

产青霉素酰化酶的大肠杆菌 AS1.76 的固定化

孙万儒 王祯祥 张渝英 张启先 王学勤

(中国科学院微生物研究所, 北京)

苏修才 岳年春

(太原制药厂, 太原)

用在有机溶剂中成型的琼脂凝胶包埋, 结合戊二醛处理的方法, 制备产青霉素酰化酶的大肠杆菌 AS1.76 固定化细胞, 其细胞含量可达 50% 以上。固定化细胞水解青霉素 G 钾盐的最适 pH 为 8.0, 比原细胞约高 0.3pH 单位; 最适温度与原细胞一样, 均为 45℃。固定化后, Hg^{++} 对酶抑制作用降低, 但酶对 Fe^{++} 、 Cu^{++} 等金属离子敏感性增加。在无底物情况下, 与原细胞相比, 固定化细胞对 pH 和热的稳定性增加; 4℃ 保存 14 个月无活力损失。固定化细胞装柱, 在 pH7.7, 37℃ 下连续裂解青霉素 G, 转化率达 95% 以上。155 天无明显酶活力损失。

6-氨基青霉烷酸 (简称 6-APA) 是半合成青霉素的最基本原料, 工业上用化学法或酶法裂解青霉素进行生产。

近年来, 已有人报道用固定化青霉素酰化酶方法来生产 6-APA^[1, 2]。由于固定化细胞技术省去了酶的分离纯化和制备工艺, 提高了酶的使用效率和稳定性, 降低了生产成本^[3-7]。因此, 探索利用固定化细胞裂解青霉素, 生产 6-APA 是一件有意义的工作。

本文报道产青霉素酰化酶的大肠杆菌 AS1.76 固定化细胞的制备和性质。

材料和方法

(一) 材料

琼脂 (碎片状) 为青岛海洋渔业公司水产加工厂出品; 戊二醛为英国 Koch-Light Laboratories LTD 产品; 丙烯酰胺, N, N, N', N'-四甲基乙二胺为英国 BDH 厂产品; N, N'-甲撑双丙烯酰胺和过硫酸钾为北京化工厂产品; 青霉素 G 钾盐为华北制药厂的工业品; 2-硝基-5-苯乙酰胺基苯甲酸 (简称 NIPAB) 为本实验室合成, 其它试剂均为

分析纯市售商品。

(二) 菌种和培养

大肠杆菌 AS1.76 为本实验室筛选, 培养方法如前报^[1]。

(三) 固定化方法

摇瓶发酵液于 4000—5000 转/分离心 25 分钟, 得到的细胞, 用生理盐水洗二次, 再于 10,000 转/分离心 15 分钟。得湿细胞, 浸泡在醋酸丁酯中, 于冰箱中保存。

1. 琼脂包埋法: 取一定量湿细胞, 加入适量蒸馏水搅拌成糊状, 保温到 40℃。将冷却到 60℃ 的等量的 8% 琼脂溶液加到细胞糊中, 混合均匀。将细胞-琼脂混合物缓慢倾入到有机溶剂中, 边倒边搅拌, 分散成珠。抽去有机溶剂, 用定量蒸馏水洗涤, 滤干, 得包埋细胞。

2. 戊二醛处理: 于 10 毫升含 1% 戊二醛的磷酸缓冲液中加入 1.0 克包埋细胞, 间歇搅拌, 处理二小时, 然后用蒸馏水洗 3—4 次; 滤干, 得固定化细胞。

3. 聚丙烯酰胺凝胶包埋法: 参照 Saito 等^[4]报道的方法。6.0 毫升细胞悬浮液 (0.25 克/毫

本文于 1979 年 6 月 29 日收到。

升)依次加入 1.13 克丙烯酰胺, 60 毫克 N,N'-甲撑双丙烯酰胺, 0.75 毫升 5% 的四甲基乙二胺, 搅拌均匀, 再加 0.75 毫升 2.5% 的过硫酸铵, 室温聚合。切成 2—4 毫米见方小块, 水洗方法如琼脂包埋法。

