

## 提高三角酵母细胞 DAO 表现活力的透性化研究

朱彤波 陈 军 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** 三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)的 D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAO, EC1.4.3.3)是一种胞内酶,完整细胞并不呈现酶促活性。为了获得三角酵母细胞的较高表现活力,需对细胞进行处理以改变壁和膜对反应底物和产物的通透性。研究中比较了冻融、丙酮、丁醇和十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)等理化因子的透性化效率,并对丙酮的透性化条件进行了优化。证明丙酮的透性化作用与溶剂浓度、保温时间和温度有关。30%~35%丙酮浓度,4~28℃保温,可得到最大酶活力。透性化所需时间极短,在5min内即可完成。同时,透性化细胞中的 DAO 比无细胞抽提液中的酶对热更为稳定。用丙酮透性化细胞作为生物催化剂可有效地转化头孢菌素(Cephalosporin C, CPC)为戊二酰-7-ACA(Glutaryl-7-ACA, GL-7ACA)。

**关键词** 三角酵母(*Trigonopsis variabilis*) D-氨基酸氧化酶 透性化 生物转化

**中图分类号** Q781 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)01-0073-05

由三角酵母产生的 D-氨基酸氧化酶(DAO, EC1.4.3.3)是一种胞内黄素蛋白酶。作为重要的工业用酶之一,DAO 具有使 D-氨基酸氧化生成酮酸并释出 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NH<sub>3</sub> 的催化特性,因此,在外消旋混合氨基酸的拆分<sup>[1]</sup>、 $\alpha$ -酮酸生产<sup>[2]</sup>以及两步酶法转化头孢菌素(CPC)以制备 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)<sup>[3~5]</sup>等方面都有着重要用途。

虽然,以固定化酶作为催化剂在实际应用中较为方便,但是酶的固定化涉及细胞裂解、离心、纯化、载体活化和固定化等多个步骤,每步均伴随不同程度的酶活丢失。据估计,制备 1 个单位固定化酶所需成本约比游离细胞高 10 倍。从经济上考虑,已有不少固定化细胞用于工业生产,或在错流过滤反应器(Cross-flow filter reactor)中,用完整细胞进行生物转化反应的例子<sup>[6~8]</sup>。本实验室在进行 7-ACA 酶法生产的国家生物技术攻关研究中,发现不论以三角酵母的游离细胞还是固定化细胞作为生物催化剂,均面临细胞膜/壁对底物和反应产物的通透屏障问题。因此,对细胞进行预处理以增加膜/壁通透性是一个必不可少的步骤。本文报道了增加三角酵母细胞 DAO 表现活力的几种细胞透性化方法,透性化对 DAO 酶热稳定性的影响以及透性化细胞对

CPC 的酶促转化作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种**:多倍体三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)FA10 为本实验室李维泉构建<sup>[9]</sup>。

**1.1.2 化学试剂**:CPC 和 GL-7ACA 由浙江海正药业股份有限公司提供,其余均为 Sigma 公司产品或国产分析纯试剂。

**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, DL-甲硫氨酸 2.67g。培养温度为 28℃。

#### 1.2 方法

**1.2.1 透性化**:采用下述处理方法增加三角酵母细胞的 DAO 表现酶活

(1)冻融:离心所得 1g 湿细胞(wet cell, w. c.)于 -20℃ 冷冻过夜。室温解冻,用 10mL 0.05mol/L 焦磷酸缓冲液(pH8.5)重悬。

(2)十六烷基三甲基溴化铵(CTAB):1g 湿菌体悬浮于 10mL 含 0.6% CTAB 的 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2)中,25℃ 保温 30min。处理后用生理

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)资助。

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

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

盐水洗涤 2 次。

(3) 丁醇和丙酮的溶剂处理: 1g 湿细胞悬浮于 10mL 含适当浓度有机溶剂的 0.05mol/L 焦磷酸缓冲液 (pH8.5) 中, 于不同温度下处理一定时间。处理后菌体用生理盐水洗涤 2 次。

**1.2.2 高压匀浆破碎细胞** 60g 湿菌体用 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.5) 稀释至 100mL, 冰浴混匀, 通过 FRENCH 高压匀浆器循环处理 6 次, 工作压力为 17Kpsi。所得酶液于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.3 DAO 活力的测定** 三角酵母细胞的 DAO 活力测定按 Ashwin D 等报道的方法<sup>[10]</sup>进行, 测定前细胞经冻融处理, 处理方法见 1.2.1 节。

