

分类号

密级

硕 士 学 位 论 文

题 目: 生物合成易降解高分子材料
羟基脂肪酸聚酯

英文并列题目: Biosynthesis of Degradable
Biopolymer Polyhydroxyalkanoates

研 究 生: 陈富强 专业: 发酵工程

研 究 方 向: 工业微生物育种

导 师: 王 武 教授

学位授予日期: 1995 年 12 月

无锡轻工业学院

地址: 无锡市青山湾

年 月 日

无锡轻工大学硕士研究生论文

摘 要

用特定的筛选方法从自然环境中筛得一株羟基脂肪酸聚酯 (PHAs) 产生菌 AMB-001, 经初步鉴定属于产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)。通过紫外线和亚硝基胍对出发株的诱变处理, 获得了对葡萄糖利用性和 PHAs 产量均为提高的变异株 AUN-39。在 2% 葡萄糖培养基中培养, AUN-39 的细胞干重可达 4.9g/l, 聚羟丁酯 (PHB) 占细胞干重的 35%, 分别是出发株的 2.6 倍和 3.6 倍。

进一步对 AUN-39 产 PHB 的影响因子进行了研究, 初步确定了温度、pH、碳、氮源及流加糖等工艺条件。透射电镜观察证明在较佳工艺条件下, AUN-39 积累的 PHB 粒子几乎充满了整个胞内空间。另外, 摸索了提取胞内 PHB 的几种方法, 并初步研究了聚羟丁酸与聚羟戊酸共聚物 (PHBV) 的生物合成。

本文还对 PHAs 易降解而化学塑料难降解的机理, 几种 PHAs 的合成途径及葡萄糖对菌体生长的抑制效应等进行了初步讨论。

关键词 羟基脂肪酸聚酯 产碱杆菌 聚羟丁酯

Abstract

Through the microbial screening method specially designed, a strain of AMB-001 producing polyhydroxyalkanoates (PHAs) was selected from soil sample, and was initially identified as *Alcaligenes* Genus. The mutant AUN-39 was obtained by UV light and NTG mutagenesis treatment, and the utility of glucose and PHAs production of the mutant were both improved. Cultivated in 2% glucose medium, the mutant's cell dry weight increased to 4.9 g/l and polyhydroxybutyrate (PHB) to 1.86g/l, and were 2.6 and 3.6 times respectively of that of the wild type.

The factors affecting PHB production of AUN-39 were studied and the conditions of temperature, pH, carbon source, nitrogen source and glucose fed-batch culture were initially determined. Transmittional electron-microscopy investigation showed that intracellular PHB granules almost occupied the whole plasmic space of the cell. In addition, several extraction methods of PHB were studied and compared. The biosynthesis of polyhydroxybutyrate-co-polyhydroxyvalerate co-polymer (PHBV) was also studied.

The mechanism of degradability of PHAs and undegradability of petro-plastics, biosynthesis pathways of several PHAs and glucose inhibition effect to biomass were discussed in this paper.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

Alcaligenes

Polyhydroxybutyrate (PHB)

无锡轻工大学硕士研究生论文

目 录

摘要	
Abstract	
前言	1
材料与方法	4
一 材料	4
1 菌种	4
2 培养基与培养条件	4
2.1 培养基	4
2.2 培养条件	4
3 主要试剂与仪器	5
3.1 试剂	5
3.2 仪器	5
二 方法	6
1 菌种初筛	6
2 诱变育种	6
2.1 致死率的测定	6
2.1.1 紫外线诱变	6
2.1.2 亚硝基胍诱变	6
2.2 诱变	7
3 苏丹黑染色法	7
4 紫外分光光度法	7
4.1 PHB紫外吸收标准曲线的绘制	7
4.2 发酵液中PHB含量的测定	7
5 菌体干重测定	8
6 发酵液中残糖测定	8

