

# 三角酵母整细胞酶促转化头孢菌素 C 为戊二酰-7-氨基头孢烷酸

陈 军 朱彤波 张益棻 杨蕴刘\* 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

**摘 要** 研究了利用含 D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAO EC1.4.3.3)的透性化三角酵母多倍体 FA10 (Trigonopsis variabilis FA10) 细胞酶促转化头孢菌素 C(cephalosporin C, CPC)为戊二酰-7-氨基头孢烷酸(Glutaryl-7-ACA, GL-7ACA)的反应过程和细胞中同时存在的过氧化氢酶(Catalase, CAT)通过水解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 而对转化反应产生的干扰作用及其对策。实验证明适量添加外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(6%)或在反应体系中加入过氧化氢酶抑制剂 NaN<sub>3</sub>(0.13mg/mL)可使 GL-7ACA 生成率分别为 73.0%和 70.1%。如果将透性化的 FA10 细胞在 pH10.5~11.0, 20℃ 条件下保温 30min, CAT 被不可逆性完全钝化,以无过氧化氢酶的 FA10 细胞进行 CPC 的酶促转化反应, GL-7ACA 的生成率可达 84%。

**关键词** 三角酵母, D-氨基酸氧化酶, 生物转化, 戊二酰-7-氨基头孢烷酸, 过氧化氢

**中图分类号** Q781 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)02-0150-05

半合成头孢菌素类抗生素是广泛应用于临床,控制细菌感染的一类高效、广谱型抗生素。长期以来,作为合成该类抗生素的重要原料之一——7-氨基头孢烷酸(7-amino cephalosporanic acid, 7-ACA)的工业生产是采用化学裂解法<sup>[1,2]</sup>。然而,基于环境保护和劳动防护的考虑,两步酶法转化头孢菌素 C 为 7-ACA 的生物技术倍受关注<sup>[3-5]</sup>。本实验室在“九五”国家生物技术攻关项目研究中,利用三角酵母多倍体菌株的 D-氨基酸氧化酶酶促降解 CPC 为戊二酰-7ACA,后者在 GL-7ACA 酰化酶(GL-7ACA acylase, GA)作用下水解得到 7-ACA。由 DAO 催化的第一步转化过程包括两个反应,即:该酶使 CPC 氧化脱氨产生等分子的 α-酮基-己二酰-7-ACA(α-keto-adipyl-7-ACA, AKA-7ACA)和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AKA-7ACA 再由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 非酶促氧化脱羧生成 GL-7ACA(图 1)。

过去,已有一些关于猪肾、红酵母和三角酵母细胞等来源的 DAO 对 CPC 进行生物转化反应的研究报告<sup>[6-8]</sup>并发现:胞内存在的过氧化氢酶通过分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 而干扰反应的顺利进行和导致 AKA-7ACA 的积累和转化效率的下降。

本文报道了三角酵母多倍体菌株 FA10 的过氧

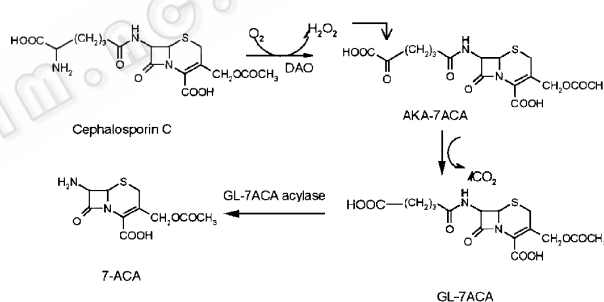


图 1 两步酶法转化 CPC 生成 7-ACA 流程图

Fig. 1 Scheme for two-step enzymatic conversion of CPC to 7-ACA

化氢酶对酶促转化 CPC 生成 GL-7ACA 的影响,以及消除这种不利影响的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** 三角酵母 FA10 多倍体菌株由李维泉构建<sup>[9]</sup>。

