CO₂到高附加值产物: 罗尔斯通氏菌的固碳研究进展

马哲^{1,2†}, 刘丹^{1,2†}, 刘梦晓^{1,2}, 曹英秀^{1,2*}, 宋浩^{1,2}

1. 天津大学化工学院, 天津 300072;

2. 天津大学合成生物学前沿科学中心, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: caoyingxiu@tju.edu.cn

2021-06-18 收稿, 2021-08-16 修回, 2021-08-17 接受, 2021-08-18 网络版发表

国家重点基础研究发展计划(2018YFA0901300)和国家自然科学基金(21621004)资助

摘要 为了实现清洁生产与碳中和的目标, 研究者已采用生物固碳方法将CO₂转化为高附加值产物. 氢氧细菌罗尔斯通氏菌由于具有化能自养能力、遗传可操作性和基因工具的可用性等特点, 为自养生产的优势底盘之一. 它可以利用CO₂作为碳源、H₂作为能源自养生长, 而H₂则可通过直接补料、电驱动或光驱动等方法提供. 罗尔斯通氏菌不仅可以天然地生产生物塑料, 还能经过代谢工程改造后生产生物燃料和糖类等其他高附加值产物. 本文首先介绍了罗尔斯通氏菌的碳固定和能量利用的代谢特点. 然后, 按照能量利用的方式, 总结了该菌株直接利用H₂进行气体发酵、间接利用H₂(含甲酸)进行电合成和光合成的研究进展. 最后, 通过对比3种生产方式的优劣势, 对罗尔斯通氏菌的未来研究方向进行了展望.

关键词 罗尔斯通氏菌, CO₂固定, 气体发酵, 光电合成, 生物塑料, 生物燃料

由于化石能源的大量开采和使用, 人类不仅面临着能源短缺的问题, 还需要解决过量CO₂引起的气候变化问题. 自1750年以来, 大气中人为的CO₂浓度从280 ppm(parts per million)上升到419.13 ppm^[1], 由此带来的全球升温超过1°C^[2]. 2018年, 联合国政府间气候变化专门委员会发布报告, 提议减少化石燃料使用和CO₂排放, 从而将全球变暖限制在温度警戒线1.5°C以内^[3]. 2020年9月, 中国政府在联合国大会上提出将在2060年前努力实现碳中和目标. 为达到这一目标, 需要发展非碳可再生能源, 如太阳能、风能和潮汐能, 替代化石能源发电、制氢, 并通过人为技术手段捕获、利用和封存已排放的CO₂, 例如物理吸附、化学吸收和生物固碳等^[4]. 与物理和化学方法相比, 生物固碳具有反应条件温和及环境友好的优势, 目前已成为实现清洁能源经济与碳中和的研究热点.

固碳生物种类繁多, 其中氢氧(Knallgas)细菌是一类可以直接利用H₂作为能源来固定CO₂的微生物^[5]. 研究最深入的氢氧细菌——罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha* H16, 又称*Cupriavidus necator* H16)是将H₂转化为生物量的最有效微生物之一^[6]. 它不仅可以利用CO₂、H₂和O₂的混合气发酵, 还能在电或光驱动水电解产生H₂的环境下生长和生产. *R. eutropha*作为微生物固碳平台的主要吸引力是: 首先, 在生长状况方面, *R. eutropha*与光合微生物如蓝藻相比, 生长较快, 且在大规模培养时不会受光照和天气等因素影响; 其次, 在基因操作方面, *R. eutropha*具有遗传可操作性和基因工具的可用性, 与其他化能自养微生物如产乙酸菌和产甲烷菌相比, 它的基因工具箱更丰富和成熟^[7,8]; 最后, 在产物范围方面, *R. eutropha*具有高通量碳储存途径, 可以天然地生产生物塑料. 此外, 与厌氧的产乙酸菌和

引用格式: 马哲, 刘丹, 刘梦晓, 等. CO₂到高附加值产物: 罗尔斯通氏菌的固碳研究进展. 科学通报, 2021, 66: 4218–4230

Ma Z, Liu D, Liu M X, et al. From CO₂ to high value-added products: Advances on carbon sequestration by *Ralstonia eutropha* H16 (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 4218–4230, doi: 10.1360/TB-2021-0584

产甲烷菌相比,后者只能生产低腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)消耗的产物,如乙醇、乙酸和甲烷等; *R. eutropha*既能生产以上的产品,又因可以利用O₂产生ATP,可以潜在地生产高ATP消耗的产物,如糖类、氨基酸和维生素等^[9]。目前,通过代谢工程改造后, *R. eutropha*可以生产的产物包括醇类、脂肪酸和萜烯等生物燃料以及其他具有经济价值的产品,例如乙偶姻、海藻糖和壳聚糖等。这些充分展现了 *R. eutropha* 是利用可再生能源和CO₂生产高附加值产物的重要细胞平台。

本文首先介绍了 *R. eutropha* 的碳代谢和能量代谢特点。随后按照H₂、电和光的能量供给方式,分别总结了 *R. eutropha* 自养生产的研究进展和代表性工作。最后对比了3种生产方式的优劣势,并对这一领域的发展方向进行了展望。

1 罗尔斯通氏菌的代谢特点

R. eutropha 是一种革兰氏阴性非致病性β-变形杆菌,为兼性化能自养营养型细菌^[10]。它具有灵活多样的代谢方式,不仅可以利用果糖、脂质或其他有机碳源异养生长,还可以利用H₂、CO₂和O₂的混合气自养生长^[11]。不论在何种营养模式下,当氮、氧或磷等必要营养元素限制细胞生长时, *R. eutropha* 能够天然地合成碳密集的生物聚合物——聚(3-羟基丁酸酯)(poly(3-hydroxybutyrate), PHB),其最高含量可达细胞干重的90%^[8]。PHB是一种可降解的生物塑料,与石油基热塑性塑料的物理性能相当,在生物医学和包装领域是一种潜在的替代品。因此, *R. eutropha* 被认为是研究化能自养营养型的模式微生物,同时也是生产PHB的理想底盘之一。

在2006年,研究人员完成了 *R. eutropha* 的全基因组测序(7416678 bp)^[12]。它的基因组包括1号染色体(4052032 bp)、2号染色体(2912490 bp)和大质粒pHG1(452156 bp)。分析结果显示,调控代谢和细胞功能的所有必需基因都位于1号染色体上,而用于拓宽底物范围和调控不同终端电子受体的基因位于2号染色体和大质粒上^[12]。

在自养条件下, *R. eutropha* 通过卡尔文(Calvin-Benson-Bassham, CBB)循环固定CO₂。CBB循环是天然的7种固碳途径之一,与其他6种固碳途径相比, CBB途径研究最深且分布最广,还广泛存在于植物和藻类等光合自养生物中。关于7种固碳途径的具体分布和代谢

反应已经有很多评述类文章发表,对比来看, CBB循环在工程改造和产物谱方面处于领先地位,但在碳固定效率方面不如其他6种途径^[13~15]。在CBB循环中,关键限速步骤是1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(1,5-bisphosphate ribulose bisphosphate carboxylase, RuBisCO)催化CO₂和1,5-二磷酸核酮糖生成3-磷酸甘油酸,其随后可以代谢到丙酮酸或其他中央代谢物中^[16](图1)。关键酶RuBisCO的催化速率较低且O₂会竞争RuBisCO的催化位点,所发生的氧合副反应会生成有毒的2-磷酸乙醇酸,并在后续的分解代谢反应中释放出CO₂,造成碳浪费,这一过程在光合生物中被称为“光呼吸”^[17]。与光合生物利用光呼吸碳氧化循环(C₂循环)回收磷酸乙醇酸不同, Claassens等人^[18]首次发现, *R. eutropha* 可以利用苹果酸循环进行磷酸乙醇酸的回收,并推测苹果酸循环可能存在于不同的化能自养菌中。

