

聚 β -羟丁酸酯紫外检测方法的改进

陈 玲 李礼尧 王 武

(无锡轻工大学食品学院, 无锡, 214036)

摘要 对聚 β -羟丁酸酯(PHB)的紫外分光检测方法作了若干改进。首先发现残留溶剂对定量检测有严重的干扰,通过延长氯仿蒸发时间和改变空白试剂可基本消除这一干扰。另外,经比较选用次氯酸钠破胞为紫外分析的预处理方法,其最优预处理条件为 pH 9.56,菌体干重/次氯酸钠为 2g/100ml,作用时间 1.02h。

关键词 聚 β -羟丁酸酯; 紫外分光测定; 氯仿

中图分类号 O633.14

0 前 言

聚 β -羟丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, 简称 PHB) 是一类用生物技术生产出来的接近商业性应用的生物降解性塑料材料, 英国 ICI 公司已有批量生产^[1]。

在生产过程中, 对菌体内的 PHB 产生情况进行定量检测跟踪非常重要。已建立的分析方法有气相色谱(GC)^[2], 高压液相(HPLC)^[3], 紫外分光光度(UV)^[4,5]等方法。1960年, Law 等利用 PHB 在热硫酸中可定量转变为巴豆酸, 于 235nm 处有强烈的吸收峰, 发明了紫外分光光度分析。由于其它方法所用仪器昂贵, 样品处理繁琐(如 GC 方法菌体处理需冷冻干燥), 因此尚没有人对各种方法测定结果及影响因素作比较研究。作者研究了 PHB 紫外分光光度分析法中残留溶剂对测定准确性的影响, 并对预处理方法及条件进行了优化选择, 使检测结果更加准确。

1 原理与方法

1.1 材料与方法

真养产碱菌 J (*Alcaligenes eutrophous*)

待菌种在营养培养基中长好后, 转入无氮培养基中, 测定菌体中的 PHB 含量。

1.2 实验试剂及仪器

1.2.1 实验试剂

聚 β -羟丁酸酯(PHB) 美国 Aldrich 公司产品

安替福明(商用次氯酸钠溶液) 宜兴市第二化学试剂厂产品

其他试剂均为分析纯

1.2.2 主要实验仪器

UV-120-02型紫外可见分光光度计 日本岛津公司产品

U-240型紫外可见光谱仪 日本岛津公司产品

1.3 实验方法

1.3.1 紫外测定样品预处理

1) 标准样品 溶于氯仿中。

2) 发酵菌液

丙酮破胞预处理方法: 离心后的菌浆加入冷却的丙酮处理, 离心, 乙醇洗, 热氯仿萃取。

次氯酸钠预处理方法: 离心后的菌浆加入次氯酸钠溶液(安替福明), 离心, 水洗, 乙醇洗, 热氯仿萃取。

十二烷基硫酸钠(SDS)预处理方法: 离心后的菌浆加入 SDS 溶液处理15min, 离心, 水洗, 乙醇洗, 热氯仿萃取。

1.3.2 紫外分光光度测定

定量吸取含有5~50 μ g 的 PHB 氯仿液置于一干净试管中, 蒸去氯仿, 加入10ml 硫酸, 100 $^{\circ}$ C 反应10min, 冷至室温, 235nm 下紫外测定。

2 结果与讨论

2.1 残留溶剂对紫外分析的干扰

已知许多杂质如某些细胞物质尤其是某些碳水化合物对 PHB 紫外分析有干扰^[4], 故测定时, 首先要确定235nm 吸收峰的位置是否正确。操作时, 应首先从220nm 扫描至260nm, 以初步对 PHB 定性。传统的紫外测定选用硫酸作为空白试剂。在建立标准曲线及样品初步检测时, 发现即使 PHB 标准品, 235nm 吸收峰也发生变形, 进一步研究发现残留溶剂氯仿对测定有很大的干扰。

氯仿的紫外吸收极限是245nm^[7]。在本实验中, 样品 A 是标准 PHB 氯仿液蒸发10min 后, 再用浓硫酸处理; 样品 B 是与 A 同体积的氯仿, 蒸发10min 后, 再用浓硫酸处理; 样品 C 是与样品 A 相同的 PHB 氯仿液, 蒸发40min 后, 用浓硫酸处理。

图1、2是样品 A、B、C 的紫外光谱图。样品 A 蒸发结束时, 已看不见有氯仿残留, 当以浓硫酸作为空白进行测定时, 呈现出如图1实线所绘的紫外光谱图, 235nm 吸收峰变形。用硫酸作空白, 测定样品 B, 如图1虚线所示, 可见, 残留的氯仿溶剂紫外吸收非常强烈, 在245nm 以后的吸收可能是氯仿在硫酸的作用下, 生成的一些副产物所致。以样品 B 作空白, 图2实线表明了样品 A 这时的紫外吸收图谱, 235nm 吸收峰很明显。同样的样品, 当延长样品氯仿蒸发时间至40min, 这样处理的样品以硫酸为空白, 仍能出现明显的235nm 紫外吸收峰, 如图2虚线所示样品 C 的紫外光谱图, 峰值较样品 A 的(图2实线)图谱稍高, 说明即使蒸发40min, 仍有微量的氯仿残留。

由于紫外分析中 PHB 样品分析量极少(5~50 μ g), 少量的氯仿残留即可给分析带来极大的干扰, 这在实际操作中是不能忽视的。为彻底消除氯仿的干扰, 在实际操作中, 除延长氯仿蒸发时间至40min 外, 取与样品分析同体积的氯仿, 同样蒸发40min 后, 用硫酸处理, 以此作空白进行分析。

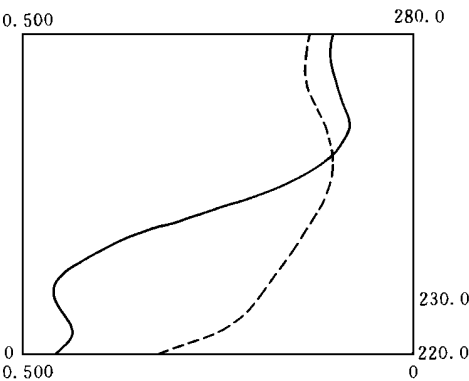


图1 样品处理10min 的紫外光谱图
实线: 样品 A 以样品 B 作空白

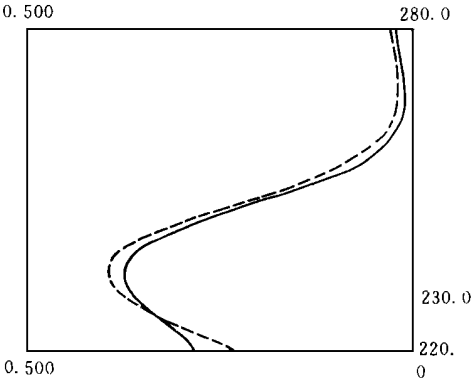


图2 样品处理10min 和40min 的紫外光谱图比较
虚线: 样品 C 以浓硫酸作空白

在以前众多的文献中, 均用硫酸作空白, 作者依此制定出的标准曲线(图3中 tradition) 的斜率与文献[5] 相差很小; 依照前述, 改用用氯仿处理过的样品作空白, 此时作出的标准曲线见图3中 modification. 两条标准曲线的差异可在图3上很明显地看出. 这个差异是由氯仿造成的。

2. 2 紫外分析前的预处理方法选择

PHB 紫外分析前, 需要对胞内 PHB 进行破胞提取, 萃取到氯仿中去, 再加硫酸反应, 转化成巴豆酸, 进行紫外测定。众多文献介绍了许多的预处理方法^[5, 6]。次氯酸钠预处理方法是60年代广为采用的一种形式, 70年代由于认识到其对 PHB 的降解作用, 从此对这种方法持否定态度, 一般采用有机溶剂预处理方法。现在人们又逐渐对有机溶剂的大量使用持否定态度。据此, 比较了以下三种常见的预处理方法:

- 1) 次氯酸钠破胞;
- 2) 丙酮破胞;
- 3) 表面活性剂 SDS 破胞。

同样的取样菌体, 分别用这三种方法破胞, 进行紫外分析, 比较测定结果的差异。见表1。

可见, 用次氯酸钠破胞, 效果最好。丙酮和 SDS 破胞后的紫外测定值分别只有次氯酸钠破胞后分析值的78%和72. 2%。这与破胞后对菌体涂片镜检的观察结果一致。次氯酸钠破胞后的菌体在光学显微镜下已看不到有完整的细胞存在, 破胞彻底; 而后面的两种方法处理后的菌体在光学显微镜下观察, 均有少量完整的细胞残存。故选用次氯酸钠方法进行 PHB 紫外分析预处理。

2. 3 预处理条件的计算机优化

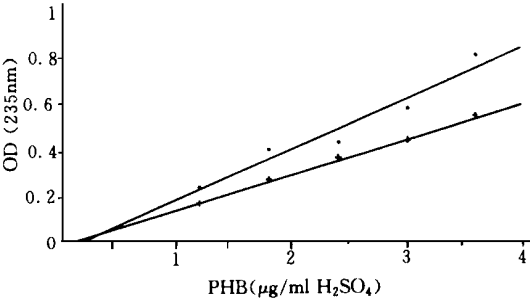


图3 PHB 紫外分光光度法标准曲线
—•— 传统曲线 —+— 修正曲线

表1 各种破胞方法对 PHB 紫外分析的影响

破胞方法	PHB 测定值(g/ L 发酵液)
次氯酸钠	2.48
SDS	1.79
丙酮	1.93

本研究中采用响应面分析方法(Response Surface Analysis, 简称 RSA)对 PHB 紫外分析预处理条件进行优化。选择 pH 值、次氯酸钠作用剂量和作用时间3个因素为自变量, 以紫外测定值为响应值 Y, 设计了三因素、三水平的实验。

