

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-065

面向工业尾气利用的产乙酸菌底盘细胞设计构建与应用进展

任玉文^{1,2}, 隆柳成¹, 陈利梅¹, 薛敏², 王杰², 李德茂¹(¹ 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308; ² 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘要: 钢铁冶炼、铁合金、炼油裂解和煤化工等重工业每年排放大量含 CO、CO₂ 和 H₂ 的工业尾气, 既是温室气体来源, 也是可观的碳资源。产乙酸菌依靠 Wood-Ljungdahl 途径高效固定一碳气体, 是尾气生物转化最具潜力的底盘。本文系统综述了产乙酸菌底盘构建与应用进展, 一是生物学基础, 包括产物途径的代谢机制、热力学约束、能量守恒机制及核心菌株的选择; 二是遗传工具, 涵盖基因转移、CRISPR-Cas9/Cas12a、内源 I-B 型系统和 RecT 重组工程; 三是代谢工程策略, 包括提高天然产物产量、构建非天然产物异源合成途径、改造中心碳代谢, 以及适应性实验室进化与理性设计的协同; 四是气-液传质与过程工程, 涉及反应器构型、连续及两阶段发酵、在线监控与过程控制; 五是结合不同产业化阶段的案例, 分析关键瓶颈并探讨以工艺协同优化为主的突破路径。本文旨在为产乙酸菌底盘的理性设计与工程化推广, 以及一碳气体生物转化的产业化提供系统参考。

关键词: 产乙酸菌; 气体发酵; 底盘细胞; 代谢工程; 合成生物学

中图分类号: Q819 文献标志码: A

Advances in the design, construction, and application of acetogenic chassis cells for industrial off-gas utilization

REN Yuwen^{1,2}, LONG Liucheng¹, CHEN Limei¹, XUE Min², WANG Jie², LI Demao¹(¹ Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; ² Institute of Feed Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Heavy industries such as steelmaking, ferroalloy production, petroleum refining and cracking, and coal chemical processing release large volumes of industrial off-gases containing CO, CO₂, and H₂ every year. These gases are not only a major source of greenhouse gas emissions but also a substantial reservoir of carbon and chemical energy. Acetogens, which fix one-carbon gases efficiently through the Wood-Ljungdahl pathway, have emerged as the most promising chassis organisms for the bioconversion of industrial off-gases. This review summarizes advances in the design, construction, and application of acetogenic chassis cells for industrial off-gas utilization. First, the biological

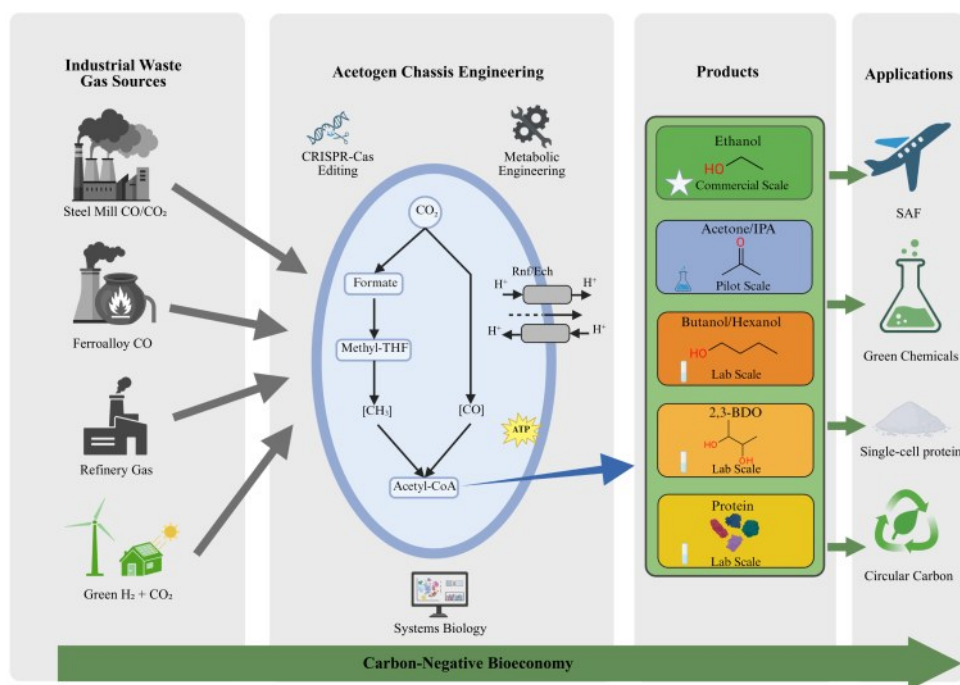
收稿日期: 2026-07-24 修回日期: 2026-10-27

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFD1302400); 京津冀自然科学基金合作专项 (25JJJC0013)

引用本文: 任玉文, 隆柳成, 陈利梅, 薛敏, 王杰, 李德茂. 面向工业尾气利用的产乙酸菌底盘细胞设计构建与应用进展[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-065

Citation: REN Yuwen, LONG Liucheng, CHEN Limei, XUE Min, WANG Jie, LI Demao. Advances in the design, construction, and application of acetogenic chassis cells for industrial off-gas utilization[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-065

basis of acetogens is outlined, including the biochemistry and thermodynamic constraints of the pathway and the Rnf- and Ech-type energy conservation mechanisms. Chassis selection is discussed in relation to variations in gas composition and impurity profiles. Second, genetic tools are reviewed: DNA transfer, CRISPR-Cas9/Cas12a, endogenous type I-B systems, and RecT-mediated recombineering. Their industrial suitability is assessed by transformation efficiency, design-build cycle time, iterative editing capacity, marker dependence, and transferability across strains. Third, metabolic engineering strategies are discussed. They cover native product enhancement, heterologous pathways, central carbon and energy metabolism engineering, genome-scale metabolic modeling, and the combination of adaptive laboratory evolution with rational design. Energy supply, reducing power, and product toxicity emerge as shared bottlenecks. In addition, process engineering is addressed: gas – liquid mass transfer, reactor configuration, continuous and two-stage fermentation, and scale-down simulations, with particular emphasis on their integration with chassis design. Based on cases at different industrialization stages (commercial operation, trial production, under construction, demonstration, and pilot), the review identifies the thermodynamic limit of energy metabolism, strain-specific tool adaptation, stability at scale, and downstream separation as core challenges. It outlines future directions: strengthening energy-conservation modules, co-optimizing strains and processes, and diversifying products and carbon conversion routes. This review aims to provide a reference for the rational design of acetogenic chassis and the industrial deployment of one-carbon gas bioconversion.



Keywords: acetogens; gas fermentation; chassis cell; metabolic engineering; synthetic biology

1 引言

钢铁冶炼、铁合金生产、炼油裂解及煤化工等重工业过程每年向大气释放数十亿吨工业尾气，其主要组分为CO、CO₂和H₂。这些气体既是温室

效应和空气污染的重要来源，又蕴含着尚未被充分开发的碳资源和化学能。据悉我国钢铁冶金、石化炼油、电石、水泥等行业年产工业尾气超过万亿立方，利用50%可年产乙醇5000万吨，饲料蛋白1000万吨，减少CO₂排放1.45亿吨，节约粮

食1.6亿吨,节省耕地4亿亩^[1-2]。传统处理方式以火炬燃烧或低效余热回收为主,碳最终仍以CO₂形式散逸,未能实现碳循环利用。在全球碳中和目标驱动下,将工业尾气中的一碳气体转化为高附加值燃料和化学品,已成为绿色制造与循环经济的核心技术方向^[3-4]。与此同时,生物质气化产生的合成气以及可再生电力驱动的绿氢和CO₂路线,也为一碳气体的生物转化提供了更广泛的原料来源^[5-6]。这进一步拓展了该技术的应用边界。

气体发酵以微生物为催化剂,常温常压下将气态底物转化为有机产物^[7-8]。对比费-托合成等热化学催化,其产物选择性更高,对原料气组成波动的耐受性更强,且无需贵金属催化剂和严苛的反应条件^[9]。相较于CO₂电催化,生物转化在二碳及以上产物合成上具备天然优势^[10]。微生物酶催化可精准导向特定产物,规避电催化高碳产物选择性难题。该技术可直接使用未分离的工业含碳尾气,仅需简单脱硫除尘预处理,降低投资与运行成本^[11]。此外,以废碳气体为原料的生物转化过程,在特定生命周期分析(life cycle assessment, LCA)系统边界下,可实现净碳固定,赋予终端产品显著的碳足迹优势^[12-13],对于低碳经济时代的化工和能源行业具有重要应用价值。

在众多能够利用一碳气体的微生物中,产乙酸菌依靠伍德-永达尔(Wood-Ljungdahl, WL)途径,拥有极低ATP消耗的高效自养固碳能力,成为气体发酵领域最具工业应用潜力的底盘微生物类群^[14]。这类严格厌氧的化能自养细菌能够以CO或CO₂和H₂为碳源和能源。通过WL途径甲基支路和羧基支路的协同作用,将一碳底物缩合为乙酰辅酶A,并进一步衍生为乙酸、乙醇等终产物。当CO直接作为电子供体时,WL途径还可额外耦联能量守恒,使理论碳转化效率接近热力学极限^[15-18]。以自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)为代表的模式产乙酸菌,已实现全球多个钢厂尾气制乙醇商业化应用^[19]。同时,合成气发酵过程中产生的菌体蛋白作为高附加值联产品,可替代传统鱼粉和豆粕用于水产养殖饲料,具有非粮食来源、碳负性和高营养密度等优势^[20-21],初步验证了该技术路线在特定条件下的产业可行性。然而,天然产乙酸菌的产物谱集中于乙酸和乙醇,能量

代谢长期运行于热力学边缘,遗传操作工具也相对有限^[22-23]。这些固有局限,制约了产品多元化和过程经济性的进一步突破。因此,系统性地设计和构建具备更广产物合成能力、更高能量利用效率和更强工业鲁棒性的底盘细胞,已成为推动产乙酸菌平台升级的核心科学命题。

近年来,面向工业尾气利用的产乙酸菌底盘细胞设计与构建研究已取得了重要进展。本综述首先概述了产乙酸菌的生物学基础、代谢特征与底盘选择策略;其次梳理了基因转移、CRISPR编辑和表达调控元件等遗传操作工具的研发现状;继而重点阐述了代谢工程与合成生物学在拓展产物谱、优化碳流分配和增强能量代谢中的应用策略;随后讨论了气-液传质与过程工程层面的协同优化方案;最后结合工业应用案例和规模化进展,分析当前面临的关键瓶颈,展望人工合成基因组、AI驱动设计及微生物电合成等新兴方向为底盘升级带来的潜在机遇与挑战(全文常用缩略语见表4)。

2 产乙酸菌的生物学基础与底盘选择

2.1 产乙酸菌的多样性

产乙酸菌是一类严格厌氧细菌,其核心代谢途径为WL途径。它们能以CO₂为碳源,将其还原同化为乙酰辅酶A,并最终产生乙酸。自1936年Wieringa从沟渠污泥中首次分离出醋酸梭菌(*Clostridium aceticum*)至今,已在29个属中鉴定出超过100个产乙酸菌种,这些产乙酸菌广泛分布于沉积物、动物肠道、深海热泉和地下含水层等各类厌氧环境^[24-27]。在工业应用中,目前受关注的底盘候选菌株主要集中于梭菌属、醋酸杆菌属、穆尔氏菌属和热厌氧杆菌属^[28]。

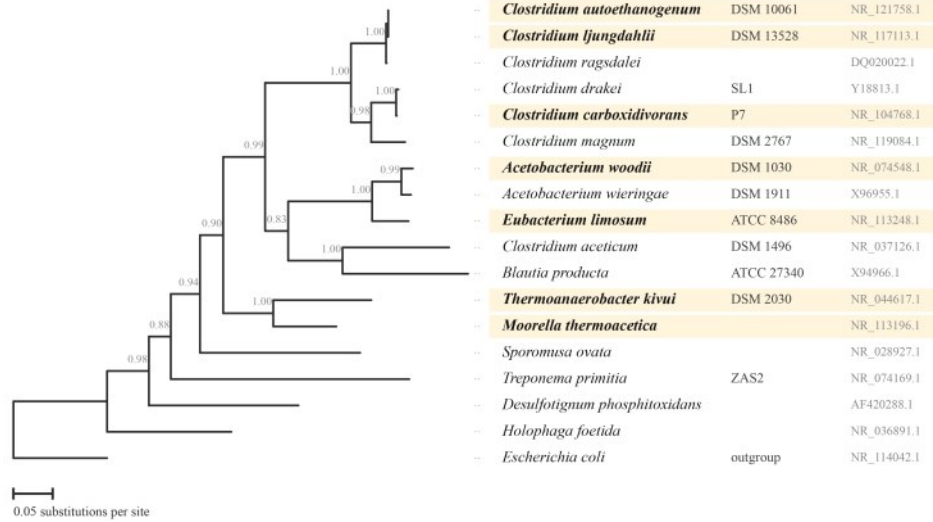
产乙酸菌系统发育分布广泛,主要归属于厚壁菌门,少量散布于螺旋体门、脱硫杆菌门与酸杆菌门,这种跨门分布并非源于WL途径的多次独立起源。本文选取具有代表性的产乙酸菌构建16S rRNA基因物种树,并进一步以乙酰辅酶A合酶催化亚基构建蛋白系统发育树(图1),分别从物种层面和核心酶家族层面展示产乙酸菌的系统发育

多样性及WL途径关键酶的保守性。基因组系统发育分析表明，一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶A合成酶（carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, CODH/ACS）复合体高度保守，演化以垂直遗传为主，其原始四亚基结构可追溯至生命最后共同祖先，跨域水平基因转移仅为偶发演化事件^[29]。宏基因组数据证实，放线菌门未培养类群可编码完整WL途径，其CODH/ACS复合体以

垂直遗传为主，且存在向其他细菌门的水平转移现象^[30]。

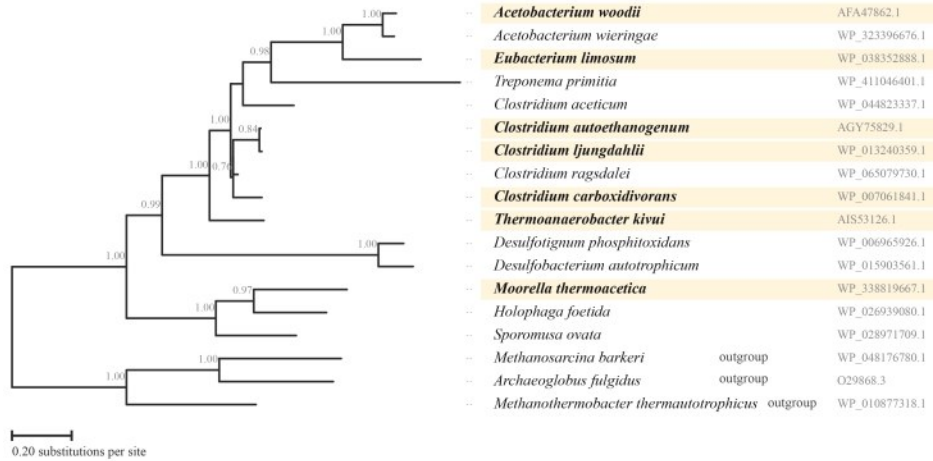
2.2 Wood-Ljungdahl途径的生化机制与热力学约束

WL途径由甲基支路和羰基支路两条线性分支组成，在甲基支路中，CO₂首先经甲酸脱氢酶还原



(a) 基于 16S rRNA 基因序列构建的代表性产乙酸菌系统发育树

(a) Phylogenetic tree of representative acetogens based on 16S rRNA gene sequences



(b) 基于 CODH/ACS 复合体 α 亚基 (AcsB) 氨基酸序列构建的进化树

(b) Phylogenetic tree of the CODH/ACS α -subunit (AcsB)

图1 产乙酸菌的系统发育分布与产乙酸代谢的进化格局

(右侧第一列、第二列和第三列分别表示菌种名称、菌株保藏编号以及用于系统发育分析的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中的登录号。黄色背景并以粗斜体标示的菌株为本文重点描述的底盘菌株。)

Fig.1 Phylogenetic distribution of acetogens and the evolutionary landscape of acetogenesis

(The first, second, and third columns indicate species name, strain designation, and GenBank accession number of the 16S rRNA gene sequence, respectively. Strains highlighted with a yellow background and shown in bold italic are the chassis strains specifically discussed in this article.)

