

以葡萄糖为碳源合成生物降解性聚酯的研究

贺文楠 张增民** 胡 平

(清华大学化工系 北京 100084)

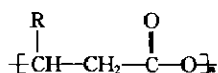
陈国强

(清华大学生命科学与技术系 北京 100084)

摘 要 利用从油田土壤中筛选的菌种 DG17 以葡萄糖为碳源通过微生物发酵法合成了具有不同结构单元的新型生物可降解性聚合物——聚羟基脂肪酸酯(PHAs)。初步研究了 DG17 以葡萄糖为碳源的生物合成规律,并借助 GC、NMR 等分析手段对合成的聚合物进行了结构的分析表征,另外还研究了 PHAs 的活性污泥降解情况。研究表明,在限氮条件下,只有碳氮比高于 5 后,DG17 才能在其体内合成 PHAs。在过量碳源的存在下,氮磷比低,得到的聚合物是一种具长侧链的聚(羟基辛酸-co-羟基癸酸)的共聚物,为一种热塑性弹性体。在硫酸铵浓度为 0.5g/L,碳氮比为 20 条件下合成的 P(HO-co-HD)热塑性弹性体的数均分子量为 1.16×10^5 ,分子量分散指数为 2.43。其玻璃化温度及熔融温度分别为 $T_g = -52^\circ\text{C}$, $T_m = 50^\circ\text{C}$ 。氮磷比高,则合成热塑性塑料 PHB。结果表明培养基中氮源与磷酸盐的相对浓度是影响 DG17 生物合成路径的重要条件。

关键词 生物降解性聚合物,聚羟基脂肪酸酯,聚羟基丁酸酯, P(HO-co-HD)

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHAs)是一类由微生物合成的生物降解性热塑性聚酯的总称。在碳源过量和某种营养物质缺乏(如限氮,限磷)的条件下,许多微生物的正常代谢途径就会被破坏,而在其细胞质内积累某种结构的 PHA,作为碳和能量的储存物质^[1]。当环境中能源缺乏时,微生物可将这些 PHAs 储存物再分解代谢掉,以提供生命活动所需要的能量。因此 PHAs 具有完全的生物降解性及生物相容性。由于 PHAs 可以通过多种微生物以多种物质为碳源发酵得到,其优点是碳源廉价,所得聚合物分子量可高达 10^5 以上,PHAs 在自然生态环境中可完全降解为水和二氧化碳,环境污染小,故引起人们广泛的研究兴趣^[2]。PHAs 的结构通式见下式。



随着侧链 R 的长度,侧链上所带官能团的不同,PHAs 的性质可以从高结晶度的热塑性塑料变化为无定形的热塑性弹性体。该类生物聚酯除具生物降解性、相容性外,还具有压电性、憎水性、结晶性、非线性光学性、构型单一性等特点^[3]。最早发现并研究的比较深入的生物聚酯是聚(3-羟基丁酸酯)(PHB)均聚物,以及 3-羟基丁酸(3HB)与 3-羟基戊酸(3HV)的共聚物,均为结晶度较高的热塑性塑料,韧性很差。近年来,发现一些细菌可合成

中长链($R=3\sim 9$)(medium-chain-length, MCL)的 PHAs, 为一种热塑性弹性体, 拉伸率可达 300% 以上. 一般合成 PHB 的细菌不能合成 MCL-PHAs, 反之亦然^[4]. 食油假单胞菌 *Pseudomonas oleovorans*、恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 是研究最多的只合成 MCL-PHAs 的菌种.

本实验主要研究了菌种 DG17 以葡萄糖为碳源合成 PHA 的生长规律, 对合成的聚合物进行了 GC、 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR 结构分析和 DSC 热分析, 利用 GPC 进行了聚合物分子量的测定并进行了简单的降解实验研究.

1 实验部分

1.1 生物降解聚合物 PHAs 的微生物合成

1.1.1 摇瓶培养基的配制及灭菌 在 1000mL 的挡板摇瓶中用蒸馏水配制 400mL 液体培养基, 培养基组成为: 0.5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9.65g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.65g/L KH_2PO_4 , 10g/L 葡萄糖, 1mL 微量元素. 10mol/L 的 NaOH 溶液调节培养基 pH 为 7.2. 然后在 115℃、0.8MPa 的条件下灭菌 25min.

1.1.2 种子培养基的制备 在 500mL 的摇瓶中用蒸馏水配制 50mL 的种子培养基. 其组成为: 5g/L NaCl, 10g/L 蛋白胨, 5g/L 牛肉膏, 调节培养基 pH 为 7.2. 在 121℃、1.0MPa 的条件下灭菌 25min. 然后从平板培养基上将菌种接入种子培养基中, 在 30℃、200rpm 条件下进行摇瓶培养 17h.

1.1.3 PHAs 的制备 无菌条件下将 10mL 种子培养基接种于已灭菌的摇瓶培养基中, 然后在 30℃、200rpm 条件下摇瓶培养 48h.

1.2 PHAs 的提取^[5]

将菌液离心分离, 得到的菌体用蒸馏水洗涤两次. 然后将菌体在抽真空条件下冰冻干燥, 以除去细胞中含有的水分. 以 1:1 的氯仿(10mL 氯仿/g 干细胞)和次氯酸钠溶液(30vol%)对干细胞进行提取. 在 30℃ 下震荡 90min, 然后离心分相, 取下层有机相, 并加入到 10 倍的 95% 的乙醇中进行沉淀. 离心得到 PHA, 溶剂挥发至恒重后, 称重.

1.3 分析表征

1.3.1 气相色谱(GC)分析细胞中聚合物各结构单元的相对含量^[6] 称取干燥后的干细胞样品或纯 PHA 50mg, 2mL 氯仿, 2mL 酯化液(纯甲醇中含 3vol% 的浓硫酸及 2g/L 的苯甲酸作内标)于带螺纹的酯化管中, 加盖密封后于 100℃ 下加热 150min. 冷却后加入 1mL 蒸馏水, 震荡 2min 后静置, 待氯仿相与水相完全分相后, 取下层氯仿相 4μL 注入气相色谱柱中进行色谱分析.

1.3.2 NMR 分析 500MHz- ^1H -NMR 与 125MHz- ^{13}C -NMR 在 Bruker AM-500 核磁共振仪上于 23℃ 下分析聚合物的碳链结构.

1.3.3 DSC 测玻璃化温度 T_g 及熔融温度 T_m 5mg 样品在氮气保护的条件下于 DuPont 2100 型示差扫描量热计上从 -100℃ 以 20℃/min 的速度加热到 200℃.

1.3.4 GPC 测定聚合物分子量 以四氢呋喃(THF)为溶剂, 利用 Maxima 820 GPC 凝胶渗透色谱仪在室温下测定 PHA 的分子量及其分子量分布.

1.3.5 降解实验 将约 0.5g 的 PHA 薄膜准确称取后装入带孔洞的塑料小盒中, 分别将

其置于微生物丰富的活性污泥及纯水中做对比实验.定期取出后烘干称重,测定聚合物重量下降程度.

2 结果与讨论

2.1 菌种 DG17 以葡萄糖为碳源合成的聚合物的结构表征

在 1.1.1 所给实验条件下,菌种 DG17 以葡萄糖为碳源合成的聚合物是一种热塑性弹性体.该 MCL-PHA 的化学结构式及其¹H、¹³C-NMR 谱图见图 1、图 2.可以看出,由菌种 DG17 以葡萄糖为碳源合成的聚合物为以各种不同链长的 3-羟基脂肪酸为主要结构单元的无规共聚物,是一种由微生物在限氮和碳源过量条件下合成的生物聚酯.聚合物的主要结构单元为 3-羟基辛酸(3-HO)和 3-羟基癸酸(3-HD),以及少量的 3-羟基己酸(3-HHx)、3-羟基十二酸(3-HDD),3-羟基十四酸(3-HTD)等.以其主要组成命名为聚(羟基辛酸酯-co-羟基癸酸酯)共聚物,简称 P(HO-co-HD).

