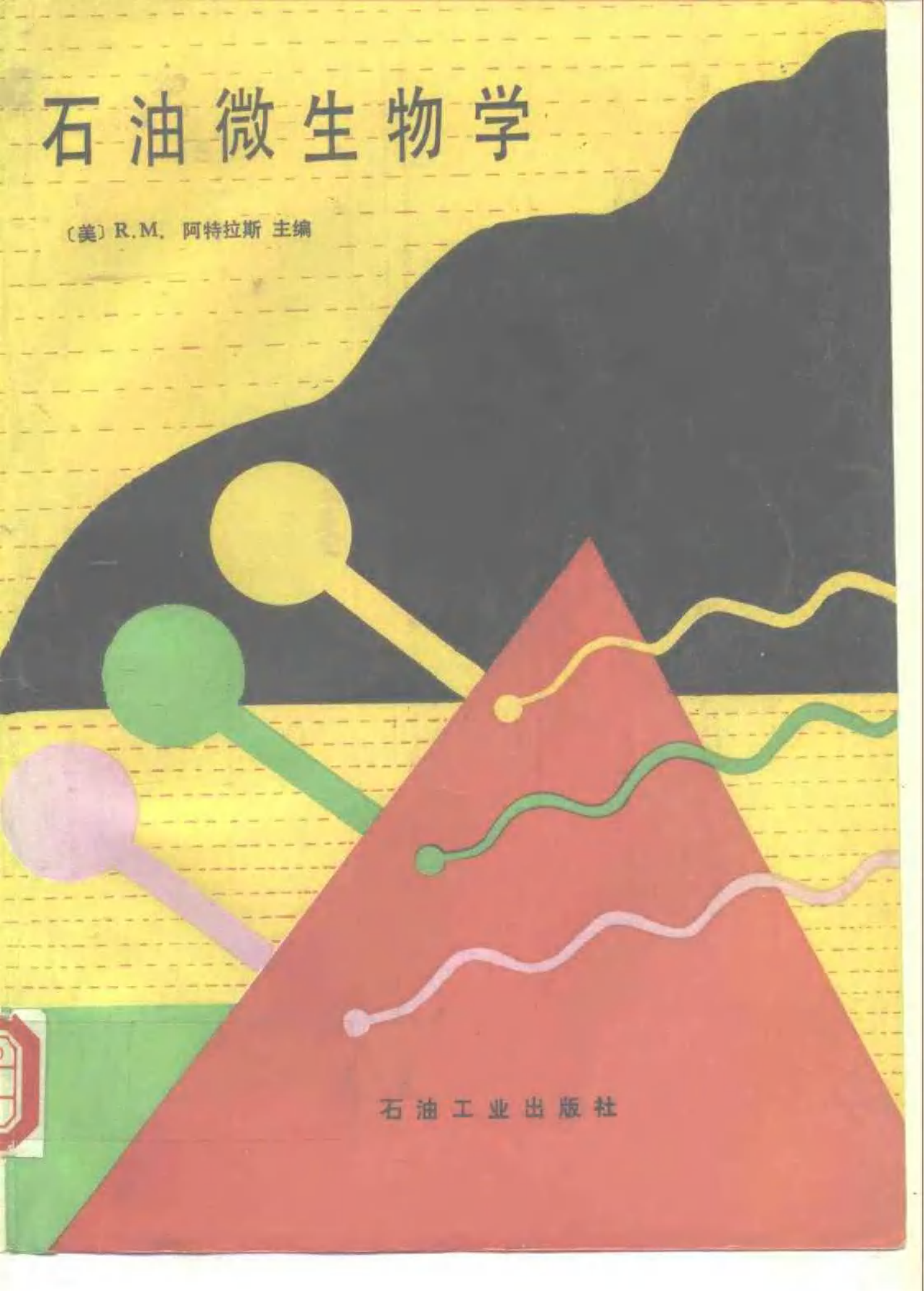


石油微生物学

(美) R.M. 阿特拉斯 主编



石油工业出版社

071403

IE-05/001

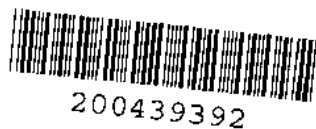
石油微生物学

[美] R. M. 阿特拉斯 主编

黄第藩 谭 实 杨文宽 等译



5250/07



石油工业出版社

内 容 提 要

本书着重介绍石油微生物学的各主要研究领域,包括石油烃的代谢,石油烃代谢的遗传学,石油降解微生物的生态学,石油对微生物种群的影响,石油微生物学的工业应用前景(包括腐蚀和生物腐蚀问题),以及应用石油烃底物培养微生物,用以生产如单细胞蛋白和生物合成燃料等有用产品的潜力。同时还指出了石油微生物学今后的研究方向。

本书内容广泛而丰富,可供科研,教学和石油勘探开发中石油微生物工作者,油田开发工作者和石油地球化学工作者参考借鉴。

石油微生物学

〔美〕 R.M.阿特拉斯 主编
黄第藩 谭 实 杨文宽 等译

石油工业出版社出版
(北京安定门外安华里二区一号楼)
北京海淀吴海印刷厂排版印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米 16开本 39印张 957千字 印1—1,800

1991年11月北京第1版 1991年11月北京第1次印刷

ISBN 7-5021-0531-X/TE·507

定价:12.50 元

译 者 的 话

石油微生物学已经有了半个世纪的发展历史,今天它已经成为石油工业中石油微生物工作者、油田开发工作者和石油地球化学工作者普遍关注的一个学科领域。石油微生物学是从“早期生油学说”的研究,即从40年代研究成岩作用早期微生物的成烃作用而发展起来的。随后在50年代和60年代,烃类的微生物代谢作用和腐败作用成为其主要研究方向。从70年代开始,人们普遍关心石油对环境的污染,广泛考查了在各种生态系统中石油污染物的归宿。在80年代,微生物遗传学和分子生物学的研究,占有突出的地位。同时利用微生物提高石油采收率和直接生产甲烷等烃类燃料以及利用废弃物经微生物作用转化为再生能源,以增加燃料储备等方面的研究,都取得了显著进展。这本书正是分章节总结了石油微生物学在这一发展历程中所取得的成就。

