

恶臭假单胞菌 JP-1 腈水合酶的诱导形成

孙韦强 余正齐* 尹光琳

(上海交通大学生物科学与技术系)

摘要 恶臭假单胞菌 JP-1 能利用乙腈、丙腈、异丁腈、乙酰胺和丙酰胺作为生长的碳源和氮源。培

* 工作单位: 石油化工科学研究院。

我系杜玲珑讲师协助完成了气相色谱分析,特此表示感谢。

养液中丙腈的代谢产物经证明是丙酰胺、丙酸和氨。

腈水合酶是诱导酶,经丙腈诱导的适应细胞的腈水合酶活力比未适应的细胞高得多。生长细胞用 0.3% 丙腈诱导 14 小时后,即具有很高的转化丙烯腈成丙烯酰胺的活力,丙烯腈转化率为 90%。除丙腈外,丙酰胺、异丁腈、正丁腈都是腈水合酶的有效诱导物。

关键词 恶臭假单胞菌 JP-1; 诱导; 腈水合酶

腈是氢氰酸的一种取代物,其结构式一般为 $R \cdot CN$ 。70 年代以来,对腈化物如乙腈^[1,2]和戊二腈^[3]等的微生物降解和代谢曾有过研究。近年来 Yamada^[4,5]报道了绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*) B23 水合丙烯腈成丙烯酰胺的研究。为了收集大量具有腈水合酶活力的细胞,我们研究了经丙腈诱导的恶臭假单胞菌 JP-1 细胞悬液对丙烯腈转化活力及其诱导形成的条件,以便更有效地应用于水合丙烯腈成丙烯酰胺的生产。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) JP-1, 由本实验室筛选鉴定。

(二) 培养基

1. 斜面和种子培养基: 牛肉汁培养基, 常规配方。

2. 无机盐合成培养基组成(%): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.2, $NaCl$ 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, pH 7.0。

3. 发酵培养基组成(%): 甘油 0.5, $NaNO_3$ 0.1, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.2, $NaCl$ 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, pH 7.0。

(三) 细胞生长试验

采用无机盐合成培养基研究恶臭假单胞菌 JP-1 利用腈化物及某些酰胺的能力。接种前培养基分别加入腈化物或酰胺作为碳源和氮源,加量为 0.2%,试验分三组进行。第一组:分别加入腈化物或酰胺,不补加其它碳、氮源。第二组:除加有各种不同腈化物或酰胺外,同时加入 0.5% 甘油。第三组:除加腈化物或酰胺外,再加入 0.1% $NaNO_3$ 。取斜面上新鲜菌苔一环接入种子培养基内,在 28℃、150r/min 旋

转式摇床上预培养 8 小时后接种到上述三组培养基内,接种量为 2%, 28℃ 振荡培养 48 小时,在 721 型分光光度计上波长为 610nm 处测定细菌生长的吸光度。

(四) 诱导试验和菌体收集

将预培养 8 小时的种液,接种到发酵培养基中,种量为 2%,振荡培养 24 小时,加入一定量丙腈(或各类腈化物和酰胺),经 24 小时适应后,取 4ml 发酵液离心(4,000r/min, 15 分钟),弃去上清液,用 pH 7.0 磷酸缓冲液洗涤,再次离心后收集菌体待测定。

(五) 丙烯腈转化率的测定和计算

将收集的菌体悬浮于 2ml 反应混合液(0.1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.0, 0.4 M 丙烯腈)中, 25℃ 水浴振荡反应 30 分钟,加一滴 6N HCl 终止反应,离心收集上清液。取 0.5ml 上清液于三角磨口瓶中,再加 10ml 蒸馏水, 5ml 0.1N 溴液和 5ml 6N HCl, 塞上盖后于暗处放置 15 分钟,加入 5ml 20% KI 溶液,用 0.02N $Na_2S_2O_3$ 溶液滴定至无色。指示剂为 0.5ml 0.5% 淀粉溶液。做空白对照后即可知滴定丙烯酰胺需多少体积的 $Na_2S_2O_3$ 溶液,以下式计算丙烯腈转化率:

$$\text{转化率} = \frac{N(V_0 - V) \times 35.5}{0.5 \times 0.4 \times 71.08} \times 100\%$$

