甲烷氧化菌吸附膜反应器中环氧丙烷的连续生物转化

辛嘉英* 崔俊儒 陈建波 李树本 夏春谷
(中国科学院兰州化学物理研究所羰基合成与选择氧化国家重点实验室,兰州 730000)

摘 要 以流化床作为固定化体系,在硅藻土颗粒表面构建了混合培养的甲烷氧化细菌的吸附膜。研究发现延迟期后固定化细胞的甲烷单加氧酶活性明显增加。流化床中 90% 以上的甲烷氧化细菌以吸附形式存在。吸附膜浓度为 3.3 ~ 3.7mg dry weight cell/g DS。通过批式反应考察了丙烯-甲烷共氧化过程合成环氧丙烷的可能性。研究了甲烷对丙烯环氧化以及丙烯对甲烷氧化细菌生长的影响。通过最佳配比的混合反应气体(methane:35%;propene:20%;oxygen:45%)连续循环通入流化床反应器中抽提产物环氧丙烷,克服了产物抑制。该生物反应器最初产生环氧丙烷的日产量为 110 ~ 150μmol/d,连续操作 25d,未观察到环氧丙烷生产能力的明显减小。

关键词 甲烷氧化细菌,吸附膜,流化床,环氧丙烷,共氧化
中图分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0089-05

甲烷氧化细菌中的甲烷单加氧酶(MMO)能够直接氧化丙烯为环氧丙烷[1]。采用该细菌整细胞生物催化法制取环氧丙烷具有反应条件温和,在常温常压下直接用空气做氧化剂,无污染、腐蚀性小等优点,显示出了巨大的应用潜力[2,3]。但 NADH 消耗和产物毒性限制着甲烷氧化细菌的丙烯环氧化能力。环氧化反应通常会因毒性产物积累和 NADH 耗尽而停止。Prichanont 等[4] 通过有机溶剂来抽提毒性产物,但 NADH 缺乏和相毒性仍限制着反应进行。Furuto[5] 等通过添加甲酸钠再生 NADH 来维持反应。但该方法是不经济的。

生物催化法制取环氧丙烷要求细菌长期保持高活性。流化床技术可通过流化态颗粒来长期固定大量的生长细胞[6]。本文构建了甲烷氧化细菌吸附膜流化床(Methanotrophic Attached-Film Fluidized-bed, MAFFB)反应器。通过甲烷氧化细菌活细胞在载体表面的群体高密度附着和不断更新,达到长期保持固定化细胞高催化活性的目的。采用丙烯-甲烷共氧化方法连续合成环氧丙烷,解决了 NADH 再生问题,表现出良好的操作稳定性。

1 实验部分

1.1 菌种及培养

甲基球菌 *Methylococcus capsulatus* IMV 3021 和甲基弯菌 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 由俄罗斯科学院催化研究所提供,甲基单胞菌 *Methylomonas* sp. GYJ3 为本实验室筛选。培养基成分如下:(g/L):NH_3Cl,0.5;K_2HPO_4,0.49;$KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$,0.40;$MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.3;$CaCl_2 \cdot 2H_2O$,0.02;KNO_3,1.6;NaCl,0.3;$FeSO_4 \cdot 7H_2O$,0.004;$CuSO_4 \cdot 5H_2O$,0.004;$MnSO_4 \cdot H_2O$,0.0004;$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,0.00034;$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$,0.00024;pH7.0。培养气体为甲烷-氧气(1:1,V/V)。在 15L 全自动发酵罐(LH1075,英国 LH Fermentation Co.Ltd)中,32℃,300r/min 培养 72 ~ 96h。

