

## 酶法合成羟头孢霉素

王祯祥 寇秀芬 韩文珍 张启先

(中国科学院微生物研究所,北京)

本文报道具有青霉素酰化酶的大肠杆菌(*E. coli* PN-66)细胞酶促合成羟头孢霉素的研究结果。酶反应的最适温度为 20℃,最适 pH 为 6.0。羟头孢霉素的合成率随着母核 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸的浓度的增加而提高,随侧链对羟基苯甘氨酸甲酯盐酸盐在与 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸的配比中的增加而提高。苯乙酸和苯氧乙酸对羟头孢霉素的合成有着强烈的抑制作用。在合适的条件下,羟头孢霉素的合成率可达 90% 以上。

**关键词** 羟头孢霉素;酶促合成;青霉素酰化酶

青霉素酰化酶(Penicillin acylase)在碱性条件下主要是催化青霉素(penicillin)水解成青霉素烷酸(6-aminopenicillanic acid),简称 6-APA。在酸性条件下又能从 6-APA 或 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸(7-aminodesacetoxycephalosporanic acid,简称 7-ADCA)为母核与不同侧链进行酰化反应,酶促合成许多不同种类和用途的半合成青霉素或头孢霉素。由于酶法合成过程工艺简单,合成率高,三废污染轻等优点,近年来有不少酶法合成半合成抗生素的文章和专利报道<sup>[1]</sup>。我们曾进行酶法合成头孢立新(Cephalexin),氨基苄青霉素(ampicillin)的研究<sup>[2-3]</sup>,取得较好的结果。但酶促合成羟头孢霉素(cefadroxil)报道很少<sup>[4-5]</sup>。为了探索酶法制备羟头孢霉素新方法,我们进行了此项研究。本文报导这一研究结果。

### 材料与方 法

#### (一) 材料

1. 菌种: 大肠杆菌(*E. coli*, PN-66)为 AS 1.76 菌株经诱变处理获得的酶活力较高菌株。铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) AS 1.204 和北京棒状杆菌(*Corynebacterium pekinense*) AS 1.586, 为本组筛选产生氨基苄青霉素酰化酶菌

种。

2. 试剂: 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸(7-aminodesacetoxy cephalosporanic acid,简称 7-ADCA),羟头孢霉素(Cefadroxil)和对羟基苯甘氨酸甲酯盐酸盐(D-P-hydroxyphenylglycine methlester hydrochlorate,简称 HPGME)为上海第五制药厂供给。其他试剂均为市场商品。

#### (二) 方法

##### 1. 菌种培养:

大肠杆菌 PN-66 的培养基成份是: 蛋白胨 1%, 苯乙酸 0.2%, 玉米浆 0.3%, 氯化钠 0.5%, pH7.0。500 ml 三角瓶装 60ml 培养基, 8 磅 30 分钟杀菌, 接种培养 24 小时斜面种子, 28℃ 培养 17 小时, 离心收集菌体备用。AS 1.204 和 AS 1.586 的培养基成份是: 葡萄糖 2%, 谷氨酸单钠 0.2%, 酵母膏 0.2%, 蛋白胨 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, MgCl<sub>2</sub> 0.1%, FeSO<sub>4</sub> 0.01%, pH 7.0。8 磅 30 分钟杀菌后, 接种培养 24 小时的斜面种子, 28℃ 培养 24 小时, 离心收集菌体备用。

##### 2. 酶活力的测定:

大肠杆菌 PN-66 细胞青霉素酰化酶活力用 NIPAB 法测定, 具体操作见前报<sup>[6]</sup>。AS 1.204 和 AS 1.586 的氨基苄青霉素酰化酶活力用 Marcon<sup>[7]</sup>修正的 Smith 的紫外分光光度法测定<sup>[8]</sup>, 在规定条件下每分钟产生 1 μM 的头孢立

