

固定化细胞生产 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸

王祯祥 乐华爱 王嫩芝 矫庆华 韩文珍 孙万儒 张启先

(中国科学院微生物研究所, 北京)

为了用重排酸制备 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA), 我们从 20 株具有青霉素酰化酶活性的大肠杆菌中筛选裂解重排酸的菌株, 发现凡能裂解青霉素 G 的菌株都能裂解重排酸, 其中 AS1.76 菌株酶活力最高。

AS1.76 菌株细胞固定化于琼脂凝胶中。研究了固定化细胞裂解重排酸生产 7-ADCA 的最适条件, 并与原细胞进行了比较。固定化细胞裂解重排酸的最适温度是 55℃, 最适 pH 是 8.0。细胞被固定化后, 酶的热稳定性和 pH 稳定性都有所增加。5% 重排酸溶液在 37℃, pH7.7, 反复循环通过固定化细胞柱, 释放出的酸用 2N 氢氧化钠中和, 维持 pH7.7, 经 2—2.5 小时, 裂解率达到 91.5%。纯的 7-ADCA 收率为 81.4%。固定化细胞在 30 天内, 重复使用 23 次, 酶活力没有下降。

半合成头孢霉素, 也是一类 β -内酰胺抗菌素, 和青霉素有近似的结构, 具有广谱、低毒、耐酸等特性, 它的母核是用头孢霉素 C 经化学裂解制成, 虽有酶法裂解的报道, 但裂解较困难, 收率也低^[1-3]。近年来发展一种方法将青霉素的噻唑环扩大成头孢霉素的噻嗪环, 再用化学或酶法去掉此重排酸的苯乙酰基侧链, 制成 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-Aminodesacetoxycephalosporanic Acid), 简称 7-ADCA。7-ADCA 是生产某些半合成头孢霉素的重要中间体。T. Fujii 等首先报道了 *Bacillus megaterium* 酰化酶裂解重排酸 (7-phenylacetamidodesacetoxycephalosporanic acid) 制备 7-ADCA 的研究^[4]。本文报道固定化大肠杆菌裂解重排酸生产 7-ADCA 的研究结果。

材料与方法

(一) 材料

重排酸和 7-ADCA 为上海第五制药厂供给, 6-硝基-3-苯乙酰氨基苯甲酸 (6-nitro-3-phenylacetamido-benzoic acid), 简称 NIPAB, 为本实验室合成。其他所用材料均为市售分析纯的商品。

(二) 菌种

大肠杆菌 (*E. Coli*) 为本组所筛的具有青霉素酰化酶活性的菌株。于牛肉汁斜面上, 28℃ 培养 23 小时备用。

(三) 培养基的制备及菌种培养

培养基的成份(%): 蛋白胨 1, 苯乙酸 0.2, 氯化钠 0.5, 玉米浆 0.3。用自来水配好后加碱调 pH 至 7.0, 在 250 毫升三角瓶中装上述培养基 30 毫升, 8 磅 30 分钟杀菌, 冷后接入斜面种子一白金环, 28℃, 170 转/分旋转摇床上培养 15 小时。取 5 毫升培养液离心 (4,000 转/分) 30 分钟, 弃去上清液, 加水 5 毫升制成菌悬液供测定酶活力用。

(四) 固定化细胞的制备

按我们以前所报道的洋菜-戊二醛法制成。

(五) 测定方法^[4]

1. 以 NIPAB 为底物测定酶活力, 基本上按 Kutzbach 所报道的方法进行^[7]。原细胞和固定化细胞酶活力的测定具体操作和酶单位的定义详见前报^[3, 4]。

2. 以重排酸为底物测定酶活力, 是用 0.05M, pH7.7 磷酸缓冲液配成的 0.5% 浓度的重排酸溶液为底物, 在 37℃ 反应 30 分钟, 用 Merrelli 所报

本文于 1980 年 4 月 30 日收到。

道的方法测定产生的 7-ADCA 的量^[8,9]。每分钟产生 1 毫克分子的 7-ADCA 所需的酶定义为一个酶活力单位。

结 果

(一) 菌种筛选

青霉素酰化酶的特异性主要和底物侧链有关,母核的影响不很大^[10]。重排酸是用青霉素 G 扩环而成,有苯乙酰胺基的侧链。但是裂解青霉素 G 的菌株能否裂解重排酸,以及裂解重排酸和裂解青霉素 G 关系怎样,未见有人报道。为此在筛选菌种时,主要是从具有青霉素酰化酶活力的大肠杆菌中,来寻找裂解重排酸活力较强的菌株,并比较了和裂解青霉素的相关性,结果列入表 1。

