

固定化米曲霉菌体填充床拆分 DL-丙氨酸的动力学行为

王燕, 张凤宝, 宋正孝, 张国亮, 王诤, 赵林

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 分析了固定化米曲霉拆分 DL-丙氨酸的动力学特性, 通过间歇反应器的实验数据处理, 获得了酶促反应的动力学参数. 应用填充床的一维稳态轴向扩散模型进行数值求解, 得到了模型计算值, 与实验结果比较表明, 提出的模型能较好地描述固定化菌体连续拆分 DL-丙氨酸过程.

关键词: 固定化; 米曲霉菌体; DL-丙氨酸; 拆分; 填充床; 动力学

中图分类号: Q814.3 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2002)02-0132-05

1 前言

利用酶的高度立体选择性和专一性等特点进行外消旋体的拆分已成为获得 L-和 D-氨基酸的重要途径^[1-4]. 在酶法拆分中, 利用固定化氨基酰化酶拆分氨基酸并实现工业化是近代酶技术发展史上和氨基酸生产中的一个重要里程碑^[5,6]. 近年来, 细胞和菌体的固定, 由于其简单方便、稳定性较好、纯化和分离方便、利于实现连续化操作等优点^[7,8], 成为当前酶工程研究的热点, 并在工业中得到了广泛应用.

实验研究表明, 米曲霉中的氨基酰化酶对乙酰-L-丙氨酸和乙酰-D-丙氨酸具有高度的选择性, 其酶活力分别为 5800 和 2.0^[9], 所以在乙酰-DL-丙氨酸(N-Ac-DL-Ala)的拆分过程中, 生成的 D-丙氨酸量非常小, L-丙氨酸对映体过量近 100%, 完全可以满足作为医药中间体的需要. 王诤等^[10]在液体培养基中培养米曲霉, 使之生长成含氨基酰化酶浓度较高、直径为 1~2 mm 的菌球, 用明胶和戊二醛交联固定, 用固定化后的菌体拆分丙氨酸, 通过实验确定和计算了有关的动力学参数. 为使研究更具有工业应用价值, 本工作利用填充床反应器数学模型来模拟连续拆分过程.

2 数学模型的建立及求解

在固定床反应器中, 固定化后的米曲霉填充密度大, 菌体间接触比较紧密, 用排水法测得的床层空隙率 $\varepsilon=0.4$ ^[11], 并近似视为常数; 固定化菌体同无机催化剂相比, 非常容易变形, 在菌体柱中呈扁片状, 床层由若干个薄层组成, 每层中空隙均匀, 反应液在空隙中流动并进行反应. 由于反应器长径比较大, 扩散主要发生在轴向, 假定反应器内的流动和传质符合一维拟均相稳态轴向扩散模型. 通常, 在反应过程中, 反应热一般很小, 例如苯丙氨酸、丙氨酸以及蛋氨酸在不同温度下拆分过程中的反应热 ΔH 均在 5 kJ/mol 左右, 故整个床层可近似按等温处理.

基于上述分析, 可作如下假设:

(1) ε 为常数; (2) 反应器内的流动和传质符合一维拟均相稳态轴向扩散模型; (3) D_a 为表观轴向扩散系数, 表示由分子扩散、湍流扩散及流速分布等传递机理而产生的综合作用, 并满足菲克定律; (4) 拆分反应热很小, 可忽略不计, 床层按等温处理; (5) 在抑制现象中, 仅考虑底物抑制.

在上述假设的基础上, 建立数学模型如下:

设床层高为 L , 在距床层底端 l 处取一微元作质量衡算, 可得:

$$(N_i^F + N_i^D) - (N_o^F + N_o^D) - N_r = 0, \quad (1)$$

其中 $N_i^F = u_0 s \varepsilon \pi R^2$, $N_i^D = (-\varepsilon D_a ds/dl) \pi R^2$, $N_o^F = u_0 (s + ds) \varepsilon \pi R^2$, $N_o^D = (-\varepsilon D_a)[(ds/dl) + (d^2s/dl^2)dl] \pi R^2$, $N_r = r_p(1-\varepsilon) \pi R^2 dl$, 经整理, 得

$$\varepsilon D_a \frac{d^2s}{dl^2} - \varepsilon u_0 \frac{ds}{dl} - r_p(1-\varepsilon) = 0, \quad (2)$$

