

羟基乙腈水解酶菌株的筛选及其催化特性

王利群* 陈萦慈 孙晓慧 蔡志强 汪庆

(常州大学制药与生命科学学院 江苏 常州 213164)

摘要: 以羟基乙腈为唯一氮源, 从土壤中筛选到一株腈水解酶产生菌 CCZU-12, 经形态观察、生理生化实验和 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。对菌株 CCZU-12 产腈水解酶的培养条件及催化反应条件进行优化, 最适产酶培养条件为: 碳源为 10 g/L 乙酸钠, 氮源为 5 g/L 酵母粉, 金属离子为 1.0 mmol/L Mg^{2+} , 培养温度 30 °C, pH 值 7.0, 接种量 4%, 装液量 50 mL/250 mL; 最适催化反应温度 35 °C, pH 值 7.0, 反应 120 h, 羟基乙腈转化率达到 98.9%。

关键词: 羟基乙酸, 腈水解酶, 假单胞菌, 优化

Isolation and catalytic characteristics of a glycolonitrile-hydrolyzing strain

WANG Li-Qun* CHEN Ying-Ci SUN Xiao-Hui CAI Zhi-Qiang WANG Qing

(School of Pharmaceutical Engineering and Life Sciences, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu 213164, China)

Abstract: A strain CCZU-12 with high glycolonitrile-hydrolyzing activity has been isolated using glycolonitrile as sole nitrogen source. It was identified as *Pseudomonas* sp. by its morphological, physiological properties and 16S rDNA sequence analysis. The preferred carbon/nitrogen sources and metal ions were sodium acetate (10 g/L), yeast extract (5 g/L), and Mg^{2+} (1.0 mmol/L), respectively. The optimum culture conditions were the filling volume 50 mL in 250 mL shaking flask, inoculum 4%, temperature 30 °C, and initial pH 7.0. After hydrolysis of glycolonitrile for 120 h, glycolic acid was obtained in a yield of 98.9% at the optimum reaction temperature 35 °C and pH 7.0.

Keywords: Glycolic acid, Nitrilase, *Pseudomonas* sp., Optimization

羟基乙酸是一种最简单的 α -羟基酸, 在自然界存在但含量甚低, 且与其它物质共存, 难于分离提纯。羟基乙酸可广泛应用于消费品和工业领域, 包括清洗、日用化工及生物降解新材料等。它还可自

聚合成聚羟基乙酸 PGA, 具有优异的生物可降解性和生物相容性, 是迄今为止研究最广泛、应用最多的生物可降解材料之一^[1-4]。

目前羟基乙酸的生产方法主要是化学合成法,

如甲醛羰基化法、氯乙酸水解法、草酸电还原法等,但无论哪种方法,产物中都含有副产物。近几年,医药和化妆品行业对高纯度羟基乙酸的需求越来越大,而化学合成法通常存在产品收率低、环境污染严重等缺点^[5],因此必须开发新型的合成方法以满足市场需要。近些年,利用脲水解酶将羟基乙腈转化为羟基乙酸的方法被广泛研究,其得到的产品质量高,过程绿色,具有广阔的开发前景。脲水解酶最早是在1964年从大麦叶中被分离出来的^[6],能将脲直接水解为羧酸和氨,作用机制为先攻击CN共价键,形成酶与底物共价结合的中间体,继而加上一分子的水,并放出一分子的氨,当加上第二分子的水时,生成了酸和酶^[7]。

本文通过富集培养,利用羟基乙腈为唯一氮源,从土壤中分离出一株产脲水解酶菌株,经形态观察、生理生化实验并结合16S rDNA序列分析,鉴定其为一株产脲水解酶的假单胞菌,并对该菌的培养条件、产酶条件及催化特性做了初步研究。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤:常州大学白云校区化工楼周围。

1.2 培养基

基础培养基(用于菌种的分离筛选, g/L): 葡萄糖 5, K₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 2, MgSO₄·7H₂O 0.2, NaCl 1, FeSO₄·7H₂O 0.002, CaCl₂ 0.001 5, 羟基乙腈 1, pH 7.2。

基础产酶培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 5, 己内酰胺 5, MgSO₄ 0.5, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, pH 7.2。

