

胞外青霉素酰化酶产生菌的选育*

王祯祥 韩文珍 门大鹏 王青

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

利用纸片显色方法,从土壤中快速筛选出 98 株产胞外青霉素酰化酶的菌种,经复筛其中 10 株酶活力较高,经鉴定均属于巨大芽孢杆菌。经单株分离得 46 号菌,用这株菌进行了产酶条件的研究,在最适产酶条件下,酶活力比开始提高了 3.6 倍。在此基础上又进行了物理化学因素处理,得突变株 UL-81,酶活力达 720u/100ml 发酵液。对原株和突变株进行比较,发现 UL-81 菌落、细胞形态、诱导剂苯乙酸用量及添加时间等明显不同于原株。在 500L 罐发酵酶活达 820u/100ml 发酵液,为开始酶活的 16 倍。

关键词 青霉素酰化酶;巨大芽孢杆菌

青霉素酰化酶 (Penicillin acylase) 能水解青霉素产生 6-氨基青霉烷酸 (6-aminopenicillanic acid), 简称 6-APA。6-APA 是半合成青霉素的重要中间体。随着固定化技术发展,此酶已广泛用于半合成抗生素工业生产中^[1]。根据作用底物不同,可把青霉素酰化酶分为青霉素 G 酰化酶、青霉素 V 酰化酶、氨基苄青霉素酰化酶。有的菌产生的青霉素酰化酶存在于细胞内,称胞内酶,如大肠杆菌青霉素酰化酶。我们曾筛选出产胞内青霉素酰化酶活力高的大肠杆菌 AS1.76^[2],并制成固定化细胞来生产 6-APA 和 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-aminodeacetoxycephalosporanic acid), 简称 7-ADCA^[3,4]。有的菌产生的青霉素酰化酶分泌到细胞外,称胞外酶^[5],它便于酶的分离和纯化,是制备固定化酶及用固定化酶生产 6-APA 的理想菌种。我们选育出高产胞外青霉素酰化酶菌种,本文报道这一研究结果。

材料与方 法

(一) 材料

6-硝基-3-苯乙酰氨基苯甲酸 (6-ni-

tro-3-phenyl acetamidbenzoic acid), 简称 NIPAR, 江苏海门制药厂产品;青霉素 G (penicillin G), 华北制药厂产品。其它所用试剂均为市售商品。

(二) 菌种

大部分是由本组从北京、石家庄、湖南等地土壤样品分离得到的细菌,部分来自中国科学院微生物研究所菌种保藏室。

(三) 培养基和培养条件

1. 菌种分离和斜面保藏培养基(%): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, 葡萄糖 0.5, 酵母膏 0.5, 氯化钠 0.5, pH7.2。0.55kg/cm² 杀菌 30 分钟,制成平板或斜面备用。

2. 发酵培养基:

A 培养基成份(%): 蛋白胨 2.5, 葡萄糖 1.0, 酵母膏 0.5, 苯乙酸 0.3, 氯化钠 0.2, pH7.0。

B 培养基成份(%): 蛋白胨 1.0, 玉米浆 0.3, 苯乙酸 0.3, 氯化钠 0.5, pH7.0。

本文于 1991 年 3 月 28 日收到。

* 国家七五科技攻关项目。

华北制药厂谈深纯等同志参加了菌种筛选工作,中国科学院微生物研究所蔡妙英同志进行菌种鉴定。太原制药厂岳年春、白增梅等参加罐发酵试验。特此致谢。

将上述配好的发酵培养基分别在 250 ml 三角瓶中装 20ml, $0.55\text{kg}/\text{cm}^2$ 杀菌 30 分钟后,接种一白金环斜面种子,在 180—200r/min 旋转摇床上,28℃ 培养 40 小时,取样测定酶活力。

(四) 测定方法

1. 青霉素酰化酶活力测定:基本参照 Kutzbach 所报道的方法进行^[6]:用 $0.05\text{mol}/\text{L}$ pH7.7 磷酸缓冲液配制浓度为 $1.8\text{mg}/\text{ml}$ 的 NIPAB 溶液。取 1ml NIPAB 溶液加 1.9ml 上述缓冲液,于 37℃ 水浴保温,待温度平衡后加入适当稀释的酶液 0.1ml,10 分钟后立即加入 2ml 10% 的三氯乙酸溶液终止反应。对照是先加三氯乙酸后加酶,反应液于 405nm 波长比色。规定一分钟产生 $1\mu\text{mol}$ 的 6-硝基-3-氨基苯甲酸所需酶量为一个酶活力单位。

