

## · 产品篇 ·

**陈国强** 清华大学生命学院化工系教授。《生物工程学报》第3-5届副主编。长期从事微生物合成生物学、微生物PHA材料合成及以极端细菌为基础的“下一代工业生物技术”的研究，获得相关授权专利35项和45项公开专利。开发的技术已经在数家公司用于大规模生产微生物塑料聚羟基脂肪酸酯 PHA。曾连续6年获得清华大学学生“良师益友”的光荣称号。在国际学术期刊上共发表微生物技术和生物材料相关论文350多篇，论文在Web of Sciences上被引用19 000余次 (H指数为67)。



# 聚羟基脂肪酸酯 PHA 代谢工程研究 30 年

陈心宇\*, 李梦怡\*, 陈国强

清华大学 生命科学学院 化工系, 北京 100084

陈心宇, 李梦怡, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯 PHA 代谢工程研究 30 年. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1794-1811.

Chen XY, Li MY, Chen GQ. Thirty years of metabolic engineering for biosynthesis of polyhydroxyalkanoates. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1794-1811.

**摘要:** 聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoate, PHA) 是微生物合成的可降解高分子材料, 种类及性能多样, 应用前景广阔, 然而其大规模生产受制于它较为高昂的生产成本。30 年来, 代谢工程的应用日益广泛, 通过代谢流调控、代谢通路改造引入新通路等方法, 微生物合成 PHA 的效率得到了很大提高, 也丰富了 PHA 的单体种类、结构多样性和底物多样性; 同时通过改变细胞形态和 PHA 颗粒大小等方法实现了更加高效的下游生产处理, 降低了 PHA 生产成本。近年来, 基于极端微生物, 尤其是嗜盐菌的“下一代工业生物技术” (Next generation industrial biotechnology, NGIB) 发展迅速。NGIB 实现了 PHA 生产过程的开放性和连续性, 节约能源和淡水, 简化了 PHA 的生产过程。结合代谢工程技术, 盐单胞菌可以作为多种 PHA 的低成本生产平台, 将有望提高 PHA 的市场竞争力和推进其商业化。

**关键词:** 聚羟基脂肪酸酯, 合成生物学, 代谢工程, 下一代工业生物技术

**Received:** July 26, 2020; **Accepted:** October 13, 2020

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900200), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31961133019, 21761132013, 31870859).

**Corresponding author:** Guo-qiang Chen. Tel: +86-10-62783844; Fax: +86-10-62794217; E-mail: chengq@mail.tsinghua.edu.cn

\*These authors contributed equally to this study.

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900200), 国家自然科学基金 (Nos. 31961133019, 21761132013, 31870859) 资助。

网络出版时间: 2020-11-19

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201119.1121.006.html>

# Thirty years of metabolic engineering for biosynthesis of polyhydroxyalkanoates

Xinyu Chen\*, Mengyi Li\*, and Guo-qiang Chen

School of Life Science, Department Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a family of biodegradable polyesters synthesized by microorganisms. It has various monomer structures and physical properties with broad application prospects. However, its large-scale production is still hindered by the high cost. In the past 30 years, metabolic engineering approach has been used to tune the metabolic flux, engineer and introduce pathways. The efficiency of PHA synthesis by microorganisms has been significantly improved, and the diversity of PHA monomer, structure and substrate have also been enriched. Meanwhile, by changing cell morphology and PHA particle size, more efficient downstream production process has achieved and PHA production costs have been reduced. In recent years, “Next generation industrial biotechnology” (NGIB) based on extremophiles, especially halophilic *Halomonas* spp., has been rapidly developed. NGIB has achieved the opening and continuous production of PHA, which simplifies the production process and saves energy and fresh water. Combined with metabolic engineering, *Halomonas* spp. can be transformed into low-cost production platform of numerous PHA. It is expected to improve the market competitiveness and promote the commercialization of PHA.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates, synthetic biology, metabolic engineering, next generation industrial biotechnology

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 是一类生物合成的高分子聚酯的统称, 是部分微生物 (主要是细菌) 在营养或代谢不平衡的条件下合成的一种储能物质<sup>[1]</sup>。PHA 具有良好的生物可降解性和生物相容性, 被公认为绿色环保型高分子材料; 且由于其种类和性能的多样性, 可被应用于大宗塑料、医学材料、生物燃料甚至饲料等诸多领域而受到广泛关注<sup>[2-5]</sup>。近年来随着代谢工程技术的发展, 关于 PHA 的微生物合成也有了新的突破。本文介绍了近 30 年应用代谢工程技术拓展 PHA 的多样性、改造 PHA 合成相关通路、提高 PHA 合成效率、进行 PHA 的低成本生产等方面的进展, 重点介绍以嗜盐单胞菌为底盘的“下一代工业生物技术”并提出展望。

## 1 PHA 多样性及合成途径

### 1.1 PHA 的单体组成及分类

自 20 世纪 20 年代首次在微生物细胞内发现 PHB (聚 3-羟基丁酸, 最常见的 PHA) 以来<sup>[6]</sup>, 不断有新的 PHA 在不同的微生物菌体中被合成出来, 目前已有超过 150 种 PHA 被研究报道<sup>[7]</sup>。PHA

化学本质上是一种高分子聚酯, 在细胞体内 PHA 聚合酶 (PhaC) 的催化下, 一定碳链长度的羟基脂肪酸相互连接形成酯键, 最终形成不同类型、不同分子量的 PHA 聚酯<sup>[8]</sup>。

根据组成单体碳链长度的不同, PHA 可以分为短链 PHA (Short chain length PHA, SCL PHA) 和中长链 PHA (Medium chain length PHA, MCL PHA), 其中短链 PHA 的单体碳链长度一般为 3-5, 而中长链 PHA 的单体碳链长度在 6-14 之间。一般来说, 天然微生物只能积累 SCL PHA 或 MCL PHA 中的一类。

根据组成单体种类的多少, PHA 可以分为均聚物 (Homopolymer) 和共聚物 (Copolymer), 后者可进一步细分为随机共聚物 (Random copolymer) 和嵌段共聚物 (Block copolymer)。

此外, 由于 PHA 单体的侧链 R 基团十分多样, 理论上可以引入具有双键或三键、卤素、氨基、苯环等功能基团的单体<sup>[9-10]</sup>, 而这些基团又允许通过后期无限可能性的化学修饰增加新的官能团, 形成所谓的“功能 PHA”。功能 PHA 能够改善材料性能, 并带来诸如温敏、光敏、pH 值调节

等特殊材料功能<sup>[11-14]</sup>。

因此,取决于 PHA 的单体种类及比例、聚合形式、侧链基团、分子量等,形成了丰富的 PHA 结构,由此带来了材料性能上的多样性,包括 PHA 热力学性能、生物相容性和生物可降解性及其他性能,拥有广阔的应用前景。

PHA 的结构通式、多样性示意图 1。

## 1.2 PHA 的生物合成途径

微生物合成的 PHA 在很大程度上依赖于所供给的碳源,简单地说,这些碳源可以分为相关碳源和非相关碳源两类。PHA 生物合成过程中有多条代谢途径能够合成羟基脂酰辅酶 A 单体,这些途径又与体内的中心代谢途径相耦联,形成一个巨大的代谢网络。不同细菌利用的碳源不同,所使用的 PHA 合成途径不同,合成 PHA 的种类也不同,这种差异与特定微生物中起作用的代谢途径有关。

目前,在自然条件下细菌中已经报道的 PHA

单体的合成途径一共有 14 种<sup>[9]</sup>。其中,最常见也是代谢工程改造研究最为成熟的,是与 SCL PHA 合成相关的乙酰辅酶 A 直接合成 PHB 途径,以及与 MCL PHA 合成相关的  $\beta$  氧化循环途径和脂肪酸从头合成途径 (图 2)。

## 2 代谢工程技术在 PHA 生产中的应用

### 2.1 生物代谢通路的基因编辑工具

精确的基因编辑技术使研究者可以根据需求对基因特定位点进行改造,从而在基因水平上对代谢通路进行调节。20 世纪 90 年代,研究人员将可以特异性识别三联碱基对的锌指蛋白与核酸酶 Fok I 进行偶联,开发出了锌指蛋白核酸酶技术 (Zinc finger nucleases, ZFNs)。但因其识别的 DNA 序列数量有限,很大程度上也被限制了应用<sup>[18-19]</sup>。随后,根据改造的黄单胞菌属的 TAL 蛋白可以特异性识别 DNA 中一个碱基的特点,研究人员又开发出了类转录激活因子效应物核酸酶技术

