



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94112285.9

[51]Int.Cl⁵

C12P 35/02

[43]公开日 1995年6月28日

[22]申请日 94.8.27

[71]申请人 中国科学院上海植物生理研究所

地址 200032上海市枫林路300号

[72]发明人 魏中获 杨蕴刘 金志坤 杨勇
毛迎辉 彭惠林 李维泉 焦瑞身

[74]专利代理机构 中国科学院上海专利事务所

代理人 邬震中

C12N 9/06 C12N 1/16

C12N 15/55

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 一步两酶法制造7-氨基头孢烷酸

[57]摘要

本发明是一种一步两酶法从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法。即在一个反应器的水相系统中加入D-氨基酸氧化酶、GL-7ACA酰化酶、双氧水,控制pH7.0—8.5和20—45℃时,在短时间内高生成率地将原料转化为产物。也可通过加入D-氨基酸氧化酶产生菌三角酵母多倍体和GL-7ACA酰化酶工程菌代替上述酶,以及加入过氧化氢酶抑制剂、 β -内酰胺酶抑制剂来实现。本发明方法不仅工艺流程和设备简化、操作简单,而且能快速、高效地获得较高浓度的产物。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法, 包括在水相体系中, 控制pH和温度下, 用D-氨基酸氧化酶转化头孢菌素C为相应的酮酸, 经双氧水脱羧生成GL-7氨基头孢烷酸, 再经GL-7ACA 酰化酶裂解成7-氨基头孢烷酸, 其特征是所述的二种酶同时存在一个反应器中。

2. 一种如权利要求1所述的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法, 其特征是所述的D-氨基酸氧化酶存在三角酵母多倍体中, 所述的GL-7ACA酰化酶存在酰化酶互程菌中。

3. 一种如权利要求1所述的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法, 其特征是将3-6%的头孢菌素C钠盐和反应液中1-2u/ml D-氨基酸氧化酶、1-3u/ml GL-7ACA酰化酶, 25-50mmol/L的双氧水, 在20-45℃和pH7.0-8.5时反应。

4. 一种如权利要求2所述的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法, 其特征是将3-6%的头孢菌素C钠盐、占头孢菌素C钠盐溶液量的8-11%重量的三角酵母多倍体和酰化酶互程菌的湿菌、1-10mmol/L的过氧化氢酶抑制剂、1-10mg/ml β -内酰胺酶抑制剂, 25-50mmol/L的双氧水, 在20-45℃和pH7.0-8.5时反应, 其中三角酵母多倍体: GL-7ACA酰化酶互程菌比例为1.75~1:1。

5. 一种如权利要求4的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法, 其特征是所述的过氧化氢酶抑制剂是抗坏血酸、3-氨基-1, 2, 3-三唑、过硼酸钠或叠氮化钠, 所述的 β 内酰胺酶抑制剂是舒巴坦钠、棒酸、硼酸及其衍生物。

6. 一种如权利要求3和4的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法, 其特征是双氧水采用流加或分批加入。

7. 一种如权利要求3和4的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法，其特征是用1-3N NaOH调节溶液pH。

8. 一种如权利要求3和4的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法，反应最好在振荡、搅拌或通气搅拌下进行。

9. 一种如权利要求3的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法，其特征是所述的三角酵母多倍体湿细胞经过预处理，即将其悬于8-10倍量的pH6.0-8.5的0.1M焦磷酸缓冲液中，45-55℃时预处理0.5-1小时，离心收集菌体。

10. 一种如权利要求3的从头孢菌素C制造7-氨基头孢烷酸的方法，其特征是反应时间0.5-1.5小时。

一步两酶法制造7-氨基头孢烷酸

本发明涉及一种微生物方法制造7-氨基头孢烷酸。

7-氨基头孢烷酸(简称7-ACA)是生产临床应用的半合成头孢菌素类抗生素的关键原料。7-ACA可由发酵生产的头孢菌素C(简称CPC)裂解7-位氨基结合的侧链而形成。

