

适应性实验室进化在工业生产菌株选育中应用的进展

王光路^{1,2}, 王梦园^{1,2}, 刘兰茜^{1,2}, 马科^{1,2}, 杨雪鹏^{*1,2}

1 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001

2 食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南 郑州 450001

王光路, 王梦园, 刘兰茜, 马科, 杨雪鹏. 适应性实验室进化在工业生产菌株选育中应用的进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 306-322

Wang Guanglu, Wang Mengyuan, Liu Lanxi, Ma Ke, Yang Xuepeng. Progress of adaptive laboratory evolution for industrial strain breeding[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 306-322

摘要: 适应性实验室进化是一种在实验室里将微生物置于一定选择压力下, 通过长期驯化, 筛选获得具有特定表型突变菌株的方法。近年来, 该方法通过改进特定进化条件和筛选策略, 已广泛应用于筛选具有优良特性的工业生产菌株, 如特定表型筛选、底物高效利用、目标产物合成及生长特性优化等工业微生物菌株选育。本文综述了适应性实验室进化技术在工业生产菌株选育中的典型应用实例及研究进展, 总结了现存问题及其解决办法, 并展望了该技术的应用前景。

关键词: 适应性进化; 菌株选育; 工业菌株

Progress of adaptive laboratory evolution for industrial strain breeding

WANG Guanglu^{1,2}, WANG Mengyuan^{1,2}, LIU Lanxi^{1,2}, MA Ke^{1,2}, YANG Xuepeng^{*1,2}

1 School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, Henan, China

2 Collaborative Innovation Center of Production and Safety, Zhengzhou 450001, Henan, China

Abstract: Adaptive laboratory evolution is a method of screening mutant strains with specific phenotypes by long-term domestication under certain selection pressure. In recent years, this method has been widely used to screen industrial production strains with excellent characteristics through specific evolutionary conditions and screening strategies, such as specific phenotypic screening, efficient use of substrates, target product synthesis, and growth characteristics optimization. In this review, the typical examples and research

基金项目: 国家自然科学基金联合基金(U1904101); 河南省科技攻关重点研发与推广专项(202102310021, 182102310607)

Supported by: Joint Funds of National Natural Science Foundation of China (U1904101); Key Research Project of Science and Technology Department of Henan Province (202102310021, 182102310607)

*Corresponding author: E-mail: yangxuepeng@zzuli.edu.cn

Received: 2021-05-18; Accepted: 2021-08-06; Published online: 2021-09-08

progress of adaptive laboratory evolution for the breeding of industrial production strains were summarized, the existing problems and solutions were discussed. The prospect of this technology was also forecasted.

Keywords: adaptive evolution; strain selection; industrial strains

适应性实验室进化(adaptive laboratory evolution, ALE)是在实验室条件下,人工模拟自然进化中的变异和选择过程,借助人选压力实现微生物的定向进化,并从进化群体中筛选优良性状个体的一种方法^[1]。微生物适应性进化是对生物进化研究的一项新技术,它被称为“定向进化、实验室进化或驯化”^[2]。通过施加人为干扰及控制微生物生长环境实现微生物进化,进化的源泉则是微生物本身的自然突变或人工诱变,进化的方向则为对人工选择压力的抗性,进化的动力则是微生物与环境的相互作用,菌株通过连续传代过程中的个体竞争和优胜劣汰最终筛选得到所需的目标菌株^[3](图 1A 和 1B)。与代谢工程相比, ALE 不需要考虑菌体内错综复杂、相互交叉的代谢网络,只需根据目标设计对应的干扰因素,具有微生物适用性广泛及实用性强的优点,易于发现新机制、实现表型优化^[4-5]。

ALE 可以维持大量细胞的快速分裂,而微生物自然突变率和基因组大小可提供丰富的遗传多样性,有益的突变体不断得到富集^[6],微生物适应性进化使菌株在较短的时间内改变某些表型或生理特性,并且基本不会影响菌株其他优良性状^[7]。由于微生物易于繁殖并且代时较短,在较小的空间内允许大量群体存在,有利于保证实验的可重复性;而且易于保存,便于比较进化过程中菌株间的特性差异^[8], ALE 为研究影响工业生产菌株表型、生产性能及遗传稳定性等因素提供了强有力的手段,在微生物进化研究领域得到了最成功的应用^[9]。ALE 不仅能够对进化过程进行实验室研究,通过鉴定与特定选择压力相关的有益基因突变或降低生产水平的有害基因突

变,可为菌株代谢工程修饰提供研究靶点;还可以通过修复因代谢工程修饰带来的特定表型适应性缺陷^[3],改善工程菌株生理特性(图 1C)。随着低成本、高通量测序技术的日益普及,基因工程技术与生物信息学手段的有效结合,大大加快了 ALE 过程中关键有益突变的鉴定和筛选^[10-11]。基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等分析手段,同样有助于解析适应性进化的分子机制^[3,12](图 1D)。另外,适应性进化在获取基因型-表型关系的信息及医学和药物研究中的应用方面也具有很大的应用前景^[13]。本文通过综述 ALE 在工业生产微生物选育中的应用案例,剖析了进化过程存在的问题及解决思路,并展望了该技术的发展前景。

1 适应性进化在选育工业生产菌株中的应用

ALE 已成为微生物学研究的强大工具,目前被广泛用来筛选具有特定表型、生产性能和遗传稳定性好的工业生产菌株。根据需求, ALE 主要应用在以下几个方面:(1) 微生物代谢途径激活;(2) 微生物特定表型优化;(3) 特定底物的高效利用;(4) 毒性产物的耐受性优化。

1.1 微生物代谢途径激活

传统的代谢工程策略,是通过解调控目标代谢途径、过表达途径限速酶、增加前体物供给等达到内源代谢产物的过量合成,但对于异源代谢产物的生物合成,需要在胞内构建外源代谢途径或者激活自身潜在合成途径,而这些途径需经激活和优化才能满足需求。特别是对重要生物燃料或化学品合成的非天然途径的激活优化^[14], ALE 能发挥巨大作用,其典型应用实例见表 1。

