

恶臭假单胞菌 NA-1 菌株烟酸羟基化酶活性的诱导和转化条件的研究

陆伟宏 王 鑫 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 恶臭假单胞菌 NA-1 菌株的培养和产酶特性与已报道的产酶菌株粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) IFO 12648 和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) TN5 有所不同,主要反映在最适碳源及浓度、最适诱导剂浓度和最适培养温度等方面。最适的转化条件是温度为 30℃,pH 为 7.0,烟酸的浓度为 3%。采用初步优化后的条件和流加底物的方式进行 4L 上罐生产,恶臭假单胞菌 NA-1 菌株的 6-羟基烟酸产率可达到 108.39g/L。

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:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)04-0551-05

工业生物转化技术被认为是“生物技术的第三次浪潮”^[1,2],生物转化法具有效率高、专一性强、条件温和、环境友好的特点,可用于降低化学工业的原料消耗、水资源消耗、能量消耗,减少污染物的排放扩散,也可用于手性药物的不对称合成和对映体的拆分。积极开展对生物转化技术领域的研究,对经济及社会发展有极为深远的意义^[3],目前国内已有一些这方面的成果报道,如微生物法生产丙烯酸^[4~6]、木糖代谢工程菌的构建^[7]、花生蛋白废水的转化^[8]等,但未见开展微生物转化烟酸生产 6-羟基烟酸的研究。

6-羟基烟酸是一种重要的农药、医药和染料中间体^[9~11]。例如它可用于合成以吡虫啉、吡虫清为代表的吡啶甲胺类农药^[9]。由于 6-羟基烟酸广阔的开发前景,微生物转化生产 6-羟基烟酸已经成为国外研究热点^[12~14]。当前,都是从国外进口 6-羟基烟酸来满足国内需求,且价格昂贵。为了填补国内空白,提高经济效益,并为创制具有自主知识产权的新农药奠定坚实基础,本实验室进行了大量的菌种筛选,得到一恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) NA-1 菌株^[15],它能高效的将烟酸转化成 6-羟基烟酸,显示了良好的工业化应用前景。本文报道恶臭假单胞菌 NA-1 菌株烟酸羟基化酶活性的诱导和转化条件的研究结果,以便使该菌株能够早日应用于工业生产。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 本实验室筛选保藏的恶臭假单胞菌(*P. putida*) NA-1 菌株^[15]。

1.1.2 培养基 种子培养基:每升含酵母粉 5g,蛋白胨 10g,NaCl 10g,烟酸 10g,pH7.0。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。发酵培养基:每升含碳源 10g,氮源 10g,酵母粉 1g,烟酸 10g,K₂HPO₄ 1g,金属离子液 10mL,pH7.0。金属离子液配方如下:每升 CaCl₂ 0.4g,H₃BO₄ 0.5g,CuSO₄·5H₂O 0.04g,KI 0.1g,FeSO₄·7H₂O 0.2g,MnSO₄·7H₂O 0.4g,ZnSO₄·7H₂O 0.4g,H₂MoO₄·2H₂O 0.2g,MgSO₄·7H₂O 50g。上罐培养基:每升含玉米浆 30mL,豆粕 6g,烟酸 10g,0.02mol 磷酸钾盐,pH7.0。

1.1.3 仪器设备 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实验仪器厂,GUJST-7013 型 7L 发酵罐购自镇江东方生物工程有限公司。

1.2 菌体培养方法

冻存管菌种接种于平板 30℃培养 24h 后,转接入种子培养液中(20mL 装液量/100mL 锥形瓶),30℃、200r/min 摇瓶培养 12h,以 0.15%的接种量接

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 2004-11-15,修回日期 2005-04-10

入发酵培养基(20mL 装液量/100mL 锥形瓶),30℃、200r/min 培养 22h。

1.3 生物量的测定

在分光光度计 600nm 处(1.0cm 光径)测定稀释 20 倍的菌体培养液的 OD_{600} ,以同样稀释度的培养基为对照。根据干细胞与吸光度的校正曲线 ,此条件下 ,1 OD 相当于 0.31mg/mL 的细胞干重。

1.4 转化方法

烟酸转化方法参照文献[15] ,1min 内催化烟酸生成 1 μ mol 6-羟基烟酸所需的酶量定义为一个活力单位(U)。检测某项因素对转化效率的影响时 ,对应改变此因素的条件 ,其余因素则不变。

