

外源电子给体对甲烷单加氧酶 催化丙烯环氧化反应活性的影响

沈润南 尉迟力 李树本

(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 以丙烯氧化反应为指标研究了不同外源电子给体对甲烷细菌 (*Methylobacterium* sp. GYJ30) 休止细胞催化活性的影响。结果表明甲烷、甲醇、甲醛和甲酸盐作为电子给体加入反应中, 将甲烷单加氧酶催化丙烯环氧化反应活性分别提高 5.3, 12.7, 10 和 12.4 倍。以甲烷和甲醛作为外源电子给体时提高初始浓度对甲烷单加氧酶具有抑制作用; 而以甲醇和甲酸盐作为电子给体时提高初始浓度对甲烷单加氧酶催化活性无明显抑制作用。研究了甲醇作为电子给体时它的代谢、环氧丙烷的积累以及催化反应活性与反应时间的关系。

关键词 电子给体, 甲烷利用细胞, 甲烷单加氧酶, 丙烯环氧化

甲烷单加氧酶 (EC 1.14.13.25, 简称 MMO) 是甲烷利用细菌代谢过程中重要的酶系。它能够催化两种重要反应——烷烃的羟基化和烯烃的环氧化反应。环氧化合物是化学和制药工业的重要合成中间体, 目前, 已在开发的利用甲烷细菌生物催化制备化学中间体的研究都是以合成环氧化合物作为目标产物^[1]。用生物催化法制备这些化合物具有原料成本低、反应立体和光学选择性高、在反应过程中无付产物生成等优点。近期研究^[2]表明用甲烷细胞催化烯烃环氧化反应光学产率达到 93% 以上。然而, 在甲烷细菌生物催化过程中仍存在许多障碍, 在 MMO 催化烯烃环氧化反应过程中需消耗辅酶 NADH, 烯烃不是甲烷细胞的代谢产物, 在环氧化反应过程中不断地消耗 NADH, 不能得到补充。所以, 用甲烷细菌催化制备环氧化合物反应速度很低, 尚不能达到工业化的要求。

在反应体系中加入 NADH, 可提高 MMO 的催化活性, 但是, 由于 NADH 本身是昂贵的生化试剂, 在经济上是不合理的。在反应体系中加入甲烷细胞的代谢产物, 在细胞中其它酶的作用下它们的代谢可再生出 NADH, 提高 MMO 反应活性, 目前已被认为是一种有效和经济的方法^[3]。在研究过程中以丙烯环氧化反应为指标反应考察了不同外源电子给体甲烷、甲醇、甲醛和甲酸盐对甲烷细菌 GYJ3 中 MMO 催化活性的影响, 优化了加入外源电子给体的浓度。考察了甲醇的代谢、环氧丙烷的积累对反应的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 所用试剂均为分析纯。1001 型气相色谱仪 (上海分析仪器厂), R2A 色谱积分仪 (日本岛津仪器公司), UV-120-02 型紫外可见分光光度计 (日本岛津仪器公司)。

1.2 细胞培养和细菌悬浮液的制备

甲烷细菌 (*Methylomonas* sp.) GYJ3 系本实验室筛选, 所用无机盐培养基及培养条件见文献[4], 培养 4d 后。用离心法 (5000×g, 30min) 收获菌体, 每 200ml 培养液收获的细胞用约 50ml pH7.0 的缓冲液 (含氯化镁 5、磷酸盐 50mmol/L) 洗涤 3 次, 加适量缓冲液悬浮细胞。0℃下保存, 在 600nm 波长处测定光密度 (OD) 值。

