

一株烟酸羟基化转化菌株的筛选和鉴定

陆伟宏 徐 莉 戴亦军 袁 生*

(南京师范大学生命科学学院 江苏省资源生物技术重点实验室 南京师范大学微生物工程重点实验室 南京 210097)

摘 要:从南京地区的土壤中筛选到一株高效转化烟酸为 6-羟基烟酸的菌株 NA-1。形态及生理生化特征测定结果表明,NA-1 菌株与假单胞菌属(*Pseudomonas*)中的恶臭假单胞菌(*P. putida*)种的特征基本一致。测定了该菌株的 16S rDNA 序列并根据 16S rDNA 构建了系统发育树,在系统发育树中,NA-1 菌株与恶臭假单胞菌形成一个类群,序列同源性为 99%。因此将 NA-1 菌株鉴定为恶臭假单胞菌。

关键词:烟酸 6-羟基烟酸 生物转化 恶臭假单胞菌

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)01-0006-04

在化学农药的最新发展中,含氮杂环化合物占据了主要地位。以吡虫啉、吡虫清为代表的吡啶甲胺类农药具有高效、广谱、低毒的特点,已成为当今新农药开发的重点,这类农药以尼古丁乙酰胆碱为作用的靶标,对有机磷类、氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类农药已产生抗性的害虫防治有良好效果^[1]。6-羟基烟酸是合成吡啶甲胺类农药的重要中间体,同时广泛用于医药和染料的合成。用化学方法合成 6-羟基烟酸步骤繁杂,提纯困难。生物转化技术具有反应条件温和、流程简单、产品纯度高、不污染环境等特点,显示出广阔的应用前景^[2~5]。

利用微生物转化烟酸生产 6-羟基烟酸已经成为国外研究热点,如 Nagasawa 报道的荧光假单胞菌 TN5 菌株^[6]、Hurh 报道的粘质沙雷氏菌 IFO12648 菌株^[7]均能用于 6-羟基烟酸的生产。目前,国内的 6-羟基烟酸市场均为外国公司占领,且价格昂贵,严重制约国内相关产品的研发生产。为了突破此瓶颈,本实验室进行了大量的菌株筛选工作,得到多株烟酸转化菌。其中一株高产菌株 NA-1 经分类鉴定确定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),尚未见文献公开详细报道。本文的工作为国内开发 6-羟基烟酸的生物转化法生产工艺奠定了坚实基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源:筛选的土样采自南京化工厂、紫

金山、江心洲、古城墙、鸡鸣寺、农药厂污水排放口、南湖、雨花台和江浦开发区等地。

1.1.2 培养基 筛选培养基 A:每升含酵母粉 5g,蛋白胨 10g,NaCl 10g,烟酸 10g,pH7.0。筛选培养基 B:每升含牛肉膏 3g,蛋白胨 10g,NaCl 5g,烟酸 10g,pH7.0。筛选培养基 C:每升含蛋白胨 10g,酵母粉 10g,K₂HPO₄ 3g,KH₂PO₄ 1g,烟酸 10g,pH7.0。筛选培养基 D:每升含烟酸 10g,(NH₄)₂SO₄ 2.0g,MgSO₄·7H₂O 0.2g,NaH₂PO₄·H₂O 0.5g,CaCl₂·2H₂O 0.1g,K₂HPO₄ 0.5g,pH6.5。斜面和平板培养基:每升含酵母粉 5g,蛋白胨 10g,NaCl 10g,烟酸 10g,琼脂 20g,pH7.0。

1.1.3 仪器 Smart 3000 型分光光度计购自 Bio-Rad 公司,3K30 高速冷冻离心机购自 Sigma 公司,HD-930 型全温摇床购自博莱特仪器厂,LC-MSD-Trip-SL-01100 液质联用仪购自 Agilent 公司,Avance400 核磁共振仪购自 Bruker 公司,H600-11 透射电镜购自日立公司,PTC-100 型 PCR 仪购自 MJ Research 公司。

