

节杆菌 K1108 乙内酰胺酶产酶条件研究

张惟材¹ 郝淑凤² 袁红杰¹ 王书锦² 黄留玉¹

(¹ 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

(² 中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

摘 要 研究了乙内酰胺酶产生菌节杆菌 K1108 的产酶条件。该菌乙内酰胺酶为诱导酶,存在于细胞内,乙内酰胺水解酶和 N-氨甲酰氨基酸水解酶是同时被诱导产生。最适诱导物为 5-苄基乙内酰胺,而 5-吡啶甲基乙内酰胺和 5-苯基乙内酰胺等不能诱导其酶的产生。筛选到一种安慰诱导物,诱导活性提高了 2 倍多。对产酶培养基进行了筛选和优化,在最适条件下, K1108 产酶能力可达 10.8U/mL。

关键词: 节杆菌,乙内酰胺酶,产酶条件

中图分类号: Q556 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)02-0214-06

乙内酰胺酶是由乙内酰胺水解酶、N-氨甲酰氨基酸水解酶及乙内酰胺消旋酶组成的酶系,可催化 5-位单取代乙内酰胺类化合物水解经过中间产物 N-氨甲酰氨基酸氨基酸水解为 α -氨基酸。乙内酰胺酶的一项重要应用就是进行各种 α -氨基酸的酶法生产^[1]。此外,根据对地球原始环境的推测和分析,原始水圈的氨基酸可能多以对应的 N-氨甲酰氨基酸或乙内酰胺类化合物的形式存在。乙内酰胺酶还被认为是在微生物三界系统形成之前就已经存在的一种将 N-氨甲酰氨基酸或乙内酰胺转化为游离氨基酸的原始酶类,因此乙内酰胺酶及其产生菌是研究生命起源和进化的重要生物材料^[2]。我们报道了一株乙内酰胺酶产生菌节杆菌 K1108 的分离及其完整细胞对 5-苄基乙内酰胺的水解作用^[3-4]。本文研究了该菌的产酶条件,现报道于下。

1 材料和方法

1.1 菌株

节杆菌(*Arthrobacter* sp.) K1108 由本室分离得到并鉴定为节杆菌属的一个种。

1.2 试剂

5-苄基乙内酰胺(5-BH)、N-氨甲酰基苯丙氨酸(N-CP)、5-苯基乙内酰胺(5-PH)、N-氨甲酰基苯甘氨酸(N-CG)、5-吡啶甲基乙内酰胺(5-IMH)、N-氨甲酰色氨酸(N-CT)和 5-BSH 等乙内酰胺类化合物及衍生物系本室化学合成, L-苯丙氨酸系日本味之素公司产品,其他均为市售分析纯化学试剂。底物悬液:将 1g 5-BH 溶于 2mol/L NaOH,用 2mol/L HCl 中和至 pH7.0,再加 CoCl₂ 6.5mg,十六烷基三甲基溴化铵 10mg,溶解后定溶至 100mL。Ehrlich 试剂:10%对二氨基苯甲醛溶于 6mol/L CH₁。

1.3 培养基

GYP 培养基:葡萄糖 5g,酵母膏 10g,蛋白胨 10g,加蒸馏水至 1L。调 pH 至 7.2,121℃ 灭菌 20min。GYPBH 培养基:每升 GYP 培养基中补加诱导物 5-BH 1g。

1.4 产酶休止细胞的制备

从斜面上接一环 K1108 菌种至含 5mL GYP 培养基的试管中,30℃ 260r/min 振荡培养 24h,再按 5% 接种量转接至含 GYPBH 的摇瓶中,30℃ 260r/min 振荡培养 24h。10 000r/min 离心收集菌体,用生理盐水洗涤 2 次,重悬于适当缓冲液中。

1.5 产物和中间产物的薄层层析(TLC)法检测

节杆菌 K1108 休止细胞 50 μ L,底物悬液 50 μ L,于 45℃ 恒温水浴中反应 4h,离心,上清液在硅胶 G 薄板上用正丁醇-醋酸-水(4:1:1)展开,用 0.5% 茚三酮的丙酮溶液喷雾显色检测氨基酸,用 Ehrlich 试剂喷雾显色检测 N-氨甲酰氨基酸。

