

知识介绍

甲烷氧化菌利用甲烷生产聚羟基脂肪酸的研究进展

朱红威*, 邵菊芳, 冷云伟, 陶秀祥

(中国矿业大学 化工学院, 徐州 221116)

摘要:化学合成塑料主要来自于不可再生的化石能源,化学合成塑料的大量使用既消耗了大量能源物质,也带来了严重的环境问题。而生物合成的高分子化合物聚羟基脂肪酸,具有与合成塑料相似的物理性质,生产原料具有可再生性,同时在环境能快速降解,结构多样可以满足不同用途等多种优点,成为合成塑料最佳的替代品。甲烷氧化菌能以甲烷为唯一碳源和能源物质生长,并在细胞内合成大分子聚羟基脂肪酸。利用甲烷氧化菌转化甲烷合成聚羟基脂肪酸不仅可以大幅降低生产成本,同时也减少了温室气体的排放。本文就甲烷氧化菌合成聚羟基脂肪酸的生物代谢途径,甲烷为原料生产聚羟基脂肪酸的方法及优缺点等方面进行了分析。

关键词:聚羟基脂肪酸; 甲烷; 甲烷氧化菌

引言

塑料制品大量使用,已经造成了严重的环境污染。据不完全统计,2009 年全球塑料的产量超过 140Mt,预计每年还将以 15% 的速度递增^[1]。每年用于生产塑料的石油、煤炭和天然气等化石原料高达 270Mt,不仅消耗了大量能源物质,同时生产过程中还排放大量的温室气体。因为使用量大,难以被降解,合成塑料已成为环境污染主要来源,因此也被称为 20 世纪最糟糕的发明。在塑料生产过程为了改善其物理性能,还会添加一些有毒有害的化学添加剂,这些物质在焚烧或降解过程中会产生大量其它有害或致癌的物质,对环境和人体健康造成威胁。利用生物生产的环境友好、可降解的新型生物塑料(如 PHA),替代传统的合成塑料是解决上述问题的最佳方法。

聚羟基脂肪酸(PHA)是一类由生物合成的高分子化合物,具有与传统化学合成塑料相似的物理性质,同时又有较好的生物相容性和可降解性等诸多优点,使其在工农业和生物医药领域有着广阔的应用前景,自上世纪 80 年代开始日益受到人们的关注和重视。1926 年在 *Bacillus megaterium* 中首次发现了 PHA^[2],随后发现许多微生物都能合成 PHA。生物法合成 PHA 的优点是环境友好,不依赖化石能源,生产原料具有可再生性。PHA 已经被用来生产高档化妆品的包装容器,及其它一些对品质要求较高而价格因素考虑较少的产品。尽管 PHA 已经工业化生产,但高昂的生产成本,限制了其大规模的应用^[3, 4]。PHA 的生产成本受多种因素的影响,如发酵方式、生物质产量、培养基组成、发酵过程控制、PHA 含量、PHA 分离纯化的方法等^[5, 6]。通过基因改造提高 PHA 合成效率^[7],采取混合菌种培养方式^[8],使用廉价的原料^[9]和先进的发酵工艺^[4]等,都能够在一定程度上降低生产成本,增加 PHA 的市场竞争力。大量的研究表明生产 PHA 的碳源的支出大约占到生产成本的 40%~50%^[10]。因此开发利用廉价的碳源物质来生产 PHA,是降低生产成本最有效的途径。近年来开展了以乳清^[11]、麦麸^[12]、米糠^[13]、淀粉^[14]、糖浆^[15]、甘油^[16]、油脂^[17]等为原料生产 PHA 的研究,但是还没有看到显著降低生产成本的报道。

10. 14028/j. cnki. 1003-3726. 2015. 02. 010

收稿:2013-07-03;修回:2014-05-12;

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2012CB214900);国家自然科学基金项目(50374068);煤炭加工与高效洁净利用教育部重点实验室开发课题基金资助项目(CPEUKF06-12);

作者简介:朱红威,(1979—),男,博士,煤矿瓦斯生物转化与利用;

* 通讯联系人,E-mail: zhuhw@cumt. edu. cn.

上个世纪 70 年代,有学者发现甲烷氧化菌在限制营养条件下可以利用甲烷合成聚羟基丁酸(PHB)^[18]。这一发现为开发利用廉价碳源底物,低成本生产 PHB 提供了一个全新的途径。甲烷是一种重要的温室气体,其温室效应是 CO₂ 的 25 倍。为了减少甲烷排放,近年来开展了以甲烷为碳源,利用甲烷氧化菌生产 PHA 的研究^[19~30]。本文对甲烷氧化菌生产 PHA 的研究进展进行了阐述。

1 PHA 介绍

1.1 PHA 生理作用

PHA 是微生物中结构相对简单、可作为能源和碳源储备物的一种大分子化合物。PHA 的合成和积累,受到细胞内 C/N 比正调控。当碳源供应充足,而氮源缺乏时细胞分裂受阻,微生物将过量的碳源物质储备起来。当微生物生长需要能源,或缺乏碳源时,PHA 又可被分解利用。另外 O、P、S、Ca、Mg、Fe 等元素供应不足,导致营养供应不平衡时,也会促进细胞中 PHA 的积累^[4, 31]。PHA 以不溶于水的包涵体形式存在于细胞中,具有较高的折射率,利用相差显微镜很容易观察到。PHA 颗粒直径在 0.3~1 μm 之间,含量可以达到细胞干重的 90%。小分子脂肪酸聚合成不溶的大分子,可以保持细胞内渗透压的稳定,因此 PHA 是一种理想的能源和碳源储备物。合成 PHA 消耗的能量少,在逆境条件下能为细胞提供更多的能源和碳源,这也是微生物选择以 PHA 作为储备物质的主要原因。

PHA 不仅是一种重要的碳源储备物,它还有为细菌孢子形成提供能源,参与形成钙离子通道^[32],提高对逆境的抵抗力等多种重要的生理功能^[33]。研究还发现细胞质或细胞膜中的小分子量 PHA,会影响细菌对外源 DNA 分子的吸收^[34]。目前还不知这些小分子 PHA 是如何合成的,分子量大小的调控机制是什么,是否还存在其它合成小分子 PHA 的途径,它们如何与其它生物大分子发生作用等,这些问题都还有需要进行深入研究。

