

固定化青霉素 V 酰化酶的制备及性质

董志扬 崔福绵

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)FP941 青霉素 V 酰化酶经 γ -氧化铝吸附洗脱、硫酸铵沉淀和脱盐处理后,固定在环氧丙烯聚合物载体上,湿固定化酶表现活力为 217 IU/g,固定化产率为 53%。固定化酶作用最适温度为 55°C,最适 pH 为 8.0,在 pH5.0~11.0 及 50°C 以下稳定,37°C 使用 25 次后,酶活力保留 90%。

关键词 青霉素 V 酰化酶,固定化,尖镰孢

分类号 Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)06-0551-53

固定化青霉素 V 酰化酶(Penicillin V acylase EC 3.5.1.11)在国外已用于 β -内酰胺系列抗菌素改造方面,制备半合成 β -内酰胺抗菌素的中间体^[1]。前文^[2]报道了尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)FP941 青霉素 V 酰化酶产生条件,本文报道该酶的固定化及性质。

1 材料和方法

1.1 载体

酶固定化载体为环氧丙烯聚合物,白色小球状,本实验室自制。

1.2 青霉素 V 酰化酶的部分纯化

参考文献[2]方法制备粗青霉素 V 酰化酶液。向粗酶液中加入 4% γ -氧化铝,调 pH6.5,搅拌吸附 2 h,然后将氧化铝装入柱子中,用 pH8.0、24% 硫酸铵溶液将酶洗脱下来,洗脱液加硫酸铵至饱和度 85%,收集酶沉淀,溶于 pH7.0、1mol/L 磷酸缓冲液中,并相对此缓冲液透析去盐,得到部分纯化的青霉素 V 酰化酶。

1.3 固定化青霉素 V 酰化酶的制备

在部分纯化的酶液中加入 10% 载体,25°C 固定化处理 24 h,过滤、洗涤、收集固定化酶。

1.4 青霉素 V 酰化酶活力的测定

参照文献方法[3]测定。每分钟由底物产生 1 μ mol 6-APA 所需的酶量定义为一个酶活力单位(IU)。

1.5 蛋白质含量的测定

按 Lowry 等人[4]的 Folin-酚试剂法测定。

2 结果和讨论

2.1 青霉素 V 酰化酶的部分纯化

由 2L 粗酶液得到部分纯化酶液 10mL。由表 1 结果可以看出,酶提纯 4.1 倍,酶活

力总回收为 28.8%。

表 1 青霉素 V 酰化酶的部分纯化结果

Table 1 Partial purification of extracellular penicillin V acylase

步骤 Procedure	总体积 Total volume /mL	总酶活力 Total activity /IU	比活力 Specific activity (IU/mg)	提纯倍数 Purification times	酶活力回收率 Recovery of enzyme activity/%
Crude enzyme	2000	13400	0.65	1	100
γ -Al ₂ O ₃ Adsorption elution	300	6887	1.04	1.6	51.4
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	8	4340	2.49	3.8	32.4
Dialysis	10	3860	2.72	4.2	28.8

2.2 青霉素 V 酰化酶的固定化

由 5mL 部分纯化酶液,按上述方法,得到 4.7g 湿固定化酶(相当于干重 0.5g)。经 pH7.0、1mol/L 上述缓冲液洗涤后,固定化酶的理论活力为 320IU/g,表观活力为 217IU/g。固定化酶理论活力回收率为 78%,表观活力回收率为 53%。计算表明,该固定化酶活力表现率为 68%。

2.3 酶的性质

2.3.1 青霉素 V 酰化酶作用 pH:于不同 pH 条件下,测定酶活力。由图 1 可以看出,自然青霉素 V 酰化酶作用最适 pH 为 7.0,固定化青霉素 V 酰化酶作用最适 pH 为 8.0。

2.3.2 青霉素 V 酰化酶 pH 稳定性:酶于不同 pH 值的缓冲液中 37℃ 保温 12 h。图 2 表明,自然酶在 pH6.0~8.0 范围内较稳定,固定化酶在 pH5.0~11.0 范围内较稳定。这说明该青霉素 V 酰化酶经固定化处理后其 pH 稳定性显著提高。

