

## 生物合成聚 3-羟基丙酸酯的研究进展

常乐, 詹元龙, 刘长莉

东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

常乐, 詹元龙, 刘长莉. 生物合成聚 3-羟基丙酸酯的研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(4): 501-509.

Chang L, Zhan YL, Liu CL. A systematic review of biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate). Chin J Biotech, 2018, 34(4): 501-509.

**摘要:** 聚 3-羟基丙酸酯 (P3HP) 作为聚羟基脂肪酸酯家族 (PHAs) 中的新型热塑性塑料, 具有生物降解性和生物相容性等优点。目前, 未见野生微生物可以合成 P3HP 的报道, 生产途径主要为化学法和生物法。其中, 通过化学法或添加 3-HP 单体及其结构类似物作为前体的 P3HP 合成效率低、成本高且不具环保性; 而通过构建和改造工程菌的生物代谢途径, 能够利用廉价、可再生的碳源, 已经逐渐成为研究热点。文中综述了国内外 P3HP 生物合成研究进展, 并对甘油途径、丙二酸单酰辅酶 A (Malonyl-CoA) 途径和  $\beta$ -丙氨酸途径等合成方法进行了优缺点分析, 为生物合成 P3HP 的深入研究奠定理论基础。

**关键词:** 聚 3-羟基丙酸酯, 生物合成, 生物塑料, 共聚物

## A systematic review of biosynthesis of poly (3-hydroxypropionate)

Le Chang, Yuanlong Zhan, and Changli Liu

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

**Abstract:** Poly (3-hydroxypropionate) (P3HP), a new member of thermoplastic of family polyhydroxyalkanoates (PHAs), has excellent characteristics of biodegradability and biocompatibility. By now no reports can be found about wild-type bacteria that naturally synthesize P3HP, so the main way to produce P3HP is chemical and biological methods. Chemical method by adding high cost 3-HP monomers or their structural analogs as precursors, has the drawbacks of toxicity, low effectiveness and high cost. Biological method using engineered strain may utilize inexpensive and renewable carbon source to produce P3HP and has gradually become more and more popular. We systematically review here the biosynthesis of P3HP research progress. The advantages and disadvantages of biosynthesis pathways of glycerol pathway, malonyl-CoA pathway and  $\beta$ -alanine pathway were analyzed.

**Keywords:** poly (3-hydroxypropionate), biosynthesis, bioplastics, copolymer

**Received:** July 5, 2017; **Accepted:** September 30, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 51678120), Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. C2017007).

**Corresponding author:** Changli Liu. Tel/Fax: +86-451-82191737; E-mail: liuchangli@nefu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 51678120), 黑龙江省自然科学基金 (No. C2017007) 资助。

网络出版时间: 2017-12-04

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20171204.1035.003.html>

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是微生物合成的一类线性高分子聚酯的总称<sup>[1]</sup>。自 1926 年 Lemoigne 在巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 中首次发现聚羟基丁酸酯 (P3HB) 以来<sup>[2]</sup>, 已有超过 150 种 PHAs 单体被发现<sup>[3]</sup>。聚 3-羟基丙酸酯 (Poly (3-hydroxypropionate), P3HP) 是 PHAs 家族中新出现的一种聚酯, 具有优异的材料学性质和机械性能, 如高机械强度和拉伸强度、生物降解性、生物相容性等, 被认为是石化合成塑料的重要代替品之一, 具有广泛的应用价值与开发前景<sup>[4]</sup>。

迄今还未见野生微生物天然合成 P3HP 的报道, 以往 P3HP 多采用化学方法合成, 其中以  $\beta$ -丙内酯开环聚合 (ROP) 和 3-HP 酯类缩合两种方法为主。前者虽然可以通过开环聚合产生高分子量的 P3HP, 但其反应过程会产生强烈的致癌物质<sup>[5-6]</sup>, 对生物和环境产生威胁; 后者可利用无毒 3-HP 直接缩合生成 P3HP, 但产生的聚合物分子量不稳定, 难以控制生产过程<sup>[7]</sup>, 因此两者均不适用于规模化商业生产。Zhang 等<sup>[8]</sup>结合了缩合反应和开环聚合反应两者的优势, 使用将 3-HP 单体优先制备成大环单体的两步法化学合成 P3HP, 其分子量 ( $M_n$ ) 可达 2.4–67 kg/mol。为了避免聚合反应中使用大量有机溶剂造成的环境污染和开环聚合中有害中间体产生的问题, 方孝斌等<sup>[9]</sup>以自制的 3-HP 为单体, 采用金属铈作为新型催化剂, 在甲苯和氮气的保护下直接催化缩聚制备高分子量的 P3HP, P3HP 的数均分子量可达到 14.7 kg/mol, 这种方式合成的高分子 P3HP 呈现出很好的成膜特性和稳定性。除此之外, 通过添加 P3HP 结构类似的前体物, 如 3-HP、丙烯酸<sup>[10]</sup>或 1,3-丙二醇 (1,3-PDO)<sup>[11]</sup>等, 也能达到合成 P3HP 的目的。