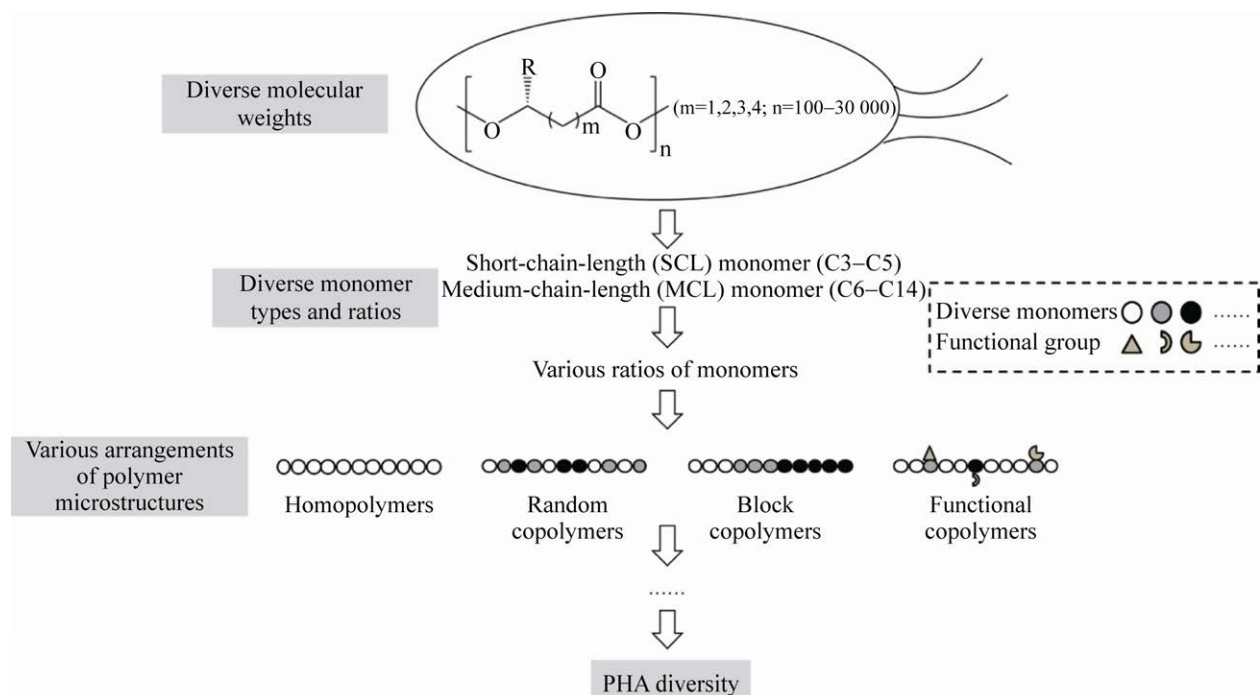


图 1 PHA 结构通式及多样性

Fig. 1 General molecular formula and PHA diversity.

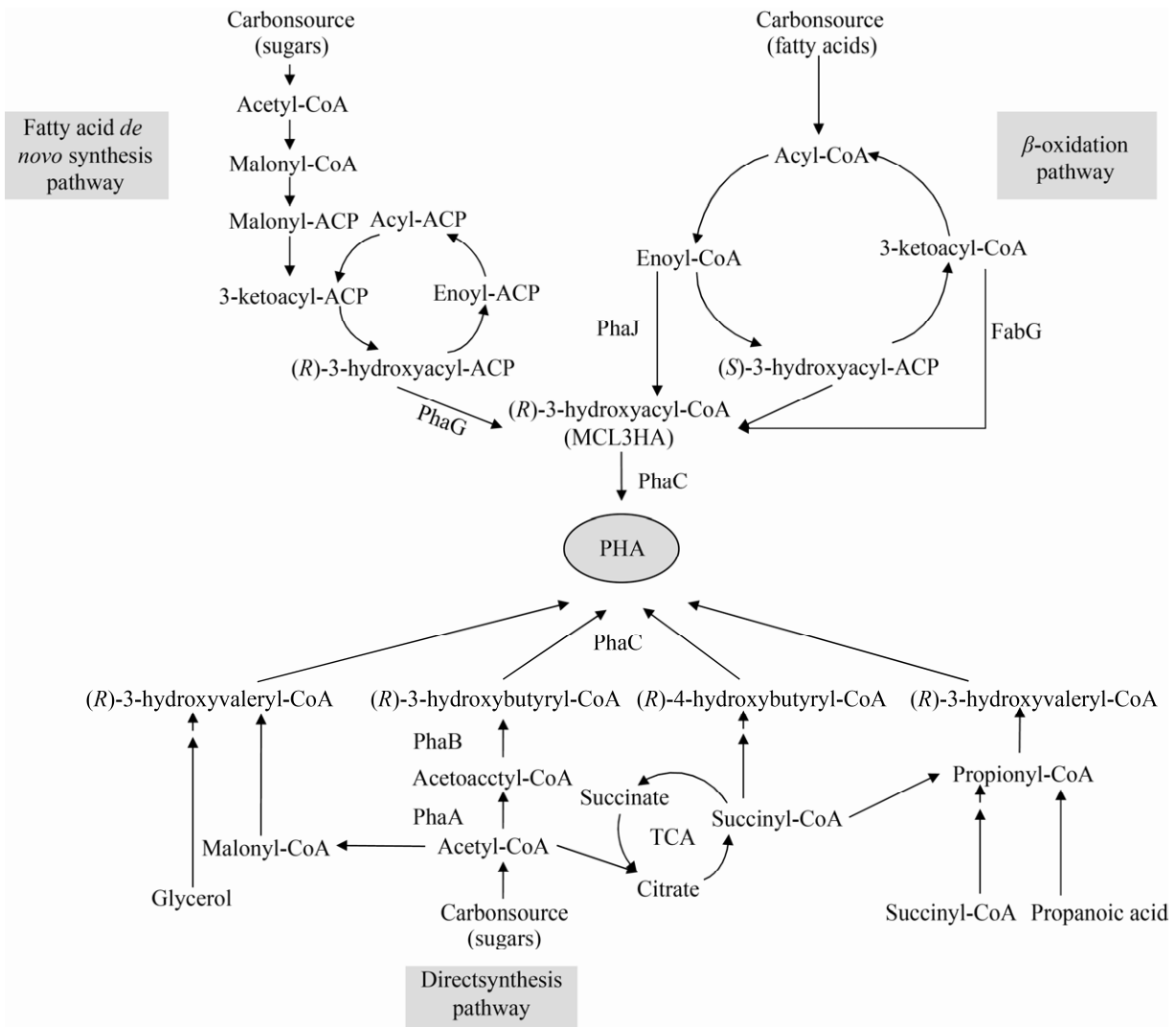


图 2 PHA 的主要生物合成途径<sup>[6,15-17]</sup> (PhaA:  $\beta$ -酮基硫解酶 ( $\beta$ -ketothiolase); PhaB: NADPH/NADH 依赖型乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (NADPH/NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase); PhaC: PHA 聚合酶 (PHA synthase); PhaG: 3-羟基脂酰-ACP:CoA 酰基转移酶 (3-hydroxyacyl-ACP:CoA transacylase); PhaJ: (R)-烯脂酰辅酶 A 水合酶 [(R)-enoyl-CoA hydratase]; FabG: 3-酮脂酰-ACP 还原酶 (3-ketoacyl-ACP reductase))  
 Fig. 2 Main PHA biosynthetic pathways<sup>[6,15-17]</sup>.

(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)。此技术理论上可以对任意基因序列进行编辑, 但因其操作较为烦琐, 应用同样受到了限制<sup>[19-20]</sup>。近年来, 随着成簇规律间隔短回文重复序列/成簇规律间隔短回文重复序列关联蛋白 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas) 的发现, 基因编辑技术有了重要突破<sup>[21-22]</sup>。CRISPR/Cas

是细菌和古菌中普遍存在的天然免疫系统, 研究人员对其加以利用, 开发出新一代基因编辑技术 CRISPR/Cas9, 可对靶向基因位点进行剪切<sup>[23-24]</sup>。与之前的技术相比, CRISPR/Cas9 更加灵活、高效、廉价且操作简便。基于 CRISPR/Cas9 开发出的 CRISPRi (CRISPR interference) 和 CRISPRa (CRISPR activation) 技术可以在不改变 DNA 的情况下可逆地抑制或上调基因表达, 大大扩展了

CRISPR/Cas9 工具箱<sup>[25-26]</sup>。

将各种技术结合使用可以满足多种基因调节需求,为研究带来极大的便利。这些基因编辑工具已经在调节 PHA 相关代谢通路、导入外源代谢途径、改变细胞形态等各方面发挥出巨大的作用,为增强 PHA 生产助力<sup>[27]</sup>。

## 2.2 代谢工程增强 PHA 生产

### 2.2.1 代谢流调控增加 PHA 产量

在生物获取的物质和能量一定的情况下,将这些物质和能量更多地引向 PHA 相关通路,理论上可以积累更多的 PHA。在 PHA 发现之初,研究者就通过控制培养条件对 PHA 的合成、降解等特性进行研究,以求得到更高的产率<sup>[28-31]</sup>。而后通过提供不同的前体在多种细菌中发现了不同种类的 PHA<sup>[32]</sup>。直到 1989 年在罗氏真氧菌 *Ralstonia eutropha* 中首次鉴定了 PHA 生物合成操纵子 *phaCAB*,自此开始了针对 *phaCAB* 等 PHA 合成相关基因的调控<sup>[33-34]</sup>。

PHA 合成相关基因稳定的强表达对于把底物引向 PHA 合成方向、提高底物转化率从而增加 PHA 积累是至关重要的,其中又以 PHA 聚合酶 PhaC 最为关键。PhaC 决定着合成的 PHA 的诸多特性,包括产率、单体类型和组成、分子量及多分散性<sup>[35]</sup>。为增强 PhaC 的活性和改变底物特异性,研究人员已经在 PhaC 的编辑上进行了很多研究。在近年 PhaC 的晶体结构被解析之前<sup>[36-38]</sup>,编辑 PhaC 的方法主要依赖于随机诱变和筛选以及基于序列同源性的结构预测<sup>[39-41]</sup>。例如,通过对假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 61-3 的随机诱变和筛选,研究者发现 Glu130、Ser325、Ser477 和 Gln481 是决定 PhaC 底物特异性和活性的重要残基。与野生型相比, Glu130Asp、Ser325Thr、Ser477Gly 和 Gln481Lys 的突变体有更强的聚合活性,可以使 PHB 产量增加 400 倍<sup>[42-44]</sup>。

