

АЦЕТОГЕНЫ: БИОХИМИЯ, ЭНЕРГЕТИКА, ГЕНЕТИКА, БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

© 2021 г. В. Г. Дебабов*

ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

*e-mail: debabov13@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 25.01.2021 г.

Принята к публикации 25.01.2021 г.

Ацетогены – это анаэробные грамположительные бактерии, способные к росту на газовых субстратах – CO_2 , CO , H_2 . Отличительной особенностью этих бактерий служит биохимический путь восстановления CO_2 до ацетил CoA, называемый ацетил-CoA восстановительный путь или путь Вуда–Льонгдала (Wood Ljungdahl Pathway, WLP). Это единственный путь фиксации CO_2 , сопряженный с запасанием энергии. Вследствие эффективной нефотосинтетической фиксации двуокиси углерода ацетогены могут служить платформой для получения биотоплива и химикатов в будущей экономике, основанной на возобновляемой энергии и ресурсах. Недостатком ацетогенов, растущих на газовых субстратах, является низкая энергетическая обеспеченность и ограниченность синтезируемых конечных метаболитов, главным образом, уксусной кислоты и этанола, и в небольших количествах бутанола и масляной кислоты. Ацетогены обладают способностью к гетеротрофному росту на многих субстратах – сахарах, лактате, спиртах. Перспективным направлением увеличения энергообеспеченности процессов является миксотрофия – одновременное использование разных субстратов ацетогенами. Как для успешного сопряжения различных метаболических путей, так и для расширения репертуара синтезируемых соединений необходимо использование методов метаболической инженерии. В последние годы генетические инструменты для преобразования геномов ацетогенов существенно усовершенствованы. Данный обзор рассматривает современное состояние биохимии, энергетики, генетики ацетогенов и их биотехнологический потенциал.

Ключевые слова: ацетогены, CO_2 -фиксация, путь Wood–Ljungdahl, электронная бифуркация, генетические инструменты, метаболическая инженерия, биотопливо, хранение водорода

DOI: 10.31857/S0026365621030022

ВВЕДЕНИЕ

Ацетогены – это анаэробные грамположительные бактерии, главным образом, филы *Firmicutes*, представленные более чем 20 родами (Darke et al., 2008, 2013). Ацетогены растут автотрофно на газовых субстратах (CO_2 , CO , H_2), и при этом основным продуктом метаболизма оказывается уксусная кислота (ацетат), что и послужило основанием для их названия. Значительная и наиболее изученная часть ацетогенов относится к роду *Clostridia* (Latif et al., 2014). Фиксацию двуокиси углерода ацетогены осуществляют через ацетил-CoA восстановительный путь, который также называется путем Вуда–Льонгдала (Wood–Ljungdahl Pathway или сокращенно WLP) (Rogsdale, Pierce, 2008). Отличительной чертой ацетогенов является то, что фиксация CO_2 у них сочетается с накоплением энергии, что и позволяет им осуществлять литотрофный рост.

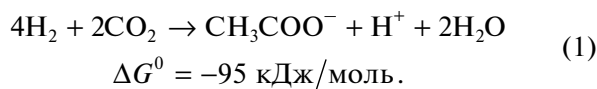
Большинство ацетогенов способны к гетеротрофному росту на разнообразных субстратах (сахара, спирты, лактат). Уникальная способность к фиксации CO_2 и метаболическая гибкость способствовали широкому распространению ацетогенов в природе. Они широко представлены во многих анаэробных экологических нишах, таких как донные отложения морей и пресных водоемов, метаногенные сообщества, горячие источники и т.д. По некоторым оценкам, ацетогены ежегодно фиксируют до 10 млрд т CO_2 (Rogsdale, 2008). Среди ацетогенов встречаются как мезофилы, так и термофилы (Basen, Müller, 2017). В последние годы показано, что способностью к фиксации CO_2 обладают и некоторые археи (Rogsdale, 2008; He et al., 2016). Большая часть фундаментальных исследований и попыток практического применения выполнена на ограниченном числе представителей ацетогенов, главным образом, это

Clostridium ljungdahlii, *C. autoethanogenum*, *Acetobacterium woodii*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*.

ПУТЬ ВУДА–ЛЮНГДАЛА (WLP)

Используя путь Вуда–Люнгдала ацетогены способны синтезировать ацетил-СоА из двух молекул CO_2 , используя в качестве восстановителя молекулярный водород. На сегодня известно 6 различных биохимических путей биологической фиксации CO_2 (Fast et al., 2012), но только ацетогены способны одновременно с фиксацией CO_2 накапливать энергию. В отличие от других путей фиксации CO_2 , WLP – линейный путь, состоящий из двух ветвей – метильной и карбонильной (рис. 1). В метильной ветви CO_2 восстанавливается до формиата с помощью фермента формиатдегидрогеназы. В качестве восстановителя в этой реакции используется NADPH. Далее формильная группа связывается с тетрагидрофолатом с образованием формилтетрагидрофолата. Эта реакция требует гидролиза 1 молекулы АТФ. Далее через ряд последовательных реакций формильная группа восстанавливается до метильной (метилтетрагидрофолат). Метильная группа с метилтетрагидрофолата переносится на специальный белок-переносчик, содержащий железосерные кластеры и кобаламин (Corrinoid Iron Sulfur Protein – FeSP) (Rogsdale, 2008). В карбонильной ветви молекула CO_2 восстанавливается до СО с помощью фермента карбонмонооксид дегидрогеназы ацетил-СоА синтетазы (CoDH/Acs). Это ключевой фермент всего WLP пути. Далее CoDH/Acs катализирует реакцию синтеза ацетил-СоА из метильной группы, доставляемой белком CFeSP, СО и коэнзима А. На самом деле CoDH/Acs – два фермента, работающих в достаточно прочном комплексе. Карбонмонооксид дегидрогеназа (CoDH) может функционировать как независимый фермент в форме гомодимера. CoDH может взаимодействовать с гидрогеназой для сопряжения окисления СО и образования водорода (Burton et al., 2018). Восстановление CO_2 до СО сопряжено с окислением ферредоксина (рис. 1).

Большинство ацетогенов превращает ацетил-СоА в ацетилфосфат с высвобождением кофермента СоА. Далее ацетаткиназа синтезирует уксусную кислоту с генерацией 1 моля АТФ. Таким образом, на уровне субстратного фосфорилирования, путь WLP оказывается нейтральным: 1 молекула АТФ образуется и 1 молекула расходуется. Вместе с тем, суммарная реакция образования уксусной кислоты из 4 молекул водорода и 2 молекул CO_2 термодинамически выгодна и осуществляется с выделением энергии (уравнение 1):



Ацетогены способны в ходе ацетогенеза использовать часть этой энергии путем создания мембранного ионного градиента и синтеза АТФ мембранно-связанными АТФазами (Schuchman, Müller, 2014).

КОНВЕРСИЯ ЭНЕРГИИ АЦЕТОГЕНАМИ

Для создания ионного градиента ацетогены обычно используют протоны, но некоторые виды используют ионы Na^+ . Для синтеза АТФ бактерии обладают либо H^+ -зависимыми, либо Na^+ -зависимыми мембранными АТФазами. Транслокация ионов через мембрану осуществляется мембранно-связанными комплексами, движущей силой работы которых является окисление Fd. У ацетогенов обнаружено два типа таких комплексов, называемых Rnf и Ech (Schuchman, Müller, 2014). Оба комплекса – многосубъединичные образования, обязательной частью которых являются субъединицы, обеспечивающие локализацию комплексов в мембране. Субъединица, катализирующая окисление восстановленного ферредоксина, субъединица, обеспечивающая транслокацию ионов и субъединица, катализирующая сопряженную с окислением Fd восстановительную реакцию (см. рис. 2). В случае Rnf происходит восстановление NAD^+ в NADH, а в случае Ech восстановление протонов до водорода. Была предложена классификация ацетогенов на основании наличия у них Rnf- или Ech-комплексов (Schuchman, Müller, 2014).

Кластеры Ruf способны транслоцировать как ионы Na^+ (*A. woodii*), так и H^+ (*C. ljungdahlii*). Как правило, Rnf- и Ech-комплексы содержат 8–9 субъединиц, и гены, ответственные за их синтез, образуют кластеры. Часто геномы бактерии содержат более одного кластера Ech и Rnf (Schoelmerich, Müller, 2020), тем не менее, делеция Rnf-генов у *A. woodii* полностью прекращает рост на $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (Westphal et al., 2018), что доказывает, что в данном случае это единственная функционирующая система. Геномный анализ 25 различных ацетогенов показал, что 19 из них содержат гены Rnf-комплексов, 9 Ech-комплексов, а 4 содержат как Rnf, так и Ech. Среди последних *Sporomusa ovata* и *Clostridium scatologenes* (Schoelmerich, Müller, 2020).

Недавно найдена анаэробная бактерия кишечника *Pseudobutyrvibrio ruminis*, у которой имеются функционально активные Ruf- и Ech-комплексы и Na^+ - и H^+ -зависимые АТФазы (Schoelmerich et al., 2020). Один из первых описанных ацетогенов, *Clostridium acetivum*, также способен к Na^+ -зависимому росту и, вместе с тем, может использовать H^+ -градиент для получения энергии (Mayer, Weuster-Botz, 2017).

Следует отметить, что детальное экспериментальное исследование функционирования Rnf- и Ech-комплексов осуществлено на небольшом числе примеров: Rnf-комплекс *A. woodii* (Hess et al.,

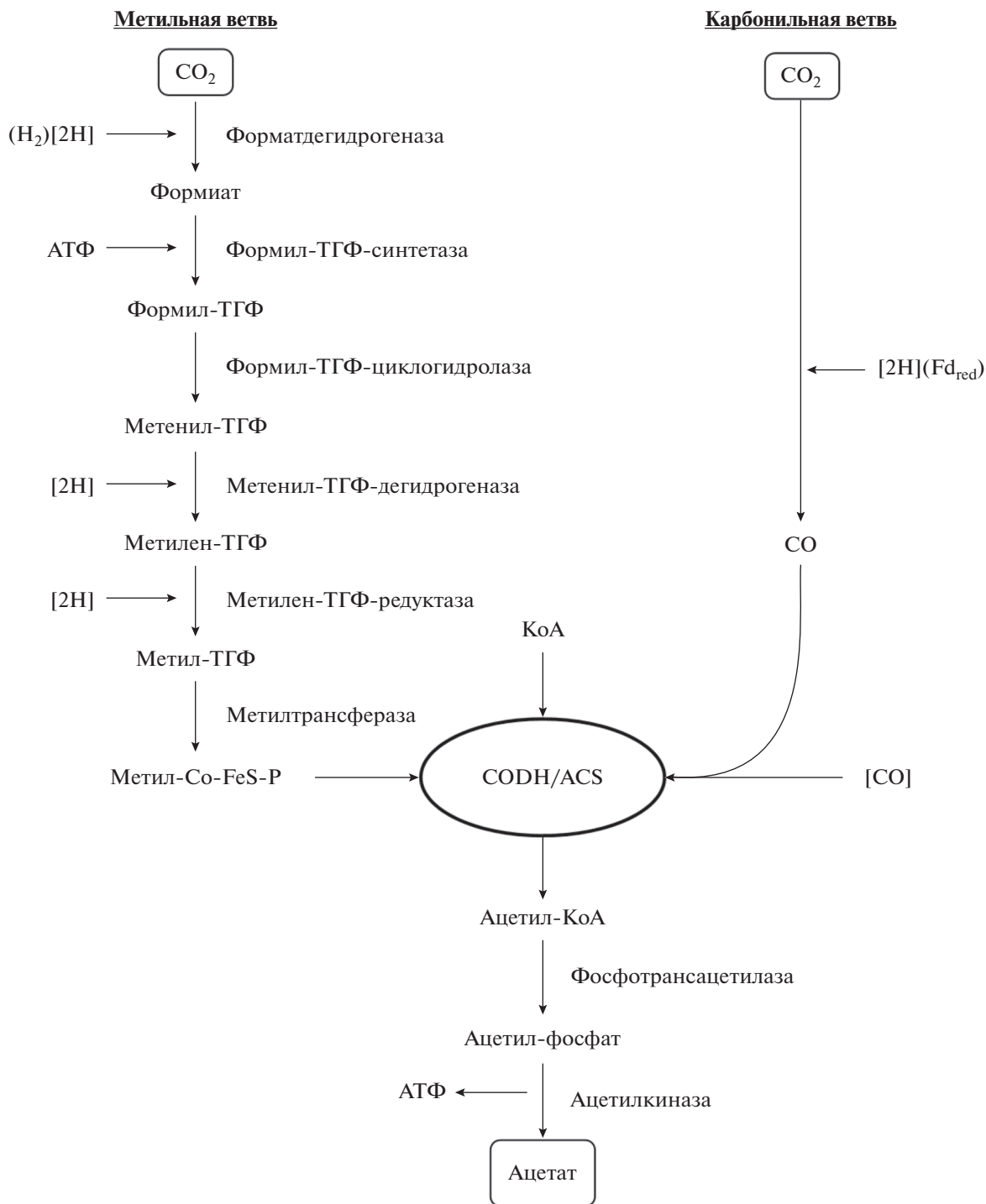


Рис. 1. Восстановление CO₂ до ацетата – путь Вуда–Льонгдаля (WLP). THF – тетрагидрофолиевая кислота [H] – восстановительные эквиваленты; CoFeSP – белок, переносчик метильной группы; CODH/ACS – карбонилдегидрогеназа – CoA синтетаза.

2013) и *C. ljungdahlii* (Tremblay et al., 2012) и Ech-комплекс *Thermoanaerobacter kivui* (Schoelmerich, Müller, 2019b). Движущей силой работы как Rnf-, так и Ech-комплексов является окисление восстановленного ферредоксина (Fd_{red}). Ферредоксины –

древние белки, содержащие простетические группы в виде железосерных комплексов (FeS, Fe₂S₂ и Fe₄S₄). Стандартный окислительно-восстановительный потенциал пары Fd_{red}/Fd_{ox} E₀' = ~470–

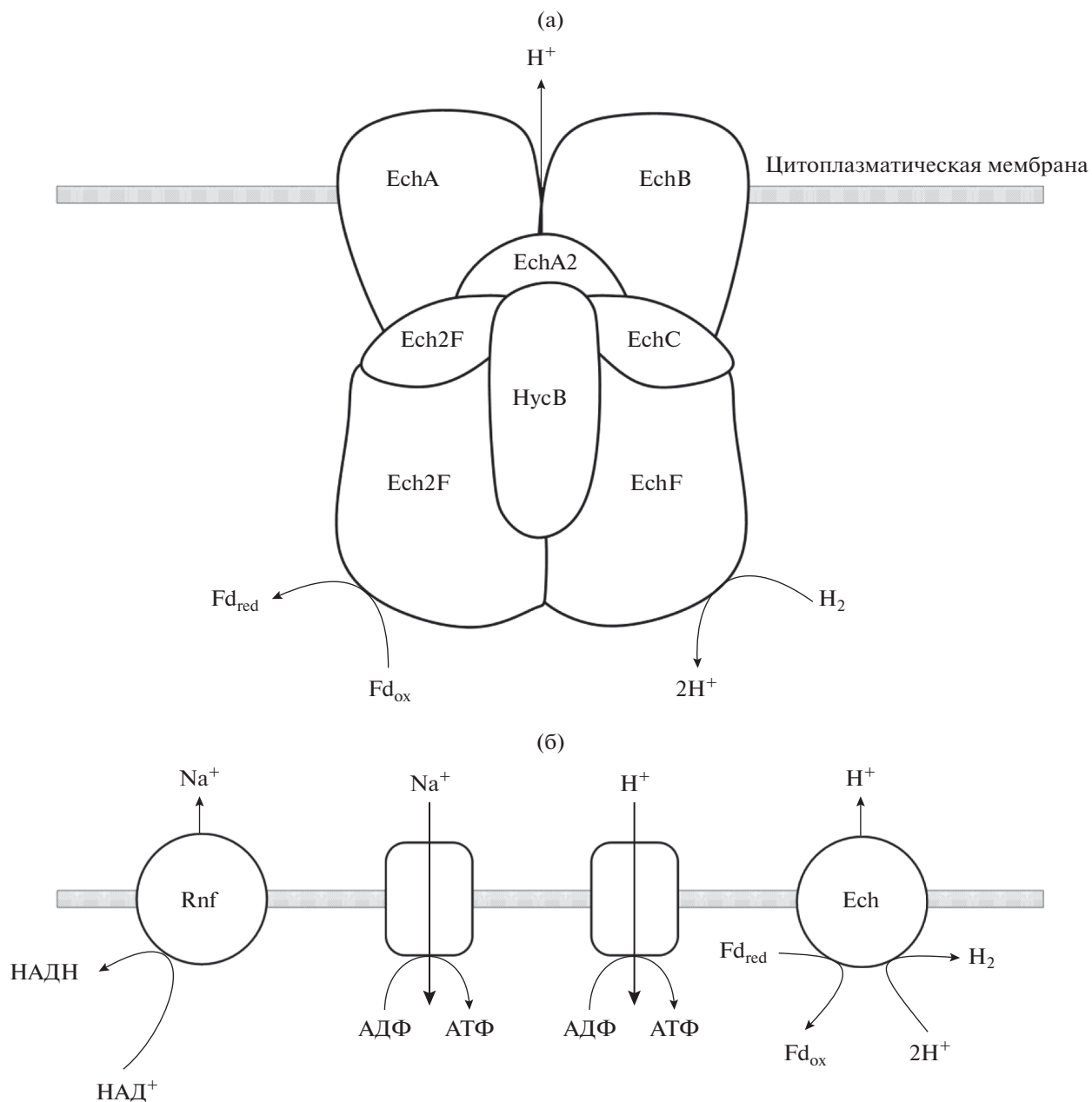


Рис. 2. а – Структура Ech-комплекса в мембране *Thermoanaerobacter kivui*. б – Схема консервации энергии у ацетогенов через осмохимический механизм: □ – Na^+ - или H^+ -зависимые мембранные АТФ-азы; Rnf- и Ech-комплексы, обеспечивающие экспорт протонов и ионов Na; Fd_{red} – восстановленный ферредоксин, обеспечивающий функционирование Rnf- и Ech-комплексов.

