第 11 卷 第 1 期
2022 年 1 月
集 成 技 术
JOURNAL OF INTEGRATION TECHNOLOGY
Vol. 11 No. 1
Jan. 2022

引文格式：
何宏韬, 郑爽, 陈国强. 基于嗜盐菌合成生物学的下一代工业生物技术 [J]. 集成技术, 2022, 11(1): 1-12.
He HT, Zheng S, Chen GQ. "Next Generation Industrial Biotechnology" based on halophilic bacteria and their synthetic biology [J]. Journal of Integration Technology, 2022, 11(1): 1-12.

基于嗜盐菌合成生物学的下一代工业生物技术

何宏韬[1] 郑 爽[1] 陈国强[1,2*]

[1](清华大学生命科学学院 北京 100084)
[2](清华大学化工系 北京 100084)

摘 要 嗜盐微生物是在高盐、高 pH 环境中具备正常生长能力的极端微生物，是珍贵的科研素材和生产资源。相关研究通过对嗜盐菌合成生物学的改造和"下一代工业生物技术"的探索，实现了嗜盐工程菌在生物反应器中利用海水进行不灭菌连续发酵并产生类型多样、性能各异的聚羟基脂肪酸酯，且与其他高附加值化学品实现了联产。基于嗜盐菌的下一代工业生物技术，具备节能、节水、节时、低成本等特点，有着很好的市场竞争力和划时代的技术优势。基于极端微生物，特别是基于嗜盐菌合成生物学的下一代工业生物技术的兴起和发展，能够提升生物制造产品的市场竞争力，促进环保的生物基工业产品替代石油基产品，同时也能为早日实现"碳达峰、碳中和"提供强有力的技术支持和保障。该文分析了基于嗜盐菌合成生物学的下一代工业生物技术的特点，为合成生物学与下一代工业生物技术提供了新的视角和思路。

关键词 合成生物学；嗜盐微生物；下一代工业生物技术；聚羟基脂肪酸酯
中图分类号 Q 819 **文献标志码** A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20210722001

"Next Generation Industrial Biotechnology" Based on Halophilic Bacteria and Their Synthetic Biology

HE Hongtao[1] ZHENG Shuang[1] CHEN Guoqiang[1,2*]

[1](*School of Life Sciences*, *Tsinghua University*, *Beijing* 100084, *China*)
[2](*Department Chemical Engineering*, *Tsinghua University*, *Beijing* 100084, *China*)
[*]*Corresponding Author*: *chengq@mail.tsinghua.edu.cn*

Abstract *Halophiles* are extremophilic microorganisms able to grow in high-salt and high-pH environments. Synthetic biology studies on halophilic bacteria lead to the development of "Next Generation

收稿日期：2021-07-22 **修回日期**：2021-10-02
基金项目：国家科技部"合成生物学"重大项目(2018YFA0900200)
作者简介：何宏韬，博士研究生，研究方向为合成生物学；郑爽，博士研究生，研究方向为合成生物学；陈国强(通讯作者)，博士生导师，主要研究方向为聚羟基脂肪酸酯(PHA)的合成、代谢工程、合成生物学等，E-mail：chengq@mail.tsinghua.edu.cn。

Industrial Biotechnology" (NGIB). Engineered *Halomonas* spp. is succeeded in the production of various polyhydroxyalkanoates (PHA) and their co-productions with other high value-added chemicals, under continuous and nonsterile fermentation processes using seawater to replace fresh water. NGIB based on halophilic bacteria provides advantages including energy-saving, water-saving, time-saving, less process complexity and low-cost. It will help to become "Carbon Neutral" for our society. This article analyzes the characteristics of the next generation of industrial biotechnology based on halophilic bacteria and their synthetic biology, providing a new perspective and ideas for synthetic biology and the next generation of industrial biotechnology.

Keywords synthetic biology; *Halophiles*; next generation industrial biotechnology; polyhydroxyalkanoates

Funding This work is supported by grants from the Ministry of Science and Technology of China (2018YFA0900200)

1 引 言

中国拥有世界上最大规模的工业发酵产业，是应用工业生物技术进行生产的大国[1]。传统发酵工艺中，微生物生长缓慢、转化率低、灭菌过程能耗高、工艺操作复杂，这些特点都使得其难以实现成本低廉、高产高效的工业生产[2]。

在经济全球化进程持续加快的背景下，世界人口迅速爆炸；根据我国第七次人口普查数据显示，中国人口也已经达到了 14.1 亿。在中国，由于人口向东部等较发达地区集聚，导致了人口与耕地、水资源的分布不相匹配，这是制约社会经济可持续发展的重要因素[3]。如果能发展新的工业技术解决人口爆炸带来的资源紧缺问题，那么将对实现“碳中和”的目标有巨大的推动作用，也对实现可持续发展有重要的促进作用。

随着现代生物学的不断发展，其与工程学、系统科学、合成科学的相互碰撞、相互融合，逐步形成了以生物学零件标准化为基础的理性设计和改造方式，即“合成生物学”[4]。通过对耐高盐、高 pH 的嗜盐单胞菌系统进行研究，设计相应分子操作工具对其进行合成生物学改造，然后以嗜盐单胞菌为底盘细胞，发展出了“下一代工业生物技术”（Next Generation Industrial Biotechnology，NGIB）。该技术可实现无需灭菌、节能节水、开放式的连续发酵，生物制造生产聚羟基脂肪酸酯（Polyhydroxyalkanoates，PHA）、四氢嘧啶等多种化合物[5]。

