

· 综 述 ·

适应性实验室进化技术在微生物育种中的应用进展

李建, 孔婧, 李圣龙, 赵禹, 赵雅坤, 肖冬光, 于爱群

天津科技大学 生物工程学院 省部共建食品营养与安全国家重点实验室 工业发酵微生物教育部重点实验室,
天津 300457

李建, 孔婧, 李圣龙, 等. 适应性实验室进化技术在微生物育种中的应用进展. 生物工程学报, 2021, 37(1): 130-141.

Li J, Kong J, Li SL, et al. Advances in adaptive laboratory evolutionary engineering to microbial breeding. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 130-141.

摘要: 适应性实验室进化 (Adaptive laboratory evolution, ALE) 技术已成为微生物学基础研究和工业微生物育种的强大工具, 被广泛用来研究影响菌株表型、性能和稳定性的进化潜力以及快速获取含有有益突变的工业生产菌株。近年来, 随着基因组测序技术的进步, 关于微生物新陈代谢机理和动力学方面的研究变得更加广泛和深入, 这也极大促进了适应性实验室进化技术的快速发展。文中主要介绍了长期、短期适应性实验室进化技术在微生物育种方面的应用实例, 并总结归纳了该技术在快速高效构建优良菌株过程中的方式与作用。最后分析了目前 ALE 技术面临的瓶颈问题及其可能的解决方法, 以期能够为该技术的未来发展提供有价值的参考依据。

关键词: 适应性实验室进化, 长期适应, 短期适应, 适应性改造, 生长速率优化, 耐受性

Advances in adaptive laboratory evolutionary engineering to microbial breeding

Jian Li, Jing Kong, Shenglong Li, Yu Zhao, Yakun Zhao, Dongguang Xiao, and Aiqun Yu

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of the Ministry of Education, State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: In recent years, adaptive laboratory evolution (ALE) has emerged as a powerful tool for basic research in microbiology (e.g., molecular mechanisms of microbial evolution) and efforts on evolutionary engineering of microbial strains (e.g., accelerated evolution of industrial strains by bringing beneficial mutations). The ongoing rapid development of next-generation sequencing platforms has provided novel insights into growth kinetics and metabolism of microbes, and thus led to great advances of this technique. In this review, we summarize recent advances in the applications of long-term and short-term ALE techniques mainly for microbial strain engineering, and different modes of ALE are also introduced. Furthermore, we discuss the current limitations of ALE and potential solutions. We believe that the information reviewed here

Received: April 21, 2020; **Accepted:** May 20, 2020

Supported by: Natural Science Foundation of Tianjin, China (No. 17JCYBJC40800), Research Foundation of Tianjin Municipal Education Commission, China (No. 2017ZD03).

Corresponding author: Aiqun Yu. Tel: +86-22-60602723; E-mail: yuaiqun@tust.edu.cn

天津市自然科学基金 (No. 17JCYBJC40800), 天津市教委科研计划项目 (No. 2017ZD03) 资助。

网络出版时间: 2020-06-05

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200604.1630.001.html>

will make a significant contribution to further advancement of ALE.

Keywords: adaptive laboratory evolution, long-term adaptation, short-term adaptation, adaptive modification, growth rate optimization, tolerance

随着微生物培养、DNA 测序、生物信息学和基因工程等技术的发展,利用微生物的自然选择过程来获取全新表型并对表型特征及其产生原因进行分析的研究变得日益重要。而适应性实验室进化(Adaptive laboratory evolution, ALE) 又是其中的典型代表之一,目前已被广泛应用于进化对菌株表型特征、生理生化特性、发酵性能和遗传稳定性的影响及其分子机制的研究;同时,该技术也已成为快速高效构建优良微生物工程菌株的强大工具。

由于微生物分子定向育种(基因工程育种)技术容易受到宿主菌遗传背景缺乏及表型间相互作用的影响,所以一些微生物学家开始尝试采用 ALE 策略(如连续传代、电镀或冷冻循环)来进化他们的目标微生物,并且取得了不错的效果。针对微生物的 ALE 技术中最典型的策略是:在实验室里的特定环境条件下对微生物菌株进行培养,促使菌株完成适应性自然进化,最后通过筛选获得具有有益突变的目的菌株^[1]。简单来说,ALE 技术是通过施加人为干扰及控制微生物生长环境以促进微生物的进化过程^[2]。有学者认为,根据作用时间的长短可以将 ALE 技术通分为长期 ALE 和短期 ALE 两大类。其中,长期 ALE 通常需要经历数十甚至数百次的传代,而短期 ALE 往往仅需数次传代或数十小时即可完成。长期 ALE 技术通常是以特定或逐渐叠加的选择压力为基准来筛选性能优良的突变体,它在提高微生物菌株抗逆性方面效果尤其显著,因此多应用于提

高工业菌株在不同生产条件下的生长性能^[2]。但这一过程非常耗时,通常需要超过数十次的反复筛选和连续传代培养后才有可能得到性状优良的进化菌株^[3]。短期 ALE 技术是将微生物在培养期间预先暴露于抑制剂胁迫环境中,以提供短期适应性并在发酵过程中改善发酵性能。与长期 ALE 相比,短期 ALE 具有耗时短、见效快、进化方向更单一的特点(表 1)。此外,在长期适应过程中,长时间处于高抑制剂浓度的微生物会产生一系列基因型的变化来响应外界胁迫压力^[4],从而得到既能耐受不利的生长环境,又能在有利的培养条件下快速生长的微生物菌株。而短期适应的结果往往取决于表达的表型和表型异质性^[5],即微生物在短期适应过程中诱导产生的表型只能在特定的环境因素下发挥作用。通过选择相应的适应性改造策略,既能够使研究微生物菌株在工业环境下的适应性变化机制成为可能,又能够为工业生产提供稳定性更高、性能更优良的微生物宿主。

对于微生物育种来说,目前的研究结果已经表明 ALE 技术具有能够提供充足的遗传多样性、积累丰富的有益突变体或目标表型以及产生有益突变的速度相对较快等特点^[6]。通过全基因组测序的方法可以对进化后的菌株或种群的基因型进行快速分析,从而阐明菌株的进化方向及优良菌株的分子进化机制,也能为后续进一步实现菌株的定向遗传改造提供新的干预靶点和方向^[7]。因此,ALE 技术与全基因组测序及功能分析相结合,又极大

