

大肠杆菌青霉素酰化酶的提纯及其性质的研究

矫庆华 张启先 王祯祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

大肠杆菌(*Escherichia coli*) AS 1.76 发酵液经有机溶剂处理, 硫酸铵分级, 再用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳进行纯化, 得到了聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的青霉素酰化酶纯品。纯酶作用的最适温度为 45—55℃, 最适 pH 为 7.0—7.7, 在无 NIPAB 存在下, 纯酶在 45℃ 以下稳定, 但在 55℃ 保温一小时, 酶活力残存 33.58%, 纯酶在 pH 5.0—8.0 稳定。酶作用于重排酸的米氏常数为 $3.33 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ 。Ag⁺ 对酶有抑制作用。用聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦测定酶的等电点 (pI) 为 6.7—6.8, 用 SDS 凝胶电泳测酶的亚基分子量分别为 14300 和 58900。纯酶具有水解苯甘氨酸甲酯盐酸盐的作用, 反应两小时产生 12.74mM 苯甘氨酸。

关键词 青霉素酰化酶; 重排酸; 青霉素 G

由大肠杆菌 AS1.76 产生的青霉素酰化酶, 不仅具有催化酰胺键水解的能力^[1-2], 而且有催化酰化合成新青霉素类或头孢霉素类的能力。我们在合成头孢力新 (Cephalexin) 时, 发现在 25℃, pH 6.0, 侧链与母核之比为 4:1, 反应 5 小时后, 头孢立新合成率达 86.9%; 如果将侧链与母核的比例降为 1:1, 则合成率低于 40%。为了搞清青霉素酰化酶对侧链是否有水解作用或有无其它酶的干扰, 我们对此酶进行了纯化, 并对该酶的物理化学性质进行了研究。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) AS1.76 是本研究组选出的青霉素酰化酶活力较强的菌株。

2. 试剂和仪器: 丙烯酰胺 (Sigma 公司产品); 标准蛋白 (BDH 产品); Ampholin (瑞典 LKB 公司产品); 苯甘氨酸甲酯盐酸盐 [D(-)-Phenylglycine methyl ester hydrochloride] 由太原制药厂提供; 6-硝基-3-苯乙酰氨基苯甲酸 (6-nitro-3-phenylacetamido-benzoic acid) 简称 NIPAB (上海生物化学研究所东风试剂厂提供)。聚丙烯酰

胺凝胶等电聚焦电泳仪 (瑞典 LKB 公司)。721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂)。其它化学试剂均为市售分析纯或化学纯。

(二) 方法

1. 菌液的培养和粗酶液的制备: 培养基成分 (%): 鱼肝 1.0, 苯乙酸 0.2, 玉米浆 0.3, 氯化钠 0.5, pH 7.0, 500ml 三角瓶装 60ml 培养液, 8 磅 30 分钟灭菌, 接斜面菌种, 28℃ 摇床 (170 次/分) 培养 15 小时。取发酵液 880ml 加 58.67ml 醋酸丁酯于 28℃ 保温 24 小时, 经 14300g 离心 40 分钟得 850ml 上清液, 即为粗酶液。

2. 酰化酶活力测定:

(1) NIPAB 法: 按 Kutzbach^[3] 方法略加改良^[4], 酶反应温度为 37℃。

(2) 以重排酸为底物测定法: 基本按 Merelli 所报道的方法测定产生的 7-ADCA 的量^[4]。

酶活力单位为 NIPAB 法测定条件下, 每分钟产生 1μmol 3-氨基-6-硝基苯甲酸所需的酶量为 1 个单位酶活力。

3. 一般分析方法:

(1) 蛋白质测定按 Folin-酚法^[5]。

(2) 等电点的测定按 Vesterberg 的聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦法^[6]。

本文于 1985 年 5 月 28 日收到。

(3) 分子量按 Weber 系统^[7] SDS 凝胶电泳测定。

(4) Disc 电泳按 Davis 方法^[8]进行, 凝胶浓度为 7%, 用考马斯亮蓝 R250 染色。

(5) 活性染色: 取溶化的 1.5% 琼脂溶液 5ml (pH7.7, 0.05M 磷酸缓冲液配制) 加入 2.8 ml NIPAB 液 (0.56mgNIPAB/ml) 混匀, 温度不低于 45℃, 圆盘电泳后的样品胶条立即放入此溶液中, 于 37℃ 保温 10 分钟, 即显示出黄色活性区带。

