文章编号：1001-3555(2008)04-0356-06

甲基弯菌 IMV 3011 细胞生物催化二氧化碳制甲醇

辛嘉英[1,2]，蔡岩松[1]，王　艳[1]，张颖鑫[2]，夏春谷[2]
（1. 哈尔滨商业大学　食品科学与工程省重点实验室，黑龙江 哈尔滨，150076；
2. 中国科学院兰州化学物理研究所　羰基合成和选择氧化国家重点实验室，甘肃 兰州，730000）

摘　要：甲基弯菌 IMV 3011 可以催化二氧化碳生物转化生成甲醇. 在细胞悬浮液中充入二氧化碳后，反应一段时间后在反应液中检测到了甲醇产生. 但是甲烷氧化细菌细胞合成甲醇的能力受到了细胞内还原当量的限制. 研究发现，细胞内贮存的聚-β 羟基丁酸(PHB)分解后能够产生还原当量，可以提高甲醇的产生能力. 本文通过改变培养基中氮和铜的起始浓度对 PHB 积累量进行调节来提高甲基弯菌 IMV 3011 还原二氧化碳生成甲醇的能力. 结果表明，随着细胞内 PHB 含量的增加甲醇的产生能力也会增加. 当细胞内 PHB 的积累量达到 38.6% 时，将二氧化碳还原成甲醇的能力最强. 当 PHB 的积累量超过 38.6% 时细胞生成甲醇的能力反而降低.

关　键　词：二氧化碳还原；合成甲醇；甲烷氧化细菌；聚-β 羟基丁酸；还原当量
中图分类号：O643.32　　**文献标识码：**A

甲醇是应用范围很广的大宗化学品. 用二氧化碳生产甲醇可以实现温室气体二氧化碳的回收利用. 甲烷氧化细菌是利用甲烷为唯一碳源和能源生长的一种微生物，它可以把甲烷通过一系列反应氧化成甲醇、甲醛、甲酸，直至二氧化碳，其中部分甲醛可用于细胞的成长. 还原二氧化碳生成甲醇是这个反应的逆反应. 在早期的工作中，我们曾研究了甲烷氧化细菌细胞催化二氧化碳还原成甲醇的可行性，发现包含有甲醇脱氢酶(ADH)、甲醛脱氢酶(FaldDH)、甲酸脱氢酶(FateDH)的甲烷氧化细菌在温和条件下经过一系列反应能够把二氧化碳还原为甲醇[1]. 如图 1 所示，该反应是一个需能反应，甲烷氧化细菌催化二氧化碳还原为甲醇需要消耗相当数量的还原当量($NADH_2$，$PQQH_2$)，正因如此，甲烷氧化细菌细胞催化二氧化碳还原成甲醇的能力是有限的. 在细胞中还原当量丰富时，反应能够顺利进行，甲醇得以积累；随着还原当量的消耗，甲醇的积累速度会逐渐降低直至停止.

聚-β 羟基丁酸(PHB)是甲烷氧化细菌等微生物在氮、磷和氧等营养不均衡条件下形成的细胞内碳源和还原能储存物质[2]. 许多文献都报导甲烷氧化细菌细胞内贮存的 PHB 能够分解产生还原当量，保证其更长时间地催化三氯乙烯降解[3~5]. 如图 1 所示，甲烷氧化细菌可以通过核酮糖单磷酸途径和

