

原核微生物腈水合酶理论和实践研究

Research on theory and practice of nitrile hydratases from prokaryotic microbes



王世伟 著

中国原子能出版社

原核微生物腈水合酶理论和实践研究

Research on theory and practice of nitrile hydratases from prokaryotic microbes

王世伟 著

中国原子能出版社

图书在版编目(CIP)数据

原核微生物脲水合酶理论和实践研究 / 王世伟著.

— 北京: 中国原子能出版社, 2018. 3

ISBN 978-7-5022-8942-3

I. ①原… II. ①王… III. ①原核生物—微生物学—
脲—水解酶—合酶—研究 IV. ①Q934.3②O623.76

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 062207 号

内 容 简 介

本书对原核微生物脲水合酶理论和实践进行了研究, 主要内容包括: 脲降解原核微生物多样性及脲转化、生物转化和生物催化、原核微生物脲转化酶、脲类物降解及脲水合酶研究概况、脲水合酶特性及其合成调节与催化机制、脲水合酶纯化和酶学性质研究、脲水合酶基因克隆与亚基 N 端测序、脲水合酶同源建模和底物对接研究、脲水合酶结晶条件优化、复合诱变选育高产脲水合酶菌株 LUV₃₀₋₀₆ 等。本书论述严谨, 结构合理, 条理清晰, 内容丰富新颖, 是一本值得学习研究的著作。

原核微生物脲水合酶理论和实践研究

出版发行 中国原子能出版社(北京市海淀区阜成路 43 号 100048)

责任编辑 张 琳

责任校对 冯莲凤

印 刷 三河市铭浩彩色印装有限公司

经 销 全国新华书店

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 14.25

字 数 255 千字

版 次 2018 年 8 月第 1 版 2018 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5022-8942-3 定 价 50.00 元

网址: <http://www.aep.com.cn>

E-mail: atomep123@126.com

发行电话: 010-68452845

版权所有 侵权必究

序 言

腈化合物的生物转化符合绿色化工要求,具有重要应用潜力。系统阐述腈降解微生物多样性和生物转化特点,无论从学术还是应用角度上来看,都具有重要理论和应用价值。研究腈降解微生物产生的腈降解酶,特别是腈水合酶的催化特性、蛋白质结构和功能,对阐明腈的降解机理具有重要科学意义。腈水合酶(NHase)可以将腈类物质转化为相应的酰胺,由于这种酶具有固有的立体和区域选择性,已经成为精细化工领域中绿色、温和、环保的生物催化剂。

本书基本理论思路是从菌株的多样性、腈水合酶的结构和功能分析、酶作用的底物及催化获得的产物、腈水合酶基因表达、酶的耐受性以及其应用价值等方面进行比较全面论述。在应用方面,腈水合酶在生物转化、生物修复和环境保护中起着重要作用。目前国内外腈水合酶的研究进展包括降解腈类的微生物多样性、腈水合酶的催化特性、产腈水合酶菌株的改造以及腈水合酶相关基因的克隆与研究、腈水合酶的固定化酶等。这些内容构成的本书作者的实验设计思路。

以微生物腈水合酶为研究对象,建立了腈水合酶筛选、酶分子纯化和改造等技术平台,利用蛋白质理性改造和非理性改造相结合的方法,在分子水平上对腈水合酶进行改造,系统地考察腈水合酶催化性能,对腈水合酶催化机制相关科学问题进行深入应用基础研究,获得高活力、高稳定性腈水解酶。利用生物信息学和分子动力学模拟技术和方法,获得了腈水合酶序列、结构和功能间的相互关系,有效提高腈水合酶应用系统中反应体系的底物浓度和转化率,降低生产强度和成本,为腈水合酶应用提供基础理论和应用技术是本书写作的最终目的。

本书是一部研究腈的微生物降解及腈水合酶催化的理论和实践的专著,是在作者攻读博士研究生期间积累的大量最新国内外相关资料和文献基础上,结合本人博士期间的实验成果,经过仔细归纳、分析、推敲、考证而总结和凝练的结晶。

