

文章编号: 1006-3080(2025)02-0209-10

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20240320001

葡萄糖酸钠流加工工艺促进红球菌腈水合酶发酵表达

张国辉^{1,2}, 刘禹轩^{1,2}, 刘燕枝¹, 谢嘉怡¹, 栗波¹, 张思楠^{1,2}, 王泽建¹, 吴诗勇^{2,3}

(华东理工大学 1. 生物反应器工程国家重点实验室; 2. 煤液化气化及高效低碳利用全国重点实验室;
3. 含碳废弃物资源化利用与碳中和教育部工程研究中心, 上海 200237)

摘要:首先, 考察了不同质量浓度的葡萄糖和氯化钴对腈水合酶(NHase)合成的影响, 结果表明当葡萄糖质量浓度为 20 g/L、氯化钴质量浓度为 0.050 g/L 时, NHase 的表达水平得到了显著提升; 其次, 建立了基于发酵过程生理代谢参数采集与分析系统, 通过多参数相关性分析得出 pH 是影响红球菌 NHase 表达的关键因素, 从而提出了发酵过程中流加葡萄糖酸钠控制 pH 的策略。结果表明, 与分批发酵工艺相比, 优化后的工艺在菌体浓度相同的情况下, 总酶活提高了 93.74%, 比酶活提高了 97.35%, 糖转化率提高了 71.36%。本研究结果为工业生产中提高 NHase 产量提供了理论指导。

关键词:腈水合酶; 红球菌; 多参数相关性分析; 葡萄糖酸钠; 发酵

中图分类号:Q815

文献标志码:A

腈水合酶(NHase)是腈分解代谢的关键酶之一, 它能催化脂肪族腈或芳香族腈转化为相应的酰胺。自从大约 40 年前 Asano 等^[1]在 *Arthrobacter* sp. J1(即红球菌 J1, *Rhodococcus rhodochrous* J1)细菌中首次检测到 NHase 以来, NHase 就受到了学术界和工业界的关注, 并迅速成为研究热点, 掀起了丙烯酰胺(AM)的生物合成浪潮^[2]。目前, 分别通过 NHase 对丙烯腈(AN)和 3-氰基吡啶的水合作用实现 AM 和烟酰胺的工业生产。AM 是聚丙烯酰胺(PAM)的合成单体, PAM 在石油开采、水处理、皮革工业等领域具有多种应用^[3]。NHase 将 AN 水合为 AM 的工业应用是生物催化领域最成功的案例之一。

NHase 存在于多种微生物^[4], 如芽孢杆菌^[5]、诺卡氏菌和微杆菌^[6]等中。来自于红球菌 *Rhodococcus* sp. N774、马红球菌 *Bacillus* sp. BR449、红球菌 *Rhodococcus equi* TG328-2、红球菌 *Rhodococcus* sp. M8 和恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 5B 中的 NHase, 也在外源宿主如大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中

成功表达^[7-10]。但与这些宿主相比, 某些红球菌菌株, 例如红球菌 M8、红球菌 J1^[11] 和红球菌 TH, 由于它们具备高 NHase 活性、耐热性和在有机溶剂中有良好的稳定性等优异性能, 而被广泛地应用于对 AN 的生物转化中^[12-13]。

AM 市场广阔, 近年来在开发含有 NHase 的红球菌作为生产 AM 的“主力军”方面取得了快速进展, 但先前的研究主要集中在 NHase 的表达、结构、催化性质、分子特征、催化机制和生物修复等方面, 鲜有如何优化红球菌发酵过程从而提高 NHase 产量的研究^[14]。

本文使用 50 L 生物反应器对红球菌进行培养, 发酵过程中尾气中的氧气和二氧化碳含量采用尾气过程质谱仪(MAX300-LG 型, 美国 Extrel 公司)进行实时检测, 利用多参数相关性分析剖析了影响红球菌 NHase 表达的关键制约因素。在此基础上, 本文提出了葡萄糖酸钠流加工工艺的优化策略并提高了 NHase 的表达量。

收稿日期: 2024-03-20

基金项目: 国家重大专项项目资助项目(2020YFA0906800); 国家自然科学基金(32071471)

作者简介: 张国辉(2000—), 男, 河南人, 硕士生, 主要研究方向为微生物发酵工程。E-mail: zghuber@163.com

通信联系人: 吴诗勇, E-mail: wsy@ecust.edu.cn; 王泽建, E-mail: wangzejian@ecust.edu.cn

引用本文: 张国辉, 刘禹轩, 刘燕枝, 等. 葡萄糖酸钠流加工工艺促进红球菌腈水合酶发酵表达[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(2): 209-218.

Citation: ZHANG Guohui, LIU Yuxuan, LIU Yanzhi, et al. Promoting the Fermentation Expression of Nitrile Hydratase in *Rhodococcus rhodochrous* by the Fed Batch Process of Sodium Gluconate[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(2): 209-218.

1 材料与方法

1.1 实验菌株

菌株 *Rhodococcus rhodochrous* J1 来源于山东诺尔生物科技有限公司。

1.2 培养基

活化培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母浸粉 3.25, 尿素 7.00, K_2HPO_4 0.50, KH_2PO_4 0.50, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50, 味精 1.00, 琼脂 15, pH 7.0。

种子及摇瓶培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母浸粉 3.25, 尿素 7.00, K_2HPO_4 0.50, KH_2PO_4 0.50, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01, 味精 1.00, pH 7.0。

5 L、30 L 罐发酵培养基(g/L): 葡萄糖 21.16, 酵母浸粉 8.08, 尿素 9.23, K_2HPO_4 3.00, KH_2PO_4 0.74, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.74, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01, 味精 0.92, pH 7.0~8.0, 消泡剂 0.38 mL。

50 L 罐发酵培养基(g/L): 葡萄糖 35, 酵母浸粉 4.90, 尿素 9.00, K_2HPO_4 3.00, KH_2PO_4 1.14, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.50, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02, 味精 1.00, pH 7.0~8.0, 消泡剂 12 mL。

优化后发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母浸粉 8.08, 尿素 9.23, K_2HPO_4 3.00, KH_2PO_4 0.74, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.74, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05, 味精 0.92, pH 7.0~8.0, 消泡剂 0.38 mL。

补料培养基: 葡萄糖酸钠 20 g/L。

1.3 培养条件

1.3.1 菌种活化 将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的红球菌甘油管取出, 接种于装有 150 mL 种子培养基的 500 mL 锥形瓶中, 于 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床 220 r/min 培养 48 h 左右取出, 在超净工作台使用无菌接种环蘸取菌液划线于含有 50 mL 固体斜面培养基的 250 mL 茄子瓶中, 然后于 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 于恒温培养箱中培养, 直至斜面上覆盖密集的红球菌菌落。

1.3.2 摇瓶发酵培养 将活化后的红球菌菌落接种到含 150 mL 培养基的 500 mL 锥形瓶中, 在恒温摇床中 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 120 h 左右, 当总酶活不再提高或下降时停止发酵。

