

## 羟基脂肪酸聚酯制备与热性质研究

王 武 李礼尧 陈 玲 李永娟

(无锡轻工大学 无锡 214036)

**摘 要** 不同的碳源条件下,真养产碱杆菌可在胞内积累聚羟丁酸(PHB)或含羟基戊酸单体(HV)比例不等的聚羟丁戊酸共聚物(PHBV)。利用次氯酸钠-氯仿混合液体系提取上述羟基脂肪酸聚酯(PHA),提取率为 85%,纯度达 97.0%。以差示扫描热分析法对 PHB 和 PHBV 材料进行热性质研究,发现材料中的 HV 组分逐渐增加,材料的熔点  $T_m$ , 熔化焓  $H_m$  逐渐下降,热分解峰值逐渐向低温区偏移。但含 HV 为 61mol% 的 PHBV 材料有关热性质出现回升现象。

**关键词** 聚羟丁酸,聚羟丁-戊酸共聚物,热性质,真养产碱杆菌

学科分类号 Q939.97

羟基脂肪酸聚酯(PHAs)是一类由微生物胞内合成的热塑性和生物降解性较理想的生物多聚物,其单体成分可以是含 3 个碳至 11 个碳的羟基脂肪酸。1925 年 Lemoigne<sup>[1]</sup> 首先发现了聚羟丁酸(PHB)。70 年代初,发现对 PHB 进行冷冻-蚀刻处理时,PHB 经历一个冷拉过程,得知此类物质具有天然的塑性<sup>[2]</sup>。不过 PHB 的脆性较强,其用途有一定的限制。后来又发现某些微生物在一定条件下可产生羟基丁酸(HB)和羟基戊酸(HV)的无规共聚物(PHBV)<sup>[3]</sup>,共聚物中 HV 的含量不同将导致材料熔点,弹性及强度不同,PHBV 较之 PHB 有更广阔的用途,可用于制作新型生物医用材料,如外科缝线,伤口拉链,人造血管,接骨材料,缓释药物载体等。

本文着重对 PHB 和含 HV 摩尔比不等的 PHBV 材料的生物合成、提取、鉴别、以及 HV 组分的变化对材料热性质的影响进行了研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种与培养

1.1.1 菌种:真养产碱杆菌(*Alcaligenes entrophus*)日本大阪大学惠赠。

1.1.2 培养基 A(g/L):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.9,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01, 柠檬酸亚铁铵 0.06, 硫胺 1.5, 葡萄糖 2.0 或有机酸 1.5, pH7.5。培养基 B(g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 10, 牛肉浸膏 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5, pH7.5

1.1.3 培养方法:用斜面接种三角瓶(30ml 培养基 B), 30℃ 回转式摇荡培养 24h 后,以 10% 种量接入培养基 A 中,定时流加碳源。

国家自然科学基金会和燕山石化公司资助项目。

收稿日期:1997-04-10, 修回日期:1997-04-10。

## 1.2 提取与测定

1.2.1 两相混合液提取法：在氯仿和不同浓度的次氯酸钠水溶液(pH 10)中加入细胞，混匀，于 30℃ 提取，离心，取氯仿相得 PHAs。

1.2.2 粘均分子量测定：参考文献[4]

1.2.3 紫外分光光度法测定 PHB：定量吸取含 5~50 $\mu$ g PHB 氯仿溶液，蒸去氯仿，加 10ml 硫酸，100℃ 反应 10min，冷至室温，在波长 235nm 下紫外测定。

1.2.4 气相色谱法测定 PHBV：色谱柱 OV-17，检测器 FID，温度 22℃。

1.2.5 PHB 和 PHBV<sup>13</sup>C 核磁共振分析法：以氘代氯仿(CDCl<sub>3</sub>)为溶剂，制成 5% 样品溶液，25℃，脉冲重复时间 3s。

## 1.3 热性质分析法

PHB 和 PHBV 的熔点，熔化焓，热分析行为以差示扫描分析仪 DSC7 进行分析，以标准物钢校准基线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚羟丁酸和聚羟丁戊酸的生物合成

