

## 工业生物技术

# 高浓度底物下青霉素扩环酶的活性评价与底物抑制现象

伍林军<sup>1,2</sup>, 范可强<sup>1</sup>, 季俊杰<sup>1</sup>, 杨克迁<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

伍林军, 范可强, 季俊杰, 等. 高浓度底物下青霉素扩环酶的活性评价与底物抑制现象. 生物工程学报, 2015, 31(12): 1690–1699.

Wu LJ, Fan KQ, Ji JJ, et al. Evaluation of penicillin expandase mutants and complex substrate inhibition characteristics at high concentrations of penicillin G. Chin J Biotech, 2015, 31(12): 1690–1699.

**摘要:** 本文对青霉素扩环酶 (Penicillin expandase, 也称 Deacetoxycephalosporin C synthase, DAOCS) 在高浓度青霉素 G 下的底物抑制现象进行初步评价与表征, 筛选适合工业应用条件的高活力突变体。我们通过 HPLC 对已报道的几个 DAOCS 高活力突变体在青霉素 G 浓度 5.6 至 500 mmol/L 间的比活力进行定量测定, 并与不同催化反应动力学模型的理论推测变化趋势比较, 发现 DAOCS 野生型酶及高活力突变体 H4、H5、H6 与 H7 在高浓度青霉素 G 条件下均表现出明显的底物抑制现象, 但是变化趋势不同。野生型酶与突变体 H4 的比活力先上升后下降, 与竞争性抑制模型预测不符。突变体 H5、H6 与 H7 的比活力变化呈现更复杂的变化趋势。在所有测试的突变体中, H6 的活性显著高于其他突变体酶。青霉素 G 对野生型 DAOCS 的底物抑制现象符合非竞争性抑制模型的预测。而部分突变体表现出复杂的底物抑制行为, 表明其具有更复杂的作用机制。在高底物浓度下筛选具有较强催化活性的青霉素扩环酶突变体对于推动其在工业生产中的应用具有重要指导作用。

**关键词:** 去乙酰氧头孢菌素 C 合成酶, 底物抑制, 高浓度青霉素 G

**Received:** January 29, 2015; **Accepted:** March 13, 2015

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB734001).

**Corresponding author:** Keqian Yang. Tel/Fax: +86-10-64807459; E-mail: yangkq@im.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB734001) 资助。

网络出版时间: 2015-05-14

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150514.1403.002.html>

# Evaluation of penicillin expandase mutants and complex substrate inhibition characteristics at high concentrations of penicillin G

Linjun Wu<sup>1,2</sup>, Keqiang Fan<sup>1</sup>, Junjie Ji<sup>1</sup>, and Keqian Yang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Penicillin expandase, also known as deacetoxycephalosporin C synthase (DAOCS), is an essential enzyme involved in cephalosporin C biosynthesis. To evaluate the catalytic behaviors of penicillin expandase under high penicillin G concentration and to identify mutants suitable for industrial applications, the specific activities of wild-type DAOCS and several mutants with increased activities toward penicillin G were determined by HPLC under high penicillin G concentrations. Their specific activity profiles were compared with theoretical predictions by different catalytic dynamics models. We evaluated the specific activities of wild-type DAOCS and previous reported high-activity mutants H4, H5, H6 and H7 at concentrations ranging from 5.6 to 500 mmol/L penicillin G. The specific activities of wild-type DAOCS and mutant H4 increased as penicillin G concentration increased, but decreased when concentrations of substrate go above 200 mmol/L. Other mutants H5, H6 and H7 showed more complex behaviors under high concentration of penicillin G. Among all tested enzymes, mutant H6 showed the highest activity when concentration of penicillin G is above 100 mmol/L. Our results revealed that the substrate inhibition to wild-type DAOCS by penicillin G is noncompetitive. Other DAOCS mutants showed more complex trends in their specific activities at high concentration of penicillin G (>100 mmol/L), indicating more complex substrate inhibition mechanism might exist. The substrate inhibition and activity of DAOCS mutants at high penicillin G concentration provide important insight to help select proper mutants for industrial application.

**Keywords:** deacetoxycephalosporin C synthase, substrate inhibition, high penicillin G concentration

青霉素扩环酶 (Penicillin expandase, 也称 Deacetoxycephalosporin C synthase, DAOCS) 是非血红素  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\alpha$ -酮戊二酸依赖的氧化酶, 它催化青霉素的五元噻唑环扩环生成六元噻嗪环, 这是由青霉素及其类似物合成具有重要医疗价值的头孢类化合物中间体的关键步骤<sup>[1-2]</sup> (图 1)。棒状链霉菌 *Streptomyces clavuligerus* 中编码该酶 (scDAOCS) 的基因为 *cefE*<sup>[3-4]</sup>。由于 DAOCS 具有重要的工业应用前景, 对其已有多年的研究基础, 特别是在通过蛋白质工程改造拓宽其底物范围、提高其活力等方面已取得许多进展。

