

## 粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶在大肠杆菌中组成型表达及分离纯化

杨志建<sup>1,2</sup> 蔡 谨<sup>2</sup> 孙 健<sup>3</sup> 袁中一<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

<sup>2</sup>(浙江大学化学工程与生物工程系,杭州 310027)

<sup>3</sup>(中国科学院大连化学物理研究所,大连 116023)

**摘 要** 将粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶基因构建重组表达质粒 pKKFPGA, pKKFPGA 再转化宿主菌 DH5 $\alpha$ , 所得重组菌不需诱导便能高效表达青霉素 G 酰化酶, 表达量达 2590 u/L, 比野生型粪产碱杆菌表达量高 432 倍, 其菌体比活力达 300 (u/L)/A<sub>600</sub>。菌体破碎后的上清液经 DEAE-Sepharose CL 6B 离子交换层析和 Butyl-Sepharose CL 4B 疏水层析, 即可得纯度提高 20 倍、比活为 68.6 u/mg 的青霉素 G 酰化酶, 两步纯化的总收率达 91%。Western 印迹分析表明 5% 的原前体青霉素酰化酶在胞内形成了包涵体, 说明其成熟的限速步骤在胞内的运输阶段。

**关键词** 青霉素 G 酰化酶, 粪产碱杆菌, 表达, 纯化

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0736-05

青霉素 G 酰化酶 (penicillin G acylase, E. C. 3.5.1.11, PGA) 能催化青霉素 G (PG) 脱苯乙酰生成 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 和头孢霉素 G (重排酸) 脱苯乙酰生成 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA)。6-APA 和 7-ADCA 是半合成  $\beta$ -内酰胺类抗生素的关键中间体。近 50 年 PGA 酶法水解已取代传统的化学裂解工艺。目前世界上工业生产 6-APA 和 7-ADCA 的固定化青霉素 G 酰化酶主要来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*, Ec) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*, Bm)。

细菌 PGA 家族成员分为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌。前者有大肠杆菌 (*Escherichia coli*, Ec)、嗜柠檬酸克吕沃尔氏菌 (*Kluyvera citrophila*, Kc)、雷氏普罗威登斯菌 (*Providencia rettgeri*, Pr)、粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*, Af)、无色杆菌木糖氧化属 (*Achromobacter xylosoxidans*, Ax) 与假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp., Ps) 等。后者为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*, Bm) 与粘节杆菌 (*Arthrobacter viscosus*, Av)。粪产碱杆菌 (Af) PGA 基因到 1994 年<sup>[1]</sup>才被克隆, 同源性比较表明它处于 PGA 进化过程一个独立分支。与其他来源的 PGA 比较, AfPGA 的酶学性质有如下特点: 1. AfPGA 对底物具有更高

亲和力, 对青霉素 G 的  $K_m$  值比 EcPGA 低, 比 BmPGA 低三个数量级。而其  $k_{cat}$  值是所有 PGA 中最高的, 表现出高活性<sup>[2]</sup>; 2. AfPGA 是 PGA 家族中唯一在一级结构中具有链内二硫键的成员, 酶的热稳定性和 pH 稳定性均很高<sup>[3]</sup>; 3. 在手性分子识别能力上, AfPGA 比 EcPGA 有更高选择性<sup>[4]</sup>; 4. AfPGA 在有机溶剂中表现出很高稳定性, 在双水相, 催化抗生素母核氨基和苯乙酰胺缩合时, 催化效率比 EcPGA 高一个数量级<sup>[4]</sup>。总之, AfPGA 会在半合成抗生素工业中有很好的应用前景。

我们将 AfPGA 克隆到含 *trc* 启动子的表达载体, 构建了表达质粒 pKKFPGA, 并在大肠杆菌宿主中表达, 所得重组菌无需诱导即可高表达 AfPGA。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒:** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (遗传特征为 *supE44*,  $\Delta$  *lacU169* ( $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*), 为本室保存。pKKCAII<sup>[5]</sup>, pKK235 衍生质粒, 含有 *lac Z* 核糖体结合位点、*trc* 启动子与 *rrn B* 转录终止子, 不含 *lac I'* 等位基因, 无需 IPTG 诱导即可在不含 *lac I'* 的宿主

