

珊瑚色诺卡氏菌 No.11 降解丙烯腈活力的诱导形成

杨惠芳 谢树华 贾省芬 张鸿翼 鲜海军 王保军

(中国科学院微生物研究所,北京)

珊瑚色诺卡氏菌 No.11 能利用丙烯腈、正-丁腈、二甲氨基丙腈以及乙酰胺和丙烯酰胺作为生长的碳源和氮源,而其它腈化物如乙腈、苯乙腈、 β - β' 氧二丙腈和 2-羟基丙腈只能作为菌生长的氮源。

呼吸试验表明,在丙烯腈基质中,经丙烯腈诱导的适应细胞的耗氧量比未适应细胞高 6—7 倍。适应细胞对丙烯酰胺或丙烯酸耗氧量也比未适应细胞高得多,推测这些化合物可能是丙烯腈代谢的中间产物。在其它腈化物中适应细胞的耗氧量均低于丙烯腈,由此可见,耗氧量的提高是由于诱导的结果。适应细胞还可耐受高浓度的丙烯腈,当丙烯腈浓度高达 20,000 毫克/升时,耗氧量才有明显降低。

生长细胞用 100 毫克/升丙烯腈诱导 1 小时,即具有较高的丙烯腈降解活力,在最适反应条件下细胞的丙烯腈降解活性 f 值为 4—5 毫升/毫克细胞·小时,无细胞提取液的丙烯腈降解活性 f 值为 8—11 毫升/毫克蛋白质·小时。丙烯腈降解酶的分布试验确定,该菌的丙烯腈降解酶是细胞内酶,该酶主要分布于细胞质的可溶性部分。在 25℃ 下细胞质可溶性部分(粗酶液)的 Michaelis-Menten 常数 K_m 值大约等于 2.2×10^{-3} 克分子/升。

腈是氢氰酸的一种取代物,其结构式一般为 $R \cdot CN$ 。腈化物是合成某些除草剂,聚丙烯腈纤维和塑料的原料。这种有毒化合物的广泛使用常引起环境污染。因此,研究它们的生物降解乃是环境保护的迫切任务。腈化物如羟基腈^[1]、芳香腈^[2,3]、乙腈^[4,5] 等的微生物降解和代谢有过一些研究。最近 Yamada^[6] 还报道了节杆菌(Arthrobacter) 利用丙烯腈的研究。这些报道大都是直接在含腈培养基中研究微生物生长过程对腈的降解。为了收集大量具有降解丙烯腈活力的细胞,应用于生化处理含丙烯腈废水的实践。我们研究了经丙烯腈诱导的细胞悬液对丙烯腈降解活力及其诱导形成的条件,同时还试验了该菌利用各种腈化物的能力,以便把该菌更有效地应用于含腈废水的处理。

材料和方法

(一) 菌种

本研究用的菌种是珊瑚色诺卡氏菌 11 号 (Nocardia Corallina No. 11), 其形态、生理和培养特征在前文中作过描述^[7]。

(二) 生长细胞的培养

研究珊瑚色诺卡氏菌 11 号利用腈化物及某些酰胺的能力,采用无机盐合成培养基,成份如下(克/升): KH_2PO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $NaCl$ 0.1, 微量元素 1 毫升; 蒸馏水 1000 毫升; pH 7.0—7.2, 于 250 毫升三角瓶中装 50 毫升培养基, 15 磅灭菌 30 分钟。微量元素原液的成份(毫克/升): $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.1, $ZnCl_2$ 100, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 500, $CoCl_2$ 50, $CuSO_4$ 100, 蒸馏水配制。接种前培养基中分别加入腈化物或酰胺作为碳源和氮源,其种类有乙腈、丙烯腈, 正-丁腈、苯乙腈

本文于 1979 年 8 月 22 日收到。

β - β' 氧二丙腈、2-羟基丙腈、二甲氨基丙腈、乙酰胺和丙烯酰胺等。腈化物的加量为 500 毫克/升,酰胺的加量为 1000 毫克/升。试验分三组进行。一组:分别加腈化物或酰胺,不补加其它碳、氮源。二组:加有各种不同腈化物或酰胺,同时加 0.2% 葡萄糖。三组:除加腈化物或酰胺外全都加 0.1% NaNO_3 。取肉汁斜面生长 40 小时的培养物,用无菌生理盐水洗下培养物并打碎,接种该菌液 5%,以不加腈化物作为空白对照,28℃ 振荡培养八天,在 72 型分光光度计上波长为 460 毫微米处测定菌生长的光密度。

