

## 微生物法生产丙烯酰胺的研究( II ) ——脲水合酶催化反应动力学与失活动力学

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 100084)

赵建勋 孙小颖

(山东胜利石油管理局,东营 257019)

**摘 要** 在以丙烯腈为原料,微生物转化生产丙烯酰胺的过程中,酶催化反应是过程的关键。为了了解酶催化的动力学,本研究以自由细胞的酶为催化剂,进行了脲水合酶的反应动力学和失活动力学的研究。首先研究了菌体浓度、温度、pH 值、丙烯腈浓度、丙烯酰胺浓度等对脲水合酶催化反应速度的影响。结果表明,在这些因素中,温度和丙烯酰胺浓度是最主要的影响因素。28℃时酶活为 5659u/mL(菌液),在 5℃时的反应速率仅为 28℃时的 11.72%,相应的表观酶活为 663u/mL(菌液)。而在丙烯酰胺 45% 浓度条件下的酶活大约只有丙烯酰胺 5% 浓度下的酶活的 1/2。经过对不同温度下的反应速度的研究,得到脲水合酶水合反应的活化能为 65.57kJ·mol<sup>-1</sup>。本文进一步研究了自由细胞状态下,菌体浓度、pH 值、温度、丙烯腈浓度、丙烯酰胺浓度对脲水合酶失活的影响,得到了失活动力学。结果表明,在这些因素中,对酶失活影响的最主要因素还是温度和丙烯酰胺浓度。尤其当丙烯酰胺浓度到达 35% 时,酶活下降得很快,在 55 h 后,酶活几乎为零。而在丙烯酰胺浓度为 10% 的情况下,55 h 的酶活仍然存在约 50%。试验结果还表明,丙烯腈对酶的稳定性的影响很小。经过数据处理,得到的 28℃的酶失活速率常数为 5℃下的 21.77 倍。经过对温度与失活速率常数的拟合,得到脲水合酶失活反应的活化能为 92.28kJ·mol<sup>-1</sup>。

**关键词** 丙烯酰胺,丙烯腈,脲水合酶,酶催化反应动力学,失活动力学

中图分类号 TQ925 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0225-06

微生物法生产丙烯酰胺的研究起始于 70 年代中期,到目前为止,其使用菌种经过了几次变革。第一代菌种为 *Rhodococcus* sp.774,其活力达到 363 单位,1985 年开始在日本日东公司用于丙烯酰胺的生产,第二代菌种为 *Pseudomonas chlororaphis* B23,活力达到 1260 单位,在 1988 年替代了第一代菌株成为生产菌株,第三代菌种为 *Rhodococcus rhodochrous* J1,经优化,其活力达到 2480 单位,于 1991 年成为新一代的生产菌株<sup>[1]</sup>。每一次菌种的更替、活力的提高,都带来工业生产产量的大幅度提高,日东公司的年产量也由初始的 4000 t/年提高到了 20000 t/年<sup>[2]</sup>。本研究使用的菌种为一种诺卡氏菌,经培养条件的优化,最高活力已达到 6567 u/mL<sup>[3]</sup>。

从诱导型脲水合酶的分类来看,大体分为 2 种<sup>[4,5]</sup>:一种在其活性中心含有铁离子<sup>[6-8]</sup>;而另一种则含有钴离子。对于含铁的脲水合酶,在菌体培

养过程中加入铁离子能有效增加酶活的产生,如第一代和第二代工业生产菌种 *Rhodococcus* sp.774 和 *Pseudomonas chlororaphis* B23<sup>[9,10]</sup>。对于含钴离子的脲水合酶,钴离子的加入也能有效提高酶活,第三代生产菌株 *Rhodococcus rhodochrous* J1 属于这种类型<sup>[11]</sup>。

在前人的研究中,发现第三代生产菌株的耐受性很强,高温、高底物浓度下酶活也能保持很长时间<sup>[12]</sup>。在分析 J1 的高耐受性时,认为主要是由于这几种菌的脲水合酶的结构不同造成的。J1 菌的脲水合酶分子量为 505 kD,由 10 个  $\alpha$  亚基和 10 个  $\beta$  亚基组成。而 R312 和 B23 分子量分别为 100 kD 和 85 kD,都由 2 个  $\alpha$  亚基和 2 个  $\beta$  亚基组成。而且通过提取得到了其他种类的分子量约为 100 kD 的含钴脲水合酶,与 R312 和 B23 的脲水合酶比较,发现其耐受性相当。所以可以排除钴离子对酶的稳定性的

