

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-024

重编程微生物底盘用于PHA材料的定制化低成本生物合成

陈国强¹, 谭丹²

(¹ 清华大学生命科学学院, 化学工程系, 合成与系统生物学中心, 北京 100084; ² 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049)

摘要: 合成生物学为新材料合成提供了无限可能, 将为材料学带来变革性影响。环境友好型材料聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 作为合成生物学与材料学深度融合的产物, 是微生物胞内合成一类线性高分子聚酯, 被认为可部分替代传统化学塑料。PHA 含有至少 150 种单体, 其组成、结构及性能的多样性带来了广泛的应用前景, 形成了 PHA 家族或组学。PHA 在学术界和产业界已深入研究了 30 多年, 其中个别 PHA 材料已实现了商业化生产。利用合成生物学和代谢工程重新编程高性能微生物底盘细胞, 并控制不同前体底物比例, 可实现具有不同结构和性能的 PHA 材料的定制化合成。下一代工业生物技术是基于嗜盐微生物的节能节水的连续无灭菌开放式工业发酵工艺, 能大幅度降低生产成本, 更推动了 PHA 材料的低成本规模化生产。本文就 PHA 家族的组成以及工程化微生物底盘利用下一代工业生物技术高效低本地合成多样化的 PHA 材料方面的进展做一简要综述, 将重点介绍 PHA 家族的单体组成、材料性能和包含塑料、医用、能源、智能材料等领域的 PHA 应用价值链, 以及重编程的假单胞菌和嗜盐单胞菌在 PHA 定制化低成本合成中的一些工程化技术和成果、产业化应用情况, 并针对如何进一步降低生产成本及提高材料性能进行探讨。本文对基于合成生物学的生物材料定制化合成研究有重要参考价值。

关键词: 聚羟基脂肪酸酯; 聚 3-羟基丁酸酯; 定制化材料; 嗜盐单胞菌; 下一代工业生物技术; PHA 组学

中图分类号: Q819 文献标志码: A

Reprogramming microbial chassis for low-cost bioproduction of tailor-made polyhydroxyalkanoates

CHEN Guo-Qiang¹, TAN Dan²

(¹ School of Life Sciences, Center for Synthetic and Systems Biology (CSSB), Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ² Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China)

Abstract: Synthetic biology offers boundless possibilities and revolutionary changes to material fields. One remarkable outcome of interdisciplinary integration of synthetic biology and material science is the development of

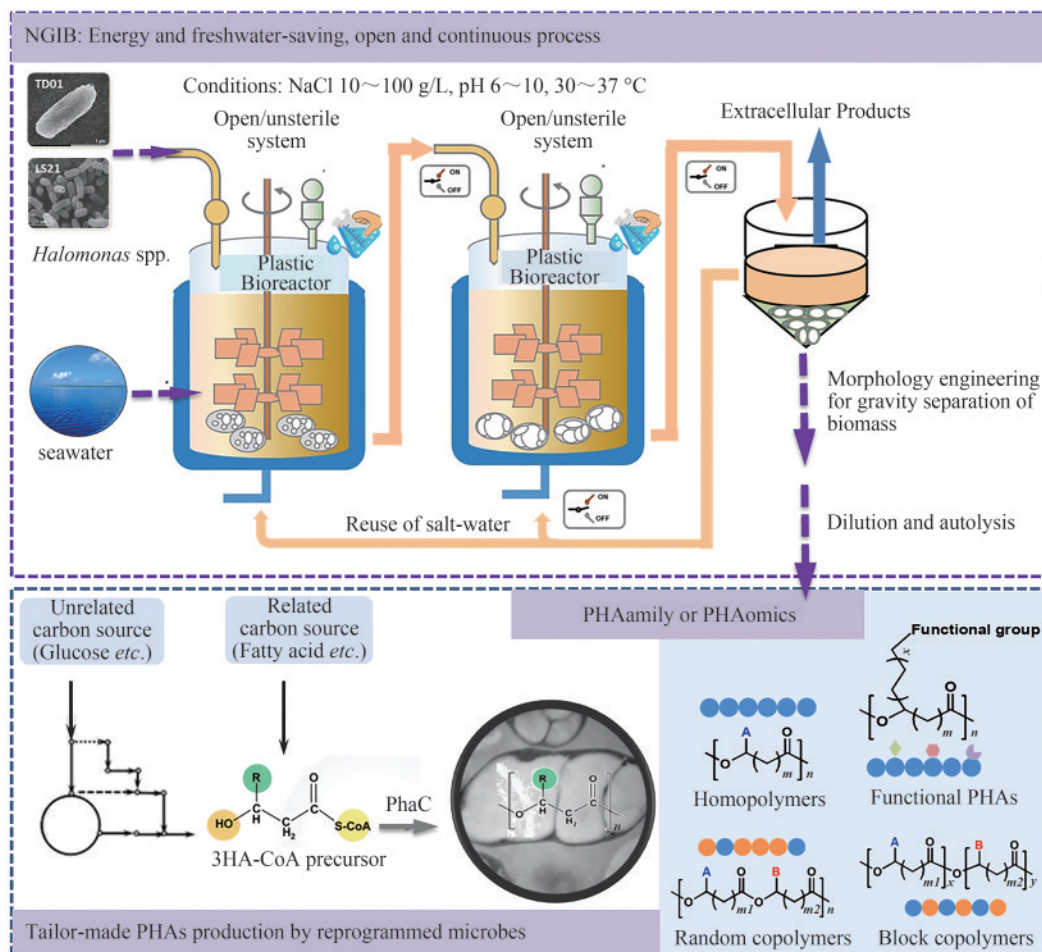
收稿日期: 2024-03-19 修回日期: 2024-06-08

基金项目: 国家自然科学基金 (32130001); 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项 (2018YFA0900200)

引用本文: 陈国强, 谭丹. 重编程微生物底盘用于 PHA 材料的定制化低成本生物合成[J]. 合成生物学, 2024, 5(5): 1211-1226

Citation: CHEN Guo-Qiang, TAN Dan. Reprogramming microbial chassis for low-cost bioproduction of tailor-made polyhydroxyalkanoates [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(5): 1211-1226

environmentally friendly polyhydroxyalkanoates (PHAs), which serve as ideal alternatives to petroleum-based plastics. PHAs are a family of linear biopolyesters synthesized by various microorganisms as their intracellular storage materials for energy and carbon sources. With at least 150 various monomers, PHAs exhibit diverse structures, material properties, and applications, collectively known as “PHAomics”. When reprogramming microbial genomes *via* synthetic biology and metabolic engineering, in combination with the feeding of special precursors, tailor-made PHAs with defined structures and varied properties can be synthesized. PHAs has been extensively studied in both academia and industry in the last few decades, leading to the commercialization of some PHAs. Next generation industrial biotechnology (NGIB) based on halophilic *Halomonas* spp. as chassis has been developed to overcome the limitations of current industrial biotechnology. NGIB offers a long lasting, open and continuous, energy and freshwater-saving bioprocess using low-cost mixed substrates and allows morphology engineering for simplified downstream processing. NGIB facilitates low-cost production of various PHAs in large scale. This review introduces PHAomics and summarizes the diverse properties of PHAs produced *via* NGIB. It primarily focuses on the composition, structure, and material properties of PHAs, as well as their extensive applications in biodegradable plastics, medical implants, medicine, drug delivery carriers, energy sources, and potential smart materials. Additionally, it covers the strategies and tools for strain engineering and their achievements in the tailor-made biosynthesis of PHA using reprogrammed *Pseudomonas* spp. and *Halomonas* spp. Finally, this review discusses strategies on how to further reduce the production cost and improve material properties of PHAs. This review summarizes the progresses on the low-cost customized synthesis of PHA biomaterials by synthetic biology, demonstrating the integration of biology and chemistry.



