

К. Р. Таранцева¹, М. И. Яхкин^{1,2}

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОЦЕСС ДВУХСТАДИЙНОГО ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ДЕЗАЦИЛИРОВАНИЯ ЦЕФАЛОСПОРИНА С С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Поступила в редакцию 02.08.12. Принята к печати 08.09.12.

Изучено влияние ряда параметров (начальная концентрация цефалоспоринона С, температура, рН обеих стадий) на процесс двухстадийного ферментативного дезацилирования цефалоспоринона С с использованием иммобилизованных ферментов для выбора оптимальных значений этих параметров. Установлено, что уменьшение давления кислорода на первой стадии окислительного дезаминирования приводит к увеличению продолжительности процесса окисления и уменьшению выходов на этой стадии и на последующих стадиях дезацилирования и осаждения. Предложены и подтверждены кинетические модели: для стадии окисления — модель линейной зависимости скорости реакции от давления кислорода, причем константа скорости K_p зависит от условий массопередачи для данной системы; для стадии дезацилирования — модель, использующая уравнение Михаэлиса – Ментен, в котором константы V_{max} и K_m также зависят от условий массопередачи. Эта зависимость связана с тем, что обе ферментативные стадии протекают в диффузионном режиме.

Ключевые слова: цефалоспорин С, 7-аминоцефалоспориновая кислота, двухстадийное ферментативное дезацилирование, иммобилизованные ферменты, кинетические модели.

7-Аминоцефалоспориновая кислота (7-АЦК, I) является ключевым промежуточным продуктом для синтеза большинства полусинтетических цефалоспоринов, являющихся наиболее применяемой в медицинской практике группой антибиотиков [1]. Антибиотики этой группы получают по схеме, аналогичной для полусинтетических пенициллинов. Известно, что ферментативным дезацилированием природных пенициллинов получают 6-аминопенициллиновую кислоту (6-АПК) [2], из которой далее получают многочисленные полусинтетические пенициллины. Подобным образом дезацилированием природного цефалоспоринона С (II) получают 7-АЦК. Однако в отличие от природных пенициллинов для цефалоспоринона С до настоящего времени не удалось найти фермент, подходящий для промышленного производства 7-АЦК одностадийным ферментативным дезацилированием [3 – 5]. Поэтому вначале были разработаны технологии производства 7-АЦК химическим дезацилированием [2, 3, 5]. Наиболее распространенный из этих

процессов включает применение весьма токсичных соединений (пятихлористый фосфор, N,N-диметиланилин, хлорсиланы) и низких температур (до -50 – -55°C). Позже была разработана технология производства 7-АЦК двухстадийным ферментативным дезацилированием [3 – 5] и уже в 2002 г. около половины 7-АЦК в мире производилось этим методом [3]. Схема этого процесса приведена на рис. 1.

Первая стадия — окисление цефалоспоринона С кислородом под действием оксидазы D-аминокислот в водном растворе; при этом удаляется аминогруппа, которая в основном и препятствует ферментативному дезацилированию.

Процесс окисления протекает в два этапа. Вначале под действием кислорода и оксидазы D-аминокислот происходит окислительное дезаминирование цефалоспоринона С и образуется α -кетоадипинил-7-АЦК (III), при этом выделяются аммиак и пероксид водорода (образуется из воды). Затем под действием пероксида водорода (без участия ферментов) происходит окислительное декарбоксилирование α -кетоадипинил-7-АЦК до глутарил-7-АЦК (IV), при этом выделяются диоксид углерода и вода (из пероксида водорода). Раствор глутарил-7-АЦК направляют на следующую стадию без выделе-

¹ Пензенская государственная технологическая академия, 440039 Пенза, проезд Байдукова, ул. Гагарина, 1а/1.

² yah@mail333.com

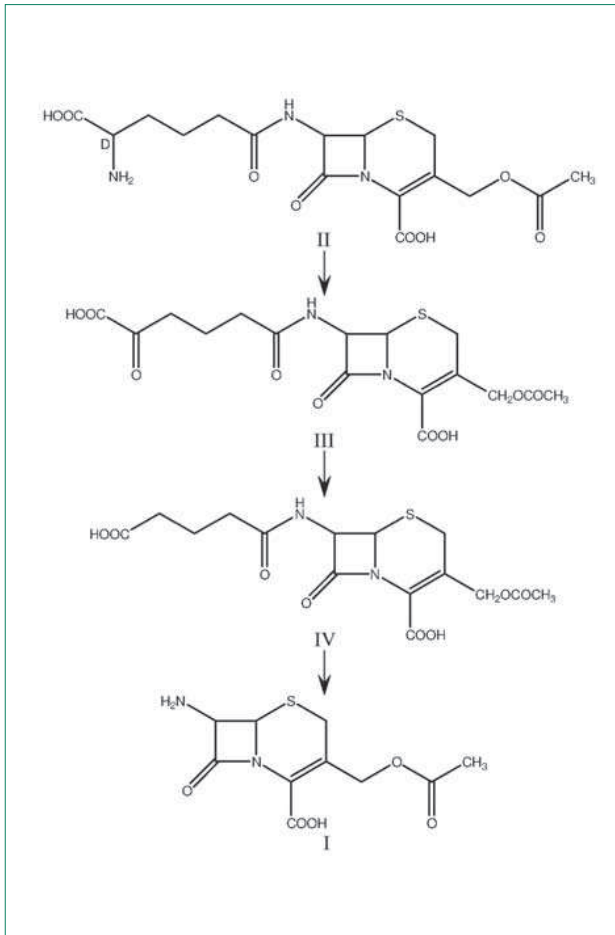


Рис. 1. Схема двухстадийного ферментативного дезацилирования цефалоспоринона С.

ния. Для того чтобы довести до конца окислительное декарбонирование и разложить пероксид водорода (который может окислить фермент на следующей стадии отделения фермента), раствор выдерживают некоторое время при перемешивании.

Вторая стадия — собственно ферментативное дезацилирование глутарил-7-АЦК под действием глутарилацилазы. При этом происходит отщепление глутаровой кислоты и образуется 7-АЦК. После отделения фермента 7-АЦК осаждают подкислением.

