氨基酸和生物资源 2004,26(3):30～32
Amino Acids & Biotic Resources

生物降解塑料聚羟基烷酸(PHA)的研究进展

金大勇,顾国维,杨海真

(同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室,上海 200092)

摘要:本文在对聚羟基烷酸(PHA)的结构和性质介绍的基础上,从实际工业应用的角度综述了国内外近年来有关它的生物合成、提取及应用的研究进展。

关键词:聚羟基烷酸(PHA);生物合成;提取;应用

中图分类号:TQ324　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1006-8376(2004)03-0030-03

聚羟基烷酸(PHA)作为生物可降解高分子,可由多种微生物作为胞内碳源和能源的储藏物生物合成。由于它具有生物降解性及生物相容性等特点,近年来有关PHA的研究已引起工业界的广泛重视。因此,许多关于PHA的研究集中在它的高效生产和应用。本文就国内外在PHA的生物合成、提取及应用方面的一些研究进展作一介绍。

一、PHA的结构和性质

1　聚-3-羟基丁酸(P(3HB))均聚物

P(3HB)含有重复的(R)-3-羟基丁酸单元,是自然界中可由多种微生物合成的生物聚酯(其结构如图1)。众所周知,革兰氏阴性细菌 *Ralstonia eutropha*(以前称为 *Alcaligenes eutrophus*)可以利用多种碳源(例如,糖、有机酸等)积累到细胞干重80%以上的PHA。从细胞中分离到的P(3HB)的结晶度为55～70%,而细胞内的P(3HB)的分子是无定形的,并且以水不溶的胞内物质存在。由微生物合成的P(3HB)的重均分子量为1×10^4～3×10^6Da(道尔顿),多分散指数为2左右,玻璃态转变温度(Tg)及熔化温度(Tm)分别为4及177℃(见表1)。P(3HB)的机械性能与聚丙烯相似,例如,它的抗拉强度为43MPa,与聚丙烯(38MPa)接近。然而,它的断裂伸长(5%)比聚丙烯(400%)低得多。因此,P(3HB)是比聚丙稀更脆的塑料。另一方面,虽然P(3HB)无法在实际中得到应用,但是它的材料性能通过与其它生物可降解聚合物,例如聚丙交酯、聚已酸内酯的共聚而得到提高[1]。

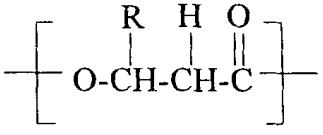

图1　PHA的结构简式

(R为甲基时,为P(3HB)的结构简式;R为乙基时,为聚-3-羟基戊酸P(3HV)的结构简式)

2　超高分子量的P(3HB)

重组大肠杆菌 *E. coli* 能够在pH6.0～6.5的条件下合成超高分子量的P(3HB),其分子量达3～20$\times10^6$Da[2]。科学家已成功将这种超高分子量的P(3HB)制成延伸膜,并且发现延伸膜的机械性能得到显著提高[3,4]。这种膜的断裂伸长及抗拉强度提高到35%和400MPa(见表1)。此外,当这种延伸膜经过退火处理后,它的机械性能得到进一步提高。因此,使用基因工程技术有可能使P(3HB)的性能得到改善,并有可能使其在工业上得到应用。

表1　生物合成和化学合成高分子的一些性质

聚合物	Tm(℃)	Tg(℃)	结晶度(%)	抗拉强度(MPa)	断裂伸长(%)
P(3HB)	177	4	60	43	5
超高分子量P(3HB)	185	4	80	400	35
P(3HB-共聚-6mol%3HV)	133	-8	45	17	680
P(3HB-共聚-10mol%3HV)	127	-1	34	21	400
P(3HB-共聚-16mol%3HV)	150	-7	45	26	444
P(3HB-共聚-20mol%3HV)	145	-1	56	20	50
聚丙稀	176	-10	50-70	38	400
低密度聚乙烯	130	-36	20-50	10	620