2 下一代工业生物技术的微生物底盘细胞

下一代工业生物技术最突出的特点是使用极端微生物作为底盘细胞。极端微生物是指适宜生活在极端环境中的微生物。这些具备“特殊本领”的极端微生物，为人类提供了珍贵的生物资源和科研素材，使人类克服传统工业的技术瓶颈成为可能。极端微生物种类多样，包括嗜热微生物、嗜冷微生物、嗜碱微生物、嗜酸微生物、嗜盐微生物等。其中，目前应用开发比较成熟的是嗜盐微生物（*Halophiles*）。嗜盐微生物是一种在高盐、高 pH 环境下能够正常生长的极端微生物。

嗜盐微生物普遍存在于古菌、细菌、真核生物 3 大领域。嗜盐微生物可以在高于海洋盐浓度几倍的环境中迅速生长，根据其对盐浓度的耐受程度，可将嗜盐微生物分为轻度嗜盐微生物、中度嗜盐微生物和极端嗜盐微生物[6]。轻度嗜盐微生物

的适宜盐浓度为 0.3～0.8 mol/L（1.7%～4.8%），中度嗜盐微生物的适宜盐浓度为 0.8～3.4 mol/L（4.8%～20%），极端嗜盐微生物适应盐浓度为 3.4～5.1 mol/L（20%～30%）[7]。

盐单胞菌属（*Halomonas*）是一类中度嗜盐微生物，可在 5%～25% 的盐浓度范围内健康生长。盐单胞菌是革兰氏阴性的杆状细菌，一般宽度为 0.6～0.8 μm，长度为 1.6～1.9 μm（图 1）。盐单胞菌能够利用鞭毛进行活动，在有氧和无氧条件下均可以正常生长。当其在琼脂平板上生长时，一般呈现白色或淡黄色菌落，菌落颜色会随时间的推移而逐渐变深，直至变成浅棕色[8]。

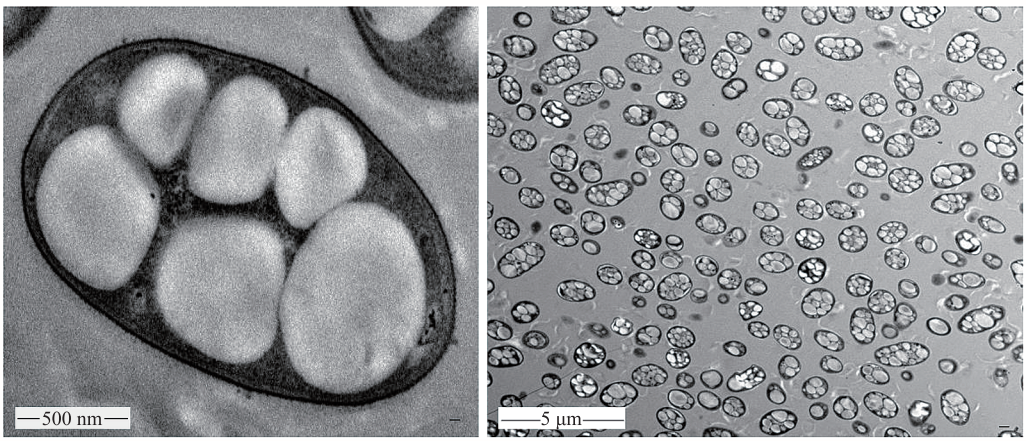
3　底盘菌的合成生物学改造

始于 20 世纪 90 年代的人类基因组计划的完成，有力地推动了生命科学的研究迈入系统生物学时代和组学时代[9]。在系统生物学的基础上，基因工程、计算科学、合成化学等多个学科的碰撞和交叉，促进了合成生物学的出现和快速发展。合成生物学自出现以来，就具有非同寻常的影响力和创造力，并被寄予厚望能够改变未来。通过合成生物学对底盘细胞的科学改造，可获得能够满足生产生活需要的良好工程菌株。

3.1　开发嗜盐菌的改造工具和方法

目前，基因编辑方式百花齐放，各有所长。与大肠杆菌等生物不同，早期嗜盐单胞菌的遗传背景不清晰、进行基因编辑的难度大、适用的基因编辑方法非常有限，这给进一步利用嗜盐单胞菌进行研究和生产造成了实际困难[10]。

经过不断尝试和努力，研究人员相继开发出针对嗜盐单胞菌的染色体重组法以及由规律成簇的间隔短回文重复序列（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats，CRISPR）和 CRISPR 相关蛋白（CRISPR-associated protein，Cas）组成的 CRISPR/Cas9 系统、CRISPR/AID（CRISPR/Auxin-Inducible Degron）系统、CRISPRi（CRISPR interference）系统，这都使得该菌株的合成生物学研究和工业技术改造更加灵活和高效。在原核生物基因组中存在一段规律成簇的短回文序列，被称作 CRISPR。古菌中存在由 CRISPR 和 Cas 蛋白组成的 CRISPR/Cas 系统，这是一种能够抵御外源核酸入侵古菌基因组的天然保护机制[11]。近年来，基于 CRISPR/Cas 的多种应用相继被科学家们研发出来，该系统既可以通过靶向 DNA 序列引导 Cas 蛋白形成



