

综 述

# 聚 $\beta$ -羟基丁酸(PHB)降解的研究和展望

高海军 陈 坚 堵国成 华兆哲 伦世仪

(生物工程学院)

各种各样废弃的塑料对环境造成了巨大的危害,据统计,全世界每年对塑料的需求量为 $1 \times 10^8 \text{t}^{[1]}$ ,倾入海洋的塑料垃圾达数 $1 \times 10^5 \text{t}$ ,陆上的更是难以计数。1995年我国的塑料需求量为 $6 \times 10^6 \text{t}$ ,其中对环境有威胁的地膜为 $88 \times 10^4 \text{t}$ ,包装用品为 $(150 \sim 200) \times 10^4 \text{t}^{[2]}$ 。美国、日本的塑料垃圾占垃圾总量的7%。许多国家已开始考虑用可生物降解塑料代替部分石化塑料,陆续颁布了一些法规禁用某些塑料制品,如意大利已立法规定自1991年起所有包装用塑料都必须是生物可降解的<sup>[1,3]</sup>,我国也已开始考虑禁用塑料方便餐盒等不可降解的塑料制品。

聚 $\beta$ -羟基丁酸(Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate 简称 PHB)是微生物合成的一种具有热塑性的聚酯,20年代对石油危机的认识使其作为一种可再生塑料的研究得以兴起,70年代 PHB 的研究扩展到聚羟基烷酸(Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates 简称 PHA)。由于投资、成本、提取等方面的原因使 PHB 逐渐成为众多可生物降解塑料的研究热点,特别是英国 ICI 公司、奥地利生物技术有限公司等已将 PHB 的研究推向工业化,生产出微生物合成的热塑性塑料。

PHB 以 D-3-羟基丁酸为单体,具有热塑性、生物可降解性、生物相容性<sup>[4]</sup>,以及光学活性、压电性等特殊性能,在工业、医学、农业、科研<sup>[5]</sup>等领域有广阔的应用前景。特别是其具有的生物可降解性,已使之成为替代石化合成塑料、减少塑料废物污染的最有潜力的材料。作者从降解机制和降解条件等方面对 PHB 生物可降解性的研究状况进行综述,以期为进一步开展这方面研究提供参考。

## 1 降解机制

### 1.1 胞内降解

胞内 PHB 的代谢是个循环过程。通过对真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)<sup>[6]</sup>、生枝动胶菌(*Zoogloea ramigera*)和拜氏固氮菌(*Azotobacter beijerinckii*)<sup>[7]</sup>等菌株的研究,发现 PHB 的代谢主要过程如图 1 所示,不同的菌种间可能略有差异。

图 1 中第 4 步到第 7 步是降解过程。首先(第 4 步)胞内无定形 PHB 颗粒在解聚酶作用下降解,形成单体和二聚体的混合物<sup>[8]</sup>。只有在真养产碱杆菌中才形成 D-3-羟基丁酸(D-3-

收稿日期:1995-11-30

HB)<sup>[9]</sup>。二聚体随之在二聚体水解酶作用下形成单体。从巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)和深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)<sup>[10]</sup>中已分离得到降解酶。对巨大芽胞杆菌进一步研究<sup>[11]</sup>表明,PHB的降解需要一个与PHB颗粒相连的热不稳定的因子,以及3个可溶性组分,即热稳定性蛋白活性因子、PHB解聚酶和水解酶,PHB在这些因子共同作用下生成80%~85% D-(-)-3HB和15%~20%的二聚体,二聚体在水解酶作用下进一步降解。从生枝动胶杆菌和深红红螺菌<sup>[12]</sup>中提取的二聚体水解酶不仅可降解(R,R)构型二聚体,还可降解(R,S)二聚体,后者还可降解(S,R)二聚体,但都比(R,R)二聚体降解得慢,二聚体降解酶同时也能作用于链较长的低聚体。PHB链的降解是以外式(ex-fashion)从羟基端开始,链越长作用越快。

