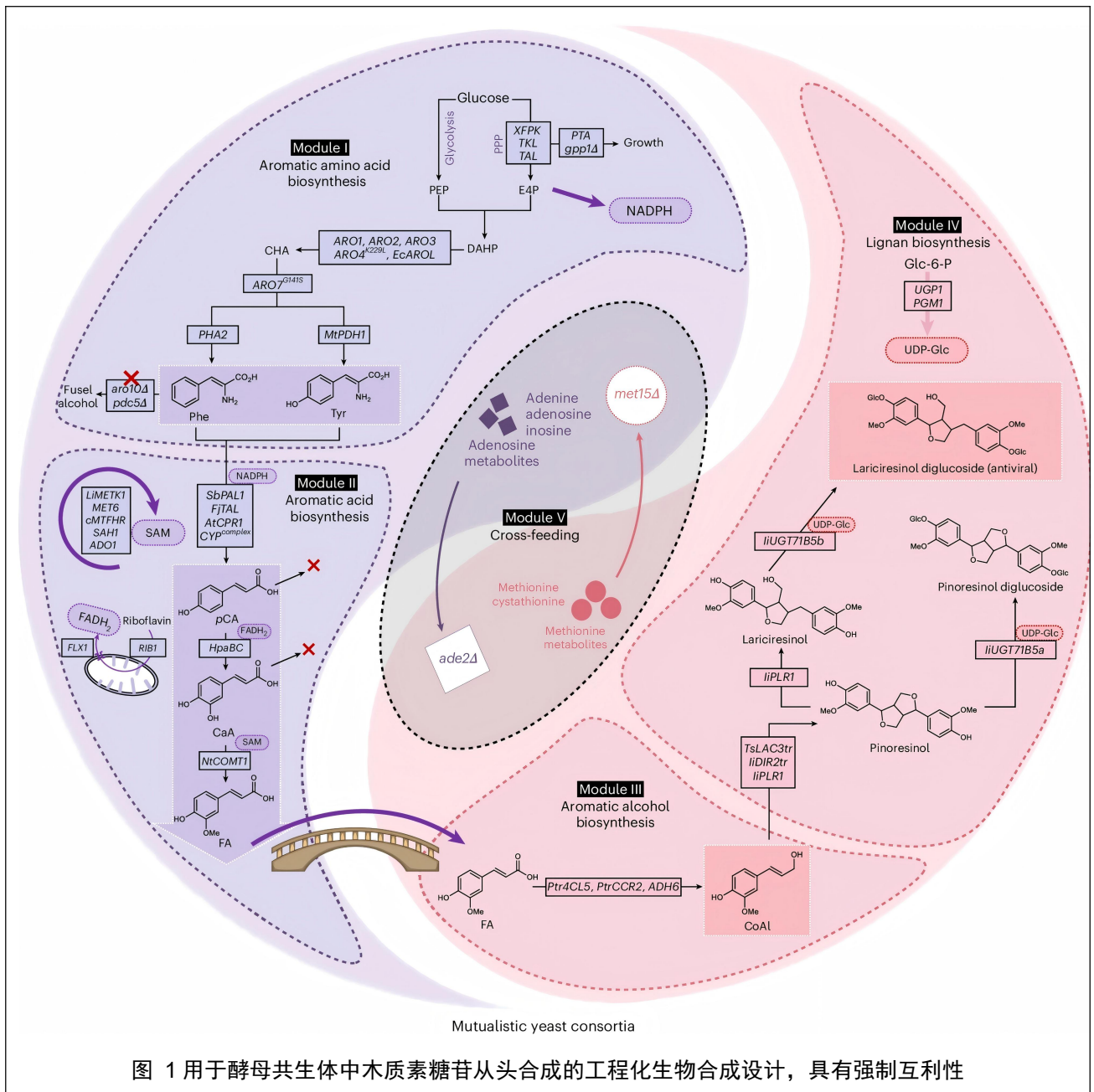


Summary

Author: 熊鑫

Date: 5/14

Name of the Article: De novo biosynthesis of plant lignans by synthetic yeast consortia	
Journal:Nature Chemical Biology	Year:2025
Methods and Backgrounds (Experiment Methods and Techniques.) 植物木脂素是一类具有复杂结构和多种生物活性的天然产物，在传统重要中具有重要作用，在植物中这样的化合物通过多个细胞器、细胞类型共同来完成，因此他们研究将微生物互作引入合成这种木质素通过构建辅助营养缺陷型的酿酒酵母，以阿魏酸为桥梁从头合成了木质素。	
主要运用了 crispr-cas9，流式细胞检测，补料发酵，ABTS 氧化显色等方法。	
What does the article mainly tell us? (<i>no more than 200 words, in English.</i>) The article presents a modular synthetic biology strategy to achieve the de novo biosynthesis of plant lignan glycosides —notably <i>lariciresinol diglucoside</i> and <i>pinoresinol diglucoside</i> —in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . By dividing the complex biosynthetic pathway into five functional modules (from aromatic amino acid biosynthesis to glycosylation), the researchers constructed a mutualistic yeast consortium composed of two auxotrophic strains (<i>met15</i> Δ and <i>ade2</i> Δ). Each strain carries part of the biosynthetic pathway and depends on metabolic cross-feeding for survival, enhancing system stability and reducing metabolic burden. Through stepwise enzyme selection, pathway engineering, and compartmentalization, the consortium successfully converted glucose into antiviral lignan glycosides. This study provides a powerful framework for producing complex plant-derived natural products in engineered microbial consortia.	
Figures explanation	



通过这个图大概介绍了这个项目，主要是介绍了他们构建的这个酵母菌群互作的具体代谢途径。

在第一部分有 Glu 反应生成 DAHP 经过 ARO 合成 CHA，通过替换 pdc6/pdc5 抑制副产物生成从而获得前体 Phe/Tyr，进而在第二部分通过引入一些酶提升 FA 的得率，以 FA 为桥梁，进入第二个菌的第三部分，在 Ptr4CL5, PtrCCR2, ADH6 三个酶的作用下得到 CoAl，最后通过 LAC 加 DIR 蛋白转换成 PLR 进而糖基化生成 LDG。在整个代谢过程中两种菌依靠底物部分的营养缺陷的互作进行营养依赖的构建。

