

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(5):620-628; 4 May 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

红纹黄单胞菌 α -氨基酸酯水解酶的分离纯化及酶学性质

屈凤¹, 易八贤², 叶丽娟^{1,3*}

¹ 中国医药集团总公司四川抗菌素工业研究所, 成都 610052

² 中国医药工业研究总院, 上海 200040

³ 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 成都 610052

摘要: 【目的】从红纹黄单胞菌中分离纯化了胞内 α -氨基酸酯水解酶(AEH), 并进行了酶学性质研究。【方法】采用乙酸丁酯破碎细胞, 并相继用磷酸钙凝胶沉淀、硫酸铵分级沉淀、DEAE Sephadex A-50 阴离子交换处理、CM Cellulose 52 离子交换层析和 Sephadex G-200 凝胶过滤层析纯化得到了电泳纯 α -氨基酸酯水解酶, 并研究了此酶的酶学性质。【结果】SDS-PAGE 显示 α -氨基酸酯水解酶的亚基分子量为 70 kDa。酶促合成头孢克洛的最适 pH 为 6.8, 最适温度为 42°C, 在 pH5.0-8.0 和 35°C 以下, 酶保持了良好的稳定性。Mn²⁺ 和 Ca²⁺ 对酶活有一定的促进作用, Cu²⁺、Fe²⁺ 及高浓度的丙酮对酶活有强的抑制作用。AEH 催化 D-苯甘氨酸甲酯、D-对羟基苯甘氨酸甲酯和头孢克洛水解反应的 k_{cat}/K_m 分别为 $123.7 \pm 3.7 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}$ 、 $2.9 \pm 0.6 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}$ 和 $101.3 \pm 2.1 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}$, AEH 对 D-苯甘氨酸甲酯的催化效率最高。AEH 催化双底物反应的机制为乒乓机制, 催化合成头孢克洛的 k_{cat} 为 $547.3 \pm 38.2 \text{ s}^{-1}$ 。【结论】有关红纹黄单胞菌 α -氨基酸酯水解酶的酶学性质研究相对较少, 本文的研究将为该酶催化合成 β -内酰胺类抗生素的工业化应用提供重要参数。

关键词: α -氨基酸酯水解酶, β -内酰胺类抗生素, 分离纯化, 酶学性质, 乒乓机制

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 05-0620-09

β -内酰胺类抗生素是含有 β -内酰胺环的一大类抗生素, 常见的有青霉素和头孢菌素。它主要是通过青霉素结合蛋白(PBPs)共价结合抑制细菌细胞壁肽聚糖的合成, 从而产生细胞壁缺损细菌, 当这些细菌处于不利环境时, 极易裂解死亡^[1]。由于这类抗生素选择性好, 杀菌作用强, 适用症广, 它们成为了最重要的一类抗感染药物。目前这类抗生素可采用化学法和酶法合成, 化学法合成不仅步骤繁琐, 能源消耗大, 还涉及大量有毒有害的试剂, 对环境造成严重污染。相比而言, 酶法合成工艺简单、反

应条件温和, 而且无污染^[2-3], 因此, 有关酶法合成 β -内酰胺类抗生素的研究日益增多^[4-7], 并且酶法合成的头孢氨苄、阿莫西林等产品已经面世^[8]。在 β -内酰胺类抗生素的工业化生产中, 酶法合成已受到极大的关注, 是未来发展的趋势。

用于合成 β -内酰胺类抗生素的酶有青霉素酰化酶(penicillin acylase, PA; EC 3.5.1.11)和 α -氨基酸酯水解酶(α -amino acid ester hydrolase, AEH; EC 3.1.1.43)。尽管这些酶均能催化相同的反应, 但不同来源的酶, 其底物专一性明显不同。AEH 的

基金项目: “十二五”重大新药创制科技重大专项(2011ZX09401-403); 四川省国际科技合作与交流研究计划项目(2010HH0036); 四川省国际合作计划项目(2011HH0013); 成都市科技计划项目(10GGYB297SW-482)

* 通信作者。Tel: +86-28-84216035; Fax: +86-28-84333218; E-mail: lisaleaf@gmail.com

作者简介: 屈凤(1987-), 女, 四川资阳人, 硕士研究生, 研究方向为应用生物催化。Email: qufeng87@gmail.com

收稿日期: 2011-12-29; 修回日期: 2012-03-06

底物仅限于含游离 α -氨基的酰基供体, 因此它比 PA 更适合合成氨基青霉素、头孢氨苄、头孢克洛等带有 α -氨基的 β -内酰胺类抗生素^[9-12]。本文主要对红纹黄单胞菌产生的 AEH 进行了分离纯化及酶学性质研究, 为 AEH 在酶法合成 β -内酰胺类抗生素的应用中奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 标准牛血清清蛋白 (Sigma); 7-氨基-3-氯-3-头孢环-4-羧酸 (7-ACCA) (南京康满林化工实业有限公司); 头孢克洛 (华北制药集团倍达有限公司); D-苯甘氨酸 (D-PGA) (梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司); D-苯甘氨酸甲酯盐酸盐 (D-PGM·HCl)、D-对羟基苯甘氨酸甲酯盐酸盐 (D-HPGM·HCl)、D-对羟基苯甘氨酸 (D-HPGA) (上海邦成化工有限公司); 脱氧核糖核酸酶 (DNase) (北京瑞达恒辉科技发展有限公司); CM cellulose 52 (Whatman); DEAE Sephadex A50 (Pharmacia); Sephadex G200 (北京瑞达恒辉科技发展有限公司); Sephadex G25 (Pharmacia); 其他常用试剂均为分析纯。BEAUTY-CN[®] 发酵罐 (上海高机生物工程有限公司); 超滤浓缩管 (MWC0 50kDa) (Millipore); Avanti[®] J-26XP 高速冷冻离心机 (BECKMAN COULTER); SHZ-22 水浴恒温振荡器 (上海离心机械研究所、江苏太仓医疗器械厂联营厂); UV-160A 紫外可见分光光度计 (SHIMADZU CORPORATION); JY-SCZ4 + 垂直电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); JY200C 电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); LC-2010AHT 高效液相色谱仪 (SHIMADZU CORPORATION); Ultimate[®] XB-C18 色谱柱 (Welch Materials)。