收稿日期 2001-08-20,修回日期 2001-10-24。

基金项目 本工作得到中国石化总公司的资助。

\* 通讯作者。Tel 86-10-62785514 Fax 86-10-62770304 E-mail szy-dce@mails.tsinghua.edu.cn

增强作用。认为主要原因可能是由于 J1 的脲水合酶多亚基的结合能增强蛋白的刚性,使之不易受到外界的影响而丧失活性。

至今,国内的生产厂家采用的大都是海藻酸盐固定化细胞的工艺,一方面引入一些离子对后续处理带来麻烦,另一方面在固定化阶段会损失相当一部分酶活,同时还增加了底物和产物的扩散路程。而且,由于酶活的损失严重,一批固定化的细胞往往水合反应 3 批左右就需要更新。现在,利用自由细胞直接进行水合反应并实现连续化生产是一个新的研究方向。为此,本文对诺卡氏菌自由细胞的脲水合酶反应动力学和失活动力学进行了研究。

## 1 实验部分

### 1.1 原料

丙烯腈:上海试剂三厂,分子量 53.06,化学纯,99.0%;丙烯酰胺:北京化学试剂公司,分子量 71.08,分析纯,98%;乙酰胺:北京亚太精细化工公司,分子量 59.03,分析纯 98.5%。

### 1.2 实验

1.2.1 自由细胞的制备:1000mL 的发酵摇瓶,装液量为 100mL。将菌种从平皿直接接于发酵摇瓶中,于 28℃、240r/min 转速下培养 96h。发酵终了的酶活通常在 4700u/mL(菌液)以上。

1.2.2 催化水合反应:在反应动力学的研究中,水合反应在 50mL 具塞三角瓶中进行。在其中加入 19mL 50mmol/L pH7 的磷酸缓冲液和 1mL 纯丙烯腈,恒温至 28℃。取一定量的菌液,稀释适当倍数后加入 0.5mL,准确反应 5 min。然后加入 0.5mL 6mol/L HCl 终止反应。终了分析样品中的丙烯酰胺浓度。

1.2.3 分析:丙烯酰胺浓度的测定用气相色谱仪法,具体步骤同文献[3]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应动力学的研究

2.1.1 菌体稀释倍数对酶活的影响:由于培养获得的菌液酶活很高,在后面的研究中,不希望反应过快,所以需要菌液进行稀释。为了研究菌液稀释对于酶活的影响,作了如下试验:分别将菌液稀释 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30 倍,测量此时的酶活,然后将测得的酶活乘以稀释倍数,换算得到原始的酶活,结果如图 1 所示。可以看到,菌液经稀释后,对折算的原始酶活没有很大改变,误差基本在 ±10% 以内。可以认为,在酶活的研究中,稀释倍数对于研究结果的

影响是可以折算的办法来补偿的。

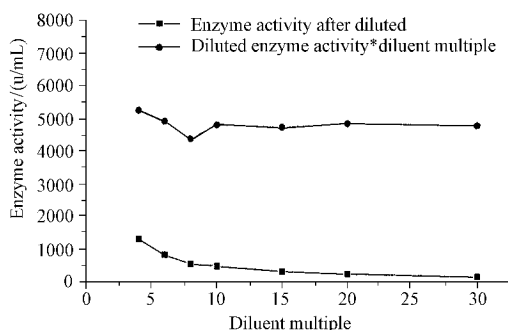


图 1 稀释倍数与酶活的关系

Fig. 1 Relationship between diluent multiple and enzyme activity

2.1.2 温度对反应速率的影响:通常情况下,温度的升高有助于反应速度的加快。在本研究中,我们对此水合反应得到了同样的结论。从文献报道来看,大多数菌种的脲水合酶的最大反应速率发生在 40~50℃ 之间,有些嗜热菌株的温度会更高一些<sup>[13,14]</sup>。但在本实验中,发现当温度大于 25℃ 后酶的失活很快,所以只研究低于 28℃ 的情况。从图 2 的研究结果可见,随着温度的降低,反应速率明显减小。在 28℃ 下测定的酶活为 5659u/mL 的菌液,在 5℃ 时的反应速率仅为 28℃ 时的 11.72%,由反应速率折算的表观酶活仅为 663u/mL。