结果与讨论

(一) 酶的提纯

1. 硫酸铵分级和脂溶性物质的去除: 经醋酸丁酯处理后的上清液 850ml, 在搅拌下缓慢加入硫酸铵 206g, 使成 40% 饱和度, 放置 4 小时后于 13400g 离心 30 分钟, 弃去沉淀, 将上清液装入分液漏斗中, 并加入硫酸铵, (边加边摇) 112.2g, 使成 60% 饱和度, 放置过夜。将下层由分液漏斗内分出并于 13400g 离心 30 分钟, 沉淀用 0.05M 磷酸盐缓冲液 (pH7.7) 溶解, 并对蒸馏水透析 30 小时, 换水 5 次, 得透析液 33ml。

2. 聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳提纯: 取 6ml 上述透析液加到聚丙烯酰胺垂直板凝胶上进行电泳, 凝胶浓度 7.0%, 电流 20—30mA, 使用 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓

冲液, 电泳 2.5 小时后, 取出凝胶, 再分别从凝胶两边切下一条 0.5cm 宽的胶条, 用 20% 的三氯醋酸配制的考马斯亮蓝 R250 溶液(浓度为 0.25%)加热染色 1—2 分钟, 立即用 7% 的醋酸漂洗脱色, 对照显色后的两边胶条上的显色带, 切下相应位置的凝胶, 用大约 5ml 蒸馏水在 4℃ 冰箱中浸泡, 过滤除去凝胶, 浸液用圆盘电泳鉴定为均一区带 (图 1)。并经活性染色也显示出单一黄色区带。提纯结果见表 1。

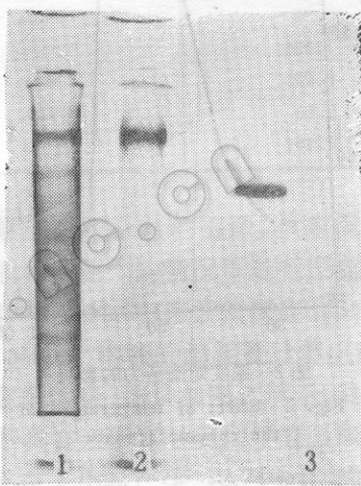


图 1 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns

1.粗酶 Crude enzyme 2,3. 纯酶 Purified enzyme

(二) 酶的性质

1. 酶作用的最适温度: 取 1.8 mg/

表 1 青霉素酰化酶的提纯

Table 1 Purification of penicillin acylase

提 纯 步 骤 Purification step	总 蛋 白 Total protein (mg)	总 酶 活 Total activity (U)	比 活 Specific activity (U/mg)	回 收 率 Recovery rate(%)	
				蛋 白 Protein	酶 活 activity
粗 酶 液 Crude extract	2087	124.77	0.059	100.0	100.0
40—60% (NH ₄) ₂ SO ₄	92.7	72.00	0.777	4.44	57.7
垂直板电泳 Preparative slab PAGE	5.2	28.48	5.480	0.25	22.8

ml 的 NIPAB 液 0.5ml, 与 0.9ml 0.05M 磷酸盐缓冲液(pH7.7)相混合, 不同温度下保温 5 分钟, 然后加入 0.1ml 纯酶液(0.0106 mg 蛋白), 反应 10 分钟, 用 1 ml 0.5 M Na_2CO_3 溶液终止反应, 于 721 型分光光度计 405nm 测吸光度 A, 结果见图 2。酶作用的最适温度为 45—55℃。

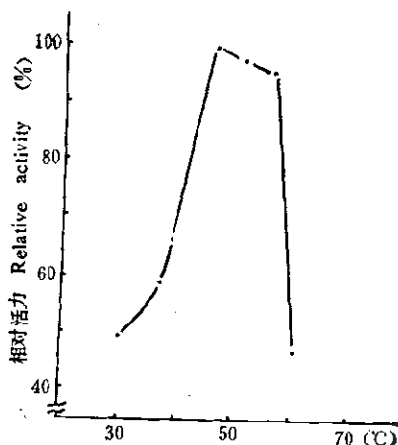


图 2 温度对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the enzyme activity

2. 酶作用的最适 pH: 取 0.7 ml 不同 pH 值的缓冲液和 0.2ml 重排酸液 (浓度为 2%) 混合, 于 37℃ 保温 5 分钟后加入 0.1ml 纯酶液 (0.0106mg 蛋白), 反应 10 分钟, 加 1ml 10% 甲酸终止反应, 再加 1ml 2% 柠檬酸液及 0.5 ml 茚三酮溶液, 22℃ 显色反应 25 分钟, 于 721 型分光光度计 405nm 测吸光度 A。(上述不同 pH 值缓冲液分别为 pH5.0—7.6 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH8.0—9.0 硼酸缓冲液, pH 9.6—10 硼酸缓冲液。)结果见图 3。酶作用的最适 pH 范围 7.0—7.7。

