

不同反应器裂解青霉素制备 6-APA 的条件

孙万儒 王祯祥 张启先

(中国科学院微生物研究所, 北京)

苏修才

(太原制药厂, 山西)

利用固定化酶或固定化细胞裂解青霉素制备 6-APA (6-氨基青霉烷酸), 在半合成青霉素工业上有重要意义^[1-5]。但上述反应过程中, 反应液的 pH 逐渐下降, 常使反应不能正常进行, 因此研究适合的反应器和反应条件非常重要^[6,7]。基于此目的, 我们曾进行了这方面的研究^[8], 本文主要报道固定化细胞在批式搅拌桶反应器和批式循环柱反应器上裂解青霉素制备 6-APA 的条件。

材 料 和 方 法

一、材料

青霉素 G 钾盐为华北制药厂生产的产品。其它试剂均为市售商品。菌株为大肠杆菌 AS 1.76。

二、方法

固定化细胞的制备, 固定化细胞的青霉素酰化酶活力的测定, 青霉素、6-APA 的效价及裂解率的测定方法同前报^[8]。

三、反应器

1. 批式搅拌桶反应器: 其装置见图 1(1)。

反应器的安装过程是: 将固定化细胞装入套管式的尼龙袋内, 放入盛有青霉素溶液的烧杯中。烧杯置于自动滴定仪搅拌台上的 37℃ 恒温水浴中。电极和碱液滴定管插入尼龙袋的

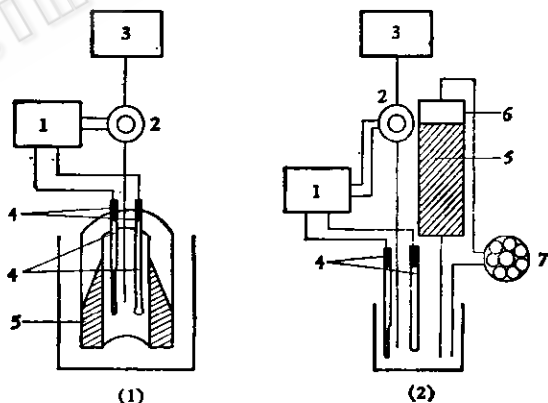


图 1 反应器示意图

1, 批式搅拌桶反应器; 2, 批式循环柱反应器。(1) pH 自动滴定仪; (2) 电磁阀; (3) 碱液罐; (4) 电极; (5) 固定化细胞; (6) 柱体; (7) 蠕动泵。

内管里。反应混合液的 pH 控制在 7.7。

2. 批式循环柱反应器: 其装置见图 1(2)。反

应器的安装过程是：将固定化细胞装在柱内（145 × 27 毫米），于 37℃ 水浴内保温，柱下端出口放入装有青霉素缓冲液的烧杯内，用导管通过蠕动泵与柱上口相连，流速由蠕动泵的转速控制。盛有青霉素缓冲液的烧杯放入自动滴定仪搅拌台上的 37℃ 水浴内，电极和碱滴定管插入烧杯溶液中，由自动滴定仪控制循环的反应混合液的 pH 在 7.7。

实验结果

一、批式搅拌桶反应器

1. 缓冲液浓度对反应混合物溶液的 pH 变化和裂解率的影响：在不加碱控制 pH 的条件下，使用不同浓度的 pH7.7 磷酸缓冲液配制 2% 青霉素溶液进行反应，定时测定反应混合物溶液的 pH 值和裂解率。结果见图 2 和图 3。

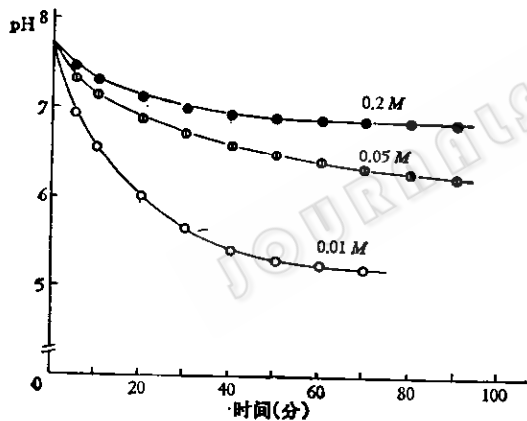


图 2 缓冲液浓度与反应混合液 pH 值变化的关系

从图 2 和图 3 可知，青霉素溶液中的缓冲液浓度越低，在反应过程中 pH 值下降的越多，裂解率也越低。

2. 加碱控制反应混合液 pH 值时，加碱量与裂解率的关系：用自动滴定仪控制滴加 2N 氨水，使反应 pH 保持在 7.7，定时测定加碱量及裂解率，结果见图 4。

