



PRODUKSI REKOMBINAN SEFALOSPORIN ASILASE SEBAGAI BOKATALIS UNTUK PRODUKSI ASAM 7-AMINOSEFALOSPORANAT

Production of Cephalosporin Acylase Recombinant as Biocatalyst for 7-Aminocephalosporanic Acid Production

Bima Wedana Isdiyono^{1*}, Dudi Hardianto², Fransiskus Xaverius Ivan¹

¹Universitas Surya, Unity Tower Building, Jl. Boulevard Gading Serpong, Kav. M5 No. 21, Summarecon Serpong, Tangerang Selatan, Banten 15810

²Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT, Gedung LAPTIAB 611-112 Kawasan Puspiptek, Tangerang Selatan, Banten 15314

*E-mail: bimawedana14@gmail.com

ABSTRACT

7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) is a precursor for the production of semisynthetic cephalosporin derivatives. The enzymatic 7-ACA production can use two-stage and one-step enzymatic methods. Two-stage enzymatic method uses D-amino acid oxidase (DAAO) enzyme to produce glutaryl-7-aminocephalosporanic acid (GL-7-ACA) in the first stage and glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase to produce 7-ACA in the second stage. The one-stage enzymatic method using cephalosporin acylase (CPC acylase) converts the CPC to 7-ACA directly. The aim of this research was to produce recombinant CPC acylase in *Escherichia coli* BL21(DE3). Transformant culture *E. coli* BL21(DE3) was induced with concentrations of IPTG 0; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 2 mM for 5 hours. The induction time of IPTG was determined at 0, 1, 2, 3, 4, and 5 hours. The results showed that CPC acylase produced by *E. coli* BL21(DE3) with optimum condition of CPC acylase production was 0.5 mM IPTG and optimal induction time of IPTG was 5 hours.

Keywords: Cephalosporin, cephalosporin acylase, 7-ACA, protein expression, *Escherichia coli* BL21(DE3)

ABSTRAK

Asam 7-aminosefalosporinat (7-ACA) merupakan prekursor untuk produksi turunan sefalosporin semisintetik. Produksi 7-ACA secara enzimatik dapat menggunakan metode dua tahap dan satu tahap enzimatik. Metode enzimatik secara dua tahap menggunakan enzim asam D-amino oksidase (DAAO) untuk menghasilkan asam glutaril-7-aminosefalosporinat (GL-7-ACA) pada tahap pertama dan menggunakan asam glutaril-7-aminosefalosporinat asilase untuk menghasilkan 7-ACA pada tahap kedua. Metode enzimatik satu tahap dengan sefalosporin asilase (CPC asilase) mengubah CPC menjadi 7-ACA secara langsung. Tujuan penelitian adalah memproduksi rekombinan CPC asilase di dalam sel *Escherichia coli* BL21(DE3). Kultur Transforman *E. coli* BL21(DE3) diinduksi dengan konsentrasi IPTG 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 mM selama 5 jam. Waktu induksi IPTG ditentukan pada 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa CPC asilase diproduksi oleh *E. coli* BL21(DE3) dengan kondisi optimal produksi CPC asilase adalah konsentrasi IPTG 0,5 mM dan waktu induksi IPTG optimal adalah 5 jam.

Kata kunci: Sefalosporin, sefalosporin asilase, 7-ACA, ekspresi protein, *Escherichia coli* BL21(DE3)

