

聚丙烯腈纤维固定化青霉素酰化酶性质的研究*

韩 辉 徐冠珠 朱丽钊 韩文珍 王祯祥

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 将巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)青霉素酰化酶连接到聚丙烯腈纤维载体上,制成固定化青霉素酰化酶。其表现活力约为 2000 u/g。水解青霉素 G 的最适温度为 50℃;最适 pH 为 9.0;在 pH5.5~10.3、温度 50℃ 以下酶的活力稳定;表观米氏常数 K_m 为 1.33×10^{-8} mol/L;最大反应速度 V_m 为 $2.564 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$;苯乙酸为竞争性抑制剂,抑制常数为 0.16 mol/L。水解 10% 的青霉素 G 钾盐溶液,使用 20 批,保留酶活力 80%。

关键词 巨大芽孢杆菌,青霉素酰化酶,聚丙烯腈,固定化酶

分类号 Q55

青霉素酰化酶水解青霉素产生 6-氨基青霉烷酸(简写作 6-APA),水解扩环酸产生 7-氨基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸(简写作 7-ADCA)。两者均为生产半合成 β -内酰胺抗生素的重要中间体。该酶还能以 6-APA 或 7-ADCA 为母核,合成各种不同的半合成青霉素或头孢菌素。随着固定化技术的发展,固定化青霉素酰化酶已广泛应用于医药工业^[1]。酶法生产 6-APA 和 7-ADCA 与传统的化学法相比,具有操作简便、产品收率高、生产成本低、环境污染小等优点。我们已经报道过三醋酸纤维固定化青霉素酰化酶^[2]。本文报道聚丙烯腈纤维固定化青霉素酰化酶的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

青霉素酰化酶浓酶液:本实验室制备^[1]。聚丙烯腈纤维:上海金山石化总厂生产。青霉素 G 钾盐:河北制药厂生产。其它试剂均为市售分析纯商品。

1.2 方法

1.2.1 固定化酶的制备:参考 Filippusson 的方法进行了改进。

1.2.2 青霉素酰化酶活力的测定:用 0.1 mol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液配制 2% 的青霉素 G 钾盐溶液为底物,37℃ 水浴保温,测定酶水解产生的 6-APA。以每分钟产生 1 μmol 6-APA 所需的酶量定义为一个活力单位。

2 结果和讨论

2.1 固定化酶和自然酶性质的比较

2.1.1 pH 对酶活力的影响:用不同 pH 值的缓冲液配制 2% 的青霉素溶液,测定酶活力。

* 该课题为“八·五”攻关项目。

收稿日期:1996-12-20

结果如图 1。固定化酶和自然酶水解青霉素 G 的最适 pH 均为 9.0。

2.1.2 温度对酶活力的影响: 在不同温度下测定酶活力。结果如图 2。由图 2 可见固定化酶和自然酶水解青霉素 G 的最适温度均为 50℃。

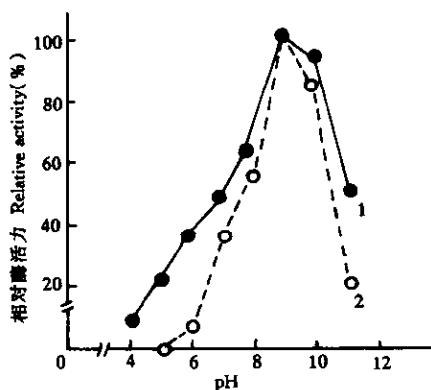


图 1 pH 对酶活力的影响

Fig.1 Effect of pH on the enzyme activity

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

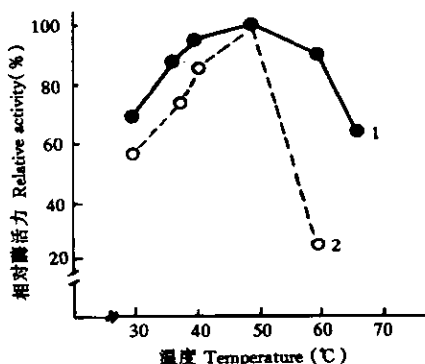


图 2 温度对酶活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on the enzyme activity

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

2.1.3 酶的 pH 稳定性: 酶在不同 pH 值的缓冲液中, 于 37℃ 保温 16 h 测定酶活力。结果如图 3。固定化酶在 pH 5.5~10.3 活力稳定; 自然酶则仅在 pH 7.0~9.0 稳定。固定化酶的 pH 稳定性明显优于自然酶。

2.1.4 酶的热稳定性: 将酶于 0.05 mol / L pH 7.5 的磷酸缓冲液中分别在不同温度下保温 6 h, 测定酶活力。结果见图 4。固定化酶在 50℃ 以下稳定, 自然酶在 40℃ 以下稳定。固定化酶的热稳定性也优于自然酶。

