

合成生物学方法构建电活性大肠杆菌

王爱文, 李盛英*, 陈辉*

山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

王爱文, 李盛英, 陈辉. 合成生物学方法构建电活性大肠杆菌[J]. 微生物学报, 2023, 63(5): 1917-1929.

WANG Aiwen, LI Shengying, CHEN Hui. Synthetic biology methods for constructing electroactive *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(5): 1917-1929.

摘要: 电活性微生物具有独特的在细胞内外环境之间传递电子的能力。在对天然电活性微生物电子传递机制充分研究的基础上, 通过合成生物学方法异源构建天然电活性微生物电子传递结构基础也可以将遗传背景清晰的非电活性大肠杆菌改造为电活性微生物。构建获得的工程化电活性大肠杆菌可以直接应用于微生物燃料电池和生物传感器等领域, 同时也可以作为底盘细胞整合相应的目标产物合成通路实现电能驱动的生物合成。本文以合成生物学方法构建电活性大肠杆菌为主题, 详细阐述天然电活性微生物电子传递的机理及结构基础, 总结了工程化电活性大肠杆菌的构建策略、成功案例以及应用领域, 并对合成生物学方法构建电活性大肠杆菌未来的研究方向进行了展望。

关键词: 电活性微生物; 大肠杆菌; 合成生物学; 电子传递

Synthetic biology methods for constructing electroactive *Escherichia coli*

WANG Aiwen, LI Shengying*, CHEN Hui*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

Abstract: Electroactive microorganisms have the unique ability to transfer electrons between intracellular and extracellular environments. Based on a thorough study of the electron transfer mechanism of natural electroactive microorganisms, the structural basis of electron transfer in natural electroactive microorganisms can also be heterologously constructed by synthetic

*Corresponding authors. E-mail: LI Shengying, lishengying@sdu.edu.cn; CHEN Hui, Chen.Hui@sdu.edu.cn

Received: 2023-03-09; Accepted: 2023-04-23

biology methods, which can transform non-electroactive *Escherichia coli* with clear genetic background into electroactive microorganisms. The engineered electroactive *E. coli* obtained can be directly applied to fields such as microbial fuel cells, biosensors, and be used as a chassis cell to integrate the corresponding target product synthesis pathway to achieve electric-driven biosynthesis. This review article focuses on the construction of electroactive *E. coli* by synthetic biology methods, elaborates on the mechanism and structural basis of electron transfer in natural electroactive microorganisms, summarizes the construction strategy, successful cases, and application fields of engineered electroactive *E. coli*, and looks forward to the future research direction of constructing electroactive *E. coli* by synthetic biology methods.

Keywords: electroactive microorganism; *Escherichia coli*; synthetic biology; electron transfer

自然界中一些微生物可以将电子转移到位于细胞外的金属或金属氧化物上，这一过程被称为细胞外电子转移(extracellular electron transfer, EET)，这些微生物被称为电活性微生物(exoelectrogens)^[1]。1911年，Potter首次证明电活性微生物的存在，从而引入了电活性微生物的概念和使用电活性微生物作为生物电催化剂的理念。作为微型尺寸能够自我复制的生物反应器，迄今为止电活性微生物已成功应用于生物传感器^[2-3]、微生物燃料电池^[4-6]、污染物修复平台^[7-9]，以及H₂生产^[10-11]和CO₂固定^[12]等领域。电化学活性微生物的核心功能是能够实现细胞内外环境之间的电子转移与传递。随着相关研究的不断深入，3种细胞内外电子转移机制已经被提出并得到阐明。具体来说，这3种电子转移过程主要通过直接接触、形成电导性纳米线和产生分泌电子穿梭介质实现^[13]。

具有还原金属功能的希瓦氏菌MR-1 (*Shewanella oneidensis* MR-1)是目前研究较为深入的模式电活性微生物。该微生物的直接电子转移机制已被证实(图1A)。其介导细胞内外电子传递的结构基础是孔蛋白-细胞色素复合物MtrCAB。该复合物由周质十血红素c型细胞色素蛋白(periplasmic decaheme c-type cytochrome, MtrA)，外膜β桶孔蛋白(outer membrane