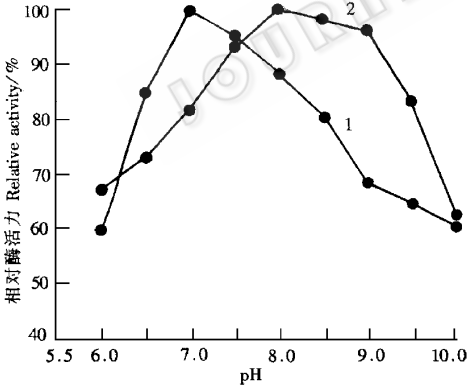


图 1 pH 对酶作用的影响

Fig.1 Effect of pH on the enzyme activity

1. Free enzyme 2. Immobilized enzyme.

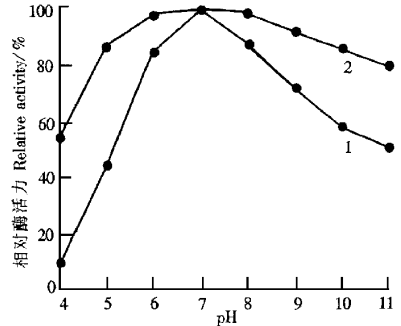


图 2 酶的 pH 稳定性

Fig.2 Effect of pH on the stability of the enzyme

1. Free enzyme 2. Immobilized enzyme.

2.3.3 青霉素 V 酰化酶的作用温度:于不同温度分别测定自然酶和固定化酶的活力。图 3 表明,自然酶作用最适温度为 45℃,固定酶为 55℃,后者作用最适温度明显提高。

2.3.4 青霉素 V 酰化酶的热稳定性:将自然酶和固定化酶分别于 pH7.0 缓冲液中,于不同温度下保温 7 h 后,测定酶活力。图 4 表明,自然酶在 40℃ 以下稳定,固定化酶在 50℃ 以下稳定。这说明,酶经固定化处理后,其热稳定性提高。

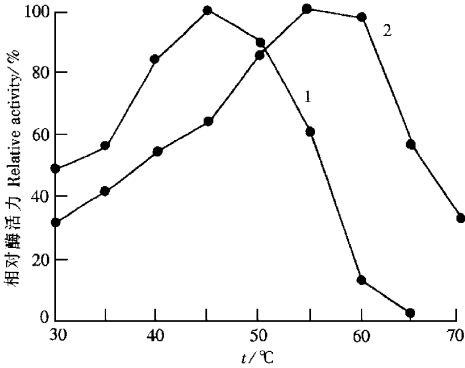


图 3 温度对酶作用的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the enzyme activity

1. Free enzyme 2. Immobilized enzyme.

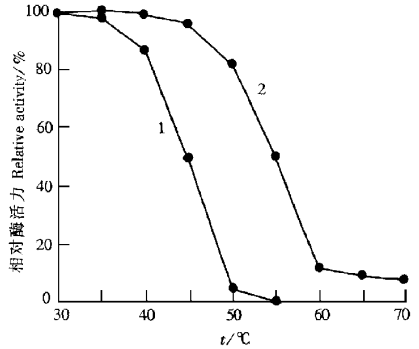


图 4 酶的热稳定性

Fig. 4 Effect of temperature on the stability of the enzyme

1. Free enzyme 2. Immobilized enzyme.

2.3.5 固定化青霉素 V 酰化酶的重复利用试验 取 0.1g 固定化酶加入 25mL 含 2% 青霉素 V 的 pH7.0、0.1mol/L 磷酸缓冲液中, 37°C 水浴中水解反应 30min。固定化酶利用 25 次后酶活力保持 90%。这说明该固定化酶具有较好的使用稳定性。

参 考 文 献

- [1] Shewale J G, Sivaraman H. *Process Biochemistry*, 1989, **24**(4): 146~152.
 [2] 冯 瑛, 崔福绵. *微生物学通报*, 1996, **23**(6): 329~332.
 [3] Matsumoto K M. *United States Patent*, 1984, **4**, 486~549.
 [4] Lowry D H. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 256.

PREPARATION OF IMMOBILIZED PENICILLIN V ACYLASE FROM *FUSARIUM OXYSPORUM* AND ITS PROPERTIES

Dong Zhiyang Cui Fumian

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

Abstract Extracellular penicillin V acylase from *Fusarium oxysporum* FP941 was partially purified by means of adsorption on γ -alumina, and elution from γ -alumina and $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation. The enzyme was immobilized on acrylic polymer support linked with covalent bond. The activity of wet immobilized enzyme was 217 IU/g, The activity yield of Immobilized enzyme was 53%. Optimum pH and temperature for immobilized enzyme action were 8.0 and 55°C, respectively. The enzyme was stable below 50°C and pH 4~11. The activity of the immobilized enzyme remained 90% after it was reused 25 times.

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