

腈水合酶转化反应的影响因子*

李文忠 张鸿翼 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) ZBB-21 腈水合酶能高效地将丙烯腈转化为丙烯酰胺, 其转化反应的最适 pH 为 8.0, 最适转化反应温度为 25℃。反应体系中加入微量的 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶的转化反应有明显的促进作用。过量丙烯腈(浓度为 0.3mol/L 以上)对酶活性有抑制作用, 转化产物丙烯酰胺及其结构类似物丙烯酸是腈水合酶的竞争性抑制剂, 其抑制常数 K_i 分别为 0.06mol/L 和 0.70mol/L, 游离氰离子 (CN^-) 的存在严重抑制丙烯酰胺的形成 ($K_i = 1.25 \times 10^{-3}$ mol/L)。

关键词 棒状杆菌; 腈水合酶; 丙烯酰胺

前文已报道了棒状杆菌(*Corynebacterium*) ZBB-21 腈水合酶(Nitrile-hydratase)的形成条件^[1]。在该菌最适生长条件下, 其无细胞提取液中腈水合酶的活力是与其共存的酰胺水解酶活力的 76 倍。为选择微生物转化丙烯腈生产丙烯酰胺的最适反应条件, 本文研究了影响棒状杆菌腈水合酶催化转化丙烯腈生成丙烯酰胺的影响因子。

材料和方法

(一) 菌种

同前文^[1]。

(二) 培养基、培养条件及无细胞提取液的制备

除改变缓冲液为 KH_2PO_4 -NaOH 0.16 mol/L, pH 8.0 外, 均同前文报道^[1]。

(三) 腈水合酶活力的测定

用 HPLC 方法测定^[2]。反应条件依实验目的不同做适当修改。在选定的条件下, 规定每分钟催化生成 1.0 μ mol 丙烯酰胺所需酶量为腈水合酶的一个活力单位。

(四) 蛋白质测定

用 Lowry^[4] 法测定。

(五) 试剂与仪器

丙烯酰胺 (Acrylamide) 为 E. Merck 公司产品, 丙烯腈 (Acrylonitrile) 和丙烯酸 (Acrylic acid) 为蒸馏纯化的国产试剂, 其余均为市售商品。DU-7 分光光度计为 Beckman 公司产品, M201 高效液相色谱仪为美国 Waters 公司产品。

结果和讨论

(一) 缓冲系统对转化反应的影响

1. 转化反应的最适 pH: 在不同 pH 值的 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 (1/15 mol/L) 缓冲液中进行转化反应, 酶活力测定结果表明, 腈水合酶转化丙烯腈生成丙烯酰胺的 pH 范围为 7.0—9.0, 最适 pH 为 8.0。此结果与 Commeyras^[5] 报道的相一致。

2. 不同组分的缓冲系统对转化反应的影响: 使转化反应在 pH 均为 8 的 Na_2HPO_4 -Citrate、 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 、Barbital、sodium-HCl、Tris-HCl 及 KH_2PO_4 -NaOH

本文于 1989 年 9 月 24 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

等缓冲液中进行。结果表明,在 KH_2PO_4 - NaOH 缓冲液中进行转化反应为最适宜。

3. KH_2PO_4 - NaOH 缓冲液浓度对转化反应的影响:表 1 表明,腈水合酶转化丙烯腈生成丙烯酰胺适宜介质为 0.16mol/L KH_2PO_4 - NaOH 缓冲液,其 pH 为 8.0。

表 1 KH_2PO_4 - NaOH 缓冲液浓度对酶活力的影响
Table 1 The effect of KH_2PO_4 - NaOH buffer with different concentration on enzyme activity

缓冲液浓度 Buffer concentration (mol/L)	相对比活力 Relative specific activity (%)
0.20	87.7
0.16	100.0
0.12	92.1
0.08	69.3
0.04	25.4

