

参赛队员姓名：孙大桐

中学：复旦大学附属复兴中学

省份：上海市

国家/地区：中国

指导教师姓名：李源

指导教师单位：复旦大学附属复兴中学

论文题目：《生物基材料聚- β -羟基丁酸的生物合成研究》

2025 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2025丘成桐中学科学奖公示

生物基材料聚- β -羟基丁酸的生物合成研究

孙大桐

复旦大学附属复兴中学高一（1）班

摘要：全球石化产业的迅猛发展，推动了化学合成塑料的规模化生产，广泛渗透至工业制造与日常生活的诸多方面。然而，这类材料在自然环境中难以降解，导致严重的“白色污染”问题，对生态环境造成了持久性危害。传统的塑料处理方式（如填埋和焚烧）不仅资源利用率低，还会加剧环境污染和温室气体排放。“白色污染”的持续加剧对环境构成了严重威胁，因而，寻求传统塑料的替代品已成为一项紧迫的科研使命。鉴于此，由微生物所产生的聚- β -羟基丁酸（PHB）作为一种理想的生物可降解材料，因其优异的生物相容性及在自然环境中可完全分解的特性，被视为解决这一难题的新途径。本研究系统探究了 PHB 的生物合成路径，包括利用 SnapGene 软件进行分子设计、PCR 扩增、Gibson 组装、质粒转化及测序等关键菌株构建步骤，本研究对 PHB 的发酵工艺参数与气相色谱（GC）检测流程进行了系统优化。结果表明，优化后的发酵条件有效促进了 PHB 的规模化合成，其产量得以显著提升。此外，本研究还对 PHB 材料的性能进行了全面表征，并对其注塑制品的降解行为进行了测试，本研究进一步佐证了 PHB 作为一种绿色材料，其应用潜力巨大，且发展前景符合可持续发展理念。

关键词：聚- β -羟基丁酸（PHB）；生物合成；菌株构建；生物可降解材料

目 录

1 引言	1
1.1 课题背景与意义	1
1.2 国内外研究现状	1
2 PHB 生物合成方法	2
2.1 主要实验设备及试剂	2
2.2 PHB 生物合成的分子设计	2
2.2.1 分子设计的理论基础	2
2.2.2 启动子的选择策略	3
2.2.3 操纵子调控系统	3
2.2.4 分子设计辅助工具	3
2.3 菌株构建	3
2.3.1 片段扩增	3
2.3.2 琼脂糖凝胶电泳（回收片段）	5
2.3.3 Gibson 组装	5
2.3.4 质粒转化（化学转化）	5
2.3.5 转化子验证（菌落 PCR）	6
2.4 发酵方法	6
2.5 PHB 的 GC 检测	7
2.5.1 GC 检测原理	7
2.5.2 样品制备	7
2.6 注塑力学测试	8
3 结果	9
3.1 分子设计结果	9
3.2 实验结果	11
3.2.1 琼脂糖凝胶电泳实验结果	11
3.2.2 Gibson 组装产物的质粒转化结果	11
3.2.3 菌落 PCR 结果	12
3.3 工程菌株的发酵检测结果	13
3.4 实验评价	15
3.4.1 PHB 性能表征	15
3.4.2 PHA 注塑实物展示	17
3.4.3 PHA 制品降解测试	17
3.4.4 注塑力学测试结果	18
4 总结	20

5 收获与成长.....	20
6 致谢	21
7 参考文献.....	22

2025 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2025丘成桐中学科学奖论文公示

1 引言

1.1 课题背景与意义

在全球工业化快速发展的背景下，石油基合成塑料因其优异的可塑性、耐用性和低成本特性，其应用范围覆盖了从日常消费到高端制造的方方面面，已成为包装、纺织、医疗与工业制造等行业的重要基础材料。然而，这类材料的化学稳定性使其在自然环境中难以降解，导致“白色污染”问题日益严峻。废弃塑料在环境中长期积累，不仅破坏土壤结构、污染水体，还会被野生动物误食，进而威胁整个生态系统的平衡。目前，传统的塑料常用的处理方式存在明显不合理之处，填埋法占用大量土地资源并降低土壤活性，而焚烧过程则释放温室气体和有毒物质，加剧气候变化和环境污染。因此，开发可自然降解的环保型材料已成为当前材料科学和可持续发展领域的重要研究方向。

聚 β -羟基丁酸（PHB）属于微生物来源的天然聚酯类物质，具备良好的生物相容能力，并可在自然条件下被微生物完全降解，最终产物为水和二氧化碳，因此被认为是替代传统石油基塑料的潜在环保材料。随着合成生物学与代谢工程领域的技术进步，借助菌种改良和发酵过程优化，PHB 的生产效率已显著提升，这也推动了其规模化制造与实际应用的进程。

本研究旨在构建高效的 PHB 生物合成体系，通过分子设计、基因工程和发酵工艺优化，提高 PHB 的产量和材料性能，并系统评估其降解特性及应用潜力。该研究不仅为缓解塑料污染问题提供了可行的解决方案，同时也促进了生物技术与材料科学的交叉创新，对推动绿色制造实践与可持续发展战略的实施具有深远的科学意义和实际应用价值。

1.2 国内外研究现状

近年来，随着环境问题的日益严峻和可持续发展理念的深入，PHB 作为一种可完全生物降解的聚酯材料，其生物合成研究受到广泛关注。目前，PHB 的生物合成研究主要集中在碳源拓展、菌种改良、发酵工艺优化以及合成生物学技术应用等方面。

在碳源利用方面，研究者们探索了多种廉价底物作为 PHB 生产的碳源。张世敏等人^[1]以工业副产物甘油为碳源，筛选获得高效 PHB 生产菌株，并优化了发酵条件，为 PHB 的工业化生产提供了可能。Huang 等人^[2]则采用乙酸为碳源，通过响应面法优化了 PHB 合成条件。值得注意的是，Wang 等人^[3]通过基因工程改造大肠杆菌，成功构建了甲醇到 PHB 的直接转化途径，这一创新不仅拓宽了碳源选择范围，还实现了 C1 资源的有效利用。更有突破性的是，N Mohammed 等人^[4]利用甲烷氧化菌实现了从温室气体甲烷到 PHB 的转化，兼具环境效益和经济效益。

在菌种改造领域，研究者已实施多项策略。例如，Ming 等^[5]报道 *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 能够同步利用葡萄糖与木糖合成 PHB，该发现凸显了混合碳源在生物

聚酯合成中的应用可行性。Grivalský 等人^[6]创新性地利用城市污水培养 *Synechocystis* MT_a24 生产 PHB，为废弃物资源化利用提供了新思路。Li 等人^[7]则通过构建 CRISPR-Cas 系统和光传感器耦合的基因回路，实现了 PHB 合成的精准调控，展示了合成生物学技术在材料制备中的强大潜力。

尽管 PHB 生物合成研究已取得显著进展，但仍面临生产成本高、产量不足、材料性能有待优化等挑战。未来，在 CRISPR 等基因编辑工具、代谢工程及人工智能辅助菌种设计技术的共同推动下，PHB 的生物合成过程将实现更高效率、更低成本与更精准调控，进而推动其在包装工业、生物医用材料等领域的大规模应用。

2 PHB 生物合成方法

2.1 主要实验设备及试剂

本研究所使用的主要仪器设备包括：

- (1) 分子生物学设备：PCR 仪，电泳系统，凝胶成像系统。
- (2) 微生物培养设备：恒温培养箱，恒温摇床。
- (3) 材料表征设备：差示扫描量热仪、万能材料试验机、塑料摆锤冲击试验机、熔体流动速率测定仪、色差分析仪；
- (4) 化学分析设备：高效气相色谱仪、凯氏定氮仪；