(三) 细胞悬浮液的制备

将生长在肉汁琼脂斜面的菌种接入培养液中,成份为(克/升):牛肉膏 5,蛋白胨 5, NaCl 2.5, 葡萄糖 2, pH 7.0~7.2, 28℃ 振荡培养 24 小时,加入 50~100 毫克/升丙烯腈,经 10 小时适应,菌液在 9000 转/分离心 20 分钟,收集到丙烯腈降解活力较高的适应细胞,用 pH 7.0 磷酸缓冲液洗涤两次,细胞悬浮于缓冲液中备用,或在 4℃ 保存可使用三、四天。以不加丙烯腈适应的细胞作为未适应细胞。

(四) 氧化活力的测定

氧化活力用检压技术测定耗氧量来表示。按上述方法制备的丙烯腈适应细胞悬液在 pH 7.0 磷酸缓冲液中饥饿 4 小时,于反应瓶中加入 1 毫升菌液,侧臂加 1 毫升基质(腈化物),中央小杯加 20% KOH 0.2 毫升,温度平衡到 30℃ 后开始反应,反应总体积为 2.2 毫升,反应的细胞浓度为 1 毫克(干重)/毫升,以未适应细胞作对照。

(五) 无细胞提取液的制备

用上述方法制备的适应细胞按图 1 步骤,经超声波破碎。超声波的频率为 9.2 千周/秒,功率 250 瓦,时间 30 分钟。该无细胞提取液用冷冻高速和超速离心后得到无细胞提取液、细胞质颗粒部分和溶液部分。分别测定丙烯腈降解活力,各部分粗酶液的浓度以蛋白质含量确定。

(六) 丙烯腈降解活力的测定和计算

适应细胞和无细胞提取液的腈降解活力的测定是在小试管(14×1.2 厘米)或大试管(20×2 厘米)中进行,于管中加入适量的细胞悬液或无细胞提取液和一定浓度的丙烯腈,反应总体积为 2 毫升或 4 毫升,试管口加橡皮套以防管内丙烯腈

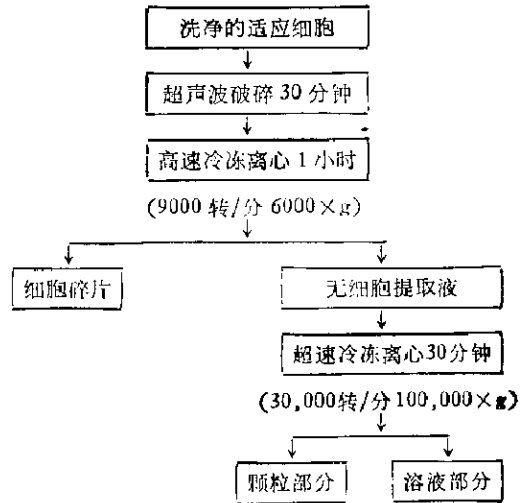


图 1 无细胞提取液的制备

的挥发,放置在水浴中保温,温度按试验要求确定,反应不同时间,取样测定丙烯腈的含量,通常以不加细胞的反应管作为对照。按同样方法,取培养上清液测定丙烯腈降解活力。

当丙烯腈浓度在 500 毫克/升以下时,该菌降解丙烯腈的速度为一级反应速度,结果见图 2。为阐明丙烯腈降解作用的动力学,参照清水达雄^[1]的计算方法,求得丙烯腈降解活性 f 值:

$$\text{即 } -\frac{ds}{dt} = K \cdot S$$

$$\text{积分后: } 2.303 \log \frac{S_0}{S} = k \cdot t$$

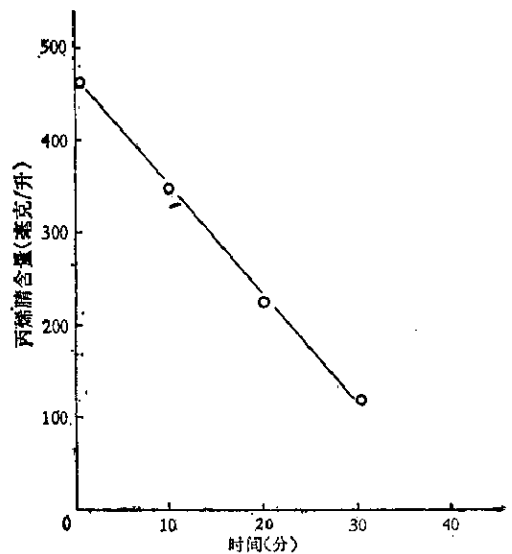


图 2 珊瑚色诺卡氏菌 11 号对丙烯腈的降解

t: 反应时间(小时)

S_0, S_t : 初始及 t 时间后的丙烯腈浓度(毫克/升)。

k: 丙烯腈降解速度常数(小时⁻¹)。

菌体浓度或蛋白质含量与丙烯腈降解速度常数之间的比例关系为:

$$k = f \cdot e$$

e: 细胞浓度或蛋白质含量(毫克/毫升)

f: 丙烯腈降解活性(毫升/毫克·小时)

(七) 分析方法

丙烯腈含量用带氢火焰离子化鉴定器的 102 型气相色谱仪测定^[9]。蛋白质含量用 Folin 酚试剂显色法测定^[10]。

结果和讨论

(一) 利用腈化物及酰胺的生长试验

我们曾报道过珊瑚色诺卡氏菌 11 号利用丙烯腈的能力^[7]。为了全面了解该菌利用其它腈化物及某些酰胺的情况, 按排了三组试验, 结果如表 1 所示。第一组试验中该菌除了能以丙烯腈作为碳、氮源外, 还能利用正-丁腈和二甲氨基丙腈、乙酰胺和丙烯酰胺作为生长的碳、氮源。第二组试验以葡萄糖为碳源, 腈化物和酰胺为氮源时, 菌的生长都很良好。第三组条件下加硝酸钠为氮源, 除丙烯腈、二甲氨基丙腈和正-丁腈可做为菌的碳源外, 其它腈化物则不能作为菌生长的碳源。由此可见, 该菌能利用全部试验的腈化物和酰胺作为氮源, 其中的丙烯腈、正-丁腈和二甲氨基丙腈, 既能作为氮源又能作为碳源。从而可考虑扩大该菌在含腈废水处理中的应用。

(二) 氧化活力试验

应用瓦勃氏检压技术测定珊瑚色诺卡氏菌 11 号在丙烯腈作为基质时的耗氧量, 以此判断适应细胞和未适应细胞氧化丙烯腈活力的差别。图 3 结果表明, 未适应细胞耗氧速度缓慢, 而丙烯腈适应细胞耗氧速度加快, 耗氧量提高 6—7 倍。显然, 这种

降解活力的提高是由于诱导的结果。

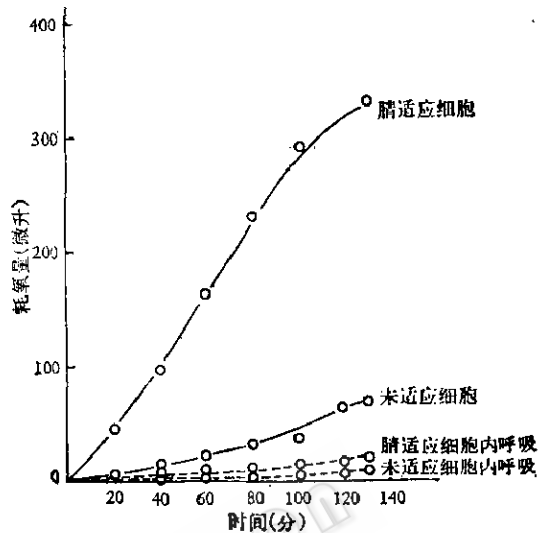


图 3 珊瑚色诺卡氏菌 11 号在 300 毫克/升丙烯腈中的耗氧量

表 1 珊瑚色诺卡氏菌 11 号利用腈化物和酰胺的生长情况 (波长 460 毫微米, O. D.)

