

聚- β -羟基丁酸酯提取方法的比较

陈银广 陈 坚 堵国成 余彩荣 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 报道了一种从真养产碱杆菌中提取聚- β -羟基 酸酯的新方法, 并将其与其它几种提取方法进行了比较。研究了各种提取方法对聚- β -羟基 酸酯的纯度、提取率及摩尔质量的影响。结果表明, 用有机溶剂在丙酮预处理后回流提取, 聚- β -羟基 酸酯的纯度达 97% 以上, 摩尔质量 $M = 330 \text{ kg/mol}$ 左右, 但提取率仅约 70%; 用次氯酸钠提取时, 纯度 90%, 提取率 88%, 但 M 只有 216 kg/mol , 比起始菌体中的 402 kg/mol 降低近一半; 用分散的氯仿-次氯酸钠提取, 聚- β -羟基 酸酯纯度 97%, 提取率 82%, $M = 310 \text{ kg/mol}$; 酶法提取的纯度只有 85%; 而用新发明的表面活性剂-络合剂法, 聚- β -羟基 酸酯纯度 98.7%, 提取率达 93.3%, $M = 316 \text{ kg/mol}$ 。

关键词 聚- β -羟基 酸酯; 提取; 纯度; 提取率; 摩尔质量

分类号 O633.14

0 前 言

聚- β -羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 是由生物合成和被生物利用作为碳源和能源的一种脂肪族聚酯^[1]。由于它在具有一般化学合成塑料特性的同时, 还具有生物可降解性、生物相容性和利用再生资源进行生物合成的特性等, 因而近年来得到国际生物工程界的广泛重视^{2,3]}。由于 PHB 的提取成本是影响其大规模工业化生产的一个重要因素, 因此研究和探索 PHB 的最佳提取方法, 是当前迫切需要解决的问题。前文[4]综述了 PHB 的各种提取方法, 主要包括次氯酸钠法^[5,6]、有机溶剂法^[7]、氯仿-次氯酸钠法^[8]以及酶法^[9]等, 国内这方面的研究报道尚未见。本文报道了一种提取 PHB 的新方法^[10], 并从产物 PHB 的纯度、提取率和摩尔质量的角度, 将新方法与其它方法进行了比较和评价。

1 材料和方法

1.1 菌种

真养产碱杆菌 *A. eutrophus* WSH3 (本研究室保藏号)。

1.2 培养基及培养方法

见本研究室发表的论文[11]。

1.3 分析方法

PHB 定量: 气相色谱法^[12]。
摩尔质量测定: 粘度法^[13]。

蛋白质含量测定: Folin-酚法^[14]。

1.4 PHB 提取方法

1.4.1 有机溶剂提取 一定量菌体与 10 倍体积的丙酮于室温 25 ℃ 搅拌 24 h, 过滤并干燥。4 g 菌体与 40 mL 有机溶剂的混合物于室温 25 ℃ 搅拌 24 h 或在不同的溶剂沸点温度下搅拌 2 h。离心(8 000 r/min, 15 min) 后去掉不溶物, 将含 PHB 的清液用旋转蒸发仪蒸发至约 20 mL, 在搅拌下加入 50 mL 冷乙醇(0~4 ℃) 并在 0 ℃ 冰箱中放置 30 min。过滤, 将白色絮状物于 60 ℃ 烘 24 h。

1.4.2 次氯酸钠提取 4 g 菌体与 100 mL 体积分数 30% 的次氯酸钠(pH10) 混合物在 30 ℃ 下搅拌 90 min。以 8 000 r/min 离心 15 min, 去离子水洗涤两次, 再用丙酮洗涤, 于 60 ℃ 烘 24 h。

1.4.3 氯仿-次氯酸钠提取 4 g 菌体与 100 mL 体积比为 1 : 1 的氯仿-次氯酸钠(pH10) 混合物在 30 ℃ 下搅拌 90 min。混合液经离心(8000 r/min, 15 min) 后分为 3 层, 上层是次氯酸钠溶液, 中间层是未破胞的细胞及非 PHB 的细胞物质(简称 NPCM), 下层是含 PHB 的氯仿溶液。用吸管吸取氯仿相, 将其加入到正在搅拌的 100 mL 冷乙醇(0~4 ℃) 中, 并在 0 ℃ 冰箱中放置 30 min, 过滤后将固体物于 60 ℃ 烘 24 h。

1.4.4 酶法提取 0.8 g 菌体悬浮于 10 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中, 加入 50 mL 浓度 50 mmol/L pH 7.3 的 Tris-HCl 缓冲液, 搅拌均匀。取 20 mL 样液, 加入 10 mg 细胞裂解酶(源于 Sigma 化学公司的 *Cytophaga* 菌株), 在 37.5 ℃ 下搅拌 90 min, 不同时刻取样、离心, 取上清液测定可溶性蛋白释放量。

1.4.5 表面活性剂-络合剂水溶液提取法 4 g 菌体加入到 pH13 且溶有表面活性剂和络合剂的 200 mL 去离子水中, 在 50 ℃ 的温度下搅拌 10 min。混合物以 8000 r/min 离心 5 min, 分别用 100 mL 水和 40 mL 丙酮洗涤, 将离心得到的沉淀物于 60 ℃ 烘 24 h。

2 结果与讨论

为了使结果有严格的可比性, 本研究中使用的 *A. eutrophus* 细胞均采用相同的培养条件, 提取前胞内 PHB 含量均达到细胞干重的 60%, 摩尔质量 $M = 402 \text{ kg/mol}$ 。

2.1 有机溶剂法提取胞内 PHB

这一方法的基本思想是, 这些有机溶剂在改变了细胞壁和膜的通透性后, 能使胞内 PHB 溶解到溶剂中。由于非 PHB 的胞内物质不能溶解, 由此可分离得到高纯度的 PHB。作者选用氯仿、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷这 3 种典型的有机溶剂进行实验, 结果见表 1 和表 2。

表1 室温25 ℃条件下不同有机溶剂提取胞内 PHB 的结果			
有机溶剂	纯度/ %	提取率/ %	$M / (\text{kg/mol})$
氯仿	98	36	402
二氯甲烷	96	34	402
1,2-二氯乙烷	—	0	—

表2 溶剂沸点条件下提取胞内 PHB 的结果				
有机溶剂	沸点/ ℃	纯度/ %	提取率/ %	$M / (\text{kg/mol})$
氯仿	61.5	97	62	327
二氯甲烷	40	96	40	330
1,2- 二氯乙烷	83	96	61	314

从表1可见, 在室温条件下用有机溶剂提取 PHB 提取率普遍较低, 而且用 1, 2-二氯乙烷难以得到 PHB. 尽管如此, 由于在用该方法提取时, PHB 分子的降解可以忽略^[5], 而且产品纯度可以达到很高(有时可达到99%以上), 因而现在人们常常将用该方法提取得到的 PHB 作为标准样品。

当提取的温度为溶剂的沸点时, 从表2可知, 采用各种溶剂的提取率都得到显著的提高, 而且 1, 2-二氯乙烷(提取率61%)表现出比二氯甲烷(提取率40%)有更好的提取效果。分析在溶剂沸点温度下 PHB 的提取率有显著提高的原因, 作者认为, 首先, 用溶剂提取胞内 PHB 的实质是浸取过程。浸取过程为固液反应, 是多相反应的一种, 反应速度是关键。反应速度与反应物接近界面的速度、生成物离开界面的速度以及界面反应的速度都有关, 其中最慢的一步决定了整个反应的速度。在一些情况下, 由于扩散常常是限速步骤, 因而通常的浸取过程速度是很慢的。当提取过程中温度从室温改为溶剂的沸点时, 温度的提高, 增加了扩散速率, 从而有助于提取率的提高。另一方面, 温度的提高, 能使细胞壁和膜的通透性增大, 有利于胞内物质的释放, 而且高温下, PHB 在溶剂中的溶解度增加, 体系粘度降低, 这样就使产物迅速到达溶液主体, 减少了因粘在未破壁的细胞及非 PHB 的细胞物质上所造成的 PHB 的损失, 因而提取率得到了提高。

有报道指出^[7], 采用丙酮对冷冻干燥过的菌体进行预处理将有助于胞内物质的提取, 因此作者采用这一研究方法进行了 PHB 的提取实验, 结果见表3。

表3 丙酮预处理后在溶剂的沸点条件下提取的结果

有机溶剂	纯度/ %	提取率/ %	<i>M</i> / (kg/mol)
氯仿	98	72	326
二氯甲烷	98	47	332
1, 2- 二氯乙烷	97	69	314

显然, 用丙酮对菌体预处理后, 再在溶剂的沸点温度下进行提取, 提取率都再次得到提高, 而且纯度都达到了97%以上。作者赞同这样的观点^[7], 用像丙酮这类极性溶剂对菌体进行预处理, 可以除掉冷冻干燥过的菌体中仍然存在的一些结合水, 从而有利于有机溶剂的提取, 表现为提取率的提高。

2. 2 氯仿-次氯酸钠法提取胞内 PHB

次氯酸钠法是最早用来提取 PHB 的方法, 其优点是简单、快速, 但易引起 PHB 分子的严重降解。尽管 Berger 等人^[5]对提取条件进行了优化, 使得次氯酸钠对 PHB 的降解作用降到最低程度, 但 PHB 的摩尔质量仍然只有原来的一半左右。

由表1可知, 氯仿在室温下提取时, 可得到纯度很高且不被降解的 PHB; 又根据 PHB 是疏水亲油物质, 而细胞膜具有亲水性的原理, 作者采用分散的次氯酸钠-氯仿提取法^[8]进行了实验, 结果见表4。为了便于比较, 作者也进行了单纯使用次氯酸钠的提取实验, 并将结果一并列在表4中。

表4 氯仿-次氯酸钠法以及单纯次氯酸钠法提取 PHB 的结果

提取剂	纯度/ %	提取率/ %	<i>M</i> / (kg/mol)
氯仿-次氯酸钠	97	82	310
次氯酸钠	90	88	216

很显然, 单纯使用次氯酸钠提取, 不仅 PHB 的纯度不是很高, 而且摩尔质量只有用氯仿提取时的一半左右。使用氯仿-次氯酸钠法提取后, 由于该法综合了氯仿提取和次氯酸钠提取的优点, 不但纯度能达到97%, 而且摩尔质量的下降程度明显减弱。Hahn 等人认为这是由于被次氯酸钠破胞以后 PHB 能迅速转移到氯仿相中而受到保护的缘故^[8]。尽管如此, 由于使用了次氯酸钠, PHB 仍然被部分降解, *M* 比用氯仿室温提取时下降了约23%。

2.3 酶法提取胞内 PHB

酶法的根据是 PHB 不溶于水体系, 因而如果能设法使非 PHB 的细胞物质消化并溶解在水相中, 就可进行 PHB 的提取与分离。由于蛋白质是菌体内的主要组分, 通过考察水相中蛋白质含量随酶解作用时间的变化情况, 就可以确定最佳酶解作用时间, 结果见图1。

图1表明, 在开始的 20 min, 酶的作用非常迅速, 随后反应速度下降, 经过 60 min 后, 每千克 NPCM 中可溶性蛋白释放量达到最大, 为 370 g/kg, 此时产品纯度 85%。

由研究结果可知, 单纯使用细胞裂解酶破胞, PHB 纯度不高。这是因为非 PHB 的细胞物质通常包括蛋白质、核酸、类脂物、磷脂以及肽聚糖等。要消化掉这些 NPCM, 需要多种酶的作用才能达到, 而且作用过程实际上又受多种因素的影响, 各种酶的作用条件又不完全相同, 因此可以认为酶法不是提取胞内 PHB 的好方法。为了得到更高纯度的 PHB, 可以结合使用有机溶剂纯化或用表面活性剂处理^[9]。

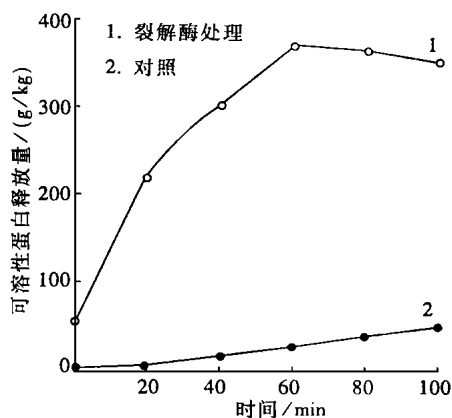


图1 可溶性蛋白释放量随时间变化的情况

2.4 表面活性剂-络合剂提取的结果

该方法的基本原理与酶法相似。提取结果为 PHB 纯度 98.7%, 提取率 93.3%, 摩尔质量 316 kg/mol。

2.5 几种提取方法的比较

有机溶剂法提取 PHB 是国外研究得最多、最深入的方法, 因为该法所得到的 PHB 被降解的程度很小且纯度很高, 因而广泛用于成膜及 PHB 一些物理化学性能的测试。但此法也存在着一些缺点, 主要有: 1) 当溶剂中含有超过 5 g/dL 的 PHB 时, 溶液变得很粘, 要去掉细胞的残余物就变得很困难; 2) 即使经过多次反复提取, 仍有一定量的 PHB 存在于菌体中^[7], 因而提取率难以达到很高; 3) 使用大量的有机溶剂, 尽管溶剂可回收再用, 但仍造成巨大的原料消耗^[9], 增加了提取成本; 4) 大量有毒、易爆、挥发性溶剂的使用, 对环境造成严重的污染, 给操作带来不便。因此, 总体上说, 有机溶剂提取不是一种好的方法。

