

用固定化三角酵母细胞转化头孢菌素 C 为戊二酰基-7-氨基头孢霉烷酸的研究

任克勤 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所)

1. 三角酵母冻融细胞用海藻酸钙包埋后, 可获得 D-氨基酸氧化酶活力较高的固定化细胞。固定化细胞的最适 pH 与冻融细胞相同, 均为 pH8.3, 最适温度为 40℃, 而冻融细胞为 33℃, 和冻融细胞相比, 固定化细胞对温度和 pH 的稳定性提高, 表观米氏常数增大。
2. 固定化细胞以头孢菌素 C 为底物时, 得到的产物经高压液相色谱鉴定为 GL-7ACA。
3. 固定化细胞装柱, pH8.3, 室温时, GL-7ACA 的转化率在通气条件下可达 92%, 产生 GL-7ACA 的能力为 9.2mg/g 固定化细胞·小时。

关键词: D-氨基酸氧化酶; 冻融细胞; 固定化细胞; 头孢菌素 C; 戊二酰基-7-氨基头孢霉烷酸

工业上生产半合成头孢菌素类抗生素的主要问题在于制备头孢菌素的母核——7-氨基头孢霉烷酸(7-ACA)。由发酵液得到的天然头孢菌素是头孢菌素 C(CPC), 其侧链是 D- α -氨基己二酸。目前, 国内外均用化学法脱去其侧链, 制备 7-ACA。但化学法有成本高、三废处理等问题, 所以研究酶法生产 7-ACA 成为值得重视的课题。酶法制备 7-ACA 有两种方法^[1]: 一种是一步法, 即酶直接作用于 CPC, 将其侧链切断。已报道多种微生物具有这种酶^[2,3], 但一般 7-ACA 的产量甚低, 尚未实际应用。另外一种 是 两步法^[4], 即 CPC 在 D-氨基酸氧化酶(D-AAO) 的作用下, 产生一个具有酮基的中间体, 这个中间体较不稳定, 很易氧化脱羧, 转变为戊二酰基-7-氨基头孢霉烷酸(GL-7ACA), 后者在酰基转移酶的作用下, 脱去其侧链, 产生 7-ACA。Mazzer 等^[5]用从猪

肾脏中提取的 D-AAO、Gilbert 等^[6]用曲霉菌(*Aspergillus flavusoryzae*) 和酵母菌(*Trigonopsis variabilis*) 的丙酮粉制剂, 氧化 CPC, 都得到了 GL-7ACA。Shibuya 等^[7-9]从自然界分离得到的假单胞杆菌(*Pseudomonas SY-77-1*) 具有 GL-7ACA 酰基转移酶活力, 可以水解 GL-7ACA, 切断其侧链, 得到 7-ACA。

我们将具 D-AAO 活力的三角酵母细胞进行冻融处理, 然后固定化, 用以氧化 CPC, 制备 GL-7ACA。这一方法简便, 比较实用, 为进一步扩大试验和生产 7-ACA 提供了基础。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养方法

本文于 1984 年 10 月 25 日收到。

本所邵大森同志帮助高压液相色谱分析, 特此致谢。

1. 菌种: 三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*), 由瑞典 Lund 大学 P. Brodeur 博士提供。

2. 培养方法: 参见 Sentheshanmugamathan 等^[10]方法。

(二) D-AAO 活力测定

1. 细胞酶活力的测定: 按 Kawamoto 方法^[11]进行。以 D-丙氨酸做底物, 反应生成的丙酮酸以 Friedemann 方法^[12]测定。在上述条件下, 每分钟产生 1 微克分子的丙酮酸所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

2. 固定化细胞酶活力的测定: 0.5g 固定化细胞, 加入 3.0ml pH8.3 0.05M Tris-HCl (含 5mM CaCl₂), 1.0ml 0.1M FAD, 1.0ml 150mM D-丙氨酸, 体积 5.0ml, 于 37°C 震荡保温 10min, 吸取 1.0ml 反应液, 加 0.5ml 10% 三氯醋酸, 1.5ml 蒸馏水, 测丙酮酸的方法同上。

