

生物法生产丙烯酰胺过程中腈水合酶的抑制和失活

高毅, 刘铭, 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084)

摘要: 为改进生物法生产丙烯酰胺工艺, 研究了腈水合酶催化丙烯腈水合生产丙烯酰胺过程中影响腈水合酶反应速率和酶失活的因素. 实验证明, 水合过程中体系 pH 值的变化基本不影响酶反应速率; 底物丙烯腈的浓度低于 10 g/L 时, 酶反应速率与底物浓度成正比, 大于 75 g/L 后, 对酶有抑制作用; 产物丙烯酰胺显著抑制腈水合酶的活性; 菌体细胞内可能存在可以稳定腈水合酶的物质, 胞内的腈水合酶在 40℃ 下的半衰期可以达到 59.9 h; 丙烯酰胺与温度的协同作用是腈水合酶失活的重要原因.

关键词: 丙烯酰胺; 腈水合酶; 失活

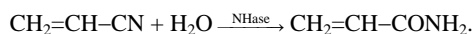
中图分类号: Q559.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2005)02-0193-04

1 前言

腈水合酶(Nitrile Hydratase, NHase)可以催化丙烯腈(Acrylonitrile, AN)水合生成丙烯酰胺(Acrylamide, AM)^[1,2]:



工业上生物法生产丙烯酰胺要求丙烯酰胺水溶液的浓度不低于 500 g/L^[3], 但在水合过程中, 酶反应速率随着催化反应的进行而降低, 使产物丙烯酰胺积累到 300~400 g/L 后就不再继续增加^[4,5], 常需通入热空气浓缩至 500 g/L 以上, 耗能很大, 而且高温容易使丙烯酰胺分解和发生聚合.

为了提高产物的终浓度, 目前进展较大的研究主要是高产物丙烯酰胺耐受性菌种筛选的工作^[5,6]. *Rhodococcus rhodochrous* J1 菌种催化丙烯腈水合的终浓度达到了 656 g/L^[5,7]. 国内报道的生物法生产丙烯酰胺终浓度的最高水平是 641 g/L^[8]. 另一方面, 在腈水合酶催化水合过程中, 体系中的 pH 值、底物丙烯腈浓度、温度和产物丙烯酰胺浓度等因素的变化都可能影响酶反应速率. 因此本工作研究了这些主要因素的影响规律, 有助于改进工艺, 提高水合过程的产物终浓度.

2 材料与方 法

2.1 菌种和培养基及腈水合酶的制备

实验所用的菌株是实验室保存的 *Norcadia* sp. RS 菌株. 培养基及酶制备方法参见参考文献[9]所述.

2.2 丙烯腈和丙烯酰胺浓度测定

丙烯腈和丙烯酰胺浓度用气相色谱 Shimadzu GC-9AM 测定, 色谱柱长 2 m, 内径 2 mm, 填料是 Porapak

Q. 色谱条件: 柱温 200℃, 进样室温度 240℃, FID 检测器 240℃, 载气 N₂ 流量 50 mL/min, 乙酰胺为内标物.

2.3 菌体浓度和腈水合酶活性测定

在 600 nm 波长下测定菌液的吸光度 OD₆₀₀, 根据 OD₆₀₀ 和菌体干重(Dry Cell Weight, DCW)的标准曲线计算菌体浓度(g/L). 经测定, 1 OD₆₀₀ 相当于 0.175 g/L 的菌体干重.

腈水合酶活性定义为 28℃ 下生成 1 μmol/min 丙烯酰胺的酶量为 1 个活性单位(IU). 在三角瓶中加入 pH 7.2、浓度为 25 mmol/L 的磷酸钾缓冲液 18 mL 和菌液或腈水合酶溶液 1 mL, 28℃ 下预热 10 min, 加入 1000 μL 丙烯腈, 200 r/min 振荡反应 5 min, 用 1 mL 盐酸(4 mol/L)终止反应, 测定丙烯酰胺生成量. 以下实验中, 除特殊说明, 都按照以上条件.

