

# 耦合中空纤维膜超滤分离游离细胞催化合成 ATP<sup>\*</sup>

段学辉<sup>1</sup> 张嗣良<sup>2</sup> 叶 勤<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南昌大学 生命科学与食品工程学院 南昌 330047)

(<sup>2</sup>华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**摘 要** 对耦合中空纤维膜超滤分离进行游离细胞催化合成 ATP 过程进行了实验研究,考察了细胞的催化效率和膜组件的操作稳定性。结果显示,中空纤维超滤膜的耦合分离能有效地截留反应液中的游离酶,其中乙醇脱氢酶(ADH)和己糖激酶(HK)的稳态截留效率在 95% 以上。耦合膜分离的酵母细胞催化 ATP 合成反应可重复使用 2.5~3.0 次,酶的利用率比普通分离的细胞提高 2.0~2.5 倍。中空纤维超滤膜于 0.1Mpa 工作压力下连续 11 批耦合分离操作,膜的渗透性无明显下降,过滤速率保持在初速率的 95% 以上。在稀释速率 0.25h<sup>-1</sup>下,反应体系保持了连续 5h 的 ATP 高转化率合成与分离耦合的拟稳态操作。

**关键词**: 反应与分离耦合,游离酵母,ATP,中空纤维膜,生物催化

中图分类号: TQ926.4; TQ272 文献标识码: B 文章编号: 0001-6209(2000)06-0633-37

三磷酸腺苷(ATP)是一种重要的生化能量试剂和临床核苷酸类药物,对进行性肌肉萎缩、肝炎、癌症、心脏病等病症具有良好的治疗或辅助治疗效果,一直受到人们的重视。利用酵母酶促合成 ATP,一般有 14 个酶参加反应<sup>[1]</sup>,其酶系完整,催化效率高,是极具工业前景的方法。提高酵母酶催化的可操作性,减少产物分离时酶的流失和保持酶系的催化活力是 ATP 生物体外合成研究的一个重要课题。近年来,采用固定化酵母细胞催化合成 ATP 的研究报道较多<sup>[2,3]</sup>。但实际的应用研究和生产试验结果显示,固定化细胞的生产成本和酶的有效利用率等问题仍没有得到解决。

中空纤维超滤膜近年来在生物反应与分离研究中得到广泛关注。这类膜具有良好的工程性能,如单位体积内有效过滤面积大,具有相对稳定和较高的过滤速率,膜的截留分子量可选择范围宽,相对强度高和耐压,具有可操作性和规模放大的可能性等。其产品易得,价格不贵。在总溶剂的细胞循环发酵,食品与医药化工产品的生物酶催化合成研究中,中空纤维膜的应用有许多成功的研究报道<sup>[4,5]</sup>。

利用中空纤维超滤膜的工程特性,构建一个 ATP 生物合成反应与超滤分离耦合的工艺,以保持游离细胞酶系与底物进行均相反应,减少酶催化反应的传质阻力和加快反应的平衡速度,截留产物分离时流出液中的游离细胞和活性酶蛋白,让小分子量的 ATP 产物溶液渗透分离,从而减少酶的分离流失,提高细胞的利用率和获得高质量的 ATP 产物溶液。并可采用底物流加和耦合分离策略,实现 ATP 合成与分离的分批或连续操作。本文

<sup>\*</sup>高等学校骨干教师资助计划资助(2000 65-08)

作者简介:段学辉(1958-),男,江西永新人,南昌大学生命科学与食品工程学院副教授,博士,主要从事生物发酵与合成研究

收稿日期:1999-09-19,修回日期:2000-01-30

研究了耦合超滤分离游离酵母催化合成 ATP 的细胞酶利用率和中空纤维超滤膜的操作稳定性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

酒精酵母 *Saccharomyces cerevisiae* SPSC II 细胞的培养和处理参考文献 [6]。

### 1.2 试剂

腺苷,葡萄糖(AR),磷酸盐(CP),硫酸镁(CP),琼脂糖(BR)和辅酶 I(由上海生物化学试剂公司提供)。

### 1.3 分析方法

1.3.1 底物消耗、中间产物和产物 ATP 生成:采用琼脂糖平板电泳法测定<sup>[3]</sup>。

1.3.2 反应液和超滤分离液中乙醇脱氢酶(ADH)和己糖激酶(HK)的活性:采用在葡萄糖、ATP、和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶存在下还原  $\text{NAD}^+$  来分析,一个 ADH 或 HK 酶活性单位相当于  $25^\circ\text{C}$  下每分钟还原  $1\mu\text{mol NDA}^+$ ,操作按文献 [7,8] 方法。

