

用 SDS-NaClO 从重组大肠杆菌中分离聚- β -羟基丁酸酯

尹 进 于慧敏 李红旗 沈忠耀

(清华大学化工系 北京 100084)

聚- β -羟基丁酸酯(PHB)是微生物合成的一种以颗粒状态存在于细胞中的高分子聚合物,由于它具有生物可降解性、生物相容性等特性,在医学上具有独特而广阔的应用前景。从微生物细胞中分离 PHB 的方法有溶剂萃取法^[1]、化学试剂法^[2,4]和酶法^[5]。目前工业生产中以溶剂萃取法和酶法为主,但这两种方法成本均很高。

用次氯酸钠破细胞壁从真养产碱杆菌中分离 PHB 的化学试剂法具有操作简单、效率高等优点^[6],但次氯酸钠会引起 PHB 分子的严重降解^[7,8]。Hahn 等人^[9]比较了用次氯酸钠作用于真养产碱杆菌和重组大肠杆菌的情况,发现低浓度的次氯酸钠对重组大肠杆菌中的 PHB 几乎不降解,高浓度的次氯酸钠降解作用也小于对真养产碱杆菌中 PHB 的降解。

本文研究了用 NaClO 与 SDS 相结合的作用从重组大肠杆菌中分离 PHB 的方法,试图利用二者的互补作用,降低 SDS 用量,减少对 PHB 分子量的降解,以获得较高纯度和分子量的 PHB。

1 方法与材料

1.1 菌体

重组大肠杆菌 HMS174(质粒为 pTZ18u-PHB),本实验室构建。发酵结束时,干菌中 PHB 的含量为 70.87%,分子量为 1 300 000,分子量分布为 1.29。

1.2 PHB 含量的分析方法

采用硫酸降解法^[10]。

1.3 PHB 重均分子量的分析方法

采用凝胶渗透色谱法。

1.4 PHB 的分离方法

50ml 10g/L(指干菌浓度)的湿菌悬液中加入一定量的 SDS 粉末或 NaClO 溶液,在 30℃ 下水浴摇床混合处理一定的时间。处理后的菌液以 4 000r/min,离心 20min。沉淀用 50ml 蒸馏水洗涤一次后于 60℃ 烘箱烘干,测沉淀中 PHB 含量。干品用氯仿萃取后,沉淀出 PHB,测分子量^[11]。

2 结果与讨论

2.1 单独用 SDS 或 NaClO 作用于菌体

如图 1 和图 2 所示。NaClO 作用于菌体的温度为 30℃,时间 15min, pH 值不调,约为 12;SDS 作用于菌体的温度为 30℃,时间 10min, pH 值不调,约为 7.1。从图 1 中 PHB 纯度和分子量(MW)的变化可看出,低浓度的 NaClO 溶液对重组大肠杆菌中 PHB 的降解作用较小,但所获得的 PHB 的纯度也较低。加大 NaClO 溶液的浓度,PHB 的纯度提高,但 PHB 分子量的降解程度也加大。图 2 中,当 SDS 用量小于 10g/L 时,PHB 的纯度随 SDS 用量的增加提高较快;当 SDS 用量大于 10g/L 时,PHB 的纯度随 SDS 用量的增加提高很慢,这与 SDS 不能破坏菌体细胞壁的肽聚糖结构有关。

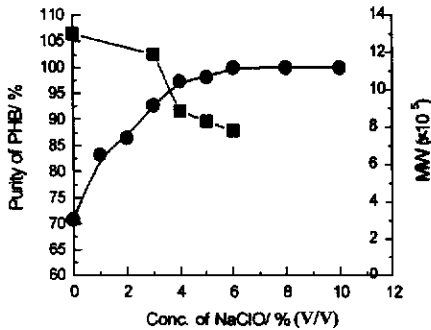


图 1 次氯酸钠溶液浓度的影响

■MW, ●purity of PHB

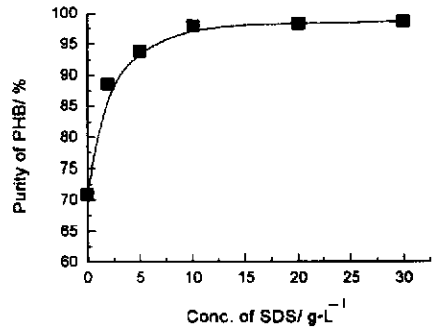


图 2 SDS 溶液浓度的影响

2.2 SDS 和 NaClO 加入顺序不同对分离 PHB 的影响

比较了 SDS 和 NaClO 加入顺序不同对分离 PHB 的影响(图 3), 结果表明, SDS 和 NaClO 加入顺序的不同, 对分离结果的影响很大。先加 SDS 后再加入次氯酸钠的两种化学试剂相结合的方法(方法 3), 其分离效果最好。

SDS 和 NaClO 加入顺序不同对分离 PHB 所带来的影响, 本文认为这是由于 SDS 和 NaClO 破壁机理的不同所造成。SDS 破壁的机理是 SDS 分子能够与菌体细胞壁中的脂类结合形成可溶于水的混合胶束, 同时也能包被蛋白质形成可溶于水的复合物, 但 SDS 不能溶解细胞壁的肽聚糖结构。NaClO 破壁则是利用它的氧化作用, 将大分子的物质降解成易溶于水的小分子物质。先加 NaClO, 它首先作用于细胞壁的外膜, 主要消耗在裂解脂类和蛋白质上, 这样当后来加入 SDS 时, SDS 就不能发挥作用。反之, 先加 SDS, SDS 首先作用于脂类和蛋白质, 后加入的 NaClO 可破坏肽聚糖的网状结构使之成为溶于水的物质, 从而可以进一步增大非 PHB 杂质的去除率, 提高 PHB 的含量。

