

腈水合酶产生菌的培养及其酶活性的比较*

张鸿翼 李文忠 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 从腈污染的土样中筛选获得 5 株腈水合酶活性较高的细菌,分属于棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)、节杆菌(*Arthrobacter* sp.)和克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)其中具有腈水合酶活性的克氏杆菌属菌为首次分离到。对这些菌株适宜培养条件及酶形成诱导特性的研究表明,棒状杆菌和节杆菌的腈水合酶为诱导酶,而克氏杆菌的酶为组成酶。前二个属的细菌完整细胞腈水合酶活性相近,均较后一属细菌高约 10 倍。

关键词 丙烯腈微生物转化;腈水合酶

应用具有腈水合酶活性的微生物转化丙烯腈生产丙烯酰胺的研究日益广泛,已选育到一批丙烯酰胺的生产菌株,并对其形成丙烯酰胺能力进行了测定。从对腈化物的微生物降解机理研究表明,这类菌株是按 $\text{RCN} \xrightarrow{\text{腈水合酶}} \text{RCONH}_2 \xrightarrow{\text{酰胺酶}} \text{RCOOH} + \text{NH}_3$ 途径^[1],将丙烯腈转化为稳定的中间产物丙烯酰胺并得到积累。这类微生物有绿针假单胞菌^[2](*Pseudomonas chlororaphis*) B23,芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),芽孢不动菌(*Bacteridium* sp.),微球菌(*Micrococcus* sp.),短杆菌(*Brevibacterium*) 312,红球菌^[3](*Rhodococcus*) N-774,和恶臭假单胞菌^[4](*P. putida*) JP-1 等。我们从腈污染过的土壤中筛选到 5 株具有腈水合酶活性的细菌,经鉴定它们为棒状杆菌(*Corynebacterium*) ZBB-21、ZBB-41 节杆菌(*Arthrobacter*) ZBB-22 和克雷伯氏菌(*Klebsiella*) ZBP-12 ZBP-21 其中克雷伯氏菌为我们首次报道。本文比较研究了该 5 株菌的培养条件及其转化丙烯腈形成丙烯酰胺的活力。

材料和方法

(一) 菌种

棒状杆菌(*Corynebacterium*) ZBB-21 ZBB-41,节杆菌(*Arthrobacter*) ZBB-22 和克雷伯氏菌(*Klebsiella*) ZBP-12 ZBP-21,均为本

研究组分离鉴定。

(二) 培养基

1. 斜面种子培养基为牛肉膏 2.5g,糊精 5g,蛋白胨 5g,NaCl 2.5g, K_2HPO_4 0.1g,蒸馏水 1000ml。

2. 基础培养基: KH_2PO_4 2.0g,NaCl 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g,半胱氨酸 0.5g,泛酸钙 0.4mg,叶酸 0.01mg, $\text{VB}_1\text{-HCl}$ 0.4mg, $\text{VB}_6\text{-HCl}$ 0.4mg,烟酸 4 μg ,生物素 2 μg , VB_2 0.2mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg,对氨基苯甲酸 0.2mg,蒸馏水 1000ml pH 按实验要求调节。

3. 液体种子培养基为含 0.3% 丁腈和 1.0% 糊精的基础培养基。

(三) 细菌培养条件

将生长 48 小时的斜面种子洗入液体种子培养基中,28℃ 摇床(200r/min)培养 24 小时。将 2.0ml 上述种子液接入装有 100ml 基础培养基的 250ml 三角瓶中(成份按实验要求调整),28℃ 振荡培养 64 小时。

(四) 完整细胞腈水合酶活力的测定

在总体积为 5ml 的反应混合液中含 0.33mmol 磷酸缓冲液(pH7.5),250 μmol 丙烯腈和 1.0ml 休眠细胞悬液,25℃ 振荡反应 10 分钟加入 0.1ml 1.0mol/L HCl 终止反应,离心取

* 本工作为国家自然科学基金资助项目

上清液用 HPLCTM 法测定反应液中的丙烯酰胺生成量。规定每分钟催化生成 10 μ mol 的丙烯酰胺所需的细胞量为完整细胞腓水合酶的一个活力单位 (u/ml)。