因为 $s = s_0(1-x)$, 所以上式亦可转化成以转化率 x 为未知变量的方程, 即

$$\varepsilon D_a s_0 \frac{d^2x}{dl^2} + \varepsilon u_0 s_0 \frac{dx}{dl} - r_p(1-\varepsilon) = 0, \quad (3)$$

式中 r_p 为酶促反应速度, 对于本研究体系, 根据实验测定为

$$r_p = \frac{V_m s_0(1-x)}{K_m + s_0(1-x)} \quad (s \leq 0.2 \text{ mol/L, 无底物抑制}), \quad (4)$$

及
$$r_p = \frac{V_m s_0(1-x)}{K_m + s_0(1-x) + s_0^2(1-x)^2/K_{is}} \quad (s > 0.2 \text{ mol/L, 有底物抑制}), \quad (5)$$

边界条件为

$$l = 0^-, x = 0; \quad \varepsilon D_a \left. \frac{dx}{dl} \right|_{l=0^+} = u_0 x \Big|_{l=0^+}, \quad (6)$$

$$l = L, \quad \left. \frac{dx}{dl} \right|_{l=L} = 0. \quad (7)$$

式(3)为二阶非线性常微分方程, 可利用有限差分法进行数值求解^[12]. 为了得到相同阶数的阶段误差的差分方程, 采用三点数值微分式, 即

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{x=x_{i-1}} = \frac{1}{2h} [-3y(x_{i-1}) + 4y(x_i) - y(x_{i+1})] + O(h)^2, \quad (8)$$

$$\frac{d^2y}{dx^2} [y(x_{i-1}) + 2y(x_i) + y(x_{i+1})], \quad (9)$$

在 $l=0$ 和 $l=L$ 之间取 $n-1$ 个等距节点, 节点间距 $h=L/n$, $l_0=0$, $l_n=L$, s_i 为第 i 个节点处的底物浓度, 将式(8), (9)代入式(3)可得方程的差分格式为

无底物抑制:

$$x_{i-1} \left(3 - \frac{2D_a}{u_0 h} \right) = x_{i+1} + 4x_i + \frac{2D_a}{u_0 h} (x_{i+1} - 2x_i) - \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{2hV_m(1-x_i)}{u_0 [K_m + s_0(1-x_i)]} \quad (i = 2, \dots, n-1); \quad (10)$$

有底物抑制:

$$x_{i-1} \left(3 - \frac{2D_a}{u_0 h} \right) = x_{i+1} + 4x_i + \frac{2D_a}{u_0 h} (x_{i+1} - 2x_i) - \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{2hV_m(1-x_i)}{u_0 [K_m + s_0(1-x_i) + s_0^2(1-x_i)^2/K_{is}]} \quad (i = 2, \dots, n-1). \quad (11)$$

边界条件为

$$l = 0, \quad 2hu_0x_0 = -\varepsilon D_a (-3x_0 + 4x_1 - x_2), \quad (12)$$

$$l = L, \quad x_{n-2} - 4x_{n-1} + 3x_n = 0. \quad (13)$$

将参数代入, 在 Pentium 100 PC 机上用 Newton-Raphson 法求解上述方程组, 可得不同床层高度的底物转化率 x_i , 在 $l=L$ 处的转化率 x_n 就是整个填充床的转化率, 整个运算过程约需时 2 s.

3 实验材料和方法

3.1 试剂

DL-丙氨酸由北京制药二厂提供, 纯度大于 98%; N-乙酰-DL-丙氨酸由 DL-丙氨酸经乙酰化制得. 其它试剂均为天津市化学试剂二厂生产, 分析纯.

3.2 米曲霉菌球的制备

菌种米曲霉(*Aspergillus oryzae*)3042 菌株由中科院微生物所提供.

菌体的液体培养:

培养基(g/L): 蛋白胨 10, 葡萄糖 20, 牛肉膏 10, 酵母膏 1.5, K_2HPO_4 2, $MgSO_4$ 1, D-维生素 0.2 mg/L, pH 6.5~7.0. 在 250 ml 三角瓶中装入 50 ml 培养液, 在 0.1 MPa 下蒸汽灭菌 30 min. 接入一定量的菌悬液后于 30°C 温度下在旋转半径为 1.5 cm 的摇床上以 130 r/min 的转速振荡培养 35~40 h, 得到直径 1~2 mm 的白色菌球, 收集菌体用去离子水洗净, 备用.

