

微生物转化丙烯腈生产丙烯酰胺

1. 菌种筛选及丙烯腈的微生物转化

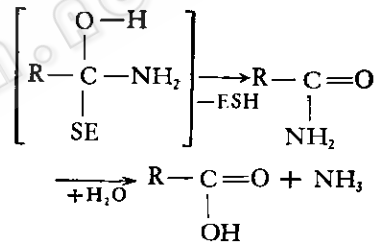
李文忠 张鸿翼 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从长期被腈化物污染的土壤及含腈废水中筛选到 97 株腈化物的同化菌, 其中丁腈同化菌 ZBB-21 休眠细胞显示了很高的丙烯酰胺形成活性, 经鉴定该菌为棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.)。研究了该菌的最适生长条件, 及其休眠细胞的最适水合反应条件。在选定条件下, 连续反应 4.5h, 反应液中积累丙烯酰胺达 270g/L, 并且未检测出丙烯酸的生成。丙烯腈转化率和丙烯酰胺形成选择性均接近 100%。

关键词 丙烯酰胺生产; 丙烯腈的微生物转化

聚酰胺化合物, 特别是聚丙烯酰胺, 在石油开采、冶金选矿、纺织和造纸工业及废水处理中应用日益广泛。做为聚丙烯酰胺单体的丙烯酰胺的生产, 一直受到人们的极大关注。从 50 年代至今, 以丙烯腈为原料生产丙烯酰胺的工艺, 经历了包括硫酸化学水解、含还原铜金属催化剂的化学水合及微生物腈水合酶转化的三个发展阶段^[1]。微生物酶法与化学法相比, 在丙烯腈转化率、丙烯酰胺形成选择性、产物产率和质量以及设备投资等方面都具有显著的优越性^[2]。在国外, 应用微生物酶法生产丙烯酰胺的研究相当活跃, 先后筛选到绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*)、红球菌 (*Rhodococcus* sp.) N-774, 短杆菌 (*Brevibacterium* sp.) 321 等丙烯酰胺高产菌株, 其中红球菌 N-774 已应用于工业化生产丙烯酰胺工艺中^[1-4]。同时对腈水合酶催化丙烯腈形成丙烯酰胺的反应机理也进行了阐述^[3-5]。

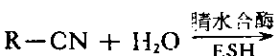


目前, 我国应用微生物酶生产丙烯酰胺的研究刚刚起步。我们分离筛选到五株腈水合酶活力高、酰胺水解酶活力低, 并且回收生物量较高的丙烯酰胺生产菌株。其中棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) ZBB-21 在生理学特性及丙烯酰胺形成能力方面显示了实际应用的潜力。本文对菌的培养条件及水合丙烯腈形成丙烯酰胺的最适反应条件进行了研究。

材料和方法

(一) 菌种来源

样品采集于被腈化物长期污染的土壤及含腈废水处理构筑物中。



本文于 1989 年 5 月 7 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

(二) 培养基

1. 富集培养基(g/L)葡萄糖 0.5, 蛋白胨 1.0, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 丙腈、丁腈或戊二腈 0.5, pH 7.0。

2. 平板和斜面培养基: 以 0.5% 可溶性糊精为碳源的半牛肉膏细菌琼脂培养基, pH 7.0。

3. 筛选和发酵培养基: 含 0.5% 的适宜碳源分别以 0.5% 丙腈、丁腈或戊二腈为氮源的 Yamada 培养基^[6] pH 7.0。

4. 二级种子培养基: 除以 0.3% 腈化物为氮源外, 其它成分与筛选培养基相同。

(三) 腈同化菌的分离

将采集的样品分别接入以 0.05% (V/V) 丙腈、丁腈或戊二腈为氮源的富集培养基中, 28℃ 摇床 (200r/min) 培养三天。经过二次富集培养后, 按 10% 接种量接入含相应腈的筛选培养基中, 封口培养, 以培养物稀释液在平板上划线分离, 挑取单菌落于斜面培养基上生长并保存。活化斜面种子, 并转接到含相应腈的筛选培养基中培养。以生物量为指标分离出相应的同化菌。

