

生物转化对二甲苯生成对苯二甲酸的初步研究*

王 净^{1,2} 田 晶^{1,2**} 许建和³ 高 鹏¹

(中国科学院大连化学物理研究所国家色谱中心 大连 116023)¹

(大连轻工业学院分析中心 大连 116034)² (华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)³

摘要: 对苯二甲酸是生产聚酯的主要原料, 其生产方法主要是采用化学合成法。随着生物转化与生物催化研究的深入, 其高效、环保、节能等优势越来越明显。筛选能够生物转化对二甲苯生成对苯二甲酸的菌株将会为生物催化法生产对苯二甲酸打下基础。通过建立筛选模型, 利用唯一碳源法从土壤中分离筛选得到微生物 16, 经鉴定为嗜麦芽窄食单胞菌和鞣丸酮丛毛单胞菌的混合菌株, 该微生物可以利用对二甲苯为底物生物转化生成对苯二甲酸。实验中对诱导剂进行了选择, 表明甲苯对该反应有明显的诱导作用, 最佳诱导剂加入量为 200 mg/L。发酵液中对苯二甲酸及中间产物采用高效液相色谱法测定。

关键词: 生物转化, 对二甲苯, 对苯二甲酸, 菌种筛选, 高效液相色谱

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0017-05

Elementary Studies on Biotransformation of *p*-Xylene into Terephthalic Acid*

WANG Jing^{1,2} TIAN Jing^{1,2**} XU Jian-He³ GAO Ping¹

(National Chromatography Research and Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics, CAS, Dalian 116023)¹

(Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034)²

(East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)³

Abstract: Terephthalic acid is monomer-having utility in the production of polyesters. A variety of chemical routes to terephthalic acid are known. Biological process to produce terephthalic acid was studied in this thesis. A strain was isolated from the soil samples through a screening procedure. It can oxidize *p*-xylene to terephthalic acid. Through the experiment, the enzyme activity of 16 was markedly induced by toluene and the yield of terephthalic acid was increased. The optimal concentration of toluene was 200 mg/L. The method of high performance liquid chromatography was used for separation and determination of terephthalic acid.

Key words: Biotransformation, *p*-Xylene, Terephthalic acid, Screening, High performance liquid chromatography

对苯二甲酸 (Terephthalic acid 简称 PTA) 是制造聚酯纤维、薄膜及瓶用聚酯等的主要原料, 也用于涂料、胶粘剂、塑料薄膜、增塑剂和染料等生产行业, 是一种重要的工业化学品^[1]。对苯二甲酸主要是通过化学方法生产, 以对二甲苯的硝酸氧化, 催化液相空气氧化及伊斯曼—科达克法^[2]等为主。化学生产方法条件苛刻, 需高温、高压, 不仅能源消耗大且环境污染严重。生物催化生产化工原料具有节能、环保、高效等特点, 具有良好的社会效益, 已经成为人们的研究热点。目前国内生物催化法

* 国家 973 计划项目基金 (No. 2003CB716003, 2004CB719605)

中国科学院创新基金 (No. K2002A12)

** 通讯作者 Tel: 0411-84379532, E-mail: jingtian0306@hotmail.com

收稿日期: 2005-11-14, 修回日期: 2006-02-22

生产对苯二甲酸的研究还很少见, 大部分的研究都集中在利用微生物降解对苯二甲酸等芳香类化合物^[3-5]。本文从活性污泥及一些被污染的土壤中筛选获得微生物 16, 并对利用该微生物转化对二甲苯生产对苯二甲酸进行了初步研究, 发酵液中的对苯二甲酸及中间产物采用高效液相色谱法测定。

1 材料与方法

1.1 土壤样品及培养基

土壤样品: 由上海、江苏、大连等城市共采集 106 份, 其中包括采集于抚顺石油化工公司的活性污泥 1 份。

细菌培养基: 氯化钠 5 g/L, 牛肉膏 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 琼脂 1.5% ~ 2.0%, pH 值 7。筛选培养基: 硫酸铵 10 mmol/L, 氯化镁 2 mmol/L, 无水氯化钙 0.7 mmol/L, 氯化锰 50 μ mol/L, 氯化铁 1 μ mol/L, 7 水氯化锌 1 μ mol/L, 硫酸铜 1.72 μ mol/L, 氯化钴 2.53 μ mol/L, 钼酸钠 2.42 μ mol/L, 硫酸亚铁 0.0001%, 维生素 B₁ 2 μ mol/L, 50 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液 (pH7)^[6]。在筛选培养基中加入 1.5% ~ 2.0% 的琼脂即为筛选用固体培养基。

