

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-042

## 基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术

陈江楠<sup>1</sup>, 陈潇宁<sup>2</sup>, 刘心怡<sup>3</sup>, 万薇<sup>4</sup>, 章义鑫<sup>1</sup>, 张自豪<sup>4</sup>, 郑逸飞<sup>1</sup>, 郑陶然<sup>1</sup>, 王宣<sup>1</sup>, 王子瑜<sup>1</sup>, 闫煦<sup>1</sup>, 张旭<sup>1</sup>, 吴赴清<sup>1</sup>, 陈国强<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 清华大学生命科学学院, 北京 100084; <sup>2</sup> 清华大学新雅书院, 北京 100084; <sup>3</sup> 天津大学生命科学学院, 天津 300072; <sup>4</sup> 山东大学生命科学院, 山东 济南 250100)

**摘要:** 我国是工业生物技术大国, 拥有世界上最大的发酵产业, 但传统发酵需要灭菌操作, 发酵过程高耗能、耗淡水且不能连续, 导致生产成本偏高, 无法与化学工业竞争。因此, 急需开发下一代工业生物技术 (NGIB) 来克服这些缺点。NGIB 利用盐单胞菌等极端微生物作为底盘细胞, 具有发酵不需灭菌、节能节水、设备投资少、产物终浓度高、分离过程简单等优点。本文围绕下一代工业生物技术的发展过程, 系统介绍了近年来在技术优势强化, 生物元件和工具开发如 Porin 启动子系统、CRISPRi 系统、CRISPR-Cas9 系统等, 新产物合成如聚 (3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸) (PHBV)、聚 (3-羟基丁酸-co-4-羟基丁酸) (P3HB4HB)、表面活性剂蛋白等, 以及 PHA 分离过程优化、发酵工艺放大、废水循环利用等方面取得的最新进展。随着合成生物学发展和应用, 基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术体系正在不断完善, 优势也愈加明显。下一代工业生物技术将为大幅提升绿色生物制造的竞争力提供强力支撑。

**关键词:** 下一代工业生物技术 (NGIB); 盐单胞菌; 生物制造; 发酵工业; 聚 3-羟基丁酸 (PHB); 生物塑料; 聚羟基脂肪酸酯 (PHA)

中图分类号: Q 819 文献标志码: A

## Engineering *Halomonas* spp. for next generation industrial biotechnology (NGIB)

CHEN Jiangnan<sup>1</sup>, CHEN Xiaoning<sup>2</sup>, LIU Xinyi<sup>3</sup>, WAN Wei<sup>4</sup>, ZHANG Yixin<sup>1</sup>, ZHANG Zihao<sup>4</sup>, ZHENG Yifei<sup>1</sup>, ZHENG Taoran<sup>1</sup>, WANG Xuan<sup>1</sup>, WANG Ziyu<sup>1</sup>, YAN Xu<sup>1</sup>, ZHANG Xu<sup>1</sup>, WU Fuqing<sup>1</sup>, CHEN Guoqiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; <sup>2</sup>XinYa College, Tsinghua University, Beijing 100084, China; <sup>3</sup>School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China; <sup>4</sup>School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, Shandong, China)

**Abstract:** China is a country with the largest industrial biotechnology capacity especially fermentation. However, it

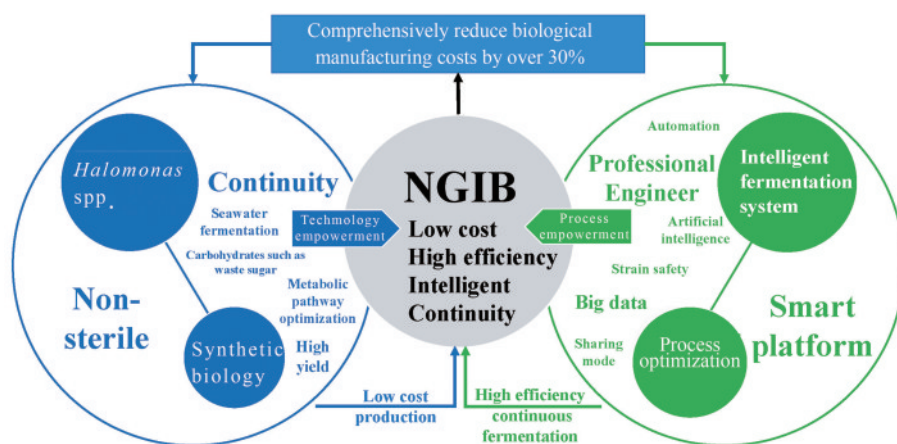
收稿日期: 2020-04-07 修回日期: 2020-05-06

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项 (2018YFA0900200)。

引用本文: 陈江楠, 陈潇宁, 刘心怡, 万薇, 章义鑫, 张自豪, 郑逸飞, 郑陶然, 王宣, 王子瑜, 闫煦, 张旭, 吴赴清, 陈国强. 基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术[J]. 合成生物学, 2020, 1(5): 516-527

Citation: CHEN Jiangnan, CHEN Xiaoning, LIU Xinyi, WAN Wei, ZHANG Yixin, ZHANG Zihao, ZHENG Yifei, ZHENG Taoran, WANG Xuan, WANG Ziyu, YAN Xu, ZHANG Xu, WU Fuqing, CHEN Guoqiang. Engineering *Halomonas* spp. for next generation industrial biotechnology (NGIB)[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(5): 516-527

requires complicated sterilization procedures, high consumption of fresh water and energy, and expensive wastewater treatment processes. Therefore, it is urgent to develop the "Next Generation Industrial Biotechnology (NGIB)". The NGIB based on *Halomonas* spp. has many advantages, including: (1) energy-saving: no need for sterilization at high temperature and high pressure; (2) water-saving: use seawater instead of fresh water, and water can be recycled; (3) time-saving: production process can be continuous; (4) less investment in equipment: no need to use stainless steel fermentation system, instead, plastic, ceramics or even cement can be used as bioreactors; (5) high concentration of final product, bacteria can produce products at a high concentration; (6) simplification of separation process: increase bacterial volume or surface charge, which is conducive to gravity or self-flocculation precipitation. Based on the newly developed 'Next Generation Industrial Biotechnology', this paper systematically introduces the latest progress in recent years in the fields such as strengthening technical advantages, development of biobricks and control parts including the porin promoter library, CRISPRi, CRISPR/Cas9 gene editing system, production of new products including poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (P3HB4HB) and Bio-surfactant Protein PhaP, optimization of separation process, scale up of fermentation processes, and recycling of wastewater. With the application of synthetic biology, the efficiency of NGIB has been continuously improved, and its advantages are obvious. Nevertheless, NGIB also faces some technical challenges, particularly treatment of salt containing wastewater. NGIB will further improve the recycling strategy of high salt wastewater, develop control modules under high cell density fermentation conditions, strengthen the design of low-cost substrate utilization ways, expand the scale and application fields, and achieve the mass production of various chemicals. The continuous improvement of NGIB will provide strong support for the competitiveness of green bio-manufacturing.



