

· 综述 ·

微生物发酵法生产聚羟基脂肪酸酯的研究进展

袁恺^{1,2,3*}, 周卫强^{1,2,3*}, 彭超^{1,2,3}, 唐堂^{1,2,3}, 王琪^{1,2,3}, 汤维涛^{1,2,3}, 安泰^{1,2,3}, 陈博^{1,2,3}, 刘海军^{4,5}, 武丽达^{4,5}, 李义^{4,5}, 佟毅^{4,5}

- 1 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209
- 2 营养健康与食品安全北京市重点实验室, 北京 102209
- 3 老年营养食品研究北京市工程实验室, 北京 102209
- 4 中粮生物科技股份有限公司, 安徽 蚌埠 233010
- 5 玉米深加工国家工程研究中心, 吉林 长春 130033

袁恺, 周卫强, 彭超, 等. 微生物发酵法生产聚羟基脂肪酸酯的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(2): 384-394.

Yuan K, Zhou WQ, Peng C, et al. Engineering progress in microbial production of polyhydroxyalkanoates. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 384-394.

摘要: 聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是一类由羟基脂肪酸单体通过酯化聚合得到的高分子化合物, 因具有传统石油基塑料类似的力学特征、100%生物降解性和生物相容性而被认为是最有潜力的绿色环保材料之一。受限于其高昂的生产成本, PHAs 作为绿色环保材料的应用推广困难。文中分别从细胞形态调控、代谢途径构建、廉价碳源利用和开放式发酵技术开发等方面详细介绍了目前有效降低 PHAs 生产成本的方法。尽管大部分研究成果还局限于实验室阶段, 但是研究方法和方向为实现低成本 PHAs 的工业化生产提供了理论指导。

关键词: 聚羟基脂肪酸酯, 基因工程, 廉价碳源, 高密度发酵, 开放式发酵

Engineering progress in microbial production of polyhydroxyalkanoates

Kai Yuan^{1,2,3*}, Weiqiang Zhou^{1,2,3*}, Chao Peng^{1,2,3}, Tang Tang^{1,2,3}, Qi Wang^{1,2,3}, Weitao Tang^{1,2,3}, Tai An^{1,2,3}, Bo Chen^{1,2,3}, Haijun Liu^{4,5}, Lida Wu^{4,5}, Yi Li^{4,5}, and Yi Tong^{4,5}

- 1 Nutrition and Health Research Institute, COFCO, Beijing 102209, China
- 2 Beijing Key Laboratory of Nutrition, Health and Food Safety, Beijing 102209, China
- 3 Beijing Engineering Laboratory for Geriatric Nutrition Food Research, Beijing 102209, China
- 4 COFCO Biochemical Co., Ltd., Bengbu 233010, Anhui, China
- 5 National Engineering Research Center of Corn Deep Processing, Changchun 130033, Jilin, China

Abstract: Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers obtained by esterification of hydroxy fatty acid monomers. Due to

Received: May 19, 2020; Accepted: July 8, 2020

Corresponding author: Yi Tong. Tel/Fax: +86-10-56989570; E-mail: tongyi@cofco.com

*These authors contributed equally to this study.

similar mechanical characteristics of traditional petroleum-based plastics, 100% biodegradability and biocompatibility, PHAs are considered to be one of the most potential green materials. However, the application and promotion of PHAs as a green and environmentally friendly material are difficult because of the high production costs. This article focuses on the current methods to reduce production cost of PHAs effectively, such as cell morphology regulation, metabolic pathway construction, economic carbon source utilization and open fermentation technology development. Despite most research results are still limited in laboratory, the research methods and directions provide theoretical guidance for the industrial production of economic PHAs.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, genetic engineering, economic carbon source, high density fermentation, open fermentation

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是一类由羟基脂肪酸单体通过酯化聚合得到的高分子化合物, 是微生物在特定环境下的能量储备物质。随着白色污染加重和石油资源枯竭, 具有传统石油基塑料相似的力学特征、100% 生物降解性和生物相容性的 PHAs 被认为是最有前景的绿色环保材料之一。目前只有少数工厂, 例如德国 Biomer Inc.、美国 P&G、巴西 PHB Industrial 和中国 Tianan Biologic 等实现了 PHAs 的中试级别生产, 但产量远远无法满足市场需求^[1]。主要原因是 PHAs 高昂的生产成本 (2.2–5.0 欧元/kg) 大大限制了其作为绿色环保材料的应用^[2]。本文首先介绍了 PHAs 的类型和合成代谢途径, 随后从细胞形态调控、代谢途径构建、廉价碳源利用和开放式发酵技术开发等方面详细介绍了不同研究团队在降低 PHAs 生产成本方面的研究成果, 以期为实现低成本 PHAs 的工业化生产提供理论指导。

1 PHAs 简介

1.1 PHAs 分类

根据单体碳原子数 PHAs 可以分为短链 PHAs (Short-chain-length, SCL) 和 中 长 链 PHAs (Medium-long-chain-length, MCL), 根据单体不同排列方式又可以分为均聚物 (Homo polymer)、无规共聚物 (Random copolymer) 和嵌段共聚物 (Block copolymer)。超过 150 种羟基脂肪酸可以作为 PHAs 合成的单体, 其多元化组合赋予了 PHAs 性能 的 多 样 性, 例 如 SCL PHAs 材 料 坚 硬 易 碎,

