

国外半合成新型青霉素的 发展近况

化工部上海医药工业研究院技术经济情报研究室

陈岱宗



陈灏庆审校

1963年12月



3833
4

化工部医药工业技术情报中心站编印

一九六四年六月印

国外半合成新型青霉素的发展近况

目 录

一、前言	1
二、青霉素分子侧链的改造	2
(1) 青霉素的母核——6-氨基青霉烷酸	2
I. 6-氨基青霉烷酸的发现	2
II. 6-氨基青霉烷酸的制备方法	2
(生物合成、化学合成、酶裂解、碱裂解等方法)	
III. 6-氨基青霉烷酸的提炼和精制	16
(溶剂提炼法、离子交换法、直接浓缩法)	
IV. 6-氨基青霉烷酸的特性	20
(2) 6-氨基青霉烷酸衍生的新型青霉素	22
I. 新青霉素的侧链类型	22
II. 几种类型侧链的合成方法	34
(苯氧烷基型、2,6-二氧烷基型、 α -氨基型、三取代基型、异噻唑型等侧链的简略合成)	
III. 侧链结构与新青霉素理化性能和抗菌作用的关系	46
IV. 新青霉素的缩合方法	49
(酰肼或酸酐法、混合酸酐法、 NH' -环己碳二亚胺法、对硝基苯酯法、异氰酸盐或异硫氰酸盐法、酰基叠氮法以及微生物酶的催化合成法)	
V. 新型青霉素的提炼和精制	53
VI. 6-氨基青霉烷酸和新青霉素的分析	54
(3) 新型青霉素及其临床评价	57
I. 青霉素和青霉素酶	57
II. 新型青霉素表	60
III. 几个比较成熟的新青霉素的性状、药理、微生物学以及临床报道	69
IV. 各种新型青霉素的比较评价	88
三、青霉素分子母核的改造	91

11) 青霉素的特殊类型——头孢子菌族抗菌素	92
I. 头孢和菌素 V 与青霉素 V, 头孢子族抗菌素	93
II. 头孢子菌素 C 及其衍生物	95
III. 7-氨基头孢子菌素羧酸的制备及其衍生物	98
(制备方法, 新衍生物类型, 新衍生物 Cephalothin, 不同母核相互转变关系以及青霉素用化学方法转变成为头孢子菌素族抗菌素的关系)	
(2) 青霉素分子母核噻唑环的重排——脱水青霉素	107
(3) 青霉素分子母核噻唑环的氧化	108
(砷和亚砷型青霉素)	
四、讨论	109
(1) 从改进青霉素的化学结构入手, 研究合成一种理想的青霉素, 仍旧是抗菌素工作者面临的一个艰巨任务	109
(2) 从青霉素的半合成工作估计整个抗菌素的半合成或全合成	111
五、参考文献	113

国外半合成新型青霉素的发展近况

一 前 言

青霉素是一个较理想的化学治疗剂，它对于引起人体疾病的某些对药敏感的微生物有强烈的杀灭作用，而且对宿主无毒性，因此在临床上一直佔着十分重要的地位，在治疗很多致病菌所引起的疾病上也取得了惊人的成就。但是随着青霉素的广泛应用，在临床上出现了耐药性金黄色葡萄球菌。这种耐药菌的出现大大地降低了对青霉素G的敏感度（英国一个医院统计在1959~1960年间细菌对青霉素的敏感度降至18%）〔1〕，使治疗失效的。原因：除天然耐药菌外，主要由于耐药性金黄色葡萄球菌产生的青霉素酶（penicillinase）破坏了青霉素，以致治疗失效。因此如何杀灭耐药金黄色葡萄球菌是当代医疗上急待解决的问题。

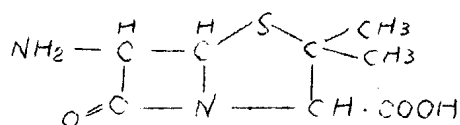
近年来许多抗菌素工作者虽然用生物合成法发现了红霉素、卡那霉素、新生霉素、万古霉素、棒菌肽及瑞斯托霉素对抑制耐药性金黄色葡萄球菌有一定的作用，但是还没有能够圆满地解决问题。而且生物合成法本身生产过程也比较复杂。因此许多学者企图从改变青霉素的分子结构中寻求一种能对抗青霉素酶的青霉素和具有其他特种性能的新抗菌素。

