



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 89108175.5

[45]授权公告日 1998年7月8日

[11] 授权公告号 CN 1039030C

[22]申请日 89.10.6 [24]颁证日 98.4.9

[21]申请号 89108175.5

[30]优先权

[32]88.10.6 [33]JP[31]252645 / 88

[32]89.2.28 [33]JP[31]046818 / 88

[73]专利权人 山田秀明

地址 日本京都府

共同专利权人 日东化学工业株式会社

[72]发明人 山田秀明 长泽透

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

代理人 辛敏忠

审查员 47 08

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 细菌培养方法

[57]摘要

在培养能产生脲水解酶的玫瑰色红球菌以制备具有脲水解酶活性的细菌的过程中,可以通过向培养基中加入至少一种尿素和其衍生物及钴离子,从而以高产率获得具有较高脲水解酶活性的玫瑰色红球菌细胞。

权 利 要 求 书

1.一种培养玫瑰色红球菌 J-1 的方法,在实质上无巴豆酰胺的培养基中培养玫瑰色红球菌 J-1CGMCC No.0143 并在培养期间往所述培养基中加入钴离子和至少一种选自下列分子式 (I) 至 (III) 的尿素和尿素衍生物的化合物从而制得具有脲水解酶活性的菌的细胞:



其中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 为 $-H$ 、 $-CH_3$ 或 $-C_2H_5$, 所有取代基不能都是 $-H$;



其中, R_5 、 R_6 为 $-H$ 、 CH_3 或 $-C_2H_5$;



2.根据权利要求 1 所述的方法,其中向培养基中加入尿素。

3.根据权利要求 1 所述的方法,其中,培养物中尿素或其衍生物的总浓度为 $1-30g/l$ 。

4.根据权利要求 1 所述的方法,其中钴离子的浓度以 $CoCl_2$ 计为 $5-15mg/l$ 。

说 明 书

细菌培养方法

本发明涉及一种能以高产率制备玫瑰色红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 的微生物细胞的方法, 其中所述的菌种具有较高的脲水解酶活性。

最近几年, 人们不断地尝试用固定化状态的微生物和酶作为催化剂, 从而进行单一或复杂的化学反应。

Hideaki Yamada (本发明发明人之一) 等人已经发现, 可以用脲水解酶作为使脲水解的酶以产生相应的酰胺 (参考文献: *Agric. Biol. Chem.* 46: 1165, 1982)。作为利用这种酶的一个例子, 已经提出了这样的方法, 在具有脲水解酶的细菌的存在下由脲类制备酰胺 (参考文献: 日本专利公开37951/1984, 美国专利4637982)。

此外, 我们已经提出了一种制备酰胺, 特别是适于由芳香脲制备酰胺的方法。(参考文献: 日本专利申请231744/1988号和美国专利申请243986号)。在这种情况下, 一种能以高产率制备具有较高的脲水解酶活性的玫瑰色红球菌细胞的方法将是非常有利的。

本发明的一个目的是通过在该细菌的培养过程中向培养基加入特定物质, 即尿素或其特定衍生物以及钴离子来解决上述问题。

因此, 根据本发明, 培养具有高脲水解酶活性的玫瑰色红球菌细菌的方法包括: 在培养能产生脲水解酶的玫瑰色红球菌以制备具有脲水解酶活性的细菌过程中, 向培养基中加入至少一种具有下列分子式 [I] 至 [III] 的尿素及尿素衍生物以及钴离子:



其中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 为-H、-CH₃或-C₂H₅, 所有取代基不能全是-H;



其中, R_5 、 R_6 为-H、-CH₃或-C₂H₅; 以及



在玫瑰色红球菌的培养过程中, 向培养基加入至少一种具有分子式 [I] ~ [III] 的尿素和特定的尿素衍生物以及钴离子, 能显著地增加单位培养液中的脲水解酶活性。

单位培养液中的脲水解酶活性的提高可能是由于细胞浓度 (即产量) 和/或细胞活性 (即细胞中脲水解酶的质量) 的增加而引起的。

在本发明中, 加入尿素或其衍生物及钴离子对于提高细胞活性是特别有效的。

I、玫瑰色红球菌

本发明中所用的细菌是玫瑰色红球菌, 它具有脲水解酶活性并能使脲, 特别是双芳香脲水解而产生相应的酰胺。这种细菌的一个特例为玫瑰色红球菌J-1菌株 (FERM BP-1478), 该细菌公布于前面所述的日本专利申请231744/1988和美国专利申请243986中, 这些专利申请中给出了下述有关菌株J-1的详细情况。