MCL PHAs 材料韧性良好, 按照不同比例混合后的共聚物表现出不同的硬度和韧性, 这为开发不同特性的产品提供了无限可能。

第一代商业 PHAs, 聚-3-羟基丁酸酯 (Polyhydroxybutyrate, PHB) 是 3-羟基丁酸 (3HB) 的均聚物, 也是发现最早、研究最深入的 PHAs 材料。因为其良好的抗氧化性、防水性和较高的硬度, PHB 材料主要被开发用作包装材料。但是它较脆的材质和接近降解温度 (220 °C) 的溶解温度 (175 °C)^[3]不利于热加工处理。第二代商业 PHAs 是由 3HB 和 3-羟基戊酸 (3HV) 无规则共聚而成的聚 3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯 (Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P(3HB-co-3HV))。相比于 PHB, P(3HB-co-3HV) 在热加工性能、韧性和延展性方面均得到了提高。第三代商业 PHAs 是由 3HB 和中链 3-羟基己酸 (3HHx) 无规则共聚合成的聚-3-羟基丁酸-3-羟基己酸 (Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), P(3HB-co-3HHx))。3HHx 的混入给予了材料优异的弹性体性能和生物相容性能, 因而被开发用作生物医用材料。随着 PHAs 研究的进一步发展, 研究人员预测 P(3HB-co-4HB) 将会成为第四代商业 PHAs, 4HB 的混入成功克服了 PHB 质地脆弱的缺点^[4]。目前 PHAs 已经用于塑料工业的包装材料、农业的农膜材料以及医药领域的组织工程和药物缓释材料等^[5-7]的加工生产中。

1.2 PHAs 合成代谢途径

超过 90 个属的 500 种细菌具有 PHAs 合成能力, 其中 PHAs 合成代谢途径主要有 3 条 (图 1,

红色部分)^[8]。途径 I：从糖酵解途径 (EMP) 生成的两分子乙酰 CoA (Acetyl-CoA) 依次经 β -酮基硫解酶 (PhaA) 和乙酰乙酰 CoA 还原酶 (PhaB)，最后在 PHA 合酶 (PhaC) 催化下合成 PHB。途径 II：同样以乙酰 CoA 为起点的脂肪酸从头合成途径 (*de novo synthesis*) 的中间产物参与 PHAs 的合成。该途径的关键酶 3-羟基酯酰 ACP-CoA 转移酶 (PhaG) 将 *R*-3-羟基酯酰 ACP (*R*-3-hydroxyacyl-ACP) 转化为 *R*-3-羟基酯酰 CoA (*R*-3-hydroxyacyl-CoA)，从而被 PhaC 催化合成 PHAs。途径 III：脂肪酸被活化成酯酰 CoA 后进入 β -氧化 (β -oxidation) 途径，中间产物 *S*-3-羟基酯酰 CoA (*S*-3-hydroxyacyl-CoA) 在差向异构酶作用下转换

成可以被 PhaC 催化利用的 *R*-3-羟基酯酰 CoA。尽管部分微生物利用脂肪酸合成 PHB，但是其主要利用 β -氧化途径生成的乙酰 CoA 通过途径 I 合成。

除这 3 条主要途径外，微生物体内还存在其他 PHAs 合成途径，以及通过基因工程构建的新的 PHAs 合成途径 (图 1, 蓝色部分)。例如从草酰乙酸 (Oxaloacetate) 出发，通过基因工程手段为 P(3HB-*co*-3HV) 的合成提供 3-羟基戊酰 CoA (3-hydroxyvaleryl-CoA, 3HV)^[9]；从琥珀酰 CoA (Succinyl-CoA) 出发为 P(3HB-*co*-4HB) 合成提供 4-羟基丁酰 CoA (4-hydroxybutyryl-CoA, 4HB)^[10]等。