(二) 阳离子对转化反应的影响

由表 1 结果看出腈水合酶比活力随 KH_2PO_4 - NaOH 缓冲液浓度的减小 (0.16mol/L 以下)而降低,为阐明阳离子对酶反应的影响,我们在反应系统中加入不同浓度的 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 、 Mg^{2+} 和 Fe^{3+} 等阳离子,腈水合酶相对活力测定结果(图 1)表明,除 NH_4^+ 使酶活力下降外,其余阳离子均对酶反应有促进作用,特别是 Fe^{3+} 促进效果更明显。分析其原因可能是在反应系统中加入一定浓度的阳离子,增大了极性底物(丙烯腈)的极化度,使 $-\text{C}\equiv\text{N}$ 基团的 C 原子所带正电荷 (δ^+) 增强,促进了含 $-\text{SH}$ 基的腈水合酶对该碳原子的亲核进攻^[6-7],从而加速了亚氨基-酶复合物的形成。复合物经水合反应形成不稳定的中间物,进而分解为丙烯酰胺和酶。

(三) 温度和时间对转化反应的影响

在选定的缓冲系统中,选择酶转化反应的最适温度和时间。实验结果表明,腈水合酶催化丙烯腈生成丙烯酰胺的最适温

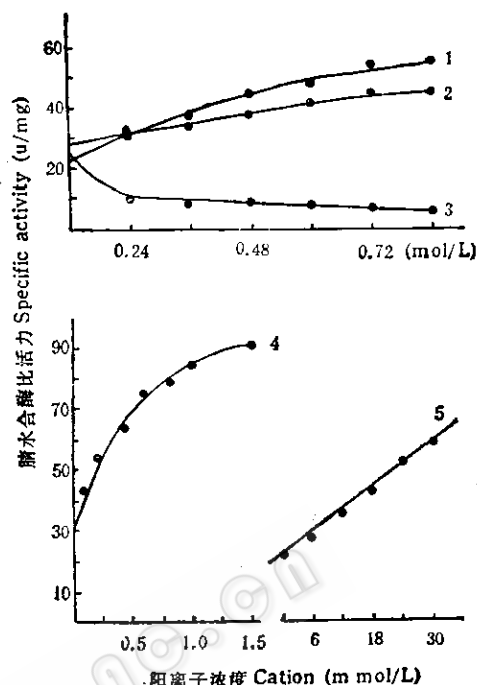


图 1 阳离子对腈水合酶活性的影响

Fig. 1 The effect of cations on nitrile-hydratase activity in reaction system

1. K^+ ; 2. Na^+ ; 3. NH_4^+ ; 4. Fe^{3+} ; 5. Mg^{2+}

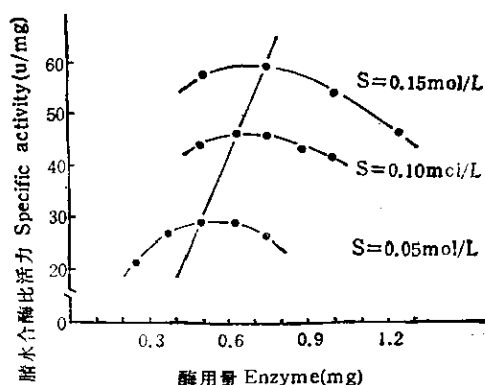


图 2 底物浓度与最适酶量的关系

Fig. 2 The optimum matching between substrate and enzyme concentration in enzyme reaction
S: Acrylonitrile

度为 25°C , 最适反应时间为 10 分钟。

(四) 底物浓度与最适酶量的关系

图 2 表明,在丙烯腈-丙烯酰胺酶促水

合反应系统中, 丙烯腈浓度与腈水合酶最适用量之间有良好的线性关系。对应于丙烯腈浓度 0.05、0.10、0.15 mol/L 的最适酶量分别为 0.50、0.63 和 0.75 mg。

