

酶法制备6-APA中的水解工序中影响因素确认

陈海¹ 刘学俊²

山西双雁药业有限公司 山西 大同 037000

摘要: 6-氨基青霉烷酸(英文书写为6-Aminopenicillanic acid,简称6-APA)作为青霉素中间体的代表,是目前原料药市场上一种重要的医药中间体,在抗生素生产中具有不可替代的作用。本文旨在对青霉素水解酰化酶在制备生产6-APA合成中时对控制环境温度、反应的pH值、参与反应的底物浓度等对催化反应的影响方面进行研究。

关键词: 青霉素水解酰化酶、酶水解、6-氨基青霉烷酸

1 青霉素水解酰化酶简介

1.1 概述

青霉素水解酰化酶是一种催化将青霉素酰基侧链断裂产生6-氨基青霉烷酸(6-APA)和相应的苯乙酸的催化反应的酶。又称为青霉素酰胺酶或青霉素氨基水解酶。

1.2 结构及催化机理

不同来源的青霉素水解酰化酶的分子结构也有很大差异,来源于 E. coli 的青霉素 G 酰化酶是由一个20.5KDa的 α 亚基和一个69KDa的 β 亚基通过氢键作用结合在一起组成的异二聚体^[1,2],其结构如图1所示。

青霉素催化水解时,产生 6-氨基青霉烷酸的同时会形成酰基-酶复合中间体,在同样的条件下,产生的中间体也会被水解,进一步水解酶分子游离出来,生成本反应的副产物苯乙酸。

青霉素水解酰化酶的催化反应特性:主要有以下两个方面:一是酶的特异性(专一性),即酶对底物的选择性较高,可以在复杂的底物中选择并催化目标底物;二是高效性,生物酶的催化效率高,能够在合适的温度、pH及合理的底物浓度下达到高转化率和高产率。



图1 青霉素 G 酰化酶的二聚体结构[12]

1.3 制备工艺简述

青霉素酰化酶可以通过产酶微生物的营养控制代谢及基因型改变,进行大规模的生产。固定化青霉素水解酰化酶是酵母菌种经过发酵培养使菌体数量增多,主要原辅料是用玉米浆、甘油和无机盐做为培养基,磷酸二氢

钠、磷酸氢二钠以及氯化钙、氯化铜等微量元素,通过营养控制代谢大规模生产,通常的发酵通过种子培养、二级发酵和大罐发酵,通常周期在一周左右的时间,发酵完成后通过提取、均质等工序,制备成固定化青霉素水解酰化酶。

1.4 性状及指标

水解用青霉素酰化酶性状为白色或浅黄色球形颗粒,在市场上销售的产品主要成分为环氧载体、固定化酶和水的混合物,质量指标以酶活力为主要控制项,是衡量酶催化效率的关键指标。

酶活力常用单位用U表示;

活力单位定义:在特定温度、浓度和酸碱条件下,时间为1分钟内催化反应1微摩尔底物转化为产物所需的水解酶的使用数量。

1.5 酶活的计算

固定化青霉素酰化酶活力的计算公式为:

$$b = \frac{(A + 0.0094) \times 4.5 \times 10^6}{m \times 0.7676}$$

b: 固定化青霉素酰化酶活力(U/g)

A: 吸光度

m: 固定化青霉素酰化酶质量(g)

1.6 国内使用情况

国产酶已经在国内多家大型药企生产线上得到推广应用,大量成功替代进口产品的使用,迫使进口酶价大幅下降,从2016年以来降价在2/3以上,使得生产成本进一步降低。

国内生产酶的厂家主要有湖南福来格生物技术有限公司、山西双雁药业有限公司、杭州俊丰生物工程有限公司、湖北魏氏化学试剂股份有限公司等。

2 青霉素水解酰化酶在催化合成 6-APA 的应用

2.1 6-APA生产历史

6-APA是 β 内酰胺抗生素工业中的重要中间体,在不

同条件下通过与不同物质的反应可以制得目前市场上销售和使用的氨苄西林原料药和阿莫西林原料药等重要的原料药。在2000年初,我国部分工业生产6-APA都已采用水解酶法水解工艺,由于6-APA在β内酰胺抗生素在下游制剂工业中的市场需求量不断增大,同时青霉素水解酰化酶在制备生产6-APA的工艺和新技术不断更新的提升,目前国内6-APA的生产厂家也逐渐稳定。生产规模最大的厂家有联邦制药(内蒙)有限公司、伊犁川宁制药有限公司、内蒙古常盛制药、国药威奇达制药有限公司等。

