

铜绿假单胞菌完整细胞 α -氨基酸酯水解酶的性质

寇秀芬 王祯祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) AS 1.204 完整细胞 α -氨基酸酯水解酶能催化 α -氨基酸酯的水解和转移 α -氨基酸酯的酰基到胺亲核试剂上。在水解和转移反应中酶的一般性质相同, 最适 pH 为 5.2, 最适温度都是 40℃。

7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA) 抑制苯甘氨酸甲酯 (PG-OMe) 的水解。因此, 该酶催化 7-ADCA 和 PG-OMe 转化成相应的半合成头孢菌素。

关键词 铜绿假单胞菌; α -氨基酸酯水解酶; 半合成头孢菌素

关于 α -氨基酸酯水解酶的研究近十几年来已有不少报道^[1-3]。Rhee 等人用柑桔黄单胞菌 (*Xanthomonas citri*) 完整细胞研究了该酶性质^[4], Kato 等人用来自柑桔黄单胞菌的纯酶进一步证明了 α -氨基酸酯水解酶的水解和转移活性共存^[5]。关于这种酶的研究目前国内尚未见报道。

我们在实验中发现, 铜绿假单胞菌 AS 1.204 完整细胞在合成头孢力新时不同于大肠杆菌青霉素酰化酶。来自大肠杆菌的青霉素酰化酶能转移苯乙酸的各种衍生物到 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸、6-氨基青霉素烷酸 (6-APA) 和 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 上, 形成不同的半合成青霉素或头孢菌素^[6,7]。苯乙酸对其形成有强烈的抑制作用^[8], 必须将原料 (7-ADCA, 6-APA) 精制才能获得较高的产品收率。铜绿假单胞菌完整细胞转移 α -氨基酸酯的酰基到 7-ADCA 或 6-APA 上, 苯乙酸不影响它的转移作用, 可以考虑水解重排酸获得的 7-ADCA 不经提取或稍加纯化直接用于形成头孢力新, 这在生产中将会带来很大的经济效益。本文将报道这一研究结果。

材料和方法

(一) 化学试剂

7-ADCA (7-amino-3-deacetoxycephalosporanic acid) 由本实验室裂解重排酸获得并重结晶; 头孢力新 (Cephalexin)、PG-OMe (Phenylglycine methyl ester) 和苯甘氨酸乙酯 [PG-OEt] 为上海第五制药厂提供; 头孢菌素 C (Cephalosporin C) 和青霉素 G (Penicillin G) 由华北制药厂提供; 氨基苄青霉素 (Ampicillin) 等由太原制药厂提供, 其他为市售商品。

(二) 菌种

本实验室筛选的铜绿假单胞菌 AS 1.204 在牛肉汁斜面上培养 24 小时备用。

(三) 菌体培养

培养基成份(%): 谷氨酸单钠 0.2, 酵母膏 0.2, 蛋白胨 0.5, K_2HPO_4 0.2, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 蔗糖 20。

将培养基煮沸, 调 pH 7.2。500ml 三角瓶内装 30ml 培养液。接种后, 将培养物在 180r/min 摇床上 28℃ 培养 28 小时左右。发酵液于 450r/min 离心 20 分钟, 用 0.9% 的氯化钠溶液洗一次, 离心收集菌体, 可获得 10—12g/L 完整细胞。

本文于 1986 年 10 月 8 日收到。

供实验用。

(四) 酶活力测定

1. 转移酶活力的测定: 基于头孢力新加碱在波长 470nm 处有吸收的特殊颜色反应, 首先用标准头孢力新做一标准曲线。参照 Fujii 法^[9]将 10mmol/L 7-ADCA 和 20mmol/L PG-OMe 等体积混合为测定酶活力的底物 (pH6.2—6.5)。取 1.8ml 底物溶液, 加入 0.2ml 适当稀释的细胞悬浮液, 于 35°C 反应 15 分钟, 加入 0.5ml 1 mol/L HCl 终止反应, 再加入 0.5ml 1 mol/L NaOH 中和。将混合物离心, 在上清液中加入 1ml 1 mol/L 的 NaOH 于 25°C 保温 1 小时, 在 470nm 处测吸光度 A 并在标准曲线上查出相应的头孢力新含量。每分钟催化产生 1 μ mol 头孢力新所需要的酶量被定义为一个酶活力单位。