В промышленности на обеих стадиях данного процесса используют иммобилизованные ферменты.

Данная работа посвящена изучению влияния различных факторов на процесс двухстадийного ферментативного дезацилирования цефалоспоринона С с использованием иммобилизованных ферментов в лабораторных и опытно-промышленных условиях и разработке кинетических моделей для обеих ферментативных стадий данного процесса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали натриевую соль цефалоспоринона С (ПНИТИА, Россия) (массовая доля цефалоспоринона С-кислоты около 75 %) и коммерчески доступные иммобилизованные ферменты (Roche, Швейцария): оксидазу D-аминокислот *Trigonopsis variabilis*, КФ 1.4.3.3 (активность 24 МЕ/г влажного фермента), и глутарилацилазу *Acinetobacter* sp., рекомбинантную в *E. coli*, КФ 3.5.1.3 (активность 100 МЕ/г влажного фермента).

Эксперименты проводили в лабораторных условиях, на пилотной установке и в опытно-промышленных условиях сериями, от 5 до 8 экспериментов в каждой. Первые два эксперимента любой серии не учитывали, поскольку выход в них был ниже из-за того, что часть глутарил-7-АЦК и 7-АЦК оставалась в своих иммобилизованных ферментах (как правило, в первом эксперименте выход составлял 60 – 70 %, а во втором — 85 – 95 % от выхода установившегося процесса). В экспериментах любой серии использовали один образец каждого фермента; для компенсации механических потерь перед каждым следующим экспериментом добавляли нужное количество фермента. Загрузка ферментов составляла 2600 МЕ/л для оксидазы, 5000 МЕ/л для глутарилацилазы согласно работам [6 – 8].

Для обеих ферментативных стадий в ходе процесса отбирали пробы для анализа методом ВЭЖХ; процесс окисления проводили до остаточной концентрации цефалоспоринона С не более 1 % от начальной, процесс дезацилирования — до конечной концентрации глутарил-7-АЦК не более 5 % от начальной.

Лабораторные эксперименты

Обе ферментативные стадии проводили в стеклянных стаканах вместимостью 1 л, помещенных в термостат и закрытых фторопластовой крышкой с отверстиями для мешалки, термометра, электродов рН-метра и добавления раствора аммиака, на стадии окисления — также для барботера. Использовали специально изготовленные лопастные мешалки с плоскими вертикальными лопастями, чтобы свести к минимуму измельчение иммобилизованного фермента, скорость вращения мешалок составляла 100 – 120 об/мин.

Было проведено 4 серии экспериментов, в каждой из которых варьировали один из следующих параметров¹:

- начальная концентрация цефалоспоринона С — 30 и 40 г/л;

¹ Выбор параметров обоснован далее, при обсуждении результатов.

- рН на первой стадии 7,2, 7,5 и 7,8; на второй стадии — 7,5 и 8,1;
- температура — либо 20 °С для обеих стадий, либо 20 °С для одной из них и 30 °С для другой.

Для окисления применяли кислород под атмосферным давлением, т. е. процесс проводили при абсолютном давлении кислорода 1,0 ата, скорость подачи 0,2 об/об/мин.

Получение глутарил-7-АЦК. 20 г или 26,7 г натриевой соли цефалоспорины С (соответственно 15 г или 20 г цефалоспорины С) растворяли в 250 мл воды при добавлении 3 М раствора аммиака¹. В стакан для окисления помещали 55 ± 1 г иммобилизованной оксидазы D-аминокислот и 200 мл воды, затем раствор цефалоспорины С. Процесс проводили при перемешивании при 20 ± 1 °С или 30 ± 1 °С, подаче кислорода со скоростью 0,1 л/мин, для поддержания заданного значения рН добавляли 3 М раствор аммиака. По окончании процесса фермент отфильтровывали, полученный раствор глутарил-7-АЦК перемешивали 30 – 35 мин для полного разложения пероксида водорода.

Получение 7-АЦК. В стакан для дезацилирования помещали $25,0 \pm 0,3$ г иммобилизованной глутарилацилазы и раствор глутарил-7-АЦК. Процесс проводили при перемешивании при температуре 20 ± 1 °С или 30 ± 1 °С, для поддержания заданного значения рН добавляли 3 М раствор аммиака. По окончании процесса фермент отфильтровывали.

Осаждение 7-АЦК. Раствор 7-АЦК обрабатывали 5,0 г активного угля в течение 15 – 20 мин, отработанный уголь отфильтровывали. Процесс осаждения проводили при 3 – 5 °С. При перемешивании доводили рН до $5,5 \pm 0,1$ добавлением 20 % (по массе) раствора хлористоводородной кислоты, перемешивали 10 – 15 мин для начала кристаллизации. Далее медленно в течение 30 – 35 мин доводили рН до $4,0 \pm 0,1$. После этого добавляли охлажденный ацетон в объеме 60 % от объема раствора 7-АЦК и вновь доводили рН до $4,0 \pm 0,1$. Выдерживали суспензию 7-АЦК при медленном перемешивании в тех же условиях в течение 2,0 – 2,5 ч, затем без перемешивания в течение 16 – 18 ч. Осадок 7-АЦК отфильтровывали, промывали ацетоном в объеме 20 % от объема раствора 7-АЦК и высушивали под вакуумом при 40 ± 2 °С.

¹ Выделяющегося в ходе реакции аммиака недостаточно, поскольку часть его уносится с током кислорода.

Эксперименты на пилотной установке

Процесс проводили в том же оборудовании, что в лабораторных экспериментах, но на стадии окисления стакан помещали в специально сконструированный стальной аппарат, что позволяло проводить процесс под давлением.

Использовали параметры проведения процессов, подобранные в лабораторных экспериментах: начальная концентрация цефалоспорины С 30 г/л, температура 20 °С, рН для первой стадии 7,3, для второй — 8,0 (на стадии окисления регулирование температуры отсутствовало, но она была близкой к 20 °С).

