

## 聚乳酸降解菌株筛选鉴定及降解过程优化

林娟<sup>1,2</sup> 周景文<sup>2,3</sup> 康振<sup>1,2\*</sup> 堵国成<sup>2,4\*</sup> 陈坚<sup>2,5</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

(3. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

(4. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(5. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】筛选能够降解聚乳酸的微生物,提高聚乳酸的降解速率并鉴定聚乳酸降解酶种类。【方法】以明胶为唯一碳源,筛选能够降解聚乳酸的微生物;通过优化明胶添加浓度、聚乳酸添加量以及金属离子种类提高聚乳酸的降解速率;通过分析降解过程中代谢产物和酶活力变化明确聚乳酸降解酶类别。【结果】筛选获得一株聚乳酸降解菌株,鉴定为 *Lentzea waywayandensis*;经优化培养,聚乳酸在 25 d 后失重 84.8%;降解过程中,检测到乳酸的产生,体外酶活实验仅检测到蛋白酶活力。【结论】明胶作为唯一碳源适用于聚乳酸降解菌株的筛选;明胶作为碳源的同时可以作为诱导剂诱导菌株 *L. waywayandensis* 降解聚乳酸;此外,研究表明蛋白酶在聚乳酸降解过程中发挥重要作用。

**关键词:** 聚乳酸, *Lentzea waywayandensis*, 明胶, 优化, 蛋白酶

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100905); 江苏省优势学科项目; 江南大学自主科研计划项目(No. JUSRP111A23)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85329031

✉ 康振: zkang@jiangnan.edu.cn; 堵国成: gcdu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-10-21; 接受日期: 2012-12-12

# Isolation, identification of poly lactic acid degrading microorganisms and optimization of the degradation process

LIN Juan<sup>1,2</sup> ZHOU Jing-Wen<sup>2,3</sup> KANG Zhen<sup>1,2\*</sup>

DU Guo-Cheng<sup>2,4\*</sup> CHEN Jian<sup>2,5</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(4. The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(5. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract: [Objective]** The study aims to screen microorganisms capable of degrading poly lactic acid (PLA), improve the degradation rate and identify degrading enzymes. **[Methods]** Gelatin was used as sole carbon source to screen PLA degrading microorganisms. To increase the PLA degradation rate, concentration of gelatin, weight of PLA added and metal ions were optimized. By investigating and comparing metabolites and enzyme involved, we determined the category of PLA degradation enzymes. **[Results]** A PLA degrading strain was screened and identified as *Lentzea waywayandensis*. After optimization, 84.8% loss of PLA was achieved (25 d). Lactic acid as metabolite was detected during cultivation. Moreover, only obvious protease activity was observed *in vitro* experiments. **[Conclusion]** Gelatin was applicable for screening PLA degrading microorganisms. Besides acting as carbon source, gelatin could also be used as an inducer to strengthen *L. waywayandensis* to degrade PLA. Furthermore, the results obtained herein suggested that protease played an important role on PLA degradation.

**Keywords:** Poly lactic acid, *Lentzea waywayandensis*, Gelatin, Optimization, Protease

塑料已经在我们日常生活和工业发展的各个方面有着广泛的应用。但传统的塑料,如聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯等,在自然环境中很难被降解,人们对这些“白色污染”的处理主要通过焚烧和填埋,而这两种方法都会对环境造成破坏。同时,石油能源日益告急,为了应对这些不可生物降解的石油基塑料产品所带来的环境和能源问题,人们正寻求可生物降解的材料。一

些脂肪族的聚合物,如聚乳酸(Poly lactic acid, PLA)、聚羟烷基酸(PHAs)、聚羧基乙酸内酯(PCL)和聚丁烯二酸盐(PBS)与传统塑料相比拥有相似的材料性质,并兼具可生物降解的特性<sup>[1-2]</sup>。在这些可生物降解的材料中,聚乳酸(PLA)引起了最广泛的关注。

PLA 属于生物可降解脂肪族聚酯,单体为乳酸(Lactic acid, LA),以其良好的机械性能、通透

性、透明度、耐热性以及环境友好等特性被认为是最有希望的材料<sup>[3-5]</sup>。而且,它可以由生物基原材料通过生物发酵、化学聚合的方法得到<sup>[6-8]</sup>。

PLA 在环境中的降解主要依赖微生物的作用,对环境而言,PLA 是一种新型材料,能够快速吸附降解 PLA 的微生物还较少。分离筛选能降解 PLA 的微生物及酶吸引了很多研究者的关注,1997 年 Pranamuda 等首次报道 *Amycolatopsis* sp. 降解 PLA,随后,陆续有报道筛选出一些能降解 PLA 的微生物,主要属于假诺卡氏菌科及其相关的属种<sup>[8-11]</sup>。虽然 PLA 是聚酯类化合物,但大部分报道的 PLA 降解酶都被认为是丝氨酸蛋白酶<sup>[12]</sup>。而一些 PLA 的天然类似物,如明胶、酪素、蚕丝蛋白和一些肽类等,因为和 PLA 手性碳在结构的相似性,对微生物产 PLA 降解酶有诱导作用<sup>[13]</sup>。

