

高酶活烟酰胺生产菌株筛选及脲水合酶催化反应条件优化

摘要

烟酰胺作为 B 族维生素关键组员，参与了机体内两种关键辅酶形成。烟酰胺作为关键营养性添加剂被广泛应用于饲料生产行业，其在医药、食品、化妆品行业应用前景也很宽广。在工业生产方面，大家关键利用化学法和微生物法进行烟酰胺生产。烟酰胺微生物生产法有着化学法无法比拟优越性，此方法对环境几乎不造成污染，且生产成本低，工艺简便。

在本试验中，关键以下四个方面进行了试验研究并取得了一定结果：

(1) 以试验室现有菌种 HD1220 为出发菌株，分别使用 ARTP 诱变、微波诱变、EMS 诱变三种单因子诱变和在各因子最好诱变条件下复合诱变，确定了复合诱变最好条件为：ARTP 诱变时间 240 s；微波诱变强度 60 %，微波照射时间 90 s，；EMS 浓度 0.8 %。诱变完成后，筛选出一株能够稳定遗传且酶活高达 1764U 高脲水合酶活性菌株，和出发菌株相比，诱变后菌株酶活提升了 33.13 %，并将该菌株临时命名为 NHD-1。

(2)利用 HPLC 对烟酰胺进行检测，经过对 HPLC 检测紫外检测波长、流动相流量、流动相百分比三个条件进行单原因优化试验，最终确定 HPLC 检测烟酰胺各个最优条件为：紫外检测波长为 220 nm，流动相流量为 0.4 mL/min，流动相中甲醇：水=1：3。在以上条件下，烟酰胺出峰时间为 5.306 min，和条件优化前相比，烟酰胺出峰时间显著缩短。

(3) 对脲水合酶参与烟酰胺生产过程中酶催化反应条件进行单原因优化试验，我们得出各原因最好条件为：菌体浓度 1.8 %，菌龄 48 h，底物浓度 100 g/L，温度 29.5 °C，PH 7.4，反应时间 30 min，在实际发酵后期应该对产物烟酰胺进行立即分离。经过 Plackett-Burman 试验设计我们分析出底物浓度、温度和 PH 这三个原因对脲水合酶酶活有及其显著影响；经过对这三个原因进行响应面优化设计，我们得出了这三个原因最好条件组合为底物浓度 98.88 g/L，反应温度 29.59 °C，PH 值 7.46。在此条件下酶活响应值为 1784

U。对 SAS 软件统计分析结果进行三次验证试验，得到腈水合酶实际酶活为 1775 U，和多元回归分析所得理论值吻合，说明利用响应面法能够很好优化酶催化反应条件。

ABSTRACT

Nicotinamide is a kind of Vitamin B and it's very important. In the body, It's one part of the formation of two kinds of coenzyme. Nicotinamide is mainly used in feed industry as nutrition additives, it also has a very broad application prospect in medical industry, food industry and cosmetics industry. In the industrial production of nicotinamide ,we mainly use chemical method and biological method. The biological method has a big superiority that chemical method hasn't it does little harm to the environment and has a lower production cost, and it's very simple in process.

Under the conditions of laboratory, we mainly carried out our research in several aspects and achieved some results as follows:

(1) Started from the strain *Nocardia* sp.HD9611 we had in the laboratory, we used the method of ARTP mutagenesis, microwave mutagenesis and EMS mutagenesis to make mutagenesis of the strain. The three methods were all used alone. Then we made the composite mutagenesis under best conditions of the three method of mutagenesis. The best conditions of composite mutagenesis were: the time of ARTP mutagenesis was 240 s; the time and intensity of microwave were 90 s and 60 %; the concentration of EMS mutagenesis was 0.8 %. By the mutagenesis we screened one stain whose nitrile hydratase had a very high enzyme activity of 1764 U and the stain had stable heredity. Compared to the stain *Nocardia* sp.HD9611, the enzyme activity increased by 33.13 %, and we named the stain as NHD-1.

(2)In the detection of Nicotinamide, we used the HPLC method. By optimizing the wavelength of UV detection, the flow rate of mobile phase and the proportion of mobile phase in the HPLC assay, we got the best conditions of HPLC method : the wavelength of UV detection was 220 nm; the flow rate of mobile phase was methanol: water=1:3; the proportion of mobile phase was 0.4 mL/min. under these conditions, the peak time of niacinamide was 5.306 min.

Compared to the method before optimization we used, the peak time significantly shortened.

(3) By optimizing the conditions of catalytic reaction of the nitrile hydratase, we got the best conditions: the concentration of bacteria producing niacinamide was 1.8 %; the fungus age was 48 h; the concentration of substrate was 100 g/L; the temperature was 29.5 °C; the PH was 7.4; the reaction time is 30 min, and we should separate nicotinamide late in the actual fermentation. By Plackett-Burman experiment we confirmed that conditions of concentration of substrate, temperature, PH had significant influences on the enzyme activity of nitrile hydratase. By response surface test we optimized these three factors: the concentration of substrate was 98.88 g/L; the temperature was 29.59 °C; the PH was 7.46. Under these conditions, we analyzed the enzyme activity is 1784 U. Through verification test, we confirmed the enzyme activity of nitrile hydratase was 1775 U. It was very close to the theoretical value. It showed that the response surface test was a very effective method in optimization of enzyme catalysis.

