

研究论文

动态膜分离式连续酶解装置生产果糖的研究*

朱宏吉 胡金榜 赵忠祥 金鼎五 聂清德

(天津大学化工系, 天津 300072)

摘 要

利用单滤室动态膜分离机(超滤膜组件)与全混式酶解反应器组成一个半封闭的回路系统, 而成为连续式酶解装置。用团假丝酵母产生的菊糖酶, 对洋姜提取液中的菊糖进行降解, 生成果糖。在这一工艺过程的研究过程中, 得出并验证了此装置的数学模型。在实验范围内表明, 生产同样重量(干物)的果糖, 连续操作过程的生产率是分批操作的2.34倍。可见, 连续酶解是非常有开发前途的操作方法。

关键词 膜分离 果糖 生物反应器 连续酶解 菊糖

The Study of Producing Fructose Using Dynamic Membrane Separation Type Enzymolysis Device

Zhu Hongji Hu Jinbang Zhao Zhongxiang Jin Dingwu Nie Qingde

(Chemical Engineering Department of TianJin Univ. Tianjin 300072)

Abstract

A continuous enzymolysis device is combined with a single filter housing dynamic separator(used as ultra filtration module)and a completely stirred enzymolysis reactor. The whole system is a semi-closed circuit. The technological process of producing fructose was studied by using inulinase from *Candida glabrata* to hydrolyze the inulin which is the main ingredient of Jerusalem artichokes extract. Thus, the mathematic model was obtained and examined. It was also proved that the device can be treated as continuous stirred tank reactor (CSTR). Besides, the results showed that within the test limits, the productivity of continuous operation is 2.34 times as much as that of a batch one under the same dry weight of

* 天津市自然科学基金资助课题。

** 参加实验工作的同志有邢义蕊、侯曾炎等。

收稿日期: 1994—10—23

fructose. It is seen that the continuous enzymolysis will be an operation of excellent developing future.

Keywords: membrane separations fructose bioreactor continuous enzymolysis inulin

蔗糖作为甜味剂的主要来源正在改变, 已经遇到自淀粉糖制取果葡糖浆(最终转化率为42%果糖)的竞争。而最新的趋势则是以高产量的粗放作物洋姜代替淀粉糖, 经一步酶解制取含量更高的果糖(最终转化率为75%果糖)的所谓“超果糖浆”

洋姜(学名菊芋)提取液中主要成分为菊糖。菊糖是由D-呋喃果糖以 β -2, 1-糖苷键连接的多聚果糖。在其还原端接一个葡萄糖基, 呈直链结构, 聚合度一般在30左右, 分子量为3000~5000碳单位。菊糖经过进一步的酸解或酶解, 可以获得高比例的果糖浆^[1]; 而用酶法制取果糖与酸法相比, 其转化过程简单, 产物单一, 最终果糖纯度高, 且仅需一种酶(菊糖酶)即可。故酶法对果糖的工业化生产更具潜力。

本课题在参考了国内外有关果糖制取工艺及设备等方面文献的基础上, 拟应用生物技术自洋姜生产果糖。生产工艺流程中除设置酶解反应器外, 并将动态膜分离机用于酶解反应后的物料分离, 以解决酶解工艺连续化的问题; 动态膜分离机为一旋叶式结构。该类机器已经在分离乳品中蛋白质、分离蛋白酶、谷氨酸等发酵液方面有了中试规模的经验。正是在此基础上, 作者又研究了自洋姜提取果糖的工艺条件, 才将动态膜分离机与酶解反应器相联, 开发成为动态膜滤式酶解反应装置, 如图1所示。其所选用的膜能截留大分子的菊糖和菊糖酶, 菊糖在菊糖酶作用下, 边反应边以过滤的方式使小分子的果糖分离出去, 而酶则循环回收利用, 实现果糖的连续生产过程。

