

固定化大肠杆菌 AS1.76 细胞酶促合成 头孢立新的研究

王祯祥 韩文珍 乐华爱 张启先

(中国科学院微生物研究所, 北京)

陈 敏 华

(上海第五制药厂中心实验室, 上海)

本文报道固定化大肠杆菌 (*E. coli*) AS1.76 细胞酶促合成 的研究结果。用 2% 7-ADCA, 4% PGME, 在 pH 6.0, 10°C—15°C 进行反应, 头孢立新的合成率达到 82%。在上述条件下, 用固定化细胞柱制备头孢立新, 每次投 7-ADCA 10g, PGME 20g, 平均得头孢立新 12g, 收率为 70.6%。

关键词 大肠杆菌; 固定化细胞; 头孢立新

头孢立新 (Cephalexin) 是一种具有抗菌谱广, 疗效高, 毒性低, 耐酸适于口服的半合成头孢霉素。它是由母核 7-氨基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-aminodesacetoxycephalosporanic acid 简称 7-ADCA) 和侧链苯甘氨酸 (phenylglycine) 缩合而成。由于母核和侧链都含有活泼的氨基和羧基, 化学合成时必须保护这些基团, 所以反应过程复杂, 收率低。七十年代初期, 发现用青霉素酰化酶在温和的条件下, 能在 7-ADCA 七位氨基上接上苯甘氨酸合成头孢立新, 并有一些专利报道^[1-3]。但在工业上应用的国家并不多。我们曾报道过酶法合成头孢立新的研究结果。但侧链苯甘氨酸甲酯盐酸盐 (Phenylglycine methyl ester hydrochloride) 用量大, 用固定化细胞 (酶) 连续制备头孢立新还存在一些问题。为此我们进一步做了研究。本文将报道这一研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌种: 大肠杆菌 (*E. coli*) AS1.76 为本组所选具有青霉素酰化酶活力的菌株。

2. 试剂: 7-氨基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-aminodesacetoxycephalosporanic acid), 头孢立新 (cephalexin), 苯甘氨酸乙酯盐酸盐 (Phenylglycine ethyl ester hydrochloride 简称 PGEH) 由上海第五制药厂供给。苯甘氨酸甲酯盐酸盐 (phenylglycine methyl ester hydrochloride 简称 PCME) 由太原制药厂和上海第五制药厂供给。CAD₄₀ 大孔树脂由华北药厂供给。其他均为市售商品。

(二) 方法

1. 菌种培养和原细胞, 固定化细胞酶活力测定: 按以前报道方法^[6,7]。

2. 头孢立新测定: 用 Marconi^[8] 修改的 Smith 紫外分光光度法^[9]。

3. 固定化细胞的制备

(1) 琼脂-戊二醛法: 按以前报道的方法进行^[7]。

(2) 明胶-戊二醛法: 按王庆诚等所报道的方法^[10]。

(3) 戊二醛交联细胞: 按以前报道的方法进

本文于 1982 年 12 月 25 日收到。

行^[1]。

结 果

(一) 大肠菌 AS1.76 细胞合成头孢立新的最适条件

1. 温度对头孢立新合成的影响: 在大肠杆菌 AS1.76 细胞酶合成头孢立新的过程中, 同时伴有头孢立新和苯甘氨酸甲酯盐酸盐水解成 7-ADCA 和苯甘氨酸的反应。任何条件的改变都将不同程度地影响着上述几种反应, 改变着头孢立新合成的平衡浓度。温度对头孢立新合成的影响见图 1。

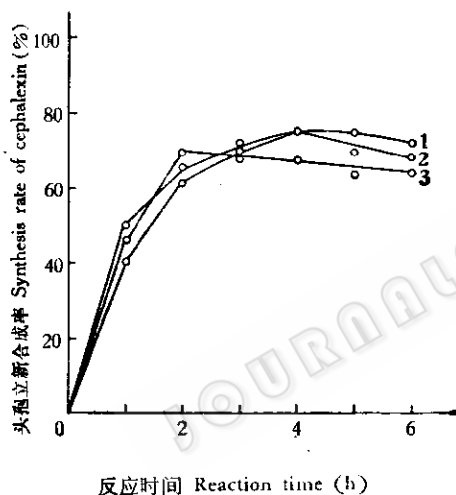


图 1 温度对头孢立新合成的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the cephalosporin synthesis.

