

极端条件驯化法提高腈水合酶产生菌的丙烯酰胺耐受性

刘铭, 李春, 黄晔, 高毅, 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084)

摘要: 为了提高产腈水合酶的菌体 *Nocardia* sp. 对催化产物丙烯酰胺的耐受性, 利用极端条件改造了现有的丙烯酰胺生产菌株 RS, 通过向发酵液间歇加入丙烯腈催化生成丙烯酰胺, 为菌体制造出一个极端环境, 使菌体在生长催化过程中逐渐适应高浓度丙烯酰胺, 强化其丙烯酰胺耐受性, 驯化得到了 RS-1 菌株. 研究了驯化过程中菌体存活率、比死亡速率和腈水合酶活性随丙烯酰胺浓度的变化. 在不同的丙烯酰胺初始浓度(0~400 g/L)下比较了两菌株的丙烯酰胺耐受性, RS-1 菌株催化丙烯腈水合的速率都大于 RS 菌株, 平均提高 30.8%; 而且 RS-1 菌株的胞内腈水合酶也具有较好的丙烯酰胺耐受性. 在相同的水合条件下, RS-1 菌株催化所得的丙烯酰胺终浓度和丙烯腈转化率分别为 587.1 g/L 和 99.97%, 都明显优于 RS 菌株的水合结果. 在进一步的水合实验中, RS-1 菌株催化所得的丙烯酰胺终浓度达到了 641.4 g/L.

关键词: 腈水合酶; 丙烯酰胺耐受性; 极端条件驯化; *Nocardia* sp.

中图分类号: Q559.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2004)03-0250-06

1 前言

腈水合酶(Nitrile hydratase, NHase)是生物催化法生产丙烯酰胺(Acrylamide, AM)的催化剂, 使丙烯腈(Acrylonitrile, AN)发生水合反应生成丙烯酰胺^[1,2], 反应式为

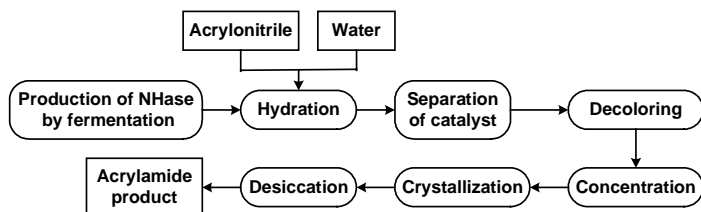


图1 腈水合酶催化生产丙烯酰胺的工艺流程

Fig.1 Bioprocess for enzymatic production of acrylamide by NHase

生物催化法的工艺流程见图

1. 目前在生物法生产丙烯酰胺的过程中如何提高腈水合酶对催化产物的耐受性是亟待解决的问题. 腈水合酶催化丙烯腈水合生成的丙烯酰胺对酶的活性有明显的抑制作用, 水合过程中, 当丙烯酰胺达到一定浓度后, 腈水合酶的

催化速率明显下降, 终浓度通常为 300~400 g/L^[3,4]. 而市场要求的丙烯酰胺水溶液的浓度不低于 500 g/L, 500 g/L 的丙烯酰胺水溶液几乎适用于全部最终用途产品的生产^[5]. 所以在目前的工业生产中, 还要通入热空气浓缩丙烯酰胺溶液使其浓度达到 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, 降低产品的收率^[5]. 因此, 如何提高腈水合酶对丙烯酰胺的耐受性及产物终浓度, 是改进微生物法生产丙烯酰胺工艺的研究热点.

目前, 提高腈水合酶产物耐受性的方法主要集中于筛选菌种上^[3,6], 日本的 Hideaki 等^[3]在菌种

收稿日期: 2003-06-17, 修回日期: 2003-08-06

作者简介: 刘铭(1975-), 男, 河北省石家庄市人, 博士研究生, 生物化工专业, Tel: 010-62785514, E-mail: liu-ming99@mails.tsinghua.edu.cn.

