

利用微生物將丙烯腈轉換成丙烯醯胺之研究

馮筠書¹ 李季眉² 王俊欽³

關鍵詞：丙烯腈、丙烯醯胺、生物轉換、*Mesorhizobium* sp.。

摘 要

丙烯腈屬氰化物之一，其所攜帶的腈基不易為微生物所分解且對生物具有毒性。微生物轉換丙烯腈是利用腈水合酶(NHase)將丙烯腈轉換至丙烯醯胺，再以醯胺酶將丙烯醯胺轉換成丙烯酸與氨氮。其中間產物丙烯醯胺為具商業價值之物質，且有研究指出鈷或鐵離子為腈水合酶之輔助因子能增加其活性，而醛類能抑制醯胺酶活性。本研究分離出一株丙烯醯胺生成菌，經 16S rDNA 序列比對資料庫得知菌名為 *Mesorhizobium* sp.；該菌株能以鈷離子作為腈水合酶之輔助因子，增加腈水合酶活性；當添加之丙烯腈濃度由 297.8 mg/l 增加至 976.2 mg/l 時，丙烯腈皆能完全轉換且隨丙烯腈添加濃度愈高，丙烯醯胺累積濃度愈高，丙烯醯胺累積濃度由 275.6 mg/l 增加至 758.4 mg/l。所添加丙烯腈濃度提高至 1906.0 mg/l 時，丙烯腈轉換情形與丙烯醯胺累積濃度並不好，於實驗監測終點，丙烯腈轉換率為 30.2%，丙烯醯胺累積濃度為 404.9 mg/l；於醛類抑制實驗中，乙醛對於菌株 *Mesorhizobium* sp.之醯胺酶活性具有較佳抑制能力能幫助丙烯醯胺的累積，添加濃度 493.8 mg/l 之丙烯腈其丙烯醯胺累積濃度為 634.9 mg/l，但相對的卻會影響丙烯腈之轉換情形；而丙醛抑制醯胺酶能力較乙醛低，但卻具有較佳轉換丙烯腈能力且能持續累積丙烯醯胺，於反應時間 0.1 小時，能將 493.8 mg/l 丙烯腈完全轉換，且丙烯醯胺累積濃度為 605.6 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 91.7%。

BIOTRANSFORMATION OF ACRYLONITRILE TO ACRYLAMIDE BY THE ACRYLAMIDE-PRODUCING BACTERIA

Yung-Shu Feng¹ Chi-Mei Lee² Chun-Chin Wang³

^{1,2}Department of Environmental Engineering,
National Chung Hsing University,
Taichung 402, Taiwan, R.O.C

³Department of Environmental Engineering,
Hung Kuang University,
Taichung 433, Taiwan, R.O.C

Key words: Acrylonitrile, Acrylamide, biotransformation, *Mesorhizobium* sp.

1 國立中興大學環境工程學系碩士班研究生 E-mail: pine.feng@msa.hinet.net

2 國立中興大學環境工程學系教授

3 弘光科技大學環境工程系助理教授

ABSTRACT

Acrylonitrile is not easily decomposed by organisms and can cause severe environmental pollution due to its high toxicity and mutagenicity. The microorganisms that have both enzymes of nitrile hydratase(NHase) and amidase can catalyze the hydration of acrylonitrile to acrylamide, and can further hydrolyze amide to acid and ammonia. Unlike amidase, nitrile hydratase is a metal-containing enzyme and requires the addition of metal ions (e.g., Co or Fe) to the culture medium for its activity. And some aldehydes including acetaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde, and acrylaldehyde can effectively inhibit the activity of amidase. The production of acrylamide is an important chemical which can be applied to manufacture of synthetic fibers, flocculant agents, paper making aids, and so on. The results indicated that one strain was isolated from the polyacrylonitrile(PAN) fiber manufacture wastewater treatment system. This strain was identified as *Mesorhizobium* sp. by methods based on 16S rDNA gene sequence. It produced significant levels of active nitrile hydratase when cobalt ion was added to the culture medium. When the acrylonitrile concentrations raised from 297.8 mg/l to 976.2 mg/l, *Mesorhizobium* sp. could remove acrylonitrile completely and accumulate acrylamide from 275.6 mg/l to 758.4 mg/l. But when the acrylonitrile concentration was 1906.0 mg/l, the removal efficiency was 30.2% in 118.8 hours, and the acrylamide concentration accumulated only 404.9 mg/l for the same period of time. The addition of acetaldehyde could inhibit the activity of amidase and accumulate more acrylamide, but it needed 126.4 hours to remove acrylonitrile completely. The inhibitory effect of propionaldehyde was worse than acetaldehyde, but in the presence of propionaldehyde, acrylonitrile could be removed completely within 0.1 hours and acrylamide could accumulate to the concentration of 605.6 mg/l, the percentage of conversion was 91.7%.

