

一碳气体利用微生物及其基因工程改造

周雨^{1,2}, 阮祚禧¹, 方崇², 陈小燕², 徐惠娟^{2*}, 王忠铭², 袁振宏²

1 汕头大学 海洋生物研究所, 广东 汕头 510632

2 中国科学院广州能源研究所 中国科学院可再生能源重点实验室 广东省新能源和可再生能源研究与开发应用重点实验室, 广东 广州 510640

周雨, 阮祚禧, 方崇, 陈小燕, 徐惠娟, 王忠铭, 袁振宏. 一碳气体利用微生物及其基因工程改造[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3125-3142.

ZHOU Yu, RUAN Zuoxi, FANG Chong, CHEN Xiaoyan, XU Huijuan, WANG Zhongming, YUAN Zhenhong. Bioconversion of C1 gases and genetic engineering modification of gas-utilizing microorganisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3125-3142.

摘 要: 一碳气体主要包括 CO、CO₂ 和 CH₄ 等, 这些气体来源于陆地生物活动、工业废气以及气化合成气等, 其中 CO₂ 与 CH₄ 是温室气体, 对全球气候变化有着重要的影响。利用微生物进行一碳气体生物转化既可以解决废气排放的问题, 又能生产燃料及多种化学品。近年来, 运用 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术对一碳气体利用微生物进行改造, 是提高它们的产物得率、增加产物类型的重要途径。本文主要围绕甲烷营养菌、自养乙酸菌、一氧化碳营养菌等一碳气体利用微生物, 综述了其生物学特性、好氧和厌氧代谢途径、代谢产物, 以及常用的基因编辑技术(利用同源重组的基因中断技术、二类内含子 ClosTron 法、CRISPR/Cas 基因编辑及以噬菌体重组酶介导的 DNA 大片段引入等)在它们中的应用, 为后续相关研究提供参考。

关键词: 一碳气体; 甲烷营养菌; 合成气发酵; 遗传改造

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFB1503904); 国家自然科学基金(42076206); 广东省自然科学基金(2020A1515011073)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFB1503904), the National Natural Science Foundation of China (42076206), and the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (2020A1515011073).

*Corresponding author. E-mail: xuhj@ms.giec.ac.cn

Received: 2022-09-14; Accepted: 2023-01-10; Published online: 2023-01-16

Bioconversion of C1 gases and genetic engineering modification of gas-utilizing microorganisms

ZHOU Yu^{1,2}, RUAN Zuoxi¹, FANG Chong², CHEN Xiaoyan², XU Huijuan^{2*}, WANG Zhongming², YUAN Zhenhong²

1 Institute of Marine Biology, Shantou University, Shantou 510632, Guangdong, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development, CAS Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: C1 gases including CO, CO₂ and CH₄, are mainly derived from terrestrial biological activities, industrial waste gas and gasification syngas. Particularly, CO₂ and CH₄ are two of the most important greenhouse gases contributing to climate change. Bioconversion of C1 gases is not only a promising solution to addressing the problem of waste gases emission, but also a novel route to produce fuels or chemicals. In the past few years, C1-gas-utilizing microorganisms have drawn much attention and a variety of gene-editing technologies have been applied to improve their product yields or to expand product portfolios. This article reviewed the biological characteristics, aerobic or anaerobic metabolic pathways as well as the metabolic products of methanotrophs, autotrophic acetogens, and carboxydophilic bacteria. In addition, gene-editing technologies (e.g. gene interruption technology using homologous recombination, group II intron Clostron technology, CRISPR/Cas gene editing and phage recombinase-mediated efficient integration of large DNA fragments) and their application in these C1-gas-utilizing microorganisms were also summarized.

Keywords: C1 gases; methanotrophs; syngas fermentation; genetic modification

一碳气体指的是分子中含一个碳原子的气体, 例如 CO、CO₂ 和 CH₄ 等。其中 CO₂ 和 CH₄ 为温室气体, 1 分子 CH₄ 造成的温室效应与 27.2 分子的 CO₂ 相当^[1]。CO 和 CO₂ 通常来自于煤、石油以及有机废弃物气化所产生的合成气或工业废气; 而 CH₄ 主要存在于钢铁冶炼、石油精炼后的废气以及垃圾填埋物所形成的废气中。近年来, 全球变暖日益明显, 世界各国都在采取措施积极应对, “碳中和”受到广泛关注。温室气体的转化是当前实现“零排放”甚至负碳排放的一个极具潜力的解决途径。

研究发现, 有一些微生物如自养乙酸菌、一氧化碳营养菌、氢营养菌和甲烷营养菌等, 能够利用 CO、CO₂ 或 CH₄ 这些一碳气体, 代谢产生燃料、

动植物饲料及功能性生物材料^[2-3]。目前一碳气体生物转化技术的主要瓶颈是产物得率低^[4]、气体利用率低、产物种类少, 从而限制了该技术的规模化应用。随着基因工程和代谢工程技术的发展, 新的遗传操作方法不断被运用于一碳气体利用微生物中, 使得定向改造成为可能, 相关研究进展极为迅速。为此, 本文就一碳气体利用微生物的特性、代谢途径、主要产物以及基因工程技术在一碳气体生物转化中的应用展开综述, 为未来微生物细胞工厂的构建与高附加值产品的合成提供借鉴。

1 一碳气体利用微生物

1.1 甲烷营养菌

Söhngen^[5]于 1906 年首次报道了可利用 CH₄

的微生物。1956年, Dworkin和Foster^[6]第一次分离了利用CH₄的纯培养物即甲烷营养菌。天然甲烷营养菌可从污水、沼泽、湿地、湖盆与反刍动物瘤胃中分离得到。这类微生物可在温度为25–37℃范围内生长代谢,且能适应大幅度pH变化,是一种革兰氏阴性菌,也是一种兼性厌氧菌,其生长代谢唯一的碳源和能源均为CH₄。目前研究较多的好氧甲烷营养菌有发孢甲基弯菌(*Methylosinustrichosporim*)、甲基孢囊菌(*Methylocystis*)、甲基单胞菌(*Methylomonas*)、甲基杆菌(*Methylobacter*)、甲基微球菌(*Methylomicrobium*)和甲基球菌(*Methylococcus*)等,它们的主要代谢产物除甲醇外,还有乳酸、异戊二烯、黏糠酸和聚羟基脂肪酸酯

(polyhydroxyalkanoates, PHA/PHB)等;厌氧甲烷营养菌由甲烷八叠球菌目(Methanosarcinales)和甲烷微菌目(Methanomicrobiales)等古菌及少数细菌组成,其代谢产物主要是乙醇和乙酸等(具体见表1)。

1.1.1 好氧代谢

甲烷营养菌在有氧条件下同化CH₄的关键酶是甲烷单加氧酶(methane monooxygenase, MMO),这种酶可以催化CH₄氧化为甲醇。MMO分为两种不同的类型,一种是可溶性的细胞质MMO(soluble methane monooxygenase, sMMO),另一种是膜结合的颗粒MMO(particulate methane monooxygenase, pMMO)。两种酶都能催化甲烷的氧化反应,但它们的蛋白结构和活性位点不

表1 已报道的甲烷营养菌

Table 1 The reported methanotrophs

Genus	Strain	Type	Temperature (°C)	pH	Product	Reference
<i>Methylosinustrichosporium</i>	<i>Methylosinustrichosporium</i> sp. OB3b	Aerobic	25	7.0	Acetyl-CoA	[7]
<i>Methylacidiphilum</i>	<i>M. fumariolicum</i> SolV	Aerobic	55	7.2–7.5	Methanol	[8]
<i>Methylococcus</i>	<i>M. capsulatus</i>	Aerobic	37–50	3.0–7.0	Lactic acid	[9]
	<i>M. capsulatus</i> Bath	Aerobic	20	7.0	Isoprene	[10–11]
<i>Methylomicrobium</i>	<i>M. buryatense</i>	Aerobic	29	8.9–10.0	Lactic acid	[12]
	<i>M. buryatense</i> 5GB1	Aerobic	30	9.0	Liquid oil	[13–14]
	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z	Aerobic	30	9.0	Lactic acid, mucofuric acid, isoprene	[15]
<i>Methylobacter</i>	<i>M. alcaliphilus</i>	Aerobic	30	9.0	Tetrahydropyrimidine	[16]
<i>Methylomonas</i>	<i>Methylomonas</i> sp. strain 16a	Aerobic	30	7.0	Astaxanthin	[17]
<i>Methylosinus</i>	<i>Methylosinus</i> sp. LW4	Aerobic	5–37	6.0–8.0	Methylactin	[18]
<i>Methylocystis</i>	<i>M. hirsuta</i> strain CSC1	Aerobic	30	7.0	PHA	[19]
<i>Methyloferula</i>	<i>M. stellata</i> AR4	Aerobic	4–33	3.5–7.2	PHB	[20]
<i>Methylocapsa</i>	<i>M. aurea</i>	Aerobic	2–33	5.2–7.2	PHB	[21]
<i>Candidatus</i>	<i>Methylomirabilis oxyfera</i>	Anaerobic	30	7.0–7.5	Ethanol	[22]
<i>Candidatus</i>	<i>Methanoperedends nitroreducens</i>	Anaerobic	22–35	7.0–8.0	Acetic acid	[23]