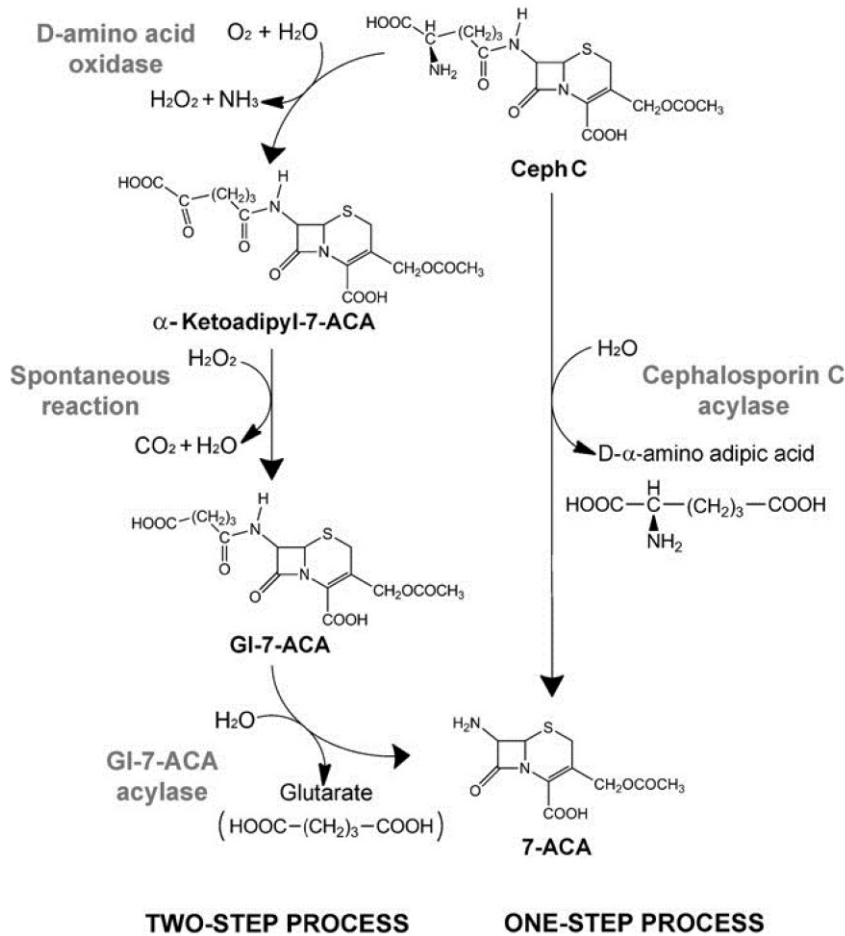
PENDAHULUAN

Sefalosporin C merupakan antibiotik golongan β -laktam yang dihasilkan oleh *Cephalosporium acremonium*. Aktivitas antibakteri sefalosporin C bersifat moderat sehingga sefalosporin C diubah menjadi asam 7-aminosefalosporanat (7-ACA) yang berfungsi sebagai prekursor untuk produksi turunan sefalosporin (Pollegioni et al. 2013; Jobanputra dan Rajendrabhai 2015; Hardianto et al. 2016a).

Harga 7-ACA berkisar antara \$ 115 - 130/kg (Elander 2003) dan pasar sefalosporin yang berasal dari 7-ACA mencapai 40% dari produksi antibiotik di seluruh dunia (Ren et al. 2014). Beberapa antibiotik turunan sefalosporin hasil semisintetik dari 7-ACA, antara lain sefaklor, sefiksim, seftezol, sefotiam, sefazedon, sefazolin, sefoperazon, dan seforadin (Egorov et al. 2000).

Terdapat dua cara produksi 7-ACA yaitu, secara fisikokimia dan enzimatik (Pollegioni et al. 2013; Ren et al. 2014). Cara pertama dengan reaksi fisikokimia 7-ACA

dihasilkan melalui reaksi deasilasi. Cara fisikokimia ini mempunyai banyak kekurangan, diantaranya memerlukan senyawa organik yang bersifat racun, menghasilkan kuantitas dan kualitas produk yang rendah, memerlukan tahapan reaksi yang banyak sehingga memerlukan waktu dan biaya yang banyak (Wang et al. 2012; Pollegioni et al. 2013). Cara kedua dengan reaksi enzimatik secara dua tahap (Gambar 1). Tahap pertama enzim asam d-amino oksidase (DAAO) membentuk glutaril asam 7-aminosefalosporanat (GL-7-ACA) dan tahap kedua menggunakan enzim GL-7-ACA asilase untuk membentuk 7-ACA (Pollegioni et al. 2013; Ren et al. 2014). Beberapa tahun terakhir ini, ditemukan enzim CPC asilase untuk konversi CPC secara langsung menjadi 7-ACA dari beberapa bakteri seperti *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas* sp. GK16, *Pseudomonas* sp. 130 dan *Pseudomonas diminuta* N176 (Cho et al. 2009; Gaurav et al. 2010; Zhang et al. 2014; Hardianto et al. 2016b). Penggunaan CPC asilase prospektif diaplikasikan pada industri



Gambar 1. Biokonversi CPC menjadi 7-ACA secara enzimatik (Pollegioni et al. 2013)

karena mempersingkat proses dan mengurangi biaya produksi (Conti et al. 2014).

