

# 酶法生产 7-氨基头孢烷酸的研究进展

罗 晖 李 强 童忆舟 司颖涛 沈忠耀  
(清华大学化工系, 北京 100084)

**摘要:** 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)是生产头孢菌素的重要原料,目前都由头孢菌素 C 通过化学法或生物酶法生产。综述了利用酶法生产 7-ACA 的研究进展,其中涉及催化过程所用两种酶(*D*-氨基酸氧化酶和 GL-7-ACA 酰化酶)的酶学特性、表达、纯化、固定化以及催化工艺。

**关键词:** 7-氨基头孢烷酸; *D*-氨基酸氧化酶; GL-7-ACA 酰化酶; 头孢菌素 C  
中图分类号: Q814 文献标识码: A

## Progress in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid

LUO Hui, LI Qiang, TONG Yi-zhou, SI Ying-tao, SHEN Zhong-yao  
(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** The 7-aminocephalosporanic acid, a starting compound in the synthesis of cephalosporin antibiotics, is obtained from cephalosporin C by a chemical process or by a two-step enzymatic process. The enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid by using *D*-amino acid oxidase and glutaryl-7-ACA acylase is reviewed with details of classification, characteristics, expression, purification, immobilization and conversion technology of the enzymes depicted in it.

**Key words:** 7-aminocephalosporanic acid; *D*-amino acid oxidase; glutaryl-7-ACA acylase; cephalosporin C

近年来,头孢菌素类抗生素的使用越来越多,临床应用证明它是一类抗菌谱广、抗菌活性强、疗效高、毒性低的抗生素。7-氨基头孢烷酸(7-aminocephalosporanic acid, 7-ACA)是医药工业生产半合成头孢菌素的重要中间体,国内外在工业上多采用化学法由头孢菌素 C 脱去其侧链来生产 7-ACA<sup>[1]</sup>。但化学法存在工艺复杂、成本高等问题,而且还会严重污染环境。与化学法相比,酶法裂解可以使生产过程大大简化(例如:发酵得到的头孢菌素 C 不需结晶就可用于酶解;生产过程中没有用到有毒溶剂;可省掉加保护剂和去保护剂等步骤),产品能够达到高收率、高质量,同时降低成本和减少污染。因此近年来人们着力进行酶法生产 7-ACA 的研究<sup>[2]</sup>。类似于利用青霉素酰化酶裂解青霉素 G 一步生产 6-氨基青霉烷酸(6-APA)的过程,人们希望采用某个酶来直接催化头孢菌素 C 一步生产 7-ACA,然而仅有很少几种酶具有这种特性,且酶活非常低<sup>[3]</sup>。目前人们研究较多的是两步酶法制备

7-ACA。首先,头孢菌素 C 在通 O<sub>2</sub> 情况下被 *D*-氨基酸氧化酶(*D*-amino acid oxidase, DAAO)催化,产生具有酮基的中间体(ketoadipyl 7-aminocephalosporanic acid, keto-7-ACA)和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。这个中间体较不稳定,很容易被同时产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 化学氧化脱羧,转变成戊二酰基-7-氨基头孢烷酸(glutaryl 7-aminocephalosporanic acid, GL-7-ACA),然后 GL-7-ACA 在 GL-7-ACA 酰化酶(GL-7-ACA acylase)的作用下脱去其侧链,生成 7-ACA。

## 1 DAAO 催化头孢菌素 C 制备 GL-7-ACA

### 1.1 DAAO 的分类和特性

DAAO 是一种典型的黄素蛋白,其辅酶为黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),广泛存在于动物内脏及微生物中。DAAO 的底物专一性较低,可以作用于几乎所有的 *D*-氨基酸,也可以作用于各种具有 *D*-氨基的化合物(如头孢菌素 C)。

DAAO 的主要来源有:三角酵母(*Trigonopsis*

*variabilis*)<sup>[4]</sup>、猪肾<sup>[5]</sup>、腐皮镰孢霉(*Fusarium solani*)<sup>[6]</sup>、红酵母(*Rhodotorula gracilis*)<sup>[7]</sup>、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)<sup>[8]</sup>和曲霉(*Aspergillus*)<sup>[9]</sup>等。

