

产腈水解酶重组菌的发酵工艺及催化性质研究

顾炳琛¹, 龚劲松^{1*}, 龙 华³, 韩 笑¹, 张 强¹, 刘清华³, 李自云³, 许正宏^{1,2}, 史劲松¹

(1. 江南大学 药学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2. 江南大学 生物工程学院 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122;

3. 山东昆达生物科技有限公司, 山东 临沂 276400)

摘要: 为了提升腈水解酶转化 3-氰基吡啶制备烟酸的工艺经济性并为其工业应用奠定基础, 对重组大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 进行了 pH-stat 高密度发酵以及催化性质研究. 结果显示, 高密度发酵实验中获得最高菌体 OD₆₀₀ 为 136.8, 细胞干重 61.97 g/L, 最高酶活为 558.6 U/mL; 进一步考察了重组菌在不同温度、pH、金属离子以及有机溶剂等条件下的催化特性. 最后, 将高密度发酵获得的菌体制备成静息细胞, 在 30 ℃、pH 7.2 条件下, 280 min 内共转化 200 mmol/L 底物总计 24 批次, 烟酸累积浓度 590 g/L, 是目前文献所报道生物法合成烟酸最高水平.

关键词: 腈水解酶; 发酵工艺; 烟酸; 3-氰基吡啶; 生物催化

中图分类号: Q814.9

文献标志码: A

腈水解酶(EC3.5.5.1)属于腈水解酶超家族, 是一类能将腈类化合物转化成相应羧酸的水解酶^[1], 具有较保守的 α - β - α 的三明治结构, 以及 E-K-C 催化三联体^[2]. 由于具有反应条件温和、环境友好、底物特异性强等优点, 腈水解酶在精细化学品、食品添加剂及医药中间体的生物催化合成中具有良好的应用价值^[3].

烟酸(维生素 B3)是人体所必须的 13 种维生素之一, 在人体中为脱氢酶的辅酶(NAD⁺, NADP⁺)提供碳骨架, 这些辅酶在多种氧化还原反应中有着重要作用. 而人体自身仅能通过转化少量酪氨酸来合成烟酸, 其余需依赖饮食以及医疗补剂来补充^[4]. 另外, 在制药工业中, 烟酸也作为一种重要的中间体被应用于维生素类药物的生产中. 但目前合成烟酸的传统方法主要采用化学水解法, 存在反应条件苛刻, 收率偏低, 能耗和生产成本较高等问题^[5]. 随着烟酸需求量的日益攀升, 腈水解酶生物催化法制备烟酸作为一种相对绿色环保的合成方式也越来越受到关注^[6].

大肠杆菌高密度发酵(High Cell-Density Cultivation, HCDC)是一种利用特定的发酵策略, 提升罐内大肠杆菌的单位体积生物量, 从而高效获取重组蛋白的技术^[7]. 除此之外, HCDC 还能够减少发酵对培养体积的需求, 在恒定的固定资产成本、时间成本以及人力成本基础上实现更高的产量, 有效降低单位产品的生产成本, 显著提升产品竞争力. HCDC 技术的实施, 能够提高酶的产量、降低生产成本, 更好地将腈水解酶应用于烟酸合成.

我们应用 HCDC 中 pH-stat 策略^[7], 补料培养基的主要成分为葡萄糖, 利用大肠杆菌代谢葡萄糖产生乙酸的原理, 通过调控发酵过程的 pH 值来控制发酵过程. 最后, 考虑到腈类化合物的毒性, 我们在生物转化过程中使用全细胞进行转化, 因此进一步考察了重组菌全细胞的催化特性, 并使用高密度发酵获得的菌体进行了 3-氰基吡啶的批次投料转化合成烟酸, 以期烟酸的大规模生物合成应用奠定基础.

我们应用 HCDC 中 pH-stat 策略^[7], 补料培养基的主要成分为葡萄糖, 利用大肠杆菌代谢葡萄糖产生乙酸的原理, 通过调控发酵过程的 pH 值来控制发酵过程. 最后, 考虑到腈类化合物的毒性, 我们在生物转化过程中使用全细胞进行转化, 因此进一步考察了重组菌全细胞的催化特性, 并使用高密度发酵获得的菌体进行了 3-氰基吡啶的批次投料转化合成烟酸, 以期烟酸的大规模生物合成应用奠定基础.

