

## 细胞工厂的优化

# 生产聚羟基脂肪酸酯的微生物细胞工厂

李正军, 魏晓星, 陈国强

清华大学生命科学学院, 北京 100084

**摘要:** 聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 是一类由微生物合成的、生物可再生、生物可降解、具有多种材料学性能的高分子聚合物, 在很多领域有着广泛的应用前景。以下从辅酶工程、代谢工程、微氧生产等方面综述了微生物法生产 PHA 的研究进展, 并对利用 PHA 合成基因提高基因工程菌的代谢潜能进行了讨论。

**关键词:** 聚羟基脂肪酸酯, 聚羟基丁酸酯, 辅酶工程, 代谢工程, 工业微生物

## Microbial cell factories for production of polyhydroxyalkanoates

Zhengjun Li, Xiaoxing Wei, and Guoqiang Chen

School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** Polyhydroxyalkanoates (PHA) are diverse polyesters synthesized by a variety of bacteria as intracellular carbon and energy storage compounds. As bio-renewable and biodegradable materials with diverse properties, PHA have drawn industrial attentions for their potential applications in many fields. This review focuses on recent strain developments for PHA production via cofactor engineering and metabolic engineering. The microaerobic production of PHA and application of PHA synthesis genes for improving robustness of industrial microorganisms are addressed.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrates, cofactor engineering, metabolic engineering, industrial microbiology

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 是一类广泛存在于微生物细胞内的高分子生物聚酯, 一般主要作为碳源和能量的贮藏物质<sup>[1-2]</sup>。储存型的 PHA 以疏水性颗粒的形式存在, 在一定条件下其含量可以超过细胞干重的 90%<sup>[3]</sup>。从化学结构上讲, PHA 是羟基脂肪酸 (Hydroxyalkanoic acid, HA) 的聚合物, 结构通式如图 1 所示, 分子量一般为几万至几百万, 不同的 PHA 及其单体具有不同的侧链 R 基团。根据单体组成的不同, PHA 具有从坚硬质脆的硬塑料到柔软的弹性体等一系列不同的材料学

性质。PHA 可以由生物可再生资源为原料合成, 进入自然界后可以被细菌等生物完全降解, 其替代传统的不可降解的塑料可以缓解严重的“白色污染”问题, 从而引起世界各国科学界和工业界的广泛重视<sup>[4-6]</sup>。

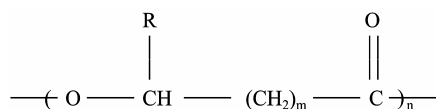


图 1 PHA 的结构通式

Fig. 1 General structure of polyhydroxyalkanoates.  $m=1-4$ ,  $n=100-30\ 000$ , R=alkyl groups C1~C15.

Received: May 26, 2010; Accepted: June 25, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707804).

Corresponding author: Guoqiang Chen. Tel: +86-10-62783844; Fax: +86-10-62794217; E-mail: chengq@mail.tsinghua.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707804) 资助。

## 1 野生菌中的 PHA 生产

### 1.1 PHA 的生物合成途径

很多细菌能够在自然条件下积累 PHA, 其生物合成途径主要有 3 条(图 2), 所需的酶及其底物特异性各有不同<sup>[3]</sup>。根据合成途径的不同和相关酶的底物特异性, PHA 的单体结构也多种多样, 其中 3-羟基脂肪酸单体包括了 3-羟基丙酸到 3-羟基十六酸的所有成员, 此外还有 4-、5-、6-羟基脂肪酸以及含有不饱和键、带有甲基侧链或者其他功能基团的 3-羟基脂肪酸作为 PHA 单体的情况<sup>[7]</sup>。

#### 1.1.1 由乙酰辅酶 A 合成 PHB 途径

聚 3-羟基丁酸酯 (Polyhydroxybutyrate, PHB) 是结构最简单、最早被发现的 PHA 成员, 其生物合

成途径以罗氏真养菌 *Ralstonia eutropha* 为代表(图 2)。糖类碳源经过糖酵解途径生成乙酰辅酶 A,  $\beta$ -酮基硫解酶 PhaA 催化 2 个乙酰辅酶 A 缩合形成乙酰乙酰辅酶 A, 然后在 NADPH 依赖的乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 PhaB 的作用下还原为(R)-3-羟基丁酰辅酶 A, 最后由 PHA 合酶 PhaC 聚合成 PHB<sup>[8-9]</sup>。

#### 1.1.2 由脂肪酸 $\beta$ -氧化途径合成 PHA

以铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和豚鼠气单胞菌 *Aeromonas caviae* 为代表的细菌能利用脂肪酸的  $\beta$ -氧化途径合成 PHA(图 2)。 $\beta$ -氧化途径的中间产物烯脂酰辅酶 A 在水合酶 PhaJ 的催化下形成(R)-3-羟基脂酰辅酶 A, 再由 PHA 合酶聚合成 PHA<sup>[3]</sup>。