### 1.4 实验仪器与设备

DHF-B1 中空纤维超滤膜(分子量 = 10kD),玻璃反应罐(500mL),19HW-1 恒温磁力搅拌仪,RP-N3 蠕动泵,LDB-Md 电子蠕动泵,751-GW 紫外分光光度计,DY-A 电泳仪。

### 1.5 实验装置

本实验采用耦合中空纤维膜超滤分离酵母细胞酶催化反应合成 ATP 过程如图 1。

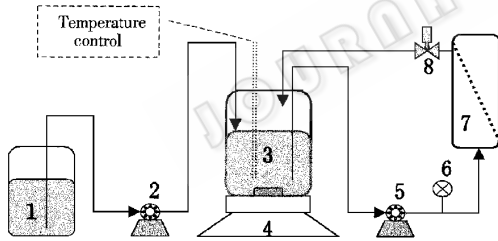


图 1 ATP 合成反应与中空纤维膜超滤分离耦合示意图

Fig. 1 Schematic of ATP synthesis couple with hollow fiber ultrafiltration separation

1. substrate tank ; 2. Electronic peristaltic pump ; 3. Fermentor ; 4. Magnetic stirring device ; 5. Circulation pump ; 6. Pressometer ; 7. Hollow fiber membrane module ; 8. Pressure control valve.

### 1.6 实验方法

反应罐工作体积为 200mL,反应温度  $37^\circ\text{C}$ 。实验分批反应与分离耦合操作和连续反应与分离耦合操作。膜超滤时,首先将循环蠕动泵的转速调至所需值,然后调节调压阀,使中空纤维超滤膜的操作压力为 0.1MPa,循环回流比为 0.725 左右。保持反应液在中空纤维超滤膜中形成错流过滤,以避免胶体层的形成和维持稳定渗透通量与截留率。批反应在 ATP 转化率大于 95% 后开始耦合分离操作,直至完成。连续反应与分离耦合操作时,在 ATP 转化率大于 90% 后开始流加底物,且保持反应液的稀释率等于膜分离速率。

## 2 结果和分析

### 2.1 ADH 和 HK 的截留

在游离细胞催化的 ATP 合成反应中,细胞酶系随反应的进行逐渐释放到反应液中。因此,一般分批合成反应中随着产物的分离酶系大部分流失。连续游离细胞催化 ATP 合成反应和超滤分离耦合实验过程中,中空纤维超滤膜对 ADH 和 HK 的截留效果,通过间

隙取样分析反应液和超滤分离液中 ADH 和 HK 酶活性来跟踪 ,离线分析结果如图 2 所示。

截留率(  $R_{obs}$  )是评价膜分离性能最常用指标 ,其表达式为 : $R_{obs} = (1 - C_p/C_b) \times 100\%$  ;式中  $R_{obs}$  为表观截留率 , $C_p$ 、 $C_b$  分别为透过液 ,反应液中酶蛋白浓度 (  $g/100mL$  )

由于溶液中酶活性与酶蛋白的浓度成正比关系。从图 2 中可以看出 ,反应和分离耦合过程的前期 ,反应液和分离液中的 ADH 活性接近 ,40min 后 ,分离液中 ADH 活性迅速下降 ,膜对 ADH 的截留效率快速逼近 100%。而 HK 的截留效率始终很高 ,分离液中几乎检测不到 HK 的活性。这些结果与酵母细胞中酶系的分子量相关。HK 分子量大 ,一般在 100kD 左右 ,几乎不能透过膜 ,而 ADH 有多种同功酶 ,分子量大小范围在 28kD~60kD 之间 ,部分小分子量的 ADH 先释放 ,能够透过膜而进入分离液中。因此 ,反应初始阶段检测到反应液和分离液中的 ADH 活性接近 ,而分离液中检测不到 HK 活性。

### 2.2 中空纤维超滤膜耦合分离操作的稳定性

中空纤维超滤膜过滤实验操作采用错流过滤。反应液走壳程 ,透过液走管程 ,反应液膜超滤时处于循环动态且与膜面形成错流 ,流体的流动冲击力使膜面不易形成滤饼或胶体层 ,过滤速率相对稳定。在批反应体积为 200mL ,反应温度 37℃ ,pH6.0~6.5 ,中空纤维超滤膜操作压力 0.1MPa ,循环回流比 0.725 左右的实验条件下 ,连续 11 批 ATP 生产反应与分离耦合操作 ,膜过滤的稳定性实验结果如图 3 所示。连续多批过滤操作的速率曲线比较稳定 ,无明显的下降趋势。说明中空纤维超滤膜的错流过滤工艺具有较好的操作稳定性。

