

一株产腈水解酶的泛菌及其催化特征*

曹明乐² 姜兴林¹ 张海波^{1**} 咸漠¹ 徐鑫¹ 刘炜¹

¹中国科学院青岛生物能源与过程研究所 青岛 266101)

²山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 通过初步活化和分步胁迫富集,采用Berthelot法高通量筛选与高压液相精细筛选获得一株底物广泛性良好的产腈水解酶菌株*Pantoea* sp.;通过菌株降解乙腈(脂肪腈类)、3-羟基丙腈(羟基腈类)、4-羟基苯乙腈(芳香腈类)等不同种类腈类,表明该菌株具有较好的底物广泛性;通过单因素法优化菌株培养条件,最佳碳源为壳聚糖,最佳氮源为无机氮源硫酸铵,产酶量达到16.45 U/mL。向反应体系中加入终浓度为1 mmol/L的钴、锌、钙离子可以增强酶活。酶学性质研究表明该腈水解酶的最适反应pH为7.0,其中在pH 6.6-7.6之间该菌株酶活性能够保持在最高酶活性的80%以上;最适反应温度为30 ℃,在22-45 ℃范围内催化活性大于最大酶活性的80%,反应30 h后离心菌体二次催化几乎不丧失活性。该菌株在医药、食品、农业、环境污染治理等领域具有潜在的工业应用开发前景。图7 参21

关键词 腈水解酶;泛菌;生物催化;生物治理

CLC Q556 : Q936

A New Nitrilase Producing *Pantoea* sp. and Its Enzymological Properties*

CAO Mingle², JIANG Xinglin¹, ZHANG Haibo^{1**}, XIAN Mo¹, XU Xin¹ & LIU Wei¹

¹Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China)

²State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Nitrilases can hydrolyze nitrile efficiently under mild conditions. For their low pollution and cost, the enzymatic methods with nitrilases are widely used in agriculture, industry, biomedicine and environment protection. Nitrilases with broad substrate specificity are lacked in the nitrilase market. In this study, Berthelot method and high performance liquid chromatography were used to separate and identify a new strain of nitrilase *Pantoea* sp. 1-2, which can hydrolyze acetonitrile, 4-hydroxyphenylcyanide and 3-hydroxypropionitrile. The strain produced 16.45 U/mL nitrilase with ammonium sulfate as nitrogen source. The enzyme remained 80% activity at pH 6.6-7.6, temperature 22-45 ℃, staying stable after 30 h incubation. The strain would be of great value in industrial utilization. Fig 7, Ref 21

Keywords nitrilase; *Pantoea* sp.; biocatalysis; bioremediation

CLC Q556 : Q936

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。利用腈水解酶(包括菌体及纯化后蛋白质)催化腈化合物的水解具有高选择性、高效性、条件温和、环境污染小、成本低等优点,与传统的化学方法相比,有着无可比拟的优越性^[1-3]。腈类化合物(Cyanides and nitriles)种类繁多,包括普通腈类(乙腈、丙腈、丙烯腈)、羟基腈类、芳香腈类、异腈类等。腈类化合物大多数属高毒类,能够在体内解离出氰离子(CN⁻),引起毒性作用。腈类常用于药

物、活性染料、塑料、有机玻璃生产中,以及在电镀、船舱和仓库烟熏杀虫灭鼠等过程中使用。在使用过程中会产生一定的腈类有毒化合物。腈类中毒是以中枢神经系统损害为主,伴有粘膜刺激的全身性疾病。腈类引起的水源及食品污染对人体有巨大的毒害作用。腈水解酶可以有效地降解转化腈类,降低腈污染的毒性。腈水解酶可广泛应用于精细化工、医药、食品、农业及畜牧业等方面^[4]。

当前对腈水解酶的研究主要集中在筛选获得底物专一性好、手性选择性能优越的菌株上。来源于*Pseudomonas chlororaphis* B23及*Rhodococcus rhodochrous* J1的腈水解酶已经应用于工业生产,年产丙烷酰胺达30 000 t以上。已证实不同属(*Agrobacterium*、*Arthrobacter*、*Corynebacterium*、*Pseudomonas*和*Rhodococcus*)的若干细菌种中都有腈水解酶存在,并从多种生态系统中分离得到这些菌株^[5-8]。此外,在几个真菌菌属中,也发现了腈水解酶^[9-12]。然而,底物专一性优越的产腈水解酶的菌株还不能够满足腈水解酶在除去食品、饮料及环境中不同腈类污染物的需求^[13]。开发底物广泛

