

## 大肠杆菌 AE109 青霉素 G 酰化酶的 分离纯化及性质研究

张其玖 颜茂恭 陈红 赵武玲\*

(中国科学院生物物理研究所, \*北京农业大学生物工程学院, 北京)

**摘要** 由发酵培养液所得大肠杆菌AE109菌体, 先经高渗休克处理, 继经D-苯甘氨酸-Sepharose 4B和DEAE-纤维素柱层析分离纯化得到青霉素G酰化酶, 酶制品在非变性条件下的聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈一条区带, 而且可以结晶。在SDS变性条件下解离为 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚基。

酶性质的研究表明, 由大肠杆菌工程菌AE109菌株所得青霉素G酰化酶与其亲本大肠杆菌AS1.76菌株所得青霉素G酰化酶性质相同。

**关键词:** 青霉素G酰化酶, 疏水层析, 酶的性质

青霉素G酰化酶(青霉素酰胺水解酶; EC 3.5.1.11)可催化青霉素G水解, 产生6-氨基青霉烷酸(6-APA)和苯乙酸<sup>[1]</sup>。6-APA是半合成青霉素的重要原料<sup>[2]</sup>, 因此对青霉素G酰化酶进行结构与功能的研究, 具有重要意义。为此我们对大肠杆菌工程菌AE109所产酶进行了分离纯化和酶性质的研究。初步实验结果曾在1988年学术年会上报告<sup>[3]</sup>。

### 材 料 与 方 法

#### 一、菌株和培养方法

**菌株:** 为本组自己构建的高效表达遗传工程菌AE109(pGA 40/E110)。

**培养基:** 发酵培养基采用文献[4]AS培养基。

**培养条件:** 在LBP平皿培养基上挑取单个菌落, 在AS培养液中28°C振荡培养过夜作为种子。按5%接种量接入大三角瓶中, 28°C振荡培养32—36小时, 离心, 弃去上清, 收集菌体。

#### 二、化学试剂

Sepharose 4B为Pharmacia公司, CNBr为E. Merck公司, DEAE-纤维素为Whatman公司产品。D-苯甘氨酸为苏州市第二制药厂生产。苯丙氨酸为北京试剂厂生产。苯乙酰胺为本实验室合成。2-硝基-5-苯乙酰胺苯甲酸(NIPAB)为上海东风试剂厂产品。对二甲氨基苯甲醛(PDAB)为北京化工厂产品。

### 三、Sephacrose 4B取代物的合成

按文献<sup>[5]</sup>方法制备CN-Sephacrose 4B。然后在0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>条件下与配体D-苯甘氨酸在4℃冰柜中搅拌过夜,以重蒸水和0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>洗涤除去过量的D-苯甘氨酸。

其它配体如6-APA, 苯乙酰胺和D,L-苯丙氨酸等与Sephacrose 4B的共价结合反应,基本上参考上述条件进行。

### 四、青霉素酰化酶活性测定

NIPAB法,按Kutzbach<sup>[6]</sup>方法进行。PDAB法,按Siewinski<sup>[7]</sup>方法进行。蛋白含量按Folin-酚法及 $E_{280}^{1\%} = 2.45$ 测定。

### 五、酶的分离与纯化

1.蔗糖渗透压休克:将离心所得新鲜菌体充分悬浮于1/10体积的20%蔗糖-20mmol/L Tris-HCL-17 mmol/L EDTA(pH 8.0)溶液中,冰浴搅拌30分钟,离心(18000 r/min)40分钟。菌体重新悬浮于1/10体积的冰冷的重蒸水中,搅拌30分钟,离心(18000 r/min)40分钟,上清液即为粗酶液。

