

## 尖镰孢青霉素 V 酰化酶的纯化及性质

冯 瑛\* 崔福绵

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 通过硫酸铵沉淀、硅藻土吸附、DEAD-纤维素离子交换层析和 Sephadex G-200 凝胶过滤,由尖镰孢(*Fusarium oxysporum*) FP941 培养滤液中得到了聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的青霉素 V 酰化酶。酶作用最适 pH 为 7.0,最适温度为 50℃。酶在 pH6.0~8.0 和 42℃ 以下稳定。酶作用青霉素 V 的米氏常数  $K_m$  为  $4.65 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ;苯氧乙酸是酶的竞争性抑制剂,抑制常数  $K_i$  为  $23.87 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ;6-氨基青霉烷酸是酶的非竞争性抑制剂,抑制常数  $K_i$  为  $30.01 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。某些金属离子对酶有抑制作用, $\text{Fe}^{2+}$ 最强,其次是  $\text{Hg}^{2+}$ 和  $\text{Cu}^{2+}$ 。用 SDS 凝胶电泳测定酶亚基分子量为 77600;用分子筛测定自然酶分子量为 148 000。

**关键词** 青霉素 V 酰化酶,尖镰孢

青霉素 V 酰化酶 (Penicillin acylase EC 3.5.1.11) 是一种重要的医药工业用酶。在  $\beta$ -内酰胺系列抗菌素改造方面,青霉素 V 酰化酶主要用于水解青霉素 V 制备半合成青霉素的初始材料 6-氨基青霉烷酸 (简称 6-APA) 和水解 7-苯氧乙酰胺基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸制备半合成头孢霉素的初始材料 7-氨基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸 (简称 7-ADCA)<sup>[1,2]</sup>。

虽然许多微生物都具有产生青霉素 V 酰化酶的能力,但能产生胞外青霉素 V 酰化酶的菌种很少。据报道,产胞外青霉素 V 酰化酶的菌种有淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*)<sup>[3]</sup>、糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*)<sup>[4]</sup>和镰孢 (*Fusarium sp.*)<sup>[5]</sup>。国外已在工业规模用镰孢生产青霉素 V 酰化酶<sup>[1]</sup>。作者从腐植土中分离出一株尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*),编号 FP941。该菌不产生  $\beta$ -内酰胺酶,并且所产胞外青霉素 V 酰化酶在 pH 7.0 表现出最高活性。在生产实践中,这一 pH 值有利于保持作用底物和产物的稳定性。作者研究了尖镰孢 FP941 胞外青霉素 V 酰化酶的纯化及性质。本文报道这一研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 化学试剂

苯氧乙酸 (简称 POAA) 和青霉素 V 均为 Sigma 公司产品;DEAE-纤维素 (DE22) 为英国 Whatman 生化试剂公司产品;Sephadex G-200 为 Pharmacia 公司产品;电泳分子量标准蛋白 (Marker) 为 Promega 公司产品。

\* 1995年毕业硕士研究生,现在美国 Wayne 州大学学习。

本文于 1995 年 8 月 21 日收到。

## 1.2 粗青霉素 V 酰化酶的制备

250ml 三角瓶装麦麸 4g, 加入 40ml 含 1% 磷酸氢二铵和 0.1% POAA 的溶液(用自来水配制), 调 pH 值至 7.7, 100kPa 灭菌 30min。接种尖镰孢 FP941(在马铃薯葡萄糖琼脂斜面上, 28℃ 培养 5d), 于旋转式摇床上, 28℃ 振荡(240r/min)培养 5d。培养物离心(10,000r/min)20min, 上清即为粗青霉素 V 酰化酶液。酶活力为 3IU/ml。

## 1.3 青霉素 V 酰化酶活力的测定

吸取 2% 青霉素 V 溶液(以 pH7.0 0.2mol/L 磷酸缓冲液为溶剂)0.4ml 于试管中, 50℃ 水浴中预热 5min 后加入酶液 0.1ml, 保温 10min, 加入 pH2.5 2.2mol/L 的醋酸缓冲液 3ml 终止反应, 再加入 0.5% 对二甲氨基苯甲酸(甲醇为溶剂)试剂<sup>[6]</sup>0.5ml, 室温显色 10min, 用 0.5×1.0cm 杯, 于 415nm 波长下测光吸收值(先加醋酸缓冲液, 再加酶液的处理为空白)。