500 мВ, т.е. восстановление ферредоксина – очень энергозатратная реакция. Для восстановления ферредоксина ацетогены используют специфический процесс, названный электронной бифуркацией.

ЭЛЕКТРОННАЯ БИФУРКАЦИЯ

Электронная бифуркация – окислительно-восстановительный процесс, при котором окис-

ление одного донора приводит к восстановлению двух акцепторов, причем одна из реакций восстановления идет с выделением энергии (экзергоническая реакция), а вторая – с поглощением энергии (эндергоническая реакция). Экзергоническая реакция обеспечивает энергией эндергоническую, делая процесс термодинамически разрешенным (рис. 3).

Процесс электронной бифуркации постулировал Питер Митчел в 1975 г. для объяснения процес-

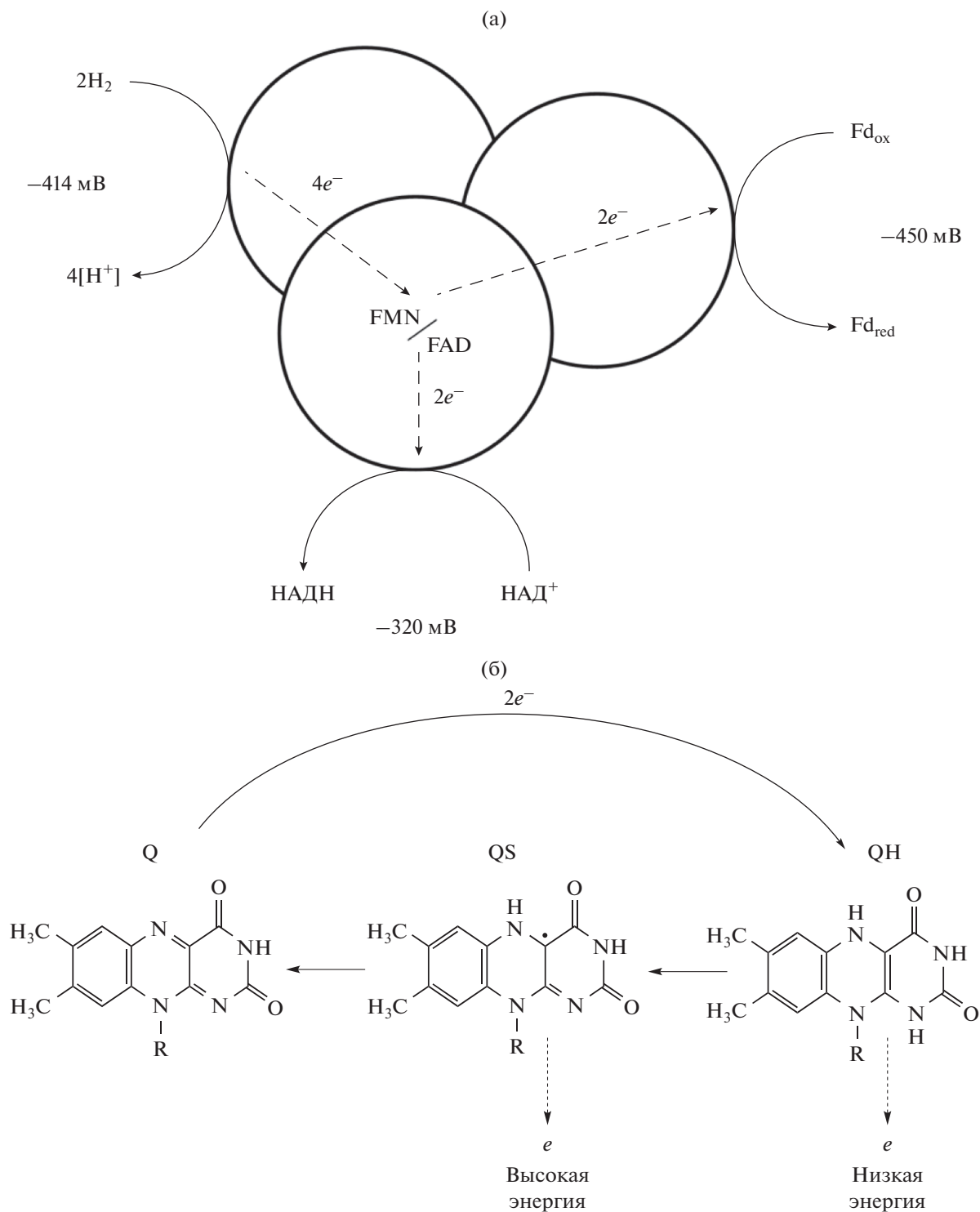


Рис. 3. а – Флавин-зависимая бифуркация (пояснение в тексте); б – механизм окисления флавинов, связанный с бифуркацией. Q – флавинохинон; QS – флавиносемихинон (радикал); QH – гидрохинон. Флавинохинон окисляется в гидрохинон, акцептируя пару электронов от донора. QH отдает 1 электрон низкой энергии в экзергоническую ветвь и превращается в короткоживущий радикал QS. Флавиносемихинон отдает 1 электрон высокой энергии в эндергоническую ветвь, вновь возвращаясь в исходное состояние Q.

са аэробного дыхания в митохондриях (Mitchell, 1975, 1976). В плане нашего рассмотрения анаэробных ацетогенов, нас будет интересовать вариант электронной бифуркации, открытой в 2008 г. (Herrmann et al., 2008) и названной флавин-зависимой электронной бифуркацией (Flavin based electronic bifurcation, FBEB). Этот процесс обеспечивает в анаэробных микроорганизмах биосинтез восстановленного ферредоксина (Fd_{red}) – электронного переносчика с очень низким отрицательным потенциалом ($E'_0 = \sim 450\text{--}500$ мВ).

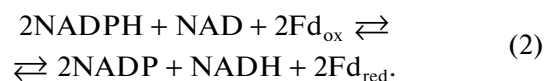
Особенностями строения всех FBEB-комплексов является обязательное наличие флавина (FMN или FAD), который участвует в бифуркации электронов и субъединиц, осуществляющих окисление и восстановление субстратов. В качестве восстановленного продукта в эндергонической реакции во всех комплексах выступает Fd_{red} , в качестве доноров электронов используется молекулярный водород, формиат, NADH (см. рис. 3).

Все FBEB-комплексы – растворимые цитоплазматические образования. В настоящее время описано 12 комплексов 4 типов (Buckel, Thauer, 2018a, 2018b). Явление FBEB широко распространено у прокариот. Анализ 4588 геномов выявил наличие хотя бы одного гомолога для 12 известных типов FBEB-комплексов в 681 случаях. Обнаружено 512 видов бактерий и 169 видов архей, имеющих такие гены. Ни в одном случае эти гены не были обнаружены у эукариот (Poudel et al., 2018).

В настоящее время установлено, что бифуркация, т.е. разделение пары электронов на электрон с высокой и низкой энергией, осуществляется на молекулах флавинов (Lubner et al., 2017; Buckel, Thauer, 2018b; Peters et al., 2018). Флавины могут находиться в трех состояниях окисленности (см. рис. 3б): в виде флавохинонов (Q), флавосемихинонов (SQ) и флавогидрохинонов (HQ). Флавосемихинон представляет собой радикал со свободным электроном, который может иметь энергию выше, чем электрон в паре, передаваемый донором. Схематично можно представить события следующим образом: 1) сначала происходит двухэлектронное восстановление флавохинона (Q) в флавогидрохинон (QH); 2) затем QH теряет один электрон, который транспортируется в каталитический центр и восстанавливает акцептор в экзергонической реакции; 3) образуется нестабильный QS радикал, который мгновенно передает электрон в эндергоническую ветвь и регенерирует исходное Q состояние (рис. 3).

Существует небольшое число хорошо охарактеризованных комплексов, для которых известна пространственная структура. Именно на этих примерах выяснен молекулярный механизм функционирования комплексов, включая потенциалы всех окислительно-восстановительных центров, их взаимное расположение и расстояние между ними.

Вероятно, лучше всего изучен комплекс NADH-зависимая ферредоксин:NADP⁺ восстанавливающая оксоредуктаза, называемая Nfn (Demmer et al., 2015; Liang et al., 2019). Nfn-комплекс катализирует реакцию (уравнение 2):



Схематически комплекс представлен на рис. 4. Nfn состоит из двух субъединиц. Большая субъединица содержит один флавин в центре окисления NADPH (называемый флавин А) и два железо-серных кластера [4Fe-4S]. Малая субъединица содержит один флавин в составе центра восстановления NAD (называемый флавин В) и один железо-серный кластер состава [2Fe-2S]. Эти пять редокс-центров расположены линейно. Бифуркацию электронов осуществляет флавин А, получающий пару электронов при окислении NADPH. В экзергонической ветви электрон с низкой энергией движется от флавина А к [2Fe-2S] кластеру, удаленному от него на 14 Å и затем к флавину В, который участвует в восстановлении NAD. В эндергонической ветви электрон с высокой энергией восстанавливает проксимальный к флавину А кластер [4Fe-4S], расположенный в 8 Å от него. Экспериментально показан удивительно высокий редокс-потенциал этого кластера [t_0 –718 мВ]. Далее электрон передается на дистальный [4Fe-4S] кластер ($E'_0 = -513$ мВ), который участвует в восстановлении ферредоксина (Lubner et al., 2017). В этой же работе показано, что потенциал [2Fe-2S] кластера $\sim +80$ мВ. Таким образом, экспериментально продемонстрирована эффективность процесса бифуркации для получения электронного переносчика Fd_{red} с очень низким потенциалом. Общее изменение свободной энергии в реакции с участием процесса бифуркации очень невелико, поэтому большинство реакций обратимо и служит для сохранения редокс баланса и соотношения NAD/NADH и NADP/NADPH в клетке (Schuchmann, Müller, 2014). Процесс, осуществляемый комплексом бифуркации в обратном направлении, называют “конфуркацией” (Shut, Adams, 2009).

МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТОГЕНОВ ПРИ РОСТЕ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ

Газовые субстраты

Ацетогены обладают способностью к росту на газовых субстратах (H_2 , CO, CO_2), на C_1 -соединениях (метанол, формиат), на сложных органических соединениях, таких как лактат, аминокислоты, сахара, спирты. Конечно, особое внимание привлекает способность ацетогенов к фиксации CO_2 при росте на газовых субстратах.

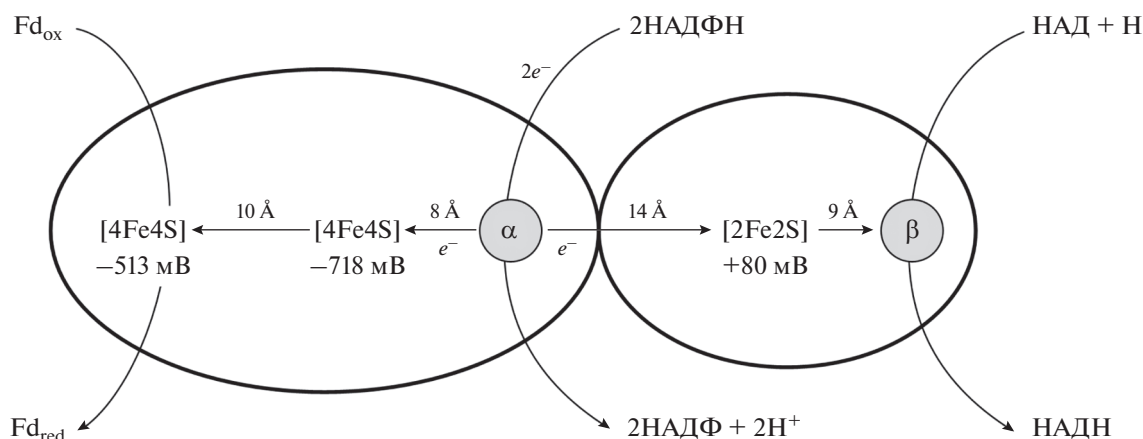
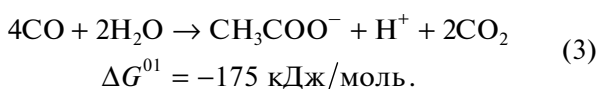
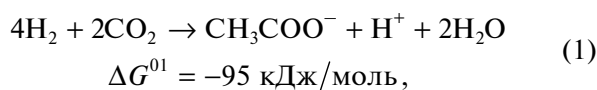


Рис. 4. Схема строения Nfn-комплекса.

В качестве восстановителя CO_2 в газовых смесях может выступить H_2 или CO . В синтез-газе одновременно присутствуют оба восстановителя. Два восстановителя энергетически неравнозначны. В случае присутствия в газовой смеси CO бактериям не нужно расходовать энергию на восстановление CO_2 до CO в карбонильной ветви WLP (рис. 1). Эта реакция, осуществляемая монокарбондегидрогеназой (CODH) проходит с использованием в качестве кофактора Fd_{red} , восстановление которого требует больших затрат энергии.

Энергетический и редокс-балансы могут различаться у разных ацетогенов и не всегда могут быть точно учтены в силу недостаточной изученности многих из них. Для наиболее изученного ацетогена, *A. woodii*, был рассчитан энергетический баланс при росте на H_2/CO и CO (Bertsch, Müller, 2015a). Рост на CO энергетически более выгоден. Ниже для сравнения приведены уравнения биосинтеза ацетата при росте на H_2/CO_2 (уравнение 1) и на CO (уравнение 3):



При росте на смеси H_2/CO_2 в метильной ветви WLP расходуются две молекулы NADH и моль H_2 для восстановления CO_2 до метильной группы, а в карбонильной 1 моль Fd_{red} для восстановления CO_2 до CO (рис. 1). У *A. woodii* Fd_{red} образуется дегидрогеназой в реакции бифуркации. При этом из 3 молей H_2 образуется 1.5 моля NADH и 1.5 моля Fd_{red} (рис. 3). Далее 1 моль Fd_{red} используется на восстановление CO_2 до CO и 0.5 моля Fd_{red} потребляется Rnf-комплексом (рис. 2), который синтезирует 0.5 моля NADH и транспортирует

1 моль иона Na^+ через цитоплазматическую мембрану. У *A. woodii* для синтеза 1 моля АТФ АТФаза требует 3 молей Na^+ . Таким образом, 4 молей водорода достаточно для синтеза 1 моля ацетата и 0.3 молей АТФ. В случае роста на CO не требуется Fd_{red} для восстановления CO_2 до CO , но зато требуется 1 моль водорода для восстановления CO_2 до формата. Из 4 молей CO (уравнение 3) 1 моль непосредственно вовлекается в WLP, а три других окисляются CODH до CO_2 с одновременным восстановлением 3 молей Fd . Один моль водорода синтезируется в процессе конфуркации дегидрогеназой из 0.5 моля Fd_{red} и 0.5 моля NADH . В Rnf-комплекс поступает 1.5 моля Fd_{red} , что приводит к синтезу 2.5 моля NADH и выбросу 5 молей ионов Na^+ . Это количество ионов Na^+ обеспечивает синтез 1.5 моля АТФ.

Большинство реакций WLP пути, реакции Rnf- и Ech-комплексов, а также реакции бифуркации электронов обратимы. Эта обратимость позволяет ацетогенам сохранять энергетический и редокс-баланс при росте на газообразных субстратах различного состава. Хотя рост на CO энергетически выгоден, но при этом синтезируется нежелательная двуокись углерода (уравнение 3). Рост на H_2/CO_2 не образует CO_2 (уравнение 1), но генерирует мало энергии и, следовательно, обладает низким потенциалом для биосинтеза полезных соединений.

Казалось бы идеальным субстратом для роста ацетогенов должен быть синтез-газ, содержащий CO , CO_2 и H_2 . Тем не менее, это не совсем так. Оказалось, что CO в концентрациях, присутствующих в синтез-газе, ингибирует некоторые ферменты. Так, при росте *C. ljungdahlii* на синтез-газе сначала потребляется CO , и только после того, как более 90% этого газа израсходовано, начинается потребление H_2 (Najafpour, Yones, 2006).

Экспериментально показано, что CO ингибирует прежде всего водород-зависимую CO₂ редуктазу (HDCR), катализирующую восстановление CO₂ в формиат (Bertsch, Müller, 2015b). Следует отметить, что если восстановление CO₂ в CO у всех ацетогенов осуществляется практически одинаковым ферментом (CODH), то структура ферментативных систем, восстанавливающих CO₂ в формиат достаточно разнообразна (Lemaire et al., 2020). Так, например, *C. autoethanogenum* использует для синтеза формиата дегидрогеназу, зависящую от окисления NADPH и Fd_{red} и не ингибируемую CO (Wang et al., 2013).

Жидкие субстраты

Главным фактором, ограничивающим скорость роста ацетогенов на газовых субстратах, является плохая растворимость в воде H₂ и CO₂, что снижает массообмен. Такого недостатка лишены метанол и формиат – C₁-соединения, которые смешиваются с водой в любых соотношениях.