β-barrel porin, MtrB)和外膜十血红素c型细胞色素蛋白(outer membrane decaheme c-type cytochrome, MtrC)构成。MtrC蛋白位于细胞外膜可与电极直接接触。电子由电极转移到MtrC，进而通过MtrB转移到MtrA，然后到达CymA复合体。此后电子通过甲基萘醌池传递到另一个CymA，最后传递到将富马酸还原为琥珀酸的周质富马酸还原酶(periplasmic fumarate reductase, FccA)。电子也可以直接从MtrA转移到FccA，但这被认为是一种不太主要的电子传递机制^[14-15]。

硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)是另一种研究较为深入的模式电活性微生物。*G. sulfurreducens*介导细胞内外电子传递的结构基础是微生物导电纳米线，通常被称为e-pili，属于IV型菌毛，由c型细胞色素自组装而成。这些e-pili连接内膜和外部电子受体，促进直接电子转移(图1B)。然而*G. sulfurreducens*的电子传递机制目前尚存争议。Wang等的研究表明*G. sulfurreducens*主要利用约一微米长由六血红素细胞色素OmcS蛋白聚合而成的导电丝完成长距离电子传递，而不是e-pili。其中，紧密堆叠的血红素能够促进电子在OmcS单体间蛋白界面的稳定性，进而有效实现了电子转移。PilA蛋白的功能主要是促进OmcS蛋白向细胞外的分泌^[16-18]。

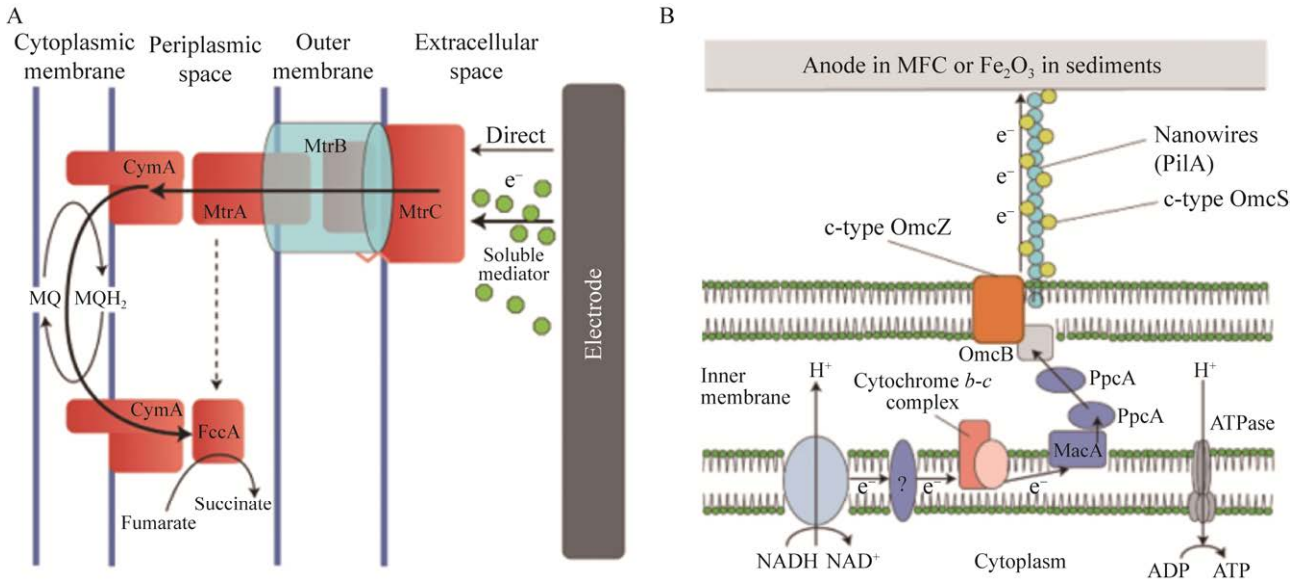


图 1 电活性微生物实现电子传递的结构基础^[27]

Figure 1 The structural basis of electroactive microbial cells for electron transfer^[27]. A: The electron transfer mechanism and conductive membrane structure of *S. oneidensis*. B: The electron transfer mechanism and conductive pili structure of *G. sulfurreducens*.