1.5 4L 上罐实验

将 -80℃ 冻存的菌种 NA-1 接种至含 1% NA 的 LB 平板 30℃ 静置培养 24h ,然后接种至 50mL 上罐培养基 ,30℃、200r/min 摇瓶培养 12h 后 ,再接入含 4L 上罐培养基(含 1% 烟酸)的 7L 发酵罐 ,30℃、500r/min 搅拌转速 ,10L/min 通气量 ,调节 pH7.0 ~ 7.5 ,发酵培养 36 h。发酵液经 5000r/min 离心 15min 收集菌体。所获静息菌体细胞再次转入 7L 发酵罐 ,加入 3L 转化液(3% 烟酸 ,pH 7.0) ,按照发酵培养同样条件进行转化反应 36h ,并以 20% 烟酸连续回补以维持转化液 3% 烟酸浓度至 28h。

1.6 转化产物检测方法

采用 Agilent 1100(USA)高效液相色谱仪 ,色谱柱为 ZORBAX ODS(4.6mm i.d. \times 250mm 5 μ m) ,流动相为甲醇 : 水(pH3.0) = 50 : 50(V : V) ,流速为 1mL/min ,检测波长为 260nm ,对供试样液(根据具体情况决定稀释倍数)中 6-羟基烟酸的含量进行测定 ,用外标法定量[16]。所有实验均重复 3 次 ,每次均设置 3 个平行。

2 结果

2.1 烟酸羟基化酶活性的诱导

2.1.1 恶臭假单胞菌 NA-1 菌株的生长及酶活曲线 :采用以苹果酸为碳源、牛肉膏为氮源的发酵培养基 ,测定恶臭假单胞菌 NA-1 菌株的生物量和烟酸羟基化酶活力随培养时间增加而发生的变化。如图 1 所示 ,发酵初期 ,酶活与生物量随着培养时间增加呈同步增长 ,在 22h 到达指数末期 ,酶活也达到最高 ,此后 ,酶活逐渐降低。故宜选择培养 22h 的菌体用于随后的转化。

2.1.2 碳源、氮源和诱导物对酶形成的影响 :在以牛肉膏为氮源的发酵培养基中添加 9 种不同的碳源

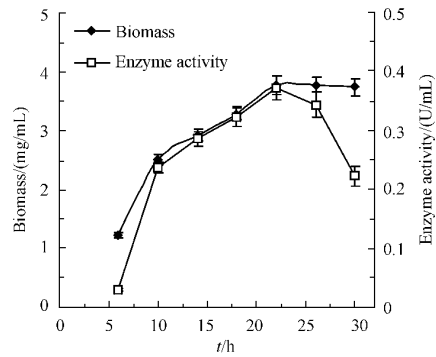


图 1 菌株 NA-1 的生长及酶活曲线

Fig.1 The curves of growth and enzyme activity

(表 1)。从表中可以看出 ,在含苹果酸培养基中培养的恶臭假单胞菌 NA-1 菌体具有最高羟基化酶活性 ,这与文献报道的 *S. marcescens* IFO 12648 菌株不同[13] ,而与 *P. fluorescens* TN5 菌株相似[12]。但又与 *P. fluorescens* TN5 菌株最适产酶的 3% 苹果酸浓度不同 ,恶臭假单胞菌 NA-1 的最适产酶的苹果酸浓度为 1% ,超过 1% 浓度后 ,生物量虽然变化不大 ,但羟基化酶活力迅速下降(图 2-A)。

表 1 碳源对酶形成的影响

Table 1 Effect of carbon sources on enzyme formation		
Carbon source	Biomass(mg/mL)	Enzyme activity(U/mL)
Citric acid	3.99 \pm 0.21	0.306 \pm 0.023
Malic acid	3.73 \pm 0.15	0.371 \pm 0.020
Succinic acid	4.43 \pm 0.19	0.041 \pm 0.005
Glucose	0.37 \pm 0.02	0.001 \pm 0.000
Sucrose	1.99 \pm 0.13	0.199 \pm 0.018
Maltose	2.16 \pm 0.12	0.221 \pm 0.015
Fructose	4.31 \pm 0.13	0.313 \pm 0.012
Solube starch	2.14 \pm 0.17	0.244 \pm 0.013
Tartaric acid	2.47 \pm 0.16	0.233 \pm 0.011