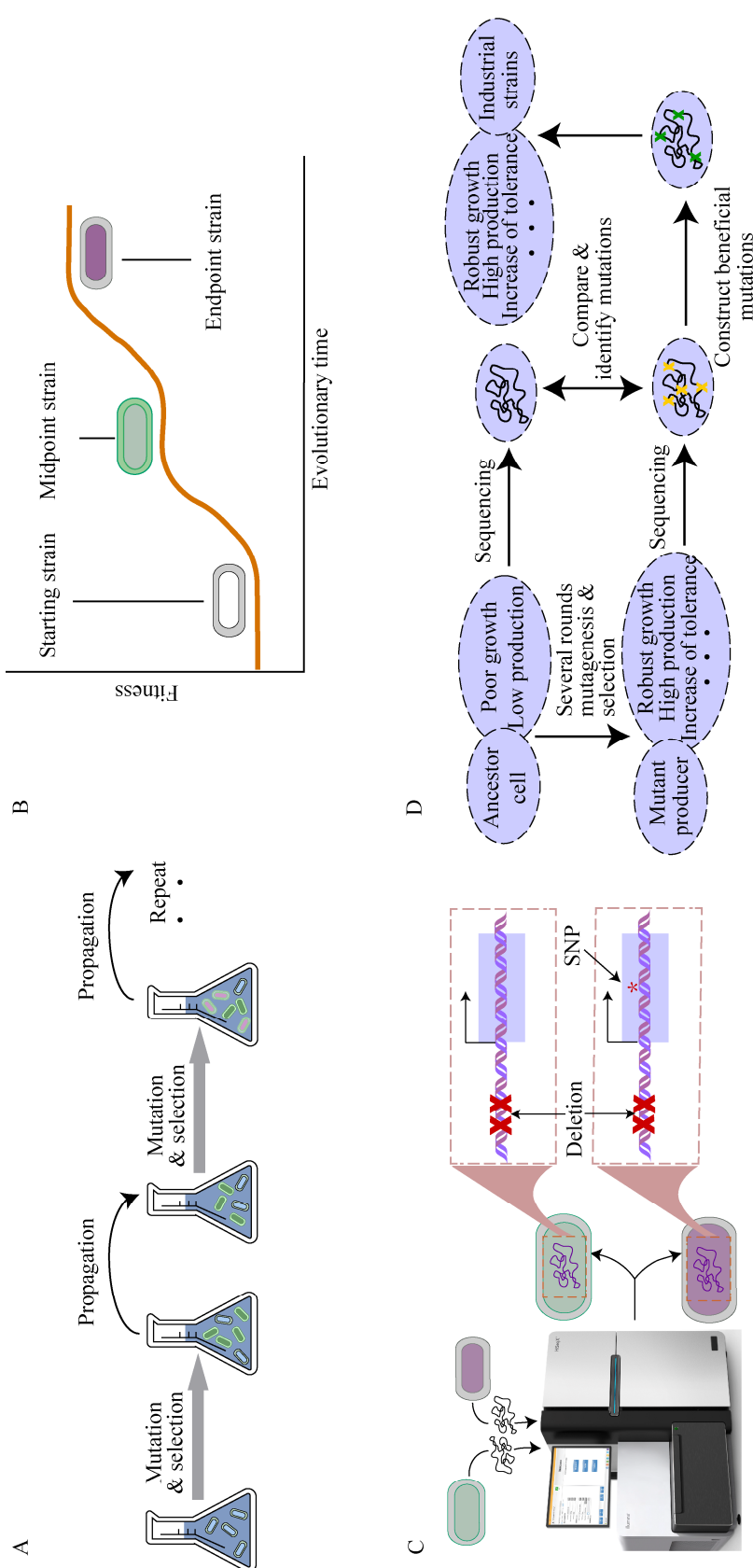


图 1 适应性进化的经典研究流程^[3] A: 适应性实验室进化典型筛选流程; B: 进化菌株随着进化进程不断提升对进化条件的适应水平; C: 比较基因组测序导致进化菌株改善表型的适应性基因突变; D: 适应性实验室进化用于工业微生物育种筛选的典型流程

Figure 1 Classic research process of adaptive evolution^[3]. A: The typical process of adaptive laboratory evolution; B: The relationship between evolutionary time and fitness; C: Genome sequencing of the evolved strains revealed the adaptive gene mutation that led to the improved phenotype of evolved strains; D: The typical progress of adaptive laboratory evolutionary engineering to microbial breeding.

表 1 ALE 对微生物代谢途径激活的经典案例

Table 1 Classic cases of activating microbial metabolic pathway by ALE

进化菌株 Evolutionary strains	代谢途径激活涉及基因 Metabolic pathway activation involves genes	进化筛选条件 Evolution/selection conditions	进化菌株特性 Characteristics of evolutionary strains	参考文献 References
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y&Z053	FFA biosynthetic pathway served as the main way for NAD ⁺ regeneration and acetyl-CoA supply, fine-tuned NADPH and ATP supply by deletion of <i>pdcl</i> , <i>pdcs</i> , and <i>pdcs</i> genes	Serially transferred for 45 days in minimal medium containing 0.5% glucose (gradually increased) and 2.0% ethanol (gradually decreased) and then continuously transferring for 50 days into minimal medium containing 2.0% glucose as the sole carbon source	The evolved strain production of 33.4 g/L extracellular free fatty acids	[14]
<i>Escherichia coli</i> S028	Constructed GalP/Glk-dependent PTS-defective <i>E. coli</i> strain, introduce the two favorable enzyme variants AroG ^{D6G-D7A} and AnTrpC ^{R378F}	Auto-CGSS system the continuous <i>in vivo</i> mutagenesis, grown at 30 °C while mixing via a magnetic stirrer with SynM medium, the mutants with a higher medium fluorescent (MFU)	This evolutionarily developed strain was able to produce 38.77 g/L of Trp with a yield of 0.164 g/g	[15]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1B	Overexpression of <i>HAP4</i> and <i>STL1</i> upregulation of the TCA cycle and oxidative phosphorylation; disruption of <i>RIM15</i> improved fermentation ability by inhibiting respiration capacity	When the <i>OD</i> ₆₆₀ reach 1.0, the culture was diluted with 5 mL fresh MG medium to obtain <i>OD</i> ₆₆₀ of 0.05 and incubated further at 30 °C, this serial transfer process was repeated until the specific growth rate of the cells increased 2–3 folds	The specific growth rate of the evolved cells reached approximately 0.14 h ⁻¹	[16]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Overexpression of <i>pgi</i> , <i>pfkA</i> , <i>gap</i> , <i>pyk</i> , <i>gdh</i> , <i>argB</i> and <i>argJ</i> genes and deletion of <i>speE</i> and <i>argR</i> genes enhanced L-ornithine synthesis pathway	Serially transferred for 100 generations in minimal medium containing gradually increased glucose (5.0%, 7.0%, 10.0%) and L-ornithine (1.5%, 2.0%)	The evolved strain L-ornithine production increased 20%	[17]
<i>E. coli</i> DSM01	Deletion of <i>adhE</i> , <i>pta</i> , <i>ldhA</i> and <i>frdA</i> four genes involved in acetyl-CoA consumption	Serially transferred for 40 days in M9 minimal medium containing 5 g/L sodium acetate	The evolved strain tolerated 250 mmol/L acetate and utilized 2.14 g/L of acetate in 48 h; the acetate consumption rate of was 76 mg/(L·h) in M9 minimal medium supplemented with acetate	[18]

Yu 等^[14]将酿酒酵母代谢进行了重新编程, 提高了目标产物的产量, 他们以 *Saccharomyces cerevisiae* Y&Z053 为出发菌株, 30 °C 条件下进行两阶段适应性进化培养: 第一阶段, 在含 0.5%

葡萄糖和 2%乙醇的基本培养基上培养, 每 48 h 或 72 h 连续传代一次, 乙醇浓度逐渐降低, 葡萄糖浓度逐渐升高, 连续传代 45 d; 随后, 将菌株转移到含有 2%葡萄糖作为唯一碳源的基本培

培养基上,并通过每 48 h 或 72 h 连续传代促进生长,持续 50 d;进化菌株大约 200 代之后,在葡萄糖上实现生长,获得的进化菌株能够产生 33.4 g/L 的细胞外游离脂肪酸。

代谢通量分析表明,使用独立的葡萄糖摄取系统,磷酸烯醇丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system, PTS),即半乳糖渗透酶/葡萄糖激酶(GalP/Glk)系统在理论上可以使葡萄糖的色氨酸(Trp)产量增加 1 倍。为探索这一可能性,Chen 等^[15]以 Trp 生产菌株 *Escherichia coli* S028 为出发菌株,构建了一株 PTS⁻和 GalP/Glk 依赖性大肠杆菌菌株,为获得更高效的 Trp 生产菌株,通过将 CRISPR/Cas9 促进的靶基因工程与生长偶联和传感器引导的体内筛选(CRISPR/Cas9-facilitated engineering with growth-coupled and sensor-guided *in vivo* screening, CGSS)相结合,开发了一种新型的连续 ALE 系统。利用该自动系统(auto-CGSS)与细胞生长实时测量和荧光强度在线监测的结合,作为细胞内 Trp 浓度的指标,获得了一个产量高、比产率高的 Trp 工程菌株 T5,该菌株能产生 38.77 g/L 的色氨酸,产量为 0.164 g/g。

Kawai 等^[16]以酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1B 为出发菌株,在以甘油为主要碳源的培养基上连续传代 70 代,提高了菌株的甘油同化能力,使其生长速率达到 0.14 h⁻¹。蒋玲艳^[17]以谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 ($\Delta argF\Delta proB$)为出发菌株,利用基因过表达、基因敲除及适应性进化等手段,构建了高产 L-鸟氨酸的工程菌株 $\Delta APE451$;其采用不断增加葡萄糖浓度(5%、7%、10%)和鸟氨酸浓度(1.5%、2.0%)的方式进化,同时以不加鸟氨酸的发酵培养基进化,对每隔约 10 代的菌株进行鸟氨酸发酵筛选,获得了一株 L-鸟氨酸产量较出发菌株高约 20%的菌株 $\Delta APE6937$;同时以该菌株

为出发菌株,敲除阻遏蛋白编码基因 *argR*,获得了一株适用于工业发酵生产 L-鸟氨酸的工程菌株 $\Delta APE6937R42$,L-鸟氨酸产量比进化菌株 $\Delta APE6937$ 提高 27%,在 5 L 发酵罐中发酵 33 h 后鸟氨酸产量达到 24.1 g/L。