Keywords: PHA; PHB; tailor-made materials; *Halomonas*; NGIB; PHAomics

生物细胞作为一个微型细胞工厂，能合成许多常规化学催化无法合成的手性化合物和高分子材料等，为各类化学品的合成提供了一种条件温和、绿色环保、可持续的策略^[1]。聚羟基脂肪酸酯（PHA）是微生物胞内合成的一类结构异常丰富的线性高分子聚酯（PHAmily 或 PHAomics）^[2]，具有良好的生物可降解性和生物相容性。由于限塑令的颁布及碳中和政策的推广，环境友好型材料PHA得到产业界和学术界的深入研究，PHA被认为可部分替代包括聚乙烯（PE）、聚丙烯（PP）和聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET）在内的传统化学塑料，以解决全球日益严重的塑料污染问题^[1, 3-5]。PHA材料的组成和性能多样，很难用化学合成，其生物合成已研究了30年，其中个别PHA材料已实现了商业化生产^[1, 6]。本文将就PHA的组成、性能和应用，以及工程化的微生物细胞工厂如何利用下一代工业生物技术，高效低成本地定制化合成丰富PHA材料做一综述。

1 聚羟基脂肪酸酯PHA简介

1.1 PHA的组成与结构

PHA是由至少150种3-羟基脂肪酸（3HA）单体构成的结构多样的聚合物，自然界中多种微生物具有PHA的合成能力，含量甚至高达细胞干重的90%以上，其分子量范围从 5×10^4 到 2×10^7 ^[6]。PHA单体均为R构型，侧链R基团不同，构成PHA的单体不同。当R为甲基时，PHA为聚3-羟基丁酸酯（PHB），是发现最早、研究最透彻的PHA分子^[7]。根据单体大小，PHA可分为短链PHA（SCL PHA，由2~5个碳原子的单体组成），以及中长链PHA（MCL PHA，含有 $C_6 \sim C_{14}$ 的单体）^[8]。根据单体种类和聚合方式，可将PHA分为均聚物和共聚物两类：前者只有一种单体，后者含两种或两种以上的单体，其中共聚物又分为性质明显不同的随机共聚物和嵌段共聚物^[9]。R基团还可被双键、三键、环氧基、羰基、氰基、苯基或卤素基团等取代，产生结构和性质多样的功能化PHA^[10-11]（图1）。PHA的这些微观结构的组合

提供了无穷无尽的结构、功能和性质的变化，被称为PHAmily或PHAomics（PHA家族或组学）^[2]，产生了一些优于传统化学塑料的材料性能。

结构差异大的PHA通常由不同的微生物来合成，不同微生物的培养方法、培养条件以及基因工程改造都不一样，而大规模生产PHA是一个长期的、昂贵的、多学科交叉的复杂过程^[13-14]。下一代工业生物技术出现之前，并没有统一的生产PHA的方法和技术^[15]。

1.2 PHA的性质

PHA的单体组成和结构多样，导致PHA具有了从坚硬质脆的硬塑料到柔软的弹性塑料等不同的材料学性质^[1, 11-12, 16]。表1列出了几种代表性PHA与传统塑料的材料性能对比。其中PHB结构最简单，结晶度高、硬度高、强度大，但柔韧性差，导致PHB不容易加工成型，限制了其应用范围。当PHB共聚物中掺入3-羟基戊酸（3HV）单体，3-羟基丁酸戊酸共聚酯（PHBV）的结晶结构发生变化，硬度、强度和熔点下降，但弹性有所提高。短链PHA呈现出硬晶体性质，而中长链PHA是具有热塑性的弹性体，硬度低，柔韧性好，但结晶速率非常慢且熔融温度低（一般 $39 \sim 61 \text{ }^\circ\text{C}$ ），这些特点也严重限制了其应用^[12]。研究表明，含3-羟基丁酸（3HB）和少量中长链3-羟基脂肪酸（3HA）的PHA共聚物，熔点和结晶速率较PHB下降不多，而韧性和弹性大幅提高，具有更好的材料性能^[10, 17]，是定制多种PHA材料的研究重点。

1.3 PHA的应用

由于PHA具有与传统塑料非常相似的材料学性质，在很多场景可代替传统的聚乙烯和聚丙烯；同时PHA具有传统塑料所不可比拟的生物可降解性和生物相容性^[18]，因此具有更广泛的应用前景，并逐步形成了PHA产业价值链^[6, 19-20]（图1）。PHA材料具有疏水性、气体阻隔性和无毒性的特点，使其比传统塑料更适合用于制造一次性食品包装用品，还可被加工成高质量纺织品和农用覆盖膜等。PHA已被广泛应用于医药领域数十年，

表1 几种典型PHA和传统塑料的性能对比^[12]Table 1 Comparison of material properties between typical PHAs and traditional plastics^[12]

聚合物类型 Polymer type	熔融温度(T_m)/°C Melting temperature/°C	玻璃化转变温度(T_g)/°C Glass transition temperature/°C	拉伸强度/MPa Tensile strength/MPa	断裂伸长率/% Elongation at break/%
PHB	178	4	43	5
P(3HB-20% 3HV)	145	-1	20	50
P(3HB-17% 3HHx)	120	-2	20	850
P(4HB)	58	-48	104	1000
P(3HB-45% 4HB)	162	-16	3	268
P(3HP)	78.1	-17.9	33.8	497.6
P(7% 3HHx-3HO)	61	-37.8	7.4	346.3
P(10% 3HHx-86% 3HO-4% 3HD)	61	-35	10	300
PP	186	-10	38	400
PET	262	—	56	8300
HDPE	135	—	29	—

注：PP—聚丙烯；PET—聚对苯二甲酸乙二醇酯；HDPE—高密度聚乙烯；PHB—聚3-羟基丁酸酯；3HB—3-羟基丁酸，3HV—3-羟基戊酸，3HHx—3-羟基己酸；4HB—4-羟基丁酸；3HP—3-羟基丙酸；3HO—3-羟基辛酸；3HD—3-羟基癸酸。

PHA 聚合物括号中表示单体种类，一种单体表示均聚物，两种及以上单体表示共聚物，数字表示单体的不同摩尔比例。

2 重编程工程菌用于PHA的定制化生物合成

2.1 PHA的生物合成

PHA生物合成大体上可分为两个步骤(图2)^[11-12, 17]：通过结构相关碳源或不相关碳源的胞内代谢产生3-羟脂酰辅酶A(3HA-CoA)前体，然后在PHA合酶催化下聚合成PHA。结构相关碳源一般具有与目标单体相似的分子结构，并通过简单的转化步骤转化为相应的3HA-CoA。目前鉴定出的PHA单体中大多数需要添加相关的前体或碳源以获得3HA-CoA。结构不相关碳源，一般可通过天然途径如糖酵解、三羧酸(TCA)循环、脂肪酸生物合成和降解、氨基酸生物合成等，或改造后的天然途径获得用于生产PHA的前体。经典的PHA生物合成途径包括糖酵解产生的乙酰辅酶A介导(图2途径I)、 β -氧化循环介导(途径II)及脂肪酸从头合成介导(途径III)；此外，生物体内还存在着其他较为少见和工程化的合成途径，主要是由相关碳源以及三羧酸循环的中间物合成PHA的路径(如2-羟基-3-甲基戊酸酯等不常见PHA单体)^[12]。

多种野生型和工程化菌株已用于生产结构和性能多样的PHA材料^[20, 40-41]。产碱弧菌(*Alcaligenes*

latus)^[42]、罗氏真养杆菌(*Ralstonia eutropha*)^[43-44]和嗜盐单胞菌(*Halomonas spp.*)^[45]主要用于生产短链PHA，而*R. eutropha*和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)则用于生产短链中长链共聚酯PHBHHx(3-羟基丁酸己酸共聚酯)^[46-47]。假单胞菌属(*Pseudomonas spp.*)通常用于中长链PHA的生产，产生了多种多样的功能化PHA^[10, 48-55]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)经过工程化改造也被用于生产各种类型的单体组成可控的PHA，并取得了一些成功^[40, 43, 56-63]。以上PHA的生产菌株中，罗氏真养杆菌的最高细胞密度可达232 g/L^[44]，而携带来自产碱弧菌的*phaCAB*合成基因簇的重组大肠杆菌获得了PHB的最高时空产率4.63 g/(L·h)^[64](表2)，推动了PHA的工业化生产。

