

微生物合成中链聚羟基烷酸酯研究进展

严群 李寅 陈坚* 堵国成

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036)

摘要 某些微生物细胞在特定营养限制的条件下会产生聚羟基烷酸酯作为碳源储备。和短链聚羟基烷酸酯 (PHB) 一样, 中链聚羟基烷酸酯由于具有更优良的性能、更高的附加值和更广泛的用途而受到人们的关注; 此外, 中链聚羟基烷酸酯还可以被人工合成为具有功能性侧链的半合成高聚物, 并因此能够具有更好的弹性和更理想的结晶性能等优点, 从而成为近年来对环境友好的生物可降解材料的研究重点。在能够合成中链聚羟基烷酸酯的微生物中, 食油假单胞菌是最典型, 也是研究得最多的一种。本文对由食油假单胞菌合成中链聚羟基烷酸酯的特点、代谢机制、发挥过程等内容进行了综述, 并提出了这一研究领域未来可能的研究方向。

关键词 中链聚羟基烷酸酯, 食油假单胞菌, 生物合成

中图分类号 Q936 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2001)05-0485-06

和哺乳动物细胞中的糖原以及植物细胞内的淀粉一样, 微生物细胞也会在其生长的特定时期在胞内合成具有相应功能的聚羟基烷酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHAs, 图 1), 作为体内的一种碳源储备^[1]。然而对 PHAs 研究的真正意义却在于它能够作为一种可降解材料来替代目前正对环境造成巨大污染的普通塑料, 以及作为生物医学工程材料^[2]。迄今为止, 已发现至少有 90 个属 (主要指细菌) 的微生物可以合成 PHAs, 其中最具代表性的是真氧产碱杆菌 (*Ralstonia eutropha*, 原 *Alcaligenes eutrophus*) 和食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*)。前者可以形成短链 PHAs (short-chain-length PHAs, scl-PHAs)^[3], 其中最具代表性的如 PHB (Polyhydroxybutyric acid); 而后者可以合成中链 PHAs (Medium-chain-length PHAs, mcl-PHAs)^[4]。PHB 的商业应用有两个主要的缺陷: 第一, PHB 的熔点不稳定, 因为它在约 200℃ 时会分解, 而这个温度与它的熔点相近。第二, PHB 在通常条件下, 存放几天后会变脆。与 scl-PHAs 相比, mcl-PHAs 是半晶体的弹性体, 熔点低, 抗拉伸强度低, 失效应变高, 可在电子束辐射后交联成为一种生物可降解橡胶; 并且, 许多 mcl-PHAs 可被定向合成为含有不同官能团如含烯基、支链烷基、卤族元素、苯基和腈

基等的人工 (non-natural) mcl-PHAs (表 1), 这些人工 mcl-PHAs 因可以具有更低的结晶度以及更高的玻璃化温度, 从而更具应用前景^[5,6] (表 2)。

1 微生物合成中链聚羟基烷酸酯概述

mcl-PHAs 主要由革兰氏阴性菌所合成, 其中主要为荧光假单胞菌类^[7]。在 *Pseudomonas* 属中, 可以合成中链或者长链 PHAs 的菌株主要为 *P. oleovorans*, 此外, 还包括恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 以及铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 等, 它们同属于 *Pseudomonas* 属 rRNA 同源组 I (rRNA homology group I)。其中 *P. putida* 在利用长链脂肪酸作为底物方面比 *P. oleovorans* 更为有效, 但长链脂肪酸的氧化过程本身效率较低; 而 *P. putida*、*P. aeruginosa* 还可以利用葡萄糖等简单底物直接合成 mcl-PHAs, 不过产率较低。Klinke 等则通过基因工程的手段, 采用重组的 *E. coli* 进行 mcl-PHAs 的生产, 这一途径的主要思路是: 在 *E. coli* 中导入 mcl-PHAs 合成基因以及其他相关基因, 并同时重组菌内的脂肪酸氧化途径阻断以大量合成 mcl-PHAs 生物合成所需前体, 这样就可以从脂肪酸甚至葡萄糖类底物中合成 mcl-PHAs^[8]。

由于 mcl-PHAs 的生物合成要在特定的营养限制条件下进行, 所以这种条件下微生物的生长速率和相应的生理、生化表现必然受到限制, mcl-PHAs 重组菌的出现或许可以解决这些问题。然而, mcl-PHAs 重组菌的遗传稳定性以及产量有待提高^[9]。

鉴于 *P. oleovorans* 是合成 mcl-PHAs 的最典型菌种, 下文即从 *P. oleovorans* 生物合成 mcl-PHAs 的特点、机制、生产过

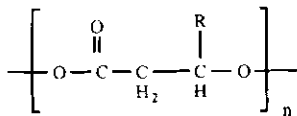


图 1 PHAs 的结构通式

Fig. 1 General structure of PHAs

scl-PHAs: carbon chain length of R varies from 0 to 2; mcl-PHAs: carbon chain length of R varies from 3 to 11

收稿日期: 2001-02-26, 修回日期: 2001-06-09。

* 通讯作者。 Tel and Fax: 86-510-5888301; E-mail: jchen@wxuli.edu.cn

表 1 发现于不同结构的 PHAs 中的单体

Table 1 Monomers found in different structured PHAs

3-hydroxy acid	3-hydroxy acids (unsaturated)	3-hydroxy acids (branched)	3-hydroxy acids (substituted sidechain)	Other than 3-hydroxy acids
propionic	2-butenic	2-methylbutyric	Cyclohexybutyric	4-hydroxybutyric
butyric	4-pentenoic	2-methylvaleric	5-phenylvaleric	4-hydroxyvaleric
valeric	4-hexenoic	2,6-dimethyl-5-heptenoic	7-fluoroheptanoic	4-hydroxyhexanoic
hexanoic	5-hexenoic	4-methyl-hexanoic	9-fluorononanoic	4-hydroxyheptanoic
heptanoic	6-heptenoic	5-methylhexanoic	6-chlorohexanoic	4-hydroxyvaleric
octanoic	6-octenoic	4-methyloctanoic	8-chlorohexanoic	5-hydroxyvaleric
nonanoic	7-octenoic	5-methyloctanoic	6-bromohexanoic	5-hydroxyhexanoic
decanoic	8-nonenoic	6-methyloctanoic	8-bromooctanoic	malic
undecanoic	9-decenoic	7-methyloctanoic	11-bromoundecanoic	
dodecanoic	10-undecenoic	6-methylnonanoic	7-cyanheptanoic	
tetradecanoic	6-dodecenoic	7-methylnonanoic	9-cyanonanoic	
hexadecanoic	5-tetradecenoic	8-methylnonanoic	12-hydroxydodecanoic	
	5,8-tetradecenoic	9-methylnonanoic	succinic methylester acid	
	5,8,11-tetradecenoic		adipic acid methylester	
	4-hexadecenoic		suberic acid ethylester	
	4,7-hexadecadienoic		pimelic acid propylester	
			sebacic acid benzylester	

表 2 PHAs 和聚丙烯的特性

Table 2 Properties of PHAs and polypropylene

Parameter	Value for ^a			
	P(3HB)	P(3HB-3HV)	P(3HO-3HH)	Polypropylene
$T_m / (^\circ\text{C})^b$	177	145	61	176
$T_g / (^\circ\text{C})^c$	2	-1	-36	-10
Crystallinity/%	70	56	30	60
Extension to break/%	5	50	300	400

^aP(3HB): poly(3-hydroxybutyrate);

P(3HB-3HV): poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) containing 20% 3HB;

P(3HO-3HH): poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyhexanoate) containing 11% 3HH;

^b T_m : Melting temperature; ^c T_g : Glass transition temperature

程等领域入手,对 mcl-PHAs 生物合成的研究进展进行综述,以期为国内同行开展相关课题的研究提供参考。

2 *P. oleovorans* 合成 mcl-PHAs 的特点

de Smet 等^[10]于 1983 年首次报道了 *P. oleovorans* ATCC 29347 以正辛烷作为碳源时,可以合成脂肪类内聚物聚 β -羟基辛酸酯 (poly- β -hydroxyoctanoate)。 *P. oleovorans* 的最主要特点是可以用来合成 mcl-PHAs 的底物非常广泛,包括碳链长度为 6 ~ 14 的链烷烃、链烷酸、链烯酸、链烷醇等(表 3)^[3,11,12],据不完全统计, *P. oleovorans* 已将至少 60 种以上的单体合成到 mcl-PHAs 中。 *P. oleovorans* 合成 mcl-PHAs 的另外一个显著特点是可以合成具有不同官能团的 mcl-PHAs,目前已有文献报道的这类官能团包括芳香类、烯烃类、酯类、卤

表 3 *P. oleovorans* 利用不同底物合成 mcl-PHAs 的比较

Table 3 Composition of PHAs accumulated by *P. oleovorans* from n-alkanes, alkanolic acids and n-alcohols

Carbon source	PHAs (% wt/wt)	3-Hydroxyacid monomers/(mol%)										
		C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂		
Alkane												
Hexane	2			83		12						5
Heptane	11.4		2.5		97.5							
Octane	25.3			11		89						
Nonane	24.3		2.3		40.6		55.7					
Decane	21.9			11.1		65.8		20.8				
Undecane	14.3				23		63					14
Dodecane	5.8			2		31		36				31
Alkanoate												
Hexanoate	5	3	<1	72		22						3
Heptanoate	22		7	<1	86		<1		7			
Octanoate	41		<1	1	6		75					17
Nonanoate	49			3	<1	20		5	72			
Decanoate	37		<1	1	7		44			47		<1
Alcohol												
Octanol	15			6		91						3
Nonanol	33					27		73				
Decanol	6							63				37

族类、腈基类等(见表 4)^[13-17]。与直接由 *P. oleovorans* 合成的 mcl-PHAs(natural PHAs)相比,含官能团的 PHAs(non-natural PHAs)可能具有更低的结晶度以及更高的玻璃化温度,如聚 3-羟基 5-苯基戊酸(poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate))的玻璃化温度高达 19 $^\circ\text{C}$,是目前有报道的来源于 *P. oleovorans* 的 mcl-PHAs 中最高的^[15]。

研究还发现,当 *P. oleovorans* 在以混合碳源为底物生长时,所合成的 mcl-PHAs 的单体中,来源于各自底物的单体与该底物在混合碳源中的比例呈正相关。

表 4 由 *P. oleovorans* 合成含不同官能团的 mcl-PHAs

Table 4 mcl-PHAs production by *P. oleovorans* grown on mixed substrates including different functional groups

Carbon source (mol: mol)	mcl-PHAs content (% , wt/wt)	mcl-PHAs with functional groups units/(mol/%)
NA ^a :PA ^b (1:2)	31.6	3-hydroxy-phenylvalerate, 41.6
6-MNA ^c : sodium butyrate(1:1)	13.2	methyl-3-hydroxy-6-methyl-nonanoate, 64
8BRUA ^d :NA(1:1)	13	Brominated units ^e , 25

^a n-nonanoic acid; ^b 5-phenylvalerate; ^c 6-methylnonanoic acid; ^d 8-bromo-octanoic acid; ^e 8-bromo-3-hydroxyoctanoate (BRHO) and 6-bromo-3-hydroxyhexanoate (BRHH)

3 *P. oleovorans* 合成 mcl-PHAs 的机制

由表 2 可以看出, *P. oleovorans* 合成的 mcl-PHAs 的单体往往跟其所能利用的碳源有一定的关系,单体的碳链长度等于或比底物少出或多出 2、4、6 个碳原子。这就意味着(1) *P. oleovorans* 合成 mcl-PHAs 时,产物往往与底物直接相关;(2) mcl-PHAs 的合成途径应该是微生物细胞内脂肪酸氧化途径的直接分支(如图 2 左侧)^[14,18]。其中值得注意的是,由于脂肪酸 β -氧化的中间物均是 S 构型,而所有 mcl-PHAs 中的单体均是 R 构型,所以对于这种合成 mcl-PHAs 的途径来说,一种差向异构酶的存在是必要的。这种途径有别于假单胞属其他微生物,如 *P. putida*、*P. aeruginosa* 等的从脂肪酸合成途径形成 mcl-PHAs 的途径,这种途径一般称做 *de novo* 脂肪酸合成途径(*de novo* fatty acid biosynthesis, 图 2 右侧),该途径的最大特点是,往往可以从不相关的底物(如葡萄糖等)合成 PHAs。

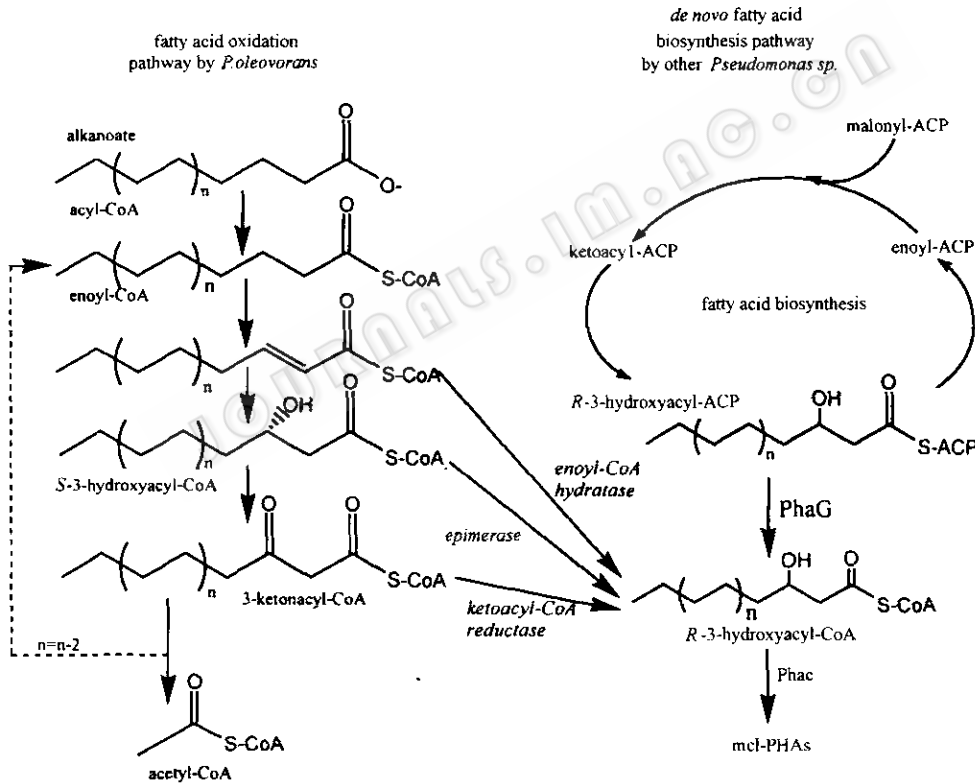


图 2 *Pseudomonas* 属合成 mcl-PHAs 的途径^[9]

Fig. 2 Biosynthetic pathway of mcl-PHAs by *Pseudomonas*^[9]

P. oleovorans 用于合成 mcl-PHAs 的基因主要包括 *phaC1*、*phaC2*、*phaZ*, 这 3 种基因分别形成开放阅读框架 (Opening reading frame, ORF) ORF1、ORF2、ORF3, 并分别编码 2 种 mcl-PHAs 聚合酶以及 1 种 mcl-PHAs 解聚酶, 近来的研究表明, 参与 mcl-PHAs 合成的基因其实还包括含有 ORF4 中的 *phaD*, 这种基因也跟 mcl-PHAs 的合成有关。因为 *phaD* 缺失的 *P. oleovorans* 突变株合成 mcl-PHAs 的能力明显下降。另外还有 2 种与 mcl-PHAs 合成有关的基因: *phaF*、*phaI*, 这 2 种基

因编码 mcl-PHAs 颗粒的结合蛋白 (Granule-associated protein, GAP, phasin) *PhaF* 以及 *PhaI*, *PhaF* 还是 *phaC1* 表达的负调节因子(图 3)^[19]。Solaiman 等已经发现了一种快速有效的检测 mcl-PHAs 合成酶基因的方法^[20]。

由 *phaC1*、*phaC2* 编码的 2 种 mcl-PHAs 聚合酶 C1 和聚合酶 C2, 分子量分别为 62.4 kD 和 64.5 kD, 等电点分别为 6.53 和 9.55。这 2 种聚合酶中 184-234 氨基酸序列的相似性为 75.9%, 而 337~492 氨基酸序列的相似性为 73.5%, 并且这 2

段氨基酸序列与 *R. eutroph* 中的 PHB 聚合酶的相似程度为 57.4% 和 60.0%，这种相似性应该与聚合酶的催化活性有关^[21]。这两种聚合酶虽然都可以单独催化 mcl-PHAs 的合成，但研究表明，两种酶对不同底物有不同的亲和性，比如 mcl-PHAs 聚合酶 C1 将六碳单体整合到 mcl-PHAs 中的能力是 mcl-PHAs 聚合酶 C2 的 2 倍^[22]。mcl-PHAs 聚合酶的存在形式通常为附着在具有 mcl-PHAs 疏水核心的 mcl-PHAs 颗粒上，外面被脂类单层膜或双层膜所覆盖，当微生物进行 mcl-PHAs 合成时，聚合酶和 mcl-PHAs 颗粒之间的相互作用对其活性有很大的影响，表现为附着在 mcl-PHAs 颗粒上的聚合酶的活性要比单独存在的聚合酶活性高得多。这种现象的出现可能是因为颗粒的存在有利于聚合酶活性中心构象的展开^[23]。

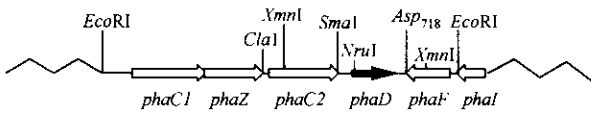


图 3 *P. oleovorans* 的 mcl-PHAs 合成基因^[19]

Fig. 3 *Pha* loci for mcl-PHAs formation in *P. oleovorans*^[19]

目前对于 mcl-PHAs 解聚酶的研究较少，从 ORF3 表达产物中分离得到的是一种十肽，这是一种脂肪酶^[24]。事实上，mcl-PHAs 聚合酶、解聚酶、GAP 与 mcl-PHAs 颗粒之间的作用力是很强的，要借助于表面活性剂才能将它们分开^[25]。并且对 PHB 合成的研究表明，解聚酶往往跟合成酶是同时工作的。不过目前尚不清楚在 mcl-PHAs 的合成过程中是否存在上述机制，有的实验室曾尝试通过缺失或突变 mcl-PHAs 解聚酶基因的方法以提高 mcl-PHAs 的胞内产量^[9]。

研究表明，mcl-PHAs 在微生物胞内的积累量除了与底物浓度有关外，还跟胞内酶的浓度有关。

4 mcl-PHAs 的发酵与生产

鉴于微生物合成 PHAs 是为了适应营养要素缺乏的生长环境，所以利用 *P. oleovorans* 生产 mcl-PHAs 也应在限制某种营养因子时进行。研究表明，在限氮以及限磷的情况下 mcl-PHAs 的积累分别可达到细胞干重的 31% 和 19%^[26]。但是在 *P. oleovorans* 在生长过程中限制氧、铁、镁等营养要素供给却导致 mcl-PHAs 生成量的下降，因为，铁、镁对于烷烃羟化酶的活性很有帮助；而氧是作为 mcl-PHAs 中的一种组分而存在。事实上，在限制其它营养要素的前提下，提高氧的传递速率，不仅可以提高细胞浓度，还有利于较大幅度地提高 mcl-PHAs 的产量^[26]。当然，也有报道指出，对氧的限制可以促使细胞合成 mcl-PHAs^[27]。所以，*P. oleovorans* 在合成 mcl-PHAs 的过程中对氧的需求可能有一个分阶段的需求过程：在合成的前期限制氧，而在合成的后期大量供氧。

P. oleovorans 发酵生产 mcl-PHAs 时，不能利用简单底物（如葡萄糖）进行 mcl-PHAs 的合成，而只能采用六碳以上的底物，其中最佳的底物是八碳碳源（主要指辛烷、辛酸及其衍生物类），所以这可能是造成 mcl-PHAs 生产成本较高的原因之一^[27]。最近有研究者转向采用较廉价的底物如牛油、油酸

盐或者棕榈核仁油，不过，由这些原料生产出的 PHAs 的缺点是结晶性能不太理想^[28,29]。另外，由于 *P. aeruginosa* 具有直接利用葡萄糖合成 mcl-PHAs 的能力，有研究者尝试将该菌的 PHAs 聚合酶基因引入 *P. oleovorans* ATCC 29347、DSM 1045，以期这 2 株菌获得直接从葡萄糖合成 mcl-PHAs 的能力，但是均未能成功。这可能是因为 *P. oleovorans* ATCC 29347 缺乏一种可以转化 *de novo* 脂肪酸合成途径中间物的酶；而 *P. oleovorans* DSM 1045 虽具有上述酶，却不具有 mcl-PHAs 合成酶^[30]。最近 Friedrich 等将 β -酮酰解酶基因以及 α -乙酰辅酶 A 还原酶基因导入 mcl-PHAs 聚合酶 C1，从而使这种酶具有了所谓“双特异性”（Bispecific），即既可利用 C_5 - C_6 ，又可利用 C_6 - C_{14} （烷烃及其衍生物）^[31]，从而有望解决 *P. oleovorans* 不能直接从葡萄糖合成 mcl-PHAs 的难题。

和其它胞内发酵产品一样，可通过提高胞内目标产物的含量以及提高细胞浓度这两个手段来提高发酵 mcl-PHAs 的经济效益。在分批发酵状态下，胞内 mcl-PHAs 的积累可以达到 37%^[11]；而在恒化状态下，如同时限制碳源和氮源的浓度，可以对生物量的浓度和细胞组分进行很好的控制。Preusting 等发现，在 *P. oleovorans* 发酵过程中，当以辛烷作为唯一的碳源和能源，并对铵（ NH_4Cl ）的浓度进行限制时，这种双液相恒化培养可以维持 200 ~ 300 h，并且整个过程中细胞保持存活（存在积累 mcl-PHAs 的能力）。胞内 mcl-PHAs 的浓度随细胞生长速率而变化，如当稀释率从 $0.09\ h^{-1}$ 上升到 $0.46\ h^{-1}$ 时，mcl-PHAs 占细胞的干重从 40% 跌至 8%，而当稀释率为 $0.20\ h^{-1}$ 时，mcl-PHAs 的生产率为 $0.17\ g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ，此时达到最大。在这种条件下，当搅拌转速从 1000 r/min 提高到 1800 r/min，空气流量从 200 mL/min 提高到 550 mL/min 时，mcl-PHAs 的生产率甚至可以达到 $0.58\ g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ^[32]。Hazenber 等在此基础上，通过改变培养基组分、改进反应器的搅拌性能，可将 mcl-PHAs 的生产率从 $0.58\ g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ 进一步提高到 $0.74\ g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ 。他们还研究了在两相系统中辛烷对传质的影响，他们发现，提高辛烷的浓度将使得生物量浓度降低^[26]。Duner 等对双营养限制（碳、氮）（dual nutrient limits）以及限氮条件下 *P. oleovorans* 发酵辛烷生产 mcl-PHAs 分别进行了研究（图 4）。在发酵过程中，底物中的 NH_4Cl 保持不变，也就是 N_0 保持不变，而通过改变碳源的流加速度以改变稀释率和 C_0/N_0 。他们发现，在双重限制区内，胞内 mcl-PHAs 的积累保持增长。在不同的稀释率下，胞内 mcl-PHAs 的积累却随稀释率的增大而减少，比如从稀释率为 $0.1\ h^{-1}$ 时的 56% 减少到稀释率为 $0.4\ h^{-1}$ 时的 21%。但在此过程中，mcl-PHAs 中各单体的比例却始终保持稳定，3-羟基己酸与 3-羟基辛酸的摩尔比始终为 12:88。提出这种模型的意义还在于可以确定最佳生长条件，由于双重营养限制区之后是限氮区，而在限氮区内 mcl-PHAs 将不再增加，而是保持在双重限制区的最高值。因此，双重限制区的宽度将直接决定胞内 mcl-PHAs 量的多少，而双重限制区的宽度又是由稀释率决定的（图 4）^[33]。

造成 mcl-PHAs 生产成本较高的另外一个原因是，与 PHB

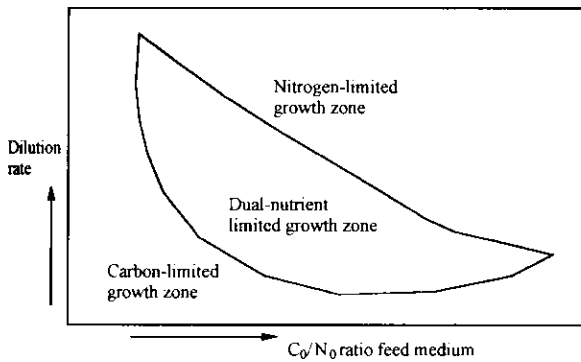


图4 *P. oleovorans* 在单重以及双重营养要素限制条件下的生长示意图

Fig.4 Illustration of *P. oleovorans* growth under single- or dual-nutrient limited growth conditions