1.2 菌种筛选

取土样 5g,加入 45mL 无菌水混匀后,取 1mL 接入筛选培养基中,30℃ 振荡(200r/min)培养 24h,以适宜稀释度的培养液于平板划线或涂布进行分离纯化,获得的单菌落分别挑于斜面培养基培养(30℃,24~48h),置于 4℃ 保存。将斜面培养物经活化(30℃,24~48h)后,取一接种环加入筛选培养基中(20mL 装液量/100mL 锥形瓶),30℃、200r/min 培养

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA308A05-02)

* 通讯作者。Tel 86-25-83598790 Fax 86-25-83598723 E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn

作者简介:陆伟宏(1974-)男,湖南人,硕士研究生,主要从事微生物转化研究。E-mail: luweihong168@sohu.com

收稿日期:2004-06-18,修回日期:2004-11-12

20h 后供转化试验。

1.3 转化

定量吸取 1mL 菌液离心(5000r/min ,10min),菌体用 0.02mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)5mL 洗涤两次 ,并悬浮于 1mL 此缓冲液中 ,加入终浓度为 1% 的烟酸。于 30℃ 振荡(200r/min)反应 120min。反应体系置于用一次性透气膜封口的 50mL 离心管中进行。离心(5000r/min ,10min)取上清 ,加热(100℃ , 5min),离心(5000r/min ,10min)取上清供测试。在上述反应的条件下 ,1min 催化烟酸生成 1μmol 6-羟基烟酸所需的酶量定义为一个活力单位(U)。另设两组分析检测对照样品 :对照 1(转化菌株 + 缓冲液),排除菌株自身代谢物的干扰 ;对照 2(烟酸 + 缓冲液)排除非微生物因素引起的烟酸结构的改变。

1.4 形态特征的观察

用革兰氏法染色 ,在光学显微镜下观察菌体形态、大小 ;用磷钨酸钠染色 ,在透射电子显微镜下观察鞭毛。在固体培养基 LB 平板、血平板上观察 24h 菌龄的菌落形态。

1.5 生理生化特征的测定

各项生理生化指标的测定均按常规方法进行^[8]。

1.6 16S rDNA 的扩增和序列分析

1.6.1 基因组 DNA 的提取 :基因组 DNA 的提取参照文献 9 的方法并稍做改进 ,即进行到加入等体积酚/氯仿/异戊醇步骤时 ,重复此步操作 ,直到上下液层界面清楚 ,再继续后续操作。

1.6.2 PCR 扩增 :以 primer A (5'-AACTGAAGAG TTTGATCCTGGCTC-3')和 primer B (5'-TACGGTTAC-CTTGTTACGACTT-3')为上下游引物扩增 NA-1 菌株的 16S rDNA。primer A 和 primer B 分别靶向大肠杆菌(*Escherichia coli*)16S rDNA 的 2 ~ 25 位和 1492 ~ 1513 位核苷酸^[10]。PCR 反应体系(50μL):50ng DNA ,0.2mmol/L dNTP ,2.0mmol/L MgCl₂ ,20pmol/L primer A ,20pmol/L primer B ,1 × PCR 反应缓冲液 ,1.25U *Taq* DNA 聚合酶。反应条件 :95℃ 5min 95℃ 1min 59℃ 2min 72℃ 2min 27 个循环 72℃ 10min。

1.6.3 测序 :扩增的 16S rDNA 纯化后由上海联合基因有限公司直接测序。

1.7 系统发育学分析

从 GenBank 中调取假单胞菌属(*Pseudomonas*) 12 个菌株的 16S rDNA 序列用于系统发育学分析。16S rDNA 全序列用 Clustal x (1.8)软件包排序 ,选择

大肠杆菌(*Escherichia coli*)为外群 ,用 MEGAversion 2 软件包中的 Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离 ,用 Neighbor-Joining 法构建系统发生树 ,1000 次随机抽样 ,计算自引导值(Bootstrap)以评估系统发生树的置信度。

