

掃流微過濾製備粗酵素液

計劃編號：NSC 88-2214-E002-018

執行期限：87/08/01~88/07/31

主持人：劉懷勝 台灣大學化工系 教授

一、中文摘要（關鍵字：掃流微過濾、薄膜、酵素。）

本研究利用孔徑為0.14 μm 的掃流微過濾膜來處理 *P. amyloclavata* 生產異澱粉酵素的醱酵液，以探討其過濾機構，並計算所探討的穩定濾速，由結果顯示，經掃流微過濾處理的粗酵素，經一週貯存後所含之蛋白約增為1.1倍，而離心機製備者，約上升1.2倍；顯然經膜過濾所得的酵素液中所含菌體，要比離心分離所得低，這結果有利於酵素液之保存。

對於穩定濾速的計算，我們透過傳統過濾對濾餅比阻力的估算，以滯留層模式，近似於濃度邊界層，可有效的計算出不同流速、壓力下之穩定濾速。由於菌體比一般分子大許多，其布朗運動的擴散係數($\sim 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$)，常無法真實的反映出其擴散速率；在演算過程中，應用與流速相關的水力擴散係數($\sim 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$)所得的結果與實驗值較為接近，其滯留層平均厚度約為 10^{-2} cm 。在20 psi操作壓力下，位於薄膜表面的菌體濃度應高於95%、滯留層之孔隙度低於0.05；由於孔隙度低，所得穩定濾速小於 20 l/h.m^2 。

Abstract(Keywords: crossflow

microfiltration, membrane, enzyme)

With 0.14 μm membrane microfiltration, the proteolytic activity of permeate was increased about 1.1-fold which was slightly lower than 1.2-fold by centrifugal treatment after 7 days storage. This implied that the crude isoamylase from microfiltration would be more stable than the centrifugal one. Besides, on the basis of the stagnant layer and conventional filtration, it seemed that the result from proposed model was comparable with the experimental data for the steady state flux of permeate. It was noted that the diffusivity ($\sim 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$) from hydraulic approach would give a reasonable value than that of molecular diffusivity ($\sim 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$). And within the stagnant layer ($\sim 0.02 \text{ cm}$), the wall concentration and porosity were estimated as 0.95 and 0.05, respectively.

二、計劃緣由與目的：

利用 *P. amyloclavata* 培養所得的醱酵液經固液分離，移去菌體及不溶性物質(Brown與Kavanagh, 1987)，以取得異澱粉酵素之粗酵素液(Harada等, 1968)。在本研究所培養的 *P. amyloclavata* 其菌體大小約 $2.0 \mu\text{m}$ ，而Datar與Rosen(1993)之研究中曾指出離心分離操作較

適合於粒徑較大的微生物細胞(> 6 μm)分離，對於菌體大小為1~3 μm 者，較不恰當；而且處理體積在3000公升以下時之小批量生產，則以掃流過濾處理較符合經濟要求。在掃流微過濾的應用裏，主要的限制在過濾過程其透流率不斷的衰減，使得處理能力降低；若穩定濾速過低，將失去使用價值。在本研究實驗中，擬選用掃流微過濾作為醱酵液之固、液分離的工具，透過對過濾機制的探討，以尋求透出液之流量與操作參數的關係，俾能計算出穩定濾速，作為實際操作之參考。

三、研究方法與結果：

研究方法

本實驗利用微過濾膜去除菌體的系統裝置，如圖1所示。所選用的薄膜為孔徑0.14 μm 之管式無機膜 (Carbosep[®]20 M14, Rhone Poulenc, France)，內徑5 mm、長度為20 cm，其過濾面積為40 cm^2 。實驗操作時取1000 ml菌液置於燒杯中，為避免溫度升高使酵素失去活性，使用循環水槽讓其溫度保持於4 $^{\circ}\text{C}$ ；以蠕動幫浦 (peristaltic pump, Model 7017, Cole-Parmer, USA) 輸送液體並藉以調整系統流量，於迴流段裝有節流閥 (throttle valve) 以控制系統所設定的壓力。當溶液充滿管路時，所需體積約30 ml；另準備200 ml菌液，俾作為維持燒杯液位所需添加之進料。

成果

Harada(1984)曾提到醱酵菌液中所存在的蛋白酵素 (pro-tease)，會破壞異澱粉的活性，蛋白酵素的來源包括：於醱酵過程分泌至菌液中及醱酵後微生物之細胞壁

被破壞而釋放至培養液裏。在本實驗中以0.14 μm 微過濾薄膜去除菌體前及貯存7天之後，溶液所含的蛋白酵素活性與離心操作所得之結果比較，如表1。

由結果顯示，以薄膜過濾去除菌體時，可降低蛋白酵素在粗酵素液中的含量，產生這種現象可能是由於蛋白酵素吸附在薄膜上，及薄膜積垢 (fouling) 形成二次膜 (secondary membrane)，使得酵素蛋白質不易透過，這效應與Le等人(1984)對醯胺 (amidase) 的討論結果類似。而在貯存過程中，薄膜處理之菌液其蛋白酵素活性上升速度亦較為緩慢，表示來自殘存菌體中所釋放之酵素量較少。