1.1.2 菌种: 红纹黄单胞菌 (*Xanthomonas rubrilineans*) 由四川抗菌素工业研究所菌种保藏中心提供。

1.2 培养基及培养条件

①斜面试培养基: PDA 培养基, 28℃ 培养 48 h; ②种子培养基 (w/v): 2% 玉米浆干粉, 1% 葡萄糖, 1% 胰蛋白胨, pH 7.5, 750 mL 摇瓶装量 50 mL, 28℃、250 r/min 培养 18 h; ③发酵培养基 (w/v): 2% 玉米浆干粉, 1% 葡萄糖, 1% 胰蛋白胨, pH 7.5, 10L 罐装量 6L, 接种量 4% (v/v), 28℃、250 r/min 培养 24 h。

1.3 酶活测定

头孢克洛在碱性溶液中会生成一种衍生物, 此衍生物在 470 nm 处有紫外吸收, 因此可利用分光光度法测定头孢克洛的量^[13]。将 1.8 mL 用 0.05 mol/L pH 6.8 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液配制的含 0.04 mol/L 7-ACCA 和 0.08 mol/L D-PGM·HCl 底物溶液置于 42℃ 保温 2 min, 再加入适当稀释的酶液 0.2 mL 反应 30 min 后, 立即加入 1 mL 0.5 mol/L HCl 终止反应, 然后加入 3 mL 1 mol/L NaOH 对反应液中的 HCl 进行中和并使其置于碱性环境下, 于 40℃ 保温 30 min 后, 在 470 nm 处测定紫外吸收。根据头孢克洛标准曲线得到的线性方程, 计算头孢克洛的量。酶活力的定义为: 在上述反应条件下, 每分钟生成 1 μ mol 头孢克洛所需酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

1.4 蛋白质测定

以牛血清清蛋白为标准, 采用考马斯亮蓝法^[14]测定蛋白质的含量。

1.5 AEH 动力学的相关物质测定

在测定 AEH 动力学参数时, 相关物质的检测采用 HPLC。色谱条件: LC-2010AHT 高效液相色谱仪; XB-C18 柱; 紫外检测器, 其中 D-PGM 和 D-PGA 的检测波长为 214 nm, D-HPGM 和 D-HPGA 的检测波长为 225 nm, 头孢克洛和 7-ACCA 的检测波长为 254 nm; 柱温为 35℃; 流动相为磷酸铵缓冲液 (0.05 mol/L, pH 2.1): 乙腈 = 87:13 (V/V); 流速为 1 mL/min; 进样量为 10 μ L。

1.6 α -氨基酸酯水解酶的分离纯化

1.6.1 粗酶液的制备: 将发酵液于 4℃, 11325 \times g 离心 20 min, 收集菌体, 然后用乙酸丁酯破碎细胞壁, 并在破壁过程中加入一定量的 DNase。破壁结束后于 4℃, 11325 \times g 离心 30 min, 保留上清液, 记为粗酶液。

1.6.2 磷酸钙凝胶处理: 参考 Koichi Kato 等^[15]方法, 在粗酶液里依次加入醋酸钙和磷酸氢二钾溶液。4℃ 下搅拌 20 min, 于 4℃, 14784 \times g 离心 30 min, 保留上清液, 记为酶液 I。

1.6.3 硫酸铵分级沉淀: 将固体硫酸铵研细加入到酶液 I 中, 调至不同的饱和度 (20% - 80%), 4℃ 下搅拌 2h, 于 4℃, 14784 \times g 离心 30 min, 分离上清与沉淀, 沉淀用 0.02 mol/L pH 6.0 组氨酸缓冲液进行溶解, 再进行蛋白和酶活测定, 确定最优分离条件。

1.6.4 DEAE sephadex A-50 阴离子交换:将硫酸铵盐析得到的沉淀用 0.02 mol/L pH 6.0 组氨酸缓冲液溶解,经 Sephadex G25 凝胶过滤层析脱盐得到酶液 II。将酶液 II 与已用 0.02 mol/L pH 6.0 组氨酸缓冲液平衡的 DEAE sephadex A-50 阴离子交换剂混合,于 4℃ 下温和搅拌 2 h 后过滤,检测滤液的酶活及蛋白,记为酶液 III。

1.6.5 CM cellulose 52 离子交换层析:采用超滤将酶液 III 的缓冲液更换为 0.02 mol/L pH 5.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$,然后加样于已用 0.02 mol/L pH 5.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液平衡的 CM cellulose 52 离子交换层析柱(2.5 cm × 13 cm),用上样缓冲液洗涤,直至无蛋白流出时开始分步洗脱,洗脱缓冲液分别是含 0.05 mol/L NaCl、0.1 mol/L NaCl 和 0.15 mol/L NaCl 上样缓冲液,每部分洗脱液体积为 3-5 个柱体积,洗脱流速为 40 mL/h。检测洗脱液的蛋白及酶活,将含酶活的洗脱液部分混合,记为酶液 IV。

