

丙烯酶催化氧化产生环氧丙烷的研究

I. 甲烷氧化菌的筛选及其特性

宁治中 廖佳坝 易淑云 李树本

(中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州)

摘要 从甘肃玉门油田土样、油样和水样中分别筛选到具有低碳烃催化氧化活性的菌种。以甲醇为碳源培养的菌体没有丙烯酶催化氧化为环氧丙烷的活力。只有以甲烷作为唯一碳源、能源培养发酵的菌体才有高专一性的酶催化氧化活性,并对筛选到的一株具有较高活性的菌株从形态、营养和生长特征等方面进行了研究,经初步鉴定表明为甲烷氧化菌甲基单胞菌属(*Methylomonas* sp.)。

关键词 *Methylomonas* sp.; 烯烃环氧化作用; 甲烷氧化菌

环氧丙烷是重要的精细化工原料。采用分子氧为氧化剂从丙烯高选择性地制取环氧丙烷在化学上尚未实现。只有甲烷氧化菌和甲烷单加氧酶可以巧妙地活化分子氧把丙烯直接氧化为环氧丙烷,选择性为100%。

最早发现微生物环氧化能力的是 Van der Linden^[1], 他们选用以庚烷为营养的 *Pseudomonas aeruginosa* 细胞悬浮液使 1-辛烯氧化得到了 1,2-环氧辛烷。其后 Ferenci 等^[2,3]报道了他们筛选出的 *Pseudomonas methanica* 也具有催化氧化低碳烃的能力。一般认为具有催化氧化功能的菌种都包含一种单加氧酶体系。70年代中相继有多篇文章报道披露可以从不同来源筛选出具有这种单加氧酶体系的菌种。其中对底物有较高专一性的甲烷单加氧酶(MMO)体系是从英国 Bath 的温泉水筛选得到的 *Methylococcus capsulatus* 中分离提取出来的^[4,5]。该菌种中的 MMO 酶系可以使 C₁-C₈ 直链烷烃和环烷烃羟化生成醇,使芳烃羟化生成酚,使烯烃环氧化生成环氧化。Tonge 等人^[6]则从另一菌种 *Methylosinus trichosporum* OB3b^[6,7] 中分离提出 MMO。de Bont 等^[8]和 Furuhashi^[9] 也分别筛选出以丙烯(或乙烯)为碳源和能源的 *Mycobacterium* 菌系和 *Nocardia corallina* 菌。最近, Hou 等人^[10]从湖水和土壤里筛选出了 8 种能够氧化气态烷烃(乙烷,丁烷)生长的新菌种,它们均能催化 C₂-C₇ 的直

链烯烃环氧化为相应的环氧化合物,而且产物都在胞外累积。

相对而言,以甲烷为碳源、能源的菌种可能更具有经济价值。甲烷氧化菌广泛存在于土壤、油气田和江河湖海中。甲烷作为能源也比丙烯、乙烯或其它气态烃经济。我们的目标是要寻找产量高,酶系纯,易培养的甲烷氧化菌。目前已从甘肃玉门油田采得的土样、油样和水样中分离筛选出几株具有丙烯环氧化能力的菌种。本文主要报道具有较高 MMO 酶活力的 GY-J-3 菌种的分离筛选和特性。

材料与 方法

(一) 培养条件与筛选方法

分离具有丙烯催化氧化制取环氧丙烷活力的菌种,采用富集培养法。采用的培养基有 MO 和 J 两种(表 1)。将采集的土壤、水或泥浆样品约 1g 接于容量 300ml 的三角瓶中,内装 30ml MO 培养基或 J 培养基, pH 值调至 6.5—7.2, 置换入甲烷: 空气 = 1:1(V/V) 的气体,在 32°C, 220r/min 摇床上培养 7—9 天。如有菌体细胞生长,再以相同的培养条件转移二次,然后进行在 MO 或 J 培养基琼脂平板上划线分离。选单个菌落转移到相同培养基中,生长后在 4°C 保存。选出的每个菌落在摇床上扩大培养,进行活力测定。

