

尖镰孢胞外青霉素 V 酰化酶的产生

冯 瑛* 崔福绵

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 由腐殖土中分离出一株产胞外青霉素 V 酰化酶的尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*), 编号 FP941。研究了该菌在液体培养基中产胞外青霉素 V 酰化酶的条件。在以 10% 麦麸为碳源的培养基中, 添加氮源能促进酶的形成。无机氮源优于有机氮源。 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的促进效果最佳, 草酸铵次之, 用量均为 1%。为提高产酶量, 培养基中添加诱导物是必要的。苯氧乙酸的诱导效果最佳, 用量为 0.1%, 其次是青霉素 V, 用量为 0.3%。最适培养条件为: 培养基起始 pH7.7, 28℃ 振荡培养 5d。以青霉素 V 为作用底物, 于 pH7.0, 50℃ 测定, 培养滤液酶活力为 3.0u/ml。培养滤液中未检出 β -内酰胺酶。

关键词 青霉素 V 酰化酶, 尖镰孢

青霉素 V 酰化酶 (Penicillin V acylase, EC3. 5. 1. 11) 主要用于制备半合成抗菌素工业生产所用初始化合物 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 和 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA)^[1, 2]。

青霉素 V 酰化酶多由放线菌和真菌所产生, 并且所见报道中只有淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*)^[3]、糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*)^[4] 和镰孢 (*Fusarium* sp.)^[5] 产生胞外青霉素 V 酰化酶。有的镰孢不产生使 β -内酰胺环破坏的 β -内酰胺酶^[5], 因此引起重视。国外已工业规模用镰孢生产青霉素 V 酰化酶^[1]。作者从腐殖土中分离出一株尖镰孢, 编号 FP941。该菌所产胞外青霉素 V 酰化酶活力高于文献^[5]所报道, 并且酶在 pH7.0 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。该菌还具有不产生 β -内酰胺酶的特点。本文报道尖镰孢 FP941 胞外青霉素 V 酰化酶的产生条件。

1 材料和方法

1.1 菌种

尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) FP941, 系本实验室分离得到。该菌在马铃薯葡萄糖琼脂斜面上, 28℃ 培养 5d 后使用。

1.2 化学试剂

苯氧乙酸 (POAA) 和青霉素 V (PenV) 均为 Sigma 公司产品。其它试剂均为国内市售商品。

1.3 产酶液体培养基和培养条件

250ml 三角瓶装麦麸 4g, 加入 40ml 含 1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.1% POAA 的溶液 (用自来水配制), 用 NaOH 溶液调 pH7.7, 1×10^5 Pa 灭菌 30min。接种斜面菌种, 于旋转式摇床上, 28℃ 振荡 (240r/min) 培养 5d。培养物 8000r/min 离心 20min, 上清液即为青霉素 V 酰化酶溶液。

1.4 青霉素 V 酰化酶活力的测定

吸取 2% PenV 溶液 (以 0.2mol/L, pH7.0 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。采用对二甲氨基苯甲醛 (P-DAB) 试剂法^[6]测定水解产生的 6-APA。

在上述条件下, 每分钟由底物产生 $1\mu\text{mol/L}$ 6-APA 所需酶量定义为一个酶活力单位 (u)。

1.5 β -内酰胺酶活力的测定

* 1995年硕士毕业研究生, 现在美国Wayne州大学学习。

1996-03-05 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

采用 O'Callaghan^[7]等人报道的方法测定。称取产色头孢(Nitrocefin) 5mg, 用 0.5ml 二甲基亚砷溶解后再加磷酸缓冲液 9.5ml。将圆形(直径 1cm)滤纸片浸入这一溶液中, 浸透后取出并真空抽干。吸取待测样品液 5 μ l 于试纸上, 显色 30min, 若试纸由黄变红, 表明有 β -内酰胺酶存在。

2 结果与讨论

2.1 碳源对产酶的影响

变动产酶培养基中麦麸用量, 进行产酶试验。由表 1 结果可以看出, 培养基中含麦麸 12.5% 时酶活力最高。由于在此含量培养基流动性较差, 所以麦麸用量选择 10%, 酶活力为 3.0u/ml。菌产酶水平高于文献[5]所报道的 2.6u/ml。