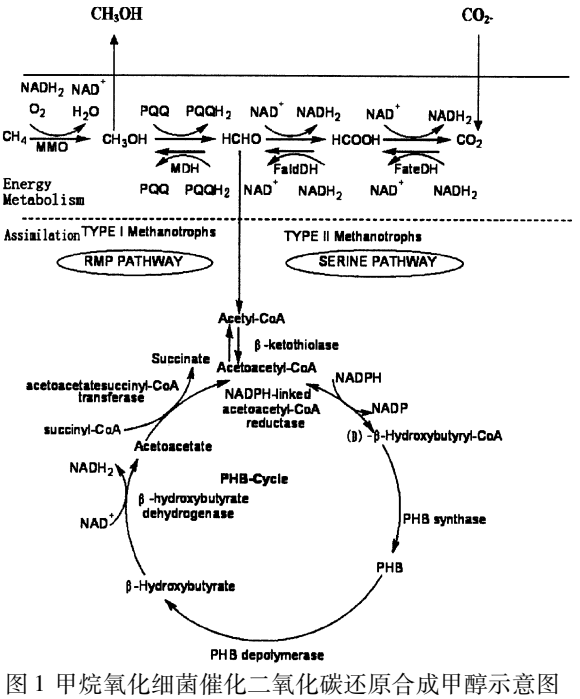

图 1 甲烷氧化细菌催化二氧化碳还原合成甲醇示意图
Fig. 1 Pathway of methanol synthesis from carbon dioxide reduction by methanotrophic bacteria
FateDH: formate dehydrogenase; FaldDH: formaldehyde dehydrogenase; MDH: methanol dehydrogenase; MMO: Methane monooxygenase

收稿日期：2008-01-30；**修回日期：**2008-04-30.
基金项目：教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET050356)；华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室开放课题.
作者简介：辛嘉英，男，生于 1966 年，博士. 博士生导师.

丝氨酸代谢途径来积累 PHB. 而 PHB 的降解反应是在 PHB 解聚合酶、β-羟基丁酸脱氢酶，乙酰乙酸-琥珀酸-CoA 转移酶，β-酮硫酶的催化下完成的，该过程可以产生还原当量.

PHB 作为胞内碳源和能源储存物质，可能会有效地提高甲烷氧化细菌细胞催化二氧化碳生产甲醇的能力.

通过优化甲基弯菌 IMV 3011 的培养条件使其有利于 PHB 的积累，对不同 PHB 含量的甲烷氧化细菌催化甲醇合成的能力进行了评价，考察了细胞催化甲醇合成能力与 PHB 含量的相关性.

1 材料与方法

1.1 微生物和培养条件

甲基弯菌 IMV 3011 来自俄罗斯微生物与病毒研究所. 采用的基本无机盐培养基成分为(g/L)：NH_4Cl，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；pH 7.0. 改变上述基本无机盐培养基中 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，NH_4Cl 和 KNO_3浓度作为 PHB 积累实验的培养基.

培养方法：在 250 mL 三角瓶中放入 50 mL 上述无机盐培养基，接种后用真空泵抽真空后置换入甲烷和空气(CH_4：air = 1：1，V/V) 的混合气体，在 30～32 ℃培养一定时间后 9 000 rpm 离心 10min 收集菌体，用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0，含 5 mmol/L $MgCl_2$) 洗涤两次后，悬浮于相同缓冲液使细胞密度为 3 mg 干重细胞/mL.

1.2 PHB 的定量分析

采用气相色谱法测定细胞中 PHB 的含量. 取约 40 mg 干细胞，加入 20 mg 苯甲酸，依次加入 4 mL 含 15%(v/v)H_2SO_4的甲醇，4 mL 氯仿，在 100 ℃下消化 4 h. 然后迅速冷却，加入 2 mL 去离子水，快速混匀，静置分相. 取下层进行气相色谱检测. 色谱条件为：SE-54 弹性石英毛细管柱(0.25 mm×25 m)，载气 N_2，检测器 FID，分流进样. 进样器、检测器温度分别控制在 180 ℃、200 ℃，柱温 60 ℃，进样体积 1μL.

1.3 甲醇测定

采用气相色谱测定甲醇含量. 色谱条件同 1.2.

1.4 二氧化碳还原制甲醇反应

取 10 mL 细胞悬浮液加入到 100 mL 三角瓶中，密封后抽出 50 mL 空气，置换入相同体积的 CO_2，30 ℃，150rpm 反应，每隔一段时间取出一定量的反应液，对甲醇的产生量进行测定.

1.5 间歇反复批式反应

取 10 mL 细胞悬浮液加入到 100 mL 三角瓶中，密封后抽出 50 mL 空气，置换入相同体积 CO_2，30 ℃，150 rpm 摇床反应 24 h 后停止. 将三角瓶内的反应物在 12 000 rpm 的条件下进行离心分离 2min 去除上层液体，将菌体重新悬于新鲜的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH7.0，含 5 mmol/L Mg^{2+})中，使菌体的浓度为 3 mg 干重细胞/mL. 三角瓶密封后将瓶中 50 mL 的空气换成 CO_2进行下一批反应. 反复循环直到没有检测量甲醇产生. 产生的甲醇总量为每次循环产生量的加和.

