

特约专栏

微生物聚羟基脂肪酸酯的应用新进展

陈国强

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要: 生物制造产业系包括生物燃料、生物材料和生物化学品的产业, 近来也称为“白色生物技术”。由于国内外对有关不依赖于石油原料、环保以及二氧化碳减排和可再生资源的利用等产业的重视, 生物制造产业得到了快速发展的机会。聚羟基脂肪酸酯(简称 PHA)拥有优良的生物可降解性、生物相容性和光学性能, 是当今生物制造的重点之一。经过数十年的努力, PHA 已经成长为一个包括工业发酵、环保材料、生物燃料和医用植入材料等的产业链。综述了聚羟基脂肪酸酯的应用新进展及国内发展现状。

关键词: 聚羟基脂肪酸酯; 生物制造; 环保材料; PHA

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2012)02-0007-09

Recent Progress in Application of Microbial Polyhydroxyalkanoates

CHEN Guoqiang

(Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Biomufacturing industry includes biofuels, biomaterials and biochemicals, and it is also called “white biotechnology”. Due to recent policy to promote industries independent of petroleum, CO₂ reduction and environmentally friendliness, biomufacturing develops very fast. Being a family of biopolyesters with biodegradability, biocompatibility and chirality; microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) has become one of the focuses of biomufacturing today. Over the past several decades, PHA has been developed into an industrial value chain ranging from industrial fermentation, bioplastics, and biofuels to medical implant materials. In this review, we describe the most recent PHA developments including new applications both in China and aboard.

Key words: polyhydroxyalkanoates; biomufacturing industry; Bioplastics; PHA

1 前言

石油资源的日渐枯竭和环境的高污染是当经社会发展的两大核心制约因素, 日益受到各国政府的高度关注。因此, 具有不依赖于石油原料、环保低碳和可再生性等特点的生物制造产业得到了快速发展的机会。生物制造产业包括生物燃料、生物材料和生物化学品等产业, 近来也被称为“白色生物技术”。目前开发的重点集中在下列领域: ① 生物燃料: 从纤维素获得生物燃料乙醇、从生物废弃物获得生物燃气(甲烷)和氢气; ② 生物材料: 生物聚酯如聚羟基脂肪酸酯 PHA 和聚乳酸 PLA 等; ③ 生物化学品: 如平台化学品包括乳酸、琥珀酸、1, 3-丙二醇、3-羟基丙酸等。

生物聚酯——聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkano-

ates, PHA)是一种典型的“低碳材料”。它来源于吸收了二氧化碳的植物, 形成后可以作为塑料使用, 使用后可以转化为燃料 HAME, 燃烧后放出的二氧化碳进行光合作用转化为植物, 植物又可以作为 PHA 发酵原料, 如图 1 所示。由于具有优异的生物可降解性、生物相容

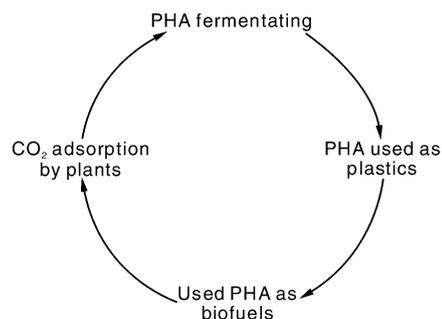


图 1 低碳材料 PHA 的绿色循环

Fig. 1 Schematic diagram of green recycle for low carbon materials PHA

收稿日期: 2011-12-09

通信作者: 陈国强, 男, 1963 年生, 教授、博士生导师

性和可再生性, PHA 已成为当今生物制造领域研究和产业化的重点之一。迄今, 研究者对于 PHA 的合成途径、代谢工程、材料性能和应用等方面进行了系统的研

究。国内外相继建立了与 PHA 大规模生产相关的 20 几家公司(表 1)。PHA 和相关技术正在形成了一个从发酵、材料、能源到医学领域的工业价值链。

表 1 全球生产和研究 PHA 的公司
Table 1 Global PHA research and production companies

Companies	Types of PHA	Production scale/t · a ⁻¹	Period
ICI, UK	PHBV	300	1980's to 1990's
Chemie Linz, Austria	PHB	20 ~ 100	1980's
BTF, Austria	PHB	20 ~ 100	1990's
Biomers, Germany	PHB	Unknown	1990's to ?
BASF, Germany	PHB, PHBV	Pilot scale	1980's to ?
Metabolix, USA	All types of PHA	Unknown	1980's to Present
Tepha, USA	All types of PHA	PHA as medical implants	1990's to present
Metabolix, USA (with ADM)	All types of PHA	50 000	2005 to present
P & G, USA	PHBHHx	Contract manufacture	1980's to present
Monsanto, USA	PHB, PHBV	Plant PHA production	1990's
Kaneka, Japan (with P & G)	PHBHHx	Unknown	1990's to ?
Mitsubishi, Japan	PHB	10	1990's
Biocycles, Brazil	PHB	100	1990's to Present
Zhejiang Tian An, China	P(HB-5% HV)	2 000	1990's to Present
Jiangmen Biotech Center, China	PHBHHx	Unknown	1990's stop
Tianjin Northern Food, China	PHB	Pilot scale	1990's stop
Beijing Tianzhu Changyun, China	All types of PHA	PHA as bio-implants	2002 to ?
Jiangsu Nan Tian Group, China	PHB	Pilot scale	1990's to ?
Shenzhen Ecoman, China	All types of PHA	5 000	2004 to present
Tianjin Green Biosci, China	P(3HB-co-4HB)	10 000	2004 to present
Shandong Lukang, China	All types of PHA	Pilot scale	2005 to ?