表2 RSA 分析因素与水平安排

水 平	因 素		
	x_1 (pH)	x_2 剂量[菌体干重/ 安替福明(g/ 100ml)]	x_3 (作用时间 h)
- 1	8	1. 0	0. 5
0	9. 52	2. 5	1. 5
1	11	4	2. 5

表3 RSA 实验安排及实验结果

实验号	x_1 (pH)	x_2 剂量	x_3 作用时间	紫外测定值(g/L 发酵液)
1	- 1	- 1	0	1. 81
2	- 1	0	- 1	1. 96
3	- 1	0	1	1. 90
4	- 1	1	0	1. 60
5	0	- 1	- 1	2. 65
6	0	- 1	1	2. 40
7	0	1	- 1	2. 15
8	0	1	1	1. 98
9	1	- 1	0	1. 85
10	1	0	- 1	2. 08
11	1	0	1	1. 88
12	1	1	0	1. 76
13	0	0	0	2. 58
14	0	0	0	2. 51
15	0	0	0	2. 63

表4 回归方程方差分析表

方差来源	自由度	平方和	均 方	f 值	相关系数 r_2
	回归9	1. 65	0. 183		
残差	5	0. 06	0. 012	15. 30	0. 96
总离差	14	1. 71			

$f_{0.01}(9, 5) = 10. 2$

从回归方程的方差分析表中可以看出, 用所得到的回归方程描述各因子与响应值之间的关系时, 变量与全体自变量之间的线性关系是显著的 ($f \gg f_{0.01}(9, 5)$), 线性相关系数 $r_2 = 0. 96$, 对回归方程各项方差的进一步检验可以看出, 方程的失拟项很小. 因此可以用所得到的回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。

得到的回归方程为:

$$Y = 2. 57 + 0. 83x_1 - 0. 015x_2 - 0. 85x_3 - 0. 58x_1^2 - 0. 24x_2^2 - 0. 091x_3^2 + 0. 030x_1x_2 - 0. 035x_1x_3 + 0. 020x_2x_3$$

表5 回归方程各项的方差分析

方差来源	自由度	均 方	F 值	显著性
一次项	3	0. 085	23. 4	*
二次项	3	0. 46	126. 6	**
交互项	3	0. 0030	0. 93	
失拟项	3	0. 018	4. 8	
误 差	2	0. 0040	0. 004	

注: ** $f_{0.01}(3, 2) = 99. 2$; * $f_{0.05}(3, 2) = 19. 2$;
 $f_{0.1}(3, 2) = 9. 16$

为确定最佳点的值, 对回归方程取一阶偏导等于零, 解得:

$$x_1 = 0.4, \quad x_2 = -0.33, \quad x_3 = -0.48.$$

由此得到次氯酸钠预处理的最佳条件为: pH9.56, 菌体干重/次氯酸钠(W/V)=2%, 时间为1.02h. 此结果与试验得出的基本相符, 说明了RSA分析的可靠性.

2.4 紫外分光光度(UV)分析与气相色谱(GC)分析方法^[2]的比较

表6为相同的PHB产生菌取样, 分别用UV方法与GC方法进行分析所得出的结果比较. 从中可见, 两者的分析结果相近, 说明这两种方法的可靠性, 其中紫外分析的结果要高些. 这是因为在紫外分析前处理过程中得到的氯仿提取液并不很纯, 还含有一些杂质, 它们在235nm也有吸收, 使得测定结果偏高. 这样, 造成了两者分析结果的差异.

表6 UV分析与GC分析的比较

样品	PHB质量分数(g/g菌体干重)	
	UV分析	GC分析
1	52.8	49.3
2	47.1	45
3	31.5	28.1
4	42.6	40.2

3 结 论

1) PHB紫外分光光度分析方法中, 残留溶剂氯仿对测定有较大干扰. 通过延长氯仿蒸发时间; 取与待分析PHB氯仿液同体积的氯仿, 蒸发同样的时间, 加入同样的硫酸反应后, 以此为空白, 可较彻底地消除氯仿的干扰.

2) PHB紫外分析预处理中, 以次氯酸钠预处理方法为最佳. 其最优条件为: pH9.56, 菌体干重/次氯酸钠溶液为2g/100ml, 作用时间为1.02h.

参 考 文 献

1 Holmes P., Chem. Week, 1985; 28: 55
2 Comeau Y., Appl. Environ. Microbiol. 1988; 54: 2325
3 Karr D. B., A ppl. Environ. Microbiol. 1983; 46: 1339
4 Slepecky R. A., Bacterial. Proc. 1960; 64
5 Law J. H. Bacteriol. 1960; 82: 33
6 李祖义, 许兴妹, 生物工程学报, 1987; 3: 212

Modification Of Poly- β -Hydroxybutyrate
Spectrophotometric Assay

Chen Lin Li Liyao Wang Wu
(Wuxi University of Light Industry Wuxi 214036)

Abstract The spectrophotometric assay of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) was modified by pretreatment to eliminate the chloroform residual. Several pretreatment methods were compared, and the optimun conditions were also analysed by computer.

Key-words poly- β -hydroxybutyrate; spectrophotometric assay; cholroform