Формиат является первым соединением в метильной ветви WLP (рис. 1), а метильная группа метанола может быть превращена в метилтетрагидрофолат в той же ветви WLP (рис. 1).

И метанол, и формиат рассматриваются как перспективные субстраты для ферментации микроорганизмов (Cotton et al., 2020). Метанол сегодня получают из природного газа, а формиат – окислением метанола. Вместе с тем, в будущей зеленой циклической экономике формиат может быть будет получать электровосстановлением CO₂ (Martin et al., 2015).

Метанол. Хотя рост ацетогенов на средах с метанолом был известен давно (Vache, Pfenning, 1981), сведения о механизмах и ферментах, участвующих в процессе, были получены лишь в последние годы. У бактерии *A. woodii* была идентифицирована специфическая трансметилаза, переносящая метильную группу от метанола к тетрагидрофолату. Идентификация фермента и соответствующих генов оказалась непростой задачей, так как геном *A. woodii* содержит около 30 генов, кодирующих потенциальные метилазы. Специфическую для метанола трансметилазу удалось обнаружить при анализе транскриптома. При переносе бактерий со среды с фруктозой на среду с метанолом активность специфической метилазы увеличилась в 10–14 раз (Kremp et al., 2018).

Метанол-специфическая трансметилаза содержит 3 субъединицы. Одна субъединица представляет собой корриноидный белок (CoP), а две другие субъединицы обеспечивают перенос метильной группы от метанола на CoP и от CoP на тетрагидрофолат с образованием метил-ТНФ, промежуточного продукта WLP (рис. 1).

Мы уже говорили ранее о легкой обратимости реакций WLP. В данном случае молекула метил-ТНФ окисляется по обращенному пути метильной ветви WLP с образованием АТФ, CO₂ и H₂. Можно рассчитать, что H₂ и АТФ могут обеспечить образование 6 восстановительных эквивалентов, достаточных для восстановления 3 молекул CO₂ до CO. Таким образом, потребление 4 молекул метанола может обеспечить синтез 3 молекул ацетата с одновременной фиксацией 2 молекул CO₂ (Kremp et al., 2018) (уравнение 4):



Донором метильной группы может быть не только метанол. Так, было показано, что такой же механизм использует *A. woodii* при росте на бетанине (триметилглицин) (Lechtenfeld et al., 2018). В процессе участвует бетаинспецифическая метилаза, которая может переносить метильную группу от бетаина к тетрагидрофолату. Интересно, что донором метильной группы не может быть диметилглицин или триметиламин (Kremp et al., 2018).

Формиат является промежуточным продуктом в WLP-пути (рис. 1). Многие ацетогены могут расти на формиате. Процесс протекает по уравнению 5:



В этом процессе электроны, необходимые для восстановления одного формиата и CO₂ до ацетата, получаются за счет окисления формиата до CO₂ и H₂. Пока еще недостаточно сведений о ферментах, принимающих участие в этом процессе (Müller, 2019).

Интересно, что при росте многих ацетогенов на газовых субстратах в среде накапливаются значительные количества формиата (Groher, Weuster-Botz, 2016). Неясно, является ли экскреция в среду и обратное поглощение формиата частью нормального метаболизма ацетогенов. Так как формиат является промежуточным продуктом в пути WLP, а метанол образует также промежуточный продукт метил-ТНФ, то при росте на этих субстратах клетка должна экономить энергию, которую она затратила бы на синтез этих промежуточных продуктов. Действительно, энергоэффективность при росте на метаноле и формиате выше, чем при росте на газовых субстратах. Энергоэффективность определяется как доля энергии, сохраненной в продукте от энергии заключенной в субстрате. Это можно определить по энергии, выделяемой при сгорании (Classen et al., 2019). При росте на газовых субстратах энергоэффективность ацетогенов (при образовании ацетата) составляет 60–80%, а при росте на метаноле и формиате – 80–90% (Cotton et al., 2020).

Метанол и формиат при высоких концентрациях ингибируют рост ацетогенов. Так, было по-

казано, что при pH 5.0–6.0 рост *C. ljungdahlii* полностью ингибируется 30 мМ формиата Na, но при pH 7.0 рост возобновляется (Romio-Pujol et al., 2014). На примере ацетогена *Sporomusa ovata* было показано, что бактерии можно адаптировать к росту на повышенных концентрациях метанола, и это приводит к усилению конверсии CO₂ в органические продукты (Tremblay et al., 2015).

МЕТАБОЛИТЫ, СИНТЕЗУЕМЫЕ ПРИ АВТОТРОФНОМ РОСТЕ АЦЕТОГЕНОВ

Многие ацетогены при росте на газовых субстратах синтезируют исключительно ацетат, но ряд представителей этой группы, наряду с ацетатом, производят и другие метаболиты, которые представляют практический интерес.

Такие ацетогены, как *Clostridium ljungdahlii*, *C. autoethanogenum*, *C. regsdalei* способны к синтезу больших количеств этанола, который при некоторых условиях ферментации становится преимущественным продуктом. Эти же ацетогены в качестве минорных продуктов синтезируют 2,3-бутандиол (2,3BD) и лактат. Некоторые ацетогены, такие как *Clostridium carboxidivorans*, *Eubacterium limosum* способны к синтезу бутирата и бутанола (De Tissera et al., 2019).

Все перечисленные продукты представляют практический интерес, особенно этанол, который сегодня производится в мире из пищевого сырья (кукурузы, сахарного тростника, злаков) в количествах более 100 млрд л (около 80 млн т в год) и используется в качестве моторного биотоплива. Производство топливного этанола с использованием газовых субстратов представляет удачную альтернативу, так как позволяет уйти от использования пищевого сырья и приводит к фиксации такого парникового газа как CO₂ (<http://www.statista.com>; Дебабов, 2012; Körpke et al., 2011a).

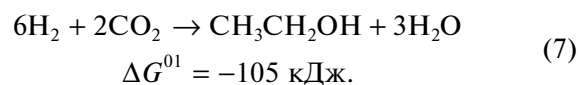
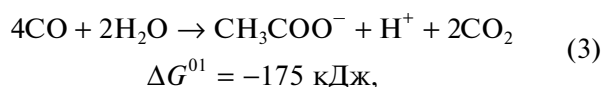
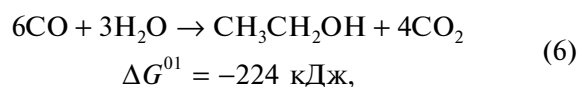
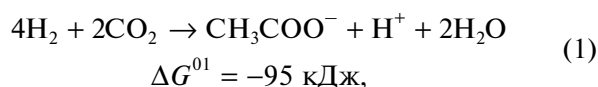
Биосинтез этанола из ацетил-СоА у ацетогенов возможен двумя путями: прямым – восстановлением из ацетил-СоА, и непрямым – восстановлением из ацетата (см. рис. 5).

При прямом синтезе ацетил-СоА восстанавливается бифункциональным ферментом алкогольдегидрогеназой (AdhE), состоящим из двух субъединиц ацетил-СоА-зависимой алкогольдегидрогеназы (Ald) и алкогольдегидрогеназы (AdH). В этом синтезе расходуются два восстановительных эквивалента в виде NADPH.

Непрямой путь связан с восстановлением ацетата ацетальдегидферредоксин оксиредуктазой (AOR) в ацетальдегид и последующим его восстановлением алкогольдегидрогеназой в этанол. В реакции расходуется восстановленный ферредоксин и NADPH. Непрямая реакция энергетически выгоднее для клетки, так как в ходе синтеза ацетата образуется молекула АТФ.

Анализ геномов ацетогенов подтвердил наличие у них всех генов вышеперечисленных ферментов. Биохимическое подтверждение наличия AOR-активности и возможность непрямого пути биосинтеза этанола была постулирована для *C. ljungdahlii* (Körpke et al., 2011a) и *C. autoethanogenum* (Mock et al., 2015).

Соотношение этанола и ацетата сильно зависит от условий ферментации и, особенно, состава газовых субстратов. Биосинтез ацетата и этанола при росте на H₂/CO₂ или СО происходит согласно уравнениям (1, 3, 6, 7) и сопровождается значительным уменьшением свободной энергии, т.е. термодинамически разрешен:



Рост на СО энергетически выгоднее, чем на H₂/CO₂, что отражается прежде всего в том, что титр биомассы выше при росте на СО. Так, титр биомассы *C. ljungdahlii* при росте на СО/CO₂ (80 : 20) составлял 8.4 OD₆₀₀ (120 ч), а при росте на H₂/CO₂ (60 : 40) только 1.84 (186 ч). В этих условиях при росте на H₂/CO₂ клетки производят практически один ацетат, а при росте на СО/CO₂—этанол (713 мМ) и ацетат (188 мМ) (Zhu et al., 2020).

При периодическом культивировании ацетогенов на синтез-газе обычно наблюдают две стадии: ацидогенез и сольватогенез (Richter et al., 2016; Arslan et al., 2019). На первой стадии синтезируется ацетат и происходит снижение pH среды, следствием чего является появление в растворе значительных концентраций недиссоциированной уксусной кислоты. Уксусная кислота проникает в клетку и ингибирует рост. Остановка роста приводит к появлению избытка восстановительных эквивалентов, которые реокисляются в процессе синтеза этанола на второй сольватогенной стадии. Интересно, что анализ экспрессии генов при переходе от ацетогенеза к сольватогенезу не показал заметных изменений, т.е. переход не регулируется на генетическом уровне. Регуляция осуществляется на уровне редокс-баланса и доступности АТФ, т.е. на термодинамическом уровне (Richter et al., 2016).

В качестве побочных продуктов этанолсинтезирующие ацетогены производят 2,3-бутандиол

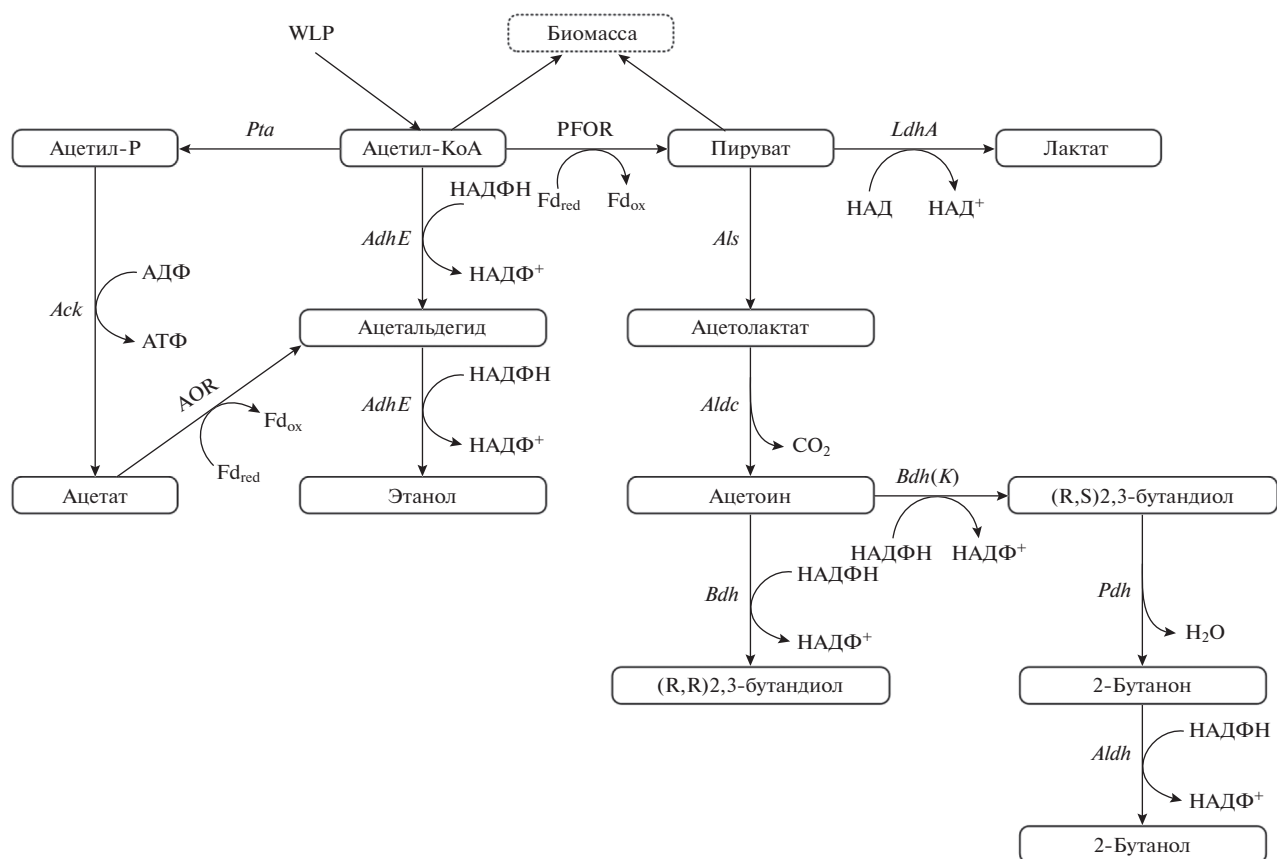


Рис. 5. Схема биосинтеза ацетата, этанола, 2,3-бутандиола, 2-бутанола и лактата у *C. ljungdahlii* и *C. autoethanogenum*. Ацетил-СоА и пируват служат исходными субстратами для синтеза всех других метаболитов и синтеза биомассы. AOR – ацетальдегид ферредоксин оксоредуктаза; PFOR – пируват ферредоксин оксоредуктаза; Als – ацетолактатсинтаза; LdhA – лактатдегидрогеназа; Pta – фосфоацетилтрансфераза; Acp – ацетилкиназа; AdhE – бифункциональный фермент ацетальдегид/алкогольдегидрогеназа; Aldc – ацетолактатдекарбоксилаза; ADH – первично-вторичная алкогольдегидрогеназа; BDH – (R,R)2,3-бутанолдегидрогеназа; DDH – (R,S)2,3-бутанолдегидрогеназа; 2-бутанон (метил-этил кетон МЕК).

(2,3BD) и лактат, предшественником которых в клетке является пируват (рис. 5).

Представление о соотношении продуктов дает работа (Körke et al., 2011b), в которой исследовали состав конечных продуктов при ферментации трех ацетогенов: *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* и *C. regsdalei* на синтетической смеси газов (44% CO₂, 22% CO и 2% H₂). В конце ферментации концентрация ацетата составляла 28–32 мМ, этанола 19–22 мМ, 2,3BD – 1.4–2 мМ и лактата 0.1–0.2 мМ. Молярное отношение 2,3BD к ацетату было 1 : 15 и к этанолу 1 : 10 (Körke et al., 2011b).

Пируват образуется из ацетил-СоА и CO₂ с помощью пируват-ферредоксин оксидоредуктазы (PFOR). Далее лактатдегидрогеназа (LdhA) восстанавливает пируват в лактат. Путь к 2,3BD начинается с конденсации двух молекул пирувата с образованием ацетолактата, который декарбоксилируется с образованием ацетоина. Ацетоин восстанавливается 2,3-бутандиолдегидрогеназой в 2,3BD (рис. 5).