N: $Na_2S_2O_3$ 溶液的当量浓度

V_0 : 空白消耗 $Na_2S_2O_3$ 溶液的体积毫升数

V: 滴定样品消耗 $Na_2S_2O_3$ 溶液的体积毫升数

(六) 分析方法

丙腈、丙酰胺和丙酸分析用带氢火焰离子化鉴定器的 100 型气相色谱仪测定^[1]。氨含量用奈斯法测定^[6]。

结 果

(一) 利用腈化物及酰胺类化合物的生长试验

为了了解恶臭假单胞菌 JP-1 对腈化物和酰胺类化合物的利用情况,进行了三组试验,结果如表 1 所示。第一组试验中 JP-1 菌株能以乙腈、丙腈、异丁腈、乙酰胺和丙酰胺作为碳、氮源。第二组试验以甘油为碳源,腈化物和酰胺类化合物为氮源,除正丁腈、丙烯腈和丙烯酰胺外,其余作为氮源时,菌的生长都很良好。第三组以硝酸钠为氮源,除丙烯腈和丙烯酰胺外,其余都能作为 JP-1 菌生长的碳源。

表 1 恶臭假单胞菌 JP-1 利用腈化物和酰胺类化合物的生长情况(波长 610nm, OD)

腈和酰胺类化合物	第一组 不加甘油 和 NaNO_3	第二组 加 0.5% 甘油	第三组 加 0.1% NaNO_3
乙腈	0.20	0.62	0.20
丙腈	0.72	2.25	0.62
丙烯腈	0.02	0.05	0.03
二甲氨基丙腈	0.05	0.18	0.16
异丁腈	2.08	2.63	2.02
正丁腈	0.10	0.08	0.18
乙酰胺	0.20	0.39	0.17
丙酰胺	0.75	3.16	0.74
丙烯酰胺	0.03	0.06	0.05

(二) 丙腈代谢产物的确定

为了检测和确定丙腈的代谢产物,在丙腈作为碳、氮源的合成培养基中培养菌体,间断地取样分析培养液中的产物。气相色谱(图 1)表明,培养 24 小时除有丙腈峰外还检测到两个新峰,两个新峰和标准样品对照确定为丙酰胺和丙酸。奈斯法分析表明培养液中还有氨存在。继续培养至 48 小时,丙腈峰消失了,丙酰胺和丙酸峰仍存在。在以丙酰胺作为碳、氮源的合成培养基中培养菌体,培养液气相色谱分析结果类似图 1(c),另外培养液中还有氨存在。

(三) 腈水合酶的诱导形成

在 0.4M 丙烯腈反应液中,定时测定丙烯腈转化率,以比较适应细胞和未适应细胞对丙烯腈转化率的影响。图 2 结果表明,未适应细

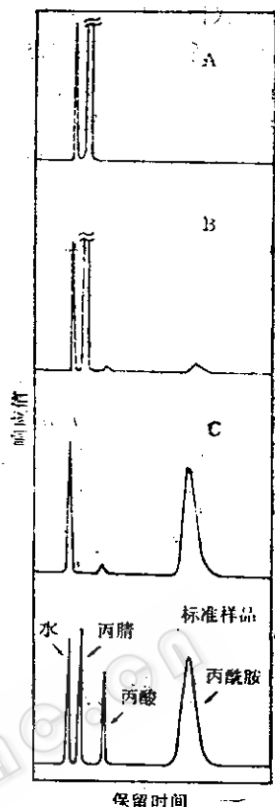


图 1 在丙腈作为碳、氮源的培养基中培养 JP-1, 间断取样分析培养液中丙腈代谢产物的气相色谱图

A. 0 小时 B. 24 小时 C. 48 小时

胞丙烯腈转化率只有 1% 左右,而丙腈适应细胞的丙烯腈转化率为 90%。

表 2 诱导剂浓度对丙烯腈转化率的影响

诱导剂丙腈浓度(%)	丙烯腈转化率(%)
0	1.0
0.05	33.8
0.10	34.6
0.20	47.4
0.30	87.2
0.40	88.9

经丙腈适应的细胞有特别高的丙烯腈转化率,这是由于受丙腈的诱导,因此我们进一步研究了诱导的条件,主要是选择合适的诱导剂浓度和诱导时间。诱导剂浓度的选择是在细胞生长过程中,加入浓度不等的丙腈适应 24 小时。如表 2 的结果所示,没有经过丙腈适应的细胞,丙烯腈转化率只有 1% 左右,当丙腈浓度

