

## 微生物法生产丙烯酰胺的研究( I ) ——脲水合酶产生菌株的培养和高活力的表达

陈 跖 孙旭东 史 悦 沈忠耀\*

(清华大学化工系 生物化工研究所,北京 100094)

赵建勋 孙小颖

(山东胜利石油管理局,东营 257019)

**摘 要** 研究了丙烯酰胺生产菌株的培养条件。通过对培养过程 pH 值调控、培养基补料以及诱导剂加入量的研究,使发酵液的脲水合酶的活力达到了 6567u/mL 菌液。这一酶活是国内外所见报道中最高的。进一步进行了丙烯脲的酶催化水合实验,产物中并没有发现副产物丙烯酸,说明在提高脲水合酶的同时,酰胺酶的活力并没有明显体现这一试验结果为工厂化生产改造以及新工艺的研究打下了基础。

**关键词** 丙烯酰胺,脲水合酶,酰胺酶

**中图分类号** TQ920.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0055-04

丙烯酰胺是重要的酰胺类化合物之一,主要用于制造聚合物或共聚物,作为水处理剂及造纸、钻井等的助剂或添加剂<sup>[1]</sup>。目前国内随着三次采油的广泛应用,丙烯酰胺的需求量日益增长,其市场前景非常乐观<sup>[2-4]</sup>。自从 1954 年美国 Cyanamid 公司采用丙烯脲硫酸水合法实现工业化生产后,丙烯酰胺的生产工艺经历了两次重大变革。第一次是 70 年代中期,发明了铜催化水合法,它相对于硫酸水合法,工艺得到巨大改进,环境污染减小,转化率提高,副产物减少,但反应条件需要在高温下进行,由于铜催化剂的残留,使生产的丙烯酰胺难以合成高分子量的聚丙烯酰胺。第二次为 1985 年,日本的日东化学工业公司实现了用微生物法转化丙烯脲生产丙烯酰胺的生产工艺。此法优点在于反应在常温常压下进行,降低了能耗,操作简单、安全,丙烯脲转化率 99.9%,产品不含铜离子,纯度高,适合于生产“三次采油”用的超高分子量聚丙烯酰胺<sup>[5,6]</sup>。在微生物法生产工艺中,菌体的培养和脲水合酶的诱导是生产的第一步和技术关键。目前文献报道的第三代生产菌株 *Rhodococcus rhodococcus* J-1 的最高的脲水合酶活力为 2480u/mL 菌液<sup>[3,7,8]</sup>。因为脲水合酶的活力关系到丙烯脲水合反应生成丙烯酰胺的生产效率和产率,为此,本文对微生物法生产丙烯酰胺的菌体培养

和脲水合酶诱导和高表达进行了深入的研究。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌种

菌种由山东胜利石油管理局提供,是在原化工部上海生物工程中心筛选得到的菌株的基础上,经诱变和驯化获得,由本实验室保藏,经鉴定为诺卡氏菌。

#### 1.2 培养基

**1.2.1 斜面培养基(%)**:葡萄糖 1;酵母膏 0.3;NaCl 0.1;K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02;琼脂 2;pH 不调节。

**1.2.2 发酵培养基(%)**:葡萄糖 2;酵母浸粉 0.5;脲 0.75;谷氨酸钠 0.1;K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05;诱导剂 60×10<sup>-6</sup>g/L(由山东胜利石油管理局提供);pH 7.5。

#### 1.3 菌种的培养方法

将菌种从平皿接于发酵摇瓶中,1000mL 发酵摇瓶的装液量为 100mL 培养基,于 28℃ 下培养 96h,摇床转速 240r/min。

#### 1.4 生物量的分析方法

将发酵液稀释一定倍数后,于 460nm 下测量吸

光度。经过试验得到的吸光度值与菌体干重的标准曲线表明,一个  $OD$  相当于每升发酵液有  $0.22\text{g}$  菌重。

### 1.5 酶活的测量

取  $19\text{mL}$   $50\text{mmol/L}$   $\text{pH}7$  的磷酸缓冲液和  $1\text{mL}$  纯丙烯腈,放入  $50\text{mL}$  具磨口玻璃塞三角瓶中,恒温至  $28^\circ\text{C}$ ,取一定量的菌液,稀释适当倍数后加入  $0.5\text{mL}$ ,准确反应  $5\text{min}$  后,加入  $0.5\text{mL}$   $6\text{mol/L}$   $\text{HCl}$  终止反应。得到的反应液与  $4\%$  的乙酰胺溶液等体积混合,用内标法在气相色谱仪上测得丙烯酰胺浓度。

