

## 3-氰基吡啶水合酶产生菌的 筛选及其酶形成条件<sup>\*</sup>

赵爱民 李文忠 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 应用富集培养和梯度底物浓度定向筛选技术,从长期被腈化物污染的土壤中筛选到一株产 3-氰基吡啶水合酶(3-cyanopyridine hydratase)活性较高的马红球菌(*Rhodococcus equi*)SHB-121。研究了该菌 3-氰基吡啶水合酶的最适形成条件。在最适条件下,酶的比活力达 5.3u/mg 干细胞,比在初筛条件下的酶活力提高 95 倍,而在其细胞内共存的尼克酰胺(烟酰胺)水解酶活力很低。

**关键词** 微生物转化,马红球菌,3-氰基吡啶水合酶,尼克酰胺

尼克酰胺(烟酰胺, Nicotinamide)和尼克酸(烟酸, Nicotinic acid)均为重要的抗糖尿病因子(Vitamin pp),也是辅酶 I、II 的组成成分,可广泛用于饲料添加剂及药物合成中。迄今国内外 Vpp 的生产仍沿用传统的化学合成工艺<sup>[1,2,3]</sup>,产率低,纯度差,反应条件苛刻。80 年代末, Nagasawa 等<sup>[4,5]</sup>报道了应用芳香腈水合(解)酶产生菌转化 3-氰基吡啶生产尼克酰胺和尼克酸的方法。虽尚未获工业应用,但在反应条件温和、流程简单、产物产率和纯度高诸方面都显示出化学合成法所不可比拟的优点,因而日益受到研究者的关注。

有关脂肪族腈化物的酶促转化机理已有很多报道<sup>[6-8]</sup>,但对芳香腈及其衍生物的微生物转化研究的成功报道却很少<sup>[9,10]</sup>。

腈化物的微生物转化研究在我国起步较晚,应用生物方法转化丙烯腈生产丙烯酰胺(具有重要经济价值的化工产品)的应用基础研究已有报道<sup>[11-13]</sup>。对芳香腈的微生物转化及其有用产物的酶法生产研究,在国内尚未见报道。我们从土壤中分离到一株在胞内可同时诱导合成芳香腈水合酶(Aromatic nitrile hydratase)和芳香酰胺水解酶(Aromatic amidase)的马红球菌(*Rhodococcus equi*)SHB-121,以 3-氰吡啶为底物时,在细胞反应液中,可同时检测到主要产物尼克酰胺和次级产物尼克酸的存在,并分别测定了该两种酶的活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种来源

微生物土样采自上海、山东等地长期被腈化物污染的土壤及含腈废水处理构筑物

\* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1992 年 9 月 2 日收到。

中。

## 1.2 培养基

**1.2.1 富集培养基(g/L):**牛肉膏 3, NaCl 5, 酵母膏 2.5, 蛋白胨 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5, 并加入梯度浓度的多种腈化物作营养基质, pH7.0。

**1.2.2 平皿和斜面培养基(g/L):**牛肉膏 3, 蛋白胨 5, NaCl 5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1, 糊精 10, 琼脂粉 12, pH7.0。

**1.2.3 筛选和生长基础培养基(mg/L):** $\text{KH}_2\text{PO}_4$  750,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  750,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  500,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10, L-半胱氨酸 500, L-谷氨酸 200, 苯丙氨酸 200, VB<sub>1</sub>-HCl 0.5, 烟酸 0.5, 肌醇 2, 依研究目的加入所试含碳、氮化合物及腈化物等, pH7.0。

## 1.3 酶活力的测定

**1.3.1 3-氰基吡啶水合酶活力:**定量吸取培养液离心(TGL 16-台式离心机),取细胞并悬浮于 2.5ml 0.2mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.5)中,加入 2.5ml 0.4mol/L 的 3-氰基吡啶,混匀,于 25℃振荡反应 20.0 分钟,以 0.1ml 3mol/L HCl 终止反应。离心后用 HPLC 法<sup>[14]</sup>测定反应液中尼克酰胺的生成量。

在上述反应条件下,1 分钟内催化水合 3-氰基吡啶生成 1.0 $\mu\text{mol}$  尼克酰胺所需的酶量定义为 3-氰基吡啶水合酶的一个活力单位(u)。

**1.3.2 尼克酰胺水解酶活力:**除以 0.4mol/L 尼克酰胺溶液作底物及测定尼克酸生成量外,其它测定条件同 3-氰基吡啶水合酶活力的测定。在 1 分钟内催化水解尼克酰胺生成 1.0 $\mu\text{mol}$ /L 尼克酸所需的酶量定义为尼克酰胺水解酶的一个活力单位(u)。