为了获得更多关于微生物降解 PLA 的信息、强化 PLA 快速降解过程和揭示降解机理,本文主要以明胶为唯一碳源来分离筛选得到 PLA 降解微生物,并系统研究了明胶对于该微生物生长及 PLA 降解的影响。同时,通过优化降解条件显著提高了 PLA 的降解效率。此外,初步对降解 PLA 的相关酶进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 PLA 材料:** 由福建省产品质量检验研究院提供,其中,PLA 薄膜: 28  $\mu\text{m}$  厚、1.457  $\text{g}/\text{cm}^3$ 。

**1.1.2 培养基:** 基本培养基(%): 酵母膏 0.01,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{NaCl}$  0.01,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.002,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.000 05,  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.000 05,  $\text{MnSO}_4$  0.000 05,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.16,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1, pH 7.3<sup>[14]</sup>; 筛选平板培养基: 含有 2%琼脂粉及 0.1%明胶的基本培养基; 菌种活化培养基(%): 酵母膏 0.1, 牛肉浸膏 0.1, NZ amine A 0.2, 葡萄糖 1.0, pH 7.3;

诱导培养基: 含有明胶的基本培养基; 脱脂奶粉培养基(%): 脱脂奶粉 4.0, 琼脂粉 1.5, pH 自然; PLA 降解培养基: 含有 PLA 膜的基本培养基。

### 1.2 方法

**1.2.1 PLA 降解菌株的筛选:** 取 5 g 垃圾填埋场表层土以下 5 cm 处的土壤,添加到已灭菌的含 0.85%  $\text{NaCl}$  及 25 颗玻璃珠的 50 mL 生理盐水中,振荡悬浮。将上清液逐级稀释后涂布筛选培养基,30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d。将单菌落转接到含 0.1 g PLA 膜及 100 mL 基本培养基的 500 mL 摇瓶中,200 r/min、30  $^{\circ}\text{C}$  培养 25 d,根据 PLA 膜失重率选出几株菌,再次经液体活化培养基活化培养后接种 PLA 膜降解培养基进行复筛,对降解效果最好的菌株进行菌种鉴定以用于进一步研究。实验设置不接种及不添加 PLA 膜这两组对照。

**1.2.2 16S rDNA 序列分析:** 将筛得菌株以菌种活化培养基培养至生长旺盛期,取 5 mL 新鲜菌液 8 000 r/min 离心 6 min 后去上清,加 4 mL 无菌水悬浮洗涤菌体,8 000 r/min 离心 6 min 后去上清,加 4 mL 无菌水悬浮后超声波(400 W)处理 5 min,其中破碎 3 s 暂停 1 s,冰浴降温。取超声波处理后的菌液 1 mL,8 000 r/min 离心 6 min 去上清,加入 180  $\mu\text{L}$  溶菌酶(20  $\text{g}/\text{L}$ )于 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 6 h 后,利用 EZ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程股份有限公司)提取基因组 DNA,所得 DNA 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。以所得基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA,PCR 体系为 50  $\mu\text{L}$ : 模板 2  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , 引物 (1 mmol/L) 各 1  $\mu\text{L}$ ,  $10\times\text{Taq}$  缓冲液 5  $\mu\text{L}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$ ),  $\text{Taq}$  酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 灭菌超纯水 36.75  $\mu\text{L}$ 。PCR 引物序列为 P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'; P2: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT T-3'。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  90 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。将 PCR 产物利用 0.8%琼脂糖凝胶电泳,

以检测、确定目的片段,回收目的产物后,送至上海生工测序。测序结果利用 Sequence Scanner v1.0 软件进行分析,选择可信度较高的序列片段,在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行序列比对,结合菌种生理形态确定菌种的属种。

**1.2.3 PLA 膜降解过程的参数测定:** 进行 PLA 膜的降解实验时,设置不接种及不添加 PLA 膜的两组对照,均于 30 °C、200 r/min 培养。降解过程中,每 2 天取样一次,先测定不接种的对照组所损失的水分体积,然后向接种的实验组中补加相应体积的无菌蒸馏水,再进行 PLA 膜质量、细胞干重(Dry cell weight, DCW)、pH、乳酸含量及酶活力的测定。

