

研究报告

醋酸梭菌在异养和自养条件下的乙酸生成与代谢特性

王泽宇^{1,5}, 范红叶², 刘灵秀^{1,3}, 柏萌薇^{1,4}, 陈浚^{*1}

1 浙江树人学院 交叉科学研究院 浙江省污染暴露与健康干预重点实验室, 浙江 杭州 310015

2 浙江树人学院 生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310015

3 浙江师范大学 地理与环境科学学院, 浙江 金华 321004

4 浙江工业大学 环境学院, 浙江 杭州 310014

5 Faculty of Sciences Interdisciplinary Centre of Chemistry and Biology, University of La Coruña, La Coruña 15001, Galicia, Spain

王泽宇, 范红叶, 刘灵秀, 柏萌薇, 陈浚. 醋酸梭菌在异养和自养条件下的乙酸生成与代谢特性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2819-2830.

WANG Zeyu, FAN Hongye, LIU Lingxiu, BAI Mengwei, CHEN Jun. Acetate production and metabolic characteristics of *Clostridium aceticum* under heterotrophic and autotrophic conditions[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2819-2830.

摘要: 【背景】产乙酸菌可以利用一碳气体发酵生产乙酸等高值化学品, 是实现碳资源回收利用和绿色生物制造的重要途径之一。绝大部分产乙酸菌还可以利用有机质进行代谢, 但二者具有不同的能量代谢模式。【目的】探究一种典型产乙酸菌醋酸梭菌(*Clostridium aceticum*)在异养/自养条件下的产酸特性, 揭示不同培养条件对其代谢模式的影响机理。【方法】分别在以葡萄糖和合成气($H_2:CO_2$ 为 6:4)为底物的条件下考察醋酸梭菌产酸和代谢的情况, 基于实验结果分析产物分布及乙酸生产比滴度, 进一步利用关键酶活性指标揭示异养/自养代谢的差异性机理。【结果】醋酸梭菌在 10 g/L 葡萄糖存在时进行分步降解, 先分解葡萄糖产生乳酸, 后续生成 6.3 g/L 乙醇、13.2 g/L 丁酸和 5.6 g/L 乙酸, 而在合成气为底物时只检测到 1.96 g/L 乙酸。产物分布结果表明自养条件下的乙酸生产比滴度和酸醇比分别最高可达 28.6 g/g 和 17.57, 远高于异养的 8.23 g/g 和 1.53。酶代谢指标表明, 异养条件下的 NADH、ATP 产生量及丙酮酸脱氢酶活性均表现出明显优势, 但乙酸激酶活性却恰好相反, 这揭示出异养条件下丙酮酸代谢的中间产物乙酰辅酶 A 大部分流向细胞合成和高级产物(乙醇和丁酸), 反而在自养条件下流向乙酸生成。【结论】醋酸梭菌在自养条件下可以实现更专注的乙酸生成, 为合成气的生物资源化利用及产乙酸菌的代谢通路调控提供一定的参考价值。

关键词: 醋酸梭菌; 异养代谢; 合成气; 乙酸; 乙酰辅酶 A

资助项目: 国家自然科学基金(42207161, 42177115); 浙江省自然科学基金(LTGS23D030001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42207161, 42177115) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LTGS23D030001).

*Corresponding author. E-mail: 601426@zjsru.edu.cn

Received: 2023-10-21; Accepted: 2023-12-12; Published online: 2024-01-23

Acetate production and metabolic characteristics of *Clostridium aceticum* under heterotrophic and autotrophic conditions

WANG Zeyu^{1,5}, FAN Hongye², LIU Lingxiu^{1,3}, BAI Mengwei^{1,4}, CHEN Jun^{*1}

1 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pollution Exposure and Health Intervention, Interdisciplinary Research Academy, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, Zhejiang, China

2 Academy of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, Zhejiang, China

3 Academy of Geography and Environmental Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

4 College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

5 Faculty of Sciences Interdisciplinary Centre of Chemistry and Biology, University of La Coruña, La Coruña 15001, Galicia, Spain

Abstract: [Background] Acetic acid-producing bacteria can utilize one-carbon gas to produce high-value chemicals such as acetic acid by fermentation, which is an important way for carbon resource recycling and green biomanufacturing. In addition, most of the acetic acid-producing bacteria can utilize organic matter for metabolism. However, the two ways have different energy metabolism patterns. **[Objective]** To investigate the acid production characteristics of a typical acetic acid-producing bacterium, *Clostridium aceticum*, under heterotrophic/autotrophic conditions, and to reveal the mechanism of different culture conditions in affecting the metabolic patterns of this bacterium. **[Methods]** The acid production and metabolism of *C. aceticum* cultured with glucose and syngas (H₂ and CO₂ mixed in the ratio of 6:4), respectively, were investigated. The distribution of the products and the specific titer of acetic acid production were analyzed on the basis of the results of the experiments. The key enzyme activity indexes were employed to reveal the mechanism of the differences in the heterotrophic and autotrophic metabolism patterns. **[Results]** *C. aceticum* performed stepwise degradation in the presence of 10 g/L glucose. It firstly decomposed glucose to produce lactic acid, and subsequently produced 6.3 g/L ethanol, 13.2 g/L butyric acid, and 5.6 g/L acetic acid. However, only 1.96 g/L acetic acid was detected in the case of syngas as the substrate. The results of product distribution showed that the specific titer of acetic acid production and acid/alcohol ratio under autotrophic conditions reached up to 28.6 g/g and 17.57, respectively, which were much higher than those (8.23 g/g and 1.53) under heterotrophic conditions. The NADH and ATP production as well as pyruvate dehydrogenase activity were higher under heterotrophic conditions, while the acetate kinase activity showed an opposite trend. This result revealed that most of acetyl coenzyme A as an intermediate of pyruvate metabolism, flowed to cell synthesis and end products (ethanol and butyric acid) under heterotrophic conditions, while it flowed to acetate production under autotrophic conditions. **[Conclusion]** *C. aceticum* could achieve higher acetic acid production under autotrophic conditions, which provides a reference value for the utilization of syngas by microorganisms and the regulation of metabolic pathway of acetic

acid-producing bacteria.

