

# 生物电化学系统对运动发酵单胞菌代谢的影响

张家威<sup>1</sup>, 王亮<sup>2</sup>, 爱赛姆 克热尼<sup>1</sup>, 吴双双<sup>1</sup>, 刘晨光<sup>1</sup>

1 上海交通大学 生命科学技术学院 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室 教育部代谢与发育国际科学国际合作联合实验室, 上海 200240

2 大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034

张家威, 王亮, 爱赛姆 克热尼, 吴双双, 刘晨光. 生物电化学系统对运动发酵单胞菌代谢的影响. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2513-2522.

ZHANG JW, WANG L, KERENI A, WU SS, LIU CG. Effect of bio-electrochemical system on the metabolic changes of *Zymomonas mobilis*. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2513-2522.

**摘 要:** 生物电化学系统能促进微生物与电极间的相互作用, 从而改变微生物的代谢状态。本工作作为研究运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 在电环境中的代谢表现, 在外接 3 V 电源的 H 型电化学发酵装置中测试了其发酵效能。结果表明, 相比于无电压的对照, 阳极甘油产量上升 24%, 阴极葡萄糖消耗上升 16%, 产物乙醇和琥珀酸的产量也分别上升 13% 和 8%。转录组分析表明, 代谢物的显著改变归因于电环境导致的有机酸代谢、氧化还原平衡、电子传递等通路的改变。从表达差异显著的基因中挑选了代表胞内氧化还原平衡、生物膜形成和电子传递的 3 个基因 *ZMO1060* (编码超氧化物歧化酶)、*ZMO0401* (编码二鸟苷酸磷酸二酯酶) 和 *ZMO1819* (编码固氮蛋白) 进行验证, 结果表明过表达 *ZMO1060* 和 *ZMO1819* 能够更显著地改变生物电化学系统中 *Z. mobilis* 的代谢。本工作为应用生物电化学系统调控微生物代谢物生产提供了参考。

**关键词:** 运动发酵单胞菌; 生物电化学系统; 转录组; 代谢; 电子传递

**Received:** April 15, 2021; **Accepted:** May 21, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2018YFB1501401); National Natural Science Foundation of China (21978167); Shanghai Natural Science Foundation Project, China (18ZR1420700, 19160745300)

**Corresponding author:** LIU Chenguang. Tel: +86-21-34205125; E-mail: cg.liu@sjtu.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2018YFB1501401); 国家自然科学基金 (21978167); 上海市自然科学基金 (18ZR1420700, 19160745300)

# Effect of bio-electrochemical system on the metabolic changes of *Zymomonas mobilis*

ZHANG Jiawei<sup>1</sup>, WANG Liang<sup>2</sup>, Kereni Aisaimu<sup>1</sup>, WU Shuangshuang<sup>1</sup>, LIU Chenguang<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

**Abstract:** A bio-electrochemical system can promote the interaction between microorganism and electrode and consequently change cellular metabolism. To investigate the metabolic performance of *Zymomonas mobilis* in the bio-electrochemical system, we applied an H-type bio-electrochemical reactor to control *Z. mobilis* fermentation under 3 V. Compared with the control group without applied voltage, the glycerol in the anode chamber increased by 24%, while the glucose consumption in the cathode chamber increased by 16%, and the ethanol and succinic acid concentration increased by 13% and 8%, respectively. Transcriptomic analysis revealed that the pathways related to organic acid metabolism, redox balance, and electron transfer played roles in metabolic changes. Three significantly differentially expressed genes, *ZMO1060* (superoxide dismutase), *ZMO0401* (diguanylate cyclase), and *ZMO1819* (nitrogen fixation protein), were selected to verify their functions in the bio-electrochemical system. Overexpression of *ZMO1060* and *ZMO1819* improved the electrochemical activity of *Z. mobilis*. This study provides insights into the microbial metabolism regulated by the bio-electrochemical system.

**Keywords:** *Zymomonas mobilis*; bio-electrochemical system; transcriptome; metabolism; electron transport

生物电化学系统 (bio-electrochemical system, BES) 被用于研究微生物与电极的相互作用, 包括微生物与电极间的外部电子运输机制<sup>[1]</sup>、微生物得失电子对代谢产生的影响<sup>[2]</sup>等方面。微生物电合成 (microbial electrolysis synthesis, MES) 是一种新型的发酵过程, 通过促进电子转移改变细胞内氧化还原状态来引发物质代谢的改变<sup>[3]</sup>, 进而促进微生物增殖, 优化碳利用效率, 提高产物生产选择性, 减少氧化还原试剂的添加<sup>[4]</sup>。目前生物电化学系统的研究热点主要集中在二氧化碳固定<sup>[5]</sup>、高附加值产物合成等方面<sup>[6-7]</sup>, 例如实现手性醇、手性胺的定向合成<sup>[8-9]</sup>或碳链的延长<sup>[10]</sup>等。

