

生物合成材料聚 β -羟基丁酸(PHB)的研究进展

杨宇^{1,2}, 徐爱玲¹, 张燕飞¹, 师舞阳¹, 钱林¹, 刘学端^{1,2}, 邱冠周^{1,2}

(1. 中南大学资源加工与生物工程学院, 中国湖南长沙 410083; 2. 生物冶金教育部重点实验室, 中国湖南长沙 410083)

摘要: 聚 β -羟基丁酸(PHB)是原核微生物在碳、氮营养失衡的情况下, 作为碳源和能源贮存在生物体内的一类热塑性聚酯。它作为微生物合成的可降解材料, 除了具有与化学合成高分子相似的性质外, 还具有一般化学合成高分子没有的性质, 如光学活性好、透氧性低、抗紫外线辐射、生物可降解性、生物组织相容性、压电性和抗凝血性等, 具有广阔的应用前景, 越来越受到人们的关注。国内外的许多公司和科研机构纷纷开展可降解塑料的研发工作。着重介绍了PHB的理化性质、检测方法、生物合成、降解以及基因改良菌种方面的研究进展, 同时对其应用、目前存在的问题以及可能的解决方案进行了讨论。

关键词: PHB; 检测; 微生物合成; 降解; 基因改良

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S2-0061-07

Advances in PHB Synthesized by Microorganism

YANG Yu, XU Ai-ling, ZHANG Yan-fei, SHI Wu-yang,
QIAN Lin, LIU Xue-duan, QIU Guan-zhou

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China;

2. Key Laboratory of Biohydrometallurgy, Ministry of Education, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China)

Abstract: PHB is a kind of polyester stored in organism body as carbon source and energy source, when prokaryotes is in imbalance of carbon and nitrogen nourishment. As a kind of degradable microorganism material, besides the similar characteristics with chemosynthesis macromolecule, it also shows some other characteristics that are not obtained by ordinary chemosynthesis macromolecule, such as, good optic activity, low oxygen filtering ability, anti-ultraviolet radiation, biological degradability, biological organism consistency, piezoelectricity, anti-cruor, and so on. It has a promising future and has attracted more and more attention from people. Many companies and research institutes both at home and abroad have carried out the research and development work on degradable plastic. Advances in the physical-chemical feature, inspecting method, biosynthesis, degradability, and genetic improvement of bacterium are mainly introduced, and its current application, existing problems, and possible resolving principles are discussed.

Key words: PHB; inspection; biosynthesis; biodegradation; genetic improvement

(*Life Science Research*, 2006, 10(4)S2: 061 ~ 067)

收稿日期: 2006-09-02; 修回日期: 2006-10-12

基金项目: 国家创新研究群体自然科学基金项目(50321402); 国家重点基础研究发展计划项目(2004CB619201)

作者简介: 杨宇(1972-), 男, 湖南长沙人, 中南大学副教授, 主要从事生物工程学方面的研究; 徐爱玲(1982-), 女, 山东德州人, 中南大学生物工程硕士; 邱冠周(1949-), 男, 广东大浦人, 中南大学教授, 通讯作者, Tel: 0731-8877216, E-mail: csyangyu@gmail.com.

随着塑料工业的发展, 各行各业对塑料制品的需求越来越大, 塑料制品在日常生活中的普遍使用, 极大地丰富和方便了人们的生活. 然而, 产生的废弃物由于难以分解, 导致大量永久性垃圾的人为产生. 据统计, 塑料垃圾以每年 2 500 t 的速度在自然界中积累. 一般来说, 塑料除热降解外, 在自然环境中光降解和生物降解的速度非常缓慢, 通常需要 200 ~ 400 年. 为解决“白色污染”问题, 一些国家采用了 3R 工程, 即减少使用 (Reduction), 重复使用 (Reuse) 和回收循环 (Recycle). 但在一些回收难度大或不易回收的领域, 3R 工程的实施仍有很大的困难, 所以国内外许多科研机构纷纷开展可降解塑料的研发工作.

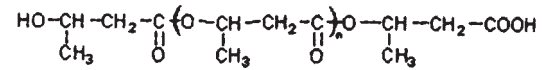
可降解塑料大致可分为光降解塑料和生物可降解塑料. 光降解塑料是将光敏基团引入聚合物中, 在光照条件下使塑料分解成小碎片, 但最终也只能是部分降解. 而生物可降解塑料则是在使用过程中能保持与普通不降解塑料相似的力学强度和材料性能, 使用后在自然环境中通过微生物的作用, 在一定时间内可以降解成 CO_2 、 H_2O 或其它无毒副产物的聚合物. 因此, 生物可降解塑料更具有发展潜力. 目前研究的生物可降解塑料一般分为 3 类, 即微生物合成型 (如聚羟基脂肪酸酯)、天然高分子型 (如淀粉、纤维素、木质素和甲壳素等) 和合成高分子型 (如聚乳酸、聚乙烯醇、聚丁二酸丁二酯等). 聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 是原核微生物在碳、氮营养失衡的情况下, 作为碳源和能源贮存而合成的一类热塑性聚酯. 目前已经发现 PHA 至少有 125 种不同的单体结构, 并且还在不断地发掘出新的单体; 其中, 聚 β -羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 是 PHA 中发现最早、研究最多的一种.

1 PHB 的组成、性质及应用

1.1 PHB 的组成和性质

早在 1926 年, 法国巴斯德研究所的 M. Lemoigne 就在巨大芽孢杆菌 *Bacillus megatherium* 细胞中发现了 PHB 颗粒, 随后人们逐渐了解到 PHB 是微生物在营养不均衡条件下 (如碳源过剩, 而其它如氮、磷、硫等营养限制) 积累在体内作为其营养和能量储存物质参与细胞代谢的天然产物. 由于具有低溶解性和相对高的摩尔质量, 故 PHB 可以在细菌胞内大量储存而不影响胞内

外的渗透压, 是一种理想的储存材料. 当增加碳氮比后, 细菌体内的 PHB 含量就会增加. PHB 的结构式如下所示:



PHB 分子结构的高度立体规整性决定了它特殊的溶解性. PHB 不溶于甲醇、水、乙醇、丙酮、醚、己烷、稀释无机酸等, 部分溶于二氧六环、甲苯、辛醇、吡啶, 而溶于氯仿、二氯乙烷、二氯乙酸、三氟乙醇、二甲基甲酰胺、乙酰乙酸、三油酸甘油酯、冰醋酸等. PHB 的相对分子质量和聚合度随微生物的种类、限制性碳源的种类及浓度、培养条件、发酵时间、提取方法等的不同而异. 如果单体的碳链长度增加, 其柔韧性将会大大增加, 而熔点及结晶度下降. 作为塑料用途的 PHB, 最好具有 60 万以上的相对分子质量.

PHB 有良好的生物降解性, 其分解产物可全部为生物利用, 对环境无任何污染; 其熔融温度为 175 ~ 180 $^{\circ}\text{C}$, 是一种可完全分解的热塑性塑料^[1]. 与传统的化学合成高分子相比, PHB 作为一种微生物合成塑料, 不仅具有化学合成塑料的特性, 而且还有密度大、光学活性好、透氧性低、抗紫外线辐射、生物可降解性、生物组织相容性、压电性和抗凝血性等优点, 可望在电子、光学、生物医学等高新技术领域获得应用. 当然, 目前天然 PHB 还存在机械性能差、容易热解、耐溶剂性差、结晶度过高、难以加工等缺点, 但是研究表明: PHB 与其它无机填充物或化学合成材料相配合, 通过热处理或共聚可改变其结晶与非结晶结构, 使其抗冲击性和耐溶性得到改善, 获得机械性能优良的制品^[2], 例如: 将 PHB 与聚酰胺 (尼龙) 进行酯交换反应, 可制成聚酰胺酯共聚物 (CPAE); 而将 PHB 与通用塑料 (PE、PP、PS、PVC) 共混, 则可制得生物崩坏型塑料等^[3]. 另外, 通过 PHB 合金生产技术的研究, 将有可能生产可降解餐具, 替代目前使用的纸质餐具.

1.2 PHB 的应用

1.2.1 医药行业的应用

作为在组织工程中用的基质材料必须具有以下性能: A) 良好的生物相容性; B) 细胞能在材料表面良好粘附和增殖; C) 材料能够诱导细胞按预制形态生长; D) 在新组织长成后, 材料能够在体

内降解成对人体无毒的小分子,并通过代谢排出体外。PHB具有良好的生物相容性,生物机体对PHB不像对其他材料那样具有强烈的排斥作用,在机体内容易被水解成 CO_2 和 H_2O 。因此还可以用作外科手术缝合线及药物控制释放体系的载体,使药物在体内缓慢释放,延缓药效,并使药效到达难以施药的部位。此外PHB具有生物可降解性、生物相容性、压电性、光学活性、无毒性、无刺激性、无免疫原性等化学合成高分子材料没有的性质,因此PHB在软骨组织工程、骨组织工程、皮肤组织工程、心脏瓣膜组织工程、血管组织工程和神经系统组织工程等医学工程中具有一定的应用前景^[4]。

1.2.2 工业上的应用

由于PHB具有压电性,可制成压电制品,制造压力传感器、点火器、声学仪器和振荡发生器等,还可用作换能元件,尤其是生物体内的换能器。

1.2.3 农业上的应用

PHB可制成化学肥料、杀虫剂、除草剂的缓释载体,缓慢将农药释放到土壤中,保持农药的长久性。农用地膜可提高土壤温度,抑制杂草生长,对农作物增产具有重要意义。使用可降解农膜,可大大减少对环境和土壤的污染。

1.2.4 包装业上的应用

PHB制成的可降解塑料可作购物袋、垃圾袋、堆肥袋、肥料袋、一次性餐盒、方便面盒、化妆品容器、瓶类、标签、包装薄膜、发泡片材和缓冲包装材料等。

1.2.5 其它方面的应用

PHB应用的另一个重要领域是其单体的应用。它的每一个结构单元都有一个手性碳,可用于色谱分析,以分离光学异构体。另外,PHB水解后得到的 β -羟基丁酸单元体可作为有机物合成的原料,制备手性衍生物。和常规药物相比,手性药物更安全、有效、使用剂量也更小;而PHB的手性单体 β -羟基丁酸可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^[5]。

总之,由于PHB具有生物可分解性、轻质、弹性、热塑性、抗辐射性以及重要的组织亲和性、光学活性和压电等特性^[5],可以预料,PHB作为新型功能材料和生物结构材料定会迅猛发展起来。

2 聚 β 羟基丁酸的检测方法

PHB的检测方法主要有染色法、气相色谱检测法、分光光度法、重量测定法和 $^1\text{H-NMR}$ 检测法,其中最常用的是染色法(定性检测)、分光光度检测法(定量)和气相色谱检测法(定量)。

染色法分为苏丹黑染色法和尼罗红染色法两种,其中苏丹黑染色法使用较多。苏丹黑染色是使用脂溶性染料对微生物细胞进行染色,染色后用显微镜检测。尼罗红染色是将玻片上固定的细胞滴加尼罗红水溶液后在火焰上微加热,冷却后加盖玻片,置于荧光显微镜下观察,尼罗红染色对PHB专一性较强,可使PHB与其他非PHB脂类化合物区分开。

重量分析法最早是由M. Lemoigne(1926)创立,他将细胞干燥后,用氯仿抽提,通过重量改变来测定PHB,此法误差较大。后来又将此法加以改进,先将细胞冷冻真空干燥或用丙酮充分洗涤,再用氯仿或二氯甲烷抽提PHB,再加入己烷或乙醚使聚合物沉淀,分离后干燥称重测定PHB含量。

气相色谱法是一种较新、较准确的PHB测定方法,该法的最大优点在于不需将细胞内PHB高度纯化即可检测其PHB含量,这对于研究及生产都十分重要,但气相色谱法需要高纯度的PHB标准样品,还需要有价格昂贵的气相色谱仪。

分光光度法是利用次氯酸盐将细胞消化后,通过分光光度法测定PHB所造成的浊度来测定PHB含量。也可以利用热浓硫酸将细胞中PHB转化为丁烯酸,通过波长235 nm处的光吸收来检测PHB的含量。

3 PHB的生物合成

产生PHB颗粒或PHB类似物的原核生物既有革兰氏阴性菌也有革兰氏阳性菌,例如:产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、嗜盐杆菌属(*Halobacterium*)和甲基杆菌属(*Methylobacterium*)等^[6]。我们在开展微生物冶金的基础研究中,也发现某些浸矿细菌(如:*Acidiphilium*属菌)也能够合成PHB,从细胞超薄切片电镜照片看此菌体内积累PHB的数量是很大的,目前我们正开展PHB定量以及培养条件优化等方面得研究,研究报告即将发表。

目前国内外所用的 PHB 生产菌种主要是真养产碱杆菌、固氮菌和假单胞菌^[7]。而在真核生物中尚未发现有 PHB^[8] 颗粒存在。不同种的微

生物在一定条件下积累 PHB 的能力和速度有很大差异,即使是同一菌株,发酵条件不同,PHB 的合成能力也相差很大(如表 1 所示)。

表 1 国内外用于生产 PHB 的菌株

Table 1 The bacterial species of producing PHB in China and other countries

细 菌	碳源和氮源	细胞中 PHB 含量/%
肥大产碱杆菌 ^[9]	糖蜜或糖浆	80 ~ 90
肥大产碱杆菌蔗糖	(NH ₄) ₂ SO ₄	73.5
真养产碱杆菌 ^[10]	葡萄糖, NH ₄ OH	55
维氏固氮菌	葡萄糖, NH ₄ NO ₃	65
假单胞菌	甲醇, 氨	62
嗜甲烷假单胞菌	甲醇, (NH ₄) ₂ SO ₄	64
生丝微菌	甲醇, (NH ₄) ₂ SO ₄	35 ~ 70

不同微生物生产 PHB 所需要的营养物质并不相同,但是一般都是在碳源过剩而其它如氮、磷、硫、氧等不足条件下产生的。我们所研究的浸矿细菌大多分离自营养条件非常恶劣的矿山废水中,部分浸矿细菌具有合成 PHB 的能力,可能增强其环境适应性。PHB 在生物体内一般作为潜在的营养物质而存在,当环境中的营养物质不足时,微生物便可以分解利用体内存储的 PHB。

由于 PHB 只是生物体在营养不均衡时暂时存储在体内的物质,因此在研究 PHB 的生产条件时,除要研究最佳培养基成分、最佳温度外,还要研究最佳提取时机。英国 ICI 公司在 20 世纪 80 年代就对生物降解性塑料中的聚 β - 羟基丁酸作了系统的研究,并于 1990 年推出商品名为 Biopol 的产品,当时产量已超过 1 000 t/d。目前发酵法仍是获得 PHB 的主要手段,然而由于菌种、发酵生产以及分离提取等方面存在一些需要解决的问题,因此 PHB 的产量仍然有限,导致生产成本较高,目前以石油为原料的合成塑料的价格为每千克 1 ~ 6.6 美元;而 PHB 的成本却高达每千克 16 ~ 22 美元。为了使 PHB 获得更广泛的应用,必须降低包括发酵、分离等步骤的成本。因此,探索菌种生产的新底物、改进发酵工艺降低发酵条件变成为有待解决的问题。国外许多公司、大学正致力于开发新的天然菌或基因工程菌、寻找合适底物、改进发酵工艺,降低生产成本。当然,要达到聚乙烯(PE)产品的价格,仍有待时日。

此外,天然 PHB 存在韧性差、在加工过程中易发生分解等缺点,也在一定程度上限制了 PHB 的开发应用^[11, 12]。因此,必须对天然 PHB 分子进行改性,PHB 的改性研究目前主要集中在两个方

面:生物改性和物理共混。生物改性就是通过细菌发酵在 PHB 的链段上引入其他的羟基脂肪酸的链节单元^[13, 14]。同生物改性相比,物理共混则是简单易行且成本低的改性方式,这方面的报道很多,如 PHB/聚氧化乙烯(PEO)^[15]、PHB/聚(β -己内酯)(PCL)^[16]、PHB/丙酸纤维素(CP)^[17]、PHB/醋丁纤维素(CAB)^[18-21]、PHB/壳聚糖^[22] 共混体系等。选择合适的共混组分,通过调节配比,采用不同的加工方法可获得满足多种用途的新型材料。除了上述两种方法以外,PHB 的化学改性也越来越受到人们的重视。PHB 的化学改性是从 PHB 本身的分子结构出发,通过分子设计来合成含有 PHB 链段的新结构,从而改善 PHB 的性能。通过改性 PHB 的热稳定性和力学稳定性大大得到改进,而生物降解性却不被破坏。通过改性使 PHB 的应用领域得到大大扩展。

4 PHB 的降解

1963 年,Chowdhury 首次发现降解 PHB 的微生物,它们是 *Bacillus*, *Seudomonas* 和 *Streptomyces*。随后,人们陆续从环境中分离出其它一些能降解 PHB 的微生物类型。人们常将能降解 PHB 的微生物按分离地点分类,如土壤、活性污泥、淡水、海水、实验室空气及混合肥料等。一般说来,不同环境中的微生物群对 PHB 的降解能力是不同的,而即使是同种微生物,在不同外界条件下其降解 PHB 的能力也不同。王加宁等人对一些具体的菌种降解 PHB 的能力做了比较,认为假单胞菌对 PHB 有强烈的降解作用,而在真菌中只有尖孢镰刀菌有轻微的 PHB 降解能力,芽孢杆菌几乎不会降解 PHB^[23]。A. Manna 等^[24]报道链霉菌

降解 PHB 的最佳条件为: 降解时间为 8 d, 温度为 30 ℃, PHB 在培养基中的浓度为 0.3% (W/V). 陈珊等^[25, 26]报道青霉 DS9701 降解 PHB 的最佳温度为 28~30 ℃, 最佳培养基 pH 值为 5.3~6.0, PHB 在 8 d 内完全降解, 而青霉素 DS9713 降解 PHB 的最佳温度为 30 ℃, 最佳培养基 pH 值为 6.0~6.8, 降解时间约需 18 d 左右.

一般情况下, 在环境中 PHB 最终被微生物所分泌的 PHB 解聚酶降解. 目前已从微生物中分离纯化了多种 PHB 解聚酶. 研究表明: PHB 的降解至少要有两个可溶性的因子(活化因子和解聚酶). 经过活化因子预处理后, 解聚酶作用于 PHB 聚合物, 通过连续作用过程, 使 PHB 颗粒降解为可溶性产物. 无论有氧还是无氧的情况下, PHB 降解产物的色谱分析均表明: 除了有 β-羟基丁酸、乙酰乙酸和少量乙酸以外, 没有发现其它短链脂肪酸. 特别是在好氧的情况下, PHB 的降解除产生少量的 β-羟基丁酸外, 大都被氧化成二氧化碳和水. PHB 分子降解的具体过程如图 1 所示.

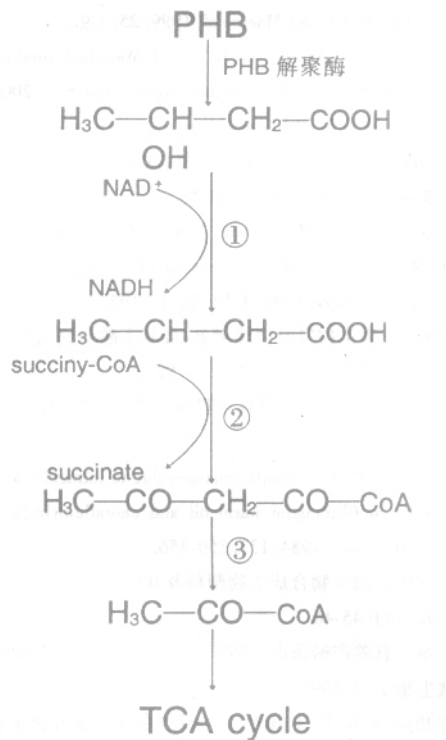


图 1 PHB 的降解^[27, 28]

① 三羟基丁酸脱氢酶; ② 乙酰乙酰辅酶 A 合成酶; ③ β-酮硫解酶.

Fig. 1 PHB degradation

① Hydroxybutyrate dehydrogenase; ② Acetoacetyl-CoA synthetase; ③ β-Ketothiolase.

PHB 的降解一般都是从表面开始的. Satoshi Kusaka 等认为 PHB 膜的降解与 PHB 的相对分子质量无关, 但与 PHB 的结晶度有关^[29]. PHB 的酶解率随结晶度的增加而降低. PHB 解聚酶不能进入 PHB 晶体中而引起降解, 而是首先进攻密度低、松散的非晶体部分. 当非晶体部分降解后, PHB 表面就会形成很多的自由端基, 这些自由端基具有较大的活动能力, 导致 PHB 的表面形成非晶过渡层. PHB 结晶逐渐被破坏, 随后 PHB 解聚酶继续对非晶体部分作用, 直至使 PHB 完全降解.

5 基因工程技术在 PHB 合成中的应用

与化学合成塑料相比 PHB 具有很多独特的优点, 但是由于其产量低, 原料贵等缺点, 大大限制了它的使用范围. 因此, 人们开始用基因工程的方法来“制造”优良菌种. 来自不同微生物的涉及到 PHB 合成的许多基因和操纵子已被克隆和鉴定. 其中有些菌种的基因、编码蛋白及其功能已经研究得比较清楚了. 例如 *R. eutropha* strains H16(ATCC 17699) 中与 PHB 合成相关的一些基因和蛋白(见表 2)^[29]. 在了解基因的作用机制以后, 运用转基因技术, 成功地将相关的基因转入某些具有生长快, 能利用廉价原料的菌种内进行表达, 甚至在植物体内进行表达^[30], 目前转基因已经取得了初步成效.

在 NCBI 中用 Blast 比对不同属的菌合成 PHB 的相关基因, 发现它们的相似度极低, 这给产 PHB 的未报道菌种的研究带来了一定的困难.

6 目前存在的问题和可能的解决办法

PHB 来源于生物体, 最终也被生物体利用, 原则上讲不会对环境造成影响, 因此是一种很有应用前景的生物材料. 但是由于其生产菌的产量不高, 生产菌在生长过程中所消耗的原料价格较高, 天然产物 PHB 的机械性能差, 很多降解菌不能降解胞外的 PHB 等缺点, 严重影响了其使用. 我们必须解决这些问题, 以实现 PHB 作为生物材料的普及应用.

