

利用微生物生产丙烯酰胺的研究

孙韦强 伍登熙 尹光琳

(上海交通大学生物科学与技术系, 上海)

余正齐 李族光

(石油化工科学研究院四室, 北京)

丙烯酰胺主要用于生产聚丙烯酰胺。聚丙烯酰胺是一种用途十分广泛的精细化工产品, 可以制成絮凝剂用于废水处理, 也可以制成纸浆增强剂用于造纸工业; 近年来, 聚丙烯酰胺取代了天然植物胶而应用于原油的深度开采。丙烯酰胺的生产工艺早期采用硫酸法, 因存在产品精制困难, 环境污染等问题而被淘汰。近年来, 美、日等国主要采用高效铜系催化剂直接水合工艺生产聚丙烯酰胺。70年代中期以来, 国外相继开展了对水合丙烯腈生成丙烯酰胺菌种的分离筛选^[1,2]和固定化细胞用于生产丙烯酰胺^[3,4]的研究, 1985年日本日东化学工业公司在横滨建立了一套年产4000吨的用微生物生产丙烯酰胺的中试装置。本文报道了利用微生物水合丙烯腈生成丙烯酰胺方面的研究。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌种: 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) JP-1, 由本实验室筛选鉴定。

2. 斜面培养基: 牛肉汁琼脂培养基。

3. 种子培养基组分(%) : 蛋白胨 0.2, 牛肉膏 0.12, 酵母膏 0.08, 甘油 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.05, NaCl 0.5, K₂HPO₄·3H₂O 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.02, 蒸馏水配制, pH7.0。

4. 发酵培养基组分(%) : 丙腈 0.3(V/V), K₂HPO₄·3H₂O 0.2, NaCl 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.02, FeSO₄·7H₂O 0.001, pH7.0。

(二) 方法

1. 菌体的培养、收集和反应: 取斜面新鲜菌苔一环接入种子培养基, 在25℃摇床上预培养

8h后接入发酵培养基中, 接种量为2%, 同上条件培养48h后, 取1ml菌培养液加入9ml反应混合液(0.1mol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH7.0, 0.44mol/L丙烯腈)中, 25℃反应10min, 加入盐酸终止反应, 离心取上清液。

2. 酶活力、丙烯腈转化率的测定和计算: 磨口三角瓶中加入10ml蒸馏水, 5ml 0.1N溴液和0.5ml反应上清液, 再加5ml 6N HCl, 塞上瓶盖, 暗室放置15min。加入5ml 20%KI溶液, 用0.02N Na₂S₂O₃溶液滴定至无色。指示剂为0.5ml 0.5%淀粉溶液。做空白对照后即可知滴定的丙烯酰胺需多少体积的 Na₂S₂O₃溶液, 以下式计算酶活力和丙烯腈转化率:

$$\text{酶活力(u/ml)} = \frac{N(V_0 - V) \times 35.5}{71.08}$$

$$\times 10^3 \times \frac{1}{0.5} \times 10 \times \frac{1}{10}$$

$$\text{转化率} = \frac{N(V_0 - V) \times 35.5}{0.5 \times 0.4 \times 71.08} \times 100\%$$

N: Na₂S₂O₃溶液当量浓度

V₀: 空白消耗 Na₂S₂O₃溶液的体积毫升数:

V: 滴定样品消耗 Na₂S₂O₃溶液的体积毫升

本文于1988年2月15日收到。

参加部分工作的同志有: 上海交通大学的张刚、张延、周建龙、孙俊、杜玲瓏、马天林、方榕和石油化工科学研究院的陆光、汪莉、杨钧、杨芳晓等; 其中张延和杨钧同志参加了菌种鉴定; 中国科学院微生物研究所的蔡妙英先生对菌种鉴定工作提出了宝贵建议; 中国科学院植物生理研究所的焦瑞身先生在研究过程中给予了关心和帮助, 在此一并致谢。

升数

u: μmol 丙烯酰胺/min

在上述反应系统中,每分钟催化生成1微克分子丙烯酰胺的酶量为一个酶单位。

3. 丙烯酸定量分析:用带SP4270积分仪的100型气相色谱仪测定^[1]。

4. 酶反应产物的分离:按上述方法获得的反应上清液冷冻干燥,加甲醇离心(4000 rpm, 10min),弃沉淀,上清液在室温下旋转真空蒸发后加40℃甲醇,离心,上清液室温下旋转真空蒸发得白色结晶。