1.2 甲烷氧化细菌吸附膜流化床(MAFFB)反应器

用于构建甲烷氧化细菌吸附膜及进行环氧丙烷生物合成的带有循环气体抽提装置的流化床反应器如图 1 所示。A 是体积为 300mL 的流化床,其中充满培养液并含有 30g 硅藻土,温度控制在 32℃。B 是体积为 30mL 的用于沉降固定化细胞的分离管。循环反应气体通过蠕动泵 G-1 以 1200mL/h 的速度从 A 底部泵入,提供底物并抽提产物环氧丙烷。从 A 顶端排出的气体经吸附瓶 C 收集产物环氧丙烷后循环回 A 中继续使用。消耗掉的气体可由气袋 D 补充。由于丙烯甲烷和氧气的消耗速度不同,每隔 24h 更换气袋以保证丙烯-氧气-甲烷分压基本保持不变。C 是体积为 150mL 的充满蒸馏水的烧瓶,由冰水浴将温度控制在 0 ~ 4℃,定期从 C 中收集产物

收稿日期:2001-08-07,修回日期:2001-10-15;
基金项目:国家自然科学基金重点项目(No.29933040),国家重点基础研究发展规划(973)项目(No.G1999022406)。
* 通讯作者。Tel:86-931-8277147;Fax:86-931-8277088;E-mail:lzcpcn@ns.lzb.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

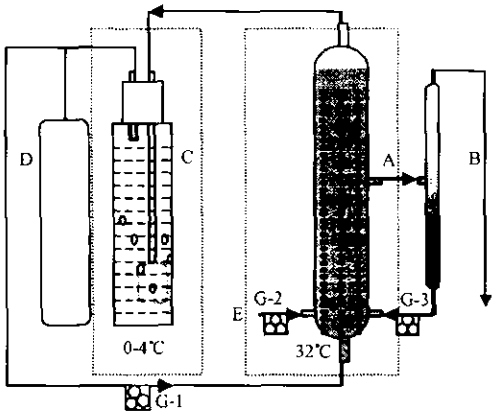

图1 MAFFB反应器系统示意图

Fig.1 Schematic representation of the MAFFB reactor system

环氧丙烷的水溶液。蠕动泵G-2以2mL/h的速度从A底部泵入新鲜培养液E,蠕动泵G-3以10mL/h的速度循环培养液并回收沉降的固定化细胞。包含有脱附细胞的流出液F从B顶端排出。

1.3 甲烷氧化细菌吸附膜的形成

将三种甲烷氧化细菌(*Methylococcus capsulatus* IMV 3021, *Methylosinus trichosporium* IMV 3011, *Methylomonas* sp. GYJ3)各以5%的接种量混合接入上述反应器的流化床A中,生长气体(甲烷:氧气=1:1, *V*/*V*)以1200mL/h的速度从A底部循环泵入。前5天以批式培养方式进行,第6天起开启蠕动泵G-2和G-3进行连续培养。定期从流化床A和流出液F中取样测定硅藻土表面和流出液中MMO活性和生物量。

1.4 MAFFB反应器中环氧丙烷的生物合成

在已形成了吸附膜的MAFFB反应器中分别以不同的气体比例进行了5个批次(每批3d)的环氧丙烷合成反应,每个批次间均通入生长气体(甲烷:氧气=1:1, *V*/*V*,通气时间:2d)使吸附膜中细胞恢复。最后持续通入反应气体进行环氧丙烷的连续生物合成。

1.5 批式反应

取20~25mL细胞悬浮液置100mL反应瓶中,用橡皮垫封口,抽取空气并置换入不同量的丙烯、甲烷和氧气,在35℃、150r/min下反应不同时间取样,气相色谱法测定环氧丙烷含量。

1.6 分析方法

环氧丙烷测定:产生的环氧丙烷由气相色谱法(GC)氢火焰检测器外标法定量分析。GC条件:SE-54石英毛细管柱(30m×ø0.23mm i.d.),柱温60℃,检测室和注射室温度180℃。

MMO活性测定:取细胞悬浮液1mL置10mL反应瓶中,密封后用注射器抽取4mL空气,置换入4mL丙烯,在35℃、200r/min下反应30min,气相色谱法(GC)测定环氧丙烷生成量。MMO比活性以每毫克干重细胞每分钟催化产生环氧丙烷的纳摩尔数表示(nmol/min·mg)。