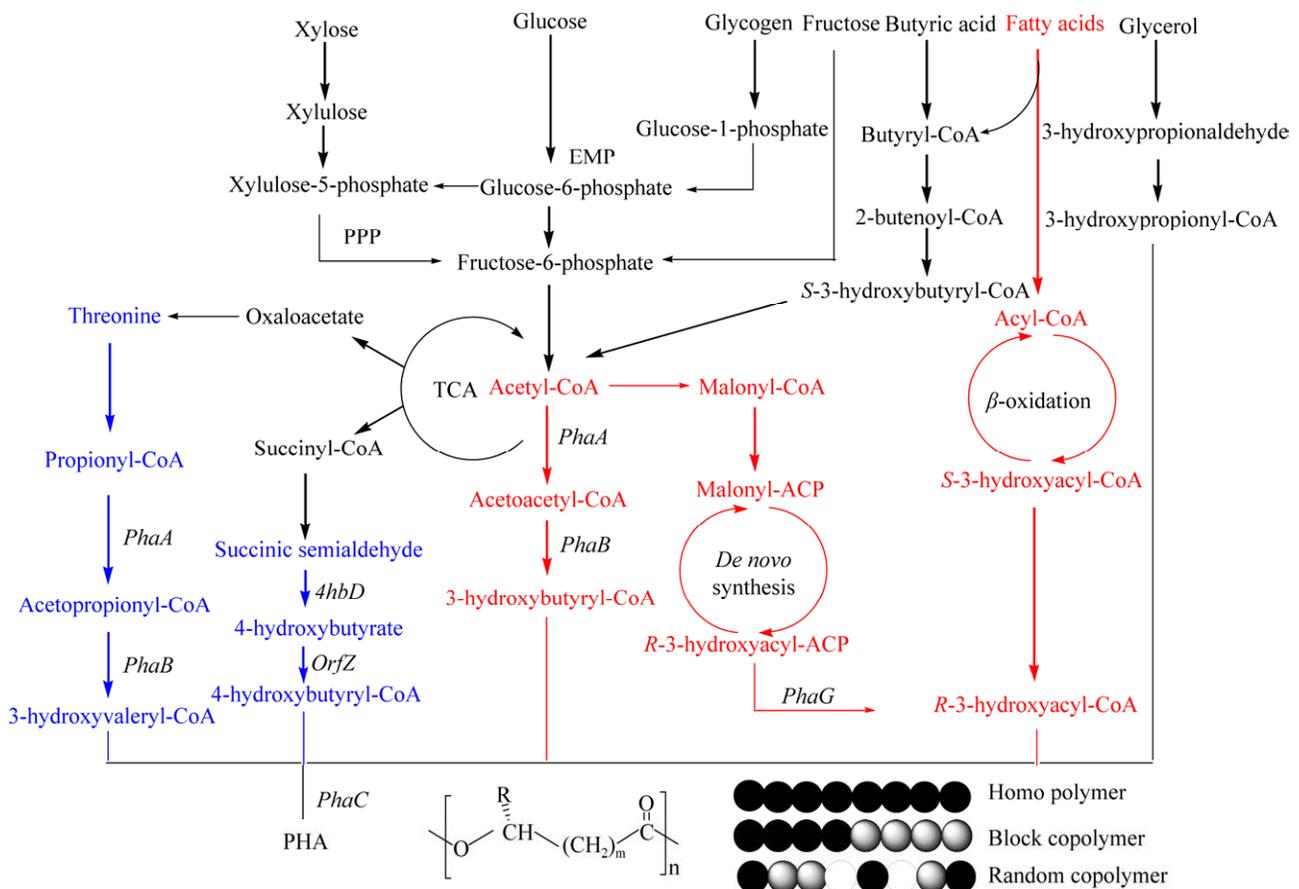


图 1 PHAs 合成代谢途径

Fig. 1 Synthesis pathways of PHAs.

2 微生物发酵法生产低成本 PHAs

PHAs 的生产成本集中在发酵物料的消耗和灭菌过程的能源消耗上,其中前者占成本的 50%,后者占 30%^[11]。基于此,各个研究团队希望通过降低发酵物料成本和灭菌过程能源消耗成本来降低 PHAs 的生产成本。例如提高菌株产率、利用廉价物料以及开发开放式发酵技术等。

2.1 细胞形态调控及代谢途径构建

作为胞内代谢产物,当盐单胞菌 *Halomonas campaniensis* LS21 内 PHAs 充满细胞体积时也仅达到生物量的 60%^[12],这表明 PHAs 积累量严重受限于细胞体积。研究人员发现通过抑制细胞分裂蛋白 FtsZ,由杆状转变为丝状形态的重组大肠杆菌 *E. coli* Trans1T1 的 PHB 占比增加了 125%^[13]。随后, Wu 等^[14]发现基因 *minCD* 和细胞骨架蛋白 MerB 也具有抑制细胞分裂和调控细胞形态的作用,重组大肠杆菌 *E. coli* JM109 内的 PHB 积累量达到生物量的 80%。基因 *minCD* 和 *ftsZ* 在 PHAs 生产菌株中同样具有影响细胞分裂和形态的作用^[15]。过表达 *minCD* 的重组盐单胞菌 *Halomonas* TD08 在静置培养下长成数百微米的丝状菌体,PHB 含量从 68.69% 提升至 82.04%,即使在振荡培养下菌丝长度依然是出发菌株的 1.4 倍^[9]。为了解决 FtsZ 和 MerB 非正常表达后细胞数量减少的问题, Jiang 等^[12]构建了温度敏感表达质粒,菌体在 30 °C 时正常生长到预定生物量后升高至 37 °C, FtsZ 和 MerB 表达受限,菌体细胞膜刚性遭到破坏、细胞分裂受到抑制,从细杆状转向粗丝状的菌体可以实现更多 PHAs 的积累。这一举措既实现了发酵前期生物量积累、发酵后期菌体存储空间增大的目的,又消除了基因工程手段对发酵前期细胞生长的负面影响。

除了形态调控,基因工程还适用于构建中间物的合成代谢途径。大部分菌株需利用多种碳源合成共聚物 PHAs,例如在培养基中同时提供葡萄

糖和丙酸才能获得共聚物 P(3HB-co-3HV)。为了解决这个问题, Tan 等^[9]强化苏氨酸合成途径的同时敲除 2-甲基柠檬酸合酶,胞内丙酰 CoA 浓度上升,重组盐单胞菌 TD01 实现了单一碳源下 P(3HB-co-3HV) 的生物合成。同样的,在单一碳源下, Li 等^[10]通过敲除琥珀酸半醛脱氢酶基因和过表达 *orfZ*,胞内碳通量流向 4HB-CoA 的合成,为共聚物 P(3HB-co-4HB) 的合成提供前体。构建中间物的合成代谢途径,一方面避免了使用其他脂肪酸导致的原料成本增加和可能带来的毒性作用,另一方面为利用微生物直接合成多种 PHAs 提供了指导方向。

