

微生物模块化共培养工程的应用及控制策略

庞庆霄, 韩昊, 祁庆生, 王倩

山东大学 微生物技术国家重点实验室 国家糖工程技术研究中心, 山东 青岛 266237

庞庆霄, 韩昊, 祁庆生, 王倩. 微生物模块化共培养工程的应用及控制策略. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1421-1431.

PANG QX, HAN H, QI QS, WANG Q. Application and population control strategy of microbial modular co-culture engineering. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1421-1431.

摘要: 传统的微生物合成方法通常依赖于单一工程菌株, 通过代谢工程改造合成目标产物。由于关键的辅因子、前体和能量被引入到复杂的化合物合成途径中, 加重了工程菌株的代谢负担, 因而常常会影响目标产物产量。而模块化共培养工程已经成为一种有效进行异源生物合成并有望大大提高产物产量的新方法。在模块化共培养工程中, 不同模块菌群之间的相互协调对于生产至关重要。文中重点介绍了模块化共培养工程的应用及种群控制策略。

关键词: 模块化共培养; 种群控制; 代谢工程; 合成生物学

Application and population control strategy of microbial modular co-culture engineering

PANG Qingxiao, HAN Hao, QI Qingsheng, WANG Qian

National Glycoengineering Research Center, State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

Abstract: Traditional methods of microbial synthesis usually rely on a single engineered strain to synthesize the target product through metabolic engineering. The key cofactors, precursors and energy are produced by the introduced complex synthetic pathways. This would increase the physiological burden of engineering strains, resulting in a decrease in the yield of target products. The modular co-culture engineering has become an attractive solution for effective heterologous biosynthesis, where product yield can be greatly improved. In the modular co-culture engineering, the coordination between the population

Received: July 23, 2021; **Accepted:** December 14, 2021; **Published online:** December 27, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904900)

Corresponding author: WANG Qian. Tel/Fax: +86-532-58631580; E-mail: qiqi20011983@gmail.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0904900)

of different modules is essential for increasing the production efficiency. This article summarized recent advances in the application of modular co-culture engineering and population control strategies.

Keywords: modular co-culture engineering; population control; metabolic production; synthetic biology

代谢工程发展了 30 年, 人们已经利用微生物代谢工程生产了大量的化学品, 包括药物、生物燃料、有机酸和聚合物前体等^[1-6]。从复杂的天然产物到生物燃料, 这些代谢产物已经应用于人类生活的许多重要方面。代谢工程通过增加目标产物代谢流、消除代谢瓶颈, 通过结合工艺优化菌株改造来降低产品开发和工业商业化过程中的能源负担和相关成本, 从而最终提高生产水平^[7]。近年来, 各种代谢工程策略逐渐被开发出来, 并与其他领域, 如系统生物学和合成生物学相结合, 以发现新的生物合成基因簇和创造工业生产菌株^[8-9]。合成生物学和代谢工程的发展使得我们可以使用更复杂和多样化的方式进行系统级代谢工程, 从而开发出更有效的微生物细胞工厂^[10], 大大提高了我们利用微生物生产高生物活性和高价值化学品的能力^[11-12]。

尽管过去的研究表明代谢工程在微生物的单一培养中取得了巨大的成功, 但是这种方法在完成复杂的生物合成任务和实现更高的产物合成效率等方面依然面临着更为严峻的挑战。当高效产物合成途径被引入生产菌株时, 往往会菌株产生不同程度的代谢负担^[11-12]。含碳底物和能量分子 (如 NADH 和 ATP) 被过度地消耗导致细胞生物物质合成受到限制^[11-12]。中间有毒产物的过度积累往往严重影响细胞的正常生理活动。生产途径酶的过表达导致蛋白质合成系统过度被占用, 以及合成速率过快导致蛋白质折叠不及时, 都会对细胞产生负担^[11-12]。因此当产物的生产途径较为复杂时, 单一工程菌株通过纯培养发酵的生产效率受到了极大限制^[13-14]。

一种基于共培养的代谢工程方法——模块化共培养工程可以弥补单一培养发酵的不足, 有效提高目标产物的生物合成效率^[15]。模块化是指代谢工程中的途径酶被分组为一系列相互作用的模块, 以提高途径通量和重建代谢平衡^[16]。将模块化的途径分别构建至两个或多个宿主的工程手段被称为模块化共培养工程^[16-17]。对于复杂生物合成途径的工程化, 模块化共培养工程是一种可行的选择。代谢工程和合成生物学的不断发展促进了模块化途径设计, 取得了理想的效果, 但是由于代谢负担等原因在同一个菌株无法很好实现复杂途径的优化^[14]。模块化共培养工程为解决这一问题提供了极好的平台。模块化共培养工程可以极大地解除菌株的代谢负担, 代谢分工也能让菌株发挥最大的代谢潜力^[17]。迄今为止, 模块化共培养在微生物代谢工程中的应用日益广泛, 所获得的产品也越来越多 (表 1)。

许多模块化共培养工程研究表明, 相对种群比例在共培养发酵中是一个十分重要的参数^[18,24,26-27,42-43]。到目前为止, 在共培养系统中对种群比例的控制大多数都基于改变初始的接种比例, 从而迫使研究者使用一个初始接种比例参数来定义整个发酵过程的种群分布^[18,24]。在模块化共培养工程的发酵中, 不同的种群含有不同的代谢模块, 由于其菌株自身的特性以及含有的模块的影响, 不同种群的生长速率是不同的, 这也导致发酵过程中种群的比例不断变化。因此, 研究者开始尝试更加精确地控制整个发酵过程的种群比例^[24,44]。

表 1 模块化共培养工程在微生物生物合成中的应用

Table 1 Application of modular co-culture engineering in biosynthesis

Co-culture system	Product	Production	Fold increase over mono-culture	References
<i>E. coli-E. coli</i>	Rosmarinic acid	172.0 mg/L	38 fold	[18]
<i>E. coli-S. cerevisiae</i>	Oxygenated taxanes	33.0 mg/L		[19]
<i>E. coli-E. coli</i>	Muconic acid	4.7 g/L		[20-21]
<i>E. coli-E. coli</i>	4-hydroxy benzoic acid	2.3 g/L	8.6 fold	[21]
<i>S. cerevisiae-P. pastoris</i>	Bioethanol	32.6 g/L		[22]
<i>E. coli-E. coli</i>	Naringenin	0.3 mmol/L		[23-24]
<i>E. coli-E. coli</i>	Biobutanol	62.8%		[22]
<i>E. coli-E. coli</i>	Resveratrolsoid	92.3 mg/L	3.2 fold	[25]
<i>E. coli-E. coli</i>	Afzelechin	40.7 mg/L	970 fold	[26]
<i>E. coli-E. coli</i>	3-amino benzoic acid	48.0 mg/L	15 fold	[27]
<i>E. coli-E. coli</i>	Apigetrin	16.6 mg/L	2.5 fold	[28]
<i>E. coli-E. coli</i>	Bisdemethoxycurcumin	6.3 mg/L		[29]
<i>Lactococcus lactis-Yarrowia lipolytica</i>	Nisin	270.0 mg/L	1.49 fold	[30]
<i>E. coli-E. coli</i>	Pinene	64.9 mg/L	1.9 fold	[31]
<i>E. coli-E. coli</i>	Salidroside	6.0 g/L		[32]
<i>E. coli-S. cerevisiae</i>	Naringenin	21.2 mg/L	8 fold	[33]
<i>E. coli-E. coli</i>	Caffeoylmalic acid	570.1 mg/L	3 fold	[34]
<i>E. coli-Streptomyces</i>	Sakuranetin	79.0 mg/L		[35]
<i>E. coli-E. coli</i>	Caffeyl alcohol	401.0 mg/L	12 fold	[36]
<i>Streptomyces-Bacillus mycoides</i>	N-acetyltryptamine	14.9 mg/L		[37]
<i>E. coli-S. cerevisiae</i>	Magnoflorine	7.2 mg/L		[38]
<i>Clostridium acetobutylicum-S. cerevisiae</i>	n-Butanol	16.3 g/L	46.8%	[17]
<i>E. coli-Corynebacterium glutamicum</i>	Pipecolic acid	3.4 mmol/L		[39]
<i>Clostridium beijerinckii-Clostridium tyrobutyricum</i>	Butanol	6.7 g/L		[40]
<i>Bacillus subtilis-Pseudomonas aeruginosa</i>	Polyhydroxyalkanoates	0.4 g/g		[41]

文中介绍了基于模块化共培养工程进行代谢生产的最新进展和模块化共培养工程研究中的不同种群比例控制策略。通过分析不同的种群比例控制策略所蕴含的巧妙思路,讨论种群比例控制如何在模块化共培养工程中发挥重要作用,并提出了种群比例控制策略新的发展方向。

1 模块化共培养工程的功能

1.1 明确菌株分工减轻代谢负担

通过对共培养菌株进行工程改造,使完整的生物合成途径被模块化,每个模块分别在

不同的宿主中完成不同阶段的生产任务,最终实现目的产物的生物合成^[45]。通过明确菌株分工来克服复杂而漫长的生物合成途径所带来的代谢负担,利用模块化的方式优化生产途径^[46],是模块化共培养最鲜明的优势之一(图 1A)。

在利用大肠杆菌共培养系统来生产阿福豆素的研究中,就很好地体现了这一点^[26]。在这项研究中,作者将线性的阿福豆素合成途径分为两个模块,上游模块为丙二酰辅酶 A 依赖性模块,合成需要丙二酰辅酶 A 的参与,经过香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL)、查耳酮合成酶 (chalcone synthase,

CHS) 和查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 的催化生成前体柚皮素; 下游模块为 NADPH 依赖性模块, 合成过程需要辅因子 NADPH 的参与, 柚皮素在黄烷酮羟化酶 (flavanone 3 β -hydroxylase, F3H)、二氢黄酮醇-4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 和白花色色素还原酶 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) 催化下生成阿福豆素。在单一培养中, 由于合成途径长而复杂, 过多的表达异源酶为工程菌株带来了极大的生理负担, 导致阿福豆素的产量较低。而通过模块化共培养, 将合成途径合理地分配在两个菌株中, 可以有效减轻菌株的代谢压力, 还可以针对特定的辅因子和前体需求对每个模块进行遗传优化。模块化共培养最终产生了 40.7 mg/L 的阿福豆素, 比单一培养提高了 970 倍^[26]。

1.2 模块化碳源利用来提高底物利用率

模块化共培养可以设计使不同微生物模块利用不同碳源, 通过调节碳源比例进一步控制共培养系统的菌株比例, 从而简单灵活地平衡各个模块之间的代谢通量^[47], 扩大代谢工程中可利用的碳源, 提高底物利用率 (图 1B)。

例如在黏康酸的生物合成中^[20-21], 作者利用了衍生自木质纤维素的糖混合物进行生物合成。作者用葡萄糖/木糖混合物代替单一碳源甘油, 利用大肠杆菌共培养系统, 使两个微生物模块分别利用葡萄糖和木糖, 避免了单一培养中葡萄糖和木糖不能同时被利用的劣势, 有效克服了单一菌株面临的葡萄糖分解代谢物阻遏效应^[21]。在这个实验中, 黏康酸合成途径被模块化为上下游两部分, 上游模块负责经莽草酸途径生成中间体 3-脱氢莽草酸 (3-dehydroshikimic acid, DHS), 下游模块则包含由 DHS 到黏康酸的异源途径以及 DHS 转运蛋白 ShiA。作者通过敲除上游菌株的磷酸转移酶系统使其更倾向

于利用木糖进行生长, 敲除下游菌株的 *xytA* 基因使其无法消耗木糖。独立的碳源供应同时也避免了共培养菌株之间的生长竞争, 进一步提高了两菌株的相容性和共培养系统的稳定性, 通过模块化共培养利用混合碳源, 作者最终获得了 4.7 g/L 的黏康酸, 其糖混合物的转化率高达理论最大值的 51% (0.35 g/g)。而以葡萄糖/木糖混合物为碳源, 单一培养的黏康酸产量仅为 68 mg/L; 以甘油为唯一碳源进行共培养也只获得了 2 g/L 的黏康酸 (0.1 g/g)。可见将模块化共培养与混合碳源相结合, 可以有效改善菌株的代谢生产。另外, 作者还充分发挥了模块化共培养即插即用的优势, 将提供前体 DHS 的上游模块与包含由 DHS 到 4-羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid, 4HB) 途径的下游模块组合, 实现了利用葡萄糖/木糖混合物生产工业上重要的芳香族化合物 4-羟基苯甲酸的过程, 获得了 2.3 g/L 的 4-羟基苯甲酸, 比单一培养增加了 8.6 倍^[21]。

1.3 将酶与非必要底物进行分离来减少副反应

细胞膜的选择性显示了模块化共培养的另一潜在优势, 由于大多数途径酶对具有相似结构的底物都有催化活性, 大大降低了酶的利用率, 而通过将生物合成途径模块化, 利用细胞膜的选择性物理分离某些酶和不需要的底物, 可以有效限制酶催化其他底物的活性, 减少不必要的副反应 (图 1C)。

例如在单木酚咖啡醇的生物合成中, 4-羟基丙酸 3-羟化酶 HpaBC 对多种芳香族和多酚类底物具有催化活性, 包括天然氨基酸酪氨酸及其脱氨基产物对香豆酸。酪氨酸羟基化后的中间体二羟基苯丙氨酸不稳定, 会迅速反应形成副产物黑色聚合物, 使培养基具有特征性的黑色, 并造成碳损失, 使目标产物咖啡醇的收率