表 1 不同菌株的酶活力

菌 号	测 定 方 法	
	NIPAB (O. D. 405)	Merrelli (O. D. 405)
<i>E. Coli</i> AS 1.76	0.513	0.324
<i>E. Coli</i> AS 1.96	0.215	0.143
<i>E. Coli</i> AS 1.129	0.373	0.244
<i>E. Coli</i> AS 1.353	0.355	0.227
<i>E. Coli</i> AS 1.349	0.380	0.238
<i>E. Coli</i> AS 1.593	0.080	0.055
<i>E. Coli</i> 大 30	0.209	0.109
<i>E. Coli</i> 大 31	0.393	0.179
<i>E. Coli</i> E 33	0.295	0.167
<i>E. Coli</i> E 38	0.248	0.145
<i>E. Coli</i> E 42	0.435	0.255
<i>E. Coli</i> E 73	0.022	0.043
<i>E. Coli</i> E 100	0.375	0.207
<i>E. Coli</i> E 104	0.304	0.155
<i>E. Coli</i> E 110	0.281	0.189
<i>E. Coli</i> E 116	0.037	0.037
<i>E. Coli</i> E 136	0.281	0.199
<i>E. Coli</i> E 148	0.196	0.160
<i>E. Coli</i> B 10	0.022	0.009
<i>E. Coli</i> D 816	0.358	0.223

从表 1 看出,所试菌株都能裂解重排酸,其中酶活最高的是 AS1.76。该菌即是

裂解青霉素 G,生产 6-氨基青霉烷酸(6-APA)所用优良菌株。我们选它作为裂解重排酸生产 7-ADCA 的试验菌。

(二) 酸反应的最适温度

用 0.2M, pH7.7 磷酸盐缓冲液配成的 0.5% 浓度的重排酸溶液 20 毫升中,加入 0.2 克固定化细胞,或相当于 0.2 克固定化细胞酶活的原细胞,在不同温度下反应 30 分钟,用 Merrelli 方法测定产生的 7-ADCA 量,结果如图 1 所示。固定化细胞反应最适温度为 55℃,原细胞为 50℃,两者相差 5℃。

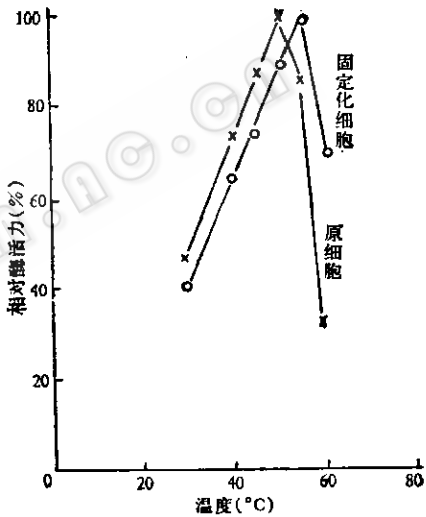


图 1 温度对酶反应的影响

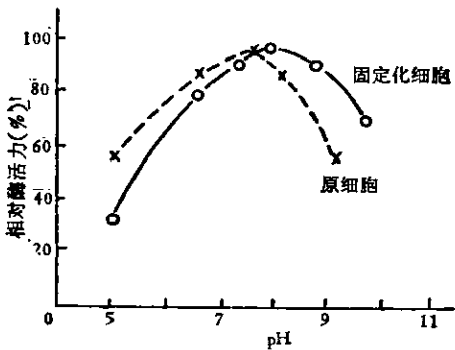


图 2 pH 对酶反应的影响

pH5—7.5 磷酸盐缓冲液
pH7.5—9 硼酸缓冲液
pH9.2—10 硼砂缓冲液

(三) 酶反应的最适 pH

以不同 pH 的 0.2M 磷酸盐缓冲液配成的 0.5% 浓度的重排酸溶液 20 毫升, 分别加入 0.2 克的固定化细胞, 或相当 0.2 克固定化细胞酶活的原细胞, 在 37℃ 反应 30 分钟, 用 Merrelli 方法测定 7-ADCA 的生成量。结果如图 2。固定化细胞最适 pH 为 8.0, 原细胞为 7.5, 两者相差 0.5。

(四) 酶的热稳定性

0.2 克固定化细胞悬于 10 毫升 0.1M, pH7.7 的磷酸盐缓冲液中, 于不同温度保温 24 小时后, 加入用此缓冲液配成的 1% 的重排酸溶液, 37℃ 反应 30 分钟。另取原细胞为 1% 悬液 0.5 毫升, 同样于不同温度下保温 24 小时后, 加入重排酸溶液 1.5 毫升, 37℃ 反应 30 分钟, 用 Merrelli 方法测定残留酶活力结果如图 3。37℃ 以下固定化细胞和原细胞稳定, 40℃ 时酶活力开始有所破坏, 但固定化细胞比原细胞稳定, 前者保存 90% 酶活力, 而后者只保存 62%, 45℃、50℃ 酶活力急剧下降。

