

# 一株产多种 $\beta$ -内酰胺类抗生素酰化酶菌株的筛选\*

朱颂成 黄曦 赵国屏\*\* 姜卫红\*\*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所  
分子微生物实验室 上海 200032)

**摘 要** :为了从大量的候选菌株中快速筛选头孢菌素酰化酶产生菌,设计并合成了一系列头孢菌素酰化酶的底物类似物。这些酰胺类的底物类似物由二部分组成,一部分为与头孢菌素相同或相似的侧链,另外一部分为发色基团或便于检测的基团。它们被酰化酶水解酰胺键以后可以方便快速的检测,因此用于对大量菌株进行快速筛选。采用这些化合物筛选到 6 株酰化酶阳性菌株。其中菌株 ZH0650 能够同时水解 GL-7ACA 和多个底物类似物。进一步研究表明,该菌至少产生 3 种酰化酶,AD-NABA 酰化酶,青霉素 G 酰化酶和头孢菌素 C 酰化酶。我们初步纯化了 AD-NABA 酰化酶和青霉素 G 酰化酶,并对头孢菌素 C 酰化酶的活力进行了鉴定。这是首次报道的可以产生青霉素 G 酰化酶和头孢菌素酰化酶等多种酰化酶的菌株,具有良好的应用前景。

**关键词** :头孢菌素酰化酶,青霉素 G 酰化酶,GL-7ACA,筛选指示剂

中图分类号 :A939.9 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2003)01-0079-08

头孢菌素酰化酶主要分为戊二酸单酰-7-氨基头孢烷酸酰化酶(GL-7ACA Acylase,GA)和头孢菌素 C 酰化酶(Cephalosporin C Acylase,CPC Acylase,CCA),分别催化戊二酸单酰-7-氨基头孢烷酸(GL-7ACA)和 CPC 水解为 7-氨基头孢烷酸(7-ACA),而 7-ACA 是生产头孢菌素类抗生素的中间体,在医药工业中具有重要地位。GL-7ACA 酰化酶已在工业上用于催化 GL-7ACA 水解产生 7-ACA。但是目前应用的 GL-7ACA 酰化酶种类有限且活力都不高,而 CPC 酰化酶的催化活力则更低,无法用于生产。因此,筛选新的高活力的头孢菌素酰化酶就显得尤为重要<sup>[1,2]</sup>。

寻找新型头孢菌素酰化酶的困难在于头孢菌素酰化酶产生菌在自然界中很少见,且此酶的表达量和活力均很低,另外在筛选技术上难以克服  $\beta$ -内酰胺酶的干扰。因此建立快速、专一的筛选方法是关键所在<sup>[3,4]</sup>。

头孢菌素酰化酶底物专一性的研究表明,头孢菌素酰化酶主要识别底物的酰基侧链,对含有头孢菌素侧链但是母核 7-ACA 被苯环、萘环(或者它们的衍生物)代替的化合物都具有一定的活力,Pierre Bouvrette 和 M. C. Chen 分别用以氨基己二酰为侧链的生色物质和戊二酸单酰萘胺进行头孢菌素酰化酶产生菌筛选,都获得了成功<sup>[5-7]</sup>。我们根据头孢菌

\* 国家 863 高技术研究发展计划项目资助(2001AA235081)

\*\* 通讯作者,E-mail:wjiang@iris.sipp.ac.cn

作者简介 朱颂成(1972-)男,安徽省岳西县人,中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所博士研究生,主要从事分子微生物的研究。

收稿日期:2002-04-08,修回日期:2002-07-22

素酰化酶主要识别底物的酰基侧链这一特点,设计并合成了一系列的筛选化合物,包括:N-戊二酸单酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸、N-己二酸单酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸、N-戊二酸单酰- $\beta$ -萘氨、N-戊二酸单酰-色氨酸、N-戊二酸单酰-苯氨、N-戊二酸单酰-对-硝基苯氨和 N-己二酸单酰-对-硝基苯氨。建立了采用这些类似物筛选头孢菌素酰化酶产生菌的系统,并进行了大量的筛选,希望得到新型的头孢菌素酰化酶产生菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器:旋转蒸发装置,熔点仪,紫外检测仪,质谱仪 HP5989A,核磁共振仪 GEMINI-300,红外分光光度计 Bio Rad FTS-185。