Все гены, потенциально кодирующие вышеперечисленные ферменты, найдены в геномах ацетогенов. Лишь в относительно небольшом числе случаев была подтверждена функциональность этих ферментов. Так, с этой целью гены кандидаты были перенесены из *C. autoethanogenum* в *E. coli*. Было показано, что лактатдегидрогеназа экспрессируется в *E. coli* и образует лактат. Метаболический путь биосинтеза 2,3BD воссоздан в *E. coli* клонированием генов ацетолактатсинтазы, ацетолактатдегидрогеназы и 2,3-бутандиолдегидрогеназы. Исследование последнего фермента показало, что этот NADPH-зависимый фермент обладает широкой специфичностью при восстановлении кетосоединений C₂–C₄ в соответствующие спирты. Фермент назван NADPH-зависимая первично-вторичная алкогольдегидрогеназа (CaADH). *E. coli* с реконструированным геномом при росте на фруктозе могли синтезировать 1.1 ± 0.2 мМ 2,3BD (Körke et al., 2011), что сравнимо с его

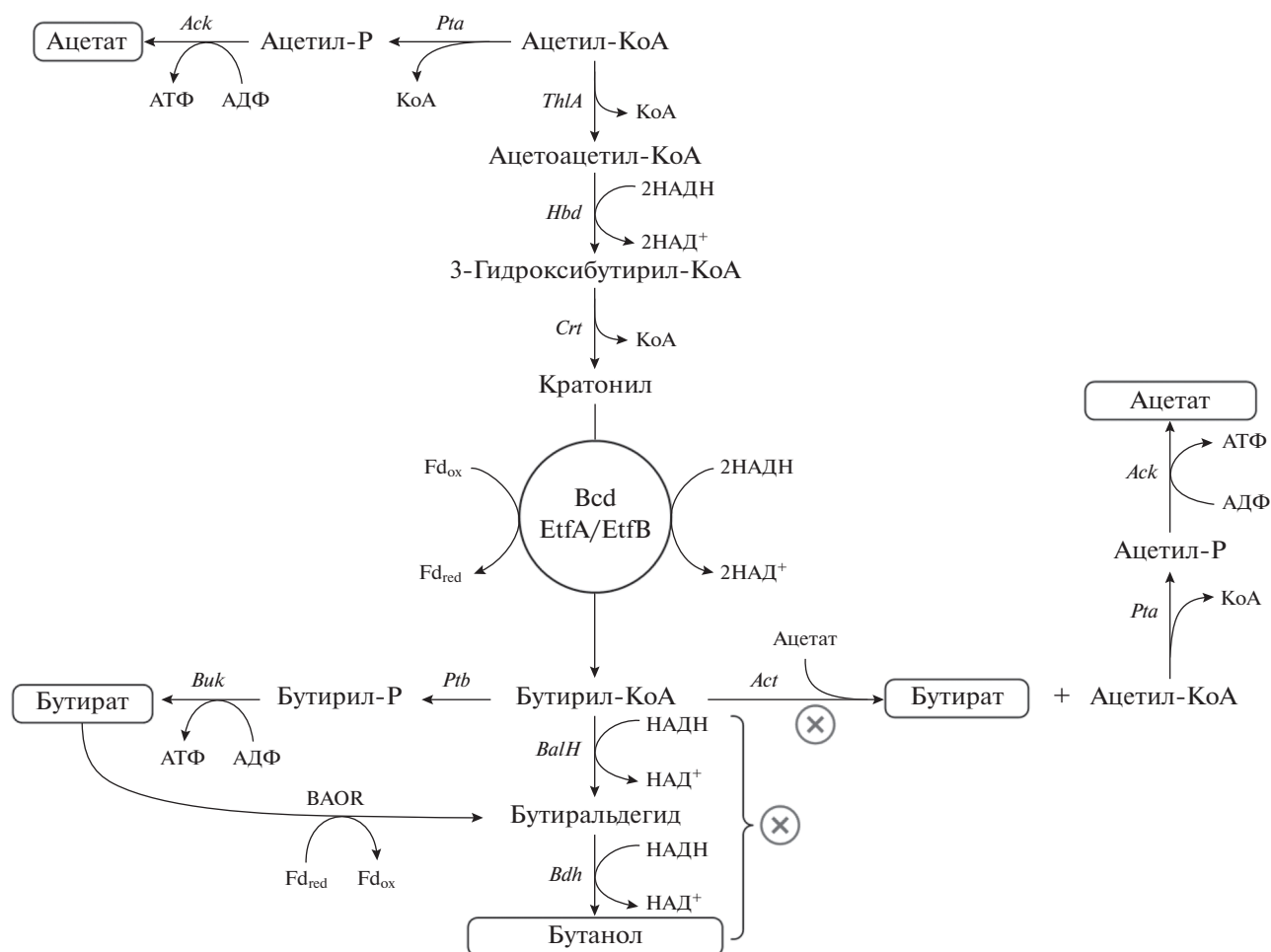


Рис. 6. Биосинтез бутанола у ацетогенов. Thl – тиолаза; Hbd – гидроксibuтирил-СоА дегидрогеназа; Crt – кротоназа; Bcd – бутирил-СоА дегидрогеназа в комплексе с бифункционным комплексом двух флавопротеинов EtfA/EtfB; BalH – бутиральнойдегиддегидрогеназа; Bdh – бутиральнойдегиддегидрогеназа (у *C. autoethanogenum* BalH и Bdh заменены одним бифункциональным ферментом AdhE₂); AcT – ацетил-СоА трансфераза; Ptb – фосфотрансбутирилаза; Buk – бутирилкиназа; BAOR – бутиральнойдегид оксиредуктаза. ⊗ – Инактивация генов в рекомбинантных штаммах.

биосинтезом ацетогенами (см. выше) (Körke et al., 2014).

К синтезу бутанола и бутирата способен ограниченный круг ацетогенов: *C. carboxidivorans*, *C. deakei*, *C. scotologenes*, *C. regsdalei*, *Eubacterium limosum*, *Butyrobacterium methylothrophicum* (Dürre, 2016).

Анализ геномов и биохимические данные говорят о том, что биосинтез бутанола и бутирата осуществляется у ацетогенов тем же путем, что и у сольватогенных бактерий, таких как *Clostridium acetobutylicum* (рис. 6). Биохимический путь начинается с объединения ферментом тиолазой (ThlA) двух молекул ацетил-СоА в ацетоацетил-СоА, который восстанавливается до 3-гидроксibuтирил-СоА гидроксibuтирил-СоА дегидрогеназой (Hbd). Далее кротоназа (Crt) дегидрирует 3-гидроксibuтирил-СоА до кротонил-СоА, который восстанавливается до бутирил-СоА соответствующей дегидрогеназой (Bcd).

Бутирил-СоА может далее превращаться либо в бутанол, либо в бутират (рис. 6). Превращение в бутанол осуществляется последовательным восстановлением в бутиральдегид и бутанол. У *Clostridium acetobutylicum* обе реакции катализируются бифункциональным ферментом альдегид-алкогольдегидрогеназой (AdhE₂), использующей в качестве кофактора NADH.

Бутирил-СоА может превратиться в бутират двумя путями (рис. 6): либо ацетил-СоА трансфераза превращает его в бутират и ацетил-СоА, либо фосфотрансбутирилаза превращает его в бутирил фосфат и бутират киназа в бутират. В последней реакции образуется 1 моль АТФ. При превращении ацетил-СоА в ацетат также образуется 1 моль АТФ (рис. 1), так что оба пути с энергетической точки зрения равнозначны. Бутират может быть восстановлен в бутанол через бутиральдегид (ферредоксиноксиредуктазой) и бутиральной-

гольдегидрогеназой аналогично биосинтезу этанола у ацетогенов (рис. 5).

Помимо бутанола, некоторые ацетогены, например, *C. carboxidivorans*, способны синтезировать и гексанол. Титры бутанола и бутирата обычно невысоки, и были предприняты попытки оптимизировать этот процесс. Было показано, что низкие значения pH (6–4.5) и температуры (–25°C) способствуют биосинтезу бутанола. Тем не менее, максимальные выходы бутанола не превышают 14–15 мМ бутанола и 8–9 мМ гексанола (Rajagopalan et al., 2002; Phillips et al., 2015; Romio-Pujol et al., 2015, 2018), что значительно ниже титров, полученных при ферментации сольватогенных клостридий.

Учитывая привлекательность микробиологического синтеза ценных химикалий на базе восстановления CO₂, были предприняты значительные усилия как по совершенствованию процесса ферментации с использованием газовых субстратов, так и по генетическому совершенствованию продуцентов ацетогенных бактерий.

ГЕНЕТИКА АВТОТРОФНЫХ АЦЕТОГЕНОВ

Для реализации полного биотехнологического потенциала газовой ферментации с использованием ацетогенов необходимо произвести генетические изменения в геномах этих микроорганизмов. Цель таких изменений может заключаться в перенаправлении потока углерода к нужному метаболиту или даже в организации новых биохимических путей для расширения спектра продуктов, синтезируемых ацетогенами.

Для успешного применения методологии метаболической инженерии необходимы два условия: 1) иметь хорошо обоснованные цели (целевые гены), которые следует активировать или инактивировать или внести новые гетерологичные гены и 2) иметь генетические технологии, позволяющие эффективно вносить в геном мутации, делеции и вставки.

Расшифровка геномных последовательностей большого числа ацетогенов, изучение метаболических путей, в особенности механизмов консервации энергии, сделали возможным определение целевых генов, подлежащих изменениям (Humphreys et al., 2015; Shin et al., 2016).

За последние 15 лет достигнуты определенные успехи в развитии генетических технологий применительно к автотрофным ацетогенам, хотя до сих пор эффективность этих методов недостаточно высока. На пути развития таких технологий возникает ряд трудностей. Во-первых, толстая стенка этих бактерий затрудняет доставку ДНК, что делает малоэффективными такие методы трансформации, как электропорация. Во-вторых, очень активные системы рестрикции разрушают трансформированную ДНК. В третьих, самое главное препят-

ствие – низкие частоты гомологичной рекомбинации, что требует специальных приемов обнаружения редких генетических событий.

Первая достаточно эффективная технология для бактерий рода *Clostridium* была разработана в 2005–2007 гг. и была основана на инактивации генов транспозонным мутагенезом. Технология получила название ClosTron (Heap et al., 2010) и основана на использовании интронов группы II. Интроны группы II – это каталитическая РНК, которая вырезает себя из РНК транскрипта и внедряется в новый сайт. В одной рамке считывания с интроном II кодируется белок LtrA. Этот белок много функций: определяет РНК сплайсинг, участвует в распознавании сайта интеграции, никкирует ДНК-мишень и внедряет сплайсированную РНК молекулу и, наконец, синтезирует соответствующую комплементарную нить ДНК путем обратной транскрипции. После этого ферменты хозяина удаляют РНК и лигируют разрыв.

Распознавание мишени осуществляет РНК-комплекс (LtrA-белок + РНК). За узнавание отвечают 15 нуклеотидов РНК, которые можно менять для направления транспозиции на определенный участок хромосомы, но возможны только такие изменения последовательности, которые сохраняют структуру комплекса. Существует доступ через интернет к специальному алгоритму, который позволяет определить последовательность РНК для направления транспозиции в желаемую область. Собственно этот алгоритм и называется ClosTron. Недостатком метода является то, что не для каждого гена можно подобрать подходящую последовательность РНК и то, что внедрение транспозона имеет сильный полярный эффект.

Недавно описан другой метод, основанный на транспозиции и конъюгации и позволяющий вносить в геном *Clostridium ljungdahlii* большие фрагменты ДНК, кодирующие целевые метаболические пути (Phillips et al., 2019). Метод использует конъюгативный перенос плазмид между *E. coli* и *Clostridia* и свойства транспозона Himar. Этот транспозон фланкирован обращенными повторами длиной в 27 п.н., которые служат мишенями транспозазы (ген HI). В ходе конъюгативного переноса преодолеваются рестрикционные барьеры, так как ДНК входит в реципиентную клетку в одноцепочечной форме и успевает правильно метилироваться. Кластер, предназначенный для внедрения в хромосому, располагается на конъюгативной плазмиде и ограничен инвертированными повторами. На той же плазмиде находится ген HI под контролем индуцибельного промотора (в качестве индуктора используют ксилозу). Включение в хромосому идет неспецифически по АТ последовательностям, причем возможны множественные интеграции. В качестве примера авторы перенесли в

C. ljungdahlii кластер биосинтеза ацетона размером 11 т.п.о. из *C. acetobutylicum* (Phillips et al., 2019).

Недостатком метода является неспецифическое встраивание в геном. Процесс конъюгации между *E. coli* и *Clostridia* плохо изучен и занимает от 2 суток до недели. Практическую полезность этого метода еще предстоит оценить.

Достаточно давно были описаны шаттл-плазмиды, способные поддерживаться в *E. coli* и *Clostridia*, и трансформация в *Clostridia* методами электропорации или конъюгации. Однако частоты электропорации в первых попытках были низкими — около 10^3 колоний на мкг плазмидной ДНК (Strätz et al., 1994). Впоследствии протокол электропорации был улучшен. Компетентность клеток повышается после их экспонирования в средах, содержащих DL-треонин. Частота электропорации была увеличена на порядок до 1.7×10^4 колоний на один мкг плазмидной ДНК (Leang et al., 2013).

Стандартные для микроорганизмов методы делеции и вставки генетического материала посредством гомологичной рекомбинации в случае *Clostridia* имеют низкую эффективность. Требуются приемы мощной контрелекции для обнаружения редких событий. Предложено несколько способов контрелекции для этих микроорганизмов, но, очевидно, что самый удобный способ — CRiSPR/Cas система (McAllister, Sorg, 2019).

Главное преимущество CRiSPR/Cas системы — это возможность направить нуклеазу Cas практически в любую точку генома, где она произведет двойной разрыв ДНК. Бактерии не имеют систем репарации двойного разрыва, и только гомологичная рекомбинация в области разрыва может спасти бактерию от гибели.

Система CRiSPR/Cas9 была успешно применена для делетирования генов у *C. ljungdahlii*. Эффективность делеции четырех генов *pta*, *adhE*, *ctf* и *pyrE* составила, соответственно, 100, 75, 100 и 50% (Huang et al., 2016). Система CRiSPR/Cas9 также была использована для редактирования генома промышленно значимого ацетогена *C. amyloethanogenum* (Nagaraju et al., 2019), которая, кстати, имеет и собственную CRiSPR/Cas систему (Brown et al., 2014). В качестве объекта был использован ген *2,3-bdh*, делеция которого осуществляется с 50% эффективностью (Nagaraju et al., 2019).

Род *Clostridia* характеризуется высоким содержанием в геноме АТ-пар (для *C. ljungdahlii* — 69.8%). В этой связи кажется более целесообразным использовать не систему CRiSPR/Cas9, для которой протоспейсер имеет последовательность GGN, а CRiSPR/Cas12, для которой протоспейсер TTN. Действительно, CRiSPR/Cas12 система успешно использована для делеций гена *pyrE* (оратофосфорибозинтрансфераза) (Zhao et al.,

2019). Данная работа хорошо иллюстрирует все преимущества и трудности использования CRiSPR систем. Успех и применение CRiSPR системы зависят от эффективности гомологичной рекомбинации клетки хозяина. Частоты гомологичной рекомбинации у *C. ljungdahlii* низкие, и для ее осуществления нужны плечи гомологии размером в 1000 п.о., а еще лучше и более длинные. В приведенной работе авторы усовершенствовали протокол электропорации, позволивший повысить эффективность трансформации плазмидами до 10^4 колоний на 1 мкг ДНК плазмиды. При оптимизированных условиях с использованием плеч гомологии в 1000 п.о. авторы получили 2–3 рекомбинанта в опыте и 10–17 рекомбинантов при увеличении плеч гомологии до 2500 п.о. Преимуществом метода является его высокая специфичность. При анализе 15 из 17 колоний рекомбинантов содержали ожидаемые вставки (Zhao et al., 2019).

Для успешного осуществления задач метаболической инженерии большое значение имеет наличие набора плазмид с нужными репликационными, промоторами разной силы, как конститутивными, так и индуцированными, терминаторами транскрипции, селективными и контрелективными маркерами. Такие конструкции созданы и для бактерий рода *Clostridia*, но, конечно, не в столь больших и совершенных формах, как для *E. coli* (Joseph et al., 2018).

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Метаболическая инженерия может быть использована как для оптимизации производства метаболитов, нативных для ацетогенов, таких как ацетат, этанол, 2,3-бутандиол, так и для создания рекомбинантных штаммов, способных производить метаболиты, не свойственные ацетогенам, такие как ацетон, пропанол, 3-гидроксипропанол, полигидроксипропанол (Bengelsdorf, Dürre, 2017).

Ацетон

Ацетон относится к крупнотоннажным химикатам, его мировое производство превышает 5 млн т в год (Schiel-Bengelsdorf, Dürre, 2012). В настоящее время ацетон производят на базе углеводородного сырья, но в первой половине XX века большая часть ацетона, а также бутанола производилась микробиологическим путем в так называемом АВЕ-процессе (ацетон, бутанол, этанол). АВЕ-процесс использовал в качестве сырья пищевой продукт (мука злаков или кукурузы), и было бы заманчиво реанимировать процесс на новом уровне с использованием ацетогенов и такого сырья, как синтез-газ. АВЕ-процесс был основан на близких к ацетогенам микроорганизмах — сольватогенных клостридиях.

Было предпринято несколько попыток переноса пути биосинтеза ацетона из сольватогенных

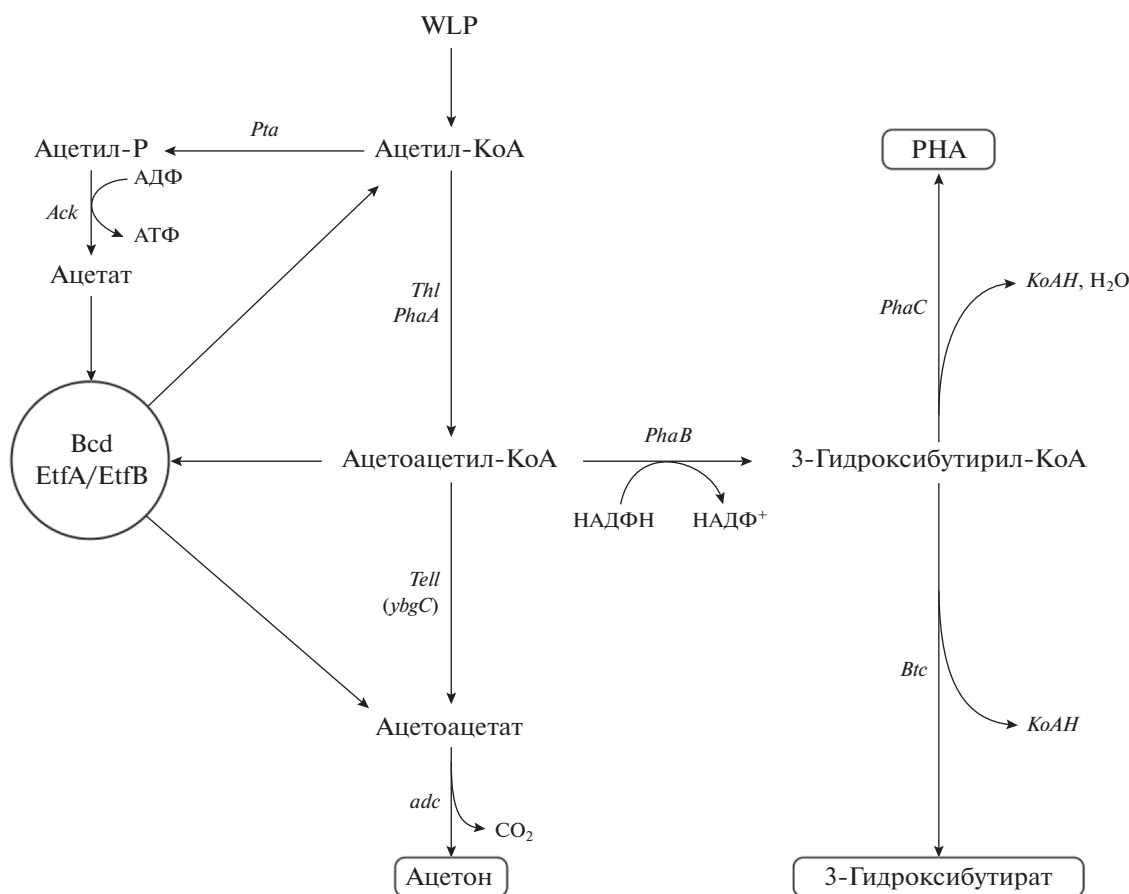


Рис. 7. Схема биосинтеза ацетона и полигидроксибутирата (PHA). Thl – тиолаза; Tell (ybgI) – тиоэстеразы из *B. subtilis* и *Haemophilus influenza* соответственно; Pta – трансацетилаза; Ack – ацетаткиназа; ctfA/ctfB – ацетоацетил-СоА-ацетат/бутирил-СоА трансфераза; Adc – ацетоацетилдекарбоксилаза. Гены биосинтеза PHA перенесены из *Cupriavidus necator*; phaA – 3-кетотиолаза; phaB – НАДФ-зависимая ацетоацетил-СоА редуктаза; phaC – PHA синтаза; Btc – бутирилтиоэстераза.