在上述条件下, 每分钟由底物产生 1μmol 6-APA 所需的酶量定义为一个酶活力单位(IU)。

## 1.4 蛋白质含量的测定

按 Lowry 等人<sup>[7]</sup>的 Folin-酚试剂法测定。

## 1.5 垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照文献[8]进行。分离胶浓度 10%, 上样量 50μl, 电泳时堆集胶 pH 8.3, 分离胶 pH9.5。采用考马斯亮蓝 R250 染色。

# 2 结果和讨论

## 2.1 酶的分离和纯化

将制得的粗青霉素 V 酰化酶液经过硫酸铵沉淀→硅藻土吸附→DEAE-纤维素离子交换→Sephadex G-200 凝胶过滤, 得到了电泳均一的青霉素 V 酰化酶。

**2.1.1 硫酸铵沉淀:** 取硫酸铵饱和度 40%~80%的分级沉淀, 按来自 100ml 粗酶液的酶沉淀对应 50ml 水, 溶解酶沉淀。本步去除了部分杂蛋白及色素, 比活力提高了 1.3 倍, 酶活力回收 94.5%(表 1)。

**2.1.2 硅藻土吸附:** 将上述部分提纯酶液稀释 4 倍, 按 100ml 加 4g 的比例加入硅藻土, 维持 pH6.0~6.5, 室温下搅拌 1h 后转入柱子中。蒸馏水洗后, 用 pH8.3 17.5%的硫酸铵溶液洗脱。本步去除了大部分杂蛋白及色素, 比活力比上一步提高了 15 倍, 酶活力回收 25%(表 1)。

**2.1.3 DEAE-纤维素离子交换层析:** 上述部分提纯酶液用聚乙二醇(MW20 000)浓缩 17 倍, 取 6ml 上样。用 pH7.3 0.05mol/L 磷酸缓冲液平衡, 用含 0.4mol/L 氯化钠的同样缓冲液洗脱。图 1 结果表明, 酶峰包含在左边蛋白质峰内。本步进一步去除了部分杂蛋白及剩余色素, 比活力比上一步提高了 0.3 倍, 酶活力回收 6.5%(表 1)。

**2.1.4 Sephadex G-200 凝胶过滤:** 上述部分提纯酶液用同样的聚乙二醇浓缩至 6ml, 上样。用 pH7.3 0.05mol/L 磷酸缓冲液洗脱。由图 2 洗脱曲线可以看出, 酶峰包含在左边蛋白质峰内。比活力比上一步提高了 0.3 倍。至此, 酶提纯约 66 倍, 酶活力回收 5.2%(表 1)。

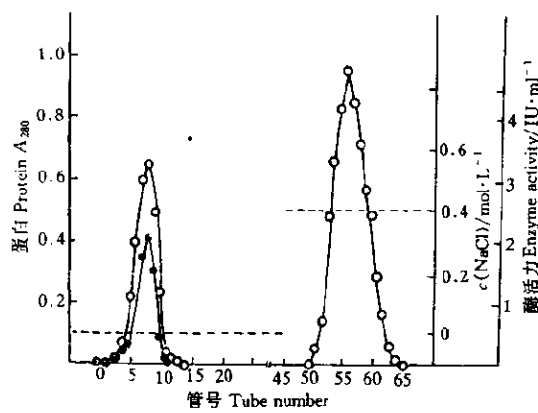


图1 青霉素 V 酰化酶 DEAE-纤维素柱层析图谱

··· 酶活力; ··· 蛋白; —— NaCl 浓度.

条件: 柱子 110×1.7cm; 洗脱速度 36ml/h, 6ml/管.

Fig.1 DEAE-cellulose column chromatography of the penicillin V acylase obtained from step 2

··· Enzyme activity; ··· Protein; —— Concentration of NaCl

Conditions: column 110×1.7cm; 36ml/h; 6ml/tube.