Pollegioni 等人<sup>[7]</sup>将几种不同来源 DAAO 的 cDNA 序列进行对比,发现红酵母与腐皮镰孢霉、三角酵母的同源性分别为 30% 和 26%,与哺乳动物 DAAO 的同源性为 24% ~ 25%。

## 1.2 DAAO 的表达和纯化

DAAO 很容易被 D-氨基酸所诱导表达。Gabler 等人<sup>[8]</sup>在尖镰孢发酵过程中添加了多种 D-氨基酸及其衍生物作为 DAAO 诱导剂,其中 D-丙氨酸的效果最佳,可使 DAAO 酶活增加 12.5 倍。另外,通过限氧也能够得到较高酶活,限氧条件下的 DAAO 酶活是非限氧条件时的 3 倍。Alonso 等人<sup>[10]</sup>也发现低通氧可以提高 DAAO 酶活,可能是因为 DAAO 的辅酶 FAD 的氧化受氧浓度的影响,当氧浓度较低时,细胞通过增加 DAAO 的生成量来弥补 DAAO 转化速度缓慢的不足。

除了直接利用各种微生物得到 DAAO 之外,人们还将不同来源的 DAAO 基因进行了克隆和表达,见表 1。

表 1 外源 DAAO 的克隆及表达

	基因来源	宿主	表达量
Ciccarelli 等人 <sup>[5]</sup>	猪肾	<i>E. coli</i>	2.2 U/ml
Isogai 等人 <sup>[6]</sup>	<i>Fusarium solani</i>	<i>E. coli</i>	8% 总可溶性蛋白
Pollegioni 等人 <sup>[7]</sup>	<i>Rhodotorula gracilis</i>	<i>E. coli</i>	0.8 U/ml
刘洪波等人 <sup>[11]</sup>	<i>Trigonopsis variabilis</i>	<i>E. coli</i>	0.802 U/ml

通常对 DAAO 采用比较传统的方法进行分离纯化,如:酶液经盐析沉淀、热处理、等电点沉淀,再用色谱进行纯化,而且在纯化过程中人们通常注意要将其他杂酶(如过氧化氢酶和酯酶)去除。由于 *R. toruloides* CCRC 20306 的酶液中存在酯酶,在 CPC 催化过程中会生成许多副产物。在酶液中加入 100 mmol/L D-丙氨酸,经过 5 min、55℃ 和 1 min、0℃ 交替处理 5 次,即可去除酯酶的活性,而 DAAO 的酶活完全保留<sup>[12]</sup>。

随着生物技术的发展,通过基因改造的方法可以使 DAAO 的分离纯化更为方便。在 N 端接上 6 个组氨酸(His-tag)的融合蛋白,完全保持了生物活性,而且能够用组氨酸与金属整合介质之间亲和作用的特性一步即完成酶的纯化<sup>[10]</sup>。

## 2 Acylase 裂解 GL-7-ACA 产生 7-ACA

### 2.1 GL-7-ACA 酰化酶的筛选、分类及性质

具有 GL-7-ACA 酰化酶活性的菌株通常都从土壤或污水中筛选得到<sup>[13~15]</sup>。例如 Shibuya 等人从土壤中筛选到 1 株假单胞杆菌(*Pseudomonas* SY-77-1),产生的 GL-7-ACA 酰化酶可以使 GL-7-ACA 脱去侧链戊二酰基生成 7-ACA。SY-77-1 菌株经诱变为  $\beta$ -内酰胺酶缺失菌株(*Pseudomonas* sp. GK16),酰化酶活力也相应提高<sup>[13,14]</sup>。

Matsuda 等人<sup>[16]</sup>筛选到 1 株 *Pseudomonas* sp. SE83,该菌株中有两种不同的头孢菌素酰化酶活性,一种能以头孢菌素 C 为底物进行转化直接生成 7-ACA,另一种只能催化 GL-7-ACA。

Lee 等人<sup>[17]</sup>对 1 株产酰化酶的菌株(*Pseudomonas nitroreducens*)进行了研究,发现其酰化酶的最适酸碱度为酸性,不同于其他酰化酶的最适酸碱度偏碱性。