全书由理论和实践两部分组成。第一篇概括了腈类物降解微生物的多样性和产酶研究情况,特别综述了腈水合酶的发展进展等理论知识和技术;

第二篇是作者博士论文成果加工和凝练等实践结论。本书可作为药物、酶学、生物技术等专业的教师、研究生和本科生的参考书,也可供相关专业科研人员进行参考。

由于作者水平限制,书中不足之处在所难免,望见谅。

作 者

2018 年 2 月

目 录

第一篇 脲水合酶的理论基础

第 1 章 脲降解原核微生物多样性及脲转化	1
1.1 脲降解原核微生物多样性及对脲的降解	1
1.2 杆菌属多样性、产酶及脲底物的转化	3
1.3 红球菌属多样性、产酶及对脲类的生物转化	5
1.4 参考文献	8
第 2 章 生物转化和生物催化	12
2.1 生物转化和生物催化概念	12
2.2 生物转化和催化反应特点	12
2.3 生物转化和生物催化发展	13
2.4 脲类物降解微生物转化和酶催化	13
2.5 参考文献	15
第 3 章 原核微生物脲转化酶	17
3.1 脲转化酶在有机脲类物代谢中的作用	17
3.2 微生物脲转化酶组成和特点	18
3.3 微生物脲转化酶系统分析和确定	19
3.4 微生物宽泛底物特异性脲转化酶	19
3.5 催化底物区域选择性脲转化酶	20
3.6 催化底物立体选择性脲转化酶	20
3.7 脲转化酶氨基耐受型和热稳定性	20
3.8 参考文献	21
第 4 章 脲类物降解及脲水合酶研究概况	24
4.1 脲水合酶类型、氨基酸组成和亚基构成	24
4.2 脲类物的化学与生物转化	25
4.3 微生物脲水合酶的纯化研究	29
4.4 脲水合酶的结构特点	32
4.5 产脲水合酶菌株的改良	34

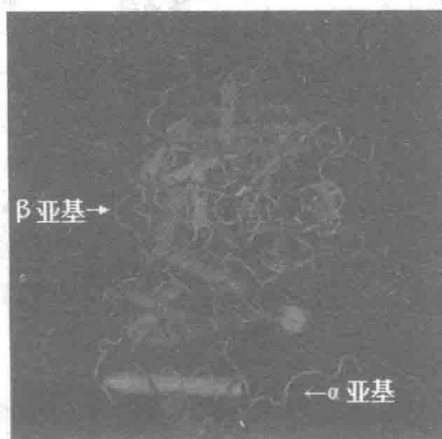
4.6	脲水合酶基因的克隆表达	35
4.7	脲水合酶的固定化研究	36
4.8	脲水合酶的应用进展	37
4.9	脲水合酶的研究展望	38
4.10	参考文献	39
第5章	脲水合酶特性及其合成调节与催化机制	52
5.1	微生物脲水合酶催化特点	52
5.2	微生物脲水合酶的合成调节	56
5.3	微生物脲水合酶的催化机理	57
5.4	影响脲水合酶活性的因素	58
5.5	参考文献	60

第二篇 脲水合酶的实践研究

第1章	绪论	67
1.1	微生物脲水合酶概述	67
1.2	产脲水合酶微生物分布和分离	69
1.3	脲水合酶蛋白性质	72
1.4	基于蛋白质晶体的脲水合酶分子结构	76
1.5	蛋白质大分子结构研究方法	81
1.6	复合诱变育种	85
1.7	脲水合酶在工业产品开发和环境修复中的应用	85
1.8	本课题的立题背景、意义及主要研究内容	87
1.9	参考文献	90
第2章	脲水合酶纯化和酶学性质研究	100
2.1	引言	100
2.2	实验材料	104
2.3	实验方法	108
2.4	结果与讨论	113
2.5	本章小结	125
2.6	参考文献	126
第3章	脲水合酶基因克隆与亚基 N 端测序	130
3.1	引言	130
3.2	实验材料	133
3.3	实验方法	136