1.3 产脲水解酶菌株的筛选

制备土壤悬液,将土壤悬液静置30 min,吸上清1 mL加入基础培养基(含0.1%羟基乙腈,为唯一氮源)中,30 °C、150 r/min培养2~4 d。反复筛选后,在含羟基乙腈的基础培养基中能生长的样品,梯度稀释后涂平板,培养3~4 d。待长出合适的单菌落后,挑取单菌落划斜面并编号,30 °C培养3~4 d。在斜面上挑取单菌落,接入产酶培养基中摇瓶培养,24 h后取样测定酶活,选择酶活高的作为出发菌株并进行

分离纯化。

1.4 分析方法和酶活测定

将种子液以1%的接种量接种到装有50 mL基础产酶培养基的250 mL锥形瓶中,30 r/min、30 °C培养48 h。离心收集菌体,并用磷酸钾缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)洗涤2次,悬浮于终浓度为10 mmol/L的羟基乙腈磷酸钾缓冲液中。在130 r/min、30 °C摇床中转化24 h后取样,进行Berthelot法^[8]进行酶活的初步分析,将酶活较高的菌株选出进行细胞的制备,用HPLC色谱进一步检测羟基乙酸的含量。

HPLC测定色谱的条件:色谱柱: Arcus EP-C18, 4.6 mm×150 mm, 5 μm;柱温:室温;检测器:UV (Waters 248);流动相:A:B=95:5 (A:磷酸缓冲液, 13 mmol/L KH₂PO₄, 1 mmol/L K₂HPO₄, pH 6.0; B:色谱级甲醇);检测波长:215 nm;流速:0.5 mL/min;进样量:20 μL。

酶活单位的定义:30 °C、pH 7.0条件下1 min内转化羟基乙腈生成1 μmol羟基乙酸所需要的酶量。

1.5 产酶菌株CCZU-12的鉴定

1.5.1 菌株的形态特征与生理生化特征测定:按《伯杰细菌鉴定手册》^[9]与《常用细菌系统鉴定手册》^[10]进行培养和生理生化特征观察。

1.5.2 16S rDNA序列分析法:采用16S rDNA序列分析法进行菌种鉴定。16S rDNA序列的测定由大连宝生物工程有限公司完成,将菌体挑入细胞溶解缓冲液中变性后离心,取上清作为模板。PCR扩增反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30个循环;72 °C 5 min。产物用1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的片段进行DNA测序。

将测定的序列用BLASTn与GenBank中已知的16S rDNA序列进行同源性比较。

1.6 产酶条件的优化及部分催化特性的研究

分别考察培养基成分(碳源、氮源及金属离子)和培养条件(初始pH值、温度、装液量等)对酶活力及菌体生长的影响,以脲水解酶活力和OD₆₀₀为检测指标;同时考察催化特性如反应温度、反应pH和静息细胞催化反应进程。实验结果均为3次平行实验的平均值。

2 结果与分析

2.1 产脒水解酶菌株的筛选

从土壤中筛选获得 146 株活性菌株, 通过 HPLC 检验转化产物, 得到 5 株较高活性菌株, 进行复筛, 选取一株有高脒水解酶活力的 CCZU-12 菌株。

2.2 产酶菌株 CCZU-12 的鉴定

2.2.1 CCZU-12 的形态特征: 在基础培养基上, 30 °C 培养 3-4 d 形成圆形或近似圆形的凸起白色菌落, 边缘不整齐且表面湿润, 直径为 1 mm-5 mm, 菌株 CCZU-12 的扫描电镜照片见图 1。生理生化鉴定见表 1。

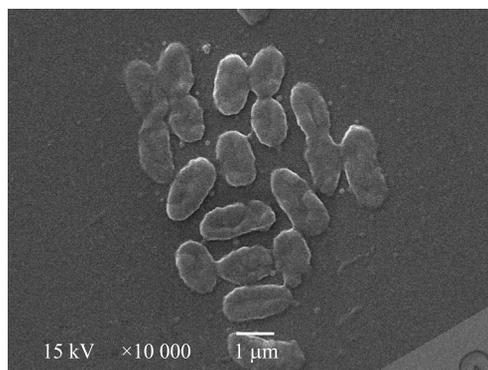


图 1 菌株 CCZU-12 的扫描电镜照片(×10 000)
Fig. 1 An SEM image of CCZU-12 (×10 000)