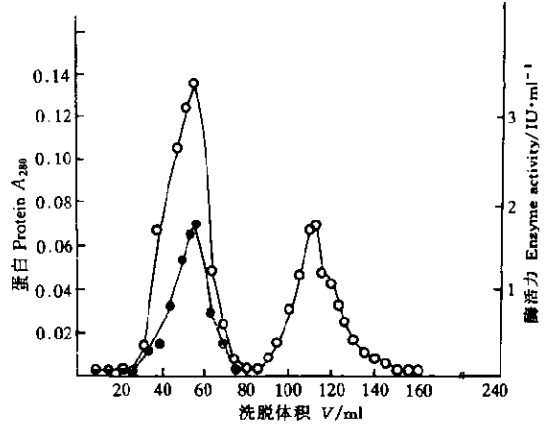


图2 青霉素 V 酰化酶 Sephadex G-200 凝胶过滤图谱

··· 酶活力; ··· 蛋白.

条件: 柱子 110×1.7cm; 洗脱速度 15ml/h, 3ml/管.

Fig.2 Sephadex G-200 column chromatography of the penicillin V acylase obtained from step 3

··· Enzyme activity; ··· Protein.

Conditions: column 110×1.7cm; 15ml/h; 3ml/tube.

表 1 尖镰孢 FP941 胞外青霉素 V 酰化酶纯化结果

Table 1 Purification of extracellular penicillin V acylase produced by *Fusarium oxysporum* FP941

步 骤 Procedure	总体积 Total volume V/ml	总活力 Total activity / IU	总蛋白 Total Protein / mg	比活力 Specific activity /IU·mg <sup>-1</sup>	提纯倍数 Purification times	活力回收 Recovery of enzyme activity / %
粗酶液 Curde enzyme solution	300	900	1627.5	0.55	1	100
硫酸铵沉淀 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractional precipitation	150	850.5	659.8	1.29	2.3	94.5
硅藻土吸附 Adsorption on celite	150	225.2	10.8	20.85	37.9	25
DEAE-纤维素离子交换层析 Ion-exchange with DEAE-cellulose	24	58.6	2.1	27.9	50.7	6.5
凝胶过滤 Sephadex G-200 gel filtration	21	46.9	1.3	36.10	65.6	5.2

通过非变性垂直板电泳检测,图 3 照片显示峰 1 为均一的蛋白带。这表明,经过上述各步骤纯化的尖镰孢 FP941 胞外青霉素 V 酰化酶已达到电泳纯。

## 2.2 酶的一般性质

**2.2.1 酶分子量的测定:** (1) 酶亚基分子量的测定: 用 SDS-PAGE 测定。纯酶在 SDS、巯基乙醇变性条件下只含有一个组份, 分子量为 77 600。表明该酶不含亚基或含有均一的亚基结构。(2) 自然酶分子量的测定: 采用 Sephadex G-200 分子筛层析法测定。分子量为 148 000, 约为 SDS-PAGE 法测定的 (77 600) 二倍。推测此酶可能含有两个相同的亚基。

**2.2.2 酶的稳定性:** (1) pH 对酶稳定性的影响: 0.1ml 纯酶液, 分别加入 0.7ml 不同 pH 的缓冲液, 37℃ 保温 12h。图 4 结果表明, 酶在 pH6.0~8.0 范围比较稳定。(2) 温度对酶稳定性的影响: 酶在不同温度下保温 7h。图 5 结果表明, 酶在 42℃ 以下稳定。

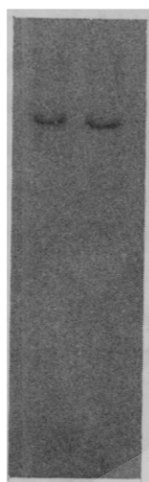


图 3 青霉素 V 酰化酶纯品聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig.3 Detection of purified penicillin V acylase by polyacrylamide gel electrophoresis