(五) 生 量测定

将细胞培养液稀释 10 倍, (以相同稀释度的培养基为对照) 用 1.0cm 光程比色杯于波长 460nm 测其吸光度并校正为细胞干重 (mg/ml)。

(六) 试剂和仪器

丙烯酰胺为 E. Merck 产品并经重结晶纯化, 丙烯腈为国产试剂经重蒸馏纯化, 其余试剂为市售商品。

高效液相色谱仪 (M201 HPLC) 为日本 Waters 产品, 分光光度计 (DU-7) 为美国 Beckman 生产。

结 果 和 讨 论

(一) 碳源对菌生长的影响

在含 0.5% (W/V) 丁腈 (对 ZBB-21, ZBB-41, ZBB-22) 和 0.5% (W/V) 丙腈 (对 ZBP-12, ZBP-21) 为氮源的基础培养基中, 加入浓度均为 0.5% (W/V) 的不同含碳化合物, 28℃ 摇床 (200 r/min) 培养 64 小时。对相应生物量测定结果表明, 该 5 株菌的最适生长碳源为糊精和可溶淀粉。另外蔗糖和葡萄糖可分别做

表 1 碳源对菌生长的影响

碳源	ZBB-21	ZBB-41	ZBB-22	ZBP-12	ZBP-21
	生物量 mg/ml (干重)				
C(一)	1.41	1.17	0.10	0.11	0.05
糊精	1.62	1.40	1.44	1.36	1.30
葡萄糖	1.31	1.00	0.98	1.28	1.03
蔗糖	1.54	1.28	0.50	1.20	1.11
果糖	0.01	0.01	0.02	0.63	0.74
麦芽糖	1.59	0.03	0.03	0.01	0.47
半乳糖	0.98	1.08	0.39	0.59	0.01
淀粉	1.65	1.48	1.72	1.41	1.76
甘油	1.40	1.12	0.06	1.03	1.14
甘露醇	1.32	1.12	0.05	1.03	1.14
乙酸钠	1.38	1.12	0.15	1.70	0.86
丁二酸钠	1.44	1.20	0.30	0.98	1.30

为棒状杆菌 ZBB-21, ZBB-41 和节杆菌 ZBB-22 的适宜碳源, 而克氏杆菌 ZBP-12 和 ZBP-21, 可利用的碳源种类要比上述三株菌多些 (表 1)。

以糊精为碳源 (0.5% 丁腈为氮源), 不同浓度碳源对生长的影响表明 (图 1), 当糊精浓度为 1.0% 时, 对 5 株菌的生长均是适宜的。

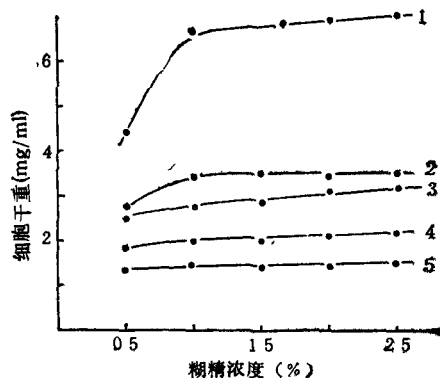


图 1 糊精浓度对菌生长的影响

1 ZBB-22 2 ZBB-21 3 ZBB-41 4 ZBP-21 5 ZBP-12

(二) 氮源对菌生长的影响

在以 1.0% 糊精为碳源的基础培养基中, 加入浓度均为 0.5% (W/V) 的各种含氮化合物。细胞生长结果 (表 2) 表明, 5 株细菌均能以乙腈、丙腈、丁腈和异丁腈为良好生长氮源, 其中以丁腈为最宜。酵母膏和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 也

表 2 氮源对菌生长的影响

氮源	ZBB-21	ZBB-41	ZBB-22	ZBP-12	ZBP-21
	生物量 mg/ml (干重)				
N(一)	0.003	0.003	0.100	0.090	0.080
乙腈	2.600	1.650	3.270	0.550	0.120
丙腈	3.180	0.730	1.270	1.310	1.850
丁腈	3.230	1.980	2.760	1.550	1.980
异丁腈	3.110	1.570	2.420	1.470	1.930
丙烯腈	0.014	0.016	0.064	0.020	0.024
丁二腈	0.610	0.060	0.390	0.800	1.050
戊二腈	0.680	0.220	0.130	1.280	1.620
己二腈	1.370	0.020	0.200	1.480	1.740
酵母膏	2.220	2.190	1.990	3.140	3.450
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.040	2.250	1.280	2.150	3.180

