

细菌合成生物可降解塑料聚羟基烷酸 (PHAs)的研究现状和未来

陈 坚 堵国成 李 寅 陈银广 高海军 伦世仪

(无锡轻工业大学生物工程学院环境生物技术研究室,无锡 214036)

[摘 要] 简要回顾生物可降解塑料的生产历史,对细菌合成生物聚羟基烷酸的研究现状进行分析,指出了实现发酵法生产聚羟基烷酸工业化所必须满足的条件,并阐明这一领域今后研究重点。

[关键词] 生物可降解塑料,聚羟基烷酸,细菌合成

全球石化工业每年生产的塑料多达数千万吨,其中部分用作低值易耗的各种包装材料,不仅难以循环再利用,而且由于其生物不可降解性,造成了日益严重的生态环境问题。因此许多国家加大了生物可降解塑料的研究力度,考虑用生物可降解塑料替代部分化工合成塑料。在此类研究中,采用发酵法生产聚羟基烷酸(Poly- β -hydroxy-alkanoates, PHAs)尤其受到各国研究者的重视。PHAs作为有光学活性的一种聚酯,除具有高分子化合物的基本特性外,其独特优点是具有生物可降解性和生物可相容性,用PHAs制作各种包装材料,可大大减少废弃物对环境的污染。此外,PHAs还可用作医药方面的骨骼替代品和长效药物的生物可降解载体等。

目前,PHAs中研究最多、被认为最具工业化前景的是聚羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)和聚羟基戊酸酯(Poly- β -hydroxyvalerate, PHV)。同时,由于PHB和PHV可聚合成共聚物(PHBV),且其共聚比可在生物合成过程中进行控制和调节,而不同共聚比的PHBV在熔点、抗拉强度等性能方面有所不同,使其具有更好的性能和更宽的应用领域,因而PHBV的研究也倍受人们关注。

本研究室从1994年开始,对PHAs的生产、降解、提取和应用进行了全面研究。首先对真氧产碱杆菌中PHAs生物合成过程和机理进行透彻解析^[1],进而利用二级连续培养系统研究了PHAs生物合成过程中的动力学特征^[2],优化了流如发酵条

件^[3,4],建立并验证了PHAs流加发酵准优化控制策略^[5]。在对现有的各种提取方法进行比较的前提下,发明了一种环境污染小、工业应用价值大的PHAs新的提取方法^[6],考察了PHAs用作药物缓释载体的应用前景^[7],还比较了不同条件下PHAs的生物降解性能^[8,9],目前正在进行有机废水生物合成PHAs耦合系统的机制研究。为提高我国发酵法生产PHAs的研究水平,加速其工业化进程,本文拟对生物可降解塑料研究的现状和今后的研究重点作一阐述。

1 生物可降解塑料生产历史和研究现状^[5]

70年代,美国联合碳化物公司及杜邦公司推出了部分可降解的塑料,如乙烯和一氧化碳共聚物,其机理在于所引入的羰基可吸收紫外线而使聚合物崩溃。据报道,用这种材料制成的薄膜在光照充分的条件下30 d即可崩解为很小的碎片。相继问世的还有在乙烯类单体中加入30%—50%淀粉聚合而成的塑料,或由聚乙烯醇(PVA)和淀粉共混聚合而成的地膜类产品,其中的淀粉成分虽可被土壤中的微生物降解,但生物不可降解的残体却仍能在环境中存留,对环境的长远影响仍然值得忧虑。在这种情况下,能够完全被生物降解的PHAs便成为该领域的研究热点和重点问题。尽管在80年代初,英国ICI公司已经成功地生产出PHBV并投放欧洲市场,但与化工合成塑料相比,其高昂的生产成本显然不

国家自然科学基金资助项目,批准号29677011.

本文于1998年9月29日收到.