气相色谱操作条件如下:GC-9AM 气相色谱仪;不锈钢填充柱,填料为 Porapak Q,长  $2\text{m}$ ,内径  $4\text{mm}$ ;柱温  $180^\circ\text{C}$ ;进样室和检测室温度  $220^\circ\text{C}$ ;载气为氮气,流速为  $30\text{mL/min}$ 。酶活计算公式为:

$$U = \frac{A_{\text{丙}} \times K \times V_{\text{总}} \times 1000000}{A_{\text{Z}} \times t \times V_{\text{菌}}}$$

其中,  $A_{\text{丙}}$  为丙烯酰胺的峰面积;  $A_{\text{Z}}$  为内标物乙酰胺的峰面积;  $K$  为内标常数,其数值为  $0.3581$ ;  $V_{\text{总}}$  为总体积,按上面的操作条件,其数值为  $0.021\text{L}$ ;  $V_{\text{菌}}$  为实际加入的菌液体积,  $\text{mL}$ ;  $t$  为反应时间,  $\text{min}$ 。  $U$  为总活,菌液中丙烯酰胺的量,  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ <sup>①</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 调节 pH 值在发酵过程中的作用

**2.1.1 发酵过程中 pH 值的变化:**通过对菌种的培养研究,发现 pH 值的变化有如下规律:在发酵初期,随着菌体的生长,pH 值很快地下降,到达  $4.4$  左右以后,如果不对 pH 值调节,则 pH 值将保持在这一数值,直到发酵结束,如图 1(a)所示。如果对 pH 值进行调控,在发酵初、中期将 pH 值调节在中性范围左右,则在发酵后期,会出现 pH 值回升的现象,如图 1(b)所示。如果继续培养,pH 值将不断攀升,并引起菌体自溶,使酶活下降。所以,pH 值的回升是培养结束的一个信号。

**2.1.2 调节 pH 对发酵过程的影响:**在培养过程中,当 pH 值到达  $4.4$  以后,如果不调节 pH 值,菌体生长和糖耗将变慢。若将 pH 值调节到中性范围,则菌体能保持较长时间的高速率生长,糖将会很快消耗完。

从图 2 酶活的对比来看,经过 pH 值调控的 2 号

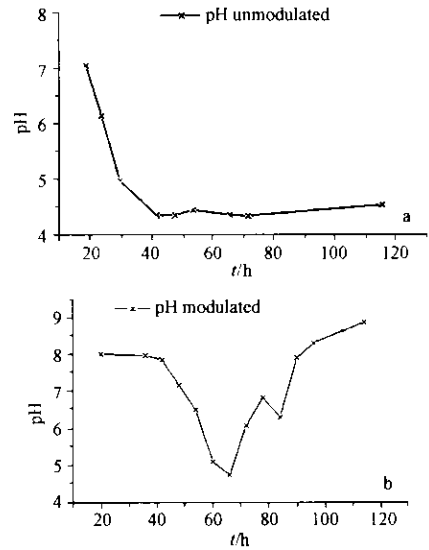


图 1 培养过程中 pH 值的变化

Fig.1 The change of pH value in the culture process

瓶,其酶活远高于 pH 值不调节的 1 号摇瓶。其原因可能是在较低 pH 值下,菌体的活力下降,生长和产酶受到抑制。也可看出,虽然在 pH 值未调节下菌体生长变慢,但受到的影响并不是很大,而对产酶的影响远大于对菌体生长的影响。通过调节 pH 值,得到的发酵液总酶活达到了  $1435\text{u/mL}$  菌液。

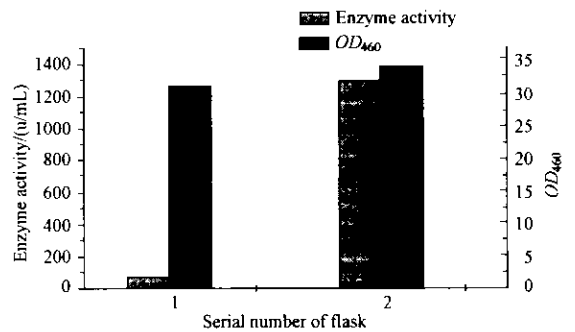


图 2 pH 值的调节对培养终了时酶活及 OD 值的影响

Fig.2 Effect of regulation the pH value on enzyme activity and OD in the end of cultivation