Key word: mutagenes nitrile hydratase enzyme activity HPLC optimization

1 序言

1.1 烟酰胺概述

1.1.1 烟酰胺介绍

烟酰胺(Nicotinamide) 化学名称为 3-吡啶甲酰胺, 又维生素 B₃ 英文简称 VB₃、NSA^[1]。烟酰胺最早从动物肝脏中提取, 市场上销售产品多为化学合成品^[2]。烟酰胺分子式图 1-1:

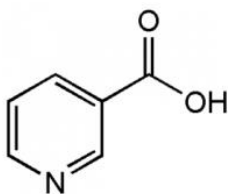


图 1-1 NSA 分子式

Fig.1-1 The structure of NSA

1.1.2 烟酰胺化学性质

烟酰胺为白色针状结晶或结晶性粉末。熔点为 128 °C~131 °C，沸点为 150 °C~160 °C。烟酰胺极易溶于水，在通常极性有机溶剂溶解，在苯和乙醚中无溶解性^[3]。烟酰胺在空气中对光、热等条件稳定，干燥状态 50 °C 以下极其稳定。

1.1.3 烟酸介绍

烟酸又称尼克酸，分子式为 $C_6H_5NO_2$ ，其整体性质和烟酰胺极其相同，但因为羧基存在造成在一些方面不用和含有酰胺基烟酰胺。二者通称维生素 PP（二者混合物），在实际应用中，二者可相互等量替换^[4]。在加热条件下有没有机酸和碱存在条件下，烟酰胺发生水解反应转化为烟酸。烟酸分子式图 2



图 1-2 烟酸分子式

Fig.1-1 The structure of niacin

1.1.4 烟酰胺用途

烟酰胺参与生物体内糖原分解、脂类代谢及多种物质氧化作用^[5]。烟酰胺有促进细胞新陈代谢等等作用^[6]。当烟酰胺缺乏时会出现细胞正常代谢不能正常进行，糖原分解受阻等情况而引发糙皮病。在市场上烟酰胺共分为三种：医药级、食品级和饲料。烟酰胺最关键作为营养添加剂在饲料广泛应用，在食品和医药行业关键以维生素形式为大家所使用，烟酰胺在电镀及生化方面也有一定应用^[7]。医学上常见来诊疗糙皮病、口炎、舌炎、肝脏疾病及日光性皮炎药品中均含有烟酰胺，其也被用来降低人体胆固醇和甘油三酯含量^[8]。烟酰胺应用最广泛应用是在饲料工业，其作为关键饲料添加剂而被大量应用^[9]。

1.1.5 国外和中国烟酰胺生产及消费情况

在 20 世纪 50 年代，国外烟酰胺生产已经实现工业大批量生产。

现在全世界烟酰胺总产能约为 30 kt/a，总产量也突破了 20 kt/a^[10]。世界上瑞士、美国、比利时、印度、西班牙等国家为烟酰胺关键产出国等，瑞士龙沙企业（LONZA）、美国 Nepera 企业、比利时 Reilly Tor AG 企业等是烟酰胺生产方面巨头，这些企业年产能均在千吨以上，瑞士 Lonza 企业以 35 %生产能力在烟酰胺生产行业首位。

烟酰胺消费有 40 %~50 %作为饲料添加剂应用在饲料生产方面；25 %~30 %应用于食品生产加工；20 %~25 %应用于医药生产方面。美国年均消费烟酰胺量在约 10000 t 以上，占世界消费总量二分之一，消费中 80 %作为饲料添加剂使用。西欧烟酰胺消费量也很大。烟酰胺关键出口于日本。伴随第三世界国家饲料等工业高速发展，烟酰胺消费量正以每十二个月超出 5 %速度快速增加^[12]。

中国在 20 世纪 50 年代初开始进行烟酰胺生产，首家进行烟酰胺生产企业在上海。中国在 70 年代烟酰胺年产量仅在 100 左右，因为此时中国烟酰胺生产还处于刚起步阶段，在设备、规模等方面还存在着很大不足。90 年代初，伴随国外优异生产技术引进，中国出现了多家从事大规模生产烟酰胺企业，比较著名有南通醋酸化工股份、广州龙沙精细化工、浙江富阳胜大生化科技、山东潍坊一邦化工科技等^[13]。其中广州龙沙是最早引进国外优异生产技术进行烟酰胺大规模生产企业，它是由中国广药和瑞士龙沙双方合资建设而成，年产烟酰胺达 3400 t。到 20 世纪早期，中国烟酰胺年生产能力超出 8000 t 企业已经有 6 家，而且实现了对东南亚地域规模性输出^[14]。和国外烟酰胺应用一样，中国所消费烟酰胺关键用于饲料工业，比重占到总消费量约 80 %。

1.2 烟酰胺生产工艺

1.2.1 烟酰胺化学合成法

利用化学合成法进行烟酰胺生产依旧是现在工业上主流工艺。化学合成工艺原材料关键是吡啶类物质，关键利用多种化学物质和吡啶类物质氧化反应来生产烟酰胺。应用氧化方法首先得到烟腈，以后将烟腈在适宜条件下进行碱水解得到烟酰胺^[15~17]。

在氧化生产过程中，吡啶类物质和烟酰胺原料产出比约为 0.95:1，所以工业上烟酰胺产量决定性原因依旧是原材料物质产量。

1.2.2 烟酰胺微生物发酵法

和化学工艺相比，烟酰胺微生物生产法有着独特优势：（1）反应条件温和，通常在常温常压下既能完成，没有爆炸、污染严重等问题。（2）原材料物质易得且廉价。微生物发酵所用原料通常为淀粉、糖蜜或其它农业副产品，不需要精制处理即可直接用于发酵生产。（3）微生物自主调控。微生物参与反应通常全部有本身酶系或代谢机制调解完成，无需过多认为参与。（4）高度专一性和选择性。因为微生物体内酶含有专一性，所以微生物本身能够专一性对一些复杂化合物进行特定部位等氧化、还原、官能团导入等等反应从而实现生产。（5）环境污染小。微生物发酵工业“三废”对环境污染小，对生物体也基础无害。这是微生物发酵相比于通常发酵最为显著地优越性。（6）此方法投资较小，见效较快，而且在效益方面潜力巨大。所以，针对烟酰胺生产来说，实现微生物发酵生产烟酰胺含有很重大意义，这也将改变烟酰胺生产工业长久以来部分难以改变不利原因^[18]。

法国研究员 Galzy 及其研究组最早提出了烟酰胺微生物发酵方法^[19]，而且在试验过程中确定了烟酰胺发酵菌株。以后经过对微生物转化腈类物质必需腈水合酶进行深入研究，经过研究得出腈水合酶参与反应所需最好条件，该企业实现了腈水合酶活力不停提升，并让丙烯酰胺产量实现三次大幅度提升，到二十一世纪早期，丙烯酰胺产量已经提升到 0 t/a。中国利用腈类物质进行工业生产起始于 90 年代中期，利用微生物转化腈类物质进行丙烯酰胺生产著名企业有江苏如皋化肥厂，江西南昌农科化工^[20]。

