

姚建, 苟敏, 汤岳琴. “绿色塑料”聚羟基脂肪酸酯生物合成研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27 (6): 1662-1671

Yao J, Gou M, Tang YQ. Research progress on biosynthesis of “green plastics”: polyhydroxyalkanoates [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2021, 27 (6): 1662-1671

“绿色塑料”聚羟基脂肪酸酯生物合成研究进展

姚建^{1,2} 苟敏^{1,2} 汤岳琴^{1,2}✉

¹四川大学建筑与环境学院 成都 610065

²四川省环境保护有机废弃物资源化利用重点实验室 成都 610065

摘要 由于化石资源日益枯竭和塑料污染加剧,迫切需求环境友好可降解的“绿色塑料”。由细菌合成的具有良好生物降解性和生物相容性的聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) 被认为是最有前景的“绿色塑料”之一。概述 PHAs 的结构、材料特性和应用、生物合成代谢途径以及发酵方式,指出高昂的生产成本是限制 PHAs 大规模生产和应用的关键问题;总结以降低 PHAs 生产成本为目标的 PHAs 生物合成研究进展,包括 PHAs 合成菌株的基因工程和代谢工程优化、在开放条件下使用富集菌群发酵以及采用极端微生物合成特定 PHAs。以低品质废弃生物质为原料,在开放条件下利用富集菌群合成 PHAs 的研究尤其受到关注,是废弃生物质高值资源化利用的一条重要途径。未来的研究中需进一步提升 PHAs 生产菌株的合成能力以及生产工艺的效率;有关基于富集菌群的 PHAs 生产,需对菌群结构和功能调控进行深入研究,构建稳定高效的 PHAs 合成菌群和工艺流程,以实现 PHAs 的低成本合成和广泛应用。(图3 表2 参71)

关键词 聚羟基脂肪酸酯; PHA 合成; 基因工程; 代谢工程; 混合菌发酵

Research progress on biosynthesis of “green plastics”: polyhydroxyalkanoates

YAO Jian^{1,2}, GOU Min^{1,2} & TANG Yueqin^{1,2}✉

¹ College of Architecture and Environment, Sichuan University, Chengdu 610065, China

² Sichuan Environmental Protection Key Laboratory of Resource Utilization of Organic Wastes, Chengdu 610065, China

Abstract Due to the depletion of fossil fuel resources and serious plastic pollution, there is an urgent need for environmentally friendly “green plastics”. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesized by bacteria are biodegradable, biocompatible, and are one of the most promising “green plastics”. This review summarizes the structure, material properties, and applications of PHAs, their biosynthetic metabolic pathways, and fermentation modes, and points out that high production cost is the key problem limiting large-scale PHA production and application. It summarizes the research progress of PHA biosynthesis aimed at reducing the production cost of PHAs, including genetic engineering and metabolic engineering optimization of PHA-synthesizing strains, fermentation with enriched flora under open conditions, and synthesis of specific PHAs by extreme microorganisms. In particular, the study of PHA synthesis with enriched floras under open conditions using low-quality waste biomass as a raw material has attracted more attention. PHA production is an important method for the high-value resource utilization of waste biomass. In future, to achieve low-cost synthesis and the wide application of PHAs, it is necessary to further improve the PHA synthesis ability of the production strains, as well as the efficiency of the production process. For enriched flora-based PHA production, a thorough study of the structure and function of microbial flora is crucial for constructing stable and efficient PHA-synthesizing flora and efficient processes.

Keywords polyhydroxyalkanoate; PHA synthesis; genetic engineering; metabolic engineering; mixed microbial culture

随着社会发展和生活水平提高,由化石资源生产的聚乙烯 (PE) 等传统塑料已广泛应用于国民生产生活的各个方面,但塑料的大量使用导致了严重的塑料污染问题(“白色污染”和“微塑料”污染)。为解决塑料污染问题,聚乳酸 (PLA)、

聚丁二酸丁二醇酯 (PBS)、聚(丁二酸-co-己二酸丁二醇酯) (PBSA) 和聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 等生物可降解塑料受到广泛关注和研究。在化石资源日益枯竭以及环境污染的双重压力下,基于生物质原料通过微生物合成的 PHAs,由于其结

收稿日期 Received: 2020-08-04 接受日期 Accepted: 2020-09-30

国家自然科学基金科学基金项目 (51678378) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (51678378)

✉ 通讯作者 Corresponding author (E-mail: tangyq@scu.edu.cn)

构多样性和良好的生物降解和相容性而被认为是最具发展潜力的“绿色塑料”。

许多微生物被证实可在碳源过剩但其他生长因素受限（缺氮、磷、低氧、紫外辐射等）时可合成聚羟基脂肪酸酯（polyhydroxyalkanoates, PHAs）并储存在体内。1925年，法国科学家Lemoigne在巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）中发现了可溶于氯仿的类脂肪包涵体，后证实为聚3-羟基丁酸（poly- β -hydroxybutyric acid, PHB），随后不同的PHAs进入人们的视野。从被发现到现在，人们对PHAs的结构、物理特性、生物合成途径等进行了广泛的研究。虽然PHAs在生物降解和生物相容性上要比传统塑料具有优势，但是PHAs的生产成本高于传统塑料，限制了PHAs的工业化生产和应用。为了降低PHAs生产成本，研究人员试图探索新的发酵模式（混合菌发酵、极端微生物发酵）以降低发酵原料和发酵过程的成本。同时，基因工程和代谢工程技术也用于提高细菌的PHAs合成能力和积累效率以降低生产成本。本文系统总结了PHAs的结构、物理特性和生物合成途径，对PHAs新发酵模式、PHAs基因工程和代谢工程等的最新研究进展进行了系统阐述，可为PHAs生物合成的相关研究提供指导。

1 PHAs的结构、材料特性和应用

PHAs在微生物细胞中以球状颗粒存在，颗粒内部是由PHAs分子链构成的疏水内核，外部覆盖有亲水性酶和蛋白。许多细菌，如*Cupriavidus*、*Pseudomonas*、*Alcaligenes*、*Bacillus*、*Aeromonas*等^[1]，能在碳源充足但生长受限（缺少氮或磷等生长必需元素）条件下合成PHAs。

1.1 PHAs的结构和分类

1926年，PHB在*Bacillus megaterium*中被发现，这是第一个被确认的PHAs。50年后，相继发现其他的PHAs成员，如聚3-羟基戊酸（poly-3-hydroxyvalerate / P(3HV)）、聚3-羟基己酸（poly-3-hydroxyhexanoate / P(3HHx)）、聚3-羟基癸酸（poly-3-hydroxydecanoate / P(3HD)）等^[2]。PHAs具有相同的结构通式（图1），分子量在几万到几百万^[3]。不同的PHAs单体如3-羟基脂肪酸、4-羟基脂肪酸、5-羟基脂肪酸以及芳香族脂肪酸等单体的出现，以及各种单体组成的共聚PHAs（无规共聚PHAs、嵌段共聚PHAs和接枝共聚PHAs）的出现，极大地丰富了PHAs成员。迄今为止，已有150多种PHAs单体被确认^[4]。

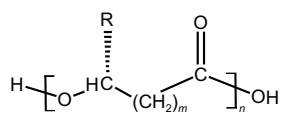


图1 PHAs结构通式。其中 $m = 1, 2, 3, 4$ 或 5 ; n 为聚合度。R 为可变基团，可为饱和或不饱和，直链或含侧链及取代基的脂肪族或芳香族基团。

Fig. 1 General structural formula of PHAs. $m = 1, 2, 3, 4$ or 5 ; n : The degree of polymerization; R: Variable group, which is saturated or unsaturated aliphatic group with straight chain or side chain and substituent, or aromatic group.

虽然PHAs结构多样，但PHAs可以按单体碳链的长度分为两大类。PHB等短链PHAs（short-chain-length, sclPHA）的单体由3-5个碳原子组成，PHO（poly-hydroxyoctanoate）等中链PHAs（medium-chain-length, mclPHA）的单体由6-14个碳原子组成^[5]。通常一种微生物只合成上述一种类型的PHAs，因为PHAs聚合酶只偏好scl-羟酰基辅酶A和mcl-羟酰基辅酶A中的一种作为底物。但也有研究发现一些PHAs聚合酶可以同

时接受两种羟酰基辅酶A作为底物合成scl-mcl PHA^[6]。

1.2 PHAs的材料特性和应用

PHAs的结构多样性导致了其材料特性的多样性，因此可根据应用目的选择合成特定结构的PHAs。Scl-PHAs通常是具有高结晶度和硬质热塑性的材料，而mcl-PHA是更加具有柔韧性的类似橡胶的聚合物^[7]。同时具有短链和长链单体的共聚PHAs会拥有更加“折中”的材料特性。

PHAs具有可生物降解性和生物相容性，可被自然环境中的许多微生物降解为 H_2O 和 CO_2 ^[8]。一些微生物能分泌胞外PHAs解聚酶降解PHAs，天然积累PHAs的微生物也能合成PHAs解聚酶，在碳源匮乏时将PHAs降解为低聚物和单体用作碳源和能源。目前已报道的PHAs解聚酶总共大约有600种^[9]。PHAs的降解速率取决于解聚酶和PHAs聚合物中酯键间的可及性，降解速率会随PHAs的理化性质如结晶度、分子量、物理形态、表面积、单体类型等以及环境条件而不同。不同微生物的PHAs解聚酶也会表现出不同的活性和底物特异性。

热学性质是影响聚合物应用的一个至关重要的因素。单体结构不同的PHAs有完全不同的热学性质。例如，PHB的熔化温度（ T_m : 178 °C）和分解温度（ T_d : 200 °C）^[9]十分相近，导致后续加工过程的难度上升。P(3HP)的玻璃转化温度（ T_g : -20 °C）和熔化温度（ T_m : 80 °C）差异较大，其在加工过程中能保持稳定^[11]。几种由短链PHAs单体构成的共聚PHAs也表现出不同的热学性质，例如P(3HB-20%3HV)、P(3HB-75%4HB)和P(3HP-67%4HB)的 T_m 分别为145 °C、51 °C和64.8 °C。共聚物的热学性质优于短链均聚PHAs，因此可向PHB聚合物中添加共聚单体（如3HV或3HP）来改进PHB的热学特性。随着P(3HB-3HP)中3HP的比例（物质的量比）从0增加到67%，共聚物的 T_m 从175 °C逐渐降低到50 °C。中长链PHAs的结晶度通常低于40%，玻璃转化温度（ T_g ）在-50 °C到-25 °C间，熔点温度（ T_m ）在38 °C到80 °C^[12]。由于中长链PHAs的玻璃转化温度（ T_g ）低于室温，其在一定的温度下表现出类似于天然橡胶的弹性体性能。在温度接近或高于熔化温度（ T_m ）时，中长链PHAs会表现出无定形和黏性。低熔点温度和低结晶速度对聚合物加工和利用会造成一定的限制，可通过将中长链PHAs和其他聚合物交联、共混或接枝以改进其热学特性。

PHAs的机械特性也具有多样性。PHB具有60%-80%的结晶度、43 MPa的高抗拉强度和3.5 GPa的杨氏模量，与常见的聚丙烯和聚乙烯相似^[13]。PHB老化后会变得脆、硬，为了增加PHB的弹性和韧性，许多不同的单体被引入PHB中形成共聚物，例如P(3HB-3HV)、P(3HB-4HB)、P(3HB-3HP)和P(3HB-3HHx)，成功地改善了聚合物的结晶度、刚度和老化问题。P(3HP)具有0.3 GPa的杨氏模量、27 MPa的拉伸强度和600%的断裂伸长率。P(4HB)是具有强弹性的热塑性材料，杨氏模量为180 MPa，断裂伸长率为1000%。具有4HB单体的共聚PHAs的韧性会得到提高，随着4HB的比例的提高，P(3HB-4HB)共聚物会从刚性材料转变为具有高韧性的弹性材料。中长链PHAs是弹性体，具有低的结晶度（< 40%）、低的拉伸强度和高的断裂伸长率。根据单体结构和组成的不同，中长链PHAs会呈现出柔软有弹性甚至黏性。少量的中长链PHAs单体（< 5mol%）加入P(3HB)等短链PHAs中形成的共聚物，在常规的热塑加工过程中表现出更好的柔韧性和热稳定性。

传统塑料早已是生产生活的必需品，在不同的产业（农业、食品包装和医疗等）中已有广泛应用。PHAs在热学性质和

机械特性上和传统塑料十分接近甚至完全相同。因此, PHAs可替代传统塑料在一般生产生活中的应用(食品包装和日化用品添加成分)。由于PHAs具有生物相容性(生物体低排斥), 在医疗领域将具有非常广泛的应用。PHAs的生物可降解性使其在自然环境中能被快速分解, 不会造成环境问题。所以, PHAs具有比传统塑料更加广泛的应用前景。

2 PHAs代谢

2.1 PHAs相关的酶

目前发现的PHAs代谢过程相关的酶主要包括催化羟酰基辅酶A转化为PHAs的PHAs聚合酶(PhaC), PHAs解聚酶(PhaZ)和低聚PHAs水解酶(PhaY), Phasins蛋白(PhaP, PhaI, PhaF, PhaD, GA14, Mms16)^[14], 调控蛋白(PhaR, PhaQ)^[15-16], PHAs聚合酶活化蛋白(PhaM)^[17]等。在这些酶中, PHAs聚合酶是PHAs合成过程的关键酶, 影响着单体组成、分子量和PHAs的合成效率。PHAs聚合酶能接受广泛的底物以合成多种结构的PHAs, 但具有立体特异性, 仅接受R构型的单体^[18]。根据酶亚基构型和偏好的底物碳链长度可以将PHAs聚合酶分为4种类型^[18]。Cupriavidus necator, Aeromonas caviae, A. hydrophila和A. punctata中存在的Class I PHA聚合酶, 亚基(PhaC)分子量为60 000-65 000, 以同型二聚体的形式发挥活性^[19-20, 22]。Pseudomonas putida和P. aeruginosa中的Class II PHAs聚合酶具有大约60 000的单亚基PhaC, 也是以同型二聚体的形式表现活性^[20, 22]。PhaC亚基有两种不同的类型, 分别由phaC1和phaC2基因编码。Class I PHAs聚合酶更偏好短链单体(C3-C5), 而Class II PHAs聚合酶偏好中长链单体(C6-C14)。Class III PHAs聚合酶包含有两个不同的亚基PhaC(约40 000)和PhaE(约20 000或40 000), 通常存在于Allochrocatium vinosum和Desulfococcus multivorans^[19, 23]。Class III PHAs聚合酶催化scl-PHA的合成, 两个亚基都具有催化活性, PhaC亚基和Class I和II聚合酶中的亚基具有21%-28%的氨基酸序列相似性, 被认为是催化亚基, 而PhaE亚基和已知的PHAs聚合酶相似低, 其具体作用方式未知。Class IV PHAs聚合酶含有PhaC亚基(约40 000)和PhaR亚基(约20 000), 催化合成长链PHAs, 通常存在于Bacillus中如B. megaterium和B. cereus^[24]。

在C. necator和Ralstonia pickettii中发现PhaY, 类似于PHAs解聚酶(PhaZ), 更加偏好于3HB的低聚物而不是P(3HB)^[25]。Phasins蛋白(14 000-24 000)是一类两亲蛋白(amphiphilic proteins), 在PHAs合成中起结构和调节功能^[26], 能通过稳定PHAs颗粒的疏水面和在细胞分裂中分离PHAs颗粒来控制PHAs颗粒的数量和大小^[14]。目前已发现多种Phasins蛋白, 如分别存在于C. necator和B. megaterium^[14]、P. putida^[14]、P. oleovorans和P. putida KT2442^[14]、Rhodospirillum rubrum^[14]、Rhodococcus ruber^[27]和Magnetospirillum gryphiswaldense^[28]中的PhaP、PhaI、PhaF、PhaD、GA14和Mms16。

2.2 PHAs合成代谢途径

微生物合成PHAs可分为两个步骤, 首先通过固有碳源代谢途径将结构相关或无关的碳源转化为各种羟酰基辅酶A, 然后PHAs聚合酶催化羟酰基辅酶A的聚合反应合成PHAs。在已知的150多种PHA单体中, 许多并不是微生物的固有代谢产物, 需要外源添加分子结构相关的底物, 经过一些简单的

转化步骤产生对应的羟酰基辅酶A。当然, 结构不相关的碳源也能通过天然存在的或者人工构建的生物合成途径产生所需的PHAs单体, 例如糖酵解途径、TCA循环、脂肪酸生物合成和降解途径、氨基酸生物合成途径、卡尔文循环和丝氨酸循环等。图2总结了不同PHAs单体的合成路径。下面对一些典型PHAs的代谢途径进行简述。

2.2.1 聚3-羟基丁酸(P3HB) C. necator是积累P(3HB)的代表物种。在P(3HB)的生物合成途径中, 两分子的乙酰辅酶A在 β -酮硫解酶(PhaA)的催化下缩合为乙酰乙酰辅酶A。乙酰乙酰辅酶A被依赖NADPH的乙酰乙酰辅酶A还原酶(PhaB)还原为3-羟基丁酰辅酶A, 然后在PHA聚合酶(PhaC)的作用下聚合为P(3HB)。和其他PHAs合成途径相比, P(3HB)合成途径较为简单。

