

# 固定化大肠杆菌 AS1.76 青霉素酰化酶的研究

张渝英 王祯祥 王学勤 张启先

(中国科学院微生物研究所, 北京)

太原制药厂中心实验室固相酶组

(太原)

用固定化青霉素酰化酶连续生产 6-氨基青霉烷酸(简称 6-APA) 已有许多报道<sup>[1-3]</sup>。近年来关于固定化微生物细胞的研究不断发展<sup>[4,5]</sup>。Sato 等<sup>[5]</sup>曾用固定化的产青霉素酰化酶的细胞连续生产 6-APA。我们用双功能试剂戊二醛固定化大肠杆菌 AS1.76 的青霉素酰化酶, 用来水解青霉素 G 生产 6-APA。现将结果报告如下。

## 材 料 和 方 法

### 一、菌体的培养及试剂

1. 菌体的培养: 利用张启先等<sup>[6]</sup>筛选的大肠杆菌 AS 1.76 并按其报道的方法培养, 离心收集菌体, 用生理盐水洗二次, 将菌体加醋酸丁酯置冰箱中备用。

2. 2-硝基-5-苯乙酰胺基苯甲酸(简称 NIPAB): 参照上海第三制药厂等单位报道<sup>[7]</sup>的方法制备。熔点为 207—209℃。

3. 青霉素 G 钾盐: 华北制药厂产品。

4. 戊二醛: 英国 Koch-Light 公司产品或由太原制药厂和天津河北制药厂提供 2-乙氧基-3, 4-二氢-2H-吡喃, 按 Fiseser 等<sup>[8]</sup>报道的

方法制备。

## 二、酶活力的测定

1. 青霉素酰化酶活力的比色测定：参照 Kulsbach 等<sup>[9]</sup>报道的方法进行。

2. 青霉素酰化酶活力的滴定法测定：按碘量法<sup>[10]</sup>测定 6-APA 的含量。

3. 固定化细胞中酶的回收率的表示方法：

$$\text{回收率} = \left( \frac{\text{固定化细胞中酶活力}}{\text{原细胞中酶活力}} \times 100 \right) \%$$

## 三、固定化细胞的制备

将冰箱保存的菌体，吹风除去醋酸丁酯后取 1 克(湿)原细胞，加 2 毫升 0.1M pH4 的醋酸钠-醋酸缓冲液搅拌均匀，再加 0.2 毫升 25% 戊二醛。在室温搅拌 30 分钟后，离心。沉淀用生理盐水洗涤二次，离心即得固定化细胞。

## 实验结果

### 一、各种因素对固定化作用的影响

1. pH 对固定化细胞中酶回收率的影响：原细胞中青霉素酰化酶在不同 pH 下，酶活力变化如图 1。

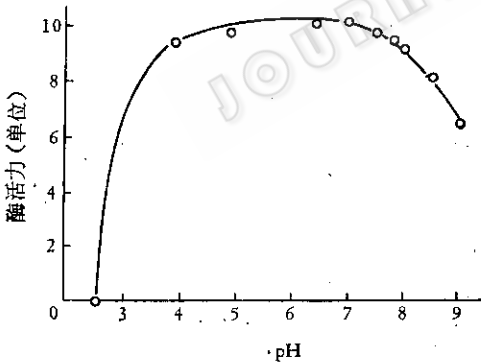


图 1 原细胞中青霉素酰化酶在不同 pH\* 下，放置 1 小时后，酶活力变化(NIPAB 法)

\*pH2.5 0.1 M 柠檬酸-柠檬酸钠；pH3.9—4.9 0.1 M 醋酸-醋酸钠；pH 6.5—8.0 0.1 M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠；pH8.5—9.0 0.1 M 硼砂-硼酸。