3.4	结果与讨论	141
3.5	本章小结	154
3.6	参考文献	155
第4章	脲水合酶同源模建和底物对接研究	158
4.1	引言	158
4.2	实验材料	160
4.3	实验方法	163
4.4	结果与讨论	164
4.5	本章小结	175
4.6	参考文献	176
第5章	脲水合酶结晶条件优化	179
5.1	引言	179
5.2	实验材料	181
5.3	实验方法	182
5.4	结果与讨论	184
5.5	本章小结	196
5.6	参考文献	196
第6章	复合诱变选育高产脲水合酶菌株 LUV ₃₀₋₀₆	199
6.1	引言	199
6.2	实验材料	200
6.3	实验方法	203
6.4	结果与讨论	206
6.5	本章小结	212
6.6	参考文献	212
第7章	结论	215
第8章	展望	217

第一篇 腈水合酶的理论基础



第 1 章 腈降解原核微生物多样性及腈转化

1.1 腈降解原核微生物多样性及对腈的降解

腈类降解微生物细胞内能降解腈类化合物的酶不仅包括腈水合酶(E. C. 4. 2. 1. 84, Nitrile Hydratase), 也可能包括酰胺酶(amidase, E. C. 4. 3. 5. 4)和腈水解酶(nitrilase, E. C. 4. 3. 5. 1), 因此把这些酶统称为腈转化酶。产腈转化酶原核微生物资源十分丰富, 具有明显的多态性。除常见的球菌和杆菌外, 其他许多种属微生物也含腈转化酶。下面首先介绍产腈转化酶原核微生物多样性, 然后着重论述前两个属(球菌和杆菌)产腈转化酶微生物的多样性、催化特性和腈降解一般规律。

从表 1.1 可以看出, 产腈转化酶原核微生物具有明显多态性。

表 1.1 产脲转化酶原核微生物的多样性

菌株	拉丁文	产酶情况	底物	产物
慢生根瘤菌	<i>B. japonicum</i> USDA 110 ^[1]	脲水合酶	吲哚-3-乙脲	3-吲哚 乙酰胺
草木樨剑 中华根瘤菌	<i>Ensifer meliloti</i> CGMCC 7333 ^[2]		噻虫啉(THI); 啉虫脒(ACE)	氨基甲酰亚 胺衍生物
泛菌属	<i>Pantoea</i> ssp. ^[3]	立体脲 水合酶	苯基甘氨酸脲	(R,S)-苯基 甘氨酸酰胺
诺卡氏菌	<i>Nocardia corallina</i> B-276 ^[4] <i>Nocardia</i> sp. 108 ^[5]	脲水合酶	多种脲类物	酰胺
敏捷食酸菌	<i>Acidovorax facilis</i> 72W ^[6]	脲水合酶	脂肪 ω 二脲	乳胺
睾丸酮丛 毛单胞菌	<i>C. testosteroni</i> 5-MGAM-4D ^[7]	脲水合酶 和酰	脲	羧酸
沼泽红假 单胞菌	<i>Rhodopseudomonas</i> <i>palustris</i> HaA2 ^[8]	立体选择性 脲水合酶	脲	酰胺
假单胞菌	<i>Pseudomonas putida</i> NRRL-18668 ^[9,10] <i>Pseudomonas marginals</i> MA32 ^[11] <i>Pseudomonas putida</i> MA113 ^[11] <i>Pseudomonas Putida</i> ^[12]	脲水合酶 和酰胺酶	多种脲类物	S-酰胺、 布洛芬等
嗜热假诺 卡氏菌	<i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM 3095 ^[9]	含钴脲水 合酶	芳香脲(偏爱)	酰胺
莫拉菌属	<i>Moraxella</i> ssp. ^[13]	外消旋脲 水解酶	对映体脲	对映体烷 酸酰胺或羧酸
粘质沙雷菌	<i>Serratia marcescens</i> ZJB-09104 ^[13]	嗜热钴型脲 水合酶	2-氰基吡嗪脲	吡嗪酰胺

