

## 研究报告

## 高产青霉素酰化酶巨大芽胞杆菌的诱变选育及产酶条件优化

韩蕊<sup>1</sup> 燕瑾<sup>2</sup> 赵利维<sup>1</sup> 张金秀<sup>1,3\*</sup> 王立安<sup>1\*</sup>

(1. 河北师范大学 生命科学学院 河北 石家庄 050024)

(2. 北京鸿仪四方辐射技术股份有限公司 北京 101113)

(3. 南开大学 药物化学生物学国家重点实验室 天津 300071)

**摘要:**【目的】选育高产青霉素 G 酰化酶(PGA)工业菌株。【方法】采用 LiCl-紫外线复合诱变以及常压室温等离子体(ARTP)诱变技术对巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*) ATCC 14945 进行处理。处理菌体涂平板后,将长出的菌落接种到液体培养基中,向培养 6 h 后的二代菌液中添加终浓度为 0.1% 的苯乙酸,28 °C、250 r/min 条件下诱导培养 40 h。对离心后获得的上清(粗酶液)采用 NIPAB 法测定 PGA 酶活力。以 PGA 酶活力最高的菌株为材料,对苯乙酸最佳添加量和最佳诱导时间进行优化,采用 NIPAB 法测定 PGA 酶活力。采用 SDS-PAGE 检测诱变前后巨大芽胞杆菌粗酶液中 PGA 的蛋白特性。【结果】从诱变菌落中筛选到 PGA 酶活力为 39.60 U/mL 的菌株 12-4,酶活力比出发菌株提高了 8.5 倍。该菌株在液体培养 6 h 后添加终浓度为 0.2% 的苯乙酸,继续培养 50 h 后,PGA 酶活力可达 78.45 U/mL,比出发菌株提高了 16.8 倍。诱变前后菌株培养液中的 PGA 蛋白均具  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基;诱变后菌株 PGA  $\alpha$  亚基的量没有明显变化, $\beta$  亚基的量明显增多; $\alpha$ 、 $\beta$  亚基之间的蛋白条带明显增多。【结论】采用诱变技术可提高巨大芽胞杆菌 PGA 活性,获得的诱变菌株 12-4 及培养条件对 PGA 工业化生产具有重要价值。

**关键词:** LiCl-紫外线复合诱变,常压室温等离子体(ARTP)诱变,苯乙酸,青霉素 G 酰化酶,酶活力

Screening and culture optimization of *Bacillus megaterium* strains for penicillin G acylase productionHAN Rui<sup>1</sup> YAN Jin<sup>2</sup> ZHAO Li-Wei<sup>1</sup> ZHANG Jin-Xiu<sup>1,3\*</sup> WANG Li-An<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024, China)

(2. Beijing Hongyisifang Radiation Technology Co., Ltd, Beijing 101113, China)

(3. State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to screen strains with high penicillin G acylase (PGA) activity. [Methods] Induced mutation of *Bacillus megaterium* ATCC 14945 was performed by

基金项目: 河北省教育厅自然科学研究项目(No. QN20131028); 药物化学生物学国家重点实验室开放基金项目(No. 20130270); 河北师范大学科学研究基金项目博士科研启动基金项目(No. L2012B10)

\*通讯作者: 张金秀: Tel: 86-311-80787572; 信箱: 2307615048@qq.com

王立安: Tel: 86-311-80787571; 信箱: wlian1965@126.com

收稿日期: 2014-09-27; 接受日期: 2014-11-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-26

LiCl-ultraviolet composite mutagenesis and atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis. Strains treated by two mutation methods were spread on solid plate culture medium. The colony growing on plate was inoculated into liquid medium and cultured at 28 °C, 250 r/min. Continuing culture was performed via transferring bacterium broth to fresh liquid medium with 10% of inoculum size to obtain second generation broth. After 6 h, phenylacetic acid was added with 0.1% final concentration into second generation broth and cultured for 40 h. The bacterium broth was centrifuged for 5 minutes with 8 000 r/min. The supernatants are crude enzyme and their PGA activities were assayed with NIPAB method. The enzyme-producing conditions, including the addition quantity and timing of phenylacetic acid were optimized using the strain with the best PGA enzyme of activity from the mutants. The protein properties of PGA from the strains induced before and after was analyzed by SDS-PAGE. **[Results]** The strains numbered 12-4 had the highest PGA of 39.60 U/mL. PGA activity increases by 8.5 times than that of original strains. After culturing strains 12-4 for 6 h and adding phenylacetic acid into broth with quantity of 0.2% (W/V), continuing culture for 50 h, the PGA activity from the supernatants reached to 78.45 U/mL, which is 16.8 times than that of original strains. PGA from the strains induced before and after all has  $\alpha$  and  $\beta$  subunit. The amount of  $\alpha$  subunit in PGA from the induced strains was no significant change. However, the amount of  $\beta$  subunit significantly increased, also protein bands locating between  $\alpha$  and  $\beta$  subunit markedly increased. **[Conclusion]** The activity of PGA from *Bacillus megaterium* could be increased by mutation. The obtained strains and PGA-producing conditions in this study are of important value to industrial production.