同一种真养产碱杆菌可以在不同的条件下生物合成 PHB 或 PHBV，特别是以有机酸作为碳源的菌株，在含偶数碳原子如丁酸培养基中，可将丁酸先转化为羟基丁酸，再以其为单体聚合成聚羟丁酸<sup>[5]</sup>。倘若培养基中存在奇数碳有机酸，如戊酸，丙酸等，该菌株可将奇数碳有机酸转化为羟基戊酸和羟基丁酸，后经胞内聚酯酶聚合成为聚羟丁戊酸的无规共聚物<sup>[6]</sup>。

为了获得一系列含 HV 组分不等的 PHBV 材料，以不同的丁酸/戊酸比调整培养基中的碳源，以两步法培养真养产碱杆菌，发现 PHVB 中 HV 摩尔百分比最高达到 35%，此时培养基中已不含丁酸，再以戊酸为唯一碳源，提高戊酸流加密度 8h/次，条件优化后，所获 PHBV 中 HV 含量最高可达到 61mol% (表 1)。另一种真养产碱杆菌以戊酸为唯一碳源时，细胞内可积累 HV 组分达 95% 的 PHBV。培养条件和时间的差别，可能影响 PHBV 中 HV 组分的含量比<sup>[7]</sup>。

### 2.2 聚羟丁酸和聚羟丁戊酸提取和鉴别

2.2.1 两相混合法提取 PHB 和 PHBV：利用次氯酸钠可消化细胞，降低粘度及漂白作用，和氯仿的萃取及保护 DNA 免受降解的作用，将二者配成混合液，提取胞内 PHA。分别研究了次氯酸钠溶液浓度，氯仿：水相比率，以及提取时间对胞内 PHA 提取率的影响。发现当次氯酸钠溶液浓度达 30%，氯仿：水相为 1:1，作用时间为 100min 时，提取率为最高达到 85%。所得到的 PHB 和 PHBV 经氯仿进一步提取后，纯度可达 97% 以上。

表 1 不同的有机酸底物对 PHBV 合成的影响

Table 1 Effects of different organic acid substances on PHBV synthesis

Butyric acid/Valeric acid	HV mol% in PHBV
2.0	19
1.0	26
0.5	31
0.0	35
0.0*	61

\* Valeric acid was fed in 0.3% of the fermentation broth every 8h.

以粘均分子量为  $6 \times 10^5$  的 PHB 作

为对照,比较了30%次氯酸钠溶液提取和两相混合液提取对PHB粘均分子量的影响,发现在处理的前60min内,在2种方法的情况下,粘均分子量都发生明显下降,60min后趋于稳定,但是,前一种方法可使粘均分子量下降至 $2 \times 10^5$ ,而后一种方法则可使粘均分子量保持在 $4 \times 10^5$ 左右,两相混合液提取法可起到缓和PHA分子量下降的作用。

**2.2.2 核磁共振法鉴别 PHB 和 PHBV:**除了可利用紫外分光光度法定量分析 PHB,气相色谱法定量分析 PHB 和 PHBV 外,利用高分辨 $^{13}\text{C}$ 核磁共振波谱法(NMR)可以鉴别这类化合物的单体基团的构成,可以验证纯度,还可对 PHBV 中的 HV 组分定量分析。

以上述方法提取得到的 PHB 和 PHBV 材料与美国 ALDRICH 公司的标准样品进行了 NMR 测试比较。所获样品与标准样的各基团峰的化学位移相同,波谱完全相同,确定其分别为 PHB 和 PHBV,且纯度相当于标准样(图 1 和表 2)。PHBV 中除了含有 HB 还有 HV,PHB 和 PHBV 的波谱解析见图 1 和表 2,较之 PHB,PHBV 中应多出 HV 的 5 个基团峰。

