

反胶团提取脂肪酶动力学研究 () 萃取过程^{*}

陈少欣 林文奎

(华侨大学化工学院, 泉州 362011)

摘要 采用 AOT/异辛烷反胶团溶液萃取脂肪酶. 应用双膜理论, 建立萃取动力学方程, 此模型能较好地与实验数据相吻合. 从模型方程中求取不同操作条件下的质量传递系数, 通过计算传递阻力, 确定提取过程的传递控制类型. 结果表明, 萃取过程主要由主体扩散阻力控制.

关键词 动力学, 反胶团, 萃取, 脂肪酶

分类号 TQ 028.8; TQ 925.6

反胶团提取生物物质是近年来在非水相提取方面的一项新技术, 实验上已证明了反胶团是一种很有效的生物物质分离方法. 目前, 国内外对反胶团提取生物物质的研究主要集中在萃取工艺条件的选择上^[1,2], 而对萃取动力学方面研究甚少. 我们在提取工艺基础上进一步研究反胶团萃取的动力学, 更深入了解反胶团的提取机制, 选择最佳的萃取条件, 有效控制和强化萃取过程, 为设计萃取设备提供一些有用的基础数据.

1 材料与实验方法

1.1 材料

AOT(二-(2-乙基己烷)丁二酸磺酸钠, 纯度大于 98%, 上海试剂二厂)、异辛烷(分析纯)、脂肪酶(分子量为 50 000、等电点 PI 等于 9.4, 无锡酶制剂厂); 其它药品均为化学纯试剂, 水溶液均用去离子水配制.

1.2 仪器

HZ 24 型回转振荡器(上海跃进医疗器械厂), 离心机 800 型(上海手术器械厂).

1.3 反胶团溶液的配制和萃取操作

将 AOT 溶于异辛烷中, 构成透明澄清的反胶团溶液, 浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 取相同体积的反胶团溶液和含脂肪酶的水相, 置于三角瓶中, 在往复振荡机上振荡混合, 隔一定时间取样. 离心 15 min 后, 将混合物分成两相, 用移液管小心将两相分开, 分别测定水相和有机相中的脂肪酶浓度.

1.4 脂肪酶浓度的测定

水相中的脂肪酶含量采用考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue G-250)染色分析法^[3]测

定,并用 751 紫外分光光度计校对,最后通过物料衡算求出有机相脂肪酶浓度.

2 萃取动力学方程的推导

萃取过程中脂肪酶在 t 时间内从水相转移到有机相. 假设水相体积为 V_1 , 脂肪酶在水相的浓度为 C_1 ; 有机相的体积为 V_2 , 脂肪酶在有机相的浓度为 C_2 .

开始萃取时, 脂肪酶全都在水相, 浓度为 C_0 . 根据物料衡算, 得

$$V_1 C_0 = V_1 C_1 + V_2 C_2. \quad (1)$$

如果两相处于平衡状态, 蛋白质浓度满足 $C_1^* = m C_2^*$, 其中 C_1^* , C_2^* 是水相 1 和有机相 2 的平衡浓度, m 是平衡常数. 对于萃取而言, m 等于平衡时水相脂肪酶浓度 C_1 与有机相脂肪酶浓度 C_2 之比. 假设萃取过程两相混合均匀, 两相界面面积设为 A (m^2). 应用双膜理论, 则脂肪酶在水相 1 传质质量的通量方程 $N_1 = - \text{d}n_1 / A \text{d}t = K_L [C_1 - C_1^*]$, 其中 N_1 是传质通量 ($\text{mol} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$), K_L 是总传质系数 ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$). 则

$$V_1 \text{d}C_1 / \text{d}t = - K_L A [C_1 - m C_2]. \quad (2)$$

定义相比 V_r 为 V_1 / V_2 , 且 $C_2 = V_r (C_0 - C_1)$. 把式 (1) 代入式 (2) 得

$$V_1 \text{d}C_1 / \text{d}t = - K_L A [(1 + m V_r) C_1 - m V_r C_0]. \quad (3)$$

式 (3) 经积分整理, 并定义 $\alpha = (K_L A / V_1) (1 + m V_r)$, $\beta = m V_r / (1 + m V_r)$, 萃取率 $E = C_1 / C_2$, 可得

$$E = \beta + (1 - \beta) e^{-\alpha}. \quad (4)$$

式 (4) 可用来描述反胶团萃取脂肪酶时萃取率随时间的变化, 其中 β 可由相比 V_r 和分配系数 m 求得, 而 α 值必须对式 (4) 进行迭代法求解. 重复迭代计算 α 值直到所得 E 的计算值与实验值误差小于 10%. 从 α 的定义式中可以求得总质量传质系数 $K_L A$ (因为我们无法求得两相界面面积, 只能用 $K_L A$ 代替传质系数). 为了验证模型的正确性, 对式 (4) 两边取对数, 即

$$\ln[(E - \beta) / (1 - \beta)] = -\alpha. \quad (5)$$

如果模型正确, 那么 $\ln[(E - \beta) / (1 - \beta)]$ 对时间 (t) 应该是一条通过原点、斜率为 $-\alpha$ 的直线.