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 我们所使用菌株 *E.coli* BL21

收稿日期: 2019-01-12; 修回日期: 2019-02-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21406088); 山东省西部人才支持计划(No. 2017GRC5217); 江南大学大学生创新训练计划项目(No. 2018542Y)资助(Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 21406088); the Western Talents of Shandong Province(No.2017GRC5217) and the College Students' Innovation Training Project of Jiangnan University(No. 2018542Y)).

作者简介: 顾炳琛(1991-), 男, 硕士; 研究方向: 生物催化(Gu Bingchen(1991-), male, Master; Research direction: Biocatalysis).

* 通讯联系人, E-mail: jinsongong.bio@hotmail.com.

(DE3)-NIT 由实验室前期构建和保藏。

1.1.2 培养基 LB 培养基(g/L): Tryptone 10, Yeast extract 5, 氯化钠 10。

种子培养基(g/L): Tryptone 20, Yeast extract 5, 氯化钠 0.5, 氯化钾 0.19, 氯化镁 0.95, 葡萄糖 3.6, 微量元素 2 mL/L。

发酵培养基(g/L): Tryptone 20, Yeast extract 5, 氯化钠 0.5, 氯化钾 0.19, 氯化镁 0.95, 葡萄糖 10, 微量元素 2 mL/L。

补料培养基(g/L): 葡萄糖 700, 硫酸镁 14, 微量元素 14 mL/L。

微量元素(g/L): 硫酸锌 0.58, 氯化铁 6, 氯化钙 0.2, 硫酸锰 0.3, 氯化铜 0.2, 乙二胺四乙酸 0.5。

将上述培养基的 pH 值调整至 7.0 后在 115 °C 条件下灭菌 20 min, 氨苄青霉素采用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

1.1.3 试剂 3-氰基吡啶、烟酸购于阿拉丁试剂有限公司, 氨苄青霉素购于上海生工生物工程有限公司, 胰蛋白胨和酵母粉购于 Thermo Fisher 公司, 葡萄糖标准液与生物传感分析仪缓冲剂购于山东省科学院生物研究所, 其余试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.4 仪器 7 L 发酵罐系统、冷冻离心机, 艾本德中国有限公司; 电子天平、电子 pH 计、pH 电极、DO 电极, 梅特勒-托利多公司; 生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所; 高压蒸汽灭菌锅, 松下健康医疗器械株式会社; 生化培养箱、超净工作台, 上海博迅实业有限公司; 酶标仪, 美谷分子仪器有限公司; 高效液相色谱仪, Dionex 公司; Atlantis dC18 柱, WATERS 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 将保藏在 -80 °C 冰箱中的重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)-NIT 在固体种子平板上划线(固体培养基中添加氨苄抗性, 下同), 在生化培养箱中 37 °C 培养 12 h, 在活化平板上挑取长势较好的单克隆接种于种子培养基中, 置于旋转式摇床(下同)37 °C、220 r/min 条件下培养 12 h 并检测菌液酶活, 选取酶活最高的菌液制备成固体斜面保存。

1.2.2 种子制备 将上述种子斜面上刮取单菌落接种至液体种子培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 8 h; 接入液体种子培养基中(2%接种量(V/V)), 37 °C、220 r/min 培养 8 h。

1.2.3 pH-stat 补料策略下的高密度发酵 培养基中的葡萄糖在 *E. coli* 发酵时会被代谢产生乙酸, 致使 pH 下降; 而当葡萄糖被代谢完后, 大肠杆菌又会继续利用之前产生的乙酸作为碳源, 致使 pH 升高。因此, 我们通过使用 pH-stat 法补料, 在发酵液 pH 升高时反馈流加葡萄糖, 此时, 菌体代谢葡萄糖产生乙酸, 会使发酵体系的 pH 值下降; 而当 pH 低于一定限值时, 又通过流加氨水、提供氮源的同时, 中和体系中的乙酸, 提升罐内 pH 值, 使整个发酵过程的 pH 控制在一定范围内。

我们以培养基初始葡萄糖被完全耗尽作为分界点, 前期为分批发酵阶段, 后期为补料发酵阶段。发酵初始, 我们将先前制备的二级种子液按接入发酵培养基中(10%(V/V)接种量), 同时添加终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素, 控制发酵温度为 37 °C, 转速和通气量通过溶氧电极反馈的溶氧值来调节(考虑到实际应用, 发酵罐转速被控制在 600 r/min 以内), pH 根据 pH 电极反馈的数据, 适量流加氨水来控制, 使发酵液 pH 不低于 6.75, 整个发酵过程中定期取样, 检测发酵液中葡萄糖浓度(g/L), 菌浓(OD_{600})以及酶活(U/mL)。在补料发酵阶段, 采用 pH-stat 补料策略, pH 高于 6.85 则流加补料培养基, pH 低于 6.75 则流加氨水。

