

微生物利用废弃油脂合成 PHA 的研究进展

刘 慧,任连海

(北京工商大学 食品学院,北京 100037)

摘要:指出了聚羟基脂肪酸酯(PHA)是细菌在碳源充足、氮源缺乏的情况下产生的作为胞内碳源和能源储存物的生物聚酯,PHA 作为一种可降解高分子材料,可替代传统塑料。然而高于传统塑料 5~10 倍的生产成本是限制 PHA 大规模应用的主要原因。以废弃油脂为碳源生产 PHA,不仅能有效降低 PHA 成本,同时可以为废弃油脂的资源化提供合理的途径。综述了近年来废弃油脂用于 PHA 合成的最新进展。

关键词:聚羟基脂肪酸酯(PHA);废弃油脂;微生物合成

中图分类号:X703

文献标识码:A

文章编号:1674-9944(2015)01-0263-03

1 引言

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoates,PHA)是广泛存在于微生物体内的一类高分子生物聚酯,在生物体内主要作为碳源和能量的贮藏物质,如图 1 所示。PHA 与传统的、以石油为原料合成的塑料具有相似的材料学性质,但可以用可再生的资源合成,并且具有生物可降解性、生物相容性和不依赖化石资源等特性,可以完全降解进入自然界的生态循环,具有广阔的应用前景。因此,通过生物技术利用可再生资源生产 PHA,获得生物可降解聚合物以代替源自石油的普通塑料,受到相关领域研究者的普遍关注。

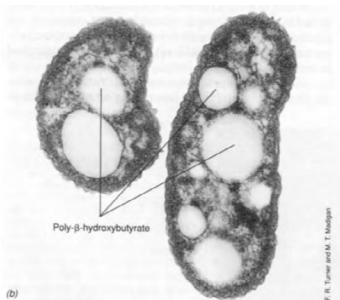


图 1 细胞内的 PHA

2 PHA 研究现状

PHA 在 20 世纪 20 年代就被发现,当时研究者发

现其能被苏丹染料染色,可溶于氯仿^[1],但未给其命名。1926 年,Lemoigne^[2]在巨大芽孢杆菌中,也发现了此类物质,并首次给这类物质命名。随后研究发现,很多菌株都能够合成 PHA。在这一阶段,还研究了 PHB 的天然颗粒提取及提取的 PHB 的功能^[3],并且对 PHB 合成和分解代谢^[4]进行了初步研究。1974 年,Wallen 和 Rohwedder^[5]发现了其它 PHA,标志 PHA 研究进入发展阶段。其他 PHA 的发现引发了人们研究 PHA 的兴趣,中长链 PHA 开始被人们广泛认识^[6,7]。在以后的 20 多年里发现了多种各种各样、性能各异的 PHA。在这一时期,PHA 的商业应用研究也开始起步,第一个商业化产品 3HB 和 3HV 的异聚物也在这一时期诞生了。在各种各样的细菌中都检测到了 PHA 的存在。PHA 合酶基因^[8]的克隆标志着 PHA 的研究进入了迅猛发展阶段。分子生物学的发展为在分子水平研究 PHA 提供了可能。在这一发展阶段,研究者们主要进行的是对合成这些聚酯分子生物学手段完美的应用于 PHA 基因的克隆、缺失突变、嵌合研究中,提高了 PHA 的产量、产生了新型 PHA。聚羟基脂肪酸酯作为一种可替代传统塑料的新型材料已被国内外学者广泛研究,国内的研究主要集中在利用基因修饰合成 PHA^[9~11],利用活性污泥合成 PHA^[12,13],以及 PHA 在微生物细胞内的生物合成途径和合成 PHA 的酶的研究^[14]。

收稿日期:2014-12-04

作者简介:刘 慧(1990—),女,河北人,北京工商大学食品学院硕士研究生。

通讯作者:任连海(1971—),男,河北人,副教授,主要从事固体废弃物处理处置方面的教学研究工作。

参考文献:

- [1] 约翰·卡莫迪. 高性能建筑用窗[M]. 刘正权,译. 北京:中国建材工业出版社,2012(1).
- [2] 罗 艺,黄 圻,刘忠伟. 建筑门窗[M]. 北京:化学工业出版社,2009(8).
- [3] 吴 蔚,雷持平. 夏热冬冷地区居住建筑节能窗传热系数和遮阳系数优化研究[J]. 墙材革新与建筑节能,2010(2).
- [4] 郭 红,桑 谦. 铝合金窗和塑料窗节能性能的比较及设计选用的基本原则[J]. 建筑科学,2006(2).
- [5] 班广生. 建筑节能窗的功能化发展趋势[J]. 新型建筑材料,2004(5).
- [6] 何水清,魏德林. 节能窗影响因素与中空玻璃窗推广应用[J]. 门窗,2007(5).
- [7] 陈建峰,孙剑波. 建筑节能玻璃膜的应用与建筑节能效果分析[J]. 住宅产业,2013(4).
- [8] 张云霞,朱 琨. 节能窗的研究应用现状及存在问题探讨[J]. 能源与环境,2008(3).

3 PHA 的结构及应用

PHA 具有多种单体,其结构是一种带有多羟基的链式聚合物,根据其支链的结构,进行不同的命名。其结构通式为如图 2 所示。

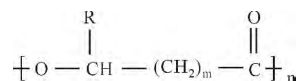


图 2 PHA 的分子结构

其中 $n=1,2,3$ 或 4;通常 $m=1$ 。 n 为聚合物单体的数目,多为 100~3000,决定分子量的大小。 R 代表侧链,可为饱和或不饱和、直链或含侧链及取代基的烷基。根据单体中的碳原子数,可将 PHA 分为两类:短

链 PHA,单体中含有 3~5 个碳原子;中长链 PHA,单体中含有 6~14 个碳原子^[15]。根据 PHA 单体成分是否唯一,也可将 PHA 分为均聚物和共聚物。在所有已发现的 PHA 中,除 PHB、PHV 为均聚物外,其余皆为共聚物。不同结构的 PHA 是在与其单体结构相关的底物培养中获得的,这使得合成多种不同结构的 PHA 成为可能。

自 1926 年 Lemoigne 第一次在芽孢杆菌中发现 PHB,到目前为止,研究人员已经在 300 多种细菌内发现了近百种不同脂肪酸构成的 PHA 单体,这些单体涵盖了碳原子数从 3 到 16 的具有饱和或不饱和键或支链的脂肪族以及芳香族 3-羟基脂肪酸^[16-18],几种常见的 PHA 分子式见表 1。

表 1 PHA 的单体结构

脂肪酸	3-羟基丁酸	3-羟基-2-甲基丁酸	3-羟基戊酸	3-羟基-2-甲基戊酸
单体结构	$\text{CH}_3 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	$\text{CH}_3 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{COOH}$	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{COOH}$

PHA 具有良好的生物相容性能、生物可降解性、紫外稳定性、生物组织相容性和塑料的热加工性能、光学活性、压电性、抗潮性、低透气性等特殊性能,在日常生活、医学、农业、工业、环境保护等各个领域有着巨大的研究价值:①可降解包装材料,由于 PHA 是类似聚丙烯的可降解材料,因此可应用于制造可抛弃型的材料用具,如手袋,包装膜,容器等。②医药行业,PHA 具有生物可降解性和生物相容性,可用作缓释材料,当其作为药物基质包埋药物植入人体后,随着药物释放,能降解为 3HA,而 3HA 在人体中是一种正常存在物质,可被人体自行代谢,而没有任何毒副作用。PHA 还可以用来生产手性单体。手性药物的天然存在性使手性药物使用起来更安全有效且使用剂量更小^[19]。③组织工程,生物相容性、生物可降解性、无毒性、无刺激性、无免疫原性、不溶血及无致突变性、压电性等特点使 PHA 在组织工程中广泛应用。比起传统的组织工程材料,PHA 的无毒可降解性使得患者在进行手术时更加安全,且能减少再次创伤、减轻患者再次疼痛。④压电性,PHB 经过 80℃ 碾压后再经热处理制成单轴定向的箔和薄膜后在 45℃ 增加拉力或剪应力,使其呈现表面压电特性,即可应用于压力测试仪,点火器,诊断器,声学仪器等仪器。⑤生物能源,PHA 作为一种聚酯本身就具有可燃性,当其经甲酯化处理 PHA 即得到 3-羟基脂肪酸甲酯,可以直接作为生物燃料,燃烧热稍低于乙醇^[20]。⑥其他应用,PHA 还具有光学活性,可应用于色谱中分离手性物质。此外,PHA 可在农业、环境中用作指示剂等,具有广泛应用。

4 利用废弃油脂合成 PHA

虽然 PHA 聚合物具有在自然条件下能被完全降解的优点,可作为传统塑料的替代物。但时至今日,PHA 并没有得到大规模的应用。其中最主要的原因是

生产 PHA 的成本太高。目前 PHA 生产主要依赖于微生物发酵,在微生物发酵合成 PHA 的所有发酵条件因素中,底物是一个重要因素,其成本占到总成本的 28%~50%^[21]。采用廉价底物将在很大程度上降低 PHA 的生产成本。利用废弃油脂合成 PHA 既可以解决废弃油脂处理不当带来的废水、废气等环境污染的问题,又可以降低 PHA 的生产成本,使其获得广泛应用。

4.1 生物柴油副产物

近年来,石油危机、能源紧缺的问题日益严峻,世界各国正积极研发太阳能、风能、水能、生物质能等可再生的替代能源。生物柴油作为一种极有前景的可再生能源,受到全世界学术界和产业界的普遍关注。然而,在生产生物柴油的过程中会产生大量的副产物,主要包括脂肪酸甲酯、甘油、游离脂肪酸、水、低碳醇(甲醇或乙醇)和微量的盐(如 K_2SO_4 , NaCl)等^[22-23]。其中仅甘油一种产物就可达到生物柴油总产量的 1/10。生物柴油副产物是非常好且便宜的 PHA 合成的原料。以生物柴油副产物为原料合成 PHA,对于解决生物柴油副产物过度积累的问题具有重要意义,因此利用生物柴油副产物甘油合成 PHA 受到广泛关注。

Nikel 等以甘油为碳源,利用重组大肠杆菌 *arcA* 突变株,添加 1.78 g/L 水解酪氨酸合成了 PHB^[24]。Koller 等最先利用还未被鉴定的耐高渗透压的微生物以生物柴油副产物为碳源在未添加任何前体的情况下合成 $\text{P}(\text{3HB-co-3HV})$ ^[25]。Mothes 等利用纯甘油,以 *Paracoccus denitrificans* 和 *Cupriavidus necator* JMP 134 为出发菌株合成 PHB,PHB 占细胞干重的 70%。当以含有 5.5% NaCl 的粗甘油为碳源时,PHB 含量降低至 48%,这主要由于氯化钠高渗作用引起的^[23]。Cavalheiro 等以纯甘油为底物,利用 *Cupriavidus necator* DSM 545 生产 PHB,最大细胞干重是 82.5 g/L,PHB 产量可达细胞干重的 62%,产率为 1.1~1.5 g PHB L^{-1}

h^{-1} 。当以废甘油为底物时, PHB 产率为 $0.84 \text{ gPHB} \cdot \text{BL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 细胞干重为 68.8 g/L 。生物量浓度在 PHB 积累时起到关键作用, 降低生物量的浓度, PHB 含量可达细胞干重的 50% , PHB 产率可达 $1.1 \text{ gPHB} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ [26]。Mazur 等以 *Cupriavidus necator* 为出发菌株, 在添加了米糠油制备的生物柴油副产物的矿物盐培养基中, 30°C , 150 rpm 培养 24 h , 合成了 PHB [27]。

4.2 餐厨废油

餐厨废油包括煎炸废油、泔水油和地沟油等源自于餐饮业的废油脂, 成分主要是烹调用植物油和食品中动物油脂, 化学组成主要为脂肪酸甘油酯 [28]。

煎炸废油是指餐馆、饭店、单位食堂等做煎炸食品后废弃的煎炸用油。煎炸废油属于大分子疏水性有机物, 其在多次煎炸过程中与空气中的氧气接触, 发生一系列水解、氧化、聚合等复杂反应, 使得油黏度增加, 油中原本含有的一些不饱和脂肪酸含量极低, 产生了一些具有致癌作用的脂肪酸类聚合物及醛、酮、内酯等刺激性气味的物质。泔水油主要是指从餐厨垃圾中分离回收的废油, 这类废油是植物油和动物油的混合物, 主要来自餐厨垃圾处理厂, 容易收集和集中管理。地沟油是从餐饮单位厨房排水除油设施分离出的油脂和排水管道或检查井清掏污物中提炼出的油脂, 由于地沟油回收、加工及提炼过程卫生条件恶劣, 导致地沟油中含有多种有毒有害成分, 重金属、细菌、真菌、黄曲霉毒素等严重超标, 因此地沟油对人体具有很大的危害性。餐厨废油如果进入环境或被不法商贩加工为食用油重新回到居民餐桌, 会造成极大的环境污染, 并严重威胁人类健康。同时餐厨废油具有废物与资源的二重性, 由于其回收价格低, 含碳量高, 因此作为微生物培养的有效碳源获得了广泛的研究。

Taniguchi 等研究发现, *Ralstonia eutropha* (现重新命名为 *C. necator*) 能吸收植物油脂废物以及废动物脂, 转换成 PHA, 且产量较高, 高达细胞干重的 80% [29]。Stanislav Obruca 等以废弃菜籽油为底物, 利用 *Cupriavidus necator* H16 生产 PHA, 通过连续培养 PHA 产量可达 105 g/L , 每克油脂可产生 0.83 gPHA , 产率为 $1.46 \text{ gPHA} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ [30]。Kahar 等利用 *Ralstonia eutropha* H16 为实验菌种, 以廉价大豆油为碳源生产 PHA, 细胞干重可达 $118 \sim 126 \text{ g/L}$, PHA 含量为 $72\% \sim 76\%$ (w/w)。研究表明, 以廉价大豆油作为唯一碳源生产 PHA, 每克豆油可产生 $\text{PHA} 0.72 \sim 0.76 \text{ g}$, 碳源成本降至 0.4 美元/kgPHA [31]。Pradella 等利用大豆油为碳源, 以 *Cupriavidus necator* 为出发菌种, 研究表明当大豆油添加量为 40 g/L 时, 细胞干重最高可达 83 g/L , PHB 含量为 81% (w/w), PHB 产率为 $2.5 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 且磷、铜、钙、铁等元素的缺乏会限制细菌的生长和 PHB 的合成 [32]。Fernández 等通过 *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 利用废的烹饪油和其他废油生产 PHA, 该菌株可以积累 54.6% 的 PHA [33]。孙万东等用硫酸铵作氮源, 以 15 g/L 煎炸废油为碳源生产 PHB 时, PHB 的含量和产量分别为 82.1% 、 10.86 g/L , PHB 的产率为 $0.724 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 相同情况下利用煎炸废油可以获得比纯豆油更高的 PHB 产量 [21]。Verlin-

den 等利用 *Cupriavidus necator* 为实验菌种, 以煎炸废油为底物生产 PHA, PHA 产量可达 1.2 g/L , 与以葡萄糖为底物时浓度类似 [34]。

5 存在问题与展望

利用废弃油脂生产 PHA 提供了废弃油脂资源化途径, 但同时也存在一些问题。废弃油脂组成较为复杂, 且成分不稳定, 其中含有不能被微生物利用的成分, 或许会影响微生物发酵合成 PHA。利用废弃油脂生产的 PHA 分子量相对较小, 且产品中容易存在油脂残留。相信随着科学技术的发展, 必将解决 PHA 生产成本较高的问题, 同时提高产品质量, 并实现废弃油脂的资源化利用和高附加值产品的开发。

参考文献:

- [1] Rehm, BHA. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases [J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(4): 207~213.
- [2] Lemoigne M. Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid [J]. Bull Soc Chem Biol, 2009 8: 770~782.
- [3] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates; biological polyesters [J]. Prog Polym Sci, 2000, 25(10): 1503~55.
- [4] Doudoroff M, Stanier R Y. Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria [J]. Nature, 2010, 183(4673): 1440~1442.
- [5] Wallen L L, Rohwedder W K. Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge [J]. Environ Sci Technol, 2012, 8(6): 576~579.
- [6] Findlay RH, White DC. Polymeric β -hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium* [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 45(1): 71~8.
- [7] Smet M J, Eggink G, Witholt B, et al. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane [J]. J Bacteriol, 2011 154(2): 870~878.
- [8] 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]. Bacteriol, 2010, 170(10): 4431~4436.
- [9] 甘智雄, 莫晓燕, 陈国强, 等. 嗜水气单胞菌 WQ 中 PHBHHx 的合成及其分子基础研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(6): 809~812.
- [10] 卢晓云, 吴琼, 张万蛟, 等. 嗜水气单胞菌合成 3-羟基戊酸单体的聚羟基脂肪酸共聚酯的研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 779~782.
- [11] 胡风庆, 游松, 陈国强. 中长链聚羟基脂肪酸酯 (mcl PHA) 在嗜水气单胞菌 I 型 PHA 合酶缺失突变株中的合成[J]. 生物工程学报, 2005, 21(4): 524~529.
- [12] 谢光健, 李家洲. 利用有机废水生产聚羟基脂肪酸 (PHAs) 的进展[J]. 广东化工, 2005(7): 34~36.
- [13] 杨幼慧, 伍朝晖, 钟士清, 等. 食品厂活性污泥积累生物降解塑料 PHA 的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(8): 5~8.
- [14] 朱博超, 焦宁宁. 聚羟基脂肪酸酯的合成和应用研究进展[J]. 现代塑料加工应用, 2003(05)
- [15] 黄玉杰, 王加宁, 邱维忠, 等. 聚羟基脂肪酸酯的生物合成与废弃物的资源化利用[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(34): 16751~16755.

(下转第 268 页)

- [14] 姜宾延. 电子垃圾的危害及其机械处理技术现状[J]. 再生资源研究, 2005(3): 25~26.
- [15] 丁 涛. 废弃印刷线路板资源化成套技术研究[D]. 北京: 北京工

- 业大学, 2007.
- [16] 李金惠, 温雪峰, 刘彤宙, 等. 我国电子电器废物处理处置政策、技术及设施[J]. 家电科技, 2005(1): 31~34.

A Brief Discussion of the Research Situation of Disassembly Technology of Waste Printed Circuit Boards

Zhang Xiaojiao, Li Ting

(School of Environmental and Materials Engineering, Shanghai Second Polytechnic University, Shanghai 201209, China)

Abstract: There exist lots of methods for the processing of printed circuit boards. Currently, the recovery processing of printed circuit boards is divided into three stages, including disassembly and break, material's gathering and separation, and product purification. The efficiency of resource utilization of the waste printed circuit boards is quite low. Therefore, adopting the concept of circular economy and recycling recovery processing is one of the ways to deal with printed circuit boards reasonably. In order to recycle the components on printed circuit boards, it is necessary to disassemble components from PCB in good condition. Through the understanding of current processing technology of PCB, this article puts forward a new processing direction of PCB, which is of high efficiency and resource utilization rate.

Key words: printed circuit boards; disassembly; components; reclamation

(上接第 265 页)

- [16] Lau N S, Chee J Y, Tsuge T, et al. Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by Burkholderia sp. USM (JCM15050) [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(20): 7916~7923.
- [17] Swift G. Opportunities for environmentally degradable polymers [J]. Journal of Macromolecular Science, 1995, 32(4): 641~651.
- [18] Madison L L, Huisman G W. Metabolic engineering of poly-(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(1): 21~53.
- [19] Angelo D P. Chiral chemistry is still evolving, driven by techniques and business demands [J]. Genet Eng News, 1996, 6: 19~25.
- [20] 陈国强. 生物高分子材料聚羟基脂肪酸酯(PHA)开发现状及产业化前景分析[J]. 化工新型材料, 2010, 38(10): 1~7.
- [21] 孙万东, 张佑红, 耿安利, 等. 煎炸废油生产聚羟基丁酸酯(PHB) [J]. 广州化工, 2013, 41(12): 114~117.
- [22] Ashbv R D, Solaiman DKY, Foglia TA. Bacterial poly(hydroxyallanoate) polymer production from biodiesel co-product stream [J]. J Polym Environ, 2004, 12(3): 105~112.
- [23] Mothes C, Schnorpfel C, Ackermann J U. Production of PHB from crude glycerol [J]. Eng Life Sci., 2007, 7(5): 475~479.
- [24] Nikel P, Pettinari J, Mendez B. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant Escherichia coli arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 77(6): 1337~1343.
- [25] Koller M, Bona R, Braunegg G, et al. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials [J]. Biomacromolecules, 2005(6): 561~565.
- [26] Cavalheiro JMBT, de Almeida MCMD, Grandfils C, et al. Poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glycerol [J]. Process Biochem, 2009(44): 509~545.
- [27] Mazur L P, da Silva D D, Grigull V H, et al. Strategies of biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) supplemented with biodiesel obtained from rice bran oil [J]. Materials Science and Engineering C, 2009(29): 583~587.
- [28] 任连海. 我国餐厨废油的产生现状、危害及资源化技术 [J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2011(6).
- [29] Taniguchi I, Kagotani K, Kimura Y. Microbial production of poly(hydroxyalkanoate)s from waste edible oils [J]. Green Chem, 2003(5): 545~548.
- [30] Obruca S, Marova I, Snajdar O, Svoboda Z. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Cupriavidus necator from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate [J]. Biotechnology Letters, 2010(32): 1925~1932.
- [31] Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by Ralstonia eutropha and its recombinant strain [J]. Polymer Degradation and Stability, 2004(83): 79~86.
- [32] Pradella, JGD, Ienczak JL, Delgado CR, Taciro MK. Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using Cupriavidus necator [J]. Biotechnology Letters, 2012(34): 1003~1007.
- [33] Fernandez D, Rodriguez E, Bassas M, et al. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain Pseudomonas aeruginosa NCIB 40045: effect of culture conditions [J]. Biochem Eng J, 2005, 26(2/3): 159~167.
- [34] Verlinden R A, Hill D J, Kenward M A, et al. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by Cupriavidus necator [J]. AMB Express, 2011(81): 1~8.