实验过程中使用的主要试剂包括：

- (1) 分子生物学试剂：卡那霉素、IPTG（异丙基- β -D-硫代半乳糖苷）；
- (2) 微生物培养试剂：LB 培养基

2.2 PHB 生物合成的分子设计

2.2.1 分子设计的理论基础

本研究以分子生物学中心法则（Central Dogma）为理论框架，构建了 PHB 生物合成的分子设计体系。中心法则确立了遗传信息沿 DNA $\rightarrow$ RNA $\rightarrow$ 蛋白质方向传递的核心路径，是指导生物合成过程设计与优化的关键理论基础。在这一理论指导下，本研究建立了完整的 PHB 合成途径分子设计流程：（1）基于 *phbA*、*phbB*、*phbC* 等关键酶基因的序列特征，设计特异性引物进行 PCR 扩增；（2）通过分子克隆技术将目标基因片段构建至表达载体；（3）在宿主菌中实现功能蛋白的表达与验证。该技术路线严格遵循遗传信息的传递规律，为 PHB 的高效合成提供了坚实的理论基础和技术支撑。

2.2.2 启动子的选择策略

启动子是调控基因转录起始的核心序列，其选用对 PHB 的生物合成效率具有决定性影响。本研究从以下维度进行启动子优化设计：

- (1) 基本特性：启动子包含-35 区（TTGACA）和-10 区（TATAAT）等保守序列，为 RNA 聚合酶提供识别与结合位点；
- (2) 表达强度：根据 PHB 合成途径各酶的最适表达水平，选择梯度化启动子；
- (3) 调控特性：采用温度诱导型（pL/pR）或代谢物感应型（cra 突变体）启动子实现 PHB 合成的动态调控。

2.2.3 操纵子调控系统

本研究重点考察了两种典型操纵子系统在 PHB 合成中的应用：

(1) 乳糖操纵子编码了细胞乳糖代谢所需的酶。当乳糖存在于环境中时，其分子可与阻遏蛋白特异性结合，诱导该蛋白发生构象变化并失活，进而解除对启动子的抑制作用。这一调控机制使得 RNA 聚合酶能够顺利结合启动子区域并启动转录过程，最终促使细胞合成分解乳糖所需的相关酶类，从而将乳糖作为碳源以维持其生长。

(2) 阿拉伯糖操纵子能够调节细菌的阿拉伯糖代谢。当环境中缺少阿拉伯糖时，阻遏蛋白会形成二聚体，弯折 DNA 并阻断启动子的表达。然而，当环境中存在阿拉伯糖时，阿拉伯糖会与阻遏蛋白结合，导致其构象改变，从而无法再抑制启动子的表达。这样，细胞就能开始转录并合成阿拉伯糖代谢所需的酶。

通过比较两种系统的诱导效率、成本等因素，为不同应用场景提供最优选择方案。

2.2.4 分子设计辅助工具

本研究采用 SnapGene 进行分子设计验证，该软件具有以下优势：

- (1) 可视化分析：支持质粒图谱的多维度展示（线性/环形视图）；
- (2) 模拟功能：可预测 Gibson 组装等分子克隆结果；
- (3) 序列优化：提供密码子优化、限制酶切位点分析等实用工具。

通过软件模拟，本研究成功构建了含 phaCAB 基因簇的重组质粒，显著提高了实验效率。

2.3 菌株构建

2.3.1 片段扩增

利用 PCR 仪，根据表 1 中的扩增程序对表 2 中的质粒骨架和表 3 中的目的片段进行扩增。

PCR 反应起始于预变性步骤，于 98℃ 条件下持续 10 分钟，该步骤仅执行一次循环，旨在使双链 DNA 彻底解链为单链，为后续扩增提供模板。随后进入包含 30 次循环的扩增

阶段：首先为变性步骤，在 98℃ 下保持 30 秒，使 DNA 双链在每一轮循环中充分解开；继而进入退火步骤，温度降至 55℃ 并维持 30 秒。在此阶段，引物能够特异性地与单链 DNA 模板的互补序列相结合，为后续的 DNA 合成做准备。然后是延伸阶段，温度升高至 72℃ 并保持 1 分钟，此步骤也循环 30 次。

在延伸阶段，耐高温 DNA 聚合酶以引物为起点，沿单链模板催化新生 DNA 链的合成。根据实验参数，该酶合成速率约为 10–15 秒/千碱基 (kb)，因此设定 1 分钟的延伸时间可确保所有目标片段有效扩增。全部循环结束后，反应进入终末延伸步骤，于 72℃ 保温 5 分钟，该步骤仅执行一次，旨在补齐所有未完全合成的 DNA 链，提高扩增产物完整性。这一步骤能够确保所有的 DNA 片段都能充分延伸，避免出现单链缺口。最后进入维持阶段，将温度降至 16℃ 并无限期保持。这一阶段主要是为了稳定保存扩增后的 DNA 产物。

通过上述一系列步骤，实现了对 PHB 片段的高效扩增。

表 1 PCR 仪扩增程序

步骤名称	温度	时间	循环数
预变性	98℃	10min	1 cycle
变性	98℃	30s	30 cycles
退火	55℃	30s	
延伸	72℃	1min	
最终延伸	72℃	5min	1 cycle
维持	16℃	∞	-

表 2 质粒骨架

引物序列	F:CAGCGGCCGCTACTAGTAtcagcccatatgcaggcc
	R:gAGAGTCACACAGGACTACTAtactagatggcgaccggcaa
体外 PCR 扩增体系	2xT5 Mix: 50μL
	引物 F: 4μL
	引物 R: 4μL
	无菌水: 40μL
	模板: 2μL

表 3 目的片段

引物序列	F:ttgccggtcgccatctagtaTAGTAGTCCTGTGTGACTCTc
	R:ggcctgcatatgggctgaTACTAGTAGCGGCCGCTG
体外 PCR 扩增体系	2xT5 Mix: 50μL

	引物 F: 4μL
	引物 R: 4μL
	无菌水: 40μL
	模板: 2μL

2.3.2 琼脂糖凝胶电泳（回收片段）

采用琼脂糖凝胶电泳系统对 PCR 扩增产物进行分析，以评估扩增是否成功。相关电泳参数详见表 4。

表 4 琼脂糖凝胶电泳相关参数

琼脂糖凝胶配制浓度	1%
电泳仪参数设置	电压: 160V 时间: 15min
DNA Marker	5K（指示 DNA 片段大小）
上样量	50μL
验证正确后进行切胶回收；利用胶回收试剂盒将目标 DNA 回收	

2.3.3 Gibson 组装

Gibson 组装法是一种基于同源重组原理的无缝克隆技术。其操作首先需要在目标 DNA 片段的末端引入一段同源序列作为重叠区，随后将这些片段与包含多种酶组分的预混反应体系混合，并在 50°C 条件下孵育约一小时，完成体外重组反应，最终将重组产物转化至感受态细胞中进行后续筛选。

该预混体系中主要包括三类酶活性成分：5'→3'外切酶可对 DNA 末端进行特异性切割，暴露出单链重叠区以促进片段间的同源配对；DNA 聚合酶负责填补配对后可能存在的缺口，确保序列完整性；DNA 连接酶则催化相邻片段间形成磷酸二酯键，最终实现无缝、准确的 DNA 分子拼接。具体的反应体系配置与条件设置参见表 5。

表 5 Gibson 组装相关参数

Gibson 组装体系	配制总量: 10μL 商用 Gibson 组装 Mix: 7μL 载体骨架: 1.5μL 目的片段: 1.5μL
组装条件	50°C, 1h