1.6 酶活的定量测定

节杆菌 K1108 休止细胞 4mL,0.1% 底物溶液 4mL,于 45℃ 水浴中反应 1h,加 12% 三氯乙酸 2mL 中止反应,离心,用高效液相色谱法测定上清液中转化产物的含量。以 5-BH 为底物,根据测得的苯丙氨酸生成速率计算乙内酰胺酶活力,根据 N-CP 的生成速率计算乙内酰胺水解酶活力;以 N-CP 为底物,根据测得的苯丙氨酸生成速率计算 N-氨甲酰氨基酸水解酶活力。将 1h 内催化底物水解生成 1mg 产物的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。单位体积培养液中所具有的酶活力用比活(U/mL)表示。在一项实验中各试验组实测酶活力的相对值用相对酶活(%)表示。

2 结果和讨论

2.1 乙内酰胺酶在细胞中的定位

用 TLC 法分别检测了节杆菌 K1108 培养液上清和菌体的乙内酰胺酶活性,结果发现菌体部分呈现较强的活性,而上清液部分则几乎测不出活性,将菌体部分用生理盐水洗涤四次,酶活仍未呈下降趋势。将洗涤的菌体超声破碎,离心,在无细胞提取液中检测到较强的酶活。在菌体对数生长后期(20h)向发酵液中补加青霉素至 1000U/mL 继续培养 8h 以促使细胞裂解,在离心得到的上清液中也检测到乙内酰胺酶活力(表 1)。这些现象说明, K1108 菌株产生的乙内酰胺酶可能是胞内酶。这与国外多数有关乙内酰胺酶的报道一致。从 K1108 完整细胞对底物的转化情况看到,即使该菌的乙内酰胺酶为胞内酶,细胞对于底物或产物的通透性没有明显障碍。

2.2 乙内酰胺酶的可诱导性

分别用 GYP 培养基和分别添加 1g/L 5-BH 及 N-CP 的 GYP 培养基对 K1108 进行培养,测定所得菌体各种酶的活力(表 2),表明 K1108 的乙内酰胺水解酶和 N-氨甲酰氨基酸水解酶均为诱导酶,在无诱导物存在时总酶活仅为 5-BH 诱导下的 1/40 左右。另外 N-CP 也有较强

表 1 K1108 乙内酰胺酶在细胞中的定位

Table 1 Cellular location of K1108 hydantoinase*

Treatment	Hydantoinase in	
	supernatant	pellet
Culture	-	++
Ultrasonic treatment	++	+
Penicillin treatment	++	++

* Symbols: - no hydantoinase activity; + moderate hydantoinase activity;

++ strong hydantoinase activity

的诱导作用,但比 5-BH 低。从表 2 结果还看到,无论底物 5-BH 或中间产物 N-CP 皆可同时诱导产生两种酶,表明组成 K1108 乙内酰胺酶系的两种酶是同时产生的,提示两种酶的结构基因可能是位于同一个操纵子上。

表 2 K1108 乙内酰胺酶的可诱导性

Table 2 Inducibility of K1108 hydantoinase*

Enzyme	Without inducer	Induced by 5-BH	Induced by N-CP
Hydantoinase	0.05	2.32	1.02
Hyphantoin hydrolase	0.13	4.52	2.13
N-carbamoylamino acid hydrolase	0.06	2.47	1.07

* The figures in the table are specific activities (U/mL)