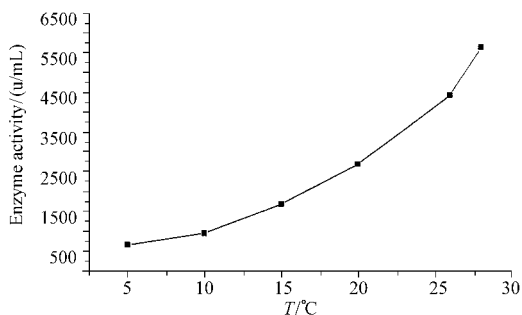


图 2 温度与表观酶活的关系

Fig. 2 Relationship between temperature and apparent enzyme activity

由阿累尼乌斯公式

$$\ln k = -\frac{E}{RT} + \ln A \quad (1)$$

可知,反应速率常数  $k$  的对数应该与  $1/T$  成正比,而反应速率常数  $k$  与表观酶活  $r$  成正比。因而,以  $\ln(r)$  对  $1/T$  作图,可得到一条直线,如图 3。直线拟合结果:

$$\ln(r) = (34.79567 \pm 0.80284) - (7887.2571 \pm 232.92912) * 1/T \quad (2)$$

也即此反应的活化能为  $65.57\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

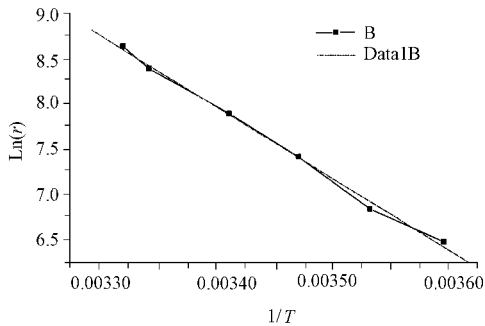


图3 温度与表观酶活的线性拟合

Fig.3 Linear fit on  $\ln(r)$  and  $1/T$

**2.1.3 pH 对反应速率的影响** :目前,水合反应基本在中性环境下进行,多数研究者得到的结果也是在  $7\sim 7.5$  之间得到最大反应速率<sup>[15,16]</sup>。对此,我们进行了验证。结果如图4,考察了 pH 从  $3\sim 10$  的情况。发现从  $5.5\sim 8.5$  之间,酶活变化不大,最大值基本上出现在  $7$  左右,与前人研究结果一致。但当 pH 超出这一范围,酶活下降很快,尤其当 pH 为  $3$  时,基本上检测不到酶活了。所以,在以后的研究中, pH 值被固定于  $7$ 。

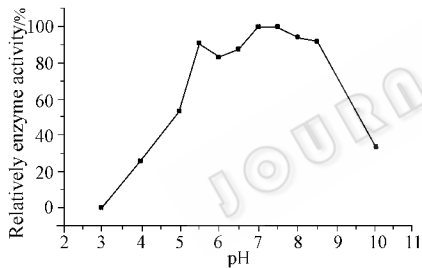


图4 pH 对酶活的影响

Fig.4 Effect of pH on enzyme activity

**2.1.4 丙烯腈浓度对反应速率的影响** :在水合反应中,丙烯腈是反应的底物。由于丙烯腈是一种有毒物质,其浓度过高对于菌体有害,可能会造成酶活的快速下降。但另一方面,从反应动力学的角度,反应底物浓度的提高又是有利于提高反应速率的。这两种的影响正好相反,有必要对丙烯腈浓度对反应速率的影响进行研究。由图5可以发现,当丙烯腈浓度较小时,以表观酶活表征的反应速率还是比较高的。随着丙烯腈浓度的不断提高,确实能观察到反应速率的上升,但上升幅度并不很大。在我们的研究中,丙烯腈的最高浓度只到  $10\%$ ,此时还观察不到对酶活明显的抑制作用,这说明本研究的范围内,所使用的菌体产生的酶对于底物的耐受性是比较强的。

