

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-031

人工多菌体系的设计与构建：合成生物学研究新前沿

刘裕¹, 韦惠玲¹, 刘骥翔¹, 王少杰^{1,2}, 苏海佳¹

(¹北京化工大学化学资源工程国家重点实验室, 北京生物过程重点实验室, 北京软物质科学与工程先进创新中心, 北京 100029; ²上海交通大学电子信息与工程学院纳米生物医学与工程研究所, 上海 200240)

摘要: 合成生物学的飞速发展拓展了单菌体系的功能。然而在重组菌株中, 异源途径的过表达会增加底盘细胞的代谢压力, 导致细胞中能量分配失衡, 进而对底盘细胞的正常生长和目标产物的生物合成产生不利影响。作为一种更加新颖有效的生物合成平台, 人工多菌体系在为目标产物的生物合成提供多样且适配的表达环境的同时, 有效地分配底盘细胞的代谢负担, 使得途径的全局调控更加灵活。本文明确指出了人工多菌体系是合成生物学领域中一个新的研究前沿, 并以多菌体系的设计和构建为文章主旨, 通过详细比较单菌体系和人工多菌体系的优缺点, 突出人工多菌体系在生物合成中的优势, 同时以人工多菌体系在近几年生物合成中的最新进展为实例, 从途径分工的理性设计、菌群互作关系的理性设计、功能菌群时空有序分布以及基于模型算法指导下的多菌体系理性构建4个方面对人工多菌体系的设计原则和构建方法进行详细介绍。最后根据目前人工多菌体系存在的问题提出了有关人工多菌体系全局调控的方法, 并对人工多菌体系的设计、构建以及在各种生物产品合成中的发展进行了展望。

关键词: 人工多菌体系; 天然产物合成; 代谢工程; 生物能源; 生物合成

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

Design and progress of synthetic consortia: a new frontier in synthetic biology

LIU Yu¹, WEI Huiling¹, LIU Jixiang¹, WANG Shaojie^{1,2}, SU Haijia¹

(¹State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing Key Laboratory of Bioprocess, Beijing Advanced Innovation Center for Soft Matter Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; ²Institute of Nano Biomedicine and Engineering, School of Electronic Information and Electrical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Metabolic engineering and synthetic biology have enabled efficient bioproduct synthesis in mono-microbial culture by pathway reconstruction. In spite of that, in the demand of increasing bioproduction, mono-culture

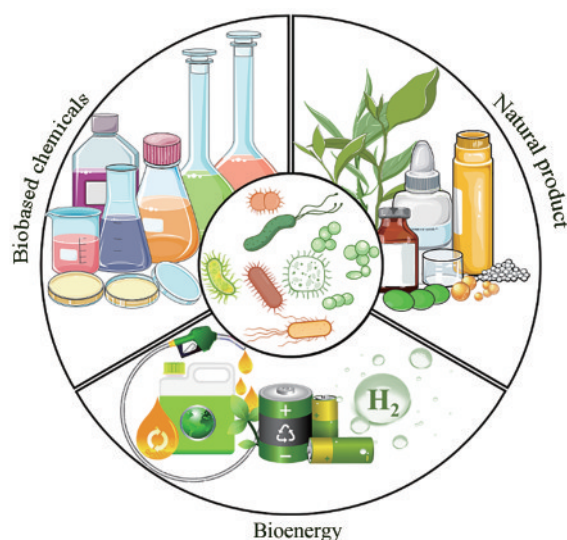
收稿日期: 2021-03-10 修回日期: 2021-05-17

基金项目: 国家自然科学基金 (21838001, 21525625, 31961133018); 国家重点研发计划 (2018YFA0902200); 中央高校基础研究经费 (JD2007, JD2102); 中国博士后科学基金 (2020M681302)

引用本文: 刘裕, 韦惠玲, 刘骥翔, 王少杰, 苏海佳. 人工多菌体系的设计与构建: 合成生物学研究新前沿[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 635-650

Citation: LIU Yu, WEI Huiling, LIU Jixiang, WANG Shaojie, SU Haijia. Design and progress of synthetic consortia: a new frontier in synthetic biology [J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(4): 635-650

has gradually showed some limitations in the tasks of accomplishing complicated biosynthesis and achieving high efficiency. The expression of multi-step biosynthetic pathways in one cell may greatly increase the metabolic burden of the host, which may result in a huge imbalance between cell growth and gene expression and thus decrease the titer of bioproduct. Synthetic consortia have been designed as an alternative effective biosynthesis system to distribute complex functions and pathways into different cells or species. In this article, the advantages of the synthetic consortia are summarized, including providing better environment for different functional genes expression, balancing working intensity, reducing metabolic burden, plug-and-play and eliminating feedback inhibition. Based on the above advantages and taking recent advances in biosynthesis studies utilizing synthetic consortia systems as case studies, some design principles involving functional modules, synergism and robustness are put forward in this article. To be specific, it is necessary to reasonably divide and allocate functional modules into different strains in the system. With appropriate chassis strains, it will be beneficial to establish synergistic substrate utilization and mutually beneficial symbiosis between different strains, which could increase the connections between functional modules as well as the interactions between chassis strains. Moreover, the application of population control strategies will efficiently increase system robustness. Under the premise of material exchange, spatiotemporal distribution in synthetic consortia is conducive for better coordination and interaction between strains. In addition, modeling on synthetic consortia systems have been initiated to simulate bioproduct process and optimize consortia construction. In response to the current problems, some global regulation methods and prospectives for synthetic consortia are also proposed in three aspects: internal optimization, external reinforcement, and mathematical modeling.



Keywords: synthetic consortia; natural product synthesis; metabolic engineering; bioenergy; biosynthesis

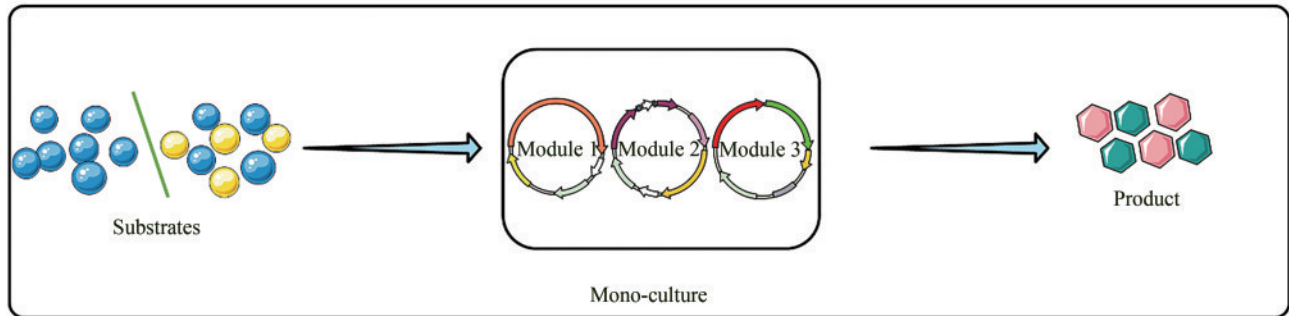
过去的几十年中，人类对各种化学品的需求不断上升。因为以化石能源得到目标产品的方法存在能耗高、污染大、对环境不友好等缺点，于是人们将研究重点转移到微生物的开发和应用上^[1-2]。微生物的细胞工厂中具有各种各样的催化酶，可以为物质的合成和转化提供合适的反应条

件和环境^[3-4]。此外，合成生物学和代谢工程等新兴领域的快速发展大大提升了研究人员对微生物进行编程的能力，降低了利用微生物进行各种化学品生物合成的难度^[5-6]。目前，大多数生物合成都是在单菌体系中完成的，这种通过微生物纯培养得到目标产物的方式为代谢工程的发展起到了

奠基作用 [图1(a)]。然而,面对日益增长的产品需求,单菌体系通过纯培养完成复杂产物的合成中逐渐显露出一些缺陷。例如,在单个细胞中表达冗长的生物合成途径可能会大大增加宿主的代谢负担,进而使得能量在细胞生长与途径表达之间的分配失衡,不利于目标产物的合成^[7-9]。

幸运的是,人们在自然界中找到了克服能量

分配受限的重要线索。为了平衡自然界中的代谢通量,高等生物会将代谢途径模块化后分布在各个细胞器中,而结构简单的微生物会形成各种功能菌群。微生物菌群一直在直接或间接地影响着人类的生活。常见的自然微生物菌群包括厌氧微生物菌群、光自养微生物菌群、嗜酸微生物菌群以及肠道或口腔微生物菌群^[10-11]。借鉴自然界中的

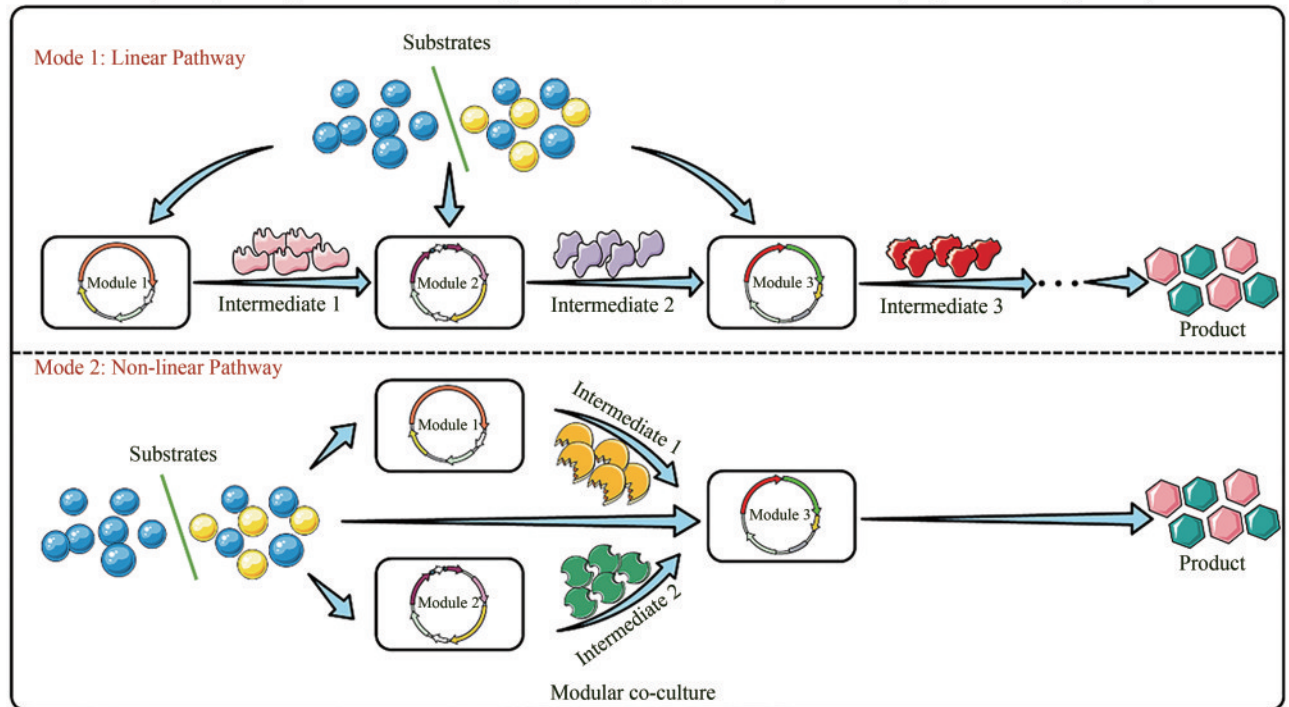


(a) 单菌体系的生物合成示意图

(在单菌体系的生物合成过程中,目标产物的合成途径在单个菌株中进行完全表达。培养体系中只存在一种功能菌株)

(a) Schematic diagram of chemical biosynthesis by mono-culture

(In biosynthesis process of mono-culture, pathway for target product biosynthesis is fully expressed in a single strain)



(b) 人工多菌体系的生物合成示意图

(目标产物的合成途径被划分成多个模块,这些模块被合理地分配到合适的菌株中。在这些菌株的共同培养下,底物被转化成目标产物。

合成途径分为线性途径和非线性途径,根据途径的种类不同,多菌体系也有一些差别)

(b) Schematic diagram of chemical biosynthesis by synthetic consortia

(Target product biosynthesis pathway is divided into several modules, which are reasonably assigned to appropriate strains.

Substrate can be transformed into target product through co-culture of these strains.

Synthetic pathways can be divided into linear pathways and non-linear pathways)

图1 单菌体系和人工多菌体系

Fig. 1 Schematic diagrams of mono-culture and synthetic consortia

多菌体系, 研究者们开始对人工多菌体系进行开发和研究。人工多菌体系就是将复杂的生物合成途径和功能分布到不同菌种中, 然后将这些具有不同功能的菌株共培养后得到目标产物^[12] [图1(b)]。与自然界的多菌体系相比, 人工多菌体系的优势在于其组成更简单, 分工更明确, 并且可针对目标产物进行个性化定制。在人工多菌体系中, 代谢途径和功能被合理地分割并分配给合适的宿主, 使得复杂的底物和中间产物有效地被转化为最终产物, 减少了交叉反应的不利影响, 并减轻细胞代谢负担^[13-15]。因此, 与单菌体系相比, 人工多菌体系是一个更加开放和高效的生物合成平台。本文全面分析和对比了单菌体系和人工多菌体系在代谢工程中的优缺点, 突出了人工多菌体系的优势, 并结合应用实例详细地阐述了人工多菌体系的设计原则。最后以全局调控为出发点, 对人工多菌体系未来的发展提出了构想。

1 人工多菌体系的优势

单菌体系之所以被广泛地应用在生物合成中, 是因其代谢网络和遗传背景清晰, 方便作为实验和研究对象, 所以研究难度较低^[16-17]。而且单菌体系的培养条件、改造方法等有针对性, 易于变化和控制^[18]。目前越来越多的针对微生物基因组进行改造的分子生物学工具已经被开发出来, 在实现单菌多功能化的同时, 降低了工业开发成本^[19-21]。尽管单菌体系为代谢工程的发展奠定了坚实的基础, 但随着目标产物需求的不断上升, 其弊端已逐渐显现出来。首先, 单菌体系在使用前需要对培养仪器和环境进行严格灭菌, 以防止染菌对发酵结果的不利影响, 这会大大增加工业成本。而且在单菌体系中表达复杂的生物合成途径会造成细胞内资源分布不均, 代谢负担增大^[22-23]。在底物利用方面, 单菌体系可使用的底物种类较为单一, 在针对复杂的可再生生物质时, 单菌体系的底物利用效率低, 稳定性差。此外, 单菌体系在生物合成中易造成中间产物和副产物的积累, 而这种积累会造成细胞应激, 使细胞消耗更多的ATP和NADH。代谢负担和细胞应激的协同作用导致“代谢悬崖”现象的出现, 不利于目标产物的

合成。随着合成生物学等新兴生物学科快速发展, 为了解决单菌体系在生物合成中所遇到的问题, 人们开始重视人工多菌体系的设计和开发。与单菌体系相比, 人工多菌体系优点具体如下:

1.1 细胞环境多样

人工多菌体系中包含了不同的菌种, 可以为生物合成途径中的各个酶提供多样的催化环境。首先, 生物合成途径中包含的酶可能具有不同的最适表达环境, 而单个细胞提供的环境较为单一, 无法满足所有酶表达的最适条件。相比之下, 人工多菌体系中包含多个菌株, 具有细胞环境多样性, 方便为途径中各个酶的表达提供合适的环境。Zhang等^[24]在构建出*E. coli-E. coli*人工多菌体系后, 为了进一步提高目标产物3-氨基苯甲酸的产量, 对10种不同的*E. coli*进行测试后, 选出了最适合下游途径表达的菌株, 成功将3-氨基苯甲酸的产量提高了30多倍 [图2(a)]。此外, 如果途径中的基因来自不同物种, 在人工多菌体系中运用不同物种的菌株, 更能为酶的表达提供合适的环境, 有效地提升酶的表达效果和目标产物合成效率。而且不同物种之间的菌株相互作用更加多样, 对产物合成也有促进作用。例如, 在设计*E. coli-S. cerevisiae*人工多菌体系之前, 研究人员也在*E. coli-E. coli*体系中成功实现氧化紫杉烷的合成, 但是产量很低, 原因就在于*E. coli*之间的相互作用较少^[25]。

1.2 代谢负担降低

人工多菌体系中途径和功能的合理分配, 有利于减少菌种的代谢负担, 平衡途径中各个模块的工作强度^[26]。来自于植物和真菌的天然产物往往有较长的合成途径, 若将整条合成途径在一个细胞中表达, 细胞在维持自身基本的生长代谢的同时, 还要额外运行复杂的合成途径, 而细胞本身的能量有限。因此细胞会将原本供给基本生长代谢的能量分配出一部分给异源途径的表达, 使得最终底盘细胞的基本生长代谢受到影响, 目标产物的产量也会随之降低^[27-28]。经过途径分配后的人工多菌体系中, 每个菌株需要运行的途径明显变短, 细胞代谢压力

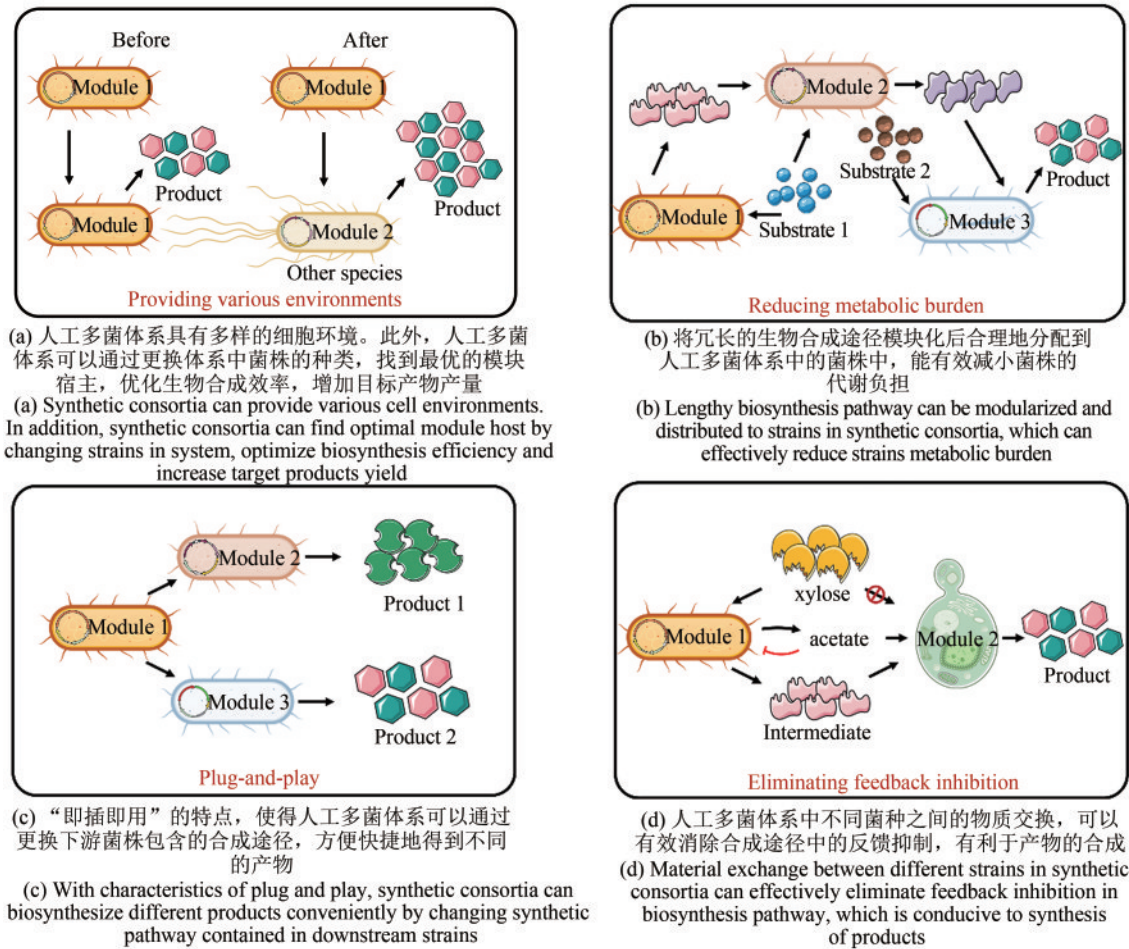


图2 人工多菌体系在生物合成中的优势

Fig. 2 Schematic diagram of synthetic consortia advantages in biosynthesis

也明显小于单菌体系时的代谢压力。Jones等^[29]设计了一个*E. coli-E. coli-E. coli-E. coli*人工多菌体系用于从头合成花青素，值得注意的是，体系中运行的途径包含了15个来自不同物种的基因。由于该途径过长，研究人员对其进行了合理分配，最大程度缓解了宿主细胞的代谢压力，经过一系列优化后，花青素的产量达到了 (9.5 ± 0.6) mg/L [图2(b)]。此外，在人工多菌体系中，可以通过简单地改变菌种接种比例的方式增加某个关键中间代谢产物的合成与转化效率，达到平衡途径中各个模块的工作强度的目的，这相比于在传统的单菌体系内进行优化更加容易^[30-34]。在*E. coli-E. coli*人工多菌体系合成原儿茶酸的实验中，研究人员发现关键中间产物4-羟基苯甲酸的转化效率不高，通过简单地调整上游细胞UY2和下游细胞

BLA的接种比例后，将原儿茶酸的产量从43 mg/L增加到260 mg/L的同时，完成4-羟基苯甲酸的全转化^[35]。

1.3 底物转化能力高

人工多菌体系具有高效的底物转化能力。尽管单菌体系经过改造后可以同时利用多种底物，但是不同底物的转化途径会相互干扰，造成细胞代谢压力增大，能量分配混乱。而且碳分解代谢抑制作用（CCR）也会严重降低每种底物的利用率^[36]。而在人工多菌体系中，可以将不同的底物利用功能进行分配，使每个菌种具有不同的底物利用偏好，这样既消除了单个细胞利用多种底物的干扰，又提高了整体的底物利用率。Flores等^[37]设计了一个*E. coli-E. coli*人工多菌体系，体系包含

了野生型 *E. coli* W 和产乙醇菌 LY180, 这两种菌经过改造后分别只利用葡萄糖和木糖。该人工多菌体系在葡萄糖:木糖=2:1 的混合底物中生产了 46 g/L 乙醇, 明显高于产乙醇菌 LY180 的单菌体系产量 (36 g/L)。这说明底物利用偏好分离的人工多菌体系有高效的生产能力。

除了高效利用多种底物, 人工多菌体系还可以利用单菌体系无法利用的复杂底物。经过改造的单菌体系虽然能合成目标产物, 但是其可以利用的底物种类有限。对于微生物普遍可以利用的葡萄糖等糖类, 单菌体系可以将其轻而易举地转化为目标产物, 而对于自然界中存在较多的淀粉、纤维素等复杂底物, 许多单菌体系往往不能对其进行转化^[38]。针对这些复杂底物, 人工多菌体系表现出更优秀的底物转化能力。某些菌株可以将这些复杂底物分解成小分子糖, 这些糖类便可被体系中其他菌株利用, 这种互利共生的菌间关系使得人工多菌体系既有效地完成了目标产物的合成, 又可以利用这些难被利用却含量丰富的复杂底物^[39]。本实验室 Wang 等^[40] 在筛选出两株高效产氢细菌 *Bacillus cereus* A1 和 *Brevundimonas naejangsanensis* B1 后, 利用 *B. cereus* A1 可以将淀粉快速分解成寡糖和 *B. naejangsanensis* B1 快速产氢的功能, 构建出具有利用淀粉高效产氢能力的人工双菌厌氧产氢体系, 该双菌体系中淀粉酶活比单菌体系提高了 1.5 倍。

1.4 “即插即用”特性

人工多菌体系具有“即插即用”特性, 可以灵活地完成多种产物的合成。人工多菌体系中, 每种菌株包含的途径和功能较为独立, 正是菌株之间这种正交的关系, 增加了人工多菌体系在产物合成方面的能力, 即通过添加或更换体系中包含的菌株, 方便快捷地对体系进行优化并改变合成的产物种类, 这便是“即插即用”特性^[41-42]。Zhang 等^[43] 在成功构建出顺, 顺-黏康酸 (*cis, cis*-muconic acid, MA) 的人工多菌体系后, 继续用同样的上游细胞, 将下游细胞包含的途径更换成从 3-脱氢莽草酸到 4-羟基苯甲酸的合成途径, 成功产出 4-羟基苯甲酸, 且产量达到了 2.3 g/L。此外,

在现有的多菌体系的基础上, 可以往体系中继续添加功能菌株, 将产物进一步转化, 完成体系的功能拓展 [图 2(c)]。Jones 等^[29] 在成功构建出花青素人工多菌体系后, 计划在体系中继续添加菌株, 进行体系功能的延伸, 这足以体现出人工多菌体系具有强大的生物合成潜力。

1.5 反馈抑制的消除

人工多菌体系可以很好地消除反馈抑制。细胞在表达合成途径时会产生一些副产物, 这些副产物的生成既消耗了菌株本身的能量, 还会反过来对菌株本身的生长造成不利影响, 进而降低目标产物的合成效率。若想在单菌体系中消除这种反馈抑制, 通过敲除副产物途径基因阻断该途径是较为常用的方法, 但是这种阻断方式可能会影响其他途径的正常工作。而在人工多菌体系中, 研究人员可以利用菌间的交叉喂养消除反馈抑制, 且不会影响其他途径的正常运行。Zhou 等^[25] 在构建 *E. coli*-*S. cerevisiae* 人工多菌体系用于生产氧化紫杉烷时, 为了消除以葡萄糖为单底物时的底物竞争和乙醇对 *E. coli* 的反馈抑制, 将底物更换成了酵母无法利用的木糖。此时 *E. coli* 利用木糖生成前体物质紫杉二烯和乙酸盐, *S. cerevisiae* 以乙酸盐为碳源生存并将紫杉二烯转化成氧化紫杉烷。此时 *S. cerevisiae* 便不再产生乙醇, 反馈抑制消失, 并且减少了乙酸对 *E. coli* 生长的不利影响 [图 2(d)]。*E. coli*-*Pseudomonas putida* 人工多菌体系在生产中链长度的聚羟基链烷酸酯 (mcl-PHA) 时, *P. putida* 会利用 *E. coli* 分泌的乙酸盐和细胞外游离脂肪酸 (FFA) 合成 mcl-PHA。此时 *P. putida* 可以为 *E. coli* 提供有利的生长环境, *E. coli* 又为 *P. putida* 提供了合成 mcl-PHA 的原料。正是人工多菌体系中的“交叉喂养-解毒”的互作关系, 将反馈抑制的消除最大化^[44]。

2 人工多菌体系设计原则

2.1 途径分工的理性设计

将体系中的功能进行合理的分割和分配, 对

途径进行理性设计是设计人工多菌体系一条重要的原则。但是途径的分割与分配,必然会造成其物理上的隔离,而这种物理隔离对中间产物浓度和传质效率有不利影响,造成传质障碍。为了将传质障碍的影响降到最低,需要选择合适的中间产物作为途径分割的标准^[45]。首先,中间产物的合成或转化过程最好是限速步骤,这样就可以通过途径分割,有针对性地进行优化,将限速的不利影响降到最低。其次,该中间产物必须可以通过细胞膜,保证物理隔离不会影响其正常地外排和吸收^[46-47]。此外,使用合适的膜转运蛋白或调节细胞膜的通透性可以提高中间产物的传质效率,例如3-脱氢莽草酸的转运蛋白ShiA的发现及应用推动了一系列相关产物的合成以及产量的提升^[43, 48-49]。尽管人工多菌体系可减轻细胞代谢负担,但途径的过度分割也会大大降低中间产物的浓度和传质效率^[50]。而且如果菌群中的菌种过多,对菌群的控制和优化的难度将增大,所以要合理对途径进行设计。

2.2 菌群互作关系的理性设计

2.2.1 底盘细胞的选择

底盘细胞的选择是菌群互作关系理性设计的基础。除了选择具有合适催化表现的菌株外^[51],还需要考虑是否可以与其他菌株共生。理想情况下,多菌体系可以利用每种菌株独特能力很好地完成目标产物的合成。但是,要使这些菌株在系统中长期稳定存在,需要考虑许多问题,例如引起种间排斥问题的外毒素和不利于其他菌种存活的副产物。为了解决种间排斥问题,可以设计包含单一物种的人工多菌体系。如果体系中必须使用不同物种,应选择不分泌外毒素或具有抵抗外毒素能力的菌株^[52]。其次,选择突变率低的菌株也有利于体系的稳定。随着时间的流逝,经过或未经过改造的菌株都可能出现不可预测的突变,进而对目标产物的合成产生不利影响。因此,有必要选择具有低突变率的宿主,维持体系的稳定。Xiao等^[53]开发了体内种群质量控制(PopQC)机制来连续选择具有高效率和非遗传变异的细胞,该机制已成功用于酪氨酸和游离脂肪酸的生物合

成,使得产量翻倍。

2.2.2 底物协同利用

设计人工多菌体系,使其可以同时利用多种底物,既可以有效避免体系内菌株利用单一底物时产生的底物竞争,又可以增加体系的底物利用能力。在设计时,需要全面分析菌株本身和目标产物合成途径,根据菌株底物代谢途径和氧化还原平衡等一系列约束条件,合理设计菌株的底物偏好。此外,底物功能互补也被广泛地用于人工多菌体系中以增加菌株之间的协作关系。当底物为淀粉或纤维素等复杂的底物时,某些菌株无法对其直接转化,此时需要将此类菌株与可以将这些复杂底物分解为小分子糖的菌株共同培养^[54]。这种功能上的互补,使得人工多菌体系能更好地利用复杂底物进行生物合成[图3(a)]。例如人工多菌体系*Clostridium phytofermentans*-*E. coli*中的*C. phytofermentans*可以将底物纤维二糖分解成葡萄糖供*E. coli*生产生物燃料^[55]; *E. coli*-*Trichoderma reesei*中的*T. reesei*分泌的纤维素酶将木质纤维素水解成可以被*E. coli*利用的可溶性糖,*E. coli*将可溶性糖转化为异丁醇^[56]; *E. coli*-*C. glutamicum*中的*E. coli*可以分泌淀粉酶,将淀粉分解成葡萄糖供*C. glutamicum*利用合成L-赖氨酸等产物^[57]。

2.2.3 菌间互利共生

由于人工多菌体系中包含多个菌株,确保菌株之间互利共生的需求关系是联系各个功能模块,高效完成生物合成的关键^[58]。确保菌间互利共生的基础是一种必需关系的确立,即对菌株进行改造,使得菌株在体系中其他菌株不存在的情况下无法正常地生长和生物合成^[59-60]。比较常见的是营养缺陷型互补的改造。将系统内菌种改造为营养缺陷型,并且菌株之间可以为对方提供缺陷的氨基酸,这种互补方式有助于增加菌种之间的协同作用,从而增加途径和功能之间的联系^[61][图3(b)]。Liu等^[62]在设计红景天苷人工多菌合成体系时,将体系中两个菌株分别改造成苯丙氨酸和酪氨酸缺陷型,既为对方菌株的生存提供了必需的营养物质,又增加了上下游途径的联系。氨基酸营养缺陷型的种类也与细胞间相互作用紧密相关。研究表明,与合成成本较低的氨基酸相比,蛋氨酸、精氨酸、异亮氨酸和芳香族氨基酸

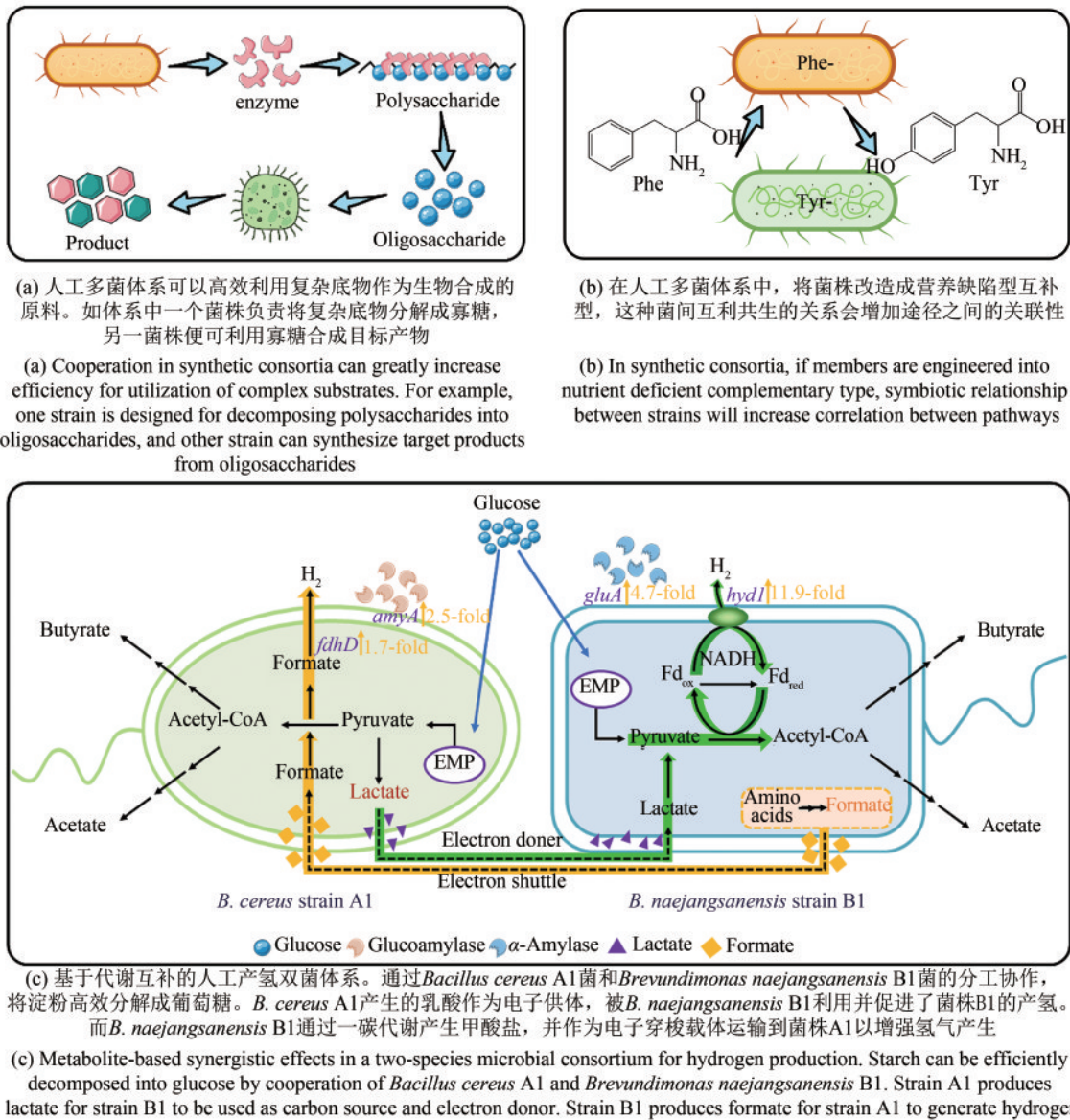


图3 人工多菌体系设计原则

Fig. 3 Design principle of synthetic consortia

等合成成本较高的氨基酸往往会促进菌间形成更强的协同作用^[63]。此外，在环境保护方面，该方法还可以有效防止生物污染。一旦环境中缺少改造菌必需的物质，该菌将无法生存。

