

细菌聚羟基脂肪酸酯检测方法研究进展*

洪葵

(华南热带农业大学植物保护学院重点实验室 儋州 571737)

摘要: 细菌聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是存在于许多细菌细胞内的聚合物, 是一种新型的生物材料, 在生态研究中可作为营养指标。回顾有关 PHAs 的研究方法的同时介绍用 FT-IR 技术从细胞水平快速定性和定量分析细菌 PHAs。

关键词: 细菌聚羟基脂肪酸酯检测方法, 傅立叶变换红外光谱

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0080-06

细菌聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是细菌细胞内的聚合物, 或以颗粒的形式作为碳源或能源的贮存物, 或与细胞膜结合参与 DNA 转化过程中感受态的形成^[1]。抽提到胞外的不同类型的 PHAs 由于具有类似从塑料到橡胶等一系列高分子聚合物的性能, 以及其独特的生物可降解性, 生物相容性, 线性光学活性等特点而作为一种新型的生物材料受到关注, 聚羟基丁酸酯 (Polyhydroxybutyrate, PHB) 是 PHAs 中被发现最早, 研究最彻底的一种。作为颗粒贮存物存在的 PHAs 在生态研究中被认为是环境中氮源缺乏时积累的物质而作为环境营养状况的一项指标。

自从 Lemoigne 发现 PHB 以后, 被发现的 PHAs 的类型越来越多, 研究 PHAs 的方法也随着各种分析手段的进步而被不断发展, 早期的方法包括苏丹黑染色及氯仿抽提, 确定 PHB 的存在及含量。以后光谱、色谱技术如 UV、IR、GC、HPLC 等以及 NMR、GC-MS、流动细胞光度法等, 被用于 PHAs 的定性及定量分析。PHAs 的提取也从最初的氯仿等有机溶剂抽提法发展到用次氯酸钠、SDS 等无机溶剂以及酶解, 工程菌诱导裂解等方法。我们在筛选新型 PHAs 的合成菌以及研究 PHAs 合成过程中, 探索了用傅立叶变换红外光谱 (FT-IR) 方法在细胞水平快速定性和半定量分析细菌 PHAs 的可行性, 并在研究过程中尝试了这一方法, 结果表明, FT-IR 技术对从细胞水平快速检测 PHAs 是非常有效的^[2]。

本文回顾有关 PHAs 的研究方法并介绍用 FT-IR 技术从细胞水平快速定性和定量分析细菌 PHAs。

1 染色法

用于定性研究细胞内 PHAs 存在的染色方法包括苏丹黑染色和尼耐尔蓝染色法。苏丹黑染色是用于 PHB 着色的常规染色方法。尼耐尔蓝 (Nile blue A, Nile blue sulfate, Basic blue 12) 是一种溶于水和乙醇的碱性恶嗪类染料, 尼耐尔蓝在水溶液中可自然氧化或在稀硫酸中回流氧化成尼耐尔红 (Nile pink), 尼耐尔红可溶于在染色温度下呈液态的中性脂。尼耐尔蓝和尼耐尔红的混合溶液是一种传统的用于组织切片的脂类物质着色

* 教育部青年骨干教师资助项目

海南省普通高校优秀中青年骨干教师科研和教学奖励基金资助项目

收稿日期: 2000-06-12, 修回日期: 2000-09-18

的染料。其方法是：将可能产 PHAs 的细菌细胞固定在玻片上，置于含 1% 尼耐尔蓝水溶液的染色缸中，55℃ 染色 10min，水洗冲去多余染液，再用 8% 乙酸水溶液染色 1min，水洗，干燥，加上盖玻片以防止香柏油将染料抽提出。然后置于荧光显微镜下观察，荧光的发射波长为 460nm，PHB 颗粒显现黄色荧光，能明显地与黑白背景分开，一般认为其着色效果优于苏丹黑染色，细胞膜及其他含脂的细胞组份不着色，其缺点是荧光观察的灵敏度不够，仍然需要通过化学分析确定 PHB 的存在。

2 重量分析法 (Gravimetric analysis)