2.2 基于假单胞菌的功能化PHA的定制化合成

假单胞菌主要通过内源性 β -氧化途径、脂肪酸从头合成途径以及最近报道的反 β -氧化途径^[67]产生单体参与到中长链PHA合成中，但单体长度不可控^[11, 52, 68]。为了定制化不同单体比例的PHA共聚物，研究者敲除了假单胞菌属中 β -氧化途径的几个关键基因(图2)，当 β -氧化减弱的工程菌株用不同碳链长度的脂肪酸培养时，脂肪酸不能

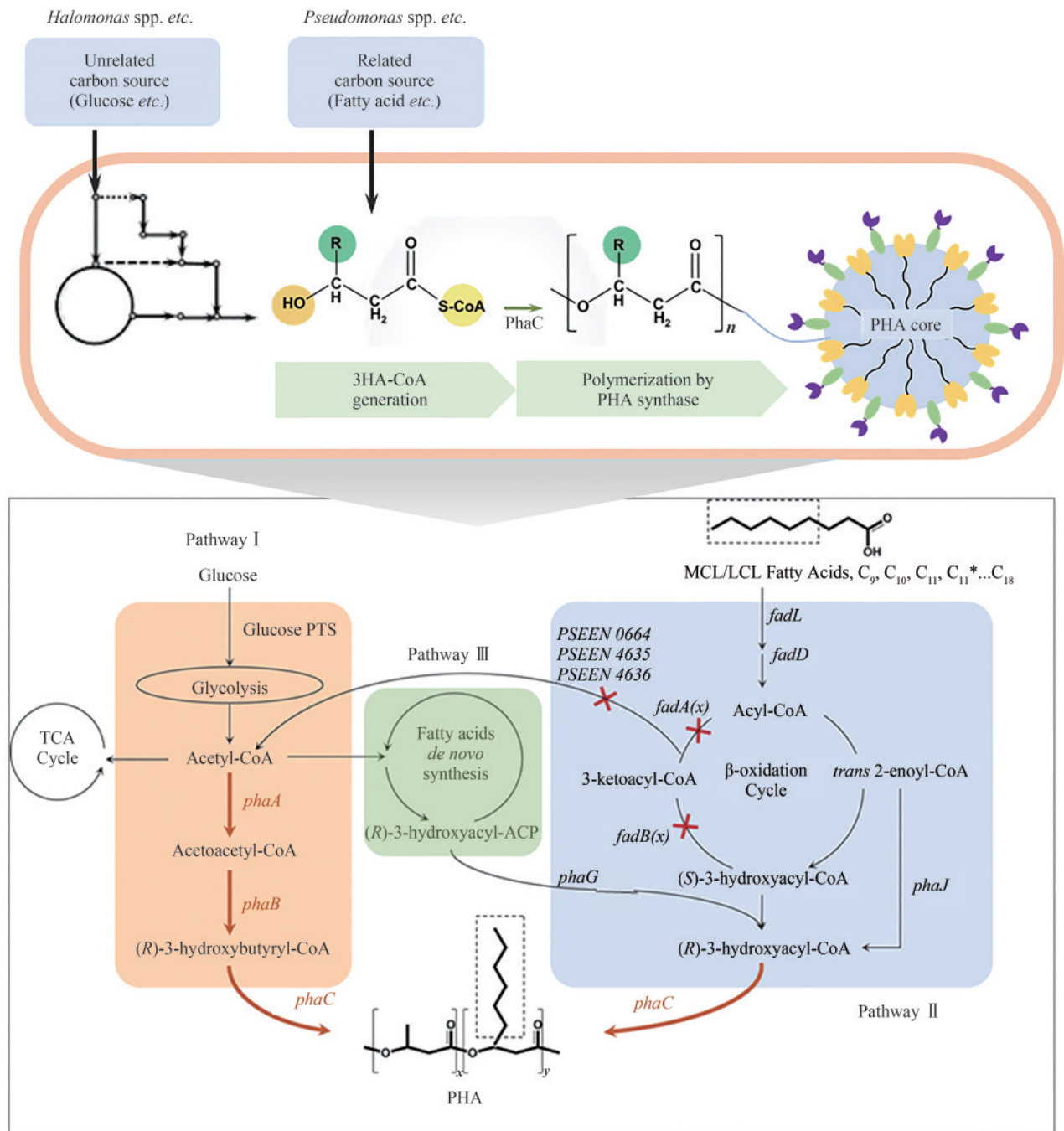


图2 PHA的主要生物合成途径

[不同底物（相关碳源和不相关碳源）培养合成PHA的代谢途径以及其中三条经典的PHA生物合成途径：糖酵解途径（Pathway I）、β-氧化途径（Pathway II）及脂肪酸从头合成途径（Pathway III）]

Fig. 2 The major PHA biosynthetic pathways

(PHA biosynthetic pathways fed with related and unrelated carbon sources in the three PHA classic pathways: glucose glycolysis pathway, β-oxidation pathway, and *de novo* synthesis pathway of fatty acids)

进一步代谢为碳长度较短的产物，整合到 PHA 链中时会保持其原始链长和结构，由此控制 PHA 聚合物中单体的组成和比例，生产 PHA 均聚物、随机或嵌段共聚物（图2）^[48, 55]。其中，工程化改造

后的恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida* KTQQ20）可以通过调节己酸钠（C₆）和癸酸钠（C₁₀）比例来轻松调控产生的 P(3HHx-co-3HD) 共聚物中两种单体的比例；当按照一定的顺序依次加入 C₆和

表2 代表性的PHA生产菌及其最高产量

Table 2 Main PHA producers and their maximal PHA yields

生产菌 Producers	PHA 类型 PHAs	底物 Substrates	细胞干重/(g/L) Cell dry weight/(g/L)	PHA 质量 分数/% PHA content/%	最高体积产率/[g/(L·h)] Highest volumetric productivity/[g/(L·h)]	参考文献 References
<i>Escherichia coli</i>	Various PHAs	Glucose	141.6	73	4.63	[64]
<i>Ralstonia eutropha</i>	SCL-PHAs, MCL-PHAs, PHBHHx	Glucose Fatty acid	232	80	3.14	[44]
<i>Aeromonas hydrophila</i>	PHBHHx	Fatty acid	43.3	45.2	1.01	[65]
<i>Pseudomonas</i> spp.	MCL-PHAs	Fatty acid	72.6	51.4	1.91	[50]
<i>Halomonas</i> spp.	SCL-PHAs	Glucose	100	60~92	1.67~3.2	[66]

C₁₀前体时则能生产嵌段共聚物P(3HHx)-b-P(HD-co-HDD)^[53]。嗜虫假单胞菌(*Pseudomonas entomophila*)是另一株优秀的功能化PHA合成菌株,可用于合成全系列的(C₆~C₁₄)PHA均聚物、随机共聚物和嵌段共聚物^[10, 48-49, 54-55]。当提供等链长脂肪酸时可生产含C₆~C₁₄单体的PHA均聚物,如β-氧化减弱后的改造菌株*P. entomophila* LAC26在加入十二酸(C₁₂)底物时,积累了占细胞干重90%(质量分数)以上的3-羟基十二酸酯P(3HDD),其中3-羟基十二酸单体3HDD摩尔分数为99%(近均聚物);随着3HDD含量增加,材料的玻璃化转变温度(T_g)和熔融温度(T_m)间的差距逐渐扩大;研究还首次发现单体碳原子数为偶数和奇数时,MCL-PHA均聚物具有不同的物理性质^[55]。由此可见,可通过控制单体比例显著提升PHA材料性能,从而拓展PHA材料的加工性能和应用领域^[48]。工程化菌株*P. entomophila* LAC23能合成含有3-羟基辛酸(3HO)和3HDD的随机共聚物P(3HO-3HDD)以及含3HO和3-羟基十四酸(3HTD)的P(3HO-3HTD)共聚物,同时还能合成嵌段共聚物P(3HO)-b-P(3HDD),其组成可通过调节两种相关脂肪酸底物的比例来控制^[55]。进一步对嗜虫假单胞菌(*P. entomophila*)进行较为系统的重编程和代谢工程改造,制备了一系列PHA含量超过60%(质量分数)且性能提升的新型P(3HB-co-MCL 3HA)共聚物^[10]。