1.3.3 5 L 生物反应器发酵培养 将活化后的红球菌菌落接种到含 150 mL 培养基的 500 mL 锥形瓶中, 在恒温摇床中 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 48 h 左右获得一级种子。将一级种子按 10% 的接种量接种到含 225 mL 培养基的 1000 mL 锥形瓶中, 在恒温摇床中 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 48 h 左右获得二级种子。将培养好的二级种子经火焰保护接种到 5 L 罐中, 罐体和罐中的

培养基已提前经过灭菌处理。发酵条件为温度 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、通气量 0.8 vvm、转速 400 r/min、罐压 $\leq 0.05\text{ MPa}$, 当发酵液中的葡萄糖质量浓度低于 5 g/L 时停止发酵。

1.3.4 50 L 生物反应器发酵培养 将活化后的红球菌菌落接种到含 400 mL 培养基的 1000 mL 锥形瓶中, 在恒温摇床中 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 48 h 左右获得一级种子。将培养好的一级种子经火焰保护接种到含 15 L 发酵培养基的 30 L 罐中, 罐体和罐中的培养基已提前经过 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min。在温度 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、初始通气量 1.1 vvm、转速 300 r/min 条件下培养 24 h 获得二级种子。将培养好的二级种子按 10% 的接种量无菌接入含 27 L 发酵培养基的 50 L 罐中, 罐体和罐中的培养基已提前经过 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min。发酵条件为温度 $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、通气量 1.2 vvm, 转速 400 r/min, 罐压 $\leq 0.05\text{ MPa}$, 发酵至 48 h 停止发酵。

1.4 实验方法

1.4.1 葡萄糖和氯化钴质量浓度优化 向摇瓶培养基中添加不同质量浓度葡萄糖(0、5、10、20、30 g/L)和 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.0005、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 g/L), 研究了二者对脲水合酶合成的影响。

1.4.2 50 L 生物反应器发酵培养 在 50 L 生物反应器中进行分批发酵, 发酵第 46 h 补加 w 为 50% 氨水, 使发酵液的 pH 维持在 6.2, 直至发酵结束。

1.4.3 pH 缓冲物质的筛选 向摇瓶培养基中分别添加 2 g/L 葡萄糖酸钠、2 g/L 柠檬酸钠、2 g/L 无水碳酸钙、2 g/L 氧化镁, 不添加任何物质的实验组作为对照组。

1.4.4 不同初始葡萄糖酸钠质量浓度对 NHase 合成的影响 向摇瓶培养基中分别加入 0、5、10、15、20、25 g/L 葡萄糖酸钠, 研究了初始添加不同质量浓度葡萄糖酸钠对红球菌生长和 NHase 合成的影响。

1.4.5 酶开始合成期一次性补加不同质量浓度葡萄糖酸钠对 NHase 合成的影响 摇瓶发酵第 24 h, 向摇瓶中分别补加 0、10、15、20、25 g/L 葡萄糖酸钠, 研究了葡萄糖酸钠一次性补加工工艺对红球菌发酵过程的影响。

1.4.6 补料分批发酵 在 5 L 发酵罐中进行补料分批发酵实验, 实验组在 NHase 刚开始合成时期(16 h)通过蠕动泵以 0.36 mL/min 的补料速率开始流加 300 g/L 的葡萄糖酸钠, 发酵 24 h 时停止补加, 共补加约 20 g/L 葡萄糖酸钠, 对照组不补加葡萄糖酸钠。两组实验同时在葡萄糖剩余质量浓度低于 5 g/L 时停止发酵。

1.5 分析方法

1.5.1 葡萄糖质量浓度的测定 将发酵液稀释一定倍数, 使得测定样品的葡萄糖质量浓度小于 1.00 g/L,

再通过 SB-40C 生化分析仪进行葡萄糖质量浓度的测定。

1.5.2 菌体生长的测定 使用 721 型可见分光光度计测定 600 nm 波长下发酵液的吸光度,通过将发酵液稀释一定的倍数使吸光度在 0.2~0.8 之间,菌体生长的情况用发酵液吸光度值(OD_{600})来反映。

1.5.3 NHase 酶活的测定 将 0.5 mL 的发酵液加入到含有 19.5 mL 的磷酸二氢钾溶液($pH=7.5$)的锥形瓶中,将锥形瓶摇匀后置于 28 °C 恒温水浴锅中开启振荡,移取 1 mL 丙烯腈加入锥形瓶中,并同时开启计时,反应 5 min,然后加入 0.2 mL 的盐酸(4 mol/L)终止反应。反应结束,将 1 mL 反应液与 1 mL 乙酰胺(0.05 g/mL)溶液进行混合。

通过气相色谱仪(7820A 型,美国 Agilent Technologies 公司,Agilent Q 30.0 m $\times$ 0.250 mm $\times$ 0.25 μ m 毛细管柱)进行 AM 的测定,气相色谱操作条件为:后进样口加热器温度 200 °C,压力 7.94×10^4 Pa;载气氮气,分流比为 25:1,分流流量 37.5 mL/min;柱箱温度 190 °C,保持时间 5 min,最高柱温 260 °C;FID 检测器,温度 200 °C。最后根据内标法^[15]进行 AM 含量的计算。

NHase 活性计算公式为:

$$E = \frac{A_1 \times V \times 50\,000}{A_2 \times K \times V_0 \times t \times M}$$

式中: E 为 NHase 活性, U/mL; A_1 为 AM 的峰面积; A_2 为内标物乙酰胺的峰面积; K 为内标常数,数值为 1.647; V 为总体积, 20 mL; V_0 为实际加入的菌液体积, mL; t 为反应时间, min; M 为 AM 的相对分子量。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖和氯化钴质量浓度优化

红球菌在生长和合成 NHase 的过程中会消耗葡萄糖^[16],同时实验用红球菌所产的胍水合酶为钴型胍水合酶, NHase 活性表达也受到钴离子的调节^[17],所以葡萄糖和 Co^{2+} 质量浓度对于酶的合成至关重要。

图 1 所示为摇瓶实验发酵至 72 h 的结果。当培养基中无葡萄糖时,菌体几乎不生长,并且没有酶的合成,说明葡萄糖是红球菌发酵过程中必不可少的营养元素。随着葡萄糖质量浓度的升高,菌体浓度和酶活也逐渐升高,当葡萄糖质量浓度为 20 g/L 时,菌体浓度最高且总酶活最大(4400.98 U/mL)。当葡萄糖质量浓度进一步增加时,菌体浓度降低并且总酶活也随之降低,这说明过高质量浓度的葡萄糖会对菌体生长和 NHase 的合成产生抑制作用,因此培

