

色谱反应分离器中青霉素 G 的水解特性

何志敏 吴金川 韩振为 余国琮

(天津大学化学工程研究所 天津 300072)

孙万儒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

6-氨基青霉烷酸(6-APA)是半合成青霉素的关键中间体,通常采用固定床反应器在青霉素酰化酶作用下水解青霉素来制备^[1]。由于该反应是典型的产物抑制可逆反应,工业生产中需不断加碱中和苯乙酸,以维持反应在最适 pH 条件下进行。为进一步提高青霉素的水解速率,除了维持最适反应条件外,消除产物抑制具有重要作用,近年来一些研究者提出采用伴有分离作用的反应-分离组合系统水解青霉素制取 6-APA。Ishimura 等^[2]采用电渗析膜耦合式生物反应器连续移除苯乙酸,将反应速率提高了近 1 倍;陈坚等^[3]研究了固定化酶-离子交换组合系统移除苯乙酸过程。本文报道青霉素在生化反应与液相色谱分离过程相耦合而形成的色谱反应分离器中的水解特性。

1 材料与方法

1.1 试剂

青霉素 G 钠盐为注射用(华北制药厂),6-APA 为美国 Sigma 公司产品。其余试剂皆为市售,分析纯。

1.2 材料

固定化产青霉素酰化酶大肠杆菌细胞用明胶-戊二醛法制备^[4]。固定化细胞酶活力为 3.2u/g,粒度范围为 0.3~0.8mm。固定化细胞一个酶活单位(u)定义为:在 37℃ 和 pH7.8 时,每分钟催化水解产生 1 μ mol 的 6-APA 所需酶量^[1]。吸附剂为 X 型吸附树脂(南开大学化工厂),粒度范围为 0.3~0.8mm。

1.3 分析方法

6-APA 含量分析采用 PDAB 法^[5]。反应体系中各组分的浓度由高效液相色谱仪(Waters 820 Maxima)分析,色谱柱为 Waters μ Bondpak C₁₈柱,流动相为甲醇-缓冲液混合物,洗脱速率为 0.6ml/min,检测波长为 254nm。

1.4 实验方法

色谱反应分离器为 Φ 10mm \times 1500mm 带恒温夹套的玻璃柱,内填等体积的固定化细胞和吸附剂均匀混合物。流动相为 0.1mol/L、pH7.8 的磷酸盐缓冲溶液。实验时,青霉素 G 溶液由柱顶以矩形脉冲方式注入,柱底流出液经 SZ-01 型示差折射仪或 752C 型紫外分光光度计检测后收集于产品接收罐,检测器的输出信号由记录仪记录。在实验过程中,色谱反应分离柱保持 37℃ 恒温。不同时刻在柱出口处取样分析其反应液组成。

1.5 分离性能指标

本文以柱底流出曲线中 6-APA 和苯乙酸之间的分离度(R)作为描述色谱反应分离器的分离性能指标。 R 被定义为二洗脱峰中心距离与半峰宽之和的二倍。

2 结果与讨论

2.1 色谱反应分离器内各组分的浓度分布

国家教委优秀年轻教师基金及重点跟踪资助项目。

本文于 1996 年 3 月 11 日收到。

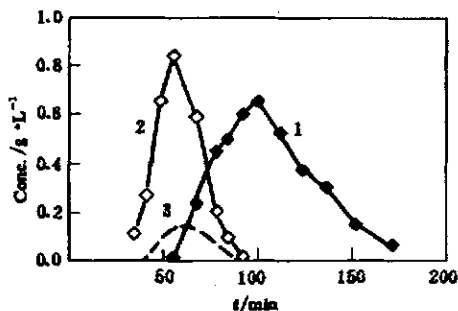


图1 色谱反应分离器流出曲线

1. 6-APA, 2. 苯乙酸, 3. 青霉素 G

影响不大, Ishimura 等^[2]通过移除苯乙酸使水解速率提高的主要原因是由于电渗析的选择性不高而使体系中 6-APA 渗出造成的。事实上, 以前提出的反应-分离组合系统均属于随程 (in situ) 分离, 而色谱反应分离器属于在反应过程中将产物瞬时分离, 从而可以最大限度地消除产物的抑制作用。

虽然本文选择的分离剂不能有效地将青霉素与苯乙酸分离, 有其不利的一面, 但鉴于青霉素水溶液在偏酸性条件下更为稳定^[9], 因而增加了青霉素的稳定性, 减少其降解为青霉噻唑酸等副产物的危险。此外, 由于 6-APA 与苯乙酸得到了较好的分离, 因此即使反应过程中由于苯乙酸生成引起 pH 发生变化, 但 6-APA 与苯乙酸结合为青霉素的逆反应速率也不会很大, 在维持适宜的缓冲能力前提下, 有可能取消滴加碱液调节反应液的 pH 值的步骤。本实验中未调节反应液的 pH 值, 但仍获得了较高的水解率。

2.2 操作条件对水解特性的影响

本文以青霉素 G 钠盐的进样浓度 $c_0 = 30\text{g/L}$ 、进样体积 $V_0 = 5\text{ml}$ 、洗脱速率 $F = 1.14\text{ml/min}$ 为基本操作条件, 研究各参数对底物转化率和产物分离度的影响。洗脱速率、进样体积、进样浓度对青霉素水解过程的影响分别示于图 2、图 3 和图 4。

