



一株腈水合酶产生菌的筛选、鉴定及培养条件研究

钟莉萍, 张锦丽, 宋 洋, 张朝正

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以葡萄糖为碳源, 逐步增大培养基中丙烯腈浓度进行重复续代培养, 从土样中筛选到一株腈水合酶活力较高的菌株. 经形态观察和 16S rDNA 序列分析, 该菌株鉴定为红球菌属 (*Rhodococcus*) 菌株, 命名为 *Rhodococcus* sp. TCCC 28001. 对菌株 TCCC 28001 培养条件进行了初步研究, 确定培养基为葡萄糖 15 g/L, 酵母粉 5 g/L, 尿素 7 g/L, Co^{2+} 10×10^{-5} mol/L. 28 °C, 180 r/min 培养 72 h, 腈水合酶活力达 892 U/mL.

关键词: 丙烯腈; 腈水合酶; 红球菌; 菌种鉴定

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 04-0035-05

Study on Screening, Identification and Culture Conditions of a Strain with Nitrile Hydratase

ZHONG Li-ping, ZHANG Jin-li, SONG Yang, ZHANG Chao-zheng

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

Abstract: A strain with nitrile hydratase activity, was isolated and screened from soil, by repeated subcultured in the medium culture containing increasing acrylonitrile and glucose as the carbon source. According to morphology and 16S rDNA sequence analysis, the strain is belonged to genus *Rhodococcus*, named as *Rhodococcus* sp. TCCC 28001. After optimizing the culture conditions, the optimum conditions are as follows: glucose 15 g/L, yeast extract 5 g/L, urea 7 g/L, Co^{2+} 10×10^{-5} mol/L. As the strain was cultured with the optimized culture medium and a rotation rate of 180 r/min for 72 h at 28 °C, the nitrile hydratase activity could reach 892 U/mL.

Keywords: acrylonitrile; nitrile hydratase; *Rhodococcus*; strain identification

腈 (R—CN) 是一类重要化合物, 其水解反应广泛应用于氨基酸、酰胺 (R—CONH₂)、羧酸 (R—COOH) 及其衍生物的合成^[1]. 自然界中一些微生物能利用腈作为生长所必需的碳源和氮源, 将腈转化为其他有机物. 与化学水解法相比, 微生物催化法具有条件温和, 环境污染小, 腈转化率高等优点, 并能实现化学选择、区域选择和对映选择^[2,3]. 因此从自然界中筛选具有腈转化能力的微生物菌种尤为重要.

腈水合酶产生菌的种类多、分布广, 目前已应用

于丙烯酰胺工业生产的微生物有红球菌 (*Rhodococcus*)、诺卡氏菌 (*Nocardia*)、假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia*)、棒状杆菌 (*Corynebacterium*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、产碱杆菌 (*Alcaligenes*)、短杆菌 (*Brevibacterium*) 等^[4]. 由于腈水合酶对腈类化合物的专一性的不同及其底物的多样性, 本文采用丙烯腈为底物从丙烯酸胺生产厂附近的土样中筛选一株腈水合酶产生菌, 并进行了鉴定. 初步研究了该菌的培养条件.

收稿日期: 2008-01-09; 修回日期: 2008-03-11

基金项目: 国家科技基础条件平台项目 (2005DKA21204-10)

作者简介: 钟莉萍 (1984—), 女, 江西人, 硕士研究生.

1 材料与方法

1.1 材料

土样从丙烯酰胺生产厂附近采集. 丙烯腈、丙烯酰胺、乙酰胺等试剂均为分析纯.

1.2 培养基

斜面培养基 (g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 1, NaCl 5, 琼脂 2, pH 7.2.

富集培养基 (g/L): 葡萄糖 5, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5×10^{-5} mol/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5×10^{-5} mol/L, pH 7.0. 灭菌后加入一定浓度的丙烯腈.

分离培养基 (g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 1, NaCl 5, 琼脂 2, pH 7.2. 灭菌后加入 3% 的丙烯腈.

种子培养基 (g/L): 甘油 10, 蛋白胨 5, 麦芽汁 3, 酵母粉 3, pH 7.0.

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 15, 酵母粉 5, 尿素 7, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 谷氨酸钠 1, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10×10^{-5} mol/L, pH 7.2.