同。大多数甲烷营养菌含有 pMMO，少数含 sMMO，还有一部分同时具有 pMMO 和 sMMO。sMMO 主要由以下 3 个活性蛋白质构成：甲烷单加氧酶还原酶 (methane monooxygenase reductase, MMOR)、甲烷单加氧酶调控蛋白 (methane monooxygenase regulatory protein, MMOB) 和甲烷单加氧酶羟化酶 (methane monooxygenase hydroxylase, MMOH)，参与 CH_4 氧化的是 MMOH。pMMO 由 pMMOR 和 pMMOH 组成。其活性部位 PmoBAC 包含 3 个亚基 PmoB、PmoA 与 PmoC。其中，PmoB 与 PmoC 为 pMMO 的活性位点。

目前已知的好氧甲烷营养菌主要由 3 种类型组成：Group I (γ -形菌)、Group II (α -形菌) 和 Group III (疣状杆菌)，不同类型对应的代谢途径有所差

异，它们的代谢途径如图 1 所示。Group I、II 甲烷营养菌分别通过 RuMP 循环或丝氨酸循环利用 CH_4 ，Group III 则先氧化 CH_4 产生能量和 CO_2 ，再通过卡尔文循环 (Calvin-Benson-Bassham cycle, CBB cycle) 吸收 CO_2 实现碳的同化。这 3 类菌的起始步骤均为 CH_4 经甲醇转化为甲醛，接着 Group I 进入 RuMP 循环，而 Group II 和 Group III 要先经由四氢甲烷喋呤 (tetrahydromethanopterin, H_4MPT) 途径转变为甲酸，然后 Group II 还要经过四氢叶酸 (tetrahydrofolate, H_4F) 途径，过程更加复杂。甲烷好氧代谢产物主要包含乙酰辅酶 A 衍生物、丙酮酸衍生物、三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环衍生物、甲基赤藓糖醇-磷酸 (methyl-D-erythritol phosphate, MEP) 途径衍生物、莽草酸途径衍生物及甘油磷酸途径衍生物等

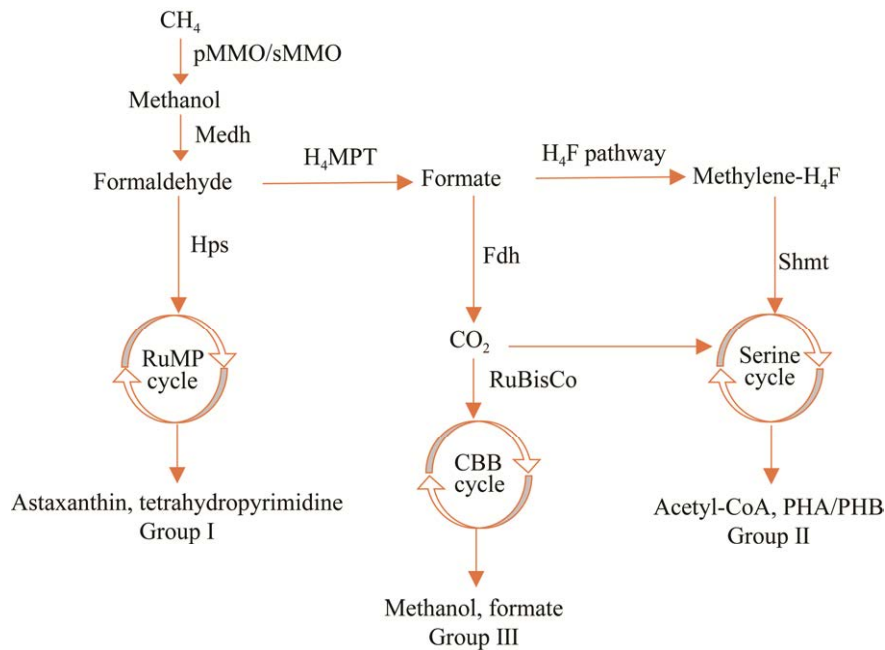


图 1 好氧甲烷营养菌及有氧甲烷代谢^[24] H_4F 途径：四氢叶酸途径； H_4MPT 途径：四氢甲烷喋呤途径；Hps：己磷酸-磷酸合成酶；Fdh：甲酸脱氢酶；Medh：甲醇脱氢酶；RuBisCo：二磷酸核酮糖羧化酶；RuMP：单磷酸核酮糖；Shmt：丝氨酸羟甲基转移酶；sMMO/pMMO：可溶性(颗粒)甲烷单加氧酶
Figure 1 Methanotrophs and aerobic metabolism of methane (modified from [24]). H_4F pathway: Tetrahydrofolate pathway; H_4MPT pathway: Tetrahydromethanopterin pathway; Hps: Hexophosphate-6-phosphate synthase; Fdh: Formate dehydrogenase; Medh: Methanol dehydrogenase; RuBisCo: Ribose-1,5-diphosphate carboxylase; RuMP: Ribose monophosphate; Shmt: Serine hydroxymethyltransferase; sMMO/pMMO: soluble (particulate) methane monooxygenase.

6 大类。例如, *Methylosinus trichosporium* sp. OB3b 通过丝氨酸循环同化 CH_4 产生乙酰 CoA^[7]; 富马酸甲酯菌 (*Methylacidiphium fumarolicum*) SoIV 经 CBB 循环将 CH_4 转化为甲醇^[8]; 甲烷营养菌 (*Methylococcus buryatense*) 在乳酸脱氢酶的催化下将丙酮酸转化为乳酸^[9]; *M. capsulatus* Bath 利用 MEP 途径合成异戊二烯相关产物^[10-11]; 耐盐性甲烷营养菌 (*Methylomicrobium alcaliphilum*) 20Z 转化 CH_4 的产物包括乳酸、黏糠酸、异戊二烯等^[15]; *Methylocystis*、*Methyloferula*、*Methylocapsa* 等甲烷营养菌代谢产生类脂化合物 PHA 或 PHB^[19-21]。此外, 甲烷营养菌生长过程中产生的细胞膜脂质成分可以生产绿色燃料生物柴油, 在可再生能源利用方面具有一定的开发与应用价值。

1.1.2 厌氧代谢

甲烷营养菌处于无氧环境时, 能够进行厌氧甲烷氧化 (anaerobic oxidation of methane, AOM), 它们通过偶联电子受体 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 或 NO_2^- 及 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子完成 CH_4 转化。甲烷厌氧代谢和好氧代谢过程有很多的共同点, 不仅仅底物是 CH_4 , 最终氧化产物是 CO_2 , 这两个过程都涉及共同的辅助因子以及用于核心反应的酶。在这两个过程中虽然参与不同氧化水平之间转移单碳化合物的反应中的一些酶在进化上是相关的, 但主要的 MMO 和新发现的甲基-辅酶 M 还原酶 (methyl-coenzyme M reductase, Mcr) 是独立进化并且完全不同的。目前研究较多的厌氧甲烷氧化是以硫酸盐为电子受体的甲烷厌氧氧化作用 (sulphate-reduction-dependent anaerobic methane oxidation, SAMO) 和以硝态氮作电子受体的硝态氮型 (nitrite-dependent anaerobic methane oxidation, N_x -dAMO)。

SAMO 过程通常由厌氧甲烷氧化古菌 (anaerobic methanotrophic archaea, ANME) 与硫酸盐还原细菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 共

同完成, 该过程发生在海洋或火山泥这样的环境中, 常见的 ANME 主要为脱硫八叠球菌属/脱硫球菌属 (*Desulfosarcina/Desulfococcus*)。目前有关此过程的理论模型包括 4 种, 以反向产甲烷理论为例进行阐述: 如图 2 所示, ANME 氧化 CH_4

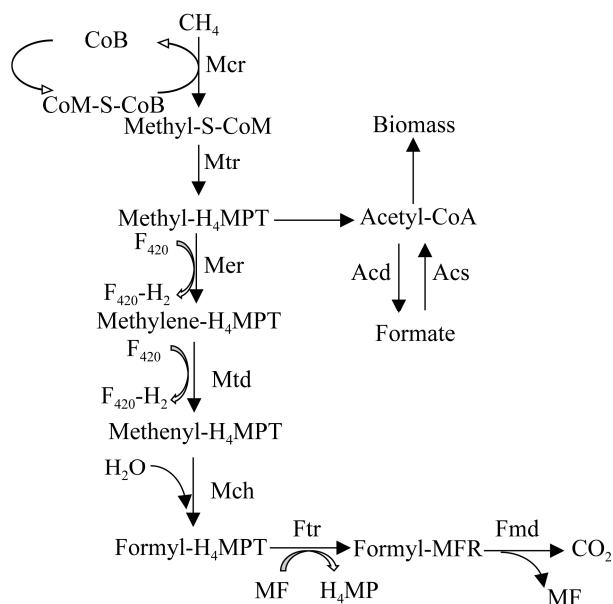


图 2 反向产甲烷理论及生物合成过程^[25] AcD: 乙酰 CoA 脱氢酶; AcS: 乙酰 CoA 合成酶; Fmd: 甲酰-甲烷咪喃脱氢酶; Formyl: 甲酰; Formyl-MFR: 甲酰-甲烷咪喃; Ftr: H_4MPT 甲酰转移酶; H_4MPT : 四氢甲烷喋呤; Mch: 亚甲基 H_4MPT 环化酶; Mcr: 甲基-辅酶 M 还原酶; Methyl-S-CoM: 甲基-S-辅酶 M; Methylene: 亚甲基; Mer: 亚甲基 H_4MPT 还原酶; Methenyl: 甲川; MF: 甲基咪喃; Mtd: 辅酶 F_{420} 型亚甲基 H_4MPT 还原酶; Mtr: CoM 甲基转移酶

Figure 2 Reverse methane production theory and the biosynthesis process (modified from [25]) AcD: Acetyl coenzyme A dehydrogenase; AcS: Acetyl-CoA synthetase; Fmd: Formyl-MFR dehydrogenase; Ftr: H_4MPT formyltransferase; H_4MPT : Tetrahydromethane methotrexate; Mch: Methenyl- H_4MPT cyclohydrolase; Mcr: Methyl-coenzyme M reductase; Mer: Methylene H_4MPT -reductase; MF: Methylfuran; Mtd: F_{420} -dependent methylene- H_4MPT dehydrogenase; Mtr: CoM methyl-transferase.