### 2.3 耦合超滤分离反应的细胞利用率

耦合中空纤维膜超滤分离合成 ATP 反应的细胞利用率 ,通过分批反应和耦合超滤分离 ,考察细胞的可重复利用次数和催化反应的 ATP 生产得率 ,并与游离细胞反应和固定化细胞反应的细胞利用率进行比较。实验结果如表 1 所示。

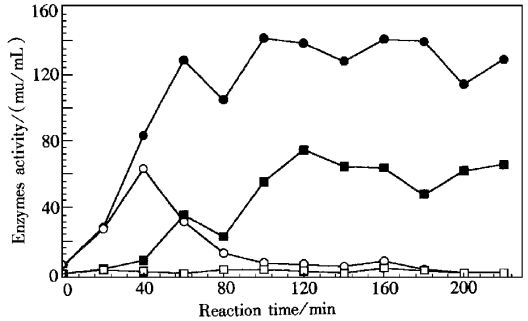


图 2 反应液( inside )和超滤分离液( UF )中 ADH 和 HK 的活性

Fig.2 ADH and HK activities of reaction solution( inside ) and UF solution( UF )during a 3.5h reaction

● ADH in reaction solution ; ○ ADH in ultrafiltrate ; ■ HK in reaction solution ; □ HK in ultrafiltrate.

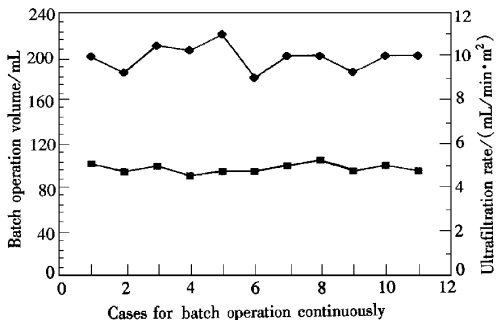


图 3 中空纤维超滤膜过滤操作的稳定性

Fig.3 The stability of UF in Hollow fiber membrane for ATP production

从表 1 的实验结果对比看出,通常方法分离的游离细胞反应酶催化活性的下降速度最快,第 2 批催化反应时,ATP 生产转化得率明显地低于第 1 批反应的得率。固定化细胞反应的酶催化活性下降速度相对较慢,基本能够维持 ATP 生产反应的 2 批转化活力,第 3 批反应的结果无实际意义。这说明普通游离细胞反应中活性酶随反应液分离大部分

表 1 膜分离耦合反应与游离细胞和固定化细胞反应合成 ATP 酶利用率对比

Table 1 Compare of cell catalysis efficiencies for hollow fiber membrane ultrafiltration to free cell and immobilization cell in ATP production

Cells utilization time	ATP conversion rate/%		
	Membrane UF	Free cell	Immobilized cell
1	100	100	100
2	100	30	95
3	85	20	20
4	45	5	5

\* The reaction conditions of membrane UF, free cell and immobilization cell for ATP production are the same. Cell immobilization methods see also referenc[ 3 ]

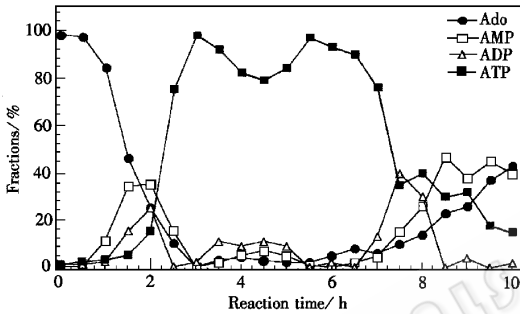


图 4 连续反应与超滤分离耦合过程中各组分的变化曲线

Fig. 4 Results of continuous ATP production under  $0.25h^{-1}$  dilution rate  
 Reaction volume, 200mL; Temperature,  $37^{\circ}C$ ; Feed time, 3.0h; Fresh medium concentration 4%; Cell concentration, 200g/L.