诱导作用的影响很大。在各种乙内酰胺类底物中,5-BH 诱导作用最强,然而即使结构上与 5-BH 相似的 5-PH 和 5-IMH (5-位取代基团分别为苯基和咪唑甲基)也未发现诱导作用,只有在苯环上比 5-BH 多一个羟基的 5-HBH 诱导活性接近 5-BH 的水平。这些结果说明 K1108 对诱导物的结构有比较严格的要求。国外报道^[5-7]过的一些 5-芳基取代乙内酰胺酶,在性质上与 K1108 乙内酰胺酶很接近,但是最适底物和最适诱导物均为 5-IMH,而本文发现 K1108 的乙内酰胺酶不能以 5-IMH 为诱导物。另外在研究 K1108 底物专一性时发现^[8],该菌乙内酰胺酶的最适底物也是 5-BH,而 5-PH 和 5-IMH 也不能作为其乙内酰胺酶的有效底物,表明该乙内酰胺酶与国外报道过的同类酶存在一定差异。

表 3 各种化合物对 K1108 乙内酰胺酶的诱导作用

Table 3 Induction of some compounds on K1108 hydantoinase

Compounds	Substitute groups	Relative activity/%	Compounds	Substitute groups	Relative activity/%
	Hydantoins		AlaH	Methyl	0
5-BH	Phenylmethyl	100	MetH	(1-Methyl)propyl	0
5-PH	Phenyl	0.8	GluH	Propionyloxy	0
5-IMH	Indolylmethyl	0.2	LysH	Butylamine	0
5-HBH	Hydroxyphenylmethyl	94		N-carbamoylamino acids	
LeuH	(2-Methyl)propyl	0	N-CP	Phenylmethyl	43
IleH	(1-Methyl)propyl	0	N-CT	Indolylmethyl	0
ValH	Isopropyl	0	N-CG	Phenyl	0

2.4 安慰诱导物的筛选

制备了一些底物 5-BH 的衍生物,考察了这些衍生物对 K1108 的诱导活性和底物活性,结果见表 4。业已发现, K1108 菌体产酶比活在对数中期最高,其后比活下降。其中一个主要因素是诱导物被诱导产生的酶所水解。通过对底物的改构,使其保留诱导作用而不被水解,可望提高诱导酶的产生,这种不能作底物的诱导物称为安慰诱导物。从表 3 结果看到, K1108 对诱导物的专一性比较强,因此 5-位取代基团不宜改动。由于酶的作用部位是乙内酰胺环上的 3-位和 1-位内酰胺键,因此可在这些部位进行保护或改构,包括甲基

化、羟基取代、硫代和烷基取代等。从表 4 结果看到,多数衍生物在失去底物活性同时也失去了诱导作用,有些情况下(如甲基化)仍保留了底物活性。两种烷基取代的衍生物 5-BESH 和 5-BSH 却失去底物活性同时保留了诱导作用,使酶的产生有了明显提高,其中 5-BSH 的诱导作用比 5-BH 提高了 2 倍多。

2.5 产酶培养基的筛选

收集了氨基酸发酵、乙内酰脲酶生产及棒状菌群的有关培养基配方 5 个,配制各种液体培养基,其中均添加 0.1% 5-BSH 作为诱导物,进行摇瓶培养。测定培养液于 600nm 下测定菌液的密度;另收集菌体洗涤,测定总酶活力,以每毫升 GYP 培养基所得菌体的酶活为 100%,计算其他培养基相对于该培养基的相对产酶活力,结果见表 5。从表 5 看到,在上述 5 个培养基中,GYP 培养基产酶活力较高,其次为 GCU 和 GY 培养基,GCU 培养基产酶活力与 GYP 培养基非常接近,尤其在该培养基中菌体生长最好。此外以玉米浆为主要成分的 GCU 培养基成本最低,适合于大规模发酵。因此可在 GCU 培养基的基础上适当改良配方确定适合于乙内酰脲酶生产的发酵培养基。

表 5 K1108 培养基的筛选

Table 5 Screening of media of K1108

Media	Main components	Cell density/ A_{600}	Relative activity/%
GYP	Glucose yeast extracts peptone	23.7	100
GCU	Glucose corn steep urea	29.6	98.6
GY	Glucose yeast extracts	20.5	94.1
DPA	Dextrin yeast extracts peptone	15.8	67.0
GMY	Glucose yeast extracts meat extracts	22.3	87.3