**Keywords:** next generation industrial biotechnology; *Halomonas* spp.; biological manufacturing; fermentation industry; PHB; bioplastics; PHA

化学工业在过去几十年里为人类社会带来了巨大的福利，但随着社会的进步，化学工业导致的环境污染、资源枯竭等问题引起越来越多的关注，可持续发展的呼声不断增多<sup>[1-2]</sup>。工业生物技术（industrial biotechnology）是指通过微生物发酵或无细胞生物催化，在温和的条件下将原材料转化为所需的化学物质、材料和能源

的技术，它可以有效缓解环境污染问题，实现可持续发展<sup>[3-4]</sup>。但现有工业生物技术存在许多缺点：易发生微生物污染，对生物反应器、操作人员、发酵条件和发酵程序要求十分严格，微生物生长缓慢，原材料价格昂贵，底物到产物的转化率低，生产过程难以连续，产品分离纯化困难，消耗大量淡水和能源等<sup>[5]</sup>。这些缺

点导致工业生物技术生产成本较高,无法与以低廉的石油为基础的传统化学工业竞争<sup>[6-7]</sup>。因此,迫切需要开发能够克服这些缺点的新型工业生物技术。

下一代工业生物技术(next generation industrial biotechnology, NGIB)是一种低成本生物加工技术,其核心是利用生长在特殊环境中的极端微生物,如嗜盐菌、嗜酸菌、嗜碱菌、嗜冷菌、嗜热菌等作为底盘细胞建立的开放、无灭菌的连续发酵生产体系<sup>[8-10]</sup>。由于这些微生物在极端环境下仍能快速生长,可以避免杂菌污染对发酵培养的干扰。盐单胞菌(*Halomonas* spp.)在高盐和碱性环境中能够快速生长,这为限制杂菌生长提供了双重保证。以盐单胞菌为基础开发的下一代工业生物技术可以有效节约淡水和能源、降低发酵过程的复杂性和生产成本(图1)<sup>[9]</sup>。此外,多种盐单胞菌的全基因组测序已经完成<sup>[11-15]</sup>,为这些物种的合成生物学和代谢工程改造和研究奠定了生物信息学基础。研究人员已开发了适用于盐单胞菌的多种基因编辑工具和调控元件,以快速获得优良的目标性状<sup>[16]</sup>。基于盐单胞菌的下一代工业生物技术体系已成功用于在开放、非灭菌条件下连续生产多种聚羟基脂肪酸酯<sup>[17-18]</sup>、生物表面活性剂蛋白<sup>[19]</sup>和氨基酸<sup>[20]</sup>。基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术显示了巨大的发展潜力。

本文作者系统总结了近年来基于工程化盐单

胞菌的下一代工业生物技术在各个方面取得的进展和突破,同时为进一步的研究提供良好的理论支撑。

## 1 下一代工业生物技术的优势

### 1.1 利用海水代替淡水

随着农业、工业和生活用水量的不断增加,全球可用淡水资源急剧下降<sup>[21]</sup>。传统工业生物技术的底盘细胞如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、假单胞菌、罗氏真氧菌以及酵母等发酵过程需要消耗大量珍贵的淡水,使水资源短缺问题更加严重。而全球水资源中97%以上为海水,却没有得到充分的利用<sup>[22]</sup>。开发能够利用海水的新型底盘细胞对节约淡水资源具有重要意义<sup>[23-24]</sup>。

盐单胞菌生活在深海、盐湖等高盐环境中,天然条件下可合成聚羟基脂肪酸酯(PHA)<sup>[24]</sup>、果聚糖<sup>[25]</sup>、胞外多糖<sup>[26]</sup>、四氢吡啶<sup>[27]</sup>、胞外聚合物(EPS)<sup>[28]</sup>等多种化合物。盐单胞菌*Halomonas bluephagenesis*(*H. bluephagenesis*)是清华大学陈国强团队<sup>[29]</sup>从新疆艾丁湖中分离出来的,该菌株可在不灭菌条件下,在海水中生长数周至数月不被污染。近年来,利用海水进行发酵生产盐单胞菌已被成功开发。Tan等<sup>[29]</sup>利用该菌株在含60 g/L NaCl

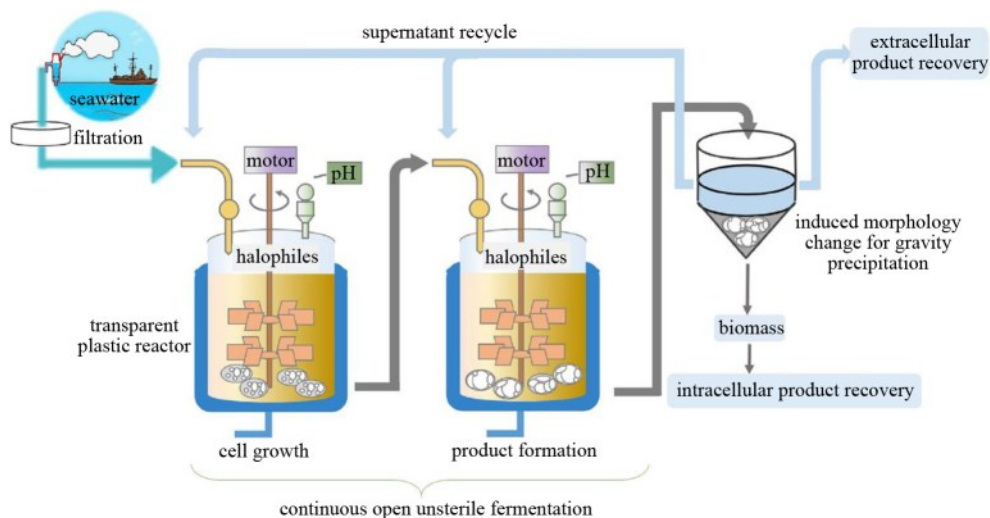


图1 基于盐单胞菌的下一代工业生物技术的流程<sup>[9]</sup>

Fig. 1 Process of next generation industrial biotechnology based on *Halomonas* spp.<sup>[9]</sup>

的发酵培养基中经56 h的补料分批发酵生产聚3-羟基丁酸(PHB)。此外,盐单胞菌*H. campaniensis* LS21重组菌株在实验室人工海水(27 g/L NaCl)中经65 d连续开放发酵,细胞干重约65 g/L, PHB占细胞干重约70%,并且在利用模拟餐厨废料的发酵过程中,分泌到胞外的纤维素酶、淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶都保持良好的活性<sup>[30]</sup>。工程化的盐单胞菌能够利用海水迅速生长并积累产物,这对充分开发海水资源、节约淡水资源具有重要应用意义。

## 1.2 节省能量

在微生物发酵生产流程中,蒸汽灭菌和好氧发酵过程中的空压机鼓气是能量消耗最高的两大步骤<sup>[31]</sup>。盐单胞菌由于生长在高盐和碱性培养液中,直接抑制了其他微生物的生长<sup>[32]</sup>,因此可以免除灭菌步骤,进行开放发酵。另外,嗜盐菌生长快,在争夺营养物质的竞争中占据优势,从而间接抑制杂菌生长繁殖<sup>[33]</sup>。Tan等<sup>[29]</sup>对高盐和碱性培养基中的培养物定期进行菌落计数和PCR污染测试,结果显示培养48 h后杂菌细胞干重仍少于3.5 g/L,仅为*H. bluephagenesis*数量的1/10。利用盐单胞菌作为底盘细胞避免了灭菌导致的能源消耗。

由于微生物耗氧量与所生产的生物质浓度密切相关,在发酵罐中进行高细胞密度培养时,需要向培养基中持续泵入充足的无菌氧气(或空气),这个过程增加的空气过滤流程导致了更高的能耗<sup>[34]</sup>。利用合成生物学方法对微生物进行改造,使其在低氧条件下维持正常的生长和生产效率是降低能量损耗的有效途径<sup>[35-37]</sup>。Ouyang等<sup>[38]</sup>将血红蛋白(VHb)导入盐单胞菌中,并利用双精氨酸转位酶途径(Tat)将其转运到细胞的周质空间,促进与氧气的接触和转运,使低氧条件下细胞干重提高了100%。Wu等<sup>[39]</sup>还发现,构建串联 $P_{vgb}$ 重复序列的启动子可以在低曝气或高细胞密度条件下强有力地诱导PHA合成。除了以上策略,蛋白定向进化技术广泛应用于酶性能的改造<sup>[40]</sup>。筛选能够在低氧培养环境中保持高活性的突变,从而降低对氧气的需求,这是更加节能的方式之一,也是下一步研究的重点方向。