1.2 PHA 化学结构

PHA 分子是由 3-羟基脂肪酸单体,彼此间通过酯键头尾相连形成的线性分子(如图 1 所示)。PHB(聚羟基丁酸)是研究得最为清楚的一种 PHA,它由 3-羟基丁酸聚合而成。不同 PHA 分子间的差异主要来自于 R 基团,R 基团可以是饱和烷烃(碳原子数从 1~13),也可以是不饱和烷烃、芳香族化合物、卤代化合物和环氧化合物等。单体分子中羟基的位置也会发生改变,如位于 4、5 和 6 位碳原之上。通过基团的替换和位置的改变,可以形成多种单体,目前已知的合成 PHA 的单体有 150 多种^[35]。不同 PHA 之间的差异,主要来自于 PHA 分子中单体的种类和数量。

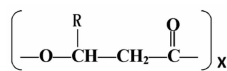


图 1 PHA 分子结构

Figure 1 PHA molecular structure

PHA 根据其分子中单体的差异可分成两类:一类由 3~5 碳原子的单体组成的短链 PHA(short-chain-length PHA, scl-PHA);另一类为中长链 PHA(medium-chain-length PHA, mcl-PHA),单体碳原子数为 6~16 个。PHB 是一种典型的短链 PHA,它的机械性能与传统的聚丙烯、聚乙烯塑料非常相似,可以做成膜和丝,但由于易结晶、碎性高,因而弹性较差。长链 PHA 的韧性更强,更容易塑形。培养底物中碳源分子的结构和种类,对细胞内 PHA 分子中单体的成分和比例会产生影响。例如当培养基中碳源为碳水化合物时,细胞中通常会合成短链 PHA;而以脂肪酸为碳源时则合成中长链 PHA,而利用不同的脂肪酸可以合成不同的 PHA 单体。因此通过不同碳源组合可以合成不同的 PHA,如 *Cupriavidus necator* 利用果糖和 1,4-丁二醇两种碳源分别合成 3HB 和 4HB,在细胞内形成 P(3HB-co-4HB)共聚物。当 1,4-丁二醇的含量分别为 25%和 75%时,共聚物中的 4HB 含量为 30%和 80%^[4]。

合成 PHA 大分子的单体种类多,使得 PHA 分子的结构多样性非常丰富,不同结构的 PHA 其理化性质各不相同,因此可以满足不同应用的需要。从自然界中还可以筛选得到能合成特殊结构 PHA 的微生物,如野生型的 *Pseudomonas mendocina* 细菌能合成聚羟基辛酸(PHO)^[36]。还可以通过对微生物进行遗传改良、添加抑制剂改变中间代谢产物的代谢途径、利用代谢工程的方法对 PHA 合成途径进行改造等多种途径来获得具有特殊结构的 PHA。PHA 分离纯化后还可以通过化学的方法对 PHA 分子中的侧链基团进行修饰,也可以改善其性质以满足某些特殊应用。

1.3 PHA 的理化性质

在众多可生物降解的高分子聚合物中,PHA 由于具有与合成塑料相似的热塑性和弹性,且无毒、不溶于水、生物相容性好及在自然环境中可生物降解等诸多优点,而成为传统合成塑料的理想替代品^[23, 37]。尽管不同微生物合成的 PHA 分子大小不同,但其分子量一般在 $10^5 \sim 10^7$ Da 之间。利用重组大肠杆菌,甚至可获得 20MDa 的 PHB^[38]。PHA 具有高分子化合物的一般特性,与传统的聚乙烯和聚丙烯性质相似(见表 1),因而作为塑料制造工业的生产原料。

表 1 几种 PHA 与聚丙烯的物理性质比较
Table 1 Comparison of physical properties of PHA and polypropylene

参数	数值				
	P(3HB)	P(3HB-3HV)	P(3HB-4HB)	P(3HO-3HH)	聚丙烯
熔点/℃	177	145	150	61	176
玻璃化温度/℃	2	—1	—7	—36	—10
结晶度/%	70	56	45	30	60
断裂伸长率/%	5	50	444	300	400

PHA 分子中的单体组成和含量,对其性质有显著影响。如 P(3HB-co-3HV)性质比较柔软,适合用做包装材料^[39]。当共聚物中 3HB 的比例增加时,其熔点、玻璃化温度、抗拉强度和透水性都会增加,但抗冲强度降低。通过改变 PHA 分子中的单体组成和含量,可以生产性能介于热塑材料和弹性材料的物质,这些特殊结构的 PHA 可以满足不同应用的需要。

1.4 PHA 合成及分子量的影响因素

当培养基中碳源物质供应充足,其它元素(如氮)缺乏时,微生物开始积累 PHA,细胞中 PHA 的含量随着 C/N 比的增加而增加。但当培养基中营养元素不均衡时,也不利于微生物的生长,虽然细胞内的 PHA 含量较高,但由于细菌生物产量小,PHA 的产量仍然较低。为了解决细菌生长和 PHA 合成所需营养条件不一致这一矛盾,可以采用两段培养法来进行培养。第一阶段培养细菌快速大量的繁殖,然后转入适合 PHA 积累的条件下进行培养,这样可以获得相对较高的 PHA 产量^[40~42]。其它的一些因素如温度、溶氧量、pH 和碳源种类等,对 PHA 的合成和分子量大小都会产生影响。

分子量是影响 PHA 物理性质的重要参数,对其应用和加工属性也有重要影响。不同生长条件和生长阶段,如 pH 值、碳源种类和浓度等因素都会影响到 PHB 的分子量^[43]。PHA 合酶的活性也会影响到分子量的大小,有研究表明 PHA 的分子量与 PHA 合酶的活性成负相关,但是不同的研究结果差异很大^[44~47]。