相比, mcl-PHAs 在胞内的积累量较少(两者最高相差 80%), 从而造成提取费用的增加^[34]。最近有研究者提出, 对 mcl-PHAs 发酵液采用聚合物絮凝剂代替传统的硫酸铝、硫酸铁絮凝剂进行预处理的方法, 这种方法可以明显地提高细胞的收率^[35]。

5 结束语

在过去 5 年中, 利用细菌生产 PHB 和 PHBV 是 PHAs 生物合成领域的热点, 文献[36]已对此进行了综述。PHB 的生产成本和性能等方面还存在不少问题, 到目前为止还难以大规模应用。在这种情况下, 研究由微生物合成性能更优良、附加值更高、用途更为广泛的 mcl-PHAs 无疑具有十分重要的意义。在此研究过程中, 应该还有很多工作要做, 主要可以展开的方面包括:

1. 采用长链脂肪酸类及其衍生物类廉价底物, 或直接从葡萄糖等不相关底物合成 mcl-PHAs;
2. 合成由多种单体聚合而成的 mcl-PHAs 以提高其性能;
3. 合成含芳香基团或其他官能团的 mcl-PHAs。由于官能团在 mcl-PHAs 的侧链上的出现, 其实质是通过增大聚合物的空间位阻从而改变其性能, 所以找到一种或多种有效增大空间位阻的侧链结构是十分有意义的;
4. 从研究 mcl-PHAs 合成机制以及发酵条件出发, 探讨提高其胞内含量的可能性。比如可以从聚合酶的合成能力、聚合酶与解聚酶的作用关系等方面入手;
5. 改进 mcl-PHAs 回收工艺中的部分工序。比如用絮凝剂吸附发酵液中细胞部分以及采用生物方法破细胞壁等。

REFERENCES(参考文献)

[1] Madison L L, Huisman G W. Metabolic engineering of poly(3-Hydroxyalkanoates): from DNA to plastics. *Microbiol Mol Bio Rev*, 1999, **63**: 21 ~ 53

[2] CHEN J(陈坚). Environmental biotechnology(环境生物技术). China Light Industry Press(中国轻工业出版社), pp. 351 ~ 356

[3] Anderson A J, Dawes E A. Occurrence, metabolism role, and indus-

trial uses of bacterial polyhydroalkanoates. *Microbiol Rev*, 1990, **54**: 450 ~ 472

- [4] Brandl, Gross R A, Lenz R W *et al.* Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and Other fluorescent *Pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 1977 ~ 1982
- [5] Doi Y. Microbial polyesters. VCH publishers, 1990
- [6] LIN S A(林尚安), LU Y(陈耘), LIANG Z X(梁兆熙). *Macromolecular chemistry*(高分子化学). Science Press(科学出版社), 1982, pp. 19 ~ 118
- [7] Timm A, Steibuchel A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 3360 ~ 3367
- [8] Klinke S, Ren Q, Witholt B *et al.* Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 540 ~ 548
- [9] Witholt B, Kessler Birgit. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin Biotech*, 1999, **10**: 279 ~ 285
- [10] de Smet M J, Eggink G, Witholt B *et al.* Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J Bacteriol*, 1983, **154**: 870 ~ 878
- [11] Preusting H, Nijenhuis A, Witholt B. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 1990, **23**: 4220 ~ 4224
- [12] Liebergesell M, Sonomoto K, Madkour M *et al.* Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. *Eur J Biochem*, 1994, **226**: 71 ~ 80
- [13] Kim Y B, Lenz R W, Fuller R C. Preparation and characterization of poly(β -hydroxyalkanoates) obtained from *Pseudomonas oleovorans* growth with mixture of 5-phenylvaleric acid and n-alkanoic acids. *Macromolecules*, 1991, **24**: 5256 ~ 5260
- [14] Kim Y B, Lenz R W, Fuller R C. Poly(β -hydroxyalkanoate) copolymers containing brominated repeating units produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 1992, **25**: 1852 ~ 1857
- [15] Hazer B, Lenz R W. Biosynthesis of methyl-branched poly(β -hydroxyalkanoate) by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 1994, **27**: 45 ~ 49
- [16] Curley J M, Hazer B, Lenz R W *et al.* Production of poly(3-hydroxyalkanoates) containing aromatic substituents by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 1996, **29**: 1762 ~ 1766
- [17] Steinbuchel A, Wiese S A. *Pseudomonas* strain accumulating polyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **37**: 691 ~ 697
- [18] Duner R A. Feast and Starvation: Accumulation of bioplastic in *Pseudomonas oleovorans*. Diss. No. 12591, ETH, Zurich, Switzerland, 1998, pp. 18 ~ 19
- [19] Klinke S, de Roo G, Witholt B *et al.* Role of *phaD* in accumulation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas*