从表 1.1 中可以看出,不同微生物菌种脲转化酶可分解和利用相同底物。如慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110、*Bradyrhizobium elkanii* USDA 76 以及 *Bradyrhizobium* sp. BTA-1 和 BGA-12 都能将 1-甲脲-3-乙脲转化为 3-甲脲乙酰胺^[11]。同一菌株也可降解不同底物。有的菌种能转化比较少见的底物,如 Zhou LY 等^[12]报道的草木樨中华根瘤菌 (*Ensifer meliloti* CGMCC 7333) 对新烟碱杀虫剂啉虫脒 (ACE) 的生物转化,生成氨基甲酰亚胺衍生物 (IM-1-2)。

1.2 杆菌属多样性、产酶及脲底物的转化

1.2.1 杆菌属及脲转化

如表 1.2 所示,能产脲转化酶的杆菌大体包括农杆菌 (*Agrobacterium*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、微杆菌 (*Microbacterium*)、节杆菌 (*Arthrobacter*)、短杆菌 (*Brevibacterium*)、棒杆菌 (*Corynebacterium*) 和克雷白氏杆菌 (*Klebsiella*) 等。这些杆菌产生的脲转化酶除脲水合酶外,还包括酰胺酶和脲水解酶。因此,在脲的降解过程中,产物既包括酰胺,又包括羧酸。

表 1.2 不同杆菌属脲转化酶

菌株	拉丁文	产酶	底物	产物
芽孢杆菌	<i>Bacillus pallidus</i> XY4 ^[14]	热稳定性 脲水合酶	脲	酰胺
	<i>Bacillus smithii</i> SC-J05-1 ^[15]	Co 型脲水合酶	脲	酰胺
农杆菌	<i>Agrobacterium radiobacter</i> 8/4 ^[16]	脲水解酶	溴苯脲、碘苯脲、 敌草脲	降解快, 毒性小
微杆菌	<i>Microbacterium</i> sp. ^[16]	脲水解酶	丙烯脲	丙烯酸
节杆菌	<i>Arthrobacter</i> sp. ^[16] <i>Arthrobacter</i> sp. IPCB-3 ^[16]	脲水解酶, 酰胺酶 脲水合酶	脲或酰胺脲	羧酸酰胺
棒杆菌	<i>Brevibacterium</i> sp. CH2 ^[17]	脲水解酶 和酰胺酶	R, S-脲 或酰胺	芳氧基-丙酸

续表

菌株	拉丁文	产酶	底物	产物
克氏杆菌	<i>Klebsiella pneumonia</i> [18]	脲水合酶, 酰胺酶	脂肪脲或酰胺 (底物诱导)	酰胺或羧酸

苍白芽胞杆菌(*Bacillus pallidus* XY4)能产生热稳定的脲水合酶,史氏芽胞杆菌(*Bacillus smithii* SC-J05-1)产生的脲水合酶为钴型脲水合酶,放射形土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter* 8/4)菌株能产脲水解酶,对敌草脲(2,6-二氯苄脲,一种除草剂)等脲类进行快速的降解,对保护环境和生物修复有重要意义。

1.2.2 杆菌属菌株的改良和脲的转化

苍白芽胞杆菌(*Bacillus pallidus* sp.)能产生底物专一性极高的热稳定性脲水合酶,若引入含强启动子的玫瑰色红球菌(*Rhodococcus rhodochrous* J1)中,可望获得具有新特性脲水合酶(高立体、区域选择性,底物和产物的高耐受性)[14]。酶或细胞固定化能改善生产工艺,在绿色化工产业具有潜能。采用酶的固定化方法也可以增加酶的催化能力,Chen J等[15]研究发现,连接盐桥区域突变可增加酶稳定性。采用 RMSF 计算确定了 *Bacillus* SC-105-1 脲水合酶 1V29 和嗜热假诺卡菌 *Pseudonocardia thermophila* JCM3095 热稳定脲水合酶 1UGQ 的 3 个易变热敏感区(在 β 亚基上 A1、A2 和 A3 区域,将稳定盐桥转移到赤红球菌 *Rhodococcus ruber* TH 适温脲水合酶-TH 中。结果发现,NHase-TH-A3 的 β -亚基表达增加,酶活性提高,热稳定性和产物耐受性均有提高。