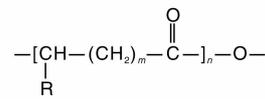
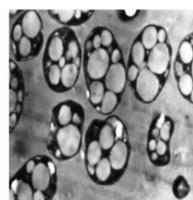
在国内各级机构支持下, 在几个五年计划和 863 计划支持下, 我国在 PHA 研究的各个领域近年来取得众多研究成果, 相关产业也得到大力发展^[1]。目前, 国内已形成了 8 个 PHA 生产企业, 总产能超过 1.5 万 t, 提供了国际市场上所有 PHA 类型, 使我国在 PHA 产业化的种类和产量方面都处于国际领先地位。下面具体对国内外 PHA 的应用新进展和国内发展现状进行分析讨论。

2 PHA 简介

PHA 由含有羟基的脂肪酸单体组成, 单体的羧基与相邻单体的羟基之间形成酯键, 分子结构如图 2 所示。其中, R 可以是烷基、烯基、带有苯环的烷基、甚至是带有卤素的烷基等等。R 可以从一个 C 到 12 个 C 不等。另外, 根据单体结构的规律性, PHA 还可以分为 PHA 均聚物 (Homopolymers)、PHA 随机共聚物 (random copolymers) 或 PHA 嵌段共聚物 (block copolymers) 等。这些不同的结构给 PHA 带来了许多热力学性能, 可以满足一些列不同的应用。

2.1 PHA 结构和分类

PHA 具有 150 多种单体结构^[2], 其中包括含有 3 ~ 16 个 C 原子的各种饱和、非饱和、直链或支链的 3-羟



○: Hydroxyalkanoate monomer

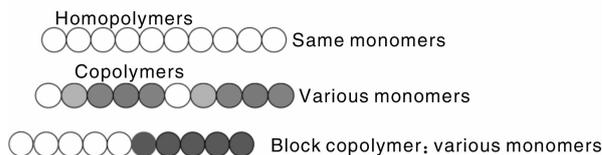


图 2 PHA 结构通式

Fig. 2 PHA general molecular structures

基、4-羟基、5-羟基、6-羟基脂肪酸, 具有脂肪族或芳香族的侧链, 也可能具有甲基、卤原子、羟基、环氧基、氰基、羰基、苯基、苯腈基、硝基苯基和酯化羰基等取代基^[3]。

根据 PHA 的单体组成, 可将其大致分成以下 3 类: 单体组成在 3 ~ 5 个 C 原子的 PHA 称为短链 PHA (scl-PHA; short chain length PHA); 单体组成在 6 ~ 16 个 C 原子的 PHA 称为中长链 PHA (mcl-PHA; medium chain length PHA); 由短链和中长链单体共聚形成的短链中

长链共聚 PHA (scl-mcl-PHA)^[4]。

按照单体单元的连接方式不同, PHA 可大致分为 3 类: ①只含有一种单体的均聚 PHA (homopolymer); ②由两种或者更多种单体单元随机聚合而成无规共聚 PHA (random copolymer); ③主链由两个或两个以上的链段构成, 且每一链段只含有一种单体单元的嵌段共聚 PHA (block copolymer)^[5]。

2.2 PHA 的性能

PHA 的材料学性质主要是由其单体组成和单体比例决定。依结构单元的组成不同, PHA 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。短链 PHA 大多数有比较高的结晶度, 表现出硬而强的塑料特性; 而中长链 PHA 由于结晶度很低, 表现出软而韧的弹性体特征。除了热塑性之外, PHA 还具有生物可降解性, 生物相容性, 疏水性、光学异构性、压电性等特殊性能^[6]。

与传统石化塑料相比, PHA 的最大优势就是其环境降解性。PHA 的环境降解主要在微生物分泌的胞外酶作用下进行, 影响 PHA 环境降解速率的因素很多: 从外部条件来看, 主要有环境类型, 微生物种群及活力、水分、温度等方面; 从材料自身性质来看, 影响其降解速率的因素主要有 PHA 的分子结构、聚集态结构、材料

宏观形态、第二组分, 如添加剂和共混的聚合物等^[7]。

2.3 PHA 的微生物发酵生产

PHA 由微生物大规模发酵生产, 迄今为止, 数种 PHA, 包括聚-3-羟基丁酸酯 (PHB)、3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚物 (PHBV)、3-羟基丁酸和 4-羟基丁酸共聚物 (P3HB4HB)、3-羟基丁酸和 3-羟基己酸共聚物 (PHBHHx) 及中长链 PHA (mcl PHA) 均实现大规模生产 (表 2)^[1]。PHA 的生产包括菌种复苏、摇瓶优化、初级发酵实验及工厂级放大发酵。PHA 的有效微生物生产取决于几个因素, 包括最终细胞密度、细菌生长速率、PHA 在细胞干重中的百分比、达到最高细胞密度所需要的时间、底物和产物间的转化效率以及底物价格及提纯 PHA 的方法。在 PHA 生产技术的开发不同阶段, 必须考虑以上的因素。

此外, 针对于特定的用途, PHA 还应该有良好的性能, 这些性能包括合适的分子量、由单体结构和组成及 PHA 生产条件共同决定的机械性能和热力学性能等。基因工程, 分子进化, 合成生物学及 PHA 生产条件操控等技术, 被大量地应用于生产具有特异结构和超分子量的 PHA。野生型细菌和重组细菌均用于各种 PHA 的大规模生产 (表 2)^[1]。对于大规模应用来说, PHA 生产成本必须足够低, 否则, PHA 无法进入市场。

表 2 用于 PHA 实验或大规模生产的野生菌株和工业化菌种

Table 2 Wild type and industrial strains used for pilot or large scale PHA production

