

聚丙烯腈纤维固定化青霉素酰化酶合成头孢氨苄的研究

陈 晖 韩 辉 徐冠珠

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:将巨大芽孢杆菌胞外青霉素酰化酶通过共价键结合到聚丙烯腈纤维的衍生物上。制成的丝状固定化青霉素酰化酶表现活力达 153U/g(湿重)。固定化酶合成头孢氨苄的最适 pH 为 6.5,最适温度为 40℃。7-ADCA 的投料浓度以 4% 为好,7-ADCA 与 PGME 的投料量比率为 1:2,最佳用酶量为 170U/g 7-ADCA。在 pH6.5、温度 30℃ 时,固定化酶对 7-ADCA 的表现米氏常数 K_{7-ADCA} 为 0.162mol/L,对 PGME 的表现米氏常数 K_{PGME} 为 0.364mol/L,最大反应速度 V_{max} 为 0.0462mol·L⁻¹·min⁻¹,用固定化酶合成头孢氨苄,使用 50 次保留酶活力 83.9%。

关键词:巨大芽孢杆菌,聚丙烯腈,固定化青霉素酰化酶

中图分类号:Q978.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2002)01-0076-05

头孢氨苄为目前临床使用量较大的一个半合成头孢菌素,工业上一直用化学合成工艺,但由于化学合成需要基团保护、工艺复杂、条件苛刻、污染环境,近年来国内外都在致力于酶法合成的研究。我们已经报道了固定化大肠杆菌细胞和氧化铝固定化酶法合成头孢氨苄的研究结果^[1-3]。氧化铝固定化酶法虽说较固定化大肠杆菌细胞法有了很大改进,但其仍存在着酶与载体结合强度不牢、合成活力不高等缺点。本文报道用聚丙烯腈作载体的丝状固定化青霉素酰化酶合成头孢氨苄的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

巨大芽孢杆菌胞外青霉素酰化酶酶液由本实验室制备^[4]。聚丙烯腈由上海金山石化总厂生产。7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸(7-ADCA)由本实验室自制^[5];7-ADCA 标准品荷兰进口。苯甘氨酸甲酯盐酸盐(PGME)由上海第五制药厂合成。其余试剂均为国产市售分析纯商品。

1.2 方法

1.2.1 聚丙烯腈纤维固定化青霉素酰化酶的制备:参考 Filippusson 的方法^[6]改进后制备。

1.2.2 头孢氨苄的合成:称一定量 7-ADCA 于 50mL 三角瓶中,加入 10mL 蒸馏水,边搅拌边滴加 2mol/L 的氨水至 7-ADCA 完全溶解,加入一定量的 PGME,溶解后调溶液的 pH 值,再加入相同 pH 值的 0.2mol/L 磷酸缓冲液 5mL,用蒸馏水补足 20mL,于 30℃ 水浴预热 10min,加入 0.5g(湿重)固定化酶,在 30℃、200r/min 的旋转震荡器上反应。不同时间取样测定 7-ADCA 浓度。

1.2.3 固定化酶合成活力的测定:采用 2% 的 7-ADCA 和 4% 的 PGME 作为底物,37℃ 按

作者简介:陈 晖(1975-),男,福建省顺昌县人,在读硕士生,从事半合成 β -内酰胺类抗生素工业用酶的研究。

收稿日期:2001-01-18,修回日期:2001-06-30

如上方法进行合成反应。以每分钟产生 $1\mu\text{mol}$ 头孢氨苄所需酶量定义为一个活力单位。固定化酶表观活力以酶的湿重计算。本文所指的固定化酶活力均为催化合成的活力。

1.2.4 7-ADCA 的测定:采用对二甲氨基苯甲醛试剂法(PDAB 法)^[7]。

1.2.5 头孢氨苄的测定:采用比色分析法^[8]。

2 结果和讨论

2.1 固定化酶的制备及活力

以聚丙烯腈为载体按文献[6]稍加改进的方法制备固定化青霉素酰化酶,表观活力为 153U/g ,而以氧化铝为载体的固定化青霉素酰化酶表观活力只有 21U/g 。

2.2 pH 对头孢氨苄合成的影响

用不同 pH 值的缓冲液配制反应溶液,按如上方法测定固定化酶合成头孢氨苄的速率,结果如图 1-a。图中显示在 pH6.5 固定化酶合成头孢氨苄的速率最高,但在 pH6.5 ~ pH7.0 这一区间内,酶都保持了很高的合成速率。

