

颗粒状固定化青霉素酰化酶的研究

韩 辉 徐冠珠

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:将巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)胞外青霉素酰化酶通过共价键结合到聚合物载体 Eupergit C 颗粒环氧基团上,制成的颗粒状固定化青霉素酰化酶表现活力达 $1400\mu\text{g/g}$ 左右。固定化酶水解青霉素的最适 pH8.0,最适温度为 55°C 。在 pH6.0~8.5、温度低于 40°C 时固定化酶活力稳定。在 pH8.0、温度 37°C 时,固定化酶对青霉素的表现米氏常数 K_a 为 $2 \times 10^{-2}\text{mol/L}$;苯乙酸为竞争性抑制剂,抑制常数 K_{ip} 为 $2.8 \times 10^{-2}\text{mol/L}$;6-APA 为非竞争性抑制剂,抑制常数 K_{ia} 为 0.125mol/L 。固定化酶水解青霉素,投料浓度为 8%,在使用 200 批后,保留活力 80% 左右,6-APA 收率平均达 89.48%。

关键词:巨大芽孢杆菌,固定化青霉素酰化酶,环氧基,Eupergit C

中图分类号:Q55 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 02-0204-05

我们已经报道了以醋酸纤维素和聚丙烯睛纤维为载体的丝状固定化青霉素酰化酶^[1,2]。本文报道用带环氧基的颗粒状聚合物 Eupergit C 作载体的颗粒状固定化青霉素酰化酶的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

巨大芽孢杆菌胞外青霉素酰化酶酶液由本实验室制备^[3]。青霉素 G 钾盐由河北制药厂生产。载体 Eupergit C 从德国 ROM 公司进口。其余均为国产市售试剂。

1.2 方法

1.2.1 固定化酶活力测定:青霉素酰化酶水解青霉素产生等分子的苯乙酸,用标准 NaOH 溶液滴定产生的苯乙酸量即为相当的青霉素量。具体操作如下:用 0.02mol/L 、pH8.0 的磷酸缓冲液配制浓度为 5% 的青霉素溶液,取该溶液 60ml, 37°C 预热 15min,加入固定化酶样品 0.3g(湿重)左右。用自动控制器自动滴加经过标定的 0.1mol/L NaOH 溶液维持 pH8.0。准确记录反应时间和相应时间内消耗的 NaOH 毫升数,然后,根据反应时间和 NaOH 溶液的消耗量计算固定化酶的活力。以每分钟水解 $1\mu\text{mol}$ 青霉素所需的酶量定义为 1 活力单位。

1.2.2 固定化酶的制备:参照 ROM 公司的方法改进^[4]。

2 结果和讨论

2.1 固定化酶的性质

2.1.1 温度对固定化酶活力的影响:在不同温度下测定固定化酶的活力,结果如图 1-a。

作者简介:韩 辉(1961-),女,北京市人,工程师,从事酶工程的研究。

收稿日期:2000-03-16,修回日期:2000-08-23

固定化最适温度为 55℃。

2.1.2 pH 对固定化酶活力的影响:用不同 pH 值的缓冲液配制 5% 的青霉素底物溶液,在不同 pH 的条件下测定固定化酶的活力,结果如图 1-b,固定化酶最适 pH 为 8.0。

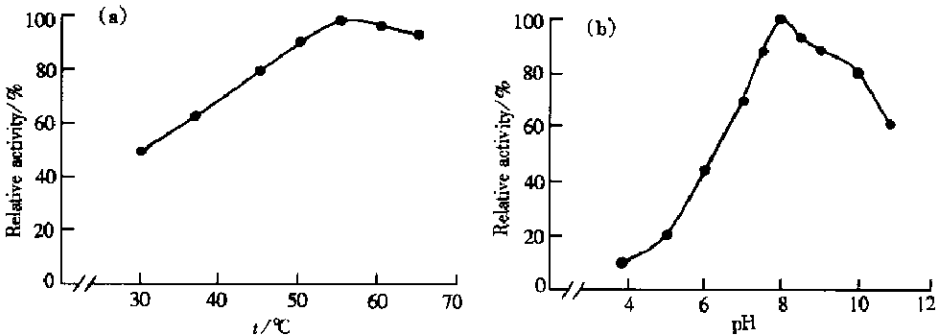


图 1 温度(a)和 pH(b)对固定化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of temperature(a) and pH(b) on activity of immobilized penicillin acylase

2.1.3 固定化酶 PH 稳定性:将固定化酶浸泡于不同 pH 值的缓冲液中,置 37℃ 水浴保温 19h 后取出,用 0.2mol/L、pH8.0 的磷酸缓冲液洗涤后,测定酶活力,结果见图 2-a,固定化酶在 pH6.0-8.5 的范围内比较稳定,在 pH7.5 左右最稳定。

2.1.4 固定化酶的热稳定性:将固定化酶浸泡于 0.02mol/L、pH8.0 的磷酸缓冲液中,分别在不同温度保温放置 16h,然后测定活力,结果如图 2-b,固定化酶在 40℃ 以下活力稳定。