收稿日期 Received: 2012-04-20 接收日期 Accepted: 2012-05-15

*山东省自然科学基金项目(Y2008B43)和中国科学院知识创新工程工业生物技术领域基础前沿研究专项(Y112131105)资助 Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. Y2008B43), and the knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. Y112131105)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhanghb@qibebt.ac.cn)

性能优越的菌株具有重要的应用前景。

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,采用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,以确定其腈水解酶活性^[14-17]。利用乙腈、三羟基丙腈、对羟基苯乙腈3种具有结构代表性的底物对筛选菌株进行底物广泛性测定,以筛选获得底物广泛性良好的菌株。

1 材料与方 法

1.1 样品采集及富集

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。

样品富集方法:取土样,1 g样品加10 mL蒸馏水溶解,将水样置于室温活化24 h后向样品中添加1 mL的选择性筛选培养基;37 °C继续富集培养48 h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的三角药瓶中;富集培养12 h后用于分离。

1.2 培养基

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。

产酶培养基:葡萄糖10 g/L, 蛋白胨10 g/L, 酵母膏5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, NaCl 1 g/L, $MgSO_4$ 0.2 g/L, pH 7.0-7.2。

1.3 菌株筛选

取1.1中经过两次富集培养的样品100 μ L富集培养液涂布于1.2中选择性筛选培养基固体平板,在37 °C经48 h培养获得单菌落,用于测定其腈水解酶活性。

1.4 Berthelot法高通量初筛

取1.3中筛选获得的单菌落接种,收集的菌体重悬于终浓度为10 mmol/L的三羟基丙腈的磷酸钾缓冲液(pH 7.0, 20 mmol/L)中,30 °C摇床上120 r/min转化24 h。利用Berthelot法显色,测定612 nm处吸光度。

1.5 高压液相法复筛

取1.4中转化液12 000 r/min离心20 min,用0.45 μ m膜过滤,采用高压液相进行检测。高压液相的检测方法为:Waters 2545 HPLC (Milford, MA, USA)系统, Aminex HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm, USA)型色谱柱。色谱条件为:进样量为10 μ L,流动相为0.005 mol/L H_2SO_4 ,流速为0.5 mL min^{-1} ,柱温为35 °C。

1.6 16S rDNA鉴定

16S rDNA序列分析是目前国际上通用的物种鉴定的重要方法之一^[18]。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。

1.7 菌株优化及酶学性质测定

反应体系:反应体系的底物分别是浓度为10 mmol/L的乙腈、三羟基丙腈、对羟基苯乙腈,缓冲体系为10 mmol/L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 r/min离心10 min,用上述磷酸钠缓冲液洗涤2次后用于催化转化,优化中的其它条件见试验结果。酶活单位定义为:常温下,1 min内转化1 μ mol/L底物所需要的酶量。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选与鉴定

经过初步活化和两步富集,共从12个样品中筛选获得23株菌株,通过进一步酶活性测定,菌株1-2具有较高的酶活性和底物广泛性,所产腈水解酶对乙腈(Acetonitrile)、3-羟基丙腈(3-hydroxypropionitrile)、4-羟基苯乙腈(4-hydroxyphenylacetonitrile)3种代表性腈类具有较好的催化活性,对芳香族腈类和脂肪族腈类的催化活性略高于羟基腈类(图1)。该腈水解酶较好的底物广泛性是目前腈水解酶研究中报道较少的,仅在腐皮镰孢菌及黑曲霉的腈水解酶研究中所涉及^[17]。在筛选过程中通过添加活化步骤有效地增加菌体活性,通过低浓度到高浓度筛选剂的胁迫,能够有效地提高样品中高产腈水解酶的菌株的优势,提高了筛选腈水解酶的效率。