氯仿抽提称重法最早用于 PHB 的定性和定量分析。Lemoigne (1926) 最早就是用热氯仿抽提发现 PHB 的。重量分析的原理是，PHB 聚合物能溶于热的氯仿而与其它细胞组份分开。通过抽提，离心，去掉其他细胞组份，然后用醇类等溶剂沉淀，离心去上清液，可得到 PHB，称重可知 PHB 的含量。这一方法需要沉淀出至少毫克级的 PHB 才能称重，且这一方法的准确性与 PHB 能否完全沉淀有关。

3 次氯酸钠水解比浊法

用次氯酸钠水解比浊法测定 PHB 的含量是基于观察到这样的现象：当 *Bacillus* sp. 悬浮在碱性次氯酸钠溶液中时，除脂类以外的其他组份几乎完全溶解在次氯酸钠溶液中。Williamson 和 Wilkinson (1958) 将这一原理用于 PHB 的定量测定。将 10 mg 含 PHB 的细胞悬浮于经预先处理的次氯酸钠溶液中，于 37℃，pH9.8，处理 90 min，这时除脂类以外的其他细胞组份均溶解，浊度将保持在一个定值。做一系列不同 PHB 含量的细胞的浊度可得到一条标准曲线，从而可测定细胞的 PHB 含量，原方法在做标准曲线时，以氯仿法测定的 PHB 含量做标准，因此这一方法与氯仿法相比虽然更方便简单，但对于某一特定菌株，都需要用氯仿法校准做一条标准曲线，因为实际上测得的是包括 PHB 在内的其他脂类共存的总脂的量，还必须知道 PHB 在总脂中所占的百分比，虽然这一百分比在特定的菌株中是一定的。

4 紫外光谱法

紫外光谱法原理是：PHB 在浓硫酸溶液中加热可以定量地转化为巴豆酸，后者在 235nm 处有一吸收峰值。将 5 ~ 50 μ g 聚合物标准品，溶于氯仿，待氯仿挥发后，加 10mL 浓硫酸，于 100℃ 作用 10min，冷却，混匀后置于石英比色皿中，于 235nm 比色，以浓硫酸为空白，可得一条标准曲线。

Law 和 Slepecky (1966) 用紫外光谱法分析细胞内的 PHB 含量。细胞先经离心（离心管为预先用乙醇和热氯仿溶液洗涤的聚乙烯塑料离心管），然后用类似 Williamson 和 Wilkinson 的方法加入与原体积相同的次氯酸钠溶液，37℃ 作用 1h，离心，水洗，再用丙酮和乙醇洗涤，后用热氯仿抽提，最后氯仿的滤出物用上述方法进行紫外分析。

该方法细胞的预处理过程比较繁琐，它是在 Williamson 和 Wilkinson 方法的基础上加上了硫酸处理和紫外检测，测定过程更复杂，而且这一方法还受到一些非 PHB 物质的干扰，但由于该方法测定的是能转化为巴豆酸的 PHB 聚合物的含量，排除了其它脂类的干扰，与细胞内总脂的含量无关，因而其标准曲线对于所有产 PHB 的细胞都适用。

Law 和 Slepecky 的方法，由于反复离心使操作费时，而且对 PHB 含量少的细胞重复性差。Ward 和 Danes 用盘分析 (Disk Assay) 的方法避免了离心过程，提高了分析的准

确性,并且更方便。

其方法概述如下:将0.2mL(含干细胞25mg/mL)细胞悬液置于玻璃纤维盘中(glass fiber disk),于80℃~110℃加热5~10min,然后用0.2mL次氯酸钠作用1h以分解细胞组分,再于80℃~110℃干燥5~10min,然后用0.2mL 50℃~60℃的热氯仿处理数次,使PHB粘贴在盘上,再将盘浸于次氯酸钠溶液中,37℃作用1h,然后用蒸馏水,乙醇,丙酮,二乙基醚等洗两次,再将溶剂风干,加入浓硫酸于100℃水浴10min,235nm比色。该法的原理与Law & Slepecky相同,只是用盘代替了离心,减少了离心引起的损失和费时的操作。

5 气相色谱法

PHB能在浓硫酸作用下解聚,脱水成巴豆酸,巴豆酸可进一步转化为巴豆酸甲酯,后者能通过气相色谱测定。Fukai等(1976)发现PHB在微碱条件下也能降解,以后Braunegg(1978)发现在微酸条件下PHB可降解为3-羟基丁酸,进一步甲酯化后可通过气相色谱检出。

