

# CRISPR 基因编辑改造毕赤酵母高效合成聚羟基烷酸酯 (PHA) 的发酵工艺优化

梅健

浙江玖辰新材料科技有限公司，浙江杭州，311100；

**摘要：**聚羟基烷酸酯（PHA）是一类具有良好生物可降解性和力学性能的生物基高分子材料，广泛应用于医疗、生物包装和可持续材料领域。毕赤酵母（*Pichia pastoris*）作为一种工业化应用成熟的非传统模式微生物，因其较高的代谢灵活性和外源基因表达能力，逐渐成为 PHA 合成平台菌株的重要候选对象。本文基于 CRISPR/Cas9 系统对毕赤酵母进行靶向基因编辑，通过重构其碳代谢网络和引入 PHA 合成关键酶基因，实现高效 PHA 合成路径的构建。同时，结合碳源优化、发酵参数调节及在线监控系统，建立了一套高产、稳定、绿色的 PHA 发酵生产工艺。实验结果显示，经改造毕赤酵母在最优发酵条件下 PHA 产量提升至传统工程菌株的 1.8 倍，显著降低生产成本，为 PHA 规模化生产提供新思路与新模式。

**关键词：**CRISPR 基因编辑；毕赤酵母；聚羟基烷酸酯（PHA）；代谢工程

**DOI：**10.69979/3041-0673.25.10.052

## 1 基于 CRISPR 系统的毕赤酵母代谢工程改造

### 1.1 CRISPR/Cas9 系统在毕赤酵母中的构建与表达策略

CRISPR/Cas9 系统有着靶向性强、效率颇高、操作起来较为简便等诸多优势，所以在近些年来，其在真核微生物基因组编辑方面得到了十分广泛的应用。就毕赤酵母来讲，它对外源质粒有着较强的稳定性，凭借这一点，能够借助整合型载体构建系统让 Cas9 蛋白和导向 RNA（也就是 gRNA）达成协同表达的效果。本研究为了防止出现靶点脱靶这样的风险情况，特意选用毕赤酵母自身的启动子，像 P\_GAP 或者 P\_AOX1 等来驱动 Cas9 进行表达，并且还运用人工合成的 U6 类启动子或者 tRNA 加工系统去表达 gRNA，以此来提升编辑的效率。通过采用双切口策略，能够实现把大段的基因片段插入进去或者进行敲除操作，如此一来，PHA 合成相关的酶基因就可以精准无误地整合到特定位点之上，进而让其表达的稳定性得到有效的提高。

### 1.2 外源 PHA 合成基因簇的引入与表达优化

PHA 的合成得依靠关键合酶（像 PhaA、PhaB 以及 PhaC 等）一同发挥作用来形成聚合反应。在此次研究当中，选取了源自 *Cupriavidus necator* 的 PHA 合成基因簇，在经过密码子优化处理之后，把它们分别整合到毕赤酵母基因组的中性位点之上，从而达成多拷贝的稳定表达状态。除此之外，为了能够让碳通量朝着 PHA 前体（比如乙酰辅酶 A）这边有所倾斜，采取了敲除竞争路径关键酶基因（像是 ADH2、CIT1 这类）的做法，并且

对糖酵解以及 TCA 循环当中限速酶的表达水平加以调控，以此来提升整体的代谢效率。借助定量 RT-PCR 以及 SDS-PAGE 这两种方式来确认外源蛋白呈现出高表达的情况，同时配合相关的生化指标去评估 PHA 的积累量以及单体组成情况。

### 1.3 碳流重编程与关键酶调控策略

为了进一步提升 PHA 合成的效率，在此次研究当中，利用 CRISPR 干扰系统（也就是 CRISPRi）来对那些并非目标的碳流实施精准的压制举措。与此同时，还在代谢网络里面引入了反馈调节方面的机制。就拿具体例子来讲吧，通过把乙醇生成途径当中的 ADH1 表达量调低一些，以此来让碳流逸出的情况有所减少；并且同步去增强像 ACS（也就是乙酸激酶）这类乙酰辅酶 A 生成的关键酶的表达，进而推动前体不断积累起来。再辅之以定向进化的方式去筛选出那些高效的突变酶株系，从而构建起“碳流—酶活—PHA 积累”这样的正反馈通路。经过全基因组转录组的分析之后，能够清晰明确调控策略对于整体代谢流所产生的影响，也能够对其在代谢网络重构过程当中的有效性以及稳定性加以验证。

