

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-022

## 合成生物技术驱动酪丁酸梭菌细胞工厂开发的研究进展

刘家宇<sup>1</sup>, 杨智晗<sup>2</sup>, 杨蕾<sup>2</sup>, 朱丽英<sup>3</sup>, 朱政明<sup>1</sup>, 江凌<sup>1,4</sup><sup>1</sup>南京工业大学食品与轻工学院, 江苏 南京 211816; <sup>2</sup>南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816;<sup>3</sup>南京工业大学化学与分子工程学院, 江苏 南京 211816; <sup>4</sup>南京工业大学材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816)

**摘要:** 作为一种重要的工业微生物和新型益生菌, 酪丁酸梭菌是厌氧条件下代谢多种底物产生丁酸的优势菌株, 在其他精细化学品生产和大健康领域亦具有广泛应用。然而, 获取生产效率高、鲁棒性强的高版本酪丁酸梭菌细胞工厂, 仍然面临着遗传转化效率低、遗传操作工具有限、调控手段单一等诸多挑战。近年来, 随着合成生物学的不断发展和酪丁酸梭菌生物信息数据的逐步完善, 多种研究策略和技术, 包括基因编辑系统等, 被用于设计和构筑酪丁酸梭菌底盘细胞高效合成各种精细化学品。本文首先对酪丁酸梭菌独特的生理特性进行了概述。然后, 对酪丁酸梭菌底盘细胞改造过程中涉及的系统生物学方法以及遗传操作工具的构建方法与技术进行了总结。同时, 探讨了酪丁酸梭菌中多类型代谢调控策略以及群体感应系统的开发及其在合成精细化学品中的应用。最后, 从遗传转化效率提升、基因编辑工具拓展、基因回路设计与重构高通量筛选平台建立、一碳气体利用等方面对酪丁酸梭菌底盘细胞的创制进行了展望。

**关键词:** 酪丁酸梭菌; 底盘细胞; 合成生物技术; 系统生物学; 代谢工程

中图分类号: Q 文献标志码: A

## Advances in the development of *Clostridium tyrobutyricum* cell factories driven by synthetic biotechnology

LIU Jiayu<sup>1</sup>, YANG Zhihan<sup>2</sup>, YANG Lei<sup>2</sup>, ZHU Liying<sup>3</sup>, ZHU Zhengming<sup>1</sup>, JIANG Ling<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>School of Food and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; <sup>2</sup>School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; <sup>3</sup>School of Chemical and Molecular Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; <sup>4</sup>State Key Laboratory of Chemical Engineering of Materials, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China)

**Abstract:** As an important industrial microorganism and a novel probiotic, *Clostridium tyrobutyricum* is a superior strain for metabolizing various substrates to produce butyric acid under anaerobic condition, presenting a great potential for the valorization of agricultural wastes. Consequently, this bacterium with high yield of butyric acid has

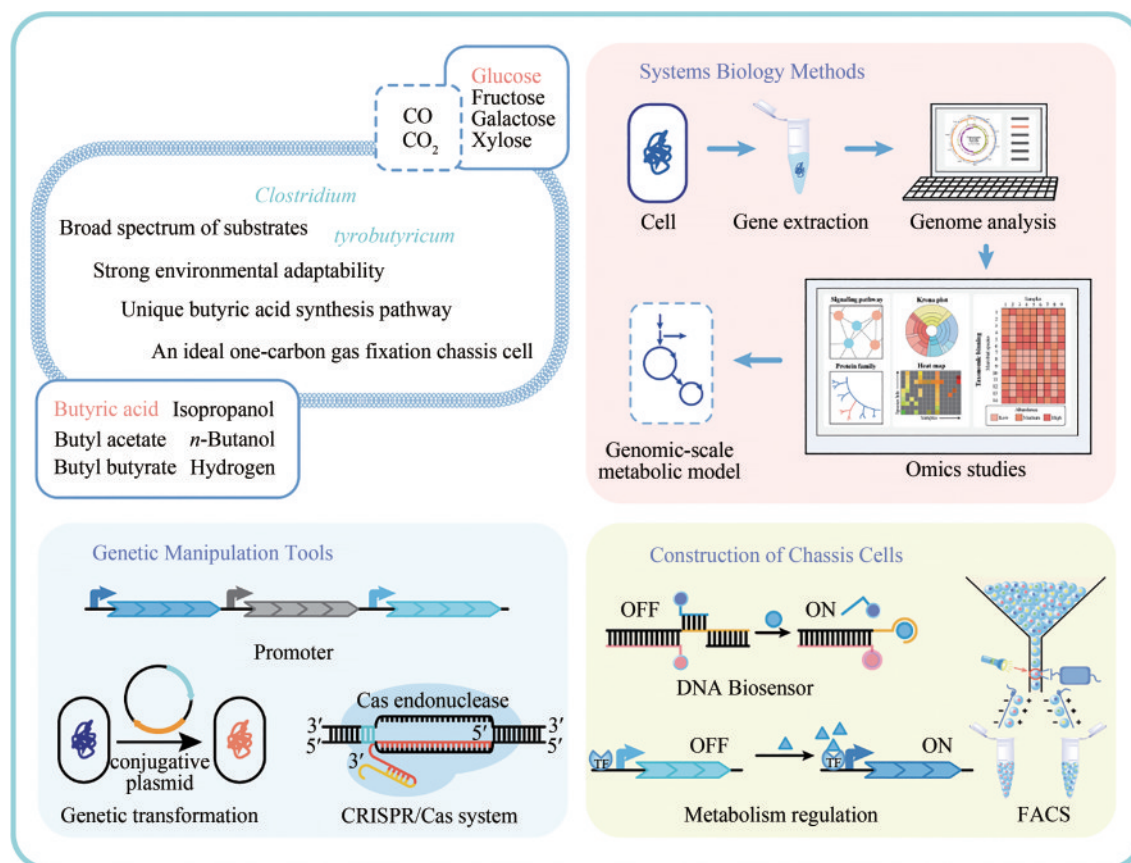
收稿日期: 2022-04-14 修回日期: 2022-05-25

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目 (31922070); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (22008114); 国家自然科学基金山东联合基金重点项目 (U2106228); 江苏省自然科学基金青年基金项目 (BK20200684); 江苏省先进生物制造创新中心资助 (XTC2205)

引用本文: 刘家宇, 杨智晗, 杨蕾, 朱丽英, 朱政明, 江凌. 合成生物技术驱动酪丁酸梭菌细胞工厂开发的研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1174-1200

Citation: LIU Jiayu, YANG Zhihan, YANG Lei, ZHU Liying, ZHU Zhengming, JIANG Ling. Advances in the development of *Clostridium tyrobutyricum* cell factories driven by synthetic biotechnology[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1174-1200

also been widely used in other fields, such as fine chemical production and human health. However, there are still many challenges in the construction of highly productive and robust *C. tyrobutyricum* cell factories. For example, the genetic transformation efficiency is rather low, due to the presence of restriction-modification systems. Gene editing tools are less developed and strain construction suffers from tedious processes and low efficiency. Moreover, genetic modification of *C. tyrobutyricum* is limited to a single mode of metabolic regulation, either knockout or overexpression, which is far behind the conventional model hosts. In recent years, with the continuous rapid development of synthetic biology and the collection of increasing amounts of *C. tyrobutyricum* bioinformatics data, a variety of research strategies and techniques, particularly the gene editing systems, have been employed to design and construct *C. tyrobutyricum* cell factories for efficient production of various fine chemicals. In this paper, we firstly provide an overview of the unique physiological properties of *C. tyrobutyricum*, including substrate range, environmental adaptability, butyric acid synthesis pathway, as well as the one-carbon gas fixation and energy metabolism pathways. Subsequently, we summarize the systems biology methods as well as the genetic manipulation tools for the modification of *C. tyrobutyricum* chassis cell, such as biological elements, the conjugation system, and the CRISPR/Cas system. Meanwhile, we discuss the static and dynamic metabolic regulation strategies and two types of quorum sensing systems (*agr*-type and RRNPP-type) as well as their applications in the synthesis of fine chemicals in *C. tyrobutyricum*. Finally, we prospect the trends for the creation of *C. tyrobutyricum* chassis cell, in terms of enhancing genetic transformation efficiency, expanding gene editing tools, designing and reconstructing gene circuits, establishing high-throughput screening platforms, and utilizing one-carbon gas.



**Keywords:** *Clostridium tyrobutyricum*; chassis cells; synthetic biotechnology; systems biology; metabolic engineering

绿色生物制造已成为全球性的战略性新兴产业。根据世界经济组织预测,到2030年约有35%的化学品和其他工业产品来自生物制造<sup>[1]</sup>。其中,短链脂肪酸/醇( $C_1\sim C_6$ )是一类应用广泛的精细化学品,其在医药、饲料、化妆品、食品、化工等行业具有巨大的市场容量<sup>[2]</sup>。作为短链脂肪酸中的典型代表,丁酸全球的年需求量已达到8万吨以上,年市场规模达1.5亿美元<sup>[1]</sup>。目前丁酸生产主要依赖正丁醛作为前体,通过氧化法制备,极度依赖石油工业产品,同时反应条件苛刻,且生产过程会造成严重的环境污染问题<sup>[3]</sup>。随着合成生物技术的快速发展,通过构筑微生物细胞工厂合成精细化学品,已经成为生物制造领域的研究热点。微生物细胞工厂在不破坏原生代谢特征的基础上构建新的生物合成途径,从而提高目标产物的产率<sup>[4]</sup>。然而,如何获得绿色高效、鲁棒性强的微生物合成系统是目前亟待解决的关键问题之一。

近年来,分子生物学和发酵工程技术得到高速发展,一些模式微生物如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等已被广泛当作底盘细胞进行改造,使其能够针

对不同目的产物重构并优化代谢途径,提高途径与宿主细胞的适配性以适应工业化生产。然而对以丁酸为代表的短链脂肪酸/醇及其衍生物,梭菌属微生物如酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)等在丁酸、丁醇生产方面具有较高的生产力效率及产物耐受性的优势,因此被广泛认为是短链脂肪酸/醇潜在的细胞工厂<sup>[5]</sup>。*C. tyrobutyricum*是一种革兰氏阳性芽孢杆菌,属于有机化能异养型专性厌氧菌,在乳酪中分离得到,具有优良的生理特性以及丁酸生产能力。以五碳糖或六碳糖作为碳源发酵时,其主要产物为丁酸,同时生成副产物,如乙酸和氢气等<sup>[6]</sup>。*C. tyrobutyricum*在生长中后期能够形成类似圆形的巨大芽孢,对强酸、高温、高盐等恶劣环境具有较高的耐受性,生命力较强,并且具有培养条件相对简单,丁酸产量、得率、纯度相对较高,发酵稳定性好等优点<sup>[7]</sup>。此外,其发酵产物氢气也是一种清洁、高效的绿色能源,因此该菌被认为是生产各种精细化学品最具商业价值的合成生物学厌氧底盘细胞(图1)。在大健康领域,短链脂肪酸在肠道的能量供应、肠道高敏感、肠黏膜屏障的维持和肠道

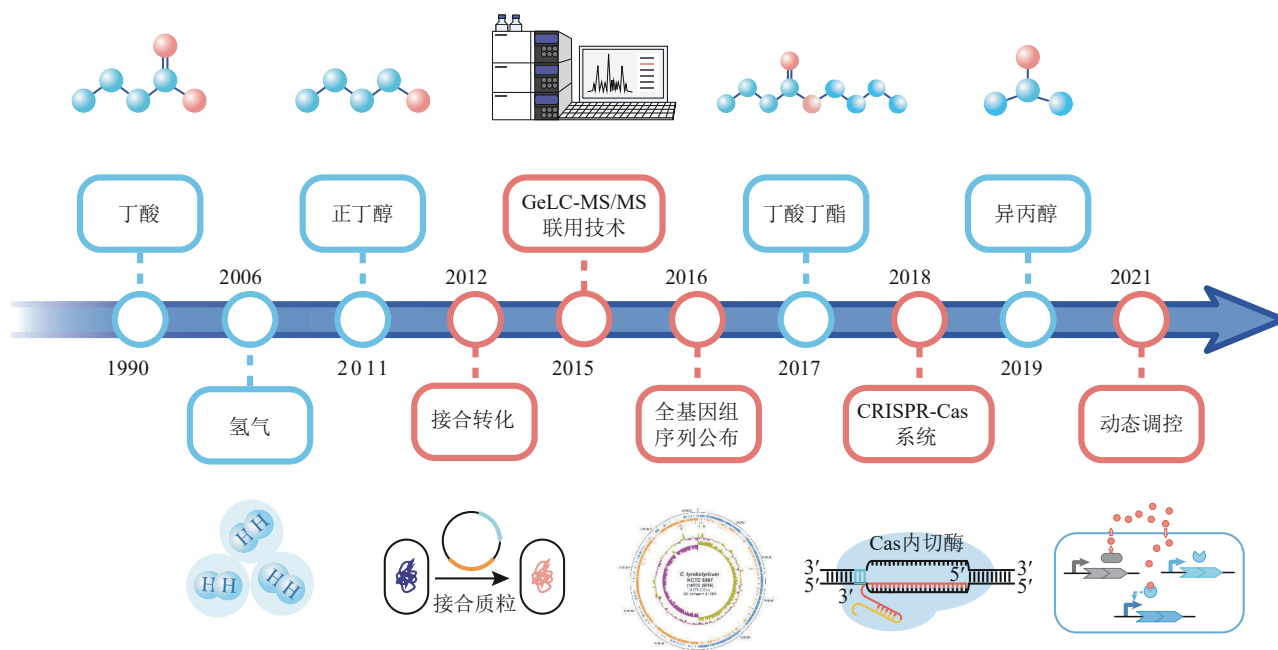


图1 *C. tyrobutyricum* 的系统与合成生物学发展路线

Fig. 1 A brief timeline of systems and synthetic biology of *C. tyrobutyricum*

动力的调节、免疫调节及抗肿瘤效应等方面发挥重要作用，而 *C. tyrobutyricum* 是短链脂肪酸生产的优势益生菌株，以其为底盘细胞，开发针对短链脂肪酸靶向调控的工程益生菌用于疾病治疗方面亦具有巨大的潜力<sup>[8]</sup>。

尽管目前已经有诸多对 *C. tyrobutyricum* 生理、遗传以及代谢的研究，尤其是已通过基因改造，拓宽了其底物谱及产物合成谱。然而，与研究相对成熟的工业模式菌株相比，*C. tyrobutyricum* 在合成生物元件挖掘与组装、基因编辑系统的开发、基因线路的构建以及代谢途径的调控等方面的研究刚刚起步，严重限制了其作为高效底盘细胞的发展。本文简述了 *C. tyrobutyricum* 作为潜在的细胞工厂实现精细化学品生产的独特生理特性，阐述了包括生物信息数据的丰富以及代谢模型的构建在内的系统生物学方法的研究进展，进一步探讨了遗传操作工具的构建方法以及高通量筛选平台、多类型代谢调控策略以及群体感应系统的开发，最后探讨了 *C. tyrobutyricum* 高版本底盘细胞的构建策略及其在精细化学品生产中的应用，并对 *C. tyrobutyricum* 底盘细胞的发展趋势进行了展望。

## 1 酪丁酸梭菌的独特生理特性

### 1.1 独特的丁酸合成途径

*C. tyrobutyricum* 在培养基上的菌落如图2(a)所

示，呈煎蛋样，端圆，中间隆起，直径约为0.3~2.0 μm，长约1.5~2.0 μm，菌体呈灰白色，菌落通常单个或成对存在，偶见长丝状菌体，周身有鞭毛，可运动。常见于动物消化系统、土壤、废水、污染或腐败的乳制品中<sup>[7]</sup>。*C. tyrobutyricum* 扫描电镜图如图2(b)所示。目前，由于全基因组测序技术的不断完善 *C. tyrobutyricum* 的代谢途径也得到了详细的阐明。