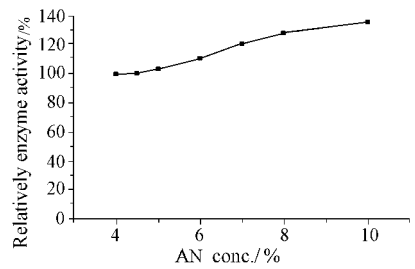


图5 丙烯腈浓度对于表观酶活的影响

Fig.5 Effect of acrylonitrile concentration on enzyme activity

**2.1.5 丙烯酰胺浓度对反应速率的影响** :文献报道<sup>[17]</sup>,丙烯酰胺作为产物,会极大地影响酶活,使酶活降低。研究中,我们在初始反应液中加入一定浓度的丙烯酰胺,终了测量反应后的浓度,由生成的丙烯酰胺的量求得与反应速率相应的酶活。图6的研究结果表明,在丙烯酰胺浓度  $20\%$  以前,酶活的保存率在  $90\%$  以上(以  $5\%$  丙烯酰胺浓度下的酶活作为对比);但当丙烯酰胺浓度达到  $45\%$  时,则酶活只剩下  $48\%$  了。说明丙烯酰胺浓度过高会严重抑制反应的速率。

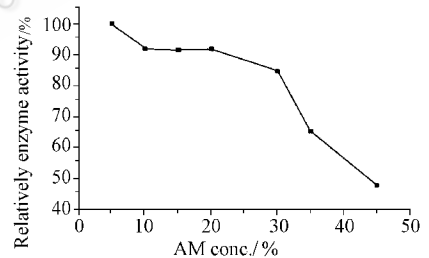


图6 丙烯酰胺浓度对酶活的影响

Fig.6 Effect of acrylamide concentration on enzyme activity

本文曾试图用竞争性抑制模型对产物抑制进行拟合,但拟合结果并不理想,说明实际上抑制的机理可能比较复杂。

## 2.2 酶失活动力学的研究

在目前批式反应的生产过程中,存在酶活稳定性比较差,菌体重复使用的次数少这样一个很大的问题,腈水合酶的活性往往反应几批后就剩无几了。要解决这一问题,首先需要找到影响酶活稳定性的主要因素。

**2.2.1 pH 对酶失活的影响** :在生产过程中, pH 基本是稳定在中性范围内的,但作为对比,我们还是研究了菌体在不含丙烯腈和丙烯酰胺的缓冲液中的稳定性。选取  $5, 7, 9$  3 个 pH 值,将培养得到的菌体浸泡于上述 3 个 pH 的磷酸盐缓冲溶液中,温度保持在  $28^\circ\text{C}$ ,过一定时间,从中取出部分菌体进行活

力测定,结果如图 7。在初始时期,酶活受到一定影响,有一定幅度的下降,但后期酶活比较稳定。而酸性环境对于表观酶活(也即反应速率)是不利的,但酶的稳定性并不受 pH 的较大影响。

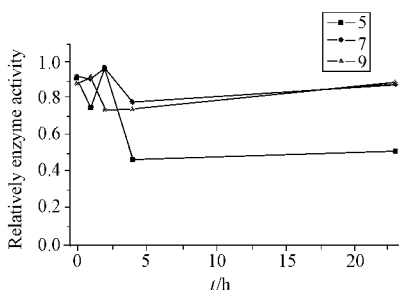


图 7 pH 对酶失活的影响

Fig.7 Effect of pH on enzyme deactivation

2.2.2 温度对酶失活的影响:据文献报道,清水合酶的失活符合下式<sup>[18]</sup>:

$$dr/dt = -k_1 \cdot r \quad (3)$$

所以有

$$r = dc/dt = r_0 \cdot \exp(-k_1 \cdot t) \quad (4)$$

其中,  $k_1$  是酶失活速率常数,不同温度、不同产物和底物浓度下  $k_1$  不同。

首先,在不同温度条件下用批式的方法得到丙烯酰胺随时间的变化曲线,为了减小产物的影响,将产物浓度控制在较低的水平。然后用龙格库卡法利用上面的公式对实验数据进行拟合可以得到不同温度、不同底物浓度下酶的失活速率常数  $k_1$ 。

下面以 7% 丙烯腈浓度下的数据来说明温度对于  $k_1$  的影响。

| T/°C                 | 5      | 10     | 15     | 20     | 28     |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| $k_1(\text{h}^{-1})$ | 0.0227 | 0.0484 | 0.1005 | 0.1722 | 0.4941 |