**Keywords:** LiCl-ultraviolet composite mutagenesis, Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis, Phenylacetic acid, Penicillin G acylase (PGA), Enzyme activity

青霉素 G 酰化酶(Penicillin G acylase, PGA, EC 3.5.1.11)能水解青霉素,产生 6-氨基青霉烷酸(6-APA);而 6-APA 是合成多种抗菌谱广、抗菌作用强的半合成青霉素的重要原料<sup>[1-5]</sup>。另外,此酶还可水解头孢菌素,用于半合成头孢菌素的重要中间体 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸(7-ADCA)的生产。PGA 有多种微生物来源<sup>[2-8]</sup>,如埃希氏大肠杆菌、大肠杆菌 ATCC 11105、克吕沃尔氏菌 ATCC 21285、粘性杆菌 ATCC 15294、雷氏变形菌 ATCC 31052、巨大芽胞杆菌 ATCC 14954 和粪产碱杆菌等。PGA 可分为胞内酶和胞外酶两大类<sup>[3-4]</sup>。胞外酶具有分离纯化方便、易于固定化,对热、pH 和有机溶剂比较稳定而受到工业生产的重视<sup>[2-5]</sup>。大肠杆菌 ATCC 11105 产生的 PGA<sup>[6-8]</sup>,分泌到周质空间中。巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)分泌的 PGA 均属胞外酶<sup>[2-5]</sup>,分离纯化方便,易于制备固定化酶,是生产上采用发酵法生产 PGA 的重要菌株。

相关文献表明,目前报道的生产用巨大芽胞杆

菌种产 PGA 的最高酶活力为 40 U/mL<sup>[4,9-10]</sup>。Rajendran 等<sup>[9-10]</sup>研究了接种量、培养温度、pH、搅拌速度、苯乙酸用量等条件对 PGA 产生的影响,通过对这些条件进行优化,得到 PGA 最大酶活力为 32 U/mL。黄鹤等<sup>[4]</sup>构建了分泌表达 PGA 的基因工程枯草杆菌菌株,PGA 的表达量由 3-6 U/mL 提高到 35-40 U/mL,为目前生产用巨大芽胞杆菌表达量的 6 倍。

采用诱变法对发酵用菌株进行诱变处理、筛选工业菌株是发酵工业降低生产成本、提高产品市场竞争力的最有效手段<sup>[2-3]</sup>。本研究采用 LiCl-紫外线复合诱变以及 ARTP 诱变技术对产 PGA 的巨大芽胞杆菌菌株进行诱变,同时,对筛选到的高产菌株进行产酶条件的优化,以期工业化生产 PGA 提供更优良的菌株及产酶条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*) ATCC 14945,购自北京北纳创联生物技术研究院。

**1.1.2 主要试剂和仪器：**胰酪蛋白胨(OXOID LTD)、苯乙酸(Phenylacetic acid, PAA, 化学合成)、NIPAB (2-硝基-5-苯乙酰胺基苯甲酸)、ANBA (5-氨基-2-硝基苯甲酸)、酵母浸粉、牛肉膏、葡萄糖、氯化钠及其它试剂(国产分析纯), 购自苏州亚科化学试剂股份有限公司。酶标仪(MK3 型), 上海热电仪器有限公司; 台式冷冻离心机(MIKRO 22R), 德国 Hettich 公司; 超低温冰箱(DW-86L338), 青岛海尔特种电器有限公司; 常压等离子体诱变仪(ARTP-II), 北京思清源生物科技有限公司; 全温摇床(HWY-2102), 上海智城分析仪器制造有限公司; 恒温培养箱(GMP-9270 BS-III), 上海新苗医疗器械制造有限公司。