**1.2.4 三角酵母细胞酶促转化 CPC 生成 GL-7ACA 的反应** 将含 20u DAO 的三角酵母细胞与 30g/L CPC-Na 溶液混合, 于  $28^{\circ}\text{C}$  水浴 200r/min 振荡条件下进行转化反应, 以 5% 氨水维持反应液 pH7.0 并添加适量  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。转化反应所需时间约为 90min。

**1.2.5 HPLC 检测** 使用 Beckman Gold System HPLC 填料直径  $5\mu$  柱容  $4.6\text{mm}\times 25\text{cm}$  的 Ultrasphere ODS 反相色谱柱, 流速  $1\text{mL}/\text{min}$ , 压力  $1.7\sim 2.2\text{Kpsi}$ , 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。

**1.2.6 电镜观察** 使用 2.5% 的戊二醛 + 1% 甲醛溶液初固定细胞过夜, 次日以 pH7.2 ~ 7.4, 0.15mol/L 的磷酸缓冲液洗脱, 然后用 1% 锇酸对细胞进行第二次固定。2h 后用清水洗涤细胞, 每次 15min 共洗 3 次。然后使用系列浓度的乙醇溶液脱水, 100% 环氧丙烷置换, 并用环氧树脂阶梯渗透细胞, 于  $60^{\circ}\text{C}$  固定 48h。再用 LKB III 型超薄切片机对细胞切片, 以醋酸双氧铀, 柠檬酸铅双重染色后, 用 JEOL 100CX II 透射电镜观察细胞结构并拍照。

## 2 结果和讨论

### 2.1 三角酵母生长与产酶

$-70^{\circ}\text{C}$  甘油管保藏菌种在斜面上活化后, 用接种环挑取菌苔接入装有 20mL 培养液的 250mL 三角瓶, 于 250r/min 旋转摇床上培养 24h。再以 5% 的接种量移种到含 80mL 同样新鲜培养液的 500mL 三角瓶中,  $28^{\circ}\text{C}$  250r/min 振荡培养。每 4h 取样一次, 测定光密度 ( $OD_{600\text{nm}}$ ) 和 DAO 活力, 相对于时间作图 (见图 1)。

图 1 显示发酵开始的 12h, 细胞生长量呈对数生长, 随后趋于平缓。在第 20~24h 进入静止期。DAO

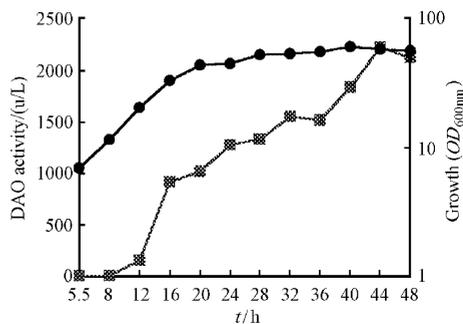


图 1 三角酵母细胞的生长及产 DAO 酶曲线

Fig. 1 Time Course of The growth and DAO yield of

*T. variabilis* FA10

—■— DAO Activity —●—  $OD_{600\text{nm}}$

的合成相对滞后, 从 12h 以后活力明显上升, 至 44h 达到峰值。延长生长期, 产酶有下降趋势。因此, 均在这一时间离心收集细胞以供实验之用。

### 2.2 几种细胞透性化方法比较

由于 DAO 是一个胞内酶, 不论对细胞的酶活测定还是采用完整细胞进行生物转化反应, 均需克服三角酵母细胞壁和细胞膜对底物的通透屏障。使之受到一定程度损伤而不破坏细胞完整性 (Integrity) 的理化处理通常被称作细胞的透性化。表 1 列出了对细胞进行透性化处理的物理化学方法, 以及不同方法进行透性化处理的效果, 其中, 使用丙酮、丁醇和 CTAB 的处理均在  $20^{\circ}\text{C}$  进行, 处理时间固定为 30min。

表 1 不同透性化处理对三角酵母表现酶活的影响

Table 1 DAO activity in *T. variabilis* FA10 after various permeabilization treatment

Treatment	DAO activity (u/g <sup>**</sup> )	Relative activity / %
Suspension of disrupted cells <sup>*</sup>	57.8	100
$-20^{\circ}\text{C}$ freezing & thawing	55.0	95.1
5% butanol	48.5	83.9
30% acetone	51.6	89.2
0.4% CTAB	53.6	92.7
Control cells	5.6	9.8

<sup>\*</sup> Six passages at  $4^{\circ}\text{C}$  through FRENCH pressure and cell press at 17Kpsi.

