

腈的微生物代谢及酰胺生产的新酶学方法

李文忠 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所,北京)

腈化物(nitriles)的微生物降解代谢,自50年代以来一直作为微生物学研究领域中的一个重要方面而得到广泛重视。随着微生物工程技术的不断发展,发现能降解腈化物的微生物种类和数量越来越多,可被生物降解的腈化物结构类型也不断增加。特别是70年代以来,用微生物休眠细胞催化水合腈化物生产相应酰胺化合物,已从实验室阶段发展到工业生产规模,为应用微生物转化腈化物制取化工产品展现了新的前景。

聚酰胺类化合物(polyamides)诸如聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺以及丙烯酰胺与丙烯酸(酯)的共聚物,具有重要的经济价值。该类化合物是水的增稠剂、絮凝剂和流体的减阻剂,也可用于纺织品上浆和做为纸力增强剂使用。当前,聚丙烯酰胺及丙烯酰胺与丙烯酸(酯)的共聚体大量用于石油钻井和石油开采,在冶金选矿、洗煤、废水处理及化工、医药和食品等工业上也得到了日益广泛的应用。随着聚酰胺应用开发研究的进展,其应用范围将会进一步扩大。做为聚酰胺化合物的单体,尤其是丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺的生产工艺研究,一直受到人们的关注。

(一) 腈化物的微生物代谢

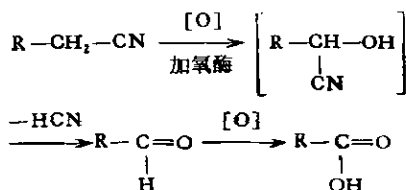
1. 腈化物的利用菌:随着合成纤维、选矿药剂及石油开采等工业的发展,包括丙烯腈(acrylonitrile)在内的腈化物的产量和用量迅速增加。由于腈化物具有高毒性和强烈的诱变作用,因此腈化物污染对环境的压力越来越大。从50年代开始,人们就注意到含腈废水对环境的污染和对水生生物的毒害,并成功地应用河

水及经驯化的活性污泥处理含腈废水^[1]。为了提高活性污泥处理含腈废水的效能,科学家们将分离到的高效腈化物利用菌,如镰刀霉(*Fusarium solani*)棒状杆菌(*Corynebacterium nitrilophilus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、粘乳产碱杆菌(*Alcaligenes viscolactis*)和无色杆菌(*Achromobacter nitriloclastes*)及珊瑚色诺卡氏菌(*Nocardia corallina* No. 11)等接种到活性污泥中或在生物反应器中形成生物膜处理该类废水。

在深入研究腈化物的微生物降解代谢过程中,人们相继发现多种微生物能利用各类型化学结构的腈化物作为生长的碳氮源或氮源,并将其代谢形成相应的酰胺、羧酸和氨(表1)。

2. 腈化物的微生物代谢机理:不同种属的微生物对腈化物的代谢途径不同。

(1) 在真菌、藻类等微生物加氧酶(oxygenase)的催化下,腈化物分子发生 α -氧化,形成不稳定的羟基腈,然后分解为醛和HCN,醛被继续氧化成羧酸^[18]:



(2) 腈化物在细菌及藻类的固氮酶(nitrogenase)作用下还原成相应的烃并释放出 NH_3 (表2)。

(3) 腈化物在腈水解酶(nitrilase)催化下,直接水解生成相应的羧酸和 NH_3 。这一反

表 1 腈化物利用菌^[12-17]