一、前言

丙烯醯胺(acrylamide)為一極重要的商業化學物質，於工業上能做為合成染料、調整土壤狀態的試劑、粘著劑等。且丙烯醯胺的聚合物能應用於紙的製造、廢水處理、油的回收，及廣泛利用於生物技術上。丙烯醯胺可利用生物轉換方法以丙烯醯胺生成菌於適當條件下轉換丙烯腈(acrylonitrile)累積丙烯醯胺[1]。因丙烯腈為氰化物，對生物具有毒性，其所攜帶的氰基(-CN group)不易為生物所分解[2]，且丙烯腈會經由呼吸道、皮膚或誤食而中毒，若不慎排入水體中，則對人體及生態環境具有重大影響。所以利用生物轉換方法不僅能處理有毒物質丙烯腈且能生成高價值的丙烯醯胺。微生物代謝丙烯腈途徑有二：一為經由腈水解酶(nitrilase)的催化，腈化物

直接被轉變成相對應之羧酸與氨[3][4][5]；另一種為腈化物先經腈水合酶(nitrile hydratase, NHase)催化產生醯胺，醯胺再被醯胺酶(amidase)催化產生羧酸與氨[6][7][8][9]。Amarant 等學者指出醛類對於菌株 *Corynebacterium nitrilophilus* 的 amidase 是可逆性且有效的抑制物質，且醛類不會對 NHase 的活性造成抑制[10]。而文獻指出一些菌株之 NHase 需要金屬離子作為輔助因子才具有活性，例如菌株 *Rhodococcus rhodochrous* J1 只有培養在含有鈷離子環境時才會產生 NHase，且沒有其他金屬離子可以取代[11]。藉由添加不同形式之鈷化合物於培養環境中，能使 *Rhodococcus rhodochrous* J1 之 NHase 活性提高許多[12]。根據 Nagasawa 等人研究，*Brevibacterium* R312 之 NHase 需要鐵離子為 cofactor[13]。所以本研究希望從工業廢水處理廠活性污泥中篩選出能利用腈水

合酶-醯胺酶酵素系統代謝丙烯腈的菌株，並藉著增加腈水合酶的活性以及抑制醯胺酶的活性來增加丙烯醯胺的累積量，期能去除丙烯腈並同時獲得高價值的丙烯醯胺。

二、實驗方法

2.1 丙烯醯胺生成菌的分離

由國內某 PAN 人造纖維製造廠廢水處理廠曝氣槽之活性污泥取回後，進行丙烯醯胺生成菌的分離，採用的培養液為含鈷鐵離子之磷酸鹽緩衝溶液，而菌株之分離方法如下：1.取活性污泥 10 ml，加入含有 100 ml 磷酸鹽緩衝溶液的 250 ml 三角瓶中。2.加入約 500 mg/l 丙烯腈，並以棉花塞塞住瓶口。3.於 30°C、120 rpm 下振盪培養 1~3 天，定時取出 5 ml 液體以 0.2 μm 過濾頭過濾後，以 HPLC 分析基質濃度之變化。4.觀察是否有丙烯腈濃度之減少及丙烯醯胺之生成，若有則將上述污泥溶液取出 10 ml 加入新的滅菌磷酸鹽緩衝溶液中，重複步驟 1~4。5.經過兩次重複步驟之後，將污泥取出作稀釋系列。6.將污泥之稀釋系列塗抹於 R2A 洋菜培養基上，於 30°C 下培養。7.挑出單一菌落後進行劃碟，一再重複直到確定培養基上為單一純菌。

磷酸鹽緩衝溶液之成分為 K_2HPO_4 : 1.0 g/l、 KH_2PO_4 : 1.0 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.2 g/l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.02 g/l、Trace element solution : 10 ml/l。R2A 之成份(g/l)為 yeast extract : 0.5、Difco Proteose Peptone no.3 : 0.5、 K_2HPO_4 : 0.3、casamino acids : 0.5、glucose : 0.5、soluble starch : 0.5、sodium pyruvate : 0.3、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.05、Agar : 15。

