

磁性聚合物微球固定化青霉素 G 酰化酶 用于催化合成头孢克洛

胡春苗, 薛屏*, 曹雪荣, 张玮玮

(宁夏大学化学化工学院, 省部共建煤炭高效利用与绿色化工国家重点实验室, 宁夏银川 750021)

摘要: 利用反相悬浮技术制备出平均孔径和比表面积分别为 13.0 nm 和 123.6 m²/g 的磁性聚合物微球, 其具有超顺磁性, 饱和磁化强度为 6.04 emu/g。磁性微球固定化青霉素 G 酰化酶在乙二醇-磷酸盐缓冲溶液共溶剂体系中催化 7-氨基-3-氯-3-头孢烯-4-酸(7-ACCA)与 D-苯甘氨酸甲酯(D-PGM)合成头孢克洛, 20℃ 反应 2 h 时, 头孢克洛产率为 33.0%, 合成与水解比(S/H)为 0.13; 而在相同反应条件下使用游离青霉素 G 酰化酶, 产率和合成与水解比分别为 17.0% 和 0.08。同时考察了酶用量、反应温度以及溶剂对磁性固定化酶催化合成头孢克洛性能的影响规律。

关键词: 头孢克洛; 磁性聚合物微球; 固定化青霉素 G 酰化酶; 共溶剂体系

中图分类号: TQ426

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2018)04-0095-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2018.04.022

Synthesis of cefaclor over Penicillin G acylase immobilized on magnetic polymer microspheres

HU Chun-miao, XUE Ping*, CAO Xue-rong, ZHANG Wei-wei

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, State Key Laboratory of High-efficiency Utilization of Coal and Green Chemical Engineering, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The magnetic polymer microspheres, with an average pore diameter of 13.0 nm and a specific surface area of 123.6 m²·g⁻¹, are synthesized by inverse suspension polymerization method. The prepared microspheres exhibit super paramagnetism for the immobilization of penicillin G acylase (PGA), with saturation magnetization of 6.04 emu·g⁻¹. Cefaclor is synthesized by catalytic reaction between 7-amino-3-chloro-cephems-3-en-4-acid (7-ACCA) and D-phenyl glycine methyl ester (D-PGM) over the magnetic polymer microspheres-immobilized PGA in ethylene glycol-phosphate buffer solvent system. The yield of cefaclor reaches 33.0% after the reaction has performed for 2 h at 20℃, and the molar ratio of synthesis to hydrolysis (S/H) is 0.13 after reaction. The yield of cephalixin and the S/H value are 17.0% and 0.08 respectively while the free penicillin G acylase is used under the same reaction conditions. The effects of enzyme content, reaction temperature and solvent on cefaclor synthesis over the magnetic immobilized PGA are studied.

Key words: cefaclor; magnetic polymer microspheres; immobilized penicillin G acylase; co-solvent system

头孢克洛是广泛应用于临床的抗感染药物, 其杀菌作用是使转肽酶失活, 干扰细菌细胞壁最终阶段的合成, 阻止粘肽原的交联。因而, 对多种革兰阳性菌、革兰阴性菌均具有很强的杀灭作用。头孢克洛的制备主要采用化学法, 最常用的 2 种方法是 Lilly 路线和盐野义路线^[1-2], 虽然工艺路线有所不同, 但都使用有毒性物质和大量的有机溶剂, 产生大量的“三废”, 因此, 化学法始终没有摆脱对环境产生严重污染问题。由青霉素酰化酶催化 7-氨基-3-氯-3-头孢烯-4-酸和苯甘氨酸甲酯缩合制备头孢克洛的酶法工艺, 由于具有反应条件温和、绿色环保、无毒副作用等化学法难以比拟的优势, 受到了人们的高度关注^[3-5]。如何提高固定化青霉素酰化酶的催化活性和重复使用性, 降低固定化酶的制备成本, 是酶法合成头孢克洛技术目前面临的挑战性课