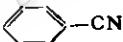
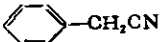
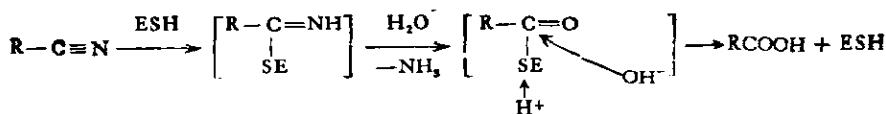
腈化物	分子式	腈化物利用菌
乙腈	CH_3CN	珊瑚色诺卡氏菌, 棒状杆菌, 假白喉棒杆菌, 假单胞菌, 红色红球菌, 节杆菌 J-1, 节杆菌 I-9, 绿针假单胞菌 B23, 短杆菌 R312
丙腈	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CN}$	节杆菌 I-9, 红色红球菌, 绿针假单胞菌, 短杆菌
正丁腈	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	珊瑚色诺卡氏菌 No. 11, 假白喉棒杆菌, 节杆菌 I-9, 绿针假单胞菌, 短杆菌 312
异丁腈	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCN}$	绿针假单胞菌, 短杆菌 312
戊腈	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CN}$	短杆菌 312
α -羟基丙腈	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CN}$	珊瑚色诺卡氏菌 No. 11, 假白喉棒杆菌, 短杆菌 312
β -羟基丙腈	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CN}$	节杆菌 I-9, 短杆菌 312
α -氨基丙腈	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CN}$	短杆菌 312, 棒状杆菌
β -氨基丙腈	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CN}$	短杆菌 312
α -氨基异戊腈	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{CN}$	棒状杆菌
丙烯腈	$\text{CH}_2=\text{CHCN}$	珊瑚色诺卡氏菌 No. 11, 节杆菌 I-9, 节杆菌 J-1, 短杆菌 312
甲基丙烯腈	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CN}$	假白喉棒杆菌, 节杆菌 I-9, 绿针假单胞菌, 短杆菌 312
二甲氨基丙烯腈	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{N}(\text{CH}_3)_2)\text{CN}$	珊瑚白诺卡氏菌 No. 11
丁烯-[1]-腈	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CN}$	假白喉棒杆菌
丁烯-[2]-腈	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCN}$	节杆菌 I-9, 绿针假单胞菌
丁二腈	$\text{NCCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	假白喉棒杆菌, 节杆菌 I-9, 短杆菌 312
戊二腈	$\text{NC}(\text{CH}_2)_3\text{CN}$	节杆菌 I-9, 节状链孢菌 TG-1, 假单胞菌 K-9
己二腈	$\text{NC}(\text{CH}_2)_4\text{CN}$	节状链孢菌 TG-1
三丙烯腈	$\text{NC}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{CN}$	节杆菌 I-9, 节状链孢菌 TG-1
苯腈		假白喉棒杆菌, 节杆菌 I-9, 短杆菌 312, 红色红球菌
苯乙腈		珊瑚色诺卡氏菌 No. 11
蓖麻硷	$\text{CH}_3\text{OC}(\text{C}(\text{CN})\text{CO})\text{CH}_2\text{CHNCH}_3$	假单胞菌

表 2 腈化物的固氮酶催化还原^[11]

腈化物	还原产物
R-CN	$\text{R-CH}_3 + \text{NH}_3 (\text{R}=\text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{---})$
$\text{CH}_2=\text{CH-CN}$	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}_2 + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3 + \text{NH}_3$
$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCN}$ (顺式)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2 + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 + \text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_3$ (顺式) + NH_3
$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCN}$ (反式)	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_3$ (反式) + NH_3

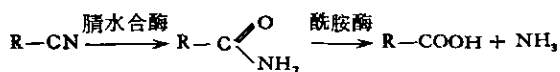
应机制是 Thimann 等人^[19]在研究 3-吡啶基乙腈及其类似物的水解反应时提出的。在整个水解反应过程中, 均未检出酰胺化化合物的存在。

其它研究者在腈化物的微生物代谢研究中也证实了这种代谢机理的存在^[16,17]。反应式如下:



(ESH 为活性中心含-SH 的腈水解酶)

(4) 腈化物在与酰胺酶 (Amidase) 共存的腈水合酶 (Nitrile hydratase) 作用下, 水合生成稳定的酰胺化合物, 作为中间代谢产物的酰胺可进一步被酰胺酶催化水解生成相应的羧酸, 并释放出 NH_3 [20,21]。



