

3-氰基吡啶水合酶的反应条件及影响因子*

王保军 李文忠

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 研究了芳腈水合酶催化水合 3-氰基吡啶生成尼克酰胺的反应条件及影响因子。酶反应的最适 pH 为 8.0, 最适温度为 25℃。酶在 pH8.5 于 25℃保温 4 小时或在 25—30℃于 pH8.0 保温 3 小时是稳定的。反应液中加入 Fe^{3+} (1.5 mmol/L) 可使酶活力增加 50%, 而加入 NH_4^+ (300 mmol/L) 则使酶活降低了 67%。 Ag^+ 和 Hg^{2+} 强烈地抑制酶反应活性, 在浓度均为 5 mmol/L 时, 抑制率分别为 99.7% 和 100%。 NaCN (50 mmol/L) 和苯甲腈 (100 mmol/L) 对酶活性的抑制率分别为 78% 和 85%。该酶作用于 3-氰基吡啶的 K_m 为 62.5 mmol/L, $V_{\max}$ 为 85.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

关键词 3-氰基吡啶, 芳腈水合酶, 尼克酰胺

3-氰基吡啶水合酶 (3-cyanopyridine hydratase) 是一种芳腈水合酶, 能催化 3-氰基吡啶水合成为尼克酰胺 (nicotinamide)^[1,2], 尼克酰胺是一种维生素, 可广泛用于动物饲料添加剂及药物合成中。前文报道了马红球菌 (*Rhodococcus equi*) SHB-121 胞内 3-氰基吡啶水合酶的形成条件^[3]。为了应用该菌转化 3-氰基吡啶形成和积累尼克酰胺, 本文报道采用该菌的部分提纯酶研究转化 3-氰基吡啶生成尼克酰胺的反应条件及影响因子。

1 材料和方法

1.1 菌种及培养基

马红球菌 (*Rhodococcus equi*) SHB-121 及其培养条件同文献^[3]。

1.2 酶液的制备

细菌在 28℃ 振荡培养 36 小时, 离心 (5000×g, 30 min), 收集细胞。用 0.06 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤并离心后, 悬浮于同样缓冲液中, 置冰浴超声波破碎 (19KHz, 200W, 2 min×3)。取无细胞粗提液经 30—80% 硫酸铵饱和度分级, 沉淀物溶解并对上述同样缓冲液透析脱盐, 即得部分纯化酶液。

1.3 3-氰基吡啶水合酶活力的测定

用 HPLC 方法^[4]测定。在选定的条件下, 每分钟催化水合 3-氰基吡啶生成 1 μmol 的尼克酰胺所需酶量为该酶的一个活力单位 (u)。

1.4 蛋白质的测定

采用 Bradford 方法^[5]测定。

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 6 月 10 日收到。

1.5 试剂与仪器

3-氰基吡啶和尼克酰胺均为美国 Aldrich 化学公司产品。M201 型高效液相色谱仪为美国 Waters 公司产品。超声波破碎器 Labsonic, 2000, 为瑞典 B. Braun 公司产品。

2 结果和讨论

2.1 酶反应的最适 pH 和最适温度

在不同 pH 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (0.06 mol/L) 缓冲液中进行反应并测定相应的酶活性。结果表明, 酶反应的最适 pH 为 8.0。酶反应的最适温度为 25℃。

2.2 pH 和温度对酶稳定性的影响

酶液在不同 pH 的磷酸缓冲液 (0.06 mol/L) 中 25℃ 保温 4 小时。该酶在 pH8.5 的条件下稳定。

酶液在不同温度下分别保温 3 小时和 6 小时, 然后按规定条件测定酶活力。结果(图 1)表明, 在 25—30℃ 保温 3 小时酶活力稳定, 保温 6 小时, 相对活力仅有 50%。在 50℃ 保温 3 小时或 6 小时, 活力全部丧失。

2.3 缓冲系统对酶反应的影响

2.3.1 不同组分缓冲液的影响: 在 pH8.0 的 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-Citrate}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 、Tris-HCl、巴比妥钠-HCl 缓冲液中按标准条件进行反应, 测定相应酶活力。结果表明, 在 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲液 (pH8.0) 中反应最为适宜。

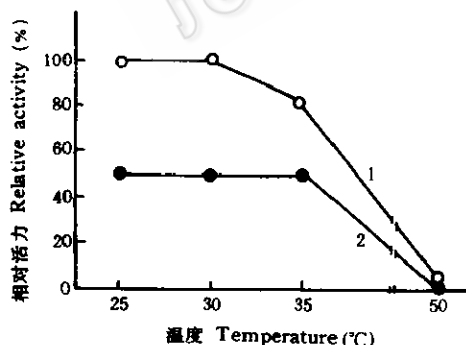


图 1 温度对酶稳定性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on enzyme stability

Incubation time: 1. 3h; 2. 6h.