题。笔者针对青霉素酰化酶的固定化制备出多孔磁性聚合物微球载体, 利用制备的磁性固定化青霉素酰化酶, 在有机物-磷酸盐缓冲溶液共溶剂中催化 7-ACCA 与 D-PGM 发生缩合反应合成头孢克洛, 考察了温度、酶用量、反应溶剂等因素对磁性固定化酶催化合成头孢克洛的影响。

1 试剂与仪器

7-氨基-3-氯-3-头孢环-4-羧酸(7-ACCA), 武汉富驰生物科技有限公司生产; D-苯甘氨酸甲酯盐酸盐(D-PGM·HCl), 扬州市奥鑫助剂厂生产; FeCl₂·4H₂O、FeCl₃·6H₂O、正庚烷、四氯乙烯、硬脂酸钙(CS)、Span 60、甲酰胺、甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、N-乙炔吡咯烷酮(NVP)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)、偶氮二异丁腈(AIBN)、丙酮、青

收稿日期: 2017-09-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(21663020)资助

作者简介: 胡春苗(1995-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为功能材料与生物催化, h13629512963@163.com; 薛屏(1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向为功能材料与生物催化转化, 通讯联系人, ping@nxu.edu.cn。

霉素酰化酶(PGA),浙江顺风海德尔公司生产。

德国布鲁克 AXS 公司生产的 QUANTAX 型扫描电子显微镜;日本 RigaKu 公司生产的 D/Max-2200PC 型 X 射线粉末衍射仪;美国 Micromeritics ASAP-2010 型自动物理吸附分析仪;美国 Lake Shore 7304 振动样品磁强计。

2 实验部分

2.1 磁性聚合物微球的制备与表征

Fe_3O_4 磁流体的制备:将 2.0 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 4.73 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 200 mL 去离子水中,加热至 90℃,搅拌下滴入浓氨水至 pH 为 8~9。悬浮液在 90℃ 下熟化 30 min 后进行过滤分离,黑色固体用去离子水洗至中性后烘干,得到 Fe_3O_4 磁粉。称取一定质量的 Fe_3O_4 磁粉与甲酰胺混合,搅拌分散得到 Fe_3O_4 磁流体。将另一装有回流冷凝管、恒速搅拌器以及导气管的三颈烧瓶中,在 60℃ 恒温下加入由正庚烷与四氯乙烯混合组成的疏水性混合溶剂,搅拌下加入一定量的硬脂酸钙和 Span 60 复合表面活性剂。将上述制备的 Fe_3O_4 磁流体加入其中,搅拌一段时间后,再加入一定配比的单体 GMA、NVP 和 MBAA,搅拌 30 min 后转移至预热的悬浮介质中。在 60℃ 下分散 45 min 后,向其中加入 1.0 g AIBN,溶解 5 min 后通氮气,使反应在惰性环境下进行 5 h 后停止,微球经丙酮洗涤抽提处理后,在室温下干燥至恒重,用 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{GMN}$ 表示。

多孔磁性聚合物形貌观察采用德国布鲁克

AXS 公司生产的 QUANTAX 扫描电子显微镜;物相分析采用日本 RigaKu 公司生产的 D/Max-2200PC 型 X 射线粉末衍射仪;比表面积、平均孔径及孔隙采用美国 Micromeritics ASAP-2010 自动物理吸附分析仪进行测定;磁性能由美国 Lake Shore 7304 振动样品磁强计(VSM)测定,磁场强度范围 $-1.6 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^6$ A/m。

2.2 PGA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{GMN}$ 的制备

称取 0.06 g $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{GMN}$,用去离子水溶胀 2 次,吸去水后,加入 2.0 mL 1.0 mol/L pH 7.8 磷酸盐缓冲溶液中浸泡 10 min,加入 0.2 mL PGA 溶液,并置于 30℃ 摇床中反应 48 h,制得的固定化酶用 PGA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{GMN}$ 表示。磁场作用下分离固定化酶,去离子水反复洗涤直到紫外分光光度计检测不出滤液中的蛋白为止。用 1.0 mol/L pH 7.8 磷酸盐缓冲溶液浸泡并置于冰箱冷藏备用。