(四) 休眠细胞丙烯酰胺形成活力的测定

将发酵液于低温下离心 (Beckman K 70D 离心机, 5000×g, 30min) 收集菌体, 用生理盐水洗涤并离心, 按 40g/L (干重) 的浓度悬浮于 1/15mol/L (pH 7.0) 的磷酸缓冲液中。将含 25mmol 丙烯腈的 25ml 休眠细胞反应液于 25℃ 反应 60min, 离心除细胞以终止反应。用高效液相色谱仪 (HPLC 201, Waters Inc.) 测定反应液中丙烯酸 (AA)、丙烯酰胺 (AM) 和丙烯腈 (AN) 的含量^[7]。规定在一分钟内催化丙烯腈生成 1μmol 丙烯酰胺所需细胞量定义为一个丙烯酰胺形成活力单位。

(五) 丙烯酰胺的积累

按选定的细胞浓度, 制备一定体积的休眠细胞反应液, 在规定反应温度下, 每反应 30min 后按 400mmol/L 加入丙烯腈, 取样并离心, 测定上清液中丙烯酰胺积累量。

(六) 生物量测定

取发酵液 0.5ml, 稀释至 5.0ml, 以相同稀释量的培养基为对照, 在 460nm 测定吸光度 A, 并校正为细胞干重。

(七) 试剂

丙烯酰胺为 E. Merck 产品, 重结晶纯化; 丙烯腈和丙烯酸为国产市售试剂, 经蒸馏纯化。其余化学试剂均为 AR 级。

结 果

(一) 腈同化菌的初筛

将平板分离到的 97 个斜面纯培养接入含腈化物的筛选培养基中, 以生物量为指标获丙腈同化菌 4 株, 丁腈菌 9 株和戊二腈菌 9 株。

(二) 丙烯酰胺生产菌的筛选

将上述 22 株腈同化菌分别接到含 0.5% 相应腈化物的筛选培养基中, 28℃ 摇床培养 3 天, 离心后测定细胞的丙烯酰胺形成活力 (表 1)。丙腈和丁腈同化菌显示了高的丙烯酰胺形成活性, 戊二腈同化菌的能力较低。

将活力大于 0.1u 的 9 株菌进行复筛, 结果得到五株丙烯酰胺形成活力高、且生物量大的丙烯酰胺生产菌。将丁腈同化菌编号为 ZBB-21、ZBB-22 及 ZBB-41; 丙腈同化菌为 ZBP-12、ZBP-21, 以其中的 ZBB-21 为代表株, 进一步研究菌的最适培养条件及休眠细胞的转化反应条件。

(三) 丙烯酰胺生产菌的鉴定

将上述五株菌进行了分类学鉴定, 按 Bergey's 细菌鉴定手册第八版^[8], ZBB-21 和 ZBB-41 为棒状杆菌, ZBB-22 为节杆菌 (*Arthrobacter*), ZBP-12 和 ZBP-

表 1 腈同化菌的丙烯酰胺积累能力

Table 1 Acrylamide accumulation by nitrile-metabolizing microorganisms

生长底物 Growth substrate	分离菌株数 No. of strains	积累丙烯酰胺的菌株数 No. of acrylamide accumulating strains		
		丙烯酰胺形成活性 Acrylamide forming activity(u)		
		<0.1	0.1—0.3	>0.3
丙腈 Propionitrile	4	2	0	2
丁腈 Butyronitrile	9	5	1	3
戊二腈 Glutaronitrile	9	6	3	0

21为克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella* sp.)。其中具有脲水合酶活性,并能将脲化物水合形成酰胺的棒状杆菌属和节杆菌属已有报道^[2,3,11],而克雷伯氏杆菌属为首次报道。

(四) 棒状杆菌 ZBB-21 的培养条件

1. 碳源和氮源对菌生长及丙烯腈转化率的影响: 在以 0.75% 丁腈为氮源的发酵培养基中,对 12 种有机碳源 (1%) 进行了研究。可溶性淀粉、糊精、半乳糖、葡萄糖及柠檬酸钠都可做为 ZBB-21 的碳源,其中糊精为最适碳源 (表 2)。最适碳源浓度实验表明,当浓度为 1.0—1.5% 时,可得到高而稳定的生物量。氮源试验表明 (表 3),该菌可以乙腈、丙腈、丁腈和异丁腈为生长氮源,丁腈最好。酵母膏等虽能促进细胞生长,但无酰胺形成活性 (表 3)。

2. 温度和 pH 对 ZBB-21 菌生长及丙烯腈转化率的影响: 该菌对培养温度较敏感,其最适生长温度为 28℃。培养基的 pH 为 6—8 时,生物量及转化率均最高,即使 pH 为 10 时,细胞生长受到部分抑制,但丙烯腈转化率不变,这对实际应用非常有利。