**1.2.4 PLA 膜的降解及失重率测定:** 将 PLA 膜裁剪至约 1 cm×1 cm 大小,75 °C 烘干 4 h,准确称取质量为  $M_0$  的 PLA 膜,添加到装有 100 mL 液体基本培养基的 500 mL 三角瓶中,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min。待培养基冷却后,接种活化得到的菌液,固定于回转式摇床上,200 r/min、30 °C 条件下培养 25 d。降解实验结束时,倾出培养液,残留 PLA 膜经过滤收集、超声波清洗、75 °C 烘干 4 h 后准确称重  $M_1$ 。

PLA 膜失重率 =  $(M_0 - M_1) / M_0 \times 100\%$ 。

**1.2.5 PLA 膜表面观察:** PLA 膜降解实验结束后,将洗净烘干的残余 PLA 膜用扫描电镜 (Quanta-200) 观察表面变化情况。

**1.2.6 菌体生长测定:** 取 4 mL 培养液 8 000 r/min 离心 6 min,去上清,以蒸馏水洗涤细胞 2 次,离心去上清后,105 °C 烘干细胞至恒重以测定 DCW。

**1.2.7 高效液相色谱检测乳酸:** 取 PLA 膜降解液 5 mL 于 8 000 r/min 离心 6 min,取上清,用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的无机滤膜过滤后-20 °C 保藏用于液相检测。采用配备 Diamonsil C18, 4.6 mm×250 mm 色谱柱的 Agilent 1100 色谱仪以紫外检测

器在 210 nm 下测定乳酸含量,柱温 30 °C,流动相为甲醇:水:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>=5:95:0.05 (V/V/V),流速 0.8 mL/min,进样体积 20  $\mu\text{L}$ <sup>[15]</sup>。流动相配制所用水均为超纯水。

**1.2.8 蛋白酶活测定:** 蛋白酶活测定参照福林酚法,1 个单位的蛋白酶活定义为 40 °C、pH 7.5 条件下 1 min 水解酪蛋白产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸所需要的蛋白酶量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种筛选与鉴定

将垃圾填埋场土样,以生理盐水混匀、稀释涂布筛选平板,挑取单菌落,转接摇瓶复筛,获得一株在未优化条件下 25 d 内使 PLA 膜失重 29.6% 的菌株,实验编号为 2F。以固体菌种活化培养基培养该菌 3 d 后,取样在扫描电子显微镜下观察,如图 1 所示,该菌为丝状菌,孢子丝分裂形成圆形的孢子。

以提取得到的菌株 2F 的基因组为模板,以引物 P1、P2 PCR 扩增得到 1 kb 左右的片段,将片段测序结果与 NCBI 中 16S rDNA 数据比对,结果表明该菌与放线菌假诺卡氏菌科 *Lentzea waywayandensis* 有 98% 的同源性,结合其菌体形态,确定该菌为 *L. waywayandensis*。

### 2.2 明胶对菌体生长的影响

明胶与 PLA 在结构上存在相似性,被证明对微生物降解 PLA 有诱导作用<sup>[13]</sup>。本文首先研究了 *L. waywayandensis* 以不同浓度明胶为唯一碳源的生长情况。如图 2 所示,分别以含 0.5、1.0、3.0、5.0、10、20、25 及 30 g/L 明胶的基本培养基培养菌种,所得生长曲线有明显不同。当明胶浓度低于 0.5 g/L 时,几乎没有菌体积累,明胶浓度提至 10.0 g/L 时,菌种对数生长期延长至 34 h 左右;继续提高明胶含量至 25 g/L,对数生长期延长至 70 h 左右,获得了最大细胞干重(3.29 g/L)。

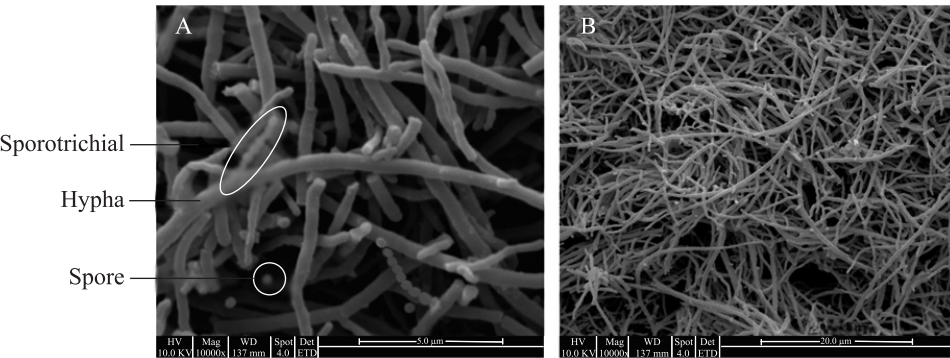


图 1 菌种 2F 在扫描电子显微镜下的照片

Fig. 1 Scanning electric microscope images of strain 2F

注: A: 具有孢子丝与孢子的菌体照片; B: 较低放大倍数下的菌体照片.