表 1 菌株 CCZU-12 的部分生理生化反应特征 Table 1 Partly biochemical and physiological characteristics of the strain CCZU-12			
鉴定指标 Identification index	结果 Result	鉴定指标 Identification index	结果 Result
革兰氏实验 Gram test	-	葡萄糖产气 Gas from glucose	-
鞭毛染色 Flagella stain	+	葡萄糖氧化产酸 Acid oxidation of glucose	+
氧化酶实验 Oxidase test	+	葡萄糖发酵产酸 Fermentation of glucose	-
过氧化氢酶 Catalase test	+	V-P 试验 V-P test	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	产 H ₂ S 试验 H ₂ S production test	-
甲基红试验 Methyl red test	+	吲哚试验 Indole test	-

2.2.2 16S rDNA 序列系统进化树: 以 CCZU-12 总 DNA 为模板, 以细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 得到 1 451 bp 的扩增产物。采用 16S rDNA 序列分析法进行同源性比较中发现, CCZU-12 的 16S rDNA 与 GenBank 中登记的假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 的同源性达到 99% 以上。序列进行 BLAST 比对后, 利用 MEGA 4.1 软件构建系统进化树, 结果如图 2 所示。结合其菌落形态特征、生理生化结果以及 16S rDNA 分析初步断定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。

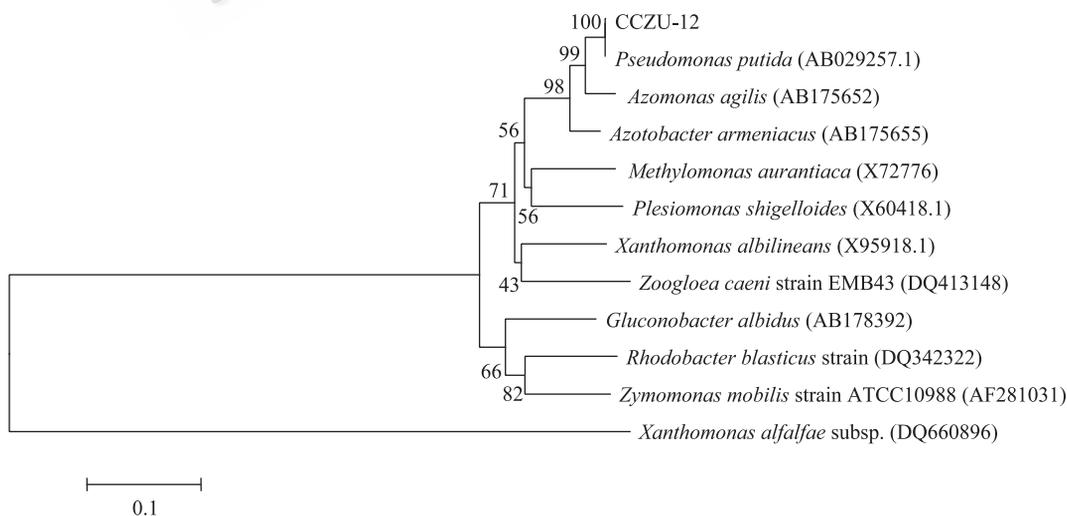


图 2 CCZU-12 菌株的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of CCZU-12

2.3 菌株产酶条件的优化

2.3.1 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(蔗糖、葡萄糖、淀粉、柠檬酸钠、乳糖、乙酸钠或糊精), 考察不同碳源对酶活力和菌体生长的影响。如图 3 所示, 乙酸钠作为碳源, 其相对酶活最高, 为 10.95 U/mL, 但菌体生长不丰富, OD_{600} 为 3.09; 其次是甘油, 其菌体浓度低于葡萄糖但相对酶活却较高; 而其他碳源对菌株产酶的促进效果都不显著。因此, 10 g/L 乙酸钠是产酶的最适碳源。