1) 筛选 PHB 高产菌株. 浸矿菌的生长条件比较特别, 在对浸矿菌的长期研究中发现有些兼性菌有积累 PHB 的能力, 虽然研究还在进一步进行中, 但是我们相信在浸矿菌中筛选出高产菌株也是很有希望的. 此外, 除了筛选自然界中天然存在的菌种外, 我们还可以从天然菌株出发通过

表 2 基因、基因产物和反转录定量 PCR 扩增所需引物

Table 2 Genes and gene products, their function, and oligonucleotides used for reverse transcriptase quantitative PCR

Gene/protein	Protein function	Oligonucleotides	Product length/bp
PhaA	β -Ketothiolase	5'-CAGTACCACATGGGCATCAC-3', 5'-CGATCTCTTCGTCAAACCTTGC-3'	139
PhaB	Acetoacetyl-CoA reductase	5'-ATCGACACCAACCTGACCTC-3', 5'-TTCACCGACGAGATGTTGAC-3'	101
PhaC	PHA synthase	5'-GCGTCTACCTGCTCAATGC-3', 5'-GATTGGTGGCAAGGAAGTTG-3'	142
PhaP	Phasin (granule formation)	5'-CAAGAACGCACAGAACTG-3', 5'-GTGAACTCGCTCTGGGTTTC-3'	120
PhaR	Negative regulation of phaP Transcription	5'-ACACCCAGACCAGCACCTAC-3', 5'-GGGTCAGTTCGTACCAGAC-3'	105
PhaZ1a	PHB depolymerase	5'-AGGTCTACGTCACCGACTGG-3', 5'-GGCATAACCGAGATCACATGC-3'	141
PhaZ1b	Putative PHB depolymerase	5'-ATCTCACCGACTGGCACAAC-3', 5'-CAAATCGCCACCAGATGC-3'	130
PhaZ1c	Putative PHB depolymerase	5'-TCGATCTTGGCTGCTATGTC-3', 5'-GCACCTGCTCGTTGTCTTC-3'	141

细胞融合、诱变等方法来改良优化菌种。

2) 寻找微生物能够利用的廉价碳源和培养材料, 改善或优化 PHB 的累积条件, 合理有效地控制微生物的生长速率、PHB 的合成速度和累积的最大限度, 提高 PHB 提取的经济性。

3) 通过遗传操作, 选择和创造能生产特殊性能塑料的菌株; 降低培养条件的要求, 探索普适化的培养模式。

4) 提高降解速度的可控性, 如控制降解速度、降解时间、生产降解速度, 开发多种性质的可降解塑料, 以适应不同的需求。

5) 使用适当的方式, 包括物理、化学或生物的方法进行改性, 以提高它的稳定性, 满足不同领域的要求。

总之, 21 世纪是经济、资源、能源、环保相互协调、经济持续发展的时代, 随着科技的进步、人们环保意识的增强、降解技术的提高, 降解塑料的生产使用将是必然的发展趋势, PHB 也将具有更加广泛的开发应用前景。

参考文献(References):

- [1] STEINBUHEL A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids[J]. Fems Microbiol Lett, 1995, 128: 219-228.
- [2] RENM B, STEINBUHEL A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthas. es and other proteins required for PHA syn-

thesis[J]. Intl J Biol Macromol, 1999, 25: 3-9.

- [3] CHENG Q, WU Q, XI J, *et al.* Microbial production of biopolyesters-polyhydroxyalkanoates[J]. Natr Sci, 2000, 10: 843.
- [4] 蔡志江, 成国祥. 聚羟基丁酸酯在组织工程中的应用[J]. 功能高分子学报, 2001, 355-359.
- [5] HULSMANR G. Metabolism of Poly(β -Hydroxy alkanooates) (PHAs) by pseudomonas oleovorans[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 4(5): 2191-2195.
- [6] 石海平. 微生物发酵制取聚 β - 羟基丁酸研究简介[J]. 食品与发酵工业, 1997, (24)2: 79-82.
- [7] 苏涛. 微生物合成可降解塑料聚羟基链烷酸[J]. 工业微生物, 1997, (27)3: 37-44.
- [8] RLCALLG. Buoyant densty echanges due to intracellular content of sulfr in Chromatlm warm oil and choratlumvlmosam[J]. Arch Microbiol, 1984, 137: 350-356.
- [9] 郑立民. 微生物合成生物塑料及其应用 [J]. 环境保护, 1992, (3): 45-46.
- [10] 王丽. 真养产碱菌由丁酸积累聚 β -羟基丁酸的研究 [J]. 微生物学报, 1993, 33(1): 48-53.
- [11] 许开天, 赵树杰. PHB 在生物医学的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 1995, 1(1): 85-91.
- [12] VERHOOGT H, RAMSAY B, FARIS B. Polymer review: polymer blends containing poly (3-hydroxyalkanoate) [J]. Polymer, 1994, 35(24): 5155-5168.
- [13] INNOUE Y, KAMYIA N, YAMAMOTO Y, *et al.* Microstructure of commercially available poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) s[J]. Macromolecules, 1989, 22(9): 3800- 3802.