图 4 表明，在低浓度（0.02M）缓冲液中，用加碱控制反应 pH 的方法，可以使反应正常进行，获得较高的裂解率。

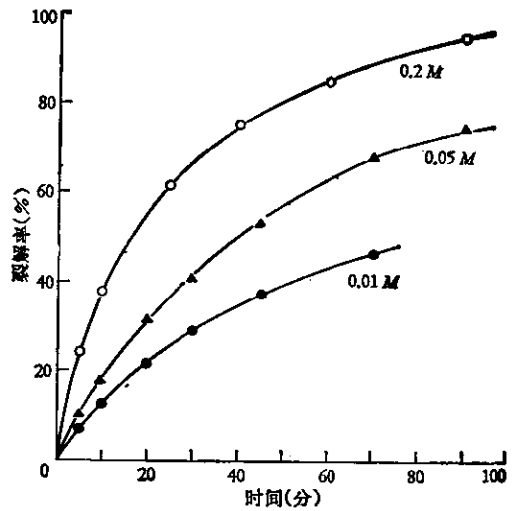


图 3 缓冲液浓度对裂解率的影响

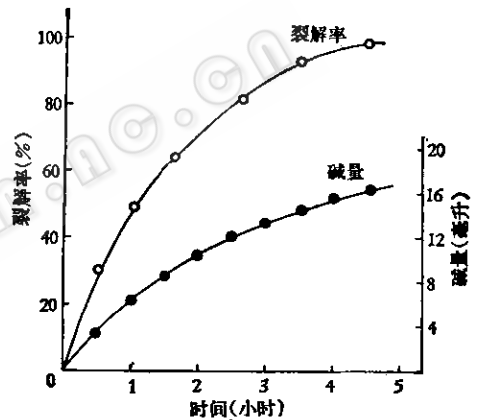


图 4 加碱量与裂解率的关系

3. 青霉素浓度的影响：用 0.02M（pH7.7）磷酸缓冲液配制不同浓度的青霉素溶液进行裂解反应，并用 2N 氨水控制反应的 pH，结果见表 1。

表 1 青霉素浓度与裂解率关系*

青霉素浓度 (%)	青霉素用量 (克)	裂解率 (%)	反应时间 (小时)
5	12	93.27	4.0
6	12	92.12	4.0
7	12	90.24	4.0

* 固定化细胞用量为 70 单位。

表 1 说明，在固定化细胞和青霉素用量不变的情况下，随着青霉素浓度的增加，裂解率略有下降的趋势。

4. 固定化细胞用量与裂解率的关系：将一定量的固定化细胞和浓度为 6% (12 克) 的青霉素溶液进行批式搅拌反应，结果见表 2。

表 2 固定化细胞用量对裂解率的影响

固定化细胞用量 (单位)	裂解率(%)	反应时间 (小时)
60	80.54	5.0
70	92.23	4.2
80	95.95	4.0
90	98.05	4.0

表 2 说明，在青霉素用量和浓度不变的情况下，增加固定化细胞用量，可使反应时间缩短，并提高裂解率。

二、批式循环柱反应器

1. 缓冲液浓度对裂解青霉素的影响：使用不同缓冲液浓度的青霉素溶液，在图 1(2) 所示的装置中，进行裂解反应，结果见表 3。

表 3 缓冲液浓度对裂解率的影响*

磷酸缓冲液 浓度(M)	空间流速 (小时 ⁻¹)	裂解率 (%)	青霉素破坏 (%)
0	54.0	43.70	5.80
0.01	31.5	88.85	0.90
0.02	27.0	89.95	0
0.04	21.0	89.30	1.0
0.06	16.2	89.88	1.8
0.08	9.0	90.38	3.3
0.10	7.2	88.96	2.0

* 固定化细胞 70 单位，4% 青霉素溶液 250 毫升，反应时间为 4.0 小时。

表 3 说明，在保持柱流出液 pH 相同 (6.7) 的条件下，即不同缓冲液浓度的青霉素溶液以不同流速进行循环裂解，柱的裂解率与缓冲液浓度无关，但在 0.01—0.04 M 的磷酸缓冲液中，青霉素破坏较少，无缓冲能力的青霉素溶液不适于裂解反应。这说明如果保持循环柱反应器的裂解率，使用低浓度缓冲液时，必需增加柱的循环使用速度。

2. 不同碱溶液对裂解青霉素的影响：用不同浓度的 NaOH 和氨水控制裂解反应的 pH，结果见表 4。实验条件同表 3。

结果说明用氨水控制裂解 pH，效果比用氢

表 4 不同种类的碱溶液对裂解青霉素的影响

名称	浓度 (N)	耗碱量 (毫升)	裂解率 (%)	青霉素破坏 (%)
NaOH	4	6.78	90.12	6.81
NaOH	2	13.13	90.53	4.33
NaOH	1	27.52	91.46	3.46
NH ₄ OH	4	6.01	92.34	2.31
NH ₄ OH	2	12.91	93.33	1.10
NH ₄ OH	1	27.91	93.06	0.48