分散的氯仿-次氯酸钠提取方法, 比单纯使用次氯酸钠提取有较多的优点, 例如, 所得的 PHB 摩尔质量较大、产品纯度高等; 比单纯使用有机溶剂提取在操作上更加简便, 而且提取率高, 但该方法仍然需要使用大量的有机溶剂。

酶法的最大优点是不使用有毒、易爆的有机溶剂, 环境污染小。但 PHB 的纯度不高, 而且操作条件比较苛刻, 要得到较高纯度的 PHB, 往往要结合其它一些纯化过程。

因此, 要真正实现 PHB 的工业化生产, 必须开发出操作更方便、成本更低、环境污染小的提取方法。新开发的从 *A. eutrophus* 中提取 PHB 的新技术, 对于 PHB 的大规模工业化生产具有重要的现实意义。

参考文献

- genes eutrophus in Batch Culture. *Biotechnology Letters*, 1990, 12(8): 563~568
- 2 Anderson A J, Dawes E A. Occurrence metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 1990, 54(4): 450~472
- 3 文欣, 郑士民, 陈琦. 真养产碱杆菌利用甜菜糖蜜发酵产聚 β -羟基丁酸的研究. *微生物学通报*, 1994, 21(2): 71~74
- 4 陈银广, 陈坚, 堵国成等. 生物可降解塑料(PHB)提取的研究进展. *化工进展*, 1998, (1): 41~45
- 5 Berger E, Ramsay B A, Ramsay J A, et al. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol Techn*, 1989, 3(4): 227~232
- 6 Ramsay J A, Berger E, Ramsay B A, et al. Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnol Techn*, 1990(4): 221~226
- 7 Ramsay J A, Berger E, Voyer R, et al. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol Techn*, 1994(8): 589~594
- 8 Hahn S K, Chang Y K, Kim B S, et al. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol and Bioeng*, 1994, (44): 256~261
- 9 Holmes P A, Lim G B. Separation process. U S Patent 4, 910, 145. 1990-05-20
- 10 陈坚, 陈银广, 伦世仪. 从真养产碱杆菌中提取聚 β -羟基烷酸酯的新方法. CN 1, 171, 410A. 1998-01-28
- 11 堵国成, 陈坚, 尹洪波等. 真养产碱杆菌生产聚 β -羟基丁酸的补料批式发酵条件研究. *应用与环境生物学报*, 1997, 3(4): 371~374
- 12 Braunegg G, Sonnleitner B, Lafferty R M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1978(6): 29~37
- 13 Akita S, Einaga Y, Miyaki Y, et al. Solution properties of poly(D- β -hydroxybutyrate). 1. Biosynthesis and characterization. *Macromolecules*, 1978(9): 774~780
- 14 Lowry O H, Rosebrough N J, Tarr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265~275

A Comparative Study on Recovery of Poly- β -hydroxybutyrate

Chen Yinguang Chen Jian Du Guocheng Yu Cairong Lun Shiyi

(School of Biotechnol., Wuxi Univ. of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract A new technology for the recovery of poly- β -hydroxybutyrate was reported and compared with other methods. Different recovery strategies affecting PHB purity, recovery ratio and M were studied. The results showed when using dispersion of sodium hypochlorite solution and chloroform, the product purity, recovery ratio and M could reach 97%, 82% and 310 kg/mol, respectively. If using only chloroform method under reflux conditions the purity of more than 97%, recovery ratio of about 70% and M of 330 kg/mol could be obtained. In the case of sodium hypochlorite method, the product purity, recovery ratio and M were 90%, 88% and 216 kg/mol. The purity of PHB was only 85% when using enzymatic digestion method. However, when the surfactant-chelant method was used, the product purity, recovery ratio and M could reach 98.7%, 93.3% and 316 kg/mol, respectively.

Key words poly- β -hydroxybutyrate; recovery; purity; recovery rate; molecular weight

(责任编辑: 秦和平)