筛选方面做了大量的工作,1985年开始应用于丙烯酰胺生产的菌种 *Rhodococcus* sp. N774 耐受的丙烯酰胺浓度为 270 g/L;1991年获得的 *Rhodococcus rhodochrous* J1 菌种有很好的丙烯酰胺耐受性,在 10°C 的摇瓶实验中催化丙烯腈水合的终浓度达到了 656 g/L,在工业生产中丙烯酰胺终浓度达到了 400 g/L^[3,7]. 而国内报道的生物法生产丙烯酰胺终浓度的最高水平是 325 g/L^[8].

本工作研究了极端条件下提高现有菌种 *Nocardia* sp. RS 丙烯酰胺耐受性的方法,将菌体生长、酶催化和筛选高丙烯酰胺耐受性菌体这三个过程耦合在一起,筛选得到了脲水合酶活力高、产物耐受性好的菌株.

2 材料与方法

2.1 菌种和培养基

菌种为 *Nocardia* sp. RS, 由本实验室保藏.

固体培养基(g/L):葡萄糖 20, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, NaCl 10, MgSO₄·7H₂O 0.5, 酵母浸膏 3, 琼脂 20. 发酵培养基(g/L):葡萄糖 20, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, 谷氨酸 1, 脲 7, 酵母浸膏 5, CoCl₂·6H₂O 10 mg/L, 调节 pH 为 7.5. 培养基在 121°C 灭菌 15 min.

以上培养基组份除酵母浸膏和琼脂是生化试剂外,其余皆为分析纯.

2.2 菌体发酵制备脲水合酶^[9]

种子培养:将 *Nocardia* sp. RS 用固体培养基在 28°C 培养箱中活化 96 h,挑取菌落接种于含有 50 ml 发酵培养基的三角瓶中,在 28°C、转速 200 r/min 的恒温摇床中振荡培养 48 h 得到种子液.

发酵培养:将 2.5 ml 种子液转接到含有 50 ml 发酵培养基的摇瓶中继续振荡培养,每 6 h 用 4 mol/L 的 NaOH 溶液调节发酵液 pH,使之维持在 6.5~7.5 之间,培养 72 h.

2.3 极端条件下提高脲水合酶对丙烯酰胺耐受性的方法

向 50 ml RS 菌株发酵液中加入 2 ml 丙烯腈,继续振荡培养,同时菌体催化丙烯腈水合生成丙烯酰胺,这一过程是生长和催化的耦合,通过间歇加入丙烯腈生成丙烯酰胺,为菌体制造出一个极端环境,使菌体在生长催化过程中逐渐适应高浓度丙烯酰胺,强化其对催化产物的耐受性,称之为极端条件驯化. 2 h 后取菌液 1 ml 冷冻离心(4°C, 10000 g, 10 min),测定上清液中丙烯腈和丙烯酰胺浓度,再用无菌水将菌体重悬回原体积,测菌体浓度和脲水合酶活性,将菌液稀释一定倍数后接种于固体培养基在 28°C 培养. 每 2 h 取样,加入 2 ml 丙烯腈,并重复上述操作,得到极端条件下菌体的脲水合酶活性和丙烯酰胺浓度的动力学变化. 固体培养基上的菌体培养 96 h 后进行活菌计数,得到 1 ml 菌液中的活菌个数 N . 随着丙烯酰胺逐步积累,菌体的存活数逐渐降低,将固体培养基上最后长出的菌体编号为 RS-1 菌株.

2.4 丙烯腈和丙烯酰胺浓度测定

丙烯腈和丙烯酰胺浓度用 Shimadzu GC-9AM 型气相色谱仪测定,色谱柱为不锈钢柱,填料是 Porapak Q,柱温 180°C,进样室温度 220°C, FID 检测器温度 220°C, N₂ 流量 50 ml/min,用乙酰胺作为内标物. 丙烯腈和丙烯酰胺浓度根据下列标准曲线计算:

$$C_{AN}=0.056+0.37825C_S A_{AN}/A_S, R=0.9998,$$

$$C_{AM}=0.055+0.678C_S A_{AM}/A_S, R=0.99995,$$

其中 C_{AN} , C_{AM} 和 C_S 分别为丙烯腈、丙烯酰胺和乙酰胺的浓度(g/L); A_{AN} , A_{AM} 和 A_S 分别为丙烯腈、丙烯酰胺和乙酰胺的气相色谱峰面积.

