

УДК 577.214.622:579.66

Бактериальный штамм *Alcaligenes denitrificans* C-32 содержит две нитрилазы с разной субстратной специфичностью

© 2016 г. А. Д. НОВИКОВ*, Л. Е. РЯБЧЕНКО, Т. Е. ЛЕОНОВА, Г. А. ЛАРИКОВА, К. В. ЛАВРОВ, С. А. ГЛИНСКИЙ, А. С. ЯНЕНКО**

ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов" (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: alexm19@mail.ru*, yanenko@genetika.ru**

Поступила в редакцию 17.11.2016

У штамма *Alcaligenes denitrificans* C-32 с высокой нитрилазной активностью, который в настоящее время используется в качестве биокатализатора для промышленного получения акрилата аммония, обнаружено два гена, кодирующих нитрилазы с различными каталитическими свойствами. Оба гена были экспрессированы в *E. coli*, и были изучены свойства кодируемых ими нитрилаз из полученных рекомбинантных штаммов. Один из этих генов, обозначенный *nitC1*, контролировал образование нитрилазы, лучшими субстратами для которой были алифатические нитрилы (акрилонитрил и бутиронитрил). Нуклеотидная последовательность гена *nitC1* была практически (на 99%) идентична последовательности гена алифатической нитрилазы из *Acidovorax facilis* 72W (DQ444267). В свою очередь, ген *nitC2* обладал высоким уровнем гомологии (85%) с геном арилцетонитрилазы из штамма *Alcaligenes faecalis* JM3 (D13419). Для нитрилазы, кодируемой геном *nitC2*, наиболее эффективным субстратом являлся бензилцианид. С учетом данных по ДНК-гомологии и различий в субстратной специфичности нитрилазы NitC1 и NitC2 из штамма *Alcaligenes denitrificans* C-32 были отнесены к группе алифатических нитрилаз и арилцетонитрилаз, соответственно.

Ключевые слова: клонирование, нитрилаза, субстратная специфичность, экспрессия гена, *Alcaligenes denitrificans*.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-6-45-52

Нитрилазы (КФ 3.5.5.1.) – ферменты, катализирующие гидролиз органических цианидов или нитрилов (структурная формула R-CN) с образованием соответствующих кислот и аммония. Эти ферменты широко распространены во всех организмах, включая бактерии, грибы, растения и человека. На основании гомологии последовательностей нитрилазы, как и другие C-N-расщепляющие ферменты, принадлежат к большой группе родственных белков, известной как CN-гидролазы [1], которая в последнее время обозначается как суперсемейство нитрилаз [2]. Ферменты этого суперсемейства имеют сходное строение с характерным структурным мотивом укладки α - β - β - α , они используют тиольный механизм катализа и содержат консервативные остатки триады Glu-Lys-Cys в каталитическом сайте [3, 4]. Собственно группа нитрилаз является

одной из 13 групп, которые по структуре последовательности выделяют в суперсемействе CN-гидролаз [1]. Сходство различных нитрилаз внутри этой группы может не превышать ~ 30%. Этот процент сходства складывается из консервативных мотивов, сгруппированных вокруг аминокислот каталитической триады, и отдельных консервативных аминокислот [1, 5].

На основании субстратной специфичности нитрилазы распределены на три группы [6]: ароматические, преимущественно действующие на ароматические нитрилы (нитрилаза из *Rhodococcus rhodochrous* J1 или грибные нитрилазы); алифатические (ферменты из *Rhodococcus rhodochrous* K22 или *Acidovorax facilis* 72W) и преимущественно гидролизующие арилнитрилы (нитрилаза из *Alcaligenes faecalis* JM3). Эта классификация используется до настоящего времени несмотря на

Список сокращений: а.о. – аминокислотные остатки; ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогактопиранозид; ОП – оптическая плотность; ПААГ – полиакриламидный гель; п.н. – пары нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; среда LB – среда Лурия–Бергана; SDS – додецилсульфат натрия.

то, что некоторые ферменты обладают более широкой субстратной специфичностью и могут быть отнесены одновременно к нескольким группам (например, нитрилазы из *Synechocystis* sp. PCC6803 и *Bradyrhizobium japonicum* USDA110).

Способность нитрилаз действовать селективно только на CN-группу, не затрагивая другие функциональные группы в молекуле, является существенным преимуществом при использовании этих ферментов в органическом синтезе. Кроме того, в отличие от традиционного кислотного или щелочного гидролиза нитрилов энзиматический гидролиз происходит с высокой конверсией в мягких условиях – при низкой температуре и нейтральных pH, а в некоторых случаях характеризуется энантиоселективностью. Благодаря этим преимуществам нитрилазы в последнее время начали использоваться в тонком органическом синтезе для получения фармацевтических субстанций сложной структуры [7].