### 2.2 诱导剂加入量的研究

通过对比试验可知,在不加入诱导剂的情况下,几乎没有酶活。由此可见,诱导剂在菌体产酶过程中具有决定性的作用。对此,专门做了诱导剂加入量的研究。结果如图 3。

可以看出,随着诱导剂浓度的升高,尤其是当诱导剂浓度大于  $60 \times 10^{-6}\text{g/L}$  后,对菌体生长有严重抑制作用。从比较 1 和 2 号可以看出,在  $40 \times 10^{-6}\text{g/L}$  和  $60 \times 10^{-6}\text{g/L}$  下,菌体生长比较良好。从初期生长来看,诱导剂的量小一些,生长会快一点,但在培养终了时它们的菌体浓度相当,而 2 号的酶活比

① 这里所用的是国际标准单位  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ ,有的文章或一般工厂采用的酶活,它的单位是  $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{mL})$ ,数值上后者是前者的  $71.08 \times 60 = 4264.8$  倍,请读者注意区分。

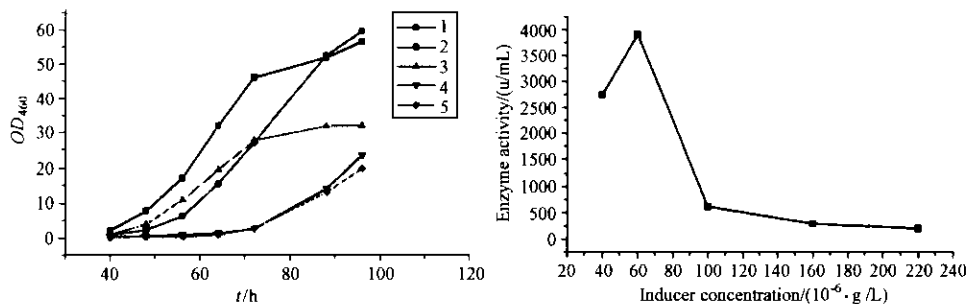


图3 诱导剂加入量对发酵过程及培养终了时酶活的影响

Fig.3 Effect of the inducer addition on the culture process and the final enzyme activity

The concentrations of inducer from No.1 to No.5 were  $(40, 60, 100, 160, 220) \times 10^{-6} \text{ g/L}$ , respectively

1号要大很多,说明适当提高诱导剂的浓度有利于酶活的诱导。所以,以后的试验中都以  $60 \times 10^{-6} \text{ g/L}$  为标准加入量。经过此诱导剂量的优化,酶活力上升到  $3907 \text{ u/mL}$  菌液。

### 2.3 补加葡萄糖的研究

**2.3.1 补加碳源的思路:**在这个培养过程中,最重要的评价指标是培养终了时的总酶活。这一数值是由菌体浓度与酶比活的乘积决定的。所以,如果能在保持酶比活的同时,提高发酵终了时的菌体浓度,也能使总酶活上一个新的台阶。由前期的试验结果来看,培养过程基本上是生长偶联型的。也就是酶活与菌浓是同步升高的,如图4所示。这更说明了提高菌浓对提高总酶活的意义。