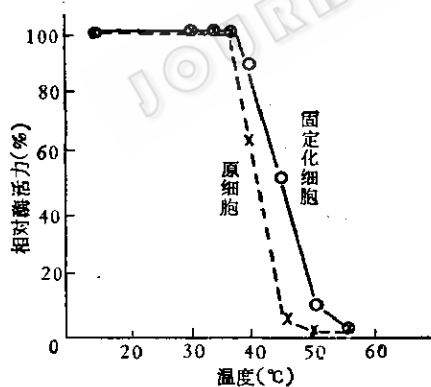


图3 酶在不同温度下热稳定性

(五) 酶的 pH 稳定性

1% 的菌悬液 0.5 毫升, 分别加到 0.5 毫升 0.2M 不同 pH 缓冲溶液, 立即测定实际 pH, 37℃ 保温 24 小时, 加入用 0.4M, pH7.7 磷酸缓冲液配制成的 1% 的重排酸溶液 1 毫升, 37℃ 保温 30 分钟, 用 Merrelli

方法测定保存的酶活力。固定化细胞为 0.2 克, 不同 pH 处理条件与菌悬液相同, 只是反应体积扩大 10 倍。结果如图 4。原细胞稳定范围在 pH6—7.5, 固定化细胞在 5.6—7.5, 超过此范围酶活力迅速下降, 但固定化细胞酶活力下降程度小于原细胞。

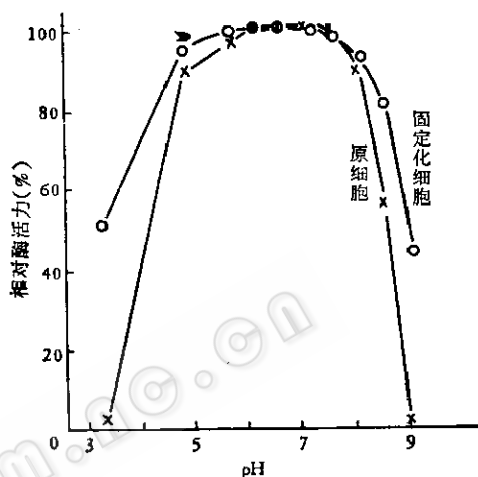


图4 酶的 pH 稳定性
pH3.6—7.6 磷酸盐缓冲液
pH8.0—9.0 硼酸缓冲液

(六) 底物浓度的影响

将装有 20 克固定化细胞 (2.38 单位/克) 的尼龙布袋, 悬在 150 毫升的烧杯中, 加入用 pH7.7, 0.05M 磷酸缓冲液配成的

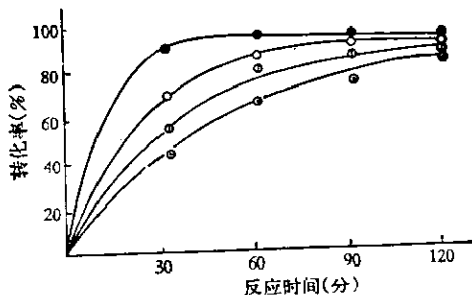


图5 底物浓度对酶反应的影响

●——● 2%
○——○ 4%
①——① 6%
⊙——⊙ 8%

不同浓度的重排酸溶液 50 毫升,使液面浸没固定化细胞,在电磁搅拌器上 37℃ 进行反应,通过 pH 自动滴定仪控制反应 pH 为 7.7。不同时间取样,用 Merrelli 方法测定 7-ADCA 的形成量。结果如图 5 所示。随着底物浓度增加,反应时间延长。2% 重排酸溶液中反应 30 分钟,裂解率可达 92.3%,而 8% 浓度的重排酸中反应 120 分钟,裂解率仅为 90.8%。

(七) 7-ADCA 的制备

1. 重排酸的裂解

将固定化细胞 58 克 (2.25 单位/克) 装柱 (3.7×17 厘米),用输液泵把 0.05M, pH7.7 的磷酸盐缓冲液配成的 5% 浓度的重排酸溶液 150 毫升注入柱中,控制柱流出液的 pH 为 6.5 左右,再用 pH 自动滴定仪,滴加 2N 氢氧化钠溶液,使进入柱子的溶液的 pH 保持 7.7。柱内温度为 37℃,反复循环裂解,经过 2 小时,流出液的 pH 逐渐上升,最后达 pH7.7,并保持不变,裂解结束。用 Merrelli 方法测定 7-ADCA 的量,计算裂解率(见表 2)。