2 结果与讨论

2.1 正常培养细胞催化二氧化碳还原合成甲醇

如图2所示，在甲烷氧化细菌中通过一系

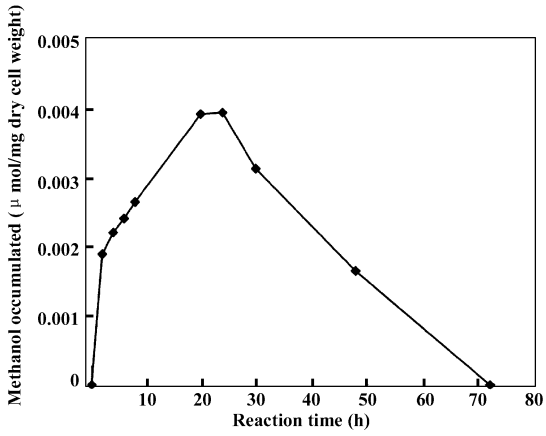

图 2 甲基弯菌 IMV 3011 细胞悬液催化甲醇生物合成

Fig. 2 Time course of methanol bilsynthesis catalyzed by cell suspensions of *M. trichosporium IMV* 3011

M. trichosporium IMV 3011 cells were obtained from routine fermentation conditions for 96 h.

Cell concentration: 3.0 mg dry cell wt/mL

列有序反应可将甲醇氧化成 CO_2，而 CO_2还原成甲醇是该反应的逆反应. 研究发现甲基弯菌 IMV 3011 细胞悬液可以将 CO_2还原成甲醇，在 CO_2气氛下，可以在反应液中检测到了产物甲醇积累. 由于在整细胞催化 CO_2还原合成甲醇的过程中三种脱氢酶之间，一种酶催化的产物是下一种酶的底物，中间产

物容易到达下一个酶的催化位点而没有太大的扩散，反应过程中没有发现甲醛和甲酸的积累. 如图 2 所示，甲醇的产量在培养 24 h 时达到最大值，此后再继续培养会发现随着培养时间的延长甲醇的产量慢慢下降，这可能是由于细胞内还原当量耗尽导致甲醇合成速度低于甲醇酶解速度造成的.

2.2 PHB 促进 CO_2 还原合成甲醇能力的可能性

甲烷氧化细菌还原 CO_2 合成甲醇的能力受到细胞还原当量的限制[11]. 甲基弯菌 IMV 3011 可以积累 PHB 作为碳源和能量的储存物[6]. 我们尝试通过增加细胞中 PHB 含量来提高其还原 CO_2 合成甲醇的能力. 为证实 PHB 的有效性，我们用 PHB 的单体物质 3-羟基丁酸作为实验底物. 如图 3 所示，在反复批式实验中发现加入 3-羟基丁酸可以提高甲醇的产量. 由此说明 PHB 可以作为还原当量再生的储存物，通过解聚产物 3-羟基丁酸氧化提高细胞内还原当量的含量，进而提高其甲醇合成能力.

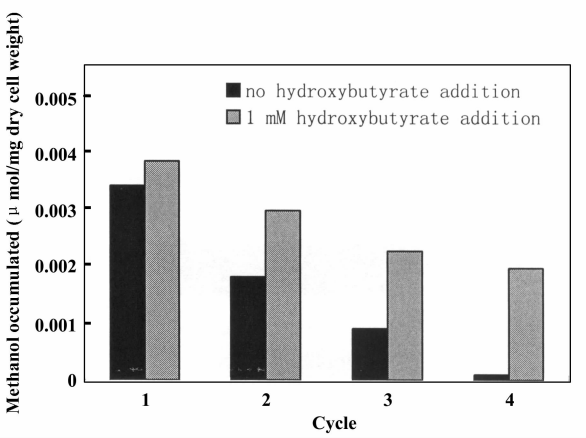

图 3 甲基弯菌 IMV 3011 细胞催化二氧化碳合成甲醇的反复批式反应

Fig. 3 Repetitive batch synthesis of methanol from carbon dioxide with *M. trichosporium IMV* 3011

M. trichosporium IMV 3011 cells were obtained from routine fermentation conditions for 96 h. Cell concentration: 3.0 mg dry cell wt/mL