Braunegg等(1978)在上述发现的基础上,利用微酸环境使细胞中的PHB解聚为3-羟基丁酸并进一步转化为 β -羟基丁酸甲酯,然后用气相色谱检出。

该方法可用于PHB纯品及细胞中PHB的检测:20mg左右的PHB纯品,加入2mL酸化甲醇(含硫酸3%v/v)及2mL氯仿,于旋塞试管中100℃加热4h,再冷却到室温,然后加入1mL蒸馏水,充分摇匀10min,分层以后,取2 μ L有机相用于GC分析。在酯化的同时加入苯甲酸作为内标以提高方法的准确性和重复性。

用于含PHB的细胞分析时,只需先将0.5~5mL的细胞悬浮液离心,去掉上清液相,然后按上述操作加入酸化甲醇酯化,气相色谱检测。

该方法的优点:样品分析相对较快,需要的样品量小,可以分析任何一种属的细胞,可同时对PHB作定型和定量分析。对含多种单体的均聚物和共聚物,可测定其单体组成,但对定量分析就必须作出各种单体的标准曲线,不能很快给出PHAs的总量。而且气相色谱的酯化时间和色谱分析时间较长,此外,水对测定结果有影响,而且酸及细胞碎片的存在使色谱柱受到了污染,须对色谱柱进行经常老化甚至需要更换新柱。

Apostolides和Potgieter(1981)在研究活性污泥中的PHB含量时,改进了Braunegg的方法,把以前的0.5~5mL细胞悬浮液改为50mg干培养物,气相色谱柱温提高到180℃使PHB检出的保留时间降至1min,进样时间缩短为4min。

Comeau等(1988)^[3]对气相色谱法用于活性污泥中PHB和PHV的分析做了更进一步的改进。细胞干燥的方法改为冻干,并对酯化后的有机相再用1mL蒸馏水萃取以去掉酸和细胞碎片,采用毛细管柱代替填充柱,避免了溶剂峰对PHAs峰的影响,增强了不同的峰如 β -羟基丁酸甲酯和 β -羟基戊酸甲酯之间的分辨率,尤其采用程序升温使4-氧代戊酸(4-oxovalonic acid)能与 β -羟基戊酸分开。但气相色谱法从获得细胞悬液到最后得到PHAs的含量,经离心、细胞冻干、酯化、色谱分析等最快也要约1d时间,对发酵过程的在线监控是不适用的。

6 高效液相色谱法

高压液相色谱法主要应用于测定PHAs聚合物的分子量、聚合度及单体排列顺序等。

Coulombe (1977) 等采用反相高压液相色谱法, 成功地将 PHB 醇解和碱解得到的寡聚物, 分离成单分相的寡聚体。这一方法可作为制备不同分子量及聚合度的 PHAs 纯品的的方法, 并可作为测定 PHAs 的分子量 (数均分子量 M_n 和重量分子量 M_g) 的基础, 可用于研究 PHAs 的降解机制, 而且通过以不同聚合度的寡聚物为标准, 根据保留时间可测定聚合物的聚合度。

利用高压液相色谱对部分甲酯化的 P (HB-co-HV) 进行分离, 然后用快原子轰击质谱 (fast atom bombardment mass spectrometry, FAB-MS) 分析 (Badistreri *et al* 1988), 可对 PHBV 共聚物的单体组成进行测序, 研究共聚物中两种单体的排列顺序区分嵌段型或杂聚型。这些特征对它们的结晶行为、熔点、热焓等物理化学特征有重要影响。

7 核磁共振法

随着越来越多的不同于 PHB 的新型 PHAs 被发现, 结合¹H-NMR 和¹³C-NMR 及其二维图谱, 核磁可以准确地区分出某一化合物或混合物中不同的结构单元及其摩尔比, 有助于分析单体的结合方式, 确定是否共聚物。单体中各种官能团如环氧基、不饱和键的位置等都可以借助于核磁共振分析, 此外还有助于通过同位素标记的碳原子分析 PHAs 的合成途径^[5]。

