

一株催化丙烯环氧化菌株的分离及特性*

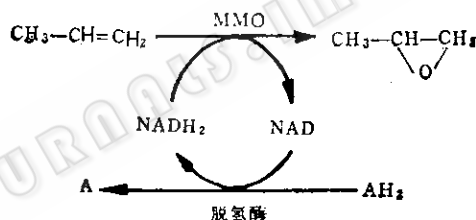
王福来 郑 坚 王 飏 陈景茹 胡 晓 赵树杰

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

从 87 株能利用甲烷的培养物中筛选到一株具有高甲烷单加氧酶活性的甲基单胞菌菌株 (*Methylomonas* Z201)。研究了该菌的最佳生长条件和催化丙烯氧化积累环氧丙烷(PO)的最佳催化条件。在最佳条件下, Z201 休止细胞的催化能力达 $60 \text{ nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干细胞。

关键词 甲基营养细菌; 甲烷单加氧酶; 环氧丙烷

环氧丙烷是塑料工业的重要单体, 我国采用氯醇法工艺生产, 该工艺的缺点是原料成本和能耗较高, 且产生严重的氯代烃类污染环境, 因此, 用生物催化法合成环氧丙烷(PO)的研究一直引人注目。70 年代末, 发现甲烷氧化细菌的单加氧酶可催化丙烯氧化形成环氧丙烷, 且环氧丙烷不被进一步代谢而分泌到胞外^[1], 这一发现成为生物氧化法合成环氧丙烷的一条潜在途径。在甲烷单加氧酶(MMO)催化下, 氧气直接氧化丙烯积累 PO, 反应过程中消耗 NADH_2 ^[2]。



该反应要求的条件温和, 与氯醇法工艺相比较, 辅助原料只需再生辅酶 I 所用的还原基质 (AH_2), 免除了因使用氯气造成的氯代烃类污染。80 年代国外不少实验室开展这方面的研究, 并从甲烷单加氧酶扩展到氨加氧酶和其他气态烃单加氧酶。研究工作的重点之一是筛选较高催化活性的菌株^[3,4], 但筛选到的菌株的催化能力仍不能适应工业化的要求。本研究的目的是寻找具有更高催化活性的菌种, 并建立其最佳生长和催化条件。

材 料 和 方 法

(一) 甲烷氧化细菌的富集、分离和纯化

采用以前报告的程序^[5,6], 但对原使用的 No. 2 培养基稍加修改: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 减为 0.5 g/L , 补加 NaCl (0.5 g/L), 需要时添加 NaHCO_3 (0.02 g/L)。

(二) 筛选

受试菌株先在试管中用液体培养基活化, 再经扩大培养, 最后按 10—20% 接种量转

本文于 1991 年 4 月 24 日收到。

* 国家自然科学基金资助课题。

原天然气蛋白组和彭 莉、陈跃初、李 浩同志曾参加部分工作, 特致谢意。

入盛于 500ml 摇瓶的 50ml 培养基中, 密封后充 250mm 汞柱分压的天然气作为碳源, 30—35℃ 振荡培养。根据生长性能选取优势菌株进入初筛。分别测定其细胞干重、以甲烷为底物的氧吸收能力和转化丙烯为环氧丙烷的能力, 再选取生长好、活性高的菌株进行复筛, 除了继续观察上述特性外, 还测定了休止细胞在磷酸缓冲液 (50mmol/L, pH 7.0) 中的活性保存能力和对环氧丙烷的耐受性。

(三) 生长条件试验

采用以前报告的程序^[5,6], 生长量用洗涤后的细胞干重 (105℃ 恒重) 表示。

(四) 细胞单加氧酶活性的测定

使用 Rank 氧电极法和气相色谱法测定^[4]。

(五) 发酵罐中的细胞培养

使用 MD500-10L 发酵罐 (B. E. MARUBISHI CO. LTD TOKYO, JAPAN)。接种量 20—40%, 培养温度 34℃, pH 6.9, 溶解氧控制在 7—15% 范围内。

(六) 化学试剂

甲烷: 培养用甲烷(碳源)为民用天然气, 含甲烷 98% 以上, 氧电极法测定单加氧酶活性用纯甲烷钢瓶气 (99.8 以上, 威远天然气八厂); 环氧丙烷: 色谱纯, 上海试剂一厂; 丙烯: 工业用钢瓶气; 甲醇: 分析纯(重庆东方试剂厂)。