将所得聚合物的 GC 谱图(图 3)与 3-HB、3-HHx、3-HO、3-HD 等单体标样定量所做 GC 标准谱图(图 4)对照,可同时确定聚合物的组成,并计算出聚合物中各结构单元的摩尔百分数.在图 3 中标示出了各峰所对应的聚合物的结构单元以及各峰的保留时间(图中没有内标苯甲酸甲酯的峰,标准谱图中未标出 3-HDD 及 3-HTD 的峰位置,应分别在 15.7min 及 35.0min 附近).在 1.1.1 实验条件下 DG17 利用葡萄糖合成的聚合物的主要组成及性质见表 1.

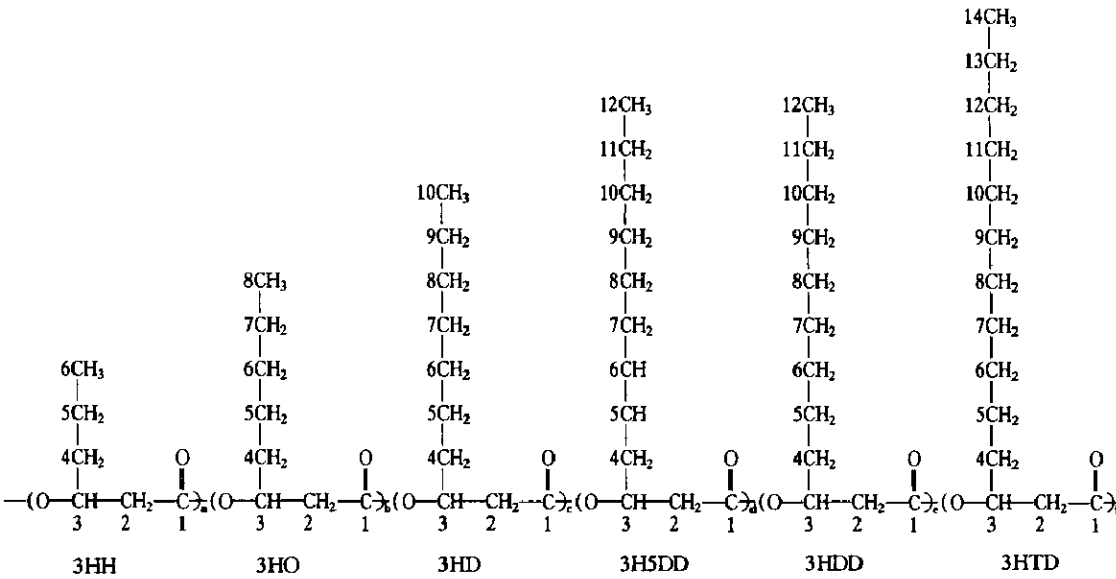


Table 1 Properties and composition of PHA synthesized by DG17 from glucose

Relative amount of repeating units in PHA (mol %)					M_n	M_w	M_w/M_n	$T_g/T_m(^{\circ}C)$
3-HHx	3-HO	3-HD	3-HDD + 3-H5DD	3-HTD				
2.4	21.3	70.1	5.2	1.0	1.16×10^5	2.82×10^5	2.43	-52.5/50.7

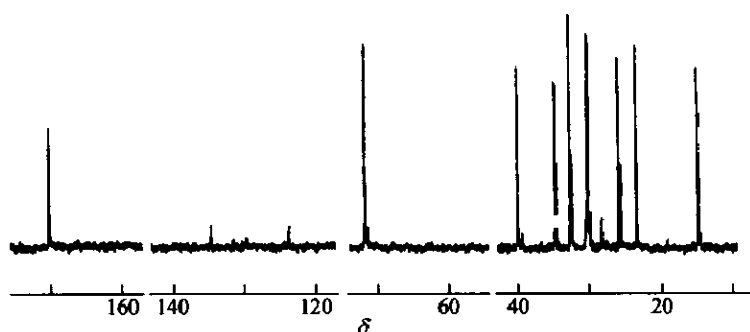


Fig. 1 ^{13}C -NMR spectrum of the polymer extracted from DG17 grown on glucose

2.2 菌种 DG17 以葡萄糖为碳源的合成规律

本文以葡萄糖为碳源,研究了不同氮源浓度、碳氮比 C/N (葡萄糖重量与硫酸铵重量之比)、磷酸盐浓度对 DG17 合成 PHA 的影响规律.