*C. tyrobutyricum* 的丁酸代谢是2 mol 乙酰辅酶A在硫解酶催化作用下生成1 mol 乙酰乙酰辅酶A (acetoacetyl-CoA)，然后在一系列酶(β-羟基丁酰辅酶A脱氢酶、巴豆酸酶、丁酰辅酶A脱氢酶)催化下形成丁酰辅酶A (butyryl-CoA)，丁酰辅酶A是形成丁酸的关键前体物质<sup>[6]</sup>，丁酰辅酶A:乙酸辅酶A转移酶以丁酰辅酶A和乙酸为底物生成丁酸和乙酰辅酶A<sup>[9]</sup>。这一丁酸合成途径尤其是最后一步的合成明显不同于其他梭状芽孢杆菌，在其他产丁酸梭菌中，丁酰辅酶A是在磷酸丁酰转移酶(phospho transbutyrylase, PTB)作用下首先形成丁酰磷酸(butyryl-P)，最后在丁酸激酶(butyrate kinase, BK)催化作用下生成目的产物丁酸，如 *C. acetobutylicum* 和 *C. butyricum*<sup>[10-12]</sup>。研究发现，由于 *ptb/buk* 基因在 *C. tyrobutyricum* 的基因组中缺失，取而代之利用丁酰辅酶A:乙酸辅酶A转移酶<sup>[13]</sup>。因此，丁酸的代谢由常规的两步反应变为一步反应。然而，细菌的生长需要更多的ATP来提供能量。如图3所示，合成乙酸的过程中会产生更多的

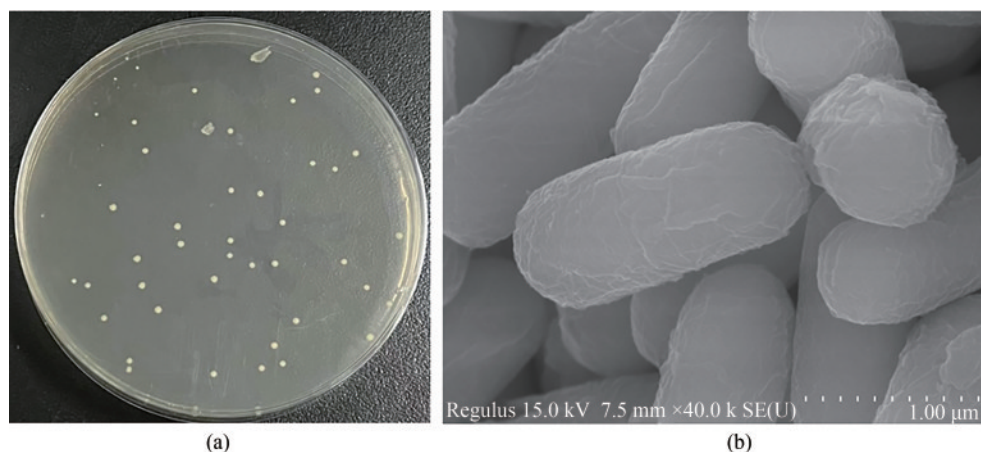


图2 *C. tyrobutyricum* 菌落图 (a) 及扫描电镜图 (b)

Fig. 2 The colony (a) and scanning electron microscopy (b) pictures of *C. tyrobutyricum*

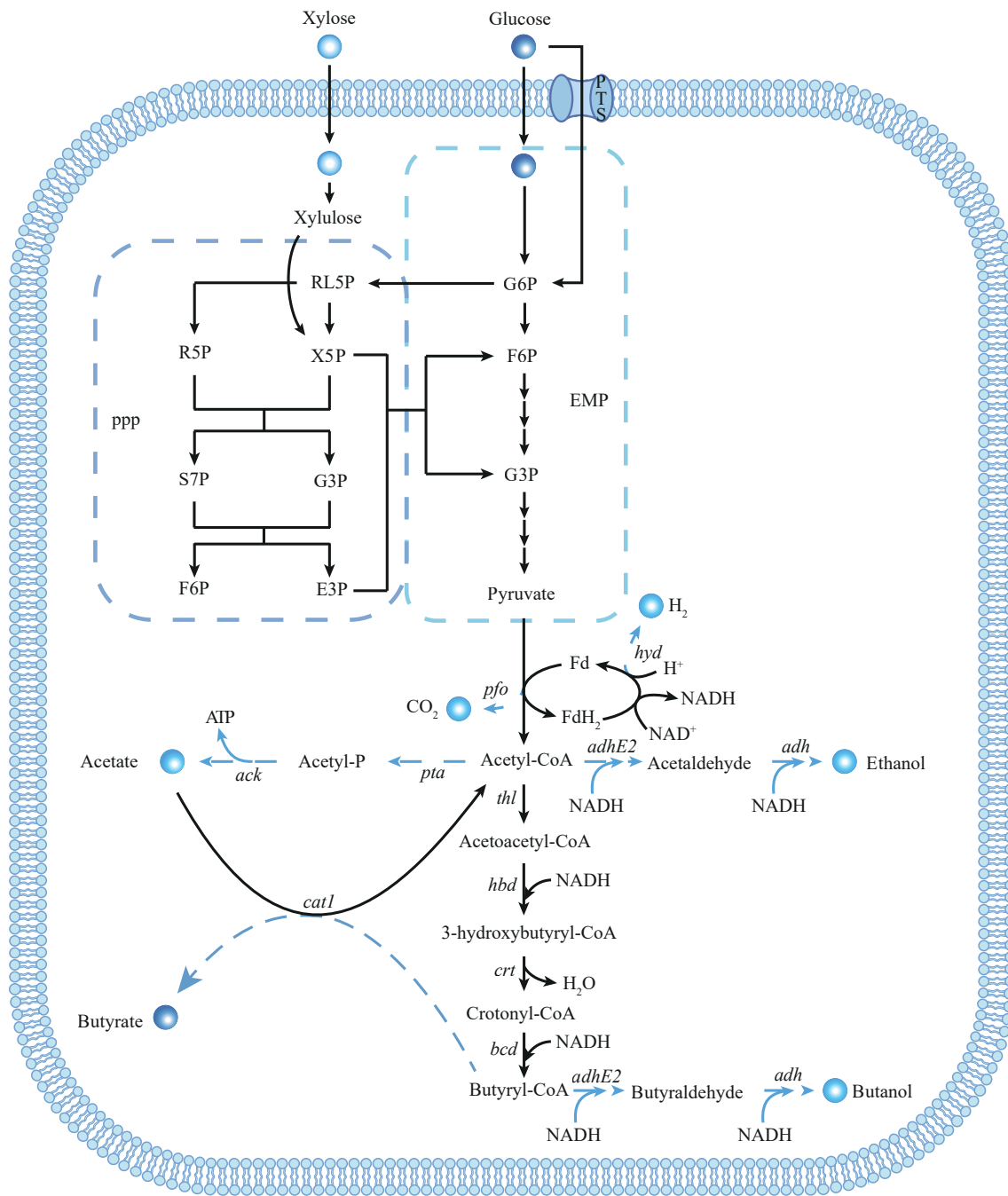


图3 *C. tyrobutyricum* 丁酸代谢合成途径<sup>[5]</sup>

主要涉及的酶的基因：*hyd*—氢化酶；*pfo*—丙酮酸：铁氧还蛋白氧化还原酶；*ack*—乙酸激酶；*pta*—磷酸转乙酰酶；*adhE2*—乙醛乙醇脱氢酶；*adh*—乙醇脱氢酶；*thl*—硫解酶；*hbd*— $\beta$ -羟基丁酰辅酶A脱氢酶；*crt*—烯酰水合酶；*bcd*—丁酰辅酶A脱氢酶；*cat1*—丁酰辅酶A—乙酰辅酶A转移酶

Fig. 3 Metabolic synthesis pathway of butyric acid in *C. tyrobutyricum*<sup>[5]</sup>

The genes encode key enzymes in pathway: *hyd*—hydrogenase; *pfo*—pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; *ack*—acetate kinase; *pta*—phosphotransacetylase; *adhE2*—aldehyde-alcohol dehydrogenase; *adh*—alcohol dehydrogenase; *thl*—thiolase; *hbd*—beta-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; *crt*—crotonase; *bcd*—butanoyl-coA dehydrogenase; *cat1*—butyryl-CoA/acetate CoA transferase

ATP。为了满足对能量的需求，细胞代谢则会朝着合成乙酸的方向进行，从而导致副产物乙酸

的大量产生，使得丁酸的合成必然会伴随乙酸的产生<sup>[8]</sup>。

## 1.2 广泛的底物谱

对于野生型的 *C. tyrobutyricum*, 其具有较为广泛的底物谱, 但底物的利用效率仍有待进一步提升。因此, 有研究者预测了 *C. tyrobutyricum* 中与底物代谢有关的基因, 并研究其相关的代谢途径, 以便对菌株进行靶向改造。Suo 等<sup>[14]</sup> 通过在 *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 中引入 *groESL* 基因, 增强了 *C. tyrobutyricum* 对木质纤维素水解液的利用, 以对 *C. tyrobutyricum* 有较强毒性的玉米秸秆和稻草水解液为底物进行分批发酵, 生产丁酸量分别为 29.6 g/L 和 30.1 g/L, 分别比野生型菌株提高 26.5% 和 19.4%。Huang 等<sup>[15]</sup> 通过重复分批发酵和补料分批发酵, 评价了纤维床生物反应器 (fibrous bed bioreactor, FBB) 固定化 *C. tyrobutyricum* ZJU 8235 利用菊芋中的果糖和葡萄糖水解液生产丁酸的可行性和效率, 结果表明, 丁酸转化率为 0.44 g/g, 产率为 2.75 g/h, 丁酸浓度为 27.5 g/L。为降低发酵成本, 农业和工业废物等低成本底物, 如奶酪乳清<sup>[16]</sup>、玉米纤维水解物<sup>[17]</sup>、小麦粉<sup>[18]</sup>、玉米粉<sup>[19]</sup> 和甘蔗糖蜜<sup>[20]</sup> 已被应用于诸多研究中。通常 *C. tyrobutyricum* 的代谢优先利用葡萄糖, 而其他单糖类物质的利用则会受到强烈抑制。He 等<sup>[21]</sup> 将 *C. acetobutylicum* ATCC 824 中的半乳糖代谢分解基因 (*galK*、*galE*、*galT* 和 *galP*) 在 *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 中进行过表达, 得到了葡萄糖和半乳糖的共同利用的工程菌株, 使得半乳糖可以有效利用, 从而免受葡萄糖诱导的碳分解代谢抑制。通过共表达异源木糖分解代谢基因 (*xylT*、*xylA* 和 *xylB*), 使得葡萄糖和木糖能够得到同时利用。*C. tyrobutyricum* 利用五碳糖 (木糖) 以及六碳糖 (葡萄糖) 作为底物代谢合成丁酸的途径如图 3 所示。综上所述, 通过研究了解 *C. tyrobutyricum* 的潜在底物来源, 尤其是以农业、工业的废弃物作为原料, 不但可以降低发酵成本, 也能将废弃物转化成具有商业价值的发酵产品 (表 1)。

## 1.3 较强的环境适应性

当丁酸浓度超过 40 g/L 时, 野生型 *C. tyrobutyricum* 才开始失去生长能力, 这一菌株的丁酸耐受性虽然远远强于大肠杆菌等模式菌株, 然而要实现产品

的经济化生产与商业化应用, 发酵过程中需满足目的产物的产量达到 50~100 g/L, 生产强度大于 1 g/(L·h), 转化率大于 0.5 g/g, 且副产物应尽可能少<sup>[1]</sup>。因此, 仍需要提高 *C. tyrobutyricum* 对丁酸的耐受性。此外, *C. tyrobutyricum* 在发酵过程中, 对氧较为敏感, 若长时间持续暴露在有氧环境下, 会明显抑制菌株的生长性能和代谢活力, 菌株会停止生长和代谢, 甚至完全死亡, 这严重影响了其生产效率, 制约了丁酸发酵法生产的工业化发展。因此, 提高菌株的环境胁迫耐受性是提高 *C. tyrobutyricum* 细胞工厂产量、转化率和生产效率的迫切需要。

一般来说, 可以通过驯化和物理化学诱变等传统方法来提高菌株环境适应性。Jiang 等<sup>[27]</sup> 采用纤维床生物反应器固定化 *C. tyrobutyricum* 并反复补料分批发酵的同时, 对菌株进行适应性进化。利用 FBB 适应培养, 将菌株在不同丁酸初始浓度 (0~100 g/L) 下进行细胞悬浮培养, 得到丁酸耐受菌株。该菌株对丁酸的耐受性明显提高, 当培养基中加入 40 g/L 丁酸时, 丁酸耐受菌株的生长速率仍保持在 50% 左右。此外, 通过物理诱变来进行菌种改良是一种常用的技术, Zhou 等<sup>[37]</sup> 利用一种高线性能量转移的辐照技术, 即<sup>12</sup>C<sup>6+</sup>离子束辐照, 对接种后的 *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 进行 12 h 的辐照, 结果发现, 随着<sup>12</sup>C<sup>6+</sup>离子辐照能量和剂量的增加, 菌株对丁酸的耐受性大大提高。无机纳米材料的引入可赋予微生物细胞独特的新特性, 包括更强的抗逆性。Liu 等<sup>[38]</sup> 通过利用自组装的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@壳聚糖 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CS) 微球包裹细胞, 以提高 *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 的丁酸耐受性。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CS 涂层的保护大大提高了菌株的耐酸性, 在 pH 为 4 和 5 时, 包裹涂层的菌株的胞内活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 水平明显低于游离细胞。

利用现代分子生物学技术导入抗逆元器件以对微生物细胞进行抗逆强化是更为直接和有效的一种方法<sup>[39]</sup>。*C. tyrobutyricum* 对丁酸胁迫的响应涉及多种抗逆基因的调控, 过表达上述抗逆基因可提高丁酸的耐受性和产量。Suo 等<sup>[24]</sup> 通过过表达 *groESL* 和 *hspG* 等 I 类热激蛋白基因, 使菌株对丁酸的耐受性显著提高。而通过敲除磷酸乙酰转移

表1 *C. tyrobutyricum*底物谱<sup>[5]</sup>  
Tab. 1 Substrate profile of *C. tyrobutyricum*<sup>[5]</sup>

底物	成分	发酵方式	产物	滴度 /(g/L)	产率 /[g/(L·h)]	产量 /(g/g)	改造方法	参考文献		
单糖	葡萄糖	补料分批	丁酸	48.2	0.50	0.38	过表达 <i>pfkA</i> 、 <i>pykA</i>	[22]		
			丁醇	约45	—	0.30	敲除 <i>ack</i> , 过表达 <i>adhE2</i>	[23]		
		FBB反应器	丁酸	52.2	0.41	0.37	过表达 <i>groESL</i>	[24]		
			丁醇	约54	—	0.33	敲除 <i>ack</i> , 过表达 <i>adhE2</i>	[23]		
		分批	丁酸	—	0.20	0.36	敲除 <i>ptb</i>	[25]		
			丁醇	约10.5	约0.24	约0.24	敲除 <i>ack</i> , 过表达 <i>adhE2</i> 、 <i>ctfAB</i>	[26]		
		重复FBB反应器	丁酸	86.9	1.1	0.46	— <sup>①</sup>	[27]		
			丁酸	13.6	—	0.44	敲除 <i>ack</i>	[28]		
		木糖	—	FBB反应器	丁酸	—	0.22	0.35	敲除 <i>ptb</i>	[25]
				分批	丁酸	—	0.22	0.35	敲除 <i>ptb</i>	[25]
果糖	—	FBB反应器	丁酸	49.4	2.60	0.48	—	[20]		
二糖	蔗糖	葡萄糖、果糖	FBB反应器	丁酸	45.8	—	0.43	—	[20]	
			分批	丁醇	18.8	0.20	0.21	敲除 <i>ack</i> , 过表达 <i>adhE2</i> 、 <i>ctfABK</i>	[29]	
麦芽糖	葡萄糖	分批	丁醇	17.3	0.40	0.17	敲除 <i>ack</i> , 过表达 <i>adhE2</i> 、 <i>aglul</i>	[30]		
农业原料及 农业废弃物	咖啡残渣水解物	木糖、阿拉伯糖、 半乳糖	分批	丁酸	34.3	0.36	0.37	过表达 <i>galKETP</i>	[21]	
	甘蔗糖蜜	果糖、葡萄糖	补料分批	丁酸	45.71	—	0.39	过表达 <i>scrBAK</i>	[31]	
	甘蔗汁	果糖、葡萄糖	分批	丁醇	14.8	0.15	0.21	敲除 <i>ack</i> , 过表达 <i>adhE2</i> 、 <i>scrBAK</i>	[29]	
	甘蔗渣水解物	木糖、阿拉伯糖、 半乳糖	补料分批	丁酸	20.9	0.51	0.48	—	[32]	
	菊粉	果糖、葡萄糖	分批	氢气	—	620 ml/(L·h)	3.7 mol/mol	过表达外源 菊粉酶	[33]	
			补料分批FBB 反应器	丁酸	60.4	1.14	0.38	—	[15]	
	玉米秸秆水解物	葡萄糖、木糖	分批	丁酸	16.1	0.38	0.35	过表达 <i>groESL</i>	[14]	
	玉米面粉水解物	葡萄糖、木糖	补料分批FBB 反应器	丁酸	46.0	6.8	0.45	—	[19]	
	玉米纤维水解物	葡萄糖、木糖	补料分批FBB 反应器	丁酸	29.0	2.9	0.47	—	[17]	
	玉米皮水解物	葡萄糖、木糖	重复FBB反应器	丁酸	20.8	0.42	0.39	—	[34]	
小麦秸秆水解物	葡萄糖、木糖	分批	丁酸	20.0	0.21	0.33	—	[35]		
稻草水解物	葡萄糖、木糖	分批	丁酸	16.9	0.40	0.35	过表达 <i>groESL</i>	[14]		
高粱秸秆和甜菜 秸秆水解物	葡萄糖、木糖	分批	丁酸	58.8	1.9	0.52	—	[36]		