Strain	DNA Manipulation	PHA type and yield/t · a ⁻¹	C · Source	Final CDW/g · L ⁻¹	Final PHA/% CDW	Companies
<i>Ralstonia eutropha</i>	No	PHB (10)	Glucose	>200	80%	Tianjin North. Food, China
<i>Alcaligenes latus</i>	No	PHB (10 ~ 300)	Glucose Sucrose	>60	>75%	Chemie Linz, btf, Austria Biomers, Germany
<i>Escherichia coli</i>	phbCAB + vgb	PHB (10)	Glucose	>150	>80%	Jiangsu LanTian, China
<i>Ralstonia eutropha</i>	No	PHBV (300 ~ 2 000)	Glucose Propionate	>160	>75%	ICI, UK Zhejiang Tianan, China
<i>Ralstonia eutropha</i>	No	P3HB4HB (> 10 000)	Glucose	>100	>75%	Metabolix, USA
<i>Escherichia coli</i>	phbCAB		1, 4-BD			Tianjin Green Biosci. China
<i>Ralstonia eutropha</i>	phaCAC	PHBHHx (1)	Fatty acids	>100	>80%	P&G, Kaneka, Japan
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	No	PHBHHx (1)	Lauric acid	<50	<50%	P&G, Jiangmen Biotech Ctr, China
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	phbAB + vgb	PHBHHx (0.1)	Lauric acid	50	>50%	Shandong Lukang, China
<i>Pseudomonas putida</i>	No	mcl PHA (0.1)	Fatty acids	45	>60%	ETH, Switzerland
<i>Bacillus spp.</i>	No	PHB (5)	Sucrose	>90	>50%	Biocycles, Brazil

Note: CDW: Cell dry weight; vgb: Gene encoding *Vitreoscilla* hemoglobin; phbCAB: PHB synthesis genes encoding β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase and PHB synthase; *A. caviae*: *Aeromonas caviae*; 1, 4-BD: 1, 4-5 butanediol; phaCAC: PHA synthase gene phaC from *Aeromonas caviae*

3 PHA 的应用

3.1 PHA 作为生物燃料的应用

张晓军等研究者发现, PHA 包括 PHB 和 mcl PHA

可分别通过酸水解催化转化为 R-3-羟基丁酸甲酯 (3HBME) 及中链羟基甲酯 (3HAME) (图 3)。研究显示 3HBME 和 3HAME 的燃烧热分别为 20 kJ/g 和 30 kJ/g。乙醇的燃烧热为 27 kJ/g, 加入 3HBME 或 3HAME 后,

可分别将乙醇的燃烧热提升为 30 kJ/g 和 35 kJ/g。在正丙醇和正丁醇中加入 3HBME 或 3HAME 后, 可导致燃烧热的轻微降低。3HBME/柴油, 3HBME/汽油, 3HAME/汽油等混合燃料的燃烧热低于汽油柴油等纯燃料, 但作为燃料来说是合理的。粗略估计, 由废水和活性淤泥等为原料的 PHA 制得的生物燃料的生产价格约为 1 200 \$/t^[8]。包括酒精和生物柴油在内的生物燃料, 始终存在“粮食或者燃料”及“燃料或者耕地”等争论, 而源于废水和活性淤泥的 PHA 生物燃料的生产, 是具有废水处理和能源生产双重功效的过程。这也使 PHA 在能源方面的应用开辟了新的领域。

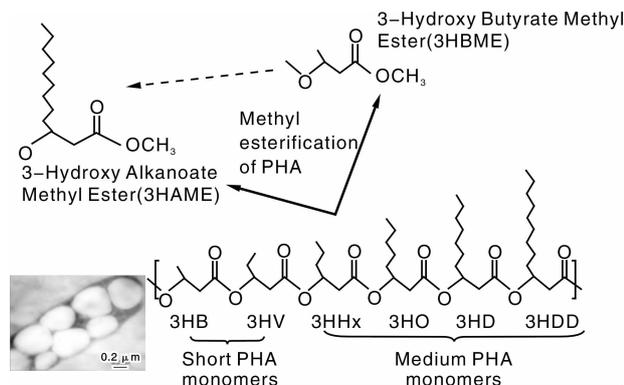


图 3 PHA 甲酯化降解生成生物燃料 3HBME 和 3HAME

Fig. 3 Biofuels 3HBME and 3HAME derived from methyl esterification of PHA

3.2 PHA 作为生物可降解塑料的应用

最初, 德国的 Wella AG 公司使用 PHA 制作日常用品及包装材料。PHA 也被 P&G、Biomers、Metabolix 及其它的一些公司开发为包装膜, 主要用于购物袋, 集装箱和纸张涂料和一次性的用品, 例如剃面刀, 器皿, 尿布, 女性卫生产品, 化妆品容器和杯子及医疗器械手术服, 家居装饰材料, 地毯, 包装袋和堆肥袋等^[1]。

PHB 纤维具有高抗张强度, 可在玻璃化温度附近等温结晶制得。延长 PHB 纤维等温结晶的时间可导致最大拉伸比的降低。当同温结晶的时间延长至 24 h 以上时, PHA 纤维的抗张强度显著提高^[9-10]。低分子量的拉伸纤维的抗张强度大于高分子量的。等温结晶化处理后再进行拉伸的 PHB 具有导向性的 α 晶体形式和平面之字形的 β 晶体结构。Vogel 等在熔融纺丝过程中, 尝试利用过氧化氢进行反应挤出。他们成功地提高了材料的结晶度并阻止了纤维中的二次结晶。这些加工方法克服了 PHA 的脆性, 生产出机械性能更强的 PHA 纤维。通过向 PHB 结构中掺入不同摩尔分数的 4HB, 3HV 或者中长链单体获得的共聚 PHA, 其韧性和弹性获得大幅度提高(表 3), 具有更广阔的应用前景。

表 3 PHA 与传统聚合物塑料性能的比较

Table 3 Comparison of PHA and conventional plastics regarding properties

Polymers	$T_m/^\circ\text{C}$	Tensile strength /MPa	Young's module /GPa	Elongation at break /%	Impact strength on break /J · m ⁻¹
P(3HB)	179	40	3.5	5	50
P(3HB-co-3HV)					
3% 3HV	170	38	2.9	-	60
10% 3HV	150	25	1.2	20	100
20% 3HV	135	20	0.8	100	300
P(3HB-co-4HB)					
3% 4HB	166	28	-	45	-
10% 4HB	159	24	-	242	-
16% 4HB	130	26	-	444	-
64% 4HB	50	17	-	591	-
90% 4HB	50	65	-	1 080	-
P(4HB)	53	104	-	1 000	-
P(3HB-co-3HH)					
5% 3HH	151	-	-	-	-
10% 3HH	127	21	-	400	-
17% 3HH	120	20	-	850	-
25% 3HH	52	-	-	-	-
P(3HH-co-3HO-co-3HD)	61	10	-	300	-
PP	170	34	1.7	400	45
PET	262	57	2.2	300	59
HDPE	135	29	0.94	650	-
PS	-	50	3.1	3	21