合成条件: 2% 7-ADCA, 4% PGME 1.2u/ml 酶活力, 0.05M pH6.8 磷酸缓冲液。

Condition of synthesis: 2% 7-ADCA, 4% PGME, 1.2u/ml enzyme activity and 0.05M (pH6.8) phosphate buffer.

1. 10°C; 2. 15°C; 3. 20°C。

由图可见, 温度低, 反应达到平衡所需要的时间长, 但头孢立新合成的平衡浓度高, 平衡维持的时间也长。相反, 温度高, 反应达到平衡所需的时间短平衡维持的时间短, 较适合的温度是 10—15°C。头孢立新的合成率分别为 74.7% 和 73.1%。

2. PGME 与 7-ADCA 之比对头孢立新合成的影响: 7-ADCA 和 PGME 以下述配比, 1:1.5, 1:1.75, 1:2.0, 1:2.5 (2% 7-ADCA, 3%, 3.5%, 4%, 5% PGME), 在 10°C, 反应不同时间, 结果如图 2。随着 PGME 用量增加, 头孢立新平衡浓度增高, 平衡维持的时间长。这可能是由于 PGME 浓度增高, 有利于合成反应, 促使平衡点向高浓度移动。

3. 缓冲溶液的离子浓度对头孢立新合成的影响: 结果如图 3。0.15M pH6.5 磷酸缓冲液配成的底物溶液, 头孢立新合成率高于用 0.05M pH6.5 磷酸缓冲液配成的底物溶液。发现, 0.15M 磷酸缓冲液配成的底物, 反应过程 pH 基本不变, 而 0.05M 磷酸缓冲液配成的底物, 反应过程中 pH 值不断下降, 这可能是两者不同的原因。

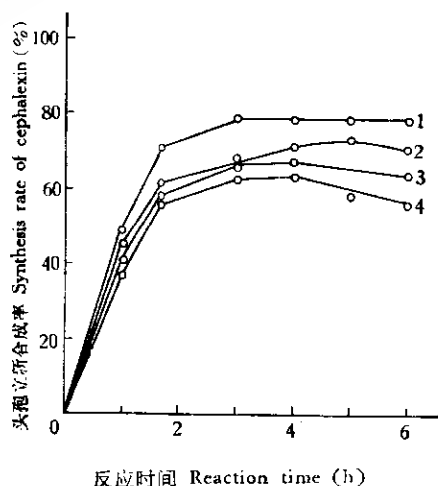


图 2 PGME 与 7-ADCA 之比对头孢立新合成的影响

Fig. 2 Effect of PGME to 7-ADCA ratio on the cephalosporin synthesis.

合成条件: 2% 7-ADCA, 1.2u/ml 酶活力, 10°C, 0.05M pH6.8 磷酸缓冲液。

Condition of synthesis: 2% 7-ADCA, 1.2u/ml enzyme activity, at 10°C, and 0.05 M (pH6.8) phosphate buffer.

1. 1:2.5; 2. 1:2.0; 3. 1:1.75; 4. 1:1.5。

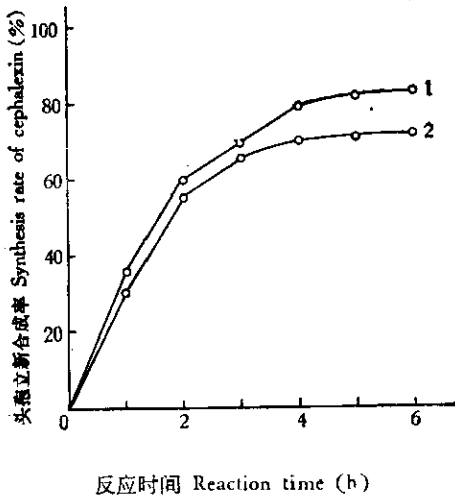


图 3 离子浓度对头孢立新合成的影响

Fig. 3 Effect of ionic strength on the synthesis cephalixin.