DAOCS 的天然底物是青霉素 N, 而对其他青霉素类化合物的活性非常低。直到 1998 年, Cho 等提高了反应体系中  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\alpha$ -酮戊二酸的浓度, 才探索出了 DAOCS 对其他青霉素类似物 (包括青霉素 G) 成功进行扩环反应的体系<sup>[5]</sup>。在他们的体系下, 棒状链霉菌 NP1 静息态细胞可成功催化青霉素 N 以及其他 14 种青霉素类似物发生扩环反应。之后 Chin 等对体外反应体系进行改进, 进一步扩大了 scDAOCS 催化扩环反应的底物范围<sup>[6]</sup>。

然而 DAOCS 对其非天然底物青霉素 G 的活性较低, 为了利用青霉素 G 来合成头孢菌素

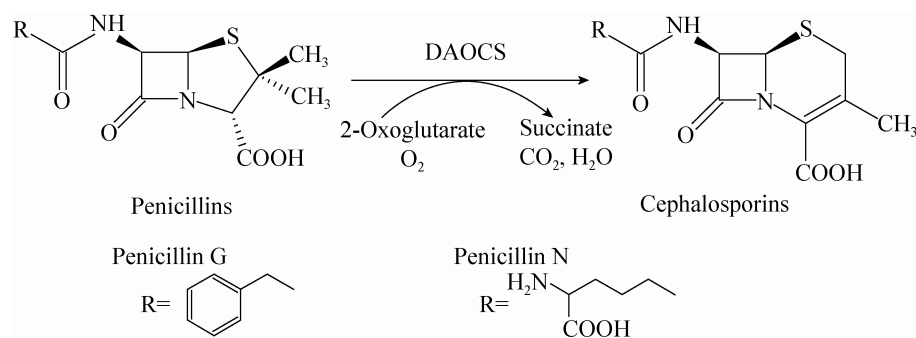


图1 DAOCS催化的扩环反应<sup>[17]</sup>

Fig. 1 The reaction catalysed by DAOCS<sup>[17]</sup>.

类抗生素的前体化合物 7-苯乙酰胺基-3-脱乙酰氧头孢烷酸 (G-7-ADCA), 需要对 DAOCS 进行改造。对 DAOCS 进行活性改造的依据主要是基于定向进化、多重序列比对以及由晶体结构<sup>[7]</sup>推测出来的活性中心的分析。通过易错 PCR<sup>[8-9]</sup>、DNA shuffling<sup>[9-10]</sup>、定点突变<sup>[6,8,11-13]</sup>、饱和突变<sup>[14-15]</sup>、双突变<sup>[16]</sup>及组合突变<sup>[17]</sup>等, 目前已经获得大量 scDAOCS 突变体, 对青霉素 G 的催化活力有明显提高<sup>[18]</sup>。最近, 本实验室季俊杰等通过组合已知的有利突变, 获得一系列对青霉素 G 活力提高的 scDAOCS 突变体, 其中 H5、H6 与 H7 的  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  分别提高至野生型的 48、53 与 81 倍<sup>[17]</sup>。

在对 scDAOCS 催化扩环反应的机理探索和活性改造过程中, 人们已经注意到青霉素 G 对 scDAOCS 的催化活性有抑制作用。Valegård 等在对 scDAOCS 反应机理的探索过程中曾经考察过青霉素 G 以及  $\alpha$ -酮戊二酸浓度对于反应稳态速率的影响, 他们通过固定青霉素 G 和  $\alpha$ -酮戊二酸中一个的浓度, 变化另一个的浓度, 发现青霉素 G 或者  $\alpha$ -酮戊二酸浓度的升高均会对稳态反应速率产生抑制作用<sup>[7]</sup>。Wei 等在对 scDAOCS 进行活性改造的过程中发现, 大部分

多位点突变体在青霉素浓度为 10 mmol/L 时表现出明显的底物抑制现象<sup>[8]</sup>。Hsu 等利用 DNA shuffling 对 scDAOCS 进行改造的过程中, 发现大多数进化得到的高活性突变体都表现出显著的底物抑制现象<sup>[10]</sup>, 但是他们也发现有一些活性很好的突变体在青霉素 G 浓度为 10 mmol/L 时并不存在底物抑制, 活性的高低似乎与底物抑制的产生之间并没有必然联系。