3. 头孢菌素的高压液相色谱分析: 以头孢菌素 C 为底物研究固定化细胞性质时, 采用高压液相色谱分析, 参见 Kennedy 方法^[13], 稍作改进。分析在日立-638-50 高压液相色谱仪上进行。柱: 2.6×500mm (3050担体), 柱温 60°C, 压力 1.41kg/cm², 流速 2.0ml/min, 流动相: 20% 甲醇, 0.01M 四丁基氯化铵。

(三) 细胞预处理

1. 表面活性剂处理: 用 0.5M CaCl₂ 或 0.5% Triton X-100 溶液分别与菌体制成菌悬液, 于 30°C 保温 2 h。

2. 丙酮粉制作: 将冷却到 0°C 以下的丙酮逐渐加到菌体中, 不断搅拌, 菌体在丙酮中均匀分散, 抽滤, 低温干燥除去丙酮, 即得丙酮粉。

3. 冻融处理: 收集的菌体在 NaCl-碎冰 (1:3, 约 -20°C) 中冻 2 h, 使成冰块, 然后在室温融化, 如此反复 5 次即

可。

(四) 固定化细胞的制备

1. 琼脂固定化: 按 Toda 等方法^[14]。

2. 明胶固定化: 参见吉鑫松等方法^[15]。

3. 聚丙烯酰胺凝胶固定化: 按 Chibata 等方法^[16]。

4. 海藻酸钙固定化: 按 Kierstan 方法^[17]。

(五) GL-7ACA 的制备

1. 戊二酸酐的制备: 参见 Berner 等方法^[18]。所得结晶熔点为 55.5°C, 与文献报道一致。

2. GL-7ACA 的制备: 参见 Shibuya 等方法^[7]。得到的粉状产品经薄板层析鉴定为一个点。

(六) 用固定化细胞酶柱制备 GL-7ACA

将 100g (湿重) 固定化细胞装入柱反应器 (4.0×20.0cm) 中, 此柱的底端装有一小管, 以接通气泵。反应前将 CPC 溶于 pH8.3, 0.05mM Tris-HCl 缓冲液 (含 5mM CaCl₂) 中, 配成 1% 的浓度。取 200ml 1% CPC 溶液, 在室温 (25°C) 下, 反复快速循环通过酶柱进行反应。在反应的同时, 用通气泵连续向柱中通入空气。终止反应的时间视 CPC 被转化的量确定。

结 果

(一) 不同方法处理细胞对 D-AAO 活力的影响

将细胞制成丙酮粉, 或冻融, 或用表面活性剂处理, 然后分别测 D-AAO 活力, 结果见表 1。表 1 说明丙酮粉和冻融细胞的酶活力较高。

表 1 不同方法处理细胞对D-AAO活力的影响

Table 1 Effect of different treatment of cells on D-AAO activity

处理方法 Methods of treatment	D-AAO 活力 (单位/克细胞干重) D-AAO activity(u/g dry cells weight)
Triton X-100	25
CaCl ₂	11.5
丙酮粉 Acetone powder	89
冻融细胞 Frozen-thawed cells	85
冻融细胞上清液 Supernatant of frozen-thawed cells	0
对照 (无任何处理) Control (no-treatment)	0

(二) 固定化细胞的制备

1. 不同方法固定化细胞的比较: 在同一细胞浓度下, 以四种方法固定化细胞, 其结果见表 2。从表 2 可以看出, 用海藻酸钠固定化得到的固定化细胞活力回收较高。

2. 海藻酸钠浓度对固定化的影响: 固定细胞浓度, 以不同浓度的海藻酸钠固定化细胞, 结果见表 3。表 3 表明, 随着海藻酸钠浓度的降低, 活力回收增高, 但在 0.5% 的浓度时, 固定化细胞不能成球形, 且机械性能差, 故以 1% 的浓度较为适宜。

3. 细胞浓度对固定化的影响: 用同一浓度的海藻酸钠溶液, 固定不同细胞含

表 2 四种方法固定化细胞的比较

Table 2 Comparison of four methods of immobilization

包埋试剂 Reagents for immobilization	聚丙烯酰胺凝胶 Polyacrylamide gel	明胶 Gelatine	琼脂 Agar	海藻酸钠 Sodium alginate
活力 (单位/克固相化细胞) Activity(u/g immobilized cells)	0.51	0.72	0.75	1.98
活力回收 Yield of activity(%)	30.6	35.0	37.5	59.4

表 3 海藻酸钠浓度对固定化的影响

Table 3 Effect of sodium alginate concentration on the activity of immobilized *Trigonopsis variabilis* cells.