1.2.4 催化性质考察 最适温度: 测定重组菌在 20~60 °C 下的酶活, 其他条件保持不变, 设定 50 °C 下的重组菌酶活为 100%。

热稳定性: 将静息细胞分别置于 4、30、40、50 和 60 °C 中温浴, 设置初始的静息细胞酶活为 100%, 定期取样检测残留酶活。以残留相对酶活的自然对数 $\text{Ln}(\text{RA})$ 对时间作图, 计算重组菌酶活的半衰期 $t_{1/2}$ 。

最适 pH: 在 pH=4.0、4.6、5.2、5.8(柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)、pH=5.8、6.5、7.2、7.8(磷酸钠缓冲液(PBS))、pH=7.8、8.5、9.0(Tris-HCl 缓冲液)的反应缓冲液条件下测定重组菌酶活, 设置 pH 7.2 条件下的酶活为 100%。

pH 稳定性: 将静息细胞分别重悬在 pH 6.5、7.2、7.8 的 PBS 缓冲液保存在 4 °C 条件下, 定期取样检测酶活, 设置初始静息细胞酶活为 100%, 以残留相对酶活的自然对数 $\text{Ln}(\text{RA})$ 对时间作图, 计算重组菌酶活的半衰期。

金属离子: 选取不同金属离子溶液添加至测活体系中, 在 30 °C 温浴 30 min, 其他条件保持不变,

金属离子终浓度设置为 10 mmol/L, 在此条件下测定重组菌酶活, 选择不额外添加金属离子的反应体系酶活为 100%.

有机溶剂: 选取 5% (V/V) 和 20% (V/V) 终浓度的不同有机溶剂, 测定重组菌酶活, 设置不添加有机溶剂的反应体系的酶活为 100%.

1.2.5 底物批次转化 为了减少底物对重组菌酶活的抑制作用, 我们采用批次投料的方式来转化 3-氰基吡啶. 离心收集发酵菌体, 采用 pH 7.2、100 mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (PBS) 重悬菌体并洗涤 2~3 次, 控制菌体生物量 (Dry Cell Weight, DCW) 为 4.6 g/L, 生物转化实验采用 100 mL 生物转化体系, 以 pH 7.2、100 mmol/L 的磷酸钠缓冲液为反应介质, 选取 200 mmol/L 作为 3-氰基吡啶的投料浓度, 30 °C、220 r/min 振荡反应, 通过 HPLC 检测转化体系中底物的残留情况, 并且在底物完全消耗完后进行下一批次的投料.

1.2.6 分析方法 菌体生物量 (DCW): 使用紫外分光光度计测定菌体 OD₆₀₀ (测定过程中将菌体密度稀释至 OD 值介于 0.2~0.7, 再乘以稀释倍数获得最终结果), 再换算成细胞干重: 1 OD₆₀₀ = 0.453 g/L.

葡萄糖浓度: 使用生物传感分析仪.

生物转化反应过程: 取 200 μL 菌液, 12 000 r/min 离心 1 min 后弃上清, 用 pH 7.2、0.1 mol/L PBS 洗涤 2 次, 再用 900 μL PBS 悬浮菌体, 获得静息细胞. 再将细胞置于 30 °C 金属浴温浴 5 min 后加入 100 μL、500 mmol/L 的 3-氰基吡啶, 30 °C、120 r/min 反应 10 min. 转化结束后取 10 μL 转化液通过苯酚-次氯酸钠法测定酶活.

腈水解酶在转化腈类底物合成羧酸的过程中, 同时也会按照等摩尔比产生氨气, 为此, 检测出氨含量也就能获得理论上催化所产生的羧酸含量, 并由此来表征酶活性. 通过 Phenol-Hypochlorite 法测定氨含量快速、灵敏、简便, 该反应过程中, 亚硝基铁氰化钠在碱性条件下催化氨先后与苯酚以及次氯酸钠生成蓝色可溶化合物, 该化合物在 630 nm 处紫外吸收强, 因此通过紫外分光光度计即可检测其生成量, 从而计算出羧酸的生成量^[8]. 酶活 (1 U) 为在生物转化反应的标准条件下, 每分钟生成 1 μmol 产物烟酸 (或氨) 所需的酶量, 总酶活 (U/mL) 为每毫升发酵液中的细胞具有的酶活力单位.