Проведено две серии экспериментов — с использованием воздуха под давлением 2,0 ати, что соответствует абсолютному давлению кислорода 0,63 ата, и с использованием кислорода под давлением 0,3 ати, что соответствует абсолютному давлению кислорода 1,3 ата. В основном процесс проводили, как в лабораторных экспериментах, но при использовании воздуха из-за ожидаемого уменьшения скорости окисления количество иммобилизованной оксидазы было увеличено до 3100 МЕ/л, а скорость подачи воздуха — до максимально возможной, чтобы не происходило уноса реакционной массы, 2,2 об/об/мин, т.е. по кислороду 0,46 об/об/мин.

Опытно-промышленные эксперименты

Обе ферментативные стадии проводили в аппаратах АНКУМ-2М вместимостью 10 л, имеющих мешалку, встроенную систему терморегуляции и регулирования рН, а также барботер. Аппараты были снабжены специально изготовленными двухъярусными лопастными мешалками с плоскими вертикальными лопастями, чтобы свести к минимуму измельчение иммобилизованного фермента, скорость вращения мешалок составляла 200 об/мин. Остальные операции проводили в стеклянном лабораторном оборудовании.

Использовали параметры проведения процессов, подобранные в лабораторных экспериментах: температура 20 °С, рН для первой стадии 7,2, для второй — 8,1, начальная концентрация цефалоспорины С составляла 33 г/л. Для окисления применяли кислород под давлением 1,0 ати, что соответствует абсолютному давлению кислорода 2,0 ата, скорость подачи 0,2 об/об/мин.

Получение глутарил-7-АЦК. 240 г натриевой соли цефалоспорины С (180 г цефалоспорины С) растворяли в 2,8 л воды при добавлении 3 М раствора аммиака. В аппарат для окисления помещали 650 ± 10 г иммобилизованной оксидазы D-аминокислот и 2,4 л воды, затем раствор цефалоспорины С. Процесс проводили

при перемешивании при 20 ± 1 °С, подаче кислорода со скоростью $1,20 \pm 0,05$ л/мин и рН $7,2 \pm 0,1$, для поддержания рН добавляли 3 М раствор аммиака. По окончании процесса фермент отфильтровывали, полученный раствор глутарил-7-АЦК перемешивали 30 – 35 мин для полного разложения пероксида водорода.

Получение 7-АЦК. В аппарат для дезацилирования помещали 300 ± 5 г иммобилизованной глутарилацилазы и раствор глутарил-7-АЦК. Процесс проводили при перемешивании при 20 ± 1 °С и рН $8,1 \pm 0,1$, для поддержания рН добавляли 3 М раствор аммиака. По окончании процесса фермент отфильтровывали.

Осаждение 7-АЦК. Проводили так же, как в лабораторных экспериментах (количество активного угля 50 г).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние начальной концентрации цефалоспорина С

Рекомендуемая начальная концентрация цефалоспорина С — от 50 до 100 мМ [6 – 9], поэтому в наших лабораторных экспериментах использовали концентрации 30 г/л (72 мМ) и 40 г/л (96 мМ). При этом обнаружено, что при увеличении концентрации продолжительность процесса окисления увеличивается с 4,33 до 6 ч. Это можно объяснить тем, что в данных условиях скорость процесса лимитируется концентрацией кислорода в реакционной смеси. В результате наблюдается некоторое уменьшение выхода глутарил-7-АЦК — с 89 до 86 %, по всей видимости, за счет гидролиза продуктов реакции в течение этого времени. Это уменьшение выхода на первой стадии было в основном компенсировано увеличением выходов на последующих стадиях, вероятно, за счет более высокой концентрации реагентов, в результате общий выход в обоих случаях был почти одинаковый — 70,5 % для 30 г/л и 69,5 % для 40 г/л.

Кроме того, при увеличении начальной концентрации цефалоспорина С в полученной 7-АЦК с 3 до 4 % возросло содержание родственных примесей, среди которых значительную часть составляют продукты гидролиза. Поэтому было принято решение в дальнейших лабораторных экспериментах и экспериментах на пилотной установке использовать начальную концентрацию цефалоспорина С 30 г/л.

При проведении экспериментов в аппарате АНКУМ-2М начальная концентрация была увеличена до 33 г/л (79 ммоль/л), поскольку в этом случае ожидалось (и было получено) значитель-

ное уменьшение продолжительности процесса окисления и увеличение выхода. При этом содержание родственных примесей в 7-АЦК составило 2 %. Таким образом, оптимальная начальная концентрация цефалоспорина С зависит от условий проведения процесса.

Влияние рН

Используемая иммобилизованная оксидаза D-аминокислот имеет максимальную активность при рН 8 – 9, стабильность ее уменьшается при рН выше 8,5 [8]. Также при увеличении рН уменьшается стабильность продуктов реакции.

Наименьшей стабильностью отличается α -кетoadипинил-7-АЦК — при 23 °С и рН 8,0 ее разложение за 1 ч составляет 25 %, при рН 7,0 – 10 % [10]. Цефалоспорин С и глутарил-7-АЦК более стабильны — при 37 °С и рН 8,0 скорость разложения цефалоспорина С — 5,2 %/ч, глутарил-7-АЦК — 4,1 %/ч [11]. При этом стабильность как цефалоспорина С, так и глутарил-7-АЦК заметно уменьшается при рН выше 8 [12 – 14]. Поэтому был сделан вывод, что для окисления цефалоспорина С оптимальным является рН около 7,5.

В лабораторных экспериментах использовали растворы с рН 7,2; 7,5 и 7,8. При этом не было обнаружено заметных отличий по выходу на этой стадии (88 – 89 %), хотя продолжительность процесса с увеличением рН несколько уменьшалась с 4,5 до 4 ч. Исходя из того, что чем меньше рН, тем меньше скорость разложения продуктов реакции, было принято решение в последующих экспериментах использовать на этой стадии рН 7,2 – 7,3.

Используемая иммобилизованная глутарилацилаза проявляет максимальную активность при рН 8 – 9 и стабильна до рН 8,5 [8], однако использование рН выше 8 нецелесообразно и в этом случае из-за уменьшения стабильности продуктов реакции. Стабильность 7-АЦК в этих условиях практически такая же, как и глутарил-7-АЦК — скорость ее разложения при 35 °С и рН 7 и близких к нему составляет около 5 %/ч [15]. Поэтому был сделан вывод, что для дезацилирования глутарил-7-АЦК оптимальным является рН около 8.