2.3.4 质粒转化（化学转化）

质粒转化的标准操作流程如下：首先将 50 μL 预先制备的感受态细胞置于冰上融化，之后加入适量连接产物并轻柔混匀，冰浴孵育 30 分钟。接着将样品移至 42°C 水浴中进行 90

秒的热激处理，完成后立即放回冰上冷却 2 分钟。随后加入 300 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基，在 37°C 摇床中以 220 rpm 振荡培养 1 小时，完成细胞复苏。取 100 μL 复苏菌液均匀涂布于含特定抗生素的 LB 固体培养基表面，倒置平板于 37°C 恒温培养箱中培养 16 小时。最终通过统计平板上生长良好、分布均匀的单菌落数量，对转化效率进行定量评估。

2.3.5 转化子验证（菌落 PCR）

为验证质粒连接成功，不存在假阳性，在片段连接处设计 1 对引物，该引物用于扩增包含接口在内的 1500bp DNA 序列。通过对转化子（单克隆）进行菌落 PCR 用于验证质粒连接是否成功。PHB 的 PCR 验证方法和验证程序如表 6 和表 7 所示。

表 6 PHB 的 PCR 验证方法

引物序列	F:tgagcagcagaaggccctg
	R:GACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATG
体外 PCR 扩增体系	2xT5 Mix: 10 μL
	引物 F: 1 μL
	引物 R: 1 μL
	无菌水: 8 μL
	模板: 单克隆（质粒转化产物）
配制总量: 40 μL ; 分装管数: 2 管;	

表 7 PHB 的 PCR 验证程序

步骤名称	温度	时间	循环数
预变性	98°C	10min	1 cycle
变性	98°C	30s	30 cycles
退火	55°C	30s	
延伸	72°C	聚合酶合成速度 10-15s/kb,	
最终延伸	72°C	5min	1 cycle
维持	16°C	∞	-

2.4 发酵方法

第一步是将菌种从冷冻保存的试管中，接种到含有卡那抗性的 LB 固体平板，然后等待 24 小时使菌种活化复苏。在经过 24 小时的培养后，将单菌落从平板上挑取下来，然后将其接种至培养基试管内，该试管包含 3 mL 卡那霉素的 LB 液体，接下来在 37 摄氏度、220 r/min 的条件下继续对其进行培养 24 小时。培养好后，按 1% 接种量将其转接到三角瓶中，三角瓶中装有 500 mL 的发酵培养基，在同样的条件下对其进行培养发酵。等到菌液 OD600 的值

达到 0.6 时，加入 1 M 的 IPTG 至终浓度 100 μ M 进行诱导，并在 37 摄氏度、220 r/min 条件下对其进行再次诱导，诱导表达时间需要 48 小时。

表 8 LB 培养基成分及配制方法

试剂	含量 (g/L)
胰蛋白胨	10
酵母提取物	5
氯化钠	10
水	1 L
LB 培养基经 115℃ 高压蒸汽灭菌处理 25 分钟。	

2.5 PHB 的 GC 检测

2.5.1 GC 检测原理

气相色谱（GC）的核心分离原理，源于混合物中各成分在固定相与流动相之间分配特性的不同。具体而言，在气-固色谱（GSC）中，组分分离主要借助其在固体吸附剂表面吸附能力的差异；而在气-液色谱（GLC）中，则依赖于各成分在液态固定相中溶解性的区别。在 GC 系统中，通常使用氦气、氮气等惰性气体作为流动相（载气），固定相则可为固体吸附材料或涂覆在惰性载体表面的高沸点液体薄膜。

样品在进样后首先于高温汽化室中瞬间气化，由载气推送进入色谱柱。由于各组分在两相间的分配系数不同，其在柱中的迁移速度也随之各异：分配系数较低者更易随气流向前移动，较早流出；分配系数较高的组分则滞留时间更长，移动缓慢，从而实现彼此分离。

分离后的组分依次进入检测环节。常规检测器如火焰离子化检测器（FID）、热导检测器（TCD）和电子捕获检测器（ECD）等，分别依据样品组分在电离、导热性或电负性等方面的物理化学特性，将其浓度信息转化为电信号。例如，FID 利用有机物在氢火焰中生成离子并产生电流响应；TCD 测量的是待测组分与载气热导率差异导致的热敏元件电阻变化；ECD 专用于高电负性物质的高灵敏度检测。

最终，这些电信号经数据系统采集和处理，转化为以保留时间为横坐标、信号强度为纵坐标的色谱图。通过分析色谱峰的出现时间可进行组分定性，而利用峰面积或峰高则可实现定量分析。因其高分离效能、良好的检测灵敏度与可靠的定性定量能力，气相色谱法在环境监测、食品安全、制药和石油化工等行业中广泛应用，尤其适用于挥发性和半挥发性有机化合物的分离与检测。

2.5.2 样品制备

首先，取用漩涡震荡仪震荡样品使其均匀后，用移液枪精准吸取 1mL 发酵液样品至 10mL 离心管。接着，向样品中加入 1mL 的 75%酒精，于 10000rpm、10min、25℃条件下离心。离心完成后将上清液倒入废液瓶，并再次加入 2mL 的 75%酒精，随后用小勺子将菌

体刮离管壁和管底，盖紧盖子以 2500rpm 震荡 5min，待菌体全部震散后继续在相同条件下离心。

离心结束倒出上清，放入 55℃烘箱烘干 24h。从烘箱取出样品，室温冷却约 10min 后称重，再将样品转移至研磨管并放入研磨珠，盖紧盖子放入液氮罐冷冻 10min。冷冻结束取出部分样品用研磨仪研磨，研磨后置于烘箱烘干 1-2h。之后用精密天平称取 30mg-40mg 左右烘干后的样品放入消解管，在 100℃条件下通过酯化体系酯化 4h。

待样品恢复至室温后，加入 1 mL 超纯水，经 2000 rpm 涡旋振荡 10 分钟，静置 30 分钟至溶液充分分层。吸取 1 mL 下层有机相，经 0.22 μm 有机系滤膜过滤后转移至 GC 样品瓶中。采用岛津气相色谱系统，选择预设的 PHB 分析方法，将待测样品置于自动进样器样品池中。待仪器基线稳定后进样分析，以实现目标组分的准确定量与可靠测定，为后续研究提供数据支持。

2.6 注塑力学测试

注塑是一种广泛应用于塑料加工的制造工艺，主要用于将塑料材料加热到熔融状态，然后通过高压将其注入到模具中，冷却后形成所需的产品。本研究系统对聚羟基丁酸酯(PHB)注塑样条展开了一系列常规的力学性能测试，涵盖冲击性能、拉伸性能以及弯曲性能三大关键板块。在冲击测试环节，精准模拟样条遭受瞬间外力冲击的真实工况，记录其抵御冲击的能力表现，由此洞察 PHB 材料在突发高能量冲击下的韧性水平；拉伸测试部分，则借助专业设备，逐步施加轴向拉力，细致追踪样条从弹性形变到塑性形变，直至最终断裂的全过程应力应变数据，这些数据对于明晰 PHB 的拉伸强度、伸长率等关键拉伸特性意义非凡；至于弯曲性能测试，通过稳定施加特定的弯曲载荷，观察样条的弯曲形变、挠曲程度，全方位评估它在承受弯曲力时的刚度、挠度极限等参数。以此来为 PHB 材料在实际工业应用场景下的合理选型、结构设计与工艺优化，奠定扎实且精准的数据基础。

(1) 冲击测试

采用已知初始能量的摆锤对水平放置的试样实施一次性冲击，直至试样断裂。冲击位置应准确选在试样两支座之间的中点；若试样带有缺口，则冲击点应对准缺口中心。通过测定摆锤在冲击前后能量的变化，可确定试样在断裂过程中所吸收的能量，并依据试样断裂前的横截面积进一步计算出其冲击强度。

