

固定化青霉素酰化酶水解青霉素 G 的研究

陈 坚 Ken-ichi Suga

(无锡轻工大学) (日本大阪大学)

摘要 研究了固定化青霉素酰化酶的部分性质,包括酶的最佳温度、pH,酶的反应动力学常数,酶的稳定性等,探讨了固定化酶反应器中青霉素 G 的酶解过程,建立了酶解过程的数学模型,并对此过程进行了计算机模拟和预测。

主题词 青霉素;酶水解;性质/青霉素酰化酶;青霉素水解

中图分类号 TQ465.1

0 前 言

6-氨基青霉烷酸(6-Aminopenicillanic acid,简称 6-APA)是 1950 年被 Sakaguchi 和 Murao 发现,1953 年被 Beecham 公司的研究者确定为半合成青霉素的重要结构单元的^[1]。由于半合成青霉素,如氨基苄青霉素、羟氨基苄青霉素等,在效力与临床价值上优于青霉素 G 或青霉素 V;也由于青霉素 G(或 V)很容易通过发酵而大量生产^[2],因此,近几十年来,有关青霉素 G 水解生产 6-APA 的研究一直是一个热点,而且 6-APA 的生产也从化学法、酶法发展到了目前广泛使用的固定化青霉素酰化酶法(penicillin acylase)。目前全世界发酵生产青霉素的年产量大约为 15000t,其中大部分被用于酶解生产 6-APA^[1]

青霉素是相对不稳定的化合物,因此 6-APA 会有二聚作用、多聚作用、 β -内酰胺环水解和与 CO₂ 反应等性质。基质和产物的不稳定性、产品的高产率 and 高质量均要求转化反应高效和迅速。采用固定化青霉素酰化酶进行青霉素的水解可有效地解决这些问题。图1为 6-APA 的生产过程,其中青霉素 G 通过发酵得到,酰化酶由微生物生产后进行固定化。在

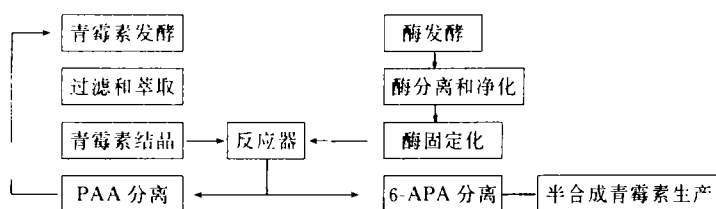


图1 6-APA 的工业生产过程

收稿日期:1994-12-15

固定化酶反应器中青霉素G水解生成6-APA和苯乙酸(Phenylacetic acid,简称PAA),6-APA用于半合成青霉素的生产,PAA可作为青霉素G发酵的前体^[3]。

本文首先研究了固定化青霉素酰化酶的部分性质,包括酶的最佳温度、pH,酶的反应动力学常数,酶的稳定性等,然后探讨了固定化酶反应器中青霉素G的酶解过程,建立了酶解过程的数学模型,并对此过程进行了计算机模拟和预测。

1 实验材料和方法

1.1 固定化青霉素酰化酶

青霉素酰化酶产自巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) B-400。*Bacillus megaterium* B-400的生长培养基组成为:1%蛋白胨,1%牛肉膏,0.5%NaCl和0.2%苯乙酸。在30℃下好氧培养30h后,酶的提纯步骤为:560号硅藻土吸附(pH7.0下),含24%硫酸铵的0.1mol磷酸缓冲液(pH8.0)洗脱,超滤提纯。固定化载体为氢化的多孔聚丙烯腈。具体固定化方法如前所述^[4]。酶活的测定采用以前的方法^[5]。一个单位酶活定义为34℃下,1min产生1μmol的6-APA。

1.2 实验装置

图2为进行青霉素G水解的实验装置。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;反应器中的温度和pH均采用PID法控制。

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)。色谱柱长为4.6×150mm,内部填料为Cosmosil 5C-18AR。流动相采用乙腈-磷酸氢钾(5%~25%Acetonitrile, 10mmolKH₂PO₄, 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1580单位/mg。其它化学试剂均为分析纯。

