

A New 4-Hydroxyphenylcyanide Nitrilases from *Pseudomonas* Sp. and Its Catalytic Properties*

Mingle Cao¹, Xinglin Jiang², Haibo Zhang^{2#}, Mo Xian², Xin Xu², Wei Liu²

¹State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Ji'nan

²Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao
Email: #zhanghb@qibebt.ac.cn

Received: May 13th, 2012; revised: May 27th, 2012; accepted: Jun. 4th, 2012

Abstract: Nitrilases can hydrolyze nitrile efficiently under mild conditions. The enzymatic methods have the advantages of less pollution, low cost compared with the chemical methods. Nitrilases are potentially applied in agriculture, industry, environment, and biomedicine. In this study, Berthelot method and high performance liquid chromatography were used to screen new stains for nitrilases. A nitrilase with high substrate specificity for 4-hydroxyphenylcyanide was found from *Pseudomonas* sp. 6-1. The stain produced 28.47 U/ml nitrilase after optimization of the culture conditions. The enzyme remained 80% activities at pH 6.6 to pH 7.6, temperature 35°C to 45°C, and it was stable after 18 h incubation. The stain can be potentially used in biosynthesis 4-Hydroxyphenylacetic acid using 4-hydroxyphenylcyanide as substrate.

Keywords: 4-Hydroxyphenylcyanide; 4-Hydroxyphenylacetic Acid; Nitrilase; Biocatalysis

新型假单胞菌对羟基苯乙腈水解酶及其性质研究*

曹明乐¹, 姜兴林², 张海波^{2#}, 咸 漠², 徐 鑫², 刘 炜²

¹山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南

²中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛

Email: #zhanghb@qibebt.ac.cn

收稿日期: 2012年5月13日; 修回日期: 2012年5月27日; 录用日期: 2012年6月4日

摘 要: 腈水解酶催化的腈水解具有反应高效、条件温和、环境污染小和成本低等优点, 在有机合成、材料合成、医药、食品、农业、畜牧业及环境等污染方面有着重要的应用前景。本研究利用初步活化和分步胁迫富集, 通过 Berthelot 法高通量筛选与高压液相精细筛选获得一株底物对 4-羟基苯乙腈具有较好的催化活性的菌株; 经过培养基初步优化, 产酶量达到 28.47 U/ml; 铜离子对该酶具有较强的抑制作用, 酶学性质研究表明该菌株能够在 pH 6.2~pH 7.3 之间酶活性能够保持在最高酶活性的 80%以上, 在 35°C~45°C 范围内催化活性大于最大酶活性的 80%, 反应 18 h 后离心菌体二次催化几乎不丧失活性; 该菌株在开发对羟基苯乙腈合成对羟基苯乙酸具有较高的开发价值。

关键词: 对羟基苯乙腈; 对羟基苯乙酸; 腈水解酶; 生物催化

1. 引言

腈水解酶包括腈水解酶(Nitrilase)和腈水合酶

(Nitrile hydratase), 前者可以催化腈直接水解生成羧酸及氨; 而后者可以催化腈水解生成酰胺, 酰胺在酰胺酶(Amidase)作用下进一步转化成羧酸及氨。传统化学方法利用腈类合成相应羧酸类需要在强酸性、高温环境中进行, 而且合成过程中会有大量的副产物产生,

*基金项目: Y2008B43, Y112131105。

#通讯作者。

合成效率低下,分离产物困难。利用腈水解酶(包括菌体及纯化后蛋白质)催化腈化物的水解具有高选择性、高效性、条件温和、环境污染小、成本低、产物光学纯度高优点,与传统的化学方法相比,有着无可比拟的优越性^[1-3]。利用腈水解酶降解腈类化合物,产物用于合成手性的羧酸和酰胺等医药中间体,此外腈水解酶及其产生菌还可用于电镀厂等腈污染废水的生物治理。