1.5 PHA 的生物降解特性

PHA 最重要的特性是可生物降解。自然界中存在能够合成 PHA 水解酶的微生物,在该酶的作用下 PHA 被分解成可溶于水的小分子物质,这些微生物再以这些小分子物质作为碳源进行生长和繁殖。PHA 材料在环境中降解周期一般为几个月到几年^[48, 49],相对于传统塑料降解需要上百年甚至更长的时间具有明显的优势。影响 PHA 降解速率的主要因素有环境条件(温度、湿度、pH 和营养物浓度等)、PHA 的组成、PHA 制品的大小、形状和添加剂成份等。PHA 分解过程中不会净增加大气中的 CO₂,因

为生产 PHA 的原料一般为碳水化合物、脂肪酸及其它有机碳化合物,它们最初的生产原料就是空气中的 CO₂ 和水。PHA 的生产原料都是可再生的,不用担心资源的枯竭。

1.6 PHA 的应用

PHA 由于其具有良好的热塑特性,可用于生产包装材料和涂料,作为传统合成塑料的替代品。但 PHA 材料由于价格高,大多数的研究还只是停留在实验室水平。PHB、P(3HB-co-3HV)共聚物和几种中链长 PHA 已经商业化生产,他们被用来生产塑料瓶、化妆品容器、止血棉球、高尔夫球钉、纸尿裤底片和无纺布等^[50]。用 PHA 制成的地膜进行覆盖,使用后可以被土壤中的微生物分解利用,不需要进行回收处理,不会对农田造成污染,非常适合农业生产中应用。PHA 分子结构多样、性质丰富,应用范围非常广阔。正在研发的应用有:生产乳胶涂料、药物缓释包装材料、发泡材料、组织工程的支架等^[51~55]。PHA 还可以与淀粉、纤维素、酶、蛋白质、有机分子、无机材料等制成复合材料,拓展其应用领域^[56~58]。

2 甲烷氧化菌合成 PHB 的代谢

2.1 甲烷氧化菌

甲烷氧化菌是一类能以甲烷为唯一的碳源和能源物质生长的革兰氏阴性菌,它于上个世纪初被发现^[59~61]。甲烷氧化菌在自然界中分布十分广泛,沼泽、河流、水稻田、海洋、湖泊、池塘、草地、森林、垃圾填埋场、城市下水道等环境中都有甲烷氧化菌^[62]。最近发现在一些极端环境中也存在甲烷氧化菌^[63~66],在这些生态系统中甲烷氧化菌位于食物链的最底层,它们在这类生态系统中作为生产者发挥重要功能。

甲烷单加氧酶是甲烷氧化菌的特征酶,该酶能催化甲烷生成甲醇,是甲烷氧化菌代谢甲烷的第一步反应。甲烷氧化菌氧化利用甲烷的代谢途径如图 2 所示。第一步反应生成的甲醇,依次被氧化成甲醛、甲酸和 CO₂,该途径为甲烷氧化菌的生命活动提供能量。中间代谢产物甲醛通过核酮糖磷酸(RuMP)或丝氨酸途径进入同化代谢途径,为生命物质的合成提供原料。根据其碳源同化代谢途径的不同,甲烷氧化菌被分成 I 型和 II 型两类,I 型甲烷氧化菌利用 RuMP 途径同化碳源,II 型甲烷氧化菌则利用丝氨酸代谢途径^[67]。

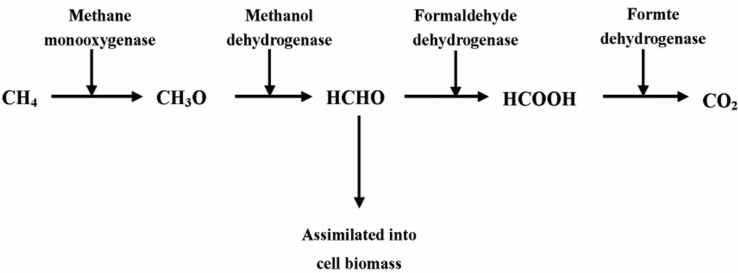


图 2 甲烷氧化菌氧化利用甲烷的代谢途径
Figure 2 Methane metabolic pathway of methanotrophs

2.2 PHB 的合成代谢途径

1926 年 Lemoigne 首次发现了 PHB,PHB 也是目前研究得最为深入的一种 PHA^[32]。上个世纪 70 年代,发现甲烷氧化菌在营养物质供应不均衡时可以合成 PHB^[18]。甲烷氧化菌中 PHB 的含量一般占干重的 9%~44%^[30],通过对培养条件的优化,含量可以提高到 50%左右^[68]。目前报道的能合成 PHB 的甲烷氧化菌大多属于 II 型甲烷氧化菌^[23, 27~30, 68~75],细胞中 PHB 的分子量可达 1MDa 以上^[69]。

借助生物化学和分子生物学的研究手段,已从不同微生物中分离和克隆了多个与 PHA 合成和分解代谢相关的基因,通过对这些基因的分析研究,发现微生物中存在几条不同的 PHA 合成代谢途径。其中 PHB 合成途径研究的最为清楚,参与 PHB 合成的三个基因(*phaA*、*phaB* 和 *phaC*),位于一个操纵子