表 1 麦麸用量对产酶的影响

麦麸用量(%)	0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0
酶活力(u/ml)	0	1.4	2.1	2.3	3.0	3.5	2.1

2.2 氮源对产酶的影响

将产酶培养基中的 1%(NH₄)₂HPO₄ 换成 1% 的不同种类的无机氮源和 1.5% 的不同种类的有机氮源, 进行产酶试验。表 2 结果表明, (NH₄)₂HPO₄ 与草酸铵对产酶的促进效果均佳, 可使酶活力由对照的 0.22u/ml 分别提高到 3.00u/ml 和 2.98u/ml。试验结果还表明, 麦麸在培养基中主要是做为碳源, 仅兼小部分氮源作用。

表 2 氮源对产酶的影响

氮源	酶活力(u/ml)	氮源	酶活力(u/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2	草酸铵	2.9
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.0	乳酸铵	1.7
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.7	尿素(0.2%)	0.3
NH ₄ Cl	1.5	胰蛋白胨(1.5%)	0.8
NH ₄ NO ₃	1.2	牛肉蛋白胨(1.5%)	2.0
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.5	酵母膏(1.5%)	0.7
醋酸铵	0.4	对照	0.2

注: () 中未标明含量的均为 1%

2.3 诱导物对产酶的影响

比较 PenV、POAA、6-APA 和 7-ADCA 的诱导效果。由表 3 测定结果可以看出, 培养基中不添加诱导物, 酶活力很低, 仅为 0.5u/ml; 而添加诱导物, 特别是 POAA, 酶活力可提高 5 倍, 达到 3.0u/ml。这表明, 该菌所产胞外青霉素 V 酰化酶中, 诱导型的居多, 组成型的居少。PenV 也有较强的诱导作用, 而 6-APA 和 7-ADCA 则未显示出诱导能力。

表 3 不同诱导物对产酶的影响

诱导物	用量(%)	酶活力(u/ml)
Pen V	0.3	2.8
6-APA	0.2	0.5
POAA	0.1	3.0
7-ADCA	0.2	0.5
对照	0	0.5

2.4 培养基起始 pH 对产酶的影响

产酶培养基用 NaOH 和 HCl 调成不同 pH, 进行产酶试验。由图 1 结果可以看出, 该菌产酶适宜起始 pH 范围为 7.5~8.0, 最适起始 pH 为 7.7(灭菌后为 7.2)。

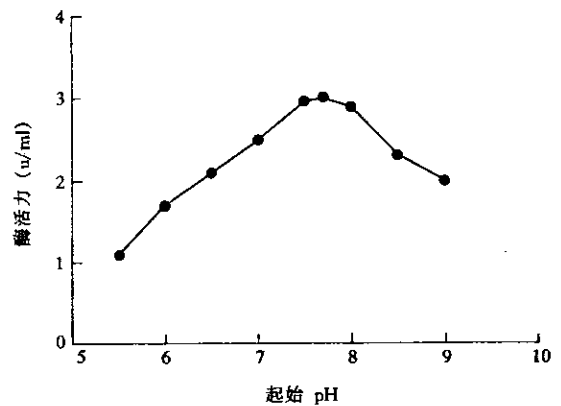


图 1 培养基起始 pH 对产酶的影响

2.5 培养温度对产酶的影响

在不同温度下进行培养。测定结果表明(图 2), 培养温度对产酶影响较大, 适宜温度范围为 26~28 $^{\circ}$ C, 最适温度为 28 $^{\circ}$ C。