表 1 长期 ALE 和短期 ALE 技术主要的技术特点

Table 1 The main characteristics of long-term ALE and short-term ALE

	Long-term ALE	Short-term ALE
Growth	Tens or even hundreds of generations	A few to several dozen hours
Phenotype	Very stable	Stable
Effectivity	Quickly	Slowly
Evolutionary direction	Diversification	Simplification

推动了 ALE 技术在微生物学基础研究和微生物育种中的应用^[8-9]。近年来,已有一些关于长期 ALE 技术在实验系统和分析方法等方面的综述^[1,10-11]。本文将着重介绍长期 ALE 技术和短期 ALE 技术在微生物育种领域中的一些重要创新实例及其进化机理,并首次比较分析了长期 ALE 技术和短期 ALE 技术在实验应用中的各自优势、不足和发展趋势。

1 长期 ALE 在微生物育种中的应用

与短期 ALE 技术,长期 ALE 技术稳定性更强、可靠性更高,因此其应用范围更加广泛。目前,长期 ALE 通常是以分批培养和连续培养两种主要方式进行的^[6,12]。当然,根据特定目的和需求的不同,也可以采取不同的策略和方法,例如,

可以将微生物培养在具有抗生素梯度大型培养皿上,用肉眼即可观察到适应性实验室进化菌株的产生^[13]。根据长期 ALE 在微生物育种过程中达成结果的不同,目前可以大致将其分为以下几个应用领域:1) 增加耐受性;2) 提高生长速率;3) 增加底物利用率;4) 提高产物产量(图 1)。

1.1 增加耐受性

当工程菌株存在于一定的胁迫压力下,如复杂的生长环境、特定的抑制剂或生物分子胁迫等,细胞就会做出应激反应,从而导致细胞结构和生理特性的变化以及代谢失调的产生,最终使得菌株生长受到明显的抑制。目前的研究表明,长期 ALE 技术已经成为了能够克服上述不利影响,从而增加工业或实验室中有价值的菌株的稳定性和

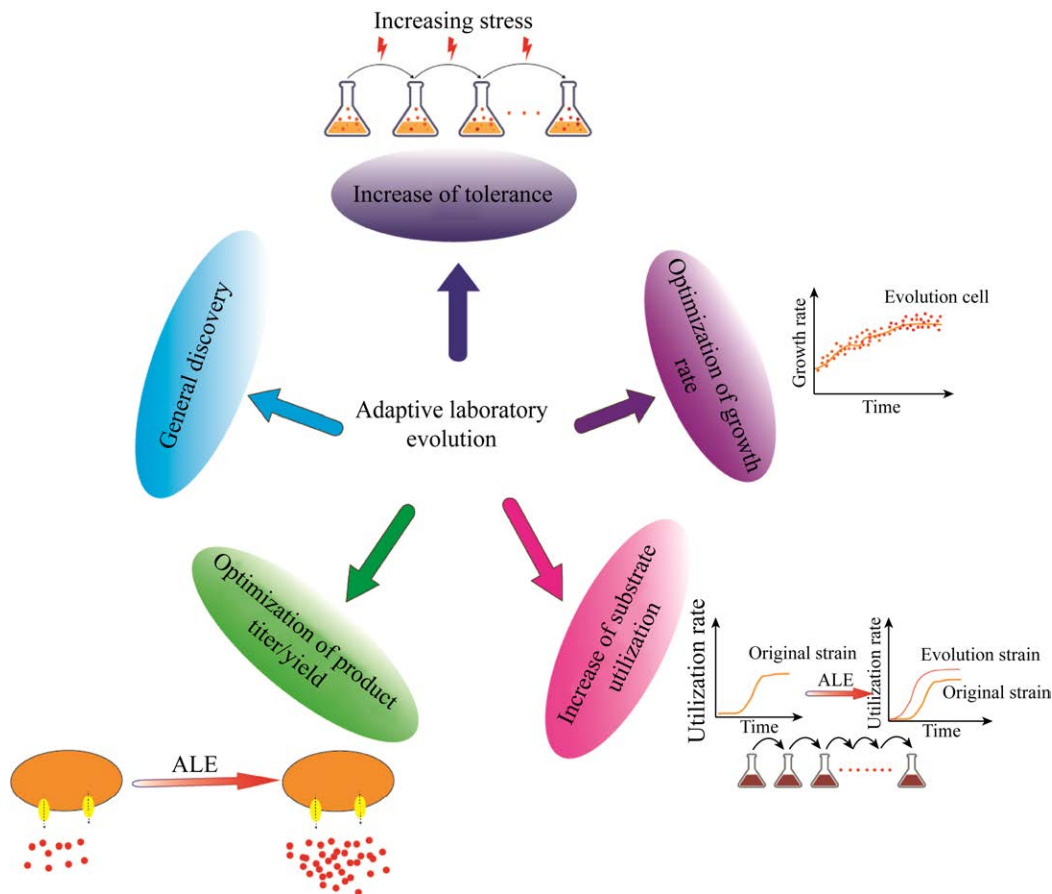


图 1 长期 ALE 技术的主要应用领域分类

Fig. 1 Classification of main application fields of long-term ALE.

