

## 固定化在多孔玻璃上的青霉素酰化酶性质

姜卫平\* 刘慧贞\*\* 孙万儒

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从大肠杆菌AS 1.76提取青霉素酰化酶, 经纯化, 用戊二醛固定在氨基硅烷化多孔玻璃上。初步摸索了固定化条件。固定化酶的米氏常数为  $7.7 \times 10^{-4} M$ , 比自然酶大10倍; 但竞争性抑制剂苯乙酸对固定化酶和自然酶的抑制常数基本相同; 固定化酶的最大反应速度为  $5.8 \times 10^{-2} \mu M/min$ , 比自然酶大2.5倍; 水解NIPAB的最适pH为7.0, 比自然酶低1个pH单位; 最适反应温度比自然酶低10℃; 固定化酶在pH 5.8—8.0之间较稳定, 较自然酶的范围略窄; 固定化酶在40℃以下稳定, 而自然酶在45℃以下稳定。

关键词 青霉素酰化酶; 多孔玻璃

青霉素酰化酶在β-内酰胺类抗生素的半合成生产上具有重要作用。固定化为其大规模工业应用奠定了基础<sup>1-4</sup>。

由于青霉素酰化酶的作用底物青霉素钠或钾盐和苯乙酰基去乙酰氧基头孢烷酸等都具有负电荷, 固定化作用, 载体性质等对酶性质会产生什么影响是个重要问题。本文目的在于对此有一简单了解。

### 材料和方法

#### (一) 材料

1. 菌种和培养: 大肠杆菌 AS 1.76 为本实验室筛选, 培养方法见前报<sup>5</sup>。

2. 试剂: 多孔玻璃为上海硅酸盐研究所提供; 戊二醛为英国Koch-Light Laboratories LTD产品分装; 羧甲基纤维素CM-32为Whatman产品; 2-硝基-5-苯乙酰胺基苯甲酸(下简称NIPAB)为本实验室合成, 其它试剂均为以分析纯市售商品。

#### (二) 方法

1. 酶的提取: 摇瓶发酵液于4000转

/min离心20min, 沉淀用生理盐水洗涤二次, 离心得菌体, 置于冰箱中保存。

用pH7.7, 0.05M的磷酸缓冲液配制50%的菌悬液, 用连续超声波破碎仪循环破碎15次, 共45min, 再经12,000转/min离心得上清液。将20%的硫酸链霉素溶液加到离心上清液中, 至浓度为1%。沉淀离心除核酸; 于上清液中加入固体硫酸铵到40%饱和度, 离心, 上清液继续加硫酸铵至60%饱和度。离心所得沉淀用适量蒸馏水溶解后, 用pH7.7、0.01M磷酸缓冲液透析24h; 粗酶液用CM-32羧甲基纤维素吸附, 批式洗脱, 洗脱液经反渗透法浓缩至一定体积, 留作固定化使用。

2. 固定化方法: 按Weetall方法进行<sup>6-7</sup>。10g多孔玻璃加到预先用6N HCl调节至pH3.5的100ml10%的氨基丙基三乙氧基硅烷水溶液中, 于75℃下加热回流3h, 然后用蒸馏水洗几次, 于120℃干燥4h。然后加到200ml pH7.2—7.5含2.5%

本文于1984年12月11日收到。

\* 北京师范大学生物系八四年毕业生

\*\* 华北药厂抗生素研究所

戊二醛的 0.1M 磷酸缓冲液中, 室温反应 1 h, 其中包括 30min 抽气时间。然后用蒸馏水彻底洗涤所得载体。

将酶液用冷的 0.04M, pH7.2—7.5 磷酸缓冲液适当稀释, 搅拌下加到活化载体中, 维持反应混合物 pH 7.2—7.5。于 4°C 下保持 15h, 用定量蒸馏水洗涤几次, 收集洗涤液, 制备的固定化酶于 pH7.2 缓冲液中, 4—8°C 下保存。