**1.1.2 试剂** 均为国产分析纯试剂。

**1.1.3 培养基及培养条件**:每 1000mL 培养基含 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g, NaNO<sub>3</sub> 3g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01g, KCl 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, 蔗糖 30g, 蛋白胨 10g,

收稿日期 2000-07-31 修回日期 2000-10-20。

基金项目 国家“九五”科技攻关项目(96-102-02-01)和上海市科学技术发展基金(984319135)。

\* 通讯作者。Tel 86-21-64042090; Fax 86-21-64042385; E-mail ylyang@iris.sipp.ac.cn

DL-甲硫氨酸 2.67g。培养温度为 28℃。

## 1.2 方法

**1.2.1 DAO 活力的测定:**参考文献 [10] 1 个单位 (u) DAO 活力定义为每分钟氧化脱氨生成 1 $\mu$ mol 酮酸所需酶量。

**1.2.2 过氧化氢酶活力的测定:**参考文献 [11] 1 个单位 (u) 的过氧化氢酶活定义为 1min 内分解 1 $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成 O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O 所需酶量。

**1.2.3 HPLC 检测:**使用 Beckman Gold System HPLC 填料直径 5 $\mu$  柱容 4.6mm $\times$ 25cm 的 Ultrasphere ODS 反相色谱柱,流速 1mL/min,压力 1.7~2.2Kpsi,流动相为 7.5% 乙腈-15% 甲醇-1% 乙酸,在 245nm 的波长下检测 CPC 及其衍生物。

**1.2.4 三角酵母细胞透性化方法:**见文献 [12]。

**1.2.5 三角酵母细胞的碱处理:**将 3g 经透性化处理的三角酵母细胞重悬于 6mL 0.2mol/L pH10.9 的焦磷酸钠缓冲液中(混合后菌悬液的 pH 约为 6.3),然后用 1mol/L NaOH 分别调节 pH 值至 9.5、10、10.5 或 11.0。于 20℃ 保温 30min,再用浓磷酸回调 pH 至 6.0~6.5,离心回收菌体待用。

**1.2.6 酶促转化 CPC 生成 GL-7ACA 的反应:**5mL 反应液含 20 $\mu$ DAO 活力的三角酵母细胞或酶提取液与 3% CPC-Na(用 50mmol/L, pH8.5 焦磷酸钠缓冲液配制)混合,于 28℃ 水浴振荡反应。HPLC 检测反应液中底物与产物的浓度。

**1.2.7 三角酵母无细胞抽提液的制备:**方法见 [12]。

## 2 结果

### 2.1 三角酵母多倍体菌株 FA10 的生长及 DAO 和 CAT 产量

保藏菌种在液体培养基中活化后以 5% 的接种量接入装有 80mL 发酵培养液的 500mL 三角瓶,于 28℃、250r/min 旋转床上振荡培养。每 4h 取样 1 次,分别测定菌浓度 ( $OD_{600}$ )、DAO 和 CAT 活力。并相对于培养时间作图。

由图 2 可以看出,三角酵母细胞生长至 20h 后即达到稳定期,44h 时,其产 DAO 活力达到高峰,产酶量在 2500u/L 左右。此时,CAT 活力也达到最高,约为 50000u/L。两种酶的产酶进程相似。因此,难以通过发酵时间的控制使两酶分开。

### 2.2 三角酵母细胞对 CPC 的酶促转化

三角酵母细胞的 DAO 为胞内酶。以整体细胞作为生物催化剂时,需对细胞进行透性化处理以克服细胞壁/膜对底物的通透屏障作用。有关细节见

文献 [12]。实验中采用丙酮处理的透性化细胞进行酶促转化 CPC 为 GL-7ACA 的研究,并通过 HPLC 对反应过程进行监测。结果发现,反应液内残留 CPC 的百分含量随反应时间而下降,但 GL-7ACA 生成率与 CPC 的减少不成比例。然而,在 HPLC 图谱上的 4.95min 处出现一个面积随时间而增加的洗脱峰,相对位置与文献 [8] 报道的 AKA-7ACA 一致(图 3a)。