3. 培养时间对生物量及酰胺形成活力的影响: 结果如图 1 所示。该菌在最适条件下,几乎不存在停滞期而迅速进入对数

表 2 碳源对 ZBB-21 菌体生长及丙烯腈转化率的影响

Table 2 Effect of carbon source on biomass and transforming rate of acrylonitrile

碳源 Carbon source	生物量 Biomass (mg dry wt./ ml culture)	丙烯腈转化率 Transforming rate (%)
Dextrin	1.54	100
Starch	1.64	52.8
Galactose	1.21	100
Glucose	1.01	100
Sucrose	0.70	100
Maltose	0.02	—
Fructose	0.02	—
Glycerol	0.64	100
Mannitol	0.80	100
Citrate. Na ₃	1.15	100
Acetate. Na ₂	0.86	100
Succinate. Na ₂	0.80	100
None	0.83	78.0

“—” No tested

期,稳定期也不明显。在 72 小时前,酰胺形成活力与菌生长正相关,72 小时达最大。继续培养,生物量有所下降,但其活力不变。该菌这一特性对催化水合丙烯腈生产丙烯酰胺的工业化生产是有益的。

4. 通气量对菌生长的影响: 在 250ml 带塞三角瓶中,分别装入不同量的按 2.0% (V/V) 接种的发酵培养基,在最适条件下

表 3 氮源对 ZBB-21 菌生长及丙烯腈转化率的影响

Table 3 Effect of nitrogen source on biomass and transforming rate of acrylonitrile

氮源 Nitrogen source	生物量 Biomass (mg dry wt./ ml culture)	丙烯腈转化率 Transforming rate (%)
Acetonitrile	0.67	100
Propionitrile	1.01	100
n-butyronitrile	1.39	100
Isobutyronitrile	0.78	100
Acrylonitrile	0.02	—
Succinonitrile	0.41	0
Adiponitrile	0.10	0
Glutaronitrile	0.34	12.4
Yeast extract	2.28	0
Polypepton	1.85	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.26	0
NaNO ₃	0.08	—
None	0.007	—

表 4 菌龄和接种量对发酵液中生物量的影响

Table 4 The effect of age and inoculum volume of strain on the biomass

接种量(%) Inoculum volume	A ₄₆₀		
	24h	48h	72h
2	1.16	0.94	0.42
5	1.14	0.96	0.43
10	1.14	0.82	0.60

(五) 棒状杆菌 ZBB-21 休眠细胞生产丙烯酰胺的反应条件

1. 反应的最适温度和 pH: ZBB-21 菌细胞转化丙烯腈生产丙烯酰胺反应的最适温度为 25°C, 最适 pH 为 7.0。此外, 还研究了反应温度对 ZBB-21 连续转化反应中丙烯酰胺积累量的影响。结果表明, 产物积累浓度与反应温度呈负相关(图 2)。这是由于腈水合酶的底物抑制特性所致。

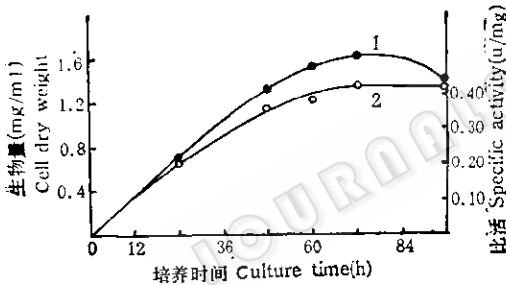


图 1 生物量、酰胺形成活力与培养时间的关系

Fig. 1 The relationship between biomass, forming activity of acrylamide and culture time

1. 生物量 Biomass; 2. 比活力 Specific activity

培养三天, 测定 A₄₆₀。当培养基装量为 125ml 时, 生物量最大。

5. 菌龄和接种量对生物量的影响: 将 48 小时菌龄的斜面培养物接入二级种子培养液中, 在 28°C 摇床上分别培养 24、48 和 72 小时, 按 2%、5%、10%(V/V) 接种量分别接入发酵培养基中, 28°C 培养 3 天, 测定 A₄₆₀。结果(表 4)表明, 菌龄为 24 小时的二级种子液、2% 接种量为宜。