（a）单个细胞图像（放大倍数：50 000×）　　（b）群体细胞图像（放大倍数：8 000×）

图 1　盐单胞菌 *Halomonas campaniensis* LS21 透射电镜图

Fig. 1　Transmission electron microscopy of *Halomonas campaniensis* LS21

空间位阻，抑制目标基因的转录；又可以通过靶向 DNA 序列与 Cas 蛋白配合对基因组进行编辑。在嗜盐菌中，利用由表达负责引导的向导 RNA 的质粒和表达负责切割的酿脓链球菌 Cas9 蛋白的质粒组成的 CRISPR/Cas 系统，可实现对目标位置的敲除、插入或替换。Cas9 蛋白表达后，在 gRNA 的引导下抵达靶位点，精确切割 DNA 双链。此时，设计在质粒上的同源序列与切割位点附近的同源臂发生同源重组，左右同源臂之间的基因序列将被删去，即基因敲除（图 2(a)）。前期实验设计时，如果将外源基因加入到两段同源臂之间，那么最终将会实现外源基因插入或替换基因组上的 DNA 片段（图 2(b)）[12]。

3.2 嗜盐菌的调控策略

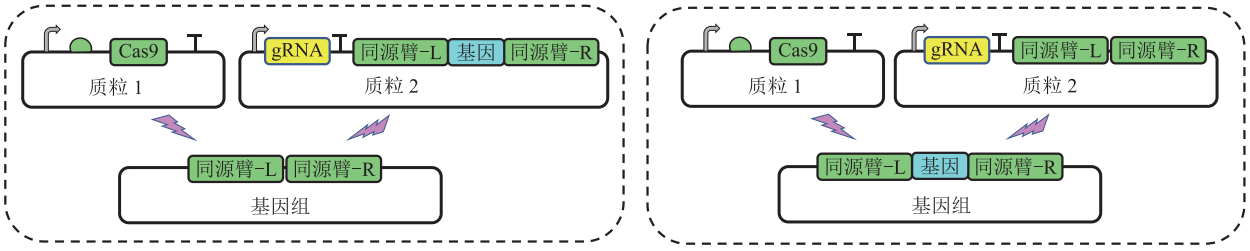
运用合成生物学中的代谢工程可以实现对微生物底盘细胞的代谢流修饰。动态调控和静态调控是代谢工程中被广泛运用的两种调控方式。其中，静态调控易于实现且高效，动态调控则以其可控性、精细化著称，有助于后期实现复杂多样的控制逻辑[13-14]。

代谢工程静态调控包括基因删除和插入[15-16]、基因表达水平调节[17]、核糖体结合位点（Ribosome Binding Site，RBS）改造[18]、代谢流平衡分析[19]等内容。通过删除代谢通路中影响目标产物积累的基因，可以达到积累目标产物的目的，这是最常见的构建工程菌的方式[20]。随着计算机模拟和代谢流模型迅速发展，可以通过模型预测基因敲除后基因表达水平及代谢流的变化情况，全局性地预估基因敲除或替换对细胞生长和合成目标产物的影响[21-24]。静态调控中也经常使用启动子工程和核糖体结合位点改造的调控手段。如果将外源基因导入嗜盐菌，必将需要合适强度的组成型启动子对其进行表达，但不同物种之间同种启动子表达存在差异，所以需要通过构建启动子库来调节基因表达。在嗜盐单胞菌中表达强度最高的蛋白是孔蛋白 Porin[25]，通过开发 Porin 的启动子得到了启动子库 P_{porin} Lib（图 3(a)），该库含有 95 个不同强度的启动子，高低表达差超 3 500 倍，完全满足科研及生产中对启动子的多样化需求。

输入信号、信号感应原件（生物传感器）和信号输出的有机结合形成了动态调控系统[26-28]。动态调控是一个以调控目标产物为最终结果，通过生物传感器感应信号分子来触发的代谢调控过程。在嗜盐单胞菌中，已建立与 T7 启动子受异丙基-β-硫代半乳糖苷（Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside，IPTG）调控的诱导系统类似的诱导系统（图 3(b)），可以利用 IPTG 诱导 T7 RNA 聚合酶进行表达。在一定范围内，基因表达强度与 IPTG 的浓度几乎成正线性相关[29]。

3.3 嗜盐菌的形态学工程改造

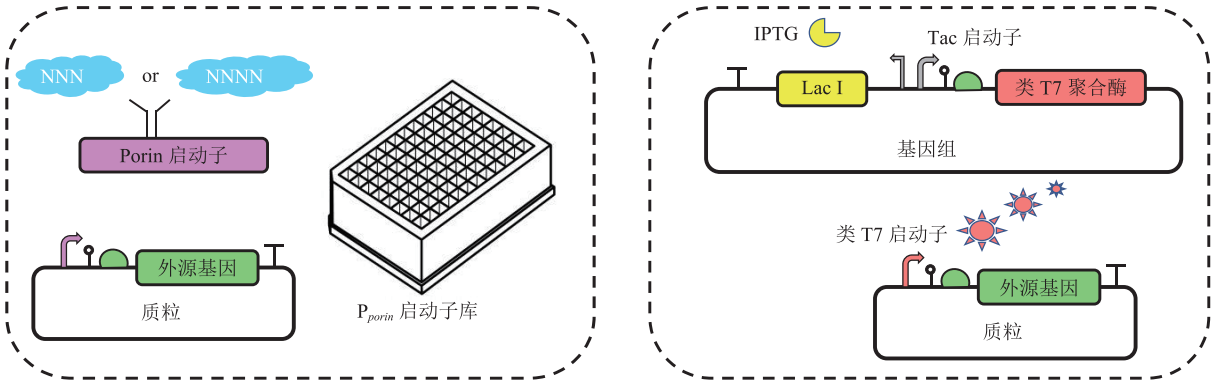
形态学工程，即通过改造细胞形态以实现增加产量和降低成本的目标。PHA 在细胞中以包涵体的形式存在。对于 PHA 含量超过 50wt% 的，尤其是应用于工业化生产中的含量超过