在对 scDAOCS 与  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\alpha$ -酮戊二酸和/或青霉素 G 的复合物晶体结构进行分析的基础上, Valegård 等推断 DAOCS 催化扩环反应的机理可能为“乒乓机制”<sup>[7]</sup>。晶体结构显示青霉素 G 与 scDAOCS 存在两种结合方式, 其中一种为非生产构象, 不能发生扩环反应。另外青霉素 G 与  $\alpha$ -酮戊二酸的结合位点有部分重叠, 因此作者推测二者不能同时结合, 进而提出一种两阶段的反应机理<sup>[7]</sup>。在 scDAOCS 的活性中心,  $\text{Fe}^{2+}$  与 His183、Asp185、His243 及三分子  $\text{H}_2\text{O}$  形成八面体配位结构;  $\alpha$ -酮戊二酸和  $\text{O}_2$  先后与 scDAOCS 结合, 取代活性中心的  $\text{H}_2\text{O}$  并与  $\text{Fe(II)}$  结合, 发生脱羧与氧化反应, 再经重排形成活泼的高氧化态  $\text{Fe(IV)}$  形式; 待生成的琥珀酸解离之后, 青霉素底物再与 scDAOCS 结合并被

Fe(IV) 氧化发生扩环反应。按照这一反应机理,青霉素 G 如果以非生产构象结合,将阻碍  $\alpha$ -酮戊二酸与 scDAOCS 结合,从而表现为典型的竞争性抑制机制。然而 Tarhonskaya 等最近对 scDAOCS 的前稳态动力学与底物结合实验研究<sup>[19]</sup>却对这一机制提出了质疑。根据他们的研究,scDAOCS 更有可能采取的是非血红素  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\alpha$ -酮戊二酸依赖的氧化酶家族保守的双底物有序结合催化机制: $\alpha$ -酮戊二酸与青霉素按顺序与 scDAOCS 结合,形成  $\text{DAOCS}\cdot\text{Fe}^{2+}\cdot\alpha$ -酮戊二酸·青霉素四元复合物,随后  $\text{O}_2$  与该复合物结合,导致  $\alpha$ -酮戊二酸氧化脱羧,产生 Fe(IV)-O 过渡态,使得青霉素甲基去氢并发生重排,完成扩环反应。按照这一反应机制,青霉素 G 的底物抑制效应可能存在其他作用机理。

到目前为止,对 DAOCS 反应特性的研究及蛋白质工程改造的评价都极少涉及到高浓度底物,一般是在 10 mmol/L 或更低底物浓度下进行研究和评价,而高浓度底物下 DAOCS 的催化活性表现,对于工业应用具有极其重要的参考价值。本文通过对 scDAOCS 野生型和本实验室季俊杰等构建的几个高活性组合突变体 H4、H5、H6、H7<sup>[17]</sup>在 5.6–500 mmol/L 青霉素 G 浓度区间内的催化活性进行研究,发现其中突变体 H6 在此范围内催化活性最高,并发现青霉素 G 对野生型 scDAOCS 的抑制作用与非竞争性抑制模型预测一致,这一结果对 DAOCS 高活力突变体在工业生产中的应用有借鉴意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

青霉素 G、维生素 C、MOPS 等购自

Sigma-Aldrich 公司, $\alpha$ -酮戊二酸、二硫代苏糖醇 (DTT) 购自 Merck 公司, $\text{FeSO}_4$  购自天津市天河化学试剂厂, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  购自国药集团化学试剂有限公司,色谱纯乙腈购自 Duksan Pure Chemicals 公司,G-7-ADCA 由中国科学院微生物研究所徐冠珠提供,其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.2 主要仪器设备

HPLC 仪:岛津 Prominence 色谱系统,配备 SPD-20A 双波长紫外检测器、LC-20AT 低压四元泵及混合器、Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱 (3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm)。

LC-MS 仪:安捷伦 1200 型 HPLC 系统,6460 型三重四极杆质谱系统。

#### 1.1.3 菌株与质粒

质粒 pET-SC (pET30a(+):*cefE*, 卡那霉素抗性, scDAOCS 的表达载体) 由本实验室的伍晓斌博士构建<sup>[12]</sup>、大肠杆菌 JM109 和 BL21 (DE3) 由本实验室保存,scDAOCS 突变体 H4、H5、H6 和 H7 由本实验室季俊杰等构建<sup>[17]</sup>。

#### 1.1.4 培养基

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0。121  $^\circ\text{C}$  灭菌 30 min, 加入 15 g/L 琼脂即为固体培养基。培养基中使用抗生素时,加入卡那霉素终浓度为 50 mg/L。

#### 1.1.5 缓冲液

含有 5%甘油的缓冲液 M (g/L): MOPS 11.626 1, DTT 0.171 4, pH 7.5。注意要现配现用,防止 DTT 氧化。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养方法与活性测定

将含有野生型和 H4、H5、H6 和 H7 突变体 scDAOCS 基因的 *Escherichia coli* BL21 (DE3)