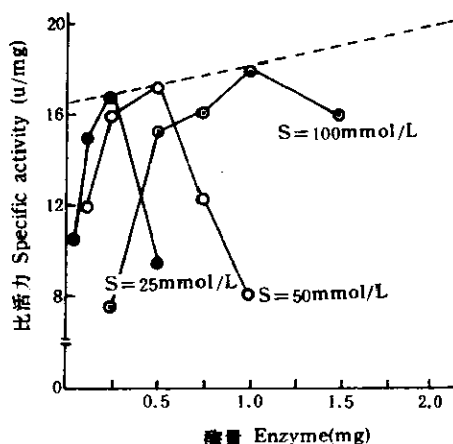


图 2 底物浓度与最适酶量的关系

Fig. 2 Relationship between substrate and optimum enzyme amount in enzymatic reaction

S: 3-cyanopyridine concentration

2.3.2 缓冲液浓度的影响: 反应在浓度为 0.017—0.225 mol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$

(pH8.0)的缓冲液中进行。缓冲液浓度为 0.15 mol/L 时,酶的活性最高。

2.4 底物浓度与最适酶量的关系

试验结果(图 2)表明,底物浓度与最适酶量之间具有良好的线性关系。对应于 3-氨基吡啶浓度 25、50、100 mmol/L 的最适酶量分别为 0.25、0.5 和 1.0 mg。

2.5 阳离子对酶反应的影响

研究了 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ (5—300 mmol/L)、 Mg^{2+} (5—50 mmol/L) 和 Fe^{3+} (0.5—5 mmol/L) 的加入对酶促反应的影响。在所试浓度范围内, K^+ 、 Na^+ 和 Mg^{2+} 对酶反应无明显影响; Fe^{3+} (1.5 mmol/L) 可使酶活力提高 50%, 而 NH_4^+ 对酶促反应具有明显的抑制作用, 在浓度为 300 mmol/L 时, 酶活力下降了 67% (图 3)。 NH_4^+ 对酶活性的抑制作用有待探讨。此外, 有关其它金属离子对酶促反应的影响也进行了研究。反应液中分别加入 Cu^{2+} 、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 和 Zn^{2+} 等离子(终浓度均为 5 mmol/L), 在规定条件下反应并测定酶活力。如表 1 所示。 Cu^{2+} 、 Ag^+ 和 Hg^{2+} 等重金属离子对酶促反应具有强烈的抑制作用, 抑制率分别为 54%、99.7% 和 100%。

表 1 金属离子对酶反应的影响

Table 1 Effect of various metal ions on enzymatic reaction

金属离子 Metal ion(5 mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
None	100
Ca^{2+}	91.7
Co^{2+}	90.5
Mn^{2+}	86.0
Zn^{2+}	86.0
Ni^{2+}	78.6
Cd^{2+}	70.6
Cu^{2+}	46.0
Ag^+	0.3
Hg^{2+}	0

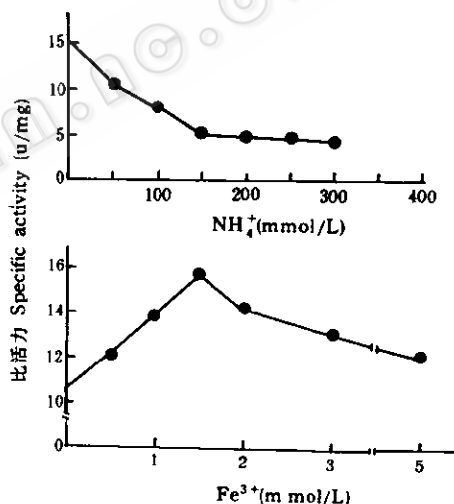


图 3 NH_4^+ 和 Fe^{3+} 对酶促反应的影响

Fig. 3 Effect of NH_4^+ and Fe^{3+} on enzymatic reaction

2.6 抑制剂及底物类似物的影响

如表 2 所示, 巯基烷化剂碘代乙酸和巯基抑制剂乙酸苯汞, 在所试条件下对酶促反应无明显抑制作用, 但酶的最简单底物 NaCN (50 mmol/L) 和底物类似物苯甲腈 (100 mmol/L) 对酶促反应抑制作用明显, 抑制率分别为 78% 和 85%。