## 1.4 生物量的测定

在 721 分光光度计 460nm 处(1.0cm 光径)测定稀释 20 倍的细菌培养液的  $A_{460\text{nm}}$ ,以同样稀释度的培养基为对照,并校正为干细胞重。

## 1.5 仪器与试剂

高效液相色谱仪(M201 HPLC)为 Waters Ltd. (USA)产品;梯度温度培养箱(TN-3F)为 Tokyo Kagaku Sangyo Kaisha, Ltd. (Japan)产品,721 分光光度计为上海第二分析仪器厂出品。

尼克酰胺、尼克酸和 3-氰基吡啶购自 Aldrich 化学公司(USA)。所用其它试剂为国产市售品。

# 2 结果和讨论

## 2.1 3-氰基吡啶水合酶产生菌的筛选

**2.1.1 腈化物同化菌的分离筛选:**将适量微生物土样分别接入以梯度浓度的各种腈化物为营养基质的富集培养基中,28℃振荡(200r/min)培养 72 小时,经三次富集培养后,以适宜稀释度的培养液于平皿划线分离,获得近 200 个单菌落并分别挑于斜面培养基生长保存。

将斜面培养物经液体种子培养获得的 24 小时菌龄种子液,按 5%(v/v)量分别转接入含 1%糊精和 0.5%(w/v)所试腈化物的筛选培养基中,28℃生长 72 小时,以生物量

( $A_{460nm}$ )为指标,经两次筛选得到分别同化所试各种腈化物的菌 36 株。

**2.1.2 3-氨基吡啶水合酶形成菌的筛选:**将初筛获得的各种腈化物同化菌经液体种子培养后,分别接入含 1%糊精和 0.5%相应腈化物的筛选培养基中,28℃好氧生长 72 小时。相应的生物量及 3-氨基吡啶水合酶和尼克酰胺水解酶活力测定结果表明,在 9 株丁腈同化菌中,有一株菌同时具有 3-氨基吡啶水合酶和尼克酰胺水解酶活性(分别为 0.06 和 0.01u/mg),将其编号为 SHB-121。经 Biolog Microstation System 鉴定定名为马红球菌(*Rhodococcus equi*)SHB-121。

## 2.2 3-氨基吡啶水合酶的最适形成条件

以 SHB-121 菌为材料,研究了营养基质、诱导物及环境限制因子对 3-氨基吡啶水合酶形成的调节作用。

**2.2.1 碳源对酶形成的影响:**在以 0.5%丁腈为氮源的生长基础培养基中添加 11 种不同碳源(1%)。经 28℃好氧培养 72 小时。相应生物量、3-氨基吡啶水合酶和尼克酰胺水解酶活力测定结果(表 1)表明,酶形成的适宜碳源为柠檬酸钠或丁二酸钠,其中尤以柠檬酸钠为佳。在含该最适碳源培养基中生长,水合酶比活力明显提高,而水解酶比活力无明显变化。柠檬酸钠形成酶的最适浓度为 1%(w/v)。

表 1 碳源对酶形成的影响

Table 1 Effect of carbon sources on enzyme formation of *Rhodococcus equi* SHB-121

碳 源 Carbon sources (%)		生 物 量 Biomass (mg dry cell/ml)	比 活 力 Specific activity ( $\dot{u}/mg$ )	
			3-氨基吡啶水合酶 Hydratase	尼克酰胺水解酶 Amidase
葡萄糖	Glucose	2.28	0.09	0.01
果糖	Frucose	4.63	0.02	0.06
蔗糖	Sucrose	4.93	0	0.01
麦芽糖	Maltose	4.11	0.02	0.05
糊 精	Soluble dextrin	5.15	0.04	0.05
淀 粉	Soluble starch	4.67	0.03	0.05
甘露醇	Mannitol	4.18	0	0.02
山梨醇	Sorbitol	4.07	0	0.01
甘 油	Glycerol	5.19	0.01	0.02
柠檬酸钠	Citrate(Na)	4.26	1.79	0.31
丁二酸钠	Succinate(Na)	4.03	1.69	0.31
	None	2.46	0.74	0.25