2.3 PGA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{GMN}$ 催化合成头孢克洛与产物分析

在装有 1 mL 溶剂的反应器中加入 D-PGM 和 7-ACCA 及固定化酶 PGA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{GMN}$,反应器置于一定温度的水浴摇床,控制转速为 120 r/min 进行反应。反应液经 0.45 μm 微滤膜过滤,底物和产物由装有反相 C_{18} (Venusil XBP, 4.6 mm \times 200 mm) 色谱柱的 FL2200 高效液相色谱检测。以乙酸钠缓冲溶液(50 mmol/L pH 5.0)和甲醇为流动相,二者体积比为 78:22,检测波长为 254 nm,柱温为 30℃,进样量为 10 μL ,流速为 1 mL/min。

(上接第 94 页)

- [2] Guo J, Yu J. Sorption characteristics and mechanisms of Pb(II) from aqueous solution by using biofloculant MBFR10543[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(14): 6431-6441.
- [3] 石春芳,冷小云.微生物絮凝剂在制药废水处理中的应用研究[J].现代化工,2015,(9):85-87.
- [4] Junyuan G, Chunping Y, Lanyan P. Preparation and characteristics of bacterial polymer using pre-treated sludge from swine wastewater treatment plant[J]. Bioresource Technology, 2014, 152(15C): 490-498.
- [5] Okaiyeto K, Nwodo U, Okoli A, et al. Studies on Biofloculant Production by Bacillus sp. AEMREG7[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2016, 25(1).
- [6] Eman Z G. Production and characteristics of a heavy metals removing biofloculant produced by Pseudomonas aeruginosa[J]. Polish Journal of Microbiology, 2012, 61(4): 281-289.
- [7] 高万超,杨朝晖,黄斌,等.微生物絮凝剂捕集 Cu(II) 的响应面优化及机理研究[J].环境工程学报,2011,5(11):2411-2416.
- [8] Subudhi S, Batta N, Pathak M, et al. Biofloculant production and biosorption of zinc and lead by a novel bacterial species, Achro-
- mobacter sp. TERI-IASST N, isolated from oil refinery waste[J]. Chemosphere, 2014, 113: 116-124.
- [9] Chen H, Zhong C, Berkhouse H, et al. Removal of cadmium by biofloculant produced by Stenotrophomonas maltophilia using phenol-containing wastewater[J]. Chemosphere, 2016, 155: 163-169.
- [10] 母哲轩,王华林,孙敏,等.微生物絮凝剂絮凝条件的响应曲面法优化[J].环境化学,2010,29(2):241-245.
- [11] 李昊.巨大芽孢杆菌絮凝剂的制备及其处理重金属废水的实验研究[D].昆明:昆明理工大学,2015.
- [12] 袁媛.自支撑地质聚合物无机膜的制备及其在废水处理中的应用[D].南宁:广西大学,2015.
- [13] 刘世念,杨梦凡,齐亮,等.重金属螯合絮凝剂 ISXA 的特性及应用研究[J].工业水处理,2016,36(7):70-74.
- [14] 王丽丽.复合型生物絮凝剂的结构和特性及去除重金属离子的研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2011.
- [15] 冯婧.微生物絮凝剂 MBFGA1 处理含铅废水的吸附行为及机制研究[D].长沙:湖南大学,2014.
- [16] 曹芳,余秀梅,郭娟利,等.巨大芽孢杆菌 MBFF6 产絮凝剂培养条件的优化及絮凝剂的化学性质[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2012,38(6):669-674. ■