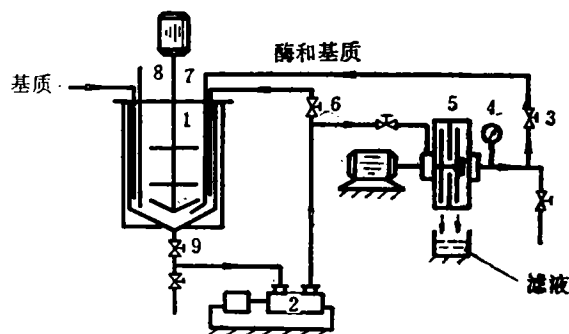


图1 动态膜反应实验装置示意图

1. 酶解反应器(带夹套) 2. 螺杆泵
3. 压力调节阀 4. 压力表 5. 旋叶式动态膜滤机 6. 泵回流阀 7. 搅拌装置 8. 温度控制系统 9. 控制阀

1 实验研究

1.1 菊糖酶(Inulinase) (E C, 3, 2, 1, 7)

是 β -2, 1-D-呋喃果糖水解脱酶。可由多种微生物合成。目前国外对微生物开展研究较多的是酵母、霉菌和细菌等^[2]。酶分子量为60000~70000碳单位。本实验采用团假丝酵母(*Candida glabrata*)所产生的菊糖酶(由南开大学提供), 清液酶活为5.5~9 u/mL^[3]。(u为酯的活力单位, 是在最适操作条件下, 1分钟内催化1微摩尔基质变化的酯量)

1.2 基质

实验用基质为洋姜提液, 其主要成分为菊糖^[4]。

1.3 实验方案

首先进行分批反应，以测定所用菊糖酶的特性，以及实验装置中所用膜的特性，并为计算连续反应的数学模型提供一些必要的实验数据。

进行分批反应可以在一定反应体积及一定的酶浓度下，观察菊糖酶降解洋姜提取液中不同浓度菊糖的转化率随时间的变化情况。（转化率定义为反应后所生成的还原糖量与反应前基质溶液中菊糖含量之比）。

在连续反应中，通过观察操作变量（反应体积 V 、透过速率 J 、基质浓度 S 和酶浓度 E ）对生产能力 K 及转化率 ε 的影响，得出实验测试范围内的最佳操作条件，并确定本实验装置的操作性能及反应动力学常数。

实验设计用量分别如表1和表2所示

表1 分批反应操作数据
 $E = 0.133 \text{ mg/mL}$, $V = 15\text{L}$

序号	1	2	3	4	5	6
$S \text{ mg/mL}$	50	50	30	70	10	30

表2 连续反应操作数据

$S \text{ mg/mL}$	$E \text{ mg/mL}$	$V \text{ L}$	$J \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$
70	0.27	7	60
50	0.27	7	60
30	0.27	7	60
10	0.27	7	60
30	0.27	4.5	60
30	0.27	10	60
30	0.27	13	60
50	0.27	7	36
50	0.27	7	84
50	0.27	7	120
50	0.07	7	60
50	0.14	7	60
50	0.54	7	60

1.4 分批反应

参阅图1，分批反应只在酶解反应器内进行。其操作方法如下：配制好的洋姜提取液，以一定体积加入反应器内。打开加热及搅拌系统，使料液升温至 50°C ，再加入一定浓度的酶液，使反应开始，计时，保持温度为 $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ，pH值为 $5.5 \sim 6$ 。每隔一定时间取样，并分装于两支试管内，其中一支放入沸水中灭活 5 min 后，同另一支一起保存在冰箱里，待测。

反应结束后，打开阀门9，启动螺杆泵2，进行膜分离，收集滤液即产品（果糖溶液），同时回收酶液。

1.5 连续反应

连续反应在酶解反应器及动态膜分离机内进行。酶解反应器内加入反应温度及pH值与分批反应均相同的反应液（洋姜提取液及酶液）。启动螺杆泵使料液进入循环操作，开始计时。在连续膜循环反应中，需要控制前述的四个操作变量， V 、 J 、 E 及 S 。此外，在反应过程中，将连续加入相同 S 的洋姜提取液，且控制加料流量与滤液滤出流量相等。每隔一定时间，在反应液及滤液内同时取样。