2.D-苯甘氨酸-Sephacrose 4B柱层析:参考文献<sup>[8]</sup>。加固体硫酸铵和pH7.5磷酸盐缓冲液于粗酶液中,调至酶液含22%硫酸铵和0.1mol/L磷酸盐。将此酶样品上到经同样浓度硫酸铵和磷酸盐预平衡的D-苯甘氨酸-Sephacrose 4B柱上,用22%硫酸铵-0.1mol/L磷酸盐(pH7.5)溶液淋洗除去杂蛋白,继以22%或15%硫酸铵-0.1 mol/L磷酸盐(pH7.5)对0.1mol/L磷酸盐(pH 7.5)缓冲液线型梯度洗脱,以 $A_{280}$ 测蛋白,NIPAB法测定酶活。

3.DEAE-纤维素柱层析:合并D-苯甘氨酸-Sephacrose 4B柱分离所得酶活性峰,经60%硫酸铵沉淀后,对0.05mol/L磷酸盐(pH7.0)缓冲液透析除盐,上DEAE-纤维素柱,青霉素G酰化酶不被柱吸附,0.05mol/L磷酸盐(pH7.0)即可将其洗下,得纯酶。

### 六、聚丙烯酰胺凝胶电泳

按Weber和Osborne<sup>[9]</sup>方法进行。

### 七、酶蛋白的结晶

采用微量透析法,50 $\mu$ L样品(3mg/mL酶蛋白),含有10% PEG 4000和0.1% NaN<sub>3</sub>,在20℃条件下对55%硫酸铵透析10天后,镜检。

## 结 果 与 讨 论

### 一、酶的分离与纯化

1.粗酶的抽提:大肠杆菌青霉素G酰化酶定位于细胞膜与细胞壁之间,故可采用蔗糖渗透压休克处理新鲜菌体细胞,处理后所得粗酶液中杂蛋白少,酶的比活比用超声破碎细胞方法所得酶比活高10倍以上;酶的收率一般在70%以上,均高于超声破碎、冻融及丙酮干燥

细胞等方法，且操作简便。

2. D-苯甘氨酸-Sephrose 4B柱层析: Mahajan<sup>[8]</sup>和Sudhakaran<sup>[10]</sup>等人认为苯甘氨酸-Sephrose 4B活化青霉素G酰化酶的原理是两者的相互疏水作用。这是因为大肠杆菌青霉素G酰化酶蛋白分子中，带非极性R基的氨基酸占1/3，在高浓度硫酸铵存在下，这些氨基酸会丛集形成集中的疏水区，而与D-苯甘氨酸-Sephrose 4B的疏水基团相互作用，牢固地结合在柱上；杂蛋白则由于疏水性较弱，不能被吸附而直接由柱中流出。当硫酸铵浓度降低时，青霉素G酰化酶又被解吸，从而达到分离纯化的目的。分离图谱见Fig.1。D-苯甘氨酸-Sephrose 4B具有吸附量大（每毫升

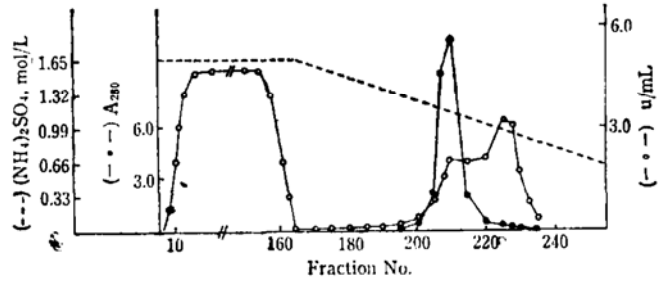


Fig.1 Elution profile of penicillin G-acylase on Phenylglycine-Sephrose-column

Table 1 Purification scheme of penicillin G-acylase by hydrophobic interaction chromatography

Step	Total activity (U)	Total protein (O.D.A <sub>280</sub> )	Specific activity (U/mg Protein)	Recovery (%)
Crude extract	326.0	725.0	1.10	100.0
Phenylglycine-Sephrose-4B	217.0	50.4	13.20	83.0
DEAE-cellulose	165.0	23.8	17.02	50.6

\* One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme needed for formation of 1 μmol of 6-APA per min at pH 7.5 and 40°C

