

聚乳酸(PLA)生物降解的研究进展

李凡, 王莎, 刘巍峰*, 陈冠军*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要: 聚乳酸(Polylactic Acid, PLA) 是一种新兴的, 由可再生资源——乳酸聚合而成的高分子聚酯。因为其具有优良的物理化学性能、生物相容性及生物可降解性, 且对环境及人体无毒害作用, 而被认为是一种最具潜力的绿色生物塑料。作为环境友好材料, 聚乳酸日益受到人们的重视。基于可循环利用的考虑, 其生物降解的研究也成为当前研究的一个重要方面。本文综述了 PLA 生物降解领域的相关进展, 包括降解的微生物学、相关酶学及分子生物学, 系统阐述了 PLA 可能的生物降解机制, 并对生物系统处理 PLA 废弃物的可行性进行了探讨。

关键词: 聚乳酸(PLA); 微生物降解; 酶; 降解机制; 生物处理系统

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0262-07

塑料作为材料产业的一大支柱, 已经成为社会生活不可或缺的一部分, 但伴随着其应用, 普通塑料也成为当今世界白色污染的罪魁祸首。随着人们对环境问题的日益重视, 生物可降解塑料逐步受到青睐。目前开发的生物可降解塑料主要是聚酯类, 包括聚羟基丁酸酯 (PHB), 聚琥珀酸丁酸酯 (PBS), 聚己内酯 (PCL), 聚乳酸 (PLA) 等, 这些聚酯的优势主要体现在其生物可降解性和可再生性; 而且, 天然的或经过改性的聚酯具有和传统塑料相当甚至更优的机械性能和物理化学性能, 能够满足人们社会生活的需求, 其中聚乳酸以其优良的物理化学性能和潜在的成本优势尤受人们的关注^[1]。在可降解聚酯开发初期, PHB 存在脆性高, 透明度和机械性能较差等问题, 而 PBS 和 PCL 熔点低, 物化性能及加工特性尚需改进, 并且这些聚酯不论是生物合成还是化学合成都存在高成本生产的问题。近年来, 虽然各国科研工作者在此领域进行了大量研究, 相继取得了一些专利成果, 但 PHB、PBS 和 PCL 仍只限于小规模生产, 在医疗卫生、高档化妆品及高附加值产品包装中试用。而

PLA 除了生物可降解性能外, 它还具有许多其它的优良性能, 如较好的机械性能、热塑性、生物相容性及产物安全性, 成膜后高透明度, 纤维的高拉伸强度和易于加工的特性等^[1, 2], 加上其相对于其它材料的成本优势率先实现了大规模的产业化生产。美国 CargillDow 公司在 2001 年已形成年产 14 万吨的规模, 计划在 09 年总能力达到 45 万吨/年; 日本岛津、丰田等公司也实现了年产上万吨的生产规模, 而我国目前以浙江海正集团规模最大, 已具有年产万吨的生产能力。PLA 已经被成功地应用于医疗、纺织和包装等产业^[2-5]。因此, PLA 被认为是最具潜力的替代现有塑料的新型“生态材料”^[6]之一。聚乳酸结构组成如图 1 所示。

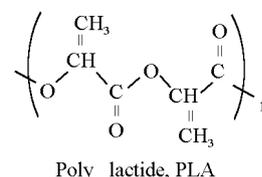


图 1 聚乳酸结构图

Fig. 1 structure of Poly lactide (PLA).

基金项目: 国家自然科学基金 (30570013); 山东省自然科学基金 (2005ZRB01141)

*通讯作者: Tel: +86-531-88364324; E-mail: weifliu@sdu.edu.cn; guanjun@sdu.edu.cn

作者简介: 李凡(1980-), 女, 吉林白山人, 博士研究生, 研究方向为资源微生物及微生物生理生化。E-mail: lifan0302@163.com

收稿日期: 2007-05-22; 修回日期: 2007-10-15

虽然 PLA 在性能和生产应用上与其它聚酯相比具有明显的优势,但其生物降解的研究却相对滞后。与 PHB、PBS 及 PCL 等其它聚合物相比,PLA 在自然界中的降解过程比较缓慢,目前发现的降解微生物和高效降解酶有一定的特殊性^[7],这也限制了针对 PLA 废弃物处理回收系统的开发,而没有成功的回收系统将无法实现 PLA 生产的物料循环。作为生物可降解塑料,其材料的降解性能是评价其应用潜力的因素之一,目前各种聚酯的降解研究都处于不完善的阶段,生命周期的评价及降解机理的研究尚不清楚。因此,如何实现此类聚酯材料的快速可控降解是其广泛应用的前提之一,只有强化包括 PLA 在内的可降解塑料的快速降解性和完全降解性机理的研究,才能够真正实现其环境友好化^[8]。