结 果 与 讨 论

(一) JP-1酶反应产物的鉴定

(1) 用色质联用对所得结晶进行鉴定:质谱图列于图1,主要由 m/e 71 $[\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2]^+$ 和 m/e 55 $[\text{CH}_2=\text{CHC}\equiv\text{O}]^+$ 二个离子峰组成,因此可知所测样品为丙烯酰胺。

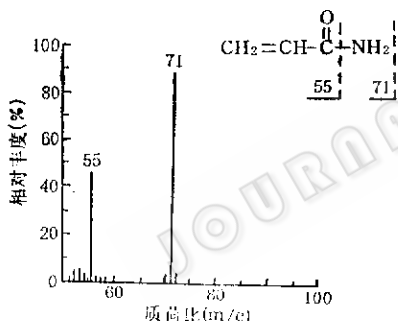


图 1 反应产物的质谱图

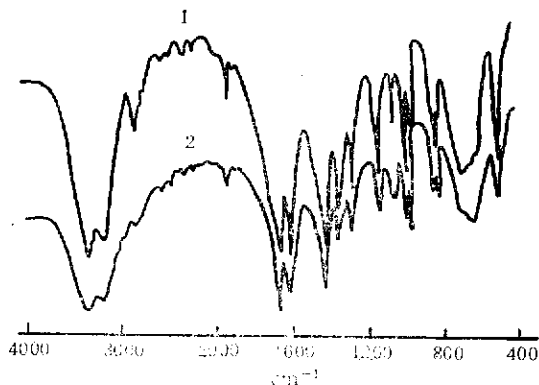


图 2 反应产物(2)与标准丙烯酰胺(1)的红外光谱

(2) 用红外光谱对所得结晶进行分析:图2是将JP-1菌株反应产物和标准丙烯酰胺的红外光谱图谱比较,证明产物为丙烯酰胺。

(二) 碳、氮源对产酶的影响

JP-1能利用丙脎作为碳、氮源,为了提高酶活力,我们在发酵培养基中添加1%各种碳源进行试验,结果如表1,在培养基中添加碳源对酶活力没有促进作用。在发酵培养基中添加不同含氮化合物(用量为0.1%,玉米浆用量为0.2%)的结果如表1,玉米浆和蛋白胨对产酶有明显的促进作用,添加玉米浆后每毫升发酵液酶活力为18.35单位。

表 1 各种碳、氮源对产酶的影响

碳 源	生长吸光度 ($A_{610\text{nm}}$)	酶 活 力 (u/ml)
葡萄糖	2.20	1.64
果 糖	2.65	2.73
甘露糖	1.40	6.54
蔗糖	1.07	9.54
麦芽糖	1.05	1.09
半乳糖	1.63	5.99
糊 精	1.53	9.26
淀 粉	0.99	11.45
甘 油	2.92	6.45
琥珀酸钠	2.63	6.54
乙 酸 钠	2.05	5.81
无	1.13	11.72

含氮化合物	生长吸光度 ($A_{610\text{nm}}$)	酶 活 力 (u/ml)
蛋 白 胨	1.53	18.71
酵 母 粉	0.82	7.63
玉 米 浆	1.70	18.35
NaNO_3	0.77	12.81
NH_4Cl	0.30	3.82
NH_4NO_3	0.32	4.36
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.40	5.72
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.22	5.18
尿 素	0.20	4.36
无	1.13	11.72

(三) 酶作用的最适pH和温度

以丙烯脎为底物,测定不同pH下游离细胞反应的酶活力(图3),结果表明,酶的最适pH为7.5。于不同温度下,测定游离细胞的酶活力,测定结果图4表明,酶反应最适温度为15—

30℃。

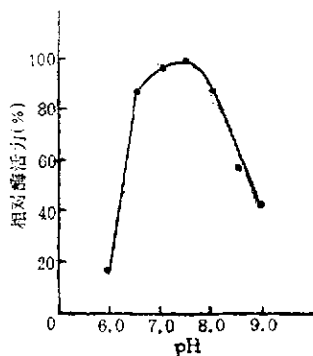


图 3 pH对酶活力的影响

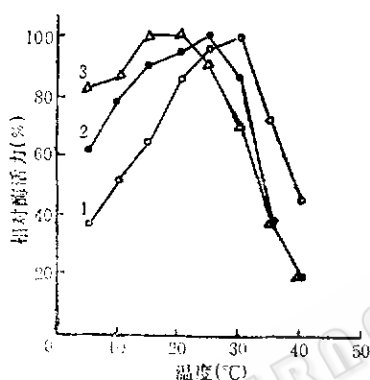


图 4 温度对酶活力的影响

反应时间: 1. 1h 2. 1.5h 3. 3h

(四) 酶量对丙烯腈转化率的影响

在反应系统中加入不同酶量进行反应，结果(图5)表明，反应转化率随使用的酶量增加而增加，反应系统中按13.01u/ml的酶量，在30min内可获得98%以上的转化率。

