

# 单相和两相发酵体系中 *Methylomonas* Z201 细胞的生长和环氧丙烷的合成\*

夏仕文<sup>1</sup> 尉迟力 李树本<sup>2</sup>

(中国科学院兰州化学物理研究所碳基合成与选择氧化国家重点实验室 兰州 730000)

**摘要** 研究了单相和两相发酵体系中甲基单胞菌(*Methylomonas*) Z201 细胞的生长和环氧丙烷的合成。在单相发酵体系中,底物丙烯和产物环氧丙烷抑制细胞生长,水相中环氧丙烷的浓度达到 1.3 mmol/L。在两相发酵体系中,十六烷作为生长底物甲烷以及反应底物丙烯和分子氧的“储器”,减小了丙烯对细胞生长的抑制作用,水相和十六烷相中环氧丙烷的浓度分别达到 1.7 mmol/L 和 2.6 mmol/L。同休止细胞相比,单相和两相发酵体系中辅酶 NADH 的原位再生使生长细胞的操作稳定性显著提高,尤为两相体系为甚。

**关键词** *Methylomonas* Z201, 单相发酵体系, 两相发酵体系, 环氧丙烷

**分类号** TQ929

在两相发酵体系中,水不溶性有机溶剂用于培养以水溶性差或对生长细胞有毒性的化合物为生长底物的微生物具有如下优点:(1)提高水溶性差的生长底物的溶解度,(2)抑制有毒底物和/或产物对生物催化剂的抑制作用。在这样的培养体系中,可以采用的两个策略是以反应物(亦为生长底物)为有机相或者将反应物或生长底物溶解于作为有机相的溶剂中。

甲基单胞菌(*Methylomonas*) Z201 是以甲烷为碳源和能源生长的甲烷氧化细菌,能够利用所含甲烷单加氧酶(Monooxygenase, MMO)催化丙烯环氧化<sup>[1]</sup>。前文报道了游离和固定化 *Methylomonas* Z201 细胞在水-有机溶剂中的活性保留并提出了一个溶剂选择原则。尽管十六烷对酶稍有激活作用,但不能提高细胞的操作稳定性<sup>[2]</sup>。本文研究 *Methylomonas* Z201 细胞在单相发酵体系和水-十六烷两相发酵体系中的生长特性和环氧丙烷的生物合成,探讨单相的两相发酵体系中生长细胞的操作稳定性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌株

*Methylomonas* Z201 系中国科学院成都生物研究所筛选,赵树杰先生提供。

### 1.2 试剂及仪器

甲烷、丙烯为市售气体,环氧丙烷(AR,上海试剂一厂),十六烷(CP,上海试剂一厂),甲酸钠(自制)。上海分析仪器厂 1001 型气相色谱仪,岛津 C-R2AX 色谱积分仪,岛津 UV-

\*国家自然科学基金资助课题。

<sup>1</sup>南开大学分子生物所博士后, <sup>2</sup> 通讯联系人。

收稿日期:1997-02-12

120-02型紫外可见分光光度计。

### 1.3 单相发酵体系中丙烯对细胞生长的影响和环氧丙烷的合成

在5只250 ml三角瓶中,加入75 ml J培养基<sup>[3]</sup>和25 ml液体种子,密封,在甲烷:空气 = 1:1气氛中,32℃,150 r/min下预培养16 h,然后分别注入20 ml、40 ml、60 ml和80 ml丙烯,在相同条件下继续培养47 h,用分光光度法和气相色谱法监测培养过程中的细胞生长和形成的环氧丙烷浓度。

### 1.4 两相发酵体系中细胞的生长和环氧丙烷的合成

在4只250 ml三角瓶中,加入25 ml液体种子,一定体积的J培养基和体积分数为10%、20%、30%和50%的十六烷。每个瓶中的培养液体积为100 ml。在甲烷/空气 = 1:1的气氛中,32℃,150 r/min下预培养16 h,然后注入60 ml丙烯,继续培养72 h,采用与单相体系相同的方法监测细胞的生长和测定水相和有机相中的环氧丙烷浓度。

### 1.5 环氧丙烷对细胞生长的影响

单相发酵体系中,细胞预培养24 h后分别加入1.3 mmol/L和1.6 mmol/L环氧丙烷,测定细胞的生长速度和环氧丙烷的剩余浓度。

### 1.6 分析方法

细胞的生长用OD值表示。定时移取2 ml水相发酵液,用分光光度法在波长为560nm下测定。

水相和有机相中的环氧丙烷浓度用气相色谱法测定。色谱条件为:SE-54弹性石英毛细管柱(25m × 0.25mm i.d.),载气N<sub>2</sub>,FID检测器,分流进样。色谱柱、进样器和检测器温度分别控制为60℃、150℃和200℃。

