

# 明胶-戊二醛固定化细胞的改进

寇秀芬 王祯祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

**摘要** 采用明胶-戊二醛在有机溶液中成球的方法制备固定化细胞, 方法简便, 固定化细胞酶活力为 6.25—6.75 单位/g (湿重)。用该固定化细胞裂解 3.0—8.0% 的青霉素溶液, 裂解率达 98.3% 以上。裂解液经过浓缩后提取 6-APA, 产率为 86.3%, 不经浓缩直接提取 6-APA, 产品收率为 72.4%, 产品质量合格。

**关键词** 固定化细胞, 6-氨基青霉烷酸

明胶含有赖氨酸  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>、N-末端氨基, 为戊二醛双功能交联提供了反应基质。通过双功能试剂的作用, 明胶与微生物细胞之间形成共价键, 使微生物细胞彼此交联, 凝集成网状结构。根据这一原理, 明胶-戊二醛和细胞混合体经深冻将水份溢出, 形成有弹性的凝聚体, 类似于海绵。然后将其切割成方块, 长条等形状用于半抗生素的生产已取得较好的结果<sup>[1]</sup>。

该固定化细胞制备过程较为复杂, 而且固定化细胞体积较大, 活力偏低, 使用过程中剖面处细胞容易脱落。为了克服上述缺点, 我们改进了固定细胞的方法。采用明胶-戊二醛和菌体的混合物在有机溶剂中成球的方法制备固定

---

青霉素的裂解实验和 6-APA 的提取、产品分析是在华北制药厂朱军等同志的大力支持和协作下完成的, 特此致谢。

化细胞,该固定化细胞颗粒均匀,直径为1.0—1.5mm,与切割成型的相同体积的固定化细胞比较,大大地增加了比表面积,显示了较高的催化效率。本文报道这一研究结果。

### 材 料 和 方 法

1. 化学试剂: 明胶由上海第五制药厂提供;青霉素 G: 华北制药厂产品;其他化学试剂均为市售商品。

2. 菌种: 大肠杆菌 PN-66 中科院微生物所酰化酶组诱变菌株。

3. 菌体培养: 培养基成份(%): 蛋白胨 1, NaCl 0.3, 苯乙酸, 0.3, 玉米浆 0.3。pH 7.5, 28℃ 培养 22 小时。离心收集菌体并用 0.9% 生理盐水洗一次, 获得 21—30 个国际单位/g 菌体, 用于制备固定化细胞。

4. 酶活力的测定: 完整细胞和固定化细胞酶活力的测定均按以前报道的方法<sup>[2]</sup>。

5. 细胞固定化方法: 将 20g 明胶加入蒸馏水 100 ml, 在沸水浴中溶化(浓度为 20%)并使之保持在 60℃ 左右。

5 g 湿菌体加入 0.5 ml 水使之呈糊状, 与上述 5 ml 明胶溶液混合, 均匀后于 40℃ 左右时倒入醋酸丁酯中, 快速搅拌, 混合物分散并凝固成球形颗粒, 直径为 1.0—1.5 mm, 弃去醋酸丁酯, 用 1.0% 浓度的戊二醛溶液 (pH6.0) 处理 1.0—1.5 小时, 在冰箱中 (0℃) 放 1—2 天再用戊二醛溶液处理一次, 获得机械强度较好的明胶-戊二醛球形固定化细胞。

6. 6-氨基青霉烷酸(简称 6-APA)的测定: 用高压液相层析法, 在 230nm 处检测, 采用外标法和计算峰值面积的方法测定 6-APA 的含量。

7. 色级及透光率的测定: 产品的色级及透光率的分析, 分别在日本岛津 190 分光光度计 400nm 和 500nm 处测定。

### 结 果

#### (一) 制备固定化细胞的条件

1. 细胞量对固定化细胞的影响: 取 1ml

20% 的明胶溶液交联一定量的菌体, 由于湿菌体中水份的影响, 菌体量和载体有一定的比例, 改进了固定化方法, 这个比例提到 1:1(W/V), 超过这个限度难以获得固定化细胞(表 1)。

表 1 细胞量对固定化细胞的影响

细胞*量 (g)	固定化细胞酶活力 (u/g)	活力收率 (%)
0.5	1.9	18.1
0.6	2.5	21.8
0.8	3.0	23.2
1.0	3.75	26.8
1.1	—	—

\* 完整细胞酶活力 21u/g

2. 菌体酶活力对固定化细胞的影响: 取 1ml 20% 的明胶溶液, 分别与 1g 不同酶活力的菌体混合制备固定化细胞, 菌体的酶活力高, 固定化细胞的酶活力也高(表 2), 制备较理想的固定化细胞与菌种密切相关。

表 2 菌体酶活力对固定化细胞的影响

菌体活力 (u/g)	固定化细胞活力 (u/g)	活力收率 (%)
17.8	2.4	13.5
21.0	3.5	16.7
28.2	6.25	22.2
31.0	6.75	21.8

3. 戊二醛对固定细胞的影响: 将一定量的固定化细胞浸泡在不同浓度的戊二醛溶液中, 处理不同时间后, 充分洗去多余的戊二醛, 然后测定固定化细胞的表现活力。高浓度的戊二醛溶液处理较长时间的固定化细胞硬而脆, 酶活力损失较大, 不经济。采用 1.0% 的戊二醛溶液 (pH6.0) 处理 1.0—1.5 小时为宜(表 3)。