2.3 发酵条件对 PHB 积累量的影响

PHB 的形成受到许多条件的影响. 有报道指出，在合成 PHB 的过程中如果限制供氮量可以促进 PHB 的合成[7]. 在甲烷转化成 PHB 的反应中催化第一步反应的酶是甲烷单加氧酶(MMO)，而 MMO 的存在状态和催化活性受到铜的控制[8~10]. 为了在发酵初期使 PHB 的积累量增加，细胞内蛋白质的含量就要受到限制. 我们通过在含有铜的培养基中限制氮的含量来控制蛋白质的合成. 氮含量的控制通过在培养基中降低 KNO_3 和 NH_4Cl 的浓度来实现. 如图 4 所示，在铜浓度为 0.002 g/L 条件下，通过降低 KNO_3 和 NH_4Cl 浓度进行细胞培养，发现减少 KNO_3 的量对 PHB 的产量影响不大. 但是，当 NH_4Cl 的浓度减小到五分之一时，培养 168 h 后，PHB 的积累量达到最大值. 继续降低 NH_4Cl 的浓度，PHB 的积累量产生了明显的减少. 这表明当 NH_4Cl 的浓度小于 0.1g/L 时，酶催化甲烷生成 PHB 的能力受到了培养基中氮含量过低的限制. 因此在接下来的实验中将培养基中 KNO_3 和 NH_4Cl 浓度定为 1.6 g/L 和 0.1 g/L.

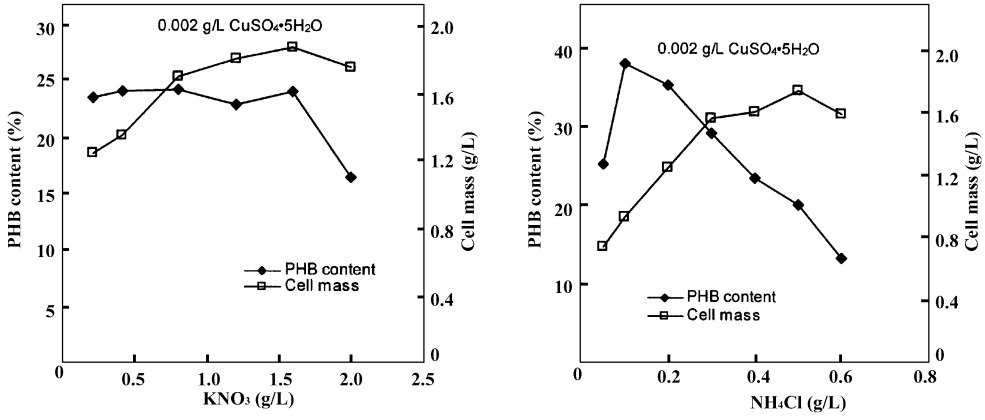

图 4 氮源对细胞生长和 PHB 积累的影响

Fig. 4 The effect of nitrogen concentration on growth and PHB accumulation

Cultivation time: 168 h

早期的文献报导，除了限氮外，限铜也可以促

进 PHB 的积累[7]. 甲基弯菌 IMV 3011 在铜浓度不同的无机盐培养基中进行培养. 如图 5 所示，在 KNO_3 和 NH_4Cl 浓度分别为 1.6g/L 和 0.1g/L 条件下，改变培养基中铜浓度. 铜浓度为 0.002 g/L 时产生的PHB最多，在培养168 h 后，PHB的积累量

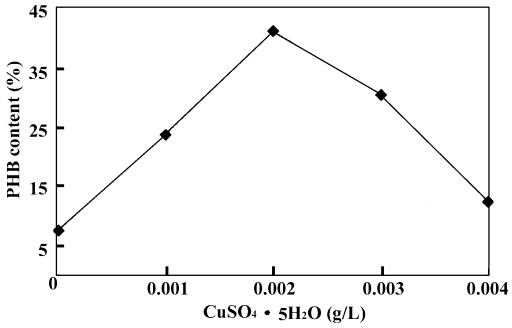

图 5 铜浓度对 PHB 积累的影响

Fig. 5 The effect of Cu concentration on PHB accumulation

达到41.0%. 如果培养基中不添加铜则培养 168 h 后，PHB 的积累量仅为 7.5%. 铜可以提高 PHB 的积累量，可能是由于铜提高了颗粒性甲烷单加氧酶（pMMO）含量，从而提高甲烷氧化效率. 但是当铜浓度大于 0.002 g/L 时，PHB 的积累量反而会降低. 当铜浓度为 0.003 g/L 和 0.004 g/L 时，培养 168 h 后 PHB 的积累量仅分别为30.3% 和12.2%. 这可能是由于过量的铜限制了 PHB 的产生. 可见铜对甲基弯菌 IMV 3011 细胞内 PHB 的积累起到非常重要的作用，通过控制介质铜的量可以提高胞内 PHB 含量. 在接下来的实验中将培养基铜含量定为 0.002 g/L 进行 PHB 积累量的实验.