2. 水解酶活力的测定: 参照 Merrelli 法^[10]测定来自头孢力新的 7-ADCA 含量。参照 Takahashi 报道的滴定法^[11], 用 0.05mol/L 的 NaOH 中和来自苯甘氨酸甲酯或苯甘氨酸乙酯的苯甘氨酸。

(五) 6-APA 的测定

按参考文献 [10] 进行。

结 果

(一) 水解 α -氨基酸酯的特性

取 19ml 50mol/L 的苯甘氨酸甲酯溶液, 加入适当稀释的细胞悬浮液 1ml, 在磁

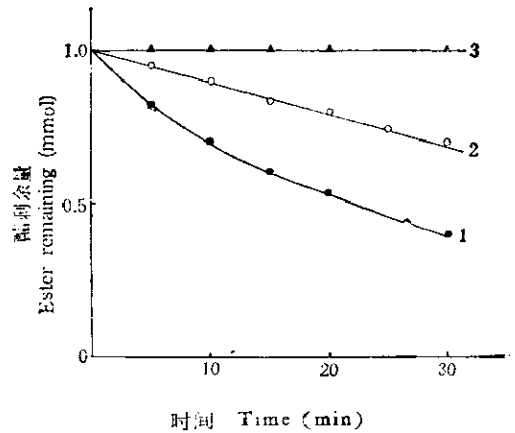


图 1 铜绿假单胞菌完整细胞水解 α -氨基酸酯的特性

Fig. 1 Specificity of hydrolyzed α - amino acid ester by cells of *Pseudomonas aeruginosa*
1. PG-OMe 2. PG-OEt 3. Ethyl acetate

力搅拌下于 35°C 反应。因 α -氨基酸酯被水解释放出苯甘氨酸, 需用 0.05mol/L NaOH 中和以维持反应体系的 pH 为 6.0。根据消耗 NaOH 的毫升数计算苯甘氨酸的量和酯的剩余量。同样方法测定对苯甘氨酸甲酯和乙酯有自然水解, 同时要做空白滴定。从图 1 看出, 铜绿假单胞菌完整细胞具有 α -氨基酸酯水解酶活力, 其水

表 1 水解含酰胺键化合物的特性

Table 1 Specificity of hydrolyzed α -amino acyl side chain compounds

化合物 Compounds	相对水解速度(%) Relative rate of hydrolysis	化合物 Compounds	相对水解速度(%) Relative rate of hydrolysis
头孢力新 Cephalexin	100.0	重排酸 7-phenylacetamidodesacetoxycephalosporanic acid	5.1
氨苄青霉素 Ampicillin	71.4	青霉素 Penicillin	4.4
羟头孢 Cefadroxil	25.9	头孢 C Cephazosporin C	3.8
羟氨苄青霉素 Amoxicillin	14.1		

解苯甘氨酸甲酯的速度远大于乙酯的速度,对有机酸酯如乙酸乙酯根本不作用。

(二) 水解含酰胺键化合物的特性

取 1.6ml 40mmol/L 的头孢菌素或青霉素类化合物溶液,加 0.4ml 细胞悬浮液,35℃ 反应 15 分钟终止反应,分别测定反应液中 7-ADCA 和 6-APA 的含量。表 1 列出铜绿假单胞菌完整细胞对上述各种化合物水解的相对速度。可以看出,该菌仅对 7-位或 6-位上有 α -氨基酸侧链的头孢菌素或青霉素类化合物显示水解能力。

(三) pH 对水解和转移作用的影响

1. 转移作用的最适 pH: 取 0.1mol/L 不同 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 0.9ml, 分别加入 10mmol/L 7-ADCA 和 20mmol/L 的 PG-OMe 混合溶液 0.9ml 和细胞悬浮液 0.2ml, 于 35℃ 作用 15 分钟,加入 0.5ml 1 mol/L 的 HCl 终止反应。测定头孢力新的含量, 计算相对酶活力。转移反应的最适 pH 是 5.2 (图 2)。

