

编 号: 0137

内 部

科学技术成果报告

固定化酶法制备6-氨基
青霉素烷酸的研究

科学技术文献出版社

科学技术成果报告

固定化酶法制备6-氨基青霉素烷酸的研究

(内部发行)

编辑者: 中国科学技术情报研究所

出版者: 科学技术文献出版社

印刷者: 中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

开本: $787 \times 1092 \frac{1}{16}$ 印张: 0.75 字数: 21千字

1979年11月北京第一版第一次印刷

科技新书目: 144—13 统一书号: 15176·

定价: 0.15元 印数: 1—2150册

1979年11月出版



目 录

一、概况	(1)
二、实验	(1)
1. 产生菌菌种的筛选	(1)
2. 消灭杂菌用药的筛选	(5)
3. 菌体细胞固化剂的选择	(5)
三、固定化酶和6-APA的试产	(9)
1. 固定化酶的制备	(9)
2. 6-APA的制备	(10)
四、结论	(11)
五、参考资料目录	(12)

固定化酶法制备 6-氨基青霉素烷酸的研究

上海医药工业研究院
中国科学院微生物研究所
太原制药厂

中国科学院生物化学研究所
上海第三制药厂
河北制药厂

一、概 况

6-氨基青霉素烷酸 (6-Aminopenicillanic acid简称: 6-APA) 是研试和生产各种半合成新青霉素的一个关键性中间体。

青霉素应用于医疗至今已有四十余年的历史。由于抢救某些危急传染病如肺炎、脑膜炎等的功效显著, 因此受到人们广泛的重视。为了克服青霉素治疗疾病范围狭隘、容易产生耐药性或过敏性等方面的缺点, 必须在青霉素类产品中寻找一些抗菌谱广、能耐酸、对某些顽固性病菌作用敏感的新品种。为加速这些新品种的试制和投产, 大量供应6-APA这一中间体显得非常重要。

6-APA的生产工艺有化学裂解法和酶化裂解法两种。根据我们试验研究的结果, 认为化学裂解法工艺步骤多、设备要求严、原材料耗损大、生产成本低、污染环境严重。酶化裂解法又可分菌体细胞破碎后的酶蛋白固相化法(简称: 固相酶法)及菌体细胞不破碎的酶蛋白固相化法(简称: 细胞内固相酶法或固定化酶法)两种。其中, 后者具有方法简便、稳定、高效、耗费少及成本低等优点。因其基础原料为青霉素 G, 所以又可命名为固定化青霉素酰化酶法。

二、实 验

产生酶的优良菌种选育、菌体细胞的酶固定及防止影响酶活力的杂菌污染是酶化裂解法首先必须解决的关键性问题。通过一系列的研究, 取得了许多符合我国实际情况的具有特色的成果。

1. 产生菌菌种的筛选

(1) 青霉素G酰化酶产生菌的初筛:

对 9 个属的 232 株细菌, 进行了培养并测定了青霉素酰化酶的活性, 结果见表 1。

筛选结果发现能产生青霉素酰化酶的菌种只有 19 个菌株, 而且全在大肠杆菌中。同时, 用了两种不同的培养基培养的结果也相同。

(2) 青霉素G酰化酶产生菌的复筛:

对上述初步选出的 19 株大肠杆菌, 又进行了复选, 结果见表 2。

从表 2 可看出 AS1.76 和 E110 为最优菌株, 其余菌株产酶趋势大致相同 (AS1.129 和 AS1.590 是营养缺陷)。

从表 2 同时可以看出培养时间由 48 小时缩短为 40 小时, 除个别菌株 (如 E73) 的酶活显著不足外, 大多菌株反显较高。

表 1

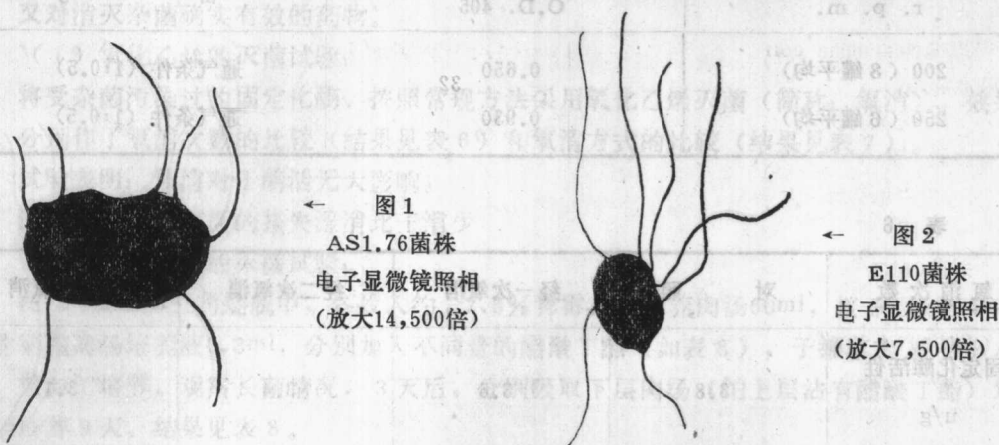
微 生 物 名 称	株 数	产生酰化酶的菌株数
大肠杆菌 Escherichia coli	168	19
假单胞菌 Pseudomonas	32	0
粪产碱杆菌 Alcaligenes faecalis	4	0
产气杆菌 Aerobacter sp.	6	0
节杆菌 Arthrobacter sp.	2	0
微球菌 Micrococcus sp.	2	0
巨大芽孢杆菌 Bacillus megaterium	6	0
变形杆菌 Proteus sp.	1	0
褐色球形固氮菌 Azotobacter chreococcus	11	0
总 计	232	19

表 2

菌 号	合 成 培 养 基		牛肉汁培养基
	40小时	48小时	48小时
AS 1.76	0.643	0.493	0.460
AS 1.96	0.416	0.295	0.341
AS 1.129	—	—	0.285
AS 1.353	0.472	0.296	0.238
AS 1.439	0.448	0.294	0.253
AS 1.590	—	—	0.200
大 3	0.439	0.239	0.239
大 31	0.448	0.365	0.394
E 33	0.504	0.244	0.311
E 38	0.417	0.233	0.207
E 42	0.433	0.171	0.246
E 73	0.108	0.218	0.329
E 100	0.497	0.273	0.292
E 104	0.433	0.189	0.280
E 110	0.627	0.493	0.354
E 116	0.197	0.040	0.077
E 136	0.539	0.168	0.035
E 148	0.246	0.207	0.196
B 10	0.262	0.097	0.160

(3) 两种最优菌株的形态观察:

对筛选获得的最优菌株AS1.76和E110通过电子显微镜放大, 其形态见图1及图2:



(4) 酰化酶活力分布的探索:

培养后的发酵液经离心分离得菌体与上清液, 复加与发酵液相等的磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution 简称PBS) 制成混悬液, 分别用6-硝基-3-苯乙酰胺基苯甲酸 (6-Nitro-3-Phenyl acetamidobenzoic acid简称NIPAB) 测定其酶活, 结果如表3。

表 3

菌 株 号	菌 体 细 胞 O.D. 420	分离菌体后的上清液 O.D. 420
AS 1.76	0.263	0
E 110	0.275	0.056

表 4

通 气 量	酶 活 力 O.D. 405	备 考
1:0.35 (3 罐平均)	0.867	NIPAB法测定
1:0.5 (6 罐平均)	0.530	NIPAB法测定
1:0.93 (4 罐平均)	0.682	NIPAB法测定

结果证明: 分离菌体后的上清液中几乎不存在活力。

(5) β -内酰胺酶的检查:

用薄层层析法分别对菌体及其上清液检查了 β -内酰胺酶, 均未发现。

(6) 通气量对酶活的影响:

在发酵过程中, 观察了不同通气量对酶活产生的影响, 见表4。

结果证明: 以1:0.5为好, 过大对酶活产生不利。

(7) 搅拌速度对酶活的影响:

表 5

搅 拌 速 度 r. p. m.	酶 活 力 O.D. 405	备 考
200 (3 罐平均)	0.650	通气条件 (1:0.5)
250 (6 罐平均)	0.930	通气条件 (1:0.5)

表 6

氧 消 次 数	对 照	经一次氧消	经二次氧消	经三次氧消
固定化酶活性 u/g	3.8	3.6	3.4	3.1

表 7

氧 消 方 式	湿 消	干 消
固定化酶活性 u/g	3.7	3.3
	3.6	3.4

表 8

杂 菌 编 号	醋酸丁酯浓度 (%)	肉汤培养三天划碟培养 9 天 杂菌结果
78-8	1	—
78-8	2	—
78-8	3	—
78-8	4	—
78-8	5	—
78-3	3	—
78-4	3	—
78-5	3	—
78-6	3	—
78-7	3	—
78-8-1	3	—
78-8-2	3	—
78-8-3	3	—

在发酵过程中, 又观察了不同的搅拌速度对酶活产生的影响, 见表 5。

结果证明: 以250r.p.m. 为最好。

2. 消灭杂菌用药的筛选

用酶制备的产品往往易被杂菌污染。为了保证生产的正常进行,筛选了既对酶活无影响、又对消灭杂菌确实有效的药物。

(1) 氧化乙烯的灭菌试验:

将受杂菌污染过的固定化酶,按照常规方法采用氧化乙烯灭菌(简称:氧消),效果良好。分别作了氧消次数的比较(结果见表6)和氧消方式的比较(结果见表7)。

试验表明:氧消对于酶活无大影响。

试验表明:对酶活的损失湿消比干消少

(2) 醋酸丁酯的灭菌试验:

在13个250ml三角烧瓶中,各投入约含2.5%青霉素的营养肉汤60ml,接种培养8小时后的杂菌肉汤培养液0.3ml,分别加入不同量的醋酸丁酯(如表8),于摇床上振荡3小时后,放37°C培养,观察长菌情况,3天后,分别吸取下层肉汤(怕上层沾有醋酸丁酯)划碟继续培养9天,结果见表8。

试验表明:生产上采用3%醋酸丁酯灭菌,平时采用1%预防,均取得了杂菌全被消灭的理想效果。

(3) 利福平等抗菌素的组合灭菌试验:

混合几种不同抗菌素的不同含量进行灭菌试验,结果见表9。

试验表明:以第3组合为最有效,即抗菌素类药物的组份按利福平、合霉素、抗敌素、新霉素各0.005%配合的药物对消灭杂菌的效果为最好。

(4) 硝酸苯汞等化学药品的灭菌试验:

观察几种化学药品单独的灭菌浓度与对酶活的影响,结果见表10。

试验表明,灭菌效果以前三种和最后二种较好,但最后二种对酶活有影响,不可取。

3. 菌体细胞固化剂的选择

查酶的固定化载体,国外已见采用的有:三聚氰氰化DEAE-C(英国)、聚丙烯酸树脂XAD-7(英国)、Sephadex G-200(瑞典)、丙烯酸与马来酸酐的共聚物(西德)、三醋酸纤维(意大利)、膨润土(美国)、聚丙烯酰胺凝胶(日本)等。其中除日本是包埋菌体细胞的方法外,其余都是要将菌体细胞先破碎、后提酶、再固化到载体上的。

表 9

组 合 编 号	利福平	硝基呋喃 丙烯酸	合霉素	抗敌素	新霉素	洁尔灭	甲醛	杂菌生长
1	0.005	0.005	0.005	0	0	0.1	0	3.5
2	0.005	0.005	0	0.005	0.005	0.1	0.1	0.6
3	0.005	0	0.005	0.005	0.005	0	0	0.5
4	0	0	0	0	0	0	0.1	4
5	0	0.005	0.005	0	0.005	0	0.1	7
6	0	0.005	0	0.005	0	0	0	2
7	0	0	0	0.005	0	0.1	0.1	0.9
8	0	0	0.005	0	0.005	0.1	0	8.5
对 照	0	0	0	0	0	0	0	8.5