综合研究表明, 化学法制备 P3HP 的合成效率不高, 且污染环境。而添加的 P3HP 结构类似前体物价格昂贵, 且添加生产方式有细胞毒性从

而抑制菌体生长, 不适用于工业化规模生产<sup>[12]</sup>。因此近年来, 采用基因工程方法构建能够利用廉价、可再生碳源合成 P3HP 的工程菌株已逐渐成为研究的热点。P3HP 的生物合成路径主要包括甘油途径和丙二酸单酰辅酶 A (Malonyl-CoA) 途径。其中丙二酸单酰辅酶 A 是脂肪酸中心代谢路径中重要的限速步骤, 亦是细菌脂肪酸合成途径中理想的调控枢纽。Zhang 课题组<sup>[13]</sup>研究的丙二酸单酰辅酶 A 生物传感器对脂肪酸代谢的动态调控与稳态维持机制的应用对 P3HP 的合成有着至关重要的作用。此外, 最新研究开发的 P3HP 合成路线—— $\beta$ -丙氨酸途径, 可以在降低生产成本的同时提高合成 P3HP 效率, 具有一定发展潜力。本文针对 P3HP 生物合成的研究进展进行概括总结。

## 1 生物法合成 P3HP

### 1.1 甘油途径

近些年, 甘油作为生产生物柴油的副产物, 已成为合成各种生物制品最具吸引力的碳源<sup>[14]</sup>, 其可用量已超过化学、制药和化妆品行业等传统消费的需求, 且来源便利。在以甲醇进行植物油或动物脂肪的酯交换反应中, 10% 的产物都为甘油<sup>[15-16]</sup>, 致使甘油价格急剧下降。因此, 以廉价的甘油为原料合成 P3HP 能够降低成本, 提高经济效益。

Andreeßen 等<sup>[4]</sup>将专性厌氧菌丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* 的甘油脱水酶基因 *dhaB1<sub>Cb</sub>*、肠道沙门氏菌 *Salmonella enteric* 中的丙醛脱氢酶基因 *pduP<sub>Se</sub>* 和真氧产碱杆菌 *Ralstonia eutropha* 的 PHA 聚合酶基因 *phaC<sub>Re</sub>* 转入大肠杆菌 *Escherichia coli*, 以纯甘油为唯一碳源, 采用两步补料分批发酵法合成 P3HP, 在好氧阶段菌体生长与繁殖, 厌氧阶段通过添加还原剂促进产物大量积累。最终结果显示, P3HP 最高产量可达 1.4 g/L, 占细胞干重的 12%。经过 Andreeßen 等<sup>[4]</sup>进一步

分析后发现, 由于甘油脱水酶 *DhaB1<sub>Cb</sub>* 仅在严格的厌氧条件下具有活性, 为了维持厌氧条件必须添加还原剂 (延胡索酸二钠和酒石酸钾钠), 不仅增加了生产成本, 且与其他途径合成的 P3HP 相比, 产量相对较低, 需要进一步开发甘油高产 P3HP 的发酵工艺。

在此研究基础上, Wang 等<sup>[17]</sup>使用对氧气敏感性较低的肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumonia* 中维生素 B<sub>12</sub> 依赖型甘油脱水酶基因 *dhaB123<sub>Kp</sub>* 及辅助基因 *gdrAB<sub>Kp</sub>* 代替 *dhaB1<sub>Cb</sub>*, 并将来自鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 的丙醛脱氢酶基因 *pduP<sub>Sr</sub>* 及来自 *R. eutropha* 的 PHA 聚合酶基因 *phaC1<sub>Re</sub>* 表达于 *E. coli* 中。在该优化策略中, 省略了 Andreeßen 等<sup>[4]</sup>实验中的 P3HP 厌氧累积阶段, 即避免了延胡索酸二钠和酒石酸钾钠还原剂的添加, 且在缩减发酵程序和添加剂的同时降低了生产成本。此外, 添加维生素 B<sub>12</sub> 可维持代谢途径中甘油脱水酶的活性; 同时添加葡萄糖作为辅助剂, 将葡萄糖分解代谢产生的生物质能量及甘油用于 P3HP 生产, 从而提高产量。该合成方法仅采用有氧发酵即可使得 P3HP 产量达 10.1 g/L, 占细胞干重的 46.4% (图 1)。尽管甘油法合成 P3HP 已经取得了非常大的进展, 但仍存在一些问题尚待解决。例如, 添加维生素 B<sub>12</sub> 导致发酵成本增加, 而采用生产维生素 B<sub>12</sub> 的菌株 *K. pneumonia* 作为 P3HP 合成的宿主菌, 就可以解决该问题。另外, 发酵生产中的氧化还原平衡问题也困扰 P3HP 的合成, 此问题可能通过引入消耗 NADH 的合成代谢途径来解决。

为了避免维生素 B<sub>12</sub> 的添加, Heinrich 等<sup>[18]</sup>引入维生素 B<sub>12</sub> 的天然生产者 *Shimwellia blattae* 作为载体, 在 *S. blattae* 中表达恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的 1,3-PDO 脱氢酶基因 *dhaT<sub>Pp</sub>* 和醛脱氢酶基因 *aldD<sub>Pp</sub>*、丙酸梭菌 *Clostridium propionicum* X2 的丙酸酯辅酶 A 转移酶基因 *pctC<sub>P</sub>*

