

恶臭假单胞菌 NA-1 菌体培养转化和静息细胞转化 联合工艺生产 6-羟基烟酸研究

徐 莉 袁 生* 陈 婷 戴亦军

(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 现有微生物羟基化烟酸采用的是静息细胞转化工艺。但研究揭示,恶臭假单胞菌 NA-1(*Pseudomonas putida* NA-1)在培养过程中不降解发酵液中由诱导剂烟酸转化形成的 6-羟基烟酸,这是由于烟酸的存在抑制了羟基烟酸降解酶的作用,而不是因为细胞停止生长不利用羟基烟酸的缘故。因而尝试利用菌体诱导培养过程进行烟酸转化生产,建立了一种新的生产工艺,即菌体培养转化和静息细胞转化联合工艺。该工艺在恶臭假单胞菌 NA-1 培养过程中持续补充烟酸以维持 1%(W/V)浓度,使烟酸被生长细胞转化为羟基化烟酸并在发酵液中线性积累,而不被进一步降解。培养转化结束后,发酵液中的静息细胞依然拥有很高的羟基化酶活力,能够再次用于转化反应。该联合转化工艺与传统的静息细胞转化工艺相比,不仅节约了诱导剂烟酸,而且 6-羟基烟酸的产量提高了 65%。

关键词 烟酸 6-羟基烟酸 恶臭假单胞菌 菌体培养转化 静息细胞转化

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)01-0063-05

6-羟基烟酸是一种合成农药、医药和其他化学药品的重要中间体^[1]。多种细菌能够氧化烟酸生成 6-羟基烟酸,然后通过某种代谢途径进一步降解成终产物^[2]。因而,许多研究人员试图寻找一些能转化烟酸为 6-羟基烟酸的突变菌株用于工业生产,如 Kulla 报道的木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans* DSM2402 and DSM 2783)^[3-5],Nagasawa 报道的荧光假单胞菌 TN5 菌株(*Pseudomonas fluorescens* TN5)^[6],Hurh 报道的粘质沙雷氏菌株(*Serratia marcescens* IFO12648)^[7]均能用于 6-羟基烟酸的生产。但上述报道的转化菌株需要在发酵培养过程中添加 1%~2%(W/V)的烟酸诱导羟基化酶活力。在诱导培养过程中,烟酸作为一种诱导剂,最初转化为 6-羟基烟酸,但 6-羟基烟酸在培养过程中很快被菌株完全降解^[6,7]。因此,现有微生物羟基化烟酸技术一般采用的是静息细胞转化工艺^[3-7]。

我们曾报道本实验筛选出具有较高转化效率的菌株恶臭假单胞菌 NA-1,并对其诱导和转化条件进行了优化研究^[8,9]。研究过程发现,该菌在发酵诱导培养过程和静息细胞转化过程中对产物 6-羟基烟酸的降解能力与有关文献报道相比非常之低。因而尝

试在诱导培养过程中,是否可以通过持续地补充烟酸、维持合适的烟酸浓度以避免产物 6-羟基烟酸降解。结果表明,通过适当控制发酵条件,诱导培养过程可以用作 6-羟基烟酸的转化生产,因而建立了生长细胞转化和静息细胞转化联合生产工艺。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:恶臭假单胞菌 NA-1(*Pseudomonas putida*)为本实验室筛选获得^[8]。

1.1.2 主要试剂:标准品 6-羟基烟酸购于 Acros 公司(Belgium),烟酸购于一诺精细化学公司(中国),所有其他化学药品为市售分析纯或生物试剂。

1.2 生物量的测定^[10]

在分光光度计 600nm 处(110cm 光径)测定稀释 10 倍的菌体培养液的 OD_{600} 值,以同样稀释度的培养基为对照。

1.3 菌体细胞诱导培养和培养转化

菌体细胞诱导培养:恶臭假单胞菌 NA-1 培养于含有 150mL 培养液的 500mL 三角瓶中,30℃、200r/min,振荡培养 48h。菌体细胞培养转化:在上

基金项目:国家“十五”科技攻关重大项目(2001BA308A05-02,2004BA308A22-12)