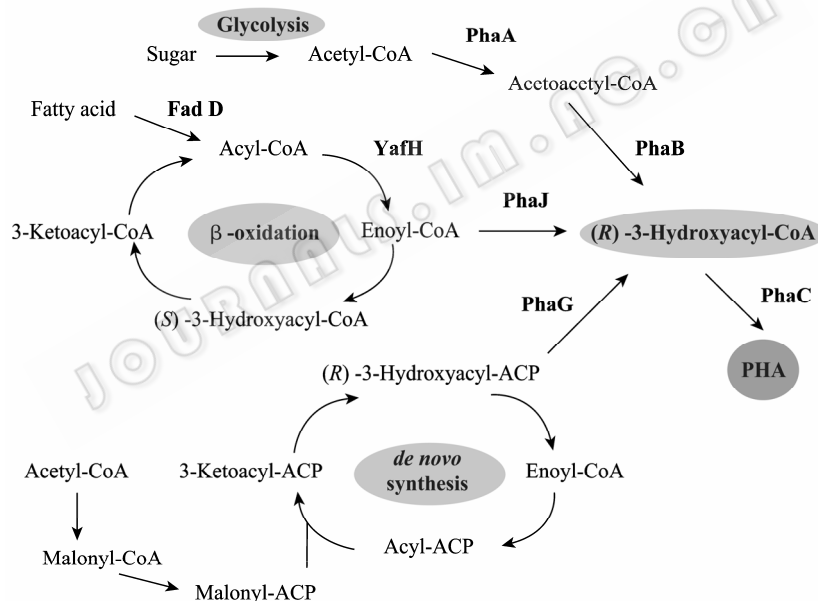


图 2 PHA 的生物合成途径

Fig. 2 Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis pathway. PhaA:  $\beta$ -ketothiolase; PhaB: NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhaC: PHA synthase; PhaG: 3-hydroxyacyl-ACP:CoA transacylase; PhaJ: enoyl-CoA hydratase; FadD: acyl-CoA synthase; YafH: fatty acyl-CoA dehydrogenase.

#### 1.1.3 由脂肪酸从头合成途径合成 PHA

以恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 为代表的细菌, 能够利用脂肪酸从头合成途径合成 PHA(图 2)。乙酰辅酶 A 进入脂肪酸的从头合成途径后, 其中间产物(R)-3-羟基脂酰-ACP 在酰基转移酶 PhaG 的催化下形成(R)-3-羟基脂酰辅酶 A, 然后由 PHA 合酶聚合成 PHA<sup>[3]</sup>。

细菌合成 PHA 所利用的碳源中, 结构与 PHA

单体类似的被称为相关碳源, 如脂肪酸等; 结构与 PHA 单体不同的被称为非相关碳源, 如糖类碳源。很多细菌可以利用相关碳源合成包含有多种不同单体的 PHA, 如细菌可以利用 3-羟基丙酸(3HP)、4-羟基丁酸(4HB)和 5-羟基戊酸(5HV)等相关碳源合成包含有 3HP、4HB 或 5HV 的 PHA。

### 1.2 短链 PHA 的发酵生产

短链 PHA (Short-chain-length PHA, scl PHA) 的

单体碳原子个数在 3~5 个之间,主要包括聚 3-羟基丁酸酯、聚 3-羟基丁酸 3-羟基戊酸酯 (PHBV) 和聚 3-羟基丁酸 4-羟基丁酸酯 (P3HB4HB) 等。*R. eutropha* 是最常见的 scl PHA 生产菌,它能利用糖类碳源积累超过细胞干重 80% 的 PHB,细胞干重可达 200 g/L 以上;当添加丙酸或 4-羟基丁酸等作为 3HV 或 4HB 的前体时,*R. eutropha* 能够合成 PHBV 或者 P3HB4HB。广泛产碱菌 *Alcaligenes latus* 也可以用来生产 PHB 或 PHBV,其优点是生长迅速,能利用蔗糖为碳源,但是 PHB 含量较低,一般只能达到细胞干重的 50% 左右。

### 1.3 中长链 PHA 的发酵生产

中长链 PHA (Medium-chain-length PHA, mcl PHA) 的单体碳原子个数在 6~14 之间。嗜油假单胞菌 *Pseudomonas oleovorans* 能够利用烷烃为碳源合成 mcl PHA,采用两步法连续发酵,前期积累生物量,后限制氮源供给积累 PHA,能够获得超过细胞干重 60% 的 mcl PHA,产率为 1.1 g/(L·h)<sup>[10]</sup>。*P. putida* 可以利用脂肪酸作为碳源合成 mcl PHA,采用脉动补料法,既可以防止碳源限制,又可以防止脂肪酸积累到可以产生抑制的浓度,36 h 发酵可获得生物量 131 g/L,PHA 含量 59%,最大产率为 2.3 g/(L·h)<sup>[11]</sup>。

### 1.4 短链中长链共聚 PHA 的发酵生产

短链中长链共聚 PHA (scl-mcl PHA) 是指 3HB 与长链 mcl 3HA 单体 (C<sub>6</sub>~C<sub>14</sub>) 形成的共聚物,根据单体组成不同其性能可以从硬塑料到弹性体之间有很大调节空间。嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 可以利用超过 12 个碳原子的脂肪酸积累 3-羟基丁酸和 3-羟基己酸共聚酯 (PHBHHx),Chen 等<sup>[12]</sup>报道了在 20 000 L 的发酵罐中 *A. hydrophila* 两步法培养生产 PHBHHx 的实验,细胞最初在 50 g/L 的葡萄糖中培养,之后在 50 g/L 的月桂酸中限磷培养,最终培养 46 h 后得到的细胞干重和 PHA 含量分别为 50 g/L、50%,共聚物中 3HHx 的单体含量为 11 mol%。

## 2 PHA 生物合成的代谢工程改造

### 2.1 利用辅酶工程提高 PHB 的生物合成

NADPH 在胞内主要作为氢的传递体参与生物

合成反应,例如氨基酸和脂肪酸的合成等。PHB 的合成也需要 NADPH 作为辅酶还原乙酰乙酰辅酶 A (图 3),胞内可利用的 NADPH 的量是影响 PHB 合成的重要因素。Lee 等在含有 *R. eutropha* PHB 合成基因的重组大肠杆菌中研究了 NADPH 对 PHB 生物合成的调节作用,包括复合 Luria-Bertani (LB) 培养基、LB 培养基加葡萄糖和化学培养基在内的多种培养基被用于细菌培养,其中 LB 加葡萄糖的培养基可以提供最高的 [NADPH]/[NADH],因此最利于 PHB 的积累<sup>[13-14]</sup>。在化学培养基中添加复合氮源、油酸或氨基酸等能够明显提高 PHB 的产量,由于氨基酸和油酸的生物合成需要消耗大量的还原力,因此重组大肠杆菌在化学培养基中生产 PHB 的效率与在复合培养基中相比要低很多<sup>[14]</sup>。