青霉素分子由两个部份所组成：侧链及母核（ β -氨基青霉烷酸）又称无侧链青霉素。因此化学改造青霉素也是从这两方面着手。1959年英国学者发表从不加前体的青霉菌（*Penicillium chrysogenum* W.5120）的发酵液中制取 β -氨基青霉烷酸获得成功（实际是1957年）〔2〕，是一重大的发现。同年在伦敦召开的抗菌素第七次年会上特别讨论了用 β -氨基青霉烷酸通过化学的耦合接上不同侧链的方法：合成各种特性的新型青霉素的可能性〔3,4,5〕，引起了人们的广泛注意，使半合成青霉素的研究工作得到了极为迅速的发展，为发展抗菌素开创了—条新的途径，国外曾有不少的文献从不同角度报道了半合成青霉素的发展情况〔6-32〕，但是从生产临床等各方面的全面综述仍然不多。本文收集和整理了半合成青霉素发现以来到目前为止的有关文献1000余篇，企图对青霉素侧链和母核的改造

情况作一综合性的报道，供有关抗菌素工作者参考。

二. 青霉素分子侧链的改造

青霉素的母核——6-氨基青霉烷酸



6-APA (6-Aminopenicillanic Acid)

I. 6-氨基青霉烷酸的发现：

1950年日本学者 Sakaguchi 和 Murao [33] 用青霉菌 *Penicillium Chrysogenum* Q176 进行青霉素发酵时，首次发现了一种新的酶——青霉素酰胺酶，可裂解青霉素G钠盐成为苯乙酰和—含氨基的物质。1953年 Murao 又从不加苯乙酰的青霉素发酵液中分离了青霉素的母核 [34]，当时把它叫做“Penicillin”，并制得了粗制品 [35]。由于其他学者未获得与 Sakaguchi 等同样的结果，因此这个发现未引起注意。另一方面，Brewer 和 Corse 等 [36, 37]，研究对氨基苯基青霉素的衍生物时，发现不加入对氨基苯乙酰前体的发酵液，生物分析效价和化学分析效价差别很大 [38]（即化学效价比生物效价高得多），这意味着发酵液中存在着青霉素分子的一部分结构物质存在，同时在青霉素G生物合成机制未阐明以前，很多学者认为青霉素生物合成过程，引入酰胺侧链是生物合成的最后阶段 [6]，这些报道引起人们进行深入的研究。

1959年 Batchelor 等 [2]，发表 *Penicillium chrysogenum* 菌，在无前体的培养基中发酵，在其发酵液中含有6-氨基青霉烷酸，分离得到结晶，测定了它的理化性能，提出了纸上层析和生物鉴定方法，证实以前日本分离的“Penicillin”就是6-氨基青霉烷酸，更重要的指出了应用6-APA制备各种新型青霉素的途径。

II. 6-氨基青霉烷酸制备方法：

δ -APA是合成各种新型青霉素的母核，因此研究制取 δ -APA，是很重要的问题，其制备方法有以下几种：

生物合成法：根据 δ -APA的发现过程(2.6.33~39)，和从前体的发酵液分离得纯的 δ -APA结晶的事实，在研究的初期阶段很自然的利用这个方法来生产 δ -APA。因此，利用青霉菌*P. Chrysogenum*及其他菌种深入研究了 δ -APA的形成过程与青霉素形成之间的关系，特别研究了影响 δ -APA生物合成的各种因素。

1. 生产菌种：不同的菌种形成 δ -APA的能力和青霉素的比例间有显著的差别。Batcheler等^[40]试验了*P. Chrysogenum* Q176, W4801, W47, 133, W. 50, 124, W5120等菌种。结果表明它们都能形成 δ -APA，尤以W5120为最好，在产淀粉培养基中其效价青霉素： δ -APA=174.15/单位/毫升。Lebutov等^[41]用*P. Chrysogenum* No. 369, No. 194, No. 136菌种试验结果，以No. 194菌种形成 δ -APA的能力最大，该菌种形成青霉素的能力大了3倍，而No. 136形成青霉素的单位比形成 δ -APA大5倍，No. 369则居于两者之中。菌种No. 194在形成 δ -APA的能力上比W5120菌种还大^[42, 43]。

除青霉菌外Cole等指出*Cephalosporium*及*Emmericellopsis*的某些菌种如*Cephalosporium* sp (I. M. 1.49137), *C. salmosynnematum* (M. D. H. 3590A), *Emmericellopsis minima* (I. M. 1.68333), *E. minima* (Stolk I. M. 1.69015), *E. terricola* (I. M. 1.68332), *E. terricola* Var. *glabra*等^[44, 45]可产生 δ -APA的类似物，如*E. minima* (Stolk I. M. 1.69015) 经培养于玉米粉的培养基中，产生的一种物质和氯苯胺反应后进行纸上层析，证实和 δ -APA相似，同时还产生了头孢菌素及其他两个抗菌素*Emmericellopsis* A和B。

