



金属离子对红球菌腈水合酶活力的影响

宋洋, 钟莉萍, 张锦丽, 王敏

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 不同金属离子对红球菌(*Rhodococcus sp.*) TCCC 28001 的生长及其腈水合酶的酶活有着不同程度的影响. 菌株 TCCC 28001 产生的腈水合酶是钴型, 且 Co^{2+} 对该腈水合酶诱导激活的最适浓度为 $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. 选择酵母粉中含有且含量波动较大的 5 种金属离子, 考察了在添加 $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Co^{2+} 诱导激活下, 5 种金属离子对酶活的影响. 结果表明: Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mo^{6+} 、 Cu^{2+} 4 种金属离子具有促进作用, Zn^{2+} 产生轻微抑制作用. $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Fe^{2+} 的促进效果显著, 使菌株 TCCC 28001 的酶活从 453 U/mL 增加到 1 941 U/mL, 提高了 328%.

关键词: 腈水合酶; 金属离子; 酶活力; 红球菌

中图分类号: TQ920.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2009)01-0011-04

Effect of Metal Ions on *Rhodococcus sp.* Nitrile Hydratase Activity

SONG Yang, ZHONG Li-ping, ZHANG Jin-li, WANG Min

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Different metal ions have different effect on the growth of *Rhodococcus sp.* TCCC 28001 and nitrile hydratase activity. The nitrile hydratase of strain TCCC 28001 is cobalt-type. The best concentration of Co^{2+} is $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Choose five metal ions in yeast extract, which have major fluctuant, to investigate its effect on nitrile hydratase activity under $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Co^{2+} induction and activation. Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mo^{6+} 、 Cu^{2+} have auxoaction while Zn^{2+} have light depressant effect. Fe^{2+} have the best auxoaction. It made nitrile hydratase activity of strain TCCC 28001 from 453 U/mL to 1 941 U/mL. And the increase value is 328%.

Keywords: nitrile hydratase; metal ion; enzyme activity; *Rhodococcus sp.*

腈水合酶(nitrile hydratase, E.C.4.2.1.84, 简称 NHase)是某些微生物在进行脲或脲代谢过程中产生的一种蛋白质, 可以将腈类物质的氰基(—CN)催化水合为酰胺(—CONH—). 利用这种酶将丙烯腈水合为丙烯酰胺是一种安全高效节能的生产工艺. 腈水合酶是以硫原子和半胱氨酸-亚磺酸残基(Cys112)为活性中心的一类可催化腈水解的酶^[1].

腈水合酶为金属酶, 按其活性中心螯合金属离子种类的不同, 可将其分为钴型腈水合酶和铁型腈水合酶两大类^[2]. Huang^[3]等人研究了铁型腈水合酶的晶体结构, 铁离子与酶侧链三个半胱氨酸残基上的硫原

子、主链丝氨酸以及第三个半胱氨酸上的氮原子形成八面体结构. 钴型腈水合酶和铁型腈水合酶序列高度相似, 表明钴离子与酶活性中心具有相似的结合方式和结构. 含钴离子的有玫瑰红球菌 *Rhodococcus Rhodochropus* J1^[4-5], 嗜热假诺卡氏菌 *Pseudonocardia thermophila* JCM3095^[6]等, 含铁离子的有棒状杆菌 *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* ZBB-41^[7], 红球菌 *Rhodococcus sp.*N-774^[8]等.

在对腈水合酶的结构与功能关系研究的基础上, Michihiko Kobayashi^[9]提出了钴型腈水合酶的催化机理:

收稿日期: 2008-03-10; 修回日期: 2008-04-21

基金项目: 国家科技基础条件平台资助项目(2005DKA21204-10)

作者简介: 宋洋(1983—), 女, 天津人, 硕士研究生.