1.3 腈水合酶产生菌的筛选

1.3.1 腈水合酶产生菌的分离

称取土样 5g 于 50 mL 水中, 用玻璃珠振荡打碎, 取悬浊液 5 mL 于装有 25 mL 富集培养基 (含有 0.3% 丙烯腈) 的 250 mL 三角瓶中, 于 30 °C、180 r/min 培养 3~4 d; 然后取 5 mL 富集后的培养物于 25 mL 新鲜的富集培养基 (含有 0.6% 丙烯腈) 中进行第二轮培养. 培养 3~4 d 后进行第三轮富集培养 (富集培养基含有 1.0% 丙烯腈), 培养 3~4 d 后涂布于分离平板. 30 °C 培养 3~4 d, 挑取单菌落转接于试管中保藏.

1.3.2 丙烯腈转化能力的测定

(1) 转化方法

取 1 环斜面种子接种于装有 30 mL 富集培养基 (含有 0.3% 丙烯腈) 的 250 mL 三角瓶中, 于 180 r/min、30 °C 下培养 72 h. 然后向培养液中添加 3% 的丙烯腈, 每隔一定时间取样测定丙烯腈转化率.

(2) 检测方法^[5]

采用气相色谱分析法, 用乙酰胺作为内标. 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 °C, 检测器温度 220 °C; 载气为 N_2 , 流速 40 mL/min.

待测样品的制备方法是将上述得到的培养液离

心, 取上清液与 4% 的乙酰胺溶液等体积混合.

$$\text{丙烯腈转化率} = \frac{C_{\text{AM}} \times V_{\text{反}} \times M_{\text{AN}}}{\rho_{\text{AN}} \times V_{\text{AN}} \times M_{\text{AM}}} \times 100\%$$

式中: ρ_{AN} 为丙烯腈密度, 0.806 g/L; V_{AN} 为加入丙烯腈的体积, mL; M_{AN} 为丙烯腈分子的摩尔质量, 53.06 g/mol; C_{AM} 为待测液中丙烯酰胺的质量浓度, g/L; $V_{\text{反}}$ 为酶催化反应体系的总体积, mL; M_{AM} 为丙烯酰胺分子质量, 71.08 g/mol.

1.4 腈水合酶产生菌的鉴定

1.4.1 形态观察

将已活化好的菌株接种到 LB 培养基中, 30 °C 培养, 定时取样观察菌体细胞形态及大小. 将活化菌株在 LA 平皿上划线分离, 28 °C 倒置培养 3~4 d, 观察菌落形态.

1.4.2 16S rDNA 序列分析法鉴定

以 CTAB/NaCl 法提取细菌总 DNA^[6]. 以细菌总 DNA 为模板, 以 16S rDNA 的通用引物 P1: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 P2: 5'-AAG GAGGTGATCCAGCCGCA-3' 为扩增引物, 进行 PCR 扩增. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 采用宝生物工程公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的条带. 然后采用上海生工的 pUC_m-T 载体 PCR 产物克隆试剂盒, 将回收的 PCR 产物连接到 pUC_m-T 载体上. 再将重组质粒转化到 *E.coli* DH5 α 中, 进行蓝白斑筛选, 转化子鉴定. DNA 序列测定由上海生工生物工程技术服务有限公司完成.

1.5 生物量的测定

将培养液稀释适当倍数, 以空白培养基作为对照, 在 600 nm 处测定培养液的吸光度.

1.6 腈水合酶活力测定

1.6.1 菌悬液的制备

将斜面种子接种于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 180 r/min、30 °C 培养 25 h. 然后以 6% 的接种量接种到装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 180 r/min、28 °C 培养 72 h. 离心收集菌体, 并用 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.0) 洗涤 2 次, 悬浮于等体积的磷酸盐缓冲液中.

1.6.2 腈水合酶活力的测定^[5]

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

在三角瓶中加入 9 mL KH_2PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.0) 和 0.5 mL 丙烯腈, 28 °C 预热 5 min, 加入 0.5 mL 菌悬液, 120 r/min 振荡反应

5 min, 用 6 mol/L 盐酸溶液终止反应, 得到的反应液与 4% 的乙酰胺溶液等体积混合, 内标法测定丙烯酰胺质量浓度, 记为 C_{AM} (g/L). 脲水合酶活力计算公式如下:

$$\text{脲水合酶活力} = \frac{C_{AM} \times V_{反} \times 10^{-3}}{M_{AM} \times t}$$

式中: t 为酶催化反应的时间, 10 min; C_{AM} 为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; M_{AM} 为丙烯酰胺分子的摩尔质量, 71.08 g/mol.

2 结果与讨论

2.1 脲水合酶产生菌的筛选

通过定向富集、逐级驯化, 在分离培养基上筛选到 8 株优势生长菌, 分别命名为 ZH1、ZH2、ZH3、ZH4、ZH5、ZH6、ZH7、ZH8, 其丙烯腈的转化能力见图 1, 其中菌株 ZH8 的丙烯腈转化能力最强.