Были проведены лабораторные эксперименты при рН 7,5 и 8,1 и найдено, что при рН 7,5 выход на этой стадии несколько ниже, чем при рН 8,1 — 86 против 89 %, также немного ниже выход на стадии осаждения — соответственно 87,5 и 89 %. Поэтому в последующих экспериментах на этой стадии использовали рН 8,0 – 8,1.

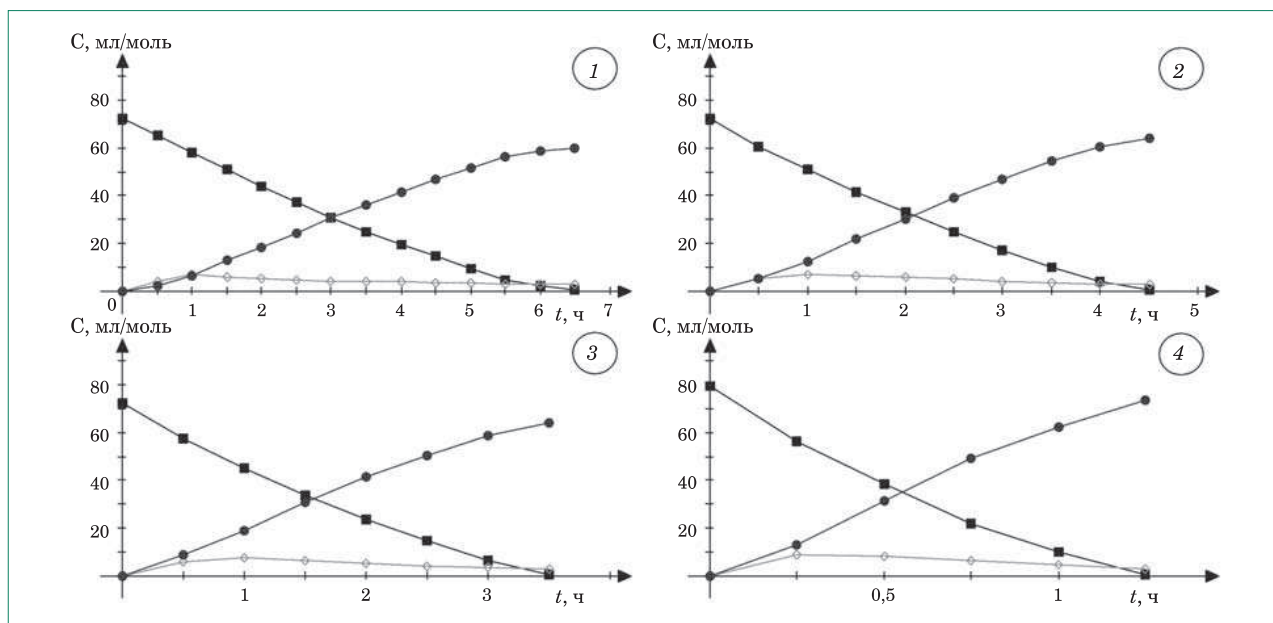


Рис. 2. Изменение концентрации реагентов в ходе процесса окисления. Здесь и на рис. 3, 4: 1 — пилотная установка, кислород 0,63 ата; 2 — лабораторные эксперименты, кислород 1,0 ата; 3 — пилотная установка, кислород 1,3 ата; 4 — АНКУМ-2М, кислород 2,0 ата. ■ — цефалоспорин С, ◇ — α-кетоадипинил-7-АЦК, ● — глутарил-7-АЦК

Влияние температуры

Активность используемой иммобилизованной оксидазы D-аминокислот возрастает при увеличении температуры до 35 °С, хотя стабильность падает при температуре выше 28 °С [8]. Активность используемой иммобилизованной глутарилацилазы возрастает при увеличении температуры до 37 °С без уменьшения стабильности [8]¹. При этом как для окисления цефалоспорина С, так и для дезацилирования глутарил-7-АЦК оптимальной следует считать температуру в диапазоне от 20 до 30 °С. Это связано с тем, что с увеличением температуры увеличивается скорость разложения всех продуктов реакции (так, для цефалоспорина С при рН 8,0 при 25 °С скорость разложения 0,5 %/ч [12], при 37 °С — 5,2 %/час [11]). А при более низких температурах уменьшается скорость реакции и увеличивается продолжительность процесса, что также может привести к уменьшению выхода за счет реакций разложения [14].

Поэтому для стадии окисления можно предположить, что увеличение температуры имеет смысл, если процесс протекает слишком медленно. Действительно, в лабораторных экспериментах было найдено, что при увеличении температуры с 20 до 30 °С продолжительность процесса уменьшилась с 4,5 до 3,5 ч, однако выход при этом уменьшился с 89 до 87 %, очевид-

но, из-за увеличения скорости процессов разложения.

Для стадии дезацилирования в лабораторных экспериментах показано, что увеличение температуры с 20 до 30 °С практически не влияет на выход (88,0 – 88,5 %).

Таким образом, по результатам лабораторных экспериментов температуру 20 °С можно считать оптимальной для обеих стадий процесса. Поэтому далее эксперименты на пилотной установке и в аппарате АНКУМ-2М проводили при этой температуре.

Влияние давления кислорода на стадии окисления

Для окисления цефалоспорина С можно использовать как воздух, так и кислород при абсолютном давлении до 5 ата [6 – 9]. Зависимость протекания всех стадий данного процесса от давления кислорода на этой стадии представляет особый интерес, однако выбор давления зависит от имеющегося оборудования. Поэтому эксперименты проводили при 4 значениях абсолютного давления кислорода: для лабораторных экспериментов и экспериментов на пилотной установке² — 0,63, 1,0 и 1,3 ата; для аппарата АНКУМ-2М — 2,0 ата.

¹ Для другой иммобилизованной глутарилацилазы компании Roche оптимальная температура 52 °С [16].

² Поскольку в экспериментах на пилотной установке использовали то же оборудование, что и в лабораторных экспериментах, здесь и далее они рассматриваются вместе как эксперименты в лабораторном оборудовании, отдельно от экспериментов в аппарате АНКУМ-2М. При этом из лабораторных экспериментов были учтены только те, которые были проведены в оптимальных условиях.