过表达磷酸戊糖途径中产生 NADPH 的相关基因,包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *zwf* 和 6-磷酸-葡萄糖酸脱氢酶基因 *gnd* (图 3),能够提高胞内 [NADPH]/[NADP] 的水平,从而促进 PHB 的合成,但是 NADPH 浓度的提高抑制了柠檬酸合成酶的活性,使细胞生长也受到了抑制<sup>[15]</sup>。调控磷酸戊糖途径中非氧化阶段的关键酶也能促进 PHB 的合成,过表达转醛醇酶基因 *talA* 使得重组大肠杆菌中 PHB 的含量由 28.2% 提高到了 52.3%<sup>[16]</sup>,过表达转酮醇酶基因 *tktA* 可以使 PHB 的合成提高 1.7 倍<sup>[17]</sup>。

嘧啶核苷酸转氢酶可以催化氢在 NAD 和 NADP 之间的转化 (图 3),在细胞的生长代谢中起调控辅酶平衡的作用<sup>[18]</sup>。在重组大肠杆菌中过表达嘧啶核苷酸转氢酶基因 *udhA*,能有效地提高 PHB 的产量,摇瓶实验中,31 h 培养后,过表达 *udhA* 的重组菌中 PHB 的产量为 6.42 g/L,而对照菌仅为 3.52 g/L<sup>[19]</sup>。NAD 激酶催化 NAD 的磷酸化生成 NADP,是胞内 NADP 的唯一来源 (图 3)。Li 等<sup>[20]</sup>的研究表明,在含有 PHB 合成途径的重组大肠杆菌中,过表达 NAD 激酶基因 *yjfb* 能够有效地提高胞内辅酶 NADP 的水平,摇瓶实验中,胞内 NADP 的浓度提高了 1.6~5.2 倍。NADP 浓度的提高促进了 PHB 的合成,6 L 的发酵罐培养中,P3HB 的产量提高了 100%,碳源转化率提高了 76%。

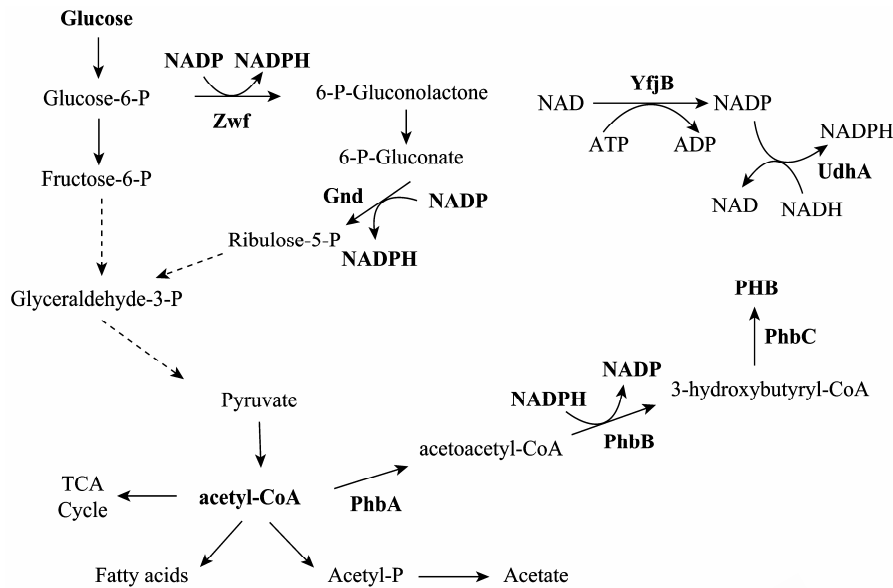


图3 重组大肠杆菌中 PHB 生物合成的辅因子代谢调控

Fig. 3 Cofactor engineering of PHB synthesis in recombinant *E. coli*. PhaA:  $\beta$ -ketothiolase; PhaB: NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhaC: PHA synthase; Zwf: glucose-6-P dehydrogenase; Gnd: 6-P-gluconate dehydrogenase; UdhA: pyridine nucleotide transhydrogenase; YfjB: NAD kinase.

## 2.2 短链中长链共聚 PHA 的生产

*Pseudomonas* sp. 61-3 和 *Pseudomonas stutzeri* 1317 的 PHA 合酶 PhaC<sub>61-3</sub> 和 PhaC<sub>2Ps</sub> 具有较低的底物特异性, 能够实现不同链长的单体的聚合, 得到短链中长链共聚 PHA<sup>[21-22]</sup>。在 PHA 合成缺陷突变株 *R. eutropha* PHB-4 中表达 phaC<sub>2Ps</sub> 基因, 重组菌可以合成单体组成包括 C<sub>4</sub>~C<sub>12</sub> 的 scl-mcl PHA, 占细胞干重的 15%~41%。利用葡萄糖酸钠和脂肪酸混合碳源培养, 通过控制脂肪酸的添加, 可以有效调节 scl-mcl PHA 的单体组成, 使 3HB 单体比例能够在 16~100 mol% 之间进行调控。

在 *R. eutropha* PHB-4 中表达 *A. caviae* 的 phaC 基因, 得到的重组菌能够以豆油为碳源高效地生产 PHBHHx, 其中 3HHx 单体含量为 5 mol%, 细胞干重为 123~138 g/L, PHBHHx 含量高达 71%~74%, 由豆油生产 PHA 的转化率为 0.72~0.76<sup>[23]</sup>。