3. 蛋白测定: 按 Folin 酚法测定蛋白含量<sup>81</sup>, 用牛血清蛋白作标准蛋白。

4. 自然酶活力测定: 取 1.0ml 6 mM 的 NIPAB 溶液 (用 0.05M, pH7.7 磷酸缓冲液配制), 加入 1.8ml 同样缓冲液, 于 37°C 下保温, 待温度平衡后加入 0.2ml 酶液, 反应 10min, 立即加入 2.0ml 0.5M 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 摇匀以终止反应, 于波长 405nm 下测定吸光度, 以零时反应物作

对照。

5. 固定化酶的活力测定: 取 50mg 固定化酶加到 10ml 0.05M pH7.7 磷酸缓冲液中, 于 37°C 保温至平衡, 加入 5.0ml 用上述缓冲液配制的 6mM NIPAB 溶液。反应 5 min, 立即取 3.0ml 反应物, 加到 2.0 ml 0.5M 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中, 同时以零时反应物作对照, 在 405nm 下测定吸光度。

在上述条件下, 每分钟催化产生 1μM 的 2-硝基 -5- 氨基苯甲酸所需的酶量为一个酶活力单位。

## 结 果

### (一) 酶的分离纯化

结果如表 1。CM-32 羧甲基纤维素处理可大幅度提高酶的比活。

表 1 酶的分离纯化  
Table 1 Separation and purification of penicillin acylase

步骤 step	体积 Volumn (ml)	酶活力 Enzyme activity (u)	蛋白量 Amount of protein (g)	比活 Specific activity (u/g)	回收 Recovery (%)
Cell 菌体	750	4680			100
超声破碎上清液 Supernatan of disrupted cell	750	4060	55.5	73.2	87
除核酸上清液 Supernatant after moved nucleic acid	400	2882	32.7	74.0	62
60% 硫酸饱和度沉淀水溶液 Solution of precipitate with 60% saturation degree of (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	65	1647	15.1	91.6	35
CMC 处理浓缩液 Solution after treatment with CMC	29	1410	0.74	1600	30

## (二) 固定化条件

1. pH的影响: 在不同pH条件下, 将酶偶联到活化的多孔玻璃上, 其结果如表2。

由结果可知固定化最适pH为7.5。

2. 给酶量的影响: 在pH7.7下, 用不同酶量与活化多孔玻璃进行偶联, 结果列于表3。说明固定化酶活力, 偶联酶量和蛋白量随加入的酶和蛋白量增加而增加。

## (三) 固定化酶和自然酶性质

1. 酶反应的最适pH: 以NIPAB为底物, 在不同pH条件下, 分别测定固定化酶和自然酶的活力, 结果如图1所示。自然酶的最适pH为8.0, 固定化酶为7.0, 比自然酶低1个pH单位。

2. 酶反应的最适温度: 在不同温度下, 以NIPAB为底物, 测定固定化酶和自

表2 pH对青霉素酰化酶固定化的影响  
Table 2 Effect of pH on immobilization of penicillin acylase

偶联 pH	偶联酶量 Coupled enzyme (u/g)	偶联蛋白量 Coupled protein (mg/g)	固定化酶活力 Activity of immobilized enzyme (u/g)
6.5	156	42	6.8
7.0	180	44	8.4
7.5	184	56	9.6
8.0	174	46	7.2
8.5	170	41	2.4