当向工程化的*P. putida* KTQQ20和*P. entomophila* LAC23提供含有功能基团的脂肪酸时,如双键、三键、环氧基、羰基、氰基、苯基或卤素基团,产生的PHA侧链上将带有各种多样的功能基团,产生功能化PHA^[68]。如加入5-苯基戊酸时能合成聚

(3-羟基-5-苯基戊酸酯)(P3HPhV)均聚物;当其在含5-苯基戊酸和十二酸的混合底物上生长时,也成功合成了3HPhV单体含量为3%~32%(摩尔分数)的共聚物P(3HPhV-co-3HDD)^[54]。此外,含有芳香族侧链的PHA均聚物和共聚物也已经被合成出来,而含烷氧基、乙酰氧基和羟基的PHA聚合物被合成且证实具有增强的材料溶解性和生物相容性^[54]。这些侧链含功能基团的PHA分子能进一步进行更复杂多样的化学修饰(如接枝),产生更为多样的PHA材料,如热响应性的PHA材料^[38]和含有稀土元素(Eu³⁺和Tb³⁺)的PHA荧光材料等^[39]。β-氧化弱化的嗜虫假单胞菌已被开发成为PHA定制化合成的高性能平台菌株,提供了一种灵活且可控的方式来定制PHA材料,即通过调整底物的加入比例和顺序,精确地控制共聚物中单体组成和比例,加上后续侧链的进一步化学修饰,可得到具有特定性能的材料。

2.3 基于大肠杆菌和嗜盐微生物的短链PHA的定制化合成

假单胞菌主要依靠β-氧化循环的弱化和控制底物加入比例和顺序的策略实现中长链PHA的定制化合成。与此不同的是,短链PHA的定制化合成依靠大肠杆菌和嗜盐微生物等宿主通过底盘细胞的代谢工程改造来实现,包括多基因代谢途径整合以实现碳源利用途径的改造和底物谱的扩展,代谢前体的富集和旁路代谢的敲除等策略^[12, 17, 68]。

大肠杆菌底盘细胞中引入包含5个外源基因(*orfZ*, *pcs'*, *dhaT*, *aldD*, *phaC1*)的生物合成途

径后,在外加不同浓度的1,3-丙二醇(1,3-PDO)和1,4-丁二醇(1,4-BDO)分别作为3-羟基丙酸单体(3HP)和4-羟基丁酸单体(4HB)的前体时,成功合成了一系列单体比例可控的3-羟基丙酸4-羟基丁酸共聚酯P(3HP-co-4HB),其中4HB的比例为12%~82%(摩尔分数);这些聚合物的材料性能也明显不同,其中P(3HP-co-67% 4HB)(括号中67%为摩尔分数,下同)聚合物显示出完全透明的材料性能,扩展了PHA材料的应用范围^[69]。同时,当大肠杆菌底盘细胞中同时组装入包含11个外源基因的3HB合成途径和3HP合成途径后,以葡萄糖为唯一碳源能合成含量为18%(质量分数)的聚3-羟基丙酸(P3HP)均聚物,以及含量为42%(质量分数)的3-羟基丁酸3-羟基丙酸共聚酯P(3HB-co-84% 3HP)^[70]。

工程化的嗜盐单胞菌通过一系列合成生物学和代谢工程改造,也能实现多种PHA聚合单体[2-羟基丁酸(2HB)、乳酸(LA)、3-羟基丁酸(3HB)、3-羟基丙酸(3HP)、4-羟基丁酸(4HB)、3-羟基戊酸(3HV)、5-羟基戊酸(5HV)、3-羟基己酸(3HHx)、3-羟基己烯酸(3HHxE)、乙醇酸(GA)等]的可控组合聚合,形成具有不同单体比例(摩尔分数10%~60%)、不同分子量(M_w 10~200)、不同材料性能(断裂延伸率10%~600%等)的短链PHA材料定制化合成体系^[6, 12, 15, 66, 71-73]。如整合4个外源基因(*ogdA*, *sucD*, *4hbD*, *orfZ*)、敲除2个基因(*gabD2*和*gabD3*)并利用动态调控手段,嗜盐单胞菌能以葡萄糖为唯一碳源合成>60%(质量分数)的P3HB4HB,4HB比例可在13%~25%(摩尔分数)范围内变化^[72, 74];重组嗜盐单胞菌能将1,3-丙二醇、1,4-丁二醇和1,5-戊二醇等二元醇转化为PHA,产生13种不同单体组成和比例的PHA聚合物,包括透明的P(53% 3HB-co-20% 4HB-co-27% 5HV)和黏性的P(3HB-co-3HP-co-4HB-co-5HV)以及高弹性的P(85% 3HB-co-15% 5HV)^[75];还能通过改造合成具有不饱和键的3-羟基丁酸和3-羟基己烯酸的共聚酯P(3HB-co-3HHxE)^[71]。另外,嗜盐古菌(*Haloferax mediterranei*)可利用淀粉和废糖蜜等工业废料合成不同单体比例(10%~60%)(摩尔分数)、不同材料学性能的PHBV;可控的材料性能及生物相容性

使其在止血、疤痕愈合、软骨修复、神经修复等多个领域中具有潜在的高值应用^[76-77]。

3 “下一代工业生物技术”用于PHA的低成本规模化生产

3.1 基于嗜盐微生物的“下一代工业生物技术”

PHA种类多样且已研究了多年,但目前实现工业化生产的仅有PHB、PHBV、3-羟基丁酸4-羟基丁酸共聚酯(P3HB4HB)和3-羟基丁酸己酸共聚酯(PHBHHx),主要原因是生产成本低,其工业化生产受到限制^[12-13]。传统工业生物技术主要以大肠杆菌、棒状杆菌、链霉菌、假单胞菌、罗氏真养菌和酵母菌等传统微生物作为底盘细胞,生产过程需要复杂的操作和设备来保持无菌,过程耗能耗水,分离工艺复杂,影响了产品的竞争力^[6, 12]。嗜盐微生物是一类适宜生长于盐浓度大于1%环境下的微生物^[78-79],由于其具有耐盐耐碱、不易染菌、生长速度快和鲁棒性强等诸多优势,研究者基于此开发了极具竞争力的“下一代工业生物技术”(next generation industrial biotechnology, NGIB),建立了基于嗜盐微生物的节能节水的无灭菌开放式工业发酵工艺(图3)^[6, 12, 80-83]:在无灭菌开放条件下,嗜盐微生物利用低成本混合底物及海水(或含盐水)快速生长并生产多种产品(发酵条件为NaCl浓度10~100 g/L, pH 6~10, 温度30~37 °C);发酵结束后,通过形态学改造体积增大的菌体在重力作用下发生自沉降和自凝聚^[84-89],并通过稀释破壁以获得胞内产物PHA,实现简单快速的产物下游处理;发酵上清中的含盐废水简单预处理后循环使用,实现了无废水连续发酵和废盐回用。开放式的节能、节水、多产物发酵生产平台的构建,多方位解决了传统发酵技术无菌条件苛刻、发酵工艺复杂和淡水耗费严重等难题,降低了制造成本,大幅度提升了产品竞争力。经过系统的挖掘和优化提升,两株嗜盐单胞菌*Halomonas bluephagenesis* TD01^[45]和*Halomonas campaniensis* LS21^[90]被开发为成熟的NGIB底盘,其中*H. bluephagenesis* TD01无染菌连续发酵14 d以上,发酵密度达100 g/L; *H. campaniensis* LS21