目前文献中报道的绝大多数产头孢菌素酰化酶的微生物都是假单胞菌,李勇等人<sup>[18]</sup>按蛋白质结构的不同对其进行了分类,同一类的酰化酶具有相似的性质,对应的基因序列有较高的同源性,见表 2。

表 2 酰化酶的分类

类型	前体	前导肽	$\alpha$ 亚基	连接肽	$\beta$ 亚基	菌株	
I	70	29a	16	ND	54	<i>Pseudomonas</i> sp. GK16	
	70	ND	16	10aa	54	<i>Pseudomonas</i> sp. 130	
	70	27aa	16	8aa	54	<i>Pseudomonas</i> sp. C427	
II	89	29aa	28	ND	61	<i>Pseudomonas</i> sp. A14	
	III	80	—	22	ND	58	<i>Pseudomonas</i> sp. SE83(Acy II)
		80	—	22	—	58	<i>Pseudomonas diminuta</i> N176
IV	80	—	22	ND	58	<i>Pseudomonas diminuta</i> V22	
	64	—	40	ND	22	<i>Pseudomonas</i> sp. SE83(Acy I)	
	64	—	40	ND	22	<i>Pseudomonas</i> sp. V22	
V	70	27aa	70			<i>Bacillus laterosporus</i> J1	

注:前体、 $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基的大小用分子质量(单位 ku)表示;前导肽、连接肽的大小用数字加氨基酸(aa)表示;ND 表示尚不清楚;“—”代表无。

### 2.2 酰化酶的表达和纯化

在野生菌株培养过程中经常加入戊二酸来诱导酰化酶的产生<sup>[14,19]</sup>,但一些菌株经过诱变后,在培养过程中不需添加戊二酸即可得到较高的酶活<sup>[14]</sup>。

由于野生菌株培养困难或酶活较低,往往还存

在导致底物及产物降解的  $\beta$ -内酰胺酶和酯酶,因此人们将酰化酶进行了克隆和表达,见表 3。

表 3 外源酰化酶的克隆及表达

	基因来源	宿主	表达量
Ishiy 等 <sup>[20]</sup>	<i>Pseudomonas</i> V22	<i>E. coli</i>	0.129 U/ml
Li 等 <sup>[21]</sup>	<i>Pseudomonas</i> sp. 130	<i>E. coli</i>	25% 可溶蛋白
Aramori 等 <sup>[22]</sup>	<i>Bacillus laterosporus</i> J1	<i>E. coli</i>	7 U/g
Aramori 等 <sup>[22]</sup>	<i>Bacillus laterosporus</i> J1	<i>Bacillus subtilis</i>	0.63 U/g
Ishii 等 <sup>[23]</sup>	<i>Pseudomonas</i> N176	<i>E. coli</i>	23.6 U/ml
Kim 等 <sup>[24]</sup>	<i>Pseudomonas diminuta</i>	<i>E. coli</i>	30% 总蛋白
KAC-1			

人们发现将酰化酶基因的信号肽去除后,采用 *E. coli* 的启动子能得到很好的表达效果<sup>[21,23,24]</sup>,这些研究显示,酰化酶的  $\alpha$  亚基的氨基末端序列对酶的活性并不重要。但是用 *E. coli* 作宿主经常导致外源蛋白形成不溶性的包涵体,影响酶的表达。例如酰化酶重组菌在高于 31℃ 培养时即会生成包涵体<sup>[24]</sup>,而 pCK013 重组质粒在 20℃ 下表达的酶活达到最高<sup>[23]</sup>。要解决这个问题,可以考虑采用分泌表达型的质粒,或者使用分泌型的宿主如枯草芽孢杆菌和酵母。

酰化酶的纯化通常采用色谱分离的方法。Binder 等人<sup>[25]</sup>分离酰化酶包括 6 个步骤,细胞经匀浆得到酶粗提液,在 2% 硫酸铵存在情况下 50℃ 进行热处理,热处理仅使酰化酶少量失活,但却能去除杂酶(酯酶和  $\beta$ -内酰胺酶),混合物经超滤处理后再用四步色谱操作(Q-sepharose, HTP hydroxyepitite, SP-Triacyl, S-300)进行纯化。Li 等人<sup>[21]</sup>使用了一种简单有效的方法纯化酰化酶,仅用了 DEAE-sepharose CL-6B 和 HA-Ultrigel 两步色谱操作即得到 50% 收率,纯度超过 90%。

### 3 7-ACA 的催化工艺

#### 3.1 酶活稳定性

DAAO 的热稳定性很差,23℃、pH 值 7.0 ~ 7.3 时,三角酵母的 DAA 酶活半衰期只有 10 ~ 15 h<sup>[26]</sup>。DAAO 也会因搅拌和通气而导致酶的失活,在 30℃ 有稳定剂的情况下,半衰期仅为 12 ~ 14 h<sup>[27]</sup>。在催化过程中,DAAO 的稳定性差的原因还可能和反应混合物中的 O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 有关。DAAO 经固定化后,对热、O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 稳定性均得以提高<sup>[28,29]</sup>。例如,

Conlon 等人<sup>[29]</sup>在 1 L 和 10 L 的反应器中进行了固定化酶制备 7-ACA 的研究,固定化 DAAO 酶的半衰期达到 138 批次。此外,通过对特定的氨基酸进行定点突变的方法来改造 DAAO 酶的结构,也可以使酶的稳定性提高<sup>[30]</sup>。

酰化酶对热的稳定性较好,例如 *Pseudomonas* A14, *Bacillus* J1 和 *Pseudomonas* BL072 菌的酰化酶在 50℃ 下稳定,能保持 90% 的酶活,但 *Pseudomonas* A14, *Bacillus* J1 酰化酶酶活仅在 pH 值为 8 ~ 9 时稳定,如此小的 pH 值范围在实际应用时是很不利的,而且 7-ACA 和 CPC 在碱性条件下不稳定,因此这类酶的实际应用会受到很大的限制<sup>[3,25]</sup>。经过固定化后,酰化酶的酶活稳定性可以得到提高。例如,Monti 等人<sup>[31]</sup>对固定化 GL-7-ACA 酰化酶重复操作 42 批次后,固定化酶活为初始酶活的 93%。

#### 3.2 固定化

由于固定化的催化剂具有稳定性高和易回收等特点,7-ACA 催化所用的酶均是通过交联、吸附或包埋的方式得到固定化酶或细胞。DAAO 的固定化载体有 CNBr 活化的 agrose, CNBr 活化的 Sepharose HB, Duolite A365 等。酰化酶的固定化载体有 Eupergit C、聚丙烯酰胺介质、Amberlite XAD7 等。有人提出了同时固定化两种酶的想法,可以使反应快速进行从而减少中间产物的降解<sup>[32]</sup>,而 Bianchi 等人<sup>[33]</sup>通过试验发现,在一种介质上同时固定化两种酶并非最好的选择,可以将 DAAO 和酰化酶分别固定在不同的载体上以保持各自最佳的活力和稳定性,但在催化 CPC 时同时加入。

DAAO 一般存在于真菌细胞的过氧化酶体中,物质传递比较困难,因此细胞需经透性化处理后再用于催化。经过 25% 丙酮溶液处理的三角酵母细胞的 DAAO 表观酶活能提高 20 ~ 50 倍<sup>[26]</sup>。重组大肠杆菌中酰化酶可能位于细胞间质,底物和产物的传递比较容易,因此可将重组大肠杆菌直接固定化并用于催化<sup>[34]</sup>。

#### 3.3 反应器

CPC 催化生产 7-ACA 大多采用搅拌式反应器,搅拌能增强底物和产物在固定化酶颗粒上的扩散,同时通入空气以提供反应所需的 O<sub>2</sub><sup>[31,33]</sup>。

由于通常采用的搅拌式反应器容易使固定化酶颗粒破碎,影响酶的回收和循环使用,Alfani 等人<sup>[35]</sup>对固定化床反应器、流化床反应器和搅拌式反应器进行了比较,发现固定化床反应器存在 O<sub>2</sub> 供应不足、酶的利用率低等的缺陷,CPC 的催化速度和转化

率均较低,而流化床反应器克服了以上问题,CPC的转化率与搅拌式反应器基本一致。

Nikolov 等人<sup>[32]</sup>采用错流过滤反应器进行 CPC 催化生产 GL-7-ACA 的研究。在过程中用的是未固定化的三角酵母细胞,并可以重复使用,每千克干细胞综合产率达到 13 kg CPC。相对搅拌式反应器,流化床反应器和错流过滤反应器更容易实现操作过程的连续性,因此在工业应用上具有很大的潜力。

#### 4 展望

目前,利用酶法裂解头孢菌素生产 7-ACA 的技术已经工业化。根据成本和技术可行性等方面的考虑,*D*-氨基酸氧化酶多采用固定化三角酵母细胞的形式进行催化,而 GL-7-ACA 酰化酶一般都由重组大肠杆菌表达,分离纯化后再进行固定化。从 7-ACA 生产的发展历程来看,生物法(酶法)有着不可比拟的优势。*D*-氨基酸氧化酶和 GL-7-ACA 酰化酶是这种方法中最重要的两种酶,改善和提高这两种酶的催化特性及稳定性,将会使 7-ACA 的生产水平得到很大的推动。前一阶段人们主要是通过酶工程或突变的方法来得到高产菌株,而随着生物技术的发展,人们越来越多地采用基因工程的手段对产酶菌株进行改造。目前,人们主要通过定点突变的技术来改变酶的结构,以提高酶的活性和稳定性,通过改变质粒或宿主细胞来提高酶的产量。但在这个领域中还存在一些问题,例如,酶经常被表达成没有活性的包涵体,酶的稳定性还需进一步提高等。另外,通过改变固定化的条件来提高酶的催化效率及稳定性,也具有一定的潜力。

#### 参考文献

- [1] Morin R B, Jackson B G, Flynn E H, et al. Chemistry of cephalosporin antibiotics XIV: reaction of cephalosporin C with nitrosyl chloride[J]. Am Chem Soc, 1969, 91: 1396 ~ 1400
- [2] Parmar A, Kumar H, Marwaha S S, et al. Recent trends in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA) [J]. Crit Rev Biotechnol, 1998, 18(1): 1 ~ 12
- [3] Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M, et al. Comparative characterization of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylases[J]. Ferment Biotech, 1992, 73(3): 185 ~ 192
- [4] Kujan P, Prell A, Safar H, et al. *D*-amino-acid oxidase: an improved production of the enzyme by the yeast *Trigonopsis variabilis* in a laboratory fermentor[J]. Folia Microbiol, 2001, 46(5): 427 ~ 431
- [5] Ciccarelli E, Massaer M, Guillaume J P, et al. Porcine *D*-amino acid oxidase: production of the biologically active enzyme in *Escherichia coli* [J]. Biochem Biophys Res Comm, 1989, 161(2): 865 ~ 872
- [6] Isogai T, Ono H, Ishitani Y, et al. Structure and expression of cDNA for *D*-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*[J]. J Biochem, 1990, 108(6): 1063 ~ 1069
- [7] Pollegioni L, Molla G, Campaner S, et al. Cloning, sequencing and expression in *E. coli* of a *D*-amino acid oxidase cDNA from *Rhodotorula gracilis* active on cephalosporin C[J]. J Biotechnol, 1997, 58(2): 115 ~ 123
- [8] Gabler M, Fischer I. Production of a new *D*-amino acid oxidase from the fungus *Fusarium oxysporum* [J]. Appl Environ Microb, 1999, 65(8): 3750 ~ 3753
- [9] Mujawar S K, Shewale J G. Production of *D*-amino acid oxidase by *Aspergillus sp.* strain 020 active on cephalosporin C[J]. Can J Microbiol, 1997, 43(3): 292 ~ 295
- [10] Alonso J, Barredo J L, Armisen P, et al. Engineering the *D*-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* to facilitate its overproduction in *Escherichia coli* and its downstream processing by tailor-made metal chelate supports[J]. Enzym Microbial Technol, 1999, 25(1/2): 88 ~ 95
- [11] 刘洪波, 姜卫红, 杨蕴刘, 等. 三角酵母 *D*-氨基酸氧化酶基因的克隆、测序及表达[J]. 生物工程学报, 1999, 15(3): 337 ~ 342
- [12] Lee Y H, Chu W S, Hsu W H, et al. Bioconversion of cephalosporin C with *D*-amino acid oxidase from the yeast *Rhodospiridium toruloides* [J]. Biotechnol Lett, 1994, 16(5): 467 ~ 472
- [13] Shibuya Y, Matsumoto K, Fujii T. Isolation and properties of 7  $\beta$ -(4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase-producing bacteria [J]. Agric Biol Chem, 1981, 45(7): 1561 ~ 1567
- [14] Ichikawa S, Murai Y, Yamamoto S, et al. The isolation and properties of *Pseudomonas* Mutants with an enhanced productivity of 7  $\beta$ -(4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase [J]. Agric Biol Chem, 1981, 45(10): 2225 ~ 2229
- [15] Khang Y H, Yoo B H. Isolation and characterization of a novel soil strain, *Pseudomonas cepacia* BY21 with glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase activity [J]. Biotechnol Lett, 2000, 22(4): 317 ~ 320
- [16] Matsuda A, Matsuyama K, Yamamoto K, et al. Cloning and characterization of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain [J]. J Bacteriol, 1987, 169(12): 5815 ~ 5820
- [17] Lee Y H, Chang T S, Liu H J, et al. An acidic glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas nitroreducens* [J]. Biotechnol Appl Biochem, 1998, 28: 113 ~ 118
- [18] Li Y, Chen J F, Jiang W H, et al. In vivo post-translational processing and subunit reconstitution of cephalosporin acylase from *Pseudomonas sp.* 130 [J]. Eur Biochem, 1999, 262(3): 713 ~ 719
- [19] Nikolov A, Danielsson B. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. Part I: Cultivation of *Pseudomonas syringae* and partial purification and immobilization of 7  $\beta$ -(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase [J]. Enzyme Microbial Technol, 1994, 16(12): 1031 ~ 1036
- [20] Ishiy M, Niwa M. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the cephalosporin acylase gene of a *Pseudomonas* strain [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1132(3): 233 ~ 239
- [21] Li Y, Jiang W H, Yang Y L, et al. Overproduction and purification of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase [J]. Protein Express Purif, 1998, 12(2): 233 ~ 238