给酶276单位, 总蛋白量178mg。

然酶活力, 如图2所示, 固定化酶的最适反应温度为40°C, 自然酶为50°C, 固定化酶最适反应温度比自然酶低10°C。

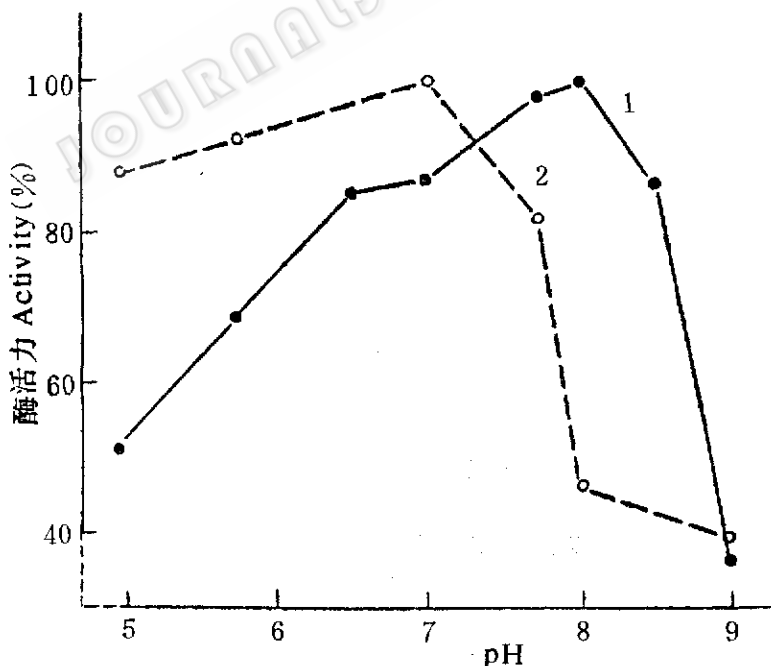


图1 酶活力与pH的关系

Fig. 1 Effect of pH on enzyme activity

1. 自然酶 Native enzyme

2. 固定化酶 Immobilized enzyme

表 3 加酶量对固定化酶活力的影响

Table 3 Dependence of activity of immobilized enzyme on the amount of enzyme

加入酶量 Amount of added enzyme (u/g)	加入蛋白量 Amount of added protein (mg/g)	偶联酶量 Coupled enzyme (u/g)	偶联蛋白量 Cou'ed protein (mg/g)	固定化酶活力 Activity of immobilized enzyme (u/g)
214	155	48	29	4.6
260	183	66	67	5.6
324	230	98	93	7.0
390	277	128	120	9.6
430	307	146	124	9.4

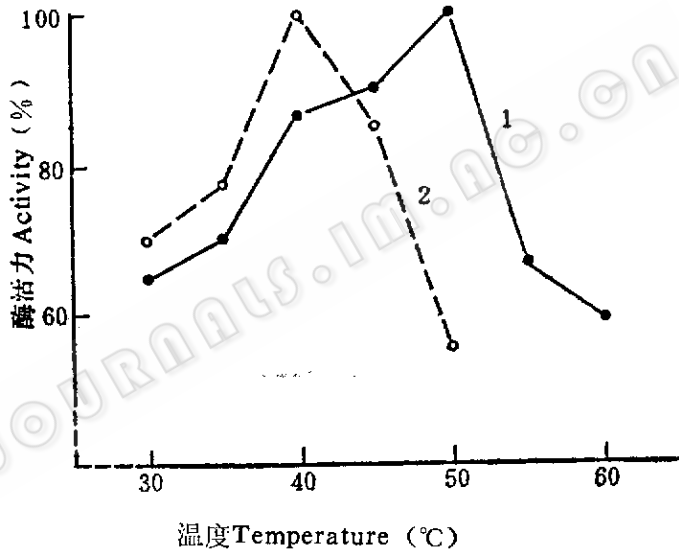


图 2 反应温度对酶活力的影响

Fig. 2 Dependence of enzyme activity on reaction temperature

1. 自然酶 Native enzyme      2. 固定化酶 Immobilized enzyme

### 3. 酶的稳定性

(1) pH稳定性：固定化酶和自然酶分别在无底物情况下于不同pH缓冲液中在37°C保温2h，然后用NIPAB法测定酶活力，结果如图3所示。自然酶在pH5-8.3范围内基本稳定，而固定化酶的范围小得多，在pH6.5-7.5范围内酶活力保留90%以上。

(2) 热稳定性：自然酶和固定化酶在pH7.7, 0.02M磷酸缓冲液中，在不同温度下保温2h后测定酶活力，由图4可看

到，在无底物情况下，自然酶在45°C以下稳定，固定化酶在40°C以下稳定。比自然酶低5°C。

4. 米氏常数和最大反应速度：以不同浓度的NIPAB为底物，在pH7.7, 0.05M磷酸缓冲液中分别测定固定化酶和自然酶的反应速度，按双倒数法作图，如图5。自然酶的 $K_m$ 为 $7.9 \times 10^{-5} M$ ， $V_{max}$ 为 $2.3 \times 10^{-2} \mu M/min$ ，而固定化酶 $K_m$ 为 $6.9 \times 10^{-4} M$ ， $V_{max}$ 为 $5.8 \times 10^{-2} \mu M/min$ 。