(四) 青霉素酰化酶活力测定

1. 原细胞酶活力测定: 按 Kutzbach^[13] 方法略加改进。除反应温度为 37℃ 外, 方法如前报^[12]。

2. 固定化细胞酶活力测定: 称取 200 毫克固定化细胞, 加入 20.0 毫升 pH7.7、0.05M 磷酸缓冲液, 在 37℃ 搅拌保温, 待温度平衡后, 加入 10.0 毫升用上述磷酸缓冲液配制的 NIPAB 溶液(浓度为 6 毫克分子/毫升)。反应五分钟, 立即过滤, 取 3.0 毫升反应液, 加到 2.0 毫升 10% 的碳酸钠溶液中。同时做试剂对照。在 405 毫微米波长下比色。在上述条件下, 每分钟催化产生 1 微克分子的 2-硝基-5-氨基苯甲酸所需的酶量定义为一个酶活力单位。

3. 以青霉素 G 钾盐为底物测定酶活力: 以含有 2% 青霉素 G 钾盐的 pH7.7、0.2M 磷酸缓冲液为底物, 按 1.0 克青霉素 G 钾盐加 7—10 个单位(NIPAB 法测定单位)的原细胞或固定化细胞, 于 37℃ 反应 30 分钟, 用加酸或过滤法停止反应。用碘量法^[10]测定产生的 6-APA。在上述条件下, 每分钟产生 1 毫克分子的 6-APA 所需的酶定义为一个酶活力单位。

(五) 青霉素裂解液的转化率测定

取 2.0 毫升含 2.0% 青霉素 G 钾盐的裂解液, 用 pH6.0 磷酸缓冲液稀释到 50 毫升, 取 2.0 毫升用碘量法测定裂解液的总单位和 6-APA 单位, 按下式计算转化率。

$$\text{转化率} = \frac{6\text{-APA 单位}}{\text{裂解液总单位}} \times 100\%$$

结 果

(一) 固定化细胞的制备

1. 包埋方法的比较: 按 15% 细胞含量, 分别用 4% 琼脂凝胶和 15% 聚丙烯酰胺凝胶制备包埋细胞。分别将其装柱, 在 37℃ 下, 将含有 2% 青霉素 G 钾盐的 pH7.7、0.2M 的磷酸缓冲液连续通过柱反应器, 结果列于表 1。两者比较结果说明琼脂凝胶包埋法比聚丙烯酰胺凝胶包埋法优越。

2. 琼脂凝胶包埋细胞的最适条件

(1) 琼脂浓度的影响: 按 10%(W/W) 细胞含量, 用不同浓度的琼脂凝胶制备包埋细胞, 结果如表 2 所示。在包埋细胞中琼脂浓度增加, 对包埋细胞酶活力、活力回收和包埋率无大影响, 但高浓度的琼脂溶化困难, 包埋细胞的弹性降低。我们认为 4%(W/W) 琼脂较好。

(2) 细胞含量的影响: 分别制备不同细胞含量的 4% 琼脂浓度的包埋细胞, 结果如图 1。包埋细胞酶活力随包埋细胞含量增加而增加, 当细胞含量达到 40% 以后, 包埋细胞酶活力增加渐趋缓慢; 包埋细胞酶活力回收和包埋率随细胞含量增加而降低。50% 细胞含量的包埋细胞酶活力回收在 50% 以上, 包埋率 95% 左右。