2. 菌种生长浓度测定:取 1ml 发酵液加水 9ml,于 721 型分光光度计 600nm 波长比色测定。

3. 青霉素酶测定:按文献报道方法进行^[7]。

(五) 产胞外青霉素酰化酶菌种筛选

根据 NIPAB 在青霉素酰化酶作用下水解产生黄色 6-硝基-3-氨基苯甲酸的原理,先将平皿大小的圆形滤纸片浸入 $1.8\text{mg}/\text{ml}$, pH7.7 的 NIPAB 溶液中,取出干后放紫外灯下杀菌备用,再将采来的土样磨细或加水稀释到适当浓度喷或涂在制备好的分离平皿上,28℃ 温箱中培养 24 小时后,菌落长出,盖上沾有 NIPAB 的圆形滤纸于 37℃ 保温 20—30 分钟,纸片上的 NIPAB 接触到产生青霉素酰化酶的菌落被分解产生 6-硝基-3-氨基苯甲酸,呈黄色,把在纸片呈黄色的菌落挑出,接种到保种斜面上,供摇瓶发酵,进一步测定酶活力。

(六) 菌种的诱变处理

基本参照文献[7—8]进行。

结 果

(一) 产胞外青霉素酰化酶菌种的快速筛选

为了得到产胞外青霉素酰化酶的菌种,根据报道^[5,9]的方法将国内收集保藏的巨大芽孢杆菌和从土壤中分离的菌种,进行摇瓶发酵,测定 499 株发酵液有无胞外青霉素酰化酶活性,结果只得到 3 株产酶菌株,且酶活力都较低。采用纸片法共挑出 321 株,经摇瓶发酵和酶活力测定,很快得到 98 株产胞外青霉素酰化酶的菌,占挑出菌株数的 30.5%。从中选出酶活力在 $50\text{u}/100\text{ml}$ 发酵液左右的菌株 10 株进行复筛,结果以菌号 246,247,275-5-48-2-7 为最高,平均酶活力分别达 $54.18\text{u}/100\text{ml}$ 、 $50.10\text{u}/100\text{ml}$ 和 $51.31\text{u}/100\text{ml}$ 。

(二) 产胞外青霉素酰化酶菌种的鉴定

根据细胞呈革兰氏染色阳性(有时也有变化)反应、杆状、大小为 $0.9-1.0 \times 2.5-4.0\mu\text{m}$,具有中生芽孢,孢囊不膨大,细胞内有聚- β -羟基丁酸颗粒的累积;不能在厌氧条件下生长,不产乙酰甲基甲醇,同时还具有能在 7% 氯化钠中生长,接触酶、氧化酶阳性,硝酸盐能还原至亚硝酸盐;不产淀粉酶和苯丙氨酸酶,也不从葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸等特征,按照 Gorden 等分类系统,被鉴定的菌株均为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。

(三) 产酶最适条件

为了提高菌种产酶活力,用由 247 号菌株经单菌分离所得的 46 号菌,进行了产酶最适条件的研究。找出一个较合适的产酶培养基。其组份是(%):蛋白胨 1.5,葡萄糖 1.0,酵母膏 0.5,苯乙酸 0.4, pH7.0。

在此发酵培养基上, 28℃ 摇瓶培养不同时间, 酶活力变化情况列入表 1。培养 40 小时, 酶活力达 181u/100ml, 为开始时的 3.5 倍, 继续延长培养时间到 72 小时, 酶活力稍有下降, 说明这个菌产生的胞外青霉素酰化酶是相当稳定的。

表 1 不同时间对产酶的影响

Table 1 Effect of the cultivation time on the enzyme production

时间(时) Time(h)	生长后 pH Final pH	生物量 Biomass (O D ₆₆₀)	酶活力 Enzyme activity (u/100ml)
24	8.0	0.88	23.43
36	8.5	0.55	136.30
40	9.0	0.43	181.80
44	9.0	0.46	180.30
48	9.0	0.31	163.30
60	9.0	0.26	171.80
72	9.0	0.24	176.10