(a) 基因敲除　　(b) 基因整合

图 2 嗜盐细菌的 CRISPR/Cas9 基因编辑工具

Fig. 2 The CRISPR/Cas9 gene editing tool for halophilic bacteria



(a) 组成型启动子库 P_{porin} Lib　　(b) 类 T7 诱导系统

图 3　嗜盐细菌的蛋白表达工具

Fig. 3　Protein expression tools for halophilic bacteria

80wt% 的 PHA 生产菌株，其细胞的体积大小是影响 PHA 产量的重要因素，是 PHA 含量上限的决定性因素。因此，增大细胞体积以容纳更多的 PHA，有助于 PHA 含量的提高。此外，增大细胞体积有助于减小发酵结束后的细胞收集难度，降低产物分离成本。

增大细胞体积可以从增大细胞宽度和长度两方面着手。关于增大细胞宽度，大多数杆状细胞所拥有的 MreB 细胞骨架蛋白具有维持细胞硬度和宽度的作用，为细胞正常生长和繁殖所必需，*mreB* 的敲除或突变会改变杆状细胞的极性状态[30]。蒋等[31]在嗜盐单胞菌 *Halomonas campaniensis* LS21 中首先敲除 *mreB*，实现细胞圆形化且体积增大，部分细胞直径可达 5 μm，然后通过条件性回补表达 MreB，使细胞在发酵后期圆形化和体积增大，实现了聚-3-羟丁酸(Poly 3-hydroxybutyric acid，PHB)产量的显著提升。关于增大细胞长度，FtsZ 微管样蛋白是细胞分裂过程中的必需蛋白，在细胞分裂时于分裂位点形成分裂环；抑制分裂环的形成可以使细胞不能正常分裂，实现细胞长度的增加[32]。蒋等在嗜盐单胞菌 *Halomonas campaniensis* LS21 中，通过融合表达 FtsZ-GFP 替代 FtsZ，使得分裂环不能正常产生，实现了细胞的纤长化，使 PHB 含量由 56wt% 提升至 78wt%。MinC 蛋白可以抑制 FtsZ 分裂环的组装，MinD 可以激活 MinC 蛋白对 FtsZ 分裂环形成的抑制活性[33]。谭等在 *Halomonas* sp. TD08 中过表达 *minCD*，实现细胞纤长化，使 PHA 含量由 69wt% 提升至 82wt%[34]。

4　下一代工业生物技术的技术特点

目前的生物工业生产过程具有高成本、高能耗、低转化率的特点，使得其绿色环保、节能节水等优势都黯然失色。

NGIB 的出现，将有助于扭转这一局面，该技术以高盐、高 pH 的极端微生物嗜盐菌为底盘细胞，利用无需灭菌的连续发酵体系进行生产(图 4)，具有低能耗、高效率、节约水资源等众多优点。

4.1　海水资源的高效利用

嗜盐单胞菌长期生活在盐湖、深海等高盐高压的极端环境中，在天然环境中就能合成并积累一些高附加值的工业产品，如 PHA 和四氢嘧啶等。前期，本实验室从新疆艾丁湖分离得到了嗜盐单胞菌 *Halomonas campaniensis* LS21 和 *Halomonas bluephagenesis* TD。其中，嗜盐单胞菌 *Halomonas bluephagenesis* TD 的耐盐能

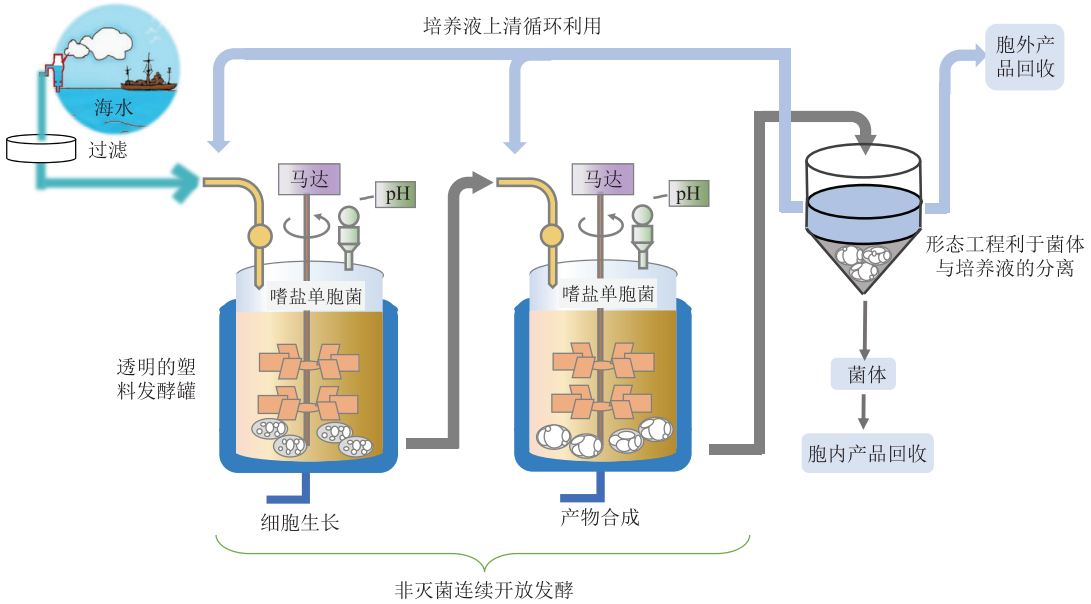


图 4 基于嗜盐菌的下一代工业生物技术的开放式无灭菌连续发酵体系[1]

Fig. 4 Open non-sterilizing continuous fermentation system of the next generation of industrial biotechnology processes based on halophilic bacteria[1]

力超强，能够在开放的、未灭菌的条件下生长数月且不被其他微生物污染[35]，而嗜盐单胞菌 *Halomonas campaniensis* LS21 能够利用海水进行连续开放发酵，在海水培养基中迅速生长并积累工业产物[36]。

4.2 节能环保的新型发酵方式

嗜盐单胞菌适宜于在高盐、高 pH 的环境中生长，而在同样的环境里，其他微生物无法正常生长，因此可以省去蒸汽灭菌步骤，实行开放发酵[37]。

在传统发酵工业中，生物耗氧量较大，溶氧量的大小直接影响最终产物的多少，因此需要空压机持续通入无菌空气以增加溶氧量。空压机的持续工作是整个生物工业生产过程中能耗最高的部分[38]。而基于合成生物学改造的微生物能够在低氧条件下正常生长并达到较高的生产效率，这种方式可以有效降低能耗，达到节能环保的目的[39-41]。通过在盐单胞菌中导入血红蛋白基因（*vgb*），同时通过双精氨酸转位酶途径（Tat）将其转运，能充分促进氧气接触和转运，该方法可以将低氧条件下的细胞干重提高一倍[42]。后期研究将侧重于通过新兴的定向进化技术改造出低氧环境中的高活性酶，并将其应用到工业生产中。通过将上述技术进行有机结合，可以有效地降低微生物生产发酵中的高能耗。

4.3 低成本的连续发酵过程

以恒定速度向生物反应器中添加新鲜培养基并流出等量发酵液，维持反应器内液体量恒定的发酵方式称为连续发酵[43]。与传统的分批发酵相比，连续发酵的工艺具备得天独厚的优势：第一，避免了生物反应器清洗处理和灭菌带来的人力、时间和能量的消耗；第二，这种连续分离收获的发酵方式可以实现培养基的重复利用，在节水的同时减少废水排放和处理[44]。普通微生物容易被其他菌种污染，不适合进行连续发酵，但嗜盐单胞菌可以在高盐、高 pH 的极端环境中快速生长，当之无愧地成为连续发酵工艺完美的细胞工厂。

4.4 加速分离提取的形态学工程手段

目前，嗜盐单胞菌生产 PHA 所使用的形态改造策略主要是通过增大细胞宽度和长度的方法来增大细胞体积。体积增大的菌体不仅有助

于 PHA 含量的提高，还有助于自沉降。此外，PHA 含量的提高不仅可以减少副产物的生成，而且当含量超过 90wt% 时，可以显著简化分离得到菌体后 PHA 的提取过程和纯化过程。更容易自沉降的菌体，将会降低高速离心获取菌体的难度，甚至依靠菌体自身足够的自沉降能力可以省去离心步骤。谭等在 *Halomonas* sp. TD08 中过表达 *minCD*，使细胞长度呈几倍到百倍的增加，部分菌丝长度超 100 μm，长菌丝相互缠绕成网发生沉降时，裹挟着其他长度较短的小菌体共同沉降，此过程可在静置 12 h 内完成，省去高速离心的步骤[34]。当前，对细胞进行形态的改造仍处于起步阶段，仍需继续研究，以实现在工业中简化产物的分离及提纯步骤，缩短分离时间，降低生产成本和时间成本，切实提高与石油基塑料的竞争力。

4.5　高密度的自动化生产

在工业生产过程中，高密度培养可以提高单位体积设备的生产能力，降低生物量的分离费用，便于下游分离纯化工艺，从而提高生产效率并降低生产成本，但一直并未实现。在高密度发酵过程中，发酵液成分复杂，反应过程中的代谢调控更加复杂。由于嗜盐菌具备实现高密度发酵的基本条件，所以本实验室前期以 *Halomonas bluephagenesis* TD01 为实验对象，进行开放式无灭菌连续发酵，陆续进行了 7 L 小试、1 000 L 和 5 000 L 中试[35, 45]、200 T 工业生物反应器发酵，并获得了理想的结果。

通过对不同发酵时期的生物样品进行转录组和蛋白组的分析，得到了不同生长时期 RNA和蛋白质的表达情况，检测到不同时期各个参数的变化[10]。利用这些数据尝试构建转录组、蛋白组数据与关键时间和参数之间的代谢网络，对理解嗜盐菌在高密度培养条件下的生长、代谢情况有非常大的帮助，为精确调控代谢流和优化生物反应器工艺都提供了可靠的理论数据支撑[46-47]。通过计算机技术、自动化技术与生物反应器的结合，在前期数据的基础上，未来有望设计出具有自主控制和自我学习功能的自动化连续生产车间。

综上所述，与现代工业生物技术（Modern Industrial Biotechnology，CIB）和化工过程（Chemical processes，CI）相比，NGIB 具有诸多优点，为生物制造真正转变为绿色制造提供了可能（表 1）。

表 1　NGIB 与 CIB 以及 CI 的比较

Table 1　Comparison of NGIB with CIB and CI

事项	CIB	CI	NGIB	NGIB 具体技术措施
无菌操作	需要	不需要	不需要	抗感染 *Halomonas* spp. 底盘
能耗	大	大	小	无需高温高压灭菌
耗水	高	高	低	耗海水或者过程水循环
产物浓度	低	高	高	细胞高密度培养和诱导
过程复杂性	高	高	低	节省许多无菌操作和设备
过程速度	慢	快	较快	构建快速生长的 *Halomonas*
过程连续性	不连续	连续	连续	保持菌株的生长稳定性
废水处理	复杂	复杂	简单	循环使用过程水
反应介质	淡水	有机溶剂	海水或人工海水	海水、人工海水或高 pH 的淡水
产物分离	困难	容易	容易	形态学工程加大细胞形状
危险程度	低（水相反应）	高（易燃易爆）	低（水相反应）	水介质不燃不爆
设备	不锈钢	不锈钢	不锈钢、塑料、有机玻璃、水泥	无需高温高压对材料要求低
环保效果	较好	一般	好	无废水低能耗的绿色制造
经济效果	较好	最好	好	提高碳的转化率
关键点	传统底盘细胞的改造	催化剂	*Halomonas* 的改造	丰富的 *Halomonas* 改造手段

5 下一代工业生物技术的未来

在合成生物学研究思想的指导下，盐单胞菌分子操作平台日趋完善，生产菌的性能不断优化，形成了能够生产多种高附加值产品的细胞工厂集群，基于嗜盐单胞菌的 NGIB 将会在此基础上进一步完善和升级。

5.1 多样化的产品

与传统发酵工业技术相比，嗜盐单胞菌除具有低能耗、节约水资源等优势外，还可以生产类型多样、性能各异的生物基优质材料——PHA。PHA 是可以代替石油基塑料产品的明星产品，它既能达到传统石油基塑料的性能要求，又具备良好的可降解性能和生物相容性，具有美好的生物医学应用前景[48]。

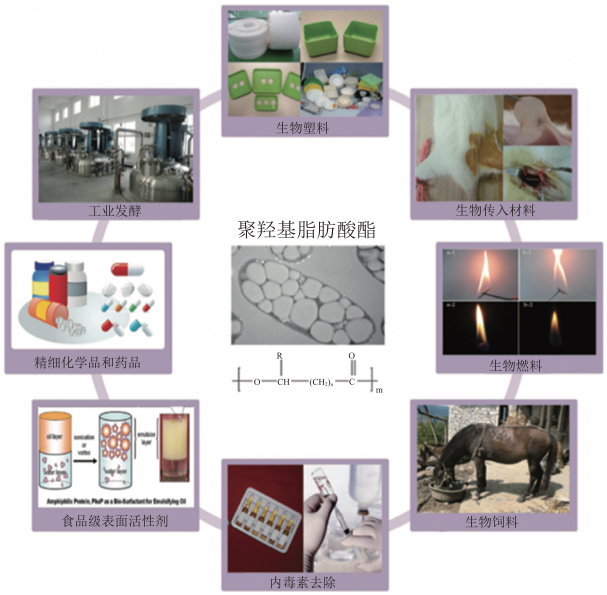


图 5 PHA 的应用领域[52]

Fig. 5 Various applications of PHA[52]

目前，聚-3-羟基丁酸(PHB)[49]、聚(3-羟基丁酸-*co*-3-羟基戊酸酯)(PHBV)[34]、聚(3-羟基丁酸-*co*-4-羟基丁酸酯)(P3HB4HB)[50]等多种材料的工业化生产趋于成熟。单体种类多样、性能丰富的 PHA 材料在包装、纺织、药物缓释、组织工程材料和生物能源等多个领域已经得到了充分的推广应用(图 5)[51-52]。

PHA 与多种高附加值的化学品联产，是目前热门的研究方向之一。本实验室以嗜盐菌 *Halomonas bluephagenesis* 为底盘细胞高效合成了四氢嘧啶，同时联产了聚-3-羟基丁酸(PHB)[53]。此外，通过提升菌株对脂肪酸类碳源的利用效率，既能大幅降低生产成本，还能联产出更高附加值的中长链聚羟基脂肪酸酯。

5.2 无人工厂

物联网概念的兴起与迅速发展，使得万物互联成为可能，其甚至被称为信息产业的第三次革命。利用终端信息传感设备，按照约定协议将任何物体(如生物反应器)与网络互联进行信息交换和通信，能够实现智能化的实时控制和监管。

基于前期嗜盐菌的基因组、转录组、蛋白组等生物发酵过程积累形成的数据库，将革命性的信息化模式与人工智能(Artificial Intelligence)结合，推广应用到嗜盐菌的菌种改造和发酵生产中，建立起基于云端数据库的具备自我管理、自我调控、自我升级的无人智能工厂。