碳源: 对二甲苯或甘油。

1.2 仪器和试剂

液相色谱系统 (日本岛津公司产品), 配有一个 LC-10ATvp 泵、紫外检测器、SCL-10Avp 系统控制器和 Shimadzu Class-VP 色谱工作站; Hypersil SAX 阴离子交换柱, 4.6 mm \times 250 mm \times 0.5 μ m (大连依利特科学仪器有限公司); PHS-3C 型酸度计 (上海雷磁科学仪器有限公司)。

磷酸二氢铵 (分析纯); 乙腈 (色谱纯); 对二甲苯 (色谱纯); 对甲基苯甲酸 (色谱纯); 4-羧基苯甲醛 (色谱纯); 对苯二甲酸 (色谱纯); 甲苯 (色谱纯)。

1.3 菌种的筛选及鉴定

菌种的筛选分为初筛和复筛两个部分。初筛主要是从采集到的 106 份土样中分离出能够以对二甲苯为唯一碳源生长的菌落, 而复筛是从初筛所得到的菌落中进一步筛选得到具有催化转化对二甲苯生成对苯二甲酸活性的菌株。

采用以对二甲苯为唯一碳源法进行初筛, 在 106 份土样中, 每份取米粒大小分别加入到 4 mL 含有 0.3% 对二甲苯的筛选培养基中, 在 35 $^{\circ}$ C、160 r/min 摇床培养 24 ~ 48 h。然后, 取 0.1 mL 上层菌液另加入到 4 mL 含 0.3% 对二甲苯的新鲜筛选培养基中, 同一条件下继续培养 24 ~ 48 h。选择培养基变混浊的试管, 用接种环取少量液体在固体筛选培养基上进行划单菌操作, 并在培养皿盖上加入对二甲苯做碳源, 在 35 $^{\circ}$ C 下倒置培养 24 ~ 48 h, 如有菌落长出则为初筛的目的菌落。

复筛时, 将初筛得到的目的菌落接入含 0.2% 甘油的筛选培养基中, 在 35 $^{\circ}$ C、160 r/min 条件下摇床培养, 待培养基变混浊后, 加入对二甲苯使培养基中对二甲苯浓度达到 100 mg/L, 条件不变继续培养。定期取 0.5 mL 发酵液, 加入 1 mL 甲醇使其蛋白质变性, 再 8,000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μ m 水系滤膜过滤, 进行 HPLC 检测, 选取具有催化转化对二甲苯生成对苯二甲酸活性的菌株, 在细菌固体培养基中保藏。

菌种的鉴定, 采用法国生物梅里埃公司 AP120NE 试验条进行鉴定。

1.4 生长曲线测定

分别对菌株在细菌培养基和筛选培养基中的生长情况进行了测定。在测定菌株在筛选培养基中生长情况时,先以细菌培养基接种有活性的菌株制成种子液,待菌株生长到对数生长期时以5%的接种量转接到筛选培养基中,根据不同时间测定的光密度 OD_{600} 值,绘制出微生物16的生长曲线。

1.5 产物生成实验

在唯一碳源培养的过程中,微生物16转化对二甲苯生成对苯二甲酸的实验采用了分批补料的方式。每5h向筛选培养基中添加对二甲苯,使其浓度为200 mg/L,定期取发酵液检测对苯二甲酸的生成量。每次取发酵液1 mL,用2 mL甲醇使其蛋白质变性,8,000 r/min离心10 min,除去其中菌体及蛋白等大分子物质,上清液用0.22 μm 的水系滤膜过滤后直接进入HPLC检测生成物浓度。

1.6 加入诱导剂实验

通过选择相似物来做诱导剂使在反应过程中产生相应的酶,加快反应进程。其中诱导剂选择了甲苯、苯甲酸、4-甲基苯甲醛和4-甲基苯甲醇。在含0.1%的甘油为碳源的筛选培养基中培养微生物16,富集培养13 h后加入诱导剂,24 h后再加入对二甲苯,使其浓度为400 mg/L,然后定期取样按1.5中方法进行样品的预处理,并采用HPLC检测对苯二甲酸的生成量。