*A. hydrophila* 4AK4 野生菌可以利用脂肪酸氧化途径合成 PHBHHx, 为了获得不同单体比例的 PHBHHx, 并提高菌株生产 PHA 的能力, 针对其 PHA 合成途径进行了一系列代谢工程改造。在 *A. hydrophila* 4AK4 中表达来源于 *A. caviae* 的 phaP 或 phaC 基因能提高菌体内 PHBHHx 含量和 3HHx

单体比例<sup>[24]</sup>。表达来源于 *R. eutropha* 的 phaAB 基因可以将胞内脂肪酸氧化产生的乙酰辅酶 A 用于 PHA 合成, 提高从脂肪酸到 PHA 的转化率, 同时提高 PHBHHx 中 3HB 单体比例<sup>[25]</sup>。异源表达透明颤菌 *Vitreoscilla* 编码血红蛋白的 vgb 基因可以提高细胞对氧的利用率, 从而提高细胞干重和 PHBHHx 含量<sup>[26-27]</sup>。

## 2.3 新型 PHA 材料的生产

### 2.3.1 高 HDD 含量 PHA 的生产

*P. putida* 能够利用月桂酸合成含 C<sub>6</sub>~C<sub>12</sub> 单体的 mcl PHA, 敲除 fadB 和 fadA 基因可以弱化其  $\beta$  氧化途径, 从而使碳源更多地流向 PHA 的合成, 提高 PHA 含量、提高碳源转化率和改变 PHA 的单体组成。Ouyang 等<sup>[28]</sup> 构建了 fadB 和 fadA 敲除突变株 *P. putida* KTOY06, 采用两步法培养, 在摇瓶中达到 5.31 g/L 的细胞干重, 其中 PHA 含量达到细胞干重的 84.3%, 单体组成中的 HDD 成分为 40.9 mol%, 是野生菌的 5 倍左右。

### 2.3.2 高 HHx 含量 PHA 的生产

*A. hydrophila* 4AK4 利用月桂酸合成的 PHBHHx 中 3HHx 比例在 20 mol% 以下, 通过敲除内源的 PHA 合酶基因, 表达异源 PHA 合酶基因

*phaCl<sub>ps</sub>*、脂酰辅酶 A 合酶基因 *fadD<sub>ec</sub>* 和脂肪酸转运蛋白基因 *fadL<sub>pp</sub>*，构建的重组菌可以利用己酸钠为碳源，积累占细胞干重 54% 的 PHBHHx，其中 3HHx 比例为 95 mol%；以辛酸钠为碳源培养时，重组菌积累占细胞干重 51% 的三元共聚物 PHBHHxHO，其中 3HHx 比例为 82 mol%<sup>[29]</sup>。

### 2.3.3 PHV 和 PHHp 的生产

Shen 等<sup>[30]</sup>用戊酸、庚酸、壬酸和十一酸等奇数碳脂肪酸培养 *A. hydrophila* 4AK4，发现其能利用十一酸合成聚 3-羟基戊酸酯 (Polyhydroxyvalerate, PHV)，采用两步法摇瓶培养，在第二步中添加 8 g/L 的十一酸，细菌能达到 5 g/L 的细胞干重，PHV 含量超过 45%。Wang 等<sup>[31]</sup>的研究发现，*fadBA* 敲除突变株 *P. putida* KTOY06 可以利用庚酸盐合成聚 3-羟

基庚酸酯 (Polyhydroxyheptanoate, PHHp)，在矿物盐培养基中，添加 10 g/L 庚酸盐为碳源，细菌能够达到 3.7 g/L 的细胞干重，PHHp 含量超过 71%。

### 2.4 利用单一糖类碳源生产 PHA 共聚酯

通常情况下，3HB 以外的 PHA 单体的聚合需要相关碳源的添加，例如 4HB 单体的聚合需要 4-羟基丁酸或 1,4-丁二醇等，3HV 单体的聚合需要丙酸或戊酸，mcl 3HA 单体的聚合需要脂肪酸或烷烃。这类相关碳源的价格普遍比糖类碳源贵很多，且对细胞毒性较大，发酵过程中需要以分批补料的方式添加，操作较为繁琐。以相对廉价的简单糖类碳源来生产 PHA 共聚酯，将能有效地降低其生产成本，促进 PHA 材料的工业化生产和应用开发，因此引起了很多研究者的兴趣，目前取得的一些进展见表 1。

表 1 利用简单碳源生产 PHA 共聚酯的研究

Table 1 Metabolic engineering of microorganisms for production of PHA from simple carbon sources

Strain	Genes manipulated	Substrate	PHA type	Monomer composition (mol%)	References
<i>E. coli</i> JM109	<i>phbCAB, sucD, 4hbD, orfZ</i>	Glucose	P3HB4HB	88% 3HB+12% 4HB	[32]
<i>S. enterica</i> JE4199	<i>phaBCA, sbm, ygfD, ygfG</i>	Glycerol	PHBV	86% 3HB+14% 3HV	[33]
<i>R. eutropha</i> PHB-4	<i>phaG, phaCl</i>	Fructose	P(HB-mcl HA)	97% 3HB+3% 3HA	[22, 34]
<i>A. hydrophila</i> 4AK4	<i>tesA</i>	Gluconate	PHBHHx	86% 3HB+14% 3HHx	[35]
<i>P. putida</i> Gpp104	<i>phaG, phaC, phbB</i>	Glucose	PHBHHx	95% 3HB+5% 3HHx	[35]
<i>R. eutropha</i> PHB-4	<i>ccr, phaC, phaJ</i>	Fructose	PHBHHx	98.5% 3HB+1.5% 3HHx	[36]
<i>P. putida</i> KTOY01	<i>phaC2, phbAB</i>	Glucose	P(HB-mcl HA)	88% 3HB+12% 3HA	[37]

