

Comamonas testosteroni 5-MGAM-4D

来源的腈水合酶基因重组菌 对腈类化合物的全细胞催化活性

刘胜先,杜文静,崔宝程,黄 姣,郭 祎,王 黎*
(大连理工大学生命科学与药学学院,辽宁盘锦 124221)

摘要:目的:通过基因工程方法获得高效表达腈水合酶的基因工程菌 CtNHase,探究其对腈类物质的全细胞催化作用,并考察 pH、温度对全细胞催化反应的影响。方法:对来源 *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D 的腈水合酶基因进行 PCR 扩增,以 pET-24a 为载体,构建基因重组表达质粒后,转化大肠杆菌感受态细胞进行 SDS-PAGE 蛋白表达验证,并通过色谱检测分析对底物丙烯腈和己二腈的转化情况。结果:在 pH=7.4,30 °C 条件下,基因重组菌 CtNHase 催化活性最高,可通过全细胞催化在 5 min 内完全转化 50 mmol/L 己二腈生成己二酰二胺,在 5 h 内完全转化 500 mmol/L 丙烯腈生成丙烯酰胺。结论:基因重组菌 CtNHase 可高效催化丙烯腈和己二腈生成丙烯酰胺和己二酰二胺,具有潜在的工业应用价值。

关键词:羧基酮丛毛单胞菌 5-MGAM-4D,基因重组,腈水合酶,全细胞催化

Whole-cell Catalytic Activity of Nitrile Hydratase on Nitrile Compounds Derived from *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D

LIU Sheng-xian, DU Wen-jing, CUI Bao-cheng, HUANG Jiao, GUO Yi, WANG Li*

(School of Life and Pharmaceutical Sciences, Dalian University of Technology, Panjin 124221, China)

Abstract: Objective: Constructed the gene recombinant *E.coli* CtNHase which expressed nitrile hydratase efficiently by gene cloning technology, then investigated its biocatalytic activity of nitriles and the effects of pH and temperature with the whole cell catalytic reaction. Methods: The nitrile hydratase gene of *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D was amplified by polymerase chain reaction (PCR), the recombinant expression plasmid was constructed with pET-24a vector. After transformed into competent *E.coli* cells, the expression of protein was verified by SDS-PAGE. The conversion of the substrates of acrylonitrile and adiponitrile were analyzed by chromatography. Results: According to the whole cell catalysis, we found the recombinant *E.coli* CtNHase transformed 50 mmol/L adiponitrile to adipamide in 5 min completely, while transformed 500 mmol/L acrylonitrile to acrylamide in 5 h. The optimum pH and reaction temperature were 7.4, 30 °C, the *E.coli* exhibited the highest catalytic activity. Conclusion: The recombinant *E.coli* CtNHase could catalyze acrylonitrile and adiponitrile to acrylamide and adipamide high efficiently, which would show the potential industrial application prospects.

Key words: *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D; genetic recombination; nitrile hydratase; whole-cell catalysis

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2020)24-0094-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020030127

引文格式: 刘胜先,杜文静,崔宝程,等. *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D 来源的腈水合酶基因重组菌对腈类化合物的全细胞催化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 94-99.

LIU Sheng-xian, DU Wen-jing, CUI Bao-cheng, et al. Whole-cell Catalytic Activity of Nitrile Hydratase on Nitrile Compounds Derived from *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(24): 94-99. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

酰胺类物质是重要的精细化工原料和医药中间体。腈水合酶(Nitrile Hydratase, NHase, EC 4.2.1.84)

收稿日期: 2020-03-12

作者简介: 刘胜先(1995-),女,硕士研究生,研究方向:基因工程菌的构建及催化活性研究, E-mail: crystal@mail.dlut.edu.cn。

*通信作者: 王黎(1985-),女,博士,讲师,研究方向:生物催化及转化, E-mail: wang_li@dlut.edu.cn。

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20170540184, 20180551049)。

是一种能够催化脘类化合物水合成酰胺类化合物的金属酶,具有很高的工业应用价值^[1-2]。NHase 广泛存在于微生物群体中,如红球菌(*Rhodococcus* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、假诺卡氏菌(*Pseudonocardia* sp.)、农杆菌(*Agrobacterium* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、棒杆菌(*Corynebacterium* sp.)及短杆菌(*Brevibacterium* sp.)等微生物中^[3-4]。与传统的化学合成法相比,采用脘水合酶生物催化法生产酰胺类化合物具有反应条件温和,专一性强,催化效率高的优势,同时反应在常温常压下进行,污染少,相对设备投资低,克服了很多化学生产的不足^[5-6]。目前,在发达国家如美国、日本等,利用脘水合酶生产酰胺类物质这项生物技术正在逐步取代传统的化学法^[7-8]。