收稿日期: 2004-01-17, 修回日期: 2004-04-05。

\* 通讯作者。 Tel: 86-21-54921243; Fax: 86-21-54921011; E-mail: zzyuan@sibs.ac.cn

菌中表达。pSU2718, 亚克隆质粒。质粒均由本所王恩多研究员惠赠。

**1.1.2 酶和其他试剂:**核酸工具酶购自 TaKaRa 公司, DEAE-Sepharose CL 6B 和 Butyl-Sepharose CL 4B 购自 Pharmacia 公司, 其他试剂均为国产或进口分析纯试剂, PCR 引物由赛百盛公司合成。

**1.1.3 培养基:**(a) LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, NaCl 10g, 补水至 1L, 调 pH7.0。(b) 发酵培养基 (FM): 蛋白胨 10g, 酵母膏 5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1g,  $KH_2PO_4$  2g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5g,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  7g,  $(NH_4)_2SO_4$  1.2g,  $NH_4Cl$  0.2g, NaCl 0.1g, 补水至 1L。

## 1.2 方法

**1.2.1 表达质粒 pKKFPGA 的构建:**引物 1 (5'-GCATCCATGGTGAAGGGCTGCTTCCT-3') 引入 *Nco* I 酶切位点, 与引物 2 (5'-ccggatccctaaggctgaggctgaatc-3') 通过 PCR 方法从载体 pETAPGA<sup>[6]</sup> 上扩增得到 AfPGA 基因克隆到经 *Sma* I 线性化质粒 pSU2718, 得到质粒 pSUFPGA。pSUFPGA 以 *Nco* I、*Hind* III 消化, 将获得的 AfPGA 基因连接到 *Nco* I、*Hind* III 消化的载体 pKKCAII 中, 得到重组表达质粒 pKKFPGA。重组质粒中, AfPGA 基因依靠 *trc* 启动子、自身表达元件以及 *rrnB* 转录终止子而表达, 然后依靠信号肽引导 AfPGA 分泌到周质空间。重组质粒转化表达菌 DH5 $\alpha$  得菌株 DH5 $\alpha$ /pKKFPGA。

**1.2.2 重组菌 DH5 $\alpha$ /pKKFPGA 组成型表达 AfPGA:** DH5 $\alpha$ /pKKFPGA 接种至 3mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}C$ , 250r/min 过夜培养。以 1:100 接种量接种到 50mL 发酵培养基。28 $^{\circ}C$ , 250 r/min 振荡培养至  $A_{600}$  为 2.5 左右。

**1.2.3 完整细胞酰化酶活力的测定:**采用 NIPAB 方法。菌体离心, 重悬于 50mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.5, 取 10 $\mu$ L 重悬液, 加入 500 $\mu$ L 50mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.5, 37 $^{\circ}C$  保温。再加入 1mL 37 $^{\circ}C$  预热的 1mL 0.9mg/mL 6-硝基-3-苯乙酰氨基苯甲酸 (NIPAB) 溶液。反应 4min, 加入 1mL 95% 乙醇终止反应。反应液在室温以 6000  $\times$  g 离心 2 min, 取上清测定 405nm 吸光度。空白为不加酶反应液。酶活力定义: 在上述反应条件下, 1min 水解 1 $\mu$ mol 的 NIPAB 所需青霉素酰化酶为 1u。酶的菌体比活力定义为每升每  $A_{600}$  菌体所具有的酶活力单位。

**1.2.4 AfPGA 的分离纯化:**菌体重悬于 50mmol/L 磷酸缓冲液, 冰浴中超声破碎菌体 (Branson Sonifier 450, 50% 间隔, 50% 输出), 离心 (12 000r/min

15min), 上清即为 AfPGA 粗酶液。粗酶液引入磷酸缓冲液 (50mmol/L, pH7.8) 预平衡 DEAE-Sepharose CL 6B 柱, 上柱后用平衡缓冲液洗至基线稳定。AfPGA 不被吸附而流出。流出液边搅拌边加固体  $(NH_4)_2SO_4$  至 1mol/L 后, 加入 50mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.8-1mol/L  $(NH_4)_2SO_4$  预平衡 Butyl-Sepharose CL 4B 柱, 分步洗脱, 在  $(NH_4)_2SO_4$  浓度为 0 的磷酸缓冲液洗脱获得 AfPGA。

**1.2.5 Western blot 分析:**1mL 菌体破碎液离心, 沉淀部分溶于 200 $\mu$ L 上样缓冲液, 上清液以 1:1 比例加入上样缓冲液, 沸水浴 5min。分别取 15 $\mu$ L 上清上样液和 5 $\mu$ L 沉淀部分上样液进行 Western blot 分析, 一抗为兔抗, 二抗为碱性磷酸酶标羊抗兔 IgG。操作按文献[7]进行。