## 1.3 从灭菌不连续的批次发酵到开放连续发酵转变

连续发酵是指以一定的速度向发酵罐内不断添加新鲜培养基,同时以相同速度流出培养液,使发酵罐内液体量维持恒定的发酵过程<sup>[41]</sup>。相比分批发酵,连续发酵工艺将产生巨大的经济效益,包括:①避免间歇发酵中重复清洗和灭菌步骤,减少了人力、能量和时间消耗;②延长微生物指数增长时间,促进产物积累;③采用连续收获分离,降低了底物或产物的抑制作用<sup>[42]</sup>。虽然连续发酵具有这些优势,但由于长时间培养增加了污染的概率,普通微生物进行连续发酵存在较大风险。

盐单胞菌由于培养基中高盐和碱性环境可有效抑制杂菌生长,是开发连续发酵工艺的理想底盘细胞。Tan等<sup>[29]</sup>在*H. bluephagenesis*中建立了连续培养体系,并进行了为期14 d的不灭菌连续发酵培养。该体系包括两个发酵罐,第1发酵罐为MM-G培养基,培养条件为37 °C、pH 9.0和50%溶解氧浓度(DO),24 h后细胞干重达40 g/L, PHB含量达60%,此时将第1发酵罐中的培养物连续泵送到第2发酵罐中,并在无氮源的培养基继续培养,第2发酵罐中的细胞干重在20 g/L左右, PHB水平保持在细胞干重的65%~70%。培养物泵出和培养液补充同时进行,保持发酵罐中培养物体积恒定。第2发酵罐中的培养物经分离后上清可继续用于配制第1或第2发酵罐的培养基,从而循环使用。经测定,第1发酵罐的葡萄糖转化率在20%~30%,第2发酵罐的葡萄糖转化率在50%以上。

Yue等<sup>[30]</sup>利用盐单胞菌*H. campaniensis* LS21进行了连续65 d的流加发酵培养未发生杂菌污染,重组菌产生的PHB大约占干重的70%,而野生型产生的PHB大约占干重的26%,重组质粒在整个流加发酵过程中稳定存在。

Ling等<sup>[43]</sup>对盐单胞菌的沉降性能进行了优化,获得了1 min内即可自动絮凝沉降的突变菌株,以此为基础进行了连续发酵培养,并进行了对比研究。在连续培养过程中,菌体移除后无需灭菌和接种,上清液可再次用于下一批的生长,在120 h的连续过程中,絮凝细胞被收集了4次,菌株细胞干重和PHB的产率分别从单次发酵的0.45 g/(L·h)和0.18 g/(L·h)提高到连续发酵的0.82 g/(L·h)和0.33 g/(L·h),

几乎是批量生产的两倍<sup>[43]</sup>。这些结果表明无废水工艺不仅减少废水排放,而且在一定时间内增加了细胞生长和产品形成效率。

#### 1.4 简化发酵过程与使用低成本原料

发酵过程的复杂程度直接影响生产效率和生产成本<sup>[44]</sup>。盐单胞菌由于生长在高盐和碱性环境中,可以有效抑制杂菌生长,因此发酵过程可以免除发酵设备、培养基和空气的灭菌程序,使发酵过程大大简化。由于不需要灭菌,发酵装置也不需要价格昂贵的不锈钢材料,可以用成本低廉的塑料甚至水泥发酵装置<sup>[9]</sup>。通过培育具有自絮凝特性的菌株,简化了后期菌体分离工艺,也可简化后期分离过程<sup>[43]</sup>。盐单胞菌作为下一代工业生物技术的底盘细胞,已经体现出了巨大的优势与潜力,未来通过改进发酵流程与发酵工艺,使用更低成本的发酵原料,将会进一步降低成本,提高盐单胞菌在绿色生物制造方面的优势。

盐单胞菌 *H. bluephagenesis* 可以利用葡萄糖、果糖、蔗糖、甘油等多种化合物作为底物生长进行培养<sup>[45]</sup>。为进一步降低底物成本,研究人员对厨余

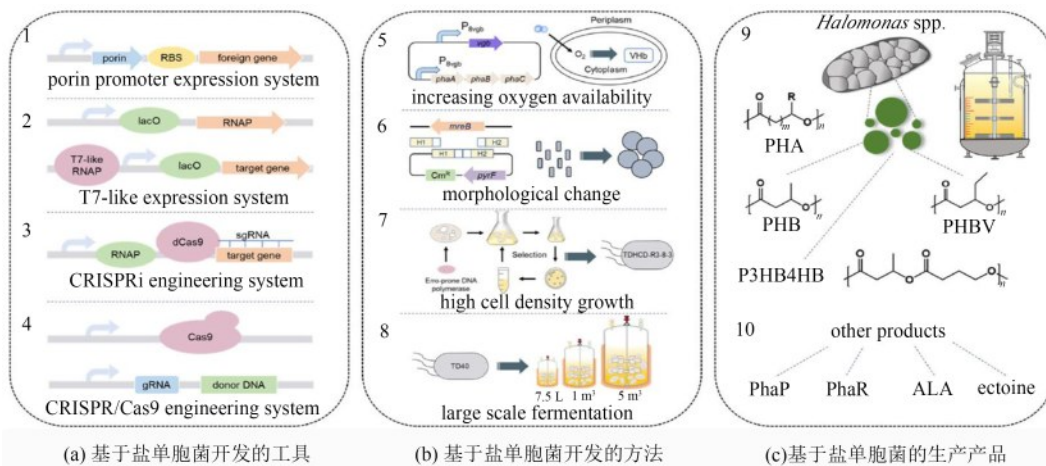
垃圾作为碳源进行了研究。Yuc等<sup>[30]</sup>利用与厨房垃圾相似的混合基质,包括可溶性和不溶性纤维素、蛋白质、脂肪、脂肪酸和淀粉等对盐单胞菌进行培养,发现菌株 *H. campaniense* LS21能产生约70%的PHB。据测算,利用嗜盐菌构建的开放连续培养工艺,碳源转化率增加了40%,PHB生产成本控制在1.4万元/吨,只有 *Escherichia coli* 成本的一半<sup>[42]</sup>。

近年来,农产品加工的废弃物如去油米糠、水稻碾米水等被用作低廉底物进行PHA等化合物生产<sup>[46-47]</sup>,开拓新兴低廉底物也是下一代工业生物技术的重要研究方向。

## 2 下一代工业生物技术开发和利用

### 2.1 盐单胞菌生物元件与调控工具开发

为对嗜盐菌进行调控和改造,许多调控工具、元件相继被开发出来<sup>[5]</sup> [图2(a)、(b)]。Fu等<sup>[48]</sup>建立了质粒接合转化到嗜盐菌中的方法,并利用自杀载体 pRE1126I-SceI 建立了无标记的基因敲除技术。Tan等<sup>[45]</sup>在高拷贝质粒 pSEVA341 中连入



