



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102690766 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

(21) 申请号 201210150111. 1

(22) 申请日 2012. 05. 15

(71) 申请人 中国科学院青岛生物能源与过程研究所

地址 266101 山东省青岛市崂山区松岭路
189 号

(72) 发明人 咸漠 张海波 刘炜 徐鑫

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006. 01)

C12N 1/02 (2006. 01)

C12Q 1/04 (2006. 01)

C12R 1/38 (2006. 01)

C12R 1/01 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

筛选生产底物广泛性的腈水解酶的菌株的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种筛选生产底物广泛性腈水解酶的菌株的方法。具体地说,本发明提供了一种利用三羟基丙腈作为筛选压力和氮源,筛选生产底物广泛性腈水解酶的菌株的方法。由通过该方法筛选获得的菌株所生产的腈水解酶具有较好的底物广泛性,能够水解羟基腈、普通腈类及芳香腈类产生相应的羧酸。该方法筛选获得菌株所生产的腈水解酶具有很好的底物广泛性,并且存在着水解条件温和、环境友好等优点。

1. 一种筛选生产底物广泛性的脲水解酶的菌株的方法,其特征在于采用三羟基丙脲作为筛选压力和氮源,将适合微生物生长的样品经过活化、初级富集、再富集后经过 Berthelot 初筛、高压液相复筛步骤后获得生产底物广泛性的脲水解酶的菌株,其中所述活化、初级富集、再富集后经过 Berthelot 初筛、高压液相复筛步骤如下:

(1) 活化步骤,将经水洗后的固体样品的水洗液或者液体样品于 25℃~37℃放置 12~24 小时;

(2) 初步富集步骤,在活化步骤后向样品中添加 1%~2% 的含三羟基丙脲的选择性筛选液体培养基;

(3) 再富集步骤,取 1ml 经初步富集的样品接种到选择性筛选液体培养基中,在 37℃继续富集培养 12~24 小时后,取 50~200 μL 富集培养液涂布于选择性筛选培养基固体平板,经 36~72 小时获得单菌落;

(4) Berthelot 初筛步骤,将 2.5g 氢氧化钠、18.7g 磷酸氢二钠和 15.9g 磷酸钠溶于 400mL 水中,加入含 250mg 有效氯的次氯酸钠溶液;用水稀释,用磷酸或磷酸钠调节 pH 为 11.7,最后定容至 500mL,得氢氧化钠与次氯酸钠复配液,即 A 液,将 5.0g 苯酚和 0.025g 亚硝基铁氰化钠溶于 450mL 水中,用水稀释定容至 500mL,制得苯酚与亚硝基铁氰化钠复配液,即 B 液,取菌体催化样品待测样 1 μL,加入 A 液、B 液各 50 μL 以及 100 μL 双蒸水,混合均匀,37℃恒温并震荡反应 20min,测定 612nm 处吸光度;

(5) 高压液相复筛步骤:使用仪器为:Waters 2545HPLC (Milford, MA, USA),色谱柱为 Aminex HPX-87H (300mm×7.8mm, USA)。色谱条件为:进样量为 10 μL,流动相为 0.005M H₂SO₄,流速为 0.3~0.5ml min⁻¹,柱温为 35℃。

2. 如权利 1 要求所述方法,其中所述样品为土壤、有机污染物、水体样品,及其它富含微生物的样品。

3. 如权利 2 要求所述方法,其中所述土壤样品取自垃圾场或废水处理厂周围的土壤。

4. 如权利 1 要求所述方法,所述固体样品水洗的固液质量比为 1:5~1:10。

5. 如权利 1 要求所述方法,其中所述选择性筛选液体培养基的成分是:葡萄糖 3~7g/l, K₂HPO₄ 0.5~2g/l, KH₂PO₄ 1~3g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1~0.3g/l, NaCl 0.5~2g/l, FeSO₄·7H₂O 0.001~0.002g/l, CaCl₂ 0.001~0.002g/l, 三羟基丙脲 0.5~1.5g/l, pH 7.0~7.4。

筛选生产底物广泛性的腈水解酶的菌株的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种从土壤、环境污染物、水体等样品中筛选获得能够生产具有较好的底物广泛性、能够水解羟基腈、普通腈类及芳香腈类的腈水解酶的菌株的方法。