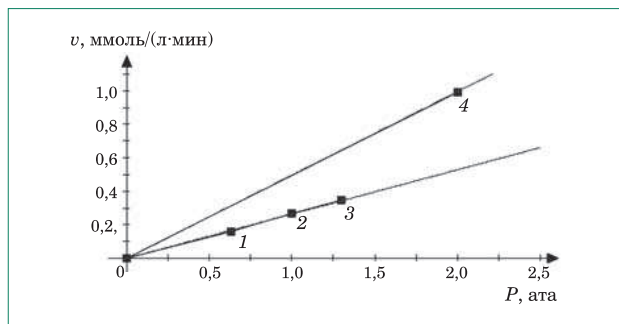


Рис. 3. Зависимость скорости окисления от давления кислорода.

При всех вариантах проведения процесса окисления концентрация цефалоспорина С убывает со временем почти линейно до практически полного исчерпания (не более 1 % от исходного) (рис. 2). Однако продолжительность этого процесса явно находится в обратной зависимости от абсолютного давления кислорода. Для аппарата АНКУМ-2М она составляет 1,33 ч при давлении 2,0 ата, для лабораторного оборудования — 3,5 ч при 1,3 ата; 4,5 ч при 1,0 ата и 6,33 ч при 0,63 ата. В результате с понижением давления кислорода происходит уменьшение выхода глутарил-7-АЦК на этой стадии, для аппарата АНКУМ-2М он составляет 93 %, для лабораторного оборудования уменьшается от 90 до 83 %, очевидно, вследствие большей степени гидролиза продуктов при увеличении продолжительности процесса.

Из-за уменьшения выхода на стадии окисления уменьшается концентрация глутарил-7-АЦК в растворе, поступающем на дезацилирование. При этом наблюдается увеличение продолжительности процесса дезацилирования и некоторое уменьшение выхода на этой стадии — для аппарата АНКУМ-2М при продолжительности 65 мин выход составляет 91,5 %; для лабораторного оборудования при продолжительности от 90 до 105 мин — от 90 до 87 %. Причины этого рассмотрены далее, при изучении кинетики ферментативных процессов (с учетом их отличия в аппарате АНКУМ-2М).

Уменьшение выходов на обеих ферментативных стадиях приводит к уменьшению концентрации 7-АЦК (в виде натриевой соли) в растворе, поступающем на осаждение. И поскольку остаточная концентрация 7-АЦК в маточнике во всех случаях практически одинакова, то это приводит к уменьшению выхода и на стадии осаждения — для аппарата АНКУМ-2М он составляет 93 %, для лабораторного оборудования уменьшается от 90 до 86 %.

В итоге общий выход 7-АЦК от цефалоспорина С уменьшается с понижением абсолютного давления кислорода на стадии окисления,

для аппарата АНКУМ-2М при 2,0 ата он составляет 79 %; для лабораторного оборудования — 73 % при 1,3 ата; 71 % при 1,0 ата; 62 % при 0,63 ата. Кроме того, параллельно наблюдается увеличение содержания примесей в конечном продукте — от 2 до 3,5 %.

Поскольку чрезмерное увеличение давления кислорода нежелательно, по этим результатам можно сделать вывод, что на стадии окисления предпочтительно использовать такое давление кислорода, чтобы продолжительность процесса была не более 1 – 1,5 ч, т.е. для аппарата АНКУМ-2М давление 2,0 ата, по всей видимости, является оптимальным.

Кинетика процесса окисления

Как было отмечено выше, при всех изученных вариантах проведения процесса окисления концентрация цефалоспорина С убывает со временем почти линейно до практически полного исчерпания (рис. 2). Нелинейностью процесса при низких концентрациях цефалоспорина С, когда уже не хватает субстрата, можно пренебречь. Это подтверждается тем, что коэффициенты корреляции R линейных уравнений прямых, построенных по точкам для графиков концентраций цефалоспорина С, приведенных на рис. 2, составили соответственно 0,992, 0,993 и 0,992 для лабораторного оборудования и 0,989 для аппарата АНКУМ-2М.

При этом продолжительность процесса окисления явно находится в обратной зависимости от абсолютного давления кислорода. Это подтверждает точку зрения, что при невысоких концентрациях кислорода в растворе данный фактор является лимитирующим и определяет общую скорость реакции окисления.

Поэтому при построении упрощенной кинетической модели для стадии окисления было предположено, что в данных условиях скорость реакции не зависит от концентрации цефалоспорина С, но прямо пропорциональна концентрации растворенного кислорода, которая, в свою очередь, прямо пропорциональна давлению кислорода¹. Следовательно, в таком случае эта реакция является реакцией первого порядка по кислороду, и при постоянном давлении в ходе процесса окисления скорость реакции также должна быть постоянной, что, собственно, и наблюдается. При этом скорость реакции v , ммоль/(л·мин), может быть выражена линейным уравнением $v = K_p P$, где K_p — константа

¹ Влияние продуктов реакции, α -кетоадипинил-7-АЦК и пероксида водорода в данном случае можно не учитывать, поскольку оба они достаточно быстро расходуются на следующем этапе этого процесса.