无锡轻工大学硕士研究生论文

7 气相色谱分析	8
7.1 样品处理	8
7.2 标准曲线制作	9
7.2.1 PHB 标准曲线制作	9
7.2.2 PHBV 标准曲线制作	9
7.3 色谱条件	9
结果	10
一 菌种筛选	10
1 初筛	10
2 染色甄别	10
3 PHB 产物的初步检测	12
4 PHB 产物的气相色谱分析	12
5 菌种鉴定	15
6 菌种保藏	16
二 诱变育种	16
1 紫外线诱变	17
2 亚硝基胍诱变	20
3 诱变株稳定性试验	21
4 诱变谱系	21
三 羟基脂肪酸聚酯产生条件的研究	22
1 各种碳源对 PHB 产生的影响	22
1.1 各种碳源对菌体生长的影响	22
1.2 各种碳源对 PHB 合成的影响	22
2 各种氮源对 PHB 产生的影响	23
2.1 各种氮源对菌体生长的影响	23
2.2 各种氮源对 PHB 合成的影响	23
3 发酵工艺条件的优化	24

无锡轻工大学硕士研究生论文

3.1 富氮培养时条件的优化	24
3.2 贫氮培养时条件的优化	26
4 流加糖工艺的研究	28
5 PHBV生物合成的研究	30
四 聚羟丁酯提取工艺的研究	35
1 菌体破碎方法	35
1.1 超声波破碎	35
1.2 冻融细胞	35
1.3 丙酮处理	35
2 PHB的溶剂抽提	35
2.1 热氯仿抽提	35
2.2 氯仿-甲醇混合溶剂抽提	36
3 次氯酸钠-氯仿抽提法	37
结论	39
讨论	40
一 诱变效应的讨论	40
1 紫外诱变有可能提高细菌羟基 脂肪酸聚酯产率的原因	40
2 亚硝基胍诱变效应	40
二 化学合成塑料难降解, 而羟基脂肪 酸聚酯易降解的机理分析	40
1 化学合成塑料难降解的机理分析	40
2 羟基脂肪酸聚酯易降解的机理分析	42
三 菌种筛选场所选取的说明	44
四 葡萄糖对菌体生长抑制效应的分析	44
五 几种羟基脂肪酸聚酯的合成途径及其调控	45
六 羟基脂肪酸聚酯工业化生产的经济分析与展望	48
参考文献	49
致谢	

前 言

羟基脂肪酸聚酯英文全称为 Polyhydroxyalkanoates, 简称 PHAs。其中以聚羟丁酯 (Polyhydroxybutyrate, 简称 PHB) 分布最丰富, 它由 Lemoigne 于 1925 年首次发现^[1]。后来, 一些研究者用冷冻蚀刻显微技术观察胞内 PHB 时, 发现 PHB 粒子经历了一个冷拉过程, 表明此类物质具有天然的可塑性, 可作热塑材料使用。

1962 年, J.N.Baptist 在美国取得了有关 PHB 的第一个专利^[18,19]。七十年代受石油危机影响, 人们对 PHB 再度产生浓厚兴趣, 并对它的生物降解性、热塑性等进行了大量研究。1982 年, 英国 ICI 公司 (Imperial Chemical Industries) 首次推出 PHB 工业产品, 商品名为 Biopol^[2]。PHB 的物理性质与聚丙烯 (PP) 非常相似, 见表 1^[3-5]。

表1 PHB 与 PP 物理性质的对比

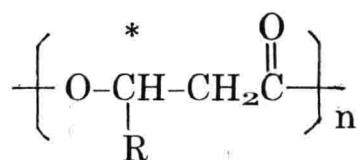
参 数	PP	PHB
熔点 T_m [°C]	171-186	171-182
玻璃态温度 T_g [°C]	-15	5-10
结晶度 [%]	65-70	65-80
密度 [g/cm ³]	0.905-0.94	1.23-1.25
分子量 M_w [$\times 10^5$]	2.2-7	1-8
分子量分布	5-12	2.2-3
弯曲模量 [GPa]	1.7	3.5-4
拉伸强度 [MPa]	39	40
拉伸率	400	6-8
抗紫外性	差	好
拉溶剂性	好	差
透氧性 [cm ³ .m ⁻² .atm ⁻¹ .d ⁻¹]	1700	45
生物降解性	无	优
生物相容性	无	良