石油微生物学是一门边缘学科。由于它与油气生成、沼气发生、石油开采、石油化工、燃料腐蚀和侵染以及环境保护等密切相关,因此,这门学科对于现今和未来油气工业和人类社会的重要性是显而易见的。但这却是我国石油科学发展上的一个薄弱环节,它在环境保护问题中的重要性也还没有引起足够的重视。这就是我们将这本80年代石油微生物学的新著译成中文奉献给我国读者的原因,以期它能够对我国石油微生物学的开拓和发展,特别是对我国石油工业发展和环境保护有所帮助。

本书共分十七章,每一章都是由该领域的专家分别执笔撰写的。他们从不同的角度广泛地综合评述了现有文献,详细介绍了石油微生物学各个分支数十年来的发展历史和现状,并且探讨了发展方向和有待解决的问题。由于本书各章的作者都是活跃在各领域研究前沿的专家,他们所提供的详实的综述、精辟的见解及广泛的参考资料,都使本书对于我国有志于石油微生物学领域有所发展的科研人员来说不失为一本有价值的参考书。本书作为我国有关这一领域出版的第一部译著,也将为许多其他读者了解认识这一边缘学科提供方便。

尽管这是一本石油微生物学的专著,但其所涉及知识领域甚广,因此又是一本翻译难度很大的著作。尽管我们加强了译、校工作,力求译文准确无误,但由于译者和校者的专业知识面毕竟有限,也许还有不尽准确甚至误译之处,恳请读者指正。

参加本书各章翻译校译的人员有:

- 第一章 王锐良 华阿新译 谭实校
- 第二章 刘斌译 张义纲 黄第藩校
- 第三章 黄第藩译
- 第四章 张大江译 黄第藩校
- 第五章 黄第藩译 谭实校
- 第六章 唐庆凤译 杨文宽校
- 第七章 杨文宽译 谭实校
- 第八章 朱桂海译 黄第藩 华阿新校

第九章 朱桂海译 杨文宽校
第十章 朱桂海译 杨文宽校
第十一章 廖志勤译 张义纲 谭实校
第十二章 程克明 卞良樵译 张义纲校
第十三章 李晋超译 黄第藩校
第十四章 谭实译 张建华校
第十五章 黄第藩 赵革译 王大珍校
第十六章 黄第藩 王大珍译 谭实校
第十七章 杨文宽译 谭实校

本书均由黄第藩、谭实、杨文宽统一校核。

黄第藩 谭实
1990年3月12日

前 言

R. M. ATLAS

迄今已有过两本《石油微生物学》问世。一本是Davis在1967年写成，另一本则是Beerstecher在1954年所著。自1967年以来，石油微生物学已经取得了许多新的进展。因此，对于这样一门复杂学科，很有必要写一本对其不同领域进行综述和回顾的新著。

自从本世纪40年代石油和微生物的关系最初被认识以来，石油微生物学已经发生了很大的变化。人们对这一领域的不同方面，其强烈兴趣每10年一变。40年代，人们的兴趣大都集中在微生物与石油成因的关系上。烃类代谢作为一个研究领域，在50、60年代引起了人们极大的关注。一方面是作为一种基础理论来研究，另一方面则是由于石油烃作为发酵工业底物的应用潜力。特别是在60年代，石油烃的低成本使之成为最富有吸引力的生产单细胞蛋白的底物。60年代的10年间，人们普遍关心人口爆炸和迫在眉睫的世界食物短缺的问题。阐明烃类代谢主要途径的细节，研究利用烃的微生物的类群，测定培养分解烃类的微生物的必要条件等，都是将石油烃用作工业发酵底物的关键性问题。另外，微生物对喷气式发动机燃料的污染，又使人们在60年代对燃料的微生物腐败产生了很大的兴趣。

70年代，由于石油成本增高，加上由石油烃底物生产单细胞蛋白的一些技术问题，人们在这方面的兴趣大大降低。70年代的特点是人们普遍关心环境问题，那是一个充满生态意识的年代。随着1967年Torry Canyon号超级油轮的沉没，许多石油微生物学家的兴趣转到了石油污染的生态学方面。70年代，微生物学家与生态学家对石油污染物的归缩及影响作了广泛的考察研究。

80年代，遗传学和分子生物学已在微生物学领域占主导地位。应用遗传工程来构建降解石油的微生物成为这一领域的主导。而且，由遗传工程构建并第一个获得专利的生物就是一株石油降解菌。石油中丰富的底物和种类繁多的石油降解微生物类群，为遗传学研究提供了很好的基础。80年代的10年也是能源危机的年代。在这期间，石油微生物学家努力探寻用微生物来增加世界可用燃料储备的途径。现在已有许多方法可用于提高石油的采收率：利用微生物从现有油井增加石油烃采收率（三次采油），并帮助从油砂和油页岩中提取烃类；利用微生物生产甲烷和其他分子量较高的烃类燃料。为了解决这些重要课题，微生物学家已综合应用了他们获得的有关代谢、生理、生态和遗传学等方面的知识。人们对于应用生物表面活性剂增加石油采收率以及使废弃物转化成再生能源这样一些问题也极感兴趣。

目前，人们对石油微生物学的兴趣已经发生了很大变化。在奉献给读者的这卷书中，许多方面的石油微生物学专家对于许多领域进行了综述。这些领域的交接点是石油与微生物的相互作用。本书各章着重介绍石油微生物学的各主要研究领域，包括石油烃的代谢，石油烃代谢的遗传学，石油烃降解微生物的生态学，石油对微生物种群的影响，石油微生物学的工业应用前景（包括侵蚀和生物腐蚀问题），以及应用石油烃底物培养微生物，借以生产如单细胞蛋白和生物合成燃料等有用产品的潜力。本书代表我们目前的认识水平，并且与任何其他这类出版物一样，它还指出了一些知识的空白点和今后的研究方向。石油微生物学至今仍属于富有活力的学科领域，在很大程度上取决于基础微生物学和应用微生物学的发展。