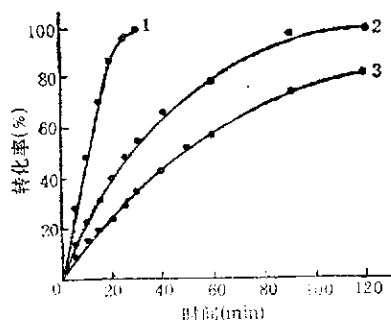


图 5 反应转化率与酶量的关系

酶量(u/ml): 1. 13.01 2. 7.84 3. 5.23

(五) 底物浓度对丙烯腈转化率的影响

含有不同底物浓度的反应混合液于30℃下反应，定时测定转化率，从图6可见，底物浓度越低转化率越高。当底物浓度小于或等于0.4mol/L时，在较短时间内可获得98%以上转化率。

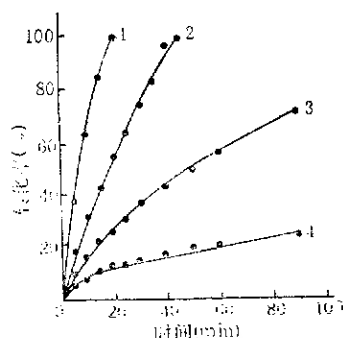


图 6 底物浓度与转化率的关系

底物浓度(mol/L): 1. 0.2 2. 0.4 3. 0.6 4. 0.8

(六) 利用完整细胞连续催化反应生成丙烯酰胺

用恶臭假单胞菌完整细胞连续加入丙烯腈来生产丙烯酰胺，在连续催化反应4h后积累丙烯酰胺量可达21.5%。图7的结果表明，在含10g湿菌体的100ml磷酸缓冲液(0.1mol/L K_2HPO_4

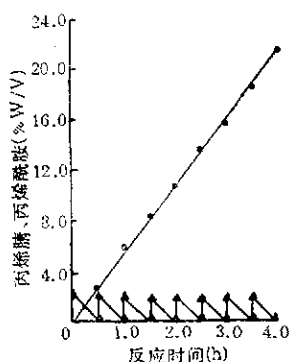


图 7 反应时间和丙烯酰胺生成的关系

▲ 丙烯腈 ● 丙烯酰胺

/KH₂PO₄, pH7.5) 中，每隔30min加入丙烯腈，使每次加入丙烯腈的量不超过0.4mol/L，10℃反应4h后丙烯酰胺积累量为21.5%，丙烯腈转化率大于99%，生成的产物中丙烯酸含量小于0.5%。

由连续催化结果我们可以看出,当直接用 JP-1 菌体作催化剂时,反应在 4h 内直线地进行,积累丙烯酰胺 21.5%,丙烯腈转化率大于 99%。这种浓度为 20% 左右的定量水合反应,用

现在化学手段是不可能实现的^[5],这显示了用微生物法生产的优越性,为今后实现用生物技术生产丙烯酰胺这一精细化工产品展示了良好的前景。

参 考 文 献

- [1] Asano, Y. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 46(5), 1183, 1982.
- [2] Watanabe, I. et al., *European Patent Application* 188, 316, 1986.
- [3] Jun Sik Hwang et al., *Biotechnol. Lett.*, 9(4), 237, 1987.
- [4] 西川新三等: 化学工学, 51: 423, 1987.
- [5] 山田秀明: 日本农艺化学会志, 60 (8), 609, 1986

STUDIES ON PRODUCING ACRYLAMIDE UTILIZING MICROORGANISMS

Sun Weiqiang Wu Dengxi Yin Guanglin

(Department of Biological Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai)

Yu Zhengqi Li Zuguang

(Research Institute of Petroleum Processing, Beijing)

Pseudomonas putida JP-1 has nitrile hydratase which hydrates acrylonitrile into acrylamide. The condition for the producing nitrile hydratase of the strain JP-1 and the properties of nitrile hydratase in intact cells of the strain JP-1 have been investigated. The results suggested that the strain JP-1 can utilize propionitrile as source of carbon and nitrogen. Additive corn steep liquor is marked factor for enzyme formation. The optimum pH of nitrile hydratase was 7.5, optimum temperature was 15—30°C. When the reaction was carried out at 10°C, 21.5% acrylamide was produced in 4 h. The yield was more than 99% with less than 0.5% acrylic acid.

Key words

Pseudomonas putida JP-1; acrylonitrile; acrylamide