Первое промышленное применение нитрилаз в крупнотоннажном синтезе связано с использованием клеток *Alcaligenes denitrificans* C-32 в качестве биокатализатора гидролиза акрилонитрила и получения акрилата аммония [8]. Однако недостаточно высокая нитрилазная активность данного биокатализатора является сдерживающим фактором в развитии соответствующего производства. В то же время, применение современных методов, основанных на генетическом конструировании, позволяет получать новые более эффективные биокатализаторы.

В данной работе указанные методы были использованы для изучения генетического контроля образования нитрилазной активности в клетках штамма *Alcaligenes denitrificans* C-32 и оценки перспективности применения этого подхода для увеличения активности биокатализатора.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы, среды, условия выращивания, реактивы. Штамм *Alcaligenes denitrificans* C-32 [8] являлся источником новых генов нитрилаз. В качестве хозяина для клонирования этих генов использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) F⁺::Tn10(Tet^r) proA⁺B⁺ laqI^q Δ(lacA)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17(r_k⁻m_k⁻) glnV44 relA1 lac. Донором при конъюгативном переносе плазмид в *A. denitrificans* служил штамм *E. coli* S17-1(ATCC47055) Trp^RSm^R recA thi pro hsdR⁺M⁺ RP4:2-Tc:Mu:KmTn7 λpir. Штамм *E. coli* BLR(DE3) (Novagen) F⁻ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tet^R) использовали для экспрессии нитрилаз.

Культивирование штамма *A. denitrificans* C-32 и его производных проводили на минеральной синтетической среде МЗ следующего состава, г/л: Na₂HPO₄·12H₂O – 6,0; KH₂PO₄ – 2,0; NH₄NO₃ – 2; цитрат Na – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,1; FeSO₄·7H₂O – 0,004; (pH 7,4–7,6). В качестве источника углерода использовали глюкозу (5 г/л). Для выращивания штаммов *E. coli* служила среда Лурия–Бертани (LB) следующего состава, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; хлористый натрий – 5. Ампициллин (100 мкг/мл) добавляли в среду LB в качестве селективного агента. Если не указано иначе, выращивание *A. denitrificans* проводили при 30°C, а *E. coli* – при 37°C. Жидкие культуры всех штаммов выращивали при постоянном перемешивании (300 об/мин).

Все использованные в работе реактивы и субстраты были получены от Sigma-Aldrich Co. (Merck).

Молекулярно-генетические методы. Манипуляции с ДНК (рестрикция, лигирование, ПЦР-амплификация) осуществляли в соответствии с рекомендациями производителей ферментов (ThermoFisherScientific, США). ПЦР-амплификацию фрагментов проводили на приборе Mastercycler Gradient (Eppendorf). Выделение тотальной ДНК из клеток *A. denitrificans* C-32 и подготовку проб осуществляли по стандартным молекулярно-биологическим методикам; выделение плазмидной ДНК – путем щелочного лизиса в соответствии с [9] или с помощью GeneJet Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisherScientific). Для клонирования и экспрессии генов нитрилаз под контролем T7-промотора использовали вектор pET16b (Merck), согласно рекомендациям изготовителя. Плазмиды в клетки вводили с помощью электропоратора Gene Pulser Xcell производства BioRad. На всех этапах конструирования гибридных плазмид их структуру подтверждали секвенированием. Определение последовательности ДНК проводили с помощью автоматического секвенатора SEQ8000 (Beckman Coulter) в ЦКП ФГБУ ГосНИИгенетика.

В работе использовали вырожденные праймеры со следующей структурой:

AN49: 5'-H Rta gtg Ncc BRH Vgg Rtc SKH VRY Ygc Ytt -3';
 AN54: 5'- Rta gtg Ncc Bac agg gtc gtt gat cgc ctt ggc -3';
 AN50: 5'- ggY taY ccK tDS YRS gtc tgg ctg ggc gca ccg gcc tgg -3'
 AN51: 5'- ggY taY ccK tDS YRS vIB tgg ctB ggB VcV ccS gcV tgg -3'.

Конъюгационное скрещивание *A. denitrificans* C-32 и *E. coli* S17-1. Ночные культуры реципиента – *A. denitrificans* C-32 и донора – *E. coli* S17-1, содержащего гибридные плазмиды, выращенные на среде LB, разбавляли в 20 раз той же средой и растили до середины экспоненциальной фазы.

