

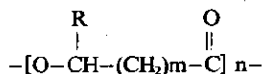
# 羟基丁酸及中链羟基脂肪酸共聚物的微生物合成

洪葵<sup>1</sup> 陈国强<sup>2</sup> 黄为一<sup>3</sup> 樊庆笙<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>华南热带农业大学工学院 儋州 571737, <sup>2</sup>清华大学生物科技系 北京 100084,

<sup>3</sup>南京农业大学微生物系 南京 210095)

聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoic acids, 简称 PHAs) 是许多原核生物于非平衡生长 (如缺乏氮、磷、镁、氧) 条件下合成的细胞内碳源和能源的贮藏性聚合物, 其分子通式可表述为<sup>[1]</sup>:



其中  $m=1, 2$  和  $3$ , 一般为  $m=1$ , 即  $\beta$ -羟基脂肪酸。  $n$  为单体数目。  $R$  为侧链, 多为不同链长的正烷基, 也可以是支链的, 不饱和的或带取代基的烷基。

自从 1926 年聚羟基丁酸 (Polyhydroxybutyrate, 简称 PHB) 被首次发现后, 已有约 80 种不同的脂肪酸作为 PHAs 的单体在约 300 种细菌中被发现, 包括碳原子数从 3 到 14 的大量含饱和或不饱和键或支链的脂肪族以及芳香族  $\beta$ -羟基脂肪酸<sup>[2]</sup>。与化学合成的高分子材料相比, 依单体的组成不同, PHAs 具有从硬的晶体到软的弹性体等一系列不同聚合物的性质。还有它们所没有的特殊性能, 如生物可降解性、生物相容性、光学活性以及生物合成过程中可利用再生原料等特性。这类聚合物是日前可能替换石油化学塑料的具有发展前途的生物材料。

根据单体中碳原子的数目可以将 PHAs 分为短链 PHAs, (short-chain-length PHA, scl PHA, 单体为含 3~5 个碳原子的羟基脂肪酸) 和中链 PHAs (medium-chain-length PHA, mcl PHA, 单体为含 6~14 个碳原子的羟基脂肪酸)。在大量的 mclPHA 中

含各种功能基团, 如烯、支链烷基、卤素、酚及氟等, 而且 mclPHA 大多是两种以上单体的随机共聚物。共聚物的发现可能是 PHA 研究的转折。目前发现的 PHA 除 PHB 为均聚物外, 其他几乎均为共聚物。依共聚物的单体组成可分为三类: ①短链羟基脂肪酸共聚物, (sclPHA-Copolymer), 以 PHBV (poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)) 为代表, 合成 scl 共聚物的菌种主要是 *Alcaligenes eutrophus*。②中链羟基脂肪酸共聚物 (mclPHA Copolymer), *Pseudomonas oleovorans* 等假单胞菌, 当以烯烃、脂肪酸、醇类为碳源时, 能合成以 3HO (3-hydroxyoctanoate) 为主的各种中链羟基脂肪酸共聚物。③短链与中链羟基脂肪酸共聚物, 尤指羟基丁酸与中链羟基脂肪酸单体组成的共聚物 Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyalkanoate (with medium chain length)) 或 P(HB-CO-HAmcl)。

## 1 羟基丁酸及中链羟基脂肪酸共聚物

虽然 PHA 被发现和研究已有 60 年的历史, 并有许多广泛的应用潜能, 但工业化生产和应用仍很有限。影响 PHA 工业化生产和应用的主要原因是相对于化学合成塑料而言, 其成本要高得多, 而且还存在加工性能上的缺陷。羟基丁酸及中链羟基脂肪酸共聚物是一种新型的 PHA, 它由大量的 HB 单体和少量的中链羟基脂肪酸单体组成, 具有更好的加工与应用性能。

1997-04-16 收稿

PHB 是一种高熔点 ( $T_m = 178^\circ\text{C}$ ) 结晶的热塑料, 它的一些特性与聚丙烯相似, 但与聚丙烯不同的是, PHB 脆性较大, 而且在稍高于其熔点的温度下即发生热降解, 因此使熔点加工过程变得难于控制。这一问题通过  $\text{P}(\text{HB} - \text{co} - \text{HV})$  的合成得到了一定程度的解决。以 *Alcaligenes eutrophus* 供给葡萄糖和丙酸的混合碳源可合成各种不同组成的  $\text{P}(\text{HB} - \text{co} - \text{HV})$  的共聚物。HV 单体插入到 HB 主链中能显著降低熔点, 使得加工过程变得易于进行而且不会发生降解。但这种多聚物表现出不同寻常的同二晶现象, HV 单体能够掺入到 PHB 的晶格中共结晶。而且随着 HV 含量的增加, 富含 HB 晶体的热焓降低。其不良结果是这种共聚物的结晶速率大大低于 PHB。PHB 的结晶速率与合成多聚物相比, 已经很慢了。这种低的结晶速率增加了加工难度, 如 PHBV 在成膜工艺中, 与冷却杆粘连, 影响加工速度和膜的分层<sup>[4]</sup>。