目前,采用脘水合酶生物法生产酰胺化合物有一部分是采用野生菌细胞,但是用从自然界土壤取样分离筛选获得野生脘酶菌株的方式获得高产脘酶菌株具有偶然性很大、成功率极低、酶活力差等局限性^[9],且大多数野生脘水合酶产生菌也会产脘酶,脘酶会使脘水合酶催化的产物脘胺转化为相应的酸,从而在一定程度上降低脘胺的产量^[10-11]。因此通过基因克隆手段获得高效表达脘水合酶的基因工程菌具有很多野生菌不可替代的优点,基因工程菌中脘水合酶基因可单独克隆,不会相互干扰,不会因产酸降低了发酵液的 pH 而抑制酶的活性,基因工程菌背景清晰,利于对基因表达调控机理进行深入研究,同时它的适应性强、发酵周期短、易于实现大规模培养和工业化生产,有着更广阔的应用前景^[3,12]。

丙烯酸酰胺和己二酰二胺是重要的精细化工原料和医药中间体,在化工生产中是一种非常重要的原料,其需求量巨大且用途广^[13-15]。用生物法生产丙烯酸酰胺和己二酰二胺符合绿色化工中经济环保理念,是一种必然的趋势,但野生型菌株普遍存在稳定性低活性低的问题,工业化应用仍十分有限^[16-19]。在我国,脘水合酶生成脘胺的生物技术虽然起步较晚但发展很快,但随着市场的不断拓展,对脘胺的需求仍在不断增长,仍需要大量的进口。因此急需拓展高效产脘水合酶菌来弥补国内行业不足和空缺^[20]。

睾丸酮丛毛单胞菌 *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D 被发现具有脘水合酶基因^[21-22],但野生型菌株对脘类物质的催化活性远低于发达国家已工业化应用的 *R.rhodochrous* J1 以及 *Pseudomonas putida* 来源的脘水合酶^[23-24]。本研究以野生菌 *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D 来源的脘水合酶基因为研究对象,通过基因工程手段构建高效表达脘水合酶的基因重组菌 CtNHase,探讨基因重组菌 CtNHase 对脘类化学物的生物转化活性,以期工业化应用的发展提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

CtNHase 基因序列 GenBank AY743666.1;PCR 引物、载体 pET-24a(+) 常州基宇生物技术有限公司合成;大肠杆菌 本实验室保藏;丙烯腈 色

谱,上海生工生物工程有限公司;己二腈、丙烯酰胺、己二酰二胺、乙酰胺 分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;甲醇 色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司;胰蛋白酶、酵母提取物 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;IPTG、卡那霉素 上海生工生物工程有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 柱式回收试剂盒、质粒小提试剂盒 日本 TaKaRa 公司;电泳相关试剂 均为国产;LB 培养基:胰蛋白酶 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L(固体培养基再加入琼脂粉 20 g/L),高压灭菌后需加入终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素再使用。

PCR 仪 日本 TaKaRa 公司;分析天平 德国 Sartorius 集团;恒温摇床 上海智城分析仪器制造有限公司;超净工作台 上海尚道仪器制造有限公司;电泳系统 北京六一仪器厂;低温冷冻离心机、超低温冰箱 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;pH 计 上海雷磁仪器厂;S6000 高效液相色谱仪 华谱科仪科技有限公司;气相色谱仪 大连中汇达科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 CtNHase 的构建