1.1.2 试剂:CPC 钠盐,7-ACA 购自江苏海门制药厂;GL-7ACA 由本实验室合成;苯乙酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸(NIPAB)购自 Aldrich;乙酰氯、戊二酸酐,己二酸、间甲苯胺等试剂和溶剂均为国产。

### 1.2 菌株和培养基

1.2.1 菌株:JM109/pBCACY, JM109/pKKCAIS 都带有来源于 *Pseudomonas* sp130 GL-7ACA 酰化酶(GL-7ACA Acylase, CA)的基因。JM109/pKKCAIS 产生的酶是分泌到胞外的<sup>①</sup>。JM109/pDB3 带有来源于 *E. coli* D816 青霉素 G 酰化酶(Penicillium G Acylase, PGA)的基因<sup>②</sup>。用于筛选的菌株均由本实验室分离和收藏,大部分待鉴定。

1.2.2 培养基:LB 培养基,分别添加底物类似物,CPC 钠盐,GL-7ACA,7-ACA,戊二酸,己二酸或谷氨酰胺等作为诱导物。

### 1.3 头孢菌素酰化酶底物类似物的合成

1.3.1 N-戊二酸单酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸(N-Glutaryl-Nitro-5-Amino Benzoic Acid, GL-NABA)和 N-己二酸单酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸(N-adipoyl-nitro-5-amino benzoic acid, AD-NABA)的合成。

(1)2-硝基-5-氨基苯甲酸(2-Nitro-5-amino benzoic acid, NABA):间硝基甲苯用盐酸和锡还原,水蒸气蒸馏出间甲苯胺,间甲苯胺在 0℃~8℃浓硫酸中用混酸(硝酸和硫酸)硝化,热水重结晶纯化硝化产物中的 2-硝基-5-氨基甲苯。2-硝基-5-氨基甲苯的氨基经乙酰化保护后,在 95℃~98℃水浴中,在硫酸镁存在的条件下用高锰酸钾氧化,氧化产物 2-硝基-5-乙酰氨基苯甲酸经酸水解去除乙酰基,得 2-硝基-5-氨基苯甲酸。

硝化产物 2-硝基-5-氨基甲苯:<sup>1</sup>H NMR (600M, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$  2.6 (s, 3H),  $\delta$ 6.45 (d, 1H),  $\delta$ 6.5 (m, 1H),  $\delta$ 8.05 (d, 1H)。

(2)N-戊二酸单酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸(GL-NABA) 2-硝基-5-氨基苯甲酸 22.5g 溶于 225mL 0.5mol/L 的碳酸氢钠,置于 1000mL 的烧杯中,称取戊二酸酐 15g 溶于 75mL 丙酮,置于分液漏斗中,室温滴加入烧杯中并加以搅拌,30min 滴加完毕,反应过程中控制 pH 为 5.0~9.0。反应完毕后减压抽去丙酮。浓缩液以稀盐酸调 pH 到 3.5,以沉淀出 N-戊二酸单酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸,抽滤,以 pH6.0 的水溶液洗涤。用水和乙醇结晶,置干燥器中

① 茅翔:中国科学院博士学位论文,2001,9。

② 戴明华:中国科学院博士学位论文,1999,9。

减压干燥。

(3) *N*-己二酸单酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸:将 2-硝基-5-氨基苯甲酸溶于 1,4-二氧六环中,水浴冷却,边搅拌边缓慢滴加己二酰二氯,滴加完毕后继续搅拌 1h,加入 2~3 倍体积的水以析出酰胺产物 *N*-己二酸单酰-2-硝基-5-氨基苯甲酸,抽滤,以 pH 6.0 的水溶液洗涤。用水和乙醇结晶。置干燥器中减压干燥。

**1.3.2** *N*-戊二酸单酰(萘氨(*N*-Glutaryl(-Naphthylamine, GL-Nap), *N*-戊二酸单酰-苯氨(*N*-Glutaryl-Aniline, GL-Aniline), *N*-戊二酸单酰-对-硝基苯氨(*N*-Glutaryl-*p*-Nitro-Aniline, GL-NA)和 *N*-己二酸单酰-对-硝基苯氨(*N*-Adipoyl-*p*-Nitro-Aniline, AD-NA)合成均通过戊二酸酐或己二酰二氯酰化相应的氨基化合物获得,方法同 1.3.1。