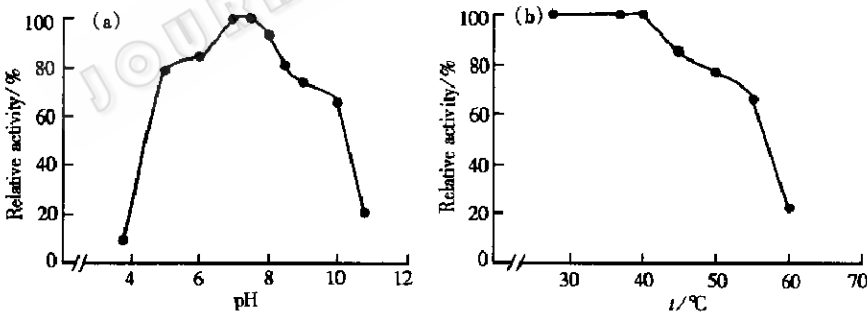


图 2 固定化酶 pH(a)和热稳定性(b)

Fig. 2 Effect of pH(a) on stability and themol stability(b) of immobilized penicillin acylase

2.1.5 固定化酶的最大反应速度、米氏常数和产物抑制常数:用不同浓度的青霉素溶液在 pH8.0、温度 37℃ 测定酶水解青霉素的初速度,并用分别含有 0.05mol/L 的苯乙酸或 6-APA 的不同浓度的青霉素溶液同样测定水解初速度。以青霉素浓度的倒数为横坐标,反应初速度的倒数为纵坐标作 Lineweaver-Buck 图(图 3)。由图 3 计算得到固定化酶对青霉素 G 的表观米氏常数 K_a 为 $2.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 。最大反应速度 V_{max} 为 $1.33 \text{mmol/g} \cdot \text{min}$ (干酶)。加入苯乙酸只改变米氏常数,不改变最大反应速度,因此,苯乙酸为竞争性抑制剂,根据竞争性抑制的动力学方程式求得抑制常数 K_{ip} 为 $2.8 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 。加入 6-

APA 不改为米氏常数而改变最大反应速度,因此 6-APA 为非竞争性抑制剂,由非竞争性抑制剂的动力学方程式求得抑制常数 K_{ia} 为 0.125mol/L 。

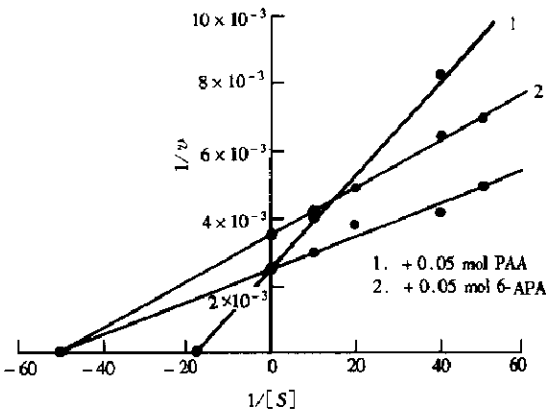


图 3 固定化酶的 Lineweaver-Buck 图

Fig.3 Lineweaver-Buck plot for immobilized penicillin acylase to determine the K_a V_m and K_i values of phenylacetic acid (PAA) and 6-APA

称取固定化酶 8g 放入 250mL 的三口瓶中,搅拌反应水解青霉素。每批投青霉素 12g,在投料量、用酶量、水解温度、pH 等条件都不变的情况下,仅改变投料浓度,考察投料浓度对青霉素的水解速度和 6-APA 收率的影响。结果见表 1。

表 1 显示,投料浓度 8% 水解时间最短,6-APA 收率最低;10% 水解时间未延长,6-APA 的收率略有提高;12% 的水解时间稍有延长,6-APA 的收率最高;15% 水解速度明显减慢,水解时间延长较多,6-APA 的收率与 12% 接近。以上结果提示,适当提高

投料浓度,减少反应液体积,有利于提高 6-APA 产率。但过高的投料浓度,较多的增加了底物抑制和产物抑制,使水解时间大大延长,由于 6-APA 不稳定,水解时间长损失多。因此,虽然反应体积减少很多,但并不能提高 6-APA 产率。

2.2.2 青霉素水解制备 6-APA:如上所述,称取固定化酶 8g(表观活力 470.5u/g ,含水量 73.28%,折合干酶活力为 1760.9u/g),在三口圆底烧瓶中搅拌反应。投料浓度 8%,水解温度 37°C 、 $\text{PH}8.0 \pm 0.2$,中和剂为 2mol/L 的 NH_4OH 溶液,水解液提取 6-APA。考察固定化酶的使用稳定性和 6-APA 的收率。考察结果,固定化酶使用 200 批后测定表观活力为 388.3u/g 、水分 72.44%(折合干酶活力为 1048.9u/g),活力保留 80%。按此推算,固定化酶的半衰期为 621 批。6-APA 的总收率为 89.48%(表 2)。