3.3 PHA 作为医用植入材料的应用

研究者对 PHB, PHBV, P3HB4HB, P4HB, 聚-3-羟基辛酸 P3HO (poly-R-3-hydroxyoctanoate) 和 PHBHHx 等 PHA 材料在缝线、修复装置、维修补丁、绷带、心血管补丁、骨科针、防粘连膜、支架、引导组织修复/再生设备、关节软骨修复支架、神经导管、肌腱修复装置、脊髓支架、人造食道及伤口敷料等方面的应用进行了开发^[11]。美国波士顿的 Tephra 公司专门研究心包补片, 动脉增强, 心脏支架, 血管移植物, 心脏植入物和补片, 缝合线, 辅料剂, 隔离粉和药物等。他们的 P4HB 以 PHA4400 为名字作为医用材料进入市场^[12]。近期研究显示, PHBHHx 因其良好的压电性而被成功地用于促进骨骼再生。研究者对于 PHBHHx 在神经损伤的修复和人工血管方面的应用也加以开发(图 4)^[13]。此外, 研究者还发现 PHA 的寡聚物具有营养和治疗的功效^[14]。

Shishatskaya 等人发现, 在长于 1 年的试验期中, PHB 和 PHBV 单纤维缝合没有造成植入区的体内任何不良反应, 在对于 PHBHHx 的研究中也发现了类似的现

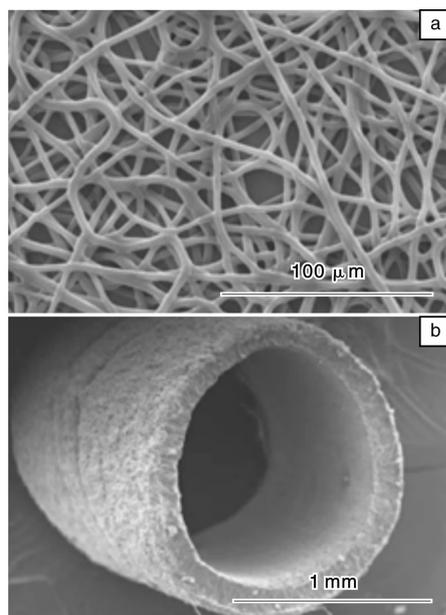


图 4 PHBHHx 电纺丝膜和神经导管支架的 SEM 像：

(a) PHBHHx 纳米纤维，(b) PHBHHx 神经导管

Fig. 4 SEM images of PHBHHx electric spinning films and its neuron conduits; (a) PHBHHx nanofibers and (b) PHBHHx neuron conduit

象^[15]。PHBHHx 的最重要的性质之一是作为植入生物材料是无毒、无免疫刺激特性，而且其降解产物包括单体和低聚物，甚至激活 Ca 离子通道并促进受损组织再生^[16]。美国 Tepha 公司以 P4HB 为原料生产的 TephaFLEX[®]可吸收缝合线产品于 2007 年获得美国食品与药品管理局 (FDA) 的美国上市批准。更多 PHA 生物材料将很快进入临床试验。因为 PHA 材料的多样性，人们可以期望 PHA 成为一个具有丰富用途的生物植入材料家族。

3.4 PHA 作为手性单体的生产和应用

如果细胞在 C 源限制培养条件下生长，所积累的 PHA 可降解为单体，可作为 C 源和能量来源被细菌重新利用，也可用于产生 PHA 单体^[17]。随着越来越多的新的 PHA 单体的被发现，PHA 已经成为获得手性化合物的新来源。

各种光学纯的 (R)-3-羟基羧酸 (R-HA) 可以通过解聚生物合成的 PHA 很方便的制得。PHB 在添加二氯乙烷和甲醇的条件下，经不同催化反应条件可化学降解生产 (R)-3-羟基丁酸 (R-3HB) 或 (R)-3-羟基丁酸甲酯^[18]。Roo 等通过水解假单胞菌生产聚羟基链烷酸酯制备手性的 (R)-3-羟基羧酸和 (R)-3-羟基羧酸甲酯^[17]。他们首先水解回收醇解后的 PHA，然后蒸馏 3-羟基羧酸甲酯混合物，分成几个组分。随后，将 (R)-3-羟基羧酸甲酯皂化产生相应的羟基羧酸，RHA 的最终产量高达 92.8%。

Lee 和同事证明，R-3HB 可以在有效地通过提供适当的环境条件后，在体内产生的解聚合作用下产生。他们在针对 *Alcaligenes latus* 的研究中发现，降低 pH 值至 3~4，能诱导细胞内的 PHB 解聚酶达到最高活性，并且阻止了细胞重新利用 (R)-3HB^[19]。Ren 等将恶臭假单胞菌细胞悬浮在不同 pH 值磷酸盐缓冲液中。当 pH 值为 11，降解和单体释放速率最高。在这种条件下，(R)-3-羟基辛酸 (R-3HO) 和 (R)-3-羟基己酸 (R-3HHx) 在培养 9 h 后降解的效率超过 90%，相应单体的产量也超过 90%。在相同条件下，相比于饱和单体，不饱和单体的降解产率较低^[20]。

PHA 来源的单体 RHA 含有手性中心及两个易于修改的功能团 (-OH 和 -COOH)。因此，RHA 的一个重要的应用是作为单体合成高分子材料，并作为合成精细化学品如抗生素，维生素，芳烃和信息素的起始原料^[21]。