Seong 等^[18]以敲除乙酰辅酶 A 消耗相关基因(*adhE*、*pta*、*ldhA* 和 *frdA*)的大肠杆菌 *E. coli* DSM01 为出发菌株,在 5 g/L 乙酸钠的 M9 基本培养基中连续传代 40 代获得一株进化菌株 SBA01;进化菌株在 48 h 内消耗 2.14 g/L 的醋酸盐,摄取量分别比亲本菌株 MG1655(DE3)和 DSM01 增加了 2.8 倍和 7.6 倍;在添加醋酸盐的 M9 基本培养基中,SBA01 醋酸盐消耗率为 76 mg/(L·h),并发现 SBA01 可耐受 250 mmol/L 的醋酸盐,生长速率为(0.049±0.001) h⁻¹。

1.2 微生物特定表型优化

ALE 是改造微生物、获得复杂生理表型的重要策略和手段。代谢工程的目标是改造微生物细胞大量合成目的产物,但这一手段通常会对细胞生长带来不利影响。通常情况下,生产菌株在适应性进化过程中会丢失部分产物合成能力。针对该问题,有学者建立了菌株生长和代谢物合成相偶联的算法,用以预测代谢工程改造策略。通过生长偶联的设计,在达到最优细胞生长速率的同时达到较高的目标代谢产物合成水平,同时合成水平更加稳定。许多生长偶联的设计经过 *in silico* 预测后进行适应性进化实验,产率得到了有效提高^[19],其案例汇总见表 2。

Fong 等^[20]以 *E. coli* K12 MG1655 为出发菌株,构建了 3 株乳酸合成工程菌株,分别为 Δpta -*adhE* 双缺失菌株、 Δpta -*pfk* 双缺失菌株和 Δpta -*adhE*-*pfk*-*glk* 4 基因缺失菌株;敲除 *pta*、*adhE*、*pfk*、*glk* 基因不仅消除副产物的分泌途径,还增加了 NADH 和丙酮酸的供应及葡萄糖的摄取;分别对 3 株工程菌株进行 2 个月 ALE

表 2 ALE 对微生物表型优化的经典案例

Table 2 Classic case of microbial phenotype optimization by ALE

进化菌株 Evolutionary strains	进化筛选条件 Evolutionary screening conditions	进化菌株特性 Characteristics of evolutionary strains	参考文献 References
<i>E. coli</i> K12 MG1655	Deletion of <i>pta</i> , <i>adhE</i> , <i>pfk</i> and <i>glk</i> genes increased the supply of NADH and pyruvate and utilized for glucose uptake, serially transferred for 60 days in 100 mL of M9 minimal medium supplemented with 2 g/L glucose at 37 °C	The growth rate increased by 30%–120%; Lactate titers ranging from 0.87 g/L to 1.75 g/L	[20]
<i>E. coli</i> BW25113	Subculturing in media with methanol and gluconate as the carbon source at 37 °C and 160 r/min	Under a co-consumption regime, evolved strain utilized methanol at rates comparable with natural methylotrophs, with a growth rate of 0.08 h ⁻¹	[21]
<i>Bacillus coagulans</i> WT-03	After 15 s of ARTP mutation and then 40 days of ALE culture in media with 0.3% bile salt (pHs gradually decreasing from 6.2 to 2.5)	Tolerance to pH 2.5 and 0.3% bile salt with a survival rate of 22.4%	[22]
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	The strains grew at 39.5 °C±0.3 °C for more than 90 days, producing over 300 generations	The specific growth rate increased on average 1.57 times, ethanol and glycerol production increased by 1.6 and 1.3 times	[23]
<i>S. cerevisiae</i> GSY1136	Short-term evolution experiment using periodic hydrogen peroxide shocking schemes, the strain incubated at 30 °C in YPG medium with 4% glycerol as a carbon source	Carotenoids production increased by 3-fold, to 18 mg/g-DCW	[24]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Serially transferred for 206 days in CGXII minimal medium supplemented with methanol and xylose as carbon sources at 30 °C and 220 r/min	The specific growth rate increased by 20-fold, from 0.000 6 h ⁻¹ to 0.0121 h ⁻¹ , utilized methanol and xylose with a high mole ratio of 3.83:1	[25]

实验, 获得了 11 株进化菌株, 生长速率提高了 30%–120%, 可利用 2 g/L 葡萄糖为底物, 37 °C 厌氧培养条件下, 菌株乳酸产量可达 0.87–1.75 g/L。

Meyer 等^[21]以 *E. coli* BW25113 为出发菌株, 利用 *in silico* 引导的多重基因敲除方法, 构建了一株甲醇必需的大肠杆菌 MeSV1, 而且包含用于甲醇同化的核糖单磷酸循环; 甲醇转化为生物质的化学计量与葡萄糖酸的代谢耦合, 将所设计的菌株进行 ALE 实验, 共传代 35 代, 提高菌株甲醇和葡萄糖酸盐的共消耗, 进化菌株 MeSV1.1 生长显著增加, OD_{600} 与亲本菌株相比增加了

3 倍, 随后敲除了 *maldh* 基因, 降低了 TCA 周期活性, 构建了工程菌株 MeSV2, 然后对其进行了 ALE 实验, 经过 16 次传代, 得到的进化菌株生长量($OD_{600}=1.21\pm0.01$)略高于野生型大肠杆菌($OD_{600}=1.06\pm0.02$); 最终获得的进化菌株在共同消耗机制下将高达 24% 的甲醇掺入核心代谢物中, 并以与天然甲基营养菌相当的速率利用甲醇。

Liu 等^[22]分离并鉴定了一株耐胆汁的凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans* WT-03, 通过常压室温等离子体(atmospheric pressure room temperature plasma, ARTP)诱导与 ALE 相结合的

方法改善该菌株的益生菌性能, 经过 15 s ARTP 诱变及连续 40 代 ALE 实验后, 获得突变体 artp-aleBC15, 其对 pH 2.5 和 0.3%胆汁盐的耐受性提高, 存活率达 22.4%; 与出发菌株相比, 突变体具有相对稳定的细胞形态、较低的细胞膜通透性和较高的疏水性。研究证明, ARTP 突变结合 ALE 是一种有效的诱变策略, 可以提高凝固酶的益生菌性能, 具有潜在的工业应用价值。

Caspeta 等^[23]对 *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D 采用适应性进化实验策略筛选耐热性菌株。在 (39.5±0.3) °C 条件下连续传代超 300 代获得进化菌株, 40 °C 时比生长速率提高 1.57 倍, 乙醇与甘油的产量分别提高了 1.6 倍和 1.3 倍。Reyes 等^[24]以 *S. cerevisiae* GSY1136 为出发菌株, 使用周期性过氧化氢刺激方案短期进化获得进化菌株, 其类胡萝卜素产量增加 3 倍, 得率高达 18 mg/g-DCW。

Tuyishime 等^[25]以谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* ATCC 13032 为出发菌株构建木糖利用途径, 使木糖转化为 5-磷酸核酮糖(Ru5P), 并使 Ru5P 转化为 5-磷酸核糖(R5P)途径失活; 通过对甲醇依赖型谷氨酸棒杆菌菌株 MX-10 (该菌株在 Ru5P-R5P 转化率方面存在缺陷, 并配备了甲醇利用酶)进行 206 代的 ALE 实验, 共培养约 27 代, 利用 ALE 每一次传代的初始和最终时间点的 OD_{600} 值测定甲醇和木糖的比生长速率, 进化菌株比生长速率从 0.000 6 h⁻¹ 提高至 0.012 1 h⁻¹, 增长了 20 倍, 利用甲醇和木糖的摩尔比高达 3.83:1。

1.3 底物的高效利用

高效的底物利用是实现高效代谢产物合成的前提。在发酵过程中, 微生物适应性与有效吸收和代谢限速生长营养物质的能力之间存在着非常直接的联系, 因此, 通过设计选择性的培养

条件进行适应性进化, 很容易筛选得到有助于底物利用的基因突变。此外, 拓展底物利用范围, 可以赋予微生物转化难利用或毒性底物的能力, 从而合成高附加值化合物^[26-28], 汇总见表 3。

酿酒酵母在发酵工业中广泛使用, 强大的发酵能力和固有的乙醇耐受性使其成为研究焦点, 研究者普遍利用适应性进化实验提高其底物利用率, 其中以菌株 CEN.PK 及其衍生物最为常见。Ho 等^[29]发现菌株 CEN.PK113 经过 60 次传代的长期适应性进化, 在 6%甘油为碳源的培养基上比生长速率可达到 0.130 h⁻¹。酿酒酵母不能代谢木糖或其他戊糖进行发酵, 但是目前已有大量研究在构建可共同利用这些化合物的工程菌株^[36-38]。有学者尝试采用代谢工程方法构建木糖利用酿酒酵母工程菌株, 但最终并未得到可将木糖转化为乙醇的高产菌株, 而且野生菌株和已有工程菌株均不能在厌氧条件下以木糖为底物。因此, 通过适应性实验室进化与代谢工程手段相结合, 可有效解决底物利用问题。Klimacek 等^[30]采用两阶段进化工程, 首先对异源表达木糖代谢基因的酿酒酵母工程菌株进行适应性进化实验, 厌氧木糖发酵的进化实验筛选出生长较快但代谢副产物不理想的进化菌株, 随后在分批培养条件下对该菌株继续进行进化实验, 改善了菌株木糖发酵的表型缺陷, 最终菌株的生长速度比出发菌株高出 500%以上, 这突显 ALE 实现适应性改善的能力。Kim 等^[39]进化天然木糖发酵毕赤酵母菌株, 以同时利用纤维二糖和木糖, 进化菌株相比出发菌株的乙醇得率从 0 提高至 0.4 g-乙醇/g-纤维二糖。Saini 等^[31]以马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus* MTCC 1389)为出发菌株, 通过 ALE 实验在 200 g/L 的乳糖浓度下适应 65 d, 获得了具有高乳糖利用率的耐渗透性进化菌株, 发酵合成乙醇产量高达 79.33 g/L, 比出发菌株(66.75 g/L)高出近 17.5%。

表 3 ALE 提升微生物对底物有效利用的经典案例

Table 3 Classic case of ALE enhancing the effective utilization of substrates by microorganisms

进化菌株 Evolutionary strains	利用底物 Utilization of substrates	进化筛选条件 Evolutionary screening conditions	进化菌株特性 Characteristics of evolutionary strains	参考文献 References
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113	6% glycerol	The strains grew for 60 generations in synthetic glycerol medium with CSM or without any addition of CSM	Growth rate of about 0.130 h^{-1}	[29]
<i>S. cerevisiae</i> BP10001	50 g/L xylose	The strain BP10001 were incubated under anoxic conditions in defined medium containing only xylose as a carbon source for 91 days	Growth rate increased by more than 500%	[30]
<i>K. marxianus</i> MTCC 1389	200 g/L lactose	The strains were used to subcultured in 200 g/L lactose up to 65 days (about 750 generations)	Ethanol titer increased by 17.5%, to 79.33 g/L	[31]
<i>B. subtilis</i> 168	9 g/L xylose	Serially transferred for 72 times into fresh M9 medium supplemented with 9 g/L xylose at mid-exponential phase	The maximum specific growth rate of 0.445 h^{-1} , the xylose consumption rate of $0.530 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$, much higher than that of E72 ($0.392 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$)	[32]
<i>E. coli</i> ATCC 8739	85 mmol/L acetate	The strain was evolved for growth rate by exposure to a 35 mmol/L acetate feed at progressively greater dilution rates in a pseudo-steady-state chemostat	Growth rate increased by 25%, to 0.51 h^{-1}	[33]
<i>Cupriavidus necator</i> H16	0.5% glycerol	Subculturing in media with 0.5% glycerol (about 60 days)	Growth rate increased by 9.5-fold in glycerol media	[34]
<i>C. glutamicum</i> MX-11	15 g/L methanol and 4 g/L xylose	Strain MX-11 was continuously cultivated at 30°C in CGXII minimal medium supplemented with 15 g/L methanol and 4 g/L xylose	The co-utilization ratio of methanol and xylose reached 7.04:1, the specific growth rate increased by 3.20-fold, the titer increased by 2.56-fold	[35]

此外, 以 *E. coli* 等细菌为研究对象也有许多类似研究^[40-41]。Zhang 等^[32]对 *B. subtilis* 168 采用适应性进化手段获得了一株能高效利用木糖的突变菌株 E72, 其最大比生长速率达到 0.445 h^{-1} 。Rajaraman 等^[33]对以乙酸盐为唯一碳源的 *E. coli* ATCC 8739 采用恒化器连续培养方式进行进化, 进化菌株比生长速率增加了 25%。González-Villanueva 等^[34]在含有 0.5%甘油的矿物

盐培养基中对 *Cupriavidus necator* H16 菌株进行驯化, 筛选了一株可同时利用葡萄糖酸盐和甘油的进化菌株 v6C6, 进化菌株在甘油中的比生长速率比野生型菌株大 9.5 倍, 在葡萄糖酸盐-甘油混合碳源中生长速度比单独葡萄糖酸盐快。

甲醇是一种极有潜力的工业发酵原料, 近年来合成甲基化的研究逐渐深入, 以实现基于

甲醇的生物燃料和高附加值化学品的生物制造。Wang 等^[35]以基因工程的甲醇依赖谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum* MX-11)为出发菌株进行进化实验,进化菌株可耐受 203.75 mmol/L 甲醇,比生长速率为 0.052 h⁻¹;基于甲醇的生物合成,发酵 144 h 后产生 230 mg/L 胞外 L-谷氨酸。

1.4 毒性产物的耐受性优化

在发酵工业中,对于毒性底物的适应性进化同样适应于高浓度毒性产物。在高产物浓度下改善微生物的生长表型是增强细胞工厂发展的一个重要设计目标。ALE 技术可以克服不利影响,增强菌株的稳定性,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^[42],其案例汇总见表 4。

L-丝氨酸会抑制细胞分化、肽聚糖合成及细胞活性,这在很大程度上限制了丝氨酸的生产。适应性驯化是提高菌株耐受性的常用方法,Mundhada 等^[43]通过敲除 *E. coli* 中 L-丝氨酸分解

的 2 条途径的相关基因(敲除基因 *sdaA*、*sdaB*、*tdcG* 和 *glyA*)构建了工程菌株 Q1;采用适应性驯化的方法,在培养基中逐渐提高添加 L-丝氨酸的浓度(从 3 g/L 提升到 100 g/L),经过 45 d 驯化,进化菌株 ALE-5 对 L-丝氨酸耐受性明显提高;以葡萄糖为碳源,经过 50 h 的发酵,L-丝氨酸产量达 37 g/L,转化率为 24%。

此外,为了提高细胞的耐受性,Zhu 等^[44]使用非分裂细胞开发了一种基于应激诱导突变(stress-induced mutagenesis, SIM)的新型适应性进化策略;以 *E. coli* FC40 为出发菌株构建了 Δ *mutL* 突变菌株 *E. coli* SMB07,将该菌株进化 6 个月,其丁醇最低抑制性浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)仅由 9.5 g/L 增加至 10.5 g/L;而基于 SIM 自适应进化,3 个月内将丁醇 MIC 增加至 13 g/L,并进一步通过基于 SIM 的自适应进化来提高 *E. coli* SMB07 渗透耐受能力和耐热性,获得了分别耐受 95 g/L NaCl

表 4 ALE 提升微生物对毒性产物耐受性进化经典案例

Table 4 Classic cases of ALE improving microbial tolerance to toxic products

进化菌株 Evolutionary strains	耐受物质 Tolerable substance	进化筛选条件 Evolutionary screening conditions	进化菌株特性 Characteristics of evolutionary strains	参考文献 References
<i>E. coli</i> Q1	L-serine	45 days of evolution in media with increased L-serine concentration	Evolved strains grew at high L-serine concentration and achieved high-titer L-serine production to 37 g/L with a 24.0% mass yield	[43]
<i>E. coli</i> SMB07	Butanol and NaCl	The strain was evolved in media with increased butanol and NaCl	Tolerant to high concentrations of butanol (13 g/L), NaCl (95 g/L), and high temperature (50 °C)	[44]
<i>E. coli</i> ML115	Octanoic acid	714 total hours of evolution in MOPS medium with increased octanoic acid	Tolerant to high concentrations of butanol (65 mmol/L) and octanoic acid (30 mmol/L), carboxylic acids titer increased by 5-fold	[45]
<i>L. pentosus</i> R3-8	Crude glycerol and lactic acid	Metabolic evolution of strain screened by was carried out by adding high concentration crude glycerol (60 days) and lactic acid (50 days)	Tolerant to high concentrations of crude glycerol (130 g/L) and lactic acid (20 g/L)	[46]
<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	The strain was evolved by sequential batch fermentations in the mineral medium were gradually increased glucose	Tolerant to high concentrations of ethanol (61 g/L), ethanol titer increased by 7.7%, to 2.03 g-ethanol/h	[47]