无锡轻工大学硕士研究生论文

从表1可以看出,PHB具有优良的生物降解性,又由于PHB密度大于水,其废弃物能在水体环境中很快下沉,容易被淤泥中的微生物群降解。但是PHB的脆性较大,从而影响了它作为工程塑料的应用。

1974年,Wallen与Rohwedder从活性污泥的氯仿萃取物中首次发现以羟基丁酸、羟基戊酸的共聚物PHBV(polyhydroxybutyrate-co-polyhydroxyvalerate)为主要组分的PHAs^[6],大大拓宽了PHAs的研究领域。研究发现,当HV的比例增加到一定程度时,材料的熔点、弹性及强度提高,硬度下降,拉伸率增大,物理性质明显优于PHB,应用前景看好。1987年,ICI公司又推出商品名为Biopol的PHBV产品^[7],月产量100吨,作为高档包装材料制成成型产品,主要销往德国,据说深受欢迎。

PHAs的结构可用通式表示为:



R为C1-C9的碳链。R基团联结的碳原子具有手性,为R构型。聚和物为线性,因其上羰基和烃基之间的相互作用,呈右手螺旋结构^[8,20]。这类物质是许多种类的微生物在碳、能源充足而氮源贫乏或缺氧等极端不平衡条件下积累的,作为能源和碳源的胞内储存物的^[9-14]。研究较多的菌有:Alcaligenes,Pseudomonas,Rhodobacter,Methylocystis,Azotobacter,Bacillus,Acinetobacter,Haloferax等。大多数微生物能积累占细胞干重30-80%的PHAs。研究发现革兰氏阳性菌的PHAs产率较低,商业价值不大。目前主要的生产菌株有Alcaligenes eutrophus和Pseudomonas oleovorans。又由于Alcaligenes eutrophus具有产率

高、发酵周期短、本身安全无毒等优点,故是工业化生产的首选菌株。

我国对 PHAs 的研究只是近几年才开始的,目前中科院微生物所、上海有机化学所、山东大学等少数单位在研究之中。在生态环境日趋恶化、石油资源日渐减少的今天,开发 PHAs 这类易降解生物材料从环保和资源角度讲都具有十分重要的意义。PHAs 具有广泛的应用领域^[4,5,15-17]:它可作医用材料,如外科缝线、伤口拉链、人造血管、接骨材料、缓释药物载体等;可作农用材料,如缓释除草剂和杀虫剂载体、地膜等;还可作各种包装材料与个人卫生用品。目前最大的问题是这类产品的生产成本高,约为聚丙烯的 7 倍,故而未能大规模推广应用。

本课题属国家自然科学基金项目,并与北京燕山石化公司进行了合作。作者在本论文中试图解决以下问题:

- 1 从自然环境中筛出产 PHB 的野生株,并初步鉴定。
- 2 诱变,以提高细胞总量,并提高 PHB 占干细胞量的比例。
- 3 研究出较完善的培养条件。
- 4 在摇瓶条件下摸索流加糖培养工艺。
- 5 初步研究 PHBV 的生物合成。
- 6 研究细胞破碎及 PHB 提取工艺。
- 7 针对实验过程中的主要问题,进行理论分析。

材料与方法

一 材料

1 菌种

AMB-001, AUN-39

作者自筛

Alcaligenes eutrophus

日本大阪大学赠送

2 培养基及培养条件

2.1 培养基

培养基 A(g/100ml): 酵母膏1 蛋白胨1 牛肉浸膏0.5

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 葡萄糖0.5 琼脂2

培养基 B(g/100ml): 酵母膏1 蛋白胨1 牛肉浸膏0.5

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 葡萄糖2

培养基 C: 培养基 B+0.04% 显色剂 X+2% 琼脂

培养基 D(g/l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.95 KH_2PO_4 1.5

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2

柠檬酸亚铁铵 0.6% $\times 10\text{ml}$

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1% $\times 10\text{ml}$

微量元素溶液 0.1ml

葡萄糖 20g(溶于 40ml 去离子水, 分开灭菌)