结 果

(一) 筛选

从全国各地的各种自然生境中, 采集了千余份样品, 其中包括各种土壤、油田、气田、矿井、沼气发酵池、固体垃圾处理池、浓香型大曲酒窖等环境来源, 大都能从中获得利用甲烷作唯一碳源的培养物。从中筛出 170 株生长性能较好的优势菌株。

由上述 170 株培养物中选出有代表性菌株 87 株, 经初筛得到 8 株单加氧酶活性在 $6\text{nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干细胞以上的菌株, 经过复筛, 发现其中 Z201 菌的各种性能较理想。该菌为粉红色杆菌, 能以甲烷为唯碳源和能源而生长, 经鉴定属于 I 型甲烷氧化细菌甲基单胞菌属 (*Methylomonas*)。

(二) *Methylomonas* Z201 的生长条件

1. 氮源: 试验了 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 KNO_3 和尿素对 Z201 生长的影响。使用不同氮源时, 均保持含氮量的一致 (0.13g/L)。结果发现以 NH_4Cl 或

表 1 氮源对 Z201 生长的影响

Table 1 Effect of nitrogen sources on the growth of strain Z201

氮 源 Nitrogen sources	细胞度 Cells concentration (mg dry cells, ml culture)
NH_4Cl	0.30
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.34
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0.20
KNO_3	0.19
Urea	0.08
None	0.08

(NH_4)₂SO₄ 为氮源时生长最好(见表 1), 这对实际应用是有利的。

2. 温度和培养基 pH 对 Z201 生长的影响: 该菌对培养温度较敏感, 在 32°C—36°C 范围内能正常生长, 以 34—35°C 最佳(图 1)。对 pH 也很敏感, 最适 pH 为 6.8(图 2)。若 pH 低于 6.5, 则细胞开始裂解, 单加氧酶活性随之明显降低。

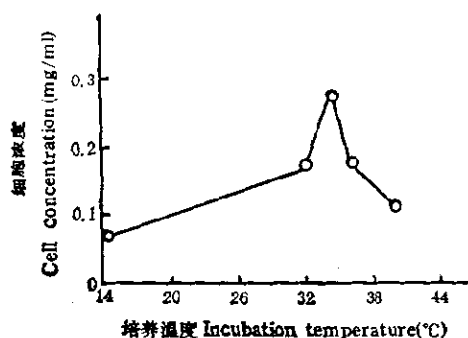


图 1 培养温度对 Z201 生长的影响

Fig. 1 Effect of incubation temperature on growth of strain Z201

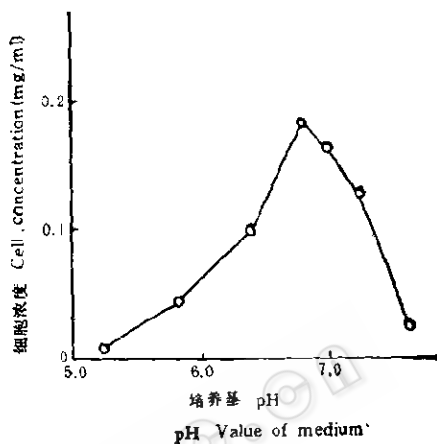


图 2 培养基 pH 对 Z201 生长的影响

Fig. 2 Effect of pH value of medium on growth of strain Z201

3. 磷酸盐浓度对 Z201 生长的影响: 磷酸盐除作为细菌生长的磷源外, 还对维持培养基的 pH 稳定性起重要作用。Z201 静止培养要求的最适浓度为 4g/L(图 3), 高于其他甲烷氧化细菌。

4. 镁离子、铜离子浓度对 Z201 生长的影响: 发现 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 在 0.2—2g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 0.5—8mg/L 范围内时对生长无明显影响。

5. 有机物(蛋白胨、酵母膏)对 Z201 生长的影响: 在无机培养基 No.2 中加入蛋白胨、酵母膏对 Z201 的生长无促进作用, 浓度过高时(1g/L)倒有抑制生长的倾向。