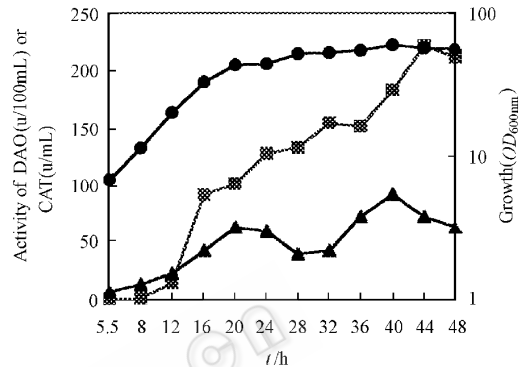


图 2 三角酵母的生长及产 DAO、CAT 曲线

Fig. 2 Time Course of Growth and yield of DAO or CAT in fermentation with *T. variabilis* FA10

■-DAO ▲-CAT ●-OD<sub>600</sub>

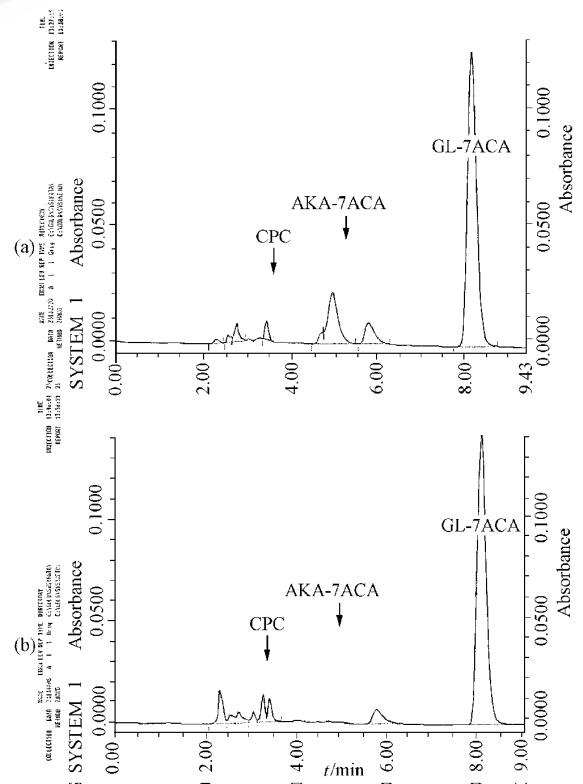


图 3 FA10 细胞转化 CPC 的 HPLC 检测图

(a) 反应结束时 (b) 在样品 a 中添加 6% 过氧化氢

Fig. 3 HPLC chromatograms of cephalosporin C bioconversion by FA10 cells (a) reaction solution at the end of the con-

根据图 1 的反应程式可知,与三角酵母细胞中 DAO 同时存在的 CAT 使  $H_2O_2$  分解,干扰了 AKA-7ACA 的进一步氧化脱羧而积累。相对积累量随反应进程而增加。从反应液的 HPLC 检测结果可知反应过程中底物 CPC 残留(反应液起始时加入量为 100%),产物 GL-7ACA 生成(已被转化为 GL-7ACA 的 CPC 占反应起始时 CPC 加入量的百分比)和中间产物 AKA-7ACA 积累(反应 150 分钟终止时 AKA-7ACA 的总量为 100%)三者的相对变化见图 4。如果向反应液添加  $H_2O_2$  至终浓度为 6%,则可看到 HPLC 图上 4.95min 处 AKA-7ACA 峰的消失(图 3b)和 GL-7ACA 的增加(详见后述)。