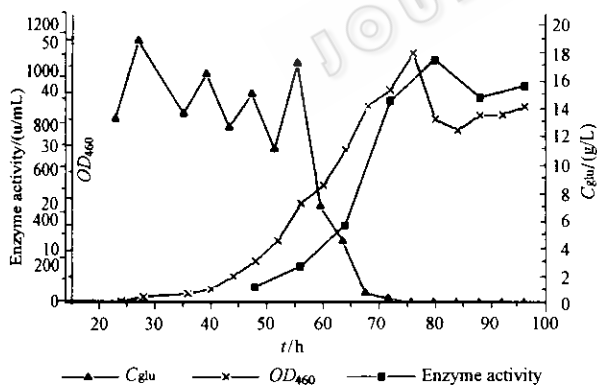


图4 培养过程曲线

Fig.4 Curve of the culture process

**2.3.2 补加碳源的试验结果:**由于是在摇瓶中进行的,因此试验中葡萄糖是分批补加入的。其条件如下(每次的补加量为1%葡萄糖):

摇瓶号	1	2	3	4
补糖次数	0	1	2	3

从试验结果来看,随着补加量的增大,菌体浓度也增高,相应的培养终了时的总酶活也越高。但可

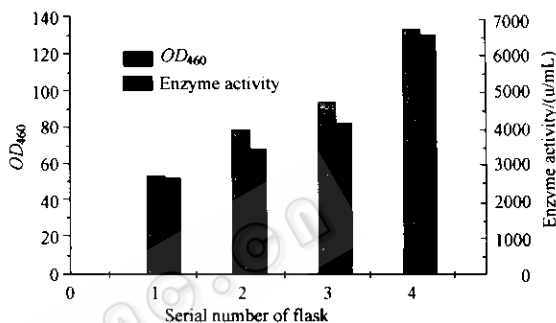


图5 补糖对发酵的影响

Fig.5 Effect of glucose supplement on the fermentation

以看出,酶比活基本相当。这与初始的预计是吻合的,即在提高菌体浓度的同时,酶比活并没受很大的影响,因而提高菌体浓度确实能有效提高总酶活。其中,4号摇瓶的菌体浓度长到了  $OD_{460}$  为 134,酶活达到  $6567 \text{ u/mL}$  菌液。

但在后面的试验中发现,再进一步补糖已不能有效提高菌浓与酶活,估计是由于溶氧的制约,菌体的生长受到限制,因而酶活不能进一步地提高。而且,进一步进行的丙烯腈的酶催化水合实验表明,产物中并没有检测出副产物丙烯酸,说明在提高脲水合酶的同时,酰胺酶的活力并没有明显体现。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] SHI J(时钧) et al. *Chemical engineering enchriridion* (化学工程手册), Beijing: Chemical Industry Press (化学工业出版社), pp. 889 - 894
- [2] WANG H G(王宏岗). Market analysis of polyacrylamide. *Modern Chemical Engineering* (现代化工), 2000, 20(7): 52 - 56
- [3] SHENG Y CH(沈寅初), ZHANG G F(张国凡), HAN J SH(韩建生). Production of acrylamide by bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology* (工业微生物), 1994, 24(2): 24 - 32
- [4] LIU Q P(刘庆普). Applying of Polyacrylamide and ramification. *Petrochemical Engineering* (石油化工), 1991, 20(5): 345 - 352

- [ 5 ] CHANG H L(常惠联),CHANG W Y(常万叶). Production technology of acrylamide with microbial method. *Hebei Chemical Engineering* (河北化工), 1999, 2: 34 ~ 36
- [ 6 ] Nagasawa T, Yamada H. Microbial production of commodity chemicals. *Pure and applied chemistry*. 1995, 67: 1241 ~ 1256
- [ 7 ] Michihiko Kobayashi, Toru Nagasawa and Hideaki Yamada. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over. *Trends in biotechnology*, 1992, 10: 402 ~ 408
- [ 8 ] KONG F L(孔凡玲). General Situation of Acrylamide Production Technology with Bioconversion. *Anhui Chemical Engineering* (安徽化工), 1998, 5: 5 ~ 6

## Study on Production of Acrylamide by Microbial Method ( I )

### ——Culture of bacterium cells and expression of high activity of nitrile hydratase

CHEN Zhi SUN Xu-Dong SHI Yue SHEN Zhong-Yao\*

(Tsinghua University, Department of Chemical Engineering, Institute of Biochemical Engineering, Beijing 100094, China)

ZHAO Jian-Xun SUN Xiao-Ying

(Shandong Shengli Petroleum Administrative Bureau, Dongying 257019, China)

**Abstract** The cultural conditions for the growth of *Nocardia* cell were studied in this paper. Controlling pH value, adding nutrient and optimizing the quantity of inducer during cultivation, the activity of nitrile hydratase reached 6567u/mL (culture medium), which was the highest value appeared in native journals. In the farther hydratase experiments, no by-product, acrylic acid, was detected. It showed that the activity of amidase was not promoted obviously while the activity of nitrile hydratase was increased greatly. The results set a strong foundation for the industrial application and the research on new technology.

**Key words** acrylamide, nitrile hydratase, a midase

Received: 06-20-2001

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62785514; Fax: 86-10-62770304; E-mail: szy-dce@mail.tsinghua.edu.cn