2 结果

2.1 菌种筛选和产物鉴定

2.1.1 筛选结果 :采用诱导方法或唯一碳源的方法 ,筛选到大量利用或耐受烟酸的微生物 ,约 1200 株菌。经摇瓶复筛 ,检测生成产物的能力 ,发现有几株具有较高的转化效率(表 1)。与菌对照和底物对照相比 ,菌株 NA-1 转化液出现了一个新的很强的烟酸转化产物峰。

表 1 菌株转化烟酸的羟基化酶的活力测定

Table 1 Hydroxylase activity of strain for transforming nicotinic acid			
Name of strain	Enzyme activity (U/mL)	Name of strain	Enzyme activity (U/mL)
NA-1	0.12	NA-4	0.10
NA-2	0.09	NA-5	0.07
NA-3	0.07		

2.1.2 产物鉴定 :图 1 是烟酸和转化产物的质谱图 ,结果表明 ,转化产物的分子量是 139 ,比烟酸的分子量 123 多 16 ,即多一个氧原子 ,显然是在烟酸分子结构上引入了一个羟基。转化产物的核磁共振氢谱图(图 2)与 6-羟基烟酸标准品的完全吻合 ,其数据为 :¹H-NMR (DMSO-*d*₆) : 3.39(bs , 1H) , 6.35(d , *j* = 9.6 Hz 1H) , 7.78 (dd , *j* = 2.6 Hz , *j* = 2.6Hz , 1H) , 7.99 (d , *j* = 2.6 Hz , 1H) , 12.3 (bs , 1H)。因此证明转化产物即为 6-羟基烟酸。

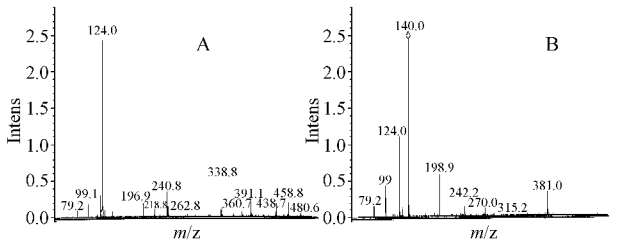


图 1 烟酸 A 和转化产物 B 的质谱图

Fig.1 Mass spectrograms of nicotinic acid (A) and transformation product (B)

The peak at *m/z* of 124.0 was assigned as molecular ion (*M* + *H*) of NA ; The peak at *m/z* of 140.0 was assigned as molecular ion (*M* + *H*) of 6-HNA .

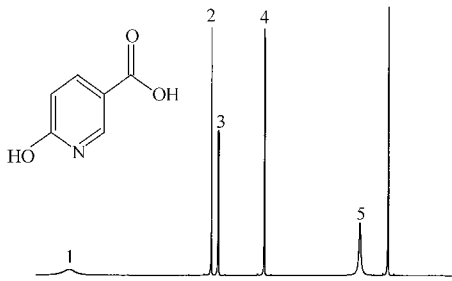


图2 转化产物的核磁共振氢谱图

Fig.2 ¹H NMR spectrum of transformation product

The chemical shift corresponding the proton : 1 , hydroxyl at C6 ; 2 , C5 ; 3 , C4 ; 4 , C2 ; 5 , carboxyl

2.1.3 转化底物特异性 :将 NA-1 菌株分别用于转化烟酸及其结构类似物 ,结果(表 2)表明 NA-1 菌株能高效地转化烟酸 ,对 3-氰基吡啶稍有一点转化能力 ,但不能转化其它结构类似物。

表 2 NA-1 菌株对底物的特异性	
Table 2 Substrate specificity of NA-1	
Substrate	Transformation rate/%
Nicotinic acid	55.0
3-Hydroxypyridine	0
3-Cyanopyridine	0.77
Pyridine	0
3-Methylpyridine	0