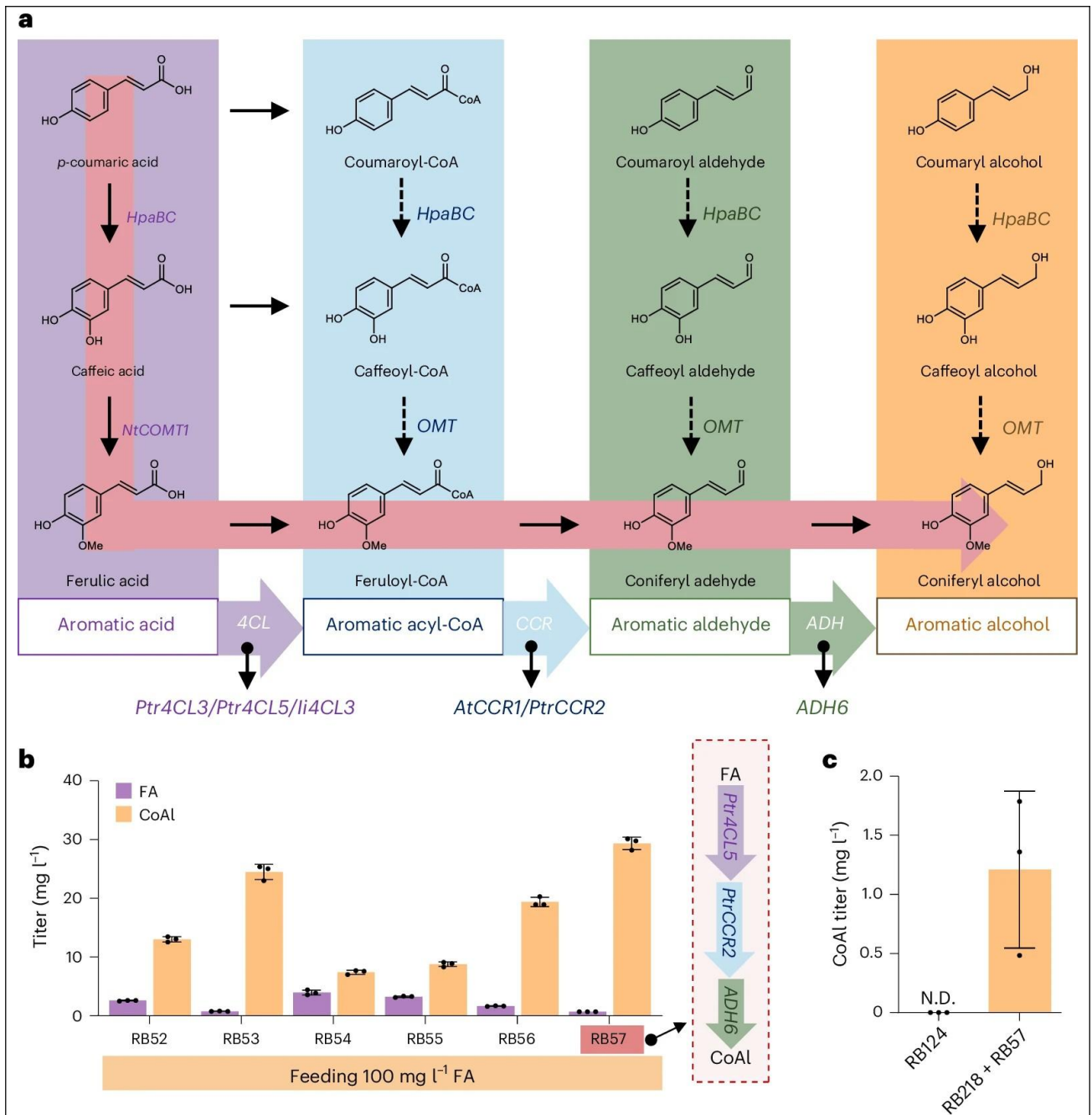


图 2 酵母中松柏醇生物合成途径的筛选与构建

图 1 部分作者提出了一个合成香豆素（苯丙类）化合物的代谢网络，同时论述了大肠杆菌中由对香豆酸以及拟南芥中一咖啡酸为底物催化合成松柏醇在酵母中不可行，因此提出了通过导入阿魏酸，将其转化为香紫苏醇通过不同酶组合的芳香醇代谢途径最终生成阿魏醇。

a 部分是生成芳香醇的代谢网络示意，红色箭头部分是他们选择的生物合成途径，合成途径大概是从芳香酸到芳香辅酶 A 芳香醛，最后还原成芳香醇。

b 部分是通过不同的酶组合由通过输入 100 mg/L 的 FA（阿魏酸），发酵 96 小时后检测 CoAl（阿魏醇），发现 RB57 可以高效产生阿魏醇，通过 RB218 和 RB57 的混合培养进行合成，新和成了 $1.2 \pm 0.7 \text{ mg/L}$ 说明微生物菌群是可行的提升产率的方案。

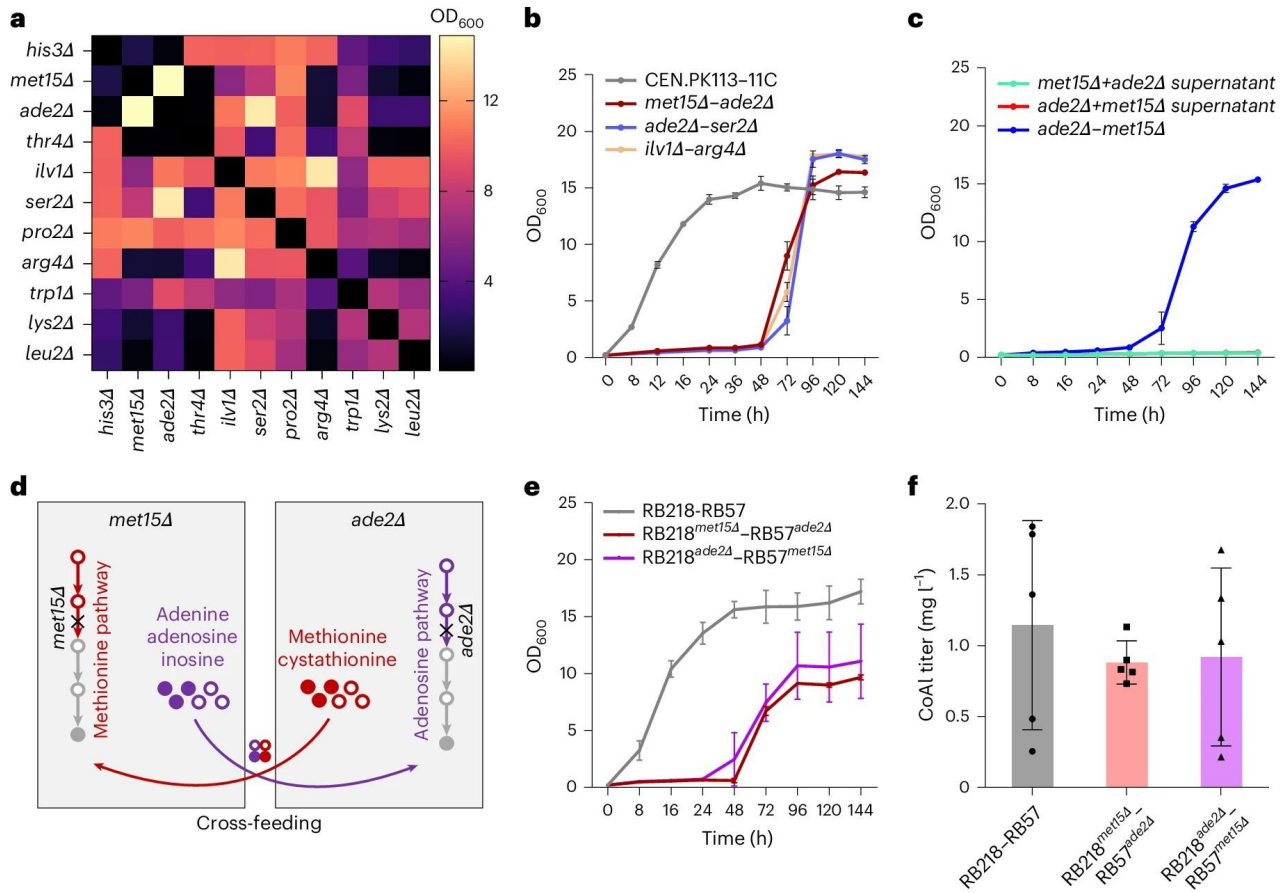


图 3 酵母菌群中具有互利共生特性的新合成松柏醇

为了实现微生物菌群的构建，他们尝试了 11 中常用的突变体作为营养缺陷型，在摇床下发酵生长，对于这 11 种突变体进行组合，找到了其中菌液密度较大的一些突变， $ade2\Delta$ - $met15\Delta$ 和 $ade2\Delta$ - $ser2\Delta$ 和 $ilv1\Delta$ - $arg4\Delta$ ，最终选择了最大生长速率的 $ade2\Delta$ - $met15\Delta$ 组合，并且将细胞裂解无上清液提取培养，发现确实无法得到细菌，说明 $ade2\Delta$ - $met15\Delta$ 的生长严格来自于交叉喂养，而非发酵液中的代谢物残留。

图 a 是他们构建的突变体以及测得的菌密，通过不同的颜色来标识相关密度获得的图片，可以学习一下相关的制图思路。

图 b 是他们构建的突变体的菌密，他们发现 $ade2\Delta$ - $met15\Delta$ 虽然最后没有到达最大的 OD 值，但是他的生长速率最大。

图 c 是将上清液的物质提取出来进行培养，发现不是发酵液的代谢残留导致的生长。

图 d 是解释了交叉喂养的机制。

图 e 是对交叉喂养的菌进行共培养，检测生长状况。

图 f 是对不同菌共培养产生的 CoAl 进行检测，发现检测方差较大，但 RB218 $met15\Delta$ -RB57 $ade2\Delta$ 的生产相对较稳定。