<sup>\*\*</sup> Wet cell

由表 1 结果可知, 机械力 (冻融)、溶剂 (丙酮、丁醇) 及表面活性剂 (CTAB) 均可使完整细胞的 DAO 表现活力达到全部酶活力 (以压榨匀浆法释放出的细胞抽提液中的 DAO 酶活作 100% 对照) 的 83.9% ~ 95.1%。

### 2.3 丙酮透性化条件的优化

考虑到工业规模的易操作性, 下游处理的生产

成本,丙酮是比较理想的透性化试剂,为此,对所采用的丙酮浓度、处理温度以及溶剂与细胞的接触时间等参数进行了试验,以确定丙酮处理三角酵母细胞的最佳透性化条件。

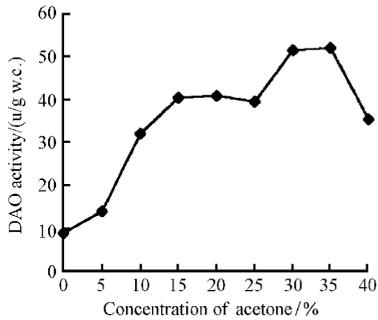


图2 丙酮浓度对三角酵母 DAO 表观酶活的影响

Fig.2 Effect of acetone concentration in permeabilization on DAO activity of *T. variabilis* cells

图2结果表明,细胞的DAO表观活力随着丙酮浓度的上升而增加,在本实验条件下,丙酮的关键浓度为30%~35%,此时,表观酶活达到最大值。进一步提高丙酮浓度,DAO活力呈下降趋势。

在对透性化所需时间的研究中,使处理温度为4℃,丙酮浓度为30%,观察不同保温时间对透性化的影响。从透性化的时间进程曲线(图3)可以看出,只需较短的细胞与溶剂接触时间即可获得较好的透性化效果。5min的处理时间已能使DAO的表观活力提高至最高酶活的90%,在5~50min之间,透性化水平基本维持恒定或略有升高。

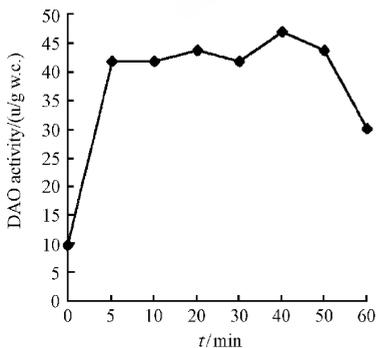


图3 丙酮透性化处理时间对 DAO 表观酶活的影响

Fig.3 Effect of treatment time with acetone in permeabilization on DAO activity of *T. variabilis* cells

在特定的处理时间(30min)和丙酮浓度(30%)条件下,温度对透性化程度有一定影响。在4℃~28℃范围内,提高处理温度有助于透性化的完成。然而,该条件下,37℃保温已属温度偏高,可能细胞受损过度而使酶蛋白泄漏导致细胞DAO活力下降(图4)。

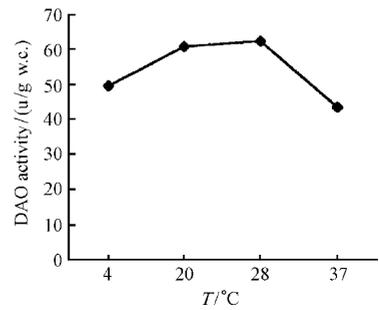


图4 不同温度对丙酮透性化处理的影响

Fig.4 Effect of temperature in permeabilization on DAO activity of *T. variabilis* cells

## 2.4 丙酮对透性化三角酵母细胞中 DAO 热稳定性的影响

本实验对DAO粗酶提取液、三角酵母细胞和透性化细胞分别于23℃、37℃和50℃保温60min后的DAO残留酶活作了比较。使三角酵母细胞先在给定温度下保温,然后再用30%丙酮透性化处理,并测DAO活力,结果表明,23℃和37℃处理时,DAO活力无明显改变,50℃时略有下降,但仍保持85%的活力(图5a)。相比之下,粗酶溶液的DAO活力,随处理温度升高而下跌,50℃处理后,残留活力仅30.8%(图5c)。丙酮透性化细胞的DAO热稳定性处于粗酶提取液和透性化前进行温度处理的样品之间(图5b)。因此,这一实验证明,粗酶液中的DAO在离开了其原来存在的细胞内环境后,对热变得较为敏感。丙酮透性化处理导致细胞壁、细胞膜结构一定程度的受损,DAO的热稳定性略低于完整细胞,但明显高于无细胞提取液。

