

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-053

微生物共培养生产化学品的研究进展

李向来, 申晓林, 王佳, 袁其朋, 孙新晓

(北京化工大学, 化工资源有效利用国家重点实验室, 北京 100029)

摘要: 生物合成已成为化学品绿色制造的重要方式。传统上, 微生物合成化学品以单菌株培养为主。然而, 单培养经常存在引入复杂途径造成沉重代谢负担、细胞微环境无法满足所有酶的功能性表达以及不同途径模块之间相互干扰等问题。借鉴自然界中普遍存在的共生现象, 研究者开发了共培养技术, 通过在同一体系中培养两种或多种细胞, 以充分模拟自然共生环境, 实现不同物种之间能量、物质及信号的交流, 达到劳动分工以及代谢分区的目的。该技术在减轻宿主代谢负担、提供适宜的酶催化环境以及底物共利用方面表现出突出优势。不过作为一种新兴技术, 微生物共培养技术在菌群稳定性、物种兼容性以及菌群比例调控等方面还存在一些挑战。本文列举了近年来微生物共培养划分长途径减轻代谢负担以及利用复杂、混合、非常规底物生产化学品和扩大化学品多样性的成功案例, 总结了通过群体感应调控菌群比例以及通过计算机模拟工具预测菌群动态变化的研究进展, 并对设计复杂稳定可控的共培养体系在高效生产化学品方面的应用前景和挑战进行了讨论。共培养技术有望成为合成复杂化学品的重要策略, 并推动合成生物学的发展。

关键词: 共培养; 生物合成; 劳动分工; 群体感应; 计算机模拟

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

Recent advances in biosynthesis of chemicals by microbial co-culture

LI Xianglai, SHEN Xiaolin, WANG Jia, YUAN Qipeng, SUN Xinxiao

(State Key Laboratory of Chemical Resources Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Biosynthesis has become an important way of green manufacturing of chemicals. Traditionally, microbial synthesis of chemicals mainly uses a single strain. However, mono-culture often has the following problems: (1) Introduction of complex pathways causes heavy metabolic burden, (2) the cell microenvironment cannot fulfil the functional expression of all enzymes in the pathways, and (3) the mutual interference between modules of different pathways. Inspired by the natural symbiosis, researchers have developed co-culture technology. By cultivating two or more different cells in the same system, they can fully simulate the natural symbiosis environment, realizing the exchange of energy, materials and signals between different species and

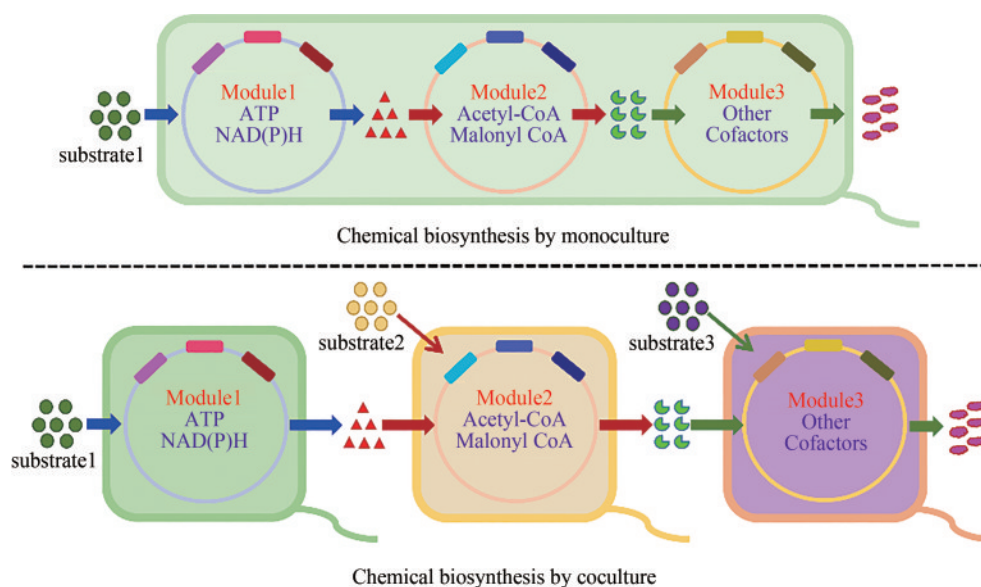
收稿日期: 2020-04-18 修回日期: 2021-01-15

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0901800); 北京化工大学双一流项目 (XK1802-8, XK1902)

引用本文: 李向来, 申晓林, 王佳, 袁其朋, 孙新晓. 微生物共培养生产化学品的研究进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 876-885

Citation: LI Xianglai, SHEN Xiaolin, WANG Jia, YUAN Qipeng, SUN Xinxiao. Recent advances in biosynthesis of chemicals by microbial co-culture [J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 876-885

achieving the purpose of division of labor and metabolic compartmentation. This technology shows outstanding advantages in reduction of the metabolic burden and provision of suitable environment for different enzymes. Co-culture strategy can also be applied in the aspect of utilizing complex (*e.g.* lignocellulose), mixed (*e.g.* glucose/xylose/arabinose) or nonconventional (methane, CO and CO₂) carbon sources. Synthesis of the target products competes with the native metabolism for precursors, energy and other resources. Introduction of long pathways in a single strain may cause severe metabolic burden. Splitting and distributing pathways to different cells can alleviate such burden. In addition, each module can be optimized independently, and the balance between the modules can be achieved by adjusting the proportion of strains. Studies have shown that co-culture can significantly affect microbial metabolism and activate silent biosynthetic pathways. In recent years, hundreds of new compounds including polyketones, macrolides and diterpenes have been discovered through co-culture techniques. As an emerging technology, microbial co-culture still has many challenges in the prediction and control of the proportion of different strains. This review lists recent successful cases of microbial co-culture to produce chemicals, summarizes the research progress on regulating the strain proportion through quorum sensing and predicting the dynamic changes through computer simulation tools. Finally, the prospects and challenges in this emerging technology is also discussed.



Keywords: co-culture; biosynthesis; division of labor; quorum sensing; computational simulation

随着合成生物学的发展，生物合成已成为化学品制造的重要方式^[1]。理论上，途径已知的任何化学品都可通过生物合成由廉价碳源实现生产。传统上，微生物合成化学品以单菌株培养为主，即单一细胞携带完整的代谢途径。目前通过单培养已实现许多化学品的工业化生产，但在合成长途径及复杂途径化学品时还存在较大挑战，生产性能往往达不到工业应用要求。代谢负担和代谢

压力是影响生产性能的重要障碍：合成途径与细胞生长竞争有限的资源；途径的引入可能会打破宿主原有的物质能量代谢平衡；终产物及中间体的积累可能会产生细胞毒性。另外，由于宿主细胞缺乏内膜结构及翻译后修饰系统，无法为某些外源酶的功能表达提供合适的细胞微环境。针对上述问题，借鉴自然界中的共生现象，研究者开发了共培养技术，通过在同一体系中培养两种或

多种细胞实现劳动分工及代谢分区。与单培养相比,共培养在减轻宿主代谢负担^[2-3]、提供合适的酶催化环境^[4]以及复杂/混合/非常规底物利用^[5-9]等方面具有显著优势,甚至可以合成通过单培养无法合成的化学品^[10-11]。

1 微生物共培养减轻代谢负担生产化学品

目标产物合成与细胞自身代谢竞争前体和能量等资源。在单一菌株中引入复杂途径可能会导致严重的代谢负担。将途径拆分并分配至不同细胞可分担代谢压力。此外,各模块可单独进行表达优化,通过菌株比例的调节可实现模块间的平衡。近来,在共培养减轻代谢负担生产化学品方面取得诸多研究进展(表1)。

在生物合成黄烷醇的过程中,研究者基于对辅因子和前体的不同需求,将途径拆分为上游丙二酰辅酶A依赖性模块和下游NADPH依赖性模块,并分配到两个大肠杆菌菌株中。通过启动子文库对上游途径进行表达优化,并对组成下游途径的基因进行组合优化。接着,对共培养体系的诱导时间、诱导温度、接种比例和碳源4个参数进行了优化,并基于初始优化数据建立了经验尺度的高斯模型,预测最佳生产条件,最终产量达到40.7 mg/L,较单培养产量提高970倍^[12]。

除了线性途径,共培养策略在非线性途径的平衡优化方面也具有突出优势。例如,迷迭香酸(RA)是一种植物多酚类活性天然产物,其合成途径属于分支-汇聚型。RA的两种结构单元咖啡酸

(CA)和丹酚酸(SAA)均来自同一前体酪氨酸,存在竞争关系;另外两者按等摩尔比酯化生成RA,又存在协同关系。单培养策略很难达到两个模块之间的微妙平衡,以实现代谢资源的合理分配。为此,研究者将RA的生物合成途径拆分为3个模块(CA模块、SAA模块以及RA模块)并分配到3种大肠杆菌工程菌株中。CA模块包含3种酶,将4-羟基苯丙酮酸转化为CA;SAA模块包含羟化和还原两步反应,将4-羟基苯丙酮酸催化为SAA;RA模块先将CA转化为咖啡酰辅酶A,然后迷迭香酸合成酶催化咖啡酰辅酶A和SAA生成RA。为了增加体系的稳定性,通过改造使得CA和RA合成菌株优先利用葡萄糖生长,而SAA合成菌株利用木糖生长,优化接种比例后RA产量达到172 mg/L,较单培养提高38倍^[13]。

当单独优化的菌株进行物理混合和共培养时,菌群比例经常发生动态变化。由于生长竞争和代谢压力,共存状态可能会崩溃。除了上述碳源的选择性利用,研究者还通过建立互利共生关系来提高菌株比例的稳定性。例如,Liu等^[14]建立了交叉喂养的共培养体系用于红景天苷的生物合成。前期的研究表明大肠杆菌单培养合成红景天苷效率低下,大量中间体酪醇未被糖基化。为此,将其合成途径分为酪醇生产模块以及UDP-葡萄糖和红景天苷生物合成模块,并分别导入代谢木糖的苯丙氨酸缺陷菌株和代谢葡萄糖的酪氨酸缺陷菌株。通过酪氨酸和苯丙氨酸的营养共生,形成了稳定的大肠杆菌共培养系统,红景天苷最终产量达6.03 g/L,较单培养提高20倍。

此外,共培养策略还成功应用于木质醇、黏糠酸、苯酚、白藜芦醇等化合物的生物合成^[15-23]。

表1 共培养生产化学品的代表性研究进展汇总

Tab. 1 Summary of representative research progresses on microbial co-culture to produce chemicals

共培养体系	产物	产量/(mg/L)	较单培养提高	参考文献
大肠杆菌/酿酒酵母	氧化紫杉烷	33	单培养无产物	[4]
大肠杆菌	黄烷醇	40.7	970倍	[12]
大肠杆菌	迷迭香酸	172	38倍	[13]
大肠杆菌	红景天苷	6030(罐)	20倍	[14]
大肠杆菌	咖啡醇	401	12倍	[15]
大肠杆菌	黏糠酸	682	19倍	[16]
大肠杆菌	苯酚	210	3.9倍	[17]
大肠杆菌	柚皮素	24	35%	[18]

2 微生物共培养利用复杂、混合及非常规底物生产化学品

联合生物加工 (CBP) 旨在直接将木质纤维素生物质转化为燃料及化学品。然而, 工业生产菌株往往不具有木质纤维素降解能力, 而木质纤维素降解菌株生产能力较弱或者缺乏遗传操作工具。研究者尝试构建可将纤维素转化为乙醇或其他燃料的单一菌株。例如, 表面展示纤维小体的酿酒酵母可利用微晶纤维素生产乙醇^[24]。然而, 单菌株既要分泌纤维素酶又要合成产物, 代谢负担往往较重, 影响最终产量。为此, 研究者尝试共培养策略进行劳动分工, 其中一种菌株分泌纤维素酶, 另一菌株将水解产生的单糖转化成产物。例如, 可水解纤维素的梭状芽孢杆菌和产乙醇的嗜热厌氧菌混合培养, 乙醇产量较单培养提高 4.4 倍^[25]。Nakayama 等^[26] 设计嗜热厌氧梭菌和淀粉产丁醇梭菌的共培养体系, 直接由纤维素生产丁醇。然而, 由于两种菌株最适生长温度不匹配, 需要进行高温糖化和中温发酵两阶段培养, 增加了过程能耗及复杂性。为此, Wang 等^[6] 通过富集培养获得了中温条件下稳定高效降解纤维素的微生物菌群 N3, 并对组成菌株进行了分类鉴定, 其中快生梭菌 N3-2 具有最佳的纤维素降解效率, 进而分别建立了 N3 和 N3-2 与丙酮丁醇梭菌的共培养体系, 结果表明前者具有较高的丁醇生产效率, 产量可达 3.73 g/L。其他的应用实例还包括里氏木霉/大肠杆菌共培养产异丁醇、里氏木霉/德氏根霉共培养产富马酸等^[7, 27]。

木质纤维素水解液含有葡萄糖、木糖和阿拉伯糖等单糖。葡萄糖效应的存在限制了碳源共利用。通过定向进化及表达相关转运蛋白可实现单菌株同时利用葡萄糖和木糖^[28-30]。此外, 通过共培养策略也可实现碳源共利用。例如, 3 种工程酵母菌株共培养可以发酵葡萄糖-木糖-阿拉伯糖的混合物, 与可代谢 3 种糖的单菌株相比, 驯化后的共培养菌株在长时间重复批次培养时具有更稳定的发酵动力学^[31]。共培养策略还用于甲烷、CO 等非常规碳源的利用。例如, Hill 等^[32] 设计了蓝细菌-甲烷氧化菌共培养体系, 实现光合作用与甲烷氧化

相偶联, 将温室气体 CH_4 和 CO_2 等转化为微生物生物量, 通过光照控制可以实现体系的连续稳态运行。该体系在沼气和天然气等混合气体中生长良好, 且与传统的甲烷异养菌单培养相比, 不需要输入 CH_4/O_2 混合气体, 提高了过程的安全性。重要的是上述两种细菌均可进行代谢工程改造, 因此该平台可进行扩展, 以 CH_4 为廉价原料合成各种化学品。Lee 等^[33] 设计了柠檬酸杆菌与卵形鼠孢菌的共培养体系用于 CO 转化。柠檬酸杆菌可通过 CO 脱氢酶将 CO 和 H_2O 转化成 CO_2 和 H_2 , 卵形鼠孢菌进而将 CO_2 和 H_2 转化成乙酸, 共培养乙酸产量较卵形鼠孢菌单培养提高 82%。另外, 通过自养微生物 (蓝细菌等) 和异养微生物 (细菌、酵母及真菌等) 共培养可以直接通过光合作用固定 CO_2 合成化学品^[34-39]。

3 微生物共培养扩大化学品多样性

微生物是各种活性化合物的重要来源。通过基因组测序分析后发现微生物中天然产物基因簇的数量远远超过实验室条件下检测到的化合物的数量, 原因之一是单培养条件下缺乏生物或化学刺激, 导致合成途径处于沉默状态^[40]。自然条件下, 微生物共生形成群落, 相互之间存在物质及信息交流。研究表明共培养可显著影响微生物代谢^[41]。近年来, 液质联用等分析技术的发展促进了共培养诱导天然产物合成的研究^[42]。通过共培养技术已发现包括聚酮、大环内酯及二萜等数百种新化合物^[43-48]。例如, 通过共培养土栖棘壳孢 (*Setophoma terrestris*) 和解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquifaciens*), Arora 等^[49] 分离到一种新的聚酮化合物 Blennolide K。从稻黑孢霉 (*Nigrospora oryzae*) 和白囊耙齿菌 (*Irpex lacteus*) 的共培养体系中, Zhou 等^[50] 分离到 5 种新的倍半萜烯化合物。

如上所述, 共培养技术在化学品的生产和发现方面取得了重要进展。为了更好地预测及控制菌株比例, 近年来研究者在调控工具开发及计算机模拟方面开展工作, 以推动共培养技术的进步。

4 群体感应调控菌群比例

在微生物共培养中，成员之间的密度比例是系统功能的决定因素之一，影响到系统稳定、基因表达以及生产效率，因此控制共培养中种群密度比例的方法至关重要。由于多细胞共培养各成员之间复杂的相互作用，往往共培养环境中一个微小的变化就会引起密度比例的大幅波动。因此，想要在实际生产中构建出符合人们期望比例的或者比例能够随生产环境变化而变化的共培养系统还面临巨大挑战。目前，关于控制共培养种群密度比例的研究还比较少，最常用的手段包括调节接种比例、微流体以及固定化培养等。这些方法还难以实现群体比例的过程控制。为此，研究者尝试利用群体感应（QS）等策略实现群体比例的自主调控（图1）。

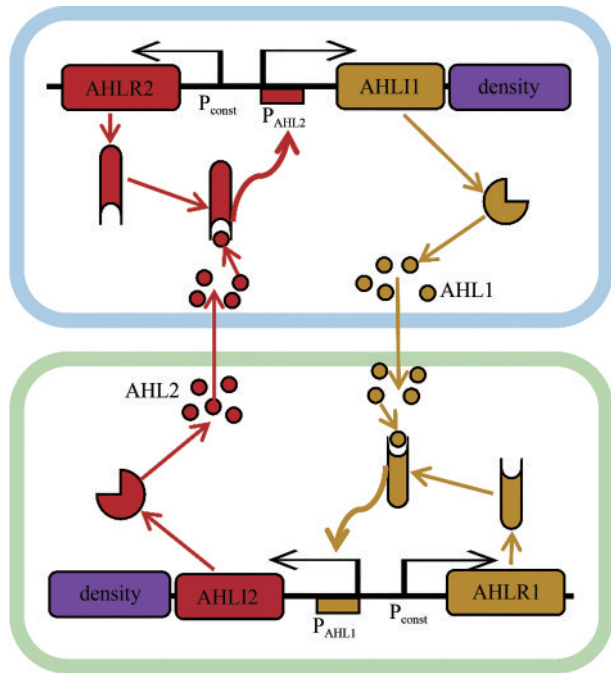


图1 基于群体感应的共培养体系

Fig. 1 A quorum sensing-based co-culture system

QS系统由于其简单的遗传结构和天然的多变性，已广泛用于工程化细胞间的通信，其中代表性的是以小分子酰基高丝氨酸内酯（AHL）为信号分子的QS系统。AHL由酰基高丝氨酸内酯合成酶合成，不同来源的合成酶产生不同结构的AHL信号分子，并响应不同的QS系统。在运用QS的

微生物共培养系统中，一种微生物经过工程化设计可以合成某种特定的AHL信号分子。该信号分子可在细胞内外环境中扩散并与对应的转录因子蛋白结合并形成活化的复合物，激活特定的QS启动子并启动下游基因转录^[51]。来自费氏弧菌和铜绿假单胞菌的lux和las系统是最常用的QS系统，均有着灵敏的信号响应性、对同源AHL信号分子的特异性以及与大肠杆菌的相容性，已被广泛应用于合成生物学^[52]。为了扩大QS系统的多样化运用，tra、rpa、rhl、cin和esa等新型QS系统得到开发^[53-54]。

Chen等^[55]使用两种不同的QS系统来构建“激活”菌株和“阻遏”菌株，其中“激活”菌株（rhl系统）在rhl-AHL信号分子存在下可激活两种菌株中目标基因的转录，而“阻遏”菌株（cin系统）在cin-AHL信号分子存在下通过表达阻遏物LacI同时降低两种菌株中靶基因的转录。此外，cin-AHL还将直接激活AiiA的表达，该酶可降解上述两种信号分子，起到负反馈作用。当两种菌株共培养时，这两种信号调控机制会共同在种群水平上产生耦合的正反馈和负反馈调节，并且由于AiiA的存在，这种负反馈的引入将紧密调节阻遏物的浓度，对共培养系统的种群密度稳定具有关键作用。而最终的结果表明，采用这种双QS系统构建的共培养体系具有很强的鲁棒性，与启动子工程结合后可成功实现种群密度的动态调控。

Scott等^[56]利用lux和rpa QS系统成功设计出以两个菌株同步裂解为动态调控核心的共培养系统。两种菌株分别携带lux和rpa系统，并表达对应的信号分子lux-AHL和rpa-AHL。随着共培养菌株密度的增长，当两个菌株中各自的AHL分子浓度达到一定的阈值时，将分别激活对应的启动子并促使细胞裂解蛋白X174的表达，造成菌株裂解，以达到调控种群密度的目的。之后，未裂解的菌株将会继续生长，并在达到下一次阈值时开始裂解循环。当维持两种信号分子处于低浓度时，共培养系统将发生恒定裂解，即生长与裂解持平，而种群密度将保持在特定的比例。

McCardell等^[57]设计大肠杆菌共培养体系，通过两个正交的QS系统控制毒素的产生，以维持特定的种群比例。通过诱导剂IPTG或aTc的诱导，

两种菌株产生不同的AHL分子，在激活自身CcdB的表达（一种细菌毒蛋白，可促使DNA裂解并阻止转录）的同时还将激活另一菌株中CcdA的表达（一种抗毒素，可抑制CcdB）。在人工添加相应诱导剂的情况下，高密度菌株表达CcdB抑制自身生长，同时促进另一菌株表达CcdA而继续正常生长。通过改变IPTG和aTc诱导剂的浓度，可以调节两种菌株的密度达到特定比值。

AI-2是一种存在于许多细菌中的自动诱导分子，能广泛响应细菌的种群密度^[58]。Stephens等^[59]基于AI-2的诱导特性，在*E. coli*中构建了一种新型的共培养系统，并成功实现种群密度比例的动态调控以及预测。该系统首先构建了一个能感应AI-2并能将其转化为正交QS信号AI-1的菌株。产生的AI-1信号自由扩散进第2种菌株，并激活PtsH蛋白表达，通过增强葡萄糖转运促进细胞生长，通过动态控制第2种菌株生长速率达到调节菌群比例的目的。最后，以初始AI-2的不同响应浓度为函数的主要变量，创建出能预测最终种群比例的数学模型，并在该模型指导下，证明这种新型的调控系统在一定种群比例范围内的可靠性。

5 计算机模拟工具预测菌群动态变化

生物系统具有复杂性，通常需要计算模型指导代谢网络的设计改造，以使工程菌株按照设计执行功能。共培养体系的功能分析可以借助典型的微生物组工具，包括细胞群落特定组分分析、宏基因组测序、宏转录组学和宏蛋白质组学等。此外，微流体细胞分选技术可以分离单个物种^[60]，用于研究它们的DNA、RNA或蛋白质特征。同时，对代谢物的实时监测还可以研究共培养组分的整体动态变化。结合这些数据分析手段，越来越多的微生物群落的计算机模拟工具被成功开发。

基因组规模模型（GSMs）是一种基于全基因组序列的模拟方法。该方法将目前所有已知的调控代谢的反应合并到合适的数学分析网络中，再结合菌株生产目标以及相关的约束条件进行共培养模拟，用以预测菌株在不同底物上的生长情况、特定基因敲除对细胞代谢的影响以及菌株间可能的相互作用等微生物功能。目前，GSMs已被应用

于微生物共培养模式及其相互作用机制的研究。例如，Koch等^[61]利用化学计量模型预测微生物群落的组成，并应用于沼气生产过程。通过模拟得到3种微生物分别在单培养、双培养和三培养情况下的全部化学反应，并利用分级优化的方法对生长速率、底物利用率以及产量进行逐级优化，成功预测了在不同底物下的种群组成、不同生长速率对最大甲烷产量的影响以及实现最大甲烷产量的最佳营养成分。更重要的是，GSMs操作简便，易将单培养模型推及双培养甚至三培养，有利于实现能量、物质的最佳化共用以及多物种间复杂相互作用的研究。结合基因表达或翻译数据作为反应限制条件，这些模型还可用于捕获DNA→RNA→蛋白质的信息传递，已被用于研究未经人工培养的共生菌并鉴定其代谢缺陷^[62-63]。

通量平衡分析（FBA）是一种在基因组规模模型基础上建立的模拟代谢网络的方法。该方法只需知道共培养中每个反应的化学计量系数，就可以对微生物群落中几乎所有的代谢相互作用进行建模，并使其适应特定的环境变化。此外，FBA还可用于预测在不同碳源中菌株的生长速度和某种代谢物的生产速度。例如，Stolyar等^[64]研究了以乳酸为唯一碳源和能源的脱硫弧菌和马氏甲烷球菌的共生系统，通过FBA模型将不同代谢物间的相互关系和代谢物在化学反应中的通量以一系列的线性方程表示，以参与甲烷生产的170个反应为模型的核心反应，并考虑不同共培养环境和物种遗传干扰带来的影响，将建模结果与在连续生物反应器中共培养数据进行比较，发现该模型可准确预测群落组成、代谢通量以及生长表型。

然而，FBA是一种伪稳态模型系统，其模型较为理想化。在处理多微生物群落的复杂时空动态变化时，还需要采用动态通量平衡分析（dFBA）。dFBA是在FBA的基础上充分考虑共培养体系中各种可能的变化后建立的。其可以模拟各个稳态模型在不同共培养时间阶段的相互作用。此外，在dFBA中，通过监测关键中心代谢产物可以验证模型准确性。目前已经开发了针对多种微生物共培养的dFBA。例如，在纤维素分解梭菌和产溶剂丙酮丁醇梭菌的共培养模型中，dFBA被用

来预测动态菌群比例、群落间相互作用以及基因表达水平^[65]。常微分方程模型被用来模拟不同的共培养相互作用类型（互利共生、偏利共生等）。例如，Kong等^[66]以营养成分、两种菌株及各自所产生的相互作用分子为主要变量，结合生长速率、相互作用强度等因素，再通过模块化途径重构与计算机模拟，构建了6种不同作用方式的乳酸乳球菌双菌株共培养体系，进一步由简至繁，推测出三菌株以及四菌株的共培养模型，并成功预测其种群动态、种群行为以及相关的动力学特征。另外，研究者基于Monod微分方程开发了计算机模型，成功预测以碳源（有机酸）和氮源（铵）营养共生的大肠杆菌和沼泽红假单胞菌的最佳发酵条件，并形成了稳定的共培养体系^[67]。模型结果表明，大肠杆菌产生的有机酸（如甲酸、乙酸和乳酸等）具有抑制作用，将会降低碳的利用效率和破坏种群平衡。

6 挑战和展望

随着合成生物学的发展，微生物共培养已成为化学品生物合成的新方法。利用该方法，不仅可以减轻代谢负担实现复杂化合物的合成，还可以充分发挥不同物种的优势和能力，利用低劣生物物质以提高目标产品经济性。虽然微生物共培养已经展现出许多优势，但目前仍存在一些问题和挑战。首先，共培养体系是一个动态变化的系统，难以实现长期的稳定。由于成员生长速度不同或者异源物种不兼容，通常出现某一成员完全取代另一成员的情况，导致生产性能降低甚至共培养系统完全破坏。虽然已有许多研究通过QS系统来保持种群的稳定性，但是这些系统在进行长时间的发酵时也表现欠佳。目前，保持种群稳定性的最有效方法是建立个体成员间牢固的互利互惠或共生关系。其次，共培养体系各成员间可控的种群比例也是一个值得关注的问题。可控的种群比例对于生产途径中的代谢通量平衡至关重要，可实现目标产物的最优化生产。然而，共培养成员间的相互作用是复杂多样的，往往一个微小的变化都会引起种群比例的巨大变化，从而导致通量平衡被破坏。尽管以前的研究通过表达裂

解蛋白^[56]、毒素蛋白^[57]或其他负反馈抑制机制^[55]来阻止细菌生长从而调控种群比例，但是这些研究不仅将产生额外的代谢压力，这种抑制性的种群比例调控方式还将导致巨大的生物质浪费。同时，随着共培养体系中所包含的成员越多，解决这个问题的难度将越来越大。目前，解决这个问题最可能有效的方法是通过QS系统或其他常规小分子响应器来正向调控共培养体系成员的生长，例如Stephens等^[59]的研究，而非阻止或杀死。此外，中间体的转运也是一个关键的问题^[68]。途径的拆分意味着中间体需要从一个菌株转运到另一个菌株。但是某些化合物不能自由通过细胞膜或者不能被第二菌株摄取。面对这种情况，通常需要表达额外的转运蛋白。最后，异源菌株的共培养是面临的另一挑战。不同种属的菌株有着不同的生物合成能力，例如，酿酒酵母具有完善的蛋白表达修饰机制和丰富的细胞内膜，是表达细胞色素P450s的理想宿主^[69]，而枯草芽孢杆菌可利用自身合成的生物表面活性剂来提高疏水有机化合物的生物利用度，其已被广泛应用于原油的降解等^[70-71]。因此，利用异种菌株的共培养来生产化学品前景广阔，但不同种菌株的生长生产条件差异显著，将造成物种间不兼容。未来，微生物共培养的发展将受益于合成生物学相关技术的进展，包括基因组工程、宏蛋白质组学、宏代谢组学以及CRISPR/Cas工具等。微生物共培养未来发展的一个方向是更广泛地兼容多物种共培养，以利用不同物种的生物合成能力。这对于植物和真菌的天然产物生物合成具有特别意义，因为在共培养中使用真核生物对于植物和真菌天然产物途径酶的功能性表达非常有益。未来发展的另一个方向是开发针对萜类化合物和生物碱等结构更复杂的化合物的高效合成共培养策略。总体而言，通过一系列元件、工具及模型的开发，上述问题和挑战将逐步得到解决，未来将可设计复杂稳定可控的共培养体系应用于化学品的高效生产。

致谢:感谢国家重点研发计划项目(2018YFA0901800)及北京化工大学双一流项目(XK1802-8, XK1902)对本研究的支持。

参 考 文 献

- [1] SUN X X, SHEN X L, JAIN R, et al. Synthesis of chemicals by metabolic engineering of microbes[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(11): 3760-3785.
- [2] DE LIMA BROSSI M J, JIMÉNEZ D J, CORTES-TOLALPA L, et al. Soil-derived microbial consortia enriched with different plant biomass reveal distinct players acting in lignocellulose degradation[J]. *Microbial Ecology*, 2016, 71(3): 616-627.
- [3] BILIOURIS K, BABSON D, SCHMIDT-DANNERT C, et al. Stochastic simulations of a synthetic bacteria-yeast ecosystem[J]. *BMC Systems Biology*, 2012, 6: 58.
- [4] 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.
- [5] HANLY T J, HENSON M A. Dynamic flux balance modeling of microbial co-cultures for efficient batch fermentation of glucose and xylose mixtures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(2): 376-385.
- [6] WANG Z Y, CAO G L, ZHENG J, et al. Developing a mesophilic co-culture for direct conversion of cellulose to butanol in consolidated bioprocess[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1):84.
- [7] SCHOLZ S A, GRAVES I, MINTY J J, et al. Production of cellulosic organic acids *via* synthetic fungal consortia[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(4): 1096-1100.
- [8] JIANG Y J, ZHANG T, LU J S, et al. Microbial co-culturing systems: butanol production from organic wastes through consolidated bioprocessing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(13): 5419-5425.
- [9] JIANG Y J, GUO D, LU J S, et al. Consolidated bioprocessing of butanol production from xylan by a thermophilic and butanogenic *Thermoanaerobacterium* sp. M5[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 89.
- [10] ROELL G W, ZHA J, CARR R R, et al. Engineering microbial consortia by division of labor[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 1-11.
- [11] ZHANG H R, WANG X N. Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 37: 114-121.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] THUAN N H, TRUNG N T, CUONG N X, et al. *Escherichia coli* modular coculture system for resveratrol glucosides production[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(6): 1-13.
- [20] THUAN N H, CHAUDHARY A K, CUONG D V, et al. Engineering co-culture system for production of apigenin in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(3): 175-185.
- [21] CAMACHO-ZARAGOZA J M, HERNÁNDEZ-CHÁVEZ G, MORENO-AVITIA F, et al. Engineering of a microbial coculture of *Escherichia coli* strains for the biosynthesis of resveratrol[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 1-11.
- [22] AKDEMIR H, SILVA A, ZHA J, et al. Production of pyranonanthocyanins using *Escherichia coli* co-cultures[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 290-298.
- [23] 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]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 280: 49-54.
- [24] FAN L H, ZHANG Z J, YU X Y, et al. Self-surface assembly of cellulosomes with two miniscaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(33): 13260-13265.
- [25] HE Q, HEMME C L, JIANG H L, et al. Mechanisms of enhanced cellulosic bioethanol fermentation by co-cultivation of *Clostridium* and *Thermoanaerobacter* spp.[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(20):9586-9592.
- [26] NAKAYAMA S, KIYOSHI K, KADOKURA T, et al. Butanol production from crystalline cellulose by cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77

- (18): 6470-6475.
- [27] 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.
- [28] WANG M, YU C Z, ZHAO H M. Directed evolution of xylose specific transporters to facilitate glucose-xylose co-utilization[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(3): 484-491.
- [29] SEDLAK M, HO N W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast[J]. Yeast, 2004, 21(8):671-684.
- [30] LI H B, SCHMITZ O, ALPER H S. Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(23): 10215-10223.
- [31] VERHOEVEN M D, DE VALK S C, DARAN J M G, et al. Fermentation of glucose-xylose-arabinose mixtures by a synthetic consortium of single-sugar-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. FEMS Yeast Research, 2018, 18(8): foy075.
- [32] HILL E A, CHRISLER W B, BELIAEV A S, et al. A flexible microbial co-culture platform for simultaneous utilization of methane and carbon dioxide from gas feedstocks[J]. Bioresource Technology, 2017, 228: 250-256.
- [33] 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.
- [34] WEISS T L, YOUNG E J, DUCAT D C. A synthetic, light-driven consortium of cyanobacteria and heterotrophic bacteria enables stable polyhydroxybutyrate production[J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 236-245.
- [35] DUCAT D C, AVELAR-RIVAS J A, WAY J C, et al. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(8): 2660-2668.
- [36] SMITH M J, FRANCIS M B. A designed *A. vinelandii*-*S. elongatus* coculture for chemical photoproduction from air, water, phosphate, and trace metals[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(9): 955-961.
- [37] HAYS S G, YAN L L W, SILVER P A, et al. Synthetic photosynthetic consortia define interactions leading to robustness and photoproduction[J]. Journal of Biological Engineering, 2017, 11: 4.
- [38] LI T, LI C-T, BUTLER K, et al. Mimicking lichens: incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1):55.
- [39] LI T T, JIANG L Q, HU Y F, et al. Creating a synthetic lichen: mutualistic co-culture of fungi and extracellular polysaccharide-secreting cyanobacterium *Nostoc* PCC 7413[J]. Algal Research, 2020, 45:101755.
- [40] GOODWIN C R, COVINGTON B C, DEREWACZ D K, et al. Structuring microbial metabolic responses to multiplexed stimuli via self-organizing metabolomics maps[J]. Chemistry & Biology, 2015, 22(5): 661-670.
- [41] PONOMAROVA O, PATIL K R. Metabolic interactions in microbial communities: untangling the Gordian knot[J]. Current Opinion in Microbiology, 2015, 27: 37-44.
- [42] BERTRAND S, BOHNI N, SCHNEE S, et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(6): 1180-1204.
- [43] HARWANI D, BEGANI J, LAKHANI J. Co-cultivation strategies to induce *de novo* synthesis of novel chemical scaffolds from cryptic secondary metabolite gene clusters [M]// GEHLOT P, SINGH J. Fungi and their role in sustainable development: current perspectives. Springer, 2018: 617-631.
- [44] TAN Z Q, LEOW H Y, LEE D C W, et al. Co-culture systems for the production of secondary metabolites: current and future prospects[J]. The Open Biotechnology Journal, 2019, 13(1): 18-26.
- [45] MOUSSA M, EBRAHIM W, BONUS M, et al. Co-culture of the fungus *Fusarium tricinctum* with *Streptomyces lividans* induces production of cryptic naphthoquinone dimers[J]. RSC Advances, 2019, 9(3): 1491-1500.
- [46] MA Y J, ZHENG L P, WANG J W. Inducing perylenequinone production from a bambusicolous fungus *Shiraia* sp. S9 through co-culture with a fruiting body-associated bacterium *Pseudomonas fulva* SB₁[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 121.
- [47] HOSHINO S, WONG C P, OZEKI M, et al. Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium[J]. The Journal of Antibiotics, 2018, 71(7): 653-657.
- [48] KHALIL Z G, CRUZ-MORALES P, LICONA-CASSANI C, et al. Inter-Kingdom beach warfare: microbial chemical communication activates natural chemical defences[J]. The ISME Journal, 2019, 13(1): 147-158.
- [49] ARORA D, CHASHOO G, SINGAMANENI V, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* induces production of a novel blennolide K in coculture of *Setophoma terrestris*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(3):730-739.
- [50] ZHOU Q Y, YANG X Q, ZHANG Z X, et al. New azaphilones and tremulane sesquiterpene from endophytic *Nigrospora ory-*

- zae* cocultured with *Irpex lacteus*[J]. *Fitoterapia*, 2018, 130: 26-30.
- [51] NG W L, BASSLER B L. Bacterial quorum-sensing network architectures[J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 197-222.
- [52] DAVIS R M, MULLER R Y, HAYNES K A. Can the natural diversity of quorum-sensing advance synthetic biology? [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3: 30.
- [53] 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.
- [54] SCOTT S R, HASTY J. Quorum sensing communication modules for microbial consortia[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(9): 969-977.
- [55] CHEN Y, KIM J K, HIRNING A J, et al. Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium[J]. *Science*, 2015, 349(6251):986-989.
- [56] 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.
- [57] MCCARDELL R D, HUANG S, GREEN L N, et al. Control of bacterial population density with population feedback and molecular sequestration[EB/OL]. bioRxiv, 2017, DOI:10.1101/225045.
- [58] THOMPSON J A, OLIVEIRA R A, DJUKOVIC A, et al. Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(11):1861-1871.
- [59] 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.
- [60] AUTEBERT J, COUDERT B, BIDARD F-C, et al. Microfluidic: an innovative tool for efficient cell sorting[J]. *Methods*, 2012, 57(3):297-307.
- [61] KOCH S, BENNDORF D, FRONK K, et al. Predicting compositions of microbial communities from stoichiometric models with applications for the biogas process[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1):17.
- [62] MILNE C B, KIM P J, EDDY J A, et al. Accomplishments in genome-scale in silico modeling for industrial and medical biotechnology[J]. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(12): 1653-1670.
- [63] MILLER I J, VANEE N, FONG S S, et al. Lack of overt genome reduction in the bryostatin-producing bryozoan symbiont "candidatus endobugula sertula"[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(22): 6573-6583.
- [64] STOLYAR S, VAN DIEN S, HILLESLAND K L, et al. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community[J]. *Molecular System Biology*, 2007, 3(1): 92.
- [65] SALIMI F, ZHUANG K, MAHADEVAN R. Genome - scale metabolic modeling of a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(7):726-738.
- [66] 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.
- [67] MCCULLY A L, LASARRE B, MCKINLAY J B. Growth-independent cross-feeding modifies boundaries for coexistence in a bacterial mutualism[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(9): 3538-3550.
- [68] TSOI R, WU F L, ZHANG C, et al. Metabolic division of labor in microbial systems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(10): 2526-2531.
- [69] GUERRA-BUBB J, CROTEAU R, WILLIAMS R M. The early stages of taxol biosynthesis: an interim report on the synthesis and identification of early pathway metabolites[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(6): 683-696.
- [70] NITSCHKE M, PASTORE G M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(2): 336-341.
- [71] TAO K Y, LIU X Y, CHEN X P, et al. Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 224:327-332.



通讯作者: 孙新晓(1985—),男,博士,副教授。研究方向为代谢工程及合成生物学。

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



第一作者: 李向来(1993—),男,博士研究生。研究方向为代谢工程及合成生物学。

E-mail: 1003277591@qq.com