- [22] Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M, et al. Cloning and nucleotide sequencing of a novel 7  $\beta$ -(4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase gene of *Bacillus laterosporus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*[J]. J Bacteriol, 1991, 173(24):7848 ~ 7855
- [23] Ishii Y, Saito Y, Fujimura T, et al. High-level production, chemical modification and site-directed mutagenesis of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176[J]. Eur J Biochem, 1995, 230(2):773 ~ 778
- [24] Kim D W, Yoon K H. Cloning and high expression of glutaryl 7- aminocephalosporanic acid acylase gene from *Pseudomonas diminuta* [J]. Biotechnol Lett, 2001, 23(13):1067 ~ 1071
- [25] Binder R, Brown J, Romancik G. Biochemical characterization of a glutaryl-7- aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas* strain BI072[J]. Appl Environ Microb, 1994, 60(6):1805 ~ 1809
- [26] Vicenzi J T, Hansen C T. Enzymatic oxidation of cephalosporin C using whole cells of the yeast *Trigonopsis variabilis* within a "cross-flow" filter-reactor[J]. Enzyme Microbial Technol, 1993, 15(4):281 ~ 285
- [27] Alfani F, Cutarella N, Gallifuol A, et al. Preliminary investigation for the continuous enzymatic production of 7- aminocephalosporanic acid [J]. Ann N Y Acad Sci, 1995, 750:491 ~ 495
- [28] Golini P, Bianchi D, Battistel E, et al. Immobilization of *D*-amino acid oxidase from different yeasts: characterization and application in the deamination of cephalosporin C[J]. Enzyme Microbial Technol, 1995, 17(4):324 ~ 329
- [29] Conlon H D, Baqai J, Baker K, et al. Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7- aminocephalosporanic acid[J]. Biotech Bioeng, 1996, 46(6):510 ~ 513
- [30] Ju S S, Lin I. L., Chien H R, et al. Substitution of the critical methionine residues in *Trigonopsis variabilis* *D*-amino acid oxidase with leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 186(2):215 ~ 219
- [31] Monti D, Carrea G, Riva S, et al. Characterization of an industrial biocatalyst: immobilized glutaryl-7-ACA acylase[J]. Biotech Bioeng, 2000, 70(2):239 ~ 244
- [32] Nikolov A, Danielsson B. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7- aminocephalosporanic acid (II): single-step procedure using a co-immobilized enzyme system[J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16(12):1037 ~ 1041
- [33] Bianchi D, Bortolo R, Golini P, et al. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-ACA by simultaneous action of immobilized *D*-amino acid oxidase and glutaryl-7-ACA acylase[J]. Appl Biochem Biotech, 1998, 73(2/3):257 ~ 268
- [34] 姜先荣, 杨杰, 任克勤. 用固定化大肠埃希氏基因工程菌株转化戊二酰基-7-氨基头孢烷酸为 7-氨基头孢烷酸的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(4):273 ~ 276
- [35] Alfani F, Cantarella M, Cutarella N, et al. Enzymatic conversion of cephalosporin C into glutaryl 7- aminocephalosporanic acid: a study in different reactor configurations[J]. Biotechnol Lett, 1997, 19(2):175 ~ 178 ■