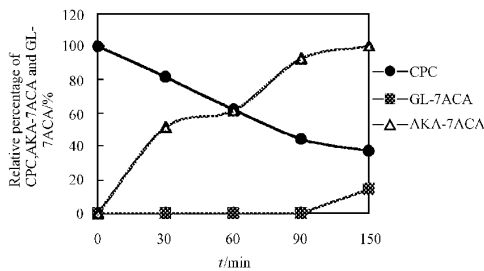


图 4 透性化三角酵母细胞转化 CPC 反应中残留 CPC、GL-7ACA 生成率、相对 AKA-7ACA 积累的变化

Fig. 4 Relationship between substrate and product in the bioconversion of CPC to GL-7ACA using permeabilized FA10 cells

### 2.3 添加外源 $H_2O_2$ 对 GL-7ACA 生成率的影响

$H_2O_2$  对 AKA-7ACA 的氧化脱羧作用为非酶促化学反应。在三角酵母细胞转化 CPC 的反应进行至 150min 时, HPLC 测定表明,虽然作为底物的 CPC 浓度已降至 34%,而 GL-7ACA 的生成率仅为 14.7%。相应伴随着大量 AKA-7ACA 的积累(图 4)。但在此时,向反应液添加不同浓度的  $H_2O_2$  溶液,既可使积累的 AKA-7ACA 进一步氧化脱羧,也可使残留的 CPC 继续被 DAO 所转化,促进 GL-7ACA 的生成。实验证明 GL-7ACA 的生成率与  $H_2O_2$  加量成正相关性(图 5),在外源加入的  $H_2O_2$  达到 6% 时,可获得 72.96% 的 GL-7ACA 生成率。若继续提高  $H_2O_2$  的加量, GL-7ACA 的生成率反而下降。

### 2.4 $NaN_3$ 对过氧化氢酶的抑制作用

为克服 DAO 酶促转化 CPC 反应中 CAT 的干扰,本研究对呼吸抑制剂  $NaN_3$  的作用进行了研究,结果发现,当在转化 CPC 的反应系统中加入 0.13mg/mL 的  $NaN_3$ ,可使 CAT 的活性完全抑制。该条件下, GL-7ACA 的生成率可达 70.10%,既无

需外源添加  $H_2O_2$ ,亦不发生 AKA-7ACA 积累的现象。然而,含这一浓度  $NaN_3$  的转化反应系统亦会导致三角酵母细胞中 DAO 的活力下降 40%。另一方面,  $NaN_3$  是一种剧毒化学品,它与 CPC 及其衍生物形成的叠氮化副产物会进一步分解释放出有毒的叠氮离子而难于被制药工业接受。

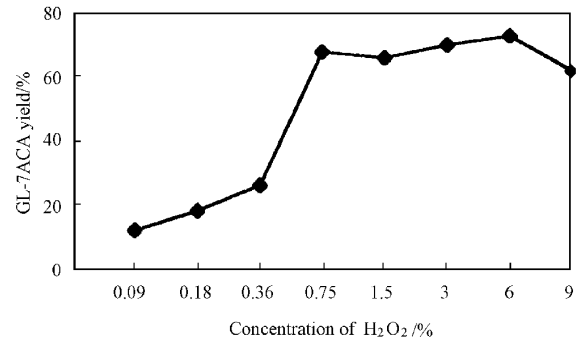


图 5 向 CPC 转化液添加不同浓度的  $H_2O_2$  溶液 GL-7ACA 生成率比较

Fig. 5 Rate of GL-7ACA formation from CPC in the reaction system after adding various concentrations of hydrogen peroxide

### 2.5 pH 对过氧化氢酶的选择性抑制作用

如上所述, CAT 对 CPC 转化反应的干扰,一定程度上虽然可通过额外添加过氧化氢和反应体系中使用一定浓度的  $NaN_3$  等方法来克服,但因毒性或工艺上难于精确操作而并不理想。另一个可供选择的方法,是利用 DAO 与 CAT 对碱敏感性的差异,按 1.2.5 节方法,对三角酵母细胞进行碱处理,分别测定细胞的 DAO 与 CAT 活力,并以 pH8.0 处理细胞的 CAT 及 DAO 活力为对照,计算相对酶活。结果如图 6 所示, pH10.5 处理 30min 已足以使三角酵母