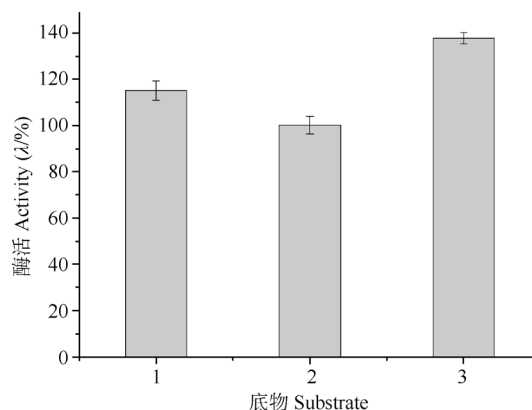


图1 菌株1-2产腈水解酶底物广泛性比较

Fig. 1 Comparison of substrate extensiveness of nitrilase produced by strain 1-2

1: 乙腈; 2: 3-羟基丙腈; 3: 4-羟基苯乙腈

1: acetonitrile; 2: 3-hydroxypropionitrile; 3: 4-hydroxyphenylacetonitrile

菌株1-2的16S rDNA经华大基因测序,序列共1 506 bp,比对结果与CP002886.1(产气肠杆菌)、JF346895.1(产气肠杆菌)、GU563755.1(泛菌)等具有99%的相似性,经葡萄糖代谢验证,该菌株能够利用葡萄糖产生酸但不产气,结合形态学观察,该菌属于泛菌属,定名为*Pantoea* sp. 1-2,此前已有

少量泛菌生产脲水解酶的报道^[19]。

2.2 脲水解酶产量优化

碳源和氮源在菌体的培养和产酶过程中有着重要的作用,选择合适的碳源和氮源既能够有效提高生产效率,又能够降低生产成本,在菌体发酵和理论研究中至关重要.本研究对常用碳源(包括葡萄糖、淀粉、木糖、乳糖、糊精、麦芽糖、蔗糖、壳聚糖)和氮源(硫酸铵、硝酸铵、牛肉粉、尿素、蛋白胨、酵母浸粉)进行研究,分析其对该菌株产酶的影响.

2.2.1 碳源对脲水解酶活力的影响 为确定菌株产酶的最适碳源,在产酶培养基中分别加入质量浓度为10 g/L的不同碳源,其它成分如1.2中产酶培养基,考察不同碳源对菌株产酶活力的影响.采用常用碳源葡萄糖作为对照,比较不同碳源对产酶的影响.结果表明在含有10 g/L的壳聚糖培养基上菌株产酶能力最高,达到8.26 U/mL,其次,麦芽糖、糊精、木糖等作为碳源时菌株的产酶能力也高于葡萄糖(图2).

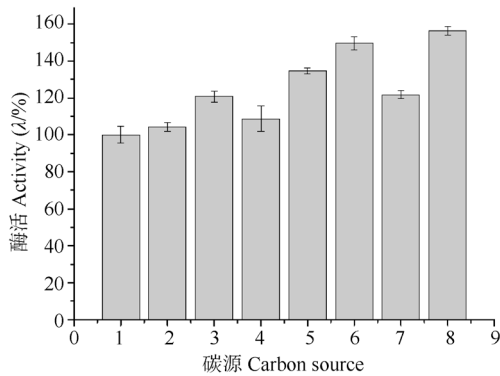


图2 碳源对菌株产酶的影响

Fig. 2 Effect of carbon sources on enzyme production

1: 葡萄糖; 2: 淀粉; 3: 木糖; 4: 乳糖; 5: 糊精; 6: 麦芽糖; 7: 蔗糖; 8: 壳聚糖
1: glucose; 2: starch; 3: xylose; 4: lactose; 5: dextrin; 6: maltose; 7: saccharose; 8: chitosan

2.2.2 氮源对脲水解酶活力的影响 为确定菌株的最适氮源,在培养基中添加了10 g/L的不同氮源,其它成分如1.2中产酶培养基,考察菌株在不同氮源中的产酶能力,采用最适氮源硫酸铵作为对比.结果表明该菌最适氮源为无机氮源硫酸铵,其次为无机氮源硝酸铵.利用无机氮源硫酸铵和硝酸铵的产酶能力是酵母粉和蛋白胨的两倍左右(图3),这与传统微生物的产酶多以有机氮为氮源有一定的差异.无机氮源作为发酵氮源能够有效降低该菌株发酵产酶的成本,这使得该菌株具有很好的工业利用前景.