Note: A: Image of sporotrichial and spore; B: Image of strain 2F with lower magnification.

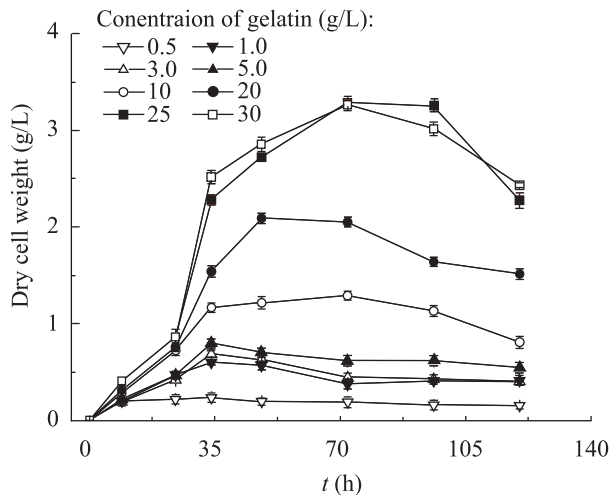


图 2 *L. waywayandensis* 在含不同浓度明胶的基本培养基中的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *L. waywayandensis* in basal medium containing different concentration of gelatin

2.3 明胶对 PLA 膜降解的影响

为了得到最佳的明胶添加方式与添加量从而

提高 PLA 膜降解效率, 结合 2.2 中明胶对菌体生长的影响, 本研究中, 首先将菌种以液体种子培养基活化培养后, 分别: (1) 不经明胶诱导培养直接转至含 0.1% PLA 膜的基本培养基中; (2) 以含 25 g/L 明胶的基本培养基诱导培养至对数中后期, 转接至含 0.1% PLA 膜的基本培养基中; (3) 直接转接到含有 25 g/L 明胶及 0.1% PLA 膜的基本培养基中; (4) 直接转接到含有 1.0 g/L 明胶及 0.1% PLA 膜的基本培养基中, 均固定在 30 ℃、200 r/min 回转式摇床上培养 25 d。测得 PLA 膜失重率如表 1 所示, 方式(2)所得 PLA 膜失重率最高, 25 d 达到 76.4%。

确定了明胶添加方法后, 进一步研究了不同明胶浓度诱导培养菌种对 PLA 膜失重率的影响。分别以含 0.5、1.0、3.0、5.0、10、20、25 及 30 g/L 明胶的基本培养基诱导培养菌种至对数中后期,

表 1 不同明胶添加方式对 PLA 膜失重率的影响				
Table 1 Effect of the way adding gelatin on weight loss of PLA film				
明胶添加方式 The way adding gelatin	不添加明胶 Without addition of gelation	在诱导培养基中添加 25 g/L 明胶 Adding 25 g/L gelatin to induction medium	在降解培养基中添加 25 g/L 明胶 Adding 25 g/L gelatin to degrading medium	在诱导培养基中添加 1.0 g/L 明胶 Adding 1.0 g/L gelatin to degrading medium
PLA 膜失重率 Weight loss of PLA film (%)	47.5	76.4	57.6	68.6

以接种量 5% 转接到含 0.1% PLA 膜的基本培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 25 d。测得 PLA 膜失重率与相应接种的细胞干重如图 3 所示。从图 3 中可以看出明胶浓度低于 10 g/L 时, 随着接种的菌液细胞干重提高, PLA 膜失重率显著提高; 当明胶浓度从 10 g/L 增加至 25 g/L, 所接种的菌体细胞干重提高了 1 倍左右, 而 PLA 膜失重率只是提高了 3%。明胶诱导浓度 25 g/L 时, PLA 膜失重率达最高至 75.6%。在优化降解培养基中的 PLA 膜添加量时, 将 PLA 膜的量由 0.1% 增加至 0.5%, PLA 失重率提高到 84.8% (此优化过程本文未详述)。

## 2.4 不同金属离子及 EDTA 对 PLA 膜降解的影响

金属离子在微生物生长以及酶催化反应中发挥着重要作用。因此, 我们考察了不同金属离子对 *L. waywayandensis* 菌体生长以及对 PLA 膜降解的影响。实验中, 我们一方面将降解 PLA 膜时所用基本培养基中含有的金属阳离子分别去除 (除  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  外), 另一方面在原基本培养基的基础上分别添加了  $\text{NiSO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{CoSO}_4$ 、 $\text{CuSO}_4$