2.4 样品制备方法

菌体重悬液: 将 RS 菌株发酵培养 72 h 后冷冻离心(10000 g, 10 min, 4℃), 收获菌体, 用 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液(25 mmol/L, pH 7.2)重悬菌体回原发酵液体积, 测定菌液的腈水合酶活性.

腈水合酶粗提酶液的获得: 在冰浴条件下用超声破碎菌体, 功率 400 W, 超声时间 20 min, 冷冻离心(10000 g, 10 min, 4℃), 取上清, 得到腈水合酶溶液(简称酶液), 测定酶液的腈水合酶活性.

3 结果与讨论

3.1 pH 值对酶反应的影响

在腈水合酶催化丙烯腈水合生成丙烯酰胺的过程中, 当反应体系中丙烯酰胺浓度从 0 升高到 500 g/L 时, pH 值相应地从 7.02 升高到 7.71, 如图 1.

收稿日期: 2004-03-26, 修回日期: 2004-07-16

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)资助项目(编号: 2003CB716007)

作者简介: 高毅(1981-), 男, 安徽青阳县人, 硕士研究生, 生物化工专业; 曹竹安, 通讯联系人, Tel: 010-62794666, E-mail: cza-dce@mail.tsinghua.edu.cn.

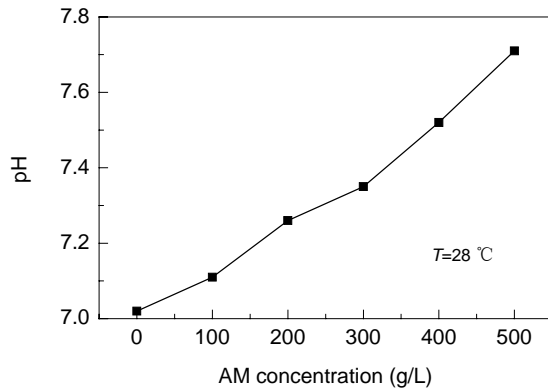


图1 反应体系 pH 值与生成丙烯酰胺浓度的对应关系
Fig.1 Relationship between pH value of the reaction system and synthetic AM concentration

为研究 pH 值对反应速率的影响, 利用不同 pH 值的 25 mmol/L 的磷酸钾缓冲液作为反应体系, 测定同一菌体重悬液中的脲水合酶酶活. 参考实际生产体系, 采用菌体重悬液, 不同 pH 值的反应体系中加入的酶量一致. 以 pH 7.2 的酶反应速率为 1, 求出不同 pH 值下的相对速率 r , 结果见图 2. 从图中可以看出, pH 值在 7~8 之间变化时, 脲水合酶的酶反应速率基本不受影响.

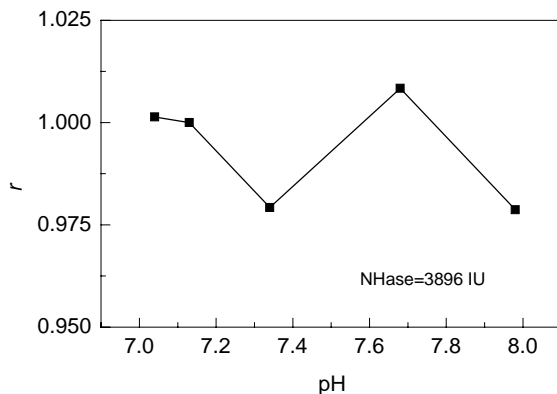


图2 pH 值对脲水合酶酶反应的影响
Fig.2 Effect of pH value on NHase reaction

3.2 丙烯腈浓度对酶反应的影响

丙烯腈浓度有两方面的影响, 低浓度时降低酶反应速率, 高浓度对酶反应有抑制作用. 实验测定了不同底物浓度下的脲水合酶的催化反应初速度. 为了更好地反映酶反应的初速度, 将反应时间减少到 1 min, 防止丙烯腈浓度较低时由于底物完全消耗而影响测量结果的准确. 考察相同的菌体悬浮液中的脲水合酶在不同的底物浓度下的酶反应速率, 以 50 g/L 时的酶反应初速率为 1, 求出不同底物浓度下的相对速率 r , 结果见图 3. 从图可以看出, 底物丙烯腈的浓度对于酶反应速率的影响比较显著. 底物浓度低于 10 g/L 时, 酶反应速率与底物