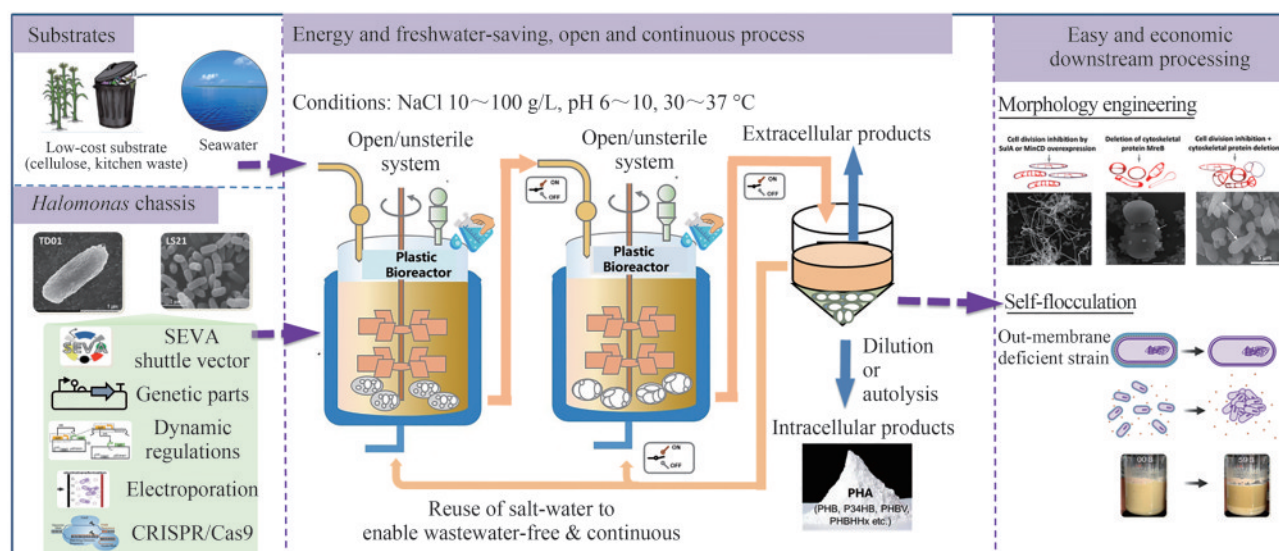


图3 基于嗜盐微生物的“下一代工业生物技术”^[80]

(连续、开放无灭菌的节水节能技术可用于生产多种产品，同时通过形态学变化简化下游提取过程)

Fig. 3 Next Generation Industrial Biotechnology (NGIB) based on *Halomonas* spp.^[80]

(An open/unsterile and continuous, energy and freshwater-saving bio-process for the production of various intracellular and extracellular products, which allows morphology engineering for the easy and economic downstream processing.)

以人工海水中的混合底物（包括纤维素和厨房垃圾）为低成本碳源的无灭菌开放式发酵技术，实现了无染菌连续稳定发酵 65 d 以上^[90]。

3.2 嗜盐微生物的合成生物学研究以实现多种 PHA 的高效生产

研究者建立了成熟的遗传改造手段用于改善和提高嗜盐微生物底盘菌的特性^[91-95]，包括外膜缺陷型电转化菌株^[96-97]、CRISPR/Cas 基因编辑体系^[98]和多基因大片段的重编程技术^[99]，实现了电转化效率达 4×10^6 CFU/ μ g DNA，基因编辑效率达 90% 以上，最大可编辑长度 50 kb；开发了丰富的基因元件用于基因表达的多样化和精细化调控，如基于强表达孔道蛋白 Porin 的组成型启动子及其一系列强度可调的人工启动子库^[100]、高动态范围的诱导型启动子和基于噬菌体的类 T7 启动子^[101]、基于铜绿假单胞菌小 RNA (sRNA) 干扰技术^[102]以及不同活性的核糖体结合位点 (RBS) 和转录终止子等^[58, 103]，并且建立了油酸响应^[104]和新型高分辨率基因表达控制 (HRCGE) 等动/静态精细调控方法^[72]。以上技术和工具的开发加速了 NGIB 底盘菌的改造以生产多样化的 PHA 材料。

嗜盐单胞菌 *H. bluephagenesis* 经过 56 h 发酵能

达到细胞干重 80 g/L，PHB 含量 80%（质量分数）^[45]，而进一步工程化改造后能合成含量高达 92%（质量分数）的 PHB^[101]。重组盐单胞菌 (*H. campaniensis* LS21) 在添加了厨余垃圾等废料的海水中进行 65 d 的开放式无灭菌连续发酵，积累的 PHB 达到细胞干重的 70%（质量分数）^[90]。

与 PHB 相比，PHBV 的热力学性能显著改善。嗜盐单胞菌中缺失 2-甲基柠檬酸合酶基因 *prpC* 并引入苏氨酸途径或异源 *scpAB* 操纵子，并进一步改造 TCA 循环相关基因后得到的工程菌株能以葡萄糖/葡萄糖酸盐为底物合成含量为 70%（质量分数）的 PHBV 共聚物 P(3HB-co-8% 3HV)（摩尔分数），其中 3HV 比例还可以进一步优化提升至 25%（摩尔分数）^[105]。

P3HB4HB 具有更加灵活的机械性能，是众多 PHA 中最有价值的材料之一。通过多基因代谢途径改造的重组嗜盐微生物能以葡萄糖作为唯一碳源合成 P3HB4HB，经过进一步基因编辑、启动子工程和染色体整合技术对基因表达和产物产量进行精细调控，重组菌 *H. bluephagenesis* TD68-194 发酵 36 h 能生长至 48.2 g/L，积累 75%（质量分数）的 P3HB4HB（4HB 摩尔分数高达 16%），实现了 PHA 含量和产率的大幅度提升^[106]。通过整合

P3HB4HB 和 PHBV 两种聚合物的合成途径, 在嗜盐微生物中实现了单体比例可调、性能更加优异的 P(3HB-4HB-3HV) 材料的合成。

研究者还利用一系列合成生物学手段对嗜盐单胞菌进行重编程改造, 包括引入透明颤菌血红蛋白 Vhb 以增加氧气利用度^[107], 调整 NADH/NAD⁺辅因子比例以平衡胞内氧化还原力^[108], 通过多轮“突变-筛选”策略获得生长密度显著提升的高密度发酵菌株^[106]等, 进一步提升嗜盐单胞菌底盘的生长和生产能力; 同时, 为建立简单经济的产物下游提取工艺, 在嗜盐菌中开展系统的形态学工程改造获得了能自沉降自絮凝的菌株^[84-89], 并引入噬菌体裂解基因诱导细胞自发裂解^[82], 还通过敲除 PHA 颗粒结合蛋白 PhaP 显著增大了 PHA 颗粒尺寸至 10 μm ^[89]; 以上策略有助于发酵液的分离、自裂解以及产物 PHA 的简单快速纯化。

在成功构建超级 PHA 生产菌后, 工程化的嗜盐单胞菌发酵生产 PHA 已从实验室的 1 L 发酵罐逐步放大到 1 t 和 5 t 的工业发酵罐^[66]。在 1 t 中试规模中, 嗜盐单胞菌 (*H. bluephagenesis* TD40) 在开放无灭菌条件生长 48 h 后细胞密度达 80 g/L, 其中含有超过 60% (质量分数) 的 P(3HB-co-16% 4HB); 而在 5 t 发酵罐, 获得了 99.6 g/L 的细胞密度和 60.4% (质量分数) 的 P(3HB-co-13.5% 4HB)。基于嗜盐微生物的下一代工业生物技术的开发和完善, 能有效地扩展 PHA 合成种类, 提升 PHA 合成产量, 降低 PHA 生产成本, 助力其大规模应用。丰富的 PHA 材料种类也带来了多样的材料性能和应用范围, 扩展了下一代工业生物技术的应用前景。

3.3 PHA 的低成本产业化生产

PHA 已成为全球范围内对抗塑料污染的环境友好型生物材料, 我国限塑令的实施极大地促进了 PHA 产业化发展, PHA 生产公司剧增 (表 3)^[6]。我国已经成立了 7 家 PHA 公司, 其中包括成立 20 多年的国内老牌公司宁波天安集团 (TianAn Biopolymer, 以生产 PHBV 著称)、天津国韵公司 (GreenBio) 和山东意可曼公司 (Ecomann)。北京微构工场 (PhaBuilder)、珠海麦德发公司