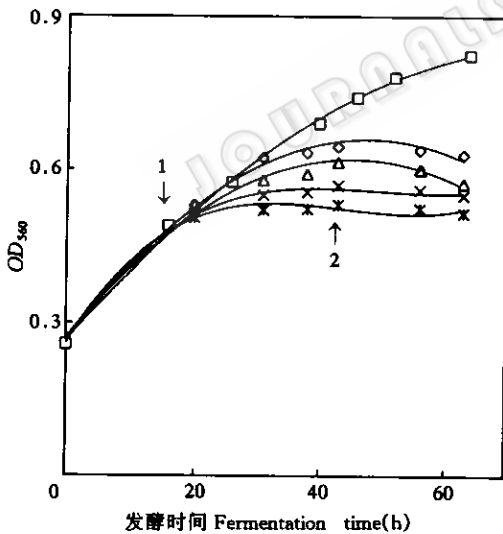


图1 单相发酵体系中丙烯对 *Methylobacterium* Z201 细胞生长的影响

Fig.1 Effect of propene on the growth of *Methylobacterium* Z201 cells in monophasic fermentation system  
None(□), 20ml(◇), 40ml(△), 60ml(×), 80ml(\*)  
Propene and 40mmol/L sodium formate were added at the time point indicated by arrow 1 and 2.

## 2 结果和讨论

### 2.1 单相发酵体系中丙烯对细胞生长的影响

图1的结果表明,当 *Methylobacterium* Z201 细胞暴露在丙烯气氛中,丙烯抑制细胞生长,这种抑制作用与丙烯浓度有关。丙烯浓度越大,抑制作用越强。加入80ml丙烯使细胞的生长完全抑制。丙烯的引入可能通过与细胞组分如蛋白质、核酸等作用产生分子毒性<sup>[4]</sup>,从而抑制细胞生长。同未加入丙烯时相比,细胞的生长速度和最大细胞密度减少。

### 2.2 单相发酵体系中环氧丙烷的合成

在单相发酵体系中,一旦丙烯加入,便有环氧丙烷形成。在丙烯环氧化过程中,反应底物丙烯和分子氧均可能限制环氧化速度。图2表明,当氧容量恒定时,环

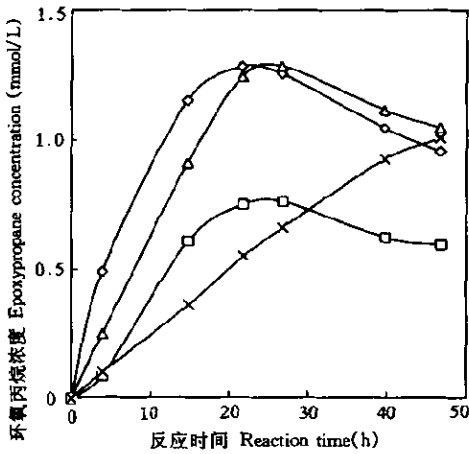


图2 单相发酵体系中环氧丙烷的产生

Fig.2 Production of epoxypropane by *Methylomonas* Z201 cells in monophasic fermentation system. Added volumes of propene were 20ml(□), 40ml(◇), 60ml(△), 80ml(\*).

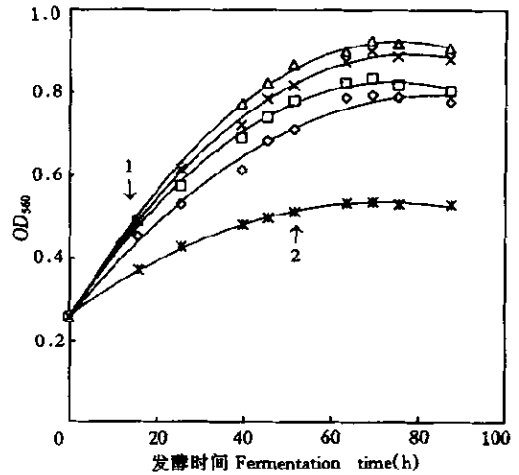


图3 两相发酵体系中十六烷对细胞生长的影响

Fig.3 Effect of hexadecane on the growth of *Methylomonas* Z201 cells in biphasic fermentation systems.

None(□), 10%(◇), 20%(×), 30%(△), 50%(\*). hexadecane were added before the cultivation of cells. 60ml propene and 40mmol/L sodium formate were added at the time point indicated by arrow 1 and 2.

