生物工程学报 7(3)：286—290,1991
Chinese Journal of Biotechnology

恶臭假单胞菌JP-1产腈水合酶的发酵工艺研究

张 刚 兰先德 韩志华 曾云峰* 尹光琳**
（上海交通大学生物科学与技术系，上海）

70年代以来，国外许多学者开展了用腈水合酶将丙烯腈一步水合生成丙烯酰胺的研究[1-5]，其反应在常温常压下进行，转化率高(近100%)，分离操作简单和产品纯度高。80年代中期日本就有用微生物转化法生产丙烯酰胺的工厂[6]，目前年产量已达万吨。

近年来，国内许多单位也在这方面开展研究[7-11]，但有关腈水合酶产生菌的发酵工艺条件研究尚未见报道。本文简报 JP-1 菌在发酵罐中的培养与发酵条件。

材料和方法

（一）菌种

恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）JP-1[7]，为本课题组筛选。

（二）培养基

1. 种子培养基(%)：蛋白胨 0.2，牛肉膏 0.12，甘油 0.5，酵母膏 0.08，NaCl 0.5，$(NH_4)_2SO_4$ 0.05，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.2，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02，自来水配制，pH6.5—7.0，121℃灭菌20min。

2. 发酵培养基(%)：甘油0.5，NaCl 0.2，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.2，玉米浆 0.4，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02，$(NH_4)_2SO_4$ 0.2，丙烯腈 0.3，自来水配制，pH6.5—7.0，121℃ 灭菌20min。

（三）发酵罐

BF-Ⅱ-10型10L玻璃发酵罐（华东化工学院制造）和MSJ-U₃型30L 发酵装置（日本丸菱公司制造）。前者的控制参数有温度、搅拌转速和通气量，检测参数有温度，pH 和溶解氧。后者具有程序控制灭菌系统，上述参数均可控制外，还有OK1-30型微型计算机进行在线控制。

（四）甘油浓度的测定

在具塞三角瓶中，加入0.5ml 样品和 100ml 高碘酸溶液，暗处静置反应 30min，取出后加入 20ml 20%KI，再用0.1*N* $Na_2S_2O_3$ 溶液滴定，以 1 %淀粉溶液作指示剂。计算公式如下：

$$甘油\% = \frac{A \cdot M \cdot N}{W \cdot Z \cdot 2} \times 100\%$$

式中：*A*：空白样品消耗$Na_2S_2O_3$ml数；*M*：甘油分子量(92.09)；*N*：$Na_2S_2O_3$ 的当量浓度；*W*：样品量(mg)；*Z*：1mol 样品消耗的高碘酸mol数(甘油为 2)。

（五）细胞量测定

1. 浊度法：取发酵液0.5ml，用0.05mol/L HCl稀释10倍，摇匀并静止数分钟后，用 721 型分光光度计测定OD_{610}，以未接种培养液作空白对照。

2. 秤量法：取10ml发酵液，3000rpm离心20min 后除去上清液，用蒸馏水洗涤三次后，将获得的细胞置于红外干燥箱内，80—85℃干燥至恒重(约4h)。取出放入干燥器内，冷却后秤量。

3. 光密度与细胞干重间的关系，采用实验方法作出OD_{610}与DCW g/L 之间的对应关系曲线，解出它的数学表达式如下：

$$Y = 3X \quad (X \leq 0.326)$$

$$Y = 3.9805X - 0.3197 \quad (X > 0.326)$$

式中：*Y*：细胞干重(DCW g/L)

X：光密度(OD_{610})

（六）腈水合酶活力测定

1. 酶反应条件：取1ml发酵液加入 9ml 反应液（0.1mol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4，pH7.0；0.44 mol/L 丙烯腈），25℃ 反应 10min后，立即加入一滴6mol/L HCl 终止反应，离心后取上

本文于1990年 1 月22日收到。
* 现在北京石油化工科学研究院工作。
** 现在中科院上海生物工程基地工作。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