MES 能够将风能、太阳能等不稳定能量转化为稳定的化学能, 具有可持续发展的前景。但对其机制的认识仍有较大探究空间。近年来 MES 的研究集中在跨膜电子传递蛋白<sup>[11]</sup>、生物膜<sup>[12]</sup>、电极材料<sup>[13]</sup>、菌株电化学活性强化<sup>[14]</sup>等。研究最广泛的电活性模式菌株为希瓦氏菌 (*Shewanella oneidensis*) 和硫还原地杆菌 (*Geobacter sulfurreducens*)<sup>[15-16]</sup>, 然而这些菌株的底物谱窄、生长缓慢、产物附加值低, 限制了其应用, 因此寻找具有电活性且发酵性能优良的菌种尤为重要。

运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 具有优良的乙醇发酵性能, 由于特殊的 ED 代谢

途径减少了底物向生物质的积累,因此其乙醇产率接近理论上限。*Z. mobilis* 是兼性厌氧菌,EMP 途径中的磷酸果糖激酶、PPP 途径中的磷酸葡萄糖酸脱氢酶和转醛酶、TCA 循环中的 2-氧戊二酸脱氢酶复合物和苹果酸脱氢酶均不存在<sup>[17]</sup>。而且运动发酵单胞菌细胞膜上的呼吸链带有分支<sup>[18]</sup>。尽管代谢中 NADH 主要的消耗途径是乙醇发酵及呼吸作用,但是该菌的呼吸链是低能量耦合类型的,这意味着终点氧化酶的功能不会仅局限于氧化磷酸化和 ATP 的生产<sup>[19]</sup>。另外,将 *Z. mobilis* 培养环境从无氧到有氧的转变不会影响其生物量<sup>[20]</sup>。这意味着氧气不是其所必需的电子受体,可能存在其他替代电子受体。不完整的呼吸链造成了低能量耦合,使其具有潜在的电话性,理论上能够实现电子在胞内外的转移。

运动发酵单胞菌的底物谱更广泛,底物包括葡萄糖等常见单糖和二糖。其不仅具有更高的代谢潜力,还具有食品安全性。尽管电子传递能力弱于电话性模式菌株,但作为新型底盘微生物,其在电化学方向的研究具有重要意义。

本研究在 H 型电化学装置中考察运动发酵单胞菌的电化学发酵性能。通过转录组分析寻找导致代谢物产量变化的原因,并挑选相关基因进行验证。以期解析电环境影响运动发酵单胞菌代谢的机制,并依此强化菌株的电话性与发酵性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株培养

采用运动发酵单胞菌 ZM4 (ATCC 31821) 作为实验用菌株。先将冻存的菌株划线在 RMG2 (10 g/L 酵母粉、2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及 20 g/L 葡萄糖) 的固体培养基上 30 °C 培养 72 h, 随后使用接种环挑取若干菌落接种在 100 mL 的 RMG2 种子培养液中, 30 °C 静置培养 18 h。之

后将生物量调整至  $OD_{600}=1.5$ , 取出 14 mL 接种到 126 mL 的 RMG10 (10 g/L 酵母粉、2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及 100 g/L 葡萄糖) 发酵培养液中。30 °C 静置培养 60 h。

### 1.2 电化学发酵装置搭建

电化学发酵装置采用 H 型双腔室的构造, 单腔室有效工作体积 140 mL, 加入 RMG10 发酵培养基。腔室间由 Nafion117 质子膜 (杜邦公司) 隔离。使用前质子膜在 1 mol/L HCl 中浸泡 24 h 后用无菌蒸馏水洗涤。电极为 2.5 cm×2.5 cm 碳布 (中国台湾碳能), 通过导线与恒压电源 (麦威 MPD-3003S) 的正负极相连, 电压 3 V。将装置放在 30 °C 恒温培养箱中静置培养。智能信号处理器 (MR9270S<sup>+</sup>, Zoxelect) 串联入电路, 每隔 10 min 自动记录一次电流数据。

### 1.3 生物量及代谢物检测

生物量检测: 取 0.2 mL 发酵液用全自动酶标仪测定  $OD_{600}$ 。代谢物检测: 在 0–60 h 每隔 6 h 取样测量, 取电化学装置阳、阴极腔中的发酵液 1 mL, 8 000 r/min 离心 2 min 并收集上清液。上清液中的葡萄糖、乙醇、琥珀酸、甘油等物质的浓度使用高效液相色谱 (HPLC Waters 1525) 测量分析, 采用色谱柱的型号是 Aminex HPX-87 H (300 mm×7.8 mm, Bio-Rad), 流动相为 4 mmol/L 的硫酸, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 65 °C。相差检测仪的型号为 Waters 2414, 检测器温度为 50 °C。