CPC asilase dari galur alami mempunyai spesifisitas yang rendah terhadap CPC dan lebih aktif terhadap GL-7-ACA (sekitar 0-4% dari GL-7-ACA) dan terdapat hambatan pada substrat dan produknya serta kemampuan hidrolisis CPC asilase tidak cukup aktif untuk memotong ikatan amida yang terletak pada posisi ke 7 dari CPC. Hal ini menyebabkan terbatasnya penggunaan CPC asilase dalam penerapan industri (Xiao et al. 2014).

Rekayasa genetika atau mutasi terarah telah dilakukan terhadap CPC asilase untuk meningkatkan aktivitasnya dalam konversi CPC menjadi 7-ACA. Mutasi terarah CPC asilase melalui mutasi gen pengkode CPC asilase yang dapat dilakukan dengan cara mengubah konformasi rantai samping dari residu aktif pada enzim (Li et al. 2014). Mutasi terarah pada sefalosporin asilase berhasil meningkatkan aktivitas sebesar 790% (Oh et al. 2003). Aktivitas sefalosporin asilase bertambah dengan meningkatkan ikatan hidrogen antara CPC dengan sefalosporin asilase (Li et al. 2014).

Selain meningkatkan aktivitas CPC asilase melalui mutasi, optimasi produksi protein rekombinan dilakukan karena berperan penting dalam memberikan informasi terhadap studi struktur dan fungsional protein (Yang et al. 2011). Pada penelitian ini, gen pengkode sefalosporin asilase (acyll) (Shin et al. 2009) dioptimasi kodon untuk meningkatkan ekspresi pada *E. coli*, disintesis di Genscript (USA), dan diekspresikan di dalam sel *E. coli* BL21(DE3).

BAHAN DAN METODE

Konstruksi gen CPC asilase acyll

Gen CPC asilase SE83 acyll disintesis oleh GenScript (USA) berdasarkan sekuens asam amino dengan kode GenBank: AAA25690.1. Gen ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21(DE3) (Novagen).

Pembuatan sel *E. coli* kompeten

Koloni tunggal *E. coli* BL21(DE3) dari LB agar dalam cawan petri yang telah diinkubasi selama 16-20 jam pada 37°C diambil dan ditumbuhkan dalam 30 mL LB pada suhu 37°C dengan kecepatan agitasi

200 rpm. Setelah kultur *E. coli* BL21(DE3) mencapai OD₆₀₀ 0,4-0,6 (sekitar 2,5 jam) diambil 15 mL dan disentrifugasi pada kecepatan 2700xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet disuspensi ke dalam 1 mL larutan dingin MgCl₂-CaCl₂ (80 mM MgCl₂-20 mM CaCl₂) dan disentrifugasi pada kecepatan 2700xg (4100 rpm) selama 10 menit dalam suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet disuspensi dalam 600 µL larutan dingin 0,1 M CaCl₂. Sel *E. coli* BL21(DE3) kompeten dapat langsung digunakan atau disimpan pada suhu -80°C (Sambrook dan Russell 2001).

Transformasi

Sel *E. coli* BL21(DE3) kompeten sebanyak 200 µL ditambahkan plasmid pET21a(+)-acyll sebanyak 0,26 µg, dan diinkubasi pada suhu 4°C (*coldbox*) selama 30 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 42°C selama 90 detik dan kemudian ditambahkan 800 µL media LB. Suspensi sel diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit dan sebanyak 50 µL sel transforman disebar dalam LB agar yang mengandung ampisilin dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12-16 jam (Sambrook dan Russell 2001).

Karakterisasi transforman

Isolasi plasmid pET21a(+)-acyll dilakukan menggunakan *high plasmid mini kit* (Geneaid). Sebanyak 1,5 mL suspensi *E. coli* yang mengandung plasmid pET21a(+)-acyll yang diinkubasi semalam dan disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 14.000xg dalam suhu ruang sehingga membentuk sel pelet. Supernatan dibuang dan pelet disuspensi ulang menggunakan buffer PD1 sebanyak 200 µL. Tahap lisis dilakukan dengan penambahan 200 µL buffer PD2 pada sampel, disuspensi ulang, dicampurkan dengan cara diinversi perlahan 10 kali, dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang. Tahap netralisasi dilakukan dengan penambahan buffer PD3 sebanyak 300 µL dan diinversi 10 kali, dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 3 menit pada 14.000xg dalam suhu ruang. Supernatan dipindahkan ke dalam kolom PDH dan disentrifugasi selama 1 menit pada 14.000xg dalam suhu ruang. Supernatan dibuang dan kolom PDH ditambahkan 500 µL buffer W1, disentrifugasi selama 1 menit pada 14.000xg dalam suhu ruang.

