

文章编号: 1006-6144(2008)01-0108-03

丙烯腈水合酶活性测定方法研究

高 俊¹, 史继诚^{*2}

(1. 大庆炼化公司, 黑龙江大庆 163411; 2. 大连交通大学环境与化学工程学院, 辽宁大连 116028)

摘 要:以乙酰胺为内标物, 丙烯酰胺在 10 ~ 70 g/L 范围内, 丙烯酰胺/乙酰胺的质量比与其积分峰面积比呈线性关系, 相对标准偏差为 0.079%; pH 值影响酶活性测定结果的准确性, pH 值低于 2.0 时, 酶反应终止, pH 值越低, 丙烯酰胺凝聚为聚丙烯酰胺的量越大, 200 μ L 5.0 mol/L 的盐酸是适宜量; 根据谱图中丙烯腈是否出峰, 决定反应体系中发酵液的加入量, 酶活性较高时, 采用 0.5 mL 的发酵液加入量。

关键词:丙烯酰胺; 气相色谱; 丙烯腈水合酶

中图分类号: O657.7⁺1 **文献标识码:** A

利用微生物细胞产生的腈水合酶将丙烯腈转化为丙烯酰胺, 具有反应条件温和(常温常压)、设备投资少、生产成本低、无污染、产品纯度高优点, 是生产丙烯酰胺的理想方法^[1]。目前国内外对腈水合酶的研究重点包括生物法生产丙烯酰胺过程的条件优化、酶催化反应过程的动力学研究^[2-5]。在酶催化反应动力学中涉及到酶活的测定方法, 其中包括产物丙烯酰胺的检测、pH 值对酶活反应的终止、酶反应体系中发酵液初始量的确定等, 这些对酶活测定结果的准确性均具有重要的影响。本文对此进行了研究, 在此基础上建立了丙烯腈水合酶活性的测定方法。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

GC-6890 型气相色谱仪(美国, Agilent Technologies), 包括 FID 检测器, Agilent Q 10.0 m $\times$ 320 μ m $\times$ 20.0 μ m 毛细管柱, 安捷伦化学工作站, 版本号 B.01.01C SR1。

乙酰胺溶液: 配制 50 g/L 的乙酰胺标准溶液备用。0.025 mol/L 磷酸缓冲溶液: 3.4 g 磷酸二氢钾与 0.8 g 氢氧化钠一同溶解, 转入 1 L 容量瓶中定容。盐酸: 4.0 mol/L、5.0 mol/L、6.0 mol/L、8.0 mol/L。丙烯腈、丙烯酰胺等试剂均为分析纯, 实验用水为蒸馏水。

1.2 丙烯酰胺气相色谱分析条件

柱箱温度 190 ; 加热器温度 200 ; 载气氮气, 总流量 77.7 mL/min, 分流流量 73.2 mL/min; 最高柱温 270 ; FID 检测器, 温度 250 。试液配制: 每份进样液中含 3 mL 蒸馏水, 1 mL 乙酰胺内标溶液, 1 mL 丙烯酰胺溶液, 进样 0.1 μ L。

1.3 酶活反应实验

1.3.1 丙烯腈水合酶催化反应条件 19 mL 0.025 mol/L 的磷酸缓冲液和 1 mL 发酵液, 放入 100 mL 锥形瓶中, 在 28 $^{\circ}$ C 恒温水浴中震荡 2 min, 然后加入 1 mL 的丙烯腈作为底物, 反应时间 5 min。

1.3.2 pH 值对酶活反应终止的影响 已知酶活为 3 800 U/mL 的反应体系, 反应 5 min 后, 分别加入 200 μ L 4.0 mol/L、5.0 mol/L、6.0 mol/L、8.0 mol/L 的盐酸以终止反应, 测反应体系的 pH 值, 然后每隔 10 min 取出 1 mL 反应液进行色谱分析, 确定不同 pH 值下酶反应是否终止。

1.3.3 pH 值对丙烯酰胺测定结果的影响 向 5 份各 20 mL 的 50 g/L 丙烯酰胺溶液中, 分别加入 0、4.0

收稿日期: 2007-03-26

修回日期: 2007-06-21

* 通讯联系人: 史继诚, 男, 硕士, 讲师, 主要从事生物工程研究。

mol/L、5.0 mol/L、6.0 mol/L、8.0 mol/L 的盐酸 200 μ L,然后测定溶液中丙烯酰胺的浓度。

2 结果与讨论

2.1 丙烯酰胺的分析

试样中乙酰胺和丙烯酰胺均为 50 g/L,色谱进样 0.1 μ L,获得谱图如图 1 所示。乙酰胺的保留时间为 2.6 min,丙烯酰胺的保留时间为 5.1 min。在该色谱条件下,乙酰胺与丙烯酰胺获得了完全分离,可见乙酰胺可作为丙烯酰胺分析的内标物。