①发酵菌株为野生型菌株。

酶基因 *pta* 或乙酸激酶基因 *ack* 也可以提高 *C. tyrobutyricum* 对丁酸的耐受性<sup>[28, 40]</sup>。由于 *C. tyrobutyricum* 是一种典型的专性厌氧菌, 持续的氧气暴露是致命的。Wu等<sup>[41]</sup>利用海藻糖能够保持

辅酶 A 转移酶天然折叠结构, 从而降低氧胁迫和酸胁迫对菌株细胞的破坏, 通过在菌株中引入海藻糖合成途径, 构建了海藻糖合成工程菌。与野生型菌株相比, 工程菌株有更宽的底物谱, 同时

改善了代谢途径，并在持续氧气暴露和酸暴露的条件下比生长速率显著提高。

#### 1.4 理想的一碳气体固定的底盘细胞

一碳底物 (one-carbon,  $C_1$ ) 是一类具有单个碳原子的化合物，其储量巨大，是重要的游离性碳资源，主要来源于劣质天然气、石化化工企业排放的尾气以及生物质加工处理后产生的合成气等，具有来源广泛、制备容易、价格低廉的特点。一碳气体的转化利用在生物制造领域具有巨大的应用前景。在产乙酸菌中 Wood-Ljungdahl 途径 (WLP) 是固定  $CO_2$ 、CO 合成乙酸最有效也是反应步骤最少的途径。与其他微生物固碳方式不同，WLP 并非循环式固碳，而是在严格厌氧的条件下直接将  $CO_2$  和 CO 还原为乙酰基团，这能够明显减少  $CO_2$  的排放<sup>[42]</sup>。如图 4 所示，WLP 是同时还原两个  $CO_2$  分子形成乙酰辅酶 A 的。第一个  $CO_2$  分子被还原为甲基自由基，并与四氢叶酸辅酶结合。第二个  $CO_2$  分子被还原为 CO，该 CO 与 CO 脱氢酶反应中心的镍自由基结合。CO 脱氢酶 (CODH) 和乙酰辅酶 A 合成酶 (ACS) 能够形成一个复合

物，该复合物是 WLP 中的关键酶，它从还原态四氢叶酸中接收甲基，与镍自由基中的 CO 结合，释放辅酶 A 形成乙酰辅酶 A 分子<sup>[43]</sup>。目前，只有少数重组 CODH/ACS 复合物能够进行异源表达，例如在 *C. acetobutylicum* 中进行。该菌与 *C. tyrobutyricum* 有很多相似之处，如均为厌氧、革兰氏阳性异养型梭状芽孢杆菌，都有广泛的底物谱，均为重要的农业废弃物发酵菌株等。*C. acetobutylicum* 是产溶剂型梭菌，主要产物为丙酮、丁醇、乙醇等溶剂。Papoutsakis 等<sup>[44-45]</sup> 在 *C. acetobutylicum* 中发现了几种能够表达 WLP 酶的基因，并在该菌中异源表达了来自永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*) 中 WLP 的 11 种关键基因以及来自厌氧食气梭菌 (*Clostridium carboxidivorans*) 中的 CODH/ACS 复合物，结果表明两个  $CO_2$  固定分支在 *C. acetobutylicum* 中都是有效的，且通过同位素标记法证明了 CO 是  $CO_2$  还原的直接产物。与其他固碳途径相比，WLP 的 ATP 需求量较低，且途径中消耗 NADH 的量恰好与糖酵解途径产生 NADH 的量相等<sup>[46]</sup>，可见 WLP 途径是微生物中理想的固碳途径 (见表 2)。然而，上述以产乙酸菌为代表的自养梭菌虽能直接利用  $CO_2$  和 CO 生产各种高值化学品，但其途径

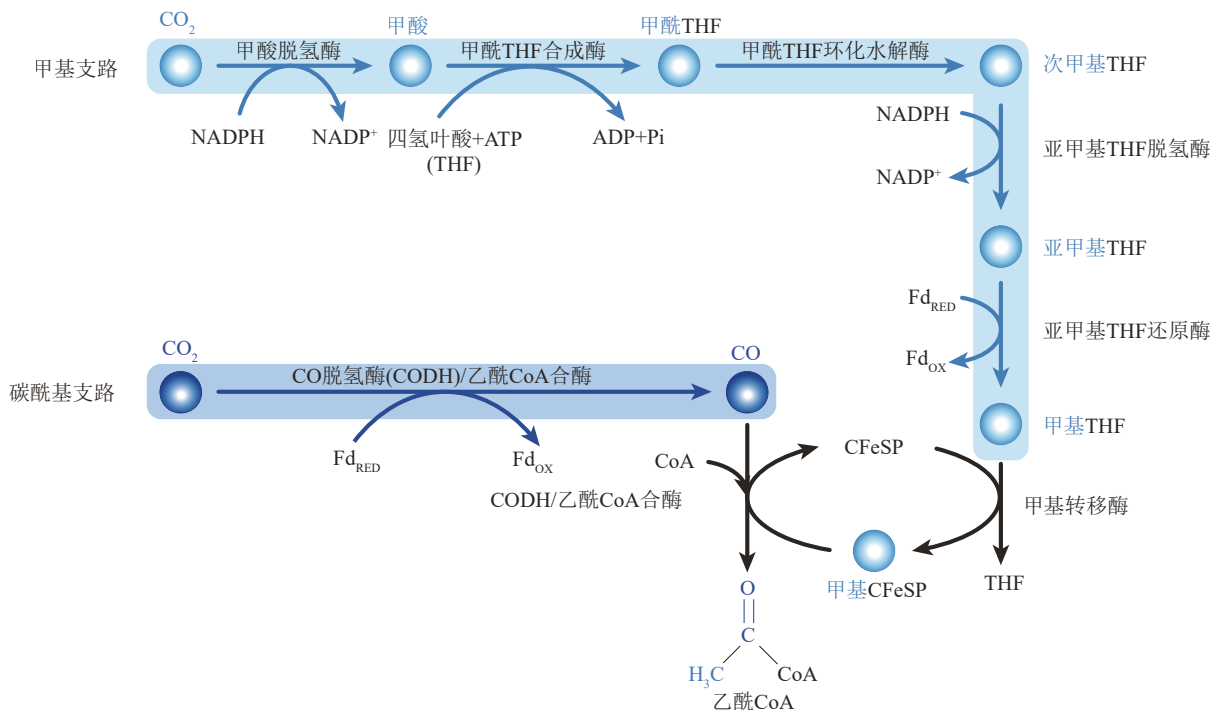


图4 梭菌属中WLP固碳途径<sup>[36]</sup>

Fig. 4 WLP carbon fixation pathway in *Clostridia*<sup>[36]</sup>

表2 CO<sub>2</sub>固定途径比较Tab. 2 Comparison of CO<sub>2</sub> fixation pathways

固碳途径	固碳种类	酶总数	关键酶	酶比活力 <sup>①</sup> /[ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]	能量来源	产物	ATP 消耗
WL途径 <sup>[47-48]</sup>	CO <sub>2</sub>	8	甲酸脱氢酶 CO脱氢酶	439 14 000	氢气	乙酰辅酶A	<1
还原性甘氨酸途径 <sup>[49]</sup>	CO <sub>2</sub>	5	还原性甘氨酸裂解复合物	—	—	乙酰辅酶A	2
卡尔文循环 <sup>[50]</sup>	CO <sub>2</sub>	11	RuBisCO	304.3	光	3-磷酸甘油醛	9
还原性TCA循环 <sup>[50]</sup>	CO <sub>2</sub>	8	2-酮戊二酸合酶 ATP-柠檬酸裂合酶	35.2 26.7	光和硫	乙酰辅酶A	2
DC/HB循环 <sup>[50]</sup>	CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	14	4-羟基丁酰辅酶A脱水酶	—	氢和硫	乙酰辅酶A	5
HP/HB循环 <sup>[50]</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	15	4-羟基丁酰辅酶A脱水酶	—	氢和氧	乙酰辅酶A	6
3-HP双循环 <sup>[51-52]</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	18	丙二酰辅酶A还原酶 丙酰辅酶A合酶	80 22	光和硫	丙酮酸	7

①所有酶的比活力数据都是从BRENDA数据库中手动获得的。这里显示的是数据库中最大的酶比活力。

自身的代谢速率较低，并需要较高的能量供给，产量和生产强度难以满足工业化需求，而异养梭菌具有较强的目的产物生产能力，同为厌氧梭状芽孢杆菌的 *C. tyrobutyricum* 中也存在编码 WLP 部分酶的基因，如甲酰四氢叶酸合成酶 (EC 6.3.4.3)、甲酰基四氢叶酸环化水解酶 (EC 3.5.4.9) 以及亚甲基四氢叶酸脱氢酶 (EC 1.5.1.5)。因此，未来若在 *C. tyrobutyricum* 中整合 WLP 固碳途径，有望进一步碳资源高效利用并实现精细化学品的工业化生产。

### 1.5 特殊的能量代谢

底物水平磷酸化和氧化磷酸化是微生物中重要的能量代谢方式，但其无法全面阐述厌氧梭菌在物质代谢和能量代谢中的所有现象，且厌氧梭菌发酵过程中缺乏氧化磷酸化途径，因此一般认为厌氧梭菌中还存在着一种基于黄素的电子歧化反应<sup>[53]</sup>。梭菌存在的电子歧化酶主要是丁酰辅酶A脱氢酶/电子转移黄素蛋白 (butyryl-CoA dehydrogenase/electron transfer flavoprotein complex, Bcd/Etf) 以及 NADH 依赖的还原型铁氧还蛋白:NADP<sup>+</sup>氧化还原酶 (NADH-dependent reduced ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase, NfnAB)。2008年 Li 等<sup>[54]</sup> 在克氏梭菌 (*C. kluyveri*) 中发现 Bcd/Etf，并验证了其反应机制：巴豆酰辅酶A转化为丁酰辅酶A偶联 NADH 将氧化态铁氧还蛋白还原为还原态铁氧还蛋白，还原态铁氧还蛋白又在氢化酶的作用下氧

化同时偶合 ATP 的形成。Wang 等<sup>[55]</sup> 在 *C. kluyveri* 中发现纯化的 NfnAB 能够偶联放能反应与吸能反应，利用放能反应放出的能量来推动吸能反应的进行，从而达到能量守恒。此外，铁氧还蛋白:NAD<sup>+</sup>氧化还原酶 (Rnf) 偶联跨膜的化学渗透 H<sup>+</sup> 或 Na<sup>+</sup> 梯度也可能是嗜酸梭菌 (*C. aceticum*)、永达尔梭菌 (*C. ljungdahlii*) 等产乙酸菌能量守恒的方式之一<sup>[56]</sup>。Mayer 等<sup>[56]</sup> 发现 *C. aceticum* 中同时含有 Rnf 复合物以及细胞色素且 Rnf 复合物偶联跨膜化学渗透 H<sup>+</sup> 或 Na<sup>+</sup> 梯度，结果表明该菌利用依赖 H<sup>+</sup> 的能量守恒机制。

## 2 酪丁酸梭菌系统生物学方法的研究进展

### 2.1 基因组序列及注释

目前已报道的 *C. tyrobutyricum* 共有 28 个菌株 (表 3)。其中，*C. tyrobutyricum* KCTC 5387 (ATCC 25755) 是完成了全基因组测序的 3 个菌株之一，其基因组由一个 3.07 Mb 的环状染色体 (3 071 606 bp) 以及一个 63 kb 的质粒 (pCTK01: 62 831 bp) 组成<sup>[13]</sup>，同大多数 *C. tyrobutyricum* 一样，KCTC 5387 含有 2 段 CRISPR 列阵。同样，完整测序组装的还有 L319 和 W428，其中由本课题组完成的 L319 的基因组测序联合了第二代和第三代高通量测序技术，更深入准确地获得了 L319 的全基因组

表3 *C. tyrobutyricum* 菌株基因组信息Tab. 3 Genomic information of *C. tyrobutyricum*

菌株名称	测序程度	基因组大小/Mb	G+C/%	蛋白数量	rRNA	tRNA	其他RNA
KCTC 5387	Complete	3.13	31.0	3015	19	63	5
L319	Complete	3.09	31.0	2922	19	63	5
W428	Complete	3.07	30.9	2945	16	51	5
Cirm BIA 2237	Chromosome	3.16	30.8	3069	3	52	5
FAM22553	Scaffold	3.09	31.0	2992	18	63	5
FAM22552	Scaffold	3.05	30.9	2923	18	68	5
DSM 663	Scaffold	3.15	30.7	3091	3	35	5
1001713B170207_170306_A1	Scaffold	3.02	31.0	2831	4	57	5
1001713B170207_170306_A10	Scaffold	3.05	30.5	2881	4	60	5
1001283B150210_160208_G3	Scaffold	3.07	30.5	2869	5	52	5
1001283B150210_160208_D6	Scaffold	3.00	30.5	2791	4	58	5
Cl_188	Scaffold	3.01	30.5	2876	3	40	5
Cl_171	Scaffold	3.04	30.5	2938	3	36	5
Cl_239	Scaffold	3.33	30.5	3219	4	48	5
Cl_117	Scaffold	3.11	31.0	3034	4	46	5
Cl_238	Scaffold	3.23	30.5	3115	4	30	5
Cl_84	Scaffold	3.05	30.5	2954	3	52	5
Cl_82	Scaffold	3.01	30.5	2916	4	45	5
Cl_64	Scaffold	3.17	31.0	3087	4	46	5
Cl_52	Scaffold	3.09	30.5	2940	2	42	5
Cl_80	Scaffold	3.09	30.5	3049	3	34	5
Cl_29	Scaffold	3.09	30.5	2988	4	37	5
MGYG-HGUT-00125	Scaffold	3.26	30.5	3101	9	63	5
24853	Scaffold	3.00	30.5	2664	4	59	5
ATCC 25755	Contig	3.01	30.5	2908	4	46	5
DIVETGP	Contig	3.02	30.5	2907	4	46	5
UC7086	Contig	3.06	30.5	2943	4	48	5
IFP923	Contig	3.19	30.5	3090	10	60	5

信息。L319基因组大小为3 086 463 bp，包含一个环状染色体和一个未命名环状质粒，大小分别为3 023 639 bp和62 824 bp，根据L319的基因组注释，该基因组中含有3076个基因和2989个CDS，rRNA基因数量（5S、16S、23S）分别为7、6、6，tRNA基因数量为63<sup>[57]</sup>。

目前，根据NCBI中所提供的信息，28个菌株的基因组大小在2.53~3.32 Mb之间，且28个菌株的G+C（%）基本上都分布在30.8%~31.0%。其中有3株菌株的基因组完成了完整测序组装，1个菌株处于Chromosome阶段，20个菌株在Scaffold阶段，4个菌株处于Contig阶段。上述关于*C. tyrobutyricum*基因组信息的揭示为后续在其中开发

遗传操作工具以及目的产物代谢途径的设计、构建与优化提供了信息支撑。例如，通过对基因组上CRISPR阵列和Cas蛋白的注释与分析，可以在该菌中构建内源性的CRISPR基因组编辑工具。

## 2.2 多组学分析方法的建立

近年来，由于DNA/RNA测序以及质谱检测技术的快速发展，基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等多组学策略的运用，使得与微生物代谢相关的数据来源更为丰富且更容易获取，同时也能够帮助我们改造、优化和利用工程菌株<sup>[58]</sup>。

Li等<sup>[59]</sup>首次将比较转录组学研究应用到

*C. tyrobutyricum* 中, 将产氢细菌 *Ethanoligenens harbinense* 中的氢化酶基因 (*hyd2293*) 在 *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 中进行过表达。得到的工程菌共检测出 3047 个基因, 占 *C. tyrobutyricum* 全基因组的 97.7%。与野生型菌株相比, 在以葡萄糖为底物的发酵过程中, 共发现 666 个差异表达基因, 其中上调基因 82 个, 下调基因 584 个。通过比较转录组学确定了编码中心代谢途径的主要基因, 并对其表达变化进行了研究, 以解析发酵过程中发生的变化<sup>[59]</sup>。转录组分析揭示了基因表达在中心碳代谢、能量代谢和芽孢形成过程中的变化, 也说明了 *C. tyrobutyricum* 代谢的复杂性, 为后续代谢工程提高丁酸产量提供了有力的帮助。

