

固定化酶-离子交换组合系统 进行青霉素 G 水解生产 6-APA 的模型化研究

陈 坚

(无锡轻工业学院生物工程系 无锡 214036)

Takeshi Omasa, Yoshio Katakura, Suteaki Shioya, Ken-ichi Suga

(大阪大学工学部生物技术系 大阪 565 日本)

摘 要 采用固定化青霉素酰化酶 (Penicillin acylase) 在反应器中进行青霉素 G 水解生产 6-APA, 同时与离子交换柱相组合以连续地去除反应混合液中的苯乙酸。建立了离子交换柱的分格模型 (Compartment model), 在确定了青霉素 G 和苯乙酸沿柱高的浓度分布的基础上, 与描述固定化酶反应器的状态方程相结合, 得到了固定化酶-离子交换组合系统的数学模型。在将计算机模拟值与实验值进行验证后, 探讨了组合系统中树脂量、循环流速和组合起始时间对青霉素 G 酶解过程的影响。

关键词 青霉素 G, 水解, 固定化酶, 离子交换, 模型

由于通过酰化作用成功地由 6-APA 生产出对微生物具有广谱性和较好的口服稳定性的半合成青霉素, 如氨基苄青霉素等, 因此, 人们对 6-APA 非常有兴趣⁽¹⁾。现在, 6-APA 已经在工业上通过青霉素 G 或青霉素 V 的酶水解来进行生产。据估计, 由于半合成青霉素继续被发现有更广的用途, 到 2000 年, 世界上的 6-APA 产量将由 1990 年的 5250t 增加到 7000t⁽²⁾。

青霉素 G 酶水解反应的特性是: (1) 酶解反应受其产物苯乙酸 (Phenylacetic acid, 简称 PAA) 的竞争性抑制和 6-APA 的非竞争性抑制; (2) 酶解反应降低 pH, 由此产生的酸环境造成青霉素 G 和 6-APA 的内酰胺环不稳定。因此, 从青霉素 G 水解反应混合液中连续地去除苯乙酸是非常重要的和令人感兴趣的。但是, 至今为止有关用于青霉素 G 水解的生物反应器与其它装置组合以连续去除苯乙酸的报道甚少⁽³⁾。

研究采用固定化青霉素酰化酶 (Penicillin acylase) 反应器进行青霉素 G 水解生产 6-APA, 同时与离子交换柱相组合以连续地去除反应混合液中的苯乙酸。通过确定 PAA、PenG (青霉素 G) 在离子交换柱的过程参数和固定化酶的动力学参数⁽⁴⁾, 本文首先建立了离子交换柱的分格模型 (Compartment model), 然后与描述固定化酶反应器的状态方程相结合, 得到了固定化酶-离子交换组合系统的数学模型, 并在此基础上对青霉素 G 水解生产 6-APA 过程进行了计算机模拟和预测。

1 材料与方法

1.1 固定化酶和离子交换树脂

青霉素酰化酶产自巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) B-400。固定化载体为活化的多孔聚丙烯腈。固定化方法见文献 [5]。

离子交换树脂选自 DIAION PA 和 WA 系列 (三菱化学公司, 日本)。这是一种多孔强碱性阴离子交换树脂 (Cl⁻型)。

1.2 组合系统实验装置和实验条件

组合系统实验装置如图 1 所示。其中固定化酶反应器采用小型发酵罐 (EYELA, 日本理研株式会社), 工作体积 5L。固定化酶被置于发酵罐的搅拌转轴上。离子交换柱 (Pharmacia 公司, 瑞典) 的工作体积为 0.3L。

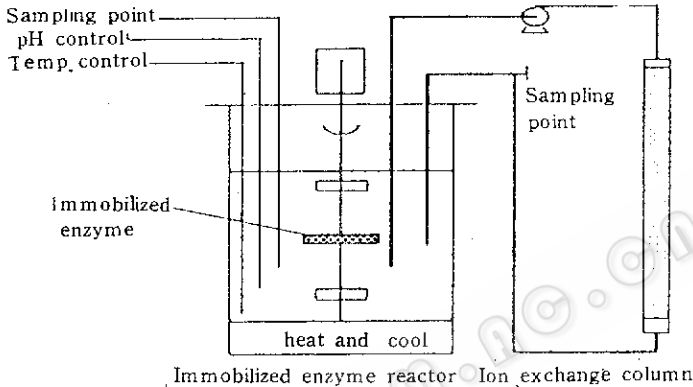


图 1 组合系统的实验装置

Fig. 1 Experimental set-up of the composite system

典型的实验条件如表 1 所示。

表 1 组合系统中青霉素 G 水解的实验条件

Table 1 Experimental conditions for PenG hydrolysis

Volume of solution	3.0L
Volume of resin	0.3L
Amount of immobilized enzyme	3.0g
Initial conc. of PenG	200mmol · L ⁻¹
Flow rate	0.04L · min ⁻¹
Temperature	37°C
pH	8.5
Borate buffer	0.1mol · L ⁻¹