1、来源及保藏

玫瑰色红球菌 J-1 (*Rhodococcus rhodochrous* J-1)

菌株J-1是我们从日本京都Sakyo-ku的土壤中分离的, 并根据布达佩斯条约于1987年9月18日保藏在日本发酵研究所 (国际工贸部工业科技署), 登记号为FERM BP-1478。该菌株已于1989年9月25日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏, 保藏

号为CGMCC No. 0143。

2、细菌特性

(a) 形态特征:

(1) 细胞的形状及大小: $0.9-1.0\mu \times 3-10\mu$

(2) 多态性: 培养初期为一种细长棒形细胞, 以后长成为具有分支的直杆, 然后分裂成短杆菌形态。

(3) 游动性: 不游动

(4) 孢子形成: 无

(5) 颗粒染色: 阳性

(6) 酸饥饿性质: 阴性

(7) 异源粒细胞: 可见

(b) 在各种培养基中的培养特征 (30°C):

(1) 肉汤琼脂平板培养: 环形, 直径为1mm (48小时), 不规则, 平滑, 表面较干燥, 平坦, 不透明, 浅桔红色。

(2) 肉汤琼脂斜面培养: 丝状, 表面平滑, 微微弯曲, 横截面较干燥, 浅桔红色。

(3) 肉汤液体培养: 大量生长, 伴以膜的形成。当细胞生长时, 培养液变得十分混乱, 并有沉淀形成。

(4) 肉汤凝胶穿刺培养: 表面沿穿刺面以漏斗形状生长良好, 但下表面生长不足, 明胶未液化。

(5) 石蕊汁: 无变化。

(c) 生理特性:

(1) 硝酸盐还原 阳性

(2) 脱氮作用 阴性

(3) MR试验 阴性

(4) VP试验 阴性

(5) 吡啉形成	阳性
(6) 硫化氢形成	阳性
(7) 淀粉水解	阴性
(8) 柠檬酸的利用	
Kocur 培养基	阴性
Christensen 培养基	阳性
(9) 无机氮源的利用	
硝酸盐	阳性
铵盐	阳性
(10) 色素的形成	阴性
(11) 尿酶	阳性
(12) 氧化酶	阴性
(13) 触酶	阳性
(14) 纤维素的水解	阴性
(15) 生长范围	PH5-10
	温度10-41°C
(16) 对氧气的性能	需氧
(17) 酪氨酸的分解	阳性
(18) 腺苷的分解	阳性
(19) 磷酸酶	阳性
(20) Tween80 的水解	阳性
(21) O-F 试验	0(固)
(22) 耐热性(在10%脱脂乳中, 72°C, 15分钟)	

无

(23) 由糖形成酸和气体

	酸	气体
L-阿拉伯糖	—	—
D-木糖	—	—
D-葡萄糖	+	—
D-甘露糖	—	—
D-果糖	+	—
麦芽糖	+	—
蔗糖	+	—
乳糖	—	—
海藻糖	—	—
D-山梨醇	+	—
甘露醇	+	—
甘油	+	—

(24) 等单一碳源中的生长

肌醇	—
麦芽糖	+
甘露醇	+
鼠李糖	—
D-山梨醇	+
m-羟苯甲酸	+
乙二酸钠	+
苯甲酸钠	+

柠檬酸钠	+
乳酸钠	+
鞣酮	+
L-酪氨酸	+
甘油 (1%, W/V)	(+)
海藻糖	(+)
对羟苯甲酸 (1%, W/V)	+

(+): 微阳性

(25) 脂肪酸和细胞壁的分析: 细胞中含有不饱和与饱和的直链脂肪酸以及结核硬脂酸。霉菌酸的薄层层析显示出单一色斑。

根据上面所列出的细菌特性和伯杰氏系统细菌学手册(1986), 菌株J-1是一种需氧的、格兰氏阳性、微弱酸饥饿、触酶阳性及无芽胞形成的无鞭毛杆菌。该菌株在生长初期为细长杆菌形状及菌丝体, 以后长出分枝, 并分裂成短的杆菌形状。根据这些特性, 菌株J-1被归入诺卡氏(Nocardia)型细菌。