- [14] SHIMAMURA E, KASUYA K, KOBAYASHI G, *et al.* Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)[J]. *Macromolecules*, 1994, 27(3): 878-880.
- [15] AVELLA M, MARTUSCELLI E, GRECO P. Crystallization behaviour of poly(ethylene oxide) from poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethyleneoxide) blends: phase structuring, morphology and thermal behaviour[J]. *Polymer*, 1991, 32(9): 1647-1653.
- [16] BONG O, SENOG I. Compatibilizing capability of poly(β -hydroxybutyrate-co- β -caprolactone) in the blend of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) [J]. *Polymer Bulletin*, 1998, 41(12): 707-712.
- [17] MAEKAWA M, PEARCE R, MARCHESSAULT R, *et al.* Miscibility and tensile properties of poly(β -hydroxybutyrate)-cellulose propionate blends[J]. *Polymer*, 1999, 40(6): 1501-1505.
- [18] PIZZOLI M, SCANDOLA M, CECCORULLI G. Crystallization kinetics and morphology of poly(3-hydroxybutyrate)/cellulose ester blends[J]. *Macromolecules*, 1994, 27(17): 4755-4761.
- [19] WANG T, CHENG G, MA S, *et al.* Crystallization behavior, mechanical properties and environmental biodegradability of poly(β -hydroxybutyrate)/cellulose acetate butyrate blends [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2003, 89(8): 2116-2122.
- [20] 成国祥, 王铁柱. 一种聚(β -羟基丁酸酯)共混改性物的组合物及其制备方法 [P]. 中国专利号: 02129066.0, 2002.
- [21] 成国祥, 马世虎, 张立广, 等. 可降解的聚羟基丁酸酯三元共混物及其制备方法 [P]. 中国专利号: 02116351.0, 2002.
- [22] IKEJIMA T, INOUE Y. Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly(β -hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan [J]. *Carbohydrate Polymer*, 2000, 41: 351-356.
- [23] 王加宁, 杨合同, 马沛生. 聚 β -羟基丁酸的微生物降解性研究[J]. *天津大学学报*, 2002, 35(1): 95-97.
- [24] MANNA A. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by soil streptomycetes[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1999, 15: 705-709.
- [25] 陈珊, 刘东波, 夏红梅, 等. 一株可降解 β -羟基丁酸酯的真菌[J]. *菌物系统*, 2001, (3): 423-425.
- [26] 陈珊, 刘东波, 夏红梅, 等. 降解聚 β -羟基丁酸酯的真菌的研究 [J]. *东北师大学报自然科学版*, 2002, 34(3): 98-102.
- [27] 卫扬保. 微生物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1992. 130-145.
- [28] SAITO Y. Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates[J]. *RIKEN Review*, 1993, 3: 19-20.
- [29] ADAM G. Transcriptional analysis of *Ralstonia eutropha* genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68: 663-672.
- [30] 王述彬, 邢贞琦, 刘均洪. 用转基因植物生产生物可降解塑料的研究进展[J]. *化工科技市场*, 2005, (5): 32-35.