本文于 1985 年 1 月 7 日收到。

新所需要的酶量为一个单位。

### 3. 产物分析:

用 Marcon 修正的 Smith<sup>[7]</sup> 的紫外分光光度法测定反应液中合成的羟头孢霉素, 其合成率计算公式是

$$\text{合成率} = \frac{\text{反应液中实测的羟头孢霉素量}}{\text{理论上应产生的羟头孢霉素量}} \times 100$$

### 4. 细胞交联: 按以前报道方法进行<sup>[9]</sup>。

## 结 果

### (一) 不同菌种合成羟头孢霉素的比较

选用青霉素 G 酰化酶的菌株 AS 1.76 和 PN-66 以及产氨基苄青霉素酰化酶的菌株 AS 1.204 和 AS 1.586, 按照它们各自合成头孢立新的最适条件来合成羟头孢霉素, 并进行比较。适合 AS 1.76 和 PN-66 的合成条件是: 7-ADCA 2%, PGME 4%, 湿菌体 5%, 在 0.1M、pH 6.0 磷酸缓冲液中, 5℃ 进行反应。适合 AS 1.204 和 AS 1.586 的合成条件是: 7-ADCA 1%, PGME 2%, 湿细胞 5%, 在 0.1M、pH 6.0 磷酸缓冲液中, 30℃ 进行反应。试验结果如表 1。其中 *E. coli* PN-66 合成率较高。在以后的试验中均用 PN-66 菌株研究其合成羟头孢霉素的最适条件。

### (二) pH 对羟头孢霉素合成的影响

青霉素酰化酶可逆地催化水解和合成反应。一般认为在碱性条件下, 反应主要向水解方向进行; 在酸性条件下, 向合成方向进行。但不同菌种催化合成不同产物时其最适 pH 值又各不相同。为此我们首先研究合成反应的最适 pH。反应系统为: 2% 7-ADCA, 4% HPGME, 1.2 单位/ml 反应液酶活力, 15℃ 在 0.1 M 的不同 pH 磷酸缓冲液中进行反应。结果表明(图 1)

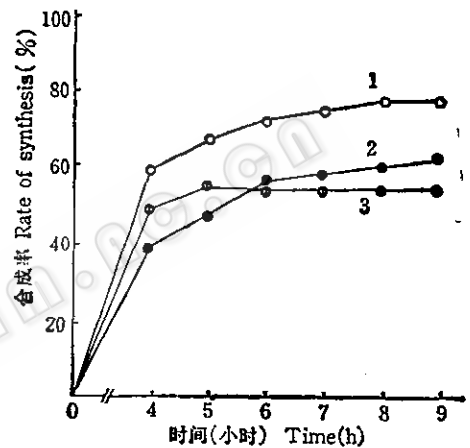


图 1 pH 对大肠杆菌 PN-66 合成羟头孢霉素的影响

Fig. 1 Effect of pH on synthesis of cefadroxil by *E. coli* PN-66  
1. pH 6.0 2. pH 6.5 3. pH 5.5

表 1 不同菌种合成羟头孢霉素比较

Table 1 Comparison of different strains in synthesising cefadroxil

菌 种 Strains	底物 Substrate		反应 Reaction		合成率 Rate of synthesis (%)
	7-ADCA (mg/ml)	HPGME (mg/ml)	温度 Temp. (°C)	时间 Time (h)	
大肠杆菌 AS 1.76 <i>E. coli</i> AS 1.76	20	40	15	4	67.5
大肠杆菌 PN-66 <i>E. coli</i> PN-66	20	40	15	4	70.0
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AS 1.204	10	20	30	4	36
北京棒状杆菌 AS 1.586 <i>Corynebacterium Pekinense</i> AS 1.586	10	20	30	4	30

在 pH 6.0 时, 羟头孢霉素合成率最高。

(三) 温度对羟头孢霉素合成的影响

反应系统为: 2% 7-ADCA, 4% HPGME, 酶活力为 1.2 单位/ml 反应液, 在 0.1 M pH 6.0 磷酸缓冲液中, 在不同温度下反应不同时间, 取样测定。结果是在 20℃ 合成率最高, 温度继续提高合成率下降(图 2)。