Supernatan dibuang dan kolom PDH disentrifugasi selama 3 menit pada 14.000×g dalam suhu ruang untuk menghilangkan sisa buffer W1. Selanjutnya kolom PDH dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf 1.5 mL baru dan ditambahkan dengan buffer EB sebanyak 50 µL, diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit, dan disentrifugasi selama 1 menit pada 14.000×g dalam suhu ruang. Larutan plasmid pET21a(+)-acyll dielektroforesis selama 30 menit pada 100 V. Kemurnian dan konsentrasi plasmid diukur dengan Nanodrop 2000/2000c Spectrofotometer.

Sisipan gen pengkode acyll dalam plasmid pET21a(+)-acyll dideteksi dengan enzim restriksi *SacI* dan *HindIII*. Sebanyak 0,78 µg plasmid pET21a(+)-acyll ditambahkan 2 µL buffer Tango, BSA terasetilasi 0,2 µL, 1 µL *SacI* dan 2 µL *HindIII*. Larutan dicampur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Hasil restriksi dielektroforesis selama 30 menit pada 100 V.

Produksi sefalosporin asilase

Sebanyak 0,1 mL kultur cair *E. coli* BL21(DE3) hasil inkubasi selama 12 jam ditumbuhkan dalam 5 mL LB cair yang mengandung 100 µg/mL ampisilin pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm sampai mencapai OD_{550nm} 0,5. Setelah itu, dilakukan penentuan konsentrasi IPTG (*isopropyl β-D-thiogalactopyranoside*) optimal induksi dengan variasi konsentrasi IPTG 0 (non-induksi); 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 mM pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm selama 5 jam. Kemudian dilakukan optimasi waktu induksi IPTG dengan variasi waktu yaitu 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 jam menggunakan kultur 50 mL (1 mL kultur cair hasil inkubasi 12 jam ditumbuhkan dalam media 50 mL LB cair yang mengandung ampisilin). Kultur diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm selama 1, 2, 3, 4, 5 jam dan disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit dalam suhu 4°C (Margawati dan Ridwan 2009). Pelet disuspensi dalam buffer fosfat 1M pH 8.0 dan dipecah dengan sonikasi pada suhu 4°C (*coldbox*), *pulse on* 5 detik, *pulse off* 10 detik dengan *amplitude* 10% dan waktu total 45 menit. Supernatan dan pelet dielektroforesis dalam SDS-PAGE selama 120 menit dengan tegangan 150 V dan arus 400. Protein dideteksi dengan *commassie blue*.

Penentuan protein total

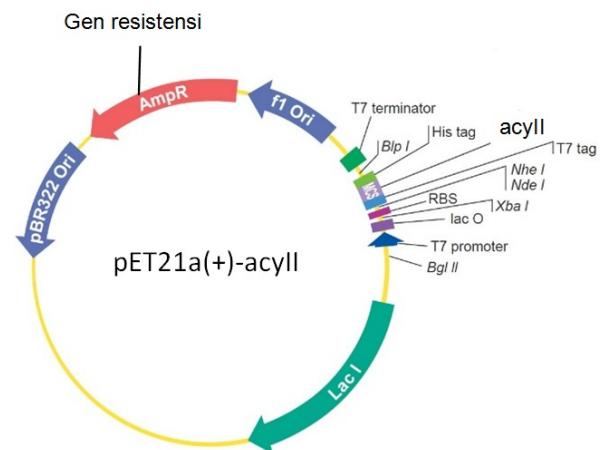
Protein total ditentukan menggunakan metode Bradford. Larutan standar BSA (Bovin Serum Albumin) dengan konsentrasi 0; 0,125; 0,25; 0,75; 1; 1,5; 2 mg/mL diambil sebanyak 20 µL, ditambahkan 1 mL reagen Bradford, dicampur, dan diinkubasi selama 5 menit. Untuk larutan sampel prosedur penentuan sama dengan larutan standar BSA di atas hanya larutan BSA diganti dengan larutan sampel. Serapan larutan standar BSA dan sampel diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan spektrofotometer *ultraviolet-visible*. Kurva standar BSA dibuat berdasarkan pengaruh konsentrasi BSA terhadap serapan pada panjang gelombang 595 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transformasi

Keberhasilan transformasi dideteksi dengan media LB agar yang mengandung ampisilin. Transforman tumbuh dalam media LB agar yang mengandung ampisilin karena mempunyai plasmid pET21a(+)-acyll yang mengandung gen pengkode resisten terhadap ampisilin (Gambar 2).