生成 CO_2 与 HS^- , CH_4 氧化过程中释放的电子经电子传递体转移到 SRB 中启动硫酸盐还原过程, 主要反应涉及 7 个酶、2 个辅酶和 2 个辅因子, 其中甲基-四氢甲烷喋呤可以被转化为乙酰 CoA, 进一步形成乙酸等物质。此反应释放的能量很低, 但是在缺氧却富含硫酸盐和 CH_4 的海洋沉积物地带该反应很普遍。

N_x -dAMO 主要发生于淡水环境中, 若利用硝酸盐称为 N-dAMO (nitrate dependent AMO), 利用亚硝酸盐的则是 n-dAMO (nitrite dependent AMO); 它们的代表性菌株分别为古菌 Methanoperedens 科的 *M. nitroreducens* 以及一种属于 NC10 门的细菌 *Candidatus M. oxyfera*。硝酸盐型 AMO 是利用 Mcr 的反向产甲烷作用激活 CH_4 , 使硝酸盐先转化为亚硝酸盐被吸收, CH_4 在胞质内被氧化为 CO_2 。例如, *M. nitroreducens* 利用硝酸盐中的硝酸根为电子受体驱动厌氧代谢, 同时产生亚硝酸盐, 并与厌氧氨氧化菌共同吸收硝酸根、亚硝酸盐与氨根离子, 进行 CH_4 的利用。而亚硝酸盐型 AMO 先利用亚硝酸盐还原酶生成 NO 再分解出 O_2 , 经甲烷单氧化酶继续对 CH_4 进行有氧氧化, 其中所需的 O_2 有部分也可能

来自环境, 但是厌氧甲烷营养菌对 O_2 的耐受性低。*M. oxyfera* 对 CH_4 的利用还需厌氧氨氧化菌协助, 其中的氨根离子可用作电子供体氧化亚硝酸盐, 若有氨存在时, 厌氧氨氧化菌会抢夺 *M. oxyfera* 所利用的亚硝酸根, 不利于此反应进行。此外, CH_4 可作为反硝化过程中的电子供体, 这一过程也达到了脱氮的效果, 将 NO 还原成了无害气体 N_2 ^[23]。对 N_x -dAMO 机理深入解析与挖掘, 利于开发能够利用一碳气体底物和含氮物质的细胞工厂系统以用于生物合成, 实现碳和氮的共同利用。

1.2 合成气发酵微生物

1987 年, Barik 等^[26]分离得到第 1 株利用 CO 、 CO_2/H_2 发酵产生乙醇与乙酸的微生物; 1992 年, Gaddy 与 Clausen 鉴定并命名该微生物为扬氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)^[27], 此后展开了合成气发酵的研究。常见能发酵合成气的微生物如表 2 所示, 它们为厌氧革兰氏阳性菌, 多为梭菌(*Clostridium*), 如 *C. ljungdahlii*、日产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)、食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)等, 其最适合生长温度为 37–38 °C, pH 偏酸性, 热乙酸梭菌(*Clostridium thermoaceticum*)则可在适宜 pH 6.0–7.5 下耐受

表 2 已报道的合成气发酵微生物

Table 2 The reported syngas-utilizing microbes

Strain	Temperature (°C)	pH	Substrate	Product	Reference
<i>C. ljungdahlii</i>	37	6	CO/CO_2	Acetic acid, ethanol, isopropanol	[26-27]
<i>C. autoethanogenum</i>	37	5.8–6.0	$\text{CO H}_2/\text{CO}_2$	Ethanol, 2,3-butanediol	[28-29]
<i>C. carboxidivorans</i>	38	6.2	CO	Butanol	[30]
<i>C. ragsdalei</i>	32–40	5.0	CO/H_2	Ethanol	[31]
<i>C. coskatii</i>	Unknown	Unknown	$\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}$	Acetic acid, ethanol	[32]
<i>C. difficile</i>	35–40	6.5–7.0	CO_2/H_2	Acetic acid, ethanol, butyrate	[33]
<i>C. thermoaceticum</i>	60	6.5–7.0	CO_2/CO	Acetic acid, ethanol	[34]
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	55–70	7.5	$\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}$	Acetic acid	[35]
<i>Eubacterium limosum</i>	38–39	7.0–7.2	CO	Acetic acid, butyric acid	[36]
<i>Acetobacterium woodii</i>	30	6.8	$\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}$	Acetate	[37]
<i>Morella thermoacetica</i>	55	6.9	H_2/CO_2	Acetic acid	[38]
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	37	7.3	$\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{CO}$	Acetic acid, butyrate, ethanol, lactic acid	[39]

60 °C高温。合成气发酵中,微生物转化 CO/CO₂ 的产物主要包括乙醇、丁醇和乙酸等,而梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*)、伍氏醋酸杆菌 (*Acetobacterium woodii*) 和食甲基丁酸杆菌 (*Butyribacterium methylotrophicum*) 还可利用合成气产生乙酸酯或丁酸酯。

Wood-Ljungdahl 途径为合成气发酵微生物利用 CO/CO₂ 的主要途径,该途径由甲基分支和羰基分支构成,如图 3 所示,在甲基分支中,CO₂ 在甲酸脱氢酶、甲酰-四氢叶酸合成酶和甲基转移酶等一系列酶催化下最终转化为类咕啉

铁硫蛋白,再由类咕啉铁硫蛋白中的甲基与羰基分支产生的羰基以及辅酶 A (HS-CoA) 一起生成乙酰 CoA,该反应由 CO 脱氢酶/乙酰辅酶 A 合成酶(Codh/Acs)催化。CO 可来自外部环境,或通过 Codh/Acs 还原 CO₂ 产生。乙酰 CoA 能进一步生成乙酸,两步反应分别由磷酸乙酰转移酶和乙酸激酶催化,乙酰 CoA 还可在醛脱氢酶、醇脱氢酶作用下依次转化为乙醛、乙醇。整个代谢过程中,由甲酸生成甲酰四氢叶酸时会消耗 1 分子 ATP,而乙酰 CoA 转化乙酸过程中生成 1 分子 ATP,故 Wood-Ljungdahl 途径没有多余

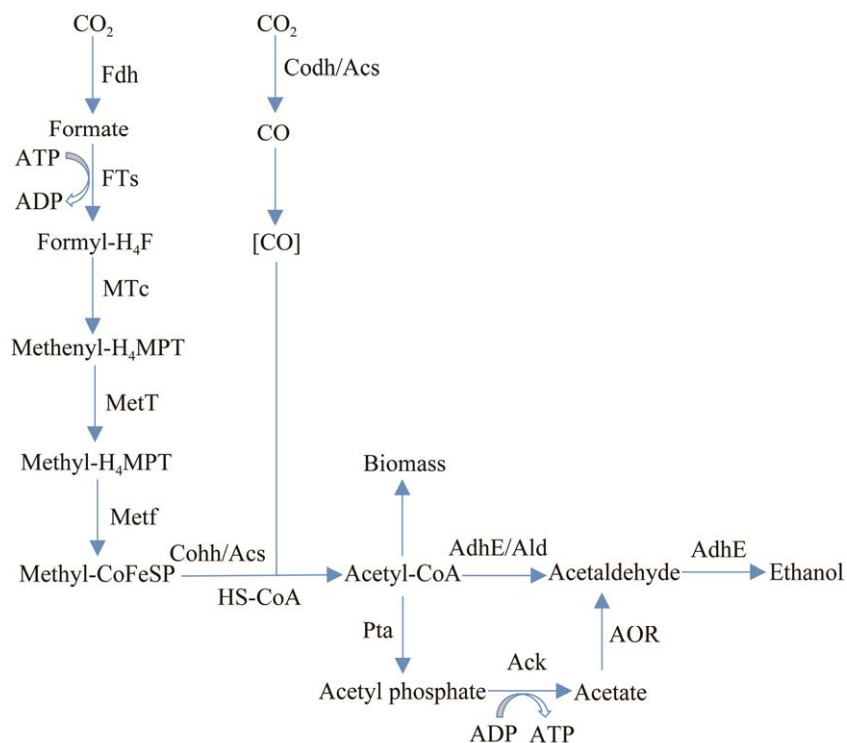


图 3 Wood-Ljungdahl 途径^[40] Ack: 乙酸激酶; Acs: 乙酰辅酶 A 合酶; AdhE: 羟醛脱氢酶; Ald: 醛脱氢酶; AOR: 醛-铁氧还蛋白氧化还原酶; Codh: 一氧化碳脱氢酶; Fdh: 甲酸脱氢酶; FTs: 甲酰-四氢叶酸合成酶; MetT: 甲基转移酶; Metf: 亚甲基四氢叶酸还原酶; MTc: 亚甲基四氢叶酸环化酶; MTD: 亚甲基四氢叶酸脱氢酶; Pta: 磷酸乙酰转移酶

Figure 3 Wood-Ljungdahl pathway (modified from^[40]). Ack: Acetate kinase; Acs: Acetyl-CoA synthase; AdhE: Acetaldehyde/Alcoholdehydrogenase; Ald: Acetaldehydedehydrogenase; AOR: Aldehyde ferredoxin oxidoreductase; Codh: Co dehydrogenase; Fdh: Formatedehydrogenase; FTs: Formyl-THF synthetase; MetT: 5,10-methylene-THF reductase; Metf: Methyltransferase; MTc: Methenyl-THF cyclohydrolyase; MTD: MethyleneTHF dehydrogenase; Pta: Phosphotransacetylase.