1.6.6 Sephadex G-200 凝胶过滤层析:将酶液 IV 进行超滤浓缩,然后加样于已用 0.02 mol/L pH 6.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液平衡的 Sephadex G-200 凝胶过滤柱(1.5 cm × 45 cm),用 0.02 mol/L pH 6.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液洗脱,流速为 11 mL/h。测定洗脱液的酶活及蛋白含量。

1.7 分离纯化效果检测

采用 SDS-PAGE 法^[14],10% 分离胶,5% 浓缩胶,电泳时上样量为 15 μL ,凝胶用考马斯亮蓝染色,用于检测目的蛋白的分离效果及测定亚基分子量。

1.8 纯化的 α -氨基酸酯水解酶酶学性质研究

1.8.1 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性:(1) 最适反应 pH: 酶分别在 pH 5.0-9.0 的 0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液和酶的最适反应温度条件下测定酶活力,酶活力最高者以 100% 计,计算相对酶活力,研究酶的最适 pH。(2) pH 稳定性: 将酶液置于 0.05 mol/L pH 3.0-10.0 不同缓冲液中于 4℃ 放置,在 0.5 h 和 3 h 时分别取样,并调至最适 pH 测定其对残留酶活力,研究酶的 pH 稳定性。此实验所用缓冲液是 pH 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-柠檬酸}$ 缓冲液, pH 6.0、7.0、8.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液, pH 9.0、9.5、10.0 Gly-NaOH 缓冲液。

1.8.2 酶的最适反应温度及热稳定性:(1) 最适反应温度: 在酶的最适反应 pH 条件下,分别测定酶在

20℃-60℃ 的酶活力,酶活力最高者以 100% 计,计算相对酶活力,考察酶的最适反应温度。(2) 热稳定性: 在 0.05 mol/L pH 6.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中,将酶液分别置于 20℃-50℃ 保温,在 0.5 h、1 h、2 h 和 3 h 时分别取样,在最适温度下测定其相应的残留酶活力,考察酶的热稳定性。

1.8.3 金属离子及其他试剂对酶活力的影响:分别向酶液中加入一定浓度的金属离子和其他试剂,4℃ 放置 20 min 后测定酶活力。未加金属离子和其他试剂的酶液酶活力为 100%,计算相对酶活力,观察金属离子及其他试剂对酶活力影响。此实验独立进行 3 次,每次做 3 组平行样。

1.8.4 AEH 水解动力学参数测定:(1) 确定一级反应时间: 分别用 0.05 mol/L、pH 6.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液溶解 D-PGM·HCl,使其终浓度为 2 mmol/L、50 mmol/L 和 200 mmol/L,于 40℃ 预热 1 min,加入已稀释好的酶液,30 min 内依次取样,测定产物 D-PGA 的生产量,绘制产物-时间曲线,判断酶作用一级反应的时间,此时间即可作为动力学参数测定的反应时间。(2) 测定水解动力学参数: 用 0.05 mol/L、pH 6.8 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 的缓冲液体系配制不同浓度的底物,在 40℃ 反应,测定产物 D-PGA 的产量,计算相应的反应速度,利用米氏方程双倒数法求得 K_m 和 V_{max} 值,再根据酶浓度计算 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 值。AEH 催化 D-HPGM 和头孢克洛水解的动力学参数测定方法同上,其中 D-HPGM 水解反应 pH 为 6.0,温度 40℃;头孢克洛水解反应 pH 为 6.8,温度 40℃。

1.8.5 AEH 合成头孢克洛动力学参数测定:(1) 确定一级反应时间: 用 0.05 mol/L、pH 6.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液配置 3 组底物溶液,分别为 0.001 mol/L D-PGM·HCl 和 0.005 mol/L 7-ACCA, 0.01 mol/L D-PGM·HCl 和 0.01 mol/L 7-ACCA, 0.03 mol/L D-PGM·HCl 和 0.005 mol/L 7-ACCA,于 40℃ 预热 1 min,加入已稀释好的酶液,30 min 内依次取样,测定产物头孢克洛的产量,绘制产物-时间曲线,判断酶作用一级反应的时间,此时间即可作为动力学参数测定的反应时间。(2) 测定合成头孢克洛动力学参数: 固定 6 组 D-PGM 浓度(5-30 mmol/L),然后在每组固定浓度的 D-PGM 条件下用 0.05 mol/L、pH 6.8 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 的缓冲液体系配制不同浓度的底物,在 40℃ 反应,测定产物头孢克洛的

产量,作出双底物反应动力学图,进一步采用第二次作图法求取动力学参数。

2 结果

2.1 AEH 的分离纯化

AEH 在硫酸铵为 30% - 50% 饱和度条件下沉

淀,经 Sephadex G200 凝胶过滤层析时,AEH 在 0.5 - 0.8 个柱体积被洗脱。经一系列的纯化后,AEH 比活力达 687.6 U/mg,回收率高达 32.5%,AEH 分离纯化结果见表 1。采用 SDS-PAGE 检验纯化过程中蛋白溶液纯度,如图 1 所示。图 1-B 表明经纯化后的蛋白溶液为单一条带,说明得到了电泳纯目标蛋白 AEH,其亚基分子量为 70 kDa。