近年来,人们逐渐认识到 PLA 生物降解的重要性,在相关研究领域取得了一些进展。本文将从 PLA 降解的微生物学、酶学及分子生物学等角度对 PLA 生物降解的研究进展进行综述;并在此基础上,对 PLA 可能的生物降解机制及建立相关的废弃物处理循环系统进行探讨。

1 PLA 降解微生物及降解酶

已有研究表明,自然界中目前已知的能够降解聚乳酸的微生物十分有限。Nishida 和 Pranamuda 等人通过平板透明圈计数法,对不同土壤环境中能够降解聚酯的微生物情况进行了评价。结果显示,自然界中降解 PHB (聚- β -羟基丁酸酯)、PCL 和 PTMS (聚四亚甲基琥珀酸酯)的微生物数量是基本相似的,大约都在 0.8%~11%,这可能与这些聚酯材料的酯键极易被相关脂肪酶水解有关;而降解 PLA 的微生物数量则不到 0.04%^[7, 9, 10]。土壤掩埋的对照实验也显示,PLA 在土壤中的降解速度相对比较缓慢,一般需要几年时间。1997 年,Pranamuda 筛选到了一株能够高效降解 PLA 的菌株——*Amycolatopsis* HT-32^[7],该菌经过 14 天的液体培养,可使 60%的 PLA 薄膜发生降解,这也是关于 PLA 降解菌株的首次报道。

目前,人们通过土壤和菌种库筛选,已经分离到了大约几十种能够降解 PLA 的菌株,其中大部分降解菌都属于放线菌,例如 *Amycolatopsis* 属菌株^[11-13], *Kibdelosporangium aridum*^[14]和 *Saccharothrix waywayandensis*^[15]等。通过对菌种库 41 个属的 105 株放线菌进行检测,并结合 16S rRNA 序列分析,人们发现 PLA 降解菌在系统发生上属于 *Pseudonocardia* 家族以及其相关

属,包括 *Amycolatopsis*, *Lentzea*, *Kibdelosporangium*, *Streptoalloteichus* 和 *Saccharothrix*^[16]。据此,人们推测 *Pseudonocardia* 家族及其相关属可能在自然界的 PLA 降解中起着重要作用。此外,还发现并分离到少数能够降解 PLA 的细菌^[17-19],以及一株具降解活力的真菌——*Tritirachium album*^[20]。已有的研究结果显示,上述微生物的 PLA 降解能力与它们可以分泌产生某类特殊的蛋白酶相关,这与 PHB、PCL 和 PTMS 的降解酶多为脂肪酶明显不同,从而暗示了它们生物降解机制的差异。同时,研究还发现大多数 PLA 降解菌株能够吸收 PLA 的降解产物——乳酸,但也有少数菌株并不能吸收乳酸,因此会在培养基中造成产物的积累^[21]。

1981 年,Williams^[22]首次报道了来源于 *Tritirachium album* 的蛋白酶 K 对聚乳酸具有降解作用。此后,蛋白酶 K 一直作为一种公认的 PLA 降解酶用来研究 PLA 及其混合物的降解特性。受蛋白酶 K 对 PLA 降解作用的启发,Oda 等^[23]对 56 种商业蛋白酶进行了检测,结果发现酸性和中性蛋白酶基本上都不能降解 PLA,而一些碱性的丝氨酸蛋白酶则对 PLA 有降解作用,并且这些酶都能够降解角蛋白,但并非所有能够降解角蛋白的酶都能够降解 PLA。这种结果显示 PLA 和角蛋白的酶解存在一定的相关性,但又存在着一定的差别。不同丝氨酸蛋白酶酶解各种聚酯的结果显示,蛋白酶 K、枯草杆菌蛋白酶、 α -胰凝乳蛋白酶以及弹性蛋白酶等都具有降解 PLA 的能力,丝氨酸蛋白酶抑制剂能够强烈抑制这些蛋白酶的 PLA 降解活性^[24]。因此,可以推测这些酶对 PLA 的降解机制可能与蛋白质的降解机制有密切的相关性。但这些酶的降解作用十分微弱,我们推测它们对 PLA 的降解活性是对浓度高度依赖的,即只有在高浓度下酶才对 PLA 有降解活性,这也就解释了为什么这些酶可以降解 PLA,但其产生菌株却检测不到降解能力,而造成这种浓度依赖的原因可能与酶和底物的结合能力有关。

