

Cephalosporin Cからの酵素二段階法による7-ACAの製造

337

(関西大・工, *薬有製薬) ○波多野俊雄, *松田耕二, 川手昭平

1. 目的 Cephalosporin Cより酵素的に二段階で7-aminocephalosporanic acid (7-ACA)を生成する反応に関与するD-amino acid oxidase (DAO), 7-(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid (CB-7-ACA) acylase (CBA)の両酵素の精製及び特性について前回までに報告した^{1,2)}。その後、両酵素についてイオン交換樹脂を担体として固定化を検討した結果、若干の知見が得られたので報告する。

2. 方法 (1) DAO 供試菌株: Gliocladium sp. GK-340。培地: Glucose 40g, 綿実粕 20g, KH_2PO_4 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, D-Glutamic acid 2g/l, pH 5.0。培養: 250rpm, 30°C, 2日間振盪培養。酵素活性測定: D-Glutamic acidを基質とし、生成する α -keto glutaric acidを2,4-DNP法で比色定量。(2) CBA 供試菌株: Alcaligenes sp. CA4887N6 (NTG変異処理株)。培地: Glucose 10g, CH_3COONa 30g, Gluten meal 40g, NaCl 5g, Dry yeast 10g, KH_2PO_4 3g, KCl 0.5g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, pH 7.6。培養: 250rpm, 30°C, 3日間振盪培養。酵素活性測定: 反応生成物である7-ACAをMarrelli法により比色定量。(3) 固定化 DAO, CBA共に抽出, 硫酸塩析, 透析脱塩したものを試料とし、DEAE-Sephadex A-50を担体として吸着固定化。尚、タンパク質の定量は両酵素の場合ともLowryの方法による。

3. 結果 DEAE-Sephadex A-50を担体としてDAO, CBA両酵素を吸着固定化した結果、DAOで72%, CBAで98%の酵素活性回収率で固定化酵素標品が得られ、両酵素とも10数回のくり返し使用に対しても比較的安定であった。至適pH, 至適温度はいずれも変化がなかったが、CBAでpH安定域が1pH単位酸性側にシフトし、温度安定性は両酵素ともに向上した。次いで、調製したDAO, CBAの固定化酵素標品を用いてCephalosporin CからCB-7-ACA, CB-7-ACAから7-ACAの製造をBatch法あるいはColumn法によって行った結果、変換率は60% (DAO-Batch), 51% (CBA-Batch), 60% (CBA-Column) であった。さらに、両固定化酵素標品を混合してBatch法で作用させてCephalosporin Cより7-ACAの製造を行った結果、約30%の変換率が得られた。なお、いずれの生成物もそれぞれCB-7-ACAあるいは7-ACAと同定された。

1) 日本農芸化学会 昭和55年度大会
3B-15

2) 醸酵工学会 昭和57年度大会 110

Table Comparison of properties of oxidase and acylase.

Characteristic	oxidase	acylase
Optimal pH	9.5 (10.0)*	8.0 (8.0)
Optimal temperature	37°C (37°C)	40°C (40°C)
pH stability	7-10 (7-10) (20°C, 30 min)	8-10 (7-9) (20°C, 30 min)
Thermal stability	< 25°C (< 30°C) (pH 8.3, 30 min)	< 30°C (< 35°C) (pH 7.8, 30 min)
pI	4.7	4.4
Substrate specificity	α -amino acids, cephalosporin C	CB-7-ACA, CB-7-ADCA
Km	a) 14.2 mM (18.0 mM) b) 6.2 mM (6.0 mM)	c) 0.27 mM (0.77 mM) d) 0.15 mM (0.67 mM)
Vmax	a) 50.2 (133) b) 100 (440) $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$	c) 2.3 (9.6) d) 1.8 (6.7) $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$
Inhibitor	Benzoate, Maleic acid, Monodacetic acid, etc.	Cu^{2+}
Molecular weight	40,000	53,000

a) α -glutamate, b) cephalosporin C, c) CB-7-ACA, d) CB-7-ADCA.

* Properties of immobilized enzyme.