

## 固定化细胞膜反应器生产6-APA的研究

马士洪 都绛瑛 曲天明 时国栋 虞星炬

(中国科学院化学物理研究所, 大连)

吴汝平 冯一民 杨胜利

(中国科学院药物研究所, 上海)

将青霉素酰化酶基因工程菌大肠杆菌  $A_{56}(\text{pPA}_{22})$  通过交联截留固定化在由中空纤维膜或平板膜构成的膜反应器内, 提高了单位体积反应器的酶活, 实现了高浓度青霉素的裂解。采用反冲模式操作的中空纤维膜反应器裂解7.8%医用青霉素钠盐50批, 产品6-APA的平均重量收率达到90.1%, 纯度达98.6%, 50批反应操作后, 膜反应器内剩余酶活力仍在80%以上。

**关键词** 固定化细胞; 膜反应器; 6-氨基青霉烷酸

6-氨基青霉烷酸(6-APA)是半合成青霉素的原料, 工业上主要由酶法裂解青霉素制备<sup>[1-3]</sup>。目前, 酶法生产6-APA的技术正向着高浓度底物裂解的方向发展, 以获得高产品收率。此外, 缩短反应时间将减少青霉素降解为青霉噻唑酸的损失, 进一步提高产品收率。由于青霉素裂解的速度和收率最终决定于反应系统中单位体积的有效酶活, 因此, 除了高活力菌种选育外, 反应器的优化也是提高6-APA收率的重要手段。

膜生物反应器是近20年来发展起来的一种新型反应器, 膜的分离选择性, 膜反应器的高比表面积, 膜的复合可实现多酶固定化等优点使其成为一种具有广泛应用前景的新技术。

利用膜反应器生产6-APA, 国外正在研究<sup>[4,5]</sup> 1987年 Klagba 等报告了一种可裂解高浓度青霉素溶液的中空纤维酶膜反应器, 由于采用扩散模式操作, 酶活偏低, 经80h裂解, 青霉素的转化率为80%。

与 Klagba 等不同, 我们采用对流控

制的模式操作, 通过交联截留将青霉素酰化酶基因工程菌固定化在膜反应器内, 基因工程菌的高活力和反应器内的高细胞密度使膜反应器内单位体积的有效酶活大大增加, 提高了裂解底物的浓度, 缩短了裂解反应时间。

