

# 聚- $\beta$ -羟基丁酸产生菌 NS-82 # 的研究

陈 宏 方东升 陈秉良

(国家医药管理局 福建省微生物研究所 福州 350007)

**摘要:** 从土壤中分离到产生聚- $\beta$ -羟基丁酸 (PHB) 的菌株 NS-82 #, 经过菌种形态和生理生化特征的研究初步确定为芽孢杆菌。经紫外光谱、红外光谱、气相色谱、核磁共振波谱测定粗提样品, 结果同美国 Aldrich Chemical Company Inc 的标准品相似。

**关键词:** 聚- $\beta$ -羟基丁酸 (PHB), 芽孢杆菌

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0027-05

---

**收稿日期:** 2000-06-12, **修回日期:** 2000-07-15

## STUDY ON THE POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRIC ACID PRODUCING STRAIN NS-82 #

CHEN Hong FANG Dong-Sheng CHEN Bing-Liang

(Institute of Microbiology State Pharmaceutical Administration of China and Fujian Province, Fuzhou 350007)

**Abstract:** Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) producing strain NS-82 # which was isolated from the soil was identified to be *Bacillus* sp. The purified sample from fermentation was similar to the standard sample produced by Aldric Chemical Company Inc after determined with ultraviolet absorption, IR-absorption, gas chromatography and nuclear magnetic resonance analysis of polyesters.

**Keywords:** Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB), *Bacillus*

聚- $\beta$ -羟基丁酸 (PHB) 在自然界中是作为微生物自身能量的储存物质而存在于细胞内, 由于它不仅具有高分子化合物的基本性质, 而且具有生物相容性和生物降解性, 在“白色污染”日益严重的今天, PHB 作为生物降解塑料的原料倍受瞩目, 成为国内外研究的热点。

我们从土壤中采样分离到 338 株细菌, 经苏丹黑染色初筛到一株产生 PHB 水平较高 (约占细胞干重 53%)、编号为 NS-82 # 的菌株。本文报道对该菌株研究的结果。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种

NS-82 # 菌株, 筛选自从土壤分离出的 338 株菌。

#### 1.2 培养基和培养方式

1.2.1 斜面培养基: 在普通牛肉膏蛋白胨培养基中加入 3g 酵母膏和 5g 葡萄糖, 定容 1L, 于 pH 7.0, 34℃ 培养 24h。

1.2.2 种子培养基: 酵母膏 10g, 蛋白胨 10g, 牛肉膏 5g, 硫酸铵 5g, 葡萄糖 10g, 定容 1L, pH7.0。

1.2.3 合成培养基:  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  4mg,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  0.07mg,  $CaCl_2$  10mg,  $NaHCO_3$  1g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  123mg,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.002mg,  $K_2HPO_4$  4mg,  $CuSO_4$  0.02mg,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.09mg, 丁酸 25mL 定容 1L, pH 8.0 ~ 8.2。

菌株在斜面培养基上活化后接入种子培养基, 32℃ 预培养 24h, 移种到无氮合成培养基, 28℃ 摇瓶培养 72h。

#### 1.3 菌株鉴定

根据《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[1]</sup> 进行鉴定。

#### 1.4 提取方法

发酵終了离心收集细胞, 用氯仿浸提冰冻过夜后, 解冻过滤。滤液经旋转蒸发器浓缩, 得到白色薄膜, 用石油醚洗下, 再用少量氯仿溶解, 加入 5 倍量无水乙醇, 有白色沉淀析出, 真空抽滤干燥后即得到白色晶体。

#### 1.5 分析方法

气相色谱定量定性测定: 按 Braunegg 等方法<sup>[2]</sup>。

紫外测定:按 Law 和 Slepecky 法<sup>[3]</sup>。PHB 经浓硫酸处理后,在 235nm 波长有最大吸收。取一定量发酵液离心,菌体用热氯仿浸提。定量测定时吸取含有 5~50 $\mu$ g PHB 的氯仿于试管中,加热除去氯仿后,加入 10mL 浓硫酸,100 $^{\circ}$ C 加热 10min,冷却后在 235nm 波长处进行紫外测定。

红外光谱测定:取提纯后的样品溶于氯仿, KBr 压片进行测定,与标准品进行比较。

核磁共振测定:在 Varian Unity 500 仪器上进行。

PHB 标准品为美国 Aldrich Chemical Company Inc 产品。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株 NS-82# 形态和生理生化特征