3. 不同方法处理的固定化细胞的稳定性比较: 为了增加包埋细胞的稳定性, 用表 3 中所列的方法处理包埋细胞, 然后装

表 1 两种包埋方法的比较

包埋方法	固 定 化 细 胞			柱 反 应 器		
	酶 活 力 (单位/克(湿))	活力回收 (%)	包埋率 (%)	SV (小时 ⁻¹)	转化率 (%)	保留活力 (%)
琼 脂 凝 胶 包 埋 法	0.512	45.50	98.5	0.2—0.3	74—94	61.95 (32 天)
聚 丙 烯 酰 胺 凝 胶 包 埋 法	0.362	32.44	95.6	0.1—0.2	76—95	45.9 (20 天)

表 2 包埋细胞中琼脂浓度对酶活力、活力回收和包埋率的影响

包埋细胞中琼脂浓度(%)	酶活力(单位)	活力回收(%)	包埋率(%)
2	3.29	73.7	96.5
3	3.29	74.0	96.1
4	3.35	74.9	96.7
5	3.32	73.9	97.2
6	3.20	71.2	97.3

包埋细胞用切块法成型, 给酶总单位为 4.63。

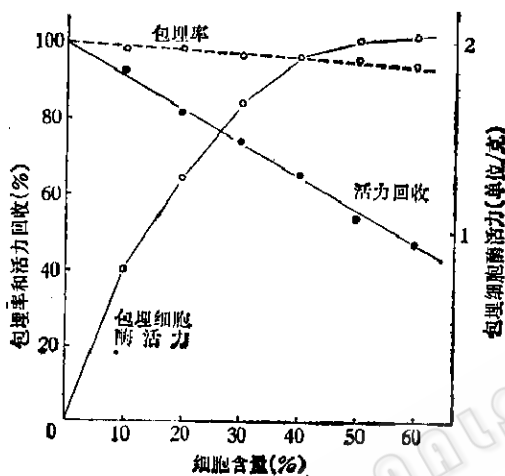


图 1 细胞含量对包埋细胞酶活力、活力回收和包埋率的影响

表 3 不同方法处理的固定化细胞的稳定性比较

处理方法	活力回收(%)	裂解青霉素的转化率(%)	保留活力(%)
未处理	100	53—92	52.3 (25 天)
戊二醛	91.93	71—92	93.56 (25 天)
乙二醛*	97.50	77—89	73.4 (28 天)

* 用 pH4.0, 0.05M 含 2% 乙二醛的醋酸缓冲液, 于室温下处理 4 小时。

柱, 在 37℃, 连续裂解 2% 青霉素 G 钾盐, 测定其稳定性, 结果列于表 3。从表 3 可看出戊二醛和乙二醛处理均有增加固定化细胞的稳定性作用, 但戊二醛效果最佳。

4. 戊二醛处理包埋细胞的最适条件: 制备 4% 琼脂浓度, 50% 细胞含量的包埋细胞, 于冰箱中保存备用。

(1) pH 的影响: 在不同 pH 缓冲液

中, 按标准方法用戊二醛处理包埋细胞, 如图 2。在 pH4.0 下处理制备的固定化细胞酶活力和活力回收最高, 此外, pH 升高或下降, 固定化细胞酶活力和活力回收均降低。

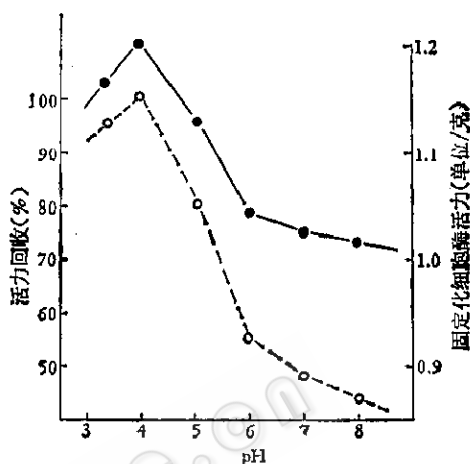


图 2 pH 对固定化细胞酶活力及活力回收的影响

●—● 固定化细胞酶活力
○---○ 固定化细胞酶活力回收
pH3.40—5.03 为 0.05M 醋酸缓冲液
pH6.0—8.0 为 0.05M 磷酸缓冲液

(2) 离子浓度的影响: 除处理的缓冲液离子浓度不同以外, 按标准方法用戊二醛处理包埋细胞, 如图 3 所示。在 0.05—0.1M 离子浓度的缓冲液中用戊二醛处理, 固定化细胞的酶活力回收较高; 在低于 0.05M 离子浓度下处理, 活力回收较低; 而高于 0.05M 离子浓度, 固定化细胞的酶活