缺口冲击计算公式：

$$a_{cU} = \frac{E_{cU}}{h \cdot b_N} \times 10^3 \quad (1)$$

E_{cU} ——试样断裂时所吸收的能量，以焦耳(J)为单位表示；

h ——试样厚度，单位为毫米(mm)；

b_N ——试样剩余宽度，单位为毫米(mm)。

无缺口冲击计算公式：

$$a_{cN} = \frac{E_{cN}}{h \cdot b} \times 10^3 \quad (2)$$

E_{cN} ——试样断裂时所吸收的能量，以焦耳（J）为单位表示；

h ——试样厚度，单位为毫米(mm)。

b ——试样宽度，单位为毫米(mm)。

(2) 拉伸性能

沿试样纵轴方向以恒定速率施加轴向拉伸力，使试样持续伸长直至断裂，或达到预定的应力或应变极限。试验过程中实时监测并记录试样所受载荷及相应的伸长变形量。

(3) 弯曲性能

将试样以两点支撑的方式放置为简支梁结构，在其中点位置以恒定加载速率施加垂直于纵轴的弯曲力，直至试样破坏或跨中挠度达到设定值。全程记录最大载荷或载荷与挠度之间的关系曲线。

弯曲应力计算公式：

$$\sigma_f = \frac{3FL}{2bh^2} \quad (3)$$

σ_f ——弯曲应力，单位为兆帕 (MPa)；

F ——施加的力，单位为牛顿 (N)；

L ——跨度，单位为毫米 (mm)。

b ——试样宽度，单位为毫米 (mm)。

h ——试样厚度，单位为毫米 (mm)。

3 结果

3.1 分子设计结果

基于 SnapGene 软件，设计的质粒骨架和目的片段分别如图 1 和图 2 所示，Gibson 组装如图 3 所示。

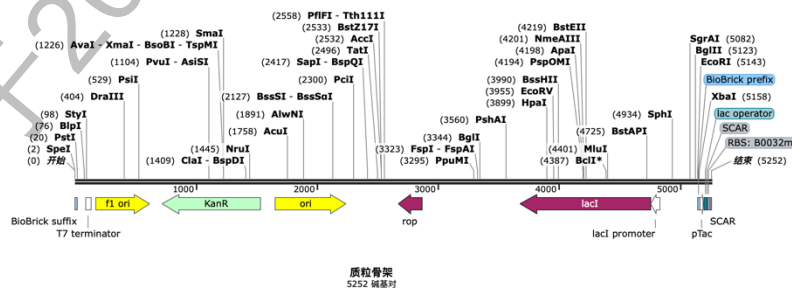
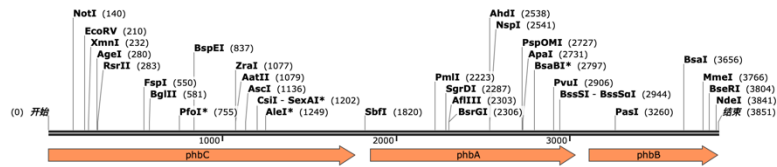


图 1 质粒骨架



E0059-提供phcAB序列
3851 碱基对

图 2 目的片段

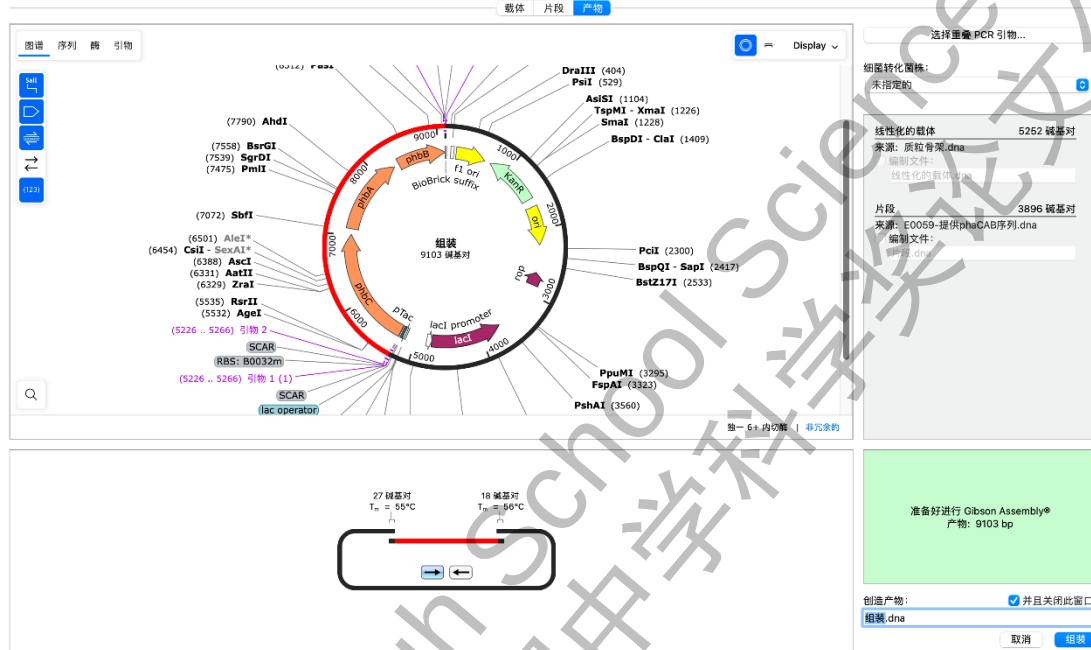


图 3 Gibson 组装

在 PHB 的生物合成分子设计中，引物列表、启动子的选择以及操纵子的应用共同构成了精确调控基因表达的关键环节。基于分子生物学原理，本研究建出高效、稳定的表达系统，如图 4 所示。

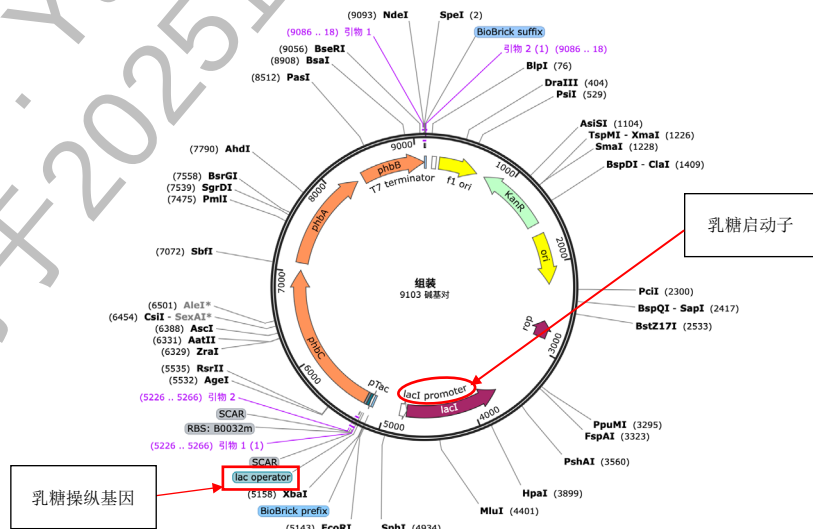


图 4 PHB 中的乳糖操纵子

3.2 实验结果

3.2.1 琼脂糖凝胶电泳实验结果

经过 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳分离，获得了用于构建 PHB 合成质粒的各 DNA 片段的电泳图谱，如图 5 所示，根据结果可以发现 PCR 扩增有杂带，经分析可能原因一是设计的引物特异性差与质粒有多个可能的结合位点；二是设计的引物可能与大肠杆菌基因组上的序列有结合，导致引物对基因组上的 DNA 也进行了扩增；三是引物部分失效。但与 DNA marker 比对，片段大小分别位于 3000bp-5000bp 附近，符合目标条带大小，初步验证 PCR 扩增成功。