1.6 分析方法

总糖测定采用蒽酮比色法^[5]；还原糖测定采用3,5-二硝基水杨酸（即DNS）法^[5]。

2 结果与讨论

2.1 膜的特性

超滤膜选用由天津海水淡化与综合利用研究所试制的聚偏氟乙烯膜，切割分子量为6000。

2.1.1 膜的最大透过速率 (J_m)

使蒸馏水透过超滤膜，测试其 J_m 值。试验用的蒸馏水体积为 12L ，压力 0.1MPa ，

叶轮转速为800r/min,温度为50℃。测试结果 $J_m = 270\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 。

2.1.2 膜的截留率

用新鲜的洋姜提取液(总糖为58.1 mg/mL, 初始还原糖为3.166 mg/mL)进行浓缩菊糖试验。启动实验装置循环1 h后, 取样测得滤液中还原糖及总糖含量分别为2.808 mg/mL和6.21 mg/mL。由此得膜的截留率为93.8%。

Smon在1990年报道用截留分子量为5000的膜对洋姜提取液进行超滤, 截留率为95%^[6]。对于截留分子量为6000的膜, 由于分离过程中, 膜孔逐渐阻塞, 透过速率下降, 截留分子量也会减小。所以在缺少截留分子量为5000的膜时, 选择截留分子量为6000的膜也是合适的。

2.2 分批反应

反应液总体积为15L, 其中酶浓度为0.133 mg/mL, 总糖含量为58.1 mg/mL, 定时取样测还原糖含量得出相应的转化率, 作出图2所示的转化率随时间变化曲线。由图2可见, 约经3.25 h, 基质转化率即达90%。由此可确定在相同条件下, 需要经历3.25 h以上的降解过程再进行膜分离或稳定的连续操作。

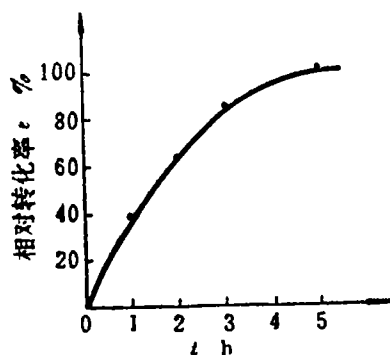


图2 相对转化率随时间变化曲线

图3显示了以不同总糖浓度的洋姜提取液为原料来进行酶解的还原糖含量随时间变化曲线。

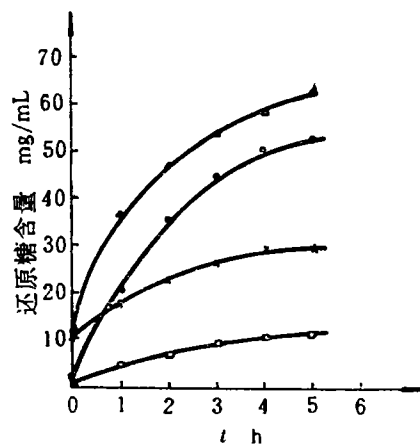


图3 分批水解洋姜提取液, 还原糖含量随时间变化曲线

$V = 15\text{L}$; 温度为50℃; $\text{pH} = 6.0$

(△-△) 为 $S = 70\text{mg/mL}$; (×-×)

为 $S = 30\text{mg/mL}$; (○-○) 为 50mg/mL ;

(□-□) 为 $S = 10\text{mg/mL}$ 。

2.3 连续反应

2.3.1 动态膜分离式连续酶解装置为CSTR

研究本实验装置CSTR中分布函数 $F(t)$ 与 t/θ 的关系, 做出图4所示曲线。其中停留时间 $\theta = 100\text{min}$ ($\theta = V/Q$, Q 为流量)。图4反映实验结果与根据理想CSTR得到的理论曲线相比较, 非常接近。而理想CSTR中停留时间分布函数为 $F(t) = 1 - e^{-t/\theta}$ ^[7]。可以认为, 此动态膜反应装置属CSTR模型。故可证明其特征为^[8]:

$$V_m \cdot \theta = SX + K_m X / (1 - X) \quad (1)$$

其中 V_m 为最大反应速度, K_m 为米氏常数, $x = P/S$ 为转化率(用小数表示), 其中 P 为被转化的还原糖浓度。

由于本实验装置中动态膜分离机内只安置了一块滤板, 这种操作过程形成的是一次连续全混流型酶解技术。如增加过滤级数(图5所示)亦即增加膜的数量, 增大单位膜面积, 则可使生产率提高。且由于其多级