对脂肪酸组成的分析揭示出, 该细菌含有不饱和及饱和的直链脂肪酸, 其中还包括结核硬脂酸。由于霉菌酸的薄层层析显示出单一色斑, 该色斑与标准的玫瑰色红球菌(IFO 3338)具有相同的 R_f 值, 故可以将该细菌与分枝菌属细菌区分开来。根据霉菌酸的组成(碳原子数), 还可以将该细菌与诺卡氏细菌区分开来。

作为对其他的生化性能的研究结果, 可以确认该细菌为玫瑰色红球菌。

II、尿素及其衍生物

在本发明中，示于前面的分子式为 [I] - [III] 的尿素和尿素衍生物能起酶诱导物的作用，但是，在此之前我们只知道典型的酶诱导物是脘或酰胺，尤其是巴豆酰胺，而完全没有预见到尿素及其衍生物能有效地诱导脘水解酶。出乎人们意料的是，当尿素和其衍生物单独而不与其他酶诱导物结合使用时，它们具有比常用的酶诱导物高得多的效果。此外，由于尿素比其他酶诱导物价格低廉，因此，从经济上考虑可以将本发明的方法用于工业目的。

在本发明所用的尿素衍生物中，分子式 [I] 的化合物例子有甲脘、乙脘、1, 1-二甲脘和1, 3-二甲脘。

分子式为 [II] 的化合物的例子有尿烷和甲脘烷。

分子式为 [III] 的化合物的例子有硫脘。

可以将尿素或其衍生物以批量形式一次加至培养基中或依次加入，这里所用的“依次”是指“连续”和“递增”。

III 钴离子

仅仅向培养基中加入尿素或其衍生物是不能获得脘水解酶的，本发明还必须向培养基中加入钴离子（钴离子的存在对于通过如前所述的日本专利申请231744/1988和美国专利申请243986中所定义的本发明的细菌来制备脘水解酶是必需的）。

为此，需通过向含水的培养基中加入水溶性钴化物，从而形成钴离子。水溶性钴化物如化学百科全书中所定义，因此，对于熟悉本领域的人员来说可以很容易地适当选择并使用这些化合物中的一种。

钴化物的典型例子如那些能提供 C_0^{++} 或 C_0^{+++} ，特别是 C_0^{++} 的

化合物，如氯化钴、硫酸钴、乙酸钴、溴化钴和硼酸钴。

另外，维生素B₁₂和金属钴也能作为钴源。维生素B₁₂中含有络合物形成的钴，通过高压釜处理可以使其离子化，而金属钴可以通过培养过程中的微生物氧化作用而离子化。

IV 脲水解酶的培养/制备

除了将尿素或其衍生物和钴离子加入到培养介质中以外，本发明的玫瑰色红球菌可以在任何一种适于此目的的条件下培养。

例如，将预定量的尿素或其衍生物及钴离子加到下面所列的基本培养基中，培养条件为温度15—50°C，优选20°C—45°C，更优选30°C左右，PH为7—9，时间为30小时或更长，优选40小时或更长（直到例如120小时）。

尿素或其衍生物在培养基中的总浓度为1—30g/l，2—20g/l优先，5—15g/l更优先，而钴离子的浓度以CoCl₂计为5—15mg/l。

基本培养基

培养基A

组分	量(在1l介质中)
K ₂ HPO ₄	13.4g
KH ₂ PO ₄	6.5g
NaCl	1.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2g
维生素混合物*	0.1ml
蒸馏水	余量(pH7.0)

*组成(在1l溶液中)

生物素	2.0 μ g
泛酚钙	0.4mg
肌醇	2.0mg
烟酸	0.4mg
维生素B ₁ 盐酸盐	0.4mg
维生素B ₆ 盐酸盐	0.4mg
对氨基苯甲酸	0.2ng
核黄素	0.2mg
叶酸	0.01ng
蒸馏水	余量

培养基B

K ₂ HPO ₄	0.5g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
酵母膏	3.0g
蒸馏水	· 余量 (pH7.2)

培养基C

葡萄糖	10g
K ₂ HPO ₄	0.5g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
酵母膏	1.0g
胨	7.5g

蒸馏水

余量 (PH7.2)

V 实验例子 酶活性的测定和定义

(1) 脲水解酶活性的测定方法

脲水解酶活性按如下方法测定

2ml 反应液中含在 1.0ml 苄脲 (20mM), 1.0ml 3-氰基吡啶 (1M) 或 1.0ml 丙烯脲 (1M) (作为底物); 0.5ml 磷酸钾缓冲液 (0.1M, PH7.0); 和预定量的细菌细胞 (由培养液分离) 在 20°C 下反应一段预定的时间, 然后通过加入 0.2ml 1N HCl 使反应终止。

(2) 脲水解酶活性的定义

该活性按下列方法测定比活 (S. A.) 和总活性 (T. A.)