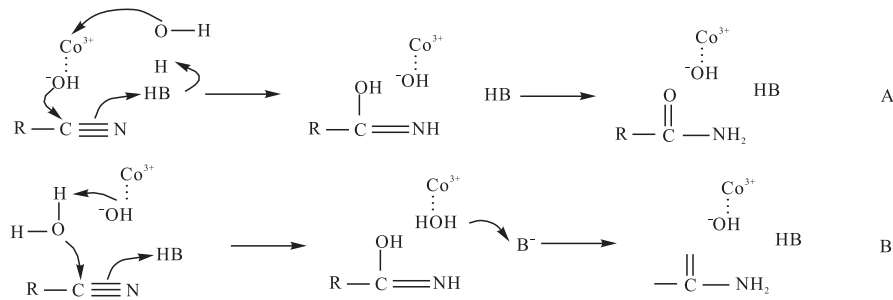


图1 钴型腈水合酶的催化机理

Fig.1 Catalytic mechanisms of Co-NHase

腈水合酶中的钴离子起到Lewis酸(可以接受电子对)的作用. 首先, 钴离子与腈以及周围的水分子结合, 激活腈基中的三键, 并在辅酶PQQ(吡咯喹啉醌)的共同作用下水合^[10]. 一腈基靠近—OH 或者一个与金属离子形成共价键的水分子, 然后, —OH(如图 1A所示)或者被活化的水分子(如图 1B所示)攻击腈基中的碳负离子, 形成一个亚酰胺, 最后, 亚酰胺异构化生成酰胺^[11]. 金属离子在其催化活性中心起着重要作用, 培养基中酵母粉等天然原料所含的金属离子对腈水合酶活力会产生显著影响. 本文旨在分析几种金属离子对腈水合酶活力的不同影响, 为合理控制培养基中各组分所含金属离子的种类与含量等提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 菌种

红球菌(*Rhodococcus sp.*) TCCC 28001, 天津科技大学微生物菌种保藏管理中心保藏.

1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂条 20, pH 7.2~7.4.

种子培养基(g/L): 甘油 10, 蛋白胨 5, 麦芽浸粉 3, 酵母粉 3, NaCl 0.5, pH 7.2.

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 5, 尿素 7, 谷氨酸钠 1, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, CoCl₂ 10×10⁻⁵mol/L, 依实验目的不同加入不同种类和浓度的金属离子.

1.3 菌种培养方法

斜面培养: 菌种接种到斜面上, 28℃恒温培养 72 h, 4℃冰箱保存.

种子培养: 取一环斜面菌体接种于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 180 r/min, 30℃振荡培养 25 h.

发酵培养: 将种子以 6% 的接种量接种到装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 180 r/min, 于 28℃振荡培养 72 h. 培养结束后取一定的发酵液测定其吸光度和腈水合酶活力.

菌悬液的制备: 将培养好的菌液离心收集菌体, 并用KH₂PO₄-K₂HPO₄缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.0)反复洗涤 2 次, 悬浮于等体积的磷酸盐缓冲液中.

1.4 菌体吸光度的测定

采用分光光度计法. 取 1 mL 菌液稀释 50 倍用紫外分光光度计在 600 nm 下进行检测.

1.5 酶活的测定

1.5.1 腈水合酶活力定义及计算公式

腈水合酶活力定义为: 28℃、1 min 内催化丙烯腈生成 1 μmol 丙烯酰胺所需的酶量为一个活力单位(U).

$$\text{腈水合酶活力} = \frac{C_{AM} \times V_{反} \times 10^{-3}}{M_{AM} \times t} \quad (1)$$

式中: t 为酶催化反应时间, 10 min; M_{AM} 为丙烯酰胺分子摩尔质量, 71.08 g/mol; C_{AM} 为样品中丙烯酰胺的质量浓度, g/L; $V_{反}$ 为酶催化反应体系的总体积, 10 mL.

1.5.2 待测样品制备方法

在三角瓶中加入 9 mL KH₂PO₄-K₂HPO₄缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.0)和 0.5 mL 丙烯腈纯品, 28℃预热 5 min, 加入 0.5 mL 菌悬液, 120 r/min 下振荡反应 5 min, 加入 1 滴 6 mol/L 盐酸溶液终止反应.