Saat proses transformasi dilakukan pengujian kemampuan tumbuh sel kompeten dengan menumbuhkan sel kompeten dalam LB agar tanpa ampisilin dan pengujian aktivitas ampisilin dengan menumbuhkan sel kompeten dalam media LB yang mengandung Hasilnya menunjukkan sel kompeten (tanpa plasmid) dapat tumbuh dalam media LB agar tanpa ampisilin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *E. coli* BL21(DE3) dalam kondisi baik

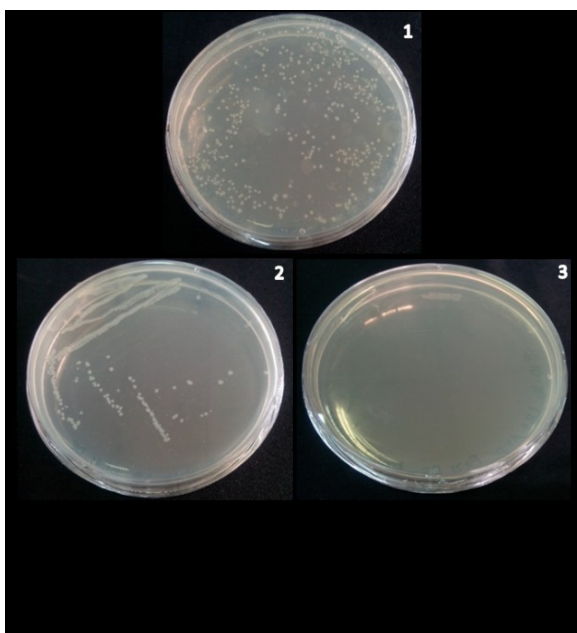


Gambar 2. Plasmid pET21a(+)-acyll (pET21a(+)) 2017)

dan tidak terkontaminasi mikroorganisme lain karena mampu tumbuh dengan baik pada media LB agar dan koloni yang tumbuh seragam. Hasil pengujian aktivitas ampisilin menunjukkan bahwa sel kompeten (tanpa plasmid) tidak tumbuh dalam media LB agar dengan ampisilin. Hasil tersebut menjelaskan antibiotik (ampisilin) yang digunakan dalam keadaan masih baik (belum terurai) karena mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan *E. coli* BL21(DE3) (Gambar 3). Selain hasil pengujian diperoleh nilai efisiensi transformasi sebesar $1,77 \times 10^5$ cfu/ μ g. Transformasi dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan.

Karakterisasi transforman

Nilai konsentrasi plasmid dari kultur 1,5 mL *E. coli* BL21(DE3) (*wild type*) yaitu 52,5 ng/ μ L dengan nilai kemurnian (A260/280) sebesar 2. Nilai konsentrasi tersebut masih rendah jika dibandingkan dengan rata-rata hasil isolasi High-Speed Plasmid Mini Kit sebesar 20-30 μ g/ μ L (*high-copy number plasmid*) dan 3-10 μ g/ μ L (*low-copy number plasmid*) (Geneaid). Nilai konsentrasi yang rendah dapat diakibatkan beberapa faktor seperti pelet sel tidak tercampur dengan sempurna saat penambahan buffer, kultur sel yang digunakan lewat masa tumbuh (*overgrowth*), dan media kultur tidak terbuang sepenuhnya pada tahap preparasi



