

棒状杆菌腈水合酶的形成条件*

李文忠 张鸿翼 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文研究了棒状杆菌 (*Corynebacterium*) ZBB-21 腈水合酶形成的最适条件。在培养基中加入 Fe^{2+} 、维生素 B₁₂ 和 L-谷氨酸等, 并以 *n*-丁腈做诱导物, 可明显促进该菌腈水合酶的生物合成。ZBB-21 菌在选定的培养基中, 于 28℃ 培养 64 小时, 其腈水合酶比活力可达 83.1u/mg, 而酰胺酶的比活力只有 1.1u/mg。腈水合酶比活力比以前报道的提高 9 倍。

关键词 棒状杆菌; 腈水合酶; 丙烯酰胺

近年来, 利用微生物脂肪腈水合酶 (Aliphatic nitrile hydratase) 催化水合丙烯腈生产丙烯酰胺的研究日益引起人们的关注, 并获得了一些丙烯酰胺高产菌株^[1-3]。我们从腈化物长期污染的土壤中, 分离到一株腈水合酶活性较高而酰胺酶活性低的棒状杆菌 (*Corynebacterium*) ZBB-21^[4], 本文进一步研究了棒状杆菌 ZBB-21 产生高活性腈水合酶的最适形成条件。

材料和方法

(一) 菌种

棒状杆菌 (*Corynebacterium*) ZBB-21 由本研究组分离鉴定^[4]。

(二) 培养基

斜面培养基、液体种子培养基及基础培养基同前文报道^[4]。

(三) 菌体培养和酶液提取

按前文进行菌体培养和收集细胞^[4], 将细胞悬浮于 1/15mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.5) 中, 在冰浴中超声破碎 (19KHz, 200W), 18000 × g, 4℃ 离心 20 分钟, 上清液即为所需酶液。

(四) 酶活力测定

1. 腈水合酶活力测定: 取 1.0ml 适当

稀释的酶液加到 4.0ml 含 650μmol 丙烯腈的磷酸缓冲液 (于 25℃ 预保温 5 分钟) 中, 摇匀, 继续保温 10 分钟, 用 0.1ml 1mol/L HCl 终止反应, 稀释后用 HPLC^[5] 测定丙烯酰胺生成量。在上述条件下, 每分钟催化生成 1.0μmol 丙烯酰胺所需的酶量定为一个活力单位 (u)。

2. 酰胺酶活力测定: 除以 500μmol 丙烯酰胺为底物和保温反应 30 分钟外, 其余同上。规定每分钟形成 1.0μmol 丙烯酸所需酶量为一个酰胺酶活力单位。

(五) 生物量测定

在波长 460nm 处, 1.0cm 光径测定菌体培养液的浊度, 并换算为菌体蛋白量 (mg/ml)。

(六) 蛋白质测定用 Lowry 法^[6]

(七) 试剂与仪器

丙烯酰胺为 E. Merck 产品, 丙烯腈、丙烯酸经重蒸纯化。

DU-7 紫外分光光度计 (Beckman, USA), HPLC M201 (Waters, USA)。

本文于 1989 年 8 月 19 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

结 果

(一) 碳源对酶形成的影响

在以 0.5% 丁腈为氮源的基础培养基中添加 11 种不同碳源(以 0.5% C 计), 测定这些碳源对酶形成的影响(表 1)。糊精、蔗糖、麦芽糖、甘油和丁二酸钠均为适宜碳源, 其中以糊精为最好, 在增加生物量的同时, 促进了腈水合酶的形成, 而对酰胺酶活

性没有影响。糊精作碳源的最适浓度为 1.0%。

(二) 氮源对酶形成的影响

在含 0.3% 丁腈和 1.0% 糊精的基础培养基中添加 0.5% 不同含氮化合物进行培养, 测定两种酶的活力。结果表明(表 2), 酵母膏、酪蛋白水解物、牛肉膏等均能促进细胞增殖和腈水合酶的形成。酵母膏、牛肉膏对酰胺酶活性无影响, 但尿素和

表 1 碳源对酶形成的影响

Table 1 The effect of carbon sources on production of enzymes by *Corynebacterium* ZBB-21