2. 培养基成分：不同菌种对培养基的要求不同因为培养基成分影响 δ -APA的形成。一般认为玉米浆培养基最好。

HP(НОВЫЙ ГИБРИД)菌种，在玉米浆培养基中比在合成和酵母/蛋白培养基形成 δ -APA和青霉素的能力高几倍^[46]。*P. Chrysogenum* W5120在4% 葡萄糖和3% 玉米浆(或豌豆粉、黄豆粉)培养基中为最好^[2, 7]。No. 194菌种在玉米浆碳水化合物培养基中，形成 δ -APA单位达1219单位/毫升，而在玉米浆—

脂肪培养基中仅1020单位/毫升。相应的青霉素在这两种培养基中分别为618单位/毫升及1140单位/毫升。更进一步研究了脂肪作为碳源对6-APA形成的影响，培养基中脂肪量的增加，对6-APA的形成有抑制作用，其效价由2209单位/毫升降至1150单位/毫升，但对于青霉素的形成有刺激作用，其效价由491单位/毫升增至1120单位/毫升。(46) 另外培养基中加入消沫剂对6-APA的形成也是不利的，而相反地有利于青霉素的形成。(40, 42, 47)

很显然培养基的成分对6-APA的生物合成有很大的影响，特别表现在6-APA和青霉素形成的比例上。

3. 通气：[40-42] 通气强度对6-APA的生物合成有很大意义，它不仅影响青霉素的合成，而且能刺激6-APA的形成。在菌丝生长阶段，强烈的通气对6-APA和青霉素的形成都是有利的。通气的强弱和整个发酵过程的阶段有关。一般分成两个阶段：菌丝生长阶段(72~96小时) 通气的强度对青霉素和6-APA的酶系统有显著的影响。这个时期需要高速度的通气。进入发酵的第二阶段时(在96~120小时)，青霉素和6-APA要求的通气量不同，青霉素的效价随通气的增加而提高，而6-APA在最大通气量时，效价反而降低。为了获得高浓度的6-APA，必须控制通气量，使通入的生气以供给菌体最大呼吸量的60%时形成6-APA的量最多。如超过则6-APA形成受到抑制而青霉素的量大量增加。因此要获得高效价的6-APA，控制通气强度是一个转折点。

4. 前体对6-APA生物合成的影响：[43, 45] Galpinia 用产生6-APA最好的两菌种 *P. chrysogenum* W51.20和HR在玉米琼培养基上试验前体的影响。证实在没有前体的培养基中永远形成游离的6-APA，可能由于在生物合成过程6-APA生物合成的速度超过6-APA和前体经酶催化结合的速度。在第一阶段结束时，加入苯乙酰胺前体，发现对6-APA的形成影响很少。6-APA的单位由170降至160单位/毫升。如在发酵开始时加入前体，则不出现游离的6-APA，这也可能是发酵的第一阶段前体刺激了酰胺酶系统催化合成青霉素，或是发酵中生理的差别。

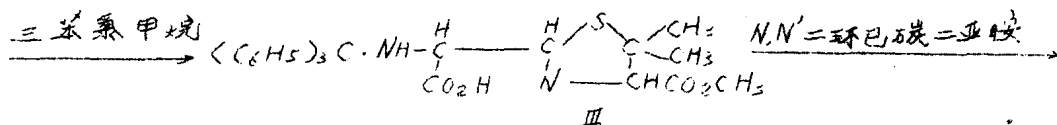
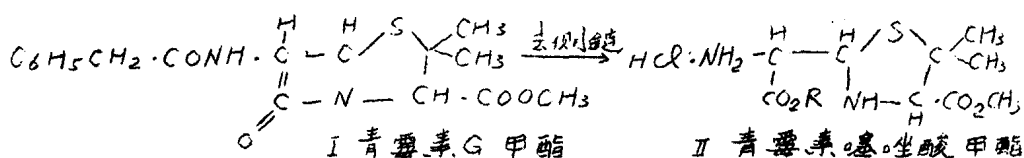
5. PH及发酵周期：[41] 6-APA生物合成过程，随着碳源的

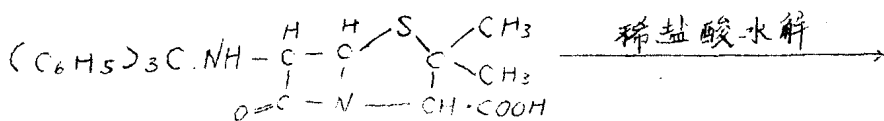
快速消耗 pH 也随之增加，试验结果， pH 控制在 7.0~7.4 为好，发酵周期以 108~120 小时为宜，此时产生的 6-APA 的单位达到 1600~2000 单位/毫升。