Затем клетки осаждали, промывали физиологическим раствором и суспендировали в 1/10 изначального объема. Затем 0,5 мл суспензии реципиента, 1 мл суспензии донора и 2,5 мл физиологического раствора смешивали и 0,5 мл этой смеси помещали на нитроцеллюлозный фильтр, находящийся на чашке со средой LB. Чашки инкубировали при 28°C в течение 18 ч, затем клетки смывали с фильтра 10 мл физиологического раствора и концентрировали в 10 раз (см. выше). После этого суспензию клеток донора и реципиента помещали на чашки Петри с агаризованной средой МЗ, содержащей налидиксовую кислоту (10 мкг/мл) и апрамицин (100 мкг/мл). Через 4-5 сут инкубации при 28°C наблюдали рост колоний трансконъюгантов *A. denitrificans* C-32.

Экспрессия генов нитрилазы из *A. denitrificans* C-32 в *E. coli*. Для экспрессии проводили индукцию синтеза нитрилазы с помощью ИПТГ. Культуру *E. coli* с плазмидой, содержащей ген нитрилазы, выращивали в течение ночи со встряхиванием при 37°C на жидкой среде LB с ампициллином (100 мкг/мл), затем разбавляли в 100 раз той же средой и растили в течение еще 3-4 ч до достижения оптической плотности 0,5-1. Затем культуру повторно разбавляли в 100 раз средой того же состава и выращивали до достижения оптической плотности 0,6. Далее температуру изменяли с 37°C на 30°C, добавляли ИПТГ до концентрации 1 мМ и продолжали культивирование со встряхиванием в течение еще 12-36 ч.

Определение нитрилазной активности по гидролизу акрилонитрила. Клетки дважды промывали 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,5, и ресуспендировали в том же буфере. Для измерения активности 500 мкл суспензии клеток с ОП = 1 смешивали с 500 мкл 2%-ного раствора акрилонитрила и инкубировали 20 мин при 30°C. Затем реакцию останавливали добавлением 10 мкл концентрированной соляной кислоты, клетки осаждали центрифугированием и определяли концентрацию образовавшегося аммония методом Несслера. Для этого к 3 мл воды добавляли 60 мкл концентрированного реактива Несслера и 60 мкл исследуемого раствора, перемешивали и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Количество NH₄ (мкмоль) рассчитывали по калибровочному графику, который строили с использованием стандартных растворов NH₄Cl. Удельную нитрилазную активность клеток выражали в количестве NH₄ (мкмоль), образуемого в присутствии 1 мг сухой массы клеток за 1 мин при 30°C.

Определение спектра субстратной специфичности исследуемых нитрилаз. Способность

нитрилаз катализировать гидролиз различных нитрилов изучали в условиях, описанных выше для гидролиза акрилонитрила. Удельная нитрилазная активность клеток в отношении акрилонитрила служила контролем и была принята за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование и анализ генов нитрилаз из *A. denitrificans* C-32. В качестве основного подхода к клонированию генов нитрилаз из штамма C-32 была выбрана стратегия ПЦР-амплификации, праймеры для которой соответствуют консервативным областям генов алифатических нитрилаз. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей этой субстратной группы из различных источников выявил не менее двух консервативных областей помимо активного центра. Эти области были использованы при построении набора праймеров для ПЦР-амплификации фрагментов гена нитрилазы из *Alcaligenes denitrificans* C-32. Позиции праймеров указаны на рис. 1, а структура – в разделе «Условия эксперимента».

При ПЦР-амплификации с использованием различных комбинаций вырожденных праймеров и геномной ДНК *A. denitrificans* C-32 в качестве матрицы был получен набор фрагментов. Их секвенирование и сравнение результатов с данными GenBank показало, что амплифицированные последовательности гомологичны генам двух различных нитрилаз, обнаруженных ранее в разных видах бактерий. Одни фрагменты были практически идентичны (на 99% по нуклеотидной последовательности) с геном алифатической нитрилазы из штамма *Acidovorax facilis* 72W (DQ444267). Другие обладали высокой гомологией (85%) с геном арилацетонитрилазы из штамма *Alcaligenes faecalis* JM3 (D13419). Гены нитрилаз из *A. denitrificans* C-32 были обозначены *nitC1* и *nitC2*, соответственно.

Для клонирования полноразмерных копий генов каждой нитрилазы из штамма C-32 был применен подход, использующий нереплицирующиеся интегративные конъюгативные векторы, ранее описанный нами в [10]. В качестве гомологичных фрагментов для интеграции в хромосому штамма C-32 служили внутренние фрагменты генов нитрилаз *nitC1* и *nitC2*. Полученные в результате интеграции и спасения из хромосомы фрагменты содержали ген *nitC1* протяженностью 1110 п.н. (369 а.о.), ген *nitC2* протяженностью 1071 п.н. (356 а.о.) и небольшие дополнительные участки, фланкирующие начало и конец каждого из генов.