经过优化后,采用10 g/L的硫酸铵作为氮源,10 g/L的壳聚糖作为碳源,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16.45 U/mL的脲水解酶.

2.3 脲水解酶催化的影响因素

2.3.1 金属离子 在反应体系中添加1 mmol/L的金属离子,测定与对照活性的差异.结果表明在添加1 mmol/L的钴离子、钙离子和锌离子对泛菌 *Pantoea* sp. 1-2脲水解酶不产生

抑制作用,反而使催化活性有一定程度的提高.镁离子、铁离子和铜离子能够在一定程度上抑制脲水解酶的活性,最大抑制率约40%(图4).研究结果表明绝大多数金属离子对该脲水解酶不具有强抑制作用,表明该脲水解酶在污水处理、食品、农药以及畜牧业等方面具有较好的应用前景,这与Khandelwal A. K.等人对金属离子对防线菌脲水解酶的研究^[20]具有一定的一致性.

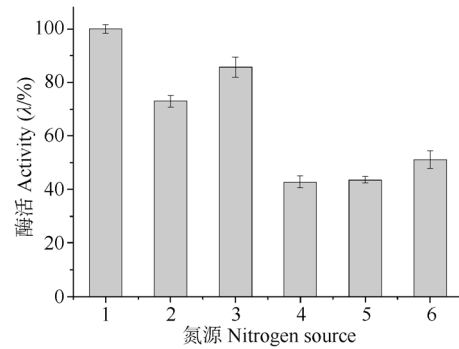


图3 氮源对菌株产酶影响

Fig. 3 Effect of nitrogen sources on enzyme production

1: 硫酸铵; 2: 硝酸铵; 3: 牛肉粉; 4: 尿素; 5: 蛋白胨; 6: 酵母浸粉
1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2: NH_4NO_3 ; 3: beef powder; 4: urea; 5: peptone; 6: yeast extract

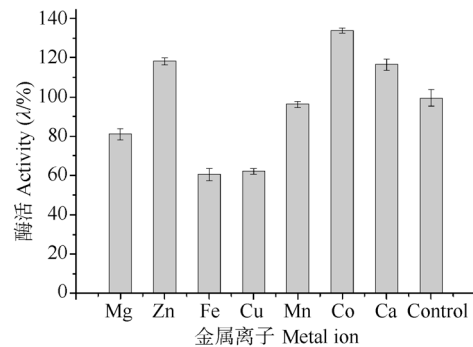


图4 金属离子对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of metal ions on the enzyme activity

2.3.2 pH 研究表明,泛菌 *Pantoea* sp. 1-2的最适反应pH在7左右,在6.6-7.6之间脲水解酶活性能够保持在最高酶活性的80%以上,表明该酶pH耐受性较好,能够在较大的范围内有效起到催化作用,可用范围较广(图5).

2.3.3 温度 温度是影响酶催化和酶稳定性的重要因素,同时也制约着酶的应用范围.研究表明, *Pantoea* sp. 1-2菌株最适催化温度约为30 °C,在22-45 °C范围内催化活性大于最大酶活性的80%(图6).该催化温度适合在室温下进行,能够有效降低反应的成本,适宜于规模化应用.

2.3.4 脲水解酶催化的稳定性 脲水解酶的催化可持续性对于脲水解酶の利用有着重要的意义.适量菌体加入含有10 mmol/L对羟基苯乙脲的pH 7.0的醋酸醋酸钠反应体系中,在反应30 h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,30 h产物约为一次转化的97%(图7),在误差