## 材料与方法

### (一)材料

1. 青霉素: 大连制药厂生产的医用青霉素钠盐和江西东风制药厂生产的工业青霉素钾盐。

2. 生物催化剂: 中国科学院上海药物所构建的青霉素酰化酶基因工程菌大肠杆菌  $A_{56}(\text{pPA}_{22})$  (以下简称细胞)。

3. 分离膜: 中国科学院大连化物所研制的聚砜中空纤维膜和平板膜。

### (二)膜反应器及操作

反应器结构如图1。将中空纤维膜或

本文于1990年9月20日收到。

参加本项工作的还有张衍坤、庄一平、王毓福、戚本凯等同志。

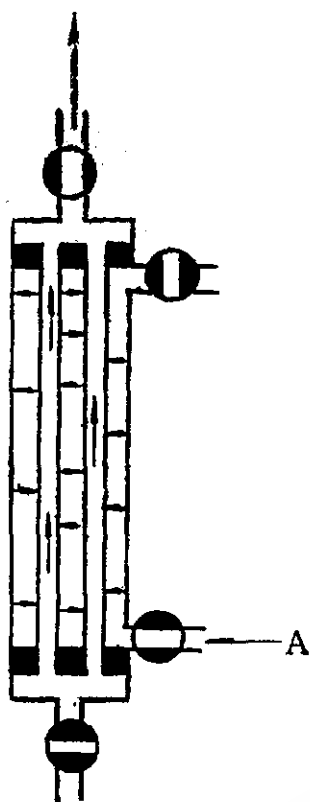


图1 中空纤维膜反应器结构图

Fig.1 Structure diagram of hollow fiber membrane bioreactor

A, 细胞悬液 Cell suspension

青霉素溶液 Penicillin solution

平板膜封入不锈钢圆筒内,膜将反应器分隔成内外两腔。反应系统见图2,青霉素裂解以反冲模式操作。反应前,将细胞悬浮液泵入膜反应器外腔,缓冲液在压力推动下透过膜从内腔流出,细胞借助膜的截留固定化在膜的表面。为避免细胞自溶,采用双功能试剂对细胞进行交联处理。青霉素溶液以pH7.8,0.05mol/L磷酸缓冲液配制,反应时也以反冲模式泵入膜反应器外腔,与膜表面的细胞接触反应后透过膜返回pH调节罐。为中和反应中产生的苯乙酸,用ZD-2型自动滴定仪滴加4mol/L NaOH溶液,维持pH值为7.8。反应在恒温38℃进行,物料通过膜反应器反复循环,直至碱液不再滴加,停止反应,放出裂解液。在裂解液中加约1/2体积的

甲醇,冷却至0—2℃,在搅拌下逐步滴加6mol/L HCl,调节pH值至4.2,6-APA结晶析出。静置过夜后过滤,干燥,称量所得产品,以理论产量为准计算产品收率。

## 结 果 与 讨 论

### (一)最佳操作条件的选择

我们用反应初速度法测定了固定化细胞的酶活,固定化细胞活力的平均值为游离细胞的87%,反应器中单位体积的酶活约33u/ml。

考察了细胞负载密度(湿重),循环流量和底物浓度对青霉素裂解反应的影响,实验结果分别见图3、表1和表2。

图3表示细胞的负载密度与细胞在膜反应器中活力的关系。提高细胞的负载密度,有利于提高反应器的生产能力(即反应器中的细胞总活力),但细胞负载密度的提高将降低膜的渗透通量,影响细胞活力的有效发挥。实验表明,随着细胞负载密度的提高,细胞的比活逐渐降

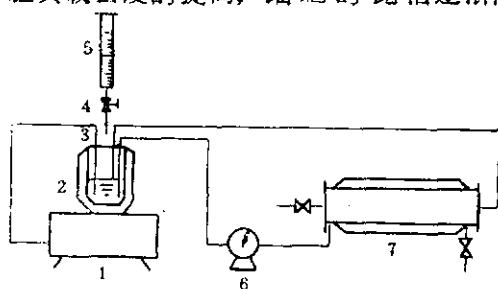


图2 膜反应器系统

Fig.2 Membrane reactor system

1. 自动电位滴定仪 Titration; 2. pH调节罐 Vessel; 3. pH电极 PH electrode; 4. 电磁阀 Magnetic valve; 5. 碱滴定管 Alkali tube; 6. 泵 Pump; 7. 膜反应器 Membrane reactor

低,膜反应器生产能力的提高逐渐减缓。当细胞的负载密度达到一定数值后,膜反应器的生产能力将不再增加乃至降低。由图3可知基因工程菌在膜反应器中的负载密度以10mg/cm<sup>2</sup>左右为宜。

表1为操作压力,循环流量和青霉素

表 1 循环流量对青霉素裂解反应速度的影响

Table 1 Effect of flow rate on hydrolytic rate of penicillin

操作压力 Operation pressure (MPa)	0.04	0.04	0.10	0.10	0.15	0.15	0.20	0.20	0.25	0.25
循环流量 Flow rate (ml/min)	213	219	347	315	385	374	429	420	478	476
反应时间 Reaction time (min)	100	100	90	90	80	80	80	80	75	75

反应器体积 Reactor volume, 283ml

浓度Conc.: 工业青霉素钾盐 Commerical potassium benzylpenicillin 7.8%(wt.)

