

## 固定化青霉素酰化酶的研究\*

徐冠珠 王祯祥 朱丽钊 韩 辉 李庆中

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

将巨大芽孢杆菌胞外青霉素酰化酶通过共价键连接到醋酸纤维素载体上, 制成的固定化青霉素酰化酶的表现活力达 2000 u/g 左右 (PDAB 法)。水解 10% (W/V) 的青霉素 G 钾盐溶液, 使用 30 批, 保留活力 70% 以上。6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 总收率平均达 88.37%。

固定化青霉素酰化酶水解青霉素 G 的最适 pH 为 9.95, 最适温度为 55℃, 表现米氏常数为  $1.093 \times 10^{-4}$  mol/L, 在 pH 5.8—10.7, 温度 45℃ 以下酶的活力稳定。

**关键词** 青霉素酰化酶; 固定化酶

我们曾经研制成功了固定化细胞大肠杆菌胞内青霉素酰化酶, 并将其应用于工业生产。但因其水解青霉素浓度低, 大规模生产受限制, 为适应我国半合成抗生素工业的需要, 我们对胞外酶的固定化方法、载体的选择、固定化酶的性质等进行了研究。本文摘要报道有关研究结果。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 材料

青霉素酰化酶浓酶液: 由本研究组分离筛选的巨大芽孢杆菌经发酵、分离、纯化制备。青霉素 G 钾盐: 工业级, 华北药厂生产。醋酸纤维素: 北京卷烟厂下脚料。聚丙烯腈: 上海金山石化总厂生产。多孔硅胶: 青岛海洋化工厂试制。

#### (二) 方法

1. 固定化酶的制备方法: (1) 多孔硅胶为载体; 参照文献[1]的方法改进。(2) 聚丙烯腈为载体; 参考 Filippusson<sup>[2]</sup> 的方法改进后制备固定化酶。(3) 脱脂棉和醋酸纤维素为载体; 参考文献[3]的方法进行了改进。

2. 固定化酶活力测定: PDAB 法, 青霉素 G 钾盐作底物, 用 0.1 mol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液配成 2% (W/V) 的溶液, 于 37℃ 用酶水解, 以水解青霉素产生  $1 \mu$  mol 6-APA 所需的酶量为一个活力单位。文中固定化酶活力以固定化酶的干重计算。

### 结 果

#### (一) 不同载体制备的固定化酶的比较

分别以多孔硅胶、聚丙烯腈、脱脂棉和醋酸纤维素为载体, 按上述不同方法制备固定

本文于 1991 年 3 月 28 日收到。

\* 本课题为“七五”攻关项目。

化酶。所得的固定化酶在同样条件下水解青霉素 G 钾盐。考察它们的活力和使用稳定性, 结果见表 1。

表 1 各种载体制备的固定化青霉素酰化酶的比较

Table 1 Apparent activity and stability of immobilized penicillin acylase on various carriers

载体 Carriers	固定化青霉素酰化酶 Immobilized penicillin acylase		
	表观活力 Apparent activity (u/g)	稳定性 Stability	
		操作次数 Batches	保留活力 Remained activity (%)
多孔硅胶 Porous silica	1262	10	52.2
脱脂棉 Absorbent cotton	1152	20	43.4
聚丙烯腈 Polyacrylonitrile fiber	2252	20	78.5
醋酸纤维素 Cellulose acetate fiber	2344	20	81.0

由表 1 可见, 以聚丙烯腈和醋酸纤维素为载体制备的固定化酶活力高, 使用稳定性好。多孔硅胶使用稳定性为最差, 这主要是因为硅胶在使用 pH 条件下有轻微溶解, 导致酶从硅胶载体上脱落, 因而影响固定化酶的稳定性。

## (二) 醋酸纤维素作载体固定化青霉素酰化酶及裂解青霉素制备 6-APA 的结果

1. 固定化酶的活力: 用醋酸纤维素作载体多次制备固定化青霉素酰化酶其表观活力平均为 2183 u/g。

2. 固定化酶水解青霉素的使用稳定性和水解效果: 用制备的固定化酶水解青霉素 G 钾盐, 以考察其使用稳定性、水解效果及水解过程。青霉素水解的工艺条件和操作方法如下: 按每克青霉素用酶 150—200 u 投料, 固定化酶装入圆柱形 ( $\phi 30 \times 200$ ) 的反应柱中, 青霉素溶解于 0.05 mol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液中, 37℃ 保温, 泵入酶柱循环水解。循环速度为 200 ml/min, 青霉素投料浓度 10%, 2 mol/L NaOH 维持 pH 8.0—8.5, 控制水解率达 95% 以上, 停止循环, 放尽酶柱中的水解液, 固定化酶用少量 0.05 mol/L 的 pH 8.0 磷酸缓冲液循环洗涤, 将洗液与水解液合并提取 6-APA。

