

聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 生物降解过程的研究*

陈 珊** 刘东波 夏红梅 何孟元 郝 水

(东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

庄宇钢 安玉贤 董丽松

(中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

摘要 利用 DS9701 菌株对聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 膜进行降解, 对降解到不同程度的 PHB 膜采用扫描电子显微镜观察其表面形态结构的变化, 并对其降解产物进行分析测定. 结果表明, PHB 的生物降解首先发生在 PHB 表面的非晶部分, 随后结晶部分开始降解, 并且降解首先发生在球晶的中心部分. DS9701 菌株所产生的 PHB 解聚酶主要降解 PHB 的第二个酯键, 降解产物为二聚体.

关键词 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB), 生物降解, 结晶结构

学科分类号 Q937

随着塑料工业的迅速发展, 塑料的使用已渗透到国民经济各个部门. 然而, 在塑料给人们带来诸多方便的同时, 其大量使用后产生的废弃物对环境造成了严重污染. 因此, 研究开发能与环境同化的可生物降解塑料已成为材料领域中一个新的研究热点. 聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 是通过发酵技术获得的脂肪族聚酯, 它不仅具有与通用塑料聚丙烯相似的物理特性, 如能纺丝、压膜、注塑等, 还具有可生物降解性和生物相容性. PHB 在工业、农业、医药和环保等领域具有广阔的应用前景.

PHB 作为胞内碳源和能源贮存物, 在细胞内是以非晶状态存在^[1], 但从细胞中分离出来后, 便以结晶度在 60% 以上的半晶态存在, 其生物降解特性发生巨大变化. 因此, 在开发 PHB 生物合成和应用的同时, 研究其生物降解特性及过程更显得十分重要. 本工作采用 DS9701 菌株对 PHB 的生物降解过程及降解产物进行了分析研究, 旨在为 PHB 的应用奠定理论基础, 为国家开发宝贵的生物自然资源.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 作者从污泥中分离筛选到一株能降解 PHB 的菌株, 经初步鉴定为青霉 (*Penicillium*, sp.), 编号为 DS9701.

1.1.2 PHB: 美国 Aldrich 公司商品, 白色粉末. 熔点 172 °C, 相对分子质量 27×10^4 .

1.1.3 培养基: NH_4Cl 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%, 66 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.8), PHB 0.15%.

1.2 方法

1.2.1 PHB 膜的制备: 将 PHB 粉末在 180 °C 热压机上预热 2 min, 保压 (50 kg/cm^2) 1 min 后转移到冷压机上 (室温) 冷却至室温, 获得厚度为 0.1 mm 的 PHB 膜.

将 PHB 粉末经 180 °C 熔融后, 快速置于事先恒温好的 60 °C 和 100 °C 的热台上进行等温结晶, 直至结晶完成.

1.2.2 PHB 膜降解速率的测定: 将称重的 PHB 膜放入摇瓶中, 接入菌种后置于 28 °C 摇床振荡培养 (100 r/min), 定时取样. 样品取出后, 用甲醇、蒸馏水冲洗干净, 干燥后用分析天平称量重量变化^[2,3].

1.2.3 电镜观察: 降解后的 PHB 膜经喷金后采用扫描电子显微镜 (SEM) 观察其表面形态结构, SEM 为日立 S-570, 加速电压为 15 kV.

1.2.4 PHB 降解产物的测定: 将 PHB 降解后的产物用 LDI-1700 激光解吸电离飞行时间质谱仪测定降解产物.

2 结果与讨论

2.1 PHB 的生物降解过程

PHB 属于结晶性高聚物, 其结晶度可达 60% 以上. 晶粒数量的多少和尺寸的大小受 PHB 的结晶条件和结晶机理所制约. 当 PHB 膜在培养基中作为唯一碳源, 接种 DS9701 菌株后, 经不同时间

* 国家自然科学基金资助项目 (29774031, 29834102).

** 通讯联系人.

Tel: 0431-5697134, E-mail: dongls@ciac.jl.cn

收稿日期: 2001-04-20, 接受日期: 2001-05-24

的降解, SEM 观察结果示于图 1. 明显见到试样表面变得十分粗糙, 即在 DS9701 菌株的作用下, PHB 膜从表面开始降解. 进一步提高放大倍数,

明显地观察到被严重侵蚀的表面和 PHB 形成的球晶结构.