3 结果与讨论

3.1 动力学参数的计算

下面以一组有关不同水相 pH 值的萃取数据来说明如何求取方程 (5) 的有关参数. 图 1 的数据, 表示在不同 pH 条件下的水相 (图 1a) 和有机相 (图 1b), 其脂肪酶的浓度随时间变化 (其它有关动力学实验也具有相类似的数据, 可用相同方法进行处理). 图中符号为实验值, 曲线为计算值. 利用上面推导的公式, 可求出平衡常数 m ($t = 250 \text{ s}$) 和总质量传递系数 $K_L A$, 结果见表 1.

从图 1 可知, 前面推导的动力学模型与实验数据相吻合. 从图 1 中还可知, 当 $t = 250 \text{ s}$ 时, 萃取基本达到平衡, 说明反胶团的萃取速率很快. 另外, 从图 2 得出 $\ln[(E - \beta) / (1 - \beta)]$ 与时间 (t) 具有较好的线性关系且满足式 (5). 由此, 这进一步说明双膜理论能较好应用于反胶团的提取动力学过程.

3.2 影响传质动力学的因素

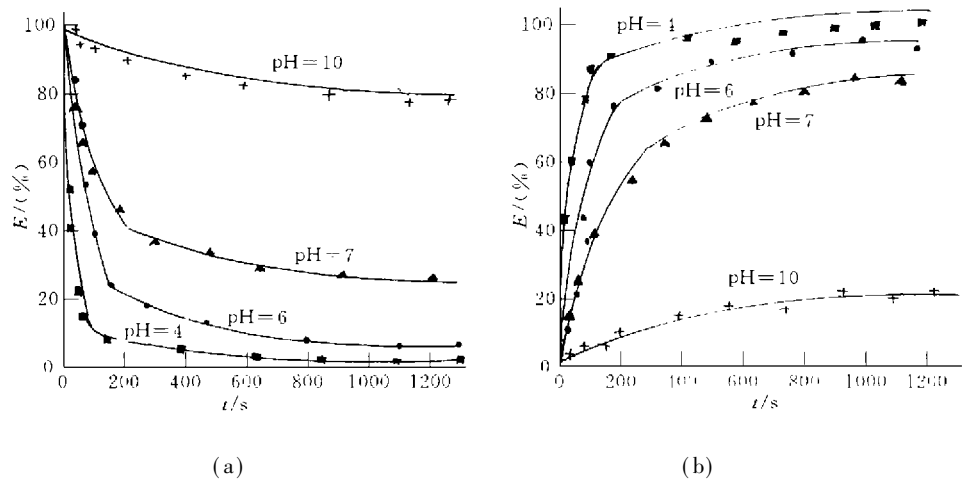


图 1 不同 pH 值的萃取率与时间的关系

利用反胶团提取蛋白质, 有很多因素会影响提取速率, 以下我们从传质动力学的角度对几个主要因素进行考察.

3. 2. 1 转速对传质系数的影响 搅拌可以强化传质, 使得反胶团分散良好, 从而能够增大相界面积和传质系数. 实验中, 为了达到较好的传递效果, 转速(N)最低为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. 转速过高易发生乳化现象, 使得离心分相困难, 所以最高转速为 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. 在不同水相 pH 的离子强度下, 转速 N 对传质系数的影响, 分别示于图 3,

表 1 不同 pH 值的萃取脂肪酶动力学参数计算值

pH	α	β	m	$\frac{K_{LA}}{\times 10^8 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}}$
4	0.036	0.052	0.055	1.70
6	0.021	0.160	0.190	0.87
7	0.018	0.320	0.470	0.61
10	0.005	0.780	3.600	0.06