2.1.6 固定化酶的保存稳定性:固定化酶浸泡在 pH7.7 的保存液中,置室温下 ($20^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$) 存放 54d,保留活力 87.6%;存放 140d 保留活力 79.43%;在 4°C 左右存放一年活力无明显下降。

2.2 固定化酶水解青霉素制备 6-APA

2.2.1 青霉素浓度对水解速度和 6-APA 收率的影响:用不同浓度的青霉素测定固定化酶水解青霉素的初速度,结果显示,青霉素浓度在 8% 以上对颗粒状固定化酶有抑制作用,青霉素浓度 10% 时,颗粒酶的相对活力为 90%。同样条件下,丝状固定化酶在青霉素浓度 5% 以上即受抑制,浓度 10% 时,丝状酶的相对活力仅为 40% [2]。

表 1 投料浓度对水解时间和 6-APA 收率的影响

Table 1 Effect of concentration of substrate on hydrolysis time and yield of 6-APA

Concentration of substrate/%	8	10	12	15
Time of hydrolysis/min	50	50	56	90
Yield of 6-APA/%	91.12	91.48	92.32	92.15

表 2 固定化酶水解青霉素制备 6-APA 的结果

Table 2 Data of penicillin G hydrolysis to 6-APA by the immobilized enzyme

No.	Penicillin/g	6-APA/g	Yield of 6-APA/%
10	12	6.200	88.98
12	12	6.189	88.82
14	12	6.188	88.80
16	12	6.318	90.66
18	12	6.323	90.74
20	12	6.207	89.07
22,23	24	12.448	89.32
26,27	24	12.348	88.60
39,40	24	12.446	89.30
45,46	24	12.484	89.58
48,49	24	12.618	90.54
52	12	6.336	90.93
56	12	6.316	90.64
58	12	6.217	89.22
63	12	6.284	90.18
66	12	6.214	89.18
68	12	6.292	90.30
83	12	6.237	89.50
120	12	6.196	88.92
130	12	6.209	89.10
140	12	6.175	88.61
150	12	6.139	88.10
160	12	6.154	88.31
170	12	6.204	89.03
180	12	6.246	89.63
190	12	6.259	89.82
200	12	6.270	89.98
Mean			89.48

将巨大芽孢杆菌胞外青霉素酰化酶通过环氧基共价结合到聚合物载体 Eupergit C 颗粒上,成功的获得了高活力的固定化青霉素酰化酶。通常情况下,不同载体和不同方法制备的各种固定化酶的性质存在一定的差异。就我们制备的固定化酶而言,与丝状酶相比,颗粒酶具有下列优点:最适 PH 为 8.0,低于丝状酶,高浓度底物对颗粒酶的抑制大大小于丝状酶;更适合青霉素水解制备 6-APA 工业化生产的需要。颗粒酶水解青霉素生产 6-APA,产品收率达 89.48%,比丝状酶高 5%左右;而且使用稳定性大大优于丝状酶。颗粒酶的缺点是苯乙酸对其抑制大于对丝状酶的抑制。综合各种酶的优点,研制更优质的固定化酶,将是一个值得研究的课题。

另一方面,适当提高青霉素的投料浓度有利于提高 6-APA 的收率。投料浓度对固定化酶使用稳定性的影响尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 徐冠珠,王祯祥,朱丽钊,等.微生物学报,1992,32(3):212~217.
- [2] 韩 辉,徐冠珠,朱丽钊,等.微生物学报,1998,38(3):204~207.

- [3] 王祯祥, 韩文珍, 门大鹏, 等. 微生物学报, 1992, 32(2): 99~104.
- [4] Rohm GmoH. German Patent, 2 732 301, 1979.
- [5] Altan A. *J Chem Tech Biotechnol*, 1991, 51: 181~195.
- [6] Shewale J G, Sivaraman H. *Process Biocemistry*, 1989, 24(4): 146~154.
- [7] Nathias U, Alexander P. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20: 61~68.
- [8] Bianchi D, Golini P, Bortolo R, *et al*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18: 592~596.

STUDIES ON THE IMMOBILIZED PENICILLIN ACYLASE ON POLYMER BEADS

Han Hui Xu Guanzhu

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

Abstract: The extracellular penicillin acylase from *Bacillus megaterium* was immobilized on oxirane group of Eupergit C beads. The apparent activity of the immobilized enzyme was about $1400 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$ (dry weight). The optimal pH and temperature were 8.0 and 55°C for hydrolytic reaction of penicillin G, respectively. The immobilized enzyme was stable in the pH range of 6.0~8.5 and at temperature below 45°C . The apparent Michaelis constant for penicillin G was inhibition constant of phenylacetic acid as competitive $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and V_m was $1.33 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (dry weight) at 37°C and PH8.0. The inhibitor and 6-APA as non-competitive inhibitor were $2.8 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for the immobilized enzyme at pH 8.0 and 37°C , respectively. The remained activity of the immobilized enzyme was about 80% after operating 200 times for hydrolysis of penicillin G to 6-APA, and the average yield of 6-APA was 89.48%.

Key words: *Bacillus megaterium*, Immobilized penicillin acylase, Oxirane, Eupergit C