

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-088

聚羟基脂肪酸酯的低碳生物制造：基于碳转化率的分析与应用

王倩, 祁庆生

(山东大学, 微生物技术国家重点实验室, 国家糖工程技术研究中心, 山东 青岛 266237)

摘要: 随着环境污染日益加剧以及全球范围禁/限塑令出台, 以聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 为代表的生物基可降解塑料的生物制造看到了曙光。然而如何实现低成本、绿色低碳可持续的 PHA 生产仍然面临巨大挑战。采用合成生物学方法, 创建合成 PHA 的微生物细胞工厂, 将廉价碳源以及可再生原料高效转化为种类繁多和性能多样的 PHA 是解决所面临问题的重要途径。本文通过总结各种 PHA 单体的生物合成途径并分析了各途径的理论碳转化率, 提出了提高共聚物单体产量的重要策略, 即优先选择高碳转化率 PHA 单体的合成。同时本文汇总了当前在创建低碳生物合成途径及利用一碳化合物合成 PHA 的研究进展, 为可降解塑料的低碳生物合成提供有效方法。最后, 对合成生物学在 PHA 低碳生物制造领域的发展趋势进行了总结和展望。在未来, 随着合成生物学及新技术的融合发展, 绿色生物制造可以生产更多低成本高附加值的 PHA, 促进生物基塑料的产业化发展, 从而更好地服务于全球绿色低碳文明。

关键词: 聚羟基脂肪酸酯; PHA; 低碳生物制造; 碳转化率

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Low-carbon biomanufacturing of polyhydroxyalkanoates: analysis and application based on carbon conversion rate

WANG Qian, QI Qingsheng

(State Key Laboratory of Microbial Technology, National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China)

Abstract: With the increasing environmental pollution and the policy introduction of global ban on free plastic bags, the bio-manufacturing of bio-based degradable plastics represented by polyhydroxyalkanoates (PHAs) is one of promising ways to respond this challenge. PHAs are polyesters of hydroxyalkanoates synthesized by many bacteria and haloarchaea as carbon and energy storage materials. There are more than 150 types of polyhydroxyalkanoate monomers reported, resulting in a variety of PHAs with diverse properties. However, how to ensure low-cost, green, low-carbon

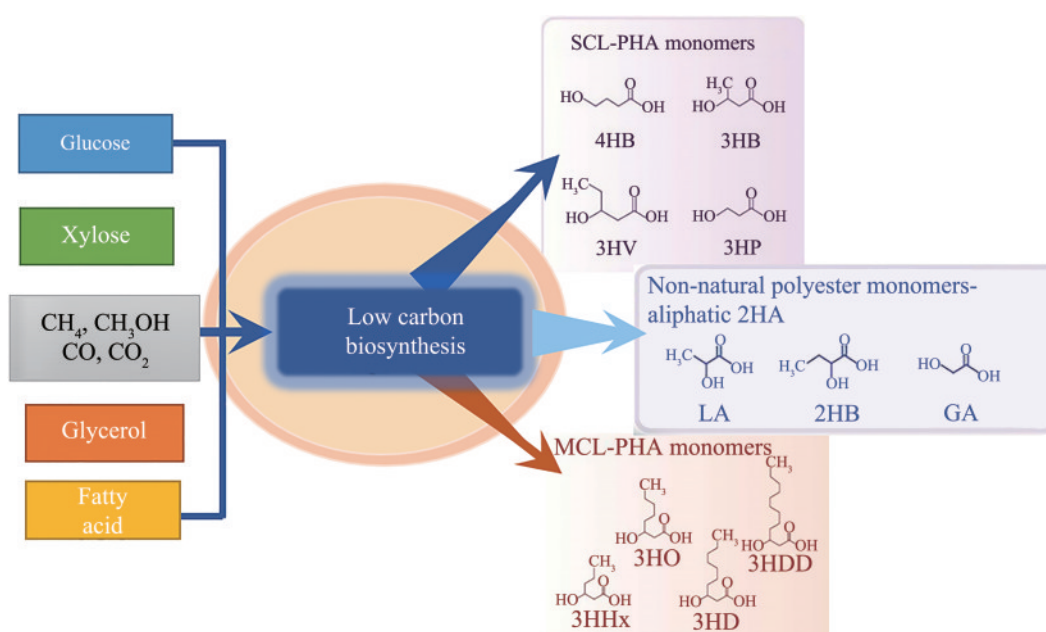
收稿日期: 2021-08-27 修回日期: 2021-11-25

基金项目: 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(31961133015); 国家重点研发计划“绿色生物制造”重点专项(2021YFC2100500)

引用本文: 王倩, 祁庆生. 聚羟基脂肪酸酯的低碳生物制造: 基于碳转化率的分析与应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(4): 748-762

Citation: WANG Qian, QI Qingsheng. Low-carbon biomanufacturing of polyhydroxyalkanoates: analysis and application based on carbon conversion rate[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(4): 748-762

and sustainable production of PHAs is still facing huge challenges. By using synthetic biology approaches, it is an important solution to construct microbial cell factories that synthesize PHAs and efficiently convert cheap carbon sources and renewable raw materials into various types of PHAs with excellent mechanical properties. This paper summarizes the biosynthetic pathways of various PHA monomers and analyzes the theoretical carbon conversion rate of various monomer synthesis pathways. It is proposed that the synthesis of PHA monomers with high carbon conversion rate is preferred to increase the yield of copolymer monomers. At the same time, it summarizes the current research progress in the creation of low-carbon biosynthesis pathways and the use of one-carbon compounds as carbon sources to synthesize PHAs. These are all effective ways to achieve low-carbon biosynthesis of degradable plastics. Finally, we summarized and prospected the development trend of synthetic biology in the field of low-carbon biomanufacturing of PHAs. In the future, with the integration and development of synthetic biology and new technologies, more low-cost and high-value-added PHAs can be obtained through green bio-manufacturing, thereby promoting the industrialization of bio-based plastics and better serving the global green and low-carbon society.



Keywords: polyhydroxyalkanoates; PHA; low-carbon bio-manufacturing; carbon conversion rate

聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 是由微生物合成的一种细胞内高分子聚酯的通称^[1-3]。PHA 具有良好的生物相容性、生物可降解性和塑料的热加工性能, 被认为是环境友好型材料^[4], 有助于解决日益严重的环境污染, 特别是塑料污染问题。PHA 已被广泛应用于包装材料、电学材料、生物医用材料等领域, 成为生物材料领域最为活跃的研究热点。

20世纪20年代, 人们首次在微生物 *Azotobacter chroococcum* 细胞内发现了一种亲苏丹染料、可溶

于氯仿的类脂肪包涵体, 其后在 *Bacillus megaterium* 中又发现了类似的包涵体, 其组成被鉴定为 PHB (poly- β -3-hydroxybutyrate)^[5]。自那以来各种不同单体组成的聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHA) 被发现和合成。作为微生物产生的天然聚酯, 它的材料特性因单体链长和组成而异。迄今为止, 在已经合成的超过150多种PHA中, 其性质从热塑性耐用聚酯到黏性树脂, PHA的材料性能可以与传统的石化塑料相媲美, 满足不同的需求^[6]。

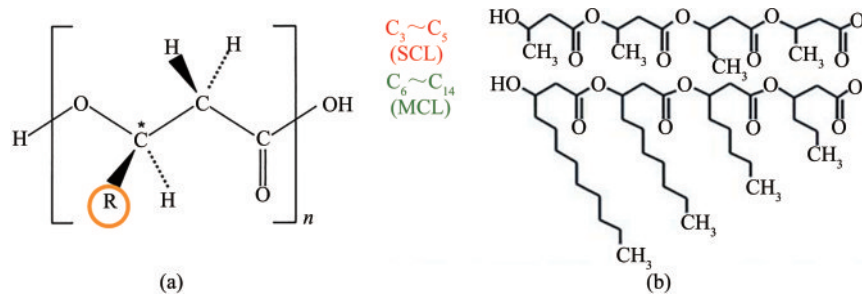


图1 PHA的分子式及分类

Fig. 1 Molecular structure of PHA and its classification

天然 PHA 通常可分为两大类 (图 1), 即短链长 (short-chain-length) PHA (SCL-PHA) 和中链长 (medium-chain-length) PHA (MCL-PHA)。SCL-PHA 由包含 3 至 5 个碳原子的单体组成, 其代表性实例为 PHB 和 PHBV [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)]。PHB 是由两分子乙酰辅酶 A 通过 β -酮硫解酶 (PhaA) 缩合成乙酰乙酰辅酶 A, 然后通过 NADPH 依赖性乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (PhaB) 还原为 (*R*)-3-HB-CoA, 最后通过 PHA 合酶 (PhaC) 聚合形成 PHB。PHB 生物合成操纵子 *phaCAB* 最初是在 *Cupriavidus necator* (之前菌名为 *Ralstonia eutropha*) 中鉴定的。MCL-PHA 通常存在于假单胞菌中, 由包含 6~14 个碳原子的单体组成。(R)-3HA-CoA 可以由脂肪酸代谢产生, 例如 β -氧化和脂肪酸从头生物合成途径。当脂肪酸通过 β -氧化途径时, 会生成不同碳长度的 (*R*)-3HA-CoA, 随后被 PhaC 聚合成 MCL-PHA。PHA 的多样性主要归因于 PHA 合酶 (PhaC) 的广泛底物特异性^[7]。PhaC 是 PHA 生物合成中使用的最重要的酶, 通常, PhaC 可以很容易地接受 3-羟酰基辅酶 A、4-羟酰基辅酶 A、5-羟酰基辅酶 A, 并将它们结合到不断增长的 PHA 链中。

近 30 年来, PHA 的微生物合成跟随代谢工程以及合成生物学的脚步得到了迅速发展。在“碳中和”的大背景下, 以合成生物学为基础, PHA 的生产倾向于以可再生资源作为原料, 符合可持续发展的理念, 同时缩短产业链长度, 从而降低原材料成本占比和产品周期属性。一些微生物菌种具备独特代谢通路, 可以使用各种廉价原料进行 PHA 生产^[8], 比如蔗糖蜜^[9]、向日葵茎水解物^[10]、木薯和玉米淀粉^[11]、植物油^[12]、乳清^[13-14]、米糠水解物^[15]、粗甘油^[16]、废煎炸油

(菜籽油和芝麻油)^[17], 以及废弃物中提取的碳源^[18]等。如将大肠杆菌乳糖降解基因重组到 *C. necator* DSM 545 的解聚酶基因 *phaZ1* 中, 使其能够获得乳清代谢能力, 并除去 PHA 降解能力。重组菌株利用乳清渗透液可以生产含量达到 30% 的 PHA^[19]。

然而, 目前合成各种高性能 PHA 的重要关键因素是合成途径与方法是否有效, 各种 PHA 单体合成路线是否具备高的碳转化率, 及各种 PHA 的产量、胞内含量如何。因此, 分析各种 PHA 单体的代谢途径, 以及各种 PHA 的理论碳转化率 (也就是碳得率, 即起始底物中的碳原子转化为目标产物中碳原子的比例, 不同于糖酸转化率) 非常必要。

1 PHA 所含不同单体的理论碳转化率及实现策略

目前, PHA 的生物制造成本仍然很高, PHA 共聚物的成本则更高; 其低碳绿色生产仍然是工业面临的挑战。而这其中最重要的一个原因是 PHA 单体的固有理论碳转化率较低。在分析大部分 PHA 单体生物合成时我们发现, 某些单体的碳理论转化率比较高。这不仅有利于提高产品生产过程中的实际转化率, 降低成本, 也会降低碳排放, 实现低碳绿色生物制造。下面, 我们将根据各种不同 PHA 单体的体内合成途径 (图 2) 与碳的理论转化率 (表 1) 来探讨 PHA 共聚物低碳合成的原子经济性与提高策略。

1.1 3-Hydroxybutyrate (3HB) 单体

PHB 首次在巨大芽孢杆菌中的类脂包裹体中

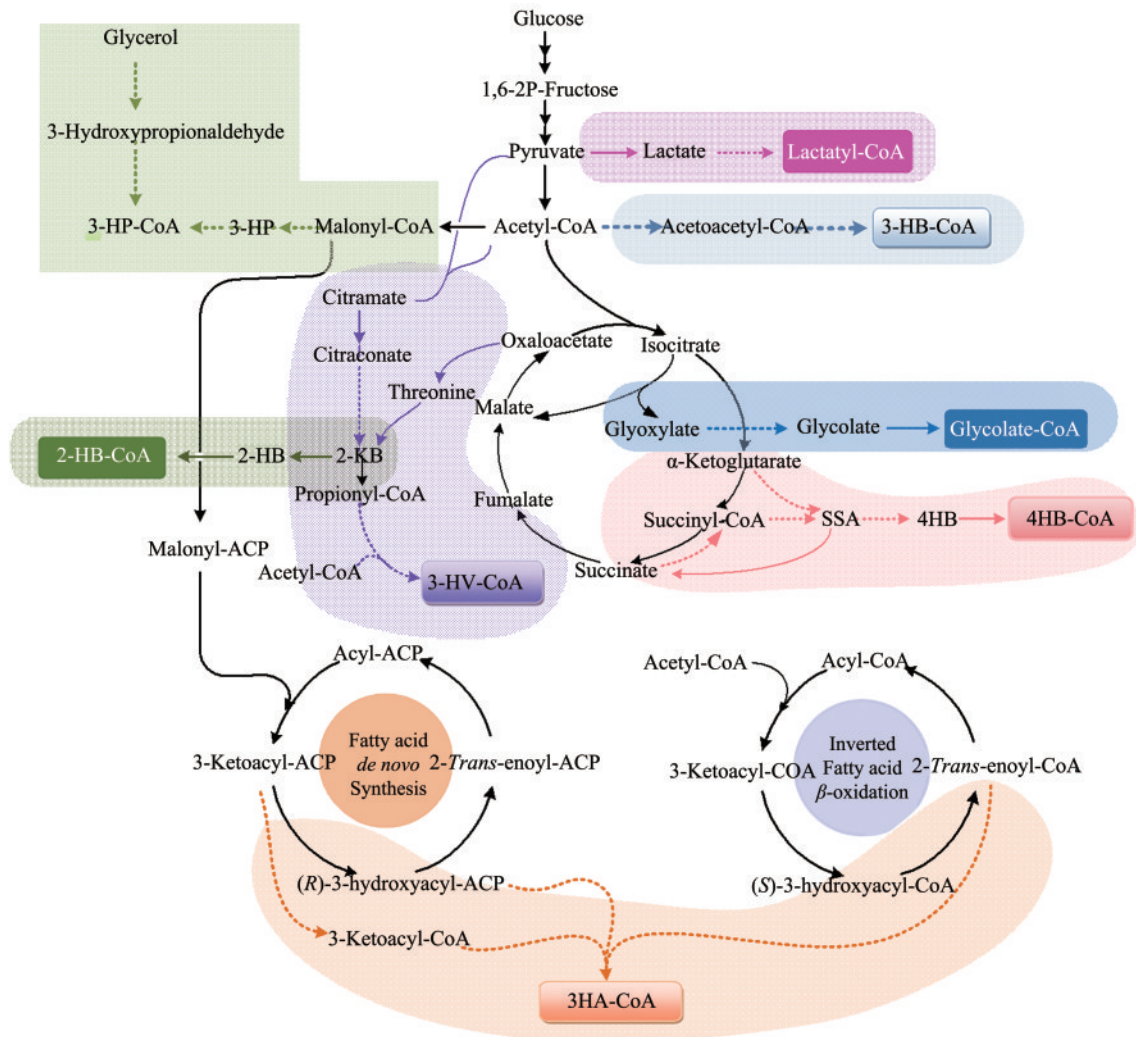


图2 微生物合成PHA的代谢途径

[其中包括天然PHA单体(3HB、4HB、3HV、3HA、3HP单体)和代表性的非天然PHA(LA、GA、2HB单体); 3HP—3-羟基丙酸; 3HP-CoA—3-羟基丙酰辅酶A; 3HB-CoA—3-羟基丁酰辅酶A; 3-HA-CoA—3-羟基酯酰辅酶A; 3HV-CoA—3-羟基戊酰辅酶A; SSA—琥珀酸半醛; 4HB—4-羟基丁酸; 4HB-CoA—4-羟基丁酰辅酶A; 2HB—2-羟基丁酸; 2HB-CoA—2-羟基丁酰辅酶A]

Fig. 2 Metabolic pathways of microbial biosynthesis of PHA, including natural PHA monomers (3HB, 4HB, 3HV, 3HA, 3HP) and representative non-natural PHA monomers (LA, GA, 2HB)

被鉴定, 被公认为PHA的第1个成员。PHB的生物合成操纵子 *phaCAB* 在 *C. necator* 中鉴定之后, 一些重组代谢工程菌株显示了高的生产效价和生产力^[20-21], 可与天然产PHB的微生物如 *C. necator* 相媲美, 分批发酵时细胞密度可达150 g/L以上, 积累的PHB的胞内含量可达80%以上。重组大肠杆菌还可以产生超分子量20 MDa形式的PHB^[37]。然而, 以葡萄糖合成PHB时因需要通过糖酵解丙酮酸脱羧生成乙酰辅酶A, 同时生产CO₂, 碳转化率仅为0.66, 产品的质量转化率则仅有48%, 所以

合成3HB单体的碳排放高, 成本也高, 不是低碳生物合成的理想选择。

1.2 3-Hydroxyvalerate (3HV) 单体

以含3HV的聚酯为例, 自20世纪70年代发现在3HB单体中掺入3HV单体的PHBV共聚物有着更好的力学性能和加工性能以来, PHA共聚物的研究便受到越来越多的关注。PHBV最初是通过加入丙酸或戊酸钠等前体在体内生成丙酰辅酶A, 即3HV的中间体来生产的^[38-39]。为了避免使用此类

表1 各类PHA单体的代表性合成途径及生产

Tab. 1 Representative biosynthesis pathways and production of various PHA monomers

单体	合成途径	理论碳摩尔得率	宿主	途径基因	碳源	单体比例 (摩尔分数)/%	文献
3HB	乙酰辅酶A	0.66	<i>E. coli</i>	—	葡萄糖	100	[20-21]
3HV	苏氨酸途径	0.83	<i>E. coli</i>	<i>E. coli thrABC, C. glutamicum ilvA</i>	葡萄糖	17.5	[22]
			<i>C. glutamicum</i> WM001	—	葡萄糖	72.5	[23]
	柠苹果酸途径	0.56	<i>E. coli</i>	<i>M. jannaschii cimA, E. coli leuBCD</i>	葡萄糖	11.5	[24]
	甲基丙二酰CoA途径	0.83	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli sbm, ygfG</i>	葡萄糖	30	[25]
4HB	琥珀酰CoA途径	0.66~1.33	<i>E. coli</i>	<i>C. kluyveri 4hbD, sucD, orfZ</i>	葡萄糖	12.5	[26]
			<i>H. bluephagenesis</i>	<i>C. kluyveri orfZ (genome intg)</i>	葡萄糖	25	[27]
3HP	甘油途径	1.00	<i>E. coli</i>	<i>C. butyricum dhaB1, S. enterica pduP</i>	甘油	100	[16]
	丙二酰CoA途径	1.00	<i>E. coli</i>	<i>C. aurantiacus mcr, E. coli AccABCD, prpE</i>	葡萄糖	100	[28]
LA	乳酸合成途径	1.00	<i>E. coli</i>	<i>E. coli ldhA, C. propionicum pct</i>	葡萄糖	30~60	[29]
2HB	柠苹果酸途径	0.66	<i>E. coli</i>	<i>E. coli thrABC, C. glutamicum ilvA L. lactis panE</i>	葡萄糖	10~60	[30]
GA	木糖Dahms途径	0.40	<i>E. coli</i>	<i>C. crescentus xylBC</i>	木糖	29.5	[31]
	乙醛酸途径	0.66	<i>E. coli</i>	<i>E. coli ycdW, aceAK</i>	葡萄糖	39	[32]
3HHx	丁酰辅酶A途径	0.66	<i>E. coli</i>	<i>C. necator bktB and phaB1, A. caviae phaJ, T. denticolater, E. coli fadB and fadA</i>	葡萄糖	13.2	[33]
			<i>C. necator</i>	<i>C. necator bktB, crt had, M. extorquens ccr</i>	葡萄糖	12.1	[34]
3HA	脂肪酸从头合成	0.66	<i>E. coli</i>	<i>P. putida phaG, PP_0763</i>	葡萄糖	100	[35]
	反向 β 氧化	0.66	<i>E. coli</i>	<i>E. coli fadBA, T. denticola ter, P. aeruginosa PhaJ1</i>	葡萄糖	78.8	[36]

昂贵前体，研究人员找到几种不依赖丙酸盐的体内丙酰辅酶A合成途径，包括苏氨酸/2-酮丁酸途径、柠苹果酸/2-酮丁酸途径和甲基丙二酰CoA途径，促进了从非相关碳源生产PHBV^[25, 40-43]。在不考虑其他因素的情况下，以葡萄糖从苏氨酸途径产3HV单体的理论碳转化率为0.83。柠苹果酸途径因其代谢过程碳损失较多，其理论转化率为0.56。以葡萄糖从甲基丙二酰辅酶A途径产3HV单体的理论转化率也为0.83。

本实验室在大肠杆菌中合成PHB时发现聚合物中有少许3HV组分的存在，通过挖掘大肠杆菌内在的代谢途径，设计了一条从苏氨酸代谢途径以葡萄糖为唯一碳源直接合成PHBV的合成途径。通过过表达苏氨酸合成酶的基因*thrA^{C1035T}BC*并解除其反馈抑制使该菌株积累苏氨酸，然后经脱氢酶IlvA转化为2-酮丁酸，再经丙酮酸脱氢酶转化为丙

酰辅酶A^[22, 43]，丙酰辅酶A与乙酰辅酶A最终缩合形成3HV-CoA；工程菌以葡萄糖为唯一碳源可以积累占细胞干重11.1%的PHBV，3HV摩尔分数可达17.5%。另外，通过柠苹果酸途径，我们将丙酮酸与乙酰辅酶A通过*Methanococcus jannaschii*柠苹果酸合酶基因（*cimA3.7*）缩合形成柠苹果酸，然后利用大肠杆菌的*leuBCD*来产生3HV的前体2-酮丁酸，最终合成PHBV^[24]。

另外，Aldor等^[25]在重组鼠伤寒沙门氏菌中，克隆来自大肠杆菌的甲基丙二酰辅酶A变位酶基因*sbm*和甲基丙二酰辅酶A脱羧酶基因*ygfG*，将TCA中的琥珀酰辅酶A转化为丙酰辅酶A，工程菌积累的PHBV中3HV摩尔分数达到30%。Chen等^[44]在工程菌*Halomonas bluephagenesis*TY194中采用基因组插入等一系列策略提高琥珀酰辅酶A含量，工程菌在葡萄糖和葡萄糖酸盐中利用甲基

丙二酸途径可以积累大约 4 g/L 的 PHBV 以及摩尔分数高达 25% 的 3HV。近年来, 一些苏氨酸转化 3HV 代谢通量较高的天然生产菌被开发出来, 如工程巨大芽孢杆菌 NRRL B-14308 以葡萄糖生产 PHBV 产量为 6.6 g/L, 其 3HV 单体的摩尔分数高达 58%^[45]; 另外, Saito 等^[46] 将 *phaCAB* 操纵子整合至产 L-异亮氨酸的谷氨酸棒杆菌 WM001, 其通过苏氨酸途径生产 PHBV 的产量为 15 g/L, 其中最大 3HV 摩尔分数可达 72.5%。如果以此单体比例计算, 该 PHBV 的最大理论碳转化率为 0.78, 远大于 PHB 均聚物 0.66 的理论碳转化率。因此, 3HV 生产优选苏氨酸/甲基丙二酰辅酶 A 途径, PHBV 共聚物中 3HV 含量越高, 其碳的转化率则越高, 生物制造的成本就越低。

1.3 4-Hydroxybutyrate (4HB) 单体

在 3HB 单体中加入 4HB 可大大提高 P(3HB-co-4HB) 共聚物的柔韧性^[46-47], 4HB 单体的合成通常需要提供前体 γ -丁内酯和丁酸^[46]。1996 年, 从 *Clostridium kluyveri* 中发现了 4-羟基丁酸 CoA 转移酶基因 *orfZ*, 该基因可以将 CoA 转移到 4-羟基丁酸^[48], 这使得在工程菌中进行 4HB 生物合成成为可能。之后 Valentin 等、Li Zhengjun 等^[26, 49] 分别利用 TCA 循环中间体琥珀酸通过琥珀酰辅酶 A: 辅酶 A 转移酶、琥珀酸半醛脱氢酶 (SucD)、4-羟基丁酸脱氢酶 (4hbD) 和 CoA 转移酶来合成 4HB-CoA, 实现了在大肠杆菌中从葡萄糖直接合成含 4HB 的共聚物。理论上以葡萄糖通过 TCA 循环还原羧化产琥珀酰辅酶 A, 可大大提高 4HB 单体的理论碳转化率至 1.33, 而通过 TCA 氧化支路合成琥珀酰辅酶 A 时, 其理论转化率仅为 0.66, 与 PHB 相同。因此在选择合成此类共聚物时, 选择合适的代谢途径也是非常重要的。

但是目前合成含 4HB 的共聚物主要以氧化支路进行。大肠杆菌中琥珀酸半醛脱氢酶基因 *sad* 和 *gabD* 的失活可使共聚物中的 4HB 含量提高 11%^[26]; 在发酵罐中, 工程菌获得了占细胞干重 62.7% 的 P(3HB-co-12.5% 4HB) 共聚物。Ye 等^[27] 构建的工程菌 *Halomonas bluephagenesis* 以葡萄糖作为单一碳源可以高产约 16 g/L 的 P(3HB-co-

4HB) 共聚物, 其中 4HB 摩尔分数可以通过控制培养物中残留的葡萄糖浓度提高至 25%。4HB 的高理论碳转化率是基于 CO₂ 的羧化固定, 即利用 TCA 的还原支路来提供琥珀酰辅酶 A。目前这方面的研究还比较少, 但对于大幅提高 4HB 的碳转化率具有非常重要的意义。

1.4 3-Hydroxypropionate (3HP) 单体

当利用 3HP、 α, ω -链烷二醇或丙烯酸酯作为底物碳源时, 可以合成含有 3HP 单体的聚酯^[50-51], 该种聚合物被认为具有更高的刚性、延展性和稳定性。已经开发了以葡萄糖或甘油为唯一碳源合成含 3HP 聚合物的体内代谢合成途径: 以葡萄糖生成 3HP 时在乙酰辅酶 A 处释放的 CO₂ 可以在羧化酶作用下固定回来, 整个反应过程中没有碳损失。而甘油作为 C₃ 化合物经两步反应就可以生成 3HP-CoA。两种碳源的理论碳转化率都可达到 1, 因此, 3HP 也是低碳合成 PHA 的理想单体。

2008 年, 研究者首次通过引入 *Chloroflexus aurantiacus* 3HP/4HB 循环的丙二酰辅酶 A 还原酶 (MCR) 和三功能丙酰辅酶 A 合酶 (Acs) 的 3HP-CoA 合成酶结构域, 实现了从葡萄糖合成 P(3HP-co-3HB)^[52]。之后, Wang 等^[28] 利用大肠杆菌克隆乙酰辅酶 A 羧化酶 AccABCD、来自 *C. aurantiacus* 的 MCR、丙酰辅酶 A 合成酶 PrpE 和 PhbC, 实现了从葡萄糖生产 P3HP 均聚物, 聚合物含量为 1.32 g/L。该途径关键酶 MCR 的系统优化是提高丙二酸单酰辅酶 A 途径产量的关键, 通过 MCR 不同功能域的拆分以及 MCR-N 和 MCR-C 表达水平的调节, 可实现该途径中 3HP 的高产。另外, 工程大肠杆菌引入甘油脱水酶 DhaB1、鼠伤寒沙门氏菌 LT2 的丙醛脱氢酶 PduP 以及 PHA 合酶 PhbC, 重组菌可以甘油积累 1.42 g/L 的 P3HP 均聚物^[16]。Wang 等^[53] 实现了结构和单体比例可控的 3HB 和 3HP 共聚物的生产, 将 3HP-CoA 和 3HB-CoA 的合成分别受到两种调节系统顺序控制, 以甘油为碳源合成了无规和嵌段共聚物 P(3HB-co-3HP), 3HP 单体的摩尔分数可以从 11.5% 调节至 94.6%。共聚物中 3HP 含量越高, 其理论碳转化率越接近 1。Gao 等^[54] 采用染色体整合的方法以及构建氨基酸营养缺陷型 PAS

质粒的方法, 构建了一个遗传稳定的菌株来整合和携带P3HP合成基因, 通过对甘油途径关键酶的筛选实现了有氧条件下P3HP的产量显著提高至25.7 g/L。

1.5 2-Hydroxypropionate (LA) 单体

由2-羟基脂肪酸如2-羟基丁酸(2-hydroxybutyrate, 2HB)、乳酸(LA)、乙醇酸(glycolate, GA)组成的PHA聚酯可以被认为具有代表性的非天然PHA, 这些聚酯具有低毒性和良好的机械性能, 包括高强度和高模量^[55], 因此适用于再生医学中使用的药物递送载体和组织器官支架^[56]。聚乳酸(PLA)的微生物合成也是一个可以实现理论碳转化率为1的聚酯。葡萄糖通过糖酵解直接产生丙酮酸, 然后还原产生乳酸LA, 其从葡萄糖的理论碳转化率为1。因此也是较理想的单体选择。

含LA聚酯的合成主要取决于辅酶A转移酶和聚合酶PhaC, 研究者对假单胞菌来源底物范围宽泛的 $phaC_{MBEL\ 6-19}$ 和 $phaC_{Ps\ 61-3}$ 的Glu130、Ser325、Ser477和Gln481位点进行了双、三和四突变, 获得了对LA-CoA的活性显著增加的突变体, 使重组大肠杆菌可以产生LA摩尔分数为19%~49%的P(3HB-co-LA)^[57]。另外, 来自*Pseudomonas putida* KT2440、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1、*Pseudomonas stutzeri*等的PhaC都被设计为通过这4个氨基酸位点的定点诱变接受LA-CoA^[58-59]。另外, 很多辅酶A转移酶已通过进化工程来合成LA-CoA。Yang等^[57]将来自*Clostridium propionicum*的丙酰辅酶A转移酶(Pct)基因进行随机诱变获得了突变体Pct532(Ala243Thr, A1200G)和Pct540(Val193Ala, T78C、T669C、A1125G和T1158C), 可以接受LA单体使聚酯的产量增加。为了使宿主具备从葡萄糖合成LA直接前体的能力, Jung等^[29]删除 $ackA$ 和 ppc 提高乙酰辅酶A和丙酮酸的水平, 增强 $ldhA$ 表达以推动代谢流向LA。大肠杆菌可以从葡萄糖生产占细胞干重达46%(质量分数)的P(3HB-co-LA), 其中LA的摩尔分数从30%增加到60%。

1.6 2-Hydroxybutyrate (2HB) 单体

为了以葡萄糖为碳源生产含2HB的聚酯, Park等^[30]在大肠杆菌中构建柠檬酸途径生成2-酮丁酸, 同时表达*Lactococcus lactis*的D-2HA脱氢酶基因($panE$)以将2-酮丁酸转化为2HB。从柠檬酸途径产2HB需要脱掉两个碳, 因此与3HB的结果类似, 2HB的合成理论碳转化率为0.66。

来自*C. propionicum*的Pct被发现也可以激活2HB、GA、3HP、4HB、5-羟基戊酸酯(5HV)和6-羟基己酸酯(6HHx)等各种HA^[30-31, 60], 用于产生一系列非天然聚酯, 包括P(2HB-co-LA)和P(LA-co-GA)等。另外几种丁酰辅酶A转移酶(Bcts)也被开发将2HB和LA转化为2HB-CoA和LA-CoA^[61]。利用Pct540_{Cp}和聚合酶PhaC1437_{Ps 6-19}, 大肠杆菌可以以葡萄糖作唯一碳源生产聚合物P(3% 2HB-co-96% 3HB-co-1% LA)(摩尔分数), 其含量占细胞干重的74%(质量分数), 但是2HB含量较低^[30]。因此从目前的代谢途径和理论转化率来看, 2HB单体的合成并不具有明显优势。

1.7 Glycolate/2-hydroxyacetate (GA) 单体

为了从非相关碳源生产含GA的聚酯, 在大肠杆菌中开发了两种不同的代谢途径。第1个是异源*Caulobacter crescentus*的木糖分解代谢途径——Dahms途径, 通过木糖的5次直接酶促转化合成GA, 此时碳转化率为0.4; 生成的另一分子丙酮酸可以用于产生另一种单体如LA, 这时木糖生产PLGA共聚物的理论碳转化率为1。Choi等^[31]将木糖脱氢酶基因 $xyIB_{ces}$ 和木糖内酯酶基因 $xyIC_{ces}$ 引入大肠杆菌产生GA; 另外发现编码苹果酸合酶和GA氧化酶的 $aceB$ 、 $glcB$ 和 $glcDEFG$ 的缺失有助于增加GA产量; 通过进一步提高LA的供应和减少2HB产生, 最终在分批补料发酵中, 从葡萄糖和木糖可以产生含有摩尔分数29.51% GA的PLGA, 产量高达细胞干重的36.2%(质量分数)^[31]。该PLGA重组大肠杆菌可以生产各种基于PLGA的共聚物, 分别含有3HB、4HB、5HV、6HHx等单体。Choi等^[62]通过精细调节降低Dahms通路通量, 以木糖作为唯一碳源, 经分批补料培养可增强PLGA的产量达到6.93 g/L, 其中GA摩尔分数达到14.6%。

用于合成含GA聚酯的第2种代谢途径是乙醛酸分流途径^[32, 64]。核心策略是增强乙醛酸还原酶 *ycdW* 基因表达以有效地将乙醛酸转化为GA, 同时增强异柠檬酸裂解酶和异柠檬酸脱氢酶激酶/磷酸酶 *aceAK* 基因表达以增加乙醛酸库, 同时删除 *gldD* 防止GA转化为乙醛酸。理论上, 从葡萄糖通过乙醛酸分流生成GA的理论转化率为0.66。工程大肠杆菌从葡萄糖以 *phaCl*_{Ps.61-3} (Ser325Thr、Gln481Lys)、*M. elsdenii* 的 *pct* 和 *C. necator* 的 *phaAB* 来生产P(LA-co-GA-co-3HB)时, GA摩尔分数达1.5%~39.0%, 聚酯质量分数达到55.9%^[32]。此外, 含有SucD和4HbD组成4HB合成途径的菌株可以从葡萄糖生产四聚体P(LA-co-GA-co-3HB-co-4HB), 聚合物质量分数高达52.6%^[63]。因此, GA单体需结合另一种单体的合成来形成共聚物才能实现较高理论碳转化率, 对于GA单体的合成还需进一步的深入研究。

1.8 MCL-3HA单体

MCL-PHA, 由于其在柔韧性、韧性和加工性方面的优异性能而引起了相当大的关注。

由3-hydroxyhexanoate (3HHx) 构成的聚酯具有较低的熔点、较低的杨氏模量和较高的断裂伸长率(高达850%), 这使其成为一种更坚韧、更柔韧的塑料^[64]。因此共聚物P(3HB-co-HHx)广泛应用于各种组织工程材料^[65]。使得利用工程菌生产只含3HHx单体的SCL-co-MCL PHA共聚物成为可能。与3HB单体类似, 从葡萄糖经过丁酰辅酶A的人工途径合成3HHx的碳转化率为0.66。以葡萄糖等廉价非相关碳源生产P(3HB-co-HHx)需构建人工途径^[33, 66], 从3个乙酰辅酶A分子构建C₆单体, 即通过巴豆酰辅酶A还原酶形成丁酰辅酶A, 然后乙酰辅酶A与丁酰辅酶A缩合提供3HHx-CoA中间体。来自 *Aeromonas caviae* 等菌的聚合酶PhaC和烯酰CoA水合酶PhaJ对3HB-CoA和3HHx-CoA具有高度底物特异性^[67]。工程菌可以合成占细胞干重75.3%(质量分数)的P(3HB-co-HHx), 其中含有摩尔分数12%的3HHx^[34]。以脂肪酸或者油脂作为碳源生产P(3HB-co-HHx)的天然生产菌也较多^[68], 这里不再过多讨论。

利用非相关碳源, MCL-PHA可以通过脂肪酸从头生物合成途径或反向脂肪酸 β -氧化途径天然合成^[69]。以葡萄糖合成关键前体乙酰辅酶A然后进行从头合成, 因此3HA单体的碳理论转化率为0.66, 与3HB的转化率相当。但实际上由于MCL-PHA的合成路线很长, 需要经过多轮循环, 实际的底物转化率会比0.66低很多。

通过引入来自恶臭假单胞菌的转酰基酶基因 *phaG*, 大肠杆菌可以通过从葡萄糖从头生物合成占2%~3%细胞干重的MCL-PHA^[35, 70]。不同类别PHA聚合酶PhaC通常只接受SCL或者MCL单体, 为扩展微生物合成SCL-co-MCL PHA共聚物的能力, 研究者将 *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19的PhaC和 *Pseudomonas* sp. 61-3的PhaC经过酶分子改造之后能够接收SCL-HA-CoA作为底物, 然后利用脂肪酸从头合成途径促进了使用葡萄糖生产SCL-MCL-PHA^[71-72]。类似地, 表达 *fabH* 和 *phaC*_{Ps.61-3} 的重组大肠杆菌可以在脂肪酸生物合成途径中将丙二酰-ACP与乙酰辅酶A缩合^[73]从葡萄糖产生包含3HB、3HHx和3HO的PHA^[74]。在重组大肠杆菌LS5218中表达PhaC₆₁₋₃、PhaG、PhaAB和来自 *P. aeruginosa* PAO的CoA连接酶PA3924, 可以从葡萄糖生产P(94.6% 3HB-co-5.4% MCL-3HA)(摩尔分数)^[72]。2014年, 本实验室^[36]首次实现在大肠杆菌中从葡萄糖通过反向脂肪酸 β -氧化循环合成MCL-PHA。该反向途径直接利用乙酰辅酶A及辅酶A硫酯中间体进行酰基链延长(而不是酰基ACP), 通过删除主要硫酯酶, 过表达 *fadBA*、齿垢螺旋体的 *ter*、烯酰辅酶A水合酶PhaJ_{Pa}, 重组大肠杆菌能够将反向脂肪酸 β -氧化循环产生的烯酰辅酶A转化为3-HA-CoA, 从而产生质量分数6.62%的MCL-PHA, 使用 *P. stutzeri* 1317的PhaC, 重组菌合成了12.10%(质量分数)细胞干重的P(21.18%3HB-co-78.82%3HA)共聚物(摩尔分数)。另外, 在生物合成中, 微生物利用葡萄糖等非相关碳源合成MCL-PHA的能力比较弱, 聚酯的细胞内含量较少。

因此, 我们认为MCL-PHA是目前最不适合用葡萄糖实现低碳生物合成的可降解塑料。然而从不同碳源的角度讲, 由于MCL-PHA中的单体主要是中长链脂肪酸, 以廉价的脂肪酸或者油脂作为

碳源生产 MCL-PHA 是比较合适的选择, 碳损失少, 碳的理论转化率高。

2 人工低碳合成途径提高 PHA 生物制造的碳转化率

通过以上分析可以看出, 影响 PHA 生物制造成本的因素除了发酵液中 PHA 的浓度, 细胞内 PHA 的含量之外, PHA 的单体种类也决定着 PHA 合成的底物碳转化率, 进而影响 PHA 的制造成本。然而 PHA 单体及其合成途径繁多, 能否设计合理的策略和人工生物合成途径, 从根本上提高所有 PHA 的碳理论转化率呢?

答案是肯定的。糖酵解或 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) 途径是大多数生命系统中的基本代谢途径, 可将糖分解为丙酮酸, 并提供 ATP 和还原力 NADH。为了合成目标代谢产物包括 PHA, 丙酮酸必须脱羧为乙酰辅酶 A, 该脱羧步骤会在环境中释放大量的 CO_2 , 导致碳产率损失 33%。这种浪费的 CO_2 会大大降低生物基产品的整体经济性。糖酵解的这种天然限制受到了 Liao 研究组的挑战, Bogorad 等^[75] 构建了一个“非氧化-糖酵解”途径 (NOG), 该途径依赖于磷酸酮醇酶 (FxpK) 对糖磷酸的磷酸化裂解, 不可逆地将 F6P 裂解为乙酰磷酸 (AcP) 和 E4P, 将 Xu5P 裂解为甘油醛-3-磷酸 (GAP) 和 AcP, 结合碳重排循环的转醛醇酶 (Tal) 和转酮醇酶 (Tkt), 最终经过果糖-1,6-二磷酸酶 (Fbp) 从 FBP 中回收 F6P。创建了 1 个以 F6P 作为输入分子的循环途径, 从 1 个 F6P 不可逆地形成 3 个 AcP, 最终转化为 3 个 AcCoA, 碳理论转化率为 1。然而, 从生物技术的角度来看, NOG 的潜力非常有限, 无法制造除乙酸盐以外的化合物。

本实验室^[76] 针对上述问题提出了一种解决 NOG 途径无法产生还原力的策略 (图 3)。通过结合了 EMP 途径、磷酸戊糖途径 (PPP) 以及引入“bifid shunt”途径, 在体内构建了一个“EP-Bifido”途径, 该途径以 PPP 的氧化分支产生 NADPH, 同时 F6P 和 Xu5P 被磷酸酮醇酶 FxpK 分解为 AcP 和 E4P/GAP。E4P 进入碳重排, GAP 通过醛缩酶 Fba 将 GAP 和 DHAP 缩合为 FBP 被再循

环为 F6P。理论上, 该途径中如果 66% 的 G6P 通过 PPP, 1 个葡萄糖可以产生 2.66 个 AcCoA, 碳的理论转化率可达到 0.88, 比天然 EMP 途径转化率提高了 33%。该 EP-Bifido 途径的工程大肠杆菌不产生乙酸, 并且释放的 CO_2 减少了 50%~70%。当 EP-Bifido 途径用于生产 PHB 时, PHB 的产率提高了 145%, 碳的实际转化率从 0.26 提高至 0.64。采用这种策略不仅可以降低制造成本, 还可以降低碳排放, 是未来 PHA 生物制造的方向。

另外, 一个称为“戊糖-双歧-糖酵解”循环 (PBG) 的合成途径在体外成功实现了通过乙酰辅酶 A 将葡萄糖转化为 PHB。Opgenorth 等^[77] 设计了该 PBG 循环, 该循环同样利用磷酸酮醇酶 FxpK 分解 F6P 和 Xu5P 以及通过 PPP 的氧化分支产生 NADPH。不同的是利用磷酸果糖激酶 PfkB 可逆地催化 FBP 形成 F6P, 同时再生 ATP。另外, 作者补充了转酮醇酶 (Tkt)、转醛醇酶 (Tal) 和核糖-5-磷酸异构酶 (Rpi), 以及通过引入“NAD(P)H 净化阀”来调节 NADPH 的积累, 实现 NADPH 的非化学计量途径生产。利用该 PBG 循环, PHB 的最大生产速率为 0.7 g/(L·h), 理论产率为 90%。无细胞系统可以克服例如有毒中间体、由于竞争途径和不良副产品而导致的低生产力, 因此在工业规模上开发这样的过程有很大的希望^[78]。

3 利用一碳化合物直接进行 PHA 生产制造

从碳排放的角度去分析, 直接利用一碳化合物生产制造 PHA 是解决低碳合成的终极策略。近年来也有很多利用气体碳源如一氧化碳 (CO)、二氧化碳 (CO_2)、甲烷 (CH_4) 以及甲醇 (CH_3OH) 来生产 PHA 的研究 (图 3)^[79]。一些天然 PHA 生产菌, 包括氢氧化细菌如 *C. necator*、蓝藻如集胞藻 PCC6803 和甲烷氧化菌如 *Methylocystis parvus* 和 *Methylocystis* sp. GB25 等, 能够通过发酵 C_1 碳源产生 PHA。

C. necator 可以利用 H_2 作为电子供体和 O_2 作为电子受体, 将 CO_2 还原为二磷酸核酮糖的中间体或反向三羧酸循环中的分子^[80]。在自养和限氧生长

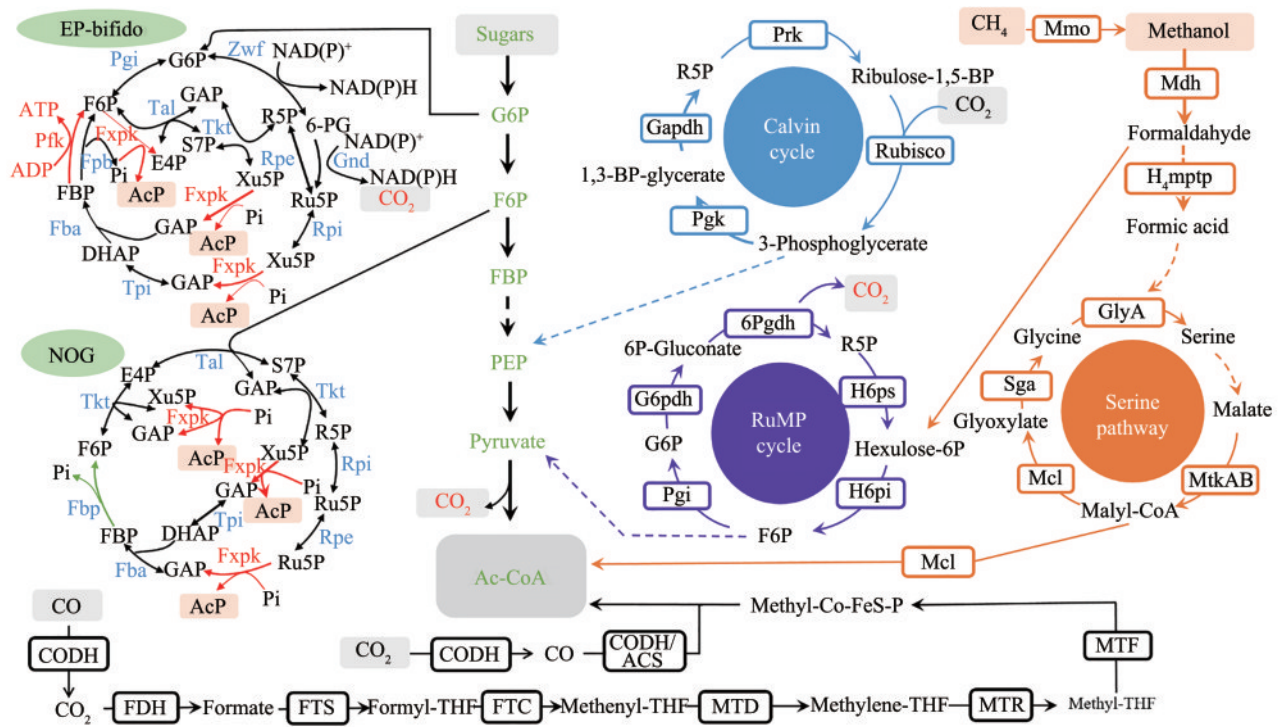


图3 PHA生产的低碳及固碳生物合成途径

(低碳生物合成途径包括如NOG途径、EP-Bifido途径等；固碳生物合成途径包括卡尔文循环、丝氨酸途径、5-磷酸核酮糖单磷酸途径等。酶：FxpK—F6P/Xu5P磷酸解酮酶；Tal—转醛醇酶；Tkt—转酮醇酶；Fbp—果糖-1,6-二磷酸；Fba—果糖-1,6-二磷酸醛缩酶；tpi—丙糖磷酸异构酶；Rpe—核酮糖-5-磷酸异构酶；Rpi—核糖-5-磷酸异构酶；CODH—一氧化碳脱氢酶；FDH—甲酸脱氢酶；FTS—甲酰基-四氢叶酸合酶；FTC—甲酰基-四氢叶酸环化水解酶；MTD—亚甲基-四氢叶酸脱氢酶；MTR—亚甲基-四氢叶酸还原酶；MTF—甲基转移酶；ACS—乙酰辅酶A合成酶；PRK—磷酸核酮糖激酶；GAPDH—3-磷酸甘油醛脱氢酶；PGK—磷酸甘油酸激酶；RuBisCO—核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶；MMO—甲烷单氧化酶；MDH—甲醇脱氢酶；H4MPTP—四氢甲烷蝶呤途径；GlyA—丝氨酸羟甲基转移酶；MtkAB—苹果酸硫激酶；Sga—丝氨酸-乙酰胺氨基转移酶；Mcl—苹果酸辅酶A裂合酶；6PGDH—6-磷酸葡萄糖醛脱氢酶；H6PS—己酮糖-6-磷酸合酶；H6PI—己酮糖-6-磷酸异构酶；PGI—磷酸葡萄糖异构酶；G6PDH—葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。代谢物：F6P—果糖-6-磷酸；PEP—磷酸烯醇式丙酮酸；Pyr—丙酮酸；E4P—赤藓糖-4-磷酸；S7P—景天庚酮糖-7-磷酸；R5P—核糖-5-磷酸；Ru5P—核酮糖-5-磷酸；Xu5P—木酮糖-5-磷酸；GAP—3-磷酸甘油醛；DHAP—磷酸二羟丙酮；FBP—果糖-1,6-二磷酸；Ribulose 1,5-BP—核酮糖-1,5-二磷酸；1,3-BP-glycerate—1,3-二磷酸甘油酸；6P-Gluconate—6-磷酸葡萄糖酸；Hexulose-6P—己酮糖-6-磷酸；AcP—乙酰磷酸；Ac-CoA—乙酰辅酶A；Formyl-THF—甲酰基-四氢叶酸；Methenyl-THF—亚甲基-四氢叶酸；Methylene-THF—亚甲基四氢叶酸；Methyl-THF—甲基-四氢叶酸；Methyl-CoFeS-P—甲基类咕啉铁硫蛋白)

Fig. 3 Low carbon and carbon sequestration biosynthetic pathways for PHA production

(Low carbon biosynthesis pathways include NOG pathway, EP-bifido pathway, etc. Carbon sequestration biosynthesis pathways include Calvin cycle, serine pathway, ribulose 5-phosphate monophosphate pathway, etc)

条件下的补料分批发酵中，*C. necator* 能累积 61.9 g/L 的 PHB，生产率为 1.55 g/(L·h)^[81]。此外，当使用 CO₂ 作为唯一碳源时，*C. necator* H16 可生产含量高达细胞干重 63% 的共聚物 P(3HB-co-3HV-co-3HHx)，产量为 5.8 g/L^[82]。最近，一株自产乙醇梭菌菌株 *Clostridium autoethanogenum* 引入 PHB 合成基因后可将合成气 CO/CO₂ (含 H₂) 转化为 PHB^[83]。许多蓝藻细胞可以以 CO₂ 作为唯一碳源自身生物合成 PHB：集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 可以在光驱动的 Calvin-Benson-Bassham

(CBB) 循环下利用 CO₂ 自然地积累 PHB^[84]，Carpine 等^[85] 通过工程化引入磷酸酮醇酶基因 *fxpk*，同时缺失 *pta* 和 *ach*，在光生物反应器中直接从 CO₂ 发酵生产 PHB，*fxpk* 的引入使 PHB 产量增加 6 倍，最终产量达到 232 mg/L，占细胞干重的 12%。