可允许范围内,表明泛菌*Pantoea* sp. 1-2的脲水解酶催化稳定性良好,可持续催化能力强。

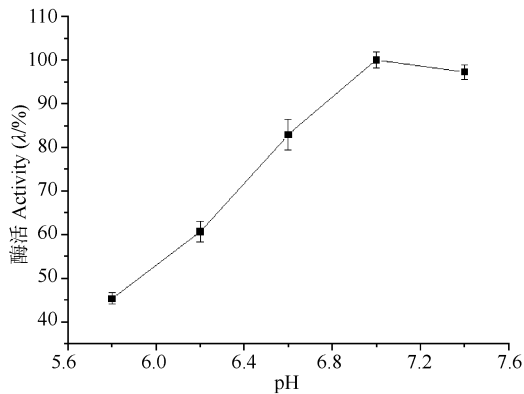


图5 pH对脲水解酶的影响

Fig. 5 Effect of pH on the nitrilase activity

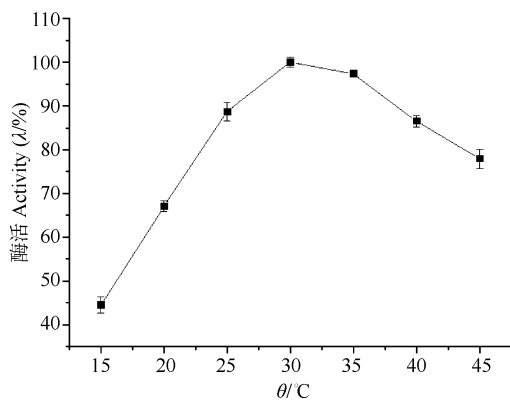


图6 温度对脲水解酶的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the nitrilase activity

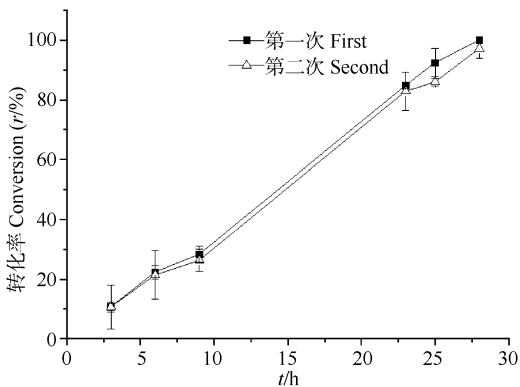


图7 脲水解酶的稳定性

Fig. 7 Stability of nitrilase

3 结论

本研究利用初步活化、二次分级胁迫富集有效提高了筛选高产脲水解酶的效率;并结合Berthelot法高通量筛选与高压液相精细筛选有效提高了筛选效率和确保筛选准确率。最终通过底物广泛性验证,发现鉴定为泛菌*Pantoea* sp. 1-2的菌株具有较好的底物广泛性,能够氧化脂肪族脲类、羧基脂肪脲类和芳香脲类。该菌株能够利用壳聚糖作为最佳碳源,

并且能够利用价格较为廉价的硫酸铵、硝酸铵等作为最佳氮源,有效降低了该菌生产成本,经过初步优化,采用10 g/L的硫酸铵作为氮源,10 g/L的壳聚糖作为碳源的产酶培养基中,能够产生酶活力单位为16.45 U/mL的脲水解酶,该酶活略低于王铁刚等人经过诱变和优化后的26.77 U/mL^[21],具有较好的开发和进一步优化的价值。此外,该脲水解酶具有较好的pH广泛性,金属离子抗性较好^[20],温度广泛性较好,反应稳定性较高,这都为该菌株在脲水解领域的应用奠定了基础。

脲类引起的水源及食品污染对人体有巨大的毒害作用。脲水解酶特别是具有良好的底物广泛性的脲水解酶可用于食品、电镀等领域脲污染废水的生物治理。当前对脲水解酶的研究主要集中在开发具有高度化学、区域和立体选择性的脲水解酶上,但此类水解酶由于底物广泛性的限制,很难广泛应用于食品、农业、畜牧业及环境等行业的脲污染防治。而本研究筛选获得产脲水解酶的*Pantoea* sp. 1-2菌株具有良好的底物广泛性,能够在一定程度上加以弥补,具有重要的开发价值。

参考文献 [References]