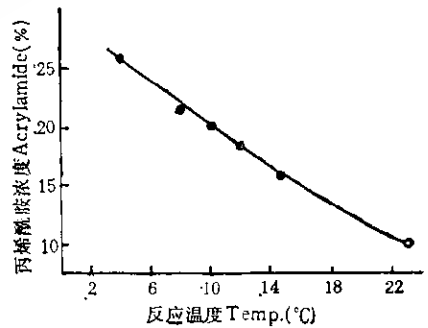


图 2 反应温度对产物积累的影响

Fig. 2 Effect of reaction temperature on accumulation of acrylamide

2. 细胞浓度对转化率的影响: 结果表明, 当细胞浓度在 20g/L 以上时, 在规定的反应条件下均可将 1.0mol/L 的丙烯腈完全转化为丙烯酰胺, 并且未检出丙烯酸生成。用不同的细胞浓度进行连续转化反应, 积累丙烯酰胺的结果如图 3 所示。当细胞浓度为 20g/L 时, 在有效反应时间 2.5 小时中获得 17.5% 的丙烯酰胺的积累;

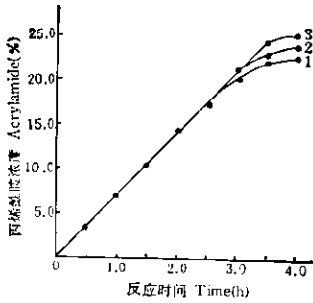


图3 细胞量对丙烯酰胺积累的影响

Fig. 3 Effect of biomass on accumulation of acrylamide

1. 20g/L; 2. 30g/L; 3. 40g/L

30g/L, 3 小时, 产物浓度为 21%; 40g/L, 3.5 小时, 产物浓度 24.2%。

(六) 应用棒状杆菌 ZBB-21 休眠细胞连续反应生产丙烯酰胺

图4表明,应用 ZBB-21 细胞连续反应生产丙烯酰胺的时间过程。将含 4g 细胞(干重)、40mmol 丙烯腈、1/15mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 的混合液(总体积100 ml),于 4℃ 振荡反应,每隔 30min 加入 40mmol 丙烯腈,同时取样分析丙烯腈、丙烯酰胺和丙烯酸含量。连续反应 4.5 小时后,反应液中积累丙烯酰胺约 270g/L,在整个反应中均未检出丙烯酸。

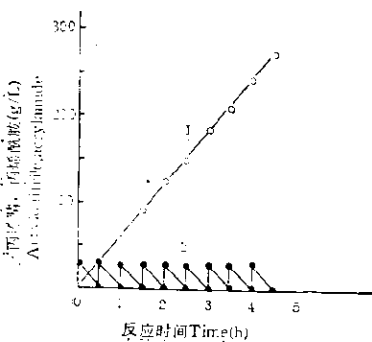


图4 ZBB-21 细胞连续反应积累丙烯酰胺的时间过程

Fig. 4 The time course of acrylamide production with *Corynebacterium* ZBB-21 cell