3. 酶的热稳定性: 取 0.1ml 纯酶液 (0.0106mg 蛋白) 与 0.9ml 0.05M 磷酸缓冲液 (pH7.7) 相混合, 在不同温度下保温 1 小时, 取出于冰水中冷却, 再于 37℃ 保温

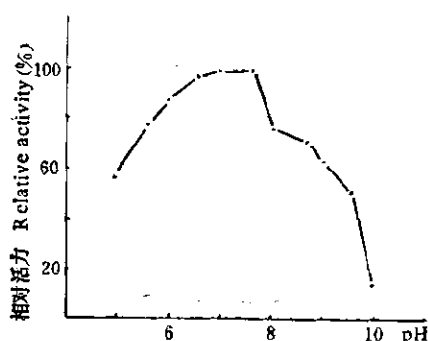


图 3 pH 对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on the enzyme activity

5 分钟后, 加入 0.5ml NIPAB 液 (1.8mg/ml), 反应 10 分钟, 加 1ml 0.5M Na_2CO_3 溶液终止酶活。于 721 型分光光度计 405nm 比色测定 (图 4)。此酶在 45℃ 以下稳定, 在 55℃ 保温 1 小时, 酶活力残存 33.58%。

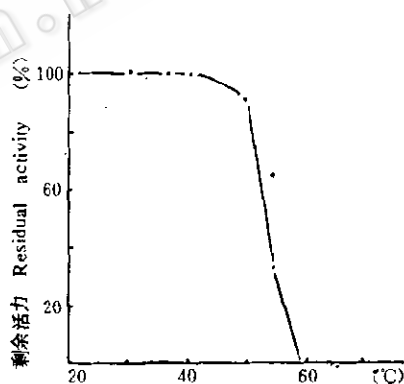


图 4 酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of the enzyme

4. pH 稳定性: 取 0.1ml 酶液 (0.0106 mg 蛋白) 和 0.6ml 不同 pH 值的缓冲液, 在 37℃ 保温 17 小时, 取其 0.1ml 用 NIPAB 法测定酶活力, 计算剩余活力 (图 5)。当 pH 值小于 4.5 或大于 8.0 时, 酶活力明显下降 (pH3.0—7.6 用磷酸缓冲液, pH8.0—9.0 用硼酸缓冲液)。

5. 酶作用于重排酸的米氏常数: 使反应液中重排酸的最终浓度分别为 0.0005、

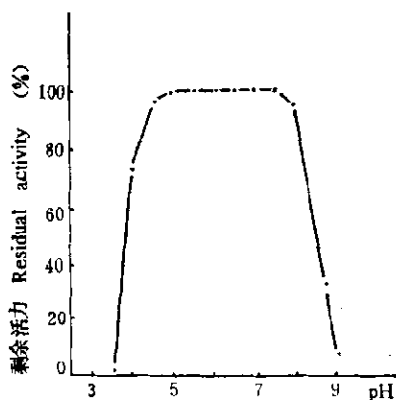


图5 酶的 pH 稳定性

Fig. 5 Stability of the enzyme at different pH values

0.001、0.002、0.003、0.004 及 0.005%，用 Merrelli 法测定酶活力，以每分钟每 ml 中的活力数代表酶反应速度(v)按 Lineweaver-Burk 法作图(图6)，根据直线在横轴上的截距($-\frac{1}{K_m}$)求出米氏常数 K_m 为 $3.33 \times 10^{-2} \text{g/ml}$ 。

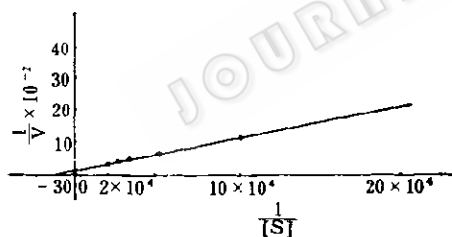


图6 以重排酸为底物的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 6 Lineweaver-Burk plot of penicillin acylase for phenylacetyl-ADCA

