

固定化尖镰孢菌细胞的某些酶学特性

盛光阳* 叶钰坤

(广东省微生物研究所, 广州)

尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*) 83-11是一株青霉素V酰化酶的高产菌株。用二醋酸纤维素固定的该菌细胞裂解青霉素V最适的pH范围为7.4至7.6;最适的反应温度为45℃至48℃;其酶活性受8-羟基喹啉和EDTA的可逆抑制; Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 离子则有激活作用。采用间歇式搅拌裂解青霉素V,测得 $\phi 0.6mm$ 颗粒度固定化细胞的表现 k_m 值为11.7mmol/L。裂解青霉素V的反应活化能为33kJ/mol;底物抑制常数 K_s 为1950mmol/L;苯氧乙酸和6-APA的抑制常数分别为220mmol/L和270mmol/L,在裂解反应中,前者是竞争性抑制剂,后者是非竞争性抑制剂。

关键词 青霉素V酰化酶;固定化细胞;酶学特性;动力学参数

近年来,随着固定化技术的发展和青霉素V酰化酶高产菌株的获得,不仅促进了酶法裂解青霉素V制备6-APA技术在工业生产上的应用^[1],也使对青霉素V酰化酶的研究更为深入。Vamdamme与Voets^[2]、Vanderhaeghe^[3]和Savidge^[4]等先后对青霉素V酰化酶的研究进展都作了比较详细的论述。Haagensen^[5]和Karlson等^[6]曾报道固定化青霉素V酰化酶(NOVOZYM217)裂解青霉素V的动力学参数,提出了有关的动力学模型,并据此设计了模拟生产的反应器。Schneider等^[7]对一株铅色灰球菌(*Bovista plumbea*)产生的青霉素V酰化酶进行了分离纯化,并研究其酶学及动力学特性。而在国内尚未见有关青霉素V酰化酶的报道。

我们在筛选和研究青霉素酰化酶过程中,获得一株青霉素V酰化酶产生菌,定名为尖镰孢菌83-11(*Fusarium oxysporum* 83-11)(简称F-83-11),其发酵液的青霉素V酰化酶活力高达30u/ml,经研究证明,该青霉素V酰化酶为胞内酶,采用其固定化细胞裂解青霉素V制备6-APA是可

行和有效的。本文描述其固定化细胞的某些酶学特性和搅拌裂解青霉素V的动力学参数。

材料与方 法

(一) 药品试剂

青霉素V钾盐(1520u/mg)从日本购进,6-APA(含量99%)为本实验室自制,EDTA和8-羟基喹啉是国产AR试剂,其他均为国产CP试剂。青霉素V、6-APA和苯氧乙酸用磷酸缓冲液(pH8.0)配制,8-羟基喹啉用少许甲醇溶解后以蒸馏水稀释,其他试剂均用蒸馏水配制成所需浓度的水溶液。

(二) 固定化细胞的制备

按本实验室改良法制备:取滤干菌体45g,与预先配制的二醋酸纤维素丙酮(8:100W/V)溶胶液100ml混合,搅拌均匀后用成型器成型于冷水中。水洗后用0.1%

本文于1988年1月4日收到。

* 现通讯址:深圳科技工业园区,深圳生物工程公司

成二醛浸泡固定。取 $\phi 0.6\text{mm}$ 颗粒度固定化细胞用于本实验的各项测定。本法制备的固定化细胞,其酶活回收率约为40—45%。

(三) 固定化细胞酶活力测定

采用P-DAB法^[8,9]测定。由于P-DAB和6-APA显色复合物的消光值随溶液被测定时的温度改变而变化,因此测定温度应与制备标准曲线时的温度相一致,并在恒温条件下进行。用本法测得上述颗粒度固定化细胞表观酶活力为55u/g(湿重)左右。