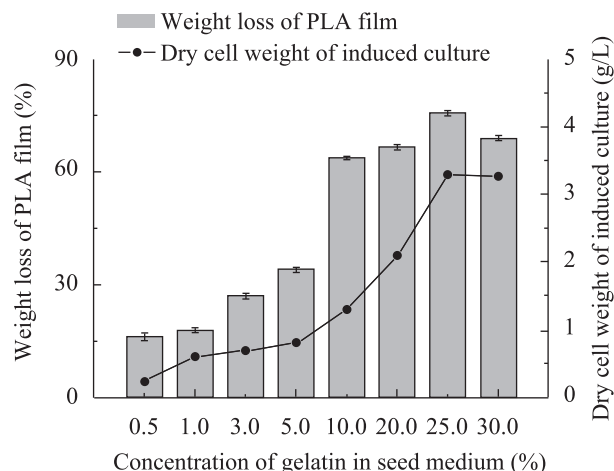


图 3 以不同浓度明胶诱导培养菌种所得细胞干重及 PLA 膜失重率

Fig. 3 DCW and weight loss of PLA film obtained by cultivating *L. waywayandensis* with different concentration of gelatin as inducer

和 EDTA (终浓度均为 1 mmol/L), 接种菌体降解 0.5% PLA 膜, 25 d 后测定 PLA 膜失重率及所得细胞干重。如图 4 所示, 去除  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  对 PLA 膜降解影响不大, 而去除  $\text{Mg}^{2+}$  则显著降低了 PLA 膜的降解。和  $\text{Ni}^{2+}$  相比, 添加  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  则显著抑制了 PLA 膜的降解, 而螯合剂 EDTA 的添加, 则使 PLA 膜的降解下降至 16.46%, 同时菌体干重降低至 0.471 g/L。通过比较菌体细胞干重和 PLA 膜的降解发现, PLA 膜的降解率与菌体生长相偶联, 即金属离子通过影响菌体生长进而影响到对 PLA 膜的降解。

## 2.5 PLA 降解酶的初步解析

以含 25 g/L 明胶的基本培养基诱导培养菌种至对数中后期, 并以接种量 5% 转接到含 0.5% PLA 膜的基本培养基中, 于 30 °C、200 r/min 培养。

2.5.1 PLA 膜降解过程解析: 将 PLA 膜降解过程中不同时间的残余材料, 洗净后用扫描电镜观察表面变化。如图 5A、B 所示, 未接种菌体的对照组 PLA 膜在第 1 天与第 24 天时表面基本没

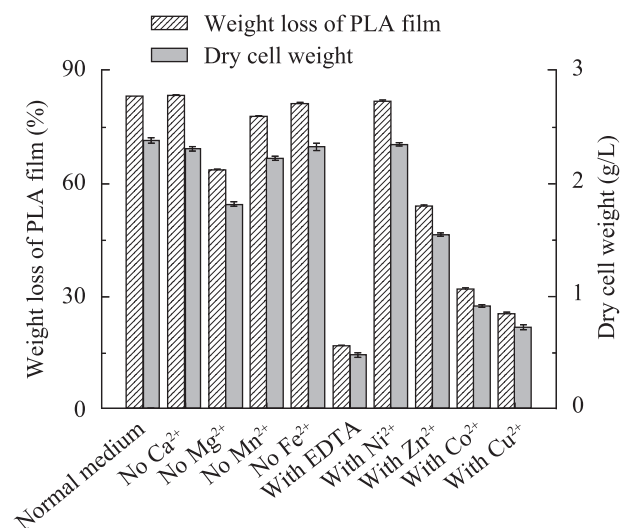


图 4 不同金属离子与 EDTA 对 *L. waywayandensis* 降解 PLA 膜及生长的影响

Fig. 4 Effect of different metal ions and EDTA on PLA film degradation and *L. waywayandensis* growth

有变化。而如图 5C 所示, 在 *L. waywayandensis* 作用下, PLA 膜在前 1-5 天内表面没有明显变化, 主要是材料断裂成小碎片; 在第 8-18 天内, PLA 膜表面开始变得凹凸不平、产生明显的沟痕, 且裂缝数量逐渐增多; 第 20-24 天的照片显示 PLA 膜很多部位已经被降解而出现破洞, PLA 膜变薄。从这些照片可以看出, 摇瓶液体降解条件下, PLA 膜的降解首先是破碎成小片段, 然后微生物逐渐侵蚀、降解 PLA 膜表面, 产生沟痕、破洞。对比图 5A、B, 可以确定在 *L. waywayandensis* 作用下, PLA 膜的确得以降解。