目 录

前言

第一章 直链烷烃和支链烷烃的微生物代谢作用

M.E. Singer和W.R. Finnerty	(1)
一、烷烃的异化途径及其调节作用	(1)
二、烷烃氧化作用的机理	(7)
三、醇和醛脱氢酶在烷烃代谢中的作用	(11)
四、烷烃双端氧化途径	(17)
五、烷烃次末端氧化途径	(18)
六、支链烷烃的代谢	(18)
七、烷烃分解微生物的超微结构	(21)
八、微生物对烃的传输和摄取	(26)
九、细胞类脂和胞外类脂	(36)
十、结论	(37)

第二章 环烷烃类的微生物代谢作用

J.J. Perry	(51)
一、在无取代基的环烷烃上的生长	(54)
二、氧化反应——非增殖细胞、酶类、共氧化作用	(56)
三、环烷醇和环烷酮的微生物降解	(59)
四、烷基取代的脂环烃的代谢	(62)
五、环烷酸类的代谢	(65)
六、环烯类的氧化作用	(68)
七、二环类的代谢	(69)
八、萜烯烃类的代谢	(69)
九、总结	(73)

第三章 芳香烃类的微生物转化作用

C.E. Cerniglia	(79)
一、苯和取代苯衍生物	(84)
二、萘	(87)
三、菲	(89)
四、蒽	(91)
五、苯并[a]芘	(93)
六、苯并[a]蒽和有关的化合物	(95)
七、小结	(98)

第四章 微生物对气态烃类的代谢作用

J.R.Vestal	(107)
一、微生物对甲烷的代谢作用	(108)
二、噬甲基微生物的分类	(111)
三、二碳气态烃的代谢作用	(116)
四、三碳气态烃的代谢	(119)
五、四碳气态烃的代谢作用	(121)
六、真核生物对气态烃的利用	(121)
七、靠气态烃生长的产率	(122)
八、气态烃的微生物共氧化作用	(123)
九、微生物在石油勘探中的应用	(123)
第五章 微生物甲烷的产生	
W.R.Winfrey	(127)
一、方法学	(128)
二、产甲烷菌的分类学	(130)
三、产甲烷菌的生理学	(138)
四、产甲烷菌的生态学	(146)
五、结论	(169)
第六章 生物表面活性剂——微生物中两亲分子生物合成的中间产物	
J.E.Zajic A.Y.Mahomedy	(188)
一、脂肪酸	(189)
二、糖脂	(209)
三、脂多糖和多糖-脂复合物	(219)
四、磷脂	(222)
五、脂肽和抗菌素	(230)
六、中性脂类	(234)
七、总结	(236)
第七章 利用烃的微生物遗传学	
J.T.Singer W.R.Finnerty	(252)
一、利用正烷烃的微生物遗传学	(252)
二、利用萘和水杨酸酯的微生物遗传学	(260)
三、利用甲苯的微生物遗传学	(272)
四、烃降解质粒之间的分子关系	(293)
五、结论	(295)
第八章 海洋生态系统中石油的归宿	
G.D.Floodgate	(301)
一、海洋中石油的来源和分布	(302)
二、石油的变化	(306)
三、微生物与石油的相互作用	(310)
四、影响石油降解的化学和物理因素	(320)

五、结论.....	(324)
第九章 石油污染物在淡水生态系统中的归宿	
J. J. Cooney	(338)
一、淡水生态系统中的烃类.....	(338)
二、影响微生物对石油活性的因素.....	(345)
三、前景、要求和问题.....	(353)
第十章 土壤生态系统中石油的归宿	
I. Bossert R. Bartha.....	(368)
一、土壤中烃污染物的类型和来源.....	(368)
二、作为烃类生物降解环境的土壤.....	(370)
三、土壤生物群对石油污染的反应.....	(376)
四、烃类在土壤中的归宿.....	(382)
第十一章 烃类对水生微生物的影响	
J. R. Vestal, J. J. Cooney, S. Crow和J. Berger.....	(400)
一、烃类对细菌和真菌的影响.....	(400)
二、烃类对光合微生物的影响.....	(405)
三、石油烃类对浮游动物的影响.....	(413)
四、石油对原生动物的影响.....	(415)
五、结论.....	(419)
第十二章 石油对微生物群落的影响	
F. K. Pfaender和E. N. Buckley.....	(426)
一、石油污染效应的研究方法.....	(426)
二、对微生物群落规模和组成的影响.....	(428)
三、对群落代谢活性的影响.....	(435)
四、小结.....	(442)
第十三章 重油和油页岩：含油地层中的三次采油	
D. W. S. Westlake.....	(449)
一、重油和油页岩.....	(449)
二、三次采油.....	(452)
第十四章 石油废物的处理和处置	
R. Bartha 和I. Bossert	(462)
一、美国炼油厂废物最终处置的联邦条例.....	(462)
二、加工废水的物理化学处理.....	(466)
三、精炼废水的生物学处理.....	(468)
四、含油污泥的农田法处理.....	(473)
第十五章 石油产品的生物降解作用	
E. C. Hill.....	(482)
一、石油产品腐败的类型.....	(482)
二、腐败生物的鉴定.....	(482)

三、燃料.....	(483)
四、液压系统、金属加工和润滑的矿物油.....	(488)
五、水包油乳化液.....	(492)
六、油包水乳化液.....	(502)
七、石油腐败的卫生方面.....	(503)
八、结论.....	(506)
第十六章 石油工业中与硫酸盐还原菌有关的诸问题	
W. P. Iverson和G. J. Olson	(513)
一、硫酸盐还原菌.....	(513)
二、硫酸盐还原菌导致的诸问题.....	(519)
三、控制方法.....	(525)
四、结束语.....	(527)
第十七章 工业发酵中作为底物的烃类	
J. L. Shennan	(533)
一、原料.....	(533)
二、单细胞蛋白.....	(534)
三、来自烃类的微生物类脂 单细胞油.....	(553)
四、来自烃类底物的特殊微生物产品.....	(554)
五、结论.....	(560)
名词索引	(569)