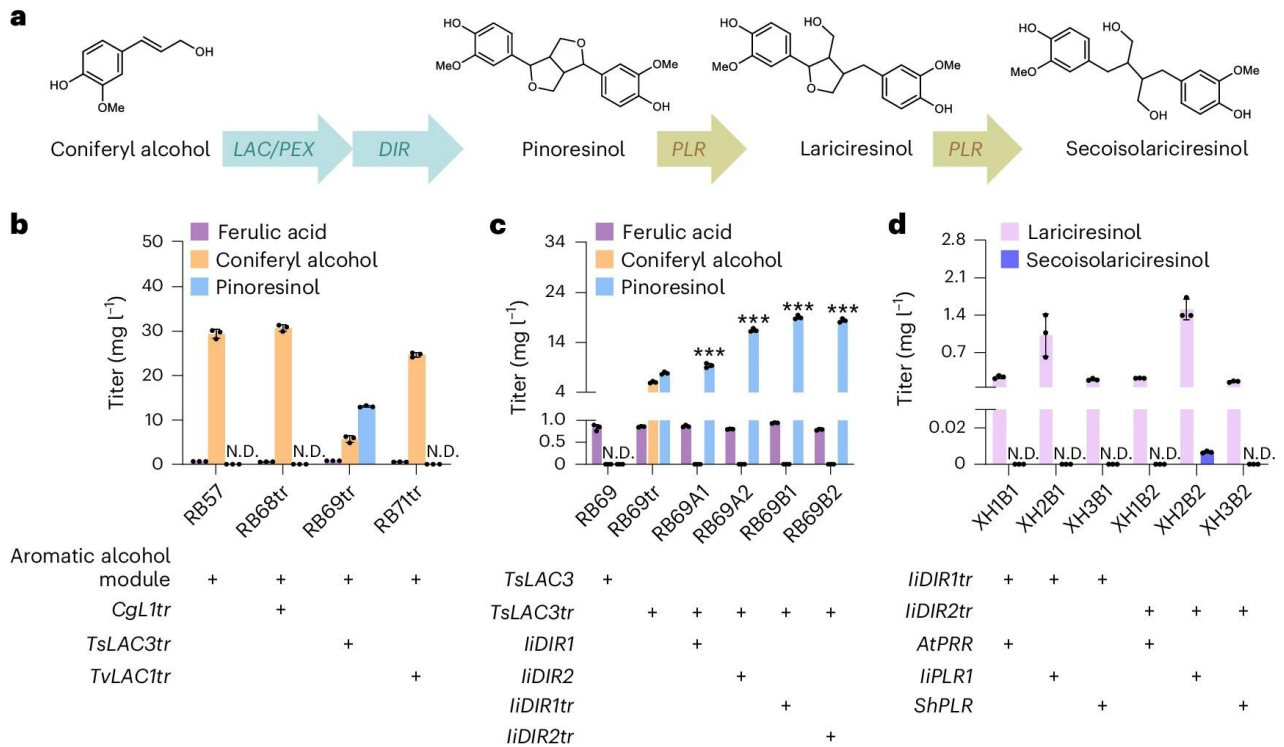


图 4 在 *S. cerevisiae* 中构建和优化木质素生物合成

然后进一步对合成途径进行优化，从植物木质素的第一个合成途径入手，先合成 pinoresinol，然后合成 lariciresinol，作者尝试了许多方法构建都未能成功，最后在菌株 RB69tr 中表达截短的 TsLAC3tr 才成功表达了 pinoresinol，并且确认了活性和去除信号肽对降低活性的影响。之后分批加入阿魏酸发现阿魏酸重组是会发生副反应，可能是 TaLac3tr 的催化导致的，同时双分子自由基反应也会产生副产物，因此，他们采用 DIR 基因减少自由基偶联的副反应。

图 a 是展示了 CoaL 转换成 secoisolariciresinol 的代谢途径，其中 LAC/PEX（漆酶/过氧化物酶）：催化 coniferyl alcohol 形成自由基偶联，生成 pinoresinol，DIR（指向蛋白）：调控偶联反应的区域与对映选择性，最后 PLR 则通过还原最终合成 secoisolariciresinol

图 b 设计了多个菌株在其中引入不同来源或修饰的漆酶 LAC，最后发现 RB69tr（表达阶段 TsLAC3tr，移除信号肽）能够从 CoAL 合成 pinoresinol。

图 c 是基于图 b 得到的 RB69tr 菌株，分别引入不同的 DIR 蛋白构建了 RB69A1/B1 等多个变体菌株，最终发现所有引入 DIR 的变体都显著提高了 pinoresinol 产量，并且 liDIR1tr + TsLAC3tr 的组合效果最好。

图 d 在 XH 菌中引入不同来源的 PLR 酶，发现表达 liPLR1 的 XH2B2 和 XH2B1 积累了最高量的 lariciresinol

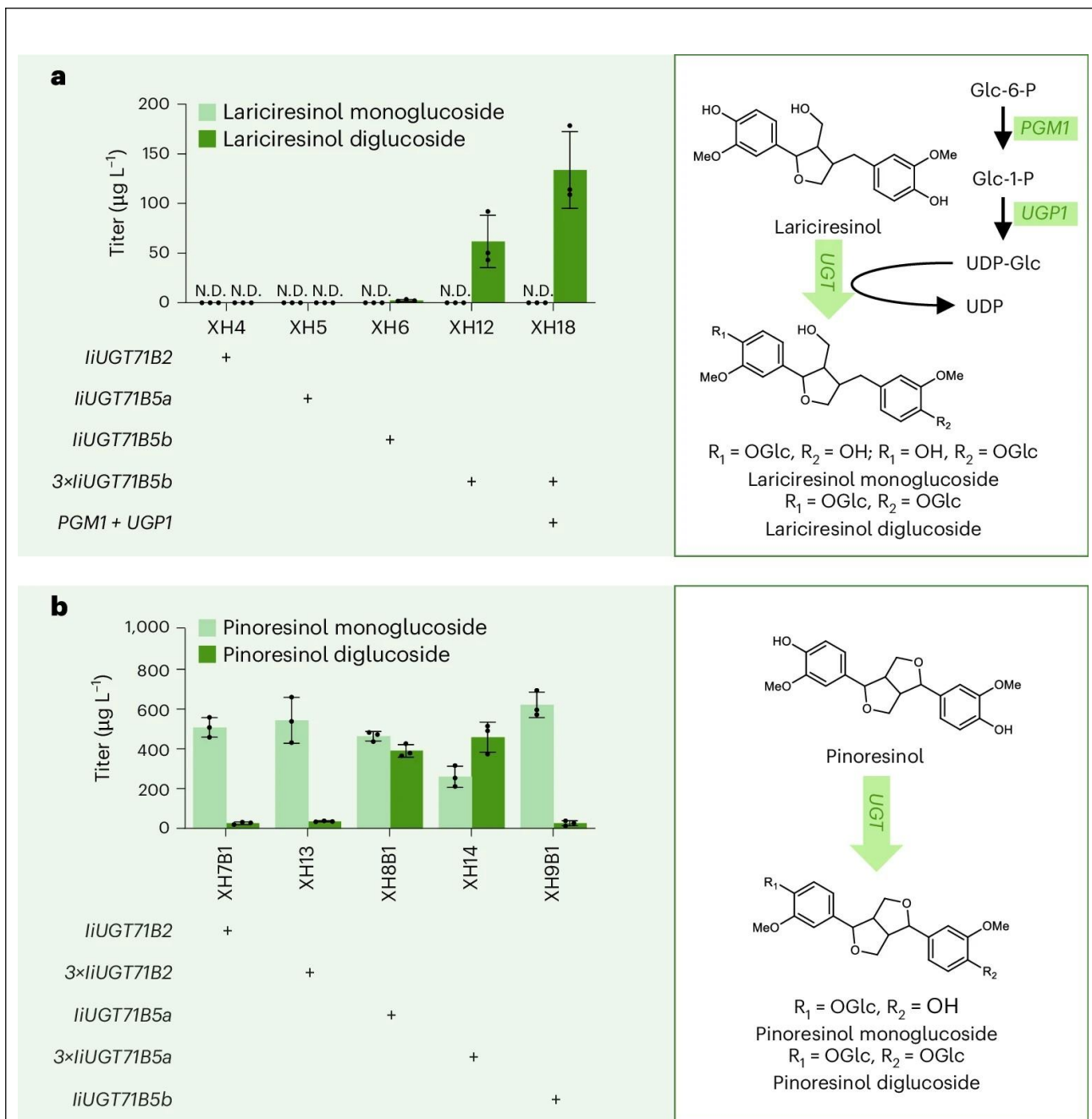


图 5 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中木脂素糖苷的产生

进而希望对木质素类产物进行糖基化，对于不同的 UGT 糖基转移酶进行对比，验证其生物合成的潜力。

图 a 是利用不同的 UGT 组合对 Lariciresinol 转化成 LMG 或是 LDG 的反应进行测量。发现在表达 *liUgt71b5b* 的 XH12 菌株中才发现 LDG，而 XH18 则在 XH12 基础上引入 *PGM1 + UGP1*（提高 UDP-Glc 合成），以及 *liUGT71B5b* 三拷贝过表达，显著增加了 LDG 产量 ($133.8 \pm 38.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 b 是测试了不同的 UGT 组合对 pinoresinol 糖基化的影响，发现所有的 UGT 基因都能显著生成 PMG 和 PDG。