结构形式，决定了每个滤室内反应物的组成为恒定，但沿轴向经各滤室的组成有变化，这便形成了高效的活塞型（PFR）的酶解反应器^[8]。

mm, $\tau = 0.54 \text{ min}$, 其中 τ 为时空, $\tau = EV/(QS)$ 等为最佳组合操作变量, 此时, 达到变化率为 $\varepsilon = 82.05\%$, 生产能力为 $K = 91.17 \text{ L/h}$ 。

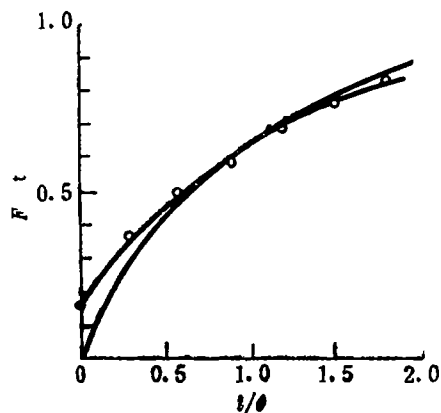


图4 停留时间分布函数曲线
(—) 为理想CSTR曲线
(○-○) 为实验数据

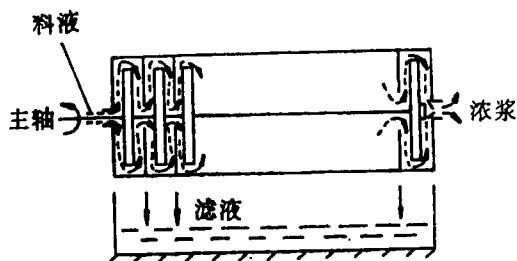


图5 多级动态膜滤式反应装置示意图

2.3.2 最佳操作变量的确定

连续反应操作达稳定状态时, V 、 J 、 S 和 E 四个操作变量对本实验装置 ε 及 K 的影响, 分别如图6~9所示。参数 K 表明了单位时间及单位酶量离开反应器的反应产物总量。

由图6~9可找出各图中两条曲线交点附近(上下波动10%以内)的操作变量为最佳。经综合分析: $V = 7 \text{ L}$, $S = 50 \text{ mg/mL}$, $J = 84 \text{ L/(m}^2 \cdot \text{h)}$, $E = 0.27 \text{ mg/mL}$ ($\theta = 100$

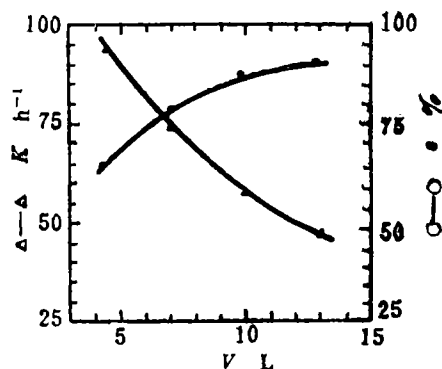


图6 在稳态时, 反应体积对 K 和 ε 的影响
 $J = 120 \text{ L/(m}^2 \cdot \text{h)}$; $S = 30 \text{ mg/mL}$;
 $E = 0.27 \text{ mg/mL}$; $\text{pH} = 6.0$; 温度为
 50°C ; (○-○) 为转化率; (Δ - Δ) 为
生产能力

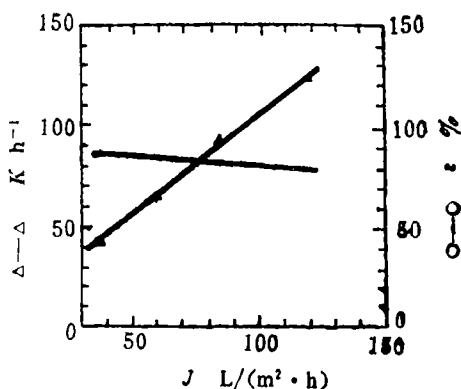


图7 在稳态时, 透过速率对 K 和 ε 影响:
 $V = 7000 \text{ mL}$; $S = 50 \text{ mg/mL}$; $F = 0.27$
 mg/mL ; $\text{pH} = 6.0$; 温度为 50°C ; (Δ - Δ)
为生产能力为转化率