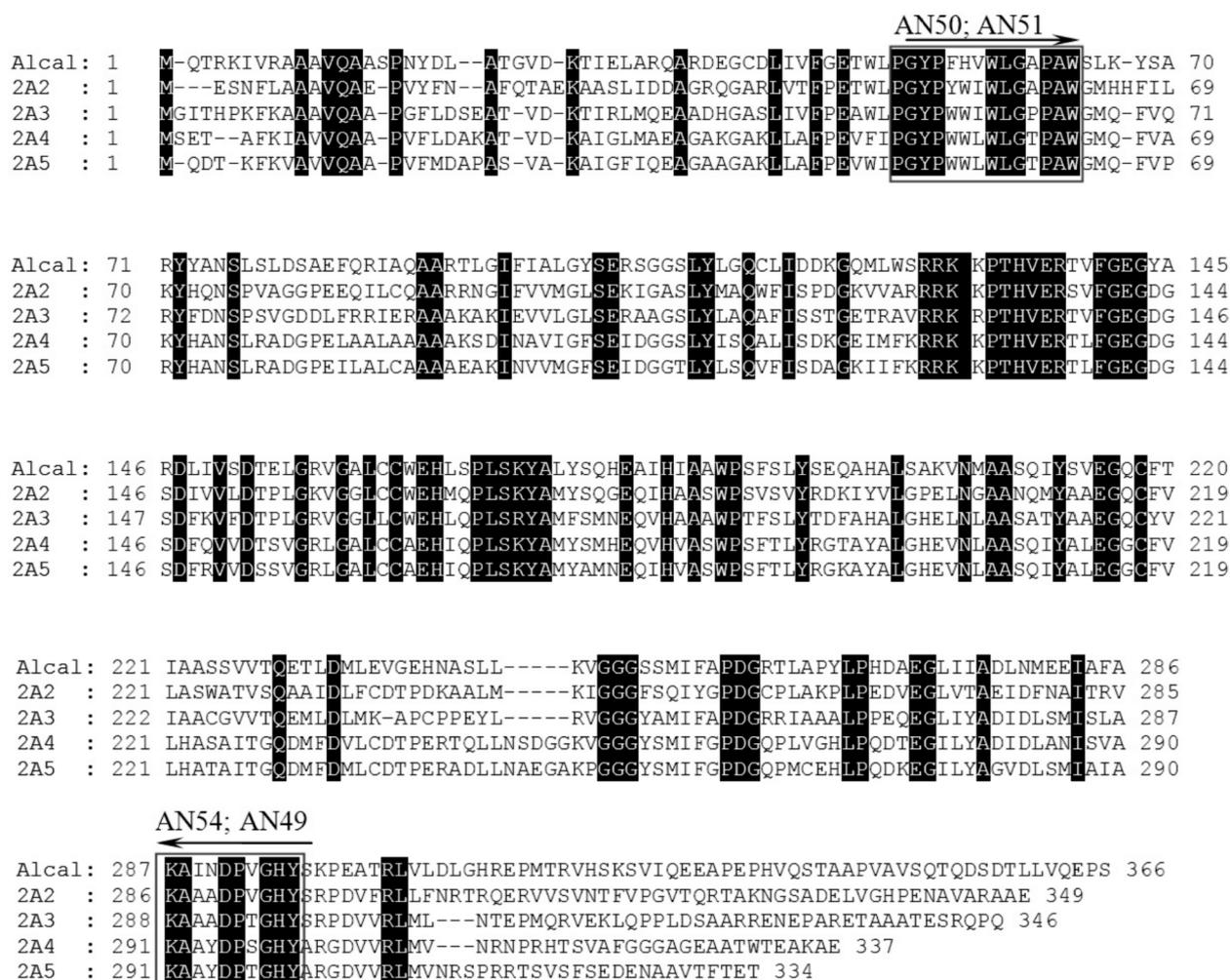


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей нитрилаз из различных источников. Черным цветом обозначены аминокислоты, идентичные для всех нитрилаз. Рамками выделены консервативные области; стрелками отмечены области, которые были использованы для построения праймеров, и их направление.