之后又开发出了很多方法调控 PHA 合成相关基因的表达。比如将大肠杆菌 *Escherichia coli*

JM109 基因组上 *phaCAB* 的拷贝数从 11 增加至 50,可以使 PHB 积累量从 0.1 g/L 增加至 1.30 g/L。这项实验结果表明,更高的 PHA 合成基因拷贝数可带来更高的 PHA 产量<sup>[45]</sup>。此外还可以用强诱导转录系统过表达 PHA 合成基因,研究人员开发了一种由噬菌体聚合酶衍生的类 T7 诱导系统,实验表明该系统在诱导后有较强的转录活性<sup>[46]</sup>。在盐单胞菌 *Halomonas bluephagenesis* 的基因组上整合该类 T7 启动子驱动的 *phaCAB* 基因,诱导 44 h 后,PHA 产量达到了 69 g/L,而同样条件下野生型只积累了 50 g/L PHA。

插入或删除基因也是一种增强 PHA 生产的常用策略,但是这种方法往往只注重局部的通路设计而忽略对细胞生长产生的不利影响。在现代计算机技术的帮助下,结合代谢流建模对细菌生产途径进行电脑模拟有助于设计和优化通路以达到最优的产品生产<sup>[47]</sup>。例如,现在已经建立了恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 代谢流的电脑模拟模型,用于预测底物向 PHA 合成酶及前体转化的最佳流量。初步的模拟分析显示,敲除葡萄糖脱氢酶(Gcd)的菌株与野生型相比,PHA 积累量可增加 100%。在实验中,敲除 Gcd 的 *P. putida* 表现出了更高的 PHA 产量(+80%)和胞内 PHA 含量(+50%),同时生成的副产物也更少,而且细菌生长几乎没有受到影响。这样构建的重组菌在所有工业生产相关评价标准下都是最优的<sup>[48]</sup>。同样地,根据初步模型预测,*P. putida* KT2440 中过表达丙酮酸脱氢酶亚基(AcoA)的同时敲除 Gcd 可以使 PHA 产量增加 120%,实际实验中 PHA 产量增加了 121%<sup>[47]</sup>。

### 2.2.2 构建重组通路利用廉价原料生产 PHA

得益于近几十年来在生物化学和分子生物学领域对 PHA 生物合成愈加透彻的理解,以及对许多细菌中 PHA 合成基因的成功克隆,多种细菌通过代谢工程改造成为了高性价比的 PHA 生产平台。其中最具有代表性的例子就是带有来源于 *R. eutropha* 的

*phaCAB* 操纵子的 *E. coli*, 这种改良的 *E. coli* 拥有能与原始 *R. eutropha* 相媲美的高 PHB 产量和产率<sup>[49-51]</sup>。通过导入适合的 *PhaC*, *E. coli*、*R. eutropha*、*Pseudomonas* sp. 等菌种还可被用来更高效地生产 SCL-co-MCL PHA<sup>[52-55]</sup>。除细菌外, 酵母和一些植物也被成功改造, 可进行 PHA 生产<sup>[56-57]</sup>。

同时构建重组代谢通路避免使用昂贵的相关碳源也是利用代谢工程降低 PHA 生产成本的重要思路。例如, 最初聚 3-羟基丁酸-3-羟基戊酸 (PHBV) 生产需要添加丙酸或戊酸钠生成 3HV 的中间体丙酰辅酶 A<sup>[58-59]</sup>, 为了避免使用这些高价格的前体, 研究人员构建了通过  $\alpha$ -酮丁酸和甲基丙二酰辅酶 A 生产丙酰辅酶 A 的通路, 以用更廉价的非相关碳源生产 PHBV<sup>[60-62]</sup>。类似地, 生产聚 3-羟基丁酸-4-羟基丁酸 (P34HB) 通常需要使用  $\gamma$ -丁内酯或丁酸<sup>[59,63]</sup>, 作为更经济的选择, 可以利用克氏梭菌 *Clostridium kluyveri* 的琥珀酸半醛脱氢酶 (SucD) 和 4HB 脱氢酶 (4HbD) 从葡萄糖生产 4HB<sup>[64-65]</sup>。通过导入编码  $\beta$ -呋喃果糖苷酶的 *sacC* 基因, 可在 *R. eutropha* NCIMB11599 和 *R. eutropha* 437-540 中构建蔗糖利用通路。 $\beta$ -呋喃果糖苷酶被分泌到培养基中, 将蔗糖水解为葡萄糖和果糖以供细胞生长。在含 20 g/L 蔗糖的无氮培养基中生长的 *R. eutropha* NCIMB11599 可获得占细胞干重 73% 的 PHB<sup>[66]</sup>。

此外还有许多利用菌种独特代谢通路使用各种廉价原料进行 PHA 生产以求降低成本的研究, 比如蔗糖蜜、木薯和玉米淀粉、木质纤维素水解物、乳清以及废弃物中提取的碳源等<sup>[59,67-71]</sup>。近年来也出现了很多针对利用气体碳源如 CO、CO<sub>2</sub>、CH<sub>4</sub> 等生产 PHA 的研究, 例如甲烷氧化菌 *Methylosinus trichosporium*、*R. eutropha*、聚球菌 *Synechococcus* sp. 等一系列天然 PHA 生产菌都有以气体一碳底物作为碳源生产 PHA 的能力<sup>[72-74]</sup>。

### 2.2.3 改造 $\beta$ 氧化途径利用脂肪酸高效合成不同链长 PHA

$\beta$  氧化途径是 PHA 合成的 3 条主要途径之一, 选用脂肪酸作为底物来提供短链和中长链单体生产 PHA 是经常采取的方法<sup>[75-79]</sup>, 对  $\beta$  氧化途径进行改造对于促进 MCL PHA 或短中长链共聚 PHA (SCL-co-MCL PHA) 的合成具有重要意义。在 1994 年首次报道了豚鼠气单胞菌 *Aeromonas caviae* 能利用烷酸和油生产聚 3-羟基丁酸-3-羟基己酸 (PHBHHx) 的随机共聚物<sup>[80]</sup>。 $\beta$  氧化是这个过程中的主要通路, 脂酰辅酶 A 脱氢酶 (FadE) 催化脂酰辅酶 A 生成烯酰辅酶 A 的反应是  $\beta$  氧化过程中的限速步骤。有研究表明, 在 *E. coli* 中过表达 FadE 可以使烯酰辅酶 A 的量增多, 再表达 *PhaJ* 和 *PhaC* 可以使重组菌积累更多的 PHA<sup>[81]</sup>。

然而在  $\beta$  氧化过程中细胞可能会将大部分脂肪酸转化为乙酰辅酶 A 用于细胞生长, 从而将昂贵的脂肪酸浪费在能用葡萄糖等廉价底物生产的乙酰辅酶 A 上<sup>[64-65,82]</sup>。因为  $\beta$  氧化的存在, 脂肪酸转化为 PHA 的效率低, 导致 MCL PHA 生产成本升高。因此, 改造  $\beta$  氧化途径也是提高 PHA 生产效率的一种可行策略。

敲除 *P. putida* 或嗜虫假单胞菌 *Pseudomonas entomophila* 内  $\beta$  氧化途径中 3-羟基脂酰辅酶 A 脱氢酶 (FadB) 及 3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶 (FadA) 可以使大多数脂肪酸转变成 3-羟基脂酰辅酶 A 用于合成 PHA, 而不是被氧化成乙酰辅酶 A, 从而显著提高底物到 MCL PHA 的转化率<sup>[82-85]</sup>。据报道, 部分敲除  $\beta$  氧化途径或者利用丙烯酸抑制  $\beta$  氧化可以获得与底物添加脂肪酸链长相同或更长的单体, 底物中各种脂肪酸的比例还可以影响 PHA 的组成成分<sup>[85-86]</sup>。部分敲除  $\beta$  氧化的 *P. putida* KT2442 可作为可控的 PHA 生产平台, 通过添加预定比例的脂肪酸精确调节 PHA 的单体比例, 并以此合成了随机和嵌段共聚物聚 3-羟基丁酸-3-羟基己酸 [P(3HB-co-3HHx)], 单体组成和材料性能



稳定<sup>[87-88]</sup>。类似地,通过部分敲除 $\beta$ 氧化途径和导入乙酰辅酶 A 直接合成 PHB 途径,重组 *P. entomophila* LAC32 被成功开发成 SCL-co-MCL PHA 的合成平台,并合成了聚 3-羟基丁酸-3-羟基癸酸 [P(3HB-co-3HD)]、聚 3-羟基丁酸-3-羟基十二酸 [P(3HB-co-3HDD)] 等多种新型 PHA<sup>[89]</sup>。*Pseudomonas* spp. 脂肪酸氧化突变体还可以生成包含 3-羟基己酸 (3HHx)、3-羟基辛酸 (3HO)、3-羟基癸酸 (3HD) 和 3-羟基十二酸 (3HDD) 的均聚、无规共聚或嵌段共聚的中链 PHA<sup>[10]</sup>。但值得注意的是,只使用脂肪酸培养的 $\beta$ 氧化缺陷菌可能会生长缓慢或只积累少量的 MCL PHA<sup>[86,90-91]</sup>。

#### 2.2.4 设计引入新通路生产非天然 PHA

以各种经过充分研究的通路作为基础,可以从目的产物出发设计构建新的生产通路。例如,乳酸和乙醇酸的共聚物 (PLGA) 是一种应用广泛的生物降解、高生物相容性的医用聚合物。在导入了新月柄杆菌 *Caulobacter crescentus* 的

Dahms 途径并敲除了磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统中葡萄糖转运体亚基 (PtsG) 后,重组 *E. coli* 可以以木糖为原料生产乙醇酸。这种 *E. coli* 可以同时利用葡萄糖生产乳酸并用木糖生产乙醇酸。之后用一种进化的丙酰辅酶 A 转移酶将乳酸和乙醇酸在体内转化为 CoA 中间体。最后利用进化的 PHA 聚合酶将这些 CoA 中间体聚合成 PLGA<sup>[92]</sup>。如图 4 所示,用相似的方法还合成了聚 2-羟基丁酸-3-羟基丁酸、聚乳酸-羟基乙酸-3-羟基丁酸-4-羟基丁酸等多种聚合物,以及一些芳香族聚酯<sup>[93-97]</sup>。通过编辑 L-苯丙氨酸生物合成途径,可以使 *E. coli* 利用葡萄糖有效生产含苯乳酸 (PhLA) 的聚合物。在这条通路中,磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 依次转化为 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸 (DAHP)、预苯酸、苯丙酮酸、PhLA、PhLA-CoA<sup>[97-98]</sup>;同时构建了由 L-苯丙氨酸合成肉桂酰辅酶 A 的通路,作为辅酶 A 的供体<sup>[97]</sup>。

### 3 PHA 的低成本生产

经过近 30 年的产业化探索,PHA 的大规模应用仍然面临困难。相较于传统石油基塑料制品,PHA 严重受制于它高昂的生产成本。为降低 PHA 的生产成本,从而提升其在材料市场上的竞争力,近年来,研究人员在运用代谢工程技术改造 PHA 生产菌株以简化下游加工过程上取得了一些新进展。

#### 3.1 形态学工程

工业生物技术通常涉及在大型发酵罐中进行微生物发酵,然后进行下游加工处理,即从发酵培养液中分离出微生物物质,再分离提取胞内产物或上清液产物。而实现分离通常需要昂贵且耗能大的连续离心、微过滤或费时的重力沉淀等。

PHA 的生产成本高昂的一个重要因素就是细菌细胞及胞内产物 PHA 的下游加工过程花费较高。由于大多数菌株细胞的大小在 0.5–2.0  $\mu\text{m}$  之

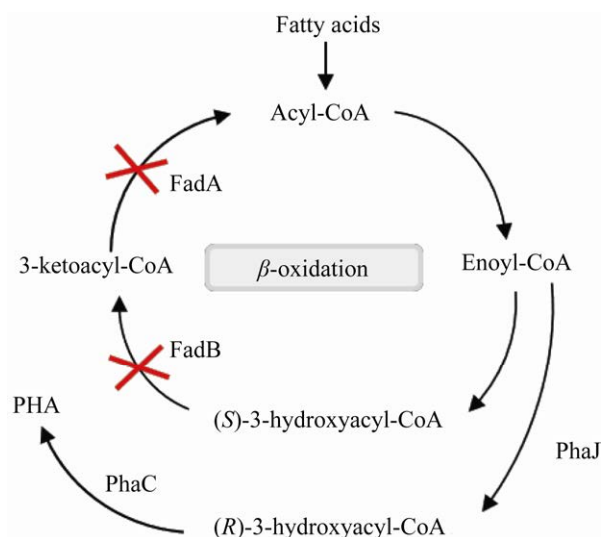


图 3 敲除部分 $\beta$ 氧化以增强 PHA 生产<sup>[82]</sup> (Acyl-CoA: 脂酰辅酶 A; Enoyl-CoA: 烯酰辅酶 A; (S)-3-hydroxyacyl-CoA: (S)-3-羟基脂酰辅酶 A; 3-ketoacyl-CoA: 3-酮脂酰辅酶 A; (R)-3-hydroxyacyl-CoA: (R)-3-羟基脂酰辅酶 A)

Fig. 3 Deleting  $\beta$ -oxidation related genes for enhanced PHA production<sup>[82]</sup>.

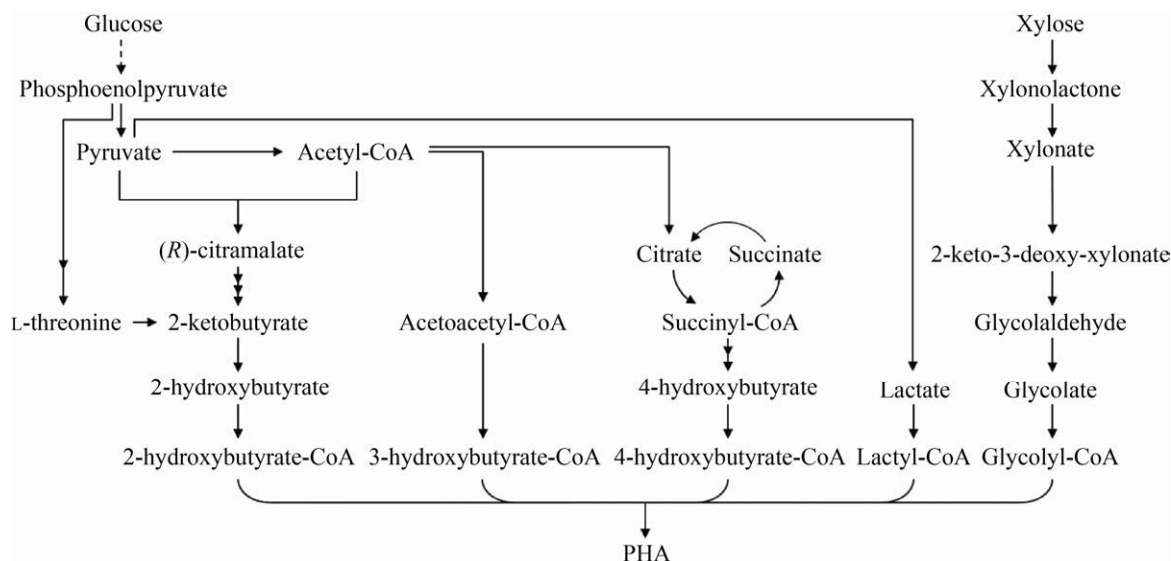


图 4 引入新通路构建多种单体 PHA 生产途径<sup>[93-96]</sup> ((*R*)-citramalate: (*R*)-柠草酸; 2-ketobutyrate: 2-酮丁酸; 2-hydroxybutyrate-CoA: 2-羟基丁酰辅酶 A; 3-hydroxybutyrate-CoA: 3-羟基丁酰辅酶 A; Citrate: 柠檬酸; Succinyl-CoA: 琥珀酰辅酶 A; Succinate: 琥珀酸; 4-hydroxybutyrate-CoA: 4-羟基丁酰辅酶 A; Lactate: 乳酸; Lactyl-CoA: 乳酰辅酶 A; Xylose: 木糖; Xylonolactone: 木糖酸内酯; Xylonate: 木糖酸; 2-keto-3-deoxy-xylonate: 2-酮基-3-脱氧木糖酸; Glycolaldehyde: 乙醇醛; Glycolate: 乙醇酸; Glycolyl-CoA: 羟乙酰辅酶 A)

Fig. 4 Introducing new pathways to produce PHA with various monomers<sup>[93-96]</sup>.

间,较小的细胞不仅增加了细菌生物量与培养液的分离难度,同时也限制了每个细胞中 PHA 颗粒的储存量。通过形态学工程改造 PHA 生产菌株,有助于提供更大的细胞空间来积累 PHA 颗粒;还有助于加速细胞沉淀,使细菌细胞易于通过重力与培养液分离,从而有效降低 PHA 的生产成本<sup>[99-101]</sup>。

细胞的形态受许多基因调控影响,包括细胞壁装配相关基因 *mreB* (编码细胞骨架肌动蛋白 MreB)、*mreC* (编码杆状细胞形状决定蛋白 MreC)、*mreD* (编码杆状细胞形状决定蛋白 MreD)、*rodZ* (编码细胞骨架蛋白 RodZ)、*rodA* (编码杆状细胞形状决定蛋白 RodA)、*pbp2* (编码青霉素结合蛋白 PBP2)、*pbp3* (编码青霉素结合蛋白 PBP3)、细胞分裂相关基因 *ftsZ* (编码细胞分裂蛋白 FtsZ)、*ftsA* (编码细胞分裂蛋白 FtsA)、*sulA* (编码细胞分裂抑制蛋白 SulA)、*minC* (编码 Z 环定位蛋白 MinC) 和 *minD* (编码 Z 环定位蛋白 MinD) 等<sup>[102]</sup>。在这些基因中,已在大肠杆菌或嗜盐菌中

成功操作 *mreB*、*ftsZ*、*sulA*、*minC* 和 *minD* 基因来改造细胞形态,简化下游生物加工过程。

SulA 是一种细胞分离抑制蛋白,当与细胞分裂的 Z 环相互作用时,SulA 的过表达会阻止细胞分裂,从而将正常的杆状大肠杆菌转变成丝状细胞<sup>[103]</sup>。丝状化增加了细胞体积,为 PHA 颗粒的积累提供了更多空间(图 5)。相比于野生型 *E. coli*,过表达 SulA 抑制 Z 环形成的丝状细胞能够比野生型多储存 27% 的 PHB<sup>[101]</sup>。

MreB 是一种细菌细胞骨架肌动蛋白,用以维持许多细菌的杆状形态<sup>[104]</sup>,也被认为是用于扩大细胞体积的合适靶标。当在 *mreB* 缺失突变体中回补表达 *mreB* 后,细胞形态变为更大的球形,并且观测到在重组大肠杆菌中 PHB 的积累量可增加 100% 以上<sup>[99]</sup>。

由 MinD 募集到细胞极的 MinC 是与 FtsZ 相互作用以抑制 Z 环组装的蛋白质<sup>[105]</sup>。类似于 SulA 诱导大肠杆菌丝状细胞的形成,在 *H. bluephagenesis*



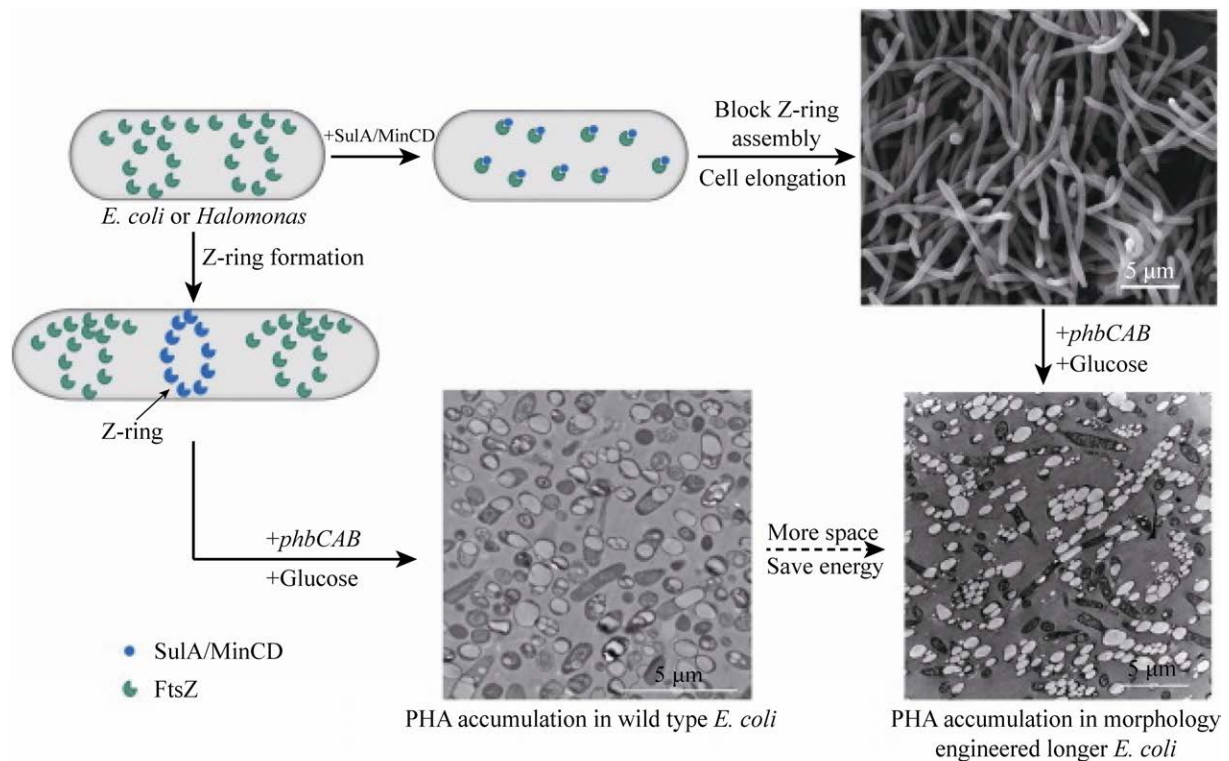


图5 过表达 SulA/MinCD 导致细胞丝状生长<sup>[102]</sup>

Fig. 5 Overexpression of SulA/MinCD leads to filamentary growth<sup>[102]</sup>.

TD08 的生长静止期中, 过表达 MinCD 抑制剂可诱导产生丝状细胞 (图 5), 使 PHA 含量从 69% 增至 82%<sup>[106]</sup>。并且观测到细胞形成了数百微米的相互缠绕的纤维网络, 其中较短的细胞在重力作用下一起包装和沉淀, 与正常的离心分离相比, 可以更轻松地将细胞从培养液中分离出来, 这大大简化了生物质的下游加工过程<sup>[106]</sup>。此外, 当 MinCD 在敲除了 PHA 颗粒相关蛋白 (PhaP) 的 *H. bluephagenesis* 菌株中过表达时, 观测到最大可积累的 PHA 颗粒大小达 10 μm<sup>[100]</sup>。

### 3.2 自絮凝

生物自絮凝是指某些微生物自发展现出受控聚集的能力, 形成大量且高度致密的细胞絮凝物, 从而降低从培养基中回收生物质的难度, 有利于实现简单经济的下游处理<sup>[107-108]</sup>。例如, 当删除了盐单胞菌 *Halomonas campaniensis* LS21 编码电子转移链中两个电子转移黄素蛋白亚基的 *etf* 操

纵子后, 细胞表面电荷减少和细胞疏水性增加, 细胞趋于自絮凝; 在停止搅拌和通气后, 大多数细胞迅速絮凝并沉淀至生物反应器的底部, 整个过程持续不到 1 min 且没有能量消耗, 从而减少了下游分离的能量消耗<sup>[109]</sup>。此外, 自絮凝还拥有诸如发酵培养基循环再使用等其他优点。收集完沉淀的细胞团后, 无需灭菌或接种, 培养基上清液即可再次使用; 无废水发酵工艺可以至少循环运行 4 次而不产生废水<sup>[109]</sup>。

## 4 下一代工业生物技术 (Next generation industrial biotechnology, NGIB)

### 4.1 现代工业生物技术面临的问题

随着分子生物学、生物化学和合成生物学的快速发展, 工业生物技术已经发展成为生产化学品和材料更有效的手段。然而, 与化学工业相比, 目前的工业生物技术在生产化学品、材料和生物

表 1 近 30 年来代谢工程在 PHA 微生物合成中的主要研究进展

Table 1 Advances in metabolic engineering of PHA microorganism biosynthesis in recent 30 years

Years	Types	Manipulations	Effects	Microorganisms	References
1988	Constructing recombinant pathways	+ <i>phaCAB</i> operon from <i>R. eutropha</i>	Producing PHA in <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	[50]
1997		+ <i>sucD</i> and <i>4hbD</i> from <i>Clostridium kluveri</i>	Producing P34HB from glucose	<i>E. coli</i>	[64]
2002	Flux tuning for higher PHA accumulation	+ <i>Acinetobacter phaBCA</i> and <i>E. coli sbm</i> and <i>ygfG</i> , $\Delta$ <i>prpC</i>	Producing PHBV with significant HV incorporation from glycerol	<i>Salmonella enterica</i>	[60]
2014		+ <i>E. coli poxB L253F V380A</i> , <i>R. eutropha prpE</i> , <i>phaCAB<sub>Re</sub></i> , $\Delta$ <i>prpC</i> $\Delta$ <i>scpC</i>	Producing P(3HB-co-5.5 mol% 3HV) from glucose	<i>E. coli</i>	[61]
2014		Introducing <i>sacC</i> to construct sucrose utilization pathway	Producing 73 wt% PHB from nitrogen free medium containing 20 g/L sucrose	<i>R. eutropha</i>	[66]
2004		+ <i>phaAB<sub>Re</sub></i> , <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> , position 325 and 481 mutated	Accumulated more P(3HB-co-3HA)	<i>E. coli</i>	[42]
2005		+ <i>phbAB<sub>Re</sub></i> , <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> , <i>phaCI<sub>Ps</sub></i> <i>E130D</i>	Accumulating 10-fold higher PHB from glucose; producing more P(3HB-co-3HA) copolymer grown on dodecanoate	<i>E. coli</i>	[43]
2006		+ <i>phaAB<sub>Re</sub></i> , <i>phaJ4<sub>Pa</sub></i> , <i>phaCI<sub>Ps</sub></i> <i>S477R</i>	Shifting in substrate specificity to smaller monomers containing a 3HB unit	<i>E. coli</i>	[44]
2014		Pathway design guided by modeling simulation	An increase of 121% PHA accumulation	<i>P. putida</i>	[47]
2015		Increasing the copy number of <i>phaCAB</i>	Enhancing PHB accumulation from 0.1 g/L to 1.30 g/L	<i>E. coli</i>	[45]
2017		Overexpressing <i>phaCAB</i> by T7-like promoter	Enhancing PHB accumulation from 50 g/L to 69 g/L	<i>H. bluephagenesis</i>	[46]
1998		Modification of $\beta$ -oxidation pathway	+ <i>phaCI</i> from <i>P. aeruginosa</i> in <i>fadR</i> deletion mutant, adding acrylic acid	Accumulating 60 wt% PHA from decanoate	<i>E. coli</i>
2009	$\Delta$ <i>fadBA</i>		Producing PHA with 71 wt% P3HHp from heptanoate	<i>P. putida</i>	[83]
2010		+ <i>fadE</i> and <i>phaC</i>	Improved PHA production	<i>E. coli</i>	[81]
2010		$\Delta$ <i>fadBA</i> $\Delta$ <i>fadB2x</i> $\Delta$ <i>fadAx</i> $\Delta$ <i>PP2047</i> $\Delta$ <i>PP2048</i> $\Delta$ <i>phaG</i>	Producing PHD or P(3HB-co-84 mol% 3HDD) from decanoic acid or dodecanoic acid	<i>P. putida</i>	[85]
2011		$\Delta$ <i>fadBA</i> $\Delta$ <i>PSEEN 0664</i> $\Delta$ <i>PSEEN 2543</i>	Producing 90 wt% PHA with 99 mol% 3HDD	<i>P. entomophila</i>	[82]
2018		$\Delta$ <i>fadBA</i> $\Delta$ <i>PSEEN 0664</i> $\Delta$ <i>PSEEN 4635</i> $\Delta$ <i>PSEEN 4636</i> $\Delta$ <i>phaG</i> $\Delta$ <i>phaCI-phaZ-phaC2</i>	Producing novel SCL-co-MCL PHA including P(3HB-co-3HD), P(3HB-co-3HDD) and P(3HB-co-3H9D)	<i>P. entomophila</i>	[89]
2012	Producing non-natural polyesters	$\Delta$ <i>ldhA</i> , + <i>phaC1437</i> , <i>pct540</i> , <i>cimA3.7</i> , <i>leuBCD</i> , <i>panE</i> from <i>Lactococcus lactis</i> $\Pi$ 1403 and <i>phaAB</i> from <i>R. eutropha</i>	Producing P(2HB-co-3HB-co-LA) with small amounts of 2HB and LA monomers from glucose	<i>E. coli</i>	[93]
2016		Introducing Dahms pathway in <i>ptsG</i> deletion mutant	Producing PLGA from glucose and xylose	<i>E. coli</i>	[92]
2016		+ <i>ilvBN<sup>mut</sup></i> , <i>ilvCD</i> , <i>panE</i> , <i>pct540</i> and <i>phaC1437</i>	Producing PHA containing 2-hydroxyisovalerate	<i>E. coli</i>	[94]