除了 *S. oneidensis* 和 *G. sulfurreducens*, 一些其他微生物还能够自主合成和分泌氧化还原活性代谢物作为细胞外的电子穿梭介质。电化学活性代谢物以还原状态分泌出细胞, 将电子转移到远距离的细胞外氧化剂中, 并以氧化状态返回细胞内, 然后这些分子被重新还原。具有细胞外电子穿梭能力的最典型的微生物是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和 *S. oneidensis*。*P. aeruginosa* 分泌具有氧化还原活性的含氮杂环代谢物吩嗪作为电子穿梭介质促进电子跨细胞膜转移。目前已知 *P. aeruginosa* 可以产生至少 5 种不同结构的吩嗪衍生物^[19-21]。与 *P. aeruginosa* 类似, *S. oneidensis* 细胞可以合成并分泌核黄素(riboflavin, B2)和黄素单核苷酸作为电子穿梭介质^[22-23]。其他一些微生物, 包括乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumonia*)和爪蟾鞘单胞菌(*Sphingomonas xenophaga*)会产生环醌作为细

胞电子穿梭介质, 介导细胞内外环境间的电子传递^[24-26]。

天然电活性微生物虽具有在细胞内外环境之间传递电子的能力, 其实际应用仍面临诸多挑战。在燃料电池和生物传感器等应用领域, 受限于天然电活性微生物细胞膜上电子传递蛋白丰度或电子传递中间体的合成效率, 电子传递的效率往往不能满足需求。在生物电合成领域, 天然电活性微生物细胞内则需要进一步整合目标产物合成通路。但由于天然电活性微生物的遗传背景尚不清晰, 相关的基因操作方法尚不成熟, 因此通过基因工程手段对电子传递蛋白和电子传递中间体合成相关酶进行过表达以增强电子传递效率, 或在细胞内整合目标产物代谢途径的研究工作依然面临诸多困难。伴随着合成生物学方法和手段的发展, 对非电活性微生物进行改造使之转变为电活性微生物逐渐成为新的研究热点。近年来的研究结果表

明, 在对天然电活性微生物电子传递机制充分研究的基础上, 通过合成生物学方法异源构建天然电活性微生物电子传递结构基础也可以将遗传背景清晰且应用广泛的非电活性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 改造为电活性微生物。这一策略的技术优势在于 *E. coli* 作为基因工程模式微生物的遗传背景清晰且基因操作方法体系成熟, 便于对其实施复杂的遗传改造。通过合成生物学方法改造的 *E. coli* 既可以具备更高的电子传递效率, 也可作为底盘细胞进一步整合目标产物代谢合成通路最终成为电能驱动的新型细胞工厂。鉴于此, 本文总结了近年来通过合成生物学方法将 *E. coli* 改造为电活性微生物的技术策略及成功案例, 并对未来的研究方向提出了科学的展望。

1 *E. coli* 改造为电活性微生物的技术策略

自然界天然电活性微生物实现细胞内外环境电子传递的策略主要有 3 类(图 2), 基于 MtrCAB 蛋白复合物的策略、基于导电纳米线的

策略以及合成分泌电子传递中间体的策略^[13,27]。本着“师法自然”的原则, 当前对 *E. coli* 的改造主要是通过合成生物学手段, 在 *E. coli* 中异源构建介导电子传递的 MtrCAB 复合体、导电纳米线和电子传递中间体的合成代谢通路, 使非电活性的 *E. coli* 获得相应的电化活性, 进而应用于生物探头和目标化合物的有效合成等领域。

1.1 基于 MtrCAB 途径的构建策略

由于 *S. oneidensis* 的 Mtr 途径已广为人知, 运用合成生物学方法将 Mtr 途径移植到 *E. coli* 中, 构建高效的外源电子传递通路, 进而使 *E. coli* 获得在细胞内外环境之间传递电子的能力是目前较为常用的改造策略。目前, 对已报道工作的总结发现对 *E. coli* 进行 Mtr 途径进行移植重构需遵循 3 个基本原则: (1) 宿主 *E. coli* 必须能够识别异源基因中发出翻译后修饰(如分泌、辅助因子插入和异源蛋白胞内定位)信号的基序并有相应的分子机制实现这些翻译后修饰^[28]; (2) 电子传递蛋白之间有效的蛋白质-蛋白质相互作用是实现高效电子转移所必需的^[29]; (3) 需要低表达水平才能使这些高度翻译后修饰的

