

# 固定化青霉素 G 酰化酶水解头孢菌素 G 制备 7-ADCA 的研究\*

徐冠珠 韩 辉 王祯祥 高宏庆 赵 丽

(中国科学院微生物所 北京 100080) (山东新华制药厂 淄博 255005)

**摘 要** 用聚丙烯腈纤维固定化青霉素酰化酶水解头孢菌素 G 制备 7-ADCA, 固定化酶对头孢菌素 G 的最适 pH 为 9.0, 最适温度 50 ℃。在 37 ℃、pH8.0 固定化酶对头孢菌素 G 的表观米氏常数为  $1.67 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。最大反应速度为  $3.01 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。头孢菌素 G 溶液浓度在 2% 以上时, 对固定化酶有明显的抑制作用。固定化酶水解头孢菌素 G 的最佳投料浓度为 5% ~ 6%, 水解时用酶量以每克头孢菌素 G 投 300U 以上为好。按上述条件水解头孢菌素 G, 操作 25 批后固定化酶保留活力 77.8%, 7-ADCA 平均收率 92.68%。

**关键词** 固定化青霉素酰化酶, 头孢菌素 G, 聚丙烯腈

头孢菌素 G(cephalosporin G, 缩写作 Cep G) 由青霉素 G(penicillin G, 缩写作 Pen G) 经化学氧化扩环而得, 与青霉素 G 有相同侧链, 可以被青霉素 G 酰化酶水解去侧链生成 7-氨基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸(7-amino-3-deacetoxycephalosporanic acid 缩写为 7-ADCA)。7-ADCA 是半合成头孢菌素的重要中间体。以前多用化学法生产, 但化学法工艺复杂、要求条件苛刻、环境污染严重、产品质量不稳定, 后来, 国内外广泛开展了酶法水解工艺的研究<sup>[1~3]</sup>。然而, 已有的报道多采用大肠杆菌的胞内青霉素酰化酶制备成固定化细胞, 或者通过破碎细胞, 将酶分离纯化后再制成固定化酶。固定化所用的载体有三醋酸纤维、丙烯环氧乙烷小球等<sup>[4]</sup>。作者以三醋酸纤维为载体, 固定化巨大芽孢杆菌胞外青霉素酰化酶, 水解青霉素生产 6-APA<sup>[5]</sup>。本文报道以聚丙烯腈纤维为载体, 固定化胞外青霉素 G 酰化酶, 水解 Cep G 制备 7-ADCA 的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

巨大芽孢杆菌胞外青霉素 G 酰化酶: 本实验室制备<sup>[6]</sup>。Cep G: 山东新华制药厂提供。青霉素 G(缩写为 Pen G) 钾盐: 河北制药厂生产。聚丙烯腈: 上海金山石化总厂生产。7-ADCA 标准品: 荷兰进口。其余均为国产市售试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 固定化酶水解 Pen G 活力的测定:** 用 0.1 mol/L pH8.0 的磷酸缓冲液配制 2% 的青霉素 G 的钾盐溶液作底物。37 ℃ 进行酶水解, 以每分钟产生 1 μmol 6-APA 所需

\* 本文为“八五”攻关项目。

本文于 1996 年 3 月 11 日收到。

的酶量定义为一个活力单位。文中除特别指定以 Cep G 为底物外, 酶活力一般以水解青霉素产生 6-APA 的活力计算; 固定化酶表观活力以酶的湿重计算。

**1.2.2 固定化酶水解 Cep G 的活力测定:** 以浓度为 2% 的 Cep G 代替 Pen G, 在方法 1 的同样条件下, 以每分钟产生  $1\mu\text{mol}$  的 7-ADCA 所需要酶量定义为 1 个酶活力单位。