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

作者简介 徐 莉(1981-),女,江苏人,硕士研究生,主要从事微生物催化研究。E-mail: xuli602@126.com

收稿日期 2005-06-21 接受日期 2005-07-19 修回日期 2005-10-31

述培养过程中,在 8~24h 的过程中每隔 2h 周期性地补充一定量用 0.02mol/L 磷酸缓冲液配制的 20% (W/V) 烟酸 (pH7.0) 溶液,以维持培养液 1% (W/V) 烟酸浓度,48h 后停止。培养液配方为:每升含酵母膏 10g,蛋白胨 10g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3.93g, KH_2PO_4 1g, 烟酸 10g, pH7.0。分析培养液中的烟酸羟基化作用。培养过程中,在指定时间取适量的发酵液,100℃ 灭活 5min,然后离心去除细胞,供 HPLC 分析。

1.4 静息细胞降解 6-羟基烟酸

恶臭假单胞菌 NA-1 培养于装有 150mL 培养液的 500mL 三角瓶中,30℃、200r/min 摇床培养。离心收集菌体,获取的静息细胞用 0.02mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤两次,重新悬浮于等体积的以 0.02mol/L 磷酸缓冲液配制的不同浓度 6-羟基烟酸的转化液中,30℃、200r/min 摇床转化 48h。每隔 4h 取液,100℃ 灭活 5min,离心,取上清 HPLC 测试。

1.5 测试静息细胞的羟基化活力

取发酵过程中的菌液 2mL,离心所得菌体用 0.02mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤两次,重新悬浮于等体积的以 0.02mol/L 磷酸缓冲液配制的 1% (W/V) 转化液^[6],30℃、200r/min 在 50mL 离心管中转化 2h,100℃ 灭活 5min,离心 (5000r/min, 10min),取上清 HPLC 检测。

1.6 菌体培养转化和静息细胞转化联合工艺生产 6-羟基烟酸

恶臭假单胞菌 NA-1 的细胞培养转化过程见 1.3。48h 后发酵转化过程停止,5000r/min 离心 10min,上清液用浓盐酸调节 pH 至 2,析出的 6-羟基烟酸用浓盐酸调节的 pH 为 2 的双蒸水洗涤后重结晶、干燥。

静息细胞转化是将发酵过程收集的菌体用 0.02mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤两次,重新悬浮于等体积的以 0.02mol/L 磷酸缓冲液配制的 1% (W/V) 烟酸转化液,30℃、200r/min 转化,在 2~24h 过程中每隔 2h 周期性地补充以 0.02mol/L 磷酸缓冲液配制的 20% (W/V) 烟酸溶液以维持转化过程所需要的 1% (W/V) 烟酸浓度,48h 后离心,上清同前处理获得晶体。以两步转化法作为对照。

1.7 HPLC 分析

HPLC 色谱柱为 Agilent Zobax OSD 柱 (250 × 4.6μm),进样体积为 20μL;柱温为室温;检测器为 Agilent G1314A 紫外检测器,波长为 260nm;流动相: A 经 0.22μm 微孔过滤膜过滤的双蒸水,用色谱级磷酸调节 pH 至 3, B: 色谱级甲醇, A: B = 50:50。以

1min 内催化烟酸生成 1mmol 6-羟基烟酸所需的酶量定义为一个活力单位 (Unit)。

2 结果

2.1 恶臭假单胞菌 NA-1 降解 6-羟基烟酸的研究

恶臭假单胞菌 NA-1 具有一个显著特点,在诱导培养过程中对诱导剂烟酸的转化产物 6-羟基烟酸的降解能力与文献报道的菌株相比非常之低。由图 1 可见,在发酵诱导培养过程中,诱导剂烟酸被转化成 6-羟基烟酸,24h 后烟酸全部被消耗,6-羟基烟酸浓度同时达到最高 (62.60mmol/L)。随后 6-羟基烟酸缓慢降解,48h 后依然维持约最高浓度的一半。因此,恶臭假单胞菌 NA-1 拥有比粘性沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)^[6] 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)^[7] 较慢的降解 6-羟基烟酸的能力,后两种报道菌株发酵诱导培养过程中不到 30h 6-羟基烟酸就完全被降解。