### 1.4 转录组检测与分析

在 12 h 和 30 h 取样运动发酵单胞菌, 低温离心收集菌体, 转录组委托北京诺禾致源科技股份有限公司检测。RNA 提取与检测使用 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) 试剂盒, 再使用 Illumina® 的 NEBNext® Ultra™ RNA 文库制备试剂盒生成测序文库。库检合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据

量的需求进行 Illumina 测序, 并使用 Bowtie2 软件对过滤后的测序序列进行基因组定位分析。用 Rockhopper 软件将测序结果根据参考基因组进行组装, 并与已注释的基因模型进行比较。基因表达水平定量使用 HTSeq v0.6.1 计算, 用 DESeq2 R 包进行差异表达分析, 通过 GOseq R 包软件实现差异表达基因的 GO 富集分析<sup>[21]</sup>。

### 1.5 菌株构建

以 ZM4 的基因组 DNA 为模板, 扩增所选基因 (*ZMO1060*、*ZMO1819*) 的 DNA 序列。纯化的扩增片段与甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (gap) 的天然启动子通过同源重组连接到线性化载体 pEZ15-Asp 中。通过 PCR、限制性内切酶分析和 DNA 测序对新构建的质粒进行了鉴定和确认。这些载体通过设置在 25  $\mu$ F、1.60 kV 和 2 000  $\Omega$  的 Gene Pulser®II 电穿孔器 (Bio-Rad) 通过电穿孔转化进入细胞, 结果通过测序验证。ZMO0401 敲除菌株来源于同课题组已发表的研究<sup>[22]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 运动发酵单胞菌的电化学调控

在 3 V 电压下 ZM4 的生长曲线与电流变化如图 1 所示。电流与细胞生长具有明显的关联, 电流在对数生长期逐渐达到最大值, 在稳定期后开始逐渐下降。推测随着生物量的累积, 发酵体系中可传导电子的载体或附着在碳布上的细菌增多, 内部电阻下降; 而在达到稳定期后, 菌体活力下降, 内阻增大, 电流也逐渐降低。

考察发酵过程中的代谢物变化情况 (图 2), 发现阳极组糖耗、乙醇产量、琥珀酸产量低于阴极组, 但甘油产量高于阴极组。其中甘油是糖酵解途径中的中间代谢产物, 由 NADH 依赖型的 3-磷酸甘油脱氢酶催化而成, 在酵母代谢中, 甘油的合成途径主要是用以平衡胞内 NADH

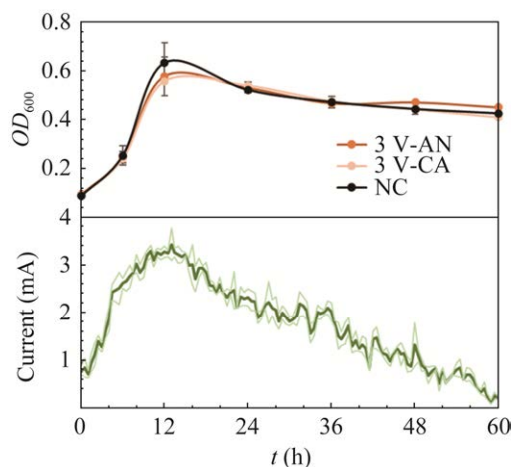


图1 电化学发酵下运动发酵单胞菌 ZM4 的生长曲线与装置电流变化 电流深绿线为平均值, 浅绿线为误差线

Figure 1 Growth profile of *Z. mobilis* under electrochemical fermentation and the current change of the device. AN: anode; CA: cathode; NC: negative control.

和  $\text{NAD}^+$ <sup>[23]</sup>, 以此推测运动发酵单胞菌中, 阳极组形成的氧化环境导致了 NADH 和  $\text{NAD}^+$  比例严重失调, 从而产生了更多的甘油。计算得率后再比较, 甘油在阳极组的合成增加了 24.4%, 得率增加了 49.4%。琥珀酸的合成在阴极组增加了 8.4%, 阳极组减少 6.3%, 但是其得率相反, 在阴极组减少了 6.4%, 在阳极组增加了 12.5%。这说明胞内的氧化还原环境变化影响了代谢物的产量。