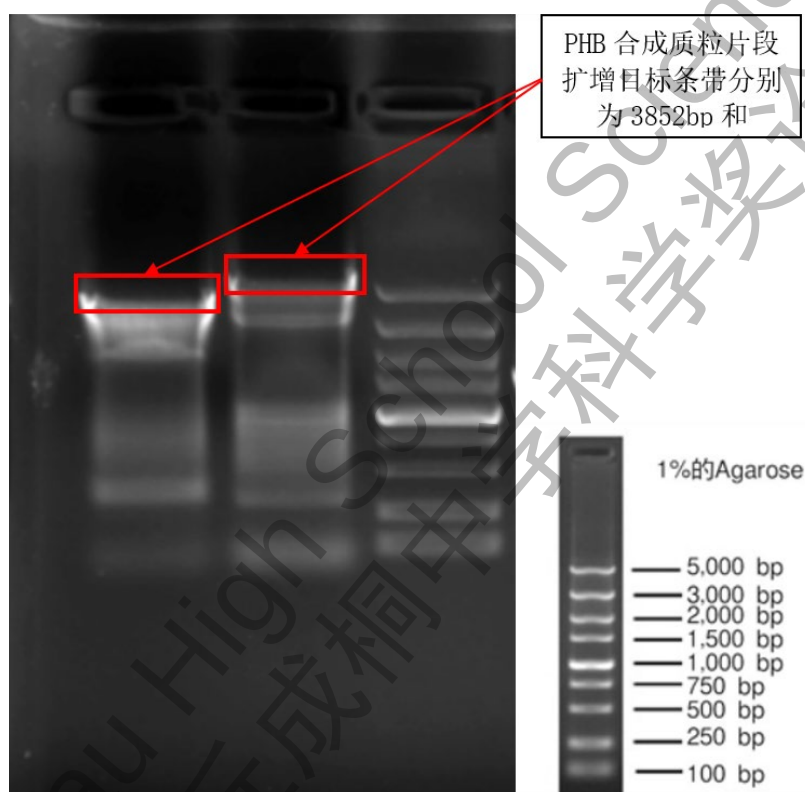


图 5 PHB 合成途径质粒片段扩增条带

3.2.2 Gibson 组装产物的质粒转化结果

目标片段扩增完成后通过胶回收试剂盒对其进行 DNA 进行回收，用于进行后续的 Gibson 组装（即在体外搭建 DNA 聚合酶和连接酶的反应体系，在适当的温度下 DNA 解链，体系内片段通过引物扩增获得的同源序列进行重组），并将 Gibson 组装产物进行大肠杆菌的转化，以实现目标质粒的构建。

将 Gibson 组装产物进行了 DNA 的大肠杆菌转化，如图 6 所示为转化结果，抗性的平板均有转化子出现，表明转化子中可能存在成功组装并可以实现自我复制的质粒。



图 6PHB 合成途径质粒组装产物的质粒转化结果

3.2.3 菌落 PCR 结果

在 DNA 片段任一连接处设计引物,该引物用于扩增包含接口在内的 1500bpDNA 序列,用于验证质粒连接是否成功,用于菌落 PCR 的引物如表 9 所示。

表 9 用于菌落 PCR 的引物

引物名称	序列
cx1-F	TGGAGCAGCAGAAGGCCCTG
cx1-R	GACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATG

为验证质粒连接成功,不存在假阳性,在片段连接处设计 1 对引物,该引物用于扩增包含接口在内的 1500bpDNA 序列。对转化所得单克隆菌落进行 PCR 验证,以检测目标质粒是否成功构建。

从转化平板上随机选取 5 个单克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定,并利用琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物大小。如图 7 所示,电泳结果中所有单克隆均在 1500 bp 处出现清晰条带,表明目标质粒已正确构建并能够在大肠杆菌内进行自主复制。



图 7 菌落 PCR 结果-胶图

3.3 工程菌株的发酵检测结果

将构建的工程大肠杆菌进行摇瓶发酵并进行 GC 检测 PHB 产量，结果如表 10 和表 11 所示。

表 10 3-羟基丁酸甲酯质量与真实 mmol 值、3HB 峰面积的对应关系

	3-羟基丁酸甲酯 m (mg)	真实 mmol 值	3HB 峰面积
PHB	14.9	0.124870905	1187787
	20.1	0.168450013	1641948
	30.1	0.252255989	2715075
	40.5	0.339414205	3357865
	50.1	0.419867942	4125865

表 11 3-羟基丁酸甲酯与 3HB 单元的分子式和分子量

	分子式	分子量
3-羟基丁酸甲酯	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$	118.13
3HB 单元	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$	86.09

以 3-羟基丁酸甲酯为标品按梯度称重并计算其对应的摩尔值，由于 PHB (3-羟基丁酸) 与 3-羟基丁酸酯摩尔数相同，因此可通过峰面积与摩尔值的关系建立标准曲线，PHB 的 mmol 值的标准曲线为 $y = 9934000.84x + 13213.81$ ， $R^2 = 0.99$ ，曲线如图 8 所示。

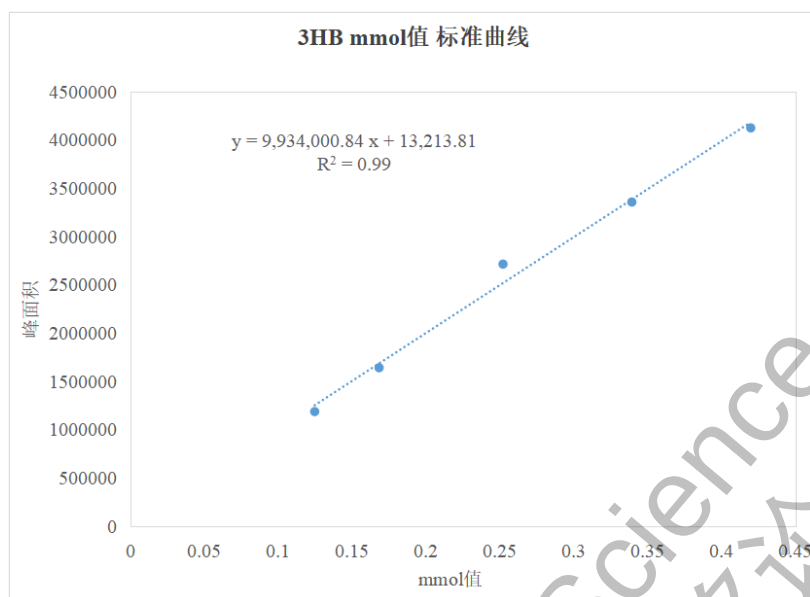


图 8 PHB 摩尔值的标准曲线

PHB 产量随时间的变化数据见表 12，相应趋势如图 9 所示。摇瓶发酵结果表明，PHB 产量（以细胞干重百分比计）随培养时间延长而持续上升，从 16 小时的 12.13%提高至 48 小时的 39.84%，相当于每毫克细胞中约含 0.4 毫克 PHB。后续经分离纯化处理，获得 PHB 粉末产物，其形态如图所示。

