



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101007257 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

(21) 申请号 200610086426.9

CN 1062857 A, 1992.07.22,

(22) 申请日 2006.06.19

JP 9-276661 A, 1997.10.28,

(66) 本国优先权数据

审查员 王辉

200610002216.7 2006.01.24 CN

(73) 专利权人 百瑞全球有限公司

地址 英属维尔京群岛托托拉岛

(72) 发明人 王骏 金彩科

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 丁业平 张天舒

(51) Int. Cl.

B01J 8/10(2006.01)

(56) 对比文件

US 6793698 B1, 2004.09.21,

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 8 页

(54) 发明名称

适用于由固相催化剂催化的反应方法

(57) 摘要

本发明公开一种适用于由固相催化剂催化的反应方法,该方法使用包括至少一个反应罐的反应器,该反应罐包括罐体以及安装于罐体内可转动的转轴,该反应罐还包括固定在转轴上的盛有固相催化剂的容器,该容器具有外壁,在整个外壁上分布有可通透反应液和气体但不通透固相催化剂的孔,该固相催化剂同时也作为离心搅拌装置,在反应液中随转轴旋转产生离心力并同时在固相催化剂内造成负压,该离心力迫使反应液沿离心方向贯穿固相催化剂后甩出,而被甩出的反应液随之再循负压流经固相催化剂,如此形成循环回流,从而使反应液和/或气体贯穿固相催化剂并与之充分而有效地接触。该反应方法能够防止催化剂活力下降、延长催化剂的使用寿命,并且应用范围广。

1. 一种适用于由固相催化剂催化的反应方法,所述方法使用包括至少一个反应罐的反应器,所述反应罐包括罐体以及安装于罐体内可转动的转轴,其特征在于:所述反应罐还包括固定在所述转轴上的用于容纳固相催化剂的容器,所述容器具有外壁,在整个外壁上分布有可通透反应液或气体、但不通透所述固相催化剂的孔,所述固相催化剂同时也作为离心搅拌装置,在反应液中随转轴旋转产生离心力并同时在固相催化剂内造成负压,该离心力迫使反应液沿离心方向贯穿固相催化剂后甩出,而被甩出的反应液随之再循负压流经固相催化剂,如此形成循环回流,从而使所述反应液和 / 或气体贯穿所述固相催化剂并与其充分而有效地接触。

2. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述外壁包括第一端面、第二端面以及在第一端面和第二端面之间延伸的周壁。

3. 根据权利要求 2 所述的反应方法,其特征在于:所述外壁的第一端面和第二端面设置有用于穿插转轴的孔,所述的用于穿插转轴的孔的形状和大小与转轴相匹配。

4. 根据权利要求 3 所述的反应方法,其特征在于:所述的用于穿插转轴的孔设置在所述容器的第一端面和第二端面上的中央位置处。

5. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述容器还包括内筒,所述内筒的内径与转轴的外径相匹配。

6. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述反应罐为直立式。

7. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述容器的容积与反应罐的体积之比在 1% 至 95% 之间。

8. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述转轴具有与罐体内外相通的用于输送液体和 / 或气体的孔道。

9. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述容器与转轴之间采用螺栓固定方式。

10. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述容器与转轴之间采用卡箍固定方式。

11. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述容器与转轴之间采用单键或花键固定方式。

12. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述固相催化剂为颗粒状。

13. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述固相催化剂为整块的。

14. 根据权利要求 1 所述的反应方法,其特征在于:所述固相催化剂是固定化酶或固定化细胞。

15. 根据权利要求 14 所述的反应方法,其特征在于:所述固定化酶或固定化细胞为颗粒状。

16. 根据权利要求 14 所述的反应方法,其特征在于:所述固定化酶或固定化细胞为整块的。

17. 根据权利要求 16 所述的反应方法,其特征在于:所述整块的固定化酶或固定化细胞是由酶或表达酶的细胞与开孔的多孔有机泡沫材料制成的,其中所述有机泡沫材料为木浆海绵、聚乙烯醇海绵或三聚氰胺海绵。

18. 根据权利要求 1 至 17 中任意一项所述的反应方法,其特征在于:所述转轴的转速

为 20 ~ 20,000rpm。

19. 根据权利要求 18 所述的反应方法,其特征在于:所述转轴的转速为 50 ~ 10,000rpm。

20. 根据权利要求 18 所述的反应方法,其特征在于:所述转轴的转速为 100 ~ 1,000rpm。

21. 根据权利要求 14 所述的反应方法,其特征在于:所述固定化细胞是表达葡萄糖异构酶的固定化大肠杆菌细胞。

22. 根据权利要求 14 所述的反应方法,其特征在于:所述固定化酶是固定化 D-氨基酸氧化酶。

23. 根据权利要求 14 所述的反应方法,其特征在于:所述固定化细胞是表达戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的固定化大肠杆菌细胞。

24. 根据权利要求 14 所述的反应方法,其特征在于:所述固定化酶是固定化戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶。

适用于由固相催化剂催化的反应方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种反应方法,特别涉及一种反应介质为液体的反应方法。

背景技术

[0002] 在医药工业、食品工业、环保、农业、轻纺工业、化学工业等领域,进行各种反应的反应方法往往借助于反应器而实现,其中所述的各种反应大都需要催化剂进行反应。对于在液态介质中进行的反应,为了提高反应效率,反应物和催化剂必须进行有效的接触。催化剂为固体时尤为如此。

[0003] 在生物、医药工业、食品工业、环保、农业等领域中,酶或含酶的细胞是众多催化剂中比较引人注目的一类催化剂。而且,目前酶或含酶的细胞等多以固定化的形式使用,这是因为固定化酶/固定化细胞通常比溶液酶稳定且可从产品中分离回收、重复使用(生物催化工艺学,孙志浩主编,化学工业出版社,北京,2005年),从而其成本可大幅降低。但大多数包括固定化酶和/或固定化细胞的固相催化剂的催化活力则较相应的溶液酶低。

[0004] 目前,使用固相催化剂的反应器主要有两种:即填充床反应器和搅拌式反应器,其中,搅拌式反应器含有反应罐,该反应罐包括罐体、罐体内的转轴和诸如搅拌桨的搅拌器。一般而言,使用填充床反应器的反应方法较为简单,具体过程为:预先将颗粒状或片状固相催化剂填充到填充床反应器中,反应时底物溶液流经填充床而使得固相催化剂与底物混合以使反应物和催化剂进行有效接触。使用搅拌式反应器的反应方法具体过程为:先将颗粒状或块状的固相催化剂悬浮在反应罐内的底物溶液中,然后在反应时通过搅拌桨进行搅拌或借助于气泡流动而使固相催化剂与底物充分混合以使反应物和催化剂进行有效接触。

[0005] 尽管上述两种反应方法均能实现将固相催化剂与底物的混合而使反应物和催化剂进行有效接触,但在实际应用中不可避免地存在下述问题:

[0006] 就使用填充床反应器的反应方法而言,其存在的问题是:[1]底物与固相催化剂之间的交换效率较低;[2]反应过程不易补料和通气体,也不易调节pH值及温度等;[3]不适于粘性或不溶性底物;[4]使用颗粒较小的固相催化剂时,床层压降大,这导致容易出现阻塞。

[0007] 就使用搅拌式反应器的反应方法而言,尽管其可根据需要来调节各种反应条件,但是在搅拌桨进行搅拌的过程中,由于固相催化剂悬浮在反应罐内的底物溶液中,因此在固相催化剂颗粒之间、固相催化剂颗粒与搅拌桨之间以及固相催化剂颗粒与反应罐罐壁之间均会发生强烈碰撞(酶学,陈石根和周润琦编,复旦大学出版社,上海,2001年;生物反应工程,戚以政和夏杰编着,化学工业出版社,北京,2004年),因而导致固相催化剂颗粒因碰撞而碎裂和磨损,从而使得固相催化剂活力下降、使用寿命变短,并且固相催化剂因碎裂和磨损会产生碎片或粉渣,而这些碎片或粉渣随反应的进行会流失,这会妨碍反应液的后续处理,如产品的过滤和纯化等。而且,众所周知,悬浮在溶液中的固相催化剂颗粒的密度越大、运动(转速)越快,反应的效率就越高;但与此同时,颗粒受碰撞的强度也随之增大,固相催化剂也就越容易碎裂,其活力的下降也越快。因而,使用搅拌式反应器的反应方法的应

用范围受到局限,尤为不适用于本身就易碎的固相催化剂颗粒。

发明内容

[0008] 为克服现有反应方法存在的上述缺陷,本发明提供了这样一种反应方法:其能够防止催化剂活力下降、延长催化剂的使用寿命,并具有交换效率高、反应充分以及应用范围广的特点。

[0009] 本发明提供的技术方案为:提供一种适用于由固相催化剂催化的反应方法,所述方法使用包括至少一个反应罐的反应器,所述反应罐包括罐体以及安装于罐体内可转动的转轴,所述反应罐还包括固定在所述转轴上的盛有固相催化剂的容器,所述容器具有外壁,在整个外壁上分布有可通透反应液和气体、但不通透固相催化剂的孔,所述固相催化剂同时也作为离心搅拌装置,在反应液中随转轴旋转产生离心力并同时在固相催化剂内造成负压,该离心力迫使反应液沿离心方向贯穿固相催化剂后甩出,而被甩出的反应液随之再循负压流经固相催化剂,如此形成循环回流,从而使所述反应液和/或气体贯穿所述固相催化剂并与其充分而有效地接触。

[0010] 在一个具体的实施方案中,所述外壁包括第一端面、第二端面以及在第一端面和第二端面之间延伸的周壁。所述外壁的第一端面和第二端面设置有用以穿插转轴的孔,所述孔的形状和大小与转轴相匹配。所述孔设置在所述容器的第一端面和第二端面上的中央位置处。

[0011] 为了避免容器中的固相催化剂直接与转轴接触或为了便于容器安装到转轴上,所述容器还可以包括内筒,所述内筒的内径与转轴的外径相匹配。此外,所述转轴上还可以设有与罐体内外相通的用于输送液体和/或气体的孔道。

[0012] 所述反应罐的安装方式可以为直立式,也可以为卧式或其它方式。在反应罐中,所述容器与转轴之间可采用螺栓固定方式,或者可采用卡箍固定方式,或者采用单键或花键固定方式等。根据反应的需要,所述容器的容积与反应罐的体积之比可以在1%至95%之间。该体积之比因不同的催化反应和需要而定。一般而言,该体积之比越高,反应进行得越快,故适用于不稳定或易降解的底物和/或产物。但该体积之比过高则会导致催化效率下降;另一方面,该体积之比过小(如少于5%)则降低搅拌效率,从而影响反应速率。

[0013] 在本发明的反应方法中,所述固相催化剂可以是各种各样的固定化酶。一个固相催化剂的具体例子是固定化酶或固定化细胞。该固定化酶和细胞的形状不受特别的限制,可以为颗粒状,片状,或者为一整块,还可以为由一整片卷绕成的柱体。在本发明的具体的实施例中,采用了整块的固相催化剂,该整块的固相催化剂是由酶或表达酶的细胞与开孔的多孔有机泡沫材料制成的,所述有机泡沫材料包括木浆海绵、聚乙烯醇海绵和三聚氰胺海绵。

[0014] 根据所用固相催化剂的性能及其所催化的反应的要求,所述转轴的转速可以在很宽的范围内,例如可以为20~20,000rpm。当转速低于20rpm,反应液不能充分有效地和催化剂接触,反应效率不高,当转速高于20000rpm,消耗的能量比较大,对于节约成本不利。一般优选的范围为50~10,000rpm,更为优选的范围为100~1,000rpm。

[0015] 相对于现有技术,本发明方法的有益效果是:

[0016] 第一,本发明的方法无需采用单独的搅拌器。利用本发明提供的反应方法,装有固

相催化剂的容器具有离心搅拌功能,所谓离心搅拌是在离心作用下使反应液和气体与容器内的固相催化剂接触,就此而言,其效果类似于搅拌桨等搅拌器的搅拌动作所产生的效果,因此本发明提供的反应方法所使用的反应器无需采用搅拌桨等搅拌器。

[0017] 第二,利用本发明提供的反应方法,不存在固相催化剂彼此之间、固相催化剂与搅拌器之间以及固相催化剂与反应罐罐壁之间的碰撞,因而,可以避免固相催化剂因碰撞而碎裂和磨损,从而可以避免固相催化剂因碎裂和磨损而导致酶的活力下降或其使用寿命降低的问题。

[0018] 第三,利用本发明提供的反应方法,可以避免固相催化剂因碎裂和磨损而产生碎片或粉渣,这样也就不会因存在碎片或粉渣而影响反应液的后续处理。

[0019] 第四,本发明提供的反应方法的应用范围广泛,其可应用于在液态介质中进行的各种反应。并且,利用本发明提供的反应方法,不存在固相催化剂彼此之间、固相催化剂与搅拌器之间以及固相催化剂与反应罐罐壁之间的碰撞,因此本发明提供的反应方法不仅适用于固相催化剂颗粒较为坚实的情况,也同样适用于固相催化剂颗粒本身就易碎的情况。另外,根据不同的应用场合,本发明提供的反应方法所使用的反应器以及其中的容器可以采取各种式样,其外形可以是例如圆筒状、球状、棱柱状、方块状等规则形状,也可以是螺旋状、阶梯状等不规则形状。反应器中的容器的安装方式也可以根据实际需要而定,例如可以为卧式、直立式以及倾斜等各种形式。

