

## 产腈水合酶菌株的驯化选育及其产酶条件的优化

邓 林<sup>1</sup> 刘延岭<sup>2</sup> 王忠彦<sup>1</sup> 胡 承<sup>1</sup> 孙 勇<sup>1</sup> 段洪武<sup>1</sup>

(1 四川大学生命科学院 成都 610064) (2 四川省食品发酵工业研究设计院 成都 611130)

**摘 要** 以 *Rhodococcus* sp. YL-1 为出发菌株,通过逐渐增加培养基中丙烯腈的浓度重复继代培养,得到 1 株酶活为 79.8 U/mg 的腈水合酶高活力菌株 YL-2,酶活比出发菌株 YL-1 提高了 87%。对菌株 YL-2 的产酶条件进行了优化。结果表明,葡萄糖、诱导剂腈、 $\text{Co}^{2+}$  及 pH 是影响腈水合酶高效表达的主要因素。在葡萄糖浓度为 20 g/L,诱导剂腈的添加量为 0.06 g/L,钴离子加入量为 0.3 g/L,培养温度为 30℃,培养基初始 pH 为 7.0 的条件下培养 40 h 后,酶活可达 134.5 U/mg,比优化前提高了 69%。

**关键词** 腈水合酶 红球菌 驯化选育 产酶条件

腈水合酶(Nitrile hydratase, EC4.2.1.84)是以硫原子和半胱氨酸-亚磺酸残基( $\text{Cys}_{112}$ )为绝对中心的一类可催化腈水解的酶<sup>[1]</sup>。Asano 等<sup>[2]</sup>最先发现这一物质具有降解有毒物质乙腈的效果,并命名为“腈水合酶”。随着科研人员对腈水合酶的生物合成调节<sup>[3]</sup>、结构与催化机理<sup>[4]</sup>及其酶学特性的深入研究,腈水合酶已被成功的应用于工业生产丙烯酰胺。除此而外,腈水合酶还被应用于高选择性的合成光学活性非天然氨基酸、同手性的单羧基羧酸衍生物和手性中间体等多种有机物以及含腈废水的治理等方面,是一种具有广泛潜在应用前景的工业酶类。

四川大学生命科学院曾在前期实验中研究了腈水合酶产生菌 *Rhodococcus* sp. YL-1 的分离、鉴定及其对腈化物的降解特性<sup>[5]</sup>。由于菌株 YL-1 产腈水合酶的能力较低,不适宜工业化生产和应用。文中以其为出发菌株,研究了腈水合酶高活力菌株的选育及其产酶条件的优化过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

出发菌株 *Rhodococcus* sp. YL-1,由四川大学工业微生物实验室筛选并保藏。

### 1.2 培养基

斜面培养基:牛肉膏蛋白胨培养基。

发酵基础培养基(g/L):丙烯腈 0.2(v/v),蛋白胨 5,酵母浸膏 3,麦芽汁 3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, NaCl 1, pH 7.0。

### 1.3 实验方法

菌株驯化选育实验:逐渐增加培养基中丙烯腈的

浓度,对菌株进行驯化选育。

**营养因子实验:**以添加诱导剂的发酵基础培养基为基础(每 250 mL 三角瓶中培养基体积皆为 25 mL),根据不同实验要求进行配制。在葡萄糖梯度实验中,每瓶培养基分别含有下列浓度的葡萄糖(g/L):5、10、15、20、25、30;在发酵基础培养基中,首先考察  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等金属离子对腈水合酶的影响情况,确定具体的金属离子后进行梯度实验,每瓶培养基分别含有下列浓度的金属离子(g/L):0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6。接种后于 30℃ 旋转式摇床(偏心距 3.5)150 r/min 振荡培养,培养结束后测定相应的菌体细胞生物量及酶活力。

**腈水合酶的诱导实验:**在确定了葡萄糖以及金属离子初始浓度的发酵基础培养基中,分别考察下列物质对酶的诱导作用:腈化物、腈、酰胺,确定诱导剂后进行诱导剂浓度实验。培养条件同前,培养结束后测定相应的菌体细胞生物量及酶活力。

**培养条件实验:**考察 pH 4.0 ~ 9.0、温度 24 ~ 34℃ 对腈水合酶合成的影响。

### 1.4 菌体细胞生物量的测定

取 5 mL 发酵液,于 6 500 r/min 离心 10 min,用 PBS 磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤 3 次,105℃ 干燥至恒重后称重。