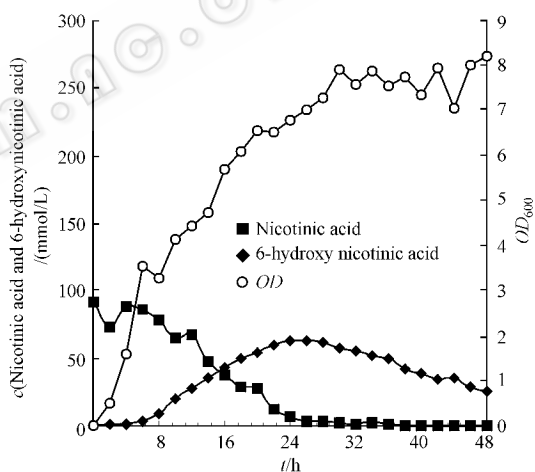


图 1 烟酸作诱导剂的发酵培养过程时间变化图

Fig. 1 Time course of the induced cultivation of for hydroxylation activity by nicotinic acid as an inducer

尽管恶臭假单胞菌 NA-1 菌体细胞在培养过程中对发酵液中 6-羟基烟酸的降解能力较弱,但实验表明静息细胞在 6-羟基烟酸溶液中却具有一定的降解能力 (图 2)。说明静息细胞转化过程中 6-羟基烟酸不被降解是由于烟酸的存在抑制了羟基烟酸降解酶的作用,而不是因为细胞停止生长不利用羟基烟酸的缘故,与前人的推测相吻合^[6,7]。

上述结果提示若在诱导培养过程中像转化过程一样维持适当浓度的烟酸,菌体细胞就能够持续羟基化烟酸而不降解产物。

2.2 恶臭假单胞菌 NA-1 生长细胞转化烟酸

在细胞培养过程中,每隔 2h 补充烟酸以维持 1% (W/V) 的烟酸浓度供转化反应 (图 2)。培养液中

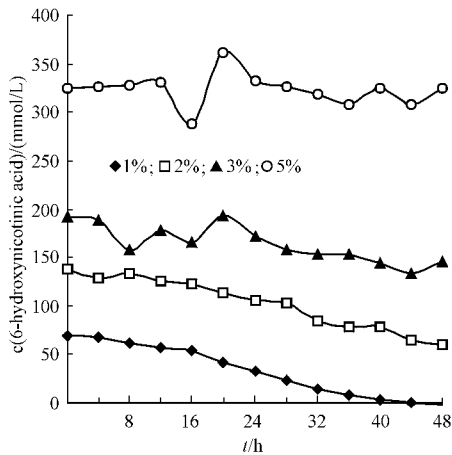


图 2 恶臭假单胞菌 NA-1 静息细胞降解 6-羟基烟酸

Fig.2 Degradation of 6-hydroxynicotinic acid by *Pseudomonas putida* NA1 resting cells

的 6-羟基烟酸浓度随着培养的进行呈线性递增。当菌体细胞培养到 44 ~ 48h 时 ,培养液中烟酸消耗停止 ,生物量不再增加 ,则培养终止。可见 ,使用烟酸诱导培养具有羟基化酶活性的细胞的过程可以用于生产 6-羟基烟酸 ,因而被称为菌体培养转化过程 ,与以往的诱导培养过程相区别。

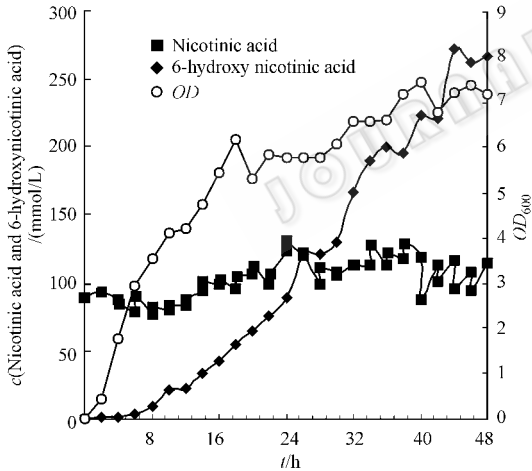


图 3 恶臭假单胞菌 NA-1 发酵转化生成 6-羟基烟酸过程的时间变化图

Fig.3 Time course of the transformation cultivation of *Pseudomonas putida* NA-1 for production of 6-hydroxynicotinic acid