2.3 SDS 和 NaClO 结合时 NaClO 作用时间的影响

根据图 3 的结果, 选择了方法 3 来分离 PHB。图 4 中, NaClO 作用 1min 与作用 15min 的效果相近, 表明 NaClO 作用 1min 足够了, 过长的作用时间只会引起它对 PHB 的降解。所以, 本文选定的方法为: 菌体先用 SDS 作用 10min, 然后再加入 NaClO 作用 1min 后离心分离, 沉淀用水洗涤。

2.4 SDS 和 NaClO 结合作用时试剂浓度对分离效果的影响

不同 SDS 浓度和不同 NaClO 溶液浓度相结合作用于菌体分离 PHB 的结果如图 5 所示。当菌体浓度为 10g/L, SDS 浓度为 1g/L, NaClO 浓度为 3% (V/V) 时, 可得到纯度为 99.3% 的 PHB, 所得 PHB 的分子量为 1 108 000, 分子量分布为 1.648, 收率 89%。

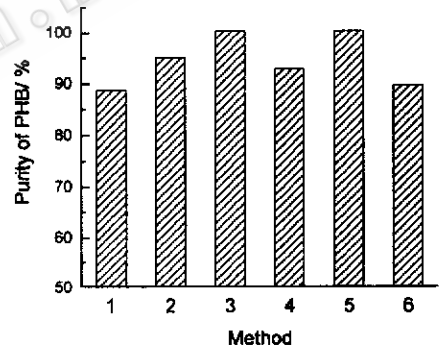


图 3 不同方法对分离结果的影响

- 1.2% (V/V) NaClO 单独作用
- 2.5g/L SDS 单独作用
- 3.5g/L SDS 处理后再加入 2% (V/V) NaClO 作用
- 4.2% (V/V) NaClO 处理后再加入 5g/L SDS 作用
- 5.5g/L SDS 处理后, 离心, 沉淀用 2% (V/V) NaClO 作用
- 6.2% (V/V) NaClO 处理后, 离心, 沉淀用 5g/L SDS 作用

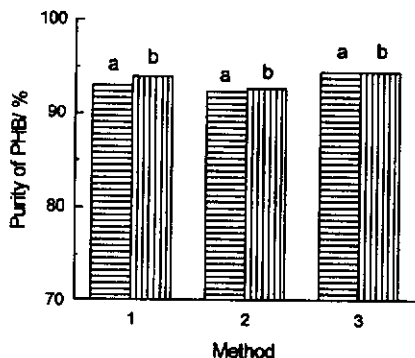


图4 不同条件下 NaClO 作用 1min (a) 和 15min(b)的结果

1.2g/L SDS + 1% (V/V) NaClO, 2. 1g/L SDS + 2% (V/V) NaClO, 3. 2/L SDS + 2% (V/V) NaClO

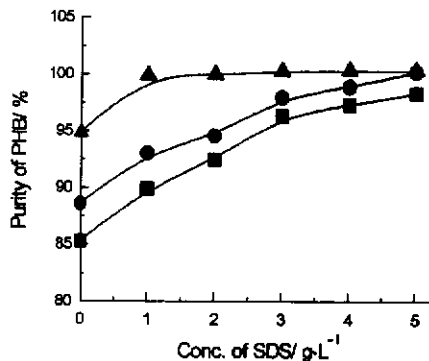


图5 不同浓度的 SDS 与 NaClO 结合作用的结果

■ 1% (V/V) NaClO, ● 2% (V/V) NaClO, ▲ 3% (V/V) NaClO

参 考 文 献

- 1 Ramsay J M, Berger E, Voyer R *et al.* Biotechnology Techniques, 1994, 8(8): 589~594
- 2 William J P, Anthony C. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(12): 4236~44
- 3 Mac-Donald J, Timothy J. Pct Int Appl WO 94/24, 302, 1994
- 4 Yamamoto O, Myata Y, Yanagi S. JP 07 79, 787, 1995
- 5 Holmes P A, Lim G B. United States Patent, 4 (910): 145, 1990
- 6 Williamson D H, Wilkinson J F. J Gen Microbiol, 1958, 19: 198~209
- 7 Berger E, Ramsay B A, Ramsay J A *et al.* Biotechnology Techniques, 1989, 3(4): 227~232
- 8 Ramsay J A, Berger E, Ramsay B A *et al.* Biotechnology Techniques, 1990, 4(4): 221~226
- 9 Hahn S K, Chang Y K, Lee S Y. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(1): 34~39
- 10 Ward A C, Dawes E A. Anal Biochem, 1973, 52: 607~613
- 11 Hahn S K, Chang Y K, Kim B S *et al.* Biotechnology Techniques, 1993, 7: 209~212

Recovering PHB from Recombinant *Eschenrichia coli* by a Combined SDS-NaClO Treatment

Yin Jin Yu Huimin Li Hongqi Shen Zhongyao

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

Abstract A combined SDS-NaClO method to recover PHB from recombinant *E. coli* HMS 174 (pTZ18u-PHB) was studied. The adding order of SDS and NaClO affected the result of this method and the reason was analyzed. A new process that the cell was treated by SDS for 10min first and then by NaClO for 1 min was proposed. Under the conditions of 10g/L biomass, 1g/L SDS, and 3% (V/V) NaClO, the purity of PHB could be increased from 70.87% to 99.3%, the yield was 89%, and the molecular weight(MW) and polydispersity index(pI) of PHB was 1 108 000 and 1.648, respectively (the initial MW = 1 300 000, pI = 1.29).

Key words Poly-β-hydroxybutyrate, separation, SDS, NaClO