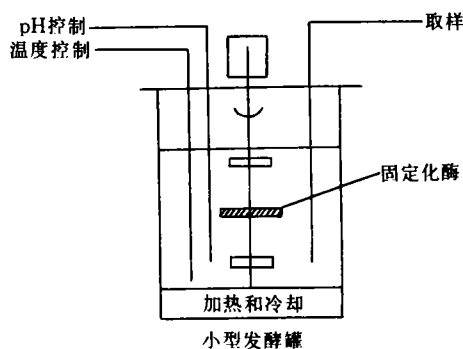


图2 青霉素G酶解的实验装置

2 结果和讨论

2.1 固定化青霉素酰化酶性质研究

青霉素酰化酶生产菌的筛选是以前能否生产具有工业价值的酰化酶为目标。通常在培养物被确定后,通过进行改善培养基和发酵过程条件、采用诱变和筛选方法得到高产菌株这两方面的工作,可10到30倍地提高酶的生产率。将由此得到的并具有表1所示性质的青霉素酰化酶进行固定化,可用于青霉素酶解的工业过程^[1]。

表 1 青霉素酰化酶所应具有的性质

1	高基质浓度和高产物浓度的耐受力
2	高基质亲和性和比活性
3	在操作条件下和长期贮存时有良好的稳定性
4	具有最大酶活的 pH 稳定范围较宽且酶活 pH 范围和基质、产物 pH 稳定范围相近
5	在高盐浓度和水混溶剂中稳定
6	对交联度和化学修饰试剂稳定

2.1.1 固定化酶的最佳温度和 pH 图 3 为 pH 对固定化青霉素酰化酶活性的影响情况。从图中可以看出,在 pH 7.2~9.5 的范围内,固定化酶能保持最大活性。为了比较,图中还给出了对未固定化的青霉素酰化酶的实验测定结果。显然,在固定化前后,青霉素酰化酶的最佳 pH 和 pH 活性曲线相当一致。据报道^[6],在用重氮法固定胰蛋白酶、用溴化氰活化的琼脂糖固定核糖核酸酶和用聚丙烯酰胺包埋法固定天冬酶时,也有类似的情况。

图 4 为温度对固定化青霉素酰化酶活性的影响情况。在温度达到 37℃ 时,固定化酶的活性最大。同样,图中也给出了温度变化对固定化前的青霉素酰化酶酶活的影响。此时,最佳温度为 43~45℃。因此,与 pH 不同,固定化前后酶的最佳温度发生了迁移。

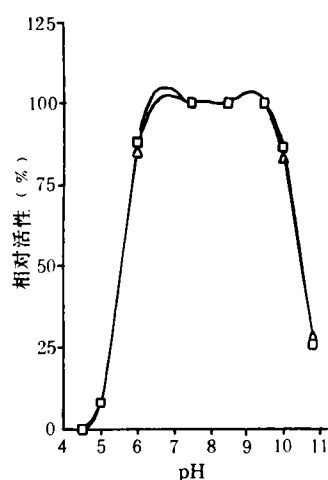


图 3 pH 对酶活性的影响情况

△ 固定化酰化酶 □ 酰化酶

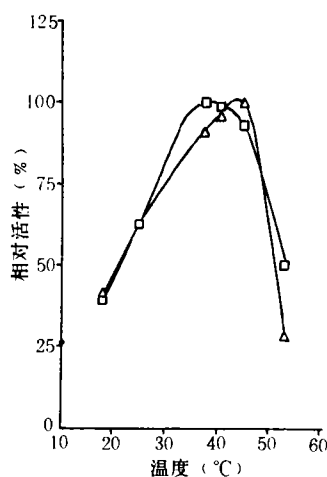


图 4 温度对酶活性的影响情况

△ 固定化酰化酶 □ 酰化酶

2.1.2 固定化酶的反应速率方程 基于有序单-双(ordered uni-bi)反应机理,固定化青霉素酰化酶反应速率方程可表述为^[7]:

$$r = \frac{V_m (C_{\text{penG}} - \frac{C_{6\text{-APA}} C_{\text{PAA}}}{K_{\text{eq}}})}{C_{\text{penG}} (1 + \frac{C_{6\text{-APA}} C_{\text{PAA}}}{K_{\text{ip}}}) + K_a (1 + \frac{C_{6\text{-APA}} C_{\text{PAA}}}{K_{\text{iq}}} + \frac{C_{\text{PAA}}}{K_{\text{iq}}} + \frac{C_{6\text{-APA}} C_{\text{PAA}}}{K_{\text{ip}} K_{\text{iq}}})}$$

