

一种简单的从大肠杆菌 细胞中释放青霉素酰化酶的方法

矫庆华 张启先 王祯祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由微生物产生的酶,按其在细胞内、外分布情况,可分为胞内酶和胞外酶两大类。用于制备半合成青霉素的由大肠杆菌 AS 1.76产生的青霉素G酰化酶为胞内酶。如何使微生物细胞破碎或使细胞壁的结构发生改变,透性加大,使胞内的酶释放到胞外,特别是如何找出适合工业规模制取胞内酶的方法,一直是酶工程研究者所关注的问题。已报道的方法^[1,2],大多数适合实验室规模使用,而工业生产所采用的方法多为挤压法^[3,4],此法不仅需要特殊设备,而且破碎效果也不理想,需要多次反复破碎,耗能也大。

我们根据青霉素酰化酶在大肠杆菌细胞内的特殊位置,建立了一种简便有效的新方法:用醋酸丁酯-蔗糖处理大肠杆菌细胞,使胞内的青霉素酰化酶释放出来,这种方法工艺简单,不受体积限制,更不需要特殊的设备,本文将报道这一方法的研究结果。

材料和方法

(一) 菌种

大肠杆菌 AS1.76、E110、D816、AS1.76的诱变株 NP-65号, NP-278号,除 D816 为本所保藏组提供外,其他均为本组保存菌种。

(二) 培养方法

将大肠杆菌 AS1.76、E110、D816、

NP-65号, NP-278号菌分别在如下培养基上培养。培养基成分为(%) : 鱼脞1.0, 氯化钠 0.5, 苯乙酸0.2, 玉米浆0.3, 用 40%NaOH调pH7.0, 500ml 三角瓶装60ml 培养基, 8磅30分灭菌, 将经23h培养的斜面菌种每株加15ml无菌水刮下, 摇匀, 接种量每瓶加1.5ml。在每分钟180次旋转式摇床上, 于28℃培养AS1.76菌株15h, 培养D816和E110菌株18h, 培养NP-65号和NP-278号菌株20h。收集发酵液于3780g离心30min, 弃去上清, 收集菌体立即使用或放冰箱保存。

(三) 青霉素酰化酶的测定方法

用NIPAB法, 按Kutzbach^[5]方法略加以改进, 除反应温度为37℃外, 方法如前报^[6]。总的酶活力回收计算:

$$u = A_{405nm} \times 0.626 \times n \times V$$

n: 稀释倍数; V: 总体积 (ml)

(四) 相对释放率的计算

$$D = S/T \times 100\%$$

T: 为菌体悬浮液中的总酶活力; S: 为菌体悬浮液经离心后上清液中的酶活力。

(五) 仪器

JC-2型超声波发生器, 为通化市无线电元件厂产品, CYC-250型超声波处理机为北京市医疗设备二厂产品。

本文于1985年8月20日收到。

(六) 试剂

6-硝基-3-苯乙酰胺基苯甲酸 (NIP-AB) 为上海生物化学研究所工厂提供, 其他所用药品均为市售分析纯。

结果和讨论

(一) 间歇式超声处理

分别称取大肠杆菌湿菌体5g、7.5g、10g、15g、25g于烧杯中, 然后加入pH7.7,

0.05M磷酸盐缓冲液50ml制成菌悬液, 然后将此装有菌悬液的烧杯置于冰浴中, 放置到处理室内。探头置于液面下10mm左右, 超声30秒, 停止30秒, 处理不同时间取样, 测定酶活力并计算释放率, 结果如表1。

从表1中可以看出, 处理样品的细胞浓度以5:50—10:50为佳, 而浓度再提高, 则释放率显著下降。在适当浓度条件下, 处理的总时间以4min为合适。

表1 细胞浓度和处理时间与破碎效果的关系

酶的相对释放率(%)	处理时间 (min)							
	2	4	6	8	10	12	14	16
湿菌体(g)								
5	94.2	96.8						
7.5	85.2	92.6	89.5	87.4	84.2	101.5	93.7	94.7
10	100.0	97.2						
15	63.2	60.0	61.0	62.0	64.2	63.7	67.9	68.4
25	31.6	31.6	32.6	35.8	36.8	35.3	38.4	37.4