1.2.1.1 目的基因扩增 PCR 引物 Forward: TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGGCAATCACACACGCATGACCACCATCG;引物 Reverse: AGCCGGATCTCAGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGCTCGAGTCACAA GCCCCAGCGACGCCACCA(5'-3');PCR 反应过程为:在 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min 后开始循环,98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 30 个循环;于 72 $^{\circ}\text{C}$ 下终延伸 10 min。最后采用琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果并对产物进行回收。

1.2.1.2 链接载体 采用限制性内切酶 NdeI 和 XhoI 使载体 pET-24a 线性化;利用无缝克隆技术将载体与扩增后目的基因片段链接。

1.2.1.3 转化大肠杆菌感受态细胞 通过低温和钙离子刺激制备 *E.coli* TOP 10 感受态细胞,取一支感受态细胞于冰上,待溶解后加入 10 μL 连接液,轻轻旋转以混匀内容物,在冰中放置 30 min;将离心管放到预加温到 42 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴锅中热激 90 s,然后快速将离心管转移到冰浴中,使细胞冷却 2~3 min;每管加 900 μL LB 培养液,将其转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上,温育 1 h 使细菌复苏;取恰当量的转化菌液按不同浓度梯度涂布于固体 LB 平板上,倒置于恒温培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h。

1.2.1.4 菌落 PCR 鉴定转化子 挑取平板上长出的转化子重悬于 10 μL LB 液体培养基中,从中取 1 μL 做模板进行菌落 PCR 鉴定。引物 Forward: TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGGCAATCACACACGCATGACCACCATCG;引物 Reverse: TGTTGCGCTCGCTGGGGCTTGTTGACTCGAGCACCACACCACCACCCTGAGATCCGGCT(5'-3')。PCR 反应过程为:在 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后开始循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 30 个循环;于 72 $^{\circ}\text{C}$ 下终延伸 10 min。最后采用琼脂糖凝胶

电泳验证扩增结果并对产物进行回收。

1.2.1.5 阳性克隆酶切验证 将阳性克隆扩增培养通过质粒小提试剂盒进行回收,采用限制性内切酶 XhoI 和 MluI 对重组质粒进行酶切,并采用琼脂糖凝胶电泳验证结果。

1.2.2 重组菌诱导培养及表达验证 选择常规表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3) 和低温诱导表达菌 *E.coli* Arctic Expression (DE3) 同时进行重组质粒的表达验证,具体步骤如下。

1.2.2.1 菌体培养 将质粒 1 μL 分别加入 100 μL BL21 (DE3) 和 Arctic Expression (DE3) 感受态细菌中,置于冰上 20 min;42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 90 s,迅速置于冰中,3 min 后加入 600 μL LB 培养液;37 $^{\circ}\text{C}$,220 r/min 振荡培养 1 h,取 200 μL 菌液涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的 LB 固体平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜;次日挑取 2 个 BL21 (DE3) 和 1 个 Arctic Expression (DE3) 的单克隆分别接种于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的 4 mL LB 液体培养基的摇菌管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 振荡培养 8 h 左右,后转移至含 100 mL 锥形瓶中扩增培养至 OD 值约 0.6~0.8;分别加入 Co^{2+} 使其终浓度 0.05 g/L, BL21 (DE3) 一管不加 IPTG 做阴性对照,一管加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 3 h。Arctic Expression (DE3) 的单管加 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L,16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜;次日,4000 \times g,10 min 离心去上清收集菌体。

1.2.2.2 菌体破碎 将离心后的菌体重悬于 20 mmol/L PBS (pH7.4) 缓冲液中,冰浴超声破碎。设置条件为 300 W 功率,破碎 2 s,间隔 5 s,共 50 个循环。完成后 18000 \times g 离心 20 min 分别收集上清液和沉淀。

1.2.2.3 SDS-PAGE 分析 选用 12% 分离胶及 5% 浓缩胶,将样品与上样缓冲液混合后每孔上样 15 μL ,电泳条件为先 80 V 运行 20 min 后 160 V 运行 100 min。电泳结束后取出胶,用考马斯亮蓝溶液进行染色 1 h,后选用脱色液过夜脱色,分析实验结果。