PLA 属于脂肪族聚酯,因此从理论上讲,脂肪酶应该对 PLA 具有降解作用。但对 18 种商业脂肪酶的研究结果却表明,虽然大部分脂肪酶对 PCL, PBS 等都呈现较好的活性,但只有一种来源于 *Alcaligenes* sp. 的脂肪酶在 55 pH8.5 的条件下,经过 20d 可以实现对 PLA 的完全降解^[25]。推测这种酶的降解作用是以 PLA 在高温和高 pH 条件下的水解为基础,即脂肪酶只对水解的中间产物——乳酸寡聚物起降解作

用。也就是说,虽然脂肪酶能够降解各种低 T_m 、无手性碳原子且在酯键和酯键之间具有大量亚甲基基团的无定型聚合物,但不能水解具有典型手性碳的聚酯例如 PHB 和 PLA^[26]。2003 年, Akutsu-Shigeno 等^[27] 采用分子生物学的方法进行功能筛选时,克隆了 *Paenibacillus amylolyticus* TB-13 的一个 PLA 降解酶基因,并在 *E.coli* 中实现了功能性表达。研究发现该降解酶的氨基酸序列与细菌脂肪酶的同源性不到 45%~50%,但具有脂肪酶保守性五肽。系统发生分析显示虽然该基因与细菌脂肪酶家族 family I-4 具有序列相似性,但与该家族中其它酶同源性不高,因此成为一个独立分支。此外它的许多功能特性与典型的 family I-4 脂肪酶有明显不同,其作用底物范围较宽,对脂肪酶底物和许多生物聚酯都有降解作用。

随着高效 PLA 降解菌株的发现,PLA 降解酶的研究也取得了很大的进展。Nakamura 等从 *Amycolatopsis* strain K104-1^[28] 中纯化到了一个 PLA 降解酶组分^[11],分子量为 24 kDa,酶反应的最适温度和 pH 分别为 55°C~60°C 和 pH9.5。除了对 PLA 具有酶解作用以外,该酶对酪蛋白和纤维蛋白都有降解作用。同年,Pranamuda 等也报道了从 *Amycolatopsis* strain-41 分离获得了一个 PLA 降解酶组分,其分子量为 40 kDa,反应的最适温度和 pH 分别为 37°C~45°C 和 pH 6,对酪蛋白和纤维蛋白也有降解作用。从底物特异性上分析,上述两种降解酶可

能属于蛋白酶家族,但其精确的作用机制仍不清楚。此外 Maeda 等从 *Aspergillus oryzae* 菌株的发酵液中分离到了一分子量为 21.6kDa 的 PBS 降解酶,经氨基酸序列比对推断是一种角质酶,底物特异性分析显示该酶对 PLA 也有一定的降解作用^[6]。Masaki 等也报道了来源于酵母 *Cryptococcus* sp. Strain S-2 的一种类似于角质酶的降解酶 CLE 对 PLA 等聚酯都有相对高效的降解作用^[29]。

本实验室近年来从事 PLA 生物降解的相关研究,获得了降解菌株 *Amycolatopsis orientalis*, 并且对其产生的 PLA 降解酶进行了分离纯化,获得了 3 个降解酶组分,分子量分别为 24 kDa、19.5 kDa 和 18 kDa,其最适酶反应温度分别为 60°C, 55°C 和 60°C。这 3 种组分均显示丝氨酸蛋白酶活性,其中一种组分还具有酯酶活性。N 端测序和 MAIDI-TOF 质谱结果显示第 3 个酶组分属于丝氨酸蛋白酶家族,另外两个组分却没有发现相似蛋白,可能是一类新的降解酶。与蛋白酶 K 相比,这些酶组分都能够相对高效地降解 PLA,但其相应的蛋白酶活性却要比蛋白酶 K 低很多,从而表明我们所分离到的降解酶虽然可能归属于蛋白酶类,但其降解机制却与蛋白酶家族降解蛋白的机制具有明显差异。所有这些新型降解酶的发现无疑为 PLA 降解酶的研究以及降解机制的阐明提供了新的信息。表 1 总结了近年来发现的 PLA 降解菌株及其产生的降解酶的相关信息。