因此他们就建立了一个 LDG 的合成路径，以阿魏酸作为桥梁，从一个已经构建了阿魏酸合成的菌株到他们所信构建的 XH12 菌株。

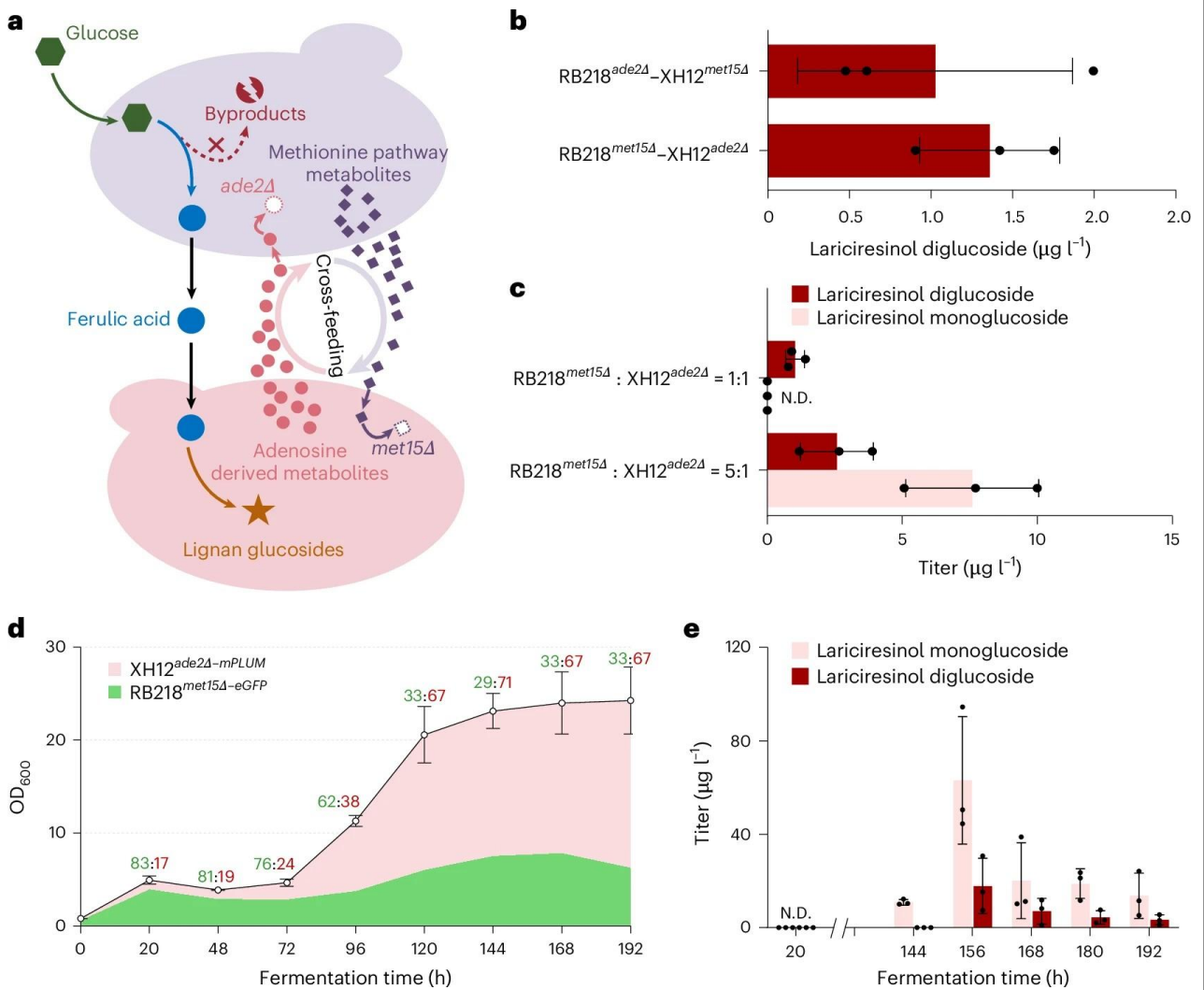


图 6 具有专性互利共生关系的酵母菌群中抗病毒木脂素糖苷的从头生物合成

图 a 是关于酵母菌群木质素葡萄糖苷合成的模型，主要是利用 RB218met15 无法合成甲硫氨酸，而 XH12 则无法合成腺苷，因此两者通过分泌自身代谢物支持彼此生存，并且共同合成木质素类物质，其中 FA 是桥梁物质，由 RB218 提供。

图 b 确定两种菌应该携带什么缺陷，发现在 RB218 中引入 met15 缺点更有利于代谢。

图 c 是对确定两种菌之间的配比，发现 5:1 会优于 1:1，但是没有给出其他的配比结果，这个 5:1 的配比最终是如何确定的？

图 d 是利用荧光标记对生物反应器中菌群的比例进行统计，发现在 5:1 的接种比例下，菌种在 48-96 小时后转变为 3:7，说明 XH12 为优势菌且整体菌最后会趋于稳定。这里如果一开始就通入 3:7 呢？