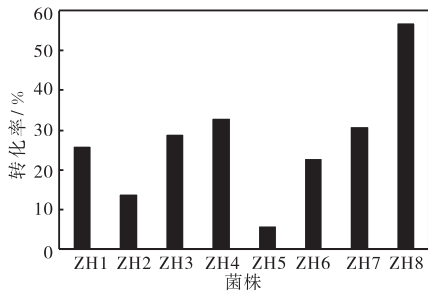


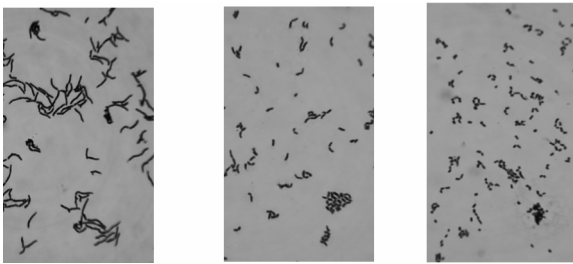
图 1 不同菌株的丙烯腈转化能力

Fig. 1 Conversion rate of acrylonitrile of different strains

2.2 脲水合酶产生菌 ZH8 的菌种鉴定

2.2.1 形态特征

需氧, 无动力, 无芽孢, 革兰氏阳性菌. 其细胞形态复杂多变 (图 2): 在 LB 培养基中培养初期菌体由球形细胞逐步变成长杆状, 继续培养菌体逐步断裂变成短杆状, 培养后期又变成球形. 在 LA 培养平板上, 菌落呈橙红色, 不透明凸起, 湿润, 边缘平整.



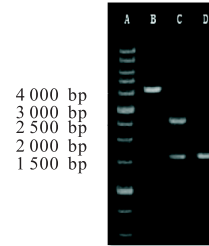
(a) 培养 18 h (b) 培养 42 h (c) 培养 64 h

图 2 菌株 ZH8 的光学显微镜照片

Fig. 2 Microphotograph of strain ZH8

2.2.2 16S rDNA 的序列分析

对含有 16S rDNA 的转化子进行鉴定: 分别采用 *Hind*III 进行单酶切验证, *Kpn*、*Hind*III 进行双酶切验证, M13 测序引物进行 PCR 扩增验证, 电泳谱图见图 3. 16S rDNA 经测序得知其大小为 1 516 bp.



A. 1 000 bp DNA 分子质量标准; B. pUCm-T/16S rDNA / *Hind*III; C. pUCm-T/16S rDNA / *Hind*III - *Kpn*; D. PCR 鉴定

图 3 转化子鉴定

Fig. 3 Transformant identification

将测序结果与 GenBank、EMBL、DDBJ 数据库中的序列进行 Blast, 得知与菌株 ZH8 同源性达 99% 的菌株有 *Rhodococcus* sp.E33 (AY114109)、*Rhodococcus* sp.DEE5151 (AY927223)、*Rhodococcus ruber* M2 (AY247275)、*Rhodococcus ruber* strain AS 4.1038 (AY114117) 等 13 株菌. 菌株 ZH8 的 16S rDNA 序列在 GenBank 中的登录号为 EU167912.

基于 16S rDNA 序列的 ZH8 菌株与红球菌菌株之间的系统发育树可知 (图 4): 菌株 ZH8 与 *Rhodococcus* sp.DEE5151 (AY927223) 具有较高的同源性, 遗传距离最近. 因此将菌株 ZH8 归属为红球菌属 (*Rhodococcus*) 菌种, 命名为 *Rhodococcus* sp.TCCC 28001.

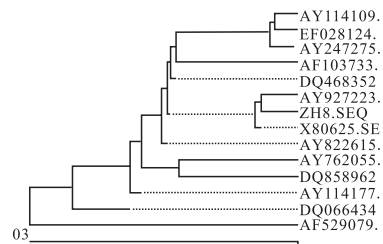


图 4 基于 16S rDNA 序列的 ZH8 菌株与红球菌菌株系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain ZH8 and strains of rhodococcus based on 16S rDNA sequence

2.2.3 *Rhodococcus* sp.TCCC 28001 的培养条件

(1) 碳源对脲水合酶活力的影响

在以 5 g/L 酵母粉为氮源、7 g/L 尿素为诱导剂的发酵培养基中, 添加质量浓度分别为 10 g/L、15 g/L、20 g/L 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘油作为碳源, 观察

碳源对酶活力的影响. 结果(图5)表明,以15 g/L的葡萄糖作为碳源,腈水合酶活力最大.