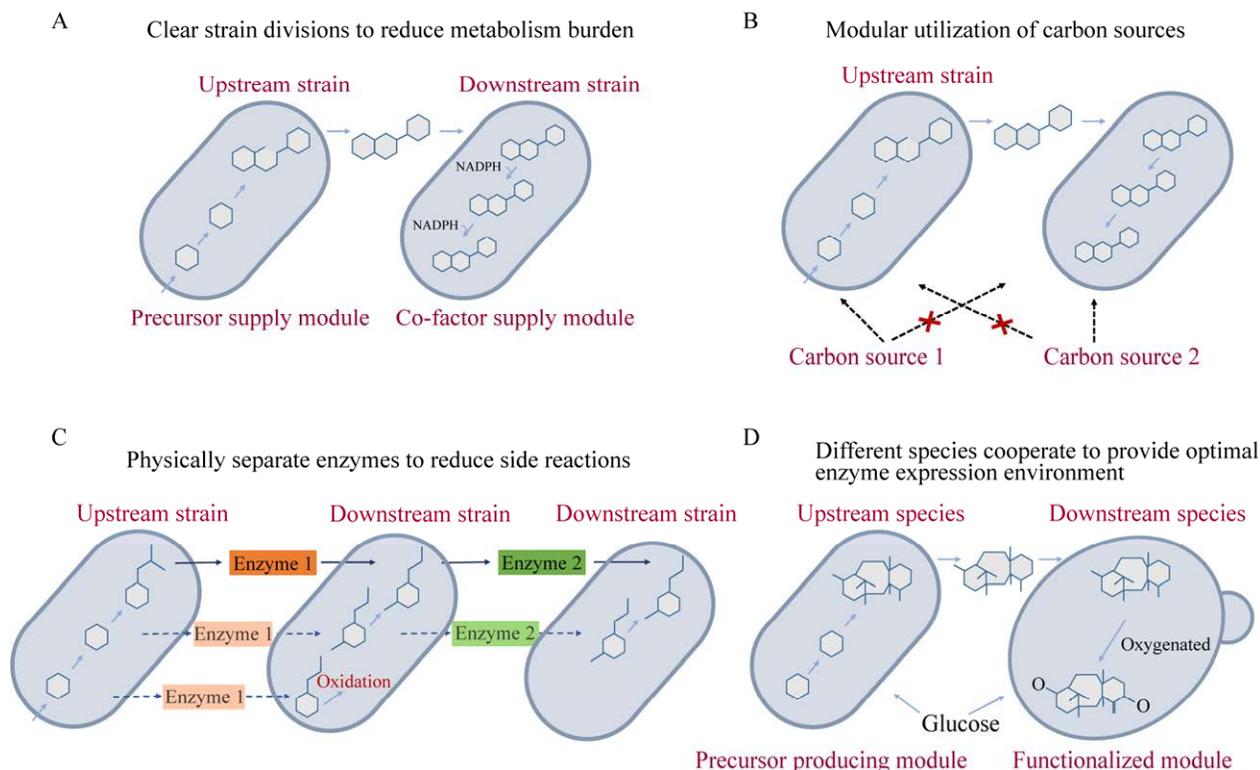


图 1 模块化共培养工程的应用模式 A: 明确菌株分工减轻代谢负担; B: 利用不同碳源提高底物利用率; C: 物理分离酶与非必要底物减少副反应; D: 不同物种配合, 提供最适酶环境

Figure 1 Application mode of modular co-culture engineering. (A) Labor divisions to reduce metabolic burden. (B) Modular utilization of carbon sources to increase substrate yield. (C) Physical separation of enzymes to reduce side reactions. (D) Cooperation between different species to provide optimal environment for enzyme expression.

较低。作者在对香豆醇生产菌株的基础上, 引入表达 HpaBC 的另一菌株, 构成共培养系统。在大肠杆菌中, 酪氨酸的跨膜转运依赖于特定的转运蛋白, 而非天然小分子通常通过自由扩散穿过细胞膜。作者测试了细胞膜对香豆醇、对香豆酸和酪氨酸的选择透过性, 由于细胞膜对酪氨酸的选择性屏障作用, 阻止了 HpaBC 与对香豆醇前体酪氨酸的催化作用, 避免了二烷基苯丙氨酸及其副产物的产生, 减少了不必要的碳损失。模块化共培养最终产生了 401 mg/L 的咖啡醇, 比单一培养提高约 12 倍^[36]。

1.4 其他功能

模块化共培养工程具备许多功能与优点,

提供了平衡各个途径模块之间生物合成强度的灵活性。可以通过改变菌种比例来操纵通路模块的相对强度。例如, 通过分别增加上游或下游菌株的相对种群大小, 可以轻松解决途径中间体的供应不足或过度积累。我们在第二部分会对菌种比例控制进行详细介绍。另外, 还有很多其他功能, 如: 可以防止代谢中间体对某些敏感酶的潜在抑制作用^[48]; 通过不同物种之间的配合, 可以提供最适酶表达的多样化环境 (图 1D); 如含氧紫杉烷可以通过酿酒酵母和大肠杆菌的共培养进行。因 P450 酶类适于在酿酒酵母中来表达, 两者共培养使大肠杆菌快速过量生产紫杉二烯, 在酿酒酵母中通过氧化反应将紫杉二

烯进一步功能化为紫杉烷^[19]。由于共培养的模块化性质，可以通过即插即用的方式快速地构建出不同的生物合成途径，通过简单地混合和搭配不同的微生物菌株，生产各种不同的化学品^[21,49-51]。例如，2015年 Zhang 等通过分别将含有 3-脱氢莽草酸合成模块菌株与含有黏康酸合成模块菌株进行共培养，实现了黏康酸的高效生产。然后将含有 3-脱氢莽草酸合成模块菌株与含有 4-羟基苯甲酸合成模块菌株共培养高效地合成了 4-羟基苯甲酸^[21]。生产相对于单一培养而言，共培养解决了很多单一培养所存在的问题，有效提高了生产效率，获得了更高的产物产量。在模块化共培养中，含有不同模块种群比例极大地影响了产物的合成效率，因此也衍生出多种种群比例控制策略。

2 模块化共培养中的种群控制策略

2.1 控制接种比例来控制共培养中的种群比例

可以通过控制携带指定模块的共培养菌株的比例，简单灵活地平衡各个模块之间的代谢通量，保持最佳的相对种群比例(图 2A)。其中最典型的例子即通过控制 3 株含有不同模块的大肠杆菌的比例，平衡非线性迷迭香酸的生物合成途径^[18]。作者开发了一个理性设计的微生物共培养系统，将迷迭香酸的生物合成途径划分为 3 个模块，共培养系统中的 3 株大肠杆菌各负责一个模块的生产，只有 3 个模块同时存在才能合成目标产物迷迭香酸。咖啡酸模块和丹参酸 A 模块的分离最大限度地减少了上游碳通量的竞争。

三菌株共培养使 3 个单独模块之间的平衡更加灵活。尽管下游迷迭香酸的形成需要以 1:1 的比例提供咖啡酸和丹参酸化合物，但咖啡酸和丹参酸模块的特异性生物合成强度(每

个细胞的咖啡酸或丹参酸的生物合成)不相等。因此，以不同的比率接种两个菌株，以协调两种化合物对迷迭香酸生物生产优化的供应。同时，迷迭香酸模块的生物转化能力还需要与咖啡酸或丹参酸前体的提供相匹配。作者尝试了 22 种接种比例，确定了最优的接种比例为 2:3:1，这一比例可以最好地满足路径模块对路径平衡的不同需求，最大可能地避免任一前体的积累。通过调节 3 株大肠杆菌的初始接种比实现了 3 个模块之间的代谢通量平衡，最终获得了明显提高的迷迭香酸产量^[18]。这种工程化的模块化共培养最终产生了 172 mg/L 的迷迭香酸，比单一培养增加了 38 倍^[18]。所以通过使用合适接种比例可以获得较高的生产性能的菌株。分别计算各个模块菌株的生产能力，可以大致计算出各个模块菌株的最佳比例。从而避免大量的尝试。例如，在迷迭香酸的双菌株共培养中，以 1:1 比例进行接种时，咖啡酸产量约为 0.1 mmol/L，而丹参酸 A 的产量约为 0.15 mmol/L^[21]。一分子迷迭香酸的生产需一分子咖啡酸和一分子丹参酸 A，因此理论上最佳接种比大概是 3:2。作者只尝试了 3:1 和 1:1 的比例，发现 3:1 的比例产量最高的结论^[18]。通过对菌株生产性能进行单独评定，可以获得更加准确的数据来计算最佳接种比例，从而减少大量尝试接种比带来的繁重工作量。

2.2 通过控制碳源比例来控制共培养中的种群比例

除了初始接种比，改变不同模块所需要的不用碳源的含量，也是经常用来控制共培养种群比例的方法之一。为了使合成种群达到合适的比例，控制所需碳源的供应是一个十分有效的方法(图 2B)。

例如利用大肠杆菌和酿酒酵母共培养来生产氧化紫杉烷^[19]。作者将氧化紫杉烷的合成途

径分为两个模块,在大肠杆菌和酿酒酵母中分别表达。上游大肠杆菌菌株通过代谢改造完成中间产物紫杉二烯的从头生物合成,但大肠杆菌并不适合表达催化多种氧化反应的细胞色素 P450,而酿酒酵母由于具有丰富的细胞内膜,成为了表达细胞色素 P450 的最佳宿主^[19]。因此引入一个能够有效表达 P450 的酿酒酵母模块,为关键酶细胞色素 P450 的表达提供最适环境。而在大肠杆菌和酿酒酵母的共培养过程中,作者发现酿酒酵母利用葡萄糖的同时会大量积累副产物乙醇,进而抑制同一培养体系中的大肠杆菌生长,使前体紫杉二烯供应不足^[19]。为了控制这两种菌株的种群密度始终处于最佳比例,作者采用控制碳源的方法,将葡萄糖更换为木糖,且使木糖仅被大肠杆菌消耗,随后产生可以被酿酒酵母代谢的乙酸盐,由此避免了酿酒酵母对大肠杆菌的生长抑制作用,最终产生了 33 mg/L 的氧化紫杉烷^[19]。

在利用大肠杆菌共培养系统生产红景天苷的过程中,同样体现了通过碳源比例控制相对种群密度的这一策略^[32]。作者将红景天苷的合成途径分为两个模块,上游大肠杆菌菌株以木糖为碳源,通过代谢改造异源合成糖苷配基酪醇,下游菌株以葡萄糖为碳源,负责生产 UDP-葡萄糖并最终合成红景天苷。复杂的代谢途径被合理地分配在两个菌株中,合适的种群比例成为了影响代谢生产的重要因素^[32]。为此作者尝试了不同的葡萄糖/木糖比例,首先以葡萄糖/木糖为 1:1 的接种比例作为对照进行生产,不断改变碳源比例,发现当葡萄糖比例增加时,前体酪醇积累减少而红景天苷的产量迅速增加,最终葡萄糖/木糖比例为 4:1 时,红景天苷的产量达到 248.67 mg/L,而将葡萄糖/木糖比例进一步提高至 6:1 时则会减少酪醇的积累且抑制红景天苷的产生^[32]。最终作者在

最佳的碳源比例控制下,获得了最优的红景天苷生产,也由此证明了通过控制碳源比例进行种群比例调节的有效性。

虽然利用不同碳源进行共培养避免了菌株之间的底物竞争,但是对于最佳碳源比例的计算更加复杂,包括菌株利用不同碳源的生产性能、菌株在不同碳源上的生长速率以及理论最佳的最终种群比例等等,这使得我们很难通过计算获得最佳碳源比例。

2.3 通过群体感应动态控制共培养中的种群比例

通过控制接种或碳源比例虽然可以在一定程度上保持合适的相对种群密度,但这两种方法均缺乏灵活性,难以进行更为精细的调节。合成生物学的不断发展为共培养的种群比例控制提供了新的思路。通过群体感应构建的人工生态系统可以模拟种群之间的共生、竞争关系,将群感系统与生长控制基因相结合,可以有效实现种群密度的同步振荡,动态调控共培养的种群比例(图 2C)^[52-55]。

Miano 等^[44]设计了一个由对香豆酸(pCA)诱导的群体密度依赖性激活的类群感系统 iQS。将 iQS 与裂解基因相结合,通过调节诱导剂浓度实现了在恒定增长、种群密度同步振荡和诱导种群死亡之间的切换,显著地扩展了种群动态范围。然后利用 iQS 系统的正交性,进行两个菌株的共培养,证明了通过改变诱导剂浓度可以动态控制种群组成以及可诱导性从种群扩展到群落水平的能力,有效实现了共培养的种群比例控制。

Dinh 等^[24]开发了一个基于群体感应系统的生长调节线路,用来调控发酵过程中共培养系统的菌株比例。细胞通过组成型表达 *EsaI*,使小分子 AHL 以细胞密度依赖性方式产生。由于菌体不断生长,AHL 逐渐积累,达到一定水

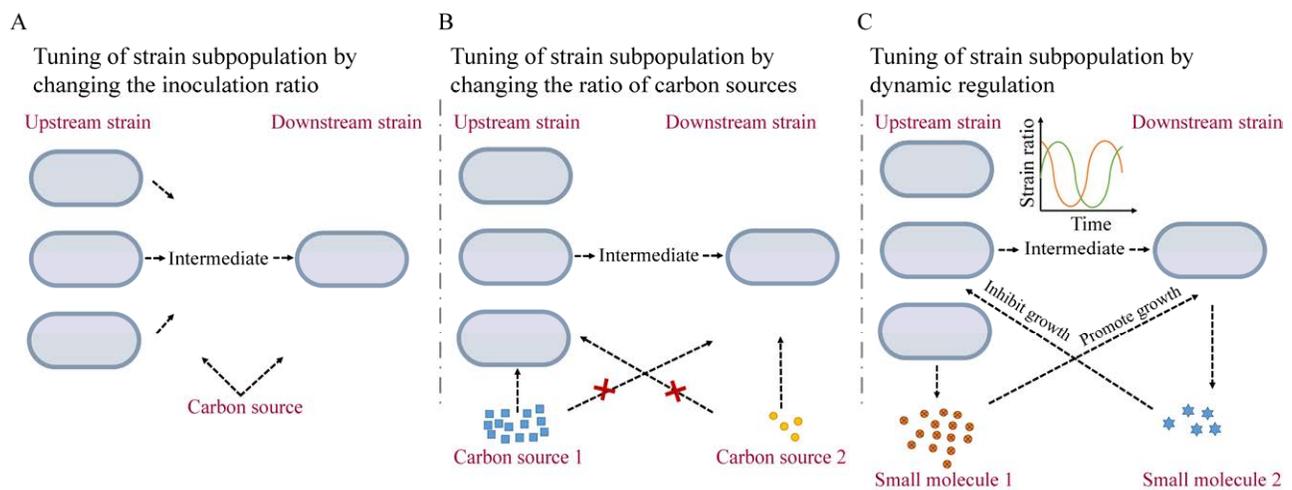


图2 模块化共培养工程中的种群比例控制策略 A: 接种比例控制; B: 碳源比例控制; C: 群体感应动态控制

Figure 2 Population control strategies in modular co-culture engineering. Tuning of strain subpopulation by changing the inoculation ratio (A), by changing the ratio of carbon sources (B), or by dynamic regulation (C).

平时, AHL 会与阻遏蛋白 LuxR 结合激活 *lux* 启动子的转录,使带有降解标签的磷酸果糖激酶 PfkA 发生降解,而 PfkA 作为糖酵解的关键酶,降解后导致糖酵解通量降低,菌体生长受到抑制^[24]。通过将群感系统与糖酵解的关键酶 PfkA 相结合,由此就实现了通过增加细胞密度下调细胞生长速率的调节。作者进一步将该线路应用在柚皮素的生产中^[24]。将酪氨酸和丙二酰辅酶 A 转化为柚皮素需要 4 种异源酶,酪氨酸氨裂解酶 (TAL) 催化酪氨酸生成对香豆酸,香豆酰辅酶 A 连接酶 (4CL) 催化对香豆酸转化为香豆酰辅酶 A,然后香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 在查尔酮合酶 (CHS) 和查尔酮异构酶 (CHI) 的催化下,最终生成柚皮素^[24]。在这个过程中,香豆酰辅酶 A 对酪氨酸氨裂解酶 (TAL) 的抑制作用极大地限制了柚皮素的生产。而通过模块化共培养将该途径分配在两个菌株中:菌株 1 负责由酪氨酸经酪氨酸氨裂解酶 (TAL) 催化生成对香豆酸;菌株 2 负责将对香豆酸经一系列催化反

应最终转化为柚皮素。这样就有效地避免了代谢中间体对敏感酶的潜在抑制作用^[24]。根据平衡代谢通量的需要,作者将生长调节线路置于菌株 1 中,使菌株 1 在共培养前期大量存在,提供了充足的中间产物对香豆酸。在生长调节线路的作用下,随着菌株 1 的细胞密度不断增加,其生长逐渐受到抑制。而菌株 2 的比例逐渐增加则可以利用菌株 1 合成的对香豆酸生产柚皮素^[24]。

基于群感系统的生长调节线路的引入可以更加精细地调节共培养系统的种群比例,达到更好的生产效果。然而目前对于群体感应系统的研究工作主要集中在大肠杆菌中^[24,44,52-55],而在其他原核宿主和酵母中仅有少量报道^[56-58]。在其他宿主中建立的群体感应未见应用到模块化共培养中,另外不同物种间共培养时群体感应系统的兼容性存在诸多问题,如信号分子的分泌和吸收、感应器在不同宿主的有效性等等,这也严重限制群体感应系统在模块化共培养中的应用。

3 总结与展望

目前已经证明了模块化共培养策略在实现分工方面具有越来越多的应用,这表明模块化共培养工程为各种生物化学物质的生物合成,尤其是结构复杂、生物合成途径较长的产物合成提供了有效而灵活的工具^[59]。这种新方法不仅加快了更高产率的实现,而且还促进了生物合成途径的重构,以即插即用的方式获得多种复杂产物^[16,21]。

尽管模块化共培养工程具有许多优势,但要大规模地实现该方法的工业化仍需要克服一些挑战,其中最重要的问题就是在整个发酵过程中如何提高共培养系统的稳定性。生长较快的物种很容易通过大量消耗营养物质而消灭群体中的其他物种,目前通过调整共培养菌株的接种比例在一定程度上缓解了这个问题。当共培养系统基于具有相似生长速率的不同物种,或在短时间的非分批发酵中时,这种方法特别有效。但对于具有显著不同的生长速率的物种或在延长对数期生长的分批补料发酵中,很难通过简单地调整初始种群密度来控制群落稳定性^[15]。

另外,培养基的组成也是需要仔细考虑的关键问题,特别是当两个或多个不同物种进行共培养时。控制碳源比例可以一定程度地控制共培养中的种群比例,然而平衡种群比例与控制生产所需碳源是不容易的。在涉及代谢通量和代谢产物时,要充分利用不同物种提供的多种能力和优势重建和设计最佳生产途径^[49-51]。

利用群感系统控制发酵过程中共培养系统的菌株比例,通过设计生长调节线路动态调控菌种比例,可以更好地满足共培养系统对菌株比例的要求,实现产物的高效生产。目前用于动态控制菌株比例的策略主要是基于群体感应的种群控制方法,该策略响应总体种群密度,

使得种群比例与细胞生长密度相关联。随着合成生物学的发展,基于转录因子、核糖开关、双组分系统等天然动态调控元件的深入开发,细胞代谢物生物传感器在代谢工程领域中得到了成功的应用,可以将其设计为根据代谢物浓度来精确动态控制种群比例的模块化共培养策略:通过细胞生物传感器监测代谢中间产物的水平,根据代谢中间体的积累来精确控制发酵过程中含有不同途径或酶的菌株在整个种群中的比例,从而实现自发地、精确地优化和平衡途径酶的表达,达到最优生产的目的。该方法将具有非常广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Liang Q, Qi Q. From a co-production design to an integrated single-cell biorefinery. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1328-1335.
- [2] Zhang MM, Wang Y, et al. Engineering microbial hosts for production of bacterial natural products. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(8): 963-987.
- [3] Zhuang Q, Wang Q, Liang Q, et al. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from glucose that contain medium-chain-length monomers via the reversed fatty acid β -oxidation cycle in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2014, 24: 78-86.
- [4] Kang Z, Wang Y, Gu PF, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 492-498.
- [5] Wang Q, Xu JS, Sun ZJ, et al. Engineering an *in vivo* EP-bifido pathway in *Escherichia coli* for high-yield acetyl-CoA generation with low CO₂ emission. *Metab Eng*, 2019, 51: 79-87.
- [6] Pang Q, Han H, Liu X, et al. *In vivo* evolutionary engineering of riboswitch with high-threshold for N-acetylneuraminic acid production. *Metab Eng*, 2020, 59: 36-43.
- [7] Ramzi AB. Metabolic engineering and synthetic biology. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1102: 81-95.
- [8] Sagt CM. Systems metabolic engineering in an industrial setting. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6): 2319-2326.
- [9] Palazzotto E, Tong Y, Lee SY, et al. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural

- product discovery. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(6): 107366.
- [10] Chae TU, Choi SY, Kim JW, et al. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 47: 67-82.
- [11] Wu G, Yan Q, Jones JA, et al. Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications. *Trends Biotechnol*, 2016, 34(8): 652-664.
- [12] Zhang R, Li C, Wang J, et al. Microbial production of small medicinal molecules and biologics: from nature to synthetic pathways. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(8): 2219-2231.
- [13] Kotopka BJ, Li Y, Smolke CD. Synthetic biology strategies toward heterologous phytochemical production. *Nat Prod Rep*, 2018, 35(9): 902-920.
- [14] Agapakis CM, Boyle PM, Silver PA. Natural strategies for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(6): 527-535.
- [15] Jones JA, Wang X. Use of bacterial co-cultures for the efficient production of chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 33-38.
- [16] Lu H, Villada JC, Lee PKH. Modular metabolic engineering for biobased chemical production. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(2): 152-166.
- [17] Luo HZ, Zeng QW, Han S, et al. High-efficient n-butanol production by co-culturing *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae* integrated with butyrate fermentative supernatant addition. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33(4): 1-10.
- [18] Li Z, Wang X, Zhang H. Balancing the non-linear rosmarinic acid biosynthetic pathway by modular co-culture engineering. *Metab Eng*, 2019, 54: 1-11.
- [19] Zhou K, Qiao K, Edgar S, et al. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(4): 377-383.
- [20] Zhang H, Li Z, Pereira B, et al. Engineering *E. coli-E. coli* cocultures for production of muconic acid from glycerol. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 134.
- [21] Zhang H, Pereira B, Li Z, et al. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products. *PNAS*, 2015, 112(27): 8266-8271.
- [22] Zhang Y, Wang C, Wang L, et al. Direct bioethanol production from wheat straw using xylose/glucose co-fermentation by co-culture of two recombinant yeasts. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(3): 453-464.
- [23] Ganesan V, Li Z, Wang X, et al. Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(3): 236-242.
- [24] Dinh CV, Chen X, Prather KLJ. Development of a quorum-sensing based circuit for control of coculture population composition in a naringenin production system. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(3): 590-597.
- [25] Thuan NH, Trung NT, Cuong NX, et al. *Escherichia coli* modular coculture system for resveratrol glucosides production. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34(6): 75.
- [26] Jones JA, Vernacchio VR, Sinkoe AL, et al. Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids. *Metab Eng*, 2016, 35: 55-63.
- [27] Zhang H, Stephanopoulos G. Co-culture engineering for microbial biosynthesis of 3-amino-benzoic acid in *Escherichia coli*. *Biotechnol J*, 2016, 11(7): 981-987.
- [28] Thuan NH, Chaudhary AK, Van Cuong D, et al. Engineering co-culture system for production of apigenin in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(3): 175-185.
- [29] Fang Z, Jones JA, Zhou J, et al. Engineering *Escherichia coli* co-cultures for production of curcuminoids from glucose. *Biotechnol J*, 2018, 13(5): e1700576.
- [30] Ariana M, Hamed J. Enhanced production of nisin by co-culture of *Lactococcus lactis* sub sp. lactis and *Yarrowia lipolytica* in molasses based medium. *J Biotechnol*, 2017, 256: 21-26.
- [31] Niu FX, He X, Wu YQ, et al. Enhancing production of pinene in *Escherichia coli* by using a combination of tolerance, evolution, and modular co-culture engineering. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1623.
- [32] Liu X, Li XB, Jiang J, et al. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides. *Metab Eng*, 2018, 47: 243-253.
- [33] Zhang W, Liu H, Li X, et al. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Eng Life Sci*, 2017, 17(9): 1021-1029.
- [34] Li T, Zhou W, Bi H, et al. Production of caffeoylmalic acid from glucose in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(7): 1057-1065.
- [35] Cui H, Song MC, Ban YH, et al. High-yield production of multiple O-methylated phenylpropanoids by the