Keywords: *Clostridium acetivum*; heterotrophic metabolism; syngas; acetic acid; acetyl-CoA

基于废弃生物质的生物资源化技术,可以在减少 CO₂ 排放的同时,通过水解和发酵过程生成高附加值产品^[1-3]。另外,气化过程可以将生物质(包括木质素在内的纤维素材料)完全转化为 H₂、CO 和 CO₂ 的混合物(即所谓的合成气),避免了因原料来源不一导致的预处理困难^[4-5]。合成气是一种常见且廉价的化工原料,不仅可以通过气化过程产生,还存在于钢铁厂等重工业的废气中。合成气形成后可通过化学合成或生物发酵将其转化为高附加值产品,但由于化学工艺对合成气的纯度以及成分比例要求比较高,其商业化应用前景并不明朗^[6]。而生物发酵过程中的厌氧微生物种类繁多,包括乙酸菌、甲烷菌和光合微生物,它们可以利用 H₂ 和 CO/CO₂ 作为碳源和能源,生产短链化学品或燃料,如乙酸、乙醇、丁酸、丁醇及甲烷等。在所有利用合成气发酵的微生物中,产乙酸菌因其分布广泛、底物广谱性强而备受广大学者关注^[7-9]。

产乙酸细菌能够利用两分子的二氧化碳(CO₂),通过 Wood-Ljungdahl (WL)途径产生乙酸^[8-9]。大多数产乙酸菌属于梭状芽孢杆菌属和醋酸杆菌属,醋酸梭菌(*Clostridium acetivum*)、克式梭菌(*Clostridium kluyveri*)和热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*)作为 3 种模式生物已被广泛研究^[10-14]。在 WL 途径中, H₂ 作为电子供体被氧化,将 CO₂ 还原成 CO 或甲基,然后由 CO 和甲基结合形成乙酰辅酶 A,进一步开展碳代谢和细胞合成。最近的基因组研究表明,在产乙酸菌中有两个与能量调控有关的基本通识:一个是膜结合酶复合物,负责转移 Na⁺或 H⁺,以形成离子梯度,通过 ATP 酶进一步合成 ATP,因为 WL 途径本身的净 ATP 产量为零;另一个

是新发现的基于黄素的电子分岔(flavin-based electron bifurcation, FBEB)机制,该机制将末端氧化还原反应与更高电位的电子受体偶联,以氧化相同的电子供体,这两种不同的能量调控机制可能与发酵的产物分布有很大关系^[1-2,15]。与此同时,据报道大部分的产乙酸菌不仅仅可以进行自养代谢,还可以基于葡萄糖等有机物开展异养代谢,然而其代谢形式与产物分布之间的关联尚无太多的报道^[16-17]。

本实验使用一种典型的产乙酸模式微生物,即醋酸梭菌(*Clostridium acetivum*),利用批次实验评估其在不同底物条件下的乙酸生产性能。其次,基于生物量和产物分布探究不同代谢模式间的差异性。最后结合关键代谢指标,揭示不同代谢路径中的乙酸生成机理,并提出最佳乙酸生产的工艺条件。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

本研究中使用的菌株为醋酸梭菌(*Clostridium acetivum*) DSM1946,购自德国国家培养物保藏中心。菌株在厌氧条件下保存在-80 °C的冷冻瓶中,实验前转移至灭菌培养基中并在 30 °C水浴中活化。

1.2 培养基

用于预培养生长、批量实验的培养基是根据先前研究改进的厌氧培养基(g/L):六水氯化钙 0.036 9,六水氯化镁 0.265 4,氯化钾 0.019 2,四水氯化锰 0.073 0,六水氯化钴 0.004 4,硼酸 0.000 7,二水氯化铜 0.001 8,二水钼酸钠 0.000 4,氯化锌 0.000 3,氯化亚铁 0.012 5,巯基乙酸钠 0.217 3,磷酸二氢钾 0.450 0,磷酸氢二钾 0.330 0,

碳酸氢钠 1.000 0。添加氯化铵(0.400 0 g/L)和酵母提取物(1.000 0 g/L)作为氮源,另外添加刃天青(0.175 0 mg/L)作为氧化还原状态指示剂。使用 2 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节 pH 值至 7.0,使用前将培养基在 121 °C 灭菌 60 min。

1.3 主要试剂和仪器

酵母提取物、氯化铵和刃天青等分析纯试剂, Sigma 化学试剂有限公司; NAD⁺/NADH 检测试剂盒、Na⁺K⁺-ATP 酶活性检测试剂盒等生化指标试剂盒, 宝日生物技术(北京)有限公司。紫外分光光度计, JASCO 公司; 液相色谱仪, Agilent 公司; pH 计, Mettler Toledo 公司; 玻璃微纤维过滤器, Whatman 公司; 超声波细胞破碎机, 新芝生物科技股份有限公司。

1.4 分批乙酸生产性能测试

本研究中的批量实验在 120 mL 血清瓶中进行,其中工作体积为 60 mL。葡萄糖作为产乙酸菌进行异养代谢的碳源,异养培养时用 N₂ 冲洗瓶子。自养培养时用 H₂:CO₂ 体积比为 6:4 的合成气作为底物,充气至大气压 1.5 bar,然后用橡胶隔塞盖紧瓶盖并用铝盖压实。37 °C、100 r/min 培养,每隔 24 h 采集液体和气体样品,用于检测物质的种类和浓度。

1.5 检测方法

通过使用紫外分光光度计测量菌株的 OD₆₀₀,对于干细胞重量(dry cell weight, DCW)分析,首先测量玻璃微纤维过滤器的重量,并过滤 20 mL 培养基。将含有细胞颗粒的滤纸在 60 °C 烘箱中干燥过夜,然后测量其重量以计算 DCW。采用高效液相色谱法测定葡萄糖、乳酸、乙酸、丁酸及乙醇的浓度,色谱柱规格为 Agilent Hi-Plex (300 mm×7.7 mm, 8 μm),二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)和折光检测器(refractive index detector, RID)的检测温度均为