1.3 腈水合酶介绍

1.3.1 腈水合酶在微生物界分布

腈类化合物通常是由和工业生产中一些物质间反应所产生副产物，这些物质通常含有很高毒性，存在于工业废水，腈类物质极难被分解掉，而微生物体内腈水合酶是腈类物质最好催化剂。

腈类物质对人体来说毒性较强，不过

这种物质却能够作为碳源或氮源为微生物所利用。自然界中存在能够利用腈类物质微生物种类很多，但通常利用率很低，以后科学家们将这些微生物进行人工驯化培养，经过改变微生物生长条件及代谢机制，实现了微生物腈水合酶活性提升。腈水合酶关键存在于短杆菌属、小球菌属及诺卡氏菌属等等。这些菌属中常见微生物菌株有：*Nocardia* sp.9611，*Brevibacterium imperialis* CBS489-74，*Rhodococcus rhodochrous* II，*Corynebacterium pseudodiphtherium* ZBB-41，*Brevibacterium* R312，*Rhodococcus* sp.N-774，*Rhodococcus* sp. YH3-3，*Alcaligenes faecalis* ARCC8750，*Alcaligenes faecalis* JM，*Pseudonocardia thermophila* JCM3095，*Bacillus* sp.BR449，*Brevibacterium* sp.CH2 等^[21~25]。

广泛分布含腈水合酶微生物有着它们相同之处：腈水合酶必需经过溴合作用和特定金属离子结合后才能表现出酶活性，在无金属离子螯合情况下酶活基础为零或极低。现在已发觉能和腈水合酶发生螯合作用螯合因子关键有铁离子和钴离子。含有钴型腈水合酶微生物菌株常见有 *Rhodococcus rhodochrous* II，*Pseudonocardia thermophila* JCM3095 等；含有铁型腈水合酶微生物菌株常见有 *Corynebacterium pseudodiphtherium* ZBB-41 等^[26]。

1.3.2 腈水合酶生物调控

能和钴离子螯合腈水合酶是由 α 和 β 两个亚基组成组成一个水溶性蛋白物质，因为酶蛋白产生过程中诱导因子不一样，两个亚基含有了不一样结构，从而造成了不一样种类微生物内腈水合酶分子量差异，比如菌株 *Rhodococcus* sp.N-774 体内腈水合酶分子量为 70 KDa，而菌株 *Rhodococcus rhodochrous* II 体内腈水合酶则有 520 KDa 和 130 KDa 两种大小^[27]。研究中发觉高酰胺类物质生产能力伴随腈水合酶分子量不一样而出现不一样，通常认为高分子量腈水合酶更适合酰胺生产，这关键是由它高稳定性和高活性决定。

腈水合酶为诱导酶，在特定诱导剂存在下才能产生腈水合酶，以钴型腈水合酶为例，菌体培养期间腈水合酶酶活性和其含量只有在有钴离子存在情况下才会有提升。X 射线衍射试验表明，辅助因子钴离子和 2 个 N 原子（酰胺基团）和 3 个 S 原子（半胱氨酸硫醇盐）形成 5 个配位键。

在透析试验中游离钴离子全部消失,说明酶活性部位已将它们全部结合并在螯合作用下转化为本身关键一环,由此可见钴离子对脘水合酶关键性。从决定脘水合酶基因开始,当基因扩增,转录和翻译过程全部完成后,得到脘水合酶必需结合钴离子才能实现其催化活性,这是我们进行理论研究关键基础。

1.3.3 脘水合酶反应机理

钴型脘水合酶酶催化反应整个催化机制已经得到了透彻研究.当钴离子进入脘类溶液后,水分子、原料中脘分子和钴离子三者相互结合,氰基中 C-N 三键在此基础上实现激活并发生水合反应,使得-OH 基攻击氰基并和其中 C-离子形成一个亚酰胺 $R-C(-OH)=NH$,异构化后亚酰胺即为酰胺类物质 [28]。

1.4 课题研究意义

烟酰胺作为 B 族维生素关键组员,也是机体辅酶关键组成部分。医药、食品、化妆品和饲料等等领域全部有很广泛应用。伴随社会发展,现在烟酰胺在化妆品生产行业也得到了应用,而其它各行业对烟酰胺需求量也在继续增加。所以,在工业中怎样有效提升烟酰胺产量成为大家重视一个问题。利用微生物法生产烟酰胺是烟酰胺生产一个关键工艺,它含有化工合成生产不含有巨大优势。在此工艺中,微生物菌种活性决定了烟酰胺产量。所以,高脘水合酶活力生产菌株筛选对烟酰胺生产含相关键意义。在生产过程中,大家应该适时对烟酰胺产量及品质进行检测,所以确立一个快速有效检测手段对烟酰胺生产也含相关键意义。

1.5 课题研究内容

本课题关键从试验室已经有菌种出发,利用现有设备、仪器、药品及方法并参阅相关文件资料,独立完成了以下几方面研究工作:

1.5.1 高脘水合酶活力菌株筛选

利用试验室已含有多种条件及仪器设备,参阅相关资料文件,研究 ARTP、微波、甲基磺酸乙酯(EMS)三种诱变剂对试验中出发菌株中脘水合酶活力影响,确定了菌种诱变过程中三种诱变剂各自最好诱变条件。在单原因诱变基础上进行三种影响原因复合诱变试验,经过不停尝试和筛选,最终选育出含有高酶活性烟酰胺产生菌株。

1.5.2 烟酰胺 HPLC 检测条件优化。

利用高效液相色谱进行烟酰胺检测，在现有检测条件基础上，经过对高效液相色谱检测中流动相百分比、紫外检测波长、流动相流量、进样量等条件进行优化，确定出烟酰胺检测最好检测条件。

1.5.3 烟酰胺高产菌株酶催化反应条件优化

经过对菌体浓度、底物浓度、反应温度、PH 和菌龄时间五个原因优化试验，确定最好酶反应条件。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 菌种