2.2.2 含有3HV单体的PHAs C. necator能利用丙酸、戊酸或正戊醇合成P(3HB-co-3HV)。乙酰辅酶A和丙酰辅酶A在phaA的催化下缩合为3-酮戊酰辅酶A, 在PhaB的催化下3-酮戊酰辅酶A被还原为3-羟基戊酰辅酶A, 最后在PHA聚合酶作用下合成PHV或P(3HB-co-3HV)。这个过程PHAs聚合酶和P(3HB)合成中的聚合酶相同, 所以最后合成的PHAs中常含有3HB作为共聚单体。一些微生物可以利用结构无关底物获得丙酰辅酶A。例如, 在突变株C. necator R3中, L-缬氨酸和L-异亮氨酸具有较高的代谢通量, 而从L-缬氨酸和L-异亮氨酸生物合成途径的中间体可以合成丙酰辅酶A, 因此突变菌株可以从无关的碳源(如果糖或葡萄糖)生产具有物质的量比4%-7% 3HV的P(3HB-co-3HV)。

2.2.3 中长链PHAs 包括假单胞菌在内的多种细菌可通过 β -氧化途径和/或脂肪酸从头生物合成途径合成mcl-PHA^[29]。 β -氧化途径分别通过烯酰基辅酶A水合酶(PhaJ或MaoC)和酰基辅酶A脱氢酶(FadG)催化烯酰基辅酶A和3-酮酰基辅酶A产生具有不同碳长度的各种羟酰基辅酶A, 例如3-羟基己酰基辅酶A和3-羟基辛酰基辅酶A, 并将其聚合成mcl-PHAs^[29]。和 β -氧化途径不同的是, 在脂肪酸原位合成途径中会合成许多不同碳链长度的羟酰基-ACPs, 然后在acyl-CoA:ACP转酰酶(PhaG)的作用下转化为羟酰基辅酶A。上述两个代谢途径能为PHAs合成提供丰富的不同碳链长度的单体, 同时也导致了PHAs产物的复杂性。有研究通过阻断脂肪酸 β -氧化或脂肪酸原位合成途径进行均质mcl-PHAs的合成。除此之外, 脂肪酸原位合成和脂肪酸 β -氧化途径可以相互连接。从脂肪酸原位合成途径产生的酰基-ACP能在硫脂酶(thioesterase)的催化下转化为脂肪酸进入脂肪酸 β -氧化途径。基于这种代谢策略构建的大肠杆菌能利用葡萄糖合成2.3% (w)的中长链脂肪酸^[30]。

2.2.4 聚4-羟基丁酸(P4HB) 合成P(4HB)通常需要在底物中添加结构相关的前体, 如4HB、4-氯丁酸、1,4-丁二醇或者 γ -丁内酯。为了利用结构无关的碳源合成P(4HB), 有研究在大肠杆菌中构建了克氏梭状芽孢杆菌的厌氧琥珀酸降解途径^[31]。琥珀酰辅酶A在琥珀酸半醛脱氢酶的催化下转化为琥珀酸半醛, 琥珀酸半醛又在4HB脱氢酶的催化下转化为4HB, 然后在PHA聚合酶作用下合成P(4HB)^[30]。虽然, 成功利用葡萄糖合成了P(3HB-co-4HB), 但4HB的物质的量比仅为2.8%。为了进一步提高4HB的比例, 敲除了编码琥珀酸半醛脱氢酶的内源性基因sad和gabD, 阻止琥珀酸半醛转化为琥珀酸, 将4HB的比例提高到了11%^[32]。

2.2.5 聚3-羟基丙酸(P3HP) 目前P3HP有3种生物合成

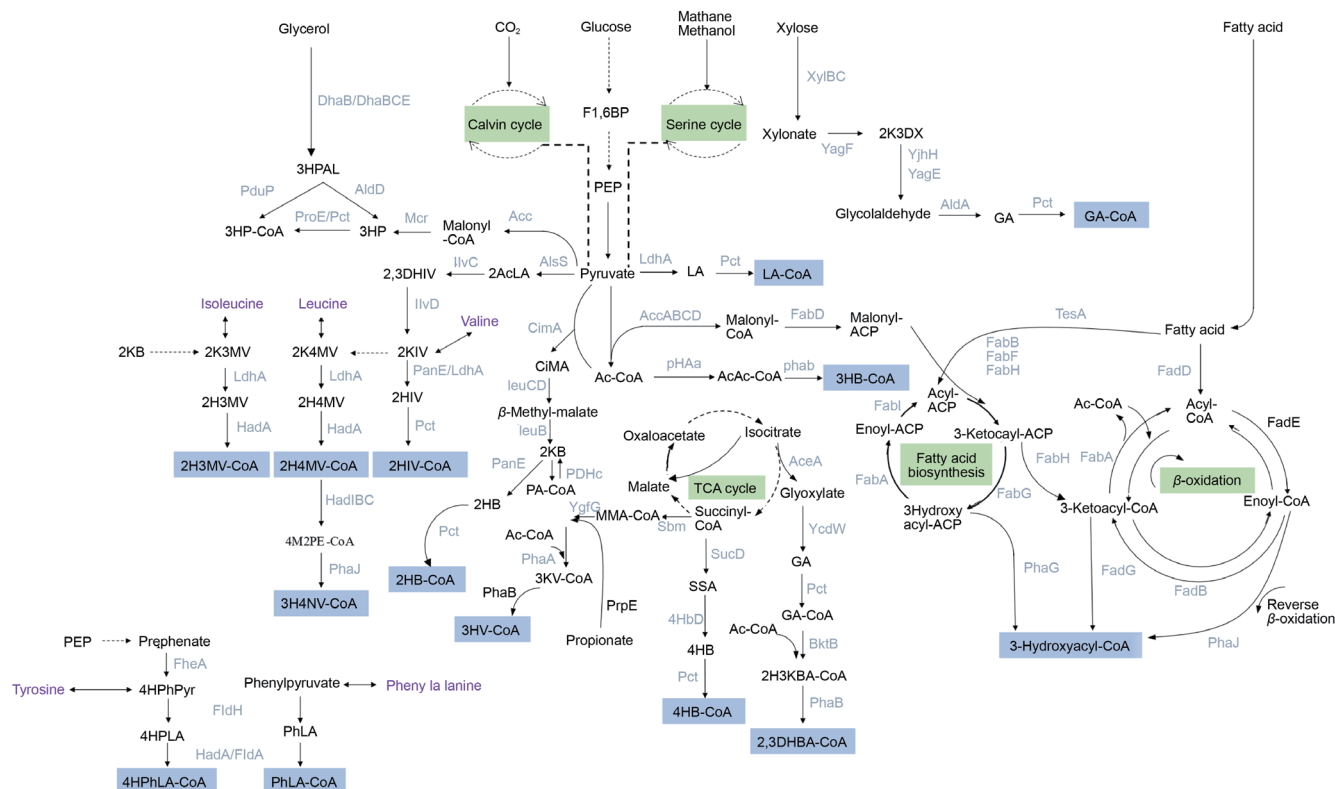


图2 不同PHAs单体的合成路径。2,3DHBA-CoA: 2,3-二羟基丁酰辅酶A; 2,3DHIV: 2,3-二羟基异戊酸; 2AcLA: 2-乙酰乳酸; 2H3KBA-CoA: 2-羟基-3-酮丁酰辅酶A; 2H3MV: 2-羟基-3-甲基戊酸; 2H4MV: 2-羟基-4-甲基戊酸; 2HB: 2-羟基丁酸; 2HIV: 2-羟基异戊酸; 2K3DX: 2-酮-3-脱氧木糖; 2K3MV: 2-酮-3-甲基戊酸; 2K4MV: 2-酮-4-甲基戊酸; 2KB: 2-酮丁酸; 2KIV: 2-酮异戊酸; 3H4MV-CoA: 3-羟基-4-甲基戊酰辅酶A; 3HB-CoA: 3-羟基丁酰辅酶A; 3HP: 3-羟基丙酸; 3HPAL: 3-羟基丙醛; 3KV-CoA: 3-酮戊酰辅酶A; 4HB: 4-羟基丁酸; 4HPLA: 4-羟基苯乳酸; 4HPhPyr: 4-羟基苯丙酮酸; 4M2PE-CoA: 4-甲基-2-戊烯酰辅酶A; AcAc-CoA: 乙酰乙酰辅酶A; Ac-CoA: 乙酰辅酶A; CiMA: 柠檬酸; F1,6BP: 1,6-二磷酸果糖; GA: 乙醇酸; LA: 乳酸; MMA-CoA: 甲基丙二酰辅酶A; PA-CoA: 丙酰辅酶A; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; PhLA: 苯乳酸; SSA: 琥珀酸半醛。实线箭头: 单个反应; 虚线箭头: 多个反应。

Fig. 2 Synthesis pathways of different PHAs monomers. 2,3DHBA-CoA: 2,3-Dihydroxybutyryl-CoA; 2,3DHIV: 2,3-Dihydroxyisovaleryl-CoA; 2AcLA: 2-Acetolactate; 2H3KBA-CoA: 2-Hydroxy-3-ketobutyryl-CoA; 2H3MV: 2-Hydroxy-3-methylvalerate; 2H4MV: 2-Hydroxy-4-methylvalerate; 2HB: 2-Hydroxybutyrate; 2HIV: 2-Hydroxyisovalerate; 2K3DX: 2-Keto-3-deoxyxylonate; 2K3MV: 2-Keto-3-methylvalerate; 2K4MV: 2-Keto-4-methylvalerate; 2KB: 2-Ketobutyrate; 2KIV: 2-Ketoisovalerate; 3H4MV-CoA: 3-Hydroxy-4-methylvaleryl-CoA; 3HB-CoA: 3-Hydroxybutyryl-CoA; 3HP: 3-Hydroxypropionate; 3HPAL: 3-Hydroxypropionaldehyde; 3KV-CoA: 3-Ketovaleryl-CoA; 4HB: 4-Hydroxybutyrate; 4HPLA: 4-Hydroxyphenyllactate; 4HPhPyr: 4-Hydroxyphenylpyruvate; 4M2PE-CoA: 4-Methyl-2-pentenoyl-CoA; AcAc-CoA: Acetoacetyl-CoA; Ac-CoA: Acetyl-CoA; CiMA: Citramalate; F1,6BP: Fructose-1,6-bisphosphate; GA: Glycolate; LA: Lactate; MMA-CoA: Methylmalonyl-CoA; PA-CoA: Propionyl-CoA; PEP: Phosphoenolpyruvate; PhLA: Phenyllactate; SSA: Succinate semialdehyde. Solid arrows: Single reaction; Dashed arrows: A series of reactions.

途径,即甘油途径、丙二酸单酰辅酶A途径和 β -丙氨酸途径^[33]。将*Clostridium butyricum*的甘油脱水酶基因*dhaBl_{cb}*、*Salmonella enterica*的丙醛脱氢酶基因*pudP_{se}*和*Ralstonia eutropha*的*phaC_{Re}*基因转入大肠杆菌中,工程菌能利用纯甘油合成P3HP,最高产量为1.4 g/L^[34]。Wang等人过表达大肠杆菌的*accABCD_{Ec}*基因以提高丙二酸单酰辅酶A的浓度,同时向大肠杆菌中转入*prpE_{Ec}*(丙酰辅酶A合成酶基因),该重组菌可以利用丙二酸单酰辅酶A途径从葡萄糖合成P3HP^[35]。在大肠杆菌中表达L-天冬氨酸脱羧酶基因*panD_{Ec}*及其成熟因子*panM_{Ec}*,3-羟基酸脱氢酶基因*ydfG*,丙酰辅酶A合成酶基因*prpE_{Ec}*,*P. putida*的 β -丙氨酸-丙酮酸转氨酶基因*pp0596*,以及*R. eutropha*的PHA聚合酶基因*phaC1_{Re}*,该重组菌株可利用 β -丙氨酸途径从葡萄糖和甘油合成P3HP^[36]。

3 PHAs的发酵方式

尽管PHAs合成菌拥有良好的PHA合成能力,但是没有合适的发酵方式,也不能达到理想的结果。优化的发酵方法

可以最大化产品浓度(PHA, g/L)、产率(PHA/C, g/g)和生产速率(PHA, g L⁻¹ h⁻¹),并降低副产物的合成以降低回收和纯化的成本。PHAs的生产方式主要有批次发酵(batch fermentation)和连续发酵(continuous fermentation)^[37]。

批次发酵工艺过程简单、易于操作,但是PHAs的生产效率低。批次发酵开始投加的碳源和氮源的浓度受到发酵物种生理承受限度的限制,在发酵过程也难以保持“碳源过量,生长因素受限”的条件,导致PHAs合成效率较低^[38]。在发酵过程中补充碳源的批次补料发酵(fed-batch)能够很好地解决批次发酵的底物限制问题。在批次补料发酵中,底物浓度低于阈值(或溶解氧突然升高)时,将补充新底物,该过程可以重复进行。批次补料发酵方式可以在初期提供营养全面的基质以调高微生物量,接着提供营养限制条件,以促进PHAs的合成和积累,这种灵活的操作方式已被广泛使用^[39]。

PHAs生产目前鲜有采用连续发酵方式的,但已有一些相关研究。连续培养的恒化条件可以通过设置稀释率来精确控制,以控制生物过程参数(如细胞比生长速率、底物消耗速率、产物生成速率等)在恒定的发酵条件下,可以合成具有恒

定单体分数的PHAs。例如, *P. putida*在批次发酵中, 所产生的mcl-PHAs的单体组分随着时间而变化, 但是在连续发酵过程中可保持恒定^[40]。连续发酵根据反应器级联的不同可分为单级(one-stage)和多级(multi-stage)连续发酵。单级连续发酵在一个恒化反应器中进行PHAs的合成和积累, 但是单级系统难以提供营养限制条件, PHAs的合成效率较低。相比于单级系统, 多级连续发酵系统可在首个恒化器中提供全面的营养条件以提升细胞量, 在后面的级联恒化器中设置营养限制条件, 这同时满足了细胞量的提高和营养限制条件, 而使得其PHAs的积累效率要高于单级连续发酵系统^[1]。

目前, 连续发酵方式在混菌合成PHAs中有所应用。例如, Bhalerao等人利用从市政污泥中富集的PHAs合成菌群, 利用酵母工业废水在连续发酵模式下进行PHAs的合成和积累, 获得了较高的PHAs积累(65% DCW)和生物量增长速率, 基于理论计算的PHAs产量(270 t/a)显著高于批次发酵模式^[41]。

4 PHAs合成前沿研究进展

PHAs具有良好的物理化学性质, 是传统塑料的强有力替代材料, 但目前较高的生产成本阻碍了其进一步的商业应用。为了降低PHAs的成本, 研究人员开展了大量的研究, 主要包括利用基因工程手段改造生产菌株、极端条件发酵、利用低品质原料进行混菌发酵等等。图3总结了降低PHAs生产成本的相关研究方向。

4.1 PHAs合成菌的基因工程和代谢工程优化

合成生物学和CRISPRi/CRISPR-Cas9等基因表达调控

和基因编辑技术已用于提升微生物的PHAs合成效率。用来改善PHAs合成的研究工作包括核糖体结合位点(RBS)优化、启动子工程、染色体整合、细胞形态工程、细胞生长行为重编程以及下游加工。

4.1.1 用于增强PHAs合成的核糖体结合位点优化和启动子工程 表达与PHAs合成相关的基因如phbCBA操纵子和一些同源基因, 可以在细胞中积累各种PHAs单体和聚合物。这些相关基因的转录水平会显著影响PHAs的合成水平。优化核糖体结合位点和启动子是调节基因转录水平的有效方法。Li等人在大肠杆菌中导入来自*C. necator*的phaCBA操纵子, 以合成PHB。设计了RBS文库, 这些RBS文库对操纵子中的3个基因都有确定的表达强度控制, 可使工程大肠杆菌在0%-92% CDW(细胞干重)范围内积累PHB, 表明优化核糖体结合位点能够提高PHB的合成能力^[42]。Zhao等人将一个强启动子P16整合到*P. mendocina* NK-01的phaC基因的上游, 敲除了编码PHA解聚酶的phaZ基因, 获得了重组菌株NKU- Δ phaZ-16C1。摇瓶发酵结果显示, 和没有插入启动子的NKU- Δ phaZ相比, NKU- Δ phaZ-16C1的PHAs合成效率提高了17%-23%^[43]。

4.1.2 应用CRISPR/Cas9或者CRISPRi提升PHAs合成能力 CRISPR/Cas9基因编辑技术已经普遍应用于大肠杆菌以改善PHAs合成。Jung等人使用CRISPR/Cas9技术敲除和副产物形成相关的4个基因(*pflb*、*ldhA*、*adhE*和*fnr*), 同时过表达*pntAB*催化NADH和NADPH的相互转换, 显著提升了大肠杆菌的细胞生长和PHAs合成^[44]。除了大肠杆菌外, CRISPR/Cas9技术也应用于非模式物种以提高其PHAs的合

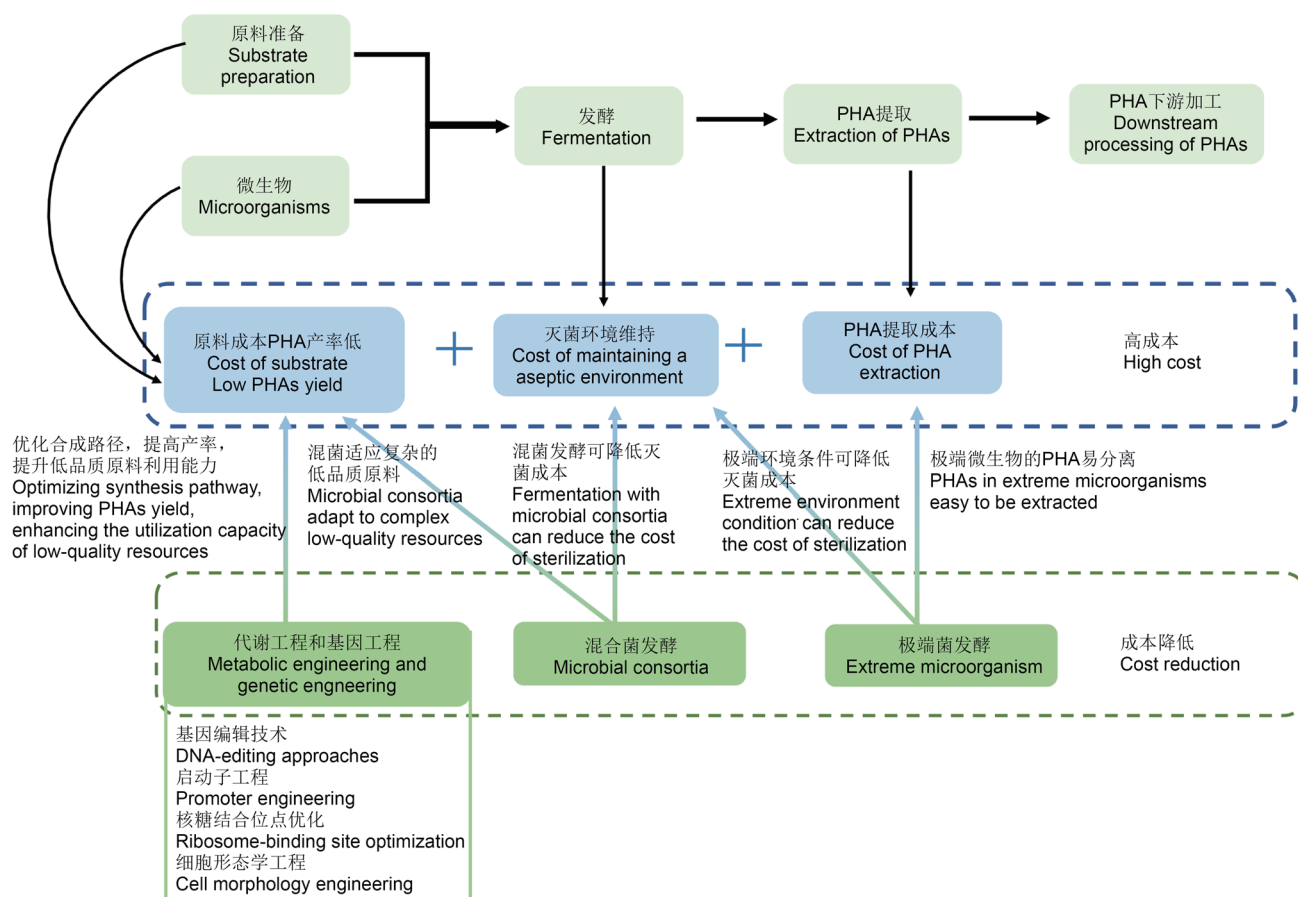


图3 降低PHAs合成成本的研究。

Fig. 3 Studies on reducing the cost of PHAs production.

成能力. 例如Qin等人采用CRISPR/Cas9技术敲除了极端嗜盐菌*Halomonas bluephagenesis* TD01的*prpC*基因, $\Delta prpC$ 变种合成的共聚物中3HV组分含量增加了约16倍^[45].

4.1.3 使用CRISPRi改造细胞形态以提高PHAs合成

PHAs在细胞中以颗粒状内涵体积累, 较小的细胞只能提供有限的PHAs积累空间, 因此可通过增大细胞体积以提高PHAs的积累. 增加细胞大小的研究集中于和细胞分裂、细胞壁和细胞骨架蛋白有关的基因(*mreB*、*ftsZ*、*sulA*、*minC*、*minD*)的表达调控. Jiang等人构建了缺失*mreB*和*ftsZ*的*H. campaniensis* LS21菌株, 细胞长度和大小增加, PHB的产量提高了80%^[46].

CRISPRi已用于改造大肠杆菌和青霉菌细胞形态以增强PHAs合成. Ihadi和同事设计了5个与CRISPRi相关的sgRNA, 靶向大肠杆菌染色体*ftsZ*和*mreB*上的5个不同位置, 降低了*ftsZ*和*mreB*的表达水平, 导致了细胞的伸长和增大^[47]. 通过组合各种sgRNA, 进一步增强了这种效果. 通过组合抑制*ftsZ*和*mreB*在不同表达水平, 观察到了各种形态包括各种大小的葫芦、棒、球菌、纺锤形、多角度和椭圆形. 这些研究表明, PHB含量取决于细胞体积, 与细胞体积成正比, 可占细胞干重的40%至80%.

4.1.4 调节细胞生长和形态以便于下游回收 在下游工艺中, 微生物的浓缩、分离以及PHAs的提取的复杂程度显著影响生产成本. 有研究通过调节细胞的生长行为和形态以更加经济地回收细胞. 抑制*ftsZ*基因的表达会使细胞异常生长并形成丝状细胞, 在为PHAs的积累提供更多细胞内空间的同时有利于细胞的沉淀和回收. 在曝气和搅拌停止的时候, 丝状大肠杆菌能够更快地聚集沉淀^[48]. 破坏大肠杆菌中调节细胞分离的*minC*和*minD*基因, 细胞的分裂模式从二分裂改变为多分裂, 这种生长方式增加了细胞的长度, 有利于细胞的沉淀分离^[49].

4.2 利用极端微生物生产PHAs

研究发现在许多极端环境下生存的极端微生物中也存在PHAs颗粒. 极端微生物所要求的特殊环境条件(高盐、高温、低温、极端pH等)天然地避免了杂菌的干扰, 这种优势能够显著减低生产成本. 应用嗜盐微生物合成PHA的研究报道较多(表1).

采用嗜盐菌合成PHAs具有一些特有的优势: (1) 不需维持灭菌环境; (2) 低品质物料发酵产酸, 使用碱调节pH后产生大量的盐, 嗜盐菌能够很好适应高盐环境; (3) 嗜盐菌在

低渗环境中易于破裂, 通过简单离心和沉淀操作分离PHAs颗粒, 可简化PHAs的回收过程.

在合成PHAs的几种极端微生物中, *Haloferax mediterranei*的研究最为广泛, 因为其可合成P(3HV-3HB)而无需补充结构相关的前体(如戊酸等). Ghosh等人使用海藻水解液作为*H. mediterranei*的底物合成PHAs, 利用含有体积分数25%海藻水解液的物料, 可达到最好的PHAs合成效果, PHAs平均体积生物量生产率 $0.052 \pm 0.008 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 细胞中PHAs质量分数含量最高为55%. 所得产物为P(3HV-3HB), 3HV:3HB物质的量比为8%:92%^[50]. Stanley等以葡萄糖作为底物, 利用*Halomonas venusta* KT832796分别在批次(batch)、批次投料(fed-batch)和高浓度单次脉冲进料(high concentration single pulse)3种发酵方式下合成PHAs, 结果表明在高浓度单次脉冲进料的发酵方式下, *H. venusta* KT832796的PHAs合成效率最好, PHAs的产率为 $0.248 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 细胞中PHAs的质量分数含量为19.4%^[51].

合成生物学和代谢工程技术也已用于改造极端微生物以合成功能性的PHAs. Yu等人敲除*Halomonas bluephagenesis*的本源*phaC*基因, 表达来自*Aeromonas hydrophila* 4AK4的PHAs合酶(PhaC)和烯酰辅酶A水合酶(PhaJ), 以合成P(3HB-3HHx)、P(3HB-3HHxE)和P(3HB-3HHx-3HHxE). 优化了本源酰基辅酶A合成酶(FadD)的表达框架和核糖体结合位点, 重组的*H. bluephagenesis* TDR4能利用葡萄糖和5-己酸的混合物合成含有35 mol% 3HHxE的PHBHHx, PHBHHx的生产效率为 $0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ^[53].

4.3 混合菌群发酵

目前, PHAs的商业化生产均采用单一物种(野生菌种或工程菌种)发酵而成, 其成本在2.2-5 €/kg, 而传统塑料的成本低于1 €/kg, 高生产成本限制了PHAs广泛应用. 维持无菌发酵条件和使用高价原料是导致单一菌种发酵高成本的两个主要原因. 由于自然界多种革兰氏阳性菌和阴性菌都具有PHAs合成能力, 使用自然形成的混合菌群可以在开放环境中进行发酵, 不需要严格的无菌措施, 同时菌群可以利用低品质廉价的富含碳源的原料(纤维素水解液^[59]、市政污泥发酵液^[60]、啤酒废水^[61]、粗甘油^[62]). 基于以上两点, 利用混合菌群生产PHAs在降低生产成本方面有明显优势.

利用混菌发酵生产PHAs主要包括3个阶段, 即原料预处理、菌群富集和PHAs生产. 第一阶段: 将富含碳源的低品质原料经过厌氧发酵转化为富含脂肪酸的发酵液作为下一步的碳

表1 嗜盐菌合成PHAs
Table 1 Synthesis of PHAs by halophiles

极端菌 Extreme microorganism	碳源 Carbon source	PHAs	生产规模和PHAs产率 Production scale and PHAs yield	参考文献 Reference
<i>Haloferax mediterranei</i>	海藻水解液 Seaweed hydrolysate	P (HB-HV)	40.4 L continuous cultivation; $0.052 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	[50]
<i>Haloferax mediterranei</i>	葡萄糖 Glucose	P (HB-HV)	2 L batch reactor; $0.248 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	[51]
<i>Haloferax mediterranei</i>	橄榄油工业废水 Olive oil industrial wastewater	P (HB-HV)	Shake flask; 0.2 g/L PHAs	[52]
<i>Haloferax bluephagenesis</i> TDR4	葡萄糖, 5-己酸 Glucose, 5-caproic acid	P (3HB-co-22.75% 3HHxE)	7 L two-stage batch feeding $0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	[53]
<i>Halomonas</i> TD01	葡萄糖 Glucose	PHB	Continuous cultivation; 64 g/L PHAs	[54]
<i>Halomonas campaniensis</i> LS21	人工合成碳源 Synthetic carbon source	PHB	26% CDW (wild strain); 70% CDW (engineered strain)	[55]
<i>Natrinema pallidum</i> JCM 8980	淀粉 Starch	P (HB-HV)	Shake flask; 53.14% CDW	[56]
<i>Halogeometricum borinquense</i> strain E3	含25%甘蔗水解液的NaCl合成基质 NaCl synthetic matrix containing 25% sugarcane hydrolysate	P (HB-HV)	Shake flask; $3 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	[57]
<i>Bacillus megaterium</i> uyuni S29	葡萄糖 Glucose	PHB	Shake flasks; 2.2 g/L PHB; $0.10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	[58]

源. 第二阶段: 使用含脂肪酸的物料富集PHAs合成菌, 富集的方法通常为饱食—饥饿方法 (feast-famine) 或者好氧动态补料方法 (aerobic dynamic feeding). 在碳源交替充足和缺乏的状态下, 使具有PHAs积累能力的物种占据竞争优势, 获得具有PHAs合成能力的目标菌群. 第三阶段: 利用富集的菌群和脂肪酸碳源合成PHAs. 三阶段方法可以将PHAs生产和生物废弃物的传统发酵产酸耦合, 实现废弃物的资源化, 带来显著的环境效益和经济效益. 但是还存在一些需要解决的问题:

(1) 低品质生物废弃物厌氧发酵产生的各种脂肪酸的比例不稳定, 会导致PHAs的单体组成不稳定, 发酵液中脂肪酸以外的成分可能影响PHAs合成菌群的活性; (2) 混合菌群中物种复杂, 具有不同PHAs合成能力的物种共存, 物种间存在碳源竞争, 可能造成碳源利用率低, 在富集阶段构建功能稳定的菌群十分重要; (3) 和纯菌相比, 混菌可能具有更强的抵抗细胞水解的能力, 需要研究从混菌中提取纯化PHAs的技术, 混菌产生的PHAs的复杂性也增加了纯化的难度.

目前对于混菌发酵的研究工作主要集中在3个方面. 第一, 研究不同低品质原料发酵的可行性; 第二, 优化混菌发酵过程工艺; 第三, 研究混菌物种间的相互作用. 许多低品质生物废弃物, 包括啤酒废水^[61]、甘蔗废渣^[63]、污泥发酵液^[60]、牛粪发酵液^[64]、纤维素水解液^[59]、粗甘油^[62, 65]和木材废料^[66]等已被用于PHAs生产研究 (表1). 有部分研究探讨了PHAs合成菌群富集的方法. 经典的富集方法是饱食—饥饿 (FF) 模式, 碳源的充足和缺乏两种状态的交替会提供基于碳源竞争的选择压力, 以选择具有更强碳源利用能力的PHAs合成菌群. Chen等认为混菌中的物种PHAs合成能力有强、弱和无3种水平, 基于碳源竞争的选择压力无法排除PHAs合成能力较弱的物种. 基于能快速利用碳源合成PHAs的物种在发酵液中沉降

速度更快的考虑, 在FF模式的饱食阶段后, 增加短暂的排放上层发酵液的步骤, 以逐步排出沉降速度较慢的PHAs合成能力较弱的物种, 达到构建具有更加强大的PHAs合成菌群的目的. 这种改进后的菌群富集方式被称为好氧动态排放方法 (aerobic dynamic discharge, ADD). 采用FF方法和ADD方法在同种条件下进行富集菌群, ADD方法的富集周期更短, 菌群的PHAs积累能力更强^[67].

富集菌群用于PHAs的积累生产, 菌群的生物量会影响PHAs的生产水平. 如何在保存良好PHAs合成能力的同时增加PHAs合成菌群的生物量是一个重要问题. Huang等提出采用扩展培养的方式以解决这个问题. 在富集培养阶段后面添加若干个小阶段, 每个阶段含有A和B两个反应器, 分别含有碳源和除碳源外的营养元素, 菌群在A中获得碳源并积累PHAs, 在B中获得其他生长元素并利用体内PHAs进行生长, 在反复培养过程中生物量不断提高, 且同时保存了PHAs合成积累的能力. 基于扩展培养, 微生物的生物量提高了52倍, 达到17.22 g/L的细胞浓度, 并且PHAs合成效率 (COD PHA/COD VFA) 为0.49 g/g^[69].

通过追踪富集过程中菌群结构的变化可以解析富集机制. Wen等利用混酸在经典FF模式下对活性污泥进行PHAs合成菌群的富集, 对PHAs合成的关键基因*phaC*进行定量检测以表征菌群的PHAs合成水平, 同时对菌群结构进行实时跟踪. 结果表明, 随着富集的进行, 3种不同属的物种交替占据优势地位 (*Thauera*、*Paracoccus*和*Comamonadaceae*), 但是*phaC*的量并未有很大变化且菌群PHAs合成功能保持稳定, 表明菌群存在功能冗余现象. 对于优势菌种的交替, 作者认为是由于噬菌体对优势物种的攻击所造成的^[71].

表2 PHAs混合菌发酵总结

Table 2 Summary of PHAs fermentation with enriched bacterial consortia

底物 Substrate	菌群富集策略 Consortium enrichment	PHAs生产策略 PHAs production	产物组成 Product composition (mol:mol, r/%)	PHAs含量 PHAs content	PHAs合成效率 PHAs synthesis efficiency	参考文献 Reference
污泥发酵液 Sludge fermentation broth	FF策略: 混酸 (乙酸, 丙酸, 丁酸) Feast-famine; mixed VFAs (acetate, propionate, butyrate)	批次发酵 Batch	—	59.47% CDW	(PHA/COD) 0.17 g/g	[60]
啤酒废水发酵液 Brewery wastewater fermentation broth	FF策略: 碳源: 乙酸钠 Feast-famine; carbon resource: sodium acetate	由DO控制的脉冲进料 Pulse feeding controlled by DO	PHB:PHV = 59:41	44.8% CDW	(C/C) 0.76 mol/mol	[61]
甘蔗渣发酵液 Bagasse fermentation broth	FF策略: 甘蔗发酵液 Feast-famine; bagasse fermentation broth	批次发酵 Batch	HB:HV = 77:23	(PHA/VSS, g/g) 49%	(COD/COD) 0.169 g g ⁻¹ h ⁻¹	[63]
牛粪发酵液 Fermented dairy manure	FF策略: 稀释2.5倍的发酵液 Feast-famine; 2.5 times diluted fermentation broth	DO控制的脉冲补料 Pulse feeding controlled by DO	HB:HV = 51:49	(PHA/VSS, g/g) 22.5%-90.7%	(C/VSS) 0.1-0.19 mol g ⁻¹ min ⁻¹	[64]
粗甘油 Crude glycerol	FF策略: 粗甘油 Feast-famine; crude glycerol	批次发酵 Batch	HB:HV = 60:40	80% CDW	(C PHA/C) 0.7 mg/mg	[65]
木材发酵液 Wood fermentation broth	FF策略: 木材发酵液 Feast-famine; wood fermentation broth	批次发酵 Batch	HB:HV = 94:6	(PHA/VSS, g/g) 50.3%	(COD/COD VFA) 0.71 g/g	[66]
食物发酵液 Food fermentation broth	ADD策略: 混酸 (乙酸、丙酸、丁酸、戊酸) Aerobic dynamic discharge; VFAs (acetate, propionate, butyrate, valerate)	DO控制的脉冲补料 Pulse feeding controlled by DO	—	(PHA/MLSS, g/g) 33.4%	—	[68]
混酸 Mixed VFAs	FF策略: 混酸 (乙酸, 丙酸, 丁酸, 戊酸) Feast-famine; VFAs (acetate, propionate, butyrate, valerate)	6次脉冲进料 Six times pulse feed	HB:HV = 41:5	69% (m/m)	(C PHA/C VFA) 1.0 mol/mol	[69]
混酸 Mixed VFAs	FF策略: 混酸 (乙酸, 丙酸, 丁酸) Feast-famine; VFAs (acetate, propionate, butyrate)	扩展培养策略 Extended cultivation strategy	—	71.4% CDW	(COD/COD VFA) 0.49 g/g	[70]

CDW: 细胞干重. CDW: Cell dry weight.