实用性的有效工具。研究者们利用长期 ALE 技术已经从不同的 pH 值^[14]、渗透压^[15-16]、温度^[17]、UV 照射^[18]、抑制剂 (最常见的是生物质预处理过程中产生的代谢副产物)^[19-21]和营养因素^[22-23]等方面调查研究了微生物对胁迫环境的适应性反应机制,表明利用长期 ALE 技术来了解应激反应和克服生长抑制是一种非常有效的解决策略。而且,长期 ALE 技术也证明了生长环境胁迫通常会诱发复杂的全局生理反应。因此,在目前很难通过理性设计实现对大量基因的表达进行准确调节的背景下,通过 ALE 技术来提高菌株对不同环境胁迫的耐受性和构建更健壮的微生物生产菌株就显得尤其重要。

具有潜在应用价值的高附加值化合物往往由于毒性影响而不能在微生物宿主中进行大量(同源或异源)合成。Royce 等^[24]在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中利用长期 ALE 技术成功解决了这一问题。在异源目标产物——辛酸浓度梯度增加的培养基中经过连续 17 次传代,最终筛选得到的进化菌株对辛酸的耐受性大大提高;同时进化菌株对其他脂肪酸以及丁醇的耐受性也得以提高;更为重要的是,辛酸的终产量增加了 5 倍。与此同时,研究者们分别对进化菌株与出发菌株细胞膜的流动性、完整性和组成方面进行了比较,结果发现进化菌株具有明显更长的膜脂质,而膜的流动性和完整性也发生了改变,这说明细胞膜组成和结构的变化有可能是导致大肠杆菌工程菌株耐受性提高的原因之一。此外,其他研究者们也发现微生物在不同环境胁迫下细胞膜组成的变化可能对菌株耐受性的提高具有重要的作用^[25]。很明显,这些结果可以为后续通过代谢工程手段理性改造微生物来提高菌株耐受性的研究提供理论指导。

在以前的研究中,已经有了很多关于酵母本身的丙酸耐受机制的报道^[26],以研究其对有机酸食品防腐剂的耐受机理。但是由于酵母先天的耐受能力与工业发酵所需还相差甚远,这也阻碍了用于丙酸生产的微生物细胞工厂的发展。Xu 等^[27]对酿酒

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D 菌株进行了丙酸胁迫下 64 d 的长期 ALE,使得工程菌株对丙酸的耐受性提高了 3 倍以上;同时也赋予了工程菌株对乙酸、苯甲酸和三梨酸等多种有机酸(木质纤维素水解产物)的高耐受性;这对未来利用酿酒酵母进行从木质纤维素原料到有机酸等高附加值化学品的生物转化具有重要意义。紧接着,通过全基因组测序和 CRISPR-Cas9 介导的逆向工程揭示了进化菌株中细胞膜上编码高亲和力 K⁺转运蛋白的 *TRK1* 基因发生了突变。通过对该突变菌株的研究证明了丙酸的解毒机制主要取决于 K⁺的吸收和积累,从而可以维持细胞 pH 和膜电位的稳定,并且研究中也证明了该机制对于多种有机酸都有相同的作用。该研究揭示了长期 ALE 技术可用于提高酵母菌株对丙酸的耐受性,这为构建高效生产丙酸的酵母细胞工厂提供了新的见解。在另一项研究中,Tilloy 等^[15]利用长期 ALE 策略评估了 *S. cerevisiae* Lalvin EC1118 菌株在高渗胁迫下产生更多甘油和更少乙醇的进化潜力。在经过 200 次传代以后得到的进化菌株在成功实现了提高甘油生产的同时也降低了乙醇代谢;长期 ALE 技术产生的进化菌株可以用于低酒精含量的葡萄酒生产。之后,为了提高酵母产甘油的能力并降低其乙醇代谢,该团队采用杂交育种策略,将进化菌株中甘油产量最高和乙醇代谢最低的两个单倍体孢子进行杂交,最终得到了性能更加优良的菌株。该研究表明,将长期 ALE 技术与其他微生物育种策略相结合能够有效提高非理性设计的微生物菌株的性能。

此外,长期 ALE 技术也被证明可以用来同时增加菌株对多个压力的耐受性。例如,Wallace-Salinas 等^[28]利用长期 ALE 技术在高温和生物质水解抑制剂胁迫的条件下经过 280 次连续传代的分批培养,最终筛选得到了能够同时耐受高温(39 °C)和生物质水解抑制剂(50%)的酿酒酵母进化菌株。该研究将菌株的耐热性与水解抑制剂的耐受性相结合,通过同时进行糖化和发

酵来提高工程菌株的生产效率,并降低冷却成本。值得注意的是,正常情况下,微生物在一个独立的成长环境中,对一种胁迫压力的耐受性往往根据所获得的特定突变而伴随着权衡——当菌株进化到高温时,就可能无法适应低温条件。而通过 ALE 技术带来的突变往往能够冲破这种权衡。例如, Rodriguez-Verdugo 等^[29]使用长期 ALE 技术在热胁迫条件下进行了 2 000 次传代的进化实验,最终得到了既能够在高温下 (45 °C) 生长又能在低温下 (20 °C) 生长的大肠杆菌进化菌株。通过对 114 个进化菌株进行全基因组测序,结果发现进化菌株主要是通过两种适应性途径的突变来分别改善微生物对高温和低温的耐受性,分别是 RNA 聚合酶 (RNAP) β 亚基基因 (*rpoB*) 的突变和 RNAP 终止因子 *rho* 中的突变。另外,该研究者证明了 *rpoB* 的适应性突变会在热胁迫下减慢 RNAP 的转录,从而导致转录终止效率提高;*rho* 的突变则导致 *rho* 基因的表达量增强从而也提高了转录终止效率。因此,长期 ALE 技术为我们了解微生物菌株的耐受机制以及构建更健壮的微生物菌株提供了一个新的思路。但是,该研究也发现进化菌株的遗传特征存在不稳定、容易发生变异的现象。这就需要研究者们利用代谢工程等策略进一步调控进化过程,从而确保进化菌株的遗传稳定性。表 2 对相关典型案例进行了总结。

1.2 提高生长速率

“适应度” (Fitness) 是决定进化过程中的一个重要参数,具有许多影响因素。在长期 ALE 中,

生长速度 ($\ln(2)/$ 倍增时间) 通常是最重要的适应度决定因素^[30]。目前, ALE 技术已被成功应用于优化微生物的生长速率^[31-34]、改善生长缺陷^[35-36]以及调查生长速率变化规律的研究中^[8,37]。例如, LaCroix 等^[32]使用 *E. coli* K-12 MG1655 菌株在最适培养基中进行了 81 d 的 ALE, 筛选得到的进化菌株的生长速率比出发菌株提高了 1.6 倍。全基因组测序结果表明,这种快速生长的表型主要是全局转录基因 *rpoB*、代谢基因 *pyrE*、*rph* 和 DNA 结构基因 *hns*、*tdk* 的突变所导致的。之后研究者将转录组学分析方法与基因组规模的建模方法相结合,以期确定进化菌株的基因型-表型关系。例如, *pyrE* 基因表达量显著上调,可能帮助缓解嘧啶假营养缺陷现象的发生;*rph* 基因编码的是磷酸依赖性核糖核酸外切酶 RNase PH, 它的表达量下调可能对适应度没有益处;*tdk* 基因表达量下调,可能帮助改善 DNA 合成过程中存在的失衡问题。