2.1.1 个体形态:杆状细胞、极生鞭毛,革兰氏阳性,好氧,培养后期细胞出现芽孢,直径 0.6 $\mu$ m~0.8 $\mu$ m,单个、成对或短链状,细胞内密集着聚- $\beta$ -羟基丁酸盐颗粒(图1)。

2.1.2 培养特征:在牛肉膏蛋白胨斜面培养基上生长良好。30 $^{\circ}$ C 培养 24h 后,菌落呈圆形、乳白色、表面光滑、低凸、不透明、边缘整齐,最适生长温度 30 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C,最适 pH 7.2~7.5。

2.1.3 生理生化特性:结果见表 1。



图 1 NS-82# 细胞的电镜照片

a 菌株 NS-82# 细胞形态(3000 $\times$ ),  
b NS-82# 细胞的超薄切片(6000 $\times$ )

表 1 NS-82# 菌株的生理生化特性

生理生化特征		由碳水化合物产酸				碳源利用					
接触酶	+	氧化酶	+	葡萄糖	+	葡萄糖	+	麦芽糖	+	蜜二糖	+
明胶液化	+	硝酸盐还原	+	阿拉伯糖	--	乳糖	--	D-果糖	+	棉子糖	+
淀粉水解	-	糠氨酸试验	--	蔗糖	--	蔗糖	+	纤维二糖	--	琥珀酸钠	+
V.P 试验	--	石蕊牛奶产碱		乳糖	--	木糖	--	D-阿拉伯糖	+	甘露醇	+
动力试验	+			甘露醇	--	水杨素	+	酒石酸钠	+	结晶乙酸钠	--

根据以上结果可初步确定 NS-82# 菌株为芽胞杆菌,而国内外研究较多的是肥大产碱杆菌<sup>[6]</sup>。芽胞杆菌的抗逆性较强,在工业发酵上有较大的应用价值。

### 2.2 PHB 理化性质的鉴定

菌株 NS-82# 发酵液的粗提样品与美国 Aldrich Chemical Company Inc 公司进口的标准品对照进行理化性质鉴别,结果如下。

2.2.1 PHB 紫外分光光度法的测定:粗提样品经过浓硫酸处理后,用日立 557 型双波长双光束紫外—可见分光光度计测定,于 235nm 处有最大吸收峰,与标准品一致。

2.2.2 气相色谱的测定:使用 GC-9AM/C-R3A 色谱仪测定,柱型为弹性石英毛细管柱 SE-30 (50m $\times$ 0.25mm),FID 检测器,载气为高纯氮气,流速为 100mL/min,柱温 100 $^{\circ}$ C。测定结果表明:样品的主要组分与标准品的校正保留值( $t'_R$ )相同,均为