1.3 MMO 催化丙烯环氧化反应催化活性测定

取 1ml 含 0.6mg 干细胞的磷酸盐缓冲液悬浮液置 10ml 反应瓶中, 用橡皮垫封口, 加 2ml 丙烯, 在 30℃下摇床上的反应 (转速为 200r/min) 30min, 用气相色谱法 (GC) 氢火焰检测器外标法定量分析环氧丙烷浓度。文献[3]报导 30℃环氧丙烷的 H_r 计算, 另有 13% 环氧丙烷于气相中)。GC 条件: SE-54 石英毛细管柱 (25m×0.25mm i.d., 兰州化物所生产); 柱温: 50℃; 丙烯和环氧丙烷保留时间分别为 2.34 和 2.76min。催化反应活性单位 (μ) μm : μmol (环氧丙烷) · min^{-1} · mg^{-1} (干细胞重量)。

2 结果和讨论

2.1 甲烷作为外源性电子给体对 MMO 催化丙烯环氧化反应活性的影响

甲烷作为甲烷细菌的碳源和能源, 它在细胞的代谢过程见文献[5], 甲烷首先在 MMO 的催化作用下转化为甲醇, 在此过程中一分子的甲烷转化为甲醇, 需消耗一分子 NADH。即在甲烷氧化的第一步, 需要消耗 NADH, 生成的甲醇在醇脱氢酶的作用下转化为甲醛, 在这一过程中每分子的甲醇转化相应的甲醛, 可使一分子 PQQ 转化为 PQQH₂, 甲醛可在醛脱氢酶的作用下转化为甲酸, 这一过程中再生等摩尔的 NADH, 甲酸在酸脱氢酶的作用下转化为 CO₂ 和 H₂O, 这一过程中可再生等摩尔的 NADH。在甲烷利用细菌细胞中一分子甲烷代谢为 CO₂ 和 H₂O, 可净还原一分子 NAD 为 NADH。所以, 在细胞反应体系中加入甲烷可能影响细胞的 MMO 催化活性, 实验结果见图 1。当加入甲烷量 0.05ml 时, MMO 催化活性可增至 7.87 μm 活力单位, 是内源性反应活性的 5.3 倍。但是, 随着反应体系中加入甲烷量的增加, MMO 活性增加明显降低, 当甲烷的加入量为 0.15ml 时, MMO 活性仅与细菌组织的内源性 MMO 活性相当。甲烷浓度较高时 MMO 反应活性降低, 低浓度的甲烷对 MMO 活性有明显的提高。甲烷作为 MMO 的底物首先和 MMO

结合, 在 MMO 催化作用下甲烷转化为甲醇, 当甲烷浓度较高时它和丙烯竞争与 MMO 结合, 这样就抑制了 MMO 催化丙烯环氧化反应的活性。根据这一结果, 在反应体系中加入甲烷预反应 30min 使 NADH 再生, 除去甲烷, 加入空气和丙烯混合气体进行反应, 在反应的初始 10min 内 MMO 催化活性可达 14.5 μm , 这一结果与高灿柱等[6]结果相似。

2.2 甲醇作为外源电子给体对 MMO 催化丙烯环氧化反应活性的影响

甲醇浓度对 MMO 催化丙烯环氧化反

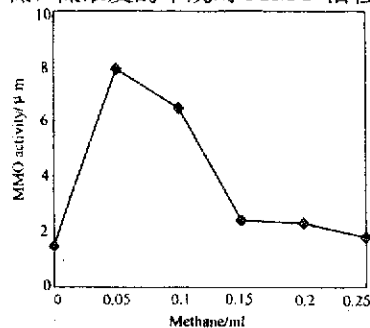


图 1 甲烷对 MMO 催化环丙烯氧化反应活性的影响

Fig. 1 The effect of methane on the activity of propylene epoxidation catalyzed by the cells of GYJ3