**1.2.6 蛋白浓度的测定:**按 Bradford 法, 以牛血清蛋白为标准蛋白, 操作见文献[7]。

## 2 结果

### 2.1 AfPGA 表达载体的构建与鉴定

引物 1 和 2 经 PCR 扩增得到含信号肽的 AfPGA 基因片段, 该片段连接到 *Sma* I 酶切的 pSU2718 得 pSUFPGA。pSUFPGA 以 *Nco* I、*Hind* III 消化, 将获得的 AfPGA 基因连接到 *Nco* I、*Hind* III 消化的载体 pKKCAII 中, 获得表达质粒 pKKFPGA (图 1)。*Nco* I 和 *Hind* III 双酶切和 PCR 扩增均能得到 2500bp 左右的片段, 大小与理论 AfPGA 基因大小一致。

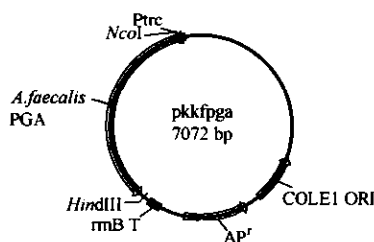


图 1 重组质粒 pKKFPGA 图谱

Fig.1 Plasmid of pKKFPGA

### 2.2 AfPGA 的表达

理论上, 低温培养有利于酶蛋白多肽链内二硫键的形成及降低包涵体的形成, 因而将菌株 DH5 $\alpha$ /pKKFPGA 在低温 28 $^{\circ}C$  进行培养。实验中发现 LB 培养基对表达不利, 这可能由于 LB 培养基 pH 缓冲能力差。以 NaOH 或 HCl 调节 LB 培养基成不同 pH, 考察不同初始 pH 的 LB 培养基对重组菌表达的影响, 结果列于表 1, 当初始 pH 7.0, AfPGA 的表达量最高。发酵培养基 (FM) 中, 重组菌 DH5 $\alpha$ /pKKFPGA

在发酵过程中, pH 基本维持 7.5 左右。在添加糊精的发酵培养基中, AfPGA 表达量可达 2590 u/L, 比野生型 *Alcaligenes faecalis* 表达量高 432 倍。

表 1 不同培养基中 AfPGA 的表达量

Table 1 Comparison of AfPGA production between different culture medium

	$A_{600}$	Enzyme activity /(u/L)	Cell-density-specific activity/[(u/L)/ $A_{600}$ ]
FM	2.65	1012	381
FM + dextrin(30g/L)	8.4	2590	308
LB(pH 9.0)	2.67	422	158
LB(pH 8.0)	2.73	501	184
LB(pH 7.0)	3.08	596	194
LB(pH 6.0)	2.96	323	109
LB(pH 5.0)	2.52	154	61

### 2.3 AfPGA 的分离纯化

菌体超声破碎后, 胞内核酸释放出来, pH 降为 7.8, 离心, 上清即为粗酶液。粗酶液引入磷酸缓冲液预平衡的 DEAE-Sepharose CL 6B 柱, AfPGA 由于不被吸附而直接流出, 大部分杂质则被吸附除去(如图 2)。直接流出的蛋白峰为 AfPGA 活力峰。流出液加入固体  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 1 mol/L 后加入磷酸缓冲液-1 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  预平衡的 Butyl-Sepharose CL 4B 柱。AfPGA 在 Butyl-Sepharose CL 4B 上疏水吸附, 当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度降低时, 它们之间的疏水作用减弱而解吸。采用分步洗脱, 在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度为 0 时收集洗脱峰 5, 为 AfPGA(图 4)。

表 2 AfPGA 的纯化

Table 2 Purification of AfPGA from the recombinant DH5 $\alpha$ /pKKFPGA

	Total volume /mL	Total protein /mg	Total activity /u	Specific activity /(u·mg <sup>-1</sup> )	Yield /%
Crude extract	10	74.43	238.7	3.2	100
DEAE-Sepharose CL 6B	47	19.20	219.1	11.4	91.8
Butyl-Sepharose CL 4B	20	3.16	216.9	68.6	90.9