此外, 反应液中若加入 EDTA (0.5—5 mmol/L) 对酶反应活性有少许促进作用 (5—31%)。

表 2 抑制剂及底物类似物对酶反应的影响

Table 2 Effect of inhibitors and substrate analogues on enzymatic reaction

抑制剂及底物类似物 Inhibitor and substrate analogue	浓 度 Conc. (mmol/L)	抑制率 Inhibition (%)
未加 None		0
碘乙酸 Iodoacetic acid	1.0 5.0	0
乙酸苯汞 Phenylmercuric acetate	1.0 3.0	3.3 19.0
NaCN	30.0 50.0	64.3 78.0
苯甲腈 Benzonitrile	50.0 100.0	81.0 85.0

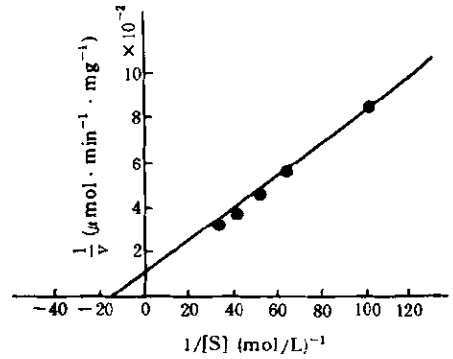


图 4 3-氰基吡啶水合酶的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of 3-cyanopyridine hydratase for 3-cyanopyridine

2.7 K_m 及 V_{max} 的测定

在选定的最适条件下反应,按 Lineweaver-Burk 法作图,求得马红球菌 SHB-121 3-氰基吡啶水合酶作用于 3-氰基吡啶的 K_m 为 62.5 mmol/L,最大反应速度(V_{max})为 85.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白(图 4)。

综上所述,酶促 3-氰基吡啶生成尼克酰胺的反应宜在 0.15 mol/L 的 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液(pH8.0)25℃条件下进行,并应防止各种具有抑制作用的成分掺入反应体系中。添加微量的 Fe^{3+} 有利于提高反应活性。选择最佳酶促反应条件可为应用微生物转化 3-氰基吡啶生产尼克酰胺提供一定的依据。

参 考 文 献

- [1] Nagasawa T et al. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(3):1766.
- [2] Nagasawa T et al. *Trends in Biotechnology*, 1989, 7:153.
- [3] 赵爱民,李文忠,杨惠芳. 微生物学报, 1994, 34(2):131.
- [4] 李文忠,张鸿翼. 色谱, 1993, 11(2):76-78.
- [5] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 72:248.

REACTION CONDITIONS AND EFFECTORS OF 3-CYANOPYRIDINE HYDRATASE

Wang Baojun Li Wenzhong

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract The optimum reaction conditions of aromatic nitrile hydratase catalyzing hydration of 3-cyanopyridine to nicotinamide and effectors on the reaction have been studied. The optimum pH of the enzymatic reaction was 8.0, the optimum temperature was 25 °C. The enzyme was stable at 25—30 °C and pH 8.0 for 3 hours or at 25 °C and pH 8.5 for 4 hours. Addition of Fe^{3+} (1.5 mmol/L) enhanced activity for 50%, whereas addition of NH_4^+ (300 mmol/L) decreased activity for 67%. Metal ions such as Ag^+ and Hg^{2+} (both 5 mmol/L) inhibited strongly enzyme activity, inhibition were 99.7% and 100%, respectively. NaCN (50 mmol/L) and benzonitrile (100 mmol/L) inhibited activity for 78% and 85%, respectively. The K_m of the enzyme for 3-cyanopyridine was 62.5 mmol/L, $V_{\max}$ was 85.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Key words 3-cyanopyridine, Aromatic nitrile hydratase, Nicotinamide