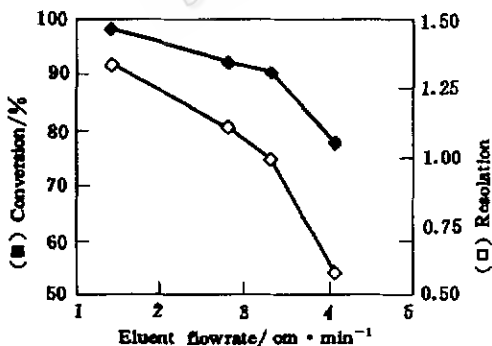


图2 洗脱速率的影响

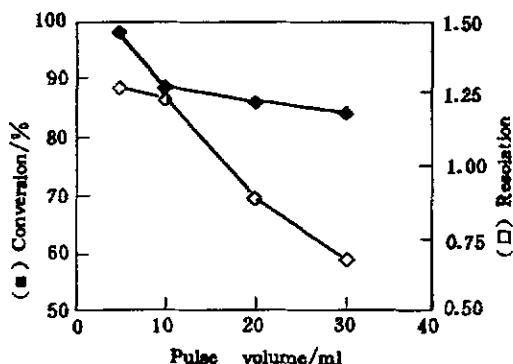


图3 进样体积的影响

由图 2 可见, 转化率与分离度都随洗脱速率的增加而减小, 这是由于增加洗脱速率减少了底物停留时间的缘故。当洗脱速率较小时, 青霉素的转化率甚至接近 98%, 此时所对应的青霉素在反应分离器内的保留时间不到 2h, 而若采用固定床反应器, 在相似条件下需要 3h 才能达到这一转化率^[4], 因此青霉素的平均水解速率提高了约 30%。由图 3 和图 4 可见, 随着进样体积或进样浓度的增加, 转化率与分离度均趋于减小, 这是由于增加进料体积或进样浓度将使反应体系的负荷增加, 因而使反应分离器的效

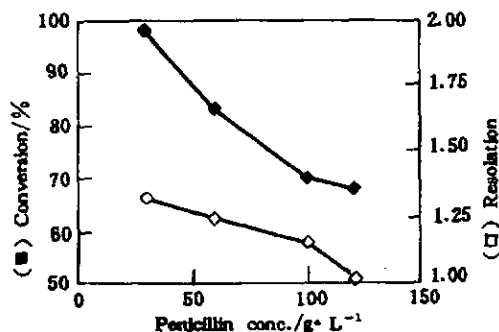


图 4 进样浓度的影响

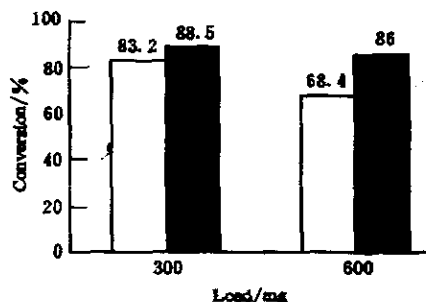


图 5 超载方式比较

■ 体积超载, □ 浓度超载。

能下降。此外,高浓度时底物及产物的抑制作用加剧,导致水解速率减慢、转化率和分离度明显下降。在色谱分离过程中,通常采用提高进样浓度或进样体积二种超载操作方式来增大处理量。在色谱反应分离器中以上 2 种超载方式对青霉素转化率的影响如图 5 所示。由图可见,体积超载较浓度超载可获得更高的转化率,且处理量越大,二者间的差别越显著。图中没有考虑产物的分离度,这是由于对青霉素水解反应而言,产物 6-APA 和苯乙酸间的分离度并不重要,因为可以通过调节水解液的 pH 值而很容易地使 6-APA 结晶出来。

参考文献

- [1] 张树政主编. 酶制剂工业, 下册, 北京: 科学出版社, 1984, pp. 719-740.
- [2] Ishimura F, Suga K I. *Biotech & Bioeng*, 1992, 39:171
- [3] 陈 坚, Omasa T, Katakura Y 等. *生物工程学报*, 1995, 11(4):343.
- [4] 孙万儒. *微生物学报*, 1980, 20(4):407.
- [5] Balasingham K. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 276:250.
- [6] 何志敏, 吴金川, 韩振为等, 第七届全国化学工程报告会论文集, 北京: 化学工业出版社, 1994, pp. 1304-1307.
- [7] Warburton D, Balasingham K, Dunnil P *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1972, 284:278.
- [8] 段 钢, 陈家镛. 第六届全国生物化学学术会议论文集, 北京: 化学工业出版社, 1995, pp. 496-500.
- [9] 华东化工学院, 沈阳药学院主编. *抗生素生产工艺学*, 北京: 化学工业出版社, 1982, pp. 295.

Hydrolysis Characteristics of Penicillin G in a Chromatographic Reactor-separator

He Zhimin Wu Jinchuan Han Zhenwei Yu Guocong

(Chemical Engineering Research Center, Tianjin University, Tianjin 300072)

Sun Wanru

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The hydrolysis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid and phenylacetic acid was carried out in a Φ 10mm \times 1500mm chromatographic reactor-separator by using 0.1mol/L pH7.8 phosphate buffer as the eluent and the mixture of immobilized cell and a microreticular resin as the stationary phase. It has been found that the hydrolysis rate can be increased obviously. Compared to the concentration overload, the volume overload can give higher conversion of penicillin, while the difference in product resolution is of little importance.

Key words Penicillin G, hydrolysis, immobilized cell, chromatographic reactor-separator