R-3-羟基丁酸氧化成乙酰乙酸(第5步)是在脱氢酶作用下进行的,从产碱杆菌<sup>[6]</sup>、拜氏固氮菌<sup>[7]</sup>和生枝动胶菌<sup>[13]</sup>中分离的脱氢酶都具有相似的最适pH、 $K_m$ 值和抑制剂,NAD<sup>+</sup>是辅助因子,而NADH和乙酰乙酸是抑制剂。

由乙酰乙酸生成乙酰乙酰CoA(第6步)有两种不同的机制。在真养产碱杆菌和拜氏乳杆菌中,这一过程由3-酮酰CoA转移酶作用,琥珀酰CoA提供CoA<sup>[7]</sup>。在生枝动胶菌中,则由ATP提供能量,在乙酰乙酰CoA合成酶作用下完成<sup>[14]</sup>。

在PHB的代谢中,最关键的酶是3-酮硫解酶,它既参与合成,(由两个乙酰CoA合成乙酰乙酰CoA),又参与分解。催化合成时可被高浓度的CoA抑制,催化分解时,为乙酰乙酰CoA抑制,CoA激活。

根据微生物的代谢原理,可以知道PHB是受三羧酸循环两级调控的,PHB的降解和合成的平衡就是CoA和乙酰CoA之间的平衡。

表1 PHB解聚酶性质的比较

| 菌种                                         | 分子量( $\times 10^3$ ) | 亚单位分子量( $\times 10^3$ ) | 最适温度 | 最适pH | 抑制剂         | 水解产物       |
|--------------------------------------------|----------------------|-------------------------|------|------|-------------|------------|
| <i>A. faecalis</i> , AE122 <sup>[29]</sup> | 90                   | 95                      | 55   | 9.0  | PMSF        | 二聚体、三聚体    |
| <i>A. faecalis</i> , T1 <sup>[27]</sup>    | 48~50                | 48                      |      | 7.5  | PMFS        | 二聚体、三聚体    |
| <i>Conamonas</i> sp. <sup>[32]</sup>       | 44~45                | 44                      | 30   | 9.2  | DTE         | 单体         |
| <i>P. lemoignei</i> <sup>[33]</sup>        | 45~49                | 54~58                   | 8.0  |      | PMSF<br>DTE | 单体、二聚体、三聚体 |

PMFS——氟化磺酸苯甲烷 DTE——二硫赤藓糖醇

## 1.2 胞外降解

PHB的胞外降解有两种机制,一种是在无菌条件下通过水解进行<sup>[15]</sup>。这种机制对于

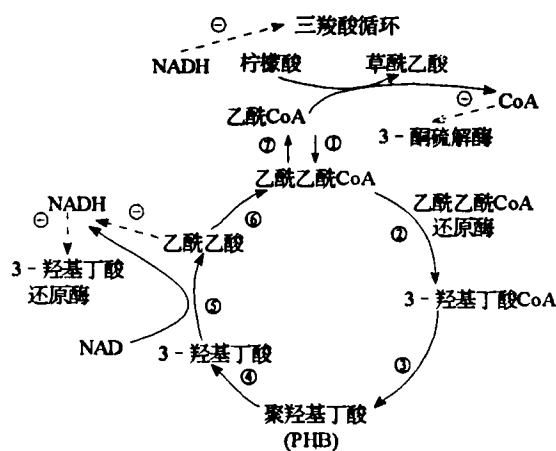


图1 PHB的代谢过程

○ 抑制

PHB 在医疗方面的应用(如作为药物的缓适载体、手术缝线等)特别重要。在自然环境中,是另一种机制——酶降解机制。许多细菌和真菌可分泌外胞解聚酶<sup>[16,17]</sup>,有些甚至可以利用 PHB 作为唯一碳源生长。如粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*)<sup>[18]</sup>、勒氏假单胞杆菌 (*Pseudomonas lemoignei*)<sup>[19]</sup>、德氏假单胞菌 (*Pseudomonas delafieldii*)<sup>[20]</sup> 和单纯青霉 (*Penicillium simplicissimum*)<sup>[21]</sup>。几种细菌和真菌产生的解聚酶的性质如表 1 所示。