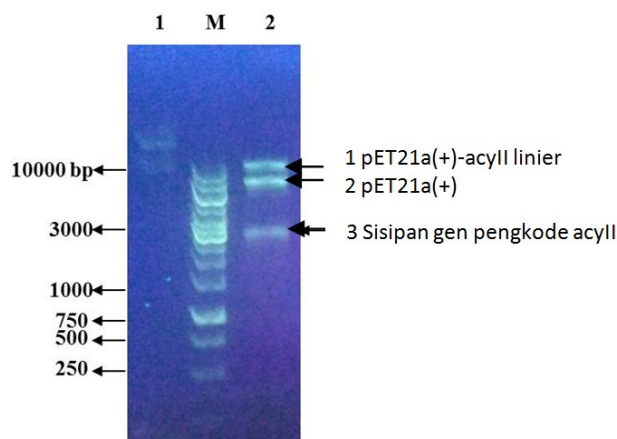
Gambar 3. Hasil transformasi plasmid pET21a(+)-acyII ke dalam *E. coli* BL21(DE3)

sel yaitu setelah sentrifugasi (Geneaid). Kemurnian plasmid adalah 2 berada pada rentang 1,6-2. Jika kurang dari 1,6 maka terdapat kontaminasi protein dan jika lebih dari 2 maka terdapat kontaminasi RNA (Khare et al. 2014).

Hasil restriksi (pemotongan) plasmid pET21a(+)-acyII dengan enzim *SacI* dan *HindIII* menghasilkan 3 pita. Pita 1 (atas) menunjukkan plasmid pET21a(+)-acyII linier, pita 2 (tengah) plasmid pET21a(+)-acyII, dan pita 3 (bawah) sisipan gen pengkode acyII. Terbentuknya 3 pita ini karena waktu inkubasi masih kurang sehingga proses restriksi plasmid pET21a(+)-acyII tidak sempurna (Gambar 4).

Produksi sefalosporin asilase

Produksi sefalosporin asilase pada transforman *E. coli* BL21(DE3) diinduksi dengan IPTG. Produksi sefalosporin asilase dilakukan pada berbagai konsentrasi IPTG dan waktu induksi karena konsentrasi dan waktu induksi mempengaruhi pertumbuhan sel dan jumlah protein yang dihasilkan. Hasil visualisasi SDS-PAGE pengaruh IPTG terhadap produksi sefalosporin asilase dapat dilihat pada Gambar 5. Konsentrasi optimal IPTG untuk induksi produksi sefalosporin asilase yaitu 0,5 mM. Penentuan konsentrasi optimal didasarkan pada ketebalan pita yang terbentuk dan didukung beberapa literatur ekspresi protein rekombinan CPC asilase yang juga menggunakan konsentrasi induksi IPTG 0,5 mM (Ren et al. 2014; Xiao et al. 2014).



Keterangan:

1. Plasmid pET21a(+)-acyII tanpa restriksi
2. Plasmid pET21a(+)-acyII restriksi

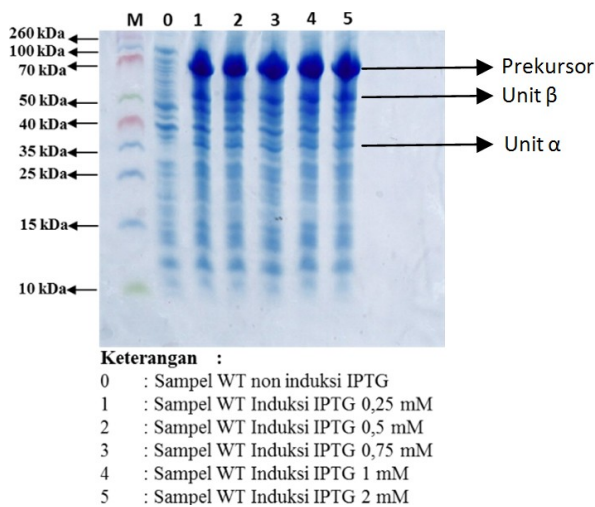
Gambar 4. Hasil pemotongan plasmid pET21a(+)-acyII dengan *SacI* dan *HindIII*

Hasi visualisasi SDS-PAGE juga menunjukkan bahwa prekursor CPC asilase terdiri dari dua unit rantai penyusun protein yaitu rantai β dan rantai α . Pita yang terbentuk selain prekursor merupakan protein pengotor atau protein yang tereksresi selain dari protein rekombinan.