1.2.3 杆菌属对脲类的转化与治理“三废”

放射土壤杆菌 *Agrobacterium radiobacter* 8/4 对环境中残留的除草剂降解快,毒性小,可应用于环境保护[16]。*Brevibacterium* sp. CH2 菌株含有立体选择性的脲水合酶和酰胺酶,可应用于精细化工生产相应的酰胺或羧酸[17]。利用某些杆菌产耐热脲转化酶的特点,可以应用于“三废”处理,例如,*Klebsiella pneumoniae* 产生的脲水合酶的最适温度为 55℃,而酰胺酶为 40℃。可见该菌在高温工业废水处理方面具有应用价值[18]。

1.3 红球菌属多样性、产酶及对腈类的生物转化

1.3.1 红球菌属多样性及产酶

研究发现,腈转化酶微生物大多属于变形菌门(*Proteobacteria*)微生物。其中红球菌属(*Rhodococcus*)是最重要的一个类群。红球菌是产腈转化酶的重要微生物资源,研究红球菌产生的腈转化酶有重要应用价值。

如表 1.3 所示,红球菌许多的种都产腈代转化酶,并均具有腈代还原能力。

表 1.3 红球菌属不同菌种产生的腈转化酶

菌株	拉丁文	产酶	底物	产物
玫瑰 红球菌	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> BX2 ^[19]	诱导腈水合酶- 酰胺酶组成型 的腈水解酶	乙腈;反式丁烯腈; 丙烯腈;顺式 丁烯腈	氨
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M33 ^[20]	腈水合酶	丙烯腈	丙烯酰胺
	<i>R. rhodochrous</i> PA-34 ^[21]	腈水合酶	烟腈;丙烯腈	烟酰胺; 丙烯
红平 红球菌	<i>R. erythropolis</i> G20 ^[16]	腈水解酶	β -氨基丙腈	β -氨基丙酸
	<i>R. erythropolis</i> JCM6823, <i>R. erythropolis</i> JCM2892 ^[16]	腈水合酶	腈	酰胺(5-己 内酰胺诱导)
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> tg1-A6 ^[22]	腈水解酶	丙烯腈	丙烯酸

续表

菌株	拉丁文	产酶	底物	产物
马红 球菌	<i>R. equi</i> A4 ^[16]	立体选择性 腈水合酶	2-(2-,4-甲氧苯 基)-丙腈, 2-(4-氯苯基)- 丙腈, 2-(6-甲氧 基萘)-丙腈	相应的 酰胺类
	<i>R. equi</i> TG328 ^[23]	腈水合酶酰胺酶 (E-值 99.4%)	(R,S)-2- 苯基丙腈(S)- 2-苯基丙酰胺	(R,S)-2-苯基 丙酰胺 S-(+)- 2-苯基丙酸
丁烷 红球菌	<i>R. butanica</i> (ATCC 21197) ^[24]	腈水解酶	苯甲腈、苯乙腈 或苯环取代物	相应的羧酸 或酰胺
嗜吡啶 红球菌	<i>R. pyridinovorans</i> MW3 ^[25]	底物耐受性 腈水合酶	腈	酰胺
红球菌	<i>R. boritolerans</i> CCTCC M 208108 ^[26]	腈水合酶	2-氨基-2,3- 二甲基丁酰胺	咪唑啉酮 除草剂

红球菌产生的腈转化酶也包含腈水合酶、酰胺酶和腈水解酶。其中产生的酶往往具有比较特殊的优势,例如立体选择性和底物耐受性。因此,对红球菌产腈转化酶的菌株多样性的研究应该特别关注,深入研究红球菌腈转化酶的多样性和腈转化酶的特点,开发和利用这些酶在生物转化的特殊优势,转化出更有价值的产品。