转化子接种到含有 50 mg/L 卡那霉素的 10 mL LB 液体培养基中, 于 37 °C、220 r/min 过夜培养。取出 0.5 mL 按照 1%接种量接种到 50 mL 的相同培养基中培养至  $OD_{600}=0.4$ , 随后加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 在 25 °C、220 r/min 培养过夜。发酵完成后三角瓶取出冰浴, 9 000 r/min、4 °C 条件下离心 3 min 收集菌体。然后用含有 5%甘油的缓冲液 M (pH 7.5) 冲洗菌体 3 遍, 再将冲洗后的菌体重悬于 10 mL 的上述缓冲液中, 超声破碎细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 取上清, 即为粗酶液。由于 scDAOCS 在空气中很快失活, 因此活性测定实验使用粗酶液进行。粗酶液总蛋白测定采用 Bradford 法<sup>[20]</sup>。粗酶液中 scDAOCS 的含量通过对粗酶液 SDS-PAGE 图像利用 ImageJ 软件<sup>[21]</sup>进行灰度值统计与计算得到。scDAOCS 的 1 个酶活性单位定义为每分钟形成 1  $\mu$ g G-7-ADCA 所需要的 DAOCS 的质量, DAOCS 野生型酶及各突变体的比活力定义为每 1 mg scDAOCS 中含有的酶活性单位数<sup>[17]</sup>。

### 1.2.2 建立 G-7-ADCA 与青霉素 G 的 HPLC 定量检测方法

所用 HPLC 分析条件为:

流动相: A: 10 mmol/L  $KH_2PO_4$ , 用浓磷酸调至 pH 3.0。B: 含有 0.1%三氟乙酸的乙腈。

洗脱条件: 流速 0.5 mL/min, 70%A/30%B 等度洗脱, 洗脱时间 25 min。采用 220 和 260 nm 进行 HPLC 分析检测<sup>[21]</sup>。

青霉素 G 定量标准曲线的建立: 分别配制 0.5、1、2、4、6 及 8 mmol/L 的青霉素 G 水溶液, 各取 10  $\mu$ L 上样进行 HPLC 分析。以青霉素 G 浓度为横轴, 220 nm 下吸收峰面积为纵轴, 绘出标准曲线。

G-7-ADCA 标准曲线的建立: 分别配制 0.016、0.032、0.040、0.064、0.080 及 0.128 mmol/L 的 G-7-ADCA 水溶液, 各取 10  $\mu$ L 上样进行 HPLC 分析。以 G-7-ADCA 浓度为横轴, 260 nm 下吸收峰面积为纵轴, 绘出标准曲线。

### 1.2.3 蛋白反应活性测定

取 220  $\mu$ L 粗酶液, 按顺序加入  $FeSO_4$ 、 $\alpha$ -酮戊二酸、维生素 C 储液各 10  $\mu$ L (终浓度分别为  $FeSO_4$  1.8 mmol/L,  $\alpha$ -酮戊二酸 4.0 mmol/L, 维生素 C 0.4 mmol/L), 250  $\mu$ L 不同浓度青霉素 G 储液 (终浓度分别为: 5.6、10、20、40、80、100、200、300、500 mmol/L), 30 °C、220 r/min 反应 30 min<sup>[5]</sup>。100 °C 金属浴终止反应, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清 10  $\mu$ L 进行 HPLC 分析, 测定 260 nm 下 G-7-ADCA 吸收峰面积, 计算 G-7-ADCA 产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 scDAOCS 各突变体的活性

在 Wei 等<sup>[9]</sup>报道的 scDAOCS 高活力突变体 H4 (C155Y/Y184H/V275I/C281Y) 基础上, 本实验室季俊杰等采用迭代组合突变策略, 引入已知的有利突变, 构建了高活力突变体 H5 (H4+I305M)、H6 (H5+T213V) 及 H7 (H6+M73T), 并在低青霉素 G 浓度下 (0.2–10.0 mmol/L) 对其活性进行了评价<sup>[17]</sup>。为了在更接近工业应用条件下评价这些高活力 scDAOCS, 我们在 5.6–500 mmol/L 青霉素 G 浓度下对其催化活性进行了评价。

HPLC 分析 scDAOCS 催化反应混合物的结果如图 2 所示, G-7-ADCA 在 220 与 260 nm 下均有较强吸收, 保留时间约为 14 min; 青霉素 G 仅在 220 nm 下具有较强吸收, 保留时间约为 18.5 min。

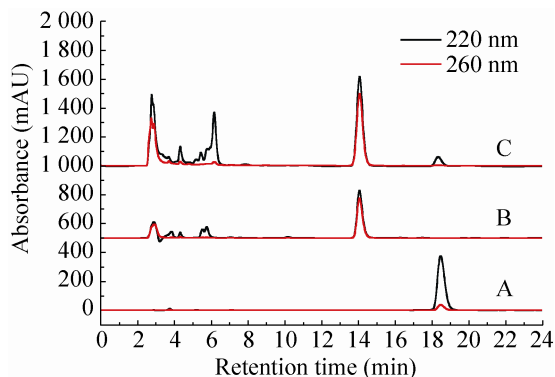


图2 青霉素 G (A)、G-7-ADCA 标准样 (B) 及反应混合物的 HPLC 谱图 (C)

Fig. 2 The HPLC traces of penicillin G (A), G-7-ADCA (B) and reaction mixture (C).

