

⑮ 82-85

TQ929      TQ324.9

# 真养产碱杆菌的化学破胞过程\*

陈银广 陈坚<sup>✓</sup> 余彩荣 堵国成 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室, 无锡 214036)

关键词 真养产碱杆菌 化学破胞 破胞剂 作用 过程

## 1 引言

PHB

近年来, 利用真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)生产生物可降解高分子聚 $\beta$ -羟基丁酸酯(*poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB*)的研究已引起人们的极大兴趣, 其中出现了很多破碎真养产碱杆菌的技术<sup>[1]</sup>。前人研究了机械法破碎真养产碱杆菌过程中的蛋白质及 DNA 释放规律<sup>[2]</sup>, 但对于化学破胞过程的研究, 尚未见报道。

本文将首先研究用表面活性剂-络合剂水溶液破胞真养产碱杆菌<sup>[3]</sup>过程中破胞剂各组分单独或同时存在时对破胞的影响, 然后对破胞过程中的蛋白质和 DNA 的释放规律进行研究, 以期得到蛋白质和 DNA 释放的初步规律。

## 2 细胞破胞及其测定

### 2.1 材料

培养基及培养方法: 见本研究室发表的论文<sup>[4]</sup>。菌种为 *A.eutrophus* WSH3。

含有 PHB 的菌体在培养结束后, 经离心(2500rpm, 15min)、去离子水洗涤、冷冻干燥后保存于-4℃的冰箱中。菌体中 PHB 的含量为菌体干重的 70%。

化学试剂: 各种试剂都为分析纯, 水为二次去离子水。

### 2.2 细胞破胞

最佳条件下的破胞: 1.2 克表面活性剂和 0.8 克络合剂溶于 500 毫升的去离子水中, 用 NaOH 调 pH 至 13。向其中加入 10 克菌体, 在恒温 50℃及恒速 1000rpm 下搅拌。定时取样并在 10000rpm 下离心 15 分钟后, 取上清液测定可溶性蛋白及 DNA 的含量。

单个试剂或混合试剂作用下的破胞: 只加入被考察的试剂, 其它条件同上。

### 2.3 分析方法

蛋白质含量测定: Folin-酚法<sup>[5]</sup>。

DNA 含量测定: 二苯胺显色法<sup>[6]</sup>。

1997-09-04 收到初稿, 1998-02-17 收到修改稿。

联系人 陈坚, 第一作者 陈银广, 男, 28 岁, 博士生。

\* 轻工总会科技基金项目, 国家自然科学基金项目。

为消除较高温度及 pH 对蛋白质及 DNA 测定的影响, 标准曲线的测定是在相应提取条件下进行的, 其中选用酪蛋白为标准蛋白。最大蛋白质和 DNA 释放量的测定是在最佳提取条件下进行, 只是选用 pH 为 14(在此条件下破胞较完全<sup>[3]</sup>)。

### 3 结果与讨论

对于真养产碱杆菌的破胞, 研究者们习惯采用测定可溶性蛋白或 DNA 的释放作为细胞破碎的量度<sup>[2, 7]</sup>, 因为这样的测定比较方便。有文献报道<sup>[2]</sup>, 用机械破胞法从真养产碱杆菌提取 PHB 的过程中, 较小程度的破胞就能促使胞内蛋白的释放, 而 DNA 的释放需要较深程度的细胞破裂, PHB 的释放一般介于两者之间。因此, 本研究采用测定可溶性蛋白和 DNA 在细胞破碎过程中的释放量来了解破胞过程的进展。

#### 3.1 破胞剂的作用

由于破胞剂含有多个组分, 有必要先研究每个组分的单独作用对蛋白质及 DNA 释放的影响, 结果如图 1 和图 2 所示。由图 1 和图 2 可以初步得出结论, 碱或碱性条件是使真养产碱杆菌破胞的必要条件。