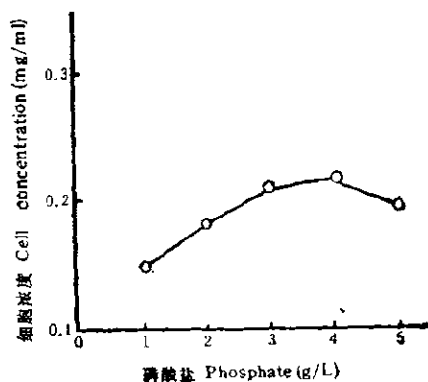


图 3 磷酸盐浓度对 Z201 生长的影响

Fig. 3 Effect of phosphate concentration on growth of strain Z201

(三) Z201 休止细胞催化丙烯环氧化产生环氧丙烷的最佳条件

1. 温度和 pH: Z201 休止细胞转化丙烯积累环氧丙烷的最适温度为 35°C(图 4), 最适磷酸缓冲液 pH 为 7.0(图 5)。

2. 磷酸缓冲液浓度: 磷酸缓冲液浓度在 0.3mol/L 以下时对 Z201 的催化活性影响不大, 直到达 1mol/L 时才受到明显的抑制(表 2)。

3. 还原辅酶 I 的再生基质——甲醇: 甲醇对 Z201 的催化活性有明显促进作用。在

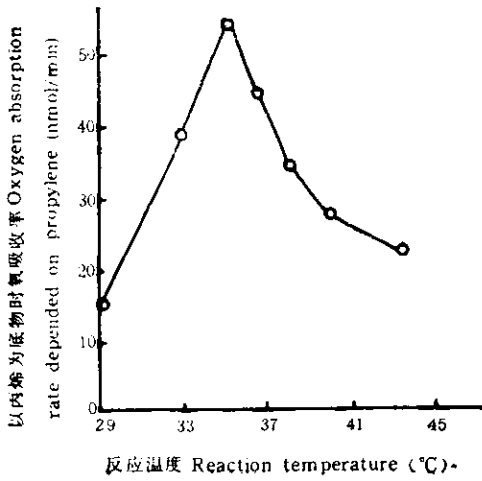


图4 反应温度对 Z201 休止细胞转化丙烯能力的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on propylene epoxidation by resting cells of strain Z201

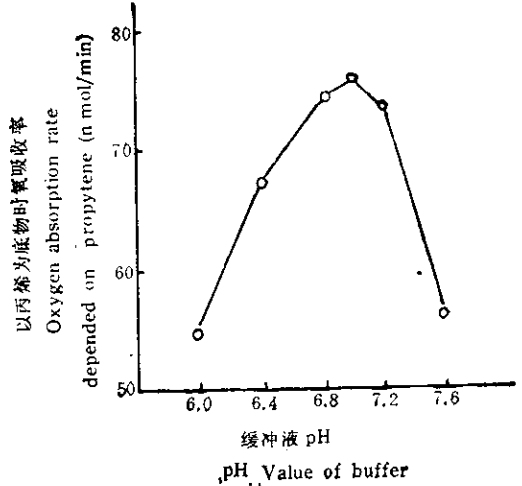


图5 磷酸缓冲液的 pH 对 Z201 休止细胞转化丙烯能力的影响

Fig. 5 Effect of pH value of phosphate buffer on propylene epoxidation by resting cells of strain Z201

表2 磷酸缓冲液浓度对 Z201 催化活性的影响

Table 2 Effect of phosphate buffer concentration on propylene epoxidation by strain Z201

缓冲液浓度 (mol/L) Buffer concentration	0.03	0.10	0.30	1.00
以丙烯为底物的氧吸收率 (nmol/min) Oxygen absorption rate depended on propylene	47	45	44	18

缓冲液中加入 5% 以下浓度的甲醇可使其活性提高一倍左右 (对照和处理分别为 19.5 和 42.3 nmol PO · min⁻¹ · mg⁻¹ 干细胞)。

(四) Z201 菌株休止细胞催化丙烯环氧化的活性

比较了未优化培养条件(筛选条件)和优化后培养条件下静止培养的菌株细胞的生长及其单加氧酶活性。采用优化条件培养者要比未优化条件者的 MMO 活性提高 24.4%，生长速度则提高 30.8% (表 3)。