背景技术

[0002] 腈水解酶包括腈水解酶 (Nitrilase) 和腈水合酶 (Nitrile hydratase),前者可以催化腈直接水解生成羧酸及氨;而后者可以催化腈水解生成酰胺,酰胺在酰胺酶 (Amidase) 作用下进一步转化成羧酸及氨。传统化学方法利用腈类合成相应羧酸类需要在强酸性、高温环境中进行,而且合成过程中会有大量的副产物产生,合成效率低下,分离产物困难。利用腈水解酶(包括菌体及纯化后蛋白质)催化腈化物的水解具有高选择性、高效性、条件温和、环境污染小、成本低、产物光学纯度高等优点,与传统的化学方法相比,有着无可比拟的优越性。利用腈水解酶降解腈化合物,用于合成手性的羧酸和酰胺等医药中间体,此外腈水解酶及其产生菌还可用于食品、电镀厂等腈污染废水的生物治理。腈水解酶可广泛应用于精细化工、医药、食品、农业及畜牧业等方面。

[0003] 来源于绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis* B23) 及红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) J1 的腈水解酶已经应用于工业生产,使得年产丙烯酰胺达 30000 吨以上。经证实不同属(农杆菌属、节杆菌属、棒杆菌属、假单胞菌属和红球菌属)的若干细菌种中都有腈水解酶存在,并从多种生态系统中得以分离,例如,热湖的沉积物、深海沟渠、腈污染的土壤等。此外,黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、串珠赤霉菌 (*Gibberella moniliformis*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的几个真菌菌属中,也发现腈类降解活性的报道。底物广泛性良好的腈水解酶在除去食品、饮料及环境中腈类污染的治理方面存在着独特的优势,具有重要的开发价值。

[0004] 目前腈水解酶的筛选方法多采用 2- 羟基腈类如 2- 羟基乙腈、2- 羟基丙腈等作为筛选压力筛选具有较好的催化专一性的腈水解酶,用于催化合成高纯度、具有旋光性的手性化合物。但这些筛选方法都不能获得底物广泛性的腈水解酶。到目前为止,未发现筛选具有较好的底物广泛性的腈水解酶的方法报道。本方法利用 3- 羟基丙腈作为筛选压力和筛选氮源,充分利用 β - 位羟基的结构,使得筛选到的腈水解酶菌株所产腈水解酶既能够降解普通腈类,又能够降解羟基腈和带芳香环的腈类,具有较好的底物广泛性。

[0005] 经检索国内外没有以 3- 羟基丙腈作为筛选压力和氮源筛选产腈水解酶的菌株的方法及筛选底物广泛性腈水解酶的方法。

发明内容

[0006] 本发明针对现当前腈水解酶市场需求,特别是对于具有底物广泛性腈水解酶的需求,以三羟基丙腈作为筛选压力和氮源,利用 Berthelot 显色法进行初步测定,结合高压液相对高效产氨菌株进行进一步确认,建立了筛选生产底物广泛性的腈水解酶的菌株的筛选

方法。本方法既通过 Berthelot 显色法提高了筛选的效率,又通过高压液相保证了筛选的准确度,经检验利用三羟基丙腈筛选到的菌株所生产的腈水解酶都具有较好的底物广泛性。

[0007] 本发明还涉及通过上述筛选方法筛选得到的菌株。通过本发明的筛选方法筛选到的菌株主要属于假单胞菌属、泛菌属。

[0008] 本发明还涉及由所筛选的菌株所产生的底物广泛性的腈水解酶。

[0009] 具体地,本发明涉及一种筛选生产底物广泛性的腈水解酶的菌株的方法,本筛选方法的关键是采用三羟基丙腈作为筛选压力和氮源,所述方法包括下述步骤:

[0010] (1) 活化步骤,将经水洗后的固体样品的水洗液或者液体样品于 25℃~37℃放置 12~24 小时;

[0011] (2) 初步富集步骤,在活化步骤后向样品中添加 1%~2% 的含三羟基丙腈的选择性筛选液体培养基;

[0012] (3) 再富集步骤,取 1ml 经初步富集的样品接种到选择性筛选液体培养基中,在 37℃继续富集培养 12~24 小时后,取 50~200 μl 富集培养液涂布于选择性筛选培养基固体平板,经 36~72 小时获得单菌落;