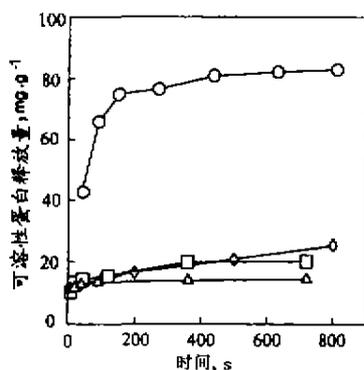


图 1 各组分的单独作用对蛋白质释放的影响  
Fig. 1 Effect of each reagent on the released protein

○—pH13      ◇—表面活性剂  
□—络合剂      △—空白实验

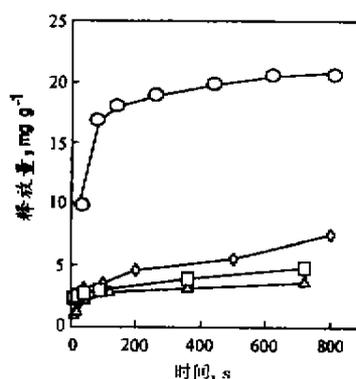


图 2 各组分的单独作用对 DNA 释放的影响  
Fig. 2 Effect of each reagent on the released DNA

○—pH13      ◇—表面活性剂  
□—络合剂      △—空白实验

图 3、图 4 是破胞剂各组分共同作用对胞内蛋白质和 DNA 释放的影响。显然, 即使表面活性剂和络合剂同时存在, 它们也不能成为细胞破碎的主要因素。然而, 络合剂或表面活性剂的加入, 都能促进胞内物质的释放。

真养产碱杆菌属于革兰氏阴性细菌, 细胞的结构一般包括细胞壁、细胞膜及内含物(包括积累产生的 PHB)等。要使胞内物质释放, 首先必须破坏细胞壁, 而这要比细胞膜的破碎难得多, 即细胞壁破碎是速率控制步骤。作者认为, 在碱性条件下细胞壁中的蛋白质、脂多糖等可发生水解、皂化等反应(通常这些反应的速度都较快), 而表面活性剂和络合剂由于不能促使上述反应发生, 所以它们在破胞过程中所起的作用远不如碱强。另一方面, 革兰氏阴性菌的外层膜结构通常靠二价阳离子  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  结合脂多糖和蛋白质来维持。络合剂的加入能与  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  发生螯合反应, 大量脂多糖分子将脱落, 外层膜出现洞穴, 细胞膜通透性增加, 这必然有助于细胞的破裂。同时, 同于选用的表面活性剂对疏水性物质具有较强的亲和力及一些特殊的功能<sup>[3]</sup>, 能结合

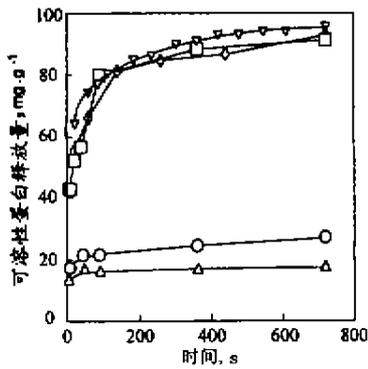


图3 各组分的共同作用对蛋白质释放的影响

Fig. 3 Simultaneous effect of reagent on the released protein

○-表面活性+ Ph13      □-络合剂+pH13  
 ○-表面活性+络合剂      △-空白实验  
 ▽-表面活性+络合剂+Ph13

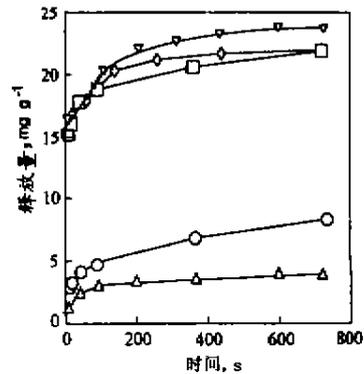


图4 各组分的共同作用对DNA释放的影响

Fig. 4 Simultaneous effect of reagent on the released DNA

○-表面活性+ Ph13      □-络合剂+pH13  
 ○-表面活性+络合剂      △-空白实验  
 ▽-表面活性+络合剂+Ph13

并使细胞破碎后产生的非 PHB 的细胞物质增溶或溶解在水溶液中。因而，表面活性剂及络合剂对细胞的破碎都起一定的辅助作用。

根据上述的研究结果，将破胞过程中的各种试剂的作用归纳到表 1 中。

表 1 破胞剂的各个组分在破胞过程中所起的作用  
 Table 1 Roles of each reagent involved in the cell disruption