CPC的N-酰基去除方法有二类,即化学法和酶法。方法之一的化学法,通常采用亚氨基卤化物或氯化甲硅烷工艺。(BE615955、JP特公昭41-13862和特公昭45-40899)。化学法需要保持低温(-40℃)、耐酸腐蚀的反应装置,造价很贵、反应用的化学品价格也比较高、多步化学反应要用大量有毒物品和易燃溶剂,要排出大量化学物质,存在三废处理严重的问题,是其主要缺点。用微生物的酰化酶裂解青霉素G制造6-APA的成功,促进了从CPC酶法制造7-ACA的研究。Walton在1964年发现某些细菌能裂解CPC产生7-ACA,以后有许多一步酶法的专利,例如USP 3239394的三种细菌*Brevibacterium*、*Achromobacterium*和*Flavobacterium*, GB 1566830的*Aspergillus* SP. MA-13, *Alternaria* SP. MA-133, JP特开昭59-44392的*Paecilomyces puntonii*, JP特开昭61-21097的*Pseudomonas* sp SE-83。但7-ACA的生成率均不高,这是因为这些微生物中能裂解CPC 7-位氨基结合的D-氨基己二酸的酰化酶——称为CPC酰化酶的酶活力均很低。因此产生了在裂解反应前先破坏侧链氨基己二酸的D-构型,形成一个中间体戊二酰7-氨基头孢烷酸(简称GL-7ACA),称为二步酶法。按照第一步生成GL-7ACA中间体的方法,二步酶法又可分为第一步是化学法和酶法二类。前者是用乙醛酸或丙酮酸等的化学反应(JP特开昭

52-7986、特公昭55-12910、特开昭56-65894)；后者是用微生物的D-氨基酸氧化酶(简称D-AAO)催化氧化作用，例如有JP特公昭50-7158的*Aspergillus flavus*、特开昭53-15494的*Trigonopsis variabilis* IFO6755、特开昭52-128295的*Cephalosporium potroni* IFO 5306、EP. 0364275的*Fusarium solani* M-0718、CS. 221, 003的*Trigonopsis variabilis*。二步酶法中的第二步是用微生物的GL-7ACA酰化酶裂解GL-7ACA产生7-ACA，例如有JP特开昭51-70884的*Comamonas* SP. SY-77-1、EP 496993的*Acinetobacter* ATCC53891、和*Pseudomonas* sp (Agriculture and Biologycal Chemistry 45, 1561, 1981)。二步酶法制造7-ACA的生成率明显提高，但缺点显然是比一步酶法多了一步工艺，并且设备也需多一倍。二步酶法中的第一步化学法生成的中间体GL-7ACA必须纯化去除有毒的化学药品，如吡啶、铜离子等，才能进行第二步反应，而二步都是酶反应，则可能串联进行反应，即第一步酶反应完成后其反应液转入第二个有酰化酶的反应器中进行第二步反应。这是二步都是酶反应比一步化学一步酶反应的优越之处。在二步酶反应以及一步酶反应进行了大量研究和比较的基础上，近年来，人们把研究的目标又投向工艺简单的一步法，如把二个酶串联在一个反应器中制造7-ACA(WO 90/12110)，但需要高压氧气，反应时间长、CPC浓度低、7-ACA生成率不高；构建了克隆二种酶基因的大肠杆菌工程菌，但转化CPC的浓度低，7-ACA生成率不高(JP特开昭63-74488)；以CPC产生菌顶头孢霉为宿主，克隆二个酶基因，(Bio/Technol. 9, 188, 1991)，以CPC产生菌顶头孢霉为宿主，克隆CPC酰化酶基因(JP. 特开平4-104792)，它们的发酵液中都可检测到7-ACA，直接发酵生产7-ACA是7-ACA制造法的突破性进展，但研究刚起步，离工业化生产相距甚远。