式中 K_a ——米氏常数(mmol)

K_{eq} ——反应方程中平衡常数(mmole)

K_{ip} ——6-APA 抑制系数(mmole)

K_{iq} —— PAA 抑制系数 (mmol)
 r —— 反应速度 (mmole/min · g)

在控制基质转化率为 5%~10% 的情况下, 上式可简化为:

$$r = \frac{V_m C_{PenG}}{C_{PenG} + K_a} \tag{1}$$

即

$$\frac{1}{r} = \frac{K_a}{V_m} \times \frac{1}{C_{PenG}} + \frac{1}{V_m} \tag{2}$$

采用微分型反应器, 实验首先确定传质阻力不起显著作用的液体流速(量)范围, 结果如图 5 所示。显然, 在流量大于 0.5L/h 的条件下, 可不考虑传质阻力问题。
 在微分型反应器的稳态条件下, 反应速率可用下式表示^[8]:

$$r = \frac{F(C_0 - C_e)}{E} \tag{3}$$

式中 F —— 流速 (ml/min)
 E —— 固定化酶量 (g)
 C_0 —— 反应器进口浓度 (mmol)
 C_e —— 反应器出口浓度 (mmol)

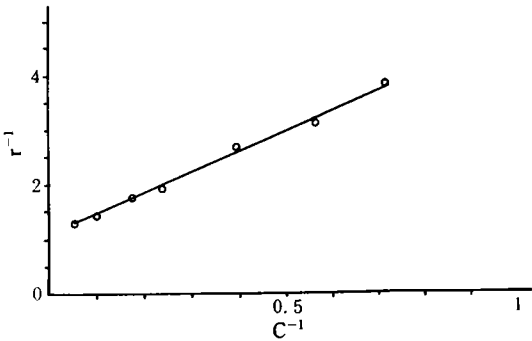
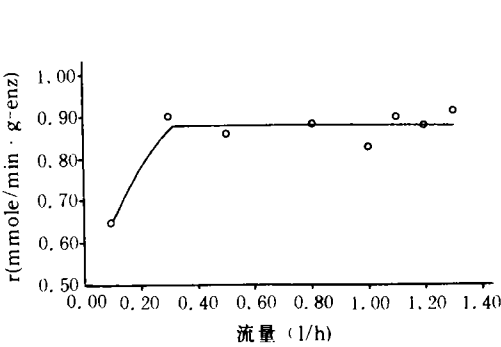


图5 不同流量下酶的反应速率

图6 动力学常数 V_m 和 K_s 的确定

因此, 在一定的 E 和 F 下, 通过测定不同 C_0 和 C_e 得到的实验结果如图 6. 对图中数据进行线形回归得到:

$$\frac{1}{r} = 3.814 \frac{1}{C_{PenG}} + 1.075$$

即 $V_m = 0.930, K_s = 3.55$. 表 2 给出了固定化酶反应速率方程中本实验和以前研究^[7]所得到的参数值。

表 2 反应速率方程中的有关参数值

K_a	3.55 (mmol)
K_{ip}	115.1 (mmol)
K_{iq}	17.6 (mmol)
K_{eq}	78268 (mmol)
V_m	0.930 (mmol/min · g-dry-g · dry-enzyme)

2.1.3 固定化酶的稳定性 稳定性问题是关系到固定化酶能否实际应用的大问题。例如, 酶和普通化学催化剂一样, 温度越高, 反应速率越快。但是, 酶是由蛋白质组成的, 一般对热不稳定, 不能在高温条件下进行反应。如果将酶固定化后, 其耐热性能有所提高, 无疑对酶的应用极为有利。实际上, 在大多数情况下, 酶经固定化后其稳定性都有所增加。