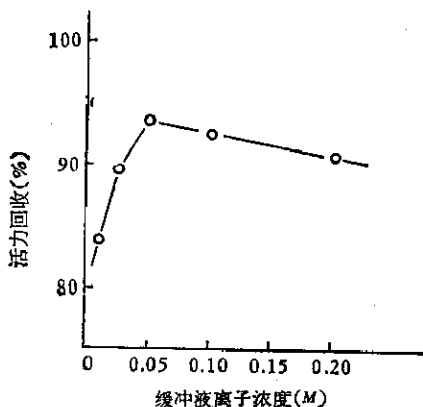


图 3 缓冲液离子浓度对固定化细胞酶活力回收的影响

力回收降低的较少。

(3) 戊二醛用量及浓度的影响：在标准条件下，用不同浓度戊二醛处理包埋细胞，发现随戊二醛浓度增加固定化细胞酶活力和活力回收下降，如图 4。一般选择 0.5—1.0% 戊二醛较合适。

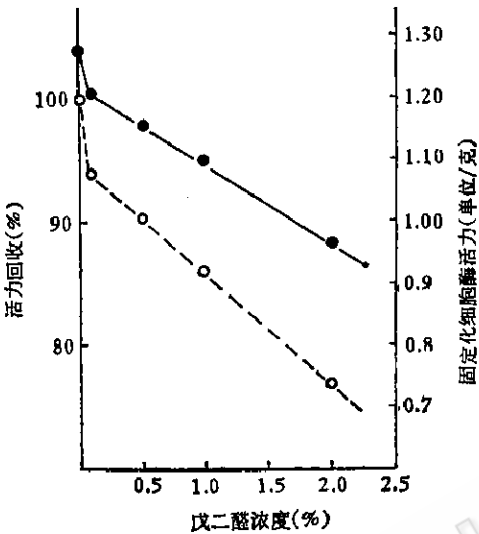


图 4 戊二醛浓度对固定化细胞酶活力和活力回收的影响

●——● 固定化细胞酶活力
○---○ 固定化细胞酶活力回收

用不同体积的含 0.5% 戊二醛的 pH

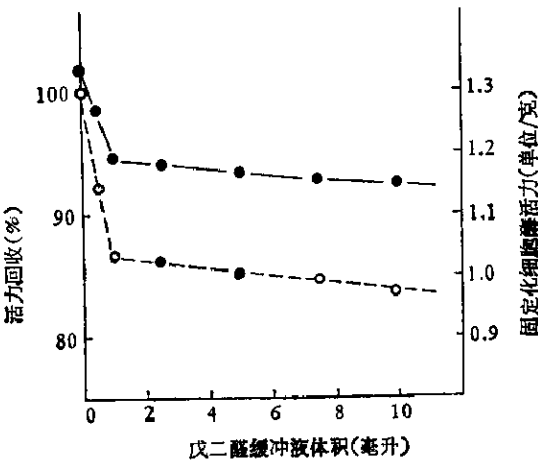


图 5 戊二醛缓冲液用量对固定化细胞酶活力及活力回收的影响

●——● 固定化细胞酶活力
○---○ 固定化细胞酶活力回收

4.0、0.05 M 磷酸缓冲液处理包埋细胞，由图 5 可知，1.0 克包埋细胞用 1—10 毫升戊二醛溶液处理，固定化细胞酶活力及活力回收随用量增大而略有降低。为此，选择 1.0 克包埋细胞用 1.0—2.5 毫升戊二醛缓冲液处理。