在另一项研究中, Pfeifer 等^[33]对谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 菌株和它的无突变前体 MB001 的 ALE 进行了比较,以提高在葡萄糖基本培养基上的生长速率。研究表明,两种菌株在基因组重排和突变频率上并没有显著差异。经 100 次传代后分离出来的进化菌株的生长速率提高了 26%。全基因组测序的结果显示进化菌株中丙酮酸激酶编码基因 (*pyk*)、磷酸果糖激酶基因 (*fruk*) 和镁转运蛋白基因 (*corA*) 发生了突变。*pyk* 和 *fruk* 基因的突变加速了葡萄糖消耗速率和 *ptsG* 启动子的表达,这可能是导致进

表 2 长期 ALE 技术提高微生物对非生物胁迫抗性的典型例子

Table 2 Representative examples of the improvement of microbial resistance to abiotic stresses by long-term ALE

Strains	Abiotic stresses	Evolution traits	References
<i>E. coli</i> ML115	High concentration of octanoic acid	Evolution for octanoic acid tolerance increased fatty acid production 5 fold	[24]
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	High concentration of propionic acid	Propionic acid tolerance increased more than 3 fold	[27]
<i>S. cerevisiae</i> wine yeast strain Lalvin EC1118	Hyperosmotic stress	Enhanced glycerol and reduced ethanol yields	[15]
<i>S. cerevisiae</i> ER	High temperature and inhibitor	Enhanced temperature and inhibitor tolerance	[28]
<i>E. coli</i> REL1206	High temperature	Tolerance to both high and low temperatures	[29]

化菌株在葡萄糖基本培养基上加速生长的原因, 而 *corA* 基因的突变则改善了微生物在 Mg^{2+} 胁迫条件下的生长性能。因此, 该研究确定了导致谷氨酸棒杆菌在葡萄糖基本培养基中生长性能更好的关键突变, 这些确定的突变可为后续利用代谢工程策略提高该微生物在葡萄糖基本培养基上的生长速率提供参考依据。此外, 很多研究者还在酵母中也进行了利用长期 ALE 技术提高生长速率的工作, 并获得了性能更加优良的菌株^[31,38]。值得注意的是, 长期 ALE 技术在提高微生物生长速率的同时往往会带来其他有益性状, 如生物量或产物产量的提高^[31,34]。有了长期 ALE 的实验数据, 研究者就可以进一步利用基因敲除等定向育种策略来改善工程菌株在不同培养基条件下的生长状况。

并且, ALE 技术还被成功应用于修复针对特定代谢表型进行理性设计菌株的适应度缺陷。例如, McCloskey 等^[39]发现催化糖酵解的 *pgi* 基因的敲除会使 *E. coli* K-12 MG1655 菌株的生长速率下降约 80%。通过长期 ALE 之后, 最终成功得到了能够克服适应度缺陷、恢复正常生长速率的表型。虽然到目前为止, 对大肠杆菌如何克服了基因损失所带来的适应度缺陷的机理尚不完全清楚, 但是可以肯定的是, 长期 ALE 技术可以为改良工程菌株的生长速率提供可能性。表 3 对相关典型案例进行了总结。

1.3 增加底物利用率

在微生物发酵过程中, 生物体的适应度与有效吸收和代谢限速生长营养因子的能力 (底物利用率) 之间存在着直接联系。此外, 底物利用率的提高有

助于更多利润的获得^[40]。目前, 长期 ALE 技术已被广泛应用于提高酿酒酵母的底物利用率^[41-43]。例如, Ho 等^[41]研究发现酿酒酵母 CEN.PK113 菌株在经过 60 次传代的长期 ALE 后得到的进化菌株可以在甘油为碳源的培养基上达到 $0.130\ h^{-1}$ 的生长速率。通过对进化菌株进行全基因组测序分析, 推测 *ubr2* 和 *gut1* 基因编码序列中的两个点突变可能引起了菌株在甘油培养基中的生长性能改善。随后逆向工程的结果证实了 *ubr2* 和 *gut1* 的突变对 CEN.PK113 菌株高效利用甘油的重要性。

此外, 研究者在大肠杆菌以及其他细菌中也作了很多相似的研究^[44-45]。例如, González-Villanueva 等^[46]在含有 0.5% (W/V) 甘油的矿物盐培养基中对钩虫贪铜菌 *Cupriavidus necator* H16 菌株进行了 6 轮 (每轮 5-7 次传代) 的连续传代过程, 筛选得到了可以同时利用葡萄糖酸盐和甘油的进化菌株; 同时, 进化菌株在甘油培养基中的生长速率与出发菌株相比提高了 9.5 倍; 进化菌株中聚羟基丁酸酯的积累量也更多。对出发菌株和 3 株进化菌株的全基因组测序分析确定了基因组中的 4 个非同义突变, 之后通过进一步的研究证实了甘油激酶基因 *glpK* 的突变是甘油利用率提高的关键因素。此外, 研究者还将进化菌株在利用纯甘油方面的优越性能又扩展至工业脂肪分解过程中的粗甘油上, 且取得了令人满意的成果。在另一项研究中, Vasconcellos 等^[47]在汉氏驹形杆菌 *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 菌株中采用长期 ALE 策略, 在含有玉米秸秆水解液的培养基中经过 12 轮实验进化产生了可抵抗酚类抑制的进化菌株, 对该抑制剂的耐受性提高了 2 倍以上;

表 3 长期 ALE 技术提高微生物生长速率的典型例子

Table 3 Representative examples of the improvement of microbial growth rates by long-term ALE

Strains	Abiotic stresses	Evolution traits	References
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	Glucose	Fitness increases up to 1.6 fold	[32]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Glucose	The growth rates were increased by 26%	[33]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 4324, cc4326, cc4334	Nitrogen starvation	The growth rates were increased by 17%–48%	[34]
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	Knockout <i>pgi</i> gene	The growth of <i>pgi</i> knockout strain was recovered	[39]