#### 1.4 GL-7ACA 酰化酶和青霉素 G 酰化酶的催化反应

将所合成的化合物溶解于 0.1 mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液,分别加入 GL-7ACA 酰化酶和青霉素 G 酰化酶,在 37°C 反应,产物若为 NABA 或 NA,可直接观察黄色产物的出现,其他化合物的水解则用对-二甲氨基苯甲醛(pDAB)比色法检测。

#### 1.5 酰化酶产生菌的筛选

用两种方法对候选菌株进行筛选。方法 I:将所合成的化合物溶解于 0.1 mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液并加到透明的 96 孔板中,将平板上的菌落用牙签挑到 96 孔板中,37°C 反应,若水解后产物为 NABA 或 NA,可直接观察黄色产物的出现,其他化合物的水解则用 pDAB 比色法检测。方法 II:将候选菌株点种到含有不同底物类似物的 LB 平板上(底物类似物浓度均为 2 mg/mL),于 33°C 培养 2~3 d 或更长时间,直接观察菌落周围的颜色变化。在含 GL-NABA, AD-NABA, GL-NA, AD-NA 的平板上,如果有酰化酶产生菌水解这些物质,菌落周围会有黄色出现。在含 GL-Nap 的平板上,如果有酰化酶产生菌水解 GL-Nap,菌落周围会出现透明圈。

在筛选过程中,除了采用我们自己合成的头孢菌素类似物,还增加了青霉素 G 酰化酶的底物类似物 NIPAB 作为筛选物。在含 NIPAB 的平板上,如果有酰化酶产生菌水解 NIPAB,菌落周围会有黄色出现。

#### 1.6 底物类似物酰化酶,青霉素 G 酰化酶和头孢菌素酰化酶酶活测定

底物类似物酰化酶和头孢菌素酰化酶的酶活测定均在 0.1 mol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液中,37°C 的条件下进行。酰化酶对生色的底物类似物活力测定在 365 nm 处直接测定水解产物的量,对 GL-Nap 和 Glutaryl-Aniline 的活力测定采用对-二甲氨基苯甲醛(pDAB)比色法。每个活力单位定义为在上述条件下每分钟产生 1  $\mu$ mol/L 的产物所需的酶量。青霉素 G 酰化酶酶活测定采用对-二甲氨基苯甲醛(pDAB)比色法,每个活力单位定义为上述条件下每分钟产生 1  $\mu$ mol/L 的 6-APA 所需的酶量。头孢菌素酰化酶酶活鉴定分别采用对-二甲氨基苯甲醛(pDAB)比色法和 HPLC 法<sup>①</sup>,每个活力单位定义为上述条件下每分钟产生 1  $\mu$ mol/L 的 7-ACA 所需的酶量。

#### 1.7 酰化酶的初步纯化

将酰化酶阳性菌株接种到 LB 培养基中,在产酶高峰时,收取菌体,破碎细胞,用 80%

① 朱彤波:中国科学院博士学位论文,2000 9。

硫酸铵沉淀无细胞提取液中的蛋白。将蛋白溶解后,上 Phenyl-Sepharose 和 Q-Sepharose,用 GL-7ACA, CPC, 底物类似物和 NIPAB 测定所有分步收集的洗脱液中的酰化酶活力。蛋白质纯化和分析操作参见参考文献 [8]。

## 2 结果和讨论

### 2.1 头孢菌素酰化酶底物类似物的设计与合成

我们分别选择苯胺, 硝基氨基苯甲酸, 硝基苯胺和萘胺作为筛选化合物的核, 戊二酸单酰胺和己二酸单酰胺为其侧链。苯环, 萘环与头孢菌素母核 7-ACA 有一定的相似性, 在空间位阻上, 苯环比 7-ACA 小, 萘环比 7-ACA 大。戊二酸单酰胺和己二酸单酰胺是头孢菌素酰化酶主要识别部位, 己二酸单酰胺更接近头孢菌素 C 的侧链氨基己二酸的结构。