(二) 酶反应和酶活力分析

表1 培养基的成分

MO 培养基 (g/L)		J 培养基 (g/L)	
Na ₂ HPO ₄	0.21	KH ₂ PO ₄	0.26
NaH ₂ PO ₄	0.09	Na ₂ HPO ₄	0.74
NaNO ₃	2.0	KNO ₃	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	NaCl	0.4
KCl	0.04	NH ₄ Cl	0.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.0 × 10 ⁻³	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
H ₃ BO ₃	2.0 × 10 ⁻³	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.004
MnSO ₄ · 5H ₂ O	2.0 × 10 ⁻³	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.004
ZnSO ₄	1.4 × 10 ⁻⁴	MnSO ₄ · H ₂ O	3.0 × 10 ⁻⁴
MoO ₃	2.0 × 10 ⁻³	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3.4 × 10 ⁻⁴
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001g	Na ₂ MoO ₄	2.4 × 10 ⁻⁴
		CaCl ₂	0.2

用高速冷冻离心机 (10000 × g, 4℃ 30 min) 收集培养的菌体细胞, 用 0.15mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 (内含 0.002mol/L MgCl₂) 洗两次, 再用 0.15mol/L 磷酸缓冲液制成悬浮液, 置于 4℃ 下保存备用。

取 1ml 悬浮细胞 (干重约 2mg) 装入 10ml 容量瓶中封口, 置换入丙烯: 空气 = 1:1 的气体, 置 30℃ 水浴中, 在振距为 2.5cm, 转速 300 r/min 的条件下反应 30 分钟。

取反应液 1μl, 在 SQ-204 气相色谱仪 (北京分析仪器厂生产) 上进行反应产物的分析。色谱柱为 20% PEG (聚乙二醇) 20000/6201 担体, 柱长 2m。

结果和讨论

采用富集培养方法从甘肃玉门油田采集的 10 个土壤、水和泥浆样品中分离到 30 个菌株, 从中复筛得到有催化氧化活性的 GY-J-3 菌株。

(一) GY-J-3 菌株形态描述

菌株 GY-J-3 为甲烷氧化菌, 能利用甲烷、甲醇作为碳源和能源。革兰氏阴性。细胞直杆状, 0.8—1.2 × 1.8—2.4 μm, 运动。该菌好氧同化甲烷性能好, 不需要有机生长因子。菌落小 (直径小于 0.1 毫米), 颜色灰黄, 呈圆形, 突起。在液体培养基表面形成褶皱膜鳞片状脱落。根据其形态和生理特性, 参照 Foster 和 Davis^[11] 以及伯杰氏鉴定细菌学手册 (第八版)^[12] 将其归属于 *Methylomonas* 属。

(二) 生长特性

用 WFZ-800D₂ 分光光度计在波长 505nm 下测定培养过程中菌体细胞的混浊度, 绘出生长曲线 (图 1) 表明, 此菌种比一般菌种生长慢。这可能是由于甲烷作为碳源、在无机培养基中的溶解度一般在 10⁻³g/L 以下^[13], 比氧的溶解度小得多所致。

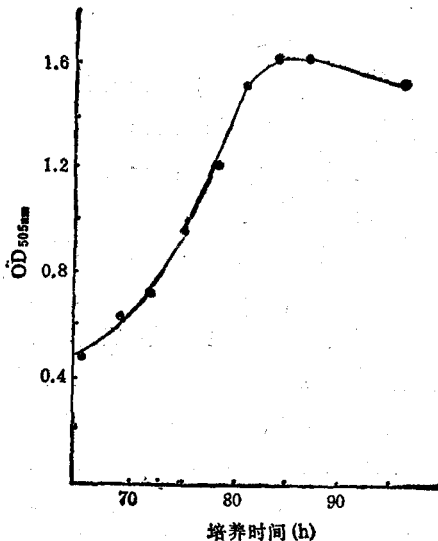


图1 GY-J-3 菌株的生长曲线
(在 J 培养基中, 220r/min, 32℃ 下培养)