粪产碱杆菌中有两种胞外聚体解聚酶,P(3-HB)解聚酶<sup>[16]</sup>和寡聚体水解酶<sup>[17]</sup>。解聚酶分子量约 50000,既可降解 P(3-HB),又可降解水溶性寡聚体,但对短链寡聚体活性较低,不能作用于二聚体,它以内式(endo-fashion)作用于羟基端第二个酯键<sup>[16]</sup>,产生二聚体和少量的单体。寡聚体水解酶仅作用于水溶性寡聚体,但活性比解聚酶要高 10 倍,链越长作用越快,但不能作用于聚体;它以外式作用于羧基端,生成单体。对二聚体来说,仅是(R,R)和(R,S)两种构型能被作用,前者较快。勒氏假单胞菌 (*P. lemoignei*) 也有两种聚体解聚酶,PHB 解聚酶和二聚体水解酶。不同的菌株情况略有差异,有些是诱导型酶,有些是组成型酶<sup>[22]</sup>。Y. Oda<sup>[26]</sup>等发现在含有易利用底物的培养基中, *Paecilomyces lilacinus* D218 几乎不分泌 PHB 解聚酶,而在仅以 PHB 为碳源的培养基中,解聚酶可达相当高的量,表 2 列出 10d 后,含 PHB 培养基中,其它碳源对 PHB 解聚酶形成的影响。并且,应指出的是,仅是 PHB 解

聚酶可以分泌到胞外,降解胞外 PHB,形成三聚体、二聚体和单体的混合物,前者在细胞壁中的二聚体水解酶作用下形成单体,进入细胞。解聚酶也是以内式作用于羟基端的第二或第三个酯键,但对寡聚体和聚体有相同的活力<sup>[19]</sup>,二聚体水解酶则可作用于(R,R)和(S,R)构型的二聚体。

表 2 其它碳源对 PHB 解聚酶形成的影响

| 其它成分 | PHB 解聚酶<br>(u/ml) | 培养液中蛋白质<br>(μg/ml) | 菌丝体重<br>(mg/ml) |
|------|-------------------|--------------------|-----------------|
| 无    | 42                | 21.0               | 1.4             |
| 可溶淀粉 | 0.02              | 21.1               | 3.1             |
| 乳糖   | 0.07              | 33.5               | 0.8             |
| 葡萄糖  | 0.06              | 15.5               | 2.2             |

2 PHB 在环境中的降解

影响 PHB 降解速度的因素较多,包括环境类型,微生物种群及活力,水分,温度,塑料制品的厚度,表面组织形态,孔隙度,制品中的第二组分,如填充料、颜料等<sup>[23,24]</sup>。表 3 列出了不同条件下 PHB 降解的一个典型例子。

在自然环境中,能降解 PHB 的微生物范围很广,包括细菌、放线菌和霉菌等。环境中的 pH、温度等不同,降解 PHB 的主导微生物也不同。J. Mergaertd 等<sup>[21]</sup>在土壤中发现有 295 种微生物可降解 PHB,包括 105 种革兰氏阴性菌,36 种革兰氏阳性菌,68 种放线菌和 86 种霉菌;在酸性土壤中,革兰氏阴性菌很少;高温时,霉菌多属烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*),而低温时多属马昆德拟青霉 (*Paecilomyces marquandii*) (砂土、粘土中)或青霉 (*Penicillium*) (其它土壤中)。

Y. Doi 等<sup>[31]</sup>在研究了环境对 PHB 降解的影响后认为:在一定范围内 PHB 降解速度与温度正相关,其降解分为两个阶段:第一阶段,分子量下降;第二阶段,是在分子量下降至 13000 后开始腐蚀。表 4 是 PHB 及两种共聚体的生物降解情况。在共聚体中,正常情况下,降解过程的速度随 4-羟基丁酸组分的增加而加快。