### 2.4 Western blot 分析 AfPGA 的表达

刚产生的 PGA 是无活性的前体蛋白, 包括信号肽、 $\alpha$  亚基、连接肽和  $\beta$  亚基, 其成熟过程为原前体 PGA(preproPGA) 肽链经信号肽引导, 跨过细胞膜被运输到周质空间。此过程中, 信号肽被切除。随后, 前体 PGA 肽链(proPGA) 自催化切割内部连接肽, 形成  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基正确折叠成有活性的 PGA。在大

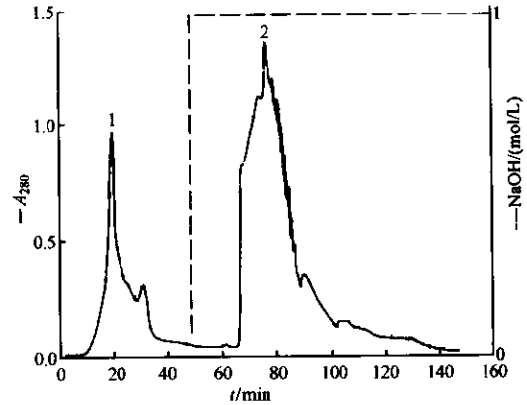


图 2 离子交换色谱纯化 AfPGA

Fig. 2 Ion exchange chromatography for AfPGA purification  
Peak 1: AfPGA; Peak 2: impurities

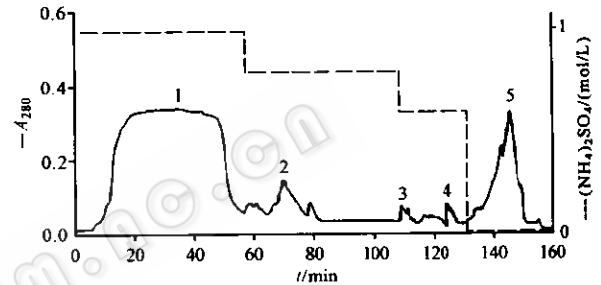


图 3 疏水层析色谱纯化 AfPGA

Fig. 3 Hydrophobic interaction chromatography  
for AfPGA purification

Peak 1, Peak 2, Peak 3 and Peak 4: impurities; Peak 5: AfPGA

经过这两步纯化, AfPGA 得率为 91%, 酶的纯化倍数提高了 20 倍(表 2), 纯化的 AfPGA 进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色呈两条带, 分别对应 AfPGA 的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基(图 4), 软件扫描显示其纯度大于 95%。

肠杆菌中过量表达 PGA 时易导致 preproPGA 和 proPGA 分别在胞内和周质空间形成包涵体<sup>[8]</sup>。

将上清和沉淀部分进行 Western blot 分析, 分析 AfPGA 是否过量表达形成包涵体。菌体破碎, 上清及沉淀部分加入上样缓冲液后(见 1.2.5), 上清样品体积为 2000  $\mu\text{L}$ , 沉淀部分样品体积为 200  $\mu\text{L}$ , 分别取 15  $\mu\text{L}$  上清样品和 5  $\mu\text{L}$  沉淀部分样品进行 Western

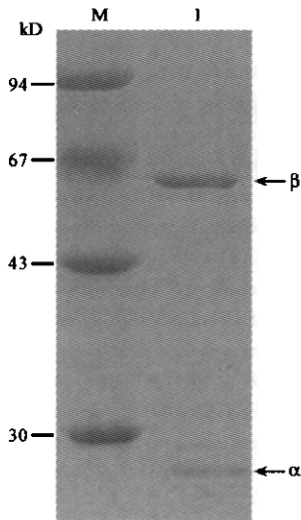
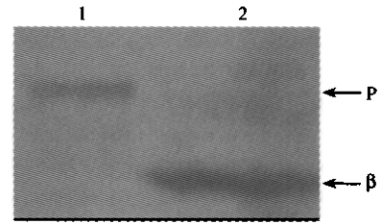


图4 AfPGA的SDS-PAGE电泳

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified AfPGA

M: standard molecular marker; 1: purified AfPGA.