本发明目的是利用本实验室已有的二步酶法，通过对它们组成的

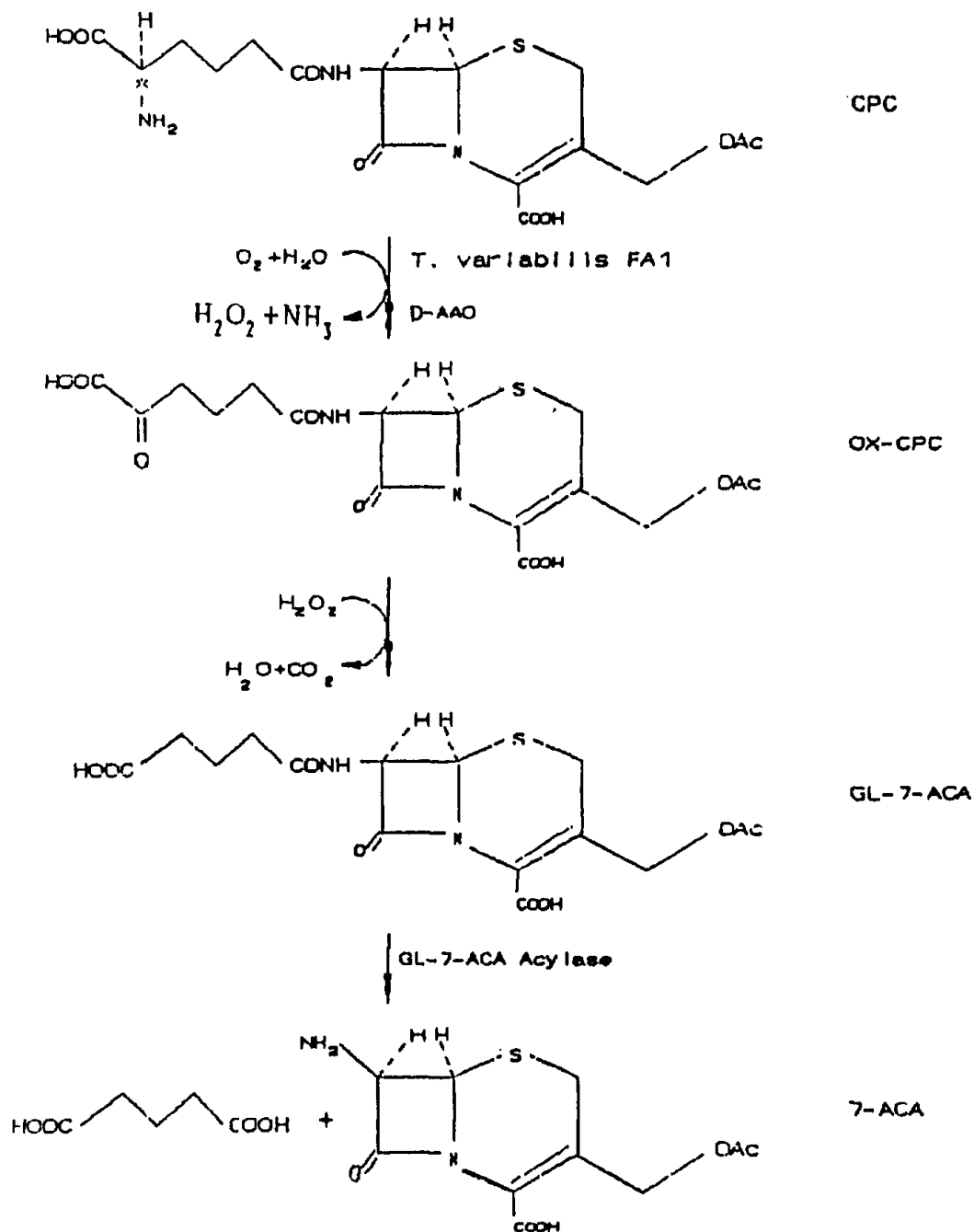
由CPC至GL-7ACA继而至7-ACA的二个酶反应系统相容性的研究，建立两酶合并在一个反应器的水相系统中快速、简便、高效地转化较高浓度的CPC，进而制造7-ACA的方法。这两种酶已能由本实验室的高产菌株实现。