[0020] 第五,容纳有固相催化剂的容器随转轴旋转时,进入容器内的反应液在离心作用下沿离心方向贯穿固相催化剂后甩出,而被甩出的反应液则循负压再度流经固相催化剂,如此形成循环回流,从而提高了交换效率。另外,由于反应器中容器的整个外壁上都有孔,因而反应液进出容器的效率更高,进而也提高了交换效率。

[0021] 第六,本发明提供的反应方法所使用的反应器中,容器外壁上的孔的大小不受特别的限制,可以视容器中所容纳的固相催化剂的大小等情况而定,只要该孔能够通透反应液和气体而不通透固相催化剂即可,而无需将其局限为孔径较小的微孔。因此,反应液和气体可以顺畅地与容器内的固相催化剂接触,从而可以提高反应效率,使得反应能够更充分地进行。

[0022] 第七,利用本发明提供的反应方法,便于在反应过程中进行补料、通气、pH调节及温度调节等操作,从而克服了使用填充床反应器的反应方法在此方面的缺陷及应用障碍。

附图说明

[0023] 下面结合附图、具体实施方式以及应用实例对本发明进行详细说明。

[0024] 图1是本发明提供的反应方法所采用的反应器的一种结构的示意图;

[0025] 图2是本发明提供的反应方法所采用的反应器的另一种结构的示意图;

[0026] 图3是图1所示反应器的使用状态的结构示意图;以及

[0027] 图4是图1所示反应器一个具体实施方式的结构示意图。

[0028] 图5显示的是表达载体 pRSET-1ac-MGI4-35-kan 的核苷酸序列。

[0029] 图6显示的是表达载体表达载体 pH5-GHA 的核苷酸序列。

[0030] 图7显示的是表达载体 pT7-kan—ACY 的核苷酸序列。

具体实施方式

[0031] 下面结合图 1 对本发明提供的反应方法进行详细说明。

[0032] 首先描述本发明的反应方法所使用的反应器的结构。

[0033] 请参阅图 1, 本发明的反应方法所使用的反应器包括至少一个反应罐, 该反应罐包括罐体 51、转轴 21 和容器 53。转轴 21 安装于罐体 51 内, 其在电机或其它传动装置 (未图标) 的带动下以一定的转速转动。如图所示, 当容器 53 为圆筒状时, 其具有这样的外壁: 即, 包括顶部 (也称为第一端面) 531、底部 (也称为第二端面) 532 以及在顶部 531 和底部 532 之间延伸的周壁 533。在顶部 531、底部 532 和周壁 533 上均可开设有能够通透反应液以及通透气体但不通透固相催化剂的孔。在顶部 531 和底部 532 的中央位置处开设有孔, 在此孔处设置有用将容器 53 固定在转轴 21 上的固定装置 54, 该固定装置 54 例如可以是带螺栓的钢环等。

[0034] 下面具体说明各个组成部分。

[0035] 罐体 51 一般用不锈钢材料制成, 当然也可用其它材料制成, 其外形与罐内转轴 21 和容器 53 的数量和排列有关, 例如, 当罐内只有一根转轴 21 时, 罐体 51 的外形可为圆柱形且两端呈圆弧状; 当罐内有多根转轴 21 时, 罐体 51 的外形可为扁的柱形、波浪柱形或其它形状。并且, 罐体 51 具有一个或多个输液管口以及可拆卸的罐盖和 / 或罐底 (未图标)。安装完成的反应罐可为直立式 (即, 转轴 21 垂直于罐底), 也可为卧式 (即, 转轴 21 平行于罐底), 当然也可为倾斜形式等其它形式。至于罐体 51 的加热、保温以及温度、pH、气体等的检测与调节方式, 可以与现有的反应器相同。

[0036] 转轴 21 可以具有与罐体 51 内外相通的纵向孔道, 因而其兼具输液功能。转轴 21 纵穿罐体 51, 其一端与电机或其它传动装置连接, 另一端连接罐外的输液管道。转轴 21 的支点位于罐体 51 两端罐壁上, 当罐内仅有一根转轴 21 时, 其支点位置优选地位于两端罐壁的中央位置处; 当罐内有多根转轴 21 时, 根据实际需要确定转轴 21 的支点位置。转轴 21 与罐壁的交联处装有轴承和防止漏液的装置 (如油封)。

[0037] 在实际应用中, 转轴 21 的转速为 20 ~ 20,000rpm, 优选的为 50 ~ 10,000rpm, 更为优选的为 100 ~ 1,000rpm。

[0038] 容器 53 可由塑料、不锈钢或其它材料制成, 并且至少有一部分可以拆卸或具有装入固体催化剂的开口, 从而可以向其内装入固体催化剂。容器 53 与整个反应罐的体积之比可在 1% 至 95% 之间。而且, 其外形可以为通常的规则形状, 例如圆筒形的圆盘、圆桶, 球状, 棱柱状, 方块状等; 也可以为不规则形状, 例如螺旋状、阶梯状等各种形状; 或者也可以是网兜等容器, 只要其能够容纳如上所述的固体物质, 并且可以固定到转轴 21 上并随转轴 21 一同旋转。根据容器 53 外形的具体形状确定是否需要将外壁划分为容器顶部 531、容器底部 532 和周壁 533, 以及它们各自的形状。而且, 为加强容器 53 的强度, 可在容器 53 的外壁上设置一个或多个紧固环。并且, 孔的开设位置以及分布形式, 例如是否需要均匀分布, 可以根据容器 53 的外形以及实际需要而定。例如, 当容器 53 为圆盘时, 可以在其整个外壁上开设孔, 也可以根据实际需要仅在顶部 531 和周壁 533 上开设孔, 或者其它开孔形式; 而当容器 53 为球状时, 可以在整个外壁上开设孔, 或者仅在某些局部位置处开设孔。至于孔的大小, 可根据固体催化剂的大小等实际情况而定, 只要保证容器 53 可通透反应液、通透气体而不通透固体物质即可。并且孔越多、孔径越大, 则容器 53 表面上的孔的总面积越大,

也就越有利于反应时的回流。

[0039] 另外,容器 53 可以是单层壁也可以是双层壁的结构。就单层壁结构的容器 53 而言,其顶部 531 和底部 532 的中央位置处开设有与转轴 21 相匹配的孔,用以穿插转轴 21。使用时,先将顶部 531 打开,在容器 53 内装填固相催化剂等固体物质;然后将容器 53 套入转轴 21,合上顶部 531;再将容器 53 固定于转轴 21 上;随后将固定有容器 53 的转轴 21 插入反应罐内。就双层壁结构的容器 53 而言,其外壁层及顶部 531 与单层壁的外壁和顶部 531 相同,而其内壁层是在单层壁容器 53 的底部中央隆起一个与外壁层同高的上下开口的圆柱壳,用以套入转轴 21 并将其固定。双层壁的容器 53 在使用时,先将固相催化剂装填于容器 53 的两层壁之间的空腔内,合上并固定顶部 531,然后套入转轴 21 并将其固定。双层壁结构的容器 53 的优点是便于在一根转轴 21 上穿套多个容器 53。为进一步加强双层壁的容器 53 的强度,在内、外壁之间也可设置数根或一系列紧固架。此外,无论单层壁还是双层壁结构的容器 53,其外壁上均分布有孔。

[0040] 至于固定装置 54 并不局限于带螺栓的钢环,也可以为其它形式的螺栓固定装置,还可以为卡箍固定装置或其它固定装置或者其它固定方式,例如,在容器 53 内加入在液体中可膨胀的物质,当反应液进入容器 53 后,该物质迅速膨胀从而使得容器 53 及其内容物紧紧挤压转轴 21,借助于挤压而产生的摩擦力将容器 53 固定于转轴 21 上。

[0041] 需要指出的是,在如上所述的一个反应罐内,可根据需要配置一个容器 53 或多个容器 53。多个容器 53 可串联在同一根转轴 21 上,也可并联在不同的转轴 21 上,并且多个串联的容器 53 可并列安装于同一反应罐内。而且在如上所述反应器中,可以具有多个反应罐。根据实际需要,这些反应罐可以相互串联或并联,并且,其中一部分反应罐并不仅仅局限于用作反应罐,也可用于其它用途,例如用作预热罐等。

[0042] 请参阅图 2,图中所示结构类似于图 1 中的结构,其中各个部分的结构、功能、以及彼此之间的连接作用关系类似于图 1 所示反应器,对此不再重复说明,并且与图 1 相同的部分采用相同的参考标号。

[0043] 可以看出,图 1 和图 2 所示结构的不同之处仅在于:图 1 中,容器 53 固定在转轴 21 的两侧或将转轴 21 包围在其中;图 2 中,容器 53 仅固定在转轴 21 的侧面。除了在容器 53 和转轴 21 之间或在容器 53 内添加物质并通过容器 53 与转轴 21 挤压而产生的摩擦力将容器 53 与转轴 21 紧紧固定在一起这种方式之外,容器 53 和转轴 21 之间的固定方式可以采用如前所述的各种固定装置和固定方式。

[0044] 可以理解,在图 2 所示的反应器的一个反应罐内,也可根据需要配置一个容器 53 或多个容器 53。多个容器 53 可串联或并联在同一根转轴 21 上,也可并联在不同的转轴 21 上,并且多个串联的容器 53 可并列安装于同一反应罐内。

[0045] 下面说明本发明提供的反应方法的原理和过程。

[0046] 本发明提供的反应方法使用图 1 所示的反应器。进行反应时,容器 53 中装有诸如固相催化剂等的固体物质,罐体 51 内装有反应液等,反应液可通过容器 53 外壁上的孔进出容器 53。当容纳有固体物质的容器 53 与转轴 21 一同旋转时,进入容器 53 内的反应液在离心作用下沿离心方向贯穿固相催化剂等的固体物质,使反应液和气体与容器 53 内的固体物质中的酶等充分接触。该方式的作用结果类似于搅拌桨等搅拌器的作用结果,因此,也可以将固相催化剂 53 视为搅拌桨或转子。由此可见,在本发明的反应方法中,容器 53 既起

容器的作用,即,用于容纳固体物质;也起搅拌器的作用,即,用于使反应物和固体物质中的酶等充分接触。本申请中,搅拌器包括搅拌桨等各种形式的搅拌部件,只要其搅拌动作和效果类似于搅拌桨即可。

[0047] 下面参阅图 3 说明利用本发明提供的反应方法进行反应时的过程。其中,图 3 所示的反应器的结构与图 1 相同,在此不再赘述。

[0048] 使用时,首先将预先制备的颗粒状、片状或整块的固相催化剂(61)装入容器 53,封闭容器 53 的上盖(顶部 531)后将容器 53 固定在反应罐内的转轴 21 上,容器 53 上开设的孔可通透反应液、通透气体而不能通透整块固相催化剂或固相催化剂颗粒(61)。然后,将容器 53 装入反应罐,关闭罐盖,向罐体 51 内注入适当温度和体积的反应液。之后,启动电机或其它传动装置以带动转轴 21 离心旋转。这样,当容纳有整块固相催化剂或固相催化剂颗粒(61)的容器 53 随转轴 21 旋转时,进入容器 53 内的反应液在离心作用下沿离心方向贯穿整块固相催化剂或固相催化剂颗粒(61),从而使反应液和气体与容器 53 内的固相催化剂接触。逐步调整转速至最佳反应效率,一般而言,转速越快,上述回流越快,底物与酶分子接触越频繁,而底物/产物与含酶分子等的交换也就越快,反应速度也随之加快。

[0049] 上述反应可批量、半批量半连续或连续进行。所谓批量反应,指的是反应完成后排放全部反应液,然后注入新的底物溶液进行下一轮反应;所谓半批量半连续,指的是在反应过程中底物连续或批量加入、而产物批量或一次性排出;所谓连续反应,指的是反应进行过程中反应液不断地输入罐内,罐内液体也以同样的流速连续输出,反应持续进行。在实际使用中,也可将多个反应罐串联起来进行连续反应以提高总体反应效率。并且,当有气体参与反应时,反应罐处设有专门的气体排出装置,并可借此调节罐内气体的压力。

[0050] 顺便说明,上述整块固相催化剂可以这样制成:即,采用开孔、多孔有机泡沫材料如木浆海绵、聚乙烯醇海绵和三聚氰胺海绵等作为固定化载体,先将开孔的多孔有机泡沫材料预制成颗粒、片带状、蜂窝块状或其它整体结构的载体,再用多元醛及蛋白质凝絮剂将酶或细胞凝絮交联于载体的三维网壁上,从而得到整块固相催化剂。当然,在实际应用中也可以使用类似的方法来制造其它的固体物质。

[0051] 请参阅图 4,通过一个具体实施方式对本发明的反应方法所使用的反应器作进一步的说明。

[0052] 在本实施方式中,反应器包括一个反应罐。该反应罐的罐体 51 由不锈钢材料制成,形状为圆筒形,其内径为 11cm,内高为 6.4cm;罐壁为双层结构,两层罐壁之间为循环水信道 1,罐壁的外层开设有与该信道 1 相连的循环水输入口 2 和循环水输出口 3,输入口 2 和输出口 3 连接恒温水浴。