**图2** 盐单胞菌 *H. bluephagenesis* 中已开发的下一代分子生物技术工具 (a)、方法 (b) 和合成的多种产物 (c)<sup>[5]</sup>  
1—Porin 启动子表达系统; 2—T7-like 诱导表达系统; 3—CRISPRi 基因编辑系统; 4—CRISPR/Cas9 基因编辑系统; 5—提升氧气利用率; 6—形态工程改造; 7—高密度生长; 8—大规模发酵; 9—PHA 产品类型 (PHB、PHBV 和 P3HB4HB); 10—其他产品类型 (PhaP, PhaR, ALA 和 ectoine)  
gRNA—向导 RNA; PHBV—聚(3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯); RBS—核糖体结合位点; sgRNA—单链向导 RNA; VHb—透明颤菌血红蛋白

**Fig. 2** Engineering halophilic *Halomonas* spp. for NGIB tools (a), methods (b) and production of multiple products (c)

1—Porin promoter expression system; 2—T7-like expression system; 3—CRISPRi engineering system; 4—CRISPR/Cas9 engineering system;

5—increasing oxygen availability; 6—morphology engineering; 7—high-cell-density growth; 8—large-scale fermentation;

9—PHA product types (PHB, PHBV, and P3HB4HB); 10—other products (PhaP, PhaR, ALA, and ectoine)

gRNA—guide RNA; PHBV—poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); RBS—ribosome binding site;

sgRNA—single-guide RNA; VHb—*Vitreoscilla hemoglobin*

LacI<sup>q</sup>-P<sub>lac</sub>系统实现嗜盐菌中多个基因的诱导表达。为实现外源基因的稳定整合和表达, Yin等<sup>[49]</sup>开发了基于强表达的 *porin* 基因的染色体表达系统。Li等<sup>[50]</sup>通过对 *porin* 基因启动子-35至-10区间进行突变, 构建了转录活性变化达310倍的组成型启动子库, 并通过将 lac 元件整合到核心启动子区, 构建了诱导率大于200倍的可诱导启动子库。Shen等<sup>[51]</sup>进一步利用 *porin* 基因启动子-10区内部及上游分别进行4碱基与3碱基的饱和突变, 构建了转录活性在40~140 000的稳定启动子库。Ouyang等将8个低氧诱导的 *vgb* 启动子串联, 获得了低氧诱导的强启动子 P<sub>vgb</sub><sup>[38]</sup>。Tao等<sup>[52]</sup>开发了盐单胞菌 CRISPRi 系统, 并成功实现了对编码细菌分裂环形成蛋白的 *ftsZ* 基因、编码2-甲基柠檬酸合成酶的 *prpC* 基因和编码柠檬酸合成酶的 *gluA* 基因可控抑制。为了控制靶基因的表达水平, Zhao等<sup>[53]</sup>成功建立3个诱导表达系统 MmP1、VP4和K1F, 基因诱导倍数达3085倍, 效率是 P<sub>lac</sub> 启动子的2.5倍。Qin等<sup>[54]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统开发了一种高效、无疤痕的盐单胞菌基因组编辑方法, 基因敲除效率最高可达100%。调控工具和调控元件的不断开发使盐单胞菌的合成生物学改造变得更加方便、更加高效。

## 2.2 重组盐单胞菌用于生产多种产品

基于盐单胞菌的下一代工业生物技术是一个广谱的生产平台, 已被成功用于合成 PHB<sup>[55]</sup>、聚(3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸)(PHBV)<sup>[45]</sup>、聚(3-羟基丁酸-co-4-羟基丁酸)(P3HB4HB)<sup>[56]</sup>、表面活性剂蛋白<sup>[19]</sup>、5-氨基乙酰丙酸(ALA)<sup>[20]</sup>等多种材料及化学品[图2(c)]。PHB是研究最多的聚羟基脂肪酸酯材料。PHB是一种热塑性材料, 性能与石油化工塑料聚乙烯和聚丙烯类似, 它具有生物惰性、生物相容性和生物可降解性, 在医学和生物医学领域有着广泛的应用前景<sup>[57]</sup>。传统菌株生产 PHB, 产量低、成本昂贵。利用盐单胞菌在实验室发酵条件下培养56 h后细胞干重达80 g/L, PHB含量达80%<sup>[29]</sup>。另外, 抑制编码柠檬酸合成酶的 *gluA* 基因, 将更多的乙酰辅酶A从三羧酸(TCA)循环引导到PHB合成途径, 使盐单胞菌中 PHB 积累增加了约8%<sup>[52]</sup>, 而提高NADH/NAD<sup>+</sup>比

值使 PHB 的积累量达到细胞干重的90%<sup>[55]</sup>。

PHBV是由3-羟基丁酸(3HB)和3-羟基戊酸(3HV)形成的共聚物, 具有良好的生物可降解性和生物相容性, 其材料物理和机械性能很大程度上取决于3HV比例<sup>[58]</sup>。在 *E. coli* 中利用葡萄糖为单一碳源, 结合柠檬酸途径和苏氨酸生物合成途径可以将 PHBV 中的3HV比例提高, 但菌株生长较差, PHBV含量较低, 而且发酵过程中还要加入昂贵的诱导剂使生产成本增加<sup>[59]</sup>。在盐单胞菌中敲除编码2-甲基柠檬酸合成酶的 *prpC* 基因, 丙酸转化为3HV单体的效率从约10%提高到近100%, 过表达苏氨酸合成途径和苏氨酸脱氢酶基因, 重组菌株 TD08 能够利用多种碳源合成 PHBV, 3HV比例在4%~6% (摩尔分数)<sup>[45]</sup>。在盐单胞菌中利用 CRISPRi 体系下调 *prpC* 基因, 获得了3HV比例在1%~13% (摩尔分数)的多种 PHBV 共聚物<sup>[52]</sup>。通过敲除 *prpC* 和琥珀酸脱氢酶组因子2编码基因 *sdhE*, 同时过表达编码甲基丙二酰辅酶A变位酶基因 *scpA*、甲基丙二酰辅酶A脱羧酶基因 *scpB* 和磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的编码基因 *ppc*, 重组菌株 TY194 细胞干重达6.3 g/L、PHBV占细胞干重65%, 3HV单体含量为25%<sup>[17]</sup>。

P3HB4HB可用于心血管、软骨和神经组织的修复以及织工程支架<sup>[60]</sup>。在 *R. eutropha* 中利用豆油和  $\gamma$ -丁内酯 (GBL) 作为碳源进行 P3HB4HB 生产的尝试, 得到了4-羟基丁酸(4HB)摩尔分数为6%~10%的共聚物<sup>[61]</sup>。提高GBL的供给可以提升共聚物中4HB的含量, 但却降低了细胞干重(CDW)和PHA产率。Chen等<sup>[56]</sup>将编码4HB-CoA转移酶的 *orfZ* 基因整合到嗜盐菌基因组中, 使菌株能够利用GBL合成4HB, 在发酵罐中培养48 h, 细胞干重超过70 g/L, P(3HB-co-12%4HB)比例达63%。利用更强的 P<sub>porin</sub> 启动子过表达 *orfZ* 基因时, 菌株在7 L发酵罐中无灭菌分批发酵50 h后, CDW超过100 g/L, 含有80%的P(3-HB-co-11%4-HB)<sup>[51]</sup>。Ye等<sup>[62]</sup>在5 m<sup>3</sup>生物反应器中进行了中试放大研究, 在数学模型和合理计算的帮助下, 生长36 h后细胞干重达100 g/L, P(3HB-co-13.5%4HB)占比60.4%。通过敲除编码琥珀酸半醛脱氢酶基因 *gabD* 减弱4HB竞争途径, 同时过表达琥珀酸半醛脱氢酶基因 *sucD*、4-羟基丁酸脱氢酶基因

*4hbD*、CoA转移酶基因 *orfZ*、2-氧葡萄糖酸脱羧酶基因 *ogdA* 促进4HB-CoA合成, 构建了以葡萄糖为唯一碳源的P3HB4HB合成菌株<sup>[18]</sup>。该菌株在7 L生物反应器中, 非灭菌条件下培养60 h细胞干重达26.3 g/L, P(3HB-co-17.04% 4HB)含量达60.5%<sup>[18]</sup>。

Lan等<sup>[19]</sup>在嗜盐菌中构建了表面活性剂蛋白PhaP的高效表达系统, 在开放发酵中得到了1.86 g/L的PhaP蛋白产量。ALA是一种重要的细胞中间代谢产物, 在许多疾病的治疗中有重要作用<sup>[63-64]</sup>, 其生物法生产也是领域内关注的重点<sup>[65]</sup>。Li等<sup>[20]</sup>在*H. bluephagenesis* TD01中构建了ALA合成途径, 产量达到635 mg/L, 同时PHB产量达到细胞干重的22%。

### 2.3 下游分离过程优化

发酵菌体分离是影响产物成本的重要因素, 常用方法有离心分离法、常规过滤法和膜过滤法等。这些方法不但需要昂贵的设备而且损耗大量能量。为简化盐单胞菌分离程序, 研究人员从增大细菌体积、增强细菌自凝絮性能等方面进行了优化, 促进细胞更方便地从培养液中分离出来。

细菌体积调控的研究最早是在大肠杆菌中展开的, 研究最多的是细胞骨架蛋白MreB和细胞分裂蛋白FtsZ<sup>[66-68]</sup>。Wang等<sup>[69]</sup>抑制*E. coli*中*ftsZ*基因, 使细胞从棒状变为丝状, PHB含量和细胞干重增加100%, 细胞静置20 min后可以自行沉降从发酵液中分离出来。Jiang等<sup>[70]</sup>删除*E. coli* JM109SG中*mreB*基因, 使细胞变为球形, 细胞尺寸增大到5~10 μm, PHB含量也显著增加。Elhadi等<sup>[71]</sup>利用CRISPRi技术同时抑制*ftsZ*和*mreB*基因表达, 产生形态各异、体积增大的细胞, 并且细胞内PHB累积量与细胞体积成正比, 约占细胞干重的40%~80%。由于*mreB*和*ftsZ*基因突变影响细菌分裂和生长, 为更好地协调生长和体积调控的关系, 急需进一步对调控策略进行优化。Jiang等首先构建*mreB*突变体, 然后将*mreB*基因连入温敏质粒再转入突变体中, 该菌株在30 °C时能够表达一定量MreB蛋白, 使细胞正常分裂生长, 但当温度升到37 °C时细胞中不再表达MreB, 细胞体积增

大, 平均长度达到5 μm; 利用相同策略, *ftsZ*基因缺失细胞的平均长度达到500 μm<sup>[59]</sup>。

除了增大细胞体积, 改变细胞表面电荷是促进细胞沉降的另一条有效途径。Ling等<sup>[43]</sup>通过敲除*H. campaniense* LS21中编码电子转移黄素蛋白的*etf*操纵子, 使细胞表面电荷降低、细胞疏水性提高, 在停止搅拌后大多数细胞在1 min内絮凝沉淀到反应器底部, 实现便捷分离。

菌体收集之后的裂解和内含物的高效分离也是下一代工业生物技术研究的重要方向。Hajnal等<sup>[61]</sup>开发了基于lambda噬菌体裂解基因SRRz和合成核糖体结合位点(RBS)新型细胞自溶系统, 当细胞生长至OD<sub>600</sub>>10, 并通过离心进一步浓缩至OD<sub>600</sub>为200时, 细胞自裂解可自发发生。Shen等<sup>[72]</sup>利用诱导型启动子在细胞平台期诱导*minC*和*minD*基因表达抑制分裂环形成, 同时删除PHA颗粒表面结合蛋白基因*phaP1*, 获得了细胞体积与PHA颗粒同时增大的菌株, PHA颗粒的尺寸最大达10 μm。增大的PHA颗粒将降低回收难度, 提高回收效率, 对简化加工过程具有重要意义。

### 2.4 发酵规模放大

基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术已经首先在PHA的大规模生产中取得突破(图3)<sup>[73]</sup>。Chen等<sup>[56]</sup>在盐单胞菌中构建了以葡萄糖和γ-丁内酯为底物合成P3HB4HB的工程化菌株, 在1 L和7 L发酵罐中分别进行补料分批培养, 在非无菌条件下培养48 h细胞干重超过70 g/L, P(3HB-co-12% 4HB)含量达到干重的63%。在1000 L发酵罐中, 经过48 h培养细胞干重可以达到83 g/L, P(3HB-co-16% 4HB)占比达到61%。Ye等<sup>[62]</sup>进一步利用废葡萄糖酸盐代替葡萄糖作为碳源, 使原料成本降低60%左右, 同时建立数学模型并进行合理计算用于指导补料策略和放大生产。在5000 L发酵罐中生长36 h后, CDW达到100 g/L, 含60.4% P(3HB-co-13.5% 4HB), 通过优化废玉米浆的用量, P3HB4HB含量达到74%。在嗜盐菌中通过将发酵与下游提取工艺耦合, 已成功地开发了一条稳定、连续、低成本、高效生产P3HB4HB等多种材料的开放式工艺。

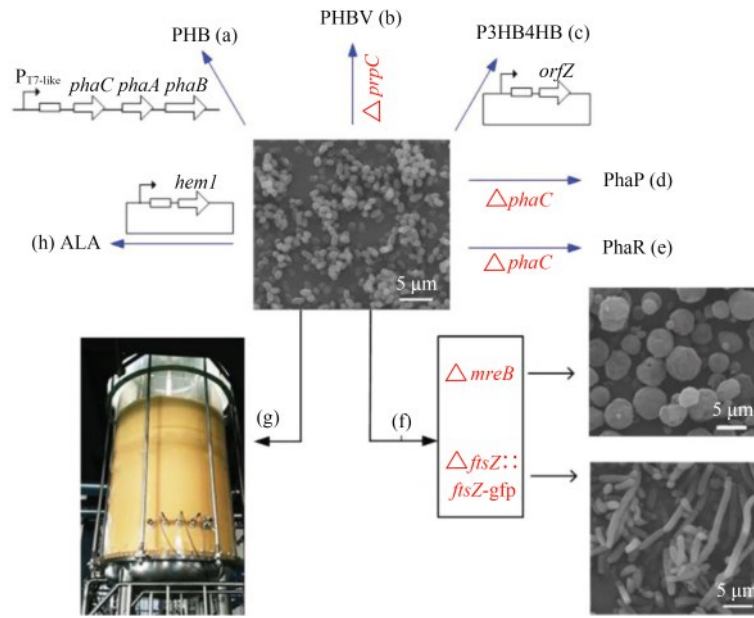


图 3 利用盐单胞菌成功合成多种不同 PHA 材料<sup>[73]</sup>

- (a) 使用 T7-like 诱导表达系统高产 PHB；(b) 利用非相关碳源在 *H. bluephagenesis* TD08 (*prpC* 基因敲除) 菌株生产 PHBV；(c) 利用  $\gamma$ -丁内酯和葡萄糖在 *H. bluephagenesis* TD40 中生产 P3HB4HB；(d) 在 *H. bluephagenesis* TD (*phaC* 敲除) 菌株中生产 PhaP 蛋白；(e) 在 *H. bluephagenesis* TD (*phaC* 敲除) 菌株中生产 PhaR 蛋白；(f) 在加大或者加长的 *H. campaniensis* LS21 中 (*mreB* 基因敲除或者 *ftsZ* 基因敲除) 生产 PHB；(g) 第一个 5000L 不灭菌开放连续塑料发酵罐，*Halomonas* spp. 在发酵罐中生长；(h) 在 *H. bluephagenesis* TD LTT22 中生产 ALA

基因：*phaC*—编码 PHA 合酶；*phaA*—编码  $\beta$ -酮硫解酶；*phaB*—编码 NADPH 依赖乙酰乙酰辅酶 A 还原酶；*prpC*—编码 2-柠檬酸甲酯合酶；*orfZ*—编码 2-柠檬酸甲酯合酶；*mreB*—编码细胞骨架蛋白；*ftsZ*—编码细胞分裂蛋白； $\Delta$ *ftsZ::ftsZ-gfp*—*gfp* 基因插入 *ftsZ* 基因的 C 端，使后者丧失功能；*hemI*—编码 ALA 合酶

Fig. 3 Engineering halophilic *Halomonas* spp. for production of multiple PHA products

- (a) Production of PHB using T7-like expression system in *H. bluephagenesis* TD-HIGH; (b) Production of PHBV in *H. bluephagenesis* TD08 (without *prpC*) in the absence of propionic acid; (c) Production of P3HB4HB in *H. bluephagenesis* TD40 using  $\gamma$ -butyrolactone and glucose as carbon sources; (d) Production of PhaP in *H. bluephagenesis* TD (without *phaC*); (e) Production of PhaR by *H. bluephagenesis* TD (without *phaC*); (f) Production of PHB by enlarged or elongated *H. campaniensis* LS21 without *mreB* and deficient *ftsZ*, respectively; (g) The first 5000L plastic fermentor used to grow *Halomonas* spp. under open unsterile and continuous conditions; (h) Production of ALA in *H. bluephagenesis* TD LTT22

Genes: *phaC*—encoding PHA synthase; *phaA*—encoding  $\beta$ -ketothiolase; *phaB*—encoding NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase; *prpC*—encoding 2-methylcitrate synthase; *orfZ*—encoding 2-methylcitrate synthase; *mreB*—encoding cytoskeleton protein; *ftsZ*—encoding cell division protein;  $\Delta$ *ftsZ::ftsZ-gfp*—a *gfp* gene was inserted into the C-terminal of *ftsZ* to destroy its function; *hemI*—encoding 5-amino-levulinic acid synthase

## 2.5 废水循环

下一代工业生物技术减少了淡水使用，但产生含盐废水。目前含盐废水处理是一个难题，常用的方法有焚烧法、蒸发法、离子交换法、吸附法、膜分离法、高级氧化法、生物法等<sup>[74-76]</sup>。无论采用哪种方法都将额外增加生产成本，因此减少含盐废水排放是下一代工业生物技术迫切需要克服的难题。Ling 等<sup>[43]</sup>探索建立了废水循环使用技

术体系，利用自凝絮菌株快速分离菌体后，在残留营养物质和发酵上清液中补充营养物质，无需再次灭菌和接种，直接用于下一批细胞的生长，同时洗涤细胞所用的水也可以被带回生物反应器中继续循环使用。利用该技术收集 4 批菌体仅产生 1 次高盐废水。这种发酵策略在降低下游处理成本的同时，还能促进细胞生长、增加 PHB 产量，进一步促进以工程化盐单胞菌为基础的下一代工业生物技术的推广应用。

### 3 结论和展望

随着盐单胞菌分子操作平台的不断完善和菌株性能的不断优化,具有开放、非灭菌、连续培养特点的下一代工业生物技术已经建立起来,并成功用于多种化学品的高效合成。相比传统工业生物技术,基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术(NGIB)具有明显优势(表1)。主要表现在:

- ①节能:无需高温高压灭菌。
- ②节水:用海水替代淡水,过程水可循环利用。
- ③节时:生产过程可连续。
- ④设备投资少:无需使用不锈钢发酵系统,转而使用便宜的塑料、陶瓷甚至水泥罐体或管道等。
- ⑤产物终浓度高:细菌在高密度下进行产品合成。
- ⑥分离过程简化:增大细菌体积或表面电荷,利于重力或自凝絮沉淀。

现阶段NGIB还面临一些技术难点,主要包括含盐废水的处理及对设备可能造成的腐蚀问题、菌株遗传操作过程复杂问题和高密度下基因诱导表达成本高问题。为减少含盐废水排放,对底盘细胞进行筛选,获得了自凝絮底盘菌株,以此为基础建立了连续培养系统,减少废水排放。但目

前该技术只在 *H. campaniensis* LS21 中取得成功,其他嗜盐菌株的自絮凝突变还有待进一步筛选。高浓度盐对不锈钢发酵罐的腐蚀在中性或酸性环境中是一个严重问题。但对于嗜盐嗜碱菌来说,其培养基 pH 在 8.5 以上,碱性环境下金属保持在稳定状态。本文作者在山东百盛生物科技有限公司多年来一直采用嗜盐菌生产 PHA,未发现明显的发酵罐腐蚀现象。与 *E. coli* 相比,嗜盐菌的基因操作方法还不完善, *H. bluephacenes* 和 *H. campaniensis* 不能通过化学或电刺激进行质粒转化,而只能进行结合转化,增加了菌株改造的复杂性和难度。高密度发酵条件下基因诱导表达对 PHA 合成和细胞形态调控具有重要意义。目前常用的化学诱导剂价格昂贵、不同批次间稳定性差,在嗜盐菌中开发以温度、光、pH 或溶解氧等为诱导因素的诱导系统将使发酵过程中细胞生长更易控制,同时节省成本。

未来下一代工业生物技术将进一步完善高盐废水循环利用策略,优化基因操作工具,加强高密度发酵条件下调控模块开发,加强对廉价底物利用途径的设计,拓宽技术应用规模和应用领域,实现多种化学品大批量生产。NGIB 的不断完善使用将有力促进化工制造向绿色生物制造的转变,为大幅提升生物制造产品的竞争力贡献力量。

表1 下一代工业生物技术与当前工业生物技术对比<sup>[9]</sup>

Tab. 1 Next generation industrial biotechnology (NGIB) compared with current industrial biotechnology

传统工业生物技术	下一代工业生物技术	实现途径
大量消耗淡水	对淡水依赖较低	海水或者循环用水
高能耗	低能耗	无灭菌开放式发酵、提高氧气利用率
易染菌	难染菌	筛选极端微生物
高成本投资	低成本投资	低成本设备
微生物生长条件苛刻	微生物生长条件灵活	筛选极端微生物
分批发酵	连续发酵	选择不易染菌的底盘菌
细胞不易分离	分离难度小	通过形态学工程改变细胞尺寸
发酵周期长	发酵周期短	利用合成生物学加快细胞生长
一个菌种对应一种产品	多个产品的平台菌	在平台菌中构建多条代谢途径
产物在胞内或者培养基中	实现胞内和胞外产品共产	工程化获得多种产品的共产
单一碳源培养生长	混合碳源或者混合废料生长	筛选或构建消耗混合碳源的菌种
自动化程度低	自动化控制智能化	菌种适应多种生长环境
底物有效转化率低	底物有效转化率高	敲除或者减弱代谢旁路
获得胞内产物难度大	减弱细胞壁	工程化细胞壁合成机制
胞外产物产量低	胞外产物产量高	减弱外膜结构