养基中葡萄糖最佳质量浓度为 20 g/L。

随着氯化钴质量浓度的增加,发酵结束的总酶活也随之提高,当培养基中氯化钴质量浓度为 0.000 5 g/L 时,发酵结束时总酶活仅为 1621.46 U/mL;当氯化钴质量浓度提高至 0.050 g/L 时,总酶活达到 5836.52 U/mL(图 1(b)),较最低浓度时的酶活提高了 259.95%。但当氯化钴质量浓度进一步提高时,总酶活的提高十分有限,因此氯化钴最佳质量浓度为 0.050 g/L。

2.2 红球菌发酵过程多参数采集与分析

本文在 50 L 生物反应器中重现工业生产中红球菌发酵工艺,通过使用实时监测软件收集并计算所有参数进行关联分析,以找出分批发酵过程中的限制因素,二氧化碳释放率(CER)和摄氧率(OUR)通过相关公式计算得出^[18]。

图 2 所示为红球菌发酵过程曲线,生理参数如 CER 和 OUR 在延滞期(0~4 h)增加十分缓慢,在 5~13 h, OUR 和 CER 随着细胞生长而增加,与此同时 pH 急剧下降,这是因为菌体生长会消耗葡萄糖,同时会产生有机酸等副产物降低发酵液的 pH^[19]。随着 pH 进一步降低, OUR 和 CER 在 13~16 h 急剧下降,随后趋于平稳,因此猜测 OUR 和 CER 的降低可能是因为 pH 的变化导致。

从酶活的变化曲线可以看出,在发酵前中期(0~20 h),菌体不合成 NHase,而在 20 h 之后,酶开始合成,并且在 24~32 h 快速合成,这表明菌体浓度是这一时期对酶活的限制因素^[18]。发酵 32 h 之后,酶活几乎没有变化, NHase 停止合成,这可能是因为发酵液中的 pH 过低,在酸性环境的胁迫下,菌体细胞膜上的 pH 梯度降低, H^+ 转运受到阻碍,从而限制了 NHase 的合成^[20]。

过程参数变化曲线表明发酵过程中 pH 的变化会影响菌体呼吸代谢的强度,从而影响 NHase 的合成^[21]。为了进行验证,发酵至 46 h 向发酵罐中补加 w 为 50% 氨水,随着氨水的加入,发酵液的 pH 快速上升,同时 OUR 和 CER 也迅速提高,酶重新启动合成,这说明在发酵后期 NHase 无法继续快速合成是发酵液中的 pH 过低导致,因此对发酵过程中 pH 的控制十分重要。

2.3 pH 缓冲物质的筛选

通过 50 L 发酵罐对红球菌进行培养,实验结果显示,红球菌生长过程中会耗糖产酸引起 pH 降低导致 NHase 合成受限,因此通过对发酵培养基进行调整,添加一系列能稳定发酵过程中 pH 的物质,从而促进 NHase 的发酵表达。

如图 3(a) 结果所示,这些物质的添加都能在一

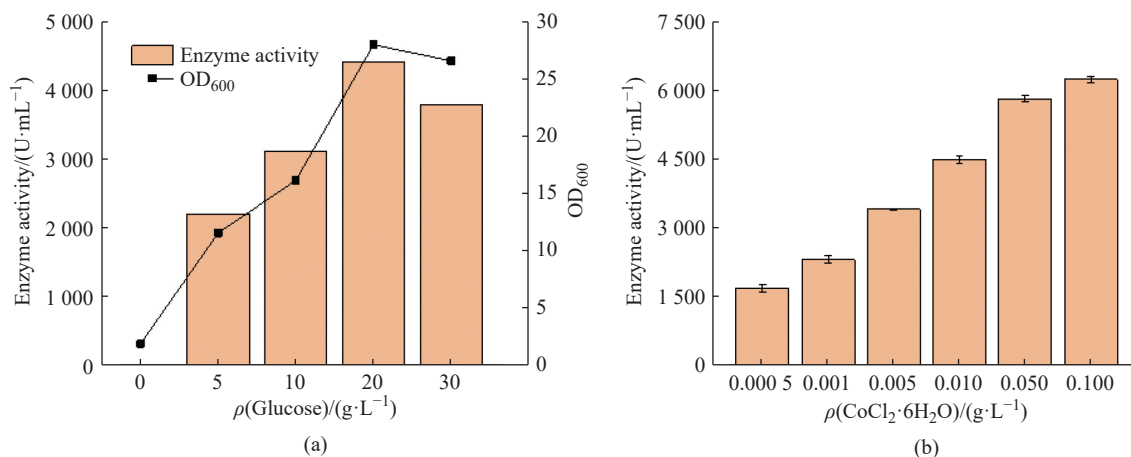


图 1 不同质量浓度葡萄糖和氯化钴对红球菌 J1 生长和 NHase 合成的影响

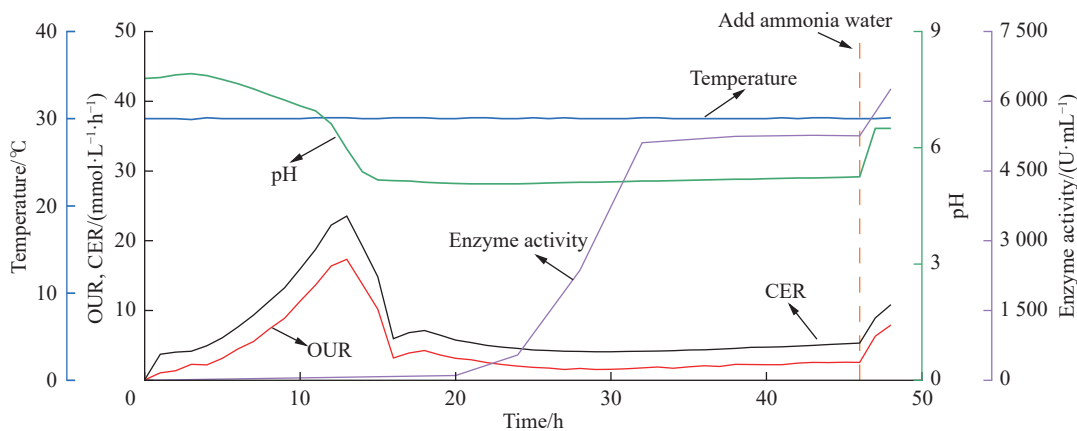
Fig. 1 Effects of different concentrations of glucose and cobalt chloride on growth and NHase synthesis of *R. rhodochrous* J1

图 2 红球菌 J1 分批发酵过程参数变化

Fig. 2 Parameter changes during the batch fermentation process of *R. rhodochrous* J1