表 10

试验项目 药品名称	灭菌浓度 (%)		灭菌后测定固定化酶的活力 (u/g) PDAB法				
	一般	最低有效浓度	浸泡浓度 (%)	1天	3天	15天	55天
硝酸苯汞	0.05	≤0.005	0.05	3.6	3.8	3.3	3.5
洗必泰	0.05	0.01	0.05	3.9	3.6	3.3	4.1
对氯苯酚	0.1	0.02	0.1	3.8	3.4	3.2	3.5
苯甲醇	0.5	0.3					
苯酚	1.0	0.1					
过氧乙酸	0.5	0.05	0.05	0.75	—	—	—
二氯异氰尿酸钠		0.005	0.05	2.3	—	—	—
对 照				3.7	3.6	3.6	3.5

表 11

明胶浓度 (%)	固 化 过 程	固化后机械强度	酶的回收率 (%) (固化后再磨碎)
5.0	慢	软	61.4
7.5	一般	较软	—
10.0	较快	富有弹性, 较好	61.1

表 12

菌体量(g)与10% 明胶量(ml)之比	固化后酶活力 u/g (湿重)	酶回收率 (%) (固化后)	酶回收率 (%) (固化后再磨碎)
2:1	1.8	32	68.2
1:1	1.8	34.9	52.2
0.5:1	1.1	41	54.5

表 13

25%戊二醛加入量 (ml)	固化后机械强度	固化后酶活力 u/g (湿重)	酶回收率 (%) (固化后)
1.0	硬	5.55	55.4
0.5	较硬	6.15	63.15
0.25	不凝固	—	—

我们采用了类似日本但又不全同日本的方法。

(1) 明胶浓度的选择:

每菌体10g加不同浓度的明胶溶液，在40℃水浴上搅匀，加25%戊二醛 0.5ml 使凝固，放入4℃以下的冰箱过夜使冷冻，次日取出，过10目筛网成型为 ϕ 2mm颗粒，蒸馏水洗清，用NIPAB法测定其酶的活力，结果见表11。

试验结果表明：明胶浓度以10%为最好。

(2) 菌体用量的选择：

对一定容量的10%明胶溶液与不同重量的菌体相比，进行筛选试验，结果见表12。

试验结果表明：10%明胶与菌体的配比以2:1为最好，其所得物的酶活力及酶回收率（用NIPAB测定）均较高；但又表明在菌体本身酶的活性大时，采用1:1的配比更为恰当。

(3) 戊二醛用量的选择：

按上述试验结果，取菌体与明胶以最优比例配合（菌体10g加10%明胶5ml），40℃水浴搅匀，分取多份，在凝固与冷冻前，先分别加不同量的25%戊二醛进行交联，待凝固后，再放入4℃以下冰箱冷冻过夜，次日取出制成颗粒，水洗，用NIPAB测定活力，结果见表13。

试验结果表明，对菌体10g与10%明胶5ml计，配以25%戊二醛0.5ml进行交联的为最好。

(4) pH值对交联效果的影响考察：

为了探测配制明胶溶液的pH值对固定化酶活力有无影响的问题，作了一些比较试验，结果见表14。

试验结果表明：交联的pH值，只与菌体的凝固速度有关，而对酶的活性关系不大，故可以用蒸馏水配制。

(5) 放置温度的影响考察：

对经过用10%明胶凝固及25%戊二醛交联后的菌体，分别在室温及冰箱放置20小时后，分别用NIPAB测定活力进行比较，结果见表15。

表 14

pH 值	菌体凝结过程	固化后酶活力 (u/g, 湿重)	酶回收率 (%) (固化后)
3	慢	5.12	51.09
5	较慢	4.87	49.67
7	较快	5.58	54.48
9	快	4.89	48.81