为进一步验证反应产物，我们收集对应于 G-7-ADCA 标准样的 HPLC 峰并进行 LC-MS 检验 (负离子模式)。结果如图 3 所示，可见预期的分子离子峰及相关信号： $m/z$  331.1 ( $[M-H]^-$ ), 663.2 ( $[2M-H]^-$ ), 287.1 ( $[M-COOH]^-$ )。这一结果

表明该产物的确是预期产物 G-7-ADCA。

野生型 scDAOCS 以及突变体 H4、H5、H6 和 H7 在 5.6–500 mmol/L 青霉素 G 范围内的比活力结果如图 4 所示，结果表明野生型 scDAOCS 以及这些突变体随青霉素 G 浓度的增加均出现底物抑制现象，但其表现形式却有明显差别。

对于野生型 scDAOCS 和突变体 H4 来说，其催化活性在青霉素 G 浓度约 200 mmol/L 时最强，青霉素 G 浓度继续增加时，其活性明显下降。这种先升后降的趋势与经典的竞争性抑制模型并不吻合。经典的竞争性抑制剂不改变表观  $V_{max}$ ，只是使表观  $K_m$  增大，因此在底物浓度增加时催化反应速率仍能不断增加，并趋近于无抑制剂存在时的  $V_{max}$ 。因此这一结果表明，Valegård 等推断的竞争性抑制模型并不正确。另外，在青霉素 G 浓度大于 40 mmol/L 时野生型酶与 H4 的活性基本一致，说明 H4 在高青霉素

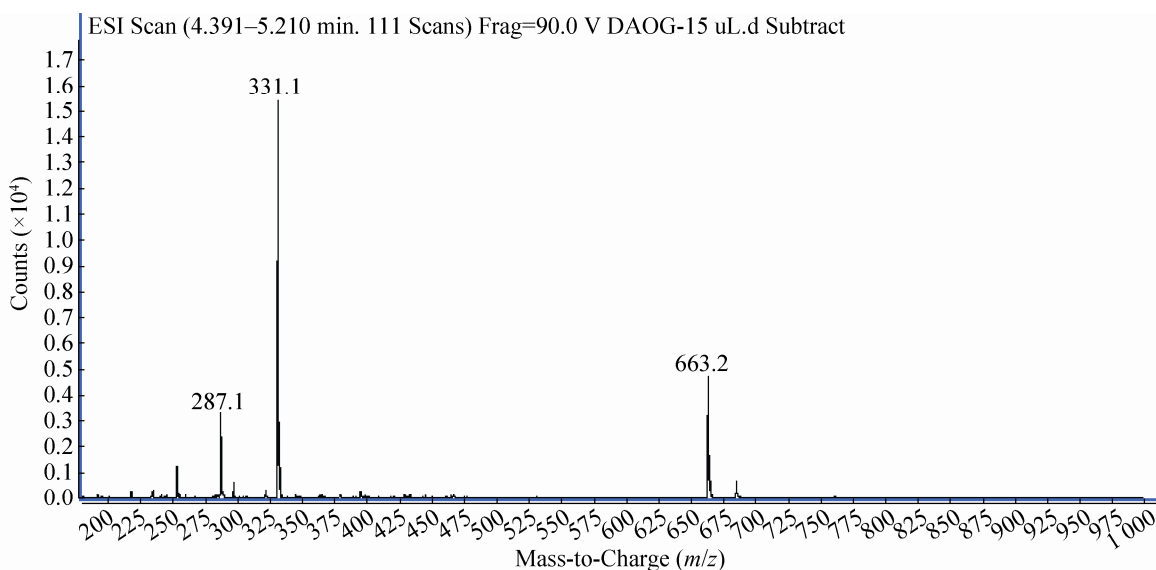


图3 产物 G-7-ADCA 的 MS 谱图 (负离子模式)

Fig. 3 The MS spectrum of G-7-ADCA (negative mode).

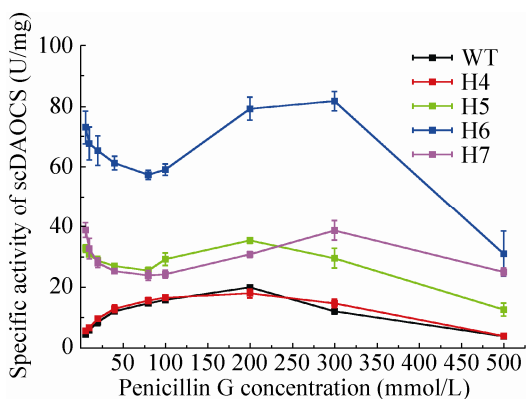


图4 不同青霉素 G 浓度下 scDAOCS 各突变体的比活力

Fig. 4 The specific activities of scDAOCS mutants under various penicillin G concentrations.