海藻酸钠浓度 Sodium alginate concentration	0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	4.0%
活力 (单位/克固定化细胞) Activity(u/g immobilized cells)	1.29	1.11	0.84	0.81	0.54
活力回收 Yield of activity (%)	80.9	69.7	52.7	50.8	33.9

量, 结果见表 4。从表 4 可以看出细胞含量越大, 固定化细胞的酶活力亦越大, 活力回收则降低。

(三) 固定化细胞及冻融细胞的 D-AAO 性质比较

1. 温度对固定化细胞的影响: 在不

同温度下分别测固定化细胞和冻融细胞的酶活力, 结果见图 1。固定化细胞的最适温度为 40°C, 冻融细胞的最适温度为 33°C。

2. pH 对固定化细胞的影响: 在不同 pH 下, 分别测固定化细胞和冻融细胞的酶活力, 结果见图 2。固定化细胞和冻

表 4 细胞浓度对固定化细胞D-AAO活力和活力回收的影响

Table 4 Effect of concentration of *Trigonopsis variabilis* cells on D-AAO activity of immobilized cells and yield of activity

细胞浓度 (湿重%) Cells concentration (wet weight %)	10	20	30	40
活力 (单位/克固定化细胞) Activity (u/g immobilized cells)	1.50	2.07	2.52	2.73
活力回收 (%) Yield of activity (%)	85.7	62.1	46.8	33.2

融细胞的最适pH均为8.3。

3. 固定化细胞对温度的稳定性: 将

固定化细胞和冻融细胞分别悬于 pH8.3, 0.05M Tris-HCl缓冲液 (含5mM CaCl₂) 中, 于不同温度中保温 30min, 取出立即置冰浴, 分别测其酶活, 结果见图 3。图

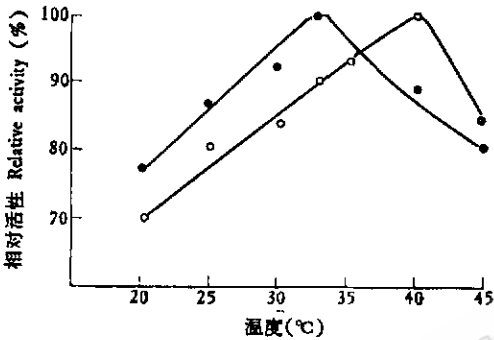


图 1 温度对固定化细胞的影响

Fig.1 Effect of temperature on the activity of immobilized cells

- 固定化细胞 (Immobilized cells)
- 冻融细胞 (Frozen-thawed cells)

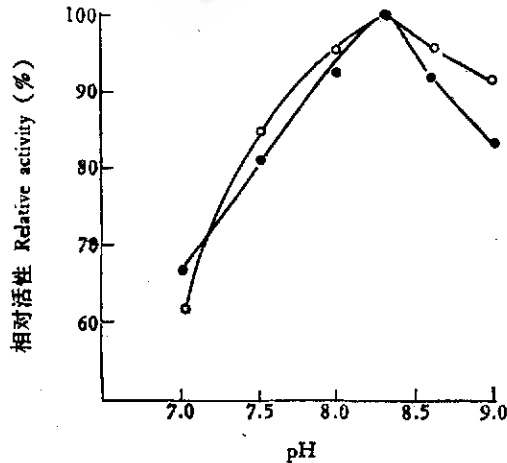


图 2 pH对固定化细胞的影响

Fig.2 Effect of pH on the activity of immobilized cells

- 固定化细胞 (Immobilize dcells)
- 冻融细胞 (Frozen-thawed cells)

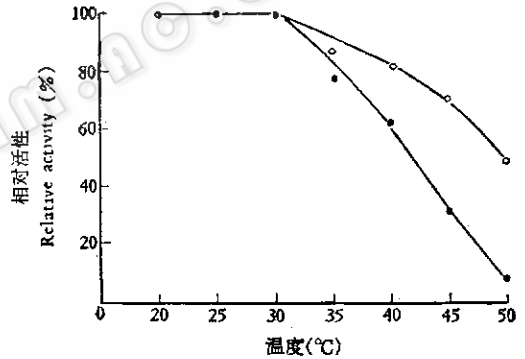


图 3 固定化细胞对温度的稳定性

Fig.3 Heat stability of immobilized cells

- 固定化细胞 (Immobilized cells)
- 冻融细胞 (Frozen-thawed cells)