(四) 菌种诱变

为了进一步提高产酶能力, 取 247 号菌经单菌分离得 46 号菌。经过多种物理化学因子处理, 结果见诱变谱系表 2。最后得到高酶活力突变株 UL-81, 酶活力达 723u/100ml 发酵液, 为出发菌株 46 号菌酶活力的 3.67 倍。

(五) 突变株与原株的比较

1. 形态变化: 将两株菌分别接种在具有分离培养基的平皿中, 28℃ 温箱培养 24 小时, 观察菌落及菌体细胞。原株 46 号菌落表面光滑呈乳白色, 凸起, 菌体粘稠, 菌体细胞较小、链短。突变株 UL-81 菌落凸起, 表面粗糙, 有放射状条纹, 稍带黄色, 细胞较粗大, 链长。

2. 苯乙酸浓度对原株和突变株产酶影响: 苯乙酸是产生青霉素酰化酶的诱导剂。在发酵培养基中添加不同量的苯乙酸, 试验对二株菌产酶的影响(图 1)。突变株和原株在没有苯乙酸的情况下都能产

表 2 诱变谱系

Table 2 Genealogy of the mutants

菌种 Strain	筛选菌数 Number of the strains	酶活力 Enzyme activity	提高 Enhance- ment (%)
46			
↓ 单菌分离			
46-1		197	100
↓ U.V, 7			
U17-1	255	240	122
↓ 单菌分离			
U17-1-41	64	221	119
↓ U.V, 3			
U23-8	464	288	146
↓ NTG			
N1-4	239	495	251
↓ U.V-5			
U35-130	678	536	272
↓ 单菌分离			
U35-130-1	54	530	269
↓ U.V, 5			
U45-3	274	560	284
↓ NTG			
N24-57	436	706	358
↓ UV+LiCl			
UL-81	223	723	367

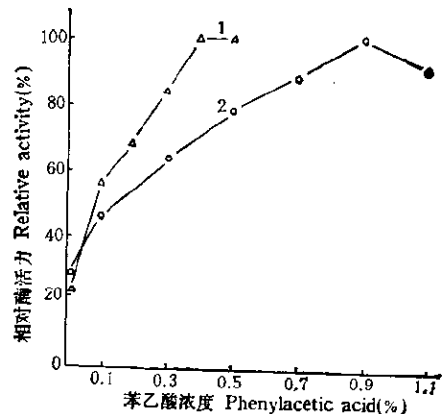


图 1 苯乙酸浓度对青霉素酰化酶产生的影响

Fig. 1 Effect of phenylacetic acid concentration on the production of penicillin acylase

1. 原株 Parent; 2. 突变株 Mutant

生青霉素酰化酶, 但酶活力较低。随着苯乙酸用量的增加, 酶活力都不断提高。当

苯乙酸用量增加到 0.4% 时,原株酶活力达最高水平,而突变株当苯乙酸用量增加到 0.9% 时酶活力才达最高水平,继续加到 1.1%,酶活力开始下降。

3. 苯乙酸添加时间对二株菌产酶影响:在合适的发酵培养基中,原株以 0.4%、突变株以 0.9% 的苯乙酸用量,在不同培养时间添加到培养液中,比较对产酶的影响(图 2)。原株在培养 10 小时添加苯乙酸,产酶活力最高,突变株则在开始时添加,产酶活力最高。

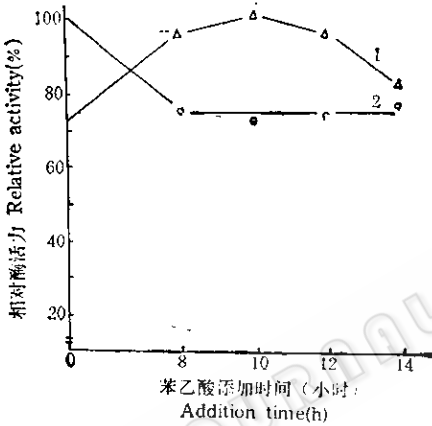


图 2 苯乙酸添加时间对青霉素酰化酶产生的影响
Fig. 2 Effect of phenylacetic acid addition time on the production of penicillin acylase
1.原株 Parent; 2.突变株 Mutant