1.3 分析方法和化学试剂

青霉素 G、6-APA 和苯乙酸的测定采用高压液相色谱法 (HPLC)。色谱柱为 $\Phi 4.6\text{mm} \times 150\text{mm}$, 内部填料为 Cosmosil 5C-18AR。流动相采用乙腈-磷酸氢钾 (5%~25% 乙腈, 10mmol/L KH₂PO₄, pH7.0) 梯度洗脱, 流速 1.0ml/min。检测采用 UV 检测器, 吸收波长 230nm。

青霉素 G 购自明治公司 (东京), 效价为 1580IU/mg。其它化学试剂均为分析纯。

2 结果和讨论

2.1 固定化酶-离子交换组合系统进行青霉素 G 水解

在表 1 的实验条件下,采用固定化酶-离子交换组合系统进行青霉素 G 水解的过程曲线如图 2 所示。为了比较,在图 2 中也给出了无离子交换柱(仅有固定化酶反应器)时青霉素 G 酶水解的情况。从图中可以发现:(1)与仅有固定化酶反应器相比较,组合系统达到 95%青霉素 G 转化所需的时间减少了 10.8%;(2)在采用组合系统时,青霉素 G 水解产生的部分苯乙酸可连续地从反应混合液中去除。至反应结束时,去除量达到 53%。上述结果表明,采用固定化酶-离子交换组合系统进行青霉素 G 水解生产 6-APA 不仅可以提高酶转化反应效率,而且有利于后期 6-APA 的提取。

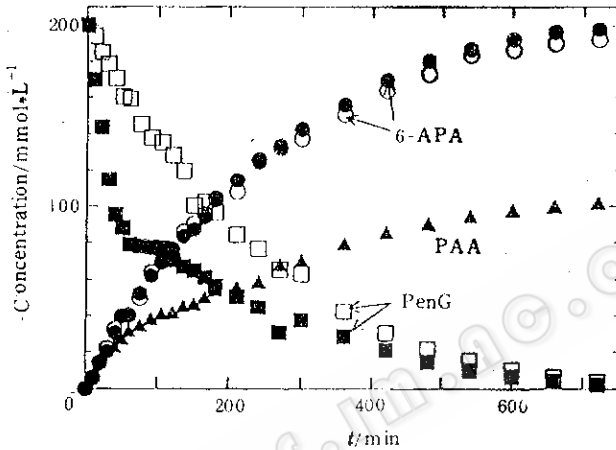


图 2 组合系统中青霉素 G 水解的过程曲线

Fig. 2 Time-course of PenG hydrolysis in the composite system

□, ○ Without ion exchange, ■, ●, ▲ With ion exchange

2.2 组合系统水解青霉素 G 生产 6-APA 的数学模型

组合系统中青霉素 G 水解过程的建模过程是:首先作出组合系统的总体模型。在总体模型中,要确定离子交换柱出口的物质浓度 C_e (Pen G)、 C_e (6-APA)、 C_e (PAA) C_e (Cl^{-1}) 就必须得到这些物质在离子交换柱中沿柱高的浓度分布。而要得到这一浓度分布就需要在离子交换柱中建立分格模型 (Compartment model)。

2.2.1 离子交换柱的分格模型:将离子交换柱分成 n 格 (n 等分,图 3),在假设每格中进出离子可达到交换平衡的条件下,由离子交换的平衡方程、交换准则和物料衡算,可得到分格模型如下:

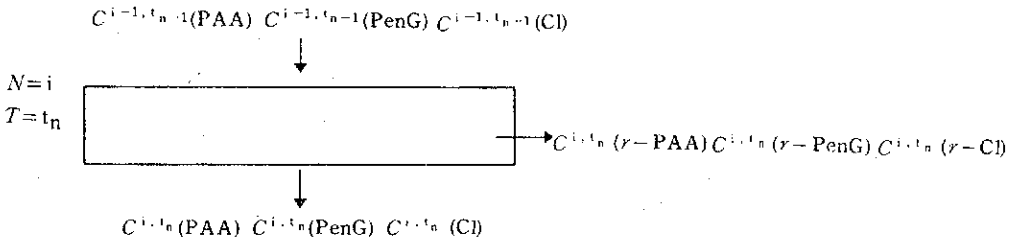


图 3 离子交换柱中的任一格

Fig. 3 A compartment in the ion exchange column

$$K_1 = \frac{C^{i,n}(r - PAA) \times C^{i,n}(Cl)}{C^{i,n}(r - Cl) \times C^{i,n}(PAA)} \tag{1}$$