腈化物种类	第一组	第二组	第三组
	不加葡萄糖和 NaNO ₃	加 0.2% 葡萄糖	加 0.1% NaNO ₃
乙腈	0.01	0.51	0.005
丙烯腈	0.55	0.73	0.60
正-丁腈	0.56	0.63	0.70
苯乙腈	0.01	0.44	0.01
β - β' 氧二丙腈	0.005	0.25	0.01
2-羟基丙腈	0.02	0.135	0.06
二甲氨基丙腈	0.12	0.39	0.15
乙酰胺	0.68	0.88	0.59
丙烯酰胺	0.59	0.71	0.74
对照(不加腈)	0.002	0.008	0.005

进一步探讨丙烯腈适应细胞在其它腈化物作为基质时的耗氧速度, 采用浓度为 300 毫克/升的腈化物进行试验。图 4 的结果清楚地看出, 细胞的耗氧量仍以丙烯腈为最高, 其次是正-丁腈、乙腈, 最低是苯乙腈和氧二丙腈。由此看来用丙烯腈适应的细胞对其他腈化物的氧化活力有一定的局限性。随后, 我们又试验了不同浓度丙烯腈对氧化活力的影响。图 5 的结果指出,

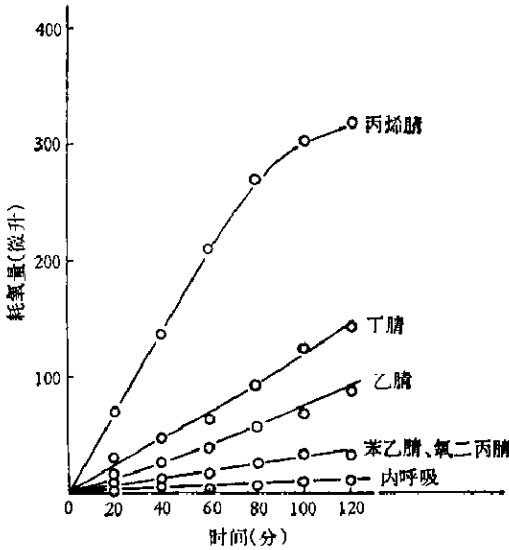


图4 珊瑚色诺卡氏菌11号丙烯腈适应细胞在不同腈化物中的耗氧量

克/升时，丙烯腈氧化活力仅受到一些抑制，高于20,000毫克/升时耗氧量明显降低。可以确认，丙烯腈适应细胞虽能耐受较高浓度的丙烯腈，但过高的丙烯腈浓度对菌的氧化活力有抑制作用。因此，要应用珊瑚色诺卡氏菌11号有效地处理含丙烯腈废水，必须考虑适当的丙烯腈浓度。

根据 DiGaronimo 等^[4]的研究提出 *Nocardia rhodochrous* LL 100-21 菌的乙腈和丙腈代谢，其中间产物为相应的酰胺和酸。我们用丙烯腈适应细胞试验了对丙烯酰胺和丙烯酸的氧化活力，结果见图6，适应细胞在丙烯酰胺中的耗氧量很高，在丙烯酸中的耗氧量也表现出相当的水平，而未适应细胞在这些基质中的耗氧量就很低，这可推测，丙烯酰胺和丙烯酸可能是该菌降解丙烯腈的中间产物。