测定降解过程中 DCW、PLA 质量、乳酸及 pH 的变化, 如图 6A 所示, 随着 PLA 质量逐渐减少, DCW 在逐渐增加, 两者的变化主要集中在前 15 天, 后 10 天变化速率减小。如图 6B 所示, 前 10 天内, 乳酸含量快速上升, 降解中后期减少并趋于稳定, pH 则随着乳酸的产生而下降, 后又随着乳酸含量下降而升高。以含 0.5% 乳酸的基本培养基培养 *L. waywayandensis*, 如图 6C 所示, 该菌可以生长也进一步证明了它可以利用 PLA 降解产物乳酸<sup>[14]</sup>。

**2.5.2 PLA 降解酶初步解析:** 蛋白酶是迄今报道的可以降解 PLA 酶中种类最多的一类, 尤其是碱性丝氨酸蛋白酶<sup>[8,12]</sup>。为了探索 *L. waywayandensis* 降解 PLA 膜所涉及到的主要酶, 以分别含脱脂奶粉和三乙酸甘油酯为唯一碳源的平板培养 *L. waywayandensis*。2 d 后 *L. waywayandensis* 在脱脂奶粉平板上形成了如图 6D 所示的显著透明圈, 而在三乙酸甘油酯平板上培养了 9 d 一直没有生长出菌落。由此可见, *L. waywayandensis* 具有能够合成、分泌胞外蛋白酶的能力, 却不能分泌胞外的脂肪酶。这一结果暗示着 *L. waywayandensis* 用来降解 PLA 膜的酶是蛋白酶而不是脂肪酶。

确认 *L. waywayandensis* 具有产胞外蛋白酶的能力之后, 在 PLA 膜降解的过程, 测定了上清液的蛋白酶活力, 得到如图 6B 中所示的酶活曲线, 在降解过程的前 18 天, 蛋白酶活上升, 之后酶活下降, 在未添加 PLA 膜的对照组上清中, 蛋白酶活力抑制维持在接近零的水平(图中未表示), 这些结果说明 *L. waywayandensis* 能够分泌对 PLA 膜降解至关重要的胞外蛋白酶。

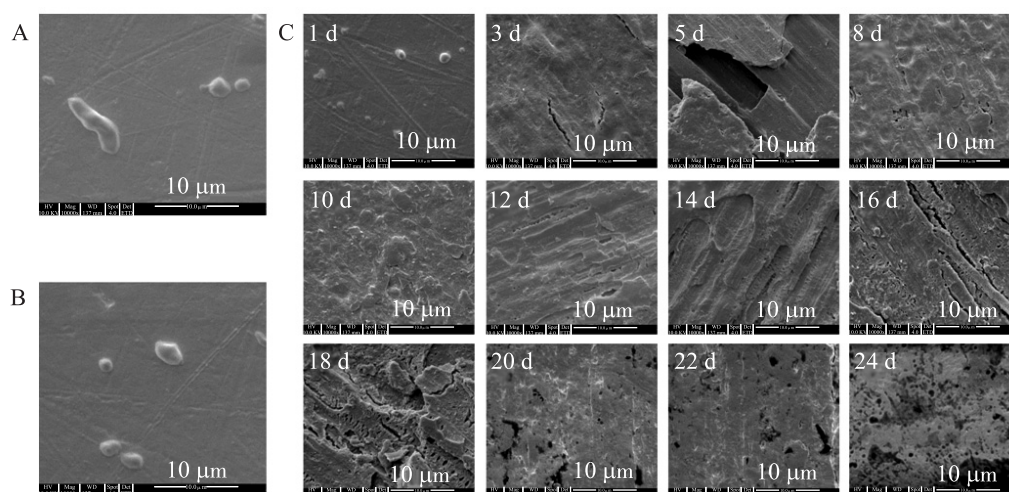


图 5 PLA 膜表面变化的扫描电镜照片

Fig. 5 Scanning electron microscope images of surface change of PLA film

注: A: 对照组 PLA 膜(第 1 天); B: 对照组 PLA 膜(第 24 天); C: *L. waywayandensis* 作用下的 PLA 膜。

Note: A: PLA film control at 1<sup>st</sup> day; B: PLA film control at 24<sup>th</sup> day; C: PLA film degraded by *L. waywayandensis*.