2.2 酶法在6-APA生产及应用

青霉素类药物的母体就是6-APA(图2为结构式),在实践中利用特质的性质,改变结构式中的M、R:能制备目前已在市场上需求的青霉素钾盐原料药、普鲁卡因青霉素原料药等等;

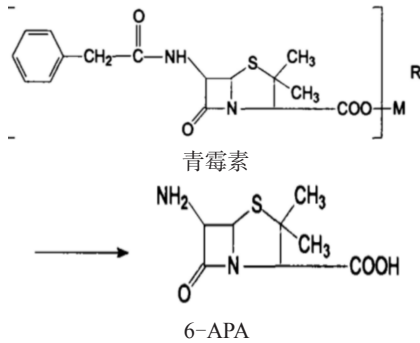
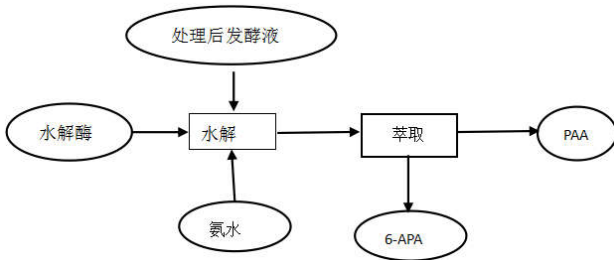


图2 青霉素生产6-氨基青霉烷酸(6-APA)

2.3 酶法制备6-APA工艺

2.3.1 6-APA生产工艺流程图示



2.3.2 酶法制备6-APA实验方案

2.3.2.1 材料

水解酶: 山西双雁药业有限公司

氨水: 河北鼎富化工有限责任公司

发酵滤液: 国药威奇达制药有限公司

2.3.3 酶法制备6-APA实验过程及数据

发酵后滤液经两次萃取转相及脱解过滤后,就进入酶罐,通过滴加3%氨水调控pH值及温控进行水解得到6-APA,副产物为苯乙酸。

2.3.3.1 青霉素G的酶解过程和数学模型

表1为青霉素G的在裂解反应时所需的各种控制环境。

图3为青霉素G的裂解反应解过程根据相关数据进行统计的曲线图示。

采用相关的措施,控制酶解反应器中的酸碱值,对青霉素、6-APA和苯乙酸进行物料衡算,可得到如下方程:

$$V \frac{dC_{PenG}}{dt} = -rE$$

$$V \frac{dC_{6-APA}}{dt} = rE$$

$$V \frac{dC_{PAA}}{dt} = rE$$

根据表1中列出的各项控制项目和参数,用相关的方法对上述方程进行解答,得到的计算结果也标注在图3上面。从图示可以明显的看出,计算结果和实验值很相近,因此根据上述数据证明所采用的模型和模型参数是正确、合理的。

表1 青霉素G的酶解条件

pH	温度 (℃)	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

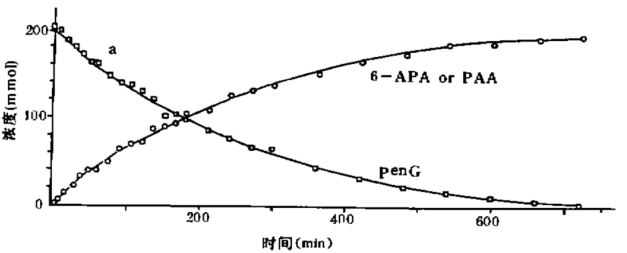


图3 青霉素水解酶解过程曲线

2.4 pH对固定化青霉素酰化酶催化6-APA合成的影响
据文献^[7]报道,在制备6-APA生产时,酶反应的最佳酸碱值控制在8.0左右,

图4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的区间范围内,所用的固定化酶活性方面能保持最大的活性值。

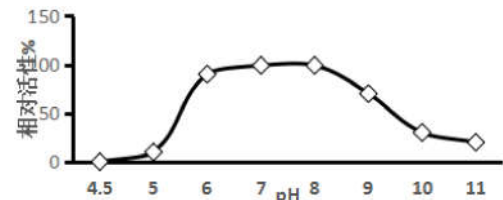


图4 pH对酶活的影响情况

pH最佳的数值为8.0左右,此时相同底物浓度和温度时酶活性高,反应速度会更快,会缩短反应时间,在相同投料比的情况下,在实际生产中的数据也是催化反应时间要比旧酶能缩短约1/3的时间,提高生产效率。