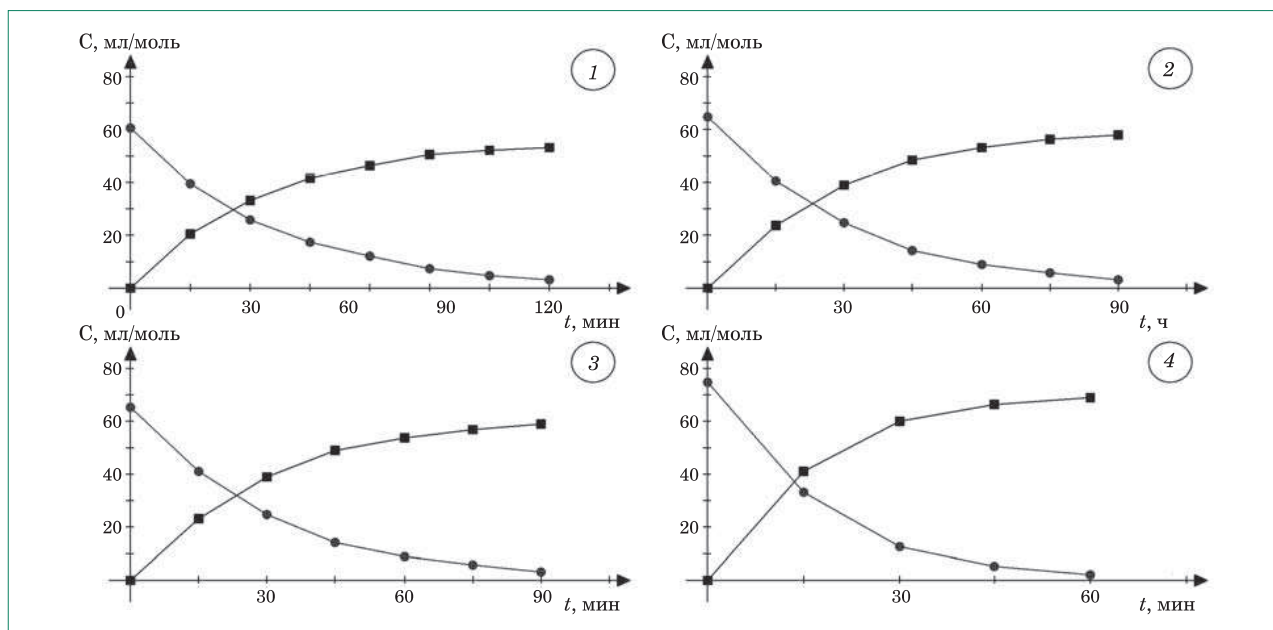


Рис. 4. Изменение концентрации реагентов в ходе процесса дезацилирования: ● — глутарил-7-АЦК; ■ — 7-АЦК

скорости, ммоль/(л·мин·ат); P — абсолютное давление кислорода, ата.

Для проверки этого предположения были рассчитаны средние скорости реакции окисления v для каждого из четырех давлений кислорода P , и по точкам 1¹, 2 и 3, которые соответствуют давлениям 0,63, 1,0 и 1,3 ата для лабораторного оборудования и началу осей координат (при отсутствии кислорода эта реакция, очевидно, не идет) была построена прямая (рис. 3). Коэффициент корреляции R соответствующего линейного уравнения равен 0,999, что подтверждает наличие линейной зависимости скорости окисления от абсолютного давления кислорода для данного лабораторного оборудования. По этому линейному уравнению была вычислена константа скорости K_p , которая оказалась равной 0,264 ммоль/(л·мин·ат). Ее также можно выразить на грамм иммобилизованного фермента (учитывая, что взято 110 г/л фермента), тогда она равна 2,40 мкмоль/(г·мин·ат).

Однако точка 4, соответствующая давлению 2,0 ата в аппарате АНКУМ-2М, не находится на этой прямой, она расположена заметно выше ее. Это связано с тем, что условия проведения процесса окисления для точек 1, 2 и 3 (лабораторное оборудование) были близки друг к другу, тогда как для точки 4 они заметно отличались.

¹ Для точки 1 при этом была сделана поправка, учитывающая, что в этом случае было взято немного больше фермента — 130 г/л против 110 г/л в остальных случаях.

В данном случае на скорость процесса оказывают свое влияние два фактора. С одной стороны, несомненно, более мощная мешалка и кольцевой барботер аппарата АНКУМ-2М обеспечивают лучшие условия массопередачи кислорода из газовой фазы в жидкую и очевидно, что при одинаковых давлениях кислорода в газовой фазе концентрация растворенного кислорода в аппарате АНКУМ-2М будет выше.

С другой стороны, известно, что катализ иммобилизованными ферментами может протекать в двух режимах: кинетическом, при котором наблюдаемая скорость определяется каталитическими свойствами самого фермента, и диффузионном, при котором наблюдаемая скорость реакции контролируется диффузией (т. е. определяется скоростью подачи субстрата к ферменту).

В данном случае предполагается, что процесс окисления идет в диффузионном режиме, и при этом условия перемешивания и массопередачи у поверхности иммобилизованного фермента также оказывают влияние на скорость этого процесса. Несомненно, что для аппарата АНКУМ-2М условия массопередачи будут лучше.

Следовательно, оба эти фактора действуют параллельно, и отсюда можно сделать вывод, что в аппарате АНКУМ-2М при всех прочих равных условиях скорость данной реакции будет выше, чем в лабораторном оборудовании.

Другими словами, константа скорости K_p зависит от условий массопередачи в аппарате, в котором проводится процесс окисления, и чем

Таблица 1. Константы V_{\max} и K_m для различных вариантов проведения процесса дезацилирования

Вариант	Давление кислорода на стадии окисления P , ата	Максимальная скорость V_{\max} ,		Константа Михаэлиса K_m , ммоль/л	Коэффициент корреляции R линейного уравнения
		ммоль/(л·мин)	мкмоль/(г·мин)		
Пилотная установка	0,63	4,0	80	129	0,986
Лабораторные эксперименты	1,0	4,6	92	128	0,989
Пилотная установка	1,3	4,9	98	138	0,990
АНКУМ-2М	2,0	9,8	196	155	0,999

лучше эти условия, тем она выше (т. е. она является характеристикой массопередачи). Для проверки этого предположения нужно определить эту константу также и для аппарата АНКУМ-2М. Для этого следовало бы провести процесс в этом аппарате при различных давлениях кислорода, но, к сожалению, у нас не было такой возможности. Однако, если провести прямую через точку 4 и начало осей координат, можно ориентировочно рассчитать константу скорости K_p для аппарата АНКУМ-2М, поделив среднюю скорость данного процесса на давление, при этом она равна 0,498 ммоль/(л·мин·ат), или 4,53 мкмоль/(г·мин·ат), т. е. почти вдвое больше, чем для лабораторного оборудования. Это подтверждает выдвинутое выше предположение.