第一章 直链烷烃和支链烷烃的微生物代谢作用

M. E. Singer 和 W. R. Finnerty

近三十年来,关于正烷烃和支链烷烃的微生物代谢作用,已经积累了相当多的文献。最初,大部分研究工作都涉及底物与产物的相互关系,以及确定能够依赖石蜡烃生长的微生物种群的多样性。大量的报道已经充分证实了烷烃底物与这种微生物氧化产物之间的关系。此外,微生物界不仅能够利用这种不寻常的底物作为唯一的碳源和能源,而且其生物学多样性已经赋予这些研究工作非常重要的实际意义。在整个近二十年中,关于利用烃的微生物的生物学和生物化学经常有评述发表,这些综述广泛概括或专题讨论了烷烃代谢作用。例如,McKenna和Kallio(1965)及van der Linden和Thijsse(1965)分别综合和专题论述了烷烃的微生物氧化作用的生物学和生物化学。Markovetz(1971)综述了涉及烃的次端(subterminal)氧化作用的文章,并对烷烃的细菌氧化作用的生物学作了概括性讨论(Klug和Markovetz, 1971)。Fuhs(1961)整理了大量有关利用烃的微生物的文献,确定在能够利用这种底物的微生物界里,微生物具有极大的多样性。Ratlidge(1978)就微生物对烷烃的利用作了一次出色的调查,并把重点放在以前被忽视了的烃的代谢作用的诸方面。Aurich(1979)曾总结过烷烃的细菌代谢作用的生物化学过程。Abbott和Gledhill(1971)及Rehm和Reiff(1981)曾广泛总结了烷烃代谢作用的产物。Perry(1979)综述过考察烃类的微生物共氧化作用的文献。本章将总结近十年来烷烃的微生物氧化作用方面的进展,着重讨论利用烷烃的微生物的超微结构,迁移和摄取现象,烷烃氧化作用的机理,烷烃的代谢途径,醇和醛脱氢酶在烷烃氧化途径中的作用和机理,细胞类脂和胞外类脂的一般性质,烷烃的双端(diterminal)和次端氧化途径以及支链烷烃的代谢作用。与十年前的认识相比,这些进展表明烷烃的微生物代谢作用具有显著更大的多样性。

一、烷烃的异化途径及其调节作用

一般认为,短链烷烃和长链烷烃经单端氧化成相应的醇、醛和一元脂肪酸(McKenna和Kallio, 1965; van der Linden和Thijsse, 1965)。然而,在烷烃的氧化作用中,关于最初的反应机理仍然存在一些问题。通常认为,源于烷烃的伯醇在醇脱氢酶的作用下被氧化为相应的醛,醛则通过经醛脱氢酶的作用氧化成脂肪酸。这些酶在烷烃代谢中的作用将在本章后面予以讨论。源于烷烃的脂肪酸经过可诱导的 β -氧化系统进行氧化,偶碳链烷烃被认为氧化成醋酸,而奇数碳链烷烃则氧化成丙酸。随后,醋酸在克雷伯氏循环(三羧酸循环)中被氧化。通过在烷烃培养的细胞中诱发的乙醛酸旁路(glyoxylate bypass)而重新生成四碳单元。

烷烃代谢途径(烷烃 $\rightarrow$ 醇 $\rightarrow$ 醛 $\rightarrow$ 脂肪酸 $\rightarrow$ 经 β -氧化为醋酸)的证据,大多是随机的,并且在很大程度上取决于能表明同时适应的方法。在某些情况下,烷烃的细菌氧化的中间产物

已经从全细胞 (Whole-Cell) 或培养肉汤 (culture broths) 中分离出来 (Proctor, 1960; Heringa等, 1961; Thijsse和van der Linden, 1963; Suzuki和Ogawa, 1972; Makula等, 1975)。它可能反映在全细胞系统中存在有快速而完全的烷烃代谢作用。无细胞的烷烃细菌氧化系统的产物包括脂肪酸类 (Baptist等, 1963; Jurtshuk和Cardini, 1971; Asperger等, 1978), 醇类 (Baptist等, 1963; Jurtshuk和Cardini, 1971) 和醛类 (Baptist等, 1963)。

要确定在异化途径中一种酶的专性功能, 必须分离得到那种酶的缺陷突变株。仅在少数情况下, 从腐臭假单胞菌 (*P. putida*) (Nieder和Shapiro, 1975; Grund等, 1975)、不动杆菌 HO1-N (J. Singer和Finnerty, 见本卷第七章)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) (Macham和Heydeman, 1974)、红皮分枝杆菌 (*Mycobacterium rhodochrous*) (Jenkins等, 1972) 和解脂复膜胞酵母菌 (*Saccharomycopsis lipolytica*) (Bassel和Ogrydzink, 1979) 中分离出了烷烃性突变株。除腐臭假单胞菌中的突变株外, 大部分烷烃阴性突变株都能在醇和醛底物上生长。很难分离到烷烃阴性的、醇或醛阴性的表型 (Phenotype), 这可能反映了在可由多途径异化醇或醛的微生物中醇和醛脱氢酶活性的多样性。Shapiro及其同事首次在腐臭假单胞菌的无质粒菌株 (plasmid-less strain) 中分离到了染色体醇脱氢酶位点 (*alk A*) 的突变体, 并用以选择 OCT 质粒醇脱氢酶位点 (*alc O*) 的突变体 (Grund等, 1975)。携带 OCT 质粒的醇阴性 (*Alc A⁻* 和 *Alc O⁻*) 菌株不能在烷烃上生长。同样, 含有野生型 (Wild type) OCT 质粒的醛阴性菌株也是烷烃阴性突变体。而且, 具野生型 OCT 质粒的脂肪酸阴性和醋酸阴性突变体也不能在烷烃上生长 (Grund等, 1975)。在假单胞菌中, 这可能是醇、醛和脂肪酸中间产物参与烷烃代谢途径的最有力的遗传证据。在下面几节中, 我们将讨论细菌和酵母中烷烃代谢的生物化学途径, 重点放在这些途径的生物化学调控方面。