Hasil SDS-PAGE optimasi waktu induksi dengan variasi waktu induksi IPTG yaitu 0 (non-induksi), 1, 2, 3, 4 dan 5 jam menunjukkan adanya pita pada setiap variasi waktu. Jika diamati pita semakin tebal diikuti dengan penambahan waktu induksi IPTG sehingga dapat diketahui lama waktu induksi berpengaruh pada jumlah protein yang dihasilkan. Waktu induksi IPTG optimal adalah 5 jam karena pita yang terbentuk lebih tebal dibandingkan dengan 4 jam (untuk CPC asilase dalam bentuk tidak larut (*inclusion bodies*) (Gambar 6 lajur 7 dan 8). Protein rekombinan yang dihasilkan oleh *E. coli* berbentuk terlarut sekitar 30% dan tidak terlarut (bentuk *inclusion bodies*) sebesar 70% (Yang et al. 2011). Visualisasi SDS-PAGE optimasi konsentrasi dan waktu inkubasi induksi IPTG dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan.

Konsentrasi protein total

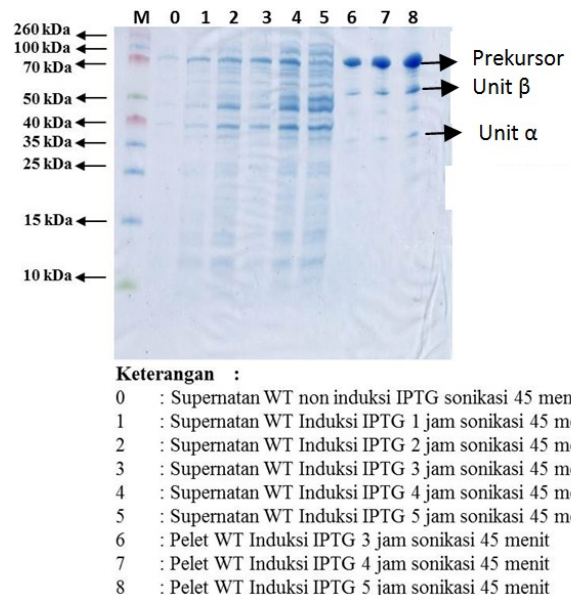
Analisis kuantitatif untuk menentukan konsentrasi protein total digunakan metode Bradford, sebagai konfirmasi lebih lanjut dari data kualitatif dari hasil visualisasi SDS-PAGE (Tabel 1). Berdasarkan data kuantitatif optimasi waktu induksi IPTG memperkuat hasil data kualitatif (visualisasi SDS-PAGE) yaitu semakin lama waktu



Gambar 5. Hasil SDS-PAGE optimasi konsentrasi induksi IPTG

induksi IPTG berbanding lurus dengan jumlah sel yang semakin banyak maka semakin banyak juga protein yang dihasilkan. Konsentrasi protein meningkat seiring lamanya waktu induksi dan pada waktu induksi IPTG selama 5 jam sebesar 1,84 mg/mL (WT) sedangkan induksi IPTG selama 4 jam sebesar 1,25 mg/mL.

Waktu inkubasi yang optimal menurut literatur berada pada rentang 4-5 jam. Waktu induksi lebih dari 5 jam dapat menyebabkan kemampuan tumbuh sel *E. coli* berkurang dikarenakan IPTG memberikan efek toksik terhadap sel. Jumlah sel yang menurun berbanding lurus dengan penurunan konsentrasi protein yang diperoleh (Larentis et al. 2014). Nilai konsentrasi protein yang



Gambar 6. Hasil SDS-PAGE sonikasi 45 menit

Tabel 1. Nilai konsentrasi protein optimasi waktu induksi IPTG

| Volume Akhir (mL) | Waktu (jam) | Optimasi Waktu Induksi IPTG | |
|-------------------|-------------|-----------------------------------|--|
| | | Sampel (Serapan) <i>Wild Type</i> | Konsentrasi Protein (mg/mL) <i>Wild Type</i> |
| 5 | 0 | 0,06 | 0,14 |
| 5 | 1 | 0,17 | 0,48 |
| 5 | 2 | 0,21 | 0,61 |
| 5 | 3 | 0,32 | 0,93 |
| 5 | 4 | 0,436 | 1,25 |
| 5 | 5 | 0,62 | 1,84 |

Keterangan: sampel yang diukur yaitu supernatan hasil sonikasi 45 menit.

diperoleh memiliki nilai standar deviasi 0,069 dan koefisien variasi 0,301.