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态与培养特征 :NA-1 菌株的形态为短杆状 ,宽 0.7μm ~ 1.0μm ,长 1.9μm ~ 3.0μm ,无芽孢 ,革兰氏阴性 ,有亚极生鞭毛 ,在 LB 平板、血平板上 30℃ 培养 24h ,菌落呈圆形光滑状、湿润、不透明、边缘整齐、白色、易挑取 ,在 LB 液体培养基中呈混浊 ,不形成菌膜。

2.2.2 生理生化特征 :表 3 为 NA-1 菌株的生理生化特征。

表 3 NA-1 菌株的生理生化特征			
Table 3 Physiological and biochemical features of strain NA-1			
Characteristics	Results	Characteristics	Results
O/F (closed)	-	Aryinine dihydrolase	+
O/F (open)	-	Citrate utilization	+
Oxidase activity	+	Acetamide hydrolase	+
Catalase activity	+	Gelatin liquefaction	-
Pyocyanin production	-	Lipase(Tween80)	-
Poly-β-hydroxybutyrate accumulated	-	Phenylalanine deaminase	-
Acid from levulose	-	Amylolysis	-
Acid from maltose	-	Fructosan production	-
Acid from sucrose	-	H ₂ S production	-
Urase	-	4℃ growth	+
Nitrate reduction	-	41℃ growth	-
Malonate utilization	-	Glucose utilization	+
Haemolysis(sheep blood)	-	Fructose utilization	+
Penicillin sensitivity	+		

2.2.3 构建系统发育树 :测得 NA-1 菌株 16S rDNA 序列有 1463 个碱基 ,将此序列在 GenBank 中 BLAST 显示与假单胞菌属有较高的同源性 ,图 3 为它与假单胞菌属构建的系统发育树。

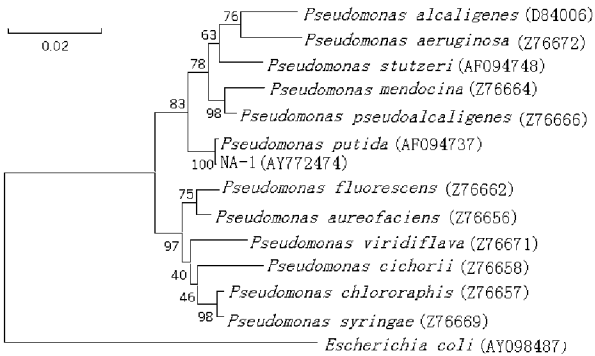


图3 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of selected strains

Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar , 2% sequence divergence.

3 讨论

工业生物转化技术被誉为“ 生物技术的第三次浪潮 ” ,广泛用于化工产品传统生产模式的改造 ,而建立生物转化生产工艺首先要得到高效转化菌株^[11] ,在对应生态环境中筛选有助于找到目标菌株。我们从吡啶类农药生产厂家污水排放口的附近土壤筛选到一株高转化能力的菌株 NA-1。

NA-1 菌株的形态和生理生化特征与恶臭假单胞菌基本一致^[8]。基于 16S rDNA 序列分析的系统发育学和表型特征存在较好的相关性^[12] ,越来越广泛的应用于细菌的分类。在构建的系统发育树中 ,菌株 NA-1 与恶臭假单胞菌聚成一个类群 ,序列同源性为 99%。综合各项实验结果 ,将 NA-1 菌株鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。烟酸羟基化转化菌株的筛选和分类鉴定工作对于 6-羟基烟酸的生物转化法生产工艺的建立有重要意义。进一步实验证明 ,NA-1 菌株相对于其它报道的菌株^[13]而言有一个突出的优点 ,它将烟酸高效地转化为 6-羟基烟酸后 ,不能再继续降解 6-羟基烟酸 ,因此非常有利于持续的生物转化生产中累积产物 ,简化了后续提纯步骤。这些实验工作及 NA-1 菌株的发酵转化研究将另文发表。

