

文章编号: 1005-8893(2000)03-0024-03

中空纤维超滤膜在青霉素酰化酶浓缩中的应用^{*}

朱卫兵¹, 龚方红²

(1. 常州能源设备总厂, 江苏 常州 213004; 2. 江苏石油化工学院, 江苏 常州 213016)

摘要: 介绍了用超滤代替硫酸铵沉淀浓缩青霉素酰化酶的方法, 不仅可缩短浓缩时间, 而且能有效地去除其中小分子杂质。研究了膜的截留分子量、操作条件和温度对酶的活力的影响。

关键词: 中空纤维; 超滤; 青霉素酰化酶; 浓缩

中图分类号: TQ

文献标识码: A

青霉素酰化酶是医药工业上的酶类。此酶的浓缩和脱盐是一个比较复杂的过程, 用传统的硫酸铵法^[1]不仅收率低, 而且得到的浓缩酶液含有大量的硫酸铵, 需要多次透析脱盐才能用于制备固定化酶^[2]。超滤法是近年来酶制剂工业所采用的一种新的浓缩技术, 虽然大大提高了酶的提取水平, 但由于膜品种多, 质量不稳定, 孔径分布广等原因, 影响了其推广应用。故选择合适的超滤膜是此技术中决定其收率的一个关键部分。本文研究了几种规格的聚砜中空纤维超滤膜, 并针对青霉素酰化酶溶液进行超滤浓缩试验, 现将结果报道如下。

1 实验部分

1.1 实验材料

(1) 聚砜中空纤维超滤膜: 截留分子量 MW 有 8 万、4 万、1 万。均自制。

(2) 青霉素酰化酶溶液: 中国科学院微生物研究所和浙江省东阳市海德公司提供。

其它试剂为市售商品。

1.2 实验装置及方法

实验装置流程见图 1。

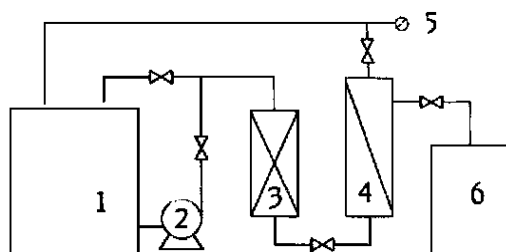


图1 实验装置流程图

实验操作时将青霉素酰化酶溶液注入储槽中, 在蠕动泵提供的动力下, 溶液经精滤后进入超滤膜中, 一方面溶液中的小分子物质经中空纤维的内壁渗透出来成为超滤液而排出, 另一方面溶液中的酶蛋白等大分子物质得以保留并得到浓缩, 返回到储槽中。如此反复循环, 直到达到规定的浓缩要求为止。

抽取超滤液用紫外线吸收法测定酶的活力。取样 1 mL, 加入蒸馏水至 3 mL, 保温 5 min, 加入某试剂终止反应, 室温放置, 离心混合, 用分光光度计测定其在某波长的吸收值。此值为 1 时, 定为一个酶的活力单位 (u/mL)。

2 结果与讨论

* 收稿日期: 2000-05-30

作者简介: 朱卫兵 (1971-), 男, 江苏海安人, 工程师, 主要从事新产品的开发。

2.1 截留分子量对酶的活力的影响

将截留分子量为 8 万、4 万和 1 万的中空纤维超滤膜依次安装到如图 1 流程所示设备中, 调节相

应阀门, 操作压力控制在 0.03 MPa 下, 让青霉素酰化酶溶液在其中循环流动。在相同的时间内, 测定原酶液, 浓缩液和超滤液中的酶的活力。得到数据见表 1。

表 1 截留分子量对酶的活力的影响

截留分子量	原酶液		浓缩液		超滤液		酶的透过率, %	浓缩收率, %
	体积/mL	活力/(u/mL)	体积/mL	活力/(u/mL)	体积/mL	活力/(u/mL)		
8 万	7 180	8 52	180	257.40	7 000	1.59	18.74	91.26
4 万	3 380	29.40	149	552.50	3 231	0.44	1.50	98.50
1 万	2 580	1 147.50	710	4 559.60	1 870	未检出	0.00	100.00

从表 1 可知, 三种不同的膜对青霉素酰化酶溶液都有浓缩效果。青霉素酰化酶的分子量为 8.8 万, 使用截留分子量 8 万的膜, 虽然通透率较大, 但酶的透过率也较大, 故浓缩收率较低; 1 万的膜虽可以 100% 的截留酶分子, 但膜通透量小, 需要设备投资大; 4 万膜的膜通透量适中, 酶的透过率小, 浓缩收率可达 98%。三者比较选用截留分子量 4 万的聚砜中空纤维超滤膜, 可以兼顾浓缩收率和通透率, 获得较满意的结果。

2.2 操作条件对酶浓缩的影响

2.2.1 操作时间与酶的关系

选择截留分子量为 4 万的膜放在装置中, 控制温度为 10℃、操作压力在 0.03 MPa 下进行浓缩试验。在不断地往储槽中注入酶的活力为 22.2 u/mL 的青霉素酰化酶溶液, 连续工作, 得到操作时间与超滤液内酶的活力之间的关系 (结果见图 2)。

