

# 固定化金霉素产生菌原生质体 转化林可霉素反应模型的研究

徐京宁 李凡超 唐孝宣 俞俊棠

(华东理工大学生物化学工程研究所 上海 200237)

**摘 要** 建立了固定化金霉素产生菌金色链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 原生质体转化林可霉素反应动力学模型并模拟计算了反应过程, 模型计算与实验结果有好的一致性。讨论了各反应参数对转化反应的影响, 给出了转化率与反应时间的关系式和最大转化率计算式, 还对转化反应动力学模型进一步应用进行了讨论。

**关键词** 林可霉素, 动力学模型, 金霉素生产菌, 固定化原生质体

固定化原生质体用于产品生产有许多优点<sup>[1,2]</sup>, 它与固定化细胞的优点相比, 其没有细胞壁, 传质阻力小, 原生质体不再增殖, 因而不会引起固定化载体融涨破裂。在金霉素的生物合成过程中, 氯化作用的酶可以合成比四环素多一个氯离子的金霉素, 且催化次级代谢过程的酶对底物专一性不强, 因此固定化金霉素产生菌原生质体, 在氯离子和林可霉素存在条件下或许也能转化林可霉素生成氯林可霉素。实验结果表明, 固定化金霉素产生菌原生质体的确能使反应液抗菌活力提高, 显然该转化反应与反应起始底物浓度、装料比、固定化媒体中原生质体浓度、固定化颗粒大小及搅拌速度等因素有关。上述条件之间呈怎样的关系? 本文研究了上述条件关系的转化反应动力学模型。

## 1 实验方法

### 1.1 菌种

金色链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*), 产金霉素, 上海医工院提供。

### 1.2 原生质体制备和固定化方法

参考文献 [3] 制得原生质体, 加入在压力为 0.1MPa, 20min 灭菌后降至 45℃ 左右 3% 琼脂中, 混匀, 倒入平皿, 凝固后制成直径 8mm, 厚度为 0.2, 2 和 4mm 的圆片。

### 1.3 转化反应

将固定化原生质体按 10% 放入盛有 30ml 含 3.2mmol/L 氯离子及 0.32mmol/L 林可霉素的转化液的摇瓶中, 37℃ 下置摇床 (200r/min) 反应 32h。

### 1.4 分析方法

初始反应液和反应终了转化液以八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 为鉴定菌, 用杯碟法测反应溶液的抗菌活性。

## 2 反应动力学模型

### 2.1 反应动力学模型的建立

转化反应的区域可分为 3 部分 (如图 1 所示), 即原生质体固定化媒体内部、反应溶液主体和溶液滞流层。转化反应只在固定化媒体内进行, 底物和产物在溶液滞流层里传递仅靠扩散进行。由于固定化媒体的厚度比它的直径小许多倍, 故底物和产物的扩散传递只考虑一维方向的运动。若假设固定媒体内涉及底物 ( $S$ ) 和产物 ( $P$ ) 的反应有如下 3 种酶催化的反应:  $a$ . 氯化酶使林可霉素 ( $S$ ) 转化生成抗菌活力比  $S$  高 4 倍的  $P$ ;  $b$ . 部分酶使  $S$  分解为无抗菌活力的  $P_1$ ;  $c$ . 一些酶使  $P$  进一步分解为无抗菌活力的  $P_2$ 。

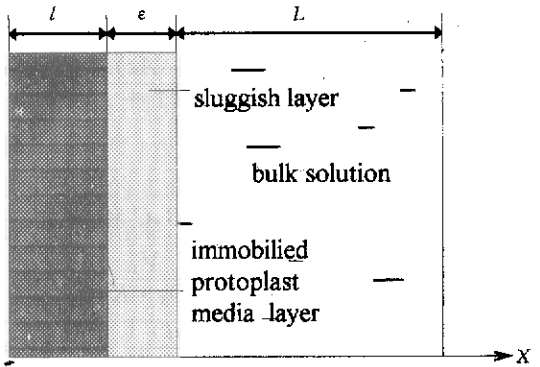


图 1 转化反应区域示意图

Fig. 1 Schematic diagram of reaction region

考虑到原生质体在媒体中是均匀分布的, 且不会增殖, 根据扩散和反应平衡原理可建立下述关于  $S$  和  $P$  的反应动力学方程组:

$$D_s \frac{d^2 S}{dx^2} = \frac{V_0 \cdot C_1 \cdot S}{K_0 + S} + \frac{V_1 \cdot S}{K_1 + S} \quad \text{当 } 0 \leq x \leq 1 \quad (1)$$

$$D_s^s \frac{d^2 S}{dx^2} = 0 \quad \text{当 } 1 < x < 1 + \epsilon \quad (2)$$

$$S = S_b \quad \text{当 } 1 + \epsilon \leq x \leq 1 + \epsilon + L \quad \text{时}$$

$$D_p \frac{d^2 P}{dx^2} = -\frac{V_0 \cdot C_1 \cdot S}{K_0 + S} + \frac{V_2 \cdot P}{K_2 + P} \quad \text{当 } 0 \leq x \leq 1 \quad \text{时} \quad (3)$$

$$D_p^s \frac{d^2 P}{dx^2} = 0 \quad \text{当 } 1 < x < 1 + \epsilon \quad \text{时} \quad (4)$$

$$P = P_b \quad \text{当 } 1 + \epsilon \leq x \leq 1 + \epsilon + L \quad \text{时}$$

上述反应动力学方程组的边界条件为:

$$D_s \frac{dS(0)}{dx} = 0, \quad D_p \frac{dP(0)}{dx} = 0, \quad \text{当 } x = 0 \quad \text{时}$$

$$S(l-0) = S(l+0), \quad P(l-0) = P(l+0),$$

$$D_s \frac{dS(l-0)}{dx} = D_s^s \frac{dS(l+0)}{dx}, \quad D_p \frac{dP(l-0)}{dx} = D_p^s \frac{dP(l+0)}{dx},$$

当  $x = 1$  时

$$S(l+\epsilon-0) = S(l+\epsilon+0), \quad P(l+\epsilon-0) = P(l+\epsilon+0),$$

当  $x = 1 + \epsilon$  时

### 2.2 反应动力学模型的解

在上述边界条件下用数值计算方法利用计算机计算得到数值解。但是当  $S$  和  $P$  的浓度比酶反应米氏常数小许多时 (实验中转化反应满足此条件), 可以得到如下解析解:

$$S = \frac{S_b \cdot \text{ch}(ax)}{(1 + A\epsilon) \cdot \text{ch}(al)}, \quad \text{当 } 0 \leq x \leq 1 \quad \text{时} \quad (5)$$

$$S = \frac{S_b(1 + Ax - Al)}{(1 + A\epsilon)}, \quad \text{当 } 1 < x < 1 + \epsilon \text{ 时} \quad (6)$$

$$S = S_b, \quad \text{当 } 1 + \epsilon \leq x \leq 1 + \epsilon + L \text{ 时}$$

$$P = \frac{[P_b \cdot (1 + A\epsilon) + S_b \cdot (1 + AD\epsilon)C] \cdot \text{ch}(bx)}{(1 + A\epsilon)(1 + B\epsilon) \cdot \text{ch}(bl)} - \frac{S_b \cdot C \cdot \text{ch}(ax)}{(1 + A\epsilon) \cdot \text{ch}(al)}, \quad (7)$$

$$P = P_b + \frac{P_b(1 + A\epsilon)B + S_b(B - DA)C}{(1 + A\epsilon)(1 + B\epsilon)}(x - \epsilon - l), \quad (8)$$

$$\text{当 } 1 < x < 1 + \epsilon \text{ 时}$$

$$P = P_b,$$

$$\text{当 } 1 + \epsilon \leq x \leq 1 + \epsilon + L \text{ 时}$$

在上面诸式中  $a, b, A, B, C$  和  $D$  为中间变量, 定义如下:

$$a = \left( \frac{V_0 \cdot C_1}{D_s \cdot k_0} + \frac{V_1}{D_s \cdot K_1} \right)^{\frac{1}{2}}; \quad b = \left( \frac{V_2}{D_p \cdot K_2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

$$A = \frac{a \cdot D_s \cdot \text{th}(al)}{D_s^2}; \quad B = \frac{b \cdot D_p \cdot \text{th}(bl)}{D_p^2}$$

$$C = \frac{\frac{V_0 \cdot C_1}{K_0}}{\frac{D_p}{D_s} \cdot \left( \frac{V_0 \cdot C_1}{K_0} + \frac{V_1}{K_1} \right) - \left( \frac{V_2}{K_2} \right)};$$

$$D = \frac{D_p D_s^2}{D_p^2 D_s}$$

### 2.3 主体溶液中 $S$ 和 $P$ 浓度的计算

由于主体溶液中  $S$  朝固定化媒体传递的量等于主体溶液中  $S$  降低的量, 固定化媒体朝主体溶液中传递  $P$  的量等于主体溶液中  $P$  变化的量, 即:

$$D_s \frac{dS(l-0)}{dx} = -\frac{dS_b}{dt} \cdot L, \quad D_p \frac{dP(l-0)}{dx} = -\frac{dP_b}{dt} \cdot L$$