2.5 菌体浓度和脲水合酶活性测定

在 600 nm 波长下测定菌液的吸光度 OD_{600} , 根据 OD_{600} 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 OD_{600} 相当于 0.175 g/L 的菌体干重.

脲水合酶活性采用国际单位, 定义 28°C 下生成 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 丙烯酰胺为一个活性单位(U). 在三角瓶中加入 pH 7.2、浓度 25 mmol/L 的磷酸钾缓冲液 18 ml 和菌液或脲水合酶溶液 1 ml, 于 28°C 下预热 10 min, 加入 1 ml 丙烯脲, 用秒表精确计时, 以 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. 菌体的酶活定义为 1 mg 菌体具有的脲水合酶活性.

2.6 菌株间的丙烯酰胺耐受性测定

菌体重悬液的获得: 将 RS 和 RS-1 菌株发酵培养 72 h 后冷冻离心(4°C, 10000 g, 10 min), 收获菌体, 用 25 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 7.2)重悬菌体回原发酵液体积, 测定菌液的脲水合酶活性.

脲水合酶溶液的获得: 在冰浴条件下用超声破碎 RS 和 RS-1 菌体, 功率 400 W, 超声时间 20 min, 冷冻离心(4°C, 10000 g, 10 min)取上清液, 得到脲水合酶溶液(简称酶液), 测定其脲水合酶活性.

用相同酶活的 RS 和 RS-1 菌液催化丙烯脲水合反应, 测定不同丙烯酰胺初始浓度时的催化速率, 比较两种菌体的丙烯酰胺耐受性. 水合条件: 丙烯脲初始浓度 40 g/L, 反应体积 20 ml, 温度 10°C, 摇床转速 160 r/min. 在同样条件下比较两个菌株酶液的丙烯酰胺耐受性.

3 结果与讨论

3.1 极端条件驯化时菌体存活率、比死亡速率和脲水合酶活性的变化

菌体的存活率 S 和比死亡速率 k 分别表示为^[10]

$$S = N_t / N_0, \quad (1)$$

$$k = -dN_t / (N_t dt), \quad (2)$$

其中 N_t 和 N_0 分别为 t 时刻和 0 时刻单位体积菌液中活菌个数.

随着丙烯脲的间歇加入, 由菌体中的脲水合酶催化水合, 使培养体系的丙烯酰胺浓度逐级提高, 在此过程中, 菌体的存活率、比死亡速率和酶活随丙烯酰胺浓度的变化见图 2.

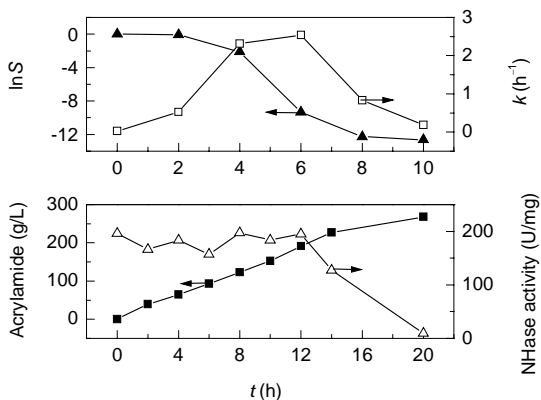


图 2 极端条件驯化时菌体存活率、比死亡速率和脲水合酶活性随丙烯酰胺浓度变化曲线

Fig.2 Survival rate, specific death rate and NHase activity of cells as function of concentration of acrylamide