1.5.3 产物检测方法

采用气相色谱(GC)分析法, 以乙酰胺作内标.

待测样品的制备方法: 将上述得到的培养液离心(4 500 r/min, 20 min), 取上清液与 4% 的乙酰胺溶液等体积混合.

气相色谱条件: 气相色谱仪为 TECHCOMP GC7890II, FID, Porapak Q 不锈钢填充柱(2 m× ϕ 3 mm); 柱温 180℃, 检测器温度 220℃; 载气为 N₂,

流量 40 mL/min.

1.6 相对酶活和相对吸光度的计算

$$\text{相对酶活} = \frac{U_{\text{后}}}{U_{\text{前}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $U_{\text{前}}$ 为只添加 $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L Co}^{2+}$ 时的酶活; $U_{\text{后}}$ 为添加其他金属离子和 $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L Co}^{2+}$ 时的酶活.

$$\text{相对吸光度} = \frac{A_{\text{后}}}{A_{\text{前}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $A_{\text{前}}$ 为只添加 $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L Co}^{2+}$ 时的吸光度; $A_{\text{后}}$ 为添加其他金属离子和 $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L Co}^{2+}$ 时的吸光度.

2 结果

2.1 腈水合酶类型的分析

腈水合酶为诱导酶,只有当培养体系中加入特定的诱导剂以后,酶的含量和活性才显著提高^[12].由表1可知,添加 Co^{2+} 时的酶活显著高于添加其他金属离子和对照的酶活,表明菌株TCCC 28001的腈水合酶为钴型腈水合酶.钴离子浓度对腈水合酶活力及菌体生长的影响见图2.

表1 金属离子对腈水合酶活力的影响

Tab.1 Effect of metal ion on nitrile hydratase activity

金属离子	浓度/($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	腈水合酶活力/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Co^{2+}	10	1 039
Fe^{2+}	10	7
Cu^{2+}	10	6
Mo^{6+}	10	6
Mn^{2+}	10	6
Zn^{2+}	10	6
对照	0	6

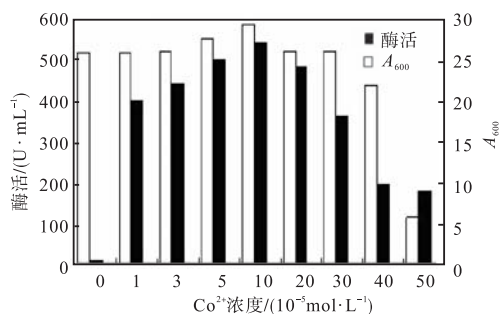


图2 Co^{2+} 对菌株TCCC 28001菌体生长及腈水合酶活力的影响

Fig.2 Effect of concentration of cobalt ion on nitrilehydratase activity and the growth of strain TCCC 28001

由图可见: Co^{2+} 浓度在 $0 \sim 10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内,

随着钴离子浓度的增大,更多的钴离子参与到酶的诱导激活中,与酶的活性中心螯合,使腈水合酶活力升高;由于钴是重金属,对菌体细胞有毒害作用,在 $(20 \sim 50) \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内,菌体生长出现抑制,从而导致腈水合酶活力下降;在 $50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时,对菌体生长具有强烈抑制作用. Co^{2+} 浓度为 $10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时,腈水合酶活力达到最高,为 545 U/mL .

2.2 不同金属离子对菌株TCCC 28001 菌体生长和腈水合酶活性的影响

2.2.1 Fe^{2+} 对菌体生长和腈水合酶酶活的影响

从图3看出, Fe^{2+} 对菌株TCCC 28001 生长和腈水合酶的酶活有明显的促进作用,这种促进作用在 $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L Fe}^{2+}$ 时达到最大,相对酶活为 328%, 腈水合酶酶活力达到 1941 U/mL .