虽然用生物合成法能制取 6-APA，产量约为生产青霉素的 70~75%，(49)，但此法未用于工业生产，因为在无前体的发酵过程，除形成 6-APA 外，还形成各种青霉素，如青霉素 F、二氢 F、K、X 以及其他与 6-APA 类似的物质，从发酵液分离也是十分复杂的。(40, 50~52)

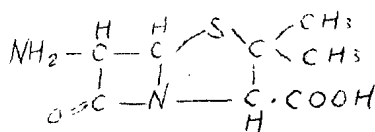
化学法，自从青霉素的化学结构阐明后，Scheehan 等人一直对青霉素化学合成进行了研究。(15, 53~64, 64a) 6-APA 用化学方法制备也是基于青霉素 V 的合成路线，青霉素 V 的化学合成最困难的是 β -内酰胺环的缩合，经过很多研究找到了有效的闭环剂 N,N' -二环己碳二亚胺 (N,N' -dicyclohexylcarbodiimide) 闭环，于 1957 合成了青霉素 V，但收率很低，只 10~12% (57)，也合成了 dethiobenzylpenicillin 和 dethiophenoxypenicillin (56) 等 1960 年 Bolhofer 等由 *t*-butyl-DL-4-benzoyloxycarbonyl-5,5-dimethyl- α -Amino-2-thiazolidineacetate hydrochloride 的 α -异构体作为中间体经酰化作用，盐酸水解，氯化亚砷酰化，闭环，催化氢化，制得各种新青霉素 (59) 其抗菌谱和青霉素 G 相似，对酸和青霉素酶均比青霉素 G 稳定。

最初 6-APA 的制备是从青霉素 G 开始，用化学方法先去侧链同时打开 β -内酰胺环，然后用三苯基甲烷保护氨基，以 N,N' -二环己碳二亚胺使内酰胺环闭合，再用稀盐酸除去三苯基甲基而制得 6-APA (53~55, 62~63) 其反应如下：



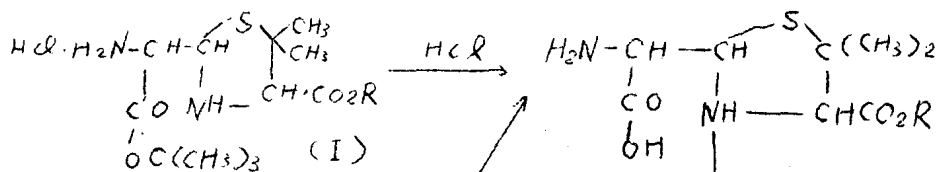


IV

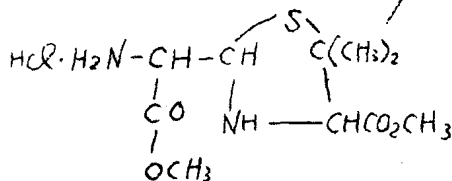


V. 6-APA

Sheehan 等人在以上的基础上, 继续进行研究, 1962 年进一步报道了 6-APA 及青霉素的全合成和部份合成. 纯粋的化學合成是先利用化學合成中间体(I), 化學的半合成是用青霉素 G 为原料开始. 经水解, 酯化生成化合物(II), 然后经如下一系列的反应而制成. [58 62.64]

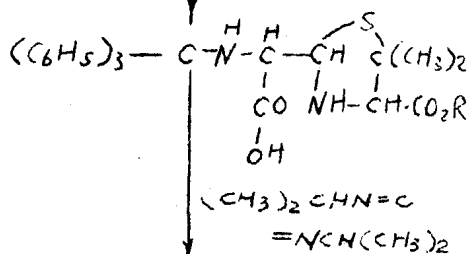


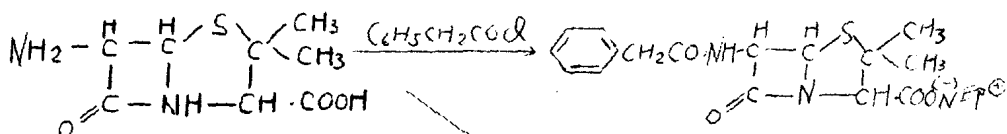
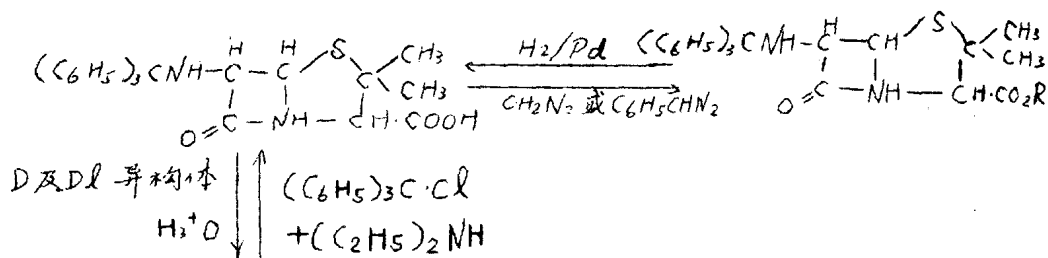
(由全合成来)



