

固定化 *Pseudomonas putida* CGMCC3830 转化 3-氰基吡啶制备烟酸

李 恒, 赵 欣, 杨 涛, 龚劲松, 朱小燕,
熊 雷, 陆震鸣, 许正宏, 史劲松*

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用固定化 *Pseudomonas putida* CGMCC3830 转化 3-氰基吡啶制备烟酸。选择海藻酸钠作为包埋材料进行固定化, 考察固定化细胞的制备条件、转化条件以及批次稳定性。结果表明, 优化的固定化条件为: 海藻酸钠 2 g/dL, 氯化钙 0.4 g/dL, 固化时间 6 h; 最适转化条件为: 温度 35 ℃, pH 7.0, 底物浓度 100 mmol/L。批次转化实验结果显示, 当底物浓度为 100 mmol/L 时, 固定化细胞重复使用 10 次, 酶活仍保留 59.1%, 产物烟酸的得率为 91.8 g/g 细胞干重, 而游离细胞的使用 3 次后, 酶活下降至 45.6%。

关键词: *Pseudomonas putida*; 固定化; 烟酸; 3-氰基吡啶; 腈水解酶

中图分类号: Q 814.6 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)08—0800—05

Biotransformation of 3-Cyanopyridine to Nicotinic Acid with Immobilized *Pseudomonas putida* CGMCC3830

LI Heng, ZHAO Xin, YANG Tao, GONG Jinsong, ZHU Xiaoyan,
XIONG Lei, LU Zhenming, XU Zhenghong, SHI Jinsong*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Biotransformation of 3-cyanopyridine to nicotinic acid with immobilized *Pseudomonas putida* CGMCC3830 was studied. Sodium alginate was selected as the immobilization material. The cell immobilization conditions, biotransformation conditions and the batch stability were investigated. The optimized conditions for immobilization were as follows: sodium alginate 2 g/dL, calcium chloride 0.4 g/dL, curing time 6 h. The optimized immobilization conditions included: temperature 35 ℃, pH 7.0, substrate concentration 100 mmol/L. Results of batch conversion experiments showed that with the substrate concentration of 100 mmol/L, the nicotinic acid yield reached 91.8 g/g cell dry weight. The immobilized cell can be reused 10 times with the enzymatic activity retained 59.1%, while the free cell could be reused only 3 times with the enzymatic activity retained 45.6%.

Keywords: *Pseudomonas putida*, immobilization, nicotinic acid, 3-cyanopyridine, nitrilase

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022204C); 国家自然科学基金项目(21206055); 江苏省自然科学基金项目(BK2012127)。

作者简介: 李 恒(1983—), 女, 江苏连云港人, 工学博士, 讲师, 主要从事生物催化方面的研究。E-mail: eternal83@163.com

* 通信作者: 史劲松(1971—), 男, 江苏泗阳人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物活性物质制备与酶工程方面的研究。

E-mail: shijs@163.com

烟酸是一种重要的医药中间体,广泛应用于医药、材料、日化、食品等行业^[1]。烟酸的生产工艺主要采用氨氧化法、硝酸氧化法等化学合成法^[2]。传统化学法生产烟酸存在反应条件苛刻、环境污染大、副产物多等缺点。随着绿色化学的发展,采用生物催化法制备烟酸受到越来越广泛的重视。

脲水解酶在羧酸的生物法合成方面一直是研究的热点^[3]。目前,一系列具有脲水解酶活性的微生物被发掘和报道,如 *Pseudomonas putida*^[4], *Bacillus subtilis*^[5], *Aspergillus niger*^[6], *Gibberella intermedia*^[7] 等。利用酶法转化脲类化合物主要有纯酶及全细胞催化两种形式。与纯酶催化体系相比,全细胞催化具有稳定性高、转化成本低廉等优势^[8]。而细胞固定化更进一步提高了生物催化剂的价值和效率。固定化细胞有利于产物的批量分离与提取,同时能够最大程度上保留酶的活性,增加细胞对底物的耐受性^[9],从而达到重复利用的目的^[10]。固定化方法主要包括包埋法、交联法、吸附法和共价结合法,其中,包埋法具有温和的固定化条件以及良好的生物相容性。海藻酸钠、琼脂、卡拉胶、聚丙烯酰胺等均是常用的固定化材料^[11]。由海藻酸钠与氯化钙交联生成的海藻酸钙凝胶成型快,酶活损失少,制备简单,是包埋法制备固定化细胞的首选材料。