由表2所得之擴散係數，以Blackshear方程式所得者較高($\sim 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$)，其次為Eckstein($\sim 10^8 \text{ cm}^2/\text{s}$)，而以分子擴散係數Stokes-Einstein($\sim 10^9 \text{ cm}^2/\text{s}$)最低，若將這些數值換算，即可得相對應的平均滯留層厚度，如表3所示。在表3所計算之滯留層厚度包括有三種數量級數值(10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})，與在文獻上所發表的類似結果為 $2 \times 10^{-3} \text{ cm}$ (van den Berg與Smolders, 1989)相當；惟高於超過濾薄膜所得之結果($\sim 10^{-6} \text{ cm}$) (Nakanishi與Kessler, 1985; Suki等, 1984)。

四、結論：

使用微過濾薄膜去除醱酵液中不溶性物質，可以降低蛋白酵素的含量，減輕異澱粉酵素被分解破壞的可能。

另外，以滯留層的模式，藉助傳統過濾對濾餅比阻力的估算，

可有效的計算系統之穩定濾速。演算過程中，應用的水力擴散係數約 10^{-6} (cm²/sec)比布朗分子擴散係數($\sim 10^{-9}$ cm²/sec)高，較能與實驗數值吻合；所得的滯留層平均厚度約為 10^{-2} cm。

五、參考文獻：

Brown, D. E., and P. R. Kavanagh, Cross-Flow Separation of Cells. *Proc. Biochem.*, **22**:96-101(August, 1987).

Datar, R. V., and C.-G. Rosen. Cell and Cell Debris Removal: Centrifugation and Crossflow Filtration. In *Biotechnology*, Vol. 3, pp.472-503, ed., G. Stephanopoulos, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany(1993).

Harada, T., K. Yokobayashi, and A. Misabi, Formation of Isoamylase by *Pseudomonas*. *Appl. Microbiol.*, **16**:1439-1444(1968).

Harada, T., Isoamylase and its Industrial Significance in the Production of Sugars from Starch. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* **1**:39-63(1984).

Le, M. S., L. B. Spark, and P. S. Ward, The Separation of Aryl Acylamidase by Cross Flow Microfiltration and the Significance of Enzyme/Cell Debris Interaction. *J. Membr. Sci.*, **21**:219-232(1984).

Nakanishi, K., and H.-G. Kessler, Rinsing Behavior of Deposited Layers Formed on Membranes in Ultrafiltration. *J. Food Sci.*, **50**:1726-1731(1985).

Suki, A., A. G. Fane, and C. J. D. Fell, Flux Decline in Protein Ultrafiltration. *J. Membr. Sci.*, **21**:269-283(1984).

van den Berg, G. B., and C. A. Smolders, The Boundary-Layer Resistance Model for Unstirred Ultrafiltration. A New Approach. *J. Membr. Sci.*, **40**:149-172(1989).

六、圖表：

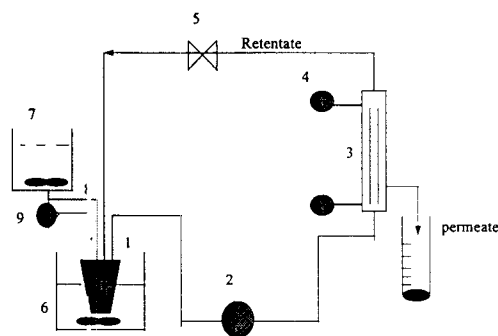


Fig. 1 Schematic diagram of membrane microfiltration for cell broths. 1 circulation tank, 2 peristaltic pump, 3 microfiltration membrane, 4 pressure gauge, 5 regular valve, 6 chilling water, 7 feeding tank, 8 peristaltic pump.

Table 1 Residual activity of protease for the treatment of crossflow microfiltration and centrifugal separation

Separation mode of cell broths	Activity of protease (U/ml)	Activity of protease stored at 4°C for 7 days (U/ml)
Membrane filtration	102	110
Centrifugation	134	160

Table 2 Relationship of hydraulic diffusivity and flowing shear rate

Shear Rate (s ⁻¹)	Diffusivity (cm ² /sec)		
	Eckstein	Blackshear	Stokes-Einstein
103.4	1.8×10^{-8}	3.1×10^{-6}	1.26×10^{-9}
125	2.2×10^{-8}	3.75×10^{-6}	1.26×10^{-9}
76.2	1.3×10^{-8}	2.3×10^{-6}	1.26×10^{-9}

Table 3 Hydraulic diffusivities of bacteria and formed stagnant layer thickness, respectively

$D(\text{cm}^2/\text{s})$	$\bar{\delta}(\text{cm})$
	9.6×10^{-4}
1.26×10^{-9}	8.72×10^{-4}
	8.2×10^{-4}
1.3×10^{-8}	2.1×10^{-3}
1.8×10^{-8}	2.1×10^{-3}
2.2×10^{-8}	2.1×10^{-3}
2.3×10^{-6}	1.2×10^{-2}
3.1×10^{-6}	1.2×10^{-2}
3.75×10^{-6}	1.2×10^{-2}