对羟基苯乙酸是一种重要的药物、材料中间体,可应用于医药、农药以及液晶材料等方面。目前,对羟基苯乙酸的合成均采用化学方法。腈水解酶的研究比较多,来源于 *Pseudomonas chlororaphis* B23 及 *Rhodococcus rhodochrous* J1 的腈水解酶已经应用于工业生产,使得年产丙烯酰胺达 30,000 吨以上^[4-7],此外在几个真菌菌属中,也发现腈类降解活性的报道^[8-11]。当前,采用腈水解酶催化对羟基苯乙腈合成对羟基苯乙酸已有报道,主要催化菌株有 *Rhodococcus butanica* 及 *Alcaligenes faecalis* 等^[12-14]。

在本研究中,利用 β -羟基丙腈作为筛选压力和筛选氮源,通过对样品进行两步富集,利用 Berthelot 法初步测定菌株的腈水解能力,结合高压液相进行精确测定确定其腈水解酶活性,筛选获得了一株对羟基苯乙腈转化效果较好的菌株并对该菌株进行了产酶优化和酶学性质测定。

2. 材料与方法

2.1. 样品采集

样品主要采集于青岛周围的污水处理厂(麦岛、李村、团岛),石老人海水浴场,中国科学院青岛生物能源与过程研究所周围土壤及水体,中国海洋大学崂山校区水体。

2.2. 菌株筛选

选择性筛选培养基(用于筛选分离菌株):葡萄糖 10 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, NaCl 1 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 g/L, $CaCl_2$ 0.001 g/L, 三羟基丙腈 1 g/L, pH 7.0~7.2。基础产酶培养基:葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, NaCl 1 g/L, $MgSO_4$ 0.2 g/L, pH 7.0~7.2。

样品富集方法:取土样按照 1 g 样品加 10 mL 蒸

馏水溶解,将水样置于室温 24 小时活化后向样品中添加 1 mL 的选择性筛选培养基;继续富集培养 48 小时后,取 1 mL 经富集的样品接种到装有 50 mL 选择性筛选液体培养基;富集培养 12 小时后用于分离。

取经过两次富集培养的样品 100 μ L 富集培养液涂布于选择性筛选培养基固体平板,在 37°C 培养 48 小时获得单菌落,测定其腈水解酶活性。获得菌株经 Berthelot 法高通量初筛,根据转化产生的 NH_3^+ 的量初步测定菌株的转化活性,进而通过高压液相(HPLC)分析获得具有高对羟基苯乙醇转化活性的菌株^[15,16]。

2.3. 16s rDNA 鉴定

根据当前国际上通用的重要菌株鉴定方法 16s rDNA 序列分析初步鉴定。菌体 DNA 提取采用 OMEGA 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,具体操作按照试剂盒说明书。PCR 采用细菌通用引物进行扩增测定 PCR 扩增反应条件为:94°C, 5 min; 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 5 min; 30 个循环; 72°C, 10 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段进行 DNA 测序。测序结果经 NCBI 数据库 Blast 比对,对菌株进行初步鉴定。

2.4. 产酶条件优化

本研究采用 1.2 中提到的基础产酶培养基作为出发培养基,对常用碳源:葡萄糖、淀粉、木糖、乳糖、糊精、麦芽糖、蔗糖、壳聚糖,以及常用氮源:硫酸铵、硝酸铵、牛肉粉、尿素、蛋白胨、酵母浸粉对该菌株产酶的影响进行评估。酶活性测定采用 Berthelot 法进行测定腈水解酶转化对羟基苯乙腈的转化率,酶活反应体系含有 1 mM 的对羟基苯乙腈底物和 10 mM 的磷酸二氢钠 - 磷酸氢二钠(pH 7.0)缓冲体系。