图 1 表明，原细胞中的青霉素酰化酶活性在 pH 2.5 时全部失活，在 pH 4.0—8.0 时，酶活性差别不大，在 pH 8.0 以上，明显失活。

根据上述结果，各取 1 克(湿)原细胞，分别加入 0.1 M 不同 pH 缓冲液 24 毫升，搅匀后再

分别加入 2.4 毫升 25% 戊二醛于室温搅拌 30 分钟后离心。再用生理盐水洗涤二次，用 NIPAB 法测定酶活力，结果见表 1。

表 1 固定化细胞时 pH 的影响

固定化 pH	3.9	4.9	6.5	7.4	7.9	8.9
回收率(%)	96.6	82.8	87.6	84.6	86.3	70.1

由表 1 表明，在 pH3.9 时进行固定化，回收率较高。

2. 戊二醛用量对固定化细胞中酶回收率的影响：各取 1 克(湿)原细胞，在 pH4 的醋酸-醋酸钠缓冲液中分别加入不同量的戊二醛进行固定化，结果见表 2。

表 2 戊二醛用量对固定化细胞中酶回收率的影响

原细胞湿重(克)	pH4 缓冲液(毫升)	戊二醛量		戊二醛最终浓度(%)	回收率(%)
		25% 戊二醛量(毫升)	纯戊二醛(克)		
1	24	2.4	0.6	1.33	84.6
1	2	0.2	0.05	2.28	81.5
1	0	0.2	0.05	25	75.4

由表 2 可知，1 克湿细胞加 24 毫升缓冲液，2.4 毫升戊二醛回收率最高，但由于体积大操作不便故以 1 克湿细胞加 2 毫升缓冲液，0.2 毫升 25% 戊二醛操作为宜。

### 二、固定化细胞青霉素酰化酶的性质

1. 作用的最适 pH：分别于 0.2M 的不同 pH

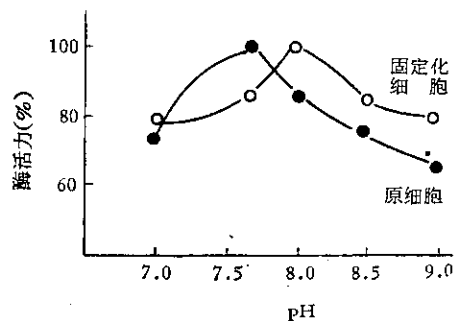


图 2 pH 与酶活力的关系\*(碘量法)

\* 缓冲液同图 1 附注所示。

缓冲液中,用原细胞与固定化细胞于 37℃,作用 30 分钟,将 2% 青霉素 G 钾盐水解生成 6-APA,并测定 6-APA 的含量,结果见图 2。

由图 2 可见,固定化细胞和原细胞水解青霉素 G 钾盐的最适 pH 分别为 8.0 和 7.7。

2. 在不同 pH 条件下的稳定性: 将原细胞与固定化细胞分别置于 0.1 M 不同 pH 缓冲液中,37℃ 保温 1 小时,其酶活力变化见图 3。

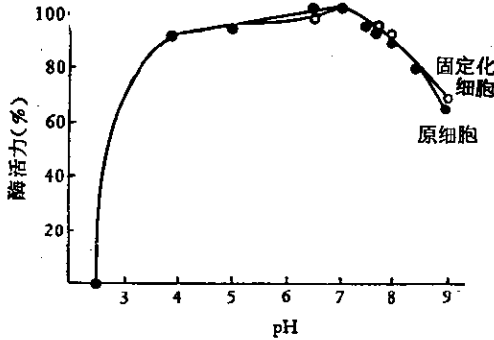


图 3 pH 对原细胞与固定化细胞中青霉素酰化酶稳定性的影响\* (NIPAB 法)  
\* 缓冲液同图 1 附注所示。

由图 3 可知原细胞与固定化细胞青霉素酰化酶的稳定性基本相同,且均在 pH 7.0 时最稳定。

3. 温度对酶活力的影响: 将原细胞与固定化细胞置 0.2 M pH7.7 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中,在不同温度反应 30 分钟测定水解 2% 青霉素 G 所生成的 6-APA 量,结果见图 4。