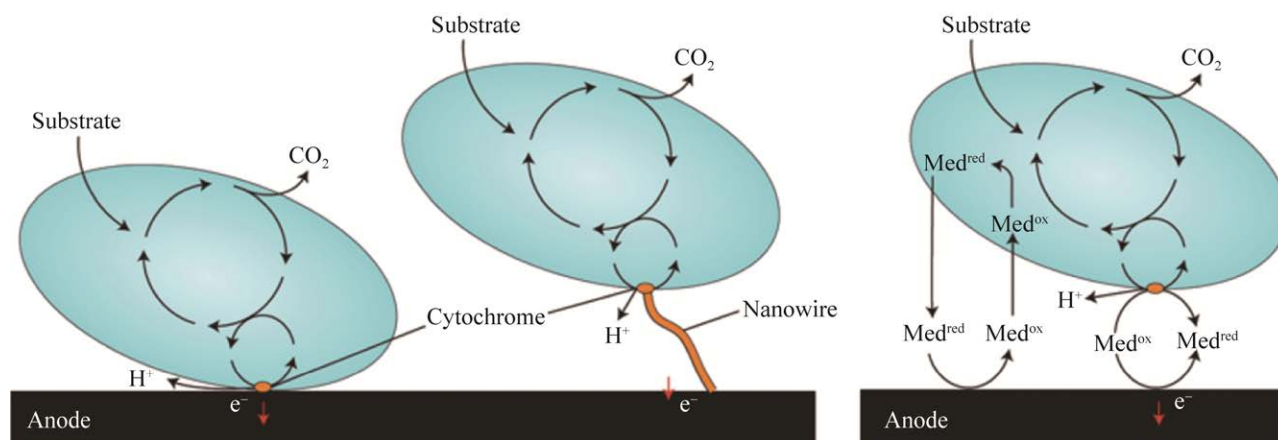


图 2 通过膜结合细胞色素或导电纳米线进行的定向电子转移以及通过微生物代谢物介导的电子转移的图示^[27]

Figure 2 Illustration of the directed electron transfer via membrane bound cytochromes or electronically conducting nanowires and mediated electron transfer via microbial metabolites^[27].

蛋白质不对宿主产生多效性后果(pleiotropic consequences)^[30]。

最初的研究集中在仅表达 *S. oneidensis* Mtr 途径的一部分。在一个早期突破性研究中, 通过在 *E. coli* 中异源表达 MtrA 蛋白, 所得到的工程化菌株能够还原周质空间中可溶性次氮基三乙酸(nitritotriacetic acid)-Fe(III)(Fe(III)NTA)。CymA 蛋白是一种位于细胞质膜外表面的四血红素 c 型细胞色素蛋白, 该蛋白可以催化电子从甲萘醌转移到包括 MtrA 在内的各种周质电子接受蛋白。后续研究发现无论是单独表达 CymA 蛋白或共表达 CymA 和 MtrA 蛋白, 所得到的工程化 *E. coli* 菌株均可利用周质空间中的可溶性 Fe³⁺螯合物使细胞生长。这些研究结果表明 CymA 和 MtrA 均可以在胞内醌池和周质受体之间传递电子^[31-32]。这里必须强调的是尽管这些工程化菌株能够从细胞代谢中提取电子, 但由于细胞外膜的绝缘性, 它们还无法在不添加胞外人工小分子电子传递中间体的情况下还原胞外金属。所以, 这些工程化菌株依然不是真正的电话性 *E. coli* 菌株。

为了实现在不使用外源人工小分子电子传递中间体条件下有效还原胞外金属, 构建真正意义上的电话性 *E. coli* 菌株的目标, 美国莱斯大学 Ajo-Franklin 课题组在 *E. coli* 中构建了完整的 MtrCAB 途径, 所得的工程化 *E. coli* 菌株成功实现了细胞外电子传递并还原细胞外固体 Fe₂O₃。但该菌株依赖于 *E. coli* 内源性内膜四血红素细胞色素 c 蛋白(inner membrane tetraheme cytochrome c, NapC)替代 *S. oneidensis* 中 CymA 蛋白的作用。由于 NapC 与 MtrCAB 复合体之间电子传递效率较低, 因而无法实现由细胞向外部环境高效的传输电子, 最终降低了工程 *E. coli* 细胞的存活率^[33]。后续的研究工作中, 他们通过共表达 CymA 蛋白进一步强化了工程菌株由