6-APA 的提取方法: 水解液加 40% (V/V) 的乙醇, 冰盐水浴冷却, 用 3 mol/L HCl 缓慢调节 pH 至 4.1, 结晶, 提取 6-APA。

(1) 固定化酶的使用稳定性: 表 2 结果显示, 固定化酶水解青霉素, 使用 30 批保留活力 70% 以上, 即每批活力损失小于 1%。

(2) 固定化酶水解青霉素提取 6-APA: 其结果见表 3。两批固定化酶的用量均为 1.5g (折合干重), 每批酶水解青霉素 30 次, 中间不补酶, 固定化酶的表观活力和活力损失见表 2 中的 3 和 4, 每次水解青霉素用量为 20g, 纯度为 95.77%。

固定化酶水解青霉素提取 6-APA 的总收率平均为 88.37%。产品透光度好, 6-

表 2 固定化青霉素酰化酶的使用稳定性

Table 2 Operation stability of immobilized penicillin acylase

序 号 No.	使用前酶活 Initial activity (u/g)	操作批数 Batches	剩余酶活 Residual activity (u/g)	活力保留 Remains of activity (%)	活力损失 Loss of activity (%)
1	2209	30	1666	75.4	24.6
2	2182	30	1588	72.8	27.2
3	2386	30	1680	70.4	29.6
4	2330	30	1654	71.0	29.0

表 3 固定化酶水解青霉素提取 6-APA 的结果

Table 3 The data on hydrolysis of penicillin G to 6-APA by immobilized penicillin acylase

水解批号 Batch No.	6-APA			
	重量 (g) Weight	纯度 (%) Purity	透光度 (%) Transparency	收率 (%) Yield
1-02	10.33	90.72		84.31
1-04	10.30	97.25		90.12
1-11	10.25	95.84		88.38
1-18	9.95	94.78		84.84
1-21	9.91	96.17		85.74
1-25	10.43	98.45		92.38
1-30	10.00	98.12		88.26
2-03	10.08	100.00	97.00	90.56
2-07	10.31	95.71	98.00	88.66
2-10	10.17	98.22	97.50	89.79
2-14	10.06	96.95	98.00	87.63
2-18	9.99	100.00	96.00	89.76
2-22	9.87	99.75	97.00	88.46
平均 Average	10.13	97.10	97.30	88.37

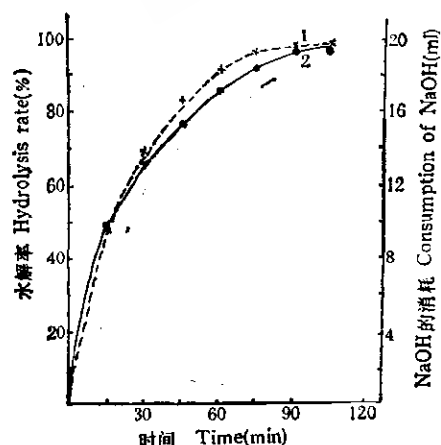


图 1 固定化酶水解青霉素的动力学曲线

Fig. 1 The kinetics of hydrolysis of penicillin G by immobilized penicillin acylase