в ацетогенные клостридии. Все попытки были основаны на переносе оперона синтеза ацетона из *Clostridium acetobutylicum* (ASO-оперон). Этот оперон состоит из четырех генов (см. рис. 7). На первом этапе тиолаза (thl) конденсирует две молекулы ацетил-СоА с образованием ацетоацетил-СоА. Далее фермент, состоящий из двух субъединиц (ctfA/ctfB) ацетоацетил-СоА-ацетат/бутирил-СоА трансфераза, используя ацетат как косубстрат, превращает ацетоацетил-СоА в ацетил-СоА и ацетоацетат. На последней стадии декарбоксилаза (adc) отщепляет молекулу CO_2 от ацетоацетата и образует ацетон.

Синтез ацетона не требует затрат АТФ, но и не производит АТФ, в отличие от биосинтеза ацетата, который генерирует АТФ. Таким образом, аутоτροφный рост ацетогенов при биосинтезе ацетона может происходить только при одновременном синтезе ацетата, поставляющего клеткам энергию.

Объектами метаболической инженерии были различные ацетогены. Так ASO-оперон под кон-

тролем промотора тиолазы (P_{thl}) был интегрирован в плазмиду (pJMP), и плазида была трансформирована в *Clostridium aceticum*. Рекомбиантный штамм при росте на фруктозе синтезировал 9 мг л^{-1} ацетона, а при росте на газовой смеси CO_2/H_2 – до 8 мг л^{-1} (Schiel-Bengelsdorf, Dürre, 2012).

Acetobacterium woodii, трансформированные плазмидой с ASO-опероном под контролем промотора $P_{pta-ack}$ той же бактерии, оказались способными к синтезу ацетона при культивировании на синтез-газе. При периодическом культивировании (350 ч) концентрация ацетона достигала 15.2 мМ ($\sim 800 \text{ мг л}^{-1}$), а продуктивность – $26.4 \text{ мг л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$ (Hoffmeister et al., 2016).

У рекомбиантных бактерий *C. ljungdahlii* и очень близкой к ней *C. autoethanogenum* вместо ацетона или наряду с ним синтезируется продукт его восстановления 2-пропанол (изопропанол), вследствие наличия у этих бактерий очень актив-

ной алкогольдегидрогеназы широкой специфичности (Körpke et al., 2014).

Продукция ацетона сильно зависит от промотора, который используется для экспрессии ASO-оперона. Так *C. ljungdahlii* не синтезирует ацетон после трансформации плазмидой с ASO-опероном под контролем промотора тиолазы *C. acetobutylicum*, но синтез обнаружен в случае, если ASO-оперон находится под контролем промотора $P_{pta-ack}$ бактерий *C. ljungdahlii*. Правда, почти весь ацетон конвертируется в 2-пропанол, и количество продукта невелико (1.4 ± 0.5 мМ) (Bengelsdorf et al., 2016).

Лучшие результаты получены при использовании индуцибельных промоторов. Так, трансформация *C. ljungdahlii* ASO-опероном под контролем индуцируемого лактозой промотора P_{lac} привело к синтезу значительного количества ацетона, как при гетеротрофном росте на фруктозе, так и при автотрофном росте на углекислом газе. Концентрация ацетона при газовой ферментации составила ~ 15.2 мМ (Banerjee et al., 2014). Неясно, почему в данной работе не обнаружен 2-пропанол, хотя он детектирован во всех последующих работах. Возможно, газовая хроматография, используемая авторами, не разделяла две субстанции — ацетон и 2-пропанол.

Запатентован штамм *C. autoethanogenum* с производительностью 300 мг л⁻¹ ацетона и 25 мг л⁻¹ 2-пропанола (Patent US, 2012).

Во всех вышеперечисленных случаях речь шла о штаммах, несущих ASO-оперон на плазидах, но с использованием транспозона Himar (Phillips et al., 2019) удалось интегрировать ASO-оперон в хромосому *C. ljungdahlii*. Оперон находился под контролем промотора, индуцируемого ксилозой. Периодическое культивирование этого штамма на синтез-газе приводит к образованию смеси 2.4 мМ ацетона и 2.4 мМ изопропанола (Phillips et al., 2019).

Интересна попытка заменить зависимый от ацетата путь превращения ацетоацетил-СоА в ацетоацетил на путь, независимый от ацетата. С этой целью на плазмиде были клонированы гены тиоэстераз *Bacillus subtilis* (*teII*) и *Haemophilus influenzae* (*ybgC*), кодирующие белки, способные отщеплять СоА от ацетоацетил-СоА. Таким образом, был создан путь биосинтеза ацетона, неизвестный в природе (Patent Germany, 2007; Schiel-Bengelsdorf, Dürre, 2012).

РНВ (полигидроксibuтират) — биодegradируемый полиэфир, который служит для некоторых бактерий резервным депо для хранения углерода и энергии (как крахмал для растений). РНВ на-

капливается внутри клеток в виде гранул иногда в очень больших количествах (до 70–80% от сухого веса клеток).

Одной из подробно изученных бактерий, синтезирующих РНВ, является *Cupriavidus necator* (прежнее название *Ralstonia eutropha*). Ацетогены не способны к синтезу РНВ. Для организации такого синтеза оперон биосинтеза РНВ, состоящий из трех генов из *Cupriavidus necator*, был перенесен на плазмиде в *C. autoethanogenum*. Оперон был предварительно модифицирован с учетом частоты использования кодонов у *Clostridia* и помещен под контроль нативного промотора одного из генов WLP пути (Lemgruber et al., 2019).

Путь биосинтеза РНВ приведен на рис. 7. Рекомбинантный штамм *C. autoethanogenum* был исследован на его способность синтезировать РНВ в проточной равновесной ферментации на газовых смесях, имитирующих синтез-газ (50% СО, 20% СО₂, 20% Н₂ и 10% аргона) и отходящие газы металлургического производства (50% СО₂, 20% СО, 2% Н₂ и 28% N₂), при разных скоростях потока и разных значениях рН. Лучшие результаты были получены при росте на синтез-газе и при рН 5.5. Интересно отметить, что сдвиг рН от 5.0 до 5.5 увеличивает синтез РНВ в 10 раз. Максимальное содержание РНВ составило 5.6% на вес сухих клеток. Синтез РНВ приводит к падению синтеза ацетата, что, в свою очередь, вызывает недостаток АТФ в клетке. Авторы провели сравнение транскриптомов рекомбинантного штамма и контрольного, содержащего плазмиду без РНВ-оперона. Оказалось, что рекомбинантные клетки увеличивают транскрипцию всех генов, участвующих в синтезе АТФ. Это гены Rnf-комплекса (активация в 2 раза), гены WLP пути (активация в 2 раза), а также гены аргинин деиминазного пути деградации аргинина (в 3–7 раз), служащего у ацетогенов альтернативным путем синтеза АТФ (Nelson et al., 2017).

Получены рекомбинантные штаммы, синтезирующие РНВ у *C. coskata* и *C. ljungdahlii*, но содержание полимера у них при ауксотрофном росте невелико (около 1% в расчете на вес сухих клеток) (Flücher et al., 2019).

При отсутствии в клетке фермента, полимеризующего 3-гидроксibuтирил-СоА, это соединение под действием эстераз клеток превращается в 3-гидроксibuтират. В недавней работе (Karim et al., 2020) биосинтез 3-гидроксibuтирата был использован в качестве примера для опробования нового подхода к конструированию полезных штаммов микроорганизмов. Так как генетические инструменты часто малодоступны или малоэффективны

для промышленных штаммов, авторы предложили проводить предварительную оптимизацию биохимических путей в системе *in vitro* (в бесклеточных экстрактах). Использовались лизаты клеток *E. coli*, в которые в определенной пропорции добавляли лизаты клеток *E. coli*, экспрессирующие определенные ферменты исследуемого пути. Метод получил название IPROBE (In vitro prototyping and rapid optimization of biosynthetic enzyme). Авторам удалось подобрать соотношение ферментов двух первых этапов на пути биосинтеза 3-гидроксибутирата (Thl и Hbd) (см. рис. 7). На базе полученных данных был сконструирован штамм *C. autoethanogenum*, который при росте на синтез-газе мог синтезировать до 15 г/л 3-гидроксибутирата со скоростью $1.5 \text{ г л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$, что намного превосходит ранее полученные результаты не только для ацетогенов, но и для *E. coli* (Karim et al., 2020).

Бутанол и бутират

Бутанол относится к крупнотоннажным химикалиям. Его мировое производство составляет около 3.5 млн тонн в год (Patent WO, 2014). Подавляющее количество бутанола сегодня производят из углеводов, хотя в первой половине прошлого века использовался микробиологический процесс АВЕ (ацетон, бутанол, этанол).

Некоторые ацетогены, такие как *Clostridium carboxidivorans*, способны синтезировать, наряду с уксусной кислотой и этанолом, и бутанол и даже гексанол (De Tissega et al., 2019). Оптимизация процесса (состав газовой смеси, pH, состав сред) позволяют повысить содержание высших спиртов в конечном продукте. Так, в работе (Phillips et al., 2015) удалось получить в конце ферментации 14.7 мМ бутанола, 9.2 мМ гексанола и 70.5 мМ этанола. Эти показатели значительно уступают АВЕ процессу, что привело к попыткам использования методов метаболической инженерии для улучшения процесса. Объектом исследования стали бактерии *C. ljungdahlii*, которые сами по себе не синтезируют бутанол, но эти бактерии лучше других ацетогенов изучены и адаптированы к генетическим модификациям.

Бактерии *C. ljungdahlii* были трансформированы плазмидой (методом электропорации), которая содержала в своем составе оперон биосинтеза бутанола из сольватогенной бактерии *C. acetobutylicum*. Оперон содержал 6 генов под контролем промотора фосфотрансбутириказы P_{ptl} (гены оперона и биохимические реакции см. на рис. 6). Рекомбинантные бактерии синтезировали бутанол. В середине фазы роста ($OD_{600} = 0.6$) концентрация бутанола составляла 0.2 мМ, однако в конце ферментации бутанол отсутствовал. Скорее всего, он

трансформировался в бутират (концентрация 0.6–0.8 мкМ) (Körke et al., 2010).

Как при синтезе ацетата, так и при синтезе бутирата образуется АТФ. Однако при синтезе ацетата образуется 1 моль АТФ на моль ацетата и только 0.5 моля АТФ при синтезе бутирата (см. рис. 6). Энергетический расчет показывает, что недостающая энергия может поступать из бифуркационного комплекса, в который входит бутирил-CoA дегидрогеназа (BclH) и два флавопротеина (EffA и EffB). Этот комплекс генерирует восстановленный ферредоксин, который далее может генерировать дополнительно АТФ через ионный мембранный градиент (Dürge, 2016).

В последующих работах в бактерии *C. ljungdahlii* и *C. autoethanogenum* вводили не только оперон биосинтеза бутанола, но и гены, кодирующие флавопротеины. Рекомбинантный штамм *C. autoethanogenum* был способен синтезировать 25.7 мМ бутанола и 3.7 мМ бутирата (Patent WO, 2012), что выше, чем у природного продуцента *C. carboxidivorans* (около 15 мМ) (Phillips et al., 2015).

В целом, применение метаболической инженерии не привело к заметному увеличению синтеза бутанола рекомбинантными штаммами по сравнению с природными ацетогенными продуцентами.

Лучшие результаты продемонстрированы при конструировании штаммов-продуцентов бутирата. Бутират (масляная кислота) не является крупномасштабным химическим продуктом, но находит достаточно широкое применение в химической, пищевой и косметической промышленности. Схема реакций биосинтеза бутирата приведена на рис. 6. В работе (Ueki et al., 2014) описано конструирование штамма на основе *C. ljungdahlii*. В штамм ввели две плазмиды с генами из *C. acetobutylicum*. На одной плазмиде находились гены *pth* и *buk*, а на другой гены *thl*, *hbd*, *crt*, *bcd*, *effA* и *effB* (см. рис. 6). На той и другой плазмидах гетерологичные гены находились под контролем промотора p_{ta} (P_{pta}) бактерий *C. ljungdahlii*. Такой рекомбинантный штамм синтезировал ацетат, этанол и бутират при росте как на фруктозе, так и на смеси газов (H_2/CO_2 или CO). Во всех случаях доминирующим продуктом был ацетат, но значительная часть углеродного субстрата оказывалась в составе бутирата (13% при росте на H_2/CO_2 и 25% при росте на CO) (Ueki et al., 2014).

Транскрипционный анализ рекомбинантного штамма показал высокую экспрессию РНК всех гетерологичных генов. Протеомный анализ подтвердил высокий уровень синтеза всех этих белков, кроме кротоназы (Crt). Модификация сайта связывания с рибосомой (RBS) этого гена увеличила синтез кротоназы и привела к некоторому увеличению синтеза бутирата.

Была предпринята попытка интегрировать генетологические гены в хромосому *C. ljungdahlii*. Авторам удалось интегрировать гены *ptb* и *buk* двойным кроссовером. Однако встроить в хромосому таким путем более длинный фрагмент из шести генов не удалось. Фрагмент был встроен в хромосому единичным кроссовером (с включением плазмиды) по сайту *pta* промотора. Штаммы с интегрированными в хромосому генами росли несколько быстрее плазмид-содержащих штаммов, но синтез бутирата заметно не увеличился.

Интересно отметить, что интеграция прошла по сайту (с его инактивацией), но синтез ацетата не только не прекратился, он оставался главным продуктом, что предполагает наличие других путей его биосинтеза. Данные результаты демонстрируют ограниченность возможностей генетических манипуляций с ацетогенами и недостаток наших знаний о биохимии и физиологии этих микроорганизмов.

Для усиления синтеза бутирата в штамме были инактивированы гены *adhE* (альдегид/алкоголь дегидрогеназа) для перекрытия пути превращения бутирил-СоА в бутанол и *act* (ацетил-СоА трансфераза) для блокировки образования ацетата из бутирил-СоА. Конечный штамм направлял большую часть углерода субстрата на синтез бутирата. Выход бутирата по углероду составлял при росте на фруктозе 71%; на СО – 71% и на Н₂/СО₂ – 42% (Ueki et al., 2014).

Интересным подходом к получению бутирата и бутанола является совместное культивирование (ко-культивирование) различных клостридий, растущих на синтез-газе. Так, было показано, что *Clostridium kluyveri* при росте на ферментационной жидкости, содержащей ацетат и этанол, синтезирует С₄–С₆ карбоновые кислоты (бутират и капронат) по механизму обращенного пути β-окисления жирных кислот (Spirito et al., 2014).

Совместное культивирование *C. ljungdahlii* и *C. kluyveri* в непрерывной ферментации на синтез-газе в оптимальных условиях привело к синтезу 40 мМ/сут/л капроната с эффективностью по углероду 90% (Gildemyn et al., 2017).

Накопление жирных кислот приводит к закислению среды и ингибированию роста и метаболической активности ацетогенов. Интересно, что можно найти узкий интервал рН, при котором образовавшиеся в процессе жирные кислоты будут восстанавливаться в соответствующие спирты – бутанол, гексанол и октанол (Richter et al., 2016a).

Описанные в литературе выходы спиртов невелики, но оптимизация условий культивирования (или разделения процесса на две последовательные стадии), подбор оптимальных пар штаммов и применение метаболической инженерии могут принципиально улучшить результаты (Jiang et al., 2018).

Метаболиты, синтезируемые из пирувата

У ацетогенов 2,3-бутандиол и лактат являются нативными метаболитами, синтезируемыми в клетке из пирувата (рис. 5) (Körke et al., 2014).

Мировой рынок 2,3-бутандиола превышает 40 млрд долларов (Dürge, Eikmanns, 2015). Фирма “LanzaTech” разрабатывает процесс получения 2,3-бутандиола путем ферментации *C. autoethanogenum* и/или *C. ljungdahlii* при росте их на СО-содержащих газах (<http://www.chemicals>). Исследователи этой фирмы разработали и запатентовали штаммы *C. autoethanogenum* и *C. ljungdahlii*, производящие метил-этил кетон (бутанон-2) и 2-бутанол – метаболиты, которые не синтезируются ацетогенами естественным путем.