4. 酵母膏浓度对二株菌产酶影响:在发酵培养基中,改变酵母膏用量,试验对原株、突变株产酶影响,结果如图 3 所示。酵母膏用量对两株菌产酶影响不大,都以 0.5% 的用量为最好。

5. 发酵培养基起始 pH 对二株菌产酶影响:发酵培养基起始 pH 对原株和突变株产酶影响见图 4。突变株和原株最适起始 pH 都为 7.0,提高 pH 到 8.5,突变株产酶活力基本保持不变,而原株产酶活力下降明显。

6 通气量对二株菌产酶影响:在 250

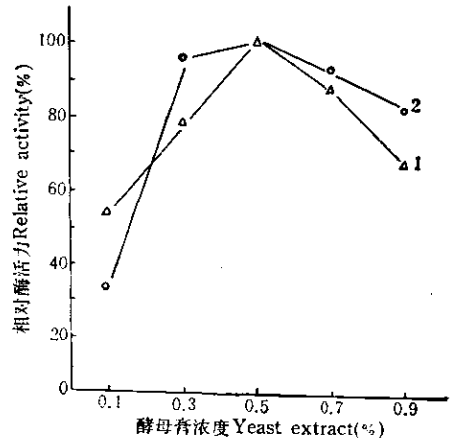


图 3 酵母膏浓度对青霉素酰化酶产生的影响
Fig. 3 Effect of yeast extract concentration on the production of penicillin acylase
1.原株 Parent; 2.突变株 Mutant

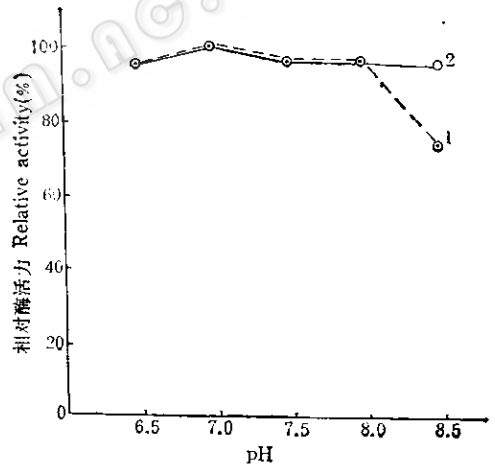


图 4 培养基的起始 pH 对青霉素酰化酶产生的影响
Fig. 4 Effect of initial pH of the medium on the production of penicillin acylase
1.原株 Parent; 2.突变株 Mutant

ml 三角瓶中,分别加入不同量的发酵培养基,比较通气量对原株及突变株产酶影响(图 5)。原株和突变株对氧的要求量都较高,培养基装量以 10—20ml 为最好。随着装量增加,酶活力明显下降,但突变株对氧要求稍高于原株。