利于大规模推广应用。鉴于此,国内外学者在围绕降低 PHBV 生产成本和提高产品质量方面开展了大量的研究工作^[10-14]。

1.1 菌种

迄今发现的能在胞内合成 PHAs 的菌种涉及 65 个属的许多种,但作为商业用途的菌株应该具备:(1)对廉价碳源的利用能力;(2)生长速度快;(3)对底物转化率高;(4)胞内聚合物含量高和(5)聚合物分子量大等基本性能。最初用来生产 PHAs 的菌种主要有真养产碱杆菌(*A. eutrophus*)、固氮菌和甲基

营养菌等。固氮菌和甲基营养菌虽然分别能以废塘蜜和甲醇为原料,但前者 PHB 产量低,后者 PHB 分子量较小,因而被淘汰。目前,对 PHAs 生产菌种的改良,主要集中于提高菌种对多种原料的利用能力和转化率、提高聚合物胞内含量以及改变细胞特性以利于提取,其中,构建能合成 PHAs 的重组 *E. coli* 是一个热门研究方向。为了便于比较,表 1 对用于 PHB 或 PHV(PHB(V))生产的 *A. eutrophus* 和重组 *E. coli* 的特点作了介绍。

表 1 生产 PHB(V)的 *A. eutrophus* 和重组 *E. coli* 的特点

<i>A. eutrophus</i>	recombinant <i>E. coli</i>
生长较快	生长快、发酵周期短
容易培养(培养基和条件相对简单)	有较成熟的高密度细胞培养技术
胞内聚合物含量高	胞内聚合物积累量大
易调节共聚比,生产共聚物较易	能利用多种碳源
聚合物分子量大	胞内无聚合物降解酶因而分子量大
分子量分布控制较难	胞内聚合物颗粒大、结晶度高
提取相对较困难	易提取
已有工业化产品	在复杂培养基下胞内聚合物才能高积累

1.2 发酵工艺

由于 PHAs 只在胞内积累,要实现其最大生产,必须尽可能提高细胞密度,保证高的胞内积累量,缩短发酵周期,以提高生产强度。目前在 PHAs 发酵中应用最多的是流加培养方法。近年来,国内外有

关 PHB 的部分最新研究结果列于表 2。从表 2 可知,国内研究水平与国外尚有明显差距。但也应指出,国外研究中为达到高细胞密度,常采用纯氧培养或多次培养技术,成本较高,操作复杂。

表 2 国内外生产 PHB 的主要研究水平^[5]

菌种	基质	培养方法	培养时间 h	细胞干重 g/L	PHB 含量 %	生产强度 g/(L·h)	发表年代
<i>A. eutrophus</i>	葡萄糖	流加发酵	30	122	65	2.64	1994
<i>A. eutrophus</i>	H ₂ /O ₂ /CO ₂	循环气体	40	91.3	67.8	1.55	1994
重组 <i>E. coli</i>	葡萄糖	流加发酵	42	117	76	2.11	1992
<i>A. eutrophus</i>	葡萄糖	反馈控制	40	117	71.6	2.1	1997
<i>A. eutrophus</i>	高果糖浆	流加发酵	50	20	34.5	0.318	1995
<i>A. eutrophus</i>	葡萄糖	流加发酵	72	50	77	0.58	1995
<i>A. eutrophus</i>	葡萄糖	流加发酵	—	—	78.6	0.24	1997
<i>A. eutrophus</i>	葡萄糖	流加发酵	52	71	79.4	1.08	1997*

* 本研究室研究结果

1.3 提取技术

由于 PHB(V)的提取费用在其生产成本中占有较大比例,从降低成本角度来考虑提取技术就显得十分有意义。现有的关于从 *A. eutrophus* 中提取 PHB(V)技术的报道主要包括有机溶剂法、氯仿-次氯酸钠法和酶法。有机溶剂法对能量和原料的消耗大、提取率难以达到很高、污染严重和操作困难;氯仿-次氯酸钠法则会使聚合物分子量严重降低;而酶

法提取的产品纯度不高。因此,近年来国外对非有机溶剂提取技术颇为重视。本研究室已申请了采用表面活性剂——络合剂水溶液体系进行 PHB(V)提取的专利,不但具有环境污染小、操作简便的显著特点,而且产品质量高、提取剂和操作费用低,经济性强,特别适合工业化生产。

2 发酵法生产聚羟基烷酸工业化所面临的问题

随着政府主管部门重视程度的提高和人们环保意识的不断加强,发展以聚羟基烷酸为代表的生物可降解塑料的生产、采用生物可降解塑料替代部分化工合成塑料,已成为社会发展的必然趋势。这不仅可以弥补石油资源日益匮乏的窘境,而且有助于“白色污染”问题的解决。据国外权威机构预测,塑料制品中至少有20%必须采用生物可降解材料来替代,可见这是一个极其庞大的市场,再考虑到 PHB