诺卡氏菌 HD1220，河南大学生命科学院生物工程试验室保藏。

2.1.2 培养基

活化培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 酵母膏 5, NaCl 1, K_2HPO_4 2, 琼脂 20, pH 7.5, 115 °C 灭菌 15 min。

筛选培养基 (g/L): 3-氰基吡啶 8, 葡萄糖 15, 酵母膏 3, NaCl 1, $MgSO_4$ 0.2, K_2HPO_4 0.5, 琼脂 15, pH 7.5, 115 °C 灭菌 15 min。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 15, 酵母膏 6, 尿素 6, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 谷氨酸钠 1, pH 7.5, 115 °C 灭菌 15 min。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 9, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, 谷氨酸钠 1, 脲 7, 钴离子 12 mg, pH 7.5, 115 °C 灭菌 15 min。

2.1.3 关键试剂

在试验中应用到关键试剂规格和生产厂家以下表 1-1 所表示:

表 2-1 关键试剂规格及生产厂家

Tab.2-1 Specifications and manufacturers of main reagent

试剂名称	型号	生产厂家
葡萄糖	分析纯	天津德恩化学试剂
酵母膏	生化级	北京奥博星生物技术企业
脲	分析纯	郑州派尼化学试剂厂
磷酸二氢钾	分析纯	天津科密欧化学试剂
磷酸氢二钾	分析纯	天津科密欧化学试剂
硫酸镁	分析纯	天津科密欧化学试剂
谷氨酸钠	分析纯	天津化学试剂六厂
氯化钴	分析纯	天津德恩化学试剂
甲醇	色谱级	西陇化工股份
盐酸	分析纯	开封东大化工试剂厂
3-氰基吡啶	化学级	郑州派尼化学试剂厂
氯化钠	分析纯	天机科密欧化学试剂
琼脂	食品级	福建莆田联邦琼脂
氢氧化钠	分析纯	郑州派尼化学试剂厂
酒石酸钾钠	分析纯	天津德恩化学试剂
苯酚	生化级	天津德恩化学试剂

2.1.4 关键仪器

在试验过程中所用到关键仪器如表 1-2 所表示：

表 2-2 关键仪器型号及生产厂家

Tab.2-2 Types and manufacturers of main equipments

仪器名称	型号	生产厂家
高效液相色谱仪	Waters-1525	美国 Waters 企业
常压等离子体诱变育种仪		北京思情源生物科技
全自动高压蒸汽灭菌锅	SX-500	日本 TOMY 企业
洁净工作台	SW-CJ-2FD	苏州安泰空气技术
回转式恒温摇床	ZWY-2102	上海智城分析仪器
电子天平	FA124	上海舜宇恒平科学仪器企业
移液器	DV-04123	大龙兴创试验仪器
微波炉	KJ23B-DE	广东美微波炉制造
水浴锅	HH-6	国华电器
紫外分光光度计	752N	上海仪电分析仪器
台式高速冷冻离心机	5810R	德国 Eppendorf 股份企业
循环水式多用真空泵	SHB-III	郑州长城科工贸
旋转蒸发仪	RE-52AA	上海亚荣生化仪器厂

2.2 试验方法

2.2.1 菌种培养方法

菌种活化：将保藏于超低温冰箱中菌种取出，在 30 °C条件下放置 10 min，以后进行梯度稀释涂布平板，以后置于 30 °C恒温培养箱中培养 48 h

斜面培养：挑取平板上面生长情况良好菌落转接斜面培养基进行培养，培养温度为 30 °C，培养时间为 48 h。

液体种子培养基：斜面培养菌种取一环接入液体种子培养基，以后放入恒温振荡培养箱振荡培养，培养温度为 30 °C，摇瓶装液量为 30 mL，转速为 200 r/min，培养时间为 36 h。

液体发酵培养基：将培养好种子液以 5

%接种量接入发酵培养基中培养，培养温度为 30 °C，摇瓶装液量为 30 mL，转速为 200 r/min，培养时间为 48 h。

2.2.2 高酶活烟酰胺生产菌种诱变及选育

(1) 等离子体诱变

等离子体关键指电离气体，只有当带电粒子密度达成其建立空间电荷足以限制其本身运动时，带电粒子才会影响整个体系性质，此时才会形成等离子体[29]。当气体经过电场作用后，基态原子在电子动能、粒子碰撞作用下向高能级跃迁称为激发态。在此过程中，电子、光子、正负离子得以形成。等离子体关键是气体在加热或强电磁场作用下电离产生，关键由电子、离子、原子、分子、活性自由基及射线等组成。其中活性自由基及射线，如紫外线、 γ 射线等对微生物含有很强灭杀作用。近 20 年来，伴随大家对等离子体研究日益深入，它在灭菌和生物诱变方面应用也引发了大家关注。比较普遍采取等离子体消毒装置有高频电磁场、激光和微波等离子体，等离子云有空气、氦气、氮气、氧气、卤素气体等，所研究微生物有大肠杆菌、酿酒酵母、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、枯草杆菌等[31~33]。依据等离子体多种性质，我们对具体试验过程进行了设计，具体步骤以下：

(1) 常温等离子体诱变出发菌株制备

本试验诱变所用菌株为诺卡氏菌 HD1220，保藏于温度为—70 °C超低温冰箱中。

将出发菌株从超低温冰箱中取出在平板上活化，在 30 °C培养 48 h，以后转接两代，从第三代生长良好平板中挑出菌落最大、长势最好菌落作为出发菌株，转接斜面培养 48 h 以后，在 200 r/min 旋转式摇床上震荡培养 36 h，将培养好种子液用 0.8%生理盐水进行稀释，经过血球计数板镜检试验使菌液浓度控制在 10^8 个/mL。