Table 2 Structure of different ligand

Name of ligand	Structure
6-Aminopenicillanic acid	
D-Phenylglycine	
D,L-Phenylalanine	
Phenylacetamide	

胶可吸附样品量达 $180A_{280}$ 以上)、酶活收率高(一般可达80%以上)及纯化效果好等特点(Table1)。

在配基方面,除D-苯甘氨酸外,我们曾以6-APA, D,L-苯丙氨酸和苯乙酰胺等化合物作为配基。根据吸附量、酶活力回收和纯化倍数等指标,其分离纯化效果次序为:苯乙酰胺>D-苯甘氨酸>D,L-苯丙氨酸>6-APA。以苯乙酰胺-Sepharose效果最佳,6-APA-Sepharose稍差。此结果可从配基分子结构的疏水性来解释,如Table 2所示,苯丙氨酸与苯甘氨酸二者结构相似,后者比前者少一个碳,疏水性相近,苯乙酰胺比苯丙氨酸和苯甘氨酸少一个极性基团羧基,从而具有较强的疏水性。Sudhakaran<sup>[10]</sup>等人认为就疏水性而言,以苯环为最佳。6-APA的环状结构不同于苯环,羧基又直接定位在环形结构上,因而与其它配基比较,它的疏水性稍差。

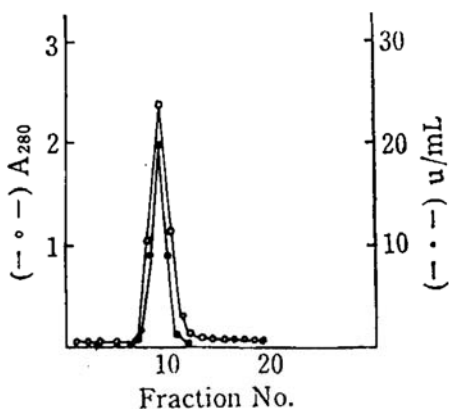


Fig.2 Elution profile of penicillin G-acylase on DEAE-cellulose column

3. DEAE-纤维素柱层析: 在0.05mol/L磷酸盐(pH7.0)缓冲液条件下,青霉素G酰化酶不被DEAE-纤维素柱吸附,而样品中的杂蛋白则被吸附于柱上。因而操作简便,酶易于回收。结果见Fig.2。

## 二、酶的纯度

1.聚丙烯酰胺凝胶电泳PAGE及分子量测定:按Weber<sup>[8]</sup>方法,用SDS-PAGE测定酶分子量,取纯酶液 $100\mu\text{L}$ (0.135mg蛋白)加等体积样品缓冲液,于 $100^\circ\text{C}$ 煮沸3分钟,冰箱中对重蒸水透析过夜。电泳,结果见图3a。以标准蛋白迁移率对log MW作图,根据青霉素

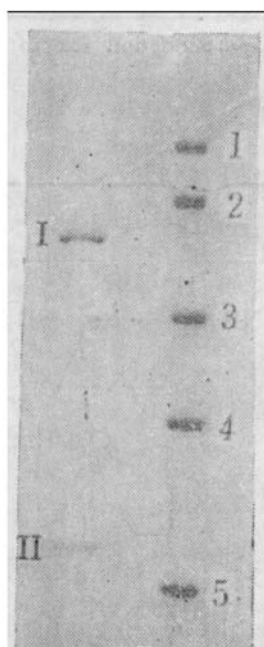


Fig.3a Sodium dodecylsulfate electrophoresis of penicillin G acylase in 10% polyacrylamide gel according to the method of Weber and Osborne<sup>[8]</sup>

I, subunit  $\beta$ . 1, subunit  $\alpha$ . 1. Phosphorylase b (94kD). 2. Albumin (67kD). 3. Actin (43kD). 4. Carbonic Anhydrase (30kD). 5. TMV coai protein (17.5kD)