上述两酶共存的连续反应机制, 极其广泛地存在于各种腈(脂肪腈、芳香腈及其取代化合物)的水解反应中, 但也有少数例外。Uematsu [22], 在研究龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*) 对丰加霉素 (Toyocamycin) 的水解反应时, 只检出生成的桑吉瓦霉素 (Sangivamycin), 而无相应的有机酸存在。Theriault 在青霉菌 (*Penicillium*) 水解 2, 2-二苯基-3-(1-吡咯烷基)-丙腈的反应中, 只检出 2, 2-二苯基-3-(1-吡咯烷基)丙酰胺。

3. 腈利用菌的代谢特异性: 在不同种属的微生物及不同营养基质培养的菌体内, 腈水合酶和酰胺酶的形成量及两酶活性比例有差异, 因此产生了只积累羧酸或同时积累酰胺和羧酸这两种代谢结果。Yamada [6] 分离的节杆菌 I-9 在含丙烯腈培养液中生长时, 只检出丙烯酸, 而利用乙腈的节杆菌 J-1 几乎不利用丙烯腈, 但其休眠细胞却能将丙烯腈水解为丙烯酸。诺卡氏菌水解苯腈时只积累苯甲酸, 而未检出苯甲酰胺 [16,17]。当节杆菌 J-1 在含乙腈的培养液中生长时, 可同时检出乙酰胺和乙酸 [8]。蓖麻碱在假单胞菌参与的水解反应中, 酰胺和羧酸同时积累 [10]。在假单胞菌 K-9 水解戊二腈的培养液中同时存在着 4-氰基丁酰胺、4-氰基丁酸、戊二酸和氨。Kuwahara 对丁二腈的微生物降解研究中也得到类似结果。

4. 腈利用菌的代谢调控:

(1) 微生物的诱变: 采用化学或物理因子诱发微生物产生遗传突变, 然后按其需要进行

突变株的定向筛选。Clarke 等人 [23] 用乙酰胺类似物正向筛选方法分离出铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 酰胺酶缺陷型突变株 PAC 307。用同样方法分离出恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putide*) 酰胺酶缺陷型突变株 A87, 此突变株只能将腈化物水合形成酰胺, 而不能将酰胺水解成羧酸。Jallageas 等 [24] 应用改良的 Clarke 方法, 诱变野生型短杆菌 R312 (*Brevibacterium* R312), 分离出酰胺酶缺陷型突变株 A4。野生型 R312 具有腈水合酶和酰胺酶两种酶活性, 可水解多种水溶性腈化物生成相应羧酸。而 A4 不能合成酰胺酶, 不能水解多种酰胺, 其中包括脂肪族酰胺。 α -氨基(羧基)丙酰胺、苯甲酰胺和 D- α -氨基丙酰胺等, 但保留了水解 L- α -氨基酰胺的能力。Bui [25] 利用代谢产物对野生型短杆菌 R312 有毒性的氯乙腈(其代谢产物为氯乙酸)作为生长的唯一氮源, 从中分离出腈水合酶缺陷型短杆菌突变株 19, 该突变株在以乙腈为唯一氮源的基础培养基上不生长。突变株 19 和野生型 R312 有相同的生理生化特性, R312 菌可将 KCN、乙腈、丙腈、 α -和 β -羟基丙腈、 α -和 β -氨基丙腈、丙烯腈、丁腈、异丁腈、戊腈、 α -三甲基乙腈和苯甲腈等化合物水解生成相应的羧酸, 而突变株 19 均不能水合上述化合物, 但却保留了与 R312 相同的酰胺酶活性。

(2) 菌的培养条件对腈水合酶活性的影响: 菌的培养条件主要是指对能够促进酶系生物合成的高活性的营养基质及诱导物的选择。Asano 以异丁腈为主要氮源分离出一株腈水合酶活力高而酰胺酶活性低的绿针假单胞菌 B23 (*Pseudomonas chlororaphis*), 并应用于水合丙烯腈生成丙烯酰胺的研究 [14]。1986 年 Yamada 在优选 B23 菌最佳生长条件时, 以甲基丙烯酰胺代替异丁腈作为生长氮源, 并用它作为腈水合酶合成的诱导物, 通过添加一定量的