对 NA-1 菌株诱导培养过程变为转化培养过程对菌株静息细胞转化活力的影响进行了评估。图 4 结果表明 ,菌体培养转化和诱导培养所收获的静息细胞显示出几乎同样的转化活性产生规律 :在细胞培养 2 ~ 16h 期间 ,转化活性线性上升 ,然后缓慢上升到约 32h 时达到最大值 ,并维持该最高活性几乎不变直到 48h。很明显 ,转化培养之后 ,发酵液中的

静息细胞依然拥有很高的羟基化酶活力 ,因而能够再次用于转化反应。

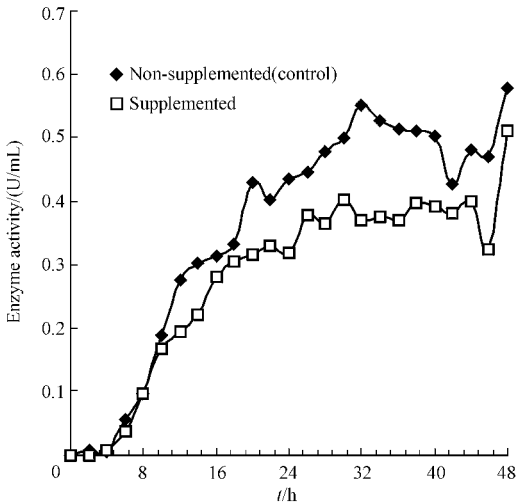


图 4 前期补充烟酸和不补充烟酸对于菌株静息转化烟酸为 6-羟基烟酸能力的影响

Fig. 4 Effects of transformation cultivation for production of 6-hydroxynicotinic acid on hydroxylation activity of resting cells cultivation medium supplemented or non-supplemented (as a control ,) by nicotinic acid

2.3 菌体细胞培养转化和静息细胞转化联合用于生产 6-羟基烟酸

恶臭假单胞菌 NA-1 在装 150mL 培养液的 500mL 的三角瓶中摇床培养 ,在 8 ~ 24h 培养转化过程中 ,每隔 2h 补充消耗的烟酸 ,以维持 1%(W/V)烟酸浓度 ,48h 后转化培养终止。离心去除菌体获得上清液 ,经过结晶 ,由消耗的 31.54mmol 的烟酸获得 22.70mmol 的 6-羟基烟酸 ,摩尔转化率达到 72.0%。考虑到对照诱导培养过程要消耗 12.14mmol 的烟酸作为诱导剂 ,如果转化培养过程除去这部分消耗的烟酸 ,那么实际的摩尔转化率超过 90%。将转化培养后离心获得的静息细胞重新悬浮于装有 150mL 的 1%(W/V)烟酸磷酸盐转化液的 500mL 三角瓶中 ,30℃ 进行静息细胞转化。在 2 ~ 24h 转化期间 ,每隔 2h 补充消耗的烟酸 ,维持 1%(W/V)烟酸浓度 ,24h 后 ,由于菌体转化活力急剧下降 ,停止补充烟酸 ,待 48h 烟酸基本全部转化为 6-羟基烟酸后 ,停止转化 ,离心取上清 ,结晶获得 38.00mmol 的 6-羟基烟酸 ,相对于消耗的 39.90mmol 的烟酸 ,其摩尔转化率达到 95.0%。而对照组也表现出相似的结果。总体算来 ,细胞培养转化和静息细胞转化联合转化工艺共计获得 60.70mmol 的 6-羟基烟酸 ,而传统的诱导培养和静息细胞转化两步转化法只能获得 36.68mmol 的 6-羟基烟酸 ,新工艺使得 6-羟基烟酸