5 结论与展望

许多细菌能合成PHAs, 这些细菌的多个代谢途径均能产生PHAs单体, 包括糖酵解途径、TCA循环、脂肪酸生物合成和降解途径、氨基酸生物合成途径、卡尔文循环和丝氨酸循环等, 导致了PHAs单体的多样性。PHAs合成途径中的一些聚合酶也可以催化多种单体聚合产生各种共聚PHAs, 使PHAs结构、性质和功能具有多样性, 应用领域十分广泛。

针对典型PHAs合成菌的代谢途径和发酵方法的研究, 已取得了一定成果, 但由于高生产成本的限制, PHAs一直无法扩大生产和应用。未来的研究目标是如何以低成本生产出高质量的PHAs。有3个突破方向: 基于代谢工程和基因工程技术对生产菌株进行优化改造, 利用极端菌生产, 利用廉价生物废弃物和富集菌群生产。但是, 上述3个方向还需更系统和深入的研发工作。

基于代谢和基因工程技术对生产菌株的优化改造方面, 目前大部分研究集中在模式生物大肠杆菌, 今后需针对典型PHAs合成物种建立高效的代谢调控和基因编辑技术, 构建可适用于成分较为复杂的低品质原料的PHAs高效生产菌株, 发

掘具有优良抗污染能力的PHAs合成物种并进行功能优化。利用极端菌的PHAs合成, 需进一步深入研究极端菌的PHAs合成分子机制, 优化合成通路, 拓展底物利用范围, 提升PHAs合成能力以及可利用的廉价原料种类。

从环境保护以及年产生量巨大的生物废弃物高值资源化利用角度考虑, 以各种生物废弃物为原料生产PHAs将成为PHAs合成研究的重点。如何高效地富集或构建PHAs合成菌群, 如何调控菌群的PHAs合成方式, 如何应对原料组分波动实现品质稳定可控的PHAs的生产, 是混菌发酵面临的问题。目前的研究主要集中在菌群富集和探讨利用各种生物废弃物生产PHAs的可行性方面, 今后需对PHAs菌群富集影响机制、菌群结构和功能鲁棒性、菌群各物种功能以及物种间相互关系、菌群结构和功能对生物及非生物环境因子的响应机制、人工合成PHAs合成微生物组等开展系统和深入的研究, 建立有效的菌群调控手段, 实现低品质生物废弃物的PHAs生产。

随着化石资源的不断减少和塑料污染的加剧, 研究“绿色塑料”PHAs以替代传统塑料不仅贡献于保护环境, 也是实现人类可持续发展的基础。

参考文献 [References]

- Martin K. A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters [J]. *Fermentation*, 2018, 4 (2): 30-55
- Findlay RH, White DC. Polymeric β -hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45 (1): 71-78
- Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters [J]. *Prog Polym Sci*, 2000, 25 (10): 1503-1555
- Choi SY, Cho IJ, Lee Y, Kim YJ, Lee SY. Microbial polyhydroxyalkanoates and nonnatural polyesters [J]. *Adv Mater*, 2020: 1907138
- Ge L, Tan GY, Wang L, Chen CL, Li L, Tan SN, Wang JY. Determination of monomeric composition in polyhydroxyalkanoates by liquid chromatography coupled with on-line mass spectrometry and off-line nuclear magnetic resonance [J]. *Talanta*, 2016, 146: 107-113
- Sagong HY, Son HF, Choi SY, Lee SY, Kim KJ. Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis [J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43 (10): 790-805
- Madalina EG, Ramona MG, Lorena L, Rodica MI, Catalin Z, Elena RA. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2019, 30 (9): 695-712
- Polyak P, Dohovits E, Nagy GN, Vertessy BG, Voros G, Pukanszky B. Enzymatic degradation of poly-[(R)-3-hydroxybutyrate]: mechanism, kinetics, consequences [J]. *Int J Macromol*, 2018, 112: 156-162
- Knoll M, Hamm TM, Wagner F, Martinez V, Pleiss J. The PHA depolymerase engineering database: a systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10 (2009): 20-29
- Saratale RG, Saratale GD, Cho SK, Kim DS, Ghodake GS, Kadam A, Kumar G, Bharagava RN, Banu R, Shin HS. Pretreatment of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) biomass feedstock for polyhydroxybutyrate (PHB) production and characterization [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 282: 75-80
- Lemechko P, Fellic ML, Bruzard S. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) using agro-industrial effluents with tunable proportion of 3-hydroxyvalerate monomer units [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 128: 429-434
- Gopi S, Kontopoulou M, Ramsay B, Ramsay JA. Manipulating the structure of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) to enhance thermal properties and crystallization kinetics [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 119: 1248-1255
- Sanhueza C, Diaz-Rodriguez P, Villegas P, Gonzalez A, Seeger M, Suarez-Gonzalez J, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, Acevedo F. Influence of the carbon source on the properties of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Paraburkholderia xenovorans* LB400 and its electrospun fibers [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 1 (152): 11-20
- Shen R, Ning ZY, Lan YX, Chen JC, Chen GQ. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis* [J]. *Metab Eng*, 2019, 54: 117-126
- Nishihata S, Kondo T, Tanaka K, Ishikawa S, Takenaka S, Kang CM, Yoshida KI. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 PhaR function for pleiotropic regulation of cellular processes besides PHB accumulation [J]. *BMC Microbiol*, 2018, 18 (1): 156
- Lee TR, Lin JS, Wang SS, Shaw GC. PhaQ, a new class of poly- β -hydroxybutyrate (PHB)-responsive repressor, regulates phaQ and phaP (phasin) expression in *Bacillus megaterium* through interaction with PHB [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186 (10): 3015-3021