2.2 純種菌株的鑑定

以 16S rDNA 序列作菌種鑑定。方法為先將菌株中染色體的 DNA 萃取純化出來，經瓊脂糖凝膠電泳確認已獲得 DNA 後，以 PCR 將樣品 DNA 量放大，之後再以瓊脂糖凝膠電泳分析確認經放大倍增之樣品 DNA，隨後將電泳跑出的 DNA 片段作純化，最後送去定序，以定序後所得之基因序列輸入基因序列資料庫(NCBI 網站上之 BLAST 程式)進行比對，即可鑑定該菌株。PCR 操作條件為(a)94°C、5 分鐘，進行熱啟動(hot start)，(b)94°C、1 分鐘，使模版 DNA 產生變性，(c)55°C、1 分鐘，讓引發物與模版 DNA

煉合，(d)72°C、2 分鐘，進行 DNA 延長作用。如此重複 30 個循環，再於 72°C 反應 10 分鐘，使 DNA 之合成能充分延長。所使用之引發物(primer)為 27f 與 1492f。

27f 為 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'。其中 M 為(AC)。

1492f 為 5'-TACGGYTACCTTGTTACGAC TT - 3'。其中 Y 為(CT)[14]。

2.3 菌株質體存在與否實驗

本實驗利用 QIA prep Spin Miniprep Kit 抽取質體，以確知菌株有無質體的存在[14]

2.4 金屬離子對丙烯醯胺生成菌之影響

以無菌棉花棒將菌株由培養皿移入經滅菌之磷酸鹽緩衝溶液中，而緩衝溶液分別含有鐵與鈷、鈷、鐵微量元素，並以單光束分光光度計於波長 600 nm 下調整菌液吸光度值為 0.08~0.1，隨後分裝菌液於 120 ml 血清瓶中，添加濃度 976.2 mg/l 丙烯腈，蓋上鋁蓋，置於 30°C、120 rpm 下振盪培養，定時分析丙烯腈、丙烯醯胺、丙烯酸、氨氮、pH 及 O.D.₆₀₀ 值的變化。

2.5 丙烯腈濃度對丙烯醯胺生成菌之影響

以無菌棉花棒將菌株由培養皿移入經滅菌之磷酸鹽緩衝溶液中，並以單光束分光光度計於波長 600 nm 下調整菌液吸光度值為 0.08~0.1，隨後分裝菌液於 120 ml 血清瓶中，分別添加濃度 297.8 mg/l、591.1 mg/l、880.2 mg/l、976.2 mg/l、1446.7 mg/l、1906.0 mg/l、2354.4 mg/l 丙烯腈，蓋上鋁蓋，置於 30°C、120 rpm 下振盪培養，定時分析丙烯腈、丙烯醯胺、丙烯酸、氨氮、pH 及 O.D.₆₀₀ 值的變化。

2.6 醛類對丙烯醯胺生成菌之影響

以無菌棉花棒將菌株由培養皿移入經滅菌之緩衝溶液中，以單光束分光光度計於波長 600 nm 下調整菌液吸光度值為 0.08~0.1，隨後分裝菌液於 120 ml 血清瓶中，分別添加濃度 142.3 mg/l 乙醛、139.0 mg/l 丙醛、140.7 mg/l 丁醛以及濃度 493.8 mg/l 丙烯腈，立即蓋上鋁蓋，置於 30°C、120 rpm 下振盪培養，定

時分析丙烯腈、丙烯醯胺、丙烯酸、氨氮、pH 及 O.D.₆₀₀ 值的變化。

2.7 分析方法

1. 丙烯腈、丙烯醯胺、丙烯酸

丙烯腈、丙烯醯胺、丙烯酸是以高效率液相層析儀(HPLC, Hitachi 日本)進行分析。每隔一段時間所取之樣品，以 0.2 μm Lida Nylon 過濾頭過濾，過濾後再以微量針筒抽取濾液 20 μl 注入分析。操作條件如下：UV detector 之波長設定為 210 nm，使用之層析管柱為 Merck Lichrospher 100RP-18 endcapped (5 μm)，Mobile phase 組成為 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 3:7$ (v/v)，流量為 0.6 ml/min。

2. 氨氮

菌株於分解丙烯醯胺時會將丙烯醯胺($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$)中之氮以氨氮(NH_3)的形式釋放出來，故監測反應過程中氨氮濃度之變化有助於瞭解丙烯醯胺之分解程度。本研究中氨氮濃度之分析是採引朵酚藍法(indophenol-blue)[15]，此法係利用比色原理來分析水樣中氨氮濃度。