HPLC 检测: WATERS Atlantis dC18 column

(5.0 μm, 250 mmol/L×4.6 mmol/L), Dionex Ultimate 3000; 流动相: Acetonitrile/0.02% Trifluoroacetic acid (3:2); 流速 0.5 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 268 nm; 进样量 2 μL.

2 结果与讨论

2.1 pH-stat 法补料高密度发酵

我们将菌种活化制备获得二级种子后, 接种至 7 L 发酵罐中开始发酵. 分批发酵阶段, 菌体自然代谢葡萄糖使发酵液 pH 降低, 此时仅流加氨水控制 pH 不低于 6.75. 由图 1 可知, 发酵进行 4 h 后, 葡萄糖已经基本耗尽, 此时开始进入补料发酵阶段,

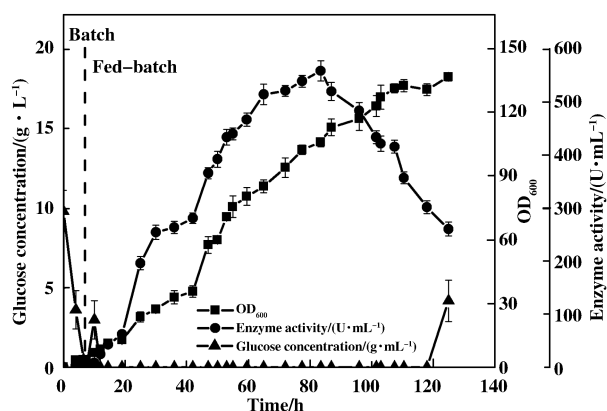


图 1 *E. coli* BL21 (DE3)-NIT 的 pH-stat 高密度发酵

Fig.1 High cell-density cultivation of *E. coli* BL21 (DE3)-NIT based on pH-stat mode

并通过补料培养基与氨水的调控流加使 pH 稳定在 6.8 左右. 发酵至 83.5 h, 测得整个发酵过程的最高酶活为 558.6 U/mL, 之后菌体生物量还在增长, 但酶活开始逐步下降, 可能是长时间发酵导致重组菌中的质粒出现部分丢失; 发酵时间延长至 110 h 时, 菌体浓度基本达到恒定, 此时, 发酵罐中的代谢物可能对菌体的生长代谢产生了明显的抑制作用, 最后补料的葡萄糖在罐中出现残留也证明菌体的代谢已经明显放缓, 整个发酵过程菌体 OD₆₀₀ 最高达到 136.8, DCW 为 61.97 g/L.

大肠杆菌的高密度发酵策略主要分为直接反馈控制、非直接反馈控制以及非反馈控制^[7]. 在考虑发酵策略时, 我们认为 pH-stat 策略不需要对菌体的发酵情况进行深入了解, 对于发酵设备也没有很高的要求, 并且通过以葡萄糖作为补料培养基, pH 值的变化能够实时反应菌体的碳源代谢情况, 从而判断发酵情况. 因此, 最终选择了 pH-stat 方式作为

我们的发酵策略，实验结果也证明 pH-stat 策略确实能够帮助我们高效获取胍水解酶。

2.2 温度对重组菌 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 酶活的影响

为了评估生物催化剂的应用性能，我们又对收集的重组菌细胞催化性质进行了考察。温度是生物催化剂反应速率的一个重要影响因素，因此，首先对重组菌的最适反应温度以及在不同温度下的酶活半衰期进行了评价。

如图 2，当催化反应温度介于 20~50 ℃ 范围内时，随着温度的提升，重组菌酶活也呈现出增长的

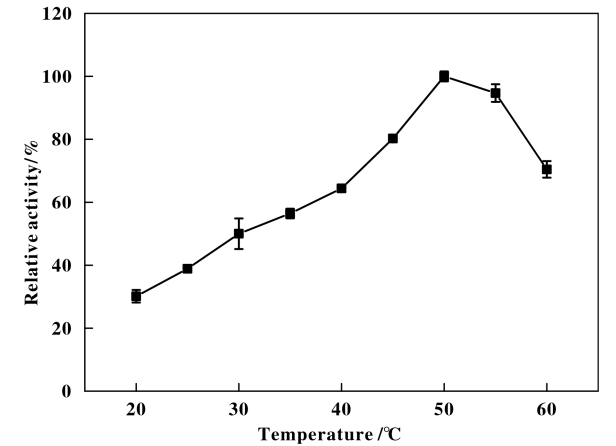


图 2 *E.coli*-BL21(DE3)-NIT 在不同温度下的相对酶活
Fig.2 Relative enzyme activity of *E.coli*-BL21(DE3)-NIT under different temperatures