氧丙烷的累积量与加入丙烯的体积有关。尽管加入 20ml 丙烯的抑制作用较小、细胞生长速度较高且发酵液中细胞密度较高,但由于丙烯限制,环氧丙烷的累积量较小。加入 80ml 丙烯时,由于氧限制以及细胞的生长速度较低和最大细胞密度较小,环氧丙烷累积量也较小。加入丙烯体积为 60 ml 时可获得较大的环氧丙烷累积量,环氧丙烷在水相中的最大浓度为 1.3 mmol/L。

### 2.3 环氧丙烷对细胞生长的影响

在单相发酵体系中,细胞培养 24 h 后分别加入 1.3 mmol/L 和 1.6 mmol/L 环氧丙烷,测定细胞密度随时间的变化。结果表明,环氧丙烷抑制细胞生长,这种抑制作用随环氧丙烷浓度增大而增大。

### 2.4 两相发酵体系中十六烷对细胞生长的影响

初步实验表明,在己烷、辛烷、十六烷中,十六烷是 *Methylomonas* Z201 细胞两相发酵最好的有机溶剂。当 10% 的十六烷引入培养液时,细胞的生长速度小于单相发酵体系中的生长速度,可能是由于甲烷和分子氧在十六烷中具有较高溶解度,水相中甲烷和分子氧的短缺使细胞生长速度减小。加入 50% 十六烷时,细胞的生长速度更低,表明高浓度的十六烷对细胞也具有分子毒性。加入的十六烷为 20%~30% 时,细胞生长良好,与不加十六烷时的细胞具有类似的生长动力学(图 3)。在水-十六烷构成的两液相发酵体系中,十六烷实际上作为生长底物甲烷以及反应底物丙烯、分子氧和产生的环氧丙烷的“贮器”。在两液相发酵体系中,丙烯对细胞生长的影响小于单相发酵体系。

## 2.5 两相发酵体系中环氧丙烷的合成

在水-十六烷两相发酵体系中,同单相发酵体系一样,一旦丙烯加入,环氧丙烷便开始累积。在10%和50%十六烷存在下,环氧丙烷的累积量较低。在20%十六烷存在下,水相中的最大环氧丙烷浓度达到1.7mmol/L(图4)。十六烷相中环氧丙烷的浓度随反应时间的变化与水相类似,反应35h后最大浓度为2.6 mmol/L。

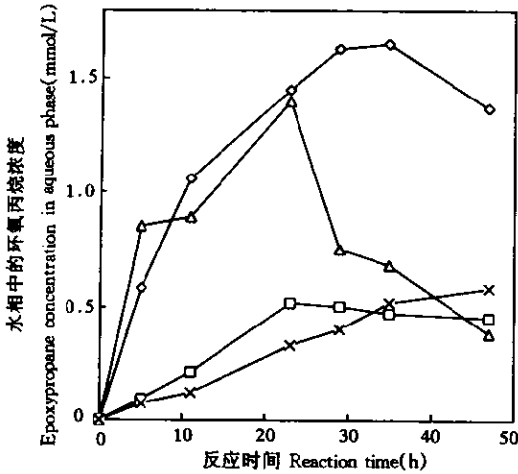


图4 两相发酵体系中环氧丙烷在水相中的累积  
Fig.4 Accumulation of epoxypropane in water phase in biphasic fermentation systems  
10%(□), 20%(◇), 30%(△), 50%(×) n-hexadecane.

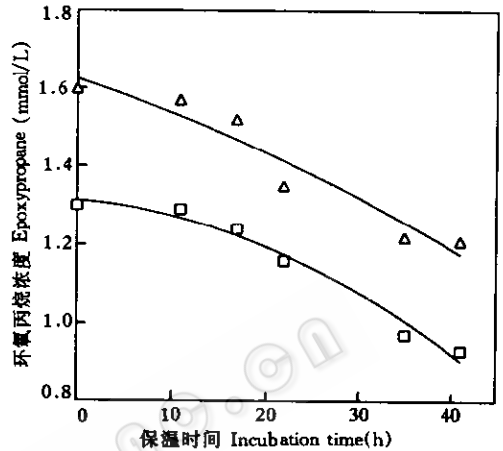


图5 单相体系中环氧丙烷的水解  
Fig.5 Hydrolysis of epoxypropane in monophasic systems  
The initial concentrations of epoxypropane were 1.3mmol/L (□); 1.6mmol/L(◇).