* 上述各培养基均 0.1MPa, 15min 灭菌, 灭菌前 pH 调至 7.5。

2.2 培养条件

斜面培养: 30℃, 24hr

液体培养: 250ml 三角瓶装液 30ml, 30℃, 200rpm 旋转式摇床振

荡培养 72hr。其中富氮、贫氮培养各 36hr。

无锡轻工大学硕士研究生论文

3 主要试剂及仪器

3.1 试剂

果糖 (BR)	上海试剂二厂
葡萄糖 (CP)	重庆北碚化学试剂厂
正丁酸 (CP)	上海香料厂分厂
戊酸 (CP)	上海星火化工厂
N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG)	FLUECO
三氯甲烷 (AP)	宜兴市第二化学试剂厂
无水乙醇 (AP)	安徽特级酒精总厂
甲醇 (AP)	上海试剂研究所
浓硫酸 (AP)	宜兴市第二化学试剂厂
琼脂	日本进口分装
苏丹黑 B	E.M.K 进口分装
PHB/PHBV	Aldrich

3.2 仪器

HYG-II 型回转式恒温调速摇瓶柜	上海新星自动控制设备厂
80-2 型离心沉淀器	上海手术器械厂
TGL-16G 台式高速离心机	上海医用分析仪器厂
电热恒温培养箱	上海华达理化器材厂
电热式高压蒸汽消毒器	无锡第二医疗器械厂
UV-120-02 分光光度计	日本岛津
H-7000 透射电子显微镜	日本 HITACHI
普通光学显微镜	日本 NIKON
MSE Soniprep150 超声波破碎仪	英国 Fosins

无锡轻工大学硕士研究生论文

HP-5880 气相色谱仪

美国 HP

Consol-24 型冷冻干燥仪

Consol

二 方法

1 菌种初筛

取新鲜活性污泥水样 100ml, 以玻珠打散, 滤纸过滤, 得澄清菌悬液。取 1ml 加入至盛 9ml 无菌水的试管中, 吹匀, 记为 10^{-1} 。如此操作, 稀释度依次为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 。取后四个稀释度的菌液各 0.1ml 涂布, 每个稀释度涂 3 块平板。30℃, 培养 1-2 天。

2 诱变育种

2.1 致死率的测定

2.1.1 紫外诱变

取对数生长期中期的菌液, 4000rpm 离心 5min, 收集细胞。生理盐水洗涤两次, 转入无菌三角瓶, 以玻珠打散, 滤纸过滤得菌悬液。细胞浓度控制在 10^7 个/ml 左右。

吸取 5ml 菌悬液于 9cm 培养皿中, 置 15w 紫外光灯下 30cm 处, 分别照射 5、10、15、20 秒。取未照射和照射过的菌悬液, 稀释后分别涂平板, 每稀释度各涂 3 块, 30℃ 培养。待菌落长好后计数, 分别计算致死率。

2.1.2 亚硝基胍诱变

同上制备菌悬液, 生理盐水用 0.1mol/l pH6.0 磷酸缓冲液代替。称取少量亚硝基胍 (NTG), 溶于 pH6.0 磷酸缓冲液中, 使其浓度为 1mg/ml。将 NTG 溶液加入菌悬液中, 使处理浓度为 0.1mg/ml 菌悬液。30℃ 振荡, 分别在 10、15、20、25 分钟时取出少量菌悬液, 稀释 1000 倍, 终止诱变。再稀释至适当浓度后涂平板, 30℃ 培养。菌落长好后计数, 计算