表 3 戊二醛对固定化细胞的影响

戊二醛 浓度(%)	活力 (u/g)		处理 时间 (h)				
	1	2	3	4	5		
0.5	4.87	4.87	4.50	4.45	3.75		
1.0	4.85	4.89	4.50	4.40	3.75		
2.0	4.55	4.38	4.10	3.10	2.00		
3.0	3.75	3.60	3.40	3.10	—		
4.0	3.30	3.00	2.50	2.40	—		

## (二) 裂解青霉素制备 6-APA

1. 裂解效率: 明胶-戊二醛固定化 PN-66 细胞, 湿重 100g (6.50u/g) 装柱 (12×24cm), 裂解 3.0—8.0% 浓度的青霉素溶液 (pH7.5), 通过滴加 2N NaOH 溶液自动控制维持 pH 值。采用下行循环使裂解液以每分钟 10l 的流速通过固定化细胞柱, 用恒温水浴保持反应在 39℃ 左右进行。记录消耗 2N NaOH 的毫升数并在不同时间取样分析青霉素的残留量, 计算其转化率。结果表明, 在 150 分钟内裂解反应基本完成。因此, 每批裂解反应控制在 2.5 小时内, 转化率在 98.3 以上(图 1)。

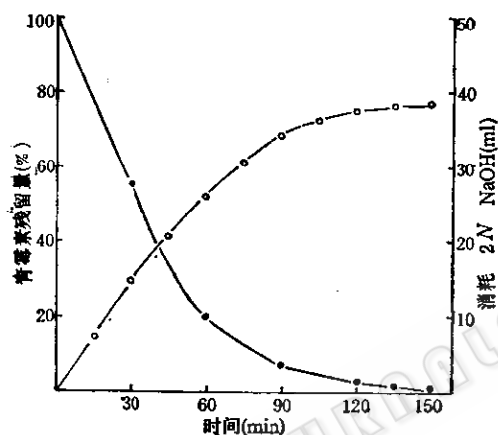


图 1 裂解曲线

2. 6-APA 产品的结晶: 该固定化细胞裂解青霉素得 6-APA。每批停止反应以后, 用 400ml 蒸馏水冲洗反应柱, 冲洗液与反应液合并, 经过过滤以后进行真空薄膜浓缩, 最终体积被控在 100ml, 用 50ml 蒸馏水冲洗浓缩管道, 共收集 150ml 浓缩液。然后加入 150ml 醋酸丁酯, 在冰浴中滴加 6N HCl (约 24—25ml) 调 pH 至 4.2, 6-APA 结晶析出。在冰箱(4℃)中放置过夜, 过滤结晶用醋酸丁酯洗, 最后用丙酮溶液洗一次获得洁白、松散的 6-APA, 于 50℃ 温箱烘干 4—5 小时即得产品。表 4 是几批产品的分析结果。

3. 裂解高浓度青霉素溶液的尝试: 为了寻求 6-APA 生产的高效率、低成本和节能, 将青霉素溶液的浓度提高到 7.5% 和 8.0% 进行了裂解实验并且在提取 6-APA 的过程中省去了浓缩步骤。实验结果表明, 裂解 3.0—8.0% 青霉素溶液, 其转化率基本相同, 但是省去浓缩步骤, 产品收率偏低, 约为 72.0—72.9%(表 5)。这是因为一部分 6-APA 残留在母液中所致。

## 讨 论

用明胶-戊二醛在有机溶剂中成球的方法固定化细胞, 适用于大规模生产。由于固定化细胞为球形颗粒 (直径 1.0—1.5mm), 其比表

表 4 6-APA 产品的分析

青 霉 素		转化率 (%)	产品 (g)	收率 (%)	纯度 (%)	水份 (%)	色级 (OD)	透光 (%)	母 液		
投料 (g)	浓度 (%)								体积 (ml)	单位 (mg/ml)	残留量 (%)
30	6	99.3	14.7	84.4	95.75	0.41	0.032	89.4	155	5.13	4.60
30	3	99.89	14.7	87.3	93.40	0.34	0.026	92.1	170	4.36	4.30
30	6	99.84	14.9	85.5	91.34	0.37	0.024	94.2	160	3.54	3.50
30	6	99.50	15.4	88.4	94.00	0.39	0.013	93.6	175	3.93	3.95

表 5 高浓度青霉素裂解液直接结晶的 6-APA

青 霉 素		转化率 (%)	产品 (g)	收率 (%)	纯度 (%)	水份 (%)	色级 (OD)	透光 (%)	母 液		
投料 (g)	浓度 (%)								体积 (ml)	单位 (mg/ml)	残留量 (%)
30	7.5	98.4	12.7	71.8	100.0	0.23	0.014	94.0	620	4.82	17.2
30	8.0	—	12.7	72.9	94.0	0.20	0.019	93.0	605	5.20	18.1

面积大,催化效率高。与以前报道的用于制备 6-APA 的明胶-戊二醛固定化细胞<sup>[1,3]</sup>和琼脂包埋固定化细胞<sup>[2]</sup>比较,裂解率、转化率和产品收率均有显著提高。

在提取 6-APA 过程中,由于裂解浓度提高,其体积相对缩小,因此,降低了能耗、节省了 时间,有利于工业生产。从表 4 和表 5 中可以看出,转化率基本相同的青霉素裂解液,直接提取 6-APA 产率偏低,这是由于一部分 6-APA

残留在母液中所致。该固定化细胞裂解 3.0—8.0% 青霉素溶液,连续使用六次以后,酶活力仍保留原酶活力的 100.0%。

### 参 考 文 献

- [1] 刘光荣等:医药工业,8: 1—3, 1979。
- [2] 孙万儒等:微生物学报,20(4): 407—414, 1980。
- [3] 王庆诚等:生物化学与生物物理学报,12(4): 305—310, 1981。