定程度上控制发酵过程中溶液的 pH, 使得溶液中的 pH 不至于过低从而限制 NHase 的合成。在 0~72 h, 葡萄糖酸钠的添加能将 pH 控制在 6.6~7.5 范围内, 柠檬酸钠和碳酸钙钠的添加则使得发酵过程中的 pH 总体偏高。氧化镁添加钠的实验组在发酵中 pH 变化较平稳, 但根据图 3(b)~3(d) 的实验结果来看, 氧化镁的添加抑制了红球菌的生长和 NHase 的合成, 使得发酵结束后的 OD₆₀₀ 和总酶活都远低于对照组。柠檬酸钠和碳酸钙虽然都能在一定程度上控制溶液的 pH^[22], 但它们都会抑制红球菌的生长和 NHase 的合成。而适宜浓度葡萄糖酸钠的添加则不影响红球菌的生长, 发酵结束后的 OD₆₀₀ 与对照组无明显差异, 且发酵结束后的总酶活达到 3844 U/mL, 较对照组提高了 27.3%, 这可能是因为葡萄糖酸钠能被红球菌利用, 直接或间接参与了 NHase 的合成^[23], 因此选用葡萄糖酸钠作为发酵过程中 pH 的调控物质。

2.4 不同初始质量浓度葡萄糖酸钠对红球菌发酵过程的影响

实验发现葡萄糖酸钠的添加能促进 NHase 的合

成, 在初始发酵培养基中分别加入不同质量浓度的葡萄糖酸钠, 探究不同初始质量浓度葡萄糖酸钠对红球菌生长和 NHase 合成的影响。

如图 4(a) 所示, 当葡萄糖酸钠初始添加质量浓度为 15 g/L 时, 发酵过程中的整体 pH 最适于红球菌生长, 当质量浓度进一步提高时, 发酵过程中的 pH 也逐渐变高, 添加过多的葡萄糖酸钠会导致发酵液中的 pH 太高。实验组发酵至 60 h 以后 pH 开始升高, 原因是发酵液中的葡萄糖质量浓度不足导致^[19]。

如图 4(b) 实验结果显示, 0~60 h 范围内, 实验组菌体浓度略低于对照组, 60 h 后实验组 OD₆₀₀ 均高于对照组, 这是因为 60 h 后对照组发酵液中的葡萄糖酸钠质量浓度不足, 菌体缺乏可供生长的碳源, 无法继续生长, 但实验组中的葡萄糖酸钠可作为第二碳源继续为菌体生长提供所需的能量, 其中当其添加质量浓度为 15 g/L 时, 菌体生长最优。

补加不同质量浓度葡萄糖酸钠后, 统计结果(图 4(c))显示, 发酵至 84 h, 对照组糖转化率($Y_{p/s}$)达到了 170.20 U/mg, 葡萄糖酸钠添加质量浓度 15 g/L

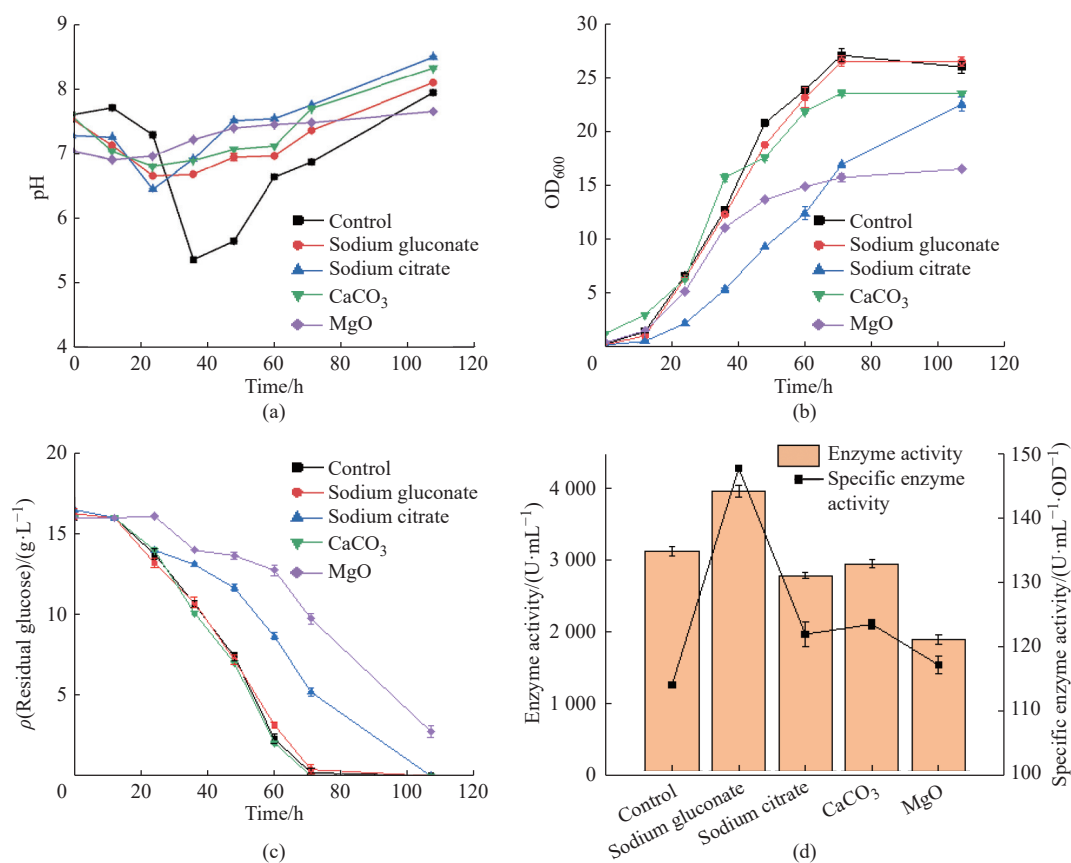


图3 红球菌 J1 发酵过程添加不同物质的参数变化

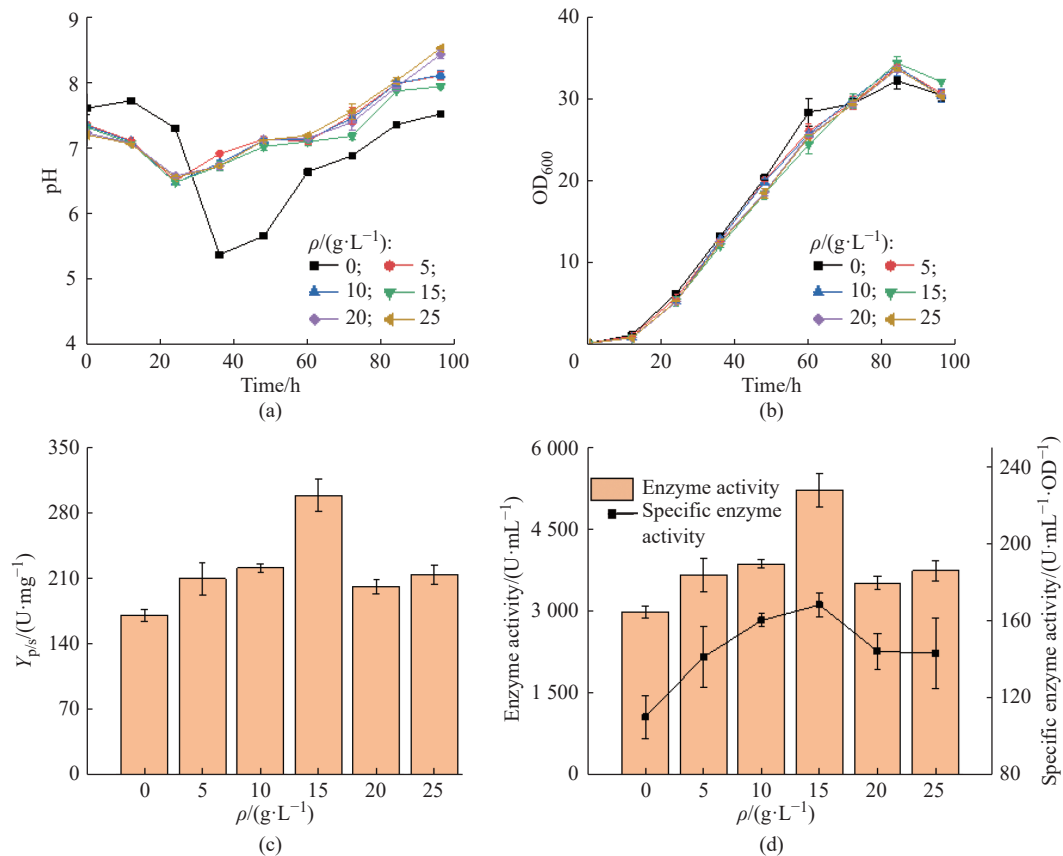
Fig. 3 Parameter changes of adding different substances during fermentation process of *R. rhodochrous* J1