(五) 底物、产物及其类似物对转化反应的抑制作用

1. 过量丙烯腈的抑制作用: 腈水合酶活性部位含有-SH^[6], 被巯基试剂掩蔽而使活性受到抑制。丙烯腈是腈水合酶的适宜底物, 但同时又是一种巯基的专一修饰剂^[8]。为了研究底物的抑制作用, 丙烯腈经重蒸馏精制而无游离氰和丙烯酸等杂质存在。图 3 表明, 酶作用于丙烯腈的 K_m 值为 0.11 mol/L。丙烯腈对该酶的抑制作用从 0.31 mol/L (相当于 2.2%, W/V) 开始产生。此抑制阈值对于试验中所用酶量 (0.1 mg/ml) 来说是相当高的。

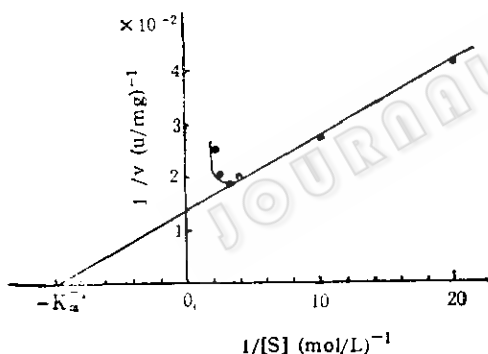


图 3 过量丙烯腈对腈水合酶的抑制作用

Fig. 3 The inhibition of excess acrylonitrile on nitrile-hydratase

2. CN^- 对转化反应的抑制: 由于某些腈化物在存放过程中能分解生成游离氰 (CN^-), 它作为酶反应底物的杂质对反应是有害的。为此, 我们研究了氰化物 ($NaCN$) 对腈水合酶活性的影响。结果表明 (图 4-A), CN^- 是腈水合酶的反竞争性抑制剂。此结果是可预料的, 因为氰化物是腈最简单的类似物, 可做为该酶的潜在底物。由 Dixon 图求得 CN^- 对酶的抑制常数 K_i

为 1.25×10^{-3} mol/L (图 4-B)。由此看出, 在丙烯腈-丙烯酰胺酶促转化反应系统中, 使用特别纯净的丙烯腈做底物是非常重要的。

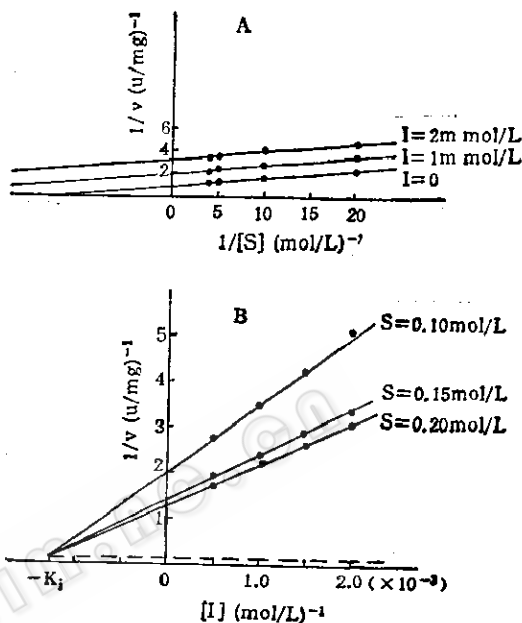


图 4 氰化物对腈水合酶的抑制作用

Fig. 4 The inhibition of cyanide on nitrile-hydratase

A: Lineweaver-Burk plot B: Dixon plot
S: Acrylonitrile; I: NaCN

3. 产物抑制: 许多酶会被反应产物所抑制^[9]。我们研究了腈水合酶转化反应的产物丙烯酰胺 (主要产物) 和丙烯酸 (与腈水合酶共存的酰胺水解酶形成的次级产物) 对腈水合酶活力的影响。上述两种产物在分子结构上与底物丙烯腈是化学相关化合物, 因此它对水合酶活性中心必然有一定亲合力。结果 (图 5) 表明, 丙烯酰胺是该酶的竞争性抑制剂。按酶竞争性抑制剂动力学方程推导公式:

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K'_m}{K_m} - 1}$$

求出丙烯酰胺对棒状杆菌 ZBB-21 腈水合酶的抑制常数 K_i 为 0.06 mol/L。此值比

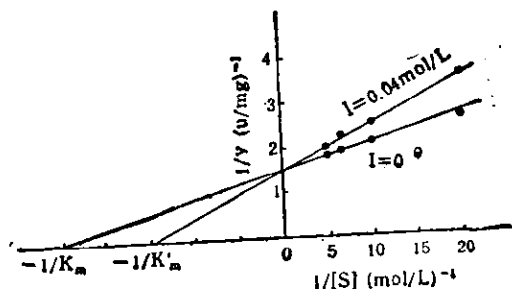


图5 丙烯酰胺对腈水合酶的抑制

Fig. 5 The inhibition of acrylamide on nitrile-hydratase S: Acrylonitrile; I:acrylamide

氰化物对该酶的抑制常数 ($K_i = 1.25 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 大得多, 表明丙烯酰胺对该酶的亲和力较小, 这对于在反应中得到高浓度的产物积累是有益的。

用丙烯酸钠代替丙烯酸(加入丙烯酸会严重影响反应系统的 pH) 研究其对腈水合酶的抑制行为。用上述相同方法求得丙烯酸对腈水合酶的竞争性抑制常数 K_i 为 0.70 mol/L 。由此看法, 丙烯酸对酶的抑制能力比丙烯酰胺还小。因此, 将具有高活性腈水合酶的棒状杆菌 (*Corynebacterium*) ZBB-21 应用于由丙烯腈转化为丙烯酰胺的反应中, 一般不会发生丙烯酸的抑

制。

综上所述, 丙烯腈-丙烯酰胺转化反应应在 $0.16 \text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH (pH 8.0)}$ 缓冲系统中 25°C 条件下进行。除须用纯净的丙烯腈(不含 CN^-) 外, 在连续转化反应中底物加入量每次不宜超过 0.31 mol/L 。若在反应系统中添加某些金属离子可明显提高腈水合酶活性, 这对于获得高浓度的丙烯酰胺积累将极为有利。

参考文献

- [1] 李文忠等: 微生物学报, 31(2): 115—121, 1991。
- [2] 李文忠等: 微生物学报, 30(1): 29—35, 1990。
- [3] 李文忠等: 色谱, 7(3): 167, 1989。
- [4] Lowry, P.H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [5] Commeyras, et al.: United States Patent, 4,001,081, 1977.
- [6] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46: 1165, 1982.
- [7] Bui, K. et al.: *J. General Microbiology*, 130: 89, 1984.
- [8] Cavins, J. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 243: 3357, 1968.
- [9] Webb, J.L.; *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1963.

EFFECTORS ON THE CONVERSION REACTION OF NITRILE-HYDRATASE FROM *CORYNEBACTERIUM* SP. ZBB-21

Li Wenzhong Zhang Hongyi Yang Huifang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The optimum reaction conditions of nitrile-hydratase from *Corynebacterium* sp. ZBB-21 and the effects of different compounds on the enzyme action have been studied.

The optimum pH was 8.0 for the enzymatic reaction of acrylonitrile-acrylamide bioconversion. The optimum reaction temperature was 25°C and the reaction time was 10min. Some metal ions such as K^+ , Na^+ , Mg^{2+} and Fe^{3+} in reaction system could activate the activity of nitrile-hydratase.

An excess of acrylonitrile as a substrate was shown to inhibit the enzyme activity. This inhibition occurred only at relatively high con-

centration of substrate (0.30 mol/L or more). A bioconversion product of acrylonitrile (acrylamide) and its structure analogue (acrylic acid) were shown to inhibit the nitrile-hydratase activity competitively. Their K_i were 0.06 mol/L and 0.70 mol/L respectively. The cyanide strongly inhibited the formation of acrylamide ($K_i = 1.25 \times 10^{-3}$ mol/L).

Key words

Corynebacterium; Nitrile-hydratase; Acrylamide