趋势，并在 50 ℃ 时静息细胞酶活达到最高值，该研究结果反映出细胞的最适反应温度为 50 ℃，高于文献报道的产胍水解酶的恶臭假单胞菌 *P. putida* MTCC 5110 (35 ℃)^[9] 以及红球菌 *Rhodococcus* sp. NDB1165(45 ℃)^[10]，但低于拟无支酸菌 *Amycolatopsis* sp. IITR 215(55 ℃)^[11]。温度的升高对重组菌酶活的促进作用也逐渐增强，可能是由于温度升高的同时，生物转化体系内的分子热运动加剧，从而加速了底物与酶分子的接触反应；而随着温度继续上升，重组菌酶活开始下降，可能是因为催化反应温度过高时，酶分子的高级结构迅速解折叠，使得高温对酶活的破坏作用超过了分子热运动所带来的促进作用，使得酶活降低。

接下来为了研究不同温度下重组菌的酶活半衰期，我们将重组菌制备成静息细胞，置于 4、30、40、50 和 60 ℃ 温度下，并间隔 12 h 取样测定酶活性(图 3)。经计算，重组菌全细胞在这些温度下的 $t_{1/2}$ 分别为 177.7、150.7、64.2、22.9 和 7.0 h。考虑到

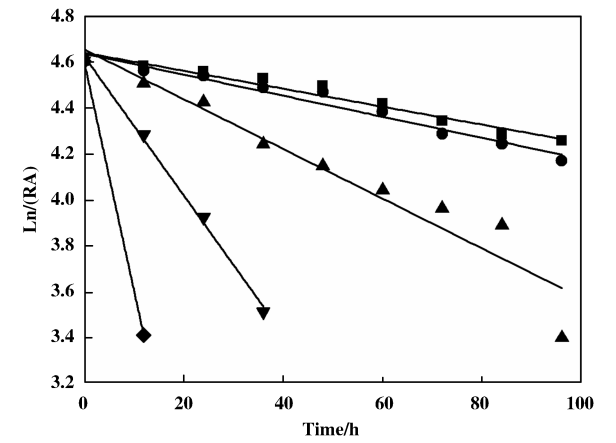


图 3 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 在 4 ℃ (■)，30 ℃ (●)，40 ℃ (▲)，50 ℃ (▼) 和 60 ℃ (◆) 下的热稳定性
Fig.3 Thermostability of *E.coli* BL21(DE3)-NIT under 4 ℃ (■)，30 ℃ (●)，40 ℃ (▲)，50 ℃ (▼) and 60 ℃ (◆)

在进行转化反应时，除了温度以外，来自底物的毒性作用也会对酶活有着不可逆的破坏作用，因此我们在后期的批次转化投料实验中，选取 30 ℃ 作为反应温度。

2.3 pH 对重组菌 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 酶活的影响

pH 也是酶催化反应中的一项重要参数，我们考察了 pH 对重组菌的酶活以及酶活半衰期的影响。如图 4 所示，重组菌在 pH 6.5、7.2、7.8 的 PBS 缓

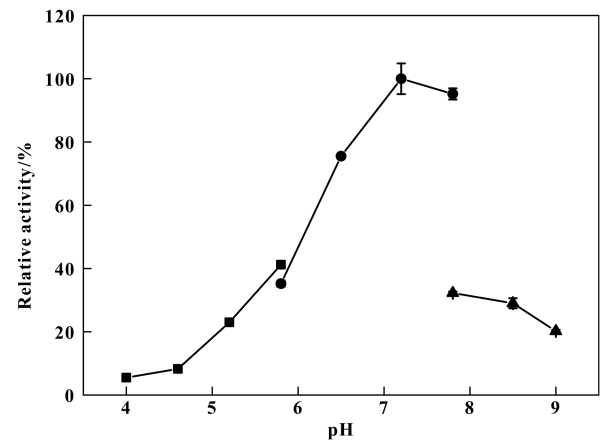


图 4 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 在不同 pH 下的相对酶活
Fig.4 Relative enzyme activity of *E.coli* BL21(DE3)-NIT under different pH
(Tris-HCl(■)，PBS(●) and Citricacid-Sodium citrate(▲))

冲液中均保持了相对较高的酶活，其中在 pH 7.2 时酶活最高；而在 pH 过高或过低的 Tris-HCl 缓冲体系和柠檬酸-柠檬酸钠缓冲体系中，重组菌的酶

活损失严重. 另外, 重组菌在相同 pH 的不同缓冲液体系中表现出了较大的酶活差异, 这可能是由不同离子对重组菌酶活产生了不同的影响.