细菌中的烷烃异化途径

1. 铜绿假单胞菌

应用同时适应 (simultaneous adaptation) 技术, 对铜绿假单胞菌中烷烃代谢途径的早期研究已确定短链烷烃 (己烷和庚烷) 的氧化作用是可诱导的, 并且在烷烃上生长可以同时诱导相应的醇、醛和脂肪酸的氧化活性 (Azoulay和Senez, 1960; Thijsse和van der Linden, 1958)。

在限氧生长条件下, 对铜绿假单胞菌 473 中的脂肪酸进行分离和化学鉴定证明, 其中存在有烷烃单末端氧化途径和随后的源于烷烃的脂肪酸的 β -氧化作用 (Heringa等, 1961)。这些研究者确证并未发生脂肪酸的 C-1 脱羧作用或 ω -氧化作用, 因为比母体烷烃少一个碳的二元羧酸或脂肪酸并未发生聚积 (Heringa等, 1961)。然而, 铜绿假单胞菌 14723 菌株可以在二元羧酸 (己二酸和庚二酸) 上生长 (Nieder和Shapiro, 1975), 并且某些铜绿假单胞菌株在烷烃上生长时产生二元酸 (Ali Khan等, 1964)。这些观察结果暗示存在一种烷烃或脂肪酸的双末端氧化途径。

Van Eyk和Bartels (1968) 研究了铜绿假单胞菌全细胞中己烷氧化的诱导性质, 发现短链烷烃 ($C_4 \rightarrow C_6$) 能诱发己烷的氧化作用。此外, 还鉴别出几种不可代谢的诱导物 (non-metabolizable inducer): 烷烃同系物、1, 2-二甲氧基乙烷、二乙氧基甲烷、单环和二

环烷烃、环丙烷、环丁烷、双环丙基甲烷、1, 2-二环丙基乙烷、双环丙基甲醇, 以及某些螺环化合物。含氮或硫原子的烷烃同系物不能作为诱导物, 但氧原子不影响诱导作用。诱导作用并不需要甲基或烷基链。用己烷作诱导物时, 在己烷氧化达到线性速率之前有12~20分钟的迟滞期, 而用5mM二乙氧基甲烷诱导时导致己烷立即氧化。这些结果表明诱导作用不是由己烷, 而是由它的氧化产物引起的。然而, 并未用己烷代谢中可能的中间产物进行诱导实验。己烷诱导中的迟滞现象可能反映了己烷在水中的溶解度很低, 细胞摄取己烷的延迟或己烷和二乙氧基甲烷的诱导机理不同。在铜绿假单胞菌473中, 1, 6-己二醇诱导庚烷的氧化, 这意味着存在一种产物(醇)诱导机理(van der Linden和Huybregste, 1967)。

Van Eyk和Bartels (1968) 还考察过全细胞己烷氧化的生理阻遏物(physiological repressor), 并列出了一些有效的阻遏化合物, 如葡萄糖、酵母胨(yeast-peptone)膏、C₄二羧酸、醋酸和甘油等。阻遏作用(repression)的机理尚未确定。己酸、 α -酮戊二酸、某些氨基酸和丙二酸都不阻遏己烷的氧化。丙二酸、醋酸、琥珀酸、延胡索酸和乙二酸(glycolate)均已表明是铜绿假单胞菌285中十四烷氧化的有效阻遏物(Dalhoff和Rehm, 1976b)。这些研究者证实, 尽管将细胞与十四烷和这些假设的中间产物一起培育并不影响对十四烷的氧化, 但与肉豆蔻酸或十四烷醇进行预培养却刺激十四烷的全细胞氧化作用(whole-cell oxidation)。相反, 在食油假单胞菌(*P. oleovarans*)的辛醇阴性突变体中, 辛醇抑制辛烷的利用(Chakrabarty等, 1973), 这意味辛醇能作为可诱导的辛烷羟化酶(hydroxylase)的阻遏物起作用。在一种海洋假单胞菌中, 癸醇作为癸烷羟基化的非竞争性抑制剂起作用(Hammer和Liemann, 1976)。葡萄糖、葡萄糖-6-磷酸和6-磷酸葡萄糖酸盐, 在铜绿假单胞菌285中抑制十四烷的全细胞氧化作用。加入环腺苷酸(cAMP)和一种十四烷氧化诱导物——二乙氧基甲烷可逆转抑制作用, 这意味着存在分解产物阻遏(catabolite repression)的调节作用(Dalhoff和Rehm, 1976b)。

据我们所知, 关于铜绿假单胞菌中烷烃异化基因的定位, 一直未见报道。在腐臭假单胞菌中, 使短链烷烃(C₆→C₁₆)由烷烃代谢为醛的基因都是质粒携带的(Chakrabarty等, 1973; Nieder和Shapiro, 1975), 而在不动杆菌HO1-N中, 所有的十六烷代谢基因都位于染色体上(J. Singer和Finnerty, 第七章)。铜绿假单胞菌可利用的烷烃生长底物的范围比腐臭假单胞菌宽得多(铜绿假单胞菌473菌株和17423菌株能够利用C₆→C₁₇烷; pA529菌株可利用C₁₂→C₁₇烷; PAS3菌株则能利用C₁₆烷)(Nieder和Shapiro, 1975)。铜绿假单胞菌17423菌株的烷烃阴性突变体被分为两组:(1)C₆→C₁₁短链烷烃生长阴性(growth negative)组;(2)C₁₂→C₁₆长链烷烃的生长阴性组。这两组突变体都能在相应的伯醇、醛和脂肪酸上生长。这种遗传特征证明铜绿假单胞菌17423菌株中具有两种独立的, 专一性有别的烷烃羟化酶活性; 相反, 腐臭假单胞菌已被证明只具有一种烷烃羟化酶(Nieder和Shapiro, 1975)。

Macham和Heydeman (1974) 从铜绿假单胞菌17423中分离出了庚烷阴性突变体, 所有十六种突变体均可在庚醇、庚醛和脂肪酸上生长。他们认为, 庚醇和庚醛可能经由替代途径代谢, 因此不能分离出烷烃阴性、醇阴性或醛阴性突变体。在这十六个突变体中有十一个缺失庚烷氧化作用, 而其中有四类庚烷氧化的缺陷突变体表现出体外的互补作用。在庚烷羟化酶系中, 至少鉴别出两种组分显示出离体的羟化酶活性的互补作用(Complementation)。