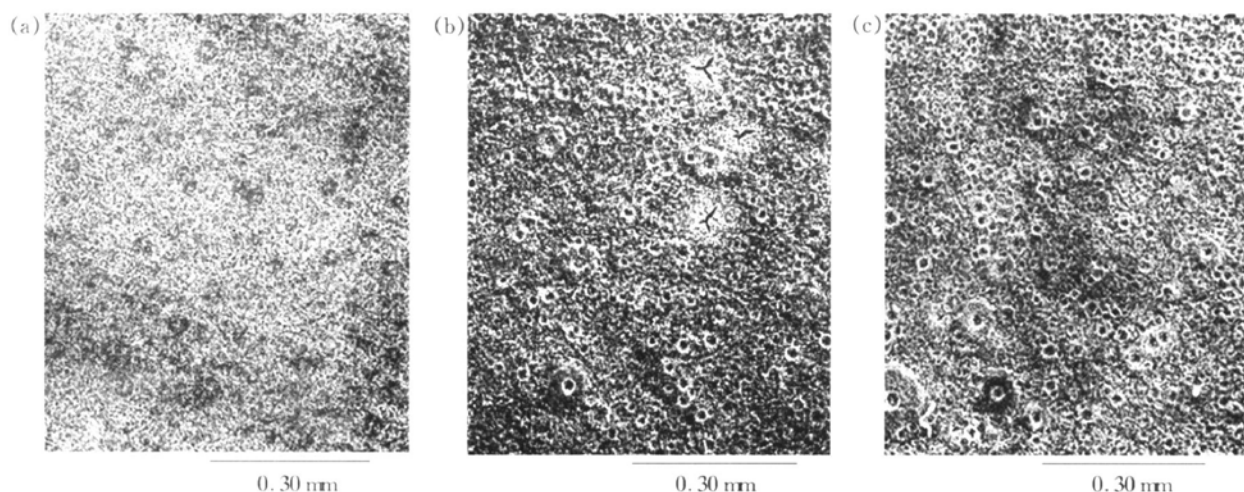


Fig 1 SEM micrographs of the PHB film surfaces after different degradation time

(a) 23 h; (b) 39 h; (c) 49 h.

图 2a 给出的是 PHB 膜经 23 h 降解, 失重百分率为 9.4% 时 SEM 的表面形貌照片. 即图 1a 的局部放大. 从该照片中可以看到黑色的圆形区域即是 PHB 形成的球晶, 球晶的形貌尚完好, 但局部开始降解. 表现为在球晶的表面上出现突起和发白色的小微区. 当进一步以高倍数观察球晶的前沿会更加明显地观察到球晶内部仍然保持比较完好的结晶结构, 而球晶的外部却降解得十分严重, 已经形成了类似蜂窝的形貌, 球晶和其周围出现了明显的

界限 (图 2b). 然而, 再仔细观察球心部分 (图 2c), 球心已经开始被侵蚀, 白色的部分就是即将被侵蚀掉的 PHB. 随着降解时间的增长, PHB 的失重百分率达到 21.3%. (图 3a), PHB 膜表面严重被侵蚀, 球晶的整体已经破坏, 轮廓变得不清楚, 球晶内部的形貌和外部的结构雷同 (图 3b). 但是, 球晶的中心部分已经被侵蚀得形成了明显的孔洞, 并且向纵深发展 (图 3c).