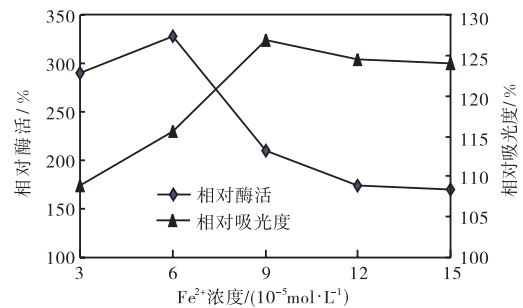


图3 Fe^{2+} 对菌体生长及腈水合酶活力的影响

Fig.3 Effect of concentration of Fe^{2+} on nitrile hydratase activity and the growth of strain

2.2.2 Cu^{2+} 对菌体生长和腈水合酶酶活的影响

如图4所示, Cu^{2+} 对菌体生长和腈水合酶酶活有促进作用,当 Cu^{2+} 浓度为 $9 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时,腈水合酶相对酶活和相对吸光度达到 192% 和 142%.

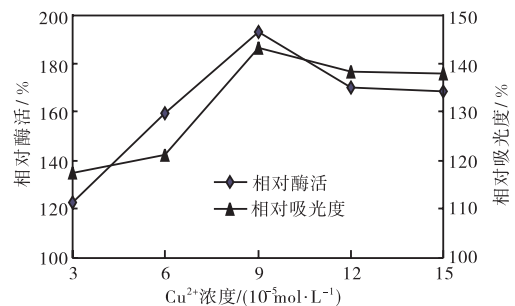


图4 Cu^{2+} 对菌体生长及腈水合酶活力的影响

Fig.4 Effect of concentration of Cu^{2+} on nitrile hydratase activity and the growth of strain

2.2.3 Mo^{6+} 对菌体生长和腈水合酶酶活的影响

由图5可见, Mo^{6+} 对菌体生长和酶活有明显的促进作用,当 Mo^{6+} 浓度为 $9 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 相对酶活和相对吸光度分别为 232% 和 154%.

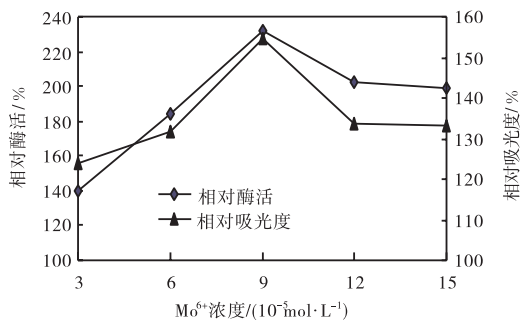


图5 Mo⁶⁺对菌体生长及腈水合酶活力的影响

Fig.5 Effect of concentration of Mo⁶⁺ on nitrile hydratase activity and the growth of strain

2.2.4 Mn²⁺对菌体生长和腈水合酶酶活的影响

如图6所示, Mn²⁺对菌体生长和酶活有促进作用, 当Mn²⁺浓度为3×10⁻⁵ mol/L时, 相对酶活为282%.

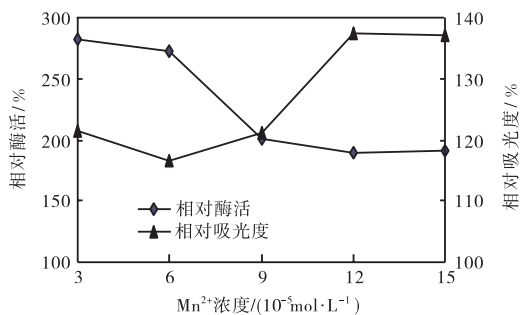


图6 Mn²⁺对菌体生长及腈水合酶活力的影响

Fig.6 Effect of concentration of Mn²⁺ on nitrile hydratase activity and the growth of strain

2.2.5 Zn²⁺对菌体生长和腈水合酶酶活的影响

由图7可以看出, Zn²⁺对菌体生长和酶活有轻微的抑制作用, 最低相对酶活为73%.