活细胞含量测定:根据每毫克干重细胞的MMO活性为5.0~5.5nmol/min进行计算。

硅藻土上生物质含量测定:超声波(150W,50s)解离吸附生物质,离心后称重。

扫描电镜(SEM)观察:将样品烘干后喷金,JEOL(JSM-5600LU)扫描电镜观察。

2 结果与讨论

2.1 MAFFB反应器中甲烷氧化细菌吸附膜的形成

许多甲烷氧化细菌可形成荚膜和粘液等有利于其在载体表面吸附的物质[7,8]。文献曾报道甲烷氧化细菌可吸附在载体表面形成吸附膜[9,10]。IMV 3021和IMV 3011具有基本相同的丙烯环氧化活性(6.0~7.0nmol/min·mg), *Methylomonas* sp. GYJ3的活性较小(3.0nmol/min·mg),但却能形成较多的荚膜和粘液性物质。批式吸附实验表明,三者结合时在硅藻土表面形成的生物质含量和环氧化活性最高。图2是将三种甲烷氧化细菌混合接入MAFFB反应器中,硅藻土颗粒上MMO活性随培养时间变化的曲线,发现整个活细胞固定化过程分为两个阶段:一个延迟期和一个MMO活性的快速增长期。延迟期时可能正处于吸附膜的最初形成阶段,甲烷氧化细菌逐渐从液相向载体表面吸附。快速增长期可能与吸附的甲烷氧化细菌在载体表面不断生长繁殖有关。由于在气流和水力的冲刷下,不断会有附

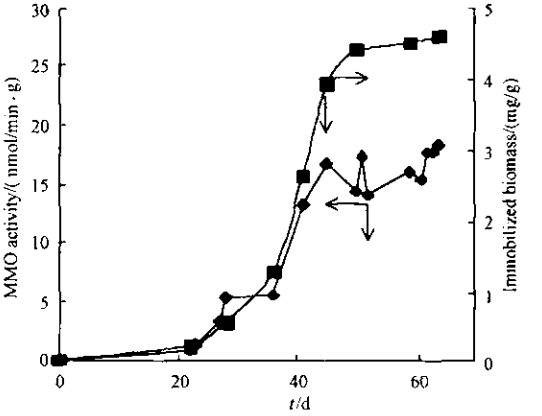

图2 固定化过程中硅藻土上MMO活性和生物量

Fig.2 MMO activity and biomass on diatomite during the immobilization process

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

着力差的衰老细胞剥落，新生细胞生长，MAFFB 反应器中的 MMO 活性和生物量最终达到一个稳定状态。此时分别测定硅藻土和流出液中 MMO 活性和生物量，发现流化床中 90% 以上的 MMO 活性存在于硅藻土中，甲烷氧化细菌主要以吸附形式存在，甲烷氧化细菌吸附膜中活细胞浓度为每克 DS(Drysolid)中 dry weight cell 含量 3.3～3.7mg/g。

2.2　添加甲烷对丙烯环氧化的影响

Lippard[11] 认为丙烯的环氧化过程是在 MMO 催化下有辅酶 NADH 存在时完成的反应，该过程同甲烷氧化成甲醇的过程是相同的(图 3)。仅用甲烷氧化细菌细胞悬浮液催化丙烯环氧化时，环氧丙烷由