**1.1.3 培养基<sup>[9-11]</sup>：**种子培养基(g/L): 胰酪蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, 牛肉膏 5, 葡萄糖 5, 氯化钠 5, pH 7.5–8.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min; 产酶培养基(g/L): 胰酪蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, 牛肉膏 5, 葡萄糖 5, 氯化钠 5, 苯乙酸(PAA) 1, pH 7.5–8.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌种活化与培养：**采用固体培养基活化巨大芽孢杆菌保藏菌株。挑单菌落接种到含 5 mL 种子液体培养基的试管中, 28 °C、250 r/min 摇床培养 12–14 h, 得到一代菌。按 10%的接种量转接至含 20 mL 种子液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 得到二代菌。向培养 6 h 后的二代菌液中添加 40  $\mu$ L 0.5 g/mL 的苯乙酸(终浓度为 0.1%), 28 °C、250 r/min 条件下诱导培养 40 h。8 000 r/min 离心 5 min 后, 得上清(粗酶液)备用。

**1.2.2 粗酶液酶活力测定：**采用 NIPAB 法, 参照文献[12]进行。(1) ANBA- $OD_{405}$  标准曲线: 用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)对 ANBA 进行梯度稀释(0、4、8、12、16、20、24、28、32 mg/L), 以浓度梯度作为横坐标, 405 nm 条件下测定的  $OD$  值为纵坐标, 绘制标准曲线:  $y=0.0329x-0.0087$ ,  $R^2=0.9988$ 。

(2) 酶活力定义: 定义 37 °C 条件下, 1 min 分解 1  $\mu$ mol NIPAB 所需的 PGA 量为 1 个酶活力单位。来自不同菌株的粗酶液 PGA 酶活力值  $A$  参照下面公式计算:  $A=OD_{405}/t \times V \times p$ 。  $t$  为反应时间(min),  $V$  为酶液样品体积(mL),  $p$  为 0.0329。

**1.2.3 粗酶液中 PGA 的 SDS-PAGE 凝胶电泳：**按常规 SDS-PAGE 凝胶电泳方法检测粗酶液中的 PGA 蛋白特性。

**1.2.4 诱变处理<sup>[13-14]</sup>：**(1) LiCl-紫外线复合诱变: 用种子培养基分别配制含量为 0.5%、1.0%的 LiCl-种子培养基。按 10%的接种量分别向各培养基中加入 500  $\mu$ L 活化菌悬液, 28 °C、250 r/min 培养 12 h 后, 加入 30 粒玻璃珠再振荡培养 0.5 h。将得到的培养液依次 10 倍梯度稀释, 标记为  $10^{-1}$ – $10^{-8}$ 。取稀释至  $10^{-6}$  的菌液 200  $\mu$ L 均匀涂布于种子培养基平板上, 直至菌液渗入培养基为止。分别按照 0、30、60、90、120、150、180 s 的处理时间进行紫外照射(40 W, 垂直距离 30 cm), 每组 3 个重复。照射完毕将平板置于 28 °C 培养箱黑暗培养 48 h 后, 观察平板菌落形态, 统计菌落数目。挑取单菌落按上述方法进行 PGA 酶活性检测。

(2) ARTP 等离子诱变: 将 LiCl-紫外线复合诱变筛选得到的 PGA 酶活性较高的菌株进行活化培养, 取 1 mL 培养 6 h 的二代菌液, 离心收集菌体, 用 1 mL 生理盐水重悬后, 进行 10 倍梯度稀释, 依次标记为  $10^{-1}$ – $10^{-10}$ , 取稀释至  $10^{-7}$  的菌液 10  $\mu$ L 均匀涂于载片上, 进行 ARTP 诱变处理(120 W, 10 slm)。处理时间: 0、10、12、14、16、18、20 s。将处理后载片放入 1 mL 生理盐水中洗脱, 取 200  $\mu$ L 洗脱后的菌悬液进行平板涂布, 将平板置于 28 °C 培养箱黑暗培养 48 h 后菌落计数, 计算致死率。从致死率 70%–80%的平板上挑取单菌落, 按上述方法进行 PGA 酶活性检测。