(三) 菌种保存时间

GY-J-3 菌株分别在室温和冰箱 (4℃) 三角瓶中充入甲烷: 空气 = 1:1, pH7.0 的条件下保存。每隔 10 天, 分别接入新鲜培养基培养 85 小时, 测其酶活力。结果 (表 2) 表明, 室温下

表2 GY-J-3 菌株保存期变化

酶活力 nmol/ml	保存天数							
	0	10	20	30	40	50	60	90
室温(24℃)	31.5	33.0	31.0	28.5	14.0	—	—	—
冰箱(4℃)	31.5	32.0	30.0	30.5	29.5	29.0	28.5	13.5

菌体细胞可保存一个月,在4℃可保存2个月。和普通菌种试管斜面保存方法保存期相近,但要定时(每两周一次)更换甲烷/空气营养气体,由于在静止保存期在低温下甲烷气体在液相中溶解速度降低,碳源不足,菌种很容易衰老。

(四) 碳源对菌体生长的影响

将 GY-J-3 菌种接种于相同的无机培养液中,分别加入淀粉、葡萄糖、丙烯、甲醇、甲烷作为碳源,置于32℃、pH7.0的条件下培养60小时,肉眼观察,以淀粉、葡萄糖、丙烯为碳源的不生长。甲醇、甲烷为碳源的菌体浑浊度增加,而后再各自添加相应量的新鲜液体培养基,振荡培养,离心收集菌体细胞,测其酶活力(表3)。除甲烷作为碳源的以外,其它都没有酶活力,即和丙烯反应不产生环氧丙烷。据文献报道此类环氧化酶活性是由甲烷诱导而产生的,也就是说当培养基中有甲烷存在时,才能产生具有使烯烃双键环氧化活力的酶,这与实验结果一致。

表3 不同碳源对菌体生长和酶活力的影响

碳源	淀粉	葡萄糖	甲醇	丙烯	甲烷
生长情况	0	0	+++	0	++
酶活力	0	0	0	0	32nmol/ ml · 30'

(五) 氮源对菌体生长的影响

在J培养基中加入KNO₃和NH₄Cl分别做为菌体生长的氮源。结果(表4)表明,氮源以KNO₃为主再加入少量的NH₄Cl较为合适。

(六) pH值对菌体生长的影响

将GY-J-3菌种接入不同pH值的无机培

养基中,充入甲烷:空气=1:1的气体,置于摇床220r/min,在32℃的条件下培养85小时,测其光密度。结果表明(图2),最适pH为7.2。

表4 氮源对菌体生长的影响

菌种 GY-J-3	1#	2#	3#
氮源	KNO ₃	NH ₄ Cl	KNO ₃ +NH ₄ Cl
光密度(OD)	0.70	0.09	1.10
pH值(终点)	6.8	6.3	6.8

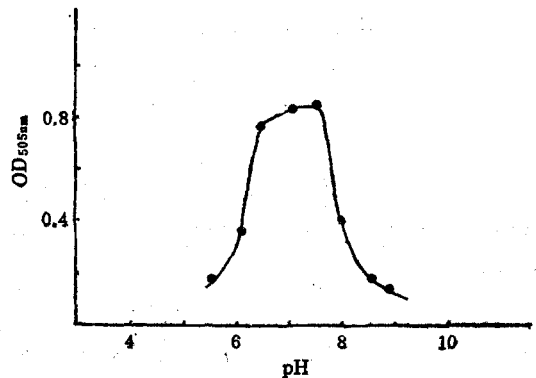


图2 pH值对菌体生长的影响

(七) 温度对菌体生长的影响

培养物在25—50℃梯度培养85小时,在505nm波长测其光密度(表5),此菌生长的最适温度为32℃,符合于一般发酵设备条件。

表5 温度对菌体生长的影响

温度(℃)	25	30	32	35	40	45	50
光密度(OD)	0.82	1.20	1.28	0.94	0.81	0.03	0.01

综上所述,菌株GY-J-3可以作为进一步

研究各种低分子烃的生物催化氧化的菌株。

参 考 文 献

- 1 Van derlinden A C. *Biochem Biophys Acta* 77. 157—159, 1963
- 2 Ferenci T *FEBS letters*, 41 94—98, 1974
- 3 Ferenci T et al *J General Microbiology*, 91 79—91, 1975
- 4 Chetham D S J *Enzyme and microbiol technology*, 9 (4), 492—494, 1987
- 5 Colby J and Dalton H *Biochemcul Journad*, 157 495—497, 1976
- 6 Tonge G M et al *Biochemical Journal*, 161 333—