碳 源 Carbon source	生 物 量 Protein (mg/ml)	比 活 力 Specific activity (u/mg)	
		腈水合酶 Hydratase	酰 胺 酶 Amidase
淀粉 Starch	1.56	45.8	1.37
糊精 Dextrin	1.61	52.8	1.27
麦芽糖 Maltose	1.88	48.4	1.27
半乳糖 Galactose	1.74	43.0	1.26
蔗糖 Sucrose	1.58	47.9	1.29
葡萄糖 Glucose	2.34	37.2	2.10
甘露醇 Mannitol	1.56	41.0	0.95
山梨醇 Sorbitol	1.63	48.3	1.33
甘油 Glycerol	2.00	47.4	1.18
丁二酸钠 Succinate Na ₂	1.54	50.9	1.25
柠檬酸钠 Citrate Na ₃	1.36	48.0	1.27
None	1.47	45.0	1.26

表 2 氮源对酶形成的影响

Table 2 The effect of nitrogen source on production of enzymes by *Corynebacterium* ZBB-21

氮 源 Nitrogen source	生 物 量 Protein (mg/ml)	比 活 力 Specific activity (u/mg)	
		腈水合酶 Hydratase	酰 胺 酶 Amidase
酵母膏 Yeast extract	1.78	43.2	0.75
牛肉膏 Beef extract	1.43	45.2	0.98
蛋白胨 Polypepton	1.40	39.4	2.24
酪蛋白水解物 Caseinhydrolysat	1.51	43.5	1.93
尿素 Urea	1.09	38.1	3.84
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.99	41.0	0.65
NH ₄ Cl	0.96	42.8	0.65
KNO ₃	1.02	44.0	0.65
None	0.94	40.7	0.82

酪蛋白水解物明显促进了该酶的形成。

(三) 氨基酸和维生素对酶形成的影响

氮源试验结果提示我们需进一步探讨氨基酸、维生素与酶形成的关系。在基础培养基中分别加入 0.1% 的不同氨基酸和一定浓度的水溶性维生素, 结果(表 3)表明, 丙氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、尤其是谷氨酸和苯丙氨酸对胍水合酶的生物合成非常

有利, 但对酰胺酶形成的影响不明显。其余氨基酸不仅不利于胍水合酶形成, 而且提高了酰胺酶的活性。维生素 B₁ 和肌醇能明显促进胍水合酶的形成, 其余所试维生素均抑制二种酶的合成(表 4)。图 1 表明, 随维生素 B₁ 和谷氨酸加入量的增加, 二种酶的比活力均有提高, 尤以胍水合酶活力提高明显。当维生素 B₁ 和谷氨酸分别为 1.0mg/L 和 1.0g/L 时, 对胍水合酶形成

表 3 氨基酸对酶形成的影响

Table 3 The effect of amino acids on production of enzymes

氨基酸 Amino acid	生物量 Protein (mg/ml)	相对比活 Relative specific activity (%)	
		胍水合酶 Hydratase	酰胺酶 Amidase
丙氨酸 Ala	1.70	654.0	118.2
甘氨酸 Gly	1.65	115.3	100.0
半胱氨酸 Cys	1.52	179.0	116.6
苯丙氨酸 Phe	1.76	661.3	141.0
谷氨酸 Glu	1.87	722.6	128.8
蛋氨酸 Met	1.52	52.4	114.0
酪氨酸 Tyr	1.57	44.4	117.6
缬氨酸 Val	1.91	62.9	192.0
赖氨酸 Lys	1.76	53.2	157.6
丝氨酸 Ser	1.74	0.0	113.0
None	1.67	100.0	100.0