Обозначения нитрилаз: Alcal – *Alcaligenes faecalis* JM3, GenBank #D13419; нитрилаза 2A2 – GenBank #AY487432; нитрилаза 2A3 – GenBank #AY487470; нитрилаза 2A4 – GenBank #AY487473; нитрилаза 2A5 – GenBank #AY487533

Fig. 1. Alignment of aminoacid sequences for nitrilases from various sources. Sequences identical for all nitrilases are typed black. Frames surround conservative regions; arrows indicate areas that were used in the design of primers, and their directions.

Nitrilases are designated as follows: Alcal, enzyme from *A. faecalis* JM3, GenBank #D13419; 2A2, GenBank #AY487432; 2A3, GenBank #AY487470; 2A4, GenBank #AY487473; 2A5, GenBank #AY487533

Последовательности генов *nitC1* и *nitC2* из *A. denitrificans* C-32 были депонированы в GenBank под номерами KY020432 и KY073297, соответственно.

Сравнение аминокислотных последовательностей, кодируемых генами нитрилаз из штамма *Alcaligenes denitrificans* C-32, приведено на рис. 2.

Аминокислотные последовательности NitC1 и NitC2 были идентичны на 38%. При этом в них

были обнаружены консервативные мотивы, характерные для других нитрилаз. Фрагменты, по которым были сконструированы вырожденные праймеры, также имеют сходство с консенсусным мотивом (см. рис. 2).

Экспрессия генов новых нитрилаз из *A. denitrificans* C-32. Фрагменты, содержащие гены нитрилаз из штамма *A. denitrificans* C-32, были

				AN50; AN51																		
				PGYP---WLG-PAW																		
NitC1	10	AATVQAE	EPVWLDADAT	IDKSI	GIIEEAQK	GASLI	IAEPEVFI	PGEPY	WAWLGD	VKYSLS	SF	69										
NitC2	9	AAAVQA	ASPNYDLAVG	VDKTIE	LARQAR	DEGCDL	IVFGETW	LPGYPF	HVWLG	APAWSL	KY	68										
NitC1	70	TSRYHENS	LELGDDRM	RRLQLA	AARRNK	IAIVM	GYSERE	AGSRY	MSQVFI	DERGEI	IVANRR	129										
NitC2	69	SARYFANS	LSLSDSAE	YRRIAE	AARSLG	IFITL	GYSER	SGGSL	YLGQCL	ISDKG	ELLWSRR	128										
NitC1	130	KLKPTH	VERTIY	GEGNGT	DFLTH	DFAE	GRVGL	NCWEH	FQPLS	KEMMYS	SLGEQ	VHVASWP	189									
NitC2	129	KLKPTH	VERTV	FGEYAR	DLIVSE	TDLGR	VGALC	CWEHL	SPLSK	YALYS	QHEA	IHIAAWP	188									
NitC1	190	AMFALQ	PDVFQ	LSIEAN	ATVTRS	YAT	EGQTE	FVLCST	QVTG	PSAIE	TFTCL	NDEQRA	LLPQ	249								
NitC2	189	SFSLY	SEQA	HALSA	KVNMA	ASQI	YSVEG	QCF	TAAS	SVVT	QETL	DMLEV	GEHNAS	LLKVG	248							
				AN54; AN49																		
				KA--DE-GHY																		
NitC1	250	CGWARI	YGP	PDGSEL	AKPLA	EDAEG	LIYA	EIDLE	QILL	LAKAG	ADPVG	HYSR	PDVLS	VQFDP	309							
NitC2	249	GGSSM	IFAPD	GRTLAP	YLP	PHDAE	GLVIA	DLNME	EIAY	AKAIND	PVG	HYSK	PEATRL	VLD	308							
NitC1	310	RNHT	PVHRI	GIDGR	-----	LDV	NR	SR	VN	FRL	QA	AE	QER	--Q	ASKR	LG	TKL	FEQ	SLLA	362		
NitC2	309	GHREP	MTRV	HSE	SKYV	QETL	DQPI	RNK	GV	QAL	TN	PA	QET	DTLL	G	ARK	RS	PT	PR	LSM	TRLV	368
NitC1	363	EEP	V	366																		
NitC2	369	TEP	V	372																		

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей пептидов NitC1 и NitC2. Идентичные у этих белков аминокислотные остатки выделены черным цветом, сходные аминокислотные остатки – серым цветом. Над выравниванием приведены консенсусы консервативных мотивов, по которым были сконструированы вырожденные праймеры AN49, AN50, AN51, AN54, использованные для клонирования этих генов (см. рис. 1 и раздел «Условия эксперимента»).