同时纳米纤维素的产量提高了 49%。以上结果凸显了长期 ALE 技术在提高微生物菌株对不同底物利用率方面的明显作用；而且，长期 ALE 技术在帮助进化出能够利用不易分解但容易获得的木质纤维素、木糖、甘油等廉价碳源的微生物菌株方面同样具有很好的潜力。表 4 对相关典型案例进行了总结。

1.4 提高产物产量

实现目标代谢产物产量的最大化是微生物发酵工业追求的终极目标之一。微生物育种以及发酵工艺优化则是实现该目标的两个重要途径。虽然微生物已经自然进化出多种机制来应对外部环境压力^[48-49]，但是，这些自然进化的机制通常还不足以应对菌株在工业生产中遇到的复杂环境的影响，最终导致菌株生长效率和产物产量受到了影响。由于微生物细胞中的碳代谢和能量代谢的高度复杂性，多数情况下还难以通过代谢工程等理性设计方法来实现对发酵过程中微生物所生产目标产物产量的控制，而长期 ALE 技术无需对复杂的微生物生理学有深入的了解，就能够通过提高菌株对胁迫的耐受性、优化代谢物的产生途径、提高代谢通量等方式来帮助获得目的产物高产菌株，发展前景广阔^[50-51]。

例如，Wang 等^[52]利用基因组复制工程技术 (Genome replication engineering assisted continuous evolution, GREACE) 辅助长期 ALE 技术对 *E. coli* MG1655 菌株进行了连续进化，最终筛选得到了高产赖氨酸的进化菌株；与出发菌株相比，进化菌株中赖氨酸的产量提高了 14.8%。通过进一步的基因组学和代谢组学分析，揭示了鲱精胺酶基因

(*speB*)、FoF1 型 ATP 合酶的膜亚基基因 (*atpB*) 和前蛋白转位酶亚基基因 (*secY*) 的突变导致了大肠杆菌对赖氨酸终点发酵液耐受性的提高。此外，长期 ALE 技术所导致的突变有助于维持菌株在应激条件下的细胞完整性以及增强赖氨酸合成的代谢通量。因此，长期 ALE 技术与基因组复制工程技术的结合对改善菌株高产目的产物具有明显的效果，这为 ALE 技术的发展提供了新的方向。

虽然长期 ALE 技术能够帮助获取性能更佳的进化菌株，但是通常需要有效的筛选方法的辅助。Mahr 等^[53]在 *C. glutamicum* ATCC 13032 菌株中使用基于生物传感器的细胞分选技术与长期 ALE 技术相结合的方法，最终筛选得到的进化菌株中缬氨酸产量提高了约 25%，并且代谢副产物的生成减少了 3-4 倍。该结果也证明了长期 ALE 技术与其他筛选方法的有效结合是快速获取有益突变表型的理想策略。

此外，目前利用基因组建模技术已经能够预测出特定基因敲除或插入对菌株生长及产物合成的影响^[54-56]。在 Jantama 等^[57]的一项研究中，利用这种基于建模的理性设计与长期 ALE 技术相结合，通过将中央厌氧发酵基因 (*ldhA*、*adhE*、*ackA*) 敲除的大肠杆菌 (这些基因的敲除能够迫使 NAD⁺在厌氧条件下通过苹果酸盐和琥珀酸盐产生途径再生) 进行超过 2 000 次传代的生长，最终得到了一株生长旺盛的进化菌株，并提高了苹果酸和琥珀酸的产量。因此，随着我们对微生物代谢和调控研究的不断深入，理性设计方法与长期 ALE 技术的结合使用势必将会在微生物育种领域有更多的应用。表 5 对相关典型案例进行了总结。

表 4 长期 ALE 技术提高微生物底物利用率的典型例子

Table 4 Representative examples of the improvement of microbial substrate utilization by long-term ALE

Strains	Abiotic stresses	Evolution traits	References
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113	High concentration of glycerol	The glycerol utilization rate and growth rate were improved	[41]
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Mixed gluconate-glycerol carbon sources	The growth rate was improved by 9.5 fold, utilization rate of glycerol and crude glycerol increased obviously	[46]
<i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769	Corn stover hydrolysate	The tolerance and nanocellulose yield were increased by 2 fold and 49%, respectively	[47]

表 5 长期 ALE 技术提高微生物产物产量的典型例子

Table 5 Representative examples of the improvement of microbial product titers by long-term ALE

Strains	Abiotic stresses	Evolution traits	References
<i>E. coli</i> MG1655	Lysine endpoint fermentation broth	The lysine yield was increased by 14.8%	[52]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	None	The L-valine titer was increased by 25%; a 3–4 fold reduction of by-product formation	[53]
<i>E. coli</i> C (ATCC 8739)	None	The growth rate of strain and the yield of dicarboxylic acid were both improved	[57]

2 短期 ALE 在微生物育种中的应用

目前,短期 ALE 技术主要应用于改善微生物菌株在含有发酵抑制剂的培养基条件下的生长和发酵性能。例如,以木质纤维素类物质为原料进行发酵时,在木质纤维素预处理的过程中会产生多种发酵抑制剂,这些抑制剂的存在会抑制菌株的生长。实验证明,利用短期 ALE 技术将菌株预先暴露于存在抑制剂的发酵培养基中是提高菌株对木质纤维素类抑制剂耐受性的有效策略。与长期 ALE 技术相比,短期 ALE 技术能够在较短的时间内获得相对稳定的耐受表型;而长期 ALE

技术所得到的进化菌株表型往往更加稳定、耐受强度更高;因此两者各具优势。在短期 ALE 技术对微生物进行育种的具体应用中,抑制剂对菌株的作用方式主要有逐渐增加浓度、恒定浓度和脉冲浓度 3 种(图 2)。

