

水-有机溶剂两相体系中甲基单胞菌 Z201 催化丙烯环氧化的初步研究

夏仕文* 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)

Lanne 于 1987 年提出了生物催化剂工程(Biocatalyst engineering)和介质工程(Medium engineering)的概念^[1]。有机相生物催化中溶剂的选择也是介质工程的内容之一。纯酶在有机相中的催化作用已有大量报道^[2],但对完整细胞研究甚少。本文以甲基单胞菌(*Methylomonas*) Z201 完整细胞为生物催化剂,丙烯环氧化为指标反应,研究有机溶剂对活性的影响并对催化活性-溶剂疏水性进行了相关性分析。研究了水-十六烷两相体系中十六烷含量和搅拌速度对丙烯环氧化速度的影响和细胞的操作稳定性。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养条件

Methylomonas Z201 系中国科学院成都生物研究所赵树杰先生赠送,按文献[3]介绍的方法培养。

1.2 细胞制备

将离心后的细胞用 50mmol/L 磷酸盐缓冲液(含 5mmol/L Mg^{2+} , pH7.0)洗涤两次,然后悬浮于相同缓冲液中,4℃ 下贮存备用。海藻酸钙包埋细胞和砂子吸附细胞的制备见文献[4,5]。

1.3 环氧化反应

于 20ml 反应瓶中加入适量游离细胞悬浮液或砂子吸附湿细胞,然后加入 50mmol/L 磷酸盐缓冲液(含 5mmol/L Mg^{2+} , 40mmol/L $HCOONa$, pH7.0)和 10% 有机溶剂。反应液总体积为 2ml。密封后注入 2ml 丙烯,35℃,200r/min 摇床反应。

海藻酸钙包埋细胞的水相为 50mmol/L $CaCl_2$ 溶液(含 40mmol/L $HCOONa$ pH7.0),其余条件同上。

1.4 分析方法

细胞密度和环氧丙烷浓度测定方法见文献[6]。

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂对细胞活性的影响

在由水和 18 种有机溶剂构成的两相体系中,以丙烯环氧化为指标反应,分别测定游离、包埋、吸附细胞的活性保留(表 1)。结果表明在所选择的有机溶剂中,包埋和吸附细胞部分或完全失活。而游离细胞在 $C_{12} \sim C_{16}$ 直链烷烃为溶剂时被激活。在水-十六烷(10%)两相体系中,游离细胞的活性提高 23%。

游离、包埋、吸附细胞分别为 1.9、3.4、0.91mg(干重)。有机相体积为 10%。介质中含 40mmol/L $HCOONa$,温度为 35℃,搅拌速度 200r/min,时间 30min。

国家自然科学基金资助课题。

* 现在南开大学分子生物研究所作博士后。

** 通讯联系人。

本文于 1996 年 5 月 12 日收到。

表 1 水-有机溶剂两相体系中 *Methylomonas* Z201 细胞的活性保留

溶 剂	Log P	活性保留/%		
		游离细胞	包埋细胞	吸附细胞
水	—	100	100	100
己烷	3.4	10	45	
庚烷	4.0	24	62	22
辛烷	4.5	82	75	59
癸烷	5.6	100	76	73
十二烷	6.6	115	82	81
十三烷	7.1	120	88	80
十四烷	7.6	121	90	87
十六烷	8.8	123	90	89
环己烷	1.5	8	10	15
环己醇	3.2	17	15	18
邻苯二甲酸二丁酯	5.4	96	79	85
苯	2.0	0	12	10
甲苯	2.5	0	15	17
乙酸乙酯	0.68	0	0	0
1-丙醇	0.28	0	0	0
2-丙醇	0.28	0	0	0
1-丁醇	0.80	10	20	25

2.2 活性保留和溶剂疏水性的相关性

将表 1 的活性和溶剂疏水性参数 Log P 作图(图 1)。发现 Log P 值越大的溶剂中,细胞活性保留越大。定量分析表明:在 Log P<2 的溶剂中,细胞完全或大部分失活,在 Log P2~4 的中等极性溶剂中细胞具有中等活性保留,在 Log P>4 的弱极性或非极性溶剂中细胞具有较高活性保留。

2.3 水-十六烷两相体系中十六烷含量对丙烯环氧化速度的影响

在水-十六烷两相体系中,十六烷含量对丙烯环氧化速度有显著影响。图 2 的结果表明:对游离细

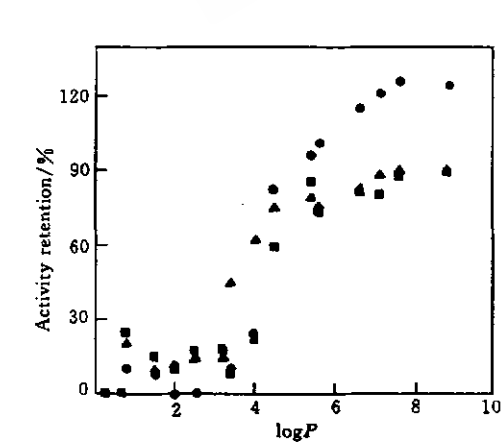


图 1 水-有机溶剂两相体系中 *Methylomonas* Z201 细胞的活性保留与 LogP 的关系
游离(●)、吸附(■)和包埋(▲)细胞

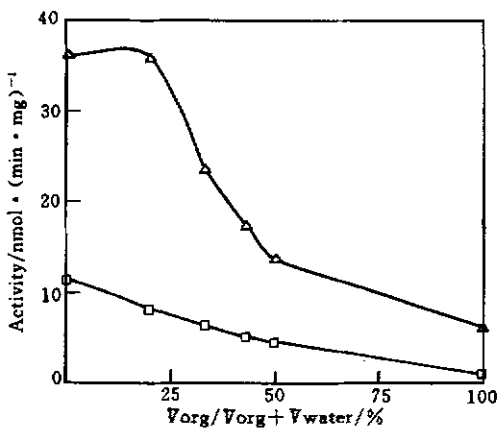


图 2 水-十六烷两相体系中十六烷含量对丙烯环氧化速度的影响
游离(△)和包埋(□)细胞分别为 4.4、5.5mg(干重)