如图 5 所示, 在不同 pH 下重组菌酶活的半衰期实验中, 在 pH 6.5、7.2、7.8 下, 酶活半衰期分别为 78.8、150.7 和 91.2 h. 因此, 我们选择酶活和稳定性最好的 pH 7.2 作为后续转化研究的 pH 条件.

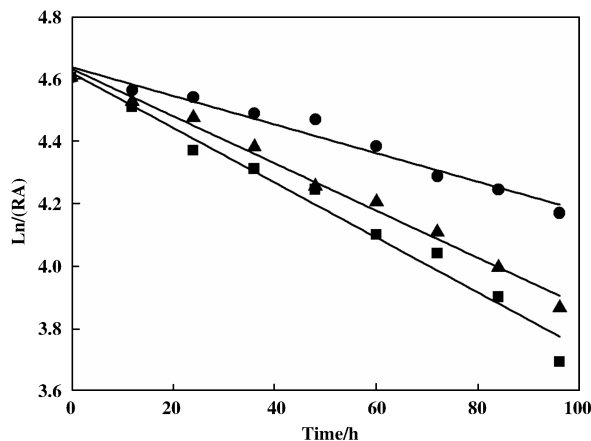


图 5 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 在 pH 6.5(■), 7.2(●) 和 7.8(▲) 下的酶活稳定性

Fig.5 pH stability of *E.coli* BL21(DE3)-NIT under pH 6.5(■), 7.2(●) and 7.8(▲)

2.4 金属离子对 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 酶活影响

金属离子对生物催化剂也会产生重要影响, 我们考察了亚铁离子、铁离子、钡离子、铝离子、锰离子、铅离子、锂离子、镍离子、银离子、铈离子、镁离子、铜离子、锌离子、钙离子、锡离子、钴离子分别在反应体系内终浓度 1 和 5 mmol/L 的条件下, 重组菌酶活的差异.

如图 6, 在不同浓度和金属离子环境条件下, 重组菌酶活产生了明显差异. 其中, 在银离子存在下, 重组菌完全检测不到酶活, 这与腈水解酶的催化机制相符, 银离子属于巯基结合试剂, 能够结合腈水解酶催化三联体中的 Cys, 使其完全丧失酶活, 而来自于 *P. abyssi*^[12] 和 *F. solani* O1^[13] 的腈水解酶的实验结果也与本研究基本一致; 另外, 锂、镍、镁、锡、钴等离子表现出对重组菌酶活较好的促进作用, 提升幅度超过了 50%, 其中 1 mmol/L 镁离子对酶活的促进作用最显著, 提升幅度达到 97%; 当金属离子终浓度达到 5 mmol/L 时, 酶活均出现了不同程度的下降.

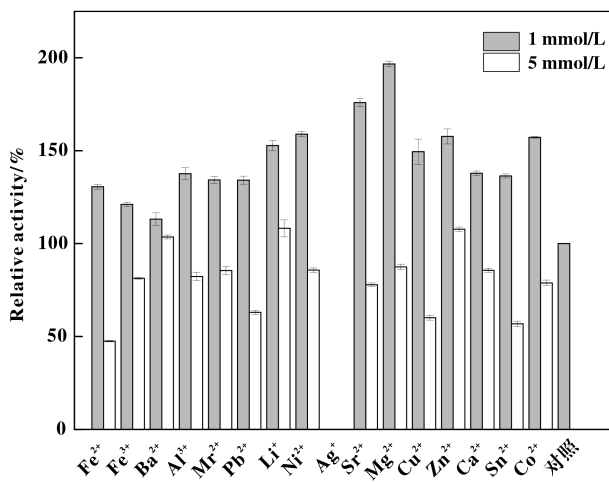


图 6 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 在 1 mmol/L(■) 和 5 mmol/L(□) 的不同金属离子下的相对酶活

Fig.6 Relative enzyme activity of *E.coli* BL21(DE3)-NIT under 1 mmol/L(■) and 5 mmol/L(□) of different metal ions