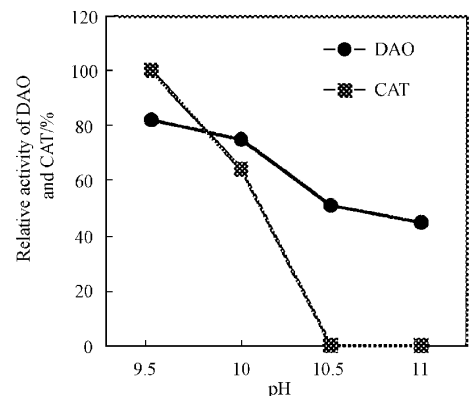


图 6 不同 pH 值处理对三角酵母细胞中 DAO 及 CAT 活力的影响

Fig. 6 Effect of pH treatment on the activities of

细胞的 CAT 活力完全钝化,但未能如 Vencezi 等<sup>[13]</sup>所述那样 DAO 活力不受损伤。在本实验条件下,将丢失 50%左右的 DAO 的活力。

## 2.6 碱处理三角酵母细胞对 CPC 的转化作用

经透性化和碱处理的三角酵母细胞可被用于进行 CPC 的生物转化反应。图 7 是反应液中底物 CPC 与产物 GL-7ACA 的含量随时间变化的曲线。转化进程中,HPLC 图谱上未见 AKA-7ACA 峰。实验证明,当 FA10 中的 CAT 经碱处理钝化后,即可消除反应进程中由于 CAT 干扰而出现的 AKA-7ACA 积累的现象,不仅在不需要添加外源  $H_2O_2$  的条件下,使 CPC 转化生成 GL-7ACA 的反应顺利进行,反应的生成率相对于加  $NaN_3$  (70.1%) 或外源添加 6%  $H_2O_2$  (73.0%) 高 10% 以上,可达 84%。

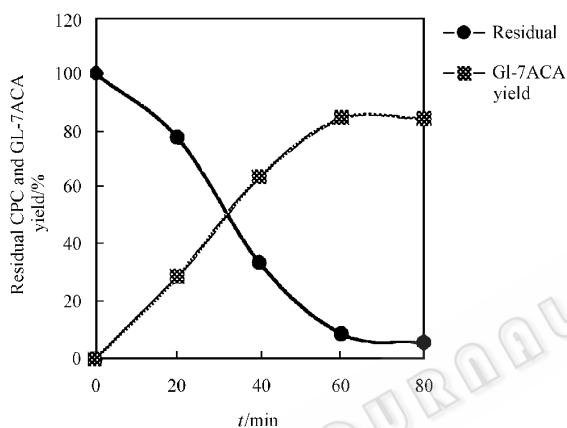


图 7 经透性化和碱处理的三角酵母转化 CPC 过程中 CPC 的残留与 GL-7ACA 生成率的变化

Fig. 7 Bioconversion of CPC to GL-7ACA using pH10.5 treated permeabilized FA10 cells

## 3 讨 论

利用整细胞作为生物催化剂有二方面的优点,即可避免酶提取纯化的高费用以及酶在细胞内比在游离态更具稳定性,然而也存在着胞内其它酶引起的一些副作用<sup>[14]</sup>。本文报道的结果证明,在 DAO 转化 CPC 为 GL-7ACA 的过程中,细胞内的 CAT 通过水解  $H_2O_2$  而阻碍了 AKA-7ACA 的氧化脱羧。为此,试验了几种不同方法以使转化反应顺利进行。其中,外源添加  $H_2O_2$ ,可从一定程度上克服  $H_2O_2$  被破坏而导致的 AKA-7ACA 积累和产率下降。但由于  $H_2O_2$  是一种强氧化剂,加量不足,反应不能完全,添加过量,又会氧化破坏 CPC 及其衍生物,降低 GL-7ACA 的产率。残留  $H_2O_2$  还会损伤 DAO 的活力,甚至引起 DAO 不可逆失活<sup>[14,15]</sup>,影响重复利