无锡轻工大学硕士研究生论文

致死率。

2.2 诱变

取致死率70-80%间的平皿对应的时间为诱变处理时间。终止诱变后,取3ml菌悬液接入30ml培养基B中,30℃摇瓶培养6小时(紫外诱变的要暗培养)。然后再稀释涂平板,30℃培养3天。每块平板上的菌落控制在200个以内。平板上葡萄糖浓度分别为4%,6%,8%。

3 苏丹黑染色法^[22]

(1) 制备涂片,热固定。用0.3%(Wt/Vol)的苏丹黑B乙二醇溶液染色10-15分钟。

(2) 冲去染色液,吸干水份。

(3) 将载片在二甲苯中浸没30秒钟,取出。如此反复3次,晾干。

(4) 用0.5%(Wt/Vol)蕃红水溶液复染30秒钟。

(5) 冲去复染液,吸干镜检。

(6) 油镜下含PHB的细胞呈蓝黑色,不含的呈红色。

4 紫外分光光度法

4.1 PHB紫外吸收标准曲线的绘制^[23]

精确称取烘至恒重的PHB标样1mg,溶于100ml氯仿,则PHB浓度为10ug/ml。分别吸取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml于刻度试管中,沸水浴加热1小时,除去氯仿。每支试管各加10ml浓硫酸,100℃加热10分钟,立即冷却终止反应。240nm处进行紫外测定。(图见下页)

4.2 发酵液中PHB含量的测定^[23,24]

吸1ml菌液→10000rpm离心5min→去上清→加0.5mlpH9.82的次氯酸钠溶液,30℃静置1小时→同上离心→水洗→2ml无水乙醇洗涤→离心→4ml氯仿60℃萃取2小时→补足挥发的氯仿,吸0.5ml至刻度试管→

无锡轻工大学硕士研究生论文

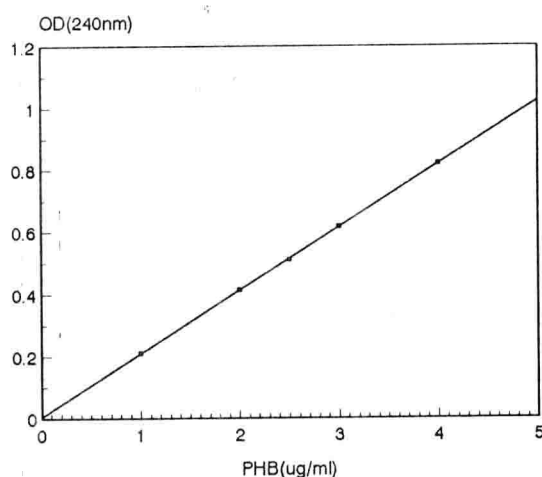
100℃ 加热1小时除氯仿→加10ml浓硫酸煮沸10分钟→冷却后,240nm处测OD(空白为浓H₂SO₄)→对照标准曲线查对应的PHB含量。

$$\text{PHB 含量 (g/l 菌液)} = 80 \times A \times B / 10^3$$

80——测定前的稀释倍数

A——由标准曲线查得的 PHB(ug/ml)

B——测定过程中的稀释倍数



5 菌体干重的测定

4ml 菌液10000rpm离心5min,水洗两次,70℃烘至恒重,称量。

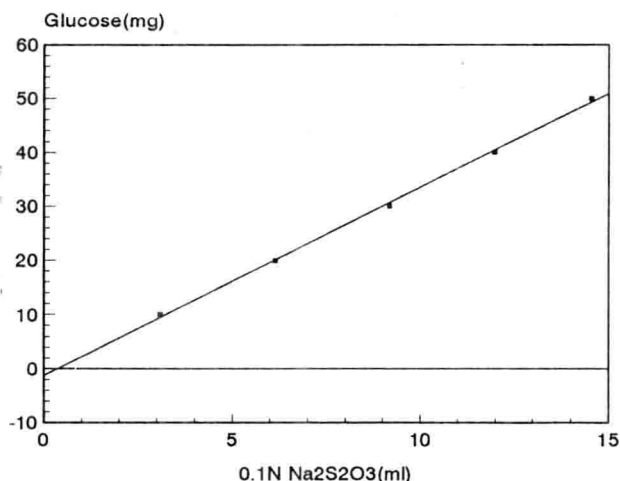
6 发酵液中残糖的测定 [25]