G 浓度下的表现并不好。

对于突变体 H5、H6 与 H7 来说，它们的活性随青霉素 G 浓度变化都表现出了奇异的先降后升再降的变化趋势，且活性的极小值均出现在青霉素 G 浓度为 80 mmol/L 时；H6 和 H7 活性的极大值出现在青霉素 G 浓度为 300 mmol/L 时，H5 活性极大值出现在青霉素 G 浓度为 200 mmol/L 时。这种复杂的变化趋势，表明在高浓度下青霉素 G 与 scDAOCS 突变体可能具有多种不同的结合方式，因而表现为多层次的抑制效应。

总体看来，H6、H7 两个突变体具有更高的底物耐受性，并且 H6 在此浓度范围内的比活力远远高于其他突变体，尽管在低浓度下评价其活性略低于 H7<sup>[17]</sup>。这一结果表明，H6 更适合用于高青霉素 G 浓度条件下的工业应用中，其可以容忍底物青霉素 G 浓度增加到 300 mmol/L，同时仍然保持较高活性。这也提示我们，对于筛选适合工业应用的高活力突变体来说，在高浓度底物条件下进行筛选是必不可少的，仅依靠低浓度底物条件下的筛选结果

进行评价可能还不够充分。

最近，付金衡等利用突变体 H7 成功构建了大肠杆菌全细胞催化青霉素 G 生产 G-7-ADCA 的工艺<sup>[22]</sup>。在对其进行条件优化时，他们发现在青霉素 G 浓度达到 50 mmol/L 时，增加底物的促进作用与抑制作用达到平衡，继续增加青霉素 G 其产量不升反降<sup>[22]</sup>。这说明青霉素 G 对 scDAOCS 的抑制作用已经限制了其在工业生产中的应用，换用在高浓度底物条件下仍有较强活力的突变体，如 H6 等，可能有助于进一步提高其转化能力。

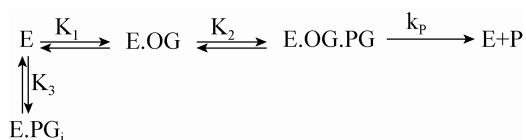
## 2.2 青霉素 G 对 DAOCS 抑制反应动力学模型的理论预测与检验

Tarhonskaya 等最近对 scDAOCS 的前稳态动力学与底物结合实验研究<sup>[19]</sup>表明 scDAOCS 的反应机制符合双底物有序反应模型，晶体结构显示青霉素 G 与 scDAOCS 存在两种结合方式，其中一种结合方式与产物取向一致，被认为是生产构象，另一种取向与  $\alpha$ -酮戊二酸一致，可能起抑制作用，称为非生产构象<sup>[7]</sup>。在此基础上，我们提出几种青霉素 G 对 scDAOCS 的抑制作用机理模型，并利用我们的实验结果进行初步的检验。

我们假设  $\text{scDAOCS} \cdot \text{Fe}^{2+} \cdot \alpha\text{-酮戊二酸} \cdot \text{青霉素 G}$  四元复合物催化扩环反应为限速步骤，而在此之前的各个底物的结合反应均已达到平衡，即符合稳态平衡假设。由于在我们的实验条件下，G-7-ADCA 的产量较低，实际转化率均小于 5%，因此我们可以假设  $\alpha$ -酮戊二酸与青霉素 G 的浓度变化不大，并以其初始浓度来近似。

模型 1：假设青霉素 G 可以非生产构象与

scDAOCS 结合, 同时抑制了 $\alpha$ -酮戊二酸的结合以及青霉素 G 以生产构象结合, 即 Valegård 等<sup>[7]</sup>推测的竞争性抑制模型。其中 E 表示 scDAOCS, OG 表示 $\alpha$ -酮戊二酸, PG 表示以生产构象结合的青霉素 G, PG<sub>i</sub> 表示以非生产构象结合的青霉素 G。

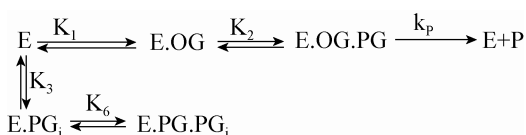


可推出反应速率为

$$v = \frac{Vc_{PG}}{A + Bc_{PG}}$$

其中  $V=k_p K_1 K_2 c_E c_{OG}$ ,  $A=1+K_1 c_{OG}$ ,  $B=K_3+K_1 K_2 c_{OG}$ ,  $c_E$  为酶浓度,  $c_{OG}$  为 $\alpha$ -酮戊二酸浓度,  $c_{PG}$  为青霉素 G 浓度,  $k_p$  为复合物催化开环反应的反应速率常数, 其他参数为各步结合反应的平衡常数 (模型 1)。按此速率方程, 反应速率随青霉素 G 浓度增加而增加, 但增加幅度逐渐放缓, 呈双曲线形。这与我们实验结果均不一致, 表明青霉素 G 对 scDAOCS 的抑制不符合竞争性抑制模型。