1.2.3 催化性能探究

1.2.3.1 菌悬液制备 将一定量培养好的重组菌发酵液 4000 \times g 离心处理 10 min,去上清后用磷酸缓冲液重复洗涤菌体 2 次,最终用原发酵液 1/20 体积的磷酸缓冲液将菌体重悬,得静息细胞悬液,测定菌体浓度后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3.2 催化丙烯腈 反应体系包含 0.5 mL 纯丙烯腈,0.2 g 乙酰胺、菌液(终浓度 3 mg(dcw)/mL) 及去离子水共 15 mL。30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应,取样加入等体积 HCl 以终止反应,18000 \times g 离心 5 min,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,送样进行气相色谱检测。

1.2.3.3 催化己二腈 反应体系包含 50 μL 500 mmol/L 己二腈、菌液(终浓度 3 mg(dcw)/mL) 及磷酸缓冲液共 500 μL 。振荡反应,控制反应温度和时间,加入等体积甲醇以终止反应,18000 \times g 离心 5 min,取上清液稀释适当倍数后经 0.22 μm 滤膜过滤,送样进行液相色谱检测。

1.2.3.4 影响因素 以己二腈为底物探究重组菌反

应最适 pH:反应体系中分别选用 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.4、8.0、8.5、9.0 的磷酸缓冲液,30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡反应 3 min。pH 稳定性:反应前将菌体分别重悬于 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.4、8.0、8.5、9.0 的磷酸缓冲液孵育 1 h,30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡反应 3 min。探究反应最适温度:反应时选用 pH = 7.4 的磷酸缓冲液,分别在 20、25、30、35、40、45、50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,220 r/min 振荡反应 3 min。热稳定性:反应前将菌体分别在 20、25、30、35、40、45、50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h,30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡反应 3 min。通过产物己二酰二胺的生成量进行定量酶活计算,并设置每组最高酶活为参照(100%),以相对活性表示不同因素的影响情况。

1.2.4 重组腈水合酶(CtNHase)酶活测定 重组腈水合酶(CtNHase)进行催化时的一个酶活力单位(IU)定义为:在 30 $^{\circ}\text{C}$,pH = 7.4 的条件下,每 min 生成 1 μmol 产物所需要的酶量。

丙烯腈及其催化产物检测采用气相色谱:FFAP GC 柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μm);进样口 260 $^{\circ}\text{C}$,FID 检测器 260 $^{\circ}\text{C}$,升温程序为柱温 190 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$,载气(He)流速 1.0 mL/min,压力 2.3 kPa,进样量 0.2 μL ;分流比 10:1。采用内标法,以乙酰胺为内标物,绘制产物丙烯酰胺和乙酰胺两者间质量比与气相峰面积间关系曲线,进行定量计算。

己二腈及其催化产物检测采用高效液相色谱:Ultimate LP-C₁₈ 柱(5 μm ,4.6 \times 250 mm);流动相为 25 mmol/L 磷酸水溶液和甲醇(89:11,V:V),检测波长 200 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 1 mL/min。采用外标法,绘制产物己二酰二胺浓度与液相峰面积间关系曲线,进行定量计算。

1.3 数据处理

气液相数据经原始数据记录软件导出后经 Excel 软件计算处理,标准曲线和反应影响因素探究图像由 Origin 软件绘制得到。标曲每点数据由 6 组平行实验去掉最大最小值后取平均值得到,其他数据均为 3 组平行实验得到。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 CtNHase 构建与表达

来源于睾酮酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D)的腈水合酶的核苷酸序列含有 1576 个核苷酸,经 PCR 扩增基因片段,电泳验证如图 1a 所示,选择 pET-24a(+) 为表达载体,选择 NdeI (CATATG) 和 XhoI (CTCGAG) 作为酶切位点插入 CtNHase 基因片段,选用 lacI 启动子,加入卡那霉素 KanR 抗性基因片段,选用 T7 终止子,转化大肠杆菌 TOP10,图 1b 所示为菌落 PCR 电泳验证结果,得到阳性克隆。

根据质粒图谱(图 2),重组质粒经 XhoI/MluI 双酶切,得到两条带分别约为 2397、4404 bp,与图 3a Lane 2 相对应,证实质粒的成功构建。