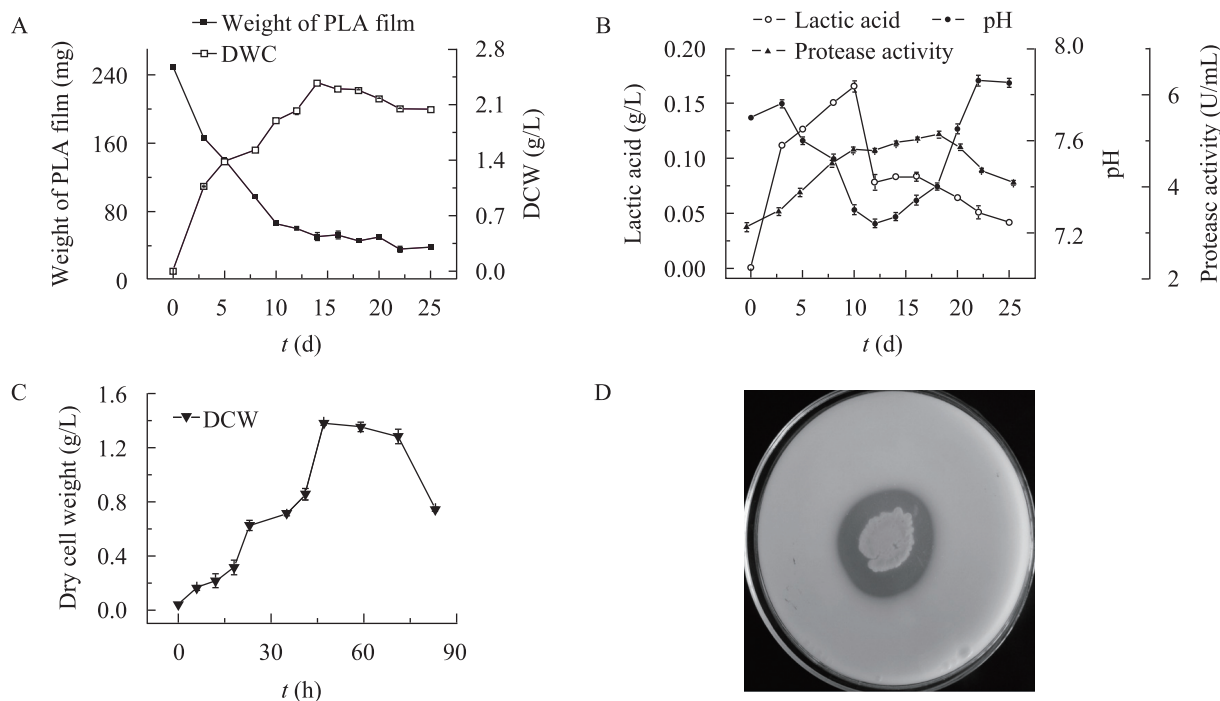


图 6 *L. waywayandensis* 降解 PLA 膜的过程解析

Fig. 6 Process resolution of PLA film degradation by *L. waywayandensis*

注: A: DCW 与 PLA 膜质量的变化曲线; B: 乳酸含量、pH 和蛋白酶活力的变化曲线; C: *L. waywayandensis* 以乳酸为唯一碳源的生长曲线; D: *L. waywayandensis* 在脱脂奶粉平板上形成的透明圈。

Note: A: Curves of DCW and weight of PLA film; B: Curves of concentration of lactate, pH and protease activity; C: Growth curve of *L. waywayandensis* with lactate as the sole carbon resource; D: Clear zone formed by *L. waywayandensis* on defatted milk powder agar plate.

### 3 讨论

随着 PLA 这一生物基、可降解材料的广泛应用, 建立其可降解性评价体系对于扩大 PLA 的工商业应用具有重要意义, 而尽可能多地获取与 PLA 生物降解、循环利用相关的信息才能帮助实现真正环境友好化<sup>[8,16-17]</sup>。本研究从大型垃圾填埋场筛选得到一株可显著利用 PLA 生长的微生物, 经鉴定为放线菌假诺卡氏菌科的 *L. waywayandensis*, 目前所发现的大部分 PLA 降解菌株属于假诺卡菌科<sup>[9]</sup>。该菌能以明胶为碳氮源生长, 且存在最佳明胶浓度使之在对数期的生长提高并延长其稳定期(图 2)。与此同时, 细胞可以利用明胶作为氮源也说明了明胶可以有

效诱导该菌产生蛋白酶。

酶在 PLA 降解中起着不可或缺的作用。酶降解 PLA 的过程首先是酶吸附到 PLA 结构中松散的部分, 然后催化酯键的水解<sup>[8]</sup>。研究表明明胶、蚕丝蛋白等可诱导微生物产 PLA 降解酶, 但怎样的明胶添加方式以及浓度可以更有效地促进 PLA 降解并未有研究报道<sup>[13,18]</sup>。通过研究本文确定了先以 25 g/L 明胶诱导培养再降解 PLA 的方法, 使菌体适应产 PLA 降解相关酶用以维持生长的环境, 从而提高降解效率, 相比 Jarerat A. 等采用的直接将明胶添加到降解培养接中的方法提高了 7.8%<sup>[14]</sup>。重金属离子会抑制或终止微生物的生长<sup>[19]</sup>, 本研究的相关研究结果说明某些金属离子对于维持 PLA 降解酶三维结构和