**1.2.5 高产 PGA 酰化酶菌株产酶条件优化<sup>[9-11,15-18]</sup>：**

(1) 苯乙酸添加时间点的优化: 将活化后的 1 代菌按 10%的接种量转接至含 20 mL 种子液体培养基的

250 mL 的锥形瓶中, 28 °C、250 r/min 培养, 分别于二代菌培养 3、6、9 h 加入苯乙酸(终浓度 0.1%), 诱导表达 0-70 h, 间隔时间取样, 测定酶活性。

(2) 苯乙酸添加量优化: 二代菌培养 6 h 后, 在锥形瓶中分别加入不同浓度的苯乙酸, 使其终浓度分别为 0、0.1%、0.2%、0.3%, 28 °C、250 r/min 培养, 诱导表达 0-70 h, 间隔时间取样, 测定酶活性。

2 结果与分析

2.1 出发菌株粗酶液 PGA 酶活力及 SDS-PAGE 电泳检测

按照 1.2.2 菌液酶活性测定和计算方法, 测得出发菌株粗酶液的酶活力值为 4.65 U/mL。出发菌株粗酶液 PGA 的 SDS-PAGE 电泳图谱见图 1。由图 1 可知, 粗酶液中含有 PGA 应该具有的 α 亚基(25-34 kD)、β 亚基(65-70 kD), 分子量大小与文献报道一致<sup>[6,15,19]</sup>。

2.2 LiCl-紫外线复合诱变结果

2.2.1 不同复合诱变处理获得的诱变菌株数: 不同复合诱变处理获得的诱变菌株数统计结果见表 1。

由表 1 可见, 随着诱变时间延长, 菌落个数减少; 诱变时间大于等于 60 s 后, 1.0% LiCl 浓度下

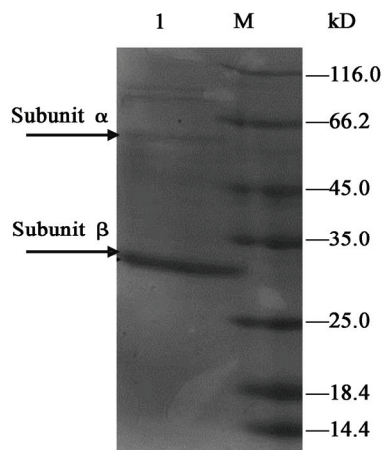


图 1 出发菌株粗酶液中 PGA 的 SDS-PAGE 电泳  
Figure 1 SDS-PAGE analysis of PGA from the supernatant of the original strain  
注: M: Marker; 1: 出发菌株粗酶液PGA的SDS-PAGE电泳条带.  
Note: M: Standard molecular marker; 1: PGA from the supernatant of the original strain.

表 1 氯化锂-紫外线复合诱变获得的诱变菌株数量 Table 1 Colony counts of strains obtained by different LiCl-ultraviolet ray composite mutagenesis		
处理时间 The processing time (s)	0.5% LiCl-紫外线复合 诱变获得菌株数量 Results of 0.5% LiCl	1.0% LiCl-紫外线复合 诱变获得菌株数量 Results of 1.0% LiCl
30	46	50
60	20	14
90	20	10
120	13	9
150	9	3
180	4	2
Sum	112	88
Total	200	

获得的突变菌株数也明显少于相同时间下 0.5% LiCl 浓度的。经过不同 LiCl-紫外线复合诱变, 共得到诱变菌株 200 株。

2.2.2 诱变菌株 PGA 酶活力筛选结果: 将获得的诱变菌株编号 1-200, 分别进行酶活性检测。共获得 9 株 PGA 酶活性较高的诱变菌株, 分别为出发菌株的 4.24 倍、4.0 倍、3.5 倍、1.5 倍、1.5 倍、1.5 倍、2.0 倍、1.8 倍、1.55 倍(表 2)。其中, 以 12 号(诱变条件 0.5% LiCl, 90 s 紫外线诱变)产酶活性最高, 为 19.72 U/mL。

2.3 ARTP 等离子诱变结果

选取 12 号菌株进行重复 ARTP 等离子诱变, 从致死率 70%-80% 的平板上挑取单菌落进行 PGA 酶活性检测, 正向突变菌株 PGA 酶活力结果见表 3。其中, 活性最高的突变菌株为 4 号菌株(12-4), 其酶活性为诱变前菌株的 8.5 倍, 酶活力值为 39.60 U/mL。