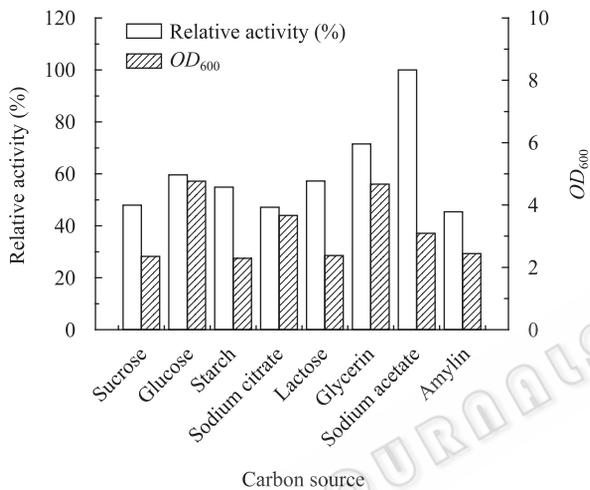


图 3 碳源对 CCZU-12 脲水解酶活力的影响

Fig. 3 Effects of various carbon sources on the nitrilase activity from CCZU-12

2.3.2 氮源对脲水解酶活力的影响: 为确定菌株产酶的最佳氮源, 分别加入质量浓度为 5 g/L 的硫酸铵、酵母粉、牛肉膏、蛋白胨及尿素为氮源, 考察不同氮源对酶活力和菌体生长的影响。如图 4 所示, 以酵母粉作为氮源, 其相对酶活最高及菌浓都较高, 酶活为 12.26 U/mL, OD_{600} 为 6.80, 而其他氮源对菌株产酶的促进作用都较低。因此, 5 g/L 的酵母粉是产酶的最适氮源。

2.3.3 金属离子对脲水解酶活力的影响: 不同的金属离子对产酶是有影响的, 分别加入 1.0 mmol/L 的 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 及 Mg^{2+} 等金属离子, 考察金属离子对酶活力及菌体生长的影响。如图 5 所

示, 与空白相比, Mg^{2+} 对菌株产酶和生长都具有明显的促进作用, 其相对酶活及菌体浓度最高, 酶活为 13.38 U/mL, OD_{600} 为 6.80; Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 对酶活也有一定的促进作用; 而 Mn^{2+} 及 Co^{2+} 对酶活有明显的抑制作用。因此, 1.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 是产酶的最适金属离子。

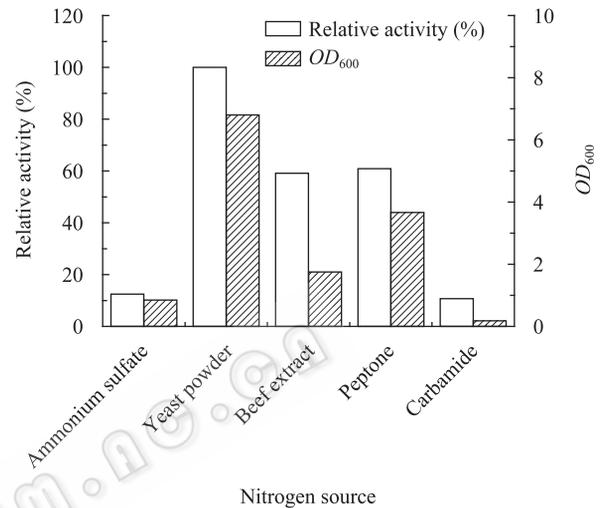


图 4 氮源对 CCZU-12 脲水解酶活力的影响

Fig. 4 Effects of various nitrogen sources on the nitrilase activity from CCZU-12

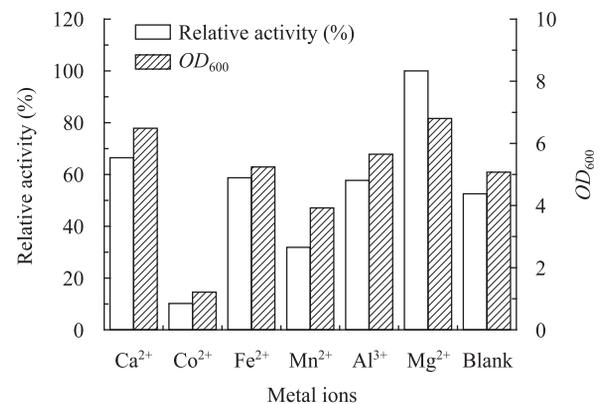


图 5 金属离子对 CCZU-12 脲水解酶活力的影响

Fig. 5 Effects of various metal ions on the nitrilase activity from CCZU-12

2.3.4 培养温度及初始 pH 对脲水解酶活力的影响: 培养温度及初始 pH 对脲水解酶的催化活性起着重要的作用, 酶是由细胞产生的生物大分子, 凡能使生物大分子变性的因素都能使酶失去催化活性, 因

此考察温度及初始 pH 对胍水解酶活力的影响。

如图 6 所示, 当温度偏低或偏高时, 菌体浓度及相对酶活都较低, 温度为 30 °C 时菌体浓度和酶活力均较高, 酶活为 15.56 U/mL, OD_{600} 为 6.62。因此, 30 °C 是最适培养温度。