3 结果与讨论

3.1 磁性聚合物微球 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的性质分析

制备的磁性聚合物微球 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的 SEM 照片如图 1 所示。

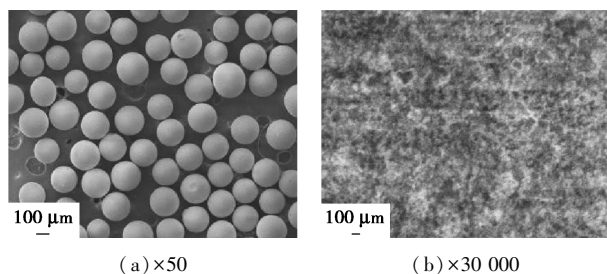


图 1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的 SEM 照片

由图 1(a) 可以看出, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的球形度非常好, 粒径大小均匀, 大约在 $150 \sim 200 \mu\text{m}$ 。从图 1(b) 可以看出, 微球中存在大量的孔。在聚合过程中, 微胶粒堆积紧密, 形成孔道结构, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的孔径分布如图 2 所示。由图 2 可以看出, 孔径分布较窄, 主要分布在 $1 \sim 38 \text{ nm}$ 。由低温 N_2 吸附方法测得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的比表面积为 $123.6 \text{ m}^2/\text{g}$, 平均孔径和孔容分别为 13.0 nm 和 $0.50 \text{ cm}^3/\text{g}$ 。

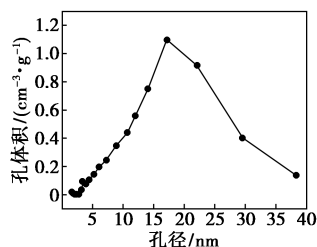
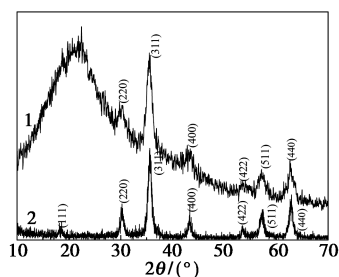


图 2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的孔径分布

$\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 和 Fe_3O_4 微粒的 XRD 谱图如图 3 所示。从图 3 可以看出, 2θ 为 30.2° 、 35.7° 、 43.3° 、 57.34° 、 62.81° 的衍射峰, 分别对应于反尖晶石结构 Fe_3O_4 衍射峰的 $\{220\}$ 、 $\{311\}$ 、 $\{400\}$ 、 $\{422\}$ 、 $\{511\}$ 、 $\{440\}$ 晶面。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 出现了与 Fe_3O_4



1— $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$; 2— Fe_3O_4

图 3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 和 Fe_3O_4 微粒的 XRD 谱图

相对应的衍射峰, 说明在聚合过程中, Fe_3O_4 晶相没有发生变化。化学法测得此聚合物微球中 Fe_3O_4 质量分数为 3.9%。在 $15 \sim 30^\circ$ 出现较宽的衍射峰, 是非晶态聚合物的特征峰。

$\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的磁滞回线如图 4 所示。磁滞回线呈“S”形, 说明合成的微球具有铁磁性; 磁滞回线关于原点对称, 当外加磁场 $H=0$ 时, 剩磁和矫顽力均为 0, 表明磁性微球具有超顺磁性。由磁化曲线可知, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的饱和磁化强度为 6.04 emu/g 。

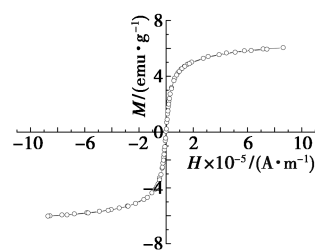


图 4 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 的磁化曲线

3.2 PGA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 催化合成头孢克洛

酶法合成头孢克洛过程中由于底物易被 PGA 水解, 合成反应中既有产物的合成, 也有底物和产物的水解^[6]。磷酸盐缓冲溶液或是磷酸盐缓冲溶液中添加部分有机物, 固定化酶的催化性能不同, 相比较而言, 添加有机物可有效地抑制 D -PGM 的水解反应, 有利于提高产率^[7]。

3.2.1 PGA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 在不同溶剂中合成头孢克洛

选择醇类以及与其极性相近的二甲基亚砜 (DMSO)、 N,N -二甲基甲酰胺 (DMF) 等分别与 pH 为 6.4 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液混合构成共溶剂作为反应溶剂, 研究 PGA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 合成头孢克洛的催化性能。控制有机物的体积分数为 40%, 反应温度为 20°C , 溶剂 pH 为 6.4, 7-ACCA 和 D -PGM 的浓度分别为 40、160 mmol/L, PGA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{GMN}$ 用量为 60 mg, 进行合成头孢克洛反应。结果如表 1 所示。