(四) 固定化(F-83-11)细胞裂解青霉素V的反应初速度测定

采用碱滴定法,实验以间歇式搅拌反应进行,将5g滤干的固定化细胞置于一定体积的20mmol/L、pH7.5的磷酸缓冲液中保温($37^{\circ}\pm 0.1^{\circ}\text{C}$),加入所需测试的试剂,然后加入预先保温至 37°C 的青霉素V溶液,使反应总体积为200ml,搅拌反应(约700rpm),每隔1分钟记录维持恒定pH所消耗的NaOH溶液毫升数,pH精确读数为 $\pm 0.01\text{pH}$ 单位。在反应初速度范围内,根据已知碱液浓度计算平均反应初速度。

结 果

(一) pH对反应速度的影响

在恒定青霉素V浓度,恒定固定化细胞量和恒温条件下,改变反应系统的pH,分别测定不同pH条件下的反应初速度。结果表明,固定化细胞在pH7.4—7.6范围内表现最高酶活性。见图1。

(二) 温度对反应初速度的影响

在其他反应条件相同,只改变反应温度的情况下,分别测定其反应初速度、结果表明,固定化细胞裂解青霉素V的最适

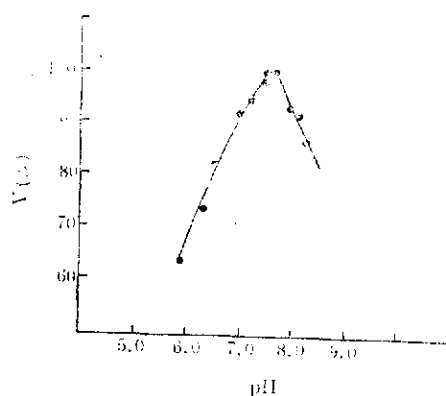


图 1 pH对反应速度的影响
Fig.1 Influence of pH on reaction

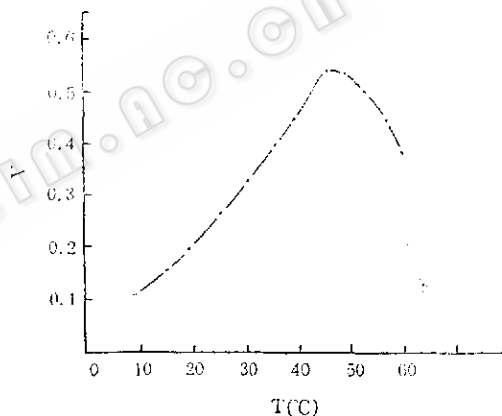


图 2 温度对反应速度的影响
Fig.2 Influence of temperature on reaction

反应温度范围在 45°C — 48°C ,见图2。

(三) 8-羟基喹啉和EDTA 及某些金属离子对酶的活力的影响

在反应条件恒定的情况下,加入不同浓度的上述试剂,分别测定其反应初速度,如表1所示,固定化(F-83-11)细胞的青霉素V酰化酶活性受8-羟基喹啉和EDTA的可逆抑制;金属离子 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 对该酶有激活作用, Fe^{3+} 离子影响不大,而 Ag^{+} 则使其不可逆失活。

(四) 固定化(F-83-11)细胞裂解青霉素V反应活化能的测定

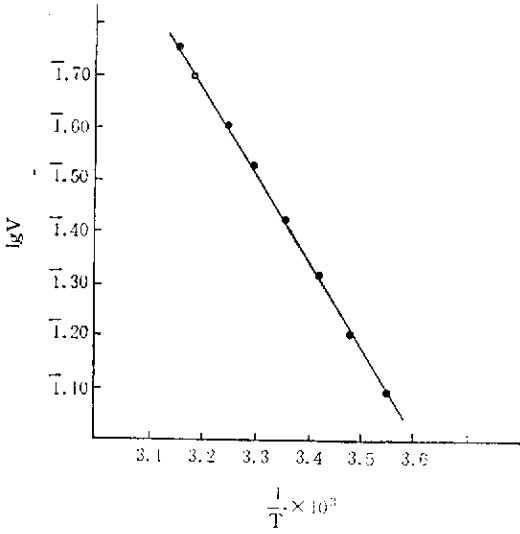


图 3 $\lg V-1/T$ 图解
Fig.3 The diagram for $\lg V-1/T$

表 1 8-羟基喹啉和EDTA 及某些金属离子对酶相对活性的影响

Table 1 Influence of 8-hydroxyquinoline, EDTA and some metal-ion on enzyme relative activity