和 50 °C 高温的突变体 *E. coli* SMB95 和 *E. coli* SMB50。Royce 等^[45]以 *E. coli* ML115 为初始菌株, 敲除 *fadD* 基因中断脂肪酸 β -氧化途径, 防止羧酸的降解, 在含有辛酸的 MOPS 基本培养基中连续传代, 同时保持培养基 pH 值为 7.0, 以 10 mmol/L 的增量增加辛酸浓度, 经过 714 h 的适应性进化筛选得到进化菌株 LAR1, 辛酸耐受性增加至 30 mmol/L; 除耐受辛酸外, 还可耐受丁醇和异丁醇, 在 65 mmol/L 丁醇条件下比生长速率比对照菌株大 15%; 进化菌株不仅改变了细胞膜的流动性和完整性, 还具有明显更长的膜脂质。

王世珍等^[46]采用戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*) R3-8 进行代谢进化, 通过在培养基中添加高浓度的粗甘油和乳酸, 分别进行底物耐受性和产物抑制的代谢进化, 进化后的菌株可耐受 130 g/L 的粗甘油和 20 g/L 的乳酸。5 L 发酵罐分批发酵结果显示, 乳酸产量、甘油转化率及生产强度分别为 45.0 g/L、0.989 g/g 和 0.47 g/(L·h)。

Elbakush 等^[47]以 *S. cerevisiae* 为出发菌株, 通过连续分批发酵获得适应性酿酒酵母菌株(耐渗透和耐乙醇), 其中葡萄糖浓度从初始 50 g/L 逐渐增加至 150 g/L; 与野生菌株相比, 进化菌株乙醇产率从 1.65 g/(L·h)提升到 2.03 g/(L·h), 乙醇浓度提高至 7.7%, 乙醇产量更高(61 g/L), 并且适应菌株最大海藻糖和糖原含量显著更高(7.5%和 10.5%)。

2 适应性进化技术存在问题及应对办法

2.1 自然突变率低导致进化周期长

ALE 实验中, 进化源自微生物本身自然突变或人工施加诱变; 微生物为保持自身基因组完整性, 细胞内存在严格错配修复机制, 用以

消除复制和重组事件中产生的错配区域, 大大降低基因突变率, 维持自然突变率在极低水平(通常 $<10^{-6}$), 因此 ALE 面临一个重要问题, 即进化周期通常较长, 从几个月至数年不等, 进化时间越久, 传代培养或连续培养等过程越容易出现染菌现象, 进而导致实验失败^[8]。此外, 实验发现, 传统物理化学诱变在 ALE 实验中对于突变率的提升不具有持续性。针对该问题, 目前已有多个可行的研究思路。

文献表明, 将微生物 DNA 错配修复机制进行人工修饰, 可大幅度提升自然突变率, 将突变维持在较高水平, 以缩短进化周期。Luan 等^[48]通过失活丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) 基因组错配修复机制操纵子 *MutSL*, 使得菌株自然突变率提升了 250 倍; 与对照菌株相比, 突变率提升的工程菌株在丁醇耐受性进化实验中显示出更好的存活能力, 同时进化速率得到了大幅度提升。王光路等^[49-50]通过采用无痕等位基因置换系统, 在不引入任何外源基因序列(如抗性标记)的情况下, 将枯草芽孢杆菌错配修复机制的 *MutSL* 操纵子进行启动子置换, 达到提高菌株突变率的目的, 获得可控高突变率的枯草芽孢杆菌工程菌株; 通过向培养基中添加不同浓度诱导物, 可控制工程菌株所需突变率水平, 在不添加木糖诱导物时 *B. subtilis* *MutSL* 菌株与出发菌株相比突变率提高了 58.4 倍, 而在木糖诱导物浓度分别为 0.5%、1.0%和 2.0%时, 菌株的相对突变率分别提高了 27.1、4.2 和 0.8 倍, 所以通过合适的木糖浓度可将菌株维持在所需的突变率水平, 同时毒性产物苯乙醇耐受实验的结果表明, 该高突变率工程菌株具有较好的进化性和适应性; 对底物粗甘油进行 35 代的连续实验室进化筛选, 获得了具有优异生长特性的 Y100 菌株, 相较于出发菌株, 进化菌株延迟期缩短了 10 h, 最大生物量提升了 17% (由

1.210±0.062 提升至 1.416±0.015), 比生长速率提升 13% (由 0.233±0.004 提升至 0.264±0.017), 说明进化菌株具有更好的生长特性。结果表明, 该突变工程菌株具有广泛应用前景, 如扩大底物利用范围、提高代谢物产量及提高底物(产物)耐受性等方面。

此外, Asakura 等^[51]在宿主 *E. coli* YA027 中额外引入外源限制性内切酶/甲基化修饰系统 (restriction/modification), 即来自铜绿假单胞菌基因组复制工程辅助的连续进化限制/修饰系统编码基因 *PaeR7I* RM, 通过每次细胞分裂时都会导致限制性内切酶和甲基化酶在子代细胞中的不平衡分配或不平衡表达, 使新生宿主基因组甲基化不完全, 限制性内切酶剪切基因组, 随之产生一系列的插入、重复、删除及基因重排, 持续性提高细胞突变率, 并最终带来了更快的基因组和生长的进化变化; 按 1%接种量连续传代 172 代后, 进化结果表明, 相较于初始菌株, 进化菌株在培养初期的生长速率提升了 6 倍, 稳定期时菌体密度提升了 1 倍, 进化过程中有 2 次生长速率的明显增加, 分别在 10 次传代和 80 次传代附近, 预示着该处可能积累了重要的有益突变。该研究结果为持续性提升菌株自然突变率提供了新颖的研究思路。

王晓璐等^[52]利用适应性进化提高大肠杆菌的甲醇利用能力, 在 *E. coli* 中异源表达核酮糖单磷酸(RuMP)途径关键酶甲醇脱氢酶、3-己酮糖-6-磷酸合成酶和 6-磷酸-3-己酮糖异构酶 (MDH、HPS 和 PHI), 构建甲醇同化途径; 进一步采用 GREACE 技术, 利用修复矫正功能缺失的 DNA 聚合酶复合体(*dnaQ* 突变基因编码), 降低细胞基因组复制过程错配修复效率, 提升自然突变率, 结合以甲醇为碳源的针对性压力筛选, 最终获得了 2 株生长特性优异的进化菌株; 其

中, 25113Δ*frmA*/pZWM1-13 突变株较原始菌株 25113Δ*frmA*/pZWM1 菌体生物量增加了 27.6%, 对该菌株进行 ¹³C 示踪分析结果表明, 适应性进化有效地提升了甲醇利用率, 为工业微生物提高突变率缩短进化周期提供了一种行之有效的解决方法。

2.2 突变随机性导致遗传背景不清晰, 进化机理复杂

由于基因突变的随机性, 随着进化过程的连续进行, 进化菌株在积累有益突变的同时, 也在不断地积累中性和有害突变, 而这些突变的数量通常远大于有益突变的数量, 这导致进化菌株遗传背景不清晰, 同时给进化机理的阐明也带来难题。随着组学技术的发展, 采用全基因组测序、转录组学、代谢组学等组学技术结合逆向代谢工程 (inverse metabolic engineering, IME) 的研究方法, 可有效鉴定进化菌株中的有益基因突变, 并可进一步重构出仅携带有益基因突变的工程菌株^[53-54] (图 2), 使之具有遗传特性稳定、遗传背景清晰的优点, 并可针对有益基因突变阐明进化机理。

Peano 等^[54]通过比较基因组学技术测定了一株采用传统诱变育种方法得到的利福霉素高产菌株地中海拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis mediterranei*) HP-130, Illumina genome analyzer IIX 测序平台测序结果发现, 该突变菌株与对照菌株 *A. mediterranei* S699 和 *A. mediterranei* U32 相比, 共包含了 64 个重要的基因突变 (54 个错误突变、3 个无义突变、4 个移码突变及 3 个片段缺失/插入突变), 这些基因突变主要影响了脂肪酸代谢的相关基因, 这些代谢途径和利福霉素代谢途径的前体物相同, 均为丙二酰辅酶 A 和甲基丙二酸单酰辅酶 A; 通过微芯片的数据, 作者着重分析了 3 个重要研究靶点