用费林试剂法。(图见下页)

7 气相色谱分析

7.1 样品处理

取标样或冻干菌体约25mg,加入2ml氯仿,2ml酸化甲醇(3% H₂SO₄)及200ul的8mg/ml苯甲酸内部标准物溶液(甲醇作溶剂)。100℃反应3.5



小时。将反应液转入离心管中,加入1ml蒸馏水,振荡5min,3000rpm离心3min,吸取下层液,进行气相色谱(GC)分析。

7.2 标准曲线制作

7.2.1 PHB 标准曲线制作

将PHB标样溶于氯仿中,配成20mg/ml溶液,分别吸取200,300,400,500,600ul进行处理,GC分析,每个样品平行测定6次。

7.2.2 PHBV 标准曲线制作

将PHBV标样溶于氯仿中,配成30mg/ml溶液,分别吸取200,400,600,800,1000ul溶液进行处理(保证反应液中氯仿总体积为2ml),GC分析,每个样品平行测定6次。

7.3 色谱条件

色谱柱: OV-17

检测器: FID, 220℃。采用程序升温:

80℃, 维持1min→10℃/min 升温→180℃, 维持10min

进样量: 0.3ul

分馏比: 1:100

结 果

一 菌种筛选

本论文的任务首先是从自然环境中筛出产 PHB 的野生株。如前言所述,能产 PHB 的细菌很多,而以 *Alcaligenes* 为科学研究和工业化生产的理想菌种。因此,本实验的筛选目标定为 *Alcaligenes*,拟采取以下实验方案:

- (1) 利用具一定选择性的培养基,将能产碱的细菌从土样中分离出来。
- (2) 用苏丹黑 B 染色,镜检是否为杆菌,是否可观察到蓝黑色细胞。
- (3) 用紫外分光光度法验证产物在 235nm 处附近有无最大吸收峰,并检测产物含量。
- (4) 用气相色谱法分析产物的图谱,并与 PHB 标样的图谱对照,确定产物是否确为 PHB。
- (5) 根据分离菌的形态特征和生理生化特性,用伯杰氏等细菌学手册鉴定之。

1 初筛

产碱菌在平板上培养一定时间能分泌微量碱,使得显色剂 X 在 pH 由微酸转为偏碱时呈现黄棕色。故显色剂 X 可作为初筛产碱菌的指示剂。取新鲜活性污泥水样,在添加 0.04% 显色剂的培养基 C 上稀释涂布。经过前后 3 批共 14 个样的分离,共找到 7 个黄褐色菌落,其余上万个菌落则呈红色、粉红色。挑出这 7 个黄褐色菌落,斜面保藏,编号为 AMB-001, ..., AMB-007。同时镜检,发现此 7 菌均为杆菌。

2 染色甄别

无锡轻工大学硕士研究生论文

根据手册知道^[22], 苏丹黑 B 能与胞内的 PHB 专一性结合, 呈现蓝黑色, 而不会与聚磷酸等其它胞内储存物结合, 故它被普遍用以 PHB 的定性分析。

取 AMB-001, ..., AMB-007 的新鲜斜面一环, 接入培养基 B, 富氮培养 36 小时。然后无菌离心, 转入培养基 D, 贫氮培养 36 小时。分别在富氮培养和贫氮培养过程中取样, 苏丹黑 B 染色镜检。发现 AMB-001、AMB-002、AMB-005 中均有呈蓝黑色的细胞, 是为苏丹黑 B 着色之故。由此可初步判定 AMB-001、AMB-002、AMB-005 均能产 PHB, 冰箱保藏之, 其余 4 支菌淘汰。

AMB-001 的苏丹黑 B 染色照片



富氮培养期



贫氮培养期