分别配制 50 g/L 乙酰胺内标溶液,丙烯酰胺溶液分别为 10、20、30、40、50、60、70 g/L。各取 0.1 μ L 溶液进行气相色谱分析,每个样品重复分析 5 次,取平均值,以丙烯酰胺/乙酰胺的质量比(X)为横坐标,丙烯酰胺/乙酰胺的峰面积比(Y)为纵坐标,作线性回归曲线,其线性方程为: $Y = 1.49786 X$,相关系数 $R = 0.99993$ 。

对含乙酰胺和丙烯酰胺均为 50 g/L 的试液,色谱进样 0.1 μ L,获得丙烯酰胺实测含量的五组平行数据。通过计算知,该测定方法的相对标准偏差为 0.079%,由此可见,该方法是一项简便且可靠性较高的丙烯酰胺含量分析方法,此方法可用于丙烯腈水合酶活性的测定。

2.2 丙烯腈水合酶活性的测定

2.2.1 pH 值的影响 活性为 3 800 U/mL 的酶催化反应 5 min 后,分别加入不同浓度的盐酸 200 μ L,实验结果显示,4.0 mol/L 及以上浓度的盐酸可使体系 pH 值降至 3.0 以下。

终止反应后,每隔 10 min 取出 1 mL 反应液进行色谱分析,实验结果表明,4.0 mol/L 的盐酸可使 pH 值降至 2.0~3.0,但不能终止酶活性;5.0 mol/L 及以上浓度的盐酸,pH 值降至 2.0 以下,即可使酶活性完全终止。陈拓等^[6,7]报道 pH 低于 3.0 时,基本检测不到丙烯腈水合酶的活性。但 pH 值过低,将改变丙烯酰胺的聚集状态。实验中发现,当盐酸浓度 ≥ 6.0 mol/L 时,反应体系中出现了絮凝现象,对絮凝物进行检测,确定该絮凝物为聚丙烯酰胺,其原因可能是反应体系过低的 pH 值使丙烯酰胺发生了聚合,所以终止反应时的 pH 值不易过低。在本反应体系中,盐酸的适宜浓度为 5.0 mol/L。

2.2.2 酶反应体系中发酵液初始量的确定 1 mL 丙烯腈在完全反应后所对应的丙烯腈水合酶的最高活性值为 3 042 U,目前,丙烯腈水合酶的最高活性值在 5 600 U 左右,如果 1 mL 发酵液中丙烯腈水合酶的转化能力超出 3 042 U,就会造成酶活性的测定结果远低于实际值,特别是在生产菌种的筛选过程中容易将高产菌株淘汰掉^[6,7]。如果将加入丙烯腈的量增加,丙烯腈对水合酶的毒害作用将会使酶的活性迅速下降或完全消失,采用 0.5 mL 的发酵液加入量,对于较低活性的酶来说,丙烯腈会使酶出现失活,从而影响实验结果^[7,8]。表 1、表 2 是已知活性为 1 200 U/mL、4 000 U/mL 的发酵液在 1 mL、0.5 mL 不同加入量下的酶活测定结果。

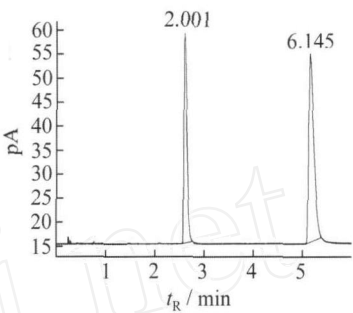


图 1 乙酰胺与丙烯酰胺保留时间对比
Fig. 1 Retention time comparison of acetamide and acrylamide

表 1 1 200 U/mL 发酵液酶活实验结果

Table 1 Enzyme activity in 1 200 U/mL fermented solution		
Sample No.	1 mL fermented solution(U)	0.5 mL fermented solution(U)
1	1 198	968
2	1 205	897
3	1 213	900
4	1 188	864
5	1 204	900

表 2 4 000 U/mL 发酵液酶活实验结果

Table 2 Enzyme activity in 4 000 U/mL fermented solution		
Sample No.	1 mL fermented solution(U)	0.5 mL fermented solution(U)
1	3 040	4 001
2	3 043	3 998
3	3 042	4 012
4	3 042	4 005
5	3 040	3 959