Следует отметить, что 2,3-бутандиол в силу наличия двух ассиметричных атомов углерода может существовать в трех изоформах: (R,R)-2,3-бутандиол; (S,S)-2,3-бутандиол и в мезоформе (RS)-2,3-бутандиол. Ацетогены синтезируют (RR) изомер, тогда как для биосинтеза метил-этил кетона (МЕК) и 2-бутанола нужен (RS) изомер.

Для осуществления нового пути ген (R,R)-2,3-бутандиол дегидрогеназы был инактивирован, и в ацетогены ввели три новых гена: R,S-2,3-бутанолдегидрогеназу, пропирил-глицеролдегидратазу и ген, кодирующий белок, реактивирующий дегидротазу под контролем промотора P_{pta/ack}. Генетологические гены были взяты из бактерии *Klebsiella pneumoniae* и состав их кодонов был оптимизирован. Бактерии *C. autoethanogenum*, трансформированные плазмидой, содержащей вышеприведенные гены, способны синтезировать небольшие количества 2-бутанола при росте на газовой смеси (44% СО; 32% N₂; 22% СО₂ и 2% Н₂). Культуральная жидкость в конце ферментации содержала 2.97 ± 0.115 г л⁻¹ ацетата; 1.33 ± 0.06 г л⁻¹ этанола и лишь 13.33 ± 1.53 мг л⁻¹ 2-бутанола.

Интересно отметить, что рекомбинантные бактерии способны катализировать трансформацию МЕК в 2-бутанол. Так, к бактериям, растущим на газе вышеприведенного состава, в середине лаг-фазы добавляли МЕК в концентрации 5 г л⁻¹ и в конце ферментации наблюдали почти 100% трансформацию его в 2-бутанол (Patent US, 2018).

Метаболическая инженерия может быть направлена не только на конструирование продуцентов новых метаболитов, но и на улучшение биосинтеза веществ, являющихся природными продуктами биосинтеза ацетогенов, таких как этанол и ацетат.

Так, было показано, что инактивация гена альдегид/алкоголь дегидрогеназы (*AdhE*) у *C. autoethanogenum* увеличивает синтез этанола на 180% (Liew et al., 2017). Очевидно, что весь поток углерода

идет теперь через ацетат, увеличивая обеспеченность клетки АТФ (см. рис. 1).

Другой пример — это усиление синтеза ацетата бактериями *Acetobacterium woodii*. Были клонированы и сверхэкспрессированы гены фосфотрансацетилазы и ацетаткиназы, а также 4 ТНФ-зависимых гена WLP-пути. Рекомбинантный штамм при периодическом культивировании на смеси H_2/CO_2 синтезировал до 50 г л^{-1} ацетата при низкой концентрации биомассы ($1.5\text{--}2 \text{ г л}^{-1}$ на вес сухой биомассы) (Straub et al., 2014).

Метаболическая инженерия может помочь и в улучшении технологических свойств штаммов-продуцентов. Так, два близкородственных и широко используемых ацетогена *C. ljungdahlii* и *C. autoethanogenum* являются природными ауксотрофами и требуют для роста добавки в среду витаминов — пантотената, тиамин и биотин. Геномный анализ показал, что у этих бактерий отсутствует три гена, необходимых для синтеза пантотената, и пять генов, необходимых для синтеза биотина (Annan et al., 2019). Для восстановления прототрофности на плазидах были клонированы кластеры генов *panBCD*, кодирующих синтез пантотената у *C. acetobutylicum* и гены биосинтеза тиамин t_{hic} -*ruqF* — оперона из *C. regsdale*. Трансформация плазмид в бактерии *C. autoethanogenum* восстанавливает прототрофность по пантотенату и тиамину.

Для восстановления прототрофности по биотину на плазидах клонировали два кластера генов биосинтеза биотина *bioBDF* и *bioHCA* из бактерий *Desulfomaculum nigrificans*. Важно отметить, что авторам удалось интегрировать гены биосинтеза витаминов в хромосомы *C. ljungdahlii* и *C. autoethanogenum*, создав удобные для промышленного использования штаммы (Annan et al., 2019).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АЦЕТОГЕНОВ

Газовая ферментация

Существует ряд объективных трудностей, которые необходимо преодолеть для реализации замечательных свойств ацетогенов в промышленности.

Одной из таких трудностей при газовой ферментации является низкая растворимость CO и H_2 в воде, что приводит к плохому массообмену и, следовательно, к замедлению процессов. Очевидным способом преодоления этой трудности является повышение давления, что увеличивает растворимость газов (Van Hecke et al., 2019).

Вторая трудность связана с медленным ростом ацетогенов, что преодолевается либо возвратом биомассы, либо использованием мембранных биореакторов, задерживающих биомассу в непрерывном процессе. Другой подход для решения

этой проблемы — использование реакторов с иммобилизованными клетками. Хотя такие приемы усложняют и удорожают технологию, но они могут привести к ускорению процесса и к увеличению выхода продукта. Так, использование реактора с иммобилизованными клеткам при ферментации *C. aceticum* на смеси CO_2/H_2 приводит к синтезу ацетата с выходом 96% при скорости синтеза $14 \text{ mM л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$ (Riegler et al., 2019).

Разновидностью реактора и использованием иммобилизованных клеток является реактор, представляющий собой колонку с полыми волокнами из полупроницаемых мембран. Бактерии образуют на поверхности волокон биопленку, а газы и жидкости циркулируют внутри полых волокон и во внешнем контуре.

Для газовой ферментации использовали почти все известные типы реакторов. Большая часть исследований выполнена на ферментерах с механической мешалкой (Continuous stirred-tank reactor — CSTR). В этом типе ферментеров удобно контролировать pH, температуру, состав сред и скорость подачи субстратов, но большие энергетические затраты на перемешивание затрудняют использование этих аппаратов в промышленности, особенно при получении таких недорогих продуктов как ацетат или этанол.

Наиболее дешевым и легко масштабируемым реактором является колонка, через которую пробулькивают (барботируют) пузырьки газа (Bubble column reactor — BCR). В промышленности популярны аппараты, где струя газа используется для перемешивания (циркуляции) жидкости (Air-lift reactor) (Stoll et al., 2020).

Важным условием успеха газовой ферментации является отсутствие примесей в газовых смесях.

Так как ацетогены являются строгими анаэробами, желательно полное отсутствие кислорода в газовой смеси, что не всегда легко достигается. Для устранения примесей кислорода предложена ко-культивация ацетогенов с карбоксидотрофами. Так, культивирование *C. ljungdahlii* с водородокисляющей бактерией *Paregeodacillus thermoglucosidasis* на смеси газов, содержащих CO_2 , CO , H_2 и O_2 привело к успешному синтезу ацетата с выходом 63% (Mohr et al., 2019).

Синтез-газ можно получать при газификации любых углеродсодержащих субстанций, начиная от природного газа, нефти, угля, древесины и кончая муниципальным мусором. Синтез-газ, полученный из таких субстанций, часто (кроме основных компонентов CO , CO_2 , H_2 , N_2) содержит минорные примеси, такие как H_2S , NH_3 , HCN . Некоторые из перечисленных примесей могут отрицательно влиять на процессы газовой ферментации. Так, маленькая компания “INEOS-BIO”

в 2013 г. построила в штате Флорида (США) пилотный завод проектной мощностью около 20 тыс. тонн в год этанола из синтез-газа. В качестве сырья для получения синтез-газа использовались отходы деревопереработки. В конце 2013 г. компания сообщила о трудностях проведения процесса из-за наличия в составе синтез-газа синильной кислоты (HCN). Фирма объявила о реконструкции производства с целью очистки синтез-газа, но завод так не приступил к промышленному производству (<http://biomassmagazin>).

В будущем, при падении цен на электричество из возобновляемых источников, основным сырьем для ацетогенов может стать синтез-газ, получаемый электролизом воды в присутствии CO₂, который не будет содержать токсичных примесей.

Недавно ученые фирмы “Siemens” предложили использовать для электрохимического получения синтез-газа промышленный электролизер с серебряным газо-диффузионным катодом, который применяется в хлор-щелочном производстве. Демонстрирована успешная работа в течение 1200 ч непрерывной работы с плотностью тока 300 мА см⁻². Важно отметить, что полученный синтез-газ имел низкое содержание кислорода (≤100 ppm) (Haas et al., 2018).

Проблемы газовой ферментации неоднократно освещались в обзорах (Liew et al., 2016; Molitor et al., 2017; Takors et al., 2018; De Tissera et al., 2019; Stoll et al., 2020).

Для промышленного производства крупнотоннажных химикатов, к которым относятся производства с объемом 100000 тонн в год (в английской литературе они обозначаются как commodities chemicals), нужна высокая продуктивность процесса (г л⁻¹ ч⁻¹), высокие выходы (г продукта на 1 г субстрата) и, желательно, высокий конечный титр продукта (г л⁻¹).

Промышленно значимые характеристики процесса газовой ферментации получены только для ацетата и этанола, и только для этанола развит индустриальный процесс. Для этанола сообщены высокие скорости продукции – 195 г л⁻¹ сут⁻¹ (Patent US, 2014; Molitor et al., 2016) с бактериями *C. ehtanogenum* и даже 360 г л⁻¹ сут⁻¹ с бактериями *C. ljungdahlii* (Patent US, 2007). Правда, все эти высокие цифры известны только из патентов и обзоров, где эти патенты упоминаются (Patent US, 2014; Takors et al., 2018; Norman et al., 2018).

Три компании интенсивно разрабатывали и осваивали технологию получения этанола из синтез-газа: “Coskata” (США), “INEOS-Bio” (США) и “LanzaTech” (Новая Зеландия).

Фирма “Coskata” в течение нескольких лет эксплуатировала опытную установку, но так и не построила промышленный завод. О печальной судьбе завода фирмы “INEOS-Bio” мы уже упо-

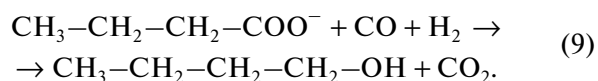
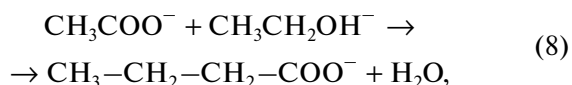
минали в нашем обзоре. Наиболее успешной оказалась деятельность фирмы “LanzaTech”, первоначально организованной в Новой Зеландии, а теперь имеющей офисы в США, Китае, Индии.

Основным сырьем для разработок фирмы “LanzaTech” являются отходящие газы металлургического производства, которые содержат CO, H₂ и CO₂, но сильно обогащены CO. В качестве микроорганизма фирма выбрала *C. autoehtanogenum* (Norman et al., 2018). Первая опытная установка была построена в Новой Зеландии в 2008 г. В 2014 г. компания построила пилотный завод мощностью 300 тонн в год с китайской компанией “Baو Steel” около Шанхая, который успешно функционирует (<http://www.lanzatech>). В настоящее время в Бельгии (г. Гент) строится промышленный завод совместно с металлургическим гигантом “Arcelormittal” мощностью 60 тыс. тонн в год стоимостью около 150 млн евро. Предполагается, что в ходе строительства будет создано 500 рабочих мест и 30 постоянных рабочих мест при эксплуатации завода (<http://belgium>). На заводе будут использованы колоночные Air-lift ферментеры. Производительность процесса будет составлять 10 г л⁻¹ ч⁻¹ (Takors et al., 2018). Пуск завода намечен на 2021 год.

Использование продуктов газовой ферментации в качестве субстратов

Главными продуктами при газовой ферментации ацетогенов являются ацетат и этанол. Оба эти вещества могут использоваться в качестве субстратов при ферментации с другими микроорганизмами.

Для получения из ацетата и этанола более дорогих продуктов – бутанола и гексанола, была использована способность *C. kluyveri* трансформировать C₂-соединения в C₄, C₆ и более высокомолекулярные органические кислоты согласно уравнению (8) и способность *C. ljungdahlii* восстанавливать органические кислоты в соответствующие спирты в присутствии H₂ и CO, согласно уравнению (9) (Dinder et al., 2016; Richter et al., 2016a):



Эти разработки были использованы при конструировании опытной установки, созданной двумя промышленными гигантами “Siemens” и “Evonik”. Установка включает электролизер для получения синтез-газа, разработанный фирмой “Siemens”, и ферментацию синтез-газа в бутанол и гек-

санол с использованием двух бактерий *C. ljungdahliae* и *C. kluyveri*. Установка будет функционировать в течение 2020 г. в Марли (Германия), и по результатам ее работы будет сделана оценка пригодности процесса для масштабирования. Самым дорогим ресурсом в этом процессе является электричество, расход которого составляет 22 кВт ч на 1 кг бутанола. При современной цене электричества около 4.5 евроцента за 1 кВт ч процесс уже может конкурировать по цене с нефтехимическим производством бутанола (<https://press.siemens>).

Большинство работ по получению соединений на базе продуктов газовой ферментации не имеют на сегодня практического значения, а скорее просто демонстрируют принципиальную возможность осуществления таких процессов. Так, финские исследователи использовали бактерию *Actinobacter baylyi*, которая хорошо растет на ацетате и способна синтезировать большое количество липидов. Эта бактерия была генетически модифицирована таким образом, что она стала способна синтезировать алканы или алкиловые эфиры жирных кислот. Количество этих соединений было очень незначительным – 90 мг л⁻¹ эфиров (Lechtien et al., 2017) и 1 мг л⁻¹ алканов (Lechtien et al., 2018).

Уксусная кислота, полученная из газовой ферментации ацетогенов, была использована для роста дрожжей с целью получения микробного белка (Single-cell protein). Получение белка одноклеточных организмов – это один из путей удовлетворения растущего спроса на кормовой и пищевой белок. Считается, что к 2050 г. население земли достигнет 9 млрд человек, и потребности в белке возрастут с 473 до 943 Мт. В предложенном двухстадийном процессе 25% углерода CO₂ оказывается в составе дрожжевой биомассы, содержащей 40–50% белка (Molitor et al., 2019).

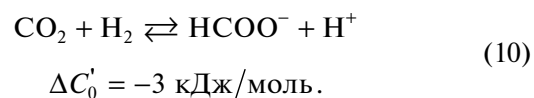
Многие бактерии могут использовать уксусную кислоту как источник углерода и энергии. Так, в СССР на заводе “Прогресс” (г. Степногорск, Казахская ССР) осуществлялся промышленный выпуск незаменимой аминокислоты L-лизина с использованием уксусной кислоты в качестве сырья и бактерий *Corynebacterium glutamicum* в качестве продуцента. Титр лизина достигал 70 г/л в аппаратах объемом 64 куб. м, а выпуск продукции составлял многие тысячи тонн в год.

Хранение водорода

Водород является перспективным энергоносителем для будущей циклической экономики. Одной из основных трудностей “водородной” энергетики является хранение и транспортировка этого высокореакционного газа, что требует построения новой и дорогой инфраструктуры.

Путем решения этой проблемы является хранение и транспортировка водорода в связанном

состоянии в виде формиата. Реакция восстановления CO₂ водородом идет по уравнению (10):



Формиат достаточно стабилен в водных растворах и может транспортироваться и храниться с использованием существующей инфраструктуры. В месте потребления водород получают из формиата достаточно просто в силу обратимости реакции (например, нагреванием раствора формиата).

В настоящее время формиат получают гидрированием CO₂ с помощью химических катализаторов при повышенных температурах и давлении. Вместе с тем реакция гидрирования CO₂ с образованием формиата – это первая реакция WLP-пути, и ацетогены осуществляют ее при комнатной температуре и нормальном давлении. К сожалению, большинство формиатдегидрогеназ, катализирующих эту реакцию, имеют в качестве кофакторов NADH и NADPH, что затрудняет использование этих ферментов для биокаталитического получения формиата.

Положение изменилось после открытия в 2013 г. у бактерий *A. woodii* фермента, осуществляющего гидрирование CO₂ с использованием только водорода. Фермент получил название водород зависимой CO₂ редуктазы (Hydrogen dependent carbon dioxide reductase, HDCR) (Schuchman, Müller, 2013). У бактерий *Thermoanaerobacter kivui* была обнаружена термостабильная HDCR (Schazz et al., 2018). Термостабильный фермент имеет оптимум действия при 70°C и катализирует как прямую, так и обратную реакции со скоростью около 930 мкмоль H₂ мин⁻¹ мг⁻¹ (Schazz et al., 2018). Была предложена технология биокатализа с использованием целых клеток для продукции формиата из синтез-газа (Schazz, Müller, 2020) и водорода из формиата (Kottenhahn et al., 2018), что снижает затраты и повышает стабильность биокатализа.

HDCR-ферменты превосходят по эффективности химические катализаторы. Так, число оборотов химического катализатора при 30°C составляет 3400 ч⁻¹ и при 80°C – 8050 ч⁻¹, а для HDCR из *T. kivui* число оборотов при 60°C достигает 9555000 ч⁻¹ (Müller, 2019). Таким образом, ацетогены имеют хорошие перспективы для развития биотехнологических процессов для получения формиата и его использования как в химической промышленности, так и в “водородной” энергетике будущего (Müller, 2019).