表 2 为硫酸铵浓度为 0.5g/L 时,不同碳氮比对细胞干重及菌体内聚合物含量的影响.由表中数据可以看出,只有碳氮比高于 5 后,细菌才能够在其体内合成 $\text{P}(\text{HO-co-HD})$,并且干细胞重及细胞内积累的 $\text{P}(\text{HO-co-HD})$ 含量随碳氮比的增加呈上升趋势.说明在碳源过量的条件下, DG17 可以利用简单的糖类物质葡萄糖为碳源在其体内合成 PHA.

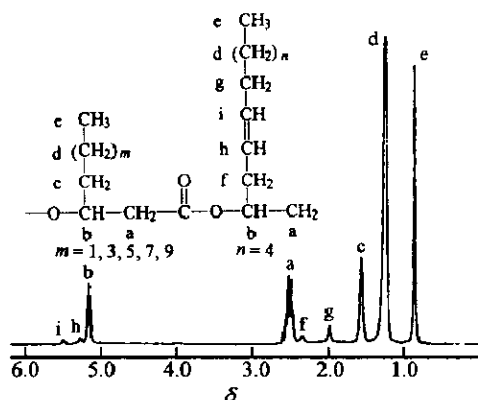


Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of the polymer extracted from DG17 grown on glucose

在恒定碳氮比为 15 时,氮源浓度对菌种 DG17 合成聚合物的影响见表 3.表中数据均在碳氮比为 15 的条件下获得,聚合物含量为实际提取得到的 PHA 重量与提取前相应干细胞重量之比.由表 3 可以看出,在碳氮比及其它无机盐浓度不变的条件下,氮源的浓度低于及等于 1g/L 时,细菌体内只积累 $\text{P}(\text{HO-co-HD})$.而氮源浓度高于等于 8g/L 后,细菌只积累 PHB.氮源浓度处于 $2\sim 7\text{g/L}$ 之间时,细菌体内不积累任何 PHA.说明在过量碳源的条件下,磷酸盐浓度与氮源浓度的相对含量控制着 DG17 的 PHA 生物合成路径.在限氮条件下趋向于合成 MCL-PHA 弹性体,当磷酸盐浓度与氮源浓度相比低于一定值以后,

DG17 又趋向于合成 PHB.

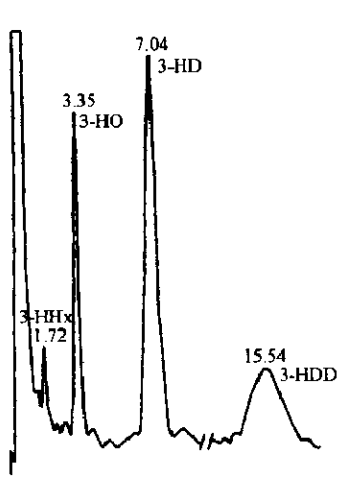


Fig. 3 GC spectrum of the polymer extracted from DG17 grown on glucose

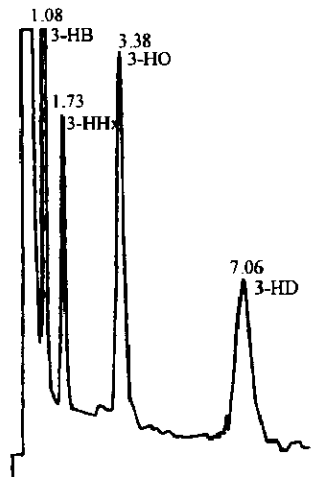


Fig. 4 GC standard spectrum of 3-HB, 3-HHx, 3-HO, 3-HD

Table 2 Influence of C/N ratios on accumulation of P(HO-co-HD) by DG17 grown on glucose

C/N*	5	10	15	20	30
Biomass yield(g/L)	0.89	1.18	1.52	1.93	2.14
PHA yield(g/L)	0	0.38	0.64	1.02	1.40
PHA content in biomass(wt%)	0	32.0	41.9	53.0	65.6

* The concentration of ammonium sulfate was 0.5g/L.