### 2.2 电调控下转录组变化

通过基因转录分析进一步探究电化学影响代谢的机制。分别收集了细胞生长对数期 (12 h) 和稳定期 (30 h) 的阳、阴极组和不通电的对照组的运动发酵单胞菌进行转录组测序, 取  $|\log_2 \text{fold change}| > 0.5$ ,  $p_{\text{adj}} < 0.05$  的基因进行分析 (图 3A)。在 12 h, 阳极组和阴极组对比于对照组显著变化的基因数量为 91 个和 116 个, 在 30 h 时数量增加到 383 个和 311 个。聚类显示对数生

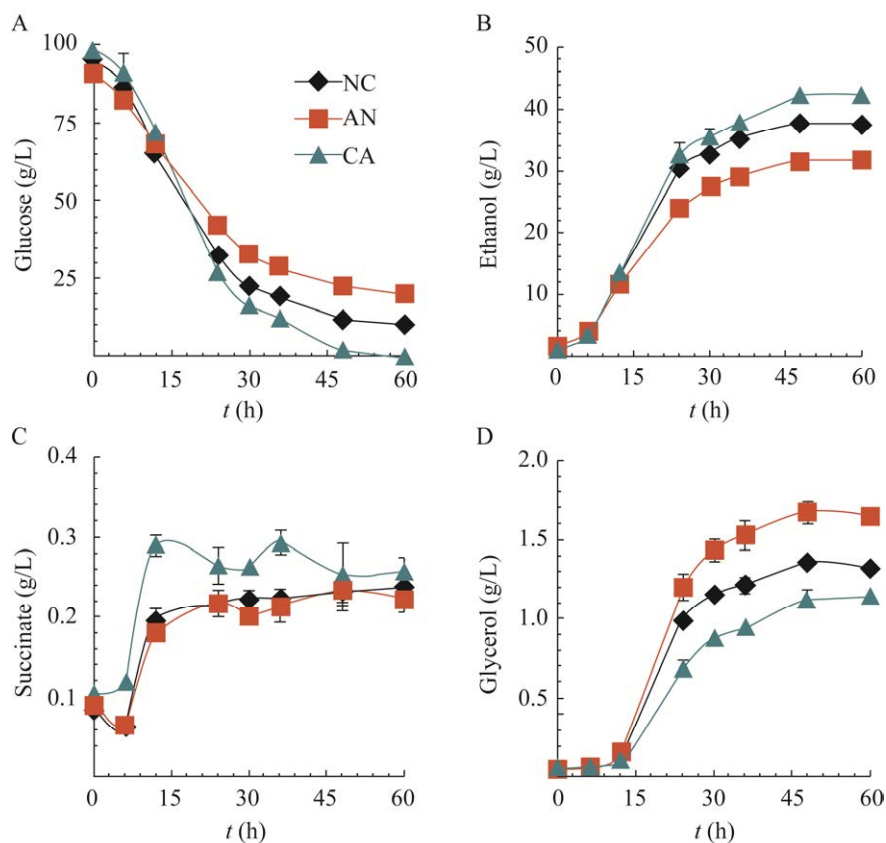


图 2 发酵过程中阳极腔 (AN)、阴极腔 (CA)、对照组 (NC) 的葡萄糖、乙醇、琥珀酸、甘油浓度变化

Figure 2 Concentrations of glucose, ethanol, succinic acid and glycerol in the anode chamber (AN), cathode chamber (CA) and control group (NC) during fermentation.

长期阴阳极组之间的转录变化相似,说明生物电化学系统在对数期对代谢影响较小。而稳定期的阴极组与对照组在聚类上更接近,因为阳极组产生的氧化胁迫,使得阳极组的转录变化更大。但从整体上来说,电化学控制下的 ZM4 转录组发生的变化较小,与此前的研究相似<sup>[24]</sup>。

电化学调控对 ZM4 转录组的差异影响远小于 ZM4 本身在不同发酵生长阶段的差异,并且电化学调控对转录组的影响主要集中在代谢、氧化还原调控、膜相关蛋白方面。图 3B 展

示了 30 h 的阳极组、阴极组相比于对照组基因差异的 GO 分析部分结果,选取了阴阳极两组中至少有一组变动基因总数目大于 20 的分类类别进行展示。表达基因的变化规律基本与生长代谢变化对应,阳极组的变化基因数目大于阴极组。变化基因数最多的几个聚类为细胞代谢、有机酸代谢等,表明电化学调控对细胞代谢相关基因的影响最大。糖耗、乙醇、琥珀酸和甘油等的合成差异与相关基因表达差异有关,也观察到氧化还原活性分类中的基因也受到了较大影响。