通过蛋白组学对不同菌株进行分析, 可明确菌株的代谢机理, 帮助改造菌株的环境耐受性。Janssen 等<sup>[60]</sup> 利用 2DE-MALDI-TOF/TOF-MS 进行蛋白质组学分析, 综合比较 *C. acetobutylicum* 的产酸和产溶剂稳态细胞。Mao 等<sup>[61]</sup> 通过比较野生型和高丁醇耐受菌在产酸阶段和产溶剂阶段的差异表达蛋白, 从而分析了 *C. acetobutylicum* 的丁醇耐受机制。Jia 等<sup>[62]</sup> 联合比较基因组学与蛋白质组学对 SMB\_G1518-1519 基因敲除菌株与原始菌株进行比较, 证明了 SMB\_G1518-1519 基因是丁醇耐受性的负调控因子。Sivagnanam 等<sup>[63]</sup> 通过鸟枪法蛋白组学技术来监测在以木糖为底物的条件下菌株生长过程中的代谢行为。Ma 等<sup>[64]</sup> 首次对 *C. tyrobutyricum* 采用凝胶-质谱/质谱 (GeLC-MS/MS) 联用技术, 构建了胞内蛋白表达数据集, 利用比较蛋白质组学方法, 确定出核心代谢途径中调节碳、能量以及氧化还原平衡的关键蛋白, 并研究了宿主细胞对丁醇产生的调节作用。

有研究者通过转录组学对 *C. acetobutylicum* 产酸期到产溶剂期的转变进行了更详细的了解<sup>[65]</sup>, 但单一的转录组学数据不足以确定整体的代谢变化, 而利用代谢组学、同位素示踪剂和定量通量模型, 能够得出与产酸-产溶剂转变相关的代谢变化<sup>[66]</sup>。通过基于 GC-MS 的代谢组学分析, 可研究在产酸期以及产溶剂期 *C. acetobutylicum* 与丁醇应激相关的细胞内生化变化, 从而解释丁醇对该菌的胁迫, 同时也说明了菌株对于丁醇胁迫适应

性<sup>[67]</sup>。此外, 还可以利用拉曼光谱辅助代谢组学研究, 对 *C. acetobutylicum* 发酵进行实时监测, 通过高效液相色谱 (HPLC) 对发酵培养基进行分析, 开发出偏最小二乘 (PLS) 模型, 从而实时监测发酵产物成分变化<sup>[68]</sup>。基因组学解释了微生物的多种遗传特征、进化历史等, 通过比较基因组学对比已知功能的菌株, 能够高效、准确地预测目标菌株的潜在功能以及得到各菌株之间的表达调控网络; 转录组学通过比较生物过程前后基因的表达水平, 提供菌株在不同状态下的表达情况, 从而推断出目标基因的功能、确定代谢途径的关键基因以及研究基因调控机制; 蛋白质组学通过分析蛋白质之间的差异以及相互作用来反映微生物对环境变化产生的代谢变化; 相比于上游的基因组学、转录组学和蛋白质组学研究, 代谢组学能够将“组学”从基因层面扩展至小分子领域, 实现将小分子整合到系统生物学中, 并联合其他组学技术实现系统研究<sup>[69]</sup>。然而, 单一的组学研究策略往往很难达到理想的结果, 通过采用多组学联合研究策略, 从基因水平—转录水平—蛋白质水平—代谢物水平系统研究细胞的代谢调控规律, 有望更精准地理解并解析微生物细胞的生理特性, 并为后续的代谢工程改造提供靶点。

## 2.3 代谢模型的构建

微生物代谢模型提供了一种系统的方式来获得数据, 并通过模拟将其转化为表型行为, 而基因组学数据构成了模型开发的基础。基因组规模的代谢模型 (GSM) 已成为生物技术中研究代谢网络的重要工具<sup>[70]</sup>。在后基因组时代, 已经开发了各种组学技术来收集高通量测序数据, 从基因型到表型水平进行表征。目前, 已对部分梭菌建立了基因组尺度的代谢模型, 这些模型通过不同的方法和角度对各种梭菌的一些生理特性进行模拟, 对于人们更好地理解与应用这些梭菌有着指导作用。

最早的代谢模型之一是由 Papoutsakis 等<sup>[71]</sup> 在 1984 年构建出来的 *C. acetobutylicum* 代谢模型, 在 1999 年他们又建立了一个小型化学计量模型, 该模型包括核心糖酵解途径、产酸途径和溶剂化途

径<sup>[72]</sup>。通过上述代谢模型，可以解释 *C. acetobutylicum* 是如何产生丁醇及其副产物醋酸盐以及丁酸盐的。之后的数年里，构建出了多种 *C. acetobutylicum* 的代谢模型<sup>[10-11]</sup>。然而，所有这些模型都只包括代谢途径，没有任何关于应激反应中代谢变化的信息。2014年 Satyakam 等<sup>[73]</sup> 构建了 *C. acetobutylicum* 的第二代基因组代谢模型 *iCac802*。在该模型中增加了前期模型中没有的新反应和途径，如 TCA 循环，完整的脂肪酸合成途径，以及增加嘌呤、嘧啶和钴胺的生物合成途径。同时利用 CoreReg 方法将基因表达数据整合到 *iCac802* 中，并预测了细胞对生理应激源丁醇和丁酸盐反应的基础调节点。

此外，2016年 Thompson 等<sup>[74]</sup> 构建了嗜热梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的基因组尺度代谢模型 *iAT601*，利用优化后的模型预测了在不同纤维糊精物种被同化的基础上观察到的细胞产量的差异。该模型能够在各种条件下准确预测复杂的细胞表型，并作为模型引导菌株设计和代谢工程的高质量平台构建，以生产需要的工业生物燃料和化学品。之后在 2020年，Garcia 等<sup>[75]</sup> 构建了一种更新的 *C. thermocellum* 基因组代谢模型 *iCBI655*，该模型是一个全面系统的数据库，连贯地代表了所有可用的遗传、基因组和代谢知识。

然而，遗憾的是，目前关于 *C. tyrobutyricum* 的代谢模型还未见报道，但其他梭菌代谢模型的建立和完善对于 *C. tyrobutyricum* 代谢模型的开发具有重要指导意义。构建标准代谢模型的过程为：代谢草图构建、模型修正、数学模型转换、模型验证、模拟计算<sup>[76]</sup>。首先，将一一对应的基因-蛋白质-代谢反应 (GPR) 组合成 GPR 耦联，这些 GPR 构成的集合就是代谢网络草图；模型修正过程主要是对错误信息的修正以及遗漏信息的填补，从而使代谢模型正确反映菌株的生理表型；通过将代谢模型的生物形式转换成数学矩阵的形式，可以实现代谢模型的模拟计算；通过限制某些氨基酸、维生素或核苷酸通量，预测目标菌株的营养缺陷型，再通过湿实验过程中的缺失实验来验证预测的准确性；最后用数学软件对模型进行模拟计算，从而起到验证、预测功能<sup>[77]</sup>。传统代谢模型是以底物的利用作为约束条件，对菌株进行

模拟分析，在底物吸收速率较低的情况下能够较为精确地预测，然而随着底物吸收速率的增加，模拟值将远大于实验值。第二代生物网络模型在传统代谢模型的基础上整合了组学、多生物模型、全细胞模型、约束条件等方法，从而提高模型预测的准确性<sup>[78]</sup>。因此，未来我们可以利用已解析的 *C. tyrobutyricum* 全基因组信息，并结合 ModelSEED (<https://modelseed.org/>) 等数据和软件平台进行首个 *C. tyrobutyricum* 基因组尺度代谢网络模型 (GSM) 的搭建，在此基础上可以整合多组学的分析数据以及各种生理学数据完善上述的代谢模型，从而开发出完善的 *C. tyrobutyricum* 基因组尺度的代谢模型，并为目标产物合成速率的模拟与强化提供理论指导。

### 3 酪丁酸梭菌遗传操作工具的开发

#### 3.1 合成生物元件的挖掘与表征

通常可以利用一些合成生物元件在基因进行转录和翻译的过程中发挥作用，从而对基因或者蛋白的表达进行调控。因此，启动子、核糖体结合位点 (ribosome binding site, RBS)、SD (Shine-Dalgarno) 序列和终止子等基本调节元件的优化是调节相关基因和蛋白表达的基础<sup>[79]</sup>。

启动子是最基本的组成部分，是合成生物学核心元件，是在转录水平上实现基因高效、精准表达调控的最关键因素之一。目前在梭菌属中已发现了多种诱导型或组成型启动子 (表 4)。Tao 等<sup>[80]</sup> 在 *C. cellulolyticum* 的 *mspI* 缺陷亲本菌株 ( $\Delta 2866$ ) 中插入合成启动子 (P4) 和内源性启动子 (P2)，分别产生染色体整合子 P4-2866 和 P2-2866。结果表明，在前 150 h 的发酵过程中，20g/L 的高浓度纤维素抑制了亲代菌株对纤维素的降解；而 P4-2866 和 P2-2866 分别水解了 29% 和 53% 的纤维素，并且两个工程菌株都表现出更高的生长速度和更高的细胞生物量。同样， $\Delta 2866$  亲本菌株表现出比野生型菌株更好的耐热性，而启动子的插入进一步增强了菌株的耐热性。进一步研究发现，在野生型菌株和乳酸产生缺陷突变株中插入启动子，细胞生长和纤维素降解得到类似

表4 梭菌表达系统常用启动子

Tab. 4 Common promoters of *Clostridium* expression systems

启动子	类型	性质	参考文献
P <sub>ptb</sub>	组成型	控制 <i>ptb</i> 的表达	[82]
P <sub>thl</sub>	组成型	控制 <i>thl</i> 的表达	[33]
P <sub>hydA</sub>	组成型	电子代谢关键酶基因 <i>hydA</i> 的启动子	[83]
P <sub>ptk</sub>	诱导型	阿拉伯糖诱导	[84]
P <sub>xylA</sub>	诱导型	受木糖诱导	[85]
P <sub>bgal</sub>	诱导型	受乳糖诱导	[86]
P <sub>celC</sub>	诱导型	受纤维素诱导	[87]
P <sub>Pcm-2tetO1</sub>	诱导型	受四环素诱导	[88]

的改善<sup>[80]</sup>。此外,来自于控制硫解酶基因表达的P<sub>thl</sub>启动子广泛存在于多种梭菌中,其目前也是*C. tyrobutyricum*中最常用的组成型强启动子<sup>[81]</sup>。除了上述的组成型启动子,在*C. tyrobutyricum*中还有受到阿拉伯糖、乳糖、木糖等诱导的诱导型启动子(表4)。

复制子是质粒复制的关键元件,它可以影响质粒的拷贝数和遗传稳定性,进而对基因表达、宿主代谢和最终产物的形成产生重要影响。Yu等<sup>[89]</sup>考察了不同复制子对*C. tyrobutyricum*质粒的转化效率、质粒稳定性、蛋白表达水平和丁醇生物合成的影响。将质粒pMAD72中的基因*adhE2*以及硫解酶启动子P<sub>thl</sub>分别连接到质粒pMTL82151、pMTL83151、pMTL84151和pMTL85151上,构建出4种穿梭质粒。结果表明在所研究的4个质粒和复制子中,含有pBP1复制子的pMTL82151质粒具有最高的转化效率、质粒稳定性、基因表达和丁醇生物合成。

绿色荧光蛋白(GFP)在紫外光照射下能发出绿色荧光,成为生物学研究和生物过程监测细胞生长和基因表达的最常用的报告基因之一。然而,在厌氧条件下GFP不能作为梭状芽孢杆菌的荧光报告基因<sup>[90]</sup>,阻止功能性GFP及其衍生物在梭状芽孢杆菌等厌氧菌中表达的主要挑战是需要分子O<sub>2</sub>来催化形成荧光发色团的氨基酸脱氢。而基于黄素单核苷酸(FMN)的荧光蛋白(FbFPs),在没有O<sub>2</sub>的情况下也可以显示出强信号<sup>[91]</sup>。目前,FbFPs已被成功地用作包括几种梭状芽孢杆菌在内的厌氧或兼性厌氧细菌的荧光标记,用于蛋白表达的监测、复制子的评价、启动子强度的评价以及转录抑制的验证等。Cheng等<sup>[92]</sup>利用FbFP蛋白

Bs2作为报告蛋白对*C. tyrobutyricum*基因表达进行了评估,通过*C. tyrobutyricum*和*C. acetobutylicum*的P<sub>thl</sub>启动子分别构建了两个质粒Ptyr-Bs2和Pace-Bs2,用于表达Bs2,共同接合至*C. tyrobutyricum*和*C. acetobutylicum*中,结果发现Bs2蛋白的表达显著提升了荧光强度,且与Pace-Bs2相比,Ptyr-Bs2的荧光强度在*C. tyrobutyricum*和*C. acetobutylicum*中分别增加了1.2倍和1.7倍,表明*C. tyrobutyricum*来源的P<sub>thl</sub>启动子比*C. acetobutylicum*来源的P<sub>thl</sub>启动子强,该结果证明了FbFP在确认转化、监测*C. tyrobutyricum*和*C. acetobutylicum*基因表达方面的有效应用。

由于较低的转化效率、限制性修饰系统的存在,使得高效的基因转化体系受到阻碍。构建新型穿梭体系,有利于解决这些问题。Bao等<sup>[93]</sup>开发了一种新型穿梭质粒(pYL001),用于切去*C. cellovorans*的两个主要RM系统(Cce743 I和Cce743 II)的所有限制性位点,并构建了三个pYL001衍生重组质粒,这些质粒通过改进后的电转化法,在没有甲基化的条件下转化进入*C. cellovorans*中,大大提高了转化效率。目前,有不少关于*C. acetobutylicum*与大肠杆菌(*Escherichia coli*)之间穿梭质粒的研究,该类型的质粒至少需要一个复制起点以及一个可选择标记物,还必须包括具有接合转化功能的*E. coli*复制起点。Heap等<sup>[94]</sup>设计并构建了*Clostridium-E. coli*穿梭质粒标准化模块化系统,极大地提高了质粒的构建效率。Oh等<sup>[95]</sup>构建了三种*Clostridium-E. coli*穿梭质粒(pKBA411-MCS, pKBE411-MCS和pKBM411-MCS),考察了它们对拜氏梭菌(*C. beijerinckii*)转化效率的影响,结果表明,转化效率主要取决于复制起点。

### 3.2 遗传转化方法的开发与优化

遗传转化系统是指通过将外源DNA或质粒导入到宿主细胞中,且进行分子水平的操作,从而使其宿主性状稳定遗传<sup>[96]</sup>。目前来说,*C. tyrobutyricum*常用的遗传转化方法主要有电穿孔转化法以及接合转移法。

电穿孔转化法是利用高脉冲电压破坏细胞膜电位,使外源DNA或质粒通过膜上形成的小孔,

进而导入宿主细胞内。电穿孔转化法的效率高、适用性广，除了质粒外，还可以转染大的基因组(>65 kb)。但电穿孔转化会导致细胞的高死亡率，且外源DNA和细胞用量大，需要根据不同细胞类型来优化电穿孔的实验条件<sup>[97]</sup>。接合转移法是一种自然状态下不同菌种间质粒的相互传递，需要细胞与细胞之间相互接触从而进行转移的过程。接合转移广泛应用于细胞尤其是非转化细菌的转移，具有温和且转化效率高的特点。在接合过程中，多种*E. coli*菌株能够将小型自主载体转移到梭状芽孢杆菌受体中<sup>[98]</sup>，如利用*E. coli* CA434作为供体菌株将穿梭质粒转移到*C. tyrobutyricum*中。

然而，与革兰氏阴性细菌不同，*C. tyrobutyricum*的细胞拥有丰富的肽聚糖外部网络，这在物理上限制了外源DNA进入细胞的通道。因此，革兰氏阳性菌株的电转化效率一般低于革兰氏阴性菌株<sup>[99]</sup>。此外，遗传转化的另一个障碍来自宿主细胞的限制性修饰(restriction-modification, RM)系统。如果在一个序列上没有宿主特定的修饰，或者含有自然界不存在的附加修饰，那么该DNA将会被当作是“外来的”，于是RM系统则会对这些未经天然修饰的外源DNA进行降解。因此，RM系统可能是*C. tyrobutyricum*中导致遗传转化效率低的根本原因。梭菌属的细菌可以通过加入细胞壁弱化剂，使那些非特异性核酸酶失活或消除以保护外来DNA免受高度特异的限制性内切酶的影响。