细胞连续反应合成 ATP 过程中底物腺苷( Ado )的消耗和产物 ATP 及中间产物一磷酸腺苷( AMP )、二磷酸腺苷( ADP )的生成变化曲线如图 4 所示。

耦合超滤分离进行连续反应合成 ATP 过程,在一定的反应条件和细胞酶浓度下,能够得到一个酶催化 ATP 生产速率等于稀释速率的拟稳态操作时区。ATP 的生产和分离能够稳定在较高的 ATP 百分浓度上。同时,图 4 显示,酵母细胞催化 ATP 生产是一个比较复杂的过程,中空纤维超滤膜的分离截留作用只能相对地维持和提高细胞 ATP 合成酶的活性,一些其它的酶失活原因和解决办法有待实验研究,工业化的生产应用需要进一步优化。

### 3 讨论

在酵母酶催化 ATP 合成反应中耦合中空纤维膜超滤分离,对通常产物分离时出现的酶流失具有截留作用,能提高细胞的利用率和产物溶液的质量,有利于后续的分

离纯化。固定化细胞对胞内酶系具有一定的缓释作用,相对减缓了因细胞酶流失而导致的酶催化活力迅速下降。耦合中空纤维膜超滤分离的反应,细胞反复使用的次数和 ATP 转化酶活力的保持程度相对游离细胞和固定化细胞反应均有提高。它的酶活性下降较慢,第 2 次使用 ATP 合成反应仍然保持较好反应速度和 ATP 生产得率,并在第 3 次使用中仍显示出有效的 ATP 转化能力。这些结果表明,耦合超滤分离进行游离细胞循环批反应,对酶蛋白具有一定的截留作用,能够减缓反应分离中酶的流失,提高细胞的利用效率。

#### 2.4 连续反应与分离耦合过程

耦合中空纤维膜超滤分离进行游离细胞

减少 ATP 的损失与降解。中空纤维超滤膜操作简单,错流过滤能减少膜的污染和堵塞,连续分离性能较稳定,容易试验放大。分批多次催化反应和连续催化反应后期出现 ATP 合成酶活性的迅速下降,说明细胞酶系催化 ATP 合成反应中酶的半衰期还与酶的结构性失活程度和部分活性因子的流失有关系,而且它们可能存在一个阈值。ATP 合成反应与膜超滤分离耦合过程的模型优化将另文报道。

### 参 考 文 献

- [1] Wei L L, Goux W J. *Bioorganic Chemistry*, 1992, **20**: 62~66.
- [2] Murata K, Tani K, Kato J, *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1981, **3**(6): 233~242.
- [3] 邱蔚然,徐茜,王秋雁,等.生物化学与生物物理学报,1993, **25**(1): 77~81.
- [4] Sims K A, Cheryan M. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **36**: 960~967.
- [5] Prazeres D M F, Cabral J M S. *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**: 738~750.
- [6] 段学辉,叶勤,张嗣良.华东理工大学学报,1998, **24**(3): 303~307.
- [7] Gowda L R, Joshi M S, Bhat S G. *Anal Biochem*, 1988, **175**: 531~536.
- [8] Bernmeyer H U. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Basel: Verlag Chemie, 1984, **6**: 163~172.

## ATP SYNTHESIS BY FREE YEAST CATALYSIS COUPLING HOLLOW FIBER ULTRAFILTRATION SEPARATION\*

Duan Xuehui<sup>1</sup> Zhang Siliang<sup>2</sup> Ye Qin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047)

(<sup>2</sup> State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237)

**Abstract**: A novel process for the ATP production employing free yeast catalysis and coupling a hollow fiber module ultrafiltration separation was studied. The experimental results of biocatalyst half-life and operating stability for ultrafiltration showed that the enzymes released from free yeast cell could be cut-off efficiently from the product output stream by hollow fiber membrane. The intercepted percentage of ADH and HK reached more than 95% during the steady running. The efficiency of enzymes utilized was 2.0~2.5 fold as much as that of batch reaction. And the time of yeast cells used repeatedly for ATP synthesis reached 2.5~3.0 batches. Under 0.1MPa, the ultrafiltrating speed of hollow fiber membrane could keep on a stabilizing value for 11 batches continuously. The continuous operation mode of ATP synthesis simultaneous product ultrafiltration separation could be maintained in higher conversion rate for 5.0h when the whole system fell in a pseudo-stat where the dilution rate was equal to 0.25h<sup>-1</sup>.

**Key words**: Simultaneous reaction and separation, Free yeast cell, ATP, Hollow fiber membrane, Biocatalysis

\* Supported by Foundation for University Key Teacher by the Ministry of Education(2000 65-8)

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed