

耐受性工程调控微生物细胞工厂胁迫抗性

张丽, 高健, 刘长青, 邓丽娜

盐城工学院 海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224051

张丽, 高健, 刘长青, 邓丽娜. 耐受性工程调控微生物细胞工厂胁迫抗性. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1373-1389.

ZHANG L, GAO J, LIU CQ, DENG LN. Tolerance engineering regulates stress resistance of microbial cell factory. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1373-1389.

摘 要: 微生物细胞工厂的生产效率是由菌株生长性能、产品合成能力和胁迫抗性共同决定的, 其中增强微生物细胞工厂的胁迫抗性是关键。耐受性工程基于微生物细胞工厂抵御胁迫压力的应激反应机制, 通过巩固壁膜屏障增强胁迫防御能力, 加快应激反应提高损伤修复能力, 创制耐受进化工具筛选鲁棒性增强的工业微生物。文中分析归纳了耐受性工程的调控策略, 并展望了耐受性工程精深调控胁迫抗性的发展前景, 对于微生物细胞工厂可持续生产天然产物和大宗化学品具有重要作用。

关键词: 耐受性工程; 微生物细胞工厂; 胁迫抗性; 胁迫防御; 损伤修复; 进化工程

Tolerance engineering regulates stress resistance of microbial cell factory

ZHANG Li, GAO Jian, LIU Changqing, DENG Lina

College of Marine and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, Jiangsu, China

Abstract: The production efficiency of microbial cell factory is determined by the growth performance, product synthetic capacity, and stress resistance of the strain. Strengthening the stress resistance is the key point to improve the production efficiency of microbial cell factory. Tolerance engineering is based on the response mechanism of microbial cell factory to resist stress. Specifically, it consolidates the cell wall-cell membrane barrier to enhance the defense against stress, accelerates the stress response to

Received: September 18, 2021; **Accepted:** January 11, 2022; **Published online:** January 13, 2022

Supported by: China Postdoctoral Science Foundation (2019M661727); National Natural Science Foundation of China (22108234)

Corresponding author: GAO Jian. E-mail: gaojianedu@163.com

基金项目: 中国博士后科学基金 (2019M661727); 国家自然科学基金 (22108234)

improve the damage repair, and creates tolerance evolutionary tools to screen industrial microorganisms with enhanced robustness. We summarize the regulation strategies and forecast the prospects of tolerance engineering, which plays an important role in the microbial cell factories for sustainable production of natural products and bulk chemicals.

Keywords: tolerance engineering; microbial cell factory; stress resistance; stress defense; damage repair; evolutionary engineering

微生物细胞工厂利用廉价的可再生原料生产有价值的化学品, 如精细化学品、生物燃料和药品等^[1]。在化学品生产过程中, 微生物细胞工厂的生产效率是由菌株生长性能、产品合成能力和胁迫抗性共同决定的, 其中设计和构建具有较强胁迫抗性的微生物细胞工厂是当代生物技术的最大挑战之一^[2]。生物体胁迫抗性(鲁棒性)即生物体在面对扰动或不确定性时仍然保持其表型相对稳定的能力, 是生物体公认的关键特性。生物体遇到扰动通常会产生相应的鲁棒性, 即基因鲁棒性(生物体发生基因变异后依然存活和运转的能力)和环境鲁棒性(生物体响应及缓冲外界环境变化的能力), 微生物胁迫抗性的增强可提高其生长性能及目标化学品的产量和生产率, 加速微生物工厂平台向工业化生产迈进。

在化学品生产中, 微生物细胞工厂面临着复杂严苛的生理或非生理逆境胁迫(图1), 这些胁迫主要源自: (1) 生理功能负担, 外源路径引入导致的细胞翻译负担、代谢通量负担、内环境负担等; (2) 底物胁迫, 如葡萄糖、木糖等和由木质纤维素水解得到的抑制物(乙酸、糠醛、羟甲基糠醛、酚类衍生物等)^[3-4]。此外, 底物的加入通常会改变微生物的胞外微环境, 如造成高渗胁迫等; 抑制物等有毒物质还会对微生物产生毒性进而抑制正常的生理代谢^[5]; (3) 中间代谢物/终产物胁迫, 代谢物胁迫主要来源于醇类等疏水性较强的物质, 或者有机酸

和氨基酸等亲水性代谢物, 这些代谢物的不断积累导致微生物胞内外微环境剧变、微生物细胞壁膜组分/功能受损; (4) 环境压力包括胞内微环境(酸胁迫、氧胁迫等)^[6-7]和胞外微环境(盐胁迫、温度胁迫、压强胁迫等)^[8-10]。上述胁迫压力限制了菌株的生长能力与产物合成效率。因此, 深入理解微生物如何应对胁迫压力, 并在此基础上开发调控胁迫抗性的策略, 对提高微生物细胞的生长及发酵性能至关重要。

微生物细胞面对外源胁迫时, 一般具有相似的应激反应机制, 首先胁迫压力会对细胞壁-细胞膜造成损伤, 壁膜屏障发生诸多生理变化防御胁迫; 紧接着, 一部分胁迫物质会进入细胞引起胞内损伤, 细胞进而启动一系列的损伤修复机制来抵御胁迫; 最终, 细胞会通过不断地重塑基因组进化至耐受胁迫环境。耐受性工程^[11]基于微生物细胞工厂抵御胁迫压力的应激反应机制, 聚焦微生物化学品生产和胁迫抗性之间的关联, 通过巩固微生物屏障增强胁迫防御能力, 加快应激反应提高损伤修复能力, 创制耐受进化工具筛选鲁棒性增强的工业微生物。基于此, 提出3种调控微生物细胞工厂胁迫抗性的策略: 胁迫防御工程、损伤修复工程和耐受进化工程。

1 胁迫防御工程

细胞壁-细胞膜作为保护微生物细胞的天然屏障, 对抵御胁迫压力具有重要作用。细胞

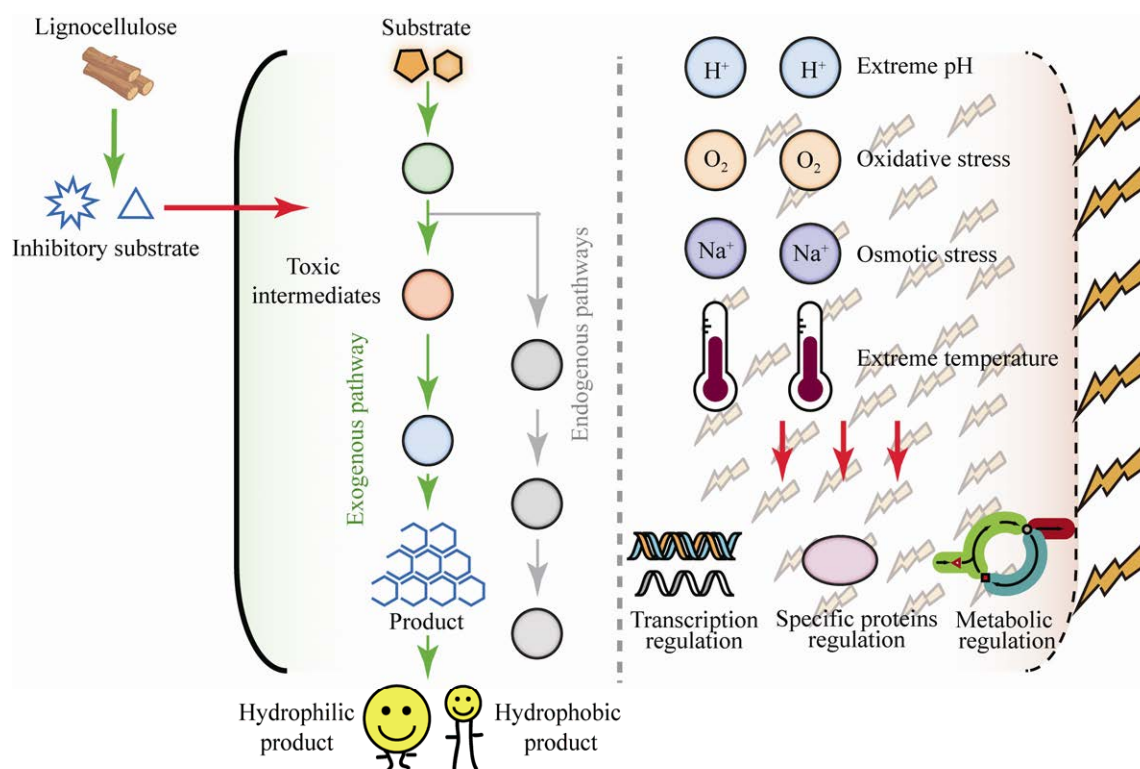


图 1 微生物细胞工厂面临的胁迫压力

Figure 1 Stress on microbial cell factory.

壁是位于细胞膜外的坚韧且略具弹性的结构，增加了细胞的机械强度，具备防御和抗逆功能。细胞膜主要是由脂质、蛋白质和糖类组成^[12]，脂质和蛋白质在细胞质膜上形成独特的功能结构域，赋予细胞膜特定的生物学功能。在胁迫环境下，工业微生物的存活能力很大程度上依赖于细胞壁膜稳态和细胞膜中脂质与蛋白质的相互作用，因细胞壁膜与溶质转运、能量代谢、信号转导、胁迫抗性、细胞生长和生物化学品生产等多种重要的生理功能有关。壁膜结构使细胞形成相对稳定的微环境，从而防御胁迫压力，保护细胞免受外界环境的侵害^[13]，同时在对化学药品毒性方面起着关键作用^[14]。因此，通过胁迫防御工程加强微生物屏障是一种有效的策略，包括重塑细胞壁的结构、调节膜脂的多样性、加速膜蛋白的转运（图 2），继而增强

微生物细胞在逆境中的鲁棒性。

1.1 工程化细胞壁

当微生物暴露在一定的胁迫压力下，必须保持微生物细胞工厂的结构完整性，这通常首先是通过改变细胞壁的组成和特性形成屏障来实现的。细胞通过调节细胞壁的厚度，激活细胞壁完整性信号通路重构细胞壁的结构抵御胞外应激。肽聚糖是原核生物细胞壁的基本组成部分，其主要功能是维持细胞形状和抵抗渗透胁迫^[12]。细胞壁的生物合成会影响微生物的胁迫抗性^[15]，敲除酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) *GLN3* 基因加强了细胞壁的合成，进而提高了菌株对异丁醇的耐受性，异丁醇产量提高了 4.9 倍^[16]。转录因子 MaSom1 对绿僵菌 (*Metarhizium acridum*) 细胞壁完整性和分生孢子表面结构有重要作用，可促进分生孢子萌发，

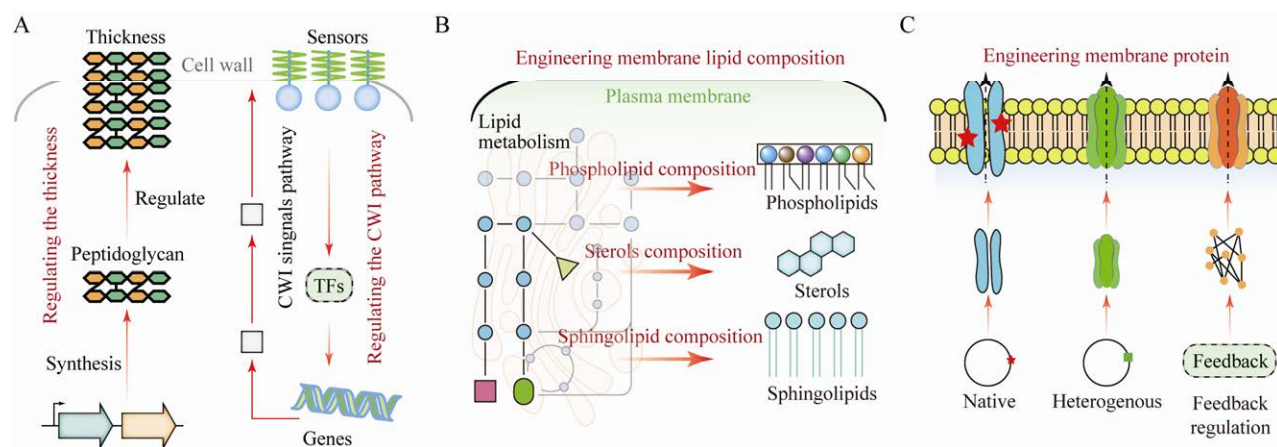


图2 调控细胞壁 (A)、膜脂质 (B) 和膜蛋白 (C) 稳态实现胁迫防御

Figure 2 Regulation of cell wall (A), membrane lipid (B) and membrane protein (C) homeostasis to achieve stress defense.

提升分生孢子产量和真菌胁迫耐受性^[17]。另外, 参与了细胞壁完整性通路调节的 *ScHAA1* 和/或 *ScPRS3* 的过表达增加了 *S. cerevisiae* 细胞壁在乙酸胁迫下的鲁棒性^[18]。

1.2 工程化细胞膜脂质

然而, 由于微生物细胞壁对物质的自由扩散和多孔结构, 工程化细胞壁保护微生物细胞免受胁迫压力的效果是有限的。因此, 细胞膜由于其选择透过性和可调节性, 成为胁迫防御工程更为关键的调控靶点^[19]。膜脂是细胞膜的基本组成成分, 由磷脂、甾醇和鞘脂组成^[20], 因此工程化细胞膜脂质策略包括: 修饰磷脂组成(磷脂头部磷酸基团、磷脂尾部脂肪酸链)^[21-24]、优化甾醇比例^[25]和调节鞘脂含量^[26-27], 如图2所示。

磷脂分子通常由一个亲水性磷酸基团(磷脂分子的头部)和两个疏水性脂肪酸链(磷脂分子的尾部)组成, 构成了细胞膜的基本骨架^[28]。因此, 修饰磷脂分子的头部和改造磷脂分子的尾部是增强细胞胁迫耐受能力的改造靶点。(1) 修饰磷脂分子头部可通过调控磷脂合成途径或改变磷脂分子的前体实现。控制磷脂生物

合成酶的表达水平可调控磷脂头部基团的分布, 如过表达大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 磷脂酰丝氨酸合成酶 *EcPssA* 增加细胞膜中磷脂酰乙醇胺的含量, 辛酸产量提高 66%, 总脂肪酸产量提高 42%^[29]。(2) 修饰磷脂尾部酰基链也是防御胁迫的有效策略, 主要包括调节脂肪酸链不饱和度^[21-22]、改变脂质酰基链长度^[30]、掺入环丙烷脂肪酸或支链脂肪酸以及增加脂肪酸链的含量。其中, 调节脂肪酸不饱和度已被广泛用于改善微生物细胞工厂对胁迫环境的耐受性, 对脂肪酸链不饱和度的改造主要通过调控去饱和酶的表达水平^[31]。在 *E. coli* MG1655 中异源表达铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 来源的顺反异构酶增加外源反式不饱和脂肪酸的比例, 辛酸产量比野生菌株提高 41%, 总脂肪酸产量提高了 35%, 同时细胞对多种胁迫(如低 pH 和高温)的耐受能力得到了增强^[32]。

通过调控甾醇的含量或者改变甾醇的种类进而优化甾醇的组成也是工程化细胞膜脂质的有效策略^[25]。在粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中表达食用菌 C-5 甾醇去饱和酶, 细胞膜甾醇含量的提升增强了 *S. pombe* 的乙醇耐受

性和菌株的耐热性^[33]。在富含离子液体的培养基中,离子会加速解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 的死亡,通过适应性实验室进化 (adaptive laboratory evolution, ALE) 结合生理特性和组学分析耐受高达 18% 离子液体工程菌株 *Y. lipolytica*, 发现其是通过增强甾醇转录因子的表达,麦角甾醇的含量增加了 2.2 倍,使得 *Y. lipolytica* 在富含离子液体的培养基中存活率增加^[25]。

鞘脂仅在少数细菌中存在,但它们是真核细胞质膜的重要结构成分,在细胞信号转导、胞内物质运输和应激反应中发挥重要作用。例如,白色念珠菌 (*Candida albicans*) 中参与鞘脂生物合成的 *CaFEN1* 和 *CaFEN12* 基因 (编码酶以合成极长链脂肪酸作为鞘脂前体) 上调,细胞鞘脂含量增加,揭示了 *C. albicans* 对唑类耐药的机制^[26]。

1.3 工程化细胞膜蛋白

防御细胞内外的应激,还取决于合适的细胞膜蛋白及其表达水平。细胞膜通透性涉及对离子、营养物质和有毒物质的选择透过性,这些物质的跨膜运输主要通过膜孔和膜蛋白的介导。脂质双分子层上的膜蛋白包括跨膜蛋白、锚定蛋白和外周蛋白^[20],其中跨膜蛋白行使着转运蛋白的功能,工程化细胞膜蛋白主要是利用转运蛋白来清理胞内的有毒物质^[34]。转运蛋白增加宿主耐受可通过重构天然膜蛋白,调节异源转运蛋白的表达和构建调控膜蛋白相关基因表达的反馈调节网络来实现 (图 2)。转运蛋白增强细胞耐受性主要策略是重构天然膜蛋白,细胞生存的必要条件是维持细胞内合适的单价阳离子浓度,质膜转运蛋白 (*ScTrk1*、*ScTrk2*、*ScTok1*、*ScNha1* 和 *ScEna1*) 在应激条件下,对一价阳离子 (Na^+ 、 K^+ 、 H^+) 的跨膜转运稳定胞内生理浓度发挥着重要作用^[35]。另外,

重构天然膜蛋白可抵御底物毒性胁迫^[36],通过蛋白质工程和突变表达多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 泵、小多药耐药 (small multidrug resistance, SMR) 泵、孔蛋白等可提高 *E. coli* 对底物糠醛 (纤维素水解液) 的耐受^[37]。对于毒性产物胁迫,工程化有毒小分子物质外排的转运蛋白可促进生物催化中小分子产物的分泌,进而提高目标物质的总产量和回收率。对于胞外亲水性产物的胁迫,过表达 *S. cerevisiae* C4-二羧酸转运蛋白 *ScMae1(p)* 使琥珀酸、苹果酸、富马酸产量分别提高了 3 倍、8 倍、5 倍,过表达 *AcDct(p)* 使苹果酸的产量提高了 12 倍^[38]。过表达转运蛋白 *EcacrE*、*EcmdtE* 和 *EcmdtC*, 敲除多药外排泵 *cmr* 可使 $\text{C}_6\text{--C}_{10}$ 中链脂肪酸 (medium-chain fatty acids, MCFAs) 产量增加两倍以上,针对 MCFAs 的高效外排泵和多转运体工程策略可用于合成并耐受对微生物有毒的生物产品^[39]。利用延时显微镜发现 *EcacrAB* 表达越高的细胞, DNA 错配修复基因 *EcmuS* 的表达越低,生长速率越低,突变频率越高, *EcacrAB* 高表达导致的瞬时抗生素耐药可促进单细胞的自发性突变,进而通过 *AcrAB-TolC* 外排泵增加对抗生素的耐受^[40]。

工程化转运蛋白还可通过调节异源转运蛋白的表达增强宿主耐受性。例如,通过在 *S. cerevisiae* 中引入人类来源的转运蛋白 *HFATP1*, 增强了 *S. cerevisiae* 细胞对疏水性产物脂肪醇的耐受能力,并使脂肪醇的产量提高了 5 倍^[41]。通过表达外源碱性金属阳离子转运蛋白 (*ScEna1*、*ScNha1*、*YNha2*), 提高了芽殖酵母 (*Saccharomyces kudriavzevii*) 对 Na^+ 的耐受和发酵性能^[42]。

另外,构建调控膜蛋白相关基因表达的反馈调节网络可增强宿主胁迫抗性,如在 *E. coli* 中利用转运蛋白 *RpCouP* 以及启动子 *ADH7* 构建自我调节系统,提高了菌株对底物香兰素的

耐受, 香兰素经细胞膜转运后转化为邻苯二酚, 使得邻苯二酚的产量增加了 40%^[43]。

由此可见, 细胞壁膜的结构、特性和生理功能影响细胞壁膜的完整性、流动性和通透性^[14], 通过工程化细胞壁、细胞膜脂质或蛋白维持壁膜稳态是一种可行且有效地提高微生物细胞工厂胁迫防御的策略。

2 损伤修复工程

当微生物细胞暴露在胁迫压力下, 壁膜屏障可在一定程度下防御胁迫保持细胞结构完整性, 但胁迫压力仍会导致胞内生理状态发生改变。为了应对压力, 微生物需要启动自身的应激机制——损伤修复系统, 此时, DNA 复制、转录谱、翻译谱和代谢物含量均发生变化, 以确保微生物在压力条件下的生存。这些损伤可通过损伤修复工程加速应激反应过程来修复, 包括调节转录因子响应应激信号, 加强应激特

异性调节蛋白的表达, 以及调节胁迫响应代谢物的含量来应对逆境压力 (图 3)。

2.1 转录因子工程

微生物细胞工厂感应外界环境信息后, 调控特定基因、蛋白质或特定代谢产物的水平以适应环境的变化, 其中转录因子对基因表达的转录调控在其胁迫响应的过程中起重要作用。转录调节途径是应激信号反应的靶点, 特定转录因子的工程化或整体转录过程的重塑或信号转导系统的级联调控可以促进转录损伤的修复, 因而转录因子工程策略可分为: 工程化特异性转录因子、工程化全局转录调控因子和工程化信号转导系统。

转录因子是一类能够调节基因表达速率的 DNA 结合蛋白, 能保证目的基因以特定的强度、在特定的时间与空间表达。特异性转录因子可调控微生物细胞工厂应对底物胁迫, 如在工业 *S. cerevisiae* 中过表达 *ScHAA1* 编码的弱酸性胁迫

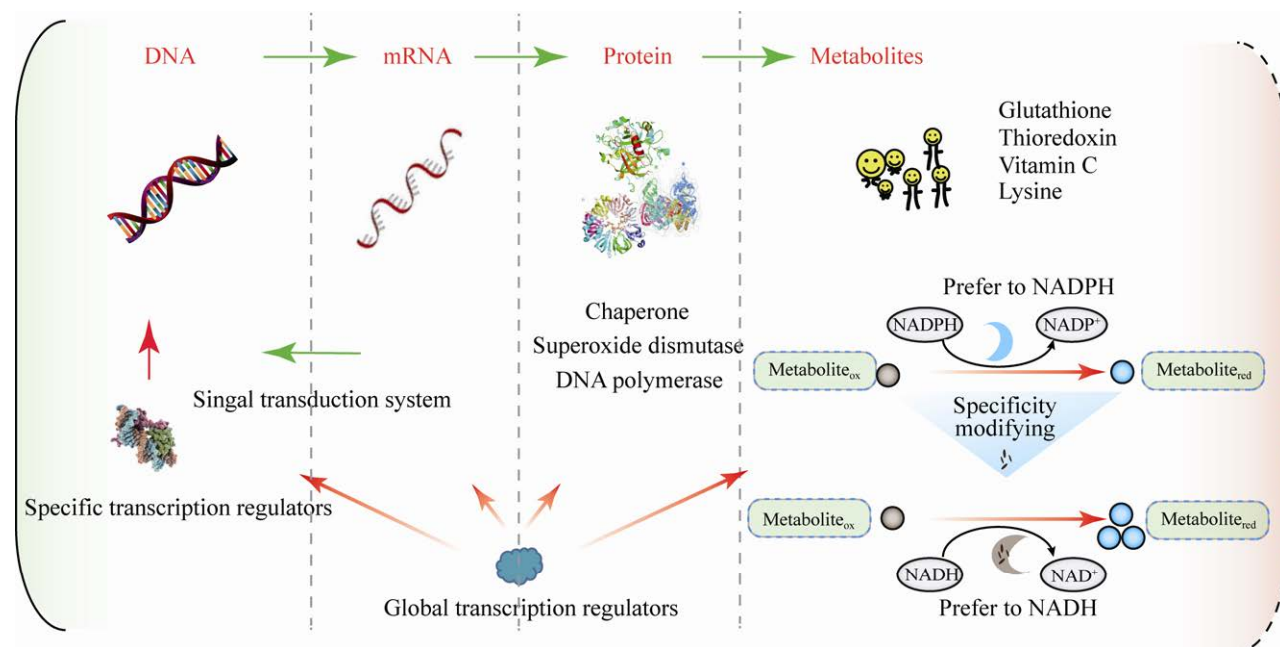


图 3 损伤修复工程调控微生物细胞工厂胁迫抗性

Figure 3 Damage repair engineering regulates stress resistance of microbial cell factory.

迫转录激活因子和 *ScPRS3* 编码的磷酸核糖焦磷酸合成酶, 可促使 *S. cerevisiae* 适应未脱毒具有高乙酸含量的硬木水解物, 增强了 *S. cerevisiae* 在乙酸胁迫下的鲁棒性^[18]。另外, 工程化特异性转录因子广泛用于调控环境胁迫, 耐高温马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 的转录因子 *KmHsf1* 和 *KmMsn2* 促进了 *K. marxianus* 在高温下的细胞生长和乙醇发酵^[8]。转录因子 *AnCrz1* 调节激活钙调磷酸酶基因表达, 可促使构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 耐受碱性 pH 条件和细胞外高浓度的钙离子^[9]。过表达转录因子 *ScYap1* 和 *ScYap8*, Fe-S 发生相关基因可作为一种细胞屏障来抵抗重金属砷酸盐毒性^[10]。

转录因子在细胞响应环境信号传递过程中通过调控单个/多个与抗逆相关基因的表达具有局限性, 单一转录因子对于微生物复杂性状和生产性能提升的空间有限。全局转录调控工程 (global transcriptional regulation engineering, gTME)^[44]是基于易错 PCR 或 DNA 重组, 改造和进化全局转录因子、转录机器等关键蛋白, 改变全局转录因子的结构和功能, 对基因表达网络和细胞代谢重编程, 从整体上调控相关基因的转录^[45]。全局转录调控因子如 σ 因子 (原核微生物改造靶点)^[34]和通用性转录因子如 Spt15 (一种 TATA 结合蛋白, 真核微生物改造靶点)^[46]已用于调控脂肪酸生物合成相关基因的表达, 改变细胞膜脂质的组成和完整性, 提高菌株的胁迫耐受性。在 *E. coli* 中表达恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) KT2440 的 σ 因子 RpoD, *E. coli* 耐受性基因的多样性增加, 增强了对生物燃料前体蒽烯的耐受性^[47]。工程化 TATA 结合蛋白 Spt15 提高了 *K. marxianus* 的乙醇耐受性和产量^[46]。因此, 工程化全局转录调控因子可以提供传统方法难以获得的细胞

表型的有效途径。

工程化信号转导系统可通过信号转导系统的激活和级联调控作用增强微生物细胞工厂的胁迫抗性, 如丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK)、雷帕霉素靶蛋白 (target of rapamycin, TOR) 等信号转导系统负责信号的感知与传递, 特定的转录因子被激活或失活, 进而影响靶基因的表达, 调控细胞的胁迫抗性。如酵母通过细胞表面蛋白 Mid2 和钙通道蛋白 Mid1 和 Cch1 感知胁迫压力, 然后分别激活 Pkc1/Mpk1 MAPK 途径和钙信号, 遗传分析显示这些途径可介导细胞存活^[48]。

2.2 特异性调节蛋白

微生物细胞工厂还可通过确保特定蛋白质的优先合成来修复损伤, 蛋白活性调控 (如修饰激活/失活降解/定位改变等) 往往能快速地响应外界环境变化, 促进应激相关特异性调节蛋白的表达。通过诱导表达分子伴侣维持蛋白质稳态, 其中热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 可帮助细胞内受损蛋白质正确折叠和损伤修复, 已被广泛用于提高微生物的鲁棒性。热激应答系统由热激转录因子 (heat shock transcription factor, HSF) 进行调控, 相关基因涉及蛋白质合成、碳源代谢及细胞结构等。HSP 除主要参与维持蛋白质天然构象外, 同时参与微生物细胞的多种生理调节以抵御胁迫。如 HSF2 是热休克转录因子家族的一员, 其表达和 DNA 结合活性在长期蛋白损伤后增加, 研究发现 HSF2 通过维持细胞与细胞的黏附来防止蛋白损伤^[49]。将嗜热菌 HSP 基因导入核黄素生产菌株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 446 中, 其抗逆性增强, 核黄素产量比野生菌株提高了 23%–66%^[50]。此外, 在一些细菌面对烃类溶剂时, 应激反应调节剂如 HSP 和冷休克蛋白会发

生上调^[51]。

特异性调节蛋白为核心的酶修复体系也在损伤修复工程中发挥着重要作用, 典型代表为超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 通过清除机体内 $\cdot\text{O}_2^-$ 来保护细胞^[52]。此外, 酶修复体系中的过氧化氢酶可以促使 H_2O_2 分解, 清除细胞内的 H_2O_2 , 还可以抗氧化、发挥分子伴侣功能和调节信号转导等。研究发现, *KIMG2* 基因的缺失会增强酵母对氧化应激的抗性并延长酵母的寿命, 这与过氧化氢酶和 SOD 基因的表达水平升高有关^[52]。胞质 Cu/Zn-SOD 和过氧化氢酶可以有效应对发酵中高渗透压、高温、高浓度产物等引起的氧化应激, 提高了 *S. cerevisiae* 乙醇产量和得率^[53]。

在许多微生物中, DNA 损伤会触发 SOS 反应, 产生调节 DNA 修复和损伤的耐受蛋白, 如 DNA 聚合酶。一系列单分子荧光显微镜研究显示, 在 *E. coli* 细胞中 DNA 聚合酶 (polymerase, pol) IV 和 DNA pol V 这两种跨损伤合成 (translesion synthesis, TLS) 聚合酶很少与复制体 (参与 DNA 复制的蛋白质复合物) 共聚^[54], 参与核苷酸切除修复、同源重组和转录, 在 *E. coli* SOS 反应的 DNA 损伤后被诱导, 使得 DNA 在修复过程中易发生错配促使基因产生突变, 进而耐受胁迫环境。此外, Y 家族 DNA 聚合酶 η (Pol η) 通过跨损伤 DNA 合成调节基因组稳定以响应不同环境压力, 新型调节因子 Lsm12 可调节 Pol η 去泛素化, 进而促进其在氧化应激下的招募^[55]。

2.3 胁迫响应代谢物

新陈代谢不仅为微生物提供能量和关键结构成分, 还提供一些关键的胁迫响应代谢物。非酶防御体系中压力缓冲代谢物 (包括谷胱甘肽、硫氧还原蛋白、维生素 C、赖氨酸和 NADH/NADPH 等) 可作为还原剂清除自由基

(超负阳离子、羟自由基、有机自由基、有机过氧基等) 的小分子, 调节这些压力缓冲代谢物的细胞内浓度可以在代谢物水平上修复损伤, 提高微生物细胞工厂的抗逆性。

谷胱甘肽是生物体内抗氧化防御系统最重要的小分子活性寡肽, 还原性谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 可清除生物体内有害自由基 (主要是氧自由基) 或脂质过氧化物, 使其转换成脂肪酸和水, GSH 被氧化成氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG), GSH 通过电子和质子的传递作用清除自由基^[56]。*S. cerevisiae* 中 GSH 含量的增加增强了细胞对木质纤维素抑制剂的耐受性, 且乙醇浓度提高了 3 倍^[57]。硫氧还原蛋白是一种含有活性半胱氨酸残基的小分子蛋白质, 具有抗氧化作用, 在自由基清除和细胞内氧化还原信号传导的调节过程中起着重要作用。螺菌属 (*Leptospirillum* sp.) 中多种硫氧还原蛋白在氧化应激耐受中作用显著, 将 *tfp* (编码硫氧还原蛋白的基因) 导入硫氧还原蛋白缺乏的 *E. coli* 中, 赋予了 *E. coli* 在氧化应激条件下的氧化保护作用^[58]。多羟基化合物维生素 C 是高效的天然抗氧化剂, 能够阻断自由基引发的氧化反应, 保证生物膜免遭氧化损伤和过氧化损伤。另外, 研究发现赖氨酸的减少会使氧化还原平衡减弱, 引起氧化应激。因而应对胁迫压力时, 酵母细胞会通过摄取赖氨酸来重新规划新陈代谢, 增强酵母细胞对压力的耐受性^[59]。

辅因子对 NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺在所有生物有机体中起着重要的电子供体或受体的作用, 调节能量代谢、细胞内氧化还原状态, 控制碳流量和调节细胞生命周期等^[60]。调节内源辅因子、再生异源辅因子、改造酶的辅因子特异性和创建合成的辅因子系统均可有助于微生物细胞工厂应对胁迫压力。如在氧化磷

酸化中, ROS 不可避免地产生并威胁细胞的生存, 生物体 (或细胞) 必须提供强大的防御系统以保持 ROS 在无害水平, 其中辅因子平衡起着关键作用。NADH 是呼吸链反应中产生能量 (分解代谢) 的来源, 通过分解代谢产生 ROS, 而 NADPH 不仅对细胞合成 (合成代谢) 起重要作用, 还能对 ROS 进行解毒从而应对氧化应激^[6]。NADPH 是赖氨酸生物合成所必需的, 酵母细胞通过戊糖磷酸途径产生足够的 NADPH, 进而获得更多的赖氨酸; 同时 NADPH 被分流到 GSH 代谢中, GSH 浓度大幅增加, 导致 ROS 水平降低, 细胞抗氧化能力增强^[61]。

由此可见, 从转录水平 (特异性转录因子)、翻译水平 (特异性蛋白质) 或代谢水平 (胁迫响应代谢物) 修复微生物细胞应对胁迫抗性时的损伤, 可改善微生物鲁棒性和生产性能。

3 耐受进化工程

耐受性工程调控微生物细胞工厂胁迫抗性可通过巩固细胞屏障增强胁迫防御能力, 加快应激反应提高损伤修复能力, 但由于微生物系统代谢和调控网络的复杂性, 难以获得鲁棒性较好的表型, 因而耐受进化工程^[62-63]在筛选鲁棒性增强的微生物细胞工厂中愈发关键。耐受进化工程是指利用微生物基因组的可塑性, 微生物种群在一定选择压力条件下不断进化, 通过精密的调控机制与复杂的抵抗策略使微生物进化以生存和适应多种胁迫压力, 获得有益突变的方法^[64], 可用于改善微生物细胞生长^[64], 提高化学品的浓度、得率和生产强度^[65], 发现未知的生物调控机制^[66]。

3.1 非理性耐受进化工程

自然进化是连续且不断筛选的, 即遗传多样性的产生、选择压力的胁迫以及适应性后代

的繁殖^[67-68]。自然进化是不经人工干预, 利用微生物的自然突变进行菌种选育的过程。如工业化发酵生产乙醇, *S. cerevisiae* 在醪液中经过连续发酵、长期进化, 对发酵液中各种胁迫因素的耐受性会得到改善, 进而可直接从中筛选出耐受性增强的 *S. cerevisiae* 菌株。

传统的工业微生物育种是通过随机诱变来改造生产菌株, 提高基因突变频率, 消除副产品形成, 富集有益表型, 再通过目的性筛选获得有利突变的选育方法。非理性耐受进化工程 (图 4) 可通过物理方法 (例如紫外线辐射和常压室温等离子体诱变处理等) 以及化学诱变剂 (例如甲磺酸乙酯、溴化乙锭或亚硝基胍) 来实现。通过亚硝基胍诱变获得了耐受 1.2 mol/L NaCl 的耐盐菌株 *S. cerevisiae* Y03, 代谢组学和转录数据表明耐盐菌株的 *cds1* 和 *cho1* 基因模块化组装重新分配了膜磷脂组分, 降低了阴离子和两性离子磷脂的比例^[24]。传统的工业微生物育种技术能在一定程度提高菌株突变率, 操作简便, 但容易导致基因型和表型的不确定变化, 有益突变出现的频率较低。

另外, 基因组改组允许通过在基因组水平上的递归重组^[69], 而这种技术基于原生质体的递归融合 (即基因组之间的重组事件) 构建突变菌株的文库, 能够同时引入多个基因变化, 直接进化整个生物体, 而不需要对基因组序列或遗传网络有任何先验知识^[68]。如利用基因组重组方法提高了梭状芽孢杆菌 (*Clostridium ragsdalei*) DSM15248 对乙醇和乙酸的耐受, 在提高乙醇和乙酸耐受性的基础上筛选出了新的融合体进行发酵, 乙醇产量比野生菌株增加了近 7 倍^[70]。可见, 基因组改组通过广泛的同源重组扩大了特定突变群体的遗传多样性, 对于快速改善非特异性宿主的复杂表型尤其有用。

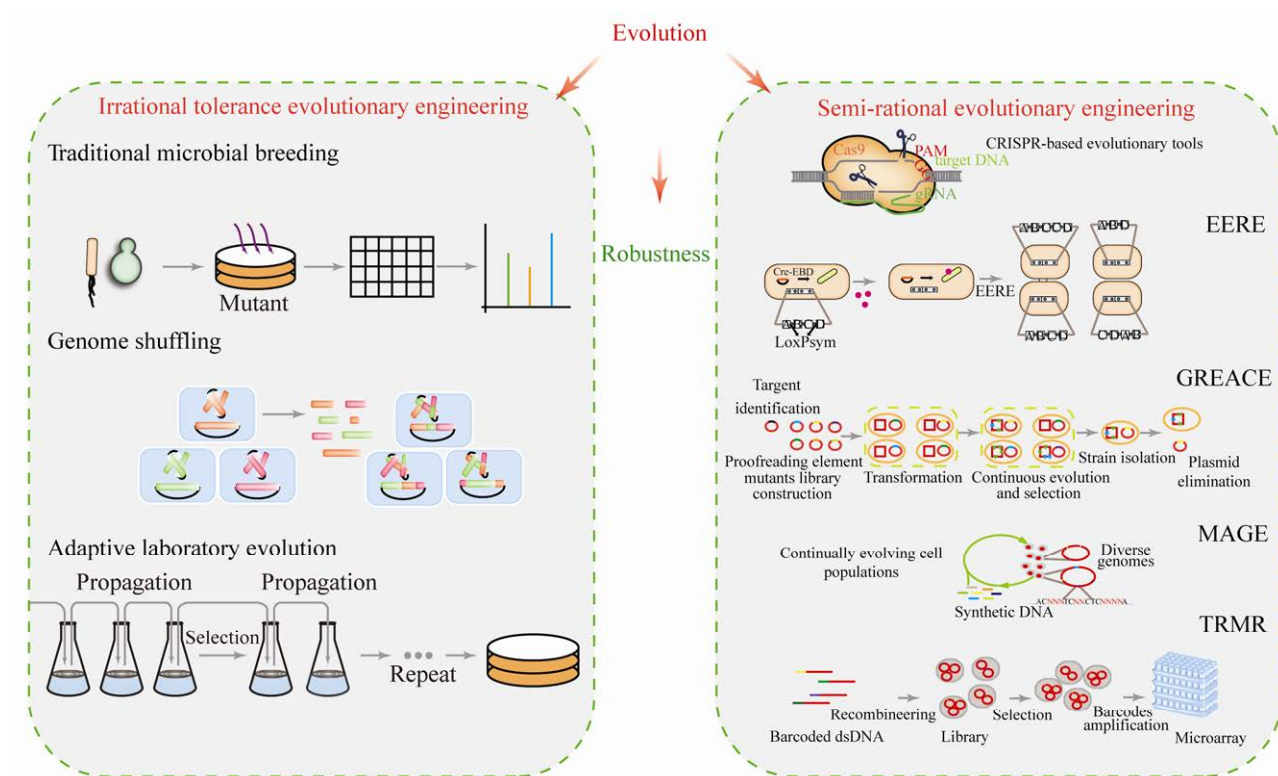


图4 非理性和半理性耐受进化工程调控微生物细胞工厂胁迫抗性

Figure 4 Irrational and semi-rational evolutionary engineering regulates stress resistance of microbial cell factory.

非理性耐受进化工程最常见的策略为 ALE^[71], 通过在胁迫压力下, 微生物基因水平上的随机突变的积累, 长期增殖、适应、传代以适应胁迫环境, 以特定或逐渐增加的胁迫来筛选鲁棒性较好的突变体, 获得在特殊环境中正常生长的能力, 并深入了解进化机制和适应变化^[72]。如采用 ALE 筛选到一株耐受高醋酸和高产 ATP 的 *E. coli* 作为细胞工厂的起始宿主, 进而利用醋酸生产乙酰 CoA 衍生产品或生产需要高 ATP 水平的产品^[73]。利用 ALE 技术进化得到一株 *E. coli*, 在高浓度的异戊二醇条件下 *E. coli* 生长提高了 47%^[74]。ALE 筛选得到的酵母菌株发酵生产丙酸, 其浓度从 15 mmol/L 增加到 45 mmol/L, 酵母菌株对丙酸的耐受性提高了 3 倍以上。通过全基因组测序和规律间隔成簇

短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)-Cas9 介导的反向工程, 发现编码高亲和力钾转运蛋白的 *TRK1* 突变是丙酸耐受性增强的原因; 而且钾反添加试验表明, *TRK1* 等位基因的突变和细胞外钾的补充不仅使酵母能够耐受丙酸胁迫, 还增强了对其他多种有机酸的耐受^[75]。与传统诱变技术相比, ALE 目的性更强, 可在一定程度上控制突变的方向和性质, 操作相对简便, 但 ALE 需要长时间的培养来积累连续的突变, 还可能会造成有益突变体的缺失。

由此可见, 非理性耐受进化工程 (传统的工业微生物育种、基因组改组、ALE) 筛选鲁棒性增强的微生物在一定程度上有效^[76], 但尚存在改造周期长、非定向、遗传机制不清晰和

不能突破代谢网络刚性的缺陷。

3.2 半理性耐受进化工程

工业微生物高产和胁迫抗性受复杂遗传调控网络控制, 鉴于非理性耐受进化工程的局限性, 半理性耐受进化工程利用系统生物学和合成生物学的方法, 以序列模块化和元件化进行组装, 同时结合自动化和高通量分析手段, 对工业微生物开展从全基因组尺度进行系统的、全局的、多位点的扰动, 多次迭代, 以达到快速积累多样性基因型突变并获得期望的表型^[77]。

经典诱变主要依赖于随机 (可能是有害的) 的突变, 而合成进化的新方法是在一个世系中缓慢的点突变积累和有性繁殖的重组^[78], 借助合成生物学技术如 CRISPR 技术迭代的多样化和选择一个或多个具有期望功能或表型的目标基因位点, 在特定基因位点加速进化, 最终允许在自然界中出现从未见过的表型的“超定向”进化, 避免经典方法的适应度负担。根据原理的不同, 基于 CRISPR 的进化工具^[79]、基于重组酶的进化工程 (evolutionary engineering based on recombinant enzymes, EERE)^[80]、多位点自动基因组工程 (multiplex automated genome engineering, MAGE)^[81]、可跟踪多轮重组工程 (trackable multiplex recombineering, TRMR)^[82]和基因组复制工程辅助的连续进化 (genome replication engineering assisted continuous evolution, GREACE)^[83]为代表的半理性耐受进化工程技术日益成熟 (图 4)。

CRISPR/Cas 系统介导的基因组编辑和 DNA 组装方法使靶向基因修饰能够快速、精确地导入微生物细胞工厂^[7,84]。Cas9 和 Cas12a 蛋白已经发展成为探索细菌遗传机制、优化工业微生物代谢途径以及其他基因修饰的有力工具^[85]。如基于 CRISPR 工具和适应性进化, 提高了

S. cerevisiae CEN PK2-1 对卡帕藻水解物的发酵性能及对半乳糖的消耗率^[86]。EERE 是基于合成染色体和 Cre-loxP 位点特异性重组机制, 其中基因组重排系统 (synthetic chromosome rearrangement and modification by LoxP-mediated evolution, SCRaMbLE) 可以产生全基因组尺度范围内大片段的 DNA 缺失、重复、易位、倒位和复杂的基因组重排事件, 实现基因组的快速进化。携带一条 (synV) 或两条合成染色体 (synV 和 synX) 的单倍体酵母菌株使用 SCRaMbLE 技术进行基因组重排, 通过多次 SCRaMbLE 实验, 筛选出了 7 株在 pH 8.0 条件下耐碱能力增强的 *S. cerevisiae* 进化菌株^[87]。

MAGE 针对基因组中多条相关代谢途径进行快速改造, 是一种利用短寡核苷酸无选择地修改基因组, 针对单个细胞或整个细胞群体中染色体的多个位置进行修饰, 从而产生组合基因组多样性^[88]。TRMR 可以构建全基因组文库, 在每个基因上游插入合成 DNA 盒和分子条形码, 对染色体整合突变。GREACE 是将保真性下降的 DNA 聚合酶元件引入到 *E. coli* 中, 诱发细胞进入高突变状态, 从而在复制过程中不断产生基因组突变, 在环境压力下积累有益突变的子代细胞被筛选出来。不断提高环境压力就可以使 *E. coli* 不断地适应新的压力, 达到连续进化的目的。智能微生物工程构建自动进化系统, 突变率可以使用反馈调节回路与期望的表型相耦合^[89]。如 GREACE 可以提高工程菌株对 3-羟基丁酮的耐受性, 从而提高 3-羟基丁酮的产量。研究人员基于 DNA 聚合酶元件开发了一种基于分层动态调控“高保真模块”与“高突变模块”的自主进化突变系统, 并结合适应性进化方法获得了高产 3-羟基丁酮的耐受型突变株 HS019, 3-羟基丁酮的产量提高到 82.5 g/L^[65]。GREACE 通过在温度敏感质粒上使用阿拉伯糖

诱导启动子表达 DNA 聚合酶复合物 (DnaQ) 突变体 KR5-2 来进行修饰, 通过在赖氨酸发酵液中富集突变体提高赖氨酸高产菌 *E. coli* MU-1 的耐受性^[90]。

半理性耐受进化工程可以在单一宿主细胞的基因组水平实现多个不同性状的同时改造, 大幅度缩短了进化时间。基于 CRISPR 的进化工具介导的全基因组编辑以构建高通量多样性文库, 可实现微生物在实验室条件下的快速进化。EERE 可提高底盘细胞与外源代谢路径间的适配性, 实现代谢通路的优化, 提高微生物细胞工厂对环境胁迫的耐受能力。MAGE 的应

用需要代谢途径的特定基因的知识, 如果目标基因是未知的, TRMR 可能是一种更好的选择, 其可创建数千个特定基因修饰和构建的基因组突变文库, 可用于定量分析全基因组尺度生长表型, 准确绘制环境耐受幅度, 大幅提高目标产品产量。GREACE 可用于改善工业菌株对高浓度底物的复杂表型和对产物浓度的耐受性。

综上所述, 细胞通过非理性或半理性进化工程策略促使微生物细胞工厂不断地重塑基因组进化至耐受胁迫环境。从全基因组尺度对微生物细胞工厂进行的全局多位点扰动, 有望加速获得优良性状的细胞表型 (表 1)。

表 1 耐受性工程对微生物细胞工厂生产能力的影响

Table 1 Effects of tolerance engineering on the productivity of microbial cell factories

Strategies of tolerance engineering	Microbial cell factories	Target products	Enhanced phenotype	References
Engineered cell walls	<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	Improved the ethanol concentration (8.15±0.08) g/L from (7.06±0.08) g/L ethanol of the control strain	[18]
	<i>S. cerevisiae</i>	Isobutanol	Boosted isobutanol production 4.9-fold in engineered strains	[16]
	<i>E. coli</i>	Octanoic acid, total fatty acids	Produced (155±5) mg/L octanoic acid and (216±8) mg/L total fatty acids, which is 66% and 42% more than the control	[29]
	<i>Synechocystis</i> sp.	Octadecanol	Increased octadecanol productivity threefold over the base strain	[23]
Engineered cell membrane lipids	<i>E. coli</i>	Octanoic acid, total fatty acids	The final octanoic acid titer of the engineered strain was 41% higher (43.70 mg/L) than the control and total fatty acids were 35% higher (82.10 mg/L) than the control	[32]
	<i>S. kudriavzevii</i>	Ethanol, glycerol	The highest ethanol content was (8.98±0.04) g/L and glycerol titer was (10.42±0.13) g/L	[42]
	<i>S. cerevisiae</i>	Fatty alcohols	The yield of extracellular fatty alcohols from strains containing FATP1 increased by 5 times	[41]
	<i>E. coli</i>	Catechol	Improved the catechol yield about 40%	[43]
	<i>S. cerevisiae</i>	Succinic, malic, and fumaric acids, malate	The highest activity toward succinic, malic, and fumaric acids resulted in 3-, 8-, and 5-fold titer increases, increased the malate titer 12-fold	[38]
	<i>E. coli</i>	Medium-chain fatty acids	Increased medium-chain fatty acids production by more than two-fold	[39]
Transcription factor engineering	<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	Improved final ethanol concentration of (27.60±1.20) g/L from (18.90±0.30) g/L ethanol of the control strain	[8]
	<i>K. marxianus</i>	Ethanol	Produced (57.29±1.96) g/L ethanol, which was 22.05% higher than that produced by control strain	[46]

(待续)

(续表 1)

Strategies of tolerance engineering	Microbial cell factories	Target products	Enhanced phenotype	References
Specific regulatory protein	<i>B. subtilis</i>	Riboflavin	23%–66% improved riboflavin titers, as well as 24 h shortened fermentation period	[50]
	<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	The ethanol titer was increased to 73.60 g /L, with ethanol yields of 0.50 g ethanol/g glucose consumed	[53]
Metabolites in response to stress	<i>Y. lipolytica</i>	Lipid	Achieved industrially-relevant level of lipid titer (72.70 g/L), oil content (81.40%) and productivity (0.97 g/(L·h))	[56]
	<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	Resulted in ethanol titer up to 45 g/L	[60]
	<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	A threefold increase in final ethanol titer (8.50 g/L)	[57]
Irrational evolutionary engineering	<i>C. beijerinckii</i>	Butanol	Produced 3.94 g/L butanol more than 5-fold of the level achieved by wild consortia	[62]
	<i>Y. lipolytica</i>	Limonene	The limonene titers of the evolved strains increased 41%–52% higher than those of the starting strain	[63]
	<i>C. ragsdalei</i>	Bioethanol	A seven-fold increase in ethanol concentration for shuffled strain	[70]
Semi-rational evolutionary engineering	<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	Ethanol concentration was 1.36–2.25 times higher than wild type, producing ethanol concentration of 20 g/L with a yield of 0.44 g/g	[86]
	<i>B. subtilis</i>	Acetoin	Resulted in acetoin titer up to 82.50 g/L from 40 g/L	[65]
	<i>E. coli</i>	Lysine	The final titer, yield and total amount of lysine reached (155.00±1.40) g/L, (0.59±0.02) g lysine/g glucose, and (605.60±23.50) g, with improvements of 14.8%, 9.3% and 16.7%, respectively	[90]

4 总结与展望

在微生物细胞工厂合成目标化学品的生产过程中，微生物细胞应对多重胁迫响应的策略涉及胁迫防御、损伤修复和耐受进化等不同层面的重塑和调控。然而耐受性工程调控微生物细胞工厂胁迫抗性的研究中，其耐受性的改善与生产性能之间的关联机制仍有待解析和阐明。随着具有优势表型的微生物不断被鉴定，耐受性工程迫切需要寻找抑制微生物胁迫抗性和生产性能的限制因素，进而增强细胞工厂的鲁棒性，使其适应生产过程中的胁迫压力，以期提高微生物的发酵性能。因而需要进一步开发能够改进微生物细胞工厂鲁棒性和生产性能的自动化、智能化的合成生物学工具；鉴定响应或参与胁迫压力的功能元件进而精准提高微

生物细胞对胁迫压力的抵御能力；探索高效的高通量和自动化技术提高菌株选育效率；运用全基因组规模网络模型预测、组学数据、反向代谢工程等揭示进化菌株的耐受和生产表型之间的关联。在此基础上，加速微生物细胞工厂进入工业化应用流程，以获得更多多重耐性重组菌株，并精准协调微生物胁迫抗性与生产性能，实现菌株能够在胁迫环境下生长，同时达到目标化学品产量、得率和生产强度的理论最大值。

REFERENCES

[1] Chen X, Gao C, Guo L, et al. DCEO biotechnology: tools to design, construct, evaluate, and optimize the metabolic pathway for biosynthesis of chemicals. Chem Rev, 2018, 118(1): 4-72.

[2] Gong Z, Nielsen J, Zhou YJ. Engineering robustness of

- microbial cell factories. *Biotechnol J*, 2017, 12(10): 1-9.
- [3] Becker J, Rohles CM, Wittmann C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metab Eng*, 2018, 50: 122-141.
 - [4] De Paula RG, Antoniêto ACC, Ribeiro LFC, et al. Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(6): 107347.
 - [5] Lam FH, Turanlı-Yıldız B, Liu D, et al. Engineered yeast tolerance enables efficient production from toxified lignocellulosic feedstocks. *Sci Adv*, 2021, 7(26): eabf7613.
 - [6] Shimizu K, Matsuoka Y. Redox rebalance against genetic perturbations and modulation of central carbon metabolism by the oxidative stress regulation. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(8): 107441.
 - [7] Gao XP, Xu K, Ahmad N, et al. Recent advances in engineering of microbial cell factories for intelligent pH regulation and tolerance. *Biotechnol J*, 2021, 16(9): 2100151.
 - [8] Li P, Fu X, Zhang L, et al. The transcription factors Hsf1 and Msn2 of thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* promote cell growth and ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* at high temperatures. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 289.
 - [9] Manoli MT, Espeso EA. Modulation of calcineurin activity in *Aspergillus nidulans*: the roles of high magnesium concentrations and of transcriptional factor CrzA. *Mol Microbiol*, 2019, 111(5): 1283-1301.
 - [10] Da Silva SM, Batista-Nascimento L, Gaspar-Cordeiro A, et al. Transcriptional regulation of FeS biogenesis genes: a possible shield against arsenate toxicity activated by Yap1. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(10): 2152-2161.
 - [11] Jiang T, Li C, Teng Y, et al. Recent advances in improving metabolic robustness of microbial cell factories. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 66: 69-77.
 - [12] Li Z, Jiang B, Zhang X, et al. The role of bacterial cell envelope structures in acid stress resistance in *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(7): 2911-2921.
 - [13] Rojas ER, Billings G, Odermatt PD, et al. The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria. *Nature*, 2018, 559(7715): 617-621.
 - [14] Qi Y, Liu H, Chen X, et al. Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains. *Metab Eng*, 2019, 53: 24-34.
 - [15] Inokuma K, Kurono H, Den Haan R, et al. Novel strategy for anchorage position control of GPI-attached proteins in the yeast cell wall using different GPI-anchoring domains. *Metab Eng*, 2020, 57: 110-117.
 - [16] Kuroda K, Hammer SK, Watanabe Y, et al. Critical roles of the pentose phosphate pathway and GLN₃ in isobutanol-specific tolerance in yeast. *Cell Syst*, 2019, 9(6): 534-547.e5.
 - [17] Du Y, Jin K, Xia Y. Involvement of MaSom1, a downstream transcriptional factor of cAMP/PKA pathway, in conidial yield, stress tolerances, and virulence in *Metarhizium acridum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(13): 5611-5623.
 - [18] Cunha JT, Costa CE, Ferraz L, et al. HAA1 and PRS3 overexpression boosts yeast tolerance towards acetic acid improving xylose or glucose consumption: unravelling the underlying mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(10): 4589-4600.
 - [19] Luo J, Song Z, Ning J, et al. The ethanol-induced global alteration in *Arthrobacter simplex* and its mutants with enhanced ethanol tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(21): 9331-9350.
 - [20] Sezgin E, Levental I, Mayor S, et al. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(6): 361-374.
 - [21] Qi Y, Liu H, Yu J, et al. Med15B regulates acid stress response and tolerance in *Candida glabrata* by altering membrane lipid composition. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(18): e01128-e01117.
 - [22] Yang Y, Xia Y, Hu W, et al. Membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* from Huangjiu (Chinese rice wine) is variably regulated by OLE1 to offset the disruptive effect of ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(23): e01620-e01619.
 - [23] Kaczmarzyk D, Cengic I, Yao L, et al. Diversion of the long-chain acyl-ACP pool in *Synechocystis* to fatty alcohols through CRISPRi repression of the essential phosphate acyltransferase PlsX. *Metab Eng*, 2018, 45: 59-66.
 - [24] Yin N, Zhu G, Luo Q, et al. Engineering of membrane phospholipid component enhances salt stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(3): 710-720.
 - [25] Walker C, Ryu S, Trinh CT. Exceptional solvent tolerance in *Yarrowia lipolytica* is enhanced by sterols. *Metab Eng*, 2019, 54: 83-95.

- [26] Gao J, Wang H, Li Z, et al. *Candida albicans* gains azole resistance by altering sphingolipid composition. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4495.
- [27] Zhu G, Yin N, Luo Q, et al. Enhancement of sphingolipid synthesis improves osmotic tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(8): e02911-e02919.
- [28] Leonard AN, Wang E, Monje-Galvan V, et al. Developing and testing of lipid force fields with applications to modeling cellular membranes. *Chem Rev*, 2019, 119(9): 6227-6269.
- [29] Tan Z, Khakbaz P, Chen Y, et al. Engineering *Escherichia coli* membrane phospholipid head distribution improves tolerance and production of biorenewables. *Metab Eng*, 2017, 44: 1-12.
- [30] Besada-Lombana PB, Fernandez-Moya R, Fenster J, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid composition for increased tolerance to octanoic acid. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(7): 1531-1538.
- [31] Santomartino R, Riego-Ruiz L, Bianchi MM. Three, two, one yeast fatty acid desaturases: regulation and function. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33(5): 89.
- [32] Tan Z, Yoon JM, Nielsen DR, et al. Membrane engineering via trans unsaturated fatty acids production improves *Escherichia coli* robustness and production of biorenewables. *Metab Eng*, 2016, 35: 105-113.
- [33] Kamthan A, Kamthan M, Datta A. Expression of C-5 sterol desaturase from an edible mushroom in fission yeast enhances its ethanol and thermotolerance. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173381.
- [34] Mitchell AM, Silhavy TJ. Envelope stress responses: balancing damage repair and toxicity. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(7): 417-428.
- [35] Ariño J, Ramos J, Sychrova H. Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast*, 2019, 36(4): 177-193.
- [36] Kang MK, Tullman-Ercek D. Engineering expression and function of membrane proteins. *Methods*, 2018, 147: 66-72.
- [37] Kurgan G, Panyon LA, Rodriguez-Sanchez Y, et al. Bioprospecting of native efflux pumps to enhance furfural tolerance in ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(6): e02985-e02918.
- [38] Darbani B, Stovicek V, Van Der Hoek SA, et al. Engineering energetically efficient transport of dicarboxylic acids in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, 2019, 116(39): 19415-19420.
- [39] Wu J, Wang Z, Zhang X, et al. Improving medium chain fatty acid production in *Escherichia coli* by multiple transporter engineering. *Food Chem*, 2019, 272: 628-634.
- [40] El Meouche I, Dunlop MJ. Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. *Science*, 2018, 362(6415): 686-690.
- [41] Hu Y, Zhu Z, Nielsen J, et al. Heterologous transporter expression for improved fatty alcohol secretion in yeast. *Metab Eng*, 2018, 45: 51-58.
- [42] Dibalova-Culakova H, Alonso-Del-Real J, Querol A, et al. Expression of heterologous transporters in *Saccharomyces kudriavzevii*: a strategy for improving yeast salt tolerance and fermentation performance. *Int J Food Microbiol*, 2018, 268: 27-34.
- [43] Wu W, Liu F, Singh S. Toward engineering *E. coli* with an autoregulatory system for lignin valorization. *PNAS*, 2018, 115(12): 2970-2975.
- [44] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, 314(5805): 1565-1568.
- [45] Deparis Q, Claes A, Foulquié-Moreno MR, et al. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17(4): fox036.
- [46] Li P, Fu X, Li S, et al. Engineering TATA-binding protein Spt15 to improve ethanol tolerance and production in *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 207.
- [47] Tomko TA, Dunlop MJ. Expression of heterologous sigma factor expands the searchable space for biofuel tolerance mechanisms. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(7): 1343-1350.
- [48] Mishra R, Van Drogen F, Dechant R, et al. Protein kinase C and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *PNAS*, 2017, 114(51): 13471-13476.
- [49] Joutsen J, Da Silva AJ, Luoto JC, et al. Heat shock factor 2 protects against proteotoxicity by maintaining cell-cell adhesion. *Cell Rep*, 2020, 30(2): 583-597.e6.
- [50] Wang J, Wang W, Wang H, et al. Improvement of stress tolerance and riboflavin production of *Bacillus subtilis* by introduction of heat shock proteins from thermophilic *Bacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(11): 4455-4465.
- [51] Kusumawardhani H, Hosseini R, De Winde JH. Solvent tolerance in bacteria: fulfilling the promise of

- the biotech era? Trends Biotechnol, 2018, 36(10): 1025-1039.
- [52] Santomartino R, Camponeschi I, Polo G, et al. The hypoxic transcription factor Klmga2 mediates the response to oxidative stress and influences longevity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. FEMS Yeast Res, 2019, 19(3): foz020.
- [53] Burphan T, Tatip S, Limcharoensuk T, et al. Enhancement of ethanol production in very high gravity fermentation by reducing fermentation-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Sci Rep, 2018, 8(1): 13069.
- [54] Henrikus SS, Van Oijen AM, Robinson A. Specialised DNA polymerases in *Escherichia coli*: roles within multiple pathways. Curr Genet, 2018, 64(6): 1189-1196.
- [55] Yao R, Shi LJ, Wu CJ, et al. Lsm12 mediates deubiquitination of DNA polymerase η to help *Saccharomyces cerevisiae* resist oxidative stress. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(1): e01988-e01918.
- [56] Xu P, Qiao KJ, Stephanopoulos G. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol Bioeng, 2017, 114(7): 1521-1530.
- [57] Raghavendran V, Marx C, Olsson L, et al. The protective role of intracellular glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* during lignocellulosic ethanol production. AMB Express, 2020, 10(1): 219.
- [58] González D, Álamos P, Rivero M, et al. Deciphering the role of multiple thioredoxin fold proteins of *Leptospirillum* sp. in oxidative stress tolerance. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1880.
- [59] Nielsen J. A stress-coping strategy for yeast cells. Nature, 2019, 572(7768): 184-185.
- [60] Liu CG, Li K, Li KY, et al. Intracellular redox perturbation in *Saccharomyces cerevisiae* improved furfural tolerance and enhanced cellulosic bioethanol production. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 615.
- [61] Olin-Sandoval V, Yu JSL, Miller-Fleming L, et al. Lysine harvesting is an antioxidant strategy and triggers underground polyamine metabolism. Nature, 2019, 572(7768): 249-253.
- [62] Wen Z, Ledesma-Amaro R, Lu M, et al. Combined evolutionary engineering and genetic manipulation improve low pH tolerance and butanol production in a synthetic microbial *Clostridium* community. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(7): 2008-2022.
- [63] Li J, Zhu K, Miao L, et al. Simultaneous improvement of limonene production and tolerance in *Yarrowia lipolytica* through tolerance engineering and evolutionary engineering. ACS Synth Biol, 2021, 10(4): 884-896.
- [64] Kim S, Lindner SN, Aslan S, et al. Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway. Nat Chem Biol, 2020, 16(5): 538-545.
- [65] Wang S, Hou Y, Chen X, et al. Kick-starting evolution efficiency with an autonomous evolution mutation system. Metab Eng, 2019, 54: 127-136.
- [66] Choe D, Lee JH, Yoo M, et al. Adaptive laboratory evolution of a genome-reduced *Escherichia coli*. Nat Commun, 2019, 10(1): 935.
- [67] d'Oelsnitz S, Ellington A. Continuous directed evolution for strain and protein engineering. Curr Opin Biotechnol, 2018, 53: 158-163.
- [68] Fernández-Cabezón L, Cros A, Nikel PI. Evolutionary approaches for engineering industrially relevant phenotypes in bacterial cell factories. Biotechnol J, 2019, 14(9): e1800439.
- [69] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. Nat Biotechnol, 2002, 20(7): 707-712.
- [70] Patankar S, Dudhane A, Paradh AD, et al. Improved bioethanol production using genome-shuffled *Clostridium ragsdalei* (DSM 15248) strains through syngas fermentation. Biofuels, 2021, 12(1): 81-89.
- [71] Portnoy VA, Bezdan D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. Curr Opin Biotechnol, 2011, 22(4): 590-594.
- [72] Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. Metab Eng, 2019, 56: 1-16.
- [73] Seong W, Han GH, Lim HS, et al. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* lacking cellular byproduct formation for enhanced acetate utilization through compensatory ATP consumption. Metab Eng, 2020, 62: 249-259.
- [74] Babel H, Krömer JO. Evolutionary engineering of *E. coli* MG1655 for tolerance against isoprenol. Biotechnol Biofuels, 2020, 13(1): 183.
- [75] Xu X, Williams TC, Divne C, et al. Evolutionary engineering in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a *TRK1*-dependent potassium influx mechanism for propionic acid tolerance. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 97.

- [76] Zhu Z, Zhang J, Ji X, et al. Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(11): 4615-4627.
- [77] Thorwall S, Schwartz C, Chartron JW, et al. Stress-tolerant non-conventional microbes enable next-generation chemical biosynthesis. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(2): 113-121.
- [78] Simon AJ, d'Oelsnitz S, Ellington AD. Synthetic evolution. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7): 730-743.
- [79] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [80] Dymond J, Boeke J. The *Saccharomyces cerevisiae* SCRaMbLE system and genome minimization. *Bioeng Bugs*, 2012, 3(3): 168-171.
- [81] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460(7257): 894-898.
- [82] Warner JR, Reeder PJ, Karimpour-Fard A, et al. Rapid profiling of a microbial genome using mixtures of barcoded oligonucleotides. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 856-862.
- [83] Luan G, Cai Z, Li Y, et al. Genome replication engineering assisted continuous evolution (GREACE) to improve microbial tolerance for biofuels production. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 137.
- [84] Liu Z, Dong H, Cui Y, et al. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 172.
- [85] Jung SW, Yeom J, Park JS, et al. Recent advances in tuning the expression and regulation of genes for constructing microbial cell factories. *Biotechnol Adv*, 2021, 50: 107767.
- [86] Sunwoo IY, Sukwong P, Jeong DY, et al. Enhancement of galactose consumption rate in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK₂-1 by CRISPR Cas9 and adaptive evolution for fermentation of *Kappaphycus alvarezii* hydrolysate. *J Biotechnol*, 2019, 297: 78-84.
- [87] Ma L, Li Y, Chen X, et al. SCRaMbLE generates evolved yeasts with increased alkali tolerance. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 52.
- [88] Ren J, Lee J, Na D. Recent advances in genetic engineering tools based on synthetic biology. *J Microbiol*, 2020, 58(1): 1-10.
- [89] Gao C, Xu P, Ye C, et al. Genetic circuit-assisted smart microbial engineering. *Trends Microbiol*, 2019, 27(12): 1011-1024.
- [90] Wang X, Li Q, Sun C, et al. GREACE-assisted adaptive laboratory evolution in endpoint fermentation broth enhances lysine production by *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 106.

(本文责编 郝丽芳)