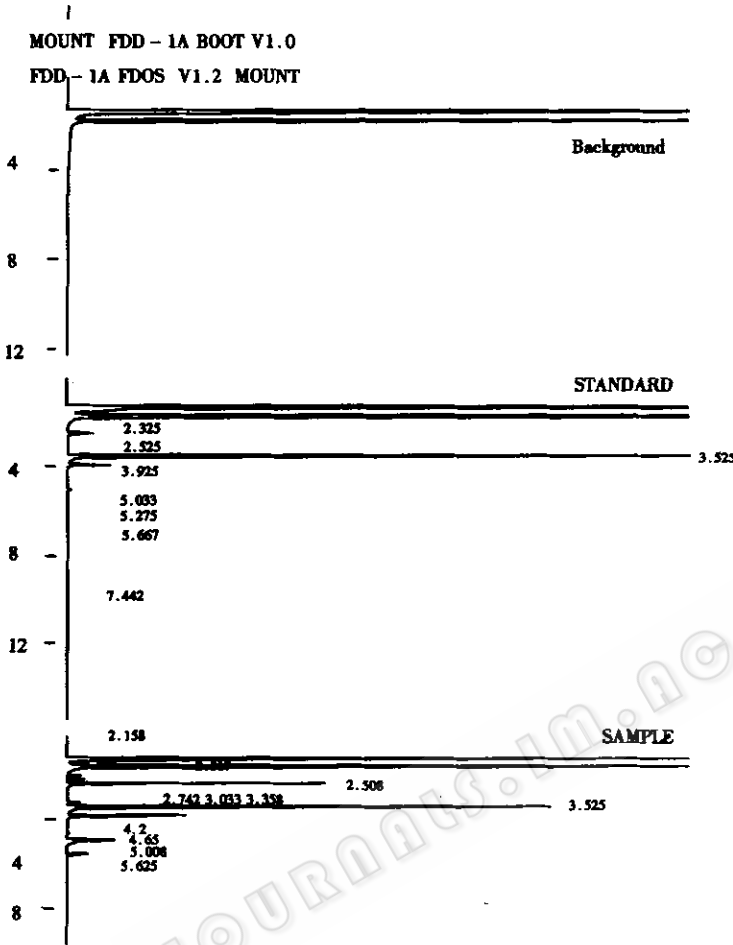


图2 PHB标准品与样品的气相色谱图

3.525。样品 PHB 的纯度为 65%，标准品纯度为 90% (图 2)。

2.2.3 红外光谱的测定：红外光谱的测定由波数 4000 ~ 500cm<sup>-1</sup>扫描。样品的红外光谱图与标准品的相似，在波数 1723cm<sup>-1</sup>处有一强烈峰值 (图 3)，此为羧酸中羰基的吸收峰。

2.2.4 核磁共振波谱的测定：在室温条件下，以 125.710MHz 观察频率，用核磁共振仪测定样品的碳链骨架结构，所得谱图中有 4 个吸收峰 (分别位于 19.765；40.769；67.599；169.126 PPM 处) 与文献<sup>[4,5]</sup>提供的数据基本一致，说明它们分别代表聚合物中的 4 组碳原子 (即—CH<sub>3</sub>，—CH<sub>2</sub>，—CH 和

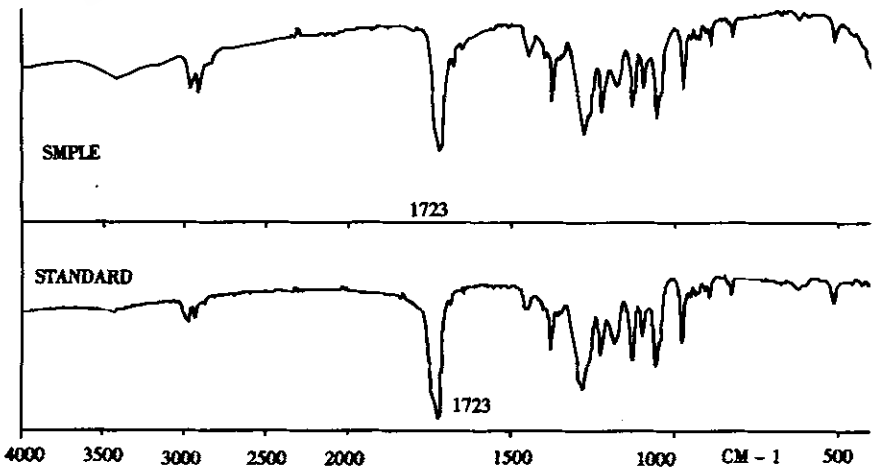


图3 PHB标准品与样品的红外光谱图

—COO—基团中的碳原子)。测得的氢谱也表明样品的几个吸收峰 (2.454, 2.466,

2.485, 2.497, 2.585, 2.600, 2.616, 2.631, 5.240, 5.253, 5.266, 5.279) 与标准品的一致。

### 3 结论

我们分离筛选的 NS-82 # 菌株, 初步鉴定属于芽孢杆菌属。经气相色谱、红外光谱和核磁共振对其发酵产物进行分析测试, 可初步断定 NS-82 # 菌株发酵得到的产物为 PHB, 与美国 Aldrich Chemical Company Inc 公司进口标准品相似。

致谢 对福建省电力测试研究所化学检测室, 福建医学院电镜室, 中国科学院福建物质结构研究所, 福建省测试技术研究所及本所仪器室等单位的支持与帮助表示感谢。

### 参考文献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] Braunegg G, Sonnleitner B, Lafferty R M. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 1978, 6: 29-37.
- [3] Law J H, Slepceky R A. *J Bacteriology*. 1961, 82 (1): 33-36.
- [4] 苏涛. 工业微生物, 1995, 25 (3): 38-42.
- [5] Doi Y, Tamaki A, Kunioka M, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 28: 330-334.
- [6] 翁维奇, 易祖华, 黄和善, 等. 微生物学通报, 1999, 26 (5): 311-314.