脲水合酶的催化产物丙烯酰胺是具有细胞毒性的有机物, 丙烯酰胺逐步积累, 使菌体死亡、自溶, 在 0~10 h 时间内 k 经历了一个先增大后减小的过程: 在 0~6 h, 丙烯酰胺对细胞的毒害作用逐渐增强, 菌体的比死亡速率在 6 h 达到最大. 培养体系中的菌体大量死亡; 在 6~10 h, 随着培养体系中活菌体的大量减少及丙烯酰胺耐受性的相对增强, 比死亡速率也随之下降. 在初始菌液中, 菌体耐受丙烯酰胺的能力存在多样性, 极端条件驯化过程既是酶催化过程, 也是菌体逐渐耐受丙烯酰胺的过程, 随着丙烯酰胺浓度逐渐升高, 耐受性高的菌体能够存活下来. 绝大多数菌体都在逐渐增

强的极端条件下被淘汰,只有极少数存活下来.最后检测出活菌体是在 10 h 时的水合液中,其中丙烯酰胺浓度为 152.5 g/L,菌体存活率为 3.2×10^{-6} ,其中的活菌体在固体培养基上生长 96 h 后获得菌株 RS-1,继代培养后,考察菌体及酶液对丙烯酰胺的耐受性.

在极端条件驯化过程中,菌体的酶活在 0~12 h 之间尽管有一定的波动,但维持在一个较高水平,在第 12 h,虽然没有活菌体存在,但菌体中的脲水合酶依然保持着较高的活性;而在 12 h 之后,菌体的脲水合酶活性下降较快.

3.2 RS 和 RS-1 菌体及其酶液在不同丙烯酰胺浓度下的催化速率

RS-1 菌株经过发酵培养后,菌体酶活为 469.8 U/mg,略大于 RS 菌体(438.6 U/mg),而且两种菌体破碎后所得酶液的脲水合酶活性也不同.为保证两种菌株催化过程的可比性,通过加入不同的菌量或酶液体积使脲水合酶活性均为 58.5 U/ml,在相同的条件下考察反应 1 h 的平均催化速率随丙烯酰胺浓度的变化,结果见图 3.

两个菌株的催化速率都随着丙烯酰胺初始浓度的增加而下降,变化趋势相同,但在丙烯酰胺初始浓度为 0~400 g/L 的范围内,RS-1 菌体催化丙烯脲水合的速率都大于 RS 菌体,平均提高 30.8%.丙烯酰胺对游离的脲水合酶活性的抑制作用大于对菌体中脲水合酶的抑制作用,这可能是由于失去了胞液和细胞膜的保护作用,脲水合酶稳定性降低.对比两菌株的酶液,在丙烯酰胺初始浓度小于 200 g/L 时,RS-1 酶液的催化速率比 RS 酶液平均提高 31.4%;当丙烯酰胺初始浓度大于 300 g/L 时,二者催化速率相同.

在相同的酶活条件下,RS 和 RS-1 菌株在丙烯酰胺初始浓度为 0 时催化速率不同,因为测定的是 1 h 的平均催化速率,在 1 h 中生成的丙烯酰胺对脲水合酶的催化活性有抑制作用,而 RS-1 菌株的丙烯酰胺耐受性高,抑制作用的影响较小,所以其催化速率高于 RS 菌株.

以上结果表明,极端条件下驯化所得的 RS-1 菌株不仅对丙烯酰胺耐受性有明显的提高,而且在一定程度上提高了脲水合酶本身对丙烯酰胺的耐受性.