清液测定丙烯酰胺含量。

2．丙烯酰胺测定：在具塞三角瓶中加入0.5ml上述清液、10ml蒸馏水、5ml 0.1mol/L溴液，5ml 6mol/L HCl，盖上瓶盖摇匀后置，暗室反应15min。取出后加入5ml 20%KI溶液，用0.02N $Na_2S_2O_3$标准溶液滴定，以1%淀粉溶液作指示剂。

3．酶活定义：在上述条件下，每毫升发酵液每分钟催化转化丙烯腈生成1μmol丙烯酰胺所需的酶量定义为一个腈水合酶的活力单位。计算公式如下：

$$TA(u/ml) = \frac{(V_0 - V)\cdot N\cdot 35.5}{71.08} \times 10^3 \times \frac{1}{0.5} \times 10 \times \frac{1}{10}$$

式中：N：$Na_2S_2O_3$溶液的当量浓度；V_0：空白样品消耗$Na_2S_2O_3$的ml数；V：样品消耗$Na_2S_2O_3$的ml数；TA：腈水合酶活力。

（七）培养与发酵条件

将新鲜斜面种子一支，接入装有500ml种子培养基的1000ml三角瓶中，28℃摇床(200rpm)培养6—12h。将培养好的种液接入二级种子罐或发酵罐中，28℃培养，按时取样分析甘油、细胞量和腈水合酶活力。

结　　果

（一）种液培养条件的确定

1．JP-1菌的生长曲线：按文献[7]的种液培养条件，测定JP-1菌株的生长曲线(图1)。结果表明，该菌的对数生长期为2—8h，10h以后菌量稳定。用10L发酵罐培养种液(150rpm，0.3vvm，28℃)，可得到满意的结果。

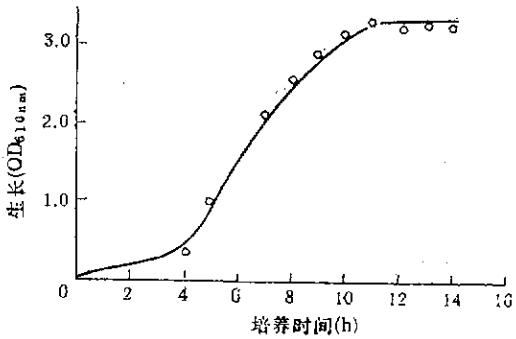

图1　JP-1菌的生长曲线

2．最适种龄的选定：图2的结果表明，以种龄6、10、14h的种液接种发酵后的细胞量相近，而腈水合酶活力差别较大，6h种龄的酶活比14h的酶活高出50%。因此种龄确定为6—12h。

3．接种量的确定：以接种量分别为2、5、10、15%(v/v)的种液进行发酵，如图3的结果表明，接种量为2—5%的培养细胞的酶活比接种量为10—15%的酶活要高出40%。但接种量大的细胞量最大，接种量少的细胞量最少。以培养细胞的酶活力为主，综合考虑细胞量，因此接种量确定为5—10%。

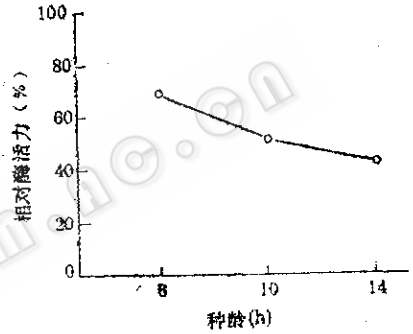

图2　种龄对产酶的影响

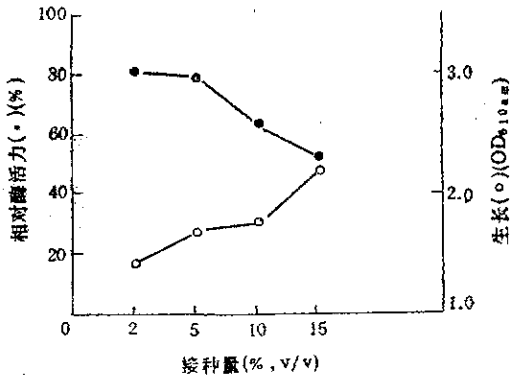

图3　接种量对产酶的影响

（二）发酵工艺条件的确定

1．通气量的选定：摇瓶试验：在250ml三角瓶中分别装入10、20、30、40、50(%、v/v)的培养液，以种龄6h，种量5%，28℃摇床培养24h。图4结果表明，装量为50%的摇瓶OD_{610}和TA最高。发酵罐：在3个10L罐中同时进行，培养条件是：培养基装量7L，种液种龄6h，种