[0053] 罐体 51 底部开设有四个孔,分别通向放料口 40、取样口 5、输液口 6 及通气口 7。其中,放料口 40 处设置有放料阀 4;通气口 7 由外向内通向嵌于罐底内表的环形管道 8。该环形管道 8 上有众多的细孔通向罐内。罐体 51 底部的中央位置处设置有与转轴 21 相匹配的油封 9 和下轴承 10。

[0054] 罐体 51 顶部为圆形罐盖 11,罐盖 11 的中央隆起形成隆起顶部 12。隆起顶部 12 的内表面设置有连接转轴 21 的上轴承 13。罐盖 11 上开设有三个小孔,分别通向排液口 14、补液口 15 及排气口 16。排气口 16 位于隆起顶部 12 的中央位置处。罐盖 11 上另有两孔,分别用于安装 pH 和温度探测电极 17 以及进料口螺旋盖 18。罐盖 11 经四个螺丝 19 与罐口

吻合固定,罐口与罐盖 11 的吻合面有一环形橡胶密封圈(未图标)。

[0055] 罐内有网盘 20 和转轴 21。转轴 21 直径约为 2cm。网盘 20 由不锈钢网板制成,直径为 10cm,高为 5.1cm,网盘 20 上端为网盘盖 22。网盘壁、网盘底及网盘盖 22 均布满孔,孔直径为 2mm,孔分布密度为 9 个/cm²。在网盘 20 的中央位置处插入转轴 21,网盘盖 22 和网盘底同转轴 21 的接合处以固定螺栓 23 固定;转轴 21 内有纵向孔道 24,此孔道 24 的顶部、上端 25 及中下端 26 分别通向排气口 16、罐盖 11 隆起的内腔及网盘 20 的内腔。顺便说明,在本实施例中网盘 20 为前述容器 53 的一种表现形式。

[0056] 调速直流电机(例如,DC 直流马达,200 瓦,VEM MOTORS CO.,LTD. HK)位于罐体 51 底部中央,电机轴经活动关节与罐内转轴 21 连接。

[0057] 需要指出的是,本实施方式的反应器可以利用本发明的反应方法的基本原理对现行常规的搅拌式反应器进行改造而获得。同现行常规的搅拌式反应器相比,本实施方式中的固相催化剂既是催化剂,又是具离心搅拌功能的搅拌器(转子);固相催化剂搅拌产生的离心力和负压进而强化其所具有的催化作用。并且,在现行的搅拌式反应器中的催化反应中,固相催化剂与底物(反应液)的旋转方向和速度基本相同;而在本发明的反应方法所使用的反应器中,反应液与固相催化剂的旋转方向和速度不同,并且固相催化剂搅拌产生的离心力和形成的负压有利于底物传质和产物传质的回流。此外,反应是不断循环的混匀体系,故易施行补料、通气、温度调节、pH 调节等操作。

[0058] 进一步需要指出的是,本发明的反应方法所使用的反应器的具体操作过程及各个参数的设定将视具体应用而定。

[0059] 下面,通过应用实例来对本发明的反应方法的原理、用途和有益效果作更为详尽的说明。

[0060] 实例 1. 悬浮搅拌对固定化酶载体的损伤

[0061] 采用图 4 所示的反应器,将目前广泛使用的颗粒状固定化酶树脂载体 Sepabeads EC-EP(Grazu V, Abian O, Mateo C, Batista-Viera F, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. *Biotechnol Bioeng.* 2005,90 :597-605 ;Grazu V, Abian O, Mateo C, Batista-Viera F, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. *Biomacromolecules.* 2003,4 :1495-1501) 以及颗粒状固定化葡萄糖异构酶分别进行网盘搅拌(即,如上所述将颗粒状固定化酶树脂载体和固定化葡萄糖异构酶 分别装入容器 53 内,容器 53 跟随转轴 21 作离心旋转而获得的搅拌作用)及悬浮搅拌试验,比较树脂载体的损伤程度。Sepabeads EC-EP 购自意大利 Resindion S. R. L 公司。颗粒状固定化葡萄糖异构酶购自 Sigma, St. Louis, MO)。

[0062] 悬浮搅拌实验采用现有的常规的搅拌型反应器来实现,其中转轴直径约为 2cm,该转轴具有不锈钢叶片(转轴上有四个对称的长 26mm、宽 20mm、厚 2.4mm 的矩形叶片,叶面平行于转轴,叶片边角圆滑),并且反应罐可以不具有放料口、通气口、取样口及输液口,具体过程为:分别将不同数量的 Sepabeads EC-EP 或颗粒状固定化葡萄糖异构酶直接加入反应罐;然后将反应罐注满蒸馏水,以不同的转速密闭旋转搅拌 1 小时;最后,收集搅拌后的 Sepabeads EC-EP 或固定化葡萄糖异构酶。

[0063] 网盘搅拌实验采用本发明的反应方法所提供的反应器来实现,所用的反应器与上述的悬浮搅拌式反应器基本一样,只是带有叶片的转轴被固定有网盘 20 的转轴 21 代替。本发明的反应方法所提供的反应器的转轴 21 直径约为 2cm。网盘 20 由不锈钢网板制成,直

径为 10cm, 高为 5.1cm, 网盘 20 上端为网盘盖 22, 下端为网盘底。网盘壁、网盘底及网盘盖 22 均布满孔, 孔直径为 2mm, 孔分布密度为 9 个/cm², 在此盘的所有内表面包括底、盖和周壁的内表面上衬有孔径为 200 目的滤布。网盘 20 中央插入转轴 21, 网盘盖 22 和网盘底与转轴 21 的接合处以固定螺栓固定。实验的具体过程为: 首先, 分别用不同数量的 Sepabeads EC-EP 或颗粒状固定化葡萄糖异构酶装填网盘 20; 然后, 装填后用海绵将网盘 20 余空填实; 再后, 将反应罐注满蒸馏水后, 以不同的转速密闭旋转搅拌 1 小时; 最后, 收集搅拌后的树脂颗粒。

[0064] 将经网盘搅拌实验和悬浮搅拌实验搅拌后的 Sepabeads EC-EP 或固定化葡萄糖异构酶以及作为对照的未经搅拌的 Sepabeads EC-EP 或固定化葡萄糖异构酶烘干, 用激光粒径测定仪 (LS13320, Laser Diffraction Particle Size Analyzer, LS13320, Beckman) 测试其颗粒的直径。结果如表 1 所示, 与未经搅拌的 Sepabeads EC-EP 树脂载体相比, 网盘 20 中的树脂载体经搅拌后其颗粒大小基本不变; 而直接加入反应罐的树脂载体经 1 小时搅拌后有明显破损造成其颗粒直径变小, 而且破损程度随树脂载体密度的增大和搅拌速度的加快而增加, 例如当 Sepabeads EC-EP 用量为 100 克、搅拌速度为 800rpm 时, 仅经 1 小时的搅拌, 其颗粒直径 (平均) 就大幅减小, 减小幅度达 13.6% 之多, 若以体积计, 则其体积减小 35% ($V = 4/3 \pi R^3$)。故现行工业搅拌反应实际上均无法采用高密度固定化酶。而从本实例可见, 高速旋转 (类似于剧烈搅拌) 对置于网盘 20 内的高密度的树脂载体几乎无损伤。而且, 直接搅拌对固定化葡萄糖异构酶的损伤也远远大于置放在网盘 20 中的固定化酶。

[0065] 表 1. 搅拌对固定化酶载体的损伤

[0066]

树脂名称	数量 (克)	实验 类型	转 速 (rpm)	颗粒直径 (微米 um)			
				平均数 D (3,2)	d10	d25	
Sepabeads EC-EP (处理前)				167.5	163.4	134.7	147.4
Sepabeads EC-EP	50	网盘 搅拌	800	169.2	164.2	134.7	147.7
Sepabeads EC-EP	100	网盘 搅拌	800	166.6	162.3	133.9	145.7
Sepabeads EC-EP	100	悬浮 搅拌	800	146.5	130.0	80.87	122.3
Sepabeads EC-EP	50	悬浮 搅拌	800	163.8	153.8	120.5	137.2
固定化葡萄糖异构酶(Sigma) (处理前)				834.5	784.5	588.9	679.8
固定化葡萄糖异构酶 (Sigma)	50	网盘 搅拌	800	780.1	755.1	548.7	633.1
固定化葡萄糖异构酶 (Sigma)	50	悬浮 搅拌	800	726.7	618.2	448.5	580.8

[0067] 由此可见,利用本发明的方法使用该反应器可以减少固相催化剂颗粒之间、固相催化剂颗粒与搅拌器之间、固相催化剂颗粒与反应罐罐壁之间的碰撞,彻底解决现行的使用常规搅拌式反应器的反应方法所固有的将固定化颗粒碎裂、磨损的通病。

[0068] 实例 2. 整块开孔固定化细胞作为搅拌桨连续搅拌反应制备高果糖浆 [1]

[0069] 葡萄糖异构酶催化将葡萄糖转化成果糖的反应。表达葡萄糖异构酶的载体 pRSET—lac—MGI4-35-kan 的制备如下所述。根据 pGEMT-Easy (Promega) 的序列设计 PCR 引物,具体为:上游引物 RBS-NdeI:5'-CATATGTATATCTCCTTCTTGTGTGAAATTG-3';下游引物 RBS-AlwNI:

[0070] 5'-CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC-3'。以 pGEMT-Easy (Promega) 为模板,用上述引物进行 PCR,扩增得到一 755bp 产物。PCR 条件为:50ng pGEMT-Easy (Promega),0.4 μM RBS-NdeI,0.4 μM RBS-AlwNI,50 μM dATP,50 μM dTTP,50 μM dCTP,50 μM dGTP,20mM Tris-HCl (pH 为 8.8),10mM KCl,10mM (NH₄)₂SO₄,2mM MgSO₄,0.1% Triton X-100,2.5U Pfu

DNA 聚合酶 (Promega), 用无菌水将反应体积调至 50 μ L。PCR 扩增反应程序为: 94 $^{\circ}$ C, 5 分钟; 94 $^{\circ}$ C, 1 分钟; 50 $^{\circ}$ C, 1 分钟; 72 $^{\circ}$ C, 4 分钟; 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C, 10 分钟。该 PCR 产物 (755bp) 在 5' 端含有 NdeI 酶切位点和核蛋白体结合位点及在 3' 端含有 AlwNI 酶切位点。用 0.8% 琼脂糖电泳提纯, NdeI 和 AlwNI 酶切后, 与经 NdeI 和 AlwNI 酶切的 pRSETA (Invitrogen) 连接, 得 pRSET-lac。用 AlwNI 和 EcoRI 酶切 pRSET-lac 和 pRSET-kan (公布号为 CN1680558 的中国专利申请), 用 0.8% 琼脂糖电泳提纯各 DNA 片段并连接, 得 pRSET-lac-kan。

[0071] 按照公开号为 CN1702172 的中国专利申请所公开的制备葡萄糖异构酶突变体的方法, 以 pGEMT-MGI-4 为模板, 分别以 T1 和 87LR、87LF 和 217GR、217GF 和 260AR、260AF 和 T2 为引物对 (均见表 2), 进行 PCR 合成, 得到编码含有 F87L、W139F、R182A、F187S、V217G、D260A 和 T299Q 共七个点突变的葡萄糖异构酶突变体的基因 MGI4-35。用 NdeI 和 EcoRI 酶切 MGI4-35 后, 与经 NdeI 和 EcoRI 酶切的 pRSET-lac-kan 连接, 得到 pRSET-lac-MGI4-35-kan。所得载体 pRSET-lac-MGI4-35-kan 的完整核苷酸序列列于图 5 中。

[0072] 表 2

[0073]

引物对
T1 : 5' AGCCTAGGTAAATTAACCTTAAGAAGGAGATATACATATGAATAAATA TTTTGAGA3'
87LR :5' AAAAACTCCAGTGCTGCTTCTACCCTTGCTTTTC3'
87LF :5' GAAGCAGCACTGGAGTTTTTTGATAAGATAA3'
217GR :5' GCATAGTCGCCAGCCATGTGCAAAAATCTT3'
217GF :5' ACATGGCTGGCGACTATGCAAAGGAAATCG3'
260AR :5' AAATATTTGCAAGGTCGTATTTTCTCAAG3'
260AF :5' ACGACCTTGCGAAATATTTCAAAGTAAATA3'
T2 :5' ATAAGCTCAGCGGCGCCCTATTCTGCAAACAAATAC3'

[0074] 然后将 pRSET—lac—MGI4—35—kan 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS。按 1% 比例接种至 LB 液体培养基 (含 50mg/L 卡那霉素) 中, 37℃ 培养该含葡萄糖异构酶突变体 MGI4—35 的大肠杆菌 36 小时。离心得湿菌体, 并悬浮于 5 倍菌体重量的蒸馏水中。