1) 固定化酶的热定性 将酶在不同温度下置于 pH7.5 的 buffer 中 2h, 然后测定酶的活性, 结果如图 7 所示。在 48℃ 以下, 固定化前后酶的耐热性一样; 在温度超过 48℃ 后, 固定化后酶的稳定性要优于未固定化的酶。

2) pH 对酶稳定性的影响 将酶在 37℃ 下, 置于不同 pH 的 buffer 中 30min, 然后测定酶的活性, 结果如图 8 所示。显然, 固定化后酶的 pH 稳定性较好。

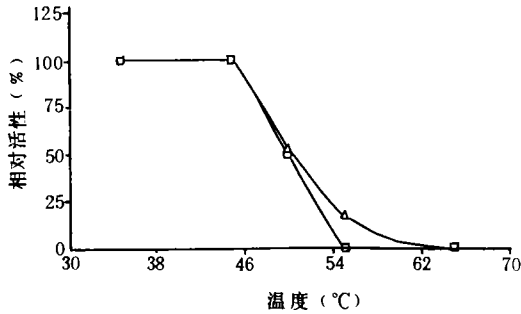


图 7 固定化酶的热稳定性

△ 固定化酰化酶 □ 酰化率

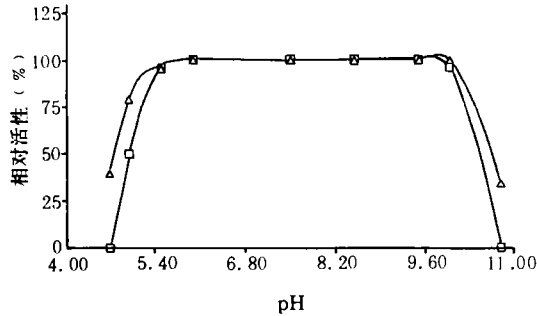


图 8 pH 对酶热稳定性的影响

△ 固定化酰化酶 □ 酰化率

2.2 固定化酶反应器水解青霉素 G 的研究

2.2.1 青霉素 G 的酶解过程和数学模型 表 3 为青霉素 G 的酶解条件。图 9 为青霉素 G 的酶解过程曲线。采用 pH-stat 法控制固定化酶反应器中的 pH 值, 对 PenG、6-APA 和 PAA 作物料衡算, 可得到如下方程:

$$V \frac{dC_{\text{PenG}}}{dt} = -rE \quad (4)$$

$$V \frac{dC_{\text{6-PenG}}}{dt} = rE \quad (4)$$

$$V \frac{dC_{\text{PAA}}}{dt} = rE \quad (4)$$

根据表 3 的实验条件, 用 Runge-Kutta-Gill(RKG)法计算机求解上述方程, 得到的计算结果也在图 9 上标出。从图可以看出, 计算值和实验值非常吻合, 由此说明所采用的模型和模型参数正确、合理。

表 3 青霉素 G 的酶解条件

pH	温度(°C)	溶液体积(L)	搅拌转速(r/min)	酶量(g)	初始浓度(mmol)	缓冲液(mol borate)
8.5	37	3.0	500	3.0	200	0.1

2.2.2 青霉素 G 酶解过程的计算机模拟 青霉素 G 酶水解反应(图 10)的特性是: 1) 酶解反应受其产物 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。根据上述数学模型, 如果固定化酶反应器与另一设备相连以连续地去除 PAA, 方程(6)将改为方程(7):

$$\frac{dC_{\text{PAA}}}{dt} = \frac{r}{V}E - \frac{F}{V}C_{\text{PAA}} \quad (7)$$