(二) 连续超声处理

称取湿菌体按2:10, 5:10, 7.5:10, 8.5:10, 10:10(W/V)的比例, 与pH7.7,

0.05M磷酸盐缓冲液制成菌悬液, 于CYC-250型液体处理机连续超声处理, 处理结果如表2。

表2 连续超声处理对酶释放率的影响

湿菌体(g)与缓冲液(ml)比例	处 理 能 力		释 放 率 (%)
	ml/h	湿菌体 (g/h)	
2:10	1513	260.0	74.0
5:10	931	312.5	80.7
7.5:10	985	419.7	84.0
8.5:10	940	444.0	83.3
10:10	564	282.0	89.0

表2表明, 湿菌体与缓冲液之比以7.5:10—8.5:10为佳, 如果再提高浓度到10:10, 则破碎湿细胞的量明显下降。

(三) 用醋酸丁酯-蔗糖法处理

本方法是用醋酸丁酯处理大肠杆菌, 使细胞膜上的脂层溶解, 从而增加了细胞的通透性, 加之蔗糖能使胞内外渗透压发生改变, 这样青霉素酰化酶得以释放。

实验所用大肠杆菌 AS1.76 湿菌体与缓冲液比例为1:10, 2:10, 3:10, 5:10, 7.5:10的菌悬液, 经此法处理后其结果如表3, 由表中可以看出, 缓冲液相对量低, 酶释放效果也较差。

我们又分别以1:10和7.5:10的比例, 分别对菌株 AS1.76, NP-65号, NP-278号, E110, D816进行处理, 结果如表4所示。

表 3 醋酸丁酯-蔗糖复合处理对酶释放的影响

湿菌体与缓冲液比例 (g/ml)	平均释放率 (%)
1:10	91.6
2:10	81.3
3:10	78.4
5:10	74.2
7.5:10	75.4

表 4 醋酸丁酯-蔗糖复合处理效果

相对释放率(%) 菌株	湿菌体(g): 缓冲液(ml)	
	1:10	7.5:10
AS1,76	91.6	75.4
NP-65	95.46	
NP-278	93.57	
E110	91.48	90.1
D816		91.2

根据以上实验表明,要应用微生物所产生的胞内青霉素酰化酶制成固定化酶,

首先需要把胞内的酰化酶释放出来成为游离酶。用超声波处理细胞虽然连续式较间歇式不论在处理体积上及浓度方面都有相当大的提高,但是要适应大规模工业化生产的要求,则要用多台仪器操作,而且耗能也大。连续超声处理细胞为湿菌体与缓冲液的比例提高到5:10以上时,则破碎后需反复多次提取,浓度愈高则抽提次数愈多,这样使终体积加大,给后处理带来不便,而用醋酸丁酯-蔗糖法处理细胞当浓度提高到5:10以上时,只需抽提2—3次就足够了。这样终体积相对比连续超声的要小,而且用连续超声来破碎时,有大量杂蛋白被释放出来,而用醋酸丁酯-蔗糖法处理细胞是有选择性地释放青霉素酰化酶,细胞不破裂,大量杂蛋白仍在细胞内,这样就使得上清液单位体积中的酶蛋白浓度高,其比活也高,从而给后处理带来方便。

参 考 文 献

- [1] Darbyshire, J., Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, 5: 147, 1981.
- [2] Scwen, M.D., Applied Protein chemistry, Applied Science pub., London, p.281, 1980.
- [3] Savidge, T.A., Methods in Enzymology, 43: 705, 1975.
- [4] Lagerlöf, E., Ibid., 44: 759, 1976.
- [5] Kutzbach, C, et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 354, S.45—53, 1974.
- [6] 张启先等:微生物学报, 19(3): 302—308, 1979.