氨基酸及金属离子,使该菌的腈水合酶比活力提高约 90 倍,同时也大大增加了菌体的增殖量^[10]。

(3) pH 对腈水解反应的影响: 在腈的酶促水合反应中,控制介质的物化条件 (pH、温度、溶氧等),特别是 pH 值,是调节反应历程的重要因素之一。Commeyras^[15] 提出了应用“酰胺水解反应临界 pH 值”来调控腈化物水解反应历程的观点。临界 pH 值,做为反应系统中腈化物类型和所用菌株的函数,可通过试验来确定。当反应介质的 pH 控制在临界 pH 以上,即酰胺酶活性受到抑制时,只存在腈被水合形成酰胺的反应,只积累酰胺而不生成羧酸。但当使用 α -羟基(氨基)腈做底物时,不能准确测得此反应的临界 pH 值,因此,在反应液中总有一定量的羧酸形成。这个经大量实验所证实的论点,对腈的微生物代谢及产物形成的研究具有一定的指导意义。

(二) 酰胺化合物生产的新酶学方法

1. 丙烯酰胺生产工艺的发展历程

(1) 硫酸水解法:1954 年美国 Cyanamid^[25] 公司研究开发了硫酸水解丙烯腈制备丙烯酰胺的方法。日本按此工艺于 1957 年实现了工业化生产。在腈化物的水解反应中,要控制连续生成酰胺、羧酸和氨的反应,从而得到大量的酰胺积累是极为困难的^[14],酰胺产率最多不超过 80%,而且产物中含有大量硫酸胺等副产物及剩余硫酸,不仅产物回收困难,而且需要中和工序^[15]。因此,在工业生产中受到极大的限制。

(2) 催化剂法:70 年代初,美国和日本研究了含铜系列金属催化剂催化丙烯腈生产丙烯酰胺的方法。在最佳反应条件下,丙烯酰胺产率提高到 95%,但催化反应须在较高温度和压力下完成,在此温度下形成的丙烯酰胺易自聚。另外,铜系催化剂制备困难,且易被氧化而失效,极难再生。产物纯化需要一系列工序以除去铁、铜离子及残留的丙烯腈等有机杂质。尽管如此,目前仍为丙烯酰胺工业生产的主要方法。

(3) 新酶学方法:70 年代中期,在深入研

究腈化物的微生物降解机理过程中,相继发现某些腈利用菌能产生与酰胺酶 (Amidase) 共存的一种新酶,称“腈水合酶” (Nitrile hydratase)^[20,26]。含该酶的微生物休眠细胞,可催化腈化物水合而形成相应的酰胺,后者在酰胺酶作用下,被水解为羧酸和氨。控制反应条件可实现酰胺化合物的大量积累,减少或阻止了羧酸的生成。Asano^[14] 筛选到具有高活性的腈水合酶而酰胺酶活性低的绿针假单胞菌 B23,并利用洗涤细胞反应系统,开发了生物催化水合丙烯腈生产丙烯酰胺的第三代新酶学方法。酶法与催化剂法相比,在产物的产率、纯度,反应条件、产物回收工序等方面,具有明显的优点,是一个很有工业应用前途的新方法。

2. 酰胺生产菌的筛选及腈水合酶的形成:从分离的腈利用菌中,以能催化腈化物水合生成酰胺并能大量积累的腈水合酶活性为指标,筛选出具有应用价值的酰胺生产菌。Commeyras 从芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、芽孢不动菌属 (*Bacteridium*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 和短杆菌属 (*Brevibacterium*) 中筛选到 18 株具有高腈水合酶活性的菌株。渡边一郎^[25]以腈化物为唯一生长氮源,分离筛选到六株高酶活细菌,它们分属于棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 和红球菌属 (*Rhodococcus*),其中红球菌 N-774 的腈水合酶活性最高。Asano, Y. 从 186 株腈利用菌中筛选到能大量积累酰胺的绿针假单胞菌 B23 (*Pseudomonas chlororaphis* B23)。B23 菌腈水合酶的合成需异丁腈诱导,但异丁腈在菌的好氧培养过程中易挥发。Yamada, H. 发现甲基丙烯酰胺诱导所形成的水合酶活力和比活力分别为异丁腈诱导的 2.2 倍和 2.5 倍。在最佳选择条件下^[10],腈水合酶活力和比活力分别提高 900 倍和 90 倍。