50 °C。以 0.005 mol/L H₂SO₄ 溶液为流动相,流速为 0.8 mL/min,柱温为 45 °C。所有样品在上机前经 7 000 r/min 离心 5 min 后用 0.22 μm PTFE 针筒式过滤器过滤。使用 pH 计记录溶液酸碱度的变化。

1.6 关键代谢指标的测定

NADH 的检测方法: NAD⁺/NADH 检测试剂盒是一种基于 WST-8 的显色反应,通过比色法来检测样品中氧化型辅酶 I (NAD⁺)和还原型辅酶 I (NADH)各自的量、比值和总量的检测试剂盒^[18]。准备两个相同的样品(每个样品 1 mL,一个用于检测 NAD⁺;另一个用于检测 NADH)以 12 000 r/min 离心 5 min,除去上清液,并加入 300 μL 0.2 mol/L HCl (用于 NAD⁺萃取)或 300 μL 0.2 mol/L NaOH (用于 NADH 萃取)以重悬沉淀。将样品于 50 °C 水浴中 10 min 后冷却至 0 °C。涡旋滴加 300 μL 0.1 mol/L NaOH (用于 NAD⁺萃取)或 300 μL 0.1 mol/L HCl (用于 NADH 萃取)中和萃取液,15 000 r/min 离心 5 min 除去细胞碎片,将上清液立即转移到试管中进行测量。通过酶促循环测定法测定细胞内 NADH 和 NAD⁺的浓度。循环实验的混合物由等体积的 1 mol/L Bicine 缓冲液(pH 8.0)、乙醇、40 mmol/L EDTA (pH 8.0)、4.2 mmol/L 噻唑基蓝和两倍体积的 16.6 mmol/L 吩嗪乙硫酸盐组成,然后将其在 30 °C 下孵育 10 min。制备如下反应混合物: 50 μL 中和的细胞提取物、0.3 mL 蒸馏水和 0.6 mL 试剂混合物。通过添加 50 μL (500 U/mL)醇脱氢酶(alcoholdehydrogenase, ADH)开始反应。在 30 °C 每 30 s 检查 570 nm 处的吸光度 10 min。用 0.01–0.05 mmol/L NADH 和 NAD⁺的标准溶液校准 NADH 和 NAD⁺的浓度,最终的 NAD⁺和 NADH 水平按每毫克蛋白质计算。

ATP 含量的测定: 将菌株在 35 °C 水浴锅中

培养 48 h 后 3 500 r/min 离心 10 min 收集沉淀物。用 PBS 洗涤 2 次, 并将 pH 值调至 7.2。然后, 取 1 mL 菌液用超声波细胞破碎机在冰浴中破碎(功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次)。用 Na^+K^+ -ATP 酶活性检测试剂盒处理细胞, 然后在 450 nm 波长下用酶标仪检测吸光度, 并与标准曲线比对获取 ATP 含量值^[19]。

丙酮酸脱氢酶活性的测定: 丙酮酸脱氢酶活性表示丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 的能力。将菌液在 3 000×g 条件下离心 3 min, 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入 100 μL 蛋白提取液[含 50 mmol/L PBS (pH 7.2), 1 mmol/L EDTA, 1 $\mu\text{mmol/L}$ PMSF, 1 mmol/L DTT]混匀。刮下细胞并超声破碎(功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次)后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000×g 离心 15 min, 所得上清液即细胞总蛋白提取液。取 10 μL 采用考马氏亮蓝法测定蛋白浓度。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 将 30 μL 蛋白提取液加至 200 μL 反应体系[50 mmol/L PBS (pH 7.4), 2.5 mmol/L NAD^+ , 0.2 mmol/L TPP, 1 mmol/L MgCl_2 , 0.02 mmol/L CoA, 0.2 mmol/L FAD, 0.2 mmol/L 硫辛酸, 2.5 mmol/L 半胱氨酸, 2 mmol/L 丙氨酸钠], 检测其 340 nm 处的吸光度。丙氨酸脱氢酶活性定义为: 25 $^{\circ}\text{C}$, 每 mg 酶蛋白所含的活力单位, 酶提取液中蛋白质的含量采用 Bradford 方法以牛血清蛋白作标准测定^[20]。

乙酸激酶活性的测定: 乙酸激酶活性代表着将乙酰辅酶 A 转化为乙酸的能力。采集 5 mL 左右的细菌悬浊液, 用 pH 7.4 的 0.025 mmol/L Tris-HCl 漂洗 3 次, 再超声破碎细胞壁 3 min, 最后以 5 000 r/min 离心 3 min 收集含有乙酸激酶的上清液。在波长为 540 nm 的条件下测定溶液的吸光度。依据 $\epsilon=0.169 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm})$ 的摩尔消光系数计算乙酸激酶的活性, 1 单位的乙酸

激酶活性定义为每分钟催化产生 1 μmol 异羟肟酸的酶的数量。乙酸激酶的比酶活定义为每 mg 酶蛋白所含的活力单位, 酶提取液中蛋白质的含量采用 Bradford 方法以牛血清蛋白作标准测定^[21]。

1.7 计算方法

乙酸生产比滴度为单位生物量产生的乙酸的量, 公式为: 乙酸生产比滴度(g/g)= $C_{\text{乙酸}}/C_{\text{菌株}}$ 。式中: $C_{\text{乙酸}}$ 表示乙酸的生成量(g/L); $C_{\text{菌株}}$ 表示菌株的生长量(g/L), 用于表示菌株中细胞合成与乙酸产生之间的关系。乙酸生产比滴度用于衡量发酵过程的产物效率, 数值越大, 单位生物量的乙酸产率越高。