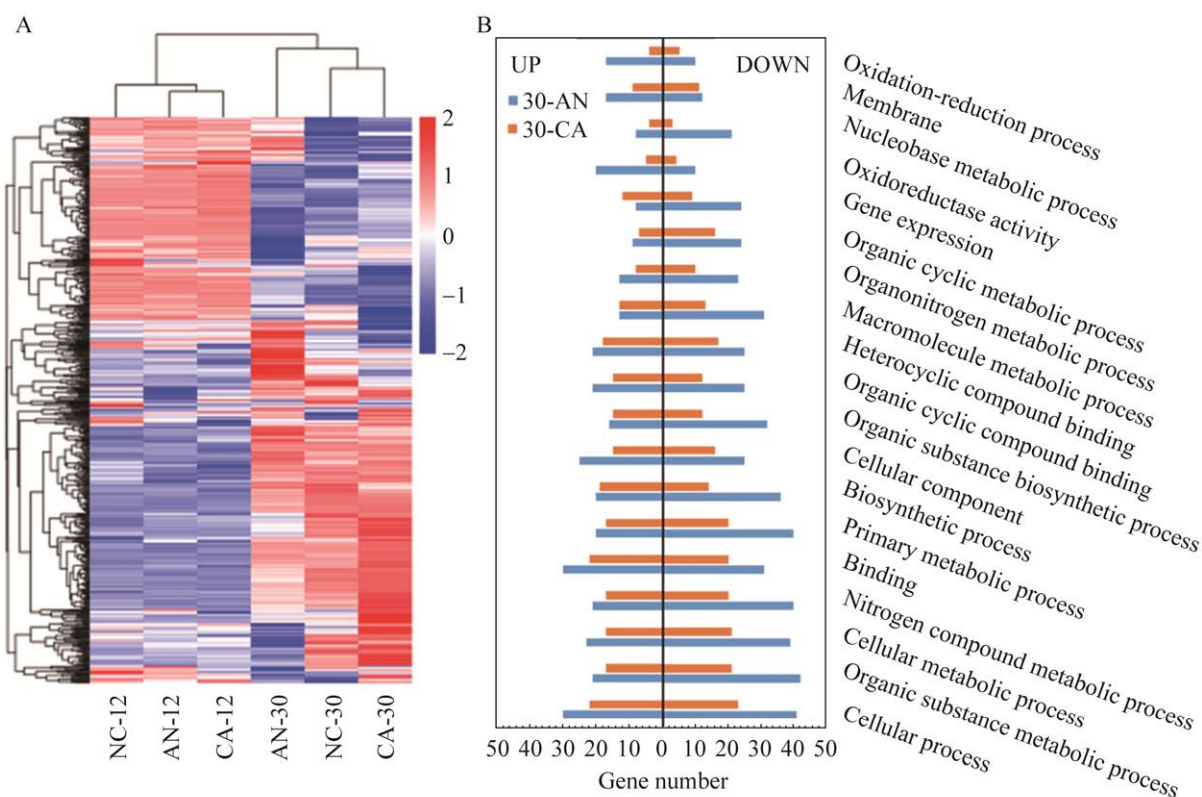


图3 电化学生物系统中细胞的转录组差异 A: 12 h 与 30 h 的对照 (NC)、阳极组 (AN)、阴极组 (CA) 基因表达热图; B: 差异基因功能聚类 GO 富集分析

Figure 3 Transcriptome differences of cells in electrochemical system. (A) Gene expression heatmap of control (NC), anode (AN) and cathode (CA) groups at 12 h and 30 h. (B) Functional clustering and GO enrichment analysis.

考察表达差异幅度大于两倍的基因, 阳极组主要是转运与氧化还原调控相关基因受影响较大, 而阴极组主要是转运与合成代谢相关基因受影响。阳极组中 20 个 tRNA 相关基因大幅下调, 说明阳极组的氧化刺激使得胞内 tRNA 的功能工作效率下降, 进一步影响了代谢速率, 解释了其为何糖耗速率、乙醇生成速率会变慢。而 9 个与氧化还原调控相关基因上调, 说明氧化环境下 ZM4 会主动维持胞内的氧化还原平衡<sup>[25-26]</sup>。阴极组中一共有 14 个基因的表达下调了两倍以上, 其中 9 个与转运相关, 证明了转运系统对电刺激较为敏感。而阴极组上调倍数大于 2 的 24 个基因中, 有与膜结构、细胞壁合

成、细胞运动性等相关的基因。此外, 阴极组代谢相关的若干基因表达有所上调, 可能因为 ZM4 的代谢表达对低氧化还原电位有一定的偏好, 还原性环境下, ZM4 的代谢能力、氧化耐受性都有一定提升<sup>[27-28]</sup>。