$$K_2 = \frac{C^{i,n}(r - PenG) \times C^{i,n}(Cl)}{C^{i,n}(r - Cl) \times C^{i,n}(PenG)} \tag{2}$$

$$\frac{C^{i,n}(r - PAA)}{Y_1} + \frac{C^{i,n}(r - PenG)}{Y_2} + \frac{C^{i,n}(r - Cl)}{Y_3} = 1 \tag{3}$$

$$V_r[C^{i,n}(r - PAA) - C^{i,n-1}(r - PAA)] = F\Delta t[C^{i-1,n-1}(PAA) - C^{i,n}(PAA)] \tag{4}$$

$$V_r[C^{i,n}(r - PenG) - C^{i,n-1}(r - PenG)] = F\Delta t[C^{i-1,n-1}(PenG) - C^{i,n}(PenG)] \tag{5}$$

$$V_r[C^{i,n}(r - Cl) - C^{i,n-1}(r - Cl)] = F\Delta t[C^{i-1,n-1}(Cl) - C^{i,n}(Cl)] \tag{6}$$

$$\Delta t = t_n - t_{n-1} \tag{7}$$

此方程组经重新整理后,采用直接搜索法可由计算机求解得到 $C(PAA), C(PenG), C(Cl^{-1}), C_r(PAA), C_r(PenG), C_r(Cl^{-1})$ 。由此逐步迭代(图 5),可确定 t 时刻各种成分沿柱高的浓度分布。

2.2.2 组合系统的总体模型: 对组合系统中的固定化酶反应器作青霉素 G、6-APA、苯乙酸和 Cl^{-} 的物料衡算,可得到如下方程:

$$\frac{dC(PenG)}{dt} = -rE - F[C(PenG) - C_r(PenG)] \tag{8}$$

$$\frac{dC(6-APA)}{dt} = rE \tag{9}$$

$$\frac{dC(PAA)}{dt} = rE - F[C(PAA) - C_r(PAA)] \tag{10}$$

$$\frac{dC(Cl)}{dt} = F[C_r(Cl) - C(Cl)] \tag{11}$$

式中 r 是酶反应速率,可用下式表示:

$$r = \frac{V_m \left[C(PenG) - \frac{C(6-APA)C(PAA)}{K_{iq}} \right]}{C(PenG) \left[1 + \frac{C(6-APA)}{K_{ip}} \right] + K_s \left[1 + \frac{C(6-APA)}{K_{ip}} + \frac{C(PAA)}{K_{is}} + \frac{C(6-APA)C(PAA)}{K_{is}K_{iq}} \right]} \tag{12}$$

将由分格模型逐步迭代得到的、离子交换柱出口处的物质浓度随时间的变化值代入总体模型,采用 Runge-Kutta-Gill (RKG) 法,可计算出组合系统中青霉素 G 水解的底物(青霉素 G)和产物(6-APA 和苯乙酸)的变化过程曲线。

2.3 组合系统中青霉素 G 水解过程的计算机模拟

表 2 给出了经实验确定的组合系统数学模型中的有关参数^[4,6]。组合系统中青霉素 G 水解过程的计算机模拟结果如图 5 所示。在图 5 中,(a)是仅有固定化酶反应器的情况;(b)是采用组合系统后的情况。此时组合起始时间为 0。这里的组合时间是指在酶转化反

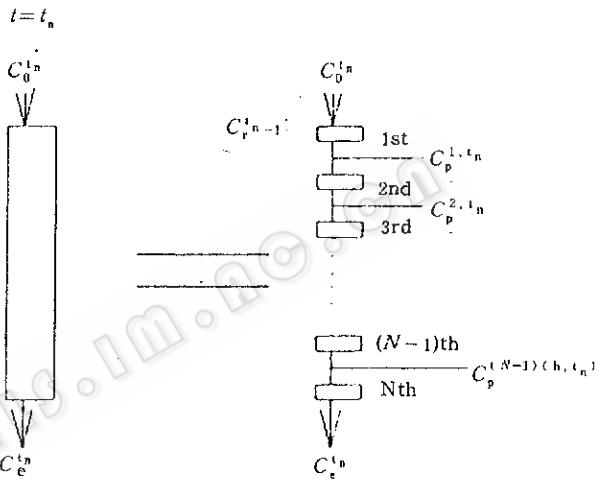


图 4 物质浓度沿柱高的确定方法
Fig. 4 The procedure for determination of the profile in the column