2.4 PHB 含量对菌体细胞生产甲醇能力的影响

PHB 在细胞内的积累量还可以通过培养时间的不同来控制. 如图 6 所示，在铜的浓度为 0.002 g/L，KNO_3 的浓度为 1.6 g/L 和 NH_4Cl 的浓度为0.1 g/L 的无机盐培养基中进行培养，在前 48 h 内 PHB 的积累量持续保持在4.0%左右，168 h 后 PHB 的积累量迅速增加到41%.

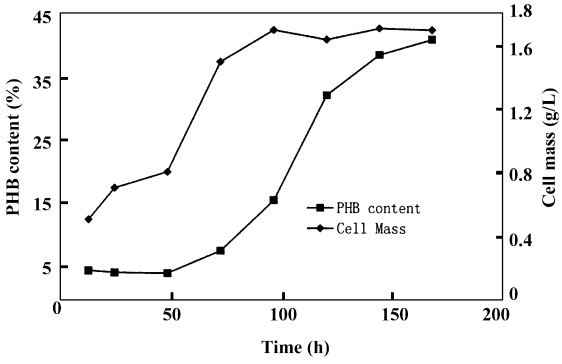

图 6 甲基弯菌 IMB 3011 的生长和 PHB 积累曲线

Fig. 6 Growth and PHB accumulation of *M. trichosporium IMV* 3011

PHB 的含量及甲醇合成能力关系如表 1 所示，在不含铜的无机盐培养基中培养 168 h 的细胞，PHB的含量仅为7.5%. 经过4次反复批式实验后大部分的 PHB 已经耗尽，细胞完全失去了合成甲醇的能力.

表 1 反复批式甲醇合成过程中细胞 PHB 消耗和甲醇合成能力变化

Table 1 The depletion of PHB level and the methanol synthesis ability of resting cells during repetitive batch synthesis of methanol

Batch	Cells containing 7.5% of PHB		Cells containing 41.0% of PHB	
	Residual PHB in cell (%)	Methanol accumulated (μmol/mg dry cell weight)	Residual PHB in cell (%)	Methanol accumulated (μmol/mg dry cell weight)
1	4.1	0.0034	36.6	0.0036
2	2.3	0.0018	33.2	0.0030
3	< 1.0	0.0009	29.8	0.0030
4	< 1.0	0.0003	27.0	0.0027

在铜浓度为 0.002g/L 的无机盐培养基中培养168h 的细胞，PHB 积累量高达 41%. 经过 4 次重复实验后 PHB 的含量仅下降了三分之一，且合成甲醇的能力仍然保存了其原有的 53%（甲醇的总产生能力为 0.026μmol/mg 细胞干重）.

在铜的浓度为 0.002g/L，KNO_3 浓度为 1.6 g/L 和 NH_4Cl 浓度为 0.1 g/L 的优化无机盐培养基中，培养不同时间的细菌细胞 PHB 的含量及其相应产生甲醇能力如表 2 所示.

细胞内 PHB 含量和甲醇产生能力的相关性研

究发现，在PHB含量为38.6%时生成甲醇的能力比PHB含量为21.5%时高了1.9倍. 说明PHB可以作为二氧化碳还原反应的内源电子供体. 但是当细胞内PHB含量为41.0%时，产生甲醇的能力有所下降. 这可能是因为随着细胞内PHB量增加使单位重量细胞中脱氢酶含量减少. 因此，建议采用PHB含量适当的甲基弯菌IMV 3011细胞催化二氧化碳还原产生甲醇的反应.