为 0.3 % 时,丙烯腈转化率为 87.2 %,若继续提高诱导浓度,丙烯腈转化率不再提高。不同诱导时间对丙烯腈转化率影响如图 3 所示,不经丙腈诱导的细胞,丙烯腈转化率很低,经丙腈诱导 8 小时,丙烯腈转化率立即提高,诱导 14 小时后丙烯腈转化率最高。不断地增加诱导时

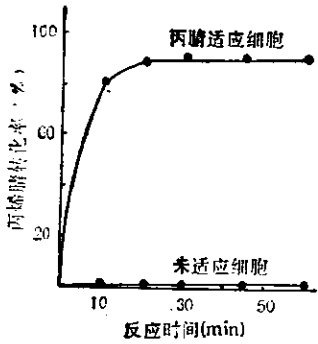


图 2 适应细胞和未适应细胞丙烯腈转化率的比较

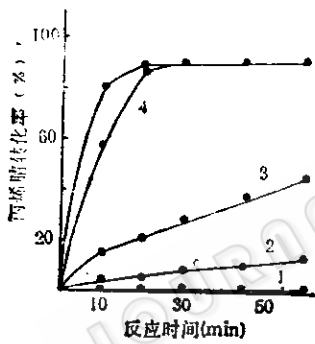


图 3 诱导时间对丙烯腈转化率的影响

1.未诱导 2.诱导 5 小时 3.诱导 8 小时
4.诱导 11 小时 5.诱导 14 和 24 小时

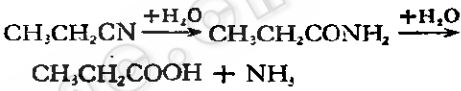
间,转化率不再提高,所以用 0.3 % 丙腈诱导 14 小时后即具有很高的丙烯腈转化率。

(四) 腈水合酶诱导物的选择

菌体在发酵培养基中培养 24 小时,加入 0.3 % 的腈化物和酰胺类化合物,继续培养 24 小时,测定丙烯腈转化率。结果如表 3 所示,除丙腈外,丙酰胺、异丁腈和正丁腈都是腈水合酶的有效诱导物。

讨 论

恶臭假单胞菌 JP-1 在以丙腈为唯一碳、氮源的培养液中发现有丙酰胺、丙酸和氨存在。在以丙酰胺为唯一碳、氮源的培养液中发现有丙酸和氨。这些结果说明丙腈代谢的产物是丙酰胺、丙酸和氨,它的代谢过程如下:



Digeronimo 等^[1]指出在研究 *Nocardia rhodochrous* LL100-21 菌的丙腈代谢过程中没有发现丙酰胺,推测可能是丙腈在腈酶的作用下生成了丙酸和氨。显然恶臭假单胞菌 JP-1 和 LL100-21 菌的丙腈代谢过程是不同的。

丙腈适应细胞的丙烯腈转化率明显地高于未适应细胞,这种丙烯腈转化率的大大提高显然是由于诱导的结果。因而由恶臭假单胞菌 JP-1 所产生的能水合丙腈成丙烯酰胺的腈水合酶是一种诱导酶。

表 3 各种腈和酰胺类诱导物对丙烯腈转化率的影响

腈和酰胺类化合物	丙烯腈转化率(%)
无	1.0
乙腈	0.5
丙腈	86.9
丙烯腈	0.5
二甲氨基丙腈	0.3
异丁腈	83.4
正丁腈	86.5
乙酰胺	0.3
丙酰胺	90.2
丙烯酰胺	0.3

参 考 文 献

[1] Digeronimo, M. J. et al.: *Appl. and Environ. Microbiol.*, 31(6): 900—906, 1976.
[2] Arnaud, A. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41(11): 2183—2191, 1977.
[3] Yamada, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58(6): 495—500, 1980.
[4] Yamada, H. et al.: US Patent, 4, 555, 487, 1985.
[5] Yamada, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46(5): 1183—1189, 1982.
[6] Seibert, F. B. et al.: In *Methodology manual for investigation of mycobacterial and fungal antigens*, American Thoracic Society, New York, p. 5—8, 1963.