合成条件: 2% 7-ADCA, 4% PGME, 1.2u/ml 酶活力, 10℃ pH 6.5 不同离子浓度的磷酸盐缓冲液。

Condition of synthesis: 2% 7-ADCA, 4% PGME, 1.2 u/ml enzyme activity, and pH 6.5 phosphate buffer.

1. 0.15M; 2. 0.05M

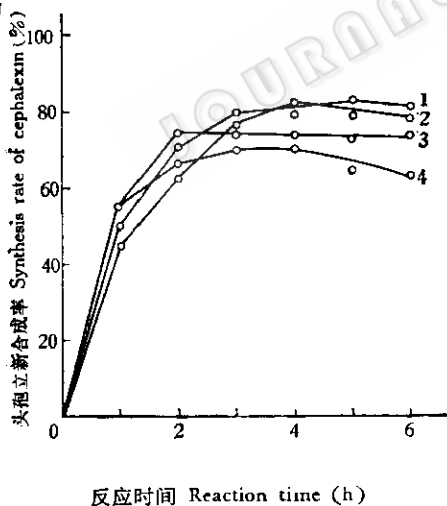


图 4 pH 对头孢立新合成的影响

Fig. 4 Effect of pH on the synthesis cephalixin.

合成条件: 2% 7-ADCA, 4% PGME, 1.2u/ml 酶活力, 10℃, 0.15M 不同 pH 磷酸盐缓冲溶液。

Condition of synthesis: 2% 7-ADCA, 4% PGME, 1.2u/ml enzyme activity, at 10℃, and 0.15M phosphate buffer.

1.pH6.5; 2.pH6.0; 3.pH6.8; 4.pH7.0

4. pH 值对头孢立新合成的影响:

青霉素酰化酶能可逆地催化合成和分解反应。一般认为在酸性条件下,反应向合成方向进行,碱性条件反应向分解方向进行。为此做了 pH 对头孢立新合成的影响。结果(图4)表明低的 pH 较好, pH6.5, 6.0 合成率较高分别达 82% 和 80%, 而 pH7.0 最差,合成率仅为 70%。

5. 不同侧链对头孢立新合成的影响:

PGME, PGEE 都能作为侧链苯甘氨酸供体,在侧链克分子浓度相同的情况下,前者合成速度较快,合成率高达 82%,后者合成速度慢,合成率稍低于前者,为 80%。

(二) 三种固定化细胞在不同 pH 下合成头孢立新的比较

为了用固定化细胞连续制备头孢立新,参照原细胞合成条件,对下述三种固定化细胞,在不同 pH 下进行比较。琼脂戊二醛固定化细胞 40g, 明胶戊二醛固定化细胞 30g, 分别装柱(16 × 3.5cm) 在 10—15℃, 不同 pH 下,用输液泵将用不同 pH 的缓冲液配制的底物溶液 (2% 7-ADCA, 4% PGME) 循环通过固定化细胞柱进行反应。戊二醛交联细胞则以每毫升反应液含 1.2u 酶量,在上述相同的 pH、温度条件下于水浴中进行反应,经 4—5 小时,反应分别达到平衡。将最高合成率列入表 1。

(三) 固定化细胞与原细胞稳定性比较

琼脂戊二醛固定化细胞和明胶戊二醛固定化细胞合成头孢立新的稳定性,结合条件试验进行了考查。琼脂戊二醛固定化细胞,使用了 29 次酶活力没有损失。明胶戊二醛固定化细胞因交联不好使用 23 次酶活力稍有下降。戊二醛直接交联固定化细胞与原细胞稳定性比较如图 5 所示。