5.3 低成本、无污染的生产后处理

利用 NGIB 的嗜盐单胞菌工业生产虽然具有低能耗、高效率、节约水资源等多个优点，但由于嗜盐菌高盐、高 pH 的生活环境会产生部分高盐、离子成分复杂的生产废水。这种生产废水如果不经过处理，就会对生态环境造成非常大的伤害。目前，高盐废水的处理方法主要有物理化学法、生物法、人工湿地处理法[54]，根据盐含量的不同，采用的处理方式不同，最终的处理效果也不同。利用人工湿地技术（由水、植物、土壤、微生物和阳光组成的污水自然净化系统）对嗜盐单胞菌的生产废水进行处理，可实现低成本、低能耗、无再生污染的处理过程。

6 结束语

在合成生物学、计算机科学、工程学等相关

学科飞速发展的背景下，基于工程化嗜盐菌的下一代工业生物技术体系正在兴起并不断完善。与传统工业发酵相比，嗜盐菌对海水、陈化粮、厨余垃圾的利用能力，进行连续发酵的抗菌能力，无需灭菌和低氧生长造就的节能能力，都使得这一技术脱颖而出，大幅提升绿色生物制造的竞争力，甚至颠覆现有的生物制造过程。

在未来，下一代工业生物技术一定会在生物工业生产中大放异彩，甚至引领生物工业革命性的潮流。当生物制造技术变得足够先进，越来越多的化学品和材料可以用生物方法制造，环境就更加绿水青山了。

参 考 文 献

[1] Chen GQ, Jiang XR. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 50: 94-100.

[2] Sun J, Alper HS. Metabolic engineering of strains: from industrial scale to lab scale chemical production [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2015, 42: 423-436.

[3] 封志明, 杨艳昭, 游珍. 中国人口分布的水资源限制性与限制度研究 [J]. 自然资源学报, 2014, 29(10): 1637-1648.
Feng ZM, Yang YZ, You Z. Water resource restriction and restriction system of population distribution in China [J]. Journal of Natural Resources, 2014, 29(10): 1637-1648.

[4] 赵国屏. 合成生物学: 开启生命科学“会聚”研究新时代 [J]. 中国科学院院刊, 2018, 33(11): 1135-1149.
Zhao GP. Synthetic biology: unsealing the convergence era of life science research [J]. Bulletin of the Chinese Academy of Sciences, 2018, 33(11): 1135-1149.

[5] Ye JW, Chen GQ. *Halomonas* as a chassis [J]. Essays in Biochemistry, 2021, 65(2): 393-403.

[6] 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: 1687-1696.

[7] Ollivier B, Caumette P, Garcia J, et al. Anaerobic bacteria from hypersaline environments [J]. Microbiological Reviews, 1994, 58(1): 27-38.

[8] Vreeland RH. *Halomonas* [M]. Bergey’s Manual of Systematics of Archaeaand Bacteria, 2015.

[9] 张先恩. 中国合成生物学发展回顾与展望 [J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(12): 1543-1572.
Zhang XE. Synthetic biology in China: review and prospects [J]. SCIENTIA SINICA Vitae, 2019, 49(12): 1543-1572.

[10] 马悦原, 陈金春, 陈国强. 嗜盐微生物底盘细胞: 应用和前景 [J]. 化工进展, 2021, 40(3): 1178-1186.
Ma YY, Chen JC, Chen GQ. Halophilic microorganisms as microbial chassis: applications and prospects [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2021, 40(3): 1178-1186.

[11] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 339: 819-823.

[12] Qin Q, Ling C, Zhao YQ, et al. CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile *Halomonas* spp. [J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 219-229.

[13] Holtz WJ, Keasling JD. Engineering static and dynamic control of synthetic pathways [J]. Cell, 2010, 140: 19-23.

[14] Cress BF, Trantas EA, Ververidis F, et al. Sensitive cells: enabling tools for static and dynamic control of microbial metabolic pathways [J]. Current

Opinion Biotechnology, 2015, 36: 205-214.

[15] Ye J, Hu D, Che X, 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.

[16] Ye J, Hu D, Yin J, et al. Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas* [J]. Metabolic Engineering, 2020, 57: 85-95.

[17] Shen R, Yin J, Ye JW, et al. Promoter engineering for enhanced P (3HB-*co*-4HB) production by *Halomonas bluephagenesis* [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(8): 1897-1906.

[18] Li T, Ye J, 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.

[19] Zhou H, Vonk B, Roubos JA, et al. Algorithmic co-optimization of genetic constructs and growth conditions: application to 6-ACA, a potential nylon-6 precursor [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(21): 10560-10570.

[20] Zhao L, Lu Y, Yang J, et al. Expression regulation of multiple key genes to improve L-threonine in *Escherichia coli* [J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 1-23.

[21] Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol [J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(7): 445-452.

[22] Burgard AP, Pharkya P, Maranas CD. Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 84(6): 647-657.

[23] Pharkya P, Maranas CD. An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems [J]. Metabolic Engineering, 2006, 8(1): 1-13.

[24] Ranganathan S, Suthers PF, Maranas CD. OptForce: an optimization procedure for identifying all genetic manipulations leading to targeted overproductions [J]. PLoS Computational Biology, 2010, 6(4): e1000744.

[25] Yin J, Fu XZ, Wu Q, et al. Development of an enhanced chromosomal expression system based on porin synthesisoperon for halophile *Halomonas* sp. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(21): 8987-8997.