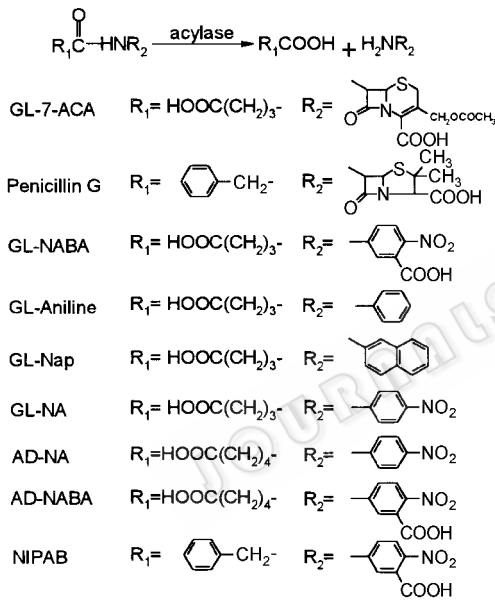


图 1  $\beta$ -内酰胺抗生素酰化酶的催化反应和底物及其类似物的化学结构

Fig. 1 Sketch of enzymatic reaction and the structures of substrates analogs

2-硝基-5-氨基苯甲酸和对-硝基苯胺为发色物质, 固态和溶液均呈明亮的黄色, 在水溶液中形成肉眼可辨的黄色的最低浓度为 0.1mg/L。用紫外-可见分光光度计进行波长扫描, 发现它们在 365nm 有较强的特征吸收。一旦它们的氨基被酰化, 则颜色消失, 且特征吸收转移到 280nm 处。对-硝基苯胺的显色效果与 2-硝基-5-氨基苯甲酸相当, 但是水溶性不如 2-硝基-5-氨基苯甲酸。

酰化苯胺对菌体的生长影响不大, 其水解产物之一苯胺对菌体生长有毒害作用。在含有戊二酸单酰苯胺的培养基上, 酰化酶产生菌水解戊二酸单酰苯胺产生苯胺, 会导致自身死亡, 不产生酰化酶的菌株则能够正常生长, 因此戊二酸单酰苯胺可以用于酰化酶产生菌的负筛选。溶液中的苯胺也可以用对二甲氨基苯甲醛比色测定含量。

酰化的  $\beta$ -萘胺溶解度很小, 萘胺溶解度比酰化的萘胺要大。当酰化的萘胺混在培养基中时, 培养基是不透明的, 当酰化萘胺被细菌的酰化酶水解后, 在该菌相应的位置上会有透明圈出现。溶液中的萘胺也可以用对二甲氨基苯甲醛比色测定含量。

所有这些化合物都不含  $\beta$ -内酰胺环, 可以避免  $\beta$ -内酰胺酶的干扰。由于它们的酰胺键被酰化酶水解以后的产物可以方便快速的检测, 因此可以对大量菌株进行快速筛选 (图 1)。

所有这些都是不含  $\beta$ -内酰胺环, 可以避免  $\beta$ -内酰胺酶的干扰。由于它们的酰胺键被酰化酶水解以后的产物可以方便快速的检测, 因此可以对大量菌株进行快速筛选 (图 1)。

### 2.2 GL-7ACA 酰化酶和青霉素 G 酰化酶对所合成的化合物的水解

用来源于 *Pseudomonas* sp130 的 GL-7ACA 酰化酶和来源于 *E. coli* D816 的青霉素 G 酰化酶对它们的底物和合成的底物类似物逐一进行了水解实验 (表 1)。研究表明青霉素 G

酰化酶只能对 GL-苯胺有微弱的水解活力,对其他的底物都不能水解,而 GL-7ACA 酰化酶对所有的化合物都能水解,但是对己二酸单酰化化合物的活力比对戊二酸单酰化化合物的活力低。说明这些化合物都可以用于头孢菌素酰化酶的筛选。

### 2.3 酰化酶产生菌的筛选

用含有多种底物及其类似物的培养基,对本实验室收藏和分离的近千株未鉴定的菌株进行筛选,得到了 6 株对这些混合物有一定水解作用的菌株,分别命名为 ZH0014, ZH0142, ZH0143, ZH0502, ZH0648, ZH0650。它们对各底物及其类似物的水解情况见表 2。

表 1 *Pseudomonas* sp.130 GL-7ACA 酰化酶和 *E. coli* 对 D816 青霉素 G 酰化酶对合成的头孢菌素类似物的水解

Table 1 Hydrolytic activities of *Pseudomonas* sp.130 GL-7ACA acylase and *E. coli* D816 penicillin G acylase on substrates and the substrate analogs synthesized

	analog synthesized	
	GL-7ACA acylase	Penicillin G acylase
GL-NABA	+++	-
AD-NABA	+	-
GL-Nap	+	-
GL-Aniline	+++	+
GL-NA	+++	-
AD-NA	+	-

