

# 生物可降解塑料的发酵生产研究进展\*

伍朝晖 杨幼慧 钟士清

(华南农业大学食品科学系 广州 510642)

**关键词:** 生物可降解塑料, 聚羟基烷酸, 发酵, 基因工程菌

**中图分类号:** TQ929 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)3-0220-04

近十几年来,随着化学合成塑料造成环境污染的日趋严重,微生物合成生物可降解塑料的研究受到人们的广泛重视。聚羟基烷酸 (polyhydroxyalkanoates,

---

\*广东省自然科学基金资助项目

**收稿日期:** 1999-03-08. **修回日期:** 1999-06-15

PHA)具有与化学合成塑料相似的性质,能拉丝、压模、注塑等,而且具有合成塑料所没有的特殊性能,如利用其生物相容性可作为外科手术缝线、人造血管和骨骼代用品,术后无需取出。因而在工业、农业、医药和环保等行业都具有广阔的应用前景。

目前,微生物发酵生产是获得生物可降解塑料的主要途径。对 PHA 研究最多的是聚羟基丁酸(poly-3-hydroxybutyrate, PHB)和羟基丁酸与羟基戊酸的共聚体(poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV)。英国 ICI 公司(现为美国 Monsanto 公司)以发酵方式生产 PHBV,年产 1000 吨,但由于生产成本过高制约了大规模商业化应用。因此,选育能利用廉价底物的菌株,改进发酵工艺,革新提取技术,不断降低成本,将是今后需要解决的主要问题。采用合适的发酵方式将有助于提高聚合物产率和改进产品质量。本文就 PHA 的发酵方式与基因工程菌生产 PHA 方面进行论述,以推动发酵生产生物可降解塑料水平的提高。

## 1 发酵方式的研究

根据 PHA 生物合成机制,产 PHA 的细菌可分为两类:(1)碳源丰富时,细菌迅速繁殖菌体,然后在限制某种营养成分如氮、磷、钾、镁、氧或硫时大量累积 PHA,如真养产碱菌(*Alcaligenes eutrophus*),扭脱原单胞菌(*Protomonas extrorquens*),食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)等;(2)细胞生长与 PHA 形成相偶联,如巨大产碱菌(*A. latus*),棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)变异株以及引入真养产碱菌 PHA 合成酶基因的大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

目前,研究 PHA 生产一般采用补料分批发酵和连续发酵。

**1.1 补料分批发酵** 补料分批发酵以分批发酵为基础,吸取了连续发酵的优点,可消除高浓度底物对细胞生长的抑制作用,还可弥补低浓度底物限制细胞生长的缺陷,从而有效地控制菌体的生长过程,获得较高的菌体浓度。在聚合物形成阶段,某些营养成分也需补料来控制,在恰当的范围,才有可能获得最佳产率。补料分批发酵是达到高密度培养获得高 PHA 产量的较好方法<sup>[1,2]</sup>,往往以补加碳源为主,或辅以氮源、无机盐,以解决氮源抑制、补料反应滞后等问题。

真养产碱菌是一种需氧、化能自养菌,易生长,聚合物积累量高,生产技术较为成熟,常用来生产 PHA。

堵国成等<sup>[3]</sup>采用指数流加模型对发酵过程进行控制,PHB 含量为 82%。如能改善供氧条件,延长细胞生长时间,可以进一步提高 PHB 产量。Kim 等<sup>[4]</sup>用在线葡萄糖分析仪控制浓度高密度培养生产聚合物,保持葡萄糖浓度 10~20g/L 及菌体浓度达到 70g/L 时限制氮源能取得最佳比生长速率和 PHB 含量,控制溶解氧浓度 20% 以上,生产率 2.42g/L/h。限制氮源后不能用氨水而需改用 NaOH 溶液调节 pH 值,但 NaOH 溶液易引起细胞裂解,在这种条件下实际上高密度培养已不太可能。而改为限制磷源用氨水调节 pH 值的试验表明:最初磷酸盐浓度为 5.5g/L 有助于提高胞内 PHB 含量,发酵过程中葡萄糖只需维持在 0~20g/L,可获得目前所报道的最高生产率 3.14g/L/h<sup>[4]</sup>。