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

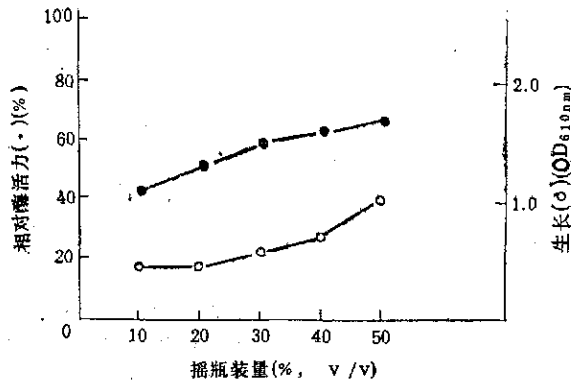

图4 摇瓶通气量对产酶的影响

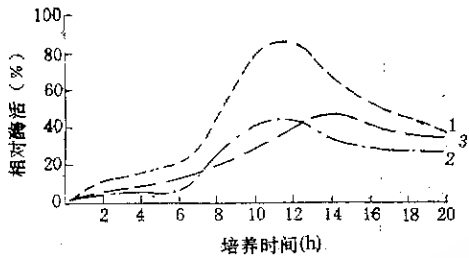

图5 发酵罐通气量对产酶的影响
1. 0.3vvm 2. 0.6vvm 3. 0.9vvm

量5%，28℃培养，搅拌转速100rpm，通气量分别为0.3、0.6和0.9vvm。培养周期24h。由图5可见，在三种通气量的条件下，最高酶活分别是86，45和47(%)，通气量0.3vvm的腈水合酶活高峰期出现最早。细胞量均可达到3.5g/L。因此，发酵罐通气量为0.3vvm。

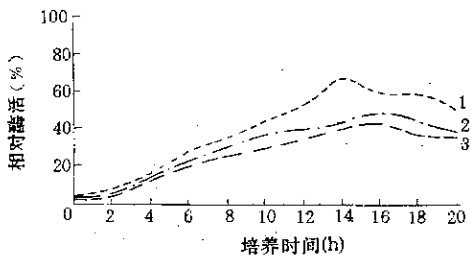

图6 搅拌速度对产酶的影响
1. 100rpm 2. 250rpm 3. 400rpm

2. 搅拌速度的选定：该实验也在三个10L罐中同时进行，搅拌速度分别为100、250、400rpm。其他条件同上。结果(图6)表明，100rpm时，腈水合酶活最高。

3. 生长和发酵的时间进程：JP-1菌的发酵在30L罐中进行，一级种液在1L摇瓶中培养，二级种液在10L罐中培养，共三级培养与发酵。其他条件同上。图7中的曲线表明了甘油浓度、细胞量和腈水合酶活力之间的关系，以及pH和溶解氧的变化规律。经过十几批实验，结果是腈水