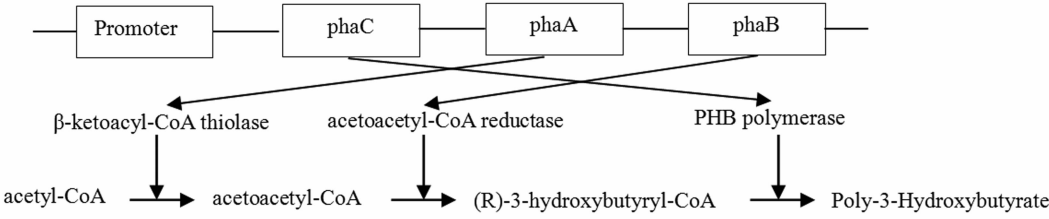


图 3 PHB 基因结构及合成途径

Figure 3 Anabolism pathway and gene structure of PHB

(*phaCAB*)内^[76],如图 3 所示。将这三个基因转移到 *E. coli* 中,细胞内 PHB 的含量最高可以达到干重的 50%^[77]。

β 酮硫解酶(β -ketoacyl-CoA thiolase PhaA)(EC 2. 3. 1. 9)催化 PHB 合成代谢的第一步反应,该酶催化两分子乙酰 CoA 发生缩合反应,生成乙酰乙酰 CoA。 β 酮硫解酶根据其作用底物的专一性不同分成两类,一类表现出较强的底物专一性,只能催化含 3~5 个碳原子的 CoA 化合物,另一类可以催化碳原子数为 4~16 的 CoA 化合物。*R. eutropha* 中有两种 β 酮硫解酶(酶 A 和酶 B)参与 PHB 的合成,酶 A 为同源四聚体蛋白,亚基分子量是 44kDa,可以催化乙酰乙酰 CoA 和 3-酮基戊酰 CoA 两种物质。酶 B 也是同源四聚体蛋白,但亚基分子量稍大(46kDa)。该酶的作用底物较广,除了乙酰乙酰 CoA,还有 3-酮基戊酰 CoA、3-酮基己酰 CoA、3-酮基庚酰 CoA、3-酮基辛酰 CoA 和 3-酮基癸酰 CoA 等,但两种酶都是催化乙酰乙酰 CoA 时活性最强。通过对 β 酮硫解酶(*PhaA*)进行定点诱变分析,发现该酶有两个活性中心,分别是为与第 89 位和 378 位的半胱氨酸(Cys)^[78~80]。乙酰乙酰 CoA 还原酶(acetoacetyl-CoA reductase PhaB)(EC 1. 1. 1. 36)催化 PHB 合成的第二步反应,该酶以乙酰乙酰 CoA 为底物催化生成 3-羟基丁酰 CoA。第三步反应是在 PHB 合酶(PHB polymerase PhaC)催化下 3-羟基丁酰 CoA 发生聚合反应,生成 PHB 高分子化合物^[37, 76, 81, 82]。PHA 合酶的分子量一般在 63kDa 左右,第 319 位存在一个高度保守的 Cys 残基,它是该酶的必需氨基酸,推测其位于酶活中心,参与形成一个酯酶盒(Gly-X-Cys³¹⁹-X-Gly-Gly),负责催化 PHB 单体间形成酯键。目前已经克隆了 50 多个 PHA 合酶基因,并在在分子水平上进行了详细研究^[83]。对 PHA 合酶基因的序列分析发现,它们之间的保守性较差。可能是由于具有 PHA 合成能力的微生物生活的环境不同,为了适应不同的生存环境导致 PHA 合酶基因朝着不同的方向进化。

PHA 合酶是 PHA 合成过程中的关键酶,它催化 3-羟基脂肪酰 CoA 发生聚合反应。根据其结构和催化底物的不同,可以将 PHA 合成酶分成三类,第一类以 3~5 个碳原子的脂肪酰 CoA 为底物,催化合成短链(short-chain-length, SCL)PHA,该酶只有一种亚基,分子量为 60~65kDa;第二类以 6~16 个碳原子的脂肪酰 CoA 为底物,催化合成中长链(medium-chain-length, SCL)PHA,此酶也只有一种亚基,分子量也在 60kDa 左右;第三类 PHA 合酶由两种分子量为 40kDa 的亚基组成,其中一种亚基在保守区域与前两种 PHA 合酶高度同源^[37, 58, 76, 81, 84]。

2.3 甲烷氧化菌中 PHB 的合成

甲烷是一种非常适合作为生产 PHB 的碳源物质^[85],它非常廉价且来源途径多样(如天然气、煤层气和沼气等)。甲烷氧化菌在营养供应不平衡的条件下,RuMP 途径和丝氨酸代谢途径不能顺利进行,中间代谢物进入 PHB 和胞外多糖等物质的合成途径^[29, 86],PHB 合成和丝氨酸代谢之间的关系如图 4 所示^[87~89]。

II 型甲烷氧化菌在低 Cu²⁺ 和低盐离子浓度,以 NH₄⁺ 为氮源,pH 值为 4~5 时 HA 合酶(*PhaC*)的活性最强,细胞内 PHB 含量最高^[30]。PHB 分解除了为细胞提供能源和碳源,还为细胞的生物代谢供应还原力^[29]。通过丰盛-饥饿法筛选高效合成 PHB 甲烷氧化菌的研究发现,周期性地氮源和甲烷限制,可以筛选到 PHB 合成效率高的甲烷氧化菌^[23]。降低培养基中的溶氧(2.0mg/L),以 N₂ 为氮源也

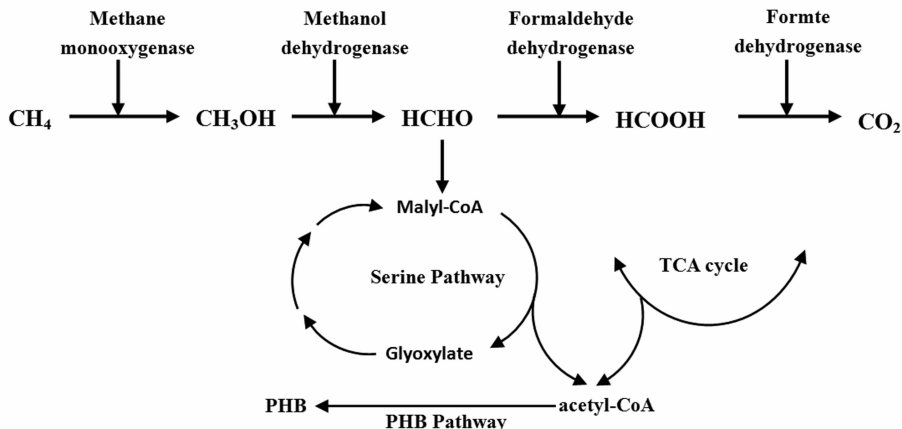


图 4 甲烷氧化菌合成 PHB 代谢途径

Figure 4 PHB anabolism pathway of methanotrophs

能筛选到合成 PHB 的甲烷氧化菌^[90]。培养基中 K、S 和 Fe 元素缺乏时,细菌开始积累 PHB,其中 K 对 PHB 的分子量和产量影响最大^[72]。