(Medpha)、中粮 PHA 生产线 (COFCO) 和蓝晶生物公司 (Bluepha) 等 4 家最近成立, 旨在利用下一代工业生物技术 (NGIB) 探索低成本 PHA 生产工艺。国外的 PHA 生产商中, 最早建立的 Metabolix 公司现已被出售给了韩国 CJ 公司; 目前这些公司大多采用罗氏真养杆菌 (*R. eutropha*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 以各种低成本的废物基质 (厨房/森林/农业垃圾、页岩气和混合有机废物等) 来生产 PHA, 旨在降低生产成本。由此可见目前国内外的 PHA 生产商大多数使用传统工业生物技术来生产 PHA, 这可能也是他们运营较为困难的原因之一; 只有新成立的 4 家公司采用了基于嗜盐微生物的 NGIB 技术进行包括 PHB、PHBV、P3HB4HB 和 PHBHHx 在内的 PHA 材料的生产。目前 NGIB 技术已成功完成了实验室小试及 5~225 t 的工业生物反应器中试, 发酵密度最高达 100 g/L, 其中含有超过 60% (质量分数) 的 P3HB4HB 聚合物^[66]。

NGIB 技术采用开放不灭菌发酵过程, 底物循环利用, 产物提取简便, 因此能显著降低 PHA 生产成本。以 5 吨发酵罐规模 (产能万吨以下) 中试生产 PHA 为例估算其成本^[6, 66, 109-110]: 底物 (葡萄糖、其他无机原料及循环使用的盐和水) 总成本约为 15 000 元/吨, 动力及人工成本估算为 3000 元/吨, 下游产物分离纯化及废水处理成本约为 2000 元/吨, 其他费用 (税费等) 约 1000 元/吨, 因此采用 NGIB 技术 PHA 的生产成本可降低至约 21 000 元/吨 (2.9 美元/千克), 且通过 NGIB 的不断开发和完善 (底盘改造、工艺优化和放大生产), 成本将能进一步降低^[110]。而同样规模下以大肠杆菌为宿主的传统补料分批发酵成本约为 29 000 元/吨 (4.0 美元/千克)。因此相较于传统发酵, 基于嗜盐菌的下一代工业生物技术生产 PHA 将显著降低生产成本 (约 30%)。

4 总结与展望

合成生物学与材料学的深度交叉融合, 为新型材料的合成提供了多样化的可能, 能为材料领域带来变革性的技术和影响。PHA 是一类含有至少 150 种组成单体的生物材料, 其组成、结构及性能多样性带来了广泛的应用前景, 形成了 PHA

表3 PHA的生产企业^[6]Table 3 PHAs commercialization companies^[6]

公司 Companies	PHA 类型 PHAs Types	技术 Technology	规模/(吨/年) Scale/(t/a)	官方网站 Websites
Go!PHA, The Netherlands	All Types	PHA Global Promotion	Unknown	gopha.org
PhaBuilder, China	All Types	<i>Halomonas</i> spp. (NGIB ^①)	1000~10 000	www.phabuilder.com
Medpha, China	P3HB4HB	<i>Halomonas</i> spp. (NGIB ^①)	100	www.medpha.com.cn
COFCO, China	PHB	<i>Halomonas</i> spp. (NGIB ^①)	1000	www.cofco.com
Bluepha, China	PHBHHx	<i>Ralstonia eutropha</i> and NGIB	1000	www.bluepha.com
TianAn Biopolymer, China	PHBV	<i>Ralstonia eutropha</i>	2000	www.tianan-enmat.com
GreenBio, Tianjin, China	P3HB4HB	<i>Escherichia coli</i>	10 000	www.tjgreenbio.com
Ecomann, Shenzhen, China	P3HB4HB	<i>Escherichia coli</i>	10 000	ecomannbruce.plasway.com
RWDC, Singapore and USA	PHBHHx	<i>Ralstonia eutropha</i>	Unknown	www.rwde-industries.com
Danimer Scientific, USA	PHBHHx	<i>Ralstonia eutropha</i>	10 000	danimerscientific.com
Full Cycle, USA	PHA ^②	non-GMO bacteria	Unknown	fullcyclebioplastics.com
Newlight, USA	PHB	Ocean microbes grown on greenhouse gas	Unknown	www.newlight.com
Metabolix, USA	P3HB4HB	<i>Escherichia coli</i>	5000	IP sold to CJ, Korea
BOSK Bioproducts, Canada	PHA ^②	Forest wastes for PHA production	Unknown	www.bosk-bioproducts.com
Genecis, Canada	PHBV	Unknown	Unknown	genecis.co
TerraVerdae Bioworks, Canada	PHA ^②	Unknown	Unknown	terraverdae.com
Kaneka, Japan	PHBHHx	<i>Ralstonia eutropha</i>	5000	www.kaneka.be
Navigate, France	PHB	Toxic waste as substrates	Unknown	www.navigate.com
CJ, Korea	P3HB4HB	<i>Escherichia coli</i>	Unknown	www.cj.co.kr
Helian Polymers, The Netherlands	PHB/PHBV	non-GMO bacteria	Unknown	helianpolymers.com
Biocycle, Brazil	PHB	<i>Bacillus</i> spp.	100	fapesp.br
Biomer, Germany	PHB	<i>Alcaligenes latus</i>	Unknown	biomer.de
Bioextrax, Sweden	PHA ^②	Bioextrax DSP method	Unknown	bioextrax.com
SABIO srl, Italy	PHA ^②	Organic wastes for PHA production	Unknown	www.bio-on.it

①下一代工业生物技术；②未知的PHA类型。

①Next Generation Industrial Biotechnology; ②Unknown PHAs types.

家族或组学。重编程的微生物底盘对于多样化和高性能PHA的生物合成具有重要意义。通过微生物细胞的一系列合成生物学改造，辅以提供不同底物培养，可以控制PHA共聚物中单体组成和比例，从而实现了具有不同结构和性能的PHA材料的定制化合成。与此同时，基于嗜盐微生物的下一代工业生物技术(NGIB)是以海水为介质的节能节水的无灭菌开放式工业发酵工艺，多方位解决了传统发酵技术耗能耗水高、发酵工艺复杂、过程易染菌等难题，大幅度降低了PHA材料的生产成本，推动PHA的规模化生产。但相对于传统塑料，PHA的生产成本及其材料性能仍然缺乏竞争力，因此仍需要进一步突破，才能最终实现从上游生产到下游应用的强大PHA工业价值链。

(1) 继续探索底盘菌的重编程技术和突破性的生产策略以进一步降低生产成本。基于嗜盐微生物的NGIB可连续无灭菌开放发酵65 d以上，细胞密度最高达100 g/L，并可实现菌体的自凝絮分离。借助新兴的合成生物学和形态学工程将能进一步提升嗜盐单胞菌的高细胞密度和高PHA产率，细胞密度有望超过200 g/L，PHA含量超过80% (质量分数)，PHA的转化率高达50%^[6, 12, 68, 83]；另外进一步开发经济快速的下游处理工艺，颗粒尺寸增大的PHA将促进产物的快速提取，同时优化废水回收和废盐回用工艺，降低废水处理成本，实现PHA生产过程的绿色化。此外，除嗜盐单胞菌属(*Halomonas* spp.)外，其他极端微生物的独特特性也可以被进一步探索用于开发NGIB^[12]。

(2) 多学科交叉融合共同提升 PHA 的材料性能。PHA 较差的热力学和机械性能限制了其高附加值应用, 因此: ① 可以筛选或合成生物学改造微生物底盘, 如扩展 PHA 合成酶的底物范围, 获得能利用各类功能基团前体的微生物, 产生功能性 PHA; 或利用基因编辑技术优化基因序列改造代谢途径, 实现对材料性能的精确调控, 如改善材料的机械性能、热稳定性或生物相容性等^[6, 12]。②在 PHA 侧链上进一步通过各种复杂化学修饰, 开发出满足不同应用需求的性能提升和性能多样的 PHA 材料, 通过控制 PHA 的各种微观结构可实现智能 PHA 材料的合成^[111]。③可借助完备的人工智能 (AI) 控制生产线, 稳定生产过程中不同批次 PHA 材料的性能^[112-114]。这将依赖于大数据收集分析和深度学习程序, 整个生产线都需要理论与技术的学科交叉。

以上生物学、材料学、人工智能等多学科交叉融合, 不仅为 PHA 材料的未来发展提供了新方向, 也为整个工业生物技术和材料领域带来革命性变化。

参 考 文 献

- [1] CHEN G Q, PATEL M K. Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review[J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(4): 2082-2099.
- [2] CHEN G Q, HAJNAL I. The 'phaome' [J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(10): 559-564.
- [3] BABU R P, O'CONNOR K, SEERAM R. Current progress on bio-based polymers and their future trends[J]. *Progress in Biomaterials*, 2013, 2(1): 8.
- [4] OLGUÍN E J, GIULIANO G, PORRO D, et al. Biotechnology for a more sustainable world[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(5): 931-932.
- [5] ANDREESSEN B, TAYLOR N, STEINBÜCHEL A. Poly(3-hydroxypropionate): a promising alternative to fossil fuel-based materials[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(21): 6574-6582.
- [6] TAN D, WANG Y, TONG Y, et al. Grand challenges for industrializing polyhydroxyalkanoates (PHAs) [J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(9): 953-963.
- [7] LEE S Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 49(1): 1-14.
- [8] SUDESH K, ABE H, DOI Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters[J]. *Progress in Polymer Science*, 2000, 25(10): 1503-1555.
- [9] SAMUI A B, KANAI T. Polyhydroxyalkanoates based copolymers[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 522-537.
- [10] LI M Y, MA Y Y, ZHANG X, et al. Tailor-made polyhydroxyalkanoates by reconstructing *Pseudomonas entomophila*[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(41): e2102766.
- [11] MENG D C, SHEN R, YAO H, et al. Engineering the diversity of polyesters[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 29: 24-33.
- [12] CHOI S Y, CHO I J, LEE Y, et al. Microbial polyhydroxyalkanoates and nonnatural polyesters[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(35): e1907138.
- [13] YE J W, LIN Y N, YI X Q, et al. Synthetic biology of extremophiles: a new wave of biomanufacturing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(3): 342-357.
- [14] YIN J, CHEN J C, WU Q, et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7): 1433-1442.
- [15] CHEN G Q. New challenges and opportunities for industrial biotechnology[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 111.
- [16] PARK S J, KIM T W, KIM M K, et al. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1196-1206.
- [17] ZHENG Y, CHEN J C, MA Y M, et al. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58: 82-93.
- [18] AMASS W, AMASS A, TIGHE B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies[J]. *Polymer International*, 1998, 47(2): 89-144.
- [19] CHEN G Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(8): 2434-2446.
- [20] CHOI S Y, RHIE M N, KIM H T, et al. Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: a 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 58: 47-81.
- [21] WU Q, WANG Y, CHEN G Q. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates[J]. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, 2009, 37(1): 1-12.
- [22] WANG Y, BIAN Y Z, WU Q, et al. Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(19): 2858-2868.

- [23] LUO Z, WU Y L, LI Z B, et al. Recent progress in polyhydroxyalkanoates-based copolymers for biomedical applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(12): e1900283.
- [24] HOFFMAN A S. Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(1): 10-16.
- [25] KE Y, ZHANG X Y, RAMAKRISHNA S, et al. Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: preparation and biomedical application[J]. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2017, 70(Pt 2): 1107-1119.
- [26] BIAN Y Z, WANG Y, AIBAIDOUA G, et al. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(2): 217-225.
- [27] SODIAN R, HOERSTRUP S P, SPERLING J S, et al. Tissue engineering of heart valves: *in vitro* experiences[J]. *Annals of Thoracic Surgery*, 2000, 70(1): 140-144.
- [28] WEI D X, DAO J W, CHEN G Q. A micro-ark for cells: highly open porous polyhydroxyalkanoate microspheres as injectable scaffolds for tissue regeneration[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(31): e1802273.
- [29] ZHANG X, LI Z H, CHE X M, et al. Synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate organo/hydrogels[J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(9): 3303-3312.
- [30] FAN F, TAN D, SHANG S, et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biopolyester based nanoparticles as NVP-BEZ235 delivery vehicle for tumor targeting therapy[J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(9): 3313-3323.
- [31] ZHANG J Y, SHISHATSKAYA E I, VOLOVA T G, et al. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications[J]. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2018, 86: 144-150.
- [32] ZHANG J Y, CAO Q, LI S W, et al. 3-Hydroxybutyrate methyl ester as a potential drug against Alzheimer's disease via mitochondria protection mechanism[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(30): 7552-7562.
- [33] LAN L H, ZHAO H, CHEN J C, 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.
- [34] WANG X, JIANG X R, WU F Q, et al. Microbial poly-3-hydroxybutyrate (PHB) as a feed additive for fishes and piglets [J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(12): e1900132.
- [35] ZHANG X J, LUO R C, WANG Z, et al. Application of (*R*)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels[J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(4): 707-711.
- [36] RYDZ J, SIKORSKA W, MUSIOŁ M, et al. 3D-printed polyester-based prototypes for cosmetic applications-future directions at the forensic engineering of advanced polymeric materials[J]. *Materials*, 2019, 12(6): 994.
- [37] DE LAS HERAS ALARCON C, PENNADAM S, ALEXANDER C. Stimuli responsive polymers for biomedical applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2005, 34(3): 276-285.
- [38] MA Y M, WEI D X, YAO H, et al. Synthesis, characterization and application of thermoresponsive polyhydroxyalkanoate-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide) [J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(8): 2680-2690.
- [39] YU L P, ZHANG X, WEI D X, et al. Highly efficient fluorescent material based on rare-earth-modified polyhydroxyalkanoates[J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(9): 3233-3241.
- [40] LEONG Y K, SHOW P L, OOI C W, et al. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: insights from the recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 180: 52-65.
- [41] FERRE-GUELL A, WINTERBURN J. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates with controlled composition and microstructure[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(3): 996-1005.
- [42] GAHLAWAT G, SRIVASTAVA A K. Model-based nutrient feeding strategies for the increased production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 183(2): 530-542.
- [43] ARIKAWA H, MATSUMOTO K, FUJIKI T. Polyhydroxyalkanoate production from sucrose by *Cupriavidus necator* strains harboring *csc* genes from *Escherichia coli* W[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(20): 7497-7507.
- [44] RYU H W, HAHN S K, CHANG Y K, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 55(1): 28-32.
- [45] TAN D, XUE Y S, AIBAIDULA G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 8130-8136.
- [46] QIU Y Z, HAN J, CHEN G Q. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(5): 537-542.
- [47] JIAN J, LI Z J, YE H M, et al. Metabolic engineering for microbial production of polyhydroxyalkanoates consisting of high 3-hydroxyhexanoate content by recombinant *Aeromonas hydrophila*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 6096-6102.

- [48] CHUNG A L, JIN H L, HUANG L J, et al. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxydodecanoate) by β -oxidation inhibited mutant of *Pseudomonas entomophila* L48 [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(10): 3559-3566.
- [49] LI S J, CAI L W, WU L P, et al. Microbial synthesis of functional homo-, random, and block polyhydroxyalkanoates by β -oxidation deleted *Pseudomonas entomophila*[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(6): 2310-2319.
- [50] LEE S Y, WONG H H, CHOI J I, et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 68(4): 466-470.
- [51] OUYANG S P, LIU Q, FANG L, et al. Construction of phage-terminon-defined knockout mutants of *Pseudomonas putida* KT2442 and their applications in poly(hydroxyalkanoate) production[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2007, 7(2): 227-233.
- [52] POBLETE-CASTRO I, BINGER D, RODRIGUES A, et al. *In-silico*-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 113-123.
- [53] TRIPATHI L, WU L P, DECHUAN M, et al. *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 225-231.
- [54] SHEN R, CAI L W, MENG D C, et al. Benzene containing polyhydroxyalkanoates homo- and copolymers synthesized by genome edited *Pseudomonas entomophila*[J]. *Science China Life Sciences*, 2014, 57(1): 4-10.
- [55] WANG Y, CHUNG A, CHEN G Q. Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate homopolymers, random copolymers, and block copolymers by an engineered strain of *Pseudomonas entomophila*[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(7): 1601017.
- [56] CHEN Q, WANG Q, WEI G Q, et al. Production in *Escherichia coli* of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14): 4886-4893.
- [57] HOKAMURA A, WAKIDA I, MIYAHARA Y, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant *Escherichia coli* from glucose[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 120(3): 305-310.
- [58] LI T, YE J W, SHEN R, et al. Semirational approach for ultrahigh poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Escherichia coli* by combining one-step library construction and high-throughput screening[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1308-1317.
- [59] WANG X, HAN J N, ZHANG X, et al. Reversible thermal regulation for bifunctional dynamic control of gene expression in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1411.
- [60] PARK S J, AHN W S, GREEN P R, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains[J]. *Biomacromolecules*, 2001, 2(1): 248-254.
- [61] WANG F, LEE S Y. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 58(2-3): 325-328.
- [62] YANG J E, CHOI Y J, LEE S J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 95-104.
- [63] ZHUANG Q Q, QI Q S. Engineering the pathway in *Escherichia coli* for the synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates consisting of both even- and odd-chain monomers[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 135.
- [64] CHOI J I, LEE S Y, HAN K. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 4897-4903.
- [65] LEE S H, OH D H, AHN W S, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 67(2): 240-244.
- [66] YE J W, HUANG W Z, WANG D S, 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.
- [67] ZHUANG Q Q, WANG Q, LIANG Q F, et al. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from glucose that contain medium-chain-length monomers via the reversed fatty acid β -oxidation cycle in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 78-86.
- [68] MENG D C, CHEN G Q. Synthetic biology of polyhydroxyalkanoates (PHA) [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2018, 162: 147-174.
- [69] 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*[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(6): 777-785.
- [70] MENG D C, WANG Y, WU L P, et al. Production of poly(3-hydroxypropionate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) from glucose by engineering *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 189-195.