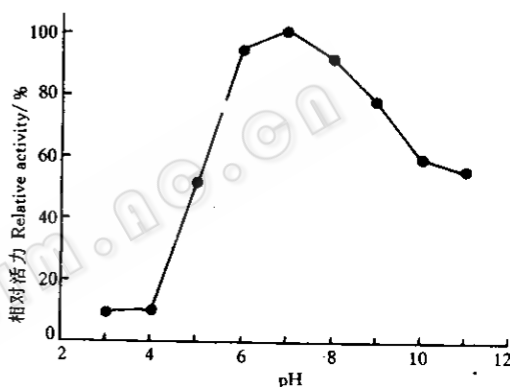


图 4 酶的 pH 稳定性

Fig.4 Effect of pH on the stability of the penicillin V acylase

**2.2.3 酶的动力学性质:** (1) 酶作用最适 pH: 于不同 pH 条件下, 分别进行粗酶和纯酶的酶反应。图 6 结果表明, 该青霉素 V 酰化酶无论是在纯状态下还是在非纯状态下, 水解青霉素 V 的最适 pH 均为 7.0。(2) 酶作用最适温度: 于不同温度条件下进行酶反应。图 7 结果表明, 纯酶水解青霉素 V 的最适温度为 50℃。(3) 金属离子对酶反应的影响: 以含 0.01mol/L 金属离子的 2% 青霉素 V 溶液 (用 Tris-HCl 缓冲液配制, 以避免金属离子沉淀) 为底物进行酶反应。由表 2 测定结果可以看出, 有些金属离子对酶反应有抑制作用,  $Hg^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  抑制酶反应 35%,  $Fe^{2+}$  抑制酶反应 67%。(4) 酶的米氏常数: 以不同浓度的青霉素 V 为底物, 测定酶反应初速度 (以每分钟产生的 6-APA 微克分子数表示)。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图 (图 8)。根据直线在横轴上的截距,  $-1/K_m$  为 -215, 求出米氏常数,  $K_m$  为  $4.65 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ; 根据直线在纵轴上的截距,  $1/v$  为 0.45, 求出最大反应速度,  $V_{max}$  为  $2.22 \mu\text{mol/min}$ 。图中的线性关系, 表明该青霉素 V 酰化酶为米氏酶。(5) 青霉素 V 水解产物 POAA 和 6-APA 对酶的抑制作用: 以不同浓度的青霉素 V 为底物, 在 POAA 和 6-APA 存在条件下, 测定酶反应初速度。如米氏常数测定作图。

图 9 表明, POAA 不影响酶的最大反应速度, 只改变酶的  $K_m$  值, 因此, POAA 为青霉素 V 酰化酶的竞争性抑制剂。由动力学方程  $K_i = K_m[I] / (K' m - K_m)$  求出抑制常数  $K_i$  为  $23.87 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。图 10 表明, 6-APA 只改变酶的最大反应速度, 不改变酶的  $K_m$  值, 故 6-APA 为青霉素 V 酰化酶的非竞争性抑制剂。由动力学方程  $K_i = [I] \cdot [V' m] / (V_m - V' m)$  求出抑制常数  $K_i$  为  $30.01 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。(6) 青霉素 V 酰化酶底物特异性: 分别以 2% 浓度的青霉素 V、青霉素 G、氨苄青霉素、头孢霉素 C 和头孢氨苄为底物, 进行酶反应。表 3 结果表明, 酶仅作用于青霉素 V, 说明该胞外青霉素 V 酰化酶具有严格的底物专一性。这与文献报道相一致<sup>[9,10]</sup>。