**1.2.3 聚丙烯腈纤维固定化青霉素酰化酶 (immobilized penicillin acylase 缩写作 IMPA) 的制备:** 参考 Filippusson 的方法<sup>[7]</sup> 改进后制备。

## 2 结果和讨论

### 2.1 固定化酶的性质

**2.1.1 pH 对固定化酶活力的影响:** 用不同 pH 值的缓冲液分别配制浓度为 2% 的 Cep G 溶液, 测定固定化酶水解 Cep G 的活力, 结果见图 1。固定化酶对 Cep G 的最适 pH 为 9.0。

**2.1.2 温度对固定化酶活力的影响:** 在不同温度下分别测定固定化酶水解 Cep G 的表现活力, 绘制酶活力与温度的关系曲线。图 2 中显示固定化酶对 Cep G 的最适温度为  $50^{\circ}\text{C}$ 。

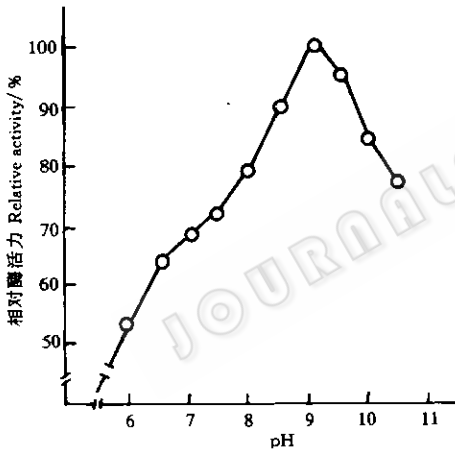


图1 pH 对固定化酶水解 Cep G 的活力的影响

Fig.1 Effect of pH on the activity of Cep G hydrolysis by IMPA

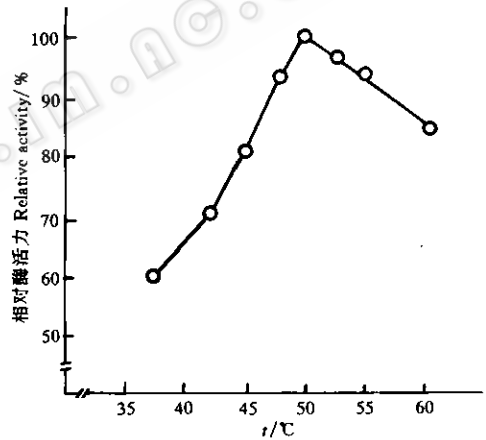


图2 温度对固定化酶水解 Cep G 活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on activity of Cep G hydrolysis by IMPA

**2.1.3 固定化酶的 pH 稳定性:** 将固定化酶浸泡于不同 pH 值的缓冲液中,  $37^{\circ}\text{C}$  保温 16 h 后, 用 Cep G 测定酶活力, 图 3 显示, 固定化酶在 pH 6.0 ~ 11.0 活力稳定。同样条件下, 自然酶活力仅在 pH 7.0 ~ 9.0 稳定。固定化酶的 pH 稳定性明显优于自然酶。

**2.1.4 固定化酶的热稳定性:** 将固定化酶浸泡于 0.05 mol / L pH 8.0 的磷酸缓冲液中, 在不同温度下保温 6 h 后测定酶活力。图 4 表明, 固定化酶在  $50^{\circ}\text{C}$  以下稳定。同样条件下, 自然酶在  $40^{\circ}\text{C}$  以下稳定。固定化酶的热稳定性也明显优于自然酶。

**2.1.5 表观米氏常数和最大反应速度:** 以 Cep G 为底物在不同浓度下测定固定化酶反

应初速度。按 Lineweaver - Burk 的方法作图, 由图 5 求得固定化酶在 37 ℃、pH8.0 对 Cep G 的表观米氏常数为  $1.67 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。最大反应速度为  $3.01 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

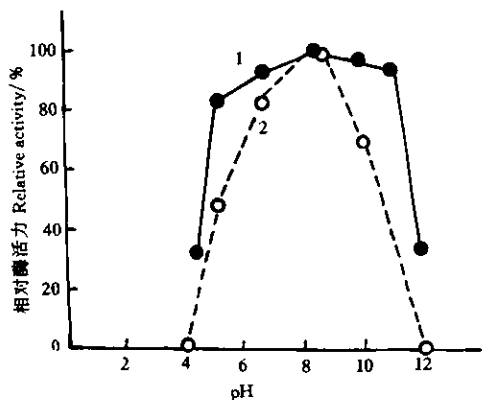


图3 酶的 pH 稳定性

Fig.3 Effect of pH for stability of penicillin acylase

1. 固定化酶 Immobilized enzyme;
2. 自然酶 Free enzyme.

