

次氯酸钠应用于聚 β -羟丁酸酯的提取

李礼尧 陈 玲 王 武

(无锡轻工大学食品学院, 无锡, 214036)

摘要 将次氯酸钠用于微生物胞内产物聚 β -羟 酸酯(PHB) 的提取中。发现在 pH9.8, 菌体干重/次氯酸钠(w/v) 1% 的条件下作用 1h 得到的 PHB 纯度达 95%, 粘均分子量 $M\eta$ 为 3.2×10^5 。进一步在次氯酸钠使用前用十二烷基硫酸钠(SDS) 破胞, 得到的 PHB 在同样的纯度下, $M\eta$ 增至 5.2×10^5 。

关键词 次氯酸钠; 聚 β -羟 酸酯; 真养产碱杆菌

中图分类号 TQ 314. 1

0 前 言

羟基脂肪族聚酯(PHA)是由微生物产生的一大类生物可降解性材料。聚 β -羟丁酸酯(PHB)是 PHA 家族中最基本的形式, 其物理性质与聚丙烯相似^[1~3], 是一类极有希望的塑料代用品^[4]。由于 PHB 是菌体的胞内产物, 多年来, PHB 工业化生产遇到的最大难题就是提取成本过高。已开发出的提取方法主要是有机溶剂提取方法, 大量采用一些易燃、易爆、有毒和挥发性的溶剂, 如氯仿^[5]、甲醇^[6]等等。故开发专一性较高、条件温和、投资低的新型回收技术是提高工业化生产经济性的关键。

次氯酸钠很早就用于 PHB 的提取, 甚至曾广泛应用于 PHB 紫外分析预处理中。这种方法简单、有效、方便、安全。但 70 年代以来, 人们发现次氯酸钠对聚合物剧烈降解^[7, 8], 使其分子量只有 10^3 数量级, 无法用作包装材料, 故一直被人们忽视。直到近几年来, 人们发现只要对次氯酸钠作用过程加以有效地控制, 则次氯酸钠对聚合物的降解作用可以减少至最低程度。作者结合本实验室的条件, 对次氯酸钠用于 PHB 提取中的若干影响因素作了研究, 并结合表面活性剂的使用, 旨在达到一个良好的提取效果。

1 材料与方法

1.1 菌种

真养产碱菌 *J* (*Alcaligenes eutrophous J*)

待菌种在营养培养基中长好后, 转入无氮培养基中, 菌体开始大量合成 PHB。

1.2 实验方法

1.2.1 次氯酸钠提取 离心后的菌浆加入次氯酸钠溶液, 25 °C 下处理, 过滤, 水洗两次, 丙酮洗涤, 干燥。

1.2.2 十二烷基硫酸钠(SDS)-次氯酸钠提取 离心后的菌浆加入 SDS 溶液, 作用 15min, 离心, 水洗, 用次氯酸钠溶液处理, 过滤, 丙酮洗涤, 过滤, 干燥。

1.2.3 PHB 纯度测定 采用气相色谱(GC)方法^[9]。

1.2.4 PHB 粘均分子量 $M\eta$ 测定 采用粘度法^[10]。

2 结果与讨论

2.1 各因素对次氯酸钠提取的影响

2.1.1 pH 的影响 商品次氯酸钠的原始 pH 是 13.4, 次氯酸钠含量达 5.4% 左右。为比较不同 pH 条件下的提取效果, 用盐酸来调节次氯酸钠的 pH, 控制 pH 分别在 6.0, 8.0, 9.8, 13.4, 25 °C 下, 菌体干重/次氯酸钠溶液 = 1% (w/v), 作用时间 1h, 实验结果见图 1。

可见, 使用的次氯酸钠试剂的 pH 对 PHB 的提取影响甚大。从产品的纯度来看, 随着溶液的 pH 偏向酸性, 当 pH 大于 10 时, PHB 的纯度均保持在 95% 以上; 而当 pH 小于 10 时, pH 愈往酸性偏移, 次氯酸钠对非 PHB 的细胞物质的消化能力愈弱, 得到的 PHB 纯度迅速下降, pH6 时得到的 PHB 纯度只有 70%。从得到的 PHB 分子量的角度比较, 则有一个最佳的 pH