#### 2.4.1 利用葡萄糖生产 P3HB4HB

Valentin 等<sup>[38]</sup>通过在大肠杆菌中异源表达 *R. eutropha* 的 PHB 合成操纵子 *phaCAB* 和克氏梭菌 *Clostridium kluyveri* 的琥珀酸降解相关基因 *sucD*、*4hbD* 和 *orfZ*，构建出能够利用葡萄糖生产 P3HB4HB 的基因工程菌 (图 4)。在摇瓶实验中，重组菌能够积累超过细胞干重 50% 的 P3HB4HB，4HB 单体含量为 2.8 mol%，但细胞干重处于较低的水平。Li 等<sup>[32]</sup>同样利用上述代谢途径，对基因表达进行了优化，并对大肠杆菌的琥珀酸半缩醛脱氢酶基因 *sad* 和 *gabD* 进行敲除 (图 4)，获得了更高的细胞干重和 4HB 单体含量。在 6 L 的发酵罐实验中，经过 32 h 的培养，细胞干重达到 24.7 g/L，含有 62.0% 的 P(3HB-co-12.1 mol% 4HB)。热力学及材料力学性质的研究表明，与 PHB 相比，P3HB4HB 共聚酯的结晶度下降，断裂伸长率提高，表现出明显的弹性体的特点。

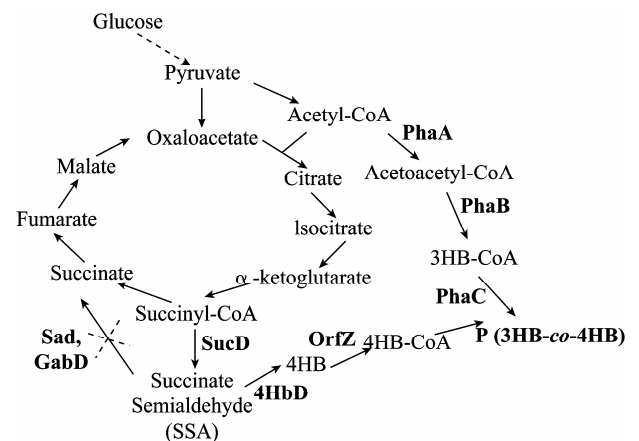


图 4 利用葡萄糖为碳源在重组大肠杆菌中合成 P3HB4HB

Fig. 4 P3HB4HB producing pathway in recombinant *E. coli* cultivated with glucose as carbon source. PhaA:  $\beta$ -ketothiolase; PhaB: NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhaC: PHA synthase; SucD: succinate semialdehyde dehydrogenase; 4HbD: 4HB dehydrogenase; OrfZ: 4HB-CoA:succinyl-CoA CoA transferase; Sad and GabD: non-CoA acylating succinate semialdehyde dehydrogenase of *E. coli*.

### 2.4.2 利用甘油生产 PHBV

大肠杆菌中存在 *sbm-ygfD-ygfG* 操纵子, 能够催化琥珀酰辅酶 A 生成丙酰辅酶 A, 肠道沙门氏菌 *Salmonella enterica* 中 *prpC* 基因催化丙酰辅酶 A 与草酰乙酸缩合成 2-甲基柠檬酸。Aldor 等<sup>[33]</sup>通过在 *prpC* 突变的 *S. enteric* JE4199 中表达 *sbm-ygfD-ygfG* 和不动杆菌 *Acinetobacter* 的 PHB 合成操纵子 *phbBCA*, 实现了由甘油来生产 PHBV, 其中 3HV 单体含量为 14 mol%, PHBV 达细胞干重的 40% 以上。

### 2.4.3 利用简单碳源生产短链中长链共聚 PHA

Taguchi 等<sup>[22,34]</sup>在 *R. eutropha* PHB-4 中表达源自 *Pseudomonas* sp. 61-3 的 *phaG* 和 *phaC1* 基因, 重组菌可以利用果糖合成短链中长链共聚的 PHA, 其中 3HB 单体含量为 95~97 mol%, 在此基础上表达 *R. eutropha* 的 *phbAB* 基因使得 PHA 含量由 26% 提高到 43%<sup>[22,34]</sup>。将肉桂地链霉菌 *Streptomyces cinnamomensis* 的 *ccr* 基因以及 *A. caviae* 的 *phaCJ* 基因导入 *R. eutropha* PHB-4 中, 得到的重组菌能够利用果糖合成占细胞干重 48% 的 PHBHHx, 其中 3HHx 单体含量为 1.5 mol%, 共聚物中的 C<sub>6</sub> 前体是通过 PhaA 催化的丁酰辅酶 A 延伸合成的, *ccr* 基因起了催化巴豆酰辅酶 A 生成丁酰辅酶 A 的作用<sup>[36]</sup>。

在一般培养中, *A. hydrophila* 4AK4 野生菌不能利用糖类碳源合成 PHBHHx 或者 PHB, 将来源于大肠杆菌、删除了前导序列的编码硫酯酶 I 的 *tesA* 基因导入 *A. hydrophila* 4AK4, 重组菌可以利用葡萄糖酸钠合成 PHBHHx, 通过限磷或限氮可使 PHBHHx 含量提高到 10%, 3HHx 含量为 14 mol%<sup>[35]</sup>。在 *P. putida* GPp104 中表达 *R. eutropha* 的 *phaB*、*A. hydrophila* 的 *phaC* 以及本身的 *phaG* 基因, 得到的重组菌可以用葡萄糖合成 PHBHHx, 其含量最高可达 19%, 其中 3HHx 含量为 5 mol%<sup>[35]</sup>。

Ouyang 等<sup>[37]</sup>删除了 *P. putida* KT2442 的 PHA 合成操纵子的大部分序列, 获得了一株 PHA 合成功能丧失的突变株 *P. putida* KTOY01, 在其中表达底物特异性较低的 *phaC2<sub>Ps</sub>* 基因以及 *R. eutropha* 的 *phbAB* 基因, 得到的重组菌株可以在以葡萄糖为碳源的摇瓶培养基中获得 2.37 g/L 的细胞干重, PHA