[26] Liu D, Xiao Y, Evans BS, et al. Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl-CoA sensor-actuator [J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(2): 132-140.

[27] Zargar A, Quan DN, Bentley WE. Enhancing intercellular coordination: rewiring quorum sensing networks for increased protein expression through autonomous induction [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(9): 923-928.

[28] Shi S, Ang EL, Zhao H. *In vivo* biosensors: mechanisms, development, and applications [J]. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 2018, 45(7): 491-516.

[29] Zhao H, Zhang HQM, Chen XB, et al. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas* [J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 128-140.

[30] Dye NA, Pincus Z, Fisher IC, et al. Mutations in the nucleotide binding pocket of MreB can alter cell curvature and polar morphology in *Caulobacter* [J]. Molecular Microbiology, 2011, 81: 368-394.

[31] Jiang XR, Yao ZH, Chen GQ. Controlling cell volume for efficient PHB production by *Halomonas* [J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 30-37.

[32] Lutkenhaus J. FtsZ ring in bacterial cytokinesis [J]. Molecular Microbiology, 1993, 9(3): 403-409.

[33] Hu ZL, Saez C, Lutkenhaus J. Recruitment of MinC, an inhibitor of Z-ring formation, to the membrane in *Escherichia coli*: role of MinD and MinE [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(1): 196-203.

[34] Tan D, Wu Q, Chen JC, et al. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates [J]. Metabolic Engineering, 2014, 26: 34-47.

[35] Tan D, Xue YS, Aibaidula G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrateby *Halomonas* TD01 [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 8130-8136.

[36] 陈江楠, 陈潇宁, 刘心怡, 等. 基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术 [J]. 合成生物学, 2020, 1(5): 516-527.
Chen JN, Chen XN, Liu XY, et al. Engineering *Halomonas* spp. for next generation industrial biotechnology (NGIB) [J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(5): 516-527.

[37] Don TM, Chen CW, Chan TH. Preparation and characterization of poly (hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei* [J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006, 17(12): 1425-1438.

[38] Carcamo M, Saa PA, Torres J, et al. Effective dissolved oxygen control strategy for high-cell-density cultures [J]. IEEE Latin America Transactions, 2014, 12(3): 389-394.

[39] Xue SJ, Jiang H, Chen L, et al. Over-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) and flavohemoglobin (FHb) genes greatly enhances pullulan production [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 701-709.

[40] Mejia A, Luna D, Fernandez FJ, et al. Improving rifamycin production in *Amycolatopsis mediterranei* by expressing a *Vitreoscilla* hemoglobin (*vhb*) gene fused to a cytochrome P450 monooxygenase domain [J]. 3 Biotech, 2018, 8(11): 456.

[41] Zhang SM, Wang JP, Wei YL, et al. Heterologous expression of VHb can improve the yield and quality of biocontrol fungus *Paecilomyces lilacinus*, during submerged fermentation [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 187: 147-53.

[42] Ouyang PF, Wang H, Hajnal I, et al. Increasing oxygen availability for improving poly (3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas* [J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 20-31.

[43] 贝泓涵, 张立卫, 孙菁. 微生物连续发酵过程线性反馈最优控制 [J]. 大连理工大学学报, 2018, 58(3): 324-330.
Bei HH, Zhang LW, Sun J. Linear optimal feedback control in continuous culture of microbial fermentation [J]. Journal of Dalian University of Technology, 2018, 58(3): 324-330.

[44] Li T, Chen XB, Chen JC, et al. Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy [J]. Biotechnology Journal, 2014, 9(12): 1503-1511.

[45] 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 [J]. Biotechnology Journal, 2018, 13(5): 1800074.

[46] Falb M, Müller K, KönigsmaierL, et al. Metabolism of halophilicarchaea [J]. Extremophiles, 2008, 12(2): 177-196.

[47] Ates Ö, Oner ET, Arga KY. Genome-scale reconstruction of metabolic network for a halophilic extremophile, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 [J]. BMC Systems Biology, 2011, 5(1): 12.

[48] Rathna GVN, Gadgil BST, Killi N. Polyhydroxyalkanoates: the application of Eco-friendly materials [J]. Biodegradable and Biobased Polymers for Environmental and Biomedical Applications, 2016: 25-54.

[49] Ling C, Qiao GQ, Shuai BW, et al. Engineering NADH/NAD^+ ratio in *Halomonas bluephagenesis* for enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHA) [J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 275-286.

[50] Chen XB, Yin J, Ye JW, et al. Engineering *Halomonas bluephagenesis* TD01 for non-sterile production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) [J]. Bioresource Technology, 2017, 244: 534-541.

[51] Chen GQ. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry [J]. Chemical Society Reviews, 2009, 38(8): 2434-2446.

[52] Chen GQ, Patel MK. Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review [J]. Chemical Reviews, 2012, 112: 2089-2099.

[53] Ma H, Zhao Y, Huang W, et al. Rational flux-tuning of *Halomonas bluephagenesis* for co-production of bioplastic PHB and ectoine [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3313.

[54] 李丹丹, 韩建秋. 高盐废水生态处理技术研究进展及展望 [J]. 应用技术学报, 2018, (4): 340-345.
Li DD, Han JQ. Research progress and prospects of high-salt wastewater ecological treatment technology [J]. Journal of Technology, 2018, (4): 340-345.