CBB循环的大多数酶由 *cbb* 基因编码。不同自养微生物 *cbb* 基因的总大小和整体排列具有物种特异性,甚至是菌株特异性;但在某些区域内,基因顺序具有保守性,这可能是由于具有共同的进化背景^[19,20]。在 *R. eutropha* 中, CBB循环的酶在基因组中重复编码,两个 *cbb* 操纵子分别位于2号染色体和大质粒上。与2号染色体上的操纵子相比,位于大质粒上的操纵子缺少编码类似甲酸脱氢酶的蛋白质(CbbB)的基因^[12]。双 *cbb* 操纵子并不是 *R. eutropha* 独有的,在很多化能自养微生物中存在,但是少见于光合微生物中^[19]。CbbR是激活 *cbb* 操纵子转录的调节因子,不同微生物的CbbR受到不同信号代谢物的调控^[21]。例如,来自集胞藻 *Synechococcus elongatus* PCC 6803的CcmR(CbbR亚家族成员)使用NADP⁺和α-酮戊二酸作为信号代谢物^[22]。与此不同的是, *R. eutropha* 中的CbbR受到磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)的负调控^[23]。在异养状态下,细胞内较高浓度的PEP会抑制CbbR的激活功能,从而抑制 *cbb* 操纵子的转录;而在化能自养条件下,低浓度的PEP会导致 *cbb* 操纵子的高度诱导(去阻遏),并会因CO₂浓度受限而增强诱导^[23]。另外,有研究发现,全局转录调控系统RegA/RegB中的RegA也以PEP依赖性方式参与 *cbb* 操纵子的转录控制,且还可能与 *R. eutropha* 的其他能源产生和利用途径的控制有关^[24]。理论上来说,在不需要CO₂固定时, *R. eutropha* 会严格控制 *cbb* 操纵子来限制能量的浪费。但是Fukui团队^[24]通过代谢组学和C¹³标记分析后发现, *R. eutropha* 在果糖上异养生长时, CBB循环的基因被转录激活,关键酶RuBisCO发挥功

图1 (网络版彩色) *R. eutropha* 化能自养的生长模式。CBB cycle, 卡尔文循环; RuBisCO, 1,5-双磷酸核糖双磷酸羧化酶; 3PG, 3-磷酸甘油酸; G3P, 3-磷酸甘油醛; RuBP, 1,5-二磷酸核酮糖; periplasm, 周质; MBH, 膜结合氢化酶; ETC, 电子传递链; Cyt A, 细胞色素氧化酶; ATPase, ATP酶; SH, 可溶性氢化酶; transhydrogenase, 转氢酶

Figure 1 (Color online) Depiction of *R. eutropha* lithoautotrophic growth model. CBB cycle, Calvin-Benson-Bassham cycle; RuBisCO, 1,5-bisphosphate ribulose biphosphate carboxylase; 3PG, 3 phosphoglycerate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; MBH, membrane-bound hydrogenase; ETC, the electron transport chain; Cyt A, cytochrome oxidase; ATPase, adenosine triphosphatase; SH, soluble hydrogenase

能。这意味着 *R. eutropha* 可能同时利用无机和有机底物进行混合自养生长^[25]。

R. eutropha 在利用CBB循环固碳的过程中需要还原力和能量的供给, 通过氢化酶催化的H₂氧化完成。 *R. eutropha* 的大质粒上含有4种类型的氢化酶, 其中在H₂氧化发挥关键作用的有两种, 分别是可溶性氢化酶(soluble hydrogenase, SH)和膜结合氢化酶(membrane-bound hydrogenase, MBH)^[26](图1)。细胞质中的SH直接将H₂氧化的电子传递给NAD⁺, 还原形成NADH^[27]。NADH和其磷酸化同源物NADPH参与CBB循环和其他合成代谢途径(如PHB合成)。MBH将来自H₂氧化的电子直接传递到呼吸链中, O₂作为终端电子受体, 产生的质子用于ATP的合成^[28]。此外, 在缺氧条件下, NO₃⁻可以作为替代的电子受体。由于这些氢化酶对O₂具有耐受性^[29,30], 因此H₂氧化可以与O₂的还原相结合, 使 *R. eutropha* 能够利用电解水产生的H₂和O₂以及作为碳源的CO₂合成目标产品。

2 气体发酵

R. eutropha 自养生产主要是利用CO₂、H₂和O₂气体发酵, 并且已有半个世纪的研究历史。通过混合气发酵, *R. eutropha* 不仅可以生产天然产品PHB, 还可以经过代谢工程改造生产异源合成途径产品, 包括生物燃料和其他增值化学品(图2)。目前这些产品的产量达到

了mg/L级别, 少数产品如PHB、醇类和乙偶姻可以在实验室规模的发酵罐下达到g/L的产量级别, 后续有望进行工业放大生产。

2.1 天然产品

早在1961年, Schlegel等人^[31]已经证明, *R. eutropha* 利用H₂、O₂和CO₂自养生长时会积累PHB。PHB的合成过程分为3个步骤(图2, 红色): (1) 两个乙酰-CoA分子通过β-酮硫解酶(PhaA)缩合形成乙酰乙酰-CoA; (2) 后者被NADPH依赖性乙酰乙酰-CoA还原酶(PhaB)还原为(R)-3-羟基丁酰-CoA; (3) 通过关键酶PHB合酶(PhaC), (R)-3-羟基丁酰-CoA转化为PHB。

为了优化 *R. eutropha* 通过混合气发酵生产PHB, 研究人员已经进行了大量的实验工作。这些研究的重点主要在两方面(表1): 一是通过代谢工程改造增强 *R. eutropha* 对混合气的利用; 二是探究培养条件增加混合气的传质和供给。两者的最终目的都是将碳源和能源尽可能多地供给到PHB的合成中。

在代谢工程改造方面, 调节碳固定途径和能量代谢可以增强 *R. eutropha* 对CO₂和H₂的利用。例如, 在CBB循环中, RuBisCO是限制CO₂固定的关键限速酶, 通过异源引入高效率的RuBisCO并通过表达其伴侣蛋白GroESL, *R. eutropha* 的自养生长得到改善^[32]。同时利用强启动子调控两种关键氢化酶SH和MBH的表达, *R.*

图 2 *R. eutropha* 生产不同化学品的代谢路径图。CBB cycle, 卡尔文循环; Pyruvate, 丙酮酸; Acetyl-CoA, 乙酰辅酶A。(1) 红色代表PHB的合成路径: Acetoacetyl-CoA, 乙酰乙酰辅酶A; R-HB-CoA, R-(-)-3-羟基丁酰辅酶A; PHB, 聚(3-羟基丁酸酯); PhaA, β -酮硫解酶; PhaB, 乙酰乙酰辅酶A还原酶; PhaC, PHB合酶。(2) 橙色代表醇类的合成路径: 异丙醇的合成路径: Acetoacetate, 乙酰乙酸酯; Acetone, 丙酮; Isopropanol, 异丙醇; Ctf, 辅酶A转移酶; Adc, 乙酰乙酸脱羧酶; Adh, 乙醇脱氢酶; 异丁醇和3-甲基-1-丁醇的合成路径: 2-Ketoisovalerate, 2-酮异戊酸; Isobutyraldehyde, 异丁醛; Isobutanol, 异丁醇; 2-Ketoisocaproate, 2-酮异己酸; 3-Methyl-butyraldehyde, 3-甲基丁醛; 3-Methyl-1-butanol, 3-甲基-1-丁醇; Kivd, 酮异戊酸脱羧酶; Adh, 乙醇脱氢酶。(3) 蓝色代表脂肪酸和甲基酮的代谢路径: Malonyl-CoA, 丙二酰辅酶A; Malonyl-ACP, 丙二酰ACP; Fatty acid synthesis, 脂肪酸合成; Acyl-ACP, 乙酰ACP; Fatty acids, 脂肪酸; β -oxidation, β -氧化; Methyl Ketones, 甲基酮; Acc, 乙酰辅酶A羧化酶; fabD, ACP转酰基酶; Tes, 硫酯酶。(4) 绿色代表烷烃和烯烃的合成路径: Fatty aldehydes, 脂肪醛; Alka(e)nes, 烷烃或烯烃; Aar, 酰基ACP还原酶; Ado, 醛脱氧酶。(5) 紫色代表 α -葎草烯的合成路径: Farnesyl pyrophosphate, 法尼基焦磷酸; α -humulene, α -葎草烯; MVA pathway, 甲羟戊酸途径; MEP pathway, 2-甲基-赤藓糖醇-4-磷酸途径; Zssi, α -葎草烯合酶。(6) 粉红色代表乙偶姻的合成路径: Acetolactate, 乙酰乳酸; Acetoin, 乙偶姻; AlsS, 乙酰乳酸脱氢酶; AlsD, 乙酰乳酸脱羧酶。(7) 深蓝色代表海藻糖的合成路径: Glycogen, 糖原; Trehalose, 海藻糖; OtsAB, 渗透调节海藻糖磷酸合酶。(8) 金色代表蔗糖的合成路径: Glucose, 葡萄糖; UDP-Glucose, 二磷酸尿苷葡萄糖; Sucrose-6-phosphate, 6-磷酸蔗糖; Sucrose, 蔗糖; Sps, 蔗糖磷酸合酶; Spp, 蔗糖磷酸酯酶。(9) 深绿色代表壳聚糖的合成路径: UDP-N-acetylglucosamine, 尿苷二磷酸-N-乙酰基-葡萄糖胺; Lipochitooligosaccharides, 壳聚糖, N-乙酰氨基葡萄糖转移酶; NodB, 脱乙酰酶; NodA, 乙酰转移酶