1.3.2 玫瑰红球菌产酶及腈类的腈生物转化

玫瑰红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*)不同菌株,如 PA-34、J1、M8 能产多种腈转化酶^[16]。Fang S 等^[19]发现 *R. rhodochrous* BX2 能完全降解腈类污染物,降解效率为乙腈>反式丁烯腈>丙烯腈>顺式丁烯腈。随着降解进行,反应过程中只有氨的积累。这是因为在生物转化过程中,酰胺和羧酸尽管能短暂存在,但最后完全消失。mRNA 表达和酶活性研究表明,降解反应由诱导型腈水合酶/酰胺酶(NHase/amidase)和组成型的腈水解酶(nitrilase)联合完成。Kang M S 等^[20]发现,在 *ilvC* 启动子控制下, *R. rhodochrous* M33 编码腈水合酶 *nhhBAG* 基因可在谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 中克隆和表达。将突变引入 *nhhB* 基因转录起始区

构建了 pNBM4 突变质粒,重组脲水合酶比野生 pNBW33 表达水平有所提高。玫瑰色红球菌(*R. rhodochrous* tg1-A6)已在大肠杆菌中得到高效表达^[21]。Raj J 等^[22]报道产脲水合酶 *R. rhodochrous* PA-34 可被固定在聚丙烯酰胺凝胶中,3 h 内被聚丙烯酰氨包裹的细胞可以完全转化丙烯脲。可见,对红球菌而言,研究其脲转化酶的基因表达和固定化,对酶合成改善和酶活性的利用有一定的价值。

1.3.3 其他红球菌产酶及生物转化

红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)不同菌株(G20、JCM6823、JCM2892)能产生偏爱芳香脲的脲水解酶和脲水合酶^[16]。马红球菌(*Rhodococcus equi* TG328)脲水合酶或酰胺酶均有立体选择性,可用来开发重要的手性物质^[23]。丁烷红球菌(*Rhodococcus butanica*) ATCC 21197 能代谢苯甲脲或其苯环上被羟基、甲基、氯、氰基及甲氧基等取代脲类物。可代谢苯乙脲和其对位被羟基、氯及甲氧基取代脲类物,产物是重要药物中间体^[24]。嗜吡啶红球菌(*Rhodococcus pyridinovorans* MW3)可产生底物耐受性脲水合酶^[25]。Lin Z J 等^[26]通过高级色度比色法筛选到产脲水合酶 *Rhodococcus boritolerans* CCTCC M 208108 菌株,可将除草剂 2-氨基-2,3-二甲基丁脲(ADBN)作为底物转化生产咪唑啉酮 2-氨基-2,3-二甲基丁酰胺(ADBA)。该菌对氰基抗性高达 5 mM,对产物(ADBA)具有明显耐受性。不同的红球菌产生的脲水合酶的活性,降解的底物种类和耐受性不同,转化出来的产物也各不相同。显然红球菌多样性为研究多种多样的特异的脲水合酶研究准备了良好的材料。

1.3.4 *R. ruber* CGMCC3090 的研究

笔者研究了一株菌株赤红球菌,发现它为产钴型脲水合酶菌株。已确定该菌株为赤红球菌(*Rhodococcus ruber*),经发酵条件优化,脲水合酶活力达 892.46 U/mL^[27-29]。金属离子能影响脲水合酶活力^[28]。通过金属离子优化,酶活进一步上升(1941 U/mL)。当底物丙烯脲浓度 $\leq 20\%$ 时,脲水合酶活性无明显抑制,转化率达 100%。菌株具有很强的底物耐受性^[29]。诱变菌株 LUV30-06 酶活力提高 21.99%^[30]。原生质体融合子 TQD-58 酶活进一步提高到 4296.8 U/mL^[31]。研究发现该菌株利用己二脲生产 5-氰基戊酰胺(5-CVAM)区域选择性几乎高达 100%^[32]。笔者^[33]对该菌脲水合酶进行了纯化,纯化倍数达到 17.13,得率高达 26.2%。通过计算机模建

和底物对接,构建了该酶 3D 模型^[34],发现底物和酶的结合位点空穴高达 559 Å³,初步揭示脲水合酶宽泛底物特异性反应机制。总之,脲转化酶产生菌具有生物多样性,在绿色化工、生物转化、生物修复、环境保护、精细化工、医药(中间体)、农业(如除草剂)等方面有重要的应用价值^[35]。

1.4 参考文献

[1] Vega-Hernández M C, León-Barrios M, Pérez-Galdona R. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium* [J]. *Soil biology and biochemistry*, 2002, 34 (5) :665-668.

