

细菌产生的高分子材料——聚羟基丁酯

李祖义 许兴妹

(中国科学院有机化学研究所, 上海)

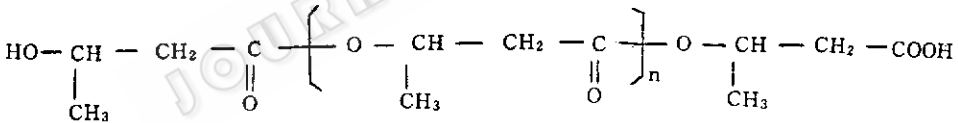
当 *Pseudomonas* sp. 生长在植物油或正烷烃中能产生大量的聚羟基丁酯 (简称PHB)。其合适的培养基为 2% 正烷烃、0.05% 尿素和 0.05% 酵母膏。从对数生长期至稳定期该菌累积的PHB量可达干细胞重的 30—40%。该菌中获得的PHB的红外光谱图的吸收峰与其他细菌中获得的PHB相同。

关键词 多聚体; 聚羟基丁酯; 假单胞杆菌。

人们通常称呼的生物高分子是指蛋白质、核酸及多糖等。而某些细菌还能产生塑料一样的高分子材料——聚羟基丁酯 (PHB)。PHB是一种耐热的聚酯高分子材料, 它除了具有高分子化合物的基本性质如质轻、弹性、可塑性、耐磨性、抗射线等外, 还具有特有性能: 压电性, 象聚

偏二氟乙烯一样可作音响设备的薄膜; 生物降解性, 可作外科缝针和缝线; 它作为光学活性物的来源, 因它的单体都是 α -羟基丁酸, 用它可制造立体专一性的衍生物^[1-3]。由于上述原因, 近年来PHB深受国际生物工程界的重视。

PHB结构式:



我们实验室筛选出一支生物表面活性剂糖脂生产菌^[4], 它在适当的培养条件下也能大量累积PHB。本文描述了PHB定量测定方法, 并摸索各种破碎菌体方法, 用各种溶剂分离抽提PHB进行了比较; 还用摇瓶试验改变各种培养条件, 观察对PHB累积的影响; 用红外光谱进行产品的定性测定。PHB高分子性能的测试将另文发表。

monas sp.)。

(二) 培养基

基本成分 (g/L): KH_2PO_4 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MnSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 酵母膏0.5, 尿素0.5, 正烷烃 20, 蒸馏水定容, pH 7.0, 8磅 30min 灭菌。

(三) 培养方法

100ml 培养基装于 500ml 三角瓶中, 接 1 白金耳菌量往复摇床 (120rpm), 30°C 培养 1 天, 此为前培养。将此培养液

材料和方法

(一) 菌种

从土壤中筛选几类细菌, 现采用的一株菌株经初步鉴定为假单胞菌 (*Pseudo-*

本文为1986年6月22日收到。

5 ml再转接至上述100ml培养基中，同上述条件培养。

(四) 菌体破碎方法

1. 超声波处理：培养4天的100ml菌液，5000rpm离心20min，悬浮于20ml蒸馏水中，用国产XSC-200-1型超声波粉碎机80W 5 min破碎后，用蒸馏水稀释至50ml待提取。

2. 冻融处理：培养液离心后的菌体，在低温冰箱（-30℃）中冷冻2h使成冰块，然后立即在沸水中融化，如此反复3次即可。

3. 丙酮处理：将冷却到0℃以下的丙酮逐渐加到菌体中不断搅拌，菌体在丙酮中均匀分散，抽滤，低温干燥除去丙酮。

(五) PHB提取

破碎或未破碎菌体用二氯甲烷：甲醇（V：V=2：1）混合溶剂提取3次，抽提液水洗后经无水硫酸钠干燥，减压蒸干，蒸干物用少许石油醚洗涤数次，除去石油醚，用少量氯仿溶解再加入5倍量的乙醚于-20℃放置一天，白色PHB析出，干燥称重。另外单独用二氯甲烷或氯仿进行抽提比较。

