

巨大芽孢杆菌 BP 931 胞外青霉素 G

酰化酶的产生条件*

崔福绵 韩文珍 韩 辉 朱丽钊 王祯祥

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 研究了巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) BP 931 胞外青霉素 G 酰化酶的产生条件。菌在由葡萄糖 0.7%, 氮源 1 号 0.5%, 酵母膏 1.0% 和苯乙酸 0.8% 组成的液体培养基(灭菌前 pH9.0, 灭菌后 pH8.0) 中, 28℃ 振荡培养 44h。以 6-硝基-3-苯乙酰胺基苯甲酸为底物, 培养滤液酶活力为 9.0IU/ml。诱导物苯乙酸于培养 6h 后加入, 酶活力可以提高到 11.0IU/ml。Ca²⁺、Al³⁺、Sn⁴⁺、Mn²⁺ 和 Fe²⁺ 离子降低酶的形成; Cu⁺ 和 Co²⁺ 离子显著抑制菌生长, 降低酶的形成; Zn²⁺、Cd²⁺ 和 Hg²⁺ 离子完全抑制菌生长和酶形成。

关键词 巨大芽孢杆菌, 青霉素 G 酰化酶

青霉素 G 酰化酶是一种重要的医药工业用酶。在 β -内酰胺系列抗菌素改造中, 既可以利用其所具有的脱酰化能力, 由青霉素 G 和 7-苯乙酰胺基-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸制备半合成 β -内酰胺抗菌素生产所用初始材料 6-氨基青霉烷酸(简称 6-APA) 和 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸(简称 7-ADCA), 又可以利用其所具有的酰化能力, 由抗菌素母核 6-APA 或 7-ADCA 或 7-ACA 和侧链结构物有机酸酯制备半合成抗菌素^[1~8]。青霉素 G 酰化酶有胞内和胞外两种。巨大芽孢杆菌产胞外青霉素 G 酰化酶能力较强^[1], 一些国家已用于青霉素 G 酰化酶的生产^[2]。作者^[9]做了大量的菌种选育工作, 获得了几株各具特色的菌种。本文报道巨大芽孢杆菌 BP 931 胞外青霉素 G 酰化酶的产生条件。

1 材料和方法

1.1 菌种

巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) BP 931, 本实验室选育得到。菌在含蛋白胨 1.0%, 牛肉膏 0.5%, 酵母膏 0.5%, 葡萄糖 0.5%, 氯化钠 0.5% 的琼脂斜面培养基上, 28℃ 培养 16h 后使用。

1.2 主要试剂

葡萄糖, 二级, 北京化学试剂二厂产品。氮源 1 号, 北京远望科技发展公司产品。酵母膏, 含干物质 77%, 上海酵母厂产品。苯乙酸, 含量 98%, 上海试剂一厂产品。6-硝基

* 国家重点科技攻关项目。

参加本研究工作的还有鲜海军。

本文于 1995 年 4 月 14 日收到。

-3-苯乙酰胺基苯甲酸,江苏省海门制药厂产品。

1.3 培养基

1.3.1 种子培养基(%):葡萄糖 0.7,氮源 1号 0.5,酵母膏 1.0。起始 pH7.5(上海试剂三厂, pH5.5~9.0,精密试纸测定)。

1.3.2 产酶培养基(%):葡萄糖 0.7,氮源 1号 0.5,酵母膏 1.0,苯乙酸 0.8。起始 pH9.0(上海试剂三厂, pH8.2~10.0,精密试纸测定)。

1.4 种子的制备

250ml 三角瓶装种子培养基 20ml, 0.06MPa 灭菌 30min 后,接种斜面菌一环,于 28℃ 旋转式摇床上振荡(250r/min)培养 16h 后使用。

1.5 酶的制备

250ml 三角瓶装产酶培养基 20ml, 0.06MPa 灭菌 30min 后,接种三角瓶种子悬液 1ml,于 28℃ 旋转式摇床上振荡(250r/min)培养 44h。4000r/min 离心 10min。所得上清液即为胞外青霉素 G 酰化酶溶液。

1.6 细胞生长的测定

取接种而未经培养的培养基和培养液,分别稀释 10 倍后,用光径 0.5cm 比色杯于 600nm 波长测光吸收。用两者光吸收差值 A_{600} 表示细胞生长。

1.7 青霉素 G 酰化酶活力的测定

参照前文^[9]方法进行。取 0.0643%6-硝基-3-苯乙酰胺基苯甲酸溶液(以 pH7.7, 0.1mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液为溶剂配制) 1.4ml 于试管中,于 37℃ 水浴中温度平衡后,加入适当稀释的酶溶液 0.1ml,保温 10min,加入 10%三氯醋酸溶液 1ml 终止反应。以 0.5cm 光径比色杯于 405nm 波长测光吸收。计算产生的 6-硝基-3-氨基苯甲酸量。