表 4 维生素对酶活力的影响

Table 4 The effect of vitamins on production of enzymes

维生素 Vitamin	浓度 Conc. (mg/L)	生物量 Protein (mg/ml)	相对比活 Relative specific activity (%)	
			胍水合酶 Hydratase	酰胺酶 Amidase
Vitamin B ₁	1.0	1.48	416.5	56.1
Vitamin B ₂	1.0	1.30	75.6	62.2
Vitamin B ₃	1.0	1.36	22.8	68.3
Vitamin B ₁₂	1.0	1.22	65.4	64.6
Vitamin B ₆	0.5	1.30	55.1	61.6
Vitamin C	1.0	1.21	16.5	64.0
生物素 Biotin	0.5	1.32	44.1	56.1
烟酸 Nicotinic acid	1.0	1.24	12.6	65.9
肌醇 Inositol	2.0	1.24	401.6	64.6
对氨基苯甲酸 p-aminobenzoic acid	1.0	1.21	26.0	72.6
None		1.48	100.0	100.0

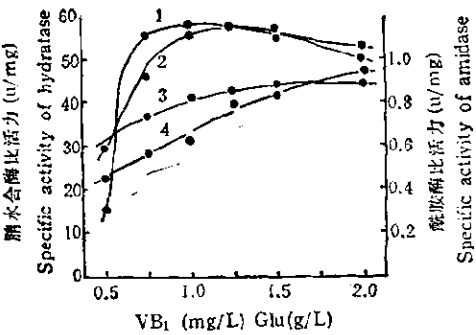


图1 VB₁ 和 Glu 含量对酶形成的影响
Fig. 1 The effect of VB₁ and Glu content on production of enzymes
1. VB₁ 对脲水合酶活力的影响
Effect of VB₁ on activity of hydratase
2. Glu 对脲水合酶活力的影响
Effect of Glu on activity of hydratase
3. VB₁ 对酰胺酶活力的影响
Effect of VB₁ on activity of amidase
4. Glu 对酰胺酶活力的影响
Effect of Glu on activity of amidase

按表 5 所列浓度将各种无机盐分别加到含有适宜碳氮源的基础培养基中。结果表明, Cu²⁺, Ni²⁺ 尤其 Fe²⁺ 明显促进了脲水合酶的形成。磷酸钾对该酶的形成也有促进作用。

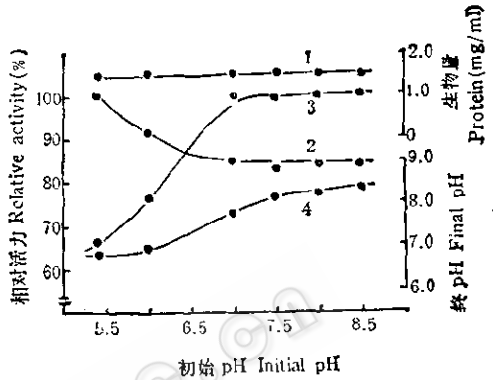


图2 初始 pH 对酶形成的影响
Fig. 2 The effect of initial pH on enzymes production
1.生物量 Biomass; 2.酰胺酶 Amidase
3.脲水合酶 Hydratase; 4.终 pH Final pH

(四) 金属离子对酶形成的影响

表 5 金属离子对酶形成的影响

Table 5 The effect of metal ions on production of enzymes

金属离子 Inorganic compound	浓 度 Conc. (mg/L)	生 物 量 Protein (mg/ml)	相对比活 Relative specific activity (%)	
			脲水合酶 Hydratase	酰 胺 酶 Amidase
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10	1.75	234.6	115.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	1.50	87.8	91.8
NiSO ₄ ·7H ₂ O	10	1.56	227.7	84.7
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	10	1.62	40.4	76.5
LiSO ₄ ·H ₂ O	10	1.70	33.5	85.7
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	10	1.55	77.7	58.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	1.55	34.0	82.7
MnCl ₂ ·2H ₂ O	10	1.63	16.5	73.5
BaCl ₂ ·2H ₂ O	10	1.55	86.2	84.7
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	1.70	471.3	134.7
	20	1.70	453.2	137.2
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	250/250	1.54	131.9	139.8
	500/500	1.60	144.7	136.7
	750/750	1.58	153.7	135.7
	1000/1000	1.36	161.2	126.5
None	0	1.55	100.0	100.0

(五) pH 对酶形成的影响

改变培养基的初始 pH，对酶形成及生物量的影响(图 2)表明，在所试 pH 范围内，当 pH < 7.0 时，腈水合酶比活力随 pH 升高而提高，当 pH 为 7.0 时，腈水合酶活力最大，以后趋于平缓。酰胺酶活力变化与上述结果相反，pH 改变对细胞生长无明显影响。