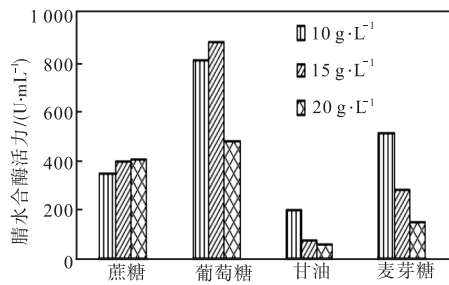


图5 不同碳源对腈水合酶活力的影响

Fig. 5 Effect of different carbon sources on nitrile hydratase activity

(2) 氮源对腈水合酶活力的影响

在以15 g/L葡萄糖为碳源、7 g/L尿素为诱导剂的发酵培养基中,添加质量浓度分别为3、5、7 g/L的酵母粉、蛋白胨、牛肉膏、NH₄Cl作为氮源,观察氮源对酶活力的影响.结果(图6)表明,5 g/L的酵母粉是形成腈水合酶的适宜氮源.

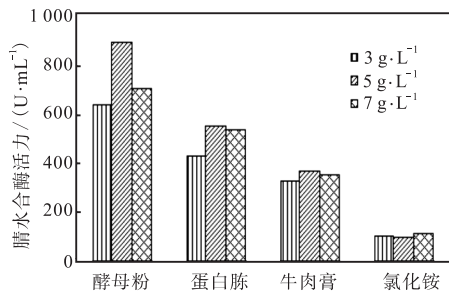


图6 不同氮源对腈水合酶活力的影响

Fig. 6 Effect of different nitrogen sources on nitrile hydratase activity

(3) 尿素对腈水合酶活力的影响

Rhodococcus sp.TCCC 28001产的腈水合酶为诱导酶,诱导剂在腈水合酶的合成过程中具有决定性的作用.只有在培养液中加入特定的诱导剂后,酶的含量和活性才能显著提高.据文献报道^[7,8],丙烯腈水合酶的诱导剂一般为尿素.在发酵培养基中,分别添加3、5、7、9、12 g/L的尿素,考察尿素对酶活力的影响.图7的结果表明:不添加尿素时菌体生物量最大,腈水合酶活力最低;添加7 g/L尿素,腈水合酶活力最高.

(4) 腈水合酶活性中心的分析

腈水合酶是金属酶,其活性部位都含有螯合的金属离子作为辅助因子.其中最常见辅助因子是非血红素铁和非类咕琳钴,分别称为铁型和钴型腈水合酶^[9].在发酵培养基中,分别添加10 × 10⁻⁵ mol/L的

Co²⁺和Fe²⁺,考察*Rhodococcus* sp.TCCC 28001的腈水合酶活性中心.表1可知,与对照相比,Co²⁺对腈水合酶的活性有显著促进作用,腈水合酶活力为892 U/mL.表明*Rhodococcus* sp.TCCC 28001的腈水合酶为钴型酶.

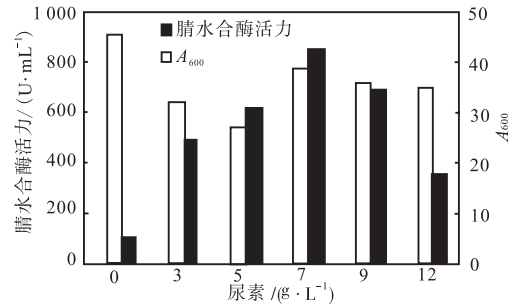


图7 尿素对腈水合酶活力及菌体生长的影响

Fig. 7 Effect of urea on nitrile hydratase activity and the growth

表1 Co²⁺和Fe²⁺对腈水合酶活力的影响

Tab. 1 Effect of Co²⁺ and Fe²⁺ on nitrile hydratase activity

金属离子	腈水合酶活力/(U·mL ⁻¹)
Co ²⁺	892
Fe ²⁺	7
对照	6

3 结 语

从土壤中筛选到一株腈水合酶产生菌,通过形态观察和16S rDNA序列比对分析,初步确定其属于红球菌属(*Rhodococcus*).为进一步研究该菌株的产腈水合酶条件及分析其合适的腈水合酶底物提供了一定的基础.初步研究了培养条件(碳源、氮源、诱导剂尿素、金属离子)对*Rhodococcus* sp.TCCC 28001腈水合酶合成及酶活性的影响,确定了发酵培养基:葡萄糖15 g/L,酵母粉5 g/L,尿素7 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, 谷氨酸钠1 g/L, CoCl₂·6H₂O 10 × 10⁻⁵ mol/L.于28 ℃, 180 r/min条件下培养72 h,腈水合酶活力达892 U/mL.