电子传递相关基因的转录上调显著, GO 富集分析表明 ZM4 中的固氮蛋白表达系统对电刺激敏感且有正反馈。其中固氮基因 *nifZ* 在阳极组与阴极组的表达都有最高的上调倍数, 此前研究发现 *nifZ* 在维氏固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 与克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 中均参与了硫铁相关蛋白 MoFe 蛋白的成熟<sup>[29-30]</sup>, 推测在运动发酵单胞菌中发挥了类似的功能,

可以促进铁硫簇的合成与组装,而铁硫簇由于具有较高的电子传递性能,因此其数量活性直接影响胞内的电子传递效率。

结合运动发酵单胞菌特殊的代谢模式,将电化学发酵 30 h 的两极与对照组的转录组数据进行对比,关注代谢物的相关酶表达情况(表 1)。ED 途径中葡萄糖通过三步反应转变为 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸(KDPG),KDPG 再经醛缩酶催化裂解为丙酮酸与 3-磷酸甘油醛。碳在 3-磷酸甘油醛流向副产物甘油的途径中,催化磷酸甘油酯为甘油酮的甘油激酶、催化甘油酮为甘油的甘油脱氢酶的基因转录在阳极组相比于对照组均有较大幅度的上调,导致了在阳极组产物较多流向甘油,甘油的得率大幅上升;而阴极组则因为这些酶的转录情况相反,甘油的得率与产量下降。碳继续从 KDPG 流向丙酮酸后,从丙酮酸产生副产物乳酸的途径上,L-乳酸脱氢酶转录表达在以阴极组上升,阳极组下调,这也导致了发酵中乳酸在阴极组累积更多,阳极组更少的现象。丙酮酸转化为乙醛后,主要的碳流向了乙醇,而丙酮酸到乙醇中的酶转录水平在阴极组有高有低,导致流向乙

醇的碳基本没有变化,说明了 ZM4 中的 ED 途径生产乙醇较为稳定,也解释了为何乙醇在两组中得率都没有太大变化。乙酰辅酶 A 后的 TCA 循环中,发现在阴极组合成琥珀酸的琥珀酸硫激酶的转录上调,而将琥珀酸催化为富马酸的琥珀酸脱氢酶转录下调,这就导致了 TCA 中间产物琥珀酸在阴极组的累积。

### 2.3 相关基因验证

为了验证转录组的检测结果并通过基因改造强化运动发酵单胞菌的电子传递能力,本研究从转录组结果中挑选了 3 个变化显著且具有研究意义的基因(*ZMO1060*、*ZMO0401*、*ZMO1819*)进行过表达或敲除验证,以期加强 *Z. mobilis* 的电活性。它们在发酵 30 h 的阳极组/阴极组转录变化分别为 3.41/1.10、0.56/0.35、4.86/2.86。

*ZMO1060* 编码铁锰家族的超氧化物歧化酶,调节胞内氧化还原平衡应对氧化胁迫<sup>[31]</sup>。*ZMO0401* 编码二鸟苷酸磷酸二酯酶,降解胞内第二信使 c-di-GMP,从而影响生物膜形态<sup>[15]</sup>。细胞在电极上的絮凝附着会影响细胞电极间的电子传递<sup>[32]</sup>。*ZMO1819* 编码固氮蛋白 NifZ,推测可能与铁硫簇关联的电子传递相关。挑选的这

表 1 阳极组和阴极组关键代谢路径的酶的转录变化水平

Table 1 Transcriptional changes of genes involved in key metabolic pathways in anode chamber (AN) and cathode chamber (CA)

Metabolite	Key pathways	Transcriptional changes of the enzyme-encoding genes	
		AN	CA
GLY	GAP→GOLP	1.219	0.960
	GOLP→GOL	1.503	0.940
	GOL→GLY	1.253	0.833
LAC	PYR→LAC	0.594	1.359
ETH	PYR→HThPP	0.983	0.796
	HThPP→ALD	0.753	1.213
	ALD→ETH	0.671	0.942
SUC	SuCoA→SUC	0.852	1.301
	SUC→FUM	1.027	0.782

GAP: glyceraldehyde-3P; GOLP: glycero-3P; GOL: glycero-3P; GLY: glycerol; PYR: pyruvate; LAC: lactate; HThPP: 2-hydroxyethyl-ThPP; ALD: acetaldehyde; ETH: ethanol; SuCoA: succinyl-CoA; SUC: succinate; FUM: fumarate.