能明显促进细胞的生长。值得注意的是克氏杆菌 ZBP-12, 和ZBP-21; 还可利用二腈类化合物为适宜氮源良好生长。

在以丁腈为唯一生长氮源条件下, 测定了培养基中不同浓度的丁腈对菌生长的影响, 其结果表明(图 2), 棒状杆菌 ZBB-21 和ZBB-41 的最适生长氮源浓度为 0.75%, 当浓度超过 1.25% 时对细胞生长产生抑制作用。节杆菌 ZBB-22 和克氏杆菌 ZBP-12, ZBP-21 的最适生长氮源浓度是 0.5%, 丁腈浓度超过此值时, 会严重抑制细胞生长。丁腈是一种具有生物毒性的物质, 适宜浓度下可被微生物同化而促进细胞的增殖, 当超过此浓度时就显现出其生物毒性, 而影响微生物的生长。上述结果所显示的丁腈对 5 株菌生长抑制临界浓度及抑制程度的不同, 恰好表明了微生物属间在生理特性上的差异。

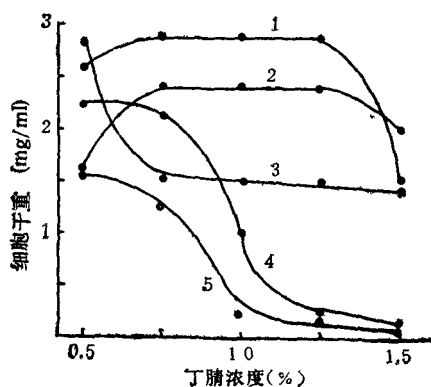


图 2 丁腈浓度对菌生长的影响

1. ZBB-21 2. ZBB-41 3. ZBB-22 4. ZBP-21 5. ZBP-12

(三) 培养基初始 pH 对菌生长的影响

将五株菌分别接种到初始 pH 不同的合成培养基中生长, 生物量测定结果表明(图 3), 棒状杆菌 ZBB-21, ZBB-41 和节杆菌 ZBB-22 的最适生长 pH 为 7.0 左右, 而克氏杆菌 ZBP-12 和 ZBP-21 约为 8.5。

(四) 5 株菌腈水合酶的诱导特性

将 5 株菌分别在含丁腈(氮源兼诱导物)和无丁腈(以酵母膏为氮源)的基础培养基中(1%

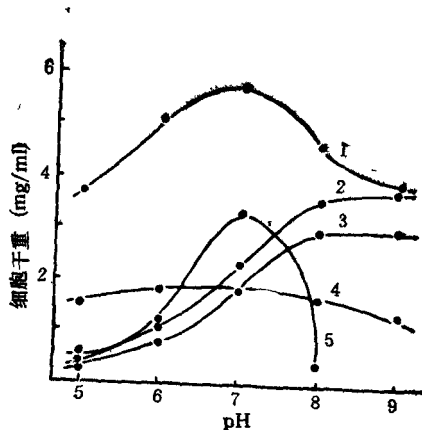


图 3 培养基初始 pH 对菌生长的影响

1. ZBB-21, 2. ZBP-21, 3. ZBP-12, 4. ZBB-41, 5. ZBB-22

糊精为碳源) 28℃ 振荡培养 64 小时, 以休眠细胞为酶源, 测定相应的完整细胞腈水合酶活性。结果表明(表 3), 棒状杆菌 ZBB-21、ZBB-41、和节杆菌 ZBB-22 的腈水合酶, 在诱导物丁腈存在条件下才能形成, 即该 3 株菌的腈水合酶为诱导酶。而克氏杆菌 ZBP-12 和 ZBP-21, 无论有无丁腈存在, 均能完成酶的生物合成, 并且显示了相同的酶活性。此结果表明, 该二株菌的腈水合酶为组成酶。不同种属微生物腈水合酶形成的条件不尽相同, 这已为许多研究者所证明。绿针假单胞菌 B₂₃ 必须有异丁腈存在下才可形成腈水合酶^[2], 但是甲基丙烯酰胺做为诱导物对该菌腈水合酶形成的诱导能力要比异丁腈强得多^[6]; 短杆菌^[1]和恶臭假单胞菌^[7]腈水合酶的形成也需要诱导物(不同的腈化物)的存在, 然而红球菌 N774 的腈水合酶为组成酶^[3]等。这些结果表明, 诱导物的存在和诱导物类型对于微生物腈水合酶的形成并不是专一的, 而是取决于不同种属微生物生理需求的特异性。