(六) PHB定量方法

按Law和Slepecky法^[6]进行紫外测定。

(七) PHB红外光谱分析

取PHB溶于氯仿，用KBr压片进行测定。

结果与讨论

(一) pHB定量测定

PHB定量测定采用紫外分光法，因pHB经浓H₂SO₄处理后，在235nm波长有最大吸收（图1）。PHB定量测定的标准

曲线见图2。取一定量的菌液经离心，菌体分别用乙醇和丙酮洗涤，去除剩余的正烷烃及表层的脂类，再用数倍蒸馏水洗涤，菌体再用热氯仿提取、蒸干。定量测定时吸含有5—50μg的PHB氯仿液于试管中，加热去除氯仿，于每支试管中加入10ml浓H₂SO₄，100℃加热10min，冷却后在235nm处进行紫外测定。

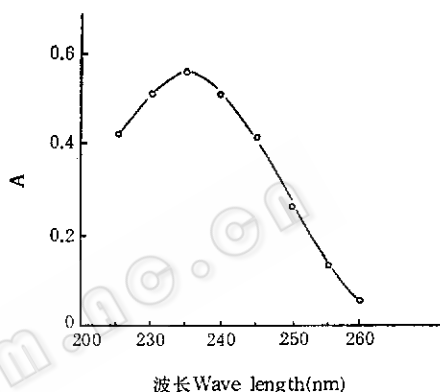


图1 PHB紫外吸收光谱

Fig.1 PHB UV spectrophotometry

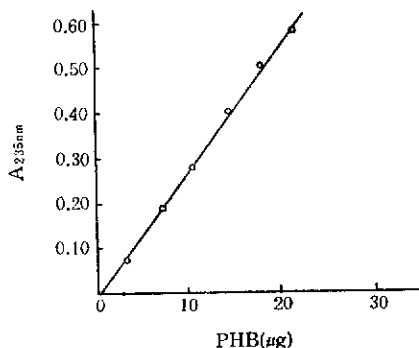


图2 PHB浓度与在235nm波长吸收值关系

Fig.2 Relationship between PHB concentration and absorbance at 235 nm

近年来有些实验室采用气相色谱法进行定量测定PHB^[6]，我们也在试验中。

(二) 菌体破碎及PHB溶剂抽提

PHB存在于菌体内，如何将其提取分离，我们摸索了一些方法。首先比较了破

碎或未经破碎的菌体,用热氯仿抽提的结果见表1。

表1 细胞不同处理方法对PHB提取量的影响

Table 1 Effect of different treatment methods of cell on PHB extracted

处理方法 Methods of treatment	每100ml培养液中抽提出的 PHB(mg) PHB mg/100ml culture medium
超声波处理 Supersonic wave	350
冻融细胞 Frozen-thawed cell	370
丙酮粉 Acetone power	250
对照 Control	150

从表1看出,细菌菌体经物理或化学法破碎后有利于PHB的抽提,冻融细胞及超声波处理效果较好,国外也曾利用渗透压碎裂法或将菌体喷雾干燥后再用适当溶液提取。有的实验室用高氯酸来化学处理细菌,使其破碎,但有其缺点,它能引起一些PHB的降解^[7]。为了简便提取工艺,我们不用破碎菌体方法,而改变抽提溶剂,直接进行抽提,也能得到较好结果,见表2。

表2 用不同溶剂抽提菌体可得的PHB

Table 2 PHB extracted by different organic solvents

有机溶剂 Organic solvents	100ml培养液中抽出的 PHB(mg) PHB mg/100ml culture medium
CHCl ₃	150
CH ₂ Cl ₂	110
CHCl ₃ :CH ₃ OH(V/V ₂ :1)	340
CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH(V/V ₂ :1)	290

在抽提溶剂中加入甲醇,有利于PHB的抽出,在一般类脂物提取中也常见到这种现象。抽提的菌体是发酵液经离心约含5—15%干菌的菌浆,提取温度范围是10—40℃之间。

(三) 不同氮源对假单胞菌产PHB的影响

用5种不同氮源进行试验来观察该菌产PHB的情况。在培养基中分别以NaNO₃、(NH₂)₂CO、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、(NH₄)₂HPO₄、作氮源(含氮量相同),加入2%正烷烃,培养4天,结果列于表3。