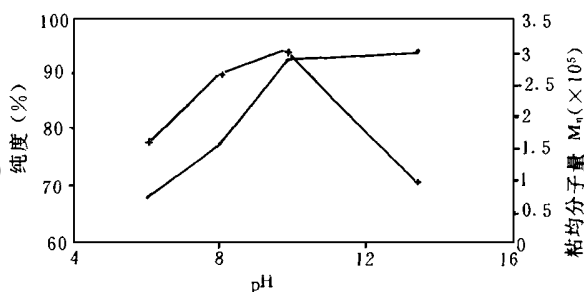


图 1 pH 对次氯酸钠提取的影响

1 纯度 2 $M\eta$

值, pH9.8, 此时提取得到的产品粘均分子量 $M\eta$ 为 3.2×10^5 , 在原始 pH 条件下的产品 $M\eta$ 仅相当于它的 1/3。可见, 次氯酸钠对产品 PHB 的消化作用与 pH 有很大关系, 在 pH9.8 时, 对 PHB 的作用能力最弱。此后的研究中均选用 pH9.8 的次氯酸钠溶液。

2.1.2 次氯酸钠剂量的影响 为考察采用不同的次氯酸钠剂量对提取的影响, 对同样的离心菌浆, 加入不同体积的次氯酸钠溶液, 使菌体干重/次氯酸钠 (w/v%) 分别为 1.2, 2.2, 3.3, 4.4, 以比较 PHB 提取效果的差异。见图 2。

图 2 显示, 次氯酸钠剂量对提取的影响较为显著。随着次氯酸钠用量的增加, 消化反应的速率提高, 得到的 PHB 纯度亦逐步提高。当菌体干重/次氯酸钠 (w/v) 为 1.1% 时, PHB 的纯度达 95%。同时随着次氯酸钠对 PHB 的消化作用逐步增强, 得到的 PHB 分子量也逐渐降低, 但变化幅度不是很大。当菌体干重/次氯酸钠从 4.4% 变化至 1.1% 时, 得到的 PHB 分子量从 4.7×10^5 减少到 2.8×10^5 。取菌体干重/次氯酸钠 (w/v) 比例为 1%, 这样既能得到较高的 PHB 纯度, 同时分子量也不会降至很低。

2.1.3 处理时间的影响 图 3 表明, 从纯度来说, 随着作用时间的延长, 提取出的 PHB 产品纯度迅速提高, 作用 1h 提取出的 PHB 纯度达到 95%, 在以后的时间里, 产品的纯度增长极为缓慢; 而就分子量来说, 次氯酸钠对 PHB 的消化随时间的变化有着同样发展趋势。当消化进行到 1h, 次氯酸钠的消化能力已趋于饱和, 消化反应的速率也渐趋于零。在本研究条件

下, 取次氯酸钠的作用时间 1h 为宜。

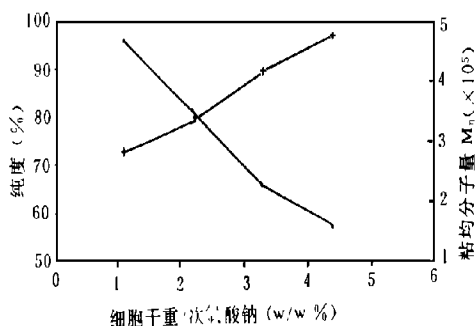


图2 次氯酸钠剂量对提取的影响

1 纯度

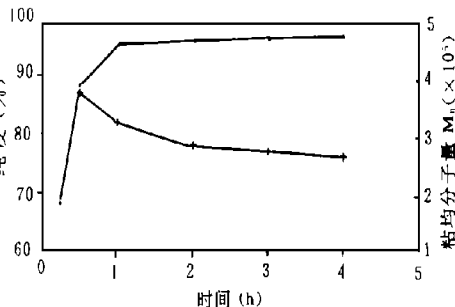


图3 次氯酸钠处理时间对提取的影响

2 M_n

2.2 十二烷基硫酸钠(SDS)-次氯酸钠提取方法的研究

以表面活性剂辅助提取是 PHB 提取的一种新型方法^[11], 本研究中采用了十二烷基硫酸钠(SDS) 破胞提取 PHB. 阴离子表面活性剂 SDS 破胞的原理是基于表面活性剂分子能够插入到细胞膜的磷脂双分子层中去, 随着越来越多的表面活性剂分子的插入, 细胞膜被不断撑大, 当表面活性剂的插入达到细胞膜所能承受的限度后, 进一步地添加表面活性剂会引起细胞膜结构的破碎, 释放出胞内物质, 表面活性剂与磷脂形成微胞体。另外, 阴离子表面活性剂还能使蛋白质变性, 使破胞进行得更容易。