表 12 发酵 PHB 产量随时间变化数据

	称重(mg)	3HB 样品峰	3HB mmol 数	3HB 质量 (mg)	3HB 含量		标准差
16h	31.7	378174	0.036738553	3.16	10.0%	12.13%	3.05%
	36.3	611769	0.060253248	5.19	14.3%		
24h	30.4	739665	0.073127819	6.30	20.7%	20.34%	7.61%
	39.4	1275537	0.12707104	10.94	27.8%		
	34.2	508668	0.049874651	4.29	12.6%		
32h	39.4	1478836	0.147536007	12.70	32.2%	29.80%	6.59%
	36.8	1491907	0.148851791	12.81	34.8%		
	31.2	817285	0.080941388	6.97	22.3%		
40h	39.5	1739309	0.173756359	14.96	37.9%	35.03%	3.53%
	34.9	1468703	0.146515975	12.61	36.1%		
	34.6	1253877	0.12489065	10.75	31.1%		
48h	35.7	1612610	0.161002284	13.86	38.8%	39.84%	2.11%
	37	1817736	0.181651164	15.64	42.3%		
	39.2	1751814	0.175015167	15.07	38.4%		

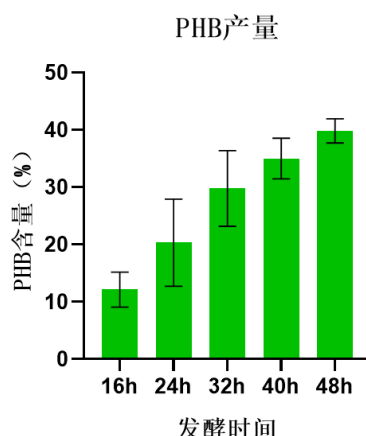


图 9 PHB 产量与发酵时间关系

3.4 实验评价

3.4.1 PHB 性能表征

本研究通过一系列材料性能测试（含氮量，DSC，熔指、高温黄度、注塑力学四项）获取 PHB 材料的各项性能参数，为后续注塑加工工艺提供参考，保证材料成型的可靠性。

经熔体流动速率测定仪对 PHB 材料进行熔融指数的测定，确定了其规定时间内挤出物的挤出速率为 2.03g/10min，如表 13 所示。在材料加工领域，熔融指数直观反映出 PHB 材料的流动性与成型性能。明确该挤出速率，为后续 PHB 的工业化成型工艺提供了关键参数。对于加工成型而言，这个熔指数数据是生产线优化的关键指引。塑料加工企业可以依据它精准调试注塑机、挤出机等设备的参数，要是熔指较高，意味着材料流动性强，注射或挤出速度便可以适当加快；反之，较低熔指则要求放慢速度、升高温度，防止加工缺陷。掌握这一数值，能显著提升生产效率，削减次品率，保障产品质量均一性，助力 PHB 制品的大规模量产。

表 13 PHB 材料的熔融指数

样本名称	切割间隔-明细(s)	m1(MFR)-明细(g)	m2(MFR)-明细(g)	m3(MFR)-明细(g)	m4(MFR)-明细(g)	m5(MFR)-明细(g)	MFR-明细(g/10min)
PHB	40	0.1353	0.1941	0.2682	0.361	0.4747	2.03

经色差分析仪对 PHB 材料在红、绿、蓝三色光的反射率计算其黄度值（YI）为 49.05，如表 14 所示。黄度值在材料评估与实际应用场景中扮演着极为关键的角色。从材料外观品质的角度来讲，黄度直观反映了材料的颜色纯净度与老化程度。黄度值越低，说明材料越趋近于无色透明，色泽更为鲜亮纯净，这在高端包装、光学器件等对外观要求严苛的领域意义非凡。例如在化妆品包装、电子显示屏防护膜的制作中，低黄度的 PHB 材料能赋予产品精致、通透的质感，极大提升消费者的视觉好感与产品档次。而此次测得的 49.05 这一数值，提示该 PHB 材料存在一定程度的泛黄现象，需在后续工艺优化中加以考量，比如调整合成配方或优化加工温度，来改善色泽表现。

表 14 PHB 材料的高黄温度

样本名称	YI-明细	L* (白-黑)-明细	a* (红-绿)-明细	b* (黄-蓝)-明细
PHB	49.05	87.36	-1.71	29.72

经差示扫描量热仪监测 PHB 材料的吸热或者放热反应，表现出的吸热或者放热峰进行测量，确定其二次升温 T_g （玻璃化转变温度）为 2.2°C ，二次升温 T_m （熔点）为 173.69°C ，这两个温度参数对 PHB 材料的实际应用和性能把控有着举足轻重的意义。

玻璃化转变温度 (T_g) 是指非晶或半结晶聚合物由硬而脆的玻璃态，转变为柔软且可发生高弹形变的橡胶态时所对应的特征温度。 T_g 为 2.2°C 意味着在环境温度稍高于此数值时，PHB 材料的分子链段开始获得足够能量，运动逐渐变得活跃起来，材料柔韧性显著提升。这一特性在软包装领域极为关键，例如食品保鲜膜、保鲜袋的制作，室温环境下，PHB 材料因高于其 T_g ，能维持良好的贴合性与柔韧性，紧密包裹食品，起到隔绝空气、保鲜防潮的作用；而在冷链运输场景，低温接近或低于 T_g 时，材料变硬，又能为运输中的物品提供稳固的支撑防护。

差示扫描量热法 (DSC) 分析曲线如图 10 所示。熔点 (T_m) 则标志着材料从固态向液态转变的温度节点，此次测得 PHB 材料的 T_m 为 173.69°C 。在加工制造层面，这是热塑成型工艺的关键参数，当加热到 173.69°C 及以上，PHB 材料便可熔融成流动态，顺利填充模具型腔，注塑成各类形状复杂的塑料制品，像塑料玩具、电子设备外壳等；从产品使用稳定性来讲，高于熔点的高温环境会致使产品变形甚至失效，知晓 T_m 能帮助使用者精准把控 PHB 制品的使用温度上限，避免因过热引发安全隐患，保障产品在正常温度区间稳定服役。

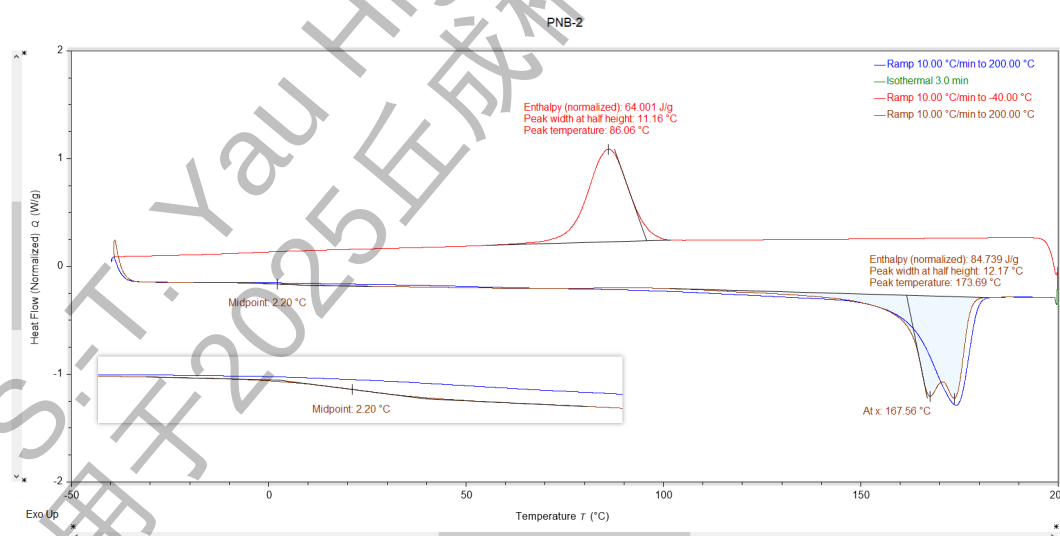


图 10 DSC 图像-谱图

经凯氏定氮仪对 1.1144g PHB 材料中的含氮量和蛋白质含量进行测定，测定结果如表 15 所示，得出 PHB 材料的含氮量为 334ppm。从材料纯度角度考量，含氮量是衡量杂质混入情况的关键参照。较低的含氮量往往意味着更高的 PHB 纯度，此次 334ppm 的含氮量