[0075] 将三聚氰胺海绵 (珠海天虹特种海绵厂) 切割成 0.5×5.5×130cm 的片带 (重 2.9 克)。按以下操作顺序制备表达葡萄糖异构酶的固定化大肠杆菌细胞 :a) 将海绵片带浸入细胞悬液中, 挤压海绵使菌液在海绵中均匀分布, 将海绵通过对滚轴, 挤压以除去海绵上未被吸附的菌液, 调节两对滚轴的间隙使海绵上所吸附的菌液约为 100g ;b) 向海绵加入 250ml 含 1mM CoCl₂、pH 为 7.0 的 0.1% 的聚乙烯亚胺 (PEI, 购自 Sigma, St. Luis, USA) 溶液, 挤压海绵使聚乙烯亚胺分布均匀, 海绵再次通过对滚轴以除去未被吸附的液体 ;c) 向海绵加入 250ml 的 0.1% 的戊二醛 (购自广东汕头市西陇化工厂) 溶液, 挤压海绵使戊二醛均匀分布并除去未被吸附的液体, 静置 5 分钟 ;d) 重复步骤 a) 至 c) 5 次, 每次重复步骤 a) 时, 调节两对滚轴间的间隙使海绵再次吸附的菌液量约为 50g, 然后以蒸馏水挤压洗涤 1 次, 挤压除去未被吸附的液体后, 置于流动空气中干燥 5-10 小时, 得表达葡萄糖异构酶固定化大肠杆菌细胞片带 25g。从所制备的表达葡萄糖异构酶固定化大肠杆菌细胞片带上剪取少量样品, 参照公开号为 CN1702172 的中国专利申请中实施例 11 所述的方法测定固定化细胞的葡萄糖异构酶比活力。具体为 :精确称取 0.5-2mg 按上述方法制备的表达葡萄糖异构酶固定化大肠杆菌细胞, 加 36% (W/V) 的葡萄糖溶液 (含 0.25mM 氯化钴, 5mM 氯化镁, 20mM 磷酸盐, pH 为 6.5) 1ml, 在 75℃ 振摇反应 10 分钟, 置于冰浴并终止反应。在此条件下每分钟催化 1 微摩尔葡萄糖转化为果糖所需的酶量定义为一个葡萄糖异构酶活力单位。测得本实例的固定化大肠杆菌细胞的酶比活力为 6,069 单位 / 克。

[0076] 将所制备的表达葡萄糖异构酶固定化大肠杆菌细胞片带 25g 卷绕成卷轴状并插入网盘 20, 再用细线将片带经网盘的孔与网盘缠绕固定, 合上网盘盖 22, 插入转轴 21, 拧紧网盘底和网盘盖 22 与转轴 21 之间的固定螺栓 23, 这样固定到转轴 21 上的装有葡萄糖异构酶固定化细胞的网盘 20 即可作为随转轴 21 转动的搅拌桨 ;然后将固定到转轴 21 上的装有葡萄糖异构酶固定化细胞的网盘 20 插入罐内, 合上带有密封圈的罐盖 11, 使网盘 20 两端露出的转轴 21 分别与罐底和罐盖 11 的凹槽良好配合, 然后拧紧固定螺丝 19 使罐盖 11 与罐体 51 紧密接合 ;再后, 将连接着可指示温度的 PHS-3D 型 pH 计 (上海三信仪表厂) 的电极 17 旋进罐盖 11, 将罐体 51 上下所有的输液 / 气口套上硅胶管, 用金属夹夹封位于罐底的取样口 5、通气口 7 及位于罐盖 11 的排气口 16 和补液口 15, 关闭放料阀 4 ;将温度设定为

76℃的精密循环水浴 (THD-0506 型, 宁波天恒仪器厂) 的进、出水管分别与罐体 51 循环水输入口 2 和输出口 3 连接并启动水循环; 之后, 用恒流泵 (HL-1S 型, 上海青浦沪西仪器厂) 将 50% (W/V) 葡萄糖溶液 (含 1mM 氯化镁及 0.2g/L 亚硫酸钠, pH 为 7.5, 流动氮气脱氧) 从输液口 6 泵入罐内, 至排液口 14 流出。启动电机, 调节转速为 600 转 / 分。当 pH 计温度显示为 75℃时, 以旋光仪 (wzz-2s 数字式自动旋光仪, 上海精密科学仪器有限公司) 监测流出液的果糖含量; 此后每 4-6 小时监测一次流出糖浆的旋光值 (22℃)。测得初始流速为 6.8 克 / 分钟时, 旋光值 (22℃) 为 -10.126 (相当于果糖转化率为 50.3%)。反应持续 98 小时, 其间流速维持在 6.0-6.5 克 / 分钟。反应第 98 小时时, 流速为 6.18 克 / 分钟, 旋光值 (22℃) 为 -9.323 (相当于果糖转化率为 49.17%)。观察见产物高果糖浆清澄、整块开孔固定化细胞外形和体积完整, 经洗涤并晾干后其重量为 24.8 克。

[0077] 实例 3. 整块开孔固定化细胞作为搅拌浆串联连续搅拌反应制备高果糖浆

[0078] 葡萄糖异构酶固定化细胞片带的制备和活力测定、其在反应罐上的安装、异构反应和反应罐的操作等基本上参照实例 2。本实例制备葡萄糖异构酶固定化细胞片带 50 克, 酶活力为 5,298 单位 / 克。采用 2 个如图 4 所示的反应罐, 反应罐 I 和反应罐 II, 分别在网盘 20 中各装填 23.5 克比活力为 5,298 单位 / 克的固定化细胞片带, 分别单独反应, 其操作与实例 2 相同。测得反应罐 I 流速为 7.1 克 / 分钟时, 旋光值 (22℃) 为 -8.68 (相当于果糖转化率为 48.68%); 测得反应罐 II 的流速为 7.3 克 / 分钟时, 旋光值 (22℃) 为 -8.689 (相当于果糖转化率为 48.30%)。然后将反应罐 I 和反应罐 II 串联, 即反应罐 I 的流出液流入反应罐 II, 在反应罐 II 内继续反应后从反应罐 II 的排液口 14 流出, 流速加大。串联反应流速为 14.27 克 / 分钟时, 旋光值 (22℃) 为 -11.28 (相当于果糖转化率为 51.88%); 串联反应流速为 18.24 克 / 分钟时, 旋光值 (22℃) 为 -10.623 (相当于果糖转化率为 50.97%); 串联反应流速为 24.0 克 / 分钟时, 旋光值 (22℃) 为 -8.86 (相当于果糖转化率为 48.53%)。比较实例 2, 本实例结果显示串联反应显著提高反应效率。

[0079] 实例 4. 整块开孔固定化细胞作为搅拌浆批量搅拌反应制备高果糖浆

[0080] 本实例中的葡萄糖异构酶固定化细胞片带的制备和活力测定、其在反应罐上的安装、异构反应和反应罐的操作等基本上参照实例 2。本实例制备葡萄糖异构酶固定化细胞片带 35 克, 酶活力为 6,775 单位 / 克。采用 2 个如图 4 所示的反应罐, 一个作为反应罐, 另一个作为底物预热罐。预热罐罐底高出反应罐的罐盖 10cm, 两罐的放料阀 4 之间串联一个三通阀, 反应罐下端的循环水输入口 2 与预热罐上端的循环水输出口 3 之间以硅胶管连接, 恒温水浴的进、出水管分别与预热罐下端的循环水输入口 2 及反应罐上端的循环水输出口 3 连接并启动水循环, 设定循环水温为 76.9℃; 在反应罐安装比活力为 6,775 单位 / 克的葡萄糖异构酶固定化细胞片带 35 克, 预热罐不加固定化细胞, 两罐的通气口 7 均连接氮气瓶, 预热罐始终保持排气口 16 开放并持续通氮气。在加料前, 夹封所有取样口 5、输液口 6、排液口 14 及反应罐的通气口 7 及排气口 16, 关闭两罐之间所有的阀门, 将 500g 的 50% (W/V) 的葡萄糖溶液 (含 1mM 氯化镁及 0.2g/L 亚硫酸钠, pH 为 7.5) 从预热罐的进料口倒入, 然后盖上并拧紧进料口螺盖 18, 启动预热罐电机 (转速设定为 900 转 / 分)。当预热罐 pH 计上温度指示为 75℃时, 开放反应罐的排气口 16 及通气口 7, 在反应罐有氮气保护下打开两罐的放料阀 4, 此时, 预热罐内的葡萄糖溶液流向反应罐, 糖液排尽后关闭两罐之间的所有阀门及反应罐的通气口 7 及排气口 16, 启动反应罐电机 (转速设定为 600 转 / 分), 并计

时。在启动反应罐后向预热罐再次加载 500g 葡萄糖溶液,同时旋转预热。当反应完成后打开三通阀、反应罐的放料阀 4 及通气口 7,排出反应液(高果糖浆)。排尽液体后,关闭三通阀,调反应罐转速为零,打开两罐的放料阀 4 及反应罐的排气口 16,预热罐内已预热至 75℃ 的葡萄糖溶液再次流入反应罐。如此循环操作,共反应 129 批,其中 3 批反应时间为 30 分钟,5 批反应时间为 10 分钟,其余反应时间均为 20 分钟。以旋光度法测定其果糖转化率。测得前 58 批产物(每批反应时间均为 20 分钟)的旋光值(22℃)不低于 -11.82(相当于果糖转化率为 52.69%以上);测得最后 10 批产物(每批反应时间均为 20 分钟)的旋光值(22℃)不低于 -5.688(相当于果糖转化率为 44.1%以上)。观察可见高果糖浆产物清澄、整块开孔固定化细胞外形和体积完整,洗涤并晾干后其重量未变,仍为 35 克。

[0081] 由本实例和实例 2 可知,固相催化剂的使用寿命可得以延长,且生产成本也相应节省。此外,反应器中的容器 53 可对上述整块固相催化剂起保护作用,避免或减缓整块固相催化剂在离心搅拌中的撕裂。

[0082] 实例 5. 整块开孔固定化细胞作为搅拌浆半批量半连续搅拌反应制备高果糖浆

[0083] 在完成实例 3 后,取出反应罐 II 中的固定化细胞,将反应罐 II 用作预热罐,以已经装填 23.5 克葡萄糖异构酶固定化细胞的反应罐 I 作为反应罐,按实例 4 的方法操作。但不同的是:每次反应完成后并不将反应液完全排出,而是仅排出 200 克;同时每次加载预热、新鲜葡萄糖溶液 200 克。进行 4 次半批量半连续反应,每次反应时间为 10 分钟,测得旋光值(22℃)在 -3.850(相当于果糖转化率为 39.8%)与 -3.709(相当于果糖转化率为 39.6%)之间。

[0084] 实例 6. 整块开孔木浆海绵固定化细胞作为搅拌浆批量搅拌反应制备高果糖浆

[0085] 按实例 2 所述的方法制备表达葡萄糖异构酶大肠杆菌湿菌体,将细胞悬浮于 5 倍蒸馏水中。将木浆海绵(珠海天虹特种海绵厂)切成 0.3×5.5×150cm(12 克)的片带,用蒸馏水洗,干燥后,按以下顺序操作:a) 将海绵片带浸入细胞悬液中,挤压海绵使菌液在海绵中均匀分布,使海绵上所吸附的菌液约为 50g;b) 向海绵加入 150ml 0.1%的聚乙烯亚胺溶液(pH 为 7.0),挤压海绵使聚乙烯亚胺均匀分布并除去未被吸附的液体;c) 向海绵加入 150ml 0.1%的戊二醛溶液,挤压使戊二醛均匀分布并除去未被吸附的液体;d) 重复步骤 a) 至 c) 5 次,每次重复步骤 a) 时使海绵再次吸附的菌液量约为 20g。最后挤压除去未被吸附的液体后,在流动空气中干燥 10 小时,即得到葡萄糖异构酶固定化细胞片带 18.47g。按实例 2 所述的方法测定固定化细胞的葡萄糖异构酶比活力。测得本实例的固定化大肠杆菌细胞的酶比活力为 2,281 单位/克。

[0086] 采用如图 4 所示的反应罐,将比活力为 2,281 单位/克的固定化葡萄糖异构酶细胞片带 18.47 克按实例 2 所述的方法装入网盘,并按实例 4 所述方法进行批量反应。投入葡萄糖溶液 500g,反应 30 分钟时,产物旋光值(22℃)为 2.19(相当于果糖转化率为 33.1%);反应 60 分钟时,旋光值(22℃)为 -6.70(相当于果糖转化率为 45.5%);反应 90 分钟时,旋光值(22℃)为 -10.383(相当于果糖转化率为 50.6%)。产物清澄。

[0087] 实例 7. 开孔聚乙烯醇海绵颗粒固定化细胞作为搅拌浆批量搅拌反应制备高果糖浆

[0088] 按实例 2 所述的方法制备表达葡萄糖异构酶大肠杆菌湿菌体,将细胞悬浮于 5 倍体蒸馏水中。将干燥的开孔聚乙烯醇海绵(购自浙江省宁海县好帮手日用品有限公司)切

成约 8mm^3 的颗粒,取聚乙烯醇海绵颗粒 20g 置于尼龙纱网袋中,再将网袋置于塑料袋中,将 40ml 菌液加入海绵颗粒中,反复挤压混合至少 3 分钟,使得菌液在颗粒上均匀分布;加 0.5% (W/V) pH 为 7.0 的聚乙烯亚胺 (PEI) 溶液 40ml,反复挤压混合至少 3 分钟;加 0.5% (V/V) 的戊二醛溶液 40ml,反复挤压混合至少 5 分钟,然后将网袋从塑料袋中取出,挤压除去液体,以蒸馏水挤压洗涤 3 次,除去未被吸附的液体后,在流动空气中干燥 5-10 小时,即得到表达葡萄糖异构酶固定化大肠杆菌细胞颗粒 25.4g。按实例 2 所述的方法测定固定化细胞的葡萄糖异构酶比活力。测得本实例的固定化大肠杆菌细胞的酶比活力为 1,402 单位/克。