氧化钠好。

3. 青霉素浓度与裂解率的关系：用 0.02M (pH 7.7) 磷酸缓冲液配制不同浓度的青霉素溶液进行循环裂解反应，结果见表 5。

表 5 不同浓度的青霉素溶液裂解结果

青霉素浓度 (%)	青霉素用 量(克)	青霉素溶液 体积(毫升)	裂解率 (%)	青霉素破坏 (%)
2	8.0	400	94.15	7.7
3	9.0	300	93.00	7.4
4	10.0	250	97.30	5.0
5	12.5	250	96.30	7.7
6*	15.0	250	94.46	7.5

* 该条件下实际反应 6 小时，其它为 4 小时

结果表明，此反应器最适的青霉素浓度为 4—5%。

4. 柱流出液的 pH。流速和青霉素裂解率的关系：用蠕动泵调节柱循环速度，测定柱开始循环时流出液的流速和 pH，保持流速不变，进行反应，记录达到 90% 裂解率所需的时间，结果见图 5 和图 6。

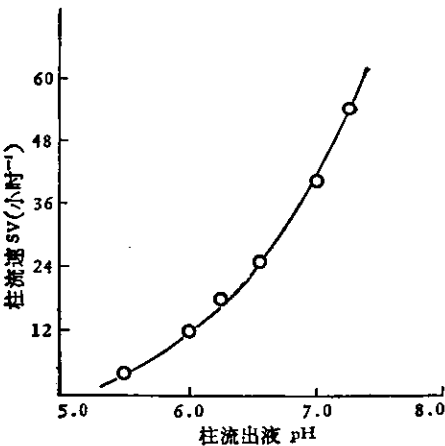


图 5 柱流速与流出液 pH 的关系

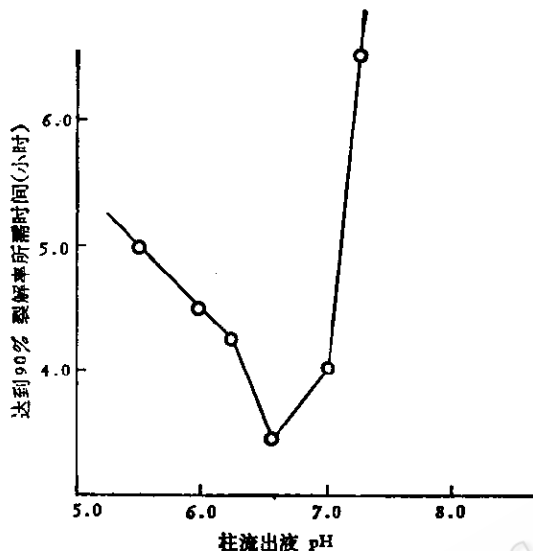


图6 柱流出液 pH 与反应时间的关系

结果说明,保持柱流出液 pH 在 6.3—7.0 或空间流速为 18—24 小时⁻¹,青霉素裂解率最高,所需时间最短。

讨 论

批式循环柱反应器中的固定化细胞,在最适条件下,单位酶活力在单位反应时间内,裂解青霉素的量略低于批式搅拌反应器。说明在搅拌桶反应器的反应过程中,由于充分的搅拌,固定化细胞的扩散阻力小,反应速度快,因而效率也较高。

从固定化细胞的稳定性来看,批式循环柱反应器比搅拌桶反应器优越。搅拌桶反应器的固定化细胞是装在尼龙纱袋中,不会因为搅拌而造成机械损伤,但在反应中加碱调节 pH 时,由于局部的碱浓度过高,引起酶失活,因此稳定性略差。而用循环柱反应器进行反应时,固定化细胞与反应液是分开的,所以加碱造成的酶活力破坏较少。

批式循环柱反应器在较高流速下进行循环使用时,起到了类似搅拌的作用,减小了扩散阻力,提高了反应速度,但过高的循环速度,会使反应液发生“路过”现象,降低反应器的效率。

参 考 文 献

- [1] Ryu, K. J. et al.: *Ferment. Technol. Today*, (ed. by Terul, G.), Soc. *Ferment. Technol.* Osaka, Japan, 307—314, 1972.
- [2] Savidge, T. A. et al.: *German Patent*, 2336829, 1974.
- [3] Lagerlöf, E. et al.: *Production of 6-Aminopenicillanic Acid with Immobilized Escherichia Coli Acylase*, *Methods in enzymology*, 44: 759—768, Academic press, New York, 1976.
- [4] Dinelli, D.: *Process Biochemistry*, 7: 9—12, 1972.
- [5] Tadashi, S. et al.: *Europ. J. Appl. Microbiol.*, 2(3): 153—160, 1976.
- [6] Karanch, N. G. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 1(3): 139—144, 1979.
- [7] Carleysmith, S. W. and M. D. Lilly: *Biotechnol. Bioeng.*, 31(6): 1057—1073, 1979.
- [8] 孙万儒等: *微生物学报*, 20(4): 1980 年。