2.3 温度对头孢氨苄合成的影响

在不同温度下测定固定化酶合成头孢氨苄的速率,结果如图 1-b,在 40°C 固定化酶合成头孢氨苄的速率最高。从 15°C ~ 50°C 的这一区间内,酶都保持了较高的活力。

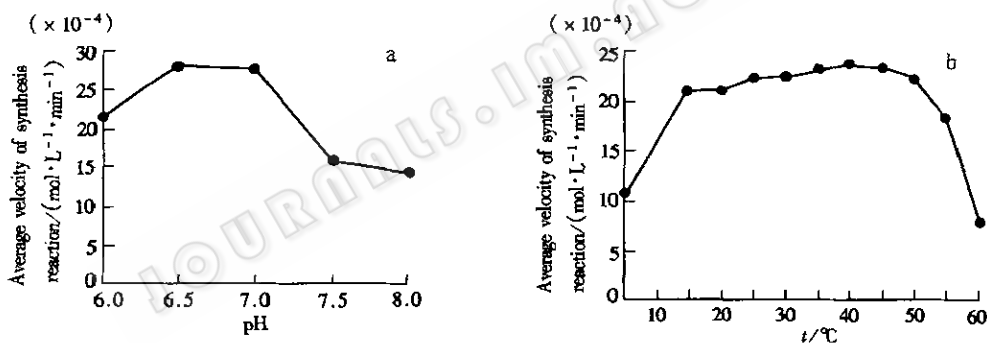


图 1 pH(a)和温度(b)对固定化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH(a) and temperature (b) on synthesis of cephalixin by immobilized penicillin acylase

2.4 7-ADCA 浓度对头孢氨苄合成的影响

分别配制 0.5% ~ 6.0% 的 7-ADCA 反应液,其中 PGME 按 7-ADCA:PGME = 1:2 的浓度比加入,酶量也按比例从 0.075g 增加到 0.900g,按如上方法反应 6h,测定 7-ADCA 的浓度变化,计算酶的平均反应速率,其结果如图 2 所示,酶的平均反应速率随着 7-ADCA 浓度的增加而提高,7-ADCA 浓度在 4.0% ~ 5.0% 时,反应速率最快,当 7-ADCA 浓度高于 5% 时,酶的平均反应速率略有下降。

2.5 7-ADCA 与 PGME 比率对头孢氨苄合成的影响

采用 4.0% 的 7-ADCA 浓度,如图 3 分别按不同的量加入 PGME,进行头孢氨苄的合成反应,6h 后测定 7-ADCA 的浓度变化,计算酶的平均反应速率。图 3 显示,在 7-ADCA:PGME = 1:2 时,酶的平均反应速率达到最大值。

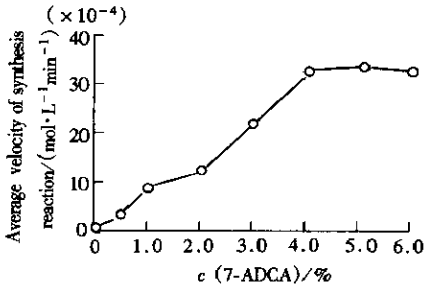


图2 7-ADCA 浓度对头孢氨苄合成的影响

Fig.2 Effect of concentration of 7-ADCA on synthesis of cephalixin by immobilized penicillin acylase

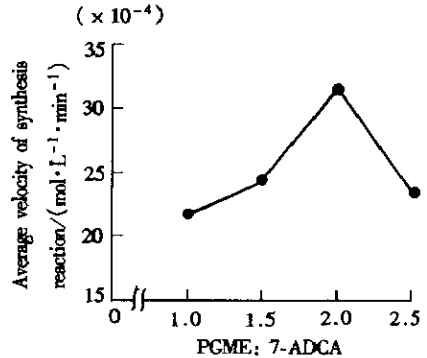


图3 PGME 与 7-ADCA 比率对头孢氨苄合成的影响

Fig.3 Effect of ratio of PGME nad 7-ADCA on synthesis of cephalixin by immobilized penicillin acylase