模型 2: 假设青霉素 G 可以非生产构象与 scDAOCS 结合, 抑制了 $\alpha$ -酮戊二酸的结合, 同时不影响青霉素 G 以生产构象结合, 但无反应活性, 即对 $\alpha$ -酮戊二酸为竞争性抑制, 对青霉素 G 为非竞争性抑制。



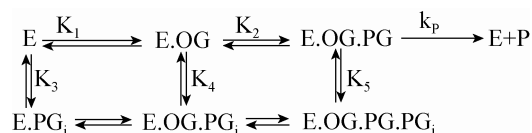
可推出反应速率为

$$v = \frac{Vc_{PG}}{A + Bc_{PG} + Cc_{PG}^2}$$

其中  $V=k_p K_1 K_2 c_E c_{OG}$ ,  $A=1+K_1 c_{OG}$ ,  $B=K_3+$

$K_1 K_2 c_{OG}$ ,  $C=K_3 K_6$ , 其他参数含义同上。对其求一阶导数可知在  $c_{PG}$  逐渐增加至  $\sqrt{A/C}$  时, 反应速率达到最大值, 然后又随  $c_{PG}$  增加而逐渐下降, 呈现先升后降的趋势, 这与我们实验得到的 scDAOCS 野生型酶及突变体 H4 的结果一致。

模型 3: 假设青霉素 G 可以非生产构象与 scDAOCS 结合, 同时不影响 $\alpha$ -酮戊二酸结合以及青霉素 G 以生产构象结合, 但无反应活性, 即对 $\alpha$ -酮戊二酸和青霉素 G 均为非竞争性抑制。



可推出反应速率为

$$v = \frac{Vc_{PG}}{A + Bc_{PG} + Cc_{PG}^2}$$

其中  $V=k_p K_1 K_2 c_E c_{OG}$ ,  $A=1+K_1 c_{OG}$ ,  $B=K_3+K_1 K_2 c_{OG}+K_1 K_4 c_{OG}$ ,  $C=K_1 K_2 K_5 c_{OG}$ , 其他参数含义同上。因为反应速率的形式与模型 2 一致, 因此其表现也应相同。

综上所述, 根据理论模型与我们实验结果的比较, 可以推论: 青霉素 G 在 scDAOCS 上至少有两个结合位点, 并且可以同时结合, 即青霉素 G 对其自身为非竞争性抑制。但是从我们的实验结果不能判断青霉素 G 对 $\alpha$ -酮戊二酸为竞争性或非竞争性抑制作用。

尽管理论模型对反应速率变化趋势的推论与 scDAOCS 野生型酶及突变体 H4 的实验结果一致, 但是仍不能解释 H5、H6 及 H7 的复杂变化趋势。相对于 H4, 这 3 个突变体都多出一个共同的突变位点 I305M<sup>[17]</sup>。Wei 等的研究表明 I305 位点的突变对 scDAOCS 活性有重要影响, 对于青霉素 G, I305M 是 I305 突变体中



$k_{\text{cat}}$  增加最大的<sup>[8]</sup>。晶体结构 (PDB: 1UOB<sup>[7]</sup>) 显示 I305 位于活性中心, 侧链末端距离 Fe(II) 约 4 Å。I305 可直接参与底物青霉素的结合, 其侧链末端与青霉素的四元内酰胺环接近, 与 1 位硫原子及 5、6 位碳原子距离在 5 Å 以内, 形成疏水作用; 与  $\alpha$ -酮戊二酸距离也在 4–6 Å, 但未形成有利的相互作用。将此位点突变为 Met, 尽管突变后 Met 仍以疏水作用为主, 但是其侧链更长, 同时引入一个硫原子, 因此该突变可能改变了底物结合口袋的形状及化学性质, 进而使底物青霉素 G 及  $\alpha$ -酮戊二酸的结合方式与结合能力发生变化, 从而引起复杂的底物抑制现象。对突变体 I305M 及其与青霉素 G 和  $\alpha$ -酮戊二酸的复合物进行晶体结构研究, 可能有助于我们了解其可能的作用机制。