表 1 典型的 PLA 降解微生物及其降解酶
Table 1 Typical PLA-degrading microbes and their PLA-degrading enzymes

Strain	Enzyme	Substrate specificity	Reference
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain HT 32		L-PLA	Pranamuda et al. (1997) [7]
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain 3118		L-PLA	Ikura et al. (1999) [12]
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain 41	Protease	L-PLA, silk powder, casein, Suc-(Ala) ₃ -pNA	Pranamuda et al. (2001) [28]
<i>Amycolatopsis</i> sp. strain K104-1	Protease	L-PLA, casein, fibrin	Nakamura et al. (2001) [11]
<i>Saccharothrix waywayandensis</i>	Protease	L-PLA	Jarerat et al. (2003) [15]
<i>Kibdelosporangium aridum</i>	Protease	L-PLA	Jarerat et al. (2003) [14]
<i>Bacillus brevis</i>		L-PLA	Tomita et al. (1999) [19]
<i>Bacillus sinithii</i> strain PL 21	Lipase	L-PLA, pNP-fatty acid esters	Sakai et al. (2001) [17]
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> strain TB-13	Lipase	DL-PLA, PBS, PBSA, PES, PCL, triolein, tributyrin	Shigeno et al. (2003) [27]
<i>Tritirachium album</i> ATCC 22563	Protease	L-PLA, silk fibroin, elastin	Jarerat et al. (2001) [20]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Cutinase	PLA, PBS, PBSA	Maeda et al. (2005) [6]
<i>Cryptococcus</i> sp. strain S-2	Cutinase-like enzyme (CLE)	L-PLA, PBS, PCL, PHB	Masaki et al. (2005) [29]

2 PLA 生物降解机制的研究

PLA 是乳酸单体之间通过酯键连接的,其降解应该是以酯键的断裂为基础。但研究结果发现,大部

分脂肪酶对 PLA 没有降解作用。来源于 *Paenibacillus amylolyticus* strain TB-13 的降解酶 PlaA 是目前分离到的,唯一对 PLA 具有降解作用的脂肪酶^[27]。进一步的研究结果表明,PlaA 与传统的脂肪酶在功能

特性上存在一定的差异。传统脂肪酶 *B. subtilis* LipA 的三维结构已经被解析^[30], 其中催化三联体被确定为 Ser77, Asp133 和 His156; 同时, 晶体结构也显示出 Ile12 和 Met78 形成了一个氧负离子空洞, 这对于丝氨酸水解酶的激活是必须的。但在 PlaA 中, Ile 被 Leu 代替, 其周围的许多氨基酸也都发生了变化^[27]。究竟 PlaA 是怎样被激活并发挥作用的目前还不清楚, 而且由于空间结构没有被解析, 其如何识别 PLA 并发生吸附作用也都不清楚。我们推测, PlaA 与传统脂肪酶结构上的差异是其对 PLA 发生降解的关键。

最近, Matsuda 等获得了 *Amycolatopsis* strain-K104-1 编码 PLA 降解酶的基因 *pld*, 并进行了表达^[31]。全基因的表达包括 26 个氨基酸的信号肽和 9 个氨

基酸的前导序列, 前导序列和信号肽切除后, 产生 20, 904 Da 的成熟酶, 其中前导序列的切除是自催化的。成熟的 PLD 显示出与真核生物丝氨酸蛋白酶 45% 的相似性, 而且它具备丝氨酸蛋白酶编码催化三联体的保守序列, 结合其它的保守性分析, 推测这种酶属于丝氨酸蛋白酶的胰凝乳蛋白酶家族。正是由于许多 PLA 的降解菌株同时也能降解蚕丝蛋白等蛋白质^[11], 分离纯化到的 PLA 降解酶也都被推测属于蛋白酶家族^[11, 27], 因此, PLA 降解酶越来越倾向于被认为是一种蛋白酶类, 并推测这些菌株或酶可能识别 PLA 的重复 L-乳酸单元, 视其为丝纤蛋白主要成分 L-Ala 单元的类似物而因此发生催化降解。Jarerat 等^[32]研究了各种氨基酸、多肽等蛋白类物质对 PLA 降解酶的诱导作用, 对它的产生及降解模式作了推测 (图 2)。