图4 初始添加不同质量浓度葡萄糖酸钠的发酵过程参数变化

Fig. 4 Parameter changes with the initial addition of different mass concentrations of sodium gluconate in the fermentation process

时的糖转化率为 298.23 U/mg, 比不添加的对照组提高 75.22%(图 4(c))。

随着初始葡萄糖酸钠添加质量浓度的增加, 最终酶活和比酶活也呈现增高的趋势, 其中添加 15 g/L 的葡萄糖酸钠实验组总酶活最高, 达到了 5433 U/mL, 较对照组 2978 U/mL 提高了 82.44%; 此时, 比酶活最高达到了 173 U/mL, 较对照组 118 U/mL 提高了 46.61%(图 4(d))。因此, 在培养基中初始添加 15 g/L 葡萄糖酸钠能有效提高酶活和糖转化率。

2.5 NHase 合成时期一次性补加葡萄糖酸钠对 NHase 合成的影响

在菌体刚开始合成 NHase 时段一次性补加葡萄糖酸钠, 探究葡萄糖酸钠一次性补加工工艺对红球菌发酵过程中菌体生长、耗糖速率、NHase 合成的影响。

图 5(a) 所示为补加不同质量浓度葡萄糖酸钠时 pH 变化情况。在 0~24 h 时, 由于未添加葡萄糖酸钠, 实验组和对照组 pH 的变化基本保持一致。24 h 后, 随着不同质量浓度葡萄糖酸钠的补加, 两组发酵液的 pH 出现差异, 葡萄糖酸钠补加组的 pH 开始高于对照组, 发酵 36 h 时对照组 pH 达到最低(5.36), 此时严重影响了 NHase 的合成, 而实验组 pH 都在 6.5

左右。且在 48~96 h 内, 实验组的 pH 都能控制在 7.2 左右。

在发酵 24 h 时一次性添加葡萄糖酸钠, 菌体生长受到一定的抑制, 且添加的葡萄糖酸钠质量浓度越高, 菌体生长受到的抑制越大; 但在发酵后期, 当一次性添加葡萄糖酸钠质量浓度为 20 g/L 时, 菌体生长情况最好(图 5(b))。

补加葡萄糖酸钠前, 各组的糖耗速率基本保持一致, 而在 24 h 时一次性补加葡萄糖酸钠质量浓度为 20 g/L 条件下, 实验组的糖耗速率均下降且低于对照组, 图 5(c) 表明, 发酵 132 h, 对照组糖转化率达到了 153.91 U/mg, 一次性葡萄糖酸钠添加 20 g/L 时的糖转化率为 273.64 U/mg, 比不添加的对照组提高 77.79%。

发酵结束总酶活结果表明, 一次性添加 20 g/L 的葡萄糖酸钠酶活总体最高, 最终酶活最高达到了 5473 U/mL, 较对照组(3078 U/mL)提高了 77.81%; 此时, 比酶活最高达到了 214 U/mL, 较对照组(125 U/mL)提高了 71.20%(图 5(d))。因此在 NHase 开始合成时期一次性添加 20 g/L 葡萄糖酸钠能有效提高酶活和糖转化率。