3 个基因分别代表了影响细菌电化学性质中较为重要的胞内氧化还原平衡、生物膜形成、电子传递 3 个重要相关因素。

将改造菌与野生型菌株进行电化学发酵(图 4),发现改造菌株相比野生型代谢物改变量更为明显,这体现出菌株对电化学环境更为敏感,具有更好的电活性。氧还平衡加强型菌株 ZM4-ZMO1060 对阴极组糖耗增加、乙醇琥珀酸产量增加有明显作用,这可能是因为糖通向乙醇的路线中,较为依赖还原状态,而超氧化物歧化酶能清除细胞代谢内产生的氧自由基,维持胞内的还原状态。电子传递加强型菌株 ZM4-ZMO1819 则对在阳极组增加甘油的产量有促进作用,推测铁硫簇参与电子转移更容易影响甘油的代谢路径。生物膜加强型菌株 ZM4-ΔZMO0401 在碳布上附着了更多的生物量(阳极组增加 132%,阴极组增加 37%),证明了其增强生物膜的有效性,但是电活性促进

作用并不明显,可能是在本装置中电子从电极传递到细胞的电阻只占整体装置电阻的一小部分,故生物膜加强所减小的电子传递阻力并不能使得电子传递效率有较大提升。对于 *Z. mobilis* 等非常规电活性微生物来说,由于对胞外电子传递机制的了解有限,难以进一步提高其电子传递效率。开发有效的基因改造策略是提高微生物电活性的重要研究方向。

### 3 结论

本研究发现,生物电化学系统显著地影响了运动发酵单胞菌的代谢物生产,阳极促进了甘油生产,阴极促进了葡萄糖消耗以及乙醇、琥珀酸的生成。转录组数据展现出有机酸代谢通路、氧化还原平衡、电子传递等功能受到了电环境的影响。从中挑选 ZMO1060 (编码超氧化物歧化酶)、ZMO0401 (编码二鸟苷酸磷酸二酯酶)、ZMO1819 (编码固氮蛋白)基因进行验证,其中过表达 ZMO1060、ZMO1819 提升了运动发酵单胞菌的电化学活性。该工作不仅探究了运动发酵单胞菌在生物电化学系统中的代谢变化机制并加以验证,也为将生物电化学反应系统应用于传统微生物发酵领域提供了参考。

### REFERENCES

- [1] Light SH, Su L, Rivera-Lugo R, et al. A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*, 2018, 562(7725): 140-144.
- [2] Sevdá S, Yuan HY, He Z, et al. Microbial desalination cells as a versatile technology: functions, optimization and prospective. *Desalination*, 2015, 371: 9-17.
- [3] Gong ZY, Yu H, Zhang JQ, et al. Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bi-directional extracellular electron transfer. *Synth Syst Biotechnol*, 2020, 5(4): 304-313.
- [4] Schievano A, Pepé Sciarria T, Vanbroekhoven K, et al. Electro-fermentation-merging electrochemistry with

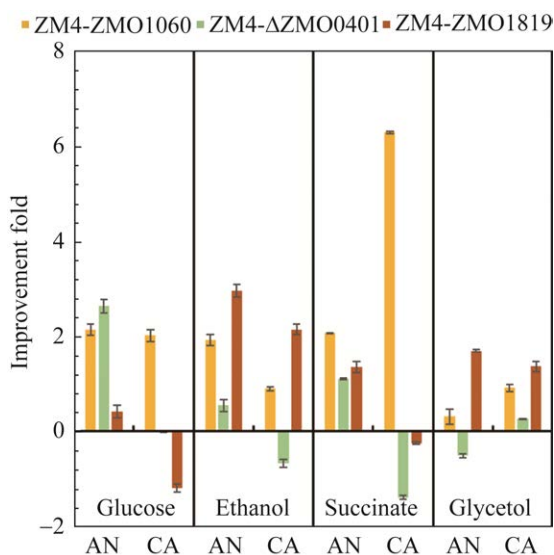


图 4 改造菌株相比于野生型电化学发酵下的底物消耗及产物合成的提升倍数

Figure 4 Improvement of substrate consumption and product synthesis (modified strains vs. wild type) during electrochemical fermentation. Anode chamber (AN), cathode chamber (CA).