3 表明固定化细胞的热稳定性较冻融细胞增高。

4. 固定化细胞对 pH 的稳定性: 将固定化细胞和冻融细胞分别悬于不同 pH 的缓冲液中, 于 30°C 保温 1 h, 取出立即置冰浴, 然后分别测二者酶活力, 结果见图 4。与冻融细胞相比, 固定化细胞对 pH 的稳定性稍高。

5. 固定化细胞 D-AAO 的表观米氏常数: 以 D-丙氨酸为底物, 在不同底物浓度下分别测固定化细胞和冻融细胞的酶

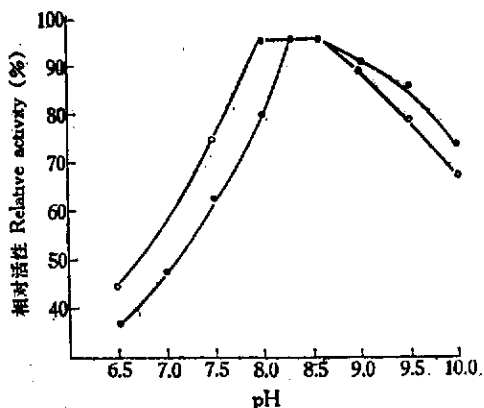


图4 固定化细胞对pH的稳定性

Fig. 4 pH stability of immobilized cells

- 固定化细胞 (Immobilized cells)
- 冻融细胞 (Frozen-thawed cells)

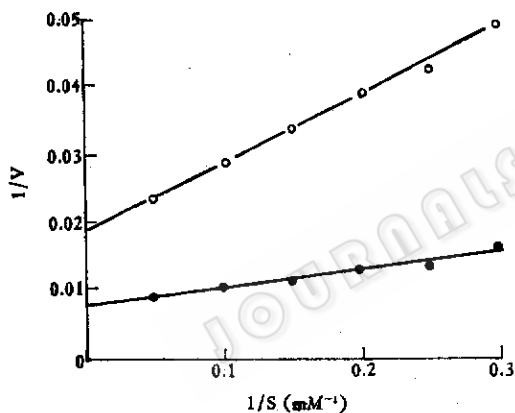


图5 固定化细胞的表观米氏常数

Fig. 5 Apparent Michaelis constant of immobilized cells

- 固定化细胞 (Immobilized cells)
- 冻融细胞 (Frozen-thawed cells)

活力,用双倒数作图法(图5)求出冻融细胞D-AAO的表观米氏常数为3.3mM,经固定化后增大为5.0mM。

(四) 固定化细胞氧化CPC的反应

用固定化细胞与CPC反应,以高压液相色谱鉴定(图6),样品出现两个峰,出峰时间分别与CPC和GL-7ACA标准样品相同,将样品与标准GL-7ACA混合上样,得到迭加的GL-7ACA峰,说明底物CPC

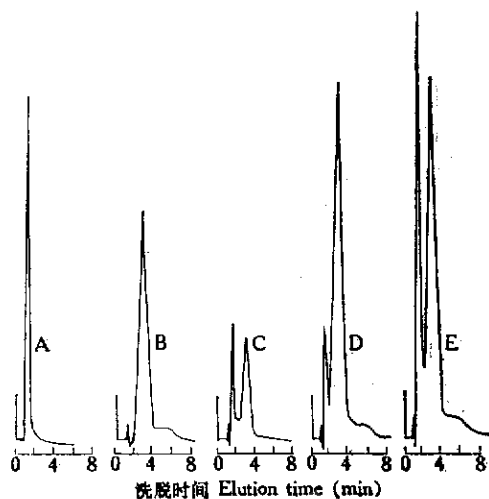


图6 反应产物的高压液相色谱

Fig. 6 HPLC of reaction products

- A. 标准CPC (Standard CPC)
- B. 标准GL-7ACA (Standard GL-7ACA)
- C. 反应混合物 (Reaction mixture)
- D. 标准GL-7ACA + 反应混合物 (Standard GL-7ACA + Reaction mixture)
- E. 标准CPC + 标准GL-7ACA + 反应混合物 (Standard CPC + Standard GL-7ACA + Reaction mixture)