及 *R. eutropha* H16 的 PHA 聚合酶基因 *phaC1<sub>Re</sub>* (图 1), 实现不添加维生素 B<sub>12</sub> 也可以高产 P3HP 的设想。除此之外, 与 Andreeßen 等<sup>[4]</sup>描述的两相发酵方法相反, 该发酵过程采用厌氧-好氧两阶段培养, 不仅实现获得比完全厌氧生产过程中更高的细胞干重, 且在好氧阶段减少了前体 3-羟基丙醛对 1,3-PDO 的转化。另一个有趣的发现是, 用粗甘油发酵时细胞干重增加, 可能是由于粗甘油碳源中的有机物可以被微生物作为补充碳源, 从而比纯甘油发酵生产获得更高的生物量<sup>[19]</sup>。最终结果表明, 在 2 L 补料分批发酵工艺中, 该重组菌培养 72 h 后 P3HP 积累占细胞干重的 9.8%±0.4%。

Feng 等<sup>[20]</sup>在 *K. pneumonia* 菌株中引入 *E. coli* 的丙酰辅酶 A 合成酶基因 *prpE<sub>Ec</sub>* (图 1), 结果发现, 曝气条件在 P3HP 生产和细胞生长中起着至关重要的作用。在该课题组研究的工程代谢途径中, 以 3-HP 作为 P3HP 的前体。然而, 在以改变振荡培养转速为 50、100、200 r/min 的 3 种曝气条件下, P3HP 生产仅占 3-HP 生产的 10% 左右。最终在不含维生素 B<sub>12</sub> 及优化曝气的条件下, 培养 48 h 后 P3HP 含量占细胞干重的 12.7%。经研究结果推测, 从 3-HP 合成 P3HP 的转化效率很低很可能是由于丙酰辅酶 A 合成酶 (PrpE) 的酶活较低造成的, 同样在构建 *R. eutropha* 表达载体时也发现类似现象<sup>[21]</sup>。另一方面, PrpE 是丙酸分解代谢过程中将丙酸酯催化合成丙酰辅酶 A 的关键酶, 与丙酸盐相比, 3-HP 可能并不适合作为 PrpE 合成底物。通过修饰 PrpE 或使用如 *S. typhimurium*<sup>[22]</sup> 等不同菌株来源的其他 PrpE 等方法, 可达到改善 P3HP 生产的目的。

通常, 微生物合成的 PHA 聚合物的分子量和产量之间存在平衡<sup>[23]</sup>。PHA 聚合物的分子量和产量通常由合成 PHA 的 3 个关键酶, 即 *phaC* 编码的聚合酶、*phaA* 编码的 β-酮硫解酶和 *phaB* 编码的 NADPH 依赖性的乙酰乙酰 CoA 还原酶合成的

比例确定。换句话说,这3种基因的表达水平可能会导致PHA合成产量的差异。众所周知,对于操纵子下游的基因,靠近启动子的基因将被更高度表达<sup>[24]</sup>。Hiroe等<sup>[25]</sup>探索了工程菌株*E. coli*中 $phaCAB$ 操纵子基因序列对目的基因转录效率的影响。研究表明,操纵子中核酸序列的特异性位置和排序构成了调节基因表达的有效方法,如改变启动子或调整诱导物的浓度都能够有效地控制重组菌株合成PHA聚合物的产率和分子量。在此基础上,Andreeßen等<sup>[26]</sup>重新排列 $phaCAB$ 操纵子基因序列来完成P3HP合成操纵子结构的优化,即在磷酸丙糖异构酶敲除突变体中,通过工程化碳源依赖性质粒成瘤体系来克服发酵期间质粒丢失问题,从而达到提高聚酯产率。

在以甘油为底物生物合成3-HP的代谢途径中,杨鹏等<sup>[27]</sup>发现了该途径中存在还原力不平衡从而限制P3HP产量的问题。该课题组基于*K. pneumonia*的1,3-PDO氧化还原酶基因 $dhaTK_p$ ,在P3HP合成途径中引入1,3-PDO的合成(图1),用以平衡细菌体内还原力。通过自杀性载体系统介导的同源重组技术,将甘油脱水酶及其激活因子的合成基因整合到*E. coli*基因组中,能够有效降低质粒的丢失率,增强质粒稳定性。经过发酵条件优化后,最终构建的工程菌可以获得2.7 g/L的P3HP和2.4 g/L的1,3-PDO,相比此前研究中1.54 g/L的P3HP摇瓶产量<sup>[28]</sup>,此代谢途径合成P3HP产量有了近2倍的提高,且同时能够获得高附加值的副产物。

为稳定P3HP生产,Gao等<sup>[29]</sup>构建了遗传稳定的*E. coli*重组菌株,在氨基酸合成代谢基础上,采用染色体基因整合和质粒成瘤系统技术,获得高产P3HP的工程菌株*E. coli* Q1738。在有氧条件下,该重组菌株经甘油发酵可获得25.7 g/L的P3HP,细胞积累高达67.9%。此项研究表明,如果在相同菌株中存在两种或更多种类型的质粒,