(4) 温度的影响：分别于不同温度下，按标准条件用戊二醛处理包埋细胞。由表 4 可知，处理温度升高，固定化细胞酶活力和活力回收均下降，在室温 (20℃) 下处理可保持 80% 以上的活力回收。

表 4 温度对戊二醛处理包埋细胞的影响

处理温度(℃)	固定化细胞酶活力 (单位/克)	活力回收(%)
0	1.146	87.95
20	1.087	81.47
30	0.992	73.35

原包埋细胞酶活力为 1.334 单位/克

(5) 时间对戊二醛处理包埋细胞的影响：在标准条件下处理包埋细胞，分别在不同时间取样，测定固定化细胞酶活力。由图 6 可知，随处理时间增长，固定化细胞酶活力及活力回收均迅速下降；4 小时后下降缓慢。处理二小时活力回收在 80% 以上。

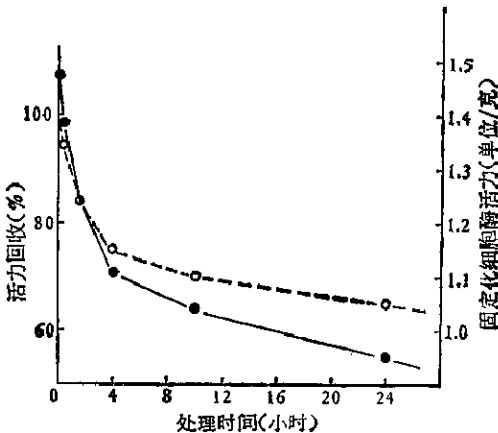


图 6 时间对戊二醛处理包埋细胞的影响

●——● 固定化细胞酶活力
○---○ 固定化细胞酶活力回收

(二) 固定化细胞与原细胞的酰化酶性质比较

1. 酶反应的最适 pH：以青霉素 G 钾盐为底物，在不同 pH 条件下，分别测定固定化细胞和原细胞的酶活力，结果如图 7 所示。原细胞酰化酶的最适 pH 为 7.7，固定化细胞酰化酶最适 pH 为 8.0，相差约 0.3 个 pH 单位。

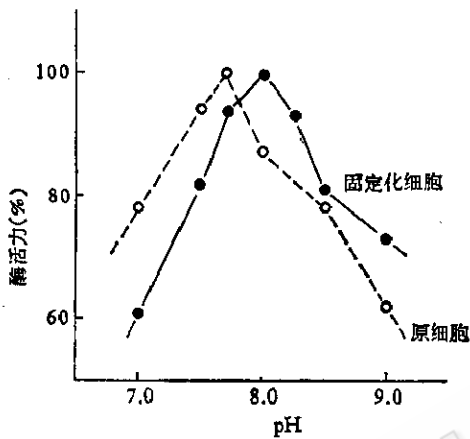


图 7 在不同 pH 条件下原细胞和固定化细胞的酶活力

2. 酶反应的最适温度：在不同温度下，以青霉素 G 钾盐为底物，测定固定化细胞和原细胞的酰化酶活力，如图 8 所示，固定化细胞和原细胞的最适温度基本相同，均为 45℃。

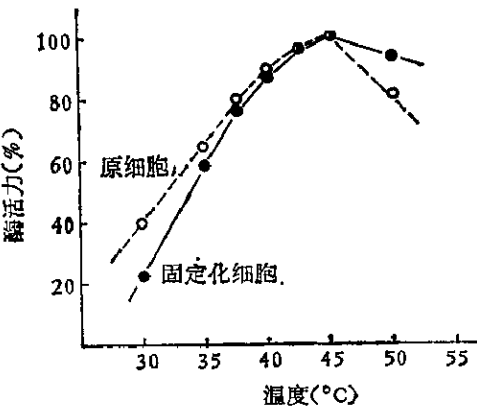


图 8 温度对固定化细胞和原细胞酶活力的影响

3. 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响：在用 NIPAB 法测定固定化细胞和原细胞酶活力时，加入最终浓度为 $1 \times 10^{-3} M$ 的各种不同金属离子和 EDTA，结果如表 5。