Также следует отметить, что с увеличением давления кислорода, очевидно, будет достигнуто некоторое предельное значение $P_{пр}$, когда этот фактор перестанет быть лимитирующим, и при дальнейшем повышении давления не будет происходить увеличения скорости реакции. На графике (рис. 3) это будет выражаться в том, что сначала он начнет изгибаться, а при достижении значения $P_{пр}$ станет параллельным оси абсцисс, чему будет соответствовать отсутствие зависимости между скоростью реакции и давлением кислорода¹. В этих условиях кинетику процесса окисления нужно будет описывать другими уравнениями, например уравнением Михаэлиса – Ментен. Вероятно, это предельное значение $P_{пр}$ будет зависеть от условий массопередачи в аппарате, и чем лучше эти условия (выше константа скорости K_p), тем оно будет ниже. Однако в данных исследованиях это значение не было достигнуто.

Кинетика процесса дезацилирования

Для стадии дезацилирования, как для стадии окисления, можно предположить, что процесс

протекает в диффузионном режиме, когда условия массопередачи у поверхности иммобилизованного фермента оказывают влияние на скорость процесса. И поскольку для аппарата АНКУМ-2М условия массопередачи лучше, то при прочих равных условиях скорость дезацилирования в нем должна быть выше, чем в лабораторном оборудовании.

В первую очередь этим, а не несколько большей начальной концентрацией глутарил-7-АЦК, можно объяснить то, что в аппарате АНКУМ-2М достаточно быстро достигается конверсия глутарил-7-АЦК 97,5 %, тогда как в лабораторном оборудовании даже при большей продолжительности процесса конверсия составляет только 95 %. При этом для лабораторного оборудования можно отметить, что с уменьшением начальной концентрации глутарил-7-АЦК наблюдается как увеличение продолжительности процесса, так и уменьшение выхода — видимо, за счет большей степени гидролиза продуктов, в основном 7-АЦК. В этом случае не имеет смысла дополнительно увеличивать продолжительность процесса дезацилирования, поскольку гидролиз сводит на нет возможное небольшое увеличение конверсии.

Поскольку глутарил-7-АЦК является единственным исходным реагентом, при построении упрощенной кинетической модели для стадии дезацилирования использовали уравнение Михаэлиса-Ментен для мономолекулярных ферментативных реакций, протекающих в стационарных условиях (в реакторе перемешивания), ингибирующее действие продуктов реакции при этом не учитывается. Согласно этому уравнению скорость реакции v , ммоль/(л·мин), определяется как

$$v = \frac{V_{\max} \cdot C_{\text{ГА}}}{K_m + C_{\text{ГА}}},$$

где V_{\max} — максимальная скорость реакции, ммоль/(л·мин); K_m — константа Михаэлиса, ммоль/л; $C_{\text{ГА}}$ — концентрация глутарил-7-АЦК, ммоль/л.

¹ Согласно работе [8] в лабораторных экспериментах с 300 мл реакционной массы активность этого фермента практически перестает увеличиваться при давлении кислорода выше 2 ата.

Уравнение Михаэлиса-Ментен в целом предназначено для свободных (растворенных) ферментов; для иммобилизованных ферментов его можно применять тогда, когда процесс идет в кинетическом режиме. Когда процесс идет в диффузионном режиме, как предполагается в данном случае, каталитическая эффективность системы уменьшается, необходимо вводить поправки для учета влияния диффузии. Однако и для диффузионного режима можно вычислить значения констант V_{\max} и K_m , которые будут отличаться от таковых для кинетического режима и будут зависеть от условий массопередачи для данной системы.

Для проверки предположения, что данный процесс описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, но константы V_{\max} и K_m зависят от условий массопередачи, были вычислены значения этих констант для всех вариантов проведения процесса — трех в лабораторном оборудовании и одного в аппарате АНКУМ-2М (рис. 4).

При расчетах использовали метод Лайнуивера-Берка, в котором уравнение Михаэлиса-Ментен выражается в форме

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{C_{\Gamma A}}$$

По точкам строили прямую зависимости $1/v$ от $1/C_{\Gamma A}$ и по соответствующему линейному уравнению вычисляли константы V_{\max} и K_m . Максимальную скорость реакции также выражали в расчете на г иммобилизованного фермента (учитывая, что взято 50 г/л фермента). Результаты расчетов для всех четырех вариантов проведения процесса приведены в табл. 1.

Судя по значениям коэффициентов корреляции R , зависимость $1/v$ от $1/C_{\Gamma A}$ для каждого из вариантов достаточно близка к линейной, причем для аппарата АНКУМ-2М эта зависимость явно лучше. При этом для всех трех вариантов проведения процесса в лабораторном оборудовании константы V_{\max} и K_m достаточно близки друг к другу, тогда как для аппарата АНКУМ-2М максимальная скорость реакции V_{\max} приблизительно в 2 раза больше, чем для лабораторного оборудования, константа Михаэлиса K_m также несколько больше. Это подтверждает выдвинутое выше предположение, что в данном случае для описания процесса можно использовать уравнение Михаэлиса-Ментен, но его константы зависят от условий массопередачи. При этом максимальную скорость реакции V_{\max} можно рассматривать как характеристику массопередачи, чем лучше условия массопередачи, тем она выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы в промышленном производстве 7-АЦК из цефалоспорина С происходит постепенная замена химического дезацилирования с использованием весьма токсичных соединений и низких температур двухстадийным энзиматическим дезацилированием с использованием иммобилизованных ферментов. В связи с этим представляет интерес изучение влияния различных факторов на процесс двухстадийного энзиматического дезацилирования и разработка кинетических моделей для обеих энзиматических стадий данного процесса с целью его оптимизации.

В настоящей работе изучено влияние ряда параметров (начальная концентрация цефалоспорина С, температура, рН обеих стадий) на протекание этого процесса при использовании иммобилизованной оксидазы D-аминокислот *T. variabilis* на стадии окислительного дезаминирования и иммобилизованной глутарилацилазы *Acinetobacter* sp., рекомбинантной в *E. coli*, на стадии дезацилирования с целью выбора оптимальных значений этих параметров для лабораторных и опытно-промышленных условий.