胞内醌池向 MtrCAB 复合体的电子传递。由此产生的 CymA-MtrCAB *E. coli* 菌株还原固体 Fe₂O₃ 和电极的速度明显快于仅表达 MtrCAB 的 *E. coli* 菌株, 这一结果进一步印证了在构建工程化电话性 *E. coli* 菌株过程中电子传递蛋白间适配性的重要性。由于 MtrCAB 途径中蛋白质翻译后修饰需要细胞色素 c 成熟系统(cytochrome c maturation system, Ccm)的调控, Su 等进一步通过易错 PCR 对 Ccm 系统中各组成蛋白进行随机突变, 所获得的 CcmH 蛋白突变体能够调控 CymA、MtrC 和 MtrA 三种电子传递蛋白的化学计量比, 进一步提高了电子传递效率^[34]。

Ajo-Franklin 课题组进一步运用合成生物学方法, 在 *E. coli* 中通过 3 个功能模块的组装构建了一条合成电子转移通路。所获得的工程菌株能够产生电流以响应环境样品中的硫代硫酸盐, 并以此为基础开发出了能够产生电读数且快速检测硫代硫酸盐的生物传感器(图 3)。3 个功能模块分别是输入模块(I)、耦联模块(C)和输出模块(O)。首先, 与硫同化相关的内源性蛋白质(CysP、CysM 和 Grx-Trx)将硫代硫酸盐转化为亚硫酸盐, 作为输入模块的底物。输入模块(I)通过铁氧还蛋白-NADP⁺还原酶(ferredoxin-NADP⁺ reductase, FNR)、铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)和亚硫酸盐还原酶(sulfite reductase, SIR)的表达耦合亚硫酸盐还原和 NADPH 的氧化并传递电子。耦联模块(C)由硫化物-醌还原酶(sulfide-quinone reductase, SQR)组成, SQR 将硫化物氧化为硫单质产生的电子将膜内的醌还原为喹啉。最后, 输出模块(O)由 CymA-MtrCAB 组成, 快速将电子从喹啉转移到电极。这些模块通过电子传递途径以硫代硫酸盐依赖的方式将电子从 NADPH 传递到电极并生成电信号, 最终实现了对环境样品中硫代硫酸盐的有效快