固定化方法: 采用明胶进行包埋, 戊二醛为交联剂进行交联固定. 具体方法见文献[2]. 用得到的固定化菌体填充固定床反应器进行拆分 DL-丙氨酸反应, 用茚三酮显色法测定反应底物浓度.

3.3 酶活性的测定

酶活性的测定用茚三酮显色法, 具体方法见文献[2].

3.4 酶促反应动力学参数的测定和计算

3.4.1 酶促反应动力学参数

该体系的反应动力学参数是用间歇反应器测定的, 所得的参数均为表观动力学参数. 在一定温度和压力下, 测定不同底物浓度下的反应初速度, 发现底物浓度高于 0.2 mol/L 时, 反应初速度随底物浓度的增加而降低, 表明高底物浓度时拆分反应存在着底物抑制现象.

当底物浓度低于 0.2 mol/L 时, 无底物抑制现象, 酶促反应速率方程为式(4), 变形为

$$\frac{s}{r_p} = \frac{s}{V_m} + \frac{K_m}{V_m}, \quad (14)$$

用此式测定不同初始底物浓度 s 下的初速度 r_p , 结果见图 1. 经线性拟合可得 37°C 下的表观动力学参数 $V_m=0.0485$ mol/(L·h), $K_m=0.0171$ mol/L.

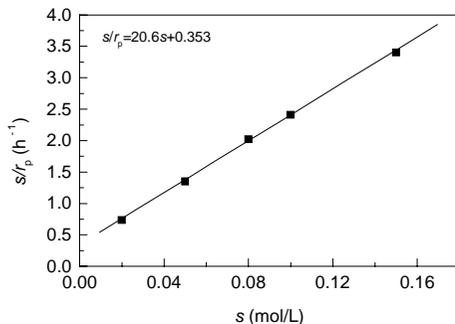


图 1 s 与 s/r_p 的关系

Fig.1 The relationship of s and s/r_p

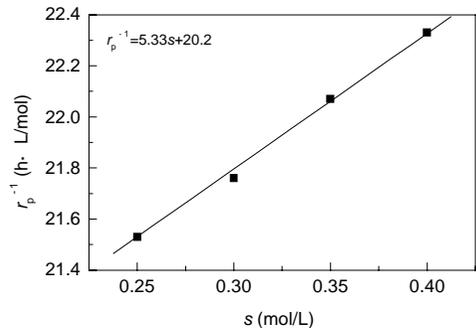


图 2 s 与 r_p^{-1} 的关系

Fig.2 The relationship of s and r_p^{-1}

当底物浓度高于 0.2 mol/L 时, 有底物抑制现象, 酶促反应写为式(5), 因为 $s/K_m > 10$, 为方便起见, 将式(5)简化为

$$\frac{1}{r_p} = \frac{1}{V_m K_{is}} s + \frac{1}{V_m}, \quad (15)$$

用该式测定不同初始底物浓度 s 下的初速度 r_p , 结果见图 2, 经线性拟合得 37°C 时的 $V_m = 0.0493 \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, $K_m = 3.79 \text{ mol}/\text{L}$. V_m 与用米氏方程计算得到的 $0.0485 \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 基本符合.

3.4.2 表观轴向扩散系数 D_a

以 KCl 为示踪物, 用脉冲法测得填充床的停留时间分布曲线. 停留时间分布的特征值 σ_0^2 与模型参数 $Pe (Pe = u_0 L / D_a)$ 的关系为^[14]

$$\sigma_0^2 = \frac{2}{Pe} - \frac{2}{Pe^2} (1 - e^{-Pe}), \quad (16)$$

用最小二乘法确定模型参数 Pe , 进而求得不同流速下的 D_a 值, 典型值 $D_a = 9.67 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$.

3.5 实验装置及方法

实验装置见图 3. 将 12.8 g 总酶活性为 10240 U 的固定化米曲霉菌体均匀装入带有恒温装置的 $\phi 19 \text{ mm} \times 128 \text{ mm}$ 玻璃管反应器. 在 37°C 下自上而下将 N-乙酰-DL-丙氨酸溶液以一定流量通入酶柱, 测定流出液的转化率.