本发明系利用两酶法的反应历程，但是采用一步工艺由CPC制造7-ACA。就是在一个反应器中，同时存在二个反应系统，同时进行二步酶反应和一步化学氧化反应，经过较短的反应时间，即将底物CPC转化为7-ACA。

本发明所用的两酶法反应历程中，首先是D-氨基酸氧化酶或含有D-氨基酸氧化酶(D-AAO)的三角酵母多倍体(*Trigonopsis variabilis* FAI)转化CPC为相应的酮酸(OX-CPC)，继而双氧水氧化脱羧生成GL-7ACA，然后是GL-7ACA酰化酶或含有GL-7ACA酰化酶的酰化酶工程菌裂解GL-7ACA为7-ACA，其反应式如下图：

三角酵母多倍体是应用原生质体融合技术构建的D-AAO高产株[李维泉、焦瑞身：微生物学报31(3)251-3, 1991；李维泉，焦瑞身：微生物学报31(5)371-5, 1991]经发酵条件优化，酶活达到500u/L。酰化酶工程菌的构建[杨蕴刘等：生物工程学报7(2)99-107, 1991；杨蕴剂等：生物工程学报8(1)15-22, 1992]运用DNA体外重组技术，把假单胞菌的酰化酶基因克隆到大肠杆菌中，并得到表达。进一步通过重组质粒改造，消除质粒上的 β -内酰胺酶，宿主菌选育和发酵条件的初步优化，酰化酶工程菌酶活从原来出发菌株的30多单位提高到700u/L。

本发明中采用的三角酵母多倍体细胞富含D-AAO，并且还有过氧化氢酶，后者能分解过氧化氢，这对CPC经D-AAO催化氧化生成的OX-CPC需要过氧化氢氧化脱羧生成GL-7ACA是不利的，加入过氧化氢酶抑制剂可以抑制过氧化氢酶活。过氧化氢酶抑制剂可以是抗坏



血酸、3-氨基-1,2,3-三唑、过硼酸钠或叠氮化钠。

GL-7ACA酰化酶对OX-CPC无活性，因此OX-CPC必须转化成GL-7ACA。OX-CPC氧化脱羧需要过氧化氢，虽然D-AAO氧化CPC生成OX-CPC的同时也生成过氧化氢，但不足以完全氧化OX-CPC生成GL-7ACA，因此需要在第一个酶反应系统中加入双氧水，促进OX-CPC氧化成GL-7ACA。高浓度的双氧水会破坏头孢菌素的化学结构，并且使D-AAO失活，因此加双氧水的量要控制，最好采用分批或流加的方式。

三角酵母多倍体细胞中存在使CPC发生副反应的某些酶。预处理可以破坏这些酶而减少甚至避免发生副反应。预处理的方法，把三角酵母多倍体湿细胞悬于8-10倍量的0.1M焦磷酸缓冲液，pH范围6.0-8.5，温度45-55℃，时间0.5-1小时。

GL-7ACA酰化酶工程菌对CPC有5u/g干菌的 β -内酰胺酶活力，在第二酶反应系统中加入1-10mg/ml β -内酰胺酶抑制剂，如舒巴坦钠(Sulbactam)、棒酸(clavulanic acid)、硼酸及其衍生物(boronic acid)。

在第二酶反应系统中，随着GL-7ACA的水解，生成戊二酸，系统的pH会下降，使GL-7ACA酰化酶活力降低。因此要用1-3N NaOH分批或流加，保持pH7.0-8.5。

本发明的二个酶反应系统都是水相磷酸缓冲液体系，因此能够把二个酶反应系统完全合并在一个反应器中，但是这二个系统在一起各自仍能正常反应，并能有效地形成7-ACA，必须做到二个酶反应系统存在相容性，这是本发明能否成立的关键。具体说，必须存在一个对二个酶反应系统都合适的反应条件，如温度、pH。在一个酶反应系统中存在的化学药品对另一个酶反应系统并无或很少为害。为了了解二个酶反应系统是否存在一个对二者都合适的反应条件，我们研究了二个酶反应系统各自适合的温度和pH范围。结果发现pH7.0-8.0范围中