2.5. 腈水解酶催化的影响因素

反应体系:反应体系的底物浓度为 10 mM 的对羟基苯乙腈,缓冲体系为 10 mM 的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲体系。经活化接种于基础产酶培养基的菌体经过夜培养后 12,000 转/分钟离心 10 min,用上述磷酸钠缓冲液洗涤 2 次后用于催化转化。酶活单位定义为:常温下,1 min 内转化 1 μ M 底物所需要的酶量。

金属离子对腈水解酶活性的影响:在上述反应体

系中添加 1 mM 的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ga^{2+} ，分别测定添加后与对照的酶活性对比，比较其变化。

pH 对脲水解酶催化水解的影响：利用 10 mM 不同 pH 值的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲体系分别测定脲水解酶在 pH 值为 5.8, 6.2, 6.6, 7.0 和 7.4 时脲水解酶的催化能力，取最大酶活性点做为对照。

温度对脲水解酶催化活性的影响：取上述反应体系，测定其在 15℃~45℃ 之间的脲水解酶活性，间隔温度 5℃。

3. 结果与讨论

3.1. 菌株筛选与鉴定

经过初步活化和两步富集，两步筛选获得菌株 6-1 对 4-羟基苯乙腈具有较好的催化活性。在筛选过程中添加活化步骤，并通过低浓度到高浓度的筛选剂的胁迫，能够有效的提高样品中高产脲水解酶的菌株的优势，使得最后涂布平板菌落较单一，提高了筛选脲水解酶的效率。

菌株 6-1 的 16S rDNA 经华大基因测序，序列共 1500bp，比对结果与 GQ246949.1(假单胞菌)、AM411070.1(假单胞菌)、AM410621.1(假单胞菌)等具有 99%~100% 的相似性，结合形态学观察，该菌属于假单胞菌属，与恶臭假单胞菌相近，定名为 *Pseudomonas* sp.6-1。

3.2. 脲水解酶产量优化

3.2.1. 碳源对脲水解酶活力的影响

对不同碳源的研究表明，麦芽糖和糊精能够较为有效的促进假单胞菌 *P. sp.6-1* 产脲水解酶，在含有 10 g/L 的麦芽糖作为碳源的培养基上菌株产酶能力最高达到 28.47 U/mL，其次，糊精、蔗糖、乳糖等作为碳源的产酶能力也高于葡萄糖。(见图 1)。

3.2.2. 氮源对脲水解酶活力的影响

通过对比不同氮源对假单胞菌脲水解酶产量的影响，结果表明该菌最适氮源为蛋白胨，其次牛肉膏和蛋白粉。而无机化合物硫酸铵、硝酸铵等产生的酶活较低，不足蛋白胨作为氮源产酶活力的 50%。(见图 2)。