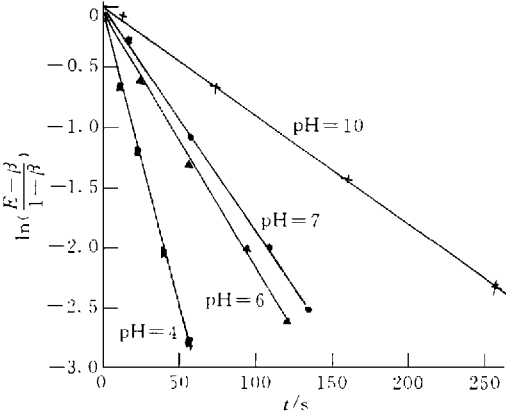


图 2 萃取动力学模型的检验

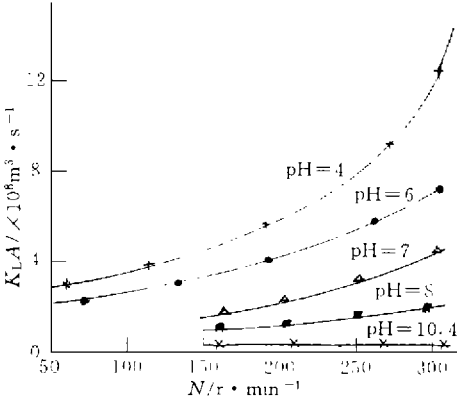


图 3 不同 pH 值时转速对传质系数的影响

4. 由图 3 可知, K_{LA} 随 N 的提高而增大, 但高速区 K_{LA} 的增大速率比在低速区快. 振荡转速对 K_{LA} 影响主要有两方面. (1) 一是增大脂肪酶与“空胶团”的接触机会. (2) 由于振荡产生使液体产生流动, 对“空胶团”表面产生冲击作用. 转速低时, 对“空胶团”表面的冲击作用较小, 当转速提到相当的程度后, 对“空胶团”的表面产生冲击作用较大, 使得表面变得较“松散”,

脂肪酶较容易传递到胶团内部. 因此, 在高转速区的影响程度比在低速区为高.

3.2.2 初始水相蛋白质浓度对传质系数的影响 在不同水相 pH 值和离子强度下, 3 种脂肪酶浓度 ($C_{\text{脂肪酶}}$) 与 K_{LA} 的关系如图 5 所示. 由图 5 可知, 在低 pH 和低离子强度下, K_{LA} 随脂

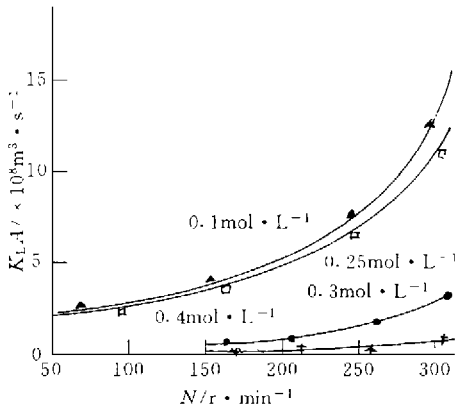


图 4 不同离子强度时转速对传质系数的影响

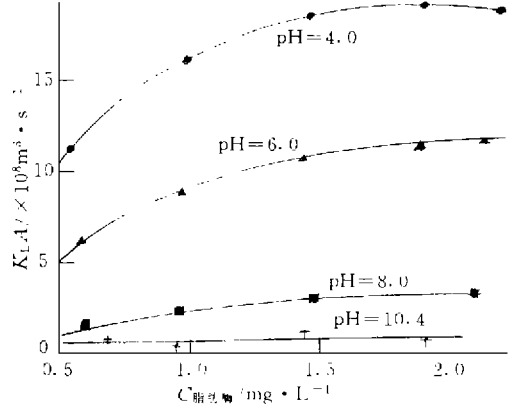


图 5 脂肪酶浓度对传质系数的影响

肪酶的浓度增大而提高. 在高 pH 和高离子强度条件下, K_{LA} 基本与蛋白质的浓度无关. 这是因为增大水相中脂肪酶的浓度会增加水相的传质推动力, 从而加速传递速率. 随着 pH 和离子强度的增大, 脂肪酶与表面活性剂的静电作用力变小, 界面的阻力增强, 此时提高水相的蛋白质浓度已经不能再增大传递推动力. pH = 10.4 时, K_{LA} 数值几乎不变.

3.2.3 水相 pH 值和离子强度对传质系数的影响 从图 3 可知, 在相同的转速 N 下, K_{LA} 随水相 pH 值和离子强度的降低而增加. 图 4 是通过 KCl 来调节离子强度, 当 KCl 浓度达到 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, K_{LA} 基本减少一个数量级. 在恒定的转速下, 随着 KCl 浓度的降低, K_{LA} 浓度逐渐增大.