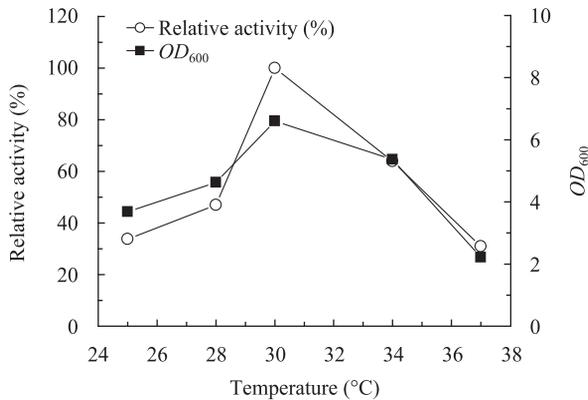


图 6 温度对 CCZU-12 胍水解酶活力的影响
Fig. 6 Effects of temperature on the nitrilase activity from CCZU-12

如图 7 所示, 在偏酸或偏碱时, 其菌体浓度和相对酶活很低, pH 为 6.0 和 7.0 时菌体浓度很接近, 但 pH 为 7.0 时相对酶活最高, 为 15.78 U/mL, 可见产酶的最适培养 pH 为 7.0。

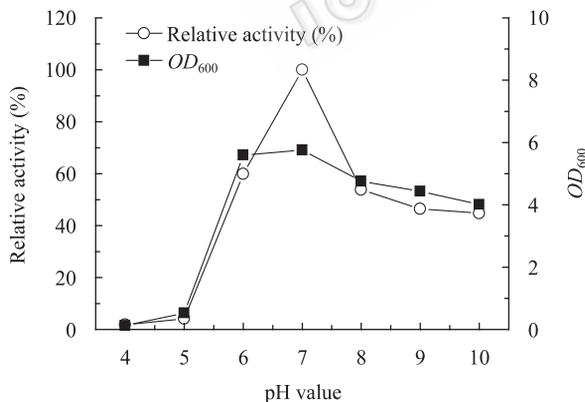


图 7 pH 对 CCZU-12 胍水解酶活力的影响
Fig. 7 Effects of pH values on the nitrilase activity from CCZU-12

2.3.5 接种量对胍水解酶活力的影响: 接种量对菌体的生长影响较大, 而菌体的生长对产酶也有影响, 因此考察接种量对酶活力的影响。如图 8 所

示, 在接种量较低和较高时菌体生长较旺盛, 但相对酶活却较低; 而接种量为 4% 时, 相对酶活最高, 为 16.76 U/mL。所以, 对产酶而言, 最适接种量为 4%。

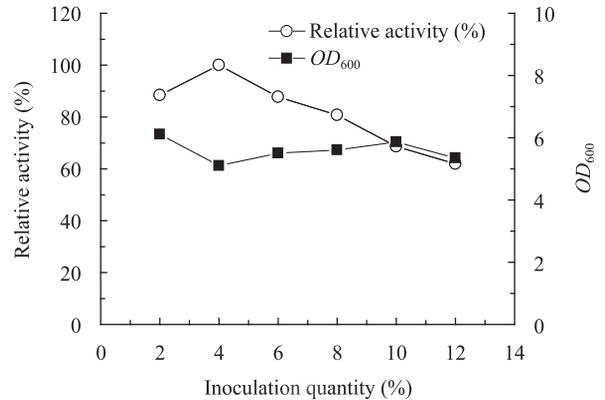


图 8 接种量对 CCZU-12 胍水解酶活力的影响
Fig. 8 Effects of inoculation quantity on the nitrilase activity from CCZU-12

2.3.6 装液量对胍水解酶活力的影响: CCZU-12 (*Pseudomonas* sp.) 是好氧菌, 发酵过程属于好氧发酵, 合理的装液量是酶活力的重要条件, 因此考察装液量对酶活力的影响。如图 9 所示, 较小的装液量对菌体的生长较为有利; 而较大的装液量对酶活的累积具有促进作用, 可装液量过大也抑制了菌体的产酶。装液量为 50 mL/250 mL 时相对酶活最高, 为 18.23 U/mL。所以, 最适装液量为 50 mL/250 mL。