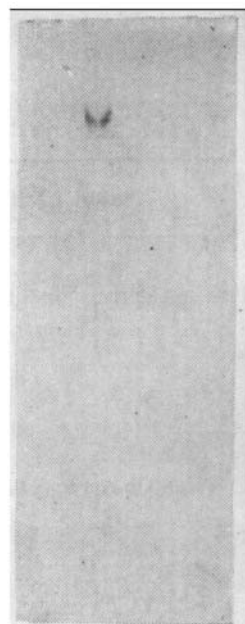


Fig.3b Polyacrylamide gel electrophoresis of penicillin G acylase on non-denaturing gel

G 酰化酶两个亚基的迁移率求得酶的两个亚基的分子量分别为 62kD 和 23kD。在非变性条件下 (酶量 4μg 蛋白) 电泳呈现一条蛋白区带 (Fig.3b), 酶蛋白的分子量相当于 85kD。此结果与文献<sup>[11,12]</sup>报道的和我们根据该酶结构基团所得的结果<sup>[13]</sup>一致。

2. 酶的结晶: 将酶浓度为 3mg/mL 含 10% PEG 4000 和 0.1% NaN<sub>3</sub> 的溶液, 于 20°C 对 55% 硫酸溶液透析 10 天后镜检, 结果如 Fig.4, 发现有棒状及棱形晶体析出。后者与 Kutzbach<sup>[6]</sup>所提示晶形相似。有关晶体的研究正在进行之中。

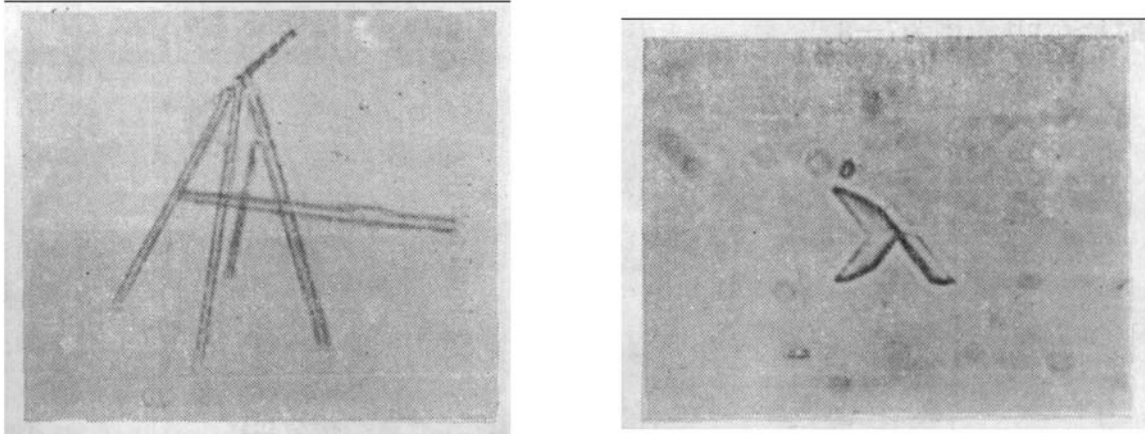


Fig.4 Crystal of penicillin acylase

### 三、酶的性质

1. 酶的最适温度: 取 6 mmol/L NIPAB 0.5mL, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.7) 0.99mL 于不同温度下预保温 5 分钟, 加入 10μL 酶液 (0.0135mg 蛋白), 反应 10 分钟, 加反应终止剂 0.5mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1mL, 测定酶活。结果见 Fig.5。酶作用的最适温度为 45—55°C。

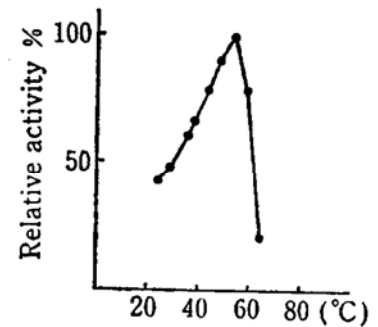


Fig.5 Effect of temperature on the enzyme activity

2. 酶的热稳定性: 基本操作同 1, 酶与底物于不同温度下保温 30 分钟, 测酶活, 结果见 Fig.6a。此酶在 45°C 以下稳定, 在 50°C 保温 30 分钟, 酶活力残存 52%。另外, 还测定了酶于不同温度下其稳定性与时间关系, 结果见 Fig.6b。由图可见, 酶于 37°C 保温 4 小时