Figure 2 Diagram of the metabolic pathways of different chemicals by *R. eutropha*. CBB cycle, Calvin-Benson-Bassham pathway. (1) The synthesis pathway of PHB is highlighted in red: R-HB-CoA, R-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA; PHB, poly(3-hydroxybutyrate); PhaA, β -ketothiolase; PhaB, acetoacetyl-CoA reductase; PhaC, PHB synthase. (2) The synthesis pathway of alcohols is highlighted in orange: The synthesis pathway of isopropanol: Ctf, CoA-transferase; Adc, acetoacetate decarboxylase; Adh, alcohol dehydrogenase; the synthesis pathway of isobutanol and 3-methyl-1-butanol: Kivd, ketoisovalerate decarboxylase; Adh, alcohol dehydrogenase. (3) The synthesis pathway of fatty acids and methyl ketones is highlighted in blue: Malonyl-ACP, Malonyl-acyl carrier protein; Acyl-ACP, Acyl-acyl carrier protein; Acc, Acetyl-CoA carboxylase; FabD, ACP transacylase; Tes, thioesterase. (4) The synthesis pathway of alkanes and alkenes is highlighted in green: Aar, acyl-ACP reductase; Ado, aldehyde deformylating oxygenase. (5) The synthesis pathway of α -humulene is highlighted in purple: MVA pathway, mevalonic acid pathway; MEP pathway, 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway; Zssi, α -humulene synthase. (6) The synthesis pathway of acetoin is highlighted in pink: AlsS, acetolactate dehydrogenase; AlsD, acetolactate decarboxylase. (7) The synthesis pathway of trehalose is highlighted in navy blue: OtsAB, osmoregulatory trehalose synthase. (8) The synthesis pathway of sucrose is highlighted in gold: UDP-Glucose, uridine diphosphate glucose; Sps, sucrose phosphate synthase; Spp, sucrose phosphate phosphatase. (9) The synthesis pathway of lipochitooligosaccharides is highlighted in dark green: UDP-N-acetylglucosamine, uridine diphosphate-N-acetylglucosamine; NodC, N-acetylglucosaminyltransferase; NodB, deacetylase; NodA, acetyltransferase

*eutropha*的PHB积累量提高了99.7%。此外,除了利用过表达RuBisCO增强酶的表达量之外,通过定向进化手段也可以改善RuBisCO的性能^[37]。但由于RuBisCO的催化速率和CO₂特异性之间存在折衷关系,目前定向进化取得的进步有限^[38]。最近,一项研究通过增加O₂的可用性来提高能量供应,在*R. eutropha*中异源表达血红蛋

白Vhb^[33]。并且通过不同氧气浓度下的转录组学分析,敲除了旁途径中的乳酸脱氢酶基因*ldh*,从而减少副产物产生,PHB产量提高了71.5%。

在培养条件探究方面,首先要考虑的问题是防止混合气发生爆炸,因此必须将氧浓度保持在爆炸下限(6.9vol%)以下,且氧限制对PHB合成是有利的^[39]。但是

表 1 *R. eutropha* 气体发酵生产 PHB 的主要研究策略和进展Table 1 The main research strategies and progress of PHB produced by *R. eutropha* in gas fermentation

策略	菌株	PHB产量或含量	文献
代谢工程改造	调节CBB循环和氢化酶 <i>R. eutropha</i> C5 (<i>rubL</i> , <i>rubS</i> , <i>rubX</i> , <i>groESL</i> , <i>sh</i> , <i>mbh</i>)	0.34 g/g DCW	[32]
	限氧条件下转录组学分析, 增加O ₂ 可用性, 并敲除旁路基因 <i>R. eutropha</i> (Δ <i>ldh</i> , <i>vgb</i>)	0.277 g/L 50.4% of DCW	[33]
培养条件探究	构建模型和仿真分析 <i>R. eutropha</i>	— ^{a)}	[34]
	优化反应器(台式填充床生物反应器) <i>R. eutropha</i>	67% of DCW	[35]
	开发异养-自养两阶段培养系统 <i>R. eutropha</i>	28 g/L	[36]

a) “—”表示原文中未提及

当氧浓度低于4vol%时会影响细胞密度, 最终限制了PHB的生产力^[36]. 同时混合气尤其是H₂和O₂在水溶液中的溶解性较差, 降低了气体传质速率, 最终限制了细胞质量或产物浓度的提高^[40]. 因此需要对气体发酵过程中的物理和动力学参数进行探究和优化, 这可借助于数学模型的构建和仿真分析^[34]. 此外, 设计具有高气体传质速率的生物反应器也是优化策略之一, 例如填充床生物反应器相较于传统的充气生物反应器具有低能耗、高气/液接触面积和传质速率等优势, 还能以较低的放气速率运行, 避免浪费未使用的气体^[35]. 对于工业应用, 高细胞密度培养可以提升整体的生产力水平. 研究人员采用异养-自养两阶段的发酵方式, 即在异养阶段消耗废甘油获得较高的细胞质量浓度, 在自养阶段消耗CO₂获得较高的PHB浓度, 最终产量可达到28 g/L, 有望用于工业化生产^[36].

2.2 合成途径产品

基于遗传工具的开发和利用, 研究人员将碳通量从PHB合成转移到其他代谢物合成, 逐步扩大了*R. eutropha*以CO₂、H₂和O₂生产的产品范围. 目前获得的合成途径产品主要包括支链醇、脂肪酸衍生物和萜烯等生物燃料以及其他化学品, 如乙偶姻、海藻糖和壳聚糖等(图2和表2). 这些研究显示了*R. eutropha*利用可再生能源将CO₂转化为增值产品的潜力.