经过优化后，采用 10 g/L 的蛋白胨作为氮源，10

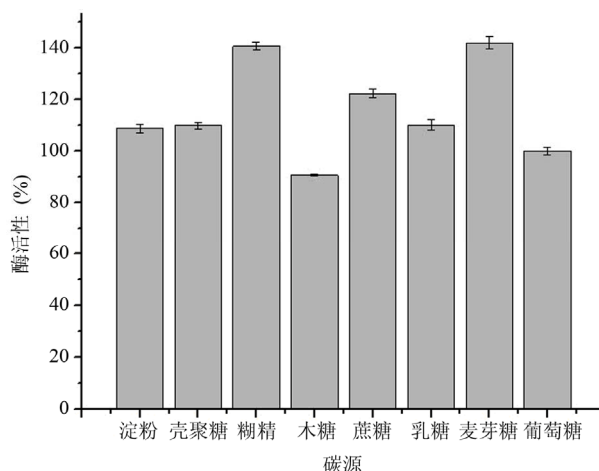


Figure 1. Impact of carbon resource on enzyme production
图 1. 碳源对酶产量影响

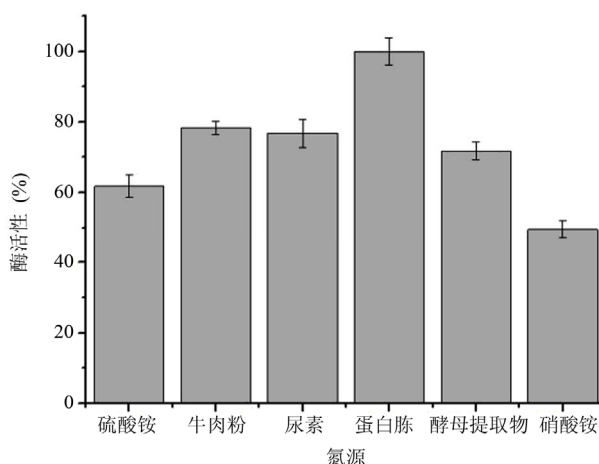


Figure 2. Impact of nitrogen resource on enzyme production
图 2. 氮源对酶产量的影响

g/L 的麦芽糖作为碳源，并添加 KH_2PO_4 2 g/L, NaCl 1g/L, $MgSO_4$ 0.2 g/L, pH 7.0~7.2 培养基能够产生酶活力单位为 28.47 U/mL 的脲水解酶。

3.3. 脲水解酶催化的影响因素

3.3.1. 金属离子的影响

不同金属离子对酶活性的研究表明在添加 1 mM 的铁离子、钴离子在一定程度上能够提高 *P. sp 6-2* 脲水解酶活性；1 mM 的镁离子、锌离子和钙离子对该脲水解酶影响不大；而 1 mM 的铜离子缺能够抑制脲水解酶活性的 50% 左右。铜离子是该脲水解酶的较强的抑制剂，这与吴明火等人对 4-羟基苯乙腈转化中金属离子对酶活影响有一定的相似性^[14]。对该脲水解酶的研究表明，该脲水解酶金属离子耐受性较强，具有

一定的开发价值。(见图 3)。

3.3.2. pH 对腈水解酶催化的影响

对假单胞菌 *P. sp. 6-2* 腈水解酶的研究表明, 该菌的最适反应 pH 在 7.0 左右, 在 6.2 到 7.3 之间酶活性能够保持在最高酶活性的 80% 以上。该腈水解酶最适 pH 在中性左右, 略偏酸性。(见图 4)。

3.3.3. 温度对腈水解酶催化的影响

对 *P. sp. 6-2* 最适反应温度研究表明, 该菌株最适催化温度约为 40°C, 在 33°C~45°C 范围内催化活性大于最大酶活性的 80%。该催化温度接近环境温度, 远低于化学方法转化的温度, 适宜规模化应用。(见图 5)。

3.3.4. 腈水解酶催化的稳定性

腈水解酶的催化可持续性对于腈水解酶の利用有着重要的意义。适量菌体加入含有 10 mM 的对羟基苯乙腈的 pH 7.0 的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠反应体系中在反应 18 小时, 离心获得催化后的菌体进行二次催化, 比较初次反应和二次反应的催化效果。结果表明, 二次催化转化效果与初次相差不大, 18 小时产物与第一次转化持平, 在误差可允许范围内, 表明泛菌 *P. sp. 6-2* 的腈水解酶催化稳定性良好, 可持续催化能力强。(见图 6)。