图 e 是对 LDG 和 LMG 两种化合物在生物反应器中反应得到最高产率的时间进行探究，发现几乎都在 156 小时后达到最高产量。

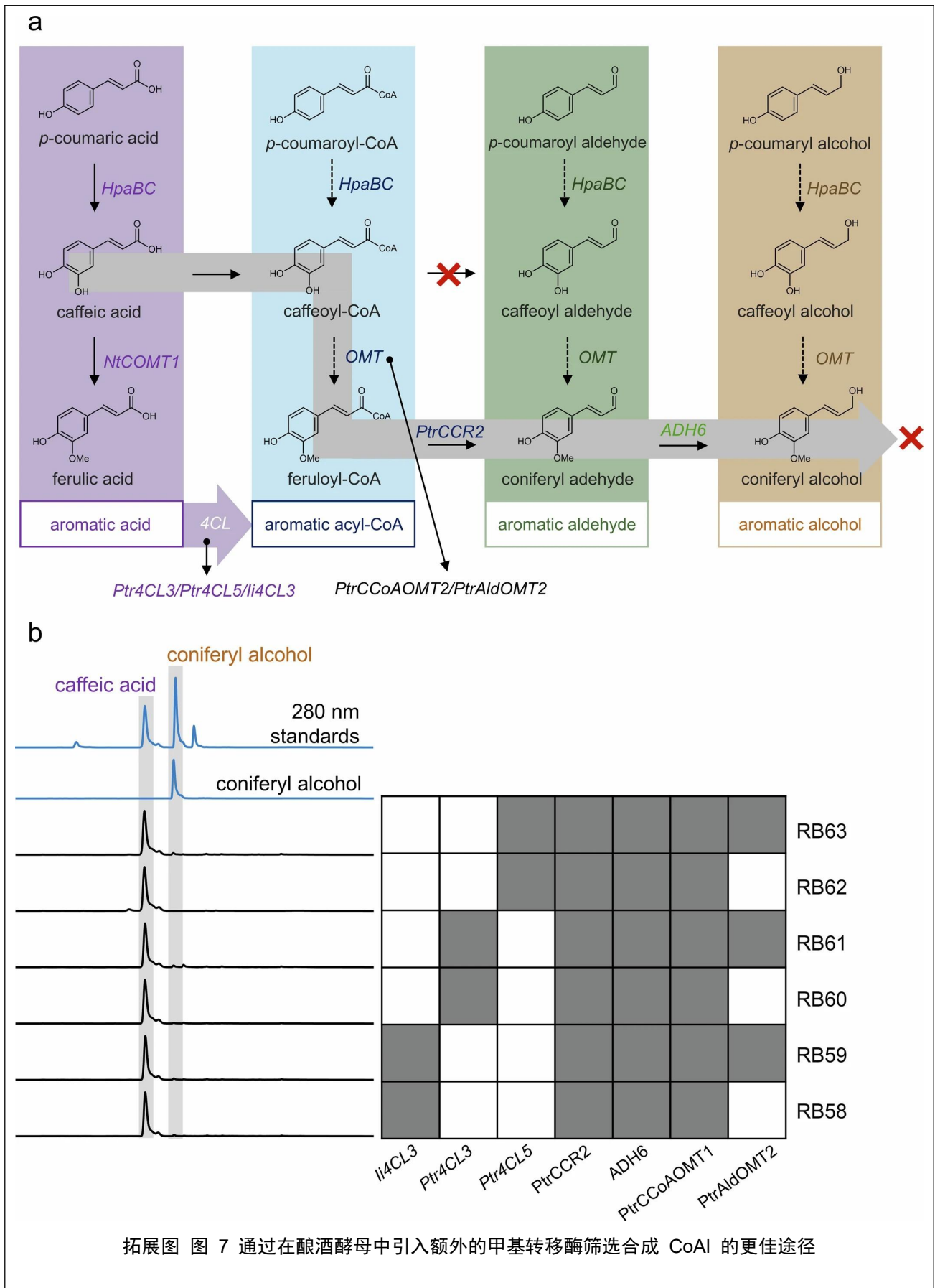
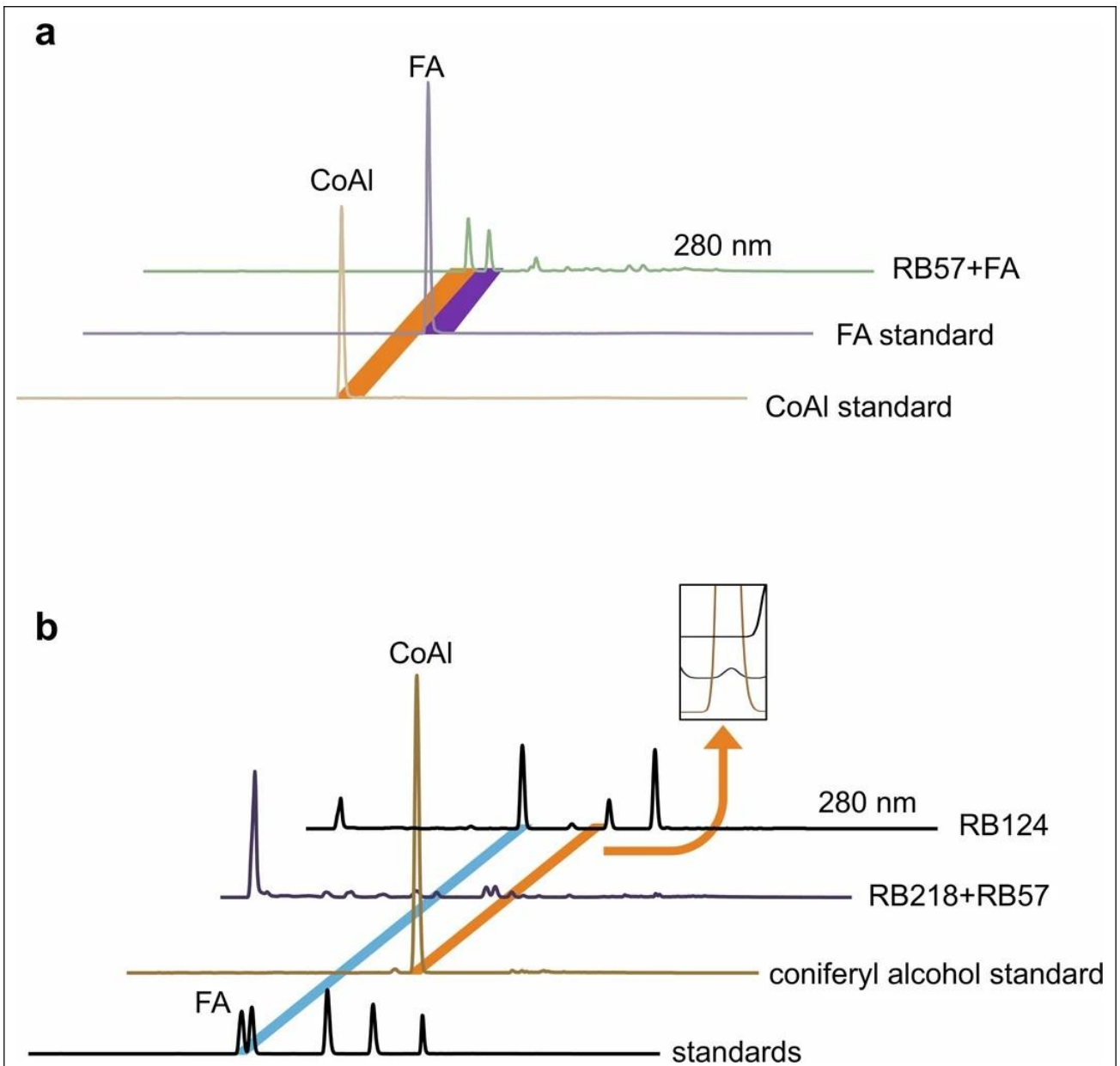


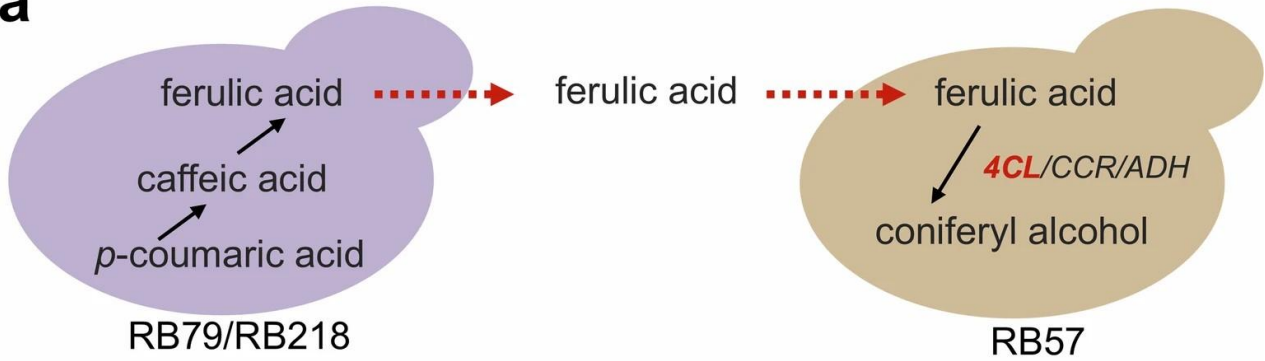
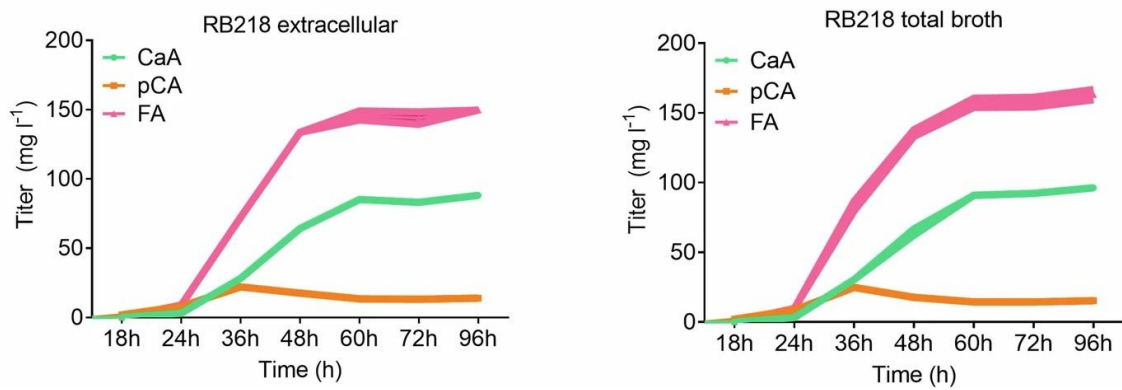
图 a 展示了通过表达甲基转移酶并且以 CaA 为底物合成 CoAl 的途径，图 b 是对其进行的实验验证，右

侧是基因矩阵，发现在所有不同基因与菌株的组合都不能产生 CoAl，



拓展图 图 8 共培养系统合成的标准品和产物的代表性色谱

图 8a 是通过液相色谱验证表达 *Ptr4CL5*、*PtrCCR2* 和 *ADH6* 的 RB57 能否将 FA 转化为 CoAL，显示在 RB57 菌株中加入 FA 后 FA 峰显著减低，同时 CoAL 有一定的峰值，说明底物发生了转化。图 b 是进一步验证了共培养中的 CoAL 发现在共培养菌群中有微弱的峰值，说明具有一定的代谢可能。

a**b**

拓展图 图 9 双酵母联合体的设计

图 9a 显示了在酵母联合体里合成 CoAL 的过程。

图 9b 是对于 RB218 产生的芳香酸浓度和细胞外的芳香酸浓度随时间变化的图，发现两者趋势相近，并且 FA 的含量都随时间增长，说明 RB218 是作为产生 FA 的良好