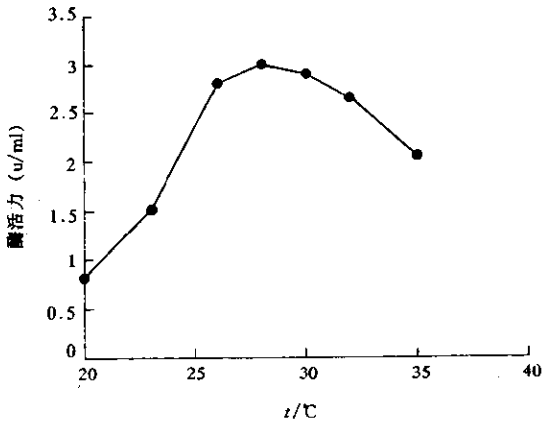


图2 培养温度对产酶的影响

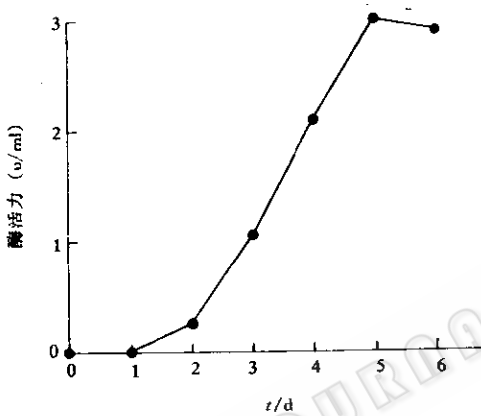


图3 产酶过程曲线

2.6 通气量对产酶的影响

250ml 三角瓶中装不同体积的产酶培养基, 接种后培养 5d。补加培养过程中失去的水量前后分别测定酶活力。由表 4 结果可以看出, 为了获得有较高酶活力的培养液, 250ml 三角瓶装 4g 麦麸及 40ml 营养液较为适宜。此外通过酶活力计算发现, 为了获得较多的酶, 250ml 三角瓶装 5g 麦麸及 50ml 营养液较为适宜。

表4 通气量对产酶的影响

装液量(ml)	20	30	40	50	60
酶活力(u/ml)*	3.1	3.0	3.0	2.7	2.2
	2.0	2.3	2.4	2.3	1.9

* 上一行为补水前酶活力, 下一行为补水后酶活力

2.7 产酶时间过程

于不同培养时间取样, 测定酶活力。由图 3 结果可以看出, 培养 5d 产酶达到高峰。延长培养时间, 酶活力趋于下降。

2.8 培养滤液中各有关酰胺酶活力

分别以 2% Pen V、Pen G、氨苄青霉素为底物, 测定培养滤液中的酶活力。同时定性检测 β -内酰胺酶活力。表 5 结果表明, 培养滤液中不含青霉素 G 酰化酶和氨苄青霉素酰化酶, 并且未检出使 β -内酰胺环破坏的 β -内酰胺酶。

表5 培养滤液中各有关酰胺酶活力的检测

酶名称	青霉素 V 酰化酶	青霉素 G 酰化酶	氨苄青霉素酰化酶	β -内酰胺酶
酶活力(u/ml)	3.0	0	0	未检出

参 考 文 献

- [1] Shewale J G, Sivaraman H. Process Biochemistry, 1989, 24(4): 146~152.
- [2] Vandamme E J. Economic Microbiology volume 5: Microbial Enzymes and Bioconversions(ed. Rose, A. H.), London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 496~504.
- [3] Batchelor F R. Roy Soc Ser, 1961, B 159: 514.
- [4] Stoppock E. Advances in Biotechnology, 1981, 3: 547~552.
- [5] Sudhakaran V K, J G Shewale. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1993, 9(2): 233~239.
- [6] Matsumoto K M. United States Patent, 1984, 4 486 549.
- [7] O'Callaghan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1972, 1: 283~288.

PRODUCTION OF EXTRACELLULAR PENICILLIN V ACYLASE BY *FUSARIUM OXYSPORUM*

Feng Ying Cui Fumian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The extracellular penicillin V acylase-producing strain named *Fusarium oxysporum* FP 941 was obtained from a soil sample. The optimum conditions of enzyme production were investigated

with the strain. Adding nitrogen sources can increase enzyme production for the medium with 10% wheat bran as carbon source. Inorganic nitrogen sources were more effective than organic ones and 1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ was optimal. The second effective was ammonium oxalate. Adding inducers was necessary for enzyme production. Phenoxyacetic acid(0.1%) was the best. Penicillin V (0.3%) was also a good inducer. After cultivating the strain in liquid medium containing wheat bran 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%, phenoxyacetic acid 0.1% (initial pH was 7.7) at 28°C for 5 days, the potency of the crude filtrate acting on penicillin V was 3.0u / ml. β -lactase was not detected in culture filtrate.

Key words Penicillin V acylase, *Fusarium oxysporum*