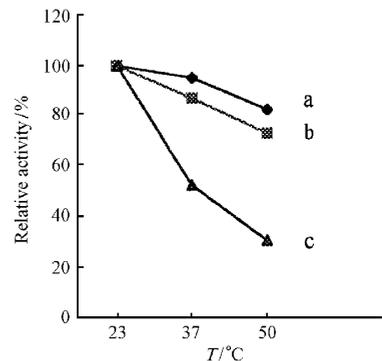


图5 不同条件下的丙酮处理对三角酵母细胞中 DAO 热稳定性的影响

Fig.5 Thermostability of DAO in permeabilized cell suspensions and crude extract of *T. variabilis* FA10 at different temperatures.

DAO activities were determined in cells (a), in permeabilized cells (b) and in crude extract (c). The initial DAO activities of the different

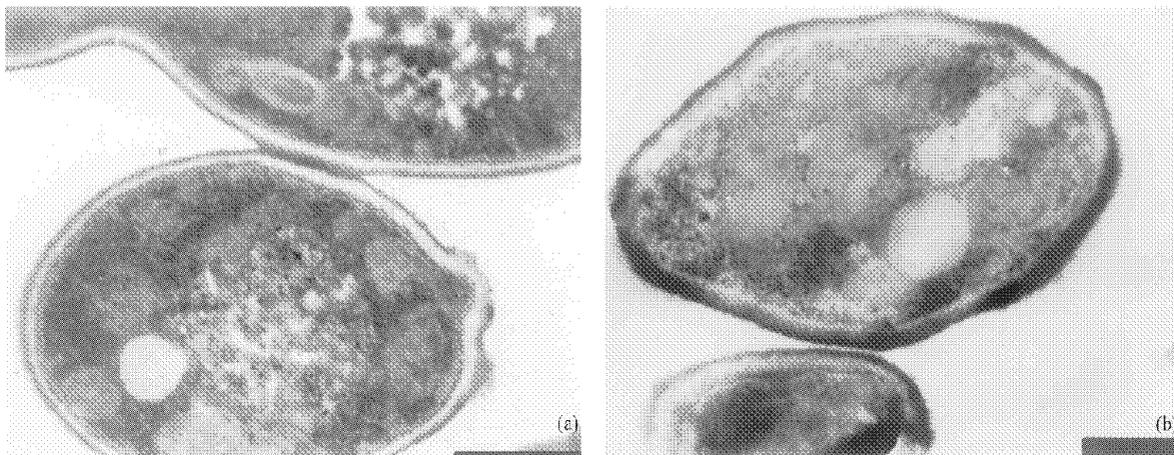


图 6 三角酵母细胞的超薄切片电镜观察(放大倍数:  $\times 12000$ )

Fig. 6 Ultrathin sections of yeast *Trigonopsis variabilis* cells ( $\times 12000$ )

(a) Control cells; (b) Cells permeabilized with 30% acetone

## 2.5 透性化细胞的形态变化

为了检查透性化处理对细胞形态结构的影响,实验以丙酮处理的透性化三角酵母细胞与未处理对照细胞按 1.2.6 节方法分别进行了超薄切片和透射电镜观察。从图 6 结果可看出,30% 丙酮 20℃ 处理 30min 的透性化细胞,细胞壁和细胞膜发生了轻微的变化,特别是膜的边缘变得略为模糊透明,不似对照细胞那样清晰坚实,壁和膜之间的间隙变大。然而,尽管细胞经丙酮透性化处理后,超微结构发生了某些变化,但并没有引起细胞的明显破坏或解体而仍保持完整。

**2.6 透性化三角酵母细胞对 CPC 的生物转化:**按 1.2.4 节方法,用经透性化处理的三角酵母细胞进行 CPC 生物转化实验。图 7 是转化结束后反应液的 HPLC 检测图。定量检测结果证明,反应液中残留的 CPC 量已低于 0.4%,而产物 GL-7ACA 的生成量达 83%。可见经透性化处理的三角酵母细胞可以顺利催化 CPC 为 GL-7ACA 反应的完成。



图 7 透性化细胞转化 CPC 生成 GL-7ACA 反应的 HPLC 检测图

Fig. 7 HPLC chromatogram of GL-7ACA produced enzymatically from CPC using permeabilized *T. variabilis* FA10 cells

## 3 讨 论

D-氨基酸氧化酶是两步酶法制备 7-氨基头孢

烷酸的重要工业用酶之一,用三角酵母整细胞对 CPC 进行转化,具有操作简单,成本低廉的优点,有很好的实用价值。

由于 DAO 是一种胞内酶,难于从发酵得到的三角酵母细胞直接检测到 DAO 活力,因此,克服细胞膜/壁的通透屏障的透性化处理是将细胞用作生物催化剂的必要步骤。用丙酮对三角酵母细胞的透性化处理结果说明溶剂浓度、保温时间和温度三者之间存在紧密相关性,通过对上述三因子的适当调配即可获得最佳透性化效果。另一方面,透性化三角酵母细胞,不仅可以顺利转化 CPC 生成 GL-7ACA,而且,固定化的丙酮处理细胞可在转化反应中循环使用 20 批以上,并保持 80% 转化效率。结果将另行报道。

致 谢 本所郭一松先生帮助进行了细胞的超薄切片和电镜观察工作,特此致谢!

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Tu S, Mc Cormick D B. Insolubilized D-amino acid oxidase: Properties and Potential Use, *Separation Sci*, 1972, **7**(2): 403~408
- [ 2 ] Pilone M S, D'Anguio L, Pollegioni L *et al.* Evaluation of D-amino acid oxidase from *rhodotorula gracilis* for the production of 2-keto acids: a reactor system, *Biotech Bioeng*, 1994, **44**(11): 1288~1294
- [ 3 ] Parmar A, Kumar H, Marwaha 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 ] Golini P, Bianchi D, Battistel E *et al.* Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeast: characterization and application in the deamination of cephalosporin C, *Enzyme Microb*

- [ 5 ] Nikolov A and Danielsson B. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. II. Single step procedure using a co-immobilized enzyme system, *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**( 12 ):1037~1041
- [ 6 ] Conlon HD, Bagai T, Baker K *et al.* Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid, *Biotechnol Bioeng*, 1995, **46**( 6 ):510~513
- [ 7 ] Fernandez-Lafuente R, Rodriguez V, Guisan J M. The coimmobilization of D-aminoacid( D-phenylalanine ) into 2-keto Acid ( phenylpyruvic acid ), *Enzyme Microb Technol*, 1998, **23**( 1 ):28~33
- [ 8 ] 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**( 4 ):281~285
- [ 9 ] LI W ( 李维泉 ) JIAO R ( 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 FD, Nadkarni G B. Coimmobilization of D-aminoacid oxidase and eatalase by entrapment of *trigonopsis variabilis* in radiation polymerized polyacrylamide beads, *J Biosci*, 1987, **11**( 1~4 ):137~144.

## Permeabilization of Yeast *Trigonopsis variabilis* FA10 Cells for Enhancing Apparent Activity of D-amino Acid Oxidase

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

**Abstract** D-amino acid oxidase( DAO) is an intracellular enzyme in *Trigonopsis variabilis* FA10. The whole cells of yeast exhibited very low DAO activity. Various treatment with physical and chemical agents, such as, freezing and thawing, acetone, butanol and cetyltrimethylammonium bromide altered membrane permeability and increased cellular DAO activity. It was demonstrated that the performance of acetone was dependent on the concentration of the solvent, the incubation time and the temperature. Maximum enzyme activity of the cells was achieved with 30~35% acetone, between 4°C and 28°C. The process was very quick and permeabilization occurred in 5 minutes or less. On the other hand, the thermostability of DAO in permeabilized cells was higher than in cell extract. It was proved that Cephalosporin C could be effectively converted to glutaryl-7ACA by permeabilized *Trigonopsis variabilis* cells with 83% yield.

**Key words** *Trigonopsis variabilis*, D-amino acid oxidase, Permeabilization, bioconversion

Received: July 31, 2000

The work was supported by Chinese National Programs for Sciences and Technology Department( 95-102-02-01 ) and Shanghai Fundation for Sciences and Technology Departemen( 98-4319135 ).

\* Corresponding author. Tel 86-21-64042090; Fax 86-21-64042385. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>