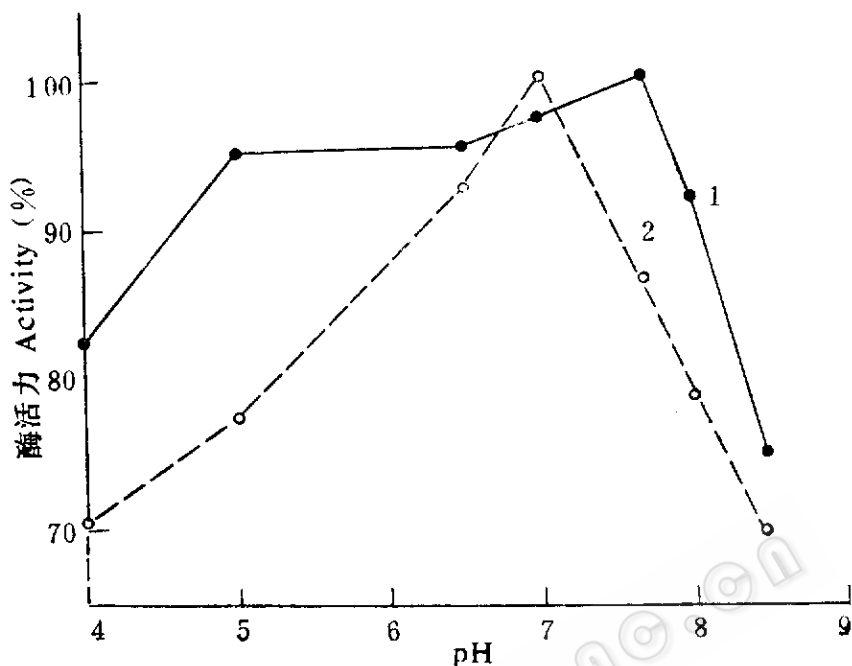


图3 pH对酶稳定性的影响

Fig. 3 Effect of pH on stability of enzyme

1. 自然酶 Native enzyme 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

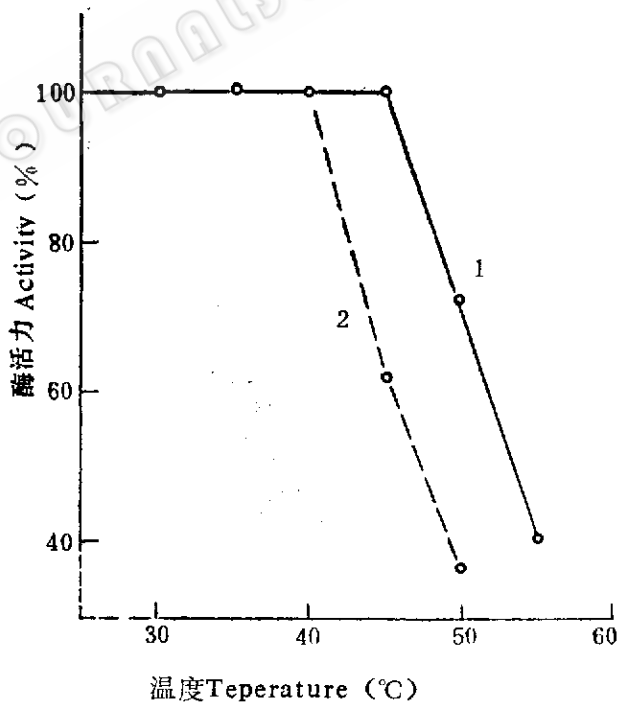


图4 温度对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on stability of enzyme

1. 自然酶 Native enzyme 2. 固定化酶 Immobilized enzyme

5. 苯乙酸对酶的抑制常数：自然酶和固定化酶分别在含有不同量苯乙酸的pH7.7, 0.05M磷酸缓冲液中于37°C下保温10min, 然后加入NIPAB溶液使之达到

图6所示浓度, 测定反应速度。由图6可知苯乙酸为竞争性抑制剂, 对固定化酶的抑制常数为 $1.5 \times 10^{-3} M$ , 对自然酶为 $3.0 \times 10^{-3} M$ 。