到目前为止,该技术在酿酒酵母中的应用最为广泛。例如,Gu 等^[58]选择香草酸、对羟基苯甲酸和丁香酸作为酚酸的模型化合物,通过短期 ALE 得到了比生长速率提高 2–3 倍的酿酒酵母进化菌株。研究表明,多种酚酸对酵母细胞的生长具有协同抑制作用,酚酸对酿酒酵母的毒性机理是由于其疏水性芳香环引起的细胞质膜损伤和羧基团解

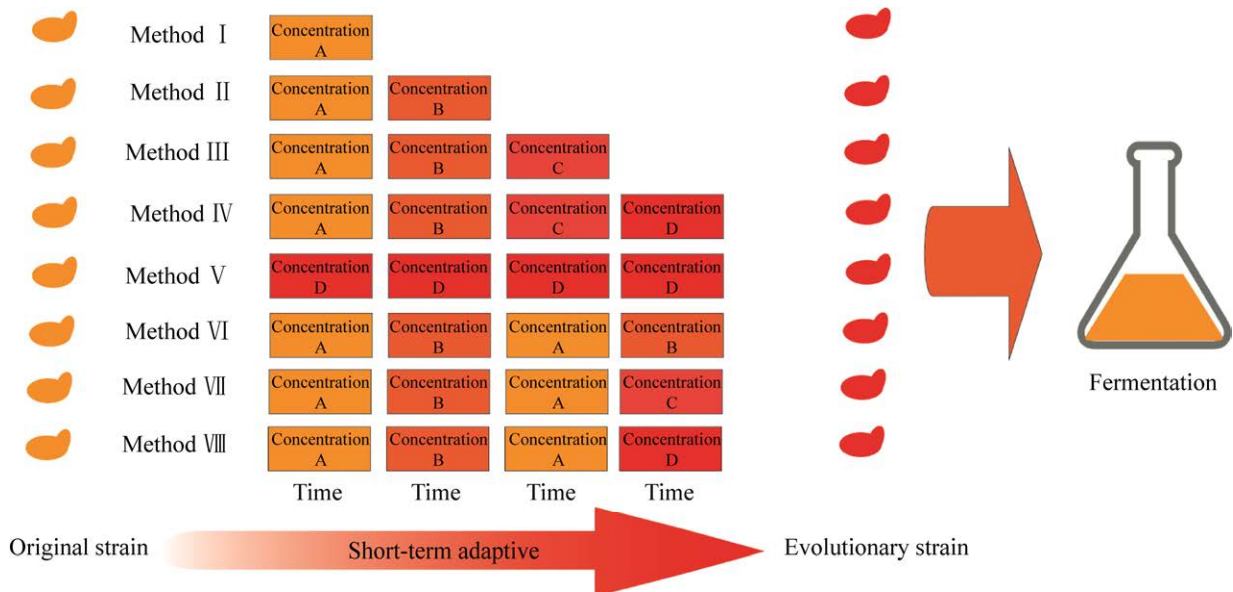


图 2 短期 ALE 技术提高菌株耐受性的进化方法(方法 I、V: 恒定浓度;方法 II、III、IV: 逐渐增加浓度;方法 VI、VII、VIII: 脉冲浓度. A、B、C、D: 指抑制剂的浓度,浓度 A<浓度 B<浓度 C<浓度 D)

Fig. 2 Typical methods of improving strain tolerance by short-term ALE. Method I and V: direct adaptation to constant concentration, method II, III and IV: stepwise adaptation to the increasing concentration, method VI, VII and VIII: pulse adaptation to high concentration. A, B, C and D: inhibitors concentration and A<B<C<D.

离引起的细胞内酸化的综合作用,而在短期适应过程中细胞产生的形态变化可以帮助维持细胞膜的完整性从而提高进化菌株对抑制剂的耐受性。

Tomás-Pejó 等^[59]在酿酒酵母细胞培养时添加木质纤维素水解产物使细胞预先适应抑制剂。结果表明,与未适应的菌株相比,短期适应菌株的延滞期明显缩短,比生长速率也显著提高。此外,这种短期适应策略还将菌株的乙醇生产能力提高了80%。这也充分证明了在发酵过程中进行适当的短期适应策略具有显著提高菌株生产性能潜力。该研究者对适应菌株进行 qPCR 分析显示,分别编码醇脱氢酶、醛脱氢酶和过氧化氢酶的 *ADH6*、*ALD6* 和 *CTA1* 基因表达量明显上调,这可能与其对抑制剂耐受性的提高有关;而编码胞质葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 *zwf1* 基因表达量下调,进一步的研究表明 *zwf1* 基因的敲除确实能够提高乙醇产量。该研究结果为以后通过理性设计继续提高微生物对该类抑制剂的耐受性及乙醇产量提供了可行性参考。

Gu 等^[60]将 *S. cerevisiae* DQ1 菌株预先培养在逐步增加玉米芯残留物浓度的培养基中,通过短期适应得到的进化菌株在发酵过程中延滞期明显缩短且发酵性能明显提高,乙醇产量和产率也得以提高。该研究也为改善酿酒酵母在以工业废玉米芯残留物为原料进行同步糖化和乙醇发酵的工业生产提供了一种简便且实用的策略。

在另一项研究中,Venkatachalam 等^[61]尝试利用短期 ALE 技术对 *S. cerevisiae* TMB3500 菌株在低 pH 的培养环境下进行培养,结果显著提高了酿酒酵母菌株在 pH 5.0 和 pH 4.5 时的生长性能。但在 pH 为 4.0 和 3.7 时,进化菌株的生长并没有

明显改善,这可能是由于低 pH 和不同抑制剂的协同作用所导致的。紧接着,研究者又利用长期 ALE 技术对该菌株进行了长达 3 600 h 的传代培养最终获得了能够在 pH 3.7 条件下生长和生产乙醇的进化菌株,并将其应用于将木质纤维素转化为燃料乙醇的生产中。而且,所得到的进化菌株能够在较低的 pH 环境中生长,这有利于在种子培养过程中避免染菌现象的发生,应用前景广阔。DNA 指纹图谱的结果显示,进化菌株并没有发生重大的重排现象。但进化菌株的细胞膜明显增厚,这也再次印证了细胞膜组成和结构对微生物耐受性的重要作用。表 6 对相关典型案例进行了总结。