表 5 各种金属离子和 EDTA 对酶活力的影响

金属离子	原细胞酶活力 (%)	固定化细胞酶活力 (%)
无	100	100
NH_4^+	91.13	94.14
Ca^{2+}	92.24	79.92
Mg^{2+}	97.32	77.41
Mn^{2+}	96.95	101.26
Zn^{2+}	94.60	84.94
Co^{2+}	90.86	84.94
Ni^{2+}	92.23	89.96
Fe^{2+}	93.62	94.14
Fe^{3+}	99.31	62.34
Al^{3+}	93.50	82.01
Cu^{2+}	91.00	48.54
Ag^+	86.01	103.77
Hg^{2+}	19.29	79.50
EDTA	95.05	91.12

表 5 说明所列金属离子对原细胞的青霉素酰化酶活力无激活作用，除 Hg^{2+} 有强烈抑制作用外，其它金属离子无明显抑制作用，EDTA 对原细胞酶活力无明显影响。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 对固定化细胞的酰化酶显示轻微抑制作用。固定化细胞和原细胞相比，固定化后， Hg^{2+} 的抑制作用降低，对其它金属离子敏感性略有增加。

4. 酶的稳定性

(1) pH 稳定性：原细胞和固定化细胞在无底物情况下，在不同 pH 缓冲液内，37℃ 保温 1 小时后，用 NIPAB 法测定酶活力，结果如图 9。原细胞在 pH4.0—7.0，固定化细胞在 pH4.0—7.7 内稳定，超出此范围稳定性很快下降。

(2) 热稳定性：原细胞和固定化细胞在 pH7.7、0.2M 磷酸缓冲液中，在不同温

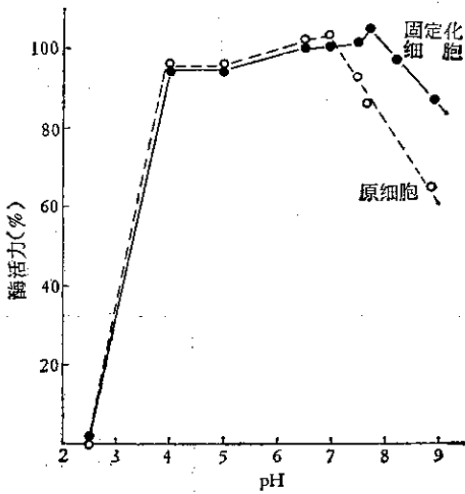


图 9 原细胞和固定化细胞对 pH 的稳定性

pH2.5: 柠檬酸缓冲液
pH4.0—5.0: 醋酸缓冲液
pH6.5—8.0: 磷酸缓冲液
pH9.0: 硼酸缓冲液

度下保温 1 小时后,用 NIPAB 法测定酶活力,结果如图 10。

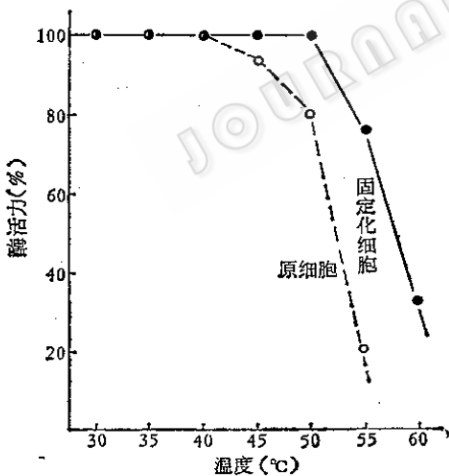


图 10 原细胞和固定化细胞对热的稳定性

由图 10 可以看出,在无底物情况下,原细胞在 40°C 以下稳定,固定化细胞在 50°C 以下稳定。细胞固定化后对热稳定性增加。固定化细胞在 4°C 冰箱中保存 14 个月无活力损失。