从图 1 和表 2 中可看出,PHBV 中的 HB 的各基团峰位移与 PHB 的相同,HV 单体只显出 4 个峰的原因是,HV 的羰基峰几乎与 HB 的重合(化学位移分别为 169.3 和 169.5)。HV 中 R 基因  $4\text{-CH}_2$ (箭头处)峰面积与 HV 单体的含量存在定量关系,有标准样对照的情况下,可定量测定 PHBV 样品中 HV 单体的摩尔比。图 1 显示出本研究所获的 HV 含量最低和最高的 2 种 PHBV 样品分别含 HV 单体为 17mol% 和 61mol%,且均不含杂质。

### 2.3 聚羟丁酸和聚羟丁戊酸的热性质研究

生物合成高分子材料加工成型和应用中,材料的热性质是非常重要的参数。PHB 和含 HV 组分不等的 PHBV 材料可因单体构成不同和分子量不同,而呈现出热性质的不同。利用差示扫描热分析法(DSC)对 PHB 和系列 PHBV 材料的热熔性质和热分解行为进行研究。

**2.3.1 热熔性质的比较:**制备 PHB 的材料和含 HV 摩尔比分别为 19, 26, 31, 35 和 61 的 PHBV 材料经 DSC 法分析后,得到一系列的熔点  $T_m$  和熔化焓  $\Delta H_m$  数据。PHA 这类半晶多聚物的熔点  $T_m$  实际上是多聚物中晶态与液相组分处于平衡状态的温度。测得的 6 种 PHA 材料的  $T_m$  和  $\Delta H_m$  数值列于表 3。

从表 3 中看出,随 PHBV 中 HV 组分的增加,材料的熔点和热化焓迅速下降,HV 含量由 0 增至 35mol%,熔点下降了  $99^\circ\text{C}$ ,熔化焓仅为 PHV 的 24%,说明单体组分对聚合物的熔化性质影响很大。上述现象的出现可能是因为 PHBV 多聚物中 HV 组分以无序形式与 HB 单体相连接,PHB 主晶阵随着 HV 单体的随机插入,打破了原有的对称性和规整性,无定形微区域的不断增加,材料达到晶态与液相平衡所需能量逐渐减小。当 HV 组

表 2 PHBV 的核磁共振波谱解析

Table 2 PHBV NMR profile analysis

Chemical shift/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Related radicals
169.5	C=O (HV)
169.3	C=O (HB)
Triple peaks around 80	$\text{CDCl}_3$
72.2	CH (HV)
67.9	CH (HB)
41.1	$\text{CH}_2$ (HB)
39.1	2- $\text{CH}_2$ (HV)
27.1	4- $\text{CH}_2$ (HV)
20.0	$\text{CH}_3$ (HB)
9.5	$\text{CH}_3$ (HV)

Chemical shift from 169.5 to 9.5 related to the peaks from left to right in the samples of b, c and d in Fig. 1

