

生物合成3-羟基丙酸的代谢工程研究进展

詹元龙, 赵瑞英, 崔鸿亮, 李华泰, 宋志峰, 刘长莉

东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

詹元龙, 赵瑞英, 崔鸿亮, 等. 生物合成3-羟基丙酸的代谢工程研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1101-1112.

Zhan YL, Zhao RY, Cui HL, et al. Progress in metabolic engineering of biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1101-1112.

摘要: 3-羟基丙酸 (3-HP) 作为一种重要的平台化合物, 以此为底物能够合成多种具有商业潜质的生物制品。野生菌合成 3-HP 产量较低, 严重限制 3-HP 的大规模应用与生产, 通过改造合成代谢通路的相关基因, 构建以廉价底物为碳源的工程菌株, 实现降低生产成本提高产量的目的。文中将对近年来国内外通过代谢工程合成 3-羟基丙酸的研究进展进行概述, 并对甘油途径、丙二酸单酰辅酶 A 途径、 β -丙氨酸等途径合成 3-HP 的优缺点进行总结分析, 对 3-HP 未来发展前景进行展望。

关键词: 3-羟基丙酸, 代谢工程, 甘油途径, 丙二酸单酰辅酶 A 途径, β -丙氨酸途径

Progress in metabolic engineering of biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid

Yuanlong Zhan, Ruiying Zhao, Hongliang Cui, Huatai Li, Zhifeng Song, and Changli Liu

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

Abstract: As an important platform compound, 3-hydroxypropionic acid (3-HP) can be used as a substrate to synthesize a variety of biological products with commercial potential. The titer of 3-HP by wild-type bacteria is low, which severely limits the large-scale application and production of 3-HP. By modifying the genes related to the metabolic pathway, engineered bacteria using cheap substrates as carbon sources are constructed, the aim of reducing production cost and increasing output is realized. In this paper, the recent progress in the synthesis of 3-HP by metabolic engineering at home and abroad is reviewed. The advantages and disadvantages of glycerol pathway, malonyl-CoA pathway and beta-alanine pathway for synthesis of 3-HP are also summarized and analyzed, and the future development of 3-HP is prospected.

Keywords: 3-hydroxypropionic acid, metabolic engineering, glycerol pathway, malonyl-CoA pathway, β -alanine pathway

随着石化资源的逐步枯竭和气候的不断恶化, 人们急需从石化经济向生物经济转变。3-羟基丙酸 (3-hydroxypropionic acid, 3-HP) 是一种可再生生物物质, 在 2004 年更新的 12 种重要平台化学品中排

Received: September 3, 2019; **Accepted:** October 10, 2019

Supported by: Research Funds for the Central Universities (Nos. 2572018CJ01, 2572019BD05), Natural Natural Science Foundation of China (No. 51678120).

Corresponding author: Changli Liu. Tel/Fax: +86-451-82192073; E-mail: liuchangli@nefu.edu.cn

中央高校研究项目 (Nos. 2572018CJ01, 2572019BD05), 国家自然科学基金 (No. 51678120) 资助。

名第三, 美国能源部将 3-HP 列为 21 世纪最具潜力的化工产品之一^[1]。

3-羟基丙酸, 又称 β -羟基丙酸, 是一种三碳非手性的有机物分子, 分子式为 $C_3H_6O_3$, 分子量为 90.08。在化学结构上, 与乳酸互为结构异构体, 两端含有一个羟基和一个羧基。3-HP 的应用具有多样化, 可用作生产粘合剂、塑料包装、纤维、清洁剂和树脂等, 也可聚合成聚 3-羟基丙酸酯 (P3HP) 或含 3-HP 的共聚物^[2]。3-HP 是多种关键化合物的合成前体, 如丙二酸、1,3-丙二醇、丙烯酸、丙烯酸甲酯以及具有致癌作用的丙烯酰胺等。

3-HP 的合成方法主要分为化学合成法和生物合成法。其中化学合成法生产 3-HP 具有成本高、

起始材料昂贵以及与环境不相容等特点。生物合成法中的天然合成途径又面临着遗传背景不清晰、产量低、稳定性差、工业生产实施困难等问题, 因此利用代谢工程技术合成 3-HP 已成为当今各国的研究热点。文中对生物合成 3-羟基丙酸的代谢工程研究进行概述, 并对甘油途径、丙二酸单酰辅酶 A 途径以及 β -丙氨酸途径进行详细介绍以及优缺点分析, 最后对未来 3-羟基丙酸的研究方向进行展望。

1 甘油途径

因甘油价格低廉、来源广泛, 以甘油途径合成 3-HP 已成为各国学者的研究热点, 如表 1 所示。其主要分为两种途径: 辅酶 A 依赖途径和辅酶 A

表 1 利用甘油途径合成 3-HP 情况

Table 1 Synthesis of 3-HP by glycerol pathway

| Engineering strategy | Strain | Reactor | Titer (g/L) | References |
|---|-------------------------|----------------|-------------|------------|
| Expressing of <i>dhaB</i> , <i>ald4</i> gene | <i>E. coli</i> | Shake flask | 0.17 | [4] |
| Expressing of <i>dhaB</i> , <i>aldH</i> gene | <i>E. coli</i> | Shake flask | 0.58 | [5] |
| Expressing of <i>dhaB</i> , <i>aldH</i> gene and medium optimization | <i>E. coli</i> | Fed-batch | 31.00 | [6] |
| Introducing the activation factor <i>gdrAB</i> , expressing <i>dhaB</i> and <i>KGSADH</i> gene | <i>E. coli</i> | Fed-batch | 38.70 | [7] |
| Screening for different acid-tolerant recombinant strains | <i>E. coli</i> | Fed-batch | 41.50 | [8] |
| Introducing a new synthetic selection device and screening for highly reactive aldehyde dehydrogenase | <i>E. coli</i> | 96-well plates | 5.08 | [9] |
| Expressing of 5 untranslated regions to optimize expression levels | <i>E. coli</i> | Fed-batch | 40.51 | [10] |
| Fine-tuning expression between genes using a synthetic regulatory cassette consisting of RBS | <i>E. coli</i> | Fed-batch | 56.40 | [11] |
| Deleting the glycerol inhibitors <i>glpR</i> and <i>ackA-pta</i> and the <i>yqhD</i> gene | <i>E. coli</i> | Bioreactor | 42.10 | [12] |
| Expressing of the <i>dhaB-dhaR</i> and <i>PSALDH</i> genes deleting <i>glpK</i> and <i>yqhD</i> genes | <i>E. coli</i> | Bioreactor | 57.30 | [13] |
| Screening for the <i>gabD4</i> gene, using site-directed mutagenesis to increase activity, knocking out <i>ackA-pta</i> , <i>yqhD</i> genes | <i>E. coli</i> | Fed-batch | 71.90 | [14] |
| Expressing of the <i>puuC</i> gene, deleting of the <i>dhaT</i> gene | <i>K. pneumoniae</i> | Fed-batch | 16.00 | [16] |
| Studying on nitrate as electron acceptor | <i>K. pneumoniae</i> | Fed-batch | 22.50 | [17] |
| Using two-stage fed-batch fermentation technology, deleting of the <i>ldhA</i> and <i>gdrAB</i> genes | <i>K. pneumoniae</i> | Fed-batch | 61.90 | [18] |
| Expressing of <i>dhaB</i> and <i>gdrAB</i> genes, deleting of byproduct synthesis genes and optimization of culture conditions | <i>K. pneumoniae</i> | Fed-batch | 43.00 | [19] |
| Natural promoter drives heterologous expressing of the <i>ald4</i> gene | <i>K. pneumoniae</i> | Shake flask | 4.23 | [20] |
| Using kanamycin-resistant Pkan promoter and expressing of <i>aldH</i> gene | <i>K. pneumoniae</i> | Shake flask | 15.28 | [21] |
| Using the IPTG-inducible tac promoter to block the synthesis of by-products | <i>K. pneumoniae</i> | Fed-batch | 83.80 | [22] |
| Overexpressing of <i>PuuC</i> gene, using tandem repeat tac promoter and supplement yeast extract | <i>K. pneumoniae</i> | Bioreactor | 102.61 | [23] |
| Introducing of ALDH pathway to express <i>dhaB</i> , <i>gdrAB</i> and <i>puuC</i> genes | <i>P. denitrificans</i> | Shake flask | 4.92 | [24] |
| Heterologous expressing of the ALDH pathway and deleting of the <i>glpK</i> gene | <i>B. subtilis</i> | Shake flask | 10.00 | [25] |

非依赖途径^[3]。在辅酶 A 依赖途径中,甘油通过辅酶 B12 依赖性的甘油脱水酶 (PduCDE) 转化为 3-羟基丙醛(3-HPA),又经丙醛脱氢酶 (PduP)、磷酸转移酶(PduL) 和丙酸激酶 (PduW) 的催化作用生成 3-HP。辅酶 A 非依赖途径中,甘油通过辅酶 B12 非依赖性的甘油脱水酶催化生成 3-HPA,再利用醛脱氢酶将 3-HPA 氧化成 3-HP。目前,国内外对甘油途径的大部分研究都是辅酶 A 非依赖途径。

在两种途径中,醛脱氢酶需要 NAD^+ 作为辅因子,维持 NAD^+ 辅因子再生可通过以下两种方法解决。首先,提供氧气的供应,增加通气量后虽然可以维持 NAD^+ 在电子传递链中再生,但氧的存在既抑制辅酶 B12 的合成又对脱水酶造成失活。其次,可在 3-HPA 转化为 1,3-丙二醇 (1,3-PDO) 的过程中添加 NADH , 利用 1,3-丙二醇氧化还原酶消耗 NADH 生成 NAD^+ 。

1.1 大肠杆菌作为宿主菌株

大肠杆菌 *E. coli* 作为一种模式生物,具有遗传背景清晰、易于改造、对生长环境要求低等优点,此外,在合成途径中,因其自身含有醛脱氢酶基因,可在表达甘油脱水酶 *dhaB* 基因的基础上,将合成的 3-HPA 氧化为 3-HP。目前,以 *E. coli* 为宿主的合成途径还存在一些问题。首先,*E. coli* 没有甘油脱水酶基因,需要从其他宿主菌中筛选并导入宿主细胞,宿主对酶的耐受性需要进一步研究。其次,在甘油途径中需要辅酶 B12 的供应,提高了生产成本,不利于工业生产。除此之外,甘油脱水酶与醛脱氢酶之间的平衡问题同样需要被考虑。针对以上问题,各国学者开始筛选多种宿主菌的脱水酶以及高效的醛脱氢酶,并在调整酶之间的平衡和抑制副产物合成等方面进行研究。

以重组 *E. coli* 为宿主,利用甘油途径合成 3-HP 最早被提出是在 2001 年,Suthers 等^[4]以甘油为底物,通过筛选来自不同宿主的醛脱氢酶后发现来自酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的醛脱氢酶活性最强、效果最佳,并利用基因工程技术将来自肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 的甘油脱

水酶 *dhaB* 基因以及来自 *S. cerevisiae* 的醛脱氢酶 *ald4* 基因在重组 *E. coli* 中过表达,生成 0.17 g/L 的 3-HP,虽然产量不高,但从此拉开了利用甘油合成 3-HP 的序幕。

由于甘油脱水酶的性质不稳定,醛脱氢酶活性较低,导致两种酶在宿主菌中不能平衡表达,使中间代谢产物 3-羟基丙醛 (3-HPA) 不断积累产生毒性,为解决此类问题,各国学者对此进行了研究。韩国 Park 团队在重组 *E. coli* 中,过表达来自 *K. pneumoniae* 的 *dhaB* 基因和来自 *E. coli* 的 *aldH* 基因,摇瓶培养后获得 0.58 g/L 的 3-HP,产率为 0.02 g/(L·h)^[5],之后将分批补料培养基进行优化,改变物化参数使产率提高到 0.43 g/(L·h)^[6]。为提高醛脱氢酶的活性和甘油脱水酶的稳定性,Rathnasingh 等^[7]在 *E. coli* 中导入激活因子 *gdrAB* 以及过表达来自巴西固氮菌 *Azospirillum brasilens* 中活性较高的醛脱氢酶 KGSADH,产量达到 38.7 g/L,产率高达 1.32 g/(L·h)。之后又在 9 株不同耐酸的重组 *E. coli* 中同时过表达 3 种基因,最终在 *E. coli* W3100 和 *E. coli* W 两种宿主菌中分别产生 15.3 g/L 和 41.5 g/L 的 3-HP,解决了宿主对酸耐受程度的问题^[8]。若想使产量达到新的突破,仅利用传统技术对目的基因筛选及表达是不够的,因此 Seok 等^[9]运用合成生物学技术,引入一种新型合成选择装置,该装置无需昂贵的仪器或密集型的劳动程序就可以筛选出定向进化的醛脱氢酶 KGSADH,将酶的催化效率提高 2.79 倍,最终获得优化的 3-HP 生产菌株。该装置可作为高通量筛选工具用于设计 3-HP 的合成途径,为后续研究提供一个新思路,使代谢工程技术不只停留在基因筛选和表达等方面。

筛选高活性的醛脱氢酶可解决活性较低的问题,但一味提高醛脱氢酶活性会起到相反作用,因此只有维持酶之间的平衡表达才能使产量最大化。Lim 等^[10]发现可在重组宿主菌体内表达 5 个非翻译区来优化表达水平,进而使翻译速率形成差异,在此基础上,通过微调 *dhaB1* 基因的表达,使酶之间活性达到平衡状态,测试后发现 4 种不同的重

组菌株经摇瓶培养后可使 3-HP 产量提高 2.4 倍, 达到 40.51 g/L。在此之后, Park 团队^[11]通过使用核糖体结合位点 (RBS) 组成的合成调节盒来微调两个基因之间的表达, 使醛脱氢酶的表达活性提高 8 倍, 在分批补料培养中产生高达 56.4 g/L 的 3-HP, 产率达到 1.18 g/(L·h), 以此证明调控酶活的平衡在 3-HP 生产中的重要性。

在 3-HP 的合成过程中会伴随着一些副产物的生成, 副产物不仅能利用培养基中的营养成分促进自身生长代谢, 工业生产时还涉及到产物分离困难等问题。理论上在表达高活性的醛脱氢酶以及调节酶之间平衡的基础上, 敲除副产物合成途径中的关键基因可使产量得到改善。Jung 等^[12]敲除甘油抑制因子 *glpR* 和促进乙酸合成的 *ackA-pta* 基因以及催化 3-HPA 生成 1,3-PDO 的 *yqhD* 基因, 发酵培养后获得 42.1 g/L 的 3-HP, 产率达到 1.32 g/(L·h)。在此之后, 研究人员将高活性的醛脱氢酶与敲除副产物合成基因的方法有效结合, 在重组 *E. coli* BL21(star) 中过表达来自短乳杆菌 *Lactobacillus breris* 的 *dhaB-dhaR* 基因以及来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的半醛脱氢酶 PSALDH, 并破坏途径中的 *glpK*、*yqhD* 基因, 培养 36 h 后产生 57.3 g/L 3-HP, 使产率提高至 1.59 g/(L·h)^[13]。为使醛脱氢酶的活性最大化, Chu 等^[14]从 17 种醛脱氢酶筛选来自贫铜菌 *Cupriavidus necator* 的醛脱氢酶 *gabD4* 基因, 并基于同源建模进行定点、饱和诱变, 获得的突变菌株的活性提高 1.4 倍, 同时又对乙酸、乙醇等副产物的合成基因 *ackA-pta*、*yqhD* 进行敲除, 最终在分批补料生物反应器中获得 71.9 g/L 的 3-HP, 产率高达 1.8 g/(L·h), 是迄今为止以 *E. coli* 为宿主利用甘油途径合成 3-HP 的最高产量。但该实验仍有可提升的空间, 后续研究可在此基础上继续调整酶之间的表达以及筛选更合适的宿主菌使产量进一步提高。

以 *E. coli* 为宿主生产 3-HP, 具有遗传背景清晰、对生长环境要求低以及可利用廉价的碳源甘油为底物等优点, 但在途径中表达来自外源的甘油脱

水酶基因、补充昂贵的辅酶 B12 以及维持 NAD^+ 再生仍然是急需攻克的问题。最近对巨大芽孢杆菌以及脱氮菌的研究显示可通过去除基于核糖开关的反馈抑制系统来增加辅酶 B12 合成, 可将此引入甘油合成途径解决辅酶 B12 添加的问题^[15]。

1.2 肺炎克雷伯氏菌作为宿主菌株

与 *E. coli* 相比, 肺炎克雷伯氏菌 *K. pneumoniae* 自身具有 *dhaB* 基因, 并能够在微氧或厌氧的条件下合成辅酶 B12, 在很大程度上解决辅酶 B12 添加的问题, 降低了生产成本, 无疑成为替代 *E. coli* 最好的选择。但是该菌株可在医院环境中迅速传播而引起人类感染, 引起公众健康问题, 并且其遗传背景也并不清晰。在 *K. pneumoniae* 中, 甘油途径分为还原途径和氧化途径。甘油被甘油脱水酶还原生成 3-HPA 后, 部分 3-HPA 继续被还原为 1,3-PDO, 而另一部分 3-HPA 则被醛脱氢酶氧化为 3-HP。利用 *K. pneumoniae* 生产 3-HP 的研究方向主要在关键酶的筛选、副产物合成基因的敲除以及高效启动子的筛选和优化等几个方面。

敲除副产物合成基因并筛选高活性的醛脱氢酶能有效减少副产物生成, 提高目标产物的产量。研究首先集中在抑制关键副产物 1,3-PDO 的合成上, Ashok 等^[16]通过表达醛脱氢酶 *puuC* 基因, 并从染色体中删除编码 1,3-PDO 氧化还原酶的 *dhaT* 基因, 产生 3.60 g/L 的 3-HP, 又通过微氧分批补料培养获得 16.00 g/L 的 3-HP。之后在硝酸盐作为电子受体的潜在用途的研究中发现该菌株在厌氧条件下可产生 22.50 g/L 的 3-HP^[17], 产率提高至 0.45 g/(L·h)。但在菌株生长后期, 乳酸的生成抑制了 3-HP 的生长, 使产量无法继续提高, 应通过其他技术手段进行优化、改善和解决乳酸生成的问题。于是为抑制乳酸的形成, Jiang 等^[18]使用两阶段分批补料发酵技术, 同时敲除乳酸和 1,3-PDO 的合成基因 *ldhA*、*dhaT*, 构建了 3 种代谢工程化菌株过表达来自 *E. coli* 的醛脱氢酶, 通过控制通气速率, 该菌株在 38 h 内产生 61.90 g/L 的 3-HP, 产率提升至 0.58 g/(L·h)。两阶段分批补料发酵的使用, 是

3-HP 培养技术新的突破。为实现 3-HP 产量最大化, Ko 等敲除多种副产物合成基因抑制乳酸、琥珀酸、1,3-PDO 的生成, 并将 *dhaB* 和 *gdrAB* 基因过表达以及在糖酵解途径减少甘油同化、增加甘油流向共生产和改变通气速率等方法, 最终合成 43.00 g/L 的 3-HP^[19]。该方法对副产物合成途径进行更深程度的研究, 抑制副产物生成和培养条件优化, 但产量并未实现新的突破, 后续可选取更高活性的醛脱氢酶进行研究。

启动子控制目的基因表达, 筛选不同强度的启动子, 可提高关键酶的活性进而提高产量。使用 *K. pneumoniae* 中天然启动子驱动醛脱氢酶 *ald4* 基因的异源表达, 获得的 3-HP 产量低且表达量无法得到控制^[20]。于是马春路等^[21]选用含有卡那霉素抗性基因的 *Pkan* 启动子在菌中过表达 *aldH* 基因, 培养后获得 15.28 g/L 的 3-HP。Li 等^[22]发现 IPTG 诱导型 *tac* 启动子能过表达 *puuC* 基因, 又通过阻断副产物合成途径并优化发酵条件, 分批补料培养获得 83.80 g/L 的 3-HP, 产率高达 1.16 g/(L·h)。在最新的研究中, Zhao 等^[23]利用 *K. pneumoniae* DSM 2026 为宿主菌株, 使用 3 个串联重复 *tac* 启动子过表达 *puuC* 基因, 并在培养过程中维持中性的 pH 值和补充酵母提取物, 使 3-HP 产量高达 102.61 g/L, 是迄今为止通过甘油途径合成 3-HP 的最高产量, 实验选用乳酸对丙酮酸回流的方式导致发酵后期乳酸完全消失, 解决后续 3-HP 和乳酸难以分离的问题。以 *K. pneumoniae* 为宿主可有效解决 *E. coli* 面临的辅酶 B12 的添加、外源甘油脱水酶基因表达等问题。研究过程中对高效醛脱氢酶的筛选、副产物合成基因的敲除以及高强度启动子的选择对最终产量有着重要的影响, 后续研究中可结合合成生物学中生物传感器调控机制和调控因子进行研究。

1.3 其他宿主菌

脱氮假单胞菌 *Paracoccus denitrificans* 在有氧条件下能够合成辅酶 B12, 保证 NAD^+ 有效再生, 被认为是利用甘油生产 3-HP 最理想的菌株, Zhou 等^[24]在 *P. denitrificans* 中引入来自 *K. pneumoniae*

的 ALDH 途径, 过表达 *dhaB*、*gdrAB*、*puuC* 基因后, 摇瓶发酵可积累 4.92 g/L 的 3-HP。但以 *P. denitrificans* 为宿主面临的问题是在生成 3-HP 的同时, 3-HP 被氧化成丙二酸并将 3-HP 作为生长的碳源, 后续研究可通过敲除转化丙二酸的相关基因方面入手。Kalantari 等^[25]以枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 生产 3-HP, 该菌株可在高温下生长, 节省发酵过程中的冷却步骤, 节约生产成本, 通过异源表达 *K. pneumoniae* 的 ALDH 途径, 敲除甘油激酶编码基因 *glpK*, 阻断甘油向 3-磷酸甘油的代谢通路, 构建的重组菌株最终合成 10.00 g/L 的 3-HP。

其他宿主菌利用甘油途径合成 3-HP 虽能解决辅酶再生、发酵过程中低温冷却的问题, 但仍面临着遗传背景不清晰、合成产量低等问题, 研究人员需要对相关代谢途径进一步研究来解决此类问题。

目前对甘油途径的研究主要以 *E. coli* 和 *K. pneumoniae* 为主。*E. coli* 具有遗传背景清晰、对生长环境要求低以及利用廉价的碳源为底物等优点, 但在途径中表达外源甘油脱水酶基因、补充昂贵的辅酶 B12 以及维持 NAD^+ 再生仍然是急需攻克的问题, 未来的研究可在 *E. coli* 中通过去除基于核糖开关的反馈抑制系统来增加辅酶 B12 合成。以 *K. pneumoniae* 为宿主可有效解决辅酶 B12 的添加、外源甘油脱水酶基因表达等问题, 研究过程中对高效醛脱氢酶的筛选、副产物合成基因的敲除以及高强度启动子的选择对最终产量有着重要的影响, 后续研究中可结合合成生物学中生物传感器调控机制和调控因子进行研究。其他宿主菌利用甘油途径合成 3-HP 的研究应主要解决遗传背景不清晰, 合成产量低等问题。

2 丙二酸单酰辅酶 A 途径

丙二酸单酰辅酶 A 途径主要是利用乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 将来自于葡萄糖的中间产物乙酰辅酶 A 还原成丙二酸单酰辅酶 A, 又通过丙二酸单酰辅酶 A 还原酶 (MCR) 生成 3-HP, 其中丙二酸半醛 (MSA) 是丙二酸单酰辅酶 A 合成 3-HP

的中间体。该途径中葡萄糖转化成乙酰-CoA 产生 2 mol NADH、1 mol ATP 和 1 mol CO₂，乙酰-CoA 利用 1 mol CO₂ 和 1 mol ATP 羧化成丙二酰辅酶 A，随后利用 2 mol NADPH 将丙二酰辅酶 A 还原成 3-HP。该途径能够在能量上很好地平衡，具有较高的转化效率。目前对丙二酰辅酶 A 途径的研究主要通过改善关键酶的催化作用、平衡酶之间的活性、增加辅因子和能量供应以及解决细胞毒性等几个方面，如表 2 所示。

2.1 大肠杆菌作为宿主菌株

在丙二酸单酰辅酶 A 途径中，大肠杆菌 *E. coli* 自身含有能够将乙酰辅酶 A 转化为丙二酸单酰辅酶 A 的乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)，在培养过程中，可诱导 *acc* 基因过表达，避免外源基因的添加而造成代谢负担。

韩国 Park 团队^[26]将 *acc*、*pntAB* 基因以及来自橙色绿屈挠菌 *Chloroflexus aurantiacus* 的 *mcr* 基因在 *E. coli* 体内共表达，在 24 h 内累积 0.19 g/L 的 3-HP，理论上抑制副产物的合成会提高目标产物，

但对合成副产物相关基因 *pta-ackA*、*ldhA*、*sucAB* 敲除后，产量并未得到改善。此研究首次证明从葡萄糖生产 3-HP 代谢通路的可行性，但因 MCR 酶的活性较低限制了 3-HP 的高产，后续可通过增加前体物质和 NADPH 的供应以及对 *mcr* 基因进行改造使酶活提高进而提高 3-HP 产量。

为改善关键酶的催化作用，赵广团队^[27]对途径中的 *mcr* 基因进行改造，通过将 *mcr* 基因分成两个功能结构域 MCR 的 N 末端和 MCR 的 C 末端区域，发现当 MCR 的两个功能区域拆分后，酶活有较大提升，又通过定点诱变技术进行改造，*E. coli* 在 48 h 后累积 0.15 g/L 的 3-HP。后续发现 MCR-C 端表达量及酶活均低于 MCR-N 端，推测两个结构域的活性不平衡是导致 MCR 整体酶活低的主要原因，通过饱和诱变和定点突变来提高 MCR-C 的酶活，采用染色体整合技术控制 MCR-N 端酶活，最后结合发酵条件的优化及补料分批培养 3-HP 产量可达 40.60 g/L，产率高达 0.56 g/(L·h)，是已知利用丙二酸单酰辅酶 A 途径合成 3-HP 的最

表 2 利用丙二酸单酰辅酶 A 途径合成 3-HP 情况

Table 2 Synthesis of 3-HP using the malonyl-CoA pathway

| Engineering strategy | Strain | Carbon source | Reactor | Titer (g/L) | References |
|--|----------------------|-----------------|-------------|-------------|------------|
| Expressing of <i>acc</i> , <i>pntAB</i> , <i>mcr</i> genes | <i>E. coli</i> | Glucose | Shake flask | 0.19 | [26] |
| Dissecting MCR into two fragments and improved <i>E. coli</i> enzyme activity | | Glucose | Shake flask | 0.15 | [27] |
| Tuning activity level to achieve functional balance between enzymes | <i>E. coli</i> | Glucose | Fed-batch | 40.60 | [28] |
| Expressing heterologous <i>acc</i> gene and optimize media | <i>E. coli</i> | Glucose | Fed-batch | 10.08 | [29] |
| Using acetate as a substrate and deleting byproduct synthesis genes | <i>E. coli</i> | Acetate | Shake flask | 3.00 | [30] |
| Increasing reducing equivalent | <i>S. cerevisiae</i> | Glucose | Shake flask | 0.46 | [31] |
| Expressing <i>pdcl</i> , <i>ald6</i> , <i>acsL641P</i> genes and enhancing the supply of cofactors | <i>S. cerevisiae</i> | Glucose | Fed-batch | 9.80 | [32] |
| Using site-directed mutagenesis to increase <i>acc</i> gene activity | <i>S. cerevisiae</i> | Glucose | Bioreactor | 0.28 | [33] |
| Development of a novel sensor that introducing the promoter TEF1 and expressing the <i>fasI</i> gene | <i>S. cerevisiae</i> | Glucose | Bioreactor | 0.80 | [34] |
| Expressing two independent enzymes | <i>S. elongatus</i> | CO ₂ | Shake flask | 0.67 | [35] |
| Expressing heterologous biotin protein ligase without carbonic anhydrase | <i>P. furiosus</i> | Maltose | Bioreactor | 0.37 | [36] |
| Optimizing <i>mcr</i> gene expression | <i>Synechocystis</i> | CO ₂ | Shake flask | 0.84 | [37] |
| Increasing promoter strength and <i>mcr</i> gene copy number | <i>M. extorquens</i> | Glucose | Shake flask | 0.07 | [38] |
| Using high expression of the <i>hsp9</i> promoter and optimizing medium | <i>S. pombe</i> | Glucose | Shake flask | 7.60 | [39] |

高产量^[28]。赵广团队对关键酶 MCR 的研究使丙二酸单酰辅酶 A 途径合成 3-HP 的产量达到一个新的高度,在此基础上可参考 Park 团队,对合成副产物基因进行敲除以及提高辅因子供应进而提高产量。

笔者所在团队在 *mcr* 基因功能区域分离的基础上,引入美国华盛顿大学 Liu Di 设计的 FapR 生物传感器,构建根据细胞内丙二酸单酰辅酶 A 浓度来调节 *acc* 基因表达的负反馈系统,有效解决 *acc* 基因过度表达所产生的毒性问题,将含有目的基因的质粒在重组 *E. coli* BL21(DE3) 中进行表达,获得相应产量的 3-HP。此项技术已申请 2 项发明专利。

除了对关键酶进行改造,通过筛选不同的宿主-载体系统,也可使产量进一步提高。Cheng 等^[29]在 *E. coli* 中表达来自兼性厌氧菌谷氨酸棒状菌 *Corynebacterium glutamicum* 的 *acc* 基因和来自 *C. aurantiacus* 的 *mcr* 基因,通过选择不同的宿主-载体系统,最终确定宿主 *E. coli* BL21(DE3) 和 pET28a 的组合生产 3-HP 最有效,在后续发酵过程中补充 NaHCO_3 和生物素,分批补料培养 36 h 后,获得 10.08 g/L 的 3-HP,产率为 0.4 g/(L·h)。

在上述研究中,实验均以葡萄糖作为底物, Lee 等^[30]打破常规,选取醋酸盐为底物并敲除副产物合成基因。过表达 *mcr* 基因和编码乙酰-CoA 合成酶的 *acs* 基因,同时删除编码乙醛酸分流途径阻遏物的 *iclR* 基因,并添加浅蓝菌素来减少碳流向脂肪酸合成,最后在 8.98 g/L 的醋酸盐中获得 3.00 g/L 的 3-HP,之后的研究应针对 *mcr* 密码子优化提高关键酶活性以及解决辅因子循环等问题。

2.2 酿酒酵母菌作为宿主菌株

与 *E. coli* 相比,酿酒酵母 *S. cerevisiae* 同样是重要的安全模式菌株,体内含有将乙酰辅酶 A 还原成丙二酸单酰辅酶 A 的 *acc* 基因,过表达后利用丙二酸单酰辅酶 A 途径与 *mcr* 基因合成 3-HP。不同的是其可以在酸性条件下生产,增强了宿主菌对产物的耐受性,培养后的产物大部分为游离的 3-HP,在工业生产中可节省下游分离提取的费用。

在合成途径中,除了对目的基因表达和副产物合成基因敲除以外,辅因子和能量供应也必不可少。Chen 等^[31]以 *S. cerevisiae* 为宿主菌株,在过表达 *acc*、*mcr* 基因基础上,同时过表达 *adh2*、*ald6* 以及 *acsSE* 基因,并敲除合成副产物编码胞质苹果酸合酶的 *mls1* 基因,最后加入甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPNsm,使 3-HP 的产量提高到原来的 3 倍,达到 0.46 g/L,但产率仅为 0.006 g/(L·h)。Kildegaard 等^[32]为改善乙酰辅酶 A 的供应,将 *pdcl*、*ald6*、*acsL64IP* 基因一起过表达,再通过转移 NADP 依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶 *gapdh* 基因,提高 *mcr* 作用所需的 NADPH,增强辅因子的供应,使重组 *S. cerevisiae* 合成 9.80 g/L 的 3-HP,产率提升至 0.1 g/(L·h)。副产物合成基因的敲除以及辅因子和能量的供应可有效提高 3-HP 的产量,但产量低下无法达到工业生产要求,可通过对关键酶的筛选以及宿主-载体系统的选择等方面进行改善,以及引入合成生物学技术对此进行研究。

为解决关键酶活性的问题,Shi 等^[33]以 *S. cerevisiae* 为研究对象,对 *acc1* 基因的 Ser659 和 Ser1157 两个位置进行定点突变,使 *acc1* 基因活性得到增强,从而促进 3-HP 的合成,使 3-HP 产量为 0.28 g/L。David^[34]以 Liu Di 设计的 FapR 生物传感器为基础,在 *S. cerevisiae* 中开发一种新型传感器,引入酵母启动子 TEF1 控制 *mcr* 基因表达以及过表达 PHXT1 启动子控制下的抑制剂 *fas1* 基因,两个基因在 FapR 控制的代谢途径下,25 h 产生约 0.80 g/L 的 3-HP,产量虽然不高,但在方法和技术上已得到创新并开展了新的研究思路,之后的研究可以此为基础,从其他菌中筛选出高活性的关键酶以及增强辅因子的供应来提高产量。

酿酒酵母 *S. cerevisiae* 作为真核模式生物,可生长在酸性条件下,解决菌株不耐酸的问题。但产量低仍是该途径的关键问题,后续应筛选具有更高活性的乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A,并对酶之间的平衡问题进行研究。

2.3 其他宿主菌

近些年,也报道过一些其他宿主菌利用丙二酸单酰辅酶 A 途径合成 3-HP。Lan 等^[35]以伊隆-盖塔斯乳腺球菌 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 为宿主菌,通过将 *msrMs*、*mcrSt* 基因整合到染色体上,最后合成 0.67 g/L 的 3-HP,证明使用蓝细菌将 CO₂ 光合转化为 3-HP 的可行性,利用 CO₂ 代替了廉价碳源使用,解决成本高等问题。Lian 等^[36]以激烈火球菌 *Pyrococcus furiosus* 为宿主菌,过表达 *acc*、*mcr*、*mrs* 基因生成 3-HP,在此基础上将来自勤奋生金球菌 *Metallosphaera sedula* 的碳酸酐酶 CA 和生物素蛋白连接酶 BPL 分别添加至该途径,3-HP 产量达 0.12 g/L 和 0.37 g/L。实验表明辅助蛋白质在代谢工程中对异源表达极为重要。

启动子对目标基因的控制同样受到研究者的关注。Wang 等^[37]以集胞藻 *Synechocystis* sp. 为宿主,通过表达 *acc* 基因和生物素酶增强前体丙二酰辅酶 A 的供应,更换启动子和培养条件增加 *mcr* 基因的表达,并且过表达 NAD(P) 转氢酶基因来改善 NADPH 供应,6 d 后产生 0.84 g/L 的 3-HP。Yang 等^[38]使用工程化扭脱甲基杆菌 *Methylobacterium extorquens* AM1,通过增加启动子强度和 *mcr* 拷贝数未提高产量。Suyama 等^[39]以重组裂殖酵母 *S. pombe* 为宿主,在高度表达的 *hsp9* 启动子作用下,编码 *Cut6p* 和 *CaMCR* 基因,在补充乙酸盐的培养基中培养 31 h,3-HP 产量达 7.60 g/L。通过对启动子修饰与更换,使 3-HP 的产量得以改善。

利用其他宿主菌合成 3-HP 的遗传背景不清晰,并面临着产量低、不能工业化生产等问题。之后的研究应主要集中在代谢途径的具体分析以及应用合成生物学技术对相关基因进行控制和表达等方面。

以丙二酸单酰辅酶 A 途径合成 3-HP 主要以 *E. coli* 和 *S. cerevisia* 为主,*E. coli* 的遗传背景清晰,自身含有能够将乙酰辅酶 A 转化为丙二酸单酰辅酶 A 的乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC,在培养过程中,可诱导 *acc* 基因过表达,避免外源基因的添加而造

成代谢负担。未来的发展方向可引入转录抑制因子 FapR,抑制 *acc* 基因过表达产生的毒性。与 *E. coli* 相比,*S. cerevisiae* 同样是重要的安全模式菌株,不同的是其可以在酸性条件下生产,增强了宿主菌对产物的耐受性,培养后的产物大部分为游离的 3-HP,在工业生产中可节省下游分离提取的费用,但合成产量低仍是急需解决的重要问题,今后应在关键酶平衡的问题上进行研究。

3 β -丙氨酸途径

β -丙氨酸是微生物体内广泛存在的代谢产物,可通过多种氨基酸发生转氨作用以及丙酮酸转化而形成,并作为中间体合成 3-HP。研究者使用基因组代谢模型发现该途径比丙二酸单酰辅酶 A 途径具有更高的理论得率,目前已经在 *E. coli* 和 *S. cerevisiae* 中成功构建 β -丙氨酸途径,并获得较高的产量。

Liao 等^[40]首次在 *E. coli* 中构建 β -丙氨酸途径,提出可通过丙氨酸 2,3-氨基变位酶 (AAM) 的转氨作用将 α -丙氨酸转化为 β -丙氨酸,再通过 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶 (BAPAT) 转化形成丙二酸半醛,最后利用 3-羟基丙酸脱氢酶 (HPDH) 的还原作用形成 3-HP。在此基础上,Song 等^[41]在 *E. coli* 中开发另一种新的 β -丙氨酸途径,使用来自富马酸盐的天冬氨酸,此途径比草酰乙酸的途径具有更高的性能,通过表达来自 *E. coli* 的 *ydfG* 基因和来自 *P. aeruginosa* 的 *pa0132* 基因,并将基因组中的强启动子 *tac* 替代 *sdhC* 基因的天然启动子,经摇瓶培养和分批补料培养分别产生 3.69 g/L 和 31.10 g/L 的 3-HP,使产率达到 0.63 g/(L·h)。

Jessen 等^[42]发现 *S. cerevisiae* 中的 γ -氨基丁酸转氨酶 (GABT) 同样可以将 β -丙氨酸转化为丙二酸半醛,成功在 *S. cerevisiae* 中构建 β -丙氨酸途径。近几年,该课题组又在不同宿主菌中发现多种可将 β -丙氨酸转化为丙二酸半醛的氨基转移酶,并已成功申请专利^[43]。Borodina 等^[44]利用 β -丙氨酸作为前体,将蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 中编码 β -

丙氨酸丙酮酸转氨酶 *yhxA* 基因与来自 *E. coli* 的 *ydfG* 基因在 *S. cerevisiae* 中过表达, 再通过表达天然细胞质天冬氨酸氨基转移酶 *aat2* 基因和两种丙酮酸羧化酶 *pyc1*、*pyc2* 基因来改善 L-天冬氨酸的供应, 最后在分批补料培养中获得 13.70 g/L 的 3-HP, 产率为 0.17 g/(L·h)。Kildegaard 等^[45]在 *S. cerevisiae* 中比较丙二酸单酰辅酶 A 途径与 β -丙氨酸途径利用木糖生产 3-HP 的能力, 结果表明, 在分批补料培养中 β -丙氨酸途径可获得 6.09 g/L 的 3-HP, 而丙二酸单酰辅酶 A 途径仅获得 2.30 g/L。

E. coli 和 *S. cerevisiae* 的遗传背景清晰, 是典型的模式菌株, 该途径可将不同种类的氨基酸转化为 β -丙氨酸, 在通过不同活性的转氨酶将其转化为丙二酸半醛, 进而还原成 3-HP。 β -丙氨酸途径可获得高产的 3-HP, 但其合成途径十分复杂, 在生长过程中容易造成代谢负担, 此外, β -丙氨酸途径通常使用常见的代谢中间体为底物, 在发酵过程中会伴随着多种副产物的合成, 使产品分离十分困难。未来应对 β -丙氨酸途径作进一步的研究找出其他更简单的代谢通路, 并筛选高活性的转氨酶以及掌握更有效的产品分离技术。

4 其他途径

Luo 等^[46]利用丙酰辅酶 A 途径, 在重组 *E. coli* 中将来自皱褶假丝酵母 *Candida rugosa* 的丙酰基-CoA 脱氢酶 PACD 和来自埃氏巨型球菌 *Megasphaera elsdenii* 的 *pct*、*hpcd* 基因共表达, 使产量达到 0.72 g/L。后又敲除途径中琥珀酸 CoA 转移酶 *ygfH* 基因和柠檬酸甲酯合成酶 *prpC* 基因, 使菌株在摇瓶实验中产生 2.17 g/L 的 3-HP, 因途径中需补充额外的丙酸盐, 导致生产成本提高, 不利于工业化生产。

Holo 等首次提出 3-HP 固碳循环途径, 研究发现 3-HP 是 *C. aurantiacus* 固碳途径的中间代谢产物。通过研究, 单循环固碳途径被逐步完善, 但却发现在途径中无法确认固定产物乙醛酸代谢机制的问题, 因此 Fuchs 等提出 3-HP 是一种双循环偶

联途径, 并通过实验阐述了乙醛酸代谢机制中未解决的问题以及对特征酶进行纯化、鉴定, 最后确立 3-HP 双循环偶联途径^[47]。该途径利用 CO_2 为底物, 可减少生产成本, 在循环过程中吸收和同化大气环境中有机酸等物质, 解决环境污染的问题, 在未来可开展绿色工业生产。

Yu 等^[48]发现一种具有高度底物耐受性的丙脞水解酶, 其可将 3-羟基丙脞 (3-HPN) 转化为 3-HP。将含有该脞水解酶基因的重组大肠杆菌, 使用海藻酸钙包埋和化学交联固定化的方法将静息细胞固定在藻酸钙上, 通过不断地重复利用以及分离、纯化, 最终从 30 批中获得 184.7 g/L 3-HP, 转化率高达 36.9 g/(L·h)。通过细胞的固定方法增强了它们对底物的耐受性、稳定性、重复利用性进而提高产量, 但 3-HPN 本身也是一种重要化学品, 其作为底物添加提高了生产成本, 不利于工业化生产。

在最新的研究中, Liu 等^[49]以脂肪酸 FAs 为原料, 在分析多种途径的限制因素后, 在 *E. coli* 中成功构建脂肪酸代谢途径, 并通过组合代谢工程和发酵条件的优化, 发酵培养后产生 52.00 g/L 的 3-HP, 产率为 1.56 g/(L·h)。利用脂肪酸为原料生产 3-HP, 虽然能获得大量产物, 但脂肪酸本身也作为一种重要的有机物可用于化妆品、涂料、脂肪酸盐的生产, 用其作原料会增加生产成本, 不利于工业化生产, 后续研究应集中在利用廉价物质作为碳源来生产 3-HP。

5 途径优缺点

甘油作为生产生物柴油的副产品, 价格低廉、来源广泛, 代谢通路中涉及的两种关键酶来源广、背景清晰。但该途径仍面临着一些问题, 如菌株对产物的耐受性较低、3-HPA 积累产生的毒性、*E. coli* 中辅酶 B12 供应以及 *K. pneumoniae* 的安全性等。后续研究可筛选适应低 pH 条件的微生物进行发酵, 找出活性更高的醛脱氢酶或降低甘油脱水酶活性来调节酶之间的平衡以及使用来自酪酸梭菌的不依赖 B12 的甘油脱水酶来解决辅酶 B12 供应的问题。

在利用丙二酸单酰辅酶 A 途径合成 3-HP 的生产过程中可使用廉价的碳源葡萄糖、木糖等原料作为底物,并在培养工程菌的过程中不需要辅酶 B12 的供应,从而降低了生产成本,且该途径代谢通路简单,便于操作。然而该途径还存在合成产量低、较低的菌株耐受性以及 *acc* 基因过度积累产生毒性等问题。为解决上述问题,应对途径中的关键基因进行筛选或根据途径中涉及的蛋白质晶体结构,设计出具有所需特性的酶来提高活性,通过筛选 3-HP 的耐受基因或菌株来解决产物耐受性的问题。笔者所在团队为控制途径中 *acc* 基因和 *mcr* 基因之间平衡表达,引入含有 FapR 调控因子的生物传感器,可有效解决 *acc* 基因过度积累产生的毒性问题。

β -丙氨酸途径作为微生物体内广存的代谢产物,前体来源广泛,并已证明合成 3-HP 的产量可高于丙二酸单酰辅酶 A 途径。但其合成途径复杂,在培养过程中容易造成代谢负担,未来的研究可找出其他更简单的代谢通路,筛选高活性的转氨酶以及掌握更有效的产品分离技术来提高 3-HP 的产量。

在对其他途径的研究中发现,*E. coli* 可利用丙腈水解酶,通过固定化细胞获得高产量的 3-HP,但其代谢途径背景不清晰,添加前体物质三羟基丙腈又提高了生产成本。其他途径中也同样需要添加昂贵的前体物质,不利于工业化生产,应对代谢调控机制进一步分析、调整,并添加廉价的前体物质作为碳源合成 3-HP。

6 总结与展望

近些年来,3-HP 作为重要的平台化合物,受到各国学者的广泛关注,生物合成 3-HP 所需的原料来源广,生产成本低,对环境的影响较小。但野生菌合成 3-HP 的产量低、稳定性差,工业生产实施困难,因此需要利用代谢工程技术对代谢途径进行研究,近几年研究主要通过更换不同的宿主、底物、代谢途径以及敲除副产物合成基因,平衡酶之间的活性,增加前体和辅助因子的供应等方法来提

高 3-HP 的产量,并在研究中引入合成生物学技术,开发了可动态调节转录因子的生物传感器。但迄今为止仍存在以下问题:1) 辅酶 B12 的供应提高生产成本;2) 产物积累产生的毒性问题;3) 菌株对产物的耐受性较低,产量无法提高。

未来 3-HP 的合成方向需要以节约、环保为理念,利用廉价或可再生的物质为碳源。针对上述问题,提出未来的发展方向:1) 最近对巨大芽孢杆菌以及脱氮菌的研究显示,可去除途径中的反馈抑制系统来增加辅酶 B12 合成,可将此方法引入途径中解决辅酶 B12 的供应问题。2) 筛选高活性的关键酶并对酶之间的平衡进行调整,可有效减少产物积累产生的毒性。3) 筛选出具有高底物耐受性的宿主菌。4) 在途径中结合合成生物学中生物传感器调控因子以及 CRISPR-Cas 系统,3-HP 产量有望得到进一步加强。下游工艺涉及的原位产品分离回收、副产物的处理以及产品纯度等问题仍需新的技术手段来解决。各国学者致力于此项技术的研究,相信 3-HP 工业化生产的前景将会日益精进。

REFERENCES

- [1] Heo W, Kim JH, Kim S, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose and xylose by alleviation of metabolic congestion due to glycerol flux in engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2019, 285: 121320.
- [2] Matsakas L, Hrušová K, Rova U, et al. Biological production of 3-hydroxypropionic acid: An update on the current status. *Fermentation*, 2018, 4(1): 13.
- [3] Kumar V, Park S. Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 150–167.
- [4] Suthers PF, Cameron DC. Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms: U.S., PCT WO 01-16346. 2001-02-08.
- [5] Raj SM, Rathnasingh C, Jo JE, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. *Proc Biochem*, 2008, 43(12): 1440–1446.
- [6] Raj SM, Rathnasingh C, Jung WC, et al. Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid

- production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(4): 649–657.
- [7] Rathnasingh C, Raj SM, Jo JE, et al. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(4): 729–739.
- [8] Sankaranarayanan M, Ashok S, Park S. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by acid tolerant *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(7): 1039–1050.
- [9] Seok JY, Yang J, Choi SJ, et al. Directed evolution of the 3-hydroxypropionic acid production pathway by engineering aldehyde dehydrogenase using a synthetic selection device. *Metabol Eng*, 2018, 47: 113–120.
- [10] Lim HG, Noh MH, Jeong JH, et al. Optimum rebalancing of the 3-hydroxypropionic acid production pathway from glycerol in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(11): 1247–1255.
- [11] Sankaranarayanan M, Somasundar A, Seol E, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid by balancing the pathway enzymes using synthetic cassette architecture. *J Biotechnol*, 2017, 259: 140–147.
- [12] Jung WS, Kang JH, Chu HS, et al. Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in *Escherichia coli*. *Metabol Eng*, 2014, 23: 116–122.
- [13] Kim K, Kim SK, Park YC, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by modulation of glycerol metabolism in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2014, 156: 170–175.
- [14] Chu HS, Kim YS, Lee CM, et al. Metabolic engineering of 3-hydroxypropionic acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(2): 356–364.
- [15] Nguyen-Vo TP, Ainala SK, Kim JR, et al. Analysis and characterization of coenzyme B12 biosynthetic gene clusters and improvement of B12 biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867. *FEMS Microbiol Lett*, 2018, 365(21): fny211.
- [16] Ashok S, Raj SM, Rathnasingh C, et al. Development of recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ dhaT strain for the co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1, 3-propanediol from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(4): 1253–1265.
- [17] Ashok S, Raj SM, Ko Y, et al. Effect of *puuC* overexpression and nitrate addition on glycerol metabolism and anaerobic 3-hydroxypropionic acid production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ glpK Δ dhaT. *Metabol Eng*, 2012, 15: 10–24.
- [18] Jiang JQ, Huang B, Wu H, et al. Efficient 3-hydroxypropionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresour Bioprocess*, 2018, 5(1): 34.
- [19] Ko Y, Seol E, Sekar BS, et al. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* J2B for co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol: reduction of acetate and other by-products. *Bioresour Technol*, 2017, 244: 1096–1103.
- [20] Wang K, Wang X, Ge XZ, et al. Heterologous expression of aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Klebsiella pneumoniae* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. *Indian J Microbiol*, 2012, 52(3): 478–483.
- [21] Ma CL, Su MY, Zhao P, et al. An engineered constitutive expression system in *Klebsiella pneumoniae* for the production of 3-hydroxypropionic acid. *J Beijing Univ Chem Technol: Nat Sci*, 2016, 43(1): 67–71 (in Chinese).
马春路, 苏明月, 赵鹏, 等. 构建组成型肺炎克雷伯氏菌表达系统生产 3-羟基丙酸. *北京化工大学学报: 自然科学版*, 2016, 43(1): 67–71.
- [22] Li Y, Wang X, Ge XZ, et al. High production of 3-hydroxypropionic acid in *Klebsiella pneumoniae* by systematic optimization of glycerol metabolism. *Sci Rep*, 2016, 6: 26932.
- [23] Zhao P, Ma CL, Xu LD, et al. Exploiting tandem repetitive promoters for high-level production of 3-hydroxypropionic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(10): 4017–4031.
- [24] Zhou SF, Catherine C, Rathnasingh C, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by recombinant *Pseudomonas denitrificans*. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(12): 3177–3187.
- [25] Kalantari A, Chen T, Ji B, et al. Conversion of glycerol to 3-hydroxypropanoic acid by genetically engineered *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol*, 2017, 8: 638.
- [26] Rathnasingh C, Raj SM, Lee Y, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. *J Biotechnol*, 2012, 157(4): 633–640.
- [27] 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.
- [28] Liu CS, Ding Y, Zhang R, et al. Functional balance between enzymes in malonyl-CoA pathway for 3-hydroxypropionate biosynthesis. *Metabol Eng*, 2016, 34: 104–111.
- [29] Cheng Z, Jiang JQ, Wu H, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose via malonyl-CoA pathway by engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2016, 200: 897–904.
- [30] Lee JH, Cha S, Kang CW, et al. Efficient conversion of acetate to 3-hydroxypropionic acid by engineered *Escherichia coli*. *Catalysts*, 2018, 8(11): 525.
- [31] Chen Y, Bao JC, Kim IK, et al. Coupled incremental precursor and co-factor supply improves 3-hydroxypropionic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabol Eng*, 2014, 22: 104–109.
- [32] Kildegaard KR, Jensen NB, Schneider K, et al. Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-dependent pathway. *Microb Cell Factor*, 2016, 15(1): 53.
- [33] Shi SB, Chen Y, Siewers V, et al. Improving production of malonyl coenzyme A-derived metabolites by abolishing Snf1-dependent regulation of *Acc1*. *mBio*, 2014, 5(3): e01130–14.
- [34] David F, Nielsen J, Siewers V. Flux control at the malonyl-CoA node through hierarchical dynamic pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(3): 224–233.
- [35] Lan EI, Chuang DS, Shen CR, et al. Metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic 3-hydroxypropionic acid production from CO₂ using *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Metabol Eng*, 2015, 31: 163–170.
- [36] Lian H, Zeldes BM, Lipscomb GL, et al. Ancillary contributions of heterologous biotin protein ligase and carbonic anhydrase for CO₂ incorporation into 3-hydroxypropionate by metabolically engineered *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(12): 2652–2660.
- [37] Wang YP, Sun T, Gao XY, et al. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO₂ in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabol Eng*, 2016, 34: 60–70.
- [38] Yang YM, Chen WJ, Yang J, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid in engineered *Methylobacterium extorquens* AM1 and its reassimilation through a reductive route. *Microb Cell Factor*, 2017, 16(1): 179.
- [39] Suyama A, Higuchi Y, Urushihara M, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid via the malonyl-CoA pathway using recombinant *fission yeast* strains. *J Biosci Bioeng*, 2017, 124(4): 392–399.
- [40] Liao HH, Gokarn R, Gort SJ, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid using beta-alanine/pyruvate aminotransferase: US, 700319. 2010-04-20.
- [41] Song CW, Kim JW, Cho IJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 3-hydroxypropionic acid and malonic acid through β -alanine route. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(11): 1256–1263.
- [42] Jessen H, Rush B, Huryta J, et al. Compositions and methods for 3-hydroxypropionic acid production: US, 9090918. 2015-07-28.
- [43] Tassone M, Diano A. Beta-alanine aminotransferases for the production of 3-hydroxypropionic acid: US, 20180265902. 2018-09-20.
- [44] Feng XJ, Xian M, Liu HZ, et al. Recent advances in biosynthesis of 3-Hydroxypropionate. *Biotechnol Busin*, 2017, 11(6): 30–44 (in Chinese).
冯新军, 咸漠, 刘会洲, 等. 生物法合成 3-羟基丙酸的研究进展. *生物产业技术*, 2017, 11(6): 30–44.
- [45] Kildegaard KR, Jensen NB, Schneider K, et al. Engineering and systems-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA reductase-dependent pathway. *Microb Cell Factor*, 2016, 15(1): 53.
- [46] Luo H, Zhou DF, Liu XH, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid via the propionyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e0156286.
- [47] Wang HJ, Ni J, Zhang Y, et al. The progress of studies on a unique carbon dioxide fixation pathway: 3-hydroxypropionate cycle. *Microbiol China*, 2013, 40(2): 304–315 (in Chinese).
王洪杰, 倪俊, 张怡, 等. 新型固碳途径-3-羟基丙酸循环的研究进展. *微生物学通报*, 2013, 40(2): 304–315.
- [48] Yu SS, Yao PY, Li JJ, et al. Enzymatic synthesis of 3-hydroxypropionic acid at high productivity by using free or immobilized cells of recombinant *Escherichia coli*. *J Mol Catal B: Enzym*, 2016, 129: 37–42.
- [49] Liu B, Xiang SM, Zhao G, et al. Efficient production of 3-hydroxypropionate from fatty acids feedstock in *Escherichia coli*. *Metabol Eng*, 2019, 51: 121–130.

(本文责编 郝丽芳)