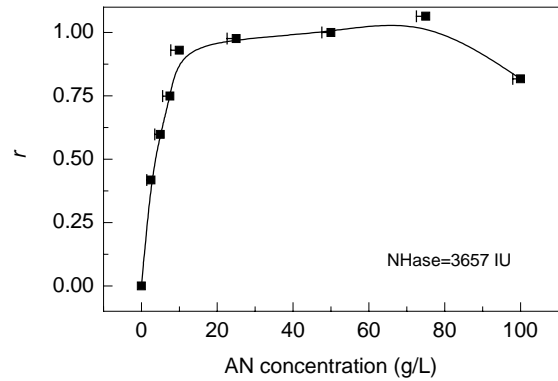


图3 丙烯腈初始浓度对脲水合酶反应速率的影响
Fig.3 Effect of initial AN concentration on NHase reaction velocity

浓度成正比, 底物浓度超过 75 g/L 后, 酶反应速率降低, 这说明高浓度的底物对于脲水合酶有抑制作用, 一定浓度(10~75 g/L)的丙烯腈有助于提高反应速率.

3.3 丙烯酰胺浓度对酶反应的影响

在初始的反应体系中加入一定浓度的产物丙烯酰胺, 反应后通过底物丙烯腈的减少量确定酶反应初速度. 为了排除温度的影响, 选择了较低的反应温度 10 °C. 研究对象是菌体悬浮液. 以丙烯酰胺浓度为 0 时的初速度为 1, 相对速率 r 与丙烯酰胺浓度的关系见图 4.

由图可以看出, 反应速率随着丙烯酰胺浓度增大而减小. 丙烯酰胺浓度为 100 g/L 时, 脲水合酶的表现活性仅为丙烯酰胺浓度为 0 时的 78.2%, 而当丙烯酰胺浓度达到 500 g/L 时, 表现酶活下降到 37.1%. 因此, 水合产生的产物丙烯酰胺对于脲水合酶有着较强的抑制作用, 这种抑制作用随着产物浓度的升高而增强.

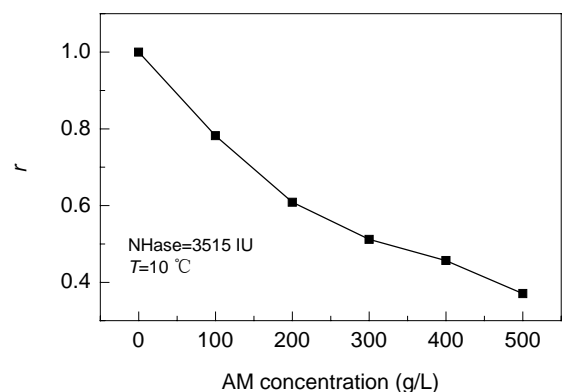


图4 丙烯酰胺浓度与酶反应速率的关系
Fig.4 Relationship between AM concentration and NHase reaction velocity

3.4 温度对脲水合酶的失活作用

大多数酶对热敏感, 在较高的温度下易变性失活. 为研究水合温度对于脲水合酶的影响, 将酶液(Enzyme

Solution, ES)和菌体重悬液(Cell Suspension, CS)在不同的温度下保温, 定时取样测量其酶活. 不同时刻的酶活与初始酶活的比值为相对酶活 r , 见图 5.