收稿日期:2004-04-14
作者简介:金大勇,男(1973-)博士生

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 R-3HB 与羟基烷酸(HA)的共聚物

提高 P(3HB)物理性能的另一种方法是在 P(3HB)中引入不同的 HA 单体。许多种微生物能够合成(R)-3HB 与其它 HA(C3 到 C12)单体的共聚物。迄今为止,研究得较多并应用于商品化的产品是(R)-3HB 与(R)-3HV 的共聚物,即 P(3HB-共聚-3HV)。由表 1 可见,通过引入 20 %mol 的 R-3HV,聚合物的熔点及玻璃化温度分别降到 145 ℃和-1 ℃。相反,它的断裂伸长增加到 50 %。显然,P(3HB-共聚-3HV)比 P(3HB)更有韧性。

二、PHA 的生物合成

1 传统的 PHA 合成方法

PHA 通常通过两阶段的流加培养方式生产,即细胞生长期和 PHA 合成期。在细胞生长期,使用营养丰富基质以得到高细胞产量;在随后的 PHA 合成期,通过限制某些营养物质,例如 N、P、O、Mg,使细胞生长受限制,从而达到使微生物的代谢转移到 PHA 的合成[5]。

糖类物质,例如葡萄糖和蔗糖是 PHA 合成最常用的碳源,因为它们的价格相对较便宜。由葡萄糖合成 P(3HB)的最高产率为 4.63g/l.h,P(3HB)的浓度及在干细胞中的含量分别为 142 g·L^{-1}和 73 %[6]。对于 P(3HB-共聚-3HV)的生产,需要加入丙酸或戊酸作为(R)-3HV 合成的前体物质。文献报道的 P(3HB-共聚-3HV)的最高产率为 2.88g/l.h[7]。

2 使用植物油或脂肪酸合成 PHA

脂肪油或它们的衍生物脂肪酸也是合成 PHA 的较好碳源因为它们是不太昂贵且可再生的原料。此外,由脂肪酸合成 PHA 的产率系数(例如,丁酸的产率系数为 0.65～0.95kg/kg)比由葡萄糖合成的(0.32～0.48kg/kg)高得多[8]。然而,由植物油或脂肪酸合成 PHA 仍然存在一些问题有待解决。其中一个主要问题是微生物相对较低的生长速率,并且细胞内 PHA 的含量较低。尽管由月桂酸合成 PHA 的含量达到细胞干重的 50 %,但是科学家仍有许多工作要做,比如,筛选和开发能够高效利用植物油的菌种及发酵技术。

3 使用农业或食品废物(水)合成 PHA

农业或食品废物能够作为合成 PHA 的廉价碳源和氮源。木糖在这些废物中的含量仅次于蔗糖,但是由于微生物对其利用率较低,因而 PHA 的产率较低。木糖通过乳酸菌的厌氧发酵产生的乳酸和乙酸能够被大多数合成 PHA 的微生物高效利用,因而它们是合成 PHA 的有效碳源。有文献报道,*R. eutropha* 利用乳酸及乳酸/乙酸混合物合成 PHB 的产率分别可达 1.1 及 1.3g·L^{-1}[9,10]。

金大勇等比较了 *Alcaligenes eutrophus* 利用不同短链脂肪酸合成 PHA 的能力,并研究了有机废水厌氧酸化产有机酸与 *A. eutrophus* 合成 PHA 的组合系统[11～13]。结果表明,丁酸是 *A. eutrophus* 合成 PHA 的最佳碳源;在 pH5.7、温度 40 ℃、停留时间 10 h,葡萄糖废水的酸化率接近 100 %,其中丁酸的质量含量占总酸的 68 %,*A. eutrophus* 合成 PHA 的质量浓度可达 10 g·L^{-1}。