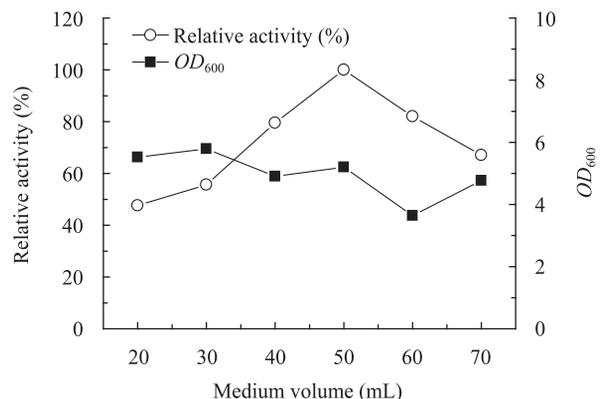


图 9 装液量对 CCZU-12 胍水解酶活力的影响
Fig. 9 Effects of medium volume on the nitrilase activity from CCZU-12

2.4 脲水解酶的部分催化特性

2.4.1 催化温度对酶活力的影响: 考察催化反应温度对于脲水解酶活性的影响。如图 10 所示, 反应温度较高或较低, 酶的催化活性都下降, 70 °C 时酶活力不足最高酶活的 5%。所以, 脲水解酶最适催化温度为 35 °C, 酶活为 20.29 U/mL。

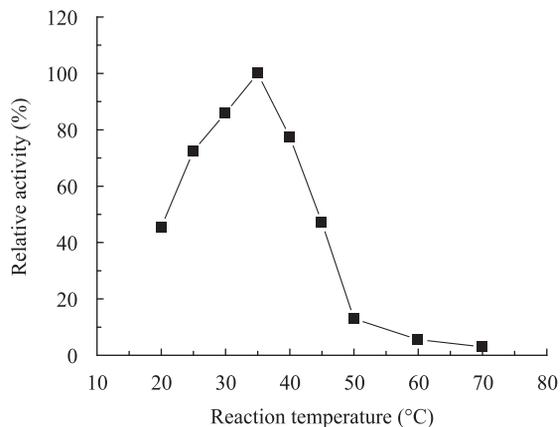


图 10 反应温度对酶活力的影响

Fig. 10 Effects of reaction temperature on the nitrilase activity

2.4.2 催化 pH 对酶活力的影响: 反应 pH 对脲水解酶活性是有影响的。如图 11 所示, 在反应条件过酸或过碱时, 酶活都很低, 甚至接近于零; 随着反应 pH 值接近于 7.0, 其酶活也随之增大, pH 为 7.0 时, 酶活达到最大值为 20.55 U/mL。继续提高反应 pH 值, 其酶活逐渐降低。因此, 脲水解酶最适催化反应 pH 值为 7.0。

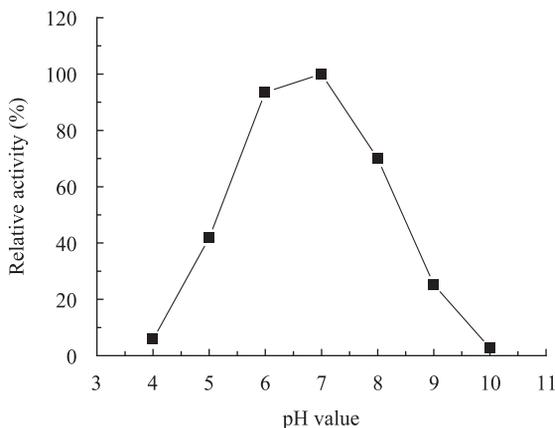


图 11 反应 pH 对细胞酶活力的影响

Fig. 11 Effects of reaction pH on the nitrilase activity

2.4.3 CCZU-12 催化羟基乙腈反应进程: 取静息细胞悬浮于 pH 7.0 的磷酸缓冲液中, 在 35 °C 考察 CCZU-12 静息细胞将羟基乙腈转化为羟基乙酸的催化反应进程。如图 12 所示, 转化率随着时间增加而升高, 反应 30 h 内, 转化率呈线性增加, 70 h 后增加渐缓, 最高转化率达到 98.9%。