作者所在研究室前期筛选获得了一株含有较高脲水解酶活性的 *P. putida* CGMCC3830^[12],该菌在 3-氰基吡啶、4-氰基吡啶生物催化合成烟酸和异烟酸的反应中表现出很高的转化效率。作者利用海藻酸钠固定 *Pseudomonas putida* CGMCC3830,通过固定化及转化条件的优化,确定固定化 *P. putida* CGMCC3830 转化 3-氰基吡啶合成烟酸的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 *P. putida*,作者所在实验室筛选获得,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号 CGMCC 3830。

1.1.2 主要试剂和设备 3-氰基吡啶、烟酸:分析纯, Sigma 公司;海藻酸钠、壳聚糖、氯化钙、甘油、尿素、亚硝基氰化钠等主要试剂:均为国产分析纯试剂。THZC 型恒温振荡器:太仓市实验设备厂;电子天平:上海鹏顺科学仪器有限公司;Multitron 培养振荡器:瑞士 INFORS HT;日立微量高速离心机

CF15RXII;日本日立公司。

1.1.3 培养基 种子培养基组分(g/dL):甘油 1,胰蛋白胨 1,酵母粉 0.5,氯化钠 0.1,磷酸二氢钾 0.1,磷酸氢二钾 0.1。

发酵培养基在种子培养基的基础上增加尿素 0.1 g/dL,调节 pH 6.0。上述培养基均在 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌体培养与菌悬液制备 接种:挑取单菌落接种于种子培养基中,在 30 °C、200 r/min 培养 24 h。扩大培养:向 50 mL 摇瓶中加入 500 μ L 种子发酵液,在 30 °C、200 r/min 条件下培养 48 h。在 7 800 r/min、10 °C 下离心 10 min,弃上清液,用生理盐水洗涤菌体,在相同条件下重复离心分离、洗涤操作,制成菌悬液,冰箱保存,备用。

1.2.2 海藻酸钠固定化细胞的制备 称取一定量的海藻酸钠,在 50 °C 水浴中搅拌溶解,将海藻酸钠溶液与 *P. putida* CGMCC3830 菌悬液混合均匀后,用蠕动泵缓慢的将上述混合液滴入氯化钙溶液中成球固化。经 PBS 缓冲液(pH 7.0)洗涤 3 次置于 4 °C 备用。

1.2.3 酶活力的测定及定义 酶活力的测定方法:取适量固定化细胞置于 10 mL 用磷酸缓冲液配置的 100 mmol/L 3-氰基吡啶溶液中,在 30 °C 摇床反应 20 min,用 2 mol/L 的盐酸终止反应。过滤收集转化液,依次加入苯酚钠溶液 1 mL,次氯酸钠 1.5 mL,亚硝基铁氰化钠 1.5 mL^[13],测定 630 nm 下 OD 值,计算产氨量。

一个单位酶活(U)的定义:在一定条件下,每分钟催化氰基水解产生 1 μ mol 羧酸所需的酶量。

1.2.4 温度对固定化细胞的转化性能的影响 取等量的固定化细胞,分别在 25、30、35、40、45、50、60 °C 条件下,于 10 mL 体系中转化 50 mmol/L 3-氰基吡啶,分别取样测定酶活。以最适温度下的酶活为 100%,计算其他温度下样品的相对活力。

1.2.5 pH 对固定化细胞的转化性能的影响 取等量的固定化细胞,在最适温度反应条件下,于 10 mL 体系中转化 50 mmol/L 3-氰基吡啶,调节 pH 分别为 3.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、11.0,转化 3-氰基吡啶,分别取样测定酶活。以最适 pH 下的酶活为 100%,计算其他 pH 值下样品的相对活力。

1.2.6 底物浓度对固定化细胞的转化性能的影响

取等量的固定化细胞,在最适反应条件下,分别考察底物浓度为 50、75、100、200 mmol/L 时对固定化细胞转化性能的影响,定时取样测定酶活,计算底物转化率。

1.2.7 固定化细胞与游离细胞的批次实验 为了评价和比较固定化细胞的重复使用性,将固定化细胞与游离细胞分别在浓度为 100 mmol/L 的 3-氰基吡啶的反应体系中转化,转化 60 min 后将细胞滤出,用生理盐水清洗后进行下一批次的反应。