pH3及pH5系以0.2M醋酸缓冲液平衡

pH7及pH9系以0.2M磷酸缓冲液平衡

表 15

20小时放置温度	固化后酶活力 (u/g)	固化后酶回收率 (%)
31℃ (室温)	2.16	55.4
4℃ (冰箱)	2.30	61.4

试验结果表明：以低温放置为好。

(6) 放置时间的影响考察：

按上述各项试验结果，取最优条件配制后的固定化酶，在4℃下观察放置不同时间对酶活力的影响，结果见表16。

试验结果表明：放置一夜是可取的。

(7) 冰冻时间的影响考察：

配制固定化酶的最优条件如上，而在交联后再行冰冻（-15℃）不同时间，进行比较，结果见表17。

试验结果表明：冰冻7天以上较为理想，显示易脱水、不粘结、机械强度高、酶活（NIPAB测定）表现性能好等优点。

(8) 再次交联的试验：

对冰冻处理后制得的固化物，每5g干粒再分别加入不同量的14%戊二醛，并各加蒸馏水补足到10ml浸泡过夜，水洗净后，以NIPAB法测定酶活进行比较，结果见表18。

表 16

放置时间 (4℃)	固化后的酶活力 (u/g)	备 考
1.5小时	1.006	酶活力用NIPAB测定
3.0小时	1.03	
5.0小时	1.05	
一夜	1.008	
一天二夜	0.78	

表 17

冰冻天数 (-15℃)	固化后色泽	固化后机械强度	固化后活性表现
1	浅 ↓ 深	差 ↓ 强 多孔, 海绵状	低 ↓ 高
2			
3			
4			
5			
6			
7			

表 18

14%戊二醛用量 (ml)	补足蒸馏水用量 (ml)	14%戊二醛实际耗量 (ml)	经14%戊二醛处理后的固定化酶		
			活性 (u/g)	回收率 (%)	机械强度
0.2	9.8	0.16	3.4	91.1	硬度逐步增加 ↓ 脆
0.4	9.6	0.305	3.3	88.5	
0.6	9.4	0.40	3.1	83.1	
0.8	9.2	0.568	3.1	83.1	
1.0	9.0	0.675	3.2	85.8	