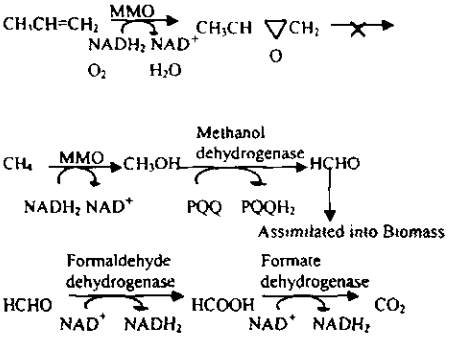

图 3　丙烯、甲烷代谢途径及辅酶再生

Fig.3　Pathway of propene (or methane) metabolism and coenzyme NADH regeneration

于无法继续代谢而在细胞外积累，细胞内的 NADH 不断转化为氧化型辅酶 NAD^+，环氧化反应进行到 6h 后因 NADH 的耗尽等原因而基本停止(数据未列出)。甲烷作为甲烷氧化细菌的生长底物，其中部分用于细胞的生长，另外一部分将被深度氧化成 CO_2，以产生供 MMO 催化第一步反应进行所需要的还原当量(NADH)[3]。采用丙烯和甲烷共氧化的方法，由甲烷深度氧化成 CO_2 时产生的外源电子给体使细胞中 NADH 再生来提供丙烯环氧化反应所需的还原当量，连续进行丙烯的环氧化反应将成为可能。甲烷可以从为 MMO 提供催化单加氧化反应所需要的还原当量(NADH)和与丙烯竞争结合 MMO 催化活性中心两方面影响丙烯的环氧化反应。从图 4 结果可以发现，低浓度甲烷引入可提高 *Methylomonas* sp. GYJ3 细胞催化丙烯环氧化的能力，说明此时辅酶(NADH)生成是两烯环氧化反应的控速步骤。当气相中甲烷含量达到 30% 时，丙烯环氧化达到最大反应速度。继续增加气相中甲烷含量，*Methylomonas* sp.GYJ3 细胞催化丙烯环氧化的能力下降，此时大量甲烷和丙烯竞争与 MMO 催化活性中心结合，抑制了丙烯环氧化反应。采用 *Methylococcus capsulatus* IMV 3021 和 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 细胞时，也发现了同样的结果。

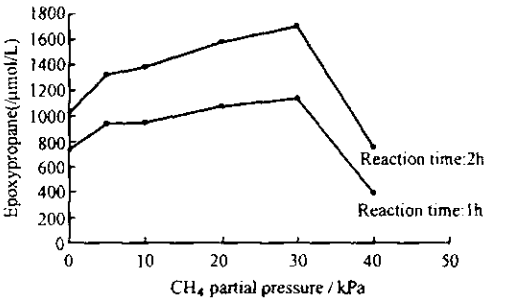

图 4　甲烷对丙烯环氧化的影响

Fig.4　Effect of methane on the epoxidation of propene

Initial propene and O_2 partial pressures were kept constant at 20 and 40kPa, respectively. Methane was diluted with N_2 to obtain various partial pressures of methane

2.3　添加丙烯对甲烷氧化细菌生长的影响

丙烯单加氧化的产物环氧丙烷无法继续代谢，不能被甲烷氧化细菌利用，同时丙烯还会与甲烷竞争 MMO 的催化位点，消耗还原型辅酶 NADH。因此大量添加丙烯会妨碍甲烷氧化细菌的生长。但由图 5结果发现当丙烯分压保持 20% 不变，添加的甲烷分压达到 35% 以上时，丙烯对甲烷氧化细菌生长的影响已很小，基本与在甲烷/氧气(1∶1，*V*/*V*)生长情况相同。这可能是因为天然底物甲烷较丙烯更容易与 MMO 结合所致。

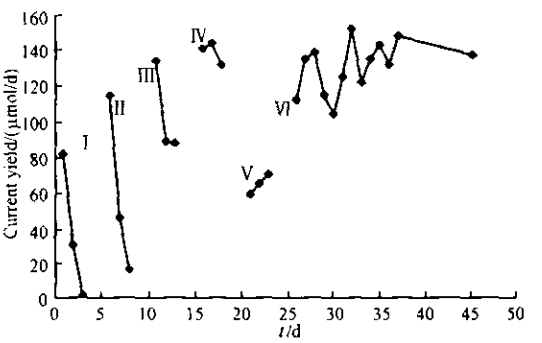

图 5　甲烷氧化细菌吸附膜流化床反应器中环氧丙烷的生物合成

Fig.5　Biosynthesis of epoxypropene in the MAFFB reactor

Partial pressure (kPa)

I . propene, oxygen, nitrogen = 20,40,40;

II . propene, methane, oxygen, nitrogen = 20,10,40,30;

III . propene, methane, oxygen, nitrogen = 20,20,40,20;

IV . propene, methane, oxygen, nitrogen = 20,30,40,10;