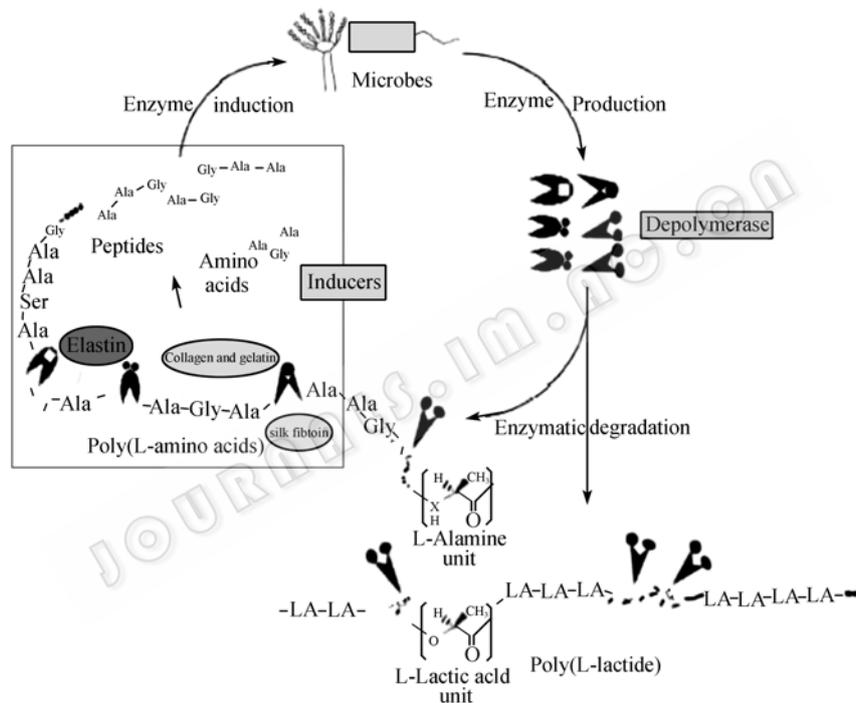


图 2 推测的 PLA 降解酶(蛋白酶类)的诱导, 产生及降解作用示意图^[32]

Fig. 2 Scheme of induction, production and enzymatic degradation of PLA-degrading enzyme. In the presence of inducers, the production of microbial depolymerase (PLA-degrading enzyme and other proteases) is induced. PLA-degrading enzyme (♣) is able to degrade both PLA and protein substrates, but proteases (♣) degrade only the protein substrates. Finally, the degradation products of proteins by both enzymes, e.g., amino acids and peptides, induced the production of microbial depolymerase enzymes.

从催化机制上讲, 人们推测 PLA 降解酶可能以丝氨酸蛋白酶降解蛋白底物的机制来降解 PLA。Matsuda 等^[31]的实验结果显示, PLA 降解酶(PLD)突变体同时失去了蛋白酶活性和 PLA 解聚酶活性。因此认为该酶以胰凝乳蛋白酶家族共同的机制来降解蛋白和 PLA, 通过催化三联体完成酰化和脱酰化两步机制。作为胰凝乳蛋白酶的催化三联体保守残基 H57、D102 和 S195 分别相应于 PLD 中的 H74、D111

和 S197; 同样, 对胰凝乳蛋白酶极性环境的稳定和氧负离子洞形成十分重要的 S214 残基和 G193 残基分别对应于 PLD 中的 S212 和 G195。但 PLD 与胰凝乳蛋白酶之间又存在着以下明显的不同: (1) 猪胰弹性蛋白酶 S1 位点的 V216 残基, 导致 S1 增强了对 P1 (底物中对应于 S1 的位点)中的小侧链残基如 Ala, Ser, Gly 和 Val 的底物特异性; 胰弹性蛋白酶 II 在 S1 位点是 Gly216 和 Ser226, 这些残基使其更易与 P1 中的大