344, 1977

- 7 Tonge G M et al. *FEBS letters*, 58 293—299, 1975.
- 8 De Bont J A M et al. *Enzyme microsol Technol.* 5 55—59, 1983
- 9 Furuhashi K et al *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.*, 12 39—49, 1981.
10. Patel R N et al *J App Biochem.* 5 121—131, 1983
11. Foster J W and Richard H Davis *J of Bacteriology*. 91(5) 1924—1932, 1966
12. R. E. 布坎南等编, 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译: 伯杰细菌鉴定手册, 第八版, 第349—352页, 1984.
13. 高桥稷二(日本): 发酵协会志, 26: 494, 1968。

地衣芽孢杆菌 A.4041 耐高温 α -淀粉酶的研究

杨俊豪 胡学智

(上海工业微生物研究所, 上海)

摘要 地衣芽孢杆菌 A 4041 是一株产生耐高温 α -淀粉酶的突变株。本文研究了 A 4041 发酵培养基的成份, 发现用天然碳源原料产酶优于葡萄糖、乳糖和淀粉。葡萄糖对发酵产酶有一定程度的抑制作用。此外还发现 A.4041 所产生的耐高温 α -淀粉酶的热稳定性与 Ca^{2+} 浓度有关, 高浓度氯化钠与淀粉能促进该酶的耐热性。

关键词 地衣芽孢杆菌, 耐高温 α -淀粉酶

耐高温 α -淀粉酶是一种用途广泛的酶, 由于其热稳定性好, 对 Ca^{2+} 的依赖性低, 适合于在高温下液化淀粉。

最初, 耐高温 α -淀粉酶是从嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的培养物中提取到的^[1], 其最适反应温度可达 70—75°C, 活性 pH 范围偏向酸性。另外, 油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*)^[2] 和嗜热硫氢酸梭菌 (*Clostridium thermohydrosulfuricum*)^[3] 等也能产生耐高温 α -淀粉酶。但是, 最高反应温度的 α -淀粉酶是由地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 产生的, 其最适反应温度可达 90°C 以上, 而且酶的活性 pH 范围相当宽^[4]。目前, 工业上生产耐高温 α -淀粉酶的菌种大多为地衣芽孢杆菌的突变株。

地衣芽孢杆菌 A. 4041 是我所从地衣芽孢杆菌 ATCC 9789 突变选育出的一株耐高温 α -淀粉酶高产菌。本文着重研究了该菌的产酶发

酵培养基及该菌所产生的耐高温 α -淀粉酶的热稳定性。

材 料 与 方 法

1. 菌种: 地衣芽孢杆菌 A 4041 (Spo^- , Rif^r , Met^- , Arg^-)。

2. 培养基: 肉汁培养基 (%) : 蛋白胨 1, 牛肉膏 1, 可溶性淀粉 1, NaCl 0.5, pH 7.0。

发酵培养基 (%) : 麦芽粉 8, 黄豆粉 3, 玉米浆 1.5, K_2HPO_4 0.1, CaCl_2 0.4, pH 8.0。

3. 培养及发酵方法: 将斜面菌种接一环入肉汁培养基 (250ml 三角瓶装 20ml), 37°C 往复摇床 120r/min 培养 10 小时左右作种子, 接 0.5ml 入发酵培养基 (500ml 三角瓶装 30ml), 37°C 往复摇床 120r/min 培养 3 天, 发酵液 90°C 处理 15 分钟, 测定酶活力。

4. α -淀粉酶活力测定方法: 按轻工业部部