表3 氮源对菌体生长量及PHB产量的影响

Table 3 Effect of nitrogen source on cell growth and PHB production

氮源 Nitrogen(g/L)	菌体干重 Biomass(g/l)	PHB(g/L)
NaNO ₃ 1.42	3.20	0.81
(NH ₂) ₂ CO 0.5	8.21	3.51
NH ₄ Cl 0.9	4.52	0.42
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.12	6.21	1.30
(NH ₄) ₂ HPO ₄ 1.12	7.42	1.92

用NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、(NH₄)₂HPO₄作氮源时,前3天pH由开始7.0降至4.2—4.6,用10%NaOH调至pH6.8,而用尿素、NaNO₃作氮源时,pH始终维持在6.5—6.8。对菌体生长来说尿素及(NH₄)₂HPO₄较好,对合成PHB来讲,尿素是合适的氮源。

(四) 尿素浓度对PHB含量的影响

以各种浓度尿素作为氮源来观察对PHB产量的影响,见图3。

用2%正烷烃作碳源,培养4天。随着尿素浓度的增加,PHB的产量也升高,尿素浓度为0.5g/L时PHB产量最高,但浓度再升高,则PHB产量就有下降的趋势。看来PHB的累积是受氮源抑制的。氮源仅提供菌体繁殖生长,到氮源消耗后,则菌体进行脂质代谢,有利于PHB的累积。

(五) 各种碳源对细菌生长及PHB产量的影响

除了用正烷烃作碳源外,还试验了其他植物油、葡萄糖、甘油、乙酸作碳源,

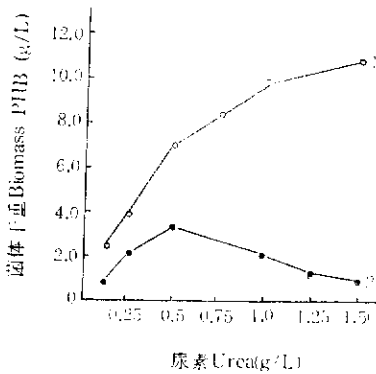


图 3 尿素浓度对细菌生长和PHB产量的影响
Fig.3 Effect of urea concentration on cell growth and PHB production
1. 菌体干重 Biomass 2. PHB

观察细菌生长和糖脂产生情况。各种碳源浓度均为 2%，尿素浓度为 0.5g/L，培养 4 天，结果见表 4。该菌在正烷烃和植物油中生长良好，PHB 产量也高。而以甘油、乙酸、葡萄糖作碳源，菌生长差，PHB 产量也低。

表 4 各种碳源对细菌生长及 PHB 产量的影响
Table 4 Effects of carbon sources on cell growth and PHB production

碳源 Carbon source	菌体干重 Biomass (g/L)	PHB (g/L)
豆油 Bean oil	11.0	3.5
菜油 Rape oil	9.5	3.0
糠油 Bran oil	12.0	3.9
正烷烃 n-paraffin	10.1	4.2
甘油 Glycerol	6.0	0.4
乙酸 Acetic acid	8.1	0.3
葡萄糖 Glucose	2.5	0.1

(六) 正烷烃浓度对PHB产量的影响

分别以浓度为 0.5—5% 的正烷烃作碳源，0.5g/L 尿素作氮源，培养 4 天，观察菌体及糖脂的产生情况，见图 4。菌体浓度随着正烷烃浓度升高而上升，而 PHB 产量增加到一定量后，基质浓度再增加，PHB 量增加也不大。

(七) 细菌生长曲线及对应 PHB 产量
在上述最适条件下，以 2% 正烷烃作

碳源，0.5g/L 尿素作氮源，进行细菌的培养，它的生长曲线及相应产生的 PHB，见图 5。PHB 主要在对数生长期开始累积，到对数后期达最高产量，再后就减少趋势。