用¹³C-NMR 可在活体条件下监测 PHAs 的合成及降解过程^[6], 与重量法等 PHAs 的定量分析法相比,¹³C-NMR 更快、更简单, 不需要破坏细胞, 因而准确, 而且能提供 PHAs 的组成的变化, 尤其有利于确定最佳的发酵时间。

目前 NMR 在细菌 PHAs 研究中应用很广。但 NMR 仪器较昂贵、样品分析时间较长。受分子量大小的限制, 结果分析比较复杂。

8 热重法 (Thermogravimetric analysis)^[7]

PHAs 在 250℃ ~ 320℃ 范围内很快降解, 通过计算热降解的失重, 可知 PHAs 的含量。该法测得的 PHB 的含量稍高于 GC 分析的值, 与这一温度范围内其他细胞组份的降解有关。这一方法在定量分析上与 GC 法相比, 每个样品只需时 30min, 而且很直观地得到 PHB 的含量, 需要的样品少, 样品的重复性好。尤其当 PHB 含量高时, 细胞组份降解的影响可以忽略, 准确度更高。由于 PHAs 以一种公认的六员环酯解过程进行热分解, 所以不同类型的 PHAs 不能从热失重图上区别出来, 是该方法的缺陷, 但这对于多组份的杂聚 PHAs 来说, 恰恰是一种方便快速地获得 PHAs 含量的有效方法, 不必经过 GC 分析, 分别由各种单体的标准曲线计算单体的含量, 然后求和。对于一个已知单体组成而只需了解其总量变化 (尤其是发酵生产控制) 的过程是更方便的。然而, 若需较准确了解聚合物中每个单体的变化, 最好还是采用 GC 法。

9 流式细胞光度和荧光分光光度法 (Flow cytometry and spectrofluorometry)^[8]

流式细胞光度法是一种测定细胞组份及细胞大小的方法, 细胞按流动的方向排列, 垂直于细胞流动方向的激光照射在几个微米的直径范围, 激光和细胞之间的相互作用通过一个光电倍增管检测出来, 这种信号可以通过荧光或散射光的记录检测出细胞内某一物质的量。研究发现, *Ralstonia eutrophus* 的 PHB 颗粒对光的散射可作为流式细胞光度法测定 PHB 含量的基础。

可产生荧光的物质,其量可以通过其荧光强度反映出来。这是荧光分光光度法的原理,光强度与激发光谱和发射光谱的比例有关,该法用于 *R. eutrophus* 的 PHB 检测,是以尼耐尔红作为产生荧光的物质,PHB 颗粒被尼耐尔红染色后发出荧光,其激发波长为 543nm,发射波长为 598nm。

Degelau 等(1995)用这两种方法测定了批次发酵过程中 *R. eutrophus* 所产的 PHB,其结果与常规 GC 法测得的结果相仿,相关系数为 0.978(流式细胞光度法)和 0.977(荧光光度法),这两种方法的优点是:(1)能快速获得 PHB 的含量(只需约 30min,而 GC 法需要至少 1d);(2)所需样品量少(只需 1mL,而 GC 需要至少 10mL),(3)省去了费时费力的繁琐的样品制备过程。但由于尼耐尔蓝染色法存在灵敏度不高的缺陷,尼耐尔蓝对 PHB 着色效果较好,而对中链 PHAs 的着色不灵敏,它对于其他类型的 PHAs 是否同样有效还有待研究。

10 傅立叶变换红外光谱技术

红外光谱技术在细菌 PHAs 的研究中,多用于研究抽提到细胞外的 PHAs 的结构。而细菌细胞的红外吸收特征早在 50 年代就被用于细菌的分类鉴定,作为细菌分类的一项指标。指出傅立叶变换红外技术的高分辨率、高信噪比及其与计算机的数据处理结合,可以使细菌分类达到株、型、亚型的水平^[9~12]。

Haynes 等发现芽胞杆菌属的许多细菌在 5.7μ 有一个强吸收,并在 7.6μ 和 8.5μ 处有弱的伴随吸收,这些吸收谱带受培养条件影响很大,在某些条件下,特征吸收不出现。他们从有特征吸收的细胞中得到了氯仿提取物,确认为是 PHB。这是首次报道的从细胞生物学的角度用红外方法直接对细胞进行的 PHB 研究,以后 Szewczyk^[13], Helm^[14]等进一步报道了红外方法对 PHB 的研究。