[0013] (4) Berthelot 初筛步骤,将 2.5g 氢氧化钠、18.7g 磷酸氢二钠和 15.9g 磷酸钠溶于 400mL 水中,加入含 250mg 有效氯的次氯酸钠溶液;用水稀释,用磷酸或磷酸钠调节 pH 为 11.7,最后定容至 500mL,得氢氧化钠与次氯酸钠复配液,即 A 液,将 5.0g 苯酚和 0.025g 亚硝基铁氰化钠溶于 450mL 水中,用水稀释定容至 500mL,制得苯酚与亚硝基铁氰化钠复配液,即 B 液,取菌体催化样品待测样 1 μL,加入 A 液、B 液各 50 μL 以及 100 μL 双蒸水,混合均匀,37℃恒温并震荡反应 20min,测定 612nm 处吸光度;

[0014] (5) 高压液相复筛步骤:使用仪器为:Waters 2545HPLC(Milford, MA, USA),色谱柱为 Aminex HPX-87H(300mm×7.8mm,USA)。色谱条件为:进样量为 10 μl,流动相为 0.005M H₂SO₄,流速为 0.3~0.5ml min⁻¹,柱温为 35℃,

[0015] 其中对所用的样品没有特别的限定,主要是含有有机质、适合微生物生长的样品。

[0016] 本发明的筛选方法中用到的样品包括,但不限于,土壤、有机污染物、水体样品,及其它富含微生物的样品,特别是取自垃圾场或废水处理厂周围的土壤样品。

[0017] 本发明的筛选方法可以从土壤、有机污染物、水体样品、及其它富含微生物的样品中通过活化、初步富集、再富集后经过筛选培养基筛选获得单克隆菌株并经过显色高通量筛选和高压液相检测后获得生产底物广泛性的腈水解酶的菌株,具体地,所述方法包括下述步骤:

[0018] (1) 水洗步骤:上述土壤及其它有机污染物等固体样品要通过水洗,以提高其富集效率,水洗固液质量比为 1:5~1:10;

[0019] (2) 初步活化步骤:经水洗后的固体样品的水洗液或者液体样品于 25℃~37℃放置 12~24 小时;

[0020] (3) 初步富集步骤:向活化后向样品中添加 1%~2% 的含三羟基丙腈的选择性液体筛选培养基;

[0021] (4) 再富集步骤:取 1ml 经初步富集的样品接种到装有 30~70ml 选择性筛选液体培养基的三角瓶中;继续富集培养 12~24 小时后,取 50~200 μl 富集培养液涂布于选

择性筛选培养基固体平板,经 36 ~ 72 小时获得单菌落;

[0022] (5) 显色高通量筛选步骤:将 2.5g 氢氧化钠、18.7g 磷酸氢二钠和 15.9g 磷酸钠溶于 400mL 水中,加入含 250mg 有效氯的次氯酸钠溶液;用水稀释,用磷酸或磷酸钠调节 pH 为 11.7,最后定容至 500mL,得氢氧化钠与次氯酸钠复配液(以下简称 A 液),将 5.0g 苯酚和 0.025g 亚硝基铁氰化钠溶于 450mL 水中,用水稀释定容至 500mL,制得苯酚与亚硝基铁氰化钠复配液(以下简称 B 液),取菌体催化样品待测样 1 μ L,加入 A 液、B 液各 50 μ L 以及 100 μ L 双蒸水,混合均匀,37 $^{\circ}$ C 恒温并震荡反应 20min,测定 612nm 处吸光度,

[0023] (6) 高压液相检测步骤:使用仪器为:Waters 2545HPLC(Milford, MA, USA),色谱柱为 Aminex HPX-87H(300mm \times 7.8mm,USA)。色谱条件为:进样量为 10 μ L,流动相为 0.005M H₂SO₄,流速为 0.3 ~ 0.5ml min⁻¹,柱温为 35 $^{\circ}$ C;

[0024] (7) 获得生产底物广泛性的脲水解酶的菌株,

[0025] 其中,所述选择性筛选培养基的成分是:葡萄糖 3 ~ 7g/l, K₂HPO₄0.5 ~ 2g/l, KH₂PO₄ 1 ~ 3g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1 ~ 0.3g/l, NaCl 0.5 ~ 2g/l, FeSO₄·7H₂O 0.001 ~ 0.002g/l, CaCl₂0.001 ~ 0.002g/l, 三羟基丙脲 0.5 ~ 1.5g/l, pH 7.0 ~ 7.4。

[0026] 由于对筛选所用的样品没有特别的限定(主要为含有有机质、适合微生物生长的样品),所以本发明的方法具有良好的重复性,在工业应用中具有良好的实用性和适用性。