有研究者从*C. tyrobutyricum*的基因组序列中分析确定了8种可能出现的RM系统，包括1个假定的I型RM系统和7个II型RM系统<sup>[100]</sup>。一般来说，在染色体上，同一个RM系统的功能亚基(I型RM系统为Rease、MTases和S亚基<sup>[101]</sup>；II型RM系统为Rease和MTases<sup>[102]</sup>)位于相同操纵子之间或彼此相邻，这有助于不同亚基的共表达，形成功能性RM系统。Zhang等<sup>[100]</sup>在此基础上预测*C. tyrobutyricum*中最有可能是I型RM系统。II型系统是最复杂的RM系统，由三个亚基组成，形成五聚体蛋白(2Rases+2MTases+S)<sup>[103]</sup>。2MTases+S部分起甲基转移酶的作用，而Rease亚基是限制性内切酶活性所必需的。虽然根据蛋白质序列信息*C. tyrobutyricum*中的I型RM系统的识别序列是未知的，但是可以合理地推测，缺失Rease亚基

(CTK\_C27620)可以消除限制性内切酶活性，从而提高转化效率。研究表明，删除限制性内切酶也可以提高电转化效率<sup>[104]</sup>。利用内源性CRISPR-Cas系统敲除Rease亚基CTK\_C27620，生成突变体ΔRMI，然后使用质粒pMTL82151测试突变体ΔRMI的接合效率。接合转化结果为：ΔRMI的接合效率达到 $(1.45 \pm 0.15) \times 10^3$  CFU/mL供体，与野生型菌株 $(3.95 \pm 0.35) \times 10^2$  CFU/mL供体相比提高了3.7倍。可以发现，通过删除Rease亚基可以提高*C. tyrobutyricum*通过接合方式接受外源DNA的能力。

### 3.3 基于CRISPR的基因组编辑工具的开发

簇状规则间隔短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR-associated(Cas)共同组成CRISPR/Cas系统，该系统是细菌和古细菌中的一种RNA引导的免疫系统，能够防御外来入侵<sup>[105]</sup>。CRISPR RNA(crRNA)与特定的DNA序列特异性识别结合，Cas蛋白通过引导RNA(Guide RNA, gRNA)的引导在特定位点将目标DNA双链切断<sup>[106]</sup>，产生基因缺口(double-strand breaks, DSBs)，从而实现“打靶”<sup>[107]</sup>，最后通过同源定向修复(homology-directed repair, HDR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)等方式进行基因修复，达到基因编辑的目的<sup>[107]</sup>。目前，根据Cas蛋白的结构及其进化关系，可将CRISPR/Cas系统分成6种类型：I型~VI型，其中I型、III型和IV型系统的Cas蛋白均是多亚基蛋白质，II型、V型和VI型系统的Cas蛋白均是单亚基蛋白质<sup>[108]</sup>。相较于多亚基的系统，单亚基系统(如II型CRISPR/Cas系统)能够通过单个多功能域的Cas蛋白切割DNA或RNA，且其操作相对简单，得到广泛应用。在II型CRISPR/Cas系统中，CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12a和CRISPR/Cas13a应用较为成功和广泛<sup>[109]</sup>。虽然CRISPR-Cas9/Cas12a是十分强大的基因组工具，但异源Cas9/Cas12a通常难以引入细菌中。Michael等<sup>[110]</sup>发现在没有gRNA的情况下表达Cas9蛋白会显著降低*C. pasteurianum*中基因的转化效率，将缺少gRNA的Cas9蛋白编码基因的表达框导入至质粒pMTL85141中，生成

p85Cas9, 导致转化效率降低两个数量级以上, 而通过切除 p85Cas9 中 *cas9* 基因启动子, 构建的 p85delCas9 转化至 *C. pasteurianum*, 其转化效率恢复到典型水平, 实现了异源 II 型 CRISPR-Cas9 系统在 *C. pasteurianum* 中的基因组编辑。

大多数原核生物都包含天然的 CRISPR-Cas 系统, 通过基因组工程可以通过利用这些内源性免疫系统来实现<sup>[111]</sup>。与 CRISPR-Cas9/Cas12a 技术相比, 基于内源性 CRISPR-Cas 系统更容易在原核生物中构建基因组编辑工具, 且这种方法不需要在细菌或古细菌细胞内异源表达 Cas 蛋白<sup>[112]</sup> (图 5)。Michael 等<sup>[110]</sup> 在 *C. pasteurianum* 中实现利用内源性 I-B 型 CRISPR-Cas 系统进行无标记基因改造, 为 *C. pasteurianum* 的 I-B 型 CRISPR-Cas 机制的原理性重新调整提供了证据, 从而实现高效无标记基因组编辑。Zhou 等<sup>[113]</sup> 利用特定的内源性 I-B 型

CRISPR-Cas 系统成功删除了 *C. butyricum* 中的 *spo0A* 和 *aldh* 基因, 敲除效率达到 100%。Zhang 等<sup>[111]</sup> 利用 I-B 型 CRISPR-Cas 系统对 *C. tyrobutyricum* 进行基因组编辑的研究, 利用乳糖诱导启动子进行 CRISPR 阵列的表达, 显著提高了其转化效率, 并切除了 *spo0A* 基因, 证明了利用可诱导的内源性 CRISPR-Cas 系统, 可以实现 *C. tyrobutyricum* 有效的基因组编辑。

然而, 除了常见的基因删除和敲入外, 对微生物细胞进行代谢调控往往还涉及对关键基因的表达进行调节, 如基因的激活或抑制等。而外源性 CRISPR-Cas 系统为基因的表达调控提供了有效的工具 (图 5)。如上所述, 由于表达异源 Cas9 的质粒在梭菌中较难转化, 有研究者致力于在梭菌属尤其是 *C. tyrobutyricum* 中开发外源性 CRISPR-Cas 系统, 以提高基因组编辑工具的应用范围。2020 年

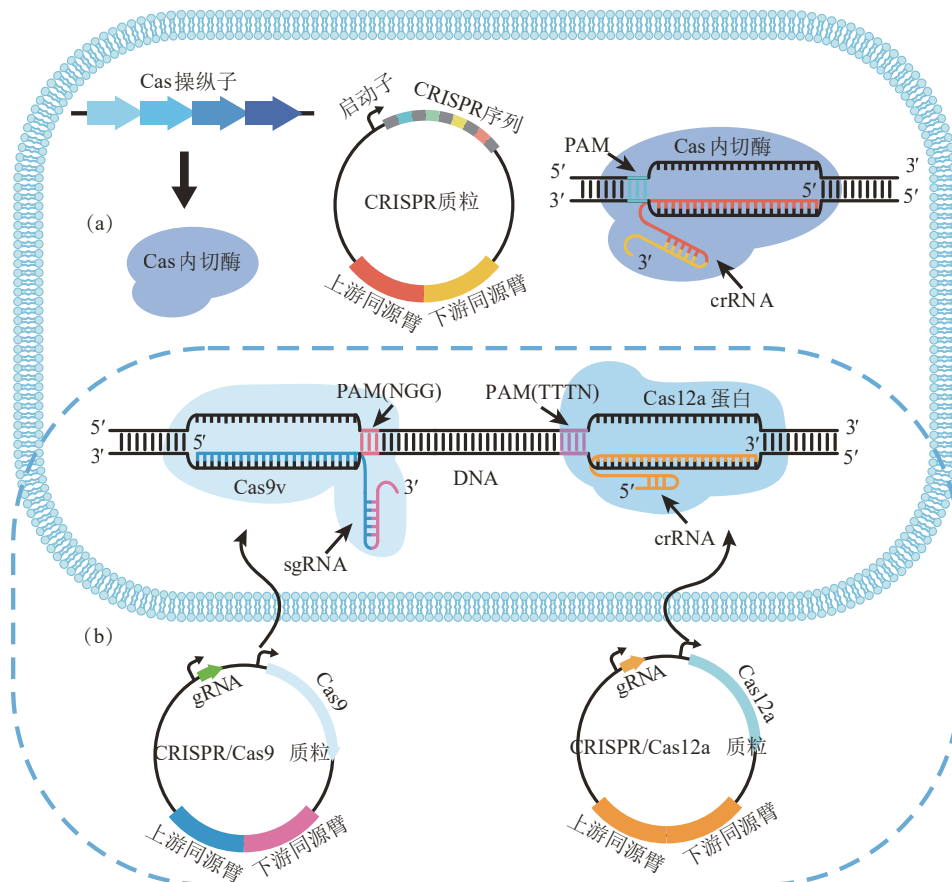


图 5 梭菌属中内源性/外源性 CRISPR/Cas 系统作用机制

(a) 内源性 CRISPR/Cas 系统; (b) 外源性 CRISPR/Cas 系统

Fig. 5 Mechanisms of the endogenous/exogenous CRISPR/Cas systems in *Clostridium* spp.

(a) endogenous CRISPR/Cas system; (b) exogenous CRISPR/Cas system

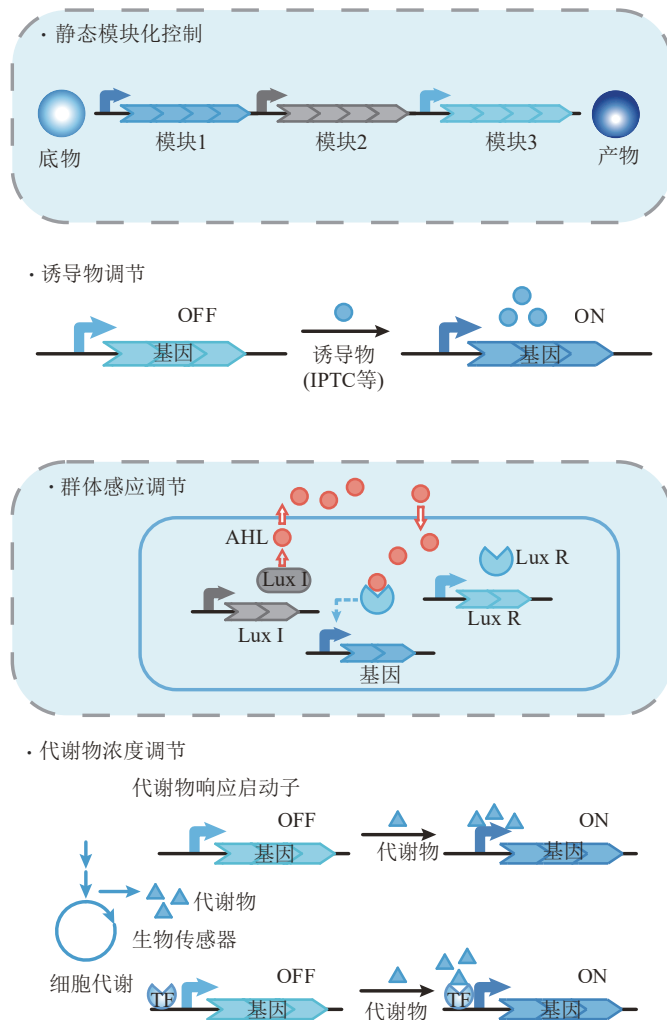
Zhang 等<sup>[100]</sup>发现, I 型限制性核酸内切酶的缺失可以使接合效率提高3.7倍, 由于接合效率的提高, 以前在 *C. tyrobutyricum* 中无法实现的CRISPR-Cas9/Cpf1 系统可以成功用于突变体  $\Delta RMIANP$  的基因组编辑, 从而使 *C. tyrobutyricum* 在生物燃料和生产方面的潜力得到释放。

## 4 酪丁酸梭菌高版本底盘细胞的创制与应用

### 4.1 代谢调控策略的建立

代谢调控的策略一般包括静态调控和动态调

启动子调控



控 (图6), 为了得到目标产物或提高产物产量, 通常利用改变或调控细胞内关键代谢途径或是通过引入/敲除代谢途径的相关基因等方法。然而, 对细胞资源需求的不断增加, 往往破坏了细胞的正常生理平衡, 使得细胞正常生长受到阻碍, 进而降低生产力。因此, 对代谢进行精准的调控, 使细胞生长和产物合成达到平衡状态是十分重要的<sup>[114]</sup>。

静态调控的基本策略是通过改变启动子的强度对基因的表达水平进行调节, 最终改变代谢通量<sup>[115]</sup>。Cheng 等<sup>[92]</sup>开发了一种能够监测 *C. tyrobutyricum* 细胞内启动子的强度并进行转录调控的荧光蛋白Bs2 基因表达报告系统, 证明了提高启动子强度能够提高异丙醇的产量。Yu 等<sup>[116]</sup>研究对比了不同启

RNA调控

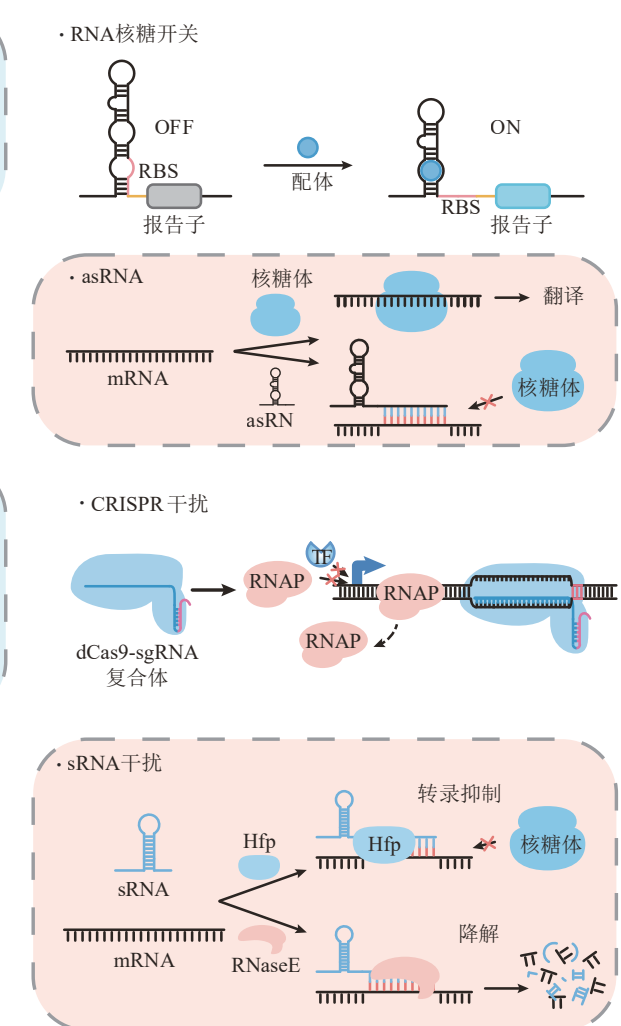


图6 代谢调控策略

Fig. 6 Metabolic regulation strategies

动子对 *C. tyrobutyricum* 丁醇产量的影响, 发现更强的组成型启动子可用于提高菌中 *adhE2* 基因的表达, 从而得到更高的丁醇产量。Feng 等<sup>[117]</sup> 评估了四种表达 *atfI* 的启动子, 确定  $P_{adh}$  启动子可以使 *atfI* 基因最适当表达, 从而使 *C. tyrobutyricum* 产生更多乙酸丁酯。Yang 等<sup>[118]</sup> 基于双报告子系统 (*catP-lacZ*) 以及广泛应用的强启动子  $P_{thi}$ , 建立了一种快速生成产溶剂性梭菌合成启动子库的有效方法, 得到的人工启动子包含两个模块组件 (核心启动子区和 RBS 与起始密码子之间的间隔区), 结果最强的启动子比原始表达部分  $P_{thi}$  的活性高 10 倍以上。适当强度的启动子可以在转录水平上提供强大的开关, 对单个基因或基因簇进行微调, 对于构建代谢途径十分重要。动态调控解决了静态调节基因表达难以满足对目标化学品生产代谢网络中多基因协同表达的有效精确调节的缺点<sup>[115]</sup>, 利用诱导型启动子的动态调控, 将菌株的生长期和产物合成期分开, 使得细胞能够充分生长, 从而实现产物的按需表达<sup>[119]</sup>。Feng 等<sup>[117]</sup> 发现, 在 *C. tyrobutyricum* 中催化丁醇和乙酰辅酶 A 缩合形成乙酸丁酯的 ATF1 并不是表达量越高产生的乙酸丁酯就越多, 通过确定更适合的启动子来对 ATF1 的合成进行动态调控, 最终使乙酸丁酯的产量增加到 20.3 g/L。动态调控策略有利于调节细胞资源的有效消耗, 从而保持最佳的产物表达水平。在 *C. tyrobutyricum* 中建立静态与动态相结合的代谢调控策略, 将有利于更好地在时空水平上调控相关代谢途径, 发挥其所拥有的优势性能。