水相 pH 和离子强度, 主要影响蛋白质与表面活性剂之间的作用力及反胶团的直径. 当水相 pH 和离子强度比较低时, 蛋白质与表面活性剂的静电作用力很强烈, 可以忽略界面的阻力^[6]. 因此, 此时的传质速率主要与主体扩散阻力有关. 当 pH > PI 时, 表面活性剂与蛋白质的静电作用变小, 界面阻力增大, 就会引起 K_{LA} 值很快下降.

3.2.4 表面活性剂的浓度对传质系数的影响

在有机相中, 表面活性剂 AOT 的含量对传质系数的影响如图 6 所示.

由图可知, 随着表面活性剂浓度 C_{AOT} 的提高, 传质系数逐渐增大; 在进一步增加

C_{AOT} 浓度, 传质系数的变化趋于平缓, 再提高 AOT 的量并不会增大 K_{LA} 值. 提高 AOT 浓度会增大 K_{LA} , 可能是 AOT 的量增大引起相界面积增大, 从而强化了传质速率, 但是 AOT 量达

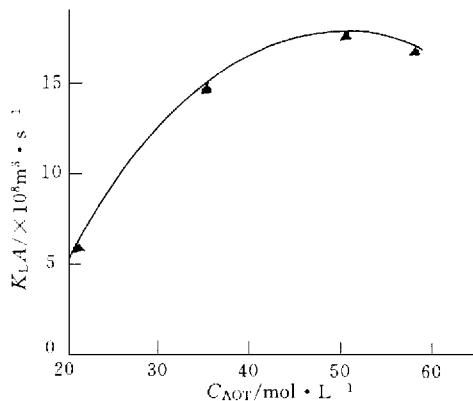


图 6 AOT 浓度对传质系数的影响

到临界反胶团浓度时, 相界面面积相对恒定, 因此传质速率也不再增加。

3.2.5 萃取过程控制类型的判断 脂肪酶从水相传递进入有机相可分为 3 个步骤^[1]: (1) 蛋白质从水相扩散到界面; (2) 在界面形成包容蛋白质的反胶团; (3) 含有蛋白质的反胶团离开界面在有机相中扩散。传质过程速率取决于最慢步骤。

3.3 扩散阻力的计算

脂肪酶在水相与有机相间的传递过程, 其阻力 R 由 3 部分组成, 即水相阻力 $R_{\text{水}}$ 、有机相阻力 $R_{\text{有机}}$ 和界面阻力 $R_{\text{界面}}$, 用公式表示为 $R = R_{\text{水}} + R_{\text{有机}} + R_{\text{界面}}$ 。当 pH 小于 PI 时, 蛋白质在界面处形成反胶团的速度很快, 可以忽略 $R_{\text{界面}}$ ^[6-7]。以传质系数的倒数表示传质阻力, 可写为 $1/K_{\text{LA}} = 1/(K_{\text{水相}}A) + m/(K_{\text{有机相}}A)$, 式中 $K_{\text{水相}}A$, $K_{\text{有机相}}A$ 分别为水相、有机相的质量传质分系数。

为了确定水相和有机相的质量传递系数, 从以上计算数据可画出萃取过程的 K_{LA} 与 m 的关系 (图 7)。通过线性回归得 $K_{\text{有机相}}A = 3.5 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, $K_{\text{水相}}A = 19.2 \times 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, 可以看出脂肪酶在萃取水相的传质速率比有机相快些。这些值比 Takumi 等人^[6]利用反胶团提取溶菌酶所得的结果约小 1 个数量, 可能是由于脂肪酶的分子比溶菌酶大, 因此传递速率比较慢。

为了判断反胶团萃取脂肪酶的传质控制类型, 对不同的分配系数求取相应的水相和有机相扩散阻力, 如表 2 所示。表 2 中, $t = 250 \text{ s}$, $N = 300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。从表 2 可知, 在 m 值很小的情况下, 水相的阻力大于有机相的阻力, 说明这时的传递受水相控制。当 m 值很小时, 也就是水相的 pH 值和离子强度都比较低的情况, 这时表面活性剂与蛋白质的静电作用很强烈, 而在有机相很快形成包容有蛋白质的反胶团, 因此传递速率受控于脂肪酶在水相的扩散速度。通过提高脂肪酶在水相中的浓度和提高转速有助于加快传递速率, 见图 3, 4, 5。

随着 m 值逐渐增大, 有机相的阻力增大, 最后有机相的阻力大于水相的阻力, 成为萃取的控制阻力。当 pH 大于 pI 时, 传质速率变得很慢, 这时界面的阻力不可忽略。这是形成包容脂肪酶所需的静电引力变小, 使得在有机相中形成含脂肪酶的反胶团变得困难。水相中再增大脂肪酶的浓度已经不能提高传质速率 (图 5), 此时传质速率受控于界面的阻力。