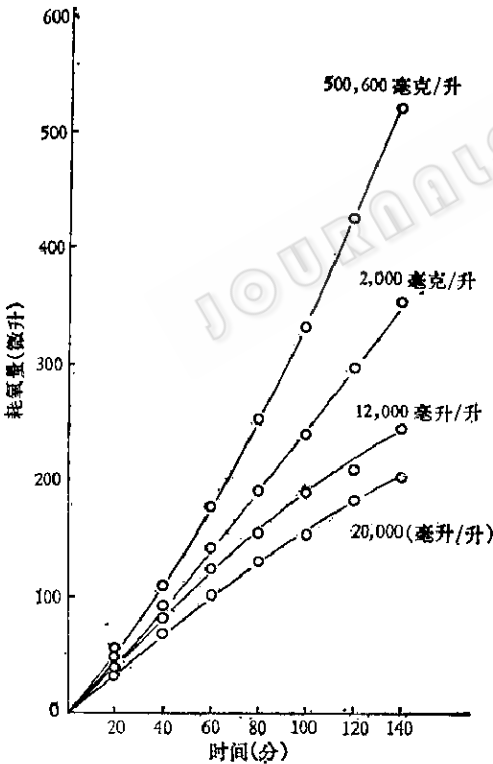


图5 丙烯腈浓度对珊瑚色诺卡氏菌11号适应细胞耗氧量的影响

当丙烯腈浓度在600毫克/升以下时耗氧量都很高，不断提高丙烯腈浓度耗氧量随之降低，当丙烯腈浓度高于2,000毫

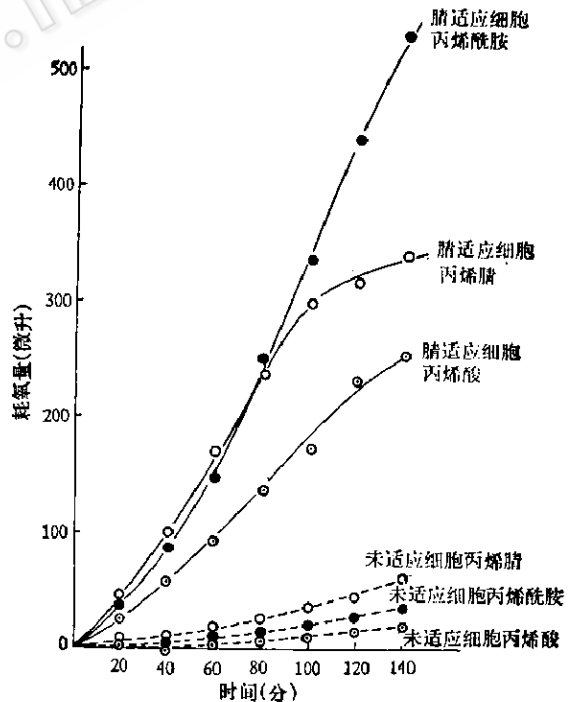


图6 珊瑚色诺卡氏菌11号在1000毫克/升丙烯酰胺和丙烯酸中的耗氧量

(三) 降解丙烯腈活力的形成条件

从以上试验可见，珊瑚色诺卡氏菌11

号经丙烯腈适应，细胞对丙烯腈有特别高的氧化活力，这是由于细胞受该有毒化合物的诱导，因此我们进一步研究了诱导的条件，主要是选择合适的诱导剂浓度和诱导时间。诱导剂浓度的选择是在细胞生长过程中，加入浓度不等的丙烯腈（0、50、100、200、300 毫克/升）适应过夜。结果如表 2 所示，没有经过丙烯腈适应的细胞降解丙烯腈的百分数很低，只有 19.8%，当用低浓度为 50 毫克/升的丙烯腈诱导后，丙烯腈的降解百分率提高到 84.27%，诱导剂浓度增加到 100 毫克/升，丙烯腈降解百分数达 89.13%，继续提高诱导浓度，丙烯腈降解百分数不再提高。不同诱导时间（0、15、30、60、90 分）的结果表示于图 7。不经丙烯腈诱导的细胞，降解丙烯腈速度很缓慢，经丙烯腈诱导 15 分钟降解速度立即加快，诱导 60 分钟丙烯腈降解速度最快，不断延长诱导时间，降解速度不再加速，从而归结为，用 100 毫克/升丙烯腈诱导 1 小时，即具有较高的丙烯腈降解活性。

表 2 诱导剂浓度对丙烯腈降解的影响*

诱导剂丙烯腈浓度 (毫克/升)	丙烯腈降解百分数 (%)
0	19.89
50	84.27
100	89.13
200	88.27
300	89.02

* 反应条件：温度 37℃，时间 20 分钟，细胞浓度 1 毫克/毫升。

(四) 丙烯腈降解活性的研究

丙烯腈降解活性是表示菌体浓度或蛋白质含量与丙烯腈降解速度常数之间的比例关系。该项研究是进一步认识生化处理中，微生物降解毒物的有效强度。因此，我们研究了温度和 pH 对丙烯腈降解活性的影响。