## 4.2 群体感应系统

细菌群体感应系统 (quorum sensing system, QS) 是细菌种内与种间的交流系统, 通过信号分子来调控代谢因子的表达<sup>[120]</sup>。当环境中的信号分子积累到一定阈值后释放到胞外, 就会被相应的受体蛋白所识别、结合形成复合物, 激活下游一系列基因的表达<sup>[121]</sup>。利用群体感应系统, 梭菌可以更好地控制溶剂及产物的生成、芽孢的形成以及减弱毒性等, 为获得理想菌株提供了一种策略。目前, 关于梭菌的 QS 的研究还不是很多, 主要的研究集中在产溶剂梭菌中, 产溶剂梭菌是一类能

够广泛利用农业原料作为碳源, 产生溶剂 (乙醇、丁醇和丙酮等) 的革兰氏阳性厌氧菌<sup>[55]</sup>, 其 QS 主要分为以下两种类型:

(1) *agr* 型系统 发现于葡萄球菌中<sup>[122]</sup>, 由一种自导肽 (AIP) 控制, AIP 的产生和感知的核心机制是由 *agrBCDA* 操纵子中组织的基因完成的。当胞外 AIP 积累到一定浓度时, 能够被组氨酸激酶 (HK) 即 AgrC 以及反应调节元件 AgrA 组成的双组分系统所感知, 从而使得反应得到调控。AgrA 通过控制 HK 的表达来影响 Spo0A 的磷酸化状态, 而磷酸化的 Spo0A 能够控制芽孢的形成<sup>[123-124]</sup>。基于上述机制, Steiner 等<sup>[125]</sup> 在 *C. acetobutylicum* 的基因组中发现了一段假定的 *agr* 位点 *agrBDCA*, 利用 ClosTron 技术获得了 *C. acetobutylicum* ATCC 824 的 *agrB*、*agrC* 和 *agrA* 失活突变体, 并对其表型进行了鉴定, 发现突变株的芽孢形成能力减弱且几乎检测不到淀粉样储存化合物颗粒的积累。在 *agrB* 突变体中发现了一种由 *agrBD* 表达菌株产生的扩散因子, 可以恢复芽孢的形成。此外, 根据 *C. acetobutylicum* 的 *AgrD* 序列设计的合成环肽, 当外源加入到培养物中时, 也能够弥补 *agrB* 突变体的缺陷。这些结果都说明了依赖于 *agr* 的群体感应参与了 *C. acetobutylicum* 产孢和颗粒糖形成的调节。

(2) RRNPP 型系统 包含 5 种肽感受调节蛋白 (Rap、Rgg、NprR、PlcR 和 PrgX)<sup>[126-128]</sup>, RRNPP 型 QS 由群体感应调节器和同源信号肽组成。成熟的信号肽可以与调控蛋白相互作用, 从而激活或抑制相关的细胞代谢。Feng 等<sup>[129]</sup> 在 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 中预测了 5 个 RRNPP 型的群体感应系统 (QS1~QS5), 且每个群体感应系统中都包含一个 RRNPP 型调节因子 (QssR1~QssR5) 以及一个同源信号肽前体 (QssP1~QssP5)。利用 CRISPR-CAS9 和 N1-4-DCas9-R4 通过基因缺失构建了 QssR 缺失突变体  $\Delta R1$ 、 $\Delta R2$ 、 $\Delta R3$  和  $\Delta R5$ 。结果表明 QS1、QS2、QS3 和 QS5 正向调节溶剂操纵子的表达, 从而调节溶剂的产生, 但它们可能负向调节细胞的运动; 相反, QS4 不直接调节溶剂的产生, 而是正向影响细胞的迁移。此外, QS3 和 QS5 能够正向调节细菌产孢效率。目前关于 *C. tyrobutyricum* 群体感应系统的挖掘和应用还未见报道, 而在上述梭菌中, 群体感应系统已经应用于

诸多方面。通过上述群体感应系统在 *C. tyrobutyricum* 中的应用,可调节相应基因的表达,从而解决该菌在生产发酵过程中所遇到的问题。

#### 4.3 以酪丁酸梭菌为底盘细胞的产物合成

由于 *C. tyrobutyricum* 具有较强的产丁酸能力,是研究最广泛的丁酸生产菌株。除了丁酸外,*C. tyrobutyricum* 目前也是丁醇<sup>[23, 116]</sup>、氢气<sup>[130]</sup>、异丙醇<sup>[92]</sup>、乙酸乙酯<sup>[117]</sup>、丁酸丁酯<sup>[131]</sup>等精细化学品的生产菌株。

丁酸是一种有机化工原料以及精细化学品,作为一种主要来源于肠道菌群的短链脂肪酸,丁酸及其衍生物被广泛应用于食品、化工和医药等领域<sup>[132]</sup>。近年来,越来越多的方法用于优化 *C. tyrobutyricum* 的丁酸合成途径,如数学建模、热休克蛋白过表达以及调控胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 等。Du 等<sup>[133]</sup>建立了 *C. tyrobutyricum* 将葡萄糖分批和连续发酵为有机酸的数学模型,结果表明,分批发酵中,当初始细胞或葡萄糖浓度较高时,丁酸的选择性较高;在连续发酵中,降低稀释率可以提高选择性,当稀释率为 0.028 h<sup>-1</sup> 时,选择性达到 95.8%;模型和实验数据表明,在全细胞循环条件下,丁酸选择性可达 97.3%。木质纤维素水解液中存在的抑制因子会严重抑制工业菌株的细胞生长和生产力,而 Suo 等<sup>[14]</sup>在 *C. tyrobutyricum* 中过表达天然 I 型热休克蛋白 GroESL 可显著提高其对木质纤维素水解产物衍生抑制因子的耐受性,尤其是对酚类化合物的耐受性,特别是在对 *C. tyrobutyricum* 有较强毒性的玉米秸秆和稻草水解液为底物时,分批发酵生产丁酸分别为 29.6 g/L 和 30.1 g/L,分别比野生型菌株提高 26.5% 和 19.4%。NADH 作为 *C. tyrobutyricum* 代谢网络中的一种关键辅因子,对其形式与浓度的调节可以实现代谢流最大化、快速化地导向目标代谢产物丁酸,Zhang 等<sup>[134]</sup>通过过表达 *C. tyrobutyricum* 中 NADH 合成相关酶,提高了胞内 NADH 供给水平,同时过表达丁酸合成途径中 NADH 消耗相关酶,加快胞内丁酸合成支路上 NADH 的消耗水平,实现胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 比率的调控和丁酸发酵水平的全面提高,并通过不同发酵模式(批次发酵、批次流加发酵、固定化发酵)的比较,确定了最优

的丁酸生产工艺。Jiang 等<sup>[27]</sup>利用纤维床生物反应器(FBB)对 *C. tyrobutyricum* 固定,通过反复分批发酵,成功地产出高浓度的丁酸;在第八次批量发酵结束时,丁酸浓度高达 (86.9±2.17)g/L,该浓度是在传统生物发酵过程中产生丁酸的最高浓度。

正丁醇(*n*-butanol)又称丁醇,作为一种先进的生物燃料,由于其具有高疏水性和能量密度、低挥发性和低腐蚀性等优点,被认为是比乙醇更好的替代生物燃料<sup>[135]</sup>。丁醇是由生产溶剂的梭状芽孢杆菌发酵产生的,而发酵反应也会产生副产物丙酮和乙醇<sup>[136]</sup>。通过 *adhE2* 导入不同的 *C. tyrobutyricum* 菌株中,用于葡萄糖生产正丁醇,Yu 等<sup>[116]</sup>通过对接合质粒表达体系的优化,*C. tyrobutyricum*  $\Delta$ *ack-adhE2* 可以甘露醇为底物生产正丁醇,转化率为 0.33 g/g。然而,这一过程也产生了大量的醋酸盐和丁酸盐,为了克服这一问题,将乙酰丁酸链霉菌的辅酶 A 转移酶(由 *ctfAB* 编码)与 *adhE2* 在酪丁酸链霉菌中过表达,以促进丁酸在正丁醇生产中的再异构化,使丁醇的产量和收率提高一倍以上。最近,Zhang 等<sup>[111]</sup>利用天然 CRISPR-Cas 系统成功地在 *C. tyrobutyricum* 基因组上敲除了 *cat1* 基因,插入了 *adhE2* 基因,突变株  $\Delta$ *cat1*:*adhE2* 产生了 26.2 g/L 正丁醇(转化率为 0.23 g/g)以及很少的丁酸盐,然而,该突变体在发酵中也产生了大量的乙酸盐和乙醇。

近年来,由于氢作为替代能源以及化工和石油工业生产原料的需求显著增加,制氢技术在世界范围内受到越来越多的研究关注。与化学方法相比,生物制氢可以利用碳水化合物作为底物,更加经济和环保<sup>[137]</sup>。Jo 等<sup>[130]</sup>研究了过表达 [FeFe]-氢化酶基因 *hyaA* 对 *C. tyrobutyricum* 产氢能力的影响,结果表明,与野生型菌株相比,工程菌株的氢化酶活性以及菌株产氢量分别增加了 1.7 倍和 1.5 倍,氢化酶活性的增加明显降低了副产物乳酸的产生,增加了丁酸的产量。江凌课题组通过导入菊粉酶基因,构建了一株 *C. tyrobutyricum* 工程菌株,无需预处理直接利用菊粉,在同步糖化批量发酵 96 h 后,得到较高氢产量 (3.7 mol/mol 菊粉糖)<sup>[138]</sup>。

异丙醇是一种重要的工业化学品,因为其高能量密度且可以通过生物技术生产的能力也被认

为是一种潜在的类似于丁醇的可再生生物燃料以及燃料添加剂<sup>[139]</sup>。利用微生物从廉价的生物质中生产这些短链脂肪族醇引起广泛的兴趣。Cheng等<sup>[92]</sup>通过Bs2荧光蛋白基因表达报告系统,比较了Ct( $\Delta ack$ )菌株中驱动异丙醇通路的两个独立启动子。添加来自*C. acetobutylicum*的*ctfA*、*ctfB*和*adc*基因以及来自*C. beijerinckii*的*adh*基因后,每个菌株的异丙醇数量大致反映了每个启动子的荧光比率,结果证明了*C. tyrobutyricum*的表达定量能力和异丙醇生物合成能力。

通常,酯是通过Fischer酯化反应产生的,会涉及到高温和无机催化剂。这种反应消耗大量的能量,产生大量的废物,从而对环境造成破坏<sup>[140]</sup>。而通过生物途径生产酯,易得且环保,得到越来越多的认可。Feng等<sup>[117]</sup>在产溶剂梭菌中构建酰基辅酶、酸和醇为前体的途径,通过系统代谢工程策略,构建了能够生产20.3 g/L乙酸丁酯和1.6 g/L丁酸丁酯的工程菌株。Cui等<sup>[141]</sup>将*C. beijerinckii*与*C. tyrobutyricum*共培养,解决了在利用ABE发酵产丁酸丁酯时丁酸不足的问题。与丙酮不同,异丙醇可以用脂肪酶和酸转化成酯。*C. tyrobutyricum*在pH为6时能够产生丁酸,而*C. beijerinckii*在相同pH值时主要产生溶剂。当两株菌共培养时,产生更多的丁酸,且丁酸丁酯的产量高于单一培养菌株。

## 5 总结与展望

短链脂肪酸/醇及其衍生物在医药、饲料、化妆品、食品、化工等行业有非常广泛的应用,具有巨大的市场前景。生物发酵法生产短链脂肪酸/醇及其衍生物在助力双碳目标的实现和环境友好度方面起到了重要作用。其中,*C. tyrobutyricum*是发酵生产短链脂肪酸/醇的理想厌氧底盘细胞。然而,目前采用*C. tyrobutyricum*发酵生产上述产品的最大困难在于生产成本仍居高不下,难以和化石来源的产物竞争。目前已有诸多研究致力于提升生物发酵法生产短链脂肪酸/醇的经济性,主要包括废弃生物质原料的使用、菌株抗逆性能的提升、产物合成途径的改造、发酵工艺的优化等。而这其中,针对底盘细胞的定向改造仍是研

究重点。近年来针对*C. tyrobutyricum*底盘细胞的改造已取得了一系列进展,但使其发展成为高效的底盘细胞工厂仍然需要在以下方面进行进一步研究:

(1) 丰富*C. tyrobutyricum*系统生物学研究方法 由于微生物系统的复杂性,难以快速发掘针对目标产物改造的潜在靶点。而生物信息学和多组学技术的快速发展,使得研究者逐渐能够从系统层面解析菌株的代谢特性,从而高效地创制理想的底盘细胞工厂。未来可以构建*C. tyrobutyricum*基因组规模代谢模型,基于模型可帮助解析*C. tyrobutyricum*在不同培养条件下的细胞生长和胞内流量分布。运用流量平衡分析(FBA)和流量可变分析(FVA),确定中心代谢途径和产物合成途径的显著改变。并进一步通过整合基因组、转录组、蛋白组等多组学数据,实现基于各种约束的基因组规模代谢模型构建,从而提升目标基因靶点识别的效率,帮助研究者快速识别潜在的改造靶点<sup>[142]</sup>。此外,*C. tyrobutyricum*的多组学联合研究策略仍需要进一步完善,以帮助研究者从系统水平上解析菌株的生理特性和调控规律。

(2) 开发以一碳气体为原料的*C. tyrobutyricum*底盘细胞 利用廉价易得的一碳气体作为原料,通过构建微生物细胞工厂合成多种精细化学品,不仅可以促进一碳资源的洁净利用,同时可以助力双碳目标的早日实现,是“一举两得、变废为宝”的碳中和策略。以一碳气体为原料的微生物制造的关键挑战是如何有效地固定大气中的二氧化碳和有效地捕获可再生能源用于生物生产。自养微生物能直接利用一碳气体生产各种精细化学品,但产量和生产强度难以满足工业化需求,而异养微生物虽具有较强的产物合成能力,但吸收、固定和转化气体速率较慢,能量代谢效率低<sup>[143]</sup>。WLP是目前已知的反应步骤最短且能量消耗最少的一种生物固碳途径,被认为是最适合厌氧固碳的途径。以异养的*C. tyrobutyricum*为底盘细胞,基于合成生物学策略的固碳途径的组装与优化、产物合成的代谢调控,可实现一碳气体高效还原并转化为精细化学品。此外,具有稳定、可调节的微生物共培养模式能实现高效生产和工艺放大。通过联合具有高效固碳能力的自养梭菌和*C.*

*tyrobutyricum*, 建立“共生模式”的菌株组合, 可以减少菌株间的竞争并增加互惠, 最终实现一碳气体的高效利用和短链脂肪酸/醇高效合成<sup>[144]</sup>。

(3) 丰富 *C. tyrobutyricum* 合成生物元件库  
合成生物元件是实现基因高效、精准表达调控的最关键因素。未来可结合生物信息学及机器学习等方法从多组学数据和各种生物信息数据库中挖掘适用于 *C. tyrobutyricum* 的各种合成生物元件。通过启动子工程策略可对 *C. tyrobutyricum* 的启动子特征及功能进行发掘与进化改造, 使其响应更多化学分子与物理信号, 实现精细、动态、调控目标基因表达。此外, 基于人工智能技术从头合成启动子, 可获得更多的新性能启动子, 从而丰富 *C. tyrobutyricum* 的启动子库。未来还需要优化 *C. tyrobutyricum* 的报告基因系统。目前厌氧梭菌中可用的报告基因与传统 GFP 等荧光蛋白相比, 仍存在荧光强度低等问题, 且可用的报告基因系统寥寥无几, 需要进一步丰富厌氧梭菌中的报告基因。提升生物元件定量检测的效率。

(4) 建立 *C. tyrobutyricum* 高通量筛选平台

高通量筛选 (HTS) 技术, 尤其是微流控芯片 (microfluidic chip) 技术对细胞生物学的研究产生了巨大的促进作用<sup>[145]</sup>。建立高通量筛选平台将丰富 *C. tyrobutyricum* 合成生物元件库。然而, 目前该技术在梭菌属特别是厌氧异养型梭菌中的研究应用较少, 未来有必要建立一系列如微流控技术、流式细胞术等高通量筛选技术应用于厌氧梭菌中 (图7)。此外, 利用转录因子生物传感器、RNA 核糖开关等基于生物传感器的筛选技术动态筛选目标菌株和代谢物 (图7), 能够解决由于显色或荧光反应不能检测到目标产物或关键中间体使得微生物高通量筛选受限的问题。高通量筛选平台的建立将推动基于生物传感器的高通量筛选策略在 *C. tyrobutyricum* 中的应用, 将大大提升该菌候选菌株的分离筛选效率。