用阿累尼乌斯公式对温度与酶失活速率常数进行拟合,得图 8。拟合结果为:

$$\ln(k_1) = (36.15 \pm 0.88) - (11099 \pm 253) \cdot 1/T \quad (5)$$

也即此酶失活反应的活化能为  $92.28 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,表明温度对于酶失活也是一个重要的影响因素。

2.2.3 丙烯酰胺浓度对酶失活的影响:从以往的研究经验来看,在很多情况下产物是酶失活的最重要因素。而产物在溶液中的浓度,也就是反应液中丙烯酰胺的浓度越高,则这一生物转化过程就越经济。两者存在一定矛盾。为了研究丙烯酰胺对酶失活的影响,拟定了以下试验:将自由细胞放入不同浓度的不含丙烯腈的溶液中,温度保持在  $28^\circ\text{C}$ ,过一

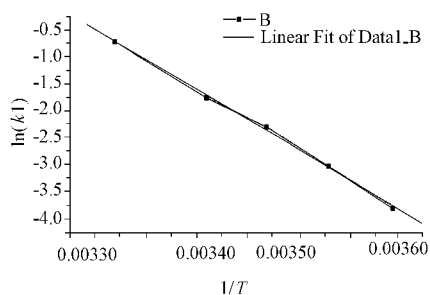


图 8 温度与酶失活速率常数进行拟合的结果

Fig.8 Result of linear fit on  $\ln(k_1)$  and  $1/T$

定时间取细胞进行活力测定,结果如图 9 所示。

可以看出,丙烯酰胺的浓度确实对酶的失活有很大影响。尤其当丙烯酰胺浓度到达 35% 时,酶活下降得很快,在 55 h 后,酶活几乎为零。而在丙烯酰胺浓度为 10% 的情况下,55 h 的酶活仍然存在约 50%。在 25% 丙烯酰胺浓度下,30 h 后酶活剩下初始酶活的 40%;而在 35% 丙烯酰胺浓度下,经过相同时间后,酶活仅为初始的 13.5%。说明丙烯酰胺浓度过高对酶活的稳定是极为不利的。

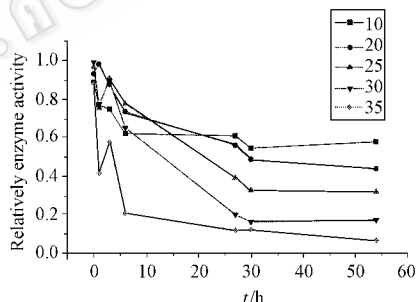


图 9 不同丙烯酰胺浓度下的酶失活曲线

Fig.9 De-active curve under different acrylamide concentrations

2.2.4 丙烯腈浓度对失活的影响:从文献来看<sup>[19]</sup>,当丙烯腈浓度比较高时,酶的失活情况非常严重,通常工厂操作时丙烯腈浓度控制在 5% 以下。但从图 10 中 15°C 和 20°C 下的数据可见,在相同温度下,在丙烯腈浓度  $\leq 7\%$  的范围内,丙烯腈浓度的改变对于失活速率常数的影响并不大。

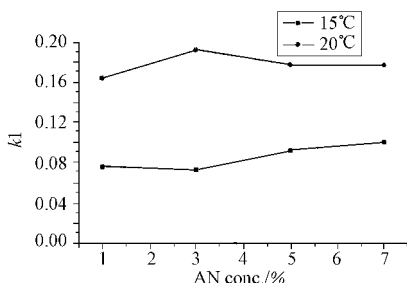


图 10 不同丙烯腈浓度下失活速率常数的对比(15、20°C)

Fig.10 Contrast of the  $k_1$  under different acrylonitrile

### 2.3 批式水合反应实验

根据以上反应动力学和酶失活动力学研究可知,温度和丙烯酰胺的浓度是最重要的影响因素。温度升高对于反应速率的提高有很大作用,但同时也会影响酶的稳定性;产物丙烯酰胺在高浓度下既降低酶活也影响酶的稳定性。在发酵研究中,菌体的总酶活已经达到了很高的水平<sup>[3]</sup>,因而在生产中对于提高酶活的要求可以适当降低,但稳定性是更需要解决的。所以可以考虑在较低温度下进行水合反应。