胞,十六烷在反应介质中的体积比小于 20% 时,丙烯环氧化速度高于以水为介质的反应体积,最佳十六烷含量为 10%。对包埋细胞,丙烯环氧化速度随十六烷含量增大而减少。游离细胞离心去水,无水十六烷为介质添加 40mmol/L 甲酸钠,丙烯环氧化速度很低。包埋细胞亦有类似结果。这说明无论是游离细胞还是包埋细胞,只有较高水含量的环境中才能保持高活性。

2.4 水-十六烷两相体系中搅拌速度对丙烯环氧化速度的影响

在水-十六烷 10% 两相体系中,反应底物丙烯、分子氧和产物环氧丙烷在两相界面的质量传递与两相界面积有关,后者决定于搅拌速度。实验中选择 100、150、200r/min 用于研究搅拌速度对游离和包埋细胞催化丙烯环氧化速度的影响。图 3 的结果表明对游离细胞和包埋细胞,200r/min 下的反应速度分别是 100r/min 下的 7 和 13 倍。可见固定化载体的存在使搅拌速度对反应速度的影响更显著。

2.5 水-十六烷两相体系中游离细胞的操作稳定性

比较水和十六烷 10% 为反应介质时游离细胞的操作稳定性。从动力学曲线可以看出,同水为反应介质时相比,游离细胞在水-十六烷 10% 两相体系中的操作稳定性无明显改善(图 4)。

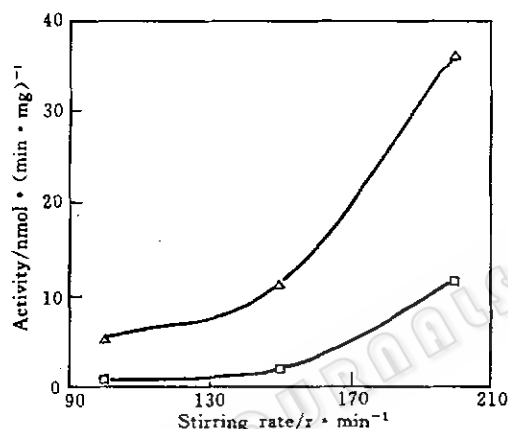


图 3 水-十六烷 10% 两相体系中搅拌速度对丙烯环氧化速度的影响
游离(Δ)、包埋(□)细胞

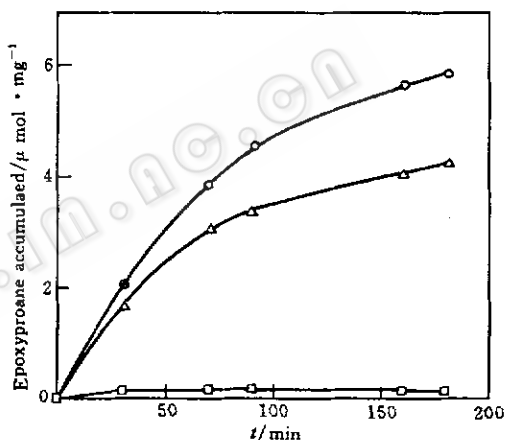


图 4 游离曲线催化丙烯环氧化的动力学曲线
水(Δ),水-十六烷 10% 两相体系(○)

以前的研究指出细胞在反应过程中的失活归因于辅酶 NADH 损耗和产物环氧丙烷对细胞的毒化作用。由于环氧丙烷为极性分子,在水中的溶解度为 40.5% (20℃),因而 10% 十六烷的引入尽管使反应中产生的环氧丙烷部分萃取至十六烷相中,但不足以使水相中的环氧丙烷浓度控制在抑制浓度之下,因而细胞的操作稳定性没有改变。

参 考 文 献

- [1] Lanne C. Biocatalysis, 1987, 1:17~22.
- [2] Dordick J S. Enzyme Microb Technol, 1987, 11: 194~211.
- [3] 王福来,郑 坚,王 飏等.微生物学报,1993,33:129~134.
- [4] 高灿柱,李树本,宁治中等.分子催化,1990,4:291~297.
- [5] 高灿柱,李树本,宁治中等.分子催化,1991,5:227~232.
- [6] 夏仕文,尉迟力,李树本.分子催化,1996,10:51~56.

Preliminary Study on the Epoxidation of Propene by *Methylomonas* Z201 Cells in Water-organic Solvent Two-phase System

Xia Shiwen Yu Chili Li Shuben

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

Abstract In water-organic solvent two phase systems, the activity retention of free, absorbed and entrapped *Methylomonas* Z201 cells was depended on the polarity of solvents. Correlation of activity retention-solvent hydrophobicity ($\log P$) revealed that the activity retention was high in solvents with $\log P > 4$. In water-hexadecane(10%, v/v) two phase system, lower volumetric phase ratio of hexadecane in reaction medium and higher stirring rate were favorable for the increase of reaction rate of propene. Although propene oxide produced could be partly extracted into hexadecane phase, the limited extraction capacity of hexadecane was not enough to decrease the concentration of propene oxide in aqueous phase to the inhibition concentration, the operational stability of *Methylomonas* Z201 cells could not be enhanced.

Key word *Methylomonas* Z201, water-organicsolvent two phase system, epoxidation of propene