2 结果与讨论

2.1 海藻酸钠固定化条件的优化

2.1.1 海藻酸钠质量浓度的确定 考察包埋过程中海藻酸钠质量浓度对酶活力的影响。如图 1 所示,当海藻酸钠质量浓度低于 2 g/dL 时,随着其质量浓度的升高,固定化细胞的相对酶活逐渐增大;当海藻酸钠质量浓度为 2 g/dL 时,酶活最高。进一步提高海藻酸钠质量浓度,酶活反而降低,这与文献[5]报道类似。这是由于海藻酸钠的质量浓度过高导致凝胶网络过于致密,从而使得底物分子难以进入固定化小球内部进行转化,因此酶活降低。同时,海藻酸钠质量浓度过高也会造成小球成型的欠缺。因此,海藻酸钠的最适质量浓度为 2 g/dL。

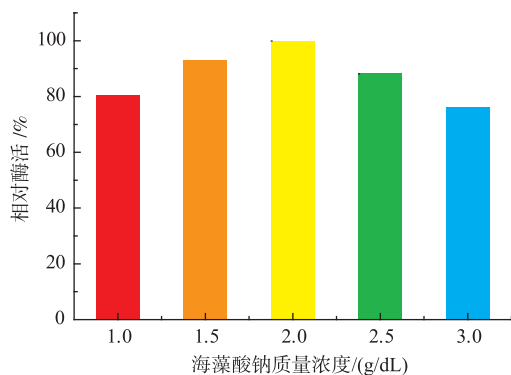


图 1 海藻酸钠浓度对固定化细胞相对酶活的影响

Fig. 1 Effect of sodium alginate concentration on the relative activity of the immobilized cell

2.1.2 氯化钙质量浓度对细胞酶活的影响 海藻酸钠包埋法的主要原理是基于 Ca^{2+} 的架桥作用,使海藻酸钠形成空间网络状结构从而固定细胞,因此作为固定剂的氯化钙的质量浓度对固定化细胞的制备也有极大的影响。由图 2 可以看出,氯化钙质量浓度对固定化 *P. putida* CGMCC3830 酶活的影响

与海藻酸钠的影响趋势相似。当氯化钙质量浓度为 0.4 g/dL 时,酶活最高;当氯化钙质量浓度高于 0.4 g/dL 时,酶活降低。这同样是由于高质量浓度的氯化钙造成底物或产物的扩散限制^[14]。

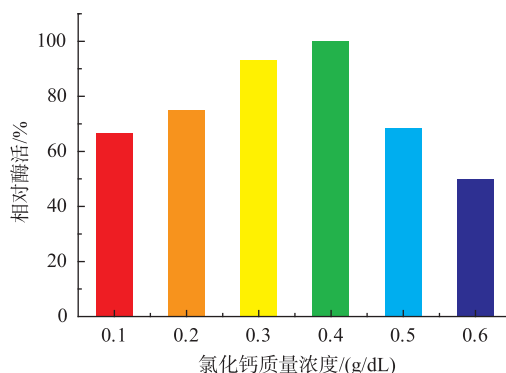


图 2 氯化钙浓度对固定化细胞相对酶活的影响

Fig. 2 Effect of CaCl_2 concentration on the relative activity of the immobilized cell

2.1.3 固化时间对细胞酶活的影响 固化时间对固定化细胞相对酶活的影响见图 3。固化时间太短易导致凝胶交联不够充分,形成的凝胶网络结构松散,机械强度差。当固化时间为 6 h 时,凝胶致密程度适中,固定化细胞的酶活最高。进一步的固化会导致凝胶过于致密,酶活反而降低。因此选定最佳固化时间为 6 h。

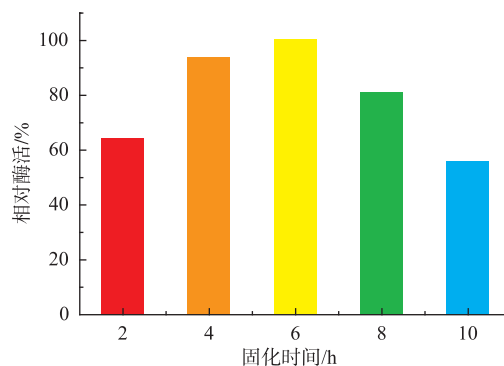


图 3 固化时间对固定化细胞相对酶活的影响

Fig. 3 Effect of immobilization time on the relative activity of the immobilized cell

2.2 温度对固定化细胞转化性能的影响

温度对固定化细胞酶活力的影响见图 4。当温度低于 35 $^{\circ}\text{C}$ 时,固定化细胞酶活随着温度的升高而增加;高于 35 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活降低速率快,这是由于高温造成酶水解酶的失活。因此选择最适温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