(五) 培养温度对菌生长及腈水合酶活力的影响

将 5 株菌在梯度温度条件下连续培养, 对相应生物量和酶活力测定结果表明(表 4), ZBB-21, ZBB-41, ZBP-12 和 ZBP-21 菌的适宜生长温度范围为 20—30℃。当温度高于 30℃ 时, 生物量特别是酶活力急剧降低, 而酶形成的最适温度均低于 25℃。ZBB-22 菌最适

表 3 5 株菌胍水合酶形成的诱导特性

ZBB-21		ZBB-41		ZBB-22		ZBP-12		ZBP-21	
诱导	未诱导	诱导	未诱导	诱导	未诱导	诱导	未诱导	诱导	未诱导
比活力 (u/mg)									
5.96	0.36	5.11	0.17	0.52	0.03	0.63	0.69	0.92	0.91

表 4 培养温度对 5 株菌生物量和酶活力的影响

温度 生长 时间 (h) 菌株		15℃		20℃		25℃		30℃		35℃	
		a*	b**	a	b	a	b	a	b	a	b
ZBB-21	24	0.26	10.9	1.06	13.6	1.38	17.3	1.40	18.7	1.17	7.2
	40	1.31	18.9	1.72	19.3	2.28	18.9	2.32	19.1	2.06	3.2
	48	1.70	19.3	2.14	21.6	2.63	20.0	2.97	19.9	2.26	3.0
	64	2.74	24.5	3.10	21.0	3.32	20.2	3.80	19.5	2.95	0.7
	72	2.87	26.4	3.18	21.3	3.38	19.7	3.85	18.8	3.02	0.5
ZBB-41	24	0.23	11.3	1.50	14.1	1.54	15.9	1.60	18.6	1.57	7.8
	40	1.04	15.9	1.94	19.6	2.17	15.9	2.23	19.4	2.07	2.8
	48	1.66	24.7	2.08	25.2	2.41	19.9	2.86	20.1	2.81	0.9
	64	2.90	26.9	3.20	25.0	3.22	20.2	3.40	21.8	3.20	0.8
	72	3.20	25.5	3.13	21.9	3.13	17.4	3.17	21.7	3.10	0.8
ZBB-22	24	0.43	0.3	0.80	0.4	1.86	0.4	2.90	0.6	2.20	0.2
	40	1.34	0.4	1.97	0.4	2.68	0.6	3.23	0.9	2.34	0.2
	48	1.58	0.9	2.71	1.2	3.26	1.8	3.43	2.4	3.28	0.4
	64	1.63	1.4	2.96	1.5	3.34	5.2	3.70	10.5	3.28	0.5
	72	1.71	2.0	3.29	2.5	3.41	9.1	3.72	20.4	3.29	1.1
ZBP-12	24	1.00	1.2	2.20	1.5	2.42	1.8	2.50	0.5	2.24	0.4
	40	1.99	1.4	2.45	1.5	2.55	1.7	2.65	1.0	2.40	0.3
	48	2.11	1.4	2.48	1.7	2.60	1.9	2.73	1.5	2.40	0.4
	64	2.21	2.2	2.52	2.1	2.69	2.0	3.10	1.4	2.84	0.4
	72	2.20	2.0	2.40	1.9	2.56	1.9	2.98	1.3	2.71	0.2
ZBP-21	24	1.55	1.0	2.48	1.7	2.57	1.4	3.00	0.3	1.57	0.2
	40	1.96	1.0	2.60	1.7	2.83	1.6	3.34	0.9	1.63	0.2
	48	2.09	1.3	2.79	2.4	2.89	1.7	3.35	1.2	1.63	0.5
	64	2.16	1.5	2.75	2.4	2.86	1.7	3.35	1.4	1.69	0.3
	72	2.28	1.7	2.74	2.4	2.82	1.8	3.39	1.2	1.67	0.2

* 生物量,细胞干重 (mg/ml); ** 酶活力 (u/ml)