最常见的 PHA 单体成员，即 (R)-3HB 已被用作生产碳青霉烯类抗生素和大环内酯的原料。(R)-3HB 一个最大的优点是，人类对它具有良好的耐受性，其在体内半衰期短。因此，(R)-3HB 可直接用作口服药物。最近，(R)-3HB 已应用于治疗失血性休克，大面积烧伤，心肌损伤，脑缺氧及帕金森等。(R)-3HB 能降低人类因老年痴呆症和帕金森神经元细胞模型的死亡率，能改善角膜上皮糜烂。此外，研究发现 (R)-3HB 能显著改善小鼠的记忆^[22]。

(R)-3HB 对于体外成骨细胞的生长有积极的促进作用，并可用于体内骨质疏松症的治疗。我们的研究发现，(R)-3HB 能增加血清碱性磷酸酶活性和钙沉积，降低血清骨钙素，防止骨密度降低，从而提高股骨最大载荷和骨变形抗力，以及改善骨小梁体积^[23]。

到目前为止，大多数 PHA 单体应用的开发，基于来源充足的 (R)-3HB。若其他的手性单体有了充足的来源，那么新的手性 (R)-3HA 的医疗应用将迅速出现。这是一个很有潜力的领域。

3.5 利用 PHA 合成机制提高微生物的适应性

有许多关于 PHA 生理功能的报道，主要是围绕如 Ca 源缺乏、干燥、紫外线辐射、高渗透压和存在有机溶剂等生存不利的条件下提高存活能力。

另据报道，有能力积累 PHB 的细菌更适应突然增加的底物浓度。最近，Zhao 等人比较了 PHBHHx 产生菌嗜水气单胞菌 *A. hydrophila* 4AK4 及其相应 PHBHHx 合成酶 PhaC 突变菌株 (称为 *A. hydrophila* CQ4) 的生存能力^[24]。清华大学的研究结果发现，野生型的 4AK4 可提供更好的抵抗环境压力，包括冷热处理，过氧化氢，

紫外线辐射, 乙醇处理, 高渗透压等。实时聚合酶链反应研究表明, PHBHHx 的合成可提高 γ poS 编码的 Sigma 因子表达水平。因此, 有可能利用 PHA 来改进一些工业微生物的耐受性。

此外, PHA 合成消耗大量的乙酰辅酶 A 和 NADH, 可用于调节某些微生物的代谢, 促进产物形成。例如, 兽疫链球菌 *Streptococcus zooepidemicus* 是一个生产化妆品透明质酸的重要菌株。当 *R. eutropha* 的 PHB 合成基因 *phbCAB* 转入兽疫链球菌中时, 重组菌只产生 40 g/L 的乳酸和 7.5 g/L 的透明质酸, 而野生型产生了 65 g/L 的乳酸和 5.5 g/L 的透明质酸^[25]。本研究成功证明, 与 PHA 合成有关的能源和 C 源代谢, 可应用于调节其他代谢产物的途径。

Han 等人分析和比较了大肠杆菌在 PHB 合成和非 PHB 合成条件下的抗性蛋白质生成情况^[26], 为 PHA 的合成与增强抗逆性有关的分子提供了证据。当分析重组菌株的蛋白质二维电泳图时发现, 3 个热休克蛋白 GroEL, GroES 和 DanK 在有 PHB 的积累时显著上调。积累的 PHB 也诱导了其他与抗性蛋白有关的基因的加强表达。这很好地说明了引入 PHA 的合成加强了大肠杆菌抗逆性, 有助于提高菌株的耐受性。

以上研究结果清楚地说明, PHA 的合成能提高非 PHA 生产菌株的抗压能力, 相关的合成机制可借用来改善在不断变化的包括温度、pH 值、底物类型和浓度等环境压力下工作的非 PHA 生产菌的生产能力。

3.6 PHA 颗粒表面蛋白的应用

几种蛋白质被发现位于胞内 PHA 颗粒的表面(图 5)^[27]。在这些蛋白质中, PHA 合成酶可以通过其 N-末端与 β -半乳糖苷酶融合, 实现与 β -半乳糖苷酶共价固定在 PHA 微粒上。同样, 无论是 PHA 解聚酶的底物结合域, 还是其他 PHA 合成调节酶 PhaF 或 PhaP (PHA 颗粒相关蛋白) 的 N-末端结构域, 都可以被用来把融合蛋白锚定在 PHA 微粒上。已证实 PHA 合成调节蛋白 PhaR 有两个不同的结果域, 分别与 DNA 和 PHB 结合^[28], PhaR 可以吸附于各种疏水性聚合物, 如 PHB, PLA, 聚乙烯 PE 和聚苯乙烯等。这种吸附主要是非特异性疏

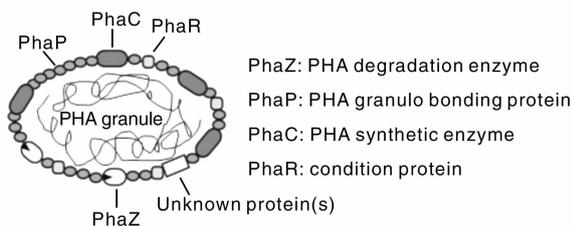


图 5 胞内 PHA 颗粒结构示意图

Fig. 5 Structural schematic diagram of a PHA intracellular granule

水作用。Banki 等开发出了一种以凝血素和目标蛋白之间自我裂解的内含融合为基础的新型重组蛋白纯化系统, 融合蛋白对细胞自身产生的 PHB 微粒有亲和力^[29]。通过收集吸附有重组蛋白的 PHB 颗粒, 内含自我剪切酶导致重组蛋白的释放。这个 PHB 蛋白纯化系统应用便捷和廉价。

王芝辉等利用一种 pH 诱导的自剪切内含子和 PHA 纳米颗粒开发出了一种新型蛋白质纯化方法(图 6)。产生靶蛋白的基因和内含子与 PhaP 是融合的, 这些基因在胞内共同过表达。重组大肠杆菌产生的含有目的蛋白及内含子和 PhaP 的融合蛋白, 通过细菌溶解过程与所有其他大肠杆菌的蛋白质一起释放。然后在体外吸附到表面疏水的聚合物纳米粒上。吸附有融合蛋白的微米或纳米粒子, 经离心浓缩, 然后纯化的目的蛋白被自我剪切的内含子释放, 通过一个简单的离心过程与微米或纳米粒子分离。该系统已成功用于生产和纯化增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、麦芽糖酶结合蛋白(MBP)和 β -半乳糖苷。此方法使低成本生产和纯化高附加值的蛋白成为可能^[30]。

