

# 聚 3-羟基丙酸及其共聚物的生物合成

杨鹏<sup>①②</sup>, 王琦<sup>①</sup>, 咸漠<sup>①</sup>, 薛永常<sup>②</sup>, 赵广<sup>①\*</sup>

① 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 中国科学院生物基材料重点实验室, 青岛 266101;

② 大连工业大学生物工程学院, 大连 116034

\* 联系人, E-mail: zhaoguang@qibebt.ac.cn

2014-02-02 收稿, 2014-03-24 接受, 2014-06-24 网络版发表

中国科学院“百人计划”(Y310011105)资助

**摘要** 3-羟基丙酸是重要的平台化合物, 其聚合物是一种性能优异的新型可生物降解塑料, 而且 3-羟基丙酸与其他羟基脂肪酸形成共聚物时, 可提高材料的延展性和生物降解能力. 由于已知的生物都不能天然合成聚 3-羟基丙酸, 所以早期研究中聚 3-羟基丙酸及含 3-羟基丙酸单体的共聚物的生物合成都依赖于 3-羟基丙酸或其结构相关前体, 如丙烯酸、1,3-丙二醇等. 这些价格昂贵的前体物质的使用, 增加了聚 3-羟基丙酸的生产成本. 近年来, 随着基因工程技术的应用, 已有两条人工代谢途径可利用廉价碳源(如葡萄糖、甘油等)合成聚 3-羟基丙酸, 而且结构和单体比例可控的系列 3-羟基丙酸共聚物也已成功合成. 与使用结构相关前体相比, 聚 3-羟基丙酸及其共聚物的生产成本已大大降低, 但仍然高于石化基塑料. 目前, 聚 3-羟基丙酸合成研究的主要问题是进一步提高聚 3-羟基丙酸及其共聚物的合成效率, 降低生产成本.

## 关键词

聚羟基脂肪酸酯  
聚 3-羟基丙酸  
生物合成  
结构相关前体  
廉价碳源

聚羟基脂肪酸酯(PHAs)是近年来迅速发展起来的一类生物可降解材料, 是微生物体内合成的由 3-羟基脂肪酸组成的线性聚酯的总称. 在碳源充足而缺乏其他营养物质时, 多种微生物都可以合成 PHAs 作为碳源和能源的储藏物质. PHAs 分子量一般为几万~几百万, 不同的 PHA 单体具有不同的侧链基团. 自 1926 年在巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)中首次发现聚羟基丁酸酯(P3HB)以来, 已发现超过 150 种单体可用来聚合生成 PHAs<sup>[1]</sup>. 根据单体的不同, PHAs 具有从坚硬质脆的硬塑料到柔软的弹性体等一系列不同的材料学性能, 而且还具有石化基塑料所无法比拟的生物降解性、生物相容性、无毒等特性, 这些优良特性使得 PHAs 在医用生物材料、包装材料、农业和食品工业等领域具有广阔的应用前景, 成为了石化基塑料(如聚乙烯和聚丙烯)最有潜力的替代品.

3-羟基丙酸(3HP)是一种重要的平台化合物, 其聚合物聚 3-羟基丙酸(P3HP)是 PHAs 家族中的出现新成员, 具有较好的材料刚度和延展性能. 相对于其他两种研究最多的可生物降解塑料 P3HB 和聚乳酸(PLA), P3HP 综合了它们的优点, 它比 PLA 更稳定不会水解, 又由于碳链骨架中没有甲基而比 P3HB 更易被微生物降解<sup>[2]</sup>. 而且 3HP 作为单体之一与 3-羟基丁酸(3HB)形成共聚物时, 可以有效地降低聚合物的结晶度, 降低材料的熔点和玻璃转化温度, 提高材料的柔韧性和生物降解性, 极大地改善材料性能<sup>[3,4]</sup>.

已知的生物都不能天然合成 P3HP, 所以早期含 3HP 单体的共聚物都是由产 PHAs 的野生菌或工程菌在人工添加 3HP 结构相关前体的条件下合成的. 使用较多的前体包括 3HP, 丙烯酸、1,3-丙二醇(PDO)、1,5-戊二醇、1,7-庚二醇等. 这些前体都来源于石油化工产品, 价格昂贵, 而且具有细胞毒性, 会抑制细菌

**引用格式:** 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

Yang P, Wang Q, Xian M, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) and its copolymers (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 2137-2144, doi: 10.1360/N972014-00010

的生长, 所以通过基因工程手段构建利用廉价可再生碳源为原料合成 P3HP 的工程菌逐渐成为研究的重点. 目前主要合成路线包括丙二酸单酰辅酶 A 途径和甘油途径. 另外 P3HP 还可以通过化学方法合成. 2010 年 Andreessen 等人<sup>[5]</sup>对含 3HP 单体的聚合物合成进行了较详细的综述, 本文将对近几年来在该方向上的研究进展进行介绍.

## 1 结构相关前体的使用

利用结构相关前体合成 P3HP 的工作较少, 2011 年 Chen 课题组<sup>[6]</sup>报道了利用 PDO 合成 P3HP 的研究. 他们构建的大肠杆菌工程菌携带了来自于臭恶假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的 PDO 脱氢酶基因 *dhaT<sub>Pp</sub>*

和醛脱氢酶基因 *aldD<sub>Pp</sub>*、来自于真氧产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*)的 PHA 聚合酶基因 *phaC1<sub>Re</sub>* 和来自于橙色绿屈挠菌(*Chloroflexus aurantiacus*)的三功能酶丙酰辅酶 A 连接酶中的辅酶 A 连接酶结构域 *pcs'Ca* 4 个基因(图 1). 在该菌中, PDO 首先在 *DhaT<sub>Pp</sub>* 和 *AldD<sub>Pp</sub>* 的作用下被转化为 3HP, 然后在 *Pcs'Ca* 作用下与辅酶 A 连接形成 3-羟基丙酰辅酶 A(3HP-CoA), 最后通过 *PhaC1<sub>Re</sub>* 的催化聚合生成 P3HP. 在补料分批发酵条件下, P3HP 最高可达细胞干重的 92%.

以此为基础, Chen 课题组<sup>[7,8]</sup>还合成了 3HP 和 4-羟基丁酸(4HB)的共聚物. 在培养基中同时加入 PDO 和 1,4-丁二醇(BDO), 该工程菌可用于合成 3HP 和 4HB 的无规共聚物. 为调节共聚物中单体的比例,

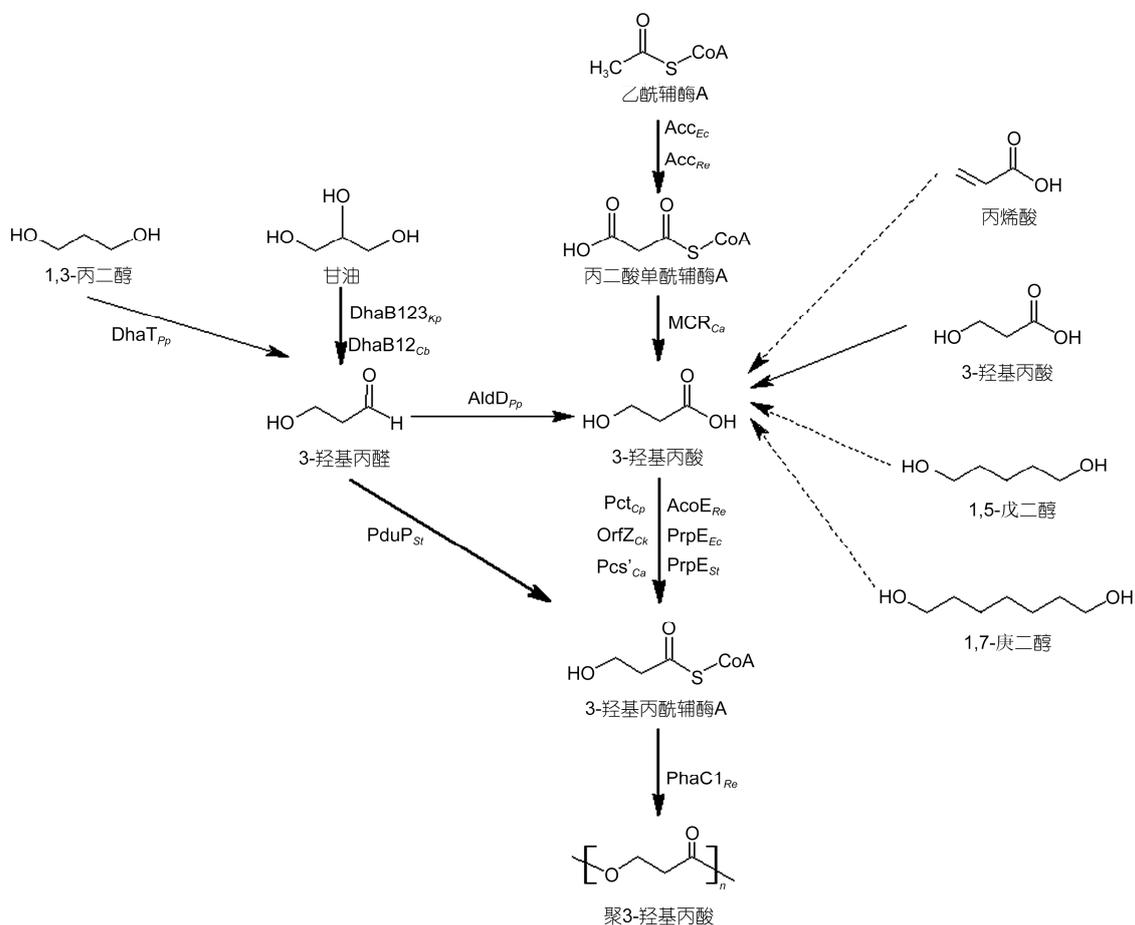


图 1 P3HP 的人工合成途径

加入其他羟基脂肪酸前体或其合成途径可合成含 3HP 单体的共聚物. *Acc<sub>Ec</sub>*, 乙酰辅酶 A 羧化酶(*E. coli*); *Acc<sub>Re</sub>*, 乙酰辅酶 A 羧化酶(*R. eutropha*); *AcoE<sub>Re</sub>*, 乙酰辅酶 A 合成酶(*R. eutropha*); *AldD<sub>Pp</sub>*, 醛脱氢酶(*P. putida*); *DhaB12<sub>Cb</sub>*, 甘油脱水酶(*C. butyricum*); *DhaB123<sub>Kp</sub>*, 甘油脱水酶(*K. pneumoniae*); *DhaT<sub>Pp</sub>*, PDO 脱氢酶(*P. putida*); *MCR<sub>Ca</sub>*, 丙二酸单酰辅酶 A 还原酶(*C. aurantiacus*); *OrfZ<sub>Ck</sub>*, 辅酶 A 转移酶(*C. kluuyveri*); *Pcs'Ca*, 辅酶 A 连接酶结构域(*C. aurantiacus*); *Pct<sub>Cp</sub>*, 丙酰辅酶 A 转移酶(*C. propionicum*); *PduP<sub>St</sub>*, 醛脱氢酶(*S. typhimurium*); *PhaC1<sub>Re</sub>*, PHA 聚合酶(*R. eutropha*); *PrpE<sub>Ec</sub>*, 丙酰辅酶 A 合成酶(*E. coli*); *PrpE<sub>St</sub>*, 丙酰辅酶 A 合成酶(*S. typhimurium*)

Meng 等人<sup>[7]</sup>测试了在培养基中添加不同比例 PDO 和 BDO 时的合成情况, 得到了 3HP 单体比例范围为 12 mol%~82mol%(mol%, 摩尔分数, 余同)的 P(4HB-co-3HP)共聚物. 通过调节 BDO 和 PDO 的添加顺序, Tripathi 等人<sup>[8]</sup>还利用该菌合成了两种 4HB 和 3HP 的嵌段共聚物 P4HB-b-71mol% P3HP 和 P4HB-b-63 mol% P3HP.

在含 3HP 单体的共聚物合成方面, 研究最多的是 3HP 和 3HB 的无规共聚物 P(3HB-co-3HP). P3HB 是最早发现的 PHA 种类, 可以由 *R. eutropha*, *B. megaterium*, 棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)等不同种类的细菌合成<sup>[9]</sup>. 在此基础上, 添加 3HP 或其结构类似前体可直接合成 P(3HB-co-3HP), 如 *R. eutropha* 在 3HP, 1,5-戊二醇或 1,7-庚二醇存在时可积累 3HP 单体比例为 1mol%~7mol%的无规共聚物<sup>[10]</sup>.

在其他 PHA 合成菌中, 生产 P(3HB-co-3HP)也有很多报道. Kang 等人<sup>[11]</sup>以甲醇和 3HP 为碳源培养甲基杆菌(*Methylobacterium* sp.)KCTC0048, 可生产占细胞干重 3.9%~11.8%(质量比)的 P(3HB-co-3HP), 其中 3HP 单体比例为 4.3mol%~10.5mol%. 而协腹产碱杆菌(*Alcaligenes latus*)在以蔗糖和 3HP 为碳源时可生产占细胞干重 11%~50%(质量比)的 P(3HB-co-3HP). 由于该菌不能以 3HP 为唯一碳源生长, 所以当培养基中 3HP 含量升高时细菌生长减弱, 细胞干重和聚酯含量都下降, 但聚酯中 3HP 单体的比例会升高到 29%<sup>[12,13]</sup>. 在培养基中同时加入 3HB 和 3HP 前体, 通过调节两种前体的加入比例可以使 *A. latus* 合成系列成分不同的 P(3HB-co-3HP)共聚物, 其中 3HP 单体的比例为 25mol%~76mol%<sup>[13]</sup>. Wang 等人<sup>[14]</sup>研究了 P(3HB-co-3HP)含量及成分与细菌培养基 pH 之间的关系, 发现培养基 pH 升高会导致共聚物中 3HP 单体比例的降低, 培养基 pH 从 6.0 升高到 8.0 时, P(3HB-co-3HP)共聚物中的 3HP 比例也随之从 33.4mol%下降到 13.2mol%. 而细胞中 P(3HB-co-3HP)共聚物含量在 pH 6.5 时达到最高, 占细胞干重的 45.2%.

Valentin 等人<sup>[15]</sup>首次报道了利用大肠杆菌工程菌合成 P(3HB-co-3HP). 该菌携带了来自于 *R. eutropha* 的 P3HB 合成基因簇 *phaCIAB1<sub>Re</sub>* 以及鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的丙酰辅酶 A 合成酶基因 *prpE<sub>St</sub>* 或克氏梭状芽孢杆菌(*Clostridium kluyveri*)的辅酶 A 转移酶基因 *orfZ<sub>Ck</sub>*(图 1). 在含有 1%(质量体积比)3HP 的 LB 培养基中, 该菌可生产约

占细胞干重 10%的 P(3HB-co-3HP), 其中 3HP 单体比例可高达约 90mol%. 但是用 *R. eutropha* 的乙酰辅酶 A 合成酶基因 *acoE<sub>Re</sub>* 代替 *prpE<sub>St</sub>* 或 *orfZ<sub>Ck</sub>* 时, 聚酯中的 3HP 单体比例会急剧下降, 说明在以 3HP 为底物时 *AcoE<sub>Re</sub>* 酶活性远低于 *PrpE<sub>St</sub>* 和 *OrfZ<sub>Ck</sub>*.

P(3HB-co-3HP)也可由酶催化的体外反应制备. Han 等人<sup>[16]</sup>构建了 PHA 聚合酶 *PhaC1<sub>Re</sub>* 和来自于丙酸梭菌(*Clostridium propionicum*)的丙酰辅酶 A 转移酶 *PctC<sub>p</sub>* 的融合蛋白, 并建立了两相反应体系. 有机相中的巯基乙酸乙酯的乙酰硫酯(AcETG)作为合成乙酰辅酶 A 的前体物, 通过在两相界面与水相中的辅酶 A 发生酯交换反应生成乙酰辅酶 A, 进而在 *PctC<sub>p</sub>* 的催化下与水相中的 3HB 和 3HP 反应生成 3HB-CoA 和 3HP-CoA, 最后由 *PhaC1<sub>Re</sub>* 催化聚合形成 P(3HB-co-3HP). 由于 *PctC<sub>p</sub>* 对 3HP 的亲合力要高于 3HB, 共聚物中 3HP 单体的比例要显著高于它在反应体系中的比例.

除 P(3HB-co-3HP)外, 研究者还合成了多种含其他单体的共聚物. 据 Green 等人<sup>[17]</sup>报道, 在以辛酸和丙烯酸为碳源时, *R. eutropha* 可合成含有 3HP, 3HB, 3-羟基己酸(3HH)、3-羟基辛酸(3HO)4 种单体的共聚物. 这是由于丙烯酸会抑制脂肪酸的 $\beta$ -氧化途径, 才导致中等碳链长度的羟基脂肪酸被掺入到 PHA 中. 由于丙烯酸具有细胞毒性, 在基础培养基中超过 5 mmol/L 就会完全抑制细菌的生长. 为进一步测试高浓度丙烯酸的效果, Green 等人<sup>[17]</sup>发展了两段式培养方法, 首先在 LB 培养基中得到高浓度的细胞, 再转入含有不同丙烯酸浓度的基础培养基中. 结果显示, 随着培养基中丙烯酸浓度的升高, 共聚物中 3HP, 3HH 和 3HO 的比例上升, 而 3HB 的比例下降. 如丙烯酸浓度为 10.6 mmol/L 时, 共聚物中含有 1.4mol% 3HP, 95.9mol% 3HB, 2.1mol% 3HH 和 0.6mol% 3HO; 而当丙烯酸浓度升高为 29.3 mmol/L 时, 3HB 比例下降为 81.7mol%, 而 3HP, 3HH 和 3HO 的比例分别上升为 6.5mol%, 10.2mol%和 1.6mol%.

尽管在利用结构相关前体合成 P3HP 及其共聚物方面已取得了较大的成果, 但仍存在以下几个问题. 首先, 这些结构相关前体价格昂贵, 增加了 P3HP 及其共聚物的生产成本, 不利于进行大规模工业化生产; 其次, 这些前体都来源于石油化工产业, 消耗了不可再生的化石资源, 不符合发展循环经济, 实现可持续发展的科学理念; 最后, 这些前体都为醇类和有机

机酸类,在发酵液中浓度过高会抑制细菌生长,影响发酵过程.所以利用廉价可再生碳源合成 P3HP 及其聚合物才是未来发展的方向.

## 2 廉价碳源的利用

利用廉价碳源合成 P3HP 目前主要有丙二酸单酰辅酶 A 途径和甘油途径两条路线.近年来,中国科学院青岛生物能源与过程研究所生物基化学品团队在这方面开展了较多工作.

### 2.1 丙二酸单酰辅酶 A 途径

*C. aurantiacus* 中丙二酸单酰辅酶 A 还原酶 (malonyl-CoA reductase, MCR)能够催化细胞中的代谢中间产物丙二酸单酰辅酶 A,经过两步还原反应直接生成 3HP<sup>[18]</sup>,它的发现开辟了一条以非结构相关碳源合成 P3HP 的新道路. Fukui 等人<sup>[19]</sup>将来自于 *C. aurantiacus* 的 *mcr<sub>Ca</sub>* 基因和 *pcs'ca* 基因克隆到质粒载体 pBBad 的 P<sub>BAD</sub> 启动子下,转入到 *R. eutropha* 中,构建了一条新的人工合成途径(图 1).以果糖为唯一碳源,该工程菌在 L-阿拉伯糖诱导下可合成 P(3HB-co-3HP),共聚物质量约为细胞干重的 60%,其中 3HP 单体仅占 0.2mol%~1mol%.当以辛酸为唯一碳源时,共聚物含量上升为细胞干重的 76%,其中 3HP 单体比例为 0.6mol%.通过对 MCR<sub>Ca</sub> 和 Pcs'ca 的酶活分析, Fukui 等人<sup>[19]</sup>认为 Pcs'ca 的酶活性远低于 MCR<sub>Ca</sub>,无法将 3HP 完全转化为 3HP-CoA,从而造成共聚物中的 3HP 含量过低.

为提高丙二酸单酰辅酶 A 途径的合成效率, Wang 等人<sup>[20]</sup>在 *E. coli* 中重新构建了该途径,用来自于 *E. coli* 的丙酰辅酶 A 合成酶基因 *prpE<sub>Ec</sub>* 替换了 *pcs'ca* 基因,同时过表达乙酰辅酶 A 羧化酶基因 *accE<sub>Ec</sub>* 用以提高细胞内丙二酸单酰辅酶 A 的浓度(图 1),最终重组菌以葡萄糖为唯一碳源合成 P3HP,产量为 13 mg/L,占细胞干重的 0.98%.进一步分析发现细胞裂解液中 PrpE<sub>Ec</sub> 的酶活是 MCR<sub>Ca</sub> 的 5 倍,因此推测 MCR<sub>Ca</sub> 才是该途径的真正限速酶. MCR<sub>Ca</sub> 来自于嗜热光合细菌,其最适反应温度为 57℃,而且活性受到菌体生长状态的调节,只有在光合自养生长状态下才能发挥最大活性<sup>[18]</sup>.在大肠杆菌中, MCR 所需的高温 and 自养环境无法实现,催化活性受到较大影响.

丙二酸单酰辅酶 A 途径以细菌中最普遍的代谢中间体乙酰辅酶 A 为起始化合物,对碳源没有任何

要求,可以广泛利用各种廉价碳源合成 P3HP.但由于 MCR<sub>Ca</sub> 催化活性的限制,该途径的 P3HP 产量过低,无法实现大规模的 P3HP 发酵生产.针对这个问题,目前正在尝试通过 MCR 的定向进化提高酶活,最终提高该途径 P3HP 的产量.

### 2.2 甘油途径

甘油是生物柴油产业的副产物,利用天然油脂经过转酯化反应制备 10 t 生物柴油就会产生 1 t 甘油.随着生物柴油产业的发展,甘油的价格也迅速下降<sup>[21]</sup>.为构建利用甘油合成 P3HP 的工程菌株, Andreessen 等人<sup>[22]</sup>在 *E. coli* 中过表达了 *phaC1<sub>Re</sub>* 基因、来自于丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 的甘油脱水酶基因 *dhaB12<sub>Cb</sub>* 和来自于 *S. typhimurium* 的醛脱氢酶基因 *pduP<sub>Sr</sub>*(图 1).由于甘油脱水酶 DhaB12 对氧极为敏感,必须处于严格厌氧条件下才有活性<sup>[23]</sup>,所以发酵过程分为两个阶段进行,即好氧生长菌体阶段和厌氧积累产物阶段,同时需要添加价格昂贵的还原剂延胡索酸二钠和酒石酸钾钠,以维持严格的厌氧环境.最终在两段式补料分批发酵条件下,重组菌能够以甘油为唯一碳源生产 1.4 g/L 的 P3HP,占细胞干重的 12%<sup>[22]</sup>.

为增加 P3HP 产量简化发酵工艺, Wang 等人<sup>[24]</sup>引入肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的甘油脱水酶基因 *dhaB123<sub>Kp</sub>* 及其辅助因子基因 *gdrAB<sub>Kp</sub>* 代替 *dhaB12<sub>Cb</sub>*.在有氧条件下,甘油脱水酶 DhaB123<sub>Kp</sub> 在其辅助因子 GdrAB<sub>Kp</sub> 的激活作用下仍具有较高的活性,因此整个发酵过程可以在有氧条件下进行,简化了发酵工艺,有利于重组菌的快速生长及产物的积累,解决了发酵过程中需要加入延胡索酸二钠等物质而带来的成本问题.在对发酵工艺进行优化时,发现甘油与少量葡萄糖共同作为碳源可显著提高重组菌的生长速度和 P3HP 产量,推测是由于在培养初期葡萄糖为细菌生长提供了最易于利用的碳源,而甘油只是作为合成 P3HP 的底物.最终在补料分批发酵条件下 P3HP 产量达到 10.1 g/L,占细胞干重的 46.4%,这也是目前报道的利用廉价碳源合成 P3HP 的最高产量<sup>[24]</sup>.

在甘油途径工程菌的基础上, Wang 等人<sup>[25,26]</sup>构建了能够生产结构和单体比例可控的 3HB 和 3HP 共聚物的生物合成系统.该系统包括两条并列的合成途径:一条用于合成 3HP-CoA,其表达受到 IPTG 的诱导;另一条为 P<sub>BAD</sub>-AraC 调节系统控制下的 *R.*

*eutropha* P3HB 合成基因簇 *phaCIAB1<sub>Re</sub>*, 用于合成 3HB-CoA, 可以利用 L-阿拉伯糖来调节基因的表达强度(图 2). 通过对两条途径诱导顺序和诱导强度的调节, 该系统可合成单体比例可控的无规共聚物 P(3HB-co-3HP)和嵌段共聚物 P3HB-*b*-P3HP. 无规共聚物系列产品中含有 11.5mol%~94.6mol%的 3HP 单体, 而在嵌段共聚物中 3HP 单体的比例范围为 7.5 mol%~74mol%. 这是利用廉价碳源生产结构和单体比例可控的 3HB 和 3HP 共聚物的首次报道.

目前甘油途径虽得到较高的 P3HP 产量, 但仍存在一些问题亟待解决. 首先甘油脱水酶 DhaB123<sub>Kp</sub> 的活性依赖于辅酶 B12, 需要在培养基中添加维生素 B12, 增加了 P3HP 的生产成本; 其次甘油到 3HP 的转化过程中产生大量还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH), 无法进行充分利用. 为解决这个问题, 可在工程菌中引入来自于 *K. pneumoniae* 的 PDO 脱氢酶 DhaT<sub>Kp</sub>, 消耗掉过量 NADH 的同时可产生另外一种重要的平台化合物 PDO.

### 3 P3HP 的化学合成

除生物合成外, P3HP 还可以通过化学方法合成, 其中以β-丙内酯聚合方法最为成熟. Gresham 等人<sup>[27]</sup>

研究了在高温(150℃)、不同酸、碱和盐存在时β-丙内酯的聚合情况, 发现最为有效的催化剂为氯化铁、氯化锡、硫酸和氢氧化钠. 以镧系元素的醇盐作为催化剂, 可在 0℃时通过开环聚合反应高效合成高分子量的聚 3-羟基丙酸. 聚合生成的 P3HP 的分子量可达到  $4.5 \times 10^6$  Da, 反应转化率达到 86%~91%<sup>[28]</sup>.

由于β-丙内酯具有强致癌作用, 不能达到绿色环保的要求, 研究人员也开发了一些其他的 P3HP 化学合成方法. Nanba 等人<sup>[29]</sup>在 70℃酯交换催化剂存在的条件下, 利用无毒的 3HP 直接缩合生成了聚 3-羟基丙酸. 与开环聚合反应相比, 缩合反应对聚合物分子量的控制较差. 为综合缩合反应和开环聚合反应两者的优势, 人们还发展了两步法合成 P3HP 的技术: 首先在酸催化下 3HP 脱水缩合形成寡聚环内酯, 然后寡聚 3HP 内酯再开环聚合生成 P3HP<sup>[30]</sup>.

目前还没有利用化学方法合成含 3HP 单体 PHA 共聚物的报道.

### 4 P3HP 及其共聚物的性能

作为可生物降解塑料, P3HP 具有很好的硬度、延展性和优异的拉伸强度, 其屈服强度和最大拉伸强度分别为 33.8 和 21.5 MPa, 基本与 P3HB 相似, 而杨

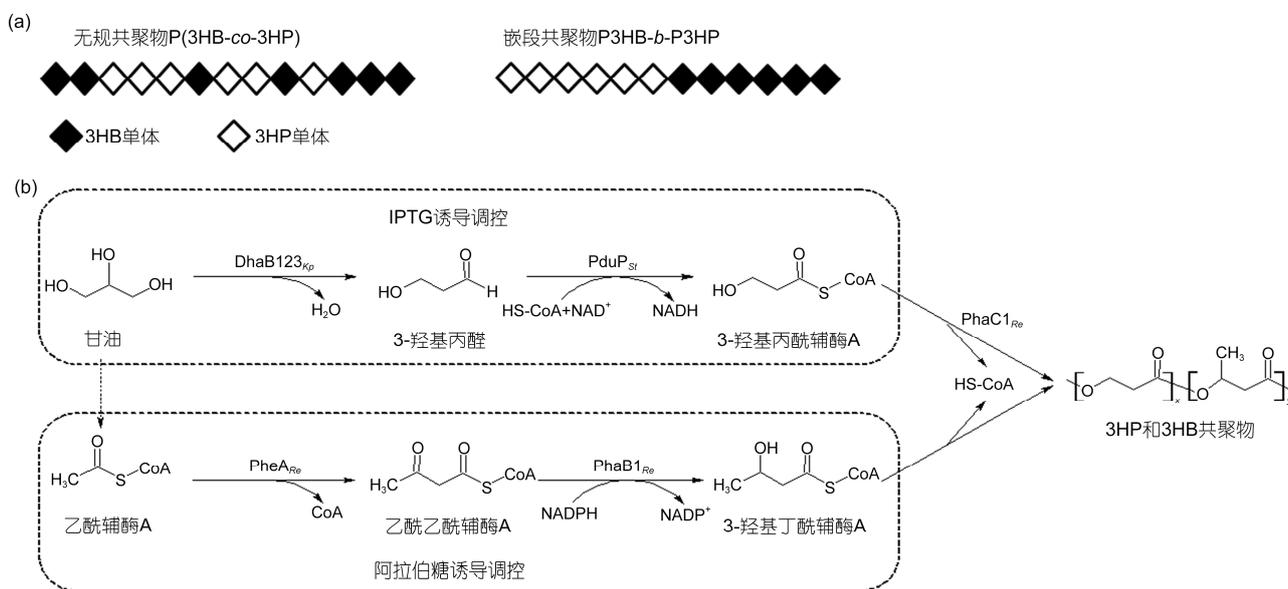


图 2 工程大肠杆菌合成 3HP 和 3HB 共聚物的代谢途径

(a) 无规共聚物和嵌段共聚物的化学结构示意图; (b) 工程大肠杆菌利用甘油合成 P(3HP-co-3HB)和 P3HB-*b*-P3HP 的代谢途径. DhaB123<sub>Kp</sub>, 甘油脱水酶(*K. pneumoniae*); PduP<sub>Sr</sub>, 醛脱氢酶(*S. typhimurium*); PhaA<sub>Re</sub>, β-酮硫解酶(*R. eutropha*); PhaB1<sub>Re</sub>, 乙酰乙酰辅酶 A 还原酶(*R. eutropha*); PhaC1<sub>Re</sub>, PHA 聚合酶(*R. eutropha*)

氏模量和断裂伸长率可分别达到 2.89 GPa 和 497.6%，远高于 P3HB(1.47 GPa 和 3%)<sup>[7]</sup>。P3HP 的熔融温度和玻璃化温度分别是 77°C 和 -19°C，表观熔融焓为 74 J/g<sup>[3]</sup>。

在共聚物中，材料的热力学和机械性能会随着单体种类和含量的变化而变化。P(3HB-co-3HP) 无规共聚物中，随着 3HP 单体含量从 0 升高到 100 mol%，材料的玻璃化温度由 4°C 逐渐降低到 -19°C。而它们的熔融温度变化趋势却有所不同，P3HB 的熔融温度为 177°C，掺入 3HP 单体后熔融温度会逐渐降低，在 3HP 单体比例为 67 mol% 时达到最低点 44°C，再随着 3HP 单体的继续增加而升高到 77°C (100 mol% 3HP)。表观熔融焓的变化和熔融温度类似，先从 97 J/g (0 mol% 3HP) 下降到 2 J/g (43 mol% 3HP)，再逐渐升高到 74 J/g (100 mol% 3HP)<sup>[3]</sup>。

在无规共聚物 P(3HP-co-4HB) 中，随着 4HB 单体含量的变化，材料的热力学性能也显示出了类似的变化趋势。随着 4HB 单体含量从 0 升高 100 mol%，玻璃化温度由 -19°C 逐渐降低到 -47°C，而熔融温度在 4HB 单体含量为 82 mol% 时到达最低点 36°C。在机械性能方面，无规共聚物的延展性得到进一步提升，在 4HB 单体占 38 mol% 时断裂伸长率达到 1611%，而杨氏模量、屈服强度和最大拉伸强度都有不同程度的下降<sup>[7]</sup>。

与 P3HP 相比，无规共聚物虽然在理化性质上有了一定的提高，但仍然存在易老化等问题<sup>[31]</sup>。嵌段共聚物不仅提高了聚合物的抗老化特性，还能够获得不同于同聚物及无规共聚物的新性质。由于是两个不同的聚合物共价连接在一起，嵌段共聚物都保留了两个片段各自的熔融温度和玻璃化温度<sup>[8,26]</sup>，因

而嵌段共聚物处于高弹态的温度范围较宽，在延展性提高的同时，硬度也得到相应的提升。例如嵌段共聚物 P3HP-*b*-29 mol% P4HB 的断裂伸长率为 877%，高于 P3HP 和 P4HB 同聚物，屈服强度和最大拉伸强度分别为 20 和 45 MPa，远高于单体比例相似的 P(3HP-co-4HB) 无规共聚物 (1.7 和 6.4 MPa)。

## 5 结论和展望

本文主要综述了近年来在 P3HP 和含 3HP 单体的共聚物合成方面的研究进展。作为一种新型的可生物降解塑料，P3HP 具有较高的硬度和延展性，制备成膜后也具有非常优异的拉伸性能。3HP 与其他单体形成共聚物后，由于碳链骨架中没有支链，可以降低共聚物的玻璃化温度和结晶度，提高共聚物的降解效率。早期研究中，P3HP 及含 3HP 单体的共聚物合成都是依靠 3HP 及其结构相关前体。近几年，利用基因工程技术，研究者已成功构建了两条利用廉价碳源合成 P3HP 的代谢途径，并成功合成了含 3HP 单体的多种共聚物。与使用结构相关前体相比，P3HP 及其共聚物的生产成本已大大降低，但仍然无法与石化基塑料竞争。目前，关于 P3HP 的研究应主要集中在以下几个方面：改造已有的丙二酸单酰辅酶 A 途径和甘油途径，提高合成效率和 P3HP 产量；通过代谢工程手段建立其他可以利用廉价碳源高效合成 P3HP 及其共聚物的新途径；进一步拓宽原料范围，力争建立直接以纤维素降解液等为原料的发酵路线和工艺。这些研究工作可进一步降低 P3HP 及其共聚物的生产成本，有助于早日实现 P3HP 及其共聚物的大规模发酵生产和应用。

## 参考文献

- 1 Chen G Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 2434–2446
- 2 Kasuya K, Ohura T, Masuda K, et al. Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases. *Int J Biol Macromol*, 1999, 24: 329–336
- 3 Shimamura E, Scandola M, Doi Y. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). *Macromolecules*, 1994, 27: 4429–4435
- 4 Cao A, Arai Y, Yoshie N, et al. Solid structure and biodegradation of the compositionally fractionated poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s. *Polymer*, 1999, 40: 6821–6830
- 5 Andreessen B, Steinbuechel A. Biosynthesis and biodegradation of 3-hydroxypropionate-containing polyesters. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 4919–4925
- 6 Zhou Q, Shi Z Y, Meng D C, et al. Production of 3-hydroxypropionate homopolymer and poly(3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by recombinant *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2011, 13: 777–785