(V)潜在的医用价值以及因塑料废物污染造成的经济损失,加速工业化进程便显得意义重大、迫在眉睫。

然而,尽管 ICI 公司通过 10 年的努力将 PHB(V)的售价降低到原来的 1/5,这一价格仍然无法与化工合成塑料相竞争,再加上其力学性能的限制,PHB(V)要在可预见的将来部分替代化工合成塑料。不仅需要环保立法的支持,更需要在菌种、工艺、提取和性能改进上满足表 3 所提出的各项条件,方能增强 PHB(V)的市场竞争力。

表 3 发酵法生产 PHB(V)工业化必须具备的条件

	降低成本因素	提高质量因素
菌种	利用廉价基质;胞内聚合物含量高;生长速度快;易于培养;改造菌种特性以利于提取	聚合物分子量;分子量分布窄;
工艺	高生产强度、高转化率和高胞内含量;提高反应器中传氧性能、降低能耗;有利于产物提取的工艺条件优化	共聚物中 HV 组分高
提取	非有机溶剂提取;提取率高,提取剂可回用;操作简单、提取步骤少;易于工业化;环境污染小;投资少	分子量降低小;纯度高
性能改进	与其它可降解材料共混	进行侧链修饰,增大分子量;采用淬火工艺,解决脆性大和易老化问题

3 今后研究重点

分析国外大量研究报道,结合本研究室已有的工作基础,作者认为,尽管已对 PHB(V)生产菌的选育与改良、发酵过程的优化控制、提取技术、降解性能和应用前景进行了广泛的研究,但已有的报道尚未能解决以下 4 个关键问题:(1)菌种对丙酸的转化率低,导致 PHBV 的高生产成本;(2)聚合物分子量分布范围较宽,且不易控制;(3)现有的提取技术难以实现高收率、高产品纯度和聚合物分子量最小降解的统一,且污染较大;(4)聚合物性能与化工合成塑料相比,尚有较大差距。为此,有必要在实验室中对上述问题进行透彻研究,以期为 PHB(V)工业化打下坚实的理论基础。从 PHB(V)工业化的需要来看,开发下列技术对解决上述 4 个难点将会起到关键的作用:(1)丙酸转化率高、生长速度快的 *A. eutrophus* 的定向育种技术;(2)以高生产强度、高转化率、高聚合物含量、聚合物分子量大和分布窄相统一为目标的流加发酵策略;(3)高基质选择性、高聚合物含量、分子量分布可控制的重组 *E. coli* 的构建技术,及重组 *E. coli* 工业化生产聚合物的工艺条件;(4)确定聚合物生产工艺与降解性能的相关性;(5)低成本、高产品质量的非有机溶剂清洁提取技术;(6)聚合物的修饰和共混加工技术。

参 考 文 献

- [1] 堵国成,陈坚,高海军等. 真养产碱杆菌 ATCC17699 生产聚 β -羟基丁酸摇瓶发酵条件的研究. 应用与环境生物学报,1996,2(3): 308—314.
- [2] 堵国成,陈坚,陈银广等. 真养产碱杆菌二级连续培养系统生产聚 β -羟基丁酸的动力学研究. 生物工程学报,1997,14(2): 192—197.
- [3] 堵国成,陈坚,尹洪波等. 真养产碱杆菌生产聚 β -羟基丁酸的补料批次发酵条件研究. 应用与环境生物学报,1997,3(4): 371—374.
- [4] Du Guocheng, Chan Jian, Chen Yinguang et al. Control of Nitrogen Concentration in Fed-batch Culture of *Alcaligenes Eutrophus* for Enhancement of Poly- β -hydroxybutyrate Accumulation. *Biochemical Engineering: Marching toward the Century of 21st*. Published by Tsinghua University, 1997, 2: 642—645.
- [5] 堵国成. 真养产碱杆菌生物合成聚 β -羟基丁酸的研究. [博士学位论文]. 无锡:无锡轻工大学,1997,12.
- [6] 陈坚,陈银广,伦世仪. 从真养产碱杆菌中提取 β -羟基烷酸酯的新方法. 中华人民共和国发明专利公报,1998,14 卷第 4 号,CN 1171410A.
- [7] 陈银广,陈坚,余彩荣等. 聚 β -羟基丁酸戊酸共聚酯作为药物缓释载体的初步研究. 无锡轻工大学学报,1998,17(1): 29—33.
- [8] 高海军,陈坚,吴玉娟等. 聚 β -羟基烷酸薄膜的好氧和厌氧降解. 环境科学,1997,18(4): 17—20.
- [9] 高海军,陈坚,堵国成等. 不同环境条件下聚羟基烷酸(聚合物)薄膜生物降解性研究. 中国环境科学,1997,17(4): 330—334.
- [10] Steinbuechel A. Biodegradable plastics, *Curr Opinion in Biotechnol*,