V . propene, methane, oxygen = 20,40,40;

VI . propene, methane, oxygen = 20,35,45

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表1 丙烯对甲烷氧化细菌生长的影响

Table 1 Effect of propene on the growth of methanotroph

Initial partial pressures/kPa				Cell concentration after 72h fermentation/(mg/mL)
Propene	Oxygen	Methane	Nitrogen	
0	50	50	0	0.30
20	40	40	0	0.27
20	40	35	5	0.27
20	40	30	10	0.10
20	40	20	20	0.03
20	40	10	30	<0.01

2.4 MAFFB反应器中环氧丙烷的生物合成

在已形成了甲烷氧化细菌吸附膜的MAFFB反应器中进行5批环氧丙烷合成反应,每批反应气体中丙烯和氧气分压保持20kPa和40kPa不变,逐批增加甲烷含量,减小平衡气体氮气含量,反应时间为3d。每个批次间均通入生长气体(甲烷:氧气=1:1, *V/V*,通气时间:2d)使生物膜中细胞恢复。由图6所示,无甲烷通入时,3d后丙烯环氧化反应由于辅酶NADH耗尽已基本停止。增加甲烷含量可明显提高和保持MAFFB反应器的环氧丙烷日产量。但甲烷分压达到40kPa时,环氧丙烷生产能力明显下降。这与批式反应得到的结果相同。综合考虑维持MAFFB反应器中甲烷氧化细菌生长和环氧丙烷生产能力,最后持续通入甲烷、丙烯、氧气分压分别为35、20、45kPa的混合反应气体进行环氧丙烷的连续生物合成。采用气提的方法抽提环氧丙烷,是根据不同温度下环氧丙烷的蒸汽压不同进行的。在本实验条件下吸附瓶C中检测到的产物环氧丙烷的浓度最高为2.93mmol/L,此时流化床中环氧丙烷的浓度为0.90mmol/L。添加2.53mmol/L的环氧丙烷可抑制40%的环氧化活性,添加1.20mmol/L的环氧丙烷对环氧化活性无明显抑制作用[12]。因此及时更换C中环氧丙烷的水溶液是十分必要的。由于产生的环氧丙烷不断被循环经过的反应气体抽提出流化床,克服了产物抑制。同时甲烷/丙烯共氧化反应解决了辅酶NADH的再生。连续操作25d,环氧丙烷生产能力基本保持在110~150μmol/d。

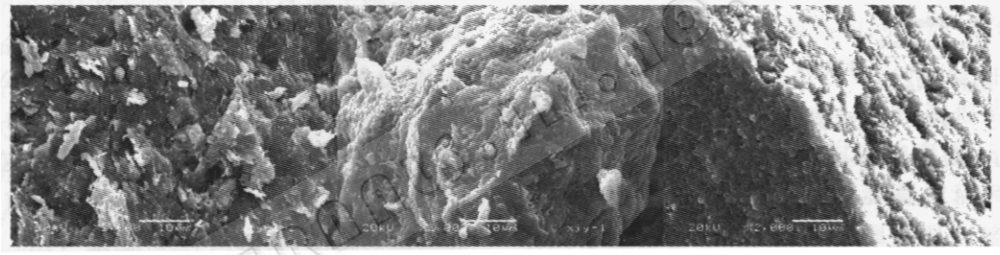

图6 固定在硅藻土上的甲烷氧化细菌吸附生物膜的扫描电镜显微照片

Fig.6 SEM Microphotographs of the methanotroph attached-biofilm immobilized on diatomite

(a) Bare diatomite particles; (b) Biofilm-covered diatomite particles; (c) Biofilm-covered diatomite particles after 51 days of epoxypropane biosynthesis

2.5 扫描电镜观察

分别将硅藻土、在MAFFB反应器中培养64d吸附有甲烷氧化细菌生物膜的硅藻土、接着又在MAFFB反应器中进行了5批批式和25d连续环氧丙烷生物合成反应以后的硅藻土进行扫描电镜观察。发现在MAFFB反应器中经过64d连续培养,在硅藻土颗粒表面已经固定有一层甲烷氧化细菌的吸附生物膜。分别进行了5批批式和25d连续环氧丙烷生物合成反应后,硅藻土表面生物膜形态未发生明显变化。