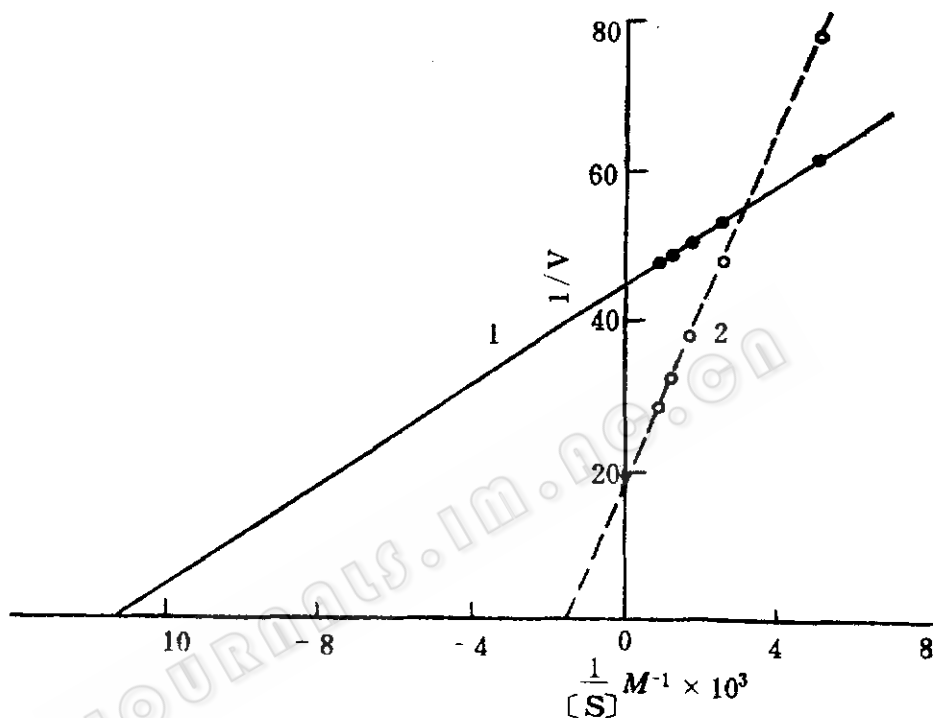


图5 自然酶和固定化酶的Lineweaver-Buck图

Fig. 5 Lineweaver-Buck plots of native and immobilized enzyme

1. 自然酶 Native enzyme

2. 固定化酶 Immobilized enzyme

## 讨 论

(一) 苯乙酸作为竞争性抑制剂, 对自然酶和固定化酶均有一定程度的抑制作用, 但它又是酶形成的诱导物, 说明苯乙酸在青霉素酰化酶生成和生理作用调节中起重要作用。

(二) 固定化酶的最适pH和温度及稳定性均比自然酶低。其主要原因可能是多孔玻璃经氨烷基硅烷化后, 表面带有较多的氨基, 使酶的微环境偏碱, 从而使

酶蛋白分子相应带有较多的负电荷, 这对保持酶蛋白分子结构稳定性不利。另外, 偏碱的微环境要求外部溶液有较低的pH, 以便维持酶处于所需的最适反应pH环境中, 表现为酶最适反应pH降低。

(三) 固定化酶与自然酶相比,  $K_m$ 大10倍,  $V_{max}$ 大2.5倍。酶固定化后对底物的亲和力减小, 是由于电荷作用和空间障碍等的综合作用结果。同时这些因素也使固定化酶与底物形成的中间过渡状态物没有自然酶和底物形成稳定, 表现为 $V_{max}$ 增大。利用多孔玻璃为载体制备的固定化