裂解时间的关系。由于青霉素裂解过程中苯乙酸的生成降低了物料的 pH 值, 细胞的有效活力下降。加大操作压力, 将增加物料的循环量, 减少 pH 下降, 有利于膜反应器生产能力的提高, 缩短了青霉素裂解转化所需的时间。但循环流量增加到一定程度, 转化所需的时间趋向稳定。

由表 2 可知, 细胞总活力一定的膜反应器, 在固定的投料量下, 青霉素转化所需的时间随底物浓度的增加而增加, 利用固定化细胞膜反应器虽然能裂解浓度达10%的青霉素, 但长时间的裂解, 过高的底物浓度会增加噻唑酸的生成。因此在实验中我们一般采用 8 %左右的裂解浓度, 产品不经浓缩直接结晶, 可获得较高的收率。

(二)连续多批的裂解结果

据上述实验提供的工艺条件, 我们采用中空纤维膜和平板膜构成的两种反应

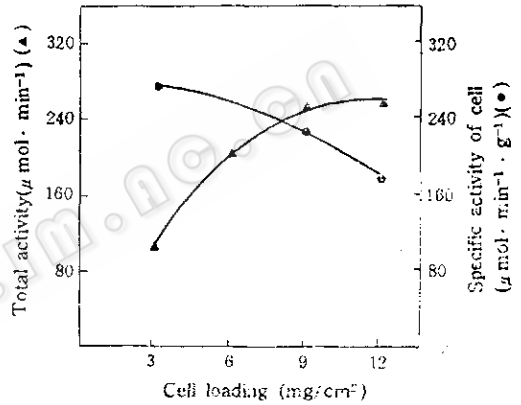


图 3 细胞负载密度与反应器的生产能力、细胞比活的关系

Fig.3 Relationship between cell loading and total activity specific activity of cell  
膜面积 Membrane area, 125cm²

器连续多批裂解青霉素, 数据分别见表 3 和表 4。

表 2 底物浓度对青霉素裂解反应速度的影响

Table 2 Effect of concentration on hydrolytic rate of penicillin

系统总体积 System volume (ml)	692	693	608	607	550	555	500	500	450	450
底物浓度 Substrate conc. (wt.%)	6.5	6.5	7.4	7.4	8.8	8.0	9.0	9.0	10.0	10.0
反应时间 Reaction time (min)	85	85	95	100	110	125	120	120	125	130

反应器体积 Reactor volume, 283ml, 循环流量 Flow rate, 400ml/min, 底物 Substrate: 工业青霉素钾盐, Commerical potassium benzylpenicillin 45g

表 3 平板膜反应器裂解青霉素的实验结果

Table 3 Results of PG hydrolysis in flat membrane reactor

实验编号 No.	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	平均值 Average
反应时间 Reaction time (min)	90	80	80	80	90	85	85	85	90	90	95	
产品重量 Product weight (g)	15.12	15.20	15.12	15.20	15.22	14.82	14.81	14.78	14.63	14.50	15.04	14.85
产品收率 Product yield (%)	85	85	85	85.5	85.7	83.4	83.4	83.2	82.3	81.6	84.6	84.1

反应器体积 Reactor volume: 283ml; 浓度 Conc.: 工业青霉素钾盐 Commercial potassium benzylpenicillin 7.8%(wt.); 批投料量 PG in each batch: 30.6g; 细胞负载密度 Cell loading: 10.8mg/cm<sup>2</sup>; 循环流量 Flow rate: 230—270ml/min

表 4 中空纤维膜反应器裂解青霉素的实验结果

Table 4 Results of PG hydrolysis in hollow fiber membrane reactor

实验编号 No.	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	平均值 Average
反应时间 Reaction time (min)	75	80	80	75	75	75	75	80	80	80	80	
产品重量 Product weight (g)	15.80	16.15	15.75	15.70	16.60	16.15	16.20	16.20	16.40	16.08	16.80	16.08
产品收率 Product yield (%)	88.6	90.5	88.3	88.0	93.1	90.5	90.8	90.8	91.9	90.1	88.6	90.1
产品纯度 Product purity (%)	98.9	98.0	100.0	98.0	99.9	100.0	99.6	97.8	96.3	98.1	97.9	98.6
透光度 Transmissivity (%)	97.0	96.5	97.0	97.0	95.5	97.5	97.0	96.0	95.0	97.0	95.0	96.4

反应器体积 Reactor volume: 283ml; 浓度 Conc.: 医用青霉素钠盐 Sodium benzylpenicillin 7.8%(wt.); 批投料量 PG in each batch: 29.4g; 细胞负载密度 Cell loading: 10.3mg/cm<sup>2</sup>; 循环流量 Flow rate: ~200ml/min