在固定苹果酸为碳源的发酵培养基中添加 8 种不同的氮源 ,分别检测恶臭假单胞菌 NA-1 菌株的生物量和酶活性。结果显示(表 2) ,无机氮源相对不利于菌的生长和酶的形成 ,在硫酸铵中酶活仅为 0.002U/mL ,在 NH_4Cl 中则根本无酶活性。而有机氮源有利于菌的生长 ,其中以谷氨酸为氮源时所获菌体生物量最高 ,但酶活显然偏低 ,牛肉膏为氮源时最有利于羟基化酶的形成 ,单位体积发酵液中酶活性最高。不同浓度牛肉膏试验表明(图 2-B) ,菌体生物量随牛肉膏浓度从 0 增加至 2.5% 而增加 ,但酶活性则在 1% ~ 1.5% 时为最大 ,故宜选择 1% 的牛肉膏作为氮源。

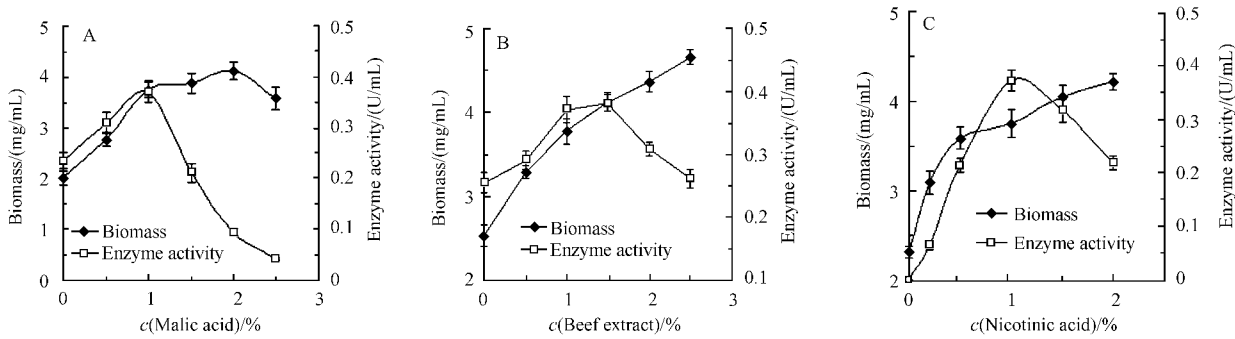


图 2 苹果酸 (A)、牛肉膏 (B) 和烟酸 (C) 的浓度对酶形成的影响

Fig.2 Effect of concentration of malic acid (A), beef extract (B), nicotinic acid (C) on enzyme formation

表 2 氮源对酶形成的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on enzyme formation		
Nitrogen source	Biomass(mg/mL)	Enzyme activity(U/mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.45 ± 0.08	0.002 ± 0.001
NH ₄ Cl	1.33 ± 0.07	0.000 ± 0.000
Peptone	3.88 ± 0.17	0.301 ± 0.022
Yeast extract	4.07 ± 0.19	0.288 ± 0.019
Urea	2.53 ± 0.16	0.111 ± 0.008
Glutamic acid	5.07 ± 0.21	0.045 ± 0.005
Beef extract	3.74 ± 0.15	0.371 ± 0.020
NaNO ₃	2.62 ± 0.13	0.114 ± 0.008

表 3 不同诱导物对酶形成的影响

Table 3 Effect of different inducers on enzyme formation		
Inducer	Biomass(mg/mL)	Enzyme activity(U/mL)
Pyridine	1.92 ± 0.05	0.002 ± 0.000
3-Cyanopyridine	1.51 ± 0.04	0.001 ± 0.000
3-Hydroxypyridine	0.21 ± 0.02	0.000 ± 0.000
Nicotinic acid	3.59 ± 0.12	0.215 ± 0.013
3-Methylpyridine	1.82 ± 0.06	0.003 ± 0.001
Control	2.32 ± 0.06	0.002 ± 0.001