试剂	作用
碱	蛋白质、脂多糖等水解、皂化
络合剂	螯合钙、镁离子
表面活性剂	增溶非 PHB 的细胞物质等功能
水	PHB 沉淀，非 PHB 的细胞物质溶解

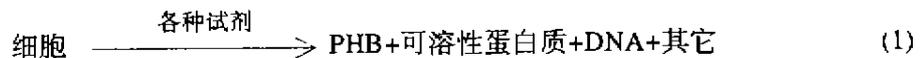
### 3.2 破胞过程中蛋白质及 DNA 释放规律的初步研究

在最佳破胞条件下，测得蛋白质及 DNA 释放数据如表 2。

表 2 蛋白质和 DNA 释放量的数据  
 Table 2 Data of released protein and DNA

<i>t</i> , min	0.2	0.5	1	1.5	2	3	4
<i>R</i> , g·g <sup>-1</sup>	0.0556	0.0645	0.0735	0.0768	0.0795	0.0847	0.0868
<i>D</i> , g·g <sup>-1</sup>	0.014	0.0168	0.0184	0.0198	0.0204	0.0213	0.0218
<i>t</i> , min	5	6	7	8	9	10	
<i>R</i> , g·g <sup>-1</sup>	0.0886	0.0894	0.0901	0.0917	0.0934	0.0945	
<i>D</i> , g·g <sup>-1</sup>	0.0226	0.0230	0.0233	0.0235	0.0237	0.0238	

设破胞方程为：



假设可溶性蛋白质释放的方程为：

$$\frac{dR}{dt} = k_R (R_m - R)^\alpha \quad (2)$$

将式(2)线性处理，由直线斜率和截距求得反应级数 $\alpha$ 和常数 $k_R$ ，得到的 $R-t$ 关系如下：

在时间 0.2~7 分钟： $\ln(dR/dt) = 0.892 + 1.430 \ln(R_m - R)$  (相关系数  $r^2 = 0.978$ )；

在时间 7~10 分钟： $\ln(dR/dt) = -5.272 + 0.216 \ln(R_m - R)$  ( $r^2 = 0.993$ )。

按上述同样的方法进行处理，可得到 DNA 释放量随时间的变化规律：

在时间 0.2~2 分钟内:  $\ln(dD/dt)=5.379+2.227\ln(D_m-D)$  ( $r^2=0.998$ );

在时间 2~10 分钟内:  $\ln(dD/dt)=-1.496+0.964\ln(D_m-D)$  ( $r^2=0.994$ )。

相关系数在 0.97 以上,表明上述的数学拟合是有意义的。这就为进一步开展真养产碱杆菌化学破胞动力学的研究工作提供了参考。

## 4 结 论

1. 化学破胞真养产碱杆菌提取 PHB 的过程中,破胞剂各组分所起作用的强弱不同。碱对细胞的破碎起主要作用,表面活性剂和络合剂起重要的辅助作用。

2. 破胞剂各组分所起的作用是由细菌细胞的结构特点决定的。碱的作用是使细胞壁中的蛋白质、脂多糖等发生水解、皂化等反应;络合剂能螯合细胞膜上的钙、镁离子;表面活性剂具有增溶非 PHB 的细胞物质等功能。

3. 真养产碱杆菌化学破胞过程中的蛋白质及 DNA 释放量随时间的变化关系能够较好地用一个比较简单的数学关系式进行拟合。

### 符 号 说 明

$t$ — 破胞时间, min	$D_m$ — DNA 最大释放量,即 0.0249g/g 干菌体
$R$ — 可溶性蛋白质释放量, g/g 干菌体	$k_r$ — 常数
$D$ — DNA 释放量, g/g 干菌体	$\alpha$ — 反应级数
$R_m$ — 最大可溶性蛋白质释放量,即 0.0957g/g 干菌体	

### 参 考 文 献

- 1 陈银广, 陈坚, 堵国成, 伦世仪. 化工进展. 1998, 1: 41~45
- 2 Harrison S T L, Chase H A, Dennis J S. Bioseparation, 1991, 2: 155~166
- 3 陈坚, 陈银广, 伦世仪. 1997, 专利申请号 97 1 06977.8, 公开号 CN 1171410A, 1998
- 4 堵国成, 陈坚, 尹洪波等. 应用与环境生物学报. 1997, 3(4): 371~374
- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Tarr A L, Randall R J. J Biol Chem, 1951, 193: 265~275
- 6 Burton K. Methods in Enzymology, 1968, 12B: 163~166
- 7 Harrison S T L, Dennis J S, Chase H A. Bioseparation, 1991, 2: 95~105

## Chemical Disruption Process of *Alcaligenes eutrophus*

Chen Yinguang Chen Jian Yu Cairong Du Guocheng Lun Shiyi  
(Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology,  
Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**ABSTRACT** Based on the assay of the released protein and DNA from the cell, the function of each reagent involved in the disruption of *Alcaligenes eutrophus* using the surfactant-chelant aqueous solution method was investigated. It was found that the alkaline condition was most important for the breakage of cell wall and surfactant and chelant could aid to the disruption of the bacteria. The released pattern of protein and DNA was primarily studied.

**Key words** *A.eutrophus*, Chemical disruption, Reagent, Function, Process