3 总结与展望

近年来,对于微生物育种来说,ALE 技术已经成为快速高效构建优良菌株的一种非常有效的补充策略。很多情况下,与分子定向育种相比,利用 ALE 技术更容易得到有价值的突变表型。虽然,进化菌株的因果突变很容易通过基因组测序分析来确定,但解释突变表型影响背后的分子因果关系往往非常具有挑战性。通过对 ALE 技术所产生突变表型的分子机制进行深入研究,就可以找到新的遗传修饰靶点。并且,探究基因型变量与表型变量之间的关系是一项重要的研究内容,这对进一步采取理性设计的方法改造目标微生物的研究势必能够起到极大的推动作用。

然而,ALE 技术仍然存在许多问题。首先,进化过程既耗时又昂贵,这也是限制该技术广泛应用的主要原因。第二,进化产生的表型可能与预期结果相反。此时,需要通过更换出发菌株或

表 6 短期 ALE 技术提高微生物对非生物胁迫抗性的典型例子

Table 6 Representative examples of the improvement of microbial resistance to abiotic stresses by short-term ALE

Strains	Abiotic stresses	Evolution traits	References
<i>S. cerevisiae</i> (Angel Yeast, Phenolic acids No. 80000012)		The specific growth rates were improved by 2–3 fold, tolerance to phenolic acids was increased obviously	[58]
<i>S. cerevisiae</i>	Lignocellulosic hydrolysates	Shorter lag phases; higher specific growth rates; ethanol yield was increased by 14.8%	[59]
<i>S. cerevisiae</i> DQ1	Industrial waste corncob residues	Shorter lag phase; fermentative ability was enhanced	[60]
<i>S. cerevisiae</i> TMB3500	Low pH	The ability to grow and ferment at pH 3.7 with inhibitors	[61]

调整微生物生长条件等方式来获得目标进化菌株。第三, ALE 技术所产生的进化菌株的遗传特性也存在不稳定、容易发生变异的问题, 对这一问题分子机制的挖掘将是未来研究的重点。目前来说, 其中的一个解决方案就是将 ALE 技术和分子定向育种技术结合使用来应对这一问题。随着对 ALE 技术的不断研究和改进, 我们相信该技术在未来一定会成为菌株开发必不可少的工具。

REFERENCES

- [1] Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metab Eng*, 2019, 56: 1-16.
- [2] 朱晁谊, 朱牧孜, 李爽. 微生物实验室进化的研究进展. *生物加工过程*, 2019, 17(1): 8-14, 22.
Zhu CY, Zhu MZ, Li S. Research progress in microbial laboratory evolution. *Chin J Bioproc Eng*, 2019, 17(1): 8-14, 22 (in Chinese).
- [3] Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution-principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 64.
- [4] Keller FA, Bates D, Ruiz R, et al. Yeast adaptation on softwood prehydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*, 1998, 70/72: 137-148.
- [5] Nielsen F, Tomás-Pejó E, Olsson L, et al. Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 219.
- [6] Gresham D, Dunham MJ. The enduring utility of continuous culturing in experimental evolution. *Genomics*, 2014, 104(6): 399-405.
- [7] Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 2017, 550(7676): 345-353.
- [8] Barrick JE, Yu DS, Yoon SH, et al. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, 2009, 461(7268): 1243-1247.
- [9] Tenaillon O, Barrick JE, Ribeck N, et al. Tempo and mode of genome evolution in a 50, 000-generation experiment. *Nature*, 2016, 536(7615): 165-170.
- [10] Long CP, Antoniewicz MR. How adaptive evolution reshapes metabolism to improve fitness: recent advances and future outlook. *Curr Opin Chem Eng*, 2018, 22: 209-215.
- [11] Shepelin D, Hansen ASL, Lennen R, et al. Selecting the best: evolutionary engineering of chemical production in microbes. *Genes*, 2018, 9(5): 249.
- [12] Westphal LL, Lau J, Negro Z, et al. Adaptation of *Escherichia coli* to long-term batch culture in various rich media. *Res Microbiol*, 2018, 169(3): 145-156.
- [13] Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*, 2016, 353(6304): 1147-1151.
- [14] Fletcher E, Feizi A, Bisschops MMM, et al. Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments. *Metab Eng*, 2017, 39: 19-28.
- [15] Tilloy V, Ortiz-Julien A, Dequin S. Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(8): 2623-2632.
- [16] Winkler JD, Garcia C, Olson M, et al. Evolved osmotolerant *Escherichia coli* mutants frequently exhibit defective *N*-acetylglucosamine catabolism and point mutations in cell shape-regulating protein MreB. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(12): 3729-3740.
- [17] Deatherage DE, Kepner JL, Bennett AF, et al. Specificity of genome evolution in experimental populations of *Escherichia coli* evolved at different temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(10): E1904-E1912.
- [18] González-Ramos D, De Vries AR, Grijseels SS, et al. A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 173.
- [19] Henson WR, Campbell T, DeLorenzo DM, et al. Multi-omic elucidation of aromatic catabolism in adaptively evolved *Rhodococcus opacus*. *Metab Eng*, 2018, 49: 69-83.
- [20] Wang X, Khushk I, Xiao YQ, et al. Tolerance improvement of *Corynebacterium glutamicum* on