在发酵培养基中分别加入 5 种 0.5% 的吡啶结构类似物作为诱导物,以不加诱导物的为对照,所培养恶臭假单胞菌 NA-1 用于微生物转化(表 3)。与对照比较,烟酸有较高诱导活性,其余 4 种尽管结构与烟酸很相似,但抑制恶臭假单胞菌 NA-1 的生长,几乎无诱导活性。在发酵培养基中分别加入不同浓度的烟酸作为诱导剂(图 2-C),从图可见,与文献报道相一致,诱导羟基化酶活性产生的最适烟酸浓度是 1%,大于 1% 的烟酸浓度则抑制酶的合成。但与大于 1% 的烟酸浓度抑制 *S. marcescens* IFO 12648 和 *P. fluorescens* TN5 菌体的生长不同^[12,13], 2% 烟酸仍然促进恶臭假单胞菌 NA-1 菌体生长。

2.1.3 温度、pH 值和溶解氧对酶形成的影响 :试验选取 28℃、30℃、33℃、35℃、37℃ 5 个温度培养恶臭假单胞菌 NA-1 菌株。如图 3-A 所示,最适于生物量增加与羟基化酶活力产生的温度是 30℃,超过 30℃,生物量急剧降低,到 37℃ 时细胞生长与羟基化酶活性都为零,与文献报道的 *S. marcescens* IFO 12648 和 *P. fluorescens* TN5 菌株所需的 28℃ 培养条件有所不同^[12,13]。

有关 pH 对微生物烟酸羟基化酶活力产生的影响未见文献报道。我们使用苹果酸、牛肉膏为碳源、氮源的发酵培养基,30℃、200r/min 培养 NA-1 菌株,研究培养基 pH 改变对细菌生长和产酶活性的影响,发现恶臭假单胞菌 NA-1 在 pH 6.0 的酸性环境

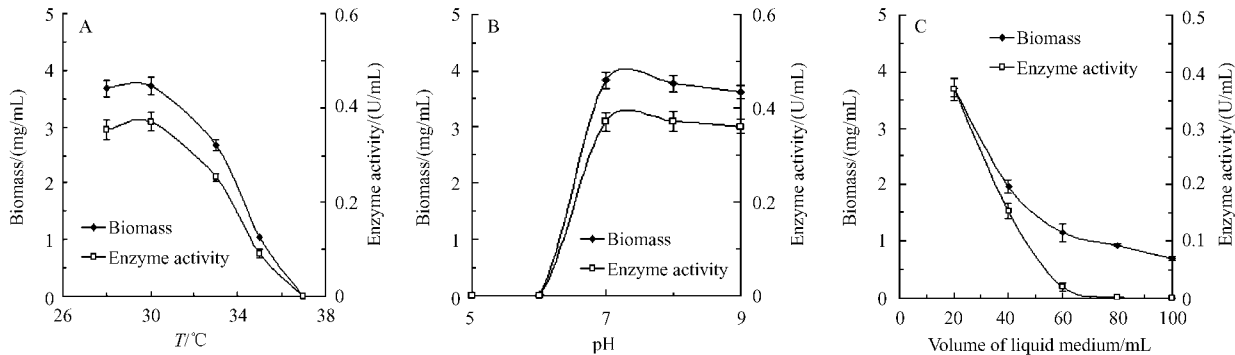


图 3 温度 (A)、pH 值 (B) 和装液量 (C) 对酶形成的影响

Fig.3 Effect of temperature (A), pH value (B), volume of medium (C) on enzyme formation

中几乎不生长,但在 pH7.0 时细菌生长量和酶活性迅速达到最高,直到 pH9.0 时是仍维持较高酶活和生物量(图 3-B)。故培养基宜选用 pH7.0 ~ 8.0 之间。

以不同装液量表示不同的溶解氧来研究溶氧对酶形成的影响。在 100mL 三角瓶分别装 20mL、40mL、60mL、80mL、100mL 发酵培养基摇瓶培养。结果如图 3-C 所示,NA-1 菌株是好氧菌,在一定范围内随着装液量的减少,菌量、酶活显著增加。在装液量为 100mL 时,虽然还有一定的生物量,但酶活已为 0,可见即使有诱导物烟酸,但没有充足的氧,仍不能合成烟酸羟基化酶。在 NA-1 菌株用于工业化生产时一定要注意溶氧问题。