表 1 AEH 的纯化

Table 1 Purification of AEH

| Purification step | Total activity /U | Total protein /mg | Specific activity/(U/mg) | Purification/fold | Total activity recovery /% |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|----------------------------|
| Crude extract | 16657.44 | 4448.16 | 3.74 | 1.00 | 100.0 |
| Calcium phosphate gel precipitation | 15837.89 | 3134.67 | 5.05 | 1.35 | 95.1 |
| Ammonium sulfate precipitation | 15273.21 | 1373.86 | 11.12 | 2.97 | 91.7 |
| DEAE-Sephadex A-50 anion exchange | 14646.89 | 295.93 | 49.49 | 13.22 | 87.9 |
| CM-cellulose C-52 cation exchange | 10050.69 | 40.82 | 246.25 | 65.76 | 60.3 |
| Sephadex G-200 chromatography | 5414.31 | 7.87 | 687.57 | 183.61 | 32.5 |

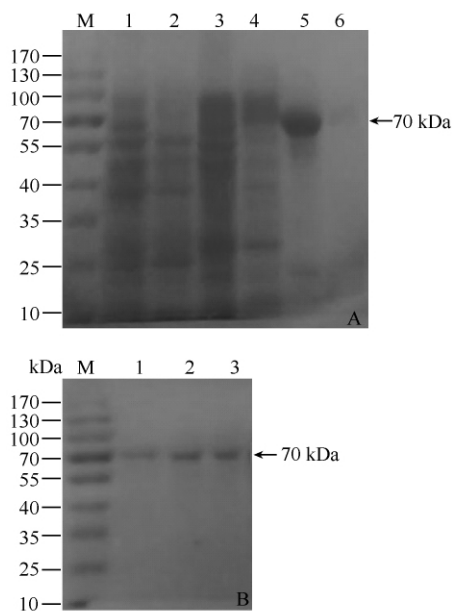


图 1 α -氨基酸酯水解酶的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of AEH. A: Samples of purification process. Lane M: Protein maker; Lane 1: Crude extract, diluted 10 times, 13.9 μ g loading amount; Lane2: Calcium phosphate gel precipitation, diluted 5 times, 11.8 μ g loading amount; Lane3: Ammonium sulfate fractionation precipitation, diluted 50 times, 20.4 μ g loading amount; Lane4: DEAE sephadex A50 anion exchange, concentrated 3 times, 11.7 μ g loading amount; Lane5: CM cellulose 52 cation exchange, concentrated 10 times, 12.3 μ g loading amount; Lane6: Sephadex G200 chromatography, 0.2 μ g loading amount. B: purified AEH. Lane M: Protein maker; Lane 1: AEH purified by Sephadex G200 chromatography, concentrated 10 times, 1.7 μ g loading amount; Lane2 to lane3: AEH purified by Sephadex G200 chromatography, concentrated 20 times, 3.4 μ g loading amount.

2.2 纯化的 AEH 酶学性质研究

2.2.1 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性: (1) 最适反应 pH: pH 对 AEH 酶活力影响的实验结果见图 2-A, 结果表明该酶最适反应 pH6.8, 在 pH 6.4—7.0 酶活力较好, 当 pH \leq 6.0 或 pH \geq 7.2 时酶活力下降比较快。(2) pH 稳定性: pH 稳定性实验结果(图 2-

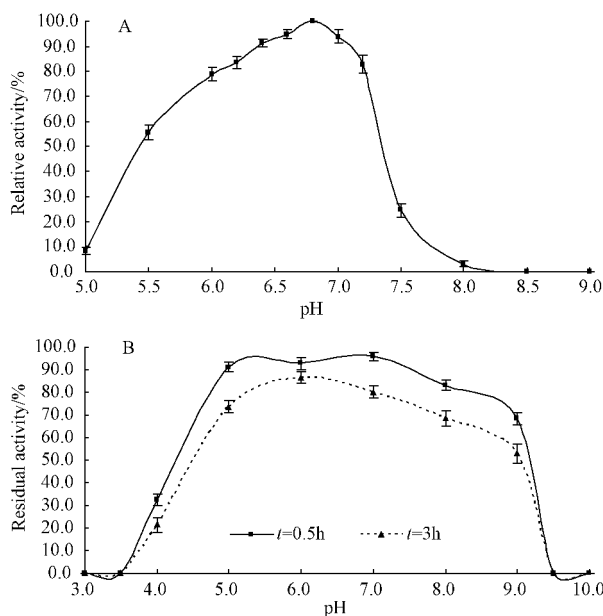


图 2 pH 对 AEH 酶活力及稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on the activity and stability of AEH. A: enzyme activity; B: pH stability, t = 0.5h and 3h: the residual activity curve of AEH placed at the different pH for half an hour and three hours respectively.

B)表明该酶在 pH 5.0 – 8.0 稳定性较好,当 pH \leq 3.5 或 pH \geq 9.5 时酶完全失活。

2.2.2 酶的最适反应温度及热稳定性:(1)最适反应温度:AEH 在不同温度下测定的酶活力结果见图 3-A,该酶的最适反应温度为 42 $^{\circ}$ C,在 40 $^{\circ}$ C—42 $^{\circ}$ C

