

以聚丙烯腈纤维为载体制备固定化青霉素 G 酰化酶的研究*

鲜海军 王祯祥

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:以酸部分水解聚丙烯腈纤维为载体,以戊二醛为交联剂,共价键结合制备了固定化胞外青霉素 G 酰化酶。当水解后的载体中-NH₂ 基含量为 690 μ mol/g 和含水量为 64% 时,对酶蛋白的固定量达 100mg/g 以上,固定化酶的活力达 2300IU/g,酶活力总产率为 30%,固定化效率为 56%。酶活力的总产率和固定化率随加酶量的增加而降低。该酶可以将浓度为 2.5% ~ 12.5% 的青霉素 G 钾盐水解 98% 以上。批投青霉素 G 钾盐为 10g,酶负荷为 150IU/g(PKG),经 20 批水解反应后,剩余酶活力为 80%。用二巯基苏酞醇处理固定化酶,对水解青霉素 G 钾盐的操作稳定性有促进作用。固定化酶的室温保存半衰期为 130d。用戊二醛和硼氢化钠溶液处理固定化酶后,酶活力的室温保存稳定性有所降低。

关键词:青霉素酰化酶,固定化酶,巨大芽孢杆菌

中图分类号:Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 04-0475-06

青霉素 G 酰化酶(PGA)在催化水解青霉素 G(Pen. G)生产 6-氨基青霉烷酸(6-APA)和催化水解头孢霉素 G(Cep. G)生产 7-氨基 3-脱乙酰氧基头孢烷酸(7-ADCA)具有反应速度快,条件温和,产品易提纯和环境污染小等特点,因此受到广泛关注。固定化青霉素 G 酰化酶已成为一种重要的医药工业用酶。制备固定化青霉素酰化酶的方法有多种,常见的有包埋法,吸附法和共价结合法等^[1-4]。用聚丙烯腈纤维制备固定化青霉素酰化酶的研究最早见于日本^[5]。根据我国的实际情况,本课题组以聚丙烯腈纤维为载体对青霉素 G 酰化酶的固定化进行了大量的工作^[6,7]。在此基础上,本文报道用酸部分水解聚丙烯腈纤维为载体制备固定化青霉素 G 酰化酶的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

聚丙烯腈纤维为上海金山化工厂生产,青霉素 G 钾盐(PKG)为河北制药厂生产,二巯基苏酞醇(DTT)为上海脑海生物公司进口分装,戊二醛(GA),对二甲氨基苯甲醛(PDAB),磷酸氢二钾和磷酸二氢钾等化学药品,均为国内市售试剂。青霉素 G 酰化酶液为本研究组选育的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)在液体培养基(葡萄糖 1%,蛋白胨 0.6%,尿素 0.06%,酵母膏 0.5%,苯乙酸 0.8%,pH7.0)中培养后的发酵液经吸附,洗脱浓缩的部分纯化酶液^[8,9],比活力为 45IU/mg 蛋白。

1.2 方法

1.2.1 固定化酶的制备:把聚丙烯腈纤维经胺化处理,将其中的-CN 基转变为-NH₂

* 国家重点科技攻关项目(85-722-03-05)

作者简介:鲜海军(1949-),男,四川省人,副研究员,主要从事生物化学和微生物学研究。

收稿日期:2000-09-28,修回日期:2001-02-06

基^[10]。用戊二醛作交联剂,将酶蛋白以共价键方式联结在纤维上制成固定化酶^[5]。

1.2.2 酶活力的测定;采用对二甲氨基苯甲醛(PDAB)比色法^[11],在青霉素 G 钾盐浓度为 2%,pH 为 8.0 的 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中,温度为 37℃,在磁力搅拌下进行反应。以每分钟产生 1 μ mol 的 6-APA 所需的酶量为 1 个单位(IU)。