能够辅助判断生产工艺的精准度与清洁度。在合成 PHB 的过程中，杂质氮元素可能来源于原材料、反应溶剂或生产设备引入，精准把控含氮量有助于排查生产环节的潜在问题，优化工艺参数，保障 PHB 产品质量的均一稳定，这对于高精度、高规格的 PHB 制品生产至关重要，以 PHB 制备医疗植入器械为例，高纯度是保障其生物相容性、防止不良免疫反应的关键前提。

表 15 PHB 材料的含氮量

样本名称	重量-明细(g)	含氮量%-明细	含氮量-明细(ppm)	蛋白质含量%-明细
PHB	1.1144	0.0334	334	0.209

在生物降解特性关联上，含氮量间接反映了 PHB 材料后续降解进程的难易程度。微生物在分解含氮有机物时，会依据含氮基团特性启动对应的降解酶系，合适的含氮量有利于构建微生物与 PHB 之间的“降解桥梁”，让降解反应更顺畅地开启与推进。若是含氮量过高或过低，都可能干扰微生物正常的代谢识别与分解流程，进而影响 PHB 在自然环境中的降解效率，而我们所测定的这个数值，为预测它在生态环境中的归宿提供了有力线索。

3.4.2 PHA 注塑实物展示

经过一系列材料力学性能的测试后，委托蓝晶微生物进行 PHB 的注塑，将 PHB 材料加热到熔融状态，然后通过高压将其注入到模具中，冷却后形成如下图 11 所示的 PHA 制品。



图 11 PHA 制品（吸管、刀、叉、勺）

3.4.3 PHA 制品降解测试

聚羟基烷酸酯（PHAs）是主要由微生物合成的天然高分子材料，具备良好的生物可降解性。该家族中常见的成员包括 PHB（聚羟基丁酸酯）、PHBV（聚(3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸酯)）、P34HB（聚(3-羟基丁酸-co-4-羟基丁酸酯)）以及 PHBH（聚(3-羟基丁酸-co-3-羟基己酸酯)）等。这些聚合物由相同或不同的单体单元聚合而成，例如 PHB 即是由 3-羟基丁酸（3HB）单体经酯键聚合形成的均聚物。

凭借良好的生物相容性、可生物降解能力以及出色的热加工特性，PHA 已被广泛用于生物医学和环保包装等行业，并成为当前生物材料领域的研究热点。本研究重点考察 PHA 材料的生物降解性能，通过实验分析其在模拟真实环境中的降解过程与效率。

如图 12 所示，在实验搭建土壤堆肥降解环境，将种植营养土与商用 EM 堆肥菌按 20:1 的比例混匀，加水调节湿度为 70 %左右，pH 为 6.9，温度为 35℃左右。由于时间关系，本实验只记录了相对材料用量较少的 PHA 吸管的降解过程（以市面上购买的不可降解吸管做对比），如图 13 所示，在为期 25 天的降解周期里，PHA 吸管在第 15 天呈现轻微破裂且变薄变软的现象，第 20 天以及第 25 天 PHA 吸管结构被破坏，降解迹象明显。而合成塑料吸管在整个过程均无任何降解迹象。由此证明 PHA 确实具有生物可降解性且降解周期短。

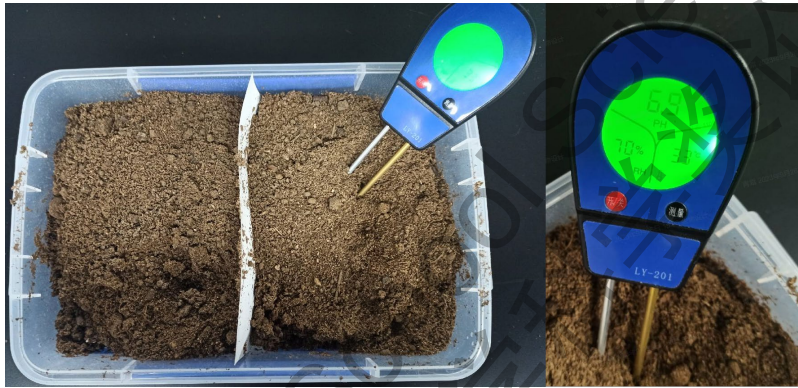


图 12 实验室搭建的堆肥降解装置

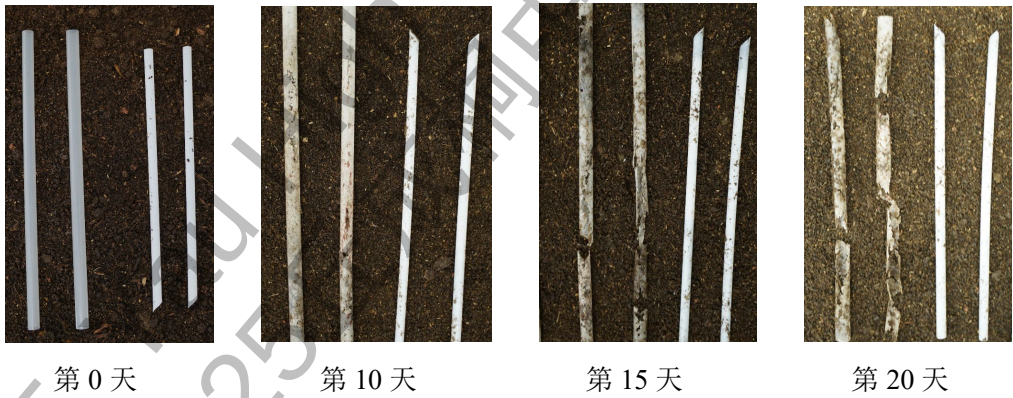


图 13 降解实验结果

3.4.4 注塑力学测试结果

对注塑的 PHA 制品进行冲击、弯曲和拉伸测试，测试指标如表 17、18 和 19 所示。由冲击测试结果可知有缺口 PHB 试样在受到 2.908 kJ/m² 冲击强度时，被完全破坏(C)，即试样断裂成两片或多片。无缺口 PHB 试样在受到 32.511 kJ/m² 冲击强度时，才会被完全破坏(C)，即试样断裂成两片或多片。这两组数据意义重大，精准反映出材料不同层面的抗冲击性能，为 PHB 材料的实际应用“量体裁衣”。

有缺口冲击强度，衡量的是材料在存在应力集中点时的脆弱程度。缺口就像是材料表面的一道“软肋”，当外力冲击袭来，应力会在缺口处急剧累积，让此处成为最先发生破坏的

薄弱环节。2.908 kJ/m² 这个数值表明，PHB 材料一旦表面有细微损伤、刮痕或者孔洞这类类似缺口的瑕疵，它抵抗冲击的能力就大幅下降。在日常使用场景里，像塑料日用品、电子设备外壳，难免会遭遇磕磕碰碰留下小伤痕，基于这一较低的有缺口冲击强度数据，就需要额外的防护措施，例如添加耐磨涂层，从而避免因微小损伤导致产品过早发生断裂失效，有效延长其使用寿命。

表 17 PHA 制品冲击测试结果

样本名称	摆锤规格- 明细	缺口断裂形 态-明细	缺口冲击强度- 明细(kJ/m2)	缺口冲击强度- 平均值(kJ/m2)	缺口冲击强 度-标准偏差
PHB-缺口 冲击	0.5J	C	2.537	2.908	0.515
			3.743		
			3.032		
			2.753		
			2.475		
PHB-无缺 口冲击	4J	C	36.723	32.511	4.62
			32.255		
			24.75		
			34.188		
			34.64		