2. 水解作用的最适 pH: 取不同 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 0.9ml, 分别加入含 10mmol/L 7-ADCA 和 20mmol/L 的 PG-OMe 混合溶液 0.9ml, 细胞悬浮液 0.2ml, 于 35℃ 作用 15 分钟,加入甲酸终止反应。测定 7-ADCA 的含量, 计算相对酶活力。水解反应的最适 pH 也是 5.2 (图 2)。

(四) 温度对水解和转移作用的影响

1. 转移作用的最适温度: 取 10mmol/L 7-ADCA 和 20mmol/L PG-OMe 混合溶液 1.8ml, 细胞悬浮液 0.2ml, 在不同温度下作用 15 分钟, 测定头孢力新的含量, 计算相对酶活力。转移作用的最适温度为 40℃ (图 3)。

2. 水解作用的最适温度: 取 50mmol/L 头孢力新溶液 1.8ml, 细胞悬浮液 0.2ml, 在不同温度下作用 15 分钟, 用甲酸终止反

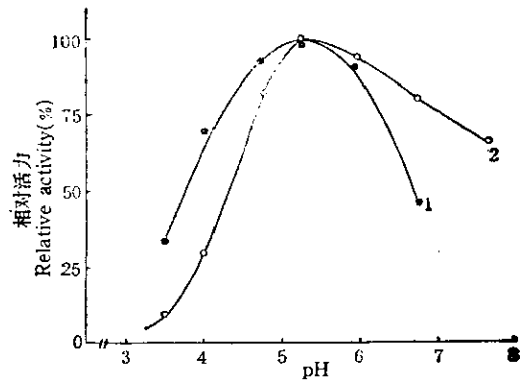


图 2 水解和转移作用的最适 pH
1. 形成头孢力新 2. 水解头孢力新
Fig. 2 Optimum pH for hydrolysis and transfer
1. Formation of cephalixin
2. Hydrolysis of cephalixin

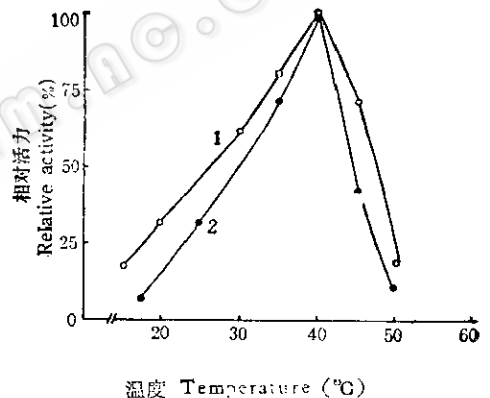


图 3 水解和转移作用的最适温度
1. 形成头孢力新 2. 水解头孢力新
Fig. 3 Optimum temperature for hydrolysis and transfer
1. Formation of cephalixin
2. Hydrolysis of cephalixin

应。测定 7-ADCA 的含量, 计算相对酶活力。水解作用的最适温度也是 40℃ (图 3)。

(五) 热稳定性

将 0.25g 铜绿假单胞菌完整细胞悬浮于 0.1mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH6.4) 中, 分别在不同温度下保温 6 小时, 立刻冷却, 按测定转移酶活力的方法测

定铜绿假单胞菌完整细胞的剩余酶活力。低于 35℃, 该酶活力相当稳定(图 4)。

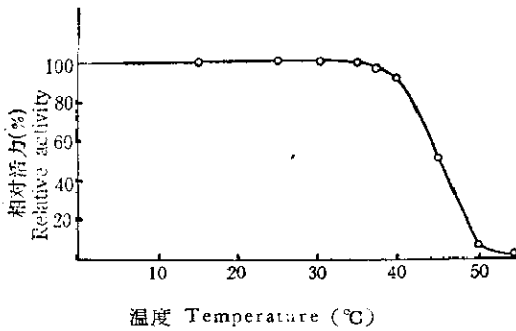


图 4 铜绿假单胞菌转移酶活力的热稳定性
Fig. 4 Thermo-stability of enzyme activity of *Pseudomonas aeruginosa*