(5) 拓展 *C. tyrobutyricum* 遗传转化方法及基因组编辑工具  
对于非典型模式宿主而言, 遗传转化效率低以及基因编辑工具不足导致了目前底盘细胞构建效率低下, 严重限制了 *C. tyrobutyricum* 的应用。虽然目前在 *C. tyrobutyricum* 中针对上述

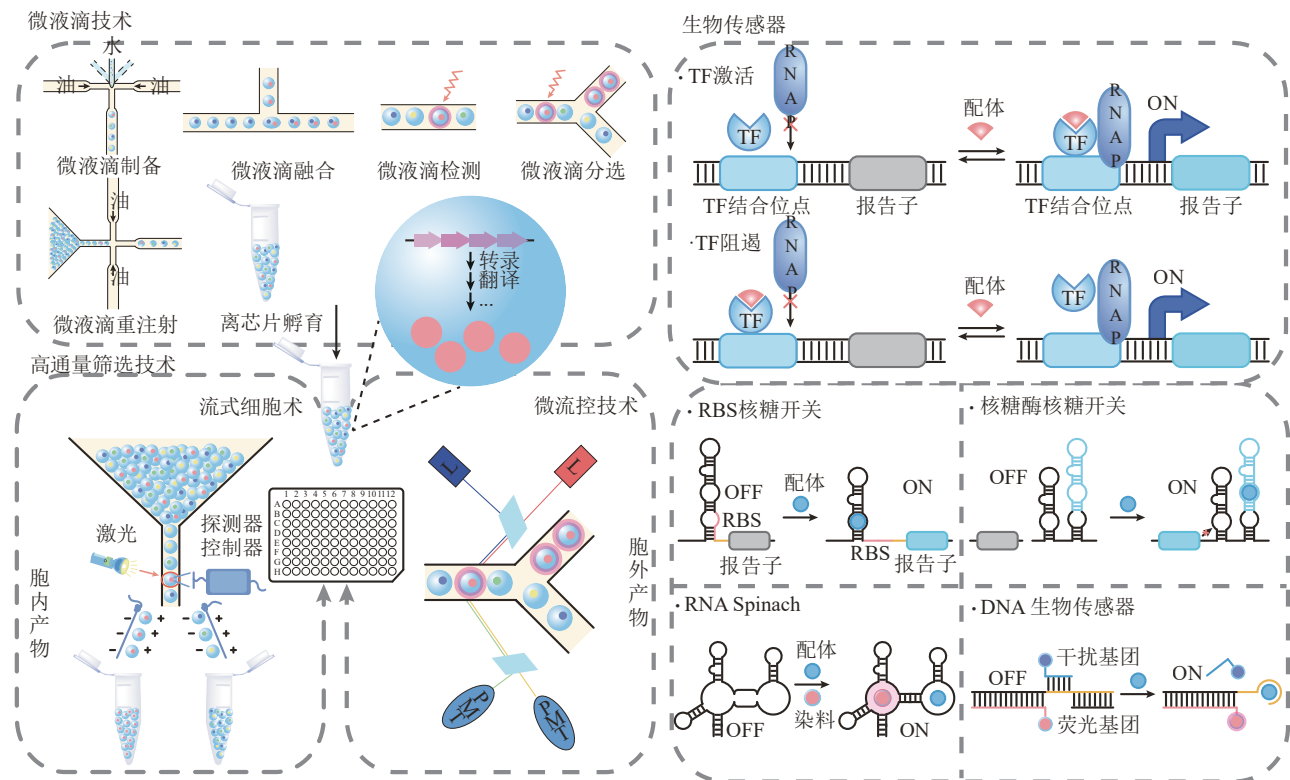


图7 高通量筛选 (HTS) 策略

Fig. 7 High-throughput screening (HTS) strategy

两个问题已有初步探究并取得了部分的进展,如通过在 *C. tyrobutyricum* 中敲除限制性内切酶提高了外源基因的转化效率,但与传统模式宿主相比,仍有待提升。遗传操作难以进行的最常见原因是限制性修饰(RM)系统,针对异源DNA普遍存在的防御机制,在多数细菌中,其阻碍了遗传操作技术的使用。未来可通过从DNA中消除目标识别序列来规避RM系统,从而创建简化的RM沉默遗传工具,如通过 SyngenicDNA 方法可有效规避RM系统<sup>[146]</sup>。此外,虽然目前已有针对 *C. tyrobutyricum* 开发的内源性和外源性CRISPR-Cas基因组编辑工具,但普遍存在编辑效率低、编辑手段单一等问题。未来需要基于目前已经构建的外源性CRISPR-Cas系统,通过改造Cas蛋白、sgRNA序列等策略提升其编辑效率,此外还需要开发针对多基因同时编辑的工具以及基于dCas9的基因抑制和激活工具,从而丰富 *C. tyrobutyricum* 的基因组编辑工具库,实现目前基因的高效、靶向与精准调控。

(6) 开发 *C. tyrobutyricum* 多类型代谢调控策略 目前针对 *C. tyrobutyricum* 的遗传改造仍局限于简单的基因敲除和过表达,代谢调控策略远远滞后于传统的模式宿主,难以满足动态精细调控的目标。未来,需要结合生物传感器和基因组编辑工具发展适用于 *C. tyrobutyricum* 的动态调控策略。如,可通过挖掘不同类型的诱导型启动子实现目标基因的精准、按需表达。此外,针对丁酸合成途径,可通过构建丁酸响应的生物传感器并结合CRISPRi基因抑制系统实现对目的产物丁酸的动态调控。而依赖于群体感应的动态调控系统可用于构建产物合成基因线路,调节和分配细胞生长与产物合成之间的碳流及能量流。

以 *C. tyrobutyricum* 为底盘细胞,已经在生物能源、食品和化工等不同工业领域取得了一系列成果。同时, *C. tyrobutyricum* 具有一系列可用的合成生物元件以及包括内、外源CRISPR-Cas基因组编辑系统在内的遗传操作工具,并积累了大量的生理、生化及生物信息数据,未来有望发展成为一个高效的底盘细胞,尤其是生产多种短链脂肪酸/醇及其衍生物的高效微生物细胞工厂。

## 参 考 文 献

- [1] WANG J F, LIN M, XU M M, et al. Anaerobic fermentation for production of carboxylic acids as bulk chemicals from renewable biomass[M]// Hatti-Kaul R, Mamo G, Mattiasson B. Anaerobes in biotechnology. Advances in biochemical engineering/biotechnology, Cham, Switzerland: Springer, 2016 156: 323-361.
- [2] CLOMBURG J M, CRUMBLEY A M, GONZALEZ R. Industrial biomanufacturing: the future of chemical production[J]. Science, 2017, 355(6320): aag0804.
- [3] YANG X M, TANG S, LU T L, et al. Sulfonic acid resin-catalyzed oxidation of aldehydes to carboxylic acids by hydrogen peroxide[J]. Synthetic Communications, 2013, 43(7): 979-985.
- [4] YU T, ZHOU Y J J, HUANG M T, et al. Reprogramming yeast metabolism from alcoholic fermentation to lipogenesis[J]. Cell, 2018, 174(6): 1549-1558.e14.
- [5] LINGER J G, FORD L R, RAMNATH K, et al. Development of *Clostridium tyrobutyricum* as a microbial cell factory for the production of fuel and chemical intermediates from lignocellulosic feedstocks[J]. Frontiers in Energy Research, 2020, 8: 183.
- [6] 唐万. 酪丁酸梭菌代谢机理及其应用的探索研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2018.  
TANG W. Study on metabolic mechanism of *Clostridium tyrobutyricum* and its application for butyric acid production[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2018.
- [7] 江凌. 纤维床固定化酪丁酸梭菌发酵廉价生物质生产丁酸的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.  
JIANG L. Study on butyric acid production from cheap biomass by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous bed bioreactor[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
- [8] ZHU Z M, ZHU L Y, JIANG L. Dynamic regulation of gut *Clostridium*-derived short-chain fatty acids[J]. Trends in Biotechnology, 2022, 40(3): 266-270.
- [9] 索玉凯. 代谢工程改造酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)强化丁酸生产及木质纤维素利用[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.  
SUO Y K. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production and lignocellulosic utilization[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [10] LEE J, YUN H, FEIST A M, et al. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(5): 849-862.
- [11] SENGER R S, PAPOUTSAKIS E T. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008,

- 101(5): 1036-1052.
- [12] XIN B, TAO F, WANG Y, et al. Genome sequence of *Clostridium butyricum* strain DSM 10702, a promising producer of biofuels and biochemicals[J]. Genome Announcements, 2013, 1(4): e00563-e00513.
- [13] LEE J, JANG Y S, HAN M J, et al. Deciphering *Clostridium tyrobutyricum* metabolism based on the whole-genome sequence and proteome analyses[J]. mBio, 2016, 7(3): e00743-e00716.
- [14] SUO Y K, FU H X, REN M M, et al. Butyric acid production from lignocellulosic biomass hydrolysates by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing Class I heat shock protein GroESL[J]. Bioresource Technology, 2018, 250: 691-698.
- [15] HUANG J, CAI J, WANG J, et al. Efficient production of butyric acid from Jerusalem artichoke by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(4): 3923-3926.
- [16] ALAM S, STEVENS D, BAJPAI R. Production of butyric acid by batch fermentation of cheese whey with *Clostridium beijerinckii*[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1988, 2(6): 359-364.
- [17] ZHU Y, WU Z T, YANG S T. Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fibre by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(5): 657-666.
- [18] FAYOLLE F, MARCHAL R, BALLERINI D. Effect of controlled substrate feeding on butyric acid production by *Clostridium tyrobutyricum*[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1990, 6(3): 179-183.
- [19] HUANG Y L, WU Z T, ZHANG L K, et al. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2002, 82(1): 51-59.
- [20] JIANG L, WANG J F, LIANG S Z, et al. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(13): 3403-3409.
- [21] HE F F, QIN S W, YANG Z, et al. Butyric acid production from spent coffee grounds by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing galactose catabolism genes[J]. Bioresource Technology, 2020, 304: 122977.
- [22] SUO Y K, FU H X, REN M M, et al. Enhanced butyric acid production in *Clostridium tyrobutyricum* by overexpression of rate-limiting enzymes in the Embden-Meyerhof-Parnas pathway[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 272/273: 14-21.
- [23] DU Y M, JIANG W Y, YU M R, et al. Metabolic process engineering of *Clostridium tyrobutyricum*  $\Delta$ ack-adhE2 for enhanced n-butanol production from glucose: effects of methyl viologen on NADH availability, flux distribution, and fermentation kinetics[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(4): 705-715.
- [24] SUO Y K, LUO S, ZHANG Y N, et al. Enhanced butyric acid tolerance and production by Class I heat shock protein-overproducing *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(8): 1145-1156.
- [25] ZHANG Y L, YU M R, YANG S T. Effects of *ptb* knockout on butyric acid fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*[J]. Biotechnology Progress, 2012, 28(1): 52-59.
- [26] YU L, ZHAO J B, XU M M, et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production: effects of CoA transferase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(11): 4917-4930.
- [27] JIANG L, WANG J F, LIANG S Z, et al. Enhanced butyric acid tolerance and bioproduction by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous bed bioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(1): 31-40.
- [28] LIU X G, ZHU Y, YANG S T. Construction and characterization of ack deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid and hydrogen production[J]. Biotechnology Progress, 2006, 22(5): 1265-1275.
- [29] ZHANG J Z, YU L, XU M M, et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production from sugarcane juice[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4327-4337.
- [30] YU L, XU M M, TANG I C, et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production from maltose and soluble starch by overexpressing alpha-glucosidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(14): 6155-6165.
- [31] GUO X L, FU H X, FENG J, et al. Direct conversion of untreated cane molasses into butyric acid by engineered *Clostridium tyrobutyricum*[J]. Bioresource Technology, 2020, 301: 122764.
- [32] WEI D, LIU X G, YANG S T. Butyric acid production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2013, 129: 553-560.
- [33] PYNE M E, MOO-YOUNG M, CHUNG D A, et al. Antisense-RNA-mediated gene downregulation in *Clostridium pasteurianum*[J]. Fermentation, 2015, 1(1): 113-126.
- [34] XIAO Z P, CHENG C, BAO T, et al. Production of butyric acid from acid hydrolysate of corn husk in fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*: kinetics and process economic analysis[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 164.
- [35] BAROI G N, BAUMANN I, WESTERMANN P, et al. Butyric acid fermentation from pretreated and hydrolysed wheat straw by an adapted *Clostridium tyrobutyricum* strain[J]. Microbial

- Biotechnology, 2015, 8(5): 874-882.
- [36] SJÖBLOM M, MATSAKAS L, CHRISTAKOPOULOS P, et al. Production of butyric acid by *Clostridium tyrobutyricum* (ATCC25755) using sweet sorghum stalks and beet molasses[J]. Industrial Crops and Products, 2015, 74: 535-544.
- [37] ZHOU X, LU X H, LI X H, et al. Radiation induces acid tolerance of *Clostridium tyrobutyricum* and enhances bioproduction of butyric acid through a metabolic switch[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 22.
- [38] LIU T T, JIANG C, ZHU L Y, et al. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@chitosan microspheres coating as cytoprotective exoskeletons for the enhanced production of butyric acid with *Clostridium tyrobutyricum* under acid stress[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 449.
- [39] 常瀚文, 郑鑫铃, 骆健美, 等. 抗逆元件及其在高效微生物细胞工厂构建中的应用进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 13-34.
- CHANG H W, ZHENG X L, LUO J M, et al. Tolerance elements and their application progress on the construction of highly-efficient microbial cell factory[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(6): 13-34.
- [40] ZHU Y, LIU X G, YANG S T. Construction and characterization of *pta* gene-deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid fermentation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 90(2): 154-166.
- [41] WU Q, ZHU L Y, XU Q, et al. Tailoring the oxidative stress tolerance of *Clostridium tyrobutyricum* CCTCC W428 by introducing trehalose biosynthetic capability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(40): 8892-8901.
- [42] LIU Z H, WANG K, CHEN Y, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO<sub>2</sub>[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(3): 274-288.
- [43] PIERCE E, XIE G, BARABOTE R D, et al. The complete genome sequence of Moorella thermoacetica (f. *Clostridium thermoacetica*) [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(10): 2550-2573.
- [44] FAST A G, PAPOUTSAKIS E T. Functional expression of the *Clostridium ljungdahlii* acetyl-coenzyme A synthase in *Clostridium acetobutylicum* as demonstrated by a novel *in vivo* CO exchange activity en route to heterologous installation of a functional Wood-Ljungdahl pathway[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(7): e02307-e02317.
- [45] CARLSON E D, PAPOUTSAKIS E T. Heterologous expression of the *Clostridium carboxidivorans* CO dehydrogenase alone or together with the acetyl coenzyme A synthase enables both reduction of CO<sub>2</sub> and oxidation of CO by *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(16): e00829-e00817.
- [46] 卞化, 孙新晓, 袁其朋. 代谢工程改造异养微生物固定 CO<sub>2</sub> 研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(2): 195-203.
- BIAN H, SUN X X, YUAN Q P. Advances in metabolic engineering of heterotrophic microorganisms for CO<sub>2</sub> fixation: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(2): 195-203.
- [47] DOBBEK H, SVETLITCHNYI V, GREMER L, et al. Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster[J]. Science, 2001, 293(5533): 1281-1285.
- [48] ALTAŞ N, ASLAN A S, KARATAŞ E, et al. Heterologous production of extreme alkaline thermostable NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase with wide-range pH activity from *Myceliophthora thermophila*[J]. Process Biochemistry, 2017, 61: 110-118.
- [49] BANG J, LEE S Y. Assimilation of formic acid and CO<sub>2</sub> by engineered *Escherichia coli* equipped with reconstructed one-carbon assimilation pathways[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(40): E9271-E9279.
- [50] FUCHS G. Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life?[J]. Annual Review of Microbiology, 2011, 65: 631-658.
- [51] HÜGLER M, MENENDEZ C, SCHÄGGER H, et al. Malonyl-coenzyme A reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(9): 2404-2410.
- [52] STRAUSS G, FUCHS G. Enzymes of a novel autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 215(3): 633-643.
- [53] 王媛媛. 艰难梭菌电子歧化酶 NfnAB 性质和功能的初步研究[D]. 济南: 济南大学, 2018.
- WANG Y Y. The preliminary study on the properties and functions of the electron-bifurcating NfnAB from *Clostridium difficile*[D]. Jinan: University of Jinan, 2018.
- [54] LI F L, HINDERBERGER J, SEEDORF H, et al. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(3): 843-850.
- [55] WANG S N, HUANG H Y, MOLL J, et al. NADP<sup>+</sup> reduction with reduced ferredoxin and NADP<sup>+</sup> reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(19): 5115-5123.
- [56] MAYER A, WEUSTER-BOTZ D. Reaction engineering analysis of the autotrophic energy metabolism of *Clostridium acetium*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(22): fnx219.
- [57] LIU T T, ZHU L Y, ZHU Z M, et al. Genome sequence analysis of *Clostridium tyrobutyricum*, a promising microbial host

