

不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.) 51-2 降解乙腈的研究*

谢树华 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

腈类化合物对人、畜及微生物等均有毒性,但可驯化某些微生物赋予分解这些物质的能力使之降解。1980年, Jalleges 对腈的生物转化作了综述^[1]。70年代, Firmin 等报道了假单胞菌 (*Pseudomonas*) 降解乙腈的代谢途径^[2], 随后 Asano 用节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) J-1 进行了乙腈酶的研究^[3], Miller 报道了短杆菌 (*Brevibacterium*) R313 酰胺酶的研究^[4]。本文研究了不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.) 51-2 对乙腈的降解特性并检测了降解产物, 为生物解毒和开发一些化工产品提供了依据。

材料和方法

(一) 菌种来源

用本组分离的 14 株细菌, 以乙腈作为碳源 (2g/L) 进行驯化, 获得一株降解乙腈的菌株, 编号为 51-2 号。

(二) 培养基成份 (g/L)

基础培养基 K_2HPO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $NaCl$ 1, 微量元素 1ml, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0—7.2; 分离菌种时再加入乙腈 2g/L; 碳源实验时在基础培养基中补加 $(NH_4)_2SO_4$ 0.5; 氮源实验时在基础培养基中加入 10g/L 的糊精。

(三) 完整细胞的收集

实验的各组均按 4% 接种量接种, 28℃ 振荡培养 (180r/min) 48 小时后, 冷冻离心 (5000r/min) 20min 收集细胞, 用 pH 8.0 磷酸缓冲液洗两次, 并悬浮于此缓冲液中备用。

(四) 分析方法

1. 乙腈、乙酰胺、乙酸: 用日本岛津 GC-7AG 型气相色谱仪测定^[5]。

2. 细胞蛋白量用费林-酚试剂显色法测定^[6], 用贝克曼 pH 计测定 pH。

3. G + C% 测定: 采用 SSC 系统在紫外分

光光度计上测定 T_{260} 值, 以大肠杆菌做标准菌株^[7]。

试验结果

(一) 51-2 号菌株的分离和鉴定

51-2 号菌株为革兰氏阴性菌, 在牛肉汁斜面上培养 18 小时细胞呈类似球形的短杆状, 直而端圆, 无芽孢, 不含内含物。该菌在含乙腈的合成培养基中生长良好, 在牛肉汁平板上菌落呈乳白色圆形, 边缘整齐, 不透明, 表面光滑湿润, 培养 48 小时, 直径为 0.2—0.3cm, 凸起, 易挑起。对葡萄糖发酵, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, VP 阴性, 不产吲哚及 H_2S , 严格好氧, 具有明显的抗青霉素的能力, G + C% 为 40—42 克分子。

根据上面特征鉴定 51-2 号菌为不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)^[8]。

(二) 不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.) 51-2 利用乙腈的适宜条件

1. 实验了包括乙腈在内的 10 种不同有机腈化合物作为氮源, 糊精作为碳源, 其生长情况见表 1。

该菌利用乙腈和丙烯腈作为碳源的结果示于表 2。实验表明该菌也可利用乙腈作为碳源。

2. pH 对菌利用乙腈的影响见图 1。该菌从 pH 4—13 都能利用乙腈, 最佳生长 pH 为 7—8。

(三) 不动杆菌 51-2 对乙腈的降解

1. 51-2 号菌生长过程中对乙腈的降解: 从图 2 看出, 乙腈浓度为 3g/L 时, 菌体蛋白量最高, 乙腈可全部去除; 乙腈浓度低于 25g/L 时, 乙腈去

本文于 1989 年 1 月 12 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

乙腈、乙酸、乙酰胺的分析工作, 由苏京军、白文响协助完成, 特此致谢。

表 1 以不同有机腈化合物作氮源对菌的生长情况

腈化物名称	腈化物加量 (g/L)	细胞蛋白含量 ($\mu\text{g/ml}$)		
		实验1	实验2	实验3
苯甲腈	0.5	332	314	296
乙腈	3	492	452	470
苯乙腈	0.5	344	348	32
丙腈	0.5	384	404	412
3-甲氧基丙腈	0.5	128	128	210
丙烯腈	0.5	410	434	432
丁腈	0.5	440	370	382
丁二腈	0.5	164	144	256
戊二腈	0.5	400	174	230
己二腈	0.5	200	88	164
对照(接种)	0	164	170	164
空白(不接种)	0	0	0	0

表 2 51-2 菌株以两种腈类碳源时菌的生长 (以硫酸铵为氮源)

碳源	细胞蛋白含量 ($\mu\text{g/ml}$)
乙腈	460
丙烯腈	88
对照	0

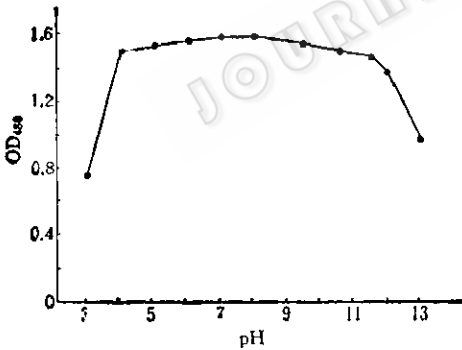


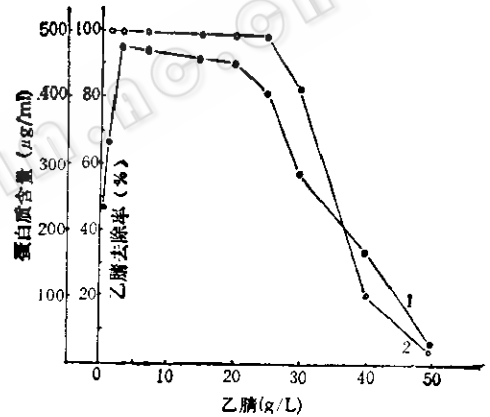
图 1 51-2 菌株在不同 pH 下的生长

除率均可达 99% 以上。当乙腈浓度为 40 g/L 时, 菌体蛋白量和乙腈去除率才有明显下降。

2. 完整细胞对乙腈的降解:

(1) 细胞浓度的影响见表 3。该菌降解乙腈的能力与速率和细胞的浓度有着直接关系。

(2) 不同培养条件下完整细胞对乙腈的降解如表 4。该菌降解乙腈的能力与细胞的适应作用有一定关系, 受乙腈适应的细胞降解乙腈的能力

图 2 51-2 号菌株对乙腈降解能力
1. 蛋白量; 2. 乙腈

比未适应的细胞强。

(3) 温度对乙腈降解的影响见表 5。该菌降解乙腈的温度范围很广, 从 30—50℃ 的条件下均能将底物降解 99% 以上。

(4) 金属离子对降解的影响: 测定了 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 等 11 种金属离子对该菌降解乙腈的影响。实验表明, 该菌降解乙腈对金属离子的耐受能力较强。离子浓度为 20 mg/L 时, 降解乙腈能力不受影响, 50 mg/L 时, 除 Pb^{2+} 以外, 其它 10 种离子并未显示出抑制细胞降解乙腈的能力。

(5) 乙腈降解产物: 为了弄清该菌降解乙腈过程中的中间产物, 要求减慢反应速度和提高底

表3 细胞浓度对乙腈去除能力的影响

反应时间 (min)	5(mg/ml)		10(mg/ml)		20(mg/ml)		30(mg/ml)		40(mg/ml)	
	去除量 (mg/L)	去除率 (%)	去除量 (mg/L)	去除率 (%)	去除量 (mg/L)	去除率 (%)	去除量 (mg/L)	去除率 (%)	去除量 (mg/L)	去除率 (%)
2	90.7	1.8	1069.5	21.57	2092.8	42.2	3378.9	68.13	4372.9	88.17
6	2173.2	43.82	2705	54.54	3087	62.25	4152.5	83.73	4654.4	93.88
10	2469.7	49.8	3134.9	63.21	3434.1	69.24	4590.2	92.56	4922	99.25
15	2819.4	56.85	3234.9	65.23	3624.7	73.09	4898.8	98.78	4959.4	100
20	3360	67.75	3641.5	73.43	4069.5	82.66	4959.4	100	4959.4	100

* 底物浓度 4959.4 mg/L

表4 细菌的培养条件对乙腈降解的影响

培养条件	乙腈降解量 (mg/L)	乙腈去除率 (%)
牛肉汁蛋白胨	2689.5	83.2
糊精	1389.1	43
乙腈	3233.4	100
牛肉汁蛋白胨 + 1g/L 乙腈	3233.4	100
牛肉汁蛋白胨 + 2g/L 乙腈	3233.4	100
牛肉汁蛋白胨 + 3g/L 乙腈	3233.4	100

* 底物浓度: 3233.4 g/L

表6 细菌降解乙腈的代谢产物

反应时间 (min)	乙腈降解量 (mg/L)	乙酰胺形成量 (mg/L)	乙酸形成量 (mg/L)
2	8240	41	6100
5	8428	48	5102
11	8640	52	5080

具有实际应用的价值,更具有变害为利的意义。

参 考 文 献

- [1] Jallageas, J. G. et al.: *Advances in Biochemical Engineering* (Ed. A. Fiechter), New York, p. 1—32, 1980.
- [2] Firmin, J. et al.: *Biochem. J.*, 158(2): 223—229, 1976.
- [3] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44(9): 2251—2252, 1980.
- [4] Miller, J. M. et al.: *Fems. microbiol. lett.*, 21(2): 147—151, 1984.
- [5] 乐华爱等: *微生物学报*, 27(2): 105—109, 1987.
- [6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [7] 周慧玲: *微生物学报*, 18(2): 134—139, 1978.
- [8] *Brisou, J. et al.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (Krieg, N. R. et al.), The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1: 303, 1984.

表5 不同反应温度对降解乙腈的影响

反应温度 (°C)	乙腈起始浓度 (mg/L)	乙腈剩余量 (mg/L)	乙腈去除率 (%)
30	4065.7	1.1	99.97
37	6382.9	5.6	99.12
43	5043.4	1.9	99.96
50	5155.4	1.5	99.97

物浓度,为此实验降低了反应细胞的浓度(5mg/ml),并提高底物乙腈的反应含量(10g/L),于37°C进行反应。从表6可看出,该细胞降解乙腈的速率相当高,同时能产生乙酰胺和大量乙酸。这一特性对于回收上述两种产品,尤其是乙酸,不仅

DEGRADATION OF ACETONITRILE BY *ACINETOBACTER* SP. 51-2

Xie Shuhua Yang Huifang

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

A strain of *Acinetobacter* sp. 51-2 was capable of degrading acetonitrile and utilizing various nitrile compounds, such as propionitrile, butyronitrile, acrylonitrile and so on. The ability and speed of degrading acetonitrile were quite strong and fast. Strain 51-2 could degrade 25 g/L acetonitrile in 48 h by adapted cells. The efficiency of degrading acetonitrile was closely related to the condi-

tions of culturing bacterial cells. The reaction temperature and present metals appeared to have a little effect on degradation of acetonitrile.

Key words

Acinetobacter; Acetonitrile; Degradation

JOURNALS.IM.AC.CN