红球菌 N-774 的腈水合酶为组成酶,促进细胞生长和酶形成的主要因子是有机组分和铁离子^[25]。在无腈的有机合成培养基中好氧培养,腈水合酶活力最高可达 50—60 单位,即使在培养后期,酶活力也比较稳定。光照也能使

N-774 菌的腈水合酶比活力大大提高。

3. 腈水合酶特性

(1) 一般性质: 节杆菌 J-1(*Arthrobacter* J-1) 产生的腈水合酶经纯化后测得分子量为 420000, 酶由两种亚基组成, 分子量分别为 24000 和 27000, 等电点为 pH 3.6。酶反应的最适温度为 35℃。酶在 55℃ 保温 10 min, 几乎完全失活, 在 35℃ 保温 10 min, 剩余 80% 酶活力。在 50% 甘油中, 于 -20℃ (pH 7.0) 保存 40 天, 酶活力稳定, 在 0℃ 保存 40 天尚存 50% 酶活力。酶的最适 pH 为 7.0—7.2。甘氨酸-NaOH 缓冲液能使酶激活, 金属螯合剂或羧基试剂对酶活力无影响, 但能被巯基试剂(Ag^+ 、 Hg^{2+} 、碘乙酸、和对氯代苯甲酸汞)强烈抑制, 巯基乙醇能解除抑制, 证明巯基位于酶的活性中心部位^[26]。Asano, H. 对绿针假单胞菌 B23 的腈水合酶的研究也证明了巯基是酶活力所必需的。丙烯腈是巯基专一性修饰剂, 在较高温度下, 腈水合酶的活性中心可能会被丙烯腈掩蔽, 所以控制较低温度是完成腈转化形成酰胺的优化条件之一。

(2) 酶的活性与底物结构的关系: 对节杆菌 J-1 腈水合酶的底物结构特异性研究表明, 该酶对含五个碳原子以下的饱和脂肪腈、不饱和脂肪腈及其取代衍生物, 均有较明显的水合活性, 使其生成相应的酰胺, 而对含有五个碳以上长链脂肪腈和芳香腈等未表现出酶活性。对 C_2 — C_6 低分子量腈的水合活性随烷基的加长而降低, 其顺序是: 氯乙腈(相对活力 130%) > 乙腈(100%) > 丙腈(81.0%) > 正丁腈(59.8%) > 正戊腈(2.4%)。在以碳数相同但其结构不同的腈为底物时, 酶的活性也有较大差异(丙腈 > 丙烯腈; 正丁腈 > 甲基丙烯腈)。氯乙腈是该酶的最适底物, 这可能是由于氯原子的吸电子效应, 有助于酶活性部位的巯基对腈的 α -碳原子亲核进攻的结果^[26]。对野生型短杆菌 312 的腈水合酶反应动力学研究表明, 酶对腈化物的亲和力与腈的结构密切相关^[11]。

在以直链脂肪腈(氰、乙腈、丙腈、丁腈和戊腈)为底物时, 酶对乙腈的亲和力最低(K_m 为

25 mmol/L), 对 CN^- 的亲和力是乙腈的 10 倍(K_m 为 2.4 mmol/L)。当直链脂肪腈的羟链增长时(除 CN^- 外), 酶对底物的亲和力随之增大(K_m 减小), 这可能是由于酶与羟基之间形成氢键数目增加的结果。