 $\beta$ :  $\beta$  subunit;  $\alpha$ :  $\alpha$  subunit图5 Western blot分析重组菌DH5 $\alpha$ /pKKFPGA的表达产物Fig.5 Western blot analysis of the product of the recombinant plasmid pKKFPGA expressed in DH5 $\alpha$ 1: precipitation fractions of DH5 $\alpha$ /pKKFPGA; 2: supernatant fraction of DH5 $\alpha$ /pKKFPGA. P: AfPGA precursors;  $\beta$ :  $\beta$  subunit

blot分析。按破碎后上清样品体积与沉淀部分样品体积比计算,上清样品上样量为沉淀部分样品上样量的30% ( $\frac{15/5}{2000/200}$ )。图6显示,菌体碎片内含有包涵体,条带色度约为AfPGA条带色度的15%,按上样量折合成全细胞破碎液,其色度为AfPGA条带色度的5%,表明大部分原前体AfPGA(preproAfPGA)已被运输到周质空间进行加工。上清中无包涵体成分,说明周质空间所含有的前体AfPGA(proAfPGA)全部正确加工折叠成有活性的AfPGA。沉淀部分含有包涵体,表明了AfPGA成熟的限速步骤在胞内的运输阶段,这可能因为表达载体高拷贝复制子、强启动子及强终止子导致胞内形成了过量的AfPGA mRNA, mRNA翻译成的preproAfPGA无法及时转运到周质空间而导致在胞内积聚形成包涵体。这预示着可以通过改善信号肽的分泌能力或改善AfPGA的合成流等方法进一步提高活性酶的表达量。

3 讨论

AfPGA所具有的酶学性质预示其在水解青霉素G与重排酸生产6-APA与7-ADCA,以及合成半合成阿莫西林与半合成头孢霉素工业中良好的应用前景。周政等<sup>[6]</sup>将AfPGA基因克隆到pet表达系统得pETAPGA,该基因在大肠杆菌JM109/DE3中表达需IPTG诱导,其表达量为150 u/L。Deak<sup>[9]</sup>等将AfPGA基因克隆到一高拷贝数、鼠李糖启动子、Ap抗性的载体上,重组质粒转化大肠杆菌。经鼠李糖的诱导,

在摇瓶中AfPGA的表达量为700 u/L,菌体比活力为25(u/L)/ $A_{600}$ 。在本文我们将AfPGA基因克隆到组成型的载体中并获得了高表达,表达量达2590 u/L,菌体比活力达300(u/L)/ $A_{600}$ 。培养条件例如碳源、氮源、溶氧等对PGA的表达有明显的影 响,另外,大肠杆菌的高密度发酵可进一步提高AfPGA的表达,此研究正在进行中。

本研究提供了简单快捷的纯化AfPGA的方法,细胞破碎液的离心上清无需硫酸铵沉淀和透析,可直接进行DEAE-Sepharose CL 6B离子交换层析。AfPGA在交换柱上不吸附,大部分杂质被吸附除去。柱上流出液加入固体硫酸铵达1mol/L后进行Butyl-Sepharose CL 4B疏水柱层析。经过这两步纯化,即可得纯度大于95%的AfPGA,总收率为91%。

文献[10,11]报道重组细胞内包涵体的形成会遏制活性PGA的高表达。而包涵体的形成大多可归因于表达载体含有过高拷贝复制子及强启动子,强终止子,导致蛋白过量表达。周志雄等<sup>[8,12]</sup>尝试共表达brp基因或degP基因,减少包涵体的形成,提高了EcPGA的表达量。与其他种属PGA在大肠杆菌中表达形成包涵体类似,菌株DH5 $\alpha$ /pKKFPGA表达AfPGA时,在胞内形成了包涵体,但其含量不高,占总PGA的5%,表明大部分原前体AfPGA被运输到周质空间进行正确加工。这解释了AfPGA为什么在菌株DH5 $\alpha$ 中获得了高表达。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Quax WJ. Penicillin G acylase, a gene encoding the same and a method for the production of this enzyme: US patent, 5695978. 1994-4-15
- [2] Svedas V, Guranda D, vanLangen L et al. Kinetic study of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*. *FEBS Letters*, 1997, 417(3): 414-418
- [3] Verhaert RMD, Riemens AM, vanderLaan JM et al. Molecular cloning