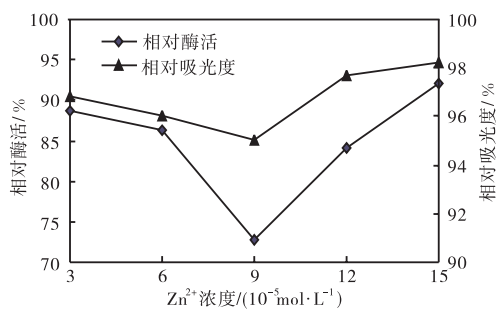


图7 Zn²⁺对菌体生长及腈水合酶活力的影响

Fig.7 Effect of concentration of Zn²⁺ on nitrile hydratase activity and the growth of strain

3 讨论

菌株TCCC 28001 产的腈水合酶为钴型, Co²⁺最佳添加浓度为 10×10⁻⁵ mol/L.

不同金属离子对菌株TCCC 28001 产生的钴型腈水合酶活力的影响不同, 其中Fe²⁺、Mn²⁺、Mo⁶⁺、Cu²⁺ 4种金属离子具有促进作用, Zn²⁺产生轻微抑制作用. 推测原因可能是Zn²⁺占据了底物与酶的结合位点即酶活中心, 改变了酶的构象, 从而使酶活受到抑制. 当Fe²⁺浓度为 6×10⁻⁵ mol/L的促进效果最好, 使酶活从 453 U/mL提高到 1 941 U/mL, 提高了 328%.

金属离子在酶的催化反应中起到重要作用, 估计有 1/3 的酶在催化过程的一个或几个阶段中需要金属离子. 金属离子通过使底物直接结合到活性部位, 或者通过可逆的改变金属离子的氧化态调节氧化还原, 或者通过静电稳定屏蔽负电荷等途径参加酶的催化反应^[13]. 不同的金属离子对酶活力的影响不同, 它们对酶的结构和功能所起的作用也不同, 一般认为酶和金属离子的关系分为三类: (1) 金属离子与酶蛋白紧密结合, 在酶的分离纯化中不相分离, 作为酶的组成部分, 金属离子作为辅因子, 比如本文中的钴离子; (2) 金属离子与酶蛋白松散结合, 纯化的酶往往不含这类金属离子, 但当加入这些金属离子后酶活大大提高, 称为酶的金属离子激活剂; (3) 金属离子可抑制酶活力, 成为酶的金属离子抑制剂^[14].

蔡谦^[15]等人研究了在菌株E10a培养基中添加一定量的钴离子和铁离子以后, 继续添加其他金属离子对对羟基苯乙腈水合酶活力的影响. 结果表明: Fe²⁺、Zn²⁺、Ni⁺、Mg²⁺、Li⁺、Hg⁺、Co²⁺、Ba²⁺对对羟基苯乙腈水合酶有明显的促进作用, Cu²⁺对酶有抑制作用. 其中Fe²⁺的结果与本文相一致, Zn²⁺和Cu²⁺的结果与本文不同, 可能因为不同菌株产生的不同腈水合酶存在差异.

Michihiko Kobayashi^[9]推测了钴型腈水合酶需要钴离子的原因: 其一, 钴对CN三键水合具有很好的催化作用; 其二, 钴可能对于酶蛋白形成正确的构象、稳定酶多肽亚基是必需的. 在培养基中添加镍、铁可以形成没有催化活性的腈水合酶蛋白, 表明镍和铁在酶的折叠过程中与钴起着相似的作用. 但对于腈类物质的水合没有催化作用. 本文在培养基中添加Fe²⁺、Cu²⁺、Mo⁶⁺、Mn²⁺可以促进钴型腈水合酶的活力, 推测其原因可能为Fe²⁺、Cu²⁺、Mo⁶⁺、Mn²⁺与Co²⁺一样可以促进酶折叠, 进而形成更多量的具有正确构象的腈水合酶, 在Co²⁺的诱导激活下, 这些具有正确构象的腈水合酶表达出来, 从而使酶活升高. 但添加过多的金属离子对菌体生长不利, 甚至抑制菌体生长, 使得产酶量下降, 酶活降低.

(下转第 18 页)