参 考 文 献

- [1] 冯晓亮,徐林祥. 2-氯-氯甲基吡啶的合成方法及其在农药合成中的应用. 浙江化工, 2001, 32(2): 50-51.
- [2] Schmid A, Dordick J S, Hauer B, *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409(11): 258-268.
- [3] 赵爱民,李文忠,杨慧芳. 3-氰基吡啶水合酶产生菌的筛选及其酶形成条件. 微生物学报, 1994, 34(2): 131-136.
- [4] 陈 跖,孙旭东,史 悦,等. 微生物生产丙烯酰胺的研究(I)- 腈水合酶产生菌株的培养和高活力的表达. 生物工程学报, 2002, 18(1): 55-58.
- [5] 鲍晓民,高 东,王祖农. 嗜热细菌木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中的高效表达. 微生物学报, 1999, 39(1): 49-54.
- [6] Nagasawa T, Hurh B, Yamane T. Production of 6-hydroxynicotinic acid from nicotinic acid by resting cells of *Pseudomonas fluorescens* TN5. *Biosci Biotech Biotech*, 1994, 58(4): 665-668.
- [7] Hurh B, Ohshima M, Yamane T, *et al.* microbial production of 6-hydroxynicotinic acid, an important building block for the synthesis of modern insecticides. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, 77(4): 382-385.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] Osborn F, Blinder R, Justin R E, *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998, 39-40.
- [10] Hurek T, Wagner B. Identification of N₂-fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR genomic fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4331-4339.
- [11] Ogawa J, Shimizu S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends in Biotechnology*, 1999, 17(1): 13-20.
- [12] Vandamme P, Pot B, Gillis M. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, 1996, 60: 407-438.
- [13] Torimura M, Yoshida H, Kano K, *et al.* Bioelectrochemical transformation of nicotinic acid into 6-hydroxynicotinic acid on *Pseudomonas fluorescens* TN5-immobilized column electrolytic flow system. *J Mol Catal*, 2000, 8: 265-273.

Screening and identification of a strain for hydroxylation of nicotinic acid

LU Wei-hong XU Li DAI Yi-jun YUAN Sheng*

(Jiangsu Key Laboratory for Bioresource technology, NNU Laboratory of Microbiology and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract : Strain screening was conducted on a large scale in order to develop a biotransforming process for 6-hydroxynicotinic acid production. A strain named as NA-1 was isolated from soil which could transform nicotinic acid into a new product showed by HPLC. The new product was identified as 6-hydroxynicotinic acid by MS and ¹H-NMR. The morphology, physiological and biochemical characteristics of strain NA-1 were studied and showed that characteristics of strain NA-1 were essentially consistent with *Pseudomonas putida*. The analysis of 16S rDNA sequence from strain NA-1 suggested that strain NA-1 was clustered together with *P. putida* in phylogenetic tree and the sequence identity between strain NA-1 and *Pseudomonas putida* was 99%. So strain NA-1 was identified to *P. putida*.

Key words : Nicotinic acid, 6-Hydroxynicotinic acid, Biotransformation, *Pseudomonas putida*

Foundation item : The 10th Five Years Project for National Key Technologies R&D Programme (2001BA308A05-02)

* Corresponding author. Tel 86-25-83598790 ; Fax 86-25-83598723 ; E-mail shengyuan@email.njnu.edu.cn

Received date : 06-18-2004

欢迎订阅《微生物学报》

《微生物学报》(双月刊,双月4日出版)创刊于1953年,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊。主要报道普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果和科研进展。

2004年本刊已全新改版,更换了彩色封面,由原来的小16开本改为标准大16开本(210×297)。2005年已再次扩增页面,由2004年的每册128页增至160页。发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,每册定价30元,全年180元,我们将按期免费邮寄。如错过邮局征订,亦可直接向编辑部订购(请将汇款从邮局寄至本刊编辑部)。

另,本刊编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,款到即免费寄上(请事先与编辑部联系,获悉每册售价)。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量。

邮购地址:100080 北京海淀中关村中国科学院微生物研究所内《微生物学报》编辑部

Tel (010) 62630422; E-mail: actamicro@sun.im.ac.cn; Http: / / www.im.ac.cn/journals

国内邮发代号: 2-504; 国外发行代号: BM67