通过我们的前期研究结果表明^[2], FT-IR 技术可用于在细胞水平上直接对细菌进行定性和半定量的分析。将细菌的平板菌落或液体培养物离心后得到的湿细胞涂在 ZnSe 盐片上,经干燥后,将样品置于傅立叶变换红外光谱仪中,让红外光透过样品,可直接检测出 PHAs 的有无,类型及相对含量。在 FT-IR 图谱上,PHAs 产生与否对应于 1735cm^{-1} 附近谱带的出现与否。3 种类型的 PHAs:(1)短链 PHAs(单体碳原子数 4~6,以 PHB 为代表),(2)中链 PHAs(单体碳原子数 7~16),(3)含短链与中链单体的 PHAs,可以利用 FT-IR 图谱上的不同谱带区别。对于短链 PHAs,除 1735cm^{-1} 附近的谱带外,在 1262cm^{-1} 及 1185cm^{-1} 有伴随谱带出现。而中链 PHAs 则在 1160cm^{-1} 有伴随谱带出现。含短链与中链单体的 PHAs 与上述两类的区别在于:(1) 1735cm^{-1} 附近的谱带位于上述两者之间,(2)在 $3000\sim 2800\text{cm}^{-1}$ 范围与甲基次甲基有关谱带中,出现短链和中链 PHAs 的所有谱带。PHAs 在细胞内的相对含量可以通过 1735cm^{-1} 附近 C=O 谱带与 1650cm^{-1} 酰 I 带的面积比计算。我们应用这一方法从野生转基因和重组菌中筛选 PHA 合成菌,并对发酵过程 PHA 的合成的相对量进行检测^[2,15]。这些研究结果表明,FT-IR 技术可用于细菌 PHAs 产生菌的快速筛选和鉴别以及 PHAs 生产的快速在线监控。由于在试验过程中,没有可固定样品量的附件,尚不能达到定量分析的水平,需要进一步改进。

自 PHB 在细菌细胞中被发现以来,PHAs 的类型及合成菌的数目在不断增加,研究 PHAs 的方法随着分析手段的进步也在不断更新。比较上述各种方法,可以发(下转 59 页)

现后续的方法都是建立在前期方法的基础上, 并受一些基本的原理指导。

参 考 文 献

- [1] Steinbuechel A. Biomaterials: novel materials from biological sources. Stockon, New York. 1991, 124 ~ 213.
- [2] Hong K, Sun S Q, Chen G Q. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51 (4): 523 ~ 563.
- [3] Comeau Y, Hall K J, Oldham W K. Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 2325 ~ 2327.
- [4] Kato M, Bao H J, Doi Y, *et al.* Appl. Microbiol Biotechnol, 1996, 45: 363 ~ 370.
- [5] Huiberts G N M, De Rijk T C, Eggink G, *et al.* J Bacteriol, 1994, 176: 1661 ~ 1666.
- [6] Curley J M, Lenz R W, Fuller R C, *et al.* Polymer, 1997, 38: 5313 ~ 5319.
- [7] Hahn S K, Chang Y K. Biotechnology Techniques, 1995, 9: 873 ~ 878.
- [8] Degelau A, Scheper T, Bailey H c, *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol, 1995, 42: 653 ~ 657.
- [9] Naumann D, Fijala V, Giesbrecht P, *et al.* J. Mol. Struct. 1988, 174: 165 ~ 170.
- [10] Naumann D, Helm D, Labischinski H. Nature, 1991, 351: 81 ~ 82.
- [11] Naumann D, Helm D, Labischinski H, *et al.* Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis (Nelson W H ed.), VCH Publishers, New York, 1991, 43 ~ 96.
- [12] Naumann D, Keller S, Helm D, *et al.* J. Mol. Struct, 1995, 347: 399 ~ 406.
- [13] Zewczyk C, Mikuki, J. FEMS Microbiol. Lett. 1989, 61: 279 ~ 284.
- [14] Helm D, Naumann D. FcMS Microbiol. Lett. 1995, 126: 75 ~ 80.
- [15] Hong K, Leung Y C, Yu P H F, *et al.* Appl Biochem Biotechnol, 2000, 84 ~ 86, 380 ~ 381.