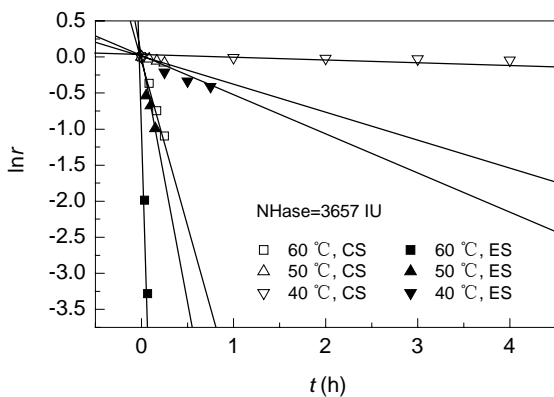


图 5 不同温度下酶液(ES)和菌体重悬液(CS)中脲水合酶的失活曲线
Fig.5 Deactivation curve of NHase in enzyme solution (ES) and cell suspension (CS) under different temperatures

从图可以看出, 在高温下, 脲水合酶的相对酶活迅速降低, 这说明温度导致脲水合酶失活. 在相同的温度下, 菌体重悬液的酶活衰减速率明显低于酶液, 这说明在菌体内可能存在可以稳定脲水合酶的物质. 图 5 表明, 脲水合酶的热失活过程是一级反应, 即:

$$\ln r = -kt. \quad (1)$$

失活半衰期为:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k. \quad (2)$$

由式(2)求得 40 °C 下菌体重悬液中脲水合酶的失活半衰期为 59.9 h. 催化过程中, 水合温度一般低于 40 °C, 水合时间也远少于 59.9 h. 因此, 实验结果证明, 菌体内的脲水合酶在水合条件下具有较好的热稳定性, 单纯

的温度因素不是导致脲水合酶失活的主要原因.

进一步通过 Arrhenius 公式:

$$\ln k = -E/RT + \ln A, \quad (3)$$

将 $\ln k$ 与 T^{-1} 拟合, 求得酶液和菌体重悬液中脲水合酶失活的活化能分别是 123.5 和 164.0 kJ/mol. 菌体重悬液中脲水合酶失活的活化能大于酶液, 说明胞内脲水合酶的失活对温度的升高更敏感, 这可能是由于温度升高对于胞内稳定组分有破坏作用.

3.5 丙烯酰胺与温度的协同作用

在脲水合酶细胞催化的水合过程中, 脲水合酶和丙烯酰胺有直接接触. 已知丙烯酰胺是一种可使蛋白质变性的物质, 可能使酶失活, 因此研究了丙烯酰胺与温度的协同作用.

研究测定了在不同温度、不同丙烯酰胺浓度下脲水合酶酶活随时间变化的曲线. 测定方法是将菌体悬浮在一定浓度和温度的丙烯酰胺溶液中, 定时取样, 将丙烯酰胺洗净测酶活. 以 0 时刻的初始酶活为 1, 图 6 是保持温度 28 °C, 丙烯酰胺溶液浓度 250 g/L 时脲水合酶的相对酶活 r 变化曲线, 可知 $\ln r$ 与时间 t 呈线性关系. 用式(1)求出失活常数 k , 不同丙烯酰胺浓度和温度下的失活常数 k 见图 7. 从图可以看出, 在相同的温度下, 随丙烯酰胺浓度增大, 脲水合酶的失活常数 k 也增大. 同时可以看出, 在相同的丙烯酰胺浓度下, 随温度升高脲水合酶的失活常数显著增大. 结合前文的结果可知, 在酶的失活过程中, 温度和丙烯酰胺具有协同作用.

由此可知, 丙烯酰胺和温度的协同作用也是使脲水合酶失活的重要因素, 这种因素的影响随着温度和丙烯酰胺浓度的升高而增强.