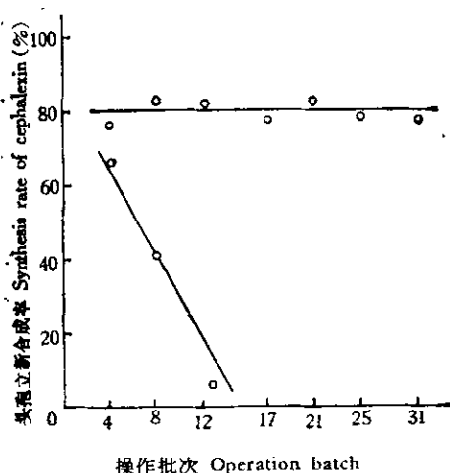


图5 固定化细胞,原细胞合成头孢立新稳定性的比较

Fig. 5 Comparison of stability of immobilized cell and intact cell in synthesis cephalixin.

合成条件: 2% 7-ADCA, 4% PGME 1.2u/ml 酶活力, 15℃, 0.15M pH6.0 磷酸盐缓冲液。

Condition of synthesis: 2% 7-ADCA, 4% PGME, 1.2u/ml enzyme activity, 15℃, 0.15 M pH 6.0 phosphate buffer.

1. 固定化细胞 Immobilized cell;
2. 原细胞 Intact cell

如图所示,戊二醛交联细胞使用 31 次头孢立新合成率基本不变。原细胞只用 13 次合成率就下降 8%。原细胞合成率迅速下降的原因是由于细胞自溶和离心不清造成酶活力损失的结果。

(四) 固定化细胞制备头孢立新

AS1.76 明胶戊二醛固定化细胞 100g, 装柱 (4 × 20cm), 在 15℃ 下用输液泵将含有 2% 7-ADCA, 4% PGME, pH6.0 的底物溶液 500ml 循环通过反应柱。待反应达到平衡时取出,调 pH 至 2.0—2.5, 上 CAD₄₀ 大孔树脂吸附柱进行吸附, 用洗脱剂洗脱, 收集浓缩部分, 用三乙胺调 pH 至 4.5, 即有头孢立新结晶析出, 放冰库过夜后过滤, 先用 50% 丙酮水溶液洗涤一次, 再用丙酮洗涤一次, 放 50℃ 左右处烘干, 即得符合国家药典规定的头孢立新。现将所做九批结果列入表 2。从 10g 7-ADCA 投料中得头孢立新量平均为 12g, 产率为 70.6%。

表 1 不同固定化细胞不同 pH 对头孢立新合成的影响

Table 1 Effect of different immobilized cell and pH on the synthesis rate of cephalixin.

固定化方法 Method of immobilization	头孢立新合成率 Synthesis rate of cephalixin (%)		
	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5
琼脂-戊二醛 Agar-glutaraldehyde	68	59.4	出现沉淀 Arising precipitate
明胶-戊二醛 Gelatin-glutaraldehyde	61.4	70.0	出现沉淀 Arising precipitate
戊二醛交联 Glutaraldehyde crosslinking	70.3	73.1	72.4

表 2 固定化细胞制备头孢立新

Table 2 Preparation of the cephalixin by immobilized cell

批 次 Batch	投 料 量 Feeding amount (g)		反应时间 Reaction time (h)	头孢立新 cephalexin	
	7-ADCA	PGME		产 量 Yield (g)	收 率 Recovery (%)
1	10	20	7	10.3	60.5
2	10	20	6.1	11.0	64.7
3	10	20	5.3	12.6	74.1
4	10	20	7.6	13.0	76.4
5	10	20	6.0	12.6	74.1
6	10	20	5.8	12.0	70.6
7	10	20	6.0	12.3	72.4
8	10	20	6.0	12.0	70.6
9	10	20	6.0	12.1	71.1
平 均 Average	10	20	6.2	12.0	70.6