2.4 苯乙酸添加时间点对 PGA 酶活力的影响

通常选择在菌种的对数生长期添加诱导剂<sup>[9]</sup>。巨大芽胞杆菌 12-4 的生长曲线见图 2。由图 2 可知, 0-9 h 为该菌株的对数生长期, 10 h 后进入平台期。因此本实验选择 3、6、9 h 作为加入诱导剂的时间点。

表 2 氯化锂-紫外线复合诱变菌株 PGA 活力检测  
Table 2 PGA activity of strains obtained by LiCl-ultraviolet ray composite mutagenesis

菌株编号 Strain number	12	15	28	85	90	93	127	161	162	原始菌株 Original strain
实验处理条件 Processing conditions	0.5% 90 s	1.0% 60 s	0.5% 60 s	1.0% 150 s	1.0% 180 s	0.5% 180 s	1.0% 30 s	0.5% 30 s	0.5% 60 s	—
405 nm 处吸光值 $OD_{405}$	0.649	0.612	0.536	0.230	0.230	0.230	0.306	0.275	0.237	0.153
酶活力 Enzyme activity A (U/mL)	19.72	18.60	16.28	6.98	6.98	6.98	9.30	8.37	7.21	4.65
倍数比 Multiple comparison	4.24	4.00	3.50	1.50	1.50	1.50	2.00	1.80	1.55	1.00

表 3 ARTP 等离子诱变后正突变菌株 PGA 酶活力  
Table 3 PGA activity of strains obtained by ARTP processed

菌株号 The number of the strains	致死率 The fatality rate (%)	诱变率 The mutation rate (%)	$OD_{405}$	酶活力 Enzyme activity A (U/mL)
<i>Bacillus megaterium</i>	—	—	0.153	4.65
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12	—	—	0.649	19.72
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12-1	70	30	1.001	30.43
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12-2	72	28	0.903	27.45
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12-3	82	18	0.743	22.58
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12-4	76	24	1.303	39.60
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12-5	85	15	0.691	21.00
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12-6	79	21	1.173	35.69
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12-7	77	23	0.700	21.28
<i>Bacillus megaterium</i> mutagenesis-12-8	75	25	1.211	36.81

不同苯乙酸添加时间点对 PGA 酶活力的影响结果如图 3 所示。由图 3 可见, 不同时期加入诱导剂后, 随着诱导时间不断延长, 酶活性呈现先上升后下降的趋势。菌株培养 3 h 后加入诱导剂, 52 h 后 PGA 达到最大酶活力, 为 63.07 U/mL; 6 h 后加

入诱导剂, 50 h 后 PGA 达到最大酶活力, 为 64.50 U/mL; 9 h 后加入诱导剂, 在 50–62 h 时, 酶活力最高仅为 16.53 U/mL。3 h 和 6 h 的酶活曲线变化趋势相似, 最大酶活力值接近。综合考虑, 本研究选择培养 6 h 后加入 PAA 为最佳诱导时间点。

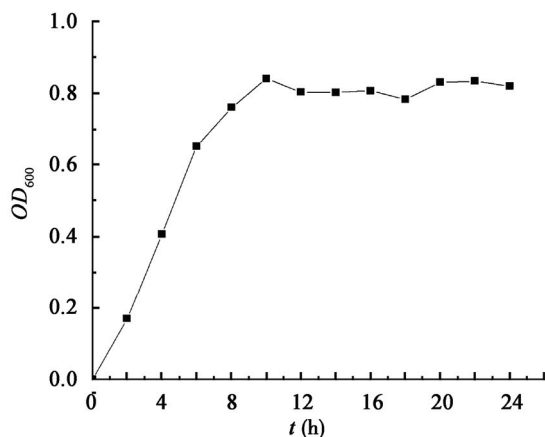


图2 巨大芽胞杆菌 12-4 的生长曲线  
Figure 2 Growth trend chart of strain 12-4

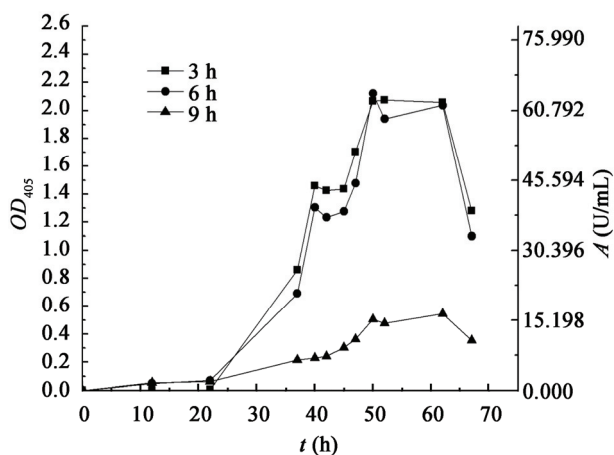


图3 苯乙酸不同添加时间点对菌株 12-4 的 PGA 酶活力的影响  
Figure 3 Effect of adding time of phenylacetic acid on PGA activity of strain 12-4