[0089] 采用如图 4 所示的反应罐,用 25g 所制备的开孔聚乙烯醇海绵颗粒固定化细胞的干颗粒装填网盘,按实例 4 所述方法进行批量反应。投入葡萄糖溶液 500g,反应 30 分钟时,产物旋光值 (22°C) 为 9.564 (相当于果糖转化率为 22.9%);反应 60 分钟时,旋光值 (22°C) 为 -0.31 (相当于果糖转化率为 37.7%);反应 90 分钟时,旋光值 (22°C) 为 -6.291 (相当于果糖转化率为 44.9%)。产物清澄。

[0090] 实例 8. 颗粒固定化细胞作为搅拌浆批量搅拌反应制备高果糖浆

[0091] 采用如图 4 所示的反应罐,用美国 Genencor 公司生产的比活力为 485 单位/克的固定化葡萄糖异构酶 Spezyme IGI (山东保龄宝生物技术有限公司提供) 的干颗粒 160g 装填网盘,催化搅拌操作同实例 4,所不同的是在本实例中离心转速为 600rpm。反应液 300g,反应 20 分钟,旋光值 (22°C) 为 -8.097 (相当于果糖转化率为 47.48%)。产物清澄。

[0092] 实例 9. 整块开孔 D-氨基酸氧化酶固定化酶作为搅拌浆批量搅拌反应制备戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸 (GL-7-ACA)

[0093] D-氨基酸氧化酶将头孢菌素 C 转化成戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸 (GL-7-ACA)。按下列方法制备 BL-HS-GHA [含有重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 的 E. coli BL21 (DE3) pLysS] 大肠杆菌菌体。

[0094] BL-HS-GHA 的来源:

[0095] 根据已知的 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* glucose isomerase DNA 序列 (GenBank L09699),设计 PCR 引物,具体为:

[0096] 上游引物 GI-NdeI:

[0097] 5' -AGCCTAGGTTAATTAACCTTTAAGAAGGAGATATACATATGAATAAATATTTTGAGA

[0098] 下游引物 GI-EcoRI:

[0099] 5' -ATAAGCTCAGCGGCGCCTTATTCTGCAAACAAATAC

[0100] 以 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (购自 ATCC, USA) DNA 为模板,用上述引物进行 PCR,扩增得到 1,376bp 产物。PCR 条件为:50ng *T. saccharolyticum* DNA, 0.4 μM GI-NdeI, 0.4 μM GI-EcoRI, 50 μM dATP, 50 μM dTTP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 20mM Tris-HCl (pH 为 8.8), 10mM KCl, 10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 2.5U Platinum Taq High Fidelity DNA 聚合酶 (Invitrogen), 用无菌水将反应体积调至 50 μL 。PCR 扩增反应程序为:95 $^\circ\text{C}$, 5 分钟;94 $^\circ\text{C}$, 1 分钟, 50 $^\circ\text{C}$, 1 分钟, 72 $^\circ\text{C}$, 3 分钟, 循环 35 次;72 $^\circ\text{C}$, 10 分钟。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳提纯,利用 TA 克隆方法,与 pGEMT-Easy (Promega) 连接,得 pGEMT-Easy-GI。用 NdeI 和 EcoRI 酶切 pGEMT-Easy-GI, 经 0.8% 琼脂糖电泳提纯,与经 NdeI 和 EcoRI 酶切的 pRSET-lac-kan 连接,得

pRSET-lac-GI-kan。根据已知 hok/sok 基因片段序列 (GenBank X05813) 设计 10 条引物 (见表 3)。PCR 基因构造根据 Kikuchi, M. et al., 1999, Gene236:159-167 所述, 惟具体步骤有变更。PCR 条件为: 20ng 各个引物, 50 μ M dATP, 50 μ M dTTP, 50 μ M dCTP, 50 μ M dGTP, 20mM Tris-HCl (pH 为 8.8), 10mM KCl, 10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 2.5U Pfu DNA 聚合酶 (Promega), 用无菌水将反应体积调至 50 μ L。PCR 扩增反应程序为: 95 $^{\circ}$ C, 4 分钟; 94 $^{\circ}$ C, 1.5 分钟, 50 $^{\circ}$ C, 1.5 分钟, 72 $^{\circ}$ C, 5 分钟, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C, 10 分钟。取 PCR 扩增反应混合物 5 μ L 作模板, 引物 1 和 10, 依上述条件再次 PCR 扩增, 得 PCR 产物长为 580bp, 在其 5' 和 3' 端分别含有 AscI 及 EcoRI 酶切位点。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳提纯, AscI 及 EcoRI 酶切后, 与经 AscI 及 EcoRI 酶切的 pRSET-lac-GI-kan 连接, 得 pRSET-lac-GI-hok/sok-kan。

[0101] 表 3

[0102]

序号	引物序列
1	5' -ttggcgcgccttaagatatcaacaaactccgggaggcagcgtgatgcggcaacaatcacacggatttcccgtgaa-3'
2	5' -catatactgcacgctgaccacactcactttccctgaaaataatccgctcattcagaccgttcacgggaaatccgtgtga-3'
3	5' -ggtcagcgtgcaggtatattggcctatgatgtgcccgccgcttgaggctttctgacctatgacgtgaaggtggtttgttgc-3'
4	5' -cgtggtggttaatgaaaattaacttactacgggctatcttctttctgccacacaacacggcaacaaccacctcacgt-3'
5	5' -aattttcattaacaccacagggcatccctatgtctagtcacatcaggatagcctcttaccgcgctttgcgcaaggaga-3'
6	5' -tgagacacacgatcaacacacaccagacaagggaacttcgtggtagtttcattggccttcttctccttgcgcaaaagcggg-3'
7	5' -tgtgttgatcgtgtgtctcacactgttgatattcaactatctgacacgaaaatcgetgtgcgagattcgttacagagacg-3'
8	5' -cgctccaggttgctacttaccggattcgttaagccatgaaagccgccacctccctgtgtccgctctctgtaacgaatctcg-3'
9	5' -taagtagcaacctggaggcgggcgaggcccttttcaggactgatgctggtctgactactgaagcgctttataaag-3'
10	5' -cggaattcacaacatcagcaaggagaaggggctaccggegaaccagcagccctttataaaggcgttcagt-3'

[0103] 用 NdeI 和 BglIII 酶切质粒 pRSET-kan-DAOGHA (公开号为 CN1680558 的中国专利申请), 得 1,074bp 基因片段 (内含 D-氨基酸氧化酶突变体 GHA 基因), 经 0.8% 琼脂糖电泳提纯, 与经 NdeI 和 BglIII 酶切的 pRSET-lac-GI-hok/sok-kan 得到的长片段连接, 得 pHS-GHA, 其核苷酸序列列于图 6 中。将 pHS-GHA 转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS (Novagen), 得菌株 BL-HS-GHA。

[0104] 制备 BL-HS-GHA [含有重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 的 E. coli BL21 (DE3) pLysS] 菌体的方法如下所述。

[0105] 从卡那霉素 (50 μ g/mL) LB 琼脂平板上挑取单菌落大肠杆菌 BL-HS-GHA, 接种到 2 \times 5mL 含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的液体 LB 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 8 小时 (摇床转速为 250 转/分钟), 再接种至 2 \times 50 mL 含卡那霉素 (100g/mL) 和氯霉素 (40 μ g/mL) 的种子培养基, 在 30 $^{\circ}$ C 培养 16 小时 (摇床转速为 400 转/分钟)。

[0106] 玉米浆 1 的制备:

[0107] 将 300g 玉米浆 (购自华北制药康欣有限公司) 溶于 300mL 的蒸馏水中, 搅拌后离心 (5,000g, 8 分钟), 上清液即为玉米浆 1。沉淀物留用。

[0108] 玉米浆 2 的制备:

[0109] 将上述沉淀物再溶于 600mL 的蒸馏水中, 搅拌后离心 (5,000g, 8 分钟), 上清液即为玉米浆 2。

[0110] 50mL 种子培养基中各成分重量如下:

[0111] 玉米浆 1 4mL

[0112]	玉米浆 2	4mL
[0113]	酵母浸膏	0.2g
[0114]	硫酸铵	0.075g
[0115]	磷酸氢二钠	0.25g
[0116]	磷酸二氢钾	0.04g
[0117]	氯化钠	0.075g

[0118] 将各成分溶于 50mL 的蒸馏水中,以 10N 氢氧化钠将 pH 值调至 7.15,高温消毒。

[0119] 种子过夜发酵后,将全部 100mL 的种子接种至含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 2L 发酵罐 (BIOENGINEERING, Benchtop Fermentor, KLF2000)。

[0120] 2L 发酵培养基中各成分重量如下:

[0121]	玉米浆 1	160mL
[0122]	玉米浆 2	160mL
[0123]	酵母浸膏	8g
[0124]	硫酸铵	3g
[0125]	磷酸氢二钠	10g
[0126]	磷酸二氢钾	1g
[0127]	氯化钠	3g

[0128] 将各成分溶于 1.9L 的蒸馏水中,以 10N 氢氧化钠将 pH 值调至 7.15,于 2L 发酵罐 (BIOENGINEERING, Benchtop Fermentor, KLF2000) 高温消毒。

[0129] 将 12.5g 葡萄糖溶于 50mL 的蒸馏水中,高温消毒;将 1.25g 硫酸镁溶于 50mL 的蒸馏水中,高温消毒。

[0130] 发酵前把已消毒的葡萄糖和硫酸镁放进 2L 发酵罐中。

[0131] 补料的制备:

[0132] 将 250mL 玉米浆 1 和 250mL 玉米浆 2 混合,以 10N 氢氧化钠将 pH 值调至 7.25,高温消毒。

[0133] 将 2.25g 硫酸铵、7.56g 磷酸氢二钠、1.2g 磷酸二氢钾、2.25g 氯化钠溶于 60mL 的蒸馏水中,高温消毒。

[0134] 将 15g 酵母浸膏溶于 100mL 的蒸馏水中,高温消毒。

[0135] 将 70g 葡萄糖溶于 140mL 的蒸馏水中,高温消毒。

[0136] 将 30mL 甘油混合 10mL 的蒸馏水中,高温消毒。

[0137] 将 20g 硫酸镁溶于 30mL 的蒸馏水中,高温消毒。

[0138] 将所有溶液混合,加入卡那霉素直至浓度为 50 μ g/mL,加入 2mL 的消泡剂。

[0139] 在 35 $^{\circ}$ C 生长,在初始的 6 小时, pH 值由 6.9 自然上升至 7.2,开始补料 (50mL/小时)。在平衡条件下 (以 5N 氢氧化钾将 pH 值维持在 7.2,溶氧水平 pO_2 不大于 0.5%),继续生长 26 小时。

[0140] 在发酵罐发酵后,细菌在 4 $^{\circ}$ C 经离心机分离 (5,000g,8 分钟),弃上清液,取沉淀,将沉淀重悬于 600mL 的磷酸钠缓冲液 (50mM, pH 为 7.5) 中。用珠磨法裂解细菌,以 50mL/分钟的速度把细菌重悬液送进珠磨机 (DYNO-MILL TYP KDL,直径为 0.2mm 的玻璃珠,WA Bachofen) 内,最后再以 800mL 的磷酸钠缓冲液 (50mM, pH 为 7.5) 把细菌残留冲洗出来。

将细菌裂解液在 55℃ 水浴中浸泡 30 分钟,以高速离心 (10,000g, 30 分钟),取上清液,即为粗纯的重组 D-氨基酸氧化酶 GHA。D-氨基酸氧化酶的纯化基本上按 Alonso, J., Barredo, J. L., Diez, B., Mellado, E., Salto, F., Garcia, J. L., Cortes, E. (1998, Microbiology 144 : 1095-1101) 所述。提取的粗纯重组 D-氨基酸氧化酶 GHA,加入甘油至最终浓度为 10%,用 5N 氢氧化钠将 pH 值调至 8,离心 (13,000g, 30 分钟),取上清液。按产品供货商所述制备法制备 DEAE-纤维素离子交换树脂 (Sigma, D-0909)。按每 1mL 粗纯酶混合 0.5mL DEAE-纤维素离子交换树脂,在 4℃ 搅拌 5 小时 (100 转 / 分钟),用滤斗 (Buchner filter funnel, 120mm P1) 将酶液滤去。以 3 倍于 DEAE-纤维素离子交换树脂体积的 40mM 的磷酸二氢钠缓冲液 (含 10% 甘油) 冲洗 DEAE-纤维素离子交换树脂,再用 2 倍于 DEAE-纤维素离子交换树脂体积的 400mM 的磷酸二氢钠缓冲液将重组 D-氨基酸氧化酶 GHA 洗脱出来。按每 1L 洗脱的重组 D-氨基酸氧化酶 GHA,加入 262g 硫酸铵,在室温搅拌 15 分钟 (100 转 / 分钟)。离心 (13,000g, 15 分钟),弃上清液,保留沉淀物。将沉淀物溶于 20mM 磷酸二氢钠缓冲液 (pH 为 7.5) 后,以 Millipore YM30 滤膜超滤除去剩余硫酸铵,将酶液浓缩至 25mg/ml。用 SDS-PAGE 检测蛋白质的纯度。取酶液 20ml,加牛血清白蛋白 3g,蒸馏水 90ml,搅拌均匀,得到稀释酶液 110ml。将三聚氰胺海绵切割成 5.5cm 厚的板状,再穿刺海绵使之具有均匀密布的穿透孔道 (孔的密度为 6 个 /cm²、孔径为 0.2cm,所有孔道平行且与海绵穿刺表面呈 45 度角);然后,将海绵切割成直径为 8.5cm、高为 3cm 的圆盘柱状,并于圆盘中央留一直径为 2cm、穿透并垂直于圆盘面的孔道。之后,按以下顺序操作:a) 在海绵载体上加 32ml 稀释酶液,挤压使酶液在海绵中均匀分布;B) 向海绵加 0.05% 的聚乙烯亚胺 (PEI) 溶液 (pH 为 7.0) 260ml,反复挤压海绵至挤出液由混变清,再次挤压并除去未被吸附的液体;c) 向海绵加入 0.05% 的戊二醛溶液 260ml,挤压使戊二醛分布均匀并除去未被吸附的液体。d) 重复步骤 a) 至 c) 5 次。流动空气干燥 24 小时后,得重 9.2 克的蜂窝状固定化 D-氨基酸氧化酶块。