表3 Z201 休止细胞催化丙烯环氧化的活性

Table 3 Propylene epoxidation ability by resting cells of strain Z201

培养条件 Culture conditions	细胞浓度 (mg/ml) Cell concentration	催化活性 (nmol PO · min ⁻¹ · mg ⁻¹ dry cells) Epoxidation ability
未优化条件静置培养 Static culture under conditions for screening	0.18	26.2
优化条件静置培养 Static culture under optimum conditions	0.25	32.6

另外,比较了静置培养与 10L 发酵罐培养的 Z201 菌株细胞的活性。在 10L 发酵罐上采用优化培养条件培养的 Z201 菌株细胞的活性在 $40\text{nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干细胞以上,最高可达 $61.7\text{nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干细胞,明显高于静置培养。

讨 论

在甲烷氧化细菌催化丙烯环氧化的研究中, Hou 等比较了 30 余株菌,绝大多数催化能力在 $8\text{--}30\text{nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白范围内,其中有一菌株 (*Methylococcus capsulatus* CRL M1) 的最高活性达 $45\text{nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干细胞^[3]。用丙烷为生长底物的细菌,单加氧酶催化这一反应其活性达到 $50.4\text{nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白^[4]。其他具单加氧酶活性的细菌,例如以葡萄糖为生长底物的 *Nocardia corallina* B-276 氧化丙烯活性较低,一般在 $10\text{nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干细胞以下^[5]。作者筛选到的 Z201 菌株具有较高的单加氧酶活性 ($60\text{nmol PO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 干细胞),且培养容易,活性稳定,有一定的应用前景。

与 Hou 等的报告^[3]一样,受试的不同的甲烷氧化细菌菌株催化丙烯环氧化的能力不同,这表明了该能力首先取决于菌株的物种属性。但是作者发现在筛选中菌株间的差异十分容易因生长的差异而被掩盖,原因在于甲烷氧化细菌的生长对培养条件的要求较严格,筛选时所采用的统一培养条件很难使每一受试菌株的生长都获得最佳条件,生长不稳定,催化能力的重现性就较差。一般说来,同一菌株凡生长好的培养物则其催化能力也明显地强。作者在筛选中作了足够批数的重复,以有利于克服由于生长不稳而导致的误选和漏选、一旦最佳生长条件建立起来,生长和催化能力的稳定性就得到明显的改善。

甲烷氧化细菌催化烯烃环氧化的能力除了受细胞合成酶的能力制约外,因为单加氧酶分布在细胞质内,所以也可能与细胞对产物环氧丙烷的耐受能力以及细胞膜运输底物和产物的能力有关。我们发现不同菌株对环氧丙烷的耐受能力有很大的差异。如果一个菌株的细胞对环氧丙烷耐受性能差又不能较快地将产物逸出细胞之外,那么环氧丙烷就会迅速在胞内积累而无法表达出较高的催化能力。作者在筛选中进行了对环氧丙烷耐受能力的考察,这可能对获得高活性菌株有一定的益处。

参 考 文 献

- [1] Colby, J. et al.: *Biochem. J.*, 165: 396—402, 1977.
- [2] Hou, C. T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 1—4, 1984.
- [3] Hou, C. T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 123—132, 1979.
- [4] Woods, N. R. et al.: *Biotechnol. Letters*, 12(6): 409—414, 1990.
- [5] 赵树杰等: *微生物学报*, 29(2): 84—92, 1989.
- [6] 赵树杰等: *微生物学报*, 21(3): 271—277, 1931.
- [7] Furuhashi, K.: *CEER*, 18(200): 21—26, 1986.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A METHANOTROPHIC STRAIN FOR CATALYZING EPOXIDATION OF PROPYLENE

Wang Fulai Zheng Jian Wang Fang Chen Jingru Hu Xiao Zhao Shujie

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

Methylomonas Z201 was screened from 87 methane-utilising strains showed the high MMO activity. The growth requirements and catalysis conditions for 1,2-epoxypropylene production were studied. Under optimum conditions, the MMO activity of resting cells reached $60\text{nmol PO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ dry cells.

Key words Methanotroph; Methane mono-oxygenase; 1,2-epoxypropylene