(六) pH 稳定性

将 0.25g 铜绿假单胞菌完整细胞悬浮于不同 pH 的缓冲液中, 于 25℃ 保温 6 小时, 离心并用蒸馏水洗一次, 再悬浮于蒸馏水中。按测定转移酶活力的方法测定该细胞的剩余酶活力。该酶活力在 pH3.5—9.5 之间稳定。pH9.0 时酶活力显著增加, 可能是由于在 pH9.0 时增加了细胞壁通透性导致的结果(图 5)。

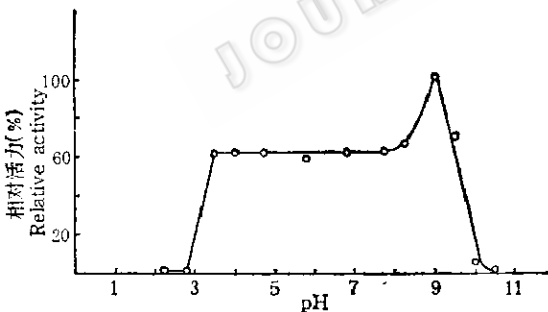


图 5 铜绿假单胞菌转移酶活力的 pH 稳定性
pH 2.1—8.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液
pH 8.5—11.0 硼酸-磷酸氢二钠缓冲液
Fig. 5 pH stability of enzyme activity of *Pseudomonas aeruginosa*
pH2.1—8.0 Na_2HPO_4 -Citric acid buffer
pH8.5—11.0 Na_2HPO_4 -Boric acid buffer

(七) 7-ADCA 对形成头孢力新的影响

在水解 α -氨基酸酯的特性中描述了

苯甘氨酸甲酯在无 7-ADCA 存在时, 水解速度很快, 1mmol 的苯甘氨酸甲酯, 30 分钟内几乎有 60% 被水解(图 1)。

在转移反应中, 7-ADCA 对形成头孢力新有很大的影响。分别取不同克分子浓度比的 7-ADCA 和 PG-OMe 混合溶液, 30℃ 反应, 间隔 1 小时取样测定头孢力新的量。随着反应体系中 7-ADCA 量的增加形成的头孢力新也增加, 这是由于 7-ADCA 抑制了 PG-OMe 的水解而增加了转移速度。到 7-ADCA 的克分子浓度达 20mmol/L 时, 形成头孢力新的转化率最高, 继续增加 7-ADCA 或 PG-OMe 的量, 其转化率不再提高(图 6)。

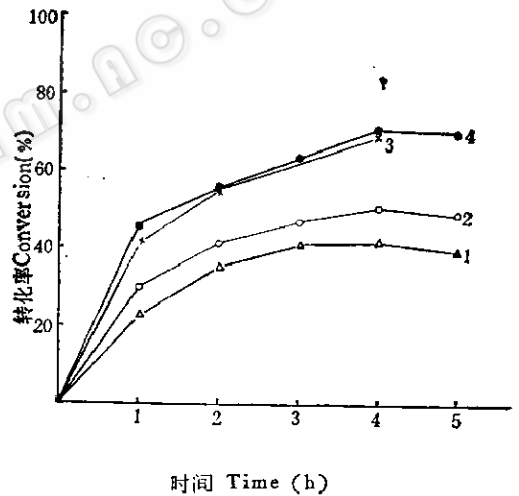


图 6 7-ADCA 对形成头孢力新的影响
Fig. 6 Effect of 7-ADCA on the formation of cephalixin

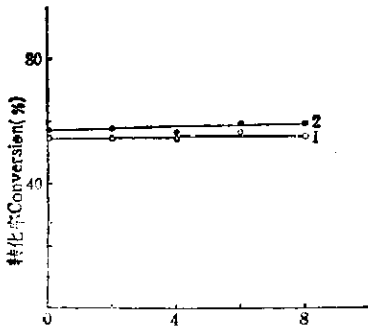
1. 5mmol/L 7-ADCA and 10mmol/L PG-OMe
2. 10mmol/L 7-ADCA and 10mmol/L PG-OMe
3. 20mmol/L 7-ADCA and 20mmol/L PG-OMe
4. 20mmol/L 7-ADCA and 40mmol/L PG-OMe