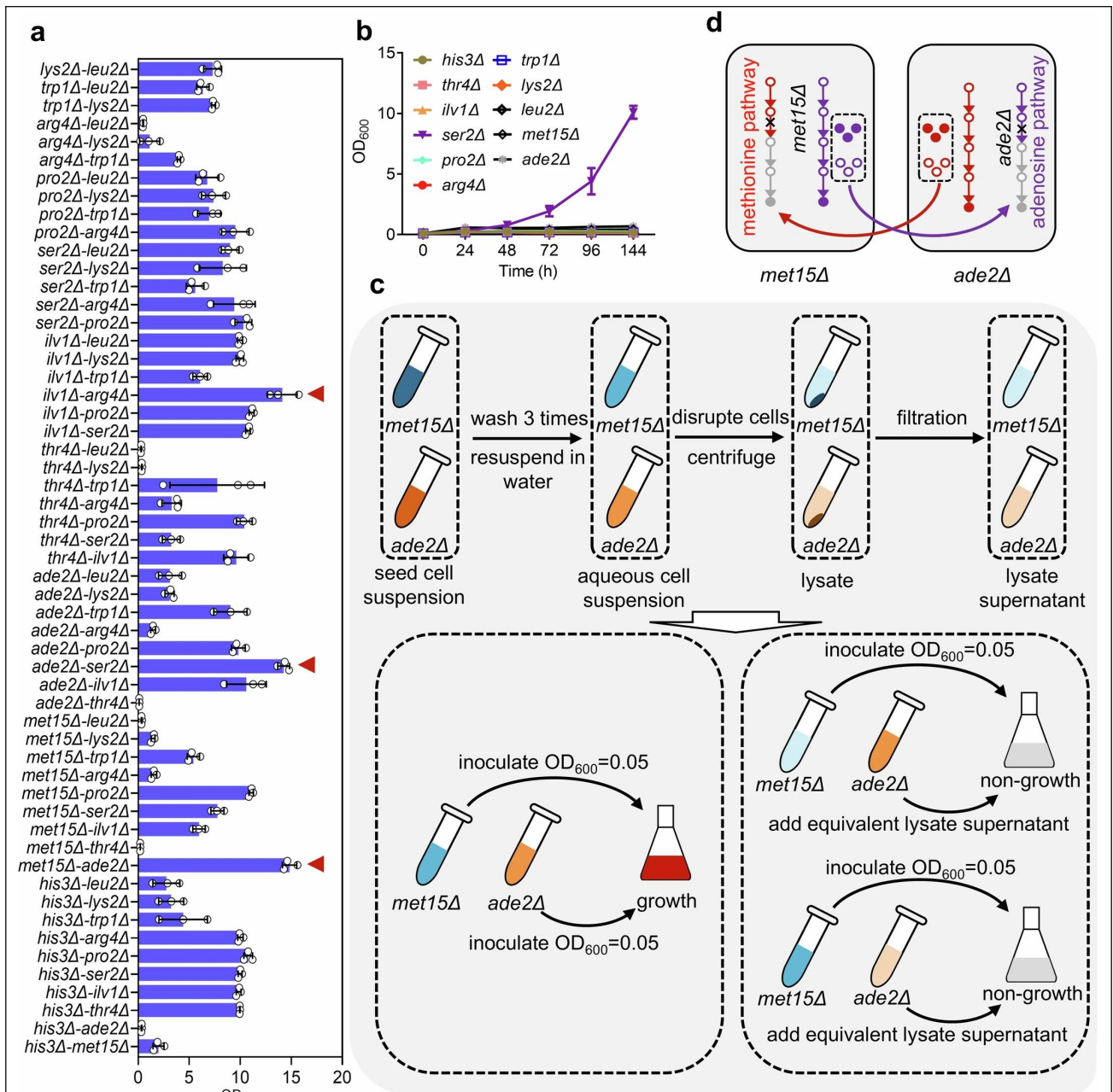


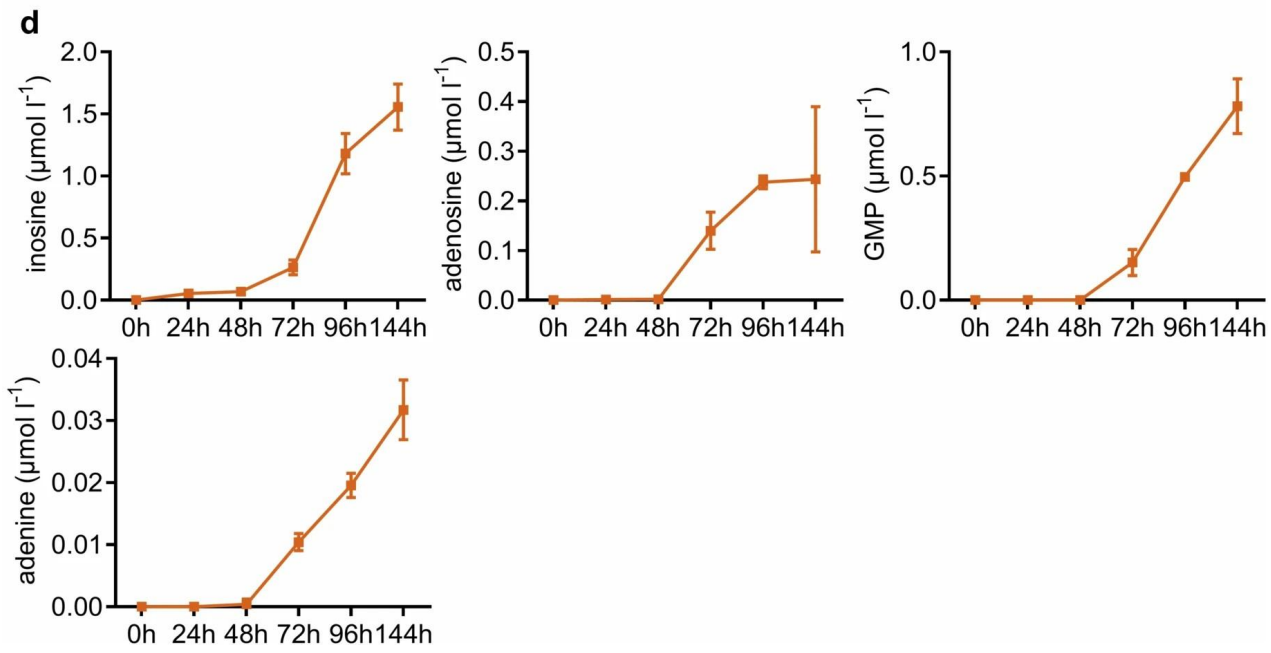
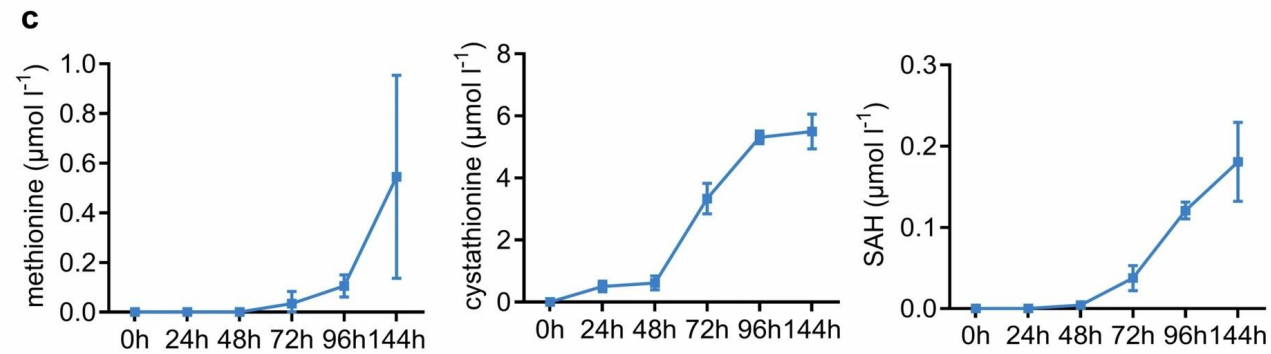
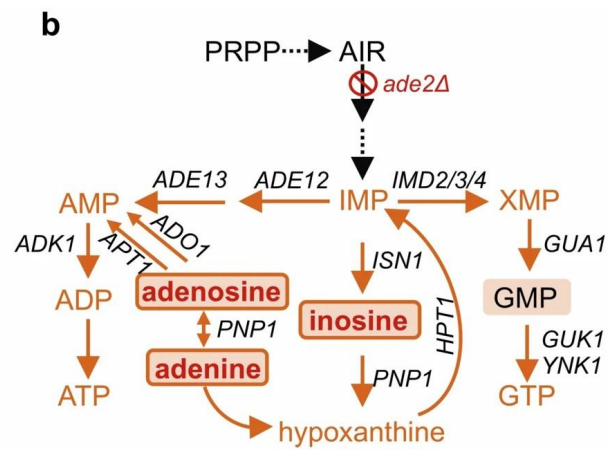
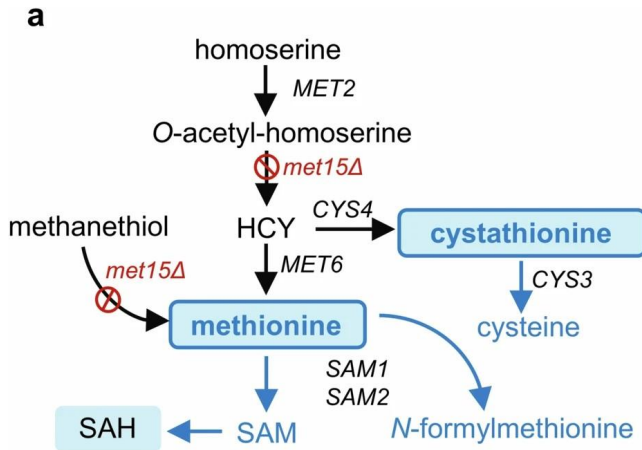
图 10 营养缺陷型生长严格依赖交叉喂养