2.5 温度对固定化青霉素酰化酶催化6-APA合成的影响

下图5:显示固定化青霉素酰化酶反应在环境温度对在反应过程中活性情况的影响。不计别的因素,在反应环境温度达到37摄氏度时,所使用的固定化酶的活性能达到最高。

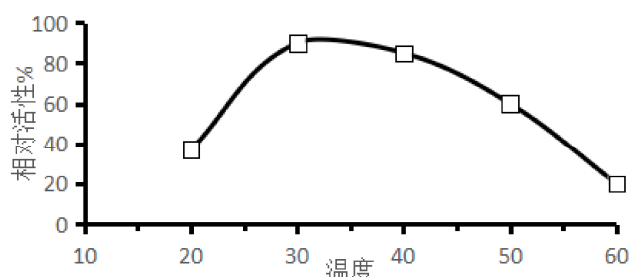


图5 温度对酶活的影响

在生产中温度最佳的数值为37℃左右,此时相同底物浓度和pH时,酶活性高,反应速度会更快,会缩短反应时间,在相同投料比的情况下,催化反应时间要比旧酶能缩短约1/5的时间,提高生产效率。

2.6 底物浓度对固定化青霉素酰化酶催化 6-APA 合成的影响

在反应中当使用的酶的加量确定的数量时,在一定的各主反应物浓度值区间内,适当增加酶解反应的底物浓度也会使酶解反应速度也有相应的加快。

但是,酶本身作为有活性的一种物质,意味它就是有生命的,也就是对活性是有限度值的,在进行催化反应时,当参与反应的各物质浓度超过一定数值限时,也就是过数量的反应底物分子会不能有效并且与催化酶进行结合,会导致在系统中所加入的过量的底物也就并不会提高相应的反应速度,在此只研究了 6-氨基青霉烷酸的浓度在20 ~ 60 mM 范围内,添加底物浓度对青霉素水解酰化酶催化 6-氨基青霉烷酸合成的影响,相关数据见图6所示。

相关资料也表明,不论是实验还是生产中,6-APA的收率随反应底物浓度的增加会先升高最后下降,通过数据汇总显示当 6-氨基青霉烷酸浓度在40mM时的收率为最大值。而当反应底物浓度低于40mM 值时,体系中参与的底物的转化率(约90%)和收率(83~88%)也接近,而6-氨基青霉烷酸浓度数值为60 mM时,所添加体系的底物的转化率和当下上标产物的收率在统计数据显示分别下降了79%和74%。相关人员^[8,9]的在此项目的研究结果也得出了在参与反应的底物在高浓度的数值下,体系中参与催化反应的方向是向利于合成方向进行。

通过上述分析,我们对产率的全面评价分析,确认底物浓度为50 mM的数值来准备下一步的反应。

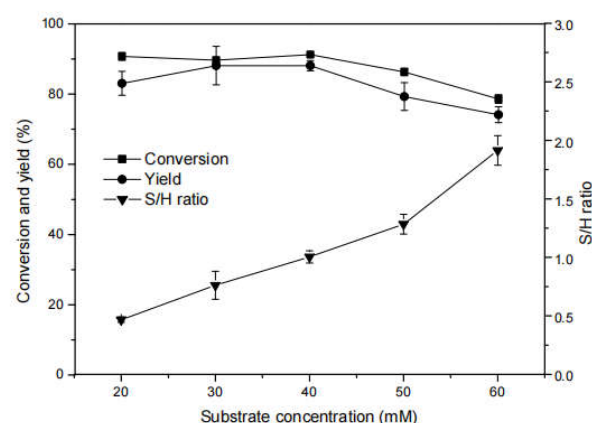


图 6 底物浓度对酶法合成 6-APA 合成的影响

2.7 设备对青霉素酰化酶催化 6-APA 合成的影响

酶反应器及其它技术^[10]选择合适的反应器,对提高 6-APA 的产量和质量非常重要。目前市场上常见的设备有搅拌釜式、柱式填充床等反应器,每种设备的优点和不足点在本文不做评价,现就在了解的国内各大生产企业已经使用的成熟的制备 6-APA 时采用的涉及相关控制技术做一简单说明。在水解用不锈钢罐式反应器中,通过罐底的不锈钢多层复合筛网将水解酶和 6-APA 及苯乙酸同反应溶液分离,减少目标产物对酶催化的抑制作用,这样能使得水解催化反应速率有明显的提高,在实际生产中的数据可以得到青霉素 G 的转化率从 92% 左右能提高到 98% 左右。在企业大生产中,从水解酶催化反应生产 6-APA,整个批次的生产过程到制得成品批用时不到 30 小时,而采用化学法用时则远多酶解法,同时产品质量和收率均高于化学法,生产效率得到了极大的提高;

