

## 重组 $\alpha$ -氨基酸酯水解酶合成头孢曲嗪

潘佳林, 王轲, 李端华, 叶丽娟

中国医药集团总公司四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610052

潘佳林, 王轲, 李端华, 等. 重组 $\alpha$ -氨基酸酯水解酶合成头孢曲嗪. 生物工程学报, 2013, 29(4): 501-509.

Pan JL, Wang L, Li DH, et al. Synthesis of cefatrizine by the recombinant  $\alpha$ -amino acid ester hydrolase. Chin J Biotech, 2013, 29(4): 501-509.

**摘要:** 为了探索酶法合成头孢曲嗪的产业化工艺路线, 从红纹黄单胞菌 *Xanthomonas rubrilineans* 中克隆 $\alpha$ -氨基酸酯水解酶基因全序列, 转化入大肠杆菌中表达。以头孢曲嗪的合成转化率为指标, 分别考察纯化的重组 $\alpha$ -氨基酸酯水解酶合成头孢曲嗪的最适温度、最适 pH 和最佳底物摩尔比。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 重组 $\alpha$ -氨基酸酯水解酶的单体分子量为 70 kDa。催化合成头孢曲嗪的最适 pH 为 (6.0 $\pm$ 0.1), 最适温度为 36  $^{\circ}$ C。底物浓度约为 7-ATTC 30 mmol/L、HPGM·HCl 120 mmol/L, 酶用量 22 U/mL 时, 头孢曲嗪的转化率达到 64.3%。结果为优化酶法合成头孢曲嗪的产业化工艺奠定了基础。

**关键词:**  $\alpha$ -氨基酸酯水解酶, 头孢曲嗪, 动力学控制, 转化率

## Synthesis of cefatrizine by recombinant $\alpha$ -amino acid ester hydrolase

Jialin Pan, Lu Wang, Duanhua Li, and Lijuan Ye

China National Pharmaceutical Group Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610052, Sichuan, China

**Abstract:** To explore the enzymatic route of cefatrizine synthesis,  $\alpha$ -amino acid ester hydrolase (AEH) gene was cloned from the whole genome of *Xanthomonas rubrilineans*, and expressed heterologously in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The effects of temperature, pH and substrates' molar ratio upon the transformation yield of cefatrizine by purified recombinant AEH were investigated. The monomer of AEH was determined as 70 kDa by SDS-PAGE. The optimal pH and temperature reaction were (6.0 $\pm$ 0.1) and 36  $^{\circ}$ C for cefatrizine synthesis. The transformation yield was 64.3% under 36  $^{\circ}$ C, pH (6.0 $\pm$ 0.1),

**Received:** October 8, 2012; **Accepted:** December 14, 2012

**Supported by:** National "Twelfth Five-Year Plan" Science and Technology Major Project (No. 2011ZX09401-403), Sichuan International Cooperation and Communication Project (Nos. 2010HH0036, 2011HH0013).

**Corresponding author:** Lijuan Ye. Tel: +86-28-84216035; Fax: +86-28-84333218; E-mail: lisaleaf@gmail.com

"十二五"科技重大专项 (No. 2011ZX09401-403), 四川省国际科技合作计划项目 (Nos. 2010HH0036, 2011HH0013) 资助。

when the concentrations of two substrates were about 30 mmol/L (7-ATTC) and 120 mmol/L (HPGM-HCl), respectively, and the enzyme consumption was 22 U/mL. The results pave the way for optimization of the industrial enzymatic synthesis of cefatrizine.

**Keywords:**  $\alpha$ -amino acid ester hydrolase, cefatrizine, kinetic control, transformation yield

头孢曲嗪为半合成的广谱口服头孢菌素,对 $\beta$ -内酰胺酶具有很高的稳定性<sup>[1]</sup>。用于制备头孢曲嗪的原料成本低于头孢克洛,临床疗效与头孢克洛类似<sup>[2]</sup>。因此,头孢曲嗪可作为头孢克洛的替代品种,市场潜力巨大。目前头孢曲嗪的制备方法主要为化学方法,一方面残留的溶剂威胁患者的用药安全,另一方面产生的废弃溶媒造成一定的环保压力。室温条件下和在中性水溶液中进行酶催化合成具有更高的能效和更低的碳排放量<sup>[3]</sup>,利用酶法合成路线代替化学合成路线可以产生巨大的环境和社会效益<sup>[4-5]</sup>。

虽然近年来酶法合成头孢类抗生素的研究比较广泛<sup>[6-8]</sup>,但目前还没有关于头孢曲嗪酶法

合成工艺的文献报道。 $\alpha$ -氨基酸酯水解酶( $\alpha$ -Amino acid ester hydrolase,简称AEH,EC 3.1.1.43)是一类具备头孢曲嗪合成活性的酶。1972年由Takahashi等在寻找能够合成带 $\alpha$ -氨基的抗生素的过程中被发现<sup>[9]</sup>。由于底物范围限于带 $\alpha$ -氨基的酰基供体,而且相比酰胺,对酯的亲合性更高而得名<sup>[10]</sup>。AEH同时催化3个反应(图1):1)催化酰胺键的形成,酶发挥抗生素合成酶活性;2)催化酰基供体的水解;3)催化产物的水解,酶发挥酰胺酶活性<sup>[11]</sup>。酶法合成头孢类抗生素可以通过热力学控制(Thermodynamically controlled synthesis, TCS)<sup>[12]</sup>或者动力学控制(Kinetically controlled synthesis, KCS)<sup>[13]</sup>来实现。

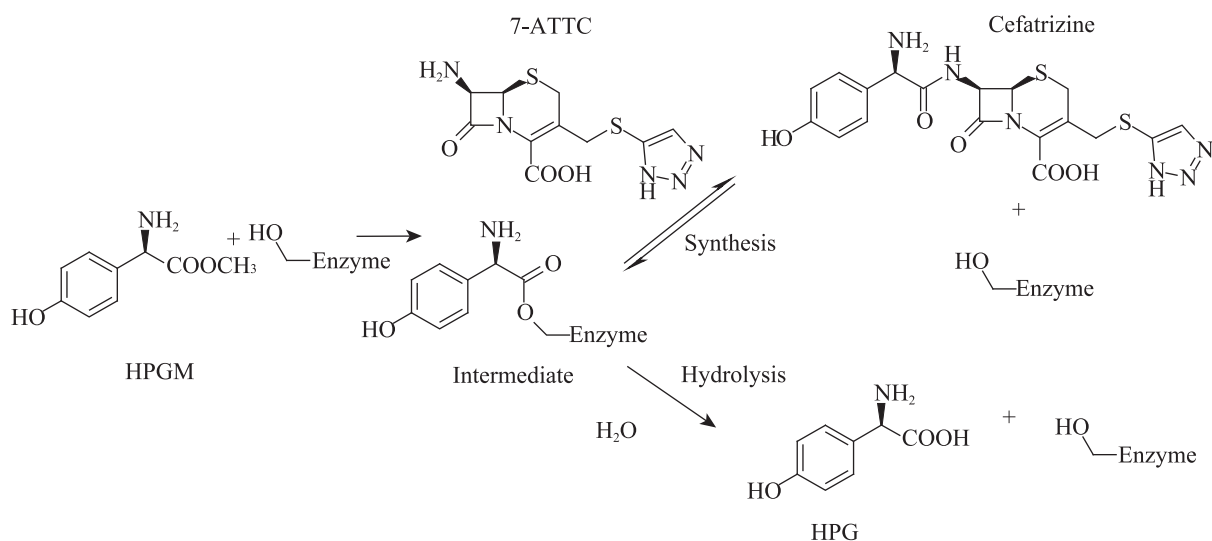


图1 AEH催化的头孢曲嗪的合成

Fig. 1 Synthesis of cefatrizine by AEH.

与热力学合成不同,动力学控制最终的转化率不是由平衡状态决定,而是由3个反应的速率共同决定<sup>[14]</sup>。动力学控制的反应其特点是存在暂时的最大转化率<sup>[15]</sup>。由于产物浓度不再受反应平衡的限制,对于高转化率意味着低成本的制药工业来说,动力学无疑是比热力学更好的策略。本文从AEH的异源表达开始,采用纯化的重组酶催化合成头孢曲嗪,以动力学控制策略考察了特定条件下头孢曲嗪的转化率。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株与质粒

红纹黄单胞菌 *Xanthomonas rubrilineans* CICC 140817 由中国医药集团四川抗菌素工业研究所保藏; *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京天根生化公司。克隆载体 pGEM-T、表达载体 pET28 分别为 Promega 公司和 Invitrogen 公司产品。

### 1.2 引物与试剂

引物合成与测序由上海 Invitrogen 公司完成。用于克隆的聚合酶为上海生工生物工程公司 *Pfu* 聚合酶,限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 购自 Fermentas 公司,质粒小量提取采用 Bio-Tek 公司的 OMEGA 试剂盒。BCA 蛋白含量测定试剂盒为 Pierce 公司产品。亲和层析柱 (FF crude, 5 mL) 购自 GE Healthcare 公司。超滤离心管 (Amicon, Ultra-15, 50 kDa) 为 Millipore 公司产品。Sephadex G-200 购自 Pharmacia 公司。

头孢氨苄标准品购自石家庄华北制药集团。7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA)、苯甘氨酸甲酯盐酸盐 (PGM·HCl)、对羟基苯甘氨酸甲酯

盐酸盐 (HPGM·HCl) 为上海邦成化工有限公司产品,7-氨基-3-(1,2,3-三唑-4-硫基) 甲基头孢烷酸 (7-ATTC) 及头孢曲嗪标准品由四川抗菌素工业研究所化学部提供 (纯度 $\geq 98\%$ )。其他试剂为进口或国产分析纯。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 *aeh* 基因的克隆及转化大肠杆菌

采用 PCR 扩增方法从红纹黄单胞菌 *X. rubrilineans* CICC 140817 的全基因组中分离 *aeh* 基因。引物序列如下: 正向: 5'-CGGAATTCA TGCGCCGCATCGCTCCCTGCCTGC-3', 反向: 5'-CCGCTCGAGTCAATGTACCGGCAGCTGAT GAAAC-3' (下划线为限制性酶切位点)。PCR 反应体系: 基因组 DNA 约 100 ng, 引物 10 pmol/L, dNTPs 200 pmol/L, 1 $\times$ PCR 缓冲液, *Taq* 酶 1.5 U, ddH<sub>2</sub>O 补足总体系至 25  $\mu$ L。梯度 PCR 反应程序如下: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 98  $^{\circ}$ C 30 s, 50~58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 20 个循环; 72  $^{\circ}$ C, 10 min。将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体中, 测序验证后, 再将 pGEM-T-*aeh* 和 pET28 载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后回收, 相连并转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3)。

#### 1.3.2 重组 AEH 的酶活测定

以头孢氨苄合成活性跟踪 AEH 的纯化过程。头孢氨苄合成活性测定方法如下: 30 mmol/L 7-ADCA、15 mmol/L PGM·HCl 溶于 50 mmol/L pH 6.2 的磷酸钠缓冲液, 酶的加量为 50  $\mu$ L 酶溶液/(mL 反应混和物), 30  $^{\circ}$ C 下温育 30 min。1 min 生成 1  $\mu$ mol 头孢氨苄所需的酶量定义为 1 个活力单位 (1 U)。HPLC 法测定反应生成头孢氨苄的量<sup>[16]</sup>。

### 1.3.3 重组 AEH 的表达及分离纯化

在 10 L 发酵罐中培养重组大肠杆菌。培养液装量 6 L, 培养液组成: 乳糖 1 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, 卡那霉素 30 mg/L, 聚醚消泡剂 1 mL/L。接种量 1%。发酵条件: 温度 25 °C; 通气量 9 L/min; 搅拌转速 250 r/min。发酵周期 24 h。

发酵结束后, 冷冻离心机 5 000×g 离心收集菌体。参考 Sambrook 的方法<sup>[17]</sup>制备无细胞提取物。表达的蛋白 N-端带有 6×His 标签, 选择亲和层析纯化无细胞提取物。6 个柱体积的结合缓冲液 (20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L NaCl, pH 7.8) 洗柱后, 以 5 mL/min 流速上样。依次用洗涤缓冲液 (10 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L NaCl, pH 7.8)、洗脱缓冲液 (50 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L NaCl, pH 7.8) 洗柱, 分布收集洗脱液。最后用含有更高浓度咪唑的缓冲液洗柱 (200 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L NaCl, pH 7.8)。经过 SDS-PAGE 分析, 合并目标蛋白纯度较高的收集管, 超滤离心管去除小分子盐并浓缩酶溶液。

分离纯化每一步获得的酶液按 1.3.2 项下测量酶活。Pierce BCA 蛋白含量测定试剂盒测定蛋白含量。

### 1.3.4 重组 AEH 亚基分子量的测定

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定亚基分子量。SDS-PAGE 分析条件: 10%分离胶, 5%浓缩胶, 上样量 15 μL。采用 Bio-Rad 公司 Powerpac Basic 电泳系统, 分子量标准为 Fermentas PageRuler Prestained Protein Ladder, 考马斯亮蓝染色。

### 1.3.5 重组 AEH 合成头孢曲嗪最适反应 pH 与最适反应温度的确定

采用不同 pH 值的缓冲体系, 分别测定重组 AEH 合成头孢曲嗪的反应初速度, 确定重组 AEH 催化头孢曲嗪合成的最适 pH 值。30 mmol/L 7-ATTC、15 mmol/L HPGM·HCl 溶于 50 mmol/L 不同 pH 的缓冲液。pH 5.5~6.0, 采用 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液; pH 6.5~7.5, 采用 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液。酶加量为 50 μL 酶溶液/(mL 反应混和物), 30 °C 下温育 30 min。测定生成的头孢曲嗪的量。

在最适 pH 条件下, 测定不同温度下重组 AEH 催化头孢曲嗪合成的反应过程。30 mmol/L 7-ATTC、15 mmol/L HPGM·HCl 溶于 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液 (pH 6.0), 酶加量为 50 μL 酶溶液/(mL 反应混和物), 分别在 28 °C、32 °C、36 °C、40 °C 下温育 180 min, 测定生成的头孢曲嗪的量。

### 1.3.6 两底物最佳摩尔比的确定

底物溶液配置: 以初始反应体积 100 mL 计算所需 2 种底物的量。0.3 mol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 溶解 0.94 g 7-ATTC (30 mmol/L), 缓慢滴加少量 1 mol/L NaOH 帮助溶解, pH 计监控溶解过程 pH 不超过 8.0。缓慢加入 HPGM·HCl, 搅拌溶解, 0.3 mol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 6.2) 定容至 96 mL (加入酶溶液后初始反应体系约为 100 mL)。用 1 mol/L NaOH 调整 pH 至 6.0。

催化反应: 向底物混合物中加入酶液开启反应, 酶加量为 22 U/(mL 反应体系)。酶反应在 36 °C, pH 为 (6.0±0.1) 的条件下进行, 以 pH 自动控制器控制 pH 并自动流加 1 mol/L NaOH, 记录所加 NaOH 的体积, 用于计算即时反应体积。取

样初始反应混和物, HPLC 测定 2 种底物的初始浓度。反应过程中间隔取样, HPLC 分析反应体系中各组分浓度。

### 1.3.7 HPLC 检测条件

去离子水稀释反应体系中取出的样品, 使浓度介于各组分标准曲线线性范围内。10 000 $\times$ g 离心后, HPLC 分析上清液。分析柱: Ultimate XB-18 (200 mm $\times$ 46 mm, 5  $\mu$ m)。流动相: A 相: MeOH; B 相: 50 mmol/L 磷酸铵缓冲液 (pH 2.1), A : B = 15 : 85 (V/V)。B 相配置方法: 3 mL 85% 磷酸溶于 950 mL 去离子水, 25% 氨水溶液调整 pH 至 2.1, 去离子水定容至 1 L 后混匀备用。流速: 1 mL/min, 柱温箱: 35  $^{\circ}$ C。检测波长: 230 nm。

## 2 结果

### 2.1 重组 AEH 的克隆、纯化与鉴定

PCR 扩增得到与预期大小一致的条带 (约 2 kb)。经回收测序分析, 确定为 *aeH* 基因, 提交 GenBank 获得登录号 JF744990。

亲和层析步骤中, 含 50 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液可以将绝大部分 AEH 洗脱下来。经过超滤离心浓缩后的酶溶液经 SDS-PAGE 分析, 重组蛋白单亚基的分子量约为 72 kDa, 与报道的