活力有着重要作用,进而直接影响 PLA 的降解效率<sup>[20]</sup>。在 PLA 加工改性的过程中,若要提高 PLA 可降解性则要注意金属离子的添加。

对 PLA 降解过程的初步解析表明 PLA 膜的降解主要集中在前 16 天;另外,PLA 虽然是聚酯类化合物,但现有商业脂肪酶能降解 PLA 的为数不多且要求高温高 pH,可能是因为脂肪酶不能水解由带手性碳的乳酸形成的聚酯<sup>[21]</sup>。本研究, *L. waywayandensis* 能够产生胞外蛋白酶而不产胞外脂肪酶,且在其降解 PLA 膜的培养液上清中检测到显著的蛋白酶活变化,这暗示了在该菌降解 PLA 膜的过程中,蛋白酶可能起到了关键作用。而是否所有能产胞外蛋白酶的微生物都能降解 PLA, 还需进一步研究,因为微生物降解 PLA 极可能需要多种酶共同作用<sup>[8]</sup>。

本研究通过筛选和优化开发了相比堆肥法成分明确、可控性强的液态培养基降解 PLA 的方法<sup>[17,22]</sup>,为构建快速准确的 PLA 可降解性评价体系 and 实现可降解材料真正环境友好提供了有价值的参考信息。

## 参 考 文 献

- [1] Gross RA, Kalra B. Biodegradable polymers for the environment[J]. Science, 2002, 297(5582): 803–807.
- [2] Scot G. ‘Green’ polymers[J]. Polymer Degradation and Stability, 2000, 68(1): 1–7.
- [3] Shen L, Worrell E, Patel M. Present and future development in plastics from biomass[J]. Biofuels Bioproducys and Biorefining-Biofpr, 2010, 4(1): 25–40.
- [4] Pang X, Zhuang X, Tang Z, et al. Polylactic acid (PLA): research, development and industrialization[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(11): 1125–1136.
- [5] Shimao M. Biodegradation of plastics[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12(3): 242–247.
- [6] Matsumoto K, Taguchi S. Enzymatic and

whole-cell synthesis of lactate-containing polyesters: toward the complete biological production of polylactate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 921–932.

- [7] Jung YK, Kim TY, Park SJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(1): 161–171.
- [8] Tokiwa Y, Calabia BP. Biodegradability and biodegradation of poly (Lactide)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(2): 244–251.
- [9] Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(22): 8493–8501.
- [10] Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, et al. Biodegradability of plastics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(9): 3722–3742.
- [11] Sangwan P, Wu DY. New insights into polylactide biodegradation from molecular ecological techniques[J]. Macromolecular Bioscience, 2008, 8(4): 304–315.
- [12] Wang ZY, Wang Y, Guo ZQ, et al. Purification and characterization of poly (L-lactic acid) depolymerase from *Pseudomonas* sp. strain DS04-T[J]. Polymer Engineering and Science, 2011, 51(3): 454–459.
- [13] Jarerat A, Tokiwa Y, Tanaka H. Microbial poly (L-lactide)-degrading enzyme induced by amino acids, peptides, and poly (L-amino acids)[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2004, 12(3): 139–146.
- [14] Jarerat A, Tokiwa Y, Tanaka H. Poly (L-lactide) degradation by *Kibdelosporangium aridum*[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(23): 2035–2038.
- [15] Codari F, Moscatelli D, Storti G, et al. Characterization of low-molecular-weight PLA using HPLC[J]. Macromolecular Materials and Engineering, 2010, 295(1): 58–66.
- [16] Krzan A, Hemjinda S, Stanislav M, et al. Standardization and certification in the area of

- environmentally degradable plastics[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2006, 91(12): 2819–2833.
- [17] 翁云宣. 国内外生物降解材料标准现状[J]. *中国塑料*, 2002, 16(4): 72–76.
- [18] Williams DF. Enzymic hydrolysis of polylactic acid[J]. *Engineering in Medicine*, 1981, 10(1): 5–7.
- [19] Sengör SS, Barua S, Gikas P, et al. Influence of heavy metals on microbial growth kinetics including lag time: mathematical modeling and experimental verification[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(10): 2020–2029.
- [20] Sukkhum S, Tokuyama S, Tamura T, et al. A novel poly (L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soil, phylogenic relationship and the enzyme characterization[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2009, 55(6): 459–467.
- [21] 李凡, 王莎, 刘巍峰, 等. 聚乳酸(PLA)生物降解的研究进展[J]. *微生物学报*, 2008, 48(2): 262–268.
- [22] Grima S, Bellon-Maurel V, Silvestre F, et al. A new test method for determining biodegradation of plastic material under controlled aerobic conditions in a soil-simulation solid environment[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2001, 9(1): 39–48.
- ~~~~~

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名课讲堂”版块,邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!