三、PHA 的提取

PHA 是微生物的胞内产物,目前限制 PHA 大规模工业化应用的一个主要原因是它的提取成本较高,因此需要开发高效的方法将其从细胞内提取出来。人类开发的提取 PHA 的方法主要有,有机溶剂萃取法、酶裂解法、次氯酸钠分解法、次氯酸钠-氯仿法以及机械破胞法等,已有文献对这些方法的特点和优缺点作了介绍[14]。由于这些方法存在很多缺点且难以工业化应用,因此有必要开发新的从微生物体内提取 PHA 的方法。

Chen 等人研究了表面活性剂水溶液提取 PHA 的新方法,并详细研究了该方法的微生物细胞破胞过程、微生物发酵时间和干燥方式对提取的影响、清洁提取(即为了减少废水的产生,将提取过程产生的废液多次回用)及提取动力学等[15～19]。结果表明,使用表面活性剂水溶液的方法不但可以得到较高纯度和较好收率的 PHA(分别为 98 %和 93 %以上),而且产生的废水可以反复回用(回用次数达到 20 次),特别是它的操作比较简单。这些研究对于推动 PHA 的工业化生产和应用具有一定的指导意义。

四、PHA 的应用

由于 PHA 具有生物降解性、生物相容性等特殊性能,在医药领域具有极为广阔的应用前景,例如将其用作为外科缝线、骨骼和血管的替代品及用作为药物缓慢释放的载体等[20]。

国内也有一些研究人员对用 P(3HB-共聚-3HV)聚合物为载体,采用乳化溶剂蒸发的方法制备黄体酮的缓释微球进行了研究[21]。结果显示,当用明胶为乳化剂时,可以制得分散、较圆且表面光滑的微球;明胶浓度及搅拌转速不但影响微球的粒径,而且影响药物包埋率;药物包埋率还受聚合物在有机相中的浓度、药物加入量及制备温度的影响。研究

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

微球体外释放行为时发现,当聚合物质量占有机相的 1/10、加入黄体酮的质量为聚合物质量的 0.6、温度 40 ℃时,制得的微球具有较好的缓释效果。

参考文献

[1] Urakami T. Biogreen. Plastics, 1999, 50, 107～111 (in Japanese)

[2] Kusaka S, Abe H, Lee S Y, Doi Y. Molecular mass of poly[(R) - 3 - hydroxybutyric acid] produced in a recombinant Escherichia coli. [J] Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, 47, 140～143.

[3] Kusaka S, Iwata T, Doi Y. Properties and biodegradability of ultra - high - molecular - weight poly[(R) - hydroxybutyrate] produced by a recombinant Escherichia coli. Int. J. Biol. Macromol, 1999, 25, 87～94.

[4] Kusaka S, Iwata T, Doi Y. Microbial synthesis and properties of ultra - high - molecular - weight poly[(R) - 3 - hydroxybutyrate]. J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem. A, 1998, 35, 319～335.

[5] Madison L L, Huisman G W. Metabolic engineering of poly(3 - hydroxyalkanates): from DNA to plastic. [J] Microbiol. Mol. Biol. Rev, 1999, 63, 21～53.

[6] Choi J I, Lee S Y, Han K. Cloning of the Alcaligenes latus polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3 - hydroxybutyrate) in Escherichia coli. [J] Appl. Environ. Microbiol, 1998, 64, 4897～4903.

[7] Choi J I, Lee S Y. High - level production of poly(3 - hydroxybutyrate - co - 3 - hydroxyvalerate) by fed - batch culture of recombinant Escherichia coli. [J] Appl. Environ. Microbiol, 1999, 65, 4363～4368.

[8] Yamane T. Cultivation engineering of microbial bioplastics production. [J] FEMS Microbiol. Rev, 1992, 103, 257～264.

[9] Tsuge T, Tanaka K, Shimoda M, Ishizaki A. Optimization of L - lactic acid feeding for production of poly - 3 - hydroxybutyric acid by Alcaligenes eutrophus in fed - batch culture. [J] J. Biosci. Bioeng, 1999, 88, 404～409.