- [71] YU L P, YAN X, ZHANG X, et al. Biosynthesis of functional polyhydroxyalkanoates by engineered *Halomonas bluephagenesis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 119-130.
- [72] YE J W, HU D K, YIN J, et al. Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 57: 85-95.
- [73] MA H, ZHAO Y Q, HUANG W Z, et al. Rational flux-tuning of *Halomonas bluephagenesis* for co-production of bioplastic PHB and ectoine[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3313.
- [74] YE J W, HU D K, CHE X M, et al. Engineering of *Halomonas bluephagenesis* for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 143-152.
- [75] YAN X, LIU X, YU L P, et al. Biosynthesis of diverse α,ω -diol-derived polyhydroxyalkanoates by engineered *Halomonas bluephagenesis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 275-288.
- [76] HAN J, WU L P, HOU J, et al. Biosynthesis, characterization, and hemostasis potential of tailor-made poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Haloferax mediterranei*[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(2): 578-588.
- [77] HAN J, WU L P, LIU X B, et al. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers[J]. *Biomaterials*, 2017, 139: 172-186.
- [78] QUILLAGUAMÁN J, GUZMÁN H, VAN-THUOC D, et al. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(6): 1687-1696.
- [79] QUILLAGUAMÁN J, DELGADO O, MATTIASSON B, et al. Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(1/2): 148-154.
- [80] CHEN G Q, JIANG X R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 94-100.
- [81] YU L P, WU F Q, CHEN G Q. Next-generation industrial biotechnology-transforming the current industrial biotechnology into competitive processes[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(9): e1800437.
- [82] 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.
- [83] CHEN G Q, ZHANG X, LIU X, et al. *Halomonas* spp., as chassis for low-cost production of chemicals[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(21): 6977-6992.
- [84] JIANG X R, CHEN G Q. Morphology engineering of bacteria for bio-production[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(4): 435-440.
- [85] WU H, CHEN J C, CHEN G Q. Engineering the growth pattern and cell morphology for enhanced PHB production by *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(23): 9907-9916.
- [86] JIANG X R, WANG H, SHEN R, et al. Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 227-237.
- [87] WANG Y, WU H, JIANG X R, et al. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 25: 183-193.
- [88] ELHADI D, LV L, JIANG X R, et al. CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 358-369.
- [89] SHEN R, NING Z Y, LAN Y X, et al. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 117-126.
- [90] YUE H T, LING C, YANG T, 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(1): 108.
- [91] SILVA-ROCHA R, MARTÍNEZ-GARCÍA E, CALLES B, et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Database issue): D666-D675.
- [92] TAN D, WU Q, CHEN J C, et al. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 26: 34-47.
- [93] 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.
- [94] XU T, MITRA R, TAN D, et al. Utilization of gene manipulation system for advancing the biotechnological potential of halophiles: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 70: 108302.
- [95] MA Y Y, YE J W, LIN Y N, et al. Flux optimization using multiple promoters in *Halomonas bluephagenesis* as a model chassis of the next generation industrial biotechnology[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 81: 249-261.
- [96] XU T, CHEN J Y, MITRA R, et al. Deficiency of exopolysaccharides and O-antigen makes *Halomonas bluephagenesis* self-flocculating and amenable to electrotransformation[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 623.
- [97] WANG Z Y, QIN Q, ZHENG Y F, et al. Engineering the permeability of *Halomonas bluephagenesis* enhanced its chassis properties[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 53-66.

- [98] QIN Q, LING C, ZHAO Y Q, et al. CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile *Halomonas* spp.[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 219-229.
- [99] LIU C Y, YUE Y X, XUE Y F, et al. CRISPR-Cas9 assisted non-homologous end joining genome editing system of *Halomonas bluephagenesis* for large DNA fragment deletion [J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 211.
- [100] SHEN R, YIN J, YE J W, et al. Promoter engineering for enhanced P(3HB-co-4HB) production by *Halomonas bluephagenesis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(8): 1897-1906.
- [101] ZHAO H, ZHANG H Q M, CHEN X B, et al. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 128-140.
- [102] WANG L J, JIANG X R, HOU J, et al. Engineering *Halomonas bluephagenesis* via small regulatory RNAs[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 58-69.
- [103] XU M M, CHANG Y, ZHANG Y Y, et al. Development and application of transcription terminators for polyhydroxyalkanoates production in halophilic *Halomonas bluephagenesis* TD01[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 941306.
- [104] MA Y Y, ZHENG X R, LIN Y N, et al. Engineering an oleic acid-induced system for *Halomonas*, *E. coli* and *Pseudomonas* [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 325-336.
- [105] CHEN Y, CHEN X Y, DU H T, et al. Chromosome engineering of the TCA cycle in *Halomonas bluephagenesis* for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate (PHBV)[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 69-82.
- [106] REN Y L, LING C, HAJNAL I, et al. Construction of *Halomonas bluephagenesis* capable of high cell density growth for efficient PHA production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(10): 4499-4510.
- [107] OUYANG P F, WANG H, HAJNAL I, et al. Increasing oxygen availability for improving poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 20-31.
- [108] LING C, QIAO G Q, SHUAI B W, et al. Engineering NADH/NAD⁺ ratio in *Halomonas bluephagenesis* for enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHA) [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 275-286.
- [109] LI T, CHEN X B, CHEN J C, et al. Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(12): 1503-1511.
- [110] SHAHZAD K, NARODOSLAWSKY M, SAGIR M, et al. Techno-economic feasibility of waste biorefinery: using slaughtering waste streams as starting material for biopolyester production[J]. *Waste Management*, 2017, 67: 73-85.
- [111] TARRAHI R, FATHI Z, SEYDIBEYOĞLU M Ö, et al. Polyhydroxyalkanoates (PHA): from production to nanoarchitecture[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 596-619.
- [112] ALI M, BROCCINI S. Synthetic approaches to uniform polymers[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58(15): 1671-1687.
- [113] AYNSLEY M, HOFLAND A, MORRIS A J, et al. Artificial intelligence and the supervision of bioprocesses (real-time knowledge-based systems and neural networks) [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1993, 48: 1-27.
- [114] GUERRA A, VON STOSCH M, GLASSEY J. Toward biotherapeutic product real-time quality monitoring[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(3): 289-305.



第一作者及通讯作者：陈国强 (1963—)，男，教授，博士生导师。研究方向为生物合成 PHA 材料及其下一代工业生物技术。
E-mail: chengq@mail.tsinghua.edu.cn

广告索引：安及义实业(上海)有限公司(后彩一)/诚志生命科技有限公司(后彩二)/安徽华恒生物科技股份有限公司(封三)