表 2 底物类似物酰化酶阳性菌株对不同底物类似物的水解

Table 2 Hydrolytic activities of acylase-positive-strains on substrates

	ZH0014	ZH0142	ZH0143	ZH0502	ZH0648	ZH0650
GL-NABA	+	+	+	+	++	+++
AD-NABA	++	+	+	++	+++	+++
GL-Nap	-	-	-	-	-	++
GL-Aniline	+++	++	++	++	+++	+++
GL-NA	+	+	+	+	++	+++
AD-NA	++	+	+	+	++	+++
NIPAB	-	-	-	-	-	++
PG	-	-	-	-	-	+
GL-7ACA	—	-	-	-	-	+
CPC	—	-	-	-	-	-

其中菌株 ZH0650 最值得注意。在含有 GL-NABA, AD-NABA, GL-NA, AD-NA 和 NIPAB 的平板上, ZH0650 均能够水解这些底物类似物,产生黄色圈。在含 GL-Nap 的平板上它水解 GL-Nap 产生透明圈。酶活测定也表明它可以水解多种底物,不仅能够水解含有苯环和萘环的戊二酸单酰胺和己二酸单酰胺化合物,而且还能够水解 NIPAB, GL-7ACA 和青霉素 G。由于 NIPAB 的侧链苯乙酰胺和其它化合物的侧链戊二酸单酰胺或己二酸单酰胺的结构特征完全不同,因此该菌的底物谱十分广泛。有两种可能,一种是该菌产生多种酰化酶活,每一种分别水解一种或几种底物。另一种可能是该菌产生一种酰化酶,该酰化酶有着十分广泛的底物谱。为此我们对该菌的产酶特性作进一步的研究。

## 2.4 菌株 ZH0650 的酰化酶的组成分析和分离酶纯化

收取 28℃ 培养 48h 的 ZH0650 菌体,破细胞提取蛋白,用 Phenyl-Sepharose 和 Q-Sepharose 柱层析将蛋白分段。发现在 Phenyl-Sepharose 层析时,最开始可以去除蛋白溶液中大量红色色素和大部分  $\beta$ -内酰胺酶,故去除了对头孢菌素酰化酶活力测定的干扰。分别用 GL-7ACA、CPC、AD-NABA 和 NIPAB 为底物,测定所有从 Phenyl-Sepharose 或 Q-Sepharose 上分步收集的洗脱液的酰化酶活力,在不同收集液中检测到了针对这 4 种底物的酰化酶活力。Phenyl-Sepharose 层析时, GL-7ACA 酰化酶活力、CPC 酰化酶活力和青霉素 G 酰化酶活力存在于 0.3 mol/L 硫酸铵洗脱液里,水解 AD-NABA 的酰化酶的活力存在于 0.05 mol/L 硫酸铵的洗脱液里。Q-Sepharose 层析时,青霉素 G 酰化酶活力存在于 0.08 mol/L NaCl 的洗脱液里,AD-NABA 酰化酶活力存在于 0.15 mol/L NaCl 的洗脱液里, GL-7ACA 酰化酶活力和 CPC 酰化酶活力存在于 0.25 mol/L NaCl 的洗脱液里。AD-NABA 酰化酶活力为 11U/L,青霉素 G 酰化酶活力为 90U/L, GL-7ACA 酰化酶活力为 5U/L。这说明 ZH0650 菌株至少能够产生 3 种不同的酰化酶:青霉素 G 酰化酶、头孢菌素酰化酶和 AD-NABA 酰化酶。

通过硫酸铵分级沉淀, Phenyl-Sepharose、Q-Sepharose 和 Superdex75 柱层析,初步纯化了 ZH0650 菌株所产生的青霉素 G 酰化酶和 AD-NABA 酰化酶。从 SDS 凝胶电泳图上看,青霉素 G 酰化酶是由两个亚基组成,大亚基约 62kD,小亚基约 25kD。AD-NABA 酰化酶为单亚基酶,分子量约为 54kD(图 2)。