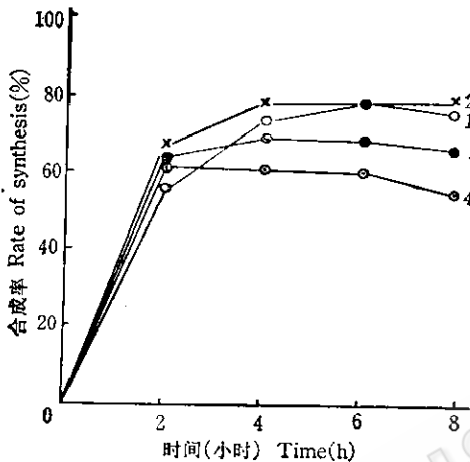


图 2 温度对大肠杆菌 PN-66 合成头孢霉素的影响  
Fig. 2 Effect of temperature on synthesis of cefadroxil by E. coli PN-66  
1. 15°C 2. 20°C 3. 25°C 4. 30°C

(四) 不同碱液溶解 7-ADCA 对羟头孢霉素合成的影响

7-ADCA 微溶于水, 需缓慢加入碱液使其成盐才能大量溶于水。考虑到溶解过程中可能产生破坏作用, 试验了不同强度的碱液溶解 7-ADCA 对羟头孢霉素的合成影响。反应系统除温度改为 20℃ 外, 其他均同温度试验反应系统。结果(图 3)表明不同碱溶液对合成率影响不大。

(五) 苯乙酸对羟头孢霉素合成的影响

重排酸 (7-phenylacetamidodesacetoxycephalosporanic acid) 经酶水解后成 7-ADCA 和苯乙酸。为探索用固定化细胞(酶)水解

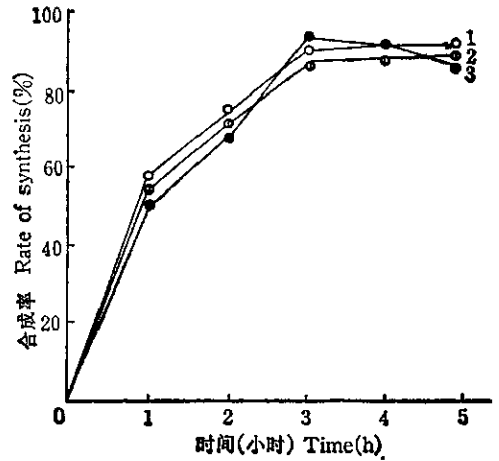


图 3 不同碱溶液溶解 7-ADCA 对合成羟头孢霉素的影响  
Fig. 3 Effect of dissolving 7-ADCA with different alkali on synthesis of cefadroxil  
1. NaOH 2. NH<sub>4</sub>OH 3. (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N

重排酸的反应液, 不经提取或稍加纯化直接用来合成羟头孢霉素的可能性, 按上述 (四) 反应系统, 添加不同量的苯乙酸 (2 ppm, 10 ppm, 20 ppm) 进行试验, 结果(图 4)发现苯乙酸对羟头孢霉素的合成具有强

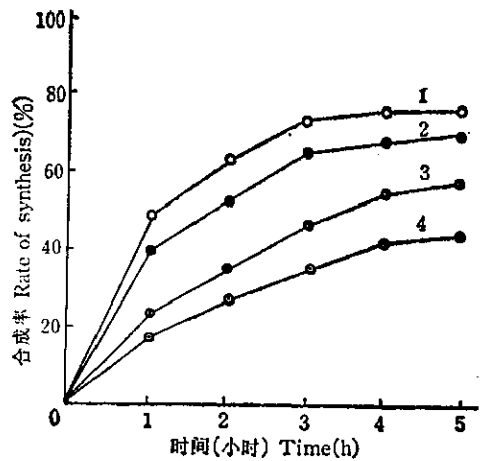


图 4 苯乙酸对合成羟头孢霉素的影响  
Fig. 4 Effect of phenylacetic acid on synthesis of cefadroxil  
1. 0 2. 2 ppm 3. 10 ppm 4. 20 ppm