菌种间最佳关系（如共生和合作）的确立也有利于菌间的互利共生^[64-65]。这种最佳关系体现在物质交换和营造菌株最佳合成条件中，在自然菌群中普遍存在，并已成功应用在人工多菌体系^[66]。Harcombe等^[67]设计了*E. coli-Salmonella enterica*多菌系统。研究人员首先在乳糖培养基上驯化了蛋氨酸营养缺陷的*E. coli*，使其可以将乳糖分解为

葡萄糖和半乳糖。同时，*S. enterica*分泌出合成成本较高的蛋氨酸，以换取*E. coli*产生的半乳糖。这种关系的转变替换了乙酸与蛋氨酸的不平等交换关系，从而使得两个菌种获得同等价值的收益。而营造菌株最佳合成条件常常与物质交换密不可分，让体系中某一菌株消耗掉不利于关键菌株生长和合成的物质，为其营造出最佳的环境，并且这种“解毒”效应也不会影响解毒菌株本身的生长。本实验室Wang等^[40]利用*Bacillus cereus* A1和*Brevundimonas naejangsanensis* B1构建出以淀粉为底物的产氢双菌系统后，该体系的产氢量明显高

于其各自菌株的纯培养。通过对两株菌进行深入研究后发现, 菌株A1产生的乳酸盐作为电子供体, 促进了菌株B1的产氢, 而菌株B1通过一碳代谢产生甲酸盐, 并作为电子穿梭载体运输到菌株A1以增强氢气产生。通过这种协同作用, 使得最终A1菌和B1菌产氢相关基因分别上调表达了1.7倍和11.9倍 [图3(c)]。

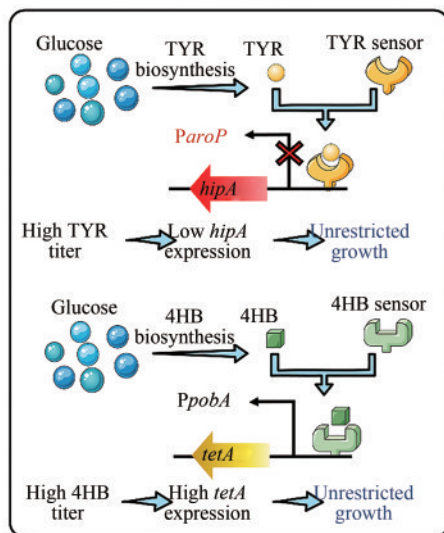
2.2.4 体系适配鲁棒

与单菌体系不同, 人工多菌体系中的不同菌种执行不同的功能, 其生长速率也各不相同。如果一个菌株生长失控, 该菌株数量将在菌群中占上风, 导致菌群结构失衡, 这不仅会导致底物竞争, 还会导致关键中间产物的积累和转化受阻, 目标产品的产量将下降。因此, 在构建人工多菌体系时, 采用种群控制策略, 应用细胞筛选机制, 可以稳定菌株数量, 从根本上保持体系结构的稳定性, 提高目标产物的产量。

根据介导物质的不同, 可以把种群控制策略分为产物介导型和信号分子介导型。产物响应型

生物元件可以根据环境中产物的浓度, 对包含该产物的合成途径的菌株进行数量上的控制。生物传感器在环境监测、医学诊断、药物发现、过程控制和食品安全中起着至关重要的作用^[68-70]。将生物传感器与产物响应型生物元件相结合, 应用到人工多菌体系中, 可以对相应菌株起到控制作用。Guo等^[71]建立了两个不同的*E. coli-E. coli*人工多菌体系, 分别通过两种不同的前体(4-羟基苯甲酸酯和酪氨酸)合成苯酚。上游菌株分别使用4-羟基苯甲酸酯和酪氨酸介导的生物传感器来筛选高效细胞, 保证4-羟基苯甲酸酯和酪氨酸的供应充足。在这两种细胞选择机制的作用下, 与单菌体系相比, 人工多菌体系中苯酚产量分别提高了2.3倍和3.9倍。而且, 该机制还消除了低效菌株和高效菌株之间的底物竞争 [图4(a)]。

信号分子介导型生物元件往往与群体感应(QS)关系紧密^[72]。群体感应提供了一种在细胞通信中协调群体水平和行为的方式, 尤其是基于小分子AHL的群体感应系统, 因其简单的遗传结

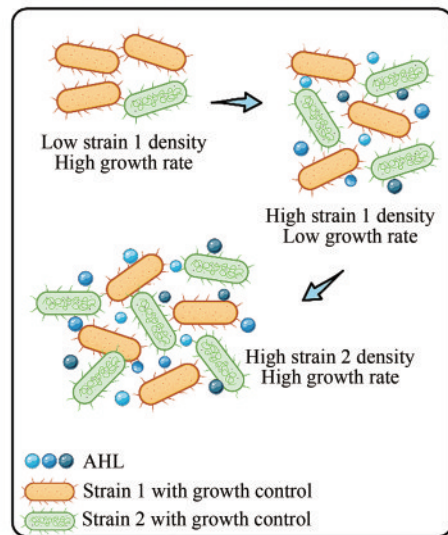


(a) 基于不同产物介导的生物传感器在*E. coli-E. coli*人工多菌体系中的应用

(这两种机制通过响应环境中高浓度的酪氨酸和4-羟基苯甲酸酯, 抑制低效率菌株的生长, 增加体系中高效细胞的占比和中间产物的合成, 确保目标产物的高效合成)

(a) Application of product-based biosensors in *E. coli-E. coli* synthetic consortia

(In response to high concentrations of tyrosine and 4-hydroxybenzoate in environment, these two mechanisms inhibit growth of inefficient strains, increase proportion of efficient cells and synthesis of intermediate products, and ensure efficient synthesis of target products)



(b) 基于信号分子介导的群体感应在*E. coli-E. coli*人工多菌体系中的应用

(对于含有生长控制元件的上游菌株来说, 环境中的AHL达到一定浓度时, 该菌株的生长就会受到抑制, 防止中间产物的过度合成)

(b) Application of signal molecules-based quorum sensing in *E. coli-E. coli* synthetic consortia

(For upstream strain with growth control elements, when AHL concentration in environment reaches a certain level, the growth of this strain will be inhibited to prevent excessive synthesis of intermediate products)

图4 菌群控制策略在人工多菌体系中的应用

Fig. 4 Applications of population control strategy in synthetic consortia

构已成为细胞通信的首选技术，特别是在人工多菌体系中^[73-76]。Stephens等^[77]设计了基于细胞信号分子的生长控制机制，以正交自诱导物AI-1和AI-2为信号分子，对*E. coli-E. coli*人工多菌体系进行菌株的代谢调控。此外，Dinh等^[78]设计了一种包含群体感应生长调节电路的*E. coli-E. coli*人工多菌体系，用于柚皮素的生物合成。体系中仅上游菌株包含生长调节回路，下游菌株没有。当两个菌种细胞密度低时，两种菌株均以其基线速度生长。一旦AHL在环境中积累到一定浓度，上游菌株的生长就会受到抑制，而下游菌株继续生长。该机制可以防止由于上游菌株生长失控而引起的中间产物积累和底物竞争，且在仅改变接种比例后即可使该菌群的柚皮苷产量增加60% [图4(b)]。

2.3 功能菌群时空有序分布

在确保物质交换的前提下，构建结构与功能相适应的限域空间，促进菌株的时空有序分布，有利于菌株之间进行更好的协同互作以及对体系的控制^[79]。菌种固定化便是比较常用的一种时空分布应用，并在生物合成中有很好的促进作用^[80]。Johnston等^[81]研发出一种特制的水凝胶作为一种新型载体应用在人工多菌体系的菌种固定中。这种水凝胶既不会影响菌种的物质交换，又对菌种有很好的保藏作用，有利于菌种功能的稳定。通过组合含有不同功能菌株的水凝胶即可完成目标产物的生物合成。这不仅避免了菌种接触培养的局限性，又有利于对菌群进行控制。为了构建性能优异、鲁棒性强的混菌体系，本实验室Su等^[82]提出基于氧驱动下时空有序分布的多壳层混菌体系快速构建策略。好氧颗粒污泥内部菌群的分布会在营养物质的供给、内部优势菌群的变化以及代谢物质改变等因素的影响下进行变化，以功能菌（如塔宾曲霉）介入构建限域空间，可促进细胞间分工协作，提高好氧颗粒污泥对环境胁迫的适应性和稳定性。根据颗粒内部氧浓度的不同，菌株在颗粒内由内而外的分布分别为厌氧的产甲烷菌、兼性厌氧的产氢产乙酸菌和好氧的产酸菌。这种基于多壳层结构的混菌体系，环境适应性和

