

# 以环氧乙烷为活性基的多孔颗粒状 固定化青霉素酰化酶的制备\*

鲜海军

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要:**报道了用以环氧乙烷为活性基的多孔颗粒状载体 (Eupergit-C) 制备固定由巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 产生的青霉素酰化酶的研究。用己二胺, 赖氨酸对载体进行化学修饰后制备固定化酶, 获得了较好的固定结果。用未修饰的载体制备固定化酶, 经 24h 固定反应, 酶活力达 176.5IU/g (wet), 酶活力总收率达 53.7%, 酶蛋白的固定量为 19.7mg/g (dry), 酶蛋白的固定效率达 87.5%。游离酶的酶浓度对制备固定化酶的活力无显著影响。当加酶量从 312IU/g (dry) 上升到 6250IU/g (dry) 时, 固定化酶活力从 89IU/g (wet) 上升到 475IU/g (wet), 总收率和固定化效率分别从 99% 和 99% 下降到 26.5% 和 32.5%, 酶蛋白的固定量从 6.9mg/g (dry) 上升到 112mg/g (dry), 酶蛋白的固定效率从 99% 下降致 80.5%。以酶活力为 155IU/g (wet), 酶蛋白固定量为 22mg/g (dry) 的固定化酶水解青霉素 G 钾盐, 经过 20 批循环水解后, 剩余酶活力为 92.5%。

**关键词:**固定化酶, 青霉素 G 酰化酶, 环氧乙烷, 颗粒状载体, 巨大芽孢杆菌

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0024-05

## IMMOBILIZATION STUDIES OF PENICILLIN ACYLASE ON THE POROUS BEAD WITH OXIRANE GROUPS

XIAN Hai-Jun

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract:** Penicillin Acylase from *B. megaterium* was immobilized on the porous bead carriers based on methacrylate, N, N-methylene-bis-methacryamide, glycidyl methacrylate, Allyl ether copolymers (Eupergit-c) either directly or after chemical modification with 1, 6-deaminohexane and L-Lysine. Directly binding with oxirane groups, the most efficient immobilization results were achieved. The immobilization yield was markedly influenced by the ratio of amount of free enzyme to the weight of the carrier. The specific activities of 89 up to 475IU/g (wet) and binding protein of 6.9 to 112 mg/g (dry) were obtained when the free enzyme added to the immobilization solution was from 323IU/g (dry) up to

\* 国家科技攻关项目 (No. 85-722-03-05)

收稿日期: 2001-02-21, 修回日期: 2001-05-11

6250IU/g (dry). The residual activity of immobilized PGA in a recycling system at the 20th was about 92.5% of the initial value.

**Key words:** Immobilization of Enzyme, Porous bead carrier with oxirane groups, Penicillin Acylase, 6-APA, *Bacillus megaterium*.

青霉素 G 酰化酶仅能催化水解  $\beta$ -内酰胺类抗生素的线性酰氨键, 而不催化水解  $\beta$ -内酰胺的环内酰氨键, 因而被广泛应用于生产 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 和 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA)<sup>[1,2]</sup>。用固定化青霉素酰化酶生产 6-APA 和 7-ADCA 具有稳定性好, 转化率高, 产品纯度高, 污染少, 成本低的特点, 是一种重要的医药工业用酶。用于制备固定化青霉素酰化酶的载体材料包括天然的和人工合成的多聚化合物。由甲基丙烯酸酰胺 (Methacryamide), N, N-甲叉-双甲基丙烯酸酰胺 (N, N-methelene-Bis-mathacrylamide), 缩水丙烯酸甲酯 (Glycidyl methacrylate) 和丙烯缩水醚 (Allyl glycidyl ether) 的单体形成的共聚体属于弱阳离子交换树脂。由该树脂制成的具有环氧乙烷活性基的多孔球状载体, 不仅使用方便, 而且有利于化学修饰。Kolpillai, Pradeeo, Skovby, Kramer 等<sup>[3-6]</sup> 对这类载体的制备方法进行了详细的研究, 制备出比较理想的多孔球状载体 Eupergit-c, 用于制备固定由大肠杆菌产生的胞内青霉素酰化酶获得了比较好的结果。我们利用这种载体进行制备固定由巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 产生的胞外青霉素酰化酶的研究。本文报道研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

青霉素 G 钾盐 (PGK) 为河北制药厂生产, 己二胺, 赖氨酸, 戊二醛 (GA), 对二甲氨基苯甲醛 (PDAB), 磷酸氢二钾 ( $K_2HPO_4$ ) 和磷酸二氢钾 ( $KH_2PO_4$ ) 等化学药品均为国内市售分析纯试剂。液体青霉素酰化酶 (PGA) 为本研究所王祯祥教授选育的巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 产生的胞外青霉素酰化酶, 比活力为 45IU/mg (protein)<sup>[7]</sup>。载体 Eupergit-c 由 Kramer DM 教授赠送, 其固体量与吸水量之比 1: 2.6 (w/w)。