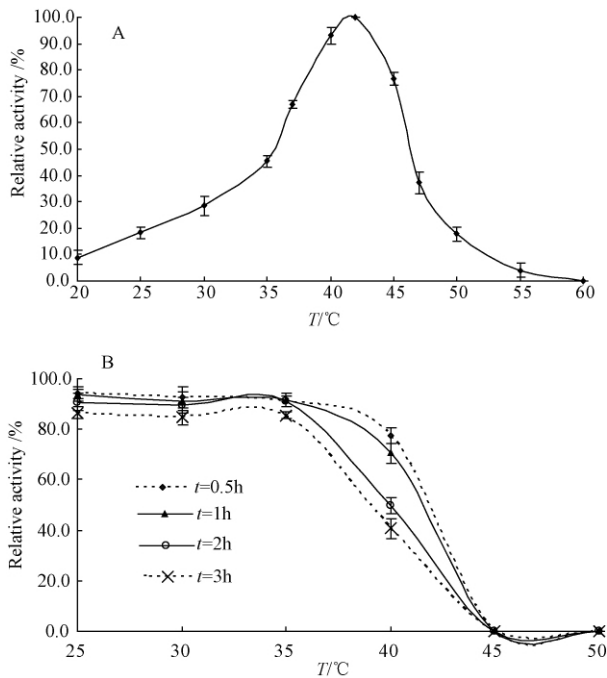


图3 温度对 AEH 酶活力及稳定性的影响

Fig.3 Effect of temperature on the activity and stability of AEH. A: enzyme activity; B: thermal stability, t=0.5h, 1h and 3h: the residual activity curve of AEH placed at the different temperature for half an hour, an hour and three hours respectively.

AEH 都具有较高的酶活力,当反应温度低于 37 $^{\circ}$ C 时,酶活随反应温度的升高而明显增加,当反应温度高于 45 $^{\circ}$ C 时,酶活迅速下降。(2)热稳定性:AEH 热稳定性实验结果见图 3-B,当温度低于 35 $^{\circ}$ C 时,AEH 稳定性良好,残留酶活都在 85% 以上;温度高于 35 $^{\circ}$ C 时,AEH 的稳定性明显下降;温度高于 45 $^{\circ}$ C 时,AEH 极易失活。

2.2.3 金属离子及其他试剂对酶活力的影响:金属离子及其他试剂对酶活力的影响的实验结果见表 2, Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶活力有一定的激活作用,酶活力分别提高到 104.6% 和 111.9%。实验中选用的其他离子和试剂都对酶活力有一定的抑制作用, Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 和高浓度的丙酮对酶活力有强烈的抑制作用,分别抑制了约 90%、65% 和 68% 的酶活力。

2.2.4 AEH 水解动力学参数测定:AEH 催化 D-PGM、D-HPGM 和头孢克洛水解时,分别在 3、5 和 5 min 内都为一级动力学,因此确定动力学参数测定的时间分别为 3、5 和 5 min。根据米氏方程,采用双倒数作图法,绘制 3 种底物的动力学曲线,并分别计算其动力学参数。结果见表 3。

实验结果表明,AEH 对 3 种底物的亲和力大小是:头孢克洛 > D-PGM > D-HPGM。 k_{cat}/K_m 表明 AEH 对 D-PGM 催化效率最高,对 D-HPGM 催化效率最低。

2.2.5 AEH 合成头孢克洛动力学参数测定:AEH 催化头孢克洛合成时在 7 min 内为一级动力学,因

表 2 金属离子和其他试剂对酶活力的影响

Table 2 Effect of metal ions and some compounds on the activity of AEH

| Ions and compounds | Concentration/(mol/L) | Relative activity/ % | Ions and compounds | Concentration/(mol/L) | Relative activity/ % |
|--------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| Control | - | 100 | Control | - | 100 |
| Mg^{2+} | 0.002 | 93.0 \pm 2.4 | K^+ | 0.002 | 85.8 \pm 3.7 |
| Mn^{2+} | 0.002 | 104.6 \pm 1.8 | Na^+ | 0.002 | 93.0 \pm 1.6 |
| Ni^{2+} | 0.002 | 77.3 \pm 2.2 | EDTA | 0.002 | 82.5 \pm 2.6 |
| Cu^{2+} | 0.002 | 34.8 \pm 4.6 | SDS | 0.002 | 72.7 \pm 4.3 |
| Zn^{2+} | 0.002 | 86.7 \pm 4.2 | D-phenylglycine | 0.002 | 91.1 \pm 2.6 |
| Fe^{2+} | 0.002 | 10.7 \pm 2.6 | alcohol | 0.343 | 92.2 \pm 2.1 |
| Ca^{2+} | 0.002 | 111.9 \pm 1.7 | alcohol | 3.427 | 93.8 \pm 2.9 |
| Co^{2+} | 0.002 | 94.1 \pm 2.5 | acetone | 0.270 | 86.3 \pm 2.2 |
| NH_4^+ | 0.002 | 84.0 \pm 3.7 | acetone | 2.701 | 32.3 \pm 1.6 |

表 3 AEH 的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of AEH

| Substrates | K_m (mmol \cdot L $^{-1}$) | V_{max} [mmol/(s $^{-1}$ \cdot L)] | k_{cat} (s $^{-1}$) | k_{cat}/K_m (mmol $^{-1}$ \cdot s $^{-1}$ \cdot L) |
|------------|---------------------------------|--|------------------------|--|
| D-PGM | 3.3 \pm 0.1 | 0.00233 \pm 0.00017 | 408.3 \pm 29.2 | 123.7 \pm 3.7 |
| D-HPGM | 32.3 \pm 7.1 | 0.000533 \pm 0.00015 | 93.3 \pm 15.8 | 2.9 \pm 0.3 |
| Cefaclor | 0.443 \pm 0.009 | 0.000257 \pm 0.00005 | 44.9 \pm 8.8 | 101.3 \pm 2.1 |