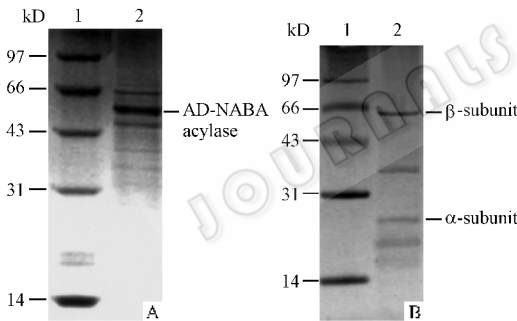


图 2 AD-NABA 酰化酶和青霉素 G 酰化酶的 SDS 凝胶电泳

Fig.2 SDS-PAGE profiles of purified AD-NABA acylase and penicillin G acylase

A. 1, Standard protein molecular weight; 2, purified AD-NABA acylase.

B. 1, Standard protein molecular weight; 2, purified PGA.

由于 ZH0650 中的头孢菌素酰化酶表达量很低(约 5U/L),未能够纯化该酶。将用 pDAB 法测定的只具有头孢菌素酰化酶活力的 Q-Sepharose 层析馏份与 GL-7ACA 反应,用 HPLC 对其产物进行了鉴定。由于头孢菌素 C 酰化酶能够一步水解头孢菌素 C 产生 7ACA,在工业上更为重要,因此我们也对 ZH0650 中的 GL-7ACA 酰化酶是否具有头孢菌素 C 酰化酶活力进行了测定。结果表明菌株 ZH0650 确实能水解 GL-7ACA 和 CPC 产生 7ACA(图 3)。因此, ZH0650 至少能产生一种具有水解 CPC 和 GL-7ACA 的头孢菌素酰化酶。

## 2.5 酰化酶产生菌 ZH0650 的 3 种酰化酶的底物谱

用初步纯化的 ZH0650 的 3 种酰化酶水解不同的底物,测定了它们各自的底物谱。从表 3 中可以看出, ZH0650 中的 AD-NABA 酰化酶虽然也具有一定的水解头孢菌素 C 的活力,但活力很低,因此它可能是一种新型酰化酶。而所发现的头孢菌素酰化酶可以水解 GL-7ACA 和头孢菌素 C。出乎意料的是,利用 NIPAB 进行筛选,在这株菌中还发现了青霉素 G 酰化酶。

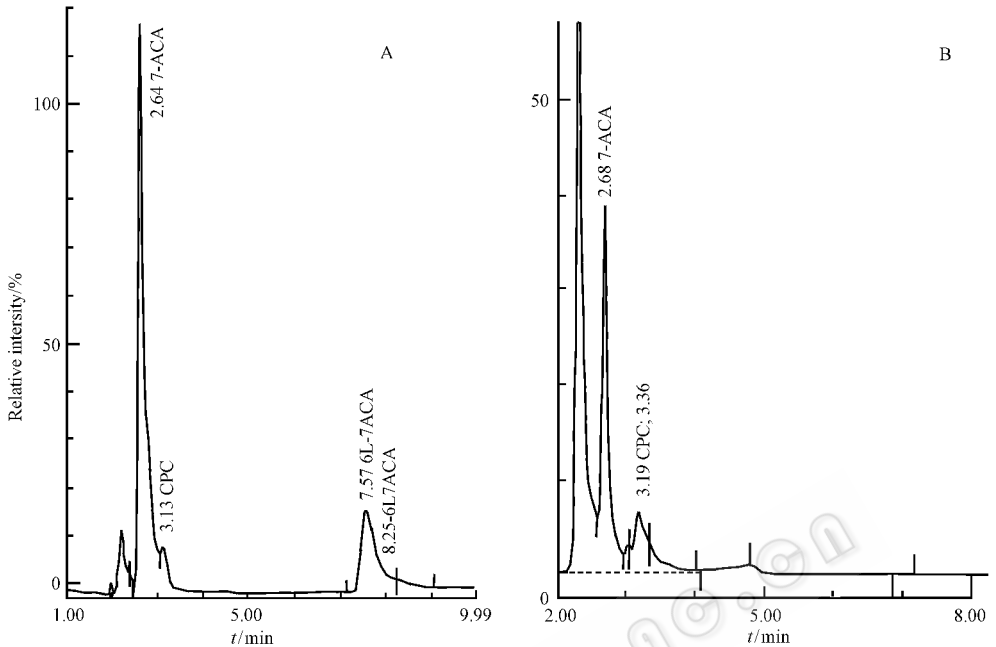


图 3 菌株 ZH0650 头孢菌素酰化酶活力鉴定的 HPLC 图谱

Fig.3 Characterization of cephalosporin acylase activity of strain ZH0650 by HPLC

0.5mg/mL GL-7ACA or Cephalosporin C was incubated with partially purified cephalosporin acylase at 37°C for 30 min. 50 $\mu$ L reaction mixture was withdrawn and applied to HPLC chromatography. Retention time of peaks : 7-ACA , 2.67 ; GL-7ACA , 7.53 ; CPC , 3.19 ;A :Chromatogram of reaction mixture of GL-7ACA and partially purified CCA ;B :Chromatogram of reaction mixture of CPC and partially purified CCA.