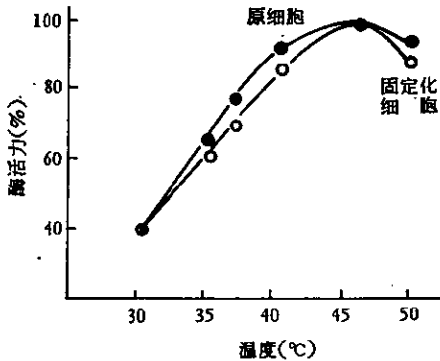


图 4 温度与酶活力的关系 (碘量法)

由图 4 可见,二者最适温度均为 45℃。

4. 热稳定性: 将原细胞与固定化细胞分别

置于不同温度水浴放置 30 分钟后,其酶活力变化如图 5。

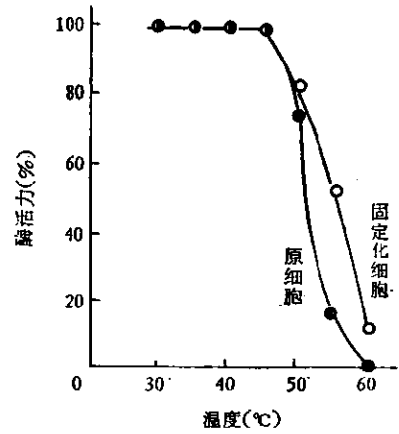


图 5 原细胞与固定化细胞的热稳定性 (NIPAB 法)

图 5 表明,在 45℃ 以上固定化细胞中的酶较原细胞中的酶稳定。

### 三、青霉素 G 的水解条件

1. 不同种类的碱溶液维持水解时的 pH 对转化率的影响: 原细胞中青霉素酰化酶水解 2% 青霉素 G 钾盐,用不同种类碱维持水解 pH7.7。结果见表 3,图 6。

表 3 用不同种类碱维持水解 pH7.7 对转化率的影响\*

不同种类碱	0.2 M NaOH	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3 M NH <sub>4</sub> OH
原细胞第一次使用的转化率(%)	100	90.5	94.4
原细胞第四次重复使用的转化率(%)	45.9	71.4	85.3

$$* \text{转化率} = \left( \frac{\text{水解液中 6-APA 效价}}{\text{水解液的总单位}} \times 100 \right) \%$$

表 4 水解不同浓度青霉素 G 钾盐的结果

青霉素浓度(%)	2	2.5	4	5	6	7.5
转化率(%)	94.3	97.2	95.4	91.8	90.9	88.8

表 3 说明,用 3 M NH<sub>4</sub>OH 维持水解 pH 为宜,由图 6 可知,不同种类的碱在所用的浓度下,不破坏青霉素 G。

2. 不同浓度的青霉素 G 钾盐与水解效果的关系: 其实验结果见表 4。

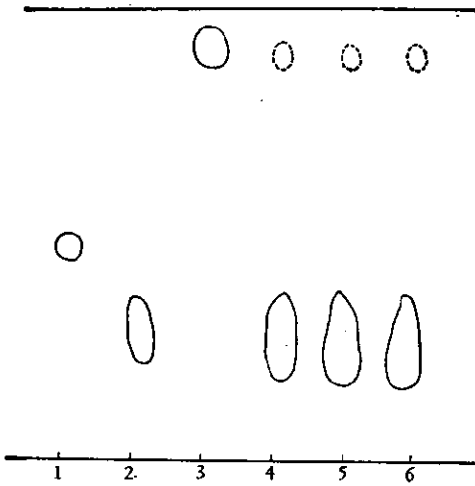


图6 用不同碱维持 pH7.7 时水解液的薄层层析图谱\*  
1: 标准青霉噻唑酸; 2: 标准 6-APA; 3: 青霉素 G 钾盐; 4:  $\text{NH}_4\text{OH}$  维持 pH 的水解液; 5:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  维持 pH 的水解液; 6:  $\text{NaOH}$  维持 pH 的水解液。

由表 4 可知, 用 3 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  维持水解 pH7.7 时, 青霉素 G 钾盐浓度在 2—6% 之间时, 水解转化率均可达 90% 以上。但用固定化细胞水解 6% 青霉素 G 钾盐的稳定性不如 5% 的青霉素 G 钾盐, 结果见表 5。