(六) 诱变株 UL-81 在 500L 罐上的产酶试验

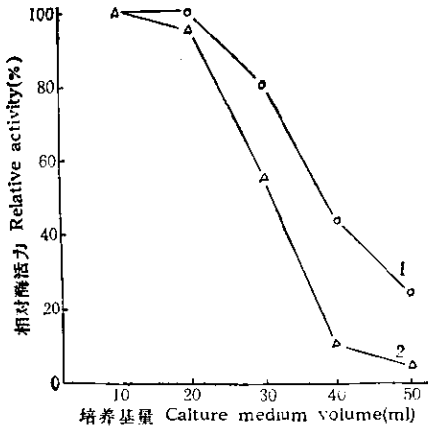


图5 培养基量对青霉素酰化酶产生的影响

Fig. 5 Effect of culture medium volume on the production of penicillin acylase

1.原株 Parent; 2.突变株 Mutant

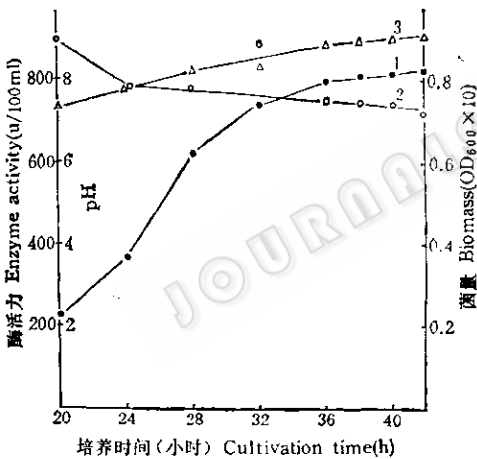


图6 在500升发酵罐中产酶时间曲线

Fig. 6 Time course of penicillin acylase production in a 500L fermentor

1.酶活力 Enzyme activity; 2.菌体生物量 Biomass; 3.pH

为验证 UL-81 菌种用于大规模生产胞外青霉素酰化酶的可行性,我们在500L标准发酵罐中装上述发酵培养基350L,杀菌后接入培养17小时的液体种子35L,发酵不同时间取样,测定pH、生物量、酶活变化情况,结果如图6。20小时后发酵液的pH在逐步上升,菌体光密度不断下降,而

酶活力却迅速增加,到42小时最高,达820u/100ml。生产的酶液非常稳定,在室温下放置24小时活力不变。

讨 论

1. 纸片显色法是筛选产胞外青霉素酰化酶菌种的一个快速有效的方法,特别是用来从土壤中筛选产青霉素酰化酶菌种。采用此方法减少了挑选菌种的盲目性,节省时间,减少工作量。但在纸片上显有酶活力的菌种,经摇瓶发酵测定,只有30.5%的菌株有酶活性。这可能是由于分离和发酵时培养基成份及培养条件变化所致。

2. 从土壤中筛选并经单株分离所得巨大芽孢杆菌46号,经物理化学因子处理得突变株UL-81,酶活力由190u/100ml提高到723u/100ml,为出发菌株酶活力的3.67倍。这一育种方法虽属常规方法,但对提高酶活力却是经济、有效、不容轻视的方法。

3. 突变株UL-81和原株46号在细胞形态、菌落和诱导剂——苯乙酸的用量、添加时间都有明显不同。UL-81对苯乙酸要求量大有提高,诱导最适时间也提早到发酵开始,这与Son, H. J.等报道的不同^[2]。按照产酶最适条件,在500L罐发酵,酶活力达820u/100ml,比摇瓶产酶活力高。发酵酶液非常稳定,在常温放置24小时酶活力保持不变,这就为酶的后处理、分离提取提供了非常有利的条件。因此,我们选育的UL-81菌种是用来大规模工业生产胞外青霉素酰化酶的较好菌种。

参 考 文 献

- [1] Vantamme, E. J. *Enzyme Microb. Technol.*, 5(6): 403, 1983.
- [2] 张启先等: 微生物学报, 19(3): 203, 1979.
- [3] 孙万儒等: 微生物学报, 20(4): 407, 1980.
- [4] 王祯祥等: 微生物学报, 21(4): 477, 1981.
- [5] Murao, S. et al.: U.S. Patent 3, 144, 397.

- 1964.
- [6] Kutzbach, C. et al.: *Physiol. Chem.*, 355: 4, 1975.
- [7] 姜书勤等: 微生物学报, 14(2): 230, 1974.
- [8] 微生物所诱变育种组: 微生物诱变育种, 科学出版社, 北京, 1972年。
- [9] Son, H. J. et al.: *J. Gen Appl. Microbiol.*, 28:281, 1982.

SCREENING OF STRAIN PRODUCING EXTRACELLULAR PENICILLIN ACYLASE

Wang Zhenxiang Han Wenzhen Men Dapeng Wang Qing

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Ninety-eight strains having extracellular penicillin acylase activity were derived from soil samples by colour-developing method. 10 strains of them possess higher activity of penicillin acylase. All of those are found to be *Bacillus megaterium*. The optimum condition of enzyme production was investigated with the strain No.46 which is from No. 247 by single colony isolation. The productivity of penicillin acylase in the optimum condition have been enhanced 2.5 times more than that in the screening condition.

The mutant strain, *Bacillus megaterium* UL-81, which penicillin acylase activity rea-

ched the level of 723u/100ml of broth was obtained from No.46 by treatment with physical and chemical factors. The penicillin acylase activity of UL-81 can reach 820u/100 ml in 500L fermentor.

The mutant strain differed from parent strain in the morphology of colony, the size of cells, the effect of concentration and the addition time of phenylacetic acid on the production of penicillin acylase.

Key words

Penicillin acylase; *Bacillus megaterium*