2. 腐臭假单胞菌

Baptist等(1963)首先描述了食油假单胞菌(腐臭假单胞菌)中无细胞辛烷氧化作用

的产物。在无细胞抽提物中， ^{14}C -辛烷被转化成 ^{14}C -辛酸酯(octanoate)，这是用纸层析法鉴定出来的。加入羧胺导致辛酸酯的放射活性下降，并伴随着 ^{14}C -辛醇和 ^{14}C -辛醛的聚积。在无细胞抽提物中，还证实存在有醇和醛脱氢酶的活性。Coon及其同事已经鉴定并定性了导致辛烷向辛醇转化的酶类，发现该酶系由三种组分构成，即 ω -羟化酶、红素氧还蛋白(rubredoxin)及红素氧还蛋白还原酶(Peterson和Coon, 1968; McKenna和Coon, 1970; Ueda等, 1972)。

在食油假单胞菌中，辛烷可诱导的辛烷羟化酶系和醇脱氢酶的基因载于OCT质粒上(Chakrabarty等, 1973; Nieder和Shapiro, 1975)。

Shapiro及其同事比较详细地研究了腐臭假单胞菌中烷烃代谢的调节作用。腐臭假单胞菌PpG6(OCT)能在碳数从6到10的链烷烃及相应的伯醇、醛和一元羧酸上生长(Nieder和Shapiro, 1975)。已经分离出了腐臭假单胞菌PpG6(OCT)的烷烃阴性突变体，它们都能在醇、醛和脂肪酸上生长，但不能在维持其亲代生长的任何烷烃上生长。回复突变体(revertants)能在 C_6 - C_{10} 烷烃上生长。这些研究结果意味着腐臭假单胞菌PpG6(OCT)只有单一的羟化酶系(Nieder和Shapiro, 1975)。其他的烷烃阴性突变体是脂肪酸、醋酸或丙酸的代谢缺陷型(defect)。发现一种醋酸阴性突变体是异柠檬酸裂解酶(乙醛酸旁路)缺陷型，它不能在偶碳链烷烃或脂肪酸上生长。丙酸阴性突变体不能在偶碳链烷烃或脂肪酸上生长。醋酸阴性和丙酸阴性的双突变体既不能依靠奇碳链烷烃也不能依靠偶碳链烷烃生长，而醋酸和戊二酸阴性双突变体则只能通过丙酸依赖奇碳链烷烃生长(Nieder和Shapiro, 1975)。这些结果为这样的假设提供了进一步证据，即烷烃的代谢作用始于烷烃至脂肪酸的单末端氧化，后者再经 β -氧化代谢为醋酸和丙酸。尽管在体外条件下 ω -羟化酶能利用脂肪酸作为底物，但腐臭假单胞菌PpG6(OCT)并不能使脂肪酸发生双末端氧化(Kusunose等, 1964; McKenna和Coon, 1970; Peterson等, 1967)。

腐臭假单胞菌PpG6(OCT)能够在十二烷醇上生长，但不能在十二烷或十一烷上生长(Nieder和Shapiro, 1975)。这意味着十二烷不能作为羟化酶的底物，或者不能诱导羟化酶的活性(Nieder和Shapiro, 1975)。在离体条件下，十二烷是羟化作用的一种底物(McKenna和Coon, 1970)。Grund等(1975)曾确定，十一烷和十二烷两者都不能诱导全细胞的庚烷氧化作用，但在这两种底物上生长时，能产生双环丙酮(DCPK)，这是一种庚烷氧化的安慰诱导物(gratuitous inducers)。所以，腐臭假单胞菌PpG6(OCT)的烷烃生长底物专一性受到诱导物专一性的限制。

通过测定腐臭假单胞菌PpG6(OCT)中的摄氧量(oxygen uptake)和 ^{14}C 壬烷转化为 $^{14}\text{CO}_2$ 的产率，进一步证实了全细胞烷烃(C_6 - C_{10})氧化作用的可诱导性(Grund等, 1975)。只有OCT⁺菌株可诱导出烷烃氧化作用。消除OCT质粒可阻止烷烃氧化的诱导作用。全细胞的醇氧化作用也可由庚烷或双环丙酮诱导；而脂肪酸和醛的氧化在这些诱导物存在下维持组成水平。全细胞壬烷氧化的诱导作用可被利福平(rifampicin)阻断，这说明烷烃氧化酶(系)的诱导作用需要进行转录(transcription)。对于腐臭假单胞菌PpG6(OCT)来说，除烷烃(C_6 - C_{10})生长底物外，伯醇和仲醇及醛均可诱导全细胞的烷烃氧化。这些发现表明存在有羟化酶活性的产物(如醇和醛)诱导作用。无论是以庚烷或庚醇作为诱导物，壬烷的初始氧化速率都是相同的。

烷烃能在腐臭假单胞菌中诱导羟化酶系(Benson和Shapiro, 1975)。在烷烃羟化酶阴

性突变体中, 只有当此突变体用DCPK或庚烷进行预诱导 (preinduce) 时, 才能证实烷烃羟化酶活性的体外互补作用。因此, 诱导作用并不需要烷烃的氧化。最近, 一种醇脱氢酶突变株腐臭假单胞菌PpS173 (*Alk A* CAM—OCT *alk⁺ alc⁻*) 已表明可以壬烷氧化累积壬醇, 但其产量却出乎意料地低 (Fish等, 1982)。这些结果表明存在有羟化酶活性的产物抑制作用, 或醇对羟化酶合成的阻遏作用。

在腐臭假单胞菌PpG6中, 全细胞烷烃氧化作用的安慰诱导物包括: 烷烃同系物如二乙氧基甲烷、2-甲基己烷、1, 7-辛二烯; 环状化合物如二环丙酮 (DCPK) 和二环丙基甲醇; 酮类如2-庚酮或2-辛酮, 以及仲醇类如3-己醇和2-己醇 (Grund等, 1975)。与铜绿假单胞菌相反, 腐臭假单胞菌中1, 6-己二醇不能诱导烷烃的氧化作用 (van Eyk和Bartels, 1968)。某些链长的伯醇和仲醇 (不包括 α , ω -二醇) 因其烷基链与烷烃相似, 所以能诱导羟化酶活性 (Grund等, 1975)。