试验结果表明：对5g干粒，以加14%戊二醛0.4ml（折合25%戊二醛0.25ml）进行再次交联较为理想——坚固结实，活性合适。

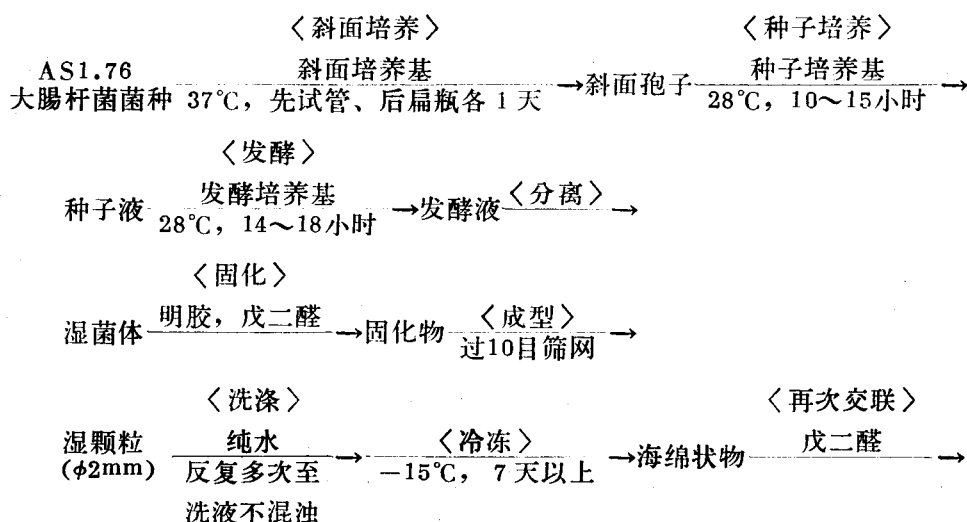
三、固定化酶和6-APA的试产

制备6-APA所必需的菌种、固化剂、灭杂菌用药以及生产设备和鉴定方法，经过了前述一系列的试验研究之后，又通过小量和中量的试产，为今后大量投产提供了可靠的依据。

现在根据中试的经验，将我国制备6-APA的新工艺综合说明于下：

1. 固定化酶的制备

工艺流程



固定化酶

操作要点

（1）斜面培养：

配制斜面培养基：取带鱼蛋白胨（简称：鱼胨）2%，氯化钠0.5%，苯乙酸0.2%，琼脂2.5%。用水溶解后，121℃灭菌30分钟，放置成斜面（分试管及扁瓶）。待培养基表面干燥至无冷凝水时，即可取预先已经选育好并保存于4℃牛奶冷冻管中的大肠杆菌菌种（AS1.76或E110），接种在斜面上，先试管，后扁瓶，于37℃各培养一天，得成熟之斜面孢子。（如不即用，须暂存于4℃下冰箱中！）

（2）种子培养：

配制种子培养基：取鱼胨1%，氯化钠0.5%，苯乙酸0.2%，泡敌0.03%。用水溶解，以液碱调pH至6.5后，投入容积为50l的不锈钢制种子罐（或容积为150ml的玻璃摇瓶）。于121℃、灭菌30分钟，放冷至室温，接入斜面孢子（每50l种子罐加一个扁瓶斜面孢子）。开动搅拌（转速300r.p.m.，摇床为180r.p.m.），通气（气量为1:1，如为150ml摇瓶装量30ml），保温28℃，培养10~15小时后，得种子液。取样测定效价应达0.3~0.4u/ml。移种前pH值应上升至8.0左右，色泽应转为淡咖啡色，带有臭味。

（3）发酵培养：

发酵培养基的成份及pH值，同种子培养基。发酵罐不锈钢制，容量为1T。接种量为

5%，通气量为1:0.5，保温28℃，培养14~18小时后，得发酵液。取样测定效价应达0.13~0.17u/ml，取样用15,000r.p.m.试管离心机沉淀，应得菌体0.8g/100ml（湿品）。

（4）菌体固化：

取所得之大肠杆菌菌体（湿品）10kg，加10%明胶溶液5l，在40℃水浴上（或夹层蒸汽加温）搅拌均匀后，立即加25%戊二醛0.5l使之凝固，于室温放置2小时后，即移置于4℃以下冷藏过夜。

（5）颗粒成型：

次日取出凝固物，切成薄片，过10目筛网，制成颗粒状物，用蒸馏水或无离子水（以下简称纯水）反复漂洗多次，至洗液不显混浊为度。然后装在无毒性的塑料薄膜袋内，放入冰库，于-15℃以下冷冻7天以上，取出，化冻，脱水，应得多孔的海绵状物。

（6）再次交联：

所得多孔的海绵状物，即用纯水反复清洗数次并甩干后，再加25%戊二醛0.25l及纯水15l浸泡一夜，再一次增加其机械强度。次日取出，分离，去戊二醛残液，再用纯水清洗后，即可分装于各层筛筐，放入固定化酶柱内供下一工序使用。

固定化酶柱采用不锈钢制，直径0.7米，高1.6米，内附有孔筛筐12层（供分装湿固定化酶130kg用），外附pH调节罐、热水罐及热水循环泵、碱液及碱液循环泵、流量计、温度计等。

固定化酶的质量鉴定（NIPAB法测定酶的活性）

试液准备：取0.05M-PAB（pH=7.5）500ml，加NIPAB0.45g，配成浓度为0.9mg/ml的试液。

检液准备：取固定化酶样品，同样以0.05M-PAB（pH=7.5）配成浓度为8mg/ml的检液。

活性测定：取检液1ml，先加试液2ml，在水浴上37°反应数分钟后（时间长短取决于显色程度，一般约10分钟），加5%碳酸钠液2ml，停止反应，用751型分光光度计于405nm波长处测定其光吸收值，然后查找按同样方法测定的标准曲线求得样品的酶活性单位。另取同样检液，先加5%碳酸钠液，后加试液，用量也均相同，作空白试验，对照校正。