*X. rubrilineans* AEH 的单亚基分子量一致<sup>[18]</sup> (图 2)。

大肠杆菌 BL21(DE3) 表达的重组 AEH 大约占无细胞提取物中总蛋白的 1%。经过 3 个步骤的提取, 从 1 L 大肠杆菌的发酵液中获得约 1.7 mg 纯度为 90% 的 AEH (表 1)。

### 2.2 重组 AEH 催化合成头孢曲嗪最适 pH 和温度

分离自 *X. rubrilineans* 的 AEH 其稳定 pH 范围介于 5.0~8.0<sup>[19]</sup>。因此将重组 AEH 催化头孢曲

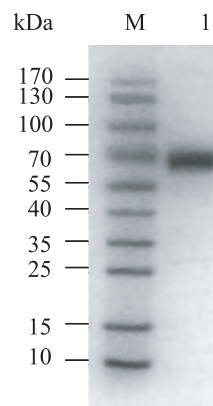


图 2 经纯化的重组 AEH 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE of purified recombinant AEH. M: protein marker; 1: sample of recombinant AEH after affinity chromatography.

表 1 大肠杆菌 BL21(DE3) 中的重组 AEH 的纯化

Table 1 Purification of recombinant AEH from *E. coli* BL21(DE3)

Purification steps	Total volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (U <sup>a</sup> )	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Activity recovery (%)
Cell free extract	250.0	265.0	2173.0	8.2	1.0	100.0
Affinity chromatography	18.0	2.3	1412.0	615.0	75.0	65.0
Ultra centrifugal filtration	2.0	1.7	1257.0	730.0	89.0	58.0

Data in the table was calculated based on 1 L of recombinant *E. coli* BL21(DE3) fermentation broth.  
a: Cephalixin synthesis activity.

嗪合成的 pH 考察范围定在 5.5~7.5。如图 3 所示, pH 6.0 的缓冲体系中重组 AEH 催化头孢曲嗪合成的初速度最高。

考虑到底物溶解度<sup>[20]</sup>和酶的温度稳定性<sup>[21]</sup>, 将合成反应温度的考察范围定在 28 °C~40 °C 之间。在 pH 为 (6.0±0.1) 的条件下, 不同温度下重组 AEH 合成头孢曲嗪的反应过程如图 4 所示, 最适温度下生成的头孢曲嗪的量标准化为 100%。反应初速度随温度升高而增加, 温度越高, 达到最高反应转化率的时间越短。以反应转化率为指标, 重组 AEH 头孢曲嗪合成的最佳温度为 36 °C。反应温度的选择需要综合考虑几个方面的因素, 温度不仅影响酶催化的速度, 也会影响反应各组份溶解性及反应产物的稳定性。相对较低的温度可以增加酶及产物稳定性, 但是达到最高转化率的时间可能延长而导致工业化之后的时间成本增加。

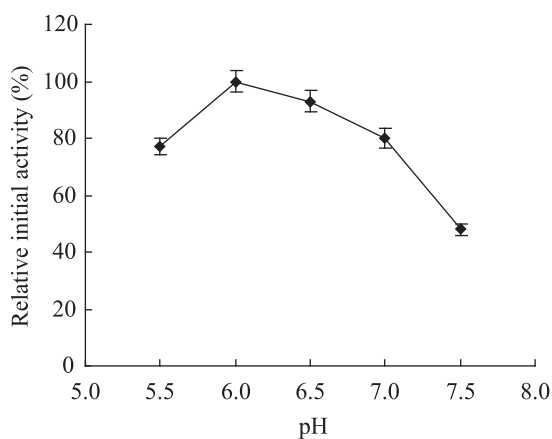


图 3 pH 对 AEH 合成头孢曲嗪初速度的影响

Fig. 3 Effect of pH on initial activity of AEH toward cefatrizine synthesis. The initial activity under optimal pH was standardized to 100%. All synthesis experiments were performed in triplicate by purified enzyme.