1.2.3 蛋白质的测定;采用 folin-Phenol 试剂显色法^[12]。以牛血清蛋白为标准。

1.2.4 载体中胺基含量的测定;采用酸碱中和滴定法^[5]。水解后的聚丙烯腈纤维经次氯酸钠处理后,取 40mg 放入 5mL 0.04mol/L 的盐酸中,搅拌 30min,过滤,用蒸馏水洗净,将水洗液和滤液混合,以酚酞作为指示剂,再用 0.02mol/L 的 NaOH 溶液滴定。根据与对照消耗的 NaOH 溶液的量之差,计算出载体的-NH₂ 基含量。

1.2.5 氮含量的测定;按奈氏比色法进行^[13]。

1.2.6 二巯基苏糖醇(DTT)处理固定化酶;配制 100mg/mL 的 DTT 水溶液,用 NaOH 溶液调 pH 为 7.7,立即放入固定化酶,4℃下静置 24h,用 pH7.7 的 0.05mol/L 的磷酸缓冲液洗净 DTT 后,用于水解 PGK 的操作稳定性实验。

1.2.7 PGK 的水解效率;用 PDAB^[11]法测定反应过程中 6-APA 的产生量,从而计算出转化效率。

1.2.8 固定化酶的室温保存稳定性实验;分别配制 0.5% 的 GA 和硼氢化钠(NaBH₄)水溶液,用 NaOH 和 HCL 调 pH7.7,放入固定化酶,室温静置 10min 后,用 pH7.7,浓度 0.5mol/L 磷酸缓冲液洗净,放入相同磷酸缓冲液中,室温静置保存,在不同时间测定酶活力。

2 结果

2.1 水解时间对聚丙烯腈纤维中-NH₂ 基和含水量的变化的影响

聚丙烯腈纤维经过酸水解,再经次氯酸钠处理,把含腈基(-CN)的纤维转换为含-NH₂ 基并具有适当含水量的纤维是制备固定化酶的关键一步。我们测定了水解过程中聚丙烯腈纤维-NH₂ 基含量和含水量的变化(如图 1)。随着水解时间的延长,纤维中的胺基含量从 60 μ mol/g 上升到 690 μ mol/g,含水量从 15% 上升到 64%。

3.2 纤维中-NH₂ 基含量对固定化酶制备的影响

通过酸水解制备出-NH₂ 含量不同的聚丙烯腈纤维,用戊二醛作交联剂,把青霉素 G 酰化酶共价键结合到纤维上,制成固定化酶后,测定固定化酶表观活力。结果(图 2)指出,随着-NH₂ 基含量不断增加,固定化酶的活力也不断提高。-NH₂ 基含量达到 690 μ mol/g 时,固定化青霉素 G 酰化酶活力达 2300IU/g。

3.3 聚丙烯腈纤维酸水解的控制

在聚丙烯腈酸水解时,如水解程度不够,制备的固定化酶的活力低,总产率差。若水解过量,则聚丙烯腈纤维的强度差,纤维收率也低。因此,准确地控制水解终点是很重要的。在聚丙烯腈酸水解过程中,不断释放出氨,其释放量与聚丙烯腈的水解程度和制出的固定化酶活力具有直接的相关性。因此,采用直接快速测定水解液中氨的含量来控制纤维的水解终点。表 1 显示了酸水解液中氨含量的变化与固定化酶制备特性的关系。当水解液中氨含量从 4 μ mol/mL 上升到 216 μ mol/mL 的过程中,酶蛋白的固定量从 11.1mg/g 上

升到 102.5mg/g,总产率(OY)从 7.9% 上升到 30%,固定化效率(IY)从 38% 上升到 56%,酶活力从 336IU/g 上升到 2300IU/g。这些结果表明,利用酸水解的聚丙烯腈纤维为载体制备固定化青霉素 G 酰化酶取得了满意的结果。显然,测定酸解液中的含氮量可以作为控制聚丙烯腈纤维水解终点的量化方法。

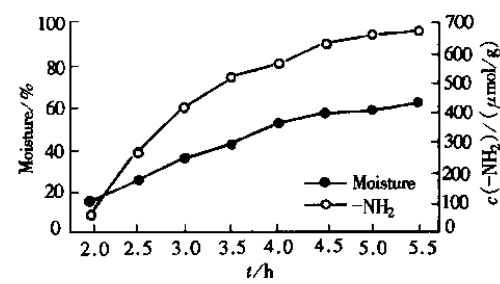


图 1 在聚丙烯腈纤维水解过程中,
-NH₂ 基和含水量的变化

Fig.1 The variation of the amounts of -NH₂ and moisture
in the fiber during the hydrolysis of polyacrylonitrile fiber