KESIMPULAN

Plasmid pET21a(+)-acyll berhasil ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21(DE3). Kondisi optimal ekspresi sefalosporin asilase diperoleh pada konsentrasi IPTG 0,5 mM dan waktu induksi 5 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Cho KJ, Kim JK, Lee JH, Shin HJ, Park SS, Kim KH (2009) Structural features of cephalosporin acylase reveal the basis of autocatalytic activation. *Biochem Biophys Res Commun* 390:342-348. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.134
- Conti G, Pollegioni L, Molla G, Rosini E (2014) Strategic manipulation of an industrial biocatalyst - evolution of a cephalosporin C acylase. *FEBS J* 281:2443-2455. doi: 10.1111/febs.12798
- Egorov AM, Kurochkina VB, Sklyarenko AV, Nys PS (2000) Enzymatic transformation of betalactam antibiotics: Trend of development and approaches to practical implementation. *Biocatalysis Fundament Appl* 41:43-46
- Elander RP (2003) Industrial production of β -lactam antibiotic. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:385-392. doi: 10.1007/s00253-003-1274-y
- Gaurav K, Kundu K, Kundu S (2010) Biosynthesis of cephalosporin-C acylase enzyme: optimal media design, purification, and characterization. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 38:277-283. doi: 10.3109/10731199.2010.482036
- Hardianto D, Royani JI, Safarrida A (2016a) Cephalosporin C acylase from microbes for one-step enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *J Pure Appl Microbiol* 10:2495-2499. doi: 10.22207/JPAM.10.4.03
- Hardianto D, Isdiyono BW, Ivan FX (2016b) Biokonversi sefalosporin C menjadi asam 7-aminosefalosporinat dengan sefalosporin asilase. *J Bioteknol Biosains Indones* 3(2): 89-95
- Jobanputra AH, Rajendrabhai DV (2015) Cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* species: Production and enhancement of its activity by optimization of process parameters. *Biocat Agric Biotechnol* 4:465-470. doi: 10.1016/j.bcab.2015.06.009
- Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S (2014) Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J Forensic Dent Sci* 6:81-85. doi: 10.4103/0975-1475.132529
- Larentis AL, Nicolau JF, Esteves Gdos S, Vareschini DT, de Almeida FV, dos Reis MG, Galler R, Medeiros MA (2014) Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Res Notes* 7:671. doi: 10.1186/1756-0500-7-671
- Li Q, Huang X, Zhu Y (2014) Evaluation of active designs of cephalosporin C acylase by molecular dynamics simulation and molecular docking. *J Mol Model* 20:2314. doi: 10.1007/s00894-014-2314-5
- Margawati ET, Ridwan M (2009). Expression and characterization of recombinant protein of JSU pGEX eiber by single or double cell lysis. *Biota* 14:166-171
- Oh B, Kim M, Yoon J, Chung K, Shin Y, Lee D, Kim Y (2003) Deacylation activity of cephalosporin acylase to cephalosporin C is improved by changing the side-chain conformations of active-site residues. *Biochem Biophys Res Commun* 310:19-27. PMID: 14511642
- Pollegioni L, Rosini E, Molla G (2013) Cephalosporin C acylase: Dream and (or) reality. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2341-2355. Doi: 10.1007/s00253-013-4741-0
- Ren Y, Lei Y, Zhu Y (2014) Site-directed mutagenesis of cephalosporin C acylase and enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Turk J Biochem* 39:51-56. doi: 10.5505/tjb.2014.48569
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, New York
- Shin YC, Jeon JYJ, Jung KH, Park MR, Kim Y (2009) Cephalosporin C acylase

- mutant and method for preparing 7-ACA using same. Patent No. US 7,592,168 B2
- Wang Y, Yu H, Song W, An M, Zhang J, Luo H, Shen Z (2012) Overexpression of synthesized cephalosporin C acylase containing mutations in the substrate transport tunnel. *J Biosci Bioeng* 113:36-41 doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.08.027
- Xiao Y, Huo X, Qian Y, Zhang Y, Chen G, Ouyang P, Lin Z (2014) Engineering of a CPC acylase using a facile pH indicator assay. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:1617-1625. doi: 10.1007/s10295-014-1501-9
- Yang Z, Zhang L, Zhang Y, Zhang T, Feng Y, Lu X, Lan W, Wang J, Wu H, Cao C, Wang X (2011) Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS One* 6:e22981. doi: 10.1371/journal.pone.0022981
- Zhang J, Yu H, Wang Y, Luo H, Shen Z (2014) Determination of the second autoproteolytic cleavage site of cephalosporin C acylase and the effect deleting its flanking residues in the α -C-terminal region. *J Biotechnol* 184:138-145. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.016