### 1.5 葡萄糖含量的测定

采用 DNS 比色法<sup>[6]</sup>。

### 1.6 腈水合酶活力的测定

取 1 mL 体积分数为 0.4% 的丙烯腈溶液与 1 mL 菌液混合后于 30℃ 反应 5 min,然后加入 0.1 mol/L HCl 溶液中中止反应。在反应条件下每分钟催化形成 1  $\mu\text{mol}$  丙烯酰胺所需的酶量规定为 1 个腈水合酶活力单位。反应混合物中形成的丙烯酰胺的量用气相

第一作者:硕士研究生(王忠彦为通讯作者)。

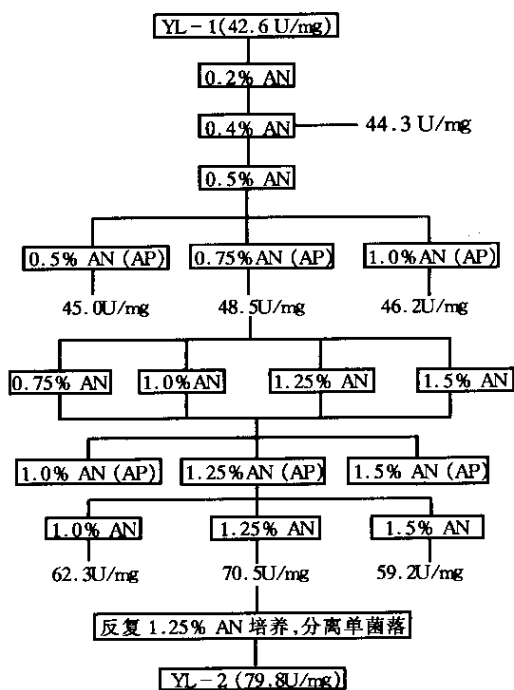
收稿时间:2004-09-14

色谱进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 腈水合酶高活力菌株 YL-2 的驯化选育

为了提高 YL-1 产腈水合酶的能力,根据图 1 所示步骤进行了菌株的驯化选育。



AN - 丙烯腈; AP - 琼脂平板

图 1 高活力菌株 YL-2 的选育

首先,将 YL-1 在含体积分数为 0.2% 的丙烯腈的培养基中振荡培养 48h 后,所得发酵液注入含体积分数为 0.4% 的丙烯腈的培养基中继续培养,所得发酵液注入含体积分数为 0.5% 的丙烯腈的培养基中继续培养,将所得的发酵液涂 3 组平板,分别含体积分数为 0.5%、0.75%、1.0% 的丙烯腈,待平板上长出单菌落后,分离单菌落,将其接种于发酵基础培养基中培养。结果,丙烯腈体积分数为 0.75% 的一组所得菌株的酶活是 3 组中最大的,为 48.5 U/mg。显然,能适应高浓度底物丙烯腈的菌株腈水合酶活力较高。

接着,将在体积分数为 0.75% 的丙烯腈平板上生长的菌株接种于含丙烯腈体积分数为 0.75%、1.0%、1.25%、1.5% 的培养基中培养,所得发酵液涂布 3 组分别含有浓度为 1.0%、1.25%、1.5% 的丙烯腈的平板。在含有 1.0% 丙烯腈的平板上生长的细胞所产的腈水合酶的活力分别为 50.2、51.8、52.3 和 49.6 U/mg;在含有 1.25% 丙烯腈的平板上生长的

细胞所产腈水合酶的比活力分别为 54.1、58.7、60.4 和 52.7 U/mg,在含有体积分数为 1.5% 的丙烯腈的平板上生长的细胞所产的腈水合酶的比活力分别为 49.0、49.5、50.2 和 48.0 U/mg。从结果可以看出,适应了体积分数为 1.25% 丙烯腈浓度的菌株酶活较大。因此,将生长于体积分数为 1.25% 的丙烯腈平板中的菌株接种于丙烯腈体积分数分别为 1.0%、1.25%、1.5% 的 3 组培养基中,在 1.25% 丙烯腈中培养的菌株有较大的酶活 71.2 U/mg。在 1.5% 丙烯腈中培养的菌株酶活只有 59.2 U/mg,可能是因为丙烯腈本身具有毒性,浓度超过一定值时会对菌株的生长造成危害所致,从而降低了酶活,且菌株不能在 2.5% 及 2.5% 体积分数以上的丙烯腈中生长。因此,在含体积分数为 1.25% 的丙烯腈的培养基中反复重复培养菌株以提高对高浓度底物的适应性。通过驯化,选育到 1 株腈水合酶活力为 79.8 U/mg 的高活力菌株,编号为 YL-2。