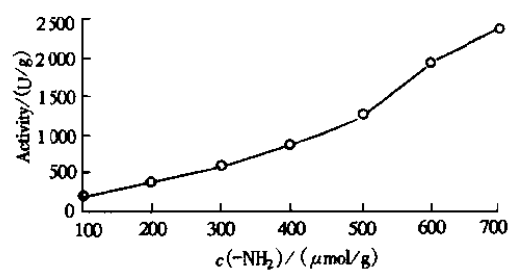


图 2 纤维中-NH₂ 含量对酶固定化的影响
Fig.2 Effect of amounts of -NH₂ in the fiber on the activity
of the immobilized PGA

表 1 从载体中释放的 NH₃ 含量变化对固定化酶制备的影响

Table 1 Effect of the amount of NH₃ released from the fiber on the preparation of immobilized PGA

NH ₃ /(μmol/mL)	4	10	23	60	91	140	186	216
Specific activity /(IU/g)	366	572	848	1195	1668	1775	2171	2300
Binding protein /(mg/g)	11.1	21.4	32.6	46	67.5	71	97	102.5
Overall yield* /%	7.9	9.2	10.2	16.3	20	24.9	28	30
Binding efficiency** /%	38	38.5	39.6	41	43	45	50	56

* Ratio of immobilized enzyme activity to total free enzyme activity used for the immobilization.
** Ratio of immobilized enzyme activity to the difference between the initial free enzyme and the enzyme remaining in the solution after immobilization.

3.4 投酶比和酶浓度对固定化酶制备的影响

以酸水解法制备的含胺基聚丙烯腈纤维为载体,加入不同的投酶量和投酶浓度制备固定化酶,结果见表 2,随着投酶量增加,制备出的固定化酶的活力逐渐提高,而酶的总产率和固定化效率则逐渐下降,投酶浓度(在本实验条件下)对固定化酶的活力,总产率和固定化效率无明显的影响。

3.5 固定化酶对不同浓度 PGK 的水解

在磁力搅拌反应器中研究了恒定酶负荷(60IU/g(PGK)条件下,固定化酶对不同浓度 PGK 的水解结果(图 3)。PGK 的浓度在 2.5%~12.5% 时,都能达到水解 98% 以上。随着 PGK 浓度的提高,达到水解 98% 所需的时间越长。

3.6 二巯基苏酞醇(DTT)处理固定化酶对水解 PGK 操作稳定性的影响

用 DTT 处理和未处理的固定化酶,酶负荷为 150IU/g(PGK),在 37℃,pH8.0~8.4 的

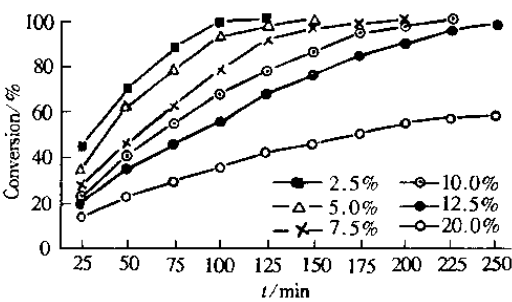


图 3 固定化酶对不同浓度 PGK 的水解

Fig.3 The hydrolysis of different concentrations of PGK by immobilized PGA

0.05mol/L 磷酸缓冲液中,循环水解 10% 浓度的 PGK,各经 20 批水解实验,结果如图 4 所示,未经 DTT 处理的固定化酶的剩余酶活力为 80%,经 DTT 处理的固定化酶剩余酶活力为 85%。这表明用 DTT 处理固定化酶能提高水解 PGK 的操作稳定性,这与 K.Sauber^[13]的报道一致。