烈的抑制作用。看来试图利用重排酸的水解液不经充分提纯 7-ADCA 来合成羟头孢霉素是不可能的。

#### (六) 苯氧乙酸对羟头孢霉素合成的影响

青霉素酰化酶根据其作用底物可分成三种类型: (1)青霉素 G 酰化酶, 水解青霉素 G 成 6-APA 和苯乙酸。(2)青霉素 V 酰化酶, 水解青霉素 V 成 6-APA 和苯氧乙酸; (3)氨基苄青霉素酰化酶, 水解氨基苄青霉素为 6-APA 和苯甘氨酸。这些酰化酶的底物特异性主要受侧链影响。为了探索用青霉素 V 经扩环成重排酸, 用青霉素 V 酰化酶水解所得的 7-ADCA 和苯氧乙酸的反应液, 直接用采合成羟头孢霉素的可能性, 试验了苯氧乙酸对合成的影响。反应条件除用苯氧乙酸代替苯乙酸外其他都与苯乙酸对合成影响的反应条件相同。结果(图 5)可以看出苯氧乙酸对大肠杆菌 PN-66 酰化酶合成羟头孢霉素同样具有强烈的影响。

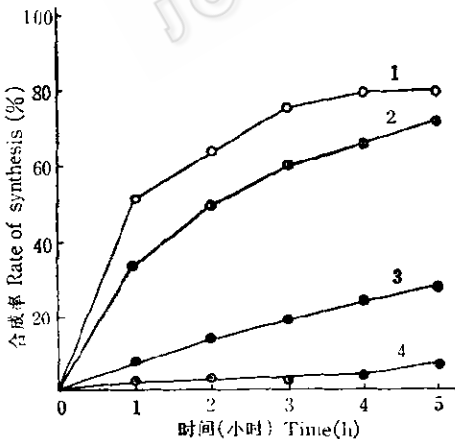


图 5 苯氧乙酸对 PN-66 合成羟头孢霉素的影响  
Fig. 5 Effect of phenoxyacetic acid on synthesis of cefadroxil by *E. coli* PN-66  
1. 0 2. 2 ppm 3. 20 ppm 4. 200 ppm

#### (七) 7-ADCA 浓度对羟头孢霉素合成的影响

称取 1—6% 7-ADCA 分别加到 0.1M、pH 6.0 磷酸缓冲液中, 用 2 N NaOH 溶液调 pH 至 7.5, 分别按 7-ADCA 与 HPGME 为 1:2 的量加 HPGME, 在酶活力为 1.2 单位/ml 反应液 20℃ 条件下反应不同时间, 取样测定合成的羟头孢霉素。结果如图 6 所示, 羟头孢霉素的合成率随 7-ADCA 浓度增高而提高。到 7-ADCA 浓度达 4% 时合成率最高, 可达 92%, 若继续提高 7-ADCA 浓度, 合成率反而下降。

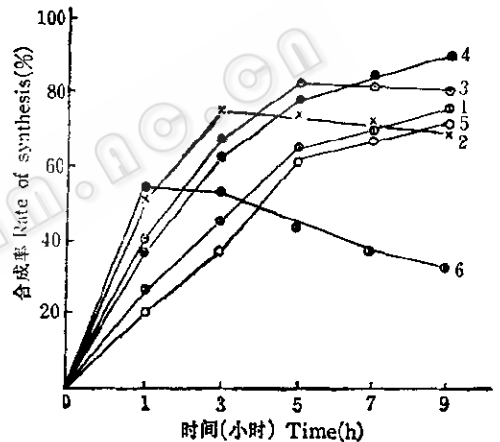


图 6 7-ADCA 浓度对大肠杆菌 PN-66 合成羟头孢霉素的影响

Fig. 6 Effect of concentration of 7-ADCA on synthesis of cefadroxil by *E. coli* PN-66  
1. 1.1% 2. 2% 3. 3% 4. 4% 5. 5% 6. 6%