则质粒稳定性将降低,导致P3HP产量不高。据报道,在验证质粒的稳定性实验中,随着质粒长度的增加而稳定性随之降低,而质粒重复数量的增加引起的代谢负荷是质粒损失的主要原因<sup>[30-31]</sup>。由此推测,多重质粒对细胞代谢负担较重,单一质粒更加合理稳定。此外,在甘油途径中经由甘油脱水酶转化生成的3-羟基丙醛具有的毒性作用也是降低P3HP产量的原因之一。

## 1.2 丙二酸单酰辅酶A途径

丙二酸单酰辅酶A途径,即脂肪酸从头合成途径。这一途径可以利用各类碳源为底物,尤其是廉价、丰富的、可再生木质纤维素类物质都能通过细胞代谢生成乙酰辅酶A,从而进一步生成中间产物丙二酸单酰辅酶A以达到合成终产物P3HP的目的,该途径是低成本合成P3HP的首选途径<sup>[32]</sup>。

Fukui等<sup>[21]</sup>将乙酰辅酶A在乙酰辅酶A羧化酶基因 $acc$ 作用下转化为丙二酸单酰辅酶A,并引入橙色绿屈挠菌*Chloroflexus aurantiacus*的丙二酸单酰辅酶A还原酶基因 $mcr_{Ca}$ 合成3-HP,再将丙酰辅酶A合成酶基因 $pcs_{Ca}$ 转入到*R. eutropha*合成P3HP,该项研究成功搭建了一条人工廉价合成P3HP的新通路(图1)。Wang等<sup>[12]</sup>为了提高该反应体系中P3HP的合成效率,过表达*E. coli*的基因 $accABCD_{Ec}$ 以提高胞内丙二酸单酰辅酶A浓度,并同时以转入*E. coli*的丙酰辅酶A合成酶基因 $prpE_{Ec}$ 替换 $pcs_{Ca}$ 基因,在*E. coli*中重新构建P3HP合成通路。该重组*E. coli*以葡萄糖为碳源合成P3HP,其产量最高为13 mg/L,占细胞干重的0.98%。

丙二酸单酰辅酶A途径中,以遗传背景明确且易培养的*E. coli*为宿主菌进行P3HP合成时,虽能利用非结构相关碳源但其产量明显过低。Wang等<sup>[12]</sup>发现,P3HP产量低可能是由质粒丢失引起的。首先,重组菌株中含有抗生素抗性的质

粒选择性标记基因分泌于培养基中,可能造成相应抗生素快速分解及无质粒细胞过度生长;其次,在丙二酸单酰辅酶 A 还原酶 (MCR) 催化两步反应中的中间产物丙二酸半醛及产物 3-HP 对 *E. coli* 的毒性作用,加重了质粒的不稳定性。另一方面,低活性的 MCR 也是造成 P3HP 含量低的原因之一。来自光合作用的绿色非硫细菌的 MCR 作为微生物生产中的关键酶,其最佳酶活反应温度为 57 °C<sup>[32]</sup>,而载体 *E. coli* 的最适生长温度为 37 °C,在 37 °C 培养条件下 MCR 酶的活性仅能达到最大活性的 60%,因此培养温度成为制约 MCR 活性的一个因素。此外,MCR 活性受其生理特性的严格控制。MCR 在 *E. coli* 中表达时,由于生理环境的变化,导致 MCR 酶活性可能进一步降低。

为了解决 MCR 催化活性低的问题,学者们对 MCR 功能域进行了详细分析。Liu 等<sup>[33]</sup>认为,MCR 酶分 MCR-N(氨基酸 1–549) 和 MCR-C(氨基酸 550–1219) 两个活性中心,且催化丙二酸单酰 CoA 合成 3HP 分两步:MCR-C 先将丙二酸单酰 CoA 还原成游离的中间体丙二酸半醛,再由 MCR-N 将其催化为 3HP(图 1)。Liu 等<sup>[34]</sup>对该路径中关键酶的活性分析后发现,MCR-C 活性比 MCR-N 低 4–5 倍,即 MCR 酶活性不均衡限制下游产物高效积累。分别对 MCR-C 和 MCR-N 进行定向诱变来调控两者的表达速率,同时优化发酵条件,P3HP 前体物 3-HP 的产量最高可达到 40.6 g/L。

Yang 等<sup>[35]</sup>认为丙二酸单酰辅酶 A 代谢不平衡限制下游产物合成,采用反义 RNA 技术下调丙二酸单酰辅酶 A 合成脂肪酸通路,并在 *E. coli* 中实现富集,当 *fabD* 基因表达被抑制时细胞内丙二酸单酰辅酶 A 浓度增加 4.5 倍。Yuzawa 等<sup>[36]</sup>在研究丙二酸单酰辅酶 A 经过 3-HP 途径积累聚酮化合物的过程中也发现,当胞内提供充足丙二酸单酰辅酶 A 时,下游产物的合成能力提高 100 倍。