2 结果与分析

2.1 异养条件下菌株的代谢与生长特性

大多数产乙酸菌都可以利用糖类进行异养代谢, 并通过底物水平磷酸化(substrate level phosphorylation, SLP)节约能量, 其中葡萄糖被水解为丙酮酸, 然后氧化为乙酰辅酶 A 以进行下游代谢反应^[22-23]。在本研究中, 醋酸梭菌在第 1 天内即开始将葡萄糖转化为乳酸, 然后利用乳酸产生大量丁酸, 同时产生少量的乙酸和乙醇(图 1A)。醋酸梭菌的这种分阶段代谢与产氢发酵生物反应器相似, 在产氢发酵生物反应器中也观察到了乙酸生成^[24]。葡萄糖作为醋酸梭菌的碳源, 其代谢速率十分显著, 在第 4 天就完成了全部降解。乳酸在第 4 天达到最大值 11.1 g/L 后下降。大部分产乙酸菌均可以利用有机碳源生成乙酸或者乙醇, 这取决于还原力的分配。产乙酸菌通常能通过体内两条天然的代谢途径产生乙醇。一条是通过醛/醇脱氢酶将乙酰辅酶 A 直接转化成乙醇, 这个过程需要消耗两分子 NADH; 另外一条途径是通过醛-铁氧还蛋白氧化还原酶

将乙酸回用转化形成乙醇, 这个过程将消耗 1 分子 Fd_{red} 和 1 分子 $NADH^{[25]}$ 。在永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*) 的细胞高密度发酵时, 梭菌由主要产乙酸向产乙醇转变, 这显然与我们的实验结果相一致^[26]。当细胞密度达到一定程度时, 主要产物则由乙酸向乙醇转化, 结合图 1, 在前 7 天内菌株的 OD_{600} 在 1 以下时, 产物以乙酸为主 (5.6 g/L), 乙醇产量仅为 1.3 g/L。随着菌株生物量的增多乙酸产量逐步稳定, 乙醇产量在第 15 天急剧上升达到 6.3 g/L, 丁酸浓度更是达到 13.2 g/L。醋酸梭菌可以利用葡萄糖生产丁酸之前很少被报道, 本实验结果表明产乙酸菌确实可以生产丁酸。

2.2 自养条件下菌株的代谢与生长特性

图 2 显示了醋酸梭菌在自养条件下代谢物的产生以及 H_2 和 CO_2 的消耗。在反应结束时, 醋酸梭菌产生 1.96 g/L 的乙酸作为主要产物, 同时检测到少量乙醇 (0.25 g/L) 和丁酸 (0.17 g/L) (图 2A)。然而, 当 pH 5.0 时乙醇成为了唯一产物 (数据未显示), 对永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*) 和拉格斯代尔梭菌 (*Clostridium ragsdalei*) 的研究报道也显示出了类似的现象, 低 pH 值触发了产酸向产溶剂的转变^[27-28]。低 pH

下较高的细胞外质子浓度可能会改变乙酸激酶反应过程中 SLP 的 ATP 生成机制, 转为膜结合 ATP 合酶的质子梯度驱动的磷酸化^[22,24,29]。在发现的 100 多种产乙酸菌中, 只有极少数的一些微生物能利用合成气作为单一碳源和能源合成一些天然的高级产物如丁酸、丁二醇和己醇^[26]。本实验中, 在自养条件下醋酸梭菌的丁酸产量很少, 这可能是由于 H_2 是唯一的电子供体, 缺乏充足的碳链延长还原力。这一结果与之前的研究一致, 即产乙酸菌从丁醇或苏氨酸等四碳有机物中合成丁酸更有利^[30]。 H_2 作为能量来源, 较低的溶解度 (气液传质) 限制了其供给, 导致微生物生长缓慢。从热力学角度看, 只有当底物能够提供足够的能量以维持细胞生长时, 一碳气体到多碳化合物的转化才是可行的。根据化学平衡, 生产高级产物也需要消耗更多的碳流, 而在气体发酵时这些能量和碳流只能由气体底物来提供, 这对气体在培养基中的溶解度和利用率提出了更高的要求^[1,8]。利用 CO_2 和 H_2 作为碳源和能源时, 为了获得更多的 ATP 维持细胞生长, 代谢流更多地流向乙酸的合成, 这与之前的报道^[31-32]一致。另外, 图 2B 中醋酸梭菌最大生物量 OD_{600} 仅为 0.91, 这印证了之前的推测。另外, 自养条件

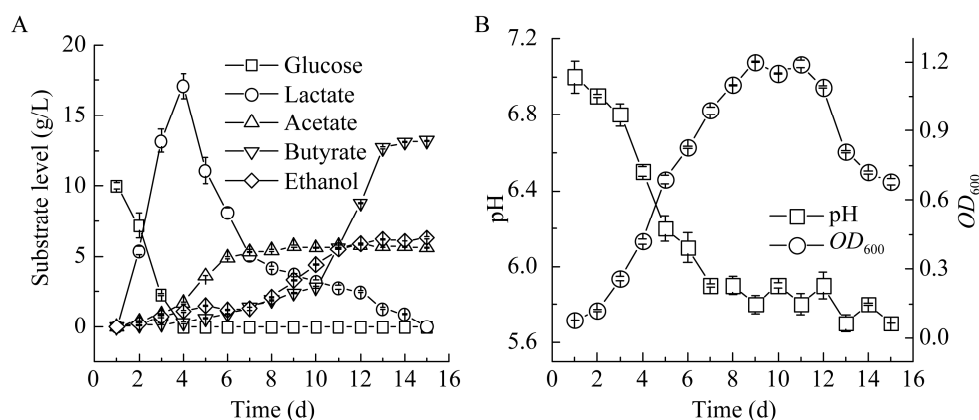


图 1 醋酸梭菌在异养条件下的代谢变化 A: 底物浓度变化. B: 生物量/pH 变化

Figure 1 Metabolic variations in *Clostridium acetivum* under heterotrophic conditions. A: Variation in substrate concentration. B: Variation in biomass/pH.