二个酶反应系统都具有反应产物不低于74%的相对生成率；温度24-37℃范围中二个酶反应系统都具有反应产物不低于79%的相对生成率，说明二个酶反应系统适宜的温度、pH范围相当重合。在反应系统中使用的化学品，经研究发现，第一酶反应系统中使用的叠氮化钠、双氧水对第二酶反应系统的GL-7ACA酰化酶活力基本无影响；第二酶反应系统中的酰化酶工程菌，当存在舒巴坦钠时，并不破坏第一酶反应系统中的底物CPC；在第二酶反应系统中使用的舒巴坦钠对第一酶反应系统中三角酵母多倍体细胞转化CPC没有影响。三角酵母多倍体对7-ACA的稳定性稍有影响，因此反应结束后立即分离菌体为宜。以上情况为二个酶反应系统合并在一个反应器中试验奠定了基础。

用3-6%CPC钠盐在一个反应器中混合存在二种酶的菌细胞，最好采用3%左右浓度，能获得较高的7-ACA生成率。这种一步两酶法制造7-ACA，可以采用振荡或搅拌或通气搅拌方法，以增加酶反应系统中的溶氧，并使加入的双氧水和氢氧化钠溶液迅速分散。各含有D-AAO和GL-7ACA酰化酶的二种湿菌的总重占底物溶液量的8-11%。二种湿菌的比例(三角酵母多倍体:酰化酶工程菌)1.75~1:1。叠氮化钠1-10mmol/L，双氧水25-50mmol/L，舒巴坦钠1-10mg/ml。温度范围20-45℃，pH范围7.0-8.5。

本发明的一步两酶法也可以用纯化的酶直接参与反应。通常采用3-6%的头孢菌素C钠盐和反应液中应含1-2u/ml D-氨基酸氧化酶、1-3u/ml GL-7ACA酰化酶和25-50mmol/L的6%双氧水，在20-45℃和pH7.0-8.5时反应。双氧水可流加或分批加。

前述反应随着反应的进行，pH会下降，为保持pH值，可以采用加碱溶液的方法调节pH值。通常可用1-3N的NaOH水溶液，分批或流加的方法加入反应液中。

本发明的方法经过0.5-1.5小时就能获得满意的结果。

本发明一步两酶法的方法，不仅操作步骤、工艺流程和设备器材都比二步酶法简化了一步。而且，一步两酶法的反应时间要比两步酶法减少一半，而7-ACA生成率却提高了。说明一步两酶的反应系统除了具有相容性外，还存在协同作用才会获得优于二步酶反应的效果。

可以通过下述实施例进一步理解本发明的内容。

本实施例中分析方法如下：

1. D-AAO酶活测定

取1毫升发酵液中的菌体或酶液，加5毫升pH8.5 50mmol/L DL-甲硫氨酸溶液，37℃振荡半小时，用10%三氯乙酸3毫升中止反应。离心后取1毫升上清液加0.2%2,4-二硝基苯肼试剂0.4毫升，10分钟后加3N NaOH 1.5毫升，15分钟后离心，上清液550nm测光密度。用丙酮酸钠制备标准曲线。一个酶单位的定义：在测定条件下，每分钟生成1 μ mol酮酸的酶量。

2. GL-7ACA酰化酶活测定

取1毫升发酵液中的菌体或酶液，加6毫升PH7.0的0.1mol/L 磷酸缓冲液，取以上溶液0.5毫升加0.5毫升5mg/ml GL-7ACA溶液，37℃保温30分钟，加3毫升终止液(20%冰醋酸：0.05N NaOH=2：1)离心后的上清液加0.5毫升0.5%对一二甲氨基苯甲醛的乙醇液，30分钟后415nm测光密度。用7-ACA制标准曲线。一个酶单位定义：在测定条件下，每分钟生成1 μ mol7-ACA的酶量。