图 a 给出了前面矩阵热力图的具体数据，直观的看到所选的备选菌组合的优势。

图 b 显示了 11 种不同的突变体单独培养的 OD，发现其中 *ser2* 仍能生长，说明该种突变不宜作为构建的菌种类型。

图 c 展示了验证实验选用的两种突变体之间的互养性，即将 *met15*Δ 与 *ade2*Δ 的细胞裂解后获取胞内代谢物上清，再分别补加到对方突变菌中，如此若能恢复生长则说明两者存在可交换的代谢互补物。实验验证确实表明，仅在二者共培养时可实现生长，而单独接种或仅加代谢物上清均不能恢复生长，证实该互利关系是通过代谢互换维持的。

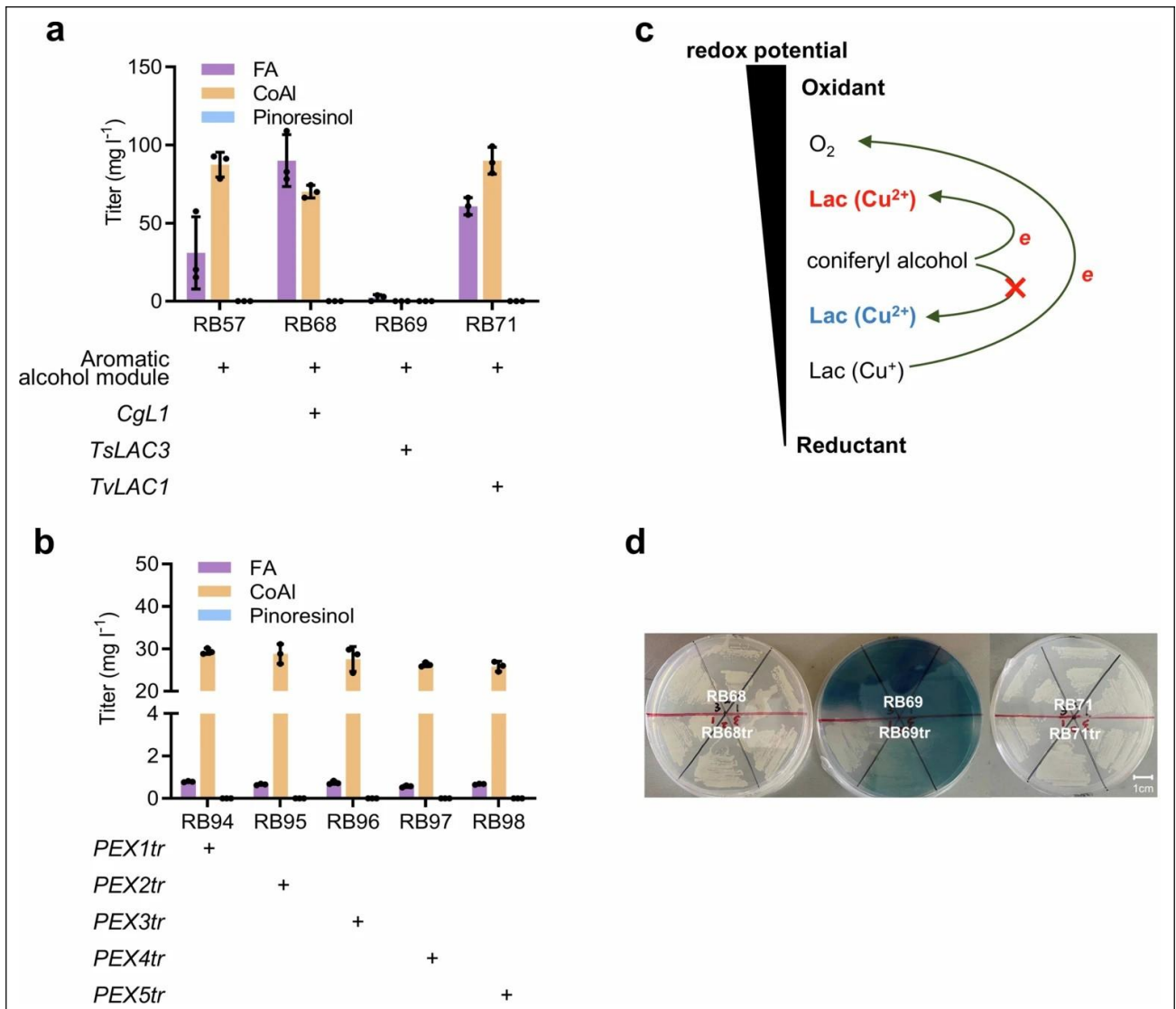
图 d 是对两种代谢路径互补机制的可视化，*met15*Δ 因硫代甲酰类代谢障碍无法合成甲硫氨酸，而 *ade2*Δ 在腺苷途径中断裂，依赖外源补充嘌呤核苷类物质，两者通过分泌并共享对方所缺代谢物形成稳定互利关系。



拓展图 图 11 潜在互养物质的定量分析

进一步探究了两者之间的代谢障碍路径及其中的代谢物积累，图 a 展示了 MET15 基因编码硫醇合成酶，在其缺失的情况下，不能将 O-乙酰同型苏氨酸转化为甲硫氨酸 (methionine)，进而影响 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)、半胱氨酸 (cysteine) 与 S-腺苷同型半胱氨酸 (SAH) 的合成，阻断了甲硫氨酸途径的下游输出图 b 则对应的是 ade2 Δ 造成的嘌呤合成中断，该突变阻断了 PRPP 到 AIR (磷酸核糖胺变换中间体) 的转化，使得嘌呤核苷 (如腺苷、肌苷、腺嘌呤等) 无法由 de novo 路径合成，依赖外源供给。

图 c 和 d 是这酵母群体外分泌的代谢物动态积累曲线，显示在共培养过程中，met15 Δ 菌株细胞外甲硫氨酸、胱硫醚、SAH 的浓度自 96 小时后快速升高，而 ade2 Δ 菌株则持续分泌出腺苷、肌苷、腺嘌呤和鸟苷酸等核苷代谢物，浓度在 144 小时达到峰值。验证了这两个菌株分别分泌对方必需但自身无法合成的关键代谢物