- 17 Bresan S, Jendrossek D. New insights into PhaM-PhaC-mediated localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha* H16 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, **83** (12): e00505-17
- 18 Kim KJ, Joo S, Cho IJ, Seo H, Son HF, Sagong HY, Shin TJ, Choi SY, Lee SY. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation [J]. *Nat Commun*, 2018, **9** (1): 382
- 19 Yuan W, Jia Y, Tian J, Snell KD, Müh U, Sinskey AJ, Lambalot RH, Walsh CT, Stubbe JA. Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochrocatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, **394** (1): 87-98
- 20 Stubbe JA, Tian J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase [J]. *Nat Prod Rep*, 2003, **20** (5): 445-457
- 21 Rehm BHA. Polyester synthases: natural catalysts for plastics [J]. *Biochem J*, 2003, **376** (1): 15-33
- 22 Rehm BH, Qi Q, Beerman BB, Hinz HJ, Steinbüchel A. Matrix-assisted in vitro refolding of *Pseudomonas aeruginosa* class II polyhydroxyalkanoate synthase from inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Biochem J*, 2001, **358** (1): 263-268
- 23 Liebergesel M, Rahalka S, Steinbüchel A. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54** (2): 186-194
- 24 Manami H, Satoshi T, Kouhei M, Hideki A, Takeharu T. Alcoholic cleavage of polyhydroxyalkanoate chains by class IV synthases induced by endogenous and exogenous ethanol [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, **80** (4): 1421-1429
- 25 Sugiyama A, Kobayashi T, Shiraki M, Saito T. Roles of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase in bacterial PHB metabolism [J]. *Curr Microbiol*, 2004, **48** (6): 424-427
- 26 Mezzina MP, Pettinari MJ. Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, **82** (17): 5060-5067
- 27 Madkour MH, Mayer F, Steinbüchel A. Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules [J]. *J Bacteriol*, 1995, **177** (9): 2513-2523
- 28 Daniel S, René H, Dieter J, Marianne H, Dirk S. The presumptive magnetosome protein Mms16 is a poly(3-hydroxybutyrate) granule-bound protein (phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense* [J]. *J Bacteriol*, 2005, **187** (7): 2416-2425
- 29 Prieto A, Escapa IF, Martinez V, Dinjaski N, Herencias C, Tarazona N, Revelles O. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida* [J]. *Environ Microbiol*, 2016, **18** (2): 341-357
- 30 Klinken S, Ren Q, Witholt B, Kessler B. Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (2): 540-548
- 31 Valentin HE, Dennis D. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose [J]. *J Biotechnol*, 1997, **58** (1): 33-38
- 32 Li ZJ, Shi ZY, Jian J, Guo YY, Chen GQ. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Metab Eng*, 2010, **12** (4): 352-359
- 33 常乐, 詹元龙, 刘长莉. 生物合成聚3-羟基丙酸酯的研究进展[J]. 生物工程学报, 2018, **34** (4): 501-509 [Chang L, Zhan YL, Liu CL. A systematic review of biosynthesis of poly (3-hydroxypropionate) [J]. *Chinese J Biotechnol*, 2018, **34** (4): 501-509]
- 34 Andreessen B, Lang AB, Robenek H, Steinbüchel A. Conversion of glycerol to poly (3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microb*, 2010, **76** (2): 622-626
- 35 Wang Q, Liu CS, Xian M, Zhang YG, Zhao G. Biosynthetic pathway for poly (3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli* [J]. *J Microbiol*, 2012, **50** (4): 693-637
- 36 Wang Q, Yang P, Xian M, Feng L, Wang JM, Zhao G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for poly (3-hydroxypropionate) production from glycerol and glucose [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, **36** (11): 2257-2262
- 37 Blunt W, Dartailh C, Sparling R, Gapes D, Levin DB, Cicek N. Microaerophilic environments improve the productivity of medium chain length polyhydroxyalkanoate biosynthesis from fatty acids in *Pseudomonas putida* LS46 [J]. *Process Biochem*, 2017, **59** (pt. a): 18-25
- 38 Gahlawat G, Srivastava AK. Enhancing the production of polyhydroxyalkanoate biopolymer by *Azohydromonas australica* using a simple empty and fill bioreactor cultivation strategy [J]. *Chem Biochem Eng*, 2017, **31** (4): 479-485
- 39 Bhatia SK, Gurav R, Choi TR, Jung HR, Yang SY, Moon YM, Song HS, Jeon JM, Choi KY, Yang YH. Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119 [J]. *Bioresour Technol*, 2019, **271**: 306-315
- 40 Hartmann R, Hany R, Pletscher E, Ritter A, Zinn M. Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: batch versus chemostat production [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93** (4): 737-746
- 41 Bhalerao A, Banerjee R, Nogueira R. Continuous cultivation strategy for yeast industrial wastewater -based polyhydroxyalkanoate production [J]. *J Biosci Bioeng*, 2020, **129** (5): 595-602
- 42 Li T, Ye J, Shen R, Zong Y, Zhao X, Lou C, Chen GQ. Semirational approach for ultrahigh poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Escherichia coli* by combining one-step library construction and high-throughput screening [J]. *ACS Synth Biol*, 2016, **5** (11): 1308-1317
- 43 Zhao FJ, Liu XS, Kong AN, Zhao YX, Fan X, Ma T, Gao WX, Wang SF, Yang C. Screening of endogenous strong promoters for enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas mendocina* NK-01 [J]. *Sci Rep*, 2019, **9** (1): 1789
- 44 Jung HR, Yang SY, Moon YM, Choi TR, Song HS, Bhatia SK, Gurav R, Kim EJ, Kim BG, Yang YH. Construction of efficient

- platform *Escherichia coli* strains for polyhydroxyalkanoate production by engineering branched pathway [J]. *Polymers*, 2019, **11** (3): 509
- 45 Qin Q, Ling C, Zhao YQ, Yang T, Yin J, Guo YY, Chen GQ. CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile *Halomonas* spp[J]. *Metab Eng*, 2018, **47**:219-229
 - 46 Elhadi D, Lü L, Jiang XR, Wu H, Chen GQ. CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification [J]. *Metab Eng*, 2016, **38**: 358-369
 - 47 Jiang XR, Yao ZH, Chen GQ. Controlling cell volume for efficient PHB production by *Halomonas* [J]. *Metab Eng*, 2017, **44**: 30-37
 - 48 Jiang XR, Chen GQ. Morphology engineering of bacteria for bio-production [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, **34** (4): 435-440
 - 49 Wu H, Chen JC, Chen GQ. Engineering the growth pattern and cell morphology for enhanced PHB production by *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100** (23): 9907-9916
 - 50 Ghosh S, Gnaim R, Greiserman S, Fadeev L, Gozin M, Golberg A. Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei* [J]. *Bioresour Technol*, 2019, **271**: 166-173
 - 51 Stanley A, Kummar HNP, Mutturi S, Vijayendra SVN. Fed-batch strategies for production of PHA using a native isolate of *Halomonas venusta* KT832796 strain [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, **184** (3): 935-952
 - 52 Alsafadi D, Al-Mashaqbeh O. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive millwastewater by *Haloferax mediterranei* [J]. *N Biotechnol*, 2017, **34** (2017): 47-53
 - 53 Yu LP, Yan X, Zhang X, Chen XB, Wu Q, Jiang XR, Chen GQ. Biosynthesis of functional polyhydroxyalkanoates by engineered *Halomonas bluephagenesis* [J]. *Metab Eng*, 2020, **59**: 119-130
 - 54 Tan D, Xue YS, Aibaidula G, Chen GQ. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01 [J]. *Bioresour Technol*, 2011, **102** (17): 8130-8136
 - 55 Yue HT, Ling C, Yang T, Chen XB, Chen YL, Deng HT, Wu Q, Chen JC, Chen GQ. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2014, **7** (1): 1-12
 - 56 Danis O, Ogan A, Tatlican P, Attar A, Cakmakci E, Mertoglu B, Birbir M. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery [J]. *Extremophiles*, 2015, **19** (2): 515-524
 - 57 Salgaonkar BB, Braganca J. Utilization of sugarcane bagasse by *Haloferax borinquense* strain E3 for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [J]. *Bioengineering*, 2017, **4** (4): 50
 - 58 Rodríguez A, Koller M, Dias MMS, Calafell M, Braunegg G, Marquésalvo MS. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* bolivian strain [J]. *J Appl Microbiol*, 2013, **114** (5): 1378-1387
 - 59 Cea M, Cabrera F, Abanto M, Felissia FE, Area MC, Ciudad G. Strategy for biological co-production of levulinic acid and polyhydroxyalkanoates by using mixed microbial cultures fed with synthetic hemicellulose hydrolysate [J]. *Bioresour Technol*, 2020, **309**: 123323
 - 60 Valentino F, Moretto G, Lorini L, Bolzonella D, Majone M. Pilot scale polyhydroxyalkanoate (PHA) production from combined treatment of organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2019, **58** (27): 23-28
 - 61 Tamang P, Banerjee R, Koster S, Nogueira R. Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture [J]. *J Environ Sci (China)*, 2019, **78**: 137-146
 - 62 Burniol A, Varrone C, Dagaard AE, Le SB, Skiadas IV, Gavala HN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented crude glycerol: study on the conversion of 1,3-propanediol to PHA in mixed microbial consortia [J]. *Water Res*, 2018, **128**: 255-266
 - 63 Guilherme HDO, Mirian YKN, Marcelo Z, Jose ADR. Effects of the organic loading rate on polyhydroxyalkanoate production from sugarcane stillage by mixed microbial cultures [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, **189** (4): 1039-1055
 - 64 Coats ER, Watson BS, Brinkman CK. Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology [J]. *Water Res*, 2016, **106**: 26-40
 - 65 Mohamad AH, Chua ASM, Yoon LW, Nittami T, Yeoh HK. Enrichment of PHA-accumulators for sustainable PHA production from crude glycerol [J]. *Process Saf Environ*, 2019, **122**: 200-208
 - 66 Li D, Yin F, Ma XJ. Towards biodegradable polyhydroxyalkanoate production from wood waste: using volatile fatty acids as conversion medium [J]. *Bioresour Technol*, 2019, **299**: 122629
 - 67 Chen ZQ, Guo ZR, Wen QX, Huang L, Bakke R, Du M. A new method for polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria selection under physical selective pressure [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, **72**: 1329-1334
 - 68 Wen QX, Ji Y, Hao YR, Huang L, Chen ZQ, Sposob M. Effect of sodium chloride on polyhydroxyalkanoate production from food waste fermentation leachate under different organic loading rate [J]. *Bioresour Technol*, 2018, **267**: 133-140
 - 69 Huang L, Chen ZQ, Wen QX, Lee DJ. Enhanced polyhydroxyalkanoate production by mixed microbial culture with extended cultivation strategy [J]. *Bioresour Technol*, 2017, **241**: 802-811
 - 70 Wang XF, Oehmen A, Freitas EB, Carvalho G, Reis MAM. The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production [J]. *Water Res*, 2017, **112**: 269-278
 - 71 Huang L, Chen ZQ, Wen QX, Zhao LZ, Lee DJ, Yang L, Wang Y. Insights into feast-famine polyhydroxyalkanoate (PHA)-producer selection: microbial community succession, relationships with system function and underlying driving forces [J]. *Water Res*, 2018, **131**: 167-176