[10] Tsuge T, Tanaka K, Ishizaki A. Development of a novel method for feeding a mixture of L - lactic acid and acetic acid in fed - batch culture of Ralstonia eutropha for poly - 3 - hydroxybutyrate production. [J] J. Biosci. Bioeng, 2001, 91, 545～550.

[11] 金大勇, 陈坚, 伦世仪. Alcaligenes eutrophus 利用不同有机酸生产聚β- 羟基烷酸的比较研究. [J]应用与环境生物学报, 1999, 5(2), 199～202.

[12] 金大勇, 陈坚, 伦世仪. Alcaligenes eutrophus 利用有机废水生产聚羟基烷酸. [J] 中国环境科学, 1999, 19(1), 38～41.

[13] 金大勇, 陈坚, 高海军, 陈银广, 伦世仪. 有机废水厌氧酸化和聚羟基烷酸生产组合系统的研究. [J] 应用与环境生物学报, 1999, 5(4), 400～403.

[14] 陈银广, 陈坚, 堵国成, 伦世仪. 生物可降解塑料 PHB 提取的研究进展. [J] 化工进展, 1998 17(1), 41～45.

[15]. Yinguang Chen, Jian Chen, Cairong Yu, Shiyi Lun. Recovery of PHB from Alcaligenes eutrophus by surfactant - chelate aqueous system. [J] Process Biochemistry, 1999, 34(2), 153～157.

[16] 陈银广, 陈坚, 余彩荣, 堵国成, 伦世仪. Alcaligenes eutrophus 的化学破胞过程. [J] 高等学校化学工程学报, 1999, 13(1), 182～185.

[17] Yinguang Chen, Qing Xu, Haizhen Yang, Jian Chen. Effect of cell fermentation time and biomass drying strategies on recovery of PHA from Alcaligenes eutrophus using a surfactant - chelate aqueous system. [J] Process Biochemistry, 2001, 36, 773～779.

[18] Yinguang Chen, Haizhen Yang, Jian Chen. Cleaner recovery of PHA synthesized in Alcaligenes eutrophus. [J] Process Biochemistry, 2001, 36, 501～506.

[19] Yinguang Chen, Yinsheng Chen, Jian Chen. Kinetics of PHB - containing biomass disruption in surfactant - chelate aqueous solution. [J] Process Biochemistry, 2003, 38, 1173～1182.

[20] Doi Y. Microbial polymers. VCH Publishers, New York, 1990.

[21] 陈银广, 陈坚, 王朝晖, 吴亢, 堵国成, 金大勇, 伦世仪. 聚 - β- 羟基丁酸戊酸酯为载体的药物缓释微球的制备. [J] 高等学校化学工程学报, 1999, 13(2), 129～134.

Recent Advances in The Studies on Biodegradable Plastics Polyhydroxyalkanoates (PHA)

JIN Da - yong, GU Guo - wei, YANG Hai - zhen

(National Key Lab of Pollution Control & Source Research, Tongji University, Shanghai 200092, China)

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

氨基酸和生物资源 2004,26(3):33～37
Amino Acids & Biotic Resources

谷胱甘肽 S- 转移酶的诱导表达及提纯

杨丹[1],叶佩莹[2],万津[1],刘永平[1],马辉文[1]

(1.武汉大学药学院 湖北武汉 430072;2.武汉大学生命科学学院 湖北武汉 430072)

摘要:含有日本血吸虫谷胱甘肽 S- 转移酶基因的质粒 pGEX- 5X- 1 在大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中得到表达。37 ℃[1]下用 1 % 乳糖诱导谷胱甘肽 S- 转移酶(GST)的最适表达时间为 3h。盐析粗提酶液并以 Habig 法[2]监测 GST 的活性,用 pH6.0,饱和度为 30 %硫酸铵去除杂蛋白,并调 pH7.5,饱和度 70 %硫酸铵使 GST 大量析出并保持活性。用透析法脱盐,并用 Sephadex- G50 凝胶对 GST 进行了初步纯化。初步探讨了 GST 的保存方法。