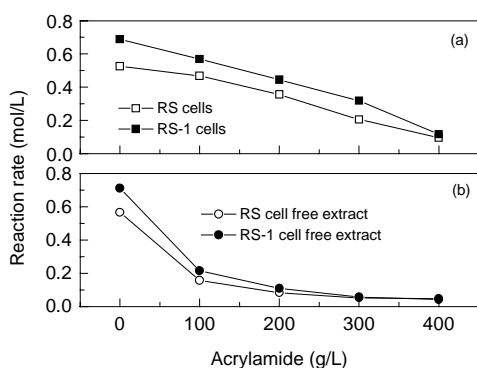


图 3 RS 及 RS-1 的催化速率

Fig.3 Reaction rates of cells and cell free extract from RS and RS-1

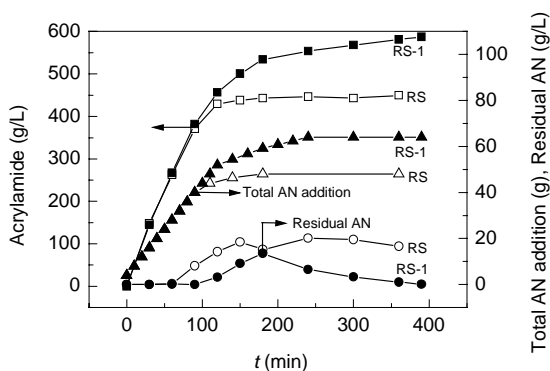


图 4 RS 和 RS-1 菌体催化丙烯脲水合过程比较

Fig.4 Comparison of acrylamide production by RS and RS-1 cells

3.3 RS 和 RS-1 菌体催化丙烯脲水合过程比较

在水合摇瓶中分别加入 RS 和 RS-1 菌体,加水至 100 ml,脲水合酶活性均为 600.4 U/ml.每隔一定时间加入丙烯脲,考察两种菌体催化丙烯脲水合过程的差异,丙烯脲的加入量、丙烯酰胺的生成量和丙烯脲残留浓度见图 4.

在 0~60 min 时间内,两菌株的催化进程相同. RS 水合体系在 90 min 时开始检测到丙烯腈残留浓度为 8.1 g/L,这是菌体催化速率下降的一个标志;而 RS-1 水合体系在 120 min 时才开始出现丙烯腈残留,浓度为 3.2 g/L. 为防止丙烯腈过量积累对腈水合酶的抑制作用^[3],从检测到丙烯腈残留的时刻开始降低丙烯腈的加入量并增大时间间隔.

RS 水合体系在 120 min 时的丙烯酰胺浓度为 429.2 g/L,在随后的反应过程中,菌体催化速率显著降低,至 180 min 后水合液中基本无丙烯酰胺生成,丙烯酰胺终浓度为 449.6 g/L,水合体系中残留丙烯腈 16.6 g/L,丙烯腈转化率为 95.3%.

RS-1 水合体系的催化速率也随着丙烯酰胺浓度增加而有所下降,但水合至 180 min 时丙烯酰胺浓度达到 500 g/L 以上,体系中有丙烯酰胺晶体生成. 晶体的存在对丙烯酰胺实际生成量的测定有影响,但可根据丙烯腈的加入量和残留浓度计算出水合体系中丙烯酰胺的实际浓度. 到 390 min 反应结束时,将水合液升温到 20°C,晶体溶解,测得丙烯酰胺浓度为 587.1 g/L,比 RS 菌株水合终浓度提高了 30.6%;RS-1 水合液中丙烯腈残留浓度是 0.12 g/L,丙烯腈的转化率达到 99.97%,优于 RS 水合体系.

通过对两菌株水合过程的比较,不论是丙烯酰胺终浓度还是丙烯腈转化率,RS-1 菌株都优于 RS 菌株,证明极端条件驯化过程显著地提高了 *Nocardia sp.* 的丙烯酰胺耐受性.

进一步提高 RS-1 菌体的酶活至 1200 U/ml,并提高丙烯腈的加入速率,水合时间缩短为 300 min,丙烯酰胺终浓度达到了 641.4 g/L,丙烯腈残留浓度为 0.45 g/L,丙烯腈转化率为 99.92%,见图 5.