含量为 22.8%, 其中含 88 mol% HB 和 12 mol% 中长链单体。

## 3 微氧条件下生产 PHB 的研究

在不影响产物形成的情况下, 降低细菌发酵过程中的氧气供给能够减少发酵工业中最大的能量消耗——通氧搅拌。无氧发酵可以生产多种产品, 如乙醇、乳酸和琥珀酸等, 但是在无氧环境下生产 PHB 是非常困难的, 因为现有的 PHB 生产菌种都是好氧生长菌, 在氧气供应不足时菌体生长难以维持。有些实验室尝试利用无氧发酵来产生 PHB, 希望能够有所突破, 但是尚未取得明显的效果<sup>[39]</sup>。目前, 一些研究者的眼光逐渐由无氧生产转向了微氧生产。相比好氧发酵, 微氧发酵有着培养过程简单、生产规模容易扩大的优点, 而且微氧培养也无需像严格厌氧发酵那样需在氮气保护等辅助手段下进行, 因此在生产上更为简单易行, 对设备的要求也更低。

Alexeeva 等在敲除了 ArcA 的大肠杆菌突变体中发现, 在充分好氧或严格厌氧的情况下菌体的代谢水平并没有发生变化, 但敲除 ArcA 却能明显提高细菌在微氧环境中的呼吸作用, 同时菌体内的氧化还原状态也有改变<sup>[40]</sup>。Nikel 等尝试使用 AcrA 突变的重组大肠杆菌在微氧条件下合成 PHB, 取得了一定效果<sup>[41]</sup>, 在微氧条件下, 通过分批补料的方式添加甘油为碳源, 60 h 的培养获得了 10.8 g/L 的 PHB 产量<sup>[42]</sup>。

Wei 等<sup>[43]</sup>将厌氧启动子引入到 PHB 的微氧生产, 以解除菌体在微氧环境下 PHB 合成基因不能正常表达的问题。经过检索分析筛选出 9 个厌氧启动子作为候选, 通过实验比较从中找到了微氧条件下具有较高活性的乙醇脱氢酶启动子 P<sub>adhE</sub>, 将 P<sub>adhE</sub> 应用于微氧 PHB 的生产, 使得菌体中 PHB 的含量从 30% 提高到了 48%。研究还发现改变菌体代谢流能够提高 P<sub>adhE</sub> 的活性, 将 P<sub>adhE</sub> 应用于乙酸缺失突变体 *E. coli* JW2293 和 JW2294 中, 在微氧条件下, 两株突变体比野生型显示了更高的 PHB 合成能力, PHB 的含量分别达到了 58% 和 67%<sup>[43]</sup>。

## 4 PHA 合成基因作为代谢调控的因子提高工业生产菌的代谢潜能

### 4.1 PHA 的合成提高微生物的抗逆性

PHA 的合成与细菌的抗逆性之间存在着密切的联系,微生物积累 PHA 能够增加其在多变环境中的竞争能力。例如 PHB 在碳源过剩以及氮、磷等营养缺乏时合成,可以作为碳源和能源的储存物;当环境中的营养物质缺乏时,PHB 可以使得细胞的生存时间延长,从而渡过难关。López 等<sup>[44-45]</sup>的研究发现,在恶劣的环境下 PHB 野生菌 *R. eutropha* 比其 PHB 积累缺陷菌有更强的耐受能力。在固氮菌中,PHB 的积累还可作为调节细菌生存环境中氧含量的因子,也可用作电子供体,赋予细菌在生命进化过程中更强的竞争力<sup>[44]</sup>。

Zhao 等<sup>[46]</sup>利用能生产共聚物 PHBHHx 的 *A. hydrophila* 4AK4 野生菌和不产 PHBHHx 的 PhcA 突变株 *A. hydrophila* CQ4 作比较来研究 PHA 合成的抗性原理,发现野生菌 4AK4 对各种环境因子包括高温、低温、紫外照射、有机溶剂、高渗透压和过氧化氢等的抗逆性均高于突变菌 CQ4。分子水平上检测 *rpoS* 表达量发现,较高的存活率与较高水平的 *rpoS* 表达量相偶联,在环境因子的刺激下,细菌内 PHBHHx 的存在会增强胞内包括 *rpoS* 在内的基因的

表达,而 *rpoS* 的表达则会与 RNA 聚合酶结合激活各种压力蛋白的表达,从而保护细菌免受环境压力的毒害。

### 4.2 PHA 合成基因在工业微生物中的应用

PHA 在细菌内的积累主要有两方面的影响,一是作为碳源和能源的储存物,二是消耗还原型辅酶,避免其积累对细胞代谢产生负面影响。PHA 的合成消耗掉了胞内的代谢资源,使整个碳源和能源的分布发生了很大的变化,由此可推测 PHA 合成途径可以改变胞内的整体代谢调节,对微生物的其他新陈代谢也产生了影响。PHA 合成基因在工业微生物菌株中的表达,可以从整体上调控微生物的代谢,从而提高含 PHA 基因重组菌的产品产率。

#### 4.2.1 PHA 的合成对谷氨酸棒杆菌中谷氨酸合成的影响

Liu 等<sup>[47]</sup>通过优化基因表达,成功地在几株谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 中表达 *R. eutropha* 的 PHB 合成基因 *phbCAB*,摇瓶培养中积累 PHB 的重组菌的谷氨酸产量分别提高了 17%~39%,发酵罐培养中,含有 *phbCAB* 的重组 *C. glutamicum* ATCC14067 与野生菌株相比,细胞干重提高 10%,葡萄糖的消耗增加 13%,谷氨酸的产量则提高 23%。由于 PHB 合成基因的引入,使得胞内 NADPH 的水平下降,细胞为了增加 NADPH 的合成,更多的