3. pH 值

pH 值是以 pH-meter 進行監測，pH-meter 為 HAMA Instrument Corp H18418 型。

4. O.D.₆₀₀ 值

O.D.₆₀₀ 值以單光束分光光度計(BECKMAN DU®530)在波長 600 nm 下進行監測。

三、結果與討論

3.1 丙烯醯胺生成菌的分離與鑑定結果

以丙烯腈為基質的丙烯醯胺生成菌是利用 R2A 作為培養基來分離。在分離過程中篩選出會利用丙烯腈之菌株，並監測這些菌株於轉換過程中是否會有丙烯醯胺的生成。由活性污泥中總共分離出 34 株純種菌株，經初步篩菌測試結果發現一株轉換丙烯腈累積丙烯醯胺能力較好的菌株，菌株編號為 F28。

菌株 F28 經 16S rDNA 序列鑑定方式得知為 *Mesorhizobium* sp.。該菌株經由 QIAprep® Spin Miniprep Kit 操作，結果發現菌株體內並無質體的存

在(結果未圖示)，顯示菌株 *Mesorhizobium* sp. 轉換丙烯腈累積丙烯醯胺的能力是位於染色體上。

3.2 金屬離子對 *Mesorhizobium* sp. 生成丙烯醯胺之影響

圖 1 為菌株 *Mesorhizobium* sp. 分別於含鐵與鈷、鈷、鐵離子磷酸鹽緩衝溶液中轉換濃度 976.2 mg/l 丙烯腈之丙烯腈與丙烯醯胺濃度變化情形。由圖中可知，菌株 *Mesorhizobium* sp. 於含鐵與鈷離子與僅含鈷離子磷酸鹽緩衝溶液下之丙烯腈轉換情形相似，於 55.8 小時，丙烯腈轉換率分別為 97.0% 與 98.7%，而於 69.5 小時丙烯腈皆達 100% 去除。於含鐵離子之磷酸鹽緩衝液中，丙烯腈轉換情形明顯較差，於 69.4 小時丙烯腈轉換率只有 32.6%。丙烯醯胺累積濃度於丙烯腈的轉換過程中漸增，含鐵與鈷離子緩衝溶液之丙烯醯胺最高累積濃度為 997.2 mg/l，此時丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 76.2%。磷酸鹽緩衝液中含鈷離子之丙烯醯胺累積最高濃度為 942.6 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 72.1%。於僅含鐵離子磷酸鹽緩衝溶液之丙烯醯胺累積濃度相較於含鐵與鈷或僅含鈷離子之情形明顯較小，丙烯醯胺累積濃度為 260.5 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 19.9%。整個實驗過程中，於含鐵與鈷、鈷、鐵離子之磷酸鹽緩衝液中隨著丙烯腈的轉換，丙烯酸濃度亦有逐漸增加的趨勢，丙烯酸最大累積濃度分別為 336.3 mg/l、378.6 mg/l、313.4 mg/l。於此三種情形下，pH 值皆有些微的下降，而 O.D.₆₀₀ 變化並不明顯(結果未圖示)

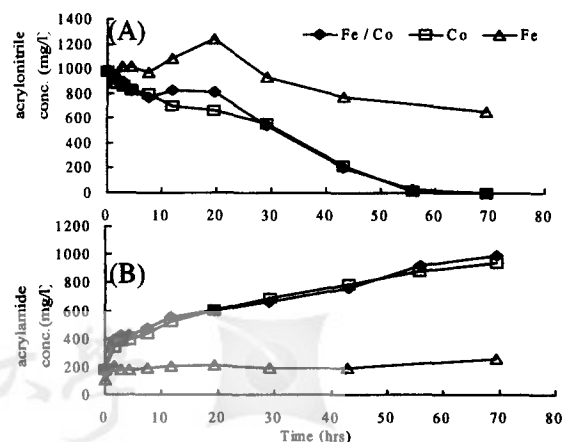


圖 1 菌株 *Mesorhizobium* sp. 於含鐵與鈷、鈷、鐵離子之磷酸鹽緩衝溶液中轉換丙烯腈(A)與累積丙烯醯胺(B)濃度變化情形。

根據上述實驗結果得知，當磷酸鹽緩衝溶液中含鈷離子時菌株具有較佳轉換丙烯腈累積丙烯醯胺的能力。亦即，菌株 *Mesorhizobium* sp. 所含脲水合酶於含鈷離子作為輔助因子時具有較佳的活性，故往後以含鈷離子之磷酸鹽緩衝溶液進行實驗。