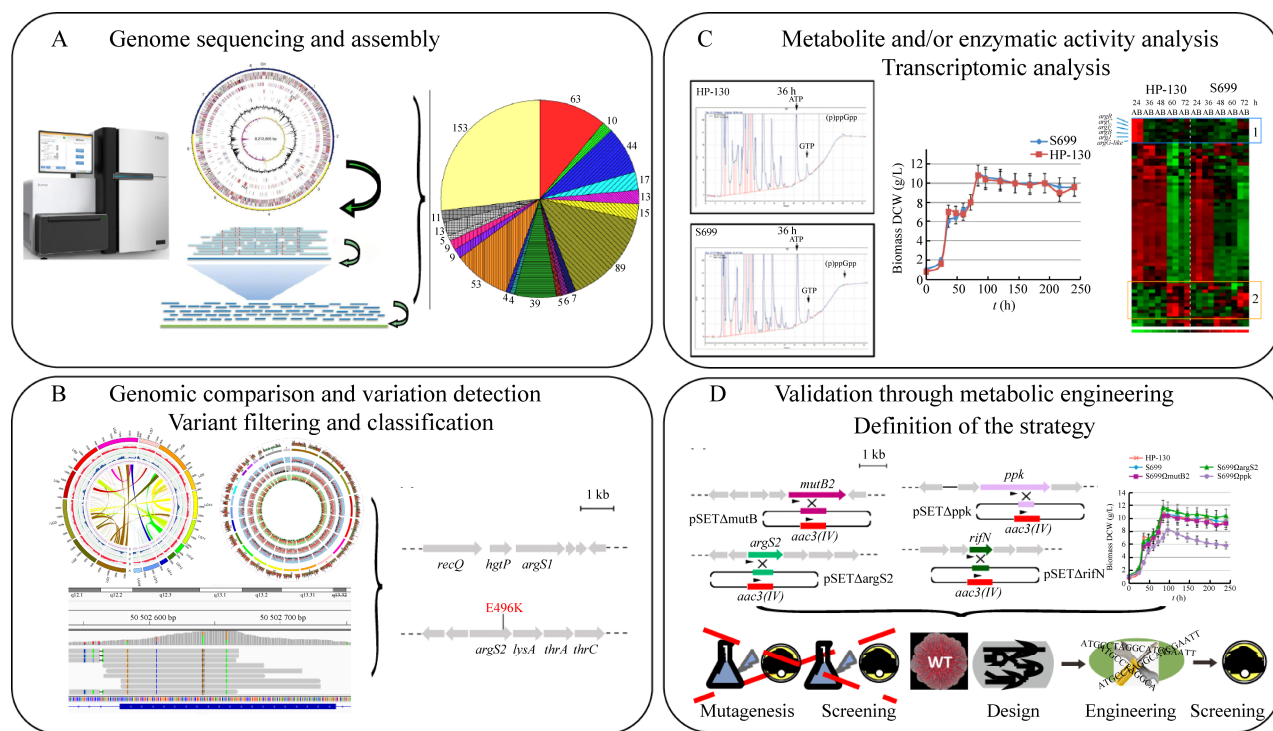


图2 多组学技术结合逆向代谢工程分析遗传背景不清晰菌株基因突变策略^[54] A: 进化菌株全基因组测序和组装; B: 比较基因组学和突变检测技术对突变基因进行筛选和分类; C: 对进化菌株进行代谢物、酶学和转录组学分析; D: 逆向代谢工程策略重构进化菌株

Figure 2 Analysis of gene mutation strategy of strains with unclear genetic background by Multi-omics technology combined with IME^[54]. A: The whole genome of the evolved strain was sequenced and assembled; B: The evolved gene mutations were classified by genomic comparison and variation detection; C: Metabolite, enzymology and transcriptome analysis were performed on the evolved strains to analyze the genetic basis for target phenotype; D: Reintroducing the specific evolved mutations into the wild-type strain recovered the evolved phenotype by reverse metabolic engineering.

argS2、*mutB2* 和 *ppk*, 结果表明, 单一的 *mutB2* 基因突变足以赋予高产菌株 HP-130 利福霉素合成能力, 同时说明菌株的高产能力主要来自甲基丙二酸单酰辅酶 A 节点的代谢流的重定向, 这是采用比较基因组学和转录组学进行研究传统诱变菌株遗传机理的又一成功案例。

Horinouchi 等^[55]通过对 *E. coli* MDS42 进行 24 d (大约 210 代) 连续传代的适应性进化手段, 提高了 *E. coli* 对于毒性代谢物异丙醇的耐受性, 并减弱了异丙醇对细胞生长不利的影响, 通过对进化菌株的基因组重测序和转录组学分

析, 并最终鉴定出和异丙醇耐受特性相关的 5 个突变基因 *relA*、*marC*、*proQ*、*yfgO* 和 *rraA*; 为了解这些菌株的表型变化, 通过微阵列对这些耐性菌株进行了全面的基因表达分析, 并鉴定了在耐性菌株中表达明显上调或下调的基因和功能类别; 使用单基因敲除收集来量化基因删除对大约 100 个与氧化应激反应、琥珀酸脱氢酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、NADH 脱氢酶 I 和受 Fur 调节相关基因的异丙醇耐受性的影响; 并且发现 *acnA* (乌头酸水合酶 A 基因)、*degP* (丝氨酸蛋白酶 Do 基因)、*fur* (铁离子摄取全局转录抑制物基因)、

gpmA (2,3-二磷酸甘油酸依赖性磷酸甘油酸变位酶基因)、*ndh* (NADH:醌氧化还原酶 II 基因)和 *tfaQ* (预测的尾纤维组装蛋白基因)的缺失,在异丙醇存在下耐性菌株生长显著下降,结果表明这些基因在异丙醇耐受机制中起重要作用,同时阐明在进化菌株中发生改变的氨基酸代谢、能量代谢和铁稳态等和耐受性呈正相关。

Wang 等^[56]通过全基因组测序和转录组学分析研究方法,在整体水平上系统分析了诱变获得的核黄素合成菌株 *B. subtilis* 24/pMX45 的基因突变及转录表达行为,以逆向代谢工程和无痕等位基因置换技术为手段,筛选出多个与核黄素过量积累相关的有益基因突变,分别是 *RibC* (G199D)、*ribD*⁺ (G+39A)、*PurA* (P242L)、*CcpN* (A44S)、*YvrH* (R222Q)、*YhcF* (R90*)和 *YwaA* (Q68*),并阐明这些有益基因突变导致核黄素过量积累的遗传机制;将有益基因突变进行菌株重构,重构菌株达到测序菌株 80%核黄素合成能力,并具有遗传背景清晰及易于进一步代谢工程改造等优点,并对首次发现的有益基因突变 *YvrH* (R222Q)进行了详细研究;转录组学研究发现该突变致使转录调控因子 *YvrH* 部分失性,并最终导致受其负调控的关键酶 N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸酰胺酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, *LytC*)的过表达,而代谢组学的数据表明, *LytC* 的过表达最终解除了枯草芽孢杆菌嘌呤从头合成途径的调控,提升了核黄素合成前体物 GTP 的供给,导致了核黄素的过量积累。此外,在 5-氨基丙酸(5-ALA)过量合成的谷氨酸棒状杆菌工程菌株 $\Delta 4$ -PPC 中诱导表达 *LytC* 同工酶 (*cgl13092*),显著增强了其 5-氨基丙酸的合成能力,发现该机制具有一定普遍适用性,可应用于其他生物基产品合成菌株的理性代谢工程修饰^[56]。

Mohamed 等^[57]通过耐受适应性实验室进化法(tolerance adaptive laboratory evolution, TALE)

提高了基础菌株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) KT2440 的羟基肉桂酸对香豆酸(*pCA*)和阿魏酸(FA)的耐受性,进化菌株在 20 g/L *pCA* 中的延滞期缩短了 37 h,在 30 g/L FA 中比生长速率增加 2.4 倍;全基因组重测序揭示了这些芳香分解代谢和毒性耐受性增强相关的遗传靶标, *PP_3350* 和 *tigB* 是最常见的突变基因,其有益作用通过基因敲除得到证实, *PP_3350* 是一种外膜孔蛋白,虽然 *PP_3350* 的功能尚未确定,但是 *PP_3350* 的基因删除可以重现对高浓度 *pCA* 毒性耐受性的改善,而对高浓度 FA 的生长率没有改善;另外, *tigB* (*TtgABC* 外排泵的一部分)的缺失严重抑制了 *pCA*+FA TALE 进化菌株的生长,但未影响野生型背景下 *pCA*+FA 的生长,推测在 *tigB* 中观察到的 SNPs 可能使 *pCA* 或 FA 衍生化合物及分解代谢中间产物的外排增强,表明上位性相互作用,即突变最初促进生长,但 *TtgB* 对于 *pCA* 或更高浓度中间产物的流出至关重要。在 TALE 实验中,经常在多种底物上突变涉及鞭毛运动和转录调控的基因,从而增强了最小化和失调细胞作为驯化生长的理想构想。