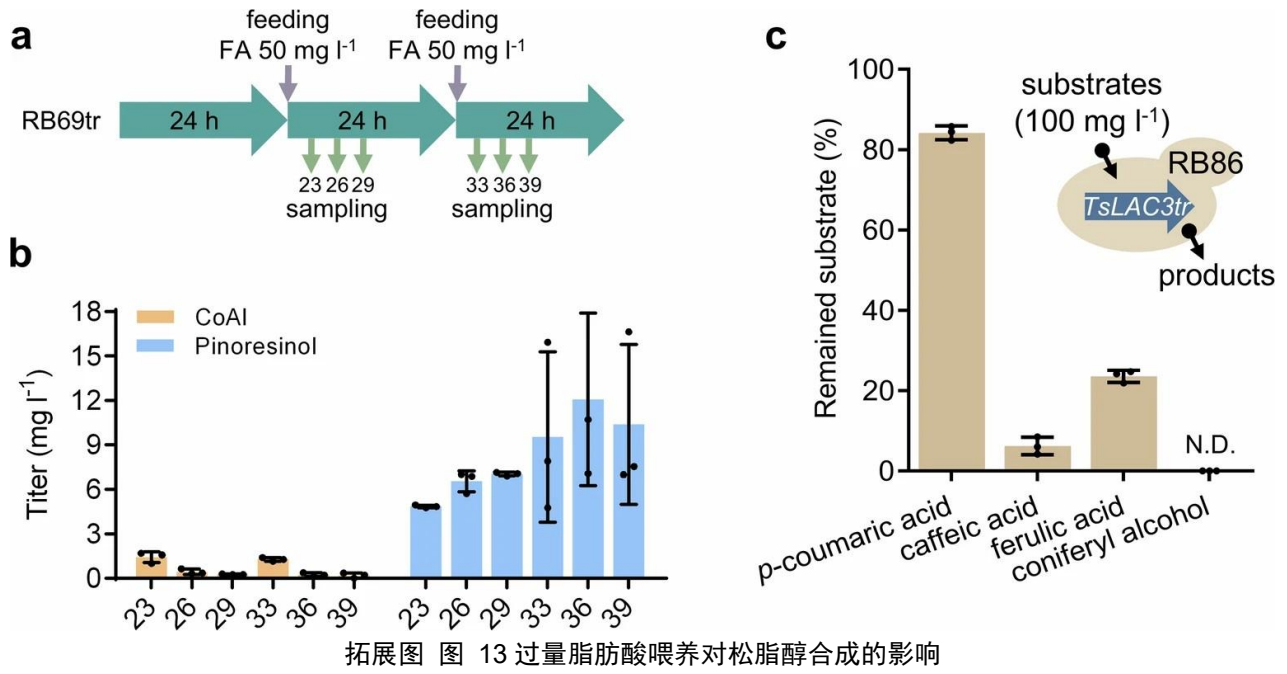
拓展图 图 12 通过 CoAl 二句话合成松脂醇的漆酶筛选

图 a 是对不同的 lac 酶进行筛选，发现表达 TsLAC3 的 RB69 能够发生 FA 的代谢转换

图 b 是对 TsLAC3 进行进一步优化，通过引入不同的截断后的信号肽，表明所有菌株都能积累 CoAl，但都没有产出 pinoresinol。

图 c 是展示了 LAC 进行氧化还原反应的机制，LAC 酶需要二价 Cu 作为活性中心，高电位的漆酶会从 CoAL 中得到一个电子，并催化二聚化完成电子转移。

图 d 是使用 ABTS 染色进一步确定，只有 RB69tr、RB71tr 都没有染色反应，即没有漆酶活性，说明 TsLAC3tr 是在酿酒酵母中具有功能的 LAC 酶。

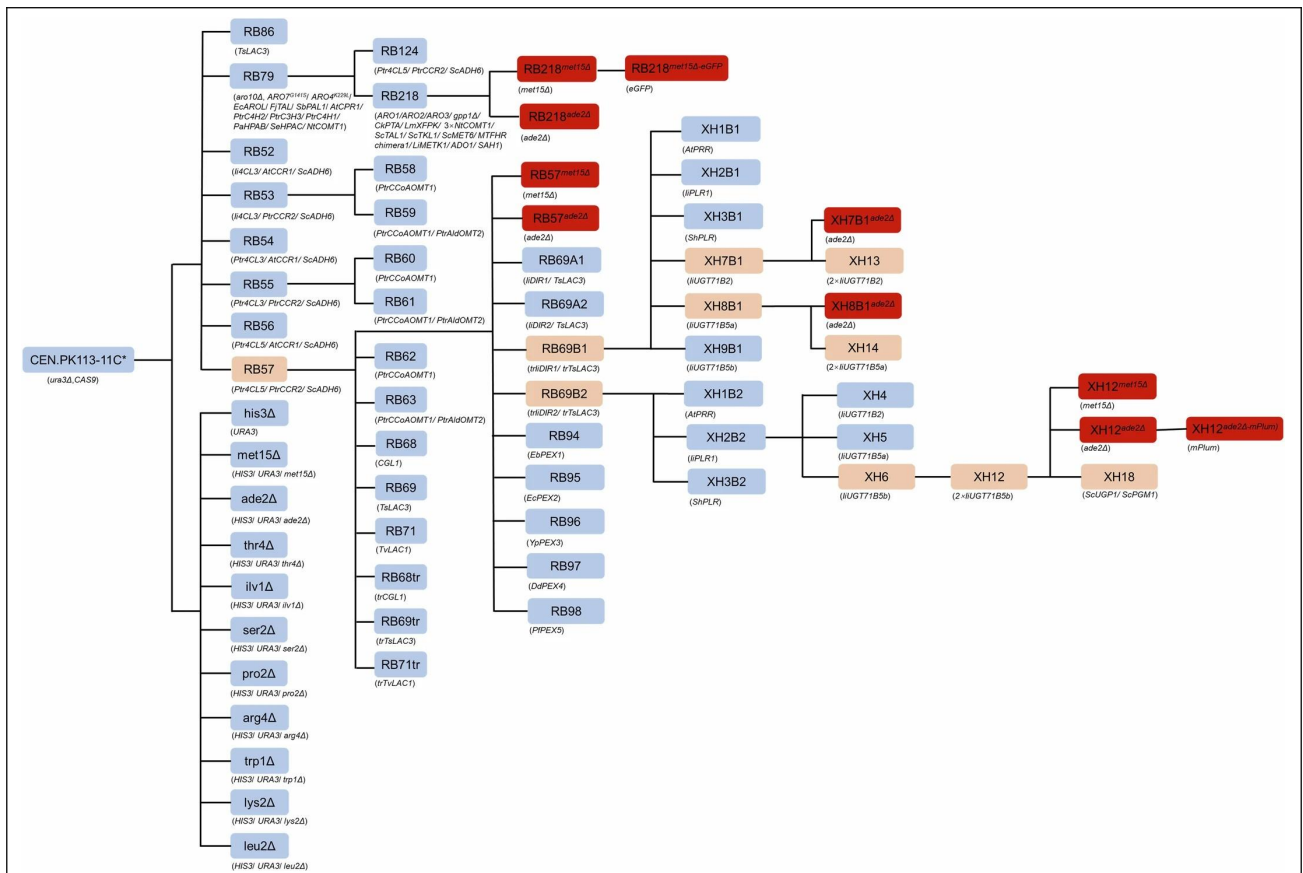


拓展图 图 13 过量脂肪酸喂养对松脂醇合成的影响

图 a 是连续补料发酵和采样的具体过程，每次加入入 50 mg/L FA，在不同时间进行取样分析。

图 b 是采样检测的结果，在首次补料后 pinosresinol 迅速积累达到 6 - 8 mg/L，最高达到 16 mg/L 左右，显示漆酶的效果。

图 c 是对导入了 TsLAC3 的 RB86 进行不同底物的检测，发现对香豆酸，咖啡酸，阿魏酸都能有效，其中对 CoAL 效果不错，几乎完全反应。



拓展图 图 14 本研究中酵母菌株构建流程图

是本研究中对于酵母菌突变体的构建方法，标红的是对于不同突变的构建，标黄的是主要工程菌的筛选与构建。

Personal Review (What do you learn from / think of this article.)

1. 多个细菌联合作用，构建两个辅助营养缺陷型或者是构建微生物群落进行生物合成是目前合成生物学中比较热门的一个方向，通过将不同的代谢模块导入不同的菌株，使其各自发挥功能，可以解决在单个菌株中表达时代谢负担重，毒性积累等问题，此外通过交叉喂养，协同生产也可以构建更稳定和受到调控的代谢网络，除了两种菌之间的互动，未来构建多种菌之间的更加复杂的互动或者是人工构建一个微生物菌群来进行代谢生产可能也是生物合成的一大方向。

2. 此外他们针对代谢链的认识和构造也值得学习，对于每一个模块都进行清晰的验证与对照，同时对于代谢反应和代谢途径的认识也非常全面，在代谢分析的逻辑上做的也很出色，从认识到问题——LAC 表达困难，到解决方案——表达截断肽——再到后续的一系列优化，整体的构建思路和对关键突变的分析非常到位，并且文献工作量也很大，无论是构建突变体还是培养菌株都是时间长并且成功率不高的工作，所以整个实验还是非常具有意义的。

3. 但是在细节上仍有不足，首先是在菌株输入配比上，没有给出有效的实验验证最佳配比，整个文献中心是在构建各个代谢通路与代谢途径上，但是在后续工业化的验证上面做的不够，并且整体产率不高，没有达到可以继续工业生产的地步，而且对于酶的设计上，仍然存在一定的局限性，意愿表达的 LAC 酶的整体反应优化不完善。此外如果能在缺陷关系中加入更复杂的调控或者是反馈可能可以获得更好的系统。