的产量提高了 65.49%(表 1)。

表 1 静息细胞转化法工艺和菌体培养转化和静息细胞转化联合工艺的生产效率比较
Table 1 Comparison of production yields between the technology of resting cells transformation and the combined technology of growing culture transformation and resting cells transformation

Technology	The technology of resting cells transformation	The combined technology of growing culture transformation and resting cells transformation
Growing culture cultivation		
Cultivation time (h)	48	48
Treatment	non-supplemented with nicotinic acid	supplemented with nicotinic acid
Nicotinic acid consumed (mmol)	12.14 ± 0.00	31.54 ± 0.00
Solid 6-hydroxynicotinic acid obtained (mmol)		22.71 ± 0.27
Molar transformation yield (%)		71.62
Resting cells transformation		
Transformation time (h)	48	48
Nicotinic acid consumed (mmol)	42.29 ± 0.00	39.90 ± 0.00
Solid 6-hydroxynicotinic acid obtained (mmol)	36.69 ± 2.67	37.98 ± 3.30
Molar transformation yield (%)	86.31	94.77

3 讨论

目前微生物游离细胞转化工艺通常采用两种方法：一种是生长细胞转化法，另一种是静息细胞转化法。生长细胞转化法是在微生物细胞培养前或培养一段时间后，将底物直接加到微生物培养基中，微生物在自身繁殖生长的同时对底物进行生物转化。该法的优点是生产工艺简单、生产时间较短，但存在产品的后处理分离纯化困难问题，特别是微生物生长细胞往往能够将转化底物或产物作为碳源、氮源或能源的一部分消耗掉，造成产物积累很难，或者产物/底物摩尔转化效率较低，因而只有少数用于中间转化产物的积累生产过程^[11,12]。静息细胞转化法是将微生物细胞发酵培养一定时间后，离心或过滤收集菌体静息细胞，然后将静息细胞悬浮于含有底物的水或缓冲液中进行生物转化。此法的优点是可以避免生长细胞对产物的降解作用，且产物后处理简单，没有培养基成分的污染，因而是微生物转化的一种主要方式^[6,7]。但该方法耗时、耗能的细胞培养过程不能充分利用，特别是诱导酶的产生需要消耗大量昂贵的诱导剂。

烟酸羟基化酶是一种诱导酶^[6,7]，烟酸和某些吡啶类化合物能够作为诱导物诱导菌体形成羟基化酶。迄今为止，所有已知生产 6-羟基烟酸的菌株都能以烟酸作为唯一碳源、氮源和能源，通过 6-羟基烟酸的途径降解烟酸供生长之需，因而未见有运用生长细胞转化烟酸生产 6-羟基烟酸的报道^[3~7]。但是在静息细胞转化过程中，6-羟基烟酸降解酶强烈地被转化液中的烟酸所抑制，并且由于细胞处于休

止状态不能够获得充足的酶反应所必需的 NADH，因而，静息细胞可以用于将烟酸转化为 6-羟基烟酸的生产^[6]。所以，现在的生产工艺一般都是首先以烟酸作为诱导剂诱导培养菌体，然后收集处于不生长状态的静息细胞用作转化烟酸生成 6-羟基烟酸^[3~7]。本研究发现，恶臭假单胞菌 NA-1 不仅处于生长状态的细胞而且处于静息状态的细胞均具有较低的 6-羟基烟酸降解能力。这样就通过实验证实其他研究者先前所做的推测：静息细胞转化过程中 6-羟基烟酸不被降解是由于转化液中存在烟酸抑制作用^[6,7]，而不是由于细胞停止生长的缘故。因而提示我们生长细胞也有可能通过在烟酸存在下不显示降解转化产物 6-羟基烟酸的能力。本研究通过实验表明，在发酵过程中，如间歇性地不断补充烟酸以维持发酵液中 1%(W/V)烟酸浓度，则细胞生长过程中就能够一直羟基化烟酸，而不使其降解，因而发酵液中的 6-羟基烟酸的量就可随着培养过程呈线性积累。这样，作为诱导菌株产生羟基化酶活力的烟酸可以被用作生成 6-羟基烟酸的底物。由于本实验并未发现转化培养过程对于后期静息细胞羟基化酶活力有显著影响，所以转化培养过程后的菌体依旧可以收集用于二次转化。从而，通过新的联合转化工艺，使 6-羟基烟酸的生产效率提高了 65.49%。说明可以通过利用底物抑制产物降解作用，改变诱导培养为转化培养，不仅可以避免作为诱导剂的烟酸消耗，而且还获得了额外的转化产物。该菌体培养转化和静息细胞转化联合转化工艺的建立，对于其他生物转化过程也具有有益的参考价值。