不同 pH 试验是在一系列磷酸缓冲液中进行，pH 对丙烯腈降解活性影响的结果表示于表 3，当温度保持在 37℃，pH 在 6~9 的范围内细胞的丙烯腈降解活性 f 值最高，无细胞提取液（粗酶液）的丙烯腈降解活性 f 值在 pH 为 6.5~10 为最佳。这表明，它们的最佳 pH 范围较广，但略有差异。

丙烯腈降解活性 f 值的大小与温度有密切的关系，从表 4 的结果可见，当 pH 条件恒定在 8，细胞的丙烯腈降解活性 f 值在 37℃ 为最高，无细胞提取液其值在 45℃ 为最高。为了取得稳定的反应条件，通常采用 37℃ 和 pH 8 为宜。总之，在最适反应条件下，细胞的丙烯腈降解活性 f 值比无细胞提取液低，细胞的丙烯腈降解活性 f 值为 4~5 毫升/毫克细胞·小时，无细胞提取液的丙烯腈降解活性 f 值为 8~11 毫升/毫克蛋白质·小时。

为阐明珊瑚色诺卡氏菌 11 号的丙烯腈降解酶的分布，分别测定培养上清液和细胞各部的丙烯腈降解活性。表 5 清楚地指出，培养上清液没有丙烯腈降解活性，细

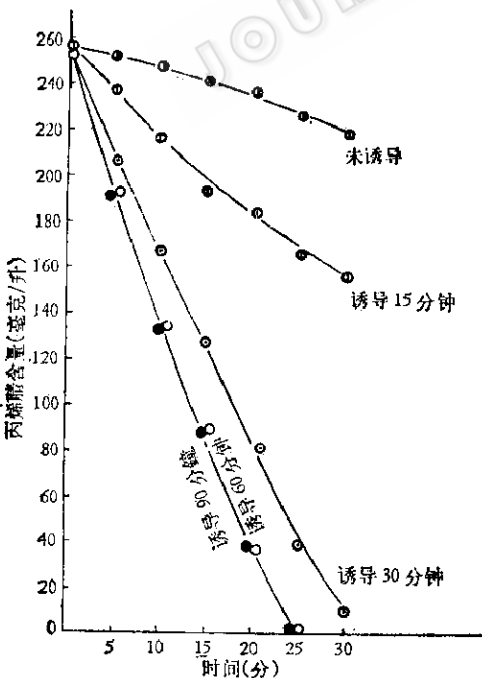


图 7 诱导时间对丙烯腈降解的影响

表 3 pH对丙烯腈降解活性的影响
(反应温度 37°C)

pH 值	细胞的丙烯腈降解活性 f 值 (毫升/毫克细胞·小时)	粗酶液的丙烯腈降解活性 f 值 (毫升/毫克蛋白质·小时)
2	0.5392	0.3305
4	2.4163	1.0228
6	4.2419	6.3490
6.5	4.5240	8.3983
8	4.5439	8.4231
9	4.5439	8.3049
10	1.0624	8.3828
11	1.0175	6.7626

胞部分的无细胞提取液、颗粒部分和溶液部分(粗酶液)都具有不同程度的丙烯腈降解活性, 试验表明, 该菌的丙烯腈降解酶是细胞内酶, 其酶系主要分布于细胞的可溶性部分。此外, 我们又测定了溶液部分的米氏常数, 如图 8 所示, 当反应温度为 28°C, 在 pH 8 磷酸缓冲液中, 丙烯腈浓度在 300 毫克/升以下测定丙烯腈降解速度和浓度的关系, 按 Michaelis-Menten 方程式计算, 求得丙烯腈降解酶的 K_m 值大约

等于 2.2×10^{-2} 克分子/升, 该值与 Arnaud^[5]报道的短杆菌中乙腈水解酶的 K_m 值, 约为 2.5×10^{-2} 克分子/升 (25°C) 相接近。

表 4 温度对丙烯腈降解活性的影响
(反应 pH8)

温度 °C	细胞的丙烯腈降解活性 f 值 (毫升/毫克细胞·小时)	粗酶液的丙烯腈降解活性 f 值 (毫升/毫克蛋白质·小时)
5	0.0464	0.6756
15	0.4711	1.9369
25	1.6370	4.0436
37	5.3755	8.4274
45	3.2700	11.7300
55	1.6033	10.5513
65	0.0553	3.3115