2.8 酶的稳定性

稳定性直接影响批次反应次数。活性衰减过快会降低生产效率,同时也增加使用酶的成本,酶的稳定性特性也是关系到在生产中能否大量应用的关键所在。比如,水解酰化酶和化学反应用的普通化学催化剂在性质上是一样的,环境反应的温度与反应速率也是成正比的,温度高反应快。不过由于酶的组成是由蛋白质组成的,蛋白质的特性是在高温下也不稳定,它在高温条件下会死亡,反而如果将水解酶固定化后,酶的耐高温性能有一定的提高,对酶在反应及应用中会有极大提升。

2.9 结论

结合 6-APA 工业化生产的可行性和经济性,根据相关经验总结,确认对影响水解酶

催化反应制备 6-APA 过程中温度、pH、底物浓度的因素最佳控制范围:

2.9.1 温度:水解催化温度控制在 35℃~39℃ 左右,

温度太高会对水解酶活性造成损害,水解温度太低也会影响水解速度;

2.9.2 pH值控制: pH数据稳定在7.5-8.5之间,目前多数生产厂家采用滴加氨水进行控制,过碱会对水解酶活造成损害,过低不利于6-APA的转化;

2.9.3 底物浓度控制: 青霉素浓度控制在10~13万青霉素单位/L,根据实验时间在等比例浓度下水解反应时间在中等活性的酶活下约在50分钟就完成水解,转化率在98%以上。

2.9.4 结合生产设备方面: 可考虑高活性酶可缩小反应器体积,降低能耗,但需匹配反应器设计(如搅拌速度、传质效率),同时在水解反应完成后进行反应液的转移是,涉及过滤筛网的选择,要既利于料液的输送,又方便水解酶重复使用数量,降低水解酶的消耗,实现酶的使用最大经济性。因此,对反应器和反应介质的优化和创新的研究将会推动6-APA的生产。

3 前景展望

在原料药生产中使用相应的酶催化反应进行原料药的中间体的制备,也是生物化学工程与化学制药工程交叉研究的重点,随着在生物化学和化学合成技术的不断提升,酶催化技术会在化工制药企业中得到广泛的应用,尤其近年来DCS自控系统的全面推广,使用员工在操作起来更加方便简单,同时对过程的质量也减少了人为的误差,在工艺不必要的浪费时间也少了,缩短了整个过程的制备时间,提高了收率和质量,与上世纪流行的传统的化学法制备工艺过程,相比能源会节省很多和对环境污染的减少也十分明显,对整个行业来说是一项可持续绿色生态的技术革新。

参考文献

[1] Duggleby H.J., Tolley S.P., Hill C.P., et al. Penicillin

acylase has a single amino acid catalytic centre[J]. *Nature*, 1995, 373(6511): 264-268

[2] Schumacher G., Sizmann D., Haug H., et al. Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation[J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(14): 5713-5727

[3] Mcvey C.E., Walsh M.A., Dodson G.G., et al. Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 313(1): 139-150

[4] Suresh C.G., Pundle A.V., Sivaraman H., et al. Penicillin V acylase crystal structure reveals new Ntn-hydrolase family members[J]. *Nature Structural Biology*, 1999, 6(5):414-416

[5] Grulich M., Štěpánek V., Kyslík P. Perspectives and industrial potential of PGA selectivity and promiscuity[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1458-1472

[6] 崔鹏、万敏 青霉素酰化酶的生产与应用新进展 化学工业与工程技术2005年 第六期 第42卷 第6页

[7] 陈坚,固定化青霉素酰化酶水解青霉素 G的研究 无锡轻工大学学报 1995年 第二期 第14卷 第5~7页

[8] Bahamondes C., Wilson L., Aguirre C., et al. Comparative study of the enzymatic synthesis of cephalixin at high substrate concentration in aqueous and organic media using statistical model[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(4): 711-721

[9] Illanes A., Wilson L., Corrotea O., et al. Synthesis of cephalixin with immobilized penicillin acylase at very high substrate concentrations in fully aqueous medium[J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2007, 47(1-2): 72-78