的能量产生。研究者发现泛素连接酶(ubiquitin-protein ligase, Rnf)复合物参与能量合成调控,提供生命活动所需的能量,并在 *C. ljungdahlii*、*C. autoethanogenum* 和 醋 酸 梭 菌 (*Clostridium aceticum*) 中得到了证实。此外,在科氏梭菌 (*Clostridium kluyveri*) 中发现了一种基于四氢酮醇的电子转运供能模型^[41]。

1.3 氢营养型菌

近年来,氢营养型菌也受到广泛关注,它们是化能型兼性自养微生物,不仅可以在有机介质上生长,还可以使用 H_2 作为能源, CO_2 作碳源,在 O_2 参与下,通过氢气的快速氧化获得同化所需的能量,这是与前面合成气发酵微生物不同之处。研究报道的氢营养型菌有泛养氢单胞菌 (*Hydrogenomonas pantotropha*)、真氧氢单胞菌 (*Hydrogenomonas eutropha*) 和氢营养型产甲烷菌 (hydrogenotrophic methanogen) 等。后者包括氢化营养的甲烷胞菌目 (Methanocellales)、甲烷杆菌目 (Methanobacteriales) 以及甲烷八叠球菌科 (Methanosarcinaceae) 甲烷菌,它们以 H_2 作为电子供体,在氢酶作用下将电子传递给铁氧还蛋白 (Fd_{ox}) 以还原 CO_2 产生 CH_4 , 同化 CO_2 的过程是由一系列独立反应组成的循环反应,称为 Calvin 循环,其机制与高等植物的基本相同只是个别细节上有差异。研究发现,温度由 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 升高到 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 可促进产氢微生物发酵产 H_2 , 而氢营养型产甲烷菌生长最适温度为 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 这样的环境更加有利于氢营养型菌的生长和代谢。同时,温度为 $25\text{--}35\text{ }^\circ\text{C}$ 时,氢营养型产甲烷菌可以和产氢微生物共存,此过程先由产氢微生物产生 H_2/CO_2 , 再通过氢营养型产甲烷菌转化为 CH_4 ^[42-43]。

2 一碳气体利用微生物的基因工程改造

2.1 常用的基因编辑技术

为了在一碳气体转化中提高碳代谢效率合

成更多的目标产物,需要对其一碳气体利用微生物进行改造,提升它们的转化能力。用于一碳气体利用微生物的基因工程改造技术包括同源重组的基因中断技术、二类内含子 ClosTron 法、CRISPR/Cas 基因编辑及以噬菌体重组酶介导的 DNA 大片段引入等。

2.1.1 基于同源重组的基因中断技术

利用相同或相近的 DNA 序列将目的基因删除或替换,使基因失活从而实现基因敲除称同源重组技术,是一种经典的遗传操作工具。通常先将同源片段连到质粒上,并添加筛选标记构建重组基因表达载体,然后将质粒载体导入宿主菌,由于两者的同源片段进行交换,经重组后使宿主菌发生大量的点突变,最后通过反向筛选标记,快速筛选到目标菌株。质粒分为拷贝型质粒和非复制型自杀质粒,非复制型质粒相适应的同源重组效果较差,拷贝型质粒因含同源片段较多,可在细胞内复制,交换片段之间接触频率和持续时间得以提高,得到突变体的机会多,并可在几代中存活。反向筛选标记主要选择一些致死基因,例如 *pyrF* (编码乳清酸单磷酸脱羧酶的基因),该酶参与嘧啶生物合成,可以将 5-氟乳清酸转换为有毒化合物,导致细胞死亡。构建 *pyrF* 缺陷型工程菌后,可以通过在筛选培养基中补加嘧啶合成前体物质乳清苷酸 (orotidylic acid, OMP), 则生存下来的便是突变株。因此可作为一种选择标记,该标记已被用在嗜热产乙酸菌 (*Thermophilic acetogen*) ATCC39073 和穆尔氏菌 (*Morella thermoacetica*) 上。虽然反向筛选标记可筛选出突变株,但操作周期长,同源重组效率待提高,突破此技术瓶颈还依赖于新的基因编辑技术。

2.1.2 基于二类内含子的基因插入失活

二类内含子广泛分布于原核生物和真核生物中,是一种具有自我剪接活性和可转移性的遗传元件。它在特定宿主内由宿主启动子表达,从

mRNA 前体自剪接下来, 形成具有催化活性的内含子 RNA。该内含子 RNA 和内含子编码蛋白 (intron-encoding protein, IEP) 组成核糖核蛋白 (RNP), 同时具有逆转录酶和 DNA 内切酶活性, 它能识别一些特定序列或结构, 并介导内含子的逆转录, 使其插入该位点从而实现内含子归巢。最后通过宿主的修复机制修补 DNA 链上的缺口, 在该位置插入一段新的 DNA 片段。如图 4 所示, 对于二类内含子编码区, 通过改变少量核苷酸, 内含子可被引导插入到几乎所有的区域。该方法操作简单, 但脱靶概率较大。针对梭菌, 研究人员基于乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* *ltrB* 基因 (*Ll.ltrB*) 可移动的二类内含子, 构建了基因失活方法, 被称为“ClosTron”, 分别在丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* 和拜氏梭菌 *Clostridium beijerinckii* 中成功实现了基因敲除^[41]。

2.1.3 CRISPR/Cas 系统

CRISPR 由富含 AT 的前导序列与跟随其后的被短重复序列隔开的特殊间隔序列 (spacer) 所组成, Cas 指核酸内切酶, 常用的为 Cas9。CRISPR/Cas9 系统依赖成熟的 crRNA (CRISPR RNA) 与 tracrRNA (*trans-activating* RNA), 在这两者的介导下, 核心蛋白 Cas9 对靶序列加以剪切, 可以实现 DNA 双链断裂 (图 5)。由此引发了同源重组 (homology-directed repair, HDR) 和非同源重组 (non-homologous end joining, NHEJ) 两种修复机制, NHEJ 实现了 DNA 的突变。同时 CRISPR/Cas9 是 CRISPR/Cas 系统第 II 类中依赖 gRNA 引导单一具有内切核酸酶活性的 Cas9 蛋白形成的复合物。故人们在使用此技术时将可由某个引导 RNA (sgRNA) 进行单点定向突变, 引入某个特定基因, 或者设计一对 gRNA 诱导 Cas9 大规模删减或重新编排基因^[44]。但是, Cas9 会导致微生物致死, 通过消除 Cas9 蛋白核酸内切

酶的活性, 得到的突变体 dCas9 蛋白可以识别目标基因但不发生双链切割, 因此可对基因的表达进行精确地定点调节, 不造成 DNA 损伤。dCas9 蛋白介导的 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 技术也用于改造 *C. ljungdahlii* 产物的合成途径, 该技术能抑制目标基因的转录, 不论是编码还是非编码的 DNA 片段。对于低 GC 含量的微生物, 例如梭菌, CRISPR/Cas12 则有明显的优势, 因为 Cas12a 蛋白的分子量比 Cas9 蛋白小 100 个氨基酸, 适配的前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列为 5'-TTN-3', 针对 AT 含量丰富的基因序列可选择的靶标位点更多, 因此适用于 GC 含量低的物种。此外, Cas12a 不仅可以对靶标 DNA 进行切割, 也可以对自身 CRISPR 转录的 RNA 前体进行切割加工, 形成成熟的 crRNA。此外, 在多个物种的基因编辑中, Cas12a 较 CRISPR/Cas9 表现出了更低的脱靶率。