就乙腈和丙腈、异丁腈和 α -三甲基乙腈而论, 腈化物的烷基越长, 酶对底物的亲和力越大, 但是由于烷基的加长使空间位阻效应增大, 反而会使酶对底物的亲和力下降。其综合影响效应对于 α -三甲基乙腈(K_m 为 6.6 mmol/L) 和异丁腈(3.9 mmol/L) 特别明显。

直链底物丁腈和戊腈的 K_m 要比同碳数而带支链的 α -异丁腈和 α -三甲基乙腈小 3—6 倍。当甲基数目增加时, 酶对同碳数底物的亲和力差异很大, 说明相邻- $\text{C}\equiv\text{N}$ 端(α -C) 的分子空间位阻效应是引起酶亲和力下降的主要因素。

酶对 α -氨基丙腈和 α -羟基丙腈的亲和力比相对应的 β -氨基丙腈和 β -羟基丙腈分别高 28 倍和 6 倍, 并且酶对带氨基的比相应位点带羟基的丙腈衍生物的 K_m 小得多。这些结果不仅与 Amaud 报道在腈水合酶部位含有一 OH 和一 NH_2 相一致, 而且也与酶和底物之间形成的氢键越多, 酶对底物亲和力越大的推论相符合。

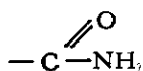
在含三个碳原子的取代腈中, 酶对羟基取代腈的水合活性比同位点氨基衍生物的高, 同样, 在 β -位有活性取代基的腈与 α -位有相同活性基团的腈相比, 前者酶活力低。此结果说明, 亲水性取代基, 特别是在 α -位上, 能促进腈水合酶对底物的反应。

苯甲腈与丁腈和戊腈的 K_m 值相似, 表明芳香环对酶亲和力影响不大, 这可能是由于苯甲腈分子为平面结构, 比具有烷基链的腈分子(有空间位阻)更容易与酶接近之故。

(3) 底物和产物对腈水合酶的抑制作用: Bui 研究了底物、产物及其类似物对 R312 菌腈水合酶的抑制作用^[27]。当丙烯腈的浓度大于 0.2 mol/L 时就产生了抑制作用。当然, 底物抑制浓度因酶的来源不同而异, 即使丙烯腈达到

0.65 mol/L 时,对 B23 菌的脲水合酶也未产生抑制^[14]。

很多酶的活性受反应产物抑制。丙烯酰胺、丙酰胺及丙烯酸都是脲水合酶的竞争性抑制剂。丙烯酰胺和丙酰胺的抑制常数 K_i 相同 (0.06 mol/L), 而丙烯酸的 K_i 大得多 (0.43 mol/L), 表明丙烯酰胺和丙烯酸分子中的双键对酶活无明显影响, 抑制作用主要由



基团引起的。

某些脲化物可分解产生游离氰, 它可作为脲水合酶的最简单底物, 其 K_i 为 4×10^{-3} mol/L。由此可知氰对该酶的抑制能力比上述所试底物和产物高得多。因此, 在酶促水合丙烯脲生产丙烯酰胺的反应中, 使用特别纯净的底物 (除去 CN^-) 是极为重要的。

(4) 脲水合酶的底物广谱性: Commeras^[15] 用短杆菌 R312 的洗涤细胞转化脲化物生产相应的酰胺。所用底物包括乙脲、异丁脲、异烟碱脲、苯甲脲、琥珀脲、丙烯脲、甲基丙烯脲、烟碱脲、1, 4-己二脲等。

(5) 固定化细胞在酰胺生产中的应用: 有些菌具有可固定在适宜载体上并保留酶活性的生物学特性, 固定化细胞法与洗涤细胞反应系统比较, 在条件控制、产物回收等方面更为简便, 更便于实现规模生产。Bui 用聚丙烯酰胺包埋短杆菌 312 洗涤细胞, 并构建成完整的固定化细胞反应装置^[21], 在低温下连续加入底物溶液, 可得到 10% 的高纯度产物溶液。此反应器具有多效性, 可实现多种产物的制备。Watanabe 对酰胺的固定化细胞生产法也进行了研究, 并对固定化细胞的制备、性质及其酶学反应进行了评述^[28]。