(由青霉素 G 制取)

注: * R = CH₃, D 和 DL 异构体
R = C₆H₅CH₂, DL-α- 异构体

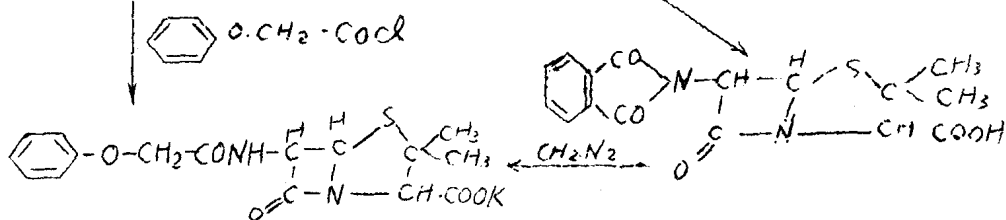




(D及DL异构体)

青霉素G = 乙基哌啶青

6-APA (6-Aminopenicillanic Acid) N-ethylpiperidine penicillin



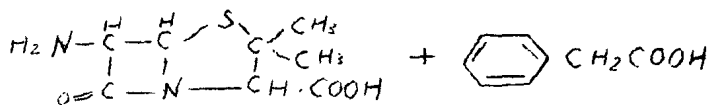
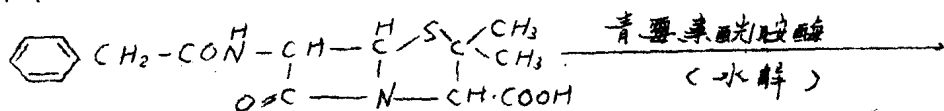
青霉素V钾盐

6-酞酰亚胺基青霉烷酸

(6-phthalimidopenicillanic Acid)

用化学方法进行部分或全合成，虽然都可制得6-氨基青霉烷酸和各种新青霉素，但是步骤繁多，收率低，不能和以下的酶裂解制取方法相比，因此化学合成法仅有理论价值，而无实际意义。

酞酰酶裂解法：(38) 日本学者早已发现青霉菌 *P. chrysogenum* 产生的酞酰酶能把青霉素分子裂解成为苯乙酸和6-氨基青霉烷酸(当时称为含氨基的物质“Penicin”)(33)其反应如下：



6-氨基青霉烷酸(6-APA) 苯乙酸

1960年 Robinson 和其他学者发表了用青霉素酰化酶裂解青霉素以生产 6-氨基青霉烷酸的方法。〔65~68〕。于是进行了深入的研究，发现了很多微生物都可引起上面的反应，证实能产生酰化酶的菌种广泛地存在于自然界中，革兰氏阳性菌，革兰氏阴性菌中都有如在放线菌、真菌、酵母及各种细菌中〔65~81, 82~84〕，归纳于下表内，

表(一) 产生青霉素酰化酶的菌种在自然界中的分布

类 别	菌 种
1. 放线菌	Streptomyces [65, 69, 71, 74]
2. 真菌	Alternaria [69, 74] Aspergillus [69, 74, 85, 83] Trichoderma [69, 74] Filamentous [65, 69]

Epicoecum [69, 78]

Mucor [74, 85]

Pleurotus Ostreatus [81]

Nectria Cancrini [84, 86]

Dermatophytes [84a] (Epidemophyton interdigitale; Trichophyton gypseum; T. mentagrophytes)

类 别	菌 种
	<i>Bacillus subtilis</i> [66]
	<i>Mycobacterium phlei</i> [66]
	<i>Salmomella</i> [73, 77~78]
	<i>Proteus</i> [73, 77-78, 82]
	<i>Shigella</i> [73]
	<i>Epicoccum</i> [74]
	<i>Foxysporum</i> [74]
	<i>bacteroides</i> (类似细菌的) [84, 86]

有的学者又进一步把不同来源的酰胺酶根据它们裂解的基质不同分成两大类(1)细菌型的酰胺酶如大肠杆菌等裂解青霉素G的能力很大,因此又称为青霉素G酰胺酶。(2)真菌型的酰胺酶如担子菌属的 *plenrotus ostreatus* 菌对青霉素V裂解很好又叫做青霉素V酰胺酶[83]。

除以上微生物产生酰胺酶外最近报道用动物器官产生的酰胺酶也可裂解青霉素V如将牛肾捣碎后和pH7.5的磷酸缓冲液均匀混合离心分离,分取固体,悬溶于新制备之磷酸缓冲液中然后加入青霉素V,于37℃,裂解12-15小时,转化率可达75%[88, 98]