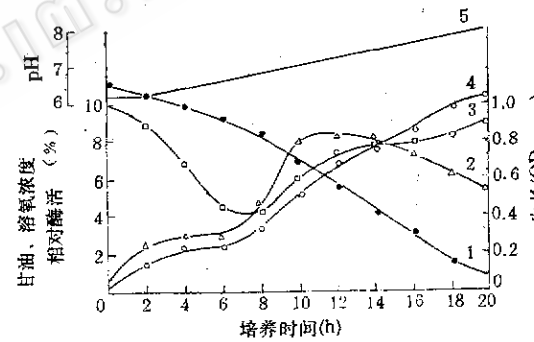

图7 腈水合酶产生菌JP-1生长和发酵的时间进程
1. 甘油浓度 2. 相对酶活 3. 溶氧浓度
4. 生长 5. pH

合酶活力可达到200u/ml，细胞量达3g/L。发酵产酶高峰出现在10—16h，细胞在2—12h平均比生长速率为0.174h^{-1}，腈水合酶的形成是在对数生长后期达到高峰。从溶解氧曲线来看，低谷出现在6—8h，而此时正是对数生长期高峰，溶解氧下限为42%左右。pH从6.2开始，随着发酵时间的延长逐渐升高，最终达到8.0。

（三）细胞固定化[8,11]

用上述最佳培养条件所得到的多批细胞，由本课题的固定化组用2%海藻酸钙包埋，再将固定化细胞装入反应柱里，以60ml/h的速率流加

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

0.4mol/h 丙烯腈，室温下连续反应，丙烯腈转化成丙烯酰胺的转化率在95%以上，该条件下固定化细胞的半衰期超过 1000h。当采用流加丙烯腈(0.4mol/h)批式系统连续反应13h，丙烯酰胺累积浓度可达30%。连续催化丙烯腈转化成丙烯酰胺的反应速度可以达到40g Am/g细胞/h。这一结果说明，本文所确定的生产工艺，具有发酵原料简单，生产周期短，操作费用低；发酵酶活力高(达到 200u/ml，为摇瓶结果[9]的10倍)；腈水合酶半衰期长等优点。为今后进一步扩大试验奠定了基础。

参 考 文 献

〔1〕Yamada, H. et al.:J. *Ferment. Technol.*, 57:8,1979.
〔2〕Pauline, A. et al.:J. *General Microbiology*, 129:711, 1983.
〔3〕Asano, Y. et al.:*Agric. Biol. Chem.*, 46(5):1183, 1982.
〔4〕Watanabe, et al.:*European Patent Application*, 188:316,1986.
〔5〕Hwang, J. S. et al.:*Biotechnol. Lett.*, 9(4):237, 1987.
〔6〕西川新三等：化学工学，51:422，1987.
〔7〕孙韦强等：石油学报，4(4):10，1988.
〔8〕罗九甫等：分子催化，3(3):242，1989.
〔9〕孙韦强等：生物工程学报，5(2):169，1989.
〔10〕常学良等：全国首届生化过程模型化与控制学术讨论会议论文集，pp.60—66，1989.
〔11〕罗九甫等：工业微生物，19(4):13—17，1989.

The Study of Fermentation Technology Conditions by *Pseudomonas putida* JP-1 Producing High Nitrile Hydrotase

Zhang Gang　Lan Xiande　Han Zhihua　Zeng Yunfeng　Yin Guanglin

(Department of Biological and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai)

The study of fermentation technology coditions by *Pseudomonas putida* JP-1 producing high nitrile hydratase was in model BF-Ⅱ-10 10 L fermenter and MSJ-U3 30 L fermenter. The results suggested that used 2 or 3 stage fermentation can obtain cells having high nitrile hydrotase due to used optimum seed culture medium and fermentation culture medium. These cells were entrapped with calcium alginate,then continuously feeded acrylonitrile and reacted for 13h, 300g/L of acrulamide was produced. The half time of the immobilized cells was over 1000h. The results also showed that optimum fermentation technology conditions are: seed ages is 6—12h, seed volume is 5—10%, culture temperature is 25—30℃, air volume is 0.25—0.5vvm, agitate speed is 100—200rpm, fermentation cycle is 18—24h. The max nitrile hydrotase of species JP-1 can achieve 200u/ml, and the cell mass can achieve 3 g/L. At the fermentation process the lowest DO concentration was over 20%

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

and the average cell specific growth rate is $0.17h^{-1}$ in logarithmic growth phase.

Key words

Acrylamide; nitrile hydratase; *Pseudomonas putida* JP-1

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn