

文章编号 :1009-038X(2002)02-0197-12

聚羟基脂肪酸酯的微生物合成、性质和应用

陈国强, 张广, 赵锴, 田格, 陈金春, 吴琼
(清华大学 生物科学与技术系 北京 100084)

摘要:聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates, PHA)是微生物合成的一种聚酯,由于其具有优良性质,如生物可降解性、生物相容性和光学性能等,现已吸引了科技界和工业界的广泛兴趣。PHA的力学性质依赖于其手性单体(R)-羟基脂肪酸((R)-hydroxyalkanoate)的组成和结构。多学科的研究表明,PHA在可生物降解的包装材料、组织工程材料、缓释材料以及电学材料方面有广阔的应用前景,但只有降低PHA的生产成本后才可能大规模应用。作者对PHA的化学、物理性质以及分子领域的研究进行了总结,包括用二维傅立叶变换红外技术对PHA的性质研究及新型PHA共聚物的工业化生产等。

关键词:聚羟基脂肪酸酯;聚羟基丁酸;PHA合成酶;聚酯

中图分类号:O 623.65

文献标识码:A

Microbial Synthesis, Properties and Applications of Polyhydroxyalkanoates

CHEN Guo-qiang, ZHANG Guang, ZHAO Kai, TIAN Ge, CHEN Jin-chun, WU Qiong
(Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Polyhydroxyalkanoates (PHA) a microbially synthesized polyesters, have attracted increasing attentions from scientific and industrial communities for their combination of several properties including biodegradability, biocompatibility and optical activity. The potential applications as biodegradable packaging, tissue engineering and controlled release materials as well as electronic applications have shown some promises. Mechanical properties of PHA depend both on their optical (R)-hydroxyalkanoate monomer contents and structures. Multidisciplinary researches have been devoted to obtain novel PHA. Large scale application of PHA will only be possible if PHA can be produced at a low cost. This paper attempts to review the recent progresses made in understanding the biochemical, physiological and molecular aspects of PHA synthesis. Industrial production of novel copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate including its property studies using the two dimension Fourier Transformed Infrared Spectroscopy has also reviewed here.

Key words: Polyhydroxyalkanoates; polyhydroxybutyrate; PHA synthase; polyesters

收稿日期 2001-12-01; 修订日期 2002-01-12.

基金项目 国家自然科学基金项目(20074020 和 30170017)资助课题.

作者简介 陈国强(1963-),男,广东汕头人,奥地利博士,教授,博士生导师.

1 聚羟基脂肪酸酯的组成和性质

1.1 聚羟基脂肪酸酯的研究历史

20 世纪初,在 *Azotobacter chroococcum* 中发现了一种亲苏丹染料、可溶于氯仿的类脂肪包涵体^[1], 随后在 *Bacillus megaterium* 中又发现了类似的包涵体, 其组成被鉴定为聚-D-3-羟基丁酸(poly-D-3-hydroxybutyric acid or P(3HB))^[2]。20 世纪 60 年代,除了 D(-)-3-羟基丁酸(3HB), 其它单体开始有了报道^[3]。20 世纪 80 年代初,在细菌合成的 PHA 中发现了 3-羟基戊酸、3-羟基己酸^[4]和 3-羟基辛酸单体^[5]。之后,在众多的 PHA 合成菌中发现了许多新的单体^[3],到 1998 年,已经有超过 125 种 PHA 被发现^[6~8]。可以期望将有更多的 PHA 组成单体通过用不同的菌种、不同的发酵底物以及代谢调控等方法被合成和发现。

1.2 聚羟基脂肪酸酯的分类

PHA 的大多数单体是链长 3~14 个碳原子的 3-羟基脂肪酸,侧链是高度可变的饱和或不饱和、直链或支链、脂肪族或芳香族的基团^[3,7,9]。根据单体的碳原子数,PHA 可以被分为两类:短链(short-chain-length, SCL)PHA,其单体由 3~5 个碳原子组成;中长链(medium-chain-length, MCL)PHA,其单体由 6~14 个碳原子组成^[10]。一般认为,PHA 的分类是由 PHA 合成酶对不同链长单体的特异性差异决定的^[10]。不过,最近也发现了由短链和中长链单体组成的聚合物,如短链 HA 单体与 3-羟基己酸的共聚物^[11~15]及短链 HA 单体和超过 6 个碳原子的中长链单体组成的共聚物^[16,17]。

1.3 聚羟基脂肪酸酯的物理性质

PHA 是由具有光学活性的(R)-3HA 单体组成的线性可降解聚酯^[3],其物理性质主要是由其单体组成决定的。由 3(HB)组成的均聚物 P(3HB)机械性能和加工性能都比较差,而其它的单体的插入会显著地改善 PHA 的性能并带来一些新的特性,所以对非 3(HB)单体的寻找吸引了科技和工业界的注意。

P(3HB)是最常见的生物聚酯,可以被很多种细菌所合成^[3],其结晶度为 55%~80%^[18]。不过,在细菌体内的聚合物为不溶于水的包涵体,为无定形态。野生菌合成的 P(3HB)的相对分子质量大约在 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 之间,分散度为 2 左右^[18]。P(3HB)的物理性质(如玻璃化温度、熔点和机械性能)等与聚丙烯和其它化工塑料相比表明,这种聚合物更加硬而脆。为了增加 P(3HB)的应用范围,进行

了很多研究以改善 P(3HB)的性能,包括加入不同的增塑剂和与其它聚合物共混等,不过在 P(3HB)均聚物中插入非 3(HB)单体似乎是最有效的方法。举例来说,在 1974 年发现的由 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸组成的共聚物 P(3HB-co-3HV)^[19]的熔点就比 P(3HB)低,可溶于乙醇,而 P(3HB)不可溶。这种共聚物之后被 ICI 公司(现在为 Zeneca 生物制品公司)商品化,商品名为 Biopol^[20]。而 3-羟基己酸、3-羟基辛酸、3-羟基癸酸(3-hydroxydecanoate, 3HD)和其它中长链单体的插入会增加聚合物的弹性(表 1)^[8]。最近的进展表明已经可以大规模生产 P(3HB-co-3HHx)的共聚物^[21~23], P(3HB-co-3HHx)是一种具有很好性能的聚合物^[24]。另外,还在 PHA 中发现了 4-和 5-HA 单体,具有新的性质,应用将更加广泛。

表 1 不同组成的 PHA 与传统塑料的物理性质比较^[9]

Tab. 1 Physical properties of various PHA in comparison with conventional plastics

样品	$T_m/^\circ\text{C}$	$T_g/^\circ\text{C}$	拉伸强度/ MPa	断裂伸长/ %
PHB	177	4	43	5
P(HB-co-10%HV)	150	-	25	20
P(HB-co-20%HV)	135	-	20	100
P(HB-co-10%HHx)	127	-1	21	400
P(HB-co-17%HHx)	120	-2	20	850
Polypropylene	170	-	34	400
Polystyrene	110	-	50	-
PET	262	-	56	7 300
HDPE	135	-	29	-

HB: 3-hydroxybutyrate, 3-羟基丁酸; HV: 3-hydroxyvalerate, 3-羟基戊酸; 3-hydroxyhexanoate, 3-羟基己酸; PET: poly(ethylene tetrphthalate) 聚对苯二甲酸乙二醇酯; HDPE: high density polyethylene 高密度聚乙烯。

1.4 聚羟基脂肪酸酯的生理功能

细菌体内的 PHA 主要被用来作为碳源和能源的储备物^[10,27]。PHA 由于具有低溶解性和高相对分子质量,可以在细菌胞内大量储存而不影响胞内和胞外的渗透压,所以是一种理想的储存材料^[27]。当增加碳氮比后,细菌体内的 PHA 含量就会增加,体现了 PHA 的储存功能^[28]。当细菌缺乏足够的营养供应而不能分裂和生长时也积累 PHA,例如,当细菌的碳源充足而镁离子、硫酸根、磷酸根或者氮氧不足时,PHA 会被迅速地合成^[18,28]。最近的研究表明细菌体内 PHA 的合成和降解可能处于一种动态的平衡中,所以 PHA 可能在细菌体内扮演更积

极的角色^[29]。PHA 其它的生理功能还有增强对逆境的抵抗力^[30]、作为形成孢子的碳源和能源^[31]和作为还原陷阱调节氧化还原反应^[32]，以及对代谢还有一定的调控作用^[33]。应该指出的是低相对分子质量 PHA 的发现表明这种聚合物还有更多的生理功能。这种 PHA 的相对分子质量大约在 13 000，即由约 150 个单体组成(寡聚物, oligo 3HB, OHB or complex PHB, cPHB)，被发现是胞质^[34]和质膜^[35]的组成成分。OHB 与其它生物大分子连接在一起，在许多生物体内广泛分布^[36]。

2 聚羟基脂肪酸酯的生产

自从 R 3HB) 在 1926 年被发现以来^[2]，不仅在革兰氏阴性菌，还在很多革兰氏阳性菌、蓝藻、紫细菌以及一些古细菌中发现了这种聚合物^[10]。PHA 研究者为了把 PHA 作为绿色塑料的生产原料，作了很多努力，不过由于其生产成本较高，目前尚不能用于日用品塑料的生产，所以很多研究集中在筛选新的 PHA 合成菌以发现新组成和新功能，给 PHA 的应用加入高附加值^[20]。为了达到发现或构建有效的 PHA 合成菌的目的，主要有 3 种策略：即野生菌种的筛选、有效的发酵技术以及基因工程技术。

2.1 菌种筛选

很多野生菌被发现能够合成 PHA 后，被实验用来大规模生产^[37~43]，但野生菌种很少适合工业生产。生产用菌种应该可以利用便宜的碳源来生长和积累 PHA，且生长迅速及易于操作回收。以前由于在操作大量的 PHA 合成菌时的困难而对 PHA 合成菌没有进行过系统的筛选。常规的染色法，利用苏丹黑、尼耳兰和尼耳红等亲脂染料，可以容易地区分 PHA 合成菌和非 PHA 合成菌^[44]，不过这种方法不能提供关于 PHA 组成的任何信息。而分析 PHA 组成时采用的气相色谱方法耗时长、工作强度大，系统地分析不同地理环境下 PHA 合成菌的分布情况就非常困难。最近，利用新建立的傅立叶变换红外快速无损检验技术进行了第一次大规模 PHA 合成菌筛选，结果表明 PHA 的合成是一个很普遍的现象，在已研究的土壤和水生细菌中基本都发现有 PHA 的合成现象^[7,8]。合成 PHA 的主要菌群是假单胞菌(*Pseudomonas*)^[45]，其中许多被鉴定为 PHA 的优良生产菌^[46~55]，甚至可以合成不常见的 PHA^[46,53]。除了假单胞菌，还有其他一些菌种也具有工业应用的潜力^[37]。筛选出来的许多菌种能够合成包含短链和中长链单体的共混 PHA，筛选结果

表明发现更多的 PHA 合成菌是有可能的。

2.2 发酵技术

尽管已经发现有超过 300 种不同的微生物可以合成 PHA，但其中仅有几种能够以高浓度和高产率来生产 PHA，如 *Ralstonia eutropha* (以前叫 *Alcaligenes eutrophus*)，*Alcaligenes latus*，*Azotobacter vinelandii*，*Aeromonas hydrophila*，几株甲烷菌和重组 *Escherichia coli*^[9,23,56,57]。为达到商业化的目标，有很多研究者正在努力降低生产成本，包括改良菌种和优化发酵和提取工艺等^[9,56,57]。PHA 生产的整个过程应该被整体设计和分析，包括碳源分析、发酵过程、PHA 产率以及提取方法等。短链和中长链 PHA 的发酵经济学已经有了综述^[57]，并提供了 PHA 有效生产的策略。

批次补料方法是 PHA 生产的最常用的发酵手段。两步培养法也经常使用，尤其是对于那些在限制营养元素条件下积累 PHA 的菌种^[56,58]。其它的菌种在合成 PHA 时不需要限制营养元素，其 PHA 合成是与细胞生长相关的，比如 *Bacillus sp.*^[37]，*A. vinelandii*^[59]和重组 *E. coli*^[18]。最近已经有综述研究了控制批次补料发酵方法的技术^[60]，也发展出了利用多波长荧光检测器在线监控发酵过程的方法^[61]，批次补料发酵方法可以被更好地优化。PHA 产率、细胞含量和产量不仅仅与特定的菌种和发酵过程有关，还在很大程度上受到所使用的碳源和其它营养元素的影响^[57]。除葡萄糖和果糖外的其它便宜碳源，如甲醇、乙醇、糖蜜和半纤维素水化物等都可以用来作为碳源以降低成本。最近，乳清^[62]、有机酸水解淀粉废水^[63]和甲烷^[64]也被用来生产 PHA。在所有与成本相关的因素中，PHA 含量被认为是最重要的，因为它影响 PHA 产量和回收效率^[59]。

细菌的 PHA 组成是另一个依赖于发酵过程的元素。一般来说，PHA 的单体结构对使用的碳源的依赖性非常大。在一些假单胞菌中，使用不同的碳源会发现有很多新的 PHA 单体被合成，这些相关碳源会使合成的 PHA 单体末端包含相应的功能基团^[46,65,66]。进一步的筛选结果表明，PHA 的合成很大程度上是底物依赖性的，当提供了合适的碳源后，很多细菌就能够合成 PHA^[7,8]。所以，当需要一些特殊结构的 PHA 时，具有相似结构的相关碳源就需要作为发酵的碳源。

2.3 代谢工程

许多蛋白参与了 PHA 合成、保持、降解和其它相关的代谢途径。因为 PHA 在细菌体内存在为细

胞质内不连续的包涵体,许多蛋白位于 PHA 包涵体的表面^[6,18]. PHA 相关蛋白和基因的命名见表 2^[6].

表 2 与 PHA 相关的酶及其基因

Tab. 2 Designation of genes involved in PHA biosynthesis, auxiliary structural proteins bound to PHA granules and PHA degrading enzymes

基因	基因编码的酶	相关途径
<i>phaA</i>	β -ketothiolase	
<i>phaB</i>	acetoacetyl-CoA reductase	
<i>phaC</i>	PHA synthase	
<i>phaE</i>	the second subunit of type III PHA synthase	PHA 生物合成途径
<i>phaG</i>	3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme A transferase	
<i>phaJ</i>	enoyl-CoA hydratase	
<i>phaZ</i>	PHA depolymerase	PHA 降解途径
<i>phaP</i>	Phasin	
<i>phaR</i>	putative regulator protein	调控功能

2.3.1 PHA 合成酶 在这些蛋白中,PHA 合成酶(PHA synthases,PhaC)是 PHA 合成的关键酶,决定着 PHA 的类型,如短链、中长链或者它们的共聚物.合成酶利用羟基脂肪酸辅酶 A(HA-CoA)为底物,催化 HA 聚合进入 PHA,释放一个 CoA 分子.第一个被克隆的 PHA 合成酶来自 *R. eutropha*^[67~69].到现在为止,至少 40 个不同的 PHA 合成酶基因被从约 40 种不同的菌种中用不同的技术克隆出来^[6].在 Rehm 和 Steinbüchel 的综述中总结了 PHA 合成酶的克隆方案、PHA 合成基因的组织方式和 PHA 合成酶的一级结构^[6].作者所在实验室建立了一种新的 PCR 克隆技术,而且从以前筛选出来的假单胞菌中克隆出新的二型 PHA 合成酶基因^[70].此方案利用了 PHA 合成基因区域的保守区域,可以被用于大多数假单胞菌.应该注意的是,PHA 合成酶与 GenBank 中其它的蛋白质家族没有明显的同源性,不过根据他们的一级结构和底物特异性,PHA 合成酶组成了一类高度同源的蛋白酶^[6].

2.3.2 PHA 前体合成途径

从简单而便宜的碳源中生产出具有更多不同单体组成的 PHA 对其广泛应用是非常重要的,在这种意义上,CO₂ 是最理想的碳源.其它来自废料或者充足的石化碳源也是可以接受的.不过,碳源最好首先是循环利用的碳水化合物和脂肪等.

为了理解碳源到聚合物的路径,应该对 PHA 的生物合成途径进行仔细地研究.

许多细菌如 *R. eutropha*^[10]等,其 P(3HB)生物合成途径可分为 3 步:从乙酰辅酶 A 开始, β -酮基硫解酶(β -ketothiolase,PhaA)催化两个乙酰辅酶 A 形成乙酰乙酰辅酶 A,然后在 NADPH 依赖的还原酶(PhaB)的作用下还原为(R)-羟基丁酰辅酶 A,最后在 PHB 合成酶的作用下聚合成 P(3HB),过程中有 CoA 的释放.

自从约 20 年前在 PHA 中发现了非 3HB 单体,表明 PHA 合成酶有更宽的底物特异性,所以才能在 PHA 中发现众多不同的单体被聚合^[3].根据组成 PHA 的不同单体类型,不同的代谢途径参与了提供这些单体^[18,71].图 1 总结了为 PHA 生物合成提供单体的不同代谢途径.最近在中心代谢途径与 PHA 合成之间发现了一些新的联系,包括利用合成或者降解代谢途径来合成 HA-CoA 或者将代谢流向导向相应的 HA-CoA 的合成^[9,10].举例来说,中长链 HA 单体一般来源于脂肪酸 β -氧化和从头合成(见图 1).最近的发现阐明了这两种途径与 PHA 合成途径的联系:PhaJ 和 FabG 将脂肪酸 β -氧化的中间产物转移到 PHA 合成上去^[72,73],而 PhaG 和 FabD 将脂肪酸从头合成途径的中间产物转移到 PHA 合成^[74,75].以前的研究表明在 PHA 合成中这两条脂肪酸代谢途径是各自单独起作用的^[76].不过,最近的研究发现这两条途径之间也有联系,可以将脂肪酸从头合成途径的中间产物 acyl-ACP 在一个硫酯酶的作用下转变为降解途径的中间产物 acyl-CoA^[77].这个新发现表明 PHA 合成的单体提供途径是多样化的,而对 PHA 合成进行代谢工程的研究也有更多的选择.

2.3.3 调控网络

由于 PHA 合成酶的关键作用,其作用机制和性质对细菌合成 PHA 的类型是非常重要的.不过因为很难获取羟基脂肪酸辅酶 A 和高纯度的合成酶,对合成酶的底物特异性研究一直面临困境.虽然合成酶底物特异性由其本身的生理环境决定的,但是还可以用分子手段来研究在其它环境中的情况(表 3~5).异源表达的结果是大多数合成酶的特异性即使在不同的底物环境中也不发生改变.不过,这种分析特异性的方法不是直接的而只能是一种预测,这种预测不能把所有的特殊条件下的单体环境模拟出来.这种方法对 PHA 合成酶的不确定带来了一个问题:最终合成的 PHA 的组成是由 PHA 合成酶的特异性还是由前体提供途径决定的,

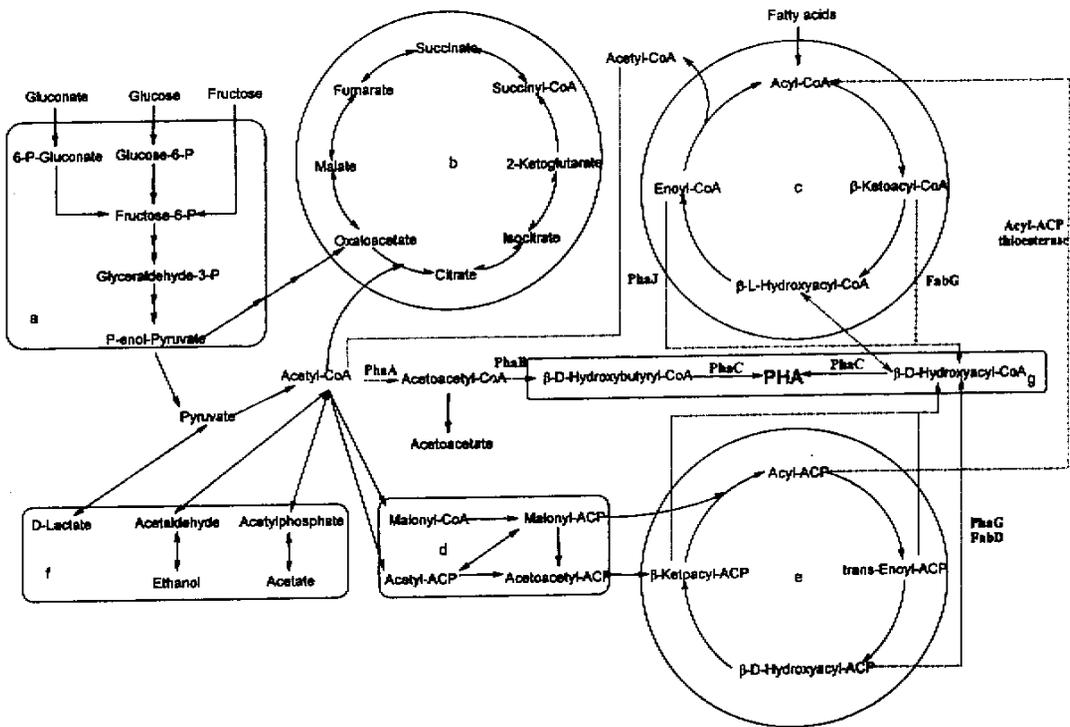
或者两者都有作用？这个问题在几个方面具有重要性 (1) 大多数假单胞菌有不止一个合成酶基因^[78]，用原始宿主体内表达不能区分这些合成酶；(2) 在不同的生理环境中，PHA 合成酶表达的结果有可能会发生很大的变化，导致合成的 PHA 的组成也不同。比如，*Thiocapsa pfennigii* 的 PHA 合成酶在不同的宿主中会有很宽的体内底物特异性^[3,79]。另外，最近对 *R. eutropha* 合成酶的分析表明它在体内还可以接受中长链的单体。对合成酶的机制研究发现在 PHA 的延长过程中合成酶处于双体聚合物形式^[79]。有的研究者对合成酶专门设计了体内分析系统对其进行系统的突变研究^[80]，不过依然没有解决这个问题。

在 P(3HB) 合成途径中，体内的乙酰辅酶 A 和自由辅酶 A 的浓度对聚合物合成的调节起到关键作用^[81]。有研究显示 P(3HB) 的合成速率由 PhbA 和 PhbB 控制，而其胞内含量由合成酶决定^[82]。PhaR 是在 *Paracoccus denitrificans* 中发现的一个调节蛋白，参与了对附近的 PHA 包涵体附着蛋白的基因表达的调控^[83]。

对 PHA 在假单胞菌合成中的调控机制，至今仅知道其单体的来源途径为脂肪酸的 β -氧化和从头合成途径。最近有人在研究一些编码转录调控因子的基因，比如来源于 *Pseudomonas* sp. 61-3 的 *phbR* 基因、来源于 *P. putida* KT2442 的 *phaS* 基因和来源于 *P. oleovorans* 和 *P. putida* 的 *phaF* 基因。这些调控因子的调控机制在 Kessler 和 Witholt 的综述中有描述^[84]。

有一种广泛分布的 PHA 包涵体附着蛋白 - Phasin 蛋白或 PhaP，也是一种调控蛋白，首先发现于 *Bacillus megaterium*^[85]。它的功能被认为是一种储存蛋白，可以在一定条件下作为氨基酸的来源被降解^[85]。PhaP 还被认为具有影响包涵体的大小和细菌体内 PHA 合成的功能^[86]。

由于资料较少，对 PHA 的代谢调控很难做一个总结。因此，为了完整了解整个途径机制，应该对所有的生化变化进行分析。有的研究采用了蛋白质组学的方法对 PHA 合成对细胞的影响进行了分析^[87]，这种方法对理解细胞体内的完整变化有所帮助。



a: 糖酵解途径; b: TCA 循环; c: 脂肪酸 β -氧化途径; d: 脂肪酸生物合成起始途径; e: 脂肪酸生物合成延长途径; f: 其它相关途径; g: PHA 生物合成途径

图 1 提供羟基脂肪酸单体的代谢途径 (FabD: malonyl-CoA 转酰酶; FabG: 3-ketoacyl-CoA 还原酶; 其它蛋白见表 2)

Fig. 1. Metabolic pathways that supply hydroxyalkanoate monomers for PHA biosynthesis (FabD: malonyl-CoA transacylase; FabG: 3-ketoacyl-CoA reductase. Other proteins see Table 2)

表 3 一型 PHA 合成酶表达的总结

Tab.3 Summary of the Type I PHA synthase genes expression

来源菌种	碳源	表达宿主	表达结果		其它
			组成	含量/%	
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Fatty acids Sugars Gluconate	Original	4, 5	2~50	
		<i>E. coli</i> DH5 α	/	Tr	
		<i>P. putida</i> GpP104	/	Tr	
		<i>R. eutropha</i> PHB-4	4, 5, 6	2~50	
		<i>K. aerogenes</i>		30~83	
<i>Alcaligenes latus</i> DSM1124	Glucose	<i>E. coli</i> BL21	4	50	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fructose	<i>R. eutropha</i> DSM541	4, 5		
	Fatty acids	<i>P. putida</i> GPp104	4, 5		
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Fatty acids Gluconate Fatty acids Gluconate	<i>E. coli</i>	4	80	
		<i>E. coli</i> <i>fad</i> mutants	4-12	27	
		<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	4, 5	8.7	
		<i>Pseudomonas</i> sp.	4	0~77	
<i>Aeromonas caviae</i>	Fatty acids	<i>R. eutropha</i> PHB-4	4, 6	50	
		<i>P. putida</i> GPp104	4, 6	50	
		<i>E. coli</i> HB101		8.4	
	Dodecanoate	<i>E. coli</i> LS5218	4, 6	38	With PhaJ
		<i>E. coli</i> DH5 α		28	
	Glucose	<i>E. coli</i> HB101	4	11	With FabD or FabH

表 4 二型 PHA 合成酶表达的总结

Tab.4 Summary of the Type II PHA synthase genes expression

来源菌种	碳源	表达宿主	表达结果		其它	特殊的 PhaC	
			组成	含量/%			
<i>P. resinovorans</i>	Sodium decanoate (0.4 g/dL)	<i>E. coli</i> DH5 α	6, 8, 10, 12, 14	5			
<i>P. citronellolis</i>	Gluconate		6, 8, 10, 12	20~40			
<i>P. mendocina</i>	Octanoate	<i>P. putida</i> GPp104	6, 8	40			
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM1650			6, 8, 10, 12	20~60			
<i>Pseudomonas</i> sp. GP4BH1		<i>P. putida</i> GPp104	6, 8, 10, 12, 14	50, 12		3 synthases cloned, 2 are type II and 1 are type I	
		<i>R. eutropha</i> H16-PHB-4	4	25~70			
<i>P. aeruginosa</i> PAOI	Gluconate	<i>P. putida</i> GPp104	6, 8, 10, 12	60			
	Octanoate	<i>R. eutropha</i> PHB-4	4, 6, 8	3~6			
		<i>Arabidopsis thaliana</i>		6~16	0.5		
	Hexadecane	<i>Rhodococcus opacus</i> PD630		6~12	34		
	Glucose, decanoate	<i>E. coli</i> LS1298		6~12	7		PhaC1
		Gluconate	<i>E. coli</i> JM109	4		With thioesterase	PhaC1
万方数据	Gluconate, decanoate	<i>E. coli</i> LS1298	4, 10				
		<i>P. fragi</i>	6, 8, 10, 12	10	With PhaG	PhaC1	

续表 4

来源菌种	碳源	表达宿主	表达结果		其它	特殊的 PhaC
			组成	含量/%		
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	Gluconate	<i>R. eutropha</i> PHB-4	4, 6, 8, 10, 12	50		
	Fatty acids	<i>R. eutropha</i> PHB-4	4-12	32		
	Gluconate	<i>P. putida</i> GPp104	4-12	40		PhaC1
	Oil					
<i>P. oleovorans</i>	Dodecanoate	<i>E. coli</i> HB101	6, 8, 10	8.1	With PhaJ	
	Doecanoate	<i>E. coli</i> LS5218	4, 6, 8, 10	29	With PhaJ	PhaC1
	Octanoic acid	<i>P. oleovorans</i> POMC1	6, 8, 10	50		
		<i>E. coli</i> 193MC1	6, 8, 10	12		
	Hexadecanoate	<i>E. coli</i>	6, 8, 10	20	With FabG	
	Gluconate decanoate	<i>P. fragi</i>	6, 8, 10, 12	10	With PhaG	PhaC1

表 5 三型 PHA 合成酶表达的总结

Tab.5 Summary of the Type III PHA synthase genes expression

来源菌种	表达宿主	表达结果		其它	特殊的 PhaC
		组 成	含量		
<i>Thiocapsa pfennigii</i>	<i>E. coli</i> JM109	4, 5	68	With Buk + Ptbs	PhaE + PhaC

2.3.4 代谢工程方法

来自不同微生物的涉及到 PHA 合成的许多基因和操纵子已经被克隆和鉴定^[6]。*E. coli* 是研究不同 PHA 合成相关基因的模式生物系统,在其中已经研究了很多不同的基因和代谢途径。*E. coli* 提供了一种容易理解的生理环境,可以用来利用不同的代谢途径从普通碳源中生产不同组成的 PHA。

自从 *R. eutropha* 的 *phbCAB* 操纵子在重组 *E. coli* 中成功地表达合成 P(3HB)以来^[67-69], P(3HB-co-3HV)^[88]、P(3HB-co-3HHx)^[74,75] 和 P(3HB-co-4HB)^[89],甚至中长链 PHA^[90] 都已经在野生或突变 *E. coli* 菌种中用异源表达技术表达不同的 PHA 合成酶基因得到了。利用 *E. coli* 生产 PHA 的另一个好处是由于它本身不能合成 PHA,所以没有胞内 PHA 降解酶,这样就可以生产出相对分子质量较高的 PHA。

有的研究把酵母、蓝藻、植物和昆虫细胞作为 PHA 潜在的生产者并获得了成功^[18]。出于经济考虑,植物和蓝藻是最有可能的候选者。在不久的将来,PHA 就可能不是生产出来,而是从转基因植物中收获了。

3 聚羟基脂肪酸酯的性质和应用

PHA 具有完美的全同规结构,只有(R)构型。

对 P(3HB) PHA 共聚物^[24]和 PHA 混合物的晶体结构已经有了很多研究,PHA 具有与化工塑料相似的性质^[18]。研究 PHA 性质的方法包括电子显微镜、DSC 和 X 光散射,以及最近发展起来的二维傅立叶变换红外技术(two-dimensional Fourier Transform Infrared correlation spectroscopy 2D FT-IR)。这种技术具有几个优点,例如可以分辨分子内和分子间的不同作用力,而且对很多种不同的聚合物都可以应用^[91]。用这种方法研究了 PHA 的热力学性质,并且探测出了 PHA 熔化过程中的中间相^[91,92]。

由于对环境污染问题的日益关注,可以用作聚合材料和非降解塑料替代品的 PHA 也逐渐引起人们的重视。不过由于其成本还是比较高,仍然不能代替传统塑料。当转基因植物和蓝藻能够以 CO₂ 为原料大量生产 PHA 后,有可能在一定程度上取代传统塑料。

PHA 还可以应用到包装材料上,例如香水瓶^[10]以及最近发展的环境友好的聚合物包扎工具^[93]。在医疗领域,PHA 的生物相容性、生物可降解性及多能吸收能力使其在细胞组织工程领域有很大的应用潜力,如心脏阀门、心血管修补材料等^[94]。当对 PHA 膜进行一些表面修饰后,其生物相容性有所提高,能在更多组织工程领域得到应用。

PHA 应用的另一个重要领域是其单体的应用。

和常规药物相比手性药物更安全、有效、使用剂量也更小^[95]。而 PHA 的手性单体 $-(R)-3\text{-HA}$ 可以被广泛用于化学药品合成的结构元件,例如抗生素、维生素、芳香素和信息素等^[96]。

传统合成手性单体的方法因分离光学异构体成本较高,难以放大。最近发展出来一些新的合成 PHA 手性单体 3-HB 的方法^[96,97]。化学和酶降解 PHA 的方法可以以很高的产率生产 3-HB,适合大规模生产。更直接的从生物系统中直接生产这种手

性单体的方法最近已在作者所在实验室取得进展,比如通过在 *E. coli* 中异源表达有关基因使得 $(R)-3\text{-HB}$ 和 $(R)-3\text{-HD}$ 可以直接被生产出来。这种方法可以直接而连续地生产手性 HA 单体,从而显著地降低手性单体的生产成本。

PHA 是最有前途的对环境友好的聚合材料,PHA 的发展会使许多工业以及人们的日常生活受益。

参考文献:

- [1] STAPP C. über die reserveinhaltsstoffe und den schleim von *Azotobacter chroococcum* [J]. **Zentbl Bakteriol**, 1924, 2 (61): 276.
- [2] LEMOIGNE M. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique [J]. **Bull Soc Chim Biol**, 1926, 8: 770.
- [3] STEINBUCHER A, VALENTIN H E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids [J]. **FEMS Microbiol Lett**, 1995, 128: 219.
- [4] FINDLAY R H, WHITE D C. Polymeric β -hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1983, 45: 71.
- [5] DE SMET M J, EGGINK G, WITHOLT B, et al. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane [J]. **J Bacteriol**, 1983, 154: 870.
- [6] REHM B H A, STEINBUCHER A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis [J]. **Intl J Biol Macromol**, 1999, 25: 3.
- [7] CHEN G Q, WU Q, XI J, et al. Microbial production of biopolyesters-polyhydroxyalkanoates [J]. **Natr Sci**, 2000, 10: 843.
- [8] CHEN G Q, WU Q, ZHAO K, et al. Functional polyhydroxyalkanoates synthesized by microorganisms [J]. **J Polym Sci**, 2000, 18: 389.
- [9] LEE S Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates [J]. **Biotech Bioeng**, 1996, 49: 1.
- [10] ANDERSON A J, DAWES E A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates [J]. **Microbiol Rev**, 1990, 54: 450.
- [11] FUKUI T, DOI Y. Cloning and analysis of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae* [J]. **J Bacteriol**, 1997, 179: 4821.
- [12] BRANDL H, KNEE E J, FULLER R C, et al. Ability of phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (β -hydroxyalkanoates): potential source for biodegradable polyesters [J]. **J Biol Macromol**, 1989, 11: 49.
- [13] LIEBERGESELL M, HUSTEDE E, TIMM A, et al. Formation of poly (3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria [J]. **Arch Microbiol**, 1991, 155: 415.
- [14] HAYWOOD G W, ANDERSON A J, WILLIAMS G A, et al. Accumulation of a poly (hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126 [J]. **J Biol Macromol**, 1991, 13: 83.
- [15] LIEBERGESELL M, MAYER F, STEINBUCHER A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1993, 40: 292.
- [16] MATSUSAKI H, MANJI S, TAGUCHI K, et al. Cloning and molecular analysis of the poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp strain 61-3 [J]. **J Bacteriol**, 1998, 180: 6459.
- [17] MATSUSAKI H, ABE H, DOI Y. Biosynthesis and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by re-

combinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3 [J]. **Biomacromolecules** , 2000 , 1 : 17.

- [18] SUDESH K , ABE H , DOI Y. Synthesis , structure and properties of polyhydroxyalkanoates : biological polyesters [J]. **Prog Polym Sci** , 2000 , 25 : 1504.
- [19] WALLEN L L , ROHWEDDER W K. Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge [J]. **Environ Sci Technol** , 1974 , 8 : 576.
- [20] BYROM D. Polymer synthesis by microorganisms : technology and economics [J]. **TIBTECH** , 1987 , 5 : 246.
- [21] LEE S H , OH D H. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila* [J]. **Biotechnol Bioeng** , 2000 , 67 : 240.
- [22] KATO M , BAO H J , KANG C K , *et al.* Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acids and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars [J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1996 , 45 : 364.
- [23] CHEN G Q , ZHANG G , PARK S J , *et al.* Industrial scale production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 2001 , 57 : 50.
- [24] CHEUNG M K , YU P H F , CHEN G Q. Thermal analyses of poly (3-hydroxybutyrate) , poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxy-hexanoate) [J]. **J Appl Polym Sci** , 2001 , 82 : 90.
- [25] KUNIOKA M , NAKAMURA Y , DOI Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids [J]. **Polym Commun** , 1988 , 29 : 174.
- [26] DOI Y , TAMAKI A , KUNIOKA M , *et al.* Biosynthesis of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate , 3-hydroxyvalerate , and 5-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids [J]. **Makromol Chem Rapid Commun** , 1987 , 8 : 631.
- [27] DOWES E A , SENIOR P J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms [J]. **Adv Microb Physiol** , 1973 , 10 : 135.
- [28] WU Q , SUN S Q , YU P H F , *et al.* Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates [J]. **Acta Polymerica Sinica** , 2000 , 6 : 751.
- [29] YAN Y B , WU Q , ZHANG R Q. Dynamic accumulation and degradation of poly (3- hydroxyalkanoate) s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by ^{13}C NMR [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 2000 , 193 : 269.
- [30] RUIZ J A , LÓPEZ N I , FERNÁNDEZ R O , *et al.* Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms [J]. **Appl Environ Microbiol** , 2001 , 67 : 225.
- [31] EMERUWA A C , HAWIRKO R Z. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism during growth and sporulation of *Clostridium botulinum* [J]. **J Bacteriol** , 1973 , 116 : 989.
- [32] SENIOR P J , DAWES E A. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* [J]. **Biochem J** , 1973 , 134 : 225.
- [33] MCDERMOTT T R , GRIFFITH S M , VANCE C P , *et al.* Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids [J]. **FEMS Microbiol Rev** , 1989 , 63 : 327.
- [34] REUSCH R N , SADOFF H L. D- (-)-poly- (-hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria [J] **J Bacteriol** , 1983 , 156 : 778.
- [35] REUSCH R N , HISKE T W , SADOFF H L. Poly- β -hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *Escherichia coli* [J]. **J Bacteriol** , 1986 , 168 : 553.
- [36] HUANG R , REUSCH R N. Poly (3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of *Escherichia coli* [J]. **J Biol Chem** , 1996 , 271 : 22196.
- [37] WU Q , HUANG H H , HU G H , *et al.* Constitutive production of poly-3-hydroxybutyrate by strain of *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media [J]. **Antonie van Leeuwenhoek** , 2001 , 80 : 111.
- [38] CHEN G Q , KOENING K H , LAFFERTY R M. Production of poly-D (-) -3-hydroxybutyrate and poly-D (-) -3-hydroxyvalerate by strains of *Alcaligenes latus* [J]. **Antonie van Leeuwenhoek** , 1991 , 60 : 61.
- [39] CHEN G Q , KOENING K H , LAFFERTY R M. Occurrence of poly-D (-) -3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus* [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1991 , 84 : 173.
- [40] CHEN G Q , PAGE W J. The effect of substrate on the molecular weight of poly-beta-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD [J]. **Biotechnol Lett** , 1994 , 16 : 155.
- [41] CHEN G Q , PAGE W J. Production of poly-beta-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in a two-stage fermentation process [J]. **Biotechnol Techniques** , 1997 , 11 : 347.

- [42] YU P H , CHUA H , HUANG A L , *et al.* Conversion of food industrial wastes into bio-plastics [J]. **Appl Biochem Biotechnol** , 1998 , 70 : 603 .
- [43] CHEN G Q , CHEN J C , LI Y . Production of co-polyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate , terpolyesters of hydroxybutyrate , 3-hydroxyvalerate and 4-hydroxybutyrate using strains of *Alcaligenes latus* DMS 1124 [J]. **Tsinghua J Sci Technol** , 1997 , 2 : 437 .
- [44] KRANZ R G , GABBERT K K , MADIGAN M T . Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1997 , 63 : 3010 .
- [45] HONG K , CHEN G Q , TIAN W D , *et al.* Isolation of microorganisms capable of synthesizing novel biopolymers from oil contaminated soil and water [J]. **Tsinghua J Sci Technol** , 1998 , 3 : 1063 .
- [46] HE W N , TIAN W D , ZHANG G , *et al.* Production of novel polyhydroxy-alkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1998 , 169 : 45 .
- [47] YAO J , ZHANG G , WU Q , *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens* [J]. **Antonie van Leeuwenhoek** , 1999 , 75 : 345 .
- [48] TIAN W D , HONG K , CHEN G Q , *et al.* Production of polyesters consisting of medium chain length 3-hydroalkanoic acids by *Pseudomonas mendocina* 0806 from various carbon sources [J]. **Antonie van Leeuwenhoek** , 2000 , 77 : 31 .
- [49] WU Q , ZHANG G , TIAN W D , *et al.* Formation of polyhydroxyalkanoates blends by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* M1-2 from various carbon sources [J]. **Tsinghua J Sci Technol** , 1999 , 4 : 1539 .
- [50] ZHANG G , WU Q , TIAN W D , *et al.* Production of medium chain length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mendocina* 0806 from related and unrelated carbon sources [J]. **Tsinghua J Sci Technol** , 1999 , 4 : 1535 .
- [51] HONG K , YAO J , ZHAO K , *et al.* Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates consisting of short-chain-length monomers and medium-chain-length monomers by *Pseudomonas* YS1 [J]. **Tsinghua J Sci Technol** , 1999 , 4 : 1574 .
- [52] HE W N , ZHANG Z M , HU P , *et al.* Microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by strain DG17 from glucose [J]. **Acta Polymerica Sinica** , 1999 , 6 : 709 .
- [53] XI J Z , WU Q , YAN Y B , *et al.* Hyperproduction of polyesters consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317 [J]. **Antonie van Leeuwenhoek** , 2000 , 78 : 43 .
- [54] HONG K , CHEN G Q , YU P H , *et al.* Effect of C/N ratio on monomer composition of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Pseudomonas mendocina* 0806 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1 [J]. **Appl Biochem Biotechnol** , 2000 , 84-86 : 971 .
- [55] CHEN G Q , XU J , WU Q , *et al.* Synthesis of copolyesters consisting of medium-chain-length β -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 [J]. **React Funct Polym** , 2001 , 48 : 107 .
- [56] LEE S Y . Plastic bacteria ? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria [J]. **Trends Biotechnol** , 1996 , 14 : 431 .
- [57] CHOI J , LEE S Y , Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation [J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1999 , 51 : 13 .
- [58] HAZENBERG W , WITHOLT B . Efficient production of medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans* : economic consideration [J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1997 , 48 : 588 .
- [59] PAGE W J . Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources [J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1992 , 38 : 117 .
- [60] LEE J , LEE S Y , PAR S , *et al.* Control of fed-batch fermentations [J]. **Biotechnol Adv** , 1999 , 17 : 29 .
- [61] SKIBSTED E , LINDEMANN C , ROCA C , *et al.* On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration [J]. **J Biotechnol** , 2001 , 88 : 47 .
- [62] AHN W S , PARK S J , LEE S Y . Production of poly (3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* [J]. **Biotechnol Lett** , 2001 , 23 : 235 .
- [63] YU J . Production of PHA from starchy wastewater via organic acids [J]. **J Biotechnol** , 2001 , 86 : 105 .
- [64] WENDLANDT K D , JECHOREK M , HELM J , *et al.* Production poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane [J]. **J Biotechnol** , 2001 , 86 : 127 .
- [65] EGGINK G , DE WAARD P , HUIJBERTS G N M . Formation of novel poly (hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids [J]. **Can J Microbiol** , 1995 , 41 : 14 .
- [66] KIM O , GROSS R A , RUTHERFORD D R . Bioengineering of poly (β -hydroxyalkanoates) for advanced material applications : incorporation of cyano and nitrophenoxy side chain substituents [J]. **Can J Microbiol** , 1995 , 41 : 32 .

- [67] SLATER S C , VOIGE W H , DENNIS D E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway [J]. **J Bacteriol** , 1988 , 170 : 4431.
- [68] SCHUBERT P , STEINBÜCHEL A , SCHLEGEL H G. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli* [J]. **J Bacteriol** , 1988 , 170 : 5837.
- [69] PEOPLES O P , SINSKEY A J. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*) [J]. **J Biol Chem** , 1989 , 264 : 15298.
- [70] ZHANG G , HANG X M , GREEN P , *et al.* PCR cloning of type II polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from two *Pseudomonas* strains [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 2001 , 198 : 165.
- [71] MADISON L L , HUISMAN G W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates) : from DNA to plastic [J]. **Microbiol Mol Biol Rev** , 1999 , 63 : 21.
- [72] FUKUI T , YOKOMIZU S , KOBAYASHI S , *et al.* Co-expression of polyhydroxyalkanoates synthase and (R) -enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli* [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1999 , 170 : 69.
- [73] TAGUCHI K , AOYAGI Y , MATSUSAKI H , *et al.* Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoates synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1999 , 176 : 183.
- [74] REHM B H A , KRÜGER N , STEINBÜCHEL A. The new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis [J]. **J Biol Chem** , 1998 , 273 : 24044.
- [75] TAGUCHI K , AOYAGI Y , MATSUSAKI H , *et al.* Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101 [J]. **Biotechnol Lett** , 1999 , 21 : 579.
- [76] HUIJBERTS G N , DE RIJK T C , DE WAARD P , *et al.* ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly (3-hydroxyalkanoate) synthesis [J]. **J Bacteriol** , 1994 , 176 : 1661.
- [77] REHM B H A , STEINBÜCHEL A. Heterologous expression of the acyl-acyl carrier protein thioesterase gene from the plant *Umbellularia californica* mediates polyhydroxyalkanoates biosynthesis in recombinant *Escherichia coli* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 2001 , 55 : 205.
- [78] SOLAIMAN D K Y , ASHBY R D , FOGLIA T A. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction [J]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 2000 , 53 : 690.
- [79] JIA Y , YUAN W , WODZINSKA J , *et al.* Mechanistic studies on Class I Polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha* : Class I and III synthases share a similar catalytic mechanism [J]. **Biochem** , 2001 , 40 : 1011.
- [80] TAGUCHI S , MAEHARA A , TAKASE K , *et al.* Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 2001 , 198 : 65.
- [81] HAYWOOD G W , ANDERSON A J , CHU L , *et al.* The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus* [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1988 , 52 : 259.
- [82] JUNG Y M , PARK J S , LEE Y H. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned *phbCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoates biosynthesis [J]. **Enzyme Microb Technol** , 2000 , 26 : 201.
- [83] MAEHARA A , DOI Y , NISHIYAMA T , *et al.* a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria , is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans* *phaP* expression in vitro [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 2001 , 200 : 9.
- [84] KESSLER B , WITHOLT B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoates metabolism [J]. **J Biotechnol** , 2001 , 86 : 97.
- [85] MCCOOLL G J , CANNON M C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium* [J]. **J Bacteriol** , 1999 , 181 : 585.
- [86] STUART E S , TEHRANI A , VALENTIN H E , *et al.* Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary [J]. **J Biotechnol** , 1998 , 64 : 137.
- [87] HAN M J , YOON S S , LEE S Y. Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing poly (3-hydroxybutyrate) [J]. **J Bacteriol** , 2001 , 183 : 301.
- [88] SLATER S , GALLAHER T , DENNIS D. Production of poly- (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1992 , 58 : 1089.
- [89] VALENTIN H E , DENNIS D. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli*

grown on glucose [J]. **J Biotechnol** , 1997 , 58 : 33.

- [90] LANGENBACH S , REHM B H A , STEINBUCHER A. Functional expression of the PHA synthase gene phaC1 from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly (3-hydroxyalkanoate) synthesis [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1997 , 150 : 303.
- [91] TIAN G , WU Q , SUN S Q , *et al.* Study of thermal melting behavior of microbial polyhydroxyalkanoates using two-dimensional fourier-transform infrared FT-IR correlation spectroscopy [J]. **Appl Spectrosc** , 2001 , 55 (7) : 888.
- [92] WU Q , TIAN G , WU Q , *et al.* Study of microbial poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) using two-dimensional fourier-transform infrared correlation spectroscopy [J]. **J Appl Polym Sci** , 2001 , 82 : 934.
- [93] WALLE G A M , BUISMAN G J H , WEUSTHUIS R A , *et al.* Development of environmentally friendly coatings and paints using medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder [J]. **Int J Biol Macromol** , 1999 , 25 (1-3) : 123.
- [94] WILLIAMS S F , MARTIN D P , HOROWITZ D H , *et al.* PHA applications : addressing the price performance issue I. Tissue engineering , Int [J]. **J Biol Macromol** , 1999 , 25 : 111.
- [95] ANGELO D P. Chiral chemistry is still evolving , driven by techniques and business demands [J]. **Genetic Engineering News** , 1996 , (6) : 15.
- [96] LEE S Y , LEE Y , WANG F L. Chiral Compounds from Bacterial Polyesters : Sugars to Plastics to Fine Chemicals [J]. **Biotechnol Bioeng** , 1999 , 65 : 363.
- [97] LEE Y , PARK S H , LIM I T , *et al.* Preparation of alkyl (R) - (-) -3-hydroxybutyrate by acidic alcoholysis of poly- (R) - (-) -3-hydroxybutyrate [J]. **Enzyme and Microbial Technol** , 2000 , 27 : 33.

(责任编辑 : 杨 萌 , 朱 明)

(上接第 193 页)

- [6] LLOYD A W , OLLIFF C J , RUTT K J. Study of modified betaine as cryoprotective additives [J]. **J Pharm Pharmacol** , 1994 : 704 - 707.
- [7] OKADA J , COHEN S , LANGER R. In vitro evaluation of polymerized liposomes as oral drug delivery system [J]. **Pharm Res** , 1995 , 12 (4) : 576 - 579.
- [8] 顾学裘编. 药物制剂新剂型选编 [M]. 北京 : 人民卫生出版社 , 1985. 102 - 104.
- [9] 平其能编. 现代药剂学 [M]. 北京 : 中国医药科技出版社 , 1998. 588 - 600.
- [10] GRIT M , UNDERBERG W J M , CROMMELIN D J A. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions [J]. **J Pharm Sci** , 1993 , 82 (4) : 362 - 368.
- [11] GRIT M , DE SMIDT J H , STRUIJKE A. *et al.* Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions [J]. **Int J Pharm** , 1989 : 1 - 4.
- [12] JANDAMEN. Transfer of phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein [J]. **Biochim Biophys Acta** , 1982 : 444 - 448.
- [13] CHEN T. Possible strategies for the formulation of antineoplastic drugs [J]. **Drug Dev Ind Pharm** , 1986 , 12 (7) : 1041 - 1044.

(责任编辑 : 秦和平)