甲烷营养菌株 *Methylocystis* sp. GB 25 DSMZ 7674 通过双阶段发酵能够在短暂的非无菌过程中积累 PHB。在 70 L 生物反应器中，经过连续生长期 (稀释率 0.17 h⁻¹) 和分批培养中必需营养素缺

乏条件下的PHB积累阶段,可以生产占细胞干重51%的PHB^[86]。另外,甲基营养菌可以利用甲醇通过丝氨酸途径生产PHA,如*M. extorquens* ATCC 55366以甲醇作为唯一碳源在115 g/L的高细胞密度下,生产含量高达细胞干重46%的PHB^[87]。重组*M. extorquens* AM1以甲醇为唯一碳源可以积累由3HB、3HV和3HHx组成的共聚物^[88]。研究者发现培养基中钴离子(Co^{2+})的浓度会影响聚合物的生长速度和积累,在低钴浓度下,3HV被掺入到所产生的共聚物中,从而产生含有6% 3HV的P(3HB-co-3HV)。通过引入*A. caviae*的*phaC*基因,该基因可以接受SCL-HA-CoA和MCL-HA-CoA,发现可以从甲醇合成P(3HB-co-3HV-co-3HHx)。Yin等^[89]从油田中分离出一株甲基杆菌*Methylobacterium* sp. 1805,该细菌可以以甲醇为唯一碳源生产获得0.55 g/L的PHB。虽然目前这些研究还不能实现规模化,但为将来的PHA的工业化发展打下了基础。

4 总结与展望

在“双碳”目标的指引下,低碳生物合成成为绿色制造的关键。以生物基塑料PHA为例,与传统合成塑料相比,PHA能够把生命周期碳排放降低90%,1根PHA吸管比PP吸管的碳排放低180 g。近年来全球推行的禁/限塑令也成为生物基塑料启动的催化剂。PHA的微生物绿色制造,其原料丰富且可再生,过程绿色智能可控且条件温和,产品种类也越来越丰富。以PHA作为新产品验证正是开启工业化脱碳、替代传统石化塑料的大好时机,市场潜力无可估量。

降低成本仍然是生物可降解塑料发展的动力。分析各种PHA的理论碳转化率有助于筛选适合的PHA单体类型、提高底物利用,降低成本,还可以减少生产过程的碳排放,助力“双碳”目标的实现。当然,文中PHA单体的理论转化率计算是基于不考虑细胞还原力等因素的碳的最大转化率,实际的底物转化率数据目前在文献报道中列出的较少,大部分的数据体现的是PHA中各种单体的组成以及PHA的细胞内含量。实际转化效率跟各种PHA合成过程中实际采用的途径以及该途径

PHA合成的效率有关,随着PHA产业不断发展和PHA产量的不断提高,今后人们也会越来越多地关注PHA的实际转化效率。

PHA的生物合成的前体是以乙酰辅酶A为主。而从葡萄糖合成乙酰辅酶A的脱羧过程会涉及碳损失。因此,设计开发新型的人工低碳途径,减少 CO_2 的排放并提高前体的碳转化率;同时提高一碳化合物的有效利用和转化,仍然是未来需突破的关键技术。利用代谢工程与合成生物学方法对产PHA底盘细胞改造^[90],通过从细胞的整体代谢网络着手,调控和优化代谢途径,提高底物到产物的转化率。

另外,PHA的价格控制可从多方面降低成本,如选择廉价糖类或者废弃物为底物;选用特殊底盘菌如嗜盐菌来生产,可节省高温高压蒸汽灭菌的设备与能量消耗,降低发酵生产过程中的耗能。总之,以上PHA合成的方法策略分析与技术开发对于开启PHA的低碳绿色生物制造的工业化进程具有深远意义。

参 考 文 献

- [1] ANDERSON A J, DAWES E A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates[J]. *Microbiological Reviews*, 1990, 54(4): 450-472.
- [2] MADISON L L, HUISMAN G W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(1): 21-53.
- [3] 祁庆生,王倩,梁泉峰. 生物合成可降解材料PHA的研究进展和产业化趋势[J]. *中国基础科学*, 2009, 11(5): 96-99, 74. QI Q S, WANG Q, LIANG Q F. Research progress and industrialization trend of biodegradable materials PHA[J]. *China Basic Science*, 2009, 11(5): 96-99, 74.
- [4] STEINBÜCHEL A. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2001, 1(1): 1-24.
- [5] SUDESH K, ABE H, DOI Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters[J]. *Progress in Polymer Science*, 2000, 25(10): 1503-1555.
- [6] LI Z B, YANG J, LOH X J. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future[J]. *NPG Asia Materials*, 2016, 8(4): e265.
- [7] REHM B H A, STEINBÜCHEL A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA

- synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1999, 25(1/2/3): 3-19.
- [8] 赵国强, 李亚丽, 武双, 等. 基于低成本碳源微生物合成聚羟基脂肪酸酯的研究进展[J]. 高分子通报, 2020(11): 22-30.
- ZHAO G Q, LI Y L, WU S, et al. Research progress in polyhydroxyalkanoates biosynthesis by microorganisms based on inexpensive carbon sources[J]. Polymer Bulletin, 2020(11): 22-30.
- [9] SANTIMANO M C, PRABHU N N, GARG S. PHA production using low-cost agro-industrial wastes by *Bacillus* sp. strain COL1/A6[J]. Research Journal of Microbiology, 2009, 4(3): 89-96.
- [10] KIM H S, OH Y H, JANG Y A, et al. Recombinant *Ralstonia eutropha* engineered to utilize xylose and its use for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from sunflower stalk hydrolysate solution[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 95.
- [11] SHEU D S, CHEN W M, YANG J Y, et al. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44(5): 289-294.
- [12] BUDDE C F, RIEDEL S L, WILLIS L B, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(9): 2847-2854.
- [13] KOLLER M, HESSE P, BONA R, et al. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey[J]. Macromolecular Bioscience, 2007, 7(2): 218-226.
- [14] PARK S J, PARK J P, LEE S Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(3): 185-189.
- [15] OH Y H, LEE S H, JANG Y A, et al. Development of rice bran treatment process and its use for the synthesis of polyhydroxyalkanoates from rice bran hydrolysate solution[J]. Bioresource Technology, 2015, 181: 283-290.
- [16] ANDREESSEN B, LANGE A B, ROBENEK H, et al. Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(2): 622-626.
- [17] VERLINDEN R A, HILL D J, KENWARD M A, et al. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*[J]. AMB Express, 2011, 1(1): 11.
- [18] NEELAMEGAM A, AL-BATTASHI H, AL-BAHRY S, et al. Biorefinery production of poly-3-hydroxybutyrate using waste office paper hydrolysate as feedstock for microbial fermentation[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 265: 25-30.
- [19] POVOLO S, TOFFANO P, BASAGLIA M, et al. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(20): 7902-7907.
- [20] CHOI J I, LEE S Y, HAN K. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(12): 4897-4903.
- [21] ELHADI D, LÜ L, JIANG X R, et al. CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 358-369.
- [22] CHEN Q, WANG Q, WEI G Q, et al. Production in *Escherichia coli* of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(14): 4886-4893.
- [23] MA W J, WANG J L, LI Y, et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-produced with L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum* WM001[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 93.
- [24] WANG Q, LIU X L, QI Q S. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose with elevated 3-hydroxyvalerate fraction via combined citramalate and threonine pathway in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(9): 3923-3931.
- [25] ALDOR I S, KIM S W, PRATHER K L, 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3848-3854.
- [26] LI Z J, SHI Z Y, JIAN J, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(4): 352-359.
- [27] YE J W, HU D K, CHE X M, et al. Engineering of *Halomonas bluephagenesis* for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 143-152.
- [28] WANG Q, LIU C S, XIAN M, et al. Biosynthetic pathway for poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(4): 693-697.
- [29] JUNG Y K, KIM T Y, PARK S J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(1): 161-171.
- [30] PARK S J, LEE T W, LIM S C, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxybutyrate from unrelated carbon source by metabolically engineered *Escherichia coli*[J].

- Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 273-283.
- [31] CHOI S Y, PARK S J, KIM W J, et al. One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(4): 435-440.
- [32] LI Z J, QIAO K J, SHI W C, et al. Biosynthesis of poly(glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate) from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 1-8.
- [33] WANG Q, LUAN Y Q, CHENG X L, et al. Engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from glucose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(6): 2593-2602.
- [34] ZHANG M X, KURITA S, ORITA I, et al. Modification of acetoacetyl-CoA reduction step in *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from structurally unrelated compounds[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 147.
- [35] WANG Q, TAPPEL R C, ZHU C J, et al. Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(2): 519-527.
- [36] ZHUANG Q Q, WANG Q, LIANG Q F, et al. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from glucose that contain medium-chain-length monomers via the reversed fatty acid β -oxidation cycle in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 78-86.
- [37] CHOI J I, LEE S Y. High level production of supra molecular weight poly(3-hydroxybutyrate) by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 9(3): 196-200.
- [38] MARANGONI C, FURIGO A, DE ARAGÃO G M F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(2): 137-141.
- [39] KOLLER M, BONA R, CHIELLINI E, et al. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4854-4863.
- [40] STEINBÜCHEL A, HUSTEDE E, LIEBERGESELL M, et al. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 103(2/3/4): 217-230.
- [41] HAYWOOD G W, ANDERSON A J, WILLIAMS D R, et al. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1991, 13(2): 83-88.
- [42] ESCHENLAUER A C, STROUP S K, SRIENC F, et al. Production of heteropolymeric polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli* from a single carbon source[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1996, 19(2): 121-130.
- [43] YANG J E, CHOI Y J, LEE S J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 95-104.
- [44] CHEN Y, CHEN X Y, DU H T, et al. Chromosome engineering of the TCA cycle in *Halomonas bluephagenesis* for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate (PHBV)[J]. Metabolic Engineering, 2019, 54: 69-82.
- [45] AKDOĞAN M, ÇELİK E. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biopolymer by recombinant *Bacillus megaterium* in fed-batch bioreactors[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2021, 44(2): 403-416.
- [46] DOI Y, KANESAWA Y, KUNIOKA M, et al. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)[J]. Macromolecules, 1990, 23(1): 26-31.
- [47] VIGNESWARI S, VIJAYA S, MAJID M I A, et al. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(4): 547-556.
- [48] SÖHLING B, GOTTSCHALK G. Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(3): 871-880.
- [49] VALENTIN H E, DENNIS D. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose[J]. Journal of Biotechnology, 1997, 58(1): 33-38.
- [50] NAKAMURA S, KUNIOKA M, DOI Y. Biosynthesis and characterization of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) [J]. Journal of Macromolecular Science: Part A-Chemistry, 1991, 28(sup1): 15-24.
- [51] VALENTIN H E, MITSKY T A, MAHADEO D A, et al. Application of a propionyl coenzyme A synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5253-5258.
- [52] 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*[J]. Biomacromolecules, 2009, 10(4): 700-706.
- [53] WANG Q, YANG P, XIAN M, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) with fully controllable structures from glycerol[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 741-744.

- [54] GAO Y Q, LIU C S, DING Y M, et al. Development of genetically stable *Escherichia coli* strains for poly(3-hydroxypropionate) production[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97845.
- [55] DEB P K, KOKAZ S F, ABED S N, et al. Pharmaceutical and biomedical applications of polymers[M]// Basic fundamentals of drug delivery. Amsterdam: Elsevier, 2019: 203-267.
- [56] GIAMMONA G, CRAPARO E F. Biomedical applications of polylactide (PLA) and its copolymers[J]. Molecules, 2018, 23(4): 980.
- [57] YANG T H, KIM T W, KANG H O, et al. Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(1): 150-160.
- [58] YANG T H, JUNG Y K, KANG H O, et al. Tailor-made type II Pseudomonas PHA synthases and their use for the biosynthesis of polylactic acid and its copolymer in recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(2): 603-614.
- [59] REN Y L, MENG D C, WU L P, et al. Microbial synthesis of a novel terpolyester P(LA-co-3HB-co-3HP) from low-cost substrates[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(2): 371-380.
- [60] PARK S J, KIM T W, KIM M K, et al. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1196-1206.
- [61] DAVID Y, JOO J C, YANG J E, et al. Biosynthesis of 2-hydroxyacid-containing polyhydroxyalkanoates by employing butyryl-CoA transferases in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(11): 1700116.
- [62] CHOI S Y, KIM W J, YU S J, et al. Engineering the xylose-catabolizing Dahms pathway for production of poly(D-lactate-co-glycolate) and poly(D-lactate-co-glycolate-co-D-2-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(6): 1353-1364.
- [63] LI Z J, QIAO K J, CHE X M, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of the quadripolymer poly(glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose[J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 38-44.
- [64] NODA I, GREEN P R, SATKOWSKI M M, et al. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(2): 580-586.
- [65] YU B Y, CHEN P Y, SUN Y M, et al. Response of human mesenchymal stem cells (hMSCs) to the topographic variation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHH_x) films[J]. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 2012, 23(1/2/3/4): 1-26.
- [66] INSOMPHUN C, XIE H, MIFUNE J, et al. Improved artificial pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with high C₆-monomer composition from fructose in *Ralstonia eutropha*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 27: 38-45.
- [67] FUKUI T, DOI Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(15): 4821-4830.
- [68] LEE S H, OH D H, AHN W S, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 67(2): 240-244.
- [69] TIMM A, STEINBÜCHEL A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(11): 3360-3367.
- [70] REHM B H, MITSKY T A, STEINBÜCHEL A. Role of fatty acid *de novo* biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(7): 3102-3109.
- [71] PARK S J, CHOI J I, LEE S Y. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(4): 579-588.
- [72] HOKAMURA A, WAKIDA I, MIYAHARA Y, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant *Escherichia coli* from glucose[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120(3): 305-310.
- [73] TSAY J T, OH W, LARSON T J, et al. Isolation and characterization of the beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III gene (*fabH*) from *Escherichia coli* K-12[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(10): 6807-6814.
- [74] NOMURA C T, TANAKA T, GAN Z H, et al. Effective enhancement of short-chain-length-medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer production by coexpression of genetically engineered 3-ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase III (*fabH*) and polyhydroxyalkanoate synthesis genes[J]. Biomacromolecules, 2004, 5(4): 1457-1464.
- [75] BOGORAD I W, LIN T S, LIAO J C. Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation[J]. Nature, 2013, 502(7473): 693-697.
- [76] WANG Q, XU J S, SUN Z J, et al. Engineering an *in vivo* EP-bifido pathway in *Escherichia coli* for high-yield acetyl-CoA generation with low CO₂ emission[J]. Metabolic Engineering, 2019, 51: 79-87.
- [77] OPGENORTH P H, KORMAN T P, BOWIE J U. A synthetic biochemistry module for production of bio-based chemicals from glucose [J]. Nat Chem Biol 2016, 12 (6):393-395.

- [78] DUDLEY Q M, KARIM A S, JEWETT M C. Cell-free metabolic engineering: Biomanufacturing beyond the cell[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(1): 69-82.
- [79] DÜRRE P, EIKMANN B J. C₁-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 35: 63-72.
- [80] BRIGHAM C. Perspectives for the biotechnological production of biofuels from CO₂ and H₂ using *Ralstonia eutropha* and other 'Knallgas' bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(5): 2113-2120.
- [81] ISHIZAKI A, TANAKA K, TAGA N. Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO₂[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(1/2): 6-12.
- [82] VOLOVA T G, KALACHEVA G S, STEINBÜCHEL A. Biosynthesis of multi-component polyhydroxyalkanoates by the Bacterium *Wautersia eutropha*[J]. *Macromolecular Symposia*, 2008, 269(1): 1-7.
- [83] DE SOUZA PINTO LEMGRUBER R, VALGEPEA K, TAPPEL R, et al. Systems-level engineering and characterisation of *Clostridium autoethanogenum* through heterologous production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB)[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 53: 14-23.
- [84] WU G F, WU Q Y, SHEN Z Y. Accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 76(2): 85-90.
- [85] CARPINE R, DU W, OLIVIERI G, et al. Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly-β-hydroxybutyrate overproduction[J]. *Algal Research*, 2017, 25: 117-127.
- [86] WENDLANDT K D, JECHOREK M, HELM J, et al. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 86(2): 127-133.
- [87] BOURQUE D, POMERLEAU Y, GROLEAU D. High-cell-density production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 44(3/4): 367-376.
- [88] ORITA I, NISHIKAWA K, NAKAMURA S, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(8): 3715-3725.
- [89] WANG J, TAN H, LI K, et al. Two-stage fermentation optimization for poly-3-hydroxybutyrate production from methanol by a new *Methylobacterium* isolate from oil fields[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(1): 171-181.
- [90] 王颖, 陈国强. 合成生物学技术在聚羟基脂肪酸酯 PHA 生产中的应用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45(10): 1003-1014.
WANG Y, CHEN G Q. Application of synthetic biology for the production of polyhydroxyalkanoates[J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2015, 45(10): 1003-1014.



通讯作者: 祁庆生(1966—), 男, 教授, 山东大学微生物技术国家重点实验室副主任。研究方向为代谢工程与合成生物学, 废弃塑料降解及生物可降解塑料的合成等。

E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn



第一作者: 王倩(1983—), 女, 博士, 教授。研究方向为微生物代谢工程与合成生物学。

E-mail: qiqi20011983@gmail.com