参 考 文 献:

[1] 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—35.
 [2] Pradip K, Mascharak. Structural and functional model of nitrile hydratase[J]. Coordination Chemistry Review, 2001, 225: 210—214.

- [3] Michihiko Kobayashi, Sakayu Shimizu. Nitrile hydratase [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4 (6): 95—102.
- [4] 李志东, 宋旭鹭, 梁伟, 等. 产腈水合酶菌株的驯化研究[J]. *化学与生物工程*, 2006, 23 (4): 38—40.
- [5] 陈跖, 孙旭东, 史悦, 等. 微生物法生产丙烯酰胺的研究(I)-腈水合酶生产菌株的培养和高活力表达[J]. *生物工程学报*, 2002, 18 (1): 55—58.
- [6] Fred Ausubel, Roger Brent, Robert E Kingston. *Short Protocols in Molecular Biology* [M]. Yan ZY, Wang HL translate. Beijing: Science Press, 1998.
- [7] 赵霞, 王纯利, 娄恺. 腈水合酶产生菌发酵条件的优化及其酶学性质研究[J]. *新疆农业大学学报*, 2006, 29 (1): 40—43.
- [8] 邱峰, 李志东, 李娜. 产腈水合酶菌株的驯化及其产酶条件优化研究[J]. *矿冶*, 2006, 15 (3): 52—56.
- [9] Akimasa Miyanaga, Shinya Fushinobu, Kiyoshi Ito, et al. Mutational and structural analysis of cobalt-containing nitrile hydratase on substrate and metal binding [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271 (7): 429—438.

(上接第34页)

(2) pACT2 为酿酒酵母-大肠杆菌穿梭质粒, 其上含有的酿酒酵母乙醇脱氢酶 (ADH1) 启动子为组成型强启动子. 构建的重组质粒转化酿酒酵母所得到的工程菌, 具有发酵条件简单、无需诱导、能以组成型表达外源蛋白等优点, 有利于大规模工业化生产. 另外, 该工程菌所克隆和表达的 SAM 合成酶-2 不受产物的抑制, 从而有利于 SAM 的积累.

(3) 通过构建高效表达 *sam2* 基因的酿酒酵母工程菌, 使 SAM 合成酶活力比出发菌株 *S.cerevisiae* TCCC 31012 提高了约 40 倍. 在该工程菌中, 目的基因的表达是受 ADH1 强启动子调控的, 所构建的重组质粒 pACT2-*sam2* 在菌体内是多拷贝的.

(4) 本实验对含有重组质粒 pACT2-*sam2* 的重组菌株 YS58-2 进行了连续传代考察. 发现连续传代 50 次, 有 96% 的转化子带有重组质粒, 说明该工程菌具有较好的稳定性.

参 考 文 献:

- [1] Shiozaki S, Yamada H, Tani Y. Yeast culture containing *S*-adenosyl-*L*-methionine in high concentrations, and process for production of *S*-adenosyl-*L*-methionine: USA, 4562149 [P]. 1985—12—31.
- [2] Angeles P M. Production of *S*-adenosyl-methionine (SAM) by fermentation of transformed bacteria: Europe, 0647712 [P]. 1995—08—15.
- [3] 李东阳, 于健, 田露. 利用重组 *Pichia pastoris* 生产腺苷甲硫氨酸[J]. *生物工程学报*, 2002, 18 (3): 298—299.
- [4] Park J, Tai J, Roessner C A. Enzymatic synthesis of *S*-adenosyl-*L*-methionine on the preparative scale [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 1996, 4 (12): 2179—2185.
- [5] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 1595.
- [6] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 81—83.
- [7] Gietz R D, Schiestl R H, Williams A R. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure [J]. *Yeast*, 1995, 11 (4): 355—360.
- [8] Li D Y, Yu J, Tian L. Production of SAM by recombinant *Pichia pastoris* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, 18 (3): 295—299.
- [9] 李建武, 于瑞元, 袁明秀. *生物化学实验原理和方法* [M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 168—170.
- [10] Taylor J C, Markham G D. The bifunctional active site of *S*-adenosyl-*L*-methionine synthetase, Roles of the active site aspartates [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 174 (46): 32909—32914.
- [11] Reczkowski R S, Taylor J C, Markham G D. The active-site Arginine of *S*-adenosyl-*L*-methionine synthetase-orients the reaction intermediate [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 8 (37): 13499—13506.