生物燃料可代替化石燃料作为运输燃油, 是可再生能源的重点研究方向. 醇类作为生物燃料的一种, 已经被用作汽油和柴油的燃料添加剂. 但由于*R. eutropha*生产乙醇的产量无法与传统模式微生物酿酒酵母相竞争, 科研人员把研究集中在*R. eutropha*生产支链醇(异丙醇和异丁醇)的工作上^[49]. 在2014年, Guillouet团队^[50]首次在*R. eutropha*中异源表达异丙醇合成途径(图2, 橙

色), 包括乙酰乙酸羧化酶(Adc)和醇脱氢酶(Adh). 但是异丙醇的积累会对细胞生长产生抑制, 影响了异丙醇产量的提高. 因此, Guillouet团队^[41]过表达了伴侣蛋白GroESL来提高菌株对异丙醇的耐受性和异源酶活性. 为了进一步提高自养发酵中的异丙醇产量, 他们设计了一种独立气体(CO₂、H₂和空气)输入和高压运行的生物反应器, 有效提高了气体的传质速率, 工程菌株的异丙醇产量高达3.5 g/L, 是目前已知的*R. eutropha*自养发酵生产异丙醇的最高产量^[42]. 与异丙醇相比, 异丁醇具有更大的能量密度, 并且其辛烷值(RON=113)与汽油和液化石油气类似^[51]. 异丁醇和另一种杂醇3-甲基-1-丁醇可以通过Ehrlich途径来合成, 包括两种异源酶: 酮异戊酸脱羧酶(Kivd)和醇脱氢酶(Adh). Liao团队^[43]通过设计*R. eutropha*的异源酮异戊酸供给途径和杂醇生成途径(图2, 橙色), 在气体发酵条件下收获了超过1 g/L的燃料(~536 mg/L异丁醇和~520 mg/L 3-甲基-1-丁醇).

脂肪酸及其衍生物是生物柴油的主要成分, 比短链醇具有更高的体积能量密度. 异源表达硫酯酶可以显著增加*R. eutropha*的脂肪酸合成, 随后操纵脂肪酸的 β -氧化途径可以获得脂肪酸的衍生物甲基酮(图2, 蓝色)^[44]. 最近, Bi团队^[45]利用双质粒系统过表达脂肪酸合成途径中的关键酶, 增强了前体物酰基载体蛋白的供应, 并且驱动其向脂肪酸合成方向进行(图2, 蓝色). 在混合气发酵条件下, 工程菌的游离脂肪酸的产量达到60.6 mg/g DCW. 烷烃和烯烃也是以酰基载体蛋白作为前体物, Guillouet团队^[46]在*R. eutropha*中异源表达酰基-ACP还原酶(Aar)和醛去甲酰氧化酶(Ado)来合成烷烃和烯烃(图2, 绿色), 自养发酵下总烃的产量可以达到4.4 mg/L.

萜烯不仅可以作为火箭燃料的前体, 还因具有生

表2 *R. eutropha* 气体发酵生产生物燃料和其他化学品Table 2 Biofuels and other chemicals produced by *R. eutropha* in gas fermentation

	产品	菌株	产量	文献
生物燃料	异丙醇	<i>R. eutropha</i> (Δ phaB1B2B3C1, phaA, ctfAB, adc, adh, groESL)	250 mg/L	[41]
	异丙醇	<i>R. eutropha</i> (Δ phaB1B2B3C1, phaA, ctfAB, adc, adh)	3.5 g/L	[42]
	异丁醇和3-甲基-1-丁醇	<i>R.eutropha</i> (Δ phaB2C2::PphaC1:alsS-ilvC-ilvD, Δ phaC1AB1, kivd, yqhD)	~536 mg/L异丁醇和~520 mg/L 3-甲基-1-丁醇	[43]
	甲基酮	<i>R. eutropha</i> (Δ beta ox, tesA, fadB, Mlut_11700, fadM)	180 mg/L	[44]
	脂肪酸	<i>R. eutropha</i> (Δ phaC1, acc, ltes, fas, acpS)	60.6 mg/g DCW	[45]
	烷烃和烯烃	<i>R. eutropha</i> (Δ phaCAB, aar, ado)	4.4 mg/L (0.75 mg/L十五烷、0.85 mg/L十七烷和2.8 mg/L十七烯)	[46]
	α -萜烯	<i>R. eutropha</i> PHB-4 (ZSSI, MVA pathway enzymes)	6.3 mg/L	[47]
其他增值化学品	乙偶姻	<i>R. eutropha</i> (Δ acoABC Δ phaC1 Δ phaC2, alsS, alsD)	3.9 g/L	[48]
	海藻糖	<i>R. eutropha</i> (setA)	0.47 g/L	[9]
	蔗糖	<i>R. eutropha</i> (SPS, SPP, scrY)	180 mg/L	[6]
	壳寡糖	<i>R. eutropha</i> (nodABC)	1.4 mg/L	[6]

物活性被用于许多传统药物中。Holtmann团队^[47]首次在*R. eutropha*中异源表达甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径和 α -萜草烯合酶(ZssI)(图2, 紫色), 在化能自养条件下获得了6.3 mg/L的 α -萜草烯。最近, 他们利用建模分析估算了*R. eutropha*在自养过程中 α -萜草烯的产率可以达到 $0.96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 接近于异养过程的产率($1.26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)^[52]。基于每年10 t生产规模, 两种工艺的成本和收益相似。这两项研究标志着利用CO₂生产高价萜烯化合物的开端。

除了生物燃料以外, 近些年研究人员也在*R. eutropha*中设计其他化学品的合成途径, 将CO₂转化为更多具有应用价值的产品。乙偶姻被认为是可从生物质中生产的前30种增值化学品之一, 可用于食品添加剂。Windhorst和Gescher^[48]首次在*R. eutropha*中表达乙偶姻合成途径。他们异源表达了乙酰乳酸脱氢酶(AlsS)和乙酰乳酸脱羧酶(AlsD), 从丙酮酸合成乙偶姻(图2, 粉红色)。气体发酵条件下, 乙偶姻的最终产量可以达到3.9 g/L。此外, 丙酮酸作为前体通过糖异生途径可以合成糖原、葡萄糖等化合物, 经过进一步的代谢途径设计, *R. eutropha*还能生产海藻糖、蔗糖和壳聚糖等糖类。例如, Löwe等人^[9]通过生物信息学研究揭示了*R. eutropha*的海藻糖和糖原合成相关的基因, 并通过异源

表达糖外排转运蛋白A(SetA)促进菌株的海藻糖外排(图2, 深蓝色)。最终, 工程菌株的海藻糖产量可以达到0.47 g/L。最近, 另外一项来自Sliver团队^[6]的研究通过代谢途径的理性设计, 利用*R. eutropha*自养发酵, 分别收获了3种产品, 包括蔗糖(180 mg/L)(图2, 金色)、具有定制成分的聚羟基链烷酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHAs)和壳聚糖(1.4 mg/L)(图2, 深绿色)。其中, 壳聚糖可以作为植物生长促进剂, 广泛应用于食品和医药化工行业。

随着*R. eutropha*的代谢研究逐步深入和遗传工具开发日益成熟, 我们不仅可以对菌株的代谢途径进行人工设计, 还可以通过计算机建模和通路分析工具来指导其他可能的遗传修饰^[53], 或者通过转录组学分析挖掘潜在的调控靶点^[33], 以促进CO₂的固定和产品的合成。

3 电合成

1965年, *R. eutropha*首次被证实能够在电解水和通入CO₂的培养容器中生长^[54]。在过去10年里, 微生物电合成(microbial electrosynthesis, MES)技术快速发展, 许多化能自养微生物包括*R. eutropha*都能在供给电能和CO₂的环境下维持生长并合成产品。电能的来源广泛,

可以从可再生能源如太阳能、风能和潮汐能中产生并储存。因此, MES技术也是解决过多的温室气体和生产生物塑料、燃料等增值产品的策略之一。 *R. eutropha*除了能够利用 H_2 作为电子载体以外, 还能够利用电极催化 H^+ 和 CO_2 产生的甲酸作为电子载体^[46](图3(a), (b)和表3)。 *R. eutropha*的甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)将甲酸催化分解为 CO_2 和还原力, 为细胞提供碳源和能量。

3.1 H_2 介导的电合成

当阴极电势低于 H^+/H_2 的氧化还原电位, 即 -0.41 V vs. 标准氢电极(standard hydrogen electrode, SHE)时, 理论上阴极可以产生氢气。但是在实验条件下, 阴极材料会影响阴极电势的高低。阴极材料常采用过渡金属(镍、钴、铜)及其化合物作为析氢催化剂。例如, Sliver和Nocera团队^[56]选择镍钼钨合金或不锈钢作为析氢催化剂, 利用Guillouet团队^[50]设计的具有异丙醇合成途径的工程菌株来生产异丙醇。但是含过渡金属的析氢催化剂在 O_2 存在的情况下会产生抑制细胞生长的活性氧(reactive oxygen species, ROS)。他们分别对比和测试

了镍钼钨合金或不锈钢作为阴极时, ROS的生成和细胞生长情况。结果显示, 不锈钢的性能更优。最终该系统能够实现3.9%的电能到化学能的转化效率和216 mg/L的异丙醇产出^[56]。类似地, 除了气体发酵外, Holtmann团队^[47]也以不锈钢作为阴极材料, 在电合成培养体系下获得了17 mg/g CDW的 α -萜草烯。

析氢催化剂要具有良好的生物相容性, 除了防止ROS的产生, 还要避免催化剂浸出的金属离子, 否则这也会抑制细胞的生长。在2016年, Sliver和Nocera团队^[57]继续优化他们的工作, 使用钴-磷合金代替镍钼钨合金和不锈钢作为阴极材料。此外, 钴磷合金也比镍钼钨合金和不锈钢具有更优异的催化活性, 其电合成体系的电能到化学能(醇类)的转化效率达39%。当与光伏发电装置耦合, 系统的太阳能到化学能的转化效率达到7.1%(醇类)、7.6%(PHB)和9.7%(生物量), 超过了自然光合系统的转化效率(1%~3%)^[57]。另外一项研究选择将金属嵌入碳纳米管中作为解决方案, 有效地消除了镍离子的浸出问题^[58]。同时在碳中掺杂氮来提高催化活性和稳定性, 最终体系的PHB产量可以达到384 mg/L。

图3 (网络版彩色)*R. eutropha*的光-电合成系统的示意图。(a) H_2 介导的电合成系统。MBH, 膜结合氢化酶; SH, 可溶性氢化酶。(b) 甲酸介导的电合成系统。M-FDH, 膜结合甲酸脱氢酶; S-FDH, 可溶性甲酸脱氢酶。(c) $g-C_3N_4$ -*R. eutropha*的光合成系统。 $g-C_3N_4$, 石墨氮化碳; Catalase, 过氧化氢降解酶; 参考文献^[55]重新绘制

Figure 3 (Color online) Schematic of photo-electrosynthesis system of *R. eutropha*. (a) H_2 -mediated electrosynthesis system. MBH, membrane-bound hydrogenase; SH, soluble hydrogenase. (b) Formate-mediated electrosynthesis system. M-FDH, membrane-bound formate dehydrogenase; S-FDH, the soluble formate dehydrogenase. (c) Photosynthesis system of $g-C_3N_4$ -*R. eutropha*. $g-C_3N_4$, graphitic carbon nitride; Catalase, H_2O_2 -degrading catalase; Redrawn using information from Ref. ^[55]

表3 *R. eutropha*通过电合成生产不同化学品Table 3 Different chemicals produced by *R. eutropha* in microbial electrosynthesis system

电子载体	策略	阴极材料	阴极电势 (vs. Ag/AgCl)	产品	产量	文献
H ₂	优化阴极材料	NiMoZn或不锈钢	-2.7 V	异丙醇	216 mg/L	[56]
	异源引入甲基戊酸途径	不锈钢	-2.0 V	α -萜草烯	17 mg/g CDW	[47]
	优化阴极材料	Co-P	-2.0 V	异丙醇	~600 mg/L	[57]
				异丁醇、3-甲基-1-丁醇	~220 mg/L	
				PHB	~700 mg/L	
	优化阴极材料	嵌入镍纳米颗粒的氮掺杂碳纳米管(Ni@N-C)	— ^{a)}	PHB	384 mg/L	[58]
甲酸	优化阴极材料	铝箔	-1.6 V	异丁醇、3-甲基-1-丁醇	~140 mg/L	[43]
	酶辅助双电子载体介导的MES系统	碳布	-0.6 V	PHB	485 mg/L	[59]
	分离电化学和发酵过程	气体扩散电极	— ^{a)}	PHB	56 mg/L	[60]

a) “—”表示原文中未提及

近两年, 研究人员陆续开发和应用了新型析氢材料, 例如钙钛矿, 其具有良好的催化活性和生物相容性^[61]. 此外, 由于在环境条件下H₂的溶解度较低, 为0.79 mmol/L, 这也是限制MES体系下生产率进一步提高的瓶颈. 解决策略之一是引入生物相容性高的H₂载体, 例如全氟化碳纳米乳, 可有效提高微生物对H₂的利用率和生产率^[62].

3.2 甲酸介导的电合成

与H₂相比, 甲酸的溶解度更高, 是一种有利的电子载体. 铜通常用作生产甲酸的阴极材料, 与锡和铅等材料相比, 它催化CO₂生成甲酸的能量转换效率更高^[63]. Liao团队^[43]在*R. eutropha*中异源引入异丁醇和3-甲基-1-丁醇的合成途径后, 使用铝箔作为阴极的MES系统来供给工程菌株的生长和生产. 该集成的MES系统在100 h内丁醇产量超过140 mg/L. 但是, 通过电解CO₂生产甲酸面临阴极电势较高和贵金属电极中毒的问题. 为此, Song团队^[59]构建了一个酶辅助双电子载体介导的MES系统. 代替金属电极还原CO₂为甲酸, 他们在阴极室内添加FDH催化这一过程. 中性红用于促进FDH辅助因子NADH的胞外再生. 同时, 中性红还作为另一种电子载体, 将电子从阴极碳布直接传递给*R. eutropha*. 整个MES系统只需要提供-0.6 V vs. Ag/AgCl的阴极电位, 更加节省电能. 并且在*R. eutropha*异源表达RuBisCO来增强CO₂的固定, 最终体系的PHB产量为485 mg/L. 另外一种解决思路是, 将电化学过程和微生物发酵过程空间分离, 对两个过程分别进行条件优化,

这也有利于工业规模的扩大. Holtmann团队^[60]采用这一策略, 并选择基于锡的气体扩散电极合成甲酸. 气体扩散电极能够有效地克服CO₂在水溶液中溶解度低的问题. 该体系的总法拉第效率达到4%, PHB产量可以达到56 mg/L.

目前关于*R. eutropha*利用甲酸作为电子载体的电合成研究报道不多. 虽然甲酸的溶解性和安全性比H₂更好, 但浓度大于0.2 g/L的甲酸会对细胞产生毒性^[64]. 因此, 需要对MES体系中的甲酸浓度进行控制. 通过模型分析可以评估各种运行参数对关键性能指标的影响, 并发现空间分离的MES系统在反应条件控制上优于集成的MES系统^[65].

4 光合成

除了电能够驱动水分解产生H₂和O₂外, 光也能驱动这一反应, 并且这是光合生物进行光合作用的基础. 但*R. eutropha*是非光合生物, 胞内没有像叶绿体一样的光收集系统, 无法直接捕获光子. 因此, 研究人员将非光合微生物与光敏材料结合, 这种混合的光合作用也被称为自光敏微生物系统. 该系统已经应用到很多非光合微生物中, 例如产乙酸菌^[66]和酿酒酵母^[67]. 目前关于*R. eutropha*自光敏微生物系统的研究论文有3篇, 全部来自Zhang团队^[55,68,69]. 2019年, Zhang团队^[68]选择石墨氮化碳(g-C₃N₄)作为光敏材料. g-C₃N₄是一种不含金属的聚合物半导体, 可用作可见光驱动的析氢反应的光催化剂. *R. eutropha*在光照下胞内NADPH/NADP⁺的比例提高, 从而利用果糖生产PHB的能力得

到提高^[68]. 随后, 为了解决g-C₃N₄产生的H₂O₂毒性问题, Zhang团队^[55]添加过氧化氢酶将H₂O₂降解为O₂和H₂O (图3(c)), 并测试了在CO₂作为唯一碳源下*R. eutropha*的生长和生产情况. 与纯菌株相比, *R. eutropha*-g-C₃N₄-过氧化氢酶杂合系统的PHB产量提高了2倍, 达到41 mg/L^[55]. 2021年, Zhang团队^[69]又选用CdS作为光敏材料与*R. eutropha*进行结合. CdS具有良好的可见光吸收性能和析氢催化性能. 在光照和供给CO₂的条件下, *R. eutropha*-CdS杂合系统可以生产28 mg/L的PHB^[69].

尽管*R. eutropha*自光敏微生物系统的研究还处在起步阶段, 但是Zhang团队^[55,68,69]的研究为后续杂合系统的设计和开发提供了很好的依据. 从PHB产量上来看, 光合成体系的产量要低于MES体系的产量. 这主要由于光生电子的效率一般没有电极供给电子的效率. 光生电子的效率受到光敏材料的影响, 因素包括: 吸光范围、表面反应动力学、活化能和生物相容性等. 例如, g-C₃N₄对于可见光(390~780 nm)的吸收有限, 仅吸收低于470 nm的可见光, 且由于巨大的活化能和缓慢的表面反应动力学, 纯g-C₃N₄不能表现出足够的光活性, 通过掺杂或共聚等手段在g-C₃N₄中加入助催化剂可以扩大光吸收范围, 加速电子迁移, 从而提高光催化效率^[70]. 此外, 探索材料与微生物的结合方式也可以克服缓慢的反应动力学, 例如Yang团队^[71]将金纳米团簇(AuNCs)内化到微生物细胞中, 有效地促进了电子的转移. 在材料的生物相容性方面, 光合成体系也会产生对微生物生长不利的ROS. 除上述提到的使用过氧化氢酶降解H₂O₂的方法外, 也可以采用金属有机骨架均匀包裹微生物, 这可以阻止ROS的产生和积累, 将细胞的死亡率降低5倍^[72]. 与电极提供电子不同的是, 光敏材料提供电子涉及电子-空穴的分离过程^[73]. 为了防止氧化性空穴对微生物产生伤害, 需要增强电子牺牲供体, 例如乙醇、三乙醇胺和半胱氨酸的传质来加快空穴的淬灭^[74]. 尽管目前在产量上, 光合成体系不具有优势, 但光合成体系只需光敏材料, 不需要额外的反应器和电化学组件, 投入成本较低^[69]. 总而言之, 光合成体系的大规模生产仍然具有挑战性, 未来需要解决的因素包括光敏材料的光吸收性能、材料与微生物的结合方式和生物相容性等.

5 总结和展望

因具有化能自养能力, 氢氧细菌*R. eutropha*成为了利用CO₂生产高附加值产物的有吸引力的底盘. *R. eu-*

*tropha*不仅可以天然且大量地生产生物塑料的主要成分PHB, 还能基于代谢工程技术生产生物燃料和其他化学品. 目前, *R. eutropha*自养生产方式主要有气体发酵(直接供给H₂)、电合成(间接产生H₂或甲酸)和光合成(间接产生H₂). 从产量上看, 气体发酵的优势比较明显, 部分产品的产量能够达到g/L级别, 如PHB为28 g/L、异丙醇为3.5 g/L、丁醇和3-甲基-1-丁醇为~1 g/L以及乙偶姻为3.9 g/L. 与光电合成的杂合系统间接产生H₂相比, 气体发酵可直接供给充足的H₂, 且不受光电催化系统中产生的有毒环境的影响(如ROS和重金属), 有望先行大规模产业化应用. 但是气体发酵需要克服和解决的难点是混合气的爆炸问题, 有效的解决策略是控制O₂的浓度、优化其他动力学参数以及设计高效的反应器等. 此外, 气体发酵的运营成本高度依赖于电力成本(用于H₂生成). 在现有技术条件下, 可再生电力成本(基于风力发电, 最低预计成本187.2~748.8美元/桶燃料)高于最终产品收益(以生物燃料为例, 127美元/桶燃料), 说明目前*R. eutropha*通过气体发酵来生产大宗化学品在技术经济上不太可行^[75]. 为了实现有利的技术经济性, 一方面, 降低可再生电力制氢的成本; 另一方面, 利用工艺工程设计将气体发酵与制氢过程整合, 提高能源效率^[76]. 尽管目前*R. eutropha*的光电合成还处在研究的起步和发展阶段, 尚不能满足工业生产, 但因其可直接利用光或电能, 在能量供给方式上具有一定的优势, 也是未来研究领域的热点方向. 需要协同调控光电催化过程与生物发酵过程, 优化光电催化材料, 保持菌株的生长代谢活性.

为了进一步提升*R. eutropha*的生产力, 还应对底盘细胞进行改造, 以提升目标产品产量或扩大产品范围. 首先是基因工具箱的开发, 相对于模式微生物(如大肠杆菌), *R. eutropha*的遗传工具有限, 尤其是基因编辑技术. CRISPR/Cas9系统已在*R. eutropha*中实施和验证^[77], 但尚未在*R. eutropha*中报道CRISPR/dCas9(CRISPRi)的应用. 而CRISPRi技术可有效控制代谢途径的多个基因, 调节产物合成的碳通量, 这对于提高产量和转化率至关重要. 其次是通过转录组学、蛋白质组学和代谢组学的研究和分析, 识别产物合成途径的瓶颈, 找到潜在的调控靶点来减少或消除代谢副产物^[33,78]. 总之, 基于*R. eutropha*自身的代谢灵活性和遗传可操作性, 人为地设计代谢途径和优化能量供给系统, 利用可再生能源将过多的CO₂转化为高附加值产物在未来会受到广泛研究和应用.

参考文献

- 1 National Oceanic and Atmospheric Administration. Trends in atmospheric carbon dioxide. 2021, <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>
- 2 International Energy Agency. Global Energy & CO₂ Status Report 2019. 2019, <https://www.iea.org/reports/global-energy-co2-status-report-2019>
- 3 Intergovernmental Panel on Climate Change. Summary for policymakers. In: Global Warming of 1.5°C, 2018. <https://www.ipcc.ch/sr15/>
- 4 Song C, Liu Q, Deng S, et al. Cryogenic-based CO₂ capture technologies: State-of-the-art developments and current challenges. *Renew Sustain Energy Rev*, 2019, 101: 265–278
- 5 Lauterbach L, Lenz O. How to make the reducing power of H₂ available for *in vivo* biosyntheses and biotransformations. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 49: 91–96
- 6 Nangle S N, Ziesack M, Buckley S, et al. Valorization of CO₂ through lithoautotrophic production of sustainable chemicals in *Cupriavidus necator*. *Metab Eng*, 2020, 62: 207–220
- 7 Gruber S, Schwab H, Koefinger P. Versatile plasmid-based expression systems for Gram-negative bacteria—General essentials exemplified with the bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *New Biotechnol*, 2015, 32: 552–558
- 8 Raberg M, Volodina E, Lin K, et al. *Ralstonia eutropha* H16 in progress: Applications beside PHAs and establishment as production platform by advanced genetic tools. *Crit Rev Biotechnol*, 2018, 38: 494–510
- 9 Löwe H, Beentjes M, Pflüger-Grau K, et al. Trehalose production by *Cupriavidus necator* from CO₂ and hydrogen gas. *Bioresour Technol*, 2021, 319: 124169
- 10 Wilde E. Untersuchungen ber Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas. *Arch Microbiol*, 1962, 43: 109–137
- 11 Volodina E, Raberg M, Steinbüchel A. Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36: 978–991
- 12 Pohlmann A, Fricke W F, Reinecke F, et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1257–1262
- 13 Liu Z, Wang K, Chen Y, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO₂. *Nat Catal*, 2020, 3: 274–288
- 14 Claassens N J, Sousa D Z, Dos Santos V A P M, et al. Harnessing the power of microbial autotrophy. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14: 692–706
- 15 Kumar M, Sundaram S, Gnansounou E, et al. Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review. *Bioresour Technol*, 2018, 247: 1059–1068
- 16 Boyle N R, Morgan J A. Computation of metabolic fluxes and efficiencies for biological carbon dioxide fixation. *Metab Eng*, 2011, 13: 150–158
- 17 Bauwe H, Hagemann M, Fernie A R. Photorespiration: Players, partners and origin. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 330–336
- 18 Claassens N J, Scarinci G, Fischer A, et al. Phosphoglycolate salvage in a chemolithoautotroph using the Calvin cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 22452–22461
- 19 Kusian B, Bowien B. Organization and regulation of *cbb* CO₂ assimilation genes in autotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 21: 135–155
- 20 Bowien B, Kusian B. Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch Microbiol*, 2002, 178: 85–93
- 21 Dangel A W, Tabita F R. CbbR, the master regulator for microbial carbon dioxide fixation. *J Bacteriol*, 2015, 197: 3488–3498
- 22 Daley S M E, Kappell A D, Carrick M J, et al. Regulation of the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism involves internal sensing of NADP⁺ and α -ketoglutarate levels by transcription factor CcmR. *PLoS One*, 2012, 7: e41286
- 23 Grzeszik C, Jeffke T, Schaferjohann J, et al. Phosphoenolpyruvate is a signal metabolite in transcriptional control of the *cbb* CO₂ fixation operons in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microb Biotechnol*, 2000, 2: 311–320
- 24 Gruber S, Schwab H, Heidinger P. CbbR and RegA regulate *cbb* operon transcription in *Ralstonia eutropha* H16. *J Biotechnol*, 2017, 257: 78–86
- 25 Alagesan S, Minton N P, Malys N. ¹³C-assisted metabolic flux analysis to investigate heterotrophic and mixotrophic metabolism in *Cupriavidus necator* H16. *Metabolomics*, 2018, 14: 9
- 26 Schwartz E, Henne A, Cramm R, et al. Complete nucleotide sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J Mol Biol*, 2003, 332: 369–383
- 27 Lauterbach L, Lenz O. Catalytic production of hydrogen peroxide and water by oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase during H₂ cycling in the presence of O₂. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 17897–17905
- 28 Lenz O, Ludwig M, Schubert T, et al. H₂ conversion in the presence of O₂ as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *ChemPhysChem*, 2010, 11: 1107–1119
- 29 Radu V, Frielingsdorf S, Evans S D, et al. Enhanced oxygen-tolerance of the full heterotrimeric membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 8512–8515
- 30 Fritsch J, Scheerer P, Frielingsdorf S, et al. The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*, 2011, 479: 249–252
- 31 Schlegel H G, Gottschalk G, Von Barth R. Formation and utilization of poly- β -hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (hydrogenomonas).

- Nature, 1961, 191: 463–465
- 32 Li Z, Xin X, Xiong B, et al. Engineering the Calvin-Benson-Bassham cycle and hydrogen utilization pathway of *Ralstonia eutropha* for improved autotrophic growth and polyhydroxybutyrate production. *Microb Cell Fact*, 2020, 19: 228
- 33 Tang R, Weng C, Peng X, et al. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* H16 for improved chemoautotrophic growth and PHB production under oxygen-limiting conditions. *Metab Eng*, 2020, 61: 11–23
- 34 Islam Mozumder M S, Garcia-Gonzalez L, Wever H D, et al. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from CO₂: Model development and process optimization. *Biochem Eng J*, 2015, 98: 107–116
- 35 Lu Y, Yu J. Gas mass transfer with microbial CO₂ fixation and poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in a packed bed bioreactor. *Biochem Eng J*, 2017, 122: 13–21
- 36 Garcia-Gonzalez L, Mozumder M S I, Dubreuil M, et al. Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO₂ using a two-stage cultivation system. *Catal Today*, 2015, 257: 237–245
- 37 Satagopan S, Tabita F R. Rubis CO selection using the vigorously aerobic and metabolically versatile bacterium *Ralstonia eutropha*. *FEBS J*, 2016, 283: 2869–2880
- 38 Flamholz A I, Prywes N, Moran U, et al. Revisiting trade-offs between Rubisco kinetic parameters. *Biochemistry*, 2019, 58: 3365–3376
- 39 Ishizaki A, Tanaka K, Taga N. Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO₂. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57: 6–12
- 40 Yu J. Fixation of carbon dioxide by a hydrogen-oxidizing bacterium for value-added products. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34: 89
- 41 Marc J, Grousseau E, Lombard E, et al. Over expression of GroESL in *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic isopropanol production. *Metab Eng*, 2017, 42: 74–84
- 42 Garrigues L, Maignien L, Lombard E, et al. Isopropanol production from carbon dioxide in *Cupriavidus necator* in a pressurized bioreactor. *New Biotechnol*, 2020, 56: 16–20
- 43 Li H, Opgenorth P H, Wernick D G, et al. Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols. *Science*, 2012, 335: 1596
- 44 Muller J, MacEachran D, Burd H, et al. Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for autotrophic and heterotrophic production of methyl ketones. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 4433–4439
- 45 Li Z K, Xiong B, Liu L, et al. Development of an autotrophic fermentation technique for the production of fatty acids using an engineered *Ralstonia eutropha* cell factory (vol 46, pg 783, 2019). *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46: 791
- 46 Crépin L, Lombard E, Guillouet S E. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production. *Metab Eng*, 2016, 37: 92–101
- 47 Krieg T, Sydow A, Faust S, et al. CO₂ to terpenes: Autotrophic and electroautotrophic α -humulene production with *Cupriavidus necator*. *Angew Chem Int Edit*, 2018, 57: 1879–1882
- 48 Windhorst C, Gescher J. Efficient biochemical production of acetoin from carbon dioxide using *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 163
- 49 Chakravarty J, Brigham C J. Solvent production by engineered *Ralstonia eutropha*: Channeling carbon to biofuel. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 5021–5031
- 50 Grousseau E, Lu J, Gorret N, et al. Isopropanol production with engineered *Cupriavidus necator* as bioproduction platform. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 4277–4290
- 51 Fei Q, Brigham C J, Lu J, et al. Production of branched-chain alcohols by recombinant *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultivation. *Biomass Bioenergy*, 2013, 56: 334–341
- 52 Milker S, Sydow A, Torres-Monroy I, et al. Gram-scale production of the sesquiterpene α -humulene with *Cupriavidus necator*. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118: 2694–2702
- 53 Unrean P, Tee K L, Wong T S. Metabolic pathway analysis for in silico design of efficient autotrophic production of advanced biofuels. *Bioresour Bioprocess*, 2019, 6: 49
- 54 Schlegel H G, Lafferty R. Growth of ‘Knallgas’ bacteria (hydrogenomonas) using direct electrolysis of the culture medium. *Nature*, 1965, 205: 308–309
- 55 Tremblay P L, Xu M, Chen Y, et al. Nonmetallic abiotic-biological hybrid photocatalyst for visible water splitting and carbon dioxide reduction. *iScience*, 2020, 23: 100784
- 56 Torella J P, Gagliardi C J, Chen J S, et al. Efficient solar-to-fuels production from a hybrid microbial-water-splitting catalyst system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E1507
- 57 Liu C, Colón B C, Ziesack M, et al. Water splitting-biosynthetic system with CO₂ reduction efficiencies exceeding photosynthesis. *Science*, 2016, 352: 1210–1213
- 58 Li Z, Li G, Chen X, et al. Water splitting-biosynthetic hybrid system for CO₂ conversion using nickel nanoparticles embedded in N-doped carbon nanotubes. *ChemSusChem*, 2018, 11: 2382–2387

- 59 Chen X, Cao Y, Li F, et al. Enzyme-assisted microbial electrosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) via CO₂ bioreduction by engineered *Ralstonia eutropha*. *ACS Catal*, 2018, 8: 4429–4437
- 60 Stöckl M, Harms S, Dinges I, et al. From CO₂ to bioplastic—Coupling the electrochemical CO₂ reduction with a microbial product generation by drop-in electrolysis. *ChemSusChem*, 2020, 13: 4086–4093
- 61 Tian S, He J, Huang H, et al. Perovskite-based multifunctional cathode with simultaneous supplementation of substrates and electrons for enhanced microbial electrosynthesis of organics. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 30449–30456
- 62 Rodrigues R M, Guan X, Iñiguez J A, et al. Perfluorocarbon nanoemulsion promotes the delivery of reducing equivalents for electricity-driven microbial CO₂ reduction. *Nat Catal*, 2019, 2: 407–414
- 63 Tashiro Y, Hirano S, Matson M M, et al. Electrical-biological hybrid system for CO₂ reduction. *Metab Eng*, 2018, 47: 211–218
- 64 Grunwald S, Mottet A, Grousseau E, et al. Kinetic and stoichiometric characterization of organoautotrophic growth of *Ralstonia eutropha* on formic acid in fed-batch and continuous cultures. *Microbial Biotechnol*, 2015, 8: 155–163
- 65 Abel A J, Clark D S. A comprehensive modeling analysis of formate-mediated microbial electrosynthesis. *ChemSusChem*, 2021, 14: 344–355
- 66 Sakimoto K K, Wong A B, Yang P. Self-photosensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production. *Science*, 2016, 351: 74–77
- 67 Guo J, Suástegui M, Sakimoto K K, et al. Light-driven fine chemical production in yeast biohybrids. *Science*, 2018, 362: 813–816
- 68 Xu M, Tremblay P L, Jiang L, et al. Stimulating bioplastic production with light energy by coupling *Ralstonia eutropha* with the photocatalyst graphitic carbon nitride. *Green Chem*, 2019, 21: 2392–2400
- 69 Xu M, Tremblay P L, Ding R, et al. Photo-augmented PHB production from CO₂ or fructose by *Cupriavidus necator* and shape-optimized CdS nanorods. *Sci Total Environ*, 2021, 753: 142050
- 70 Zhang G, Lan Z A, Wang X. Surface engineering of graphitic carbon nitride polymers with cocatalysts for photocatalytic overall water splitting. *Chem Sci*, 2017, 8: 5261–5274
- 71 Zhang H, Liu H, Tian Z, et al. Bacteria photosensitized by intracellular gold nanoclusters for solar fuel production. *Nat Nanotechnol*, 2018, 13: 900–905
- 72 Ji Z, Zhang H, Liu H, et al. Cytoprotective metal-organic frameworks for anaerobic bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 10582–10587
- 73 Zhang S, Shi J, Chen Y, et al. Unraveling and manipulating of NADH oxidation by photogenerated holes. *ACS Catal*, 2020, 10: 4967–4972
- 74 Zhang S, Shi J, Sun Y, et al. Artificial thylakoid for the coordinated photoenzymatic reduction of carbon dioxide. *ACS Catal*, 2019, 9: 3913–3925
- 75 Khan N E, Myers J A, Tuerk A L, et al. A process economic assessment of hydrocarbon biofuels production using chemoautotrophic organisms. *Bioresour Technol*, 2014, 172: 201–211
- 76 Bommareddy R R, Wang Y, Pearcy N, et al. A sustainable chemicals manufacturing paradigm using CO₂ and renewable H₂. *iScience*, 2020, 23: 101218
- 77 Xiong B, Li Z, Liu L, et al. Genome editing of *Ralstonia eutropha* using an electroporation-based CRISPR-Cas9 technique. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 172
- 78 Härrer D, Windhorst C, Böhner N, et al. Production of acetoin from renewable resources under heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour Technol*, 2021, 329: 124866

Summary for “CO₂到高附加值产物: 罗尔斯通氏菌的固碳研究进展”

From CO₂ to high value-added products: Advances on carbon sequestration by *Ralstonia eutropha* H16

Zhe Ma^{1,2†}, Dan Liu^{1,2†}, Mengxiao Liu^{1,2}, Yingxiu Cao^{1,2*} & Hao Song^{1,2}

¹ School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

² Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Frontier Science Center for Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: caoyingxiu@tju.edu.cn

Due to the large-scale mining and utilization of fossil energy, human not only face the issue of energy shortage but also need to solve the problem of climate change caused by excessive CO₂. In order to achieve the goal of green manufacturing and carbon neutrality, it is necessary to develop non-carbon renewable energy sources such as solar, wind, and tidal energy to replace fossil energy, and to capture, utilize, and store the emitted CO₂ through artificial technology. Since biological carbon sequestration has the advantages of mild reaction conditions and environmental friendliness, it has become one of the most attractive and promising fields in the future.

Among a wide variety of carbon-fixing organisms, Knallgas bacteria are a type of microorganisms that can directly use H₂ as an energy source to fix CO₂. H₂ is a kind of clean energy and can be produced by water electrolysis driven by renewable energy. *Ralstonia eutropha* H16 (also known as *Cupriavidus necator* H16), as the most in-depth studied Knallgas bacteria, is one of the most effective microorganisms that convert H₂ into biomass.

The main attraction of *R. eutropha* as a platform for microbial carbon sequestration lies in the following three aspects. First of all, in terms of growth conditions, *R. eutropha* grows faster than photosynthetic microorganisms such as cyanobacteria and will not be affected by factors such as light and weather during large-scale cultivation. Secondly, in terms of genetic manipulation, *R. eutropha* has genetic maneuverability and availability of genetic tools. Compared with other autotrophic microorganisms such as acetogens and methanogens, its genetic toolbox is more abundant and mature. Finally, in terms of product range, *R. eutropha* can naturally synthesize high-carbon density bioplastics, namely poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), which is biodegradable and has physical properties comparable to petroleum-based thermoplastics. Under gas fermentation conditions, *R. eutropha* can produce 28 g/L PHB. Moreover, *R. eutropha* can be engineered to produce biofuels through metabolic pathway design, including alcohols, fatty acids and derivatives, alkenes, and terpenes, as well as other products with economic value, such as acetoin, trehalose, lipochitooligosaccharides (plant growth enhancer), and so on. The output of some products can reach the g/L level under the laboratory-scale fermentation tank, such as isopropanol 3.5 g/L, butanol and 3-methyl-1-butanol ~1 g/L, and acetoin 3.9 g/L, which are expected to be industrially produced. It is fully demonstrated that *R. eutropha* is a promising cell factory that can use renewable energy and CO₂ to produce high value-added products.

In this review, we first introduce the metabolic characteristics of CO₂ fixation and energy utilization of *R. eutropha*. Under autotrophic conditions, *R. eutropha* fixes CO₂ through the Calvin-Benson-Bassham cycle and utilizes hydrogenase to catalyze H₂ oxidation to provide cells with reducing power and energy. Then, according to the pattern of energy utilization, we summarize the advances and representative works, including *R. eutropha* directly using H₂ through gas fermentation, indirectly using H₂ and formate through electrosynthesis, and indirectly using H₂ through photosynthesis. In the section of gas fermentation, we summarize the research progress and related strategies of production of natural products and synthetic products by *R. eutropha*. In the section of electrosynthesis, we introduce the research work of electrosynthesis by *R. eutropha* according to the electron carrier type (H₂ and formate) and compare the advantages and disadvantages of the two electron carriers. In the section of photosynthesis, we introduce the latest work and analyse the current main problems and solutions. Finally, we compare the pros and cons of the three patterns and prospect the research direction in the future.

***Ralstonia eutropha* H16, CO₂ fixation, gas fermentation, photo-electrosynthesis, bioplastics, biofuels**

doi: [10.1360/TB-2021-0584](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0584)