3.3 丙烯腈濃度對 *Mesorhizobium* sp. 生成丙烯醯胺之影響

為了解菌株 *Mesorhizobium* sp. 對於不同濃度丙烯腈之轉換情形，以五種不同丙烯腈濃度(297.8、880.2、1446.7、1906.0、2354.4 mg/l)進行批次實驗。圖 2 為菌株 *Mesorhizobium* sp. 於含鈷離子之磷酸鹽緩衝溶液下轉換 297.8 mg/l 丙烯腈之各項監測值變化情形。由圖中可知，於 4.9 小時丙烯腈轉換率已達 93.3%，為進一步驗證菌株 *Mesorhizobium* sp. 確實可將丙烯腈轉換成丙烯醯胺及了解其轉換能力，故於 8.6 小時再添加濃度 295.6 mg/l 之丙烯腈，再添加之丙烯腈於 12.9 小時被轉換達 98.8%。在丙烯腈減少的過程中，可同時監測到丙烯醯胺的生成且於 9.6 小時達到最大濃度 369.9 mg/l，此時丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 46.9%。於 9.6 小時~28.8 小時丙烯醯胺濃度漸減，丙烯酸濃度漸增至 718 mg/l，隨後丙烯酸可能被菌株 *Mesorhizobium* sp. 當碳源利用而逐漸減少。另一代謝產物氨的變化情形與丙烯酸類似，其最大濃度 186.5 mg/l 出現於 28.8 小時。pH 值則隨著溶液中丙烯酸與氨的產生漸減，由起始的 7.51 到最終點的 7.16。菌液生長方面，O.D.₆₀₀ 值起初變化並不明顯，至 22.5 小時後大幅增加。

當所添加丙烯腈濃度為 880.2 mg/l 時，於 12.8 小時，菌株 *Mesorhizobium* sp. 之丙烯腈轉換率為 95.1%。隨著丙烯腈的逐漸轉換，丙烯醯胺濃度漸增，於 12.8 小時丙烯醯胺累積最高濃度為 823.3 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 69.8%。而後丙烯醯胺逐漸轉換為丙烯酸。當丙烯腈濃度為 1446.7 mg/l 時，於 118.8 小時丙烯腈轉換率為 72.6%，此時丙烯醯胺累積最高濃度為 796.9 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 41.1%。當丙烯腈添加濃度增加至 1906.0 mg/l 與 2354.4 mg/l 時，於實驗監測終點 118.8 小時丙烯腈轉換率分別為 30.2% 與 11.1%，而丙烯醯胺累積最高濃度為 404.9 mg/l 與 259.0 mg/l，此時丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率分別為 15.9% 與 8.2% (圖 3)。在整個

實驗過程中皆監測到丙烯酸與氨的產生，而隨著丙烯酸的生成，pH 值亦皆有下降的趨勢。菌液生長方面，O.D.₆₀₀ 有略為增加但並未有明顯變化情形(結果未圖示)。

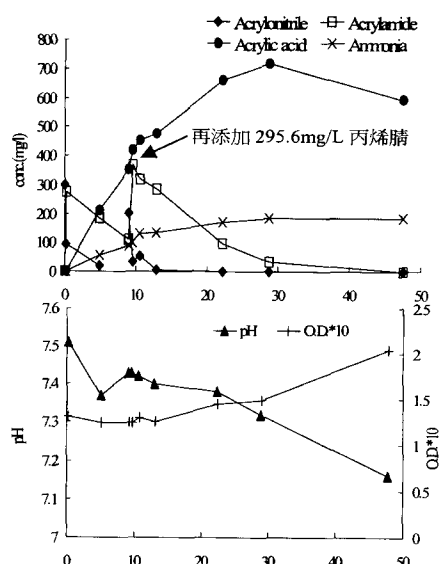


圖 2 菌株 *Mesorhizobium* sp. 於含鈷離子之磷酸鹽溶液下轉換 297.8 mg/l 丙烯腈之各項監測值變化情形。

由上述實驗結果及與 3.2 節中轉換濃度 976.2 mg/l 丙烯腈所述可知，當丙烯腈濃度由 297.8 增至 976.2 mg/l 時，菌株 *Mesorhizobium* sp. 皆能將丙烯腈完全轉換而累積丙烯醯胺，當所添加丙烯腈濃度愈高則丙烯醯胺累積濃度則由 275.6 mg/l 漸增至 758.3 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率分別為 69.1% 與 58.0%。而當丙烯腈濃度由 1446.7 mg/l 增加至 2354.4 mg/l 時，丙烯腈之轉換效率則隨濃度增加而漸減，且除添加丙烯腈濃度 1446.7 mg/l 之丙烯醯胺累積情形較好外，丙烯醯胺之累積濃度並不高，顯示所添加丙烯腈濃度小於 976.2 mg/l 時，具有較佳轉換效率及丙烯醯胺累積情形。而造成丙烯腈濃度大於 1446.7 mg/l 時，菌株 *Mesorhizobium* sp. 累積丙烯醯胺能力較差之原因，可能為高濃度丙烯腈抑制其脲水合活性。