用。因此  $H_2O_2$  的添加在操作上较难精确掌握。另一方面,呼吸抑制剂  $NaN_3$  对 CAT 有抑制效应,有助于转化反应的进行,但即使微量的叠氮化离子对人体也具较高毒性,故难于被生产实践所接受。相对而言,细胞的碱处理,因其安全无毒,易于操作而被认为是选择性消除 CAT 活力的较好方法。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Fechtig B, Peter H, Bickel H *et al.* Modification of antibiotics, II. Preparation of 7-aminocephalosporanic acid, *Helv Chim Acta*, 1968, **51**(5):1108~1120
- [2] Morin R B, Jackson B G, Flynn E H *et al.* Chemistry of cephalosporin antibiotics, X IV. Reaction of cephalosporin with nitrosyl chloride, *J Am Chem Soc*, 1969, **91**(6):1396~1400
- [3] Parmar A, Kumar H, Marvaha S S *et al.* Recent trends in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA), *Crit Rev Biotechnol*, 1998, **18**(1):1~12
- [4] Conlon H D, Baqal J, Baker K *et al.* Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid, *Biotechnol Bioeng*, 1995, **46**(6):510~513
- [5] Golini P, Bianchi D, Battistel E *et al.* Immobilization of D-amino oxidase from different yeast: characterization and application in the deamination of cephalosporin C, *Enzyme Microb Technol*, 1995, **17**(4):324~329
- [6] Sauber K. In "Stability and stabilization of enzymes" (Van der Tweel T T, Harder A, Buitelaar R M, eds) 1993, pp. 145
- [7] Buto S, Pollegioni L, D'Anfario L *et al.* Evaluation of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis* for the production of  $\alpha$ -keto acid: a reactor system, *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**(11):1288~1294
- [8] Pilone M S, Buto S, Pollegioni L A process for bioconversion of cephalosporin C by *Rhodotorula gracilis* D-amino and oxidase, *Biotechnol Lett*, 1995, **17**(2):199~204
- [9] LI W Q (李维泉), JIAO R S (焦瑞身). The breeding of diploid strains of *Trigonopsis variabilis*, *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 1991, **31**(5):371~375
- [10] Ashwin D, Souza S F D, Nadkarni G B. Coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase by entrapment of *Trigonopsis variabilis* in radiation polymerized polyacrylamide beads, *J Biosci*, 1987, **11**(1-4):137~144
- [11] Mukhopadhyay S, Schellhorn H E. Induction of *Escherichia coli* hydroperoxidase I by acetate and other weak acid, *J Bacteriol*, 1994, **176**(8):2300~2307
- [12] ZHU T H (朱彤波), CHENG J (陈军), ZHANG Y F (张益葵) *et al.* Permeabilization of yeast *Trigonopsis variabilis* FA10 cells for enhancing apparent activity of D-amino acid oxidase. *Chinese Biotechnol*. 2001, **17**(1):73~77
- [13] Vicenzi J T, Hansen G J. Enzymatic oxidation of cephalosporin C using whole cells of the yeast *Trigonopsis variabilis* within a "cross-flow filter reactor", *Enzyme Microb Technol*, 1993, **15**

- [ 14 ] Brodelius P , Nilsson K , Mosbach K. Production of 2-keto acid , I. Immobilized cells of *Trigonopsis* containing D-amino acid oxidase , *Appl Biochem Biotechnol* ,1981 **4** ( 4 ) 293~300
- [ 15 ] Tarhan L , Telefoncu A. Characterization of immobilized glucose oxidase-catalase and their deactivation in a fluid bed reactor , *Appl Biochem Biotechnol* ,1990 **26** ( 1 ) :45~57

## Enzymatic Conversion of Cephalosporin C to Glutaryl-7-aminocephalosporanic Acid Using Whole Cells of the Yeast *Trigonopsis variabilis* FA10