(待续)

(续表 1)

Years	Types	Manipulations	Effects	Microorganisms	References
2017		$\Delta sad \Delta gabD \Delta glcD$ , +p68pcH5Z and pMCS-ycdW-aceAK	Producing P(GA-co-LA-co-3HB-co-4HB) from glucose	<i>E. coli</i>	[96]
2018		Manipulating L-phenylalanine biosynthesis pathway	Producing PhLA-containing polyesters	<i>E. coli</i>	[97–98]
1993	Morphology engineering	+ftsZ	Accelerating cell division, high cell density with 127 g/L PHB	<i>E. coli</i>	[103]
2014		+sulA	Filamentary cells, PHB storage increased by 27% compared to wild type	<i>E. coli</i>	[101]
2014		+minCD	Filamentary cells, enhancing PHA content from 69% to 82%	<i>H. bluephagenesis</i>	[106]
2015		+mreB in mreB deletion mutant	Larger spherical cells, an increase of over 100% PHB accumulation	<i>E. coli</i>	[99]
2019		+minCD in phaP deletion mutant	Accumulating PHA granules up to 10 $\mu\text{m}$	<i>H. bluephagenesis</i>	[100]
2018	Self-flocculation	$\Delta etf$	Most cells rapidly flocculate and precipitate to the bottom in less than 1 min	<i>H. bluephagenesis</i>	[109]

燃料等方面仍然存在生产成本较高、竞争力不足的问题。工业生物技术需要通过微生物的大规模发酵培养生产产品,因此在发酵过程中,如何廉价高效地避免杂菌污染是长久以来人们关注的重点。发酵过程中一旦沾染了杂菌,轻则降低物料利用率和产物收率,严重时则必须从头开始生产流程,带来极大的经济损失。在生产前对发酵设备进行灭菌处理是现在普遍采取的方法,然而这些方法也带来了不可忽视的高能耗成本,同时依然无法完全规避杂菌污染风险。因此必须进一步发展“下一代工业生物技术”,以更少的淡水消耗、节能和持久的开放式发酵为基础,克服目前工业生物技术的缺点,将目前的工业生物技术转化为具有竞争力的工艺。其中,以抗污染的极端微生物作为代谢改造及发酵培养的底盘菌株将会是 NGIB 成功的关键。

#### 4.2 基于极端微生物的 NGIB 及其优势

极端微生物可以在大多数微生物都无法增殖的苛刻条件下(诸如极端 pH、极端温度或高渗透压)生长,正因如此,它们在发酵过程中对杂菌有更强的抵抗能力。选择在极端条件下生长良好

的稳健菌株作为底盘菌,并通过代谢工程导入新的通路或添加新的基因元件,可以使这种能力进一步增强,使其适合开放连续式的大规模发酵生产。

以 PHA 生产为例,结合多种生物工程技术,可以将极端微生物开发成优秀的 PHA 生产底盘菌,这不仅将简化生产流程也会显著降低 PHA 生产成本。嗜盐单胞菌 *H. bluephagenesis* 和 *H. campanienseis* 就是其中两个很好的例子,其能够在高盐浓度、高 pH 条件下快速生长,使得它们拥有其他微生物难能媲美的抗污染能力。据报道嗜盐菌在未经灭菌的海水培养基中可以持续开放发酵至少两个月而不被杂菌污染<sup>[110]</sup>。野生型 *H. bluephagenesis* 能在 pH 8.0–9.0 含有 60 g/L NaCl 的葡萄糖培养基中快速生长并积累高达细胞干重 80% 以上的 PHA<sup>[111]</sup>。极端嗜盐古菌 *Natrinema ajinwuensis* RM-G10 也能在 pH 7.0 的 200 g/L NaCl 组成的高盐培养基中积累 60% 以上的 PHA<sup>[112]</sup>。除嗜盐菌外,嗜热菌也被用作生产 PHA 的经济宿主。例如,嗜热的沙氏芽孢杆菌 *Bacillus shackletonii* K5 菌株可以在 45 °C 和 pH 7.0 条件下合成高达其细胞干重 73% (9.76 g/L) 的 PHB<sup>[113]</sup>。

### 4.3 对基于极端微生物的 NGIB 进行的代谢改造

下面将以 *H. bluephagenesis* 为例, 分享改造 NGIB 菌株的经验, 希望能起到抛砖引玉的作用。

从新疆艾丁湖分离出的中度嗜盐菌 *H. bluephagenesis* 可以在高盐浓度、高 pH 的含葡萄糖矿质培养基中快速生长并能利用多种碳源积累丰富的 PHB。Zhao 等在 *H. bluephagenesis* 基因组上整合了类 T7 表达系统调控 *phaCAB* 基因, 显著增强了 *phaCAB* 的转录, 提高了 PHB 产量<sup>[46]</sup>。Qin 等在 *H. bluephagenesis* 中构建及优化了 CRISPR/Cas9 和 CRISPRi 系统, 为高效基因组编辑奠定了基础<sup>[114]</sup>。Ling 等通过阻断电子传递途径改变了 *H. bluephagenesis* 中 NADH 和 NAD<sup>+</sup> 的比例, 增加了 PHB 的积累<sup>[115]</sup>。此外 *H. bluephagenesis* 还被改造为能生产 P34HB、PHBV 等 PHA 的底盘菌, Ye 等在 *H. bluephagenesis* 中构建两条 4HB 合成途径的同时敲除了与 4HB 竞争的琥珀酸半醛脱氢酶, 以葡萄糖为单一碳源在 7 L 发酵罐中非无菌开放发酵 60 h 得到了干重 26.3 g/L 的菌体和占干重的 60.5% 的 P34HB, 其中 4HB 摩尔比为 17.04%<sup>[116]</sup>。尹进等插入甲基丙二酰辅酶 A 变位酶和脱羧酶 (ScpAB), 并敲除了 2-甲基柠檬酸合成酶 (PrpC) 后获得了能以葡萄糖为单一碳源稳定生产 3HV 含量为 5–12 mol% 的 PHBV 的菌株<sup>[45]</sup>。

### 4.4 NGIB 面临的挑战

尽管嗜盐菌已被设计成为 PHA 生产菌, 其依然存在一些有待解决的问题, 比如高盐造成的钢制设备锈蚀、诱导系统成本高、高盐废水处理和基因操作不便等问题<sup>[117-118]</sup>。借助合成生物学和代谢工程技术, 部分阻碍嗜盐菌进一步工业开发的问题得到了一定的缓解, 比如 *H. bluephagenesis* 适应高 pH 环境 (pH>8.5), 而在这样的碱性条件下钢制品耐锈蚀能力较强; 多种诱导体系也逐步引入菌株中以实现用温度、光线、pH 或溶氧等方法实现低成本诱导<sup>[119-122]</sup>。相信在未来会有更多问题得到解决, 使 NGIB 得到更广泛的应用。

## 5 总结与展望

PHA 因其具有良好的生物可降解性和生物相容性, 以及种类和性能的多样性, 受到广泛关注。随着越来越多的新型功能 PHA 被开发出来, PHA 的应用面将进一步扩大。然而生产成本和热力学性能依然是制约 PHA 大规模生产和商业化的最大难题。