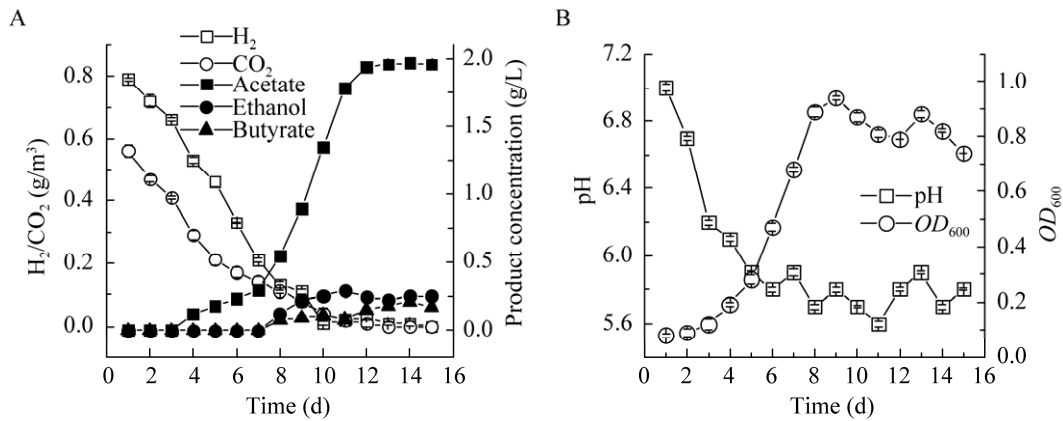


图 2 醋酸梭菌在自养条件下的代谢变化 A: 底物浓度变化. B: 生物量/pH 变化

Figure 2 Metabolic variations in *Clostridium acetivum* under autotrophic conditions. A: Variation in substrate concentration. B: Variation in biomass/pH.

下的 pH 似乎在一开始下降得比异养条件下快, 一般来说, 产酸过程会导致溶液中的酸度上升, 因为产物的酸度系数(乳酸、乙酸、丁酸)都要高于初始底物(葡萄糖), 而自养条件下 pH 一开始的快速下降是由 CO₂ 溶解于培养基形成的弱酸导致的^[33]。

2.3 菌株的乙酸生产比滴度和酸醇比

借助两个产物指标来进一步揭示醋酸梭菌在不同底物条件下产酸过程中的特性分析。如图 3A 所示, 乙酸生产比滴度(acetate production specific titer, APST)表示每单位质量的菌株生物量所产生的乙酸量, 这一指标可以反映底物中碳的流向。在异养条件下随着培养时间的推移, 乙酸生产比滴度也缓慢上升, 在反应结束时达到了 8.23 g/g。形成鲜明对比的是, 自养条件下的乙酸生产比滴度远远高于异养条件下, 最高达到了 28.60 g/g。在以 H₂ 作为还原力来源的特定条件下, 菌株面临能量供应的限制, 导致其难以合成更高级别的代谢产物。从热力学的角度分析, 与细胞合成相比, 乙酸的生成过程更加符合能量效率原则。也就是说, 利用 H₂ 驱动 CO₂ 的固定产乙酸的过程自由能变化很小, 导致了热力学的约

束, 在整个过程中每生成 1 mol 乙酸时 ATP 的净生成小于 1 mol, 低的能量供应限制了微生物的生长及高值产物的合成。与此同时, 图 3B 中的酸醇比也可以反映醋酸杆菌在代谢过程中的产物分布, 类似地, 与异养条件相比, 自养条件下的酸醇比最高可达 17.57, 远远高于异养条件下的 1.53, 这无疑更加印证了醋酸杆菌自养条件下产物纯度的优越性, 但是由于受生物量的限制, 其乙酸浓度还是不及异养条件。

2.4 菌株的碳代谢活性指标分析

为了进一步揭示异养和自养条件下的代谢差异, 4 种典型的代谢指标被用来评估其代谢活性。图 4A 所示的是醋酸梭菌中 NADH 和 ATP 产生的活性, 显而易见, 异养条件下无论是葡萄糖氧化为乳酸的过程, 还是乳酸进一步氧化为丙酮酸的过程均可以产生大量的还原力(NADH)和能量(ATP), 与之对应的是异养条件下 NADH 的产生活性和 ATP 活性高达 23.14 nmol/mg 和 9.11 nmol/mg, 远远高于自养条件下的 14.75 nmol/mg 和 5.84 nmol/mg。而如图 4B 所展示的是醋酸杆菌的丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)和乙酸激酶

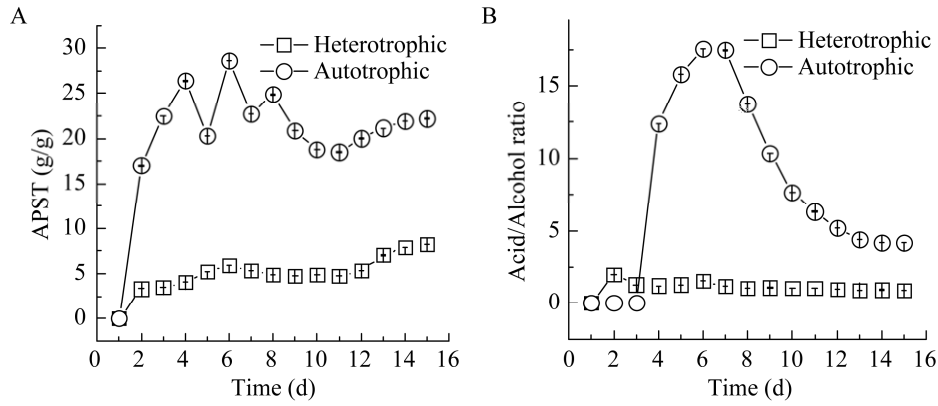


图3 醋酸梭菌在异养/自养条件下的产物特征 A: 乙酸生产比滴度. B: 酸醇比

Figure 3 Product characteristics of *Clostridium aceticum* under heterotrophic/Autotrophic conditions. A: Specific titer of acetate production. B: Acid/Alcohol ratio.