应活性的影响结果见图 2 (a), 不同浓度的甲醇均可提高 MMO 的催化活性, 其中甲醇浓度在 0~2mmol/L 之间, 随着浓度增加, MMO 催化活性增加; 在 2~4mmol/L 之间, 随着浓度的增加, MMO 催化活性增加程度有所下降; 而在甲醇浓度在 4~10mmol/L 之间, 甲醇浓度再增加, MMO 催化活性不增加。可以解释为: 甲醇浓度较低时, 醇脱氢酶催化甲醇的比活随着甲醇浓度的增加而增加, 即 NADH 的再生速度增加, 细胞中 NADH 的增加提高了 MMO 的活性。当甲醇的浓度达到 2mmol/L 时, NADH 的再生速度达到最大, 此时, MMO 活性最高, 达到 $20.7 \mu\text{m}$, 为细胞内源性催化活性的 12 倍。当甲醇大于 2mmol/L 时, 作为醇脱氢酶底物的甲醇已达到饱和浓度, 活性不再随甲醇浓度增加而增加, 而甲醇作为 MMO 催化产物, 它能够和 MMO 的催化活性中心结合, 尽管这种结合相对较弱, 但是, 当甲醇浓度较高时仍能对 MMO 催化反应产生微弱的抑制作用。所以, 甲醇在 2~4mmol/L 之间, 甲醇浓度增加, 而 MMO 催化丙烯环氧化反应活性下降。当甲醇浓度大于 4mmol/L 时, 随着甲醇浓度的增加, MMO 活性基本不再变化。

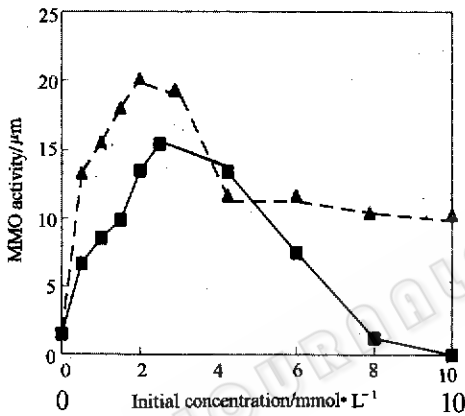


图 2 不同初始浓度的甲醇和甲醛对 MMO 催化丙烯环氧化反应催化活性的影响

Fig. 2 The effect of initial concentration of methanol and formaldehyde on the activity of propylene epoxidation catalyzed by the cells of GYJ3
 ▲Methanol (a), □Formaldehyde (b)

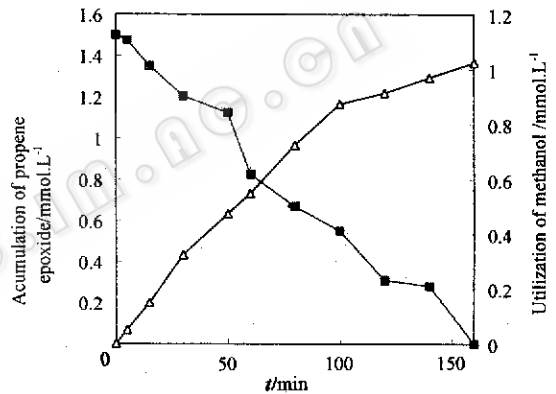


图 3 甲醇利用和环氧丙烷的积累与反应时间的关系

Fig. 3 The Utilization of methanol and the accumulation of propylene oxide in the course of reaction time.
 △Propylene oxide, □Methanol

在实验中考察了 MMO 催化丙烯环氧化反应过程中甲醇的消耗和环氧丙烷的积累与反应时间的关系 (见图 3)。结果表明甲醇的代谢速度在 160min 内基本保持不变, 它的代谢速度为 $16.2 \text{nmol} (\text{甲醇}) \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (dry cell)。以每分子甲醇代谢为 CO_2 和 H_2O 可再生二分子 NADH 计算, NADH 的再生速度为 $32 \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (dry cell), 而环氧丙烷的生成量在 160min 内平均反应速度为 $10.8 \mu\text{mol/L}$, MMO 催化丙烯环氧化速度小于 NADH 的再生速度, 可以推断, 在反应过程中 NADH 作为 MMO 催化丙烯环氧化反应的电子给体是过量的, 即在反应过程中加入甲醇作为电子给体, NADH 不再是制约 MMO 催化反应的因素。但是在整个反应过程中 MMO 催化丙烯环氧化反应活性仍在下降, 从图 4 中我们可以看出 MMO 活性在 30min 内保持不变 (在 $20 \mu\text{mol/L}$);