从表 1 中的数据可以看出, 在体积分数为 40% 的乙二醇中, 反应 2 h, 头孢克洛的产率达到 32.0%, 在其他溶剂中, 头孢克洛的产率较低。从溶解度分析, 是由于乙二醇更易于溶解底物 7-ACCA。Kim 等^[8] 报道了有机溶剂对酶活性的影响, 不是有机溶剂本身使酶失活, 而是和有机溶剂分子与 PGA 活性位相互作用有关。Wei 等^[9] 在体积分数为 40% 的乙二醇中合成氨苄西林, 基本保持了水相中的 PGA 90% 以上的活性, 产率较水相从 39% 提高到

表 1 不同有机物-磷酸盐缓冲溶液共溶剂中合成头孢克洛

有机物-磷酸盐缓冲溶液 (有机物 40%, 体积比)	产率/%				
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
乙二醇	13.0	32.0	11.3	9.2	6.3
二甲基亚砜	4.3	5.0	5.8	8.7	10.9
甲酰胺	—	—	2.1	2.0	2.0
二甲基甲酰胺	—	—	1.9	1.8	1.8
甲醇	—	—	2.0	1.9	1.7
乙腈	—	—	2.6	3.0	1.5
异丙醇	—	—	2.6	2.7	2.7
正丁醇	—	—	2.5	2.3	2.0

65%。说明乙二醇的适量添加不仅可以保证酶应有的催化活性,还可有效地降低水的活度,抑制水解反应发生。

3.2.2 PGA/Fe₃O₄@GMN 在乙二醇-磷酸盐缓冲溶液共溶剂中合成头孢克洛

反应体系中添加亲水性或疏水性有机物势必会影响水的活度,而水的活度又关系到 PGA 的催化活性。因此,考察了共溶剂体系中有有机物的体积分数对合成头孢克洛反应的影响,如表 2 所示。

表 2 不同体积分数的乙二醇-磷酸盐缓冲溶液共溶剂中合成头孢克洛

反应时间/h	30%			40%			50%		
	产率/%	HR/%	S/H	产率/%	HR/%	S/H	产率/%	HR/%	S/H
1	2.30	69.1	0.01	13.0	59.1	0.05	5.40	46	0.04
2	16.6	74.4	0.07	33.0	62.3	0.13	17.0	54	0.10
3	19.3	79.9	0.08	11.2	74.3	0.04	15.6	65	0.07
4	8.90	89.7	0.03	9.2	79.5	0.03	9.90	70.7	0.04

注:HR 为 D-PGM 自身水解率;S/H 为合成与水解比。

反应条件: pH 为 6.4, 反应温度为 20℃, 7-ACCA 的浓度为 40 mmol/L, D-PGM 的浓度为 160 mmol/L, PGA/GMN 质量为 60 mg。

从表 2 中可以看出,当乙二醇体积分数为 40% 时,PGA/Fe₃O₄@GMN 催化合成头孢克洛的产率较高。D-PGM 自身水解率 HR 的时间进程显示,随着有机溶剂体积分数的增加,底物的水解率逐渐降低。说明向反应体系中添加乙二醇可有效地抑制 D-PGM 的水解。但是添加的过少,D-PGM 水解反应严重,过多,有效抑制 D-PGM 的水解反应,但不可避免对酶活性产生影响,二者都不利于产率的提高。合成与水解比 S/H 如表 2 所示,反应体系中添加体