## 参 考 文 献

- [1] 李雪静. 新形势下炼油工业发展新动向及新挑战[J]. 石化技术与应用, 2019, 37(4): 225-229.  
LI Xuejing. New trends and challenges of refining industry in the new situation [J]. Petrochemical Technology & Application, 2019, 37(4): 225-229.
- [2] 余春浩. 石油泄漏对土壤的污染[J]. 当代化工, 2019, 48(10): 2385-2387.  
YU Chunhao. Review of soil pollution in petrochemical industry [J]. Contemporary Chemical Industry, 2019, 48(10): 2385-2387.
- [3] VENKATESH A, POSEN I D, MACLEAN H L, et al. Environmental aspects of biotechnology [J]. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 2020, 173: 77-119.
- [4] OTERO J M, NIELSEN J. Industrial systems biology [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(3): 439-460.
- [5] YU Linping, WU Fuqing, CHEN Guoqiang. Next-generation industrial biotechnology - transforming the current industrial biotechnology into competitive processes [J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(9): e1800437.
- [6] CHEN Zhu, WAN Caixia. Non-sterile fermentations for the economical biochemical conversion of renewable feedstocks [J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(12): 1765-1777.
- [7] PHILP J C, RITCHIE R J, ALLAN J E. Biobased chemicals: the convergence of green chemistry with industrial biotechnology [J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(4): 219-222.
- [8] RADDADI N, CHERIF A, DAFFONCHIO D, et al. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(19): 7907-7913.
- [9] CHEN Guoqiang, JIANG Xiaoran. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 50: 94-100.
- [10] YIN Jin, CHEN Jinchun, WU Qiong, et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(7): 1433-1442.
- [11] CAI Lei, TAN Dan, AIBAUDULA G, et al. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships [J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 88.
- [12] KAWATA Y, KAWASAKI K, SHIGERI Y. Draft genome sequence of *Halomonas* sp. strain KM-1, a moderately halophilic bacterium that produces the bioplastic poly(3-hydroxybutyrate) [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(10): 2738-2739.
- [13] LIN Yanbing, FAN Haoxin, HAO Xiuli, et al. Draft genome sequence of *Halomonas* sp. strain HAL1, a moderately halophilic arsenite-oxidizing bacterium isolated from gold-mine soil [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 194(1): 199-200.
- [14] PHUNG LE T, SILVER S, TRIMBLE W L, et al. Draft genome of *Halomonas* species strain GFAJ-1 (ATCC BAA-2256) [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(7): 1835-1836.
- [15] SCHWIBBERT K, MARIN-SANGUINO A, BAGYAN I, et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T [J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(8): 1973-1994.
- [16] ZHENG Yang, CHEN Jinchun, MA Yiming, et al. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction [J]. Metabolic Engineering, 2020, 58: 82-93.
- [17] CHEN Yong, CHEN Xinyu, DU Hetong, 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.
- [18] YE Jianwen, HU Dingkai, CHE Xuemei, 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.
- [19] LAN Luhong, ZHAO Han, CHEN Jinchun, et al. Engineering *Halomonas* spp. as a low-cost production host for production of bio-surfactant protein PhaP [J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(12): 1595-1604.
- [20] LI Tian, GUO Yingying, QIAO Guanqing, et al. Microbial synthesis of 5-aminolevulinic acid and its coproduction with polyhydroxybutyrate [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(11): 1264-1274.
- [21] 杨博, 南昊. 我国水资源现状及其安全对策研究[J]. 太原学院学报(自然科学版), 2016, 34(1): 9-12.  
YANG Bo, NAN Hao. Research on the present situation of China's water resources and its security countermeasures [J]. Journal of Taiyuan University (Natural Science Edition), 2016, 34(1): 9-12.
- [22] 姜祖岩. 我国海水利用产业发展形势与存在问题分析[J]. 海洋经济, 2019, 9(1): 20-28.  
JIANG Zuyan. Analysis on the development situation and existing problems of China's seawater utilization industry [J]. Marine Economy, 2019, 9(1): 20-28.
- [23] CHEN Guoqiang. New challenges and opportunities for industrial biotechnology [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 111.
- [24] JIANG Xiaoran, YIN Jin, CHEN Xiangbin, et al. *Halomonas* and pathway engineering for bioplastics production [J]. Methods in Enzymology, 2018, 608: 309-328.
- [25] TOHME S, HACIOSMANOGLU G G, EROGLU M S, et al. *Halomonas smyrnensis* as a cell factory for co-production of PHB and levan [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118(A): 1238-1246.
- [26] JOULAK I, FINORE I, NICOLAUS B, et al. Evaluation of the production of exopolysaccharides by newly isolated *Halomonas* strains from Tunisian hypersaline environments [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 658-666.
- [27] ZHAO Qi, LI Shannan, LÜ Peiwen, et al. High ectoine production by an engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a reduced salinity medium [J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 184.

- [28] ADIMOOLAM S R, NANJAN E S, SUBRAMANIAN M, et al. Metabolic heat coherent growth of *Halomonas variabilis* (HV) for enhanced production of extracellular polymeric substances (EPS) in a bio reaction calorimeter (BioRC) [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2020, 50(1): 56-65.
- [29] TAN D, XUE Y S, AIBAI DULA G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01 [J]. Biore-source Technology, 2011, 102(17): 8130-8136.
- [30] YUE Haitao, LING Chen, YANG Tao, et al. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7: 108.
- [31] KREYENSCHULTE D, KRULL R, MARGARITIS A. Recent advances in microbial biopolymer production and purification [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2014, 34: 1-15.
- [32] DON T M, CHEN C W, CHAN T H. Preparation and characterization of poly(hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei* [J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006, 1425-1438.
- [33] JOHNSON K, JIANG Yang, KLEEREBEZEM R, et al. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(4): 670-676.
- [34] CARCAMO M, SAA P A, TORRES J, et al. Effective dissolved oxygen control strategy for high-cell-density cultures [J]. IEEE Latin America Transactions, 2014, 12(3): 389-394.
- [35] XUE Sijia, JIANG Hong, CHEN Lu, et al. Over-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) and flavohemoglobin (FHb) genes greatly enhances pullulan production [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 701-709.
- [36] MEJIA A, LUNA D, FERNANDEZ F J, et al. Improving rifamycin production in *Amycolatopsis mediterranei* by expressing a *Vitreoscilla hemoglobin* (*vhb*) gene fused to a cytochrome P450 monooxygenase domain [J]. 3 Biotechnology, 2018, 8(11): 456.
- [37] ZHANG Shumeng, WANG Jieping, WEI Yale, et al. Heterologous expression of *VHb* can improve the yield and quality of biocontrol fungus *Paecilomyces lilacinus*, during submerged fermentation [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 187: 147-153.
- [38] OUYANG Pengfei, WANG Huan, HAJNAL I, et al. Increasing oxygen availability for improving poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas* [J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 20-31.
- [39] WU Hong, WANG Huan, CHEN Jinchun, et al. Effects of cascaded *vgb* promoters on poly(hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* grown micro-aerobically [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(24): 10013-10021.
- [40] 朱晁谊, 朱牧孜, 李爽. 微生物实验室进化的研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(1): 8-14.
- ZHU Chaoyi, ZHU Muzi, LI Shuang. Research progress in microbial laboratory evolution [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(1): 8-14.
- [41] 贝泓涵, 张立卫, 孙菁. 微生物连续发酵过程线性反馈最优控制[J]. 大连理工大学学报, 2018, 58(3): 324-330.
- BEI Honghan, ZHANG Liwei, SUN Jing. Linear optimal feedback control in continuous culture of microbial fermentation [J]. Journal of Dalian University of Technology, 2018, 58(3): 324-330.
- [42] LI Teng, CHEN Xiangbin, CHEN Jinchun, et al. Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy [J]. Biotechnology Journal, 2014, 9(12): 1503-1511.
- [43] LING Chen, QIAO Guanqing, SHUAI Bowen, et al. Engineering self-flocculating *Halomonas campaniensis* for wastewaterless open and continuous fermentation [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 116: 805-815.
- [44] 邓姗, 任元元, 周远洁. 浅谈工业化发酵产品成本工艺控制关键[J]. 食品与发酵科技, 2019, 55(2): 78-80.
- DENG Shan, REN Yuanyuan, ZHOU Yuanjie. Key points of cost control in industrial fermentation products [J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2019, 55(2): 78-80.
- [45] TAN Dan, WU Qiong, CHEN Jinchun, et al. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates [J]. Metabolic Engineering, 2014, 26: 34-47.
- [46] SABAPATHY P C, DEVARAJ S, PARTHIPAN A, et al. Polyhydroxyalkanoate production from statistically optimized media using rice mill effluent as sustainable substrate with an analysis on the biopolymer's degradation potential [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 977-986.
- [47] AL-SHORGANI N K N, AL-TABIB A I, KADIER A, et al. Continuous butanol fermentation of dilute acid-pretreated deoiled rice bran by *Clostridium acetobutylicum* YM1 [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 4622.
- [48] FU X Z, TAN D, AIBAI DULA G, et al. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals [J]. Metabolic Engineering, 2014, 23: 78-91.
- [49] YIN Jin, FU Xiaozhi, WU Qiong, et al. Development of an enhanced chromosomal expression system based on *porin* synthesis operon for halophile *Halomonas* sp. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(21): 8987-8997.
- [50] LI Tingting, LI Teng, JI Weiyue, et al. Engineering of core promoter regions enables the construction of constitutive and inducible promoters in *Halomonas* sp. [J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(2): 219-227.
- [51] SHEN Rui, YIN Jin, YE Jianwen, et al. Promoter engineering for enhanced P(3HB-co-4HB) production by *Halomonas bluephagenesis* [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(8): 1897-1906.
- [52] TAO Wei, LV Li, CHEN Guoqiang. Engineering *Halomonas* species TD01 for enhanced polyhydroxyalkanoates synthesis via CRISPRi [J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 48.
- [53] ZHAO Han, ZHANG Haoqian M, CHEN Xiangbin, et al. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas* [J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 128-140.
- [54] QIN Qin, LING Chen, ZHAO Yiqing, et al. CRISPR/Cas9 edit-