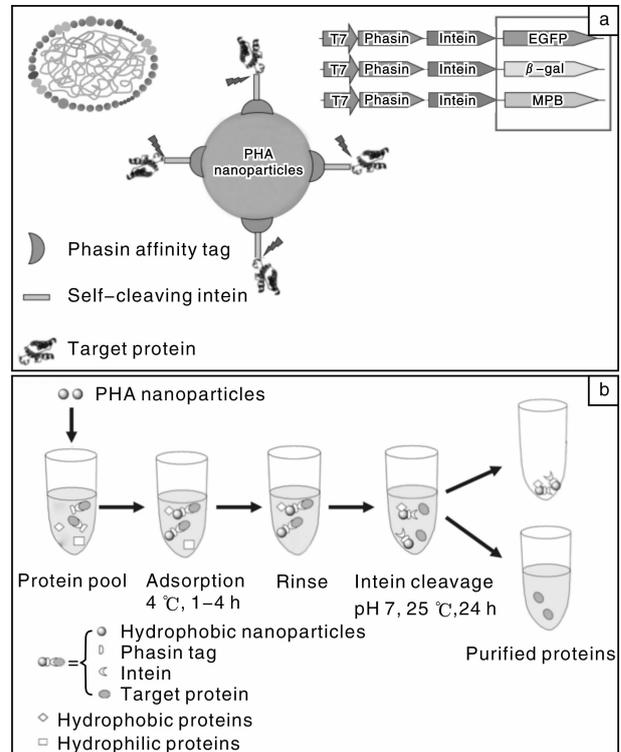


图 6 一种基于 pH 诱导的自剪切内含子和 PHA 纳米颗粒和颗粒结合蛋白的新型蛋白质纯化方法: (a) 结构示意图, (b) 蛋白纯化流程

Fig. 6 A protein purification method based on pH induced intein and PHA granule binding proteins: (a) structure illustration and (b) flowsheet of protein purification

4 国内 PHA 产业发展现状

我国在 PHA 领域的研究在世界范围内是最活跃的，特别是清华大学和中科院。基础研究的活跃开展，进一步促进了我国 PHA 产业的发展，这就解释了我国目前具有世界最多的 PHA 产业化企业的原因。

我国在研究、开发和应用可持续发展的环境友好生物材料已经奠定了坚实的基础，包括长春应用化学研究所、清华大学、天津大学和山东大学等单位，在聚羟基脂肪酸酯 PHA 领域的研发工作以及国内业已形成 1.5 万 t PHA 的生产能力，这为 PHA 产业链的形成做好了技术和物质储备(图 7)。特别是最近天津国韵生物材料公司与荷兰 DSM 公司等合作投资 2 000 万美元建立一个

1 万 t 的 PHA 的工厂，目前产能仅次于美国 Metabolix 和 ADM 合作在建的 5 万 t 工厂。

除了在产业化方面取得成功之外，在国家自然科学基金的支持下，我国还克隆了 20 个以上与生物聚酯 PHA 合成有关的基因，合成了 15 种非传统的 PHA 材料，开发了 PHA 加工成形的工艺技术。同时，在植物体系也成功地表达了一种聚酯。在“九五”期间，我国在天津、浙江、江苏和广东分别进行了 PHA 材料的中试和工业化生产，取得了宝贵的产业化经验。目前在山东、江苏、浙江和天津正在进行产业化生产基地的扩大建设，总产能将超过 10 万 t。

在专利方面，至 2009 年底国内外有关 PHA 的专利共 881 个，其中我国拥有 64 个，清华大学占其中 21 个。

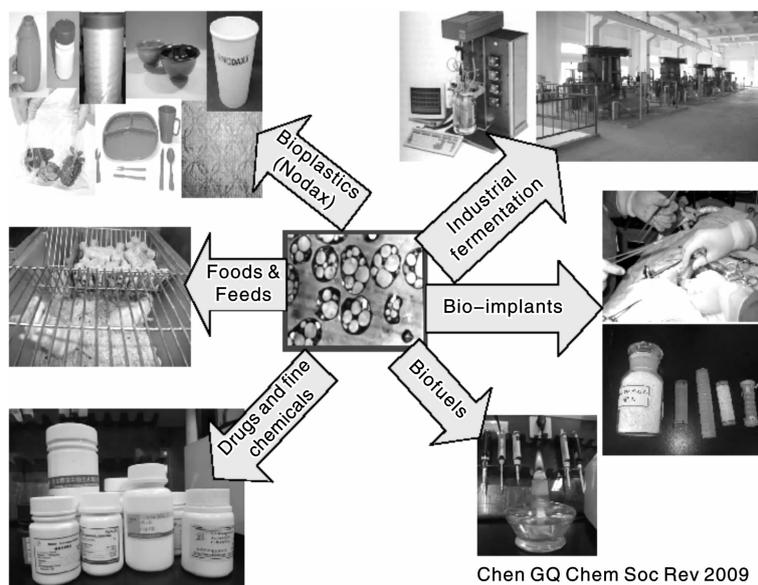


图 7 PHA 产业链

Fig. 7 PHA industrial value chain

5 结 语

聚羟基脂肪酸酯 PHA 具有与传统石化塑料如聚乙烯、聚丙烯等类似的材料学性质，同时 PHA 可由碳水化合物、脂肪酸等可再生资源合成，并且在环境中可以完全降解进入自然界生态循环，因此被认为是一种环境友好的“绿色塑料”，具有替代传统不可降解塑料的前景。PHA 多种的单体结构，产生材料性能的多样性：从坚硬质脆的硬塑料到柔软的弹性体，因而比其他生物可降解材料具有更广阔的应用领域。PHA 材料由于具有良好的组织相容性，可用于医用植入材料和药物缓释材料。PHA 单体的立体特异性以及羟基、羧基等活性位点，使其可以作为精细化工合成品的起始原料；一些 HA 单体还具有特殊的生物学活性和医疗应用前景。