- lignocellulose derived inhibitors by adaptive evolution. *Appl Microbiol Biot*, 2018, 102(1): 377-388.
- [21] Xu CX, Sun T, Li SB, et al. Adaptive laboratory evolution of cadmium tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 205.
- [22] Jung YH, Kim S, Yang J, et al. Intracellular metabolite profiling of *Saccharomyces cerevisiae* evolved under furfural. *Microb Biotechnol*, 2017, 10(2): 395-404.
- [23] Mundhada H, Seoane JM, Schneider K, et al. Increased production of L-serine in *Escherichia coli* through adaptive laboratory evolution. *Metab Eng*, 2017, 39: 141-150.
- [24] Royce LA, Yoon JM, Chen YX, et al. Evolution for exogenous octanoic acid tolerance improves carboxylic acid production and membrane integrity. *Metab Eng*, 2015, 29: 180-188.
- [25] Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*, 2014, 346(6205): 75-78.
- [26] Mira NP, Lourenço AB, Fernandes AR, et al. The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(2): 202-216.
- [27] Xu X, Williams TC, Divne C, et al. Evolutionary engineering in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a *TRK1*-dependent potassium influx mechanism for propionic acid tolerance. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 97.
- [28] Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 151.
- [29] Rodríguez-Verdugo A, Carrillo-Cisneros D, González-González A, et al. Different tradeoffs result from alternate genetic adaptations to a common environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(33): 12121-12126.
- [30] Vasi F, Trivisano M, Lenski RE. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. II. changes in life-history traits during adaptation to a seasonal environment. *Am Nat*, 1994, 144(3): 432-456.
- [31] Hong KK, Vongsangnak W, Vemuri GN, et al. Unravelling evolutionary strategies of yeast for improving galactose utilization through integrated systems level analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 12179-12184.
- [32] LaCroix RA, Sandberg TE, O'Brien EJ, et al. Discovery of key mutations enabling rapid growth of *Escherichia coli* K-12 MG1655 on glucose minimal media using adaptive laboratory evolution. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(1): 17-30.
- [33] Pfeifer E, Gätgens C, Polen T, et al. Adaptive laboratory evolution of *Corynebacterium glutamicum* towards higher growth rates on glucose minimal medium. *Sci Rep*, 2017, 7: 16780.
- [34] Yu SY, Zhao QY, Miao XL, et al. Enhancement of lipid production in low-starch mutants *Chlamydomonas reinhardtii* by adaptive laboratory evolution. *Bioresource Technol*, 2013, 147: 499-507.
- [35] Aguilar C, Martínez-Batallar G, Flores N, et al. Analysis of differentially upregulated proteins in *ptsHIcrr⁻* and *rppH⁻* mutants in *Escherichia coli* during an adaptive laboratory evolution experiment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(23): 10193-10208.
- [36] Thyer R, Shroff R, Klein DR, et al. Custom selenoprotein production enabled by laboratory evolution of recoded bacterial strains. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(7): 624-631.
- [37] Lenski RE, Wisner MJ, Ribbeck N, et al. Sustained fitness gains and variability in fitness trajectories in the long-term evolution experiment with *Escherichia coli*. *Proc Roy Soc B: Biol Sci*, 2015, 282(1821): 20152292.
- [38] Mans R, Daran JMG, Pronk JT. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 50: 47-56.
- [39] McCloskey D, Xu SB, Sandberg TE, et al. Multiple optimal phenotypes overcome redox and glycolytic intermediate metabolite imbalances in *Escherichia coli* *pgi* knockout evolutions. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(19): e00823-18.
- [40] Plácido J, Capareda S. Conversion of residues and by-products from the biodiesel industry into value-added products. *Bioresour Bioprocess*, 2016, 3: 23.
- [41] Ho PW, 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.

- [42] 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.
- [43] Sanderson K. Lignocellulose: A chewy problem. *Nature*, 2011, 474(7352): S12-S14.
- [44] Sandberg TE, Lloyd CJ, Palsson BO, et al. Laboratory evolution to alternating substrate environments yields distinct phenotypic and genetic adaptive strategies. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(13): e00410-17.
- [45] Cordova LT, Lu J, Cipolla RM, et al. Co-utilization of glucose and xylose by evolved *Thermus thermophilus* LC113 strain elucidated by ¹³C metabolic flux analysis and whole genome sequencing. *Metab Eng*, 2016, 37: 63-71.
- [46] González-Villanueva M, Galaiya H, Staniland P, et al. Adaptive laboratory evolution of *Cupriavidus necator* H16 for carbon co-utilization with glycerol. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5737.
- [47] Vasconcellos VM, Farinas CS, Ximenes E, et al. Adaptive laboratory evolution of nanocellulose-producing bacterium. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(8): 1923-1933.
- [48] Delamarche C, Thomas D, Rolland JP, et al. Visualization of *AqpZ*-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J Bacteriol*, 1999, 181(14): 4193-4197.
- [49] Laimins LA, Rhoads DB, Epstein W. Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(1): 464-468.
- [50] Luo H, Hansen ASL, Yang L, et al. Coupling *S*-adenosylmethionine-dependent methylation to growth: design and uses. *PLoS Biol*, 2019, 17(3): e2007050.
- [51] Pontrelli S, Fricke RCB, Sakurai SSM, et al. Directed strain evolution restructures metabolism for 1-butanol production in minimal media. *Metab Eng*, 2018, 49: 153-163.
- [52] Wang XW, Li QG, Sun CM, et al. GREACE-assisted adaptive laboratory evolution in endpoint fermentation broth enhances lysine production by *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 106.
- [53] Mahr R, Gätgens C, Gätgens J, et al. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of L-valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2015, 32: 184-194.
- [54] Jensen K, Broeken V, Hansen ASL, et al. OptCouple: Joint simulation of gene knockouts, insertions and medium modifications for prediction of growth-coupled strain designs. *Metab Eng Commun*, 2019, 8: e00087.
- [55] 王文豪, 闻鹏飞, 许孔亮, 等. 工业环境下酶蛋白的催化行为与适应性改造研究进展. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1857-1869.
- Wang WH, Wen PF, Xu KL, et al. Catalysis of enzymes under industrial environment and their adaptive modifications: a review. *Chin J Biotech*, 2019, 35(10): 1857-1869 (in Chinese).
- [56] King ZA, O'Brien EJ, Feist AM, et al. Literature mining supports a next-generation modeling approach to predict cellular byproduct secretion. *Metab Eng*, 2017, 39: 220-227.
- [57] Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, et al. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(5): 1140-1153.
- [58] Gu HQ, Zhu YY, Peng YF, et al. Physiological mechanism of improved tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to lignin-derived phenolic acids in lignocellulosic ethanol fermentation by short-term adaptation. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 268.
- [59] Tomás-Pejó E, Olsson L. Influence of the propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucose in lignocellulosic hydrolysates. *Microb Biotechnol*, 2015, 8(6): 999-1005.
- [60] Gu HQ, Zhang J, Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. *Bioresource Technol*, 2014, 157: 6-13.
- [61] Narayanan V, Sánchez I Nogué V, Van Niel EWJ, et al. Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Expr*, 2016, 6: 59.

(本文责编 陈宏宇)