

# 固定化细胞制备头孢氨苄的研究

王鲁燕 倪孟祥 王耀伟 王伟 顾觉奋

(中国药科大学微生物制药教研室,南京 210009)

**摘要** 采用卡拉胶固定柑桔黄单胞菌 X034进行头孢氨苄的生产,控制 pH 6.2左右,25°C,底物 7-ADC A的浓度为 2.0%,侧链与底物配比 (PGME/7-ADC A)为 3.0时可得到较高的转化率。用戊二醛硬化,可连续反应32次。细胞载量 [菌体重量 (g) /固定化介质重量 (g)] 控制在 15% 左右,可使固定化细胞有较好的机械强度及较高的酶活性。

**关键词** 头孢氨苄; 柑桔黄单胞菌; 细胞固定化

## 生物合成初级代谢产物的有关酶的固定化技术

日趋成熟,七十年代后期,固定化技术又向前迈出了第二步——完整细胞固定化。活的微生物细胞固定化包含了微生物全部复杂的酶系统,同时也避免了酶纯化过程中活力的损失。王祯祥等人<sup>[1]</sup>曾报道过用固定化 *E. Coli* AS1.7% 细胞合成头孢氨苄 (cephalexin, CEX)。本研究采用柑桔黄单胞菌完整细胞进行固定,探索较适宜的固定化材料,确定固定化细胞转化的工艺条件,以期实现连续生产。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 柑桔黄单胞菌 (*Xanthomonas citri*) X043

1.1.2 培养基成分及化学试剂 参见文献 [2]

### 1.2 方法

1.2.1 细胞固定化方法 将试验菌株按文献<sup>[3]</sup>报道的方法进行培养,培养液在 5000 r/min 下离心 20 min, 菌体细胞用生理盐水洗涤后,再以 12000 r/min 离心 10 min, 每克菌体与 1 ml 生理盐水混匀制成菌悬液备用。将卡拉胶 0.25 g 溶于生理盐水 5 ml,加入菌液充分混匀。用针头滴入 5°C 含 KCl (0.3 mol/L) 和环己二胺 (0.2 mol/L) 的 0.5 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.2) 中,形成直径为 1.5 mm 的球体,4 h 后加入戊二醛使其浓度达到 0.1%,浸泡 1 h 后再以生理盐水洗涤,活化过夜备

用。

1.2.2 酶缩合反应方法 将底物 7-ADCA 溶于 pH 6.2, 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液中。定量加入 PGME 制成原料液,每克固定化细胞加入原料液 1 ml, 定时取样离心, 检测 7-ADCA 及 CEX 的含量。

### 1.2.3 分析方法

7-ADCA 含量测定: 用 PDAB 法, 参见文献<sup>[4]</sup>。

头孢氨苄含量测定: 样品用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 稀释, 一份在沸水浴中加热 10 min, 冷却后于 295 nm 处测吸光值  $A_1$ ; 另一份用 PDAB 法测得 7-ADCA 含量, 根据其在 295 nm 吸光值与浓度的标准曲线, 计算出该浓度下 7-ADCA 的吸光值  $A_2$ ;  $A_1 - A_2$  即可得出 CEX 的实际吸光值按标准曲线求得其含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同材料固定细胞的比较

实验用琼脂—戊二醛法,明胶—戊二醛法,海藻酸钠法<sup>[5]</sup>以及卡拉胶法<sup>[6]</sup>固定细胞。各种不同材料对头孢氨苄合成的影响见图 1。

由图可见,卡拉胶固定细胞的转化率最高,故我们选用卡拉胶作为固定化材料。

### 2.2 温度对头孢氨苄合成的影响

头孢氨苄的合成过程中同时伴有水解,即 CEX 水解成 7-ADCA 和 PGME 以及 PGME 水解

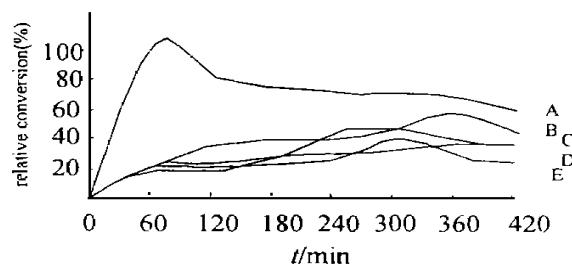


Fig. 1. Comparison of different immobilized materials on the CEX biosynthesis

A free cell; B kappa-carrageenan gel; C marine alga; D agar; E gelatin

成 PGA 的反应,一般说来,CEX 的水解随着温度升高而趋于完全,另一方面,细胞固定化后,酶的热稳定性提高,CEX 的转化率随温度升高而有所增大。此外,由图 2 知得,固定化细胞的半衰期随温度升高而急骤缩短,从实际生产出发,认为反应温度以 25℃ 左右为宜。

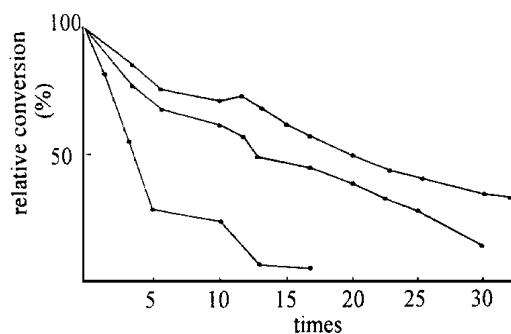


Fig. 2. Effect of temperature on half-life

### 2.3 pH 对头孢氨苄合成的影响

实验在 pH 5.06~7.35 间取 10 个 pH 值进行转化率考察,结果如图 3 可以看出,pH 6.2~6.3 间转化率最高,当 pH 小于 6.0 或大于 6.5 时,转化率会急剧下降,pH 7.0 时的转化率仅为 pH 6.5 时的 20%,因此,实验时应将 pH 严格控制在最适范围内。

### 2.4 底物浓度对头孢氨苄合成的影响

底物 7-ADCA 浓度增大可促进反应向合成方向进行,但浓度过高必然会导致侧链 PGM E 浓度升高引起水解产物 PGA 增加,从而影响 CEX 的合成,我们取 0.1%~3.0% 之间 7 个不同浓度 7-ADCA 进行比较,结果见图 4。

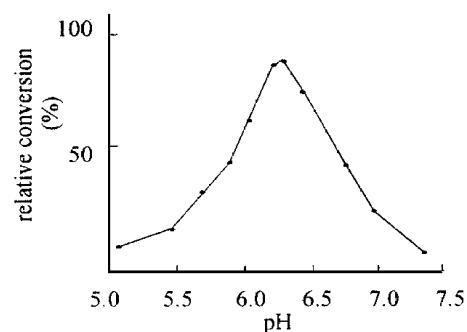


Fig. 3. Influence of pH on CEX synthesis

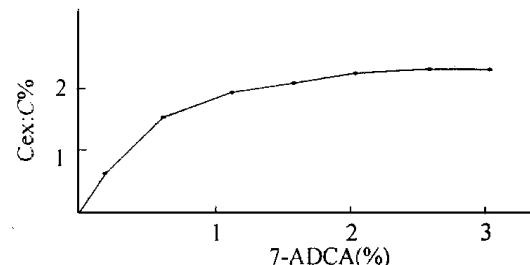


Fig. 4. Effect of conc. of 7-ADCA on CEX synthesis

由图 4 可认为产物浓度随底物浓度升高而升高,达到一定值后趋于平衡,另一方面,随底物浓度升高,转化率下降,综合考虑,7-ADAC 浓度可定在 1.5%~2.0% 范围内。

### 2.5 侧链配比对头孢氨苄合成的影响

侧链与底物的高配比能促进反应向合成方向进行,但随之而来的水解产物会抑制酶的活性,实验得出当 PGM E/7-ADAC 高于 3.0 后,转化率趋于稳定,实验结果见表 1。

Tab. 1. Effect of ratio of PGME /7-ADCA on CEX synthesis

PGM E/7-ADAC	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0
Conversion(%)	30.7	36.9	40.8	46.8	54.1	55.0	55.1	55.6
Relative conversion (%)	55.2	66.3	73.4	84.2	97.3	98.9	99.1	100

### 2.6 细胞含量对头孢氨苄合成的影响

菌体 (g) 固定化细胞 (g) 取 7.6%, 14%, 21% 等三种不同含量, 考察 CEX 转化率, 结果见表 2。

Tab. 2. The result of content of enzyme on CEX synthesis

NO.	1	2	3	4
Content(%)	7.6	14	21	100 (free cell)
Relative conversion(%)	84.2	89.6	90.9	100

由表 2 可以看出, 成倍增加载酶量, 转化率并未大幅度提高, 却使固定化细胞的机械强度显著减

弱,半衰期明显下降,所以固定化介质中的细胞含量控制在 15.0% 左右为宜

### 2.7 戊二醛的影响

戊二醛作为一种交联硬化剂,可增加固定化细胞的硬度和机械强度,延长半衰期。但同时戊二醛对酶有灭活作用,加入戊二醛后,其转化率仅为对照组的 75% (见图 5),25℃时,连续反应 32 次,转化率基本保持不变。

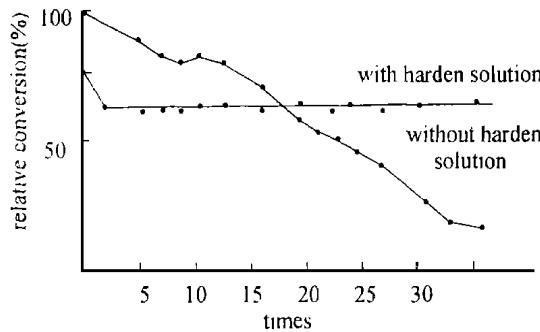


Fig 5. Effect of glutaraldehyde on half-life

### 2.8 表面活性剂对头孢氨苄合成的影响

柑桔黄单胞菌产生的头孢氨苄合成酶是一种胞内酶,加入适当的表面活性剂可增加细胞壁通透性。我们采用 0.01% C 溴化十六烷基三甲基胺 (CTAB) 水溶液及 0.3% 猪胆汁酸处理固定化细胞,结果见表 3

实验得出,猪胆汁酸有一定的活化作用,浓度可控制在 0.1% ~ 0.3%。

Tab 3. Effect of surfactants on synthesis CEX

NO	1	2	3	4
CTAB	-	+	+	-
cholic acid	-	-	+	+
Relative conversion(%)	100	82.8	84.3	103.4

## 3 结 论

采用卡拉胶固定柑桔黄单胞菌,用 0.1% 戊二醛硬化可连续反应 30 余次。选用 1.5% ~ 2.0% 7-ADCA, PGM E/7-ADCA = 3, 25℃, pH 6.2 条件下反应,能得到较高转化率。加入猪胆汁酸作为表面活性剂,可适当提高转化率。细胞固定时,细胞含量不宜过高,可控制在 15% 左右。当转化率达到高峰时,应立即停止反应,则可得到最大的平衡产物浓度。

## 参 考 文 献

- 1 王祯祥, 韩文珍, 乐爱华等. 固定化大肠杆菌 AS1.7 细胞酶促合成头孢立新的研究. 微生物学报, 1984, 24(4): 376
- 2 王鲁燕, 王耀伟, 冯晓梅等. 酶转化法生产头孢氨苄的研究. 中国药科大学学报, 1998, 29(4): 311
- 3 Choi WG, Lee SB, Dewey DY, et al. Cephalexin Synthesis by Partially Purified and Immobilized Enzymes. *Biotechnol Bioeng*, 1981, 23(2): 361
- 4 李明, 徐景娣, 赵玉秀等. 酶法制备头孢菌素IV 的研究(I). 医药工业, 1981, 8(1)
- 5 赵景联. 固定化大肠杆菌细胞生产  $\gamma$ -氨基丁酸的研究. 生物工程学报, 1989, 5(2): 124
- 6 冯立, 陈向东, 彭珍荣. 卡拉胶固定粘质赛氏菌产碱性蛋白酶的研究. 生物工程学报, 1994, 10(1): 66

# Cephalexin Synthesis by Immobilized Cells

Wang Luyan, Ni Mengxiang, Wang Yaowei, Wang Wei, Gu Juefen

Department of Microbial Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

**Abstract** For continuously producing of cephalexin, whole cells of *Xanthomonas citri* were immobilized by entrapment in kappa-carrageenan gel. The immobilized cells showed maximal conversion at pH 6.2. The concentration of 7-ADCA was 1.5% ~ 2.0% and PGME/7-ADCA was about 3.0, in which the reaction could take place completely. Those cells with hardening by glutaraldehyde could continue to product 32 times. The load of enzyme was kept at 15%, and it showed high enzyme activity and strength.

**Key words** *Xanthomonas citri*; Cephalexin; Immobilized cells