2.5 有机溶剂对 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 酶活影响

在腈水解酶的底物谱中, 多种腈类底物在水中的溶解度较差, 在一些转化反应中, 可能需通过添加一些有机助溶剂来促进底物的溶解以加速反应. 因此, 我们也选取了一些常见的有机溶剂(甲醇、乙醇、1,2-丙二醇、正丁醇、正戊醇和二氯甲烷), 考察 5%(V/V) 和 20%(V/V) 浓度下对重组菌酶活的影响. 由图 7 可知, 甲醇、正丁醇、正戊醇和二氯

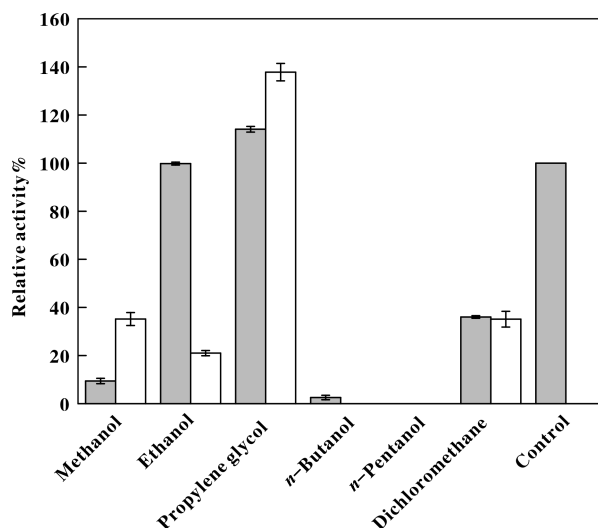


图 7 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 在 5%(V/V)(■) 和 20%(V/V)(□) 的不同有机溶剂下的相对酶活

Fig.7 Relative enzyme activity of *E.coli* BL21(DE3)-NIT under 5%(V/V)(■) and 20%(V/V)(□) of different organic reagents

甲烷在两种浓度下均表现出对重组菌酶活强烈的抑制作用，特别是在正丁醇和正戊醇存在下，酶活几乎完全丧失。然而，1,2-丙二醇在两种浓度下均能提升酶活，相对酶活分别达到 114% 和 138%。

2.6 批次投料合成烟酸

为研究该重组菌的转化潜能，我们考察了静息细胞对 3-氰基吡啶的生物转化情况。将发酵液中菌体离心分离并制备静息细胞，转入 100 mL 转化体系，以 pH 7.2、100 mmol/L 的磷酸钠缓冲液为反应介质，以 200 mmol/L 3-氰基吡啶为投料浓度，在 30 ℃、220 r/min 条件下完成批次转化。

如图 8 所示，在 280 min 内转化了 24 批次的 3-氰基吡啶，烟酸终浓度达到了 590 g/L。其中，在前 22 批的投料反应中，底物均在 10 min 内被完全转化，之后转化速度明显下降，最后两批底物均在 30 min 内完成转化，通过 HPLC 检测转化体系中无底物残留。

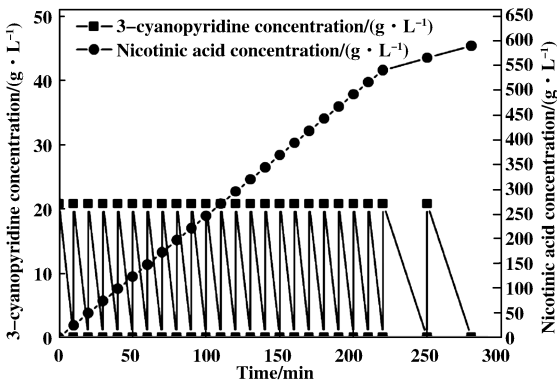


图 8 利用 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 进行批次投料转化合成烟酸

Fig.8 Fed-batch mode for synthesis of nicotinic acid with *E.coli* BL21(DE3)-NIT

3 结论

我们为降低生产成本和提高工艺效率，对产腈水解酶的 *E.coli* BL21(DE3)-NIT 进行了 pH-stat 补料高密度发酵，重组大肠杆菌最高 DCW 达到了 61.97 g/L，最高酶活达到了 558.6 U/mL。并且，通过对重组菌在不同环境条件下催化性质的研究，对该酶的催化潜能有了更深入的了解，为工艺优化以及应用提供了数据支撑。最后，我们考察了该菌株对 3-氰基吡啶的转化能力，通过批次投料反应，重组菌静息细胞在 280 min 内转化获得了 590 g/L 的

产物，是截至目前文献报道的生物法合成烟酸最高水平。然而，高密度发酵周期仍然偏长，培养基条件对于工业应用也有待进一步优化，未来研究可从这两方面进一步提升该腈水解酶的应用潜力，以更好地适应工业化生产的需要。

参考文献：

[1] Charles B. Catalysis in the nitrilase superfamily[J]. *Curr Opin Struc Biol*, 2002, **12**(6): 775-782.