将质粒转化入大肠杆菌感受态中,得到重组菌 CtNHase,通过 SDS-PAGE 验证重组蛋白能否表达。

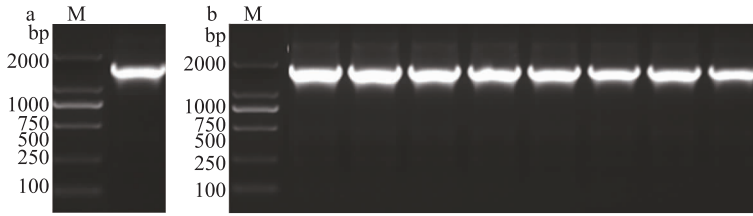


图1 PCR电泳图

Fig.1 PCR electrophoresis

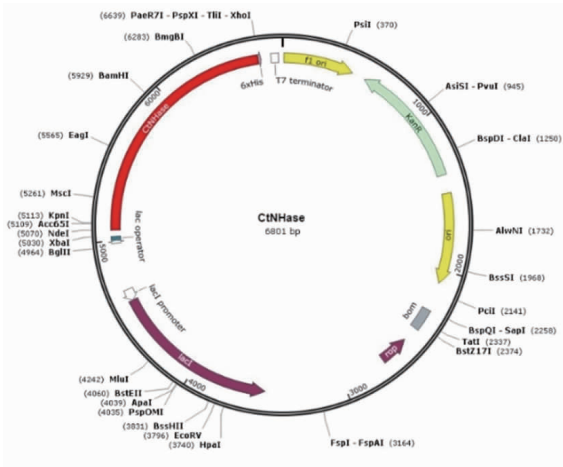


图2 质粒 CtNHase 谱图

Fig.2 Map of CtNHase gene in plasmid vector pET-24a(+)

由于工业用野生型菌均具有培养时间长,蛋白表达量低等问题,而大肠杆菌过表达系统具有明显的菌体生长速度快、蛋白表达量高等优势^[12,25],如图3b所示,通过箭头可以看到,脲水合酶在两种菌的上清中均有大量表达,其中低温诱导的 Arctic Expression (DE3)产生的蛋白包涵体更少,上清中脲水合酶表达更高,因此后续实验选用该重组菌进行催化活性探究。

2.2 基因重组菌 CtNHase 的催化活性

2.2.1 催化丙烯腈 采用内标法对丙烯腈及丙烯酰胺进行气相色谱检测,选取乙酰胺作为内标物,称取不同质量比的标样及内标物,溶于 15 mL 水中模拟反应体系,在 1.2.4 所述检测方法下进样 0.20 μ L,重复 6 次,取得各样品的峰面积,分析结果见表 1。

图 4a 所示为反应 4 h 时的气相色谱图,可见丙烯腈出峰时间 1.66 min,乙酰胺出峰时间 2.47 min,丙烯酰胺出峰时间 2.97 min。如图 4b 所示,以标样产物峰面积与内标峰面积比为纵坐标,标样产物质量与内标质量之比为横坐标作内标校正曲线图,将数

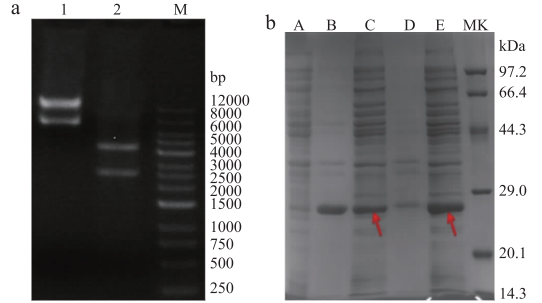


图3 质粒双酶切(a)与重组质粒(b)的蛋白表达电泳图

Fig.3 Protein expression electrophoresis diagram of plasmid double digestion(a)and recombinant plasmid(b)

注:a 中 Lane 1 为未处理质粒, Lane 2 为双酶切后的质粒;b 中 Lane A 为阴性对照; Lane B、C 分别为 *E.coli* BL21 (DE3) 破碎沉淀、上清; Lane D、E 分别为 *E.coli* arctic expression (DE3) 破碎沉淀、上清。

据作线性回归处理,得到方程 $Y = 1.6456x$, $R^2 = 0.9964$ 。通过此方法计算可以准确的对丙烯酰胺产量进行定量研究。采用静息细胞反应,重组菌 CtNHase 可在 5 h 内完全转化终浓度 500 mmol/L 的丙烯腈生成丙烯酰胺。

2.2.2 催化己二腈 液相谱图如图 5a 所示,己二酰二胺出峰时间 4.34 min,己二腈出峰时间 15.5 min(由于浓度过低,己二腈峰面积极小,故图 5 无显示)。采用外标法对己二酰二胺含量进行高效液相色谱检测,如图 5b 所示,选取己二酰二胺浓度为 2~12 mmol/L,重复进样 6 次,计算峰面积平均值,并进行线性回归,得到标曲方程 $Y = 1268.1238x$, $R^2 = 0.99967$ 。采用静息细胞反应,重组菌 CtNHase 在 5 min 内即可将终浓度 50 mmol/L 的己二腈完全转化成己二酰二胺,酶活可达 5567 U/g(dcw),高于目前文献报道^[26]。

2.3 温度和 pH 对基因重组菌 CtNHase 催化活性的影响

如图 6a 所示以最高酶活为参照,反应的最适温度为 30、35 $^{\circ}$ C 时仍有较高的相对活性,温度持续升

表 1 线性范围测定表

Table 1 Measuring of linear extension

编号	乙酰胺(g)	丙烯酰胺(g)	质量比(丙/乙)	面积比(丙/乙)	校正因子
1	0.2	0.0543	0.2715	0.4104	0.6615
2	0.2	0.1086	0.543	0.8069	0.6730
3	0.2	0.2172	1.086	1.7041	0.6373
4	0.2	0.3208	1.604	2.6076	0.6152
5	0.2	0.4344	2.172	3.6653	0.5926

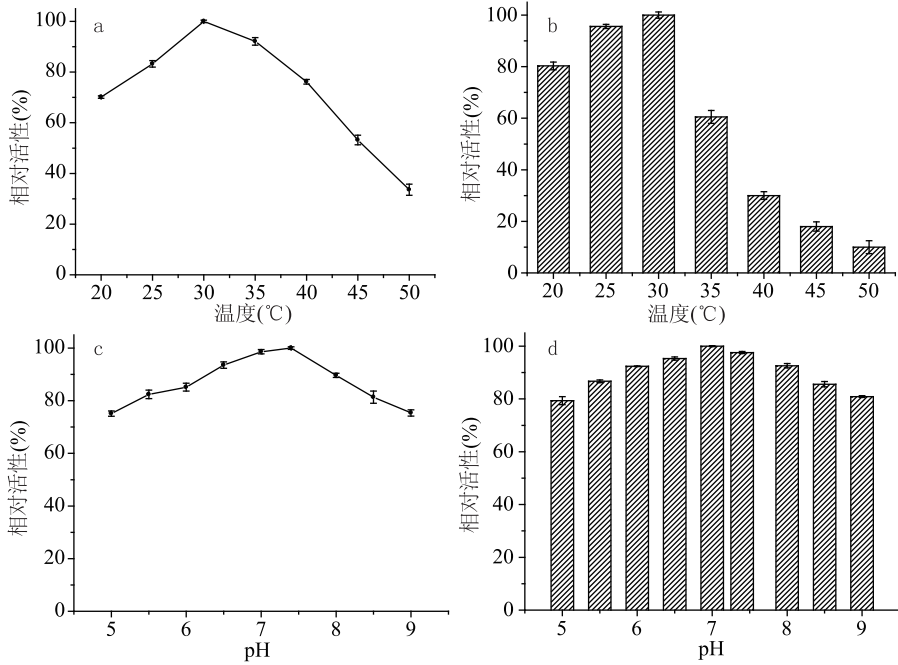


图6 不同因素对基因重组菌 CtNHase 催化活性影响

Fig.6 Effect of different temperatures and pH values on the catalytic activity of recombinant CtNHase

注:(a)为反应最适温度曲线;(b)为温度稳定性曲线;(c)为反应最适 pH 曲线;(d)为 pH 稳定性曲线

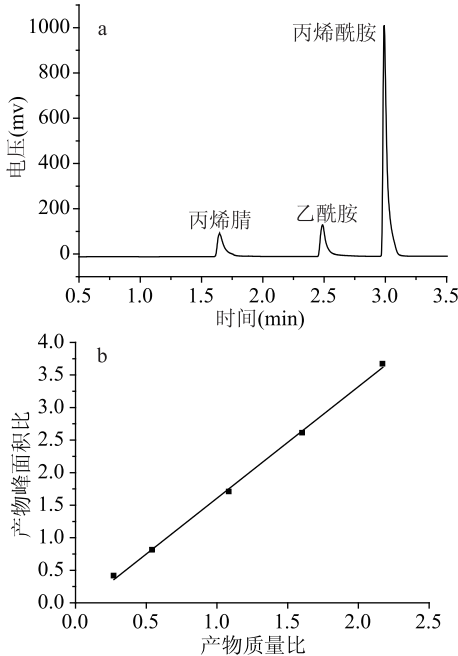


图4 催化丙烯腈反应 4 h 气相色谱图和内标校正曲线

Fig.4 Gas chromatogram for 4 h catalysis of acrylonitrile and internal standard calibration curve

高后酶活下降;如图 6b 所示为重组菌关于温度稳定性的曲线,可以看出低温时菌体的稳定性较好,30 °C 时菌种活性最高,温度高于 35 °C 后酶活迅速下降,证明该重组菌非嗜热型菌种,高温下易失活。

如图 6c 所示为重组菌关于反应时缓冲液 pH 影响的曲线,在中性环境下 pH = 7.4 时酶活最高,为最佳反应条件;以最高酶活做参照,如图 6d 所示得到重组菌关于 pH 稳定性的曲线,可以看出缓冲液 pH 对酶活影响不大,pH 在 5~9 范围内酶活均在 80% 以

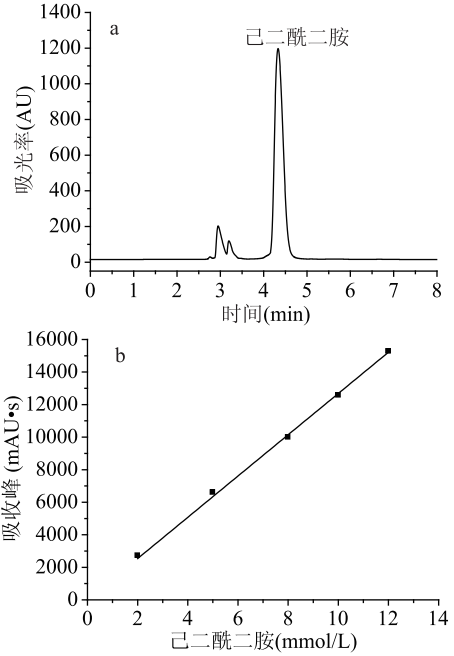


图5 催化己二腈反应 5 min 液相色谱图和产物标准曲线

Fig.5 Liquid chromatogram for 5 min catalysis of adiponitrile and product standard curve

上,说明该菌具有良好的 pH 稳定性。

以上结果表明基因重组菌 CtNHase 对己二腈的最佳催化反应条件为 30 °C , pH7.4。

3 结论

本研究成功构建了野生菌 *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D 来源的腈水合酶基因重组菌 CtNHase ,发现在 pH = 7.4 , 30 °C 的最佳反应条件下,基因重组菌 CtNHase 可在 5 min 和 5 h 内分别完全转化 50 mmol/L 己二腈和 500 mmol/L 丙烯腈生成己二酰

二胺和丙烯腈。本实验结果说明基因重组菌 CtnHase 可高效转化腈类化合物为酰胺类化合物。鉴于酰胺类化合物具有极高的工业应用价值,因此本研究下一步会深入对酶的固定化操作进行探究,进一步提升催化效率,以期为真正的工业化生产提供理论依据,为绿色化学的发展添砖加瓦。