关键词:谷胱甘肽 S- 转移酶;基因表达;GST 的纯化

中图分类号:Q814　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1006- 8376(2004)03- 0033- 05

谷胱甘肽 S- 转移酶(glutathione- S- transferases,GSTs)是一组具有多种生理功能的蛋白质,是人体重要的生物转化酶之一,主要存在细胞液中。GSTs 能催化还原型的谷胱甘肽(glutathione,GSH)的巯基(- SH)结合到疏水的化合物上,使亲电子的化合物变成亲水的物质,易于从胆汁或尿液中排泄,从而达到解毒的目的[3]。GSTs 在机体有毒化合物的代谢、保护细胞免受急性毒性化学物质攻击中起到重要作用[4]。此外,GSTs 还有抑制细胞癌变的功能[5]。目前,GST 主要是从哺乳动物的肝脏中采取柱层析或用 GSH 亲和层析提取,但有操作复杂,酶不稳定,回收率不高等缺点[6]。本文将在大肠杆菌中大量表达的 GST 蛋白质,通过盐析,透析,凝胶过滤等一系列纯化步骤初步纯化得到大量具有生物活性的 GST。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂:

菌种 BL21(DE3)、pGEX- 5X- 1 由武汉大学药学院基因工程实验室提供。测定 GST 的活性所用 CDNB(1- 氯- 2,4- 二硝基苯)购自上海生工生物工程有限公司(纯度 99.0 %),配制前用无水乙醇重结晶 2 次,干燥后测熔点为 53 ℃～54 ℃。硫酸铵:市售,分析纯;Sephadex- G50: Pharmacia 公司产品。

1.2 质粒的提取与鉴定

从保存菌种 BL21(DE3)pGEX- 5X- 1 的平板上挑取单菌落于 5 mL 含 Amp(100 μg·mL^{-1})的 LB 液体培养基中于 37 ℃,250 rpm 振荡培养过夜[1]。碱裂解法提取质粒,用 EcoR I 在 37 ℃酶解 3 h 后,以λ- Hind III/ EcoR I 为对照,用 1 %琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 诱导蛋白的鉴定及 GST 诱导表达条件的测定

1.3.1 菌体生长密度对诱导蛋白活力的影响

将 BL21(DE3)pGEX- 5X- 1 单菌落接种于 5 mL 含 Amp (100 μg·mL^{-1})的 LB 液体培养基中,37 ℃振荡过夜培养后,以 1:10 的接种量分别接种于 6 管含 Amp 的 LB 液体培养基中继续培养。自第 1 到第 5 管,以 0.5 h 为间隔,监测菌体生长密度,测定菌液 OD_{600}值,并添加质量分数 10 %的乳糖至终浓度为 1 %[1]。3 h 后,离心收集菌体,反复冻融破碎细胞后离心收集上清,以 Habig 法测定 OD_{340}作为 GST 的活性,确定添加诱导剂时培养液的最佳 OD_{600}值。

1.3.2 最佳诱导时间的测定

根据上步实验结果,选择 OD_{600}约为 1.0 的培养菌液添加乳糖培养。自加入乳糖开始计时,每隔 1 h 取 1 mL 样品,收集菌体,煮沸裂解后进行 15 % SDS- PAGE 检测。

1.4 GST 的提取与纯化

收稿日期:2004- 02- 17
作者简介:杨丹(1982-),女,药学专业本科生。

Abstract: The structure and characteristics of polyhydroxyalkanoates (PHA) are introduced, and the recent advances in the biosynthesis, recovery and application of PHA are reviewed.

Key words: polyhydroxyalkanoates(PHA); biosynthesis; recovery; application

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net