如J. Singer和Finnerty所述 (第七章), Shapiro及其同事已经提供了遗传证据, 表明在腐臭假单胞菌中, 质粒携带的烷烃代谢基因群集于一个或多个调控子中。编码羟化酶系 (*alk B*, *alk A*) 组分的基因处于正 (positive) 调控之下, 涉及一个尚未确认的调节蛋白 (regulatory protein) (*alk B*) 和诱导分子 (inducer molecule) (Fennewald等, 1979)。烷烃可诱导质粒编码的醇脱氢酶活性 (*alk C*) (Grund等, 1975; Benson和Shapiro, 1976); *alk C* 基因不是位于*alk* BAE操纵子中。*alk C* 的表达需要*alk E*和*alk D*位点 (loci) 的产物 (Fennewald等, 1979)。烷烃羟化酶 (*alk B*) 的膜组分和质粒编码的醇脱氢酶活性 (*alk C*) 均位于细胞质膜 (cytoplasmic membrane) 中 (Benson等, 1977; Benson等, 1979)。烷烃羟化酶 (*alk A*) 的可溶组分相当于红素氧还蛋白或红素氧还蛋白还原酶, 或相当于这两者 (Benson等, 1977)。烷烃氧化的诱导作用产生三种新的细胞质膜肽, 发现其中一个40000道尔顿的肽是*alk B*基因的产物 (Benson等, 1979)。*alk C*基因的产物尚未鉴定。烷烃氧化的诱导作用可能涉及一个定位于膜上的调节蛋白, 因为可溶的羟化酶组分 (*alk A*) 活性被细胞的局部麻醉剂处理而阻断, 这种试剂破坏膜的完整性, 并可能妨碍诱导物的识别 (Benson, 1979)。

在烷烃培养的腐臭假单胞菌中不能诱导出醛脱氢酶活性, 该活性是由染色体基因 (组) 编码的 (Grund等, 1975)。在腐臭假单胞菌中, 醛脱氢酶活性定位在膜上 (Tauchert等, 1978)。

根据腐臭假单胞菌PpG6 (OCT) 中烷烃异化途径酶的定位, 有人提出一个烷烃在胞质膜中被氧化为醛或脂肪酸的假想模式 (Benson等, 1979)。如果在胞质膜部位将烷烃氧化为脂肪酸, 则无需将烷烃摄取到细胞内。如下所述, 假单胞菌的这种羟氧化模式与所设想的不动杆菌HO1-N的羟氧化模式根本不同。

3. 不动杆菌

不动杆菌HO1-N能够在长链烷烃 (C_{10} — C_{20})、烯烃、某些支链烷烃、大部分伯醇、 α , ω -二醇、长链醛、一元和二元脂肪酸及其他各种底物上生长。由于需要摄取烃类, 或需要形成胞质内膜系统 (intracytoplasmic membrane system) 和合成烷烃代谢中的可诱导酶类, 十六烷的全细胞氧化作用需要有一个诱导期 (Kennedy和Finnerty, 1975)。

与其他微生物系统相似, 在不动杆菌HO1-N中, 烷烃也是在末端甲基被氧化成相应的一元羧酸 (Makula和Finnerty, 1968)。来自十六烷的脂肪酸被直接掺入细胞类脂中, 其中棕榈酸或棕榈油酸占细胞脂肪酸的98—99%。不动杆菌在十六烷上生长时, 脂肪酸的从头合

成受到抑制 (Sampson和Finnerty, 1974)。

在十六烷上生长的不动杆菌HO1-N, 在其停滞生长期, 伴随着蜡酯即鲸蜡醇十六烷酸酯 (cetyl palmitate) 的胞外聚积 (Stewart等, 1959; Stewart和Kallio, 1959; Makula等, 1975)。根据 ^{18}O 示踪测定 (Stewart等, 1959), 以及对从 ^{14}C -十六烷标记细胞中分离出来的蜡酯的 ^{14}C -棕榈酸部分进行化学降解 (Finnerty和Kallio, 1964), 证明鲸蜡醇十六烷酸酯是源于鲸蜡醇与棕榈酸的缩合作用。尽管在胞外聚积游离脂肪酸, 但在十六烷培养的细胞中只检测到少量游离脂肪醇或游离脂肪酸, 并且没有检测到脂肪醛 (Makula和Finnerty, 1972; Makula等, 1975)。在烷烃培养的细胞中, 蜡酯的醇基总是与母体烷烃 (parent alkane) 的碳链长度相同 (Stewart和Kallio, 1959)。因此, 来自烷烃的醇是直接和脂肪酸进行酯化。在不动杆菌HO1-N中, 氢过氧化物类 (hydroperoxides) 是烷烃氧化中可能的中间产物。它们是一类很不稳定的活性化合物, 在溶剂萃取过程中容易分解, 并且有待从烷烃培养的细胞中检测出来。可是, 正烷基氢过氧化物会被不动杆菌HO1-N很快氧化 (Stewart等, 1959; Finnerty等, 1962)。

图 1.1 所示为不动杆菌 HO1-N 中十六烷代谢的假设图解。该图包含在加双氧酶 (dioxygenase) 和分子氧参与下的烷烃末端甲基的氧化作用, 产生一种正烷基氢过氧化物, 并随之还原为醇。然后, 醇与通过醇的氧化产生的脂肪酸形成蜡酯。在此图解中, 醇在蜡酯的形成中起到一种烷烃代谢末端产物的作用, 也是能量转换的烃类氧化途径中的中间产物。