## 2.5 苯乙酸添加量对 PGA 酶活力的影响

苯乙酸添加量对 PGA 酶活力的影响结果如图 4 所示。由图 4 可知, 随着诱导时间的延长, 各曲线都呈现先上升后下降的趋势, 其中终浓度为 0、0.1%、0.2% 时, 随苯乙酸浓度的增加, PGA 酶活力也相应增高; 诱导 50 h 时酶活力值达到最大, 分别为 59.09、64.50、78.45 U/mL。终浓度为 0.3% 时, 诱导 62 h 后, 酶活力值达到最大, 为 64.16 U/mL。最终确定诱导剂最适添加浓度为 0.2%, 其在诱导时间 50 h 时, 可获最大酶活力(78.45 U/mL)。

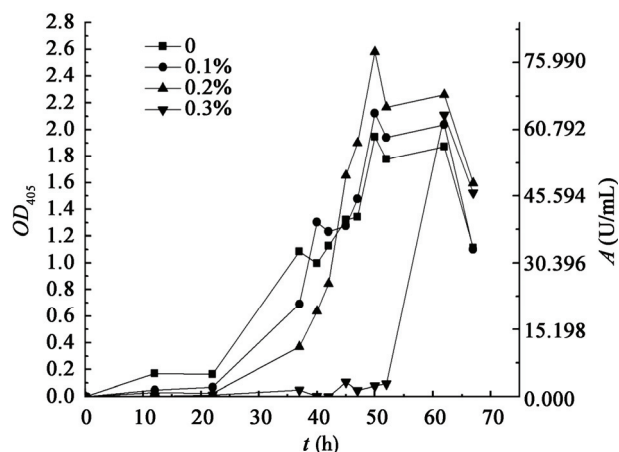


图4 苯乙酸不同添加量对菌株 12-4 PGA 酶活力的影响  
Figure 4 Effect of concentration of phenylacetic acid on PGA activity of strain 12-4

## 2.6 诱变前后菌株粗酶液中 PGA 的 SDS-PAGE 电泳

诱变前后菌株粗酶液中 PGA 的 SDS-PAGE 电泳图谱见图 5。由图 5 可知, 诱变后(泳道 2)菌株粗酶液中 66 kD 以上的杂蛋白明显减少,  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基之间的蛋白条带明显增多。但诱变前后粗酶液中仍具有 PGA 应具有  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基。 $\alpha$  亚基的量没有明显变化,  $\beta$  亚基的量明显增多。

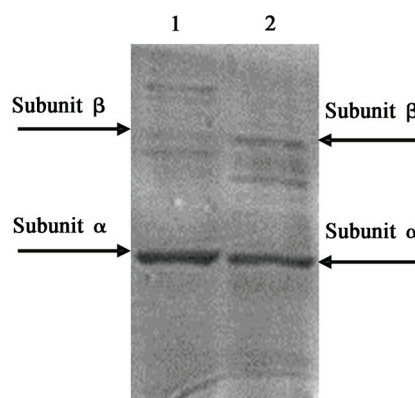


图5 诱变前后菌株粗酶液中 PGA 的 SDS-PAGE 电泳  
Figure 5 SDS-PAGE analysis of PGA from supernatant of the strains before and after mutagenesis

注: 1: 诱变前菌株粗酶液 PGA 的 SDS-PAGE 电泳条带; 2: 诱变后菌株粗酶液 PGA 的 SDS-PAGE 电泳条带。

Note: 1: PGA from supernatant of the strain before mutagenesis; 2: PGA from supernatant of the strain after mutagenesis.