注意事项：若检品为发酵液或菌体，显混浊时，则可在加5%碳酸钠液停止反应后，再加等量乙醇，搅匀，过滤，取澄清之滤液供比色，并于计算活性单位时乘以2即得。

若无751型分光光度计时，可用721型的代之，但波长宜选择在420~430nm处。

酶活力单位1u指1分钟内水解NIPAB1微克分子所需的青霉素酰化酶的量。固定化酶的活力一般应为2~2.5I.u/g，回收率应为20~30%。

2.6-APA的制备

工艺流程

〈裂解〉

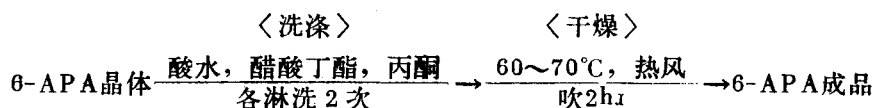
青霉素G钾盐 $\xrightarrow[\text{pH7.5~7.8, 40℃, 反应3小时}]{0.038\text{M—缓冲液, 2N-NaOH, 固定化酶}}$ 裂解液

〈浓缩〉

〈结晶〉

薄膜蒸发 $\xrightarrow[\text{真空620~700mm/Hg}]{\text{薄膜蒸发}}$ 浓缩液 $\xrightarrow[\text{搅拌1hr, 静置3hr}]{\text{醋酸丁酯, 盐酸, 10℃, pH3.8~4.1}}$

流量180~200l/hr



操作要点

(1) 裂解:

取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 6.75kg及磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.75kg, 加纯水650l, 配成 $\text{pH}=7.5$, 浓度 $=0.038\text{M}$ 的缓冲液, 利用循环泵使之反复循环通过固定化酶柱, 同时开动热水循环泵使缓冲液加温至 40°C , 然后投入青霉素钾盐20kg, 并用 2N-NaOH (约28l) 调 pH 至 $7.5\sim 7.8$, 继续控温 $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 循环, 进行裂解反应, 循环流速控制在 4T/时 , 至用对一二甲基苯甲醛 (Para-dimethyl aminobenzaldehyde简称PDAB) 法测定裂解液所含6-APA浓度、确定终点为止。在正常情况下, 一般约需反应3个小时。

反应完毕, 放出反应液, 约可得300l, 应再加纯水700l, 以 1T/时 的流速顶入酶柱内进行洗脱, 洗脱液与反应液合併, 共约1,000l。

(2) 浓缩:

取上述裂解反应液, 以薄膜蒸发器进行浓缩。约可得浓缩液140~150l, 用PDAB法测定6-APA的含量至达 18u/ml 为度。

蒸发器的汽压应控制在 $0.4\sim 0.5\text{kg/cm}^2$, 真空液温 $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ / $620\sim 700\text{mm-Hg}$, 流量 $180\sim 200\text{l/hr}$ 。

(3) 结晶:

将所得之浓缩液140~150l投入容积为300l的搪玻璃结晶罐内, 加入相当于浓缩液 $2/3$ 量的醋酸丁酯 (简称BA), 在搅拌下, 夹层通冰盐水冷却至 10°C 左右, 再缓缓加入预冷至 10°C 的 6N-HCl 调 pH 至 $3.8\sim 4.1$, 使溶液中之6-APA结晶析出, 至 $\text{pH} \approx 4.5$ 时, 即可停止加酸, 同时停止搅拌, 使结晶晶体加大, 稍过片刻, 即继续开动搅拌1小时, 再静置3小时, 使结晶完全析出而滤取之。

(4) 干燥:

所得晶体, 顺序用酸水 (纯水加盐酸配成 $\text{pH}=5\sim 6$)、BA及丙酮各20l, 各分二次淋洗、抽干 (或甩干), 于 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ 热空气吹干2小时以上即得。

6-APA的质量鉴定 (PDAB法测定6-APA的效价)

试液准备: 取甲醇100ml, 加PDAB0.5g, 溶解后, 加冰醋酸80ml与 2N-NaOH 5ml的混合液, 和匀后, 补加蒸馏水至700ml (总量), 配成浓度为 0.7mg/ml 的试液。