3.4 醛類對 *Mesorhizobium* sp. 生成丙烯醯胺之影響

為了解醛類對菌株 *Mesorhizobium* sp. 累積丙烯醯胺能力之影響，故額外添加乙醛、丙醛及丁醛來探討其累積丙烯醯胺情形。圖 4 為添加乙醛、丙醛及丁醛濃度分別為 142.3、139.0 與 140.7 mg/l 時，菌株

Mesorhizobium sp. 轉換丙烯腈濃度 493.2 mg/l 之變化情形。由圖中可知，當額外添加濃度 142.3 mg/l 乙醛，於 35.6 小時 *Mesorhizobium* sp. 轉換濃度 493.8 mg/l 丙烯腈之轉換率為 97.4%，且於 126.4 已監測不到丙烯腈。此時丙烯醯胺累積濃度為 634.9 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 96.0%。而隨著丙烯腈的轉換，丙烯酸濃度亦逐漸增加至 19.8 mg/l。當額外添加 139.0 mg/l 丙醛時，於 0.1 小時已監測不到丙烯腈，而此時丙烯醯胺累積濃度為 605.6 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 91.7%。丙烯酸濃度為 20.8 mg/l。為確認其轉換情形故於 26.3 小時再添加濃度 487.8 mg/l 之丙烯腈，所添加丙烯腈於反應時間 27.5 小時時已監測不到，隨著丙烯腈的轉換，丙烯醯胺亦持續累積至 1163.1 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 88.5%。此時丙烯酸濃度為 91.0 mg/l，之後隨著丙烯醯胺轉換至丙烯酸，丙烯醯胺濃度漸減而丙烯酸濃度漸增。當所添加醛類為丁醛時，於 3.6 小時已監測不到丙烯腈且此時丙烯醯胺及丙烯酸濃度分別為 587.5 mg/l 與濃度為 46.1 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 88.9%。隨後丙烯醯胺逐漸轉換為丙烯酸。為進一步確認菌株 *Mesorhizobium* sp. 於丁醛存在下，其對丙烯腈之轉換情形，故於 26.3 小時再添加濃度 487.8 mg/l 丙烯腈。再添加丙烯腈於 32.0 小時亦被轉換 98.1%，且於反應時間 34.0 小時，丙烯醯胺累積之最高濃度為 971.6 mg/l，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率為 73.9%。而丙烯酸濃度為 339.7 mg/l，隨後丙烯醯胺漸轉換為丙烯酸而濃度漸減。整個實驗過程中，不管額外添加乙醛、丙醛或丁醛，隨著丙烯酸濃度的累積，氨氮濃度亦逐漸增加，且 pH 值隨丙烯酸濃度漸增而下降。在菌液生長方面，O.D.₆₀₀ 值變化皆不明顯(結果未圖示)。

表 1 為比較菌株 *Mesorhizobium* sp. 分別於含鐵與鈷、鈷、鐵離子磷酸鹽緩衝溶液中轉換濃度 976.2 mg/l 丙烯腈與額外添加濃度 142.3 mg/l 乙醛、139.0 mg/l 丙醛及 140.7 mg/l 丁醛且未包含再添加丙烯腈情形下，轉換濃度 493.8 mg/l 丙烯腈累積丙烯醯胺之整理。由表中可知當磷酸鹽緩衝溶液中含鈷離子時菌株 *Mesorhizobium* sp. 具有較佳丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率，能夠獲得較高濃度丙烯醯胺的累積。額外添加醛類確實可抑制菌株 *Mesorhizobium* sp. 之醯胺酶活性，丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率較高使丙烯醯胺累積濃度較高。三種醛類比較結果可知乙醛具有較佳

的抑制能力，能夠獲得較高的丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率，對於丙烯醯胺累積有所幫助，但相對的卻需較長的反應時間才能達到 100% 丙烯腈的轉換。故乙醛除抑制醯胺酶活性外，亦會輕微抑制腈水合酶的活性。雖然添加丙醛所累積之丙烯醯胺濃度較低但其卻具有較佳的丙烯腈轉換效果，且於再添加丙烯腈的情形下亦能持續的轉換丙烯腈與累積丙烯醯胺。故於實際應用上，可採行含鈷離子作為輔助因子並添加丙醛來達到良好的丙烯腈去除與丙烯醯胺的累積。