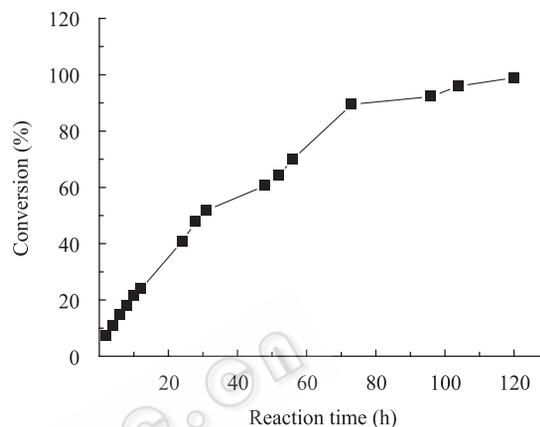


图 12 静息细胞催化羟基乙腈反应进程

Fig. 12 Time courses for the hydrolysis of glycolonitrile by resting cells

3 讨论

脲水解酶是一种具有广泛底物适应性的生物催化剂, 现有研究表明脲的酶法水解具有高效性、高选择性、反应条件温和、环境污染小和产物光学纯度高优点, 因此有着化学方法无可比拟的优越性^[1], 在精细化学品的合成中越来越受到人们的关注。近年来, 利用脲水解酶的生物酶法转化生产羟基乙酸途径因其反应条件温和、对环境污染少、转化率高、产物光学纯度高优点而备受青睐。利用脲水解酶把羟基乙腈水解为羟基乙酸的酶法转化国内已有若干报道, 涉及的产酶菌种包括产碱杆菌^[2]、紫红红球菌^[12]、乳酪短杆菌^[13]等。

本实验得到一株名为 CCZU-12 的产脲水解酶菌株, 最适产酶培养条件和催化反应条件为: 碳源为乙酸钠(10 g/L), 氮源为酵母粉(5 g/L), 金属离子为 Mg^{2+} (1.0 mmol/L), 培养温度为 30 °C, 初始培养 pH 为 7.0, 接种量为 4%, 装液量为 50 mL/250 mL; 最适催化反应温度为 35 °C, 反应 pH 为 7.0。经过检

测得到该菌株在此最适条件下的酶活为 20.55 U/mL。该菌株与以往报道的产腈水解酶菌株不同, 它是一种新酶源。在条件优化上与其他报道有所区别, 如: 其在碳源的利用上有较大差异, 有关报道^[12]的最适碳源多为甘露醇或葡萄糖, 而本实验为乙酸钠; 对于催化最适温度, 有关文献报道结果为 45 °C^[13], 而本实验为 35 °C。王铁钢等^[12]将菌株经诱变和优化后, 酶活力达到了 26.77 U/mL, 此为目前文献报道中酶活最高值, 而本实验菌株暂未进行诱变及进一步优化, 因此相比而言所得菌株产腈水解酶活力值处于较高水平, 为今后菌种的研究奠定了基础, 为工业上利用腈水解酶催化羟基乙腈生产羟基乙酸打下了良好基础。

参 考 文 献

- [1] 李峰, 杨仲春. 羟基乙酸的合成与应用[J]. 精细与专用化学品, 2006, 14(9): 1-6.
- [2] He YC, Xu JH, Su JH, et al. Bioproduction of glycolic acid from glycolonitrile with a new bacterial isolate of *Alcaligenes* sp. ECU0401[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(5): 1428-1440.
- [3] Sarita C, Robert D, Fallon RD, et al. Method for producing glycolic acid from glycolonitrile using nitrilase: US, 6416980 B1 [P]. 2002-07-09.
- [4] 陈莉, 杜锡光, 赵保中, 等. 聚羧基乙酸及其共聚物[J]. 高分子通报, 2003(1): 18-24.
- [5] 胡基埂. α -羟基乙酸合成与分析方法综述[J]. 化工进展, 2007, 26(4): 496-500.
- [6] 徐建妙, 郑裕国, 沈寅初. 腈水解酶的来源、结构、作用机制及其应用[J]. 微生物学通报, 2005, 32(5): 141-146.
- [7] Pace HC, Brenner C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function[J]. Genome Biology, 2001, 2(1): 1-9.
- [8] 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: 自然科学版, 2009, 35(4): 545-548.
- [9] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 274-312.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-388.
- [11] 何玉财, 许建和. 腈水解酶在羧酸合成中的研究进展[J]. 生物加工过程, 2009, 7(1): 7-12.
- [12] 王铁钢, 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.
- [13] 罗积杏, 薛建萍, 沈寅初. 腈水解酶产生菌游离细胞催化特性的初步研究[J]. 工业微生物, 2006, 36(4): 13-17.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。