(六) 底物、产物及其类似物对酶形成的影响

在含 0.1% 酵母膏和 1.0% 糊精的基础培养基中，分别加入 0.5% 的各种腈、酰胺和丙烯酸。试验结果(表 6)表明，ZBB-21 菌的腈水合酶和酰胺酶均为诱导酶，其中丙腈、正丁腈和异丁腈是该菌腈水合酶

形成的有效诱导物，同时也诱导酰胺酶的形成。作为腈水合酶反应的底物(丙烯腈)和产物(丙烯酰胺)及其类似物抑制了菌的生长。

不同浓度的丙腈和正丁腈为诱导物时，对酶形成的影响如图 3。用丙腈作诱导物时，腈水合酶和酰胺酶的比活力在所试范围内随浓度的增加而提高，到 0.8% 时，两种酶的比活力均达最大，在丙腈浓度为 0.5% 以上时，生物量趋于稳定。正丁腈的诱导行为与丙腈截然不同，其浓度 < 0.6% 时，腈水合酶比活力随丁腈浓度增加而迅速提高，而酰胺酶活性明显降低，当浓度 > 0.6%，前者比活力急剧下降，而后者无明显改变。

表 6 腈、酰胺和丙烯酸对酶形成的影响
Table 6 Induction of nitriles, amides and acrylic acid on enzymes production

诱导物 Inducer	生物量 Protein (mg/ml)	比 活 力 Specific activity (u/mg)	
		腈水合酶 Nitrile hydratase	酰 胺 酶 Amidase
None	0.74	0.0	0.0
丙 腈 Propionitrile	2.34	39.6	6.6
丙 烯 腈 Acrylonitrile	0.66	0.2	0.6
正-丁腈 n-Butyronitrile	2.22	41.2	4.4
异 丁 腈 iso-Butyronitrile	2.24	41.6	5.1
乙 酰 胺 Acetamide	1.43	29.2	6.1
乙二酰胺 Oxamide	1.08	0.0	0.4
N, N-二甲基乙酰胺 N,N-Dimethyl acetamide	0.82	0.8	1.0
丙 酰 胺 Propionamide	2.14	15.2	3.6
丙 烯 酰 胺 Acrylamide	0.93	0.8	0.8
丙 烯 酸 Acrylic acid	0.38	0.2	0.8

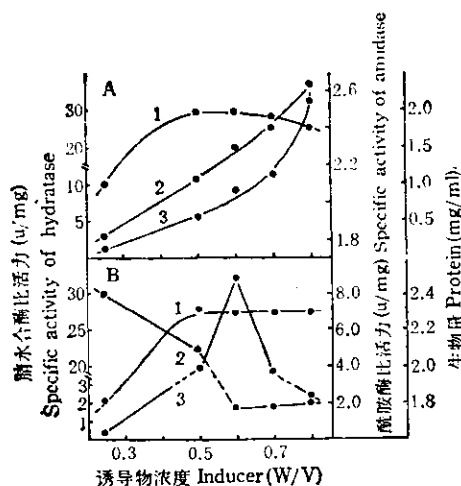


图3 诱导物浓度对酶形成的影响

Fig. 3 The effect of inducer concentration on enzymes production

A: 丙腈诱导 Propionitrile as inducer;
B: 丁腈诱导 n-Butyronitrile as inducer
1. 生物量 Biomass; 2. 酰胺酶 Amidase;
3. 胍水合酶 hydratase

(七) 培养时间对酶形成的影响

在上述研究确定的胍水合酶形成最适合成培养基中, 28℃ 摇床(200r/min)培养棒状杆菌 ZBB-21, 结果(图 4)表明, 胍水合酶比活力和生物量与培养时间正相关。当培养 64 小时, 二者均达最大值, 以后趋于平稳。酰胺酶比活力在 36 小时最高, 以后随时间延长而降低。由此认为培养 64 小时为宜。