1. Acrylamide; 2. Acrylonitrile

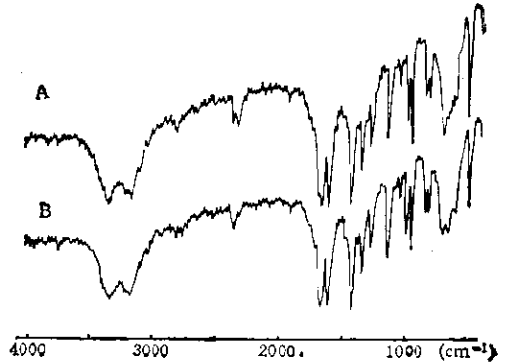


图5 红外光谱图

Fig. 5 The infrared of standard and isolated acrylamide

A. Standard acrylamide; B. Isolated acrylamide

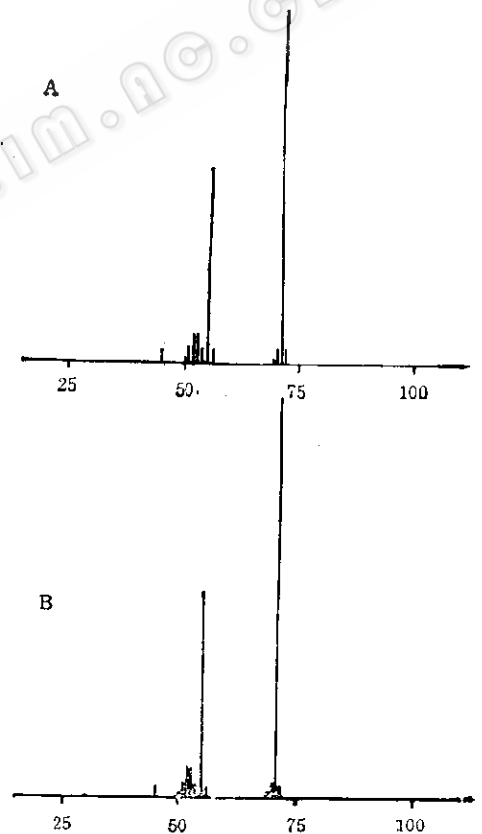


图6 质谱图

Fig. 5 The mass spectrum of standard and isolated acrylamide

A. Standard acrylamide; B. Isolated acrylamide

(七) 反应液中产物分析

将反应混合液离心除菌体,冷干上清液,再用甲醇溶解,抽滤(0.5 μ),除去不溶杂质。溶液于低温真空干燥后,再用温热甲醇溶解,置4 $^{\circ}$ C析出无色针状晶体,抽滤,干燥。晶体的红外光谱、质谱图与标准丙烯酰胺的完全一致(图5,图6)。证明棒状杆菌 ZBB-21 水合丙烯腈的产物确为丙烯酰胺。

讨 论

ZBB-21 菌腈水合酶最适反应温度为25 $^{\circ}$ C,但在连续转化反应积累丙烯酰胺的实验中发现,随着反应温度的提高,产物积累终浓度反而下降。其原因除在较高温度下形成的丙烯酰胺发生自聚作用之外,丙烯腈对酶的抑制作用也是一个主要原因。Arnaud 等研究证明,腈水合酶的活性中心含有巯基(-SH),并且是酶活性的必需基团^[12]。Asano 对绿针假单胞菌 B23 的研究也证实了这一点^[4]。丙烯腈是腈水合酶的底物,又是巯基的专一性修饰剂^[13]。在较高温度下,腈水合酶活性中心的巯基会被丙烯腈掩蔽。因此控制较低温度,是利用具有腈水合酶活性的休眠细胞转化丙烯腈

生产丙烯酰胺的一个重要条件。

应用棒状杆菌 ZBB-21 休眠细胞反应生产丙烯酰胺,其底物转化率和产物形成选择性均接近100%,丙烯酰胺积累量达到270g/L,产物纯度高,反应条件温和,比化学法具有明显的优越性。

参 考 文 献

- [1] Commeyras, et al.: United States Patent, 4,001,081, 1977.
- [2] 渡辺一郎: 有机合成化学,46(2): 169, 1988.
- [3] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44(9): 2251, 1980.
- [4] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46(5): 1183, 1982.
- [5] 山田秀明: 發酵工業,41(11): 926,1983.
- [6] Yamada, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58(6): 495, 1980.
- [7] 李文忠等: 色谱,7(3): 167,1989.
- [8] Holding, A. J. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., (ed. Buchanan, R. E. et al.), The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [9] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46(5): 1165, 1980.
- [10] Mimura, A. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 47: 631, 1969.
- [11] Fukuda, Y. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 49: 1011, 1971.
- [12] Arnaud, A. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41: 2183, 1977.
- [13] Carins, J. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 243: 3357, 1960.

THE PRODUCTION OF ACRYLAMIDE BY MICROBIAL CONVERSION OF ACRYLONITRILE

I. SCREENING OF STRAINS AND BIOCONVERSION OF ACRYLONITRILE

Li Wenzhong Zhang Hongyi Yang Huifang

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

Production of acrylamide by the microbe cells containing nitrile-hydratase has been investigated. A number of nitrile-metabolizing strains were screened according to the biomass and the enzyme activity of intact cells. A butyronitrile-metabolizing bacterium, strain ZBB-21, showed the highest productivity of acrylamide among 97 strains tested. The strain was identified as *Corynebacterium*. The culture and reaction conditions for acrylamide production were studied. Under optimum con-

ditions, 270 g/L of acrylamide was accumulated in the reacting solution through a continual reaction for 4.5 h, and no acrylic acid was found. The conversion rate of acrylonitrile and acrylamide yield were nearly 100%.

Key words

Acrylamide production; Microbial conversion of acrylonitrile