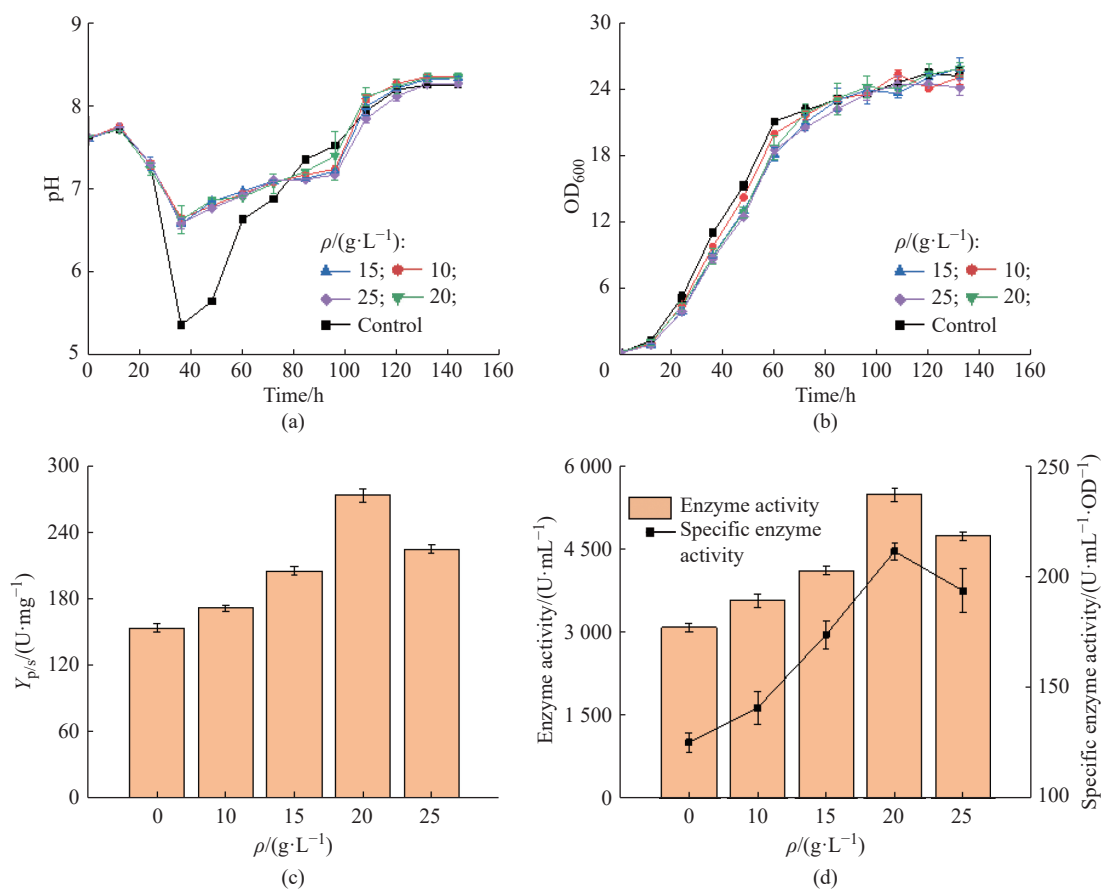


图 5 红球菌 J1 发酵 24 h 添加不同质量浓度葡萄糖酸钠的参数变化

Fig. 5 Parameter changes in the addition of different mass concentrations of sodium gluconate at 24 h of fermentation of *R. rhodochrous* J1

在培养基中初始添加葡萄糖酸钠和在 NHase 开始合成时一次性添加葡萄糖酸钠都能有效提高酶活。培养基中初始添加 15 g/L 的葡萄糖酸钠最终酶活最高达到了 5433 U/mL, 比酶活最高达到了 173 U/mL (图 4(d)), 而在 NHase 开始合成期一次性添加 20 g/L 的葡萄糖酸钠最终酶活最高达到了 5473 U/mL, 比酶活最高达到了 214 U/mL, 在酶活差异不大的情况下, 比酶活比初始添加时提高了 24% (图 5(d)), 因此选择在发酵过程中 NHase 开始合成时一次性添加葡萄糖酸钠的方式。

2.6 葡萄糖酸钠连续流加工艺促进 NHase 发酵表达

2.6.1 葡萄糖酸钠连续补加对 OUR 和 CER 的影响

为了降低葡萄糖酸钠对红球菌生长的抑制, 选择在发酵过程中葡萄糖酸钠的添加方式为低速率流加。实验在 5 L 发酵罐中进行, 发酵过程中检测 OUR、CER、OD₆₀₀、NHase 酶活力、pH 和发酵液中葡萄糖质量浓度等一系列参数, 过程变化曲线如图 6 所示。

从图 6 可以看出, 生理参数如 CER 和 OUR 在延滞期(0~12 h)增加十分缓慢, 而 12 h 之后, CER 和 OUR 升高的同时, 溶氧(DO)快速下降, OD₆₀₀快速升高, 这说明菌体开始进入对数期。发酵 20 h, 伴随着

菌体快速生长, NHase 也开始合成, 并且以较高的合成速率一直合成到发酵结束。整个发酵过程中 CER 和 OUR 持续升高并保持平稳, 这说明菌体呼吸代谢稳定, 且发酵过程中 pH 始终维持在 6.8~7.2 范围之内, 这表明使用优化后的培养基以及采用葡萄糖酸钠流加的方式, 很好地解决了发酵过程中 pH 过低对于红球菌生长以及 NHase 合成的抑制。

2.6.2 葡萄糖酸钠连续流加对发酵过程菌体生长和 NHase 合成的影响 整个发酵过程中, 葡萄糖酸钠补料组菌体生长不受抑制, 发酵 32 h 葡萄糖酸钠补料组菌体 OD₆₀₀ 测量值为 29.85, 对照组菌体 OD₆₀₀ 测量值为 30.4 (图 7(a)), 说明在发酵过程中采用连续流加的补加方式可以消除发酵液中葡萄糖酸钠浓度高对菌体生长的抑制作用。

发酵前期, 菌体处于延滞期, 生长缓慢且不合成 NHase (图 7(b)), 可能是酶的合成需要相关的前体物质, 菌体在前期无法直接利用培养基中大分子的营养物质, 需要激活相关酶将其分解为小分子的物质才能加以利用^[24], 从而进行酶的合成; 发酵中期, 菌体进入对数生长期, 此时菌体已经合成了生长和酶合成所需的前体物质, 因此伴随着菌体的快速生长,

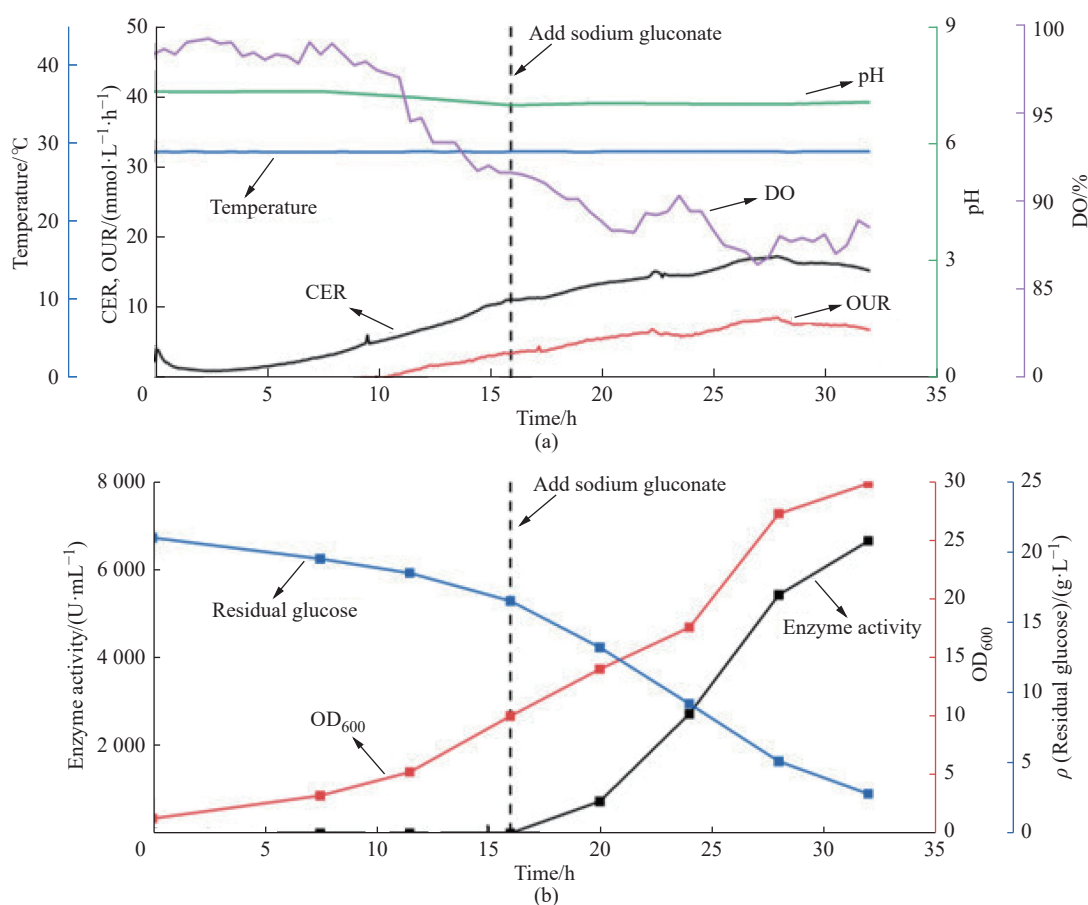


图 6 红球菌 J1 补料分批发酵过程参数变化

Fig. 6 Parameter changes during the fed-batch fermentation of *R. rhodochrous* J1