2.6 酶量对头孢氨苄合成的影响

采用 4.0% 的 7-ADCA 和 8.0% 的 PGME 浓度,加入不同量的固定化酶进行头孢氨苄的合成,6h 后终止反应。如图 4,反应速率随用酶量增加而增加,当酶量超过 0.9g/20mL 时,即每克 7-ADCA 用酶 172U 时,酶的平均反应速率几乎不再增加,故每克 7-ADCA 用酶量应控制在 170U 左右。

2.7 固定化酶的最大反应速度、米氏常数

固定 PGME 的浓度分别为 3.0%、4.0% 和 5.0%,采用不同的 7-ADCA 浓度,37℃测定酶合成头孢氨苄的初速度,作 Lineweaver-Buck 图,并将各一次线在 Y-轴的截距对 1/[PGME] 制出二次线(图 5)。计算得到固定化酶对 7-ADCA 的表现米氏常数 K_{7-ADCA} 为 0.162mol/L,对 PGME 的表现米氏常数 K_{PGME} 为 0.364mol/L,最大反应速度 V_{max}

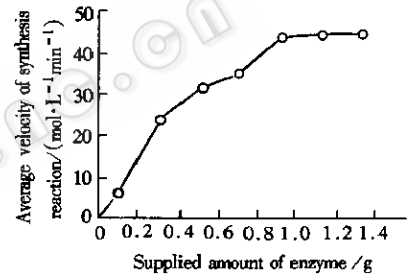


图4 酶量对头孢氨苄合成的影响

Fig.4 Effect of supplied amount of immobilized penicillin acylase on synthesis of cephalixin

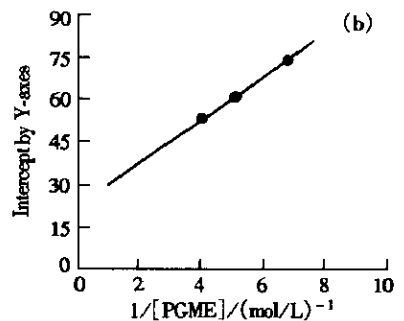
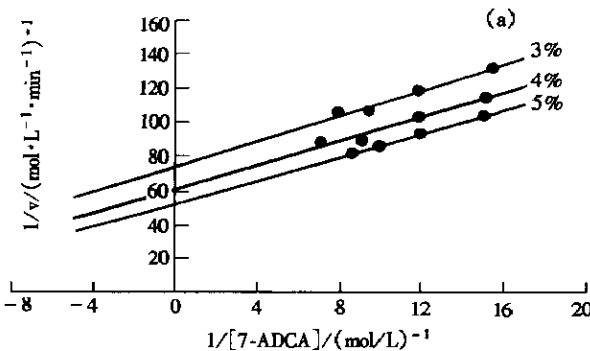


图5 固定化酶最大反应速度、米氏常数的测定

Fig.5 Lineweaver-Buck plate (a) and its secondary plots (b) for immobilized penicillin acylase to determine the K_m , V_{max} values of 7-ADCA and PGME

为 $0.0462 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.8 固定化酶合成头孢氨苄的动力学曲线

采用 3.0% 的 7-ADCA、6.0% 的 PGME, 用酶量为 0.9g, 按如上方法合成头孢氨苄, 在不同时间测定 7-ADCA 和头孢氨苄的浓度(图 6)。在开始反应的最初 1h 内, 酶的反应速度基本保持恒定, 6h 以后, 开始有苯甘氨酸沉淀出现。这是酶法合成头孢氨苄所需要解决的一个难题。

2.9 固定化酶的使用稳定性

用 3 批制备的固定化酶重复合成头孢氨苄, 考察其使用稳定性。在使用了 50 批次后, 测定固定化酶的剩余活力, 3 批固定化酶平均剩余活力 83.9%, 固定化酶催化合成反应的半衰期为 198 批次。