1. NaOH 的消耗 Consumption of NaOH;  
2. 水解率 Hydrolysis rate

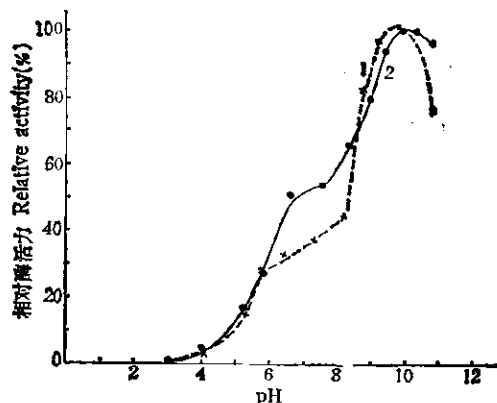


图 2 pH 对酶水解青霉素反应速率的影响

Fig. 2 Effect of pH on penicillin G hydrolysis by penicillin acylase

1. 自然酶 Free enzyme; 2. 固定化酶  
Immobilized enzyme

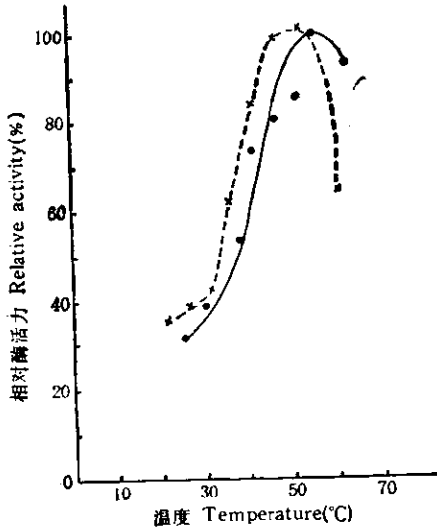


图3 温度对酶水解青霉素反应速度的影响

Fig. 3 Effect of temperature on penicillin hydrolysis by penicillin acylase

×--× 自然酶 Free enzyme; ●—● 固定化酶 immobilized enzyme

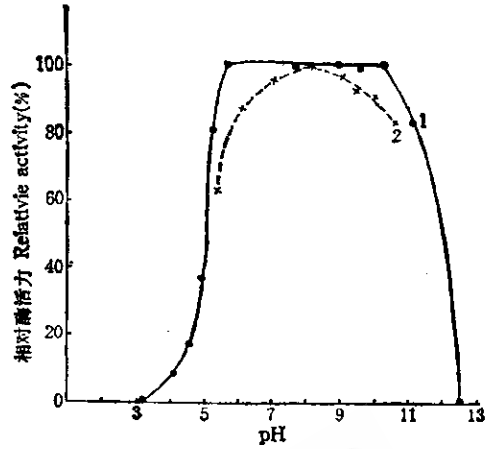


图4 酶的 pH 稳定性

Fig. 4 Effect of pH for stability of penicillin acylase

1. 固定化酶 Immobilized enzyme;  
2. 自然酶 Free enzyme

APA 的纯度平均为 97.1%。

(3) 固定化酶水解青霉素的时间过程: 在固定化酶水解青霉素的过程中, 定时记录 NaOH 的消耗量, 测定水解率, 绘成曲线如图 1。图 1 显示, 水解初期, 反应速度极快, 仅 15 分钟, 水解率已达 50%。随着产物浓度的迅速增加, 产物对酶的抑制作用急剧增加, 反应速度呈直线下降, 水解进展越来越慢, 因而水解剩余一半量的青霉素所需的时间长达前一半的六倍。这就提示我们, 严格控制水解初期的工艺条件, 提高起始反应速率, 对缩短水解周期, 提高固定化酶的使用效率是极其重要的。

### (三) 固定化酶与自然酶性质的比较

1. pH 对酶水解青霉素反应速度的影响: 用不同 pH 的缓冲液, 分别配制 2% 的青霉素 G 钾盐溶液, 37°C 水浴保温, 测定酶的活力, pH 对酶活力的影响见(图 2)。固定化酶和自然酶水解青霉素的最适 pH 分别为 9.95 和 9.5。

2. 温度对酶反应速度的影响: 在不同温度下测定酶活力, 结果由图 3 表示。固定化

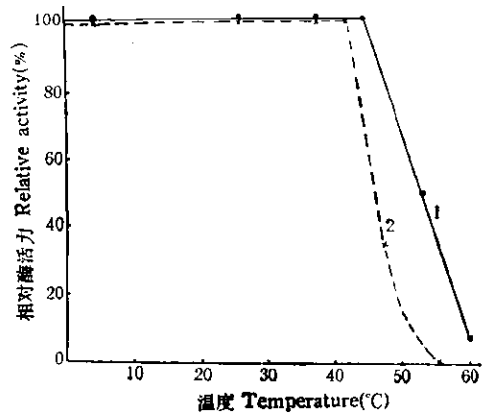


图5 酶的热稳定性

Fig. 5 Temperature stability of penicillin acylase

1. 固定化酶 Immobilized enzyme; 2. 自然酶 Free enzyme

酶水解青霉素的最适反应温度为 55℃, 自然酶为 50℃, 前者比后者高 5℃。

3. pH 稳定性: 酶在不同的 pH 缓冲液中, 37℃ 保温 6 小时后测定酶的活力见图 4。固定化酶在 pH 5.8—10.7 稳定。固定化酶的耐酸和耐碱性都显著优于自然酶。

4. 酶的热稳定性: 酶在 pH 7.7 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液中, 于不同温度下保温 6 小时后, 测酶活力见图 5。固定化酶和自然酶分别在 45℃ 和 43℃ 以下稳定。酶经固定化后, 热稳定性变化不大。