应开始后，固定化酶反应器和离子交换柱结合的起始时间。组合时间为 0 意味着在酶转化反应一开始就将反应混合液在离子交换柱和酶反应器之间循环。考虑到酶转化反应的初始阶段，基质浓度很高，底物浓度很低，如果组合时间为 0，离子交换树脂将首先吸附大量的青霉素 G 而可能降低酶反应的速率。因此，在 (c) 中采用了组合起始时间为 200min，即在酶转化反应进行了 200min 以后，再开始将反应混合液通过离子交换柱。从图 5 可以发现，在各种实验条件下，计算机模拟值和实验值非常吻合。这意味着组合系统的数学模型可以用于不同条件下青霉素 G 水解过程的模拟和预测。

表 2 组合系统的数学模型中的有关参数

Table 2 Important parameters in the mathematical model

Equilibrium coefficients,	
K_1 (PAA)	$= 3.033$
K_2 (PenG)	$= 1.333$
Effective capacity of column,	
Y_1 (PAA)	$= 8.25 \text{mmol} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ resin}$
Y_2 (PenG)	$= 6.25 \text{mmol} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ resin}$
Y_3 (Cl^{-})	$= 1.20 \text{mmol} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ resin}$
Kinetic parameters of immobilized enzyme,	
K_m	$= 3.55 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
K_{ip}	$= 115.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
K_{iq}	$= 17.6 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
$K_{m\pi}$	$= 78268 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
V_m	$= 0.930 \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$

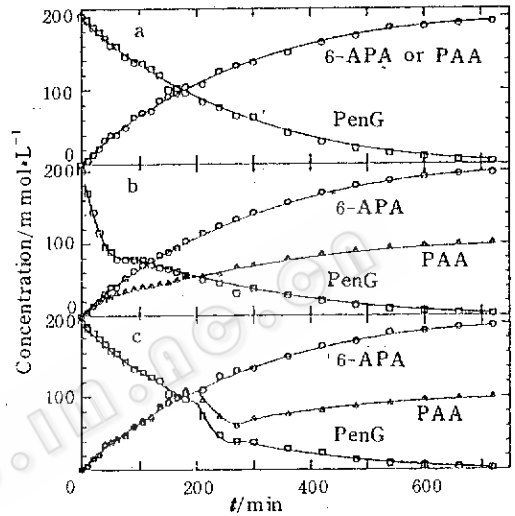


图 5 组合系统中不同条件下青霉素 G 的水解过程
Fig. 5 Hydrolysis of PenG at different conditions
○, □, △. Experimental data; —. Simulation values
a. Without ion exchange
b. With ion exchange and switching time=0
c. With ion exchange and switching time=200min

2.4 模型中有关参数对青霉素 G 水解过程的影响

在建立的数学模型中，离子交换树脂的量 (V_r) 和流量 (F) 是最重要的模型参数，而组合时间 (t_s) 则是最重要的实验条件之一。为了了解这些参数对青霉素 G 水解过程的影响，在表 3 所示的模型参数范围内，利用计算机模拟，考察了参数变化对达到 95% 青霉素 G 转化所需时间 ($t_{95\%}$) 的影响情况。计算机模拟结果如图 6~8 所示。从这 3 个图可以发现：(1) 在其它条件一定的情况下，最佳树脂量在 300ml 左右。这是因为较少的树脂不能去除足够的苯乙酸而消除产物抑制，而过量的树脂又要吸附大量的青霉素 G。虽然这部分青霉素 G 会逐步被苯乙酸替代，但量大将使替代进行得非常缓慢。这样就影响了