以下采用目前工厂生产中常用的批式反应的方式,一共测试了5批,每批反应约3 h,反应温度为5℃。每批结束后用高速冷冻离心机在8000r/min,10min 4℃条件下将菌体与反应液分离。菌体在50mmol/L pH7的磷酸缓冲液中重悬,然后进入下一批反应。

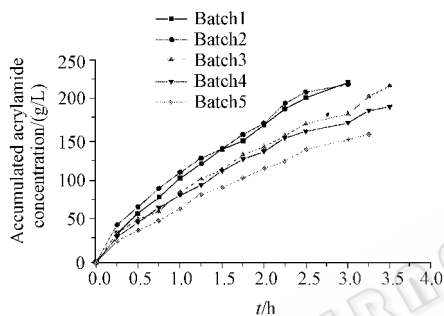


图 11 连续五批次的水合试验

Fig. 11 Batch reactions of acrylamide bioconversion for five times

实验结果如图 11。由图可见,随着批次的增加,丙烯腈的转化效率越来越低。以反应 3 h 的数据作对比,第五批的丙烯酰胺生成量只有第一批的 68%。虽然如此,这一失活幅度已经低于目前工厂中固定化酶或自由细胞操作条件下的失活幅度。目前,工厂操作的失活标准为酶活下降到初始的 10% 左右,按照这一标准,在 5℃ 下菌体可以反复利用多次。而且,在 5 批水合的产物中都没有检测到丙烯酸的生成,说明丙烯腈转化的选择性是很高的。

### 3 小 结

本文通过实验得出了温度和产物浓度是影响酶活的关键性因素。温度对于酶活的影响很大,要在较高温度下才能获得较高酶活,但温度高会带来严重的酶的失活。对于温度的选择,需要对这两个影响作用进行权衡优化得出。产物浓度在水合过程中应该保持在较低浓度范围以内。一般当丙烯酰胺浓度在 20% 以下时,酶活还比较高,但当丙烯酰胺浓

度大于 30% 以后,酶活的下降非常快。本文得到的温度对酶活影响的重要参数,为进一步的工厂设计改造以及操作条件的优化打下了基础。

对于酶失活动力学,影响最大的因素也是温度和丙烯酰胺浓度。在实际生产中,控制比较低的反应温度是有利于酶活的稳定。当然,温度降低会使得反应速度也相应变慢,但失活反应的活化能 ( $92.28 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 要大于水合反应的 ( $65.57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),也就是说降低温度带来的酶活稳定性增加的倍数要大于酶活降低的倍数。而且由于发酵酶活水平已很高,可以很大程度上弥补低温对酶活的降低。这一操作带来的问题是能耗将会加大,因此最优反应温度需要进行经济的综合分析得出。至于产物浓度,则应该尽量使这一数值保持在较低水平,满足产品要求即可,要求过高的丙烯酰胺浓度反而带来反应速度的下降以及酶活损失的加速,造成产量和经济效益的下降。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] CHANG H K (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(2): 34 ~ 36
- [2] 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
- [3] CHEN X (陈拓), SUN X D (孙旭东), SHI Y (史悦) et al. Study on production of acrylamide by microbial method (I). *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2002, 18(1): 55 ~ 58
- [4] Ramakrishna A, Desai J D. Induction of iron and cobalt dependent acrylonitrile hydratases in *Arthrobacter* sp. IPCB-3. *Biotechnology letters*, 1992, 14: 827 ~ 830
- [5] Kobayashi M, Shimizu S. Metalloenzyme nitrile hydratase: Structure, regulation, and application to biotechnology. *Nature biotechnology*, 1998, 16(8): 733 ~ 736
- [6] Nagasawa T et al. Nitrile hydratase of *Brevibacterium* R312-purification and characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1986, 139: 1305
- [7] Vlasenko V G, Shuvaev A T, Nedoseikina T I et al. EXAFS studies of the novel iron(III) complexes with an N(S/Se) chromophore simulating ligand environment of the active site of nitrile hydratase. *Journal of synchrotron radiation*, 1999, 6: 406 ~ 408
- [8] Sugiura Y et al. Nitrile hydratase: The first non-heme iron enzyme with a typical low-spin Fe(III)-active center. *Journal of American chemical society*, 1987, 109: 5848
- [9] Isao Endo, Masafumi Odaka and Masafumi Yohda. An enzyme controlled by light: the molecular mechanism of photoreactivity in nitrile hydratase. *TIBTECH*, 1999, 17: 244 ~ 248
- [10] Kobayashi M, Yanaka N, Nagasawa T et al. Primary structure of an