4. 结论

本研究利用初步活化, 二次分级胁迫富集有效的提高了筛选高产腈水解酶的效率; 并结合 Berthelot

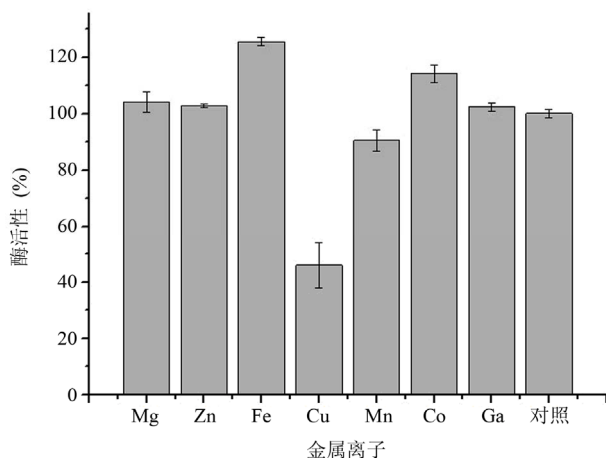


Figure 3. Impact of metal ion on enzyme production
图 3. 金属离子对酶产量的影响

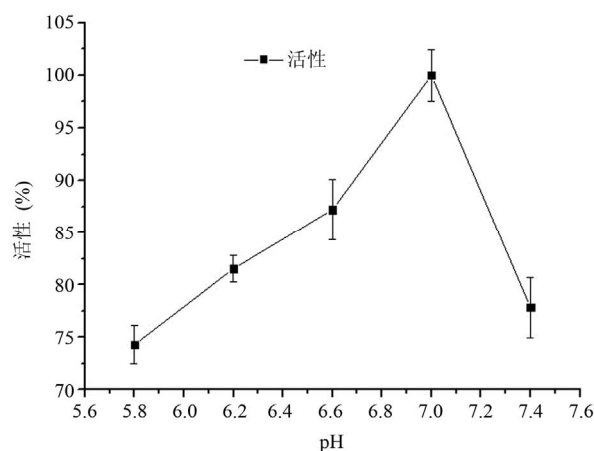


Figure 4. Impact of pH on enzyme production
图 4. pH 值对腈水解酶的影响

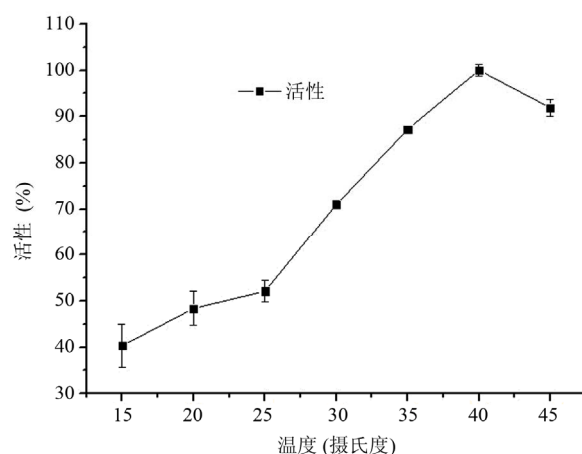


Figure 5. Impact of temperature on enzyme production
图 5. 温度对腈水解酶活性的影响

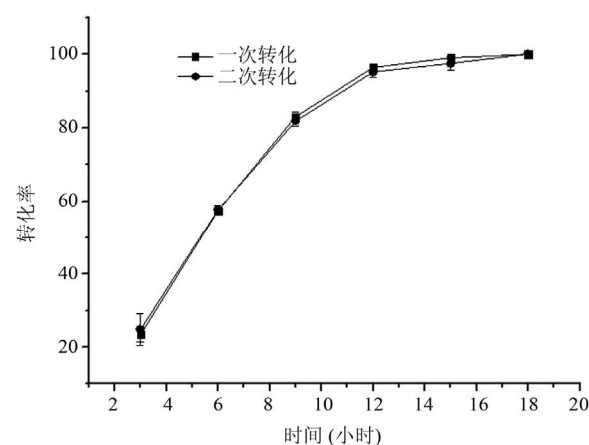


Figure 6. The stability of Nitrilases
图 6. 腈水解酶的催化稳定性

法高通量筛选与高压液相精细筛选有效的提高了筛选效率和确保筛选准确率。经过进一步筛选, 获得并

鉴定了菌株假单胞菌(*P. sp.6-1*)对底物对羟基苯乙腈具有较好的底物选择性。该菌株能够利用麦芽糖作为最佳碳源,利用蛋白胨作为最佳氮源高效生产对4-羟基苯乙腈具有较好的底物选择性的腈水解酶,经过初步优化,采用10 g/L的蛋白胨作为氮源,10 g/L的麦芽糖作为碳源的产酶培养基中,能够产生酶活力单位为28.47 U/mL的腈水解酶,该酶活略高于王铁刚等人经过诱变和优化后的26.77 U/mL,具有较好的开发和进一步应用价值^[17]。此外,该腈水解酶具有较好的pH广泛性,较大的温度广泛性和反应稳定性都为该菌株在腈水解领域的工业化应用奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] S. L. Kitson, W. Watters, V. L. Murrell, et al. Hydrolysis of [(14)C]nitrile using nitrilase (Nit) biocatalysts. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*, 2011, 54(7): 396-397.
- [2] C. He, C. L. Ma, J. H. Xu, et al. A high-throughput screening strategy for nitrile-hydrolyzing enzymes based on ferric hydroxamate spectrophotometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 817-823.
- [3] L. Martinkova, V. Kren. Biotransformations with nitrilases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14(2): 130-137.
- [4] S. Baum, D. S. Williamson, T. Sewell, et al. Conversion of sterically demanding alpha, alpha-disubstituted phenylacetone nitriles by the arylacetone nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(1): 48-57.
- [5] C. S. Yang, X. D. Wang and D. Z. Wei. A new nitrilase-producing strain named *Rhodobacter sphaeroides* LHS-305: Biocatalytic characterization and substrate specificity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(7-8): 1556-1567.