Электробиосинтез

Еще одним перспективным направлением практического применения ацетогенов является

электробиосинтез. Электробиосинтез – это прямое поглощение электронов бактериями с электрода (катода) и использование этих электронов в качестве восстановительных эквивалентов. Феномен был открыт 10 лет назад на примере ацетогена *Sporomusa ovata*, который поглощал электроны с катода и, восстанавливая CO_2 , синтезировал уксусную кислоту (Nevin et al., 2010). Процесс проводят при напряжении на катоде, которое не позволяет образование водорода. К электробиосинтезу кроме *S. ovata* способны еще некоторые ацетогены, например, *S. ljuyngdahlii*, *Sporomusa spheroides*, *Moorella thermoacetica*, но далеко не все (Shin et al., 2017).

Следует отметить, что механизм транспорта электронов для ацетогенов не известен.

Электробиосинтез осуществляется с очень высокой кулоновской эффективностью (то есть все электроны, полученные с катода, расходуются на восстановление CO_2 и формирование конечных продуктов), но скорости очень низкие. Так, электробиосинтез с *S. ovata* дикого типа приводит к накоплению около 1.8 мМ ацетата за 5 сут. Штамм был улучшен путем его адаптации к быстрому росту на метаноле (лабораторная эволюция). Такой штамм (*S. ovata* T18-2) за 5 сут синтезировал уже 13 мМ ацетата (Tremblay et al., 2015).

Совершенствование процесса связано с подбором условий процесса, особенно с подбором материала электродов. На сегодня скорости электробиосинтеза заметно увеличены и достигнуты показатели в $13.1 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$ (Aryal et al., 2018) и даже $25.2 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$ (May et al., 2016).

Высказывается предположение, что электробиосинтез хорошо бы сочетать с установками для получения электричества с помощью солнца или/и ветра. Такие установки работают неравномерно (в зависимости от силы ветра и освещенности), и возникают ситуации, когда электроэнергию хорошо бы законсервировать в виде химических связей. В этой связи важно понять, как будет вести себя электробиосинтез в случае периодического включения и выключения электрического тока. Этот случай был исследован, и оказалось, что прерывание подачи электричества даже на 64 ч не приводит к гибели микроорганизмов на катоде, и через 6 ч после возобновления подачи тока электробиосинтез восстанавливается в полном объеме (Rojas et al., 2018).

Несмотря на достигнутые успехи, биоэлектробиосинтезу присущи внутренние противоречия. Для высоких скоростей биосинтеза нужна высокая плотность тока, но в этом случае снижается кулоновская эффективность. При малой плотности тока эффективность процесса высока, но скорости малы. В целом электробиосинтез проигрывает по эффективности процессам, основанным на абиотическом электровосстановлении CO_2 в син-

тез-газ и последующей газовой ферментации (Prevotetan et al., 2020).

Миксотрофия

Многие ацетогены могут усваивать различные органические субстраты и осуществлять гетеротрофный рост. Усвоение сахаров осуществляется у них по широко распространенному пути Эмбдена–Мейергофа–Парнаса (Embden–Meyerhof–Parnas-pathway, EMP). Конечными продуктами этого пути при уксуснокислом брожении являются 2 молекулы ацетил-СoА, 2 молекулы АТФ, 2 молекулы CO_2 и 8 электронов из 1 молекулы гексозы. Теоретически, так как ацетогены имеют WLP-путь фиксации CO_2 , то они могут, используя энергию АТФ и наличие восстановительных эквивалентов, восстановить 2 молекулы CO_2 в ацетил-СoА и далее синтезировать ацетат. Таким образом, теоретически, при гетеротрофном росте на гексозах ацетогены могут синтезировать 3 моля ацетата на 1 моль гексозы. Условием такого сверхсинтеза ацетата является одновременная работа в клетке EMP и WLP путей биосинтеза. Это явление наблюдали экспериментально при росте ацетогенов на сахарах, и оно получило название анаэробная нефотосинтетическая миксотрофия – ANP (Anaerobic nonphotosynthetic mixotrophy) (Fast et al., 2015).

Хотя явление миксотрофии известно давно (Braun, Gottschalk, 1981), но оно до сих пор изучено недостаточно. Мало сведений о взаимодействии EMP и WLP путей. У некоторых ацетогенов обнаружена катаболитная репрессия, но для других отмечен равномерный рост на газовых субстратах в присутствии гексоз. В любом случае, наличие миксотрофии наблюдали в экспериментальных условиях неоднократно. Так, было исследовано 17 ацетогенных бактерий, как мезофильных, так и термофильных, и у всех отмечалось явление ANP. Наличие миксотрофии оценивается по величине отношения углерода в субстрате (гексозе) C_c к углероду в продукте C_p . Углерод в продукте – это сумма углерода в биомассе и синтезированных метаболитах. Для EMP пути $C_c/C_p = 0.67$ (что связано с выделением CO_2 в процессе). Всякое превышение C_c/C_p выше 0.67 будет означать наличие миксотрофии. Действительно, для всех изученных ацетогенов C_c/C_p колебался от 0.78 до 0.80 (Maru et al., 2018).

Явление миксотрофии можно использовать для увеличения энергообеспеченности ацетогенов при синтезе ими таких соединений как липиды или алканы. Интересным, но пока нереализованным направлением является перенос WLP-пути в промышленные гетеротрофы для увеличения выхода продуктов ферментации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Направлением современного научно-технического прогресса является движение от экономики, основанной на ископаемых ресурсах (нефть, газ, уголь) к циклической неисчерпаемой экономике, основанной на возобновляемых источниках энергии (ветер, солнце, биомассы растений, гидро- и геотермальная энергия) и замкнутом цикле использования углерода. Рецикл углерода может осуществляться через газификацию любых углеродсодержащих соединений с образованием синтез-газа. Синтез-газ в свою очередь будет субстратом для синтеза химикатов, полимеров и биотоплива.

Энергетика и химия — это гигантские и очень инерционные отрасли, и, конечно, переход их на рельсы циклической экономики займет многие десятилетия, возможно, весь оставшийся XXI век. Тем не менее, тенденция явно прослеживается. Уже сегодня цены ветровой и солнечной электроэнергии приблизились к ценам электричества, получаемого традиционными способами. К 2030 г. около 20% всей электроэнергии в мире будет получено из возобновляемых источников.

В новой циклической экономике большой удельный вес будет иметь биотехнология и, в частности, промышленная микробиология, которая будет производить различные химикаты, биотопливо, незаменимые аминокислоты, витамины, кормовой и пищевой белок, биодegradуемые биополимеры и многие другие продукты. Сегодня можно предполагать различные способы использования ацетогенов в будущей биоэкономике, несмотря на имеющиеся свойственные им ограничения. Эти ограничения связаны с бедным репертуаром синтезируемых ацетогенами метаболитов и энергетическими ограничениями, приводящими к медленному росту и невозможности синтеза энергоемких соединений, таких как алканы или высшие жирные кислоты и спирты.

Уже сегодня преодолены многие технические трудности газовой ферментации и синтез этанола из газов металлургического производства, обогащенных CO, реализован в промышленном масштабе. Нет технологических препятствий в тиражировании этой технологии. Сырьем для процесса могут быть растительная биомасса, подвергнутая газификации, или в будущем синтез-газ, получаемый электролизом воды в присутствии CO₂. Учитывая современное производство 100 млн тонн топливного этанола, легкость превращения этанола в этилен и полиэтилен, а также прогресс в технологиях получения авиационного топлива из этанола, будущий рынок этанола можно оценить в 0.5–0.8 млрд тонн в год.

Расширение состава синтезируемых ацетогенами метаболитов будет увеличиваться по мере

совершенствования методологии метаболической инженерии. Другой и очень простой подход к расширению набора синтезируемых метаболитов — это двустадийный процесс ферментации, когда на первом этапе ацетогены из синтез-газа образуют ацетат и этанол, а на втором гетеротрофы используют ацетат и этанол как источник углерода и энергии и синтезируют желаемые метаболиты. Двустадийный процесс пригоден почти для всех известных на сегодня продуктов микробиологической промышленности.

Большой и пока мало используемый потенциал заключается в явлении миксотрофии. В случае ацетогенов газовая ферментация с одновременным использованием сахаров усиливает энергообеспеченность, что делает возможным синтез энергоемких продуктов, например, алканов. Заманчива перспектива переноса WLP-пути в промышленные гетеротрофные микроорганизмы с целью повышения выхода целевых продуктов при ферментации сахаров.

В будущей “водородной” энергетике ацетогены могут найти применение в синтезе формиата из H₂ и CO₂ и в процессе разложения формиата на водород и уголекислоту. Синтез формиата может представлять и самостоятельный интерес для современной химической индустрии.

Успех всех вышеперечисленных направлений будет зависеть от прогресса в исследовании ацетогенных микроорганизмов, поиске новых представителей с уникальными свойствами, совершенствовании инструментов генетических преобразований, от успехов в понимании функционирования, регуляции и сопряжения метаболических сетей у этих микроорганизмов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дебабов В.Г. Биоэтанол из синтез-газа // Биотехнология. 2012. Т. 28. № 3. С. 8–19.
- Annan F.J., Al-Sinawi B., Humphreys C.H., Normann R, Winzer K., Köpke M., Simpson S.D., Mitton N.P., Henstra A.M. Engineering of vitamin prototrophy in *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. P. 4633–4648.
- Arslan K., Bayer B., Abubackar H.V., Veiga M., Kennes C. Solventogenesis in *Clostridium acetivum* producing high

- concentrations of ethanol from syngas // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 292. P. 12191.
- Aryal N., Tremblay P.L., Xu M., Dangaard A.E., Zhang T. Highly conductive poly (3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate polymer coated cathode for the microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide // *Front. Energy Res.* 2018. V. 6. P. 72.
- Bache R., Pfennig N. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields // *Arch. Microbiol.* 1981. V. 130. P. 255–261.
- Basen M., Müller V. Hot acetogenesis // *Extremophiles.* 2017. V. 21. P. 15–26.
- Banerjee A., Leang C., Ueki T., Nevin K.P. Lovley D.R. Lactose-inducible system for metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 2410–2417.
- Bengelsdorf F.R., Dürre P. Gas fermentation for commodity chemicals and fuels // *Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 10. P. 1167–1170.
- Bengelsdorf F.R., Poehlein A., Linder S., Erz C., Hummel T., Hoffmeister S., Daniel R., Dürre P. Industrial acetogenic biocatalysts: a comparative metabolic and genomic analysis // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1036.
- Bertsch J., Müller V. Bioenergetic constraints for conversion of syngas to biofuels in acetogenic bacteria // *Biotechnol. Biofuel.* 2015a. V. 8. P. 210.
- Bertsch J., Müller V. CO metabolism in the acetogene *Acetobacter woodii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015b. V. 81. P. 5949–5956.
- Braun K., Gottschalk G. Effect of molecular hydrogen and carbon-dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium acetatum* // *Arch. Microbiol.* 1981. V. 128. P. 294–298.
- Brown S.D., Nagaraju S., Utturkar S., De Tissera S., Segovia S., Mitchell W., Land M.I., Dassanayake A., Köpke M. Comparative single-molecule sequencing and hybrid approach for finishing the genome of *Clostridium autoethanogenum* and analysis CRISPR systems in industrial relevant clostridia // *Biotechnol. Biofuel.* 2014. V. 7. P. 40–58.
- Buckel W., Thauer R. Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin and anaerobic respiration with proton (Ech) or NAD (Rnf) as electron acceptors: A historical review // *Front. Microbiol.* 2018a. V. 9. P. 401.
- Buckel W., Thauer R. Flavin-based electron bifurcation. A new mechanism of biological energy coupling // *Chem. Rev.* 2018b. V. 118. P. 3862–3886.
- Burton R., Can M., Eskilsen D., Wiley S., Ragsdahl S.W. Production and properties of enzymes that activate and produce carbon monoxide // *Methods Enzymol.* 2018. V. 613. P. 297–324.
- Classen N.J., Cotton C.A.R., Kopljar D., Bar-Even A. Making quantitative sense of electromicrobial production // *Nat. Catal.* 2019. V. 2. P. 437–447.
- Cotton C.A.R., Claassens N.J., Benito-Vequejizo S., Bar-Even A. Renewable methanol and formate as microbial feed stocks // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2020. V. 62. P. 168–180.
- Drake H.L., Gossner A.S., Daniel S.L. Old acetogenes new light // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1125. P. 100–128.
- Drake H.L. Kiisel K., Matthies M. “Acetogenic Prokaryotes” // *The Prokaryotes* / Eds. Rosenberg E., De Long E.F., Lory S., Stackelbrandt E., Tompson F. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013.
- Demmer K., Huang H., Wang S., Demmer U., Tauer R.K., Ermler U. Insight into flavin-based electron bifurcation via the NAD-dependent reduced ferredoxin NADP oxidoreductase structure // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 21985–21995.
- De Tissera S., Köpke M., Simpson S.D., Humphreys C., Minton N.P., Dürre P. Syngas biorefinery and syngas utilization in *Biorefineries*, Wagemann K. and Tippkötter N., Eds. // *Adv. Biochem. Biotechnol.* 2019. V. 166. P. 247–280.
- Diender M., Stams A.J., Souza D.Z. Production of medium-chain acids and higher alcohols by a synthetic coculture grown on carbon monoxide or syngas // *Biotechnol. Biofuels.* 2016. V. 9. P. 82.
- Dürre P. Butanol formation from gaseous substrates // *FEMS Microbiol. Lett.* 2016. V. 363. P. fnw040.
- Dürre P., Eikmanns B. C₁-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V. 35. P. 63–72.
- Fast A.G., Papoutsakis E.T. Stoichiometric and energetic analysis of non-photosynthetic CO₂ fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuel and chemicals // *Curr. Opin. Chem. Engin.* 2012. V. 1. P. 380–395.
- Fast A.G., Schmidt E.D., Jones W., Tray B.P. Acetogenic mixotrophy novel options for yield improvement in biofuel and biochemical production // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 60–72.
- Flüchter S., Follonier S., Schiel-Bengelsdorf B., Bengelsdorf F.R., Zinn M., Dürre P. Anaerobic production of poly(3-hydroxybutyrate) and its precursor 3-hydroxybutyrate from synthesis gas by autotrophic *Clostridia* // *Biomacromolecules.* 2019. V. 20. P. 3271–3282.
- Gildemyn S., Molitor B., Usack G., Nguen M., Rabaey K., Angenent L.T. Upgrading syngas fermentation effluent using *Clostridium kluyveri* in a continuous fermentation // *Biotechnol. Biofuel.* 2017. V. 10. P. 83.
- Groher A., Weuster-Botz D. Comparative reaction engineering analysis of different acetogenic bacteria for gas fermentation // *J. Biotechnol.* 2016. V. 288. P. 82–94.
- Haas T., Krause R., Weber R., Demler M., Schmid G. Technical photosynthesis involving CO₂ electrolysis and fermentation // *Nature Catal.* 2018. V. 1. P. 32–39.
- He Y., Li M., Perumal V., Feng X., Fang Y., Xie Y., Sievert S.M., Wang F. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum *Bathyarchaeota* widespread in marine sediments // *Nature Microbiol.* 2016. V. 1. P. 16035.
- Heap J.T., Kuchne S.A., Ehsaan M., Gartman S.T., Cooksley C.M., Scott J.C., Minton N.P. The GlosTron mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined // *J. Microbiol. Meth.* 2010. V. 80. P. 49–55.