2.1.4 噬菌体重组酶介导的 DNA 大片段引入

此前以穿梭质粒为载体携带基因导入宿主菌的方法简单有效, 但是质粒转化与整合效率低, 对于大片段 DNA 的引入很困难。而 CRISPR/Cas9 还不能有效将大的 DNA 片段整合到染色体中, 2019 年, 中国科学院植物生理生态研究所姜卫红研究组^[45]提出了一种基于噬菌体位点特异性重组机制的大片段基因簇染色体整合表达的新技术, 应用于 *C. ljungdahlii*, 为一碳气体化能细胞工厂的创建和研究提供了新的遗传操作工具。此方法通过基于“双整合酶-双 *attP/attB*”策略的两次重组以及 CRISPR-Cas9 定向切割的筛选作用, 实现了特定目标基因簇在染色体上的整合。它由位点专一的噬菌体重组酶和它的特异性识别位点组成, 包括自身基因组上的 *attP* 位点和宿主基因组上的 *attB* 位点, 操作首先借助于 CRISPR-Cas9 基因编辑系统,

在 *C. ljungdahlii* 染色体上整合了来自于两套异源噬菌体整合系统的 *attB* 位点, 再通过整合酶介导的 *attP-attB* 重组机制实现了外源基因簇在染色体上任一 *attB* 位点的 100% 插入。新技术在一定程度上克服了 DNA 大片段整合的不足, 但目前仅应用于少数一碳气体利用微生物中。

2.1.5 密码子优化及分子元件构建

生物存在密码子偏爱性, 为提高对靶基因的翻译质量, 可避免使用稀有密码子, 通过对

mRNA 二级结构的优化与 GC 含量的改变等手段进行基因设计。另外, 基因表达的分子元件包括启动子与终止子等重要的调控元件, 启动子又分为诱导型和组成型, 采用诱导型表达, 人为地控制基因表达的时间点, 可以避免基因表达产物对宿主前期生长造成不利影响, 而组成型表达就是基因不受限制的表达, 这可以一定程度上提高表达量。诱导型启动子主要与环境应答和化学诱导有关, 文献已报道在合成气发酵微生物中可用

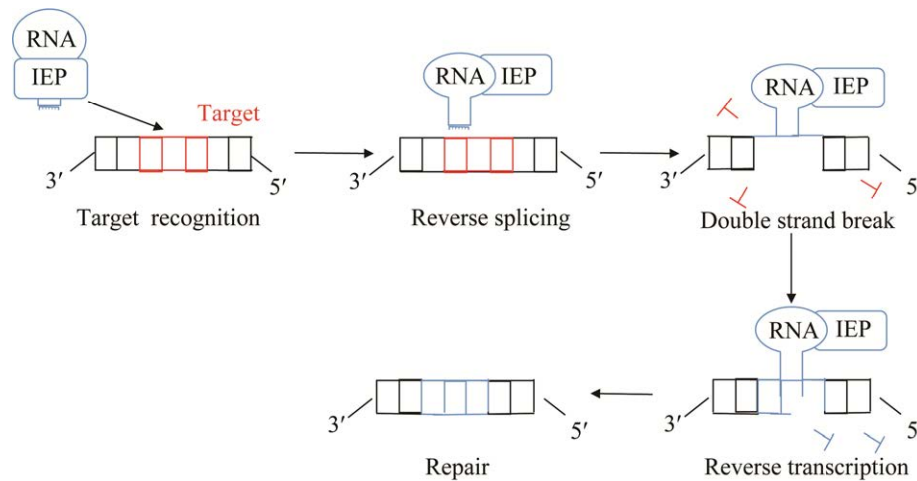


图 4 基于二类内含子的基因插入失活示意图

Figure 4 Intron excision and retrohoming.

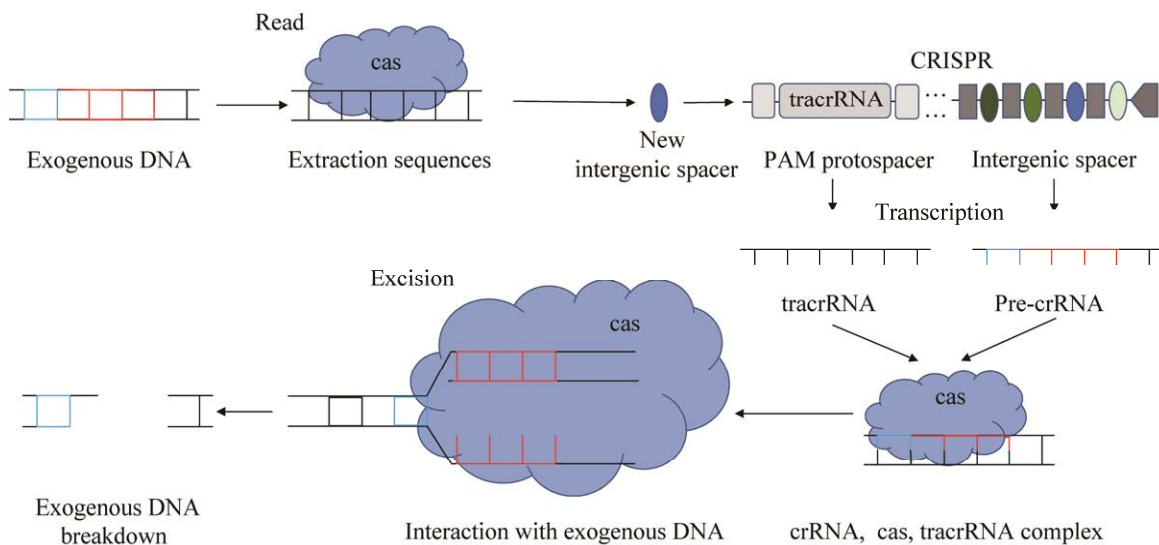


图 5 CRISPR/Cas 系统基因编辑示意图

Figure 5 CRISPR/Cas gene editing.

的启动子有四环素诱导型等,而组成型启动子有 *Ppta* 和 *Pthl* 等。上述这些辅助手段可以扩充基因表达元件,改进遗传操作工具,从而进一步提高基因表达效率^[15]。

2.2 基因工程技术在一碳气体利用微生物上的应用

在完善现有一碳气体利用微生物的生物信息数据库,建立有效的分子遗传操作工具的基础上,研究者们进一步从以下两个方面对一碳气体利用微生物进行基因工程改造:(1)对原有的代谢途径进行调控增加或减少某产物的合成;(2)引入外源的代谢途径以合成新的产物。

2.2.1 甲烷营养菌的基因工程改造

通过甲烷营养菌转化 CH_4 生产乳酸并应用于生物技术和工业领域,成为代谢工程及工业应用的研究热点。丙酮酸作为甲烷营养菌 RuMP 途径中重要的中间化合物,具有较高的碳通量^[46],表 3 列出了一些甲烷营养菌的基因工程改造研究。Garg 等^[47]则专门设计了不同组合的启动子和来自瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)的乳酸脱氢酶基因(*Lhldh*)的核糖体结合位点,以及重组质粒载体等基因表达元件,应用在 *M. buryatense* 5GB1 中,获得了一株能产生 L-乳酸的菌株,它的产量也比先前报道的高 14 倍。通过

甲烷氧化中能量代谢分析也显示,底物氧化和糖酵解(EMP)途径占总能量产生的 80%以上,而通过 TCA 循环的通量较弱。Nguyen 等^[48]先敲除甲烷营养菌(*Methylomonas* sp.) DH-1 中 TCA 的琥珀酸脱氢酶基因(*succinate dehydrogenase, sdh*),使琥珀酸产量为野生型的 10 倍,再通过整合来自 *E. coli* MG1655 菌株的乙醛酸循环中两种关键酶基因异柠檬酸裂解酶(*isocitrate lyase, il*)基因和苹果酸合酶(*malate synthase, ms*)基因,实现了最大的琥珀酸产量 134 mg/L (DS-GL)。最后,他们破坏了丙酮酸甲酸裂解酶(*pyruvate formate lyase, pfl*)和乙酸激酶-磷酸转乙酰酶(*acetate kinase-phosphotransacetylase, ack-pta*)两个酶基因,将碳通量集中到 TCA 循环。

此外, Henard 等^[12]建立了一种含有四环素启动子的可诱导的广宿主基因表达载体,得到了一株表达异源乳酸杆菌乳酸脱氢酶(*lactate dehydrogenase, LDH*)的甲烷营养工程菌,该菌可发酵 CH_4 产乳酸,最终产量高达 0.005 g 乳酸/g CH_4 ,乳酸浓度为 0.8 g/L。他们的后续研究基于其中莽草酸途径衍生物黏糠酸产生的上游代谢机制,将涉及的酶导入 *M. buryatense* 5GB1 中,整合了一条黏糠酸的生物合成途径^[49]。通过在甲烷营养菌中引入外源代谢途径的关键酶基因

表 3 甲烷营养菌的基因工程改造

Table 3 Genetic engineering modification of methanotrophic bacteria

Strain	Approach	Result	Reference
<i>M. buryatense</i>	Homologous recombination	Lactate dehydrogenase was overexpressed and 0.8 g/L lactate was achieved, 13-fold compared to the initial titer	[12]
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z	Homologous recombination	Recombinant cells containing L-aspartokinase genes could grow in the presence of 4% NaCl and synthesize ectoine	[15]
<i>M. buryatense</i> 5GB1	Codon optimization and molecular element construction	Inducible and constitutive promoter and ribosome-binding site were combined and the strain produced L-lactate from CH_4 at a flux 14-fold higher than previously reported	[47]
<i>Methylomonas</i> sp. DH-1	Homologous recombination	Succinate dehydrogenase (<i>sdh</i>) was deleted and succinate production grew by 10 times compared to that of the wild type	[48]
<i>M. capsulatus</i> Bath	Homologous recombination	Expression of heterologous genes to produce muconic acid (MA), the highest titer, 12.4 mg/L MA, was achieved	[49]
	Homologous recombination	Isoprene synthetase genes were introduced to synthesize isoprene	[50]
<i>Methylomonas</i>	Homologous recombination	Isoprene synthase was expressed and the activity of isoprenyl bisphosphoisomerase increased, synthesizing 0.056 mg/L isoprene from CH_4	[51]