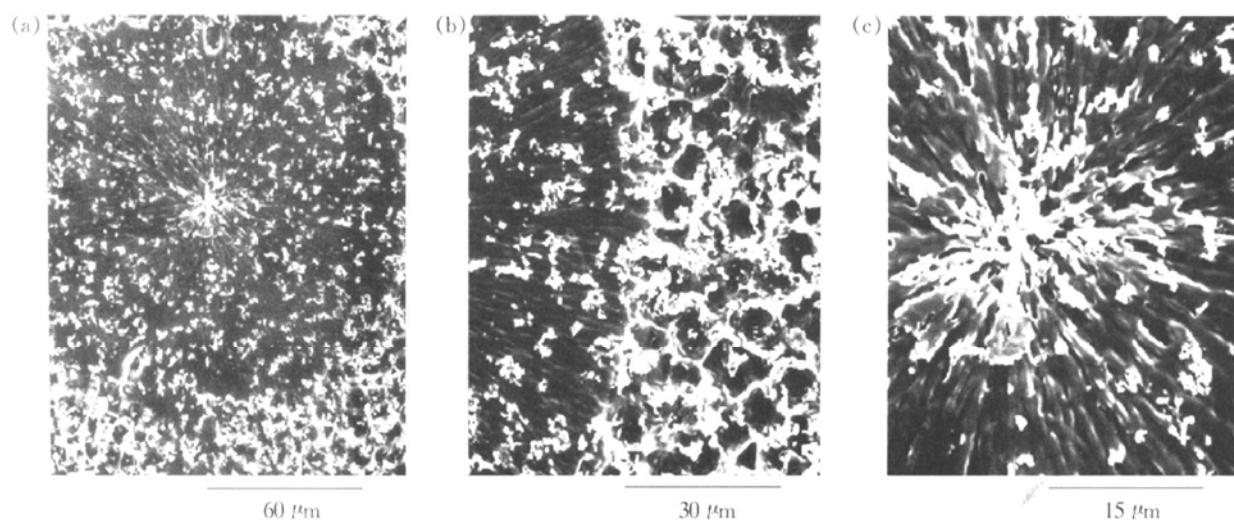


Fig 2 SEM micrographs of the PHB film surfaces after 23 h degradation

(a) a whole spherulite; (b) spherulite edge; (c) spherulite center.

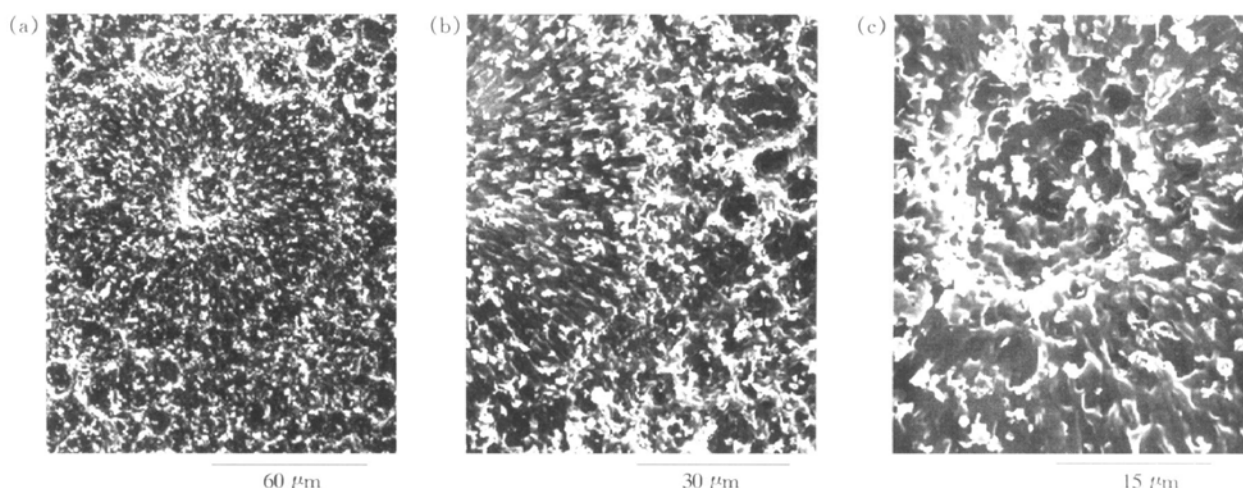


Fig. 3 SEM micrographs of the PHB film surfaces after 39 h degradation

(a) a whole spherulite; (b) spherulite edge; (c) spherulite center.

图 4 给出了增加降解时间 PHB 膜表面形貌的 SEM 照片, 由图 4 可以清楚地看到 PHB 球晶降解已达到相当严重的程度, 边界更加不清晰, 特别是球晶的中心, 孔洞进一步扩大和加深. 根据对 PHB 生

物降解特性的研究^[4], 此时 PHB 的降解进入加速期. 除降解菌株本身的生物降解特性外, 此时 PHB 降解加速的另一原因是 PHB 膜的表面积随降解程度增加而加大, 从而进一步促进了 PHB 的降解.