30min 后 MMO 活性开始下降；在 50~100min 之间，MMO 催化活性相对稳定，但活性明显较反应开始时低；在 100~120min 之间 MMO 活性又开始下降，120min 后活性保持不变，此时 MMO 催化活性为 $5.6\mu\text{m}$ 。在反应过程中影响 MMO 活性的两个因素是甲醇浓度和环氧丙烷的浓度，从图 2(a) 中可知甲醇的初始浓度为 1.0mmol/L 时反应活性为 $18\mu\text{m}$ ，而反应 50min 时，甲醇的浓度为 1.0mmol/L ，MMO 的催化活性为 14mmol/L ，MMO 活性下降，可能是由于环氧丙烷的积累造成对 MMO 的毒性所致。但是，环氧丙烷的浓度对 MMO 活性的抑制作用不成线性关系，当环氧丙烷浓度达到一定阈值环氧丙烷对 MMO 活性产生抑制作用，图 4 中 MMO 的活性出现两个平台，它暗示 MMO 可能有两个和环氧丙烷的结合部位。*Methylomonas* sp. GYJ3 的 MMO 是一个 3 组份复合酶系⁽⁷⁾，sMMO 和环氧丙烷的结合部位可能位于一个酶组份上也可能位于不同的酶组份上，而环氧丙烷和 sMMO 的哪个组份结合需进一步研究。

2.3 甲醛作为外源电子给体对 MMO 催化丙烯环氧化反应的影响

甲醛的初始浓度对 MMO 催化丙烯环氧化反应活性的影响见图 2b，从图 2b 中可以看出甲醛浓度在 $0\sim 3\text{mmol/L}$ 之间，随着甲醛浓度的增加，MMO 活性增加，当甲醛的浓度为 3mmol/L 时，MMO 催化活性达到最高点，为 $17.9\mu\text{m}$ 。当甲醛浓度大于 3mmol/L ，随着甲醛浓度的增加，MMO 催化活性下降。当甲醛浓度为 10mmol/L 时，MMO 完全失活，这表明甲醛在较低浓度时可提高 MMO 活性，而浓度较高，甲醛能够使 MMO 完全失活。甲醛本身是一种蛋白变性剂，浓度较高可改变蛋白质的构象，使酶失活。

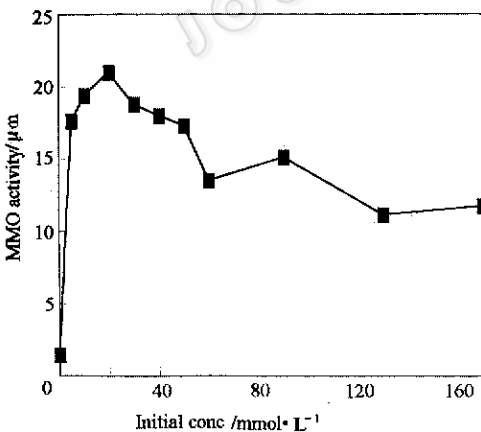


图 5 甲酸钠初始浓度对 MMO 催化丙烯环氧化反应活性的影响

Fig. 5 The effect of initial concentration of sodium formate on the activity of propylene epoxidation catalyzed by the cells of GYJ3