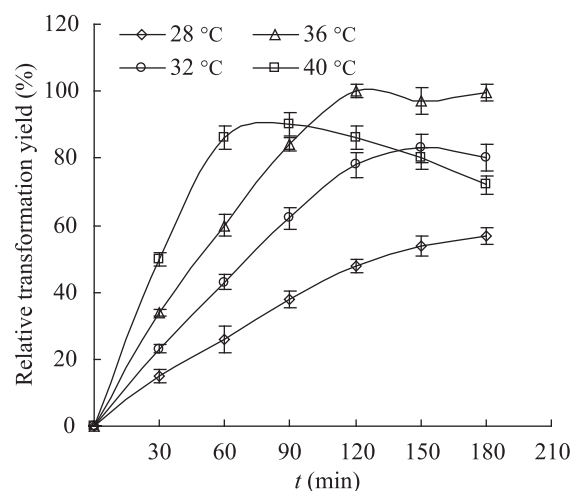


图 4 温度对 AEH 合成头孢曲嗪初速度的影响

Fig. 4 Effect of temperature on initial activity of AEH toward cefatrizine synthesis. The initial activity under optimal temperature was standardized to 100%. All synthesis experiments were performed in triplicate by purified enzyme.

### 2.3 两底物不同摩尔比条件下头孢曲嗪的合成

反应温度 36 °C, 反应 pH 为 (6.0±0.1) 的条件下, 当母核 7-ATTC 的浓度约为 30 mmol/L, 侧链 HPGM·HCl 与母核初始摩尔比分别为 2.0、2.9 和 4.1 时, 头孢曲嗪的酶法合成实验结果见表 2。合成转化率  $\eta_{\text{CFTZ}}$  随着摩尔比的增加而增加。

侧链与母核摩尔比为 4.1 的条件下, 整个反应过程中底物的减少以及产物的增加见图 5。转化率在 150 min 到达峰值, 后续 90 min 内, 头孢曲嗪的浓度基本不变。从工业角度看该现象非常有利, 有足够的时间终止酶催化反应以及进行下游过程处理, 不必担心产物的水解。合成转化率最高处, HPGM 大约剩余 40%, 此后的 HPGM 没有用于合成头孢曲嗪, 而是缓慢水解为 HPG。

图 5 也显示了相对于母核和侧链浓度的物质平衡情况。整个催化反应过程中, 含 HPG 化合

表 2 重组 AEH 催化 7-ATTC 和 HPGM 合成头孢曲嗪

Table 2 Enzymatic synthesis of cefatrizine from 7-ATTC and HPGM by AEH

Experiment No.	Initial conditions of reaction mixture				
	$V_0$ (mL)	$C_{0\text{Enz}}$ (U/mL)	$C_{0\text{7-ATTC}}$ (mmol/L)	$C_{0\text{HPGM}}$ (mmol/L)	$R_0$ (mmol/L)/(mmol/L)
1	103.0	22.0	29.1	58.4	2.0
2	99.0	22.0	31.0	90.7	2.9
3	102.0	22.0	29.3	120.1	4.1
Experiment No.	Results at the moment of maximum of cefatrizine				
	$V_{\text{max}}$ (mL)	$C_{\text{max CFTZ}}$ (mmol/L)	$\eta_{\text{CFTZ}}$ (%)	Bal. rg nuclei (%)	Bal. rg HPGM (%)
1	107	13.3	47.5	—	—
2	102	17.5	58.3	—	—
3	106	18.1	64.3	89.9	100.1

Note: —: not calculated;  $R_0$ : initial ratio of two substrates molar.  $\eta_{\text{CFTZ}}$ : transformation of cefatrizine regard to 7-ATTC; Bal. rg nuclei: balance regard to nuclei = (Mass of 7-ATTC and cefatrizine)/Mass of initial 7-ATTC; Bal. rg HPGM: balance regard to HPGM = (Mass of HPGM, HPG and cefatrizine)/Mass of initial HPGM.

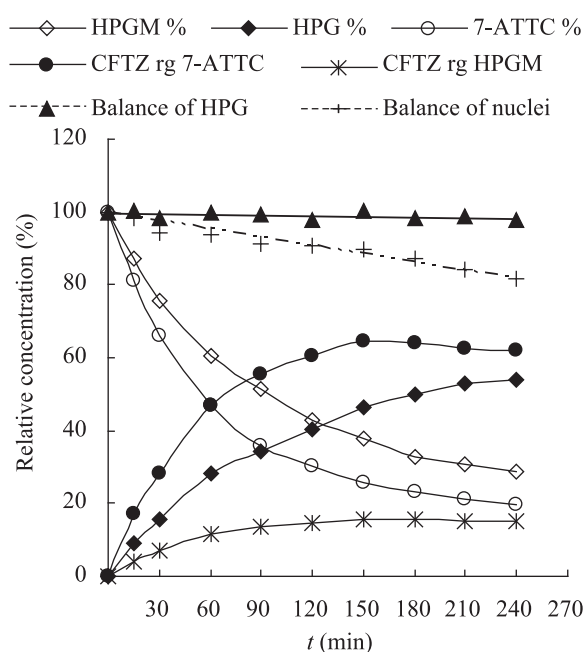


图 5 AEH 催化的头孢曲嗪合成动态过程

Fig. 5 Dynamics of cefatrizine synthesis by AEH. Initial masses of 7-ATTC and HPGM were standardized to 100%.