将巨大芽孢杆菌胞外青霉素酰化酶通过共价键结合到聚丙烯腈上, 成功地获得了高活力的固定化青霉素酰化酶。与氧化铝吸附制备的固定化青霉素酰化酶^[8]相比, 聚丙烯腈固定化青霉素酰化酶合成活力高, 转化速度快, 投料浓度高, 酶反应温度范围广, 可在室温下反应, 明显优于氧化铝固定化酶。这些优点对于酶法合成头孢氨苄工业化生产具有重要意义。

2.10 合成方法的改进

青霉素酰化酶既能催化母核酰化, 生成半合成 β -内酰胺抗生素, 又能催化酰化产物的水解。当反应达到酰化和水解的平衡点后, 固定化酶即会催化侧链水解, 如上所述生成苯甘氨酸沉淀, 污染固定化酶。为解决这一难题, 我们筛选到一个能使产物沉淀而不沉淀底物的沉淀剂。在进行合成反应的过程中, 不断地将产物从反应液中沉淀下来, 这样不仅大大增加了合成反应的推动力, 提高了产品收率(头孢氨苄的收率达 86% 以上), 而且使上述难题获得解决, 在合成反应完成后, 继续延长反应时间达 3h 之久, 也未出现苯甘氨酸沉淀。同时还具有富集产物、简化产品提取操作等优点。详细研究结果将在以后作进一步报道。

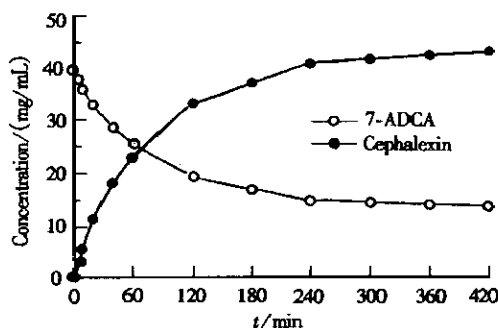


图 6 固定化酶合成头孢氨苄动力学曲线

Fig.6 The kinetics of synthesis of cephalixin by immobilized penicillin acylase

参 考 文 献

- [1] 王玉梅, 王桢祥, 乐爱华, 等. 生物化学和生物物理学报, 1982, 14(6): 548 ~ 552.
- [2] 王桢祥, 韩文珍, 乐爱华, 等. 微生物学报, 1984, 24(4): 376 ~ 381.
- [3] 崔福绵, 朱丽钊, 韩文珍, 等. 微生物学报, 1996, 36(2): 151 ~ 154.
- [4] 王桢祥, 韩文珍, 门大鹏, 等. 微生物学报, 1992, 32(2): 99 ~ 104.
- [5] 徐冠珠, 韩 辉, 王桢祥, 等. 微生物学报, 1997, 37(3): 190 ~ 195.
- [6] Filippuson H, Hornby W E. *Biochem J*, 1970, 120: 215.
- [7] Mishima K M, Shizuoka R I, Shizuoka H S, *et al.* United States Patent, 1984, 4,486,549
- [8] Fujii T, Matsumoto K, Watanabe T. *Process Biochemistry*, 1976, 11(8): 21 ~ 24.

Studies on Enzymatic Synthesis of Cephalexin by Immobilized Penicillin Acylase by Polyacrylonitrile Fibres

Chen Hui Han Hui Xu Guanzhu

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The extracellular penicillin acylase from *Bacillus megaterium* was immobilized by coupling to derivatives of polyacrylonitrile fibres. The apparent activity of the immobilized enzyme was about 153U/g (wet weight). The optimal pH and temperature were 6.5 and 40°C for synthesis of cephalexin by penicillin acylase, respectively. When the concentration of 7-ADCA was 4% and the ratio of PGME and 7-ADCA and 1:2, the average velocity of synthesis reaction was highest. The optimal supplied amount of immobilized penicillin acylase was 1.125g/g 7-ADCA. The apparent Michaelis constant for 7-ADCA was 0.162mol/L and for PGME was 0.364mol/L, V_{max} was 0.0462mol·L⁻¹·min⁻¹ at 30°C and pH6.5. The remained activity was about 83.9% after operating 50 times.

Key words: *Bacillus megaterium*, Polyacrylonitrile fibres, Immobilized penicillin acylase