被转化成GL-7ACA。

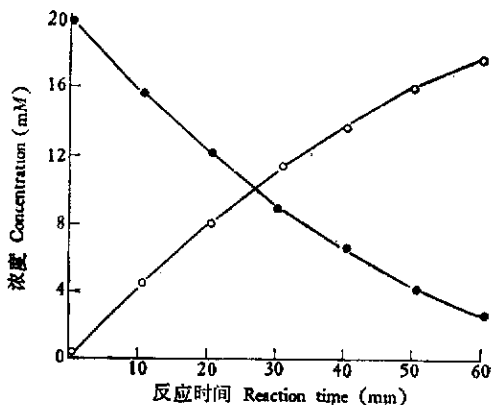


图7 固定化细胞氧化CPC的反应

Fig. 7 Stoichiometry of D-AAO reaction by immobilized cells

- CPC
- GL-7ACA

10g固定化细胞,加20ml 20mM CPC, 37℃震荡保温,每间隔10分钟取样,以高压液相色谱分析CPC和GL-7ACA的含量,结

果见图7。从图中可以看出,随着反应时间的延长,CPC含量不断下降,GL-7ACA含量不断上升。反应60min时,GL-7ACA浓度可达17.5mM,由此可推算出固定化细胞产生GL-7ACA的能力为14.5mg/g固定化细胞·小时。

(五) 固定化细胞在柱反应器中的反应

1. 通气对反应速度的影响: 100g固定化细胞装柱,取200ml1% CPC,在室温下,反复快速循环通过酶柱,设通气与不通气两个处理,每隔20min取样,以高压液相色谱测GL-7ACA的浓度,结果见图8。图8表明,在通气的情况下,随着反应时间的延长,转化率不断提高,反应2h,转化率可达92%。在不通气时,最大转化率仅30%。通气时的反应速度比不通气时加快2倍以上。

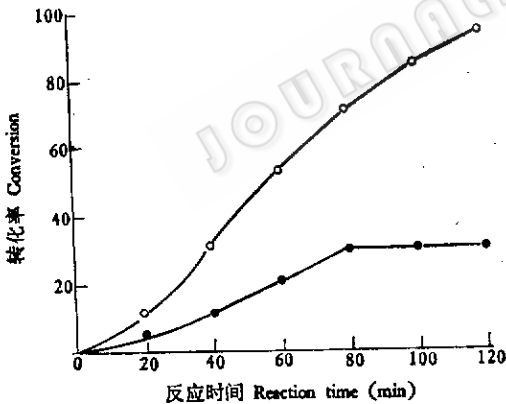


图8 通气对转化率的影响

Fig. 8 Effect of aeration on conversion

· 通气 (Aeration) · 不通气 (No aeration)

从图中还可以看出,反应2小时,转化率达92%,由此可以推算出固定化细胞在柱反应器中,通气条件下,产生GL-7ACA的能力为9.2mg/g固定化细胞·小时。

2. 固定化细胞的使用稳定性: 将100g固定化细胞装柱,取1.0% CPC,以

60ml/小时的流速通过酶柱,在室温(25°C)、通气条件下反应,每隔12h取出适量固定化细胞,测其D-AAO活力,结果见图9。图9表明固定化细胞在连续反应5天后,D-AAO活力丧失80%,半衰期为3天。

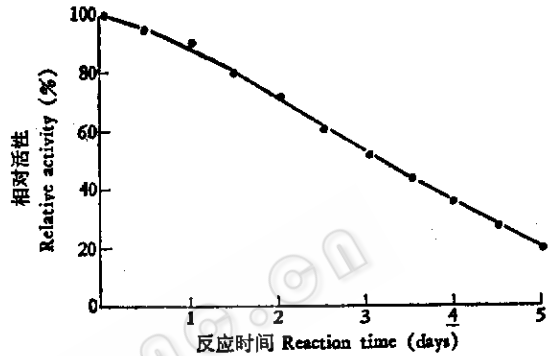


图9 固定化细胞的使用稳定性

Fig. 9 Operational stability of immobilized cells

讨 论

1. D-AAO是一胞内酶,整体三角酵母细胞在不经任何处理的情况下,不能测出D-AAO活力。Gilbert等^[6]将细胞制成丙酮粉,测出的D-AAO活力很高,这可能是经丙酮处理后,细胞膜的透性改变,底物可以自由进出细胞。我们用几种方法处理,其中以冻融细胞和丙酮粉的D-AAO活力较高(表1)。而细胞的冻融方法简便,可能更适用于生产。