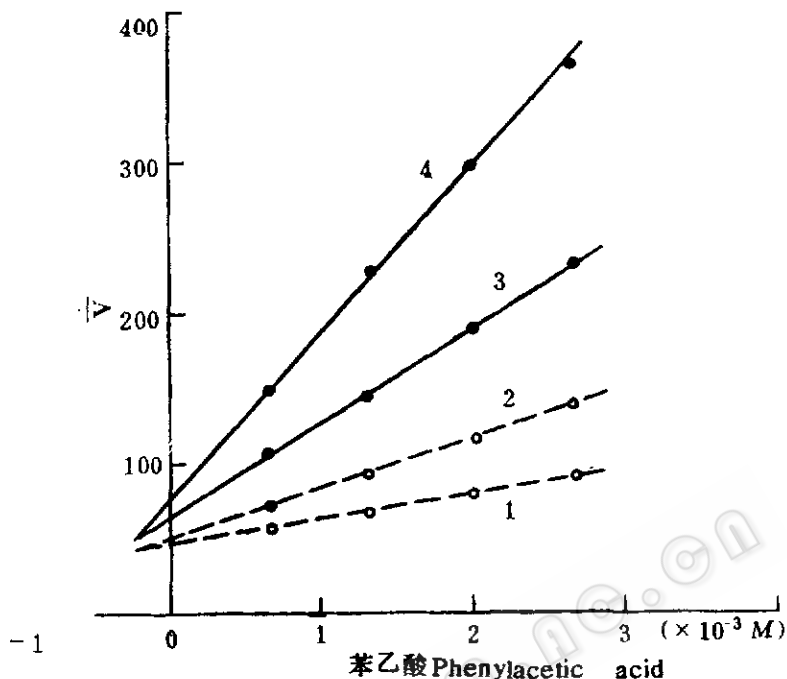


图 6 苯乙酸对自然酶和固定化酶的抑制作用

Fig. 6 Inhibition of phenylacetic acid for native and immobilized enzyme

1,2 自然酶 Native enzyme

1.  $[S] = 6 \times 10^{-4} M$

2.  $[S] = 3 \times 10^{-4} M$

3,4 固定化酶 Immobilized enzyme

3.  $[S] = 6 \times 10^{-4} M$

4.  $[S] = 3 \times 10^{-4} M$

青霉素酰化酶虽对底物亲和力比自然酶低,但能提高酶催化的反应速度,有利发挥酶反应效率。

(四) 用本法制备的固定化青霉素酰

化酶的相对活力和活力回收均低。其原因是能结合酶的活性基团密度过大造成酶分子多点结合而失活。适当改变酶偶联条件,可获得活力高的固定化酶。

### 参 考 文 献

- [1] Vandumme, E. J. and J. P. Voett; *Advances Appl. Microbiol.*, 17:311-361, 1974.
- [2] Abbott, B. J.; *Appl. Microbiol.*, 20:203-252, 1976.
- [3] 孙万儒等; *微生物学报*, 20(4):407-414, 1980.
- [4] Lagerlof, E. et al.; *Methods Enzymology*, Vol.44, Ed. by Mosback K., Academic press, New York, pp759-768.
- [5] 张启先等; *微生物学报*, 19(3), 302-308:1979.
- [6] Weetall, H.H. and N. B. Havawala; *Enzyme Engineering*, Ed by Wingard, Jr. L. B. New York, 1972, pp.241-266.
- [7] Li Gaoxing, et al.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 7, 325-341, 1982.
- [8] 北京大学生化教研室; *生物化学实验指导*, 人民出版社, 北京, 1979, pp.73-74.

## PROPERTIES OF IMMOBILIZED PENICILLIN ACYLASE ON THE POROUS GLASS

Jiang Weiping   Liu Huizhen   Sun Wanru

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Separation and purification of penicillin acylase from *E. coli* AS 1.76, conditions of preparation and properties of immobilized enzyme on porous glass which was aminoalkylsilicated and activated with glutaraldehyde were investigated.

$K_m$  of immobilized penicillin acylase was  $7.7 \times 10^{-4} M$  which was 10 times higher than native enzyme. Phenylacetic acid was a competitive inhibitor for both immobilized and native enzyme, and inhibit constant for both of them were nearly the same.  $V_{max}$  of immobilized enzyme was  $5.8 \times 10^{-2} M/min$  which was 2.5 times higher than native one. The optimum pH of immobilized enzyme was 1.0 pH unit lower than native enzyme when NIPAB was used as substrate. The optimum temperature of immobilized and native enzyme were  $40^\circ C$  and  $50^\circ C$ , respectively. Immobilized enzyme was stable under  $40^\circ C$  and native enzyme was stable under  $45^\circ C$ . In other words, its stability decreased when penicillin acylase was immobilized on the porous glass containing amino groups. All of those phenomena were due to the microenvironment changing which around enzyme molecule by amino groups on the surface of support.