积分数为 40% 的乙二醇时,S/H 值最高。

3.2.3 PGA/Fe₃O₄@GMN 用量的确定

改变 PGA/Fe₃O₄@GMN 的用量,考察酶量分别为 40、60、80、100 mg 对合成头孢克洛的影响,结果如图 5 所示。由图 5(b)可以看出,随着固定化酶用量的增大,D-PGM 水解速率也在增大。由图 5(a)、图 5(c)可以看出,产率以及 S/H 都在反应 2 h 达到最大。固定化酶用量为 60 mg 时,产率最大,为 33.0%,S/H 为 0.13。固定化酶用量过少,反应太慢,反应体系尚未达到所希望的高转化率,底物和产物已开始自身水解,导致产率和 S/H 偏低;固定化酶用量过大,D-PGM 水解速率明显增大,反应向水解方向进行的趋势显著增加,生成的产物也会被迅速水解,同样不利于产率和 S/H 的提高。综合考虑,固定化酶 PGA/GMN 最佳用量为 60 mg。

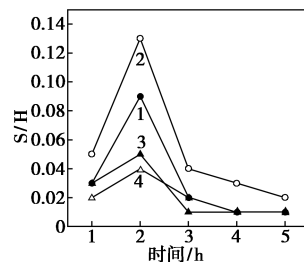
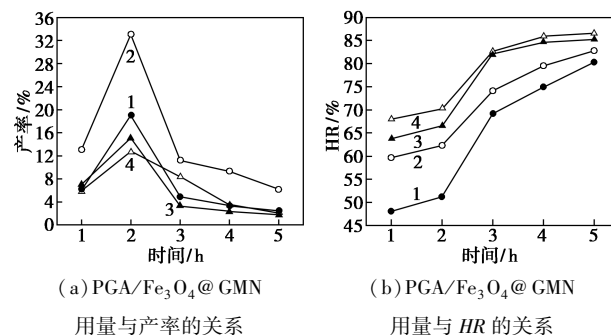


图 5 固定化酶的用量对合成头孢克洛的影响

反应条件: pH 为 6.4, 反应温度为 20℃, 7-ACCA 的浓度为 40 mmol/L, D-PGM 的浓度为 160 mmol/L。

3.2.4 反应温度的确定

控制其他条件不变,考察反应温度对合成头孢克洛的影响,结果如表 3 所示。由表 3 可以看出,当反应温度为 25℃ 时,反应 1 h 达到最大产率 27.5%;温度为 15℃ 时,反应 3 h 达到最大产率 16%;20℃ 时,反应 2 h 达到 33.0% 的最大产率。高温会加剧 D-PGM 水解反应,也可以加快反应速率,而较低的温度虽可抑制底物和产物的水解却又减缓了反应速率。故选择 20℃ 进行合成头孢克洛的反应。

表3 反应温度对合成头孢克洛的影响

反应 时间/ h	25℃			20℃			15℃		
	产率/ %	HR/ %	S/H	产率/ %	HR/ %	S/H	产率/ %	HR/ %	S/H
1	27.5	54.1	0.12	13.1	59.7	0.05	11.8	52.0	0.05
2	21.2	65.4	0.08	33.0	62.3	0.13	14.4	57.1	0.06
3	13.8	79.0	0.04	11.2	74.1	0.04	16.0	67.4	0.06
4	9.4	83.4	0.03	9.3	79.5	0.03	14.1	72.9	0.05
5	6.2	88.4	0.02	6.2	82.8	0.02	8.1	77.9	0.02

反应条件:pH为6.4,7-ACCA的浓度为40 mmol/L,D-PGM的浓度为160 mmol/L。PGA/Fe₃O₄@GMN质量为60 mg。

3.3 PGA/Fe₃O₄@GMN与游离PGA的催化性能比较

在优化条件下合成头孢克洛,其中一个反应中加入60 mg固定化酶PGA/Fe₃O₄@GMN;另一个反应中加入0.2 mL游离PGA,实验结果如表4所示。

表4 PGA/Fe₃O₄@GMN与游离PGA催化性能比较

反应 时间/h	PGA/Fe ₃ O ₄ @GMN			游离PGA		
	产率/%	S/H	HR/%	产率/%	S/H	HR/%
1	12.5	0.05	60.0	6.5	0.05	52.5
2	33.0	0.13	62.3	17.0	0.08	58.3
3	11.0	0.04	73.2	10.2	0.03	68.2
4	9.5	0.03	78.4	7.5	0.01	73.5
5	7.5	0.02	84.5	6.0	0.01	78.3