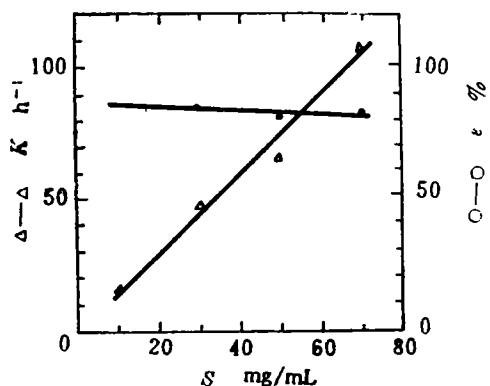


图8 在稳态时, 基质浓度对K和ε的影响

$J = 60 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$; $V = 7000 \text{ mL}$; $E = 0.27 \text{ mg/mL}$
 $\text{pH} = 6.0$, 温度为 50°C ; ($\bigcirc - \bigcirc$) 为转化率;
 ($\triangle - \triangle$) 为生产能力

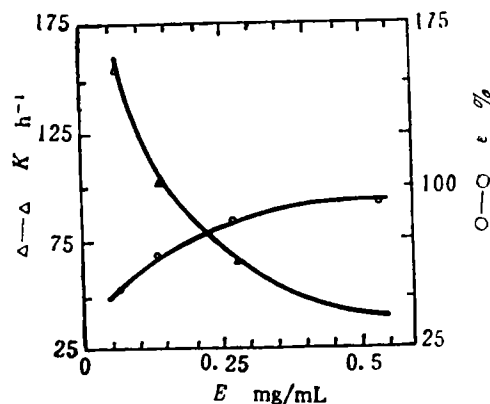


图9 在稳态时, 酶浓度对K和ε的影响:

$J = 60 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$; $V = 7000 \text{ mL}$;
 $S = 50 \text{ mg/mL}$; $\text{pH} = 6.0$; 温度为
 50°C ; ($\bigcirc - \bigcirc$) 转化率; ($\triangle - \triangle$)
 为生产能力

2.3.3 动力学常数

分批反应动力学常数可用L-B双倒数曲线法^[8]。其中初速度的测定方法如下: 在一定反应时间(15min)内, 相应的转化率小于0.05, 计算每分钟被降解的还原糖含量, 则可认定为初始反应速度。

进行连续反应操作时, 由于进入反应器

内的新鲜基质浓度的S迅速被转化为罐内的基质浓度(S-P), 如以Se表示有效浓度, 故可做如下假定: $Se = S(1 - X)$, 由基质质量平衡及特征方程(1)可知, 反应速度式为 $r = SX/\theta$ 。

在实验室中, 由于 $1/r = \theta/(SX)$, $1/Se = 1/[S(1 - X)]$, 由L-B双倒数曲线方程, 作出 $1/r \sim 1/Se$ 曲线, 确定连续反应的动力学常数。

对于分批反应及连续反应中的所有 K_m 、 V_m 及 k_{+2} (为反应速度常数) 值列于表3中。

表3 分批及连续反应动力学常数

动力学常数	分批反应	连续反应
$K_m \text{ mg/mL}$	62.5	43.52
$K_m \text{ mM}$	13.89	9.67
$V_m \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$	0.27	1.82
$k_{+2} \text{ min}^{-1}$	2.077	6.74
$E \text{ mg/mL}$	0.13	0.27

• (按菊糖平均分子量4500计算)