S. A.: 微摩尔产物酰胺/mg 细胞/分钟

T. A.: 微摩尔产物酰胺/ml 培养基/分钟

实例1

将预定量的尿素加到含有 10mg/l CoCl_2 的上述基本培养基 C 中。向 60ml 所得到的培养基中加入 4ml 玫瑰色红球菌 J-1 菌株 (FERM BP-1478, 用基本培养基 C 获得) 的预培养液, 并在 28°C 下进行振动培养 96 小时。

为了比较, 可以类似地在仅含有尿素或 CoCl_2 的基质中进行培养。

其结果概括于表 1 中。

由表中可以看出, 同时加入尿素和 CoCl_2 对于提高脲水解酶生产是必需的。

实例2

在10ml/1CoCl₂存在下，使菌株J-1在上述基本培养基C中进行与实例1相似的培养，温度为28℃，时间为48—120小时，加入或不加入预定量的酶诱导物(尿素和巴豆酰胺)，如表2中所示。

表2中所列的T. A. 和S. A. 值是在活性测定过程中T. A. 值最大时获得的。

由该表可以明显看出，单独用尿素作为酶诱导物可以有效地提高脲水解酶的产量。

表1

CoCl ₂ (mg/l)	脲 (g/l)	细胞浓度 (mg/ml)	苜 蓿		氨基吡啶		丙烯腈	
			T. A.	S. A.	T. A.	S. A.	T. A.	S. A.
0	0	4.61	0.11	0.02	0.75	0.16	3.59	0.70
0	7.5	5.53	0.11	0.02	1.00	0.18	4.31	0.78
10	0	5.26	1.09	0.21	3.70	0.70	17.7	3.35
10	2.0	5.17	25.2	4.87	39.6	7.66	189	36.5
10	5.0	5.03	65.6	13.0	162	32.2	774	154
10	7.5	4.99	210	42.1	519	104	2480	497
10	10	4.72	186	39.4	471	99.7	2250	477
10	15	4.26	191	44.9	515	121	2460	578
10	20	3.96	162	40.9	363	91.7	1740	438

表2

培养基	CoCl ₂ (mg/l)	脲 (g/l)	巴豆酰胺 (g/l)	苜 蓿	
				T. A.	S. A.
C	10	-	2.0	23.2	6.0
C	10	-	4.0	24.6	6.1
C	10	-	7.5	16.6	5.8
C	10	5.0	2.0	32.6	6.5
C	10	7.5	-	213	42.2

实例3

将预定量的尿素衍生物加到含有10mg/l CoCl_2 的上述基本培养基C中。向60ml所得到的培养基中加入4ml玫瑰色红球菌J-1菌株 (FERM BP-1478) 的预培养液 (用基本培养基C获得)，在28°C 下进行振动培养96小时。

为了比较，在仅含有甲脲或 CoCl_2 的介质中进行类似的培养。

结果示于表3中，其中所示的T. A. 和S. A. 值是在活性测定过程中T. A. 值为最大时获得的。在该表中，加入了由7.5g/l 尿素获得的结果以供对比。

由该表可以明显看出，同时使用尿素衍生物和 CoCl_2 对于提高脲水解酶生产是必需的。

表3

CoCl_2 (mg/l)	酶诱导物	酶诱导量 (g/l)	细胞浓度 (mg/ml)	3-靛吡啶	
				T. A.	S. A.
0	甲脲	7.5	4.75	0	0
10	—	0	4.94	3.20	0.65
10	甲脲	7.5	5.72	230	40.2
10	乙脲	7.5	5.76	245	42.5
10	二甲脲	7.5	6.44	150	23.3
10	二甲脲	7.5	4.16	104	25.0
10	甲脲烷	7.5	6.19	166	26.8
10	硫脲	7.5	1.99	40.2	20.2
10	脲	7.5	4.99	519	104