- engineered *Escherichia coli*-*Streptomyces* cocultivation system. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 67.
- [36] Chen Z, Sun X, Li Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial synthesis of monolignols. *Metab Eng*, 2017, 39: 102-109.
- [37] Yu L, Hu Z, Ma Z. Production of bioactive tryptamine derivatives by co-culture of marine *Streptomyces* with *Bacillus mycoides*. *Nat Prod Res*, 2015, 29(22): 2087-2091.
- [38] Minami H, Kim JS, Ikezawa N, et al. Microbial production of plant benzylisoquinoline alkaloids. *PNAS*, 2008, 105(21): 7393-7398.
- [39] Sgobba E, Stumpf AK, Vortmann M, et al. Synthetic *Escherichia coli*-*Corynebacterium glutamicum* consortia for l-lysine production from starch and sucrose. *Bioresour Technol*, 2018, 260: 302-310.
- [40] Li L, Ai HX, Zhang SX, et al. Enhanced butanol production by coculture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium tyrobutyricum*. *Bioresour Technol*, 2013, 143: 397-404.
- [41] Munir S, Jamil N. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source. *J Basic Microbiol*, 2018, 58(3): 247-254.
- [42] Tsai SL, Goyal G, Chen W. Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(22): 7514-7520.
- [43] Jones JA, Vernacchio VR, Collins SM, et al. Complete biosynthesis of anthocyanins using *E. coli* polycultures. *mBio*, 2017, 8(3): e00621-e00617.
- [44] Miano A, Liao MJ, Hasty J. Inducible cell-to-cell signaling for tunable dynamics in microbial communities. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1193.
- [45] Jawed K, Yazdani SS, Koffas MA. Advances in the development and application of microbial consortia for metabolic engineering. *Metab Eng Commun*, 2019, 9: e00095.
- [46] Zhang H, Pereira B, Li Z, et al. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products. *PNAS*, 2015, 112(27): 8266-8271.
- [47] Liu Y, Tu X, Xu Q, et al. Engineered monoculture and co-culture of methylotrophic yeast for *de novo* production of monacolin J and lovastatin from methanol. *Metab Eng*, 2018, 45: 189-199.
- [48] Avalos JL, Fink GR, Stephanopoulos G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(4): 335-341.
- [49] Gebreselassie NA, Antoniewicz MR. (13)C-metabolic flux analysis of co-cultures: a novel approach. *Metab Eng*, 2015, 31: 132-139.
- [50] Johns NI, Blazejewski T, Gomes AL, et al. Principles for designing synthetic microbial communities. *Curr Opin Microbiol*, 2016, 31: 146-153.
- [51] Zhang H, Wang X. Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering. *Metab Eng*, 2016, 37: 114-121.
- [52] Kim JK, Chen Y, Hirning AJ, et al. Long-range temporal coordination of gene expression in synthetic microbial consortia. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(11): 1102-1109.
- [53] McMillen D, Kopell N, Hasty J, et al. Synchronizing genetic relaxation oscillators by intercell signaling. *PNAS*, 2002, 99(2): 679-684.
- [54] Chen Y, Kim JK, Hirning AJ, et al. SYNTHETIC BIOLOGY. Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium. *Science*, 2015, 349(6251): 986-989.
- [55] Scott SR, Din MO, Bittihn P, et al. A stabilized microbial ecosystem of self-limiting bacteria using synthetic quorum-regulated *Lysis*. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 17083.
- [56] Yang X, Liu J, Zhang J, et al. Quorum sensing-mediated protein degradation for dynamic metabolic pathway control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2021, 64: 85-94.
- [57] Albuquerque P, Nicola AM, Nieves E, et al. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, 2013, 5(1): e00986-e00913.
- [58] Williams TC, Nielsen LK, Vickers CE. Engineered quorum sensing using pheromone-mediated cell-to-cell communication in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2013, 2(3): 136-149.
- [59] Wang R, Zhao S, Wang Z, et al. Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 62: 65-71.

(本文责编 陈宏宇)