检液准备: 取6-APA样品, 用蒸馏水溶解, 配成浓度约为 2mg/ml 的检液。

效价测定: 取检液0.5ml, 加试液3.5ml, 在 37°C 水浴中反应3分钟后, 即用分光光度计在 415nm 波长处测定其光吸收值, 查找预先另用6-APA精制品按同样方法测定并绘制而成的光吸收值函数标准图, 求出检品中的6-APA含量即得。另按上述方法, 用蒸馏水代替检液作空白试验, 对照校正。

注意事项: 6-APA成品, 应为白色或微黄色、松散的粉末状晶体, 易溶于水, 熔点 $208\sim 209^{\circ}\text{C}$, 平均效价 2600u/mg 以上, 水份10%以下。

四、结 论

用固定化酶制6-APA的生产方法, 在国外早于70年代初就已试验成功, 而在我国自1975

年起才开始研试,但我们吸收了国外的经验之后,在工艺上又作了一系列的研究和改进,而且技术比较成熟和完整;例如:选育了我国自己的菌种,制成了机械强度高、酶回收率大、使用期长的固定化酶,设计了使用方便、液体循环、结构简单、分层装置的反应柱,以及检验酶活性和成品效价的快速测定方法等等。

由于在生产工艺上有许多改进,有些指标已超过国外,例如,固化物在英国是用DEAE-纤维素制作,其使用有效期为11周,由于我们采用明胶凝固和戊二醛交联,可连续使用达14周以上仍能保持活力而不损失。

虽然如此,我们还有一些指标落后于国外,例如总收率,国际水平已达到85~90%,我们的仅75~80%,还须进一步分别从裂解、浓缩、结晶等步骤中努力提高、赶超国际先进水平。另外,我们还有一些自己设想而尚未试验的项目,例如青霉素G不经结晶直接利用固定化酶裂解生产6-APA及6-APA不经结晶直接用以半合成P-12等青霉素类的新品种;如能获得成功,则更可简化手续、扩大产量、节约原料、降低成本等等,也是值得进一步努力研究的。

五、参 考 资 料 目 录

- [1] 上海第三制药厂、上海生物化学研究所,大肠杆菌发酵小结(1978.12.)
- [2] 上海第三制药厂,防污染问题的研究(1978.12.)
- [3] 上海生物化学研究所、上海医药工业研究院,固相青霉素酰化酶制备工艺的确定
- [4] 南方协作组,关于〈明胶戊二醛固定化菌体生产6-APA新工艺〉的几点说明和讨论
- [5] 上海第三制药厂、上海生物化学研究所、上海医药工业研究院,固相青霉素酰化酶制备6-APA的试产情况及与老工艺水平的比较(1978.2.)
- [6] 上海第三制药厂、上海生物化学研究所、上海医药工业研究院,固相酶制备6-APA新工艺(1978.9.)
- [7] 上海第三制药厂、上海生物化学研究所、上海医药工业研究院,固相酶制备6-APA的小试与中试总结
- [8] 太原制药厂、中国科学院微生物研究所,青霉素酰化酶产生菌的筛选
- [9] 太原制药厂、中国科学院微生物研究所,大肠杆菌AS1.76青霉素酰化酶形成的条件
- [10] 中国科学院微生物研究所,大肠杆菌AS1.76在蛋白胨培养基上的条件
- [11] 太原制药厂、中国科学院微生物研究所、河北制药厂,大肠杆菌AS1.76发酵扩大试验总结
- [12] 太原制药厂、中国科学院微生物研究所,青霉素酰化酶的大肠杆菌细胞固定化研究
- [13] 太原制药厂、中国科学院微生物研究所、河北制药厂,青霉素酰化酶的大肠杆菌细胞生产6-APA中试小结
- [14] 太原制药厂、中国科学院微生物研究所,青霉素酰化酶的大肠杆菌细胞生产6-APA生产总结
- [15] 一种快速、简便的青霉素酰化酶活性测定方法,《医药工业》1978(7)22~24