Table 3 Influence of concentration of nitrogen source on accumulation of P(HO-co-HD) by DG17

(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Biomass yield (g/L)	PHA yield (g/L)	PHA content in biomass (wt%)	PHA obtained
0.5	1.52	0.64	41.9	P(HO-co-HD)
1	2.02	0.82	40.8	P(HO-co-HD)
2~7	2.30~2.41	0	0	No PHA
8	2.60	0.60	23.0	PHB
10	2.74	0.61	22.4	PHB

2.3 DG17 合成的 P(HO-co-HD)及 PHB 的降解情况

PHB 在活性污泥及纯水中的降解结果见表 4. 由表中数据可看出 PHB 在水中的水解速率是比较缓慢的, 而在活性污泥中 PHB 重量下降的非常快, 3 周时间重量损失达 93.2%. P(HO-co-HD)样品于活性污泥中降解的比 PHB 更快, 1 周后已难以找到较完整的膜, 故降解数据未在表中列出. 可能是由于 PHB 的结构规整, 结晶度高, 比 P(HO-co-HD)稍难被微生物侵入并破坏的缘故. 这些结果表明微生物合成的聚合物具有非常好的生物降解性.

Table 4 The degradation results of PHB in activated sludge and pure water

Time (days)	7	14	21
Weight loss rate in activated sludge(%)	20.6	53.5	93.2
Weight loss rate in pure water(%)	2.9	4.0	6.5

以上实验结果说明,在摇瓶培养条件下,菌种 DG17 可以在其体内积累含量高达 65.6wt% 的 PHA,是一株有开发潜力的菌种.并且可以通过限氮或限磷来合成分子量高达 10^5 以上的热塑性弹性体 P(HO-co-HD)或热塑性塑料 PHB,这是一般菌种所没有的特性.通过改变培养条件有可能利用 DG17 对 PHAs 的合成进行分子设计,来制备 HB 与 MCL-HA 的共聚物,利用长侧链 HA 结构单元来改善 PHB 的结晶结构,获得力学性能良好的完全可降解性生物材料.

REFERENCES

- 1 Hazer B, Lenz R W, Fuller R C. *Macromolecules*, 1994, 27: 45~49
- 2 Shalaby S W. *Biomedical Polymers*. New York: Hanser, 1994. 173~187
- 3 De Koning G J M. *Can J Microbiol*, 1995, 41(Suppl. 1): 303~309
- 4 Chen Guoqiang(陈国强), He Wennan(贺文楠), Zhang Zengmin(张增民). *Biotechnology(生物技术)*, 1997, 7(4): 1~7
- 5 Hahn S K, Chang Y K, Kim B S. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44: 256~261
- 6 Abe H, Doi Y. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16: 115~119

MICROBIAL SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLYHYDROXYALKANOATES BY DG17 FROM GLUCOSE

HE Wennan, ZHANG Zengmin, HU Ping

(*Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084*)

CHEN Cuoqiang

(*Department of Biological Sciences & Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084*)

Abstract Poly(3-hydroxyalkanoates), abbreviated as PHAs are a series of bacterial storage polyesters, currently receiving much attention because of their potential application as biodegradable, biocompatible materials. This paper studied the influence of glucose as the carbon source, nitrogen source, and phosphate on the structure of polymer synthesized by DG17, a mutant isolated from oilfield. The structure of polymer was determined by gas chromatograph(GC), nuclear magnetic resonance(NMR) analysis. Under the experimental conditions, a thermoplastic elastomer P(HO-co-HD) with molecular weight 1.16×10^5 was synthesized when concentration of ammonium sulfate were not over 1g/L. But thermoplastics PHB was isolated from cells when concentration of ammonium sulfate was up to 8g/L. During these two concentrations, no polymer was found in cells. Concentrations of nitrogen and phosphate maybe have great influence on the pathway of PHA synthesis. 5 was the lowest weight ratio of glucose to ammonium sulfate needed for DG17 to accumulated PHA in cells. Both P(HO-co-HD) and PHB synthesized by DG17 from glucose lost up to 90% weights in activated sludge in one month.

Key words Biodegradable polymers, Polyhydroxyalkanoates, Polyhydroxybutyrate, P(HO-co-HD), PHB