为甲酸，再由甲酰-四氢叶酸合成酶催化甲酸与四氢叶酸（tetrahydrofolate, THF）的ATP依赖性连接，该反应是甲基支路唯一消耗ATP的步骤，然后在一系列THF依赖性酶的催化下逐步还原为甲基-THF^[17]。甲基随后经甲基转移酶转移至类咕啉铁硫蛋白（corrinoid iron-sulfur protein, CFeSP），形成甲基-Co（III）-CFeSP。在羰基支路中，另一分子CO₂被CODH还原为酶结合态羰基。最后，CODH/ACS复合体的A-cluster活性位点将CFeSP上的甲基、羰基和辅酶A缩合，生成乙酰辅酶A^[31-33]（图2A）。

WL途径的热力学特征随底物组成的不同而显著变化。当底物为CO₂和H₂时，总反应 $4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$ 的标准吉布斯自由能变（ ΔG° ）为-95 kJ/mol。该自由能仅能支持1 mol乙酸净合成约0.3 mol ATP。当底物为CO时，总反应 $4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$ 的 ΔG° 为-175 kJ/mol，释放的自由能约为CO₂和H₂途径的1.8倍，因此具有更高的理论能量保存潜力（图2B）。这种热力学差异是影响生物量积累和产物分配的重要因素之一^[15]。

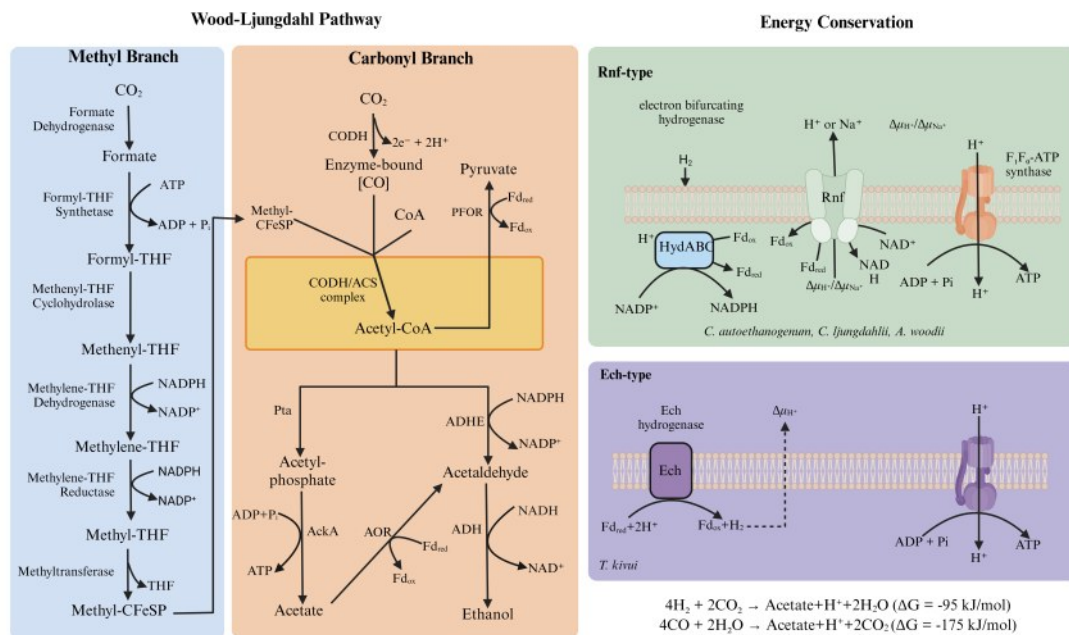


图2 Wood-Ljungdahl途径的生化机制与能量守恒系统

(Formyl-THF—甲酰四氢叶酸；Methyl-THF—甲基四氢叶酸；Methylene-THF—亚甲基四氢叶酸；Methyl-CFeSP—甲基化咕啉铁硫蛋白；Formate Dehydrogenase—甲酸脱氢酶；Formyl-THF Synthetase—甲酰四氢叶酸合成酶；Methyl-THF Cyclohydrolase—甲酰四氢叶酸环化水解酶；Methylene-THF Dehydrogenase—亚甲基四氢叶酸脱氢酶；Methylene-THF Reductase—亚甲基四氢叶酸还原酶；Methyltransferase—甲基转移酶；CODH/ACS complex—一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶A合成酶复合体；PFOR—丙酮酸：铁氧还蛋白氧化还原酶；Pta—磷酸转乙酰酶；AckA—乙酸激酶；AOR—醛：铁氧还蛋白氧化还原酶；ADHE—双功能乙醛/乙醇脱氢酶；FADH₂—还原型黄素腺嘌呤二核苷酸； $\Delta\mu_{\text{H}^+}/\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ —质子/钠离子动力势）

Fig.2 Biochemical mechanisms and energy conservation systems of the Wood-Ljungdahl pathway

(Formyl-THF—Formyl-tetrahydrofolate; Methyl-THF—Methyl-tetrahydrofolate; Methylene-THF—Methylene-tetrahydrofolate; Methyl-CFeSP—Methylated corrinoid iron-sulfur protein; Formate Dehydrogenase—Formate dehydrogenase; Formyl-THF Synthetase—Formyl-tetrahydrofolate synthetase; Methyl-THF Cyclohydrolase—Methyl-tetrahydrofolate cyclohydrolase; Methylene-THF Dehydrogenase—Methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase; Methylene-THF Reductase—Methylene-tetrahydrofolate reductase; CODH/ACS complex—Carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase complex; PFOR—Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; Pta—Phosphotransacetylase; AckA—Acetate kinase; AOR—Aldehyde:ferredoxin oxidoreductase; ADHE—Bifunctional acetaldehyde/alcohol dehydrogenase; FADH₂—Reduced flavin adenine dinucleotide; $\Delta\mu_{\text{H}^+}/\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ —Proton/sodium motive force. Blue shading indicates the methyl branch, orange shading indicates the carbonyl branch, green shading indicates the Rnf-type energy conservation system (represented by *C. autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, and *Acetobacterium woodii*), and purple shading indicates the Ech-type energy conservation system (represented by *Thermoanaerobacter kivui*). All figures in this manuscript were created in BioRender (Created in BioRender. Yuw, R. (2026). <https://BioRender.com/ozsfkn9>)

2.3 能量守恒机制

产乙酸菌在热力学极限附近维持生长的关键在于其化学渗透能量守恒机制。已研究的产乙酸菌能量代谢中,主要涉及的膜结合能量转换复合体,可分为含 Rnf (Rhodobacter nitrogen fixation) 型与能量转换型氢化酶 (energy-converting hydrogenase, Ech)。

Rnf 复合体是多数中温产乙酸菌的核心能量转换复合体。该复合体催化还原态铁氧还蛋白 (reduced ferredoxin, Fd_{red}) 向 NAD^+ 的电子转移,并将该放能反应与 Na^+ 或 H^+ 的跨膜转运相偶联,建立离子电化学梯度,进而驱动 ATP 合酶合成 ATP^[34-36]。永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*) 和 *C. autoethanogenum* 的 Rnf 系统通常被认为主要建立质子动力势,并由 H^+ 依赖型 ATP 合酶完成 ATP 合成^[37-38]。

在 CO_2 和 H_2 自养条件下, Rnf 的底物 Fd_{red} 主要由电子歧化氢化酶 (electron-bifurcating hydrogenase, Hyd) 提供。HydABC 通过电子歧化机制将 H_2 氧化与 NAD^+ 和氧化型铁氧还蛋白 (oxidized ferredoxin, Fd_{ox}) 还原相偶联,同时生成 NADH 和 Fd_{red} ^[39],该步骤是 CO_2 和 H_2 自养模式下驱动 Rnf-ATP 合酶通路的关键上游反应。当以 CO 为电子供体时, CODH 可直接将 CO 氧化并生成 Fd_{red} ,为 Rnf 复合体提供还原力,绕过电子歧化氢化酶步骤,因此具有更高的能量保守潜力。已有生物能学模型预测,以 CO 为电子供体时细胞具有更高的理论 ATP 保守能力,具体数值取决于菌株及能量耦联方式^[40]。

Ech 氢化酶是另一种化学渗透能量守恒机制,主要存在于基伍嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter kivui*) 等不含 Rnf 基因的嗜热产乙酸菌中。在 CO_2 和 H_2 自养条件下, Ech 主要催化 H_2 氧化并还原铁氧还蛋白,同时偶联 H^+ 跨膜转运以建立质子动力势,驱动 ATP 合酶合成 ATP^[41-42]。该机制使 *T. kivui* 在 CO_2 和 H_2 条件下实现了 1.24 h 的倍增时间,是目前报道的自养生长速度最快的产乙酸菌之一^[43]。2025 年的一项适应性进化研究进一步将 *T. kivui* 驯化为能以 CO 为唯一碳源和能源的快速生长菌株^[44],显著拓展了 Ech 型产乙酸菌的底物利用

范围。

Rnf 与 Ech 并非功能等价的能量守恒系统,二者在电子耦联方式、底物适应性和工程改造难度上均存在差异。Rnf 主要介导 Fd_{red} 与 NAD^+ 之间的电子转移,并与跨膜离子转运耦联,在 CO_2 和 H_2 条件下通常需要上游电子歧化反应提供还原力; Ech 则可将 Fd/H_2 氧化还原与质子跨膜转运直接耦联,因此在 CO_2 和 H_2 自养生长中具有较高的能量利用效率和生长速率^[45]。在 CO 或复杂合成气条件下,两类系统的差异则受到 CODH 介导的 CO 氧化、 Fd_{red} 生成及整体还原力平衡的共同影响,其中 Rnf 型中温菌凭借较成熟的遗传工具和较宽的产物谱具有较强的工程优势,而 Ech 型嗜热菌则在富 H_2 和 CO_2 体系及高温条件下展现出较大的应用潜力^[41, 44]。此外, Rnf 可通过基因表达调控实现一定程度的还原力重分配,而 Ech 与核心能量代谢及 Fd/H_2 平衡紧密耦联,不同 Ech 亚型还可能存在底物依赖性的功能分工,因此直接改造的难度更高^[46]。热醋酸穆尔菌 (*Moorella thermoacetica*) 含有细胞色素和醌类辅因子^[47],可能拥有与 Rnf 型和 Ech 型不同的第三类膜电子传递机制。该菌的能量守恒策略尚未被完全阐明,仍是产乙酸菌生物能学研究的重要方向。

2.4 核心底盘菌株

2.4.1 自产乙醇梭菌

C. autoethanogenum DSM 10061 是目前气体发酵中产业化应用程度最高的产乙酸菌底盘菌株。其基因组大小为 4.35 Mbp, GC 含量为 31.1%,共有约 4000 个蛋白质编码基因。该菌的天然发酵产物包括乙醇、乙酸和 2,3-丁二醇^[48-49]。在以 CO_2 和 H_2 为底物连续培养中,总产物碳 54% 左右流向乙醇;在合成气条件下,恒化培养的比碳摄取速率可达 $1030 \text{ mmol C} \cdot \text{gDCW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,高于单独采用 CO 或 CO_2 和 H_2 供气时的水平,体现了其在合成气条件下的底物利用能力^[50-51]。LanzaTech 公司以该菌株为核心生物催化剂,已合作建成多套商业化的钢厂尾气制乙醇装置。2022 年,该公司进一步通过表达异源丙酮、异丙醇合成途径,实现了工业中试规模的异丙醇生产^[12]。

2.4.2 永达尔梭菌

C. ljungdahlii DSM 13528 的基因组大小为 4.63 Mbp^[52], 在其与 *C. autoethanogenum*、拉格斯代尔梭菌 (*Clostridium ragsdalei*) 和科斯卡蒂梭菌 (*Clostridium coskatii*) 组成的近缘四菌亚群中最大。基因组比较和平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 分析表明, *C. autoethanogenum*、*C. ragsdalei* 和 *C. coskatii* 与 *C. ljungdahlii* 的基因组相似性极高 (ANI > 95%)。据此, 有研究提出这四种菌可能属于同一个细菌种, 但该分类归并尚未被广泛接受。*C. ljungdahlii* 是最早建立稳定电转化和异源基因表达体系的模式产乙酸菌之一, 并证明了通过代谢工程利用合成气生产丁醇的可行性^[53-54]。该菌通过 H⁺-Rnf 复合体偶联 H⁺-ATP 合酶实现能量保守, 且不依赖 Na⁺ 和细胞色素。近年来, 其遗传操作工具持续完善。总的来说, *C. ljungdahlii* 仍是产乙酸菌代谢工程和合成生物学研究的重要模式菌株, 但其工业化应用进展仍明显落后于 *C. autoethanogenum*。

2.4.3 伍氏醋酸杆菌

A. woodii DSM 1030 是研究产乙酸菌生物能学的经典模式菌株。其 Na⁺ 依赖型 Rnf 复合体与 Na⁺-F₁F₀-ATP 合酶相偶联的能量守恒机制, 为理解产乙酸代谢的热力学极限提供了核心框架。该菌的氢依赖型 CO₂ 还原酶 (H₂-dependent CO₂ reductase, HDCR) 复合体, 由 [FeFe]-氢化酶和钨/钼依赖型甲酸脱氢酶等组分组成, 能够利用 H₂ 直接驱动 CO₂ 还原生成甲酸, 实现高效电子传递^[55-56]。然而, Wood-Ljungdahl 途径后续还原步骤仍依赖包括电子歧化氢化酶和铁氧还蛋白循环在内的复杂电子分配网络^[57]。由于缺乏适用于 CO 代谢的相关酶系统, 野生型 *A. woodii* 不能以 CO 作为唯一碳源和能源进行生长, 限制了其在 CO 富集工业尾气利用中的应用^[58], 其核心价值在于作为机制研究与生物能学的基准模型。

2.4.4 食一氧化碳梭菌

C. carboxidivorans P7 的完整基因组约 5.75 Mbp, GC 含量为 29.7%, 共编码 5325 个蛋白质编码序列。该菌天然拥有从乙酰辅酶 A 经反向 β -氧化途径合成丁酸、丁醇、己酸和己醇的完整基因簇, 可在合成气培养条件下直接生产四碳及以上化合

物^[59-60]。与缺乏天然碳链延伸途径的 *C. ljungdahlii* 以及不能通过 WL 途径固定 CO₂ 的丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 相比, *C. carboxidivorans* 将自养固碳与碳链延伸这两种代谢能力集于一身, 是目前已知最具代表性的长链醇产乙酸菌之一。*C. carboxidivorans* 目前更多作为天然碳链延伸基因资源的供体, 用于向 *C. ljungdahlii*、*C. autoethanogenum* 等模式产乙酸菌中导入反向 β -氧化途径, 以构建高效长链醇生物合成底盘。

2.4.5 黏液真杆菌

黏液真杆菌 (*Eubacterium limosum*) ATCC 8486 近年来已成为甲基营养型产乙酸菌的重要模式底盘。该菌具有较强的底物利用灵活性, 可利用合成气、甲醇、甲酸以及甜菜碱等多种一碳或甲基化化合物进行生长。其天然代谢产物包括乙酸和丁酸, 并可通过引入异源途径扩展至丙酮和丁醇等高附加值化学品^[61]。与多数严格厌氧的产乙酸菌不同, *E. limosum* 具有相对较高的氧耐受性, 可在非手套箱条件下进行遗传转化操作^[62], 从而大幅降低了遗传操作的门槛。然而, 与 *C. autoethanogenum* 等工业化底盘相比, *E. limosum* 自养生长速率相对较低, 且尚缺乏工业规模气体发酵验证, 因此其应用仍主要集中于甲基营养代谢研究和新型生物制造策略的开发。

2.4.6 热醋酸穆尔菌及嗜热产乙酸菌

M. thermoacetica ATCC 39073 是 WL 途径发现与解析过程中最重要的模式菌株之一。其基因组大小仅 2.63 Mbp, GC 含量约为 56%, 明显小于中温梭菌类产乙酸菌^[63]。该菌含有细胞色素和醌类辅因子, 可能拥有与 Rnf 型和 Ech 型产乙酸菌不同的膜电子传递机制。*M. thermoacetica* 可在 45 - 65 °C 范围内生长, 最适生长温度为 55 - 60 °C, 其嗜热特性不仅有利于降低污染风险, 还为挥发性产物的原位分离及高温气体发酵提供了潜在优势^[64]。另一种值得关注的嗜热底盘是 *T. kivui*, 其最适生长温度为 66 °C, 属于 Ech 型产乙酸菌^[65]。*T. kivui* 兼具快速生长和嗜热发酵优势, 但目前可用于精细调控的诱导型表达元件仍然有限^[66], 尚难满足复杂代谢工程对多层级动态调控的需求。

2.5 底盘选择

不同工业气源在CO、CO₂与H₂的比例、碳源浓度及组成波动方面存在明显差异,是产乙酸菌底盘选择与菌株设计的重要约束条件。典型钢铁厂高炉煤气的CO含量约为18%–23%,CO₂含量随工况变化;实际钢厂研究表明,其组成可在较短时间尺度内波动^[67]。转炉煤气的CO含量通常较高,不同资料给出的示例中,CO含量分别约为54%和63%,但其产生与回收受吹炼周期影响,气体组成也与净化方式有关^[68-69]。焦炉煤气富含H₂,原始气体中H₂含量约为39%–65%,可为CO₂加氢发酵提供氢源,但需考虑其他杂质带来的影响^[70]。对于工业尾气生物转化的产乙酸菌底盘选择,气体底物及杂质耐受性、产物合成能力、遗传操作体系和工业鲁棒性是不可忽视的考虑范围,并根据不同尾气的组成及工艺条件确定筛选重点。

C. autoethanogenum 兼具高CO利用能力、已获商业规模验证的连续发酵稳态和成熟编辑工具,是高CO底物中经工业验证后的选择;*C. ljungdahlii* 具有相近的生理基础和同样成熟的工具体系,但工业化验证程度较低,更适合作为策略开发与验证平台;野生型*A. woodii* 不能以CO为唯一碳源和能源,除非引入氢化酶基因敲除并经适应期获得HDCR亚基突变,否则并不适用于该场景^[58, 71]。CO₂和H₂富集的底物中,H₂氧化提供的ATP产率显著低于CO,能量供给成为主要问题^[50]。*A. woodii* 的HDCR复合体可直接以H₂驱动CO₂还原生成甲酸,在机制层面具有优势,但其产物谱局限于乙酸且工业鲁棒性未经验证,目前更适合作为元件供体;工程实践仍以*C. autoethanogenum* 和*C. ljungdahlii* 为主,并可通过向气源中掺入少量CO以扩大还原态铁氧还蛋白池,兼顾能量供给与稳态维持。

含硫及焦油的气化合成气作为底物时,杂质耐受性发挥出筛选作用。目前已报道的抑制阈值主要来自合成气发酵体系,硫化氢(H₂S)的抑制阈值约为108 ppm,氨(NH₃)约为1520 ppm,氰化物(CN⁻)约为0.025 mmol·L⁻¹^[72],*C. carboxidivorans* P7在NO浓度超过40 ppm时生长受到抑制^[73]。菌株间的杂质耐受性存在差异,在同一搅拌釜平台的

比较中,*C. ljungdahlii* 对铵盐和硝酸盐的耐受性较高,*C. ragsdalei* 在0.1 g·L⁻¹ H₂S存在时表现出生长促进^[74]。这些结果可为候选底盘筛选提供参考,但由于研究条件不同,相关数据尚不能直接用于定量排名。对于多杂质共存的工业尾气,还需在实际气体组成和运行条件下验证菌株的耐受性及转化性能。现阶段更容易实现的做法是以气体深度净化为主、以底盘耐受性为辅,并在菌株筛选阶段即采用真实气源而非配气进行评价。

当气源排出时温度较高,或目标产物需要原位汽提移除时,嗜热底盘可省去气体冷却并降低染菌风险。*M. thermoacetica* 已实现嗜热条件下以气态底物合成丙酮,*T. kivui* 的CO自养生长性能是目前报道的最高水平之一;两者的共同短板是遗传工具与调控元件不足,且*T. kivui* 的CO营养表型依赖可移动的巨型转座子,其在工业连续培养中的遗传稳定性尚待验证^[44, 75, 66]。就单一底盘的综合能力而言,*C. autoethanogenum* 具有完善的遗传操作体系、已获工业化验证的气体发酵工艺以及丰富的组学资源,仍是综合能力较强的底盘菌株之一。未来,通过不同底盘菌株之间遗传元件和代谢模块的标准化共享,以及多底盘协同开发和优势互补,有望加速高性能产乙酸菌底盘的构建,推动工业尾气生物转化技术向更高效、更稳定和更广泛的产业化应用发展(表1)。