表 5 固定化细胞水解不同浓度青霉素 G 钾盐的稳定性比较

青霉素 浓度(%)	转化率 (%)	次数	次数			
			2	4	6	8
5	100	100	98	98	98	
6	92	77	91	85	85	

3. 固定化细胞酶的稳定性: 温度 37℃, 青霉素 G 钾盐浓度为 5% (0.01 M, pH7.7 磷酸缓冲), 以 3 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  维持水解时 pH 7.7, 用适宜酶量反应 100 分钟后离心。以新的底物重复水解。用碘量法测水解液的转化率, 结果见图 7。

由图 7 可见, 重复使用固定化细胞水解青霉素 G 20 次以内时, 其转化率在 94% 以上。使用 30 次以后测其酶活力, 约损失掉原始酶活力的 16.5%。若补加适当酶量, 则转化率可以提高。

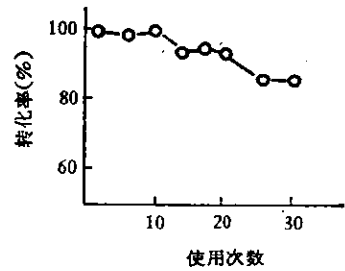


图 7 固定化细胞中酶水解青霉素 G 钾盐的稳定性

## 讨 论

用戊二醛将大肠杆菌 AS1.76 青霉素酰化酶固定在细胞中是一种较为简便的方法, 在冰箱保存 130 天酶活力不降。且由于直接将酶固定于细胞中, 省去了破碎细胞提取酶再固定化的繁杂过程。与琼脂凝胶包埋并结合戊二醛处理的方法相比, 此法回收率较高, 但固定化细胞需离心与产物分开, 这给工业使用带来不便。

在不同 pH 交联时发现, 随着 pH 值的增加, 固定化细胞的颜色变红。这可能与戊二醛有关。因为戊二醛在水溶液中往往以聚戊二醛的形式存在<sup>[1]</sup>, 而且在不同介质中聚合程度不同, 在碱性介质中聚合度较高。在碱性条件下, 聚戊二醛与  $-\text{NH}_2$  基团反应所形成的多个双键连成的共轭体系中, 其双键较在偏酸性介质中的双键要多, 所以随反应 pH 的增高, 固定化细胞的颜色加深。至于它和稳定性的关系有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Self, D. A., G. Kay and M. D. Lilly: *Biotech. Bioeng.*, 11: 337—348, 1969.
- [2] Warburton, D., K. Balasingham and P. Dunnill: *Biochem. Biophys. Acta*, 284: 278—284, 1972.
- [3] Warburton, D., P. Dunnill and M. D. Lilly: *Biotech. Bioeng.*, 15: 13—25, 1973.
- [4] 孟广震: *微生物学通报* 4: 41—45, 1977.
- [5] Sato, T., T. Tosa and I. Chibata: *European J. Appl. Microbiol.*, 2: 153—160, 1976.
- [6] 张启先、王嫩芝、乐华雯等: *微生物学报* 19(3): 302—308, 1979.
- [7] 上海第三制药厂, 中国科学院生物化学研究所, 上海医药工业研究院一固相酶协作组: *医药工业* 7: 22—24, 1978.
- [8] Fieser, L. F., and M. Fieser: *Glutaraldehyde, Reagents for organic synthesis* (ed. by Fieser, L. F.,

and M. Fieser), John Wiley and Sons, Inc., New York, 1967, p. 411.

[9] Kutsbach, C. and Erich Rauenbusch: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**(1): 45—53, 1974.

[10] 化学工业部上海医药工业研究所: 抗菌素工业分析, 化学工业出版社, 北京, p. 202, 1960.

[11] Monsan, P., Puzo G et Mazaruil H.: Etude du Mecanisme d'Action du Glutaraldehyde, *Analysis and Control of Immobilized Enzyme Systems* (ED by Thomas, D. and J. P. Kernevez), North-Holl and American Elsevier, Inc., New York, 1976, p. 275—282.