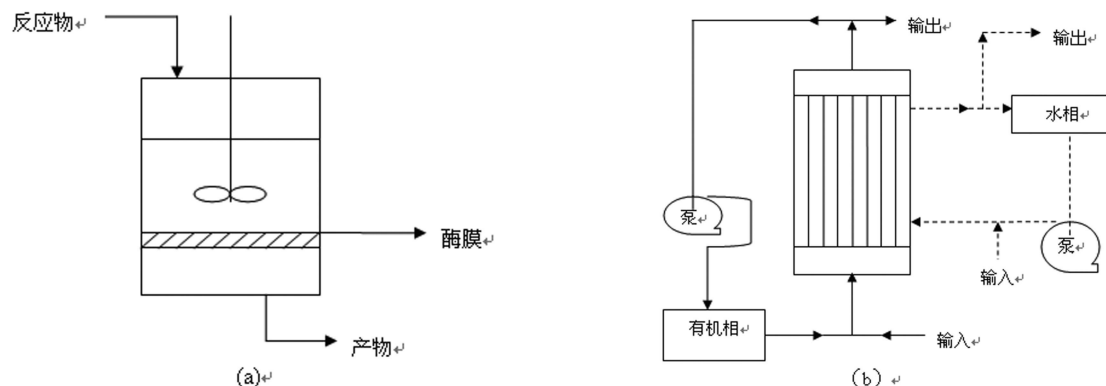


图4 单相酶膜反应器(a)和多相酶膜反应器(b)

Figure 4 Scheme of the monophase EMR(a) and the multiphase EMR(b)

(4)按照酶与底物的反应方式分,酶膜反应器可分为游离态和固定化酶膜反应器。

游离态的酶膜反应器一般根据产物的分子量比反应物分子量小,选择的膜孔径大小可以使产物通过,而反应物和游离酶仍留在一侧继续反应的膜反应器。Liu等^[16]选择孔径大小合适的聚醚砜超滤膜作为游离酶膜反应器的分离膜,把底物和葡萄糖氧化酶放置在同一侧,生成的产物葡萄糖酸为小分子量的物质,可以透过膜进入另一侧,从而使得产物得以分离,并且葡萄糖氧化酶仍然完全留在底物一侧继续反应。

绝大部分的酶膜反应器都是采用固定化酶反应器,这有利于酶的回收利用和产物分离。陈必强、谭天伟等^[17]开发了固定化假丝酵母脂肪酶 99-125 合成棕榈酸异辛酯的工艺,脂肪酶以吸附的形式固定在织物膜上,以 1g 棕榈酸、0.67g 异辛醇、0.12g 固定化脂肪酶和 5mL 石油醚组成的反应系统在 40℃条件下反应 24h,酯化率可达 96.6%,固定化酶连续反应 9 批后酯化率仍维持在 90%以上。Wang等^[18]利用一种特殊的复合微孔膜(醋酸纤维素/聚四氟乙烯,CA/PTFE)固定化脂肪酶进行手性分离外消旋布洛芬。通过扫描电子显微镜观察,脂肪酶被包埋在膜的内侧,其结构未发生改变,这使得酶仍然保持很高的活性,结果表明了固定化脂肪酶手性拆分外消旋布洛芬更优于游离酶,选择性高达 83.5%,并且固定化酶的半衰期也高于游离酶(约 2 倍)。

另外,固定化酶膜反应器在污水处理方面也有广泛应用。Georgieva等^[19]将 *Trametes versicolor* 中提取的漆酶固定到聚丙烯膜上处理废水中的苯酚及其衍生物。结果发现,固定化漆酶在 pH = 5.5 和 55℃表现出很高的活性,并且在等温条件下固定化漆酶可以氧化很大范围内的酚类化合物,可见酶膜反应器已经成为处理污水中酚类的很有用的工具。Burton^[20]等研究了酚类混合物(苯酚、甲氧基苯酚、甲酚等)的降解,通过把多酚氧化酶固定到聚砜毛细管膜上,虽然酶活有所降低,但酶膜生物反应器表现出了良好的氧化能力,而且很容易把产物从污水中分离出来。Jolivalt等^[21]报道了固定化漆酶在酶膜生物反应器中分解污水中苯基尿素杀虫剂。固定化后酶活更加稳定,处理能力更强。还有报道,用固定化酶膜生物反应器去除污水中的苯磷二酚和苯酚。Edwards等^[22]将多酚氧化酶固定在涂附有脱乙酰壳多糖胶层的聚砜膜上,于酶膜反应器内氧化水中的酚类化合物。实验表明,脱乙酰壳多糖胶层不仅能够有效

增加酶载量,减少反应产物对酶的抑制作用,提高反应效率,而且还有利于水的脱色。Lante 等^[23]将漆酶固定在聚醚砜膜反应器内用于水中酚的生物降解,研究了反应底物上取代基类型及位置对降解过程的影响。Akay 等^[24]将酶固定在平板聚酰胺膜上,在酶膜反应器内以错流过滤的方式催化水中酚的降解,降解反应速率受扩散控制,随着流速的提高而增加,最高可达 $1.3 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 。

4 展望

目前,酶膜反应器的应用研究进展迅速,但是酶膜反应器的潜能尚未得到充分发挥;反应器结构设计、膜、酶体系三者任何一个因素的改进,都将提高酶膜反应器的工作效率,扩大其应用范围。从酶膜反应器的发展趋势来看,以下几个方面亟待进一步研究:

(1)开发新型的酶膜反应器,从而在工业生产中避免复杂的化学反应生产流程,取代繁杂的生产管道和反应器。另外,设计良好的膜组件,降低浓差极化和膜污染的不利影响,在纵深方面提高酶膜反应器的效率;

(2)在酶膜反应器中,膜的加工水平较低,膜孔径分布与形态结构的均一性差,容易造成酶分子和小分子激活剂的泄露^[25],再加上有机溶剂的引入,常使膜发生溶胀,从而使膜发生弯曲变形,丧失有效传质面积,所以需要开发耐溶胀的膜材料,研制生物相容性好、抗污染的高分子膜材料,采用先进的成膜工艺使膜的形态结构更优化;

(3)酶在固定的过程中存在空间位阻效应,这使得固定化酶可能因为空间构型改变或活性位点被遮蔽而失活。所以需要以定向固定化代替随机固定化,以保证酶的空间构型保持不变;另外,还可以对酶分子的侧链基团进行必要的化学修饰改性^[26, 27],以增加酶与膜材料之间的生物相容性,提高酶对有机溶剂的耐受性,同时使酶的分子量有所增大,从而改善膜的截留效应。

参考文献:

- [1] Giorno L, Drioli E. *Tibtech*, 2000, 18(3): 339~348
- [2] 李琳. 膜技术基本原理. 北京: 清华大学出版社, 1999, 12
- [3] 梁世中. 生物反应器工程. 广州: 华南理工大学出版社, 1990, 6
- [4] 姜忠义, 陈洪钊. *化学工程*, 1996, 24(4): 7~10
- [5] 姜忠义, 陈洪钊. *膜科学与技术*, 1996, 16(1): 5~10
- [6] 尚雁, 李娜, 傅博诣, 黄卓楠, 傅强, 方琪. *化学工程*, 2010, 38(4): 50~55.
- [7] 杨大令, 吴迪, 张守海, 赛锡高. *食品工业科技*, 2007, 28(11): 167~168.
- [8] 王魁. 中空纤维酶膜反应器制备 L-蛋氨酸的研究. 天津: 天津大学, 2008
- [9] Bongs J, Hahn D, Schöken U, Sprenger G A, Kragl U, Wandrey C. *Biotechnol Lett*, 1997, 19(3): 213~215
- [10] 彭益强, 方柏山. *化工时刊*, 2004, 18(1): 13~17
- [11] Tsai S W, Shaw S S. *J Membr Sci*, 1998, 146(1): 1~8
- [12] 姜忠义, 贾琦鹏, 刘家祺. *应用化学*, 2001, 18(1): 56~59
- [13] Sakaki K, Giorno L, Drioli E. *J Membr Sci*, 2001, 184(1): 27~38
- [14] Duan G, Ching C B. *Biochem Eng J*, 1998, 2(3): 237~245
- [15] Lopez J L, Matson S L. *J Membr Sci*, 1997, 125(1): 189~211
- [16] Liu J G, Cui Z F. *J Membr Sci*, 2007, 302(1): 180~187
- [17] 陈必强, 叶华, 谭天伟. *化工学报*, 2004, 55(3): 422~425
- [18] Wang Y J, Hu Y, Xu J, Luo G S, Dai Y Y. *J Membr Sci*, 2007, 293(1): 133~141
- [19] Georgieva S, Godjevargova T, Mita D G, Diano N, Menale C, Nicolucci C, Romano Carratelli C, Mita L, Golovinsky E. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 66(2): 210~218
- [20] Burton S G, Boshoff A, Edwards W, Rose P D. *J Molecular Catalysis B: enzymatic*, 1998, 5(4): 411~416.
- [21] Jolival C, Brenon S, Caminade E, Mougin C, Pontié M. *J Membr Sci*, 2000, 180(1): 103~113
- [22] Edwards W, Leukes W D, Rose P D, Burton S G. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 25(8): 769~773
- [23] Lante A, Crapisi A, Krastanov A, Spettoli P. *Proc Biochem*, 2000, 36(2): 51~58
- [24] Akay G, Erhan E, Keskinler B, Algur O F. *J Membr Sci*, 2002, 206(1): 61~68

- [25] 姜忠义, 陈洪钊. 高分子材料科学与工程, 2004, 20(1): 14~17.
- [26] Desantis G, Jones J B. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(1): 1324~1327.
- [27] 姜忠义, 高蓉, 许松伟, 等. 现代化工, 2001, 21(8): 25~28.

Enzyme Membrane Reactor and its Application in the Field of Biocatalysis

CHENG Xiao-fei¹, XIAO Tong-hu^{1*}, ZHANG Biao-ming^{2,3}, YAO Chang-hong^{2,3}

(1 Faculty of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Enzyme membrane reactor that contains an enzyme and a membrane with the appropriate pore size and physicochemical properties is a new type of bioreactor, in which continuous reaction occurs simultaneously with separation of the product from the reaction mixture. Membrane bioreactor has some advantages in the field of resource saving, environmental protection and clean production in biocatalysis, and has already become one of the hottest research fields these years. The basic concept, feature and classification of enzyme membrane reactor were generally described, and some applications in biocatalysis field and examples were reviewed. The current problems and the future tendency were discussed.

Key words: Enzyme membrane reactor; Feature; Classification; Biocatalysis; Application