可以实现黏糠酸和异戊二烯等产物的合成,黏糠酸可以被转化为多种高价值的产物,异戊二烯可以生产一种“天然乳胶”聚异戊二烯,而对于后者,研究比较多的是基于 MEP 途径,例如, Held 等^[50]将越南葛藤(*Pueraria montana*)的 *ispS* 基因(异戊二烯合成酶基因)在 *M. capsulatus* Bath 中进行异源表达,改造后的菌株可以产生异戊二烯; Donaldson 等^[51]改造甲烷营养菌 *Methylomonas*,使其可异源表达异戊二烯合酶并且提高了其异戊烯基二磷酸异构酶的活性,最终工程菌以 CH_4 为底物产生异戊二烯,浓度可达 0.056 mg/L ,为对照组的 2.7–2.8 倍。

还有研究将耐盐性 *M. alcaliphilum* 20Z 的四氢嘧啶合成相关基因 L-2,4-diaminobutyric acid transaminase (*EctB*)、L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase (*EctA*) 和 L-ectoine synthase (*EctC*)及其特定启动子区域在大肠杆菌 *E. coli* 中表达,重组细胞可以在 4% NaCl 下生长并合成四氢嘧啶^[15]。大多数基因工程改造都集中于 Group I型甲烷营养菌。研究发现,Group I型菌体生物量高于 Group II型,通过 RuMP 循环的通量最高,且前者进行 RuMP 循环反应中均放能,因此 Group I型较 Group II型具更高的能量效率。但是,Group II型高产乙酰 CoA,可合成其衍生物,在 CH_4 和 CO_2 共利用方面有其独特而明显的优势^[52]。此外,通过丝氨酸循环高效产生 PHB 是 Group II型所特有的。所以,今后也可以对 Group II型进行相应的研究与开发等。

2.2.2 合成气发酵微生物的基因工程改造

相比较甲烷营养菌,研究者们针对合成气发酵微生物开发了更为丰富的遗传操作工具。例如,Heap 等^[53]构建了大肠杆菌-梭菌穿梭质粒,汪俊卿等^[54]构建的质粒中具有基因编辑和反向筛选标记双重功能,顾阳团队研制了双报告基因系统并构建了人工启动子文库,该文库不仅适用于梭菌,

还具有极好的普适性^[55],以上这些研究拓展并丰富了合成气发酵微生物的表达元件。表 4 主要列出了一些合成气发酵微生物的基因工程改造研究。

Liu 等^[4]利用 CRISPR-Cas9 技术敲除 *C. ljungdahlii* 的乙醛/乙醇脱氢酶基因(*adhE*),删除了乙醇的经典 AdhE 合成途径,使用 ^{13}C 标记乙醇和乙酸进行了代谢实验,并通过氧化还原平衡分析和比较转录组分析,表明乙醇形成后在没有 CO 的情况下通过醛铁氧还蛋白氧化还原酶(aldehyde ferredoxin oxidoreductase, AOR)途径被氧化为乙酸,这与先前提出的乙酸转化为乙醇的 AOR 途径是相同的。Tan 等^[56]通过丁醇处理 *C. ljungdahlii* DSM 13528,经 qRT-PCR 分析编码丁醇脱氢酶的基因(*putative butanol dehydrogenase, bdh1* 和 *bdh2*)转录后,克隆其基因 *bdh1* 和 *bdh2* 并在 *E. coli* BL21(DE3)中异源表达,也可以将丁醇转化为丁醛,明确敲除这 2 个基因,可以避免丁醇的进一步降解,对未来进一步提升丁醇的产量有一定的借鉴意义。Woolston 等^[57]还在 *C. ljungdahlii* 中开发了可诱导的 CRISPRi 系统,它能够高效抑制磷酸转乙酰酶基因 *pta* 的转录,促进 3-羟基丁酸(3-hydroxybutyrate, 3-HB)的合成,菌株经诱导后产生的 3-HB 的浓度较野生型提高了近 2.3 倍且不影响乙醇产量。该研究工作在生产绿色燃料乙醇的同时,得到的 3-HB 可以聚合生成聚羟基丁酸 PHB。

其实,由一碳气体利用微生物生产乙酸和丁酸等可再生产物,也具有一定的工业应用潜力。Ueki 等^[58]将丙酮丁醇梭菌 *C. acetobutylicum* 中乙酰 CoA 合成丁酸途径所需的基因异源导入并整合到 *C. ljungdahlii* 染色体中,然后对 *C. ljungdahlii* 的核糖体结合位点进行修改,增加了对应酶的翻译,利用 CO_2 发酵生成了更多的丁酸。而 Nakashimada 等^[59]与 Kita 等^[60]分别以嗜热产乙酸菌(*Thermophilic acetogen*) ATCC39073 和热醋穆尔

表 4 合成气发酵微生物的基因工程改造

Table 4 Genetic engineering modification of syngas-utilizing microorganisms

Strain	Approach	Result	Reference
<i>C. ljungdahlii</i>	CRISPR-Cas9 gene editing	<i>AdhE</i> gene was knocked out, deletion of the classical AdhE ethanol synthesis pathway	[4]
	Phage recombinase-mediated efficient integration of large DNA fragments	Efficient chromosomal integration of a whole donor vector via single-crossover recombination produced 1.01 g/L of butyric acid within 3 days fermenting syngas (CO ₂ /CO)	[45]
	CRISPR-Cas9 gene editing	The dual reporter system (<i>catP-lacZ</i>) and the strong promoter <i>Pthl</i> had over 10-fold-higher activity than the original expression part <i>Pthl</i>	[55]
	CRISPRi system	Downregulating phosphotransacetylase (<i>pta</i>) led to a 97% decrease in enzyme activity and a 2.3-fold increase in titer	[57]
	Homologous recombination	Knock out butanol dehydrogenase to improve the productivity of butanol from syngas	[56]
	Codon optimization	The ribosome binding site was modified, translation of acetyl coenzyme A increased and high yield of butyric acid was achieved	[58]
<i>M. thermoacetica</i>	Homologous recombination	Reintroduction of <i>pyrF</i> into the mutant <i>pyrF</i> ⁻ by homologous recombination ensured the recovery of uracil malnutrition, producing acetic acid by using H ₂ /CO ₂	[59-60]
<i>C. autoethanogenum</i>	Homologous recombination	Transforming exogenous poly-3-hydroxybutyrate pathway genes obtained PHB-producing cell recombinants and the synthesis of PHB, an acetone heterologous product in WLP	[61]
	Homologous recombination	Reconstruction of a 2,3-butanediol pathway involved a NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase (<i>CaADH</i>)	[62]
	Intron excision and retrohoming	Genes encoding <i>Codh</i> was knocked out, indicating <i>cooS1</i> and <i>cooS2</i> were dispensable for autotrophic growth and verifying the functional redundancy of <i>Codh</i>	[63]
	Molecular element construction	The CRISPR/Cas9 system promoter was cloned downstream of the PHT3 reporter gene, expressing <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , and <i>phaC</i> , producing ethanol and butanol <i>AOR</i> , <i>adhE2</i> , and <i>FNR</i> were overexpressed, enhancing ethanol yields	[64]
<i>C. carboxidivorans</i>	Homologous recombination		[65]

氏菌(*M. thermoacetica*)为研究对象, 利用同源重组的原理使编码乳酸脱氢酶的基因 *pyrF* 失活, 得到尿嘧啶营养缺陷型菌株 *dpyrF*, 从外源引入来自嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter pseudethanolicus*) ATCC33223 的乳酸脱氢酶基因 *T-ldh* 和 *pyrF* 后, 该菌株可利用 H₂/CO₂ 产生乙酸。此外, 近年 PHB 受到越来越广泛的关注, de Souza 等^[61]通过 pMTL83157 空质粒转化了钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)的合成 PHB 途径

基因, 得到一株能利用合成气产生聚-3-羟基丁酸酯(PHB)的重组 *C. autoethanogenum*。

目前, 合成气衍生乙醇和丁醇已成功成为天然气发酵技术的先驱。李宁^[64]对 *C. ljungdahlii* 利用 CO 的过程进行研究, 找到驱动 CRISPR/Cas9 系统元件表达的两个关键启动子 (*ParaE* 和 *Pthl*), 对 *pta* 和 *ack* 基因进行敲除, 随后将丙酮丁醇梭菌 *C. acetobutylicum* ATCC 824 的丁酸合成途径导入 *C. ljungdahlii* 中, 得到