2.6 产酶培养基的优化

用氯化铵代替 GCU 培养基中的尿素,发现产酶活性略有提高,而且氯化铵较稳定,故用氯化铵取代了 GCU 中的尿素。然后通过均匀设计的方法考察了该培养基中的 5 种主要成分葡萄糖、诱导物、玉米浆、 NH_4Cl 及 K_2HPO_4 的最适用量。5 个因素的考察范围确定如下:

A:葡萄糖 1.00% ~ 3.50%; B:诱导物(5-BSH) 0.05% ~ 0.60%; C:玉米浆 0.50% ~ 3.00%; D: NH_4Cl 0.10% ~ 1.20%; E: K_2HPO_4 0.05% ~ 0.60%。

将上述 5 个因素在考察范围内分成 12 个水平,选择 $U_{12}(13^{12})$ 表,根据其使用表的规定,选取其中的 1,6,8,9,10 列,组成 $U_{12}(12^5)$ 表。将该表对应各因素的各水平填入表得到表 6 的试验方案。按此表再加入培养基的不变成分组成一系列不同的 GCU 培养基,在

表 4 安慰诱导物的设计和筛选

Table 4 Screening of gratuitous inducers

Compounds	Types	Relative activity/%	Induction activity/%
5-BH		100	100
5-PMPD	Alkyl substituted	0	0
N-TCP	Thiation	0	0
5-BTH	Thiation	0	0
5-PHCP	Hydroxylated	0	0
5-BMH	Methylated	23	65
5-BESH	Alkyl substituted	0	207
5-BSH	Alkyl substituted	0	343

摇瓶条件下进行产酶菌的培养,测定培养液的菌密度和菌体的比活,试验结果并入表中。将表中数据输入计算机,利用多元逐步回归程序进行处理,得下列 3 组回归方程:

菌密度(A_{600}):

$$Y_1 = 4.06 + 23.5A - 3.05A^2 - 3.49B^2 - 2.67AB - 1.83AC - 9.95AE + 12.9CE - 14.6DE \dots\dots\dots \text{I}$$

相关系数 $R = 0.9904$ 经程序自检 $\alpha = 0.0166$ 时, F 检验通过。

比活力(U/A_{600}):

$$Y_2 = 0.150 - 0.231A + 0.882B + 0.0953C + 0.197D + 0.0674E + 0.0348A^2 - 0.950B^2 - 0.0138C^2 - 0.0761D^2 + 0.0300E^2 \dots\dots\dots \text{II}$$

相关系数 $R = 0.9998$ 经程序自检 $\alpha = 0.0474$ 时, F 检验通过。

总酶活(U/mL):

$$Y_3 = -1.22 - 1.24A + 25.3B + 4.34C + 2.30D - 30.4B^2 - 0.886C^2 - 0.699D^2 \dots\dots \text{III}$$

相关系数 $R = 0.9848$ 经程序自检 $\alpha = 0.0068$ 时, F 检验通过。

从以上分析结果可以看出:①葡萄糖有利于菌体成长,但不利于酶的产生,为了保证菌体的正常生长又尽量降低葡萄糖对产酶的负效应,可采用 1% 的浓度;②诱导物对产酶有利,可以通过增加诱导物含量提高酶的产量,但增加诱导物对酶活提高的幅度不大,且诱导物成本较高,不宜采用过高浓度,以 0.1% 为宜;③玉米浆对产酶比活的影响不显著,但玉米浆既作为有机氮源又提供菌体生长所需的维生素和微量元素,对菌体的生长有显著影响,添加玉米浆的量以保证菌体生长为宜,采用了原配方的量;另外 NH_4Cl 及 K_2HPO_4 对菌体生长和产酶的影响亦不显著,同样采用原配方量。由此确定了产酶培养基 GCI 的配方,在其中不加诱导物则为 GC 培养基。用这种经优化得到 GCI 培养基进行了产酶的发酵试验,结果 K1108 菌体的产酶活力达到 10.8U/mL(表 6)。