3.7 硼氢化钠和戊二醛处理对固定化酶室温保存稳定性的影响

我们进一步考查了固定化酶在室温下的保存稳定性。由图 5 可以看出,未经处理的固定化酶室温保存 40 天,活力基本不变。酶活力的半衰期为 130 天。用硼氢化钠和戊二醛试剂处理的固定化酶的室温保存稳定性都降低,经戊二醛处理的降低更明显。

表 2 投酶比和酶浓度对固定化酶制备的影响

Table 2 The effect of the different amounts and concentrations of free enzyme on the immobilization of PGA

Ratio of free enzyme to the fiber /(IU/g)	Concentration of free enzyme /(IU/mL)	Specific activity /(IU/g)	Overall yield* /%	Binding efficiency* /%
3163	301.5	1006	33.0	52.0
3163	472.5	1010	33.0	52.0
4063	301.5	1288	31.5	51.0
4063	472.5	1280	31.5	50.0
6480	301.5	1960	30.0	49.9
6480	47.25	1957	30.0	49.0
8470	472.5	2313	27.3	44.5
14490	904.5	2616	18.0	35.4
26000	904.4	2891	11.1	29.3

* As the same of table 1.

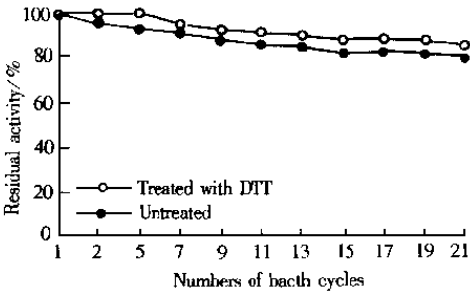


图 4 DTT 处理固定化 PGA 对水解 PGK 操作稳定性的影响

Fig.4 Effect of DTT on the stability of operation in hydrolysis of PGK by the immobilized PGA

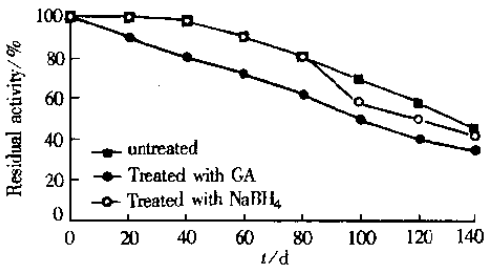


图 5 NaBH₄ 和 GA 处理对固定化酶室温保存稳定性的影响

Fig.5 Effect of NaBH₄ and GA on the storage stability of the immobilized PGA at the room temperature

3 讨论

聚丙烯腈纤维具有机械性能好,疏水性能好和抗微生物侵蚀等优点,用聚丙烯腈纤维为载体制备的固定化 PGA,具有活力高,稳定性好和能水解高浓度 PGK 的特点,是制备固定化酶的理想载体。在酸水解聚丙烯腈纤维的过程中,用测定水解液中氨的含量可以及时控制纤维的水解程度,以得到收率高,强度好和具有满足制备固定化酶所需要的活性基($-\text{NH}_2$)与含水量的纤维载体,以确保制备出活力高,产率高,稳定性好的固定化酶。

硼氢化钠是还原剂,可以把固定化酶的蛋白质分子和载体分子中的 $-\text{NH}_2$ 基与交联剂的醛基所形成的席夫式碱还原为不活泼的仲胺,以增加其稳定性。戊二醛为双功能试剂,既可以将固定化酶中的蛋白质分子互相连接,也可以将蛋白质分子与载体分子相连接,以增加固定化酶的牢固性。我们试图用这两种试剂处理固定化酶,以期提高固定化酶的室温保存稳定性,但结果却相反(图 5),这可能是由于硼氢化钠和戊二醛在使固定化酶蛋白质分子结合更加牢固的同时,也对酶蛋白分子产生了其它作用,使保存稳定性降低。这需要进一步的研究。

用固定化 PGA 水解不同浓度 PGK,水解 PGK 效率高于 98%所需时间不同,这是由于在反应系统中存在的底物(PGK)和产物(6-APA,苯乙酸)综合抑制作用的结果。所以及时地取出反应液中的产物是提高水解浓度,缩短水解时间,增加固定化酶使用稳定性的有效方法。