在上述条件下,每分钟由底物产生 1 μ mol6-硝基-3-氨基苯甲酸所需酶量定义为 1 个酶活力单位(IU)。

2 结果和讨论

2.1 碳源对产酶的影响

以 0.7% 浓度用量,试验各种糖对产酶的影响。表 1 表明,葡萄糖为产酶最佳碳源,山梨糖和阿拉伯糖作为碳源,显著降低酶的形成。

改变产酶基本培养基中葡萄糖的添加量,进行产酶试验,结果表明,葡萄糖最适用量为 0.7%。

2.2 氮源对产酶的影响

试验不同氮源对产酶的影响。由表 2 可见,添加氮源能增进酶的形成。在所试 5 种氮源中,氮源 1 号效果最佳。

改变产酶基本培养基中氮源 1 号的添加量进行产酶试验,结果表明,氮源 1 号最适用量为 0.5%。

2.3 几种物质对产酶的影响

试验酵母膏(干物质 77%),玉米浆(干物质 50%),麦芽汁(12 波林)和马铃薯汁对产酶的影响。由表 3 可以看出,培养基中不加所试物质,菌生长极其微弱,以致无酶产生。

因此,生长因子是必需的。在所试4种物质中,酵母膏最佳。由表1、2和3对照数据对比可以看出,所试物质除了提供生长因子外,还提供一部分碳氮源。

表1 碳源(0.7%)对产酶的影响

Table 1 Effect of various carbon sources on the production of penicillin G acylase

碳源 Carbon source	酶活力 Enzyme activity / IU · ml ⁻¹	碳源 Carbon source	酶活力 Enzyme activity / IU · ml ⁻¹
葡萄糖 Glucose	9.0	蔗糖 Sucrose	4.2
可溶性淀粉 Soluble starch	5.9	甘露糖 Mannose	3.7
乳糖 Lactose	5.7	米苏糖 Lxose	3.6
糊精 Dextrin	5.7	木糖 Xylose	2.8
岩藻糖 Fucose	5.6	山梨糖 Sorbose	1.3
半乳糖 Galactose	4.6	阿拉伯糖 Arabinose	0.8
麦芽糖 Maltose	4.5	对照 Control	2.9
蜜三糖 Raffinose	4.5		

表2 氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of various nitrogen sources on the production of penicillin G acylase

氮源 Nitrogen source	酶活力 Activity / IU · ml ⁻¹	氮源 Nitrogen source	酶活力 Activity / IU · ml ⁻¹
氮源1号(0.5%)	9.0	大豆蛋白胨(1.0%)	8.2
Nitrogen source No.1		Soytone	
胰蛋白胨(1.0%)	8.9	鱼蛋白胨(1.0%)	6.9
Tryptone		Fish peptone	
牛肉蛋白胨(1.0%)	8.7	对照	2.0
Beef peptone		Control	

表3 几种物质对产酶的影响

Table 3 Effect of some materials on the production of penicillin G acylase

物质 Material	酶活力 Activity / IU · ml ⁻¹	细胞生长 Cell growth (A ₆₀₀)
酵母膏(1.0%) Yeast extract	9.0	0.60
玉米浆(2.0%) Corn syrup	4.8	0.60
麦芽汁(10.0%) Wort	1.4	0.59
马铃薯汁(10.0%) Potato extract	0.8	0.58
对照 Control	0	0.05

* 稀释10倍后的数据。The broth was diluted for 10 times.

2.4 诱导物对产酶的影响

2.4.1 诱导物添加量对产酶的影响:改变产酶培养基中苯乙酸的添加量,进行产酶试验。表4表明,培养基中不添加诱导物,仅产生少量酶,而在添加诱导物情况下,酶量大幅度增加。苯乙酸最适添加量为0.8%。用量比文献[10]报道的(0.3%)大,说明该菌产酶需

要较高浓度苯乙酸作为诱导物。

表4 苯乙酸添加量对产酶的影响

Table 4 Effect of phenylacetic acid concentration on the production of penicillin G acylase

苯乙酸浓度 (phenylacetic acid) / (%)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
酶活力 Activity / IU · ml ⁻¹	1.2	2.9	4.6	7.2	9.0	8.5	6.8	5.0