3. β -内酰胺酶活的测定：

用0.1mol/L PH7.6磷酸缓冲液配制约含15mg温菌/ml 的酰化酶工程菌液和1mg/ml CPC-Na溶液。二液各取0.5 毫升在恒温水浴中反应半小时，加4毫升终止液(与分析方法2.相同)，以菌液保温后先加终止液后加底物为对照，离心后上清液测260nm的光密度，二者光密度的差数可计算得酶活。一个酶单位的定义：在测定条件下，每分钟破坏

1 μ mol CPC的 β -内酰胺环的酶量。

4. HPLC测定CPC、GL-7ACA和7-ACA

仪器: Beckman Gold system HPLC

层析柱: 填料直径5 μ , 柱容4.6mm $\times$ 25cm的Ultrasphere
ODS反相色谱柱

溶剂相: 6%乙腈, 15%甲醇, 1%乙酸的水液

流速: 1.5ml/min

保留时间: 25 $^{\circ}$ C, 7-ACA 1.74分, CPC 2.03分, GL-7ACA
4.05分

实施例1: 三角酵母多倍体的培养和预处理

蛋白胨0.5%, 酵母抽出粉0.5%, DL-甲硫氨酸0.3%, 葡萄糖2.0%, H_3BO_3 0.01%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $(NH_4)_2MoO_4$ 各为0.004%, 生物素和 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 各为0.002%, 硫胺素0.001%, pH自然, 500ml三角烧瓶装80ml, 121 $^{\circ}$ C灭菌25分钟, 接入以上前四种成份再加2.0%琼脂的斜面所培养的菌种, 28 $^{\circ}$ C, 转床培养45小时。发酵液8000rpm离心10分钟, 用生理盐水洗一次, 菌体置-20 $^{\circ}$ C保存。取低温保存的湿菌体加10倍量(W/V) pH8.5 0.1mol/L焦磷酸缓冲液45 $^{\circ}$ C保温一小时, 离心收集处理菌体, -20 $^{\circ}$ C保存。

实施例2: GL-7ACA 酰化酶工程菌的培养

胰蛋白胨1%, 酵母抽出粉0.5%, 氯化钠0.8%, pH自然, 500ml三角烧瓶装80ml培养基, 121 $^{\circ}$ C灭菌25分钟。以上配方再加入50 μ g/ml氯苄青霉素和2%琼脂培养的平皿菌种接入三角烧瓶培养基。以上培养均在37 $^{\circ}$ C。发酵瓶自第16小时开始每隔2小时加葡萄糖0.1%共四次, 41小时后取出发酵液, 经8000rpm离心10分钟, 用生理盐水洗一次, 菌体置-20 $^{\circ}$ C保存。

实施例3: 温度对三角酵母多倍体细胞转化CPC的影响

按实施例1方法培养和预处理湿菌0.3克, 用0.1mol/L pH7.6的磷酸缓冲液配制的3%CPC钠盐(CPC含量70%)溶液5ml置于50ml三角烧瓶, 再加入13mg/ml叠氮化钠50 μ l, 在恒温水浴中振荡1小时, 期间分批加入6%双氧水100 μ l。反应结束后离心得上清液, 按分析方法4, HPLC测GL-7ACA。不同反应温度转化3%CPC钠盐为GL-7ACA的相对生成百分数15 $^{\circ}$ C为93.9%、20 $^{\circ}$ C为100%、28 $^{\circ}$ C为96.2%、37 $^{\circ}$ C为86.0%、45 $^{\circ}$ C为60.0%。

实施例4: 温度对酰化酶工程菌转化GL-7ACA为7-ACA的影响

按实施例2的方法培养酰化酶工程菌, 在50ml三角烧瓶中加入0.2克湿菌、2%GL-7ACA(90%纯度)溶于0.1mol/L pH7.6磷酸缓冲液5ml、舒巴坦钠5mg。在恒温水浴中振荡1小时, 期间用1N NaOH调pH不低于7.0, 反应结束后离心得上清液。按分析方法4, HPLC测7-ACA。不同反应温度转化2%GL-7ACA为7-ACA的相对生成百分数24 $^{\circ}$ C为79.0%、28 $^{\circ}$ C为99.2%、33 $^{\circ}$ C为100%、37 $^{\circ}$ C为99.2%、45 $^{\circ}$ C为85.0%。