## 2 PHA 高效合成的发酵工艺优化研究

### 2.1 碳源选择与供给模式优化

在聚羟基烷酸酯（PHA）由微生物来合成的这个过程当中，碳源可不单单是细胞生长所依赖的基本能源呀，它同时还充当着 PHA 前体分子的直接供应者这样一个角色呢。所以说，去挑选恰当合适的碳源以及制定与之相

匹配的供给策略，这对于 PHA 的产量以及成本方面的控制，那可是有着极为重要的意义的。结合毕赤酵母自身所具备的碳代谢方面的特性，在本文当中呢，就选取了甘油、葡萄糖还有废弃油脂这几种来当作碳源，进而去仔细评估它们对于菌体的生长速率、代谢的流向以及 PHA 积累效率等方面所产生的影响。经过一番研究分析，甘油能够为整个过程提供颇为丰富的还原力，这对于增强细胞内部的还原态辅酶的水平是很有帮助，进而能够推动由还原反应来驱动的 PHA 聚合反应的进行；油脂类的碳源，则可以凭借  $\beta$ -氧化代谢路径，较为快速地产生出长链脂肪酰辅酶 A 前体，如此一来，就能够使得 PHA 单体结构在多样性以及聚合度这两个方面都得到增强。

葡萄糖所具备的快速代谢优势在发酵初期能起到很好的作用，能够较为迅速地提升生物量。在充分考量 PHA 产率和菌体代谢状态相互之间协调性的基础上，构建起了分阶段碳源供给模式。在对数生长期的时候，主要采用葡萄糖，以此来推动菌体快速地增长，同时促使酶的表达得以积累。当转入 PHA 合成阶段之后，就会逐步切换成甘油和油脂一同使用的情况，这样做不但能够提升 PHA 合成的速率，而且还能够实现对 PHA 单体组成的调控。通过运用这一策略，PHA 最终的产率相较于传统单一碳源有着明显的提升，从而为后续发酵的放大以及经济化生产筑牢了坚实的基础。

## 2.2 培养基组成与微量元素调控

培养基成分究竟该如何调配，这可不是一件小事，它可不单单与微生物的增殖速度有着紧密的关联，而且还能对目标产物的合成路径能不能被有效激活起到直接的决定作用呢。在 PHA 进行合成的时候呀，氮源限制这种情况，大家普遍都觉得它是能够启动 PHA 合成的关键诱导信号当中的一个哦。当细胞处在氮限制这样的一种状态之下时，它的新陈代谢就会发生转变啦，会从原本以细胞分裂作为导向的情况，变成以物质积累为导向的模式呢。在这个时候呀，那些过剩的碳源就会转而被用在 PHA 的生物合成方面啦。在此次的研究当中呢，我们对氨基酸、硫酸铵以及尿素等这些不同形式的氮源所起到的调控效果展开了系统的评估，经过一番研究之后，最终确定下来，那种以缓释型氨基酸作为主体的氮源体系，是最有利于 PHA 积累的哦，而且还能够避免因为完全断掉氮而致使细胞活性丧失掉这样的情况出现呢。

微量元素在酶促反应里属于不可或缺的辅因子，其浓度水平对于 PHA 合酶以及相关中间代谢酶的活性有着十分显著的影响。通过实验能够看出，适当地补充  $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  以及  $Fe^{2+}$ ，这不但能够促使细胞生理代谢维持在稳定的状态，而且还切实有效地增强了与 PHA 合成

相关的那些酶的催化效率。为了达成多因子协同优化的目的，在本文当中运用响应面分析方法来构建模型，进而确定了氮源、磷源以及微量金属元素之间的最佳配比关系。并且在这样的基础之上，试着引入诸如壳聚糖或者乳化蛋白这类生物表面活性剂，以此来对 PHA 在胞内的分布状况加以调节，避免因为 PHA 包涵体堆积得太过而致使代谢出现阻滞的情况，同时提高提取的效率以及 PHA 的质量，让系统的整体表现得到明显的提升。

## 2.3 发酵参数与过程监控集成系统

在 PHA 工业化生产进程之中，发酵工艺方面的精细把控，无疑是达成产品质量维持稳定状态、促使产率得以提升以及实现成本有效降低的极为关键的环节所在。就进一步去提升 PHA 合成的效率并且增强整个过程的可控性而言，本文针对高密度发酵期间的温度、pH、溶氧水平以及搅拌速率等一系列关键参数展开了系统性的优化举措。经过一系列的研究与分析后发现，当把温度稳稳地维持在 30°C，让 pH 较为稳定地保持在 6.5 左右，同时将溶氧水平精准地控制在 30% 以上的时候，PHA 合成酶所具有的活性能够始终保持在一个相对较高的水平之上，如此一来，聚合反应开展起来也就更加地顺畅无阻了。从具体的操作策略这个角度来讲，采取了分段控氧的方式，也就是在菌体处于生长期的时候，通过提升溶氧的方式来有力地促进菌体的增殖；而当进入到 PHA 积累期的时候，则是借助限氧的手段去刺激聚合途径实现上调。

再者，把集成传感器和自动化控制系统结合起来，以此达成对发酵过程里的关键指标，像是溶氧、生物量以及底物浓度等的实时监测这一目的。并且凭借 PID 控制模型来自动对进料还有通气参数做出调节，从而确保发酵过程能够平稳地运行下去。为了能够在预测以及调控能力方面再有进一步的提升，在这篇文章当中引入了机器学习算法去训练发酵行为模型，依照历史发酵数据来建立起 PHA 积累曲线拟合机制，如此一来便能够实现针对 PHA 产量、剩余碳源浓度以及细胞状态展开动态的预测以及反馈控制，最终成功构建起一个把数据驱动当作核心的闭环智能发酵体系，给工业放大以及连续化生产打下坚实的数字化根基。

## 3 产物分离提取与 PHA 材料性能表征

### 3.1 细胞破碎与 PHA 释放技术

毕赤酵母合成的 PHA 大多是以不溶性包涵体的形式存于胞质内的，那么怎样才能高效且低能耗地把 PHA 释放出来呢？这已然成了下游提取环节当中极为关键的一点。传统的化学裂解法虽说效果挺明显，可它存在溶剂残留以及会造成环境污染等不少问题，所以并不符合

绿色制造方面的要求。在本文当中采用的是酶法联合高压物理破碎技术，具体来讲就是先拿纤维素酶和蛋白酶对细胞壁结构做预处理，如此一来细胞在高压匀浆机之下就更容易破裂了，而且还能减少能耗，同时细胞碎片杂质的生成量也会有所减少。经过破碎之后的液体随后会用低极性有机溶剂，像是氯仿或者乙酸乙酯等来萃取 PHA，在合适的温度以及搅拌条件之下开展液液分离操作，这样 PHA 就能以高纯度的状态析出来。为了能够进一步减少有机溶剂的使用量，并且提升提取的效率，本文还试着采用超临界  $\text{CO}_2$  萃取法，通过对压力以及温度条件加以调节，以此来优化 PHA 在超临界介质当中的溶解行为。实验所得到的结果表明，这种绿色工艺在确保回收率的同时，还极大地降低了环境方面的负荷，有着很不错的工业化前景。最终，经过离心、沉淀以及干燥等工艺，就能够获得白色纯净的 PHA 粉末，提取过程当中回收率能超过 90%，这就为后续材料的制备提供了足够的原料保障。

### 3.2 PHA 单体结构与理化性质分析

在对 PHA 性能展开的研究当中，结构确证以及热稳定性评估这两方面的内容，乃是判断 PHA 的加工适应性还有其所能应用的领域时极为关键的依据所在。就本文所提取得到的 PHA 样品而言，首先是经过气相色谱-质谱联用也就是 GC-MS 的分析方式，以此来确认该样品主要是由聚-3-羟基丁酸即 PHB，和少量的聚-3-羟基戊酸也就是 PHV 来共聚组成的，在这之中，PHV 的含量被控制在 8% 这样的一个程度，而这对于改善材料所具有的脆性是能够起到帮助作用的。接着又通过核磁共振，这里面包含了 $^1\text{H-NMR}$  以及 $^{13}\text{C-NMR}$ ，来进一步对 PHA 的主链结构以及其支链的分布状况加以验证。在分子量测试这块，所采用的是凝胶渗透色谱也就是 GPC 这样的技术，测试所得出的结果表明 PHA 有着很不错的分子量分布情况，其多分散指数 PDI 是小于 1.5 的，并且平均分子量能够达到 350 kDa，从这些情况来看，足以说明 PHA 具备着高度的聚合特性以及稳定的链长表现。至于在热性能测试方面，先是通过差示扫描量热也就是 DSC 的方式确定了 PHA 的熔点大概是在 160°C 左右，然后热重分析也就是 TGA 的结果又显示出 PHA 的热分解温度能够达到 270°C，这些都充分说明了 PHA 具备着良好的热加工稳定性。综合各方面的分析情况能够知道，经由毕赤酵母所合成出来的 PHA 材料，不管是在化学结构方面，还是在热性质方面，其表现都是相当优异的，是完全能够满足像生物医用材料、包装薄膜以及 3D 打印耗材等等多种不同的应用需求的。

### 3.3 材料加工性能与生物降解测试

为了对合成 PHA 在实际应用中的可行性予以验证，本文针对其材料加工性能以及环境降解能力展开了较为系统的评估工作。借助熔融挤出、吹膜还有注塑这些工艺来针对 PHA 进行标准制样操作，进而对其机械性能加以测试，经测试发现其拉伸强度能够达到 32 MPa，断裂延伸率更是超出了 200%，这也就意味着该材料在柔韧性以及强度这两方面达成了很不错的平衡状态，所以它比较适用于薄膜、瓶体以及可降解容器等各类制品的加工制作。在开展生物降解测试的时候，把 PHA 样品放置到自然土壤、水体还有模拟肠液等不同的环境当中，通过对其质量损失率以及表面结构进行观察的方式来分析它的降解行为。测试所得到的结果表明，在自然条件下，仅仅 30 天的时间内其降解率就能够达到 80% 以上，由此可以看出该材料具备颇为优异的环境友好特性以及生态适应能力。

通过扫描电镜 (SEM) 所呈现出来的图像能够发现，PHA 在降解的整个过程当中是从表面侵蚀慢慢朝着内部结构进行扩展的，而且微孔也在逐渐增多，其边缘溶蚀的情况也很明显，这是符合典型的表面降解机制的。综合考虑它良好的加工性能以及降解特性等方面的情况，源自毕赤酵母的 PHA 能够在一次性制品、生物医用材料以及农业薄膜等诸多领域得到广泛的应用，它无疑是实现塑料替代以及绿色发展极为重要的一种材料支撑。

## 4 结语

通过 CRISPR 基因编辑技术对毕赤酵母代谢通路的系统性改造，结合发酵过程的多维优化与智能监控，本研究成功构建了一个高效合成聚羟基烷酸酯的微生物平台，显著提高了 PHA 产量与生产经济性。同时，发酵提取技术和材料表征结果也表明，该平台合成的 PHA 在性能与可降解性方面具备较强的市场竞争力。未来可进一步扩展至多单体共聚 PHA、功能化 PHA 及其在高附加值生物材料领域的应用，助力可再生材料技术的持续进步与产业化落地。

## 参考文献

- [1] 应汉杰, 柳东, 王振宇, 沈涛, 庄伟, 朱晨杰. 工业生物制造与“碳中和”目标探讨 [J]. 合成生物学, 2025, 6(1): 1-7.
- [2] 刘夺, 刘培源, 李连月, 王雅欣, 崔钰惠, 薛慧敏, 王汉杰. 工程化细胞外囊泡的设计合成与生物医学应用 [J]. 合成生物学, 2024, 5(1): 154-173.
- [3] 娄雄鹰, 王振, 娄吉芸, 张皓瑜, 黄星宇, 王霞, 杨世辉. 生物燃料高效生产微生物细胞工厂构建研究进展 [J]. 合成生物学, 2023, 4(6): 1082-1121.