通过合成与系统生物学、代谢工程、下一代生物工业技术等手段, 以极端微生物作为 PHA 的低成本生产平台菌株, 可通过无需灭菌的开放式连续发酵, 大大简化生物制造过程。同时, 利用代谢工程和合成生物学技术对生产菌株进行改造, 使更多的代谢流转向 PHA 合成, 可以提高底物转向 PHA 的转化率; 对菌株进行形态学、自絮凝改造, 可以简化 PHA 下游提纯加工流程, 从而大幅度降低 PHA 的生产成本。另一方面, 还需要不断开发能够改善 PHA 性能的新单体 (及最优的单体比例)、新结构和加工工艺等, 使 PHA 热力学性能可以接近甚至超越石油基塑料, 进一步促进 PHA 的应用与推广。

## REFERENCES

- [1] Lee SY. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 49(1): 1-14.
- [2] Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J Chem Technol Biot*, 2010, 82(3): 233-247.
- [3] Zinn M, Witholt B, Egli T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 53(1): 5-21.
- [4] Gao X, Chen JC, Wu Q, et al. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(6): 768-774.
- [5] 车雪梅, 司徒卫, 余柳松, 等. 聚羟基脂肪酸酯的应用展望. *生物工程学报*, 2018, 34(10): 1531-1542. Che XM, Situ W, Yu LS, et al. Application perspectives of polyhydroxyalkanoates. *Chin J*

- Biotech, 2018, 34(10): 1531-1542 (in Chinese).
- [6] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog Polym Sci*, 2000, 25(10): 1503-1555.
- [7] Li ZB, Yang J, Loh XJ. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Mater*, 2016, 8(4): e265.
- [8] Lu JN, Tappel RC, Nomura CT. Mini-review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates). *Polym Rev*, 2009, 49(3): 226-248.
- [9] Meng DC, Shen R, Yao H, et al. Engineering the diversity of polyesters. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 29: 24-33.
- [10] Chen GQ, Hajnal I, Wu H, et al. Engineering biosynthesis mechanisms for diversifying polyhydroxyalkanoates. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(10): 565-574.
- [11] Li ZB, Loh XJ. Water soluble polyhydroxyalkanoates: future materials for therapeutic applications. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(10): 2865-2879.
- [12] Ma YM, Wei DX, Yao H, et al. Synthesis, characterization and application of thermoresponsive polyhydroxyalkanoate-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide). *Biomacromolecules*, 2016, 17(8): 2680-2690.
- [13] Yao H, Wei DX, Che XM, et al. Comb-like temperature-responsive polyhydroxyalkanoate-graft-poly(2-dimethylamino-ethylmethacrylate) for controllable protein adsorption. *Polym Chem*, 2016, 7(38): 5957-5965.
- [14] Yu LP, Zhang X, Wei DX, et al. Highly efficient fluorescent material based on rare-earth-modified polyhydroxyalkanoates. *Biomacromolecules*, 2019, 20(9): 3233-3241.
- [15] Kim DY, Kim HW, Chung MG, et al. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J Microbiol*, 2007, 45(2): 87-97.
- [16] Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol*, 2010, 102(6): 1437-1449.
- [17] 李正军, 魏晓星, 陈国强. 生产聚羟基脂肪酸酯的微生物细胞工厂. *生物工程学报*, 2010, 26(10): 1426-1435.
- Li ZJ, Wei XX, Chen GQ. Microbial cell factories for production of polyhydroxyalkanoates. *Chin J Biotech*, 2010, 26(10): 1426-1435 (in Chinese).
- [18] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4): 347-355.
- [19] Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405.
- [20] Li LX, Piatek MJ, Atef A, et al. Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol Biol*, 2014, 78(4/5): 407-416.
- [21] Coffey A, Ross RP. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 82(1/2): 303-321.
- [22] Jansen R, Van Embden JD, Gaastra W. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [23] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [24] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845.
- [25] Lv L, Ren YL, Chen JC, et al. Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis. *Metab Eng*, 2015, 29: 160-168.
- [26] Li D, Lv L, Chen JC, et al. Controlling microbial PHB synthesis via CRISPRi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(14): 5861-5867.
- [27] Jung HR, Yang SY, Moon YM, et al. Construction of efficient platform *Escherichia coli* strains for polyhydroxyalkanoate production by engineering branched pathway. *Polymers*, 2019, 11(3): 509.
- [28] Macrae RM, Wilkinson JF. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J Gen Microbiol*, 1958, 19(1): 210-222.
- [29] Chowdhury AA. Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzym. *Archiv*

- Mikrobiol, 1963, 47(2): 167-200.
- [30] Merrick JM, Doudoroff M. Depolymerization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J Bacteriol*, 1964, 88(1): 60-71.
- [31] Delafield FP, Doudoroff M, Palleroni NJ, et al. Decomposition of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Pseudomonads*. *J Bacteriol*, 1965, 90(5): 1455-1466.
- [32] Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 128(3): 219-228.
- [33] Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 1988, 170(12): 5837-5847.
- [34] Peoples OP, Sinskey AJ. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J Biol Chem*, 1989, 264(2): 15298-15303.
- [35] Sim SJ, Snell KD, Hogan SA, et al. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(1): 63-67.
- [36] Kim J, Kim YJ, Choi SY, et al. Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnol J*, 2017, 12(1): 1600648.
- [37] Kim YJ, Choi SY, Kim J, et al. Structure and function of the N-terminal domain of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnol J*, 2016, 12(1): 1600649.
- [38] Wittenborn EC, Jost M, Wei YF, et al. Structure of the catalytic domain of the class I polyhydroxybutyrate synthase from *Cupriavidus necator*. *J Biol Chem*, 2016, 291(48): 25264-25277.
- [39] Amara A, Steinbüchel A, Rehm B. *In vivo* evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(4/5): 477-482.
- [40] Nomura CT, Taguchi S. PHA synthase engineering toward superbio-catalysts for custom-made biopolymers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 73(5): 969-979.
- [41] Sujatha K, Mahalakshmi A, Solaiman DKY, et al. Sequence analysis, structure prediction, and functional validation of *phaC1/phaC2* genes of *Pseudomonas* sp. LDC-25 and its importance in polyhydroxyalkanoate accumulation. *J Biomol Struct Dyn*, 2009, 26(6): 771-779.
- [42] Takase T, Matsumoto K, Taguchi S, et al. Alteration of substrate chain-length specificity of type II synthase for polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *in vitro* evolution: *in vivo* and *in vitro* enzyme assays. *Biomacromolecules*, 2004, 5(2): 480-485.
- [43] Matsumoto K, Takase K, Aoki E, et al. Synergistic effects of Glu130Asp substitution in the type II polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: enhancement of PHA production and alteration of polymer molecular weight. *Biomacromolecules*, 2005, 6(1): 99-104.
- [44] Matsumoto K, Aoki E, Takase K, et al. *In vivo* and *in vitro* characterization of Ser477X mutations in polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase 1 from *Pseudomonas* sp. 61-3: effects of beneficial mutations on enzymatic activity, substrate specificity, and molecular weight of PHA. *Biomacromolecules*, 2006, 7(8): 2436-2442.
- [45] Yin J, Wang H, Fu XZ, et al. Effects of chromosomal gene copy number and locations on polyhydroxyalkanoate synthesis by *Escherichia coli* and *Halomonas* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(13): 5523-5534.
- [46] Zhao H, Zhang HM, Chen XB, et al. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*. *Metab Eng*, 2017, 39: 128-140.
- [47] Acuña JMBD, Bielecka A, Häussler S, et al. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 88.
- [48] Poblete-Castro I, Binger D, Rodrigues A, et al. In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. *Metab Eng*, 2013, 15: 113-123.
- [49] Choi JI, Lee SY. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production



- by fermentation. *Bioprocess Eng*, 1997, 17(6): 335-342.
- [50] Slater SC, Voige WH, Dennis DE. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J Bacteriol*, 1988, 170(10): 4431-4436.
- [51] Wang F, Lee SY. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(12): 4765-4769.
- [52] Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, et al. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polym Degrad Stab*, 2004, 83(1): 79-86.
- [53] Park SJ, Ahn WS, Green PR, Lee, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 74(1): 82-87.
- [54] Purama RK, Al-Sabahi JN, Sudesh K. Evaluation of date seed oil and date molasses as novel carbon sources for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Cupriavidus necator* H16 Re 2058/pCB113. *Ind Crop Prod*, 2018, 119: 83-92.
- [55] Bhatia SK, Yoon JJ, Kim HJ, et al. Engineering of artificial microbial consortia of *Ralstonia eutropha* and *Bacillus subtilis* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production from sugarcane sugar without precursor feeding. *Bioresour Technol*, 2018, 257: 92-101.
- [56] Leaf TA, Peterson MS, Stoup SK, et al. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate. *Microbiology*, 1996, 142(5): 1169-1180.
- [57] Poirier Y, Dennis DE, Klomparens K, et al. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science*, 1992, 256(5056): 520-523.
- [58] Marangoni C, Furigo A Jr, De Aragão GMF. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Process Biochem*, 2002, 38(2): 137-141.
- [59] Koller M, Hesse P, Bona R, et al. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromol Biosci*, 2007, 7(2): 218-226.
- [60] Aldor IS, Kim SW, Prather KLJ, et al. Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(8): 3848-3854.
- [61] Yang JE, Choi YJ, Lee SJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 95-104.
- [62] Haywood GW, Anderson AJ, Williams DR, et al. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. *Int J Biol Macromol*, 1991, 13(2): 83-88.
- [63] Doi Y, Kanesawa Y, Kunioka M, et al. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 1990, 23(1): 26-31.
- [64] Valentin HE, Dennis D. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *J Biotechnol*, 1997, 58(1): 33-38.
- [65] Li ZJ, Shi ZY, Jian J, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2010, 12(4): 352-359.
- [66] Park SJ, Jang YA, Noh W, et al. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 112(3): 638-643.
- [67] Santimano MC, Prabhu NN, Garg S. PHA production using low-cost agro-industrial wastes by *Bacillus* sp. strain COL1/A6. *Res J Microbiol*, 2009, 4(3): 89-96.