- [6] S. J. Yeom, J. K. Lee and D. K. Oh. A positively charged amino acid at position 129 in nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 33278 is an essential residue for the activity with meta-substituted benzonitriles. *Febs Letters*, 2010, 584(1): 106-110.
- [7] H. Luo, L. Fan, Y. H. Chang, et al. Gene cloning, overexpression, and characterization of the nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* tg1-A6 in *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(2): 393-400.
- [8] A. Petrickova, A. B. Vesela, O. Kaplan, et al. Purification and characterization of heterologously expressed nitrilases from filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(4): 1553-1561.
- [9] O. Kaplan, K. Bezouska, O. Plihal, et al. Heterologous expression, purification and characterization of nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *BMC Biotechnology*, 2011, 11, in press.
- [10] O. Kaplan, K. Bezouska, A. Malandra, et al. Genome mining for the discovery of new nitrilases in filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(2): 309-312.
- [11] V. Vejvoda, D. Kubac, A. Davidova, et al. Purification and characterization of nitrilase from *Fusarium solani* IMI196840. *Process Biochemistry*, 2010, 45(7): 1115-1120.
- [12] H. Kakeya, N. Sakai, T. Sugai, et al. Microbial hydrolysis as a potent method for the preparation of optically active nitriles, amides and carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, 1991, 32(10): 1343-1346.
- [13] M. Kobayashi, S. Shimizu. Versatile nitrilases: Nitrile-hydrolysing enzymes. *Fems Microbiology Letters*, 1994, 120(3): 217-223.
- [14] 吴明火, 蔡谦, 郑裕国等. 对羟基苯乙腈水解酶产生菌的筛选及产酶条件研究[J]. *生物加工过程*, 2005, 3(4): 32-44.
- [15] 周冬杰, 欧阳立明, 许建和等. 土壤中腈水解酶产生菌的快速筛选[J]. *华东理工大学学报*, 2009, 35(4): 545-548.
- [16] 王利群, 陈紫慈, 孙晓慧等. 羟基乙腈水解酶菌株的筛选及其催化特性[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(6): 825-831.
- [17] 王铁刚, 罗晖, 于慧敏等. 产腈水解酶菌株的诱变及培养优化[J]. *生物加工过程*, 2007, 5(1): 41-44.