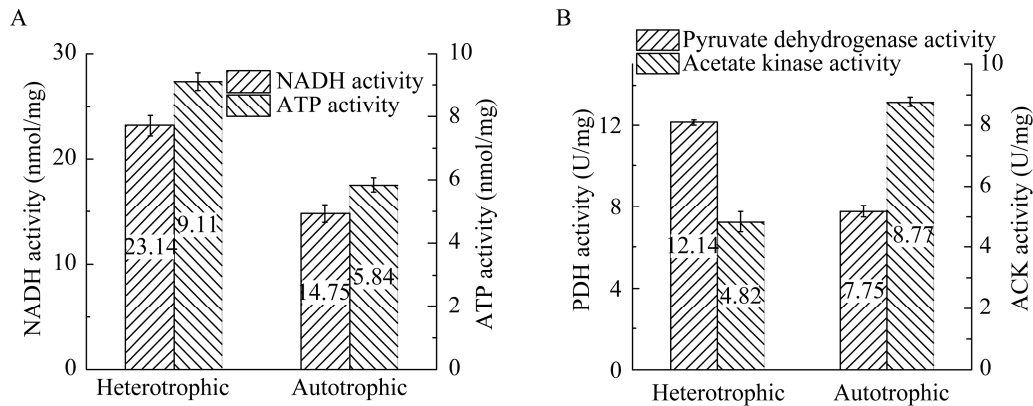


图4 醋酸梭菌在异养/自养条件下的代谢活性 A: NADH/ATP产量. B: 丙酮酸脱氢酶/乙酸激酶活性
Figure 4 Metabolic activity of *Clostridium aceticum* under heterotrophic/autotrophic conditions. A: NADH/ATP production. B: Pyruvate dehydrogenase (PDH)/acetate kinase (ACK) activity.

(acetate kinase, ACK)的活性,其中PDH负责催化丙酮酸脱羧,生成乙酰辅酶A的不可逆反应,而ACK则负责将乙酰辅酶A通过底物水平磷酸化形成乙酸,同时生成一分子的ATP^[9,34-35]。另外,异养条件下的PDH活性结果显示其高达12.14 U/mg,远远高于自养条件下的7.75 U/mg,而ACK的活性却呈相反的结果,自养和异养条件下的活性分别为4.82 U/mg和8.77 U/mg。结合图1-3的结果,我们推测异养条件下由葡萄糖氧化代谢陆续生成乳酸、丙酮酸和乙酰辅酶A

的过程中,其活性不断升高,而自养条件下因还原力和能量不足,由WL途径生成乙酰辅酶A的代谢活性相对偏弱。相反地,ACK的活性在自养条件下则相对活跃得多,其反应的正是乙酰辅酶A向乙酸转化程度的高低,这表明自养条件下乙酰辅酶A大部分流向了乙酸,而不是脂肪酸合成、氨基酸合成或者中心碳代谢途径。

3 讨论

如图5所示,结合之前给出的结果与分析,

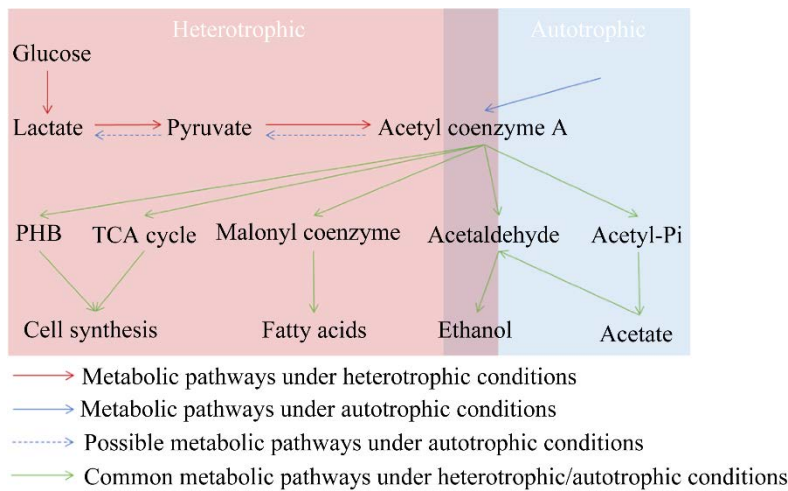


图 5 异养/自养条件下醋酸梭菌的不同代谢路径示意图

Figure 5 Schematic representation of different metabolic pathways of *Clostridium acetivum* under heterotrophic/autotrophic conditions.

醋酸梭菌在不同碳源作为底物条件下的代谢路径具有显著差异性,当葡萄糖作为初始碳源时,其代谢路径较为丰富,经由糖酵解途径代谢产生乳酸,再由乳酸脱氢酶进一步生成丙酮酸,而丙酮酸作为生物体内重要的代谢货币,其下一步代谢路径的调控往往是生物学方面重要的研究方向^[36]。丙酮酸脱氢酶复合体催化糖代谢中的丙酮酸不可逆地氧化脱羧产生乙酰辅酶 A。乙酰辅酶 A 既可以走向继续分解提供能量的途径,又可走向生物合成途径,关键在于对丙酮酸脱氢酶复合体活性的调节^[37]。在本研究中,醋酸梭菌在葡萄糖存在的条件下,乙酰辅酶 A 的主要转化方向是流向细胞合成(生物量增多)和 TCA 循环途径(NADH 和 ATP 产生量提升),这一点可以通过图 1 中的产物分布和细胞生物量以及图 3 中的乙酸生产比滴度结果得到验证。菌株在能量和还原力充足的条件下,优先生成乙醇、高级产物丁酸和合成自身骨架。然而,以合成气作为唯一底物时,其乙酸产量相对于其他产物以及菌株生物量就明显占优势,这是由于 CO₂ 和 H₂ 作为能源和还原力来源时,它们每生成 1 分子乙酸的