[2] Helen C P, Charles B. The nitrilase superfamily: Classification, structure and function[J]. *Genome Biol*, 2001, **2**(1): 1-9.

[3] a. Gong J S, Lu Z M, Li H, *et al.* Metagenomic technology and genome mining: Emerging areas for exploring novel nitrilases[J]. *Appl Micro Biotechnol*, 2013, **97**(15): 6603-6611.

b. Zheng Li-na(郑丽娜), Xin Jia-ying(辛嘉英), Wang Yan(王艳), *et al.* Research progress on the influence of microwave on enzyme-catalyzed reactions and the microwave effect(微波对酶催化反应的影响及其微波效应的研究进展)[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2017, **31**(6): 567-574.

[4] Chuck R. Technology development in nicotinate production[J]. *Appl Catal A-Gen*, 2005, **280**(1): 75-82.

[5] Dong T T, Gong J S, Gu B C, *et al.* Significantly enhanced substrate tolerance of *Pseudomonas putida* nitrilase via atmospheric and room temperature plasma and cell immobilization[J]. *Biore Technol*, 2017, **244**(1): 1104-1110.

[6] Velankar H, Clark K G, Preez R D, *et al.* Developments in nitrile and amide biotransformation processes [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, **28**(11): 561-569.

[7] Lee S Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*[J]. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(3): 98-105.

[8] Gong J S, Li H, Zhu X Y, *et al.* Fungal His-tagged nitrilase from *Gibberella intermedia*: Gene cloning, heterologous expression and biochemical properties [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**(11): e50622.

[9] Banerjee A, Kaul P, Banerjee U C. Enhancing the catalytic potential of nitrilase from *Pseudomonas putida* for stereoselective nitrile hydrolysis[J]. *Appl Micro Biotechnol*, 2006, **72**(1): 77-87.

[10] Prasad S, Misra A, Prakash V J, *et al.* A propionitrile-induced nitrilase of *Rhodococcus* sp. NDB 1165 and its application in nicotinic acid synthesis[J]. *World J Micro Biot*, 2007, **23**(3): 345-353.

- [11] Babu V, Shilpi, Choudhury B. Nitrile-metabolizing potential of *Amycolatopsis* sp. HTR215[J]. *Proce Biochem*, 2010, **45**(6): 866–873.
- [12] Mueller P, Egorova K, Vorgias C E, *et al.* Cloning, overexpression, and characterization of a thermoactive nitrilase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*[J]. *Prote Expre Purif*, 2006, **47**(2): 672–681.
- [13] Vejvoda V, Kaplan O, Bezouska K, *et al.* Purification and characterization of a nitrilase from *Fusarium solani* O1[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2008, **50**(2/4): 99–106.

The Fermentation Process of a Nitrilase-producing Strain and Its Catalytic Properties

GU Bing-chen¹, GONG Jin-song^{1*}, LONG Hua³, HAN Xiao¹, ZHANG Qiang¹,
LIU Qing-hua³, LI Zi-yun³, XU Zheng-hong^{1,2}, SHI Jin-song¹

(1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

3. Shandong Kunda Biotechnology Co., Ltd, Linyi 276400, China)

Abstract: In order to promote the application potential of nitrilase for production of nicotinic acid, we conducted the high cell-density cultivation of a nitrilase-producing recombinant strain *E.coli* BL21(DE3)-NIT, setting pH-stat as the feeding strategy. And results showed that the highest OD₆₀₀ of 136.8 (the dry cell weight of 61.97 g/L) and the highest enzyme activity of 558.6 U/mL were achieved. Then we investigated the catalytic properties of *E.coli* BL21(DE3)-NIT under varied circumstance, including the effects of temperature, pH, and metal ions on conversion reaction. Finally, we carried out the conversion of 3-cyanopyridine with the fed-batch mode, with the resting cells prepared from HCDC, at 30 °C, pH 7.2. Finally, 24 batches of 200 mmol/L of 3-cyanopyridine were converted to nicotinic acid in 280 min, which accumulated the nicotinic acid concentration of 590 g/L. This is the highest level reported in literature on biosynthesis of nicotinic acid to date.

Key words: nitrilase; fermentation process; nicotinic acid; 3-cyanopyridine