2.4.2 诱导物添加时间对产酶的影响: 不含苯乙酸的产酶培养基接种并培养不同时间后, 分别测定细胞生长并以 0.8% 浓度补加苯乙酸, 继续培养至 44h, 测定酶活力。由图 1 可以看出, 培养 6h 后添加诱导物, 效果最佳, 酶活力由培养一开始添加诱导物的 9.0IU/ml 提高至 11.0IU/ml。诱导物添加时间应根据菌生长情况而定。在对数期添加, 效果最佳。早期添加诱导物, 由于诱导物的抑制作用, 降低了细胞生长, 因此降低了酶的产生。酶的诱导主要发生在对数期, 而酶的分泌主要集中在静止期。这与文献[10]报道一致。

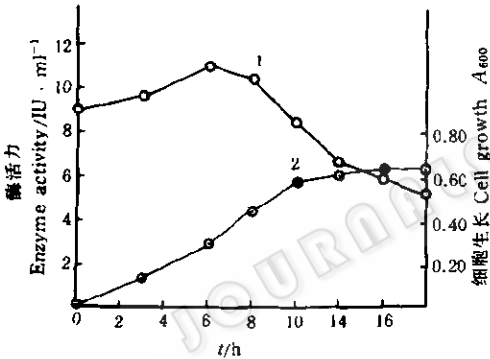


图1 苯乙酸添加时间对产酶的影响

Fig.1 Effect of addition time of phenylacetic acid on the production of penicillin G acylase

1. 培养终了酶活力 Final enzyme activity; 2. 添加诱导物前细胞生长(稀释 10 倍) Cell growth before adding inducer (broth was diluted for 10 times).

2.5 金属化合物对产酶的影响

将各种供试金属化合物以 0.1% 浓度分别加入到产酶基本培养基中, 考察它们对产酶的影响。由表 5 可见, Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Sn^{4+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 离子降低酶的形成; Cu^{2+} 和 Co^{2+} 离子显著抑制菌生长, 降低酶的形成; Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 离子完全抑制菌生长和酶形成。

2.6 培养基起始 pH 对产酶的影响

将培养基起始 pH 调至不同值, 灭菌后接种, 进行产酶试验。表 6 表明, 该菌产酶适宜起始 pH 范围较宽, 7.5~9.3; 最适起始 pH 为 9.0 (灭菌后为 8.0)。

2.7 培养温度对产酶的影响

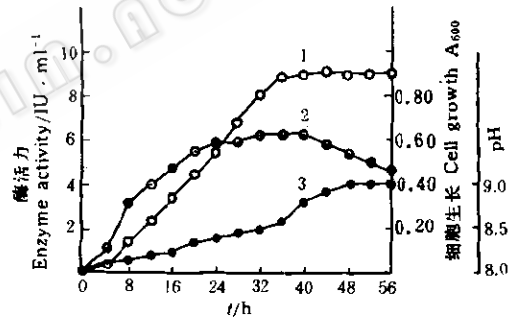


图2 青霉素 G 酰化酶产生时间过程

Fig.2 Time course of penicillin G acylase production

1. 酶活力 Enzyme activity; 2. 细胞生长(稀释 10 倍) Cell growth (Broth was diluted for 10 times); 3. 培养液 pH pH of culture broth.

于不同温度条件下进行产酶试验。表 7 表明, 该菌产酶适宜温度为 26~28℃; 最适温度为 28℃。

表 5 金属化合物对产酶的影响

Table 5 Effect of metal compounds on the production of penicillin G acylase

金属化合物 Metal compound	相对酶活力 Relative activity /(%)	细胞生长* Cell growth A_{600}	金属化合物 Metal compound	相对酶活力 Relative activity /(%)	细胞生长* Cell growth A_{600}
未加 Non-added	100	0.60	MgSO ₄ · 7H ₂ O	101	0.60
Li ₂ SO ₄ · H ₂ O	101	0.60	CaCl ₂ · 2H ₂ O	68	0.49
NaCl	102	0.62	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0	0.01
NaH ₂ PO ₄	77	0.48	3CdSO ₄ · 8H ₂ O	0	0
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	100	0.60	HgCl ₂	0	0
Na ₂ B ₂ O ₇	92	0.50	AlCl ₃ · 6H ₂ O	25	0.43
KH ₂ PO ₄	83	0.52	SnCl ₄ · 5H ₂ O	15	0.49
K ₂ HPO ₄	100	0.60	MnSO ₄ · H ₂ O	5	0.38
K ₂ SO ₄	102	0.61	FeSO ₄ · 7H ₂ O	61	0.54
Cu ₂ SO ₄ · 5H ₂ O	2	0.01	CoCl ₂ · 6H ₂ O	10	0.03

* 稀释 10 倍后的数据 The broth was diluted for 10 times.