6. 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响: 以 NIPAB 为底物测定酶活力时, 加入最终浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 各种金属离子及 EDTA, 结果见表 2。除 Ag^+ 对酶活力有抑制作用外, 其它均无明显影响。

7. 苯甘氨酸甲酯盐酸盐的酶水解: 基本参照 Takamashi 等所报道的方法进行^[9]。在 55mM pH 6.8 苯甘氨酸甲酯盐酸盐的水溶

表 2 各种金属离子和 EDTA 对酶活力的影响

Table 2 Effect of various metal ions and EDTA on enzyme activity

金属离子 Metal ion	酶活力 Enzyme activity
none	100.0
NH_4	97.5
Ca^{2+}	106.0
Mg^{2+}	97.3
Mn^{2+}	110.0
Zn^{2+}	96.7
Co^{2+}	103.3
Cu^{2+}	90.67
Fe^{2+}	98.8
Fe^{3+}	100
Al^{3+}	99.5
Ag^+	62.2
EDTA	101.9

液中添加 0.6U/ml 的酶量, 反应混合物在 25°C 表面通氮气的情况下进行反应 2 小时, 滴加 200mM NaOH 溶液使反应的 pH 恒定, 通过 NaOH 溶液的消耗量计算出产生的苯甘氨酸的量, 结果如图 7 所示, 纯酶在此条件下具有水解苯甘氨酸甲酯盐酸盐的活性, 反应 2 小时产生 12.74mM 的苯甘氨酸。

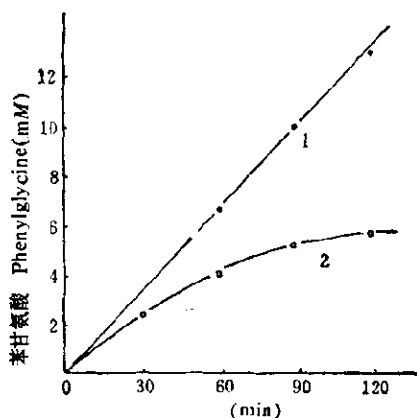


图7 苯甘氨酸甲酯盐酸盐的水解

Fig. 7 Hydrolysis of phenylglycine methyl ester hydrochloride

1. 酶水解 Hydrolysis by penicillin acylase
2. 自然水解 Spontaneous hydrolysis

酸。

8. 等电点的测定: 用 Vesterberg 的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦测定, 凝胶浓度为 5%, 内含 2% 的载体两性电解质 "Ampholine", pH3.0—10, 控制电流开始为 80mA, 终止为 20mA, 控制电压开始为 400V, 终止为 1000V, 共电泳 3 小时。电泳毕, 在凝胶边上截取一条 1cm 宽的胶, 按每 0.5cm 的距离截成小段, 用 2ml 除去 CO₂ 的蒸馏水浸 15 小时, 用 pH 计测定浸泡液的 pH 值, 以 pH 对距离作图(图 8), 电泳后用 10% 的三氯醋酸固定并漂洗除去载体两性电解质, 用 0.1% 的考马斯亮蓝 R250 染色, 用冰醋酸: 水: 95% 乙醇 = 1:8:3 (V/V) 溶液脱色, 量出酶蛋白的区带位置, 从 pH-距离曲线上查得纯酶的一条主要区带的等电点 (pI) 为 6.7—6.8。

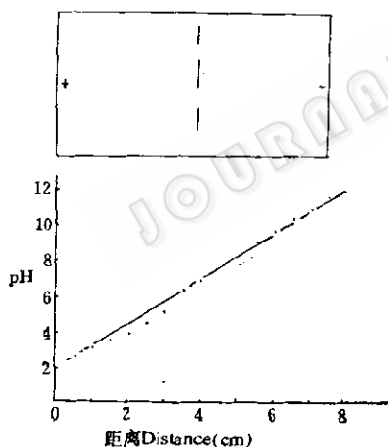


图 8 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳图

Fig. 8 Estimation of pI of purified enzyme by electrofocusing on polyacrylamide gel

9. 分子量的测定: 用 Weber^[7] 等人的 SDS 凝胶电泳测定, 取蛋白含量为 2.85 mg/ml 的纯酶液 0.3ml 加 0.3ml 样品处理液于 100℃ 煮沸 3 分钟, 在室温透析过夜。标准蛋白采用 BDH 公司的分子量为 14300—71500 的混合样品。其中各分子