表 6 $\text{U1X } 12^5$ 试验方案及结果

Table 6 Experimental design and results of $\text{U1X } 12^5$ test

Number	A	B	C	D	E	Cell density ^a	Specific activity ^b	Total activity ^c
1	1.00	0.30	2.00	0.90	0.50	21.3	0.425	9.03
2	1.00	0.60	1.00	0.50	0.35	17.7	0.327	5.69
3	1.50	0.25	3.00	0.10	0.20	27.3	0.238	6.50
4	1.50	0.55	1.50	1.00	0.05	25.3	0.318	8.03
5	2.00	0.20	0.50	0.60	0.55	24.7	0.149	3.67
6	2.00	0.50	2.50	0.20	0.40	30.8	0.253	7.79
7	2.50	0.15	1.00	1.10	0.25	30.5	0.123	3.75
8	2.50	0.45	3.00	0.70	0.10	26.2	0.216	6.84
9	3.00	0.10	2.00	0.30	0.60	29.7	0.085	2.52
10	3.00	0.40	0.50	1.20	0.45	22.2	0.178	3.74
11	3.50	0.05	2.50	0.80	0.30	29.1	0.095	2.76
12	3.50	0.35	1.50	0.40	0.15	32.7	0.149	4.87
GCI	1.00	0.10	3.00	0.50	0.20	31.5	0.355	10.80

^a in A_{600} , ^b in U/A_{600} , ^c in U/mL

参 考 文 献

- [1] 张惟材 . 生物技术通讯 ,1999 ,10 :141 ~ 144 .
 [2] Syldatk C ,May O. *Appl Microbiol* ,1999 **51** :293 ~ 309 .
 [3] 张惟材 ,沙 沂 ,宋爱华 ,等 . 生物技术通讯 ,1999 ,10 :161 ~ 163 ,164 .
 [4] 张惟材 ,宋爱华 ,沙 沂 ,等 . 生物技术通讯 ,1999 ,10 :164 ~ 166 .
 [5] Nishida Y ,Nakamichi K ,Nabe K ,et al . *Enzyme-Microb Technol* ,1987 **9** :721 ~ 725 .
 [6] Gross C ,Syldatk C ,Mackowiak V ,et al . *J Biotechnol* ,1990 **14** :363 ~ 376 .
 [7] Syldatk C ,Cotoras D ,Dombach G ,et al . *Biotechnol Lett* ,1987 **9** :25 ~ 30 .
 [8] 张惟材 ,袁红杰 ,郝淑凤 ,等 . 生物工程学报 ,2001 **17** (6) :635 ~ 638 .

Studies on Hydantoinase Producing Conditions of *Arthrobacter* K1108

Zhang Weicai¹ Hao Shufeng² Yuan Hongjie¹ Wang Shujin² Huang Liuyu¹

(¹ Institute of Biotechnology ,Beijing ,100071 ,China)

(² Institute of Ecology ,Academia Sinica ,Shenyang ,110015 ,China)

Abstract : The hydantoinase-producing conditions from strain *Arthrobacter* K1108 were investigated. It is shown that the hydantoinase in the strain is intracellular and inducible. Its optimal inducer is 5-benzylhydantoin ,while 5-indolymethylhydantoin and 5-phenylhydantoin cannot induce the production of hydantoinase in K1108. A gratuitous inducer was designed with which the hydantoinase production is 343% as much as that with 5-benzylhydantoin. The media for culturing the bacteria were screened and optimized. Under optimal conditions ,the specific activity of K1108 cells reached 10.8U/mL.

Key words : *Arthrobacter* , Hydantoinase , Enzyme producing conditions

寻求微生物发酵新技术、新产品合作项目

★ 合作方式 : 技术转让、技术入股、共同开发均可。

★ 单 位 : 山西省农科院科锋中心

★ 联 系 人 : 张先生 郭先生

★ 联系电话 : 0351 - 7123328

★ E-mail : kefeng@public.ty.sx.cn