2.2 转化条件的优化

国外有关微生物羟基化烟酸的转化条件因工艺保密因素,一般不予详细报道。本文以恶臭假单胞菌 NA-1 菌株为对象仔细研究了烟酸羟基化的条件。

2.2.1 pH 值、温度和底物浓度对转化效率的影响: 配制 pH4.0、pH5.0 的乙酸 buffer, pH6.0、pH7.0 的磷酸 buffer, pH8.0、pH9.0 的硼酸 buffer, 浓度均为 0.02mol/L, 将恶臭假单胞菌 NA-1 菌体置于这些不同 pH 的缓冲液中进行转化。结果显示(图 4), 中性偏酸的 pH6 ~ 7 条件有利于烟酸转化, 以 pH7.0 时 6-羟基烟酸产率最高, 偏离此 pH 范围时转化效率大大下降, 碱性 pH 的抑制作用显得更强。菌体转化时分别置于 28℃、30℃、33℃、35℃、37℃, 检测各温度下的 6-羟基烟酸的产量(图 4)。随着温度升高, 酶的转化效率也增高, 在 35℃ 时 6-羟基烟酸的产量最高。可见短时间内酶的最适温度为 35℃。但酶在较高温度下易丧失活性: 将菌体置于不同温度下保温 1h 后再用于转化, 发现 35℃、40℃、45℃ 下的酶活性分别是 30℃ 下酶活性的 86.5%、11.5%、1.4%。故生产中仍选 30℃ 作为转化温度。不同烟酸浓度对转化效率的影响见图 4。当烟酸浓度为 3% 时, 6-羟基烟酸的产量最大, 浓度超过 3% 后, 底物开始抑制羟基化酶的活性。因此可选择 3% 作为转化时底物的浓度。

2.2.2 缓冲介质对转化效率的影响: 配制磷酸缓冲液(PBS)、Mes 缓冲液、Heps 缓冲液、柠檬酸缓冲液, 均为 pH7.0、0.02mol/L。检测 NA-1 菌株在这些不同缓冲介质中的转化能力, 结果表明, 不同介质对转化效率并无显著影响, 从经济角度来看, 磷酸缓冲液是合适的选择。

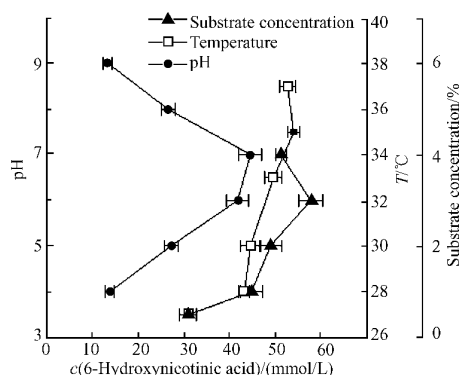


图 4 pH 值、温度和底物浓度对转化效率的影响

Fig. 4 Effect of initial pH value, temperature, substrate concentration on transformation efficiency

2.3 6-羟基烟酸的生产性能评价

根据前述的优化培养和转化条件, 并根据工业生产实际需要, 我们进行了 4L 发酵罐生产试验。首先将 NA-1 在含 4L 培养基的 7L 发酵罐中培养 36h, 然后收集静息细胞菌体在含 3L 转化液的 7L 发酵罐中进行 36h 的烟酸转化生产。转化过程采用流加底物的方式以维持转化液中的烟酸在 3% 浓度左右, 并持续搅拌通气和保持 pH 中性。总计投入原料烟酸 313.50g, 产生反应产物 6-羟基烟酸 325.17g, 6-羟基烟酸产率可达到 108.39g/L。

3 讨论

由上可见, 恶臭假单胞菌 NA-1 菌株的培养和产酶特性与已报道的产酶菌株 *S. marcescens* IFO 12648 和 *P. fluorescens* TN5 有所不同^[12, 13], 主要反映在最适碳源及浓度、最适诱导剂浓度和最适培养温度等方面。由实验结果可得, NA-1 菌株的较优发酵条件是: 培养基(g/L): 苹果酸 10、牛肉膏 10、酵母粉 1、烟酸 10、K₂HPO₄ 1、金属离子液 10mL, pH7 ~ 8, 30℃, 充足供氧, 较优的转化条件是温度为 30℃, pH 为 7.0, 烟酸的浓度为 3%。采用初步优化后的条件和流加底物的方式进行 4L 上罐生产, 恶臭假单胞菌 NA-1 菌株的 6-羟基烟酸产率可达到 108.39g/L。此产率高于 Kulla^[14]报道的 *Achromobacter xylosoxidans* (65g/L), 但低于 Nagasawa 等^[12]报道的 *Pseudomonas fluorescens* TN5 (191g/L) 和 Hurh 等^[13]报道的 *Serratia marcescens* IFO12648 (301g/L)。因而 NA-1 应用于工业转化生产, 尚需进一步提高生产效率。除了传统的诱变方法进行高产菌株选育以外, 通过改进或建立新的转化生产工艺目前也是提高烟酸转化效率的一个新的研究动向。Torimura 等^[17]报道的采用