参考文献

- [1] Denard C A, Ren H, Zhao H. Improving and repurposing biocatalysts via directed evolution [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 25: 55-64.
- [2] Prasad S, Bhalla T C. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 725-741.
- [3] Supreetha K, Rao S N, Srividya D, et al. Advances in cloning, structural and bioremediation aspects of nitrile hydratases [J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(4): 4661-4673.
- [4] 张玉香, 韩平平, 李晋, 等. 1 株腈水合酶产生菌株的筛选、鉴定及酶学特性 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(23): 128-133.
- [5] Abdelraheem E M, Busch H, Hanefeld U, et al. Biocatalysis explained: From pharmaceutical to bulk chemical production [J]. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2019, 4(11): 1878-1894.
- [6] Bornscheuer U T. The fourth wave of biocatalysis is approaching [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2018, 376(2110): 20170063.
- [7] Jiao S, Li F, Yu H, et al. Advances in acrylamide bioproduction catalyzed with *Rhodococcus* cells harboring nitrile hydratase [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(3): 1001-1012.
- [8] Sheldon R A, Pereira P C. Biocatalysis engineering: The big picture [J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(10): 2678-2691.
- [9] Sharma B, Dangi A K, Shukla P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review [J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 210: 10-22.
- [10] France S P, Hepworth L J, Turner N J, et al. Constructing biocatalytic cascades: *In vitro* and *in vivo* approaches to de novo multi-enzyme pathways [J]. *Acs Catalysis*, 2017, 7(1): 710-724.
- [11] Sun Z, Wikmark Y, Bäckvall J E, et al. New concepts for increasing the efficiency in directed evolution of stereoselective enzymes [J]. *Chemistry - A European Journal*, 2016, 22(15): 5046-5054.
- [12] Gileadi O. Recombinant protein expression in *E. coli*: A historical perspective [M]. Berlin: *Heterologous Gene Expression in E. coli*, 2017: 3-10.
- [13] Fernandes J O. Acrylamide [M]. *Coffee*, 2019: 679-696.
- [14] Turk S C, Kloosterman W P, Ninaber D K, et al. Metabolic engineering toward sustainable production of nylon-6 [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(1): 65-73.
- [15] Sun J, Yu H, Chen J, et al. Ammonium acrylate biomanufacturing by an engineered *Rhodococcus ruber* with nitrilase overexpression and double-knockout of nitrile hydratase and amidase [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(12): 1631-1639.
- [16] Dicosimo R, Mcauliffe J, Poulou A J, et al. Industrial use of immobilized enzymes [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6437-6474.
- [17] Bornscheuer U, Huisman G, Kazlauskas R J, et al. Engineering the third wave of biocatalysis [J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 185-194.
- [18] Velankar H, Clarke K G, Du Preez R, et al. Developments in nitrile and amide biotransformation processes [J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(11): 561-569.
- [19] 郑裕国, 薛亚平, 柳志强, 等. 腈转化酶在精细化学品生产中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1795-1807.
- [20] 王世伟, 王卿惠, 翟丽萍, 等. 原核微生物腈转化酶研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(10): 100-107.
- [21] Petrillo K L, Wu S, Hann E C, et al. Over-expression in *Escherichia coli* of a thermally stable and regio-selective nitrile hydratase from *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(5): 664-670.
- [22] Mersinger L J, Hann E C, Cooling F B, et al. Production of acrylamide using alginate-immobilized *E. coli* expressing *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D nitrile hydratase [J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2005, 347(7-8): 1125-1131.
- [23] Nagasawa T, Shimizu H, Yamada H. The superiority of the third-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 40(2-3): 189-195.
- [24] Nagasawa T, Ryuno K, Yamada H. Superiority of *Pseudomonas chlororaphis* B23 nitrile hydratase as a catalyst for the enzymatic production of acrylamide [J]. *Experientia*, 1989, 45(11-12): 1066-1070.
- [25] Liu Z, Dong L, Cheng F, et al. Gene cloning, expression, and characterization of a nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ZJUTB10 [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011, 59(21): 11560-11570.
- [26] Cheng Z, Cui W, Liu Z, et al. A switch in a substrate tunnel for directing regioselectivity of nitrile hydratases towards α , ω -dinitriles [J]. *Catalysis Science & Technology*, 2016, 6(5): 1292-1296.