2.3.4 动力学模型及试验验证

在本实验装置的特征方程(1)中, $V_m = k_{+2}E$, $\theta = V/Q$, 由此得本装置的动力学模型:

$$k_{+2}EV/(SQ) = X + K_m X/[S(1 - X)] \\ = k_{+2}\tau \quad (2)$$

式中 $\tau = EV/(QS)$, 这个参数很好地综合了所选择的四个操作变量。将已测定的连续反应 K_m 及 k_{+2} 值做为膜反应装置的性能参数, 由(2)式可计算X作为 τ 的函数的理论值, 如图10所示。在同一图中绘出X作为 $f(\tau)$ 函数的实验值, 它们是在前述 ϵ 为 $f(V, J, S, E)$ 的函数的实验中得来的。

由图10可以看出, 实测值与理论推导的动力学模型非常接近(除个别的实测值与理论值的相对偏差为19.19%外, 绝大多数相对偏差在10%以内)

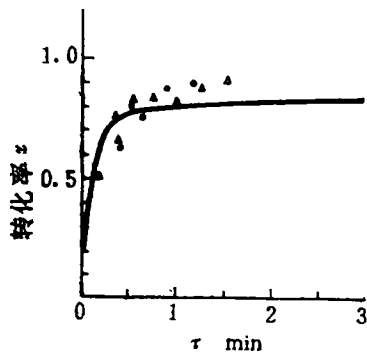


图10 转化率 X 随空时 τ 的变化关系曲线
理论曲线(—); $K\tau = X + [K_m X / S(1 - X)]$,

$$S = 50 \text{ mg/mL};$$

实验点: $\triangle$ $S = 50 \text{ mg/mL}$;

$\circ$ $S = 30 \text{ mg/mL}$;

$\times$ $S = 38 \text{ mg/mL}$;

$\square$ $S = 70 \text{ mg/mL}$;

因此不会出现产物抑制现象。从这一点看,此装置优于传统的填充床反应器。此外,在本研究课题中连续操作优于分批操作^[3]。

(3)验证了单滤室的动态膜滤式酶解反应器模型仍为CSTR。

(4)确立了动态膜分离式酶解装置的动力学模型。

(5)以洋姜为原料,提取其中高比例的菊糖,做为菊糖酶降解的基质。在料液制备过程中,应注意去除蛋白质,尽可能纯化料液,以利于膜分离的进行。

参 考 文 献

- 1 Vandamme E J, Derycke D G. Adv Appl, Microbiol 1933, 29: 139~176
- 2 魏文铃等. 微生物学通报, 1991, 18(2): 78~81
- 3 朱宏吉. 动态膜反应装置用于多糖酶法水解的研究, 天津大学研究生学位论文, 1993
- 4 王惠莲. 食品与发酵工业, 1983, №1 摘译自 Starch/Starke, 1981, 33, Nr118: 373~377
- 5 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1979
- 6 Smon H. T. et al, Process Biochem, 1990, May: 9~22
- 7 A. 怀斯曼. 酶生物技术手册. 北京: 科学出版社, 1987
- 8 山根恒夫. 生物反应工程. 北京轻工学院化工系生物化工教研室, 1987

3 结 论

(1)动态膜滤式酶解反应装置适合于菊糖的连续酶解以制取果糖。由此推测,只要膜的选用适当,对于与果糖生产有相同工艺过程的酶解反应此装置亦能适用。而且,此装置实现酶或细胞的固定化时,易于将其改变为PFR型反应器。因此,动态膜滤式酶解反应装置在生物技术领域中具有开拓应用的前景。

(2)菊糖酶处于游离状态,在降解过程中,随着膜分离的进行,果糖不断被滤出。

· 信息 · ※ ※ ※ ※ ※ ※

1996年《陕西化工》征订启事

《陕西化工》创刊于1972年,是适用性综合化工科技信息刊物,旨在传递和交流化工领域的先进经验和科研成果、适用技术,及时报道国内外化工科技动态和市场信息,注意为科研生产、成果转让、产品销售服务。设有“专论与综述”、“科研与生产”、“分析测试”、“经验交流”、“化工商情”、“缓蚀剂文摘”、“国内外化工技术”等栏目,适于广大科技人员、管理干部、院校师生和技术人员参阅。该刊每年4期。定价20元(含邮费)。

联系地址: 西安市西影路45号《陕西化工》编辑部 邮 编: 710054