2.2 廉价碳源的利用

实现低成本 PHAs 生产,寻找经济可行且稳定高效合成 PHAs 的发酵物料是关键,尤其是占发酵物料总成本 70%–80% 的碳源替代物。合理利用廉价碳源,尤其是工农业废弃物料,能够有效降低 PHAs 的生产成本,增加 PHAs 的市场竞争力。

2.2.1 农业廉价碳源

作为农业大国,我国廉价碳源储量丰富。玉米淀粉经液化、糖化、灭酶处理后用于发酵生产增加了使用成本,因此开发直接利用玉米淀粉的 PHAs 生产菌株十分重要。Shamala 等^[16]筛选出一株能同时实现 α -淀粉酶分泌和 PHAs 积累的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. CFR-67。相比于 30 g/L 的葡萄糖,当以 30 g/L 玉米淀粉作为碳源时, CFR-67 的生物量和 PHAs 分别提高了 25% 和 50%。如果同时添加 5 g/L 的麦麸和米糠水解液, CFR-67 的生物量达到 10 g/L, PHAs 含量升高至 5.9 g/L。地中海富盐菌 *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 利用膨化玉米淀粉和膨化米糠作为复合碳源时生物量达到 140 g/L, PHAs 产量达到 77.8 g/L^[17]。由此可见,直接利用玉米淀粉可以实现高生物量和高 PHAs 的积累。近年来也有研究人员尝试将米糠、麦麸等农业废弃物用作 PHAs 的发酵碳源。米糠含有 19.9% (W/W) 的淀粉和 19.5% (W/W)

的脂肪,经水解后可以被重组大肠杆菌 *E. coli* XL1-Blue 和真氧产碱杆菌 *Ralstonia eutropha* NCIMB11599 用作合成 PHB 的碳源^[18]。

秸秆经生物炼制得到的纤维素和木质素同样可以作为 PHAs 生产的碳源。Li^[19]按照葡萄糖:木糖:阿拉伯糖=4:2:1 的比例模拟纤维素水解液验证其用于 PHAs 生产的可能性。结果显示,伯克霍尔德里氏菌 *Burkholderia sacchari* DSM 17165 的 PHAs 产量占生物量的 77%,达到 67 g/L。木质素的利用效果远低于纤维素,贪铜菌 *Cupriavidus basilensis* B-8 利用处理后的木质素合成 PHAs 得率仅 482.7 mg/L^[20]。

2.2.2 甘蔗炼糖行业廉价碳源

甘蔗炼糖行业中的副产物糖蜜和蔗渣都是生产低成本 PHAs 的理想碳源。以稀释后的甘蔗糖蜜为碳源,枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* RS1 经过 48 h 发酵后生物量达到 9.5 g/L, PHAs 含量达到生物量的 70.5%^[21]。另一株 *B. subtilis* 以酸处理后的甘蔗糖蜜为碳源,经过 96 h 发酵后生物量达到 38.98 g/L, PHAs 含量 32.25 g/L, PHAs 占生物量 82.99%^[22]。相比于糖蜜,蔗渣的利用难度稍大。蔗渣经酸水解后除木糖 (16.9 g/L) 和葡萄糖 (9.7 g/L) 外还含有糠醛、乙酸等毒性物质。在 10 L 发酵罐中进行的分批发酵实验证明洋葱伯克氏菌 *Burkholderia cepacia* IPT 048 和 *B. sacchari* IPT 101 可以利用蔗渣水解液发酵生产 PHAs,且这两株菌的生物量都达到 4.4 g/L,其中 PHAs 含量分别达到生物量的 53%和 62%。当仅以木糖和葡萄糖作为混合碳源时,这两株菌株的生物量都能够达到 60 g/L, PHAs 含量占比 60%^[23]。这表明蔗渣水解液中的毒性物质对细胞积累 PHAs 影响极大,是实现高效利用蔗渣水解液的阻碍之一。

2.2.3 生物柴油行业廉价碳源

生物柴油行业每生产 100 kg 生物柴油将产生 10 kg 粗甘油,其中甘油占比 75%。据报道钩虫贪铜菌 *C. necator* DSM 545 可以以粗甘油为底物合

成 PHB,尽管占比可以达到生物量的 59.8%,但是生物量只有 5.7 g/L^[24]。此外 DSM 545 可以将丙酮酸和粗甘油作为共同碳源合成 P(3HB-4HB-3HV),其中生物量达到 45 g/L, PHAs 产量达到 16.7 g/L, PHAs 占比 36.9%^[25]。同样地,苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* EGU45 直接利用粗甘油可以实现 3.16 g/L 生物量和 1.83 g/L PHAs 的积累^[26]。研究结果证明粗甘油可以作为 PHAs 生产的廉价碳源,尤其是其产量大、成本低以及环境无污染等特性,都为生产低成本 PHAs 提供了可能性。但是目前研究结果发现利用粗甘油无法达到 PHAs 的高产量积累,通过基因工程手段或发酵调控策略提高粗甘油利用率或许是未来实现粗甘油利用的发展方向之一。