同时会产生 1 分子的 ATP(通常来说,乙酰辅酶 A 被当作是活化态的乙酸,因此乙酰辅酶 A 向乙酸转化时会降低自身化学能,以 ATP 形式释放),可以用于菌株其他代谢路径,比如细胞合成(细胞合成需要大量的 ATP 和还原力供应),相较于其他高级产物,细胞合成相对来说对菌株代谢更重要,因为在自养条件下乙醇和丁酸的产量较少。结合以上分析结果,异养条件下的碳流量大部分流向了细胞合成和高级产物,而自养条件下的碳流量向着可以生成 ATP 途径的乙酸产物流去。

4 结论

综上所述,本实验使用葡萄糖和合成气探究醋酸梭菌的异养和自养代谢性能,结果显示异养条件下乙酸产量仅仅为 5.6 g/L,远低于 6.3 g/L 的乙醇产量和 13.2 g/L 的丁酸产量。然而,自养条件下的乙酸产量为 1.96 g/L,没有明显乙醇和丁酸的生成。产物分布数据分析结果表明自养条件下的乙酸生产比滴度和酸醇比分别最高可达

28.6 g/g 和 17.57, 远远高于异养条件下的 8.23 g/g 和 1.53。进一步结合关键酶代谢指标, 与自养条件相比, 异养条件下的 NADH 和 ATP 产量均表现出明显优势, 丙酮酸脱氢酶活性也揭示了乙酰辅酶 A 在此条件下的快速生成, 而乙酸激酶则显示出较低活性, 这无疑揭示了醋酸梭菌在不同培养条件下的代谢差异取决于乙酰辅酶 A 的代谢通路。异养条件下乙酰辅酶 A 大部分流向细胞合成和高级产物(乙醇和丁酸), 自养条件下流向乙酸生成。本研究结果可以为合成气的生物利用及产乙酸菌的代谢通路调控提供一定的参考价值。

REFERENCES

- [1] 李婉麒, 杨凤娟, 贾德臣, 姜卫红, 顾阳. 合成气的生物利用与定向转化[J]. 化工进展, 2023, 42(1): 73-85.
LI WQ, YANG FJ, JIA DC, JIANG WH, GU Y. Biological utilization and conversion of syngas[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2023, 42(1): 73-85 (in Chinese).
- [2] 姚伦, 周雍进. 一碳化合物生物利用和转化研究进展[J]. 化工进展, 2023, 42(1): 16-29.
YAO L, ZHOU YJ. Progress in microbial utilization of one-carbon feedstocks for biomanufacturing[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2023, 42(1): 16-29 (in Chinese).
- [3] ARHIN SG, CESARO A, CAPUA FD, ESPOSITO G. Recent progress and challenges in biotechnological valorization of lignocellulosic materials: towards sustainable biofuels and platform chemicals synthesis[J]. Science of The Total Environment, 2023, 857: 159333.
- [4] SU W, LI XY, ZHANG HS, XING Y, LIU P, CAI CQ. Migration and transformation of heavy metals in hyperaccumulators during the thermal treatment: a review[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28: 47838-47855.
- [5] ZHANG Y, YUAN H, CAI SY, ZHANG YK, WANG DS, ZHANG WJ. Molecular transformation pathway and bioavailability of organic phosphorus in sewage sludge under hydrothermal treatment: importance of biopolymers interactions[J]. Journal of Cleaner Production, 2023, 385: 135746.
- [6] HU M, HU HY, YE ZH, TAN SQ, YIN K, CHEN Z, GUO DB, RONG HW, WANG JL, PAN ZY, HU ZT. A review on turning sewage sludge to value-added energy and materials via thermochemical conversion towards carbon neutrality[J]. Journal of Cleaner Production, 2022: 134657.
- [7] FANG SY, CAO WB, SHAO QQ, HUANG WX, WANG F, CHENG XS, CAO JS, LUO JY, WU Y. Reutilization of waste crawfish shell and sludge for efficient volatile fatty acids production by synchronously regulating the bioavailable substrates and microbial metabolic traits[J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 349: 131456.
- [8] 文志琼, 李煜真, 张金刚, 王菲菲, 马小清, 李福利. 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 ZQ, LI YZ, ZHANG ZG, WANG FF, MA XQ, LI FL. Progress on bio-fixation and utilization of CO₂ in acetogens driven by chemical energy[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(6): 1178-1190 (in Chinese).
- [9] 朱慧, 符波, 鲁帅领, 刘宏波, 刘和. 一株新型同型产乙酸菌 *Clostridium* sp. 的自养和异养生长特性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(11): 2320-2330.
ZHU H, FU B, LU SL, LIU HB, LIU H. Autotrophic and heterotrophic characteristics of a novel *acetogenic Clostridium* sp.[J]. Microbiology China, 2018, 45(11): 2320-2330 (in Chinese).
- [10] FERNÁNDEZ-BLANCO C, VEIGA MC, KENNES C. Efficient production of n-caproate from syngas by a co-culture of *Clostridium aceticum* and *Clostridium kluyveri*[J]. Journal of environmental management, 2022, 302: 113992.
- [11] ROBLES-IGLESIAS R, VEIGA MC, KENNES C. Sequential bioconversion of C1-gases (CO, CO₂, syngas) into lipids, through the carboxylic acid platform, with *Clostridium aceticum* and *Rhodospiridium toruloides*[J]. Journal of Environmental Management, 2023, 347: 119097.
- [12] ARSLAN K, VEIGA MC, KENNES C. Autotrophic (C1-gas) versus heterotrophic (fructose) accumulation of acetic acid and ethanol in *Clostridium aceticum*[J].

- Bioresource Technology, 2021, 337: 125485.
- [13] LI X, HENSON MA. Metabolic modeling of bacterial co-culture systems predicts enhanced carbon monoxide-to-butyrate conversion compared to monoculture systems[J]. Biochemical engineering journal, 2019, 151: 107338.
- [14] JIA DC, DENG WSY, HU P, JIANG WH, GU Y. Thermophilic *Moorella thermoacetica* as a platform microorganism for C1 gas utilization: physiology, engineering, and applications[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2023, 10(1): 61.
- [15] LIEW FE, NOGLE R, ABDALLA T, RASOR BJ, CANTER C, JENSEN RO, WANG L, STRUTZ J, CHIRANIA P, TISSERA SD, MUELLER AP, RUAN ZH, GAO A, TRAN L, ENGLE NL, BROMLEY JC, DANIELL J, CONRADO R, TSCHAPLINSKI TJ, GIANNONE RJ, et al. Carbon-negative production of acetone and isopropanol by gas fermentation at industrial pilot scale[J]. Nature biotechnology, 2022, 40(3): 335-344.
- [16] ZEPILLI M, CRISTIANI L, FERRETTI J, MAJONE M, VILLANO M. Acetogenic inoculum selection for acetate production from waste biomasses via thermal shock treatment[J]. Chemical Engineering Transactions, 2022, 92: 13-18.
- [17] MOON J, JAIN S, MÜLLER V, BASEN M. Homoacetogenic conversion of mannitol by the thermophilic acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui* requires external CO₂[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 571736.
- [18] XU WJ, LU XY, TANG XH, JIN X, YE ZF. Mechanism of quinone mediators modified polyurethane foam for enhanced nitrobenzene reduction and denitrification[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023: 131830.
- [19] GU X, LENG JT, ZHU JT, ZHANG K, ZHAO JQ, WU P, XING QY, TANG KJ, LI XL, HU B. Influence mechanism of C/N ratio on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process[J]. Bioresource Technology, 2022, 343: 126116.
- [20] WAN R, WANG L, CHEN YG, ZHENG X, CHEW JW, HUANG HN. Tetrabromobisphenol A (TBBPA) inhibits denitrification via regulating carbon metabolism to decrease electron donation and bacterial population[J]. Water research, 2019, 162: 190-199.
- [21] SHI LL, DU R, PENG YZ, LI YN. Successful establishment of partial denitrification by introducing hydrolytic acidification of slowly biodegradable organic matter[J]. Bioresource Technology, 2020, 315: 123887.
- [22] BAE JY, SONG Y, LEE H, SHIN J, JIN S, KANG S, CHO BK. Valorization of C1 gases to value-added chemicals using acetogenic biocatalysts[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 428: 131325.
- [23] BECK MH, FLAIZ M, BENGELSDORF FR, DÜRRE P. Induced heterologous expression of the arginine deiminase pathway promotes growth advantages in the strict anaerobe *Acetobacterium woodii*[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2020, 104(2): 687-699.
- [24] KATSYV A, MÜLLER V. Overcoming energetic barriers in acetogenic C1 conversion[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 621166.
- [25] MARTIN WF. Older than genes: the acetyl CoA pathway and origins[J]. Frontiers in microbiology, 2020, 11: 817.
- [26] TRISCHLER R, ROTH J, SORBARA MT, SCHLEGEL X, MÜLLER V. A functional Wood-Ljungdahl pathway devoid of a formate dehydrogenase in the gut acetogens *Blautia wexlerae*, *Blautia luti* and beyond[J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(7): 3111-3123.
- [27] RICCI L, AGOSTINO V, FINO D, RE A. Screening of gas substrate and medium effects on 2,3-Butanediol production with *C. ljungdahlii* and *C. autoethanogenum* aided by improved autotrophic cultivation technique[J]. Fermentation, 2021, 7(4): 264.
- [28] OLIVEIRA L, RÖHRENBACH S, HOLZMÜLLER V, WEUSTER-BOTZ D. Continuous sulfide supply enhanced autotrophic production of alcohols with *Clostridium ragsdalei*[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9(1): 15.
- [29] SCHWANDER L, BRABENDER M, MRNJAVAC N, WIMMER JLE, PREINER M, MARTIN WF. Serpentinization as the source of energy, electrons, organics, catalysts, nutrients and pH gradients for the origin of LUCA and life[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1257597.
- [30] TRIFUNOVIĆ D, BERGHAUS N, MÜLLER V. Growth of the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii* by

- dismutation of acetaldehyde to acetate and ethanol[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2020, 12(1): 58-62.
- [31] LEE H, BAE J, JIN S, KANG S, CHO BK. Engineering acetogenic bacteria for efficient one-carbon utilization[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 865168.
- [32] YANG CL, DONG LF, GAO YH, JIA P, DIAO QY. Engineering acetogens for biofuel production: from cellular biology to process improvement[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 151: 111563.
- [33] LITTY D, KREMP F, MÜLLER V. One substrate, many fates: different ways of methanol utilization in the acetogen *Acetobacterium woodii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2022, 24(7): 3124-3133.
- [34] WOOD JC, GONZALEZ-GARCIA RA, DAYGON D, TALBO G, PLAN MR, MARCELLIN E, VIRDIS B. Characterisation of acetogen formatrophic potential using *Eubacterium limosum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107: 4507-4518.
- [35] 谢丽, 杜诗云, 卜凡. 同型产乙酸菌研究进展及其环境生物技术应用[J]. *同济大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(1): 67-73, 108.
- XIE L, DU SY, BU F. Homoacetogen and its application in environmental biotechnology[J]. *Journal of Tongji University (Natural Science)*, 2018, 46(1): 67-73, 108 (in Chinese).
- [36] DAI ZJ, ZHU Y, DONG HJ, ZHAO CH, ZHANG YP, LI Y. Enforcing ATP hydrolysis enhanced anaerobic glycolysis and promoted solvent production in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20: 1-11.
- [37] 陈露, 刘丁玉, 汪保卫, 赵玉姣, 贾广韬, 陈涛, 王智文. 大肠杆菌乙酰辅酶A代谢调控及其应用研究进展[J]. *化工进展*, 2019, 38(9): 4218-4226.
- CHEN L, LIU DY, WANG BW, ZHAO YJ, JIA GT, CHEN T, WANG ZW. Advances in acetyl coenzyme A metabolic engineering with *Escherichia coli*[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2019, 38(9): 4218-4226 (in Chinese).