### 2.2 培养基组成成分对腈水合酶高效表达的影响

#### 2.2.1 葡萄糖对菌株产酶的影响

前期实验研究结果表明,YL-2 培养过程中,菌体生物量与酶活是相偶联的。据文献报道,培养终了时的总酶活是由菌体浓度与酶比活的乘积决定的。因此,如果能提高发酵终了时的菌体生物量,便可以显著提高酶的总活力。在培养基中添加葡萄糖是达到这一目的的有效方法<sup>[7]</sup>。为此,考察了葡萄糖浓度对提高菌体生物量及酶活的影响,如图 2 所示。实验证实,当葡萄糖浓度为 20 g/L 时菌体生物量达到最大值,为 20.8 g/L,酶活相对提高了 85.4%。

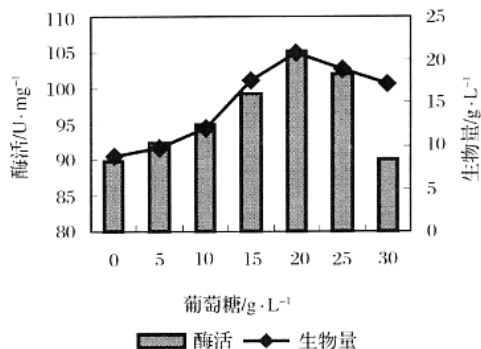


图 2 葡萄糖对产酶和细胞生产的影响

#### 2.2.2 培养基中的金属离子对酶合成的影响

腈水合酶是一种金属酶,金属离子在其催化活性中心起着重要的作用,因此,在腈水合酶产生菌的培养基中加入一定量相应的金属离子会促进腈水合酶

的合成<sup>[8]</sup>。为此考察了不同含量、不同种类的金属离子对酶合成的影响。结果表明： $\text{Co}^{2+}$ 对菌株 YL-2 脲水合酶的合成有明显的促进作用，其最适浓度为  $0.3 \text{ g/L}$ ，如图 3 所示。

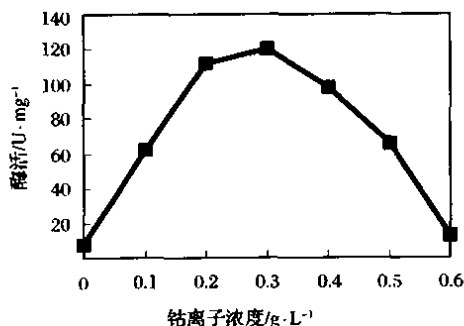


图3 钴离子对脲水合酶合成的影响

## 2.3 诱导剂对菌体产酶的影响

脲水合酶是一种诱导酶<sup>[9]</sup>，诱导剂在脲水合酶的合成过程中具有决定性的作用，只有在培养体系中加入特定的诱导剂以后，脲水合酶的活力才能显著提高。实验中采用多种诱导剂进行了诱导实验，结果表明，脲为诱导菌株 YL-2 产酶的最佳诱导剂。在上述实验的基础上，进行了脲添加量的实验，结果如图 4 所示。实验表明，随着脲添加量的增加酶活升高，在脲的添加量为  $0.06 \text{ g/L}$  时，菌体生长和产酶量达到最大值。此后随着脲添加量的增加，菌体的酶活反而有所下降，由此确定 脲的添加量最佳值为  $0.06 \text{ g/L}$ 。