[0027] 本发明筛选到的菌株所产生的脲水解酶具有较好的底物广泛性。

[0028] 上述底物广泛性的测定底物为苯乙脲、三羟基丙脲、对羟基苯乙脲。

[0029] 上述底物广泛性的测定方法为 Berthelot 法。

[0030] 上述测定底物广泛性的测定方法底物浓度为 10mM。

[0031] 本发明有益效果如下:本方法能够实现产脲水解酶菌株的高通量筛选,结合普通显色法高通量筛选的优点和高压液相法精确度较高的特点;并且在筛选前经过两轮富集,筛选到的产脲水解酶菌株所产生的脲水解酶经过验证具有很好的底物广泛性,能够同时转化乙脲、3-羟基丙脲、对羟基乙脲等普通脲类、羟基脲类、芳香族脲类。并且,本发明筛选到的菌株所产生的脲水解酶转化脲类产物的条件温和、环境友好以及具有产品绿色天然等优点。

附图说明

[0032] 图 1HPLC 检测转化产物;

[0033] 图 2 利用本发明的方法筛选到的菌株(假单胞菌属、泛菌属等)所产生的脲水解酶的底物广泛性。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图详细描述本发明。本领域技术人员应该理解,除非另外指明,下述实施例中所用的试剂均为市售分析纯级别的试剂。本领域技术人员还应该理解,下述实施例仅是举例说明的目的,并不限制本发明的范围。

[0035] 实施例 1:生产底物广泛性的脲水解酶的菌株的筛选

[0036] 1. 培养基:

[0037] 选择性筛选液体培养基:葡萄糖 3 ~ 7g/l, K₂HPO₄0.5 ~ 2g/l, KH₂PO₄1 ~ 3g/l,

MgSO₄·7H₂O 0.1~0.3g/l, NaCl 0.5~2g/l, FeSO₄·7H₂O 0.001~0.002g/l, CaCl₂ 0.001~0.002g/l, 三羟基丙腈 0.5~1.5g/l, pH 7.0~7.4。

[0038] 选择性固体筛选培养基:在上述培养基中添加 1.5%的琼脂。

[0039] 2. 筛选方法:

[0040] 取垃圾场、污水处理厂周围的土壤样品按照 1g 样品用 5~10ml 水溶解,将水样置于室温 12~24 小时活化后向样品中添加 0.5~1ml 的选择性筛选培养基;在 37℃富集培养 48 小时后,取 1ml 经富集的样品接种到装有 50ml 选择性筛选液体培养基的三角瓶中;在 37℃继续富集培养 12 小时后,取 100 μl 富集培养液涂布于选择性筛选培养基固体平板,在 37℃经 48 小时获得单菌落,并测定其腈水解酶活性。

[0041] 实施例 2:筛选获得菌株的腈水解酶水解活性的测定

[0042] 1. 培养基

[0043] 产腈水解酶培养基:甘油 8~12g/l, 蛋白胨 8~12g/l, 酵母膏 4~6g/l, KH₂PO₄ 1~3g/l, NaCl 0.5~1.5g/l, MgSO₄ 0.1~0.3g/l, pH 7.0~7.2。

[0044] 2. Berthelot 法初步测定

[0045] 上步收集的菌体重悬于终浓度为 10mmol/L 的三羟基丙腈的磷酸钾缓冲液 (pH 7.0, 20mM) 中, 30℃摇床上 120 转/分转化 24h。

[0046] 溶液 A: 2.5g 氢氧化钠、18.7g 磷酸氢二钠和 15.9g 磷酸钠溶于 400mL 水中, 加入含 250mg 有效氯的次氯酸钠溶液;磷酸或磷酸钠调节 pH 为 11.7, 最后定容至 500mL, 棕色瓶中 4℃保存。

[0047] 溶液 B: 5.0g 苯酚和 0.025g 亚硝基铁氰化钠溶于 450mL 水中, 用水稀释定容至 500mL, 棕色瓶中 4℃保存。

[0048] 取待测样 10 μl, 加入 A 液、B 液各 500 μl 以及 100 μl 双蒸水, 混合均匀, 37℃恒温并震荡反应 20 分钟, 测定 612nm 处吸光度。根据氨分子数初步估算转化率。

[0049] 3. HPLC 法测定转化率:使用仪器为:Waters 2545HPLC (Milford, MA, USA), 色谱柱为 Aminex HPX-87H (300mm×7.8mm, USA)。色谱条件为:进样量为 10 μl, 流动相为 0.005M H₂SO₄, 流速为 0.5ml min⁻¹, 柱温为 35℃, 测定结果如图 1 所示对于 10mM 的 3-羟基丙腈经过 24 小时的转换率为 83%。