2. D-AAO所催化的反应是需氧反应,通气时的反应速度比不通气时加快2倍以上(图9)。在震荡通气的条件下,固定化细胞产生GL-7ACA的能力为14.5mg/g固定化细胞·小时,而在柱反应器中,通气条件下,产生GL-7ACA的能力为9.2mg/g固定化细胞·小时,主要原因是柱反应

器通气不够充分,从而限制了反应速度。但剧烈的通气又可能会影响固定化细胞的机械性能。Mattiasson等^[19, 20]曾利用H₂O₂、全氟化合物(Perfluorochemicals)和血红蛋白提供氧来解决固定化细胞反应中的需氧问题,但在工业生产的应用上还有困难。因此,在扩大试验或工业生产上,怎样适度地解决反应器中的通气问题,需要进一步探讨。

3. 图9的结果表明,三角酵母固定化细胞的半衰期仅3天,其使用稳定性对于工业生产是不够满意的,怎样才能提高固定化细胞的稳定性,延长使用时间,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 冈地谅:日本农芸化学会志, 53:169, 1979.
 [2] Walton, R.B.: *Development of Industrial Microbiol.*, 5:349, 1964.
 [3] 明治制菓:公开特许公报, 昭52-143289, 1977.
 [4] 松本邦男:发酵と工业, 38:216, 1980.
 [5] Mazzero, P. et al.: *J. Chem. Soc. Perkin I*,

- 20:2532, 1972.
 [6] Gilbert, D.A. et al.: British Patent: 1272769, 1968.
 [7] Shibuya, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 45: 1561, 1981.
 [8] Ichikawa, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 45: 2225, 1981.
 [9] Ichikawa, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 45:2231, 1981.
 [10] Sentheshanmuganathan, S. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 27:465, 1962.
 [11] Kawamoto, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55:13, 1977.
 [12] Friedemann, F.E.: *Methods in Enzymol.*, Vol. 3, 414, 1957.
 [13] Kennedy, H.J.: *J. Chromat. Science*, 16: 492, 1978.
 [14] Toda, K. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 481, 1975.
 [15] 吉鑫松等:生物化学与生物物理学报, 14:85, 1982.
 [16] Chibata, I. et al.: *Appl. Microbiol.*, 27: 878, 1974.
 [17] Kierstan, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, 1977.
 [18] Berner, E. et al.: *C. A.* 29:50779, 1935.
 [19] Holst, O. et al.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14:64, 1982.
 [20] Adlercreutz, P. et al.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16:165, 1982.

PRODUCTION OF GLUTARYL-7-AMIDOCEPHALOSPORANIC ACID FROM CEPHALOSPORIN C BY IMMOBILIZED TRIGONOPSIS VARIABILIS CELLS

Ren Keqin Chiao Juishen

(Department of Microbiology, Shanghai Institute of Plant Physiology, Academic Sinica)

The frozen-thawed cells of *Trigonopsis variabilis* were immobilized in Ca²⁺-alginate and the immobilized cells show a high activity of D-amino acid oxidase. The optimum pH of the immobilized cells was the same as that of the frozen-thawed cells, pH8.3, and the optimum temperature was 40°C, while that of the frozen-thawed cells

was 33°C. The stability of the immobilized cells to variations of pH and temperature was higher than that of the frozen-thawed cells. The immobilized cells exhibited an increase in the apparent Michaelis constant, Km'.

2. The product from conversion of cephalosporin C by the immobilized cells was GL-7ACA as determined by

HPLC.

3. when the immobilized cells were packed in a column and fed with 1% CPC solution at pH 8.3 and room temperature, production of GL-7 ACA from CPC was substantially increased by aeration, reaching a conversion of 92%. The yield of GL-7ACA from the

reactor was 9.2mg/g immobilized cells ·h.

Key words

D-amino acid oxidase; Immobilized cells; Frozen-thawed cells; CephalosporinC; Glutaryl-7-amidocephalosporanic acid