**2.2.2 氮源对酶形成的影响:**在含 0.3%(w/v)丁腈和 1.0%(w/v)柠檬酸钠的生长基础培养基中,添加浓度均为 0.5%(w/v)的不同含氮化合物。测定培养液生物量、完整细胞水合酶和水解酶活力。结果表明,SHB-121 菌的最适生长氮源为蛋白胨,其适宜浓度为

0.05%。

2.2.3 酶形成的诱导特性:在含有选定的最适碳、氮源的生长基础培养基中,分别加入0.5%(w/v)的不同腈化物、酰胺或羧酸作酶形成诱导物。相应生物量及酶活性测定结果(表2)表明,SHB-121菌的水合酶和水解酶均为胞内诱导酶,其适宜诱导物为正丁腈和甲基丙烯酰胺。该诱导物的存在不仅诱导形成较高活性的3-氰基吡啶水合酶,而且可得到较高的生物量。由于正丁腈易挥发而不便操作,故以甲基丙烯酰胺为该酶的最适诱导物。

表2 诱导物对酶形成的影响

Table 2 Effect of inducers on enzyme formation of *Rhodococcus equi* SHB-121

诱导物 Inducers (0.5%)		生物量 Biomass (mg dry cell/ml)	比活力 Specific activity (u/mg)	
			3-氰基吡啶水合酶 Hydratase	尼克酰胺水解酶 Amidase
丙腈	Propionitrile	3.32	0.20	0.02
甲基丙烯腈	Methacrylonitrile	4.11	1.53	0.32
异丁腈	iso-Butyronitrile	4.55	0.05	0.04
正丁腈	n-Butyronitrile	4.09	2.94	0.06
乙酰胺	Acetamide	1.10	0	0.05
草酰胺	Oxamide	2.31	0	0.01
甲基丙烯酰胺	Methacrylamide	3.14	3.00	0.39
尼克酰胺	Nicotinamide	1.57	0.01	0
丙烯酸	Acrylic acid	0.25	0	0
尼克酸	Nicotinic acid	0.37	0	0.01
3-氰基吡啶	3-Cyanopyridine	1.81	0	0.01
	None	0.40	0	0

以甲基丙烯酰胺为诱导物,使用浓度为0.6%(w/v)时,SHB-121菌诱导形成的3-氰基吡啶水合酶活性达最高值(图1),但尼克酰胺水解酶活性无明显提高。当甲基丙烯酰胺浓度大于最佳值时,水合酶活性急剧降低,其原因可能是在过高浓度下,甲基丙烯酰胺虽然不影响细胞生长,但抑制了酶的合成。

2.2.4 金属离子对酶形成的影响:在选定的不含无机离子的生长基础培养基中,添加各种无机盐。培养液生物量及酶活力测定结果表明, $Ba^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ ,特别是 $Fe^{2+}$ 的存在能明显促进SHB-121菌3-氰基吡啶水合酶的形成,而尼克酰胺水解酶活性无明显变化。

2.2.5 氨基酸和维生素对酶形成的影响:结果表明,在所试的8种氨基酸(0.05%)和8种维生素(2mg/L)中,只有胱氨酸和半胱氨酸的存在对SHB-121菌3-氰基吡啶水合酶的形成有利。

2.2.6 初始 pH 对酶形成的影响:结果(图 2)表明,当培养基初始 pH 为 7.0 时,SHB-121 菌水合酶活力达最高值,而 pH 对该菌水解酶形成无明显影响。

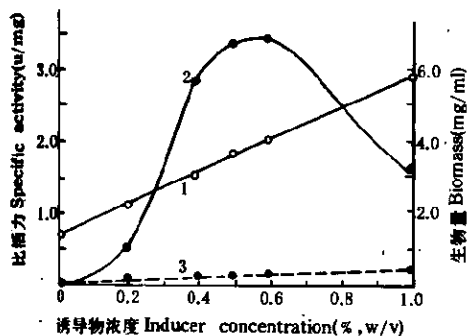


图 1 诱导物浓度对酶形成的影响

Fig. 1 Effect of inducer concentration on enzyme formation of *Rhodococcus equi* SHB-121

- 1. 生物量 Biomass;
- 2. 3-氨基吡啶水合酶 Hydratase;
- 3. 尼克酰胺水解酶 Amidase.