2.4 甲烷生产 PHB 的优点

2.4.1 甲烷合成 PHB 的转化效率高 PHB 生产的一个重要经济指标是底物转化率,也就是消耗一定量的底物原料生产的 PHB 的量。按照生物化学计量学的理论进行计算,以甲烷为底物,生物合成 PHB 的转化率大约为 67%^[91]。通过测定 *Methylocystis spp.* GB250 SM 培养过程中的甲烷消耗量和 PHB 产量,计算出底物的实际转化率为 54%^[69]。

2.4.2 原料丰富生产成本低廉 甲烷是一种廉价且来源丰富的气体物质,天然气、沼气和煤层气中的主要成分都是甲烷。甲烷的人工排放源主要有垃圾填埋场、污水处理厂、城市下水道、煤矿矿井、油气田等场所,这些地方排出的甲烷,由于浓度低、存储和运输困难,难以被有效利用,一般都是直接排放到大气中或燃烧掉。根据美国环境保护署的报告,2009 年美国大约排放了 68 亿吨甲烷。中国 2010 年煤矿排放的甲烷约 300 亿 m³,其中绝大部分是以低浓度(<0.5%)的乏风瓦斯形式排出。目前乏风瓦斯的利用主要是通过甲烷氧化来产热,为其它生产环节提供热源和能源。但是煤矿乏风瓦斯的性质很不稳定,从而增加了问题解决的难度和复杂性^[92]。由于中国的煤矿大多位于经济落后的偏远山区,这些地区往往人口稀少,工业不发达,对能源的需要量也相对较小。上述多种因素共同导致煤矿企业回收和利用乏风瓦斯的积极不高,使得大量的甲烷气体被排放到大气中,既浪费了宝贵的资源,同时也给环境造成了污染。

甲烷氧化菌的生长对甲烷气体的质量要求相对较低,甲烷浓度在一个较大范围的浮动对其生长影响不大。利用甲烷氧化菌生产高价值的 PHB,能产生可观的经济效益,可以促进企业对甲烷进行回收和利用。如果按照每克甲烷生产 0.45~0.67g 的 PHB 计算^[85],每年仅利用垃圾填埋场排放的甲烷来生产 PHB,就可以占到全球塑料产量的 20%~30%^[1]。这不仅减少了温室气体的排放,还节约了大量的化石资源,为社会提供了绿色环保的新型包装塑料,综合效益十分明显。全球每年生产的塑料约为 260Mt,生物塑料的产量只有 1Mt,到 2016 年预计将达到 6Mt。根据 Transparency Market Research 公司的报告,2011 年全球绿色包装材料市场规模是 1090 亿美元,到 2018 年将达到 1780 亿美元^[93],增长速度非常快。生物塑料大规模应用的瓶颈是生产成本过高,如果用甲烷为原料生产其成本可以大幅降低。根据测算一个以天然气为原料,年产规模为 500t PHB 的工厂,每公斤 PHB 的生产成本是 6.35 英镑^[94]。生产规模扩大十倍,生产成本可以降低 30%~35%,相对于用其它原料生产 PHB,经济上具有很强的竞争力。

2.4.3 温室气体零排放 甲烷是一种重要的温室气体,其温室效应是二氧化碳的 25 倍左右,利用甲烷为碳源生产 PHB,碳物质可以循环利用,实现甲烷气体零排放。利用甲烷合成 PHA 的循环生产模式如

图 5 所示:(1)甲烷氧化菌利用甲烷为碳源和能源物质进行生长繁殖,在控制营养条件下将甲烷转化成 PHA;(2)甲烷氧化菌和发酵液分离,从菌体中分离 PHA;(3)PHA 用来生产各种终端产品,使用完后最理想的处理方式是进行回收新利用;(4)废弃的 PHA 制品被送到垃圾填埋场,在厌氧环境中被分解产生沼气。沼气中 40%~70%是甲烷,又可以重新被甲烷氧化菌利用来生产 PHA。该生产模式的最大优点是能够有效的降低甲烷排放,通过微生物将难以被利用的碳源物质转化成价值的产品。

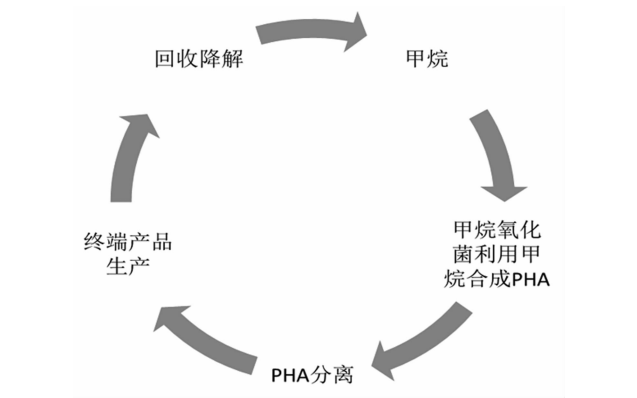


图 5 甲烷氧化菌循环利用甲烷生产 PHA
Figure 5 Feedstock cycle for PHA production using methane

3 甲烷氧化菌生产 PHA 的方法

3.1 开放培养降低成本

以碳水化合物为原料的发酵工业,需要严格的无菌条件,以防止杂菌的污染。培养基的灭菌和发酵过程中无菌环境的控制,在一定程度上增加了生产成本,也增加了生产操作的复杂性。利用甲烷为碳源进行发酵生产,不需要对无机盐培养基进行灭菌处理,因为该培养基中不含碳源,其它微生物一般不能生长。因此,发酵过程可以在一个“开放”条件下进行,极大地简化了生产工艺,降低了生产成本。

许多学者对“开放”培养条件下甲烷氧化菌合成 PHB 进行了研究^[8, 31, 71, 90]。在控制温度、pH、甲烷浓度条件下,可以利用甲烷氧化菌在开放环境中生产 PHB。在该条件下可以富集到 PHB 产量高且微生物组成稳定的甲烷氧化菌群^[8, 71],生产的 PHB 分子量也较高($>2.5 \times 10^6$ Da)^[69],PHB 的含量可以占到细胞干重的 51%^[95]。

3.2 两相培养提高甲烷转化效率

虽然生物法转化甲烷生产 PHB 有着诸多优点,但是也面临一个严峻的障碍,那就是甲烷在水中的溶解度非常低,导致甲烷的生物转化利用效率较低。可以从两方面入手解决这一问题,一是通过工程技术的方法延长甲烷在培养体系中的保留时间^[96],二是增加甲烷在培养体系中的溶解度。利用两相生物反应器能增加甲烷在培养基中的溶解度,从而增加碳源供给,提高甲烷氧化菌的生长速率,增加 PHB 的产量。研究^[97, 98]发现,在添加硅油的两相反应器中,能显著提高甲烷转化的效率,添加 10%的硅油可以使搅拌反应器和滴流床反应器中甲烷转化效率分别提高 41%和 131%。采用两相生物反应器,在最优条件下甲烷氧化菌中的 PHB 含量可以达到 57%^[26]。

4 结论

PHA 作为一种绿色环保的生物塑料,具有广阔的市场前景。PHA 与传统化工合成塑料具有相似的物理性质,同时又有较好的生物相容性和可降解性等诸多优点,使其能应用于不同的领域。PHA 也成为最有发展前景,最有可能替代传统塑料的高分子材料。尽管全球对绿色环保的塑料需求旺盛,但由于

PHA 的生产成本过高,限制了其大规模生产和应用。目前虽然可以进行工业化生产,但是规模都较小。今后的研究重点是降低 PHA 的生产成本,使其与传统的化工塑料具有更强的竞争力。推高 PHA 成本的主要因素是培养基中的碳源支出,开发和利用廉价碳源是降低 PHA 生产成本的最有效的途径。利用光合作用将 CO₂ 转化成 PHA 是最廉价的方法,但是近期难以实现。目前还只能通过微生物培养来大规模生产 PHA。从目前的研究报道来看,甲烷是一种理想的生产 PHA 的碳源物质。甲烷来源丰富,相对于其它碳源非常廉价。利用甲烷生产 PHA 的工艺流程简单,不需要严格的无菌操作,进一步降低了生产成本。筛选 PHA 合成效率高的甲烷氧化菌、对培养方法进行优化、借助遗传工程和代谢工程的方法手段对甲烷氧化菌进行改造提高 PHA 的底物转化效率、优化 PHA 分离纯化工艺等都是降低 PHA 生产成本的有效手段。利用甲烷生产 PHA 是一个非常有前景的研究领域,如果能在上述几个关键领域取得突破,有望实现生物塑料的可持续性的生产和大规模应用。

参考文献:

- [1] DiGregorio B E. *Chem Biol*, 2009,16(1): 1~2.
- [2] Prieto M A. *J Bacteriol*, 2007,189(2): 289~290.
- [3] Choi J H, Keum K C, Lee S Y. *Chem Eng Sci*, 2006,61(3): 876~885.
- [4] Chanprateep S. *J Biosci Bioeng*, 2010,110(6): 621~632.
- [5] Cavalheiro J M B T, Raposo R S, de Almeida M, Teresa Cesário M, Sevrin C, Grandfils C, da Fonseca M. *Bioresour Technol*, 2012,111: 391~397.
- [6] Du C, Sabirova J, Soetaert W, Ki Carol Lin S. *Curr Chem Biol*, 2012,6(1): 14~25.
- [7] Höfer P, Vermette P, Groleau D. *Biochem Eng J*, 2011,54(1): 26~33.
- [8] Jiang D, Dong J, Xin J Y, Zhang Y Y, Zhang Y X, Xia C G. *Letters in Biotechnology*, 2011,(6): 846~849.
- [9] Akaraonye E, Keshavarz T, Roy I. *J Chem Technol Biotechnol*, 2010,85(6): 732~743.
- [10] Choi J, Lee S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000,53(6): 646~649.
- [11] Koller M, Bona R, Chiellini E, Fernandes E G, Horvat P, Kutschera C, Hesse P, Braunegg G. *Bioresour Technol*, 2008,99(11): 4854~4863.
- [12] Ramadas N V, Singh S K, Soccol C R, Pandey A. *Braz Arch Biol Technol*, 2009,52(1): 17~23.
- [13] Huang T Y, Duan K J, Huang S Y, Chen C W. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006,33(8): 701~706.
- [14] Sheu D S, Chen W M, Yang J Y, Chang R C. *Enzyme Microb Technol*, 2009,44(5): 289~294.
- [15] Wu Q, Huang H, Hu G, Chen J, Ho K, Chen G Q. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2001,80(2): 111~118.
- [16] Posada J A, Naranjo J M, López J A, Higueta J C, Cardona C A. *Process Biochem*, 2011,46(1): 310~317.
- [17] Park D H, Kim B S. *New Biotechnol*, 2011,28(6): 719~724.
- [18] Whittenbury R, Phillips K, Wilkinson J. *J Gen Microbiol*, 1970,61(2): 205~218.
- [19] Rostkowski K H, Pfluger A R, Criddle C S. *Bioresour Technol*, 2013,(0).
- [20] Wang H T, Dong J. *Applied Mechanics and Materials*, 2012,200: 385~388.
- [21] van der Ha D, Nachtergaele L, Kerckhof F M, Rameiyanti D, Bossier P, Verstraete W, Boon N. *Environ Sci Technol*, 2012,46(24): 13425~13431.
- [22] Rahnama F, Vasheghani-Farahani E, Yazdian F, Shojaosadati S A. *Biochem Eng J*, 2012,65: 51~56.
- [23] Pieja A J, Sundstrom E R, Criddle C S. *Bioresour Technol*, 2012,107: 385~392.
- [24] 张莹莹,董静,辛嘉英,姜丹,张颖鑫,夏春谷. *农产品加工(学刊)*, 2011,(11): 7~10.
- [25] 姜丹,董静,辛嘉英,张莹莹,张颖鑫,夏春谷. *生物技术通讯*, 2011,(6): 846~849.
- [26] Zuniga C, Morales M, Le Borgne S, Revah S. *J Hazard Mater*, 2011,190(1/3): 876~882.
- [27] Zhang S, Xin J Y, Chen L L, Wang Y. *Advanced Materials Research*, 2011,183: 924~928.
- [28] Xin J Y, Zhang Y X, Dong J, Song H, Xia C G. *Afr J Biotechnol*, 2011,10(36): 7078~7087.
- [29] Pieja A J, Sundstrom E R, Criddle C S. *Appl Environ Microbiol*, 2011,77(17): 6012~6019.
- [30] Pieja A J, Rostkowski K H, Criddle C S. *Microbial Ecology*, 2011,62(3): 564~573.
- [31] Morgan-Sagastume F, Karlsson A, Johansson P, Pratt S, Boon N, Lant P, Werker A. *Water Res*, 2010,44(18): 5196~5211.
- [32] Madison L L, Huisman G W. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999,63(1): 21~53.