生长和酶形成温度均为 30°C, 培养温度高于或低于此温度时胍水合酶的形成均受到明显的影响。另外, 从表 4 结果还可看出, 以培养 64 小

时为例, 除 ZBB-22 菌外的其余 4 株菌, 其胍水合酶活性随培养温度的增高而呈下降趋势, 其原因可能是由该菌形成的胍水合酶的热稳定

性较差之故。

(六) 菌体生长和腓水合酶形成的时间过程

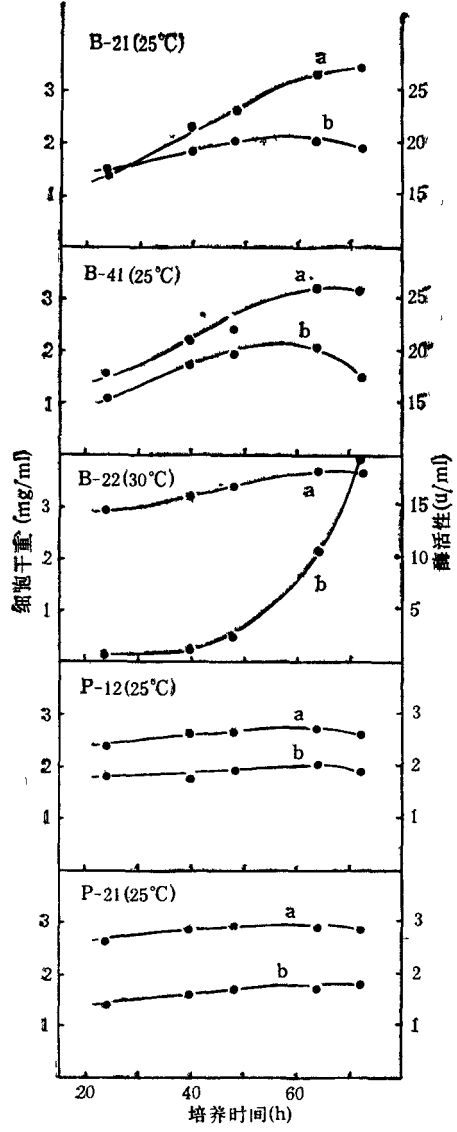


图4 生物量和酶活力与培养时间关系
a.生物量 (mg/ml 细胞干重), b 腓水合酶活力 (u/ml)。图中的菌号顺序同表 1

在选定的适宜培养条件下,连续培养该 5 株菌,对生物量增加和酶活力的测定结果表明(图 4),ZBB-21、ZBB-41 菌的生物量增殖和腓水合酶活力与生长时间呈正相关,64 小时均为最大。而 ZBP-12 和 ZBP-21 菌在所试培养时间过程中,生物量和酶活力变化不明显。ZBB-22 菌的培养特性与上述 4 株菌不同,其腓水合酶活力只有在培养 64 小时以后才显著提高,至 72 小时达最大值。

综上所述,所试 5 株菌的适宜培养条件及其完整细胞腓水合酶活力的比较列于表 5。结果表明,在适宜培养条件下,棒状杆菌 ZBB-21、ZBB-41 与节杆菌 ZBB-22 的酶活力相近似,而克雷伯氏菌 ZBP-12、ZBP-21 的酶活力较上述三株菌约低 10 倍。

表 5 5 株菌的培养条件及酶活力的比较

培养条件	ZBB-21	ZBB-41	ZBB-22	ZBP-12	ZBP-21
糊精*	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
丁腓*	0.5	0.5	0.2	0.2	0.2
酵母膏*	—	—	0.25	0.25	0.25
pH	7.0	7.0	7.0	8.5	8.5
培养温度(℃)	20—30	20—30	30	20—30	20—30
培养时间(h)	64	64	72	64	64
酶活 (u/ml)	21	25	20.4	2.1	2.4

* 为在基础培养基中添加的营养质均以%(W/W)计

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 J 有机合成化学,46(2): 169,1988。
4. 孙韦强等: 生物工程学报,5(2): 169,1989。
5. 李文忠等: 色谱,7(3): 167,1989。
- 6 Yamada H et al Agric Biol Chem, 50(11) 2859, 1986
7. 孙韦强等: 微生物学通报,15(4): 162,1988。