巨大产碱菌生长速度快,不需营养限制,细胞生长同时大量积累聚合物,能利用蔗糖特别是糖蜜作碳源合成 PHB,有效地降低了生产成本。发酵过程中,补加复合氮源增加比生长速率,可提高 PHA 的产量和质量。而用恒溶氧流加法培养菌体浓度为 76g/L 时,限制氮源,维持蔗糖浓度 5~20g/L,此时细胞基本不生长,溶氧没有明显变化,PHB 生产率高达 5.13g/L/h,合成速率为 0.44g/g 细胞/h,高于真养产碱菌的 0.15g/g 细胞/h 和重组大肠杆菌的 0.18g/g 细胞/h<sup>[5]</sup>。

Tanaka 等<sup>[7]</sup>使用两种微生物两阶段补料分批发酵生产 PHB。先用乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)将木糖转化成 L-乳酸和乙酸,离心除去菌体细胞,在上清液中接种真养产碱菌。即使发酵期间不限制营养,PHB 积累量也占细胞干重的 55%,细胞比生长速率 0.30h<sup>-1</sup>。Katoh 等<sup>[8]</sup>使用德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)和真养产碱菌混合发酵葡萄糖,并建立数学模型优化和控制 PHB 的发酵生产。真养产碱菌利用 CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 合成 PHB 的两个主要困难得到解决<sup>[9]</sup>:一是利用气体循环系统增加可利用气体;二是混合气体中 O<sub>2</sub> 浓度控制在爆炸极限以下解决了安全问题。由于细胞生长需氧高,混合气体中氧气含量低,因此商业化生产还有一段距离。

现将国内外使用不同菌种补料分批发酵生产 PHA 的部分结果列于表 1。

**1.2 连续发酵** 连续发酵可以使微生物细胞的生长速度、代谢活性处于恒定状态,达到稳定高速培养微生物或产生大量代谢产物的目的。

表1 各种细菌在发酵罐中补料分批发酵生产PHA

菌种	碳源	规模(L)	时间(h)	细胞干重(g/L)	PHA浓度(g/L)	PHA含量(%)	生产率(g/L/h)	文献
<i>A. eutrophus</i>	葡萄糖	2.5	50	164	121	76	2.42	1
<i>A. latus</i>	蔗糖	1	18	143	71.4	50	3.97	2
<i>A. eutrophus</i>	葡萄糖	2	49	60.1	49.3	82	1.01	3
<i>A. eutrophus</i>	葡萄糖	60	74	281	232	83	3.14	4
<i>A. latus</i>	蔗糖	6.6	8	112	98.7	88	4.94	5
<i>A. latus</i>	葡萄糖+丙酸	10	34	6.6	4.75	72		6
<i>L. lactis</i> + <i>A. eutrophus</i>	木糖	1	24	8.5	4.7	55		7
<i>A. eutrophus</i>	CO <sub>2</sub>	2	40	91.3	61.9	68	1.55	9
重组 <i>E. coli</i>	葡萄糖	2.5	42	117	88.8	79	2.11	12
重组 <i>E. coli</i>	葡萄糖	6.6	44	206	149	73	3.4	13
重组 <i>E. coli</i>	葡萄糖	50	36	154	101	66	2.8	13
重组 <i>E. coli</i>	乳清	2.5	49	87	69	80	1.4	14
重组 <i>E. coli</i>	糖蜜	5	31.5	39.5	31.6	80	1	15

Ramsay 等<sup>[10]</sup>首先研究了一级和二级连续发酵生产 PHB 和 PHBV。在单级恒化器中使用真养产碱菌以葡萄糖为基质,限制氮源合成的 PHB 占细胞干重的 33%。使用巨大产碱菌以蔗糖为主要碳源,加入丙酸至 5g/L, PHBV 中 3HV 单体为 20mol%, 聚合物总产量不受影响。如以戊酸替代丙酸,3HV 的含量更高。戊酸浓度达到 8.5g/L 时蔗糖同化作用受到抑制。一级连续发酵生产 PHA 时,C/N 比过高导致底物利用不完全。将发酵液转入二级发酵罐,延长发酵时间,碳源被完全消耗,PHBV 占细胞干重的 58%,其中 3HV 占 11mol%。大多数细菌如真养产碱菌在单级恒化器中不能同时得到高比生长速率和高 PHA 含量,而巨大产碱菌等少数细菌 PHA 合成与生长偶联,更适合于使用一级连续发酵法生产 PHA。

堵国成等<sup>[11]</sup>则采用二级连续发酵系统对不同稀释率下 PHB 的生产进行了研究。在一级连续发酵系统中,当稀释率为  $0.21\text{h}^{-1}$ ,细胞干重最大值为  $27.1\text{g/L}$ 。二级发酵系统中,稀释率为  $0.14\text{h}^{-1}$ 时,细胞干重最大值为  $47.6\text{g/L}$ ;稀释率  $0.12\text{h}^{-1}$ 时,PHB 的生产率为  $2.50\text{g/L/h}$ ,但胞内 PHB 含量仅 47.6%;稀释率为  $0.075\text{h}^{-1}$ 时,胞内 PHB 含量 72.1%,生产率为  $2.14\text{g/L/h}$ 。随着细胞比生产速率的增长,细胞中 PHB 含量和单位菌体合成 PHB 的量不断下降。如果要在较大的稀释率下进行发酵,可考虑采用三级连续发酵系统,以提高 PHB 含量和产物对基质的转化率,但会加大过程控制的难度,增加系统染菌的可能性。

## 2 基因工程菌生产 PHA 的研究

重组 DNA 技术可用于修改或引入新的代谢途径,合成新型聚合物,拓宽底物利用范围,提高产量降低成本。合适底物的选择可以通过两种途径解决:一是将底物合成基因转入 PHA 生产菌株中;二是将 PHA 合成酶基因转入可以利用廉价底物的非 PHA 生产菌株中。第二种方法可能更有希望。目前引入真养产碱菌 PHA 合成酶基因的重组大肠杆菌是最成功的基因工程菌。

Kim 等<sup>[12]</sup>首次报道了使用重组大肠杆菌恒 pH 值补料分批发酵生产 PHB,但必须使用复合培养基,增加了生产成本。为了降低成本,改用合成培养基生产 PHB,但 PHB 的浓度相当低,其原因是在复合培养基中产生了更多的乙酰 CoA 和 NADPH,有利于 PHB 的合成,但重组大肠杆菌在合成 PHB 的过程中细胞会丝状化,且在合成培养基中的程度比在复合培养基中更严重,丝状化导致比生长速率变小,代谢活性降低,因而 PHB 积累量减少。研究发现形成丝状是由于细胞分裂蛋白 FtsZ 失去活性所致,通过在大肠杆菌中多量表达 FtsZ 蛋白,扩增其活性可抑制丝状化<sup>[13]</sup>。

Wang 和 Lee<sup>[13]</sup>利用能抑制丝状化的重组大肠杆菌在合成培养基中恒 pH 值补料分批发酵生产 PHB。他们认为可将重组大肠杆菌的发酵过程分为两个阶段:(1)细胞生长期,此时胞内 PHB 含量相对不变;(2)PHB 合成期,此时 PHB 随细胞生长积累很快。他们进行了限氧试验,细胞生长期限氧,则细胞生长停止,胞内 PHB 也没有明显增加,而在 PHB 合成期限氧,细胞生长和