Установлена зависимость протекания всех стадий данного процесса от давления кислорода на первой стадии окислительного дезаминирования. Показано, что чем меньше давление кислорода, тем больше продолжительность процесса окисления, что приводит к уменьшению выхода глутарил-7-АЦК на этой стадии из-за гидролиза продуктов реакции. Это далее приводит к уменьшению выходов на последующих стадиях дезацилирования и осаждения.

Предложены и подтверждены кинетические модели для обеих энзиматических стадий. Для стадии окисления это модель линейной зависимости скорости реакции от давления кислорода, причем константа скорости K_p зависит от условий массопередачи для данной системы. Для стадии дезацилирования — модель, использующая уравнение Михаэлиса-Ментен, в котором константы V_{\max} и K_m также зависят от условий массопередачи. Эта зависимость связана с тем, что обе энзиматические стадии протекают в диффузионном режиме.

Из этого следует, что в промышленных условиях необходимо обеспечить надлежащую массопередачу, чтобы получить по возможности большее значение константы скорости K_p на первой стадии и константы V_{\max} на второй (они, как показано, являются характеристиками массопередачи) для увеличения скоростей энзиматических реакций. Поэтому для каждой установки целесообразно будет провести серию экспериментов, подобных описанным выше, и

определить эти константы. Для стадии окисления также желательно определить предельное значение давления кислорода $P_{пр}$, при котором скорость реакции перестает зависеть от давления, поскольку не имеет смысла использовать более высокое давление. Однако в целом по соображениям экономии и техники безопасности следует использовать по возможности меньшее давление кислорода, но чтобы продолжительность процесса окисления была не более 1 – 1,5 ч.

При этом оптимальные рН и температура, по всей видимости, должны быть близкими к найденным в этих исследованиях, хотя могут несколько отличаться в зависимости от используемых иммобилизованных ферментов. Начальная концентрация цефалоспориноса С при быстром протекании процесса окисления может быть увеличена.

В целом можно сделать вывод, что для оптимального проведения данного процесса в промышленных условиях наиболее важными факторами являются характеристики массопередачи (которые определяются аппаратным оформлением) и давление кислорода на стадии окисления, тогда как другие рассмотренные параметры (которые можно варьировать в достаточно узких пределах) имеют меньшее значение.

СПИСОК ССЫЛОК

1. Курочкина В. Б., Ныс П. С. / Антибиот. и химиотер. 2002. Т. 47. № 2. С. 29 – 37.
2. Huber F. M., Chauvette R. R., Jackson B. G. / Cephalosporins and Penicillins, Chemistry and Biology // Ed. Flynn E. — NY: Academic Press, 1972. P. 27 – 73.

3. Barber M. S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. / Adv. Biochem. Eng. / Biotechnol. 2004. V. 88. P. 179 – 215.
4. Sonawane V. C. / Crit. Rev. Biotechnol. 2006. V. 26. P. 95 – 120.
5. Таранцева К. Р., Яхкинд М. И. / Анализ технологий синтеза 7-аминоцефалоспориновой кислоты (7-АЦК) и выбор оптимальной безопасной промышленной технологии. — М.: Научный мир, 2009. — 216 с.
6. Tischer W., Giesecke U., Lang G., Röder A., Wedekind F. / Ann. N. Y. Acad. Sci. 1992. V. 672. P. 502 – 509.
7. Conlon H. D., Baqai J., Baker K., Shen Y. Q., Wong B. L., Noiles R., Rausch C. W. / Biotechnol. Bioeng. 1995. V. 46. P. 510 – 513.
8. CC2: Twin enzyme process for the splitting of cephalosporin C. — Roche Diagnostics, 1999. — 46 p.
9. Bayer T. / Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions // Ed. Blaser H.-U., Schmidt E. — Wiley-VCH Verlag, 2004. P. 117 – 130.
10. Vicenzi J. T., Hansen G. J. / Enzyme Microb. Technol. 1993. V. 15. P. 281 – 285.
11. Binder R. G., Numata K., Lowe D. A., Murakami T., Brown J. L. / Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 3321 – 3326.
12. Konecny J., Felber E., Gruner J. / J. Antibiotics. 1973. V. 26. P. 135 – 141.
13. Alfani F., Cutarella N., Gallifuoco A., Cantarella M., Golini P., Franzosi G., Bianchi D. / Ann. N. Y. Acad. Sci. 1995. V. 750. P. 491 – 495.
14. Alfani F., Cantarella M., Cutarella N., Gallifuoco A., Golini P., Bianchi D. / Biotechnol. Lett. 1997. V. 19. P. 175 – 178.
15. Курочкина В. Б., Ларина Е. В., Ныс П. С., Лубинсон Г. С. / Антибиот. и химиотер. 1995. Т. 40. № 3. С. 3 – 9.
16. López-Gallego F., Betancor L., Hidalgo A., Mateo C., Guisán J. M., Fernández-Lafuente R. / J. Biotechnol. 2004. V. 111. P. 219 – 227.

INFLUENCE OF VARIOUS FACTORS ON THE PROCESS OF TWO-STAGE ENZYMATIC DEACYLATION OF CEPHALOSPORIN C WITH USE OF IMMOBILIZED ENZYMES

К. Р. Таранцева¹, М. И. Яхкинд^{1,2}

¹ Penza State Technological Academy. 440039, Penza, Baydukova/Gagarina, 1a/11

² E-mail: yah@mail333.com

Influence of some parameters (initial concentration of cephalosporin C, temperature, pH of both stages) on the process of two-stage enzymatic deacylation of cephalosporin C with use of immobilized enzymes to choose optimum values of these parameters was investigated. It was found that reduction of oxygen pressure in the first stage of oxidative deamination leads to increase of oxidation process duration and decrease of yields in this stage and the subsequent stages of deacylation and precipitation. Kinetic models were offered and confirmed: for oxidation stage — the model of linear dependence of reaction rate from oxygen pressure, and kinetic constant K_p depends on mass transfer conditions for given system; for deacylation stage — the model with use of Michaelis-Menten equation, in which constants V_{max} and K_m also depend on mass transfer conditions. This dependence is connected with a fact that both enzymatic stages go in diffusion mode.

Keywords: cephalosporin C, 7-aminoccephalosporanic acid, two-stage enzymatic deacylation, immobilized enzymes, kinetic models.