(2) 等离子体诱变

本试验所使用诱变设备是北京思情源生物科技生产常压等离子体诱变育种仪。该仪器所使用气体为氦气，在使用前需先设定气体流量为 10 mL/min，打开紫外

灯杀菌处理 20 min。

取经过稀释处理菌液 10 μ L 置于诱变专用载片上，涂抹均匀制成菌膜后进行诱变处理。本装置采取紫外灭菌，以空气为传导介质，在常压下，灭菌室内电极经过特定条件激发产生辉光放电形成等离子体。在射频功率 300 W 下以 60 s 为梯度，对样品分别进行 60 s、120 s、180 s、240 s、300 s、360 s 诱变处理，诱变后样品放入 1 mL EP 管内，加入 1 mL 无菌生理盐水震荡洗脱，将洗脱液稀释成 $10^{-1}\sim 10^{-7}$ 浓度梯度，取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度涂布平板，30℃ 培养 48 h 后对平板菌落进行观察统计，以每皿菌落数在 100 左右为最好浓度，从而计算出不同诱变时间所对应致死率情况。

致死率计算公式为：

$$\text{致死率} = 100\% - \text{存活率}$$

$$\text{存活率} = (\text{诱变后存活菌落数} \times \text{对应稀释倍数}) / (\text{对照平板菌落数} \times \text{对应稀释倍数})$$

依据致死率和诱变时间对应关系，我们能够制作出致死率曲线。

(3) 高产菌株初筛

在各个诱变时间相对应平板上分别挑出 30 株不一样形态菌落及一株不经过诱变处理平板菌落接斜面在 30℃ 条件下培养 48 h，以后转接种子瓶培养 36 h 后，以 5 % 接种量转接发酵培养基震荡培养 48 h 测定配活力，要求诱变后酶活高于出发菌株且酶活为其 1.1 倍以上突变株定义为正突变株，酶活低于出发菌株且酶活为其 0.9 倍以下突变株定义为负突变株。然后对突变株突变率进行统计，依据统计结果，选择最高正突变率所对应时间点作为诱变处理时间。

正突变率计算方法为：

$$\text{正突变率} = \text{正突变菌株数} / \text{突变株总数} \times 100\%$$

(2) 微波诱变

利用微波进行菌种诱变是一个新兴诱变手段、微波诱变关键利用微波辐射作用，微波辐射是一个低能电磁辐射，在诱变育种领域，它对微生物含有较强生物效应，这种生物效应关键包含两个方面：热效应和非热效应。热效应关键是指在一定功率和一定频率下，经过电磁辐射对微生物进行照射，引发局部温度上升，从而引发微生物体内部分生理生化反应改变，甚至死亡；

非热效应是指在电磁波作用下，尤其是在长时间及低温电磁场作用下，生物体并没有显著温度改变，或生物体本身温度改变在自然范围内，但却能够产生强烈生物效应，并在生物体内产生多种生理，生化功效改变，表现为频率和功率选择性上。因为微波这两种效应存在，从而能够引发生物体内产生一系列正突变效应和负突变效应。

在本试验中，菌种诱变所使用微波炉为广东美企业制造型号为 KJ23B-DE 型微波炉，微波输出功率 800 W，频率为 2450 MHz。微波炉含有低火、中低火、中火、中高火、高火五种不一样档位，假如设定高火档位为 100 %，那么其它四种档位根据前后次序分别为 80 %、60 %、40 %、20 %。在试验中，我们从不一样照射强度和不一样照射时间两个方面进行菌种诱变。

为了确定微波诱变最好输出功率，我们设定在照射时间为 60 s 时，取经过稀释菌悬液 5 mL 于无菌培养皿中，开盖放入微波炉，设定微波炉输出频率分别为 20 %、40 %、60 %、80 %、100 % 进行照射处理，以后在 4℃ 冰箱中放置 2 h 以降低回复突变，然后进行平板培养，并进行摇瓶发酵培养。对经过培养诱变菌株进行存活率及正负突变率进行统计，最终确定出最好照射强度。

经过上述试验，我们确定了最好照射强度，在此基础上，将装有 5mL 稀释菌液培养皿开盖置于微波炉中，设定照射时间分别为 30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s，进行诱变处理。将诱变后菌种在冰箱中冷藏 2 h 后进行固体培养并进行发酵培养，统计菌株存活率及正负突变率，最终确定最好照射时间。

(3) 甲基磺酸乙酯诱变

甲基磺酸乙酯是一个在微生物育种领域常见化学诱变剂，简称 EMS。EMS 是一个关键致癌物，在生物学上，EMS 常见作突变体库建立、微生物育种等。EMS 对微生物含有诱变效应机理关键是 EMS 能使基因中鸟嘌呤烷基化，并使烷基化鸟嘌呤和胸腺嘧啶配对，替换了胞嘧啶，从而产生转换型突变效应，另外，因为鸟嘌呤烷基活化造成糖苷键断裂造成在 DNA 复制过程中碱基对发生替换。EMS 诱发这种染色体结构和数量方面改变是其诱变效应关键表现。

本试验选择 EMS 作为诱变因子，首先要确定 EMS 浓度，因为 EMS 为液体物质，我们需要从 EMS 母液出发进行稀释。

取 0.5 mL EMS 溶解于 9.5 mL PH 为 7.2 磷酸缓冲液，

将其配置成体积分数为 5 %EMS 母液，震荡摇匀后待用。

分别取不一样体积菌液，将其和 EMS 母液进行混合，混合后浓度分别为 0.2 %、0.4 %、0.6 %、0.8 %、1.0 %、1.2 %，将混合液装入无菌三角瓶中，在 30 °C 下置于震荡培养箱中震荡培养 30 h，最终加入一定量 2 %硫代硫酸钠终止反应。将诱变后菌种进行固体培养并进行发酵培养，统计诱变后菌种存活率和正负突变率，确定最好 EMS 浓度。

(4) 复合诱变

在诱变育种过程中，假如对同一菌株进行长久单一因子诱变，会使该菌种对诱变剂产生“疲惫效应”，从而会是诱变效果大大降低。单一诱变因子长久使用会改变菌株一些生理特征，比如可能会使菌株生长缓慢，代谢效率降低，对于真菌会造成孢子产生量降低，这些负面效应不利于发酵工艺控制。在实际生产中，复合诱变能有效降低这些负面效应。复合诱变包含多个诱变剂前后使用，同一个诱变剂反复使用和多个诱变剂同时使用。大家普遍认为，复合诱变含有显著协同效应，多个诱变剂合理搭配及使用效果要显著优于单一诱变剂诱变效果。

在本试验中，复合诱变实在单因子诱变基础上进行，复合诱变所使用诱变剂分别为等离子体、微波和 EMS 三种因子。取 5 mL 稀释过菌悬液加入到无菌培养皿内，分别利用以上三种诱变因子在已确定最好条件下进行第一次诱变处理。诱变后，将菌液混合均匀，并将其分成两部分，一部分在 30 °C、200 r/min 条件下震荡培养 8 h 后，利用甘油保藏法进行超低温冷冻保藏，一部分作为出发菌株分别在三个诱变因子最好诱变条件下进行第二次诱变，如同第一次操作，第二次诱变所得菌液也分成两部分，一部分保藏，另一部分作为出发菌株进行第三次诱变处理，将所得菌液进行超低温冷冻保藏。

诱变操作完成后，将第一次、第二次、第三次分别保藏突变菌株进行稀释，涂布于含有 80 g/L 3-氰基吡啶筛选培养基上进行菌种筛选，挑选生长情况良好菌株转接发酵培养基在 30 °C、220 r/min 条件下进行震荡培养，筛选出高酶活菌株，并进行立即保藏。

(5)遗传稳定性测定

为确保诱变后菌株遗传稳定性,降低回复突变对菌株酶活带来负面影响,我们需将挑选出来酶活性最高 3 株菌株进行连续传代培养,每代菌株在 30 °C 条件下培养 48 h,连续传代培养 6 次,测定每次传代菌株酶活,并将遗传稳定性改变图绘制成曲线图。依据遗传稳定性曲线图挑选出稳定性良好菌株进行保藏,保藏于设定温度为-70 °C超低温冰箱中。

(6)菌株酶活性测定方法

在测定菌株酶活性高低时,我们需要严格控制酶反应时间和参与反应酶量。我们定义 1 mL 发酵液在 1 min 内催化 3-氰基吡啶生成 1 μmol 烟酰胺所需腈水合酶数量定义为一个酶活力单位(U)。测定腈水合酶酶活时,整个反应过程是在磷酸缓冲液中进行。将发酵液进行离心,磷酸缓冲液洗涤两次后,取 1 mL 菌悬液加入到 9 mL 质量分数为 8 %3-氰基吡啶溶液,再向混合溶液中加入 10 mL 磷酸缓冲液,混匀后置于 30 °C 条件下震荡反应 5 min,反应结束后用 6 mol/L 盐酸溶液终止反应。利用 HPLC 测定腈水合酶活力。

2.2.3HPLC 检测烟酰胺条件优化

现在在烟酰胺检测方面最正确方法是高效液相色谱检测法。高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)又称“高速液相色谱”、“高分离度液相色谱”、“高压液相色谱”。高效液相色谱技术使色谱技术一个关键分支,其所用流动相为液态,利用高压输液系统,将含有不一样极性单一溶剂或不一样百分比混合溶剂、缓冲液等流动相进入装有固定相色谱柱,在柱内完成份离各成份分离,再经检测器检测,从而实现对样品分析检测^[34]。

和其它检测技术相比,高效液相色谱有以下特点:(1)流动相为液体,在高压作用下能使各成份快速完成份离。(2)分离效能高。(3)灵敏度高。检测可达成纳米级。(4)应用范围广。在有机化合物中,70 %物质全部能用高效液相色谱法进行检测分析,尤其是高沸点、大分子、强极性、热稳定性差化合物。(5)分析速度快。通常检测通常能够在几分钟到几十分钟内完成,通常不超出一个小时。但高效液相色谱也有其缺点,高效液相色谱含有“柱外效应”。在从进样到检测器之间,假如流动相流型有改变,被分离物质任何扩散和滞留全部会显著地造成

色谱峰加宽和柱效能降低。

现在高效液相色谱作为一个快速、正确、直接检测技术已被广泛应用，尤其是在药品检测方面。通常药品成份全部比较复杂，尤其是中药成份，检测难度比较大。利用高效液相色谱技术能够成功对很多药品具体成份进行分析测定，它也称为现在药品检测采取主流方法之一。在《中国药典》中，使用高效液相色谱技术检测标准品已从 80 年代 7 种增加到了余种。在生命科学领域，HPLC 现在已成为生物化学家和医学家在分子水平生命科学、临床化学、遗传工程、分子生物学等必不可少工具，其在生化领域应用关键集中在两个方面：（1）低分子量物质，如氨基酸，有机酸，糖类，卟啉类，有机胺类、维生素类等分离测定。（2）高分子物质，如多肽，蛋白质、酶、核糖核酸等纯化、分离和测定。

相关高效液相色谱检测，本实验室现在临时使用检测条件为：检测所使用流动相为甲醇和水，其百分比为：甲醇：水=1：4，流动相流速为 0.3 mL/min，检测样品进样量为 10 μ L，色谱柱柱温为 30 $^{\circ}$ C，紫外检测波长为 248 nm，色谱柱规格为 C₁₈ 柱。以上检测条件均是经过预试验进行确定。在此条件下，烟酰胺和 3-氰基吡啶检出时间分别为 13.776 min 和 25.968 min。图 1-3 所表示：

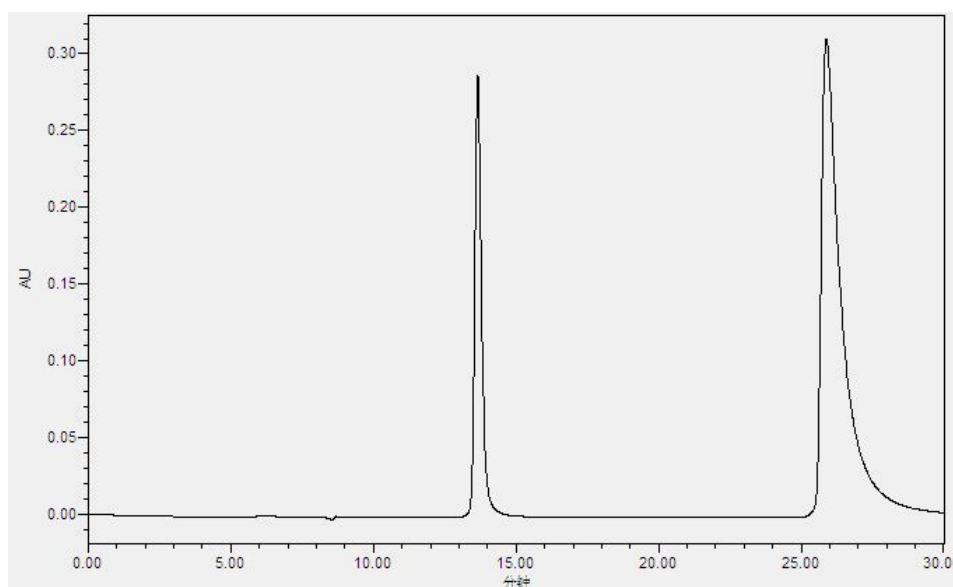


图 2-1 烟酰胺和 3-氰基吡啶出峰时间图

Fig.2-1 The peak time of nicotinamide and 3-cyanopyridin

在试验过程中，为了取得愈加好检测结果，我们需要从各个检测条件入手，对整个检测过程进行优化处理，以期能在最短时间内检测出烟酰胺含量。

(1) 绘制烟酰胺标准曲线

为了确定高效液相色谱检测过程中检出峰峰面积和烟酰胺含量是否含有良好线性关系，我们需要绘制烟酰胺标准曲线：配置 0.025 g/L 烟酰胺标准溶液（用 0.22 μm 水系滤膜过滤），设定烟酰胺溶液进样量分别为 5 μL 、10 μL 、15 μL 、20 μL 、25 μL ，以烟酰胺进样量为横坐标，检出峰峰面积为纵坐标绘

(2) HPLC 紫外检测波长确实定

为了确定烟酰胺检测波长，我们应对烟酰胺及其生产所用底物 3-氰基吡啶进行紫外吸收光谱扫描，确定二者紫外吸收峰后，为了得到最好出峰效果，我们也要考虑在其它紫外波长下烟酰胺处峰情况，在试验中，我们选择 200 nm、220 nm、240 nm、260 nm 五个紫外波长进行测定，观察在每个紫外吸收波长下烟酰胺出峰情况，经过对比，选出最好峰形所对应紫外吸收波长作为烟酰胺检测波长。

(3) HPLC 流动相流量确实定

高效液相色谱检测所使用流动相要是依据被检测物质溶解性和极性来确定。被检测物质在流动相中应该有很好的溶解性，而且要求流动相洗脱能力要强，再者流动相和稀释液不应再样品紫外吸收波优点有吸收。HPLC 检测过程中，流动相流量大小会直接影响到检测保留时间长短。选择最好流动相流量，不仅能优化流动相使用量，更能使检测时间缩短，检测效果提升，这对检测过程有着很关键影响。在烟酰胺检测过程中，我们分别设定流动相甲醇和水混合液流速分别为 0.1 mL/min、0.2 mL/min、0.3 mL/min、0.4 mL/min、0.5 mL/min、0.6 mL/min 六个不一样流量进行试验，烟酰胺检测出峰时间会有不一样，我们将出峰时间短、检测峰峰型最好流动相流量作为烟酰胺检测最适宜流动相流量。

(4) 高效液相色谱流动相百分比确实定

烟酰胺高效液相色谱检测所使用流动相为甲醇和水混合物。有机相甲醇要求必需是色谱级检测专用具。水相要求使用超纯水，即蒸馏水除去几乎全部离子杂质。流动相中甲醇和水百分比决定了对烟酰胺洗脱能力及检测所用时间。所以，确定最好流动相百分比对于烟酰胺检测含有很关键意义。在本试验中，我们设定了流动相百分比分别为甲醇：水=1：7、1：5、1：3、1：1、四个不一样流动相

百分比进行试验，经过出峰时间不一样来确定最好流动相百分比。

2.2.4 烟酰胺提取

烟酰胺在固体状态下为白色结晶或白色结晶粉末，在水中或乙醇中有很高溶解度。依据烟酰胺物理性质，我们设计了烟酰胺提取过程并得到了烟酰胺结晶。

烟酰胺生产菌经过发酵培养 48 h 后，离心处理 3 次，每次离心条件为 4000 r/min、15 min，每次离心后弃去上清液并加入蒸馏水和菌体震荡混匀。离心是为了对菌体进行清洗，充足洗去菌体中发酵液成份。取出菌体加入蒸馏水制成菌悬液，取 5 mL 菌悬液加入 15 mL 含有 8 %3-氰基吡啶溶液中，在 30 °C 下进行酶反应，反应过程中充足震荡，并检测 3-氰基吡啶反应情况，当确定 3-氰基吡啶已反应完全后，将反应液再次离心，弃去菌体沉淀。将所得上清液进行旋转蒸发干燥后，加入 20 mL 无水乙醇将所得固体溶解。将溶液放入 45 °C 真空干燥箱中干燥后，对所得固体进行检测，并对烟酰胺纯度及收率进行计算。

2.2.5 烟酰胺生产过程中酶催化反应条件优化

在脲水合酶催化生产烟酰胺过程中，我们需要对转化所需各个条件加以控制，以实现稳定高效生产。烟酰胺生产过程中脲水合酶催化反应所包含条件有：（1）微生物菌龄。微生物法生产烟酰胺关键利用微生物体内脲水合酶，而微生物菌龄影响着脲水合酶活性，所以我们需要在脲水合酶活性最高微生物生长时间内进行转化生产。（2）菌体浓度。为了确保菌体充足和底物接触，实现底物充足利用，我们需要控制微生物菌体浓度。菌体浓度过大将会使菌体不能充足接触底物，造成转化效率降低，菌体浓度过小将会使生产时间延长，降低生产效率。（3）温度。温度影响着脲水合酶酶活性，为了确保菌体在高酶活情况下参与反应，适宜温度是不可或缺。（4）PH。微生物生长需要适宜 PH，脲水合酶在适宜 Ph 条件下才能确保较高酶活性。（5）底物浓度。烟酰胺生产所使用底物 3-氰基吡啶为一个剧毒性物质，底物毒性会降低微生物活性，从而降低脲水合酶酶活性，选择适宜底物浓度，不仅能降低底物对脲水合酶影响，也能确保烟酰胺生产高效进行。（6）反应时间。伴随酶反应时间延长，底物连续消耗和产物不停积累，脲水合酶活性也会出现一定改变。（7）产物浓度。在酶反应过程中，产物不停积累会对脲水合酶活性造成抑制效应，从而降低脲水合酶活性。