此将 5 min 作为测定合成头孢克洛动力学参数的时间。根据双倒数作图, 得到 6 条近似平行直线 (见图 4), 再利用此 6 条直线的数据进行第二次作图,

求得动力学参数, 其中 V_{\max} 为 $0.0043 \pm 0.0003 \text{ mmol} / (\text{s}^{-1} \cdot \text{L})$, $K_m^{\text{D-PGM}}$ 为 $4.8 \pm 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_m^{\text{7-ACCA}}$ 为 $7.4 \pm 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, k_{cat} 为 $547.3 \pm 38.2 \text{ s}^{-1}$ 。

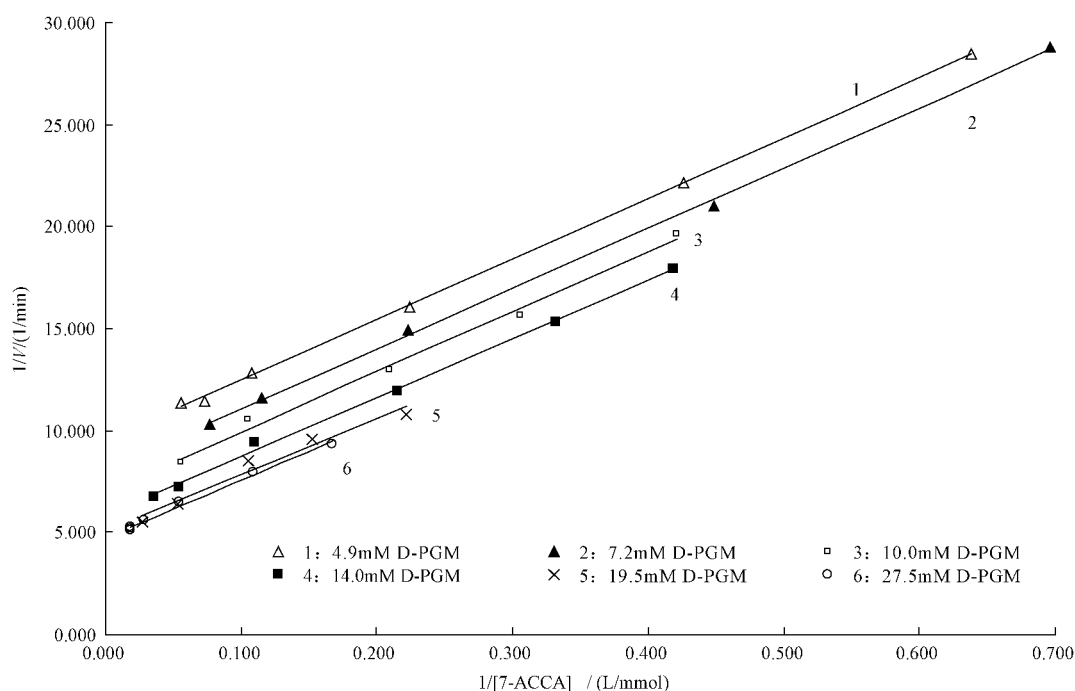


图 4 AEH 催化合成头孢克洛动力学 Lineweaver-Burk 作图

Fig. 4 Lineweaver-Burk plot for kinetics of cefaclor synthesis catalyzed by AEH. Lines from 1 to 6 represent different D-PGM concentrations respectively.

3 讨论

目前酶法合成 β -内酰胺类抗生素涉及 3 种酶, 即青霉素酰化酶、头孢菌素酰化酶和 α -氨基酸酯水解酶, 统称为 β -内酰胺酰化酶, 其中以青霉素酰化酶研究最为广泛, 是 β -内酰胺类抗生素酶法合成工业化生产主要酶。1972 年 Takahashi 等^[16]首次报道了假单胞菌科的一些菌株不能利用苯甘氨酸甲酯和 6-氨基头孢烷酸 (6-APA) 合成青霉素, 但能催化 7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA) 和 α -氨基酸酯合成头孢氨苄。他们继续研究了 *Acetobacter turbidans* ATCC9325 催化合成 β -内酰胺类抗生素的底物特异性, 发现它在合成头孢菌素类抗生素时, 酰基供体需要有游离的 α -氨基, 并且它催化水解反应的优先底物是酯。根据酶的命名规则, 能同时催化水解和转移反应的酶被命名为水解酶类, 因此他们将产生的酶命名为 α -氨基酸酯水解酶^[9]。此后对 α -氨基酸酯水解酶的研究逐渐增多, 但有关红纹

黄单胞菌 α -氨基酸酯水解酶的报道仍甚少。本文基于我所曾与俄联邦国家科学中心工业微生物研究所的合作项目, 对诱变的红纹黄单胞菌产生的 α -氨基酸酯酰化酶进行了分离纯化, 并研究了其酶学性质。

Krest'ianova 等^[17]报道 *X. rubrilineans* 的 AEH 等电点为 6.8, 最适 pH 为 6.5, 在 pH4.0 - 8.0 稳定, 且此酶是同源四聚体, 全酶分子量为 270 - 280 kDa, 亚基分子量为 $70 \pm 2 \text{ kDa}$ 。通过研究, 我们建立了一套分离纯化红纹黄单胞菌 AEH 的方案, 获得电泳纯 AEH 比活力约为 687 U/mg, 回收率高达 32%, 明显高于其他报道^[15, 18-19], 这有益于此酶的工业化生产。

我们的研究表明 AEH 最适 pH 为 6.8, 由于 β -内酰胺母核及 β -内酰胺类抗生素在酸性条件下更稳定^[20-21], 因此在 β -内酰胺类抗生素酶法合成中 AEH 比 PA 更有利。AEH 热稳定性实验结果表明低于 35℃ 时, AEH 稳定性良好。AEH 最适温度为