表 1 说明 1 mL 的丙烯腈对于 0.5 mL 1 200 U/ mL 的酶活性具有毒害作用,1 mL 的发酵液加入量可准确反映酶活性;表 2 由于酶活较高,1 mL 的发酵液加入量超出了 1 mL 丙烯腈所对应的最高酶活性值,0.5 mL 的发酵液加入量可准确反映酶活性。根据色谱图中丙烯腈的出峰情况确定发酵液的加入量,是解决此问题的可行方法。图 2 谱图中没有出现丙烯腈的峰,表明酶活性较高,发酵液的加入量超出了 1 mL 丙烯腈所对应的酶活性值,此时应采用 0.5 mL 的发酵液加入量,重复实验,结果如图 3 所示,这时谱图中出现了保留时间为 0.759 min 的丙烯腈峰。实验结果说明,反应体系应首先采用 1 mL 的发酵液加入量,当谱图中出现保留时间为 0.759 min 的丙烯腈峰时,发酵液的加入量是合理的,实验结果是可信的,当谱图中未出现丙烯腈峰时,应采用 0.5 mL 的发酵液加入量重复进行实验。

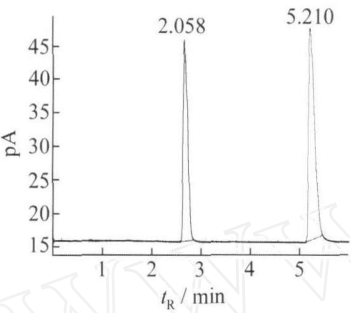


图 2 1 mL 发酵液对应的丙烯腈水合酶活性谱图
Fig.2 Chromatogram of acrylonitrile hydratase activity with 1 mL fermented solution

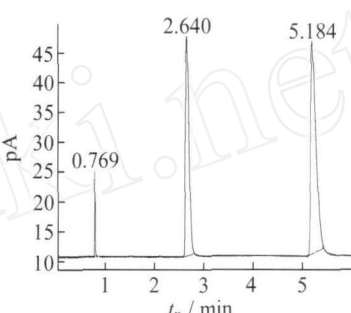


图 3 0.5 mL 发酵液对应的丙烯腈水合酶活性谱图
Fig.3 Chromatogram of acrylonitrile hydratase activity with 0.5 mL fermented solution

参考文献:

[1] LUO Ji-xing(罗积杏),XUE Jian-ping(薛建萍),SHEN Yi-rchu(沈寅初). Shanghai Chemical Industry(上海化工)[J], 2007,32(2):17.

[2] QIU Feng(邱 峰),LI Zhi-dong(李志东),LI Na,et al(李 娜等). Mining & Metallurgy(矿冶)[J],2006,15(3):52,37.

[3] YANG Sheng-yu(杨生玉),MA Wu-sheng(马武生),MA Tong-sen(马同森). Journal of Zhengzhou Institute of Light Industry(Natural Science)(郑州轻工业学院学报(自然科学版))[J],2004,19(1):56.

[4] LI Zhi-dong(李志东),LIANG Wei(梁 伟),MIAO Lei,et al(苗 磊等). Science Technology and Engineering(科学技术与工程)[J],2006,14(6):2072.

[5] GAO Yi(高 毅),LIU Ming(刘 铭),CAO Zhu-an(曹竹安). The Chinese Journal of Process Engineering(过程工程学报)[J],2005,5(2):193.

[6] CHEN Zhi(陈 跖),SUN Xu-dong(孙旭东),SHI Yue,et al(史 悦等). Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)[J],2002,17(1):55.

[7] CHEN Zhi(陈 跖),SUN Xu-dong(孙旭东),SHI Yue,et al(史 悦等). Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)[J],2002,18(2):225.

[8] LIU Ming(刘 铭),LI Chun(李 春),GAO Yi,et al(高 毅等). Journal of Chemical Industry and Engineering(China)(化工学报)[J],2004,55(10):1678.

Study on Measurement of Acrylonitrile Hydratase Activity

GAO Jun¹, SHI Ji-cheng^{*2}

(1. Daqing Refining & Chemical Company, Daqing, Heilongjiang 163411; 2. School of Environmental & Chemical Engineering, Dalian Jiaotong University, Dalian, Liaoning 116028)

Abstract: A method to evaluate of the activity of acrylonitrile hydratase based on gas chromatography was developed. It was found that the pH value was an important factor in the determination of the activity of acrylonitrile hydratase. When the pH value was below 2.0, the enzyme activity was inhibited completely.

Keywords: Acrylamide; Gas chromatography; Acrylonitrile hydratase