为了取得烟酰胺生产最适宜条件，我们影响脲水合酶活性原因分别进行试验，以期确定最好生产条件组合。

酶催化体系：配置 PH 7.2 磷酸缓冲液和质量分数为 10%3-氰基吡啶溶液。取发酵液 1 mL 加入到 10 mL 3-氰基吡啶溶液和 9 mL 磷酸缓冲液混合溶液中，置于 30 °C 下震荡反应 10 min，用 6 mol/L 盐酸溶液终止反应（加入盐酸溶液 0.1 mL），8000 r/min 离心 10 min，取上清液进行高效液相色谱分析，确定反应体系中烟酰胺含量。

(1) 最适菌体浓度确实定。

将培养 48 h 发酵液取 20 mL 在 4000 r/min 条件下离心 15 min，放入 60 °C 真空干燥箱内烘干，测定菌体干重，计算出菌体在发酵液中质量分数。在确保其它条件不变情况下，我们优异行预试验，设定菌体浓度分别为 1 %、1.5 %、2 %、2.5 %，确定大范围内最好菌体浓度，以后在小范围内进行精细优化，在确定分别选择菌体浓度为 1.5 %、1.6 %、1.7 %、1.8 %、1.9 %、2.0 % 菌液进行转化反应，反应完成后利用 HPLC 测定脲水合酶活性，以确定反应所需最适菌种浓度。

(2) 最好菌龄确实定。

确保其它条件不变，依据烟酰胺生产菌种生长曲线，选择菌龄（即发酵培养时间）分别为 30 h、36 h、42 h、48 h、54 h、60 h 菌体进行转化反应，反应完成后测定脲水合酶活性，以确定反应所需最好菌龄。

(2) 最适底物浓度确实定。

确保其它条件不变，我们进行预试验，设定底物浓度分别为 1 %、5 %、10 %、15 %，以后依据较高脲水合酶活性所对应底物浓度，我们进行精细优化试验，设定底物 3-氰基吡啶分别为 7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 % 五个不一样浓度进行转化反应，反应完成后测定脲水合酶活性，以确定反应所需最适底物浓度。

(4) 最适温度确实定。

确保其它条件不变，在预试验中，我们将浓度范围设置为 26 °C、28 °C、30 °C、32 °C，在此范围内确定高酶活菌株所对应温度，以后进行精细优化试验，在试验中将温度分别设定为 28.5 °C、29 °C、29.5 °C、30 °C、30.5 °C、31 °C 五个不一样温度进行转化反应，反应完成后测定脲水合酶活性，以确定反应所需最适温度。

(5) 最适 PH

确保其它条件不变，在预试验中我们将 PH 改变范围设置为 6、6.5、7、7.5、8，在此范围内确定较高酶活菌株所对应温度，以后进行精细优化试验，在试验中将 PH 分别设定为 6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8 五个不一样酸碱度进行转化试验，反应完成后测定脲水合酶活性，以确定反应所需最适 PH。

(6)最好反应时间

为了确定反应体系中脲水合酶最好反应时间，，在确保其它试验条件不变情况下，设定反应时间分别为 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min，反应结束后测定脲水合酶活性，以确定最好反应时间。

(7)产物浓度对脲水合酶活性影响

为了确定烟酰胺生产过程中烟酰胺积累对脲水合酶活性影响，我们在确保其它反应条件不变情况下，在预试验基础上，设定反应体系内烟酰胺浓度分别为 40 g/L、50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L，测定不一样浓度烟酰胺存在时对脲水合酶活性影响并绘制曲线。

(8) 响应面法优化脲水合酶催化反应条件

响应面法（Response Surface Methodology，简称 RSM）是由 Box-Wilson 在 1951 年建立一个数学方法和统计学方法相结合综合性优化分析方法。具体来讲，响应面法是利用合理试验设计并经过试验得到部分数据，经过对这些数据进行多元二次回归方程分析来得到拟合原因和响应值之间函数关系，并寻求出最优工艺参数。响应面法是用来处理多变量问题一个关键方法。

在微生物发酵方面，响应面法要求我们进行合理试验设计，并在有限试验次数下评价出各个原因对微生物发酵影响，进而探索各原因之间交互作用等，最终求最好试验条件。它是一个快捷有效统计分析方法。

影响脲水合酶催化反应关键原因有菌龄、底物浓度、温度、PH、反应时间五个原因，为了确定这五个原因中对烟酰胺产量影响最为显著原因，进而经过响应面法对显著影响原因进行分析来取得最高脲水合酶活性，我们要利用 Plackett-Burman 设计法来找出显著影响原因。

Plackett-Burman 设计法即筛选试验设计，关键针对

原因数较多且未能确定各个原因对响应变量显著影响而采取试验设计方法。该方法关键经过对各个原因取两个水平进行分析,经过比较各个因子两水平差异和整体差异来确定因子显著性。

在本试验中,经过对影响脲水合酶活性五个原因取 1 和 2 两个水平,1 代表低水平,2 代表高水平,各原因具体水平设计如表 2-3 所表示:

表 2-3 Plackett-Burman 试验设计

Tab.2-3 Design of Plackett-Burman experiment

原因	水平	
	1	2
A 菌龄(h)	36	54
B 反应温度(℃)	29	31
C 反应时间 (min)	20	40
D 反应 PH	7.0	7.8
E 底物浓度(g/L)	80	120

经过 Plackett-Burman 设计法挑选出显著影响原因后,以脲水合酶活性为响应值(Y),以显著影响原因为自变量,进行响应面优化试验。

3 结果和讨论

3.1 烟酰胺高产菌株初筛

3.1.1 ARTP 诱变

对出发菌株 *Norcardia* sp.HD9611 进行 ARTP 诱变处理,以诱变时间为自变量,对菌体致死率进行统计并绘制出菌体致死率曲线,图 3-1 所表示:

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/386112050013010145>