### 3 结论

青霉素扩环酶是酶法催化青霉素类化合物合成头孢类化合物的关键酶, 具有潜在的工业应用价值。我们研究了 scDAOCS 野生型酶以及高活力突变体 H4、H5、H6、H7 在青霉素 G 浓度 5.6–500 mmol/L 区间内的活性变化趋势, 发现在高青霉素 G 浓度下它们均存在明显的底物抑制现象, 其中 H6 在青霉素 G 浓度大于 100 mmol/L 时仍能保持较高的催化活力, 适合在高浓度底物下的工业应用。

野生型 scDAOCS 及各个突变体在高青霉素 G 浓度 (大于 80 mmol/L) 均表现出复杂的底物抑制现象, 其中野生型酶及突变体 H4 的表现与非竞争性抑制模型预测相符, 而突变体 H5、H6 和 H7 可能有更复杂的抑制作用机制。

### REFERENCES

- [1] Baldwin JE, Abraham E. The biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Nat Prod Rep*, 1988, 5(2): 129–145.
- [2] Valegård K, van Scheltinga AC, Lloyd MD, et al. Structure of a cephalosporin synthase. *Nature*, 1998, 394(6695): 805–809.
- [3] Kovacevic S, Weigel BJ, Tobin MB, et al. Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Streptomyces clavuligerus* gene encoding deacetoxycephalosporin C synthetase. *J Bacteriol*, 1989, 171(2): 754–760.
- [4] Diez B, Mellado E, Rodriguez M, et al. Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 55(1): 216–226.
- [5] Cho H, Adrio JL, Luengo JM, et al. Elucidation of conditions allowing conversion of penicillin G and other penicillins to deacetoxycephalosporins by resting cells and extracts of *Streptomyces clavuligerus* NP1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(20): 11544–11548.
- [6] Chin HS, Sim TS. C-terminus modification of *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase improves catalysis with an expanded substrate specificity. *Biochem Biophys Res Comm*, 2002, 295(1): 55–61.
- [7] Valegård K, van Scheltinga AC, Dubus A, et al. The structural basis of cephalosporin formation in a mononuclear ferrous enzyme. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(1): 95–101.
- [8] Wei CL, Yang YB, Wang WC, et al. Engineering *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase for optimal ring expansion activity toward penicillin G. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(4): 2306–2312.
- [9] Wei C, Yang Y, Deng C, et al. Directed evolution of *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase for enhancement of penicillin G expansion. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12): 8873–8880.

- [10] Hsu J, Yang Y, Deng C, et al. Family shuffling of expandase genes to enhance substrate specificity for penicillin G. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(10): 6257–6263.
- [11] Lee HJ, Dai YF, Shiau CY, et al. The kinetic properties of various R258 mutants of deacetoxycephalosporin C synthase. *Eur J Biochem*, 2003, 270(6): 1301–1307.
- [12] Ji J, Tian X, Fan K, et al. New strategy of site-directed mutagenesis identifies new sites to improve *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase activity toward penicillin G. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2395–2401.
- [13] Chin HS, Sim J, Sim TS. Mutation of N304 to leucine in *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase creates an enzyme with increased penicillin analogue conversion. *Biochem Biophys Res Comm*, 2001, 287(2): 507–513.
- [14] Goo KS, Chua CS, Sim TS. A complete library of amino acid alterations at R306 in *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase demonstrates its structural role in the ring-expansion activity. *Proteins*, 2008, 70(3): 739–47.
- [15] Chin HS, Goo KS, Sim TS. A complete library of amino acid alterations at N304 in *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase elucidates the basis for enhanced penicillin analogue conversion. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 607–609.
- [16] Goo KS, Chua CS, Sim TS. Relevant double mutations in bioengineered *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase result in higher binding specificities which improve penicillin bioconversion. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(4): 1167–1175.
- [17] Ji J, Fan K, Tian X, et al. Iterative combinatorial mutagenesis as an effective strategy for generation of deacetoxycephalosporin C synthase with improved activity toward penicillin G. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(21): 7809–7812.
- [18] Goo KS, Chua CS, Sim TS. Directed evolution and rational approaches to improving *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase for cephalosporin production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(5): 619–633.
- [19] Tarhonskaya H, Szöllössi A, Leung IKH, et al. Studies on deacetoxycephalosporin C synthase support a consensus mechanism for 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Biochemistry*, 2014, 53(15): 2483–2493.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [21] Girish V, Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer*, 2004, 41(1): 47–47.
- [22] Fu JH, Zhao J, Lin BX, et al. Optimization of whole-cell biocatalysis for phenylacetyl-7-aminodeacetoxycephalosporanic acid production. *Chin J Biotech*, 2014, 30(11): 1782–1786 (in Chinese).
- 付金衡, 赵健, 林白雪, 等. 全细胞催化生产苯乙酰-7-氨基-3-脱乙酰氧基头孢烷酸的条件优化. *生物工程学报*, 2014, 30(11): 1782–1786.

(本文责编 陈宏宇)