量如下: 单体 14300, 二聚体 28600, 三聚体 42900, 四聚体 57200, 五聚体 71500, 六聚体 85800。结果见图 9。根据酰化酶两个亚基的迁移率的百分比, 从图中查得亚基分子量分别为 14300 和 58900 (图中箭头所指)。

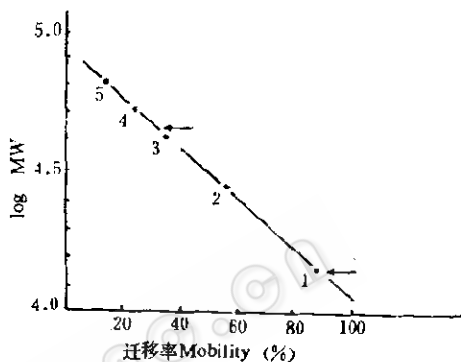


图 9 SDS 电泳测定酶的分子量

Fig. 9 Estimation of the molecular weight of penicillin acylase by SDS PAGE

1. 单体 Monomer
2. 二聚体 Dimer
3. 三聚体 Trimer
4. 四聚体 Tetramer
5. 五聚体 Pentamer

讨 论

精制的大肠杆菌 AS 1.76 青霉素酰化酶经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的分子量, 结果得到了两个组分的分子量分别为 58900 和 14300。这一点与 Kutzbach 等的结果稍有不同, ATCC11 105 菌所产生的青霉素酰化酶用 Sephadex G200SF 方法得到的分子量为 70000, 而用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测得二个组分的分子量分别为 71000 和 20500, 这可能是由于所用的 SDS 的量和其它实验条件不同而引起的。

在用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦测定等电点时发现, 纯酶有一条主带, 同时出现 3—4 条极弱的带, 主带的等电点为 6.7—6.8, 这与 Kutzbach 等的报道是一致的。

该酶对青霉素和重排酸有水解能力, 能催化侧链羧酸和母核6-APA或7-ADCA之间的酰化反应。此外, 在我们的实验中也证明了它能水解苯甘氨酸甲酯盐酸盐。可见该酶的底物特异性是相当宽的。用于6-APA或7-ADCA的生产有一定的好处, 可以一酶多用, 但用于合成反应时, 却不利。酯的酶水解使酶法半合成青霉素的效率降低。

参 考 文 献

- [1] 张启先等: 微生物学报, 19(3): 302—308, 1979。
- [2] 王祯祥等: 微生物学报, 21(4): 477—481, 1981。
- [3] Kutzbach, C. and E. Rouenbusch: Hoppe-Soyler's, Z. Physiol. Chem., 355: 45. 1974.
- [4] Merrelli, L. P.: J. Pharmaceutics Sci, 57: 219, 1968.
- [5] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 科学出版社, 北京, p. 28, 1979。
- [6] Vesterberg, O.: Biochem. Biophys. Acta., 257: 11, 1972.
- [7] Weber, K. and M. Osborn: J. Biol. Chem., 244: 4406, 1969.
- [8] Davis, B. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 121: 404, 1964.
- [9] Takahashi, et al.: Biochem. J., 137: 497—503, 1974.

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF PENICILLIN ACYLASE FROM *ESCHERICHIA COLI* AS 1.76

Jiao Qinghua Zhang Qixian Wang Zhenxiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The culture of *E. coli* As 1.76 were treated with organic solvent and penicillin acylase was precipitated by 40—60% ammonium sulfate and purified by preparative polyacrylamide gel electrophoresis.

The optimum temperature for enzyme activity was 45—55°C and optimum pH was 7.0—7.7. The purified penicillin acylase has higher stability bellow 45°C, only 33.58% of the original enzyme activity was remained when the enzyme was heated at 55°C for 1 h. It was stable in the pH from 5.0 to 8.0. The Michaelis constant (K_m) for 7-phenylacetyl-ADCA was

3.33×10^{-2} g/ml. The enzyme activity was inhibited by Ag^+ . The enzyme has isoelectric point of 6.7—6.8, which was determined by isoelectric focusing on polyacrylamide gel. The molecular weight of the subunits was 14300 and 58900 respectively, which were estimated by SDS PAGE. The purified penicillin acylase hydrolyzed phenylglycine methyl ester hydrochloride to produce about 12.75 mM phenylglycine at 25°C for 2 h.

Key words

Penicillin acylase; 7-phenylacetyl-ADCA; Benzylpenicillin