表 6 培养基起始 pH 对产酶的影响

Table 6 Effect of initial pH of medium on the production of penicillin G acylase

培养基起始 pH Initial pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.3	9.5	10.0
酶活力 Activity / IU · ml ⁻¹	6.8	8.2	8.5	8.6	8.9	9.0	8.8	8.1	5.5

表 7 培养温度对产酶的影响

Table 7 Effect of cultivation temperature on the production of penicillin G acylase

培养温度 t / °C	24	26	28	30	32	34
酶活力 Enzyme activity / IU · ml ⁻¹	6.7	8.7	9.0	8.5	7.1	2.5

2.8 通气量对产酶的影响

在 250ml 三角瓶中装入不同体积的培养基, 灭菌后按 5% 接种量接入种子, 进行产酶试验。表 8 表明, 250ml 三角瓶装 20~35ml 培养基, 均可取得满意的效果。

2.9 培养时间对产酶的影响

于不同培养时间取样, 测定细胞生长、培养液 pH 值和酶活力。图 2 表明, 该菌生长速度快, 产酶时间早。培养 40h, pH 值上升至 8.8, 菌细胞生长达到最高值, 产酶量接近最高值; 培养 44h, pH 值上升, 菌细胞减少, 产酶量达到最高值 (9.0IU / ml); 延长培养时间, pH 值上升至 9.0, 菌细胞继续减少, 酶活力水平保持不变。

表 8 通气量对产酶的影响

Table 8 Effect of aeration on the production of penicillin G acylase

培养基体积 Medium volume / ml	10	15	20	25	30	35	40	50	60
酶活力 Activity / IU · ml ⁻¹	8.1	8.4	9.0	9.0	9.0	8.8	8.0	6.5	3.8

参 考 文 献

- [1] Vandamme E J. Economic Microbiology. In : Rose A H ed. Microbial Enzymes and Bioconversions, London, New York: Toronto Sydney San Francisco. 1980, 5: 468~506.
- [2] Shewale J G, Sivaraman H. *Process Biochemistry*, 1989, 14(4): 146~152.
- [3] Fujii T, Matsumoto K, Watanabe T. *Process Biochemistry*, 1976, 11(8): 21.
- [4] 王祯祥, 乐华爱, 王薇芝, 等. 微生物学报, 1981, 21(4): 477~481.
- [5] 王祯祥, 韩文珍, 乐华爱, 等. 微生物学报, 1984, 24(4): 376~381.
- [6] 王祯祥, 寇秀芬, 韩文珍, 等. 微生物学报, 1985, 25(4): 340~346.
- [7] Baldaro, Eva Salita San Rocco. European Patent, 1991, 0473 008 A2.
- [8] Gardner, John Paul. European Patent, 1993, 0 567 323 A2.
- [9] 王祯祥, 韩文珍, 门大鹏, 等. 微生物学报, 1992, 32(2): 99~104.
- [10] Son H J, Mheen T I, Seong B L. *et al. J. Gen Appl Microbiol.* 1982, 28(4): 281~291.

STUDIES ON PRODUCTION CONDITIONS FOR EXTRACELLULAR PENICILLIN G ACYLASE FROM *BACILLUS MEGATERIUM* BP931

Cui Fumian Han Wenzhen Han Hui Zhu Lizhao Wang Zhenxiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Production conditions for extracellular penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* BP 931 were studied. Liquid seed was prepared by cultivating the strain in liquid medium consisted of 0.7% glucose, 0.5% nitrogen source No.1, 1.0% yeast extract at pH 7.5 and 28°C for 16h. Fermentation was conducted in 250ml flasks, each containing 20ml of medium consisted of 0.7% glucose, 0.5% nitrogen source No.1, 1.0% yeast extract and 0.8% phenylacetic acid (Na⁺ salt). The optimal culture conditions are following: 5% inoculum size, temperature 28°C, 250r / min and cultivation time 44h. Enzyme activity toward 0.0643% 6-nitro-3-phenylacetamido-benzonic acid at pH 7.7 and 37°C for 10 min was 9.0 IU per ml the culture filtrate per min. When inducer, phenylacetic acid, was added after 6h of cultivation, enzyme activity was enhanced to 11.0 IU / ml. Enzyme formation was decreased by Ca²⁺, Al³⁺, Sn⁴⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Cu⁺, Co²⁺ and strongly inhibited by Zn²⁺, Cd²⁺ and Hg²⁺.

Key words *Bacillus megaterium*, Penicillin G acylase