- ing and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(9):3412-3418
- [ 4 ] van Langen LM, Oosthoek NHP, Guranda DT *et al.* Penicillin acylase-catalyzed resolution of amines in aqueous organic solvents. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2000, **11**(22):4593-4600
- [ 5 ] Li Y, Jiang WH, Yang YL *et al.* Overproduction and purification of glutaryl 7-amino cephalosporanic acid acylase. *Protein Expression and Purification*, 1998, **12**(2):233-238
- [ 6 ] Zhou Z(周政), Zhou LP(周丽萍), Chen MJ(陈美娟) *et al.* Purification and characterization of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase expressed in *Bacillus subtilis*. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2003, **35**(5):416-422
- [ 7 ] Wang JZ(汪家政), Fan M(范明). *Protein Technology Handbook* (蛋白质技术手册), Science Press(科学出版社), 2000
- [ 8 ] Lin WJ, Huang SW, Chou CP. High-level extracellular production of penicillin acylase by genetic engineering of *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2001, **76**(10):1030-1037
- [ 9 ] Deak PM, Lutz-Wahl S, Bothe H *et al.* Bioreactor cultivation of *Escherichia coli* for production of recombinant penicillin G amidase from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(5):397-400
- [ 10 ] Scherrer S, Robas N, Zouheiry H *et al.* Periplasmic aggregation limits the proteolytic maturation of the *Escherichia coli* penicillin-G amidase precursor polypeptide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, **42**(1):85-91
- [ 11 ] Sriulbolmas N, Panbangred W, Sriurairatana S *et al.* Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, **47**(4):373-378
- [ 12 ] Lin YH, Hsiao HC, Chou CP. Strain improvement to enhance the production of recombinant penicillin acylase in high-cell-density *Escherichia coli* cultures. *Biotechnology Progress*, 2002, **18**(6):1458-1461

## Constitutive Expression and Purification of *Alcaligenes faecalis* Penicillin G Acylase in *Escherichia coli*

YANG Zhi-Jian<sup>1,2</sup> CAI Jin<sup>2</sup> SUN Jian<sup>3</sup> YUAN Zhong-Yi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

<sup>2</sup>(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

<sup>3</sup>(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract** Considering *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase(AiPGA), which possesses the attractive characteristics for beta-lactam antibiotics conversions, the gene of PGA was cloned into an expressing vector pKKFPGA. The recombinant plasmid contained multicopy replicon(COLE 1), trc promoter, AiPGA gene, rrnB transcript terminator and ampicillin marker transformed *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . As both the recombinant plasmid and the host DH5 $\alpha$  had no lacI<sup>q</sup> gene, the trc promoter was always active and the AiPGA could be constitutively expressed without IPTG induction in the host DH5 $\alpha$ . In the shaking flask, the recombinant cell was inoculated into the fermentation medium (tryptone 10g/L, yeast extract 5g/L, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 5g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 7g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.2g/L, NH<sub>4</sub>Cl 0.2 g/L, NaCl 0.1g/L, dextrin 30g/L) and cultured at 28 °C for 20h. The production of AiPGA reached 2590u/L(NIPAB method), with a cell-density-specific activity of more than 300(u/L)/A<sub>600</sub>, this yield increased 432 fold higher than the native expression of *Alcaligenes faecalis*. Without ammonium sulphate fractionation and dialysis, the supernatant of crude extract was directly loaded on DEAE-Sepharose CL 6B column equilibrated by phosphate buffer (50mmol/L, pH7.8), and the enzyme fraction was not absorbed on the column but impurities were absorbed. Subsequently the effluent was added ammonium sulphate to 1mol/L and loaded on Butyl-Sepharose CL 4B column equilibrated by 50mmol/L phosphate buffer pH7.8-1mol/L ammonium sulphate. The enzyme was eluted as concentration of ammonium sulphate in phosphate buffer decreased to 0, PGA was eluted. After these two column chromatography, the enzyme was enriched 20 times with a 91% activity recovery. The purified enzyme had a specific activity of 68.6u/mg protein. However, the overproduction of PGA was often limited by translocation and/or periplasmic processing steps, subsequently resulted in intracellular accumulation of various types of PGA precursors and then formed inclusion bodies in the cytoplasm and/or periplasm. In this study, 5% PGA precursors formed as inclusion bodies in the cytoplasm while no inclusion bodies formed in the periplasm. It suggested most PGA precursors were transported to the periplasm and matured to active PGA and also explained why PGA gene was highly expressed in the host DH5 $\alpha$ . On the other hand, inclusion bodies in the cytoplasm indicated that the maturation of PGA in the host DH5 $\alpha$  was limited by the translocation step.

**Key words** penicillin acylase, *Alcaligenes faecalis*, expression, purification

Received: 01-17-2004

\* Corresponding author. Tel:86-21-54921243; Fax:86-21-54921011; E-mail: zyuan@sibs.ac.cn