青霉素酰胺酶的制备:

酰胺酶裂解青霉素转变成 δ -氨基青霉烷酸,如需要获得高产量的 δ -APA,首先筛选酰胺酶活力高的菌种是生产的关键。

Batchelor 等[60]以天然青霉素作为基质筛选了215株,其中160株霉菌中有24株具有酰胺酶的作用;30株酵母中有3株;25株链霉菌中有11株,其中以淡紫链霉菌(*Streptomyces lavendulae*) BRL 198为最好。Murao [77]筛选264株原种(stock culture)和从日本土壤中分离的319株,约17%具有青霉素酰胺酶活性,它们都属于假单胞菌属、沙门氏菌属、变形菌属、根希氏菌属、链霉菌、产气杆菌……等中。其中选出的如VII, C50, AaO, 特别是从原种中而得的菌种具有较高的酶

活力，同时在筛选中发现在同种间的固有酰胺酶产生菌和非酰胺产生菌两种。

Kameda 等报道了分离裂解菌的方法[89]。English 等[90]採用各种动物和人口服或注射青霉素后，观察到从尿里排出 6-APA 的情况，这对筛选青霉素酰胺酶菌种有所启示。

发酵培养酰胺酶的产生菌：产生酰胺酶的菌种在培养过程中，发现青霉素酰胺酶和青霉素酶同时存在[68~69, 75]，95% 的青霉素酶存在于菌体内，发现培养基的成分可影响两种酶的活力。[68] 试验了六种培养基，结果以含葡萄糖 3%，黄豆饼粉 2.5%，酵母抽提液 0.5%，NaCl 0.5%， CaCO_3 0.2% 的培养基产生青霉素酰胺酶为最好，在这种培养基上产生青霉素酶很少。在产碱杆菌 No. 015 培养过程同样发现了产生青霉素酰胺酶和青霉素酶的现象，和培养基成份有关，试验了大菱-酵母玉米浆、肉汤-蛋白胨及 XOTTNHep 等培养基。其中以肉汤-蛋白胨（用水稀释的）及 XOTTNHep（含 1% 葡萄糖和 30~40 毫克 % 氨氮）的培养基为最好。但在 XOTTNHep 培养基中氨氮含量增加到一定浓度时就会大大降低青霉素酰胺酶的活力[69]

除培养基的成分外，发酵时通气条件对青霉素酰胺酶活性有很大影响，在剧烈通气条件下测得的菌体酰胺酶活力最大[69] 同时培养基的 pH 值，培养温度对菌种产生酰胺酶的活性均有很大的影响，这主要取决于不同的菌种，它们所需要的培养条件不同。

另外发现某些抗菌素和化学药物对青霉素酰胺酶的活性影响很大。如 *P. chrysogenum* 在淀粉和氨基酸酯的培养基中，其产生酰胺酶的作用受到抗菌素如制霉菌素[91, 92] 和某些氨基酸酯[93] 包括甘氨酸乙酯、D-苯基丙氨酸甲酯、 α -异白氨酸等所抑制，在这些氨基酸酯中其抑制作用与量有一定关系，如甘氨酸乙酯、甘氨酸酰胺以及氨基乙酸乙酯在 $10^{-2} M$ 时则不显示抑制作用。制霉菌素含量 1 微克/毫升时达到 85% 的抑制作用[92]，而链霉素在 2000 微克/毫升时不产生抑制现象。[91] 其他化学物质如 α , β -I 丙基酚[91, 94] NaN_3 、 KCN 、 NH_2OH 、苯酚等对青霉素酰胺酶的产生呈抑制作用。[91]

在产生酰胺酶的培养基中加入 0.002~2% 的苯乙醇或其衍

生物必要时可连续地通入二氧化碳是有利的〔95~96〕可以提高青霉素酰基酶的活力。0.1% 的淀粉〔94〕和某些磺胺类药物如磺胺噻唑〔35,99,100〕对 *D. Chryseogenum* 产生青霉素酰基酶具诱导作用。