[2] Zhou L Y, Zhang L J, Sun S L, et al. Degradation of the Neonicotinoid Insecticide Acetamiprid via the N-Carbamoylimine Derivate (IM-1-2) Mediated by the Nitrile Hydratase of the Nitrogen-Fixing Bacterium *Ensifer meliloti* CGMCC7333 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(41):9957-9964.

[3] 曹明乐,姜兴林,张海波,等.一株产脲水解酶的泛菌及其催化特征[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(2):346-350.

[4] Lievano R, Pérez H I, Manjarrez N, et al. Hydrolysis of ibuprofen nitrile and ibuprofen amide and deracemisation of ibuprofen using *Nocardia corallina* B-276[J]. *Molecules*, 2012, 17(3):3148-3154.

[5] Wang Y J, Zheng Y G, Xue J P, et al. Characterization of nitrile hydratation catalysed by *Nocardia* sp. 108[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(3):355-362.

[6] Gavagan J E, Fafer S K, Fallon R D, et al. Chemoenzymatic production of lactams from aliphatic, ω dinitriles[J]. *Journal of organic chemistry*, 1998, 63 (14) :4792-4801.

[7] 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.

[8] van Pelt S, Zhang M, Otten L G, et al. Probing the enantioselectivity of a diverse group of purified cobalt-centred nitrile hydratases[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2011, 9(8):3011-3019.

[9] Fallon R D, Stieglitz B, Ijr T. A *Pseudomonas putida* capable of

stereoselective hydrolysis of nitriles[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(2):156-161.

[10] 郑裕国,金晓峰,郑仁朝等.一类生物催化剂—氰基耐受型腈水合酶.生物加工过程,2010,8:(3),73-78.

[11] Cui Y, Cui W, Liu Z, et al. Improvement of stability of nitrile hydratase via protein fragment swapping[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 450(1):401-408.

[12] Liu Y, Cui W, Fang Y, et al. Strategy for successful expression of the *Pseudomonas putida* nitrile hydratase activator P14K in *Escherichia coli*[J]. BMC Biotechnology, 2013,13(1):48.

[13] Prasad S, Bhalla T. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28 (6):725-741.

[14] Cheng Y M, Ma L, Deng C, et al. Effect of PEG-mediated pore forming on Ca-alginate immobilization of nitrilase-producing bacteria *Pseudomonas putida* XY4[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(8):1653-1658.

[15] Chen J, Yu H, Liu C, et al. Improving stability of nitrile hydratase by bridging the salt-bridges in specific thermal-sensitive regions[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 164(2):354-362.

[16] Vega-Hernández M, León-Barrios A, Jarabo-Lorenzo, et al. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium* [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2002, 34:665-668.

[17] Lee C Y, Choi S K, Chang H N. Bench-scale production of acrylamide using the resting cells of *Brevibacterium* sp. CH2 in a fed-batch reactor[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1993, 15(11): 979-984.

[18] Nawaz M S, Franklin W, Campbell W L, et al. Metabolism of acrylonitrile by *Klebsiella pneumonia* [J]. Archives of microbiology, 1991, 156 (3):231-238.

[19] Fang S, An X, Liu H, et al. Enzymatic degradation of aliphatic nitriles by *Rhodococcus rhodochrous* BX2, a versatile nitrile-degrading bacterium[J]. Bioresource Technology, 2015,185:28-34.

[20] Kang M S, Han S S, Kim M Y, et al. High-level expression in *Corynebacterium glutamicum* of nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* for acrylamide production[J]. Applied Microbiology Biotechnolo-