

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-032

代谢工程改造微生物利用甲酸研究进展

程真真^{1,2}, 张健^{1,2}, 高聪^{1,2}, 刘立明^{1,2}, 陈修来^{1,2}

(¹ 江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; ² 江南大学, 食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 微生物利用甲酸生产高附加值产品, 是实现碳资源回收利用与绿色产业发展的重要策略之一。然而, 在微生物利用甲酸过程中存在甲酸利用效率偏低、细胞生长速率缓慢、目标代谢物产量不高等问题。为了解决上述问题, 本文从甲酸利用的微生物、代谢路径与代谢工程策略三个方面, 系统总结分析了代谢工程改造微生物利用甲酸的研究进展。在甲酸利用微生物方面, 概述了天然甲酸利用微生物的代谢特点以及模式微生物的代谢工程改造潜能; 在甲酸利用代谢路径方面, 梳理了天然的甲酸利用路径、重构与优化的甲酸利用路径与人工的甲酸利用路径的关键步骤、能量/还原力消耗与特点; 在甲酸利用代谢工程策略方面, 阐述了提高甲酸同化效率与改善甲酸利用微生物细胞生长的关键方法。最后, 从甲酸利用的微生物、代谢路径与代谢工程策略三个方面, 展望了微生物利用甲酸的发展方向, 为甲酸生物经济的发展奠定了基础。

关键词: 甲酸; 微生物; 代谢路径; 能量再生; 代谢工程

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Progress in metabolic engineering of microorganisms for the utilization of formate

CHENG Zhenzhen^{1,2}, ZHANG Jian^{1,2}, GAO Cong^{1,2}, LIU Liming^{1,2}, CHEN Xiulai^{1,2}

(¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; ²International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: One carbon resources are expected to become the next generation raw materials for the production of high value-added chemicals to achieve the recycling and utilization of carbon resources and promote the development of green industries. To achieve this aim, microbial utilization of formate produced from various one carbon resources, is one of the important strategies to build a green and sustainable platform for one-carbon biomanufacturing. However, there are many problems in the process of microbial utilization of formate, such as the low efficiency of formate utilization, the slow growth rate of formate-utilizing microorganisms, and the low yield of target metabolites and so on.

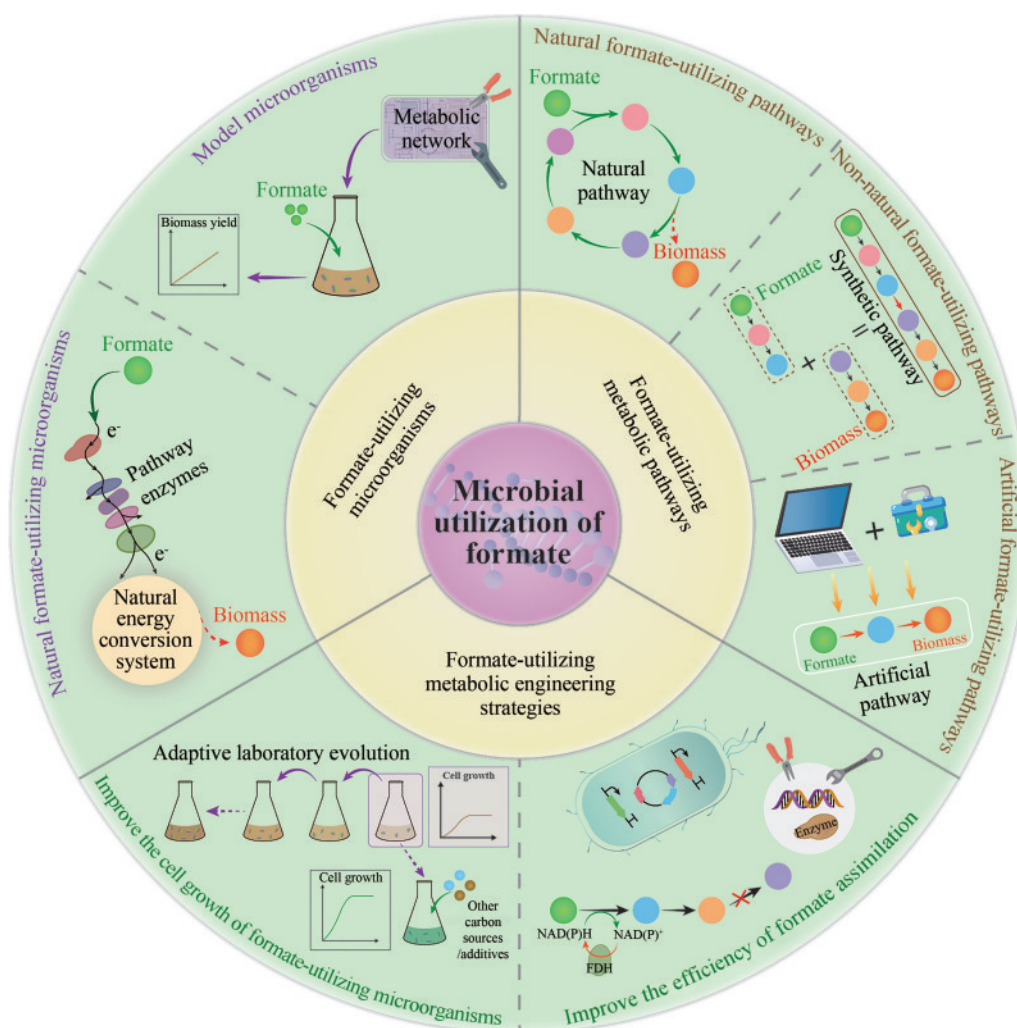
收稿日期: 2023-04-17 修回日期: 2023-05-22

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2103500); 国家自然科学基金 (22122806); 江苏省自然科学基金 (BK20211529); 江南大学基本科研计划面上培育项目 (JUSRP22031)

引用本文: 程真真, 张健, 高聪, 刘立明, 陈修来. 代谢工程改造微生物利用甲酸研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(4): 756-778

Citation: CHENG Zhenzhen, ZHANG Jian, GAO Cong, LIU Liming, CHEN Xiulai. Progress in metabolic engineering of microorganisms for the utilization of formate[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(4): 756-778

To solve these problems, in this paper we systematically summarize and analyze the research progress in metabolic engineering of microorganisms for the utilization of formate from following three aspects: formate-utilizing microorganisms, metabolic pathways and metabolic engineering strategies. For formate-utilizing microorganisms, we summarize the metabolic characteristics and applicative advantages of natural formate-utilizing microorganisms, as well as the potential and advantages of model microorganisms for the application of metabolic engineering. For formate-utilizing metabolic pathways, we review the key steps, energy/reducing power consumption and characteristics of natural formate-utilizing pathways, reconstruction and optimization of formate-utilizing pathways and artificial formate-utilizing pathways, and then discuss the potential of metabolic engineering modification of these pathways. For formate-utilizing metabolic engineering strategies, we describe the useful strategies to improve the metabolic efficiency of formate assimilation pathways, such as optimizing the expression level of pathway genes, engineering key pathway enzymes, blocking the competitive pathways, reconstructing cofactor regeneration system, and modular pathway engineering, and then summarize the key approaches to improve the cell growth of formate-utilizing microorganisms, such as adaptive laboratory evolution, enhancing the cell growth of formatotrophs and improving the ability of microorganisms to synergistically utilize formate. Finally, we prospect the developmental direction of microbial utilization of formate from three aspects of formate-utilizing microorganisms, metabolic pathways and metabolic engineering strategies, which would lay the foundation for the development of formate bio-economy.



Keywords: formate; microorganisms; metabolic pathway; energy regeneration; metabolic engineering

传统化工行业依赖于化石燃料或糖类资源,在实际生产过程中不仅产生了大量温室气体,对环境造成了巨大压力,而且还会与食品行业竞争,影响粮食安全^[1-2]。近年来,随着微生物细胞工厂的开发与应用,二氧化碳(CO₂)、一氧化碳(CO)、甲烷(CH₄)、甲醇与甲酸等一碳资源的生物炼制备受关注。相比于化石燃料与传统碳源,一碳资源天然储备丰富且生产成本相对低廉,因此,一碳资源有望成为下一代原料用于制备高附加值化学品^[3-5],如生物能源^[6-7]、生物基材料^[8-9]、生物医药^[10-11]等,从而推动碳资源的可持续循环利用。CO₂、CO与CH₄作为气态底物,在气液传质上具有一定的局限性^[4, 12],不利于微生物的细胞生长与产物合成;甲醇与甲酸作为液态底物,很好地绕过了这些限制条件^[13]。甲醇作为一种大宗化学品,产能丰富且生产成本低,但是受到易燃性的限制,甲醇在微生物培养过程中的安全性明显低于甲酸^[14]。因此,甲酸的工业应用逐步展现出了巨大的潜能^[15],从而凸显了甲酸生物经济的优势。

甲酸生物经济的发展关键在于甲酸营养型微生物的构建与应用。目前,甲酸营养型微生物的构建方式主要有两种:①优化天然甲酸利用微生物,提高甲酸代谢能力。例如,在钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)中,采用低能耗的异源还原性甘氨酸途径取代高能耗的本源卡尔文循环,有效提高了菌株的甲酸代谢潜力^[16]。虽然天然甲酸利用微生物具有一定的甲酸代谢基础,能够进行代谢工程改造,但是天然甲酸利用微生物的分子遗传学操作工具与方法相对较少,从而在很大程度上限制了其改造与应用的空间。②构建人工甲酸利用微生物,人工赋予模式微生物甲酸代谢能力。例如,通过在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中引入还原性甘氨酸途径与能量再生模块,使得工程菌株能够利用甲酸为唯一碳源和能源进行细胞生长^[17-18]。类似地,通过在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中强化还原性甘氨酸途径,获得的工程菌株可以同化利用甲酸与CO₂^[19]。相比于天然甲酸利用微生物,模式微生物的代谢工程改造难度小且应用范围广,但是却面临甲酸代谢能力不足与生长速率偏低等问题,因此,需要采用合适的代谢工程策略进行

相应的改造与优化,提高甲酸的利用效率。

本综述围绕微生物同化利用甲酸过程中的关键问题,从甲酸利用的微生物、代谢路径和代谢工程策略三个方面,阐述了微生物同化利用甲酸的改造与优化策略,并展望了甲酸生物经济进一步发展与应用的方向。

1 甲酸利用的微生物

甲酸生物经济的发展有利于推动一碳生物炼制的工业化进程,现阶段甲酸生物经济的首要任务是开发出能够高效利用甲酸的微生物。然而,在提高微生物的甲酸利用效率方面仍然存在很多挑战,如:天然甲酸利用微生物的甲酸代谢机制研究尚不完善、代谢工程改造的微生物甲酸耐受性偏低等。因此,需要在解析微生物甲酸代谢机制的基础上,结合代谢改造策略进一步强化微生物甲酸耐受性,提高微生物的甲酸利用效率。

1.1 天然甲酸利用微生物

天然甲酸利用微生物广泛存在于各种环境中,能够通过多种代谢途径,以甲酸为碳源或能源进行细胞生长(图1,表1)。近年来,随着甲酸生物经济的快速发展,天然甲酸利用微生物展现出了广阔的开发空间与独特的研究价值,不仅可以进行代谢改造提高甲酸利用效率与目标代谢物生产能力,而且还能借鉴所具有的天然甲酸利用路径,拓展模式微生物的代谢工程改造空间。

1.1.1 产乙酸菌

产乙酸菌(acetogen)为专性厌氧微生物,可以利用还原性乙酰辅酶A途径进行CO₂固定,在完成终端电子接受和能量代谢的同时,将CO₂转化为乙酰辅酶A^[20][图1(a)]。甲酸作为还原性乙酰辅酶A途径中的重要代谢物之一,对于产乙酸菌的生长与代谢具有重要意义,可以被多种产乙酸菌同化利用,如伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)、永达尔梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)和热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*)等^[20, 37]。近年来,随着甲酸营养型微生物的开发与研究,产乙酸菌可天然利用甲酸的这一特征引起了研究

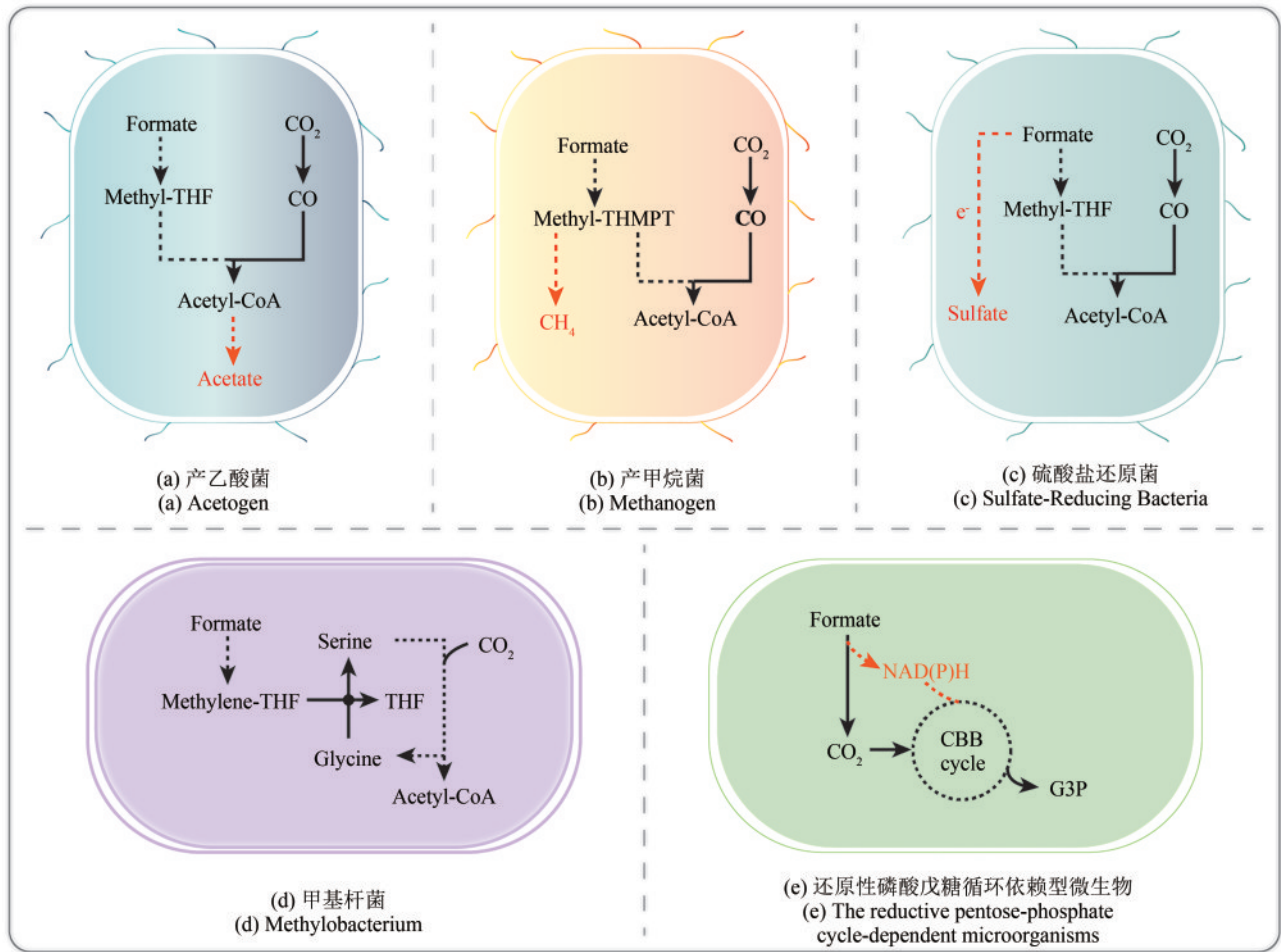


图1 天然甲酸利用微生物

CBB cycle—Calvin-Benson-Bassham 循环; THF—四氢叶酸; THMPT—四氢甲基蝶呤

Fig. 1 Natural formate-utilizing microorganisms

CBB cycle—Calvin-Benson-Bassham cycle; THF—tetrahydrofolate; THMPT—tetrahydromethanopterin

人员的极大重视。其中，以 *A. woodii* 作为产乙酸菌模式菌株，通过定量生理学、转录组学、蛋白质组学和代谢模型计算等策略，分析了菌株的甲酸利用水平与甲酸代谢路径，结果表明 *A. woodii* 具有良好的单一营养/混合营养型甲酸利用能力与能量利用效率^[21-22]，从而充分证明了 *A. woodii* 作为甲酸天然利用微生物所具有的巨大应用潜能。

1.1.2 产甲烷菌

产甲烷菌 (methanogen) 是一种专性厌氧的古菌，可将 CO₂、甲酸、乙酸或含甲基的简单化合物等还原为 CH₄，并从中获取能量^[23] [图1(b)]。根据代谢底物类型的不同，可将产甲烷菌分为氢营养型、甲基营养型和乙酸营养型^[38]。其中，氢营养型产甲烷菌具有最高的产能效率^[39]，部分氢营

养型产甲烷菌可以利用甲酸作为主要的电子供体，将 CO₂ 还原为 CH₄ 进行细胞生长^[38, 40-41]。氢营养型海沼甲烷球菌 (*Methanococcus maripaludis*) 作为产甲烷菌的模式菌株，不仅能利用氢气与甲酸作为电子供体，还能以高转化率将甲酸转化为氢气^[24]。目前，基于 *M. maripaludis* 已经开发出了一系列分子遗传学操作工具与技术^[25-26]，如基于 CRISPR/Cas9 系统^[42] 与 CRISPR/Cas12a 系统^[43] 的基因编辑工具，充分显示出了产甲烷菌进行代谢工程改造的潜能与应用优势。

1.1.3 硫酸盐还原菌

硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 为专性厌氧微生物，能够以有机物、氢气等作为电子供体，以硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐等作为末端

表1 天然甲酸利用微生物

Table 1 Natural formate-utilizing microorganisms

微生物种类	需氧类型	模式菌株	天然甲酸代谢途径	应用优劣势	参考文献
产乙酸菌	专性厌氧	伍氏醋酸杆菌	还原性乙酰辅酶A途径	优势:能够天然利用甲酸和CO ₂ 合成乙酸、乙醇等化合物 劣势:在厌氧条件下生长,不利于工业应用;代谢研究尚不完善,代谢改造工具少	[20-22]
产甲烷菌	专性厌氧	氢营养型海沼甲烷球菌	还原性乙酰辅酶A途径	优势:能够天然利用甲酸和CO ₂ 合成甲烷,在清洁能源产业方面具有应用潜能 劣势:在厌氧条件下生长,不利于工业应用;代谢研究尚不完善,代谢改造工具少	[23-26]
硫酸盐还原菌	专型厌氧	普通脱硫弧菌	还原性乙酰辅酶A途径	优势:具有非常高的氢化酶活性,能够天然利用甲酸产氢,在清洁能源产业方面具有应用潜能 劣势:厌氧条件下生长,不利于工业应用;代谢研究尚不完善,代谢改造工具少	[27-29]
甲基杆菌	好氧或兼性厌氧	扭脱甲基杆菌 AM1	丝氨酸循环	优势:能够天然利用甲酸、CO ₂ 与甲醇等一碳底物进行细胞生长;模式菌株的研究与改造相对充分,具有一定的改造潜能 劣势:所具有的甲酸代谢路径的能量利用效率偏低,不利于工业应用	[30-32]
CBB循环依赖型微生物	好氧	钩虫贪铜菌 H16	还原性磷酸戊糖循环	优势:具有甲酸脱氢酶,能够利用甲酸作为唯一碳源和能源;模式菌株的研究与改造相对充分,具有一定的应用潜能 劣势:甲酸的氧化供能存在能量浪费,因此微生物的细胞生长速率与工业生产潜能均偏低	[33-36]

注: CBB循环为还原性磷酸戊糖循环的别称。

电子受体,通过异化作用获取能量来进行细胞生长[图1(c)]。部分SRB可以利用甲酸作碳源或电子供体,如普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*)^[44]、巴氏脱硫弧菌(*Desulfovibrio baarsii*)^[45]、脱硫脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)^[46]和巴氏脱硫菌(*Desulfarculus baarsii*)^[47]等。在SRB可利用的众多底物中,甲酸被认为是生物制氢的最佳底物之一^[27-28]。以*D. vulgaris*作为SRB的模式菌株,验证了以甲酸为底物驱动产氢的可行性^[27, 29, 48],证明了SRB在生物制氢方面所具有的优势与未来发展空间。

1.1.4 甲基杆菌

甲基杆菌属(*Methylobacterium*)细菌为好氧或兼性厌氧的甲基营养型微生物,能够在甲酸、甲醛、甲醇或甲胺等一碳化合物上进行生长,也能利用二碳、三碳和四碳等多碳化合物进行生长^[30][图1(d)]。扭脱甲基杆菌 AM1 (*Methylobacterium extorquens* AM1)为甲基杆菌的模式菌株,能够利用甲醇作唯一碳源和能源。以往关于*M. extorquens* AM1的研究,多集中于以甲醇为底物生产聚羟基丁酸酯、有机酸和精细化学品等^[49]。近年来,随着甲酸为底物的优势逐步凸显出来,*M. extorquens* AM1可

通过丝氨酸循环利用甲酸的特性也引起了研究人员的重视^[31]。特别是对*M. extorquens* AM1的5,10-次甲基四氢叶酸环化酶的研究,为甲酸同化分子机制的研究奠定了生物化学基础^[50]。另外,通过甲醇与甲酸的耦合利用,提高了*M. extorquens* AM1的甲羟戊酸产量、产率和甲醇消耗速率^[32],充分体现了*M. extorquens* AM1代谢利用甲酸的优势,为一碳化合物转化为高附加值化学品提供了一种切实可行的途径。

1.1.5 其他天然微生物

除了上述天然甲酸利用微生物之外,近年来研究人员逐步分离与鉴定出更多新的天然甲酸利用微生物,如能够通过丝氨酸循环同化甲酸合成单细胞蛋白的共生副球菌 MA5 (*Paracoccus communis* MA5)^[51],这在一定程度上拓宽了甲酸利用微生物的应用范围。另外,除了还原性乙酰辅酶A途径、丝氨酸循环以及还原性甘氨酸途径之外,部分天然甲酸利用微生物还可以通过还原性磷酸戊糖循环利用甲酸,如*C. necator* H16^[33-34]、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)^[52]、亚硝酸盐氧化细菌(*Nitrolancetus hollandicus*)^[53]、嗜二氧杂环乙烷假诺卡氏菌 CB1190 (*Pseudonocardia*

dioxanivorans CB1190)^[54] 和嗜硫偶氮螺旋菌 (*Azospirillum thophilum*)^[55] 等, 它们都具有甲酸脱氢酶, 能够在甲酸氧化为CO₂的同时产生还原力, 并通过还原性磷酸戊糖循环固定CO₂进行细胞生长与代谢 [图1(e)]。 *C. necator* H16作为这一类型微生物的模式菌株, 已经开发出一系列相应的分子遗传学操作工具与技术, 并结合代谢工程改造策略将其应用于开发微生物细胞工厂生产多种代谢产物^[35-36], 极大地拓宽了生物固碳与甲酸生物经济的发展空间。

1.2 代谢工程改造的微生物

天然甲酸利用微生物具有同化甲酸的代谢途径, 可以直接将甲酸作为碳源或能源。然而, 大多数天然甲酸利用微生物并不像 *E. coli*、*S. cerevisiae* 等模式微生物适用于代谢工程改造与工业化生产。

与代谢工程改造模式微生物相比, 天然甲酸利用微生物仍然存在一定的不足, 如: 对环境条件更为敏感、培养条件更加复杂、生长速度较为缓慢等。此外, 由于天然甲酸利用微生物的代谢机制研究尚不清晰, 因此对其进行代谢工程改造仍然存在挑战。相比而言, *E. coli*、*S. cerevisiae* 等模式微生物 (图2, 表2) 的研究更加充分, 不仅更适用于代谢工程改造与工业化生产, 而且更有利于甲酸生物经济的进一步发展。

1.2.1 大肠杆菌

E. coli 作为常用的原核模式微生物, 近年来已有多项研究聚焦于改造 *E. coli* 利用甲酸。在这些研究中, 通过构建甲酸利用路径 [图2(a)], 并结合代谢工程策略与实验室适应性进化等策略, 使得 *E. coli* 能够利用甲酸 (或甲酸与CO₂) 进行细胞生长^[56], 充分体现了实验室改造模式微生物利用甲酸的可行性。然而, 这种甲酸营养型 *E. coli* 的生长

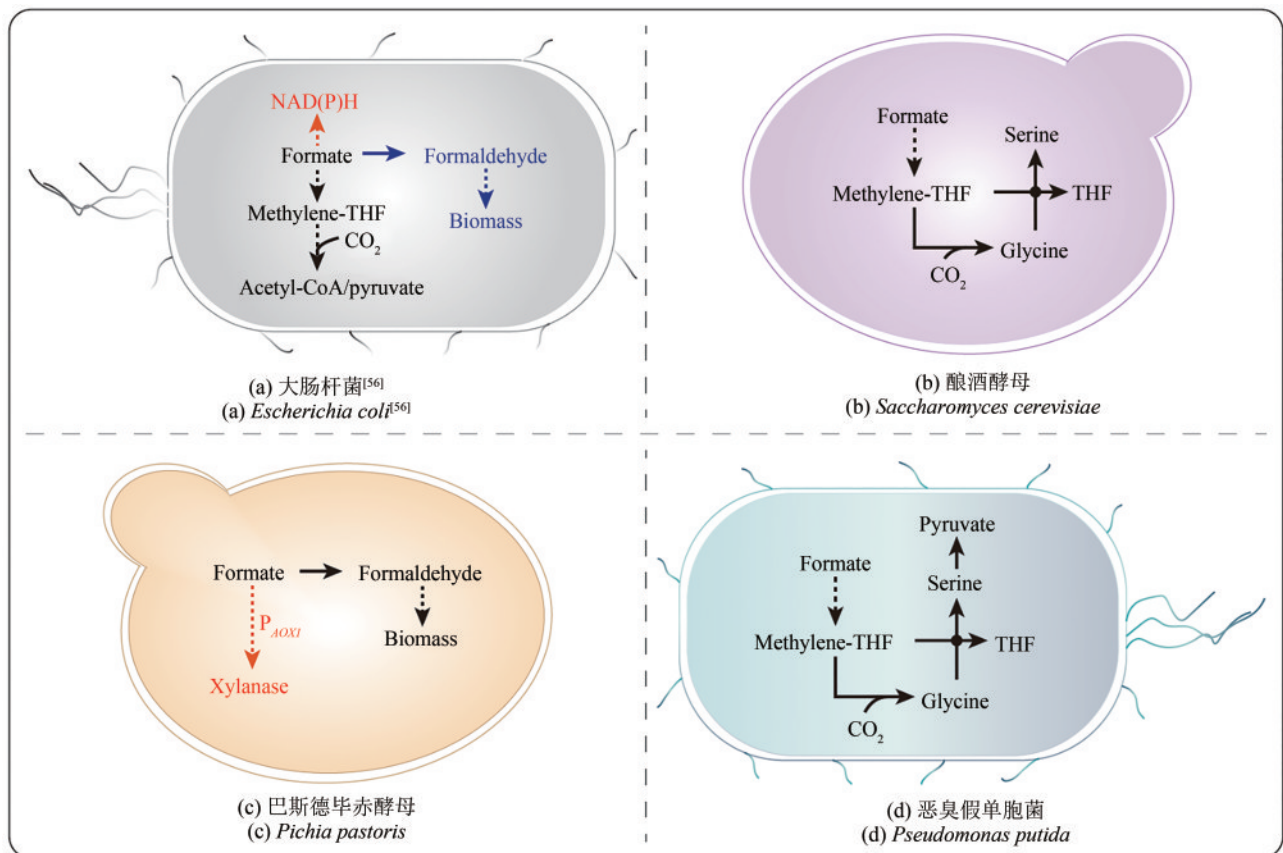


图2 代谢工程改造的微生物

P_{AOX1} —醇氧化酶启动子; THF—四氢叶酸

Fig. 2 Metabolically engineered microorganisms

P_{AOX1} —alcohol oxidase 1 promoter; THF—tetrahydrofolate

表2 代谢工程改造的微生物

Table 2 Metabolically engineered microorganisms

微生物	非天然甲酸代谢路径	主要的应用优势	改造潜能	参考文献
大肠杆菌	重构的卡尔文循环; 改良的丝氨酸循环; 高丝氨酸循环; rTHF-rgcv 途径及关键模块 合成乙酰辅酶A途径等	生长周期短; 遗传背景清晰; 代谢工程改造工具种类丰富且高效	设计并构建更加高效的甲酸利用路径; 通过实验室适应性进化与培养条件优化等策略提高菌株对甲酸的耐受性	[17-18, 56-67]
酿酒酵母	rTHF-rgcv 途径 的关键模块	遗传背景清晰; 分子遗传操作工具与技术成熟且高效; 具有内源性甲酸脱氢酶,对甲酸的耐受性较高	通过代谢改造进一步提高 rTHF-rgcv 途径对甲酸的利用效率,开发以甲酸为唯一碳源和能源的工程菌株	[19]
毕赤酵母	以甲酸作为 P _{AOX1} 的诱导物	能够利用甲醇作为唯一碳源和能源进行细胞生长; 在生物医药产业和工业酶生产方面具有巨大潜力	通过代谢改造进一步提高菌株对甲酸的利用效率; 基于菌株的代谢网络,设计并构建更加高效的甲酸利用路径	[68-69]
恶臭假单胞菌	rTHF-rgcv 途径	能够编码多种天然甲酸脱氢酶; 具有灵活的代谢机制,能够抵抗氧化应激和多种有毒化合物	开发更高效的分子遗传操作工具,进一步完善菌株的甲酸代谢网络	[70]

注: rTHF-rgcv 途径为重组 THF 循环-反向甘氨酸裂解途径 (reconstructed THF cycle-reverse glycine cleavage pathway)。

速率与细胞密度显著低于使用常规碳源培养的 *E. coli*, 主要原因在于甲酸营养型 *E. coli* 对甲酸的同化效率与耐受性均偏低。

1.2.2 酿酒酵母

相比于 *E. coli*, *S. cerevisiae* 作为真核模式微生物, 虽然生长周期较长, 但是其拥有高效的内源性 NAD⁺ 依赖型甲酸脱氢酶, 因此对甲酸的耐受性更高。此外, 已有研究表明 *S. cerevisiae* 中存在还原性甘氨酸途径所需的酶, 将该途径所涉及的酶进行强化表达之后, 能够实现 *S. cerevisiae* 同化利用甲酸与 CO₂ [图 2(b)], 并且在 1~500 mmol/L 甲酸范围内生长速率均能保持恒定^[19], 这表明 *S. cerevisiae* 具有成为高效利用甲酸宿主的潜力。

1.2.3 其他微生物

甲酸营养型微生物的开发与应用在一碳生物炼制方面展现出了巨大潜能。除了 *E. coli* 与 *S. cerevisiae* 之外, 通过改造其他模式微生物进行甲酸代谢, 有利于开发更高效的甲酸营养型微生物细胞工厂。巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为天然的甲基营养型酵母, 在一碳生物炼制方面有望成为代谢工程改造的关键底盘微生物。甲醇作为诱导物, 可以触发 *P. pastoris* 的醇氧化酶 (alcohol oxidase 1, AOX1) 启动子 P_{AOX1} 所调控的异源蛋白表达。然而, 由于甲醇具有一定的毒性、

易燃性和爆炸性, 从而限制了 *P. pastoris* 在食品与生物医药等产业的大规模应用。与甲醇相比, 甲酸被认为是更安全的 P_{AOX1} 的诱导物^[68]。利用甲酸作为诱导物, 可以增强 *P. pastoris* 木聚糖酶的表达 [图 2(c)], 体现了该系统在异源蛋白表达与安全性方面的潜力^[68-69]。此外, 通过在恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 中引入异源的还原性甘氨酸途径 [图 2(d)], 并结合模块化工程、代谢工程改造与实验室适应性进化等多项策略, 获得了能够同化利用甲酸的工程菌株^[70], 从而证明了 *P. putida* 在甲酸利用方面的潜能。

2 甲酸利用的代谢路径

甲酸代谢路径是甲酸营养型微生物利用甲酸的基础, 根据甲酸代谢路径的来源与特点可分为 3 类: 天然的甲酸利用路径、重构与优化的甲酸利用路径以及人工设计的甲酸利用路径。然而, 天然的甲酸利用路径存在明显的应用局限性, 人工设计的甲酸利用路径则面临路径酶催化效率低等问题。因此, 现阶段甲酸代谢路径的研究仍聚焦于天然甲酸利用路径的重构与优化。

2.1 天然甲酸利用途径

根据微生物利用甲酸的方式, 可将天然甲酸利用途径分为2类(图3): ①甲酸分子并不直接参与到细胞代谢中, 而是在氧化为 CO_2 过程中产生还原力, 从而为微生物的生长与固碳代谢提供能量, 如还原性磷酸戊糖循环; ②甲酸分子作为碳源, 被直接同化进入到微生物的中心代谢之中, 但是部分甲酸分子仍可能被氧化用于供能, 如丝氨酸循环、还原性乙酰辅酶A途径和还原性甘氨酸途径。

2.1.1 还原性磷酸戊糖循环

还原性磷酸戊糖循环(reductive pentose-phosphate cycle), 也称为 Calvin-Benson-Bassham (CBB) 循环, 是唯一已知的能够利用甲酸进行微生物自养生长的天然碳同化途径^[71]。CBB循环主要包括三个过程[图3(a)]: 首先是羧化作用, 在关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的作用下, 1分子 CO_2 与1,5-二磷酸核酮糖(ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP)分子进行反应, 生成一个不稳定的六碳化合物, 随之分解为2分子3-磷酸甘油酸; 其次是还原作用, 2分子3-磷酸甘油酸先转化为2分子1,3-二磷酸甘油酸, 随之生成2分子3-磷酸甘油醛; 最后是RuBP的再生, 在经过一系列多碳糖之间复杂的生物转化后, 5分子3-磷酸甘油醛先转化为1分子5-磷酸核酮糖, 随之再生得到1分子RuBP。综上所述, 每轮CBB循环固定1分子 CO_2 , 三轮循环后生成1分子3-磷酸甘油醛, 共计消耗6分子NAD(P)H与9分子ATP。CBB循环依赖型微生物可以将甲酸作为唯一碳源和能源进行细胞生长。然而, CBB循环途径仍然存在一定的不足, 如该循环是ATP利用效率最低的固碳途径之一^[72]。与甲酸直接同化相比, 甲酸的氧化供能存在着能量浪费, 因为电子从甲酸转移到氧化还原载体的过程需要消耗额外的能量^[71]。因此, CBB循环依赖型微生物的细胞生长速率与生产潜能仍然不够高, 与实际的工业化生产仍然存在差距。

2.1.2 丝氨酸循环

丝氨酸循环(serine cycle)是多种甲基营养型微生物(如*M. extorquens* AM1^[31])同化利用甲酸

的代谢途径。该循环包含了二碳、三碳及四碳化合物之间的相互转化[图3(b)]: 首先是四氢叶酸(tetrahydrofolic acid, 简称THF)循环, 即甲酸分子在甲酸四氢叶酸连接酶、次甲基四氢叶酸环水解酶和亚甲基四氢叶酸脱氢酶的先后作用下, 生成5,10-亚甲基四氢叶酸, 随后5,10-亚甲基四氢叶酸的甲基转移到二碳化合物甘氨酸上, 生成三碳化合物丝氨酸; 其次, 丝氨酸依次转化为羟基丙酮酸、甘油酸、2-磷酸甘油酸与磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP), 随后PEP经羧化作用固定1分子 CO_2 生成四碳化合物草酰乙酸; 然后, 草酰乙酸依次转化为苹果酸与苹果酰辅酶A; 最后, 苹果酰辅酶A裂解为两个二碳化合物乙酰辅酶A与乙醛酸, 其中乙醛酸能够再次转化为甘氨酸用于维持丝氨酸循环。综上所述, 每轮丝氨酸循环能够同化1分子甲酸并固定1分子 CO_2 , 最终生成1分子乙酰辅酶A, 共计消耗3分子NAD(P)H与3分子ATP。与甲酸氧化供能相比, 丝氨酸循环可以同化甲酸并固定 CO_2 , 不仅避免了碳损失, 而且还能在一定程度上减少能量浪费。通过在*E. coli*中引入异源的天然丝氨酸循环, 同时结合实验室适应性进化策略, 获得了能够同化利用甲酸合成乙醇的工程菌株^[73], 从而验证了丝氨酸循环在模式微生物中同化利用甲酸的可行性。然而, 天然丝氨酸循环所涉及的酶和代谢反应比较多, 且ATP利用效率仍然比较低, 因此, 利用该循环同化甲酸的微生物, 目标代谢物的产量偏低, 目前还不适合用于工业化生产。

2.1.3 还原性乙酰辅酶A途径

还原性乙酰辅酶A途径(reductive acetyl-CoA pathway), 也称为 Wood-Ljungdahl (WL) 途径, 是一种广泛存在于产乙酸菌、产甲烷菌与硫酸盐还原菌等厌氧微生物中的固碳途径。不同类型的厌氧微生物所具有的WL途径结构相似但有所差别, 如产乙酸菌与产甲烷菌的WL途径存在着一碳载体、辅酶与路径酶等方面的差异^[74]。以产乙酸菌的WL途径为例[图3(c)], WL途径由甲基分支与羧基分支两条支路组成。在甲基分支中, 甲酸到5,10-亚甲基四氢叶酸的部分与丝氨酸循环一致, 随后5,10-亚甲基四氢叶酸先转化为5-甲基四氢叶酸, 再实现甲基与钴铁硫蛋白(corrinoid iron-sulfur

protein, CoFeSP) 间的连接, 生成5-甲基钴铁硫蛋白; 在羰基分支中, CO_2 在一氧化碳脱氢酶的作用下转化为CO; 最后, 甲基分支的产物5-甲基钴铁硫蛋白提供甲基, 羰基分支的产物CO提供羰基, 两者连接生成乙酰辅酶A。综上所述, WL途径能够同化1分子甲酸与1分子 CO_2 , 最终生成1分子乙酰辅酶A, 共计消耗3分子NAD(P)H与1分子ATP。与丝氨酸循环相比, WL途径生成1分子乙酰辅酶A仅仅消耗了1分子ATP, 且该途径不存在碳损失, 是ATP利用效率最高的天然甲酸同化路径。然而, WL途径的蛋白质组学十分复杂, 且包含对氧气非常敏感的路径酶, 因此, 该途径仅仅能够在严格厌氧的条件下运行, 且代谢改造难度比较大^[75-76], 实现工业应用仍然存在挑战。