实施例5: PH对三角酵母多倍体细胞转化CPC为GL-7ACA的影响

按实施例3的方法, 温度为28 $^{\circ}$ C, 用不同pH的磷酸或焦磷酸缓冲液转化3%CPC钠盐为GL-7ACA的相对生成百分数, pH7.0为74%、pH7.6为95%、pH8.0为100%。

实施例6: pH对酰化酶工程菌转化GL-7ACA为7-ACA的影响

按实施例4方法, 温度为28 $^{\circ}$ C, 用3N NaOH调不同pH, 转化2%GL-7ACA为7-ACA的相对生成百分数, pH7.0为80.1%、pH7.6为100%、pH8.0为99.2%、pH8.5为88.4%。

实施例7: 叠氮化钠、双氧水、舒巴坦钠对酰化酶活力的影响

在离心管中加入用0.1mol/L pH7.6磷酸缓冲液配制的含GL-ACA酰化酶工程菌湿菌20mg/ml悬浊液1ml, 再分别加入1mg舒巴坦钠或6%双氧水10 μ l或13mg/ml叠氮化钠10 μ l, 不加为对照, 28 $^{\circ}$ C保温1.5

小时离心弃上清液，按分析方法2，测GL-7ACA酰化酶活力。酰化酶相对活力对照为100%，则加叠氮化钠为98.9%，加双氧水为101.1%，加舒巴坦钠为103.4%。

实施例8：存在舒巴坦钠时，酰化酶工程菌对CPC稳定性的影响

按实施例4的方法，3%CPC钠盐代替2%GL-7ACA，温度28℃，不加NaOH溶液。反应结束后离心得上清液，按分析方法4，HPLC测CPC，以不加菌体为对照，存在舒巴坦钠时，加酰化酶工程菌的CPC相对剩余值为102%。

实施例9：舒巴坦钠对三角酵母多倍体转化CPC为GL-7ACA的影响

按实施例3的方法菌体预处理改为55℃半小时，转化温度28℃，转化反应前加入1mg/ml舒巴坦钠，以不加为对照。反应结束后按分析方法4，HPLC测GL-7ACA，加舒巴坦钠生成的GL-7ACA为对照的102%。

实施例10：三角酵母多倍体对7-ACA稳定性的影响

按实施例3方法，用1.5%7-ACA(93%纯度)代替3%CPC钠盐，用1mg/ml舒巴坦钠代替叠氮化钠。28℃保温期间不加双氧水，1小时后按分析方法4测剩余的7-ACA，以不加菌体为对照，加三角酵母多倍体的7-ACA为对照的94.6%。

实施例11：三角酵母多倍体与GL-7ACA酰化酶工程菌细胞分别或合并转化的效果

按实施例3方法，但改为0.35克三角酵母多倍体湿菌经55℃半小时预处理，反应温度为28℃，GL-7ACA生成率71.5%。

按实施例4方法，转化GL-7ACA，反应温度28℃，7-ACA生成率88%，合并6次反应上清液得30ml，加15ml乙醇和5ml乙酸乙酯，离心除去沉淀，上清液用6N HCl调pH3.5析出结晶，4℃过夜，用滤纸抽滤，pH3.5水洗一次，滤并真空干燥得0.268克白色固体，按分析方法4，HPLC测7-ACA含量79.5%，按反应上清液计得率62.3%。合并70ml反

应上清液，含10.9mg/ml 7-ACA，用6N HCl调pH3.5，析出结晶，4℃置约二小时，用滤纸抽滤，真空干燥滤饼得0.640克白色固体，按分析方法4，HPLC测7-ACA含量为90.7%，按反应上清液计得率76.1%。测母液含1.675mg/ml的7-ACA，母液中的7-ACA占反应上清液的15.4%。