在确定了诱导剂后,考察了诱导剂的加入量对产物生成的影响,其中诱导剂的加入量分别为100 mg/L,200 mg/L,400 mg/L,800 mg/L,1,000 mg/L。

1.7 高效液相色谱分析方法

流动相配制:用双蒸水配制0.10 mol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液,用氨水调pH至4.90,再用0.45 μm 水系滤膜过滤,超声振荡15 min。色谱纯乙腈用0.45 μm 有机滤膜过滤后超声振荡15 min。

色谱条件: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 缓冲液和乙腈配比为9:1,流速0.8 mL/min,采用紫外检测器,检测波长为240 nm,进样量20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选结果

对二甲苯和对苯二甲酸对细胞都有一定的毒性,所以采集的土样多是受污染地区的土。实验证明这些地区的土样中含有能够转化对二甲苯的微生物。106份土壤中,初筛出能够在只含有对二甲苯筛选培养基中生长的菌落近90%,但是生长情况不好,在分离的菌株中有活性的菌株数量仅占2%(4株),其中微生物16转化能力最好。经鉴定微生物16为嗜麦芽窄食单胞菌和鞣丸酮丛毛单胞菌的混合菌株。

2.2 生长曲线测定结果

对微生物16进行了初步的研究,图1为微生物16在细菌培养基和初始底物浓度为200 mg/L的唯一碳源培养基中的生长曲线。由图1可以看出,该菌0~7 h为延滞期,7~15 h为菌体的对数生长期,其后为稳定期,该菌在细菌培养基中的生长情况要优于以对二甲苯为唯一碳源的培养基。细菌培养基中菌体浓度大约是唯一碳源培养基中菌

体浓度的4倍。而且在25 h后，在唯一碳源培养基中的微生物16有衰亡的迹象，而在细菌培养基中没有衰减。这证明对二甲苯和对苯二甲酸对细胞有毒性。它们对微生物的生长都有抑制作用^[7]。

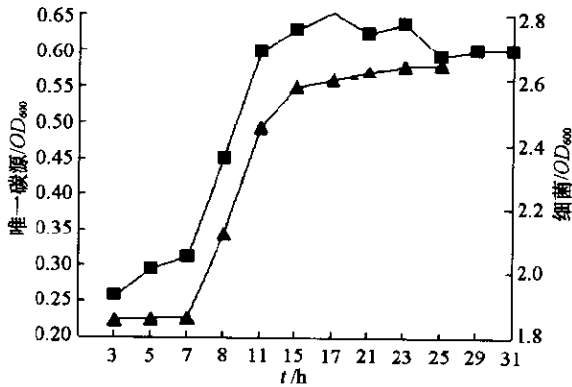


图1 微生物16在细菌培养基和对二甲苯为唯一碳源培养基中生长曲线
 ▲ 细菌培养基中的生长曲线，■ 以对二甲苯为唯一碳源培养基中的生长曲线

2.3 产物生成实验

由前面的实验结果可知，一定浓度的对二甲苯对菌株的生长有抑制作用。并且对二甲苯具有挥发性，所以在微生物16转化对二甲苯生成对苯二甲酸的实验中，碳源加入采用了分批补料的方式。每5 h向培养基中添加对二甲苯使其浓度为200 mg/L。图2为产物对苯二甲酸的生成情况图。由该图可知，在底物被利用后，产物也可能作为碳源被微生物16利用，不会大量积累，这与文献报道的微生物降解苯系化合物相符合^[8]。反应过程中会产生中间产物对甲基苯甲酸(p-TOL)，如图2所示。从图中可以看出，对苯二甲酸的降解量要比中间产物的降解量少，说明在对甲基苯甲酸向对苯二甲酸的转化过程中，一定有其它的反应途径^[9]，使对甲基苯甲酸向其它方向转化。对二甲苯催化转化生成对苯二甲酸的限速步骤很有可能在对甲基苯甲酸到对苯二甲酸的转化过程中^[10]。