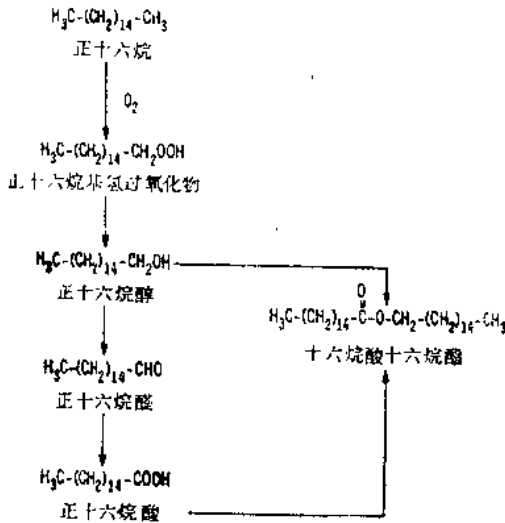


图 1.1 不动杆菌HO1-N中十六烷代谢的设想途径

通常经可诱导的 β -氧化系统进一步代谢, 或者直接掺入细胞类脂中。但在不动杆菌HO1-N中发现存在一种烷烃同系物或脂肪酸代谢的替代途径。一种对称的十六碳的二辛基醚是十六烷的同系物, 它在末端甲基被氧化后转变为相应的十六碳脂肪酸, 即不能进一步代谢的8-辛氧基-1-醋酸 (8-Octoxy-1-acetic acid), 及一个六碳二元羧酸己二酸。这个二元羧酸被氧化并作为生长的唯一碳源和能源 (Modrzakowski等, 1977; Modrzakowski和Finnerty, 1980)。这种对称的醚-脂肪酸氧化机理涉及内部的碳-碳键断裂反应, 从氧原子处移走两个碳, 产生烷氧基-醋酸末端产物和一个二元羧酸 (Modrzakowski和Finnerty, 1980)。

醋酸钙不动杆菌69V (*Acinetobacter calcoaceticus* 69V) 与不动杆菌HO1-N的生长

底物谱 (growth substrate spectrum) 相似 (Kleber等, 1973)。在用非烃底物培养的细胞中未检测到十六烷氧化作用 (以全细胞的摄氧量测量), 而且把氯霉素 (Chloramphenicol) 加到十六烷培养的饥饿细胞 (hexadecane-grown-starved cell) 中可阻止十六烷的氧化作用, 因此认为这是一个可诱导的过程 (Aurich和Eitner, 1973)。虽然1-十六烷醇、2-十六烷醇、1, 12-十二烷基二醇和酮类可被醋酸培养的细胞氧化, 但这些底物的氧化速率在十六烷培养的细胞中增大2-3倍, 而棕榈酸的氧化速率在醋酸培养的或十六烷培养的细胞中相近。因此在醋酸钙不动杆菌69V中, 脂肪酸的氧化作用可能是组成性 (constitutive) 的 (Aurich和Eitner, 1973; Asperger和Aurich, 1977)。 ^{14}C 脂肪酸示踪实验 (在用 ^{14}C 十四烷培养的不动杆菌69V的无细胞抽提物中, 经层析法鉴定出 ^{14}C 棕榈酸和 ^{14}C 肉豆蔻酸) 肯定了烷烃单末端氧化途径 (Aurich等, 1977; Asperger等, 1978)。在粗提物中, ^{14}C -十四烷被氧化成 ^{14}C -脂肪酸, 但只检测出微量的 ^{14}C -醇。在粗提物中加入NAD(P)H刺激脂肪酸的形成。可溶组分和颗粒组分两者对 ^{14}C -十四烷转化为 ^{14}C -脂肪酸都是必需的 (Asperger等, 1978)。

一种组成性的、NADP依赖的可溶性醇脱氢酶已从醋酸钙不动杆菌69V中纯化出来 (Tauchert等, 1976)。此外, 在烷烃培养的细胞中, 证实有一种不依赖于NAD(P)而依赖于电子受体的颗粒性醇氧化酶活性 (Tauchert等, 1975)。除此之外, 还证实有一种可由十六烷诱导的, NADP依赖的醛脱氢酶活性颗粒 (Aurich和Eitner, 1977)。这些酶在不动杆菌的烷烃代谢过程中的作用, 尚未被遗传学或生物化学资料明确证实。因此, 不动杆菌的烷烃氧化途径及其专性中间产物和酶类还有待充分阐明。

4. 假丝酵母菌

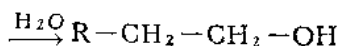
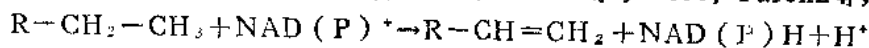
烷烃经醇和醛单端氧化成相应的脂肪酸, 通常被认为是烷烃在假丝酵母中的主要异化途径 (Ratledge, 1978)。脂肪酸经过 β -氧化系统氧化成醋酸, 或者直接掺入细胞的类脂中。烷烃的双端氧化和次端氧化途径也已有过描述。在本章的下文中将会进一步讨论。

已经分离出了解脂假丝酵母菌 [*Sacchromycopsis (Candida) lipolytica*] 的癸烷阴性突变体, 但是所有28个突变体都能依靠醇和醛生长 (Bassel和Ogrydzink, 1979)。因此, 这一途径并未被在醇或醛的利用位点被阻断的突变体所证实。分离出了好几种脂肪酸或醋酸阴性、烷烃阴性突变体, 这意味着在烷烃代谢中利用了脂肪酸和醋酸。被称为A组的五个突变体分别是: 癸烷阴性、醇阳性、醛阳性、脂肪酸阳性和醋酸阳性突变体。鉴于A组突变体的连锁分析表明这五个位点中俩俩之间具有明显的连锁, 故将A组突变体分为五个遗传互补组。A组突变是根据染色体而分离的 (Bassel和Orgydzink, 1979)。

二、烷烃氧化作用的机理

尽管人们已选择少数微生物进行了一些引人注目的研究, 但烷烃的微生物氧化的酶学多年来仍存在着一些多少有点棘手的问题。具有历史意义的代谢机理是脱氢作用、羟化作用及氢过氧化作用, 它们都已得到严密和规范程度的实验证据所证实。

有关烷烃脱氢成为烷-1-烯, 随后又水化形成伯醇的描述, 已有几篇报道见于文献中 (Chouteau等, 1962; Wagner等, 1967; Iizuka等, 1969; Parekh等, 1977)。



虽然由赭色诺卡氏菌 (*Nocardia salmonicolor*) 形成内十六碳单烯似乎是无可辩驳的