

# 膜反应器包衣酶法水解橄榄油的研究

丁 辉 徐世民 宋宝东 吴金川 李鑫钢  
(天津大学化工学院, 天津 300072)

**摘要:**在聚丙烯腈中空纤维膜反应器油-水两相体系中,使用表面活性剂包衣酶催化水解橄榄油。含有橄榄油和包衣酶的油相(有机相)在中空纤维膜管束内循环流动,而在纤维膜管束外则是水相循环。实验表明橄榄油和油酸的截留率分别为 91% 和 82%,包衣酶全部截留在管束内。在 30℃、橄榄油浓度为 0.62 mol/L 时,包衣酶催化底物转化率为 60%,是相应脂肪酶催化转化率的 2 倍。

**关键词:**中空纤维膜反应器;油-水两相体系;包衣酶;水解

**中图分类号:**TQ426.97

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-4320(2003)11-0035-03

## Study on catalyzed hydrolysis of olive oil by surfactant-coated lipase in a hollow fiber membrane reactor

DING Hui, XU Shi-min, SONG Bao-dong, WU Jin-chuan, LI Xin-gang  
(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 30072, China)

**Abstract:** The hydrolysis of olive oil catalyzed by surfactant-coated lipase in a biphasic system was studied in a hollow fiber membrane reactor made of hydrophilic polyacrylonitrile. The organic phase containing the olive oil and coated lipase recycles inside the hollow fiber membrane tubes and the aqueous phase recycles outside. Lipase is completely retained by the membrane with the retention percentages of olive oil and oleic acid are 91% and 82%, respectively. When the olive oil has a concentration of 0.62 mol/L and reacts at 30℃, the substrate conversion (60%) in the case of coated lipase is twice that of the native lipase after 12 h.

**Key words:** hollow fiber membrane reactor; organic-aqueous biphasic system; surfactant-coated lipase; hydrolysis

近年来有机相中包衣酶催化酯化合成反应<sup>[1-3]</sup>以及包衣酶在油-水两相体系中催化底物的水解反应<sup>[4]</sup>成为有机介质酶工程的研究热点。表面活性剂包衣酶<sup>[5-6]</sup>巧妙地利用了表面活性剂分子的两亲性质使酶催化反应均相地在有机介质中进行,提高了反应速率,且由于酶分子受到表面活性剂分子层的保护,稳定性也得到提高。从目前资料来看包衣酶应用于有机介质中催化反应的研究仍处于实验室开发阶段,对橄榄油水解反应的研究一般在乳化状态下进行,乳化时所必需的搅拌不仅消耗大量能源而且很容易使酶因受到剪切力而失活。笔者采用中空纤维膜反应器,对橄榄油的包衣酶催化水解反应进行了初步探讨,并以天然脂肪酶为催化剂的酶膜反

应器做了对比,为其在将来的商业化应用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

葡萄糖酸内酯和脂肪酶(*Candida rugosa*, Type VII), Sigma 公司,包衣用表面活性剂谷氨酸二烷基酯核糖醇按 Goto 等<sup>[5]</sup>的方法在实验室中合成;橄榄油,皂化值 195;异辛烷等其他试剂均为分析纯。

### 1.2 包衣酶的制备

将 Kamiya 制备包衣酶的方法<sup>[7]</sup>进行了一些改进,具体方法见文献[8]。

收稿日期:2003-08-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(29986031)

作者简介:丁辉(1976-),男,博士生;李鑫钢(1961-),男,博士,教授,博导,主要研究方向为传质与分离工程、环境化学工程,通讯联系人,022-27890628, xingli@tju.edu.cn.

### 1.3 实验仪器

中空纤维膜购于无锡超滤膜厂,聚丙烯腈材料,亲水性超滤膜,截留分子质量 50 000 g/mol。反应系统膜组件自制,其中封有该中空超滤膜 32 根,有效长度 0.3 m,内径为 1.5 mm。1515 型恒流泵;752 型紫外光栅分光光度计等。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 分析方法

橄榄油的测定方法:在一定浓度范围内,含橄榄油的异辛烷溶液在 218 nm 的光吸收值与其浓度成正比。配置一系列不同浓度橄榄油异辛烷溶液,以纯异辛烷为参比溶液,紫外分光光度计测定橄榄油浓度与吸光度的关系,绘制标准曲线。测定橄榄油含量,只需测定其 218 nm 下吸光度,然后通过该标准曲线即可查得其浓度。

甘油测定方法:过碘酸钾氧化甘油成甲酸和甲醛,而过碘酸钾被还原为碘酸钾,碘酸钾和过量的过碘酸钾,在强酸溶液中加入碘化钾后析出碘,游离碘用硫代硫酸钠标准溶液滴定<sup>[9]</sup>。

油酸的测定可用碱标准溶液滴定。包衣酶中蛋白质含量的测定采用紫外分光光度法<sup>[10]</sup>。酶催化反应生成的脂肪酸利用适当浓度的 NaOH 滴定,具体方法见文献<sup>[11]</sup>。

截留率的测定:橄榄油、油酸及甘油、酶液通过膜反应器的渗透情况以截留系数  $\delta = 1 - c_p/c_c$ , ( $c_p$ 、 $c_c$  分别为渗透侧、浓缩侧浓度)表示。将橄榄油、油酸和包衣酶分别溶于异辛烷中,甘油和脂肪酶则分别溶于 0.1 mol/L 缓冲溶液(pH 值 7.0)中,操作压力为 0.02 MPa,通过恒流泵循环操作 2 h 后,分别在渗透侧和截留侧取样,并计算超滤膜对各物质的截留率  $\delta$ 。

#### 1.4.2 酶膜反应流程

采用聚丙烯腈中空纤维膜反应器进行橄榄油的水解,流程见图 1。

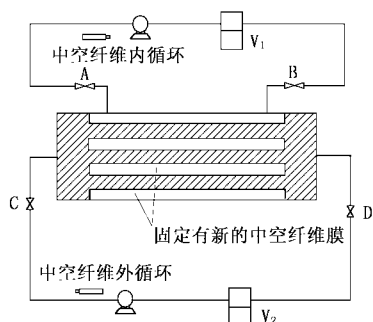


图 1 酶膜反应分离器结构示意图

#### 1.4.3 实验操作

在油-水两相体系酶膜反应水解橄榄油之前,先进行包衣酶或天然脂肪酶在纤维膜管束内的超滤固化操作。将 50 mg 脂肪酶溶于 200 mL、0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(pH 值 7.0)置于 V1 中。关闭阀 A、D,打开阀 B、C,进行酶的超滤,流率均控制在 50 mL/h(即固定化操作)。V1 中残留的酶液继续加入缓冲液,直至超滤完全。渗透液流到 V2,从 V2 取样,在 280 nm 下测其吸光度。包衣酶的固定化操作同前,其所含蛋白质也相同。操作完毕后将膜反应器内的水排出。

水解橄榄油的操作条件是:有机相为 150 mL 含有 0.62 mol/L 橄榄油和包衣酶(蛋白质含量等同于 50 mg 天然脂肪酶的蛋白量)的异辛烷溶液,在中空纤维膜管束内循环。水相为 150 mL、0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(pH 值 7.0),在纤维膜管束外循环,流率均控制在 100 mL/h,体系温度控制在 30℃。天然酶反应体系操作条件与包衣酶体系相同,天然脂肪酶为 50 mg。每隔一定时间从 V1 中取 1 mL 溶液,加入的乙醇/丙酮(体积比 1:1)溶液终止反应,滴加 2~3 滴酚酞,用碱液滴定油酸,确定浓度。从 V2 中取出一定量的水溶液,测定甘油浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 中空纤维膜对各组分截留率

渗透实验结果表明,亲水性聚丙烯腈中空纤维超滤膜的渗透侧没有检测到天然脂肪酶或表面活性剂包衣酶,即 2 种酶的截留率  $\delta$  均为 100%。底物和产物的截留率实验结果见表 1。聚丙烯腈超滤膜对反应底物橄榄油及产物油酸均能截留,且截留较好,分别为 91% 和 82%。但对产物甘油却基本不截留,其截留率仅为 0.06%。姚传义<sup>[12]</sup>等报道疏水性聚砜膜中空纤维膜对橄榄油和油酸的截留率分别小于 5% 和小于 15%。实验结果表明,膜组件材质的亲水/疏水性对小分子组分的截留起到关键作用。

从表 1 中可以看到,即使使用聚丙烯腈膜,仍有约 10% 的橄榄油(平均  $\delta = 91%$ )和 20% 的油酸(平均  $\delta = 82%$ )渗透到膜另一侧,也即原料包括水、橄榄油在膜的一侧进料进行反应生成的油酸、甘油,所有这些成分都能渗透到膜的另一侧造成底物和产物的混合,没有更好的起到膜分离的作用。故下面尝试了有机相/水相分别经过中空纤维膜管束内和中空纤维膜管束外的反应、分离实验,参见图 1,该流程优点在于包衣酶和底物同在中空纤维膜壁的内侧

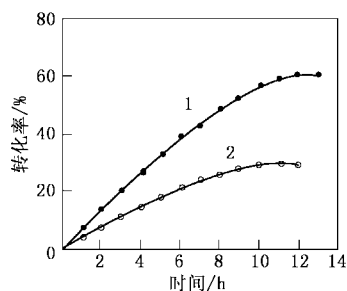
利于底物的转化。生成的产物甘油有着高度的渗透性(平均  $\delta = 0.06\%$ ),易于通过亲水性的纤维膜管束壁,进入外侧的水相,从而促使加速底物的酶解。

表 1 底物和产物的膜截留系数

实验	橄榄油浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\delta/\%$	油酸浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\delta/\%$	甘油浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\delta/\%$
1	1.1	91.0	39.1	81.5	60.2	0.05
2	1.9	90.3	61.2	82.1	95.7	0.07
3	3.0	92.1	163.4	80.8	180.4	0.04
4	4.4	91.4	241.2	81.9	290.4	0.05
5	5.7	90.8	324.6	82.3	400.1	0.08
平均值	—	91.0	—	82.0	—	0.06

## 2.2 膜反应器橄榄油水解时间进程

水解时间进程曲线如图 2 所示。由图可见,在相同条件下,包衣酶膜反应器内的底物转化率相对天然酶膜反应器的要高。水解反应 12 h 后,包衣酶催化底物的转化率为 60%,而天然酶仅 30%。包衣酶催化水解转化率高出天然酶的原因是由于脂肪酶经表面活性剂的包衣后,使得酶活性中心更易外露,并借助表面活性剂的两条疏水烷基链的亲油性,使得酶很好地溶解在油相中,有利于和疏水性底物橄榄油的结合。并且由于包衣剂的保护避免了酶直接与溶剂的接触而引起的酶活的降低。



1—包衣酶;2—天然酶

图 2 酶膜反应器中橄榄油水解时间进程图

经测定包衣酶和天然酶催化底物反应后,水相中甘油与油相中油酸的摩尔浓度比值分别为 2.9 和 3.1。两者都接近 3,即油酸基本没有透过超滤膜而被截留在纤维管内有机介质中,甘油则几乎全部从管内渗透到管外,可以认为中空纤维膜反应器起到一定的产物分离效果,也符合体系各组分截留率实验的预示规律。

## 3 结语

首次考察疏水性聚丙烯腈中空纤维膜反应器油-水两相体系中,包衣酶催化水解橄榄油的反应进程,并与相同条件下的天然脂肪酶催化做了对比。实验结果表明:在 30℃、橄榄油浓度为 0.62 mol/L 时,包衣酶催化底物转化率为 60%,是相应脂肪酶催化转化率的 2 倍。采用包衣酶在油-水两相体系中空纤维膜反应器催化橄榄油水解是具有较大的工业前景。

## 参考文献

- [1] Okahata Y, Ijiri K. [J]. Chem Soc Chem Commun, 1988, 20: 1392 - 1394.
- [2] Goto M, Kamiya N, Miyata M, et al. [J]. Biotechnol Prog, 1994, 10: 263 - 268.
- [3] Noda S, Kamiya N, Goto M, et al. [J]. Biotechnol Lett, 1997, 19: 307 - 309.
- [4] Mori T, Kishimoto S, Ijiri K, et al. [J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 76: 157 - 163.
- [5] Goto M, Matsumoto M, Kondo K. [J]. J Chem Eng Jpn, 1987, 20(2): 157 - 164.
- [6] Okazaki SY, Kamiya N, Abe K, et al. [J]. Biotech and Bioeng, 1997, 55: 455 - 460.
- [7] Kamiya N, Goto M. [J]. J Ferment Bioeng, 1996, 82: 37 - 41.
- [8] Wu J C, Song B D, Xing A H, et al. [J]. Process Biochem, 2002, 37: 1229 - 1233.
- [9] 李秋良. 肥皂和甘油生产分析[M]. 北京:轻工业出版社, 1985.
- [10] Okahata Y, Ijiri K. [J]. Bull Chem Soc Jap, 1992, 65: 2411 - 2420.
- [11] 丁辉, 邢爱华. [J]. 化学工业与工程, 2002, 19(6): 417 - 421. ■

(上接第 30 页)

- [9] 梁斌. 具有规则流体通道的规整催化剂[P]. ZL 02221221.3, 2003-7-23.
- [10] 梁允尚. [J]. 岩土工程学报, 1992, 14(3): 80 - 84.
- [11] 赵久柄, 王正良. [J]. 国外公路, 1996, 16(6): 18 - 22.
- [12] 张格, 刘乃庆, 吴华. [J]. 农业与技术, 1996, 5: 44 - 45.

- [13] 卢俊. [J]. 安庆石化, 1998, 120(4): 57 - 59.
- [14] 王雷. [J]. 混凝土, 2001, 2: 33 - 34.
- [15] Steele R, Hu Z X. Effect of pore-fluid on soil/water behavior with examples[A]. In: Proceedings of International Symposium on Environmental Geotechnology[C]. Bethlehem, PA: Envo Publishing Co, 1987. 301 - 309. ■