2.2.4 废水废料

工农业废水废料中富含的有机质通过酸化或厌氧发酵后转化成的挥发性脂肪酸 (Volatile fatty acid, VFAs),是微生物生产 PHAs 的高效廉价碳源。在 1 L 发酵罐中, *R. eutropha* H16 能够将工农业废水转化的 VFAs 作为碳源和底物能量完成 P(3HB-co-3HV) 的积累。经 48 h 发酵后,生物量达到 112 g/L,其中 PHAs 占比 83.3%^[27]。在江苏省无锡市芦村进行的 100 L 发酵罐中试实验中, Jia 等^[28]同样利用酸化后的污水沉淀物实现了 PHAs 的微生物转化,其中 PHAs 产量可以达到生物量的 59.47%。除工农业废水废料外,生活产生的废弃生物质^[29],例如豌豆皮、土豆皮、洋葱皮等^[30]生物质资源经酸化后同样可以转化为 VFAs,最后用于低成本 PHAs 的生产。

除此之外,表 1 中还列举了其他可以用于低成本 PHAs 生产的碳源,例如石油炼制过程中的甲苯、乙苯、二甲苯等苯系化合物^[31]、奶酪加工过程中的乳清^[32-33],油炸食品加工过程中的废弃橄榄油、棕榈油、葵花籽油等植物油^[34-36]。用于微生物发酵生产低成本 PHAs 的理想碳源种类丰富,其中来自农业、工业、城市排放和餐余垃圾

表 1 用于低成本 PHAs 生产的廉价碳源

Table 1 Economic carbon source on producing inexpensive PHAs

Substrate sources	Substrate main components	Pretreatment	Strains	Biomass (g/L)	Yield of PHA (g/L)	PHA (%Bio-mass)	Productivity of PHA (g/(L·h))	References
Agriculture	Corn starch	–	<i>Bacillus</i> sp. CFR-67	10.00	5.90	59.00	0.08	[16]
		Extruded	<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500	140.00	77.80	55.60	0.66	[17]
	Rice bran	Acid treatment	<i>Ralstonia eutropha</i> NCIMB11599	5.34	5.20	97.20	–	[18]
			<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	2.98	2.68	90.10	–	[18]
	–	–	<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	87.00	67.00	77.00	1.67	[19]
	Lignin	Alkali treatment	<i>Cupriavidus basilensis</i> B-8	–	0.48	–	–	[20]
Biodiesel Industry	Crude glycerin	–	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	5.70	3.42	59.80	0.07	[24]
			<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	45.00	16.70	36.90	0.25	[25]
			<i>Bacillus thuringiensis</i> EGU45	3.16	1.83	57.90	0.04	[26]
			<i>Ralstonia eutropha</i> H16	112.00	93.30	83.30	1.94	[27]
Industrial Waste	Organic matters	Low pH anaerobic fermentation	A PHA-accumulated bacterial consortium	0.47	0.28	59.47	0.01	[28]
		Low pH anaerobic fermentation and membrane filtration	A PHA-accumulated bacterial consortium	4.85	1.64	33.80	0.03	[30]
Waste Biomass	Organic matters	Low pH anaerobic fermentation	A PHA-accumulated bacterial consortium	4.85	1.64	33.80	0.03	[30]
		Low pH anaerobic fermentation	A PHA-accumulated bacterial consortium	4.85	1.64	33.80	0.03	[30]
Sugar Refining Industry	Molasses	–	<i>Bacillus subtilis</i> RS1	9.50	6.70	70.50	0.14	[21]
		Acid treatment	<i>Bacillus subtilis</i>	38.98	32.25	83.00	0.34	[22]
	Bagasse	Acid treatment and toxicity removal	<i>Burkholderia cepacia</i> IPT 048	4.40	2.33	53.00	0.11	[23]
			<i>Burkholderia sacchari</i> IPT 101	4.40	2.73	62.00	0.09	[23]
Petroleum Industry	Benzene compounds	–	<i>Pseudomonas fulva</i> TY16	3.80	2.20	58.00	0.06	[31]
Food Processing Industry	Cheese whey	Acid treatment	<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500	–	20.20	–	0.17	[33]
			Protein removal	<i>Escherichia coli</i> K24K	70.00	51.00	72.90	2.13
	Olive oil	–	<i>Cupriavidus necator</i> ATCC17699	5.40	4.37	81.00	0.03	[34]
			<i>Cupriavidus necator</i> H16	–	1.20	–	0.02	[35]
Vegetable oil	–	–	<i>Cupriavidus necator</i> H16	–	1.20	–	0.02	[35]

的废弃物料来源广、体量大,更适用于低成本 PHAs 的生产。但是大部分廉价物料经预处理后碳源浓度低、碳源成分复杂多样、毒性化合物存在、生物量低等问题为后期发酵策略的开发提出了新的挑战。

2.3 高密度发酵策略调控

实现 PHAs 的高密度发酵是生产低成本 PHAs 的必要条件之一。当 PHAs 产量相同时,高密度发酵所需的发酵体积更少,在人工成本、设备成本和能源消耗上都会有明显降低^[37]。

2.3.1 高密度发酵策略

PHAs 的高密度发酵主要围绕“饱-饥”策略展开,即通过控制特定营养元素的浓度实现菌株先积累生物量再积累 PHAs 的多阶段发酵调控。补料分批发酵技术和连续发酵技术是实现高密度发酵最常用的两个技术手段。Huschner 等^[27]以氮元素为营养限制条件,按照 0–16 h C/N=10、16–36 h C/N=90 和 36–48 h C/N=∞ (乙酸 330.9 g/L、丙酸 147.3 g/L、丁酸 106.7 g/L) 的调控策略实现了 *R. eutropha* H16 的高密度发酵,其中生物量达到 112 g/L, PHAs 占比 83.3%。Ye 等^[38]同样以氮元素为限制条件实现了 *H. bluephagenesis* TD01 发酵过程的精准控制。发酵 18 h 时 TD01 细胞数量达到 10^{10} 个并在随后的发酵过程中保持不变,后续流加的高浓度葡萄糖 (800 g/L) 全部用于 PHAs 合成。当发酵结束后 TD01 生物量达到 90 g/L, PHAs 占比 74%。Atlic 等^[39]利用 5 级连续发酵罐实现了 *C. necator* DSM545 的连续发酵生产,其中流出发酵液生物量 81 g/L, PHAs 占比 77%。5 级连续发酵罐中的第一个发酵罐用于 DSM545 菌体数量的培养,其余发酵罐均用于氮元素限制下的 PHA 积累, PHAs 生产速率达到 1.85 g/(L·h) (补料中葡萄糖浓度 500 g/L)。上述策略中都要求使用高浓度补料液以减少对发酵体系的影响,显然纤维素水解液、粗甘油等低碳浓度的廉价物料无法满足这一要求。于是 Haas 等^[40]开发了一种含

有微滤膜出口的发酵罐,发酵清液经微滤膜出口流出,细胞则被保留在发酵罐中。当以 50 g/L 的葡萄糖作为补料液时得到生物量 148 g/L, PHB 占比 76% 的结果。这一策略巧妙地避免了低糖浓度补料导致的发酵体积增大、细胞逃逸等问题,尤其是为后期开发利用低浓度廉价碳源提供了思路。

2.3.2 碳源浓度控制

高密度发酵过程中碳源浓度过高过低或频繁波动都会严重影响细胞 PHAs 合成的能力。Shang 等^[41]发现葡萄糖浓度保持 9 g/L 时 *R. eutropha* 可以表现出优异的 PHAs 积累能力,而当葡萄糖浓度在 8–12 g/L 范围内波动时, PHAs 的积累量也会出现 2% 的波动。*Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599^[42]、*H. bluephagenesis* TD01 等^[43]菌株也被证实在发酵液中的葡萄糖浓度为 10 g/L,即接近于其半速系数时,菌株可以实现 PHAs 的高效合成。结果表明控制发酵液中的碳源浓度,有利于提高高密度发酵过程中的 PHAs 积累量。

2.3.3 溶氧水平控制

溶氧水平是影响高密度发酵的重要因素之一。高密度发酵后期溶氧量急速降低形成微氧或无氧环境, PHAs 合成代谢途径受抑制,积累量降低。尽管提高搅拌转速、通气量或者供给富氧空气可以保证高密度发酵后期的溶氧水平,但是这些举措增加了 PHAs 的生产成本。基因工程手段的应用解决了菌株在微氧情况下的适应问题。例如导入乙醇脱氢酶启动子 P_{adhE} 的重组 *E. coli* JW2294 在微氧环境中实现了 7.8 g/L 生物量, 64% PHB 的积累^[44]。导入由 8 个透明颤菌血红蛋白启动子串联的 P_{8vgb} 片段的重组 *E. coli* S17-1 在微氧环境中的 PHB 占比达到 90%^[45]。随后研究人员发现在重组 *Halomonas* sp. LS21 中表达透明颤菌血红蛋白可以提高细胞在微氧环境中对氧气的摄取能力,发酵结束后生物量达到 30.21 g/L, PHB 占比 75.32%。由此可见利用微氧启动子、或者提高细胞对氧气的摄取能力都可以维持细胞在

微氧环境下的胞内正常代谢表达。

2.3.4 毒性物质影响

毒性物质积累是影响高密度发酵的另一个重要因素。高密度发酵过程中毒性物质的不断积累导致细胞活力降低甚至死亡,最终影响发酵产量。连续传代进化是目前提高菌株耐受性最常用、也是最有效的方法。为了解决乙酸、乳酸、富马酸和甲醇富集导致菌株代谢能力降低的问题,人造高密度发酵体系被用于 *H. bluephagenesis* TDHCD-R0 的连续传代进化。经过 3 轮筛选后的 TDHCD-R3 在生物量和 PHAs 积累方面出现明显增长。相比于出发菌株,TDHCD-R3 生物量提高了 41.7%, PHAs 产量提高了 8.2%^[46]。连续传代进化同样适用于微生物菌群的优化。可以高效利用北京市小红门污水处理厂废液废料的微生物菌群经过 4 轮连续传代进化后才适用于江苏省无锡市芦村污水处理厂废液废料,其中 PHAs 积累量达到菌体生物量的 59.47%,远高于出发微生物菌群的 PHAs 占比 (21.5%)^[28]。微生物菌群的连续传代进化可以优化菌群结构、提高底物选择能力,甚至菌群在过量氮源和非 VFA 存在情况下不积累 PHAs 的现象都得到了缓解。

2.4 开放式发酵策略开发

微生物发酵法产 PHAs 过程中能源消耗的费用占总成本的 30%,其中主要集中于无菌化处理过程,如设备灭菌、培养基灭菌等的蒸汽消耗。因此有研究者提出“下一代工业生物技术 (Next-generation industrial biotechnology, NGIB)”,即一种开放式连续发酵生物工业技术。