Srivastava 等^[58]选取一株生长快速、高光和耐 CO₂ 的细长聚球蓝细菌(*Synechococcus elongatus*) PCC 11801 作为出发菌株用于 ALE 实验,在历时 8 400 h 的培养和 100 次连续传代的 2 次平行实验中, *S. elongatus* PCC 11801 进化为可耐受 5 g/L 正丁醇或 30 g/L 2,3-丁二醇的进化菌株,耐受浓度提高了 100%;此外,正丁醇进化菌株可以耐受高达 32 g/L 的乙醇,从而使其有望成为通过代谢工程光合作用生产生物燃料的宿主,并对其他醇类也表现出较高的耐受性,正丁醇进化菌株的全基因组重测序揭示了许多应激响应基因的基因突变,这些基因编码了翻译起始因子、RpoB 和 ABC 转运蛋白,在 2,3-丁二醇进化的菌株中,发现了一种不同的 ABC 转运

蛋白 ClpC, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶和磷酸二氢激酶的基因发生了突变, 通过全基因组测序鉴定出的突变为研究耐高浓度正丁醇和 2,3-丁二醇的机制提供了新的思路。

3 展望

对于工业生产微生物育种而言, ALE 是获得具有特定表型目标菌株非常有效的手段。适应性进化在代谢途径激活、底物利用、微生物生长表型优化和目标代谢物过量合成等微生物育种中展现了广泛的应用价值。由于微生物培养、高通量测序、生物信息学和基因组编辑等技术的发展, 适应性进化已经成为强大的育种工具, 这也为组学分析、机理研究和理性代谢工程提供了重要的研究基础。然而 ALE 技术仍然存在许多问题需要克服, 比如进化过程通常十分耗时且劳动力成本高昂。ALE 技术应和理性代谢工程紧密结合, 以最大限度地发挥其快速改善菌株表型的作用。同时, 与直接引入外源基因或敲除原有基因的理性代谢工程相比, ALE 并不能在短时间内大幅重塑代谢, 但若以理性代谢工程菌株作为进化初始菌株, 就能显著缩短进化过程, 特别是对复杂表型的获得, 代谢工程和 ALE 结合的效果越发显著。另外, 构建工业菌株的遗传稳定性也是一个重要的问题, 而生长耦合设计是解决这一问题的较好选择。

虽然进化过程积累基因突变可通过基因组测序和转录组测序等技术进行分析和筛选, 但突变随机性使得进化机制复杂, 进化机理的详细阐明有一定难度且耗时耗力。随着 ALE 的广泛应用, 突变分析和进化机理解析越发重要, 探究基因型与表型相互关系成为重要的研究内容。尽管逆向代谢工程已取得较大进展, 但是还远远不够。ALE 研究中对基因型-表型关联的解释仍缺乏标准, 未来研究中应更多运用多组学技术, 即

将基因组、转录组、蛋白质组、代谢组和通量组等分析信息充分整合, 增加系统整体和关键代谢途径水平的表型-基因型关联数据, 从微生物代谢和基因调控等层面系统解析进化机理。总之, ALE 技术促进了工业生产菌株的选育效率, 相关技术的发展促使其被快速应用, 成为工业微生物育种的重要手段。

REFERENCES

- [1] Lee S, Kim P. Current status and applications of adaptive laboratory evolution in industrial microorganisms[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(6): 793-803
- [2] LaCroix RA, Sandberg TE, O'Brien EJ, Utrilla J, Ebrahim A, Guzman GI, Szubin R, Palsson BO, Feist AM. Use of adaptive laboratory evolution to discover key mutations enabling rapid growth of *Escherichia coli* K-12 MG1655 on glucose minimal medium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 17-30
- [3] Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, Palsson BO, Feist AM. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 1-16
- [4] 朱晁晔, 朱牧孜, 李爽. 微生物实验室进化的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2019, 17(1): 8-14, 22
Zhu CY, Zhu MZ, Li S. Research progress in microbial laboratory evolution[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2019, 17(1): 8-14, 22 (in Chinese)
- [5] Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution — principles and applications for biotechnology[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 64
- [6] Gresham D, Dunham MJ. The enduring utility of continuous culturing in experimental evolution[J]. *Genomics*, 2014, 104(6): 399-405
- [7] Wu YN, Jameel A, Xing XH, Zhang C. Advanced strategies and tools to facilitate and streamline microbial adaptive laboratory evolution[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.04.002>
- [8] Long CP, Antoniewicz MR. How adaptive evolution reshapes metabolism to improve fitness: recent advances and future outlook[J]. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2018, 22: 209-215

- [9] Conrad TM, Lewis NE, Palsson BØ. Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science[J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7: 509
- [10] 李建, 孔婧, 李圣龙, 赵禹, 赵雅坤, 肖冬光, 于爱群. 适应性实验室进化技术在微生物育种中的应用进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 130-141
- Li J, Kong J, Li SL, Zhao Y, Zhao YK, Xiao DG, Yu AQ. Advances in adaptive laboratory evolutionary engineering to microbial breeding[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(1): 130-141 (in Chinese)
- [11] Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, Waterston RH. DNA sequencing at 40: past, present and future[J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 345-353
- [12] 贺雪婷, 张敏华, 洪解放, 马媛媛. 大肠杆菌丁醇耐受机制及耐受菌选育研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(9): 81-87
- He XT, Zhang MH, Hong JF, Ma YY. Research progress on butanol-tolerant strain and tolerance mechanism of *Escherichia coli*[J]. *China Biotechnology*, 2018, 38(9): 81-87 (in Chinese)
- [13] 巩继贤, 郑辉杰, 郑宗宝, 段楠, 陈涛, 赵学明. 微生物进化工程育种技术进展与展望[J]. *生物加工过程*, 2010, 8(2): 69-76
- Gong JX, Zheng HJ, Zheng ZB, Duan N, Chen T, Zhao XM. Strain improvement by evolutionary engineering: progress and perspective[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2010, 8(2): 69-76 (in Chinese)
- [14] Yu T, Zhou YJ, Huang MT, Liu QL, Pereira R, David F, Nielsen J. Reprogramming yeast metabolism from alcoholic fermentation to lipogenesis[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1549-1558
- [15] Chen ML, Ma CW, Chen L, Zeng AP. Integrated laboratory evolution and rational engineering of GalP/Glk-dependent *Escherichia coli* for higher yield and productivity of L-tryptophan biosynthesis[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2021, 12: e00167
- [16] Kawai K, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Hirasawa T. Identification of metabolic engineering targets for improving glycerol assimilation ability of *Saccharomyces cerevisiae* based on adaptive laboratory evolution and transcriptome analysis[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(2): 162-169
- [17] 蒋玲艳. 利用代谢工程与适应性进化构建鸟氨酸高产菌株[D]. 广州: 中山大学博士学位论文, 2012
- Jiang LY. Combining metabolic engineering and adaptive evolution to construct high-production strains of L-ornithine in *C. glutamicum*[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of Sun Yat-sen University, 2012 (in Chinese)
- [18] Seong W, Han GH, Lim HS, Baek JI, Kim SJ, Kim D, Kim SK, Lee H, Kim H, Lee SG, et al. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* lacking cellular byproduct formation for enhanced acetate utilization through compensatory ATP consumption[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 249-259
- [19] Godara A, Kao KC. Adaptive laboratory evolution for growth coupled microbial production[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(11): 175
- [20] Fong SS, Burgard AP, Herring CD, Knight EM, Blattner FR, Maranas CD, Palsson BO. *In silico* design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 91(5): 643-648
- [21] Meyer F, Keller P, Hartl J, Gröninger OG, Kiefer P, Vorholt JA. Methanol-essential growth of *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1508
- [22] Liu KY, Fang H, Cui FJ, Nyabako BA, Tao TL, Zan XY, Chen HY, Sun WJ. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(14): 6363-6373
- [23] Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, Feizi A, Buskov S, Hallström BM, Petranovic D, Nielsen J. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant[J]. *Science*, 2014, 346(6205): 75-78
- [24] Reyes LH, Gomez JM, Kao KC. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 21: 26-33
- [25] Tuyishime P, Wang Y, Fan LW, Zhang QQ, Li QG, Zheng P, Sun JB, Ma YH. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for methanol-dependent growth and glutamate production[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 220-231
- [26] Jang S, Kim M, Hwang J, Jung GY. Tools and systems for evolutionary engineering of biomolecules and microorganisms[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(9/10): 1313-1326
- [27] Ji XJ, Huang H, Ouyang PK. Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(3): 351-364
- [28] Plácido J, Capareda S. Conversion of residues and by-products from the biodiesel industry into value-added products[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2016, 3(1): 23
- [29] Ho PW, Swinnen S, Duitama J, Nevoigt E. The sole