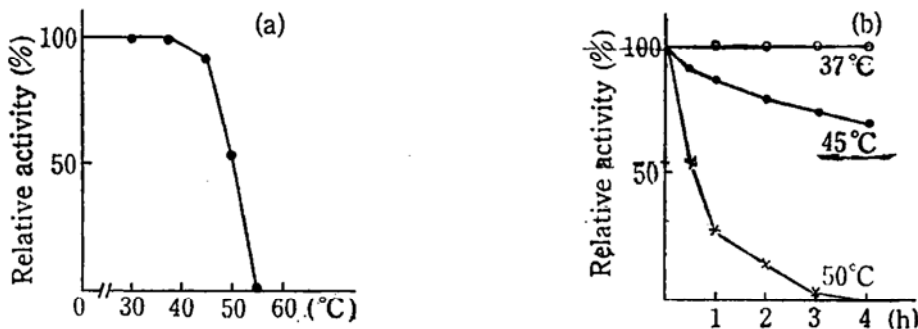


Fig.6 Thermal stability of the enzyme

酶活性保持不变。于 45℃ 保温 30 分钟。活性即开始下降，4 小时后残存酶活为 70%。而于 50℃ 保温 30 分钟酶活几近于 0，4 小时酶活性全部丧失。

3. 酶的最适 pH: 取 0.95 mL 不同 pH 的缓冲液 (pH 3—7.5 为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH 8 为硼砂-硼酸缓冲液, pH 8.5—10 为硼砂-氢氧化钠缓冲液) 和 0.05 mL 青霉素 G 钠盐 (0.5 g 青霉素 G 钠盐溶于 5 mL 0.05 mol/L 磷酸盐 (pH 7.5) 缓冲液), 于 37℃ 保温 5 分钟, 加入 20 μL 纯酶液 (0.027 mg 蛋白), 反应 10 分钟, 加入 1 mL 1% 甲酸终止反应; 再加 1 mL 2% 柠檬酸及 0.5 mL 0.5% 茚三酮溶液, 保温 25 分钟后测 405 nm 吸光度。结果见 Fig. 7。酶作用的最适 pH 范围为 7—8。

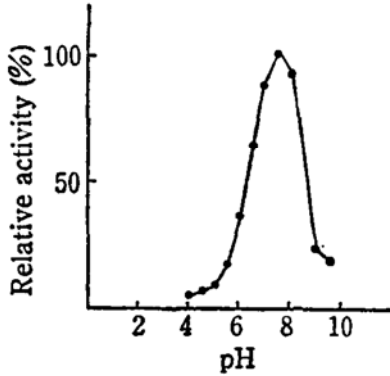


Fig. 7 Effect of pH on the enzyme activity

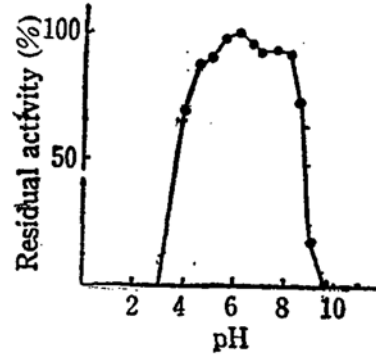


Fig. 8 Stability of the enzyme at different pH Values

4. pH 稳定性: 取 10 μL 酶液 (0.0135 mg 蛋白), 加入 0.99 mL 不同 pH 的缓冲液, 37℃ 保温 18 小时, 取 0.2 mL 用 NIPAB 法测定酶活。见 Fig. 8。酶于 pH 4.5—8 之间有较好稳定性, 酶活保持在 85% 以上, 小于 pH 4.5 或大于 pH 8 酶活性明显下降。