[0050] 实施例 3:底物广泛性鉴定

[0051] 1. 不同底物的配制:分别将乙腈、3-羟基丙腈、对羟基乙腈溶于 20mM 的 pH 7 的磷酸钠缓冲液, 终浓度为 10mM, 作为底物。

[0052] 2. 测定方法:同实施例 2 中 Berthelot 法初步测定。在实施例 1 中利用本发明的方法筛选得到的几株产腈水解酶能力较强的菌株的情况如图 2 所示, 几株腈转化能力较好的菌株产生的腈水解酶具有较好的底物广泛性, 都能够水解三种具有代表性结构的腈类。

[0053] 应该理解, 尽管参考其示例性的实施方案, 已经对本发明进行具体地显示和描述, 但是本领域的普通技术人员应该理解, 在不背离由后附的权利要求所定义的本发明的精神和范围的条件, 可以在其中进行各种形式和细节的变化, 可以进行各种实施方案的任意组合。

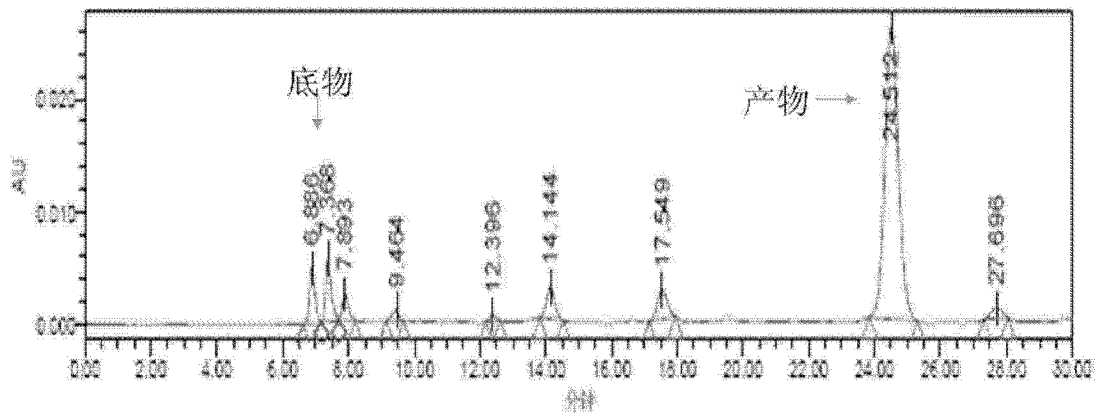


图 1

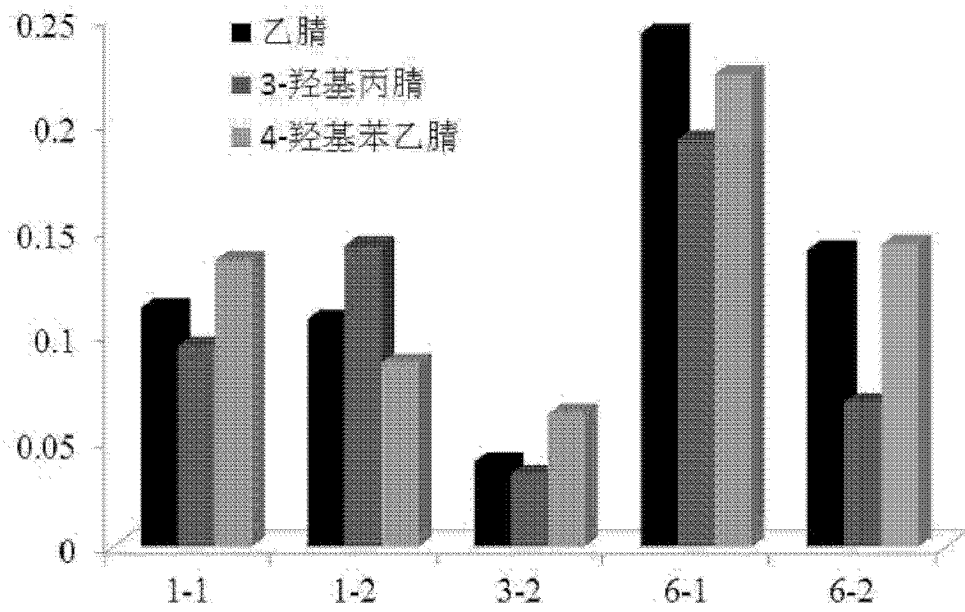


图 2