2. 7-ADCA 的结晶

上述裂解液冷至 10℃ 以下,加 1% 的活性炭脱色,过滤除去活性炭,滤液在搅动下缓慢滴加 6N 的盐酸,调 pH 至 3.7,放置 30 分钟后,加 1/2 体积的醋酸丁酯抽提,过滤,用调至 pH3.7 的蒸馏水 20 毫升洗涤两次,取出结晶于烧杯中,加 20 毫升醋酸丁酯悬浮洗涤一次,过滤,结晶放烧杯

中,再用 20 毫升丙酮悬浮洗涤一次,过滤出的结晶放在 40—50℃ 下烘干至恒重。收率见表 2。

讨 论

筛选菌种时,我们用重排酸作底物,用 Merrelli 的方法直接测定产物 7-ADCA。同时也用 NIPAB 法测定酶活力,寻求不同菌株所产的酰化酶裂解重排酸和裂解青霉素 G 间的关系。从表 1 看出,凡能裂解青霉素 G 的菌株都能裂解重排酸产生 7-ADCA,而且裂解的强弱也是平行的。

据实验结果,AS1.76 固定化细胞,在无底物情况下,pH 在 5.6—7.5 之间,温度在 37℃ 以下是稳定的。裂解重排酸的最适 pH 是 8.0,最适温度为 55℃,和裂解青霉素 G 的条件相比,仅最适温度相差较多。为了延长固定化细胞柱使用寿命减少反应过程中底物、产物的破坏,和尽可能保持高效率裂解,裂解条件完全套用了裂解青霉素 G 的条件,即反应温度为 37℃,反应 pH 为 7.7。实践证明,这样的条件也是裂解重排酸较适合的条件。在这样的条件下,固定化细胞柱在 30 天内,分批裂解重排酸 23 次后,用 NIPAB 方法测定固定化细胞的酶活力,未见下降。产品 7-ADCA 经熔点测定为 222—224℃。在硅胶薄板上用正丁醇:冰醋酸:醋酸丁酯:水 (15:40:80:24) 展开,得一个斑点。

参 考 文 献

- [1] Walton, R. B.: *Development of industrial Microbiol.*, 5: 349, 1964.
- [2] 五井仁ウ: 公开特许, 94093, 1978.
- [3] 波谷友三ウ: 特许公报, 17032, 1979.
- [4] Fujii, T. et al.: *Process Biochem.*, 11(8): 31, 1976.
- [5] 张启先等: 微生物学报, 19(3): 302, 1979.
- [6] 孙万儒等: 微生物学报, 20(4): 407, 1980.
- [7] Kutzbach, C. and E. Rouenbusch; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355: 45, 1975.

表 2 固定化细胞制备 7-ADCA 概况

测定结果	裂解率 (%)	结晶收率 (%)	总收率 (%)
最高	98	98.78	84.5
最低	85	82.0	79.7
平均	91.5	87.52	81.4

- [8] Marrelli, L. P.: *J. Pharmaceutics Sci.*, 57: 219, 1968. 1225, 1975.
[10] Cole, M.: *Biochem J.*, 115: 733, 1969.
[9] Shimizu, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 39:

PRODUCTION OF 7-AMINODESACETOXYCEPHALOSPORANIC ACID BY IMMOBILIZED *E. COLI* CELLS

Wang Zhenxiang Yeu Huaai Wang Meizhi Jiao Qinghua
Han Wenzhen Sun Wanru Zhang Qixian
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

For the production of 7-ADCA from phenylacetyl-ADCA, 20 strains of *E. coli* having penicillin acylase activity was tested. All these acylase-producing strains have the ability to split phenylacetyl-7-ADCA into 7-ADCA. Of these strains, AS 1.76 is the most promising one.

Whole cells of AS 1.76 strain were entrapped in agar gel. Conditions for 7-ADCA production by immobilized cells have been investigated and compared with those of the intact cells. The optimal pH and temperature of the immobilized cells

was 8.0 and 50°C, respectively. The stability toward heat and different pH was markedly increased by immobilization of the cells.

Recycling of 5% phenylacetyl-7-ADCA through an immobilized cells column at 37°C, pH 7.7 (adjusted with 2N NaOH) for 2—2.5 hr. Resulted in a 91.5% cleavage of the substrate and a 81.4% yield of 7-ADCA. The immobilized cells column have been operated for 23 times repeatedly during 30 days, without decrease of enzyme activity.