#### (八) 添加 HPGME 时, 7-ADCA 溶液的 pH 对羟头孢霉素合成的影响

HPGME 在 pH 6.0 以下溶液中溶解, 超过 pH 6.0 分解成对羟基苯甘氨酸甲酯析出, 致使 pH 变化不易看出, 另外溶解有 7-ADCA 和 HPGME 的溶液, 再想通过添加酸碱改变其 pH 值也很困难。加碱溶, 因局部过碱对羟基苯甘氨酸甲酯析出; 加酸, 7-ADCA 又容易沉淀出来, 影响合成反

应进行。为避免因加酸、碱调 pH 引起对羟苯甘氨酸甲酯或 7-ADCA 析出, 采用预先调 7-ADCA 溶液到 pH 7.5, 再加 HPGME, 此时溶液的 pH 在 6.0 左右, 且没有任何物质析出。在进行 7-ADCA 浓度试验时, 发现 5—6% 浓度的 7-ADCA 溶液, 调 pH 7.5, 加 HPGME 放置片刻后溶液变混浊, 可能因酸碱度不适合引起 7-ADCA 沉淀, 使合成率下降, 为此我们在 0.1 M、pH 6.0 磷酸缓冲液中, 加 6% 7-ADCA 调到不同 pH 值后再加 HPGME, 在 1.8 单位/ml 反应液中, 20°C 反应不同时间, 观察 pH 对羟头孢霉素合成的影响。结果(图 7)指出, 溶液调至 pH 8.5—9.5 较好, 合成率都能达到 90% 以上。

**(九) 7-ADCA 与 HPGME 比率对羟头孢霉素合成的影响**

采用 4—5% 7-ADCA, 配不同比例的 HPGME, 即: 7-ADCA:HPGME 为 1:1、1:1.5、1:1.75、1:2.0、1:2.25, 酶量为 1:6 单位/ml 反应液, 在 0.1 M, pH 6.0 磷酸缓冲液中, 20°C 反应 9 小时, 取样测定羟头孢

霉素的合成, 结果列入表 2。随着 HPGME 比例增加, 羟头孢霉素的合成率提高, 7-ADCA 与 HPGME 为 1:2 时, 对羟头孢霉素的合成较适合, 再增加 HPGME 时对合成率影响不大。

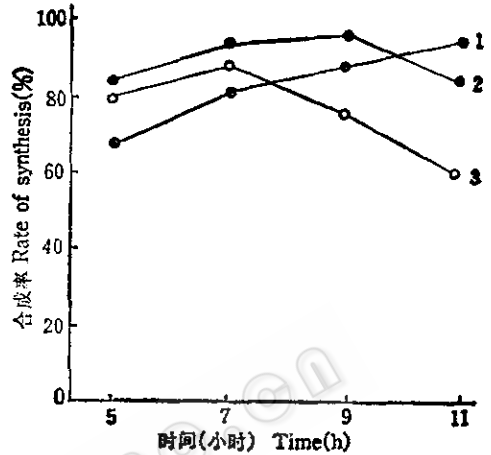


图 7 添加 HPGME 时, 7-ADCA 溶液的 pH 对 PN-66 合成羟头孢霉素的影响

Fig. 7 Effect of pH of 7-ADCA solution in adding HPGME on synthesis of cefadroxil by *E. coli* PN-66

1. pH 8.5 2. pH 9.5 3. pH 10.0

表 2 7-ADCA 与 HPGME 对大肠杆菌 PN-66 合成羟头孢霉素的影响

Table 2 Effect of the ratio of 7-ADCA and HPGME on synthesis of cefadroxil by *E. coli* PN-66

7-ADCA (mg/ml)	HPGME (mg/ml)	Ratio of 7-ADCA and HPGME	羟头孢霉素 Cefadroxil (mg/ml)	合成率(%) Rate of synthesis
40	40	1:1	39.3	58
40	60	1:1.50	59.3	86
40	70	1:1.75	61.0	89
40	80	1:2.0	62.0	90
40	90	1:2.25	62.0	90
50	50	1:1	50.8	60
50	75	1:1.5	72.1	85
50	87.5	1:1.75	74.6	88
50	100	1:2.0	77.2	91
50	112.5	1:2.25	78.9	93