- 7 Meng D C, Shi Z Y, Wu L P, et al. Production and characterization of poly(3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway. *Metab Eng*, 2012, 14: 317–324
- 8 Tripathi L, Wu L P, Meng D C, et al. Biosynthesis and characterization of diblock copolymer of P(3-hydroxypropionate)-block-P(4-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli*. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 862–870
- 9 Lundgren D G, Alper R, Schnaitm C, et al. Characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate extracted from different bacteria. *J Bacteriol*, 1965, 89: 245–251
- 10 Nakamura S, Kunioka M, Doi Y. Biosynthesis and characterization of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). *J Macromol Sci Chem*, 1991, 28: 15–24
- 11 Kang C K, Lee H S, Kim J H. Accumulation of PHA and its copolyesters by *Methylobacterium* sp. KCTC 0048. *Biotechnol Lett*, 1993, 15: 1017–1020
- 12 Ichikawa M, Nakamura K, Yoshie N, et al. Morphological study of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). *Macromol Chem Phys*, 1996, 197: 2467–2480
- 13 Shimamura E, Kasuya K, Kobayashi G, et al. Physical-properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, 1994, 27: 878–880
- 14 Wang Y, Ichikawa M, Cao A, et al. Comonomer composition distribution of P(3HB-co-3HP)s produced by *Alcaligenes latus* at several pH conditions. *Macromol Chem Phys*, 1999, 200: 1047–1053
- 15 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*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 5253–5258
- 16 Han X R, Satoh Y, Tajima K, et al. Chemo-enzymatic synthesis of polyhydroxyalkanoate by an improved two-phase reaction system (TPRS). *J Biosci Bioeng*, 2009, 108: 517–523
- 17 Green P R, Kemper J, Schechtman L, et al. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid  $\beta$ -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, 2002, 3: 208–213
- 18 Hugler M, Menendez C, Schagger 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: 2404–2410
- 19 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: 700–706
- 20 Wang Q, Liu C, Xian M, et al. Biosynthetic pathway for poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol*, 2012, 50: 693–697
- 21 Yazdani S S, Gonzalez R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metab Eng*, 2008, 10: 340–351
- 22 Andreesen B, Lange A B, Robenek H, et al. Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 622–626
- 23 Raynaud C, Sarcabal P, Meynial-Salles I, et al. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 5010–5015
- 24 Wang Q, Yang P, Liu C, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol by recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2013, 131: 548–551
- 25 Wang Q, Yang P, Xian M, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) with fully controllable structures from glycerol. *Bioresour Technol*, 2013, 142: 741–744
- 26 Wang Q, Yang P, Xian M, et al. Production of block copolymer poly(3-hydroxybutyrate)-block-poly(3-hydroxypropionate) with adjustable structure from an inexpensive carbon source. *ACS Macro Lett*, 2013, 2: 996–1000
- 27 Gresham T L, Jansen J E, Shaver F W.  $\beta$ -proponlactone. I. Polymerization reactions. *J Am Chem Soc*, 1948, 70: 998–999
- 28 Yamashita M, Takemoto Y, Ihara E, et al. Organolanthanide-initiated living polymerizations of  $\epsilon$ -caprolactone,  $\delta$ -valerolactone, and  $\beta$ -propiolactone. *Macromolecules*, 1996, 29: 1798–1806
- 29 Nanba T, Ito H, Kobayashi H, et al. Production process of poly(hydroxyalkanoate). *JP Patent*, 6359774, 1994
- 30 Zhang D H, Hillmyer M A, Tolman W B. A new synthetic route to poly[3-hydroxypropionic acid] (P[3-HP]): Ring-opening polymerization of 3-HP macrocyclic esters. *Macromolecules*, 2004, 37: 8198–8200
- 31 Shen F, Zhang E L, Wei Z J. Surface bio-modification of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) and its aging effect. *Colloid Surface B*, 2009, 73: 302–307

## Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) and its copolymers

YANG Peng<sup>1,2</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>, XIAN Mo<sup>1</sup>, XUE YongChang<sup>2</sup> & ZHAO Guang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CAS Key Laboratory of Bio-based Materials, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China;

<sup>2</sup>School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China

3-Hydroxypropionate is an important platform chemical, and its polymer is a biodegradable plastic with high rigidity and ductility, and exceptional tensile strength. The incorporation of 3-hydroxypropionate in copolyesters can increase in the ductility and biodegradability of the resulting polymers. The biosynthesis of polyesters containing 3-hydroxypropionate requires the addition of precursor molecules that are structurally related to 3-hydroxypropionate, such as acrylate and 1,3-propanediol, because most organisms do not contain this material. The addition of expensive precursors, however, can increase production costs. Two artificial synthetic pathways, including the malonyl-coenzyme A and glycerol pathways, were recently constructed to produce poly(3-hydroxypropionate) from inexpensive carbon sources such as glucose and glycerol. Furthermore, a series of 3-hydroxypropionate-containing copolymers with controllable structures and monomer compositions were recently biosynthesized. Compared with using structurally related precursors, the costs associated with the production of 3-hydroxypropionate-containing polymers have decreased significantly, although these costs are still much higher than those associated with the petrochemical synthesis of plastics. Further research in this area should therefore focus on enhancing the synthetic efficiency of poly(3-hydroxypropionate) and its copolymers, while simultaneously reducing production costs.

**polyhydroxyalkanoate, poly(3-hydroxypropionate), biosynthesis, structural related carbon source, inexpensive carbon source**

doi: 10.1360/N972014-00010