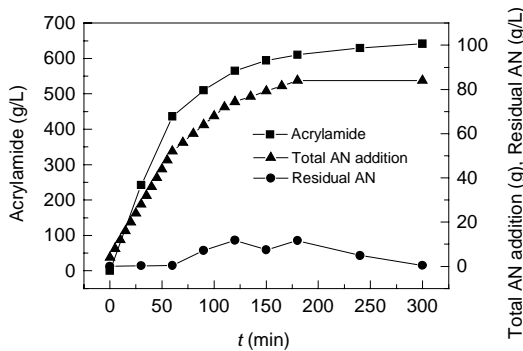


图 5 RS-1 菌体催化丙烯腈水合生产丙烯酰胺
Fig.5 Acrylamide production by RS-1 cells

4 结论

利用极端条件驯化法改造了菌体 *Nocardia sp.* RS 的丙烯酰胺耐受性,该方法将菌体生长过程、催化水合过程和耐受丙烯酰胺菌株的驯化耦合在一起,筛选到了在 152.5 g/L 的丙烯酰胺浓度下依然存活的 RS-1 菌株. 与 RS 菌株相比,RS-1 菌株既具有较高的腈水合酶活力,也有很好的丙烯酰胺耐受性. 在不同的丙烯酰胺初始浓度下,RS-1 菌体的催化速率比 RS 菌体平均提高 30.8%. 在相同条件的水合反应中,RS-1 菌株催化所得的丙烯酰胺终浓度和丙烯腈转化率分别为 587.1 g/L 和 99.97%,都明显优于 RS 菌株的水合结果. 在进一步的实验中,用 RS-1 菌株催化所得的丙烯酰胺终浓度达到了 641.4 g/L. 极端条件驯化法的工艺过程简单,易于操作,获得了高丙烯酰胺耐受性的菌株,经催化水合得到高浓度的丙烯酰胺溶液,可大大降低后续的浓缩能耗,简化工艺过程,对于开发新的丙烯腈催化水合新工艺具有重要的意义.

参考文献:

- [1] Kobayashi M, Shimizu S. Nitrile Hydrolases [J]. *Curr. Opin. 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] Hideaki Yamada, Michihiko Kobayashi. Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, 60(9): 1391-1400.

- [4] Toru Nagasawa, Hitoshi Shimizu, Hideaki Yamada. The Superiority of the Third-generation Catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J₁ Nitrile Hydratase, for Industrial Production of Acrylamide [J]. Appl. Microb. Biotechnol., 1993, 40: 189–195.
- [5] 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.
- [6] Ogawa J, Shimizu S. Microbial Enzymes: New Industrial Applications from Traditional Screening Methods [J]. Tibtechnol., 1999, 17(1): 13–20.
- [7] William Bunch A. Biotransformation of Nitriles by *Rhodococci* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 74: 89–97.
- [8] 陈雪梅, 薛胜伟, 康亮. 微生物法丙烯酰胺非固定化水合技术实验研究 [J]. 江西化工, 2002, (4): 128–130.
- [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 [J]. 过程工程学报, 2003, 3(6): 555–559.
- [10] 俞俊堂, 唐孝轩. 生物工艺学, 下册 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1992. 11–12.

Improving the Acrylamide-tolerance of Nitrile Hydratase in *Nocardia* sp. by Extreme Cultivation

LIU Ming, LI Chun, HUANG Ye, GAO Yi, CAO Zhu-an

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

Abstract: The RS strain, *Nocardia* sp., was screened at extreme cultivation conditions to improve the acrylamide-tolerance of nitrile hydratase. Acrylonitrile was fed periodically into the shaker containing the RS cells and medium to produce acrylamide by the cells. The extreme cultivation conditions were formed by gradual accumulation of acrylamide. The acrylamide-tolerance of cells was enhanced in the coupling process of cell growth, enzymatic catalysis and screening. The survival rate, specific death rate and nitrile hydratase activity of cells as the function of acrylamide concentration during the process were investigated. The amount of living cells decreased rapidly with the increase of acrylamide concentration and the survival cells were cultivated on solid medium to gain a new strain RS-1. The average reaction rate of acrylonitrile hydration catalyzed by the RS-1 cells was 30.8% higher than that by the RS cells within 0~400 g/L of acrylamide concentration. Accordingly, the acrylamide-tolerance of nitrile hydratase in the RS-1 cells was superior to that in RS cells. Under the same conditions, the hydration processes catalyzed by the RS and the RS-1 strain were compared. The final acrylamide concentration and percent conversion of acrylonitrile in the hydration catalyzed by the RS-1 strain were 587.1 g/L and 99.97% respectively, which were higher than those by the RS strain significantly. In the further study on acrylamide production catalyzed by the RS-1 strain, the final acrylamide concentration reached 641.4 g/L.

Key words: nitrile hydratase; acrylamide-tolerance; extreme cultivation; *Nocardia* sp.