致谢 崔福绵先生对研究工作和论文的形成提出了有益的意见,特表感谢。

参 考 文 献

- [1] Ryu D Y, Bruno C F, Lee B K, et al. *Proc Inter Technol Today*, 1972, 307 ~ 314.
- [2] Marconi W, Cecer F, Morisi F, et al. *Antibiot*, 1973, 24: 228 ~ 232.
- [3] Szewczuk A, Ziomek E, Mordarski M, et al. *Biotechnol Bioeng*, 1979, 21: 1543 ~ 1552.
- [4] Bryjak J, Noworyta A. *J Chem Biotechnol*, 1993, 5(7): 39 ~ 85.
- [5] Matsumoto K, Izumi R, Seijo H, et al. U. S. Patent, 4 486 549/1984.
- [6] 徐冠珠, 韩文珍, 王祯祥, 等. 微生物学报, 1992, 32(3): 212 ~ 217.
- [7] 韩 辉, 徐冠珠, 朱丽钊, 等. 微生物学报, 1998, 38(3): 204 ~ 207.
- [8] 王祯祥, 韩文珍, 徐冠珠, 等. 微生物学报, 1992, 32(2): 99 ~ 104.
- [9] 崔福绵, 韩文珍, 朱丽钊, 等. 微生物学报, 1996, 36(3): 193 ~ 198.
- [10] 顾可权. 有机合成化学. 上海: 上海科学出版社出版, 1961. 236 ~ 243.
- [11] Shewale J C, Kumar K K, Ambekar G R. *Biotechnol Techniques*, 1987, 1: 69 ~ 72.
- [12] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265 ~ 275.
- [13] 中国医学科学院卫生研究所. 水质分析法. 北京: 人民卫生出版社, 1974.
- [14] Sauber K, Kramer D M, Stabilization of Penicillin Amidohydrolase Immobilized on Eupergit C, In: Chibata I, Fukui S ed. *Enzyme Engineering*. New York: Plenum Press, 1982, 6: 235 ~ 236.

IMMOBILIZATION OF PENICILLIN G ACYLASE ON POLYACRYLONITRILE FIBER *

Xian Haijun Wang Zhenxiang

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

Abstract: The immobilization of Penicillin G Acylase from *Bacillus megaterium* by glutaraldehyde crosslinking on the partially acid-hydrolyzed polyacrylonitrile fiber was studied. When the amount of $-NH_2$ on fiber were $690\mu\text{mol/g}$ and the moisture in the fiber was 64%, and the content of enzyme protein immobilized on fiber was more than 100mg/g . The activity of 2300IU/g was obtained with 30% of overall yield and 56% of binding efficiency. The immobilization yield was markedly influenced by ratio of the amount of free enzyme used to the weight of the fiber. The half-life of storage stability of immobilized PGA at room temperature was 130 days. The immobilized PGA kept 80% of the initial activity after 20 cycles of operation in 10% of PGK (W/V) in 0.05mol/L phosphate buffer, pH8.0, at 37°C and an enzyme load of 150IU/g (PGK) and 10g (PGK) for per cycle of operation. The hydrolysis conversion of PGK in the range of 2.5% ~ 12.5% (W/V) were over 98% for the immobilized PGA. The operation stability of immobilized PGA treated with DTT was better than that of immobilized PGA untreated.

Key words: Penicillin G acylase, Immobilization of enzyme, *Bacillus megaterium*

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(85-722-03-05)

※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※

《微生物学报》2001 年征稿计划

为适应新世纪我国生物科技飞速发展的需要,促进国内外学术交流,本刊 2001 年征稿的主要内容如下:

1. 国家高技术研究发展计划项目
2. 国家自然科学基金资助的重点基金项目、青年基金资助项目、杰出青年基金项目、地区基金项目和面上资助项目以及省部级基金资助项目
3. 国家科技攻关项目及省部级科技攻关项目
4. 国际合作项目
5. 具创新性或有重大突破的基础和应用基础研究成果;对我国西部大开发具有重要学术价值和应用价值的研究成果

对高水平的论文将优先刊登,欢迎投稿,感谢您对本刊工作的大力支持!