如果掺入一种不与 PHB 形成共结晶的共聚物单体, 将有可能在含量较低的情况下, 限制晶体的厚度,

不会显著影响晶体中单体的融解热, 也就不会影响结晶速率。比如, 在 PHB 中引入适当含量的偶数碳共聚单体如 3-羟己酸 (3-hydroxycaproate 简称 3HC), 3-羟辛酸 (3-hydroxyoctanoate 简称 3HO) 和 3-羟癸酸 (3-hydroxydecanoate 简称 3HD) 等<sup>[5]</sup>。研究发现引入这些基团后, 它们的热力学性质发生了变化。随着少量中链单体的加入, 熔点, 玻璃化温度, 热焓等降低, 随着中链单体含量越高, 这些参数降低越多。在以 HB 为主而含少量 HC、HO 单体的共聚物中, 通过 X 射线晶体衍射及质量分析发现, 含量少的单体在 PHB 形成晶体时是未被组合进去的。对不同 HC 含量的共聚物结晶研究表明, 晶球生长的速率受 HC 含量及结晶温度的影响, 当 3HC 含量增加时, 结晶速率迅速下降 (表 1)<sup>[5]</sup>。当中链单体的含量超过一定范围后, 热焓下降, 不易结晶, 而成为无定型态。以 *Pseudomonas oleovorans* 等为代表合成的中链羟基脂肪酸共聚物就是这种状态。所以虽然发现和研究了許多假单胞菌合成的中链共聚物, 它们的加工性能并不理想。

表1 PHB与P(HB-co-HAmcl)的部分物化性质比较

菌种	聚合物(单体组成)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_m(\text{Jg}^{-1})$	$T_g(^{\circ}\text{C})$	文献
<i>Aeromonas caviae</i>	P(100%3HB)	177	97	4	16
	P(3HB-co-5%3HC)	151	69	0	16
	P(3HB-co-15%3HC)	115	54	0	16
	P(3HB-co-25%3HC)	52	19	-4	16
<i>Bacillus cereus</i>	P(3HB-co-2.3%3HC)	168	79	2	2
<i>Comomonas testosteroni</i>	P(3HB-co-4.2%3HC)	158	65	-4	2
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	40%3HB, 5%3HC, 20%3HO, 24%3HD, 1%3HSD, 4%3HDD, 6%3H5DD	—	0	-39	8

良好的结晶性能除能使 PHA 易于加工外, 也是实现其压电特性和光学活性等高附加值应用的前提。因此, 羟基丁酸及中链羟基脂肪酸共聚物继 PHB, PHBV 和中链羟基脂肪酸共聚物之后, 成为 PHA 研究的热点<sup>[3, 5, 8, 9, 10]</sup>。

2 合成羟基丁酸与中链脂肪酸共聚物的微生物

多数情况下, PHA 合成酶都只对短链或只对中链底物有亲和力。所以能够合成短链中链脂肪酸共聚物的微生物很少。但至少到目前为止, 已有许多报道与这种结论不符。 *Rhodococcus ruber* 以己酸为碳源时合成含 3HB, 3HV, 3HC 和 4HC 单体的共聚物。两株 *Aero-*

*monas* sp. 能以碳原子数多于 12 的脂肪酸为底物合成  $\text{P}(3\text{HB} - \text{co} - 3\text{HC})$ 。严格厌氧的 *Syntropho - monas wolfei* 能从各种六碳脂肪族化合物合成 3HB 与 3HC 的共聚物。Doi 实验室从土壤中分离的 *Pseudomonas* sp. 61-3 能以葡萄糖等糖类及葡萄糖酸盐和脂肪酸为碳源合成含 C4-C12 偶数碳原子单体的脂肪酸脂共聚物<sup>[8, 9, 10]</sup>。 *Pseudomonas* sp. A33 和其它一些好氧细菌能在限氧条件下以 3-羟丁酸或 1, 3-二羟基丁烯合成 3HB 及各种 3HAmcl 的复杂共聚物<sup>[11]</sup>。 *Comomonas testosteroni*, *Bacillus cereus* 以及另一未知菌在己酸和辛酸生长时能合成 3HB 与 3HC 和 3HO 的共聚物<sup>[3]</sup>。

### 3 羟基丁酸与中链脂肪酸共聚物的基因工程菌合成

通过基因工程手段,向 *Pseudomonas* 中引入 PHA 合成酶基因,也能合成 P(HB-co-HAmcl) 聚合物(表 2)。不产 PHA 的 *P. putida* 突变株在引入了 *Thiocapsa*