表2 PHB含量与甲醇合成能力关系

Table 2 The PHB contents and the corresponding total methanol production capacities

Culturing time at 30°C (h)	PHB in cell (%)	Total methanol production capacity (μmol/mg dry cell wt)
96	21.5	0.016 ± 0.002
120	32.2	0.022 ± 0.001
144	38.6	0.031 ± 0.001
168	41.0	0.026 ± 0.002

3 结 论

研究发现，甲烷氧化细菌细胞中PHB在分解代谢过程中可以产生还原当量，能够提高其将二氧化碳还原合成甲醇的能力. 与直接再生$NADH_2$相比，PHB的贮存功能可以大大减少反应-再生的交替频度，有利于反应长期进行.

采用甲烷氧化细菌中贮存的聚合物PHB作为内源电子供体驱动二氧化碳还原合成甲醇反应. 通过发酵介质调控，使得甲烷氧化细菌中在C/N营养不均衡条件下进行PHB积累；通过控制发酵介质中金属离子Cu的浓度对PHB产生进行调控. 利用高PHB含量的甲烷氧化细菌催化二氧化碳还原反应，大大提高了其合成甲醇能力.

参考文献：

[1] Cui Jun-ru(崔俊儒), Xin Jia-ying(辛嘉英), Niu Jian-zhong(牛建中), *et al. J. Mol. Catal.*(分子催化)[J], 2004, **18**(3): 214~218

[2] Davis J B, Coty V F, Stanley J P. *J. Bacteriol.*[J], 1964, **88**: 468~472

[3] a Henry S M, Grbic-Galic D. *Appl. Environ. Microbiol.*[J], 1991, **57**: 236~244
b Wu Xiao-mei(吴小梅), Xin Jia-ying(辛嘉英), Zhang yin-xin(张颖鑫), *et al. J. Mol. Catal.*(China)(分子催化)[J], 2006, **20**(6): 597~603

[4] Henrysson T, McCarty P L, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 1 602~1 606

[5] Chu K H, Alvarez-Cohen L. *Water Environ. Res.*[J], 1996, **68**: 76~82

[6] Xin Jia-ying, Zhang Ying-xin, Zhang Shuai, *et al. J. Basic Microbiol.*[J], 2007, **47**: 426~435

[7] Shah N N, Hanna M L, Taylor R. *Biotechnol. Bioengineer.*[J], 1996, **49**: 161~171

[8] Park S, Hanna M L, Taylor R T, Droege M W. *Biotechnol. Bioeng.*[J], 1991, **38**: 423~433

[9] Baik M H, Newcomb M, Friesner R A, Lippard S J. *Chem. Rev.*[J], 2003, **103**(6): 2 385~2 419

[10] Lieberman R L, Rosenzweig A C. *Crit Rev Biochem Mol.*[J], 2004, **39**: 147~164

[11] Xin J Y, Cui J R, Niu J Z, *et al. Biotechnol*[J], 2004, **3**(1): 67~71

[12] Lee S G, Goo J H, Kim H G, *et al. Biotechnol Lett.*[J], 2004, **26**: 947~950

Methanol Production from CO_2 by Resting Cells of *Methylosinus trichosporium* IMV 3011

XIN Jia-ying [1,2], CAI Yan-song[1], WANG Yan[1], ZHANG Ying-xin [2], XIA Chun-gu [2]

(1. *Key Laboratory for Food Science & Engineering*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076, *China*;
2. *State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation*, *Lanzhou Institute of Chemical Physics*, *Chinese Academy of Sciences*, *Lanzhou* 730000, *China*)

Abstract: Methanol production from carbon dioxide was successfully achieved using resting cells of Methylosinus trichosporium IMV 3011 as biocatalysts. Carbon dioxide is reduced to methanol and extracellular methanol accumulation has been found in the carbon dioxide incubations. However, resting cells of methanotrophs have a finite or intrinsic methanol production capacity due to a limiting supply of intracellular reducing equivalent. It has been found that the catabolism of stored Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) can provide intracellular reducing equivalents to improve the intrinsic methanol production capacity. The initial concentration of nitrogen and copper in the culture medium were studied for the accumulation of PHB by M. trichosporium IMV 3011, to expand its potential uses in methanol production from carbon dioxide reduction. The results showed that the total methanol production capacity was improved with increasing PHB content in cells. Resting cells containing 38.6% PHB exhibited the highest total methanol production capacity. But higher PHB accumulation adversely affected the total methanol production capacity.

Key words: Carbon dioxide reduction; Methanol production; Methanotroph; Poly-β-hydroxybutyrate; Reducing equivalent