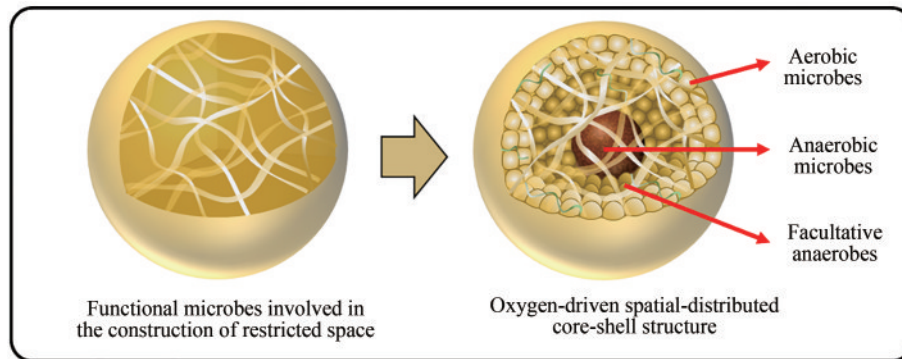
稳定性增强，而且在高盐、高有机负荷下，有机质的利用率提高，甲烷产率提高近1倍^[83] [图5(a)]。培养装置的设计对人工多菌体系中菌种的时空分布和控制也有很大的帮助。基于氧气在空间上的梯度分布，Shahab等^[84]设计了一个通气生物膜反应器，实现了里氏木霉、兼性厌氧乳酸菌与专性厌氧乳酸菌的合理共存和功能互补，在确保人工多菌体系中不同氧需求的菌种共存的同时，使得该多菌系统可以利用复杂底物生产多种化学品 [图5(b)]。此外，Moutinho等^[85]设计了一个垂直膜共培养板，通过实时测量OD₆₀₀来量化非接触菌种之间的相互作用。

2.4 基于模型算法指导下的多菌体系的理性构建

作为一种新兴的方法，基于各种优化数据对人工多菌体系进行计算和模拟有望准确地构建人工多菌体系^[86]。计算的辅助可以进一步提高人工多菌体系构建的准确性和针对性，从而大大提高目标产品的产量。目前已经发展的人工多菌体系构建的计算辅助方法已经涵盖了代谢网络的构建方法（如PROM和GEMINI算法^[87]等）、多菌体系代谢相互作用的模拟算法（如Joint-FBA^[88]和NECom^[89]算法等）、代谢调控算法（如蛋白质相互作用网络分析法^[90]等）等各个方面。Jones等^[91]在*E. coli-E. coli*多菌体系中成功生产了黄烷-3-醇后，建立了一个规模化的高斯模型，根据一系列优化数据来预测最优体系。最后，黄烷-3-醇的产量提高到 (40.7 ± 0.1) mg/L，相当于先前报道的970倍提高。同样，Harcombe等^[92]设计了一个多尺度建模框架，该框架基于详细的细胞-细胞代谢计算多菌体系的时空动态，而无需预先假设不同物种是否以及如何相互作用。计算数据与转录组、蛋白质组和其他组学数据相结合，可以全面地对人工多菌体系进行评估。但目前可以全面评估、预测和计算人工多菌体系的程序和方法相对较少，需要投入更多的时间和精力进行开发。

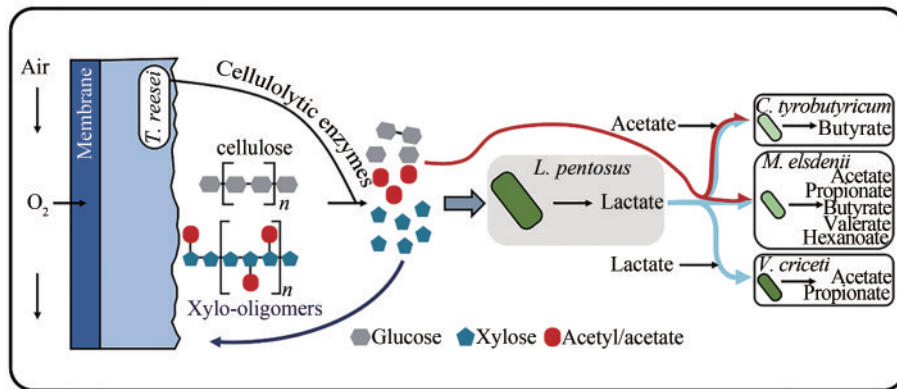
3 结论与展望

与具有很多限制的单菌体系相比，人工多菌



(a) 通过功能菌的介入，使得对氧气敏感度不同的菌群在颗粒污泥中分层分布，进而污泥颗粒的环境适应性和稳定性增强

(a) With help of functional microbes, different cell members with different oxygen sensitivity are distributed in granular sludge layer by layer, thereby enhancing environmental adaptability and stability of sludge particles



(b) 通气生物膜反应器的设计，将人工多菌体系中不同氧需求的菌种进行空间排布，有利于各个菌株的生存和功能执行

(b) Design of aerated biofilm reactor can arrange functional microbes with different oxygen requirements in synthetic consortia, which is conducive to each strain survival and function

图5 时空分布在人工多菌体系中的应用

Fig. 5 Application of spatiotemporal distribution in synthetic consortia

体系因其强大的鲁棒性、灵活性和高产量而成为新型且有效的生物合成系统，特别是对于具有复杂结构和冗长合成途径的天然产物。人工多菌体系可以为生物合成途径提供更好的细胞环境，通过优化途径所在菌种便可实现相关中间产物的合成与转化，进而提升目标产物产量。此外，人工多菌体系支持即插即用的生物合成，方便生物合成途径的重建，简单、快速地获得多种生物产品。人工多菌体系为解决各种蛋白质的功能表达、复杂底物的有效利用、生物合成途径的快速重组等问题提供了新的视角。因此，人工多菌体系在异源生物合成中具有广阔的研究和应用前景。尽管人工多菌体系的合成能力非常出色，但其在广泛应用和工业化中仍存在问题，例如传质受阻，体系的维稳与菌株适配等。因此研究人员需要寻找

和设计人工多菌体系的优化手段，以达到维持菌群的稳定性以及菌群代谢的控制和分析的目的。

对人工多菌体系进行全局调控是人工多菌体系优化中的重要组成部分。全局调控可分为内部优化和外部强化。内部优化是指通过一系列分子生物学方法改变菌种携带的遗传物质，改变其功能性状以提高目标产物产量。常见的单菌体系代谢工程改造方法也可用于人工多菌体系的优化，例如：敲除竞争途径使更多的物质和能量流向产物合成途径^[93]和使用顺式作用元件和反式作用因子（例如强启动子和转录调节因子）来调节关键基因的表达等^[94-95]。此外，还有一些针对人工多菌体系内部优化的新方法：①在人工多菌体系中改造菌种使其具有不同的底物偏好，以消除碳分解代谢阻遏效应和底物竞争，有利于维持人工多菌

体系的稳定性^[96]；②将具有不同功能的质粒分布到不同的细胞中，合理地对功能和途径进行划分，尽可能减少物理隔离对传质的影响。因为质粒的复制和保存会给宿主带来额外的新陈代谢的负担，占用宿主的细胞资源^[97]。此外，开发有效的合成生物学工具和设备，以监测、控制和调节菌群内细胞间通信^[98-99]。例如，基于RNA核糖开关的生物传感器模块的开发也可有效地实时筛选和控制系统中过量生产的细胞，防止中间产物积累^[100]。与内部优化相反，外部优化是在没有任何基因工程操作的情况下通过改变发酵条件等外部条件提升目标产物产量的优化方式。常见的外部优化包括调整接种比例、底物浓度、温度、pH和需氧-厌氧转换等^[101-103]。将内部优化和外部优化共同作用在人工多菌体系中，有望大幅提升目标产物合成效率。在*E. coli-E. coli*己二酸合成的人工多菌体系中，关键酶CaER的使用使得关键中间产物顺，顺-黏康酸的生物合成与降解的需氧量不同，所以在上游细胞中表达玻璃藻血红蛋白（VHb），促进上游细胞摄取氧气，增加了顺，顺-黏康酸的合成的同时，为下游细胞中CaER酶的工作营造出微需氧的最佳工作环境。在经过更换强启动子和接种比例的优化后，己二酸的产量达到了 $(27.6 \pm 1.3)\text{mg/L}$ ，明显高于*E. coli*纯培养的产量 $(5.8 \pm 0.9)\text{mg/L}$ ^[104]。除了全局调控之外，选取在工业化生产中表现优秀的菌株或者构建出可以投入工业化生产的菌株作为人工多菌体系的成员菌株，有利于缩短从实验室发酵到工业化的距离。

目前发表的人工多菌体系多为双菌体系，即包含两种执行不同功能的菌株，而且包含同种属菌株的人工多菌体系较多，因为相比之下包含不同种属菌株的人工多菌体系在培养条件和菌间调控的要求较高，增加了操作成本。另外，包含3种及以上成员菌的人工多菌体系报道极少，除了培养条件优化的难度与双菌体系相比更高，体系内菌间互作机制变得更加复杂，不利于后期的探究与体系改造。然而，包含多种成员菌的人工多菌体系拥有容纳和执行更加复杂的生物学功能的潜力，因此，研究人员需要将更多的注意力放在人工多菌体系研究方法的开发上。例如，随着生物信息学与多组学技术的快速发展，开发新的数学算法，