2.1.5 固定化酶的表现米氏常数 K_m 、最大反应速度和苯乙酸的抑制常数: 用不同浓度的

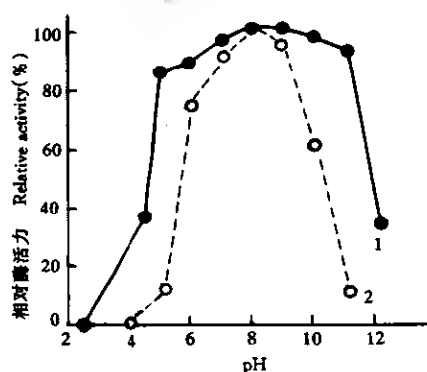


图 3 酶的 pH 稳定性

Fig.3 Effect of pH for stability of the penicillin acylase

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

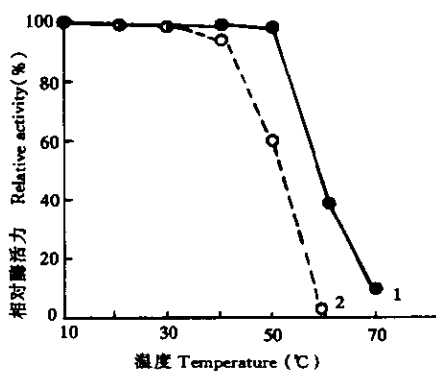


图 4 酶的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of the enzyme

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

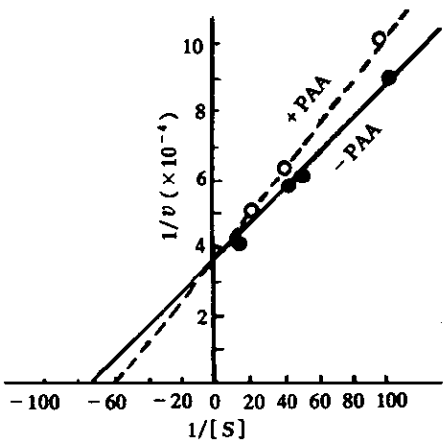


图5 固定化酶的 Lineweaver-Buck图

Fig.5 Lineweaver-Buck plots of initial rate at different penicillin G concentration with or without the presence of Phenylaceticacid (PPA) by the immobilized enzyme

青霉素作底物,测定固定化酶对其水解的初速度,以底物浓度的倒数为横坐标,反应初速度的倒数为纵坐标作图。在底物溶液中加入苯乙酸,同样测定作图见图5。图中求得,固定化酶的 K_m 为 $1.33 \times 10^{-1} \text{ mol / L}$; 最大反应速度 V_m 为 $2.564 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$; 苯乙酸对固定化酶的抑制常数 K_p 为 0.16 mol / L 。图5显示,加入苯乙酸后,最大反应速度不变,但米氏常数改变。因此,苯乙酸为竞争性抑制剂。

2.1.6 固定化酶水解青霉素的使用稳定性:用制备的固定化酶重复水解青霉素,考察其使用稳定性。将0.8 g固定化酶装在 32×100 的圆柱形玻璃反应柱中,10 g青霉素G钾盐配成10%的溶液,循环通过酶柱水解,控制反应温度 37°C ; 2 mol / L NaOH 维持水解液 $\text{pH } 8.0$; 循环速度为 $300 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。控制水解率98%以上。使用20

次测定固定化酶的剩余活力。10批制备的固定化酶考察结果见表1。

表1 固定化酶水解青霉素G的操作稳定性

Table 1 Operation stability of immobilized enzyme for hydrolysis penicillin G

酶 号	使用前活力	剩余活力	活力保留
No.	Initial activity	Residual activity	Remains of activity
	(u)	(u)	(%)
1	1518	1202	79.2
2	1520	1239	81.5
3	1501	1186	79.0
4	1498	1213	81.0
5	1531	1225	80.0
6	1511	1269	84.0
7	1499	1243	82.9
8	1525	1244	81.6
9	1504	1188	79.0
10	1507	1197	79.4
平均 Average	1511	1221	80.8

从表1中看出,10批制备的固定化酶各使用20次保留活力平均为80.8%。即使用一次活力仅损失1%。

以聚丙烯腈纤维为载体共价键结合法制备固定化青霉素酰化酶,表现活力高,使用稳定性好,并具有酶层疏松、透水性好、对物料流动阻力小、产物吸附少、易于洗涤等优点。有利于工业化生产应用。

参 考 文 献

- [1] Vantamme E J. *Enzyme Microb Technol*, 1983, 5(6): 403.
- [2] 徐冠珠, 王祯祥. 微生物学报, 1992, 32(3): 212~217.
- [3] 王祯祥, 韩文珍. 微生物学报, 1992, 32(2): 99~104.
- [4] Filippuson H, Hornby W E. *Biochem J*, 1970, 120: 215.

STUDIES ON SOME PROPERTIES OF THE IMMOBILIZED PENICILLIN ACYLASE BY POLYACRYLONITRILE FIBRES

Han Hui Xu Guanzhu Zhu Lizhao Han Wenzhen Wang Zhenxiang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The extracellular penicillin acylase from *Bacillus megaterium* was immobilized by coupling to derivatives of polyacrylonitrile fibres. The apparent activity of the immobilized penicillin acylase was about 2000 u / g (dry weight). The optimal pH and temperature were 9.0 and 50℃ for hydrolysis of penicillin G, respectively. The immobilized enzyme was stable in the pH range of 5.5~10.3, and at the temperature below 50℃. The apparent Michaelis constant K_m and V_m of the immobilization enzyme were 1.33×10^{-2} mol / L and $2.564 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. The inhibition constant of phenylacetic acid acted as a competitive inhibitor for The immobilization enzyme was 0.16 mol / L. The remained activity was about 80% after operating 20 times.

Key words *Bacillus megaterium*, Penicillin acylase, Polyacrylonitrile fibres, Immobilized enzyme