*pfennigii* 的 PHA 合成酶基因后,能在以辛酸为碳源时合成含 HB, 3HC, 3HO 的多聚物,同样含有这一基因的不产 PHA 的 *A. eutrophus* 在供以 4-羟基己酸为底物时合成含 3-羟基丁酸, 3-羟基己酸和 4-羟基己酸的三聚物<sup>[6]</sup>。

表2 工程菌合成的P(HB-co-HAmcl)聚合物

菌株	碳源	PHA含量		PHA 组 成					文 献
		细胞干重(%)	3HB	3HC	3HO	3HD	3HDD		
<i>P.aeruginosa</i> PAC1(pvk101::pp1)	葡萄糖酸盐	31.0	43.5	4.1	20.5	19.4	12.4	TimmA等 1990	
<i>AP. oleovorau</i> (puk101::pp1)	辛酸盐	70.5	46.8	4.5	48.0	0.7	—	Timm A等 1990	
<i>P. putida</i> GPp104 (pHP1014::E156)	辛酸盐	22.3	48.5	47.3	4.2	<0.1	—	Liebergesell 等 1993	
<i>P. putida</i> (pVK101::PPI)	葡萄糖酸盐	59.6	81.9	1.8	7.2	2.5	6.6	Timm A等 1990	

### 4 影响 PHA 共聚物合成的因素

P(3HB-co-3HA) 共聚物能否合成,关键在于酶系统。由于 PHA 合成酶很难被纯化到一个稳定的形态,直到现在 PHA 合成酶尚无 EC 编号,也未能进行详细的研究。*A. eutrophus* 的 PHA 合成酶被认为是专一地作用于 C3-C5 的 D-(-)-羟基酰 CoA。许多荧光假单胞菌能在以葡萄糖和葡萄糖酸盐为唯一碳源的培养基上合成含 6~14 个碳原子的中链 3-羟基脂肪酸共聚物。由葡萄糖或乙酸合成 PHA 的合成途径可能与脂肪酸的从头合成有关。

从几例已报道的共聚物合成的研究可以看出,除基因以外的其它外界条件,尤其是碳源形式及营养限制因素,也会影响 PHA 共聚物的合成。以前认为假单胞菌要么合成 PHB,要么合成 mcl PHA,这一特征是假单胞菌类的一项分类指标,而目前已发现两例 *Pseudomonas* sp. 61-3<sup>[8,9,10]</sup>, *Pseudomonas* sp. A33<sup>[11]</sup> 能合成 HB 与 mclHA 的共聚物,也许是它们的 PHA 合成酶基因比较特殊。但也不排除底物及其它培养条件的影响。

*Pseudomonas* sp. A33<sup>[11]</sup>,是以 3-羟基丁酸和 1, 3-丁二醇为底物时合成 P(HB-co-HAmcl),这是两种很易被迅速转化为 3-羟基丁酰 CoA 进而作为 HB 单体进入 PHA 链的底物,因此可以估计对一些能合成 mclPHA 的假单胞菌供给易合成 HB 单体的前体来合成 P(HB-co-

HAmcl) 共聚物。

当 *Bacillus cereus* 以葡萄糖为碳源培养时,只合成 PHB,而当以己酸和辛酸为碳源时分别合成 HB-co-HC 及 HB-co-HO 的共聚物<sup>[3]</sup>。因而在寻找 P(HB-co-HAmcl) 共聚物时,除菌种外也需进行各种底物的试验。

限制营养因素,如 N, P, 氧,会使碳源过剩,生长处于非平衡状态,从而促进 PHA 的合成。某些金属离子,辅酶,辅基的加入也会抑制或促进 PHA 的合成,这些因素若直接影响酶系统本身,则有可能合成 P(HB-co-HAmcl) 共聚物。Ramsay 等报道<sup>[7]</sup>。 *Pseudomonas resinovorans* 在限 N 的恒化培养条件下,以辛酸为底物合成含 3-羟基丁酸-3-羟基己酸(C6)-3-羟基辛酸(C8)-3-羟基癸酸(C10) (1:15:75:9) 的共聚物。而以己酸为底物时,合成 C4-C6-C8-C10 (8:42:23:7) 的共聚物。

### 5 选育 P(HB-co-HA) 微生物及工业化生产所存在的问题

①已经获得的可合成 P(HB-co-HAmcl) 的微生物并未表现出一定的规律。包括革氏阳性菌 *Bacillus*, 革氏阴性菌 *Aeromonas*, *Comomonas*, *Pseudomonas*, 光合细菌 *Rhodococcus* 和严格厌氧菌 *Syntrophomonas*。同一种菌,有的报道能合成 P(HB-co-HAmcl) 有的则不能。如 *B. megaterium*, 被 Findly 发现能合成 P(HB-co-HAmcl), 而 Caballero 等的实验则只有 PHB<sup>[3]</sup>。