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 作为胞外电子受体替代氧气, 在厌氧条件下可促进烟酸转化为 6-羟基烟酸, 提高烟酸转化效率。我们最近也尝试采用综合转化工艺提高烟酸的转化效率, 并已取得进展, 有关研究结果将另行发表。

参 考 文 献

- [1] 林章凇, 曹竹安, 刑新会, 等. 工业催化. 生物加工过程, 2003, **11**(1):12-16.
- [2] 杜晨宇, 李 春, 张 木, 等. 工业催化过程及其展望. 化工学报, 2003, **54**(4):456-463.
- [3] Schmid A, Dordick J S, Hauer B, *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, **409**(11):258-268.
- [4] 李文忠, 张鸿翼, 杨惠芳. 微生物转化丙烯腈生产丙稀酰胺 I. 菌种筛选及丙稀腈的微生物的转化. 微生物学报, 1990, **30**(1):29-35.
- [5] 陈 跖, 孙旭东, 史 悦, 等. 微生物法生产丙稀酰胺的研究(II)—腈水合酶催化反应动力学与失活动力学. 生物工程学报, 2002, **18**(2):225-230.
- [6] 张云桦, 方仁萍, 沈寅初. 一株腈基水合酶菌株的研究. 工业微生物, 1998, **28**(3):1-5.
- [7] 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.
- [8] 张玉臻, 马桂荣. 花生蛋白废水的转化. 环境科学学报, 1996, **16**(3):381-384.
- [9] Yoshida T, Nagasawa C. Enzymatic functionalization of aromatic N-heterocycles: hydroxylation and carboxylation. *J Biosci Bioeng*, 2000, **89**(2):111-118.
- [10] Fetzner S. Bioconversion of pyrimidine by resting cells of quioline-degrading bacteria. *FEMS Microbiol Letters*, 1999, **176**:291-299.
- [11] Uchida A, Yoshida T, Ogawa M, *et al.* Regioselective hydroxylation of quinolinic acid, lutidinic acid and isocinchomeric acid by resting cells of pyridine dicarboxylic acid-degrading microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**:337-341.
- [12] Nagasawa T, Hurh B, Yamane T. Production of 6-hydroxynicotinic acid from nicotinic acid by resting cells of *Pseudomonas fluorescens* TN5. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58**(4):665-668.
- [13] Hurh B, Ohshima M, Yamane T, *et al.* Microbial production of 6-hydroxynicotinic acid, an important building block for the synthesis of modern insecticides. *J of Fermentation and Bioengineering*, 1994, **77**(4):382-385.
- [14] Kulla H G. Enzymatic hydroxylations in industrial application. *Chimia*, 1991, **45**:81-85.
- [15] 陆伟宏, 徐 莉, 戴亦军, 等. 一株烟酸羟基化转化菌株的筛选和鉴定. 微生物学报, 2005, **45**(1):6-9.
- [16] 陆伟宏, 袁 生, 戴亦军. 烟酸微生物转化产物的高效液相色谱分析方法. 江苏农业科学, 2004, **3**:90-92.
- [17] 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.

Induction of nicotinic acid hydroxylase activity of *Pseudomonas putida* NA-1 and optimization of transformation conditions

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

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

Abstract: Some features of *Pseudomonas putida* NA-1 strain in cultivation and enzyme production were different from *S. marcescens* IFO 12648 and *P. fluorescens* TN5 strains which could transform nicotinic acid to 6-hydroxynicotinic acid reported by other scientists, such as optimal carbon and its optimal concentration, optimal inducer concentration, and optimal cultivation temperature. The ideal transformation condition was nicotinic acid 3%, temperature 35°C and pH 7.0. Under an appropriate condition, in a 4 liter fermenter, production yield of 6-hydroxynicotinic acid by *Pseudomonas putida* NA-1 was 108.39g/L.

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