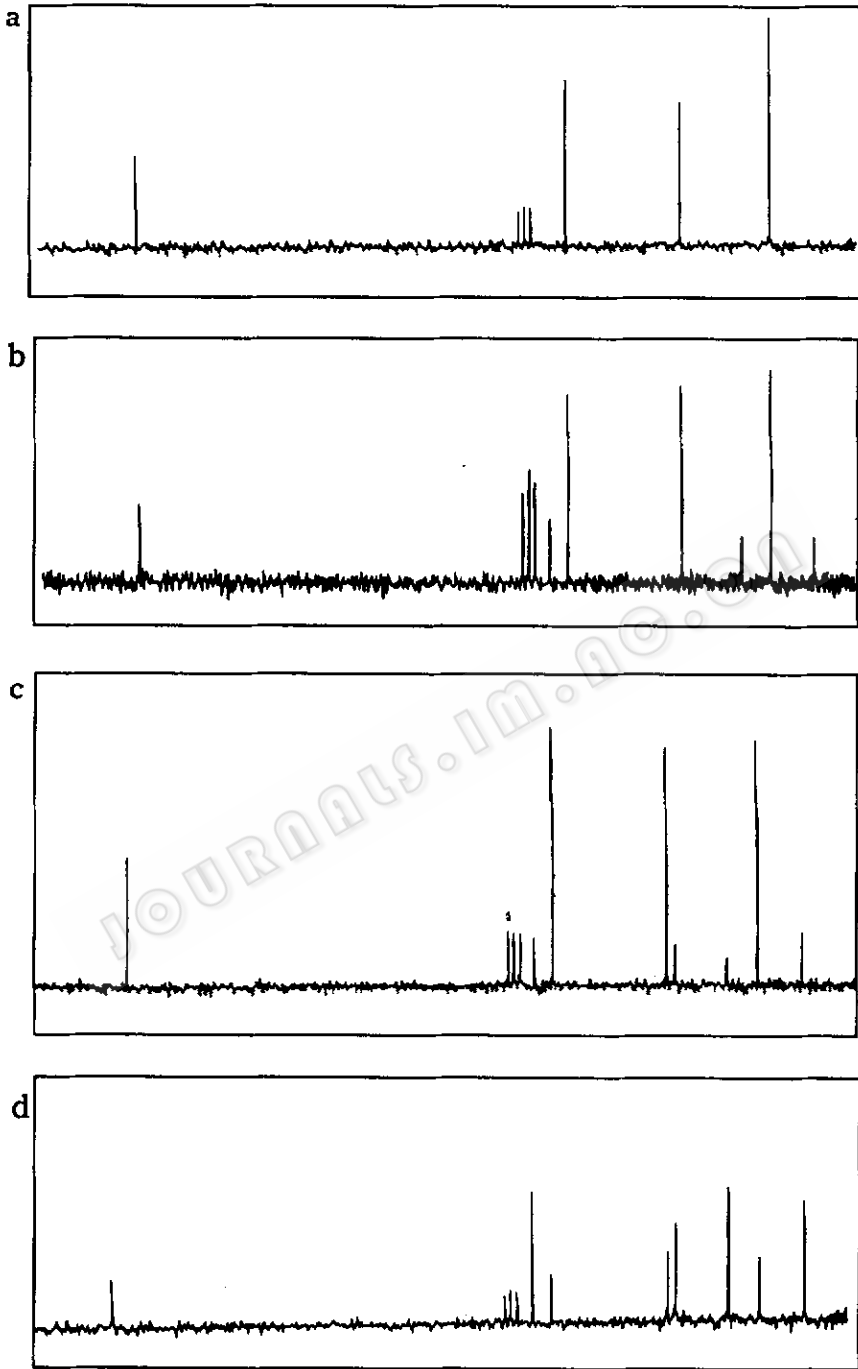


图 1 PHB 和 PHBV 的 NMR 波谱图

Fig. 1 <sup>13</sup>C-NMR profile of PHB and PHBV

- a) PHB sample
- b) PHBV standard (HV 24 mol%)
- c) Extracted PHBV (HV 17 mol%)
- d) Extracted PHBV (HV 61 mol%)

分增加至与 HB 相等的程度,可能其熔点和熔化焓值降至最低程度。可惜本研究未能获得 HV 和 HB 组分正好各占一半的 PHBV 材料,但 HV 组分为 61mol% 的 PHBV 的  $T_m$  和  $\Delta H_m$  值的反弹现象已表明多聚物中有序状态转而加强,聚合物转而以 HV 为主晶阵。