NHase 也快速合成。根据摇瓶优化结果,在发酵 16 h 即 NHase 开始合成时流加葡萄糖酸钠溶液,根据图 7(b)所示,表明在开始流加葡萄糖酸钠溶液 4 h 后,实验组与对照组的 NHase 合成速率开始出现差异,葡萄糖酸钠补料实验组 NHase 快速合成,且总酶活高于对照组,一直持续到发酵结束,这说明葡萄糖酸钠能有效地促进 NHase 的合成,最终葡萄糖酸钠补加实验组总酶活最高达到 6651 U/mL,对照组总酶活为 3433 U/mL,葡萄糖酸钠补加实验组总酶活较对照组提高了 93.74%。

图 7(c)实验结果表明,在葡萄糖酸钠开始流加后的 4 h 内,比酶活无明显差异,可能是因为补加的葡萄糖酸钠还未被菌体利用,发酵第 20 h 开始,两组之间比酶活开始出现差异,葡萄糖酸钠补加实验组比酶活快速升高且远高于对照组;发酵 28~32 h,对照

组比酶活开始趋于平稳甚至下降,而葡萄糖酸钠补料实验组比酶活仍能以一定的速率升高,说明葡萄糖酸钠有利于维持菌体呼吸代谢的稳定,延缓菌体的衰亡,使得 NHase 合成时间延长。最终葡萄糖酸钠补加实验组比酶活最高达到 223 U/mL,对照组最高达到 113 U/mL,葡萄糖酸钠补加实验组比酶活较对照组提高了 97.35%。

2.6.3 葡萄糖酸钠连续流加工工艺过程的耗糖情况

补加葡萄糖酸钠前,各组的糖耗速率基本保持一致,而开始流加葡萄糖酸钠溶液后,实验组的糖耗速率增快且快于对照组,这是因为葡萄糖酸钠的流加促进了 NHase 的合成,使得更多的葡萄糖用于酶的合成。统计结果表明,发酵 32 h 时,对照组糖转化率达到 213.25 U/mg,葡萄糖酸钠补加实验组的糖转化率为 365.43 U/mg(图 8(a)),比对照组提高了 71.36%。

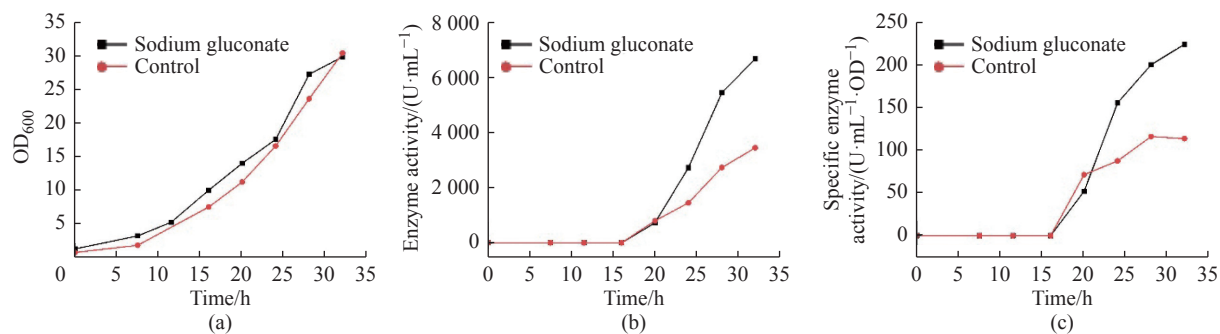


图 7 葡萄糖酸钠连续流加对红球菌 J1 生长和 NHase 合成的影响

Fig. 7 Effect of continuous addition of sodium gluconate on growth and NHase synthesis of *R. rhodochrous* J1

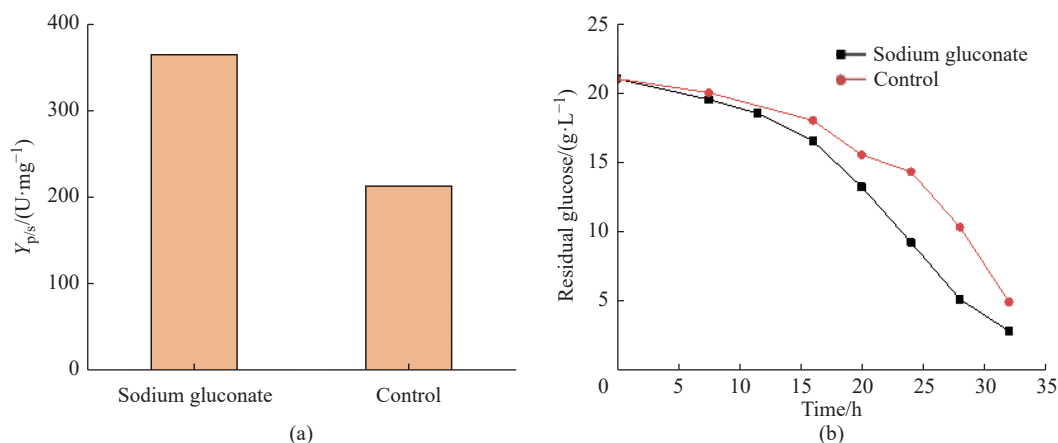


图 8 葡萄糖酸钠连续流加对红球菌 J1 发酵过程耗糖的影响

Fig. 8 Effect of continuous addition of sodium gluconate on glucose consumption during fermentation of *R. rhodochrous* J1

3 结 论

本研究首先发现适宜浓度的葡萄糖和 Co^{2+} 能有效促进 NHase 的合成,其次建立了基于发酵过程生

理代谢参数的采集与分析系统,利用多参数相关性分析剖析了 pH 是影响红球菌胍水合酶表达的关键制约因素,发酵过程中 pH 的变化会影响菌体的呼吸代谢强度以及胍水合酶的合成。本文通过在发酵过程中流加适宜浓度的葡萄糖酸钠,不仅能实现红球

菌 J1 发酵过程中 pH 自控, 并且还能促进 NHase 的合成, 最终葡萄糖酸钠流加工艺使发酵结束后腈水合酶总酶活提高了 93.74%, 比酶活提高了 97.35%, 糖转化率提高了 71.36%。本文的方法为工业生产提高丙烯腈水合酶产量提供了理论指导。

参考文献:

- [1] ASANO Y, FUJISHIRO K, TANI Y, *et al.* Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter* sp. J-1 purification and characterization[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1982, 46(5): 1165-1174.
- [2] KOBAYASHI M, NAGASAWA T, YAMADA H. Enzymatic synthesis of acrylamide: A success story not yet over[J]. Trends in Biotechnology, 1992, 10: 402.
- [3] MA Y, YU H, PAN W, *et al.* Identification of nitrile hydratase-producing *Rhodococcus ruber* TH and characterization of an *amiE*-negative mutant[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 285-291.
- [4] PRASAD S, BHALLA T C. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 725-741.
- [5] KIM S H, ORIEL P. Cloning and expression of the nitrile hydratase and amidase genes from *Bacillus* sp. BR449 into *Escherichia coli*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27(7): 492-501.
- [6] WATANABE I, SATOH Y, ENOMOTO K, *et al.* Screening, isolation and taxonomical properties of microorganisms having acrylonitrile-hydrating activity[J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1987, 51(12): 3193-3199.
- [7] KANG M S, HAN S S, KIM M Y, *et al.* High-level expression in *Corynebacterium glutamicum* of nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* for acrylamide production[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2014, 98(10): 4379-4387.
- [8] WU S, FALLON R D, PAYNE M S. Over-production of stereoselective nitrile hydratase from *Pseudomonas putida* 5B in *Escherichia coli*: Activity requires a novel downstream protein[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 1997, 48(6): 704-711.
- [9] RYABCHENKO L E, PODCHERNYAEV D A, KOTLOVA E K, *et al.* Cloning the amidase gene from *Rhodococcus rhodochrous* M8 and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Russian Journal of Genetics*, 2006, 42(8): 886-892.
- [10] RZEZNICKA K, SCHATZLE S, BTTCHEER D, *et al.* Cloning and functional expression of a nitrile hydratase (NHase) from *Rhodococcus equi* TG328-2 in *Escherichia coli*, its purification and biochemical characterisation[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 85(5): 1417-1425.
- [11] NAGASAWA T, SHIMIZU H, YAMADA H. The superiority of the third-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 40(2/3): 189-195.
- [12] LIANG Y, JIAO S, WANG M, *et al.* Overexpression of epoxide hydrolase in *Rhodococcus ruber* with high robustness for the synthesis of chiral epichlorohydrin[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 79: 49-56.
- [13] YANGZI C, SONG J, MIAOMIAO W, *et al.* A novel molecular chaperone GroEL2 from *Rhodococcus ruber* and its fusion chimera with nitrile hydratase for co-enhanced activity and stability[J]. *Chemical Engineering Science*, 2018, 192: 235-243.
- [14] JIAO S, LI F, YU H, *et al.* Advances in acrylamide bioproduction catalyzed with *Rhodococcus* cells harboring nitrile hydratase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(3): 1001-1012.
- [15] 高俊, 史继诚. 丙烯腈水合酶活性测定方法研究 [J]. 分析科学学报, 2008, 24(1): 108-110.
- [16] 张云天. 利用膜生物反应器微生物转化丙烯酰胺的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨理工大学, 2008.
- [17] LAVROV K V, SHEMYAKINA A O, GRECHISHNIKOVA E G, *et al.* New *cblA* gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous*[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(4/5): 227-236.
- [18] LU F, WANG Z, ZHAO W, *et al.* A simple novel approach for real-time monitoring of sodium gluconate production by online physiological parameters in batch fermentation by *Aspergillus niger*[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 202: 133-141.
- [19] SANCHEZ-CLEMENTE R, GUIJO M I, NOGALES J, *et al.* Carbon source influence on extracellular pH changes along bacterial cell-growth [J]. *Genes*, 2020, 11(11): 1292.
- [20] YUE X, LIU H, WEI H, *et al.* Reactive and microbial inhibitory mechanisms depicting the panoramic view of pH stress effect on common biological nitrification [J]. *Water Research*, 2023, 231: 119660.
- [21] 陈跖, 孙旭东, 史悦, 等. 微生物法生产丙烯酰胺的研究 (I)——腈水合酶产生菌株的培养和高活力的表达 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18(2): 225-230.
- [22] MIURA R, FURUHASHI K, HASEGAWA F, *et al.* Calcium carbonate prevents *Botryococcus braunii* growth inhibition caused by medium acidification[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2022, 34(1): 177-183.
- [23] TAO W, WANG Y, WALTERS E, *et al.* Homoethanol production from glycerol and gluconate using recombi-

- nant *Klebsiella oxytoca* strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(5): e02122.
- [24] KHETAN A, MALMBERG L H, KYUNG Y S, *et al.* Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*[J]. [Biotechnology Progress](#), 1999, 15(6): 1020-1026.

Promoting the Fermentation Expression of Nitrile Hydratase in *Rhodococcus rhodochrous* by the Fed Batch Process of Sodium Gluconate

ZHANG Guohui^{1,2}, LIU Yuxuan^{1,2}, LIU Yanzhi¹, XIE Jiayi¹, LI Bo¹, ZHANG Sinan^{1,2}, WANG Zejian¹, WU Shiyong^{2,3}

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering; 2. State Key Laboratory of Coal Liquefaction, Gasification and Utilization with High Efficiency and Low Carbon Technology; 3. Engineering Research Center of Resource Utilization of Carbon-Containing Waste with Carbon Neutrality, Ministry of Education, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Nitrile hydratase (NHase) is one of the key enzymes in nitrile catabolism, which can catalyze the conversion of aliphatic nitriles or aromatic nitriles to the corresponding amides. Currently, NHase is used in the industrial production of acrylamide (AM) and niacinamide through the hydration of acrylonitrile (AN) and 3-cyanopyridine, respectively. *Rhodococcus* has been widely used in the biotransformation of AN due to their excellent properties such as high NHase activity, heat resistance and good stability in organic solvents. In this study, the effects of different concentrations of glucose and cobalt chloride on the synthesis of nitrile hydratase (NHase) were investigated. The results showed that the glucose mass concentration of 20 g/L and the cobalt chloride concentration of 0.050 g/L could effectively enhance the synthesis of NHase. Subsequently, a process physiology metabolic parameter collection and analysis system based on fermentation process off-gas mass spectrometer were established. Through multi-parameter correlation analysis, pH was identified as a key factor influencing the expression of NHase in *Rhodococcus rhodochrous* J1, and thus a strategy of continuous adding sodium gluconate during the fermentation process to control the pH was proposed. Compared to the original batch fermentation, the optimized process exhibited a total enzyme activity of NHase increased by 93.74%, the specific enzyme activity increased by 97.35% and the sugar conversion rate increased by 71.36% in continuous batch fermentation under the same bacterial concentration. This paper provides theoretical guidance for enhancing acrylonitrile hydratase production in industrial settings.

Key words: nitrile hydratase; *Rhodococcus rhodochrous* J1; multi-parameter correlation analysis; sodium gluconate; fermentation

(责任编辑: 王晓丽)