- [33] Ruiz J A, López N I, Fernández R O, Méndez B S. Appl Environ Microbiol, 2001,67(1): 225~230.
- [34] Reusch R, Hiske T, Sadoff H. J Bacteriol, 1986,168(2): 553~562.
- [35] Steinbüchel A, Valentin H E. FEMS Microbiol Lett, 1995,128(3): 219~228.
- [36] Rai R, Keshavarz T, Roether J, Boccaccini A, Roy I. Mater Sci Eng: R: Reports, 2011,72(3): 29~47.
- [37] Gumel A M, Annuar M S M, Chisti Y. J Polym Environ, 2012; 1~26.
- [38] Kusaka S, Abe H, Lee S, Doi Y. Appl Microbiol Biotechnol, 1997,47(2): 140~143.
- [39] Camargo F A, Innocentini-Mei L H, Lemes A P, Moraes S G, Durán N. J Compos Mater, 2012,46(4): 417~425.
- [40] Jung K, Hazenberg W, Prieto M, Witholt B. Biotechnol Bioeng, 2001,72(1): 19~24.
- [41] Hartmann R, Hany R, Witholt B, Zinn M. Biomacromolecules, 2010,11(6): 1488~1493.
- [42] Sun Z, Ramsay J, Guay M, Ramsay B. Appl Microbiol Biotechnol, 2007,74(1): 69~77.
- [43] Ezhov V A, Doronina N V, Trotsenko Y A. Appl Biochem Microbiol, 2013,49(2): 150~153.
- [44] Sim S J, Snell K D, Hogan S A, Stubbe J, Rha C, Sinskey A J. Nat Biotechnol, 1997,15(1): 63~67.
- [45] Bhubalan K, Chuah J-A, Shozui F, Brigham C J, Taguchi S, Sinskey A J, Rha C, Sudesh K. Appl Environ Microbiol, 2011,77(9): 2926~2933.
- [46] Thomson N M, Saika A, Ushimaru K, Sangiambut S, Tsuge T, Summers D K, Sivaniah E. Appl Environ Microbiol, 2013,79(6): 1948~1955.
- [47] Hiroe A, Ushimaru K, Tsuge T. J Biosci Bioeng, 2013,115(6): 633~638.
- [48] Artsis M, Bonartsev A, Iordanskii A, Bonartseva G, Zaikov G. Mol Cryst Liq Cryst, 2012,555(1): 232~262.
- [49] Boyandin A, Prudnikova S, Filipenko M, Khrapov E, Vasil'ev A, Volova T. Appl Biochem Microbiol, 2012,48(1): 28~36.
- [50] 吴琼, 任梦达, 丁长坤, 陈国强, 程博闻. 聚羟基脂肪酸酯纤维的制备方法: 中国, 201010547339[P].
- [51] 张必良, 周丽. 一种生物可降解的聚合物及其制备方法以及核酸药物运输载体: 中国, 201210140883[P].
- [52] 张必良, 周丽. 两亲性三嵌段聚合物及其制备方法和 siRNA 药物载体: 中国, 201210140883[P].
- [53] 张萍, 高德, 邹萍萍. 含纳米纤维素的聚脂脂肪酸酯微孔发泡材料及其制备方法: 中国, 201210087576[P].
- [54] 王迎军, 陈聪, 杜昶. PHBV 纳米纤维支架材料及其制备方法和应用: 中国, 201010249413[P].
- [55] 陈海锋, 唐培松, 王坤燕, 崔桂圆. 溶液浇筑法制备 PHBV 装载改性纳米 TiO₂ 薄膜: 中国, 201210057808[P].
- [56] García-García J M, López L, Paris R, Núñez-López M T, Quijada-Garrido I, de la Peña Zarzuelo E, Garrido L. J Biomed Mater Res A, 2012,100A(1): 7~17.
- [57] Sadik T, Massardier V, Becquart F, Taha M. J Appl Polym Sci, 2013,127(2): 1148~1156.
- [58] Veleirinho B, Coelho D S, Dias P F, Maraschin M, Ribeiro-do-Valle R M, Lopes-da-Silva J A. Int J Biol Macromol, 2012,51(4): 343~350.
- [59] Kaserer H Z. Landw Versuchsw in Österreich, 1906,(8): 789~792.
- [60] Söhngen N L. Z. Bakteriell Parasitenk (Infektionster), 1906,(15): 513~517.
- [61] Söhngen N L. Rec Trav Chim, 1910,(29): 238~374.
- [62] Holmes A, Owens J, Murrell J. Microbiology, 1995,41: 1947~1955.
- [63] Heyer J, Berger U, Hardt M, Dunfield P F. Int J Syst Evol Microbiol, 2005,55(Pt 5): 1817~1826.
- [64] Dunfield P F, Yuryev A, Senin P, Smirnova A V, Stott M B, Hou S, Ly B, Saw J H, Zhou Z, Ren Y, Wang J, Mountain B W, Crowe M A, Weatherby T M, Bodelier P L, Liesack W, Feng L, Wang L, Alam M. Nature, 2007,450(7171): 879~882.
- [65] Islam T, Jensen S, Reigstad L J, Larsen O, Birkeland N K. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,105(1): 300~304.
- [66] Pol A, Heijmans K, Harhangi H R, Tedesco D, Jetten M S, Op den Camp H J. Nature, 2007,450(7171): 874~878.
- [67] Bowman J P, Sly L I, Stackebrandt E. Int J Syst Bacteriol, 1995,45(1): 182~185.
- [68] Wendlandt K-D, Stottmeister U, Helm J, Soltmann B, Jechorek M, Beck M. Eng Life Sci, 2010,10(2): 87~102.
- [69] Wendlandt K D, Jechorek M, Helm J, Stottmeister U. J Biotechnol, 2001,86(2): 127~133.
- [70] Wendlandt K D, Geyer W, Mirschel G, Hemidi F A. J Biotechnol, 2005,117(1): 119~129.
- [71] Helm J, Wendlandt K D, Rogge G, Kappelmeyer U. J Appl Microbiol, 2006,101(2): 387~395.
- [72] Helm J, Wendlandt K D, Jechorek M, Stottmeister U. J Appl Microbiol, 2008,105(4): 1054~1061.
- [73] Zhang Y X, Xin J Y, Chen L L, Song H, Xia C U. J Nat Gas Chem, 2008,17(1): 103~109.
- [74] Zhang Y X, Xin J Y, Dong J, Xia C G. Mater Sci Eng Appl, 2011,160~162(Pts 1~3): 91~95.
- [75] Yingying Z, Jing D, Jiaying X, Dan J, Yingxin Z, Chungu X. Nongchanpin Jiagong Xuekan, 2011,(11): 7~10.
- [76] Reddy C S, Ghai R, Rashmi, Kalia V C. Bioresour Technol, 2003,87(2): 137~146.
- [77] Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel H G. J Bacteriol, 1988,170(12): 5837~5847.