目前 NGIB 中成功用于 PHAs 生产的 *Halomonas* sp. TD01 是清华大学陈国强团队从艾丁湖筛选获得的耐盐耐碱菌株,在高盐高碱的环境下可以保持 PHAs 的高效合成。盐单胞菌 TD01 已经实现了中试级别的开放式补料分批发酵和连续发酵,这一过程中发酵物料、设备以及补料无需进行灭菌操作,大大减少了灭菌过程的能源消耗^[43]。另一株嗜盐菌 *H. campaniensis* LS21 以按

照厨余垃圾和海水成分配制的模拟培养基 (其中 NaCl 浓度为 27 g/L, pH 为 10) 实现了连续 65 d 的开放式发酵,经基因工程改造后的重组 *H. campaniensis* LS21 在同样条件下实现了生物量 70% 的 PHB 积累^[47]。这为未来直接利用厨余垃圾和海水进行开放式无灭菌发酵提供了可能性。研究团队发现发酵过程及下游分离提取过程中产生的高盐废水在无需预处理的情况下可以再次实现 4 批次的 PHAs 发酵。这不但减少了新水及 NaCl 的使用量,还同时解决了高盐高碱发酵废水的处理排放问题^[48]。

NGIB 的核心是获得一株可以抵抗噬菌体或其他菌种感染的底盘微生物。因此可以用于开发生产 PHA 的底盘微生物种类繁多,例如在高碱无灭菌培养基中生产乙醇的耐盐碱马氏芽孢杆菌 *Bacillus marmarensis*^[49]、在 50°C 高温无灭菌培养基中生产乳酸的凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans* WCP10-4^[50]等,以及自然界中存在的嗜酸、嗜碱等嗜极微生物都可以开发用作低成本 PHAs 发酵生产的底盘微生物。

3 展望

随着白色污染的加重和石油资源的枯竭,绿色环保材料必将取代传统石油基塑料。被认为是未来最有前景的绿色环保材料 PHAs 由于其高昂的生产成本在推广应用中受到了极大的限制,因此实现低成本 PHAs 的工业化生产是目前的研究重点。目前利用合成生物学、基因工程以及代谢工程等手段,菌株合成 PHAs 的能力已经得到明显提升,但依然无法满足工业化生产要求。未来的研究方向将主要集中到两个方面:(1) 开发低成本物料利用技术。例如利用农业秸秆、餐余垃圾和废水废料等废弃物料,降低 PHAs 发酵生产的物料成本。(2) 开发 NGIB。寻找高效积累 PHA 的嗜极微生物,实现 PHAs 的开放式发酵生产,能够进一步推动低成本 PHAs 的工业化生产进程。

REFERENCES

- [1] Alves MI, Macagnan KL, Rodrigues AA, et al. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): review of production process technology. *Ind Biotechnol*, 2017, 13(4): 192-208.
- [2] Ong SY, Zainab-I I, Pyary S, et al. A novel biological recovery approach for PHA employing selective digestion of bacterial biomass in animals. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(5): 2117-2127.
- [3] Tokiwa Y, Ugwu CU. Biotechnological production of (*R*)-3-hydroxybutyric acid monomer. *J Biotechnol*, 2007, 132(3): 264-272.
- [4] Gahlawat G. Polyhydroxyalkanoates biopolymers. Springer International Publishing, 2019: 31-67.
- [5] Muhammadi, Shabina, Afzal M, et al. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chem Lett Rev*, 2015, 8(3/4): 56-77.
- [6] Gadgil BST, Killi N, Rathna GVN. Polyhydroxyalkanoates as biomaterials. *Med Chem Commun*, 2017, 8(9): 1774-1787.
- [7] Arcos-hernandez MV, Laycock B, Pratt S, et al. Biodegradation in a soil environment of activated sludge derived polyhydroxyalkanoate (PHBV). *Polym Degrad Stabil*, 2012, 97(11): 2301-2312.
- [8] Meng DC, Shen R, Yao H, et al. Engineering the diversity of polyesters. *Curr Opin Biotech*, 2014, 29: 24-33.
- [9] Tan D, Wu Q, Chen JC, et al. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metab Eng*, 2014, 26: 34-47.
- [10] 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.
- [11] Wang Y, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates: sustainability, production, and industrialization// Tang CB, Ryu CY, Eds. *Sustainable Polymers from Biomass*. Germany Wiley, 2017, DOI: 10.1002/9783527340200.ch2.
- [12] Jiang XR, Yao ZH, Chen GQ. Controlling cell volume for efficient phb production by *halomonas*. *Metab Eng*, 2017, 44: 30-37.
- [13] 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.
- [14] Wu H, Fan ZY, Jiang XR, et al. Enhanced production of polyhydroxybutyrate by multiple dividing *E. coli*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 128.
- [15] Tao W, Lv L, Chen GQ. Engineering *Halomonas species* TD01 for enhanced polyhydroxyalkanoates synthesis via CRISPRi. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 48.
- [16] Shamala TR, Vijayendra SVN, Joshi GJ. Agro-industrial residues and starch for growth and co-production of polyhydroxyalkanoate copolymer and α -amylase by *Bacillus* sp. CFR-67. *Braz J Microbiol*, 2012, 43(3): 1094-1102.
- [17] Huang TY, Duan KJ, Huang SY, et al. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(8): 701-706.
- [18] Oh YH, Lee SH, Jang YA, et al. Development of rice bran treatment process and its use for the synthesis of polyhydroxyalkanoates from rice bran hydrolysate solution. *Bioresource Technol*, 2015, 181: 283-290.
- [19] Li MX. Adding value to lignocellulosic biorefinery: efficient process development of lignocellulosic biomass conversion into polyhydroxybutyrate. 2019, <https://digitalcommons.unl.edu/biosysengdiss/96>.
- [20] Si MY, Yan X, Liu MR, et al. *In situ* lignin bioconversion promotes complete carbohydrate conversion of rice straw by *Cupriavidus basilensis* B-8. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2018, 6(6): 7969-7978.
- [21] Rathika R, Janaki V, Shanthi K, et al. Bioconversion of agro-industrial effluents for polyhydroxyalkanoates production using *Bacillus subtilis* RS1. *Int J Environ Sci Technol*, 2019, 16(10): 5725-5734.
- [22] Gomaa EZ. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. *Braz Arch Biol Technol*, 2014, 57(1): 145-154.