[0141] 采用如图 4 所示的反应罐。将蜂窝状固定化 D-氨基酸氧化酶块插入网盘中,按实例 2 所述方法操作反应罐,但以 pH 控制器 (Biotech-2020, 上海保兴生物设备有限公司) 代替 pH 计,将 pH 控制器的蠕动泵输出端连接罐底的补液口 15,将 pH 控制器的蠕动泵吸液口插入 15% 的氨水溶液中。加料前,关闭取样口 5、输液口 6、排液口 14 及放料阀 4,排气口 16 保持开放;将氧气从通气孔 7 通入罐内,调节气流量为 2.17L/min;将 300ml 175mM 头孢菌素 C 钠盐水溶液 (pH 为 7.5) 从罐盖进料口加入罐内,然后盖上并旋紧进料口螺盖 18,启动电机并计时,调节转速为 600 转 / 分;将温度设定为 25℃;启动 pH 控制器以 15% 的氨水维持反应液 pH 为 7.5±0.1;在不同时间 (10、20、30、40、50 分钟) 取样,参照公布号为 CN1680558 的中国专利申请中实例 5 所述,以 HPLC 法 (色谱柱: Diamonsil™ C18, 250x4.6mm; 流动相: 含 50mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ 及 5% 乙腈, pH 为 7.0; 柱温为 30℃; 流速为 1ml/min; 检测波长为 260nm) 测定固定化 D-氨基酸氧化酶转化头孢菌素 C 为戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸 (GL-7-ACA) 的活力和转化率。一单位酶活力定义为在上述反应条件每分钟转化一微摩尔头孢菌素 C 为戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸的酶量。共进行 7 次反应,99% 头孢菌素 C 均在 50 分钟之内被转化完毕;本实例测得固定化 D-氨基酸氧化酶初始 10 分钟的酶活力不低于 265 单位 / 克。

[0142] 实例 10. 整块开孔固定化细胞作为搅拌浆批量搅拌反应制备 7-氨基头孢霉烷酸 (7-ACA)

[0143] 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶将戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸 (GL-7-ACA) 转化成 7-氨基头孢霉烷酸 (7-ACA)。戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶表达载体 pT7-kan-ACY 的构建:根据已知的假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶 DNA 序列 (Matsuda, A. et al., 1987, J. Bacteriol. 169, 5821-5826), 设计 PCR 上游引物 NdeI-ACY: 5'-CATATGAACGCTCCCGTCCCGTCCC-3', 和 PCR 下游引物 BglIII-ACY:

[0144] 5'-AGATCTCAGATGGTGAAGCGGGCAC-3'。以假单孢菌 SE83DNA 为模板, 用上述引物进行 PCR, 扩增得到 1, 676bp 产物。PCR 条件为: 50ng 假单孢菌 SE83DNA, 0.4 μ M NdeI-ACY, 0.4 μ M BglIII-ACY, 50 μ M dATP, 50 μ M dTTP, 50 μ M dCTP, 50 μ M dGTP, 20mM Tris-HCl (pH 为 8.8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 2.5U Pfu DNA 聚合酶 (Promega), 用无菌水调反应体积至 50 μ L。

[0145] PCR 扩增反应程序为: 95 $^{\circ}$ C, 5 分钟; 94 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 50 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C, 3 分钟, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C, 10 分钟。该 PCR 产物 (1, 676bp) 在 5' 和 3' 端分别含有 NdeI 和 BglIII 酶切位点。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳提纯, NdeI 和 BglIII 酶切后, 与经 NdeI 和 BglIII 酶切的 pRSET-kan 连接, 得 pT7-kan-ACY, 其具体核苷酸序列示于图 7 中。将 pT7-kan-ACY 转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS (Novagen), 得菌株 BL-T7K-ACY。

[0146] 以含卡那霉素 (50mg/L) 的 20L LB 液体培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 培养大肠杆菌 BL-T7K-ACY 24 小时, 离心收集菌体, 得到湿菌体细胞。

[0147] 将湿菌体细胞悬浮于 4 倍菌体重量的蒸馏水中。将三聚氰胺海绵切割成 0.5 \times 5.5 \times 150cm (3.3g) 的片带状, 按以下操作顺序制备表达戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的大肠杆菌固定化细胞: a) 将海绵片带浸入细胞悬液中, 挤压海绵使菌液在海绵中均匀分布, 将海绵通过对滚轴挤压除去海绵上过量的菌液, 调节两对滚轴的间隙使海绵上所吸附的菌液约为 100g; b) 向海绵加入 300ml 的 0.1% 的聚乙烯亚胺 (pH 为 7.0), 挤压海绵以使聚乙烯亚胺均匀分布, 海绵再次通过对滚轴以除去未被吸附的液体; c) 向海绵加入 300ml 的 0.1% 的戊二醛溶液, 挤压海绵以使戊二醛均匀分布并除去过多的液体; d) 重复步骤 a) 至 c) 5 次, 每次重复步骤 a) 时, 调节两对滚轴之间的间隙以使海绵再次吸附的菌液量约为 70g, 然后以蒸馏水挤压洗涤 3 次, 通过挤压除去未被吸附的液体后, 在流动空气中干燥 10 小时, 得到戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶固定化细胞片带 26g。

[0148] 采用如图 4 所示的反应罐。将 26g 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶固定化细胞片带卷绕成卷轴状并插入网盘中, 按实例 9 所述方法操作反应罐, 但不通氧气。关闭取样口 5、通气口 7、排气口 16、输液口 6、补液口 15、排液口 14 及放料阀 4; 将实例 9 制备的戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸溶液从罐盖 11 上的进料口加入罐内, 盖上并旋紧 进料口螺盖 18, 启动电机并计时, 控制温度为 25 $^{\circ}$ C, 调节转速; 启动 pH 控制器以 5N NaOH 维持反应液 pH 为 8.0 \pm 0.1; 在不同时间 (10、30、60 分钟) 从取样口 5 取样, 参照 Binder, R. et al., (1994, Appl. Environ. Microbiol. 60, 1805-1809) 所述的方法, 以 HPLC 法 (色谱柱: DiamonsilTM C18, 250 \times 4.6mm; 流动相: 含 50mM 的 K₂HPO₄/KH₂PO₄ 及 5% 的乙腈, pH 为 7.0; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 流速为 1ml/min; 检测波长为 260nm) 测定戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶转化戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸为 7-氨基头孢霉烷酸 (7-ACA) 的活力。一单位戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶活性定义为在上述反应条件每分钟转化一微摩尔戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸至 7-氨基头孢霉烷酸的酶量。测得四次不同转速的实验中初始 10 分钟的酶活力, 结

果如表 5 所示。

[0149] 表 5

[0150]

实验	反应液浓度 (CPC)	体积 (mL)	转速 (rpm)	固定化细胞初始 10 分钟的酰化酶活力 (单位 / 克)
1	75mM	300	150	37.91
2	75mM	300	300	47.85
3	75mM	300	600	48.38
4	75mM	270	900	51.10

[0151] 实例 11. 整块开孔固定化细胞作为搅拌浆批量搅拌反应制备高浓度 7-氨基头孢霉烷酸

[0152] 使用实例 10 所用的戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶固定化细胞片带, 并如实例 10 所述进行催化搅拌反应制备 7-氨基头孢霉烷酸, 惟使用 320ml 的高底物浓度 (97.7mM) 的戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸溶液以及搅拌转速为 900rpm。如实例 10 所述测定戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的活力和转化率。测得初始 10 分钟的活力为 61.78 单位 / 克固定化细胞; 10、20、30 及 40 分钟的转化率分别为 70.7%、87.40%、92.0% 及 93.36%。与实例 10 的数据相比, 底物浓度提高 26% 之后, 酶活力也相应提高约 20%。

[0153] 实例 12. 颗粒固定化酶作为搅拌浆批量搅拌反应

[0154] 按实例 10 发酵大肠杆菌 BL-T7K-ACY24, 然后 4℃ 经离心机分离细菌 (5,000g, 8 分钟), 弃上清液, 得到湿细菌。将细菌重悬于 400mL 的磷酸钠缓冲液 (50mM, pH 为 8) 中。用珠磨法裂解细菌, 以 50mL / 分钟的速度把细菌重悬液送进珠磨机 (DYN0-MILL TYPKDL, 直径为 0.2mm 的玻璃珠, WA Bachofen) 内, 再以 600mL 的磷酸钠缓冲液 (50mM, pH 为 8) 把细菌残留冲洗出来。将细菌裂解液放在 55℃ 水浴中浸泡 15 分钟, 高速离心 (10,000g, 30 分钟) 后取上清液, 即为粗纯假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶。

[0155] 固定化假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的制备参照载体供货商德国 Rohm 公司的说明进行, 其中具体步骤有变更。取 50g Eupergit C250L 湿载体与 1,900mL (蛋白浓度为 3mg/ml) 的如上所述制备的粗纯假单孢菌 SE83 戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶混合, 在室温下搅拌 (300 转, 72 小时), 静置片刻。然后过滤, 用蒸馏水在室温下搅拌洗涤 (300 转, 2 分钟), 用 3 号砂芯漏斗抽干, 重复洗涤步骤 8 次直至过滤液中的蛋白量少于 0.1mg/mL, 即得到 202 克固定化戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶颗粒。

[0156] 采用如图 4 所示的反应罐, 将 200 克固定化戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶颗粒装入网盘 20 中, 将网盘 20 的内表面 (底、盖、周) 衬以 200 目的滤布, 以防颗粒漏出。之后, 反应条件、检测方法及反应罐的操作等与实例 10 基本相同, 只是转速为 800rpm, 底物为 300mL 浓度为 75mM 的戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸 (戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸制备方法参见 Shibuya, Y. et al., 1981, Agric. Biol. Chem. 45, 1561-1567), 取样时间为 5、15、30 和 60 分钟。如实例 10 所述测定戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸酰化酶的转化率。测得 5、15、30 及 60 分钟戊二酰-7-氨基头孢霉烷酸转化为 7-氨基头孢霉烷酸 (7-ACA) 的转化率分别为 49.16%、62.23%、79.33% 及 93.49%。

[0157] 实例 13. 对苯醌的还原

[0158] 用定性滤纸 102 (杭州新华纸业有限公司) 将 10% Pd/C 催化剂 20 克 (BDH Laboratory Suppliers Poole, England) 包成 3cm x 3cm 小包, 再用 450 目滤布包裹固定在

图 4 所示的反应器网盘内壁。将 5 克对苯醌（化学纯，国药集团化学试剂有限公司）溶于 500 毫升甲醇，加入 6M HCl 一滴。将对苯醌甲醇溶液注入图 4 所示的反应罐中，参照实例 2 操作反应罐。转速控制在 500rpm；通入氢气，氢气流量控制在为 2L-3L/min。用 754 型紫外分光光度计（上海光谱仪器有限公司）在 435nm 处测定反应液的 OD 值，计算对苯醌的还原率。测定结果如表 6 所示：

[0159] 表 6

[0160]

反应时间 (min)	0	30	60	90
对苯醌含量 (%)	1	0.634	0.482	0.364
对苯醌还原率	0	36.6	51.8	63.6

[0161] 实例 14. 丹参酮 IIA 的还原

[0162] 所用催化剂、反应罐及其操作均参照实例 13 所述。底物溶液为含 406 毫克丹参酮 II A（中山大学古练权教授提供）的乙醇溶液（500 毫升）。将丹参酮 II A 乙醇注入反应器中，开启反应器，转速控制在 500rpm；通入氢气，氢气流量控制在为 2L-3L/min。用 754 型紫外分光光度计（上海光谱仪器有限公司）在 435nm 处测定反应液的 OD 值，计算对苯醌的还原率。测定结果如表 7 所示：

[0163] 表 7

[0164]

反应时间 (min)	0	120	150
丹参酮 II A 含量 (%)	0.0813	0.00789	0.0039
丹参酮 II A 还原率	0	90.3	95.2