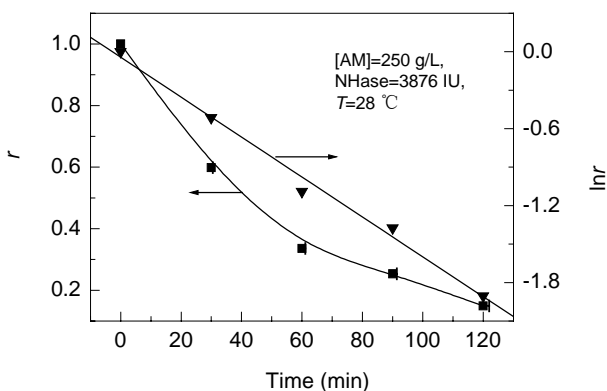


图 6 丙烯酰胺溶液浓度 250 g/L 时相对酶活 r 的变化
Fig.6 Change of relative activity with time

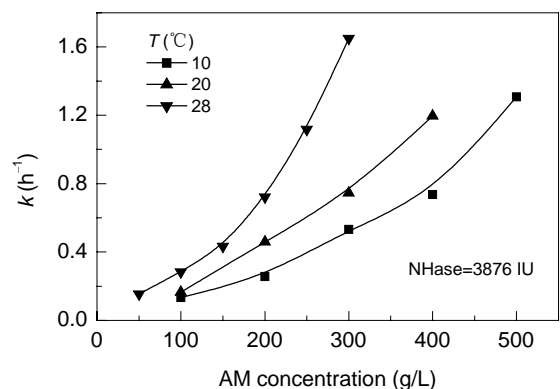


图 7 不同丙烯酰胺浓度和温度下脲水合酶的失活常数
Fig.7 Deactivation constant of NHase under different AM concentrations and temperatures

4 结论

(1) 水合过程 pH 值的变化对腈水合酶反应速率基本没有影响。

(2) 底物丙烯腈的浓度大于 75 g/L 时, 对酶有抑制作用。

(3) 高浓度丙烯酰胺对酶有抑制作用。

(4) 细胞内可能存在可以稳定腈水合酶的物质, 胞内酶在 40 °C 下的半衰期可以达到 59.9 h, 因此在水合过程中基本不会单纯因为环境温度而失活。

(5) 丙烯酰胺和温度的协同作用是腈水合酶失活的重要原因。

参考文献:

[1] Kobayashi M, Shimizu S. Nitrile Hydrolyses [J]. *Current Opinion Chem. Biol.*, 2000, 4(1): 95–102.

- [2] 刘铭, 焦鹏, 曹竹安. 微生物法生产丙烯酰胺的生物催化剂—腈水合酶研究进展 [J]. *化工学报*, 2001, 52: 847–852.
- [3] 刘家祺. 化工百科全书, 第一卷 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1990. 889–894.
- [4] Yamada H, Kobayashi M. Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, 60(9): 1391–1400.
- [5] Nagasawa T, Shimizu H, Yamada H. The Superiority of the Third-generation Catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 Nitrile Hydratase, for Industrial Production of Acrylamide [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, 40: 189–195.
- [6] Ogawa J, Shimizu S. Microbial Enzymes: New Industrial Applications from Traditional Screening Methods [J]. *TIBTECH*, 1999, 17(1): 13–20.
- [7] William Bunch A. Biotransformation of Nitriles by *Rhodococci* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 74: 89–97.
- [8] 刘铭, 李春, 黄晔, 等. 极端条件驯化法提高腈水合酶产生菌的丙烯酰胺耐受性 [J]. *过程工程学报*, 2004, 4(3): 250–255.
- [9] 刘铭, 李春, 高毅, 等. *Nocardia* sp. RS 合成腈水合酶过程及其高酶活表达工艺的研究 [J]. *过程工程学报*, 2003, 3(6): 555–559.

Inhibition and Deactivation of Nitrile Hydratase in the Production of Acrylamide

GAO Yi, LIU Ming, CAO Zhu-an

(*Inst. Biochem. Eng., Dept Chem. Eng., Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

Abstract: In order to improve the production of acrylamide (AM), the main effects of pH, temperature, substrate concentration and product concentration on the deactivation of nitrile hydratase (NHase) in the process of biotransformation from acrylonitrile (AN) were investigated. The results indicate that in the process of hydration, system pH value changes from 7 to 8, while NHase reaction velocity remains almost stable in this range. NHase reaction velocity increases with AN concentration when it is below 10 g/L, and NHase is inhibited when the concentration is above 75 g/L. The product acrylamide could inhibit NHase greatly. Cells were observed slowing resistance to thermal deactivation in the process of catalysis, and the half life time of intracellular NHase was as long as 59.9 h. At the same time, the synergistic effect of acrylamide and heat was also an important reason for the deactivation of NHase.

Key words: acrylamide; nitrile hydratase; deactivation