(上接第 13 页)

步拓宽和深入, 现有的纺丝工艺参数、合成工艺条件等还有待进一步优化。然而, 从已有的研究中, 我们已经看到了导电聚合物纳米化和功能化的希望曙光。有理由相信, 伴随着纳米技术研究手段的日益成熟以及导电聚合物成型加工技术的完善, 导电聚合物纳米纤维可望在微型光电子器件、分子级电路、电磁屏蔽、隐身技术等领域获得广泛的应用, 取得巨大的社会效益和经济效益。

### 参考文献

- [1] MacDiarmid A G. Synthetic metals: a novel role for organic polymers [J]. Synth Met, 2002, 125:11 ~ 22
- [2] Li Xingui, Huang Meirong, Duan Wei, et al. Novel multifunctional polymers from aromatic diamines by oxidative polymerizations[J]. Chemical Reviews, 2002, 102(9):2925 ~ 3030
- [3] Reneker D H, Chun I. Nanometre diameter fibers of polymer, produced by electrospinning[J]. Nanotechnology, 1996, 7:216 ~ 223
- [4] Doshi J, Reneker D H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers[J]. Journal of Electrostatics, 1995, 35:151 ~ 160
- [5] Penner R M, Martin C R. Controlling the morphology of electronically conductive polymers[J]. J Electrochem Soc, 1986, 133(10):2206 ~ 2207
- [6] Langer J J, Framski G, Joachimiak R. Polyaniline nano-wires and nano-networks[J]. Synth Met, 2001, 121:1281 ~ 1282
- [7] Wu Chun-Guey, Bein Thomas. Conducting polyaniline filaments in a mesoporous channel host[J]. Science, 1994, 264:1757 ~ 1759
- [8] 王臻, 力虎林. 模板法制备高度有序的聚苯胺纳米纤维阵列[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(4):721 ~ 723
- [9] Norris I D, Shaker M M, Ko F K, et al. Electrostatic fabrication of ultra-fine conducting fibers: polyaniline/polyethylene oxide blends[J]. Synth Met, 2000, 114:109 ~ 114
- [10] MacDiarmid A G, Jones W E Jr, Norris I D, et al. Electrostatically-generated nanofibers of electronic polymers[J]. Synth Met, 2001, 119:27 ~ 30
- [11] Cai Zhihua, Martin C R. Electronically conductive polymer fibers with mesoscopic diameters show enhanced electronic conductivities[J]. J Am Chem Soc, 1989, 111:4138 ~ 4139
- [12] Li Xiaohong, Zhang Xiaogang, Li Hulin. Preparation and characterization of pyrrole/aniline copolymer nanofibrils using the template-synthesis method[J]. J Appl Polym Sci, 2001, 81:3002 ~ 3007 ■