以上说明在制备固体酰基酶的过程影响的因素很多，因此严格控制各种条件才可提高酰基酶的活力。

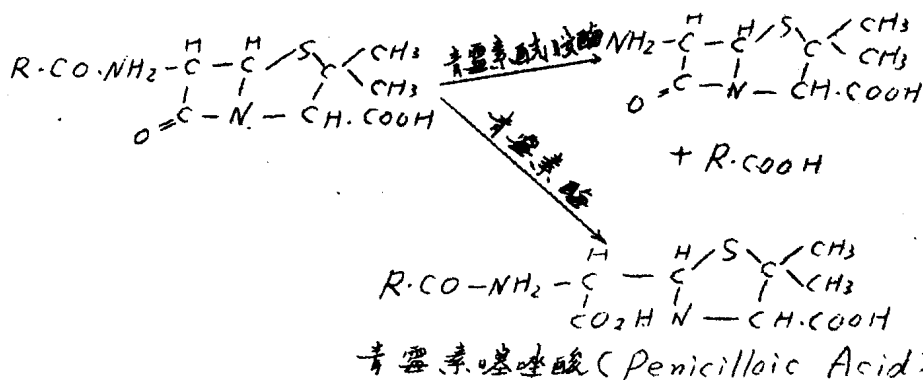
用发酵法制得的酰基酶，裂解各种青霉素基质时可利用全菌体也可进一步提纯和精制，使成为无菌体的而具有显著酶活力的提取物。冷冻物或干粉状的酶〔62,68,75,101〕来进行裂解。

无菌体的酰基酶浓缩物的制备：先用石英沙〔102〕或超声波破碎菌体〔66,103〕，在 pH. 7.5 的磷酸缓冲液中磨细离心分离上层清液含有原来酶活力 $2/3$ 的活性，清液用硫酸铵饱和分离沉淀，经三昼夜透析，其酶活力为原来的 45%〔75〕。

酰基酶的发酵液可以直接用硫酸铵饱和，或用 30% 80% 硫酸铵分级沉淀〔104~105〕，保存了 65% 的酶活力，该物质透析结果活力不变〔103,106〕。除硫酸铵外也可采用丙酮沉淀、离心分离，沉淀用丙酮洗涤，制成干粉（重量为原液的 $1/5$ ，即浓缩 5 倍）未发现降低酰基酶活力〔68,103〕。

青霉素酰基酶的特性：青霉素酰基酶和其他酶一样有它的特异性，其性质直接和产生 6-APA 的裂解过程有关，它表现有以下几个方面：—

(1) 青霉素酰基酶对青霉素作用的位置：青霉素酰基酶不同于青霉素酶，前者是裂解青霉素分子 6-位氨基的侧链，形成 6-APA 和侧链相应的酸，而后者是破坏青霉素分子的 β -内酰胺环形成青霉素噻唑酸，如下反应：—



(2) 青霉素酰胺酶与基质：各种青霉素如青霉素G、青霉素V [61, 74, 80, 10] ~ 108] 及其若干取代的苯氧甲基衍生物 [109], butylthiomethylpenicillin, 青霉素K, 二氢F, 青霉素X以及各种混合的青霉素都可作为酶作用的基质, [68, 74, 110] 作为制取6-APA的原料, 青霉素G是最常用的基质, 在这方面的报道也较多 [65 ~ 67, 18 ~ 79, 111 ~ 114], 其次是青霉素V。各种来源的酰胺酶对各种基质的转化率, 它们以什么基质最适合, 可通过各青霉素的试验来决定。[112]

(3) 裂解条件：不同来源的酰胺酶对青霉素裂解的条件要求不同, 能反映在裂解速度上各异, 转化率也各有高低。一般来说链霉菌、真菌、酵母菌对青霉素K、F、二氢F、苯氧甲基青霉素等裂解很快, 对青霉素G则很慢 (仅为前者的1%)。各种细菌产生的酰胺酶对青霉素G水解很快而对青霉素V很慢 (为前者速度的1/5) [65]。大肠杆菌酰胺酶裂解青霉素G比青霉素V大9倍 [49]。担子菌属的 *Pleurotus ostreatus* 菌种的自溶物, 提取物以及由菌丝而得的干粉对青霉素V裂解最好。[70, 79]。又 *Brodeella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* 以及 *Nocardia* 等对青霉素G有高的选择性尤其是后者。[67]

对大肠杆菌、芽枝杆菌、产碱杆菌研究指出, 要获得较高的转化率, 与反应过程有关, 特别表现在反应的条件如基质的选择、基质的浓度、裂解的pH值、温度、时间、菌体酰胺酶的用量等。淡紫链霉菌 (*S. lavendulae*) 产生的酶裂解青霉素V以pH 9.0 温度50°C为最好, 从裂解至6-APA结晶回收率达50%。[68] *Pleurotus ostreatus* 产生的酶裂解青霉素V温度28~30°C pH 7, 经36小时可获得94%的转化率 [70]。大肠杆菌产生的酰胺酶, 裂解青霉素G, 基质浓度2% (相当于30000单位/毫升以上) 发现最好的pH是7.5~8.5 温度40°C, 在4小时内转化率达95% [65]。冻干的双卡氏菌 FD46973 加入0.05 M, pH 7.5 的磷酸缓冲剂中, 基质浓度0.5% (青霉素G 8000单位/毫升以上), 菌体用量0.2%, 28°C经16小时转化率达80% [67]。产碱杆菌裂解青霉素G的钾盐, 基质浓度5000单位/毫升, 菌体用量20毫克/毫升, pH 7.5~8, 37°C