**2.3.2 热分解行为:** 已有研究表明<sup>[8]</sup>PHB 和 PHBV 材料在 200℃ 以上受热不稳定,开始断链分解。为考察和比较 PHB 和 PHBV 的热分解行为,将所制备的 6 种材料置于高温区进行 DSC 扫描,从 DSC 图谱分析得到各种材料的两个热分解峰值列于表 4。从表中可以看出各种材料的热分解峰值皆不相同,范围介于 200~400℃ 之间,每种材料均有两个峰值(图略)。这启示着这类材料的热分解皆经历两个阶段,第一阶段可能发生了晶区破坏,有序转为无序,同时聚酯分子中酯键开始断裂。另外,上述 6 种材料的 DSC 图谱中第二热分解峰面积和峰高皆大于第一热分解峰,这意味着热分解第二阶段发生了高分子的断裂片段的进一步分解需要吸收更多的能量。

表 3 PHB 和 PHBV 的熔点和熔化焓

Table 3 Melting point and heat enthalpy of PHB and PHBV

HV content/mol%	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta H_m/\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$
0	181	86.52
19	148	33.78
26	126	28.84
31	105	24.72
35	82	20.63
61	100	30.90

表 4 PHB 和 PHBV 的热分解行为

Table 4 Heat decomposition of PHB and PHBV

HV content/mol%	1st peak value/ $^\circ\text{C}$	2nd peak value/ $^\circ\text{C}$
0	267	355
19	258	322
26	246	293
31	221	285
35	212	271
61	284	297

比较各种材料的两个热分解峰值之差,可以得知 PHB 热分解峰值之差为 88℃,随着 PHBV 中 HV 组分的增加,峰值差越来越小。当 HV 组分达 61mol% 时峰值差,仅为 13℃,且两个吸热峰面积和峰高差异很小,这可能说明以 HB 为主晶阵的材料,其热分解两个阶段过渡期相对较长。

观察 6 种材料热分解第一峰值变化趋势还可看出, HV 组分由 0 增至 35% 的变化中,峰值从 267℃ 逐步降至 212℃,同样可说明 HV 的插入造成无序性增强而导致热分解温度下降。HV 组分上升至 61mol%,其峰值上升至 284℃,这可理解为材料中 HV 主晶阵的形成使无序性复为有序,导致热分解温度的回升。关于热分解第二峰值的变化也存在着类似的规律,目前尚未能作出令人信服的解释,有待对分解产物进行系列的分析,才能进一步推测。

## 参 考 文 献

- 1 Lemoigne M. Ann Inst Pasteur, 1925, 39:144
- 2 Dunlop W F. J Bacterial, 1973, 114:1271
- 3 Wallen L L. Environ Sci Technol, 1974;8:576
- 4 Berger E. Biotech Techniques, 1989, 3:(4):227
- 5 Jackson F A. J Gen Microbiol 1976, 97:303

- 6 石原义幸. *Alcaligenes Eutrophus* にする生分解共重合高分子の生産, 平成 4 年度特別研究, 大阪大学工学部発酵工学科管研究室, 1993
- 7 Masao K. *Macromolecules*, 1989, **22**:694
- 8 Kunioka M. *Macromolecules*, 1990; **23**:1933

## Polyhydroxyalkanoates Preparation and Thermo Properties

Wang Wu Li Liyao Chen Ling Li Yongxian

(*Wuxi University of Light Industry Jiangsu, Wuxi 214036*)

**Abstract** *Alkaligenes eutrophus* could produce polyhydroxybutyrate (PHB) or polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) containing different ratio of hydroxybutyrate (HB)/hydrovalerate (HV). The polyhydroxyalkanoates(PHA) were extracted by hypochlorite-chloroform mixture with the recovery rate of 85% and purity of 97.0%. The thermoproperties of the prepared PHB and PHBV materials were studied with the method of Differential Scanning Calorimetry (DSC). It was found that with gradual increasing of the ratio of HV/HB in PHBV to 35 mol%, the melting points, melting enthalpy and the heat decomposition peak values of the materials gradually dropped. But the values of the above thermoproperties of PHBV containing HV component of 61mol% go up again.

**Key words** Polyhydroxybutyrate, polyhydroxybutyrate-co-valerate, thermoproperties, *alkaligenes eutrophus*