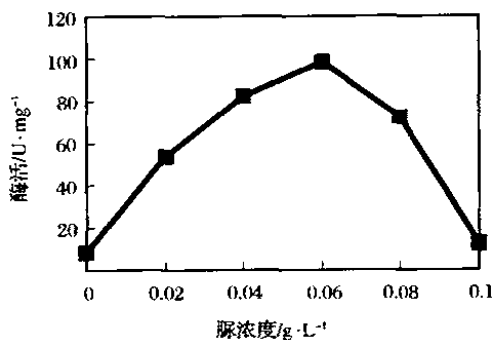


图4 诱导剂脲的添加量对产酶的影响

## 2.4 培养条件对脲水合酶活性的影响

### 2.4.1 培养基初始 pH 对菌株 YL-2 产酶的影响

培养基做 pH 梯度实验，初始 pH4.0 ~ 9.0。当 pH 为 7.0 时，酶活达到最大，为  $130 \text{ U/mg}$ 。pH 为 5.0 时，酶活性只有 pH 为 7.0 时的 1/5。在 pH < 5 或 > 8 时，酶活性急剧下降，结果如图 5 所示。产生这种现象的原因可能是酸、碱导致亚基的断裂或酶的活性中心的电离所致。

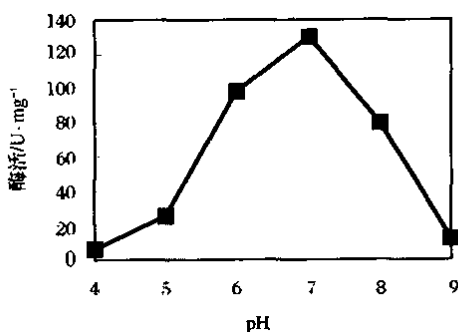


图5 培养基初始 pH 对产酶的影响

### 2.4.2 温度对产酶的影响

对培养温度进行梯度实验，分别考察 YL-2 在 24、26、28、30、32、34℃ 下的摇瓶产酶情况，结果如图 6 所示。当温度在 26 ~ 32℃ 时，菌体生物量和胞内脲水合酶含量都能保持在较高的水平。说明菌株 YL-2 对温度的要求并不严格。考虑到生产的实际情况，选择 30℃ 进行后续实验。

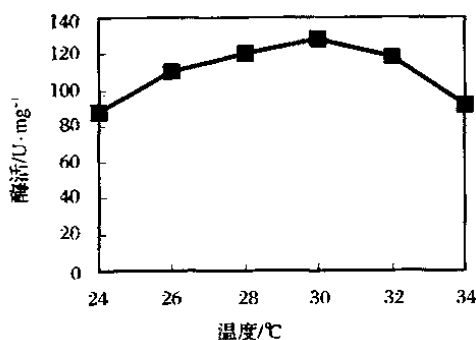


图6 培养温度对产酶的影响

## 2.5 菌株 YL-2 的发酵过程曲线

菌株 YL-2 于优化的条件下：葡萄糖  $20 \text{ g/L}$ 、脲  $0.06 \text{ g/L}$ 、 $\text{Co}^{2+}$   $0.3 \text{ g/L}$ ；培养温度  $30^\circ\text{C}$ 、pH7.0，摇瓶培养的发酵过程曲线如图 7 所示。当培养至 40 h

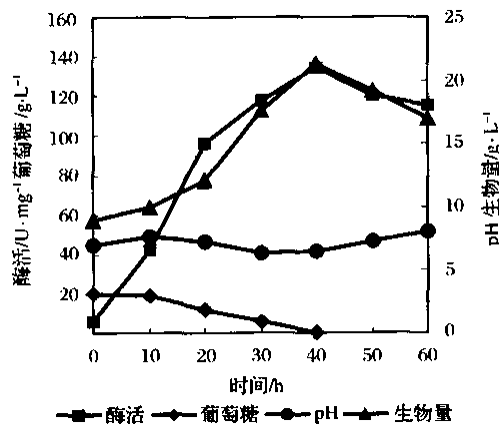


图7 菌株 YL-2 的发酵过程曲线

时,菌体生物量和酶活达到最大值,可获得 134.5 U/mg 的酶活力。继续培养酶比活力有所下降,为了获得最大酶活力,在 40 h 时停止培养。

### 3 结 论

通过逐渐增加培养基中丙烯腈的浓度重复继代培养的方法,成功的选育出 1 株酶活为 79.8 U/mg 的腈水合酶高活力菌株,编号为 YL-2。

产酶条件的最优组合为:葡萄糖的初始浓度为 20 g/L,诱导剂尿素的添加量为 0.06 g/L, $\text{Co}^{2+}$  加入量为 0.3 g/L,培养温度为 30℃,pH 7.0,在优化条件下,YL-2 的酶活可达 134.5 U/mg,较优化前提高了 69%。