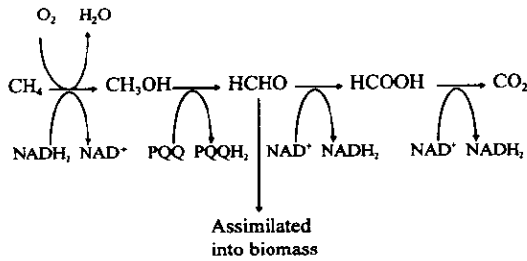
## 2.6 单相和两相发酵体系中环氧丙烷的水解

在环氧丙烷对细胞生长实验的影响中,水相中环氧丙烷的浓度随发酵时间增加而降低(图5),这个现象在单相和两相发酵过程中也观察到。在单相发酵体系中,环氧化反应进行到27h时环氧丙烷浓度开始降低。在两相发酵体系中,反应进行到35h,水相和十六烷相中的环氧丙烷浓度开始降低。这些结果并不表明细胞中存在环氧丙烷水解酶。Weijers<sup>[5]</sup>曾指出甲烷氧化细菌不能降解环氧化合物。实验中发现,在细胞培养过程中,培养液的pH由7.0降至6.2。因此,环氧丙烷浓度的降低可能是化学水解的直接结果。

## 2.7 单相和两相发酵体系中细胞的操作稳定性

对于休止细胞,操作2.5h后几乎完全失活<sup>[2]</sup>。在单相和两相发酵体系中,*Methylomonas* Z201生长细胞分别操作27h和35h后才完全失活。显然单相发酵体系中生长细胞的操作稳定性高于休止细胞,两相发酵体系中细胞的操作稳定性高于单相发酵体系。

丙烯的环氧化反应消耗辅酶NADH,产生的环氧丙烷对细胞具有毒化作用,正是这两个原因导致细胞失活<sup>[6]</sup>。单相和两相发酵体系中细胞操作稳定性的提高归因于辅酶NADH的原位再生。一方面,甲烷作为*Methylomonas* Z201细胞的生长底物,另一方面,作为电子给体通过下列方式原位再生环氧化反应所需的辅酶NADH<sup>[7]</sup>:



在单相和两相发酵体系的失活细胞中加入 40 mmol / L 甲酸钠(图 1、图 3), 发现甲酸钠加入后环氧丙烷的累积量并没有增加, 提示长时间操作后细胞的失活并非 NADH 短缺造成的, 而是甲烷单加氧酶失活的直接结果。

### 参 考 文 献

- [1] 王福来, 郑 坚, 王 钊等. 微生物学报, 1993, 33(2): 129~134.
- [2] 夏仕文, 尉迟力, 李树本. 生物工程学报, 1997, 13(2): 206~209.
- [3] 宁治中, 缪德坝, 易淑云等. 微生物学通报, 1990, 17(5): 283~286.
- [4] Laane C, Tramper J, Lilly M D. *Biocatalysis in Organic Medium*. Amsterdam: Elsevier, 1986, 147.
- [5] Weijers C A G M, de Haan A, de Bont J A M. *Microbiological Science*, 1988, 5(5): 156~161.
- [6] 夏仕文, 尉迟力, 李树本等. 化学学报, 1997, 55(1): 76~82.
- [7] Stanley S H, Dalton H. *Biocatalysis*, 1992, 6(1): 163~175.

## GROWTH OF *METHYLOMONAS* Z201 CELLS AND PRODUCTION OF EPOXYPROPANE IN MONOPHASIC AND BIPHASIC FERMENTATION SYSTEMS

Xia Shiwen Yu Chili Li Shuben

(State Key Laboratory of Oxidation Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

**Abstract** The growth of *Methylomonas* Z201 cells and production of epoxypropane in mono- and biphasic fermentation systems were studied. In monophasic fermentation systems, the inhibitions of propene and epoxypropane on the growth of *Methylomonas* Z201 cells were observed and the concentration of epoxypropane reached 1.3 mmol / L. In biphasic fermentation systems, hexadecane acted as the "reservoir" of growth substrate (methane) and reactants (propene, molecular oxygen), the decrease of propene and epoxypropane in aqueous phase reduced the inhibition effect of propene and epoxypropane on the growth of cells, the concentrations of epoxypropane in both water phase and hexadecane phase reached 1.7 mmol / L and 2.6 mmol / L. In both monophasic and biphasic fermentation systems, the operational stability of cells was enhanced compared to that of resting cells.

**Key words** *Methylomonas* Z201, Monophasic fermentation system, Biphasic fermentation system, Epoxypropane