



基于模式微生物生长特性调控的食品功能因子生物制造研究进展

王斌^{1,2}, 吕雪芹^{1,2}, 李江华^{1,2*}, 刘龙^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}, 刘延峰^{1,2*}

1. 江南大学生物工程学院, 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122;

2. 江南大学未来食品科学中心, 无锡 214122

* 联系人, E-mail: lijianghua@jiangnan.edu.cn; yanfengliu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2023-02-22; 接受日期: 2023-05-31; 网络版发表日期: 2023-11-30

国家重点研发计划(批准号: 2018YFA0900300)、国家自然科学基金(批准号: 32222069)和江苏省自然科学基金(批准号: BK20200085)资助

摘要 食品功能因子作为功能性食品制造的基础素材, 是食品中真正起生理作用的有效成分, 在调节人体机能, 改善睡眠和促进生长发育等方面发挥着重要作用. 合成生物学作为一种更安全、更健康 and 绿色可持续的食品获取方式, 已经成为推动食品行业发展的重要技术支撑. 食品合成生物技术主要通过采用合成生物学技术设计构建食品组分的合成途径, 创建具有食品工业应用能力的智能化细胞工厂, 大幅提升食品功能因子等高附加值产品的合成效率. 目前, 以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌和酿酒酵母等模式微生物作为合成载体, 通过对其生长进行精细调控, 食品功能因子的生物制造已取得重大进展. 本文主要从转运蛋白工程改造提高细胞生长速率、重编程细胞能量代谢和平衡细胞生长与产物合成方面总结了基于模式微生物生长特性调控合成食品功能因子的研究策略和进展, 提出了目前所面临的挑战, 并对其未来发展做出展望.

关键词 食品功能因子, 合成生物学, 模式微生物, 生长调控

随着社会发展和人们对安全、健康、营养饮食的追求, 功能性食品的研发成为食品领域的研究热点^[1]. 其中, 食品功能因子是功能性食品制造的基本原料, 也是赋予食品特定生理功能的关键成分. 食品功能因子种类丰富^[2], 根据其化学结构主要分为11类: 活性多糖, 功能性低聚糖和功能性单双糖, 功能性脂类, 糖醇类, 多糖类, 氨基酸、肽与蛋白质, 维生素和维生素类似物, 矿物元素, 植物活性成分, 益生菌和低能量食品成分. 这些功能因子在调节人体机能, 改善睡眠和促进生长发育等方面发挥重要作用.

合成生物学作为一种更安全、更健康 and 绿色可持续的食品获取方式, 为功能性食品组分和重要功能营养因子的生产提供了技术支撑, 成为推动食品行业发展的重要手段. 以大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*, *C. glutamicum*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)等为代表的典型模式微生物具有生长速度快、营养要求简单、遗传操作简便和工业发酵培养模式相对成熟等优势^[3,4], 已广泛用于合成各种生物能源和生物

引用格式: 王斌, 吕雪芹, 李江华, 等. 基于模式微生物生长特性调控的食品功能因子生物制造研究进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 217–232
Wang B, Lv X Q, Li J H, et al. Advances in bio-manufacturing of food functional factors based on regulating cell growth of model microorganism (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 217–232, doi: [10.1360/SSV-2023-0031](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0031)

医药等^[5-7], 同时在食品领域也被开发用于高效合成各种营养组分, 如N-乙酰氨基葡萄糖^[8,9]、母乳中的关键成分2'-岩藻糖基乳糖^[10]、血红蛋白^[11]以及乳蛋白^[12]等. 其中, 细胞的生长调控是实现高效生物制造的关键控制点, 因此以模式微生物底盘细胞作为食品功能因子的合成载体, 充分利用合成生物学原理和技术对细胞的生长进行有效精细调控, 有望实现食品功能因子的高效合成. 本文主要从转运蛋白工程改造提高菌株生长速率、重编程细胞能量代谢、细胞生长与产物合成偶联以及细胞生长与产物合成解偶联四个方面系统总结了目前基于模式微生物生长调控合成食品功能因子的研究策略和进展(图1), 并指明微生物合成食品功能因子面临的挑战及未来发展方向, 以期为实现功能因子的高效生物制造提供新思路.

1 优化底盘细胞生长速率

发酵过程中微生物有效吸收和代谢关键营养基质的能力直接影响细胞的生长. 因此, 提高碳源利用率或扩大可利用碳源的范围能够优化底盘细胞的生长速率, 增加细胞密度, 从而实现食品功能因子的高效合成^[13].

1.1 碳源转运蛋白工程

微生物可以利用多种碳源, 它们对碳源的选择主

要取决于胞内相关碳源转运蛋白的表达, 因此高效表达碳源转运蛋白是提高碳源利用率的一种直观快速方法. 研究较为广泛的是*S. cerevisiae*^[14-18]和*E. coli*^[19-23]中的各种内源和外源糖类转运蛋白. *S. cerevisiae*对己糖特别是葡萄糖的转运机制已被很好地表征, 它通过内源的Hxt家族己糖转运蛋白介导的转运系统来利用己糖^[18,24]. 目前, 已鉴定出约20种编码己糖转运蛋白的Hxt基因, 研究表明, 通过调节一种或几种转运蛋白的表达可提高细胞对葡萄糖的摄取能力, 以*S. cerevisiae* CEN.PK m850作为出发菌株, 经过改造使其具备乳酸合成能力, 乳酸的生产强度为0.77 g/(L h), 后通过强化HTX1基因的表达, 提高菌株对葡萄糖的消耗速率, 使得乳酸生产强度达到(0.85±0.02) g/(L h)^[25]. 考虑到发酵成本和环境保护等因素, 越来越多的糖组分成为微生物可利用的替代碳源^[26]. 在无特异性转运蛋白存在时, 添加非天然碳源会明显减弱底盘细胞的生长速率. 而Wang等人^[27]通过引入低亲和力的阿拉伯糖转运蛋白araE基因, 使得*S. cerevisiae*在以蔗糖为碳源的培养基中高效合成白藜芦醇, 产量达2.3 mg/L. 因此, 研究人员可通过引入外源转运蛋白或改造内源Hxt转运蛋白, 使得*S. cerevisiae*在以蔗糖、果糖或纤维二糖等非天然碳源为营养基质的条件下进行有效生长, 从而赋予其高产果聚糖^[28]、柠檬酸^[29]等食品功能因子的能力. Bruschi等人^[30]在不能以蔗糖为碳源的*E. coli*基因组上整合表达蔗糖利用

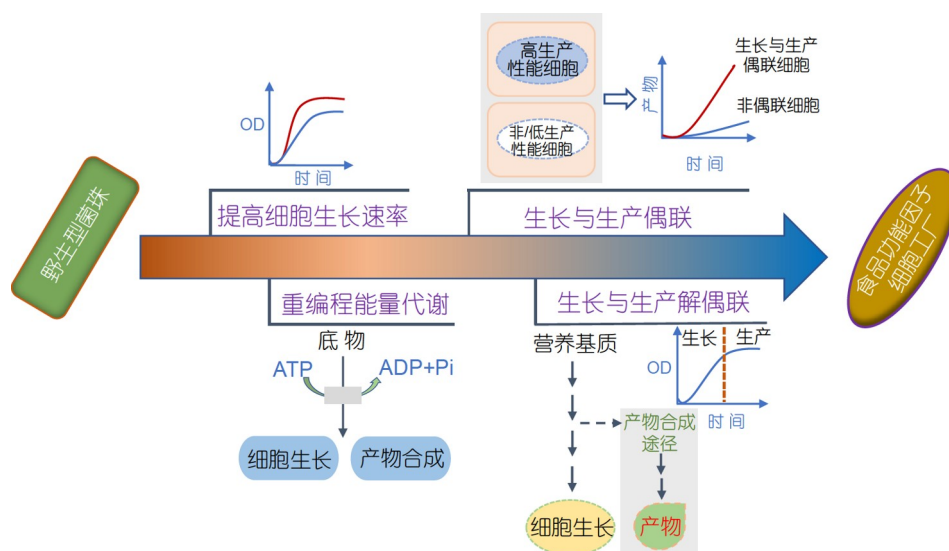


图1 目前基于模式微生物生长特性调控合成食品功能因子的研究策略

Figure 1 Research strategies in the synthesis of food functional factors based on regulating cell growth of model microorganisms

基因表达盒,发现菌株以蔗糖为碳源和以葡萄糖为碳源时的生长速率一致,这为以蔗糖或含蔗糖的廉价原料为碳源有效合成产品提供了可能.一方面,通过调节转运蛋白表达强度或继续挖掘其他碳源转运蛋白有利于提高碳源摄取率并扩大可利用碳源种类,从而改善底盘细胞的生长性能和生产潜力.另一方面,转运蛋白可能受到转录因子及其效应物的调控^[31,32].因此,深入了解其调控机制可为合成食品功能因子底盘细胞的改造提供理论依据.

1.2 适应性实验室进化

适应性实验室进化(adaptive laboratory evolution, ALE)是一种在特定生长环境或选择压力下,通过长期培养筛选获得具有某种更优特性菌株的技术.它无需深入了解细胞错综复杂的代谢网络,只需根据目标表型设计选择压力来筛选获得较优突变株,具有适用范围广、实用性强等优点^[33~35].适应性实验室进化已被广泛用于优化微生物底盘细胞的生长表型,以改善菌株的生产性能^[36~39].*B. subtilis*作为GRAS(generally recognized as safe)菌株,已广泛用于高效合成多种功能性低聚糖^[40,41]、功能性单糖^[42]及蛋白质^[43]等食品功能因子.Liu等人^[44]将野生型*B. subtilis* 168在M9基本培养基中传代超过1000代,进化菌株A40的比生长速率提升43.5%,乙偶姻和卵清蛋白生物合成分别提高54.5%和20%.多层次组学技术可用于阐明进化株的进化机制及其基因型和表型之间的关联,后者可用于指导构建或优化高效合成目标产物的细胞工厂.LaCroix等人^[45]对*E. coli* MG1655进行为期81天的进化后获得一株生长速率提高1.6倍的菌株.全基因组测序发现,主要是*pyrE/rph*基因间隔区、全局转录基因*rpoB*和DNA结构基因*hns/tdk*间隔区发生突变,*pyrE/rph*突变与菌株的嘧啶生物合成相关.经转录组学分析,*rpoB*和*hns/tdk*突变导致与蛋白合成、葡萄糖转运和糖酵解途径相关基因的表达水平上调,增加中心碳代谢途径的通量,从而提高底盘细胞的生长速率.研究表明,*C. glutamicum*在以葡萄糖为唯一碳源的基本培养基中经过1500代培养后,其生长速率提高了42%.经基因组测序和反向代谢工程发现,转录调控因子GntR1和RamA的突变导致菌株生长性能的改善^[46].因此,适应性实验室进化结合组学分析可鉴定出提高底盘细

胞生长适应性的关键突变点,有助于实现食品功能因子的高效生物合成.

适应性实验室进化也可被用于优化微生物对碳源的摄取率,或者扩大微生物对替代碳源,如木糖、乙酸盐和柠檬酸盐等的利用范围以提高细胞生长速率^[34,47].木糖作为木质纤维素中含量第二丰富的糖类,如何高效转化为功能营养品等高附加值产品是研究热点.Promdonkoy等人^[48]在以木糖作为唯一碳源的培养基中对*S. cerevisiae*进行适应性实验室进化,提高了其对木糖的摄取能力,并鉴定出一株生长速率提高58%且异丁醇产量提升110%的菌株.Seong等人^[49]以*E. coli* DSM01作为出发菌株,在以乙酸钠为唯一碳源的M9培养基中传代培养40天后获得一株生长速率为0.14 h⁻¹的进化株,而DSM01在该培养条件下几乎无法生长.随后验证该进化菌株合成萜类化合物中间体甲羟戊酸(mevalonate, MVA)的能力,MVA的生产强度达到1.32 g/(L h),相比出发菌株提高14.3倍,这加速了乙酸盐作为碳源生产功能营养品、生物燃料和重组蛋白等的研究进展.适应性实验室进化也可用于实现微生物对混合碳源的吸收利用.例如,Reider Apel等人^[16]对引入木糖利用途径的*S. cerevisiae* BY4742菌株以木糖为碳源进行培养进化,进化后菌株经全基因组测序,发现己糖转运蛋白HXT7(F79S)发生突变,该突变一方面提高了*S. cerevisiae*在以木糖为唯一碳源时对木糖的摄取率,从而展现出显著的生长;另一方面,在存在双碳源——葡萄糖和木糖时显示出可同时利用两种碳源的优良特性,从而减少培养时间并提高生产效率.由此可见,适应性实验室进化可以有效提高微生物对不同底物的利用率和对环境的适应性,进化得到的高生长速率底盘细胞在改善产物合成方面具有很好的潜力(表1).

适应性实验室进化与合成生物学和系统生物学工具相结合是一种优化菌株表型和性能的有效策略,删除有害突变、保留有益突变可重构性能优异的微生物底盘细胞.适应性实验室进化通过非直观的方式提高微生物的适应性,但是由于突变本身很难达到精准预测,同时较长的进化周期可能导致错失获得最优表型的突变株.而基因组规模代谢模型^[62~64]可揭示表型与基因型的相关性并用于预测生理变化,两者相互结合补充可以更好地用于优化菌株表型或开发新的微生物平台.

表 1 利用适应性实验室进化优化微生物对碳源的利用以改善细胞生长的主要代表性实例

Table 1 The major examples of optimizing carbon source utilization of microorganism through ALE to improve cell growth

进化后菌株	营养基质	进化时间	进化菌株特性	参考文献
<i>E. coli</i> SBA01	以乙酸盐为碳源的M9培养基	40天	出发菌株几乎无法生长, 进化菌株生长速率达到 0.14 h^{-1} ; 甲基戊酸的生产强度提高14.3倍	[49]
<i>E. coli</i> CY02	以甘油为碳源的M9培养基	1300代	菌株比生长速率提高40%; γ -氨基丁酸产量提高2.6倍	[50]
<i>E. coli</i> SCD78	以葡萄糖/木糖为碳源的AM1最小培养基	78代	葡萄糖和木糖的消耗率分别增加3.4倍和3倍; 乙醇产量提高3倍	[51]
<i>E. coli</i> SM1	以甲醇为碳源的最小培养基	180天	以甲醇为唯一碳源进行生长	[52]
<i>B. subtilis</i> E72	以木糖为碳源的M9培养基	72代	菌株比生长速率为 0.445 h^{-1} ; 乙偶姻产量 7.6 g/L	[53]
	以阿拉伯糖为碳源的M9培养基	72代	菌株比生长速率为 0.429 h^{-1} , 比野生型菌株提高1.38倍	[53]
<i>C. glutamicum</i> WMB2 _{ev}	以木糖为碳源的最小培养基	35代	菌株比生长速率为 $(0.26\pm 0.02)\text{ h}^{-1}$, 提高2.6倍	[54]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032工程菌进化6代后菌株	以木糖为碳源的CGXII最小培养基	6代	菌株比生长速率为 0.26 h^{-1} , 未进化菌株无法生长	[55]
<i>C. glutamicum</i> MX-11	以甲醇和木糖为碳源的CGXII最小培养基	27代	菌株比生长速率为 0.0121 h^{-1} , 提高20倍; 谷氨酸产量为 90 mg/mL	[56]
<i>C. glutamicum</i> MX-11进化7代后菌株	以甲醇和木糖为碳源的最小培养基	7代	甲醇耐受能力增强; 菌株生长速率提高3.2倍	[57]
<i>C. glutamicum</i> GluA T7	以葡萄糖为碳源的最小培养基	8代	菌株最大比生长速率提高1.7倍; 戊二酸生产强度提高2倍	[58]
<i>S. cerevisiae</i> HXT5	以木糖和葡萄糖为碳源的合成培养基	50天	解除葡萄糖(50 g/L)对木糖(10 g/L)转运的抑制作用	[17]
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK JLI	以甘油为碳源的合成培养基	60代	菌株比生长速率为 0.164 h^{-1} , 提高31.2%	[59]
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D进化后菌株	以甘油为碳源的MG培养基	80代/300代	增强菌株对甘油利用能力; 菌株生长速率提高4倍	[60]
<i>S. cerevisiae</i> BN-91	以甘露醇为碳源的合成培养基	1500 h	菌株比生长速率加倍	[61]

2 重编程细胞能量代谢

能量代谢在细胞生长和中心代谢途径中发挥重要作用, 操纵能量代谢是优化微生物生长适应性和实现产物高产量、高产率和高生产强度相统一的有效策略^[65,66]. ATP作为最重要的能量来源, 调控ATP供应是调节细胞工厂代谢流分布、生物量积累和产物合成的重要手段^[67,68]. 有氧条件下细胞主要通过氧化磷酸化途径合成ATP, 因此操纵该途径可以有效调节细胞内ATP的浓度, 其中主要通过调控NADH水平、ATP合酶活性和电子传递链来调节ATP代谢.

2.1 调控NADH供给

细胞内NADH主要来源于糖酵解、脂肪酸氧化和

三羧酸循环, 所以可以根据NADH代谢来调控NADH相关酶的活性进而调节胞内ATP水平. Zhu和Shimizu^[69]敲除*E. coli*中编码丙酮酸甲酸裂解酶的*pfk*基因, 从而导致胞内NADH/NAD⁺比率显著升高, ATP/AMP水平降低, 同时在以葡萄糖为碳源时菌株的糖酵解通量显著增加. 研究人员通过调控*E. coli* TCA循环中相关基因的表达, 增强了TCA循环的碳通量和胞内ATP水平, 导致 β -胡萝卜素^[70]和番茄红素^[71]产量显著增加. 为实现异丁醇的快速高效生产, 研究人员对合成异丁醇的*B. subtilis*进行代谢网络分析, 揭示了NADPH对异丁醇生物合成的重要性^[72]. 因此在氧化还原失衡且NADPH过量的情况下, 强化表达来源于*E. coli*的*udhA*基因提高胞内NADH和ATP浓度, 最终细胞生长性能得到优化, 异丁醇产量提高. 敲除*S. cerevisiae*中消耗

NADH的乙醇脱氢酶的同时过表达生成NADH的乙醛脱氢酶,可提高胞内NADH的水平和甘油的产量^[73].此外,在培养基中补充依赖NAD⁺脱氢酶的相关底物^[74],可以有效调控胞内ATP浓度,从而提高产物合成效率.通过调控NADH供给实现上调或下调胞内ATP水平的策略较为清晰简便,且调控效果显著,但NADH浓度的变化可能会破坏胞内氧化还原的平衡,因此需要考虑细胞的氧化还原状态是否利于产物合成.

2.2 调控F₀F₁-ATP合酶表达

在氧化磷酸化过程中,电子传递链产生的质子动力通过ATP合酶驱动ATP生成,因此操纵F₀F₁-ATP合酶表达是调控ATP水平最直接有效的方法.在*E. coli*中强化ATP合酶基因操纵子的表达提升胞内ATP水平,可有效提高β-胡萝卜素的产量^[70]. Zhang等人^[75]在*S. cerevisiae*中表达来源于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的ATP6基因,提高了ATP水平;后将该基因在产朊假丝酵母(*Candida utilis*)中进行表达,提高了胞内F₀F₁-ATP合酶的活性和胞内ATP水平,同时菌株的生物量提高且S-腺苷甲硫氨酸和谷胱甘肽的合成增强^[76].

由于ATP合酶的F₁亚基具有水解ATP的功能,因此表达该亚基会促进ATP水解从而降低ATP的浓度.在*E. coli*中表达ATP合酶的F₁亚基降低了胞内ATP水平,并显著提高菌株对葡萄糖的摄取速率和乳酸合成能力^[77].利用类似的策略,在糖多孢红霉菌(*Saccharopolyspora erythraea*)表达F₁亚基导致较低的[ATP]/[ADP]比,维持了细胞的氧化还原平衡状态,红霉素合成能力提高28%^[78],同样该策略提高了乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的乙偶姻合成能力^[79].因此对于可产生质子动力的菌株,操纵ATP合酶活性可有效调控胞内ATP的供应,并改善生产菌株生物量的累积和与ATP合成相关的目标代谢物的生产.

2.3 调控电子传递链

在氧化还原反应中,电子传递链上电子转移过程中产生的质子梯度可用于胞内ATP合成.在有氧发酵中,氧气是电子传递链的最终电子受体,因此氧气浓度是影响胞内ATP含量的关键因素^[80].尤其是某些高密度、高能量的发酵体系中氧气的丰度是ATP合成的重要条件^[81].调控发酵罐的搅拌速度或在发酵过程通入氧气是较为简单的氧气供给策略^[82].另一种策略是

添加一定浓度的正己烷、正庚烷、血红蛋白和正十六烷等携氧载体,该策略也可提高氧浓度^[83-86].*E. coli*发酵过程中血红蛋白的添加使细胞生物量提高约11%^[85]. Li等人^[86]在培养基中加入正十六烷,促进*S. cerevisiae*胞内ATP积累,S-腺苷甲硫氨酸的产量达到2.27 g/L.此外,调控pH维持在酸性条件下可以提高胞内ATP水平.因为较低pH产生的质子梯度可驱动呼吸链中的F₀F₁-ATP合酶活性^[87,88].虽然通过调控电子传递链可以调节ATP代谢,但由于其涉及多个基因的调控,难以通过简单的单基因或几个相关基因的调控来调节胞内ATP水平.

ATP作为一类重要的辅因子,对代谢反应的速率、细胞的生长和产物合成具有重要的调控意义.胞内ATP水平对不同产物的影响不同,胞内高浓度的ATP可以促进多糖等食品功能因子的合成^[89],而谷氨酸等代谢物的合成则需要维持低浓度ATP,因此需要平衡宿主胞内ATP水平和细胞生长之间的关系,从而实现产品的高效合成.

3 细胞生长与产物合成偶联

采用传统微生物代谢工程策略对细胞工厂进行改造可能会导致代谢通量失衡或代谢负担,从而使得细胞生长性能受损和生产性能减弱,特别是具有高度工程化或遗传回路的微生物往往会在长期发酵中失去生产表型^[90,91].为了解决该问题,一种策略是将细胞生长与产物合成相偶联,使生产适应细胞的生长,实现生长和产物合成之间的平衡^[92,93].

3.1 营养缺陷系统与产物合成偶联

营养缺陷与产物合成进行偶联是一种生长与生产偶联的方法,其中产物合成对于细胞生长是必需的. Atsumi和Liao^[94]在异亮氨酸营养缺陷型*E. coli*中引入柠草酸途径合成α-酮戊二酸,从而为1-丙醇和1-丁醇的合成提供前体,且α-酮戊二酸可进一步转化为异亮氨酸,使得该菌株能够恢复生长能力,但生长速率仍低于直接添加异亮氨酸的情况.后对该途径的关键酶CimA进行定向进化,筛选得到生长速率高于野生型的突变株,并显著提高1-丙醇和1-丁醇产量. Ye等人^[95]发现,合成番茄红素的*S. cerevisiae*在继代培养时出现白色菌落,猜测可能是由于GAL调控系统的破坏导致途

径基因转录被抑制从而不能合成番茄红素, 所以出现菌株表型退化的现象. 菌株是需要表达URA3才能正常生长的尿嘧啶缺陷型菌株, 编码番茄红素合成的基因由GAL启动子驱动表达. 为了实现生长与合成偶联, 研究人员利用GAL启动子同时控制URA3和番茄红素途径基因的表达, 从而导致在长期培养中GAL系统破坏的菌株无法正常生长. 当葡萄糖存在时, 葡萄糖诱导的启动子 P_{HXT1} 开启URA3的表达, 细胞正常生长. 当葡萄糖耗尽时, P_{GAL} 启动子激活产物合成相关基因和偶联的URA3基因表达, 从而赋予生产细胞生长优势. 将该策略用于*S. cerevisiae*高效合成(+)-瓦伦亚烯, 产量达到16.6 g/L.

此外, 研究人员拓展了模块化细胞(modular cell, MODCELL)^[96]的设计原理以优化生长偶联效果. 模块化细胞是一种营养缺陷型细胞, 包含必要但不足以支持细胞生长和维持代谢的中心代谢途径, 因此必须与可变的产物合成模块偶联. 该模块可以辅助细胞生长, 维持细胞代谢并增强产物的合成, 通过优化两者之间的偶联强度可以快速筛选最优生产宿主, 并通过乙醇的生物合成进行了验证^[97].

3.2 基于群体质量控制和代谢产物成瘾系统的生长与产物合成偶联

代谢负担常常导致生产细胞表现出降低的生长适应性, 由于遗传和不可遗传变异导致的非生产细胞亚群由于缺乏代谢负担而恢复生长适应性, 并可以快速占据细胞群体, 从而降低生产能力^[98,99]. 对抗代谢异质性的一个策略是将代谢产物的合成与细胞生长进行偶联, 从而解决非生产亚群导致的细胞群体生产能力流失的问题. 对此, Xiao等人^[100]提出了群体质量控制系统(population quality control, PopQC)的概念. 首先在*E. coli*中开发一种基于调控因子FadR且响应目标产物的生物传感器, 该传感器响应游离脂肪酸的浓度, 在低产细胞或者非生产细胞中转录调控因子FadR与 P_{AR} 启动子结合, 抑制编码四环素外排蛋白基因 $tetA$ 的表达; 而在高产细胞内, 随着游离脂肪酸浓度的增加, 其会解除FadR对相应启动子的阻遏作用, $tetA$ 基因正常表达. 因此, 在四环素存在的情况下, PopQC富集高产细胞并使之占据主导地位, 最终游离脂肪酸的产量提高3倍(图2), 相同的策略使得酪氨酸产量提高2.6倍. 同样, Rugbjerg等人^[101]利用胞内必需过程, 在

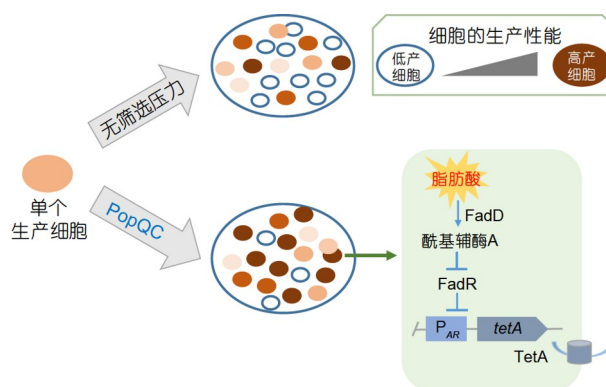


图2 PopQC的设计原理

Figure 2 The design principle of PopQC

*E. coli*中设计了正向响应产物MVA的遗传回路以调控必需基因的表达. 当MVA产量较高时, 生物传感器与MVA结合从而激活必需基因的转录表达, 导致菌株具有较高的生长速率; 而当不存在MVA时, 必需基因的表达也会被限制, 从而导致较低的生长速率. 因此在整个细胞群体中, 生长缓慢的非生产细胞比例逐渐减少, 具有高生长速率生产细胞逐渐占主导. 最终, 未改造的菌株在经过50次传代后MVA合成能力逐渐丧失, 而引入产物成瘾系统的菌株在传代95次后仍然拥有高产能力, 并且该系统无需使用抗生素并且不存在宿主受限的问题. 研究人员还将产物柚皮素成瘾与负向自调控系统相结合, 使得成瘾酵母细胞培养324代后仍拥有90.9%的柚皮素生产能力, 而正常细胞在传代300代后丢失94.5%的生产能力, 且恢复了正常生长^[102]. 该策略同样适用于以*E. coli*为底盘细胞合成柚皮素的研究^[103].

代谢异质性已成为影响细胞生产性能的主要问题, 通过激励生产细胞和惩罚非生产细胞的方式可以用于对抗这种限制, 从而通过富集生产细胞亚群稳定维持生产表型.

食品功能因子的可持续生物合成面临的一个主要挑战是扩大生产规模并维持高产性能. 但是, 异源基因表达引起的代谢负担会产生选择性压力, 从而导致培养体系中非生产种群的自发形成, 使得高产能力但适应性较低的细胞丧失优势, 最终导致整体生产性能下降. 因此, 将细胞生长与产物合成偶联可以很好地解决这类矛盾, 从而提升细胞群体的生产性能.

4 细胞生长与产物合成解偶联

产物的高效合成往往与底盘细胞生长竞争资源, 在底物充足的条件下, 对菌株生产力的最大限制来自用于支持细胞生长和内源性基础代谢所需资源的持续消耗。当导向目标代谢途径的资源不足时, 大量的底物主要用于细胞的生长, 从而导致生产能力下降。相反, 过度的分流会影响细胞的生长从而降低生产强度。微生物底盘细胞的这种局限性可通过将细胞生长与产物合成解偶联来解决^[104~106]。将发酵过程解耦成生长和生产两个阶段进行动态调控, 通过严格控制细胞的基础生长, 在发酵早期最大程度地积累生物量, 然后通过诱导激活合成途径将资源转向生产途径, 这样细胞可在半衰老状态下工作, 吸收利用底物进行产品合成。

4.1 化合物诱导调控系统

特定化学物质和营养成分可以作为用于解偶细胞生长的诱导剂^[107,108]。IPTG和无水四环素是常用的诱导剂, 已被用于1,4-丁二醇^[109]、异丙醇^[110]和苹果酸^[111]等的生物合成调控。营养成分如甲硫氨酸被用于抑制 P_{MET3} 启动子驱动的表达以解偶细胞生长, 提高青蒿素前体紫穗槐二烯的生物合成^[112]。Tan等人^[113]在*S. cerevisiae*中利用四环素转录激活系统将碳通量转向产物合成, 使得葡萄糖酸和异丁醇产量分别提高10倍和3倍。外源性诱导剂的动态调节是有效的, 但需要精确控制诱导时间和诱导强度。

4.2 群体感应系统

基于内源性压力感应机制, 开发可自发调节的遗传回路以控制代谢是解偶细胞生长的另一种策略。群体感应(quorum sensing, QS)系统是一种响应细胞密度的基因回路, 可以根据细胞密度自适应地将碳通量从生长转移到生产途径^[114,115]。目前研究最为广泛的群体感应系统主要是来自费氏弧菌的*luxI/luxR*系统^[116]和来自玉米细菌性枯萎病菌的*esal/esaR*系统^[117]。研究人员在*E. coli*中构建基于*luxI/luxR*的群体感应系统用于红没药烯的生物合成, 其生产能力比需要添加诱导剂的工程菌株提高44%^[118]。天然QS回路虽然可以响应不同细胞密度进行动态调控, 但是其动态调控的范围较为狭隘。因此, Ge等人^[119]通过优化*luxR-luxI*基因间序列创建了一个具有高动态调控范围和低泄漏率的

QS突变体库, 将其应用于以*E. coli*作为底盘细胞合成4-羟基香豆素, 其产量提高11.3倍。此外, 该QS系统也广泛用于改善*E. coli*合成柚皮素^[120]和中链脂肪酸^[121]等。Corrêa等人^[122]在*B. subtilis*中构建了基于*luxI/luxR*的群体感应系统自诱导基因回路(图3), 并用于核黄素的生产。该系统包括两大模块, 一个模块是包含2种变体的诱导模块——*luxR*和*luxI*基因以及各自的启动子, 另一个模块是包含7种变体的应答模块——产物合成相关基因和控制基因表达的群体感应启动子。由LuxI合成的信号分子AHL扩散进入细胞, 当AHL浓度达到一定阈值后与LuxR结合, 从而激活应答模块中靶基因的表达。最终, 最强响应元件S1-R6的转录水平是*B. subtilis*内源启动子 P_{veg} 的3.2倍, 筛选得到的工程菌株显示出响应细胞密度的核黄素生产曲线。然而, 该群体感应系统只能正向响应信号分子的浓度, 需要利用负调控元件才可进行双向调节, 这会导致菌株代谢负担加重和灵敏性降低等问题。

与*luxI/luxR*不同的是, *esal/esaR*系统中的信号分子受体EsaR具有同时产生激活和抑制的双重作用。在低细胞密度和信号分子AHL不存在时, EsaR可与启动子 P_{esaR} 的转录调控区结合抑制下游基因表达, 也可与启动子 P_{esaS} 的转录调控区结合激活下游基因表达; 而在高细胞密度和AHL浓度积累到一定阈值后, AHL与EsaR作用使其无法再结合到转录调控区, 因此开启 P_{esaR} 启动子下游基因的表达和抑制 P_{esaS} 启动子下游基因的表达^[117]。Gupta等人^[123]通过微调EsaI的表达, 利用该系统控制1-磷酸果糖激酶和莽草酸激酶的表达, 成功实现了细胞生长与产物合成途径碳通量的平衡, 并有效提高*E. coli*中肌醇、葡萄糖二酸和莽草酸的产量。

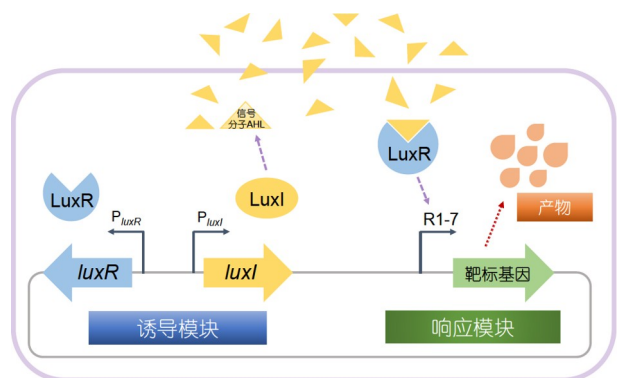


图3 在*B. subtilis*中构建的*luxI/luxR* QS系统工作原理

Figure 3 The working principle of *luxI/luxR* QS system in *B. subtilis*

由于真核生物的转录抑制需要染色质重塑, 所以将这两类群体感应系统应用于 *S. cerevisiae* 仍具有挑战性。因此, 已经设计了信息素群体感应系统用于改善羟基苯甲酸(para-hydroxybenzoic acid, PHBA)^[124,125]、2'-岩藻糖基乳糖和3'-岩藻糖基乳糖^[126]的合成。此外, 研究人员还在 *B. subtilis* 中构建了基于Phr60-Rap60-Spo0A的双功能群体感应系统基因回路, 通过解耦生长和合成将维生素K2产量提高40倍^[127]。群体感应系统的深入研究为动态调控代谢途径提供了新的指导, 但仍有不足之处。基于群体感应的动态调控存在泄露表达, 无法实现对目标基因的严谨调控, 仍需对基因元件进行优化或挖掘更多的动态调控元件等。其次, 由于群体感应系统的复杂性, 其调控机制尚未完成解析明了, 实现完全的宿主解偶联也仍需进一步研究。

近年来, 利用基于代谢物响应转录因子的生物传感器来重编程细胞活性也已取得重大研究进展^[128]。通过将传感器——制动器与底盘细胞集成, 以动态调控关键酶的表达并驱动碳通量转向目标途径。其中, 丙二酰辅酶A是脂肪酸生物合成的前体, 开发响应丙二酰辅酶A的生物传感器在克服限速途径和优化产量方面具有巨大的希望。FapR可以特异性响应丙二酰辅酶A的浓度并调节 *B. subtilis* 脂肪酸生物合成途径中相关基因的表达^[129]。Xu等人^[130]设计响应丙二酰辅酶A的双启动子传感器动态调控胞内丙二酰辅酶A的通量以优化 *E. coli* 中脂肪酸的生物合成。在 *E. coli* 中, 丙二酰辅酶A是通过 *accABCD* 基因编码的乙酰辅酶A羧化酶催化乙酰辅酶A合成, 而低水平的丙二酰辅酶A使FapR处于活性状态, 由pGAP启动子驱动的 *accABCD* 基因被激活, 同时由T7启动子驱动的脂肪酸合成途径被抑制, 从而使丙二酰辅酶A得以在胞内积累。随着细胞生长, 丙二酰辅酶A积累到一定浓度时, 开-关状态被转换从而开启脂肪酸的生物合成, 使得细胞生长与产物合成解偶联。后通过优化FapR阻遏物结合位点fapO的数量, 使得脂肪酸产量提高至3.86 g/L。另外也有研究通过设计分层遗传回路^[106]和代谢转换开关^[110]实现细胞生长与生产解偶联, 从而提高目标产物的合成。细胞生长与产物合成解偶联可以通过严格控制非必需基因的基础表达, 使得代谢负担最小化, 从而在发酵早期阶段最大限度积累生物量。一旦达到一定的细胞密度时, 便可将资源转移至产物合成途径从而实现高产。同时, 生长与生产解偶联可以很好地避免有毒中间体

的积累或对细胞有毒性的酶的过量表达, 抑制合成毒性中间体的上游途径并在适当时间激活利用它的下游产物合成途径, 从而更好地平衡细胞生长和产物合成。

5 结论与展望

微生物细胞的生长调控在高效生物制造过程中有举足轻重的作用, 构建优化模式微生物底盘细胞高效合成食品功能因子已取得一定的进展, 几种功能性低聚糖、多种有机酸、氨基酸、维生素以及植物活性成分等均通过调控相应底盘细胞的生长实现产物有效合成(表2)。快速有效地生长和高效地产物合成是微生物底盘细胞的两个重要特性, 但由于细胞资源分配的局限性、异源途径与细胞代谢竞争导致的代谢通量失衡和代谢异质性问题会严重影响微生物细胞工厂的生长特性, 进而降低其合成性能。基于合成生物学原理和技术已开发出多种通过调控细胞生长改善生物合成的策略, 通过碳源转运蛋白工程和适应性实验室进化提高底盘细胞的生长速率; 通过调控NADH供给、F₀F₁-ATP合酶的表达以及电子传递链以重编程细胞能量代谢; 构建营养缺陷系统、开发基于群体质量控制和代谢产物成瘾系统使得细胞生长与产物合成偶联; 构建化合物诱导调控系统和群体感应系统将细胞生长与产物合成解偶联, 这些策略在优化细胞生长的同时可以有效增强产物的合成。而进一步提升细胞生长速率或挖掘具有更好生长潜能的新型微生物宿主, 优化适应性进化方法以及完善动态调控工具将更好地促进高效合成食品功能因子细胞工厂的构建。

基于微生物的生长调控高效合成食品功能因子已取得重大进展, 但仍然存在一些亟待解决的问题。目前已有多种策略可以有效提高底盘细胞的生长速率, 但由于细胞自身的局限和代谢负担等问题, 工程菌株的生长可能会仍低于野生型菌株, 阻碍其工业应用。再者, 目前研究对象主要局限于模式微生物底盘细胞, 因此挖掘生长性能更优的微生物对实现产物的高效合成具有重大意义。随着新的微生物不断被发现, 需要评估其生长代谢能力和产品合成效率。目前, 一种快速生长的微生物——需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)已被分离得到, 其倍增时间小于10 min^[131]并且相应的遗传操作工具^[132~134]已被开发, 因此该菌株作为潜在的微生物合成平台具有远大前景, 但该菌株作为合成食品功

表 2 模式微生物底盘细胞高效合成食品功能因子的主要示例

Table 2 The prime examples of synthesizing food functional factors efficiently by model microbial chassis cells

食品功能因子类别	产物	生产宿主	产量/产率/生产强度	改造策略	参考文献
活性多糖	果聚糖	<i>S. cerevisiae</i>	7.74 g/L	碳源转运蛋白工程	[28]
功能性低聚糖	2'-岩藻糖基乳糖	<i>S. cerevisiae</i>	3.37 g/L	群体感应系统	[126]
	3'-岩藻糖基乳糖	<i>S. cerevisiae</i>	2.36 g/L	群体感应系统	[126]
功能性脂类	脂肪酸	<i>E. coli</i>	21.5 g/L	代谢产物成瘾	[100]
有机酸	乳酸	<i>E. coli</i>	乳酸合成速率比对照菌株提高70%	调控NADH供给	[69]
		<i>S. cerevisiae</i>	(0.85±0.02) g/(L h)	碳源转运蛋白工程	[25]
	甲羟戊酸	<i>E. coli</i>	39.5 mg/L	适应性实验室进化; 代谢产物成瘾	[49,101]
	戊二酸	<i>C. glutamicum</i>	4.3 g/L	适应性实验室进化	[58]
	苹果酸	<i>E. coli</i>	36 g/L	化合物诱导调控系统	[111]
	葡萄糖酸	<i>S. cerevisiae</i>	1.8 g/L	化合物诱导调控系统	[113]
	水杨酸	<i>E. coli</i>	2.1 g/L	群体感应系统	[119]
	对羟基苯甲酸	<i>S. cerevisiae</i>	148 mg/L	群体感应系统	[125]
	γ-氨基丁酸	<i>E. coli</i>	(0.39±0.03) g/L	适应性实验室进化	[50]
氨基酸及其衍生物	谷氨酸	<i>C. glutamicum</i>	90 g/L	适应性实验室进化	[56]
	S-腺苷甲硫氨酸	<i>S. cerevisiae</i>	2.27 g/L	调控电子传递链	[86]
维生素	肌醇	<i>E. coli</i>	(0.27±0.01) g/g DCW	群体感应系统	[123]
	维生素B2	<i>B. subtilis</i>	489 μg/OD	群体感应系统	[122]
	维生素K2	<i>B. subtilis</i>	360 mg/L	群体感应系统	[127]
植物活性成分	白藜芦醇	<i>S. cerevisiae</i>	2.3 mg/L	碳源转运蛋白工程	[27]
	β-胡萝卜素	<i>E. coli</i>	2.1 g/L	调控NADH供给; 调控F ₀ F ₁ -ATP合酶表达	[70]
	番茄红素	<i>E. coli</i>	3.52 g/L	调控NADH供给	[71]
	(+)-瓦伦亚烯	<i>S. cerevisiae</i>	16.6 g/L	营养缺陷系统与产物合成偶联	[95]
	柚皮素	<i>E. coli</i>	(352.3±45.5) mg/L	代谢产物成瘾	[103]
		<i>E. coli</i>	1073.8 mg/L	群体感应系统	[120]
	红没药烯	<i>E. coli</i>	1.1 g/L	群体感应系统	[118]

能因子细胞工厂的潜能仍需进一步验证，因为任何适用于食品合成的微生物底盘细胞的安全性最为重要。动态调控可以有效减弱或避免传统代谢工程改造策略造成的细胞代谢负担、中间代谢物或有毒物质积累、辅因子失衡和细胞生长受损等问题。但目前开发的动态调控元件数量不多，且元件响应的灵敏性、正交性和稳定性仍需进一步优化。对此，可利用不同的调控元件构建逻辑线路，高效精细地调控代谢流；也可通过定向进化优化已有元件的响应性能，或者挖掘和开发新型调控元件。为了进一步扩展细胞生长调控方法的适用范围并且避免胞内代谢物干扰的问题，Liu 团队^[135]引入了基于密码子扩展的正交翻译系统，该系