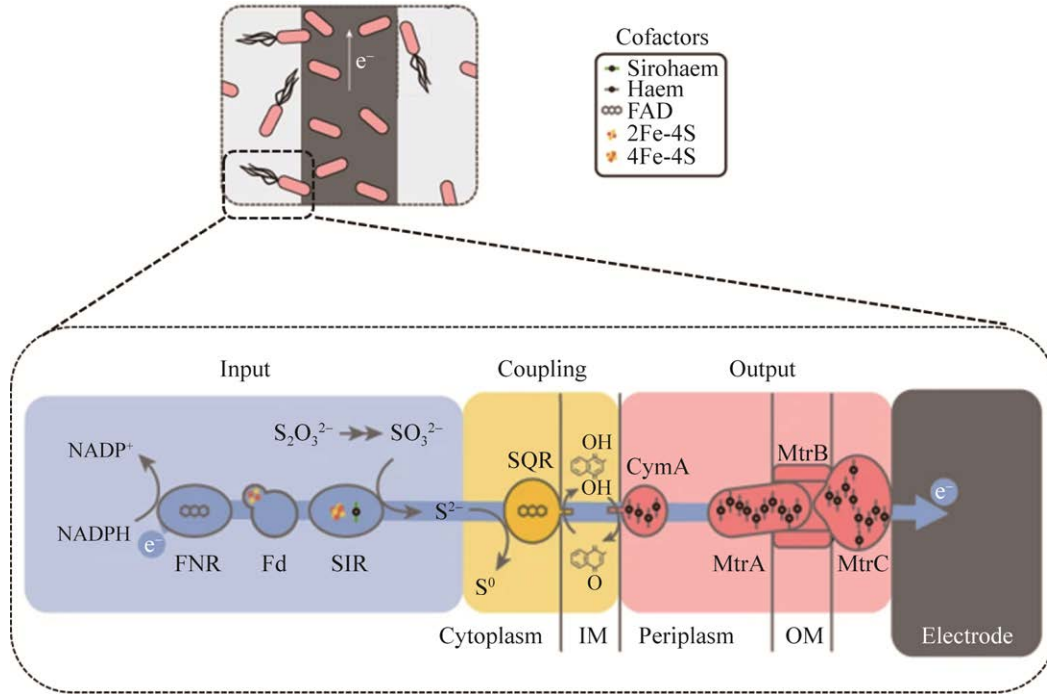


图 3 带有合成电子传递链的大肠杆菌生物传感器^[35]

Figure 3 Schematic *Escherichia coli* sensor with a synthetic ET chain^[35]. Fd-dependent ET from FNR to SIR couples NADPH oxidation to sulfite reduction (input module), SQR uses sulfide oxidation to reduce quinones (coupling module), and CymA-MtrCAB use quinol oxidation to drive EET (output module). IM: Inner membrane; OM: Outer membrane.

速检测^[35]。这一研究成果通过多功能模块的设计组装和功能元件的调控适配，在成功获得工程化电活性 *E. coli* 的基础上进一步实现了其在生物传感器中的有效应用。因此可以作为合成生物学方法构建电活性 *E. coli* 的经典范例，并对后续研究具有重要的指导意义。

基于 MtrCAB 途径构建获得的电活性 *E. coli* 细胞除了可以实现电子由胞内向胞外传送，也可以实现电子由电极向细胞内环境的反向传递，进而作为电活性细胞工厂用以各类目标化合物的有效合成。Wu 等在研究中将来自 *S. oneidensis* MR-1 的电子传递蛋白 MtrABC、FccA 和 CymA 在 *E. coli* T110 中表达，成功构建了电活性细胞工厂，实现了电能驱动的富马酸还原和琥珀酸的有效制备(图 4A)。在此基础上，进一步共

表达聚球藻来源的碳酸氢盐转运蛋白和碳酸酐酶，所获得的电活性 *E. coli* 菌株在微生物电合成体系中以中性红为电子传递中间体将电子由电极传送至细胞内环境，在补充 HCO_3^- 的条件下可以达到 1.10 mol/mol 葡萄糖的琥珀酸产率^[36-37]。Sturm-Richter 和同事使用类似的策略，在 *E. coli* 细胞中异源表达来自 *S. oneidensis* 的 c 型细胞色素 CymA、MtrA 和 STC 构建电子传输通路。所得到的工程化 *E. coli* 菌株可用作底盘细胞进一步整合目标产物的合成途径^[38]。在此基础上，Mayr 及其同事将来自短乳杆菌的 NADPH 依赖性醇脱氢酶整合到这种电活性 *E. coli* 底盘细胞中。当使用甲基紫精作为电子传递中间体，该电活性 *E. coli* 菌株可以利用外源电子实现 NADPH 的有效循环再生，进而驱动醇脱