- fermentation in industrial applications. *Trends Biotechnol*, 2016, 34(11): 866-878.
- [5] Nevin KP, Woodard TL, Franks AE, et al. Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *mBio*, 2010, 1(2): e00103-e00110.
- [6] Zhao Y, Cao W, Wang Z, et al. Enhanced succinic acid production from corn cob hydrolysate by microbial electrolysis cells. *Bioresour Technol*, 2016, 202: 152-157.
- [7] Alkotaini B, Abdellaoui S, Hasan K, et al. Sustainable bioelectrosynthesis of the bioplastic polyhydroxybutyrate: overcoming substrate requirement for NADH regeneration. *ACS Sustain Chem Eng*, 2018, 6(4): 4909-4915.
- [8] Mayr JC, Grosch JH, Hartmann L, et al. Resting *Escherichia coli* as chassis for microbial electrosynthesis: production of chiral alcohols. *ChemSusChem*, 2019, 12(8): 1631-1634.
- [9] Chen H, Cai R, Patel J, et al. Upgraded bioelectrocatalytic N<sub>2</sub> fixation: from N<sub>2</sub> to chiral amine intermediates. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(12): 4963-4971.
- [10] Coma M, Vilchez-Vargas R, Roume H, et al. Product diversity linked to substrate usage in chain elongation by mixed-culture fermentation. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(12): 6467-6476.
- [11] Gomes FO, Maia LB, Cordas C, et al. Electroanalytical characterization of the direct *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* nitric oxide reductase-catalysed nitric oxide and dioxygen reduction. *Bioelectrochemistry*, 2019, 125: 8-14.
- [12] Champigneux P, Renault-Sentenac C, Bourrier D, et al. Effect of surface roughness, porosity and roughened micro-pillar structures on the early formation of microbial anodes. *Bioelectrochemistry*, 2019, 128: 17-29.
- [13] Fang X, Kalathil S, Divitini G, et al. A three-dimensional hybrid electrode with electroactive microbes for efficient electrogenesis and chemical synthesis. *PNAS*, 2020, 117(9): 5074-5080.
- [14] Chen S, Fang Y, Jing X, et al. Enhanced electrosynthesis performance of *Moorella thermoautotrophica* by improving cell permeability. *Bioelectrochemistry*, 2018, 121: 151-159.
- [15] Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, et al. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(8): 592-603.
- [16] Lovley DR, Ueki T, Zhang T, et al. *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. *Adv Microb Physiol*, 2011, 59: 1-100.
- [17] Seo JS, Chong H, Park HS, et al. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(1): 63-68.
- [18] Balodite E, Strazdina I, Galinina N, et al. Structure of the *Zymomonas mobilis* respiratory chain: oxygen affinity of electron transport and the role of cytochrome c peroxidase. *Microbiology (Reading)*, 2014, 160(pt 9): 2045-2052.
- [19] Galinina N, Lasa Z, Strazdina I, et al. Effect of ADH II deficiency on the intracellular redox homeostasis in *Zymomonas mobilis*. *Sci World J*, 2012, 2012: 742610.
- [20] Rutkis R, Strazdina I, Balodite E, et al. The low energy-coupling respiration in *Zymomonas mobilis* accelerates flux in the entner-doudoroff pathway. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153866.
- [21] Garber M, Grabherr MG, Guttman M, et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods*, 2011, 8(6): 469-477.
- [22] 夏娟. 运动发酵单胞菌 ZM401 自絮凝的分子机理[D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- Xia J. Molecular mechanism underlying the self-flocculation of *Zymomonas mobilis* ZM401[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2019 (in Chinese).
- [23] Valadi A, Granath K, Gustafsson L, et al. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J Biological Chem*, 2004, 279(38):39677-39685.
- [24] Harrington TD, Mohamed A, Tran VN, et al. Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*. *Bioresour Technol*, 2015, 195: 57-65.
- [25] Yang J, Kim HE, Jung YH, et al. Zmo0994, a novel

- LEA-like protein from *Zymomonas mobilis*, increases multi-abiotic stress tolerance in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 151.
- [26] Fuchino K, Kalnenieks U, Rutkis R, et al. Metabolic profiling of glucose-fed metabolically active resting *Zymomonas mobilis* strains. *Metabolites*, 2020, 10(3): 81.
- [27] Chen LJ, Wu YD, Xue C, et al. Improving fructose utilization and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* via extracellular redox potential regulation and intracellular metabolite analysis. *Biotechnol J*, 2017, 12(10):
- [28] Li K, Xia J, Mehmood MA, et al. Extracellular redox potential regulation improves yeast tolerance to furfural. *Chem Eng Sci*, 2019, 196: 54-63.
- [29] Jimenez-Vicente E, Yang ZY, Martin Del Campo JS, et al. The NifZ accessory protein has an equivalent function in maturation of both nitrogenase MoFe protein P-clusters. *J Biol Chem*, 2019, 294(16): 6204-6213.
- [30] Paul W, Merrick M. The roles of the *nifW*, *nifZ* and *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. *Eur J Biochem*, 1989, 178(3): 675-682.
- [31] Loftie-Eaton W, Taylor M, Horne K, et al. Balancing redox cofactor generation and ATP synthesis: key microaerobic responses in thermophilic fermentations. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(4): 1057-1065.
- [32] Wagner RC, Porter-Gill S, Logan BE. Immobilization of anode-attached microbes in a microbial fuel cell. *AMB Express*, 2012, 2(1): 2.

(本文责编 郝丽芳)