3 遗传操作工具体系的开发与完善

3.1 基因转移方法

多数产乙酸菌属于严格厌氧的革兰氏阳性菌,其外源DNA导入效率长期制约着遗传工程的发展。电转化是目前应用最广泛的基因导入方法,已在*C. ljungdahlii*、*C. autoethanogenum*、*E. limosum* 等多种产乙酸菌中建立,其效率受电场强度、脉冲参数、细胞生长阶段及感受态制备条件等多种因素影响。宿主限制修饰系统尤其是对大肠埃希菌(*Escherichia coli*) Dam和Dcm甲基化DNA的识别与降解,是影响外源DNA稳定导入的关键障碍,因此去甲基化质粒已成为提高多种非模式产乙酸菌转化效率的重要策略^[53, 76]。

表1 面向工业尾气利用的核心产乙酸菌底盘菌株综合比较

Table 1 Comprehensive comparison of core acetogenic chassis strains for industrial off-gas utilization

特征 Characteristics	<i>C. autoethanogenum</i> DSM 10061	<i>C. ljungdahlii</i> DSM 13528	<i>A. woodii</i> DSM 1030	<i>E. limosum</i> ATCC 8486	<i>C. carboxidivorans</i> P7	<i>M. thermoacetica</i> ATCC 39073	<i>T. kivui</i> DSM 2030
基因组大小 Genome size (Mbp)	4.35	4.63	4.04	4.37	5.75	2.63	2.40
GC 含量 GC content (%)	31.1	31.0	39.0	47.0	29.7	56.0	35.0
最适温度 Optimum growth temperature (°C)	37	37	30	37	37	55 – 60	66
能量守恒类型 Energy conservation system	Rnf (H ⁺)	Rnf (H ⁺)	Rnf (Na ⁺)	Rnf	Rnf	Cytochromes/ Quinones	Ech
CO 利用能力 CO utilization capability	High	High	Low	Moderate	High	Moderate	High
天然主要产物 Major native products	Ethanol, acetate, 2,3-butanediol	Ethanol, acetate	Acetate	Acetate, butyrate	Ethanol, acetate, butanol, hexanol	Acetate	Acetate
CRISPR 编辑系统 CRISPR genome editing systems	Cas9, endogenous I-B	Cas9, base editing	Endogenous I-B	Cas9, CRISPRi	No established system	Limited (strain Y72)	Hi-TARGET (I-B)
工业化验证 Industrial validation	Commercial	Pilot scale	Laboratory	Laboratory	Laboratory	Laboratory	Laboratory
参考文献 References	[48-51]	[52-54]	[55-58]	[61-62]	[59-60]	[63-64]	[65-66]

近年来，电转化体系已扩展至更多非模式产乙酸菌。2023 年，维林格醋酸杆菌（*Acetobacterium wieringae*）的电转化方法首次建立，通过优化感受态制备、生长阶段、电场参数及质粒用量，在 *A. wieringae* 不同菌株及 *A. woodii* DSM 1030 中均实现了最高约 2.0×10^3 CFU·μg⁻¹ DNA 的转化效率 [77]。*E. limosum* 则受益于其对短时间氧暴露具有一定耐受性，可在严格控制的厌氧条件下完成无需全程依赖厌氧手套箱的转化操作，从而降低了高通量菌株构建的实验复杂度。对于嗜热产乙酸菌 *T. kivui*，通过系统优化转化和铺板条件，将电转化效率提高 245 倍，达到 $1.96 \times 10^4 \pm 8.7 \times 10^3$ CFU·μg⁻¹ DNA，为后续高效基因编辑工具的建立奠定了基础 [66]。

除电转化外，接合转移也是产乙酸菌中重要的 DNA 导入策略，尤其适用于较大片段 DNA 的递送。该方法通常利用 IncPa 质粒 RK2 来源的 oriT 位点，通过 *E. coli* 供体菌将穿梭质粒转移至产乙酸菌

受体细胞 [78]。模块化穿梭载体和多种革兰氏阳性菌复制子，已在 *C. ljungdahlii*、*C. autoethanogenum*、*A. woodii* 和 *A. wieringae* 等多个产乙酸菌中得到验证 [79-81]。相比电转化，接合转移更适用于递送较大的 DNA 片段，2019 年建立的 Himar1 转座系统利用接合转移将大型表达盒导入 *C. ljungdahlii*，并通过木糖诱导表达转座酶，实现了完整丙酮合成途径在染色体上的随机稳定整合 [82]，因此该方法在大型代谢途径和多基因表达盒的构建中具有重要优势（图 3A）。

3.2 基因敲除与整合策略

3.2.1 等位基因交换系统

在 CRISPR 系统应用之前，产乙酸菌的基因编辑主要依赖 ClosTron 系统和等位基因偶联交换技术。ClosTron 系统来源于 *Lactococcus lactis* L1.LtrB 的 II 型内含子可重新靶向插入机制。通过在线设计算法重新设计内含子识别序列，可将内含子定向

插入目标基因,并利用红霉素抗性作为筛选标记,通常可在约2周内获得目标突变株。ClosTron对宿主同源重组活性和供体DNA质量要求不高,在转化效率有限的菌株中通常仍能拿到插入突变体,这是它长期被沿用的原因^[83]。然而,该系统本质上通过内含子插入实现基因失活,而非精确删除,因此残留内含子序列可能引起极性效应,且难以实现无痕编辑、大片段删除及多轮连续基因组改造,残留标记也难以满足饲料蛋白生产的无抗要求。

等位基因偶联交换技术则利用尿嘧啶生物合成基因*pyrE*作为正、负双向选择标记。*pyrE*缺失突变株可在含5-氟乳清酸的培养基中存活,而恢复*pyrE*功能后则重新获得尿嘧啶原养型。借助同源重组,可将目标突变等位基因与*pyrE*野生型等位基因共同导入染色体,从而实现无标记、精确的基因组修饰。该策略已成功应用于*C. autoethanogenum*等产乙酸菌,并实现了多轮连续无标记基因组编辑,为复杂代谢工程菌株的构建提供了重要技术基础^[84-85]。但在不同产乙酸菌底盘中,等位基因偶联交换技术依赖较长同源臂和多轮同源重组筛选,构建周期较长,且不同菌株的同源重组效率差异较大。对于具有较强限制性修饰系统、低转化效率或遗传稳定性较差的工业底盘,供体DNA导入和突变体筛选也可能成为限制因素,因此,该方法在多基因编辑和高通量菌株构建方面效率有限。

3.2.2 CRISPR-Cas 系统

CRISPR-Cas基因编辑系统的建立显著提高了产乙酸菌基因组编辑的效率、精确性和操作便利性,并推动了无痕编辑、多基因编辑及代谢工程的发展。2016年,*C. ljungdahlii*首次建立了基于酿脓链球菌Cas9的高效编辑系统,实现*pta*、*adhE1*、*ctf*和*pyrE*四个靶基因的高效敲除^[80]。同年,*C. autoethanogenum*采用脱水四环素诱导型启动子 P_{IPTL12} 控制Cas9表达,编辑效率大于50%^[86]。由于Cas9持续高表达会抑制细胞生长甚至导致细胞死亡,因此严格调控Cas9表达是其成功应用的重要前提。随后开发的茶碱核糖开关进一步实现了Cas9翻译水平的诱导调控,有效降低了表达泄漏及其细胞毒性^[87]。

2023年的一项突破性进展证明了内源CRISPR-Cas系统在产乙酸菌中的可用性。研究者利用*A. woodii*和*C. autoethanogenum*自身编码的I-B型CRISPR-Cas系统,通过自动化PAM预测和合成CRISPR阵列设计,实现了内源性基因编辑。其中,对*pyrE*靶点的敲除在所筛选的转化子中全部为预期突变型,且在*A. woodii*中还实现了报告基因的敲入,该策略规避了Cas9毒性及大质粒转移的困难^[88]。2025年,*T. kivui*的内源I-B型CRISPR系统被开发为高效编辑工具Hi-TARGET。利用该系统,从DNA构建到获得纯净编辑菌株仅需12天。

2025年,*C. ljungdahlii*中诱导型启动子的开发进一步完善了CRISPR编辑工具箱。研究者鉴定出泄漏极低的胆碱诱导型启动子 $P_{choline1}$ 和表达水平高的1,2-丙二醇诱导型启动子 $P_{1,2-PD}$ 。将后者用于驱动一体式质粒上的Cas9系统,对*pyrE*、*pduS*、*aor2*和*eutT*四个基因进行编辑,经筛选的转化子均为预期敲除型。将Cas9整合入基因组后,仅需导入gRNA质粒即可实现编辑,质粒构建和转化的负担下降,多基因连续编辑的单轮周期随之缩短^[89]。

碱基编辑技术将失活型Cas9与胞苷脱氨酶融合,可介导C→T的碱基替换,且无需提供同源臂供体DNA,为产乙酸菌提供了一种不依赖DNA双链断裂的精准修饰手段。在*C. ljungdahlii*中,研究者通过引入提前终止密码子,分别破坏了乙酸和乙醇代谢的相关基因,获得了碳流重分配的工程菌株^[90]。不产生双链断裂,使碱基编辑对同源重组活性和供体DNA制备的依赖远低于常规CRISPR敲除,在修复背景不明或转化效率有限的底盘中更容易实施,但它只能产生特定类型的碱基替换,受PAM位置和编辑窗口限制,也无法用于大片段的插入或删除。此外,CRISPR-Cas12a系统已在AWRP菌株等新兴底盘菌株中实现了无痕、无标记的单基因及多基因连续敲除。该菌中以最弱启动子 P_{ptb} 驱动的CRISPR-Cas9系统未能实现有效编辑;而基于*Acidaminococcus* sp. BV3L6的Cas12a蛋白系统,则成功实现了*xylB*和*pyrE*单基因敲除以及两个前噬菌体基因簇的双重缺失^[91],同一底盘中Cas9失效而Cas12a成功,说明工具有能

否在一株菌中工作，取决于核酸酶与宿主表达调控、PAM 偏好和毒性耐受是否匹配，而不是它在其他物种中报道过多高的效率。

3.2.3 重组工程系统

2024 年，在 *E. limosum* 中开发的 RecT 介导的重组工程系统代表了产乙酸菌基因组工程的新范式。该系统利用单链 DNA 寡核苷酸直接介导基因组修饰，无需构建含同源臂的供体载体。研究者通过筛选多样化的重组酶蛋白文库，鉴定出适用于 *E. limosum* 的高效 RecT 蛋白。优化后，单链 DNA 重组效率约为 2%，进一步引入 Cas9 反筛选，Cas9 靶向切割未发生重组的野生型基因组，使可存活细胞 100% 携带目的突变。该系统可直接在基因组中创建精确的点突变、小片段插入或缺失，从 DNA 设计到突变确认，仅需一次转化与筛选^[92]。重要的是，该系统能够进行寡核苷酸文库介导的饱和突变和高通量表型筛选，这为产乙酸菌的定向进化开辟了全新路径（图 3B）。

RecT 介导的重组工程目前仍处于产乙酸菌中的早期验证阶段，该方法对宿主细胞内单链 DNA 重组活性、寡核苷酸稳定性以及 DNA 修复背景具有较强依赖，不同菌株之间的重组效率可能存在较大差异。同时，Cas9 反筛选虽然能够显著提高突变体富集效率，但仍需要适宜的 Cas9 表达调控和靶位点设计。对于工业菌株而言，其基因组复杂性、遗传稳定性及转化效率等因素均可能影响该系统的实际表现。因此，RecT 介导的重组工程目前更适合作为高通量突变和定向进化的潜在工具，其在不同工业产乙酸菌底盘中的通用性和长期遗传稳定性仍需进一步验证。

对工业应用而言，具有决定意义的几项指标，其一是转化效率，它决定了可供筛选的克隆规模，也是多数非模式产乙酸菌的真正瓶颈，*A. wieringae* 和 *T. kivui* 经系统优化后分别达到约 2.0×10^3 和 1.96×10^4 CFU $\cdot\mu\text{g}^{-1}$ DNA^[66, 77]，仍明显低于模式微生物的常规水平。其二是单轮构建周期，等位基因交换体系须先构建营养缺陷亲本并经多轮同源重组筛选，单轮耗时明显长于基于 CRISPR 的体系，而 Hi-TARGET 可将构建周期缩短至约 12 天，RecT 介导的重组工程仅需一次转化筛选^[92, 66]。其三是多基因连续编辑能力，在不积累

抗性标记的前提下完成多轮迭代，决定了复杂异源途径能否在同一底盘中逐步组装；将 Cas9 预先整合至染色体、后续仅导入 gRNA 质粒的策略在此方向上更具实用价值^[89]。其四是对选择标记的依赖程度，残留抗性标记不仅限制迭代轮次，也不符合菌体蛋白等饲料级产品的无抗要求。其五是在工业菌株中的可迁移性，由于不同产乙酸菌在细胞壁结构、限制性修饰系统、DNA 修复机制、CRISPR 毒性耐受性及质粒复制能力等方面存在差异，在模式菌株中优化得到的不同表达元件往往不能直接移植。比如在 AWRP 菌株中以 P_{ptb} 驱动的 CRISPR-Cas9 系统未能实现有效编辑，改用 Cas12a 后方才成功^[91]；*T. kivui* 的内源 I-B 型系统之所以可行，前提是其电转化效率先被提高了 245 倍^[66]。这意味着工业底盘的工具开发往往需要从转化条件与甲基化适配开始重新建立参数，而不能以模式菌株的既有方案直接套用，这也是模式菌株编辑体系向工业底盘推广的主要障碍。

3.3 基因表达调控元件

3.3.1 组成型与诱导型启动子

启动子是调控异源基因表达的核心元件。常用的组成型启动子包括硫解酶启动子 P_{thi}、磷酸转乙酰酶启动子 P_{pta}、铁氧还蛋白启动子 P_{fdx} 和 WL 基因簇启动子 P_{wl}，但它们的表达强度因宿主菌株而异。例如，P_{thi} 在 *C. ljungdahlii* 中的强度约为 P_{ptb} 的 4 - 6 倍，但在 AWRP 中仅为后者的 1.5 倍，P_{uraA} 则展现了最高的表达活性^[91]。因此，在构建异源途径时，必须针对目标宿主重新表征相关表达元件。

诱导型启动子可用于控制 CRISPR 系统以降低毒性，也可用于精确调节代谢通路的时序表达。目前已在产乙酸菌中验证的诱导系统包括脱水四环素诱导系统 P_{tetO1}、P_{IPL12}、木糖诱导系统、茶碱核糖开关系统、乳糖诱导系统 P_{bgaL}^[93] 以及最新报道的胆碱诱导系统和 1, 2-丙二醇诱导系统，分别适用于毒性蛋白的严格表达和代谢途径的高强度驱动。

嗜热产乙酸菌的诱导型表达元件开发相对滞后，研究者在 *T. kivui* 中表征了果糖诱导启动子 P_{fru} 和甘露醇诱导启动子 P_{man}，分别替换必需基因 *ech1*

操纵子以及WL途径起始酶基因簇的天然启动子,成功实现了对嗜热产乙酸菌中心代谢途径的条件性调控^[46]。这些启动子不仅为*T. kivui*的基础代谢研究提供了工具,也为代谢工程中平衡生长与产物合成的时序表达策略奠定了基础。

*E. limosum*的表达元件库构建在2022年取得了系统性进展。研究者定量评估了三种复制子的拷贝数差异,发现通过调节抗生素浓度即可连续调控质粒拷贝数与异源基因表达水平,提供了无需更换启动子即可微调表达强度的简便策略。此外,多个启动子的强度与调控严谨性被系统表征。结合新开发的两种抗生素选择标记,*E. limosum*的可用工程元件数量实现了翻倍^[62]。

3.3.2 核糖体结合位点工程与终止子

核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)的序列及其与起始密码子的间距,直接影响翻译起始效率。*C. ljungdahlii*的多组学研究表明,5'非翻译区及编码区序列特征与翻译效率相关,为RBS设计提供了依据^[94]。高效转录终止子的选择同样影响表达盒的整体性能。合成终止子BBa_B1010已在多种产乙酸菌中验证了功能^[79](图3C)。

3.4 质粒系统与染色体整合平台

pMTL80000模块化穿梭载体系统为产乙酸菌的异源基因表达提供了标准化平台,该系统包含四个可互换模块,革兰氏阴性菌复制子、革兰氏阳性菌复制子、抗性选择标记和应用模块。不同的革兰氏阳性菌复制子决定了质粒的拷贝数和稳定性。其中,pCB102和pBP1在产乙酸菌中通常表现出良好的维持能力^[77]。

在需要长期稳定表达的工业应用中,染色体整合策略优于质粒表达。目前,在产乙酸菌中已建立多种整合策略。第一种是基于*pyrE*位点的ACE系统,通过正负选择实现定点无标记整合。其前提是宿主能够构建并耐受尿嘧啶营养缺陷背景,工业菌株若不具备,需要先构建缺陷株,这一步本身可能成为瓶颈。第二种是Himar1转座酶介导的随机整合,可用于大型基因簇的一步稳定插入,该系统已在*C. ljungdahlii*中实现了7.8 kb已

醇合成基因簇的稳定基因组整合^[95]。第三种是CRISPR辅助的靶向整合,利用Cas9在目标位点产生双链断裂,配合同源臂供体DNA提高同源重组效率并筛选整合菌株。外源基因整合到基因组后无需抗生素维持,遗传稳定性好,适合长期连续发酵。

3.5 高通量筛选与基因组规模功能基因组学工具

转座子插入测序(Tn-seq)和CRISPRi文库筛选推动了产乙酸菌由单基因编辑向全基因组功能解析发展。2022年,研究人员在*C. autoethanogenum*中建立了基于mariner转座子的Tn-seq系统^[96],该系统突破DNA转移效率低下的技术瓶颈,成功构建覆盖全基因组的转座子突变文库。通过比较CO自养与异养培养条件下的突变频率分布,首次在全基因组水平上鉴定了产乙酸菌自养生长所必需的基因集,并确证了WL途径全部基因、Rnf复合体及ATP合酶在自养过程中的不可或缺性。这些发现为最小基因组设计及非必需基因座的工程改造提供了系统性指导。

2021年,研究者利用P_{IP₁₂}启动子驱动dCas9表达,在*C. autoethanogenum*中建立了CRISPRi系统,通过沉默仲醇脱氢酶基因,丙酮向异丙醇的转化效率降低了95.7%,而沉默*budA*则使2,3-丁二醇产量几乎丧失^[97]。在*C. ljungdahlii*中,研究人员借助CRISPRi对*pta*进行部分下调,成功将碳流从乙酸重定向至乙醇,规避了完全敲除可能引发的ATP供应崩溃。2026年,研究人员进一步开发了针对*C. ljungdahlii*必需基因的诱导型CRISPRi系统,实现了对合成气利用及碳同化代谢中必需基因的精确可调抑制,揭示了PFOR、AOR及部分WL途径相关基因在自养生长中的作用,并分析了*ftsZ*等基因对细胞形态的影响^[98]。2023年,在*E. limosum*中完成全基因组CRISPRi筛选,揭示了WL途径、膜再生、膜蛋白生物合成及丁酸合成对自养产乙酸代谢的必要性,并发现部分基因沉默可增强自养生长和目标产物合成^[99]。基于dCas12a的多重沉默系统已在丙酮丁醇梭菌中得到验证^[100],抑制率高达99%。若将此类dCas12a多重系统适配至产乙酸菌,并与全基因组靶向sgRNA

文库相结合，便可在单次实验中评估数千个基因的沉默表型，从而为系统性筛选代谢工程靶点提供高效平台（图 3D）。

总的来说，产乙酸菌遗传操作工具的发展格局极不均衡，但这种不均衡并不能用单次编辑效率来刻画。*C. autoethanogenum* 和 *C. ljungdahlii* 的优势在于工具链的完整性，外源 CRISPR 与内源 I-B 型系统互为补充，碱基编辑、无标记迭代、CRISPRi 与 Tn-seq 资源齐备，使多数改造需求在可控周期内实现。然而，这两株菌在多轮迭代编辑通量方面仍显著落后于大肠杆菌等模式菌株。*A. woodii* 主要依赖 ClosTron 和初步的内源 CRISPR 系统；*T. kivui* 虽已通过 Hi-TARGET 在所测靶点上获得很高的敲除与敲入阳性率，但其可用表达元件仅限于两个糖诱导启动子，难以支撑多层次动态调控；而 *M. thermoacetica* 则受制于严格的限制修饰系统，目前仅 Y72 菌株初步具备可操作性（表 2）。未来的发展需致力于构建标准化元件库，实现

CRISPR 多重编辑与重组工程的迭代自动化，并开发面向产乙酸菌特异性需求的定制化工具。这些努力将共同加速“设计-构建-测试-学习”（Design-Build-Test-Learn，DBTL）循环的落地实施。

4 代谢工程与合成生物学策略

4.1 天然代谢产物产量提升策略

4.1.1 碳流重分配与竞争途径消除

产乙酸菌以乙酰辅酶 A 为中心代谢枢纽（图 4A），其中，乙酸和乙醇的合成分别经由磷酸转乙酰酶、乙酸激酶和醛/醇脱氢酶路径实现^[101]，乙酸合成伴随 ATP 的产生，乙醇合成则消耗还原力。因此，乙酸与乙醇的产物分配本质上由细胞的能量状态和氧化还原平衡驱动。提高乙醇选择性的直接策略是削弱乙酸合成途径，敲除 *pta* 基因可有

表 2 产乙酸菌遗传操作工具汇总
Table 2 Genetic Toolbox for Acetogens

工具类型 Tool Category	适用菌株 Applicable Strains	参考文献 References
DNA 转移方法 DNA transfer methods		
Electroporation	<i>C. ljungdahlii</i> , <i>C. autoethanogenum</i> , <i>E. limosum</i> , <i>A. wieringae</i> , <i>T. kivui</i>	[53,66,77,86,92]
Conjugation	<i>C. ljungdahlii</i> , <i>C. autoethanogenum</i> , <i>A. woodii</i>	[78-81]
基因组编辑系统 Genome editing systems		
ClosTron	Clostridium	[83]
ACE (<i>pyrE</i>)	<i>C. autoethanogenum</i>	[85]
CRISPR-Cas9	<i>C. ljungdahlii</i> , <i>C. autoethanogenum</i>	[80,86]
Endogenous CRISPR type I-B	<i>A. woodii</i> , <i>C. autoethanogenum</i> , <i>T. kivui</i>	[66,88]
CRISPR-Cas12a	AWRP	[91]
CRISPR base editing	<i>C. ljungdahlii</i>	[90]
RecT-mediated recombineering	<i>E. limosum</i>	[92]
诱导型启动子系统 Inducible promoter systems		
Theophylline riboswitch	<i>C. sporogenes</i>	[87]
1,2-Propanediol-inducible system	<i>C. ljungdahlii</i>	[89]
Mannitol/fructose-inducible expression system	<i>T. kivui</i>	[46]
高通量功能基因组 High-throughput functional genomics		
Tn-seq	<i>C. autoethanogenum</i>	[96]
Genome-wide CRISPRi screening	<i>E. limosum</i>	[99]

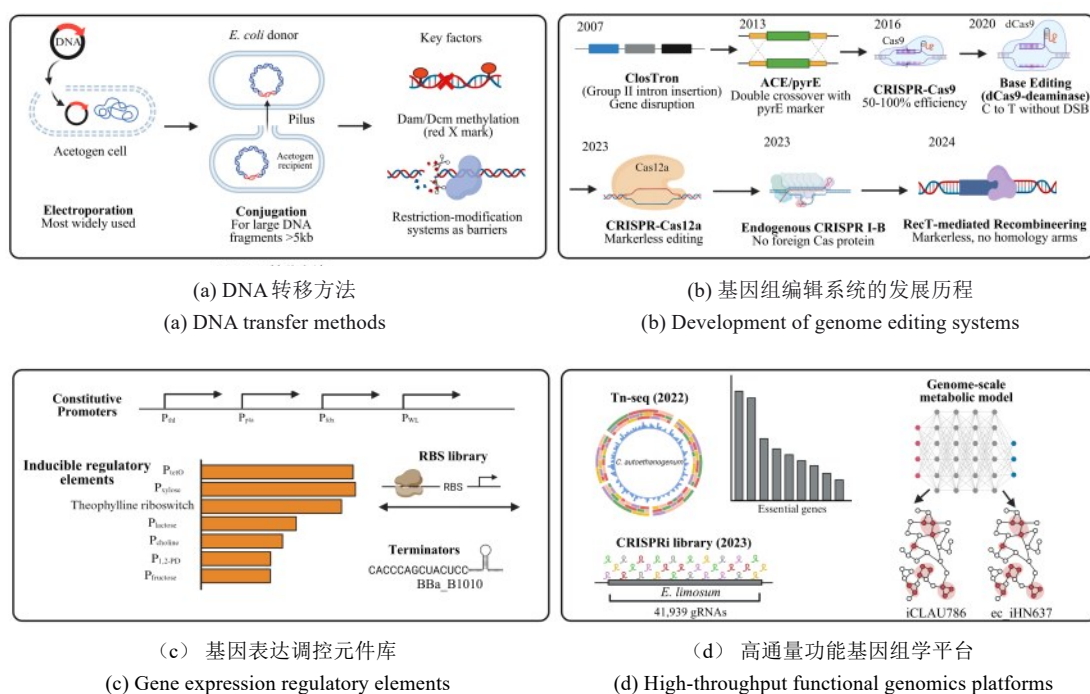


图3 产乙酸菌遗传操作工具体系全景图

Fig.3 Overview of the genetic engineering toolbox for acetogenic bacteria

效阻断乙酰辅酶A向乙酸的碳流，但同时也会切断Pta-Ack路径提供的ATP，从而显著抑制自养生长。更为精细的策略是保留乙酸合成能力但调整其通量，如通过CRISPRi部分下调*pta*表达，可减少乙酸分流并提高3HB滴度和得率^[102]，在*C. autoethanogenum*的连续培养和适应性进化中均已实现乙醇比例的提高^[50]。

2,3-丁二醇是*C. autoethanogenum*的另一天然代谢产物，其合成途径由丙酮酸经三步催化完成，依次涉及 α -乙酰乳酸合酶、 α -乙酰乳酸脱羧酶和2,3-丁二醇脱氢酶^[103]。敲除2,3-丁二醇脱氢酶基因可消除该副产物途径，使碳流集中于目标产物。与之相对，强化2,3-丁二醇合成途径也已在连续培养中实现了显著的产物积累。

4.1.2 辅因子工程与氧化还原平衡优化

产乙酸菌的产物分配深受胞内氧化还原状态的影响（图4B），当NADH/NAD⁺比值升高时，碳流倾向于合成更还原的产物乙醇；反之，则倾向于合成乙酸。还原态铁氧还蛋白的可用性是Rnf复合体产能及多种生物合成反应的共同限速因素。2020年的一项研究通过系统扰动*C. autoethanogenum*的氧化还原状态，揭示了其代谢网络对还原力波动的

鲁棒性机制。在此之前，Valgepea等发现，补充精氨酸可显著提升精氨酸脱亚胺酶途径（arginine deiminase pathway，ADI途径）产生ATP，以补偿Rnf通量的下降，展现出超出预期的代谢弹性^[104-105]。

辅因子工程是调节胞内辅因子平衡的有效手段。Nfn复合体是一种电子歧化/汇聚酶，其电子汇聚反应为： $\text{NADH} + \text{Fd}_{\text{red}} + 2\text{NADP}^+ + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{Fd}_{\text{ox}} + 2\text{NADPH}$ ，即同时消耗NADH和Fd_{red}以生成NADPH^[106]。Nfn的过表达可增加NADPH供应，从而支持需要NADPH的异源合成途径。此外，Fd_{red}/Fd_{ox}比值对Nfn通量具有核心调控作用，其变化直接影响NADPH的可用性和产物分配格局。相反，对于依赖NADH的目标产物，可通过改造异源酶的辅因子偏好性来匹配宿主的辅因子池，如将NADPH依赖型还原酶替换为NADH依赖型同工酶。

4.2 非天然代谢产物的异源合成途径

4.2.1 三碳化合物

丙酮、异丙醇途径是产乙酸菌中最为成功的

异源代谢途径, 该途径以乙酰辅酶A为起点, 经硫解酶缩合生成乙酰乙酰辅酶A, 随后依次由乙酰乙酸辅酶A转移酶和乙酰乙酸脱羧酶催化生成丙酮, 最后可由仲醇脱氢酶还原为异丙醇^[107]。2022年, 在*C. autoethanogenum*中取得的工业化突破代表了该方向的最高水平(图4C)^[12]。在*C. ljungdahlii*中, 研究者基于热力学和动力学建模, 鉴定出乙酰乙酸辅酶A转移酶和乙酰乙酸脱羧酶为关键通量控制位点, 定向过表达这两个酶后, 异丙醇产量提升了2.8倍, 在混合营养条件下超过 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 在纯气体发酵中达到 $2.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[108]。在*A. woodii*中, 丙酮产量在 CO_2 和 H_2 条件下可达 $15.2\pm 3.4\text{ mM}$ ^[109]。

4.2.2 四碳及以上化合物

聚3-羟基丁酸酯极其前体的合成也已在产乙酸菌中初步实现。*C. coskatii*中3-羟基丁酸产量达 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)含量达细胞干重的1.2%^[110], 这些结果验证了异源合成的可行性, 但产物浓度与细胞内积累水平有待提升。

丁醇合成途径需将乙酰辅酶A经 β -氧化逆反应延伸为丁酰辅酶A, 再将其还原为丁醇。在共培养条件下, *C. autoethanogenum*和克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)生产丁酸的产率可达 $8.5\pm 1.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[111]。将碳链延伸至六碳及以上的核心挑战在于每延伸两个碳原子, 需额外消耗一个乙酰辅酶A和两个还原当量。这对能量本已匮乏的产乙酸菌构成了沉重的代谢负担。共培养策略提供了一种规避宿主能量限制的方案。产乙酸菌先利用合成气生产乙醇和乙酸, 链延伸菌(如*C. kluyveri*等)再通过反向 β -氧化将这些短链产物转化为正丁酸、正己酸乃至正辛酸^[112]。最终, 这些有机酸可由产乙酸菌或链延伸菌的醇脱氢酶还原为相应的醇。

4.2.3 萜类及高附加值精细化学品

在*C. ljungdahlii*中, 已通过引入甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA途径)实现了萜类前体甲羟戊酸的合成, 滴度约为 $0.068\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然而, 从甲羟戊酸到异戊二烯的进一步转化仅达约 $1.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的极低水平^[113]。从甲羟戊酸生成异戊二烯前体的途径包含ATP消耗步骤, 而自养产乙酸

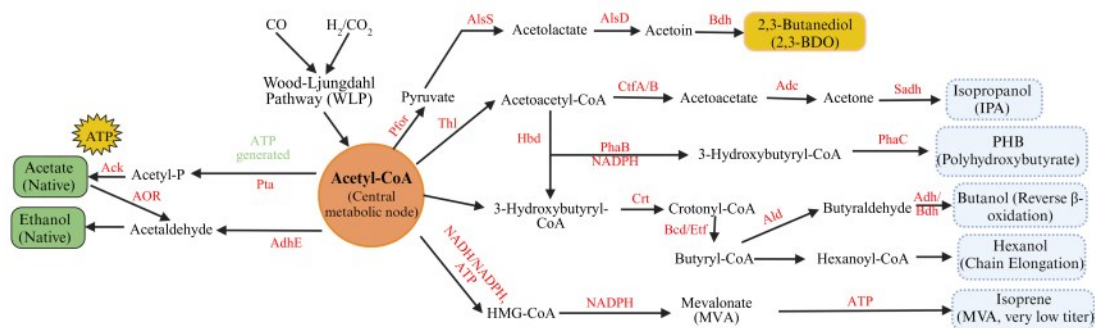
菌的ATP供应极为有限, 可能限制该途径的通量。要实现萜类产物的有效积累, 需与额外的能量再生途径耦联, 或采用混合营养策略引入有机碳源以补充能量。相比之下, 以乙酰辅酶A为直接前体、且不额外消耗ATP的精细化学品更易在产乙酸菌中实现。在*C. autoethanogenum*中异源表达来自马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)的Eat1(ethanol acetyltransferase)或酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的Atf1(alcohol acetyltransferase)醇酰基转移酶, 可将胞内乙酰辅酶A与乙醇直接缩合为乙酸乙酯, 实现了以CO为唯一底物的酯类合成^[114]。

将上述产物按碳链长度和还原度比较可见, 产乙酸菌异源合成能力受到能量、还原力及产物毒性的多重约束。首先, 异源途径的额外ATP需求会加剧其与自养生长之间的能量竞争^[115]。其次, 还原当量需求随产物还原度增加而升高, NAD(P)H 和 Fd_{red} 供应不足将限制高还原度产物及碳链延伸产物的合成。最后, 产物毒性限制了高滴度积累, 中长链醇对细胞膜的毒性尤其突出, 如*C. carboxidivorans*在乙醇约 $1.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即可出现明显生长抑制^[116]。因此, 提升产乙酸菌异源产物谱和产量上限的关键, 不仅在于优化单条合成途径, 更在于突破能量供给、辅因子再生和产物耐受等底盘限制。围绕这些共性瓶颈进行底盘工程, 可能比单纯优化途径酶活更具普适性。

4.3 中心碳代谢的理性改造

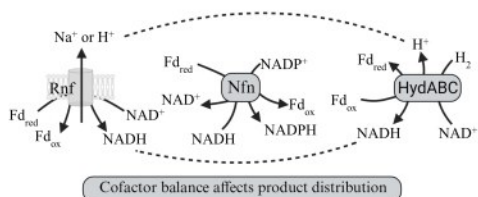
4.3.1 丙酮酸节点与TCA循环片段的重塑

丙酮酸是连接WL途径与下游产物合成的关键枢纽代谢物, 丙酮酸: 铁氧还蛋白氧化还原酶催化乙酰辅酶A与 CO_2 可逆缩合生成丙酮酸, 并为糖异生和氨基酸合成提供碳骨架^[117]。强化PFOR的正向反应可为丙酮酸衍生物提供更多前体。产乙酸菌不具备完整的三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA循环), 仅编码部分TCA酶, 如柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶等, 用于提供生物合成前体。目前尚无将完整TCA循环片段引入产乙酸菌的实验报道。这一策略在理论上可增加碳骨架多样性, 但其实际可行性受限于自养条件下ATP



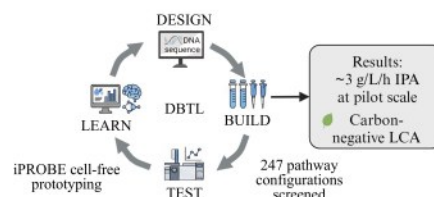
(a) 以乙酰辅酶A为中心枢纽的代谢网络与产物合成途径

(a) Metabolic network centered on acetyl-CoA and downstream product biosynthetic pathways



(b) 辅因子工程与电子载体网络

(b) Cofactor engineering and electron carrier network



(c) 组合途径优化

(c) Combinatorial pathway optimization

图4 产乙酸菌代谢工程策略与产物多样化

(图中酶名缩写: AlsS—乙酰乳酸合酶; AlsD—乙酰乳酸脱羧酶; Bdh—2,3-丁二醇脱氢酶; Thl—硫解酶; CtfA/B—乙酰乙酰辅酶A转移酶A/B亚基; Adc—乙酰乙酸脱羧酶; Sadh—仲醇脱氢酶; Hbd—3-羟基丁酰辅酶A脱氢酶; Crt—巴豆酸酶; Bcd/Etf—丁酰辅酶A脱氢酶/电子传递黄素蛋白; Pta—磷酸转乙酰酶; Nfn—NADH依赖型铁氧还蛋白; NADP⁺氧化还原酶。)

Fig.4 Metabolic engineering strategies and product diversification in acetogenic bacteria

(Enzyme abbreviations: AlsS—acetolactate synthase; AlsD—acetolactate decarboxylase; Bdh—2, 3-butanediol dehydrogenase; Thl—thiolase; CtfA/B—acetoacetyl-CoA transferase subunits A/B; Adc—acetoacetate decarboxylase; Sadh—secondary alcohol dehydrogenase; Hbd—3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; Crt—crotonase; Bcd/Etf—butyryl-CoA dehydrogenase/electron-transferring flavoprotein; Pta—phosphotransacetylase; Nfn—NADH-dependent ferredoxin; NADP⁺ oxidoreductase.)

和还原力的严苛约束。此外，引入额外的氧化脱羧反应可能进一步加剧碳和能量供应的匮乏。

4.3.2 ATP产率提升与能量代谢增强

Rnf复合体是能量守恒的核心枢纽，其表达在合成气自养条件下相对于异养条件显著上调。转录起始信号强度分析显示，Rnf基因簇在自养生长中的转录驱动力明显增强。近期，Zhai等^[118]在*C. autoethanogenum*中以金纳米颗粒-牛血清白蛋白(AuNPs@BSA)构建的光驱动生物杂合系统，通过转录组分析系统鉴定了AuNPs@BSA处理后显著上调的关键能量代谢模块，包括Rnf复合体全部亚基、F₁F₀-ATP合酶基因簇、电子歧化氢化酶以及丙酮酸磷酸双激酶。该工作证明Rnf过表达可有效增强产乙酸菌的能量代谢和发酵性能，表明Rnf通量强化可能是产乙酸菌能量工程的可行靶点。

已获实验支持的能量代谢调控策略包括在CO₂和H₂发酵中补充CO，该策略中，CO氧化经

CODH产生额外的还原态铁氧还蛋白，增强Rnf-ATP合酶通量，同时醛：铁氧还蛋白氧化还原酶旁路将乙酸直接还原为乙醛，绕过了需消耗ATP的乙酸激酶、磷酸转乙酰酶逆反应。这一策略已使*C. autoethanogenum*在CO₂和H₂条件下实现了此前无法达到的稳定连续培养。ADI途径在*C. autoethanogenum*还原力扰动条件下的上调同样代表一种内源性ATP补偿机制^[104]，尽管精氨酸的外源供应限制了其工业适用性。另外，2026年的一项研究在*C. ljungdahlii*中敲除*hytA*，显著增强H₂驱动的CO₂自养生长，经分析，单亚基氢化酶Hyt发生补偿性上调，作者推测其可绕过Hyt介导的电子歧化，直接利用H₂还原Fd，重塑H₂来源电子在Fd、NAD(P)H及能量守恒系统之间的分配，并伴随胞内ATP水平升高^[119]。引入异源电子歧化酶以优化铁氧还蛋白和NAD(P)H之间的电子分配是另一理论上可行但尚待验证的策略。

4.4 基因组规模代谢模型指导的系统设计

C. autoethanogenum 的基因组尺度代谢模型 (genome-scale metabolic model, GEM) iCLAU786 包含 786 个基因关联的代谢反应网络^[120], 通过通量平衡分析可定量预测不同气体条件下的胞内代谢通量分布。*C. ljungdahlii* 的酶约束模型 ec_iHN637 在 iHN637 基础上整合了酶周转数和分子量信息^[121], 改善了生长速率和产物谱的预测准确性。利用该酶约束模型的计算机模拟代谢工程策略, 可识别提升目标产物合成的基因敲除和过表达靶点, 从而避免冗余操作。模型预测表明, 在混合营养条件下, *C. ljungdahlii* 可在保持 CO₂ 净固定的同时改善细胞生长并提高乙醇生产率^[122], 为工艺优化提供了方向性指导。

将 GEM 与蛋白质组学和代谢组学数据相整合的多组学约束方法正逐渐成为主流。通过比较模型预测的通量分布与实测外排速率之间的偏差, 可识别当前模型未能捕捉的调控机制, 进而深化对代谢网络的理解。

4.5 适应性实验室进化与理性设计的协同

ALE 通过长期施加选择压力驱动菌株表型优化, 从而规避了对复杂代谢网络详尽理解的需求^[123]。*C. autoethanogenum* 的进化菌株 LABrini 来自三个大洲的独立 ALE 策略联合筛选获得。经长期连续传代培养后, 该菌株可在不含酵母提取物的定义培养基上生长, 最大比生长速率显著提升, 以及在恒化器中实现稳态运行的稀释率翻倍, 达 $D = 1 \text{ d}^{-1}$, 为其他进化株的两倍。全基因组测序在进化菌株中共检测到 25 个突变, 其中, 两个候选基因在三种 ALE 策略中累计了 7 种不同的突变^[124]。

ALE 的核心局限在于进化轨迹的随机性。有利突变常与中性甚至有害突变共存。反向遗传工程策略将 ALE 中发现的候选突变逐一导入野生型背景, 并评估其表型效应, 从而确证了因果关系。研究表明, 孢子形成相关基因的突变是 LABrini 三项优势特征的共同遗传基础。将该突变引入亲本株, 即可恢复进化菌株的全部优势表型, 这种闭环范式, 为非模式菌株的快速改造提供了高效路径, 未来将可能成为产乙酸菌底盘持续优化的主

要策略。

4.6 AI 驱动的菌株设计与高通量工程

机器学习在产乙酸菌工程中的应用正从被动数据分析转向主动设计指导。深度学习蛋白质工程模型可预测酶的活性、稳定性和底物特异性, 从而加速异源途径关键酶的定向进化^[125]。基因组规模代谢模型与机器学习的整合可从多组学数据中识别隐藏的调控模式和代谢瓶颈^[126]。生成式模型则正从蛋白质尺度向基因组尺度延伸, 去噪变分自编码器已在概念验证中展示了学习细菌基因组组成规则、并由部分基因集重建完整功能基因组向量的能力^[127]; 2026 年, 基因组语言模型进一步实现了噬菌体基因组的从头生成, 在近 300 条设计序列中获得 16 株具有侵染活性的噬菌体^[128]。若将此类模型与产乙酸菌的 Tn-seq 必需基因集和全基因组 CRISPRi 表型数据深度结合, 并借助持续下降的 DNA 合成成本与自动化平台, 有望将底盘基因组的设计构建周期从年压缩至月。无细胞体外原型构建与生物合成酶快速优化平台 (iPROBE) 已用于比较 54 条 3-羟基丁酸合成途径, 并筛选 205 种丁醇途径组合, 为后续细胞内验证提供候选方案。2024 年, 在 *E. limosum* 中建立的 RecT 介导的重组工程系统首次为产乙酸菌引入了寡核苷酸介导的精确基因组修饰能力, 该技术路线的真正潜力在于其与高通量设计的天然耦合性。合成寡核苷酸文库可在单次实验中向同一基因座引入数千个设计突变; 结合自动化的条件培养和测序分析, 有望在产乙酸菌中建立类似于 *E. coli* 多重自动化基因组工程技术的多位点饱和突变和连续进化能力。若将 RecT 介导的重组工程与 AI 驱动的突变设计相结合, 可实现计算预测、合成验证、迭代优化的闭环加速。

5 气-液传质与过程工程耦合

5.1 气-液传质限制的本质与关键参数

CO 和 H₂ 等气体在水中的溶解度较低, 按亨利常数估算, 在 37 °C、1 atm 条件下, CO 的水溶解

度约为 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, H_2 约为 $0.78 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [129]。两者的摩尔溶解度远低于液相发酵中糖类底物的浓度, 较低的底物溶解浓度会增加传质受限的风险。气-液传质速率由容积传质系数 (K_La) 决定, 不同反应器构型的 K_La 差异可达两个数量级以上。系统实验评估表明, 配备 $20 \mu\text{m}$ 微孔扩散器的气升式反应器可获得超过 90 h^{-1} 的 CO K_La 值, 配备搅拌和微孔扩散器的连续搅拌釜 (continuous stirred-tank reactor, CSTR) 通常为 $50 - 150 \text{ h}^{-1}$ 。相比之下, 复合中空纤维膜组件的 K_La 低至 0.4 h^{-1} , 但可提供无泡传质和极高的比表面积 [130-131]。

传质限制的直接后果是容积生产率受限。基于 700 m^3 鼓泡塔的模拟计算显示, 当 K_La 按纯水中氧传质系数估算时, 乙醇体积生产率约为 $5.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 气体利用率仅为 $17\% - 23\%$; 若 K_La 提升一倍, 乙醇生产率可达 $9.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 气体利用率则提升至 38% [132]。这一计算清楚表明, 工业化气体发酵的经济性在很大程度上取决于反应器设计能否突破传质瓶颈。

5.2 反应器构型选择与优化

鼓泡塔是目前大规模气体发酵的首选反应器构型, 具有结构简单、无运动部件、能耗低且易于放大的特点。北京首钢朗泽科技股份有限公司 (首钢朗泽) 的商业化装置采用连续操作的大型鼓泡塔。其传质性能主要取决于表观气速、气泡尺寸分布和液相流型。在工业规模鼓泡塔中, 一维模型可合理预测气含率和 K_La , 但精确的气泡群体平衡模型和计算流体力学模拟可进一步实现对工业级鼓泡塔内气体分布、传质速率和微生物反应动力学的耦合预测, 为优化反应器几何参数和操作条件提供了定量工具 [133-134]。

CSTR 是实验室和中试规模的标准选择。其通过机械搅拌和挡板设计实现高 K_La , 适合精确控制稀释率和开展稳态研究。*C. autoethanogenum* 的多数代谢工程成果均在 $1 - 3 \text{ L}$ 规模的 CSTR 中得到验证。CSTR 的局限在于放大后搅拌能耗急剧增加, 且存在传质不均匀区域 [135]。在大型 CSTR 中, 微生物经历的溶解气体浓度波动幅度远大于小型装置。2023 年的研究利用计算流体力学分析工业规

模外循环气升式反应器中的溶解气体波动, 并提出通过改变搅拌转速的搅拌釜缩尺模拟器概念设计, 为后续实验验证提供依据 [136]。

中空纤维膜反应器将气体底物通过膜扩散至液相, 可实现无泡传质并提供极大的气-液接触面积。该构型可在较低能耗下维持稳定的底物供给。同时, 膜表面有利于细胞附着并形成生物膜, 从而天然实现高细胞密度。其局限在于膜污染和跨膜压力损失随运行时间增加, 以及放大过程中膜面积与流道设计的复杂性。

5.3 连续发酵与细胞固定化/循环策略

工业气体发酵的核心运行模式是连续培养, 首钢朗泽于 2018 年启动的全球首个商业化气体发酵装置即以全连续方式运行。根据专利及中试报告的外推估算, 其乙醇体积生产率可达约 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 具体运行数据尚未公开。连续操作的关键优势包括稳态代谢可维持恒定的产物选择性、无间歇操作的停车损失以及通过调控稀释率将细胞维持在最优生理状态。

在无细胞循环的恒化器中, 以 CO_2 和 H_2 为底物时, *C. autoethanogenum* 的稀释率仅能维持在约 0.5 d^{-1} , 生物量浓度约为 $0.18 \text{ gDCW} \cdot \text{L}^{-1}$ 。若尝试提升至 $D = 1 \text{ d}^{-1}$, 则无法达到稳态, 培养物会出现振荡行为 [50]。引入细胞循环的保留培养可将稀释率与生长速率脱耦, 从而在低比生长速率条件下维持高细胞密度并实现稳定生产。在完全细胞循环的保留培养中, 以 CO_2 和 H_2 为底物时, *C. ljungdahlii* 实现了高生物量浓度和高乙酸产率的持续稳定产出。

两阶段连续发酵是优化合成气乙醇产率的重要过程策略, 在第一阶段, 维持较高 pH (通常 $5.5 - 6.0$) 以促进细胞快速增殖和乙酸积累; 在第二阶段, 通过降低 pH (通常 $4.5 - 5.0$)、提高细胞密度或施加营养限制等策略, 触发代谢从产酸向产醇的转换, 诱导细胞将第一阶段产生的乙酸经 AOR 旁路还原为乙醇。Richter 等建立了以 *C. ljungdahlii* 为生物催化剂的两阶段连续系统, 第一阶段为 1 L CSTR (pH 5.5), 第二阶段为配备细胞循环模块的 4 L 鼓泡塔, 通过细胞循环将生物量密度维持在高

达 $10 \text{ g DCW} \cdot \text{L}^{-1}$ ，乙醇浓度持续达到 $450 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (约 2.1%)，乙醇体积生产率最高达 $0.37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。Kim 等进一步针对 *C. autoethanogenum* 开发了两阶段连续 CO 发酵工艺，该研究系统优化了两阶段之间的稀释率匹配、pH 梯度设置和细胞循环策略，实现了高滴度生物乙醇的稳定产出^[137-138]。

两阶段策略的核心优势在于，允许对各代谢阶段的条件进行独立精细优化，从而突破单级反应器中生长与产物合成之间的固有权衡。此外，第二阶段的低 pH 条件有利于乙酸向乙醇的热力学驱动，并可减少乙酸对细胞的抑制效应。该策略也为产乙酸菌与 *C. kluyveri* 等链延伸菌的分级共培养提供了工程框架^[139]。

细胞固定化是实现高细胞密度的另一种方案，将产乙酸菌固定于活性炭、陶瓷环或生物膜载体等多孔载体表面，可防止细胞被冲出反应器，同时缩短底物从气相经液相到达细胞表面的传质路径^[140]。在膜反应器中已观察到自发发生的颗粒化和生物膜形成，所形成的生物聚集体具有良好的机械稳定性和长期活性。

5.4 在线监控与过程控制的集成

气体发酵过程的实时监控需同时覆盖气相和液相参数。对进气和尾气进行在线质谱分析，可提供 CO、CO₂、H₂ 和 N₂ 的实时消耗与产生速率数据，这是计算碳平衡和电子平衡的基础。可靠的代谢工程研究应报告大于 90% 的碳回收率，即进入系统的碳原子在产物、生物量和气相 CO₂ 之间的分配总和应接近 100%。液相中 pH、溶解 CO、溶解 H₂ 以及挥发性产物浓度的在线测量，可为过程控制提供反馈信号。先进的过程分析技术将在线传感器数据与软传感器模型相结合，可实时推断难以直接测量的参数，从而实现前馈控制^[141]。

产物分配调控是气体发酵过程控制的核心目标，溶剂生成可通过降低胞外 pH、提高胞外乙酸浓度或补充 H₂ 来触发^[142]。研究表明，向 CO₂ 和 H₂ 发酵体系中补充 CO 可通过扩大还原态铁氧还蛋白池、激活 AOR 旁路并增强 H₂ 摄取驱动力，使 *C. autoethanogenum* 实现较高稀释率下的稳定连续培养。在工业操作中，通过动态调整进气 CO₂ 和 H₂

比例和反应器 pH 设定值，可在乙酸与乙醇之间灵活切换产物谱，以适应下游市场需求的变化。

5.5 底盘细胞设计与过程工程的协同优化

底盘设计与过程工程之间的割裂，是该领域长期存在的系统性问题。代谢工程研究多在血清瓶或小型 CSTR 中进行，其传质条件与工业反应器存在本质差异。在瓶培养中观察到的低生产率，可能源于传质限制而非遗传改造本身的不足。2023 年，一项缩尺模拟器研究通过概率密度函数量化了工业规模外循环气升式反应器中微生物所经历的溶解气体浓度分布。该模拟器通过多反应器串联和可控气体脉冲，再现了这些不均匀性，为评估工程菌株在工业环境中的真实表现提供了桥梁工具^[136]。

反之，过程工程的优化也需考虑底盘菌株的生理特征，如高 CO 分压虽可提升 ATP 产率，有利于能量密集型异源途径，但同时会抑制 [FeFe]-氢化酶活性，影响 H₂ 利用。此外，进化菌株在连续培养中表现出优于亲本的鲁棒性，使其更适合承受工业环境中的气体浓度波动。理想的协同策略应将反应器操作条件纳入底盘设计的约束条件，先依据反应器可提供的 $K_L a$ 确定合理的代谢通量目标，再在目标操作模式和进气组成下选择表现最优的菌株变体，并在早期筛选阶段利用缩尺模拟器评估工程菌株对工业环境波动的耐受性，同时将评估结果反馈至菌株设计，形成迭代优化。这种一体化思维，是缩短从实验室发现到工业部署周期的关键所在。

6 工业应用案例与规模化进展

6.1 工业尾气的生物转化

LanzaTech 与首钢朗泽，在河北省曹妃甸建立了全球首个钢厂尾气制乙醇商业装置。该项目将高炉煤气和转炉煤气混合后导入连续发酵系统，以 *C. autoethanogenum* 为生物催化剂，转化为燃料级无水乙醇，于 2018 年投产，其连续运行验证了气体发酵技术在真实工业尾气条件下的可靠性。

2024年,首钢朗泽在曹妃甸启动建设全球首个以含CO₂工业尾气为原料的无水乙醇生物合成示范项目的二期工程,并入选国家发改委首批先进绿色低碳技术示范项目^[143]。据首钢朗泽2026年中期报告,该二期项目已于2026年6月进入试生产^[144]。

欧洲的标志性项目 Steelanol 在比利时举行落成典礼,2023年成功产出首批乙醇并进入产能爬坡阶段,产出的乙醇以 Carbalyst® 品牌联合销售,进一步转化为可持续运输燃料、包装材料、纺织纤维及化妆品香料等多元产品^[145]。

铁合金冶炼尾气是除钢铁外的另一主要工业气源,首钢朗泽在中国宁夏滨泽和贵州金泽分别建设了以铁合金冶炼尾气为原料的商业化乙醇生产装置,设计年产能各约6万吨,分别于2022年11月和2023年6月正式投产^[146]。截至2026年中期报告,贵州金泽恢复正常生产,由于实际生产水平受上游尾气供应量及其稳定性影响,且公司未在该报告中披露两座装置的半年产量,因此,实际产能未知。

6.2 废弃物气化合成气利用

生物质和城市固体废弃物经气化产生的合成气是气体发酵的另一重要原料来源,与钢厂尾气相比,气化合成气的组成随原料和气化工艺变化更大,且通常含有焦油、H₂S和NH₃等杂质,对生物催化剂的耐受性提出了更高要求。LanzaTech与加拿大森科能源公司(Suncor Energy)及日本积水化学工业株式会社(Sekisui Chemical)分别开发了以生物质或废弃物气化合成气为原料的示范装置^[3]。这些项目验证了气体预处理工艺与气体发酵系统的工程集成方案,为非钢铁来源的碳废弃物利用开辟了路径。英力士生物公司(INEOS Bio)开发了气化发酵一体化技术,并于美国佛罗里达州建成 Indian River BioEnergy Center,这是全球首批实现商业规模运行的废弃物制纤维素乙醇示范项目之一。据2013年7月的企业公告,该装置已利用园林及木质废弃物产出乙醇并向当地输送电力;其工艺结合气化、发酵和余热发电,乙醇设计年产能800万加仑,设计总发电功率为6

兆瓦^[147]。然而,INEOS Bio项目后续运行过程中也暴露出废弃物组成波动、气化系统稳定性不足以及合成气净化成本较高等问题,商业化推广未达到预期。

与钢厂尾气利用相比,废弃物气化路线虽然面临更复杂的气体净化和工艺控制挑战,但其突破了工业尾气来源限制,可将城市固体废弃物和农林废弃物直接转化为高附加值生物基产品,在实现废弃物资源化利用和负碳生物制造方面具有更大的发展潜力。

6.3 CO₂和绿氢的利用

随着可再生电力成本的持续下降,利用电解水产生的绿氢将工业排放或大气中的CO₂还原为有机产物的Power-to-X路线,正成为气体发酵的第三代技术方向^[148]。与以CO为主的工业尾气相比,CO₂和H₂底物的热力学驱动力较弱,对细胞能量代谢构成更严峻的挑战。印度NTPC正在推进基于CO₂生物转化的第四代乙醇示范项目,采用LanzaTech的气体发酵技术,设计乙醇产能为3000吨每年,并配套建设CO₂捕集和绿氢制备单元。截至2026年4月,公开资料显示该项目仍处于执行中^[149]。

未来,当绿电制氢成本降至2美元·kg⁻¹以下时,Power-to-X路线的经济性有望与当前石化工艺相竞争^[150]。将电解槽与气体发酵反应器直接耦合的“电-生物”集成系统概念,正在多个研究团队中推进。

6.4 代表性技术路线分析

从技术路线来看,处于不同产业化阶段的气体发酵体系可分为三类。第一类为钢铁/铁合金尾气产乙醇,技术成熟度最高,LanzaTech的多个商业化项目采用了类似的气体发酵技术路线^[151-152]。第二类为煤化工或生物质气化合成气发酵联产乙醇和蛋白,其关键在于气化气的深度净化与组分波动控制;巨鹏生物与内蒙古伊泰化工以煤化工脱碳尾气、未变换净化气及CO₂为原料,设计年产10万吨乙醇和2万吨菌体蛋白的示范项目,已于2024年11月开工建设,到目前为止尚未见投产或

延期的公开报道^[153-154]。河南赛龙图生物科技有限公司以龙宇煤化工甲醇装置产生的合成气为原料，采用 Synata Bio 生物发酵技术，设计年产 5 万吨无水乙醇，已于 2024 年 12 月完成机械竣工中间交接，此后的试运行情况 and 实际产值均未见公开数据^[155]。第三类为 CO₂和绿氢发酵产蛋白，以合气生物 HQP 蛋白中试线为代表，其核心挑战是低能量底物下的稳态维持；合气生物于 2025 年 5 月建成国内首条 HQP 菌体蛋白中试产线，以焦炉氢气、煤化工副产氢和工业 CO₂为原料，每吨产品可封存近 2 吨 CO₂，同类产品已通过新加坡和日本的生物安全认证^[156]。

气体发酵商业化进程并非一帆风顺，多个已公告的项目曾经历显著的启动延迟和产能爬坡困难。Steelanol 项目从落成到首次产出乙醇间隔约 5 个月，其后产能爬坡仍在持续（表 3）^[134]。工业尾气组成的实时波动对生物催化剂的稳定性构成持续挑战，任何冶炼工况的变化都可能引发代谢

响应偏移^[136]。此外，该商业模式高度依赖场地伙伴的持续气源供应和碳减排政策支撑，在政策环境不确定的市场中面临一定的系统性风险。

6.5 技术经济分析与生命周期评价

技术经济分析（techno-economic analysis, TEA）和生命周期评价为气体发酵技术的产业决策提供了定量依据，基于工业中试数据的 LCA 研究表明，LanzaTech 丙酮工艺的温室气体排放为 -1.35 kg CO₂e·kg⁻¹ 丙酮，相较于石化异丙苯法路线，实现了超过 180% 的温室气体减排。其乙醇联产物的排放降至 33.3 g CO₂e/MJ，满足美国可再生燃料标准中纤维素生物燃料大于等于 60% 减排的认证门槛。中试数据的工业级工厂设计研究进一步量化了经济可行性，以钢厂尾气为原料、年产约 4.75 万吨的异丙醇和丙酮联产装置模型显示，其可年产 4.18 万吨纯度为 99.6% 的异丙醇和 0.564 万吨纯度为 99.0% 的丙酮。该工艺通过真空蒸馏和

表3 全球气体发酵工业化示范项目汇总
Table 3 Summary of global industrial gas fermentation demonstration projects

项目名称/地点 Project (Location)	运营方 Operator	原料气 Feed Gas	主要产品 Main Products	阶段 Stage	数据年份 Data year	参考文献 References
Hebei Shoulang, Caofeidian, China	Hebei Shoulang New Energy Technology Co., Ltd.	Steel industrial off-gas	Fuel ethanol	Commercial operation	2018	[143]
Ningxia Binze, China	Ningxia Binze New Energy Technology Co., Ltd.	Ferroalloy furnace gas	Fuel ethanol	Commercial operation	2022	[144]
Guizhou Jinze, China	Guizhou Jinze New Energy Technology Co., Ltd.	Ferroalloy industrial off-gas	Fuel ethanol	Commercial operation	2023	[144]
Steelanol, Ghent, Belgium	ArcelorMittal Belgium	Steel industrial off-gas	Ethanol	Commercial operation	2023	[134]
IndianOil – LanzaTech, Panipat, India	Indian Oil Corporation	Refinery off-gas	Ethanol	Commercial operation	2023	[149]
Hebei Shoulang Phase II, Caofeidian, China	Hebei Shoulang New Energy Technology Co., Ltd.	CO ₂ -containing industrial off-gas	Anhydrous ethanol, microbial protein	Trial production	2026	[144]
Yitai – Jupeng / Inner Mongolia Pengtai, Ordos, China	Inner Mongolia Pengtai Biotechnology Co., Ltd.	Decarbonized off-gas, unshifted purified gas, CO ₂	Anhydrous ethanol, microbial protein	Under construction	2024	[154]
Henan Sailongtu, Yongcheng, China	Henan Sailongtu Biotechnology Co., Ltd.	Coal-chemical synthesis gas	Anhydrous ethanol, microbial protein	Demonstration	2024	[155]
HQP Microbial Protein Pilot Plant, Chengdu, China	Chengdu Heqi Biotechnology Co., Ltd.	Low-carbon gases such as H ₂ and CO ₂	HQP microbial protein	Pilot	2025	[156]
INEOS Bio Indian River BioEnergy Center, USA	INEOS Bio	Biomass / municipal solid waste gasification syngas	Cellulosic ethanol, renewable electricity	Discontinued	2013	[147]

热泵集成萃取精馏处理 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的发酵液, 在该模型的热集成及尾气能量回收条件下, 无需外部蒸汽输入, 并实现净发电。模型估算的单位生产成本约为 $0.57 \text{ 美元} \cdot \text{kg}^{-1}$ 产品, 低于2023年市场价格, 该估算假设了满负荷运行和稳定低成本气源供应。从摇篮到大门的LCA结果显示, 全球变暖潜势为 $-1.42 \text{ kg CO}_2\text{e} \cdot \text{kg}^{-1}$ 异丙醇和 $-1.25 \text{ kg CO}_2\text{e} \cdot \text{kg}^{-1}$ 丙酮, 这主要归因于避免了钢厂尾气排放, 仅淡水消耗高于石化路线, 需在干旱地区的项目规划中予以关注^[12, 157]。

然而, 上述经济性结果主要基于过程模型和中试数据, 并假设稳定低成本气源、较高负荷率和稳定产品价格, 尚缺乏商业化装置长期运行成本的验证。因此, 在无碳溢价、无补贴的中性市场环境下, 丙酮、异丙醇气体发酵目前尚不能认为已具备稳定的全面成本竞争力。其经济性仍受到尾气波动、气体预处理、发酵液低滴度及产品分离能耗等因素影响, 现有TEA敏感性分析表明, 产品选择性、体积生产率和产物滴度是关键经济参数^[158]。因此, 现阶段最核心的降本路径是提高目标产物选择性和体积生产率, 并同步提高产物滴度, 以减少副产物形成、反应器规模和下游分离负荷; 同时, 稳定获得低成本工业尾气也是实现产业化经济性的关键。

总的来说, 气体发酵产乙醇已进入商业化阶段, 而丙酮/异丙醇路线仍处于由中试向商业化过渡阶段, 其长期竞争力仍取决于菌株性能提升、过程强化及低成本气源获取。

7 挑 战

7.1 当前面临的核心挑战

7.1.1 能量代谢的热力学天花板

产乙酸菌面临的最根本制约因素是其自养代谢的极端能量匮乏。在 CO_2 和 H_2 条件下, WL 途径固定 CO_2 的 ATP 净产率仅约 0.3 mol/mol 乙酸, 而以 CO 为底物时据模型估算最高可达约 1.5 mol/mol 乙酸^[101]。细胞维持和生物量合成对 ATP 的竞争, 使得分配给产物合成的能量极为有限。所有需要额外 ATP 或还原力输入的异源途径, 如萜类和高

度还原的四碳及以上产物, 其产率均受此热力学天花板的严重限制。能量约束可能导致低生物量浓度, 并影响连续培养的稳定性。突破能量瓶颈需要从代谢工程、过程工程和外部能量输入三个维度协同推进。

7.1.2 遗传工具的菌株适配性与通量

如前文所述, 产乙酸菌遗传工具的发展呈现高度不均衡格局。这一瓶颈对产业化的直接影响在于, 当某一菌株在生理层面更适合特定应用场景时, 如 *T. kivui* 的高生长速率适配高容积生产率需求, 却因遗传工具不足而无法进行必要的代谢途径改造。此时, 研究者被迫退回到工具成熟但生理特性次优的底盘, 从而造成“可改造性”与“最优适配性”之间的系统性矛盾。打破这一僵局的关键在于建立跨菌株的通用化工具开发范式。内源 CRISPR 系统和 RecT 介导的重组工程正是朝此方向迈出的重要步伐。

7.1.3 规模化过程中的稳定性问题

工业规模反应器中不可避免的气体浓度梯度, 会导致微生物经历频繁的底物浓度冲击, 进而引发代谢波动和产物选择性漂移。高细胞密度培养中的自聚集、噬菌体污染和长期遗传漂变均威胁连续发酵的长期稳定性。工业尾气组成随冶炼工况实时波动, 其中的 H_2S 、 HCN 和焦油等痕量杂质可导致关键酶的不可逆失活。

7.1.4 下游分离与产品规格挑战

气体发酵产物的下游纯化面临特殊挑战。发酵液中产物滴度通常在 $10 - 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 远低于传统糖基发酵的 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 这直接增加了蒸馏或萃取的单位能耗。对于乙醇, 工业装置已采用成熟的多效蒸馏和分子筛脱水技术。对于丙酮/异丙醇等新产品, TEA 研究表明真空蒸馏结合热泵萃取精馏可实现热自足的分离流程。然而, 对于滴度更低的产品, 传统分离方案的经济性急剧恶化, 因此需要开发原位产物移除技术, 如气提、渗透蒸发或选择性吸附等。

7.2 知识产权壁垒与监管考量

LanzaTech 对其核心菌株、遗传工具和发酵工艺持有广泛的专利保护, 这些知识产权壁垒在一

一定程度上限制了同行对 *C. autoethanogenum* 工业化路径的自由探索。推动该领域的开放创新,需要开发不受现有专利约束的替代底盘或采用自主开发的遗传工具体系。工程菌株的工业化应用还涉及生物安全和环境释放评估。尽管气体发酵系统为密闭反应器,且产乙酸菌为严格厌氧菌,但各国对基因改造微生物的使用仍有不同的监管要求。

在欧盟框架下,封闭使用基因改造微生物须遵循 Directive 2009/41/EC 的分级管理制度,气体发酵虽属于密闭系统,但工程菌株的风险评估仍需覆盖从实验室到工业规模的全生命周期^[159]。美国对工业微生物的监管由 EPA、FDA 和 USDA 三方协调框架执行,其中 EPA 依据《有毒物质控制法》对新型微生物的商业化使用进行审查,要求提交详细的环境风险评估数据^[160]。中国于 2021 年施行的《生物安全法》及后续配套法规,对基因编辑微生物的研发和产业应用实施分类分级管理,具体监管要求需根据生物技术活动的风险等级、菌株性质、最终产品用途及适用配套法规确定^[161]。

值得注意的是,各国监管体系对基因改造的定义范畴存在差异:欧盟采用过程导向定义,即凡经过定向遗传操作的微生物均纳入遗传修饰生物监管;而部分国家对不含外源 DNA 的基因编辑产品采取较为宽松的审批路径,这种监管异质性的跨国技术转让和产品出口构成了额外壁垒。在知识产权层面, LanzaTech 的专利组合覆盖了从 *C. autoethanogenum* 菌株改良到连续发酵工艺参数、产物分离流程等方法,形成了多层次的专利壁垒网络。

近年来,国内在产乙酸菌底盘开发方面已由菌株筛选逐步转向遗传改造与系统代谢工程。以 *C. ljungdahlii*、*C. autoethanogenum* 为代表的底盘已建立较完善的遗传操作体系,并实现乙醇、异丙醇等产物的合成,显示出较好的工程化潜力^[53, 162]。国内代表性企业首钢朗泽等建立从菌株选育到工业应用的一体化研发平台,并实现钢铁、铁合金等工业尾气生物发酵装置规模化的技术布局^[163-164]。因此,替代底盘进一步实现工业化的关键是突破高效自养生长、工业尾气耐受和目标产物定向合成之间的协同瓶颈,其中能量利用效率

和生长速率是制约底盘工业应用的关键因素。

8 结论与展望

8.1 结论

产乙酸菌底盘细胞的设计构建与应用已由基础研究走向工程应用,其中钢铁与铁合金尾气制乙醇已进入商业化部署阶段,形成了从菌株工程到过程放大,再到产品市场化的完整价值链。

(1) 在遗传操作层面, CRISPR-Cas9/Cas12a 系统已在 *C. autoethanogenum*、*C. ljungdahlii* 和 *T. kivui* 等菌株中实现无标记基因组编辑;但效率受靶点、供体形式和筛选方式等影响,难以直接横向比较。工业底盘改造的关键瓶颈在于转化效率、多轮迭代通量及编辑参数的跨菌株迁移性。内源型 CRISPR 系统和重组工程系统的开发,则为仍受转化瓶颈制约的非模式菌株提供了突破遗传操作限制的新路径。

(2) 在代谢工程层面,气体发酵已拓展至丙酮、异丙醇等多种高附加值产品,部分成果已实现中试验证,并持续向产业化推进。相关技术的发展为提升菌株性能、拓展产品谱系及推动气体发酵产业化奠定了重要基础。

(3) 在过程工程层面,鼓泡塔数值建模为工业反应器设计提供了依据;缩尺模拟器的概念设计为后续在实验室评价工程菌株对工业气体浓度波动的响应提供了方法框架。

(4) 在产业化层面,气体发酵已实现多座商业化装置部署。以首钢朗泽为例,其乙醇设计年产能合计数十万吨,相关项目支持该路线商业部署的可行性;实际产量及连续运行仍受上游气源供应、气体组成和装置检修等因素影响。

8.2 展望

未来,提高能量代谢效率仍是重要方向,突破这一瓶颈需要从代谢工程、过程工程和外部能量供给等层面协同推进。

(1) 强化能量代谢与细胞底盘。通过强化 Rnf 复合体、电子歧化和 ATP 再生等能量守恒模块,

表4 本文常用缩略语

Table 4 Abbreviations used in this review

缩略语 Abbreviation	英文全称 Full name	中文名称 Chinese term
WL	Wood-Ljungdahl	伍德-永达尔
CODH/ACS	carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase	一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶A合成酶
CFeSP	corrinoid iron-sulfur protein	类咕啉铁硫蛋白
THF	tetrahydrofolate	四氢叶酸
HDCR	hydrogen-dependent CO ₂ reductase	氢依赖型CO ₂ 还原酶
Rnf	ferredoxin:NAD ⁺ oxidoreductase complex	Rnf复合体(铁氧还蛋白:NAD ⁺ 氧化还原酶)
Ech	energy-converting hydrogenase	能量转换氢化酶
HydABC	electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase	电子歧化[FeFe]-氢化酶
Hyt	electron-bifurcating hydrogenase complex (HytA - E)	电子歧化氢化酶复合体
Fd _{red} / Fd _{ox}	reduced / oxidized ferredoxin	还原态/氧化态铁氧还蛋白
PFOR	pyruvate:ferredoxin oxidoreductase	丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶
AOR	aldehyde:ferredoxin oxidoreductase	醛:铁氧还蛋白氧化还原酶
ADHE	bifunctional acetaldehyde/alcohol dehydrogenase	双功能乙醛/乙醇脱氢酶
FADH ₂	reduced flavin adenine dinucleotide	还原型黄素腺嘌呤二核苷酸
Pta / AckA	phosphotransacetylase / acetate kinase	磷酸转乙酰酶/乙酸激酶
Nfn	NADH-dependent ferredoxin:NADP ⁺ oxidoreductase	NADH依赖型铁氧还蛋白:NADP ⁺ 氧化还原酶
ADI	arginine deiminase pathway	精氨酸脱亚胺酶途径
Dam / Dcm	DNA adenine / cytosine methyltransferase	DNA腺嘌呤/胞嘧啶甲基转移酶
Clostron	group II intron-based gene inactivation system	基于II型内含子的基因失活系统
TCA	tricarboxylic acid cycle	三羧酸循环
ACE	allele-coupled exchange	等位基因偶联交换
Hi-TARGET	high-efficiency Thermoanaerobacter kivui CRISPR genome editing tool	基伍嗜热厌氧杆菌高效CRISPR基因组编辑工具
CRISPRi	CRISPR interference	CRISPR干扰
Tn-seq	transposon insertion sequencing	转座子插入测序
RBS	ribosome binding site	核糖体结合位点
ALE	adaptive laboratory evolution	适应性实验室进化
GEM	genome-scale metabolic model	基因组规模代谢模型
DBTL	design-build-test-learn	设计-构建-测试-学习循环
iPROBE	in vitro prototyping and rapid optimization of biosynthetic enzymes	体外原型构建与生物合成酶快速优化
$K_L a$	volumetric mass transfer coefficient	容积传质系数
CSTR	continuous stirred-tank reactor	连续搅拌釜反应器
CFD	computational fluid dynamics	计算流体力学
LCA	life cycle assessment	生命周期评价
TEA	techno-economic analysis	技术经济分析
MVA	mevalonate pathway	甲羟戊酸途径
PHB	poly(3-hydroxybutyrate)	聚3-羟基丁酸酯
SAF	sustainable aviation fuel	可持续航空燃料
ANI	average nucleotide identity	平均核苷酸一致性
DCW	dry cell weight	细胞干重
EPA	U.S. Environmental Protection Agency	美国环境保护署
FDA	U.S. Food and Drug Administration	美国食品药品监督管理局
USDA	U.S. Department of Agriculture	美国农业部

提高ATP和还原力供给,是提升底物利用效率和产物合成能力的重要方向。未来可结合转录组、多组学约束代谢模型和DBTL循环,实现关键靶点的系统挖掘与快速迭代。

(2) 推进菌株与过程协同优化。基因组规模代谢模型已用于产乙酸菌的代谢分析与改造靶点识别,缩尺模拟器的概念设计旨在实验室重现工业气体发酵中的溶解气体浓度波动,为菌株筛选和过程优化提供依据。后续可将气体组成波动、杂质胁迫及长期运行稳定性纳入菌株评价,结合多组学分析、自动化实验与反应器模拟,先在关键酶和代谢模块层面开展预测与实验验证,再逐步拓展至途径优化,提高工程菌株对工业环境的适应性。

(3) 拓展多元化产品与新型碳转化路线。钢厂尾气制乙醇已实现商业化,而丙酮/异丙醇、Power-to-X及碳链延伸等路线仍处于由实验室向中试和示范发展的阶段。后续产业化的关键在于提高菌株能量效率、产物耐受性和过程稳定性,并降低绿色氢能及产物分离成本。对于碳链延伸体系,共培养和原位产物移除等策略有望进一步缓解能量限制与产物抑制。

总的来说,产乙酸菌气体发酵已由基础代谢研究逐步迈向产业化应用,在工业尾气资源化、CO₂生物转化和绿色化学品制造方面具有重要潜力。未来,合成生物学、人工智能、自动化实验、反应器工程与绿色能源技术的深度融合,将进一步推动菌株和工艺协同优化,促进气体发酵由单一乙醇生产向多元化绿色生物制造拓展,为构建低碳循环经济体系和实现全球碳中和目标提供重要的生物技术支撑。

参 考 文 献

- [1] 宋美倩. 河北首朗新能源科技有限公司: 22秒快速转化工业尾气[EB/OL]. 经济日报, 2021-12-26. <https://www.jingjiribao.cn/static/detail.jsp?id=382202>.
SONG M Q. Hebei Shoulang New Energy Technology Co., Ltd. 22-Second Rapid Conversion of Industrial Off-Gases[EB/OL]. Economic Daily, 2021-12-26. <https://www.jingjiribao.cn/static/detail.jsp?id=382202>.
- [2] 中平资本. 首钢朗泽 ESG 实践概况[EB/OL]. [2026-10-8]. <http://www.zpcapital.com/newsinfo/4571810.html>.
Zhongping Capital. Overview of Shougang LanzaTech ESG practices[EB/OL]. [2026-10-8]. <http://www.zpcapital.com/newsinfo/4571810.html>.
- [3] FACKLER N, HEIJSTRA B D, RASOR B J, et al. Stepping on the gas to a circular economy: accelerating development of carbon-negative chemical production from gas fermentation[J]. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2021, 12: 439-470.
- [4] KÖPKE M, SIMPSON S D. Pollution to products: recycling of 'above ground' carbon by gas fermentation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 65: 180-189.
- [5] DANIELL J, KÖPKE M, SIMPSON S D. Commercial biomass syngas fermentation[J]. Energies, 2012, 5(12): 5372-5417.
- [6] ARTZ J, MÜLLER T E, THENERT K, et al. Sustainable conversion of carbon dioxide: An integrated review of catalysis and life cycle assessment[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(2): 434-504.
- [7] LIEW F, MARTIN M E, TAPPEL R C, et al. Gas fermentation- A flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feedstocks[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 694.
- [8] DÜRRE P, EIKMANN S B J. C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 35: 63-72.
- [9] LIEW F, HENSTRA A M, WINZER K, et al. Insights into CO₂ fixation pathway of *Clostridium autoethanogenum* by targeted mutagenesis[J]. mBio, 2016, 7(3): e00427-16.
- [10] DE LUNA P, HAHN C, HIGGINS D, et al. What would it take for renewably powered electrosynthesis to displace petrochemical processes? [J]. Science, 2019, 364(6438): eaav3506.
- [11] XU D, TREE D R, LEWIS R S. The effects of syngas impurities on syngas fermentation to liquid fuels[J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(7): 2690-2696.
- [12] LIEW F E, NOGLE R, ABDALLA T, et al. Carbon-negative production of acetone and isopropanol by gas fermentation at industrial pilot scale[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(3): 335-344.
- [13] HANDLER R M, SHONNARD D R, GRIFFING E M, et al. Life cycle assessments of ethanol production via gas fermentation: Anticipated greenhouse gas emissions for cellulosic and waste gas feedstocks[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2016, 55(12): 3253-3261.
- [14] DRAKE H L, GÖßNER A S, DANIEL S L. Old acetogens,

- new light[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125: 100-128.
- [15] 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.
- [16] LJUNGDAHL L G. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1986, 40: 415-450.
- [17] WOOD H G. Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy[J]. *The FASEB Journal*, 1991, 5(2): 156-163.
- [18] BERTSCH J, MÜLLER V. Bioenergetic constraints for conversion of syngas to biofuels in acetogenic bacteria[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 210.
- [19] LanzaTech. Investor Relation[EB/OL]. [2026-09-05]. <https://ir.lanzatech.com>.
- [20] XU J, WANG J, MA C, et al. Embracing a low-carbon future by the production and marketing of C1 gas protein[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 63: 108096.
- [21] WANG J, CHEN L, XU J, et al. C1 gas protein: A potential protein substitute for advancing aquaculture sustainability[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, 15(3): 1179-1197.
- [22] MÜLLER V. Energy conservation in acetogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6345-6353.
- [23] HUMPHREYS C M, MINTON N P. Advances in metabolic engineering in the microbial production of fuels and chemicals from C1 gas[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 174-181.
- [24] WIERINGA K T. Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1936, 3(1): 263-273.
- [25] RAGSDALE S W. Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1): 129-136.
- [26] KIM J Y, LEE M, OH S, et al. Acetogen and acetogenesis for biological syngas valorization[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 384: 129368.
- [27] LEVER M A. Acetogenesis in the energy-starved deep biosphere-a paradox? [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 2: 284.
- [28] BENGLSDORF F R, POEHLEIN A, LINDER S, et al. Industrial acetogenic biocatalysts: A comparative metabolic and genomic analysis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1036.
- [29] ADAM P S, BORREL G, GRIBALDO S. Evolutionary history of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, one of the oldest enzymatic complexes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(6): E1166-E1173.
- [30] JIAO J Y, FU L, HUA Z S, et al. Insight into the function and evolution of the Wood - Ljungdahl pathway in Actinobacteria [J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(10): 3005-3018.
- [31] RAGSDALE S W. Life with carbon monoxide[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 39(3): 165-195.
- [32] SCHUCHMANN K, MÜLLER V. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(14): 4056-4069.
- [33] RAGSDALE S W, KUMAR M. Nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase[J]. *Chemical Reviews*, 1996, 96(7): 2515-2540.
- [34] BIEGEL E, MÜLLER V. Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin: NAD⁺ oxidoreductase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(42): 18138-18142.
- [35] HESS V, SCHUCHMANN K, MÜLLER V. The ferredoxin: NAD⁺ oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na⁺ and is reversibly coupled to the membrane potential[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(44): 31496-31502.
- [36] 文志琼, 李煜真, 张金刚, 等. 化能驱动的产乙酸菌转化利用 CO₂研究进展[J]. *合成生物学*, 2023, 4(6): 1178-1190.
- WEN Z Q, LI Y Z, ZHANG J G, et al. Progress on bio-fixation and utilization of CO₂ in acetogens driven by chemical energy [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(6): 1178-1190.
- [37] TREMBLAY P L, ZHANG T, DAR S A, et al. The Rnf complex of *Clostridium ljungdahlii* is a proton-translocating ferredoxin: NAD⁺ oxidoreductase essential for autotrophic growth[J]. *mBio*, 2013, 4(1): e00406-12.
- [38] MOCK J, ZHENG Y, MUELLER A P, et al. Energy Conservation associated with ethanol formation from H₂ and CO₂ in *Clostridium autoethanogenum* involving electron bifurcation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(18): 2965-2980.
- [39] BUCKEL W, THAUER R K. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013, 1827(2): 94-113.
- [40] VALGEPEA K, DE SOUZA PINTO LEMGRUBER R, MEAGHAN K, et al. Maintenance of ATP homeostasis triggers metabolic shifts in gas-fermenting acetogens[J]. *Cell Systems*, 2017, 4(5): 505-515.
- [41] BAUM C, ZELDES B, POEHLEIN A, et al. The energy-converting hydrogenase Ech2 is important for the growth of

- the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui* on ferredoxin-dependent substrates[J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(4): e0338023.
- [42] KATSYV A, MÜLLER V. A purified energy-converting hydrogenase from *Thermoanaerobacter kivui* demonstrates coupled H⁺-translocation and reduction in vitro[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298: 102216.
- [43] SCHOELMERICH M C, MÜLLER V. Energy conservation by a hydrogenase-dependent chemiosmotic mechanism in an ancient metabolic pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(13): 6329-6334.
- [44] HOCQ R, HORVATH J, STUMPTNER M, et al. A megatransposon drives the adaptation of *Thermoanaerobacter kivui* to carbon monoxide[J]. Nature Communications, 2025, 16: 4217.
- [45] POEHLEIN A, ZELDES B, FLAIZ M, et al. Advanced aspects of acetogens[J]. Bioresource Technology, 2025, 427: 131913.
- [46] ZELDES B, MITTELSTEDT S, BAUM C, et al. Sugar-inducible promoters for manipulation of core metabolic pathways in the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(12): e01641-25.
- [47] GOTTWALD M, ANDRESEN J R, LEGALL J, et al. Presence of cytochrome and menaquinone in *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium thermoaceticum*[J]. Journal of Bacteriology, 1975, 122(1): 325-328.
- [48] HUMPHREYS C M, MCLEAN S, SCHATTSCHNEIDER S, et al. Whole genome sequence and manual annotation of *Clostridium autoethanogenum*, an industrially relevant bacterium[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1085.
- [49] BROWN S D, NAGARAJU S, UTTURKAR S, et al. Comparison of single-molecule sequencing and hybrid approaches for finishing the genome of *Clostridium autoethanogenum* and analysis of CRISPR systems in industrial relevant Clostridia[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7: 40.
- [50] HEFFERNAN J K, VALGEPEA K, DE SOUZA PINTO LEMGRUBER R, et al. Enhancing CO₂-valorization using *Clostridium autoethanogenum* for sustainable fuel and chemicals production[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 204.
- [51] VALGEPEA K, DE SOUZA PINTO LEMGRUBER R, ABDALLA T, et al. H₂ drives metabolic rearrangements in gas-fermenting *Clostridium autoethanogenum*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 55.
- [52] KÖPKE M, HELD C, HUJER S, et al. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(29): 13087-13092.
- [53] LEANG C, UEKI T, NEVIN K P, et al. A genetic system for *Clostridium ljungdahlii*: a chassis for autotrophic production of biocommodities and a model homoacetogen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(4): 1102-1109.
- [54] KÖPKE M, LIEW F. Production of butanol from carbon monoxide by a recombinant microorganism[P]. WO2012/053905 A1, 2012.
- [55] SCHUCHMANN K, MÜLLER V. A bacterial electron-bifurcating hydrogenase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(37): 31165-31171.
- [56] SCHUCHMANN K, MÜLLER V. Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase[J]. Science, 2013, 342(6164): 1382-1385.
- [57] WESTPHAL L, WIECHMANN A, BAKER J, et al. The Rnf complex is an energy-coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the acetogen *Acetobacterium woodii*[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(21): e00357-18.
- [58] BERTSCH J, MÜLLER V. CO metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17): 5949-5956.
- [59] BRUANT G, LÉVESQUE M J, PETER C, et al. Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain P7[J]. PLOS ONE, 2010, 5(9): e13033.
- [60] FERNÁNDEZ-NAVEIRA Á, ABUBACKAR H N, VEIGA M C, et al. Carbon monoxide bioconversion to butanol-ethanol by *Clostridium carboxidivorans*: Kinetics and toxicity of alcohols [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(9): 4231-4240.
- [61] GENTHNER B R S, DAVIS C L, BRYANT M P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 42(1): 12-19.
- [62] SANFORD P A, WOOLSTON B M. Expanding the genetic engineering toolbox for the metabolically flexible acetogen *Eubacterium limosum*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2022, 49(5): kuac019.
- [63] PIERCE E, XIE G, BARABOTE R D, et al. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*) [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(10): 2550-2573.
- [64] FONTAINE F E, PETERSON W H, MCCOY E, et al. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* [J]. Journal of Bacteriology, 1942, 43(6): 701-715.

- [65] LEIGH J A, MAYER F, WOLFE R S. *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium [J]. Archives of Microbiology, 1981, 129(4): 275-280.
- [66] SITARA A, HOCQ R, LU A J, et al. Hi-TARGET: a fast, efficient and versatile CRISPR type I-B genome editing tool for the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2025, 18(1): 49.
- [67] PUGH D, GILES A, HOPKINS A, et al. Thermal distributive blast furnace gas characterisation, a steelworks case study[J]. Applied Thermal Engineering, 2013, 53(2): 358-365. DOI: 10.1016/j.applthermaleng.2012.05.014.
- [68] COLLIS J, STRUNGE T, STEUBING B, et al. Deriving economic potential and GHG emissions of steel mill gas for chemical industry[J]. Frontiers in Energy Research, 2021, 9: 642162. DOI: 10.3389/fenrg.2021.642162.
- [69] International Flame Research Foundation. What are the fuel, combustion and flue gas properties of Basic Oxygen Furnace Gas (BOFG)?[EB/OL]. (2003-09-21)[2026-10-19]. <https://ifrf.net/research/handbook/what-are-the-fuel-combustion-and-flue-gas-properties-of-basic-oxygen-furnace-gas-bofg/>.
- [70] MORAL G, ORTIZ-IMEDIO R, ORTIZ A, et al. Hydrogen recovery from coke oven gas. Comparative analysis of technical alternatives[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2022, 61(18): 6106-6124. DOI: 10.1021/acs.iecr.1c04668.
- [71] MOON J, POEHLEIN A, DANIEL R, et al. Redirecting electron flow in *Acetobacterium woodii* enables growth on CO and improves growth on formate[J]. Nature Communications, 2024, 15: 5424.
- [72] NI J, MIAO H, ZHANG W, et al. Effects of impurities on the syngas fermentation: Mechanism and future perspectives[J]. Bioresource Technology, 2025, 425: 132301.
- [73] AHMED A, LEWIS R S. Fermentation of biomass-generated synthesis gas: Effects of nitric oxide[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(5): 1080-1086.
- [74] OLIVEIRA L, RÜCKEL A, NORDGAUER L, et al. Comparison of syngas-fermenting clostridia in stirred-tank bioreactors and the effects of varying syngas impurities[J]. Microorganisms, 2022, 10(4): 681.
- [75] KATO J, TAKEMURA K, KATO S, et al. Metabolic engineering of *Moorella thermoacetica* for thermophilic bioconversion of gaseous substrates to a volatile chemical[J]. AMB Express, 2021, 11: 59.
- [76] BOURGADE B, MINTON N P, ISLAM M A. Genetic and metabolic engineering challenges of C1-gas fermenting acetogenic chassis organisms[J]. FEMS Microbiol Rev, 2021, 45(2): fuab008.
- [77] MOREIRA J P C, HEAP J T, ALVES J I, et al. Developing a genetic engineering method for *Acetobacterium wieringae* to expand one-carbon valorization pathways[J]. Biotechnol Biofuels Bioprod, 2023, 16(1): 24.
- [78] PURDY D, O'KEEFFE T A T, ELMORE M, et al. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(2): 439-452.
- [79] 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.
- [80] HUANG H, CHAI C, LI N, et al. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Clostridium ljungdahlii*, an autotrophic gas-fermenting bacterium[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(12): 1355-1361.
- [81] JOSEPH R C, KIM N M, SANDOVAL N R. Recent developments of the synthetic biology toolkit for *Clostridium* [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 154.
- [82] PHILIPPS G, DE VRIES S, JENNEWEIN S. Development of a metabolic pathway transfer and genomic integration system for the syngas-fermenting bacterium *Clostridium ljungdahlii* [J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 112.
- [83] HEAP J T, PENNINGTON O J, CARTMAN S T, et al. The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(3): 452-464.
- [84] LIEW F, HENSTRA A M, KÖPKE M, et al. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production[J]. Metabolic Engineering, 2017, 40: 104-114.
- [85] HEAP J T, EHSAAN M, COOKSLEY C M, et al. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(8): e59.
- [86] NAGARAJU S, DAVIES N K, WALKER D J F, et al. Genome editing of *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/Cas9 [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 219.
- [87] CAÑADAS I C, GROOTHUIS D, ZYGOUROPOULOU M, et al. RiboCas: A universal CRISPR-based editing tool for *Clostridium*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(6): 1379-1390.
- [88] POULALIER-DELAVALLE M, BAKER J P, MILLARD J, et al. Endogenous CRISPR/Cas systems for genome engineering in the acetogens *Acetobacterium woodii* and *Clostridium autoethanogenum*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1213236.
- [89] ZHANG J Z, LI Y Z, XI Z N, et al. Inducible promoters of bacterial microcompartments improve the CRISPR/Cas9 tools

- for efficient metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(4): e02183-24.
- [90] XIA P F, CASINI I, SCHULZ S, et al. Reprogramming acetogenic bacteria with CRISPR-targeted base editing via deamination[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(8): 2162-2171.
- [91] KWON H J, LEE J, KWON S J, et al. Development of a genetic engineering toolbox for syngas-utilizing acetogen *Clostridium* sp. AWRP[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23: 6.
- [92] SANFORD P A, WOOLSTON B M. Development of a recombineering system for the acetogen *Eubacterium limosum* with Cas9 counterselection for markerless genome engineering [J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(8): 2505-2514.
- [93] BANERJEE A, LEANG C, UEKI T, et al. Lactose-inducible system for metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(8): 2410-2416.
- [94] AL-BASSAM M M, KIM J N, ZARAMELA L S, et al. Optimization of carbon and energy utilization through differential translational efficiency[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 4474.
- [95] LAUER I, PHILIPPS G, JENNEWEIN S. Metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* for the production of hexanol and butanol from CO₂ and H₂[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21: 85.
- [96] WOODS C, HUMPHREYS C M, TOMI-ANDRINO C, et al. Required gene set for autotrophic growth of *Clostridium autoethanogenum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(7): e02479-21.
- [97] FACKLER N, HEFFERNAN J, JUMINAGA A, et al. Transcriptional control of *Clostridium autoethanogenum* using CRISPRi[J]. Synthetic Biology, 2021, 6(1): ysab008.
- [98] MUNIR S, WAN S, GAO X, et al. Elucidating the roles of essential genes in autotrophic metabolism and cell morphology of *Clostridium ljungdahlii* by CRISPRi[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2026, 110(1): 44.
- [99] SHIN J, BAE J, LEE H, et al. Genome-wide CRISPRi screen identifies enhanced autolithotrophic phenotypes in acetogenic bacterium *Eubacterium limosum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2023, 120(6): e2216244120.
- [100] JOSEPH R C, SANDOVAL N R. Single and multiplexed gene repression in solventogenic *Clostridium* via Cas12a-based CRISPR interference[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8: 148-156.
- [101] KATSYV A, MÜLLER V. Overcoming energetic barriers in acetogenic C1 conversion[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 621166.
- [102] WOOLSTON B M, EMERSON D F, CURRIE D H, et al. Redirecting carbon flux in *Clostridium ljungdahlii* using CRISPR interference (CRISPRi) [J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 243-253.
- [103] KÖPKE M, GERTH M L, MADDOCK D J, et al. Reconstruction of an acetogenic 2, 3-butanediol pathway involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80 (11): 3394-3403.
- [104] VALGEPEA K, LOI K Q, BEHRENDORFF J B, et al. Arginine deiminase pathway provides ATP and boosts growth of the gas-fermenting acetogen *Clostridium autoethanogenum* [J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 202-211.
- [105] MAHAMKALI V, VALGEPEA K, DE SOUZA PINTO LEMGRUBER R, et al. Redox controls metabolic robustness in the gas-fermenting acetogen *Clostridium autoethanogenum* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(23): 13168-13175.
- [106] WANG S, HUANG H, MOLL J, et al. NADP⁺ reduction with reduced ferredoxin and NADP⁺ reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*[J]. J Bacteriol. 2010, 192(19): 5115-5123.
- [107] JIN S, BAE J, SONG Y, et al. Synthetic biology on acetogenic bacteria for highly efficient conversion of C1 gases to biochemicals[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7639.
- [108] LO J, WU C, HUMPHREYS J R, et al. Thermodynamic and Kinetic Modeling Directs Pathway Optimization for Isopropanol Production in a Gas-Fermenting Bacterium[J]. mSystems, 2023, 8(2): e0127422.
- [109] HOFFMEISTER S, GERDOM M, BENGLSDORF F R, et al. Acetone production with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 36: 37-47.
- [110] FLÜCHTER S, FOLLONIER S, SCHIEL-BENGLSDORF B, et al. Anaerobic production of poly(3-hydroxybutyrate) and its precursor 3-hydroxybutyrate from synthesis gas by autotrophic clostridia[J]. Biomacromolecules, 2019, 20(9): 3271-3282.
- [111] DIENDER M, STAMS A J, SOUSA D Z. Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas[J]. Biotechnol Biofuels. 2016, 9: 82.
- [112] RICHTER H, MOLITOR B, DIENDER M, et al. A narrow pH range supports butanol, hexanol, and octanol production from syngas in a continuous co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with in-line product extraction[J].

- Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1773.
- [113] DINER B A, FAN J, SCOTCHER M C, et al. Synthesis of heterologous mevalonic acid pathway enzymes in *Clostridium ljungdahlii* for the conversion of fructose and of syngas to mevalonate and isoprene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(1): e01723-17.
- [114] DYKSTRA J C, VAN OORT J, YAZDI A T, et al. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for ethyl acetate production from CO[J]. Microb Cell Fact, 2022, 21(1): 243.
- [115] BAE J, PARK C, JUNG H, et al. Harnessing acetogenic bacteria for one-carbon valorization toward sustainable chemical production[J]. RSC Chem Biol, 2024, 5(9): 812-832.
- [116] KOTTENHAHN P, PHILIPPS G, JENNEWEIN S. Hexanol biosynthesis from syngas by *Clostridium carboxidivorans* P7 - product toxicity, temperature dependence and in situ extraction [J]. Heliyon, 2021, 7(8): e07732.
- [117] FURDUI C, RAGSDALE S W. The role of pyruvate ferredoxin oxidoreductase in pyruvate synthesis during autotrophic growth by the Wood-Ljungdahl pathway[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(37): 28494-28499.
- [118] ZHAI Y, CHEN L, LIU F, et al. Engineering energy-robust *Clostridium autoethanogenum* via integrated nanotechnology and transcription-guided metabolic reprogramming[J]. Trends in Biotechnology, 2026 Jul 28.
- [119] WEN Z Q, LI Y Z, SU H J, et al. Deletion of electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase enhances H₂-driven CO₂ fixation and ethanol production in *Clostridium ljungdahlii*[J]. Bioresource Technology, 2026, 453: 134636.
- [120] LI X, HENSON M A. Metabolic modeling of bacterial co-culture systems predicts enhanced carbon monoxide-to-butyrate conversion compared to monoculture systems[J]. Biochem Eng J, 2019, 151: 107338.
- [121] CAIVANO A, VAN WINDEN W, DRAGONE G, et al. Enzyme-constrained metabolic model and in silico metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* for the development of sustainable production processes[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2023, 21: 4634-4646.
- [122] FAST A G, SCHMIDT E D, JONES S W, ET AL. Acetogenic mixotrophy: novel options for yield improvement in biofuels and biochemicals production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33: 60-72.
- [123] DRAGOSITS M, MATTANOVICH D. Adaptive laboratory evolution-principles and applications for biotechnology[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 64.
- [124] INGELMAN H, HEFFERNAN J K, HARRIS A, et al. Autotrophic adaptive laboratory evolution of the acetogen *Clostridium autoethanogenum* delivers the gas-fermenting strain LABrini with superior growth, products, and robustness [J]. New Biotechnology, 2024, 83: 1-15.
- [125] YANG K K, WU Z, ARNOLD F H. Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering[J]. Nature Methods, 2019, 16(8): 687-694.
- [126] LAWSON C E, MARTÍ J M, RADIVOJEVIC T, et al. Machine learning for metabolic engineering: A review[J]. Metabolic Engineering, 2021, 63: 34-60.
- [127] DUDEK N K, PRECUP D. Towards AI-designed genomes using a variational autoencoder[J]. Proc Biol Sci, 2024, 291 (2036): 20241457.
- [128] KING S H, DRISCOLL C L, LI D B, et al. Generative design of bacteriophages with genome language models[J]. Science, 2026, 393(6811): eaec2657.
- [129] MANN M, HÜSER A, SCHICK B, et al. Online monitoring of gas transfer rates during CO and CO/H₂ gas fermentation in quasi-continuously ventilated shake flasks[J]. Biotechnol Bioeng, 2021, 118(5): 2092-2104.
- [130] BREDWELL M D, SRIVASTAVA P, WORDEN R M. Reactor design issues for synthesis-gas fermentations[J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(5): 834-844.
- [131] MUNASINGHE P C, KHANAL S K. Syngas fermentation to biofuel: evaluation of carbon monoxide mass transfer coefficient ($K_L a$) in different reactor configurations[J]. Biotechnol Prog, 2010, 26(6): 1616-1621.
- [132] ALMEIDA BENALCÁZAR E, NOORMAN H, MACIEL FILHO R, et al. Modeling ethanol production through gas fermentation: a biothermodynamics and mass transfer-based hybrid model for microbial growth in a large-scale bubble column bioreactor[J]. Biotechnol Biofuels, 2020, 13: 59.
- [133] SIEBLER F, LAPIN A, TAKORS R. Synergistically applying 1-D modeling and CFD for designing industrial scale bubble column syngas bioreactors[J]. Eng Life Sci, 2020, 20(7): 239-251.
- [134] ArcelorMittal Belgium. Steelanol: blast furnace gas becomes ethanol[EB/OL]. [2026-09-08]. <https://belgium.arcelormittal.com/steelanol>.
- [135] STOLL I K, BOUKIS N, SAUER J. Syngas Fermentation to alcohols: Reactor technology and application perspective[J]. Chemie Ingenieur Technik, 2020, 92: 125-136.
- [136] PUIMAN L, ALMEIDA BENALCÁZAR E, PICIOREANU C, et al. Downscaling industrial-scale syngas fermentation to simulate frequent and irregular dissolved gas concentration shocks[J]. Bioengineering, 2023, 10(5): 518.
- [137] RICHTER H, MARTIN M E, ANGENENT L T. A two-stage continuous fermentation system for conversion of syngas into ethanol[J]. Energies, 2013, 6(8): 3987-4000.

- [138] KIM T H, LEE J S, LEE M J, et al. Two-stage continuous CO fermentation process strategy for high-titer bioethanol production using *Clostridium autoethanogenum*[J]. Bioresour Technol, 2025, 421: 132152.
- [139] RICCI L, SEIFERT A, BERNACCHI S, et al. Leveraging substrate flexibility and product selectivity of acetogens in two-stage systems for chemical production[J]. Microb Biotechnol, 2023, 16(2): 218-237.
- [140] CHAIKITKAEW S, WONGFAED N, MAMIMIN C, et al. Conversion of carbon dioxide in biogas into acetic acid by *Clostridium thailandense* immobilized on porous support materials[J]. Heliyon, 2024, 10(4): e26378.
- [141] 焦静, 郑勇, 李尊香, 等. 厌氧发酵在线监控技术研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(9): 87-95.
- JIAO J, ZHENG Y, LI Z X, et al. Advances in on-line monitoring technology of anaerobic fermentation[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(9): 87-95.
- [142] ABUBACKAR H N, VEIGA M C, KENNES C. Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid[J]. Bioresource Technology, 2015, 186: 122-127.
- [143] 北京首钢朗泽科技股份有限公司. 关于我们[EB/OL]. [2026-10-19]. <https://www.bjsglt.com/aboutus/>.
- Beijing Shougang LanzaTech Technology Co., Ltd. About us [EB/OL]. [2026-10-19]. <https://www.bjsglt.com/aboutus/>.
- [144] 北京首钢朗泽科技股份有限公司. 2026年中期报告[R/OL]. (2026-09-18)[2026-10-19]. https://www.hkexnews.hk/listedco/listconews/sehk/2026/0918/2026091800170_c.pdf.
- Beijing Shougang LanzaTech Technology Co., Ltd. 2026 Interim Report[R/OL]. (2026-09-18) [2026-10-19]. https://www.hkexnews.hk/listedco/listconews/sehk/2026/0918/2026091800170_c.pdf.
- [145] LanzaTech. World's leading steel company, ArcelorMittal and LanzaTech announce first ethanol samples from commercial flagship carbon capture and utilisation facility in Ghent, Belgium[EB/OL]. (2023-06-14) [2026-10-21]. <https://ir.lanzatech.com/news-releases/news-release-details/worlds-leading-steel-company-arcelormittal-and-lanzatech>.
- [146] 北京首钢朗泽科技股份有限公司. 招股章程[R/OL].(2026-05-26) [2026-10-19]. https://www1.hkexnews.hk/listedco/listconews/sehk/2026/0526/2026052600048_c.pdf.
- Beijing Shougang LanzaTech Technology Co., Ltd. Prospectus [R/OL]. (2026-05-26)[2026-10-19]. https://www1.hkexnews.hk/listedco/listconews/sehk/2026/0526/2026052600048_c.pdf.
- [147] INEOS Bio. INEOS Bio Produces Cellulosic Ethanol at Commercial Scale[EB/OL]. (2013-07-31) [2026-10-19]. www.ineos.com/it/notizie/gruppo-ineos/ineos-bio-produces-cellulosic-ethanol-at-commercial-scale.
- [148] PALYS M J, DAOUTIDIS P. Power-to-X: A review and perspective[J]. Computers & Chemical Engineering, 2022, 165: 107948.
- [149] Press Information Bureau, Government of India. Green energy projects[EB/OL]. (2026-04-02)[2026-10-19]. <https://www.pib.gov.in/PressReleasePage.aspx?PRID=2248336&lang=1&reg=6>.
- [150] LANGENMAYR U, HEINZMANN P, SCHNEIDER A, et al. Stand-alone power-to-X production dynamics: A multi-method approach to quantify the emission-cost reduction trade-off[J]. Journal of Industrial Ecology, 2025, 29: 1791-1805.
- [151] 北京首钢朗泽科技股份有限公司. 公司简介与已投产项目概览[EB/OL]. [2026-08-30]. <https://bjsglt.com/>.
- Beijing Shougang LanzaTech Technology Co., Ltd. Company profile and overview of commissioned plants[EB/OL]. [2026-08-30]. <https://bjsglt.com/>.
- [152] LanzaJet. LanzaJet makes history as the world's first to produce jet fuel from ethanol at commercial-scale plant delivering the next generation fuel solution for aviation[EB/OL]. (2025-11-13) [2026-10-8]. <https://www.lanzajet.com/news-insights/lanzajet-makes-history>.
- [153] 巨鹏生物科技有限公司. 巨鹏生物技术介绍[EB/OL]. [2026-09-08]. <http://cn.jupengbio.com/our-technology>.
- Jupeng Biotechnology Co., Ltd. Jupeng Biotechnology: Our Technology[EB/OL]. [2026-09-08]. <http://cn.jupengbio.com/our-technology>.
- [154] 鄂尔多斯日报. 内蒙古杭锦旗又一重大延链补链项目开工建设[EB/OL]. (2024-11-21) [2026-10-19]. <https://www.cciac.org.cn/html/article/2024-11/27656.html>.
- Ordos Daily. Construction begins on another major project to extend and strengthen industrial supply Chains in Hanggin Banner, Inner Mongolia[EB/OL]. (2024-11-21) [2026-10-19]. <https://www.cciac.org.cn/html/article/2024-11/27656.html>.
- [155] 化盟网. 投资3.1亿元 河南无水乙醇项目即将转入试运行[EB/OL]. (2024-11-11) [2026-08-30]. <https://zx.hm-w.com/dynamic/detail/22960>.
- Huamengwang. RMB 310 million ethanol project in henan set to enter trial operation[EB/OL]. (2024-11-11) [2026-08-30]. <https://zx.hm-w.com/dynamic/detail/22960>.
- [156] 成都日报. 国内首条生物合成HQP蛋白中试产线在成都投用 让工业尾气变身有机蛋白[EB/OL]. 2025-05-15. <https://news.chengdu.cn/2025/0515/2481926.shtml>.
- Chengdu Daily. China's first pilot production line for biosynthetic HQP protein begins operation in Chengdu, turning industrial exhaust gas into organic protein[EB/OL]. (2025-05-

- 15)[2026-10-8]. <https://news.chengdu.cn/2025/0515/2481926.shtml>.
- [157] BROUWER G J A, JANKOVIC T, STRAATHOF A J J, et al. Green industrial-scale plant design for syngas fermentation to isopropyl alcohol and acetone: economic and environmental sustainability assessment[C]. Proceedings of the European Symposium on Computer Aided Process Engineering (ESCAPE 35), 2025: 473-478.
- [158] FU R, KANG L, ZHANG C, et al. Application and progress of techno-economic analysis and life cycle assessment in biomanufacturing of fuels and chemicals[J]. Green Chemical Engineering, 2023, 4(2): 189-198.
- [159] European Parliament and Council. Directive 2009/41/EC on the contained use of genetically modified micro-organisms[S]. Off J Eur Union, 2009, L125: 75-97.
- [160] US Environmental Protection Agency. Microbial products of biotechnology; final regulation under the Toxic Substances Control Act[S]. Federal Register, 1997, 62: 17910-17958.
- [161] 全国人民代表大会常务委员会. 中华人民共和国生物安全法[S]. 2021. Standing Committee of the National People's Congress. Biosecurity Law of the People's Republic of China[S]. 2021.
- [162] JIA D, HE M, TIAN Y, et al. Metabolic Engineering of Gas-Fermenting *Clostridium ljungdahlii* for Efficient Co-production of Isopropanol, 3-Hydroxybutyrate, and Ethanol[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(10): 2628-2638.
- [163] 北京首钢朗泽新能源科技有限公司. 一种工业尾气发酵法制乙醇的方法及系统: CN107099556B[P]. 2021-03-05. Beijing Shougang LanzaTech Technology Co., Ltd. Method and system for producing ethanol by industrial off-gas fermentation: CN107099556B[P]. 2021-03-05.
- [164] 北京首钢朗泽科技股份有限公司. 一种高效率工业尾气发酵制醇工艺: CN113652454B[P]. 2023-09-01. Beijing Shougang LanzaTech Technology Co., Ltd. High-efficiency industrial off-gas fermentation process for alcohol production: CN113652454B[P]. 2023-09-01.



通讯作者: 李德茂(1978—),男,研究员,博士生导师,研究方向为一碳化合物生物转化微生物蛋白/油脂研究。
E-mail: li_dm@tib.cas.cn



通讯作者: 王杰(1989—),男,副研究员,硕士生导师,研究方向为一碳菌体蛋白创制与饲料应用。
E-mail: wangjie03@caas.cn



第一作者: 任玉文(1994—),女,博士研究生。研究方向为乙醇梭菌细胞工厂固碳途径改造机制研究。
E-mail: 2297196420@qq.com

作者贡献声明:

李德茂、薛敏、王杰:提出概念、基本框架、提出研究方向、设计论文框架;隆柳成、任玉文:文献调研与整理;陈利梅、任玉文:绘制图谱、参与撰写论文;李德茂、薛敏、王杰:参与论文审核、论文修订、论文最终版本修订。

所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突:

没有利益冲突。