侧链残基结合, 例如 Leu, Met, Phe 或 Tyr; 但在 PLD 中, 这一残基被 S216 取代, 其取代效应尚不清楚; (2) 胰凝乳蛋白酶的 C191 和 C220 被认为在 P1 的口袋处形成二硫键, 该二硫键连接 S1 位点的两壁, 可能为洞穴提供一定程度的刚性, 但这两个残基在 PLD 中不存在^[31]。可能正是由于这些差异性导致了 PLD 结构与其它丝氨酸蛋白酶的不同, 从而造成了 PLD 特殊的底物特异性, 使 PLD 更容易与 PLA 结合。与蛋白酶 K 相比, PLD 与 PLA 底物的结合能力是蛋白酶 K 的 10 倍^[31], 这可能正是 PLD 高效降解 PLA 的原因所在。从识别机制上讲, PLD 似乎不具有类似于 PHB 解聚酶的底物结合域^[33], 它与底物的结合更可能是一种疏水作用的结果。蛋白酶 K 分子的晶体结构表明^[34], 整个酶分子呈半球形结构, 活性位点在平坦面。蛋白酶 K 没有底物结合域, 其底物识别位点确定为两个肽序列 Gly100-Ser101 和 Ser132-Gly134。它们只能正确识别底物, 不能强烈的结合水不溶性底物的表面, 而蛋白酶 K 与 PLA 膜的结合却是不可逆的。目前对蛋白酶 K 和 PLA 膜之间的这种亲和性还不清楚, 但疏水作用被认为是酶和膜之间的主要作用。AFM 观察结果显示, 蛋白酶 K 伴随着构象的变化在膜表面移动, 使得其催化位点可以对膜起作用, 从而水解酶分子周围的 PLA^[35]。

综上所述, 我们推测上述相关 PLA 降解酶类可能在进化上属于较为原始的水解酶类, 其相关催化或底物结合氨基酸具有很强的可塑性 (plasticity), 因而其对 PLA 等非天然底物的降解活性只是对底物适应性较广的一个反映^[36], 这也在某种程度上解释了到目前为止所报道的有降解能力的微生物不是很多, 且降解效率不高的原因。但通过对这些降解酶降解机制的深入研究不仅可以从进化角度阐述此类酶催化可塑性的分子机制, 而且还可以根据酶的催化特性及进化地位指导相关高效微生物菌株的筛选。

3 废弃物生物处理系统的探索

PLA 产品废弃后, 为了加快其生物降解和实现其有效循环利用, 开发 PLA 的循环处理系统是十分必要的。关于 PLA 循环利用的方法已经有过一些报道, 例如在高于 200 °C 下的温度下促使其分解和水解^[37]。随着越来越多 PLA 降解菌株和酶的发现, 人们开始尝试开发 PLA 废弃物的生物处理系统。高效的降解菌或降解酶不但可以加速 PLA 的降解, 而且其各级水解产物都可以作为聚合物合成的原料, 从

而实现 PLA 的循环利用。酶处理系统还具有许多其它优势, 其反应条件温和, 处理过程清洁无污染, 而且如果使用立体专一酶, 还可以满足人们对不同手性产物的需要。因此, 生物处理系统被认为是最理想的 PLA 循环处理系统。

目前有关 PLA 生物处理系统的报道还较少。2005 年 Masaki 等报道了来源于酵母 *Cryptococcus* sp. Strain S-2 的 PLA 降解酶 CLE^[29], 该酶对 PLA 具有高效降解的性能, 而且已经被成功应用于甲酯的生产上, 其产生菌株也已被用来对废水进行处理。基于这些优良性能和在其它方面的应用信息, CLE 有望被应用在 PLA 的循环处理上。2006 年 Jarerat 等人使用 5L 发酵罐研究了 *Amycolatopsis orientalis* 连续发酵以对 PLA 降解酶进行经济生产, 同时还研究了酶在非溶剂环境中对 PLA 的循环降解^[38]。发酵结果表明, 20 mg/L 纯酶在 40°C, 8h 内可以完全降解 2000 mg/L PLA 粉, 同时获得 600mg/L 的乳酸产物, 且此过程中没有不必要的外消旋作用发生, 从而显示了低成本规模化产酶的可行性。

综上所述, 虽然将 PLA 降解菌株和酶用于生物处理系统还需要进一步的实验探索, 但如果菌株产生的其它降解酶类对系统和产物没有负面作用, 那么菌株或发酵粗酶液直接可以用于循环系统, 这将进一步降低生产成本, 加快生物循环系统的构建。