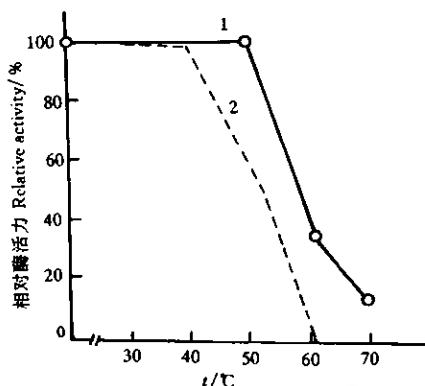


图4 酶的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of penicillin acylase

1. 固定化酶 IMPA;
2. 自然酶 Free enzyme.

## 2.2 固定化酶水解 Cep G 制备 7-ADCA

2.2.1 底物浓度对固定化酶活力的影响: 用不同浓度的 CepG 溶液测定固定化酶的活力,

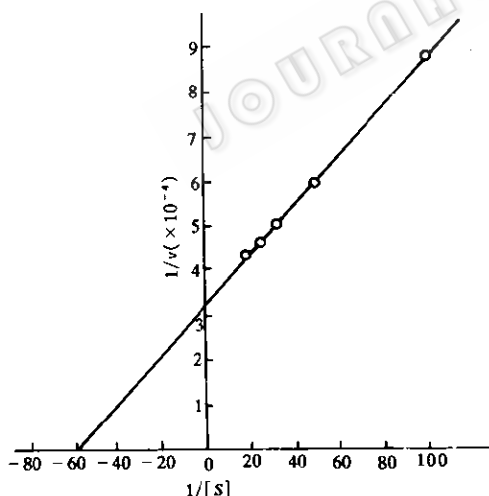


图5 固定化酶的 Lineweaver - Burk 图

Fig.5 Lineweaver - Burk plote of initial rate of hydrolysis Cep G by immobilized penicillin acylase

结果见图 6。当 CepG 浓度低于 2% 时, 固定化酶活力随浓度升高而增加; 但在浓度高于 2% 时, 则随浓度升高而降低。CepG 浓度在 2% 以上对固定化酶显示明显的抑制作用。同样条件下, 青霉素 G 在 5% 以上才对固定化酶有明显的抑制作用。CepG 对酶的抑制大于青霉素 G。

2.2.2 不同浓度 Cep G 的水解过程: 在用酶量和投料量均相同的情况下, 将 Cep G 配制成不同浓度, 进行酶水解并提取 7-ADCA, 考察水解过程和 7-ADCA 的收率, 试验结果见图 7。浓度 5% 和 6% 的两条曲线大部分重叠, 仅在水解后期 6% 较 5% 的曲线斜率降低。说明水解后期。浓度 6% 的产物抑制增加, 故水解时间延长。随着 CepG 浓度的增加, 水解速度变慢, 水解时间相应延长, 由此证明 CepG 浓度增加, 底物抑制和产物抑制都明显增加, 不利于 CepG 的酶水解, 就产品收率而言, 浓度 5% ~ 8% 对 7-ADCA 的收率无明显影响,

然而在 10% 时 7-ADCA 收率略有降低(数据未列出)。因此, 我们选定 Cep G 浓度 5% ~ 6% 作为下面试验的底物浓度。

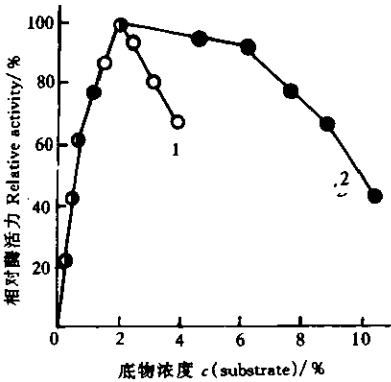


图 6 底物浓度对固定化酶活力的影响  
Fig.6 Effect of concentration of substrate on activity of the IMPA  
1. Cep G; 2. Pen G.

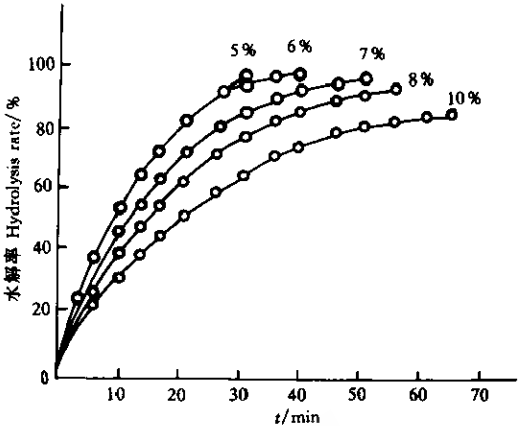


图 7 不同浓度 Cep G 的水解曲线  
Fig.7 Couse of hydrolysis for various concentration Cep G by IMPA

2.2.3 酶量对水解效果的影响: 按不同的用酶量(以青霉素为底物的活力单位)水解 Cep G(Cep G 的浓度均为 5%), 提取 7-ADCA。表 1 的数据表明, 酶用量增大, 则水解速度加快, 时间缩短, 7-ADCA 收率增高。故扩环酸 G 水解宜采用较大的用酶量。综合考虑, 一般每克 Cep G 用酶量以 300U 以上为好。

表 1 不同用酶量的水解效果

Table 1 Effect of supplied amount of enzyme on Cep G hydrolysis

用酶量 amount of enzyme U /g Cep G	最初 15min 水解率 Hydrolysis rate of starting 15min /%	水解时间 Hydrolysis t /min	7-ADCA 收率 Yield of 7-ADCA /%
440	88.9	33	96.5
291	60.5	60	93.8
146	43.3	100	92.7

2.2.4 固定化酶水解 Cep G 的使用效果: 按上述试验结果, Cep G 的浓度为 5%, 用酶量以每克 Cep G300U 计, 称取固定化酶 1g(湿重), 装入直径 32mm、长 100mm 的玻璃柱中, 重复水解 Cep G 提取 7-ADCA, 检验固定化酶水解 Cep G 的使用稳定性和水解效果。每批称取 Cep G5g 溶于 0.05mol / L pH8.0 的磷酸缓冲液中, 37℃ 保温, 泵入酶柱循环水解, 用 2 mol / LNaOH 维持 pH8.0 ~ 8.5, 至 pH 不再下降, 停止循环, 放尽酶柱中的水解液, 固定化酶用 10ml 缓冲液洗一遍, 洗液并入水解液中提取 7-ADCA。再用 80ml 缓冲液分两次循环洗涤固定化酶, 两次洗液合并作下批配料用。

试验结果列于表 2。

表 2 固定化酶水解 Cep G 的结果

Table 2 The data on hydrolysis of Cep G to 7-ADCA by IMPA

批号 Batches No.	Cep G 用量 amount of Cep G /g	水解时间 t /min	7-ADCA	
			Output /g	Yield /%
1	5.0	30	未提取	
2	5.0	30		
3	5.0	30		
4	5.0	30	11.715	90.67
5	5.0	30		
6	5.0	30		
7	5.0	30		
8	5.0	30	5.962	92.31
9	5.0	45		
10	5.0	45	12.186	94.32
11	5.0	45		
12	5.0	30		
13	5.0	45		
14	5.0	45	11.972	92.66
15	5.0	45		
16	5.0	45		
17	5.0	45		
18	5.0	45	9.163	94.56
19	5.0	30		
20	5.0	45		
21	5.0	45	11.890	92.03
22	5.0	30		
23	5.0	45		
24	5.0	45		
25	5.0	45	5.815	90.01
合计			68.700	92.68