CHEN Jun ZHU Tong-Bo ZHANG Yi-Fen YANG Yun-Liu JIAO Rui-Shen  
( Shanghai Institute of Plant Physiology , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China )

**Abstract** A process for the production of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid ( GL-7ACA ) from cephalosporin C ( CPC ) using permeabilized cells of yeast *Trigonopsis variabilis* FA10 containing D-amino acid oxidase ( DAO ) is described. It was found that the bioconversion of CPC to GL-7ACA was interfered by the catalase activity presented in the cells that hydrolyzed the hydrogen peroxide and resulted in the accumulation of  $\alpha$ -keto-adipyl-7-ACA ( AKA-7ACA ) and decrease of GL-7ACA yield. the methods to overcome this problem including the addition of extra  $H_2O_2$  and use of catalase inhibitor ,  $NaN_3$  , were developed and the rate of GL-7ACA from CPC were 73 % and 70.1 % , respectively. Another alternative method was to incubate the permeabilized FA10 cells at pH10.5~11.0 for 30 minutes at 20°C which served to selectively inactivate the catalase. In the bioconversion of CPC to GL-7ACA using pH10.5-treated cells without catalase activity , the high reaction yield of GL-7ACA ( 84 % ) was achieved.

**Key words** D-amino acid oxidase , bioconversion , cephalosporin C , glutaryl-7-aminocephalosporanic C , catalase

Received : June 31 , 2000

This work was supported by grant from Chinese National Programs for Sciences and Technology Departmen( 95-102-02-01 ) and Shanghai Foundation for Sciences and Technology Departemen( 98-4319135 ).

\* Corresponding author. Tel 86-21-64042090 ; Fax 86-21-64042385 ; E-mail ylyang@iris.sipp.ac.cn

## 安捷伦科技公司瞄准生命科学领域

随着“芯片实验室”技术的开发和 DNA 分析工具的研制 ,以测试和测量设备闻名于业内的安捷伦科技公司 ,已经逐渐把致力的主要目标转向生命科学领域。

几十年来 ,生物科学的最新变化正在以人们难以想象的方式改变着未来的世界。自从人类发现了 DNA 分子的双螺旋结构以后 ,人类对生命科学的研究便进入了一个新时代-基因时代 ,基因这个构成生命最基本的物质的发现 ,把人类对自身的研究带入了一个前所未有的领域。1990 年 10 月 1 日 ,耗资 30 亿美元、由全球数百名顶尖科学家组成的研究小组启动了人类基因组研究计划。这一计划拟用 15 年时间 ,完成所有基因测序工作。一旦破译了基因密码 ,人类不仅能够战胜所有困扰自己的疾病 ,更重要的是还能够改造人类本身 ,也正因如此 ,人类基因组工作草图被誉为“生命天书”。而这项工作的完成 ,必须依赖最先进的科技手段才能得以实现。

安捷伦科技作为一家高科技跨国公司 ,一直致力于生命科学领域研究的开发。据了解 ,安捷伦日前已经开发出“芯片实验室技术” ,这种技术基于邮票大小的微型芯片 ,通过分析细胞间的相互作用 ,实现了药物治疗和给药技术的缩微化和改进分析时间及数据 ,大大地改善了分析能力。安捷伦在生命科学领域内的另一项创新是它采用惠普喷墨打印技术 ,创造出 DNA 分析工具。不同的是 ,这种类似打印机的系统 ,喷出的是组成人类遗传密码的 4 种碱基 ,即腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和鸟嘌呤 ,从而为未知的 DNA 片段创造出独一无二的测试工具。研究人员可以决定喷出的碱基序列 ,也称为微阵列。微阵列允许同时测试成千上万的 DNA 序列 ,明显改善了当前既费时又昂贵的方法。随着生命科学的研究重点从构成人类 DNA 序列的测定转向基因的功能 ,这些技术将帮助确立和保持安捷伦在生命科学领域中的领导地位。

(北京世纪恒通有限公司 安东娜 供稿)