5. 酶的最大反应速率和米氏常数: 用酶水解不同浓度的青霉素, 测定酶反应的初速度, 以浓度的倒数  $\frac{1}{[S]}$  为横坐标, 反应速度的倒数  $\frac{1}{v}$  为纵坐标作图(图 6)。分别测得固定化酶的表现米氏常数为  $1.093 \times 10^{-2}$  mol/L, 自然酶的  $K_m$  为  $0.893 \times 10^{-2}$  mol/L。可见固定化酶对底物的亲和力略小于自然酶。

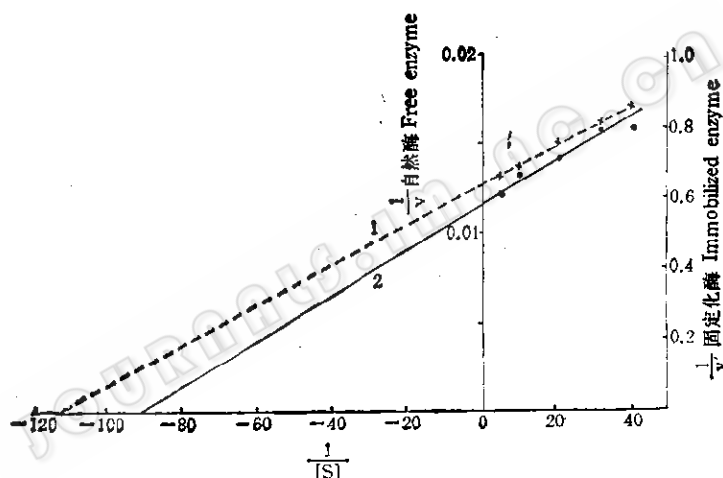


图 6 酶的 Lineweaver-Buck 图

Fig. 6 Lineweaver-Buck plots of initial rate of hydrolysis penicillin G by penicillin acylase

1. 自然酶 Free Enzyme; 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

## 讨 论

1. 以醋酸纤维素为载体, 采用共价结合法制备的固定化酶, 载体比表面积大, 酶与载体结合牢固, 制成的固定化酶表观活力高, 使用稳定性好, 6-APA 收率高、质量好, 且载体为卷烟厂下脚料, 价格便宜, 来源方便, 是一个比较成功的制备方法。

2. 固定化酶水解青霉素的过程提示, 在水解操作的中后期, 产物对酶的抑制作用大, 水解速度缓慢, 此时的 pH 在一定范围内对酶反应速度的影响比产物抑制作用小得多。为减少碱性条件对青霉素的破坏, 应将 pH 控制在 7.8—8.0。

3. 酶经过固定化后, 耐酸性和耐碱性都有显著的提高。因此, 固定化酶在使用过程中, 对 pH 的适应范围宽, 有利于工业化应用。

## 参 考 文 献

- [1] Sidney, J. G.: Immobilized Enzyme Preparation and Engineering Techniques, Chemical Technology Review, No. 39, p. 93—97, Noyes Data Corporation, London, England, 1974.
- [2] Filippsson, H. et al.: *Biochem. J.*, **120**: 215, 1970.
- [3] 刘树煌: 酶制剂工业(张树政主编), 下册, 第 758 页, 科学出版社, 北京, 1984 年。
- [4] 袁中一: 酶制剂工业(张树政主编), 上册, 第 364 页, 科学出版社, 北京, 1984 年。

## STUDIES ON THE IMMOBILIZED EXTRACELLULAR PENICILLIN ACYLASE

Xu Guanzhu Wang Zhenxiang Zhu Lizhao

Han Hui Li Qingzhong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The extracellular penicillin acylase from *Bacillus megaterium* was immobilized by coupling on cellulose acetate fibres. The apparent activity of the immobilized penicillin acylase was about 2000 $\mu$ /g (by PDAB method). It was used to hydrolyze 10% penicillin G solution in 0.05 mol/L phosphate buffer pH8.0. The remained activity was over 70% after operating 30 times, and the average yield of 6-APA was 88.37%.

The properties of immobilized penicillin acylase were studied. The optimal pH and temperature for hydrolytic reaction of penicillin G was pH 9.95 and 55°C respectively. The immobilized enzyme was stable in the pH range of 5.8—10.7, and at temperature below 45°C. The apparent Michaelis constant ( $K_a$ ) for the penicillin G was  $1.093 \times 10^{-2}$  mol/L.

### Key words

Penicillin acylase; Immobilized enzyme