Fig. 2. Alignment of aminoacid sequences of NitC1 and NitC2 peptides. Identical for both proteins aminoacid residues are typed black; similar amino acids are typed gray. Above the sequences, consensus of conservative motifs that served as patterns for the design of degenerate primers (AN49, AN50, AN51, AN54) for those genes cloning are shown (see Fig. 1 and tabular output in Experimental section)

получены в результате ПЦР с использованием высокоточной Phusion-полимеразы и клонированы в векторе pET16b. Клонированные участки нитрилазного кластера содержали полные последовательности генов каждой из нитрилаз, но были лишены промоторной области. Для экспрессии генов в клетках *E. coli* использовали рибосом-связывающий сайт и T7-промотор pET16b. Хозяином служил штамм *E. coli* BLR(DE3).

Удельная активность клеток *E. coli*, содержащих ген нитрилазы *nitC1*, превосходила активность родительского штамма *A. denitrificans* C-32 (3,5–5,5 ед/мг) и достигала 30 ед/мг. SDS-ПААГ показал, что молекулярная масса полипептида, синтезированного в клетках *E. coli* (около 45 кДа), была идентична молекулярной массе субъединицы нитрилазы штамма C-32 (рис.3, а).

Удельная активность клеток *E. coli*, синтезирующих нитрилазу NitC2, составляла 4,2 ед/мг,

что сравнимо с активностью исходного штамма C-32. При этом в клетках *E. coli* синтезировался полипептид, молекулярная масса которого была на 1–2 кДа меньше, чем у нитрилазной субъединицы из штамма C-32 (рис.3, б).

Для установления причин выявленных различий в последовательности нитрилазы из *A. denitrificans* C-32 и NitC2 были секвенированы N-концы аминокислотных последовательностей из рекомбинантного штамма *E. coli*.

N-концевая аминокислотная последовательность нитрилазы из штамма *Alcaligenes denitrificans* C-32 (V(C/V)YNSKF) совпадает с последовательностью, транслируемой с гена *nitC1*. В то же время, на N-конце NitC2 имеется последовательность GTRKIVR, отличающаяся от N-концевой последовательности нитрилазы из C-32. Таким образом, по-видимому, нитрилазная активность штамма C-32 связана с наличием в клетке белка NitC1.

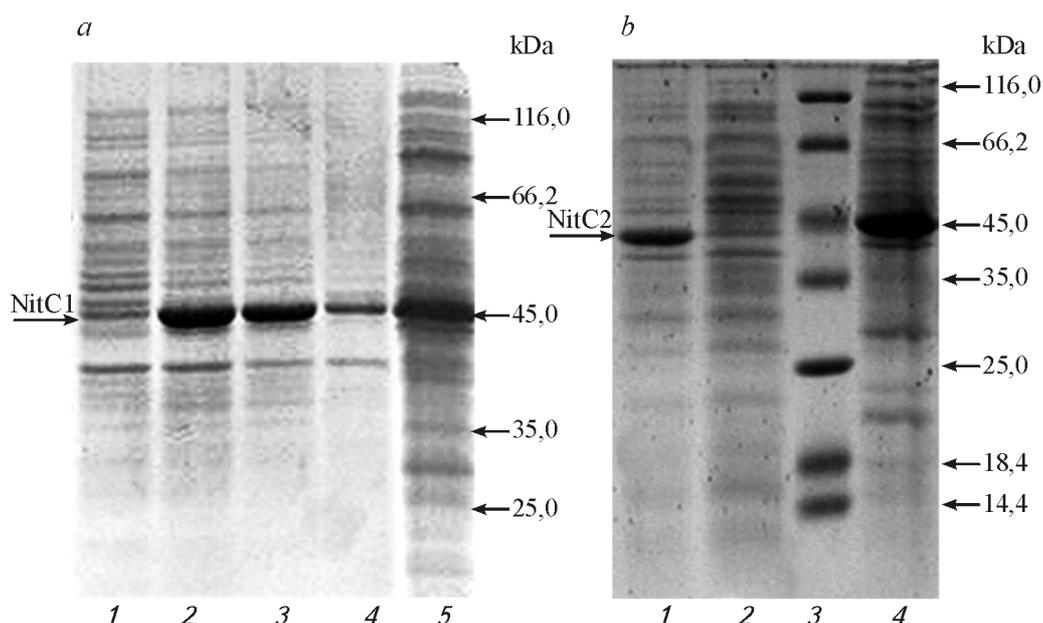


Рис. 3. SDS-ПААГ электрофорез белков из клеток штамма *E. coli* BLR(DE3) pET16b с клонированными генами *nitC1* и *nitC2*: *a* – *nitC1*: 1 – без индукции; 2 – после 26 ч индукции, общая фракция; 3 – то же, растворимая фракция; 4 – то же, нерастворимая фракция. 5 – белки *Alcaligenes denitrificans* C-32; *b* – *nitC2*: 1 – после 26 ч индукции, общая фракция; 2 – без индукции; 3 – маркеры молекулярной массы (Thermo #26610); 4 – белки *Alcaligenes denitrificans* C-32