### 1.2 方法

**1.2.1 酶活力的测定:** 对二甲氨基苯甲醛 (PDAB) 比色法<sup>[8]</sup>。在 PGK 浓度为 2%, pH 为 8.0 的 0.05mol/L 磷酸缓冲液中, 温度为 37℃, 测定固定化酶是在磁力搅拌反应器中进行反应, 测定液体酶是在水浴中进行反应, 以每分钟产生 1 $\mu$ mol 的 6-APA 所需的酶量为 1 单位 (IU)。

**1.2.2 酶蛋白的测定:** 采用 Folin-Phenol 试剂显色法<sup>[9]</sup>。以牛血清蛋白为标准。

**1.2.3 载体的化学修饰:** 按 Drobnid J<sup>[10]</sup> 方法进行。将 1.6 二胺基己二胺与载体的水溶液混合加热回馏 5h, 或将赖氨酸与载体在 4mol/L 的 NaOH 溶液中加热回馏 24h, 用水洗净备用。

**1.2.4 固定化程序:** 按 Kramer DM<sup>[7]</sup> 的方法进行。将载体放入含酶的 pH 为 7.7, 浓度为 1mol/L 的磷酸缓冲液中, 室温静置反应。经过修饰的载体, 用戊二醛活化后, 加入含酶的缓冲液中制备固定化酶<sup>[7]</sup>。

**1.2.5 固定化酶水解 PGK 的转化率和稳定性:** 水解反应是在批式循环反应器中进行, 在 0.05mol/L, pH8.0 的磷酸缓冲液中, PGK 浓度为 10%, 酶负荷为 150IU/g (PGK), 批投 PGK 为 10g, 转化率达 98% 以上。用 pH 自动调控仪控制加入 2 mol/L 的 NaOH 溶液,

使反应液维持在 pH8.2~8.4, 用 PDAB 法测定反应过程中 6-APA 的产生量, 从而计算出转化率。

## 2 结果

### 2.1 化学修饰载体对酶固定的影响

用己二胺和赖氨酸对 Eupergit-c 载体化学修饰后, 经戊二醛活化, 再用来制备固定化酶, 结果如表 1 所示。经过用己二胺和赖氨酸修饰的载体在不同的加酶量条件下都能制备出固定化酶, 其酶活力, 总收率等各项指标都比未修饰的载体低。因此, 最好直接用载体 Eupergit-c 制备固定化胞外青霉素酰化酶。

表 1 对载体化学修饰后的固定化结果

修饰内容	加酶量 IU/g (wet)	活力 IU/g (wet)	总收率* %	固定化效率** %	蛋白固定量 mg/g (dry)	蛋白固定效率 %
未修饰	645	300	46	46.6	46	98
己二胺修饰	645	166	25.7	26	46	98
赖氨酸修饰	645	230	36.2	41.8	39.6	82.5

\* 固定化酶活力与加入酶活力之比再乘以 100, \*\* 固定化酶活力与加入酶活力与反应液中剩余酶活力之差的比再乘以 100

### 2.2 加酶量对酶固定的影响

加酶量对固定化酶制备的影响如表 2 所示。当加酶量从 312.5 IU/g (dry) 增加到 6250 IU/g 时, 固定化酶的活力从 89 IU/g (wet) 上升到 475 IU/g (wet), 总收率和固定化效率逐渐降低。分别从 99% 和 99% 下降到 26.5% 和 32.5%。对酶蛋白的固定量则从 6.9mg/g (dry) 上升到 112mg/g (dry), 对酶蛋白的固定效率从 99% 下降到 80.5%。

表 2 不同加酶量的固定结果

加酶量 IU/g (dry)	活力 IU/g (wet)	总收率* %	固定化效率* %	蛋白固定量 mg/g (dry)	蛋白固定效率 (%)
312.5	89	99	99	6.9	99.5
1250	200	55.3	58.3	27.2	98
2500	327	47	48.3	52.8	96.5
4375	430	35.4	38.5	85.9	88
5625	470	29.4	34.1	106	84.8
6250	475	26.5	32.5	112	80.5

\* 同表 1

### 2.3 酶浓度对固定化酶制备的影响

如表 3 所示, 在实验的加酶量和酶浓度的范围内, 反应液中的酶浓度对固定化酶的活力和总收率没有显著的影响。但对酶蛋白的固定量和固定效率则随酶浓度的降低而稍有减少。

表 3 酶浓度对固定化的影响

加酶量 IU/g (dry)	酶浓度 IU/mL	酶活力 IU/g (wet)	总收率* %	蛋白固定量 mg/g (dry)	蛋白固定效率 %
625	125	138	79	13.8	99
625	41.67	132	78	13.6	98.4
1250	250	184	55.1	27.4	98.4
1250	83.3	183	55	27.1	97.2
1875	375	287	52	41.2	98.8
1875	125	290	54	40.3	96.8