的重组菌能够发酵 CO 产生丁醇。Cheng 等^[65]利用穿梭质粒 pMTL82151 转化了来自丙酮丁醇梭菌 *C. acetobutylicum* 的基因 *AOR*、*adhE2* 和 *FNR* (分别编码乙醛-铁氧还蛋白氧化还原酶、醇脱氢酶和铁氧还蛋白 NAD⁺还原酶), 改造后的梭状芽孢杆菌 *C. carboxidivorans* 发酵 CO 得到的乙醇产量显著增加。因为乙酸能参与能量代谢的调控, 此前为增强乙醇产量, 采取的副产物途径减弱或单独的主途径增强不是很理想, 今后也可以组合这两个策略。

3 总结与展望

采用生物炼制工艺, 可以将甲烷营养菌 *M. buryatense* 所产生的细胞膜脂转变为绿色柴油, 将合成气经由微生物转化为新型燃料乙醇/丁醇。最新的研究中, 研究者报道通过对 *C. autoethanogenum* 进行遗传工程改造, 使工程菌获得了将 CO、CO₂/H₂ 等转化为丙酮和异丙醇的能力^[65]。通常生产丙酮和异丙醇的原料来源于石油裂解及原煤提取, 因此与传统工艺相比, 该技术不仅可减少不可再生能源的消耗, 还可降低温室气体的排放。因此, 利用 CO、CO₂ 及 CH₄ 等一碳气体的生物转化生产燃料及化学品有利于环境保护和可持续发展, 在未来具有巨大的优势。

尽管目前一碳气体利用微生物的研究受到很多关注, 分子改造技术也层出不穷, 但仍然存在一些问题。首先, 一碳气体利用微生物 DNA 识别位点序列短且频率低加上修复能力弱, 导致同源重组效率低, 给遗传操作带来了困难。研究者们先后开发了不同的遗传工具, 此前报道基于 *E. coli* λ 噬菌体重组酶开发的 Red/ET 是应用于大肠杆菌中最有效的重组技术, 该重组系统也被用于一碳气体利用微生物, 解决了同源重组率低的问题, 但在 λ Red 同源重组后, 染色体会发生

DNA 分子内的重排现象, 导致基因组不稳定。为达到理想的改造效果, 现有的技术还待完善创新。其次, 质粒在宿主中稳定性差, 高效且简单的基因整合技术还有待发展, 来自噬菌体 Att/Int 系统的 *attB* 位点已引入 *C. ljungdahlii* 的基因组中, 那么是否可以进一步对多个目标 DNA 片段的染色体一步整合有待探索。最后, 仍缺乏快捷有效的重组菌筛选方法, 虽然可以利用质谱技术 (LC-MS/GC-MS) 实现高通量筛选, 但成本比较高。此前有报道生物传感器是一种价格相对便宜但功能强大的工具, 可用于检测和量化各种代谢物, 比如, 高灵敏度的 DNA 电化学生物传感器, 定量分析特定形式目标蛋白的生物传感器 “tpMetROG”^[66] 等。因此, 开发新型的生物传感器并用于一碳气体利用微生物, 也是今后的一个发展方向。

REFERENCES

- [1] FORSTER P, STORELMO T, AMOUR K. The Earth's energy budget, climate feedbacks, and climate sensitivity[M]// In: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge and New York: Cambridge University Press, 2021.
- [2] DÜRRE P, EIKMANN BJ. C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 35: 63-72.
- [3] 刘昊鹏, 刘超, 王雯, 刘广青. 基于厌氧微生物的碳链延长合成高价值化学品反应机理及研究进展: 不同电子供体[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2020, 47(5): 1-17.
LIU HP, LIU C, WANG W, LIU GQ. Advances in understanding the mechanism of chain elongation with anaerobic microbes for the synthesis of high value-added chemicals: the effect of different electron donors[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2020, 47(5):

- 1-17 (in Chinese).
- [4] LIU ZY, JIA DC, ZHANG KD, ZHU HF, ZHANG Q, JIANG WH, GU Y, LI FL. Ethanol metabolism dynamics in *Clostridium ljungdahlii* grown on carbon monoxide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(14): e00730-e00720.
- [5] SÖHNGEN NL. Über bakterien, welche methan ab kohlenstoffnahrung and energiequelle gebrauchen[J]. Parasitenkd Infektionskr Abt, 1906, 15: 513-517.
- [6] DWORKIN M, FOSTER JW. Studies on *Pseudomonas methanica* (Söhngen) nov. comb[J]. Journal of Bacteriology, 1956, 72(5): 646-659.
- [7] NGUYEN DTN, LEE OK, LIM C, LEE J, NA JG, LEE EY. Metabolic engineering of type II methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b, for production of 3-hydroxypropionic acid from methane via a malonyl-CoA reductase-dependent pathway[J]. Metabolic Engineering, 2020, 59: 142-150.
- [8] HOGENDOORN C, POL A, NUIJTEN GHL, OP den CAMP HJM. Methanol production by *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV under different growth conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(18): e01188-e01120.
- [9] FEI Q, PURI AW, SMITH H, DOWE N, PIENKOS PT. Enhanced biological fixation of methane for microbial lipid production by recombinant *Methylococcus buryatense*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 129.
- [10] WOODLAND MP, DALTON H. Purification and characterization of component A of the methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(1): 53-59.
- [11] COLEMAN WJ, VIDANES GM, COTTAREL G, MULEY S, KAMIMURA R, JAVAN AF, SUN JP, GROBAN ES. Biological conversion of multi-carbon compounds from methane: US20140273128[P]. 2014-09-18.
- [12] HENARD CA, SMITH H, DOWE N, KALYUZHAYAYA MG, PIENKOS PT, GUARNIERI MT. Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21585.
- [13] DEMIDENKO A, AKBERDIN IR, ALLEMANN M, ALLEN EE, KALYUZHAYAYA MG. Fatty acid biosynthesis pathways in *Methylococcus buryatense* 5G(B1)[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 7: 2167.
- [14] STONE K, HILLIARD M, BADR K, BRADFORD A, HE QP, WANG J. Comparative study of oxygen-limited and methane-limited growth phenotypes of *Methylococcus buryatense* 5GB1[J]. Biochemical Engineering Journal, 2020, 161: 107707.
- [15] RESHETNIKOV AS, KHMELENINA VN, TROTSSENKO YA. Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph "*Methylococcus alcaliphilum* 20Z"[J]. Archives of Microbiology, 2006, 184(5): 286-297.
- [16] KHMELENINA VN, KALYUZHAYAYA MG, STAROSTINA NG, SUZINA NE, TROTSSENKO YA. Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from tuva soda lakes[J]. Current Microbiology, 1997, 35(5): 257-261.
- [17] YE RW, YAO H, STEAD K, WANG T, TAO L, CHENG Q, SHARPE PL, SUH W, NAGEL E, ARCILLA D, DRAGOTTA D, MILLER ES. Construction of the astaxanthin biosynthetic pathway in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp. strain 16a[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(4): 289-299.
- [18] KENNEY GE, GOERING AW, ROSS MO, DeHART CJ, THOMAS PM, HOFFMAN BM, KELLEHER NL, ROSENZWEIG AC. Characterization of methanobactin from *Methylosinus* sp. LW4[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(35): 11124-11127.
- [19] BORDEL S, RODRÍGUEZ E, MUÑOZ R. Genome sequence of *Methylocystis hirsuta* CSC1, a polyhydroxyalkanoate producing methanotroph[J]. Microbiology Open, 2019, 8(6): e00771.
- [20] DEDYSH SN, NAUMOFF DG, VOROB'EV AV, KYRPIDES N, WOYKE T, SHAPIRO N, CROMBIE AT, MURRELL JC, KALYUZHAYAYA MG, SMIRNOVA AV, DUNFIELD PF. Draft genome sequence of *Methyloferula stellata* AR4, an obligate methanotroph possessing only a soluble methane monooxygenase[J]. Genome Announcements, 2015, 3(2): e01555-e01514.
- [21] DUNFIELD PF, BELOVA SE, VOROB'EV AV,