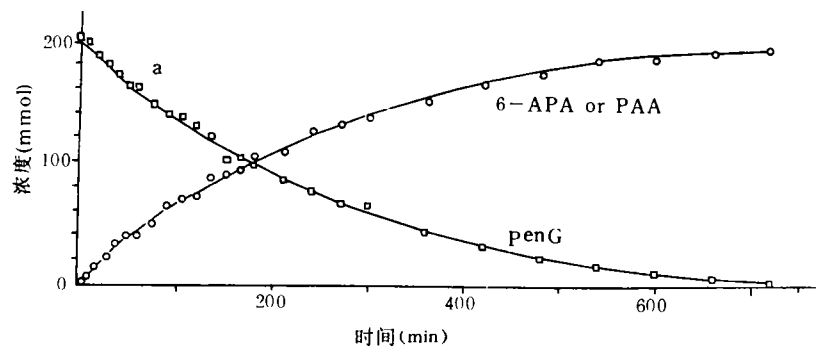


图 9 青霉素 G 的酶解过程曲线

○, □ 实验值 — 计算值

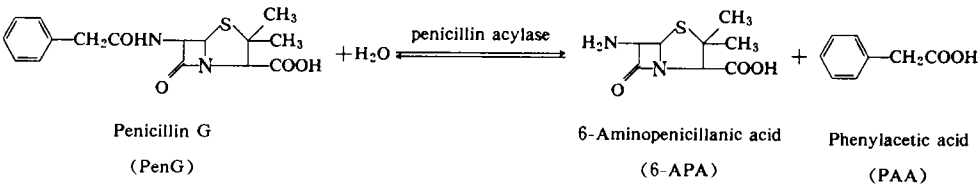


图 10 青霉素 G 的酶水解反应

式中: $F = PAA$ 被去除部分的流速。

在不同的 F 下,由方程(4)、(5)和(7)用计算机对青霉素 G 酶解过程进行模拟,得到图 11。显然, F 增大,即单位时间内 PAA 被去除的量增加,酶解反应效率提高。如果以达到 95%青霉素 G 转化所需的时间为目标,则不同 F 下酶解所需的时间如表 4 所示。

表 4 不同 F 下计算机计算得到的
95%青霉素 G 的转化时间

流速 F (l/min)	时间 (min)	时间缩短率 (%)
0.00	634	0
0.01	524	17.35
0.02	483	23.82
0.04	451	28.86
0.06	439	30.75

* 计算条件同表 4

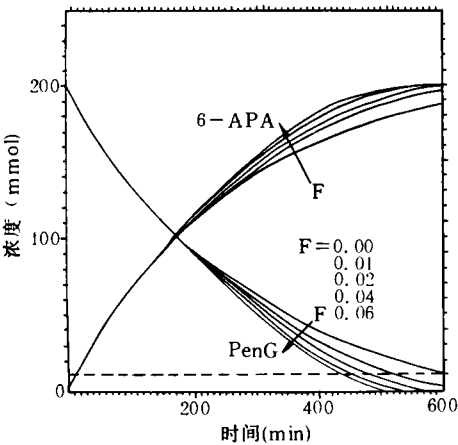


图 11 青霉素 G 酶解过程的计算机模拟

因此,将固定化酶反应器与其它设备相连去除 PAA 可能是有效地提高青霉素 G 酶解效率的重要途径。后续的实验研究也充分证明了这一点。

参 考 文 献

- 1 David A L. Immobilized beta-lactam acylase. In: Development in Industrial Microbiology. 1989,30:121~130
- 2 Nayler J H. Triend in Biochem. Sci. 1991,16(5):195~197
- 3 Shewale J G,Sivaraman H. Process Biochem. 1989,24:146~154
- 4 Ishimura F,Seijo H J. Ferment. Bioeng. 1991,71:140~143
- 5 Ishimura F,Suga K. Biotechnol. Bioeng. 1992,39:171~175
- 6 千西一郎著,胡宝花等译. 固定化酶. 河北人民出版社,1981
- 7 Suga K,Shiba Y,Sorai T, Shioya S,et al. Ann. NY Acad. Sci. 1991,613:808~815
- 8 Chen J, Omasa T, Katakura Y, Shioya S,et al. Proc. of 27th Autumn Conference of Society of Chemical Engineering of Japan. 1994, 196

Hydrolysis of Penicillin G by Immobilized Penicillin Acylase

Chen Jian

Ken-ichi Suga

(Wuxi University of Light Industry) (Osaka University, Japan)

Abstract The properties of immobilized penicillin acylase, such as optimal temperature, optimal pH, reaction kinetics and stability of the enzyme were studied. Based on the analyses of PenG hydrolysis in an immobilized enzyme reactor, a mathematical model of PenG hydrolysis was developed. Computer simulation and prediction of the process were carried out.

Subject-words Penicillin; Enzyme hydrolysis; Property / Penicillin acylase; Penicillin hydrolysis