(3) 工作稳定性: 将 40 克固定化细

胞装柱 (104 × 27.5 毫米), 于 37°C, 连续作用于 pH7.7、0.2M 磷酸缓冲液配制的 2% 青霉素 G 钾盐溶液, 控制柱流出液流速, 使 pH 保持在 6.5, 进行连续裂解反应, 转化率在 95% 以上。定期测定固定化细胞酶活力, 结果如图 11。除去在冰箱中保存 20 天以外, 共连续使用 155 天, 固定化细胞酶活力无明显损失, 转化率无明显下降。

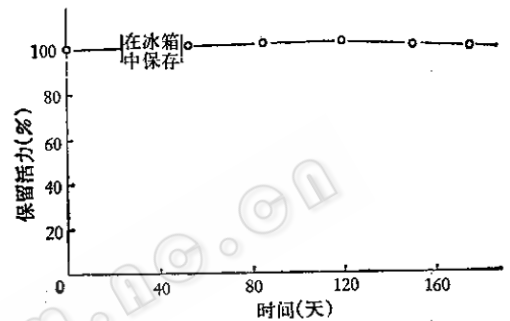


图 11 固定化细胞连续水解青霉素的稳定性

(三) 固定化细胞表面的电镜观察

将新制备的和连续使用了 155 天的固定化细胞真空干燥, 于扫描电子显微镜下观察表面结构, 如图 12、13 所示, 说明固定化细胞经长期使用后表面结构无明显变化。

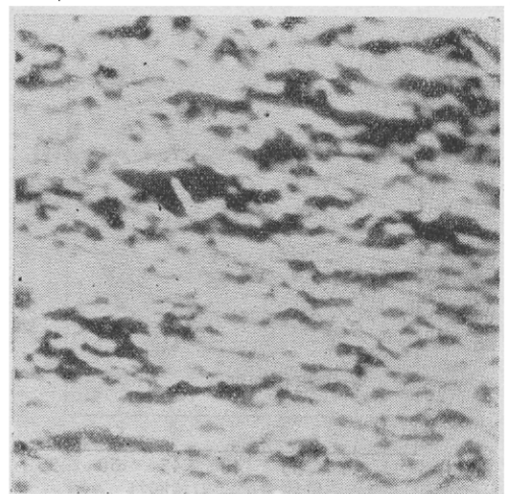


图 12 在扫描电子显微镜下观察到的新制备的固定化细胞的表面结构 ×6,000

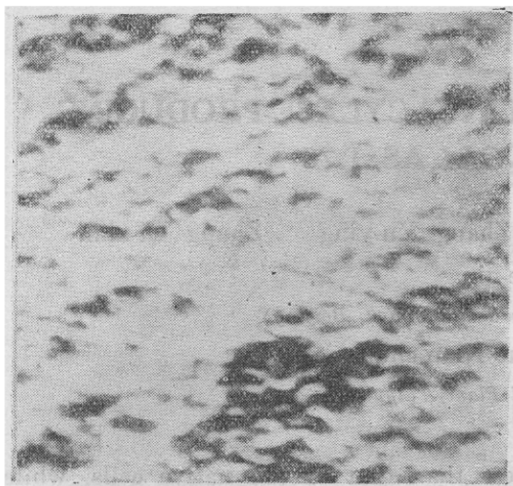


图 13 在扫描电子显微镜下观察到的使用 155 天的固定化细胞的表面结构 $\times 6,000$

讨 论

1. 用于有机溶剂中成型的琼脂凝胶包埋制备珠型固定化细胞, 方法简便、无毒、成本低廉、适于工业化生产; 由于成型时散热快, 因此酶失活少、酶活力回收较高; 用此法制备的固定化细胞的细胞含量可达 50—60%, 而采用其它成型方法, 细胞含量达到 30% 时, 就难于成型。