讨 论

棒状杆菌 ZBB-21 的胍水合酶和酰胺酶均为诱导酶。Yamada 曾报道异丁腈是绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) B23 胍水合酶形成的适宜诱导物, 经过进一步研究, 又发现某些酰胺化合物, 其中包括异丁酰胺、巴豆酰胺、特别是甲基丙烯酰胺对该酶形成的诱导能力更强^[7]。我们在研究棒状杆菌 ZBB-21 胍水合酶形成过程中发现, 只有丙腈、正丁腈和异丁腈可做为

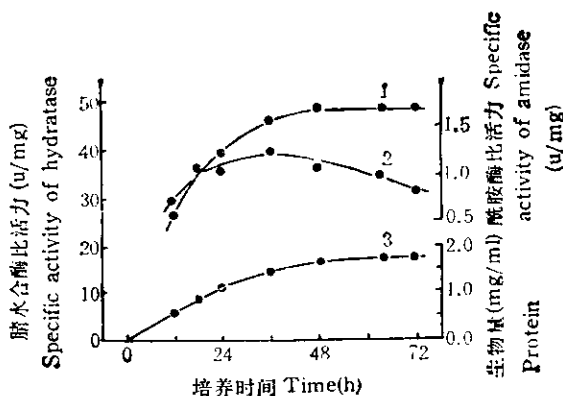


图4 培养时间对酶形成的影响

Fig. 4 The time course of enzymes production

1. 胍水合酶 Hydratase;
2. 酰胺酶 Amidase;
3. 生物量 Biomass

该酶形成的有效诱导物。另外还发现, 丙腈和正丁腈对 ZBB-21 菌胍水合酶和酰胺酶形成的诱导行为大不相同(图 3-A, B), 这可能是由于丙腈和正丁腈对该酶的底物抑制特性不同所造成的。ZBB-21 菌胍水合酶的形成还需特定的辅因子和促进因素。在酶形成过程中加入 Fe^{2+} , 可明显提高酶的比活力, 这似乎表明 Fe^{2+} 参与了胍水合酶的生物合成。微量的维生素 B_1 和肌醇及一定量的氨基酸均能促进酶的形成。

棒状杆菌 ZBB-21 在选定的最适条件下培养, 胍水合酶比活力可达 83.1u/mg, 而酰胺酶只有 1.1u/mg。前者比在以前报道的培养条件^[4]下形成的酶比活力提高 9 倍。

应用最适条件培养得到的休眠细胞, 在含 20g(干重)细胞的 500ml 0.1mol/L 磷酸盐反应混合液的恒化器中, 采用滴加批式反应工艺在 9 小时有效反应期内, 反

应液中丙烯酰胺积累浓度达 305g/L, 且未检出残留丙烯腈和付产物丙烯酸。此结果为棒状杆菌 ZBB-21 的实际应用展现了前景。

参 考 文 献

- [1] Commeyras, et al.: United States Patent, 4,001, 081, 1977.
- [2] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46(5): 1183, 1982.
- [3] Watanabe, I.: 有机合成化学, 46(2): 169, 1988.
- [4] 李文忠等: 微生物学报, 30(1): 29, 1990.
- [5] 李文忠等: 色谱, 7(3): 167, 1989.
- [6] Lowry, P. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 65, 1951.
- [7] Yamada, H., et al.: *Agric. Biol. Chem.* 50(11): 2859, 1986.

OPTIMUM CONDITIONS FOR NITRILE-HYDRATASE FORMATION BY *CORYNEBACTERIUM* ZBB-21

Li Wenzhong Zhang Hongyi Yang Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The optimum culture condition for the formation of nitrile hydratase with the highest activity by *Corynebacterium* ZBB-21 have been studied in this paper. Additions of ferrous ions, vitamin B₁, L-glutamic acid and the use of n-butyronitrile as an inducer greatly enhanced nitrile hydratase production. When the ZBB-21 was cultivated for 64 h at 28°C in the chosen culture broth, the specific

activity of nitrile hydratase was up to 83.1 u/mg and that of amidase was 1.1 u/mg only. The former was about 9-times higher than that in a medium previously reported.

Key words

Corynebacterium; Nitrile hydratase; Acrylamide