Fig. 3. SDS-PAGE of proteins synthesized in *E. coli* BLR(DE3) pET16b cells with cloned *nitC1* and *nitC2* genes. (*a*), proteins in cells with *nitC1* gene: (1), without induction; (2), 26 h of induction, total fraction; (3), 26 h of induction, soluble fraction; (4), 26 h of induction, insoluble fraction. (5), *A. denitrificans* C-32 proteins. (*b*), proteins in cells with *nitC2* gene: (1), 26 h of induction; (2), without induction; (3) MM markers (Thermo #26610). (4), *A. denitrificans* C-32 proteins

Субстратная специфичность нитрилаз из *A. denitrificans* C-32. Известные на сегодняшний день нитрилазы существенно различаются по субстратной специфичности [5]. Поскольку NitC1 и NitC2 имеют структурное сходство с алифатическими нитрилазами и арилнитрилазами, мы провели сравнение субстратной специфичности фермента из C-32 и нитрилаз, синтезированных в *E. coli*. Были использованы различные субстраты: алифатические нитрилы (акрилонитрил, бутиронитрил и адипонитрил), ароматический субстрат (бензонитрил) и представитель арилнитрилов (бензилцианид). Данные об активности нитрилаз в отношении различных субстратов представлены в таблице.

Из данных таблицы видно, что лучшими субстратами для штамма C-32 оказались алифатические предельные и непредельные короткоцепочечные нитрилы. Активность штамма в отношении бензонитрила и бензилцианида была на порядок меньше, чем в отношении акрилонитрила. По субстратной специфичности клетки *E. coli* с *nitC1* практически не отличались от клеток штамма C-32. В то же время, для клеток *E. coli*, содержащих *nitC2*, самым эффективным субстратом ока-

зался бензилцианид. Следовательно, на основании ДНК-гомологии и субстратной специфичности нитрилазы NitC1 и NitC2 из штамма *A. denitrificans* C-32 должны быть отнесены к группе алифатических нитрилаз и арилацетонитрилаз, соответственно. При этом исследование субстратной специфичности различных клеток подтвердило вывод о том, что нитрилазная активность штамма C-32 связана с наличием в клетке одного фермента – NitC1.

Таким образом, у штамма *A. denitrificans* C-32 с высокой нитрилазной активностью, который в настоящее время используется в качестве биокатализатора для промышленного получения акрилата аммония, обнаружено два гена, кодирующих нитрилазы с различными каталитическими свойствами. На основании ДНК-гомологии генов и субстратной специфичности кодируемых ими ферментов обнаруженные нитрилазы были отнесены к группам алифатических нитрилаз (NitC1) и арилацетонитрилаз (NitC2). При этом нуклеотидная последовательность гена *nitC1* была практически идентична (на 99%) последовательности гена алифатической нитрилазы из *Acidovorax facilis* 72W (DQ444267), а ген *nitC2* обладал высоким

Субстратная специфичность нитрилаз из рекомбинантных штаммов *E.coli* и нитрилазы из родительского штамма *A. denitrificans* C-32

Substrate specificity of nitrilases from *E. coli* recombinant strains and from *A. denitrificans* C-32 parental strain

Субстрат	Относительная нитрилазная активность*, %		
	C-32	NitC1	NitC2
Акрилонитрил	100	100	100
Бутиронитрил	53	75	83
Адипонитрил	36	42	100
Бензонитрил	10	5	8
Бензилцианид	10	5	1667

*За 100% для всех нитрилаз принята активность по отношению к акрилонитрилу.

*Activity towards acrylonitrile was taken for 100% for all nitrilases.

уровнем гомологии (85%) с геном арилацетонитрилазы из штамма *Alcaligenes faecalis* JM3 [11]. Эти данные свидетельствует о высокой активности систем горизонтального переноса у почвенных бактерий.

Сравнение нитрилазной активности у родительского штамма *A. denitrificans* C-32 и рекомбинантных штаммов *E.coli*, содержащих гены *nitC1* или *nitC2*, показало, что первая обусловлена функционированием одного фермента – NitC1, который конститутивно синтезируется в клетках C-32. В этих условиях образование фермента NitC2 не наблюдается. Пока не удалось обнаружить индуктор синтеза нитрилазы NitC2 в клетках C-32.