[0165] 通过上述应用实例可见，与现行的反应方法相比，本发明的反应方法采用整块的固相催化剂或使用网盘 / 网桶大量装载固相催化剂，反应罐内固相催化剂的密度可远远超过现有的搅拌式反应器，达到罐体总容量的 95% 或以上，反应速度可因之提高，反应时间则相应缩短。这对容易降解的底物或产物尤为有利。高密度的固相催化剂用量更可提高反应时底物的浓度，进而加快反应速度，并有助于产物的纯化、结晶等和提高产率。而且反应时，网盘 / 网桶内的固相催化剂相对于转轴保持静态，也不直接与反应罐罐壁相撞，由此避免了固相催化剂与搅拌器、固相催化剂与罐壁、以及固相催化剂之间的碰撞而造成的破裂和磨损，从而延长固相催化剂的使用周期，也减少反应液中催化剂、酶蛋白、固定化载体碎片及细胞碎片等杂质，便于产物纯化。另外，在反应时，由于离心作用，反应液与固相催化剂表面之间的传质加快，因此相对于填充床反应柱，本发明的反应方法的催化效率大大提升。

[0166] 本专利申请中参照的各种文献的全部公开内容，无论是专利文献还是非专利文献，全部以引用方式并入本文。另外，本发明不受上述具体实施方式和应用实例的限制。本发明可在权利要求书所概括的范围内做各种改变，这些改变也在本发明的范围之内。

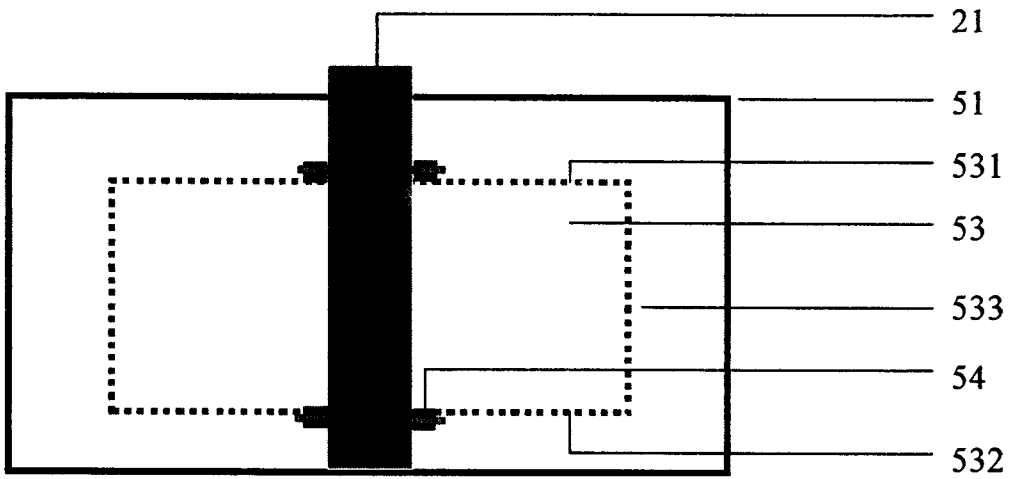


图 1

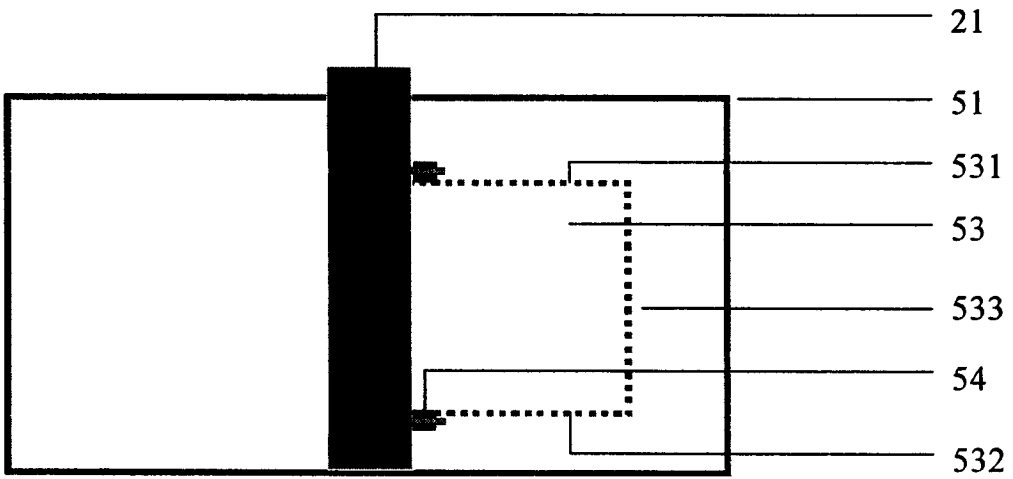


图 2

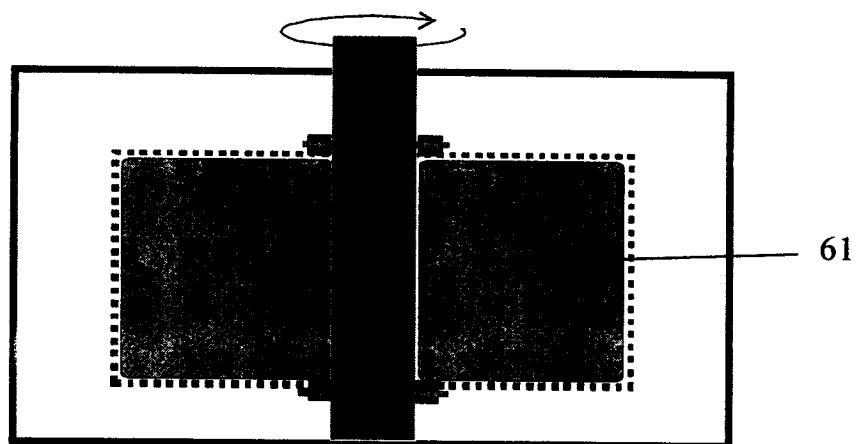


图 3

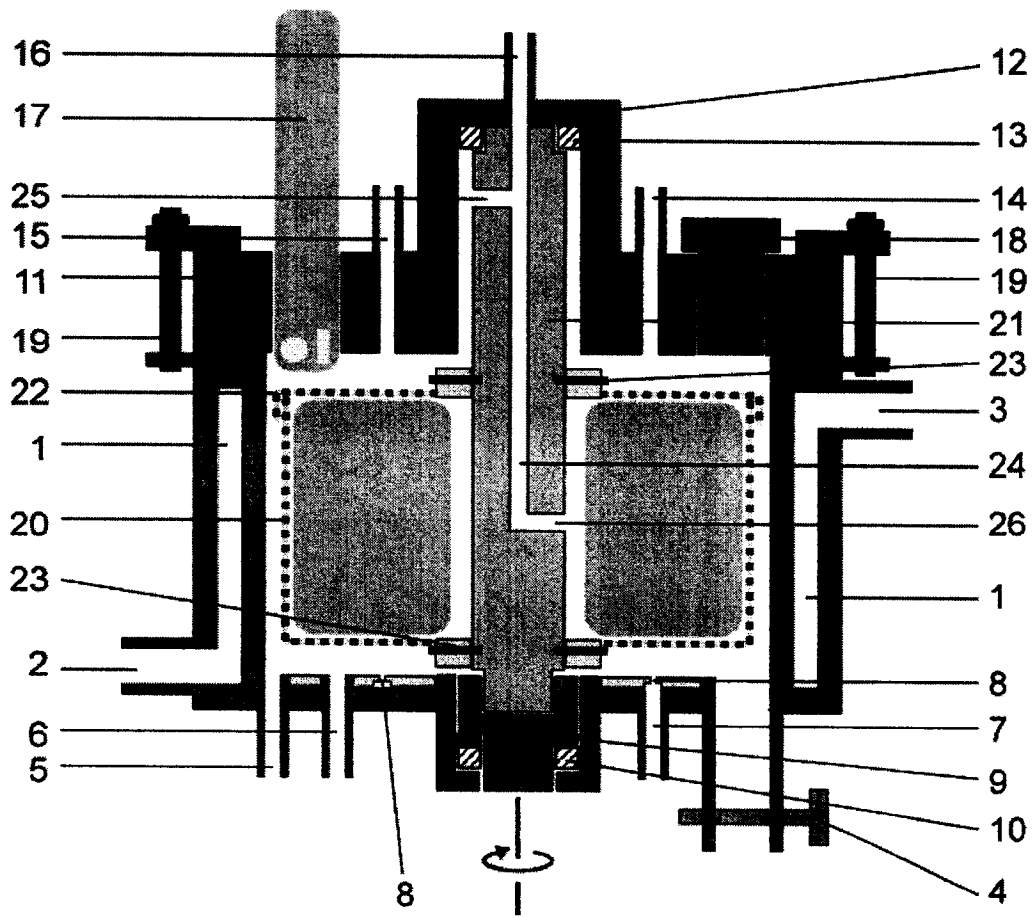


图 4

表达载体 pRSET-lac-MG14-35-kan 的序列:

```

caccaccaggc tttacacttt atgcttccgg ctctgatgtt gtgtggaatt gtgagcggat      60
aacaatttca cacaagaagg agatatacat atgaataaat attttgagaa cgtatctaaa      120
ataaaatag aaggaccaa atcaaataat ccttattcct ttaaatttta caatccagag      180
gaagtaatcg atggcaagac gatggaggag catctccgct tttctatagc ttattggcac      240
acttttactg ctgatggaac agatcaattt ggcaaggcta ctatgcaaag accatggaac      300
cactacacag atcctatgga tatagcgaag gcaagggtag aagcagcatt agagtttttt      360
gataagataa atgcaccttt cttctgcttc catgataggg atattgcccc tgaaggagat      420
actcttagag agacaaacaa aaacttagat acaatagttg ctatgataaa ggattactta      480
aagaccagca agacaaaagt tttgtttggt accgcaaadc ttttctccaa tccgagattt      540
gtacatgggt catcaacatc ctgcaatgct gacgtttttg catattctgc agcgcaagtc      600
aaaaaagccc ttgagattac taaggagctt ggcgcggaag actacgtatc ttggggtgga      660
agagaagggt acgagacgct tctcaataca gatatggagt tagagcttga taactttgca      720
agatttttgc acatggcttg tgaactatga aaggaaatcg gctttgaagg tcagttcttg      780
attgagccga agccaaagga gcctacaaaa catcaatacg actttgacgt ggcaaatgta      840
ttggcattct tgagaaaata cgaccttgcc aaatatttca aagtaaataat cgaagcaaac      900
catgcgacat tggcattcca cgacttccaa catgagctaa gatacgccag aataaacggt      960
gtattaggat caattgacgc aaatcaaggc gacatgcttt tgggatggga tacggaccag      1020
ttccctacag atatacgcat gacaacgctt gctatgtatg aagtcataaa gatgggtgga      1080
tttgacaaag gtggccttaa ctttgatgca aaagtaagac gtgcttcatt tgagccagaa      1140
gatcttttct taggtcacat agcaggaatg gatgcttttg caaaaggctt taaagttgct      1200
tacaagcttg tgaagatgg cgtatttgac aagttcatcg aagaaagata cgcaagctac      1260
aaagaaggca ttggcgctga tattgtaagc ggtaaagctg acttcaagag ccttgaagaa      1320
tatgcattag agcacagcca gattgtaaac aaatcaggca gacaagagct attagaatca      1380
atcctaaatc agtatttgtt tgcagaataa ggcgcgccgc tgagcttadc gaattcgaag      1440
cttgatccgg ctgctaacaa agcccgaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag      1500
caataactag cataaccctt tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa      1560
ggaggaacta tatccggatc tggcgtaata gcgaagaggc ccgaccgat cgccctccc      1620
aacagttgag cagcctgaat ggogaatggg acgccccctg tagcggcgca ttaagcggg      1680
cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcggccta gcgcccctc      1740
ctttcgtctt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgcccg ctttccccgt caagctctaa      1800
atcgggggct ccttttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac      1860
ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt      1920
tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaactca      1980
accctatcgc ggtctattct tttgatttat aagggtttt gccgatttcg gcctattggt      2040
taaaaaatga gctgatttaa caaatattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta      2100
caatttaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tattttcta      2160
aatacattca aatattgtat cgctcatgag acaataacc tgataaatgc ttcaataata      2220
ttgaaaaagg aagagtatga gtcatattca acgggaaacg tcttgctcta ggccgcgatt      2280
aaattccaac atggatgctg atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata atgtcgggca      2340
atcaggtgag acaatctatc gattgtatgg gaagcccgat gcgccagag tgtttctgaa      2400
acatggcaaa ggtagcgttg ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac taaactggct      2460
gacggaattt atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc cgtactcctg atgatgcatg      2520
gttactcacc actgcatgac ccgggaaaac agcattccag gtattagaag aatattctga      2580
ttcaggtgaa aatattgttg atgcgctggc agtgttcctg ccgcggttg attcgattcc      2640
tgtttgtaat tgtcctttta acagcgtatc cgtatttctg ctgctcagg cgcaatcacg      2700
aatgaataac gttttggttg atgcgagtga ttttgatgac gagcgtaat gctggcctgt      2760
tgaacaagtc tggaaagaaa tgataaaact tttgccattc tcaccggatt cagtcgtcac      2820
tcatggtgat ttctcacttg ataaccttat ttttgacgag gggaaattaa taggttgat      2880
tgatgttggg cgagtcggaa togcagaccg ataccaggat ctggccatcc tatggaactg      2940
cctcgggtgag ttttctcctt cattacagaa acggcttttt caaaaatag gtattgataa      3000
tctgatatg aataaattgc agtttctatt gatgctcgat gagtttttct aactgtcaga      3060
ccaagtttac tcatatatac ttttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat      3120
ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaadc ccttaacgtg agttttcgtt      3180
ccactgagcg tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct      3240