- 1 Kitson SL, Watters W, Murrell VL, Moody TS. Hydrolysis of [(14)C] nitrile using nitrilase (Nit) biocatalysts [J]. *J Labelled Compd Rad*, 2011, **54** (7): 396-397
- 2 He YC, Ma CL, Xu JH, Zhou L. A high-throughput screening strategy for nitrile-hydrolyzing enzymes based on ferric hydroxamate spectrophotometry [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2011, **89** (3): 817-823
- 3 Martinkova L, Kren V. Biotransformations with nitrilases [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, **14** (2): 130-137
- 4 Thuku RN, Brady D, Benedik MJ, Sewell BT. Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, **106** (3): 703-727
- 5 Baum S, Williamson DS, Sewell T, Stolz A. Conversion of sterically demanding alpha,alpha-disubstituted phenylacetone nitriles by the arylacetone nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191 [J]. *Appl Environ Microb*, 2012, **78** (1): 48-57
- 6 Yang CS, Wang XD, Wei DZ. A new nitrilase-producing strain named *Rhodobacter sphaeroides* LHS-305: biocatalytic characterization and substrate specificity [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2011, **165** (7-8): 1556-1567
- 7 Yeom SJ, Lee JK, Oh DK. 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 [J]. *Febs Lett*, 2010, **584** (1): 106-110
- 8 Luo H, Fan L, Chang YH, Ma JW, Yu HM, Shen ZY. Gene cloning, overexpression, and characterization of the nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* tgl-A6 in *E. coli* [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2010, **160** (2): 393-400
- 9 Petrickova A, Vesela AB, Kaplan O, Kubac D, Uhnakova B, Malandra A, Felsberg J, Rinagelova A, Weyrauch P, Kren V, Bezouska K, Martinkova L. Purification and characterization of heterologously expressed

- nitrilases from filamentous fungi [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2012, **93** (4): 1553-1561
- 10 Kaplan O, Bezouska K, Plihal O, Ettrich R, Kulik N, Vanek O, Kavan D, Benada O, Malandra A, Sveda O, Vesela AB, Rinagelova A, Slamova K, Cantarella M, Felsberg J, Duskova J, Dohnalek J, Kotik M, Kren V, Martinkova L. Heterologous expression, purification and characterization of nitrilase from *Aspergillus niger* K10 [J]. *BMC Biotechnol*, 2011, **11**: 2
- 11 Kaplan O, Bezouska K, Malandra A, Vesela AB, Petrickova A, Felsberg J, Rinagelova A, Kren V, Martinkova L. Genome mining for the discovery of new nitrilases in filamentous fungi [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, **33** (2): 309-312
- 12 Vejvoda V, Kubac D, Davidova A, Kaplan O, Sulc M, Sveda O, Chaloupkova R, Martinkova L. Purification and characterization of nitrilase from *Fusarium solani* IM1196840 [J]. *Process Biochem*, 2010, **45** (7): 1115-1120
- 13 Schreiner U, Hecher B, Obrowsky S, Waich K, Klempier N, Steinkellner G, Gruber K, Rozzell JD, Glieder A, Winkler M. Directed evolution of *Alcaligenes faecalis* nitrilase [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2010, **47** (4): 140-146
- 14 周冬杰, 欧阳立明, 许建和, 周鹏鹏, 潘江. 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 [Zhou DJ, Ouyang LM, Xu JH, Zhou PP, Pan J. Rapid screening of nitrilase producing strains in soil [J]. *J East China Univ Sci Technol*, 2009, **35** (4): 545-548]
- 15 吴明火, 蔡谦, 郑裕国, 沈寅初. 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 [Wu MH, Cai Q, Zheng YG, Shen YC. Hydroxyphenyl acetonitrile hydrolase producing strain and enzyme production conditions [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2005, **3** (4): 32-44]
- 16 Martinková L, Vejvoda V, Kren V. Selection and screening for enzymes of nitrile metabolism [J]. *J Biotechnol*, 2008, **133** (3): 318-326
- 17 Yazbeck DR, Durao PJ, Xie ZY, Tao JH. A metal ion-based method for the screening of nitrilases [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2006, **39** (1-4): 156-159
- 18 Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J Bacteriol*, 1991, **173** (2): 697-703
- 19 Kakeya H, Sakai N, Sugai T, Ohta H. Microbial hydrolysis as a potent method for the preparation of optically active nitriles, amides and carboxylic acids [J]. *Tetrahedron Lett*, 1991, **32** (10): 1343-1346
- 20 Khandelwal AK, Nigam VK, Vidyarthi AS, Ghosh P Evaluation of various ions and compounds on nitrilase produced from *Streptomyces* sp. [J]. *Artif Cell Blood Sub*, 2010, **38** (1): 13-18.
- 21 王铁刚, 罗晖, 于慧敏, 杨慧芬, 沈忠耀. 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 [Wang TG, Luo H, Yu HM, Yang HF, Shen ZY. Mutagenesis of the production of nitrilase strains and culture optimization [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2007, **5** (1): 41-44]