- for human health and industrial applications[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(11): 3685-3694.
- [58] 禹伟, 高教琪, 周雍进. 蛋白质组学和代谢组学在微生物代谢工程中的应用[J]. *色谱*, 2019, 37(8): 798-805.  
YU W, GAO J Q, ZHOU Y J. Application of proteomics and metabolomics in microbial metabolic engineering[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(8): 798-805.
- [59] LI W M, CHENG C, CAO G L, et al. Comparative transcriptome analysis of *Clostridium tyrobutyricum* expressing a heterologous uptake hydrogenase[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 749: 142022.
- [60] JANSSEN H, DÖRING C, EHRENREICH A, et al. A proteomic and transcriptional view of acidogenic and solventogenic steady-state cells of *Clostridium acetobutylicum* in a chemostat culture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(6): 2209-2226.
- [61] MAO S M, LUO Y M, ZHANG T R, et al. Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(6): 3046-3061.
- [62] JIA K Z, ZHANG Y P, LI Y. Identification and characterization of two functionally unknown genes involved in butanol tolerance of *Clostridium acetobutylicum*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38815.
- [63] SIVAGNANAM K, RAGHAVAN V G S, SHAH M, et al. Shotgun proteomic monitoring of *Clostridium acetobutylicum* during stationary phase of butanol fermentation using xylose and comparison with the exponential phase[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012, 39(6): 949-955.
- [64] MA C, KOJIMA K, XU N, et al. Comparative proteomics analysis of high n-butanol producing metabolically engineered *Clostridium tyrobutyricum*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 193: 108-119.
- [65] JONES S W, PAREDES C J, TRACY B, et al. The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation[J]. *Genome Biology*, 2008, 9(7): R114.
- [66] AMADOR-NOGUEZ D, BRASG I A, FENG X J, et al. Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 7984-7997.
- [67] WANG Y F, TIAN J, JI Z H, et al. Intracellular metabolic changes of *Clostridium acetobutylicum* and promotion to butanol tolerance during biobutanol fermentation[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, 78: 297-306.
- [68] ZU T N K, LIU S C, GERLACH E S, et al. Real-time metabolite monitoring of glucose-fed *Clostridium acetobutylicum* fermentations using Raman assisted metabolomics[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2017, 48(12): 1852-1862.
- [69] IDLE J R, GONZALEZ F J. Metabolomics[J]. *Cell Metabolism*, 2007, 6(5): 348-351.
- [70] KIM T Y, SOHN S B, KIM Y B, et al. Recent advances in reconstruction and applications of genome-scale metabolic models[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(4): 617-623.
- [71] PAPOUTSAKIS E T. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, 26(2): 174-187.
- [72] DESAI R P, HARRIS L M, WELKER N E, et al. Metabolic flux analysis elucidates the importance of the acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 1999, 1(3): 206-213.
- [73] DASH S, MUELLER T J, VENKATARAMANAN K P, et al. Capturing the response of *Clostridium acetobutylicum* to chemical stressors using a regulated genome-scale metabolic model[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 144.
- [74] THOMPSON R A, DAHAL S, GARCIA S, et al. Exploring complex cellular phenotypes and model-guided strain design with a novel genome-scale metabolic model of *Clostridium thermocellum* DSM 1313 implementing an adjustable cellulosome[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 194.
- [75] GARCIA S, THOMPSON R A, GIANNONE R J, et al. Development of a genome-scale metabolic model of *Clostridium thermocellum* and its applications for integration of multi-omics datasets and computational strain design[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 772.
- [76] THIELE I, PALSSON B Ø. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(1): 93-121.
- [77] 董风晴. 凝结芽孢杆菌36D1全基因组代谢网络模型的构建和验证[D]. 上海: 华东理工大学, 2017.  
DONG F Q. Reconstruction and verification of the genome-scale metabolic model of *Bacillus coagulans* 36D1[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2017.
- [78] 叶超. 新一代工业微生物生物网络模型的构建及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2019.  
YE C. Construction and application of the new generation industrial microorganisms biological network models[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [79] 林璐, 吕雪芹, 刘延峰, 等. 枯草芽孢杆菌底盘细胞的设计、构建与应用[J]. *合成生物学*, 2020, 1(2): 247-265.  
LIN L, LV X Q, LIU Y F, et al. Advances in design, construction and applications of *Bacillus subtilis* chassis cells[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(2): 247-265.
- [80] TAO X Y, XU T, KEMPER M L, et al. Precise promoter integration improves cellulose bioconversion and thermotolerance in *Clostridium cellulolyticum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020,

- 60: 110-118.
- [81] FU H X, YU L, LIN M, et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production from glucose and xylose[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 50-58.
- [82] LEE J, JANG Y S, PAPOUTSAKIS E T, et al. Stable and enhanced gene expression in *Clostridium acetobutylicum* using synthetic untranslated regions with a stem-loop[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 230: 40-43.
- [83] GORWA M F, CROUX C, SOUCAILLE P. Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(9): 2668-2675.
- [84] ZHANG L, LEYN S A, GU Y, et al. Ribulokinase and transcriptional regulation of arabinose metabolism in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(5): 1055-1064.
- [85] SIZEMORE C, BUCHNER E, RYGUS T, et al. Organization, promoter analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon[J]. *Molecular & General Genetics*, 1991, 227(3): 377-384.
- [86] HARTMAN A H, LIU H L, MELVILLE S B. Construction and characterization of a lactose-inducible promoter system for controlled gene expression in *Clostridium perfringens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(2): 471-478.
- [87] MEARLS E B, OLSON D G, HERRING C D, et al. Development of a regulatable plasmid-based gene expression system for *Clostridium thermocellum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(18): 7589-7599.
- [88] DONG H J, TAO W W, ZHANG Y P, et al. Development of an anhydrotetracycline-inducible gene expression system for solvent-producing *Clostridium acetobutylicum*: A useful tool for strain engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(1): 59-67.
- [89] YU M R, DU Y M, JIANG W Y, et al. Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and n-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(2): 881-889.
- [90] ZHANG X D, YANG S T. High-throughput 3-D cell-based proliferation and cytotoxicity assays for drug screening and bioprocess development[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 151(2): 186-193.
- [91] DREPPER T, EGGERT T, CIRCOLONE F, et al. Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(4): 443-445.
- [92] CHENG C, LIN M, JIANG W Y, et al. Development of an *in vivo* fluorescence based gene expression reporter system for *Clostridium tyrobutyricum*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 305: 18-22.
- [93] BAO T, ZHAO J B, ZHANG Q X, et al. Development of a shuttle plasmid without host restriction sites for efficient transformation and heterologous gene expression in *Clostridium cellulovorans*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(13): 5391-5400.
- [94] HEAP J T, PENNINGTON O J, CARTMAN S T, et al. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 78(1): 79-85.
- [95] OH Y H, EOM G T, KANG K H, et al. Optimized transformation of newly constructed *Escherichia coli*-*Clostridia* shuttle vectors into *Clostridium beijerinckii*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(1): 226-236.
- [96] 张晋龙. 3株放线菌的分离鉴定及其遗传转化系统的构建与优化[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017.
- ZHANG J L. Isolation and identification of three Actinomyces strains and construction and optimization of their genetic transformation system[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2017.
- [97] 周隽. 电穿孔转化沙眼衣原体建立衣原体载体实验研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.
- ZHOU J. Research on electroporation transfection *Chlamydia trachomatis* to build vector of *Chlamydia*[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2006.
- [98] WOODS C, HUMPHREYS C M, RODRIGUES R M, et al. A novel conjugal donor strain for improved DNA transfer into *Clostridium* spp.[J]. *Anaerobe*, 2019, 59: 184-191.
- [99] SZOSTKOVÁ M, HORÁKOVÁ D, NĚMEC M. The influence of the growth phase of enteric bacteria on electrotransformation with plasmid DNA[J]. *Folia Microbiologica*, 1999, 44(2): 177-180.
- [100] ZHANG J, HONG W, GUO L, et al. Enhancing plasmid transformation efficiency and enabling CRISPR-Cas9/Cpf1-based genome editing in *Clostridium tyrobutyricum*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(9): 2911-2917.
- [101] MURRAY N E. Type I restriction systems: Sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle)[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(2): 412-434.
- [102] ROBERTS R J, BELFORT M, BESTOR T, et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(7): 1805-1812.
- [103] LOENEN W A M, DRYDEN D T F, RALEIGH E A, et al. Type I restriction enzymes and their relatives[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 42(1): 20-44.
- [104] CUI G Z, HONG W, ZHANG J, et al. Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 89(3): 201-208.
- [105] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR

- provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [106] LIAN J Z, HAMEDIRAD M, HU S M, et al. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1688.
- [107] 李洋, 申晓林, 孙新晓, 等. CRISPR 基因编辑技术在微生物合成生物学领域的研究进展[J]. *合成生物学*, 2021, 2(1): 106-120.
- LI Y, SHEN X L, SUN X X, et al. Advances of CRISPR gene editing in microbial synthetic biology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(1): 106-120.
- [108] SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Molecular Cell*, 2015, 60(3): 385-397.
- [109] 柳柯, 林桂虹, 刘坤, 等. CRISPR/Cas 系统的挖掘、改造与功能拓展[J/OL]. *合成生物学*, 2021-04-30[2022-05-24]. <https://synbioj.cip.com.cn/CN/10.12211/2096-8280.2021-022>.
- LIU K, LIN G H, LIU S, et al. Mining, engineering and functional expansion of CRISPR/Cas systems[J/OL]. *Synthetic Biology Journal*, 2021-04-30[2022-05-24]. <https://synbioj.cip.com.cn/CN/10.12211/2096-8280.2021-022>.
- [110] PYNE M E, BRUDER M R, MOO-YOUNG M, et al. Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25666.
- [111] ZHANG J, ZONG W M, HONG W, et al. Exploiting endogenous CRISPR-Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 49-59.
- [112] MAIKOVA A, KREIS V, BOUTSERIN A, et al. Using an endogenous CRISPR-Cas system for genome editing in the human pathogen *Clostridium difficile*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(20): e01416-e01419.
- [113] ZHOU X Q, WANG X L, LUO H Y, et al. Exploiting heterologous and endogenous CRISPR-Cas systems for genome editing in the probiotic *Clostridium butyricum*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(7): 2448-2459.
- [114] 刘洋, 牟庆璇, 石雅南, 等. 微生物细胞工厂的代谢调控[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1541-1563.
- LIU Y, MOU Q X, SHI Y N, et al. Metabolic regulation in constructing microbial cell factories[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(5): 1541-1563.
- [115] XU N, WEI L, LIU J. Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2019, 35(2): 33.
- [116] YU M R, ZHANG Y L, TANG I C, et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(4): 373-382.
- [117] FENG J, ZHANG J, MA Y C, et al. Renewable fatty acid ester production in *Clostridium*[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4368.
- [118] YANG G H, JIA D C, JIN L, et al. 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.
- [119] HOLTZ W J, KEASLING J D. Engineering static and dynamic control of synthetic pathways[J]. *Cell*, 2010, 140(1): 19-23.
- [120] LOWERY C A, DICKERSON T J, JANDA K D. Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing[J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(7): 1337-1346.
- [121] QSIM M, ASHFAQ U A, YOUSAF M Z, et al. Genetically modified aedes aegypti to control dengue: a review[J]. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2017, 27(4): 331-340.
- [122] NOVICK R P, GEISINGER E. Quorum sensing in staphylococci[J]. *Annual Review of Genetics*, 2008, 42: 541-564.
- [123] OLSON M E, TODD D A, SCHAEFFER C R, et al. *Staphylococcus epidermidis agr* quorum-sensing system: signal identification, cross talk, and importance in colonization[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(19): 3482-3493.
- [124] XUE C, ZHAO J B, CHEN L J, et al. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(2): 310-322.
- [125] STEINER E, SCOTT J, MINTON N P, et al. An *agr* quorum sensing system that regulates granule formation and sporulation in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(4): 1113-1122.
- [126] NEIDITCH M B, CAPODAGLI G C, PREHNA G, et al. Genetic and structural analyses of RRNPP intercellular peptide signaling of gram-positive bacteria[J]. *Annual Review of Genetics*, 2017, 51: 311-333.
- [127] DO H, KUMARASWAMI M. Structural mechanisms of peptide recognition and allosteric modulation of gene regulation by the RRNPP family of quorum-sensing regulators[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(14): 2793-2804.
- [128] PEREZ-PASCUAL D, MONNET V, GARDAN R. Bacterial cell-cell communication in the host via RRNPP peptide-binding regulators[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 706.
- [129] FENG J, ZONG W M, WANG P X, et al. RRNPP-type quorum-sensing systems regulate solvent formation, sporulation and cell motility in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 84.
- [130] JO J H, JEON C O, LEE S Y, et al. Molecular characterization and homologous overexpression of [FeFe]-hydrogenase in *Clostridium tyrobutyricum* JM1[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(3): 1065-1073.

- [131] ZHANG Z T, TAYLOR S, WANG Y. In situ esterification and extractive fermentation for butyl butyrate production with *Clostridium tyrobutyricum*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(7): 1428-1437.
- [132] WANG J F, LIN M, XU M M, et al. Anaerobic fermentation for production of carboxylic acids as bulk chemicals from renewable biomass[M]// Hatti-Kaul R., Mamo G., Mattiasson B. ed. *Anaerobes in Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Cham, Switzerland: Springer, 2016, 156: 323-361.
- [133] DU J J, MCGRAW A, HESTEKIN J. Modeling of *Clostridium tyrobutyricum* for butyric acid selectivity in continuous fermentation[J]. *Energies*, 2014, 7(4): 2421-2435.
- [134] 张亚南. 调控胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 对酪丁酸梭菌丁酸生物合成的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.  
ZHANG Y N. Effects of intracellular NADH/NAD<sup>+</sup> ratio regulation on butyric acid biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [135] AMIRI H, KARIMI K. Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: challenges and perspectives[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 702-721.
- [136] XUE C, ZHAO X Q, LIU C G, et al. Prospective and development of butanol as an advanced biofuel[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1575-1584.
- [137] SINHA P, PANDEY A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(13): 7460-7478.
- [138] JIANG L, WU Q, XU Q, et al. Fermentative hydrogen production from Jerusalem artichoke by *Clostridium tyrobutyricum* expressing exo-inulinase gene[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 7940.
- [139] PALSSON B O, FATHI-AFSHAR S, RUDD D F, et al. Biomass as a source of chemical feedstocks: an economic evaluation[J]. *Science*, 1981, 213(4507): 513-517.
- [140] RODRIGUEZ G M, TASHIRO Y, ATSUMI S. Expanding ester biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(4): 259-265.
- [141] CUI Y H, HE J Z, YANG K L, et al. Production of isopropyl and butyl esters by *Clostridium* mono-culture and co-culture[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(6/7): 543-550.
- [142] HEIRENDT L, ARRECKX S, PFAU T, et al. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(3): 639-702.
- [143] HU G P, LI Y, YE C, et al. Engineering microorganisms for enhanced CO<sub>2</sub> sequestration[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(5): 532-547.
- [144] LI X L, ZHOU Z, LI W N, et al. Design of stable and self-regulated microbial consortia for chemical synthesis[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1554.
- [145] ERTL P, STICKER D, CHARWAT V, et al. Lab-on-a-chip technologies for stem cell analysis[J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(5): 245-253.
- [146] JOHNSTON C D, COTTON S L, RITTLING S R, et al. Systematic evasion of the restriction-modification barrier in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(23): 11454-11459.



**通讯作者:** 江凌(1982—), 男, 博士, 教授。研究方向为发酵工程与酶工程。

E-mail: jiangling@njtech.edu.cn



**通讯作者:** 朱政明(1989—), 男, 博士, 副教授。研究方向为微生物系统与合成生物学。

E-mail: zhuzm@njtech.edu.cn



**第一作者:** 刘家宇(1998—), 男, 硕士研究生。研究方向为微生物系统与合成生物学。

E-mail: liujoy@njtech.edu.cn