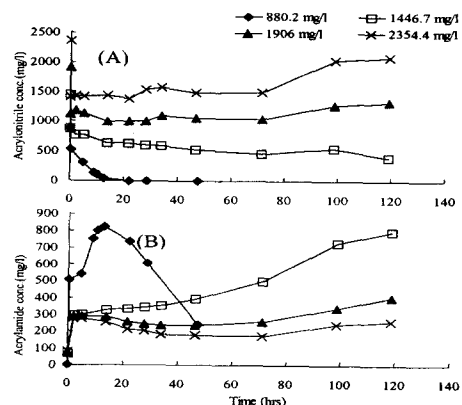


圖 3 菌株 *Mesorhizobium* sp. 於含鈷離子之磷酸鹽緩衝溶液中轉換濃度 880.2、1446.7、1906.0 及 2354.4 mg/l 丙烯腈之監測情形。(A)與(B)分別為丙烯腈與丙烯醯胺濃度變化情形。

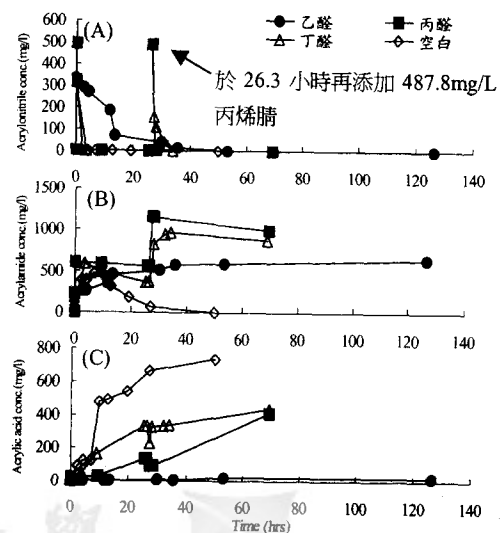


圖 4 菌株 *Mesorhizobium* sp. 於未添加醛類與添加乙醛、丙醛及丁醛濃度為 142.3、139.0 和 140.7 mg/l 時轉換丙烯腈濃度 493.2 mg/l 之監測情形。(A)、(B)與(C)分別為丙烯腈、丙烯醯胺與丙烯酸濃度變化情形。

誌 謝

本實驗承蒙國科會專題研究計劃(NSC91-2211-E-005-013)提供經費補助得以順利完成，謹此致謝。

五、參考文獻

1. Nawaz, M.S., Chapatwala, K.D. and Wolfram, J.H., "Degradation of Acetonitrile by *Pseudomonas putida*," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, No. 9, pp. 2267-2274 (1989).
2. Yanase, H., Sakai, T. and Tonomura, K., "Microbial Metabolism of Nitriles in *Pseudomonas* sp.," *Journal of Fermentation Technology*, Vol. 63, No. 2, pp. 193-198 (1985).
3. Hook, R. H. and Robinson, W.G., "Ricinine Nitrilase. II. Purification and Properties," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 239, No. 12, pp. 4263-4267 (1964).
4. Harper, D.B., "Fungal Degradation of Aromatic Nitriles. Enzymology of C-N Cleavage by *Fusarium Solani*," *The Biochemical Journal*, Vol. 167, pp. 685-692 (1977)
5. McBride, K.E., Kenny, J.W. and Stalker, D.M., "Metabolism of the Herbicide Bromoxynil by *Klebsiella Pneumoniae* Subsp. *Ozaenae*," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 52, No. 2, pp. 325-330 (1986).
6. Asano, Y., Fujishiro, K., Tani, Y. and Yamada, H., "Aliphatic Nitrile Hydratase from *Arthrobacter* sp. J-1. Purification and Characterization," *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 46, No. 5, pp. 1165-1174 (1982)
7. Yanase, H., Sakai, T. and Tonomura, K., "Microbial Metabolism of Nitriles in *Pseudomonas* sp.," *Journal of Fermentation Technology*, Vol. 63, No. 2, pp. 193-198 (1985).
8. Linton, E.A. and Knowles, C.J., "Utilization of Aliphatic Amides and Nitriles by *Nocardia Rhodochrous* LL100-21," *The Journal of General Microbiology*, Vol. 132, pp. 1493-1501 (1986).
9. Babu, G.R.V., Wolfram, J.H., Marian, J.M. and