- introduction of two single-point mutations establishes glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK derivatives[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 10
- [30] Klimacek M, Kirl E, Krahulec S, Longus K, Novy V, Nidetzky B. Stepwise metabolic adaption from pure metabolization to balanced anaerobic growth on xylose explored for recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 37
- [31] Saini P, Beniwal A, Kokkiligadda A, Vij S. Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 62: 69-79
- [32] Zhang B, Li N, Wang ZW, Tang YJ, Chen T, Zhao XM. Inverse metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for xylose utilization based on adaptive evolution and whole-genome sequencing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 885-896
- [33] Rajaraman E, Agarwal A, Crigler J, Seipelt-Thiemann R, Altman E, Eiteman MA. Transcriptional analysis and adaptive evolution of *Escherichia coli* strains growing on acetate[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(17): 7777-7785
- [34] González-Villanueva M, Galaiya H, Staniland P, Staniland J, Savill I, Wong TS, Tee KL. Adaptive laboratory evolution of *Cupriavidus necator* H16 for carbon co-utilization with glycerol[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22): 5737
- [35] Wang Y, Fan LW, Tuyishime P, Liu J, Zhang K, Gao N, Zhang ZH, Ni XM, Feng JH, Yuan QQ, et al. Adaptive laboratory evolution enhances methanol tolerance and conversion in engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 217
- [36] Promdonkoy P, Mhuantong W, Champreda V, Tanapongpipat S, Runguphan W. Improvement in D-xylose utilization and isobutanol production in *S. cerevisiae* by adaptive laboratory evolution and rational engineering[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2020, 47(6/7): 497-510
- [37] Sarkar P, Mukherjee M, Goswami G, Das D. Adaptive laboratory evolution induced novel mutations in *Zymomonas mobilis* ATCC ZW658: a potential platform for co-utilization of glucose and xylose[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(3): 329-341
- [38] Millán C, Peña C, Flores C, Espín G, Galindo E, Castillo T. Improving glucose and xylose assimilation in *Azotobacter vinelandii* by adaptive laboratory evolution[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(3): 1-11
- [39] Kim DH, Lee WH. Development of *Pichia stipitis* co-fermenting cellobiose and xylose through adaptive evolution[J]. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 2019, 47(4): 565-573
- [40] Cordova LT, Lu J, Cipolla RM, Sandoval NR, Long CP, Antoniewicz MR. Co-utilization of glucose and xylose by evolved *Thermus thermophilus* LC113 strain elucidated by ¹³C metabolic flux analysis and whole genome sequencing[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 37: 63-71
- [41] Sandberg TE, Lloyd CJ, Palsson BO, Feist AM. Laboratory evolution to alternating substrate environments yields distinct phenotypic and genetic adaptive strategies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017. DOI: 10.1128/aem.00410-17
- [42] Pereira R, Wei YJ, Mohamed E, Radi M, Malina C, Herrgård MJ, Feist AM, Nielsen J, Chen Y. Adaptive laboratory evolution of tolerance to dicarboxylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 130-141
- [43] Mundhada H, Seoane JM, Schneider K, Koza A, Christensen HB, Klein T, Phaneuf PV, Herrgård M, Feist AM, Nielsen AT. Increased production of L-serine in *Escherichia coli* through adaptive laboratory evolution[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 141-150
- [44] Zhu LJ, Cai Z, Zhang YP, Li Y. Engineering stress tolerance of *Escherichia coli* by stress-induced mutagenesis (SIM)-based adaptive evolution[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(1): 120-127
- [45] Royce LA, Yoon JM, Chen YX, Rickenbach E, Shanks JV, Jarboe LR. Evolution for exogenous octanoic acid tolerance improves carboxylic acid production and membrane integrity[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 180-188
- [46] 王世珍, 严正平, 邱隆辉, 方柏山. 发酵粗甘油产乳酸的戊糖乳杆菌代谢进化[J]. *化工学报*, 2015, 66(8): 3195-3203
- Wang SZ, Yan ZP, Qiu LH, Fang BS. Metabolic evolution of *Lactobacillus pentosus* for lactic acid production from raw glycerol[J]. *CIESC Journal*, 2015, 66(8): 3195-3203 (in Chinese)
- [47] Elbakush AE, Güven D. Evaluation of ethanol tolerance in relation to intracellular storage compounds of *Saccharomyces cerevisiae* using FT-IR spectroscopy[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 101: 266-273
- [48] Luan GD, Cai Z, Gong FY, Dong HJ, Lin Z, Zhang YP,

- Li Y. Developing controllable hypermutable *Clostridium* cells through manipulating its methyl-directed mismatch repair system[J]. Protein & Cell, 2013, 4(11): 854-862
- [49] 王光路, 周忆菲, 张帆, 王梦园, 马科, 叶建斌, 朱年青, 钟桂芳, 杨雪鹏. 可控高突变率枯草芽孢杆菌工程菌株的构建及应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1450-1460
- Wang GL, Zhou YF, Zhang F, Wang MY, Ma K, Ye JB, Zhu NQ, Zhong GF, Yang XP. Developing controllable hypermutable *Bacillus subtilis* cells through manipulating their methyl-directed mismatch repair system[J]. Microbiology China, 2021, 48(5): 1450-1460 (in Chinese)
- [50] 王光路, 杨琳琳, 张志平, 王跃, 张静涛. 一种人工控制枯草芽孢杆菌自发突变率的遗传操作方法及其应用: 中国, CN108865963A[P]. 2018-11-23
- Wang GL, Yang LL, Zhang ZP, Wang Y, Zhang JT. A genetic manipulation method for artificially controlling spontaneous mutation rate of *Bacillus subtilis* and its application: China, CN108865963A[P]. 2018-11-23 (in Chinese)
- [51] Asakura Y, Kojima H, Kobayashi I. Evolutionary genome engineering using a restriction-modification system[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(20): 9034-9046
- [52] 王晓璐, 王钰, 刘娇, 郑平, 路福平. 利用定向进化提高基因工程大肠杆菌的甲醇利用能力[J]. 生物技术通报, 2017, 33(9): 101-109
- Wang XL, Wang Y, Liu J, Zheng P, Lu FP. Enhanced methanol utilization in genetically engineered *Escherichia coli* by directed evolution[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(9): 101-109 (in Chinese)
- [53] Warner JR, Patnaik R, Gill RT. Genomics enabled approaches in strain engineering[J]. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12(3): 223-230
- [54] Peano C, Damiano F, Forcato M, Pietrelli A, Palumbo C, Corti G, Siculella L, Fuligni F, Tagliazucchi GM, De Benedetto GE, et al. Comparative genomics revealed key molecular targets to rapidly convert a reference rifamycin-producing bacterial strain into an overproducer by genetic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2014, 26: 1-16
- [55] Horinouchi T, Sakai A, Kotani H, Tanabe K, Furusawa C. Improvement of isopropanol tolerance of *Escherichia coli* using adaptive laboratory evolution and omics technologies[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 255: 47-56
- [56] Wang GL, Shi T, Chen T, Wang XY, Wang YC, Liu DY, Guo JX, Fu J, Feng LL, Wang ZW, et al. Integrated whole-genome and transcriptome sequence analysis reveals the genetic characteristics of a riboflavin-overproducing *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 138-149
- [57] Mohamed ET, Werner AZ, Salvachúa D, Singer CA, Szostkiewicz K, Rafael Jiménez-Díaz M, Eng T, Radi MS, Simmons BA, Mukhopadhyay A, et al. Adaptive laboratory evolution of *Pseudomonas putida* KT2440 improves *p*-coumaric and ferulic acid catabolism and tolerance[J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 11: e00143
- [58] Srivastava V, Amanna R, Rowden SJL, Sengupta S, Madhu S, Howe CJ, Wangikar PP. Adaptive laboratory evolution of the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 for improved solvent tolerance[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 131(5): 491-500