致谢 本课题研究过程中得到了江苏省农药研究所的张湘宁、徐尚成两位老师的悉心指导,在此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] Yoshida T, Nagasawa C. Enzymatic functionalization of aromatic N-heterocycles: hydroxylation and carboxylation. *J Biosc Bioeng*, 2000, **89**(2):111–118.
- [2] Torimura M, Yoshida H, Kano K. Bioelectrochemical transformation of nicotinic acid into 6-hydroxynicotinic acid on *Pseudomonas fluorescens* TN5-immobilized column electrolytic flow system. *J Mol Catal B Enzy*, 2000, **8**:265–273.
- [3] Lehky P, Kulla H, Mischler S. Verfahren zur Herstellung von 6-hydroxynikotinsäure. European Patent Application 0152948, 1985.
- [4] Kulla H, Lehky P. Verfahren zur Herstellung von 6-hydroxynikotinsäure. European Patent Application 0152949, 1985.
- [5] Kulla HG. Enzymatic hydroxylation in industrial application. *Chimia*, 1991, **45**:81–85.
- [6] 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 Ferment Bioeng*, 1994, **77**(4):382–385.

- [7] Nagasawa T, Hurh B, Yamane T. Production of 6-hydroxynicotinic acid from nicotinic acid by resting cells of *Pseudomonas fluorescens* TN5. *Biosci Biotechnol Bioche*, 1994, **58**(4):665–668.
- [8] 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.
- [9] 陆伟宏,王 鑫,徐 莉,等.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.微生物学报,2005, **45**(4):551–555.
- [10] Tariq S, Benedict C, Muhammad A, et al. Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms. *J Environ Qual*, 2003, **32**:47–54.
- [11] Eyal S, Uzi R, Yuval S. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J Biotechnol*, 2000, **78**(1):1–9.
- [12] Ivančić M, Šantek B, Novak S, et al. Fermentative bioconversion in a horizontal rotating tubular bioreactor. *Process Biochem*, 2004, **39**(8):995–1000.

Combination of growing culture transformation and resting cells transformation of *Pseudomonas putida* NA-1 for production of 6-hydroxynicotinic acid

XU Li, YUAN Sheng*, CHEN Ting, DAI Yi-jun

(Jiangsu Key Lab for Bioresource Technology, Key Lab for Microbial Technology in College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The current technology for microbial hydroxylation of nicotinic acid is a procedure of resting cells transformation. Here it was reported that non-degradation of 6-hydroxynicotinic acid during hydroxylation of nicotinic acid by resting cells was due to existing of nicotinic acid in the transformation mixture, not the death of cells. Therefore it was attempted that the induced cultivation of *Pseudomonas putida* NA-1 for hydroxylation activity by nicotinic acid was used for accumulation of 6-hydroxynicotinic acid to establish a new technology, a combined technology of growing culture transformation and resting cells transformation. In the combination technology, when 1% of nicotinic acid was kept in cultivation medium by supplement of nicotinic acid at intervals during cultivation of *Pseudomonas putida* NA-1, the growing culture could consistently hydroxylate nicotinic acid without degradation of its product which was accumulated linearly in the cultivation medium with progress of cultivation; the resting cells obtained from cultivation broth after growing culture transformation still processed a very high hydroxylation activity and could be used to next resting transformation of nicotinic acid. By using of the combined technology, the inducer was saved and the production yield of 6-hydroxynicotinic acid increased above 65%.

Keywords: Nicotinic acid; 6-Hydroxynicotinic acid; *Pseudomonas putida*; Growing culture transformation; Resting cells transformation