4 结论和展望

随着环境和能源危机的日益严重, 人们已经认识到了可降解塑料的应用势在必行。目前, 全世界范围内都在倡导和推广生物可降解塑料的使用。在这种情况下, 同时开展对这些塑料的生物降解研究是十分必要的。对于 PLA 来讲, 其生物降解的研究刚刚处于起步阶段, 分离到的降解菌株和降解酶相对较少, 降解机制还不完全清楚, 其生物循环还没有被实现。因此, 在未来的研究中, 我们认为菌株和酶的分离仍然是必须的, 而以酶的多样性为基础的机制研究可能更多的还要集中在与同家族酶的差异性研究上, 其中酶与 PLA 的识别结合机制可能是降解的关键。随着可降解塑料使用的日益增多, 建立合理有效的循环处理系统也将成为实际生产生活的需要。同时, 以现有的降解酶为基础筛选新的生物降解塑料也是将来合成新型材料的有效途径之一, 解机制的阐明将为化学设计新的能够降解的塑料提供必要的信息。

参 考 文 献

- [1] Gross RA, Kalra B. Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 2002, 297(5582): 803–807.
- [2] Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol Biosci*, 2004, 4(9): 835–864.
- [3] Vink ET, Rabago KR, Glassner DA, *et al.* The sustainability of NatureWorks polylactide polymers and Ingeo polylactide fibers: an update of the future. *Macromol Biosci*, 2004, 4(6): 551–564.
- [4] Webb AR, Yang J, Ameer GA. Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(6): 801–812.
- [5] Erwin THV, Karl RRB, David AG, *et al.* Applications of life cycle assessment to Nature Works™ polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*, 2003, 80: 403–419.
- [6] Maeda H, Yamagata Y, Abe K, *et al.* Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(6): 778–788.
- [7] Pranamuda H, Tokiwa Y, Tanaka H. Polylactide Degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(4): 1637–1640.
- [8] Kim MN, Lee AR, Yoon JS, *et al.* Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green and Mater-Bi by fungi isolated from soils. *European Polymer Journal*, 2000, 36: 1677–1685.
- [9] Pranamuda H, Tokiwa Y, Tanaka H. Microbial Degradation of an Aliphatic Polyester with a High Melting Point, Poly (Tetramethylene Succinate). *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(5): 1828–1832.
- [10] Nishida H, Tokiwa Y. Distribution of poly (β -hydroxybutyrate) and poly (ϵ -caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. *J. Environ. Polym. Degrad*, 1993, 1: 227–233.
- [11] Nakamura K, Tomita T, Abe N, *et al.* Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1): 345–353.
- [12] Ikura Y, Kudo T. Isolation of a microorganism capable of degrading poly (L-lactide). *J. Gen. Appl. Microbiol*, 1999, 45: 247–251.
- [13] Tokiwa Y, Konno M, Nishida H. Isolation of silk degrading microorganisms and its poly(L-lactide) degradability. *Chem. Lett*, 1999: 355–356.
- [14] Jarerat A, Tokiwa Y, Tanaka H. Poly(L-lactide) degradation by *Kibdelosporangium aridum*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(23): 2035–2038.
- [15] Jarerat A, Tokiwa Y. Poly(L-lactide) degradation by *Saccharothrix waywayandensis*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(5): 401–404.
- [16] Jarerat A, Pranamuda H, Tokiwa Y. Poly(L-lactide)-egrading activity in various actinomycetes. *Macromol. Biosci*, 2002, 2: 420–428.
- [17] Sakai K, Kawano H, Iwami A, *et al.* Isolation of a thermophilic poly-L-lactide degrading bacterium from compost and its enzymatic characterization. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92(3): 298–300.
- [18] Teeraphatpornchai T, Nakajima-Kambe T, Shigeno- Akutsu Y, *et al.* Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(1): 23–28.
- [19] Kosuke T, Yutaka K, Kota N. Isolation of Thermophiles Degrading Poly(L-Lactic Acid). *Journal of bioscience and bioengineering*, 1999, 87(6): 752–755.
- [20] Jarerat A, Tokiwa Y. Degradation of Poly(L-lactide) by a Fungus. *Macromol. Biosci*, 2001, 1: 136–140.
- [21] Pranamuda H, Tokiwa Y. Degradation of poly(L-lactide) by strains belonging to genus *Amycolatopsis*. *Biotechnol. Lett*, 1999, 21: 901–905.
- [22] Williams D F. Enzymatic hydrolysis of polylactic acid. *Eng. Med*, 1981, 10: 5–7.
- [23] Oda Y, Yonetsu A, Urakami T, *et al.* Degradation of polylactide by commercial proteases. *J. Polym. Environ*, 2000, 8: 29–32.
- [24] Lim H A, Raku T, Tokiwa Y. Hydrolysis of polyesters by serine proteases. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(7): 459–464.
- [25] Hoshino A, Isono Y. Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. *Biodegradation*, 2002, 13(2): 141–147.
- [26] Tokiwa Y, Jarerat A. Biodegradation of poly(L-lactide). *Biotechnol Lett*, 2004, 26(10): 771–777.
- [27] Akutsu-Shigeno Y, Teeraphatpornchai T, Teamtisong K, *et al.* Cloning and sequencing of a poly(DL-lactic acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amylolyticus* strain TB-13 and its functional expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(5): 2498–2504.
- [28] Pranamuda H, Tsuchii A, Tokiwa Y. Poly(L-lactide)-egrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp. *Macromol. Biosci*, 2001, 1: 25–29.
- [29] Masaki K, Kamini NR, Ikeda H, *et al.* Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 7548–7550.
- [30] Van Pouderoyen G, Eggert T, Jaeger KE, *et al.* The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol*, 2001, 309(1): 215–226.