讨 论

大肠杆菌 AS1.76 细胞在酶促合成头孢立新时,同时也伴随有头孢立新水解成 7-ADCA 和苯甘氨酸,以及 PGME 被水解成苯甘氨酸和甲醇。且 PGME 被水解成苯甘氨酸就不能参与合成反应。合成条件的改变,在不同程度上影响着上述几种反应过程。因此在研究头孢立新合成最适条件时,应着重看平衡点的头孢立新浓度的高低,不应只看合成速度,合成速度快往往合成率不一定高,相反,合成速度慢时,却能获得较高的合成率。

研究酶催化合成头孢立新要看母核 7-ADCA 转化成头孢立新的效率,即合成率,但也不应忽视 PGME 的利用率。不同条件对侧链 PGME 的利用率有着明显的影响。我们现在用 2% 7-ADCA, 4% PGME, 在 pH6.0, 10—15℃ 条件下反应,合成率达 82%,和以前报道用 2% 7-ADCA, 8% PGME 在 pH6.8, 25℃ 进行反应,合成率为 86.9% 相比,合成率减少了 4% 左右,但 PGME 的用量减少了一半。除了由于

在低的温度和 pH 条件下明显地抑制头孢立新的水解反应外,另一个重要的原因就是 PGME 转变成苯甘氨酸的水解反应也被明显地抑制。

PGME 变成苯甘氨酸的水解反应减弱,不仅降低了头孢立新的制造成本,而且因反应过程中不出现苯甘氨酸结晶,使固定化细胞柱连续制备头孢立新有了可能。我们用固定化细胞制备头孢立新转化率达 82%,产品收率为 70.6%。固定化细胞可长期使用。这就意味着固定化细胞用来大量生产头孢立新将是可以实现。

参 考 文 献

- [1] 东洋酿造: 特许公报,昭 50-6551
- [2] 东洋酿造: 公开特许公报,昭 48-35090
- [3] 武田薬品: 公开特许公报,昭 47-25388
- [4] 武田薬品: 公开特许公报,昭 53-107484
- [5] 万有制薬: 公开特许公报,昭 50-117990
- [6] 张启先等: 微生物学报, 19(3)302—308, 1979
- [7] 孙万儒等: 微生物学报, 20(4)407—412, 1980
- [8] Marconi, W. et al.: *Ag. Biol. Chem.*, 39: 277—279, 1975.
- [9] Smith, J. W. G., E. De. Grey and V. J. Patel: *Analyst*, 92:247—252, 1976.
- [10] 王庆诚等: 生物化学与生物物理学报, 12(4): 305—310, 1980.
- [11] 张渝英等: 微生物学通报, 7(3)112—116, 1980.

STUDIES ON ENZYMATIC SYNTHESIS OF CEPHALEXIN BY IMMOBILIZED *E. COLI* AS 1.76 CELL

Wang Zhenxiang Han Wenzhen Yue Huaai Zhang Qixian

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

Chen Minhua

(*Shanghai The Fifth Pharmaceutical Factory, Shanghai*)

For the production of cephalixin by immobilized *E. coli* AS 1.76 cells, the optimal conditions of enzymatic synthesis cephalixin were investigated. The optimal pH and temperature for enzymatic synthesis reaction was 6.0 and 10—15°C, respectively. The effect of the ratio of phenylglycine methyl ester hydrochloride (PGME) and the ionic concentration of phosphate buffer solution on synthesis of cephalixin were remarkable. About 82%

of 7-aminodesacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) was converted to cephalixin under suitable conditions. When 500ml solution containing 2% 7-ADCA and 4% PGME were passed through the immobilized cell column, 12 g cephalixin were obtained. The yield of cephalixin was 70.6%.

Key words

Escherichia coli; immobilization cell; cephalixin