## 讨 论

通过用大肠杆菌 PN-66 酶促合成羟头孢霉素的研究, 我们发现羟头孢霉素的合成最适条件和头孢立新 (cephalexin) 的最适合条件相差不大。但是羟头孢霉素的合成率随着 7-ADCA 浓度增加而增加, 在 7-ADCA 浓度达到 6% 时, 仍能得到较高的合成率, 这是酶法合成  $\beta$ -内酰胺类抗菌素少见的报道。所以能在较高的 7-ADCA 浓度下合成, 除可能因产物对酶的抑制作用小外, 一个重要的原因是合成过程中所产生的对羟基苯甘氨酸在反应液中溶解度大, 使反应能够顺利进行。

先用大肠杆菌青霉素 G 酰化酶来水解青霉素 G 或其重排酸得母核 6-APA, 7-ADCA, 然后加入所需要的侧链, 通过逆反应合成  $\beta$ -内酰胺抗生素, 因苯乙酸对合成有强烈的抑制作用, 合成需经水解, 6-APA、7-ADCA 提取或精制, 分三步完成。有人报道用青霉素 G 酰化酶水解青霉素 G 或其重排酸得 6-APA 和 7-ADCA, 不经提纯直接加入所需要的侧链, 通过另外一个酶, 氨基苄青霉素酰化酶, 或  $\alpha$ -氨基酸酯水解酶作用, 二步可合成所需要的产物<sup>[9]</sup>。

但是一些文献和我们的工作都指出, 用这一方法合成时, 底物浓度不能提高<sup>[11]</sup>, 这就给产物的后提取带来不便。我们试图通过改变原料避免苯乙酸的影响, 用青霉素 V 酰化酶水解青霉素 V 或其重排酸得 6-APA、7-ADCA, 再加入所需要的侧链, 用青霉素 G 酰化酶二步合成所需要的产物, 但试验结果证明此路不通, 苯氧乙酸和苯乙酸一样, 对青霉素 G 酰化酶合成羟头孢霉素有着强烈的抑制作用。

## 参 考 文 献

- [1] Perlman, D.: *Advances Applied Microbiology*, **20**: 203—257, 1976.
- [2] 王祯祥等: 微生物学报, **24** (4): 367—381, 1984.
- [3] 王玉梅等: 生物化学与生物物理学报, **14** (6): 547—552, 1984.
- [4] 万有制药: 特许公报, 昭 54-37237.
- [5] 东洋酿造: 特许公报, 昭 54-37238.
- [6] 张启先等: 微生物学报, **19** (3): 302—308, 1979.
- [7] Marconi, W. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**: 277—279, 1975.
- [8] Smith, J. W. G. DE Grey and V. J. Patel: *Analyst*, **92**: 247—252, 1976.
- [9] 张谕英等: 微生物学通报, **7**(3): 112—116, 1980.
- [10] Chibata, L. et al.: *Enzyme Engineering*, **6**: 81—90 1982.
- [11] Kato, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **44**: 1083—1088, 1980.

## ENZYMATIC SYNTHESIS OF CEFADROXIL BY *E. COLI* PN-66

Wang Zhenxiang Kou Xiufen Han Wenzhen Zhang Qixian

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

The optimal conditions for synthesis of cefadroxil by penicillin acylase in the cells of *E. coli* PN-66 was investigated. Experimental data showed that the optimal pH and temperature for enzymatic synthesis reaction were pH 6.0 and 20°C respectively, the suitable ratio of 7-ADCA to HPGME was 1:2, the synthesis of cefadroxil was enhanced with increasing of the concentration of 7-ADCA, and both phen-

ylacetic acid and phenoxidacetic acid strongly inhibited the synthesis of cefadroxil. About 90% of 7-ADCA could be converted into cefadroxil under optimal conditions.

### Key words

Cefadroxil; Enzymatic synthesis; Penicillin acylase