渡边一郎用聚丙烯酰胺包埋红球菌 N-774 细胞, 在低温下连续定量加入丙烯脲, 得到了高产率高质量的产物溶液。1985 年在日本横浜建立了年产 4000 吨丙烯酰胺的工厂。工业生产中丙烯脲转化率和丙烯酰胺形成的选择率均高于 99.9%, 产物溶液浓度达 20% 以上, 其工艺

流程如图 1 所示^[25]。

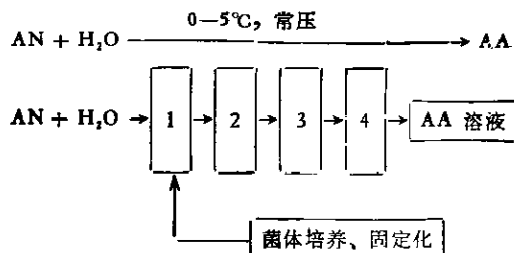


图 1 固定化细胞法生产丙烯酰胺的工业流程

AN: 丙烯脲; AA: 丙烯酰胺

1. 固定化细胞生物反应器; 2. 固液分离器;
3. 脱色柱; 4. 浓缩器

综上所述, 微生物酶促催化生产酰胺工艺的的优点如下:

1. 以石油产品为原料, 采用酶法生产酰胺的流程简单, 反应条件温和, 设备投资少, 且具有多效性。
2. 底物转化率和产物形成选择率极高, 几乎无副反应, 可得到高产率高质量的产物。
3. 可用廉价物质大量培养菌体, 获得高活性酶, 并可重复使用, 从而降低了生产成本。
4. 产物纯化工序较化学方法简单, 采用固定化细胞生产酰胺, 还可进一步简化后处理工艺。

参 考 文 献

- [1] Ludzack, F. J. et al.: *J. Water Poll. Cont. Fed.*, **33**(5): 492, 1961.
- [2] 中国科学院微生物所污水微生物组: *微生物学报*, **17**(3): 223, 1977.
- [3] 杨惠芳等: *微生物学报*, **21**(2): 222, 1981.
- [4] Mimura, A. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **47**: 631, 1969.
- [5] Grant, D. J. L. et al.: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **39**: 273, 1973.
- [6] Firmin, J. L. et al.: *Biochem. J.*, **158**: 223, 1976.
- [7] Digeronimo, M. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 900, 1976.
- [8] Yamada, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **57**(1): 8, 1979.
- [9] Collins, P. A. et al.: *J. General Microbiology*, **129**: 711, 1983.
- [10] Yamada, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**(11): 2859, 1986.
- [11] Bui, K. et al.: *J. General Microbiology*, **130**: 89, 1984.
- [12] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**(10): 2497, 1980.

(下转第 347 页)

(上接第 353 页)

- [13] Yamada, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **58** (6): 495, 1980.
- [14] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **46** (5): 1183, 1982.
- [15] Commeyras: United States Patent, 4, 001, 081, 1977.
- [16] Harper, D. B.: *Biochem. J.*, **165**: 309, 1977.
- [17] Harper, D. B.: *Biochem. J.*, **167**: 685, 1979.
- [18] Jallageas, J. C. et al.: *Advances in Biochemical Engineering*, **14**: 7—9, 1980.
- [19] Thimann, K. V. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**: 133, 1964.
- [20] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **44** (9): 2251, 1980.
- [21] Bui, K. et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **4**: 195, 1982.
- [22] Uematsu, T. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**: 614, 1974.
- [23] Clarke, P. H. et al.: *J. General Microbiology*, **75**: 231, 1973.
- [24] Jallageas, J. C. et al.: *Advances in Biochemical Engineering*, **14**: 22—25, 1980.
- [25] Watanabe, I. 有机合成化学, **46**(2): 169, 1988.
- [26] Asano, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 1165, 1982.
- [27] Bui, K. et al.: *J. Applied Bacteriology*, **57**: 183, 1984.
- [28] Watanabe, I.: *Method in Enzymology*, **136**: 523, 1987.