- [68] Sheu DS, Chen WM, Yang JY, et al. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 44(5): 289-294.
- [69] Sukruansuwan V, Napathorn SC. Use of agro-industrial residue from the canned pineapple industry for polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* strain A-04. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 202.
- [70] Park SJ, Park JP, Lee SY. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(3): 185-189.
- [71] Rodriguez-Perez S, Serrano A, Panti3n AA, et al. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *J Environ Manage*, 2018, 205: 215-230.
- [72] Scott D, Brannan J, Higgins IJ. The effect of growth conditions on intracytoplasmic membranes and methane mono-oxygenase activities in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology*, 1981, 125(1): 63-72.
- [73] Brigham C. Perspectives for the biotechnological production of biofuels from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> using *Ralstonia eutropha* and other 'Knallgas' bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(5): 2113-2120.
- [74] Miyake M, Takase K, Narato M, et al. Polyhydroxybutyrate production from carbon dioxide by Cyanobacteria. *Appl Biochem Biotechnol*, 2000, 84: 991-1002.
- [75] Andree3en B, Lange AB, Robenek H, et al. Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(2): 622-626.
- [76] S3nchez RJ, Schripsema J, Da Silva LF, et al. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHA<sub>mcl</sub>) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *Eur Polym J*, 2003, 39(7): 1385-1394.
- [77] Kroumova AB, Wagner GJ, Davies HM. Biochemical observations on medium-chain-length polyhydroxyalkanoate biosynthesis and accumulation in *Pseudomonas mendocina*. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 405(1): 95-103.
- [78] Cavalheiro JMBT, Raposo RS, De Almeida MCMD, et al. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresour Technol*, 2012, 111: 391-397.
- [79] Doi Y, Segawa A, Kunioka M. Biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced from  $\gamma$ -butyrolactone and butyric acid by *Alcaligenes eutrophus*. *Polym Commun*, 1989, 30(6): 169-171.
- [80] Kobayashi G, Shiotani T, Shima Y, et al. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas* sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA440. *Stud Polym Sci*, 1994, 12: 410-416.
- [81] Lu XY, Zhang JY, Wu Q, et al. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 221(1): 97-101.
- [82] Chung AL, Jin HL, Huang LJ, et al. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxydodecanoate) by  $\beta$ -oxidation inhibited mutant of *Pseudomonas entomophila* L48. *Biomacromolecules*, 2011, 12(10): 3559-3566.
- [83] Wang HH, Li XT, Chen GQ. Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a *fadBA* knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. Putida* KT2442. *Process Biochem*, 2009, 44(1): 106-111.
- [84] Chen GQ, Jiang XR. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(3): 192-197.
- [85] Liu Q, Luo G, Zhou XR, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metab Eng*, 2010, 13(1): 11-17.
- [86] Qi QS, Steinb3chel A, Rehm BHA. Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis

- in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid  $\beta$ -oxidation by acrylic acid. FEMS Microbiol Lett, 1998, 167(1): 89-94.
- [87] Tripathi L, Wu LP, Meng DC, et al. *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. Bioresour Technol, 2013, 142: 225-231.
- [88] Tripathi L, Wu LP, Chen JC, et al. Synthesis of diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate -*block*-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-*b*-PHHx] by a  $\beta$ -oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. Microb Cell Fact, 11: 44.
- [89] Li MY, Chen XB, Che XM, et al. Engineering *Pseudomonas entomophila* for synthesis of copolymers with defined fractions of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. Metab Eng, 2018, 52: 253-262.
- [90] Green PR, Kemper J, Schechtman L, et al. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid  $\beta$ -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. Biomacromolecules, 2002, 3(1): 208-213.
- [91] Ward PG, O'Connor KE. Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates containing aromatic and aliphatic monomers by *Pseudomonas putida* CA-3. Int J Biol Macromol, 2005, 35(3/4): 127-133.
- [92] Choi SY, Park SJ, Kim WJ, et al. One-step fermentative production of poly(lactate-*co*-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. Nat Biotechnol, 2016, 34(4): 435-440.
- [93] Park SJ, Lee TW, Lim SC, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxybutyrate from unrelated carbon source by metabolically engineered *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(1): 273-283.
- [94] Yang JE, Kim JW, Oh YH, et al. Biosynthesis of poly(2-hydroxyisovalerate-*co*-lactate) by metabolically engineered *Escherichia coli*. Biotechnol J, 2016, 11(12): 1572-1585.
- [95] David Y, Joo JC, Yang JE, et al. Biosynthesis of 2-hydroxyacid-containing polyhydroxyalkanoates by employing butyryl-CoA transferases in metabolically engineered *Escherichia coli*. Biotechnol J, 2017, 12(11), DOI: 10.1002/biot.201700116.
- [96] Li ZJ, Qiao KJ, Che XM, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of the quadripolymer poly(glycolate-*co*-lactate-*co*-3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) from glucose. Metab Eng, 2017, 44: 38-44.
- [97] Yang JE, Park SJ, Kim WJ, et al. One-step fermentative production of aromatic polyesters from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. Nat Commun, 2018, 9: 79.
- [98] Mizuno S, Enda Y, Saika A, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxy-4-methylvalerate and 2-hydroxy-3-phenylpropionate units from a related or unrelated carbon source. J Biosci Bioeng, 2018, 125(3): 295-300.
- [99] Jiang XR, Wang H, Shen R, et al. Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation. Metab Eng, 2015, 29: 227-237.
- [100] Shen R, Ning ZY, Lan YX, et al. Manipulation of polyhydroxyalkanoate granular sizes in *Halomonas bluephagenesis*. Metab Eng, 2019, 54: 117-126.
- [101] Wang Y, Wu H, Jiang XR, et al. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. Metab Eng, 2014, 25: 183-193.
- [102] Jiang XR, Chen GQ. Morphology engineering of bacteria for bio-production. Biotechnol Adv, 2015, 34(4): 435-440.
- [103] Bi E, Lutkenhaus J. Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. J Bacteriol, 1993, 175(4): 1118-1125.
- [104] van Den Ent F, Amos LA, Löwe J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. Nature, 2001, 413(6851): 39-44.
- [105] Graumann PL. Cytoskeletal elements in bacteria. Curr Opin Microbiol, 2004, 7(6): 565-571.
- [106] Tan D, Wu Q, Chen JC, et al. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. Metab Eng, 2014, 26: 34-47.
- [107] Ummalyma SB, Gnansounou E, Sukumaran RK, et al. Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae—An overview. Bioresour Technol, 2017, 242: 227-235.
- [108] Bauer FF, Govender P, Bester MC. Yeast

- flocculation and its biotechnological relevance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(1): 31-39.
- [109] Ling C, Qiao GQ, Shuai BW, et al. Engineering self-flocculating *Halomonas campaniensis* for wastewaterless open and continuous fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 116(4): 805-815.
- [110] Yue HT, 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. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 108.
- [111] Tan D, Xue YS, Aibaidula G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol*, 2011, 102(17): 8130-8136.
- [112] Mahansaria R, Dhara A, Saha A, et al. Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinema ajinwuisis* (as synonym)  $\equiv$  *Natrinema altunense* strain RM-G10. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 1480-1490.
- [113] Liu Y, Huang SB, Zhang YQ, et al. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. *J Environ Sci*, 2014, 26(7): 1453-1462.
- [114] Qin Q, Ling C, Zhao YQ, et al. CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile *Halomonas* spp. *Metab Eng*, 2018, 47: 219-229.
- [115] Ling C, Qiao GQ, Shuai BW, et al. Engineering NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in *Halomonas bluephagenesis* for enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHA). *Metab Eng*, 2018, 49: 275-286.
- [116] Ye JW, Hu DK, Che XM, et al. Engineering of *Halomonas bluephagenesis* for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose. *Metab Eng*, 2018, 47: 143-152.
- [117] Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D, et al. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(6): 1687-1696.
- [118] Mahler N, Tschirren S, Pflügl S, et al. Optimized bioreactor setup for scale-up studies of extreme halophilic cultures. *Biochem Eng J*, 2018, 130: 39-46.
- [119] Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Pérez NO, et al. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 18.
- [120] Müller K, Engesser R, Metzger S, et al. A red/far-red light-responsive bi-stable toggle switch to control gene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): e77.
- [121] Yin X, Shin HD, Li JH, et al. P gas, a low-pH-induced promoter, as a tool for dynamic control of gene expression for metabolic engineering of *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(6): e03222-16.
- [122] Khosla C, Curtis JE, Bydalek P, et al. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* using an oxygen-responsive promoter. *Nat Biotechnol*, 1990, 8(6): 554-558.

(本文责编 陈宏宇)