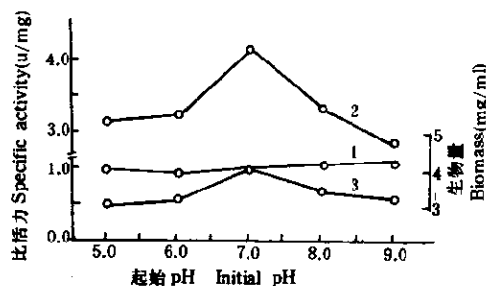


图 2 初始 pH 对酶形成的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on enzyme formation of SHB-121

- 1. 生物量 Biomass;
- 2. 3-氨基吡啶水合酶 Hydratase;
- 3. 尼克酰胺水解酶 Amidase.

2.2.7 培养温度和时间对酶形成的影响:酶形成与培养温度关系研究表明,SHB-121 菌完整细胞 3-氨基吡啶水合酶的比活力随培养温度升高而提高,其最适温度为 28℃,当温度高于最佳值时,其表现酶活力明显降低。

酶形成时间过程的研究表明(图 3), 3-氨基吡啶水合酶比活力在细胞生长对数后期,即在培养 34 小时时可达到最高值,然后随培养时间的延长而逐渐降低,但培养时间对酰胺水解酶的形成无明显影响。产生上述现象的原因并非是提高生长温度或延长生长时间对酶形成不利,而主要是由于已合成胞内水合酶在较高温度或在一定温度保温较长时间,使酶活力部分丧失,即该菌 3-氨基吡啶水合酶热稳定性较差。

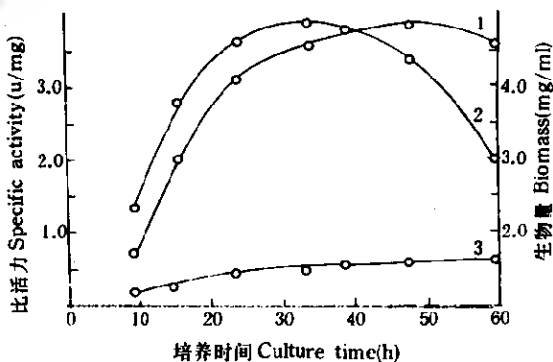


图 3 培养时间对酶形成的影响

Fig. 3 Time course of enzyme formation of *Rhodococcus equi* SHB-121

- 1. 生物量 Biomass;
- 2. 3-氨基吡啶水合酶 Hydratase;
- 3. 尼克酰胺水解酶 Amidase.

综合上述研究结果,在选定的最适条件下培养,SHB-121菌3-氰吡啶水合酶比活力可达5.3u/mg,比初筛条件下酶比活力提高了95倍。

### 参 考 文 献

- [1] Kroh W. German Patent, 828274, 1953.
- [2] Kron W. German Patent, 828246, 1953.
- [3] Anderson A et al. *Naturwissenschaften*, 1985, **72**:209.
- [4] Nagasawa T et al. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(3):1766.
- [5] Mathew C D et al. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(4):1030.
- [6] Uematsu T et al. *Arch Biochem Biophys*, 1974, **162**:614.
- [7] Thimann K V et al. *Arch Biochem Biophys*, 1964, **105**:133.
- [8] Asano Y et al. *Agric Biol Chem*, 1980, **44**(9):2251.
- [9] Robinson W G et al. *J Biol Chem*, 1964, **239**:4257.
- [10] Nagasawa T et al. *Trends in Biotechnology*, 1989, **7**(6):153.
- [11] 李文忠,张鸿翼,杨慧芳. *微生物学报*, 1990, **30**(1):29-35.
- [12] 李文忠,张鸿翼,杨慧芳. *微生物学报*, 1991, **31**(2):115-121.
- [13] 李文忠,张鸿翼,杨慧芳. *微生物学报*, 1991, **31**(3):227-231.
- [14] 李文忠,张鸿翼. *色谱*, 1993, **11**(2):76-78.

## SCREENING OF 3-CYANOPYRIDINE HYDRATASE-PRODUCING STRAINS AND FORMATION OF THE ENZYME

Zhao Aimin Li Wenzhong Yang Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** A bacterium, *Rhodococcus equi* SHB-121 forming 3-cyanopyridine hydratase was screened from soil polluted by nitriles according to the biomass and the enzyme activity. Its activity was the highest among 200 nitrile-utilizing bacteria isolated. The optimum formation conditions for the 3-cyanopyridine hydratase of SHB-121 have been studied. Under the optimum conditions, 5.3 u/mg dry cell weight of specific activity was produced, and the coexistent amidase activity was very low. The specific activity of strain SHB-121 was about 95 times higher than that in primitive screening medium.

**Key words** Microbial conversion, *Rhodococcus equi*, 3-cyanopyridine hydratase, Nicotinamide