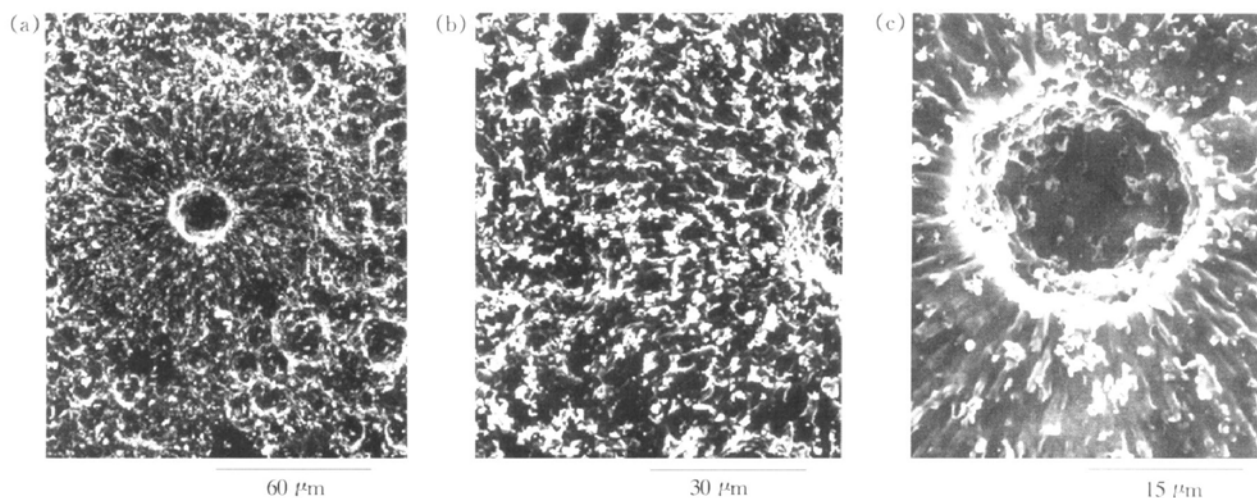


Fig. 4 SEM micrographs of the PHB film surfaces after 49 h degradation

(a) a whole spherulite; (b) spherulite edge; (c) spherulite center.

综合上述实验结果可以得出如下结论: PHB 膜的降解首先发生在 PHB 表面的非晶部分, 随后, 结晶部分开始降解, 并且 PHB 球晶的中心部分易于降解.

对 PHB 的降解机制, Doi^[5]曾提出一种假设, 认为 PHB 解聚酶由两部分组成: 结合部 (binding domain) 和活性端 (active side), 由于 PHB 结晶具有规整结构, 解聚酶易于在其表面吸附, 能和 PHB 分子粘合在一起, 随后解聚酶的活性部分发挥酶促作用, 首先降解 PHB 的非晶部分, 然后再

降解 PHB 的结晶部分. 我们的实验结果与此具有很好的一致性. 实验表明, PHB 的结晶部分具有较高的有序性和较大的密度, PHB 解聚酶不能直接进入 PHB 的结晶中而引起降解, 而是首先进攻密度低、松散的非晶部分. 当非晶部分降解后, PHB 结晶表面便会形成很多的自由端基, 这些自由端基具有较大的活动能力, 导致 PHB 的结晶表面形成非晶过度层, PHB 结晶逐渐被破坏, 随后 PHB 解聚酶继续对非晶部分降解, 直至使 PHB 完全降解.

为进一步考察 PHB 的降解过程, 又制备了分别在 60 °C 和 100 °C 等温结晶的 PHB 试样, 分别记作 PHB 60 和 PHB100, 仍然采用 DS9701 菌株降解 PHB60 和 PHB100, 降解条件与其他试样完全相同. 试样失重量随降解时间的变化由图 5 给出. 由图 5 可见, PHB 60 的降解速率远远大于 PHB100. 事实上, PHB60 和 PHB100 试样在不同温度下结晶其结晶度相近, 但是结晶规整性是有差别的, 即结晶温度越高, 结晶规整性越好. PHB100 的降解速率低于 PHB60, 其原因就是来自结晶规整性的差别. 由此可见, PHB 解聚酶不能直接对 PHB 的结晶部分产生降解, 只有当结晶结构被破坏后才能产生降解.