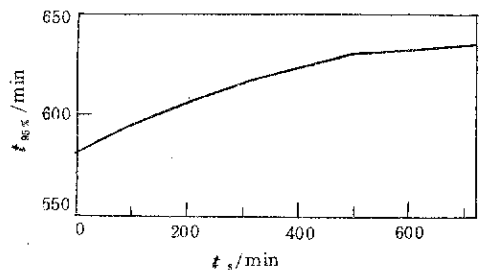


图 6 树脂量对水解过程的影响
Fig. 6 Effect of the resin amount on the process

酶转化过程。因此存在一个最佳值。(2) 组合起始时间越小, 达到 95% 青霉素 G 转化所需的时间越短。(3) 较大的流量对青霉素 G 水解过程有利。

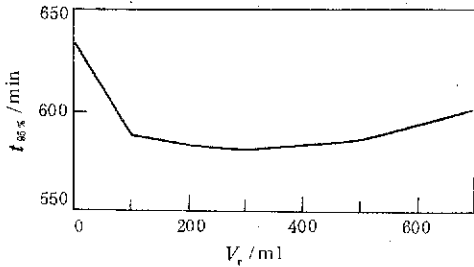


图 7 组合起始时间对水解过程的影响

Fig. 7 Effect of the switching time on the process

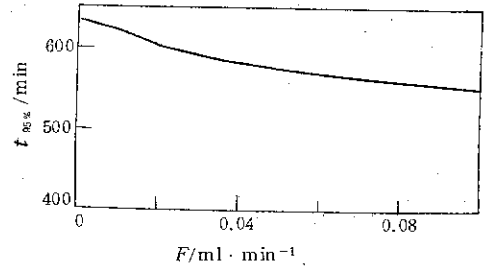


图 8 流量对水解过程的影响

Fig. 8 Effect of the flow rate on the process

表 3 计算机模拟青霉素 G 水解过程的模拟条件 *

Table 3 Simulation conditions for PenG hydrolysis

Fig.	Parameters studied	Different V_s/ml	Different $F/ml \cdot min^{-1}$	Different t_s/min
6	V_s/ml^{-1}	0~700	0.04	0
8	F/min^{-1}	300	0.01~0.1	0
7	I_s	300	0.04	0~700

Other conditions as same as Table 1

符 号 说 明

C ion conc. in liquid / $mmol \cdot L^{-1}$
 C_e ion conc. in effluent/ $mmol \cdot L^{-1}$
 C_r ion conc. in resin/ $mmol \cdot L^{-1}$
 E amount of enzyme/g
 F flow rate/ $ml \cdot min^{-1}$
 K equilibrium coefficient
 K_m Michaelis-Menten constant/ $mmol \cdot L^{-1}$
 K_{sp} constant/ $mmol \cdot L^{-1}$
 K_{ip} inhibition constant (6-APA) / $mol \cdot L^{-1}$
 K_{iq} inhibition constant (PAA) / $mmol \cdot L^{-1}$
 r reaction rate of enzyme/ $mmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$
 t time/min
 t_s switching time/min

V volume of solution/L
 V_m maximum reaction rate of enzyme/ $mmole \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$
 V_r volume of resin/ml
 Y effective capacity/ $mmol \cdot ml^{-1}$
 6-APA 6-aminopenicillanic acid
 PAA phenylacetic acid
 PenG Penicillin G
 Cl chloride ion
 1, 2, 3 PAA, PenG, Cl
 i ith compartment
 n at n time (t_n)

参 考 文 献

- (1) Naylor J H. Triend in Biochem Sci, 1991, 16 (5), 195~197.
- (2) Shewale J G, Sivaraman H. Process Biochem, 1989, 24, 146~154.
- (3) Ishimura F, Sug K. Biotechnol Bioeng, 1992, 39, 171~175.
- (4) Chen J, Omasa T, Katakura Y *et al.* Proc. of 27th Autumn Conference. Nagoya, Society of Chemical Engineering of Japan. 1994, p. 196.

[5] Ishimura F, Seijo H. *J Ferment Bioeng*, 1991, **71**: 140~143.

[6] Suga K, Shiba Y, Sorai T *et al.* *Ann NY Acad Sci*, 1991, **613**: 808~815.

Modeling of Penicillin G Hydrolysis to 6-APA in an Immobilized Enzyme-ion Exchange System

Chen Jian

(Department of Biotechnology, Wuzi Institute of Light Industry, Wuzi 214036)

Takeshi Omasa, Yoshio Ketakura, Suteaki Shioya, Ken-ichi Suga

(Department of Biotechnology, Osaka University, Osaka 565, Japan)

Abstract A composite system of an immobilized enzyme reactor combined with an ion exchange column was employed for hydrolysis of PenG to 6-APA with continuous removal of PAA. In this study, a mathematical model of PenG hydrolysis to 6-APA in the composite system was developed based on the compartment model, the profile of concentration in the ion exchange column and the enzyme kinetics in the immobilized enzyme reactor. After checking the simulation value and experimental data, the effects of the resin volume, the flow rate and the switching time on the time required to reach the desired conversion rate was also examined by computer simulation.

Key words Penicillin G, hydrolysis, immobilized enzyme, ion exchange, model