- coccus rhodochrous* and expression of its gene and identification of its active site residue. *Biochemistry*, 1992, **31**: 9000 ~ 9007
- [ 11 ] Toru Nagasawa, Koji Takeuchi, Hideaki Yamada. Occurrence of a cobalt-induced and cobalt-containing nitrile hydratase in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, **155**: 1008 ~ 1016
- [ 12 ] Toru Nagasawa, Hitoshi Shimizu, Hideaki Yamada. The superiority of the third-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide. *Applied microbial biotechnol*, 1993, **40**: 189 ~ 195
- [ 13 ] Rui A Pereira, Dan Graham, Fred A Rainey *et al.* A novel thermostable nitrile hydratase. *Extremophiles*, 1998, **2**(2): 347 ~ 357
- [ 14 ] Padmakumar R, Oriol P. Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using a thermostable nitrile hydratase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, **77**(9): 671 ~ 679
- [ 15 ] Yasuo Kato, Takashi Tsuda, Yasuhisa Asano. Nitrile hydratase involved in aldoxime metabolism from *Rhodococcus* sp. Strain YH3-3, purification and characterization. *European journal of biochemistry*, 1999, **263**: 662 ~ 670
- [ 16 ] Toru Nagasawa, Hironori Nanba, Koichiro Ryuno *et al.* Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23, Purification and characterization. *European Journal of Biochemistry*, 1987, **162**: 691 ~ 698
- [ 17 ] Toru Nagasawa, Hitoshi Shimizu, Hideaki Yamada. The superiority of the third-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide. *Applied microbial biotechnol*, 1993, **40**: 189 ~ 195
- [ 18 ] Cantarella M, Spera A, Cantarella L, Alfani F. Acrylamide production in an ultrafiltration-membrane bioreactor using cells of *Brevibacterium imperialis* CBS 489-74. *Journal of Membrane Science*, 1998, **147**(2): 279 ~ 290
- [ 19 ] LI W (李文忠), ZHANG H Y (张鸿翼), YANG H F (杨惠芳). The Production of Acrylamide by Microbial Conversion of Acrylonitrile. I. Screening of Strains and Bioconversion of Acrylonitrile. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 1990, **30**(1): 29 ~ 35

## Study on Production of Acrylamide by Microbial Method( II ) ——Enzyme catalytic kinetics and de-active dynamics of nitrile hydratase

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

( Department of Chemical Engineering, Institute of Biochemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China )

ZHAO Jian-Xun   SUN Xiao-Ying

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

**Abstract** The hydration reaction by microbial method is the crisis of the procedure of acrylamide production from acrylonitrile. This research studied the enzyme catalytic kinetics and de-active kinetics of nitrile hydratase in the type of free cell. Firstly, the effects of the concentration of cells, the temperature, pH value, the concentration of acrylonitrile and the concentration of acrylamide on the activity of nitrile hydratase was investigated. The result is that the temperature and the concentration of acrylamide are the most important among these factors. The activity of the nitrile hydratase was 5659u/mL( broth ) at 28°C; the counterpart was only 663u/mL( broth ) at 5°C. And the activity of NHase in solution of 45% acrylamide was just about half of that in solution of 5% acrylamide. After study on the relation of temperature and the reaction speed, It was found that the activation energy of the hydration of NHase was 65.57kJ·mol<sup>-1</sup>. This paper studied the effects of concentration of cells, temperature, pH value, concentrations of acrylonitrile and acrylamide on the deactivation of Nhase, as well as the related enzyme de-active kinetics. The result also showed that the temperature and the concentration of acrylamide are the most important among these factors. In solution of 35% acrylamide, the residual activity was about 0% of the original value after 55h; but in solution of 10% acrylamide, after the same period of time, the residual activity was 50% of the original one. It was also found that the concentration of acrylonitrile had little effect on the stability of NHase. The coefficient of deactivation at 28°C was 21.77 times of the one at 5°C. Correlating the temperature and the coefficient of deactivation, the activation energy of the de-active reaction was found to be 92.28 kJ·mol<sup>-1</sup>.

**Key words** acrylamide, acrylonitrile, nitrile hydratase, enzyme catalytic kinetics, de-active kinetics