\* 同表 1

## 2.4 酶连接反应时间的影响

连接反应时间对酶固定效果的影响如表4所示。经过24h的酶连接反应,固定化酶活力达176.5IU/g(wet),酶活力总收率达53.75%左右,再继续延长酶连接反应时间到96h,固定化酶的活力达187IU/g(wet)。经24h的反应后,酶蛋白固定量达19.7mg/g(dry),酶蛋白固定效率达87.5%,反应96h,酶蛋白的固定效率达96.3%。

表4 连接时间对酶固定化的影响

时间(h)	1	12	24	48	72	96
酶活力(IU/g)	110	138	176.5	176	182	187
总收率(%)	33.5	41.25	53.75	53.5	53	57
蛋白量(mg/g)	11.9	16.3	19.7	20.6	20.9	21.6
蛋白固定效率(%)	55	72	87.5	92	93.7	96.3

\* 同表1

## 2.5 固定化酶水解PGK的特性

用酶活力为150IU/g(wet),酶蛋白固定量为22mg/g(dry)的固定化酶水解PGK的特性如图1图2所示。经过40min的水解(图1),6-APA的浓度上升到44.8mg/mL,转化率达99.5%。

由水解PGK的操作稳定性(图2)可知,经过20批水解后,剩余酶活力为92.5%。可见该固定化酶水解PGK的稳定性是比较好的。

## 2.6 讨论

以上的结果表明,利用以环氧乙烷为活性基的多孔球状载体Eupergit-C制备固定化胞外青霉素G酰化酶具有酶蛋白固定量大,酶活力高,产率高,水解PGK稳定性好的特点,表明该载体是一个制备固定化酶的理想载体。利用己二胺和赖氨酸对载体中的环氧基团进行化学修饰后再用于制备

固定化酶,获得了较好的结果。虽然制备的固定化酶的活力,收率都比未修饰的载体低,但说明载体中的环氧基是易于化学修饰的。

利用甲基丙烯酰胺, N, N-甲叉-双甲基丙烯酰胺, 缩水丙烯醚和缩水丙烯酸甲酯为单体聚合制成的共聚体,是属于多孔弱阳离子交换树脂(porous weak cation-exchange resin),对酶蛋白具有吸附能力,载体所具有的多孔性,为酶蛋白的固定提供了较大的空间和表面积,环氧乙烷的活性基易于与酶蛋白分子进行化学结合,形成牢固的化学键。因此,这种载体集中了有利于制备固定化酶的物理和化学特性,利用这种载体容易制备出高质量的固定化酶。同时其所具有的环氧基团易于进行化学修饰,使这类载体在固定化酶的制备中具有广泛的使用性能。因此,掌握和改进这类载体的制备工艺,

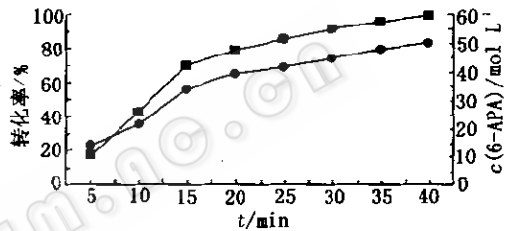


图1 固定化酶转化PGK的特性

■ 转化率(%), ● 6-APA(mg/mL)

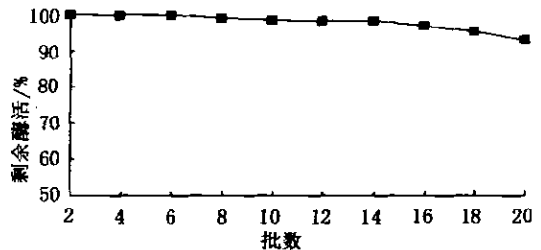


图2 固定化酶水解PGK的稳定性

对发展固定化酶产业将有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Vandamme E J. Bioreactor Immobilized 'Enzyme and cells: Fundament and Application', Ed. by M. Mu-Yang, Elsevier Applied Science, New York, 1988, 261 ~ 286.
- [2] Altan E. Process Biochemistry, 1993, 28: 311 ~ 318.
- [3] Leena K, Rohini A, Gadre, *et al.* J Chem Tech Biotechnol, 1990, 49: 173 ~ 182.
- [4] Michael H B, Skovby, Jokgen K. J Appl Polymer Science, 1990, 39: 169 ~ 177.
- [5] Goekcek Z, Kramer D M. Eur Congr Biotechnol, 1987, 2: 341.
- [6] Kramer D M, Lehmann K, Pennewiss H, *et al.* Enzyme Eng, 1978, 4: 153 ~ 154.
- [7] 鲜海军, 王祯祥. 微生物学报, 2001, 41 (4): 475 ~ 480.
- [8] Shewale J G, Kumark K, Ambekar G R. Biotechnol Technoques, 1987, 1: 69 ~ 72.
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265 ~ 275.
- [10] Drobnik J, Saudek V, Svec F, *et al.* Biotech Bioeng, 1979, 21: 1317 ~ 1322.