丙烯腈 (mg/l)	醛類	金屬離子	時間 (hrs)	丙烯腈去除率 (%)	丙烯醯胺累積濃度 (mg/l)	丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率 (%)*
976.2	-	Co/Fe	69.5	100	997.2	76.2
	-	Co	69.5	100	942.6	72.1
	-	Fe	69.4	32.6	260.5	19.9
493.2	-	Co/Fe	2.36	100	394.6	59.7
	乙醛	Co/Fe	126.4	100	634.9	96.1
	丙醛	Co/Fe	0.1	100	605.6	91.7
	丁醛	Co/Fe	3.6	100	587.4	88.9

*丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率=(丙烯醯胺累積莫耳濃度/丙烯腈轉換莫耳濃度)×100%

四、結 論

本實驗主要從某 PAN 人造纖維製造廠廢水處理廠曝氣槽之活性污泥中分離出丙烯醯胺生成菌，並研究丙烯醯胺生成菌之生理特性期能對丙烯腈之去除有所助益並得到高產量之丙烯醯胺。實驗結果顯示：

1. 由活性污泥中分離出一株具有較好轉換丙烯腈累積丙烯醯胺能力的菌株 F28，經 16S rDNA 序列鑑定方式得知菌名為 *Mesorhizobium* sp.。
2. 菌株 *Mesorhizobium* sp. 不含有質體。
3. 菌株 *Mesorhizobium* sp. 之腈水合酶，於鈷離子作為輔助因子時具有較佳活性。
4. 當丙烯腈濃度由 297.8 mg/l 增至 976.2 mg/l 時，丙烯腈皆能完全轉換成丙烯醯胺，且隨丙烯腈添加濃度愈高，丙烯醯胺累積濃度愈高。當丙烯腈濃度提高至 1446.7 時，丙烯腈已不能完全被轉換，但丙烯醯胺累積濃度仍然很高。當添加之丙烯腈濃度提高至 1906.0 mg/l 時，丙烯腈轉換情形與丙烯醯胺累積情況不佳。
5. 乙醛對於菌株 *Mesorhizobium* sp. 之醯胺酶活性具有較佳抑制能力且有利於丙烯醯胺的累積，但卻影響丙烯腈之轉換效率。雖然丙醛抑制醯胺酶能力較乙醛低但具有較佳轉換丙烯腈能力且能持續累積丙烯醯胺，在添加鈷離子及丙醛 139.0 mg/l 下可於 0.1 小時內達到 91.7% 丙烯腈轉換丙烯醯胺百分率，獲得高濃度的丙烯醯胺。

- Chapatwala, K.D., "Pseudomonas Marginalis: its Degradative Capability on Organic Nitriles and Amides," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 43, No. 4, pp. 739-745 (1995)
10. Amarant, T., Vered, Y. and Bohak, Z., "Substrates and Inhibitors of the Nitrile Hydratase and Amidase of *Corynebacterium Nitrilophilus*," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 11, pp. 49-59 (1989).
11. Nagasawa, T., Takeuchi, K. and Yamada, H., "Characterisation of a New Cobalt-Containing Nitrile Hydratase Purified from Urea-induced Cells of *Rhodococcus Rhodochrous J1*," *European Journal of Biochemistry*, Vol. 196, pp. 581-589 (1991).
12. Nagasawa, T., Takeuchi, K. and Yamada, H., "Occurrence of a Cobalt-Induced and Cobalt-Containing Nitrile Hydratase in *Rhodococcus Rhodochrous J1*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 155, No. 2, pp. 1008-1016 (1988).
13. Nagasawa, T., Ryuno, K. and Yamada, H., "Nitrile Hydratase of *Brevibacterium R312* -Purification and Characterization," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 139, pp. 1305-1312. (1986).
14. 王俊欽, 「以難分解化合物為基質之脫硝菌的分離及特性研究」, 博士論文, 國立中興大學環境工程學研究所, 台中 (2001)。
15. Keeney, D.R. and Nelson, D.W., "Indophenol-Blue Method," In: *Methods of Soil Analysis*, Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds), part2, second edition, Chemical and Microbiological Properties, pp. 674-676 (1982).
16. 陳莉容, 「利用微生物將丙烯腈轉換成丙烯醯胺之研究」, 碩士論文, 國立中興大學環境工程學系研究所, 台中 (2000)。
17. 馮筠書, 「丙烯醯胺生成菌之分離、鑑定與特性研究」, 國立中興大學環境工程學系暑期參與專題研究計畫成果報告, 台中 (2002)。

論文收稿：92年 7月 14日

論文修訂：92年 8月 14日

論文接受：92年 8月 27日