*P. pseudoflava* 被 Timm 等发现能合成, 而 Caballero 的研究中没有发现 P(HB-co-HAmcl) [3]。关于它们的 PHA 合成的酶及基因有待深入研究。在这种状况下, 寻找合成 P(HB-co-HAmcl) 的微生物就有一定的难度。

② PHA 产物的发现都是通过先在显微镜下用苏丹黑或 Nile 蓝染色观察脂肪酸颗粒。然后用有机溶剂提取, 气相色谱、NMR 确定产物结构。在大量的筛选工作中, 完全通过气相色谱法来确认 P(HB-co-HAmcl) 的合成与否这一套通用于所有 PHA 的方法, 对 PHA 共聚物不具特异性和灵敏性。

③ P(HB-co-HAmcl) 的合成同时受菌种和培养条件的影响, 最关键的是菌种必须具有合成 P(HB-co-HAmcl) 的酶系统。从环境因素的影响可以推测这种酶系统可能是被诱导的。

④ P(HB-co-HAmcl) 工业化生产的实现依赖于以下因素: 微生物能否利用廉价的碳源, 生长速率, 多聚物合成速度, 多聚物积累的最大限度, PHA 提取的经济性等。

## 6 展望

塑料由于其使用的耐久性和不易降解性以及其它一些特点如质轻、易加工等, 已成为人类生活中不可缺少的重要材料。而这种不易降解性的负面效应是导致每年以 2,500 万吨速率增长的固态垃圾的积累。为了处理这些“白色污染”, 保护地球环境, 人们开始寻找既能保持塑料的物理化学及加工性能又能被生物降解的材料, 如聚酯酯, 脂肪酸酯, 多糖等及其共聚物和共混物。估计到 2000 年生物可降解塑料的市场需求将达到 140 万吨或更多。在生物可降解塑料中, 微生物合成的聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoic acids 或 PHAs) 由于能被彻底降解且具有与化学合成的塑料相似的性质而受到关注。与化学合成的高分子材料相比, 依单体的组成不同, PHAs 具有从硬的晶体到软的弹性体等一系列不同聚合物的性质。此外 PHA 的生物合成也赋予了它们与由化学方法从石油原料获得的多聚物不同的特点。如酶的立体专一性使得 PHA 的单体均呈 D(-) 构象, 从而具有光学活性; 生物合成的 PHA 也易与生物相容, 这些特性使 PHA 在许多高技术含量及高附加值

领域具有应用前景。如用 PHA 制成骨骼愈合支架, 它的压电效应可促进骨骼生长和愈合, 因为骨骼新组织生长压迫支架, 这种压力可使 PHA 产生电流, 骨骼受到电流的刺激而加速生长, 骨骼很快愈合后, 支架不必再动手术取出, 让其逐渐吸收。PHA 用作药物缓释载体, 手术缝线和人造血管等, 不会引起过敏反应, 在体内缓慢降解而被吸收, 经简便水解的 PHA 还可作为碳源在临床上与葡萄糖一样供注射或口服。

羟基丁酸与中链脂肪酸共聚物作为 PHA 家族最有应用前景的新成员, 它的单体组成及分子量的控制, 生产及产物提取的效率与成本的提高, 都还需要对其遗传和代谢背景的深入研究。通过基因工程手段提高产物的表达量, 利用噬菌体裂解因子促进产物的释放将是未来研究的方向。

## 参 考 文 献

- [1] 陈 琦, 黄和春, 易祖华. 微生物学通报, 1994, 21(5): 297~303.
- [2] Lee S Y, Biotechnol Bioeng, 1996, 49: 1~14.
- [3] Caballero K P, Karel S F, Register R A. Int J Bio Macromol, 1995, 17: 86~92.
- [4] Noda I, United States Patent, No. 5,502,116, 1996.
- [5] Doi Y, Kitamura S, Abe H. Macromol, 1995, 28: 4822~4828.
- [6] Valentin H E, Lee E Y, Steinbuchel A. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 40: 710~716.
- [7] Ramsay B A, Saracovan I, Ramsay J A, et al. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 744~746.
- [8] Abe H, Doi Y, Fukushima T, et al. In: J Biol Macromol, 1994, 16: 115~119.
- [9] Kato M, Bao H J, Doi Y. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 45: 363~370.
- [10] Kato M, Fykui R, Doi Y. Bull Chem Soc Jap, 1996, 169: 515~520.
- [11] Lee E Y, Jendrossek D, Steinbuchel A, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 42: 901~909.
- [12] Kobayashi G, Shiotani T, Doi Y, et al. in: Doi Y and Fukuda (eds), Biodegradable Plastic and Polymers, Elsevier Science, Amsterdam. 1994, p410~416.