在50ml三角烧瓶中加入的按实施例1方法培养和55℃半小时预处理的三角酵母多倍体湿菌0.35克和按实施例3方法加入的叠氮化钠和双氧水；加入按实施例2方法培养的0.2克GL-7ACA酰化酶工程菌湿菌和按实施例4方法加入舒巴坦钠和氢氧化钠溶液。28℃转化3%CPC钠盐，反应1小时后按分析方法4，HPLC测7-ACA生成率为72.5%。

取反应上清液11ml含10.0mg/ml 7-ACA，用6N HCl调pH 3.5析出白色结晶，4℃置2小时，滤纸抽滤，真空干燥得白色固体95.7mg。按分析方法4，HPLC测7-ACA含量78.8%，从反应上清液计得率68%，母液含7-ACA 2.257mg/ml占反应上清液的22.6%。

实施例12：柱反应器中一步两酶反应

底为2号砂芯直径40mm高120mm的玻璃柱，用隔套水浴保温，通过砂芯空气通入柱内。在反应器中加入用pH8.0的0.1mol/L焦磷酸缓冲液配制的3%CPC钠盐溶液80ml，加入按实施例1方法培养和pH6.0磷酸缓冲液预处理的3.2克三角酵母多倍体湿菌，按实施例2方法培养的酰化酶工程菌3.2克和按实施例3方法加入叠氮化钠2mmol/L和双氧水25mmol/L，按实施例4方法加入舒巴坦钠10mg/ml和氢氧化钠溶液调pH 7.2，反应温度24℃，通气量约1升/分。1小时后按分析方法4，HPLC测7-ACA生成率为65%。

实施例13：一步两酶法转化5%和6%CPC钠盐

按实施例11，两菌合并转化5%和6%CPC钠盐，但是叠氮化钠为10mmol/L，H₂O₂用量增加到50mmol/L，1N NaOH用量也增加一倍。转化反应1.5小时后按分析方法4，HPLC测7-ACA生成率分别为65.0% (5%

CPC钠盐)和51.7%(6% CPC钠盐)。

实施例14: 一步两酶法转化CPC的温度、PH试验

按实施例11, 一步两酶法转化3%CPC钠盐, 但是反应温度20℃, pH8.5, 反应1小时后按分析方法4, HPLC测7-ACA生成率为42.3%。

按实施例11, 一步两酶法转化3%CPC钠盐, 但反应温度45℃, pH7.0, 反应1小时后按分析方法4, HPLC测7-ACA生成率31.9%。

实施例15

三角酵母多倍体湿菌10克经-20℃至20℃三次冻融, 加20ml 0.1 mol/L pH7.6磷酸缓冲液, 超声波破碎10分钟, 15000rpm离心10分钟, 取上清液, 加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 析出D-AAO活性成份。GL-7ACA酰化酶工程菌10克湿菌经冻融一次后, 加20ml 0.1mol/L pH7.6磷酸缓冲液, 超声波破碎10分钟, 15000rpm离心15分钟, 取上清液, 加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 析出酰化酶活性成份, 再溶于10ml上述磷酸缓冲液, 通过DEAE-Sephadex A50柱, 用氯化钠溶液梯度洗脱, 取酰化酶高活性流段。

取以上制备的7u D-AAO和9u酰化酶, 5ml 3% CPC钠盐, 置于50ml三角烧瓶中, 28℃水浴振荡一小时, 期间分批加入1N NaOH 0.2ml, 6% H_2O_2 0.1ml, 按分析方法4 HPLC测7-ACA生成率65%。

实施例16:

按实施例15方法制备D-AAO和GL-7ACA酰化酶

按实施例15方法转化3%CPC钠盐, 但是D-AAO是5u, GL-7ACA 酰化酶是15u, 温度是20℃, pH7.0。按分析方法4, HPLC测7-ACA生成率52%。

实施例17:

按实施例15方法制备D-AAO和GL-7ACA酰化酶

按实施例15方法转化6%CPC, 但是D-AAO是10u, GL-7ACA酰化酶5u, 6% H_2O_2 0.2ml, 温度是45℃, pH8.5, 按分析方法4 HPLC测7-ACA生成率34%。