经4小时转化率达100%，如其他条件相同，菌体用量减少一半，则裂解时间增长一倍：基质浓度10000单位/毫升，菌体20毫克/毫升经4~5小时转化率50%，如为10毫克/毫升菌体经8小时，转化率达50%；20000单位/毫升的基质浓度、菌体用量20毫克/毫升转化率50~60%，如用10毫克/毫升菌体，达到同样的转化率则需8小时。〔69.75〕

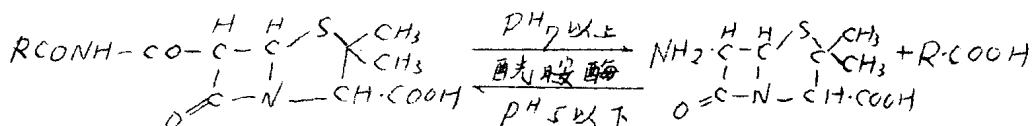
(4) 活力的表现〔49.68〕 菌体酰胺酶有体外酶和体内酶之分，在适当的条件下，淡紫链丝菌产生的酶其活力几乎产生在细胞外，又称为体外酶，可用滤液进行裂解。埃希氏菌的酰胺酶常与菌体结合又称为体内酶，因此在裂解时用全菌体进行裂解。由于酰胺酶存在的部位不同，在裂解时可考虑用完整的菌体浓缩物或无菌体的提取物及纯的酶进行裂解。

(5) 稳定性，pH值对酶的稳定性有较大的影响，淡紫链丝菌产生的酰胺酶在pH 10时稳定性最大，pH 11时稍失去活性，在pH 3时几乎没有活性。在较高温度对酰胺酶有分解作用，在培养液中发现有游离氨基酸出现，则影响酶的活力。〔68〕如果在适当的条件下，菌体酰胺酶可保持相当的稳定性，因此可以重复多次应用，而不减退其活性〔66.68〕，由下面的数据可以证明。

表(二) 产碱杆菌菌体酰胺酶重复使用情况(青霉素G作基质)

使用次数	反应时间(小时)	6-APA单位/毫升
1	5 1/2	2675
2	18 1/2	4050
3	4 1/2	3280
4	18 1/2	—
5	4 1/2	3825

(6) 酶的可逆性：青霉素酰胺酶裂开青霉素分子的侧链是通过青霉素酰胺酶在一定条件下酶的催化作用所致，这主要决定于pH值。如在pH7以下(4.5~5.5左右)又可产生一可逆反应，又把6-APA和侧链重新结合起来成为各种青霉素〔65〕



大肠杆菌酰胺酶的酰化作用一般在 pH 4.5 左右，在甲酮介质中进行[97]，如单纯用 6-APA 和苯乙酰赖氨酸酶进行酰化反应时，发现反应进行很慢甚至不进行，但 6-APA 和一些苯乙酰甘氨酸衍生物经酰胺酶的催化作用，则反应进行很快而且收率也高。[115] 如 6-APA 和一些含有 α -苯基甘氨酸或苯基甘氨酸乙酯的 α -氨基苯乙酸衍生物借大肠杆菌的催化作用可把侧链和 6-APA 结合起来形成 α -氨基苯基青霉素（即 BRL 1341）[119]。有的文献报导 N - α -苯氧丙酰基甘氨酸和 6-APA 作用仅生成少量青霉素，改用 S - α -苯氧丙酰基硫代乙醇酸代替苯乙酸和 6-APA 反应在大肠杆菌 ATCC 9637 的催化作用下，很快地生成苯氧乙基青霉素，并获得较高的收率。依此推则在 α -苯氧丙酰基硫代乙醇酸中有一个 α -苯氧基丙酸衍生物有着很强的催化作用。[123] 酶催化合成的青霉素，通过纸上层析证明和一般方法制取者完全一样[123]。

利用青霉素酰胺酶裂解已知青霉素已成为大量生产 6-APA 的主要方法，它和以上方法比较起来优点是收率高，容易分离现将国外裂解一步的水平列表于下：

表(三) 青霉素酰胺酶裂解(65.70.69.75.81) 青霉素 G 和青霉素 V 的情况

	裂解基质和浓度 $\mu\text{g/ml}$	菌株/酰胺酶	用量	条件			转化率%
				pH	温度	时间	
英	青霉素 G 30000 以上	大肠杆菌	-	7.8~8.5	40°	4	95
、	" " "	如卡氏菌	0.2%	7.5	28°	16	80
美	" " " V 8000 以上	担子菌属	-	7	28~30°	36	94