- [31] Matsuda E, Abe N, Tamakawa H, *et al.* Gene cloning and molecular characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *J Bacteriol*, 2005, 187(21): 7333–7340.
- [32] Amnat J, Yutaka T, Hideo T. Microbial Poly (L-lactide)- Degrading Enzyme Induced by Amino Acids, Peptides, and Poly(L-amino Acids). *Journal of Polymers and the Environment*, 2004, 12(3): 139–146.
- [33] Jendrossek D, Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 403–432.
- [34] Betzel C, Gourinath S, Kumar P, *et al.* Structure of a serine protease proteinase K from *Tritirachium album* limber at 0.98 Å resolution. *Biochemistry*, 2001, 40(10): 3080–3088.
- [35] Yamashita K, Kikkawa Y, Kurokawa K, *et al.* Enzymatic degradation of poly(L-lactide) film by proteinase K: quartz crystal microbalance and atomic force microscopy study. *Biomacromolecules*, 2005, 6(2): 850–857.
- [36] Yoshikuni Y, Ferrin TE, Keasling JD. Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature*, 2006, 440(7087): 1078–1082.
- [37] Tsuji H, Daimon H, Fujie K. A new strategy for recycling and preparation of poly(L-lactic acid): hydrolysis in the melt. *Biomacromolecules*, 2003, 4(3): 835–840.
- [38] Jareerat A, Tokiwa Y, Tanaka H. Production of poly(L-lactide)-degrading enzyme by *Amycolatopsis orientalis* for biological recycling of poly(L-lactide). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(4): 726–731.

Progress on biodegradation of polylactic acid —A Review

Fan Li, Sha Wang, Weifeng Liu*, Guanjun Chen*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, University of Shandong, Jinan 250100, China)

Abstract: Polylactic acid is a high molecular-weight polyester made from renewable resources such as corn or starch. It is a promising biodegradable plastic due to its mechanical properties, biocompatibility and biodegradability. To achieve natural recycling of polylactic acid, relative microorganisms and the underlying mechanisms in the biodegradation has become an important issue in biodegradable materials. Up to date, most isolated microbes capable of degrading polylactic acid belong to actinomycetes. Proteases secreted by these microorganisms are responsible for the degradation. However, subtle differences exist between these polylactic acid degrading enzymes and typical proteases with respect to substrate binding and catalysis. Amino acids relative to catalysis are postulated to be highly plastic allowing their catalytic hydrolysis of polylactic acid. In this paper we reviewed current studies on biodegradation of polylactic acid concerning its microbial, enzymatic reactions and the possible mechanisms. We also discussed the probability of biologically recycling PLA by applying highly efficient strains and enzymes.

Keywords: polylactic acid; microbial degradation; enzyme; degradation mechanism; biological recycling; treatment of plastic wastes

Supported by the Chinese National Natural Science Foundation (30570013) and the Shandong Provincial Natural Science Foundation (2005ZRB01141)

*Corresponding author. Tel: +86-531-88364324; E-mail: weifliu@sdu.edu.cn; guanjun@sdu.edu.cn

Received: 22 May 2007/Revised: 15 October 2007