40 - 42°C, 高于其他文献报道的最适反应温度^[10-11, 18-19, 22], 这表明来源于不同菌种的 AEH 在其性质方面有一定的差异, 反应温度升高将增加酶促反应速率, 因此本文研究的 AEH 在工业化应用中更具有优势。在实验中我们发现 Ca^{2+} 对酶活有一定的促进作用, Barends 等^[23] 发现黄单胞菌属 AEH 的结构中有一个 Ca^{2+} 结合位点, Ca^{2+} 与 AEH 的 Try318、Glu322、Asn331、Asp325 和 Asn328 形成一个 Ca^{2+} 结合环, 说明 Ca^{2+} 在 AEH 中具有重要的作用, 这很好地解释了我们的结果。

Polderman - Tijmes 等^[23-24] 研究了 AEH 的催化基团及晶体结构, 结果表明 AEH 是一种含有 Ser-His-Asp 催化三联体的丝氨酸蛋白酶, 在活性部位除含有催化三联体外, 还有一个氧负离子孔和带负电的羧酸簇。在他们建立 *X. citri* AEH 催化氨苄青霉素水解模式中, 底物的酰胺键先接近 Ser174, 然后酰胺中的氧进入到氧负离子孔, 与 Tyr175 氨基和 Tyr82 羟基形成氢键, 接着底物中的 α -氨基与带负电的羧酸簇通过静电相互作用, β -内酰胺母核被释放, 最后苯甘氨酸与 AEH 部分芳香族氨基酸产生芳香环堆积作用。从这个模式可以看出, AEH 对 β -内酰胺母核没有特异性, AEH 的底物特异性与带负电的羧酸簇有关。他们后来的研究证明在靠近活性位点 Ser 处有一个酰基结合口袋, 在这里形成酰基-酶复合物^[25]。比较 D-HPGM、D-PGM 和头孢克洛的结构, D-HPGM 苯环多一个羟基, 因此我们可以推测在形成酰基-酶复合体时, AEH 在催化空间位阻大的底物时效率低, 这充分地解释了我们得到的有关 AEH 催化 D-PGM、D-HPGM 和头孢克洛水解的动力学参数 k_{cat}/K_m 值。和 AEH 催化水解反应相同, 在催化合成反应中也会形成酰基-酶复合物, 因此, 我们进一步推测 AEH 在催化 β -内酰胺类抗生素合成时, 更容易利用空间位阻小的酰基供体。研究表明 AEH 催化双底物反应时, 酶与第一个底物结合后释放第一个产物, 然后再与第二个底物结合, 生成第二个产物^[26-27], 由此我们可以判断 AEH 催化双底物反应的机制为乒乓机制。在本文 AEH 催化合成头孢克洛动力学参数的研究中, 通过双倒数作图得到 1 组斜率为 28.5 ± 1.1 的直线。在 AEH 催化头孢克洛合成时, 由于操作误差使得同组固定的 D-PGM

浓度不完全相同, 因此在作图时存在一定误差。实验结果表明这组直线斜率的相对误差小于 4%, 因此我们可以将此组直线判断为近似平行直线。根据双底物动力学图可以判断酶促反应的催化机制^[28], 因此我们的研究表明 AEH 催化双底物反应的机制为乒乓机制。

参考文献

- [1] Blum JK, Deaguero AL, Perez CV, Bommarius AS. Ampicillin synthesis using a two-enzyme cascade with both α -amino ester hydrolase and penicillin G acylase. *ChemCatChem*, 2010, 2: 987-991.
- [2] 吴伟波, 王旭, 王娜, 吴起, 林贤福. β -内酰胺类抗生素酶促合成新进展. *有机化学 (Chinese Journal of Organic Chemistry)*, 2006, 26(3): 292-298.
- [3] Bruggink A, Roos EC, Vroom ED. Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics. *Organic Progress Research & Development*, 1998, 2(2): 128-133.
- [4] Yang L, Wei DZ. Enhanced enzymatic synthesis of a semi-synthetic cephalosprin, cefaclor, with in situ product removal. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1195-1198.
- [5] Valencia P, Flores S, Wilson L, Illanes A. Effect of internal diffusional restrictions on the hydrolysis of penicillin G: reactor performance and specific productivity of 6-APA with immobilized penicillin acylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(2): 426-441.
- [6] Zhao J, Wang Y, Luo G, Zhu S. Immobilization of penicillin G acylase on macro-mesoporous silica spheres. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 529-535.
- [7] Harold MM, Theodorus JGM. Process for the synthesis of cefaclor. US: 20080050771A1. 28-02-2008.
- [8] Wegman MA, Janssen MHA, Rantwijk F, Sheldon RA. Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2001, 343(6-7): 559-576.
- [9] Takahashi T, Yamazaki Y, Kato K. Substrate specificity of an α -amino acid ester hydrolase produced by *Acetobacter turbidans* A. T. C. C. 9325. *Biochemical Journal*, 1974, 137: 497-503.
- [10] Kato K, Kawahara K, Takahashi T, Kakinuma A. Substrate specificity of α -amino acid ester hydrolase from