浓度Conc. ($\mu\text{mol/L}$)	0	25	50	100	200	水洗除去 Remove by washing	加(added) MgCl_2 200 $\mu\text{mol/L}$
试剂 Reagents							
8-羟基喹啉 (8-hydroxyquinoline)	100	85	63	38	—	94	101
EDTA	100	93	85	69	—	96	104
MgCl_2	100	110	114	115	115	107	—
ZnSO_4	100		107	109	109	104	—
MnCl_2	100		114	111	112	105	—
FeCl_3	100		101	100	100	101	—
AgNO_3	100	90	84	78		79	80

条件: Condition, pen-V 10mmol/L, 固定化细胞
Immobilized cell 5g, pH7.5, 37℃

按测定温度对反应速度影响的方法, 在10℃至 60℃ 温度范围内测定反应初速度。实验结果用Arrhenius 图解法求算反应活化能。如图3所示, $\phi 0.6\text{mm}$ 颗粒度固定化细胞的 $\lg V-1/T$ 图基本为一直线, 由直线斜率求得活化能为32.3kJ/mol。

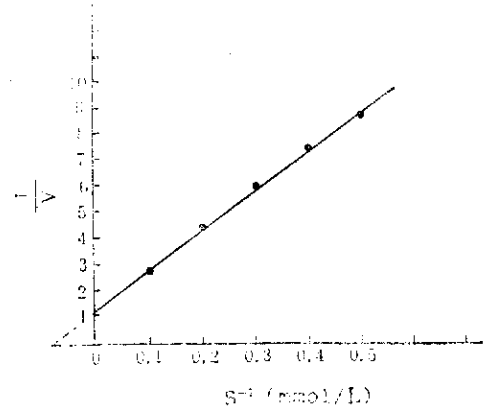


图 4 $1/V-1/S$ 图解
Fig.4 The diagram for $1/V-1/S$

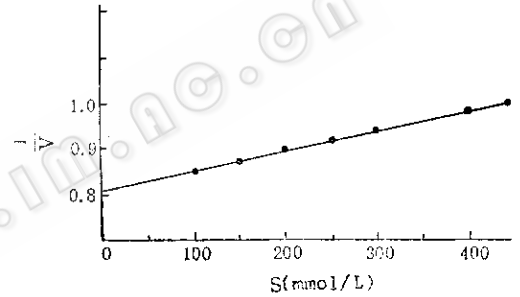


图 5 $1/V-S$ 图解
Fig.5 The diagram for $1/V-S$

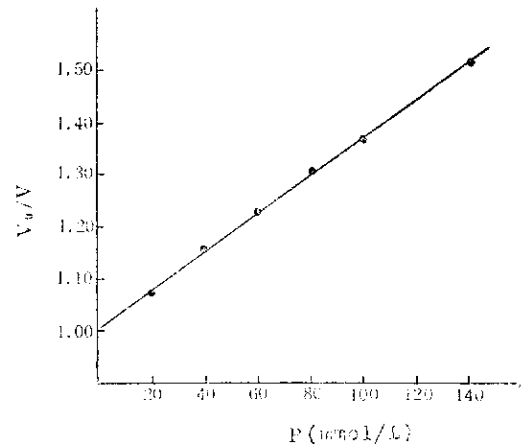


图 6 $V_0/V-P$ 图解
Fig.6 The diagram for $V_0/V-P$

(五) K_m 值的测定

在底物浓度为2—20mmol/L的范围内分别测定37℃、pH7.5时的反应初速度,

用Lineweaver-Burk图解求 K_m 值,从图 4 可见,上述条件下测得 K_m 值为 11.7 mmol/L 。

(六) 底物抑制常数 K_s 的测定

在 37°C 、 $\text{pH}7.5$ 条件下分别测定底物浓度为 20 mmol/L 至 400 mmol/L 时的反应初速度。由于在底物浓度 $S \gg K_m$ 条件下,高浓度底物抑制的反应速度方程式可简化为:

$$\frac{1}{V} = S \cdot \frac{1}{V_{\max} K_s} + \frac{1}{V_{\max}}$$

所以由 $1/V-S$ 图解所得的直线斜率和 V_{\max} 值可求 K_s 值。结果如图 5,求得上述条件下的 K_s 值为 1950 mmol/L 。

(七) 6-APA 抑制常数 K_p 的测定

在上述 pH 和温度条件下,改变加入体系中的 6-APA 浓度,分别测定底物浓度为 10 mmol/L 和 20 mmol/L 时的一系列反应初速度,用Lineweaver-Burk 图分析实验结果,判定 6-APA 是裂解反应的非竞争性抑制剂。其反应速度方程式为:

$$V = \frac{V_{\max} S}{(K_m + S)(1 + P/K_p)}$$

令没有 6-APA 存在时的反应初速度为 V_0 , 则:

$$\frac{V_0}{V} = \frac{V_{\max} S}{(K_m + S)} \cdot \frac{1}{(K_m + S)(1 + P/K_p)} = 1 + P/K_p$$

以 $V_0/V-P$ 作图,由所得直线斜率可求 K_p 值。求得上述条件下的 K_p 值为 270 mmol/L (见图 6)。

(八) 苯氧乙酸抑制常数 K_q 的测定

反应条件如前述,分别测定在不同浓度苯氧乙酸存在下的一系列反应初速度。实验结果同样用 Lineweaver-Burk 图分析,表明苯氧乙酸是裂解反应的竞争性抑制剂。由Dixon图解求 K_q 值。如图 7 所示,

测得上述条件下的 K_q 值为 220 mmol/L 。

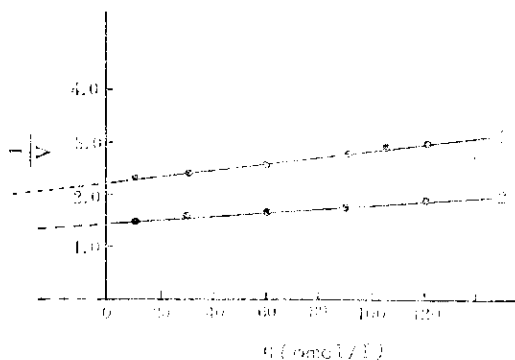


图 7 Dixon图解
Fig.7 Dixon diagram

1. Pen-V conc, 10 mmol/L
2. Pen-V conc, 20 mmol/L

表 2 有关青霉素酰化酶动力学参数比较

Table 2 Comparison of kinetic parameters for some penicillin acylases

参数 底物 Parameters	<i>E. coli</i> 5K (pHM12)		<i>B. plumbea</i> NRRL 3824	<i>F. oxysporum</i> 83-11
	Pen-G	Pen-V	Pen-V	Pen-V
最适 pH (pH optimum)	7.8	8.1	7.0	7.4—7.6
K_m	9—11	5—9	5—10	11.7
K_s	1570	170—180	1500—1700	1950
K_i 6-APA	131	43—52	125	270
K_i 乙酰基团 (K_i -acyl-group)	130	4—5	240	220

(九) 有关动力学参数的比较

我们根据 Stoppok 等^[10] 报道已用于工业生产的 *B. plumbea* 和基因工程菌 *E. coli* 5K/pHM₁₂ 完整细胞酰化酶动力学参数的资料,与本实验结果进行比较,发现固定化 (F-83-11) 细胞酰化酶的某些动力学特性比前两者更为优越。见表 2。

讨 论

1. 据报道, 半裸镰孢菌 (*F. semitectum*) 产生的青霉素 V 酰化酶由于分子中含有两个锌原子, 其酶活性受金属螯合剂 8-羟基喹啉和 EDTA 的强烈抑制^[11]。本实验结果表明, 固定化 (F-83-11) 细胞酶活性被 8-羟基喹啉和 EDTA 可逆抑制, 如果把体系中螯合剂除去或加入相对过量的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 等离子, 则能恢复其酶活性, 说明适当的金属离子对该酶是必要的。至于该酶分子中是否有锌原子尚待进一步研究。