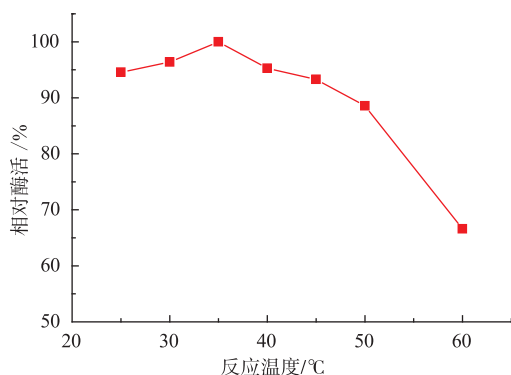


图 4 温度对固定化细胞相对酶活的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the relative activity of the immobilized cell

2.3 pH 对固定化细胞转化性能的影响

反应体系中 pH 值直接影响酶的催化活性。如图 5 所示, 当 pH 为 7.0 时, 固定化细胞的酶活最高。pH 过高或者过低, 均易造成酶活力的降低。但固定化细胞对碱环境的耐受性较好, pH 为 11.0 时, 其相对酶活仍保留 88.7%。

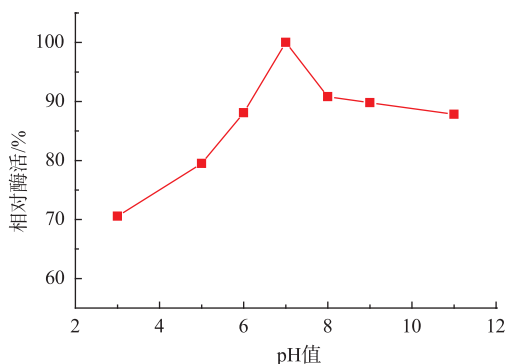


图 5 pH 对固定化细胞相对酶活的影响

Fig. 5 Effect of pH on the relative activity of the immobilized cell

2.4 固定化细胞底物浓度选择

底物浓度对固定化细胞相对酶活的影响见图 6。底物浓度由 50 mmol/L 增加到 100 mmol/L 过程中, 随着底物浓度的增加, 固定化细胞转化 3-氰基吡啶的速率逐渐减慢, 底物完全转化所需时间逐渐延长。当底物浓度达到 200 mmol/L 时, 底物转化率明显下降, 180 min 的转化率仅为 17.4%。这是由于高底物浓度对细胞有一定的毒害作用^[15], 从而造成腈水解酶的失活。因此, 选择 100 mmol/L 为最适底物浓度。

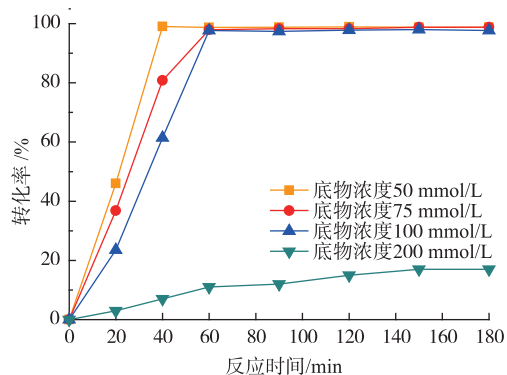


图 6 不同浓度底物对固定化细胞酶活力影响

Fig. 6 Effect of substrate concentration on the relative activity of the immobilized cell

2.5 固定化细胞的批次转化

固定化细胞与游离细胞的批次转化效果见图 7。可以看出, 固定化细胞连续使用 10 次后, 酶活保留 59.1%, 产物烟酸的得率为 91.8 g/g 干细胞重。而相同条件下, 游离细胞使用 3 次后, 酶活下降至 45.6%, 烟酸得率仅为 24.6 g/g 干细胞重。由此可见, *P. putida* CGMCC3830 经过海藻酸钠包埋后, 批次使用次数及产物得率均明显提高。

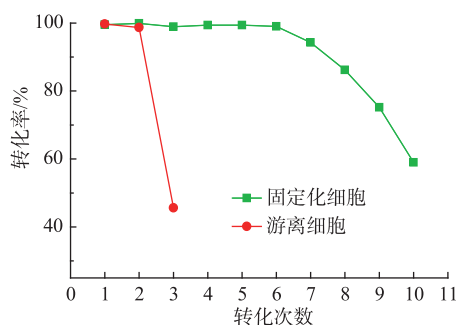


图 7 固定化细胞批次转化性能

Fig. 7 Reuse of the immobilized cell

3 结 语

作者采用包埋法对 *P. putida* CGMCC3830 细胞进行固定化, 同时考察其转化 3-氰基吡啶为烟酸的性能。以海藻酸钠为包埋材料, 通过海藻酸钠质量浓度、氯化钙质量浓度以及固化时间等的优化, 得到固定化最适条件为: 海藻酸钠质量浓度 2 g/dL, 氯化钙质量浓度 0.4 g/dL, 固化时间 6 h。进一步优化固定化细胞的转化条件, 得到最适转化条件为: 温度 35 ℃, pH 7.0, 底物浓度 100 mmol/L。批次转化实验结果显示, 当底物浓度为 100 mmol/L 时, 固定化