表 5 丙烯腈降解酶的分布*

不同部位		丙烯腈降解活性 f 值 (毫升/毫克蛋白质·小时)
培养基上溶液		0
细胞部分	无细胞提取液	7.792
	颗粒部分	1.91
	溶液部分	10.22

* 反应条件: 温度 37°C, pH 8。

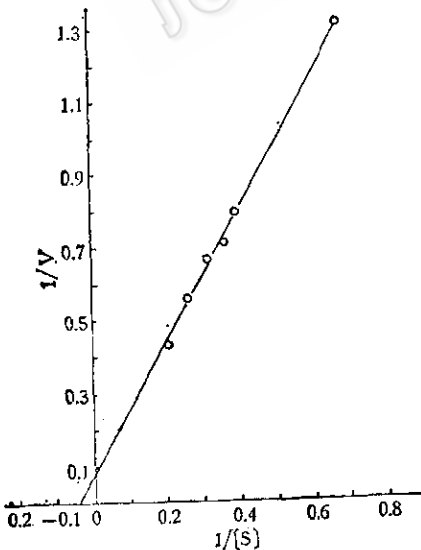


图 8 25°C 测定的 K_m 值

参 考 文 献

- [1] Fukuda, Y, et al.: *J. Ferment. Technol.*, 51(6): 393—397, 1973.
- [2] Harper, D. B.: *Biochem. J.*, 165(2): 309—319, 1977.
- [3] Harper, D. B.: *Biochem. J.*, 167(3): 685—692, 1977.
- [4] DiGeronimo, M. J. et al.: *Appl. and Environ. Microbiol.*, 31(6): 900—906, 1976.
- [5] Arnaud, A. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41(11): 2183—2191, 1977.
- [6] Yamada, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57(1): 8—14, 1979.
- [7] 中国科学院微生物研究所污水微生物研究组: *微生物学报*, 17(3): 223—230, 1977年。
- [8] 清水达雄等: *醸工*, 47(10): 639—643, 1969.
- [9] 中国科学院大连化学物理研究所: *气相色谱法*, 科学出版社, 1973年。
- [10] 潘家秀等编著: *蛋白质化学研究技术*, 科学出版社, 1962年。

INDUCED FORMATION OF ACRYLONITRILE DEGRADATION ACTIVITY IN *NOCARDIA CORALLINA* No.11

Yang Huifang Xie Shuhua Jia Sungfen
Zhang Hunyi Xian Haijiu Wang Baojiu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Nocardia corallina No. 11 is capable of utilizing acrylonitrile, N-propyl cyanide, dimethylaminopropionitrile, acetamide and acrylamide as sources of carbon and nitrogen for growth. But other nitriles as acetonitrile, benzylocyanide, β - β' oxydipropionitrile and 2-hydroxy-propionitrile support growth but only as a source of nitrogen.

The results of respiratory experiments showed that in acrylonitrile substrate the O_2 uptake by acrylonitrile-adapted cells is six to seven times higher than by unadapted cells. In substrate containing acrylamide or acrylic acid the O_2 uptake by the acrylonitrile-adapted cells is also higher than that by unadapted cells. It is supposed that these compounds may be the intermediate metabolites of acrylonitrile. In substrates containing other nitriles O_2

uptake by acrylonitrile-adapted cells is lower than in acrylonitrile. So that, the increase of O_2 uptake results from induction. The adapted cells are able to resist high concentration of acrylonitrile. The O_2 uptake is decreased when the concentration of acrylonitrile is higher than 20,000 mg/l. The high acrylonitrile-degrading ability can be produced within one hour when 100 mg/l acrylonitrile is used for induction in growing culture. Under optimum conditions the nitrile-degrading activity is 4—5 ml/mg cell·hr, but the activity is 8—11 ml/mg protein·hr in cell-free extracts. The acrylonitrile-degrading enzyme is an intracellular enzyme. It is mainly localized in soluble part of cytoplasm. The Michaelis constant K_m for acrylonitrile-degrading enzyme is about $2.2 \cdot 10^{-3}$ M at 25°C.