物 (HPG+HPGM+头孢曲嗪) 的物质平衡非常好, 介于 97%~101% 之间, 含母核化合物 (7-ATTC+头孢曲嗪) 的物质平衡随着反应的进行逐渐下降, 在最高转化率处, 即 150 min 时为 89.9%, 至反应终止时为 81.7%。

### 3 讨论

由于实验是产业化工艺的前期研究, 为了保障工艺规模放大后的重现性, 每一次头孢曲嗪酶法合成实验都采用 HPLC 精确测定底物初始浓度, 避免了通过称量和定容引起的误差。反应过程定量调节 pH 导致的反应体积增加, 保证对最高转化率时间点处各组分的精确定量。

母核物质平衡在整个反应过程中呈现逐步下降的趋势, 可能与母核 7-ATTC 的某种副反应有关。在所有反应混合物样品的 HPLC 图谱中出现了与 4 个标准品不一致的 2 个未知的峰 (结果

未显示)。可以确定的是该副反应与酶相关, 因为以缓冲液代替酶液的反应空白对照并没出现未知峰, 具体是何物质有待进行收集和解析, 以探索排除该副反应的可能性。

虽然形成头孢曲嗪需要的酰基受体 (母核 7-ATTC) 和供体 (HPGM) 的摩尔比相等, 由于 HPGM 存在水解副反应, HPGM 的过量可以提高产物转化率。这也是通过动力学控制使反应向合成方向进行的体现。头孢氨苄、头孢唑啉和头孢克洛也有采用该策略的报道<sup>[22]</sup>。虽然侧链成本低于母核, 但显然无限制升高侧链浓度并不是提高转化率的明智选择。因此实验选择的摩尔比范围介于 2 : 1~4 : 1。下一步将在此基础上尝试添加有机溶剂抑制水解或采用产物络合的方法提高合成转化率。

通过本实验一方面实现了 AEH 的异源表达, 为降低酶的生产成本提供了可能; 另一方面, 确定了反应体系中各成分的 HPLC 分析方法和物质质量衡算方法。不过, 头孢曲嗪 64.3% 的转化率距离实现产业化还有很长的路要走, 可以选择很多策略来改善转化率, 比如: 通过分子改造<sup>[23]</sup>或酶制剂形式<sup>[24]</sup>提高催化合成头孢曲嗪的效率, 或通过改变反应体系使反应平衡倾向合成反应<sup>[25]</sup>等等。

## REFERENCES

- [1] Essack SY. The development of  $\beta$ -lactam antibiotics in response to the evolution of  $\beta$ -lactamases. *Pharm Res*, 2001, 18(10): 1391–1399.
- [2] Fung-Tomc JC, Huczko E, Stickle T, et al. Antibacterial activities of cefprozil compared with those of 13 oral cepheims and 3 macrolides. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(2): 533–538.
- [3] Woodley JM. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(6): 321–327.
- [4] Bruggink A, Roy PD. Industrial synthesis of semi-synthetic antibiotics//Bruggink A. *Synthesis of  $\beta$ -lactam Antibiotics, Chemistry, Biocatalysis and Process Integration*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001: 13–56.
- [5] Volpato G, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Use of enzymes in the production of semi-synthetic penicillins and cephalosporins: drawbacks and perspectives. *Curr Med Chem*, 2010, 17(32): 3855–3873.
- [6] Valencia P, Flores S, Wilson L, et al. Batch reactor performance for the enzymatic synthesis of cephalexin: influence of catalyst enzyme loading and particle size. *New Biotechnol*, 2012, 29(2): 218–226.
- [7] Sheldon RA. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 92(3): 467–477.
- [8] Bahamondes C, Wilson L, Aguirre C, et al. Comparative study of the enzymatic synthesis of cephalexin at high substrate concentration in aqueous and organic media using statistical model. *Biotechnol Bioproc E*, 2012, 17(4): 711–721.
- [9] Takahashi T, Yamazaki Y, Kato K, et al. Enzymic synthesis of cephalosporins. *J Am Chem Soc*, 1972, 94(11): 4035–4037.
- [10] Blum JK, Bommarius AS. Amino ester hydrolase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ATTC 33913 for enzymatic synthesis of ampicillin. *J Mol Catal B Enzym*, 2012, 67(1/2): 21–28.
- [11] Barends TRM, Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, et al. The sequence and crystal structure of the  $\alpha$ -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of  $\beta$ -lactam antibiotic acylases. *J Biol Chem*, 2003, 278(25): 23076–23084.



- [12] Schroën CGPH, Nierstrasz VA, Kroon PJ, et al. Thermodynamically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties. *Enzyme Microb Tech*, 1999, 24(8/9): 489–506.
- [13] Schroën CGPH, Nierstrasz VA, Moody HM, et al. Modeling of the enzymatic kinetic synthesis of cephalexin-influence of substrate concentration and temperature. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 73(3): 171–178.
- [14] Diender MB, Straathof AJJ, Heijnen JJ. Predicting enzyme catalyzed reaction equilibria in cosolvent-water mixtures as a function of pH and solvent composition. *Biocatal Biotransform*, 1998, 16(4): 275–289.
- [15] Polderman-Tijmes JJ. Biochemical characterization of  $\alpha$ -amino acid ester hydrolases[D]. Groningen: University of Groningen, 2004.
- [16] Xia DN, Xia YJ, Yin J, et al. Simultaneous determination of cefalexin and trimethoprim in plasma by HPLC. *Chin J Antibiot*, 2008, 33(11): 682–684, 700 (in Chinese).  
夏登宁, 夏艳姣, 尹佳, 等. HPLC 同时测定血浆中头孢氨苄和甲氧苄啶的浓度. *中国抗生素杂志*, 2008, 33(11): 682–684, 700.
- [17] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 1252 (in Chinese).  
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. *分子克隆实验指南*. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1252.
- [18] Krest'ianova IN, Uvarov NN, Rudenskaia GN, et al. Intracellular aminopeptidase from *Xanthomonas rubrilineans*, hydrolyzing  $\alpha$ -amino acid esters and cefalexin. *Biokhimiia*, 1990, 55(12): 2226–2238.
- [19] Qu F, Yi BX, Ye LJ. Purification and characterization of  $\alpha$ -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas rubrilineans*. *Acta Microbiol Sin*, 2012, 52(5): 620–628 (in Chinese).  
屈凤, 易八贤, 叶丽娟. 红纹黄单胞菌 $\alpha$ -氨基酸酯水解酶的分离纯化及酶学性质. *微生物学报*, 2012, 52(5): 620–628.
- [20] Kurochkina VB, Sklyarenko AV, Satarov JE, et al. Ionization constants and solubility of compounds involved in enzymatic synthesis of aminopenicillins and aminocephalosporins. *Bioproc Biosyst Eng*, 2011, 34(9): 1103–1117.
- [21] Bluma JK, Ricketts MD, Bommarius AS. Improved thermostability of AEH by combining B-FIT analysis and structure-guided consensus method. *J Biotechnol*, 2012, 160(3/4): 214–221.
- [22] Nys PS, Kurochkina VB. Methodological approach to development of enzymatic technologies for semisynthetic betalactam antibiotic production. *Appl Biochem Biotech*, 2000, 88(1/3): 221–229.
- [23] Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, et al. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 2012, 485(7397): 185–194.
- [24] Cecchini DA, Pavesi R, Sanna S, et al. Efficient biocatalyst for large-scale synthesis of cephalosporins, obtained by combining immobilization and site-directed mutagenesis of penicillin acylase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(6): 1491–1500.
- [25] Feng SX, Liang SZ, Lou WY. Two-step, one-pot enzymatic synthesis of cefprozil from *p*-phenylacetamido-3-propenyl-cephalosporanic acid (GPRA). *Biocatal Biotransform*, 2008, 26(4): 321–326.

(本文责编 陈宏宇)