В то же время, в клетках *E.coli* обе нитрилазы активны. При этом клетки *E.coli*, содержащие ген *nitC1*, обладают в 3–4 раза большей активностью, чем родительский штамм C-32. Эти результаты подтверждают возможность создания высокоактивных биокатализаторов для синтеза акрилата аммония методами геной инженерии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта 16-14-00216 «Изучение системы кобальт-зависимой экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus* и создание на ее основе платформы для биосинтеза ферментов-биокатализаторов для получения акриловых мономеров».

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Russian Science Foundation (Project 16-14-00216, “Study on cobalt-dependant gene expression in *Rhodococcus* Bacteria and construction on its basis of a platform for biosynthesis of enzyme biocatalysts for obtaining of acrylic monomers”).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bork P., Koonin E.V. A new family of carbon-nitrogen hydrolases. *Protein Sci.*, 1994, 3, 1344–1346. doi: 10.1002/pro.5560030821
2. Pace H.C., and Brenner C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology*, 2001, 2, 1–9. doi: 10.1186/gb-2001-2-1-reviews0001
3. Nakai T., Hasegawa T., Yamashita E., et. al. Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure*, 2000, 8, 729–737. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00160-X
4. Wang W.-C., Hsu W.H., Chien F.T., and Chen C.-Y. Crystal structure and site-directed mutagenesis studies of N-carbamoyl-D-amino-acid amidohydrolase from *Agrobacterium radiobacter* reveals a homotetramer and insight into a catalytic cleft. *J. Mol. Biol.*, 2001, 306, 251–261. doi: http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4380
5. O'Reilly C., and Turner P.D. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - a comparative study. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 95(6), 1161–1174. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02123.x
6. Thuku F.R.N., Brady D., Benedik M.J., and Sewell B.T. Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, 106, 703–727. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03941.x

7. Osswald S., and Yanenko A. Hydrolysis of nitriles to carboxylic acids. in: enzyme catalysis in organic synthesis, Third edition. [Eds: K. Drauz, H. Grüger, O. May]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2012, 545–559. doi: 10.1002/9783527639861
8. Glinskii S.A., Kozulin S.V., Kozulina T.N., et al., Comparative analysis of strains used for ammonium acrylate obtaining. *Biotekhnologiya*, 2010, 1, 17–24.
9. Birnboim H.C., and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.*, 1979, 7 (6), 1513–23. doi: 10.1093/nar/7.6.1513–1523.
10. Riabchenko L.E., Poliakova I.N., and Yanenko A.S. Mobilized plasmid vectors capable of conjugative transmission between *E. coli* and *Rhodococcus* cells and their application to *Rhodococcus* strains construction. *Biotekhnologiya*, 2005, 5, 6–13.
11. Nagasawa T., Mauger J., Yamada H. A novel nitrilase, arylacetone nitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.*, 1990, 194(3), 765–772. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19467.x

A Bacterial Strain *Alcaligenes denitrificans* C-32 Contains Two Nitrilases with Different Substrate Specificities

A.D. NOVIKOV*, L.E. RIABCHENKO, T.E. LEONOVA, G.A. LARIKOVA, K.V. LAVROV, S.A. GLINSKII, and A.S. YANENKO**

The Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

*e-mail: alexm19@mail.ru**, yanenko@genetika.ru**

Received November 17, 2016

Abstract – Two genes encoding nitrilases with different catalytic properties have been found in *Alcaligenes denitrificans* C-32 strain with high nitrilase activity that is currently used as a biocatalyst for the commercial ammonium acrylate production. Both genes were expressed in *E. coli*, and the properties of the recombinant nitrilases were studied. One of these genes designated as *nitC1* controlled the formation of nitrilase that preferred aliphatic nitriles (acrylonitrile and butyronitrile) as best substrates. The nucleotide sequence of the gene *nitC1* was almost (by 99%) identical to the gene sequence of an aliphatic nitrilase from *Acidovorax facilis* 72W (DQ444267). In turn, *nitC2* gene had a high level of homology (85%) with the gene of arylacetone nitrilase from *Alcaligenes faecalis* JM3 (D13419). Benzylcyanide was shown to be the best substrate for the *nitC2*-encoded nitrilase. Considering the results of DNA homology and differences in substrate specificity, the NitC2 and NitC1 nitrilases from *Alcaligenes denitrificans* C-32 were allocated to the groups of aliphatic nitrilases and arylacetone nitrilases, respectively.

Key words: *Alcaligenes denitrificans*, nitrilase, cloning, gene expression, substrate specificity.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-6-45-52