### 参 考 文 献

- Ohtsuka Y, Hasegawa J, Nakatsuji H et al. Density functional study on geometry and electronic structure of nitrile hydratase active site model[J]. J Inter Quan Chem, 2002, 90(3): 1174 ~ 1187

- Asano Y, Tani Y, Yamada H. A new enzyme nitrile hydratase which degrades acetonitrile in combination with amidase[J]. Agric Biol Chem, 1980, 44: 2251 ~ 2252
- Mizunashi W, Nishiyama M, Horinouchi S et al. Overexpression of high-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 in recombinant *Rhodococcus* cell[J]. Appl microbial Biotechnol, 1998, 49: 568 ~ 572
- Kobayashi M, Shimizu S. Cobalt protein Eut[J]. J Biochem, 1999, 126: 1 ~ 9
- 邓林, 刘延岭, 王忠彦等. 一株腈化物降解菌的分离、鉴定及其降解特性[J]. 精细化工, 2004, 21(12): 32 ~ 35
- 无锡轻工业学院, 天津轻工业学院, 大连轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992
- 陈 跖, 孙旭东, 史 悦等. 微生物法生产丙烯酰胺的研究(I)—腈水合酶产生菌株的培养和高活力的表达[J]. 生物工程学报, 2002, 17(1): 55 ~ 58
- Sang H K, Patrick O. Cloning and expression of the nitrile hydratase and amidase genes from *Bacillus* sp. BR449 into *Escherichia coli*[J]. Enzyme Microbial Tech, 2000, 27: 492 ~ 501
- Kobayashi M, Shimizu S. Nitrile hydratases[J]. Curr Opin Chem Biol, 2000, 4: 95 ~ 102

## Domestication of a Nitrile Hydratase Producing Strain and Optimization on Its Nitrile Hydratase Producing Conditions

Deng Lin<sup>1</sup> Liu Yanling<sup>2</sup> Wang Zhongyan<sup>1</sup> Hu Cheng<sup>1</sup>  
Sun Yong<sup>1</sup> Duan Hongwu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, 610064, China)

<sup>2</sup>(Sichuan Academy of Food and Fermentation Industries, Chengdu, 611130, China)

**ABSTRACT** A bacterial strain having higher nitrile hydratase activity and acrylonitrile concentration tolerance, numbered *Rhodococcus* sp. YL-2, was developed by repeated subculturing of *Rhodococcus* sp. YL-1 in the broth containing acrylonitrile with slightly increased acrylonitrile concentration. The specific nitrile hydratase activity of YL-2 increased up to 79.8 units/mg of dry cells, 1.8 times higher than that of YL-1. The nitrile hydratase producing conditions were studied and optimized. The results showed that the factors influencing nitrile hydratase activity mostly were glucose, urea,  $\text{Co}^{2+}$  and pH. Initial pH of broth was 7.0. After culturing 40 hours at 30℃ in broth containing 20g/L glucose, 0.06 g/L urea, 0.6 g/L  $\text{Co}^{2+}$ , the nitrile hydratase activity of YL-2 can reach 134.5 units/mg of dry cells, 1.68 times higher than that of before optimization.

**Key words** nitrile hydratase, *Rhodococcus* sp., domestication, nitrile hydratase producing conditions

### 信息窗

#### 日本一公司为患干渴症的病人开发“喷雾饮料”新品

口腔干燥已成为影响人们健康的一大问题。其主要表现为口腔和咽喉感到异常干渴,必须经常摄取水分,结果却会由于补充水分过多,导致体内水分平衡遭到破坏。日本基赛依药品工业公司保健品事业部近日开发了一种可以缓和口腔干渴症状和保持体内适当水分平衡的喷雾饮料新产品——“保湿润柠檬”,投放市场后受到消费者的广泛欢迎。

“保湿润柠檬”是采用喷雾法来保持体内湿润,以解除口腔及咽部的干渴症状。其中透明质酸是保持体内湿润的主要成分。此饮料产品无刺激性,反复喷雾多次也不会产生任何问题,喷雾 5 次仅相当于 1 mL 水分,但却能使患者取得大大超过该数值水分的湿润感。其优点是减少了水分摄取量,保持了身体的适当水分摄取量。