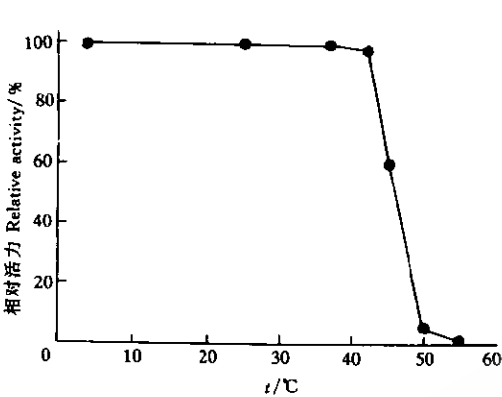


图 5 酶的热稳定性

Fig.5 Effect of temperature on the stability of the penicillin V acylase

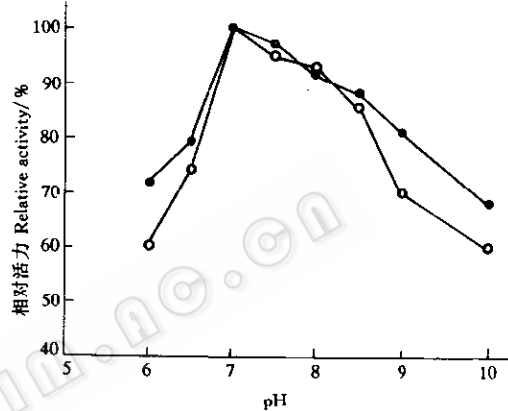


图 6 pH 对酶作用的影响

Fig.6 Effect of pH on the enzyme activity  
— — — 粗酶; · — · 纯酶.  
Fig.6 Effect of pH on the enzyme activity  
— — — Crude enzyme; · — · Purified enzyme.

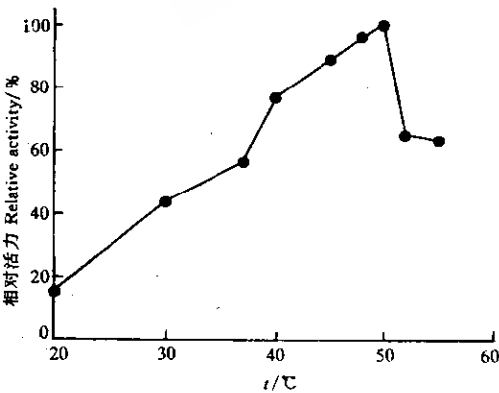


图 7 温度对酶作用的影响

Fig.7 Effect of temperature on the enzyme activity

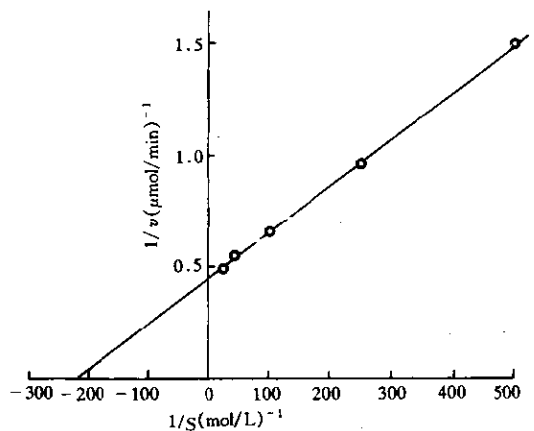


图 8 青霉素 V 酰化酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig.8 Lineweaver-Burk representation of the experiment performed for the determination of  $K_m$  of the penicillin V acylase

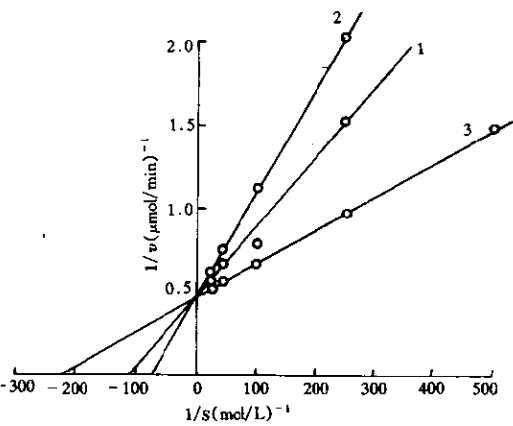


图9 POAA存在条件下青霉素V酰化酶的  
Lineweaver-Burk图

Fig.9 Lineweaver-Burk representation of the experiments performed for the determination of the competitive inhibition constant of POAA in the penicillin V acylase reaction

1. 0.025mol/L POAA; 2. 0.05mol/L POAA;  
3. Control.

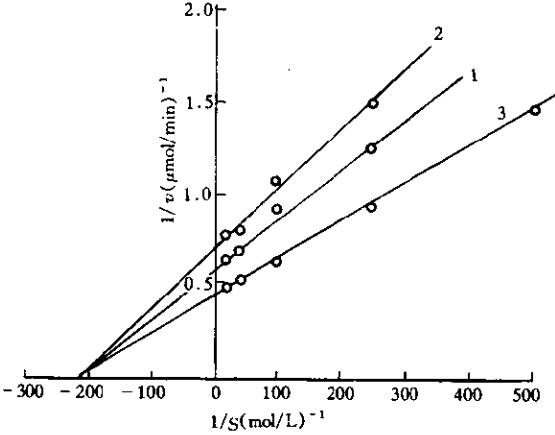


图10 6-APA存在条件下青霉素V酰化酶  
Lineweaver-Burk图

Fig.10 Lineweaver-Burk representation of the experiments performed for the determination of the noncompetitive inhibition constant for 6-APA in the penicillin V acylase reaction

1. 0.01mol/L 6-APA; 2. 0.02mol/L 6-APA;  
3. Control.