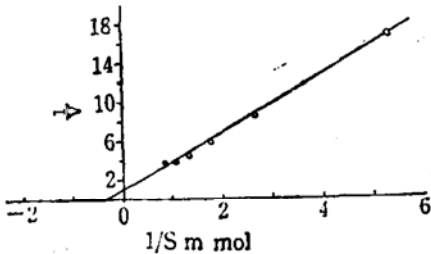


Fig. 9 Lineweaver-Burk plot of penicillin acylase for penicillin G

5. 酶作用于青霉素 G 的米氏常数的测定: 在 40℃, 0.1 mol/L 磷酸盐 (pH 7.5) 缓冲液条件下, 以不同浓度青霉素 G 为底物, 与 20 μL 酶反应, 每个浓度做三个样品, 以 PDAB 法测酶活, 以每分钟每毫升反应液所生成 6-APA 的微克分子数代表酶反应速度, 计算机处理数据并作 1/S VS 1/V 双倒数直线图, 以最小二乘法线性回归分析, 求得  $K_m$  为 3.89 mmol (Fig. 9)。

6. 金属离子和 EDTA 对酶活性的影响: 测定  $NH_4^+$ , Ag,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $CO^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  等金属离子以及 EDTA 对酶活性影响时发现, 除  $Ag^+$  离子对酶活有明显的抑制作用 (28%) 外, 其余金属离子均无明显影响。

鉴于上述研究, 大肠杆菌工程菌 AE109 所得青霉素 G 酰化酶的基本性质同其亲本大肠杆菌 AS1.76 酶的性质<sup>[14]</sup> 相似。这就为工业生产青霉素酰化酶提供了又一个工程菌株。

致谢: 王彪、薛小平、徐婉学等同志参加部份工作, 特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Vandamme E J et al. *Adv Appl Microbiol*, 1974, 17: 311-369.
- [2] Lagerlöf E et al. *Methods in Enzymology*, 1976, 44: 759.
- [3] 张其玖等. "863" 学术年会论文集, 1988, 132.
- [4] 张其玖等. 微生物学报, 1988, 28: 40-44.
- [5] 田宫信雄等. 日本生化学会编: 生化学实验讲座1, タンパク質の化学 I, 1976, ch. 3: 148.
- [6] Kutzbach C et al. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 1974, Bd. 354, S.45-53.
- [7] Siewinski M et al. *Hoppe-seyler's Z Physiol Chem*, 1984, Bd. 365: S. 829-837.
- [8] Mahajan P B et al. *Appl Biochem Biotech*, 1984, 9: 421-437.
- [9] Weber K et al. *J Biol Chem*, 1969, 244: 4406-4412.
- [10] Sudhakaran V K et al. *Biotech Let*, 1987, 9: 539-542.
- [11] Oliver G. *Gene*, 1985, 40: 9-14.
- [12] Oh Sang-Jin et al. *Gene*. 1987, 56: 87-97.
- [13] 郭礼和等. 实验生物学报, 1989, 22: 99-100.
- [14] 矫庆华等. 微生物学报, 1986, 26: 254-259.

## The Purification and Properties of Penicillin G Acylase From *E. coli* AE109

Zhang, Qi-jiu    Yan, Mao-gong    Chen, Hong  
(*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing*)

Zhao, Wu-ling  
(*Department of Biochemistry, College of Biological Science, Beijing Agricultural University, Beijing*)

**Abstract** Penicillin G acylase has been isolated and purified from *E. coli* AE109 by treating with high osmotic shock followed by hydrophobic interaction chromatography and DEAE-cellulose chromatography. Electrophoresis analysis shown that the enzyme preparation has a high purity and can be crystallized. The enzyme was dissociated into subunit  $\alpha$  and  $\beta$  on denaturing SDS-PAGE.

Studies on the enzyme properties shown that the penicillin G acylase from *E. coli* AE109 strain is identical with the enzyme from one of the parent strain *E. coli* As 1.76.

**Key words:** Penicillin G acylase, hydrophobic interaction chromatography, Properties of the enzyme