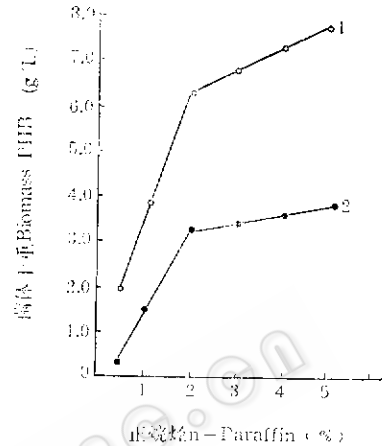


图 4 正烷烃基质浓度对细菌生长和 PHB 的影响
Fig.4 Effect of n-paraffin concentration on cell growth and PHB production
1. 菌体干重 Biomass 2. PHB

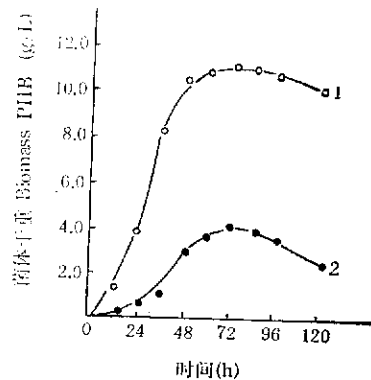


图 5 细菌的生长和 PHB 累积的时间过程
Fig.5 Time courses of cell growth and PHB accumulation
1. 菌体干重 Biomass 2. PHB

(八) PHB 的红外光谱

从假单孢菌中提取所得的 PHB，经氯仿溶解再反复沉淀得较纯的 PHB 作元素分析。

从 $(C_4H_6O_2)_n$ 得计算值 C 55.81%；
H 7.03%

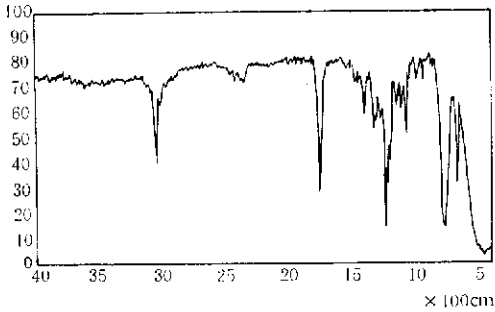


图 6 从假单胞菌分离所得 PHB 的红外光谱

Fig.6 Infra-red absorption spectrogram of PHB from *Pseudomonas* sp.

分离样品分析值 C 56.14% ; H 7.32%
经纯化过的 PHB 溶于氯仿, 经 KBr 压片, 所得红外光谱图见图 6。主要吸收峰 1730cm^{-1} 是羰基的吸收峰, 其光谱图与其他实验室^[8]从细菌中所得的 PHB 的红外光谱图基本相似。

参 考 文 献

- [1] Howells, E.R.: *Chemistry and Industry*, 7 August, p.508, 1982.
- [2] Braunegg, G. and Korneti, L.: *Biotechnology Letters*, 6(12):825, 1984.
- [3] Korsatko, W, et al.: *Pharm. Ind.*, 45(10):1004, 1983.
- [4] 李祖义等: *生物工程学报*, 2(2):234, 1986.
- [5] Law, J.H. and Slepecky, R.A.: *J.Bacteriology*, 82: 33—36, 1961.
- [6] Jüttner, R.R. et al.: *European J. Appl. Microbiol.*, 1:233—237, 1975.
- [7] Powell, et al.: *U.S. Patent*, 4,336,334.
- [8] 手塚 千史等: *微生物工业技术研究所研究报告第54号*, pp. 5—12, 1980.

FORMATION OF POLYMER (POLY-HYDROXYBUTYRATE) BY *PSEUDOMONAS* SP.

Li Zuyi Xu Xingmei

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai)

This invention relates to a microbiological process for the production of poly-hydroxybutyrate (PHB).

A culture of *Pseudomonas* sp. is able to produce a large amount of PHB when it is grown on vegetable oil or waterinsoluble alkanes.

It was demonstrated that the most suitable medium contained 2% n-paraffin as carbon source, 0.05% urea as nitrogen source and 0.05% yeast extract as Organic nutrient. The Organism accumulated PHB up to 30—40% of dry cell weight, from late exponential growth phase to stationary phase.

The infrared spectra of PHB isolated from this organism has the same absorption peakes as that of PHB from other bacteria.

Key words

Polymer; poly-hydroxybutyrate; *Pseudomonas* sp.