统可以实现在代谢流调控和细胞生长关键酶中插入非天然氨基酸(ncAA)，并通过精确调控必需基因的表达来精准控制代谢流量和细胞生长。应用该策略，研究人员分别在基因组重编码的*E. coli*中将*N*-乙酰氨基葡萄糖产量提高了4.5倍，在基因组未重编码的*B. subtilis*中将燕窝酸产量提高了2.2倍，为创建生长与代谢精准可控的高版本底盘细胞提供了新策略。但该策略仍存在成本较高、难以大规模应用的问题，因此需要进一步优化。总之，基于系统生物学和合成生物学的代谢工程策略发展迅速，对微生物的各种机制进行深入挖掘，开发各种工具调控细胞生长，为实现食品功能因子的高效、绿色、稳定合成提供了潜力。

参考文献

- 1 Baker M T, Lu P, Parrella J, et al. Consumer acceptance toward functional foods: a scoping review. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19: 1217
- 2 Galanakis C M. Functionality of food components and emerging technologies. *Foods*, 2021, 10: 128
- 3 Choi K R, Jang W D, Yang D, et al. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, 2019, 37: 817–837
- 4 Xu X, Liu Y, Du G, et al. Microbial chassis development for natural product biosynthesis. *Trends Biotechnol*, 2020, 38: 779–796
- 5 Przystalsowska H, Zeyland J, Szymanowska-Powalowska D, et al. 1,3-Propanediol production by new recombinant *Escherichia coli* containing genes from pathogenic bacteria. *Microbiol Res*, 2015, 171: 1–7
- 6 Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 445–452
- 7 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528–532
- 8 Liu Y, Liu L, Shin H, et al. Pathway engineering of *Bacillus subtilis* for microbial production of *N*-acetylglucosamine. *Metab Eng*, 2013, 19: 107–115
- 9 Deng C, Lv X, Li J, et al. Synergistic improvement of *N*-acetylglucosamine production by engineering transcription factors and balancing redox cofactors. *Metab Eng*, 2021, 67: 330–346
- 10 Zhang Q, Liu Z, Xia H, et al. Engineered *Bacillus subtilis* for the *de novo* production of 2'-fucosyllactose. *Microb Cell Fact*, 2022, 21: 110
- 11 Xue J, Zhou J, Li J, et al. Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient synthesis of hemoglobins and myoglobins. *Bioresour Tech*, 2023, 370: 128556
- 12 Deng M, Lv X, Liu L, et al. Efficient bioproduction of human milk Alpha-lactalbumin in *Komagataella phaffii*. *J Agric Food Chem*, 2022, 70: 2664–2672
- 13 Yan Q, Fong S S. Increasing carbon source uptake rates to improve chemical productivity in metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 254–263
- 14 Hara K Y, Kobayashi J, Yamada R, et al. Transporter engineering in biomass utilization by yeast. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17: fox061
- 15 Ha S J, Wei Q, Kim S R, et al. Cofermentation of cellobiose and galactose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 5822–5825
- 16 Reider Apel A, Ouellet M, Szmidi-Middleton H, et al. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*, 2016, 6: 19512
- 17 Farwick A, Bruder S, Schadeweg V, et al. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 5159–5164
- 18 Nijland J G, Driessen A J M. Engineering of pentose transport in *Saccharomyces cerevisiae* for biotechnological applications. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 464
- 19 Luo Y, Zhang T, Wu H. The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv*, 2014, 32: 905–919
- 20 Jeckelmann J M, Erni B. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 2020, 472: 1129–1153
- 21 Alva A, Sabido-Ramos A, Escalante A, et al. New insights into transport capability of sugars and its impact on growth from novel mutants of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 1463–1479
- 22 Khankal R, Chin J, Cirino P. Role of xylose transporters in xylitol production from engineered *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2008, 134: 246–252
- 23 Lee J W, Choi S, Park J H, et al. Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning β -fructofuranosidases and its application for L-threonine production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88: 905–913
- 24 Leandro M J Á, Fonseca C, Gonçalves P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9: 511–525
- 25 Rossi G, Sauer M, Porro D, et al. Effect of *HXT1* and *HXT7* hexose transporter overexpression on wild-type and lactic acid producing

- Saccharomyces cerevisiae* cells. [Microb Cell Fact](#), 2010, 9: 15
- 26 Wendisch V F, Brito L F, Gil Lopez M, et al. The flexible feedstock concept in industrial biotechnology: metabolic engineering of *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and yeast strains for access to alternative carbon sources. [J Biotechnol](#), 2016, 234: 139–157
 - 27 Wang Y, Halls C, Zhang J, et al. Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. [Metab Eng](#), 2011, 13: 455–463
 - 28 Franken J, Brandt B A, Tai S L, et al. Biosynthesis of levan, a bacterial extracellular polysaccharide, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. [PLoS ONE](#), 2013, 8: e77499
 - 29 Lane S, Zhang S, Wei N, et al. Development and physiological characterization of cellobiose-consuming *Yarrowia lipolytica*. [Biotechnol Bioeng](#), 2015, 112: 1012–1022
 - 30 Bruschi M, Boyes S J, Sugiarto H, et al. A transferable sucrose utilization approach for non-sucrose-utilizing *Escherichia coli* strains. [Biotechnol Adv](#), 2012, 30: 1001–1010
 - 31 Kim D, Song J Y, Hahn J S. Improvement of glucose uptake rate and production of target chemicals by overexpressing hexose transporters and transcriptional activator Gcr1 in *Saccharomyces cerevisiae*. [Appl Environ Microbiol](#), 2015, 81: 8392–8401
 - 32 Pérez-García F, Wendisch V F. Transport and metabolic engineering of the cell factory *Corynebacterium glutamicum*. [FEMS Microbiol Lett](#), 2018, 365: fny166
 - 33 Hirasawa T, Maeda T. Adaptive laboratory evolution of microorganisms: methodology and application for bioproduction. [Microorganisms](#), 2022, 11: 92
 - 34 Wang G, Li Q, Zhang Z, et al. Recent progress in adaptive laboratory evolution of industrial microorganisms. [J Ind Microbiol Biotechnol](#), 2023, 50: kuac023
 - 35 Mavrommati M, Daskalaki A, Papanikolaou S, et al. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. [Biotechnol Adv](#), 2022, 54: 107795
 - 36 Thyer R, Shroff R, Klein D R, et al. Custom selenoprotein production enabled by laboratory evolution of recoded bacterial strains. [Nat Biotechnol](#), 2018, 36: 624–631
 - 37 Hong K K, Vongsangnak W, Vemuri G N, et al. Unravelling evolutionary strategies of yeast for improving galactose utilization through integrated systems level analysis. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2011, 108: 12179–12184
 - 38 Cheng K K, Lee B S, Masuda T, et al. Global metabolic network reorganization by adaptive mutations allows fast growth of *Escherichia coli* on glycerol. [Nat Commun](#), 2014, 5: 3233
 - 39 Stella R G, Wiechert J, Noack S, et al. Evolutionary engineering of *Corynebacterium glutamicum*. [Biotechnol J](#), 2019, 14: e1800444
 - 40 Zhang X, Liu Y, Liu L, et al. Microbial production of sialic acid and sialylated human milk oligosaccharides: advances and perspectives. [Biotechnol Adv](#), 2019, 37: 787–800
 - 41 Deng J, Gu L, Chen T, et al. Engineering the substrate transport and cofactor regeneration systems for enhancing 2'-fucosyllactose synthesis in *Bacillus subtilis*. [ACS Synth Biol](#), 2019, 8: 2418–2427
 - 42 Wu Y, Li Y, Jin K, et al. CRISPR-dCas12a-mediated genetic circuit cascades for multiplexed pathway optimization. [Nat Chem Biol](#), 2023, 19: 367–377
 - 43 Lee B C, Tsai J C, Hung C W, et al. High antimicrobial activity of lactoferricin-expressing *Bacillus subtilis* strains. [Microb Biotechnol](#), 2022, 15: 1895–1909
 - 44 Liu Y, Su A, Tian R, et al. Developing rapid growing *Bacillus subtilis* for improved biochemical and recombinant protein production. [Metab Eng Commun](#), 2020, 11: e00141
 - 45 LaCroix R A, Sandberg T E, O'Brien E J, et al. Use of adaptive laboratory evolution to discover key mutations enabling rapid growth of *Escherichia coli* K-12 MG1655 on glucose minimal medium. [Appl Environ Microbiol](#), 2015, 81: 17–30
 - 46 Wang Z, Liu J, Chen L, et al. Alterations in the transcription factors GntR1 and RamA enhance the growth and central metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. [Metab Eng](#), 2018, 48: 1–12
 - 47 Lee S R, Kim P. Current status and applications of adaptive laboratory evolution in industrial microorganisms. [J Microbiol Biotechnol](#), 2020, 30: 793–803
 - 48 Promdonkoy P, Mhuantong W, Champreda V, et al. Improvement in D-xylose utilization and isobutanol production in *S. cerevisiae* by adaptive

- laboratory evolution and rational engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2020, 47: 497–510
- 49 Seong W, Han G H, Lim H S, 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
- 50 Kim K, Hou C Y, Choe D, et al. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* W enhances gamma-aminobutyric acid production using glycerol as the carbon source. *Metab Eng*, 2022, 69: 59–72
- 51 Dev C, Jilani S B, Yazdani S S. Adaptation on xylose improves glucose-xylose co-utilization and ethanol production in a carbon catabolite repression (CCR) compromised ethanologenic strain. *Microb Cell Fact*, 2022, 21: 154
- 52 Chen F Y H, Jung H W, Tsuei C Y, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol. *Cell*, 2020, 182: 933–946.e14
- 53 Zhang B, Li N, Wang Z, et al. Inverse metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for xylose utilization based on adaptive evolution and whole-genome sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 885–896
- 54 Radek A, Tenhaef N, Müller M F, et al. Miniaturized and automated adaptive laboratory evolution: evolving *Corynebacterium glutamicum* towards an improved d-xylose utilization. *Bioresour Tech*, 2017, 245: 1377–1385
- 55 Wang Y, Cheng H, Liu Y, et al. In-situ generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming via CRISPR-guided base editing. *Nat Commun*, 2021, 12: 678
- 56 Tuyishime P, Wang Y, Fan L, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for methanol-dependent growth and glutamate production. *Metab Eng*, 2018, 49: 220–231
- 57 Wang Y, Fan L, Tuyishime P, et al. Adaptive laboratory evolution enhances methanol tolerance and conversion in engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Commun Biol*, 2020, 3: 217
- 58 Prell C, Busche T, Rückert C, et al. Adaptive laboratory evolution accelerated glutarate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2021, 20: 97
- 59 Ho P W, Swinnen S, Duitama J, et al. The sole introduction of two single-point mutations establishes glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK derivatives. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 10
- 60 Strucko T, Zirngibl K, Pereira F, et al. Laboratory evolution reveals regulatory and metabolic trade-offs of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2018, 47: 73–82
- 61 Zhu C, You X, Wu T, et al. Efficient utilization of carbon to produce aromatic valencene in *Saccharomyces cerevisiae* using mannitol as the substrate. *Green Chem*, 2022, 24: 4614–4627
- 62 Hansen A S L, Lennen R M, Sonnenschein N, et al. Systems biology solutions for biochemical production challenges. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 45: 85–91
- 63 Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, 2002, 420: 182–186
- 64 Choe D, Lee J H, Yoo M, et al. Adaptive laboratory evolution of a genome-reduced *Escherichia coli*. *Nat Commun*, 2019, 10: 935
- 65 Liu Y, Su A, Li J, et al. Towards next-generation model microorganism chassis for biomanufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 9095–9108
- 66 Hädicke O, Klamt S. Manipulation of the ATP pool as a tool for metabolic engineering. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43: 1140–1145
- 67 Man Z, Guo J, Zhang Y, et al. Regulation of intracellular ATP supply and its application in industrial biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, 40: 1151–1162
- 68 Zhou J, Liu L, Shi Z, et al. ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives. *Biotechnol Adv*, 2009, 27: 94–101
- 69 Zhu J, Shimizu K. The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure d-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64: 367–375
- 70 Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42–50
- 71 Sun T, Miao L, Li Q, et al. Production of lycopene by metabolically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 1515–1522
- 72 Qi H, Li S, Zhao S, et al. Model-driven redox pathway manipulation for improved isobutanol production in *Bacillus subtilis* complemented with experimental validation and metabolic profiling analysis. *PLoS ONE*, 2014, 9: e93815
- 73 Cordier H, Mendes F, Vasconcelos I, et al. A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol

- production. *Metab Eng*, 2007, 9: 364–378
- 74 Sanchez C, Neves A R, Cavalheiro J , et al. Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 1136–1144
 - 75 Zhang X, Liu S, Takano T. Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (AtMtATP6) confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 1289–1294
 - 76 Xu R, Wang D, Wang C, et al. Improved *S*-adenosylmethionine and glutathione biosynthesis by heterologous expression of an *ATP6* gene in *Candida utilis*. *J Basic Microbiol*, 2018, 58: 875–882
 - 77 Boecker S, Zahoor A, Schramm T, et al. Broadening the scope of enforced atp wasting as a tool for metabolic engineering in *Escherichia coli*. *Biotechnol J*, 2019, 14: e1800438
 - 78 Li X, Chen J, Andersen J M, et al. Cofactor engineering redirects secondary metabolism and enhances erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 655–670
 - 79 Liu J, Kandasamy V, Würtz A, et al. Stimulation of acetoin production in metabolically engineered *Lactococcus lactis* by increasing ATP demand. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 9509–9517
 - 80 Stark B C, Pagilla K R, Dikshit K L. Recent applications of *Vitreoscilla* hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 1627–1636
 - 81 Chen H, Chu J, Zhang S, et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves *S*-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 1205–1212
 - 82 Zupančič G D, Roš M. Aerobic and two-stage anaerobic-aerobic sludge digestion with pure oxygen and air aeration. *Bioresour Tech*, 2008, 99: 100–109
 - 83 Zhang J G, Wang X D, Zhang J N, et al. Oxygen vectors used for *S*-adenosylmethionine production in recombinant *Pichia pastoris* with sorbitol as supplemental carbon source. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105: 335–340
 - 84 Li D, Wang D, Wei G. Efficient co-production of *S*-adenosylmethionine and glutathione by *Candida utilis*: effect of dissolved oxygen on enzyme activity and energy supply. *J Chem Technol Biotechnol*, 2017, 92: 2150–2158
 - 85 Wang Z, Xiao Y, Chen W, et al. Functional expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) in *Arabidopsis* relieves submergence, nitrosative, photo-oxidative stress and enhances antioxidants metabolism. *Plant Sci*, 2009, 176: 66–77
 - 86 Li M, Meng X, Diao E, et al. Productivity enhancement of *S*-adenosylmethionine in *Saccharomyces cerevisiae* using n-hexadecane as oxygen vector. *J Chem Technol Biotechnol*, 2012, 87: 1379–1384
 - 87 Yamanaka K, Kito N, Imokawa Y, et al. Mechanism of epsilon-poly-L-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an epsilon-poly-L-lysine-degrading enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 5669–5675
 - 88 Wang D, Yu X, Gongyuan W. Pullulan production and physiological characteristics of *Aureobasidium pullulans* under acid stress. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 8069–8077
 - 89 Blank L M, McLaughlin R L, Nielsen L K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90: 685–693
 - 90 Wu G, Yan Q, Jones J A, et al. Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications. *Trends Biotechnol*, 2016, 34: 652–664
 - 91 Rugbjerg P, Sommer M O A. Overcoming genetic heterogeneity in industrial fermentations. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 869–876
 - 92 Alter T B, Ebert B E. Determination of growth-coupling strategies and their underlying principles. *BMC BioInf*, 2019, 20: 447
 - 93 Buerger J, Gronenberg L S, Genée H J, et al. Wiring cell growth to product formation. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 59: 85–92
 - 94 Atsumi S, Liao J C. Directed evolution of *Methanococcus jannaschii* citramalate synthase for biosynthesis of 1-propanol and 1-butanol by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 7802–7808
 - 95 Ye Z, Huang Y, Shi B, et al. Coupling cell growth and biochemical pathway induction in *Saccharomyces cerevisiae* for production of (+)-valencene and its chemical conversion to (+)-nootkatone. *Metab Eng*, 2022, 72: 107–115
 - 96 Trinh C T, Liu Y, Conner D J. Rational design of efficient modular cells. *Metab Eng*, 2015, 32: 220–231
 - 97 Wilbanks B, Layton D S, Garcia S, et al. A prototype for modular cell engineering. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 187–199
 - 98 Lv Y, Qian S, Du G, et al. Coupling feedback genetic circuits with growth phenotype for dynamic population control and intelligent bioproduction. *Metab Eng*, 2019, 54: 109–116

- 99 Wang T, Dunlop M J. Controlling and exploiting cell-to-cell variation in metabolic engineering. [Curr Opin Biotechnol](#), 2019, 57: 10–16
- 100 Xiao Y, Bowen C H, Liu D, et al. Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis. [Nat Chem Biol](#), 2016, 12: 339–344
- 101 Rugbjerg P, Sarup-Lytzen K, Nagy M, et al. Synthetic addiction extends the productive life time of engineered *Escherichia coli* populations. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2018, 115: 2347–2352
- 102 Lv Y, Gu Y, Xu J, et al. Coupling metabolic addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield. [Metab Eng](#), 2020, 61: 79–88
- 103 Zhou S, Yuan S F, Nair P H, et al. Development of a growth coupled and multi-layered dynamic regulation network balancing malonyl-CoA node to enhance (2S)-naringenin biosynthesis in *Escherichia coli*. [Metab Eng](#), 2021, 67: 41–52
- 104 Liu D, Mannan A A, Han Y, et al. Dynamic metabolic control: towards precision engineering of metabolism. [J Ind Microbiol Biotechnol](#), 2018, 45: 535–543
- 105 Tan S Z, Prather K L. Dynamic pathway regulation: recent advances and methods of construction. [Curr Opin Chem Biol](#), 2017, 41: 28–35
- 106 Lo T M, Chng S H, Teo W S, et al. A two-layer gene circuit for decoupling cell growth from metabolite production. [Cell Syst](#), 2016, 3: 133–143
- 107 Sowa S W, Gelderman G, Contreras L M. Advances in synthetic dynamic circuits design: using novel synthetic parts to engineer new generations of gene oscillations. [Curr Opin Biotechnol](#), 2015, 36: 161–167
- 108 Min B E, Hwang H G, Lim H G, et al. Optimization of industrial microorganisms: recent advances in synthetic dynamic regulators. [J Ind Microbiol Biotechnol](#), 2017, 44: 89–98
- 109 Wu M Y, Sung L Y, Li H, et al. Combining CRISPR and CRISPRi systems for metabolic engineering of *E. coli* and 1,4-BDO biosynthesis. [ACS Synth Biol](#), 2017, 6: 2350–2361
- 110 Soma Y, Tsuruno K, Wada M, et al. Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch. [Metab Eng](#), 2014, 23: 175–184
- 111 Gao C, Wang S, Hu G, et al. Engineering *Escherichia coli* for malate production by integrating modular pathway characterization with CRISPRi-guided multiplexed metabolic tuning. [Biotechnol Bioeng](#), 2018, 115: 661–672
- 112 Paradise E M, Kirby J, Chan R, et al. Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulating squalene synthase. [Biotechnol Bioeng](#), 2008, 100: 371–378
- 113 Tan S Z, Manchester S, Prather K L J. Controlling central carbon metabolism for improved pathway yields in *Saccharomyces cerevisiae*. [ACS Synth Biol](#), 2016, 5: 116–124
- 114 Ge C, Sheng H, Chen X, et al. Quorum sensing system used as a tool in metabolic engineering. [Biotechnol J](#), 2020, 15: 1900360
- 115 Gu P, Ma Q, Zhao S, et al. Application of quorum sensing system in microbial synthesis of valuable chemicals: a mini-review. [World J Microbiol Biotechnol](#), 2022, 38: 192
- 116 Haseltine E L, Arnold F H. Implications of rewiring bacterial quorum sensing. [Appl Environ Microbiol](#), 2008, 74: 437–445
- 117 Papenfort K, Bassler B L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. [Nat Rev Microbiol](#), 2016, 14: 576–588
- 118 Kim E M, Woo H M, Tian T, et al. Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*. [Metab Eng](#), 2017, 44: 325–336
- 119 Ge C, Yu Z, Sheng H, et al. Redesigning regulatory components of quorum-sensing system for diverse metabolic control. [Nat Commun](#), 2022, 13: 2182
- 120 Wu J, Zhou L, Duan X, et al. Applied evolution: dual dynamic regulations-based approaches in engineering intracellular malonyl-CoA availability. [Metab Eng](#), 2021, 67: 403–416
- 121 Wu J, Bao M, Duan X, et al. Developing a pathway-independent and full-autonomous global resource allocation strategy to dynamically switching phenotypic states. [Nat Commun](#), 2020, 11: 5521
- 122 Corrêa G G, Lins M R C R, Silva B F, et al. A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. [Metab Eng](#), 2020, 61: 326–334
- 123 Gupta A, Reizman I M B, Reisch C R, et al. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit. [Nat Biotechnol](#), 2017, 35: 273–279
- 124 Williams T C, Nielsen L K, Vickers C E. Engineered quorum sensing using pheromone-mediated cell-to-cell communication in *Saccharomyces cerevisiae*. [ACS Synth Biol](#), 2013, 2: 136–149
- 125 Williams T C, Aversch N J H, Winter G, et al. Quorum-sensing linked RNA interference for dynamic metabolic pathway control in

- Saccharomyces cerevisiae*. [Metab Eng](#), 2015, 29: 124–134
- 126 Xu M, Sun M, Meng X, et al. Engineering pheromone-mediated quorum sensing with enhanced response output increases fucosyllactose production in *Saccharomyces cerevisiae*. [ACS Synth Biol](#), 2023, 12: 238–248
- 127 Cui S, Lv X, Wu Y, et al. Engineering a bifunctional Phr60-Rap60-Spo0A quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*. [ACS Synth Biol](#), 2019, 8: 1826–1837
- 128 Xu P. Production of chemicals using dynamic control of metabolic fluxes. [Curr Opin Biotechnol](#), 2018, 53: 12–19
- 129 Schujman G E, Guerin M, Buschiazio A, et al. Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria. [EMBO J](#), 2006, 25: 4074–4083
- 130 Xu P, Li L, Zhang F, et al. Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 11299–11304
- 131 Xu J, Yang S, Yang L. *Vibrio natriegens* as a host for rapid biotechnology. [Trends Biotechnol](#), 2022, 40: 381–384
- 132 Weinstock M T, Hesek E D, Wilson C M, et al. *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology. [Nat Methods](#), 2016, 13: 849–851
- 133 Maida I, Bosi E, Perrin E, et al. Draft genome sequence of the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens* strain DSMZ 759. [Genome Announc](#), 2013, 1: e00648-13
- 134 Wang Z, Lin B, Hervey Iv W J, et al. Draft genome sequence of the fast-growing marine bacterium *Vibrio natriegens* strain ATCC 14048. [Genome Announc](#), 2013, 1: e00589-13
- 135 Tian R, Liu Y, Cao Y, et al. Titrating bacterial growth and chemical biosynthesis for efficient *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylneuraminic acid bioproduction. [Nat Commun](#), 2020, 11: 5078

Advances in bio-manufacturing of food functional factors based on regulating cell growth of model microorganism

WANG Bin^{1,2}, LV XueQin^{1,2}, LI JiangHua^{1,2}, LIU Long^{1,2}, DU GuoCheng^{1,2},
CHEN Jian^{1,2} & LIU YanFeng^{1,2}

1 Key Laboratory of Sugar Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

As the basic materials of functional food manufacturing, food functional factors are the physiological activators which play a vital role in regulating human performance, improving sleeping and accelerating growth. Synthetic biology, as a safer, healthier and sustainable approach to obtain food, has become the important technical support to promote the development of food industry. The synthetic pathway of food components is designed and constructed by synthetic biological technology in food synthetic biology, then an intelligent cell factory with food industry application capability is created. The synthesis efficiency of food functional factors and other high value-added products will be greatly improved. At present, the model microorganisms such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* and *Saccharomyces cerevisiae* are regarded as synthetic carriers of food functional factors. The bio-manufacturing of food functional factors has made great progress by finely regulating cell growth. This review summarized the current research strategies and progress in the synthesis of food functional factors based on regulating cell growth of model microorganism. We mainly focused on the aspects of improving the growth rate by transporters engineering, reprogramming cell energy metabolism, balancing cell growth and product synthesis. Finally, the current challenges were put forward and the future development was prospected.

food functional factor, synthetic biology, model microorganisms, growth regulation

doi: 10.1360/SSV-2023-0031



刘延峰, 江南大学未来食品科学中心研究员、博士生导师, 国家优秀青年科学基金获得者, 主要从事利用合成生物技术构建细胞工厂, 用于合成重要营养化学品及食品组分的研究. 作为第一/通讯作者在*Nature Chemical Biology*, *Nature Communications*和*Metabolic Engineering*等期刊发表论文30余篇; 以第一发明人获得授权发明专利12项, 其中授权美国发明专利2项; 作为项目负责人承担包括国家自然科学基金、江苏省优秀青年基金等在内的国家和省部级科研项目9项. 获得江苏省科学技术一等奖(2020)、闵恩泽能源化工奖青年进步奖(2019). 现为中国微生物学会工业生物微生物学专业委员会委员, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*和*Fermentation*期刊编委、*Food Bioengineering*期刊青年编委.