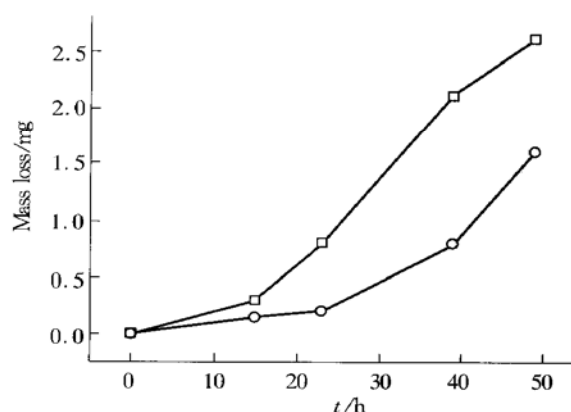


Fig. 5 Mass loss of the PHB films crystallized at different temperatures

□ — □: 60 °C; ○ — ○: 100 °C.

2.2 PHB 降解产物的测定

图 6 给出了 PHB 降解产物的质谱图, 图 6 中出现明显的 191、213 和 229 质谱峰. 它们相应于

PHB 二聚体的质量数 190 加氢、加钠和加钾. 换言之, 降解产物中存在着大量的 PHB 的二聚体. 由此得知, DS9701 菌株所产生的 PHB 解聚酶主要降解 PHB 的第二个酯键, 其降解产物为二聚体.

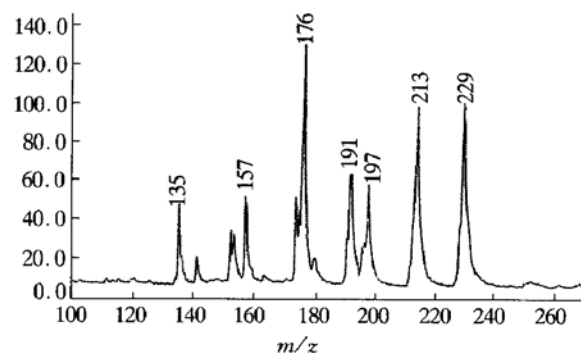


Fig. 6 Mass spectrum of the products after PHB degradation

参 考 文 献

- 1 Horowitz D, Clauss J, Hunter B, *et al.* Amorphous polymer granules. *Nature*, 1993, **363** (6): 23
- 2 Yamada K, Mukai K, Doi Y. Enzymatic degradation of poly (hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas pickettii*. *Int J Biol Macromol*, 1993, **15** (8): 215~220
- 3 Tomasi G, Scandola M, Holger B, *et al.* Enzymatic degradation of bacterial poly (3-hydroxybutyrate) by a depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. *Macromolecules*, 1996, **29** (2): 507~508
- 4 陈 珊, 刘东波, 夏红梅, 等. 一株可降解聚 β-羟基丁酸酯的真菌. *菌物系统*, 2001, **20** (3): 423~425
Chen S, Liu D B, Xia H M, *et al.* *Mycosystema*, 2001, **20** (3): 423~425
- 5 Abe H, Matsubara I, Doi Y. Physical properties and enzymatic degradability of polymer blends of bacterial poly [(R)-3-hydroxybutyrate] and poly [(R, S)-3-hydroxybutyrate] stereoisomers. *Macromolecules*, 1995, **28** (4): 844~853

Study on The Biodegradation Process of Poly (3-hydroxybutyrate)*

CHEN Shan**, LIU Dong-Bo, XIA Hong-Mei, HE Meng-Yuan, HAO Shui

(College of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

ZHUANG Yu-Gang, AN Yu-Xian, DONG Li-Song

(Changchun Institute of Applied Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) films were biodegraded by DS9701. The degradation process was monitored by using SEM. It was shown that the PHB degradation occurred firstly in the amorphous part of PHB and then in the crystalline part, especially from the center of PHB spherulites. PHB depolymerase produced by DS9701 mainly attacked the second ester bond of PHB and the degraded product was dimmer, determined by using mass spectrometer.

Key words poly (3-hydroxybutyrate), biodegradation, crystalline structure

* Project Granted by the National Natural Science Foundation of China (29774031, 29834102).

** Corresponding author. Tel: 86-431-5697134, E-mail: dongls@ciac.jl.cn Received: April 20, 2001 Accepted: May 24, 2001