由表4可以看出,游离PGA的蛋白含量多于固定化酶PGA/Fe₃O₄@GMN,但是其易于团聚,局部浓度过高,最终导致其催化活性不能充分发挥。PGA/Fe₃O₄@GMN显示了其较高的催化活性,催化合成头孢克洛的最大产率为33.0%,S/H为0.13,HR为62.3%。而游离PGA催化下的反应产率仅为17%,S/H为0.08。PGA经Fe₃O₄@GMN微球固定化后,获得较高的反应活性,在取得高产率的同时能够获得较高的S/H,HR也较低。由于固定化酶的超顺磁性,可将其从反应液中分离而得以重复使用。

3.4 PGA/Fe₃O₄@GMN的重复使用性

反应结束后将PGA/Fe₃O₄@GMN在磁场中分离,用0.1 mol/L pH 7.8的磷酸钠缓冲溶液洗涤数次后在4℃储存。在已优化的条件下重复使用PGA/Fe₃O₄@GMN催化合成头孢克洛,结果如表5所示。

表5 固定化酶PGA/Fe₃O₄@GMN的重复使用性

重复使用次数	1	2	3	4	5	6	7	8
产率/%	33.0	32.1	30.4	29.6	28.5	27.8	27.5	27.2

由表5可以看出,固定化酶在前4次使用时,头孢克洛的产率从起始的33.0%下降到29.6%。从第4次开始,固定化酶活性几乎保持稳定,保持初始活性的88%。以共价结合的方式固定在Fe₃O₄@GMN微球上的PGA不易脱落,显示出了良好的稳定性。

4 结论

利用合成的磁性聚合物微球固定化青霉素酰化酶催化合成头孢克洛。最佳的反应条件为:40%乙二醇-磷酸盐缓冲溶液共溶剂作溶剂,反应温度为20℃,体系pH为6.4,底物7-ACCA和D-PGM的浓度分别为40、160 mmol/L,固定化酶加入量为60 mg,反应时间为2 h,头孢克洛产率达到33.0%,合成与水解比S/H为0.13。在重复使用前4次,活性略有下降,第4次后,其催化活性稳定,保持初始活性的88%。与游离PGA比较,固定化酶催化合成头孢克洛的最大产率从17%提高到33.0%,具有优良的操作稳定性。由于微球具有很强的磁响应性,更易从反应介质中分离。

参考文献

- [1] 潘月,王佳珉,李端华,等.α-氨基酸酯水解酶合成头孢克洛[J].中国医药工业杂志,2015,46(8):817-822.
- [2] 李鸣海,王炜,蒋宁.3-羟基头孢菌素的合成研究[J].国外医药(抗生素分册),2009,30(5):229-235.
- [3] 颜淑玮,高克亮,魏东芝.固定化酶催化合成头孢克洛与产物的分离纯化[J].华东理工大学学报(自然科学版),2009,35(4):549-553.
- [4] 杨晓章.头孢克洛的合成[D].杭州:浙江大学,2007.
- [5] Kemperman G J, Degelder R, Dommerholt F J, et al. Clathrate-type complexation of cephalosporins with β-naphthol[J]. Chem Eur J, 1999,5(7):2163-2168.
- [6] 邓凯顺,顾兰智,李秀立.酶法合成头孢克洛工艺研究[J].中国抗生素杂志,2015,40(2):96-99,119.
- [7] 刘宝树,栗晓特,张军立,等.生物酶法制备头孢克洛的研究进展-刘宝树[J].中国抗生素杂志,2017,42(5):334-339.
- [8] Kim M G, Lee S B. Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: Interaction of organic solvents with enzymes[J]. J Mol Catal B:Enzym, 1996,1(3-6):181-190.
- [9] Wei D Z, Yang L. Effects of ethylene glycol on the synthesis of ampicillin using immobilized penicillin G acylase[J]. J Chem Technol Biotechnol, 2003,78(4):431-436. ■