- CORNISH SL, DEDYSH SN. *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultative methanotroph possessing a particulate methane monooxygenase, and emended description of the genus *Methylocapsa*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(Pt 11): 2659-2664.
- [22] WU ML, van TEESELING MCF, WILLEMS MJR, van DONSELAAR EG, KLINGL A, RACHEL R, GEERTS WJC, JETTEN MSM, STROUS M, van NIFTRIK L. Ultrastructure of the denitrifying methanotroph "candidate *Methylomirabilis oxyfera*," a novel polygon-shaped bacterium[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(2): 284-291.
- [23] HAROON MF, HU SH, SHI Y, IMELFORT M, KELLER J, HUGENHOLTZ P, YUAN ZG, TYSON GW. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J]. Nature, 2013, 500(7464): 567-570.
- [24] KALYUZHAYAYA MG, PURI AW, LIDSTROM ME. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria[J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 142-152.
- [25] CHISTOSERDOVA L, VORHOLT JA, LIDSTROM ME. A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea[J]. Genome Biology, 2005, 6(2): 208.
- [26] BARIK S, PRIETO S, HARRISON SB, CLAUSEN EC, GADDY JL. Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1988, 18(1): 363-378.
- [27] GADDY JL, CLAUSEN EC. *Clostridium ljungdahlii*, an anaerobic ethanol and acetate producing microorganism: US5173429[P]. 1992-12-22.
- [28] 徐惠娟, 梁翠谊, 许敬亮, 何敏超, 袁振宏, 陈小燕, 张宇. CO一步法 *C. autoethanogenum* 发酵产乙醇的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2017, 33(23): 246-251.
- XU HJ, LIANG CY, XU JL, HE MC, YUAN ZH, CHEN XY, ZHANG Y. Study on one-step ethanol production from CO by *C. autoethanogenum*[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017, 33(23): 246-251 (in Chinese).
- [29] KÖPKE M, MIHALCEA C, LIEW F, TIZARD JH, ALI MS, CONOLLY JJ, AL-SINAWI B, SIMPSON SD. 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15): 5467-5475.
- [30] FERNÁNDEZ-NAVEIRA Á, ABUBACKAR HN, VEIGA MC, KENNES C. Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(7): 3361-3370.
- [31] KUNDIYANA DK, WILKINS MR, MADDIPATI P, HUHNKE RL. Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by *Clostridium ragsdalei*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 5794-5799.
- [32] ZAHN JA, SAXENA J. Novel ethanogenic *Clostridium* species, *Clostridium coskatii*: US20120156747[P]. 2012-06-21.
- [33] KÖPKE M, STRAUB M, DÜRRE P. *Clostridium difficile* is an autotrophic bacterial pathogen[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62157.
- [34] KERBY R, ZEIKUS JG. Growth of *Clostridium thermoaceticum* on H₂/CO₂ or CO as energy source[J]. Current Microbiology, 1983, 8(1): 27-30.
- [35] WEGHOFF MC, MÜLLER V. CO metabolism in the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(8): 2312-2319.
- [36] GENTHNER BR, BRYANT MP. Growth of *Eubacterium limosum* with carbon monoxide as the energy source[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(1): 70-74.
- [37] BERTSCH J, MÜLLER V. CO metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17): 5949-5956.
- [38] PIERCE E, XIE G, BARABOTE RD, SAUNDERS E, HAN CS, DETTER JC, RICHARDSON P, BRETTIN TS, das A, LJUNGDAHL LG, RAGSDALE SW. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*)[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(10): 2550-2573.
- [39] HEISKANEN H, LLKKA V, LIISA V. The effect of syngas composition on the growth and product formation of *Butyribacterium methylotrophicum*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(3): 362-367.

- [40] MOHAMMADI M, NAJAFPOUR GD, YOUNESI H, LAHIJANI P, UZIR MH, MOHAMED AR. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: a review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2011, 15(9): 4255-4273.
- [41] SHAO LJ, HU SY, YANG Y, GU Y, CHEN J, YANG YL, JIANG WH, YANG S. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*[J]. Cell Research, 2007, 17(11): 963-965.
- [42] 聂明. 气候变暖下水圈甲烷排放及其微生物学机制[J]. 微生物学报, 2020, 60(9): 1821-1833.
NIE M. Hydrospheric methane emission and its microbiological mechanisms under climate warming[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(9): 1821-1833 (in Chinese).
- [43] LIU PF, KLOSE M, CONRAD R. Temperature-dependent network modules of soil methanogenic bacterial and archaeal communities[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 496.
- [44] 李聪, 曹文广. CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1531-1542.
LI C, CAO WG. Advances in CRISPR/Cas9-mediated gene editing[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(11): 1531-1542 (in Chinese).
- [45] HUANG H, CHAI CS, YANG S, JIANG WH, GU Y. Phage serine integrase-mediated genome engineering for efficient expression of chemical biosynthetic pathway in gas-fermenting *Clostridium ljungdahlii*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 52: 293-302.
- [46] HE L, FU YF, LIDSTROM ME. Quantifying methane and methanol metabolism of *Methylovimicrobium buryatense* 5GB1C under substrate limitation[J]. mSystems, 2019, 4(6): e00748-e00719.
- [47] GARG S, CLOMBURG JM, GONZALEZ R. A modular approach for high-flux lactic acid production from methane in an industrial medium using engineered *Methylomicrobium buryatense* 5GB1[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(6): 379-391.
- [48] NGUYEN DTN, LEE OK, HADIYATI S, AFFIFAH AN, KIM MS, LEE EY. Metabolic engineering of the type I methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1 for production of succinate from methane[J]. Metabolic Engineering, 2019, 54: 170-179.
- [49] HENARD CA, AKBERDIN IR, KALYUZHNYAYA MG, GUARNIERI MT. Muconic acid production from methane using rationally-engineered methanotrophic biocatalysts[J]. Green Chemistry, 2019, 21(24): 6731-6737.
- [50] HELD MA, ZHAO X, CHAO LY. New genetically modified microorganism comprising a heterologous gene under the control of a molecular switch, useful for making a multicarbon product, e.g. 2,3-butanediol, 1,4-butanediol and isobutyraldehyde[P]. US: 0040344. 2020-02-06.
- [51] DONALDSON GK, HOLLANDS K, PICATAGGIO SK. Biocatalyst for conversion of methane and methanol to isoprene: US20150225743[P]. 2015-08-13.
- [52] BORDEL S, RODRÍGUEZ Y, HAKOBYAN A, RODRÍGUEZ E, LEBRERO R, MUÑOZ R. Genome scale metabolic modeling reveals the metabolic potential of three type II methanotrophs of the genus *Methylocystis*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 54: 191-199.
- [53] HEAP JT, PENNINGTON OJ, CARTMAN ST, MINTON NP. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 78(1): 79-85.
- [54] 汪俊卿, 修翔, 王瑞明, 范翰, 李丕武, 苏静, 薛乐, 张丽华, 王松江, 王建彬, 郭传庄, 隋松森. 基于 CRISPR-Cas9 的基因组无痕编辑的载体与应用: CN109722436A[P]. 2019-05-07.
WANG JQ, XIU X, WANG RM, FAN H, LI PW, SU J, XUE L, ZHANG LH, WANG SJ, WANG JB, GUO CZ, SUI SS. Method of utilizing traceless editing technology to increase diacid yield: CN109722436A[P]. 2019-05-07 (in Chinese).
- [55] YANG GH, JIA DC, JIN L, JIANG YQ, WANG Y, JIANG WH, GU Y. Rapid generation of universal synthetic promoters for controlled gene expression in both gas-fermenting and saccharolytic *Clostridium* species[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(9): 1672-1678.
- [56] TAN Y, LIU JJ, LIU Z, LI FL. Characterization of two novel butanol dehydrogenases involved in butanol degradation in syngas-utilizing bacterium *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528[J]. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(9): 996-1004.

- [57] WOOLSTON BM, EMERSON DF, CURRIE DH, STEPHANOPOULOS G. Redirecting carbon flux in *Clostridium ljungdahlii* using CRISPR interference (CRISPRi)[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 48: 243-253.
- [58] UEKI T, NEVIN KP, WOODARD TL, LOVLEY DR. Converting carbon dioxide to butyrate with an engineered strain of *Clostridium ljungdahlii* [J]. *mBio*, 2014, 5(5): e01636-e01614.
- [59] NAKASHIMADA Y, IWASAKI Y, KITA A. O-405 development of genetic transformation system in thermophilic acetogen to produce useful materials from H₂-CO₂ or syngas from biomass[C]// Conference on Biomass Science. The Japan Institute of Energy, 2014.
- [60] KITA A, IWASAKI Y, SAKAI S, OKUTO S, TAKAOKA K, SUZUKI T, YANO S, SAWAYAMA S, TAJIMA T, KATO J, NISHIO N, MURAKAMI K, NAKASHIMADA Y. Development of genetic transformation and heterologous expression system in carboxydophilic thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(4): 347-352.
- [61] de SOUZA PINTO LEMGRUBER R, VALGEPEA K, TAPPEL R, BEHRENDORFF JB, PALFREYMAN RW, PLAN M, HODSON MP, SIMPSON SD, NIELSEN LK, KÖPKE M, MARCELLIN E. Systems-level engineering and characterisation of *Clostridium autoethanogenum* through heterologous production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB)[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 53: 14-23.
- [62] KÖPKE M, GERTH ML, MADDOCK DJ, MUELLER AP, LIEW F, SIMPSON SD, PATRICK WM. Reconstruction of an acetogenic 2,3-butanediol pathway involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(11): 3394-3403.
- [63] LIEW F, HENSTRA AM, WINZER K, KÖPKE M, SIMPSON SD, MINTON NP. Insights into CO₂ fixation pathway of *Clostridium autoethanogenum* by targeted mutagenesis[J]. *mBio*, 2016, 7(3): e00427-e00416.
- [64] 李宁. 食气梭菌分子遗传改造方法的建立及应用[D]. 北京: 中国科学院大学硕士学位论文, 2015.
- LI N. Establishment and application of molecular genetic modification method of *Clostridium aerophagus*[D]. Beijing: Master's Thesis of University of Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese).
- [65] CHENG C, LI W, LIN M, Yang ST. Metabolic engineering of *Clostridium carboxidivorans* for enhanced ethanol and butanol production from syngas and glucose[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 284: 415-423.
- [66] LEE HM, CHOI DW, KIM S, LEE A, KIM M, ROH YJ, JO YH, CHO HY, LEE HJ, LEE SR, TARRAGO L, GLADYSHEV VN, KIM JH, LEE BC. Biosensor-linked immunosorbent assay for the quantification of methionine oxidation in target proteins[J]. *ACS Sensors*, 2022, 7(1): 131-141.

(本文责编 郝丽芳)