建立高精度全基因组代谢网络模型，理性指导多菌体系的构建有望成为研究新趋势。相信在未来几年中，更高效、更具成本效益的人工多菌体系的开发将成为现实，生产出更多的高价值生物产品，推动绿色生物制造的发展。

参 考 文 献

- [1] BITTIHN P, DIN M O, TSIMRING L S, et al. Rational engineering of synthetic microbial systems: from single cells to consortia[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 45: 92-99.
- [2] WU Jiwen, DONG Lili, ZHOU Chunshuang, et al. Developing a coculture for enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bioresource Technology Reports*, 2019, 6: 223-228.
- [3] LINDEMANN S R, BERNSTEIN H C, SONG H S, et al. Engineering microbial consortia for controllable outputs[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(9): 2077-2084.
- [4] DENG Yu, MA Lizhou, MAO Yin. Biological production of adipic acid from renewable substrates: current and future methods [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 105: 16-26.
- [5] KHALIL A S, COLLINS J J. Synthetic biology: applications come of age [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(5): 367-379.
- [6] CHAE T U, CHOI S Y, KIM J W, et al. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 47: 67-82.
- [7] ZHANG H R, WANG X N. Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 37: 114-121.
- [8] LEE C R, KIM C, SONG Y E, et al. Co-culture-based biological carbon monoxide conversion by *Citrobacter amalonaticus* Y19 and *Sporomusa ovata* via a reducing-equivalent transfer mediator [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 259: 128-135.
- [9] LIU Y Q, TU X H, XU Q, et al. Engineered monoculture and co-culture of methylotrophic yeast for *de novo* production of monacolin J and lovastatin from methanol [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 189-199.
- [10] SGOBBA E, WENDISCH V F. Synthetic microbial consortia for small molecule production [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 72-79.
- [11] GAO L, XU T S, HUANG G, et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body [J]. *Protein & Cell*, 2018, 9(5): 488-500.
- [12] LI Z H, WANG X N, ZHANG H R. Balancing the non-linear rosmarinic acid biosynthetic pathway by modular co-culture engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 54: 1-11.

- [13] BEN SAID S, OR D. Synthetic microbial ecology: engineering habitats for modular consortia [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1125.
- [14] SHEN Y P, NIU F X, YAN Z B, et al. Recent advances in metabolically engineered microorganisms for the production of aromatic chemicals derived from aromatic amino acids[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 407.
- [15] ZHANG C Z, HONG K. Production of terpenoids by synthetic biology approaches [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 347.
- [16] PONTRELLI S, CHIU T Y, LAN E I, et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 16-46.
- [17] XU P, VANSIRI A, BHAN N, et al. ePathBrick: a synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(7): 256-266.
- [18] WU Y F, SHEN X L, YUAN Q P, et al. Metabolic engineering strategies for co-utilization of carbon sources in microbes [J]. *Bioengineering*, 2016, 3(1): 10.
- [19] DHARMADI Y, MURARKA A, GONZALEZ R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(5): 821-829.
- [20] ATSUMI S, CANN A F, CONNOR M R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production [J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 305-311.
- [21] CLOMBURG J M, GONZALEZ R. Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(2): 419-434.
- [22] GAO C, WANG S H, HU G P, et al. Engineering *Escherichia coli* for malate production by integrating modular pathway characterization with CRISPRi-guided multiplexed metabolic tuning [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(3): 661-672.
- [23] CHEN T T, ZHOU Y Y, LU Y H, et al. Advances in heterologous biosynthesis of plant and fungal natural products by modular co-culture engineering [J]. *Biotechnology Letters*, 2019, 41(1): 27-34.
- [24] ZHANG H R, STEPHANOPOULOS G. Co-culture engineering for microbial biosynthesis of 3-amino-benzoic acid in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(7): 981-987.
- [25] ZHOU K, QIAO K J, EDGAR S, et al. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(4): 377-383.
- [26] ROELL G W, ZHA J, CARR R R, et al. Engineering microbial consortia by division of labor [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 35.
- [27] NAKAGAWA A, MATSUMURA E, KOYANAGI T, et al. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli* [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10390.
- [28] WU G, YAN Q, JONES J A, et al. Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2016, 34(8): 652-664.
- [29] JONES J A, VERNACCHIO V R, COLLINS S M, et al. Complete biosynthesis of anthocyanins using *E. coli* polycultures [J]. *mBio*, 2017, 8(3): 00621-17.
- [30] JONES J A, WANG X. Use of bacterial co-cultures for the efficient production of chemicals [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 53: 33-38.
- [31] JIANG W, QIAO J B, BENTLEY G J, et al. Modular pathway engineering for the microbial production of branched-chain fatty alcohols [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 244.
- [32] XU P, GU Q, WANG W Y, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli* [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1409.
- [33] WU J J, DU G C, ZHOU J W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy [J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 16: 48-55.
- [34] LAYTON D S, TRINH C T. Engineering modular ester fermentative pathways in *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 26: 77-88.
- [35] GUO Xiaoyun, WANG Xiaonan, CHEN Tingting, et al. Comparing *E. coli* mono-cultures and co-cultures for biosynthesis of protocatechuic acid and hydroquinone [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 156: 107518.
- [36] SAINI M, LIN L J, CHIANG C J, et al. Synthetic consortium of *Escherichia coli* for *n*-butanol production by fermentation of the glucose-xylose mixture[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(46): 10040-10047.
- [37] FLORES A, AYLA E Z, NIELSEN D R, et al. Engineering a synthetic, catabolically orthogonal coculture system for enhanced conversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(5): 1089-1099.
- [38] VARDON D R, RORRER N A, SALVACHÚA D, et al. *cis,cis*-Muconic acid: separation and catalysis to bio-adipic acid for nylon-6,6 polymerization [J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(11): 3397-3413.
- [39] TONDRO H, MUSIVAND S, ZILOUEI H, et al. Biological production of hydrogen and acetone- butanol-ethanol from sugarcane bagasse and rice straw using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2020, 142: 105818.
- [40] WANG S J, TANG H Z, PENG F, et al. Metabolite-based mutualism enhances hydrogen production in a two-species microbi-

- al consortium [J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 82.
- [41] QIAN X J, CHEN L, SUI Y, et al. Biotechnological potential and applications of microbial consortia [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107500.
- [42] JIA X Q, LIU C, SONG H, et al. Design, analysis and application of synthetic microbial consortia [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2016, 1(2): 109-117.
- [43] ZHANG H R, PEREIRA B, LI Z J, et al. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(27): 8266-8271.
- [44] LIU Y R, YANG S Y, JIA X Q. Construction of a "nutrition supply-detoxification" coculture consortium for medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production with a glucose-xylose mixture [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(3): 343-354.
- [45] LU H Y, VILLADA J C, LEE P K H. Modular metabolic engineering for biobased chemical production [J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(2): 152-166.
- [46] FENG Y Y, YAO M D, WANG Y, et al. Advances in engineering UDP-sugar supply for recombinant biosynthesis of glycosides in microbes [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 41: 107538.
- [47] CHEN Z Y, SUN X X, LI Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial synthesis of monolignols [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 102-109.
- [48] ZHOU Y Y, LI Z H, WANG X N, et al. Establishing microbial cocultures for 3-hydroxybenzoic acid biosynthesis on glycerol [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(5): 389-395.
- [49] ZHANG H R, LI Z J, PEREIRA B, et al. Engineering *E. coli* — *E. coli* cocultures for production of muconic acid from glycerol [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 134.
- [50] GOERS L, FREEMONT P, POLIZZI K M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2014, 11(96): 20140065.
- [51] LIU Yue, DING Mingzhu, LING Wei, et al. A three-species microbial consortium for power generation [J]. *Energy & Environmental Science*, 2017, 10(7): 1600-1609.
- [52] JAWED K, YAZDANI S S, KOFFAS M A. Advances in the development and application of microbial consortia for metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2019, 9: e00095.
- [53] XIAO Y, BOWEN C H, LIU D, et al. Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis [J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(5): 339-344.
- [54] WEN Z Q, LEDESMA-AMARO R, LU M R, et al. Combined evolutionary engineering and genetic manipulation improve low pH tolerance and butanol production in a synthetic microbial *Clostridium* community [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(7): 2008-2022.
- [55] PARK H, PATEL A, HUNT K A, et al. Artificial consortium demonstrates emergent properties of enhanced cellulosic-sugar degradation and biofuel synthesis[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2020, 6(1): 59.
- [56] MINTY J J, SINGER M E, SCHOLZ S A, et al. Design and characterization of synthetic fungal-bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(36): 14592-14597.
- [57] SGOBBA E, STUMPF A K, VORTMANN M, et al. Synthetic *Escherichia coli-Corynebacterium glutamicum* consortia for L-lysine production from starch and sucrose [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 260: 302-310.
- [58] KONG W, MELDGIN D R, COLLINS J J, et al. Designing microbial consortia with defined social interactions [J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(8): 821-829.
- [59] ZHANG W, LIU H, LI X, et al. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae* [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2017, 17(9): 1021-1029.
- [60] LIU X, LI L L, LIU J C, et al. Metabolic engineering *Escherichia coli* for efficient production of icaraside D2 [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 1-12.
- [61] DOUGLAS A E. The microbial exometabolome: ecological resource and architect of microbial communities [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2020, 375(1798): 20190250.
- [62] LIU X, LI X B, JIANG J, et al. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 243-253.
- [63] MEE M T, COLLINS J J, CHURCH G M, et al. Syntrophic exchange in synthetic microbial communities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(20): E2149-E2156.
- [64] SONG H, DING M Z, JIA X Q, et al. Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(20): 6954-6981.
- [65] SANGANI A A, MCCULLY A L, LASARRE B, et al. Fermentative *Escherichia coli* makes a substantial contribution to H₂ production in coculture with phototrophic *Rhodospseudomonas palustris* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(14): fnz162.
- [66] BOURDAKOS N, MARSILI E, MAHADEVAN R. A defined co-culture of *Geobacter sulfurreducens* and *Escherichia coli* in a membrane-less microbial fuel cell [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(4): 709-18.
- [67] HARCOMBE W R, CHACÓN J M, ADAMOWICZ E M, et al. Evolution of bidirectional costly mutualism from byproduct consumption[J]. *Proceedings of the National Academy of Sci-*

- ences of the United States of America, 2018, 115(47): 12000-12004.
- [68] WANG Xiaonan, CABALES A, LI Zhenghong, et al. Biosensor-assisted high performing cell selection using an *E. coli* toxin/antitoxin system [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 144: 110-118.
- [69] WANG X N, POLICARPIO L, PRAJAPATI D, et al. Developing *E. coli-E. coli* co-cultures to overcome barriers of heterologous tryptamine biosynthesis [J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, 10: e00110.
- [70] ZENG J, BANERJEE A, KIM J, et al. A novel bioelectronic reporter system in living cells tested with a synthetic biological comparator [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 7275.
- [71] GUO X Y, LI Z H, WANG X N, et al. *De novo* phenol bioproduction from glucose using biosensor-assisted microbial coculture engineering [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(12): 3349-3359.
- [72] LAGANENKA L, SOURJIK V. Autoinducer 2-dependent *Escherichia coli* biofilm formation is enhanced in a dual-species coculture [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(5).
- [73] SCOTT S R, HASTY J. Quorum sensing communication modules for microbial consortia[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(9): 969-977.
- [74] KYLILIS N, TUZA Z A, STAN G B, et al. Tools for engineering coordinated system behaviour in synthetic microbial consortia [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2677.
- [75] SCOTT S R, DIN M O, BITTIHN P, et al. A stabilized microbial ecosystem of self-limiting bacteria using synthetic quorum-regulated lysis [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17083.
- [76] STEPHENS K, BENTLEY W E. Synthetic biology for manipulating quorum sensing in microbial consortia[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(8): 633-643.
- [77] STEPHENS K, POZO M, TSAO C Y, et al. Bacterial co-culture with cell signaling translator and growth controller modules for autonomously regulated culture composition [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4129.
- [78] DINH C V, CHEN X Y, PRATHER K L J. Development of a quorum-sensing based circuit for control of coculture population composition in a naringenin production system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(3): 590-597.
- [79] JOHNS N I, BLAZEJEWSKI T, GOMES A L, et al. Principles for designing synthetic microbial communities [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2016, 31: 146-153.
- [80] WANG Shaojie, MA Zhihong, SU Haijia. Two-step continuous hydrogen production by immobilized mixed culture on corn stalk [J]. *Renewable Energy*, 2018, 121: 230-235.
- [81] JOHNSTON T G, YUAN S F, WAGNER J M, et al. Compartmentalized microbes and co-cultures in hydrogels for on-demand bioproduction and preservation [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 563.
- [82] CHEN Y Y, GE J Y, WANG S J, et al. Insight into formation and biological characteristics of *Aspergillus tubingensis*-based aerobic granular sludge (AT-AGS) in wastewater treatment [J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 739: 140128.
- [83] XIONG W, WANG S J, ZHOU N, et al. Granulation enhancement and microbial community shift of tylosin-tolerant aerobic granular sludge on the treatment of tylosin wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 318: 124041.
- [84] SHAHAB R L, BRETHAUER S, DAVEY M P, et al. A heterogeneous microbial consortium producing short-chain fatty acids from lignocellulose [J]. *Science*, 2020, 369(6507): eabb1214.
- [85] MOUTINHO T J JR, PANAGIDES J C, BIGGS M B, et al. Novel co-culture plate enables growth dynamic-based assessment of contact-independent microbial interactions[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182163.
- [86] ZOMORRODI A R, SEGRÈ D. Synthetic ecology of microbes: Mathematical models and applications [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(5pt b): 837-861.
- [87] CHANDRASEKARAN S. A Protocol for the construction and curation of genome-scale integrated metabolic and regulatory network models [M]// SANTOS C N S, AJIKUMAR P K. *Microbial metabolic engineering: methods and protocols*. New York: Springer New York, 2019: 203-214.
- [88] GOMEZ J A, HÖFFNER K, BARTON P I. DFBAlab: a fast and reliable MATLAB code for dynamic flux balance analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15: 409.
- [89] CAI J Y, TAN T W, CHAN S H J. Bridging traditional evolutionary game theory and metabolic models for predicting Nash equilibrium of microbial metabolic interactions[EB/OL]. *bioRxiv*, 2019, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/623173v4>. DOI:10.1101/623173.
- [90] JADHAV A, SHANMUGHAM B, RAJENDIRAN A, et al. Unraveling novel broad-spectrum antibacterial targets in food and waterborne pathogens using comparative genomics and protein interaction network analysis[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 27: 300-308.
- [91] JONES J A, VERNACCHIO V R, SINKOE A L, et al. Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 35: 55-63.
- [92] HARCOMBE W R, RIEHL W J, DUKOVSKI I, et al. Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics [J]. *Cell Reports*, 2014, 7(4): 1104-1115.
- [93] SANTALA S, KARP M, SANTALA V. Rationally engineered synthetic coculture for improved biomass and product formation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e113786.

- [94] MCCARTY N S, LEDESMA-AMARO R. Synthetic biology tools to engineer microbial communities for biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(2): 181-197.
- [95] LÜ X M, GU J L, WANG F, et al. Combinatorial pathway optimization in *Escherichia coli* by directed co-evolution of rate-limiting enzymes and modular pathway engineering [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(12): 2661-2669.
- [96] HANLY T J, URELLO M, HENSON M A. Dynamic flux balance modeling of *S. cerevisiae* and *E. coli* co-cultures for efficient consumption of glucose/xylose mixtures [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2529-2541.
- [97] RODRIGUES J L, GOMES D, RODRIGUES L R. A combinatorial approach to optimize the production of curcuminoids from tyrosine in *Escherichia coli* [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 59.
- [98] CHEN Ye, KIM J K, HIRNING A J, et al. Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium [J]. Science, 2015, 349(6251): 986-989.
- [99] FIORE D, SALZANO D, CRISTÒBAL-CÓPPULO E, et al. Multicellular feedback control of a genetic toggle-switch in microbial consortia[J]. IEEE Control Systems Letters, 2021, 5(1): 151-156.
- [100] XIU Y, JANG S, JONES J A, et al. Naringenin-responsive ribo-switch-based fluorescent biosensor module for *Escherichia coli* co-cultures [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(10): 2235-2244.
- [101] XIA Tian, ALTMAN E, EITEMAN M A. Succinate production from xylose-glucose mixtures using a consortium of engineered *Escherichia coli* [J]. Engineering in Life Sciences, 2015, 15(1): 65-72.
- [102] LI T Z, ZHOU W, BI H P, et al. Production of caffeoylmalic acid from glucose in engineered *Escherichia coli* [J]. Biotechnology Letters, 2018, 40(7): 1057-1065.
- [103] GANESAN V, LI Z H, WANG X N, et al. Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2017, 2(3): 236-242.
- [104] SUN J, RAZA M, SUN X X, et al. Biosynthesis of adipic acid via microaerobic hydrogenation of *cis,cis*-muconic acid by oxygen-sensitive enoate reductase [J]. Biotechnology Journal, 2018, 280: 49-54.



通讯作者：苏海佳(1970—),女,教授,博士生导师。研究方向为合成生物学、生物分离、工业水处理、生物环境材料等。

E-mail: suhj@mail.buct.edu.cn



通讯作者：王少杰(1991—),男,博士后。研究方向为合成生物学与生物能源。

E-mail: wangshaojie0711@sjtu.edu.cn



第一作者：刘裕(1997—),女,硕士研究生。研究方向为基于合成生物学的人工多菌体系构建。

E-mail: 983381329@qq.com

广告索引:武汉国家生物产业基地(后彩一)/国家合成生物技术创新中心(后彩二)/诚志生命科技有限公司(封三)