实验证明, 在 pH10, 菌体干重/SDS 为 1 的条件下, SDS 有较强的破胞能力。基于 SDS 有较强的破胞能力, 而对非 PHB 物质没有强的降解作用, 故提取得到的 PHB 纯度不高。因此在 SDS 破胞处理后, 用次氯酸钠进行短暂的消化(10min), 以进一步纯化产品。

从表 1 中可见, SDS 破胞与次氯酸钠方法联用, 起到了很好的效果。前期用 SDS 破胞去除了大部分的蛋白质, 随后的次氯酸钠处理过程除进一步去除蛋白质外, 还对杂质、肽聚糖等进行了消化。两种手段的结合使最终得到的 PHB 既保持了较高的纯度, 又不致使分子量下降得太多。与单纯的次氯酸钠提取方法比较, 缓解了 PHB 纯度和分子量之间的矛盾。

表 1 次氯酸钠在 SDS 破胞后使用的情况

提取方法	PHB 纯度 (%)	回收率 (%)	粘均分子量 $M_n \times 10^5$
SDS	80	92	6.1
SDS-次氯酸钠	95	90	5.2
次氯酸钠(作用 25min)	85	94	3.8

2.3 次氯酸钠降解作用的分析

在以前的文献^[7,8]中, 均提出次氯酸钠对于 PHB 有较强的降解作用, 使得 PHB 的分子量降至很低, 以致无法做包装材料。在本研究中, 发现的确存在着次氯酸钠对 PHB 的降解, 但分子量并不会降低到如文献所述的情况, 数量级仍保持在 10^5 , 研究结果的差异可能是由以下因素造成的:

1) 微生物菌株不同, 生产条件不同, 所合成的 PHB 分子量就不同。在以前的文献资料中, 鲜有各种不同提取方法对 PHB 分子量的影响情况比较。

2) 同样的次氯酸钠与不同状态下的细胞接触, 得到的 PHB 分子量也不同。有人报道, 从冷冻干燥状态及新鲜湿菌体中提取出来的 PHB, 前者 PHB 的分子量是后者的 5 倍^[8]。

3) 次氯酸钠消化的条件, 对提取出的 PHB 分子量有着较大的影响。在本研究中, 对作

用 pH 值、作用剂量、作用时间的研究发现, 这三者对 PHB 的分子量均有着或大或小的影响, 尤其是 pH。在以前的研究中, 往往采用原始 pH(13.4) 的次氯酸钠作用过夜, 这样的条件下, 次氯酸钠对 PHB 的消化作用较强, 得到的分子量也较低。

3 结 论

- 1) 次氯酸钠提取 PHB 方法中, 适宜的条件为: pH9.8, 菌体干重/次氯酸钠(w/v) 为 1%, 作用时间 1h.
- 2) 十二烷基硫酸钠(SDS)-次氯酸钠提取方法较单纯的次氯酸钠提取方法缓解了 PHB 纯度与分子量之间的矛盾, 在同样纯度的情况下, 能得到更高的分子量。

参 考 文 献

- 1 Bloembergen, characterization of bacterial PHBV and synthesis of analogues via a non-biochemical approach, Thesis, University of Waterloo, 1987
- 2 Winton J M. Chem. Week, 1985, 8 28
- 3 King P P. J. Chem. Technol. Biotechnol. 1982, 32 2
- 4 Holmes P A. Chem. Week, 1985, 28 55
- 5 Walker J, Whitton J R, Alderson B. Eur. Pat. Appl. 1982, 46, 017
- 6 李祖义, 许兴妹. 生物工程学报, 1987, 3 212
- 7 Alper R, Can J. Microbiol. 1972, 18 1257
- 9 Comeau Y. Appl. Environ. Microbiol. 1988, 54 2325
- 10 Akita S. Macromolecules, 1976, 9 774
- 11 Holmes D A. Eur. Pat. Appl. 1985, 145 233

Extraction of Poly- β -Hydroxybutyrate by Hypochlorite

Li Liyao Chen Lin Wang Wu

(School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract Hypochlorite digestion was applied in the extraction of intracellular poly- β -hydroxybutyrate (PHB). The optimum treatment conditions were found to be pH 9.8, Biomass/hypochlorite (w/v) 1% and treating time 1 hr. PHB with 95% purity and average molecular weight (M_n) 3.2×10^5 were obtained. When the cells were treated with surfactant sodium sulfate (SDS) before digestion, the molecular weight (M_n) of PHB increased to 5.2×10^5 with the same purity.

Key words poly- β -hydroxybutyrate; hypochlorite; *Alcaligenes eutrophus*