- [23] Silva LF, Taciro MK, Ramos MEM, et al. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2004, 31(6): 245-254.
- [24] Gahlawat G, Soni SK. Valorization of waste glycerol for the production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresour Technol*, 2017, 243: 492-501.
- [25] 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.
- [26] Kumar P, Ray S, Patel SKS, et al. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. *Internat J Biol Macromol*, 2015, 78: 9-16.
- [27] Huschner F, Grousseau E, Brigham CJ, et al. Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts. *Process Biochem*, 2015, 50(2): 165-172.
- [28] Jia QQ, Xiong HL, Wang H, et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by bacterial consortium from excess sludge fermentation liquid at laboratory and pilot scales. *Bioresour Technol*, 2014, 171: 159-167.
- [29] Kumar P, Ray S, Kalia VC. Production of co-polymers of polyhydroxyalkanoates by regulating the hydrolysis of biowastes. *Bioresour Technol*, 2015, 200: 413-419.
- [30] Kumar P, Singh M, Mehariya S, et al. Ecobiotechnological approach for exploiting the abilities of *Bacillus* to produce co-polymer of polyhydroxyalkanoate. *Indian J Microbiol*, 2014, 54(2): 151-157.
- [31] NI YY, Rhee Y. Screening of aromatic hydrocarbons-degrading bacteria and production of PHA by an improved feeding strategy. *Environ Sci Technol*, 2018, 41(5): 11-16.
- [32] Nickel PI, De Almeida A, Melillo EC, et al. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(6): 3949-3954.
- [33] Pais J, Serafim LS, Freitas F, et al. Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnol*, 2015, 33(1): 230-244.
- [34] Rao U, Sridhar R, Sehgal PK. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochem Eng J*, 2010, 49(1): 13-20.
- [35] Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, et al. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Expr*, 2011, 1: 11.
- [36] Ciesielski S, Możejko J, Pisutpaisal N. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *J Cleaner Product*, 2015, 106: 408-421.
- [37] Ienczak JL, Schmidell W, De Aragao GMF. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(3/4): 275-286.
- [38] Ye JW, Huang WZ, Wang DS, et al. Pilot scale-up of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Halomonas bluephagenesis* via cell growth adapted optimization process. *Biotech J*, 2018, 13(5): 1800074.
- [39] Atlíć A, Koller M, Scherzer D, et al. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Appl Microbiol Biot*, 2011, 91(2): 295-304.
- [40] Haas C, El-najjar T, Virgolini N, et al. High cell-density production of poly(3-hydroxybutyrate) in a membrane bioreactor. *New Biotechnol*, 2016, 37: 117-122.
- [41] Shang LA, Fan DD, Kim MI, et al. Modeling of poly(3-hydroxybutyrate) production by high cell density fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2007, 12(4): 417-423.
- [42] Lee JH, Lim HC, Hong J. Application of nonsingular transformation to on-line optimal

- control of poly- β -hydroxybutyrate fermentation. *J Biotechnol*, 1997, 55(3): 135-150.
- [43] Tan D, Xue YS, Aibaidula G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol*, 2011, 102(17): 8130-8136.
- [44] Wei XX, Shi ZY, Yuan MQ, et al. Effect of anaerobic promoters on the microaerobic production of polyhydroxybutyrate (PHB) in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot*, 2009, 82(4): 703-712.
- [45] Wu H, Wang H, Chen JC, et al. Effects of cascaded vgb promoters on poly(hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* grown micro-aerobically. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(24): 10013-10021.
- [46] Ren YL, Ling C, Hajnal I, et al. Construction of *Halomonas bluephagenesis* capable of high cell density growth for efficient PHA production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(10): 4499-4510.
- [47] 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.
- [48] Ling C, Qiao GQ, Shuai BW, et al. Engineering self-flocculating *Halomonas campaniensis* for wastewaterless open and continuous fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(4): 805-815.
- [49] Wernick DG, Pontrelli SP, Pollock AW, et al. Sustainable biorefining in wastewater by engineered extreme alkaliphile *Bacillus marmarensis*. *Sci Rep*, 2016, 6: 20224.
- [50] Zhou XD, Ye LD, Jin CW. Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance. *Appl Microbiol Biot*, 2013, 97(10): 4309-4314.

(本文责编 陈宏宇)