表 18 PHA 制品弯曲测试结果

样本名称	弯曲强度 -明细 (Mpa)	弯曲强度-平 均值(Mpa)	弯曲强度 -标准偏 差	弯曲模量- 明细 (Mpa)	弯曲模量- 平均值 (Mpa)	弯曲模量- 标准偏差
PHB-弯 曲性能	35.93	36.007	0.519	2055.81	2041.797	28.593
	35.53			2008.9		
	36.56			2060.68		

无缺口冲击强度则展现出材料完整状态下的韧性与抗冲击极限。32.511 kJ/m² 的测试结果说明，在理想、无瑕疵的表面状况下，PHB 材料能承受相当可观的瞬间冲击力。这对于那些要求较高结构完整性的应用极为关键，比如在建筑领域用作采光板、或是汽车内饰件，正常使用时不会遭遇尖锐物体造成缺口，依靠较高的无缺口冲击强度，就能维持稳定可靠的性能，无惧突发撞击，保障使用安全与产品的耐用性。

根据相关标准，硬质塑料的弯曲模量通常要求不低于 700 MPa。本实验对 PHB 材料进行弯曲性能测试，结果表明其弯曲模量达到 2041.797 MPa，显著高于硬质塑料的基准要求。弯曲模量作为材料力学性能的关键指标，在实际应用中具有重要工程意义。

弯曲模量是表征材料在弯曲载荷下抵抗弹性变形能力的物理参量，其数值反映了材料的刚性大小，数值越高，意味着材料越“刚硬”，越不容易在受力弯曲时发生形变。对于 PHB 材料而言，2041.797 MPa 的弯曲模量赋予它出色的结构支撑性。在家具制造领域，使用 PHB 材料制作桌椅腿、柜体框架时，即便承载较重的物品，或是频繁受到外力挤压、碰撞，依然能够维持原本的形状，不会轻易出现摇晃、弯折，保障家具的长期稳定性与耐用性。较高的弯曲模量让 PHB 材料在机械加工时，有着更好的尺寸精度保持能力，有利于制造出形状规

则、精度要求高的零部件，拓宽了其在精密机械、电子设备外壳等领域的应用可能，为替代传统硬质塑料，迈出坚实且关键的一步。

表 19 PHA 制品拉伸测试结果

名称	拉伸强度-明细 (MPa)	拉伸强度-平均值 (MPa)	拉伸强度-标准偏差	断裂伸长率-明细(%)	断裂伸长率-平均值 (%)	断裂伸长率-标准偏差	拉伸弹性模量-明细 (MPa)	拉伸弹性模量-平均值 (MPa)	拉伸弹性模量-标准偏差
PHB-拉伸性能	23.03	23.543	0.715	3.45	6.06	4.391	2171.34	2100.403	71.609
	23.24			3.6			2101.73		
	24.36			11.13			2028.14		

4 总结

在本次聚-β-羟丁酸（PHB）生物合成项目中，我们深入探索了微生物作为“活工厂”在生物塑料生产中的应用潜力。通过分子设计、PCR 扩增、Gibson 组装、质粒转化、测序等菌株构建步骤，成功诱导了目标菌株积累 PHB。实验过程中，我们观察到了细菌在特定环境下有效转化为 PHB 的现象，这不仅加深了对微生物代谢机制的理解，也让我们直观感受到了生物技术在可持续材料开发中的重要作用。

本项目主要创新点包括：（1）本项目利用分子设计方法合成一种聚 β-羟基丁酸降解材料。（2）通过 PCR 扩增、Gibson 组装、质粒转化、测序等系列实验，生成了高性能的 PHA 材料。并通过降解实验验证了合成材料的高降解性能。

面对传统塑料污染日益严峻的挑战，PHB 作为一种可降解的生物塑料，其生物合成研究显得尤为重要。实验中遇到的菌种筛选、条件优化等难题，激发了我们解决问题的兴趣与能力。通过团队合作与多次尝试，最终我们收集到了纯度较高的 PHB 样品，这为后续的性能测试及应用探索奠定了坚实基础。

5 收获与成长

通过本课题对聚-β-羟丁酸（PHB）生物合成的研究，我获得了丰富的知识与宝贵的成长。首先，在理论与实践结合的过程中，我对微生物代谢与生物合成有了更深入的理解，学会了如何设计并实施科学实验来探索未知领域。其次，面对实验中的挑战与失败，我学会了耐心分析与解决问题，培养了坚韧不拔的科学精神。最重要的是，这次课题让我深刻认识到生物技术在环保与可持续发展中的重要性，激发了我对科学研究的热情与责任感。未来，我将带着这些宝贵的经验与成长，继续在科学探索的道路上勇往直前。

6 致谢

在本课题的研究与撰写过程中，我衷心感谢李源老师的悉心指导与无私奉献。正是老师专业的引领与耐心的解答，让我在聚-β-羟丁酸（PHB）生物合成的探索之路上少走了许多弯路。同时，我也衷心感谢上海蓝晶微生物科技有限公司，是贵公司为我们提供了本项目所需的所有实验环境、实验材料和实验器材，保证了本项目的顺利实施，在实验过程中，贵公司工程师给予了大量的指导和帮助。此外，衷心感谢在实验过程中给予指导和合作的老师与同学们，你们的支持与陪伴为这段充满挑战的科研旅程增添了动力与温暖。同时，感谢学校优良的科研平台与资源保障，使我得以将理论付诸实践，在探索中收获成长。谨向所有支持、帮助过我的师长与朋友致以最真诚的谢意，你们的鼓励是我在科研道路上不断前行的信心之源。

课题指导老师李源，在课题实施过程中，无私提供理论指导、实验建议和论文撰写指导。

上海蓝晶微生物科技有限公司姜尧竹工程师，在本课题实施过程中，提供了大量的实验指导，辅助实现了实验产品的注塑。

感谢一直支持我的课题研究的家人们。

最后，感谢一下自己的努力和坚持，在科创道路上又前进了一步。

7 参考文献

- [1] 张世敏, 赵璞, 高玉千, 徐淑霞, 赵继红, 吴坤. 以甘油为碳源的聚- β -羟丁酸产生菌筛选及发酵条件研究. 河南农业大学学报, 2013, 47(6): 737-742
- [2] ZS Huang, BY Liang, F Wang, et al. Response surface optimization of poly- β -hydroxybutyrate synthesized by *Bacillus cereus* L17 using acetic acid as carbon source. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 247: 125628
- [3] JY Wang, ZQ Chen, XG Deng, et al. Engineering *Escherichia coli* for Poly- β -hydroxybutyrate Production from Methanol. Bioengineering, 2023, 10:415
- [4] N Mohammed, JK Katari, D Das. Overproduction of poly- β -hydroxybutyrate in *Methylosinus trichosporium* 11131 as degradable food packaging material utilizing methane. Biomass Conversion and Biorefinery, 2024, 14: 21963–21978
- [5] Y Ming, GQ Li, ZZ Shi, et al. Co-utilization of glucose and xylose for the production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Sphingomonas sanxanigenens* NX02. Microbial Cell Factories, 2023, 22:162
- [6] T Grivalský, GE Lakatos, K Štěrbová, et al. Poly- β -hydroxybutyrate production by *Synechocystis* MT_a24 in a raceway pond using urban wastewater. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108:44
- [7] X Li, W Jiang, Q Qi et al. A Gene Circuit Combining the Endogenous I-E Type CRISPR-Cas System and a Light Sensor to Produce Poly- β -Hydroxybutyric Acid Efficiently. Biosensors, 2022, 12: 642.