- [78] Masamune S, Palmer M A, Gamboni R, Thompson S, Davis J T, Williams S F, Peoples O P, Sinskey A J, Walsh C T. *J Am Chem Soc*, 1989,111(5): 1879~1881.
- [79] Palmer M, Differding E, Gamboni R, Williams S, Peoples O, Walsh C, Sinskey A, Masamune S. *J Biol Chem*, 1991,266(13): 8369~8375.
- [80] Thompson S, Mayerl F, Peoples O P, Masamune S, Sinskey A J, Walsh C T. *Biochemistry (Mosc)*, 1989,28(14): 5735~5742.
- [81] Sudesh K, Abe H, Doi Y. *Prog Polym Sci*, 2000,25(10): 1503~1555.
- [82] Lenz R W, Marchessault R H. *Biomacromolecules*, 2005,6(1): 1~8.
- [83] Steinbüchel A, Hein S. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2001,71: 81~123.
- [84] Liebergesell M, Rahalkar S, Steinbüchel A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000,54(2): 186~194.
- [85] Yamane T. *Biotechnol Bioeng*, 1993,41(1): 165~170.
- [86] Breuer U, Babel W. *Acta Biotechnol*, 1999,19(1): 79~86.
- [87] Korotkova N, Lidstrom M E. *J Bacteriol*, 2001,183(3): 1038~1046.
- [88] Korotkova N, Chistoserdova L, Lidstrom M E. *J Bacteriol*, 2002,184(22): 6174~6181.
- [89] Fitzgerald K A, Lidstrom M E. *Biotechnol Bioeng*, 2002,81(3): 263~268.
- [90] Pfluger A R, Wu W M, Pieja A J, Wan J, Rostkowski K H, Criddle C S. *Bioresour Technol*, 2011,102(21): 9919~9926.
- [91] Ueda S, Matsumoto S, Takagi A, Yamane T. *Appl Environ Microbiol*, 1992,58(11): 3574~3579.
- [92] Su S, Chen H, Teakle P, Xue S. *J Environ Manage*, 2008,86(1): 44~62.
- [93] Research T M. *Green Packaging Market (Recycled, Reusable & Degradable)-Global Scenario, Trends, Industry Analysis, Size, Share And Forecast, 2011~2018 [M].* 2012.
- [94] Listewnik H F, Wendlandt K D, Jechorek M, Mirschel G. *Eng Life Sci*, 2007,7(3): 278~282.
- [95] Wendlandt K D, Jechorek M, Helm J, Stottmeister U. *Polym Degrad Stab*, 1998,59(1/3): 191~194.
- [96] Rocha-Rios J, Kraakman N J R, Kleerebezem R, Revah S, Kreutzer M T, van Loosdrecht M C M. *Chem Eng J*, 2013,217(0): 91~98.
- [97] Rocha-Rios J, Bordel S, Hernández S, Revah S. *Chem Eng J*, 2009,152(1): 289~292.
- [98] Rocha-Rios J, Quijano G, Thalasso F, Revah S, Munoz R. *J Chem Technol Biotechnol*, 2011,86(3): 353~360.

A Review of Production of Polyhydroxyalkanoate by Methanotrophic Bacteria Using Methane as Feedstock

ZHU Hong-wei*, SHAO Ju-fang, LENG Yun-wei, TAO Xiu-xiang

(School of Chemical Engineering & Technology, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China)

Abstract: At present, most synthetic plastic materials produced from fossil carbon feedstock, which regenerated over time scales of millions of years. Petrochemical-derived plastic materials had been widely used, massive petro-plastic production consumed large amount energy resource and caused severe environmental pollution. Polyhydroxyalkanoates biosynthesized by microbe was macro polymer molecules, its physical and chemical characteristics were similar to conventional plastics such as polypropylene. Polyhydroxyalkanoates produced from renewable resource and have many advantages compared with petro-plastic, such as, it can be biodegraded in nature will not pollute environment, and the diverse structure endowed it with multiple function to meet for different use, which make polyhydroxyalkanoates extremely desirable substitutes for petro-plastic. Methane can be used as sole carbon and energy source for growth of methanotrophs. Methanotrophs can anabolism methane to accumulate polyhydroxyalkanoates in the cell at property conditions. Using methane as feedstock can substantially reducing cost for polyhydroxyalkanoates production, at the same time greatly reducing greenhouse gas emission. This article reviewed the fundamentals of strategies for reducing PHA production cost from methane and some explanation for methanotrophs, polyhydroxyalkanoates metabolic pathway, culture condition, and nutritional requirements are given.

Key words: Polyhydroxyalkanoate; Methane; Methanotrophic bacteria