2. 有关动力学参数测定结果表明, 固定化 (F-83-11) 细胞具有适于工业生产的良好动力学特性。其 K_m 值与铅色灰球菌 (*B. plumbea*) 相近。由于 (F-83-11) 具备了有利的抑制特性, 允许在生产中使用高浓度底物 (可高达 20% 的底物浓度),

这对提高 6-APA 产品收率和降低提纯过程的能耗是十分有好处的。

3. 实验表明苯氧乙酸和 6-APA 分别是固定化 (F-83-11) 细胞酰化酶裂解青霉素 V 反应的竞争性和非竞争性抑制剂, 这与 P. Heagensen 等^[6]报道的结果相一致。

4. 我们用 Arrhenius 图解法测得固定化 (F-83-11) 细胞裂解青霉素 V 反应活化能为 32.3 kJ/mol, 还看出其 $\lg V-1/T$ 图基本为一直线。张惠展等^[12]认为用活化能测定及 $\lg V-1/T$ 图解可初步识别固定化细胞内扩散阻力是否存在。从而, 可初步认为本实验所用颗粒度为 $\phi 0.6\text{mm}$ 的固定化细胞内扩散阻力影响不大。

本实验结果将有助于完善和确定用二醋酸纤维素固定 (F-83-11) 细胞裂解青霉素 V 制备 6-APA 的工艺条件, 并将为设计反应器等设备提供必要依据。

参 考 文 献

- [1] Gestretius, S., *Appl Biochem Biotech.*, 7:19—21, 1982.
- [2] Vandamme, E. J. and Voets, J. P., *Adv. Appl. Microbiol.*, 17:311, 1974.
- [3] Vanderhaeghe, H., *Methods in Enzymology* Vol., 43, p.721, 1975.
- [4] Savidge, T. A., *Drugs and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 22 *Biotech. of Industrial Antibiotics*, 172—200, 1983.
- [5] Haagensen, P. et al., *Biotech. Bioeng.*, 25:1873, 1983.
- [6] Karlsen, L. G. and Villadsen, J., *Biotech. Bioeng.*, 26:1485, 1984.
- [7] Schneider, W. J. and Max, Roohe., *Biochim. Biophys. Acta*, 452:177, 1976.
- [8] Balasinghan, K. et al., *Biochim. biophy. Acta*, 276:252—256, 1972.
- [9] 王庆诚等: 生物化学与生物物理学报, 12 (4): 305, 1980.
- [10] Stoppok, E. et al., *Poster. Presentation at the 6th International Fermentation Symposium London, Ontario, Canada* 1980.
- [11] Waldschmidt-Leitz, E. and Breteel, G., *Z. Physiol. Chem.*, 337:222, 1964
- [12] 张惠展: 医学工业, 8:1—6, 1980.

SOME ENZYMOLOGICAL AND KINETIC PROPERTIES OF IMMOBILIZED *FUSARIUM OXYSPORUM* 83-11 CELL

Sheng Guangyan Ye Yukun

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou)

Fusarium oxysporum 83-11 is a strain with high activity of penicillin-V acylase. The cells were immobilized by entrapping into diacetate cellulose. We found that the optimum pH was 7.4—7.6 and the optimum temperature was 45°C—48°C for the cleavage of pen-V. In addition, the enzyme activity of immobilized cell was reverse inhibited by 8-hydroxyquinoline and EDTA, but Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} has a activation.

The apparent K_m for pen-V was 11.7mmol/L which was determined with ϕ 0.6mm particle immobilized cell by stirred method. The activation energy for cleavage of pen-V was evaluated by Arrhenius graphical method, the value obtained was 32.3kJ/mol. The substrate inhibition constants K_s was 1950mmol/L. The inhibition constants K_q and K_p for phenoxyacetic acid and 6-APA, the cleavage products of pen-V, were 220mmol/L and 270mmol/L respectively. For the cleavage of pen-V, The first is a competitive inhibitor, and the second is a non-competitive inhibitor.

Key words

Penicillin V acylase; immobilized cell; enzymological properties; kinetic parameter