

# 生物合成聚羟基脂肪酸酯(PHAs)的研究进展

王国影, 刘长莉, 卢丽霞, 杨敬杰, 李春玲 (东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要** 聚羟基脂肪酸酯(PHAs)是微生物在不平衡生长状态下作为胞内碳源和能源被储存的一种高分子聚合物, 可以用一系列的可再生原料和生物方法来生产, 具有生物降解性和生物相容性等特点, 可以代替某些传统的石化塑料, 应用前景广阔。目前, 工业上生产 PHAs 主要利用野生型和重组型微生物的发酵来进行, 而混合培养和转基因植物生产 PHAs 也因其成本低廉等优点受到越来越广泛的关注。文中主要对近年来生物合成聚羟基脂肪酸酯(PHAs)的研究进展进行总结, 以期对聚羟基脂肪酸酯的工业化生产及进一步的开发利用提供依据。

**关键词** 聚羟基脂肪酸酯; 生物合成

**中图分类号** S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)27-10960-03

## Research Advances in Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates

WANG Guo-ying et al (College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract** Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are synthesized by numerous bacteria as an intracellular carbon and energy storage compound under nutrient-limiting conditions with excess carbon. PHAs are biodegradable and biocompatible polyesters that can potentially replace certain plastics derived from petroleum, it can be used in many fields. PHAs can be produced using a combination of renewable feedstocks and biological methods. Native and recombinant microorganisms have been generally used for making PHAs via fermentation processes, but the use of mixed cultures and transgenic plants as a cheaper method to produce PHAs has gained much attention in recent years. The research advances in biosynthetic of polyhydroxyalkanoates were summarized, which can provide basis for industrialization production and further development and utilization of polyhydroxyalkanoates.

**Key words** Polyhydroxyalkanoates; Biosynthesis

聚羟基脂肪酸酯(PHAs)是微生物在碳源过剩、氮源不足的不平衡生长状态下作为胞内碳源和能源被储存的一种高分子聚合物。化学合成塑料的成本比生物合成塑料低, 但是存在着严重的环境污染问题。化学合成塑料的生产要利用石油等不可再生资源, 且会导致大气中二氧化碳整体水平的上升。PHAs 具有与化学合成塑料相似的物理性质, 且具有生物降解性和生物相容性, 因此可以利用一系列的可再生原料和生物方法来生产, 也可以被完全降解, 对环境无污染, 是一种新型的低碳环保材料, 有望代替石化塑料。目前, PHAs 成为近年来生物技术领域的一个研究热点。生物合成 PHAs 的方法主要有纯菌发酵法、基因重组法和混合培养法 3 大类。生物合成聚羟基脂肪酸酯的技术发展迅速, 但与石化塑料相比, 生产成本仍然较高, 因此其主要被应用在医疗卫生、农业和食品包装等特殊方面。笔者对近年来生物合成聚羟基脂肪酸酯(PHAs)的研究进展进行总结, 以期对聚羟基脂肪酸酯的进一步开发利用提供依据。

## 1 通过纯菌发酵生产 PHAs

**1.1 利用野生型细菌发酵生产 PHAs** 1926 年 Lemolgne 发现巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)具有合成 PHB 的能力。到目前为止, 已在包括光能自养菌、化能自养菌和异养菌在内的 65 个属 300 多个种的微生物细胞内发现 PHA 的存在<sup>[1]</sup>。PHA 可以被产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、红杆菌属(*Rhodobacter*)、罗尔斯通菌属(*Ralstonia*)和贪铜菌属(*Cupri-*

*avidus*)的细菌作为内含物积累。细菌在碳源过剩氮源贫乏的情况下可以积累 PHAs。所有可代谢的碳源都可以用来生产 PHA, 包括挥发性脂肪酸和糖类等。在合适的环境下, 某些蓝藻和某些嗜盐菌也能积累 PHAs。

最好的 PHAs 生产菌应该满足以下几个条件: ①菌体生长迅速; ②能够利用廉价的碳源; ③高产 PHAs(表 1)。塔国城等利用真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophu*)以葡萄糖为碳源通过限氮的方式进行发酵, PHB 的浓度达 49.0 g/L, 含量 80.5%<sup>[2]</sup>。Mothes 等用(*Cupriavidus necator*)JMP134 进行发酵生产, 以粗甘油作为碳源, 菌体浓度达到 50 g/L, 获得的聚合物为 PHB, 含量到达了 48%<sup>[3]</sup>。通过控制碳源的类型和组成影响共聚物 PHA 的组成。Chanprateep 等以(*Cupriavidus necator*)为菌种, 通过补料分批发酵的方法获得了聚合物 P(3HB-4HB), 含量达到生物量的 77%<sup>[4]</sup>。试验通过控制 C: N 为 200: 1, 果糖作为合成 3HB 的前体, 1,4-二丁醇作为合成 4HB 的前体, 硫酸铵作为氮源来进行, 结果表明聚合物中 3HB/4HB 的组成比例受培养基中 2 种碳源底物的摩尔比影响。例如, 如果培养基中含有 25% 的 1,4-二丁醇, 聚合物中就用 30% 的 4HB; 当 1,4-二丁醇得含量达到 75% 时, 4HB 可以增加至 80%。

**1.2 利用重组大肠杆菌生产 PHAs** *E. coli* 因生长迅速、具多种代谢途径、胞内积累大量 PHA 后会变得脆弱而易于提取和纯化, 并且其胞内不存在 PHA 降解酶, 产物无损失等优势被认为是最佳 PHB 的基因受体菌株。重组的大肠杆菌(*Escherichia coli*)K24K 以乳清作为唯一的碳源, 通过补料分批培养的方式进行培养, 细胞浓度为 70.1 g/L, PHA 含量达到了 72.9%<sup>[10]</sup>。被导入固氮菌属 *phaABC* 和 *phaP* 基因的重组大肠杆菌, 可以用相对廉价的碳源 - 甘油为底物积累 PHB。PHB 的积累量随着氧气的供应量的上升而下降<sup>[11]</sup>。

**基金项目** 中央高校基本科研业务费专项资金资助(DL12CA06); 哈尔滨市科技创新人才基金(2011RFQXN061)。

**作者简介** 王国影(1988-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物, E-mail: wangguoying1988@126.com。

**收稿日期** 2013-08-18

表 1 高产 PHAs 的生产菌种

菌种	碳源	聚合物类型	PHAs 含量/%	参考文献
<i>Alcaligenes eutropha</i>	葡萄糖	PHB	80.50	[2]
<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	甘油	PHB	48.00	[3]
<i>Cupriavidus necator</i>	果糖和 1,4-二丁醇	P(3HB-4HB)	77.00	[4]
<i>Zoogloea sp1</i> GY3	蔗糖	-	85.40	[5]
<i>Ralstonia eutropha</i>	甘蔗渣水解产物	PHB	56.50	[6]
<i>Haloflex mediterranei</i>	淀粉水解液	PHBV	50.80	[7]
<i>Cupriavidus necator</i> H16	植物油	PHBV	80.00	[8]
<i>Hydrogenophaga sp</i>	蔗糖	-	68.15	[9]

**1.3 利用转基因酵母生产 PHAs** 酵母菌遗传操作简单、外源基因拷贝数高,是基因工程最理想的表达宿主。酿酒酵母(*S. cerevisiae*)<sup>[12-13]</sup>、毕赤酵母(*P. pastoris*)<sup>[14]</sup>、解脂酵母(*Y. lipolytica*)<sup>[15]</sup>和陆地酵母(*A. adeninivorans*)<sup>[16]</sup>都曾作为 PHA 基因的表达宿主。虽然重组酵母的报道很多,但还未见合成 PHA 超过干重 7.06% 的报道。陆地酵母(*A. adeninivorans*)被导入 *phaABC* 基因后,合成 PHB 和 PHV 仅为干重的 0.019% 和 2.200%<sup>[12]</sup>。酿酒酵母(*S. cerevisiae*)和克勒克酵母(*Kloeckera*)被转入 *phaABC* 基因,获得的重组(*S. cerevisiae*)和(*Kloeckera*)合成 PHB 分别占干重的 2.68% 和 7.06%<sup>[17]</sup>。Gadallah 将 *phaABC* 合酶基因转入克勒克酵母(*Kloeckera sp.*),却合成与 PHA 无关的糖蛋白类物质<sup>[18]</sup>。Haddouche 的研究表明,酵母的 PHB 代谢调控是个复杂的网络系统,重组酵母合成 PHB 尚待进一步研究,才能揭开其神秘面纱<sup>[15]</sup>。

## 2 通过混合培养生产 PHAs

目前,工业上生产 PHAs 主要是利用野生型和重组型微生物的纯菌发酵来生产,PHAs 的积累量最高可达微生物干重的 90%。但是纯菌发酵不仅需要维持无菌的发酵环境,而且需要相对稳定均一的底物,导致其生产成本远高于石化制品。与纯菌发酵相比,混合培养可以利用复杂的低成本的碳源底物,无需灭菌,作为一种更为廉价的生产 PHA 的方法在最近几年得到了广泛的关注。使用混合菌种如活性污泥代替纯菌,使用含小分子脂肪酸的废水代替葡萄糖、果糖等底物,可以在降低 PHA 的生产成本的同时,达到污泥减量、废水资源化等目的。

PHAs 是污水处理过程,特别是生物除磷过程中的代谢产物<sup>[19]</sup>。Zachary 利用生产甘油废水驯化混合菌群获得占菌体干重 55% 的 PHA<sup>[20]</sup>。Liu 等通过调节剩余活性污泥内的营养、氧气和酸碱度使得 PHA 占菌体干重的 67%<sup>[21]</sup>。发酵条件在很大程度上影响以挥发脂肪酸为底物的微生物积累 PHA;如碳源、底物浓度、温度、pH 和停留时间等。通过改变碳源和进料方式可以改变混合培养聚合物的组成,可以改变 PHA 聚合物中 HB 和 HV 的比例,因此改变其平均相对分子质量、结晶度和其他的物理特性。不同的碳源导致聚合物组成的改变:乙酸盐作为碳源主要生成羟基丁酸(HB)单元,丙酸盐主要生成羟基戊酸(HV)单元,而使用混合酸将得到共聚物。以乙酸和丁酸为碳源获得 PHB 均聚物,然而以乙酸丙酸和丙酸戊酸混合物为碳源获得了三元聚合物 P(HB/HV/HMV)<sup>[22]</sup>。发酵工艺运行条件的优化也会提高 PHAs 的产量。曲波等通过通过动态底物投加方式(也称为 feast-fam-

ine 机制)驯化活性污泥,PHB 含量达到 64%<sup>[23]</sup>。Serafim 等采用好氧动态进料工艺(aerobic dynamic feeding,ADF),得到 PHB 最高含量达细胞干重的 78.5%<sup>[24]</sup>。

## 3 通过转基因植物生产 PHAs

除提到的微生物生产 PHAs,转基因植物也可以用来生产 PHA。烟草叶子、谷物、甘蔗和棉花已经被报道具有合成 PHAs 的能力,但是转基因植物中 PHAs 的含量相对较低<sup>[25-26]</sup>。与微生物生产 PHAs 相比,转基因植物可以将大气中的二氧化碳和阳光转化为 PHAs,因此不需要提供碳源,对减少 PHA 的成本具有巨大贡献<sup>[27]</sup>。此外,发酵液中微生物生物量的恢复和进一步处理来提取 PHA 是昂贵的。植物很容易收获,大量的水分也不需要从植物体内除去来提取 PHAs。

转基因烟草合成 PHB 已经被报道<sup>[28]</sup>。将含有不动杆菌属(*Acinetobacter sp*)基因和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)基因的质粒导入到烟草中,使其具有编码合成 PHA 所需要酶的基因。转基因烟草叶片组织的 PHB 含量在 17% ~ 19%,占总生物量 9%。

Matsumoto 等用密码子优化的方法来提高插入了来自(*R. Eutropha*)的 PHA 合成基因的烟草的 PHA 表达<sup>[29]</sup>。密码子优化的 *phbB* 基因与没有优化的基因相比,植物组织中的 PHB 含量增加了 2 倍。与此相反,密码子优化的 *phaC* 基因对 PHB 的积累量没有明显影响。从中可以总结出 *phaB* 基因对烟草叶子中的 PHB 含量有决定性影响。

植物中高含量的 PHB 表达会引起一种以降低叶绿素生产为特点的萎黄病,这种病害减少了碳水化合物的生产,进而影响了植物的生长<sup>[27]</sup>。通过使用化学诱导基因开关来延迟 PHB 的合成直到植物的光合组织发育良好,可以缓解这个问题。基因开关的方法已经在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中成功实现<sup>[30]</sup>,幼嫩的叶片中 PHB 水平大约在 14%,老的叶片中达到 7%。

## 4 展望

2011 年,接近 2.80 亿 t 的石化塑料被生产,并以每年 4% 的增长率上升。到 2050 年,石化塑料的生产可能增加到 8.10 亿 t。石化塑料的生产大量地消耗了不可再生的石油资源,随着石油资源的短缺和白色污染的日益严重,用可降解生物塑料替代石化塑料是一个亟待解决的问题。PHAs 已经有超过 20 年的商业化历史,但是由于成本高昂,使其一直没有形成真正的产业。将 PHAs 的生产价格降到石化塑料的水平是当前研究面临的最主要问题。随着微生物合成和植

物转基因等技术的不断发展, PHAs 的生产成本正在逐渐下降, 在不远的将来将会迎来 PHAs 的大规模商业化生产。

### 参考文献

- [1] 刘宝全, 蒋本国. 聚  $\beta$  羟基丁酸 (PHB) 的研究进展[J]. 大连民族学院学报, 2000, 2(4): 16-20.
- [2] 堵国成, 陈坚, 高海军, 等. 真养产碱杆菌积累聚- $\beta$ -羟基丁酸发酵条件的研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(1): 104-107.
- [3] MOTHE G, SCHNORPFEIL C, ACKERMANN J U. Production of PHB from Crude Glycerol[J]. Eng Life Sci, 2007, 7(5): 475-479.
- [4] CHANPRATEEP S, BUASRI K, MUANGWONG A, et al. Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)[J]. Polymer Degradation and Stability, 2010, 95(10): 2003-2012.
- [5] 杨金水, 黄建新, 倪晋仁. 产胶菌发酵生产可降解塑料 PHAs[J]. 化工进展, 2005, 24(9): 1033-1036.
- [6] YU J, HEIKO S. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 8042-8048.
- [7] CHEN C W, DON T M, YEN H F. Enzymatic extruded starch as acarboxin source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloflex mediterranei*[J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 2289-2296.
- [8] LEE W H, LOO C Y, NOMURA C T, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 6844-6851.
- [9] VARAVUT T, TSUYOSHI I, PAIBOON D, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate(PHA) by *Hydrogenophaga* sp. isolated from soil environment during batch fermentation[J]. Journal of Life Sciences, 2011, 5: 1003-1012.
- [10] NIKEL P I, ALMEIDA A D, MELILLO E C, et al. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by products[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3949-3954.
- [11] ALMEIDA DE A, GIORDANO A M, NIKEL P I, et al. Effects of aeration on the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 2036-2040.
- [12] ZHANG B, CARLSON R, SRIENC F. Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72: 536-543.
- [13] MARCHESINI S, ERARD N, GLUMOFF T, et al. Modification of the monomer composition of polyhydroxyalkanoate synthesized in *Saccharomyces cerevisiae* expressing variants of the beta-oxidation-associated multifunctional enzyme[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 6495-6499.
- [14] POIRIER Y, ERARD N, MAC D C, et al. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 207: 97-102.
- [15] HADDOUCHE R, POIRIER Y, DELESSERT S, et al. Engineering polyhydroxyalkanoate content and monomer composition in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* by modifying the  $\beta$ -oxidation multifunctional protein[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91: 1327-1340.
- [16] TERENTIEV Y, BREUER U, BABEL W, et al. Non-conventional yeasts as producers of polyhydroxyalkanoates-genetic engineering of *Arxula adenivorans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64: 376-381.
- [17] BREUER U, TERENTIEV Y, KUNZE G, et al. Yeasts as producers of polyhydroxyalkanoates: genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Macromolecular Bioscience, 2002, 8: 380-386.
- [18] GADALLAH A E, SAHAR Z, SOHA F, et al. Exobiopolymer from polyhydroxyalkanoate-producing transgenic yeast[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(34): 6558-6563.
- [19] CHEN Y G, ANDREW A R, TERRENCE M. The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratio of acetic to propionic acid[J]. Water Research, 2004, 38(1): 27-36.
- [20] DOBROTH Z T, HU S, COATS E R, et al. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 3352-3359.
- [21] LIU Z G, WANG Y P, HE N. Optimization of polyhydroxybutyrate(PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185: 8-16.
- [22] 王琴, 陈银广. 活性污泥合成聚羟基烷酸(PHAs)的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(5): 111-114.
- [23] 曲波, 刘俊新. 活性污泥合成可生物降解塑料 PHB 的工艺优化研究[J]. 科学通报, 2008, 53(13): 1598-1604.
- [24] SERAFIM L S, LEMOS P C, OLIVEIRA R F, et al. Optimisation of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 87(2): 145-160.
- [25] BOHLMANN G M. Polyhydroxyalkanoate production in crops. In feedstocks for the future: renewables for the production of chemicals and materials[J]. ACS Symposium Series, 2006, 921: 253-270.
- [26] NIELSEN L. Polyhydroxyalkanoate production in sugarcane-recognizing temporospatial complexity[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 131(2): 28-29.
- [27] REEMMER J. Advances in the synthesis and extraction of biodegradable polyhydroxyalkanoates in plant systems-a review[J]. Basic Biotechnology, 2009, 5(1): 44-49.
- [28] BOHMERT T K, MCAVOY S, DAUGHTRY S, et al. Focus issue on plastid biology: high levels of bioplastic are produced in fertile transplastomic tobacco plants engineered with a synthetic operon for the production of polyhydroxybutyrate[J]. Plant Physiol, 2011, 155(4): 1690.
- [29] MATSUMOTO K, MORIMOTO K, GOHDA A, et al. Improved polyhydroxybutyrate(PHB) production in transgenic tobacco by enhancing translation efficiency of bacterial PHB biosynthetic genes[J]. Bioscience and Bioengineering, 2010, 111(4): 485-488.
- [30] KOURTIZ L, PEOPLES O P, SNELL K D. Chemically inducible expression of biosynthetic pathways. US Patent App. 20, 100/196,974[P]. 2010.
- [31] 司红岩, 向天成. 聚羟基脂肪酸酯的生物合成研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5699-5700, 5703.

(上接第 10916 页)

疾病的天然产物或药物奠定了基础。

### 参考文献

- [1] GREGOR M F, HOTAMISLIGIL G S. Inflammatory Mechanisms in Obesity[J]. Annual Review of Immunology, 2011, 29: 415-445.
- [2] SCHENK S, SABERI M, OLEFSKY J M. Insulin sensitivity: modulation by Nutrients and inflammation[J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 2992-3002.
- [3] 王旭方. 肥胖与免疫炎症[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2011, 20(5): 454-460.
- [4] LUMENG C N, SALTIEL A R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease[J]. J Clin Invest, 2011, 121(6): 2111-2117.
- [5] VALLABHAPURAPU S, KARIN M. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 693-733.
- [6] ECKNER R, EWEN M E, NEWSOME D, et al. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor[J]. Genes Dev, 1994, 8(8): 869-884.
- [7] CHEN L F, FISCHLE W, VERDIN E, et al. Duration of nuclear Nf $\kappa$ B action regulated by reversible acetylation[J]. Science, 2001, 293(5535): 1653-1657.
- [8] BOYES J, BYFIELD P, NAKATANI Y, et al. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation[J]. Nature, 1998, 396(6711): 594-598.
- [9] VO N, GOODMAN R H. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(17): 13505-13508.
- [10] OGRYZKO V V, SCHILTZ R L, RUSSANOVA V, et al. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases[J]. Cell, 1996, 87(5): 953-959.
- [11] SUN K, KUSMINSKI C M, SCHERER P E. Adipose tissue remodeling and obesity[J]. J Clin Invest, 2011, 121(6): 2094-2101.
- [12] 沈晓东, 周晓燕, 艾有生. 巨噬细胞极化与代谢性疾病的研究进展[J]. 实用临床医学, 2012, 13(4): 123-129.