表2 金属离子对酶反应的影响

Table 2 Effect of metal ions on the enzyme reaction

金属离子 Metal ion	相对酶活力 / % Relative enzyme activity	金属离子 Metal ion	相对酶活力 / % Relative enzyme activity
H <sub>2</sub> O	100.00	Cd <sup>2+</sup>	85.22
Mn <sup>2+</sup>	106.52	Fe <sup>2+</sup>	33.04
Al <sup>3+</sup>	80.87	Zn <sup>2+</sup>	90.43
Mg <sup>2+</sup>	108.26	K <sup>+</sup>	95.65
Co <sup>2+</sup>	92.17	Ca <sup>2+</sup>	82.61
Hg <sup>2+</sup>	65.22	Cu <sup>2+</sup>	65.22
Fe <sup>3+</sup>	95.22	EDTA	106.36

表3 青霉素V酰化酶的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of the penicillin V acylase

底物 Substrate	相对酶活力 / % Relative enzyme activity
青霉素 V Penicillin V	100
青霉素 G Penicillin G	0.04
氨苄青霉素 Ampicillin	0.09
头孢氨苄 Cephalixin	0
头孢霉素 C Cephalosporin C	0

## 参 考 文 献

- [1] Shewale J G, Sivaraman H. *Process Biochemistry*, 1989, **24**(4): 146~152.
- [2] Vandamme E J. Penicillin Acylase and Beta-lactamases. In: Rose A H ed. *Economic Microbiology volume 5. Microbial Enzymes and Bioconversions*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco. 1980. 496~504.
- [3] Batchelor F R. *Proc Roy Soc, Ser B*, 1961, **159**: 514.
- [4] Stoppock E. *Advances in Biotechnology*, 1981, **3**: 547~552.
- [5] Sudhakaran V K, Shewale J G. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 1993, **9**(2): 233~239.
- [6] Matsumoto K M. United States Patent, 1984, **4**, 486, 549.
- [7] Lowry D H. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 256.
- [8] 何忠效, 张树政. 生物化学实验技术丛书. 北京: 科学出版社, 1990. 35~39.
- [9] Brandl E. *Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1965, **342**: 86.
- [10] Brandl E. *Scientia Pharmaceutica*, 1972, **40**: 89.

## PURIFICATION AND PROPERTIES OF PENICILLIN V ACYLASE FROM *FUSARIUM OXYSPORUM*

Feng Ying Cui Fumian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** Penicillin V acylase from the crude culture filtrate of *Fusarium oxysporum* FP 941 was purified with a single band on non-denaturing electrophoresis by means of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractional precipitation, adsorption on, and elution from, celite, ion-exchange column chromatography with DEAE-cellulose, and Sephadex G-200 gel filtration chromatography. The optimum pH and temperature for enzyme action were 7.0 and 50°C respectively. The purified enzyme was stable below 42°C and pH 6.0~8.0. The Michaelis constant ( $K_m$ ) of this enzyme for penicillin V was found to be  $4.65 \times 10^{-3}$  mol/L. Phenoxyacetic acid was a competitive inhibitor of penicillin V acylase with an inhibitory constant ( $K_i$ ) of  $23.87 \times 10^{-3}$  mol/L, whereas 6-aminopenicillanic acid was noncompetitive in nature with a  $K_i$  of  $30.01 \times 10^{-3}$  mol/L. The enzyme activity was inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and strongly by  $\text{Fe}^{2+}$ . The molecular weight of the subunit was 77 600, which was estimated by SDS-PAGE. The molecular weight of the whole enzyme was 148 000, determined by gel filtration chromatography.

**Key words** Penicillin V acylase, *Fusarium oxysporum*