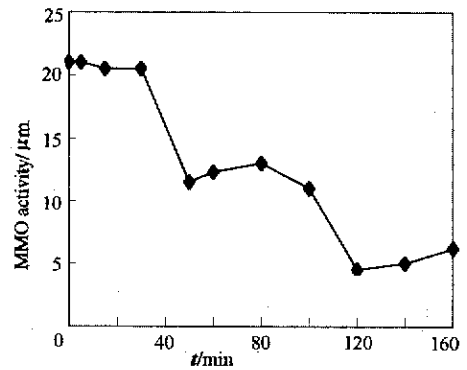


图 4 MMO 催化丙烯环氧化反应活性与时间的关系

Fig. 4 Relationship between the activity and time in propene epoxidation catalyzed by MMO

2.4 甲酸钠作为外源性电子给体对 MMO 催化丙烯环氧化反应的影响

甲酸作为甲烷细菌的代谢产物，它在酸脱氢酶的作用下直接转化为 CO_2 和 H_2O ，在这一过程中一分子的 NADH 被再生。当甲酸盐作为电子给体的加入，能够迅速使细胞反应体系中 MMO 催化活性提高，当甲酸盐的浓度为 20mmol/L 时 MMO 催化活性可达 $2\mu\text{m}$ ，当甲酸浓度大于 20mmol/L 时随着甲酸的浓度的增加，MMO 活性略有下降，但仍能保持较高活性（结果见图 5）。甲酸钠作为电子给体对 MMO 活性在较高浓度时无明

显抑制作用,所以,甲酸钠是甲烷利用细菌催化丙烯环氧化反应中较好的电子给体之一。

参 考 文 献

- [1] Laek D J, Aikens P, Mahnoudan M *et al*, Trends Biotech., 1992, 10: 256.
- [2] Mahmoudan M, Michael A J. J Ind Microbiol, 1992, 40: 25.
- [3] Stanley S, Dalton H. Biocatalysis, 1992, 6: 163.
- [4] 宁治中, 缪德坝, 易淑云等. 微生物学通报, 1990, 17: 283.
- [5] Colby J, Strirling D, Dalton H. Biochem J, 1977, 165: 395.
- [6] 高灿柱, 李树本, 宁治中等. 分子催化, 1991, 5: 377.
- [7] Green J, Dalton H. J Biol Chem, 1985, 260: 15795.
- [8] Fox B G, Surerus K, Munck E *et al*. J Biol Chem, 1988, 263: 10553.

Effects of Exogenous Electron Donors on Epoxidation of Propylene Catalyzed by Methane Monooxygenase of *Methylomonas* sp. GYJ3

Shen Runnan Yuchi Li Li Shuben

(State Key Laboratory of Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou
Institute of Chemical physics, Academia sinica, Lanzhou 730000)

Abstract Effect of exogenous electron donors on activity of MMO of *Methylomonas* sp. GYJ3 were studied. The results indicated that methane, methanol, formaldehyde and formate as electron donors were able to enhance the rates of propylene epoxidation catalyzed by MMO. The initial concentration of these electron donors added to reaction system greatly influenced the rates of propylene epoxidation. At the optimum initial concentration of methane, methanol, formaldehyde and formate, the activities of MMO were stimulated to enhance 5.3, 12.7, 10 and 12.4 fold of intrinsic activity, respectively. Methane and formaldehyde becomes toxic to MMO at high concentrations. Formate, an ideal electron donor, was shown to stimulate activity of MMO without apparent inhibition at relatively high concentrations up to 130 μ m. The metabolism of methanol, the accumulation of propylene oxide and the activity of MMO in course of reaction time were studied with propylene epoxidation by resting cell of *Methylomonas* sp. GYJ3 at initial concentration of 1.5mmol/L methanol. The results revealed that the metabolic rate of methanol and regeneration rate of NADH were much higher than the rates of propylene epoxidation and almost unvaried with reaction time. However, the rates of propylene epoxidation were lower with reaction time, suggesting that the propylene oxide was inhibitory to MMO at relatively high concentrations.

Key words Methanotrophic bacteria, methane monooxygenase, electron donors, propylene epoxidation