表3 PHB在不同环境条件下的生物降解

| 环境条件    | 1mm 厚膜消失<br>所需时间(周) | 降解速度<br>( $\mu\text{m}/\text{周}$ ) | 50 $\mu\text{m}$ 厚膜消失<br>所需时间(周) | 降解速度<br>( $\mu\text{m}/\text{周}$ ) |
|---------|---------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 厌气活性污泥  | 6                   | 170                                | 0.5                              | 100                                |
| 河口堆积物   | 40                  | 25                                 | 5                                | 10                                 |
| 好气活性污泥  | 60                  | 17                                 | 7                                | 7                                  |
| 土壤(25℃) | 75                  | 13                                 | 10                               | 5                                  |
| 海水(15℃) | 350                 | 2.5                                | 50                               | 1                                  |

环境中有许多微生物能降解 PHB,但每种的数量并不一定很多,活力不一定很高。当 PHB 出现在环境中后,经过一定的迟滞期,能降解 PHB 的微生物会逐渐增多,活力升高,降解速度会逐渐加快<sup>[25]</sup>。Y. Oda<sup>[26]</sup>等发现在培养基中加入 PHB 后, *Paecilomyces lilacinus* 开始分泌 PHB 解聚酶,并且活力逐渐升高,6d 后达到一稳定值。

微生物分泌的解聚酶,不仅对底物有专一性,而且还具有很强的立体异构专一性,通常对只有 R-构象的聚体(共聚体)有良好的降解性,而含 S-构象的聚体则较差。表 5 列出从河水沉淀中培养出的混合菌群对 PHA 膜的降解情况。

通常情况下,PHB 厌氧降解比有氧降解快<sup>[25,27]</sup>,真养产碱杆菌在厌氧条件下,主要代谢产物是乙酸和 R-3-羟基丁酸,乙酰 CoA 转变成乙酸的同时生成 ATP。而在有氧情况下,乙酰 CoA 完全分解成 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O,产生 12 个 ATP,这是一种对 PHB 更为经济的利用。与

PHB 相比较,有较长侧链的 PHA 在环境中降解速度较慢,因为低分子量的有机化合物离子化速度比结构复杂的要快<sup>[28,29]</sup>,并且长侧链的重复单元增加了 PHA 的疏水性,抑制或阻碍了微生物在聚体表面的生长。因此我们可以通过改变重复单元、立体构象等来控制聚合物的生物降解速度。

### 3 展 望

随着石化合成塑料污染的加剧,人们正积极地进行各种生物可降解塑料的研究,内容涉及其生产的可行性、可用性和降解性。

目前对 PHB 降解的研究不仅是在降解的机制和现象上。利用遗传工程手段,将 PHB 胞外降解酶基因进行克隆表达的实验已见于报道,如 Saito 等<sup>[30]</sup>分析了粪产碱杆菌的 PHB 胞外解聚酶结构基因的序列,并将其克隆到大肠杆菌中。结果发现重组菌可以较高水平的表达这个酶,约为普通菌株的 10%,同粪产碱杆菌所分泌的解聚酶一样,该酶为一个 488 个氨基酸的前体和一个 27 个氨基酸的单肽组成。

表4 PHB及共聚体的生物降解

| t (d)         | 20    | 80 | 180 |
|---------------|-------|----|-----|
| P(3HB-co-4HB) | +     | +  | ✓   |
| PHB           | -     | +  | ✓   |
| P(3HB-co-3HV) | -     | +  | ✓   |
| -             | 分子量未变 |    |     |
| +             | 分子量下降 |    |     |
| ✓             | 开始腐蚀  |    |     |

表5 各种 PHA 膜的有氧降解情况

| 类型          | 构象    | PHB 含量 | 分子量    | 降解性 |
|-------------|-------|--------|--------|-----|
| PHB         | (R)   | 100    | 150000 | +   |
| PHB         | (R)   | 100    | 800000 | +   |
| PHB         | (R,S) | 100    |        | -   |
| PHB         | (R,S) | 100    |        | -   |
| PHB         | (S)   | 100    |        | --  |
| P(HB-co-HV) | (R)   | 83/37  | 150000 | +   |
| P(HB-co-HV) | (R)   | 80/20  |        | +   |
| P(HB-co-HV) | (R)   | 70/30  |        | +   |
| P(HB-co-HV) | (R)   | 94/4   | 360000 | +   |
| P(HN-co-HH) | (R)   | 59/32  | 190000 | -   |