### 3 结论

巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)是生产上采用发酵法生产 PGA 的重要菌株,但其天然菌株 PGA 酶活力普遍偏低。本研究所用菌株的初始酶活力仅为 4.65 U/mL,几乎没有工业应用价值。本研究采用 LiCl-紫外线复合诱变<sup>[11]</sup>结合 ARTP 等离子诱变技术<sup>[14]</sup>,可使该菌株的 PGA 酶活性提高到 39.6 U/mL。随后,结合对 PAA 诱导剂添加时间点及添加量的优化,PGA 酶活性提高到 78.45 U/mL。与原始菌株相比提高了 16.8 倍,为目前生产用巨大芽胞杆菌酶活力的 6-12 倍,对 PGA 的工业化生产具有重要的价值。

长期以来,诱变育种一直是提升发酵工程菌株效价的行之有效的方 法之一<sup>[2-3]</sup>,而 LiCl-紫外复合诱变<sup>[13]</sup>的致死率和诱变率都较高。常压等离子诱变(ARTP)技术是近几年才开始应用的诱变技术<sup>[14]</sup>。该技术采用新型等离子体作为诱变源,具有高效突变、安全、操作快捷、运行成本低等的优势。本实验采用复合诱变和 ARTP 等离子诱变相结合方法用于工业微生物菌株改造,国内外研究中未见报道。

资料显示,刚产生的PGA是无活性的前体蛋白,由信号肽、 $\alpha$ 亚基、连接肽、 $\beta$ 亚基四部分组成。信号肽在前体蛋白分泌到周质空间时被切除,而连接肽在周质空间经自催化被剪切掉。成熟的PGA由 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基组成,分别是结合和催化活性中心, $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基的比例是固定的, $\beta$ 亚基的正确折叠依赖于 $\alpha$ 亚基的正确折叠<sup>[19]</sup>。本研究首先采用NIPAB法检测菌株PGA的酶活力,并采用SDS-PAGE验证了粗酶液中含PGA应该具有的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基。对诱变后菌株粗酶液中PGA的SDS-PAGE检测发现,诱变后菌株粗酶液中66 kD以上的杂蛋白明显减少, $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基之间的蛋白条带明显增多。但诱变前后粗酶液中仍具有PGA应具有的 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基。 $\alpha$ 亚基的量没有明显变化, $\beta$ 亚基的量明显增多。这种变化是否与PGA酶活力变化有关仍需进一步研究。

诱导剂苯乙酸(PAA)的具体作用机制还不清楚,

推测可能有三方面的作用<sup>[11,15-18]</sup>:(1)为菌株提供C源;(2)诱导菌株产酶;(3)影响pH。不同的添加时间点和添加量对菌体产酶表达有很大影响<sup>[9]</sup>。本研究证实,在菌体培养6h后加入终浓度为0.2%的PAA,可使诱变菌株PGA酶活力达到最大。

实验获得的PGA高产诱变菌株(12-4号)虽然比目前工业化生产所用菌株PGA酶活力高6-12倍,对PGA的工业生产具有重要意义,但将其开发为真正可以用于工业化生产的菌株还有许多问题需要解决,如菌株遗传稳定性问题、大规模发酵培养问题、PGA分离纯化及固定化等,这方面的工作我们正在继续。

### 参 考 文 献

- [1] Marešová H, Plačková M, Grulich M, et al. Current state and perspectives of penicillin G acylase-based biocatalyses[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(7): 2867-2879
- [2] Wang ZX, Han WZ, Men DP, et al. Screening of strain producing extracellular penicillin acylase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1992, 32(2): 99-104 (in Chinese)  
王祯祥, 韩文珍, 门大鹏, 等. 胞外青霉素酰化酶产生菌的选育[J]. 微生物学报, 1992, 32(2): 99-104
- [3] Xu W, Yu ZP. Screening of strains producing extracellular penicillin acylase and the conditions for enzyme production[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 1997, 14(4): 269-272 (in Chinese)  
徐威, 余仲平. 胞外青霉素酰化酶产生菌的筛选及产酶条件[J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(4): 269-272
- [4] Huang H, Yang S, Li RB, et al. Optimization of recombinant penicillin G acylase expression in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 17(2): 173-177 (in Chinese)  
黄鹤, 杨晟, 李仁宝, 等. 重组青霉素 G 酰化酶在枯草芽孢杆菌中的表达条件优化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(2): 173-177
- [5] Shi AQ, Hu HH, Hu YH, et al. PGA intergration expression in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2009, 26(5): 776-781 (in Chinese)  
石爱琴, 胡海红, 胡艳华, 等. 青霉素酰化酶(PGA)在枯草芽孢杆菌基因组上的整合表达[J]. 浙江理工大学学报, 2009, 26(5): 776-781
- [6] Yang ZJ, Cai J, Sun J, et al. Constitutive expression and purification of alcaligenes faecalis penicillin G acylase in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(5): 736-740 (in Chinese)  
杨志建, 蔡谨, 孙健, 等. 粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶在大肠杆菌中组成型表达及分离纯化[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 736-740
- [7] Huang Y, Zhang Y, Chu R. Cloning and expression of the pga gene of *Bacillus megaterium* in *E. coli*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1997, 30(2): 107-113

- [8] Pinotti LM, Fonseca LP, Prazeres DMF, et al. Recovery and partial purification of penicillin G acylase from *E. coli* homogenate and *B. megaterium* culture medium using an expanded bed adsorption column[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44(2): 111-118
- [9] Rajendran K, Mahadevan S, Jeyaprakash R, et al. Strategies for enhancing the production of penicillin G acylase from *Bacillus badius*: influence of phenyl acetic acid dosage[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 171(6): 1328-1338
- [10] Rajendran K, Sekar S, Mahadevan S, et al. Biological real-time reaction calorimeter studies for the production of penicillin G acylase from *Bacillus badius*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(8): 3736-3747
- [11] Wang J, Feng WL, Shi CG, et al. Optimization of fermentation culture media for production of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium*[J]. *Hebei Chemical Industry*, 2011, 34(4): 12-14 (in Chinese)  
王静, 冯文亮, 石晨广, 等. 巨大芽胞杆菌产青霉素酰化酶培养基的优化[J]. *河北化工*, 2011, 34(4): 12-14
- [12] Shi XJ, Wang YH, Zhang SL, et al. Evaluation and improvement of determination of penicillin G acylase activity using NIPAB method[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2008, 39(9): 659-661 (in Chinese)  
施晓杰, 王永红, 张嗣良, 等. NIPAB 法测定青霉素 G 酰化酶活力的分析和改进[J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(9): 659-661
- [13] Dong HP, Xia F, Zhang HS. Breeding of high-yield glucoamylase strains by UV-LiCl mutagenesis[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2009(8): 33-34 (in Chinese)
- 董会平, 夏帆, 张华山. 紫外-LiCl 复合诱变选育高产糖化酶菌株[J]. *酿酒科技*, 2009(8): 33-34
- [14] Yang Y, Yu WN, Jin Y, et al. Screening of mutants of xylanase high-producing strain of *Saccharomonospora viridis* by atmospheric and room temperature plasmas and its enzyme characterization[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(5): 905-915 (in Chinese)  
杨颖, 玉王宁, 金一, 等. 常压室温等离子体快速诱变绿色糖单孢菌筛选木聚糖酶高产菌株及其酶学性质研究[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(5): 905-915
- [15] Zhang Q, Xu H, Zhao J, et al. Expression and characterization of a thermostable penicillin G acylase from an environmental metagenomic library[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(3): 617-625
- [16] Vélez AM, da Silva AJ, Luperni Horta AC, et al. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *E. coli* fed-batch cultivations[J]. *BMC Biotechnology*, 2014, 14: 6
- [17] Srirangan K, Orr V, Akawi L, et al. Biotechnological advances on penicillin G acylase: pharmaceutical implications, unique expression mechanism and production strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1319-1332
- [18] Lüders S, David F, Steinwand M, et al. Influence of the hydromechanical stress and temperature on growth and antibody fragment production with *Bacillus megaterium*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(1): 81-90
- [19] Zhang Y, Yang S. Cross-species heterodimers of penicillin G acylase[J]. *Qilu Pharmaceutical Affairs*, 2008, 27(3): 171-174 (in Chinese)  
张燕, 杨晟. 青霉素 G 酰化酶的亚基重组[J]. *齐鲁药事*, 2008, 27(3): 171-174

~~~~~  
(上接 p.1744)

## 征 稿 简 则

### 3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

脚注(正文首页下方):

基金项目:                      基金项目(No.    )

\*通讯作者: Tel:                ; Fax:                ; E-mail:

收稿日期: 2015-00-00; 接受日期: 2015-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-00-00

(下转 p.1787)