

DOI: 10.13376/j.cbls/2019052

文章编号: 1004-0374(2019)04-0385-06



陈国强, 博士, 清华大学教授。1985年本科毕业于华南理工大学应用化学系, 1989年获得奥地利格拉茨(Graz)工业大学应用化学博士学位。1990—1994年在英国诺丁汉(Nottingham)大学和加拿大阿尔伯达(Alberta)大学做博士后研究, 1994年被聘为清华大学副教授, 1997年被聘为清华大学教授, 2003—2009年兼任汕头大学多学科研究中心主任。长期从事“生物合成PHA材料及其下一代工业生物技术”的研究。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320多篇, Web of Sciences记录论文被引用15 000多次(H指数为59)。获得授权专利30项, 40个公开专利。他开发的技术已经用于生产微生物塑料聚羟基脂肪酸酯PHA。

基于嗜盐微生物合成生物学的下一代工业生物技术

杜鹤童, 赵倚晴, 陈金春*, 陈国强*

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要: 工业生物技术旨在利用微生物生化反应进行工业生产, 以获得人们需要的各种化合物或燃料等产品。然而, 由于现有的工业生物技术需要在生产过程中保持无菌, 会消耗大量的能源和淡水资源, 大大增加了成本。嗜盐微生物是一类可以在高盐环境下生长的微生物, 其生长环境极端, 可以有效避免生产过程中受到其他微生物的污染, 是降低工业生物技术成本的可行之道。基于本课题组前期大量研究探索, 总结了盐单胞菌合成生物学改造的前沿应用, 期待对未来生物制造产生积极的影响。

关键词: 嗜盐微生物; 合成生物学; 下一代工业生物技术; 聚羟基脂肪酸

中图分类号: Q81; Q939.9 **文献标志码:** A

Next generation industrial biotechnology based on synthetic biology of halophiles

DU He-Tong, ZHAO Yi-Qing, CHEN Jin-Chun*, CHEN Guo-Qiang*

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Industrial biotechnology aims to use microorganisms to produce chemicals, biofuels and other products that are commonly made by chemical industries. However, because of the heavy consumption on fresh water and energy during the production process, current industrial biotechnology has a very high production cost. Halophilic bacteria are a class of microorganisms growing under high concentration of salt. The high salt environments can avoid contamination by other microorganisms during the production processes, thus reducing the complexity of industrial biotechnology associated with sterilization processes. Applications of synthetic biology of *Halomonas* are summarized in this article with a hope to promote current industrial biotechnology into the next generation industrial biotechnology.

Key words: halophiles; synthetic biology; next generation industrial biotechnology; polyhydroxyalkanoate

收稿日期: 2018-06-11; 修回日期: 2019-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31430003, 21761132013, 31870859); 科技部基金项目(2016YFB0302504)

*通信作者: E-mail: chengq@mail.tsinghua.edu.cn (陈国强); chenjc@mail.tsinghua.edu.cn (陈金春)

长久以来, 化学工业为人类社会生产了大量的产品, 极大丰富了人类的物质文明, 但同时也带来了很多问题。化学工业大量使用石油、煤等化石燃料, 在造价低廉、产业完善的背后, 不断消耗着大量不可再生资源, 同时, 对环境也造成了破坏^[1]。随着石油资源日益紧张和保护环境呼声不断高涨, 开发新的、更加环保且可持续发展的工业生物技术的需求迫在眉睫, 更多学者对工业生物技术给予了关注和期待。工业生物技术旨在利用生物产物为原料(如淀粉、纤维素等), 并利用生物活体、细胞器或酶等生物制品以生化反应的形式对原料进行加工, 从而获得需要的产物。相比于传统的化学工业, 工业生物技术具有可持续发展和对环境破坏更小的优势^[2]。然而, 目前工业生物技术由于底物价格昂贵、消毒灭菌步骤繁琐且消耗大量能源和水资源等原因, 相比于传统化学工业在生产产品时具有更高的成本, 在市场竞争中不占优势^[1,3]。因此, 开发一系列可以高效、经济地生产各类产品的菌种和工业生物技术成为当下的重要任务。为了解决上述问题, 人们开始关注自然界中存在的各种生活在极端条件下, 具有特殊性质的微生物, 如嗜盐、嗜碱、嗜酸、嗜热微生物等, 它们可以有效解决工业生物技术中的污染问题。其中, 嗜盐微生物, 以盐单胞菌属(*Halomonas*)为例, 可在高盐高碱条件下进行开放的、连续的发酵并大量生产生物塑料聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)等其他类型的产物, 逐渐成为了工业生物技术研究热点, 成为下一代工业生物技术开发的良好平台^[4-5]。近年来, 国内外学者从合成生物学改造与发酵技术开发和优化的角度, 使基于嗜盐微生物的工业生物技术取得显著进步^[3-6]。本文将简要介绍近年嗜盐微生物的相关技术进展, 并对未来研究方向进行展望。

1 嗜盐微生物的生物学性质及其工业价值

嗜盐微生物是一类生长过程中需要高浓度氯化

钠(NaCl)的微生物的总称, 在盐湖、盐沼中常有发现。嗜盐微生物在细菌、古细菌和真核生物中均有分布。根据其生长最适盐浓度, 嗜盐微生物可被分为中度嗜盐生物(最适盐浓度 0.5~2.5 mol/L)和极端嗜盐生物(最适盐浓度 2.5~5.2 mol/L)两类^[7-8]。

为在高盐浓度下生存, 嗜盐微生物中存在对应高渗透压环境的两种机理^[9]: 其一是储存氯化钾为主的无机离子, 多见于厌氧古细菌; 其二是储存水溶性有机小分子作为相容性溶质^[10], 如氨基酸、糖类和多元醇类物质及其衍生物。这些溶质不仅起到平衡渗透压的作用, 同时对抗逆性也产生重要影响, 使嗜盐微生物得以在高碱、高温环境中存活^[11]。这些小分子在微生物内储存量较高, 且不对其基础代谢造成压力, 因此, 野生型的嗜盐微生物具有优秀的生产能力, 包含极高的工业价值。工业中最常使用的是嗜盐细菌, 均来自 γ -变形杆菌纲的盐单胞菌科(*Halomonadaceae*)。表1列举了近年被开发用于工业生产的嗜盐微生物种类及产品名称^[4,12-17]。

然而, 嗜盐微生物生长的特殊环境在为物种存续和工业生产带来优势的同时, 也对研究造成了阻碍^[18], 并使得发酵后的污水处理变得十分困难。由于培养环境中存在较高浓度的盐, 使得质谱等其他常见检测手段的应用变得十分困难, 对嗜盐微生物群体感应现象和醇类生产的相关研究造成了影响^[19]。

2 嗜盐微生物中合成生物学相关研究进展

2.1 合成生物学方法与思路介绍

合成生物学是基于高度优化的生物元件和完全透明的平台生物学的分支学科, 旨在建立复杂的、功能专一的人工生物反应器。合成生物学相较于其他科学学科更侧重设计与量化, 与工程学科更为相近。Andrianantoandro等^[20]曾将合成生物学与计算机科学进行形象的比较。如图1所示, 将基因与蛋白质等生物分子看作用于组装机器的零件, 可以通过拼

表1 近年被开发用于工业生产的嗜盐微生物

产物	应用	菌种	参考文献
PHB	包装	<i>Halomonas bluephagenesis</i>	Tan等 ^[4]
PHBV	包装、医用材料	<i>Haloferax mediterranei</i>	Don等 ^[12]
四氢嘧啶	抗衰老护肤因子	<i>Halomonas elongata</i>	Sauer和Galinski ^[13]
淀粉酶	食品工业	<i>Halomonas</i> spp.	Coronado等 ^[14]
蛋白酶	制药业、洗衣剂	<i>Bacillus</i> spp.	Shivanand和Jayaraman ^[15]
纤维素酶	水解纤维素	<i>Halomonas</i> spp.	Shivanand等 ^[16]
生物表面活性剂	乳化剂	<i>Halomonas</i> spp.	Gutierrez等 ^[17]

PHBV, 聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯; PHB; 聚-3-羟基丁酸酯

凑组合获得对应条件下的化学反应, 再对多个化学反应进行组合设计形成具有功能的反应通路和细胞群体。

2.2 合成生物学的工业应用思路

合成生物学是一个高度交叉的学科, 与计算机科学、软件科学、机械、能源动力等学科均有交叉。在工业生物技术方面, 合成生物学技术被期待用于构建基因稳定性高、代谢产物专一且高产量的工业生产平台菌^[21]。为达成目的, 目前主要存在3种研究方向。第一, 通过删减微生物基因组的非必需基因片段, 将底盘菌基因组中除生存、生产外相关的所有基因全部剔除, 从而达到降噪功能。如 Park 等^[22]将大肠杆菌基因组中23%的片段敲除后, 成功获得了生长状况正常, 且具有更高基因稳定性的大肠杆菌菌株。第二, 从合成生物学基础元件出发, 制作适用于工业生产菌株的合成生物学元件。这些合成生物学元件包含启动子、终止子及增强基因表达强度的其他非特异性元件等。如 Segall-Shapir 等^[23]设计的特殊启动子, 可以在不同拷贝数的质粒骨架上获得相同的基因表达强度, 使目的基因的表达仅与外界给予的诱导强度有关, 排除了易波动的质粒拷贝数对基因表达的影响。第三, 通过 CRISPR、精准控制等合成生物学技术, 快速、大量进行菌种代谢通路的精确优化。在基因组编辑中, 大肠杆菌等模式生物中最常用到的敲除系统为 Wanner 实验室在2000年发表的 Red 重组敲除法^[24]; 真核生物中则以 CRISPR-Cas9 和 RNA 干扰等技术为主。图2展示了在嗜盐菌中进行 CRISPR-Cas9 基因操作技术的过程。

2.3 嗜盐微生物中的合成生物学研究进展

为了高效编辑嗜盐微生物的代谢通路, 通过精准的遗传改造等获得更高产量, 近年来学者试图将合成生物学方法引入嗜盐微生物中^[1,6]。但前文已经提到, 嗜盐微生物在基因功能研究、基因组编辑等方面均与经典模式生物存在较大差异, 故在进行合成生物学设计前, 需要针对嗜盐微生物开发成熟、高效的基因编辑技术和大量的生物学元件。2018年, Qin 等^[25]成功在 *Halomonas* spp. 中引入了精准、高效的 CRISPR-Cas9 系统, 第一次在嗜盐微生物中进行了精确、快捷的基因组编辑。CRISPR-Cas9 技术的引入为研究节省了大量时间, 并为在嗜盐微生物中进行复杂的基因操作创造了条件。在生物元件设计方面, 2017年, Zhao 等^[26]成功发现了可在嗜盐细菌 *Halomonas bluephagenesis* 中诱导表达目的基因的新型 T7-like 诱导启动子, 可成功在 *Halomonas bluephagenesis* 中诱导表达各种基因。

基于这些针对嗜盐微生物设计的生物元件, Jiang 和 Chen^[27]在 *Halomonas bluephagenesis* 中进行了一系列形态学研究, 通过对 MreB、MinCD、FtsZ 等蛋白表达进行控制, 使盐单胞菌形状变长、体积变大, 从而达到提高产物储存量的目的。其研究成功观察到细菌菌体变长, 并且使聚-3-羟基丁酸酯 (poly-3-hydroxybutyrate, PHB) 积累量从细胞干重的80%上升到92%^[27]。

3 基于嗜盐微生物的下一代工业生物技术

工业生物技术旨在利用生物以最常见的农业产品(如淀粉或纤维素等)为原料生产化学分子、聚

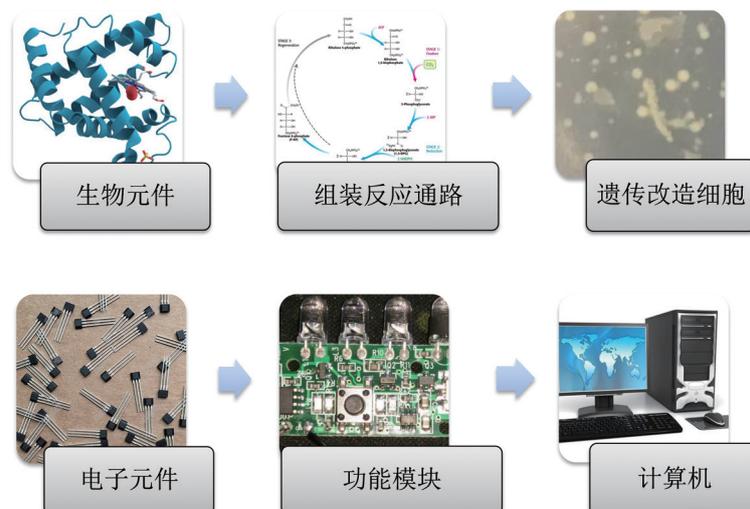
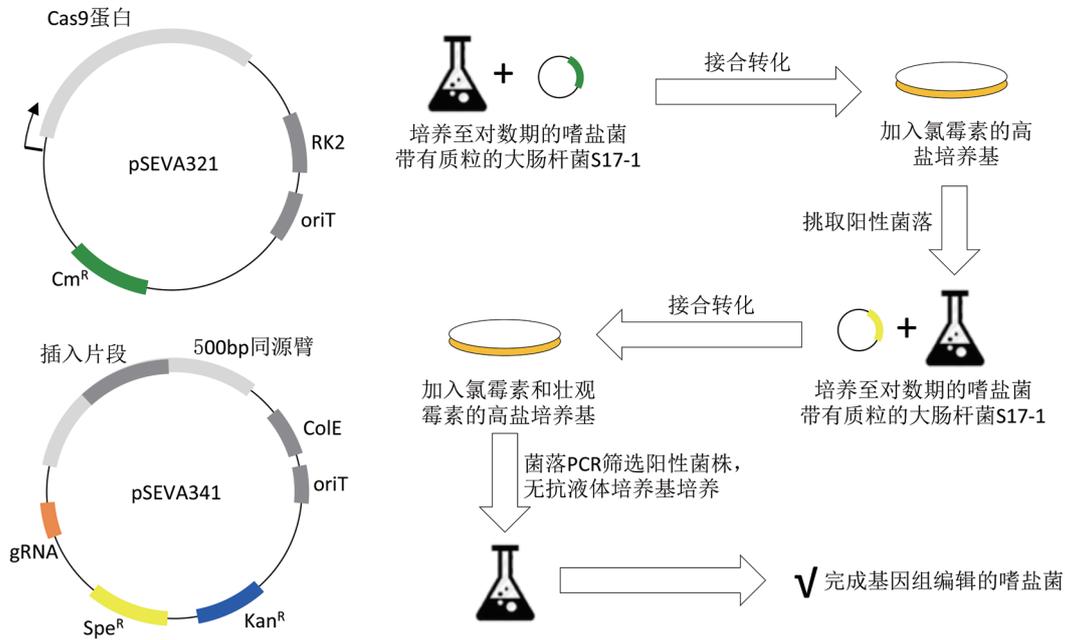


图1 合成生物学思路与计算机科学比较



首先, 带有Cas9基因的低拷贝质粒pSEVA321被接合转化进嗜盐细菌中, 完成Cas9蛋白的稳定表达。随后, 将表达guideRNA的高拷贝质粒pSEVA341接合转化进带有pSEVA321的嗜盐细菌, 即可完成基因组剪切与同源重组, 通过菌落PCR可在一周之内完成一次精准的基因组编辑, 且可进行连续编辑。

图2 嗜盐细菌中利用CRISPR-Cas9系统进行基因组编辑

合材料、生物燃料等产品, 以应对目前日益严重的环境污染问题和化石能源危机问题。然而, 目前基于生物技术所得到的产品相比于化学方法获得的产品仍然比较昂贵, 除去原料的价格外, 生产过程中需要尽可能避免其他微生物的污染, 使得工业生物技术的成本难以下降。避免污染意味着在工业中需要耗费大量的能源和洁净的水资源对生产设备进行灭菌, 同时, 需要昂贵的仪器设备和严格的操作保证生产过程中没有引入外来污染, 并且现有的工业生物技术大多不支持连续生产, 生产效率低下。这些缺点导致目前的工业生物技术市场竞争力较弱。与传统的生物发酵技术相比, 基于嗜盐微生物的下一代工业生物技术可以很大程度地解决上述问题, 有效降低成本, 提高产品的市场竞争力。其核心技术在于利用嗜盐微生物高盐的生长环境, 减少对无菌生产的需求, 进行长时间的连续发酵。嗜盐微生物的这些特性为其作为下一代工业生物技术的核心, 有效降低产品成本提供了基础。

近年来, 研究人员们基于嗜盐微生物 *Halomonas bluephagenesis* 成功开发了一系列下一代工业生物技术。*H. bluephagenesis* 具有生长迅速的优势和较高的 PHB 积累能力。合成生物学思维指导下的工作使得 *H. bluephagenesis* TD01 成为一种优秀的生

产平台菌, 生产多种不同的产品, 如聚-3,4-羟基丁酸酯 (P34HB)^[28]、聚-3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯 (PHBV)^[4-5]、生物表面活性剂蛋白 PhaP^[29]、5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 等^[30]。由于该菌可以在高盐高碱环境中生长, 使得其发酵过程不易受到其他微生物的污染, 可以进行开放式连续发酵, 大幅减少传统发酵过程中用于灭菌的能源消耗, 得到了 80 g/L 的细胞干重和 80% 的聚-3-羟基丁酸酯 (PHB) 产量, 并在后续工作中利用合成生物学技术将产量提高到 92%^[27,30]。基于 *H. bluephagenesis* 和另一株相似的细菌 *Halomonas campaniensis* LS21, 利用它们的耐盐特性, 研究者们成功开发出以海水代替淡水进行发酵的技术, 在实验室中进行了长达数周的开放式连续发酵而没有受到污染, 减少了对淡水资源的消耗, 同时, 降低了生产成本, 提高了生产效率^[31]。

目前, 基于 *H. bluephagenesis* 的下一代工业生物技术开发已经成功地从实验室中的 1 L 扩大到 1 000 L 中试^[3]。同时, 一系列基于 *H. bluephagenesis* 的开放式连续发酵技术流程和下游处理工艺已经被成功开发和应用。图 3 展示了研究者对于基于嗜盐微生物开发的下一代无灭菌开放式连续发酵工业生物技术的设想。

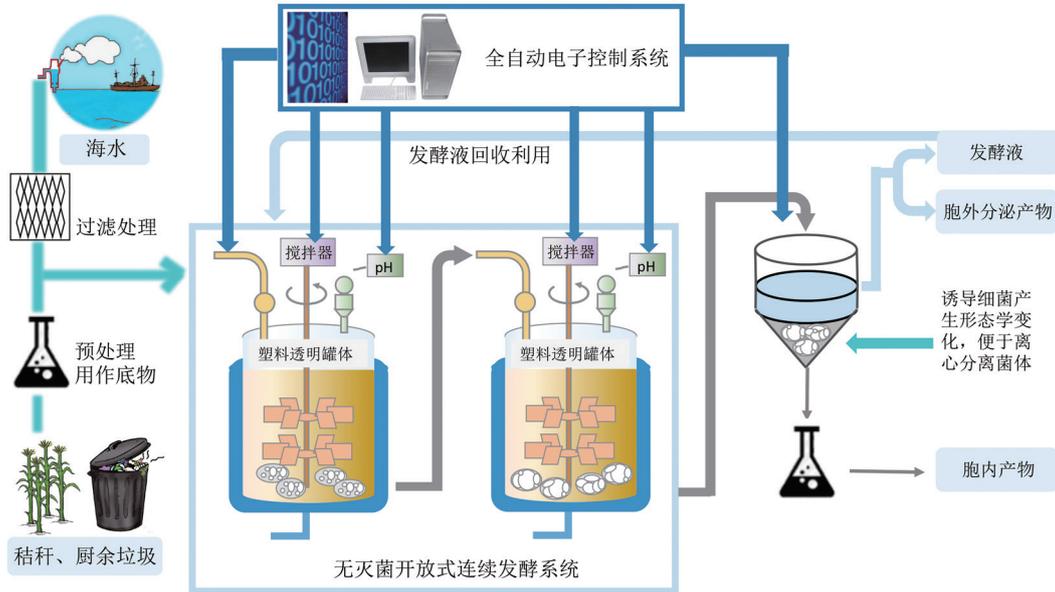


图3 基于嗜盐微生物的下一代工业生物技术设想

4 展望

基于嗜盐菌的下一代工业生物技术利用其在高盐环境下生长的特性, 可以大幅降低发酵过程中受到其他微生物污染的可能性, 其开放、连续的生产方式相比于传统的工业生物技术可以节约大量能源和淡水资源, 有效降低成本, 提高生产效率。同时, 对于嗜盐微生物的研究和合成生物学改造使其可以更好地利用更丰富、更便宜的原材料, 并生产更多、种类更加丰富、附加值更高的产品。然而, 虽然近年来嗜盐微生物的基因编辑技术领域的成果不断涌现, 工业应用屡次出现突破, 但本质上依然未能改变嗜盐微生物的遗传改造过程相比模式生物更加繁琐, 且内源基因功能难以研究的问题。例如, 与现有工业微生物相同, 嗜盐微生物在发酵后期面临着高细胞密度下有效调控元件缺失的问题, 特别是由于高密度下诱导剂工作效率低, 可能影响细胞生长, 并且价格昂贵, 给需要高细胞密度诱导表达的情况造成了障碍。工业应用方面, 虽然基于嗜盐微生物的工业生物技术可以有效减少其他微生物污染的风险, 但由于发酵环境需要较高浓度的盐和碱, 对于现有的工业生产设备提出了严峻的挑战, 需要研究者的进一步努力, 对发酵技术优化与生产设备改造升级进行集成整合, 开发基于塑料、陶瓷等耐腐蚀且更廉价材质的发酵设备, 将会对目前的基于嗜盐微生物的工业生物技术推广提供帮助。同时, 由于培养基中含有较高浓度的盐, 给污水处理带来了

一定的困难, 需要从菌种改造和发酵过程优化等多个方面进行改进。能否顺利解决以上各种问题, 将决定基于嗜盐菌的工业生物技术能否真正走出实验室走进工厂, 成为一项成熟完善的工业生物技术。随着全基因组测序技术和分析技术不断发展, 许多非模式生物的代谢途径和遗传特性得到充分研究, 使得嗜盐微生物的合成生物学研究进展迅速, 成果斐然。而针对高盐发酵对于生产设备提出的挑战, 目前研究者们已开发出塑料制透明发酵罐, 耐盐耐碱, 全透明, 更便于发酵过程的检测和控制, 在生产试验中表现良好。

在能源危机和环境污染问题日趋严峻的今天, 开发基于嗜盐微生物的工业生物技术生产各类塑料、燃料和其他产品, 可以有效缓解能源危机, 并能够很大程度上解决白色污染问题, 是应对当下困境的最好途径之一, 将成为未来工业生物技术发展的趋势所在。

[参 考 文 献]

- [1] Yin J, Chen JC, Wu Q, et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol Adv*, 2015, 33: 1433-42
- [2] Yan X, Chu F, Puri AW, et al. Electroporation-based genetic manipulation in type I methanotrophs. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 2062-9
- [3] Yin J, Fu XZ, Wu Q, et al. Development of an enhanced chromosomal expression system based on porin synthesis operon in *Halomonas* TD01. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 8987-97

- [4] Tan D, Xue YS, Aibaidula G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Biores Technol*, 2011, 102: 8130-6
- [5] Fu XZ, Tan D, Aibaidula G, et al. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals. *Metab Eng*, 2014, 23: 78-91
- [6] Harris JR, Lundgren BR, Grzeskowiak BR, et al. A rapid and efficient electroporation method for transformation of *Halomonas* sp. O-1. *J Microbiol Methods*, 2016, 129: 127-32
- [7] Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst*, 2008, 4: 2
- [8] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 504-44
- [9] Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63: 334-8
- [10] Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst*, 2008, 4: 2
- [11] Hozzein WN, Reyad AM, Hameed MSA, et al. Characterization of a new protease produced by a thermohaloalkali tolerant *Halobacillus* strain. *J Pure Appl Microbiol*, 2013, 7: 509-15
- [12] Don TM, Chen CW, Chan TH. Preparation and characterization of 6 poly (hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*. *J Biomater Sci*, 2006, 17: 1425-38
- [13] Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 57: 306-13
- [14] Coronado MJ, Vargas C, Hofemeister J, et al. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 183: 67-71
- [15] Shivanand P, Jayaraman G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochem*, 2009, 44: 1088-94
- [16] Shivanand P, Mugeraya G, Kumar A. Utilization of renewable agricultural residues for the production of extracellular halostable cellulase from newly isolated *Halomonas* sp. strain PS47. *Ann Microbiol*, 2013, 63: 1257-63
- [17] Gutiérrez T, Mulloy B, Black K, et al. Glycoprotein emulsifiers from two marine *Halomonas* species: chemical and physical characterization. *J Appl Microbiol*, 2007, 103: 1716-27
- [18] Aune TE, Achmann FL. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 1301-13
- [19] Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 2017, 551: 313-20
- [20] Andrianantoandro E, Basu S, Weiss R, et al. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Mol Syst Biol*, 2006, 2: 2006.0028
- [21] Chen GQ, Jewett MC. Transforming biotechnology with synthetic biology. *Biotechnol J*, 2016, 11: 193-4
- [22] Park MK, Lee SH, Yang KS, et al. Enhancing recombinant protein production with an *Escherichia coli* host strain lacking insertion sequences. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 6701-13
- [23] Segall-Shapiro TH, Sontag ED, Voigt CA. Engineered promoters enable constant gene expression at any copy number in bacteria. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 352-8
- [24] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6640-5
- [25] Qin Q, Ling C, Zhao Y, et al. CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile *Halomonas* spp. *Metab Eng*, 2018, 47: 219-29
- [26] Zhao H, Zhang HM, Chen X, et al. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*. *Metab Eng*, 2017, 39: 128-40
- [27] Jiang XR, Chen GQ. Morphology engineering of bacteria for bio-production. *Biotechnol Adv*, 2016, 34: 435-40
- [28] Chen XB, Yin J, Ye J, et al. Engineering *Halomonas bluephagenesis* TD01 for non-sterile production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Bioresource Technol*, 2017, 244: 534-41
- [29] Lan LH, Zhao H, Chen JC, et al. Engineering *Halomonas* spp. as a low-cost production host for production of bio-surfactant protein PhaP. *Biotechnol J*, 2016, 11: 1595-604
- [30] Li T, Guo YY, Qiao GQ, et al. Microbial synthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA) and its co-production with polyhydroxybutyrate (PHB). *ACS Syn Biol*, 2016, 5: 1264-74
- [31] Yue HT, Ling C, Yang T, et al. A sea water based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 108