4 结果与讨论

为了验证固定化米曲霉菌填充床模型的正确性, 分别用初始浓度为 0.2 和 0.4 mol/L 的 N-乙酰-DL-丙氨酸为底物, 在不同体积流量下进行实验, 测定出口处的底物浓度, 从而求得底物的转化率, 并将实验结果与模型计算结果进行了比较, 结果见图 4. 横坐标为体积流量 Q , 代表流体在填充床中的平均停留时间 τ , τ 与 Q 的关系为 $\tau = \varepsilon \pi R^2 L / Q$.

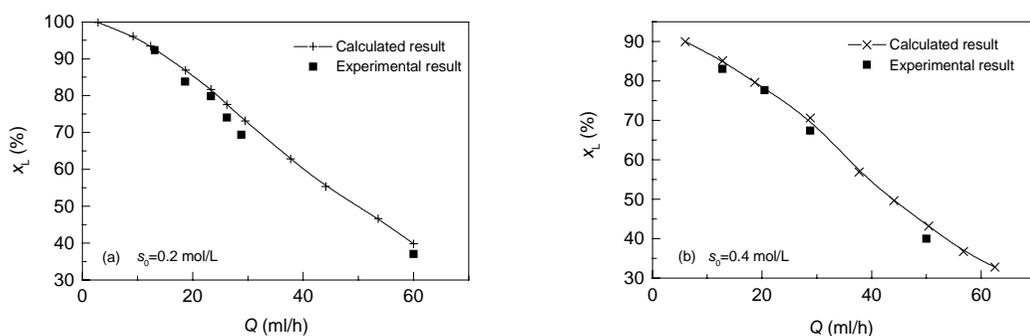
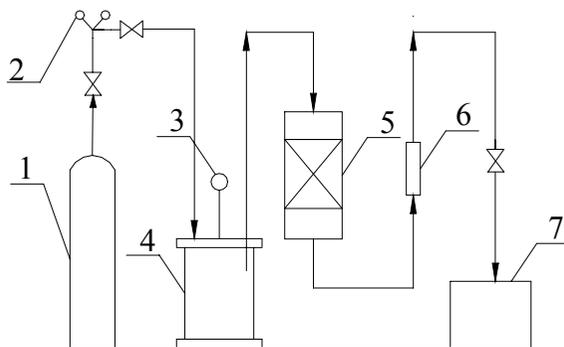


图 4 底物体积流量对转化率的影响

Fig.4 Effect of flux of substrate on the resolution ratio

由图 4 可见, 模型预测值与实验结果吻合较好, 最大误差小于 10%; 从图还可看出, 实验结果一般都低于模型计算值, 这主要是因为模型求解过程中所用动力学参数是在间歇反应器上得到的, 将其用于填充床反应器时, 二者的流体力学条件有一定差异, 所以出现了此现象, 但误差不大, 说明在本研究情况下可将间歇反应器的参数用于菌体填充床反应器; 此外, 在建立数学模型时, 曾忽略了产物的抑制作用, 这也可能是导致误差的一个原因.



1. High-pressure cylinder 2. Pressure meter 3. Pressure meter
4. Substrate tank 5. Packed-bed reactor 6. Flow meter
7. Product tank

图 3 实验装置图

Fig.3 Schematic diagram of continuous resolution of alanine by immobilized *asp. ory.* mycelium

5 结论

采用液体培养米曲霉菌体, 制备出氨基酰化酶浓度较高、直径 1~2 mm 的菌球, 用戊二醛和明胶固定。使用间歇反应器用固定化菌球对 N-Ac-DL-Ala 进行拆分实验, 获得了 37°C 下该拆分反应的表观动力学参数 $V_m=0.0485 \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, $K_m=0.0171 \text{ mol}/\text{L}$, 底物抑制常数 $K_{is}=3.79 \text{ mol}/\text{L}$ 。采用一维稳态轴向扩散模型描述固定化米曲霉填充床连续拆分 N-Ac-DL-Ala 动力学并进行数值求解, 得到了不同体积流量下出口转化率的计算值, 与实验值吻合较好, 表明对固定化米曲霉填充床反应器所做的模型假设和简化是合理的, 从而可为工业连续操作条件的优化提供参数。