上面两微分方程的初始条件分别为:

$$S_b(0) = S_b^0 \text{ 和 } P_b(0) = P_b^0, \quad t = 0 \text{ 时}$$

解这两个微分方程得到任意反应时间下主体溶液中  $S$  和  $P$  浓度的计算公式:

$$S_b = S_b^0 \exp(-Et) \quad \text{液体} \quad (9)$$

$$P_b = P_b^0 \exp(-Ft) + \frac{S_b^0 \cdot G}{E - F} [\exp(-Et) - \exp(-Ft)] \quad (10)$$

上两式中  $E, F$  和  $G$  为中间变量, 它们被定义为:

$$E = \frac{A \cdot D_s^2}{(1 + A\epsilon)L}; \quad F = \frac{B \cdot D_p^2}{(1 + B\epsilon)L}; \quad G = \frac{D_p^2 \cdot C \cdot (B - D \cdot A)}{L \cdot (1 + A\epsilon)(1 + B\epsilon)}$$

## 3 结果与讨论

用单纯形法根据理论计算值与实验数据差的平方和最小为目标函数, 对模型中有关参数进行拟合, 得到如下一套动力学参数:

$$V_0 C_1 / K_0 = 6.7 \times 10^{-5} (\text{l/s});$$

$$V_1 / K_1 = 42 \times 10^{-6} (\text{l/s});$$

$$K_2 / V_2 = 6.6 \times 10^{-5} (\text{l/s});$$

$$D_s = D_p = 5.1 \times 10^{-10} (\text{m}^2/\text{s});$$

$$D_s^2 = D_p^2 = 8.7 \times 10^{-10} (\text{m}^2/\text{s});$$

根据文献[4]  $\epsilon = \exp(-6.7 - 0.032R)$  (m),  $R$  表示摇床转速。

根据实验条件可知; $l = 2.0 \times 10^{-3}(\text{m}); R = 200(\text{r}/\text{min});$

$$L = l/\alpha = 2.0 \times 10^{-2}(\text{m}); P_b^0 = 0, S_b^0 = 0.32(\text{mol}/\text{m}^3); \alpha = 0.1.$$

在以下讨论中如果不特别指明,模型计算中都使用了上述参数值。

### 3.1 最高转化率和最佳反应时间计算及实验数据与计算值的比较

在不同的反应时间下,实验测得的反应液中相对抗菌活力数据(相对于反应起始时反应液的抗菌活力)与模型计算得到的反应液中抗菌活力,理论计算得到的反应液中相对底物和相对产物浓度(即相对于反应液相中底物起始浓度)变化曲线如图 2 所示;由图 2 可以看出,实验数据与理论计算值吻合较好,在图 2 所示的实验条件下,32h 反应得到最高抗菌活力的反应液。为了比较不同起始底物浓度的反应结果,定义溶液相对抗菌活力( $\gamma$ )和转化率  $\beta$  为:

$$\gamma = \frac{S_b + 4.0P_b}{S_b^0} \quad (11)$$

$$\beta = \frac{P_b}{S_b^0} \quad (12)$$

在(11)和(12)式中代入(9),(10)式,令  $\frac{d\gamma}{dt} = 0$ ,可解出反应溶液呈最大抗菌活性时反应时间:

$$t_{\max\gamma} = \frac{\ln(4FE) - \ln[E(4G + E - F)]}{F - E}$$

从而再解出反应溶液最大相对抗菌活力为:

$$\gamma_{\max} = \left( \frac{F - E - 4G}{F} \right) \left[ \frac{E(4G + E - F)}{4FG} \right]^{\left( \frac{E}{F-E} \right)}$$

令  $\frac{d\beta}{dt} = 0$  可解出最高转化率下反应时间:

$$t_{\max\beta} = \frac{\ln F - \ln E}{F - E}$$

从而再解出反应溶液最高转化率为:

$$\beta_{\max} = - \left( \frac{G}{F} \right) \left( \frac{E}{F} \right)^{\left( \frac{E}{F-E} \right)}$$

这些公式可用来计算最佳反应时间和已知实验条件下所能达到的反应溶液最大相对抗菌活力或者最高转化率。例如当已知如上参数时计算出所能达到的最大相对抗菌活力为 164.3%, 达到此最大相对抗菌活力需要反应 33.06h。计算出反应溶液所能达到最高转化率为 30.8%, 达到此最高转化率需要反应 47.44h。

### 3.2 固定化媒体中原生质体浓度及装料比的影响

实验和理论计算得到的原生质体浓度影响见图 3, 可见在反应 32h、10% 装料比, 固定化媒体中原生质体为  $1.2 \times 10^7/\text{ml}$ , 要得到最高抗菌活力的反应液。理论分析还可知, 当媒体中原生质体浓度较高或装料比增大时, 相应的反应液达到最高抗菌活力时间将缩短。反之, 最高抗菌活力反应时间将延长。

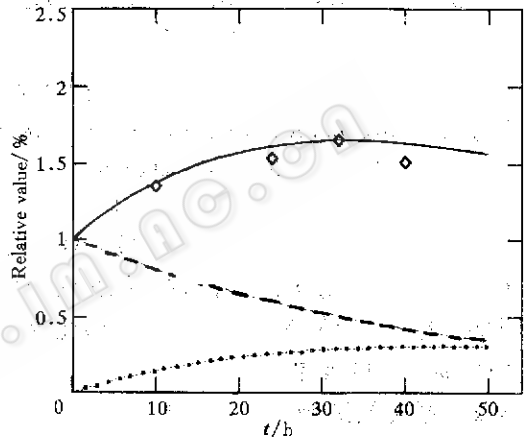


图 2 反应液相对抗菌活性与反应时间的关系  
Fig. 2 Effect of reaction time on relative antibiotic activity in reaction solution  
◇ Antibiotic activity for experiments  
— Antibiotic activity for model simulation  
..... Substrate conc. for model simulation  
---- Product conc. for model simulation

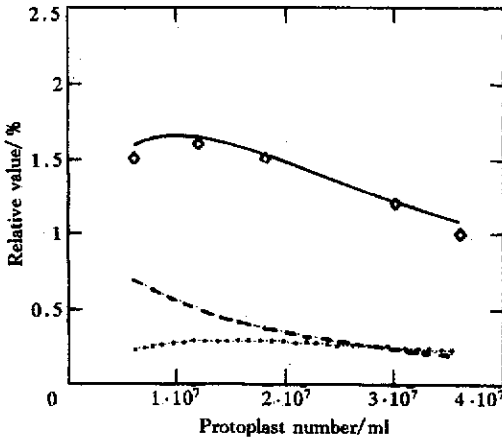


图3 原生质体浓度与相对抗菌活性的关系

Fig. 3 Effect of protoplast concentration on relative antibiotic activity in reaction solution

The legend is the same as Fig. 2

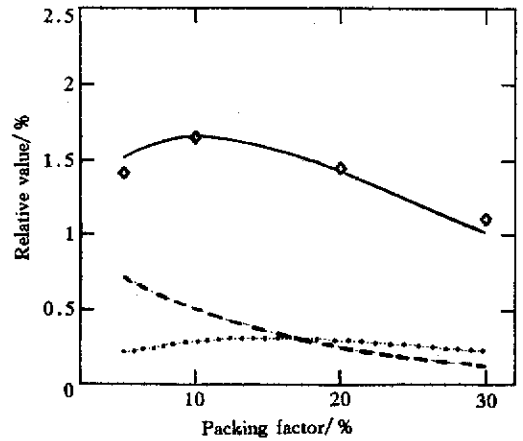


图4 装料比与反应溶液相对抗菌活性的关系

Fig. 4 Effect of packing factor on relative antibiotic activity in reaction solution

The legend is the same as Fig. 2

实验和理论计算得到的装料比对转化反应的影响见图4,显然,实验条件下装料比较低时 $S$ 得不到充分的转化,因而抗菌活力低,装料比合适时,可得到最高抗菌活力,装料过大时,由于反应使 $S$ 浓度降低而使转化反应速率小于 $S$ 和 $P$ 分解速率,故而表现出抗菌活力反而下降的现象。

### 3.3 扩散的影响

摇床转速( $R$ )影响了媒体外表面处溶液滞流层厚薄,增大摇床转速,减小了溶液滞流层厚度,降低了外扩散阻力,使底物更易由溶液进入媒体,也使 $P$ 较快的由媒体内扩散出去,前者 $S$ 转化反应速度增大,后者使 $P$ 分解机会减小,这都有利于提高转化率或增大反应液抗菌活力。实验中, $R = 0$ 时,相对抗菌活性为140%,而 $R = 200\text{r/min}$ , $\gamma = 150\%$ 。

固定化媒体圆片厚度代表内扩散阻力大小,当圆片 $l = 0.2, 2, 4$ 时,分别为190%,180%,165%;变化趋势同理论计算值相符,减小内扩散阻力有利于提高转化率或增大反应液相对抗菌活力,这表明转化反应在本文实验条件下受到内扩散阻力影响。

## 4 总 结

本文的动力学模型计算与实验结果有较好的一致性,这说明动力学模型与解是比较合理的,反应动力学模型解可用来分析计算转化反应最佳条件。理论分析可知:最高转化率与反应液 $S$ 起始浓度无关,且与装料比无关,但与内扩散和外扩散阻力有着较复杂的关系。它们之间关系趋势为:内扩散阻力越小(固定化媒体圆片越薄或 $S$ 及 $P$ 在媒体内扩散系统越大),外扩散阻力越小(摇床转速越高或 $S$ 及 $P$ 在溶液中扩散系数越大)则可能获得的溶液最高转化率越大。由动力学模型研究可知:固定化金霉素产生菌原生质体可转化林可霉素生成抗菌活力较强的氯林可霉素,同时该抗菌活力较强的产物和林可霉素也不断被分解掉。模型研究表明,最高转化率只有30.8%,大部分林可霉素被分解掉或者转化生

成产物后被分解掉,还表明:如果能把固定化媒体内底物转化反应酶活提高的同时,把分解反应酶活降低,则可望加速转化反应速度和提高转化率。

### 符 号 说 明

$D_s, S$ ——在媒体中的扩散系数 / $m^2 \cdot s^{-1}$	$S$ ——底物 $S$ 浓度,
$D_p, P$ ——在媒体中的扩散系数,	$P$ ——产物 $P$ 浓度,
$D_s^0, S$ ——在滞流层中的扩散系数,	$S_b$ ——本体溶液中 $S$ 浓度,
$D_p^0, P$ ——在滞流层中的扩散系数,	$l$ ——固定化媒体半厚度 / $m$ ,
$P_b$ ——本体溶液中 $P$ 浓度,	$\epsilon$ ——溶液滞流层厚度
$L$ ——媒体所均摊的反应溶液半厚度,	$S$ ——分解酶反应和 $P$ 分解酶反应的表现最大速率常数 / $mol \cdot (m \cdot S)^{-1}$
$V_0, V_1$ 和 $V_2$ ——分别为 $S$ 转化酶反应,	$S$ ——分解酶反应和 $P$ 分解酶反应的表现米氏常数 / $mol \cdot m^{-3}$
$K_0, K_{1\pm}$ 和 $K_2$ ——分别为 $S$ 转化酶反应,	
$C_1$ ——氯离子浓度 / $mol \cdot m^{-3}$	

### 参 考 文 献

- [1] 张克旭, 张永志. 生物工程学报, 1986, 2 (3): 66~69.
- [2] Karube I, Kawarai M, Matsuoka H *et al.* Applied Microbiology and Biotechnology, 1985, 21: 270~273.
- [3] 徐克宁, 米惯东, 唐孝宜. 生物工程学报, 1992, 8 (3): 237~242.
- [4] 李凡超等, 徐京宁, 张嗣良. 生物工程学报, 1992, 8 (4): 478~388.

## Studies on the Reaction Model for the Immobilized *Streptomyces aureofaciens*'s Protoplast Used to Convert Lincomycin

Xu Jingning Li Fanchao Tang Xiaoxuan Yu Juntang

(Research Institute of Biochemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

**Abstract** A reaction kinetic model is proposed for Immobilized *S. aureofaciens*'s protoplast used to convert lincomycin. to clindamycin. the simulation result of the model has been given. Effects of various kinetic parameters of the reaction on the conversion rate are given in formula. the formulas which can be used to calculate the maximum conversion rate and the optimal reaction time have been given. The results of model simulation are in good agreement with the experimental results.

**Key words** Lincomycin, kinetic model, *S. aureofaciens*, immobilized protoplast