- 1992, 3:291—297.
- [11] Byrom D. Production of poly- β -hydroxyvalerate: poly- β -hydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microbiology Reviews*, 1992, 103:247—250.
- [12] Muller H-M, Seebach D. Poly (hydroxyalkanoates): A Fifth Class of Physiologically Important Organic Biopolymers? *Angew Chem Int Ed Engl*, 1993, 32:477—502.
- [13] Lee I Y, Kim G J, Shin Y C et al. Production of Poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) by Two-stage Fed-batch Fermentation of *Alcaligenes eutrophus*. *J Microbiol Biotechnol*, 1995, 5(5):292—296
- 14: Lee J H, Hong J, Lim H C. Experimental Optimization of Fed-Batch Culture for Poly- β -Hydroxybutyric Acid Production. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 56(6):679—705.

THE RESEARCH ACTUALITY AND FUTURE DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE PLASTICS (POLYHYDROXYALKANOATES, PHAs) SYNTHESIZED BY BACTERIA

Chen Jian Du Guocheng Li Yin Chen Yinguang Gao Haijun Lun Shiyr

(*Lab of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036*)

Abstract The research history of biodegradable plastics was reviewed briefly. The research actuality of polyhydroxyalkanoates synthesized by bacteria is analyzed. The necessary conditions for commercialized fermentation of polyhydroxyalkanoates are pointed out and the future research emphasis in this field is elucidated.

Key words biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoates (PHAs), bacteria, synthesize

·资料·信息·

中日科学技术合作委员会第八次会议在东京召开

根据中日政府间科学技术合作协议的规定,中日科学技术合作委员会第八次会议于1998年5月27日在日本首都东京召开。

中日科学技术合作委员会每两年召开1次。会议的主要议题是确认政府级别的科技合作项目。国家自然科学基金委员会非常重视利用这一渠道来拓展与日本的交流、合作。

“中日太阳物理共同研究”是中日科学家长期合作的研究项目。中方首席科学家是国际天文学会第10届委员会主席、中国科学院院士艾国祥研究员。7年来,两国太阳物理学家通力合作,中国在改善日本太阳光学观测仪器方面给予了有力的帮助,日本在技术上支持了我国的太阳仪器从地面观测进入高空观测;双方共召开了3次中日太阳物理讨论会,加强了国际学术交流;双方科学家在太阳活动区矢量磁场的空间结构和演化、太阳耀斑的多波段分析和动力学过程的研究中取得了世界一流的研究成果。

合作过程中共发表学术论文近200篇。

类似的还有由中国原子能科学研究院与日本茨城大学合作的“原子核大振幅运动的非常平衡运送理论”课题,中国科学院高能物理研究所与日本东京大学合作研究的“在西藏10 TeV γ 源和超高能宇宙线研究”等多个双方长期合作,并卓有成效的课题。

在中日科学技术合作委员会第8次会议上,双方共同认定的合作项目清单中共有由国家自然科学基金委员会建议并给予资助的中日合作项目12项(继续执行8项,新认定4项)。另外还有继续探讨合作可能性项目3项。这些项目分别来源于数理、生命、地球、材料、信息科学部。项目课题组分别隶属于中国科学院、中国原子能科学研究院、清华大学、浙江大学、南京大学、东北大学、北京医科大学等单位。

(国际合作局 王逸 供稿)