PHB 积累都不会受到抑制。这种现象可能是由于生长期限乙乙酸浓度 (14g / L) 高于临界生长浓度 (5g / L); 而 PHB 合成期浓度低于 4g / L。

总之,使用重组大肠杆菌具有以下有利之处:(1)原料广泛,乳糖、木糖、乳清、半纤维素水解物和糖蜜都可作为原料,有利降低成本。(2)高密度培养,生长速度快,生产率高。(3)胞内 PHB 含量高,且聚合物变脆,更易提取。(4)大肠杆菌细胞内不含 PHB 解聚酶,发酵期间 PHB 不降解。(5)使用重组大肠杆菌发酵生产 PHB 可以通过调节 PHA 合成酶活性控制分子量大小。但是使用重组大肠杆菌需要解决两个问题:复合氮源和高纯度氧气。虽然 Wang 和 Lee 取得了一些进展,但产物转化率却降低了<sup>[13]</sup>,因此有待进一步研究。

### 3 结束语

近年来,由于产品价格太高制约了 PHA 的广泛应用。因此发酵生产的关键是提高产量降低成本,具体来说,可从以下几方面考虑:

选育能利用廉价原料、高产 PHA 的优良菌种。可以通过传统菌种选育方法发现新的天然菌,或对现有菌种进行改造,提高合成 PHA 的能力,还可利用重组 DNA 技术构建基因工程菌,将 PHA 合成酶的关键基因植入能利用廉价底物的菌株中,并且要注意保持高拷贝数质粒的稳定性。重组大肠杆菌已经显示了良好的发展前景。

针对不同微生物进行发酵工艺及动力学研究,提高细胞培养密度,缩短发酵周期,建立发酵过程的数学模型,实现发酵过程的优化和控制的自动化,为工业生产的设计、放大、优化控制和经济分析奠定基础。

革新 PHA 分离提取工艺,将提取成本降低到最低限度,提高聚合物的纯度。在构建工程菌的同时,插入噬菌体热敏溶解基因,使工程菌易于裂解而自动释放出胞内聚合物,将是未来的研究方向。

从目前已获得的研究成果可以展望,微生物塑料不仅是发酵工业的重要成果,而且是一类新兴生物材料的重要来源,在 21 世纪将有可能成为塑料工业发展的一个新方向。

### 参 考 文 献

- [1] Kim B S, Lee S C, Lee S Y *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**:892~898.
- [2] Yamane T, Fukunaga M, Lee Y W. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **50**:197~202.
- [3] 堵国成,陈坚,尹洪波等. *应用与环境生物学报*, 1997, **3**(4):371~374.
- [4] Ryu H W, Hahn S K, Chang Y K *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1997, **55**:28~32.
- [5] Wang F L, Lee S Y. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**:3703~3706.
- [6] Braunegg G, Lefebvre G, Reener G *et al.* *Can J Microbiol*, 1995, **41**(Suppl 1):239~248.
- [7] Tanaka K, Katamune K, Ishizaki A. *Biotechnol Lett*, 1993, **15**:1217~1222.
- [8] Katoh T, Yuguchi D, Yoshii H *et al.* *J Biotechnol*, 1999, **67**:113~134.
- [9] Tanaka K, Ishizaki A. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **45**:268~275.
- [10] Ramsay J A, Lomaliza K, Chavarie C *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**:2093~2098.
- [11] 堵国成,陈坚,陈银广等. *生物工程学报*, 1998, **14**(2):187~192.
- [12] Kim B S, Lee S Y, Chang H N. *Biotechnol Lett*, 1992, **14**:811~816.
- [13] Wang F L, Lee S Y. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**:4765~4769.
- [14] Wong H H, Lee S Y. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **50**:30~33.
- [15] Liu F, Li W Q, Ridgway D *et al.* *Biotechnol Lett*, 1998, **20**:345~348.