(八) 苯乙酸对形成头孢力新的影响

苯乙酸对形成头孢力新有无影响关系到生产中所用原料的纯度问题。

取 0.5g 铜绿假单胞菌完整细胞催化含有不同苯乙酸的 7-ADCA 与苯甘氨酸甲酯形成头孢力新, 30℃ 作用 2 小时和 3

小时后分别测定形成头孢力新的量, 并计算其转化率。实验结果指出, 20mmol/L 7-ADCA 中含 8mmol/L 的苯乙酸不影响头孢力新的形成(图 7)。



苯乙酸 Phenylacetic acid (mmol)

图 7 苯乙酸对形成头孢力新的影响
Fig. 7 Effect of phenylacetic acid on the formation of cephalixin
1.2h 2.5h

讨 论

许多研究工作者致力于寻找一种微生物能利用不经纯化的原料(7-ADCA, 6-APA)生产半合成抗生素, 但只有较少的报道^[2]。我们筛选出的铜绿假单胞菌 AS 1.204 完整细胞充分显示了这种优越性。7-ADCA 中含有 40% 的苯乙酸时不影响头孢力新的形成。虽然该菌具有水解和转移双功能, 但是 7-ADCA 抑制苯甘氨酸的水解。有人报道^[12], 7-ADCA 的浓度达

5mmol/L 时转移速度大于水解速度, 达 20mmol/L 处于平衡态。我们用铜绿假单胞菌 AS 1.204 完整细胞转化 20mmol/L 7-ADCA 和 40mmol/L PG-OMe 形成头孢力新时, 其转化率近 70%, 这是少有的。但与生产水平相比转化率偏低, 这可能是由于该细胞内含 β -内酰胺酶所致^[2]。用除去 β -内酰胺酶的方法(如 pH9.0 缓冲液处理, 抑制剂等)处理该细胞后转化率明显增加。我们认为, 通过进一步研究, 铜绿假单胞菌 AS 1.204 用于生产是有希望的。

参 考 文 献

- [1] Takahashi, T. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 94: 4035, 1972.
- [2] Okachi, R. et al.: *Enzyme Engineering*, 6: 81—89, 1982.
- [3] Kato, K. et al.: *Agric Biol. Chem.*, 44(5): 1069—1074, 1980.
- [4] Rhee, D. K. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 22(6): 1237—1247, 1980.
- [5] Kato, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44(5): 1075—1081, 1980.
- [6] Kato, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44(4): 821—825, 1980.
- [7] 王祯祥等: *微生物学报*, 24(4): 376—381, 1984.
- [8] 王祯祥等: *微生物学报*, 25(4): 340—346, 1985.
- [9] Fujii, T. et al.: *Process Biochem.*, 11: 21, 1976.
- [10] Merrelli, L. P.: *J. Pharm. Sci.*, 57: 2172, 1968.
- [11] Takahashi, T. et al.: *J. Biochem.*, 137: 497—503, 1974.
- [12] Kayo, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44(5): 1083—1088, 1980.

PROPERTIES OF α -AMINO ACID ESTER HYDROLASE IN INTACT CELL OF *PSEUDOMONAS* *AERUGINOSA*

Kou Xiufen Wang Zhenxiang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*;

α -Amino acid ester hydrolase in intact cell of *Pseudomonas aeruginosa* AS 1.204 catalyzed both hydrolysis of α -amino acid ester and transfer of the acyl group from the amino acid ester to amide nucleophiles. The enzymologic properties in hydrolysis was parallel with that in transfer. The optimum pH for both hydrolysis and transfer was 5.2 and the optimum temperature was 40°C.

7-Amino-3-deacetoxycephalosporanic acid

(7-ADCA) inhibited hydrolysis of phenylglycine methyl ester (PG-OMe). So that, the enzyme in intact cell of *Pseudomonas aeruginosa* catalyzed the conversion of 7-ADCA and PG-OMe to the corresponding semisynthetic cephalosporins.

Key words

Pseudomonas aeruginosa; α -Amino acid ester hydrolase; Semisynthetic cephalosporins