- Xanthomonas citri*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44 (5): 1075-1081.
- [11] Kato K, Kawahara K, Takahashi T, Igarasi S. Enzymatic synthesis of amoxicillin by the cell-bound α -amino acid ester hydrolase of *Xanthomonas citri*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44 (5): 821-825.
- [12] Blum JK, Bommarius AS. Amino ester hydrolase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ATCC 33913 for enzymatic synthesis of ampicillin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 67: 21-28.
- [13] 寇秀芬, 王祯祥. 铜绿假单胞菌完整细胞 α -氨基酸酯水解酶的性质. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1988, 28 (2): 143-148.
- [14] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] Kato K, Kawahara K, Takahashi T, Kakinuma A. Purification of α -amino acid ester hydrolase of *Xanthomonas citri*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44 (5): 1069-1074.
- [16] Takahashi T, Yamazaki Y, Kato K, Isona M. Enzymatic synthesis of cephalosporins. *Journal of the American Chemical Society*, 1972, 94 (11): 4035-4037.
- [17] Krest'ianova IN, Uvarov NN, Rudenskaia GN, Tsibanov VV, Vasil'eva LI, Stepanov VM. Intracellular aminopeptidase from *Xanthomonas rubrilineans*, hydrolyzing alpha-amino acid esters and cefalexin. *Biokhimiia*, 1990, 55: 2226-2238.
- [18] Kim DJ, Byun SM. Purification and properties of ampicillin acylase from *Pseudomonas melanogenum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1040: 12-18.
- [19] Blinkovsky AM, Markaryan AN. Synthesis of β -lactam antibiotics containing α -aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalyzed by D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15: 965-973.
- [20] Shewale JG, Sudhakaran VK. Penicillin V acylase: its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20: 402-410.
- [21] Schroën CGPH, Nierstrasz VA, Kroon PJ, Bosma R, Janssen AEM, Beefink HH, Tramper J. Thermodynamically controlled synthesis of β -lactam antibiotics. equilibrium concentrations and side-chain properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 24: 498-506.
- [22] 王嫩芝, 王祯祥, 乐华爱, 韩文珍, 矫庆华. α -氨基酸酯水解酶产生菌的筛选及其合成头孢立新的研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1990, 30 (3): 238-241.
- [23] Barends TRM, Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, Hensgens CMH, Vries EJ, Janssen DB, Dijkstra BW. The sequence and crystal structure of the α -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of β -lactam antibiotic acylases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (25): 23076-23084.
- [24] Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, Vries EJ, Merode AEJ, Floris R, Laan JM, Sonke T, Janssen DB. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding an α -amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (1): 211-218.
- [25] Barends TRM, Polderman-Tijmes JJ, Jekel PA, Williams C, Wybenga G, Janssen DB, Dijkstra BW. *Acetobacter turbidans* α -amino acid ester hydrolase how a single mutation improves an antibiotic-producing enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (9): 5804-5810.
- [26] Kato K. Kinetics of acyl transfer by α -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44 (5): 1083-1088.
- [27] Polderman-Tijmes JJ. Biochemical characterization of α -amino acid ester hydrolases. Doctor degree of Rijksuniversiteit Groningen, 2004.
- [28] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 第三版 (上册). 北京: 高等教育出版社, 2002: 363-367.

Purification and characterization of α -amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas rubrilineans*

Feng Qu¹, Baxian Yi², Lijuan Ye^{1,3*}

¹Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610052, China

²China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

³Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610052, China

Abstract: [Objective] The intracellular α -amino acid ester hydrolase (AEH) from *Xanthomonas rubrilineans* was purified and characterized. [Methods] AEH was extracted by butyl acetate, and then purified to electrophoretic homogeneity by calcium phosphate gel precipitation, ammonium sulfate fraction precipitation, anion exchange with DEAE Sephadex A-50, cation exchange with CM cellulose 52, and Sephadex G 200 column chromatography. [Results] The subunit molecular mass of AEH was 70 kDa by SDS-PAGE. The optimal reaction pH for cefaclor synthesis was 6.8, and optimal temperature was 42 °C. The enzyme was stable between pH 5.0 and 8.0, and at 35 °C. The enzyme activity was enhanced by Mn^{2+} and Ca^{2+} , however was strongly inhibited by Cu^{2+} , Fe^{2+} and high concentration of acetone. The kinetic parameters that the enzyme hydrolyzed D-Phenylglycine methyl ester, D-Hydroxyphenylglycine methyl ester and cefaclor were determined, and the values of k_{cat}/K_m were 123.7 ± 3.7 , 2.9 ± 0.6 and 101.3 ± 2.1 $mmol^{-1} \cdot s^{-1} \cdot L$ respectively. The k_{cat}/K_m values indicated that the enzyme hydrolyzed D-Phenylglycine methyl ester more efficiently than other substrates. The mechanism of enzymatic reaction with bi-substrates by AEH is Ping-Pong kinetics, and the k_{cat} value that the enzyme catalyzed the synthesis of cefaclor is 547.3 ± 38.2 s^{-1} . [Conclusion] The studies of AEH from *Xanthomonas rubrilineans* were rare, and our research may provide an important basis for industrial application of AEH for beta-lactam antibiotics synthesis.

Keywords: α -amino acid ester hydrolase, beta-lactam antibiotics, purification, enzyme characterization, Ping-Pong kinetics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science and Technology Major Project of China (2011ZX09401-403), by the Research Projects of Sichuan International Cooperation and Communication (2010HH0036), by the Research Projects of Sichuan International Cooperation (2011HH0013) and by the Chengdu Municipal Science and Technology Plan Project (10GGYB297SW-482)

* Corresponding author. Tel: +86-28-84216035; Fax: +86-28-84333218; E-mail: lisaleaf@gmail.com

Received: 29 December 2011 / Revised: 6 March 2012