表 2 中, 固定化酶水解 Cep G, 使用 25 批保留活力 77.8%(固定化酶使用前活力为 1500 u /g, 使用 25 批后剩余活力为 1167 u /g), 7-ADCA 总收率平均达 92.68%。

酶法水解 Cep G 生产 7-ADCA, 与酶法水解青霉素生产 6-APA 有较大差异。前者水解时的用酶量为后者的两倍; 底物对酶的抑制前者明显大于后者。因此, 前者水解时的投料浓度为 5%, 而青霉素水解投料浓度可高达 10%。其原因尚有待深入研究。就产品收率而言, 7-ADCA 的收率高于 6-APA。我们曾用纯度仅为 90% 的 Cep G 制备

7-ADCA, 7-ADCA 的收率也能达到 90%。值得注意的是 Cep G 质量对酶水解有较大影响, 尤其是底物对酶的毒害作用, 使用质量差的 Cep G, 酶在反应过程中活力损失大, 7-ADCA 生产的耗酶成本提高。因此酶法生产 7-ADCA, 应注意控制 Cep G 的质量。其影响原因也尚待探讨。

以聚丙烯腈纤维为载体, 比表面积大, 固定化酶表现活力高于颗粒状固定化酶。其纤维为疏水性, 耐磨强度和抗腐能力均优于醋酸纤维。用它制备固定化酶具有疏松、透水性好、循环水解时对流体阻力小、产物吸附少、易于洗涤等特点, 实为较理想的纤维状固定化酶。

### 参 考 文 献

- [1] Erarslan A. *Process Biochemistry*, 1993, 28: 311 ~ 318.
- [2] Erarslan A. *Process Biochemistry*, 1993, 28: 319 ~ 324.
- [3] 王桢祥, 乐华爱, 王嫩芝等. 微生物学报, 1981, 21(4): 477 ~ 481.
- [4] Kramer D. (Rohm pharma GmbH). Verfahren zur erstellung von stabilisierten ragergenundenen Protein. German Patent 2732301, 1979.
- [5] 徐冠珠, 王桢祥, 朱丽钊, 等. 微生物学报, 1992, 32(3): 212 ~ 217.
- [6] 王桢祥, 韩文珍, 门大鹏, 等. 微生物学报, 1992, 32(2): 99 ~ 104.
- [7] Filippuson H, Hornby W E. *Biochem J*, 1970, 120: 215.

## THE HYTROLYSIS OF CEPHALOSPORIN G TO 7-AMINODEA CETOXY-CEFALOSPORANIC ACID BY IMMOBILIZED PENICILLIN ACYLASE

Xu Guanzhu    Han Hui    Wang Zhenxiang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica. Beijing 100080*)

Gao Hongqing    Zhao Li

(*Shandong Xinhua Pharmaceutical factory, Shandong 255005*)

**Abstract** The extracellular penicillin G acylase (PA) from *Bacillus megaterium* was immobilized on polyacrylonitrile fibres by coupling. The optimal pH and temperature values of the immobilized penicillin acylase (IMPA) for the hydrolysis cephalosporin G (cep G) was 9.0 and 50 °C respectively. the apparent Michaelis constant for Cep G was  $1.67 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$  and the  $V_m$  was  $3.01 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  at 37 °C pH 8.0. It is good for hydrolysis of cephalosporin G, the 5% ~ 6% concentration of cefalosporin G and the 300U activity of the IMPA for one gram cephalosporin G was used. The remained activity was 77.8% after operation 25 times and the yield of 7-ADCA was 92.68%.

**Key words** Immobilized penicillin acylase, Cephalosporin G, Polyacrylonitrile