- oleovorans*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**:3705 ~ 3710
- [20] Solaiman D K, Ashby R D, Foglia T A *et al*. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **53**:690 ~ 694
- [21] Huisman G W, Wonink E, Meima R *et al*. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates)(PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. *J Bio Chem*, 1991, **266**:2191 ~ 2198
- [22] Huisman G W, Wonink E, de Koning G *et al*. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **38**:1 ~ 5
- [23] Steibuchel A, Valentin H E. Diversity bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **128**:219 ~ 228
- [24] Pearson W R, Lipman D J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, **85**:2444 ~ 2448
- [25] Kraak M J, Kessler B, Witholt B. In vitro activitie of granule-bound poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] polymers C1 of *Pseudomonas oleovorans*. *Eur J Biochem*, 1997, **250**:432 ~ 439
- [26] Hazenberg W, Witholt B. Efficient production of midium-chain-length poly(3-hydroalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans*: economic consideration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**:588 ~ 596
- [27] Scholz C, Fuller R C, Lenz R W. Production of poly(beta-hydroxyalkanoates) with beta-substituents containing terminal ester groups by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromol Chem Physics*, 1994, **195**:1405 ~ 1421
- [28] Tan I K, P K S, Kumar M *et al*. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**:207 ~ 211
- [29] Cromwick A M, Fogilia T, Lenz R W. The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**:464 ~ 469
- [30] Timm A, Steinbuchel A *et al*. Cloning and Molecular analysis of poly(3-hydroxyalknaoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Biochem*, 1992, **209**:15 ~ 30
- [31] U S patent No.6143952, Nov. 7th, 2000
- [32] Preusting H, Hazenberg W, Witholt B. Cotinuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid-phase chemostat. *Enzyme Microb Technol*, 1993, **15**:311 ~ 316
- [33] Duner R, Witholt B, Egil T. Accumulation of poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas* during growth with octanoate in continous culture at different dilution rates. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**:3408 ~ 3414
- [34] Lee S Y *et al*. Comparison of recombinant *Escherichia coli* strain for synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**:1337 ~ 1347
- [35] Cho K-S, Ryu H W, Lee G E *et al*. Separation of *Alcaligenes eutrophus* cells containing poly(3-hydroxybutyrate) from fermentation broth with pretreatment using Al- and Fe-Based coagulants. *Biotechnol Prog*, 2000, **16**:238 ~ 243
- [36] CHEN J(陈坚), DU G C(堵国成), LI Y(李寅). The research actuality and future development of biodegradable plastics (polyhydroxyalkanoates, PHAs) synthesized by bacteria. *Bulletin of National Science Foundation of China(中国科学基金)*, 1999, **13**(2): 76 ~ 79

Progress on the Biosynthesis of Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates by Microorganisms

YAN Qun LI Yin CHEN Jian* DU Guo-Cheng

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a class of polyesters produced as reserve materials by a large number of microorganisms under metabolic stress. The most fascinating feature of PHAs is its degradability, and which is supposed to take place of the traditional plastics made from petroleum in the future. PHAs are divided into two classes: short-chain-length PHAs (scl-PHAs) and medium-chain-length PHAs. mcl-PHAs is more welcome owing to its more wide crystallinity and higher extension to break than scl-PHAs, especially when some kind of new functional groups were incorporated into the side chain of the polyester. Since *Pseudomonas oleovorans* is the most typical microorganism to produce mcl-PHAs, here the author summarized how *P. oleovorans* synthesize the mcl-PHAs and the production of mcl-PHAs by fermentation and give some of the idea about the future research of this field.

Key words medium-chain-length PHAs, *Pseudomonas oleovorans*, biosynthesis

Received: February 26, 2001

* Corresponding author. Tel(Fax): 86-510-5888301; E-mail: jchen@wxuli.edu.cn