两种膜反应器裂解高浓度青霉素底物, 接近完全转化的时间都在 2 h 以内, 其中中空纤维膜反应器裂解青霉素 50 批, 产品平均重量收率为 90.1%。由于反应物料在膜反应器中经过膜的反复过滤, 产品纯度和透光度都很高, 50 批反应的 6APA 纯度为 98.6%, 透光度平均为 96.4%。

### (三) 膜渗透通量和酶活的稳定性

在使用过程中, 由于膜的压实及反应物料中杂质对膜的污染, 膜的渗透通量逐渐下降, 我们采用民用饮水连续通过已固定化菌体的膜反应器, 得到膜渗透通量与通水时间的关系曲线(图4)。结果表明, 膜

渗透通量随通水时间的增加而降低, 逐步趋于稳定。

连续通水 300h 后, 裂解 7.6% 的工业青霉素钾盐, 底物接近完全转化的时间为 120min。由于青霉素裂解转化时间控制

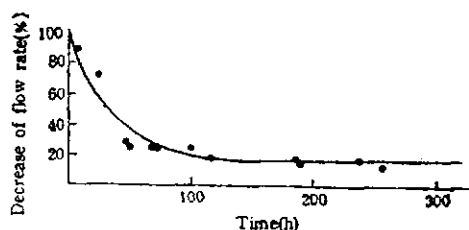


图 4 膜的渗透通量与时间的关系

Fig.4 Relationship between flow rate and operation time of hollow fiber reactor

在 2h 左右, 均可获得高的产品收率。由此可见, 膜反应器裂解青霉素的使用批数不少于 150 批。使用的水质改善, 使用的批数更多。固定化细胞膜反应器在连续多次的青霉素裂解反应过程中, 表现了良好的酶活稳定性(图 5)。

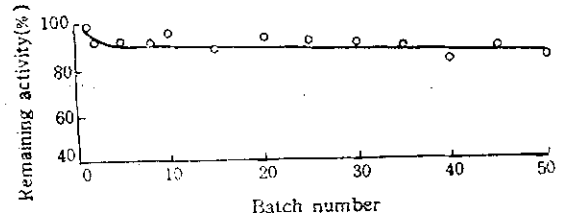


图 5 固定化细胞活力衰减曲线

Fig.5 Operation stability of immobilized Cell in the hollow fiber reactor

### 参 考 文 献

- [1] Erick, J. V., *Enzyme Microb. Technol.*, 5(5):403—423, 1983.
- [2] 石村文宏, 渥美有三, 公开特许公报, 昭 59—82097, 1984.
- [3] Goekcek, Z. and Kraemer, D.M., *Eur. Congr. Biotechnol.*, 2:341, 1987.
- [4] Klagba, W. et al., *The 1987 International Congr. Membrane and Membrane Processes*, pp.639—640, 1987.
- [5] Noworyta, A., *Preprints of 6th International Symposium on Synthetic Membranes in Science and Industry (1989)*, Post No.75, pp.376—378, 1987.

## Production of 6-amino Penicillanic Acid in Immobilized Cell Membrane Bioreactor

Ma Shihong Du Jiangying Qu Tianming Shi Guodong Yu Xingiu  
(Institute of Chemical Physics, Academia Sinica, Dalian)

Wu Ruping Feng Yimin Yang Shengli  
(Institute of Pharmacy, Academia Sinica, Shanghai)

6-Amino penicillanic acid has been produced in an immobilized cell membrane bioreactor, which was constructed with hollow fiber or flat membrane and operated in the backflush mode. the cell containing penicillin acylase was immobilized on the surface of membrane by cross-linking and intercepting, the loading of cells was high, and enzyme activity per unit volume of the reactor was also high, The penicillin of high concentration can be converted completely within 2 h. After 50 runs, the activity remained in the reactor was about 87% of the initial one, the average yield of 6-APA was 90.1% with the purity of 98.68%.

### Key words

Immobilized cell, membrane bioreactor, 6-amino penicillanic acid