PHA 合成机制的引进可以提高微生物的适应性，增加抗逆性。近年来又不断开发出 PHA 作为生物燃料、蛋白纯化系统，药物特异输送系统等多种应用。PHA 领域已经形成了一条包含农业、发酵、塑料、包装、生物燃料、精细化工、医药和营养的产业价值链。PHA 生产成本的降低、生产和应用的规模化以及开发出更多更成熟的高附加值应用需要微生物学家，遗传学家，植物学家，化学家，高分子科学家，化学工程师，生物技术，医学科学家，政府机构和工业界等跨领域的通力合作。

参考文献 References

- [1] Chen Guoqiang (陈国强). A Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) Based Bio-and Materials Industry [J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38: 2 434 - 2 446.

- [2] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates; Biological Polyesters [J]. *Progress in Polymer Science*, 2000, 25: 1 503 – 1 555.
- [3] Steinbüchel A, Valentin H E. Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 128: 219 – 228.
- [4] Reddy C S K, Ghai R, Rashmi, *et al.* Polyhydroxyalkanoates: an Overview[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 87: 137 – 146.
- [5] Abe H, Doi Y, Kumagai Y. Synthesis and Characterization of Poly [(R, S)-3-Hydroxybutyrate- β -6-Hydroxyhexanoate] as a Compatibilizer for a Biodegradable Blend of Poly [(R)-3-Hydroxybutyrate] and Poly (6-Hydroxyhexanoate) [J]. *Macromolecules*, 1994, 27: 6 012 – 6 017.
- [6] Steinbüchel A, Lutke-Eversloh T. Metabolic Engineering and Pathway Construction for Biotechnological Production of Relevant Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 16: 81 – 96.
- [7] Gao Haijun(高海军), Chen Jian(陈 坚), Du Guochen(堵国成), *et al.* 聚 β -羟基丁酸(PHB)降解的研究和展望[J]. *Journal of Wuxi High Industry University(无锡轻工大学学报)*, 1996, 15: 174 – 178.
- [8] Zhang X J, Luo R C, Wang Z, *et al.* Application of (R)-3-Hydroxyalkanoate Methyl Esters Derived from Microbial Polyhydroxyalkanoates as Novel Biofuels [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 707 – 711.
- [9] Mikova G, Chodak I. Properties and Modification of Poly (3-Hydroxybutanoate) [J]. *Chemické Listy*, 2006, 100: 1 075 – 1 083.
- [10] Tanaka T, Yabe T, Teramachi S, *et al.* Mechanical Properties and Enzymatic Degradation of Poly [(R)-3-Hydroxybutyrate] Fibers Stretched after Isothermal Crystallization Near T-g [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2007, 92: 1 016 – 1 024.
- [11] Chen G Q, Wu Q. The Application of Polyhydroxyalkanoates as Tissue Engineering Materials [J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 6 565 – 6 578.
- [12] Martin D P, Williams S F. Medical Applications of Poly-4-Hydroxybutyrate: a Strong Flexible Absorbable Biomaterial[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 16: 97 – 105.
- [13] Bian Y Z, Wang Y, Aibaidoula, *et al.* Evaluation of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) Conduits for Peripheral Nerve Regeneration[J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 217 – 225.
- [14] Martin D P, Peoples O P, Williams S F, *et al.* Nutritional and Therapeutic Uses of 3-Hydroxyalkanoate Oligomers. US 359086 [P], 1999.
- [15] Qu X H, Wu Q, Zhang K Y, *et al.* In Vivo Studies of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) Based Polymers: Biodegradation and Tissue Reactions[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 3 540-3 548.
- [16] Cheng S, Chen G Q, Leski M, *et al.* The Effect of D, L-Beta-Hydroxybutyric Acid on Cell Death and Proliferation in L929 Cells[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 3 758 – 3 765.
- [17] De Roo G, Kellerhals M B, Ren Q, *et al.* Production of Chiral R-3-Hydroxyalkanoic Acids and R-3-Hydroxyalkanoic Acid Methyl esters via Hydrolytic Degradation of Polyhydroxyalkanoate Synthesized by Pseudomonads [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 77: 717 – 722.
- [18] Seebach D, Beck A K, Breitschuh R, *et al.* Direct Degradation of the Biopolymer Poly [(R)-3-Hydroxybutyric Acid] to (R)-3-Hydroxybutanoic Acid and Its Methyl Ester[J]. *Organic Syntheses*, 1993, 71: 39.
- [19] Lee S Y, Lee Y, Wang F L. Chiral Compounds from Bacterial Polyesters; Sugars to Plastics to Fine Chemicals[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 65: 363 – 368.
- [20] Ren Q, Grubelnik A, Hoerler M, *et al.* Bacterial Poly (Hydroxyalkanoates) as a Source of Chiral Hydroxyalkanoic Acids[J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 2 290 – 2 298.
- [21] Ruth K, Grubelnik A, Hartmann R, *et al.* Efficient Production of (R)-3-Hydroxycarboxylic Acids by Biotechnological Conversion of Polyhydroxyalkanoates and Their Purification [J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 279 – 286.
- [22] Zou X H, Li H M, Wang S, *et al.* The Effect of 3-Hydroxybutyrate Methyl Ester on Learning and Memory in Mice[J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 1 532 – 1 541.
- [23] Zhao Y, Zou B, Shi Z, *et al.* The Effect of 3-Hydroxybutyrate on the in Vitro Differentiation of Murine Osteoblast MC3T3-E1 and in Vivo Bone Formation in Ovariectomized [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 3 063 – 3 073.
- [24] Zhao W, Chen G Q. Production and Characterization of Terpolyester Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate-co-3-Hydroxyhexanoate) by Recombinant *Aeromonashydrophila* 4AK4 Harboring Genes PhaAB [J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 1 342 – 1 347.
- [25] Zhang J Y, Hao N, Chen G Q. Effect of Expressing Polyhydroxybutyrate Synthesis Genes (phbCAB) in *Streptococcus Zooepidemicus* on Production of Lactic Acid and Hyaluronic Acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71: 222 – 227.
- [26] Liu Q, Ouyang S P, Kim J. The Impact of PHB Accumulation on L-Glutamate Production by Recombinant *Corynebacterium Glutamicum* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 132: 273 – 279.
- [27] Rehm B H. Biogenesis of Microbial Polyhydroxyalkanoate Granules: a Platform Technology for the Production of Tailor-Made Bioparticles[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2007, 9: 41 – 62.
- [28] Yamashita K, Yamada M, Numata K, *et al.* Nonspecific Hydrophobic Interactions of a Repressor Protein, PhaR, with Poly [(R)-3-Hydroxybutyrate] Film Studied with a Quartz Crystal Microbalance[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 2 449 – 2 454.
- [29] Banki M R, Gerngross T U, Wood D W. Novel and Economical Purification of Recombinant Proteins: Intein-Mediated Protein