进而 Zhang 等<sup>[37]</sup>提出设计丙二酸单酰辅酶 A 动态调节系统,以便提高丙二酸单酰辅酶 A 合成与转化速率,从而提高终产物的产量。

### 1.3 $\beta$ -丙氨酸 ( $\beta$ -alanine) 途径

前期研究发现,在甘油途径中,虽然能够提高最终产物 P3HP 的产量,但维持甘油脱水酶的活性需要外源供应维生素 B<sub>12</sub>,导致生产成本高;而丙二酸单酰辅酶 A 途径中,以葡萄糖作为碳源合成 P3HP,其产量偏低,不能够有效应用于大规模生产。

为了解决上述问题,Wang 等<sup>[38]</sup>在重组 *E. coli* 中开发了一种从廉价碳源出发由  $\beta$ -丙氨酸作为中间体合成 P3HP 的新途径(图 1)。经过一系列系统优化后,克隆 *E. coli* 的 L-天冬氨酸脱羧酶基因 *panD<sub>Ec</sub>* 及其成熟因子 *panM<sub>Ec</sub>*、3-羟基酸脱氢酶基因 *ydfG* 和丙酰辅酶 A 合成酶基因 *prpE<sub>Ec</sub>*,同时扩增 *P. putida* 的  $\beta$ -丙氨酸-丙酮酸转氨酶基因 *pp0596* 以及 *R. eutropha* 的 PHA 聚合酶基因 *phaC1<sub>Re</sub>*,并将上述全部基因在 *E. coli* 中表达。以甘油和葡萄糖为碳源,摇瓶培养重组菌株产生的 P3HP 含量为 0.5 g/L,高达细胞干重的 10.2%。虽然 P3HP 的含量不高,但该途径比其他报道途径的优势在于氧化还原中性,不需要添加任何辅酶及昂贵的前体,可以利用广泛的碳源等,以上优势也值得科研工作者进一步研究与开发。

Lacmata 等<sup>[39]</sup>在以  $\beta$ -丙氨酸为中间体的 P3HP 合成途径中发现,由天冬氨酸生物合成途径产生的 L-天冬氨酸可利用 *E. coli* 的 L-天冬氨酸- $\alpha$ -脱羧酶转化为  $\beta$ -丙氨酸,中间产物  $\beta$ -丙氨酸由 *P. putida* 的  $\beta$ -丙氨酸-丙酮酸转氨酶转化成丙二酸半醛,然后丙二酸半醛由 3-羟基酸脱氢酶从 *E. coli* 还原为 3-HP 作为 P3HP 的前体(图 1)。实验过程发现, $\beta$ -丙氨酸供应不足限制了 P3HP 的生物合成,可能是由于 L-天冬氨酸- $\alpha$ -脱羧酶活性低或胞内 L-天冬氨酸浓度不高所引起的。L-天冬

氨酸- $\alpha$ -脱羧酶是  $\beta$ -丙氨酸通路中的限速酶，可通过转入 *E. coli* 或谷氨酸棒杆 *Corynebacterium glutamicum* 的 L-天冬氨酸- $\alpha$ -脱羧酶提高合成效率，以便生成足量的  $\beta$ -丙氨酸。但实验结果显示，

L-天冬氨酸浓度的增高并未有效转化合成  $\beta$ -丙氨酸。最终实验表明，适宜条件下的重组 *E. coli* 分别在烧瓶培养和补料分批发酵中合成 0.98 g/L 和 10.2 g/L P3HP。

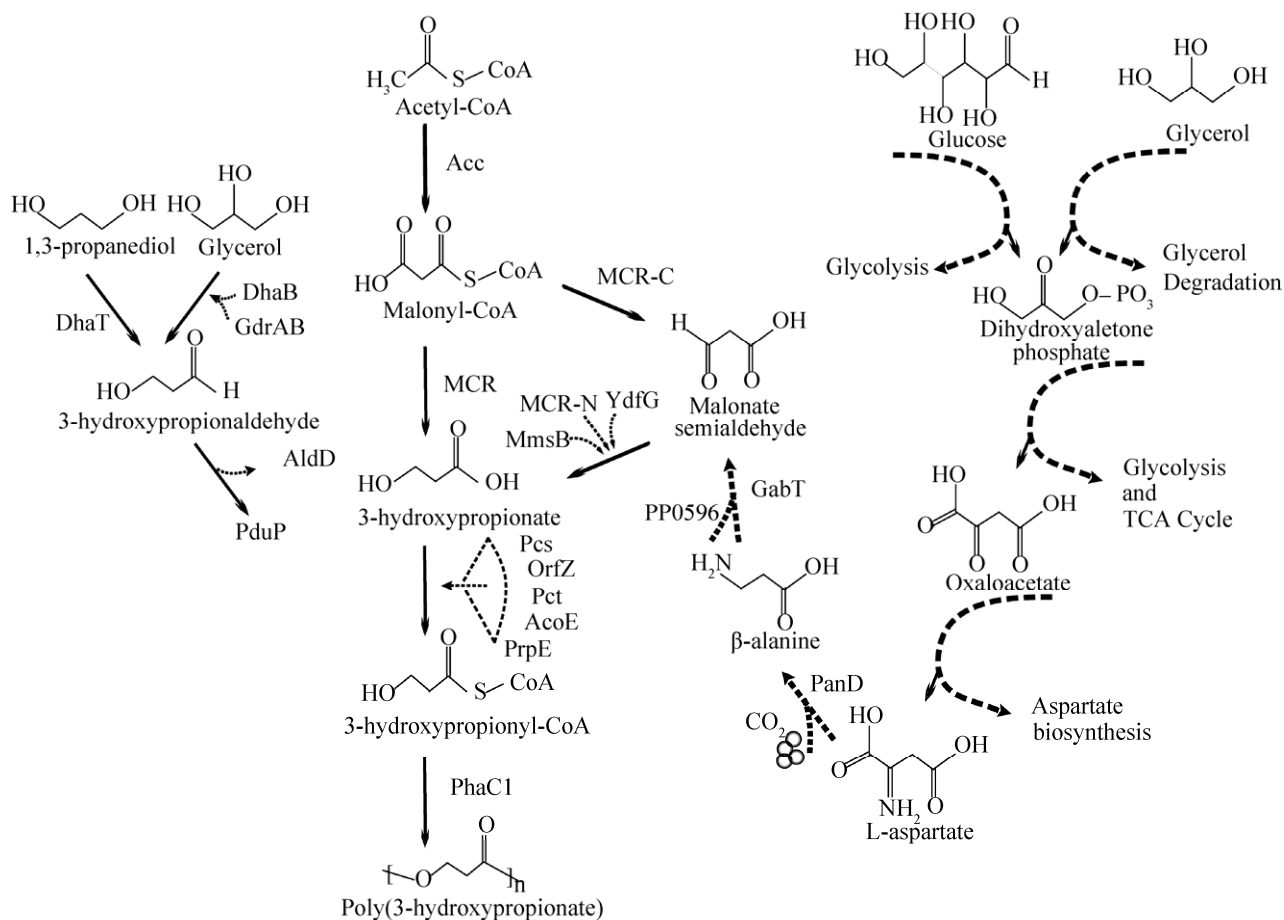


图 1 P3HP 生物合成途径<sup>[40]</sup>

Fig. 1 P3HP biosynthetic pathway<sup>[40]</sup>. Acc: acetyl-CoA carboxylase from *E. coli*; AcoE: acetyl-CoA synthase from *R. eutropha*; AldD: aldehyde dehydrogenase from *P. putida*; DhaB12: glycerol dehydratase from *C. butyricum*; DhaB123: glycerol dehydratase from *K. pneumoniae*; GdrAB: glycerol dehydration enzyme co-factor from *K. pneumoniae*; DhaT: 1,3-propanediol oxidoreductase from *P. putida* or *K. pneumoniae*; MCR: malonyl-coenzyme A (CoA) reductase from *C. aurantiacus*; MCR-C: malonyl-coenzyme A (CoA) reductase from *C. aurantiacus*; MCR-N: malonyl-coenzyme A (CoA) reductase from *C. aurantiacus*; OrfZ: coenzyme A (CoA) transferase from *C. kluyveri*; Pcs': coenzyme A (CoA) ligase domain from *C. aurantiacus*; PctCp: propionyl-CoA transferase from *C. propionicum*; PduP: propionaldehyde dehydrogenase from *S. typhimurium*; PhaC1: PHA synthase from *R. eutropha*; PrpE: propionyl-CoA synthase from *E. coli* or *S. typhimurium*; ACS: 3-hydroxypropionyl-CoA synthase from *C. aurantiacus*; YdfG: 3-hydroxyacid dehydrogenase from *E. coli*; MmsB: 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *P. putida*; PanD: L-aspartate decarboxylase from *E. coli*; PP0596: b-alanine-pyruvate transaminase from *P. putida*; GabT: 4-Aminobutyrate transaminase from *C. acetobutylicum*.

为了释放胞内聚羟基脂肪酸酯,提高最终产物产量,Lacmata 等<sup>[41]</sup>同时建立了一种利用镁严格控制的新型自溶系统,应用于工程化 *E. coli* 中 P3HP 的生产。通过启动子  $P_{mgtA}$  后面的 5'非翻译区 (5'UTR) 插入到过表达的裂解基因 (*E. coli* 的 *S*、*R* 和 *Rz*) 中构建自溶系统。在含有裂解基因和 P3HP 生物合成基因的双重质粒的 P3HP 表达系统中,自溶系统功能良好(裂解效率超过 90%),而 P3HP 生产由于质粒损失而降低。将自溶基因和 P3HP 生物合成基因整合到一个质粒中,在启动子  $P_{mgtA}$ -UTR 的菌株 Q2646 中实现了 P3HP 含量为 72.7% (比对照提高 2.4 倍) 及质粒稳定性为  $79.8\% \pm 3.1\%$ 。然而,在含有启动子  $P_{mgtA}$  的菌株 Q2647 中,由于细胞快速裂解而不能高效合成 P3HP。在  $Mg^{2+}$  剥离条件下活化的新型自溶体系证明了在聚羟基脂肪酸酯生产中的可行性,其可能对其他胞内产物的合成具有很大的应用潜力。

## 2 结论与展望

本综述旨在总结近年来 P3HP 生物合成的研究进展。近几年,研究者通过基因工程技术构建有效的 P3HP 生物合成途径:其中,丙二酸单酰辅酶 A 途径和甘油途径经过改造可以利用丰富而廉价的碳源,在一定程度上提高 P3HP 的合成效率;而新型的  $\beta$ -丙氨酸途径经过优化也可以降低生产成本,目前也成为生物合成中的热门话题。但迄今为止,P3HP 生物合成技术依然存在以下问题:1) 添加相关辅酶及 P3HP 结构类似前体增加生产成本。2) 基因工程菌株中的质粒丢失致使最终 P3HP 产量偏低。3) 在 P3HP 生物合成途径中,相关中间产物浓度过高造成细胞毒性;部分酶活性低;氧化还原反应不平衡。以上问题都尚待解决。

随着基因编辑技术与表达修饰技术的成熟与发展,现逐步应用在医药、化工等诸多领域,因

而:1) 正如 Gao 等<sup>[29]</sup>在 2014 年的报道中利用基因组整合技术有效增加了甘油途径中 P3HP 的产量,可以将基因组的改造运用到丙二酸单酰辅酶 A 生产途径中;2) 可依据 Zhang 课题组研发的生物传感器的负反馈调控机制<sup>[13]</sup>,寻找 MCR 酶活控制的关键因子,并设计负反馈调节通路,将 MCR 的酶活性与细胞增殖能力调控在较高水平上;3) 利用基因敲除手段减少与终产物无关的代谢产物的生成,最终构建出不需要额外添加辅酶及前体,通过丙二酸单酰辅酶 A 合成途径,仅利用可再生、廉价碳源即可高效合成 P3HP 的稳定遗传背景的 *E. coli* 株系,推进廉价、大规模生产 P3HP 的工业化进程。

## REFERENCES

- [1] Chen GQ. Recent progress in application of microbial polyhydroxyalkanoates. Mater China, 2012, 31(2): 7–15 (in Chinese).  
陈国强. 微生物聚羟基脂肪酸酯的应用新进展. 中国材料进展, 2012, 31(2): 7–15.
- [2] Lemoigne M. Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide beta-oxybutyrique. Bull Soc Chim Biol, 1926, 8: 770–782.
- [3] Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Biochem Eng J, 2003, 16(2): 81–96.
- [4] Andreeßen B, Lange AB, Robenek H, et al. Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(2): 622–626.
- [5] Gresham TL, Jansen JE, Shaver FW.  $\beta$ -Propiolactone. I. polymerization reactions. J Am Chem Soc, 1948, 70(3): 998–999.
- [6] Yamashita M, Takemoto Y, Ihara E, et al. Organolanthanide-initiated living polymerizations of  $\epsilon$ -caprolactone,  $\delta$ -valerolactone, and  $\beta$ -propiolactone. Macromolecules, 1996, 29(5): 1798–1806.
- [7] Nanba T, Ito H, Kobayashi H, et al. Production process of poly(hydroxyalkanoate): JP, JPH06329774. 1994-11-29.

- [8] Zhang DH, Hillmyer MA, Tolman WB. A new synthetic route to poly[3-hydroxypropionic acid] (P[3-HP]): ring-opening polymerization of 3-HP macrocyclic esters. *Macromolecules*, 2004, 37(22): 8198–8200.
- [9] Fang XB, Tao YL, Xu KT, et al. Catalytic synthesis of poly(3-hydroxypropionic acid). *Chin J Synth Chem*, 2007, 15(4): 452–453 (in Chinese).  
方孝斌, 陶玉伦, 许开天, 等. 铈催化合成聚 3-羟基丙酸. *合成化学*, 2007, 15(4): 452–453.
- [10] Valentin HE, Mitsky TA, Mahadeo DA, et al. Application of a propionyl coenzyme a synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(12): 5253–5258.
- [11] Zhou Q, Shi ZY, Meng DC, et al. Production of 3-hydroxypropionate homopolymer and poly(3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by recombinant *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2011, 13(6): 777–785.
- [12] Wang Q, Liu CS, Xian M, et al. Biosynthetic pathway for poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol*, 2012, 50(4): 693–697.
- [13] Liu D, Xiao Y, Evans BS, et al. Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl-CoA sensor-actuator. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(2): 132–140.
- [14] Yazdani SS, Gonzalez R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 340–351.
- [15] Johnson DT, Taconi KA. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog*, 2007, 26(4): 338–348.
- [16] Quispe CAG, Coronado CJR, Carvalho Jr JA. Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renew Sust Energy Rev*, 2013, 27: 475–493.
- [17] Wang Q, Yang P, Liu CS, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol by recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2013, 131: 548–551.
- [18] Heinrich D, Andreesen B, Madkour MH, et al. From waste to plastic: synthesis of poly(3-hydroxypropionate) in *Shimwellia blattae*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(12): 3582–3589.
- [19] Andreeßen B, Taylor N, Steinbüchel A. Poly(3-hydroxypropionate): a promising alternative to fossil fuel-based materials. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(21): 6574–6582.
- [20] Feng XJ, Xian M, Liu W, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol using engineered *Klebsiella pneumoniae* strain without vitamin B<sub>12</sub>. *Bioengineered*, 2015, 6(2): 77–81.
- [21] Fukui T, Suzuki M, Tsuge T, et al. Microbial synthesis of poly((R)-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) from unrelated carbon sources by engineered *Cupriavidus necator*. *Biomacromolecules*, 2009, 10(4): 700–706.
- [22] Lee SK, Newman JD, Keasling JD. Catabolite repression of the propionate catabolic genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol*, 2005, 187(8): 2793–2800.
- [23] Lim HN, Lee Y, Hussein R. Fundamental relationship between operon organization and gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(26): 10626–10631.
- [24] Sim SJ, Snell KD, Kim BW, et al. Increased poly-β-hydroxybutyrate (PHB) chain length by the modulation of PHA synthase activity in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(24): 2057–2061.
- [25] Hiroe A, Tsuge K, Nomura CT, et al. Rearrangement of gene order in the *phaCAB* operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(9): 3177–3184.
- [26] Andreeßen B, Johanningmeier B, Burbank J, et al. Influence of the operon structure on poly(3-hydroxypropionate) synthesis in *Shimwellia blattae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(17): 7409–7422.
- [27] Yang P, Wang Q, Xian M, et al. The production of poly(3-hydroxypropionate) by recombinant *Escherichia coli* from glycerol. *Microbiol China*, 2014, 41(10): 1961–1968 (in Chinese).  
杨鹏, 王琦, 咸漠, 等. 以甘油为底物利用重组大肠杆菌生产聚 3-羟基丙酸. *微生物学通报*, 2014, 41(10): 1961–1968.
- [28] Yang P. The production of poly(3-hydroxypropionate) and 1,3-PDO by biosynthesis from glycerol[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2014 (in Chinese).  
杨鹏. 从甘油途径生物法合成 P3HP 和 1,3-PDO[D]. 大连: 大连工业大学, 2014.



- [29] Gao YQ, Liu CS, Ding YM, et al. Development of genetically stable *Escherichia coli* strains for poly(3-hydroxypropionate) production. PLoS ONE, 2014, 9(5): e97845.
- [30] Wójcik K, Wieckiewicz J, Kuczma M, et al. Instability of hybrid plasmids in *Bacillus subtilis*. Acta Microbiol Pol, 1993, 42(2): 127–136.
- [31] Friehs K. Plasmid copy number and plasmid stability//Scheper T. New Trends and Developments in Biochemical Engineering. Berlin Heidelberg: Springer, 2004: 47–82.
- [32] Hügler M, Menendez C, Schägger H, et al. Malonyl-coenzyme A reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation. J Bacteriol, 2002, 184(9): 2404–2410.
- [33] Liu CS, Wang Q, Xian M, et al. Dissection of malonyl-coenzyme A reductase of *Chloroflexus aurantiacus* results in enzyme activity improvement. PLoS ONE, 2013, 8(9): e75554.
- [34] Liu CS, Ding YM, Zhang RB, et al. Functional balance between enzymes in malonyl-CoA pathway for 3-hydroxypropionate biosynthesis. Metab Eng, 2016, 34: 104–111.
- [35] Yang YP, Lin YH, Li LY, et al. Regulating malonyl-CoA metabolism via synthetic antisense RNAs for enhanced biosynthesis of natural products. Metab Eng, 2015, 29: 217–226.
- [36] Yuzawa S, Chiba N, Katz L, et al. Construction of a part of a 3-hydroxypropionate cycle for heterologous polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. Biochemistry, 2012, 51(49): 9779–9781.
- [37] Zhang FZ, Carothers JM, Keasling JD. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. Nat Biotechnol, 2012, 30(4): 354–359.
- [38] Wang Q, Yang P, Xian M, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for poly(3-hydroxypropionate) production from glycerol and glucose. Biotechnol Lett, 2014, 36(11): 2257–2262.
- [39] Lacmata ST, Kuate JR, Ding YM, et al. Enhanced poly(3-hydroxypropionate) production via  $\beta$ -alanine pathway in recombinant *Escherichia coli*. PLoS ONE, 2017, 12(3): e0173150.
- [40] Yang P, Wang Q, Xian M, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) and its copolymers. Chin Sci Bull: Chin Ver, 2014, 59: 2137–2144 (in Chinese).  
杨鹏, 王琦, 咸漠, 等. 聚 3-羟基丙酸及其共聚物的生物合成. 科学通报, 2014, 59: 2137–2144.
- [41] Lacmata ST, Yao L, Xian M, et al. A novel autolysis system controlled by magnesium and its application to poly(3-hydroxypropionate) production in engineered *Escherichia coli*. Bioengineered, 2017, doi: 10.1080/21655979.2017.1286432.

(本文责编 陈宏宇)