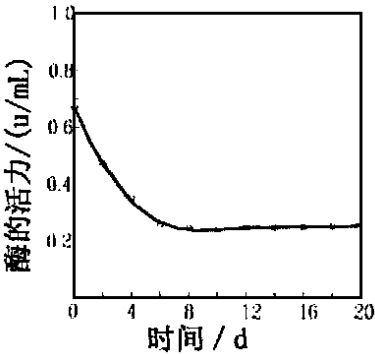


图 2 操作时间与酶的活力的关系

由图 2 可以看出, 开始时青霉素酰化酶和小分子物质透过中空纤维膜的量较多, 之后酶透过的量逐渐减少直到稳定在一定的范围内。这是因为刚开始时青霉素酰化酶没有在膜的表面形成浓差极化, 酶的透过能力相对较大, 随着酶不断在膜的表层的积累, 酶的透过最终趋向平衡。在这种动态稳定的条件下, 储槽中原液的浓度越来越大, 粘度也越来越大, 这时候可以向储槽中添加蒸馏水稀释酶

液, 使酶液中盐类和小分子杂质的浓度降低, 连续操作, 这样在浓缩的同时又达到了脱盐和部分纯化的目的。

2.2.2 操作压力与酶的活性的关系

由于青霉素酰化酶是一种蛋白质, 过高的操作压力会使酶的形态由于剪切而发生变化, 甚至损伤。同时, 过高的操作压力使中空纤维超滤膜的内表面皮层的孔隙变大 (膜的有效分离孔变形), 工作时更多的酶就会穿透出来, 超滤液中的酶的活性偏大, 影响了浓缩收率。图 3 显示了原液酶活力为 109.4 u/mL 且温度是 10℃时, 膜的操作压力与超滤液中酶的活性的关系。对于截留分子量为 4 万的膜而言, 当压力控制在 0.03 MPa 以下时, 超滤液中酶的活性小于 0.5 u/mL, 浓缩收率大于 99.5%。实际应用中, 控制压力在 0.03 MPa 左右时是一个比较理想的范围。

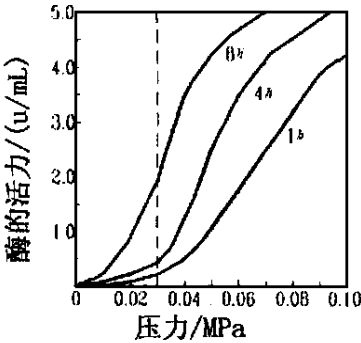


图 3 操作压力与酶的活性的关系

2.2.3 温度对浓缩酶的影响

当温度超过某一数值 (40℃) 时, 青霉素酰化酶的活性逐渐丧失。而中空纤维超滤膜的表层孔在 40℃以上时也表现得极不稳定, 使得大量的酶进入到超滤液中, 影响了浓缩收率。图 4 给出了青霉素酰化酶的活率随温度升高而降低的关系。故浓缩青霉素酰化酶溶液时, 温度一般控制 (5~15)℃为宜。

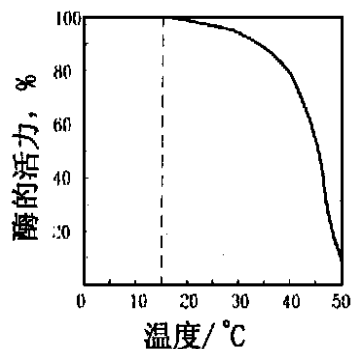


图 4 酶的活率与温度的关系

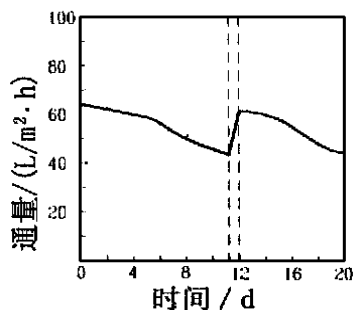


图 5 膜的通量与时间的关系

2.3 超滤膜的清洗

由于原料液中的杂质存在, 中空纤维超滤膜在使用一段时间后膜的表皮层被不溶的沉积物覆盖, 使膜超滤液的通量下降, 操作压力升高, 这种现象称为膜的污染。每批酶液浓缩结束后, 因酶在空气中极易变性, 须及时对膜进行清洗。图 5 给出了浓缩青霉素酰化酶溶液时, 截留分子量 4 万的超滤膜的通量与时间的关系曲线图。图中可以反映出, 超滤膜在连续使用过程中, 超滤液的通量随时间增多逐渐降低, 膜污染程度增加。在第十一天通过清洗又可快速回升到原来状态。但由于微量沉积物渗透于膜表皮层间隙孔中, 导致膜在每次清洗后通量会缓慢地衰减。

清洗过程为: 在储槽中配制一定比例的清洗液, 启动泵, 让超滤液也回到前面的储槽中, 循环操作 30 min, 关机浸泡 3 h, 再循环操作 30 min, 将浑浊的清洗液放出。再用清水冲洗干净。

3 结 论

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, 采用截留分子量为 4 万的中空纤维超滤膜对青霉素酰化酶溶液进行浓缩, 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, 在我国酶制剂和医药行业上有推广价值。

参考文献:

- [1] 张树政. 酶制剂工业 (下册) [M]. 北京: 科学出版社, 1984. 671.
- [2] 谭佩幸, 陶宗晋. 现代化学试剂手册第三分册生化试剂 (一) [M]. 北京: 化学工业出版社, 1986. 237.

Application of Hollow Fiber Ultrafiltration Membrane for Condensation of Penicillinacylase

ZHU Wei-bing¹, GONG Fang-hong²

(1. Changzhou Energy Engineering Factory, Changzhou 213004, China; 2. Jiangsu Institute of Petrochemical Technology, Changzhou 213016, China)

Abstract: This paper introduces the technique of condensed penicillinacylase with ultrafiltration instead of precipitated ammonium sulfate. It was found that using ultrafiltrated membrane not only would save the concentrated time, but also could effectively remove low molecular impurities. The influence of blocked molecular weight of membrane, operating conditions and temperature on the penicillinacylase activity was studied.

Key words: hollow fiber; ultrafiltration; penicillinacylase; condensation