萃取过程中是一个由主体溶液阻力控制和界面阻力控制相互作用的过程。但是, 一般反胶团的萃取操作是在 pH 小于 pI 的条件下进行的, 因此界面的阻力可以忽略, 萃取速率主要由主体的扩散阻力控制。

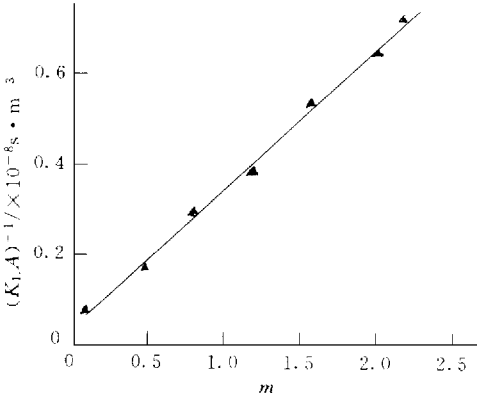


图 7 水相与有机相传质阻力的求取

表 2 不同 m 值的水相的阻力和有机相阻力

m	$(K_{\text{水相}}A)^{-1} / \times 10^{-8} \text{ s} \cdot \text{m}^{-3}$	$m \cdot (K_{\text{有机相}}A)^{-1} / \times 10^{-8} \text{ s} \cdot \text{m}^{-3}$
0.055	0.520	0.015
0.190	0.520	0.053
0.470	0.520	0.136
0.920	0.520	0.257
2.100	0.052	0.588

3.4 萃取机理的推断

根据以上分析,我们提出一个在混合过程中形成包容有蛋白质的反胶团的形成机理.即在含有蛋白质的水相与含有表面活性剂的有机相接触过程中,由于表面活性剂的极性很容易与水结合,形成一个只包含水分子的极性核,称为“空胶团”.而带电的表面活性剂会在“空胶团”内形成一个静电场,当带相反电荷的蛋白质与“空胶团”相碰撞时,把蛋白质吸引到“空胶团”内,从而形成了包容蛋白质的反胶团.从这个推断可以知道,提高转速可使水相和有机相更充分的接触,产生更多的“空胶团”分子,增大“空胶团”与蛋白质的接触机会,加快传质速率.另一方面,增加转速使两相的界面变松散,蛋白质也比较容易穿透进入反胶团内.在水相 pH 值的离子强度较低时,静电引力大,可以很容易地把蛋白质吸引到胶团内部,此时的界面阻力可以忽略.如果提高水相的蛋白质浓度,也可增加蛋白质“空胶团”的碰撞机会,会加快传质速率.因此,应用此推断可以解释实验中的一些现象.然而,反胶团萃取是一个非常复杂的过程,更完善的传质机制有待于进一步深入研究.

参 考 文 献

- 1 陈少欣,林文奎.阳离子反胶团提取蛋白质.华侨大学学报(自然科学),1998,19(3):304~307
- 2 陈少欣.反胶团提取蛋白质研究.硕士学位论文]:华侨大学化学与生化工程系,1998.11~20
- 3 Maion M, B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248~254
- 4 陆强,施亚钧.反胶束液-液萃取牛血清白蛋白的动力学研究.华东理工大学学报,1994,20(12):726~727
- 5 Dekker M. Enzyme recovery using reversed micelles. Ph. D thesis. Wageningen Agricultural University, Holland., 1990. 12~57
- 6 Takumi K. Extraction of lysozyme using reversed micellar solution: distribution equilibrium and extraction rates. Ind. Eng. Chem. Res., 1991, 30: 2470~2476
- 7 Plucinski P. Two phase kinetics of the solubilization in reversed micelles extraction of lysozyme. Ber. Bunsen Ges. Phys. Chem., 1995, 30(13): 994~997

Kinetics of Extracting Lipase by Adopting Reversed Micelles (I) Process or Extraction

Chen Saoxin Lin Wenluan

(College of Chem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract By adopting AOT/isooctane reversed micellar solution extracting lipase. Two-film theory is applied to forming kinetic equation of extraction which tallies with experimental data. From this model equation, mass transfer coefficient is obtained under different operating conditions. By calculating transfer resistance, type of transfer control of extraction is determined. The results indicate that the extraction is principally controlled by diffusion resistance of main body. The mechanism of extraction is studied simultaneously.

Keywords reversed micelles, extraction, kinetics, lipase