- Herrmann G., Jayamani E., Mai G., Buckel W. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. P. 784–791.
- Hess V., Schehman K., Müller V. The ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase from acetogen *Acetobacter woodii* requires Na⁺ and reversible coupled to the membrane potential // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 288. P. 31496–31502.
- Hoffmeister S., Gerdom M., Bengelsdorf F.R., Linder S., Flüchter S., Öztürk H., Blümke W., May A., Fischer Y., Bahl H., Dürre P. Acetone production with metabolically engineered strain *Acetobacterium woodii* // *Metabolic. Engin.* 2016. V. 36. P. 37–47.
- <https://belgium/arcelormittal.com/en/> ArcelorMittal and LanzaTech break ground on €150million project to revolutionise blast furnace carbon emissions capture
- <http://biomassmagazine.com/articles/13662/ineos-bio-to-sell-ethanol-business-including-vero-beach-plant>.
- <https://www.chemicals-technology.com/projects/LanzaTech-2,3-Butanediol-Demonstration-Plant>
- <https://www.lanzatech.com>.
- <https://press.siemens.com/global/en/pressrelease/research-project-rheticus>.
- <https://www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries/>.
- Huang H., Chai C., Ci N., Rove P., Minton N.P., Yang S., Liang W., Gu Y. CRISPR/cas9-based efficient genome editing in *Clostridia ljungdahlii* an autotrophic gas-fermenting bacterium // *ACS Synt. Biol.* 2016. V. 5. P. 1355–1361.
- Humphreys C.M., McLean, S., Schatschneider M.S., Milat S., Henstra A.M., Annan F.J., Breitkopf R., Pander B., Piatek P., Rowe P., Wichlacz A.T., Woods C., Norman R., Blom J., Goesman A., Hodgman C., Barrett D., Thomas N.R., Winzer K., Minton N.P. Whole genome sequence and manual annotation of *Clostridium ethanogenum* and industrial relevant bacterium // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. P. 1085.
- Jiang Y., Zhang T., Lu J., Dürre P., Zhang W., Doung W., Zhou J., Jiang M., Xin F. Microbial co-culturing systems butanol production from organic waste through consolidated bioprocessing // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. P. 5419–5425.
- Joseph R.C., Kim N.M., Sandoval N.R. Recent development of the synthetic biology Toolkit for *Clostridium* // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 154.
- Karim A.S., Dudlen Q.M., Juminaga A., Yuan Y., Crowe S.A., Heggstad J.T., Gary S., Abdalla T., Grubbe W., Rasor R.J., Coar D.N., Torulas S.M., Krein M., Liew F.M., Qua-Tellbaum A., Jensen R.O., Stuart J.A., Simpson S.D., Köpke M., Jewett M.C. *In vitro* prototyping and rapid optimisation of biosynthetic enzymes for cell design // *Nature Chem. Biol.* 2020.
- <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0959-0>
- Köpke M., Held C., Hujer S., Liesegang H., Weizer A., Wellherr A., Ehrenreich A., Liebel W., Gottshalk G., Dürre P. *Clostridium ljungdahlii* represent a microbial production platform based on syngas // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 13087–13092.
- Köpke M., Mihalcea C., Bromley J.C., Simpson S.D. Fermentative production of ethanol from carbon monoxide // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011a. V. 22. P. 320–325.
- Köpke M., Mihalcea C., Liew F.M., Tizard J.H., Ali M.S., Konnoly J.J., Sinawi A.L., Simpson S.D. 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011b. V. 77. P. 5467–5475.
- Köpke M., Gerth M.L., Maddok D.J., Mueller A.P., Liew F.M., Simpson S.D., Patrick W.M. Reconstruction of acetogenic 2,3-butandiol pathway involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 3394–3403.
- Kottenhahn P., Schuchman K., Müller V. Efficient whole-cell biocatalyst formate based hydrogen production // *Biotechnol. Biofuels.* 2018. V. 11. P. 93.
- Kremp F., Poelein A., Daniel R., Müller V. Methanol metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii* // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 4369–4384.
- Latif H., Zeidan A.A., Nielson A.T., Zandler K. Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. V. 27. P. 79–87.
- Leang C., Ueki T., Nevin R., Lovley D.R. A genetic system for *Clostridium ljungdahlii* a chassis for autotrophic production of biocomodities and a model homoacetogen // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 1102–1109.
- Lechtenfeld M., Heine J., Sameith J., Kremp F., Müller V. Glycine betaine metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii* // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 4512–4525.
- Lehtinen T., Efimova E., Tremblay P.L., Santala S., Zhang T., Santala V. Production of long chain alkyl esters from carbon dioxide and electricity by a two-stage bacterial process // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 43. P. 30–36.
- Lehtinen T., Vitrauen M., Santala S., Santala V. Production of alkanes from CO₂ by engineered bacteria // *Biotechnol. Biofuels.* 2018. V. 11. P. 228.
- Lemaire O.N., Jespersen M., Wagner T. CO₂-fixation strategies in energy extremophiles: what can we learn from acetogenes? // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 486.
- Lemgruber R.S.P., Valgepea K., Tappel R., Behrendorff J.B., Palfreyman R.W., Plan M., Hodson M.P., Simpson S.D., Nielsen L.K., Köpke M., Marcellin E. System-level engineering and characterization of *Clostridium autoethanogenum* through heterologous production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) // *Metabol. Eng.* 2019. V. 53. P. 14–23.
- Liang J., Huang H., Wang S. Distribution, evolution, catalytic mechanism and physiological functions of the flavin-based bifurcating NADH-dependent reduced ferredoxin NADP oxidoreductase // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 373.
- Liew F.-M., Martin M.E., Tappel R.C., Heijstra V.D., Mihalcea C., Köpke M. Gas fermentation – a flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feed stocks // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 694.

- Liew E., Henstra A.M., Köpke M., Winzer K., Simpson S.D., Minton N. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production // *Metab. Engin.* 2017. V. 40. P. 104–114.
- Lubner C.E., Jennigs D.P., Mudler D.W., Schut G.J., Zadvornyy O.A., Hoben J.P., Tokmina-Lukaszewska M., Berry L., Nguen D.M., Lipscomb G., Bother B., Jones A.K., Miller A.F., King P.W., Adams M.W., Peters Y.W. Mechanistic insight in to energy conservation by flavin-based electron bifurcation // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. P. 655–659.
- Martin A.J., Larrazable G.O., Peretz-Ramirez Y. Towards sustainable fuels and chemicals through the electrochemical reduction of CO₂: lesson from water electrolysis // *Green Chem.* 2015. V. 17. P. 5114–5130.
- Maru B.T., Munasinghe P.C., Gilary H., Yones S.W., Tray P. Fixation of CO₂ and CO on a diverse range of carbohydrates using anaerobic, non-photosynthetic mixotrophy // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. P. 039.
- May H.D., Evans P.J., La Belle E.V. The bioelectrosynthesis of acetate // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. V. 42. P. 225–233.
- Mayer A., Weuster-Botz D. Engineering analysis of the autotrophic energy metabolism of *Clostridium aceticum* // *FEMS Microbiol. Letters.* 2017. V. 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx2019>
- McAllister K.N., Sorg J.A. CRISPR genome editing systems in the genus *Clostridium*: a timely advancement // *J. Bacteriol.* 2019. V. 201(16). e 00219-19.
- Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation // *FEBS Lett.* 1975. V. 59. P. 137–139.
- Mitchell P. Possible molecular mechanism of the proton motive function of cytochrome system // *J. Theor. Biol.* 1976. V. 62. P. 317–327.
- Mock J., Zheng Y., Mueller A.P., Ly S., Trau L., Segovia S., Nagaraju S., Köpke M., Dürre P., Thauer R.K. Energy conservation associated with ethanol formation from H₂ and CO₂ in *Clostridium autoethanogenum* involving electron bifurcation // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. P. 2965–2980.
- Mohr T., Intantes A., Biebinger L., Mayer P., Neuman A. Acetogenic fermentation from oxygen containing waste gas // *Front. Bioengin. Biotechnol.* 2019. V. 7. Art. 433.
- Molitor B., Richter H., Martin M.F., Jensen R.Q., Juminada A., Mihalcea C., Augenent L.T. Carbon recovery by fermentation of CO-rich gasses-turning steel mills in to biorefineris // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 15. P. 386–398.
- Molitor B., Marcellin E., Augenent L. Overcoming the energetic limitations of syngas fermentation // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017. V. 84. P. 84–92.
- Molitor B., Mishra A., Augenent L.T. Power-to-protein: converting renewable electric power and carbon dioxide into cell protein with two-stage bioprocess // *Energy Environ. Sci.* 2019. V. 12. P. 3515–3521.
- Müller V. New horizons in acetogenic conversion of one-carbon substrates and biological hydrogen storage // *Trends Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 1344–1354.
- Nagaraju S., Davis N.K., Jeffery D., Walker F., Köpke M., Simpson S.D. Genome editing *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/cas9 // *Biotechnol. Biofuel.* 2019. V. 9. P. 219–227.
- Najafpour G.D., Yones H. Ethanol and acetate synthesis from waste gas using butch culture of *Clostridium ljungdahlii* // *Enzyme. Microbiol. Technol.* 2006. V. 38. P. 223–228.
- Nelson L.K., Marcellin E., Valdepea K., Loi K.Q., Behrendorff J.B., Lemgruber R.S.P., Hodson M.P., Köpke M. Arginine deaminase pathway provides ATP and boosts growth of the gas-fermenting acetogen *Clostridium autoethanogenum* // *Metab. Engin.* 2017. V. 41. P. 202–211.
- Nevin K.P., Woodart T.L., Franks A.E., Summers Z.M., Lovley D.R. Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds // *mBio.* 2010. V. 1. e00103–e00110.
- Norman R.O.J., Millat T., Winzer K., Minton N.P., Hogman C. Progress towards platform chemical production using *Clostridium autoethanogenum* // *Biochem. Soc. Trans.* 2018. V. 46. P. 523–535.
- Patent Germany DE. № 102007052463 A1.
- Patent US. 2007. № 7285402.
- Patent US. 2012. № 0252083.
- Patent US. 2014. № 20140273115 A1.
- Patent US. 2018. № 890384132.
- Patent WO. 2012. № 2012/053905.
- Patent WO. 2014. № 2014/1132209 A1.
- Peters J.W., Beratan D.N., Bother B., Dyer R.B., Harwood S., Heiden Z.M., Hill R., Jones A.K., King P.W., Lu Ji., Lubber C.E., Minter S.D., Mudler D.W., Rangei S., Schut G.J., Seefeld L.C., Tokmina-Lukaszewska M., Zadvornyy O.A., Zhang P., Adams M.W. A new era for electron bifurcation // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018. V. 47. P. 32–38.
- Phillips J.R., Atiyeh H.K., Tanner R.S., Torres J.R., Saxena Y., Wilkins M.R., Hunke R.L. Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorus* syngas fermentation: medium development and culture techniques // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 190. P. 114–121.
- Phillips G., de Vries S., Jennevein S. Development of a metabolic pathway transfer and genomic integration system for the syngas-fermenting bacterium *Clostridium ljungdahlii* // *Biotechnol. Biofuel.* 2019. V. 12. P. 112.
- Poudel S., Dunham E.C., Lindsay M.R., Amenober M.J., Fones E.M., Colman D.R., Boyd E.S. Origin and evolution of flavin-based electron bifurcating enzymes // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1762.
- Prevot A., Carvajal-Arroyo J.M., Ganigue R., Rabaey R. Microbial electrosynthesis from CO₂: forever a promise? // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2020. V. 62. P. 48–57.
- Rajagopalan S., Datar R.P., Lewis R.S. Formation of ethanol from carbon monoxide via new microbial catalyst // *Bioenergy.* 2002. V. 23. P. 487–493.
- Ramio-Pujol S., Ganigue R., Baneras L., Calprim J. Impact of formate on the growth and productivity of *Clostridium ljungdahlii* PETO and *Clostridium carboxidivorus* P7 grown on syngas // *Int. Microbiol.* 2014. V. 17. P. 195–204.
- Ramio-Pujol S., Ganigue R., Baneras L., Calprim J. Incubation at 25°C prevents acid crush and enhances alcohol pro-

- duction in *Clostridium carboxidivorus* P7 // Bioresour. Technol. 2015. V. 192. P. 296–303.
- Ramio-Pujol S., Ganigue R., Banaras L., Colprim J. Effect ethanol and butanol on autotrophic growth on model homoacetogenes // FEMS Microbiol. Letters. 2018. V. 365. fny084.
- Riegler P., Bieringer F., Chrousel T., Stazz T., Lowe M., Webster-Botz D. Continuous conversion CO₂/H₂ with *Clostridium acetatum* in biofilm reactors // Bioresour. Technol. 2019. V. 291. P. 121760.
- Richter H., Molitor B., Diender M., Sousa D.Z., Augenent L.T. A narrow pH range supports butanol, hexanol and octanol production from syngas in a continus co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with in-line product extaction // Front. Microbiol. 2016a. V. 7. P. 1773.
- Richter H., Molitor B., Wei H., Chen W., Aristide L., Augenent L.A. Ethanol production in syngas-fermentating *Clostridium ljungdahlii* controlled by thermodynamic rather than enzymatic expression // Energy Environ. Sci. 2016b. V. 9. P. 2392–2399.
- Rogsdale S.W., Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1784. P. 1873–1898.
- Rogsdale S.W. Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenes // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1125. P. 129–136.
- Rojas M., Zaiat M., Gonzalez E.R., Wiver H., Pant D. Effect of the electric supply interruption on a microbial electrosynthesis system converting in organic carbon into acetate // Bioresour. Technol. 2018. V. 206. P. 203–210.
- Schwarz M.F., Schuchman K., Müller V. Hydrogenation of CO₂ at ambient pressure catalyzed by a highly active thermostable biocatalysis // Biotechnol. Biofuels. 2018. V. 11. P. 237.
- Schwarz M.F., Müller V. Whole-cell biocatalysis for hydrogen storage and syngas conversion to for mate using thermophilic acetogen // Biotechnol. Biofuels. 2020. V. 13. P. 13.
- Schoelmerich M.C., Müller V. Energy-converting hydrogenases: the link between H₂ metabolism and energy conservation // Cell Mol. Life Sci. 2019a. V. 77. P. 1461–1481.
- Schoelmerich M.C., Müller V. Energy conservation by a hydrogenase-dependent chemiosmotic mechanism in an ancient metabolic pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019b. V. 116. P. 6329–6334
- Schoelmerich M.C., Katsyv A., Dinig J., Hackmann T.J., Müller V. Energy conservation involving 2 respiratory circuits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. P. 1167–1173.
- Schiel-Bengelsdorf B., Dürre P. Pathway engineering and synthetic biology using acetogenes // FEBS Letters. 2012. V. 586. P. 2190–2198.
- Shin J., Song Y., Jeong Y., Cho B.-K. Analysis of the core genome and pangenome of autotrophic acetogenic bacteria // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 1531.
- Shin H.J., Yuang K.A., Nam C.W., Park J.M. A genetic approach for microbial electrosynthesis system as biocommodities production platform // Bioresour. Technol. 2017. V. 245. P. 1421–1429.
- Schuchman K., Müller V. Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase // Science. 2013. V. 342. P. 1380–1385.
- Schuchman K., Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life. A model for energy conservation in acetogenic bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2014. V. 12. P. 809–821.
- Shut G.J., Adams M.V. The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 4451–4457.
- Spirito C.M., Richter H., Rabaey K., Stams A.J.M., Augenent L.T. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste // Curr. Opin. Biotechnol. 2014. V. 27. P. 115–122.
- Stoll R., Boukis N., Sauer J. Syngas fermentation to alcohols: reactor technology and application // Chem. Ind. Tech. 2020. V. 92. P. 125–136.
- Strätz M., Sauer U., Kuhn A., Dürre P. Plasmid transfer into the homoacetogen *Acetobacter woodii* by electroporation and conjugation // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 1033–1037.
- Straub M., Demler M., Wenster-Botz D., Dürre P. Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii* // Biotechnol. 2014. V. 178. P. 67–72.
- Takors R., Kopf M., Mampel J., Bluemke W., Blombach B., Eikmanns B., Bengelsdorf F.R., Weuster-Botz D., Dürre P. Using gas mixture of CO, CO₂ and H₂ as microbial substrates: the do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale // Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 11. P. 606–625.
- Tremblay P.L., Zhang T., Dar S.A., Leang C., Lovley D.K. The Rnf complex *Clostridium ljungdahlii* is a proton-translocating ferredoxin:NAD oxidoreductase essential for autotrophic growth // mBio. 2012. e00406-12.
- Tremblay P.L., Höglund D., Koza A., Bonde I., Zhang T. Adaptation of the autotrophic acetogen *Sporomusa ovata* to methanol accelerate the conversion CO₂ to organic products // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 16168.
- Ueki T., Nevin K.P., Woodart T.L., Lovley D.R. Converting carbon dioxide to butyrate with engineered strain of *Clostridium ljungdahlii* // mBio. 2014. e01636-14-e4.
- Van Hecke W., Bockrath R., De Wever D. Effects of moderately elevated pressure on gas fermentation process // Bioresour. Technol. 2019. V. 293. P. 122129.
- Wang S., Huang H., Kahut Y., Mueller A.P., Köpke M., Thauer R.K. NADP-specific electron-bifurcating [Fe-Fe]-hydrogenase in functional complex with formate dehydrogenase in *Clostridium autoethanogenum* grown on CO // J. Bacteriol. 2013. V. 195. P. 4373–4386.
- Westphal L., Wiechmann A., Baker J., Minton N.A., Müller V. The Rnf complex is an energy coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the *Acetobacterium woodii* // J. Bacteriol. 2018. V. 200. e00357-18.

Zhao R., Lin Y., Zhang M., Chai C., Wang J., Yang W., Gu Y. CRiSPR/gas12-mediated gene deletion and regulation in *Clostridia ljungdahlii* and its application in carbon flux redirection in synthesis gas fermentation // ACS Synth. Biol. 2019. V. 8. P. 2270–2279.

Zhu H.-F., Lin Z.Y., Zhou L., Yi J.-H., Lun Z.-M., Wang S.-N., Tang W.-Z., Li F.-L. Energy conservation and carbon flux distribution during fermentation of CO and H₂/CO₂ by *Clostridium ljungdahlii* // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 416.

Acetogens: Biochemistry, Bioenergetics, Genetics, and Biotechnological Potential

V. G. Debabov*

*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”,
Moscow, 117545 Russia*

**e-mail: debabov13@yandex.ru*

Received December 30, 2020; revised January 25, 2021; accepted January 25, 2021

Abstract—The review discusses the present-day data on the biochemistry, bioenergetics, and genetics of acetogens, as well as their biotechnological potential. Acetogens are anaerobic gram-positive bacteria capable of growth on gaseous substrates: CO₂, CO, H₂. These bacteria have a characteristic biochemical pathway of CO₂ reduction to acetyl-CoA, termed the reductive acetyl-CoA pathway or a the Wood–Ljungdahl pathway. This is the only pathway of CO₂ fixation coupled to energy storage. Due to their efficient non-photosynthetic CO₂ fixation acetogens may be used for production of chemicals and biofuel in the expected economy based on renewable energy and resources. The shortcoming of acetogens growing on gaseous substrates are low energy provision and a narrow spectrum of terminal metabolites, primarily acetic acid and ethanol with low amounts of butanol and butyric acid. Acetogens are capable of heterotrophic growth on such substrates as sugars, lactate, or alcohols. Mixotrophy, i.e., simultaneous utilization of different substrates by acetogens, is a promising approach to increasing the energy provision. Application of the methods of metabolic engineering is required both for successful coupling of different metabolic pathways and for broadening the range of synthesized products. Genetic tools for the transformation of genomes of acetogens have been considerably improved in recent years.

Keywords: acetogens, CO₂ fixation, Wood–Ljungdahl pathway, electron bifurcation, genetic tools, metabolic engineering, biofuel, hydrogen storage