2.1.4 还原性甘氨酸途径

还原性甘氨酸途径 (reductive glycine pathway, 简称为rGly途径), 主要存在于硫酸盐还原菌 (如 *D. desulfuricans*)^[46] 和产乙酸菌 (如梭状芽孢杆菌 *Clostridium drakei*)^[77] 中。该途径主要包括三个模块 [图3(d)]: 首先, 由甲酸到5,10-亚甲基四氢叶酸的转化; 其次, 5,10-亚甲基四氢叶酸在甘氨酸裂解系统 (glycine cleavage system, GCS) 的催化下, 固定1分子 CO_2 生成甘氨酸; 最后, 甘氨酸可通过两种路线转化为丙酮酸, 一种为还原甘氨酸 (reductive glycine, RG) 路线, 即5,10-亚甲基四氢叶酸的甲基转移到甘氨酸上生成丝氨酸, 随后丝氨酸脱氨基形成丙酮酸, 另一种为甘氨酸还原酶 (glycine reductase, GR) 路线, 即甘氨酸依次转化为乙酰磷酸、乙酸与乙酰辅酶A, 随后固定1分子 CO_2 生成丙酮酸。综上所述, 依赖于RG路线的rGly途径能够同化2分子甲酸和1分子 CO_2 , 最终生成1分子丙酮酸, 共计消耗3分子NAD(P)H与2分子ATP; 依赖于GR路线的rGly途径能够同化1分子甲酸和2分子 CO_2 , 最终生成1分子丙酮酸, 共计消耗2分子NAD(P)H与1分子ATP。rGly途径是一种能够高效同化甲酸的代谢路径, 具有许多优势: rGly途径对ATP的利用效率仅次于WL途径; rGly途径为线性途径, 降低了代谢改造的难度, 且多种微生物具有内源性的rGly途径^[78]; rGly途径与中心代谢途径的重叠较少, 因此异源引入或改造内源rGly途径对本源代谢网络的干扰

比较小; 与丝氨酸循环和WL途径相比, rGly途径具有更高的代谢物灵活性, 可以进一步转化为多种化学品。基于上述优势, rGly途径成为目前最具发展潜力的甲酸代谢路径, 与此同时, 对路径关键酶GCS的深入研究^[79-80], 有望进一步优化rGly途径。然而, 对于具有天然rGly途径的微生物研究仍然较少, 还不能满足现阶段甲酸生物经济的发展要求。

2.2 重构与优化甲酸利用路径

目前, 对于天然甲酸利用路径的应用, 还存在着许多缺点与限制条件, 因此, 为了提高甲酸利用路径的效率与应用潜能, 研究人员在 *E. coli* 等模式微生物中重构与优化了天然甲酸利用路径, 获得了一系列新型甲酸利用路径 (图4), 并分析了新型路径的特点与可行性。

2.2.1 重构的卡尔文循环

通过在 *E. coli* 中重构卡尔文循环, 首次实现了异养微生物向自养微生物的转化^[57]。通过敲除糖酵解途径中的磷酸果糖激酶和戊糖磷酸途径中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 并异源表达核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶、磷酸核酮糖激酶、碳酸酐酶和甲酸脱氢酶, 实现了在 *E. coli* 中重构卡尔文循环 [图4(a)]。重构的卡尔文循环 (reconstructed Calvin cycle) 可以固定 CO_2 合成生物量, 同时氧化甲酸实现供能。在此基础上, 将该循环与实验室适应性进化相结合, 进化获得了自养型 *E. coli*, 这种基于甲酸供能的生物固碳模式在甲酸生物经济发展和未来工业生物制造方面具有极大的潜力^[81]。此外, 随着近年来电化学法还原 CO_2 生产甲酸^[82-84]的深入研究, 该自养系统中由于甲酸氧化速率高于固碳速率而导致的 CO_2 净排放也有望得到优化与解决。

2.2.2 改良的丝氨酸循环

基于源自 *M. extorquens* AM1 的天然丝氨酸循环, 通过在 *E. coli* 中进行表达与改良丝氨酸循环, 获得的工程菌株能够利用甲醇、甲酸和 CO_2 合成乙酰辅酶A^[58]。改良的丝氨酸循环 (modified serine cycle) 同化甲酸的过程主要分为以下几个步骤 [图4(b)]: 首先, 甲酸在甲酸四氢叶酸连接酶和5,10-亚甲基四氢叶酸合成酶的作用下转化为

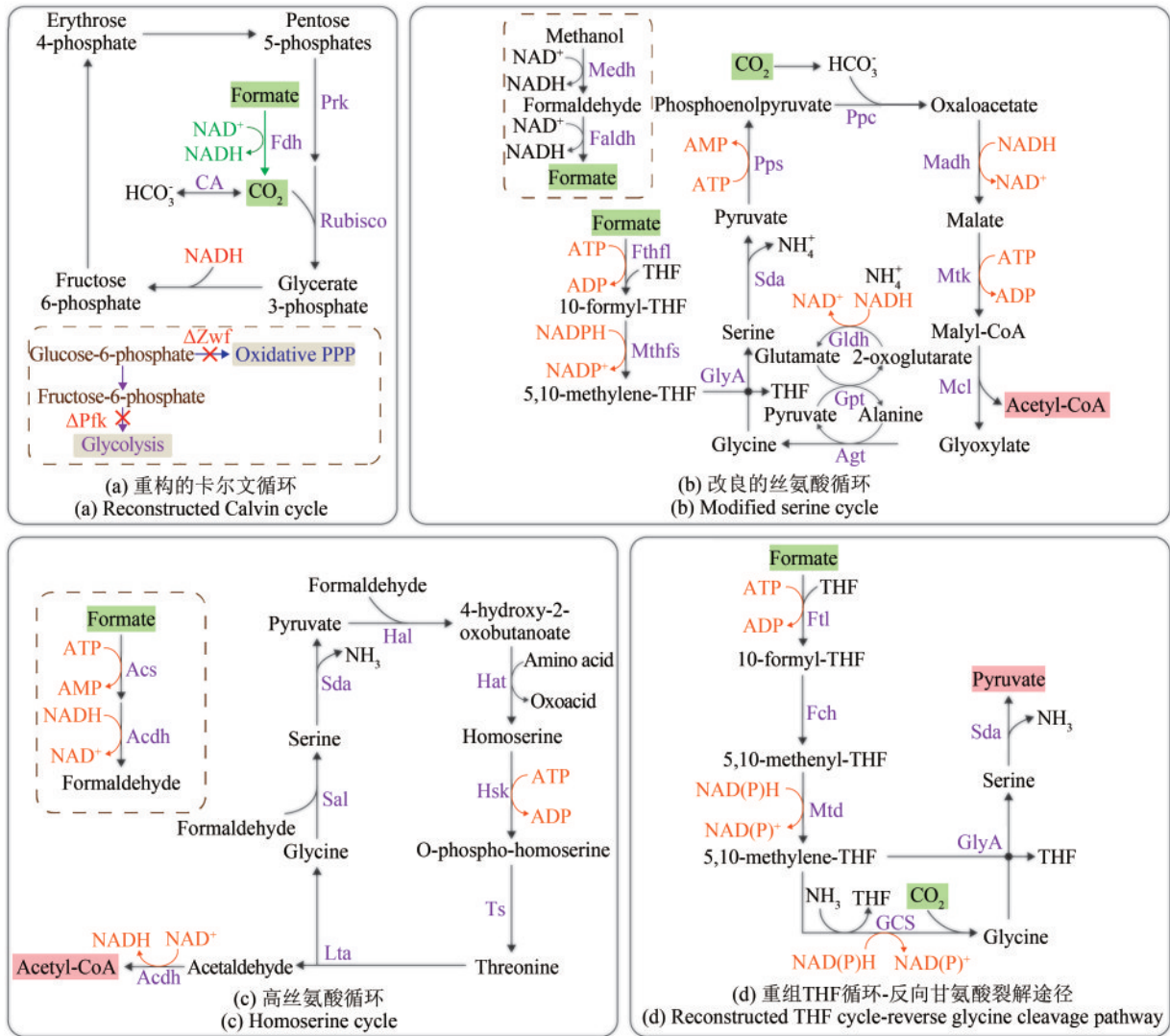


图4 重构优化甲酸利用路径

(绿色底色的化合物为路径底物, 粉色底色的化合物为路径产物)

Acdh—乙醛脱氢酶; Acs—乙酰辅酶A合成酶; Agt—丙氨酸-乙醛转氨酶; CA—碳酸酐酶; Faldh—甲醛脱氢酶; Fch—一次甲基四氢叶酸环水解酶; Fdh—甲酸脱氢酶; Fthfl—甲酸四氢叶酸连接酶; Ftl—甲酸四氢叶酸连接酶; GCS—甘氨酸裂解系统; Gldh—谷氨酸脱氢酶; GlyA—丝氨酸羟甲基转移酶; Gpt—谷氨酸-丙酮转氨酶; Hal—HOB醛缩酶; Hat—HOB转氨酶; Hsk—高丝氨酸激酶; Lta—苏氨酸醛缩酶; Madh—苹果酸脱氢酶; Mcl—苹果酰辅酶A裂解酶; Medh—甲醇脱氢酶; Mtd—亚甲基四氢叶酸脱氢酶; Mthfs—5,10-亚甲基四氢叶酸合成酶; Mtk—苹果酸硫激酶; Oxidative PPP—氧化戊糖磷酸途径; Pfk—磷酸果糖激酶; Ppc—PEP羧化酶; Pps—PEP合成酶; Prk—磷酸核酮糖激酶; Rubisco—核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶; Sal—丝氨酸醛缩酶; Sda—丝氨酸脱氨酶; THF—四氢叶酸; Ts—苏氨酸合成酶; Zwf—6-磷酸葡萄糖脱氢酶

Fig. 4 Reconstruction and optimization of formate-utilizing pathways

(compounds with a green background are pathway substrates; compounds with a pink background are pathway products)

Acdh—acetaldehyde dehydrogenase; Acs—acetyl-CoA synthase; Agt—alanine-glyoxylate transaminase; CA—carbonic anhydrase; Faldh—formaldehyde dehydrogenase; Fch—methenyl-tetrahydrofolate cyclohydrolase; Fdh—formate dehydrogenase; Fthfl—formate-tetrahydrofolate ligase; Ftl—formate-tetrahydrofolate ligase; GCS—glycine cleavage system; Gldh—glutamate dehydrogenase; GlyA—serine hydroxymethyltransferase; Gpt—glutamate-pyruvate transaminase; Hal—4-hydroxy-2-oxobutanoate aldolase; Hat—4-hydroxy-2-oxobutanoate aminotransferase; Hsk—homoserine kinase; Lta—threonine aldolase; Madh—malate dehydrogenase; Mcl—malyl-CoA lyase; Medh—methanol dehydrogenase; Mtd—methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase; Mthfs—5,10-methylene-tetrahydrofolate synthase; Mtk—malate thiokinase; Oxidative PPP—Oxidative pentose-phosphate pathway; Pfk—phosphofruktokinase; Ppc—phosphoenolpyruvate carboxylase; Pps—phosphoenolpyruvate synthase; Prk—phosphoribulo kinase; Rubisco—ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase; Sal—serine aldolase; Sda—serine deaminase; THF—tetrahydrofolate; Ts—threonine synthase; Zwf—glucose-6-phosphate dehydrogenase

5,10-亚甲基四氢叶酸,随后在丝氨酸羟甲基转移酶的催化下,5,10-亚甲基四氢叶酸的甲基转移至甘氨酸上,生成丝氨酸;其次,丝氨酸在丝氨酸脱氨酶的催化下脱氨生成丙酮酸,再经PEP合成酶、PEP羧化酶的作用,固定1分子CO₂生成草酰乙酸;再次,草酰乙酸在苹果酸脱氢酶和苹果酸硫激酶的作用下转化为苹果酰辅酶A;最后,苹果酰辅酶A经苹果酰辅酶A裂解酶的催化,裂解为乙醛酸与乙酰辅酶A。其中,乙酰辅酶A作为该循环的输出产物,而乙醛酸则转化为甘氨酸用于完成新一轮循环。综上所述,当甲酸作为底物时,改良的丝氨酸循环与天然丝氨酸循环一致,每轮循环能够同化1分子甲酸并固定1分子CO₂,最终生成1分子乙酰辅酶A,共计消耗3分子NAD(P)H与3分子ATP。相比于天然丝氨酸循环,改良的丝氨酸循环具有一定生物优势。通过甲醇脱氢酶和甲醛脱氢酶,不仅简化了甲醇转化为甲酸的路径,而且还利用丙氨酸-乙醛酸转氨酶、谷氨酸-丙酮酸转氨酶和谷氨酸脱氢酶进行氨同化,以丙氨酸代替丝氨酸成为氨基供体,从而避免了有毒中间代谢物羟基丙酮酸的生成。然而,改良的丝氨酸循环路径比较复杂,涉及多个酶促反应,且与中心代谢途径的重叠较多。因此,仍存在ATP利用效率偏低的问题,不利于进一步的代谢工程改造与工业应用。

2.2.3 高丝氨酸循环

基于丝氨酸循环,在*E. coli*中构建了高丝氨酸循环(homoserine cycle)^[59] [图4(c)]。首先,甲酸在乙酰辅酶A合成酶和乙醛脱氢酶的作用下转化为甲醛,甲醛作为一种高活性化合物,更易于被同化进入代谢系统^[56, 85];其次,在丝氨酸醛缩酶的作用下,甲醛与甘氨酸反应生成丝氨酸,随之丝氨酸脱氨形成丙酮酸;然后,另一分子甲醛与丙酮酸在4-羟基-2-氧代丁酸(4-hydroxy-2-oxobutanoate, HOB)醛缩酶的作用下,生成非天然代谢物HOB;随后,氨基被结合到HOB上生成高丝氨酸,高丝氨酸在高丝氨酸激酶与苏氨酸合成酶的作用下转化为苏氨酸;最后,在苏氨酸醛缩酶的催化下,苏氨酸裂解为甘氨酸与乙醛。其中,甘氨酸重新进入循环,而乙醛分子经乙醛脱氢酶的催化,生成乙酰辅酶A并输出循环。综合

所述,每轮高丝氨酸循环能够同化2分子甲酸,最终生成1分子乙酰辅酶A,共计消耗1分子NADH与3分子ATP。高丝氨酸循环是在改良丝氨酸循环的基础上,对天然丝氨酸循环进行的更深层的优化,具有明显的优势:以甲醛替代CO₂进入同化路径,改善了羧化反应所造成的限速作用,减少了还原力的使用,有利于支持更高的生物量产量;该循环路径所涉及的酶均为*E. coli*的内源酶,保证了酶的催化活性;相比于丝氨酸循环,该循环所包含的酶促反应较少,且与中心代谢途径的重叠也较少^[59]。然而,甲醛与高丝氨酸对*E. coli*都具有一定的毒性作用。因此,深入探究*E. coli*的毒性机理与解毒机制^[86-88],对于进一步优化高丝氨酸循环具有重要意义。

2.2.4 重组THF循环-反向甘氨酸裂解途径

近年来,依赖于RG路线的rGly途径已被应用于多种微生物的代谢改造。在这些研究中,rGly途径通常被分为两个模块[图4(d)]:重组THF循环(reconstructed THF cycle, rTHF)模块与反向甘氨酸裂解(reverse glycine cleavage, rgcv)模块。通过组合rTHF模块与rgcv模块,验证了甲酸同化在*E. coli*中的可行性。随后,rTHF-rgcv途径以及关键模块被进一步从*E. coli*拓展到多种微生物中,通过组合和优化异源路径酶与微生物内源酶之间的适配性,实现了rTHF-rgcv途径在多种微生物中的应用(表3),从而证明了该途径所具有的优势与工业应用潜能。

2.3 人工设计甲酸利用路径

随着计算机辅助路径设计^[90]与酶工程^[91-92]等技术的发展,研究人员在开发新型甲酸利用路径(图5)时不再局限于自然界已有的酶促反应,这不仅有利于简化甲酸利用路径,而且还能够拓展甲酸营养型微生物的改造空间。

2.3.1 甲醛酶途径

以荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的苯甲醛裂解酶为基础,设计并优化获得了一种新酶:甲醛酶(formolase)^[93]。在此基础上,重构了一条新型甲酸同化路径,即甲醛酶途径(formolase pathway),该途径由四步酶促反应组成

表3 rTHF-rgev途径的路径酶来源

Table 3 Source of pathway enzymes of the rTHF-rgev pathway

菌株	路径酶来源	参考文献
<i>Escherichia coli</i>	Ftl、Fch、Mtd(源自 <i>Clostridium ljungdahalii</i>) GCS、GlyA、Sda(内源酶)	[61]
<i>Escherichia coli</i>	Ftl、Fch、Mtd(源自 <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1) GCS、GlyA(内源酶)	[62]
<i>Escherichia coli</i>	Ftl、Fch、Mtd(源自 <i>Methylobacterium extorquens</i> CM4) GCS、GlyA、Sda(内源酶) Fdh(源自 <i>Candida boidinii</i>)	[63]
<i>Escherichia coli</i>	Ftl(源自 <i>Clostridium kluyveri</i>) FolD(Fch/ Mtd)、GCS、GlyA(内源酶)	[64]
<i>Escherichia coli</i>	Ftl、Fch、Mtd(源自 <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1) GCS、GlyA、Sda(内源酶) Fdh(源自 <i>Pseudomonas</i> sp.)	[17]
<i>Escherichia coli</i> (Bang等 ^[63] 研究的进一步拓展)	Ftl、Fch、Mtd(源自 <i>Methylobacterium extorquens</i> CM4) GCS、GlyA、Sda(内源酶) Fdh(源自 <i>Candida boidinii</i> 、 <i>Arabidopsis thaliana</i>)	[18]
<i>Escherichia coli</i> (Döring等 ^[64] 研究的进一步拓展)	Ftl(源自 <i>Clostridium kluyveri</i>) FolD(Fch/ Mtd)、GCS、GlyA(内源酶)	[65]
<i>Escherichia coli</i> (Kim等 ^[17] 研究的进一步拓展)	Ftl、Fch、Mtd(源自 <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1) GCS、GlyA、Sda(内源酶) Fdh(源自 <i>Pseudomonas</i> sp.)	[66]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MIS1(Ftl/ Fch/ Mtd)、GCS(内源酶) Fdh(内源酶)	[19]
<i>Cupriavidus necator</i>	Ftl、Fch、Mtd(源自 <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1) GCS、GlyA、Sda(内源酶) Fdh(内源酶)	[16]
<i>Clostridium pasteurianum</i>	GCS(源自 <i>Gottschalkia acidurici</i>) Ftl、Fch、Mtd、GlyA、Sda(内源酶)	[89]
<i>Pseudomonas putida</i>	Ftl、Fch、Mtd(源自 <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1) GCS、GlyA、Sda(内源酶) Fdh(内源酶)	[70]

注: FolD为Fch/ Mtd双功能酶; MIS1为Ftl/ Fch/ Mtd三功能酶。

[图5(a)]: 首先, 甲酸在乙酰辅酶A合成酶与乙醛脱氢酶的作用下转化为甲醛; 其次, 在甲醛酶的催化作用下, 3分子甲醛缩合生成1分子二羟基丙酮; 最后, 二羟基丙酮在二羟基丙酮激酶的作用下转化为微生物的中心代谢物磷酸二羟丙酮。综上所述, 该路径能够同化3分子甲酸生成1分子磷酸二羟丙酮, 共计消耗3分子NADH与4分子ATP。甲醛酶路径为线性反应路径, 仅需4种酶即可完成路径催化, 然而, 甲醛酶的酶促反应效率比较低, 从而限制了该路径的应用潜能。通过酶工程策略对甲醛酶途径的甲醛酶与乙醛脱氢酶进行改造, 能够有效提高该路径对甲酸的利用效率^[94-95]。

2.3.2 合成乙酰辅酶A途径

通过定向进化 *P. putida* 的苯甲酰甲酸脱羧酶, 获得了乙醇醛合成酶 (glycolaldehyde synthase)^[67]。在此基础上, 构建了一条合成乙酰辅酶A途径 (synthetic acetyl-CoA pathway), 该途径仅有3步酶促反应 [图5(b)]: 首先, 在乙醇醛合成酶的作用下, 两个甲醛分子缩合生成1分子乙醇醛; 其次, 在乙酰磷酸合成酶的催化下, 实现了乙醇醛到乙酰磷酸的转化; 最后, 乙酰磷酸在磷酸转乙酰酶的催化下生成乙酰辅酶A。综上所述, 该路径能够同化2分子甲醛生成1分子乙酰辅酶A, 且不存在ATP与还原力的消耗。合成乙酰辅酶A途径同样为线性反应路径, 仅需3种酶即可完成路径催化。然

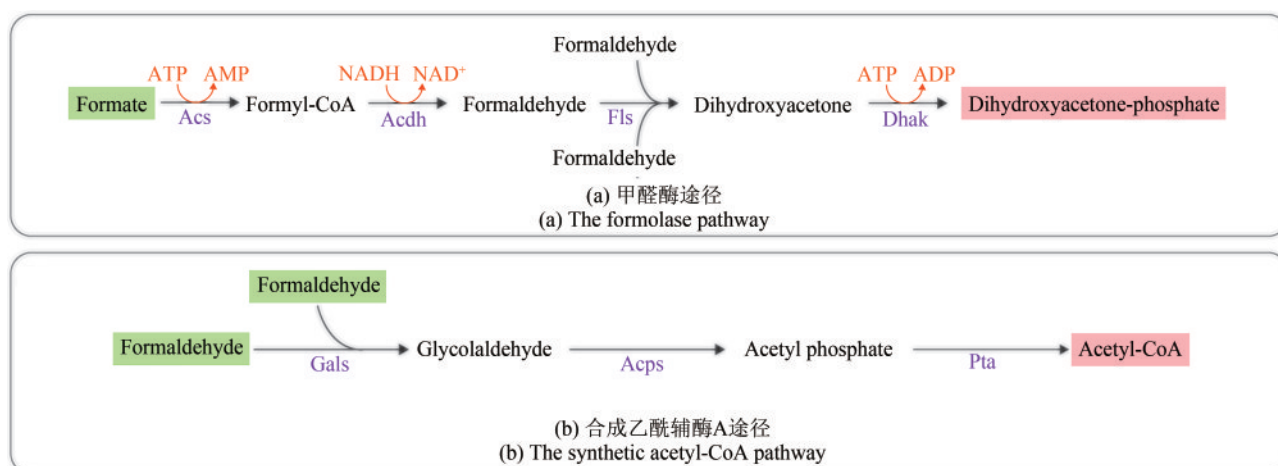


图5 人工设计甲酸利用途径

Acdh—乙醛脱氢酶；Acs—乙酰辅酶A合成酶；Acps—乙酰磷酸合成酶；Dhak—二羟基丙酮激酶；
Fls—甲醛酶；Gals—乙醇醛合成酶；Pta—磷酸转乙酰酶
(绿色底色的化合物为路径底物，粉色底色的化合物为路径产物)

Fig. 5 Artificial formate-utilizing pathways

Acdh—acetaldehyde dehydrogenase; Acs—acetyl-CoA synthase; Acps—acetyl phosphate synthase;
Dhak—dihydroxyacetone kinase; Fls—formolase; Gals—glycolaldehyde synthase; Pta—phosphate acetyltransferase
(compounds with a green background are pathway substrates, compounds with a pink background are pathway products)

而，该途径尚未被拓展到直接利用甲酸作为路径的起点，尚需参考甲醛酶途径以实现甲酸到甲醛的转化。另外，由于甲醛毒性以及乙醇醛合成酶和乙酰磷酸合成酶对底物的亲和力比较差，因此在 *E. coli* 中引入合成乙酰辅酶A途径后，菌株的生物量偏低^[67]，从而限制了该路径在现阶段的应用范围。

3 甲酸利用的代谢工程策略

代谢工程改造在提高微生物细胞工厂的应用方面具有重要意义。甲酸营养型微生物的工业应用主要面临着甲酸同化路径效率低、甲酸利用微生物生长速率缓慢等问题。因此，需要开发合适的代谢工程策略，提高甲酸同化路径的代谢效率，改善甲酸利用微生物的细胞生长，从而推动甲酸生物经济的发展。

3.1 提高甲酸同化路径的代谢效率

甲酸同化路径的代谢效率决定了微生物利用甲酸的效率。然而，不同类型的甲酸利用微生物具有不同的代谢特征，因此，需要选择合适的代

谢工程策略来提高甲酸同化路径的代谢效率。近年来，提高甲酸同化路径代谢效率的策略，主要包括：路径基因表达水平优化、路径关键酶改造、竞争路径阻断、辅因子再生系统重构、路径模块化优化等。

3.1.1 路径基因表达水平优化

甲酸同化路径的构建方式主要包括两种：一种是将异源路径基因与微生物的内源基因进行理性组合；另一种是仅对微生物内源基因进行系统优化。然而，上述两种构建方式均会影响微生物的本源代谢网络，从而影响甲酸同化效率。因此，需要对路径基因的表达水平进行合理优化 [图6(a)]。采用的策略主要包括两种：①选择合适的异源基因，用于构建甲酸同化路径。例如，当在 *E. coli* 中引入甲酸四氢叶酸连接酶 (Ftl)、次甲基四氢叶酸环水解酶 (Fch) 和亚甲基四氢叶酸脱氢酶 (Mtd) 等基因构建 THF 循环 [图4(d)] 时，同时将源自 *C. ljungdahlii* 和 *A. woodii* 的基因操纵子 C1 和 Aw 分别引入丝氨酸营养缺陷型菌株中，结果显示 C1 操纵子可以回补菌株的丝氨酸营养缺陷，使其以甲酸为碳源进行生长，但是 Aw 操纵子却不能实现上述效果。上述结果表明，C1 操纵子有利于异源 Ftl、Fch 和 Mtd 以及内源丝氨酸羟甲基转移酶 (GlyA)

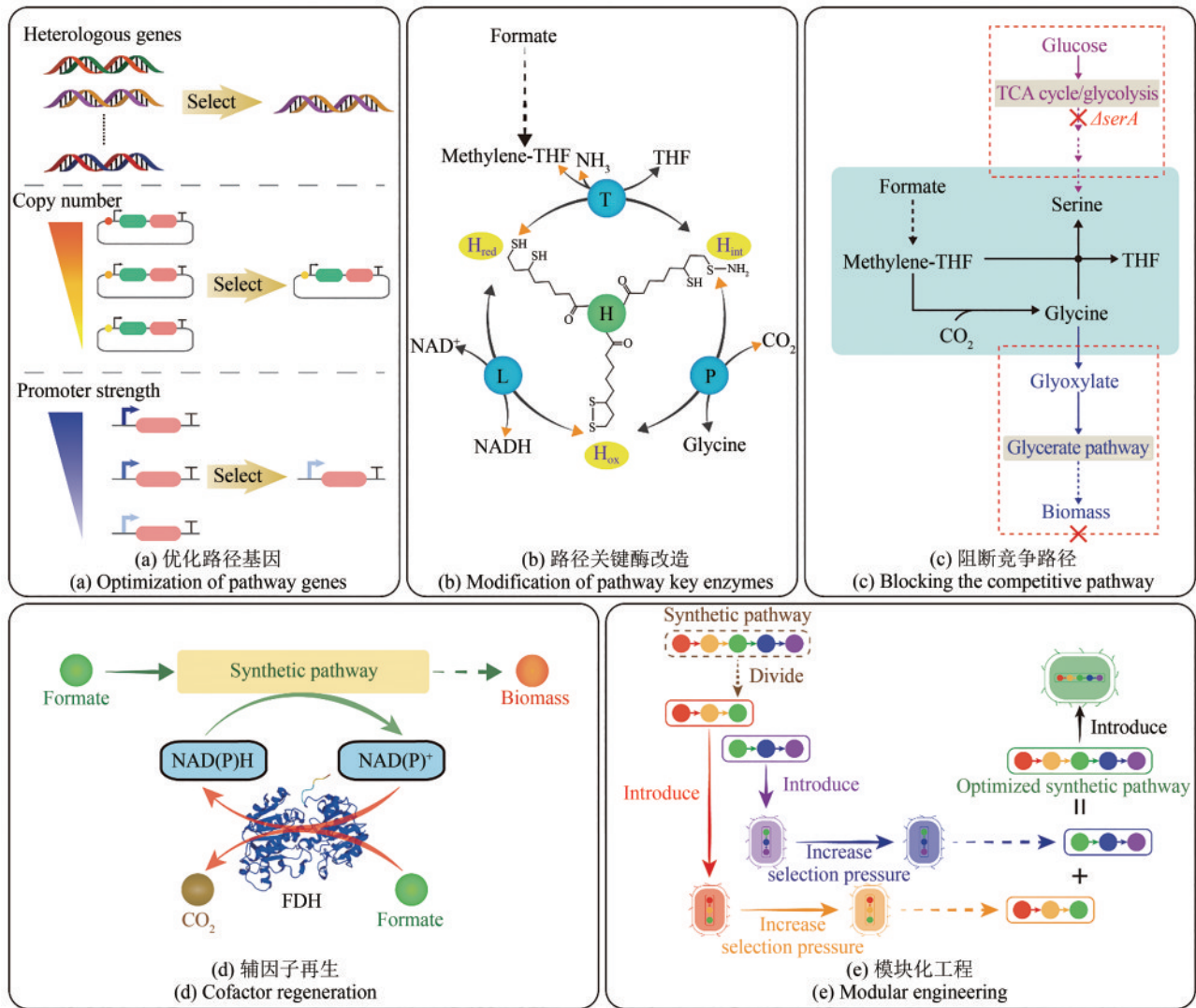


图6 提高甲酸同化效率的关键方法

FDH—甲酸脱氢酶； H_{int} —H蛋白的氨甲基化形式； H_{ox} —H蛋白的氧化形式； H_{red} —H蛋白的还原形式；TCA cycle—三羧酸循环；THF—四氢叶酸

Fig. 6 Key methods to improve the efficiency of formate assimilation

FDH—formate dehydrogenase; H_{int} —aminomethylated form of H protein; H_{ox} —oxidized form of H protein; H_{red} —reduced form of H protein; TCA cycle—tricarboxylic acid cycle; THF—tetrahydrofolate;

的催化作用，实现甲酸到丝氨酸的转化^[61]。然而，上述研究所构建的THF循环对甲酸的同化效率明显低于源自*M. extorquens*的THF循环^[62-63]，这也进一步证明了选择合适的异源基因对于构建甲酸同化路径的重要性。②优化路径基因水平，实现路径与宿主的最优适配。例如，采用高拷贝数、中拷贝数和低拷贝数的质粒，在*E. coli*中表达Ftl、Fch、Mtd与两种甲酸脱氢酶，结果显示含有低拷贝数质粒的菌株生长速率明显高于中含有高拷贝数的菌株。上述结果表明，低拷贝数质粒有利于

实现菌株路径基因的最优表达^[18]。除了利用不同拷贝数的质粒外，启动子工程也可以用于优化路径基因表达水平。例如，通过将不同启动子组合的质粒pC1（表达Ftl、Fch、Mtd）和pC2（表达GCS）分别导入*E. coli*甘氨酸营养缺陷型菌株，结果显示当采用弱启动子时菌株生长最好。上述结果表明，弱启动子组合有利于实现路径基因的最优表达^[16]。另外，值得注意的是，虽然使用质粒过表达路径基因相对简捷，但是过多质粒的使用会影响微生物的生长，相比而言基因组的过表达

更加稳定。例如,首先在*E. coli*的基因组上过表达GCS,随后导入rTHF循环,获得了菌株*E. coli* RG3。与使用质粒过表达GCS的菌株*E. coli* RG2相比,*E. coli* RG3具有更高的生长速率与产物产率^[63]。

3.1.2 路径关键酶改造

甲酸同化路径的代谢流量受到路径关键酶活性的直接影响。因此,结合路径关键酶的催化特点并进行理性改造,能够减少甚至消除路径表达的限制性因素,从而提高甲酸同化路径的催化效率。以rTHF-rgcv途径的关键酶GCS为例,GCS是由四种蛋白质(T/H/P/L)组成的多酶复合体,催化的甘氨酸代谢为可逆反应[图6(b)],但是在*E. coli*等多数微生物中的GCS更倾向于催化甘氨酸的裂解而非合成,因此,在构建rTHF-rgcv途径的过程中,不仅需要改造GCS的催化反应方向,而且还需要提高GCS的催化活性。例如,通过在*E. coli*中过表达内源GCS和敲除gcvR基因(抑制编码蛋白T/H/P的基因转录),工程菌株*E. coli* RG1能够更好地转化甲酸与CO₂生成甘氨酸,从而证明了改造GCS有利于提高甲酸同化路径的代谢通量^[63]。

3.1.3 竞争路径阻断

由于甲酸同化路径与微生物的本源代谢网络存在一定的交叉性,所以不可避免地存在着路径代谢流的泄露,因此,需要对甲酸同化路径的竞争路径进行合理阻断。以rTHF-rgcv途径为例[图6(c)],一方面阻断本源代谢网络中能够合成甲酸同化途径中间产物的路径。例如,通过在serA基因(编码3-磷酸甘油酸脱氢酶)缺陷型*E. coli*中构建rTHF-rgcv途径,促进5,10-亚甲基四氢叶酸的合成,使得rTHF-rgcv途径的丙酮酸合成通量达到了总丙酮酸合成通量的12.9%,而在未敲除serA基因的菌株中仅为7.3%^[63]。另一方面阻断能够代谢甲酸同化途径中间产物的路径。例如,*C. necator*能够通过乙醛酸路径同化甘氨酸,即甘氨酸先氧化生成乙醛酸,随后乙醛酸通过甘油酸途径转化为生物量。然而,相比于rTHF-rgcv途径中的丝氨酸路径,乙醛酸路径同化甘氨酸的效率更低,故丝氨酸路径取代乙醛酸路径更有利于菌株在甲酸上生长^[16]。

3.1.4 辅因子再生系统重构

辅因子NAD(P)H可以为甲酸同化路径提供还原力,而甲酸能够在甲酸脱氢酶(Fdh)的催化下将NAD(P)⁺转化为NAD(P)H,从而无需添加其他底物即可完成还原力供应[图6(d)]。因此,辅因子再生系统重构不仅有利于提高甲酸同化路径的催化效率,而且对于甲酸营养型微生物的还原力和能量供给至关重要。例如,通过在*E. coli*中异源引入能够再生NADH的Fdh(来自博伊丁假丝酵母*Candida boidinii*)和能够再生NADPH的Fdh_{mut}(来自拟南芥*Arabidopsis thaliana*),构建了能够将NAD(P)⁺转化为NAD(P)H的能量再生模块,结合rTHF-rgcv途径,使得工程菌株能够利用甲酸为唯一碳源和能源进行生长^[18]。

3.1.5 路径模块化优化

路径模块化优化作为一种理性的代谢工程策略,通过将甲酸同化路径划分为几个代谢模块,并利用相应的营养缺陷型菌株测试各个模块的活性与限制性瓶颈,通过解除瓶颈最终实现甲酸同化路径的整体优化与适配^[96][图6(e)]。例如,借助模块化工程策略,通过组合rTHF模块与丝氨酸-苏氨酸循环,验证了甲酸同化在*E. coli*中的代谢可行性^[60]。首先,通过在一碳与甘氨酸营养缺陷型菌株中过表达异源Ftl,甲酸能够回补菌株的一碳营养缺陷,从而证明了一碳模块的活性;其次,通过在丝氨酸营养缺陷型菌株中过表达rTHF模块的Fch/Mtd双功能酶(FoID)与GlyA,工程菌株实现了在甲酸与甘氨酸上进行生长;最后,通过在丝氨酸营养缺陷型菌株中引入丝氨酸-苏氨酸循环,使工程菌株能够在甲酸与葡萄糖上进行细胞生长,不再需要提供外源甘氨酸。上述研究为后续甲酸同化路径的构建提供了重要参考,模块化工程不仅实现了甲酸营养型*E. coli*的构建^[17],而且还完成了*P. putida*甲酸代谢改造^[70]等,从而拓展了同化甲酸的底盘微生物。

3.2 改善甲酸利用微生物的细胞生长

为了充分发挥甲酸利用微生物在工业生产中的应用潜能,需要甲酸利用微生物在保持较高细胞生长水平的前提下进行目标产物的高效合成。

因此, 研究人员采用了一系列代谢工程与生化工程策略用于提高甲酸利用微生物的细胞生长水平, 主要包括实验室适应性进化、强化甲酸营养型微生物的细胞生长、提高微生物协同利用甲酸的能力等。

3.2.1 实验室适应性进化

实验室适应性进化 (adaptive laboratory evolution, ALE) 是工业微生物领域常用的方法之一, 能够在实验室条件下模拟自然进化对有益的遗传突变进行富集^[97] [图7(a)]。与理性代谢工程策略相比, ALE无需对微生物复杂的代谢系统进行改造, 不仅在一定程度上减少了工作量, 而且还能够绕开现阶段代谢工程改造的理论与技术限制 (尤其是非模式微生物)。因此, ALE在甲酸营养型微生物的构建与应用方面具有明显优势, 主要包括两种进化方式: ①ALE用于推动甲酸利用路径在代谢网络中的运行, 在提高路径代谢流量的同时改善菌株的细胞生长^[57, 64]。例如, 在 *E. coli* 中引入异源 Ftl (来自克氏梭菌 *Clostridium kluyveri*) 后, 采用 Turbidostat 培养方法对菌株进行定向进化, 提高了重构 rTHF-rgcv 途径在代谢网络中的代谢流量, 最终获得的菌株 *E. coli* G4670 和 *E. coli* G4671 能够利用甲酸和 CO₂ 合成甘氨酸和

丝氨酸^[64]。在此基础上, 通过进一步的长期进化, 获得的菌株 *E. coli* G5222 和 *E. coli* G5225 能够利用甲酸与 CO₂ 为唯一碳源进行细胞生长^[65]。②ALE用于提高菌株在甲酸上的细胞生长与代谢能力, 主要针对经过一系列代谢改造后具有一定甲酸代谢能力的工程菌株^[16-17, 70, 73], 或者本身不经改造即可天然利用甲酸的菌株 (如 *C. necator* H16^[36])。例如, 通过在 *E. coli* 中构建 rTHF-rgcv 途径与能量再生模块, 实现了菌株利用甲酸为唯一碳源和能源进行细胞生长。随后, 在补料-分批模式下对菌株进行短期进化, 在 13 个进化周期内, 菌株的倍增时间缩短至不到 8 h, 生物量产量提高至 2.3 g CDW/mol 甲酸^[17]。在此基础上, 采用类似的进化方式, 将菌株的倍增时间进一步缩短至 6 h, 生物量产量提高至 3.3 g CDW/mol 甲酸, 同时也提高了菌株对甲酸的耐受性^[66]。

3.2.2 强化甲酸营养型微生物的细胞生长

对于人工构建的甲酸营养型菌株而言, 合适的培养条件对于提高菌株对甲酸的耐受性与利用效率至关重要。甲酸营养型微生物的培养条件优化主要包括两种方式 [图7(b)]。①培养基成分的调整。例如, 基于以甲酸为唯一碳源和能源进行生长的 *E. coli* 工程菌株, 通过在培养基中添加 100 mmol/L

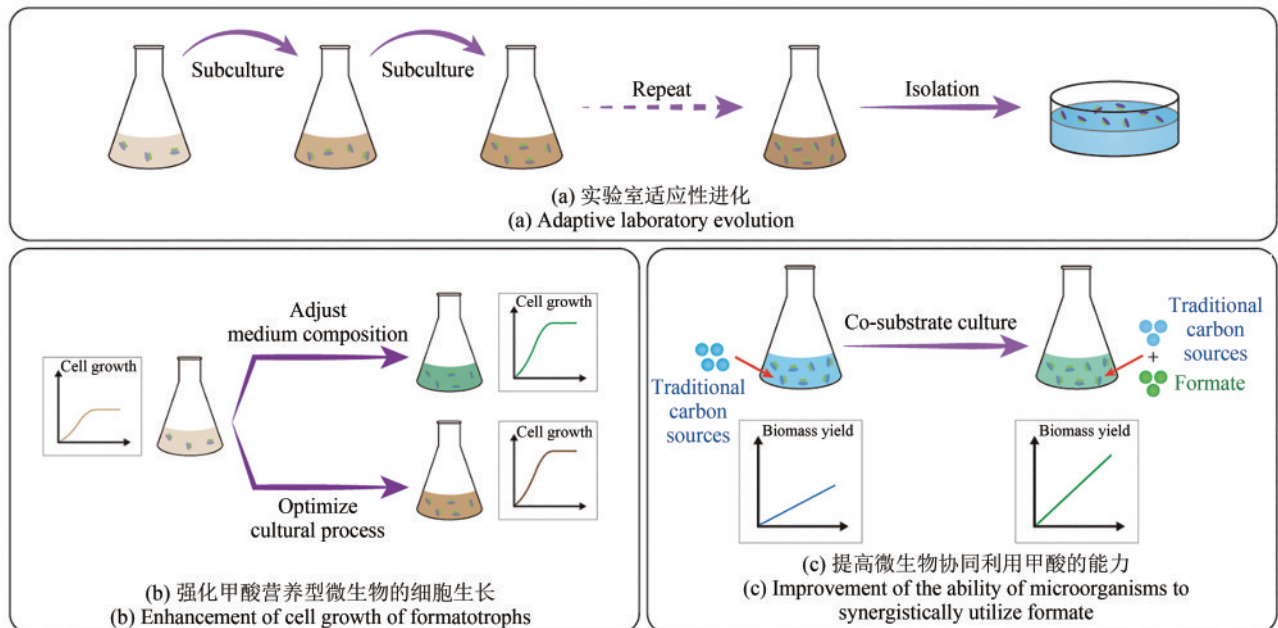


图7 改善甲酸利用微生物细胞生长的关键方法

Fig. 7 Key methods to improve the cell growth of formate-utilizing microorganisms

的碳酸氢钠, 可以使菌株在更高的甲酸浓度下进行生长, 甚至可以耐受 300 mmol/L 甲酸。菌株对甲酸耐受性的增加可能是由于含有碳酸氢盐的溶液具有更好的 pH 缓冲性能, 从而减少了由于甲酸消耗所引起的生长环境局部 pH 波动^[17]。②培养过程的优化。例如, 通过在 *E. coli* 中构建 rTHF-rgcv 途径与能量再生模块, 并降低菌株的培养温度 (由 37 °C 降至 32 °C), 提高了菌株细胞色素 Cyo 的表达水平并降低了 Cyd 的表达水平, 使得还原力 NAD(P)H 能够更有效地转化为 ATP, 从而解决了菌株生长过程中能量供应不足的问题^[18]。

3.2.3 提高微生物协同利用甲酸的能力

利用甲酸与其他碳源对微生物进行共底物培养也是实现甲酸有效利用的方法之一, 如甲酸与其他一碳化合物 (如甲醇和甲醛等) 可以实现协同代谢。在甲酸与甲醇的协同代谢过程中, 甲醇脱氢酶能够催化甲醇转化为甲醛, 而甲醛经甲醛脱氢酶的催化可进一步转化为甲酸, 上述过程均能够产生还原力, 从而为甲酸营养型微生物的生长提供更多能量。然而, 传统碳源 (如葡萄糖和蔗糖等) 与甲酸的协同代谢具有更大的优势, 不仅有利于传统生物经济向甲酸生物经济的过渡, 而且更加适用于现阶段的工业应用 [图 7(c)]。曼氏产琥珀酸菌 (*Mannheimia succiniciproducens*) 是公认的高效生产琥珀酸的菌种之一, 以阻断副产物合成途径的 *M. succiniciproducens* 为底盘微生物, 通过过表达源自 *M. extorquens* 的甲酸脱氢酶后, 实现了工程菌株协同代谢葡萄糖 (或蔗糖) 和甲酸, 使得琥珀酸得率达到了 1.41 mol/mol, 接近于琥珀酸的最大理论得率 1.5 mol/mol^[98]。另外, 传统碳源与甲酸的协同代谢也拓展了模式微生物 (如 *E. coli*) 的工业应用范围。例如, 通过在 *E. coli* 中构建能够协同代谢葡萄糖和甲酸的合成途径 SMGF, 使得工程菌株由葡萄糖合成丙酮酸的得率达到了理论糖酵解得率的 94% (达到 1.88 mol/mol)^[95]。

4 结 语

针对微生物利用甲酸的研究, 研究人员采用合成生物学与代谢工程等策略, 提高了天然甲酸利用微生物的甲酸同化能力, 赋予了模式微生物

甲酸代谢能力, 推动了甲酸生物经济的发展。然而, 目前微生物利用甲酸的研究尚处于初始阶段, 仍然存在许多不足, 例如: 微生物利用甲酸的效率偏低, 细胞生长速率较慢, 目标代谢物产量尚未达到工业化要求等。因此, 未来的研究重点可以继续围绕甲酸利用的微生物、代谢路径和代谢工程策略三个方面进行。

在甲酸利用的微生物方面, 深入探究天然甲酸利用微生物的甲酸代谢机制, 针对微生物的生化特征与代谢特性, 开发相应的分子遗传学操作工具与检测技术, 如高通量测序技术^[99]与同位素标记检测技术^[100]等, 从而拓展天然甲酸利用微生物的应用空间。目前, 模式微生物利用甲酸的研究主要聚焦于 *E. coli*, 需要进一步拓展至改造与提高其他模式微生物 (如 *S. cerevisiae* 与 *P. pastoris* 等) 的甲酸代谢能力。此外, 通过挖掘与开发新型甲酸利用微生物, 也能够进一步拓宽甲酸利用微生物底盘与代谢产物范围。

在甲酸利用的代谢路径方面, 结合新型的基因编辑工具与路径酶改造技术, 进一步优化现有的甲酸利用路径与路径酶。结合生物信息学与计算机算法, 进一步设计与构建更加简单高效的甲酸利用路径。另外, 通过构建微生物细胞微区室等方式, 提高氧气敏感性路径酶在甲酸同化过程中的可实用性。在 *E. coli* 中设计能够封存丙酮酸甲酸裂解酶和磷酸酰基转移酶的微区室, 可以有效地将甲酸和乙酰磷酸转化为丙酮酸^[101]。这类微生物细胞微区室的构建, 不仅能够降低其他路径对甲酸同化路径的代谢干扰, 而且对氧气敏感性路径酶在需氧生物中的应用具有重要的借鉴意义。

在甲酸利用的代谢工程策略方面, 开发更有效的代谢工程改造策略, 优化微生物的甲酸代谢网络。通过探究 sRNA 对微生物基因表达的微调机制, 并将该机制应用于微生物的甲酸代谢网络改造, 有利于进一步优化相关基因在甲酸同化过程中的表达水平, 从而提高甲酸营养型微生物的甲酸同化效率^[102-103]。此外, 通过优化甲酸脱氢酶的催化性能、建立能够评估辅因子再生系统的微生物体内平台等策略, 进一步完善甲酸代谢的能量再生机制。例如, 通过在 *E. coli* 中敲除二氢硫辛酸脱氢酶基因, 消除了丙酮酸脱氢酶和 α -酮戊二酸

脱氢酶的活性,从而构建了NADH和ATP的营养缺陷型菌株,并用于评估NAD⁺依赖型甲酸脱氢酶和甲醇脱氢酶,为甲酸代谢的能量机制评估提供了一种有效的策略^[104]。在此基础上,进一步采用实验室适应性进化等策略,提高甲酸利用微生物的工业化生产潜能。

参 考 文 献

- [1] ESCOBAR J C, LORA E S, VENTURINI O J, et al. Biofuels: environment, technology and food security[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2009, 13(6/7): 1275-1287.
- [2] ZHOU Y J, KERKHOVEN E J, NIELSEN J. Barriers and opportunities in bio-based production of hydrocarbons[J]. *Nature Energy*, 2018, 3(11): 925-935.
- [3] LV X Q, YU W W, ZHANG C Y, et al. C1-based biomanufacturing: advances, challenges and perspectives[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 367: 128259.
- [4] ZHANG C Q, OTTENHEIM C, WEINGARTEN M, et al. Microbial utilization of next-generation feedstocks for the biomanufacturing of value-added chemicals and food ingredients [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 874612.
- [5] SAKARIKA M, GANIGUÉ R, RABAËY K. Methylophils: from C1 compounds to food[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 75: 102685.
- [6] FLAIZ M, LUDWIG G, BENGELSDORF F R, et al. Production of the biocommodities butanol and acetone from methanol with fluorescent FAST-tagged proteins using metabolically engineered strains of *Eubacterium limosum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 117.
- [7] OKOYE-CHINE C G, OTUN K, SHIBA N, et al. Conversion of carbon dioxide into fuels—a review[J]. *Journal of CO₂ Utilization*, 2022, 62: 102099.
- [8] YOON J H, CHANG W J, OH S H, et al. Metabolic engineering of *Methylorubrum extorquens* AM1 for poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production using formate[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 177: 284-293.
- [9] RAY S, JIN J O, CHOI I, et al. Recent trends of biotechnological production of polyhydroxyalkanoates from C1 carbon sources[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 10: 907500.
- [10] LIU Y Q, BAI C X, XU Q, et al. Improved methanol-derived lovastatin production through enhancement of the biosynthetic pathway and intracellular lovastatin efflux in methylotrophic yeast[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5(1): 22.
- [11] LIU Y Q, TU X H, XU Q, et al. Engineered monoculture and co-culture of methylotrophic yeast for *de novo* production of monacolin J and lovastatin from methanol[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 189-199.
- [12] YASIN M, JEONG Y S, PARK S Y, et al. Microbial synthesis gas utilization and ways to resolve kinetic and mass-transfer limitations[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 177: 361-374.
- [13] COTTON C A, CLAASSENS N J, BENITO-VAQUERIZO S, et al. Renewable methanol and formate as microbial feedstocks [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 168-180.
- [14] JIANG W, HERNÁNDEZ VILLAMOR D, PENG H D, et al. Metabolic engineering strategies to enable microbial utilization of C1 feedstocks[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(8): 845-855.
- [15] THUIS B, RONGÉ J, MARTENS J A. Matching emerging formic acid synthesis processes with application requirements[J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(6): 2287-2295.
- [16] CLAASSENS N J, BORDANABA-FLORENT G, COTTON C A R, et al. Replacing the Calvin cycle with the reductive glycine pathway in *Cupriavidus necator*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 30-41.
- [17] KIM S, LINDNER S N, ASLAN S, et al. Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(5): 538-545.
- [18] BANG J, HWANG C H, AHN J H, et al. *Escherichia coli* is engineered to grow on CO₂ and formic acid[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(12): 1459-1463.
- [19] GONZALEZ DE LA CRUZ J, MACHENS F, MESSERSCHMIDT K, et al. Core catalysis of the reductive glycine pathway demonstrated in yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(5): 911-917.
- [20] DRAKE H L, KÜSEL K, MATTHIES C. *Acetogenic prokaryotes*[M/OL]//*The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 3-60[2023-03-01]. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-30141-4_61.
- [21] MOON J, DÖNIG J, KRAMER S, et al. Formate metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(8): 4214-4227.
- [22] NEUENDORF C S, VIGNOLLE G A, DERNTL C, et al. A quantitative metabolic analysis reveals *Acetobacterium woodii* as a flexible and robust host for formate-based bioproduction [J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 68-85.
- [23] REEVE J N. Molecular biology of methanogens[J]. *Annual Re-*

- view of Microbiology, 1992, 46: 165-191.
- [24] LUPA B, HENDRICKSON E L, LEIGH J A, et al. Formate-dependent H₂ production by the mesophilic methanogen *Methanococcus maripaludis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(21): 6584-6590.
- [25] SARMIENTO F B, LEIGH J A, WHITMAN W B. Genetic systems for hydrogenotrophic methanogens[M/OL]//Methods in Methane Metabolism, Part A: Methods in Enzymology. Amsterdam: Elsevier, 2011: 43-73[2023-03-01]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123851123000032?via%3Dihub>.
- [26] GOYAL N, ZHOU Z, KARIMI I A. Metabolic processes of *Methanococcus maripaludis* and potential applications[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 107.
- [27] MARTINS M, PEREIRA I A C. Sulfate-reducing bacteria as new microorganisms for biological hydrogen production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2013, 38(28): 12294-12301.
- [28] RITTMANN S K M R, LEE H S, LIM J K, et al. One-carbon substrate-based biohydrogen production: microbes, mechanism, and productivity[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(1): 165-177.
- [29] MARTINS M, MOURATO C, PEREIRA I A C. *Desulfovibrio vulgaris* growth coupled to formate-driven H₂ production[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(24): 14655-14662.
- [30] SINGH R P, SINGH R N, SRIVASTAVA M K, et al. Structure prediction and analysis of MxaF from obligate, facultative and restricted facultative methylobacterium[J]. Bioinformatics, 2012, 8(21): 1042-1046.
- [31] CROWTHER G J, KOSÁLY G, LIDSTROM M E. Formate as the main branch point for methylotrophic metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(14): 5057-5062.
- [32] CUI L Y, YANG J, LIANG W F, et al. Sodium formate redirects carbon flux and enhances heterologous mevalonate production in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Biotechnology Journal, 2023, 18(2): 2200402.
- [33] POHLMANN A, FRICKE W F, REINECKE F, et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(10): 1257-1262.
- [34] CRAMM R. Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2008, 16(1/2): 38-52.
- [35] PAN H J, WANG J, WU H L, et al. Synthetic biology toolkit for engineering *Cupriavidus necator* H16 as a platform for CO₂ valorization[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 212.
- [36] CALVEY C H, SANCHEZ I N V, WHITE A M, et al. Improving growth of *Cupriavidus necator* H16 on formate using adaptive laboratory evolution-informed engineering[J]. Metabolic Engineering, 2023, 75: 78-90.
- [37] SCHUCHMANN K, MÜLLER V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(12): 809-821.
- [38] LIU Y C, WHITMAN W B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1125(1): 171-189.
- [39] 冷欢, 杨清, 黄钢锋, 等. 氢营养型产甲烷代谢途径研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(10): 2136-2160.
- LENG H, YANG Q, HUANG G F, et al. Recent advances in hydrogenotrophic methanogenesis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(10): 2136-2160.
- [40] THAUER R K, KASTER A K, SEEDORF H, et al. Methanogenic Archaea: ecologically relevant differences in energy conservation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8): 579-591.
- [41] COSTA K C, WONG P M, WANG T S, et al. Protein complexing in a methanogen suggests electron bifurcation and electron delivery from formate to heterodisulfide reductase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(24): 11050-11055.
- [42] LI J, ZHANG L Y, XU Q, et al. CRISPR-Cas9 toolkit for genome editing in an autotrophic CO₂-fixing methanogenic archaeon[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): 01165-22.
- [43] BAO J C, DE DIOS MATEOS E, SCHELLER S. Efficient CRISPR/Cas12a-based genome-editing toolbox for metabolic engineering in *Methanococcus maripaludis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(7): 2496-2503.
- [44] HEIDELBERG J F, SESHADRI R, HAVEMAN S A, et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(5): 554-559.
- [45] JANSEN K, THAUER R K, WIDDEL F, et al. Carbon assimilation pathways in sulfate reducing bacteria. Formate, carbon dioxide, carbon monoxide, and acetate assimilation by *Desulfovibrio baarsii*[J]. Archives of Microbiology, 1984, 138(3): 257-262.
- [46] SÁNCHEZ-ANDREA I, ALVES GUEDES I, HORNUNG B,

- et al. The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5090.
- [47] SUN H, SPRING S, LAPIDUS A, et al. Complete genome sequence of *Desulfarculus baarsii* type strain (2st14^T) [J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2010, 3(3): 276-284.
- [48] MARTINS M, MOURATO C, MORAIS-SILVA F O, et al. Electron transfer pathways of formate-driven H₂ production in *Desulfovibrio*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 8135-8146.
- [49] ZHANG W M, SONG M, YANG Q, et al. Current advance in bioconversion of methanol to chemicals[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 260.
- [50] KIM S M, LEE S H, KIM I K, et al. Structural insight into a molecular mechanism of methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase from *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 202: 234-240.
- [51] TONG S, ZHAO L Z, ZHU D L, et al. From formic acid to single-cell protein: genome-scale revealing the metabolic network of *Paracoccus communis* MA5[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 55.
- [52] PICKERING B S, ORESNIK I J. Formate-dependent autotrophic growth in *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(19): 6409-6418.
- [53] SOROKIN D Y, LÜCKER S, VEJMEJKOVA D, et al. Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the *Phylum chloroflexi*[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(12): 2245-2256.
- [54] GROSTERN A, ALVAREZ-COHEN L. RubisCO-based CO₂ fixation and C1 metabolism in the actinobacterium *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(11): 3040-3053.
- [55] ORLOVA M V, TARLACHKOV S V, DUBININA G A, et al. Genomic insights into metabolic versatility of a lithotrophic sulfur-oxidizing diazotrophic Alphaproteobacterium *Azospirillum thiophilum*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(12): fiw199.
- [56] BANG J, AHN J H, LEE J A, et al. Synthetic formatotrophs for one-carbon biorefinery[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(12): 2100199.
- [57] GLEIZER S, BEN-NISSAN R, BAR-ON Y M, et al. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂[J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1255-1263.e12.
- [58] YU H, LIAO J C. A modified serine cycle in *Escherichia coli* converts methanol and CO₂ to two-carbon compounds[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3992.
- [59] HE H, HOPER R, DODENHOFT M, et al. An optimized methanol assimilation pathway relying on promiscuous formaldehyde-condensing aldolases in *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 60: 1-13.
- [60] YISHAI O, GOLDBACH L, TENENBOIM H, et al. Engineered assimilation of exogenous and endogenous formate in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(9): 1722-1731.
- [61] TASHIRO Y, HIRANO S, MATSON M M, et al. Electrical-biological hybrid system for CO₂ reduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 211-218.
- [62] YISHAI O, BOUZON M, DÖRING V, et al. *In vivo* assimilation of one-carbon via a synthetic reductive glycine pathway in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(9): 2023-2028.
- [63] BANG J, LEE S Y. Assimilation of formic acid and CO₂ 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.
- [64] DÖRING V, DARI E, YISHAI O, et al. Implementation of a reductive route of one-carbon assimilation in *Escherichia coli* through directed evolution[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(9): 2029-2036.
- [65] DELMAS V A, PERCHAT N, MONET O, et al. Genetic and biocatalytic basis of formate dependent growth of *Escherichia coli* strains evolved in continuous culture[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 200-214.
- [66] KIM S, GIRALDO N, RAINALDI V, et al. Optimizing *E. coli* as a formatotrophic platform for bioproduction via the reductive glycine pathway[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1091899.
- [67] LU X Y, LIU Y W, YANG Y Q, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1378.
- [68] LIU B, LI H J, ZHOU H L, et al. Enhancing xylanase expression by *Komagataella phaffii* by formate as carbon source and inducer[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(23): 7819-7829.
- [69] LIU B, ZHAO Y X, ZHOU H L, et al. Enhancing xylanase expression of *Komagataella phaffii* induced by formate through Mit1 co-expression[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, 45(9): 1515-1525.
- [70] TURLIN J, DRONSELLA B, DE MARIA A, et al. Integrated rational and evolutionary engineering of genome-reduced *Pseu-*

- domonas putida* strains promotes synthetic formate assimilation [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 74: 191-205.
- [71] BAR-EVEN A, NOOR E, FLAMHOLZ A, et al. Design and analysis of metabolic pathways supporting formatotrophic growth for electricity-dependent cultivation of microbes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013, 1827(8/9): 1039-1047.
- [72] BAR-EVEN A, FLAMHOLZ A, NOOR E, et al. Thermodynamic constraints shape the structure of carbon fixation pathways[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2012, 1817(9): 1646-1659.
- [73] KIM S J, YOON J, IM D K, et al. Adaptively evolved *Escherichia coli* for improved ability of formate utilization as a carbon source in sugar-free conditions[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12:207.
- [74] NITSCHKE W, RUSSELL M J. Beating the acetyl coenzyme A-pathway to the origin of life[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1622): 20120258.
- [75] YISHAI O, LINDNER S N, GONZALEZ DE LA CRUZ J, et al. The formate bio-economy[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 35: 1-9.
- [76] LIU Z H, WANG K, CHEN Y, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO₂[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 274-288.
- [77] SONG Y, LEE J S, SHIN J, et al. Functional cooperation of the glycine synthase-reductase and Wood-Ljungdahl pathways for autotrophic growth of *Clostridium drakei*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(13): 7516-7523.
- [78] MAO W, YUAN Q Q, QI H G, et al. Recent progress in metabolic engineering of microbial formate assimilation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(16): 6905-6917.
- [79] ZHANG H, LI Y C, NIE J L, et al. Structure-based dynamic analysis of the glycine cleavage system suggests key residues for control of a key reaction step[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 756.
- [80] XU Y Y, REN J, WANG W, et al. Improvement of glycine biosynthesis from one-carbon compounds and ammonia catalyzed by the glycine cleavage system *in vitro*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2022, 22(1): 40-53.
- [81] ERB T J, KELLER P, VORHOLT J A. *Escherichia coli* in auto (trophic) mode[J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1244-1245.
- [82] ZHANG Y X, LI F L, DONG J, et al. Recent advances in designing efficient electrocatalysts for electrochemical carbon dioxide reduction to formic acid/formate[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2023, 928: 117018.
- [83] JUNQUEIRA J R C, DAS D, CATHRIN BRIX A, et al. Simultaneous anodic and cathodic formate production in a paired electrolyzer by CO₂ reduction and glycerol oxidation[J]. *ChemSusChem*, 2023: e202300667.
- [84] WANG T, CHEN J D, REN X Y, et al. Halogen-incorporated Sn catalysts for selective electrochemical CO₂ reduction to formate[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(10): e202211174.
- [85] BAR-EVEN A. Formate assimilation: the metabolic architecture of natural and synthetic pathways[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(28): 3851-3863.
- [86] CHEN N H, DJOKO K Y, VEYRIER F J, et al. Formaldehyde stress responses in bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 257.
- [87] ALKIM C, FARIAS D, FREDONNET J, et al. Toxic effect and inability of L-homoserine to be a nitrogen source for growth of *Escherichia coli* resolved by a combination of *in vivo* evolution engineering and omics analyses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1051425.
- [88] KLEIN V J, IRLA M, GIL LÓPEZ M, et al. Unravelling formaldehyde metabolism in bacteria: road towards synthetic methylotrophy[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 220.
- [89] HONG Y, ARBTER P, WANG W, et al. Introduction of glycine synthase enables uptake of exogenous formate and strongly impacts the metabolism in *Clostridium pasteurianum*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(3): 1366-1380.
- [90] KHANA D B, CALLAGHAN M M, AMADOR-NOGUEZ D. Novel computational and experimental approaches for investigating the thermodynamics of metabolic networks[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2022, 66: 21-31.
- [91] CHEN K, ARNOLD F H. Engineering new catalytic activities in enzymes[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 203-213.
- [92] KIM D H, NOH M H, PARK M H, et al. Enzyme activity engineering based on sequence co-evolution analysis[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 74: 49-60.
- [93] SIEGEL J B, SMITH A L, POUST S, et al. Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(12): 3704-3709.
- [94] HU G P, LI Z H, MA D L, et al. Light-driven CO₂ sequestration in *Escherichia coli* to achieve theoretical yield of chemicals[J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(5): 395-406.
- [95] HU G P, GUO L, GAO C, et al. Synergistic metabolism of glu-

- cose and formate increases the yield of short-chain organic acids in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(1): 135-143.
- [96] CLAASSENS N J, HE H, BAR-EVEN A. Synthetic methanol and formate assimilation *via* modular engineering and selection strategies[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2019, 33(1): 237-248.
- [97] DRAGOSITS M, MATTANOVICH D. Adaptive laboratory evolution—principles and applications for biotechnology[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 64.
- [98] AHN J H, BANG J, KIM W J, et al. Formic acid as a secondary substrate for succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(12): 2837-2847.
- [99] SINGH A, MOESTEDT J, BERG A, et al. Microbiological surveillance of biogas plants: targeting acetogenic community[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 700256.
- [100] SUDA K, SAKAMOTO S, IGUCHI A, et al. Novel quantitative method for individual isotopomer of organic acids from ¹³C tracer experiments determines carbon flow in acetogenesis [J]. *Talanta*, 2023, 257: 124328.
- [101] KIRST H, FERLEZ B H, LINDNER S N, et al. Toward a glycol radical enzyme containing synthetic bacterial microcompartment to produce pyruvate from formate and acetate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(8): e2116871119.
- [102] NA D, YOO S M, CHUNG H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(2): 170-174.
- [103] PONATH F, HÖR J, VOGEL J. An overview of gene regulation in bacteria by small RNAs derived from mRNA 3' ends[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(5): fuac017.
- [104] WENK S, SCHANN K, HE H, et al. An "energy-auxotroph" *Escherichia coli* provides an *in vivo* platform for assessing NADH regeneration systems[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(11): 3422-3434.



通讯作者: 陈修来(1985—),男,博士,教授。研究方向为微生物代谢工程与合成生物学。

E-mail: xlchen@jiangnan.edu.cn



第一作者: 程真真(2001—),女,学士。研究方向为微生物固碳途径的设计、构建与应用。

E-mail: zzch0929@163.com