符号表:

D_a	表观轴向扩散系数 (m^2/s)	K_{is}	底物抑制常数 (mol/L)	K_m	表观米氏常数 (mol/L)
l	距反应器底端的距离 (m)	L	反应床高度 (m)	N	物料量 (mol/h)
Pe	贝克来特征数 ($Pe=u_0L/D_a$)	Q	底物的体积流量 (ml/h)	r_p	酶促反应速度
R	固定床半径 (m)	s	底物浓度 (mol/L)	u_0	进料线速度 (m/h)
V_m	最大表观反应速度	x	反应底物转化率	ε	床层空隙率
上标	D 轴向扩散	F	主体流动		
下标	i 物料输入	o 物料输出		p	产物
	r 反应物	0	入口		

参考文献:

- [1] 梅乐和, 姚善泾. D-氨基酸的生物转化与拆分技术研究的新进展 [J]. 中国医药杂志, 1999, 30(5): 235-237.
- [2] 宋正孝, 李晓敏, 王铮, 等. 固定化米曲霉菌体细胞光学 DL-丙氨酸 [J]. 生物工程学报, 1997, 13(2): 168-173.
- [3] Rosell C M, Guisan J M. Resolution of Racemic Mixtures by Synthesis Reactions Catalyzed by Immobilized Derivatives of the Enzyme Penicillin Gacylase [J]. J. Mol. Cat., 1993, 84: 365-371.
- [4] Lee P M, Lee K H, Siaw Y S, et al. Immobilization of Aminoacylase to Alginate for L-phenylalanine Production [J]. J. Chem. Tech. Biotechnol., 1993, 58: 65-70.
- [5] Tsai Ying-Chieh, Lin Chyuan-Sheng, Tseng Tsu-How. Production and Immobilization of D-aminoacylase of *Alcaligenes faecalis* DA1 for Optical Resolution of N-acyl-DL-amino Acids [J]. Enzyme Microb. Technol., 1992, 14(5): 384-389.
- [6] 周晓云. 酶技术 [M]. 北京: 石油工业出版社, 1995. 37.
- [7] Ephraim K E, Dieter M K. Eupergit C, a Carrier for Immobilization of Enzymes of Industrial Potential [J]. J. Mol. Cat. B: Enzymatic, 2000, 10: 157-176.
- [8] Lee K H, Lee P M, Siaw Y S. Immobilization of Aminoacylase by Encapsulation in Poly-L-lysine Stabilized Calcium Alginate Beads [J]. J. Chem. Tech. Biotechnol., 1993, 57: 27-32.
- [9] Ingrid G, Hans G, Loffer F. Aminoacylase from *Aspergillus oryzae*: Comparison with the Pig Kidney Enzyme [J]. Z. Naturforsch., 1980, 36: 544-550.
- [10] 王铮. 固定化菌柱-酶膜耦合器拆分 DL-丙氨酸的研究 [D]. 天津: 天津大学化工学院, 1996. 34-46.
- [11] 彭英. 用固定化米曲霉-酶膜反应器光学拆分 DL-苯丙氨酸的研究 [D]. 天津: 天津大学化工学院, 1997. 43.
- [12] 周爱月. 化工数学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1993. 160-164.
- [13] 戚以政, 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1996. 107.
- [14] 李绍芬. 反应工程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1990. 259.

Kinetics of Mycelium-immobilized Packed Bed Continuous Resolution of DL-alanine

WANG Yan, ZHANG Feng-bao, SONG Zheng-xiao, ZHANG Guo-liang, WANG Zheng, ZHAO Lin

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Based on the systematical study of continuous resolution of DL-alanine employing the immobilized *Aspergillus oryzae* cell, the kinetics of the enzymic reaction was determined. Furthermore, the method of Newton-Raphson was applied to the solution of one-dimension-steady-diffusion model of packed bed for continuous resolution of DL-alanine. The calculated results of the model, with the error less than 10%, were in good agreement with those of experiments. It was demonstrated that the model was reasonable and accurate.

Key words: immobilization; *Aspergillus oryzae* cell; DL-alanine; resolution; packed-bed; kinetics