表 3 菌株 ZH0650 产生的 3 种酰化酶的底物谱

Table 3 Substrate profiles of three acylases derived from strain ZH0650

	GL-7ACA	CPC	NIPAB	AD-NABA	GL-Anil	GL-Nap	AD-NA	PG
Penicillin G acylase	-	-	++	-	+	-	-	++
AD-NABA acylase	+	+	-	+++	+++	++	+++	-
AD-NABA acylase	++	+	-	-	+++	-	-	-

在一株菌中同时产生多种  $\beta$ -内酰胺类抗生素酰化酶的现象不多见,对于这些酶的分别研究和开发,将具有十分重要的意义。目前,ZH0650 中的 AD-NABA 酰化酶和青霉素 G 酰化酶的基因已经克隆和测序(待发表),有关头孢菌素酰化酶的研究还在继续之中。

致谢 对茅翔博士在有机合成实验中给予的帮助表示感谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Franzosi G , Battistel E , Gagliardi I , *et al.* Screening and characterization of microorganisms with glutaryl-7ADCA acylase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1995 , 43( 3 ) 508 ~ 13.

- [ 2 ] Binder R , Brown J , Romancik G. Biochemical characterization of a glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas* strain BL072. *Appl Environ Microbiol* , 1994 , **60**( 6 ) :1805 - 9.
- [ 3 ] Baker W L. Co-existence of beta-lactamase and penicillin acylase in bacteria ; detection and quantitative determination of enzyme activities . *J Appl Bacteriol* , 1992 , **73**( 1 ) :14 ~ 22.
- [ 4 ] Walton R. Search for microorganisms producing cephalosporin C acylase. *Dev Ind Microbiol* , 1963 **5** :349 ~ 353.
- [ 5 ] Zhu Songcheng , Jiang Weihong , Zhao Guoping , et al . The synthesis of 3-nitro-5-( 6-bromohexanoylamino ) benzoic acid and the studies on its use as an indicator of cephalosporin C-acylase-producing-microorganisms. *Chinese Journal of Antibiotics* , 1999 , **24**( 3 ) :169 ~ 172.
- [ 6 ] Pierre B , Edmund Z. Use of amino adipoyl chromogenic amides in screen for amino adipoylhydrolases. *Analytic biochemistry* , 1992 , **200** :315 ~ 320.
- [ 7 ] Ichiri A , Yoshio U , Hiroshi I. Comparative characterization of new glutaryl-7ACA and cephalosporin C acylase. *Journal of Fermentation and Bioengineering* , 1992 , **73**( 3 ) :185 ~ 192.
- [ 8 ] Rosenberg , Ian M. Protein Analysis and Purification : Benchtop Techniques. Boston : Birkhaeuser , 1996.

## Selection of A Strain Producing $\beta$ -Lactam Antibiotics Acylases\*

Zhu Songcheng Huang Xi Zhao Guoping\*\* Jiang Weihong\*\*

( Laboratory of Molecular Microbiology , Institute of Plant Physiology and Ecology , Shanghai Institutes for Biological Sciences , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China )

**Abstract** : A series of substrates analogues containing the same or similar side chain of its substrate have been synthesized and applied to screen cephalosporin acylase producers from a mass of microorganisms. The deacylation products of these analogues can be detected conveniently and used as screening indicators for the cephalosporin-acylase-producing-microorganism. Six strains possessing deacylation activity have been screened out with these substrate analogs. Among them , strain ZH0650 can simultaneously hydrolyze GL-7ACA , NIPAB and other analogues including AD-NABA. Further investigation on this strain confirmed that it could produce at least three acylases , AD-NABA acylase , penicillin G acylase and cephalosporin acylase , which were characterized by bioassay with multiple substrate analogues. This is the first report that three different acylases were produced by one strain.

**Key words** : Cephalosporin acylase , Penicillin G acylase , GL-7ACA , Screening indicator

\* Supported by a grant from National High-Tech. Program( 2001AA235081 )

\*\* Corresponding author