```

```
gcgogtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 3300
ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 3360
aaatactgtc cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 3420
gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 3480
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 3540
aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 3600
cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gttcccga gggagaaagg cggacaggta 3660
tccggtaaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc 3720
ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg 3780
atgctogtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 3840
cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 3900
ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 3960
gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgccctctccc 4020
cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg 4080
cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat tagg 4124
```

图 5

表达载体 pHS-GHA 的序列:

```

catatggcta aaatcgttgt tattggtgcc ggtggtgcc gtttaactac agctcttcaa      60
cttcttcgta aaggacatga ggttacaatt gtgtccgagt ttacgcccggt tgatcttagt      120
atcggatata cctcgccttg ggcaggtgcc aactggctcc cgttttacga tggaggcaag      180
ttagccgact acgatgccgt ctcttatcct atcttgcgag agctggctcg aagcagcccc      240
gaggctggaa ttcgactcat caaccaacgc tcccatgttc tcaagcgtga tcttcctaaa      300
ctggaaggtg ccatgtcggc catctgtcaa cgcaaccocct ggttcaaaaa cacagtcgat      360
tctttcgaga ttatcgagga caggtccagg attgtccacg atgatgtggc ttatctagtc      420
gaatttgctt ccgtttgtat ccacaccgga gtctacttga actggctgat gtcccaatgc      480
ttatcgctcg gcgccacggt ggttaaactg cgagtgaacc atatcaagga tgccaatttt      540
ctacactcct caggatcacg ccccgacgtg attgtcaact gtagtggctt ctttgcccgg      600
ttcttgggag gcgtcgagga caagaagatg taccctattc gaggacaagt cgtccttgtt      660
cgaaactctc ttccttttat ggccctcttt tccagcactc ctgaaaaaga aatgaagac      720
gaagctctat atatcatgac ccgattcgat ggtacttcta tcattggcgg ttgtttccaa      780
tccaacaact ggtcatccga acccgatcct tctctcacc atcgaatcct gtctagagcc      840
ctcgaccgat tcccggaaact gaccaaagat ggccctcttg acattgtgcg cgaatgcgtt      900
ggccaccgtc ctggtagaga gggcgggtcc cgagtagaat tagagaagt cccggcggtt      960
ggctttgttg tccataacta tgggtccgcc ggtgctggtt accagtcctc ttacggcatg     1020
gctgatgaag ctgtttctta cgtcgaaaga gctcttactc gtccaaacct tttagatct     1080
ttcttaggt cacatagcag gaatggatgc ttttgcaaaa ggctttaaag ttgcttacia     1140
gcttgtgaaa gatggcgtat ttgacaagtt catcgaagaa agatacgsaa gctacaaaga     1200
aggcattggc gctgatattg taagcggtaa agctgacttc aagagccttg aaaagtatgc     1260
attagagcac agccagattg taaacaaatc aggcagacaa gagctattag aatcaatcct     1320
aatcagtat ttgtttgcag aataaggcgc gccttaagat atcaacaaac tccgggaggc     1380
agcgtgatgg ggcaacaatc acacggattt cccgtgaacg gtctgaatga gcggattatt     1440
ttcagggaaa gtgagtgtgg tcagcgtgca ggtatatggg ctatgatgtg cccggcgtt     1500
gaggctttct gcctcatgac gtgaaggtgg tttgtccgtg gttgtgtggc agaaagaaga     1560
tagccccgta gtaagttaat tttcattaac caccacgagg catccctatg tctagtccac     1620
atcaggatag cctcttaccg cgctttgcgc aaggagaaga aggcatgaa actaccacga     1680
agttcccttg tctggtgtgt gttgatcgtg tgtctcacac tgttgatatt cacttatctg     1740
acacgaaaat cgctgtgcga gattcgttac agagacggac acagggaggt ggccgcttc     1800
atggccttac aatccggtaa gtagctacct ggaggcgggc gcaggcctgc cttttcagga     1860
ctgatctgct tctgactact gaagcgcctt tataaagggg ctgctggttc gccggtagcc     1920
cctttctcct tgctgatgtt gtgaattcga agcttgatcc ggctgctaac aaagcccga     1980
aggaaactga gttggctgct gccaccgtg agcaataact agcataaacc cttggggcct     2040
ctaaacgggt cttgaggggt ttttgctga aaggaggaaac tatatccgga tctggcgtaa     2100
tagcgaagag gccccaccg atcgccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg     2160
ggacgcgcc tgtagcggcg cattaagcgc ggccgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac     2220
cgctacactt gccagcggc tagcggcgc tctttcgtt tcttccctt cctttctcgc     2280
cacgttcgcc ggctttccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt     2340
tagtgcttta cggcacctog accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg     2400
gccatcgccc tgatagacgg tttttgccc tttagcgttg gagtccacgt tctttaatag     2460
tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt     2520
ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt     2580
taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgct tacaatttag gtggcacttt tccgggaaat     2640
gtgcgggaa cccctatttg tttattttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg     2700
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtcatatt     2760
caacgggaaa cgtcttgctc taggccgga ttaaattcca acatggatgc tgatttata     2820
gggtataaat gggctcgcga taatgtcggg caatcaggtg cgacaatcta tcgattgtat     2880
gggaagccc atgcccaga gttgtttctg aaacatggca aagtagcgt tgccaatgat     2940
gttacagatg agatggtcag actaaactgg ctgacggaat ttatgcctct tccgaccatc     3000
aagcatttta tccgtactcc tgatgatgca tggttactca ccaactgcgat cccgggaaa     3060
acagcattcc aggtattaga agaatacct gattcaggtg aaaatattgt tgatgcgctg     3120
gcagtgttcc tgcgccggtt gcattcgatt cctgtttgta attgccttt taacagcgat     3180
cgcgtatttc gtctcgtca ggcgcaatca cgaatgaata acggtttggt tgatgcgagt     3240
gattttgatg acgagcgtaa tggctggcct gttgaacaag tctggaaaga aatgcataaa     3300
cttttgccat tctcaccgga ttcagtctc actcatggtg atttctcact tgataacctt     3360

```

```

atTTTTgacg aggggaaatt aataggttgt attgatgttg gacgagtcgg aatcgcagac 3420
cgataccagg atcttgccat cctatggaac tgcctcgggt agTTTTctcc tcattacag 3480
aaacggcttt ttcaaaaata tggTattgat aatcctgata tgaataaatt gcagtttcat 3540
ttgatgctcg atgagTTTT ctaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt 3600
gatttaaaac ttcatTTTT atttaaaagg atctaggTga agatcTTTT tgataatctc 3660
atgaccaaaa tcccttaacg tgagTTTTcg ttccactgag cgTcagaccc cgtagaaaag 3720
atcaaaggat cttcttgaga tccTTTTttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa 3780
aaaccaccgc taccagcggT ggTTTTgttg ccggatcaag agctaccaac tctTTTTccg 3840
aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag 3900
ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatoctg 3960
ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttTga ctcaagacga 4020
tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gtTcgtgcac acagcccagc 4080
ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaaagcgc 4140
acgcttcccg aaggggagaaa ggccggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga 4200
gagcgcacga gggagctTc agggggaaac gcctggTatc tttatagtcc tTcgggtt 4260
cgccacctct gacttgagcg tcgattttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg 4320
aaaaacgcca gcaacgcggc cTTTTtacgg ttctTggcct ttTgctggcc tttTgctcac 4380
atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc cttTgagtga 4440
gctgataacc ctcgccgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg 4500
gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc 4560
tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt 4620
tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgtTgtgt 4680
ggaattgtga gcggataaca atttcacaca agaaggagat ata 4723

```

图 6

表达载体 pT7-kan-ACY 的序列:

```

catatgaacg ctccccgtccc cgtccccgcgc gtcgccgatt tcacctgcga gaagaagcct 60
gcgagcggct cgcgcggcat ggtcgtcacc aaccaccgc tcgcctcggc agccggcgcg 120
cagatcctgc tcgccggcgg caatgccatc gacgcggctg tcgcgtcgtt cttcgcctg 180
acggtggccg agccgatgat ggtcggcatc ctcggcgggg gcctgagcca tatccggctc 240
gccgacgggc gtcatgtcgt gatcgacaat ctctcgaccg cgcggggcaa ggcgacggcc 300
gagatgtacg agtgccctgc cgacgagatc ggcaagcagc gcgacacgcg cgaaccgcag 360
aacgtggtcg gagccaaggc ggtcgcgggt cccggcgcgc tcaagggctg gtgcgaggcg 420
ctcgcgccgt tcggcacgct gccgctcggc gaggttctcc agccggcgat cgggctggcg 480
gagcgcggct tcgtggtcac gccctatctc tcgaactgca tcaccgacaa cgcgggggat 540
ctcgcgccgc accccggcct cgcggcgatg ctgctgccgg gcggaaagcc gctccagccg 600
ggcatgcccg tcgtccagtc cgactatgcc gcgagcctca aactgatcgc ggctgagggg 660
ccggacgcgc tctatggcgg caagctcggc cgggcgctga ccgattacat ggcgggcaat 720
ggcggcctga tcgatcaggc cgacctcggc aattaccgca tcgaactcgc cgagccgatt 780
cgcggctcct atcgcggcta cgagatcacc ggcccgcgc cgcctcgtc atcgggcgtg 840
catatcacgc agatgtcaca cattctcgaa ggctatgata tcggctcgtt cggcttcggc 900
tcgacggacg ctgtgcatct cctcgcgcaa gccctgaaga tcgccttcgc cgaaccgcgc 960
gtggcgacag ccgatccggc cttcgtcaag gttccggtcg cgcgattgat cgacaaggcc 1020
tatgccagc agcgcgcgc gctcattgag atggagcagg cgaagagctg gacggccggg 1080
ctctctggcg gcgaatccgc cgacaccact catgtaccg tcgctgacgc catggggaat 1140
gtcgtcagcg cgacgcagac gatcaacggg ctgttcggcg cctgcgtgca gattccgggc 1200
accggcatga tcgccaacaa ctacatgtac aacttcgata cgcattccgg ccgggcgctc 1260
tcgatcgcgc cgggaaagag ggtcttcacc tcgatggcgc cgatgatggc gttgaaggag 1320
ggacggatcg cttttcgcct cggcttgcct ggcgcgctcc gcatcttccc ctcggcgctg 1380
caggcgatcg tcaacctgat cgaccaccgc atgagcctgc aggaggcggg cgaggcgcca 1440
cgcgtctgga cggaggcggc cgtgctcgaa ctcgaggaag cgatccccga ggccgtggca 1500
caagcgctga tcgcgcgcgg ccataagggt gtgcgctcgc cccgcgtggc cgggtggcatg 1560
aacgccatcg ctttcaatcc ggacgggtacc ttgaccgggt ccgcctgctg gcgcgcggac 1620
ggcacaccgg tcgccatctc cggcgggctc gcccgctgcc gtgcccgctt caccatctga 1680
agatctgcag ctggtaccat ggaattcgaa gcttgatccg gctgctaaca aagcccgaaa 1740
ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc 1800
taaacgggtc ttgaggggtt ttttctgtaa aggaggaact atatccggat ctggcgtaat 1860
agcgaagagg cccgcaccga tcgccttcc caacagtgc gcagcctgaa tggcgaatgg 1920
gactacccct gtgacggcgc attaagcgcg cggggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 1980
gctacacttg ccagcgcct agcggcctc ctttctgctt tcttccctc ctttctgccc 2040
acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccttttagg gttccgattt 2100
agtgccttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg 2160
ccatcgcctt gatagacggt tttcgcctt ttgacgttgg agtccacggt ctttaatagt 2220
ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctcattc ttttgattta 2280
taagggattt tgccgatttc ggctatttgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 2340
aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttagg tggcactttt cggggaaatg 2400
tgccgggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 2460
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtcatattc 2520
aacgggaaac gtcttgctct aggcgcgat taaattcaa catggatgct gatttatatg 2580
ggtataaatg ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg 2640
ggaagcccga tcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg 2700
ttacagatga gatggtcaga ctaaacctggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca 2760
agcattttat ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgata cccgggaaaa 2820
cagcattcca ggtattagaa gaatacctg attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg 2880
cagtgcttct gcgcgggttg cattogattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgate 2940
gcgtatttct tctcgtcag cgcgaatcac gaatgataa cggtttgggt gatgcgagtg 3000
attttgatga cgagcgtaat gctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac 3060
ttttgccatt ctaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta 3120
ttttgacga ggggaaatta ataggttga ttgatgttgg acgagtcgga atcgcagacc 3180
gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtg gttttctcct tcattacaga 3240
aacggccttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt 3300
tgatgctcga tgagtttttc taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg 3360

```

```

atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca 3420
tgacccaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 3480
tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 3540
aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 3600
aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt 3660
taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt 3720
taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 3780
agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct 3840
tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 3900
cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 3960
agcgcaogag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc 4020
gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggscgg agcctatgga 4080
aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct ttgctcaca 4140
tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc ttgagtgag 4200
ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg 4260
aagagcggcc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgctt gccgattcat taatgcagga 4320
tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac tatagggaga ccacaacggt ttccctctag 4380
aaataatfff gttaactfff aagaaggaga tata 4414

```

图 7