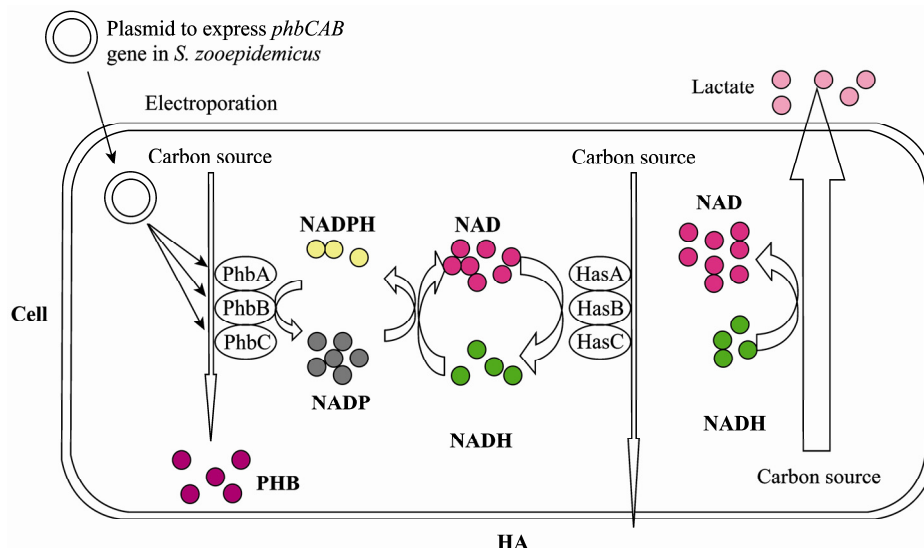


图 5 PHB 合成基因在兽疫链球菌中表达提高透明质酸生产

Fig. 5 Expression of PHB synthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* improved hyaluronic acid production.

代谢流流向了糖酵解途径和 TCA 循环, 进而促进了谷氨酸的合成; 同时由于 PHB 合成对碳源的分流, 减少了副代谢产物乳酸的产量。

#### 4.2.2 PHA 的合成提高兽疫链球菌生产透明质酸的能力

在兽疫链球菌 *Streptococcus zooepidemicus* 发酵生产透明质酸的过程中, 大量的碳源流向乳酸的合成, 高浓度的乳酸抑制了菌体的生长和透明质酸的生产。在发酵罐的低溶解氧条件下, 生成乳酸是细胞再生 NAD 的主要途径, Zhang 等<sup>[48]</sup>通过在兽疫链球菌中表达 *R. eutropha* 的 *phbCAB* 基因, 提供了另一条获得氧化力的途径, 使乳酸的产量由 64 g/L 下降到 41 g/L, 同时增加了透明质酸的合成 (图 5)。

#### 4.2.3 PHA 的合成对移动单胞菌中乙醇生产的影响

Lai 等<sup>[49]</sup>在移动单胞菌 *Zymomonas mobilis* 中表达 *R. eutropha* 的 PHB 合成基因并实现了 PHB 的积累, 48 h 的摇瓶培养表明, PHB 的积累对运动发酵单胞菌的葡萄糖利用和乙醇合成产生了影响, 带有 PHB 合成基因表达质粒的重组菌的乙醇生产量比野生菌提高了约 10%, 说明 PHB 的积累能够在一定程度上提高了运动发酵单胞菌的乙醇生产能力。

## 5 结论与展望

聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 是一类材物化性能多样的生物可降解聚合物, 在很多领域都有潜在的应用价值, 具有非常好的发展前景。过去几十年中对于 PHA 合成机制和代谢途径的深入研究使得我们能够构建出各种生产 PHA 的基因工程菌, 这些基因工程菌的生产能力比天然的生产菌株要强很多。合成生物学、系统生物学、生物信息学等的迅速发展提供了强有力的分子生物学工具, 将其应用于 PHA 代谢工程领域, 会有利于我们构建更为高效的 PHA 生产菌, 降低 PHA 材料的生产成本, 推动其工业化生产和商业应用开发, 促进塑料产业的可持续发展。

## REFERENCES

[1] Ahn WS, Park SJ, Lee SY. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated

whey solution. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3624–3627.

- [2] Steinbüchel A, Lutke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Eng J*, 2003, **16**: 81–96.
- [3] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci*, 2000, **25**: 1503–1555.
- [4] Chen GQ. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev*, 2009, **38**: 2434–2446.
- [5] Hazer B, Steinbüchel A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**: 1–12.
- [6] Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, **82**: 233–247.
- [7] Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **128**: 219–228.
- [8] Peoples OP, Sinskey AJ. Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: characterization of the genes encoding beta-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 15293–15297.
- [9] Peoples OP, Sinskey AJ. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J Biol Chem*, 1989, **264**: 15298–15303.
- [10] Jung K, Hazenberg W, Prieto M, et al. Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnol Bioeng*, 2001, **72**: 19–24.
- [11] Kellerhals MB, Kessler B, Witholt B. Closed-loop control of bacterial high-cell-density fed-batch cultures: production of mcl-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442 under single-substrate and cofeeding conditions. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **65**: 306–315.
- [12] Chen GQ, Zhang G, Park SJ, et al. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 50–55.
- [13] Lee IY, Kim MK, Park YH, et al. Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **52**: 707–712.
- [14] Lee SY, Lee YK, Chang HN. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid)



- synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *J Ferment Bioeng*, 1995, **79**: 177–180.
- [15] Lim SJ, Jung YM, Shin HD, *et al.* Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *J Biosci Bioeng*, 2002, **93**: 543–549.
- [16] Song BG, Kim TK, Jung YM, *et al.* Modulation of *talA* gene in pentose phosphate pathway for overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in transformant *Escherichia coli* harboring *phbCAB* operon. *J Biosci Bioeng*, 2006, **102**: 237–240.
- [17] Jung YM, Lee JN, Shin HD, *et al.* Role of *tktA* gene in pentose phosphate pathway on odd-ball biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate in transformant *Escherichia coli* harboring *phbCAB* operon. *J Biosci Bioeng*, 2004, **98**: 224–227.
- [18] Sauer U, Canonaco F, Heri S, *et al.* The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 6613–6619.
- [19] Sanchez AM, Andrews J, Hussein I, *et al.* Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2006, **22**: 420–425.
- [20] Li ZJ, Cai L, Wu Q, *et al.* Overexpression of NAD kinase in recombinant *Escherichia coli* harboring the *phbCAB* operon improves poly(3-hydroxybutyrate) production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **83**: 939–947.
- [21] Chen JY, Liu T, Zheng Z, *et al.* Polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas stutzeri* 1317 had different substrate specificities. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **234**: 231–237.
- [22] Matsumoto K, Nakae S, Taguchi K, *et al.* Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) copolymer from sugars by recombinant *Ralstonia eutropha* harboring the *phaCI*(Ps) and the *phaG*(Ps) genes of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, 2001, **2**: 934–939.
- [23] Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, *et al.* High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polym Degrad Stabil*, 2004, **83**: 79–86.
- [24] Han J, Qiu YZ, Liu DC, *et al.* Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **239**: 195–201.
- [25] Qiu YZ, Han J, Chen GQ. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **69**: 537–542.
- [26] Ouyang SP, Han J, Qiu YZ, *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) production in recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring *phbA*, *phbB* and *vgb* genes. *Macromol Symp*, 2005, **224**: 21–34.
- [27] Qiu YZ, Ouyang SP, Shen ZY, *et al.* Metabolic engineering for the production of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate by *Aeromonas hydrophila*. *Macromol Biosci*, 2004, **4**: 255–261.
- [28] Ouyang SP, Luo RC, Chen SS, *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydodecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules*, 2007, **8**: 2504–2511.
- [29] Jian J, Li ZJ, Ye HM, *et al.* Metabolic engineering for microbial production of polyhydroxyalkanoates consisting of high 3-hydroxyhexanoate content by recombinant *Aeromonas hydrophila*. *Bioresour Technol*, 2010, **101**: 6096–6102.
- [30] Shen XW, Yang Y, Jian J, *et al.* Production and characterization of homopolymer poly(3-hydroxyvalerate) (PHV) accumulated by wild type and recombinant *Aeromonas hydrophila* strain 4AK4. *Bioresour Technol*, 2009, **100**: 4296–4299.
- [31] Wang HH, Li XT, Chen GQ. Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a *fadBA* knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. putida* KT2442. *Process Biochem*, 2009, **44**: 106–111.
- [32] Li ZJ, Shi ZY, Jian J, *et al.* Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2010, **12**: 352–359.
- [33] Aldor AS, Kim SW, Prather KLJ, *et al.* Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3848–3854.
- [34] Taguchi S, Matsusaki H, Matsumoto K, *et al.* Biosynthesis of biodegradable polyesters from renewable carbon sources by recombinant bacteria. *Polym Int*, 2002, **51**: 899–906.

- [35] Qiu YZ, Han J, Guo JJ, *et al.* Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from gluconate and glucose by recombinant *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**: 1381–1386.
- [36] Fukui T, Abe H, Doi Y. Engineering of *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer. *Biomacromolecules*, 2002, **3**: 618–624.
- [37] Ouyang SP, Liu Q, Fang L, *et al.* Construction of pha-operon-defined knockout mutants of *Pseudomonas putida* KT2442 and their applications in poly(hydroxyalkanoate) production. *Macromol Biosci*, 2007, **7**: 227–233.
- [38] Valentin HE, Dennis D. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *J Biotechnol*, 1997, **58**: 33–38.
- [39] Carlson R, Wlaschin A, Srienc F. Kinetic studies and biochemical pathway analysis of anaerobic poly-(R)-3-hydroxybutyric acid synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 713–720.
- [40] Alexeeva S, Hellingwerf KJ, de Mattos MJT. Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 204–209.
- [41] Nikel PI, Pettinari MJ, Galvagno MA, *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli arcA* mutants in microaerobiosis. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 2614–2620.
- [42] Nikel PI, Pettinari MJ, Galvagno MA, *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **77**: 1337–1343.
- [43] Wei XX, Shi ZY, Yuan MQ, *et al.* Effect of anaerobic promoters on the microaerobic production of polyhydroxybutyrate (PHB) in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **82**: 703–712.
- [44] López NI, Floccari ME, Steinbüchel A, *et al.* Effect of poly(3-Hydroxybutyrate) (Phb) content on the starvation-survival of bacteria in natural-waters. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, **16**: 95–101.
- [45] López NI, Ruiz JA, Mendez BS. Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms. *World J Microb Biotechnol*, 1998, **14**: 681–684.
- [46] Zhao YH, Li HM, Qin LF, *et al.* Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **276**: 34–41.
- [47] Liu Q, Ouyang SP, Kim J, *et al.* The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, 2007, **132**: 273–279.
- [48] Zhang JY, Hao N, Chen GQ. Effect of expressing polyhydroxybutyrate synthesis genes (*phbCAB*) in *Streptococcus zooepidemicus* on production of lactic acid and hyaluronic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**: 222–227.
- [49] Lai WJ, Chen GQ. Polyhydroxybutyrate synthesis in recombinant *Zymomonas mobilis* affected ethanol production. *China Biotechnol*, 2006, **26**: 52–56.
- 赖伟坚, 陈国强. 运动发酵单胞菌积累聚羟基丁酸提高乙醇产量. *中国生物工程杂志*, 2006, **26**: 52–56.