珠型固定化细胞的形状规则, 忍受静压能力强、阻力小, 在柱反应器内长期使用无破碎现象, 适于在高速流动的柱反应器上使用。

2. 一般未经任何处理的包埋细胞的半寿期约为 20—30 天^[4, 7, 11]。若用戊二醛处理包埋细胞, 可以大大提高青霉素酰化酶的稳定性。我们认为主要原因可能是: (1)

戊二醛将细胞杀死, 防止了细胞自溶, 避免酶漏出; (2) 戊二醛将酶固定在酶所处的细胞内的最适自然环境中, 对保持酶在适宜的作用条件和稳定性有利; (3) 戊二醛对酶蛋白进行化学修饰, 使酶蛋白的特殊空间构型得以“固定”, 降低了不利因素引起构型改变而发生失活的可能性。

3. 用固定化细胞在工业上生产 6-APA 已经成功, 结晶的 6-APA 收率在 78% 以上。将本法生产的 6-APA 制造注射用氨苄青霉素和苯甲异噁唑青霉素的质量完全符合药典标准、未发现蛋白污染产品的现象。

参 考 文 献

- [1] Vandamme, E. J. and J. P. Voetl: *Advances in Appl. Microbiol.*, 17: 311—361, 1974.
- [2] Abbott, B. J.: *Appl. Microbiol.*, 20: 203—252, 1976.
- [3] Jack, T. R. and J. E. Zajic: *Advances in Biochem. Eng.*, 5: 125—145, 1977.
- [4] Sato, T. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 2(3): 153—160, 1976.
- [5] Ныс, П. С. и др.: *Биорг. Хим.*, 2(9): 1259, 1976.
- [6] Toda, K. and M. Shoda: *Biotechnol. Bioeng.*, 71: 481—497, 1975.
- [7] Шелленберг, П. С. и др.: *Антибиотики*, 22(2): 125—130, 1977.
- [8] 张启先等: *微生物学报*, 19(3): 302—308, 1979 年。
- [9] Carl Kutzbach and Erich Rautenburth: *Hoppe-Soyler's Z. Physio. Chem. Bd.*, 354: S45—53, 1974.
- [10] 陈执中、张叔良: 《抗菌素检定法》, 人民卫生出版社, 1959 年, 86 页。
- [11] 孟广震等: *微生物学报*, 18(1): 39—44, 1978 年。

IMMOBILIZATION OF PENICILLIN ACYLASE-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* AS 1.76

Sun Wan-ru Wang Zhen-siang Zhang Yu-ying Zhang Qi-xian
Wang Xue-qin

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

Su Xiu-cai and Yue Nian-chun

(*Taiyuan Pharmaceutical Plant, Taiyuan*)

The immobilized cells of *Escherichia coli* AS 1.76 with high activity of penicillin acylase were prepared by entrapping 40—60% bacterial cells in 4% agar gel beads formed in stirring organic solvent and crosslinked with 0.5—1.0% glutaraldehyde solution. The optimum pH for the hydrolysis of benzylpenicillin by the immobilized cells was found to be pH 8.0, while that of native cells was pH 7.7. The optimum temperature of the immobilized cells was the same as that of the native cells, 40°C. The inhibition of the immobilized cells by Hg^{2+} was found to be

less than that of the native cells, while the sensitivity of the immobilized cells toward metallic ions such as Fe^{3+} and Cu^{2+} etc. slightly increased. The stability of the immobilized cells to variation of pH and temperature was higher than that of the native cells. No loss of activity was observed upon storage at 4°C for 14 months. When the immobilized cells were packed in the column and fed continuously with 2% benzylpenicillin solution at 37°C and pH 7.7, the initial activity remained unchanged after 155 days.