+ 可降解 - 不可降解

随着对 PHB 降解研究的一步步深入,降解的内部机制逐步展现在人们面前。笔者以为深入进行以 PHB 为代表的生物可降解塑料的生物可降解性的评价,以及开发高效的降解 PHB 的微生物制剂,并应用于垃圾处理和使用农膜的农田中,将是这一研究领域的发展方向。

### 参 考 文 献

- 1 陈文瑛. 中国包装协会四大交流材料. 1992,10
- 2 周杉寰等. 全国包装废弃物回收利用及环境学术讨论会论文 07 号. 1991,7
- 3 Evans J D, Sildar S K. CHEMTECH 38. 1990
- 4 Howells DR Chem. Ind. 1982. 508
- 5 Uttley N L. Appl. Biotechnol. proc. BIOTECH' 86 1987,1:171
- 6 Schindler J H, Schlegel G. Biochem. 1963,339:154
- 7 Senior P J, Dawes E A. Biochem. J. 1973,134:225
- 8 Gavard R, Dahinger A, Hauttecoeur B, et al. C. R. Acad. Sci. 1967,265:1557~1559
- 9 Hippe H, Schlegel H G. Arch. Mikrobiol. 1967,56:278~299
- 10 Errick J M, Doudoroff M. J. Bacteriol. 1964,88:60~71
- 11 Riebel R, Smirh Z, Merrick J M. Biochem. 1968,7:3676~3681
- 12 Errick J M, Yu C J. Biochem. 19665:3563
- 13 Akata T, Fukui T, Saito T, et al. Tomit J. Biochem. 1981,89:625
- 14 Fukui T, Ito M, Tomita T. Eur. J. Biochem. 1982,127:423
- 15 Odham G, Tunlid A, Westerdaahl G, et al. Appl. Environ. Microbiol. 1986,52:905~910
- 16 Miller ND, Williams DF. Biomaterials 8;129 J. Environ. Polymer Degrad. 1987,1:53~63
- 17 Shirakura Y, Fukui T, Tanio T, et al. Biochem. Biophys. Acta. 1983748:331~339
- 18 Chowdhury A A. Arch. Mikrobiol. 1963,47:167
- 19 Nakayama K, Saito T, Fukui T, et al. Biochem. biophys. Acta. 1985,827:63
- 20 Davics D, Stanier R Y, Doudoroff M, et al. Arch. Microbiol. 1970,70:1
- 21 Mergaert J A, Webb C, Anderson A. Swings J. Appl. Envir. Microbio. 1993,59:3233~3238
- 22 Delafield F P, Doudoroff M, Palleroni N J, et al. J. Bacteriolog 1965,90:1455~1466
- 23 中津留有纪. 水素细菌 *Alcaligenes eutrophus* の作る脂肪族ポリステル(PHB)の生分解特性. 大阪大学论文(日, 本). 1994,3
- 24 Holland S J, Jolly A M, Yasin M. Biomaterials 1989,8:289~295
- 25 Uttley N L. Appl. Biotechnol. Proc. BIOTECH'86 1986,1:171
- 26 Oda Y, Asari H, Urakami T, et al. J. of Fementation and Bioengineering 1995,80:265~269
- 27 Tanio T, Fukui T, Shirakura Y, et al. Eur. J. Biochem. 1982,124:71
- 28 Fenchel T, Blackburn T H. Bacteria and Mineral Cycling. Academic. London. New York. San Francisco 1979
- 29 Kita K, Ishimaru K, Teraoka M, et al. Appl. Enviro. Microbiol. 1995,61:1727~1730
- 30 Saito T, Suzuki K, Yamamoto J, et al. J. Bacteriol. 1989,17:184~189
- 31 Doi Y, Kanesawa Y, Kawaguchi Y, et al. Chem. Rapid Commun. 1989,10:227~230
- 32 Jendrossek D I, Kuoke R B, Habibian, J. Environ Polymer Degrad. 1993,1:53~56
- 33 Nakayaina K, Saiko T, Fukui T. Biochim. Biophys. Acta. 1985,827:63~72