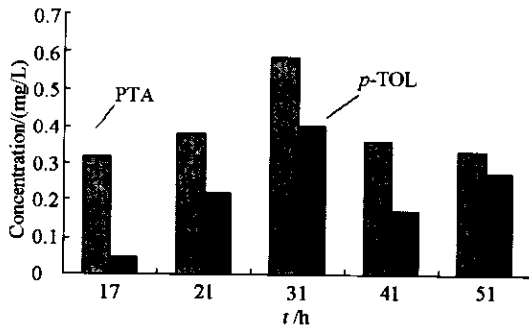


图2 微生物16在以对二甲苯为唯一碳源培养基中PTA和p-TOL的生成

2.4 加入诱导剂的实验

由于直接用唯一碳源法生成对苯二甲酸的量很少，产物生成所需时间也较长，希望通过加入诱导剂，使其诱导产生可以催化该反应的酶。实验中选用结构相似物质甲苯、苯甲酸、4-甲基苯甲醛、4-甲基苯甲醇作为诱导剂。研究发现，甲苯对该反应具有

诱导作用。图3为加入甲苯诱导后不同时间生成的对苯二甲酸的图。由图3可以看出,产物的生成时间提前了。在没有加入诱导剂时,产物在31 h时才能达到最大生成量,而在加入诱导剂后仅在21 h就有最大量产物生成,这说明,甲苯可以诱导微生物16产生催化该反应的二甲苯单加氧酶^[10]使其利用对二甲苯生物转化生成对苯二甲酸。图4为微生物16在21h发酵液中产生PTA的HPLC谱图。其中诱导剂甲苯的最适加入量为200 mg/L。

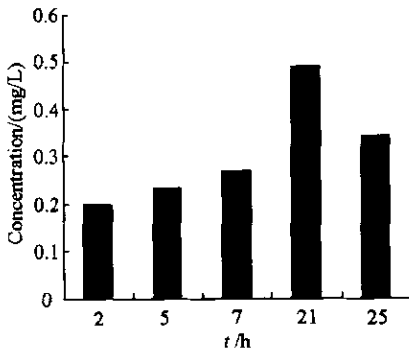


图3 甲苯诱导微生物16产生对苯二甲酸图

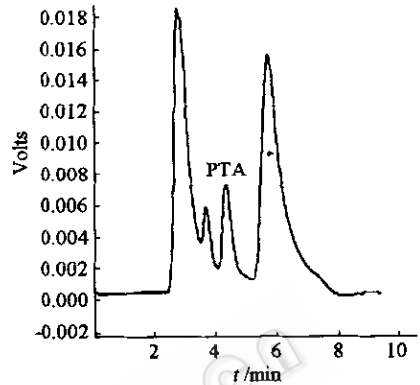


图4 微生物16在21h发酵液中产生PTA的HPLC谱图

3 结论

实验结果表明,从土壤中筛选出的微生物16能够转化对二甲苯生成对苯二甲酸,该微生物具有较好的对二甲苯耐受能力和生成对苯二甲酸的能力。经鉴定微生物16为嗜麦芽窄食单胞菌和鞣丸酮丛毛单胞菌的混合菌株。在甲苯作为诱导剂的情况下,该微生物转化对二甲苯生成对苯二甲酸的能力强于仅以对二甲苯为唯一碳源的情况。对二甲苯向对苯二甲酸转化的酶可能是二甲苯单加氧酶。但是,目前产物生成量还较少,还需要进一步改进方法,提高产量。本研究为进一步应用生物催化法生产对苯二甲酸的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 骆耀仙, 李 路. 福建环境, 2003, 20 (6): 27~29.
- [2] Junker F, Kiewitz R, Cook A M. J Bacteriology, 1997, 179 (3): 919~927.
- [3] 程金平, 郑 敏, 张兰英, 等. 干旱环境监测, 2002, 16 (2): 107~120.
- [4] 王菊思, 赵丽辉, 匡 欣, 等. 环境化学, 1993, 12 (5): 394~400.
- [5] 赵丽辉, 贾智萍, 陈梅雪, 等. 环境科学, 1996, 17 (3): 15~18.
- [6] Bramucci M G, McCutchen C M, Nagarajan V, et al. US Patent: US 6, 187, 569 B1. Feb. 13, 2001.
- [7] 田 蕴, 郑天凌, 胡 忠. 应用与环境生物学报, 2003, 9 (4): 439~443.
- [8] 于俊林, 藤田早苗. 天津工业大学学报, 2004, 23 (2): 48~50.
- [9] 饶佳家, 霍丹群, 陈炳灿, 等. 化工环保, 2004, 24 (5): 323~327.
- [10] Bühler B, Witholt B, Hauer B, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (2): 560~568.