Purification Using in Vivo Polyhydroxybutyrate (PHB) Matrix Association[J]. *Protein Science*, 2005, 14: 1387-1395.

[30] Wang Z H, Wu H N, Chen J, et al. A Novel Self-Cleaving Pha-

sin Tag for Purification of Recombinant Proteins Based on Hydrophobic Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles[J]. *Lab on a Chip*, 2008, 8: 1957-1962.



专栏特约编辑谭天伟



特约撰稿人陈国强



特约撰稿人蹇锡高



特约撰稿人张立群



特约撰稿人乔金樑

谭天伟：男，1964年生，中国工程院院士；现任北京化工大学副校长，兼任中国化工学会理事，生物化工专业委员会副主任委员，中国可再生能源学会理事，中国材料研究学会理事；先后承担了国家重大和重点项目11项；获国家技术发明二等奖2项，省部级一等奖4项，二等奖4项；曾获何梁何利科学与技术创新奖、谈家桢生命科学奖、亚洲青年生物化工学会授予的杰出贡献奖(YABEC Award)、BASF和中国化学会青年创新奖；在核心期刊发表论文300多篇，其中SCI收录150多篇，EI收录200余篇。

陈国强：男，1963年生，教授，教育部长江学者特聘教授，国家杰出青年基金获得者；1985年毕业于华南理工大学，1989年获得奥地利格拉茨(Graz)工业大学博士学位；1990~1994年在英国诺丁汉(Nottingham)大学和加

拿大阿尔伯达(Alberta)大学做博士后研究；长期从事“微生物和生物材料”的研究；发表微生物技术和生物材料相关论文180多篇，获得授权专利23项，29个公开专利；曾获第八届中国青年科技奖、纽伦堡国际发明奖、国家发明二等奖(排名第一)，茅以升科技奖、教育部高校青年教师奖等；曾连续6年获清华大学学生“良师益友”的光荣称号，连续5年获得清华大学梅贻琦奖，2011年度获第四届“谈家桢生命科学创新奖”。

蹇锡高：男，1946年生，教授，博导，大连理工大学高分子研究所所长、辽宁省高性能树脂工程技术研究中心主任；1969年毕业于大连理工大学留校任教，1988~1990年初赴加拿大留学；先后主持并完成国家重点科技攻关项目4项，“863”重大项目2项，国家重点军工配套项目6项，“973”项目子课题1项，国家

自然科学基金项目8项，科技部创新基金项目1项，火炬计划项目和振兴东北老工业基地项目各1项，省、市重大科技项目4项，获11项发明专利授权；发表论文400余篇，其中被SCI收录212篇，EI收录210篇；先后获2003年度国家技术发明二等奖和2011年度国家技术发明二等奖等10项省部级以上科技奖励；被评为国家有突出贡献中青年专家、获国防军工协作配套先进工作者等。

张立群：男，1969年生，工学博士，教授，博导，教育部长江学者特聘教授；北京市普通高校重点实验室“新型高分子材料的制备及成型加工”实验室主任，教育部重点实验室“纳米材料制备与应用科学”副主任；兼任教育部第六届科技委学部委员、中国轮胎产业技术创新联盟技术委员会主任等；发表学术论文200余篇，其中被SCI收录120余篇；译

书1部，参写国内著作3部、国际著作6部；获中国发明专利30余项；以第一获奖人获得国家技术发明二等奖和省部级科技奖励8项。

乔金樑：男，1959年生，教授级高工，博导，中国石化北京化工研究院副院长；1982年毕业于中国科学技术大学，1985在北京化工研究院获硕士学位，1996在北京大学获博士学位；曾任国家“863”新材料领域专家委员会委员和国家“973”项目首席科学家等；曾获国家发明二等奖和国家科技进步二等奖等省部级以上科技成果13项，获国家专利金奖1次；2010年获“中国化学会-中国石油化工股份有限公司化学贡献奖”，曾被亚洲化学联合会授予2009年度经济促进杰出贡献奖；发表学术论文90余篇，在国内外申请发明专利90多项。

褚良银：男，1967年生，博士，教育部长江学者特聘教授，国家



特约撰稿人褚良银

杰出青年科学基金获得者；日本东京大学博士后，美国哈佛大学高级研究学者，法国巴黎高等工业物理化学学院访问教授；在智能膜与控制释放材料等领域取得了重要的创新性成果；发表学术论文被SCI收录106篇、EI收录130篇，论著被SCI等引用2300余次，申请中国专利20项(已授权16项)、国际专利8项(已授权3项)；出版英文专著1部(Springer邀请撰稿)、中文专著2部，参编中英文专著、教材和手册等8部，国际学术会议邀请做主题报告和邀请报告23次；获省部级自然科学奖1项、科技进步奖3项。