- ing genome of extremophile *Halomonas* spp. [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 219-229.
- [55] LING Chen, QIAO Guanqing, SHUAI Bowen, et al. Engineering NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in *Halomonas bluephagenesis* for enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHA) [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 275-286.
- [56] CHEN Xiangbin, YIN Jin, YE Jianwen, et al. Engineering *Halomonas bluephagenesis* TD01 for non-sterile production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 534-541.
- [57] PENA C, CASTILLO T, GARCIA A, et al. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work [J]. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(4): 278-293.
- [58] RIVERA-BRISO A L, SERRANO-AROCA A. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): enhancement strategies for advanced applications [J]. *Polymers (Basel)*, 2018, 10(7): 732.
- [59] JIANG Xiaoran, YAO Zhihao, CHEN Guoqiang. Controlling cell volume for efficient PHB production by *Halomonas* [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 30-37.
- [60] 车雪梅, 司徒卫, 余柳松, 等. 聚羟基脂肪酸酯的应用展望 [J]. *生物工程学报*, 2018, 34(10): 1531-1542.  
CHE Xuemei, SITU Wei, YU Liusong, et al. Application perspectives of polyhydroxyalkanoates [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(10): 1531-1542.
- [61] HAJNAL I, CHEN X B, CHEN G Q. A novel cell autolysis system for cost-competitive downstream processing [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(21): 9103-9110.
- [62] YE Jianwen, HUANG Wuzhe, WANG Dongsheng, et al. Pilot scale-up of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Halomonas bluephagenesis* via cell growth adapted optimization process [J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(5): e1800074.
- [63] ZHANG C R, BOOP F A, RUGE J. The use of 5-aminolevulinic acid in resection of pediatric brain tumors: a critical review [J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2019, 141(3): 567-573.
- [64] WAINWRIGHT J V, ENDO T, COOPER J B, et al. The role of 5-aminolevulinic acid in spinal tumor surgery: a review [J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2019, 141(3): 575-584.
- [65] KANG Zhen, DING Wenwen, GONG Xu, et al. Recent advances in production of 5-aminolevulinic acid using biological strategies [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(11): 200.
- [66] BISSON A W, HSU YEN-PANG, SQUYRES G R, et al. Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division [J]. *Science*, 2017, 355(6326): 739-743.
- [67] HUSSAIN S, WIVAGG C N, SZWEDZIAK P, et al. MreB filaments align along greatest principal membrane curvature to orient cell wall synthesis [J]. *eLife*, 2018, 7: e32471.
- [68] SHI H D, BRATTON B P, GITAI Z, et al. How to build a bacterial cell: MreB as the foreman of *E. coli* construction [J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1294-1305.
- [69] LIU Yunqi, YIN Shengli, WANG Yujie, et al. Effect of high porosity on biodegradation of poly (4-hydroxybutyrate) *in vivo* [J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2014, 28(7): 1105-1112.
- [70] JIANG Xiaoran, WANG Huan, SHEN Rui, et al. Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 227-237.
- [71] ELHADI D, LV L, JIANG X R, et al. CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 358-369.
- [72] SHEN Rui, NING Zhiyu, LAN Yuxuan, et al. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis* [J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 117-126.
- [73] ZHANG Xu, LIN Yina, CHEN Guoqiang. Halophiles as chassis for bioproduction [J]. *Advanced Biosystems*, 2018, 2: 1-12.
- [74] 陈则立, 李彤, 朱华静. 阳离子交换膜在高盐废水处理中的应用 [J]. *膜科学与技术*, 2019, 39(5): 136-142.  
CHEN Zeli, LI Tong, ZHU Huajing. Application of cation exchange membrane in the treatment of high-salt wastewater [J]. *Membrane Science and Technology*, 2019, 39(5): 136-142.
- [75] 曹美玲, 李海, 刘佛财, 等. 高盐有机废水的处理与研究进展 [J]. *有色金属科学与工程*, 2019, 10(3): 92-98.  
CAO Meiling, LI Hai, LIU Focai, et al. Recent development in the treatment process for high salt organic wastewater [J]. *Non-ferrous Metals Science and Engineering*, 2019, 10(3): 92-98.
- [76] 李俊虎, 周珉, 王乔, 等. 高盐废水处理工艺最新研究进展 [J]. *环境科技*, 2018, 31(4): 74.  
LI Junhu, ZHOU Min, WANG Qiao, et al. The latest progress of treatment technology for high salinity wastewater [J]. *Environmental Science and Technology*, 2018, 31(4): 74.



通讯作者: 陈国强(1963—),男,博士,教授,主要从事微生物聚羟基脂肪酸酯(PHA)的合成、代谢和应用研究。  
E-mail: chengq@tsinghua.edu.cn



通讯作者: 吴志清(1978—),男,博士,副研究员,主要从事PHA合成调控研究。  
E-mail: wufuqing@tsinghua.edu.cn

除了通讯作者,其他作者贡献相同。