REFERENCES(参考文献)

[1] Leak D J, Aikens P J, Seyed-Mahmoudian M. The microbial production of epoxides. *TIBTECH*, 1992, **10**: 256~261

[2] Hou C T, Patel R, Laskin A I *et al*. Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons: Epoxidation of C_2 to C_4 n-alkenes by Methylotrophic bacteria. *Applied and environmental Microbiology*. 1979, **38**(1): 127~134

[3] Dalton H. Biological methane activation-lessons for the chemists. *Catalysis Today*, 1992, **13**: 455~461

[4] Prichanont S, Leak D J, Stucky D C. Alkene monooxygenase-catalyzed whole cell epoxidation in two-liquid phase system. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, **22**: 471~479

[5] Furuto T, Takeguchi M, Okura I. Semicontinuous methanol biosynthesis by Methylosinus trichosporium OB3b. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 1999, **144**: 257~261

[6] Meraz M, Alvarez-Ramirez J. A simple rate model for the dynamics of immobilization of anaerobic bacteria on a plastic support. *J Chem Technol Biotechnol*, 2000, **75**: 152~158

[7] Whittenbury R, Phillips K C, Wilkinson J F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J Gen Microbiol*, 1970, 6x: 205~218

[8] Dworkin M, Foster J W. Studies on Pseudomonas methanica (sohngen) nov comb. *J Bacteriol*, 1956, **72**: 646~659

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[9] Niedzielski J J, Schram R M, Phelps T J *et al*. A total-recycle expanded-bed bioreactor design which allows direct headspace sample of volatile chlorinated aliphatic compounds. *J Microbiol Meth*, 1989, **10**: 215 ~ 223

[10] Oldenhuis R, Vink R I J M, Janssen D B *et al*. Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by Methylosinus trichosporium OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 2819 ~ 2826

[11] Gassner G T, Lippard S J, Component interactions in the soluble methane monooxygenase system from methylococcus capsulatus (Bath). *Biochemistry*, 1999, **38**(39): 12768 ~ 12785

[12] XIN J Y(辛嘉英), CUI J R(崔俊儒), CHENG J B(陈建波) *et al*. Semicontinuous epoxypropane biosynthesis by *Methylomonas* sp. GYJ3. *Chinese Journal of Molecular Catalysis*(分子催化), 2001, **15**(3): 206 ~ 210

Continuous Biosynthesis of Epoxypropane in a Methanotrophic Attached-films Reactor

XIN Jia-Ying* CUI Jun-Ru CHEN Jian-Bo LI Shu-Ben XIA Chun-Gu

(*State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou* 73000, *China*)

Abstract Using a fluidized bed as immobilization system, mixed culture methanotrophic attached-films were developed on diatomite particles. The Methane Monooxygenase (MMO) activity was found to increase obviously as soon as the lag phase ended. Greater than 90% of the MMO activity in the bed was attached. Biofilm concentration of 3.3 ~ 3.7mg dry weight cell/g DS was observed. Batch experiments were performed to explore the possibility of producing epoxypropane by a cooxidation process. The effect of methane on the oxidation of propene to epoxypropane and the effect of propene on the growth of methanotroph were also studied. In continuous experiments, optimum mixed gaseous substrates (methane: 35%; propene: 20%; oxygen: 45%) were continuously circulated through the fluidized bed reactor to remove product. Initial epoxypropane productivity was 110 ~ 150μmol/d. The bioreactor operated continuously for 25d without obvious loss of epoxypropane productivity.

Key words methanotroph, attached biofilm, fluidized bed, epoxypropane, cooxidation

Received: 08-07-2001

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 29933040) and the Special Funds for Major State Basic Research (973) of China.

* Corresponding author. Tel: 86-931-8277147; Fax: 86-931-8277088; E-mail: lzcpcn@ns.lzb.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn