

# 不稳定的有机物在固定化生物催化剂 内扩散系数的测定

汪 恩 浩

(北京市营养源研究所)

俞 俊 棠

(华东化工学院)

为了研究固定化生物催化剂的反应工程问题,需要反应物和产物在固定化生物催化剂内扩散系数的数据。生物催化剂所催化的反应常涉及不稳定物质。测定不稳定物质在生物催化剂内扩散系数的方法迄今未见报道。本文推导出二维稳态扩散降解方程,并据此实验测定了不稳定物质——青霉素G以及6-APA和PAA在固定化细胞内的扩散系数。

**关键词:** 扩散系数的测定; 不稳定物质; 固定化生物催化剂

固定化生物催化剂所催化的反应体系属非均相体系,至少包括液相(反应溶液)和固相(固定化酶或细胞)两相。其反应过程为底物分子从液相主流扩散到固相表面,接着向固相内部扩散,与酶的活性中心接触,反应后产物分子从酶的活性中心向外移动,从固相扩散到液相。液相扩散阻力通过充分搅拌或提高流速很容易消除。而固相扩散阻力由于受到种种条件的限制而难以改变。因此反应物和产物在固定化生物催化剂内扩散速度的大小对总反应速度的影响很大。

为了定量地了解固定化生物催化剂的设计变量(如颗粒大小,比活力等)和操作变量(如底物与产物的浓度,反应温度等)对总反应速度的影响,对固定化生物催化剂工程进行最优化设计和控制,则必须知道底物和产物在固定化生物催化剂内的扩散系数。

测定扩散系数的方法在化学工程的有

关文献中不乏报道。前人对气体、无机物和一些简单、稳定的有机物在固体催化剂内扩散系数的测定方法或估算方法做过很多工作<sup>[1]</sup>;对底物或产物在固定化生物催化剂内扩散系数的测定方法也有一些报道。如Toda和Shoda<sup>[2]</sup>提出测定蔗糖在琼脂中的扩散系数的方法;Goldman<sup>[3]</sup>测定了HCl在火胶膜内的扩散系数;Bollmeier和Middleman<sup>[4]</sup>测定了尿素在明胶膜内的扩散系数。然而酶催化的反应常涉及不稳定的有机物。直接测定易降解的有机物分子在固定化生物催化剂内扩散系数的方法尚未见报道。

作者在研究固定化含青霉素酰胺酶大肠杆菌细胞(以下简称IC)的反应动力学和有关的工程问题时,需要测定易降解的底物——苄青霉素(BP)在IC内的扩散系数。为此作者首先对不稳定物质在固体内扩散的过程进行理论分析,推导出二维稳态扩散降解方程,并据此设计了测定方

法, 实验测定了 BP 以及 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 和苯乙酸 (PAA) 在 IC 内的扩散系数。

## 一、一维稳态扩散-降解方程

设扩散池 A 和 B 被一块厚  $l$ 、面积为  $A$  的薄膜隔开 (图 1)。扩散池中待测物质的浓度分别为  $C_A$  和  $C_B$ 。设  $C_A > C_B$ , 则待测物质由 A 池通过膜扩散到 B 池。假定两池的搅拌都是充分的, 只考虑一维扩散的情况, 则由 Fick 第二定律:

$$\frac{dC_x}{dt} = D \frac{d^2 C_x}{dx^2} \quad (1)$$

式中:  $C_x$  —— 膜内距界面  $X$  处扩散物质的浓度

$D$  —— 膜内有效扩散系数

$t$  —— 时间

如 A、B 两池足够大, 且待测物质的降解速度很慢, 则扩散物质在膜内的浓度可达稳态, 此时膜内的浓度分布不随时间而变化, 即

$$\frac{dC_x}{dt} = D \frac{d^2 C_x}{dx^2} = 0 \quad (2)$$

由边界条件  $x = 0, C_x = C_A$

$x = l, C_x = C_B$

求解 (2) 式得:  $C_x = C_A + \frac{C_B - C_A}{l} x$

(3)

微分上式得:  $\frac{dC_x}{dx} = \frac{C_B - C_A}{l}$  (4)

(4) 式说明当扩散达到稳态时, 扩散物质在膜内的浓度呈直线下降, 浓度梯度为常数  $(C_B - C_A)/l$ 。

设扩散物质的降解为  $n$  级反应:

$$\frac{dc}{dt} = -kC^n \quad (5)$$

$K$  为降解速率常数。由 Fick 第一定律:

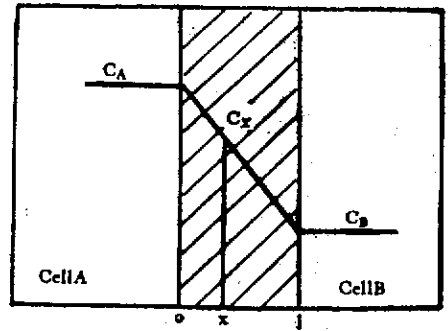


图 1 被 IC 薄膜隔开的两个扩散池 A 和 B。  
Fig.1 Two diffusion cells, A and B, separated by a thin IC film.

扩散已达到稳态。

The diffusion has reached its steady-state.

$$\frac{dm}{dt} = -DA \frac{dC_x}{dx} \quad (6)$$

$m$  为扩散物质扩散通过膜的量。

则对于 A 池, 扩散物质的浓度除因向 B 池扩散而降低外, 同时也因自然降解而下降, 故有:

$$\begin{aligned} \frac{dC_A}{dt} &= -\frac{dm}{V_A dt} - kC_A^n \\ &= -\frac{DA dC_x}{V_A dx} - kC_A^n \end{aligned} \quad (7)$$

如扩散达到稳态, 则有

$$\frac{dC_A}{dt} = -\frac{DA(C_A - C_B)}{V_A l} - kC_A^n \quad (8)$$

对于 B 池, 扩散物质的浓度因由 A 池扩散过来而增加, 同时又因自然降解而下降。即

$$\begin{aligned} \frac{dC_B}{dt} &= \frac{dm}{V_B dt} - kC_B^n \\ &= \frac{DA(C_A - C_B)}{V_B l} - kC_B^n \end{aligned} \quad (9)$$

$V_A$ 、 $V_B$  分别表示 A 池和 B 池的液相体积。扩散物质在膜中的量忽略不计。

如降解为一级反应, 将 (8) 式减去 (9) 式得:

$$\frac{d(C_A - C_B)}{dt} = -\frac{DA}{l} \left( \frac{1}{V_A} + \frac{1}{V_B} \right) (C_A - C_B)$$

$$\frac{1}{V_B}(C_A - C_B) - k(C_A - C_B) \quad (10)$$

由于在实验条件下得不到上述理论上的稳态, 而只能达到所谓准稳态 (quasi-stationary state), 因此无论扩散物质的浓度或者浓度梯度在膜内都不是常数, 即  $\frac{dc}{dt} \neq 0$ 。但如果  $\frac{dc}{dt}$  很小, 令  $\frac{dc}{dt} = 0$  也不会引入很大的误差。准稳态是实验上有可能达到的扩散过程的瞬时状态。它与稳态在量的方面的差异从宏观角度上看可以忽略。将准稳态当成稳态处理使得以后对扩散方程的推导大大简化, 并使得用实验方法测定扩散系数成为可能。

设在实验时间  $t$  内, 扩散不断地从一个准稳态向另一个准稳态过渡。将此准稳态过程近似当作稳态过程处理, 则可认为在时间  $t$  内, 扩散物质在膜内的浓度曲线始终呈直线, 其浓度梯度为  $(C_B - C_A)/l$ 。故可积分方程(10)得:

$$\ln \frac{C_{A0} - C_{B0}}{C_A - C_B} = \left[ \frac{DA}{l} \left( \frac{1}{V_A} + \frac{1}{V_B} \right) + k \right] t \quad (11)$$

边界条件:  $t = 0, C_A = C_{A0}, C_B = C_{B0}$ ;  
 $t = t, C_A = C_A, C_B = C_B$ 。

重排(11)式得:

$$\ln \frac{C_{A0} - C_{B0}}{C_A - C_B} = (D\beta + k) t \quad (12)$$

式中  $\beta$  为扩散池常数:

$$\beta = \frac{A}{l} \left( \frac{1}{V_A} + \frac{1}{V_B} \right) \quad (13)$$

(12)式即为一维稳态扩散降解方程。

该方程全部由可测变量和扩散系数组成。

如扩散物质的降解反应不是一级反应, 则将稳态后  $C_A$  和  $C_B$  随时间变化的数据, 对微分方程组

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dC_A}{dt} &= -\frac{DA(C_A - C_B)}{V_A l} - kC_A^2 \quad (8) \end{aligned} \right.$$

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dC_B}{dt} &= \frac{DA(C_A - C_B)}{V_B l} - kC_B^2 \quad (9) \end{aligned} \right.$$

求数值解, 可得到扩散系数  $D$ 。

## 实验部分

在试管中加入 10g (湿重) 大肠杆菌  $D_{81}$  菌体 (上海第三制药厂), 加塞于沸水浴中加热 15min 使菌体失活。取出菌体加 5ml、10% 明胶于 40°C 水浴中混匀, 再加入 0.5ml、25% 戊二醛交联, 切成薄片, 置于冰箱中冰冻一周后再次用 0.5ml、25% 戊二醛交联。

将制成的固定化细胞 (IC) 薄片置于一根垂直的有保温夹套的玻璃管的下端, 此为扩散池。另在一个有保温夹套的平底玻璃杯中放入用 0.02M 磷酸缓冲液配制成的待测物质 (BP、6-APA 或 PAA) 溶液 (pH7.5), 其浓度不超过 0.1M。上扩散池用一小玻璃搅拌器在靠近底部处搅拌。下扩散池由磁力搅拌器搅拌 (图 2)。

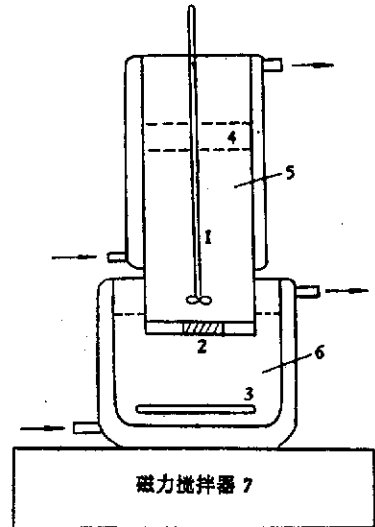


图 2 测定扩散系数的实验装置

Fig.2 The experimental arrangement used in determining diffusivity

1. 小玻璃搅拌器, 2. IC 膜, 3. 小铁棒,
4. 液体石蜡油, 5. 上扩散池, 6. 下扩散池,
7. 磁力搅拌器

1. small glass stirrer, 2. IC film, 3. iron rod
4. liquid paraffin, 5. upper diffusion cell, 6. lower diffusion cell, 7. magnetic stirrer.

实验开始时，将上扩散池插入下扩散池，开动磁力搅拌和循环恒温水泵，待下扩散池内的温度达 $37^{\circ}\text{C}$ 时，在上扩散池内加入 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $0.02\text{M}$ 、 $\text{pH}7.5$ 的磷酸缓冲液，开动上搅拌，并开始计时（在上扩散池的液面上加 $5\text{mm}$ 厚的液体石蜡油，以防止 $\text{CO}_2$ 侵入和水份蒸发）。定期从上扩散池取样分析扩散物质的浓度。下扩散池中的浓度由物料平衡算出。

为了得到上扩散池中很低的BP浓度的准确数据，作者采用酶法测定：将 $0.5\text{ml}$ 样品加入试管中，再加入适量 $250\mu\text{m}$ 的IC颗粒，用 $37^{\circ}\text{C}$   $0.02\text{M}$ 、 $\text{pH}7.5$ 的磷酸缓冲液定容到 $10\text{ml}$ 。在 $37^{\circ}\text{C}$ 恒温水中振摇，使反应在 $5-10$ 分钟内完成。取样用PDAB<sup>[6]</sup>法测定6-APA的浓度，然后折算成BP的浓度。

同时也测定了6-APA和PAA在IC内的扩散系数。6-APA的浓度用PDAB法测定；PAA的浓度用羟胺比色法测定。IC膜的厚度用千分卡测得。

## 结果与讨论

BP在 $\text{pH}7.5$ 、 $37^{\circ}\text{C}$ 时的一级降解速率常数为 $1.26 \times 10^{-4} \text{min}^{-1}$ <sup>[7]</sup>。在本实验条件下， $3\text{h}$ 内用PDAB法测不出6-APA的浓度变化，故6-APA的降解不予考虑。将达到准稳态的实验数据（当 $\Delta C_{B1}/\Delta t_1 \approx \Delta C_{B2}/\Delta t_2$ 时，可认为准稳态已建立），代入(12)式，以 $\ln \frac{C_{A0}-C_{B0}}{C_A-C_B}$ 对 $t$ 作图，由得到的直线的斜率可算出扩散系数D的值。实验结果见图3和表1。

由图3可以看出，三种扩散物质的实验数据均呈很好的线性关系，将此直线外推时，恰好通过原点，说明准稳态的假设与实际情况相符。根据实验测得的扩散系

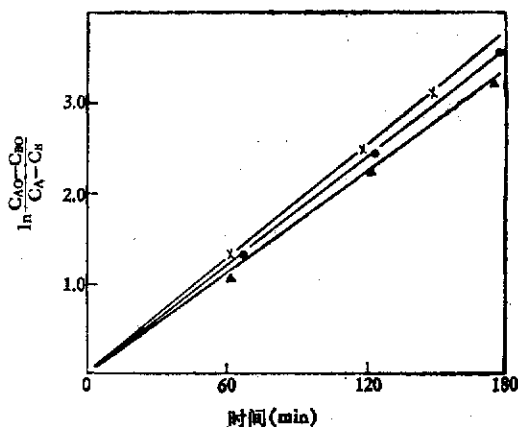


图3 扩散系数的测定

Fig.3 Determination of diffusivity, The symbols refer to (▲) BP, (●) PAA, and (×) 6-APA.

表1 BP、6-APA、PAA在IC内的扩散系数

Table 1 The diffusivities of BP, 6-APA and PAA in IC

被测物质 Determined substance	BP	6-APA	PAA
扩散系数 Diffusivity ( $\text{cm}^2/\text{min}$ ) $\times 10^4$	0.77	1.8	1.7

数和反应动力学模型计算得到不同颗粒大小的IC有效因子，与实验数据吻合<sup>[6]</sup>。扩散系数的测定使得对IC的反应工程进行最优化设计和控制成为可能<sup>[5]</sup>。

## 参考文献

- [1] Satterfield, C.N.: "Mass Transfer in Heterogeneous Catalysis", M.I.T. Press, U.S.A., 1970
- [2] Toda, K., and M. Shoda: *Biotechnol. Bioeng.*, 17:481, 1975
- [3] Goldman, R. et al.: *Biochemistry*, 7:486, 1968
- [4] Bollmeier, J.P. and Middleman S.: *Biotechnol. Bioeng.*, 21:2303, 1979
- [5] 汪恩浩等：华东化工学院学报，3:291-308, 1983
- [6] Balasinghan, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 276:250, 1972
- [7] Brodersen, R.: *Acta Pharmacol.*, 3:345, 1947

# INTERNAL DIFFUSIVITY DETERMINATION OF UNSTABLE ORGANIC SUBSTANCES IN IMMOBILIZED BIOCATALYST

Wang Enhao

*(Beijing Research Institute for Nutritional Sources)*

Yu Juntang

*(East China Institute of Chemical Technology, Shanghai)*

In order to research engineering problems of reaction catalyzed by immobilized biocatalysts, the diffusivities of the reactant and product must be determined beforehand. Reactions catalyzed by biocatalysts often involve unstable substances. How to determine the diffusivity of unstable substance in biocatalyst has not been reported in literatures up to now. One-dimensional steady-state diffusion-decay

equation was derived in this paper. Based on the equation, the diffusivities of a unstable substance, benzylpenicillin, 6-APA and PAA in the immobilized *E. coli* cells were determined experimentally.

## Key words

Diffusivity determination; unstable substance; immobilized biocatalyst