细胞可重复使用 10 次,酶活保留 59.1%,烟酸得率为 91.8 g/g 细胞干重,比游离细胞提高了 2.7 倍。由

此可见,*P. putida* CGMCC3830 经固定化后,单位细胞的转化能力以及使用稳定性均显著提高。

参考文献:

- [1] 何玉财,周琼,张跃,等. 一株烟腈水解酶菌株的筛选及其催化特性初步研究[J]. 化工进展,2011,30(12):2714-2718.
HE Yucai,ZHOU Qiong,ZHANG Yue,et al. Isolation and catalytic characteristics of a 3-cyanopyridine hydrolyzing strain[J]. **Chemical and Engineering Progress**,2011,30(12):2714-2718. (in Chinese)
- [2] 王奇昌,白金泉,郭丰艳,等. 烟酸制备的研究进展[J]. 广东化工,2008,35(3):32-35.
WANG Qichang,BAI Jinquan,GUO Fengyan,et al. Research development on preparation of nicotinic acid [J]. **Guangdong Chemical Industry**,2008,35(3):32-35.(in Chinese)
- [3] Gong J S,Lu Z M,Li H,et al. Nitrilases in nitrile biocatalysis:recent progress and forthcoming research [J]. **Microbial Cell Factories**,2012,11:142-159.
- [4] Banerjee A,Kaul P,Banerjee U C. Purification and characterization of an enantioselective arylacetone nitrilase from *Pseudomonas putida*[J]. **Archives of Microbiology**,2006,184(6):407-418.
- [5] Zheng Y G,Chen J,Liu Z Q,et al. Isolation,identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063,a versatile nitrile-converting bacterium[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2008,77(5):985-993.
- [6] Kaplan O,Vejvoda V,Plihal O,et al. Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10 [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2006,73(3):567-575.
- [7] Wu Y,Gong J S,Lu Z M,et al. Isolation and characterization of *Gibberella intermedia* CA3-1,a novel and versatile nitrilase-producing fungus[J]. **Journal of Basic Microbiology**,2013,53(11):934-941.
- [8] Kaul P,Banerjee A,Banerjee U C. Stereoselective nitrile hydrolysis by immobilized whole-cell biocatalyst[J]. **Biomacromolecules**,2006,7:1536-1541.
- [9] Sheldon R A, Van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis:why,what and how [J]. **Chemical Society Reviews**,2013,42(15):6223-6235.
- [10] Dursun A Y,Tepe O. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*[J]. **Journal of Hazardous Materials**,2005,126(1-3):105-111.
- [11] Hartmeier W. Immobilized Biocatalysts[M]. Berlin:Springer,2013:22-50.
- [12] 朱小燕,龚劲松,李恒,等. 产芳香腈水解酶的恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* CGMCC3830 的筛选、鉴定及发酵优化[J]. 生物工程学报,2014,30(3):412-424.
ZHU Xiaoyan,GONG Jinsong,LI Heng,et al. Screening,identification and culture optimization of a newly isolated aromatic nitrilase-producing bacterium-*Pseudomonas putida* CGMCC3830[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2014,30(3):412-424. (in Chinese)
- [13] 徐美珍,任杰,龚劲松,等. 生物催化 3-(4-氯苯基)-戊二腈去对称性水解合成光学纯巴氯芬的关键前体[J]. 生物工程学报,2013,29(1):31-40.
XU Meizhen,REN Jie,GONG Jinsong,et al. Biocatalytic desymmetric hydrolysis of 3-(4-chlorophenyl)-glutaronitrile to the key precursor of optically pure baclofen[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2013,29(1):31-40.(in Chinese)
- [14] El-Hadi A A,El-Minofi H A. Enhanced bioconversion of lactose by immobilized cells of *Bacillus subtilis* using different matrices [J]. **Wudpecker Journal of Agricultural Research**,2012,1(10):415-423.
- [15] Sharma N N,Sharma M,Bhalla T C. An improved nitrilase-mediated bioprocess for synthesis of nicotinic acid from 3-cyanopyridine with hyperinduced *Nocardia globerula* NHB-2 [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**,2011,38(9):1235-1243.