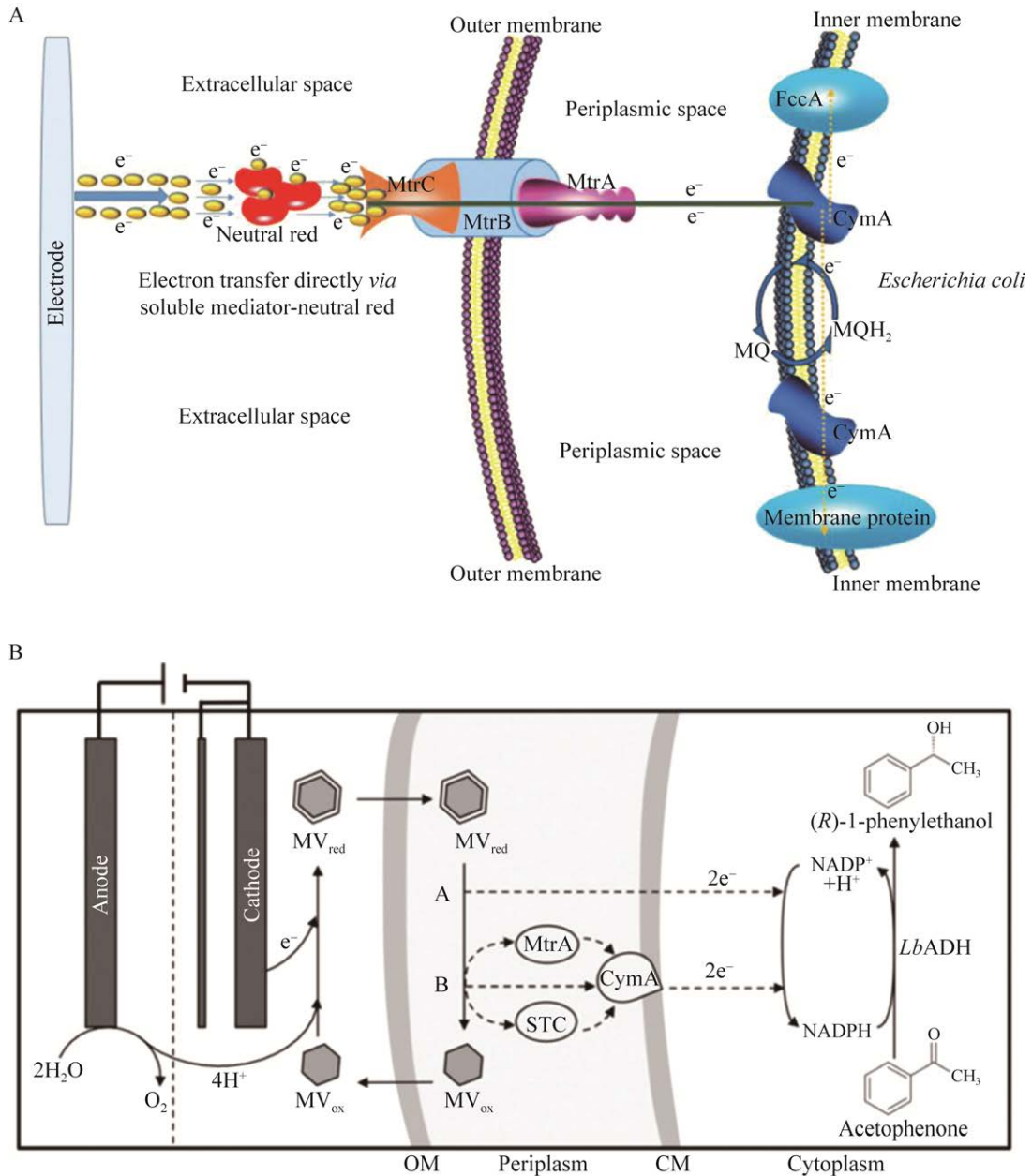


图 4 电活性 *Escherichia coli* 细胞传递通路

Figure 4 Electron transfer pathway of electroactive *Escherichia coli*. A: Schematic representation of the electron transfer pathway of electroactive *E. coli* constructed for production of succinate from glucose and CO₂. The heterologously expressed MtrABC complex was assembled in the inner membrane, which allowed the input of electrons transferred from electron carriers. The electrons were delivered to menaquinone or other biological carriers inside the cell, and thus transformed into reducing power for biosynthetic reactions^[36]. B: Microbial electrosynthesis of chiral alcohols with *E. coli*. The cytoplasmic NADPH pool is linked to the cathode by using extracellular electron transfer through MV as a mediator and further periplasmic cytochromes. In the cytoplasm, the enantioselective reduction takes place. MV: Methyl viologen; LbADH: Alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*; MtrA, STC and CymA: Proteins of the electron transfer pathway in *S. oneidensis* MR-1; OM: Outer membrane; CM: Cytoplasmic membrane^[39].

氢酶催化苯乙酮的不对称还原和(*R*)-1-苯乙醇的合成(图 4B)^[39]。以上这些研究结果表明,通过合成生物学方法构建得到的电活性 *E. coli* 细胞不但可以通过从细胞内部向外输出电子进而应用于微生物燃料电池和微生物传感器,还可以从细胞外环境中将电子输入胞内,进而驱动细胞内的目标产物合成反应。这一特点将为解决胞内目标产物异源代谢通路还原力不足的问题提供新的技术解决方案。

1.2 基于导电纳米线的构建策略

G. sulfurreducens 必须厌氧生长才会产生导电纳米线的特点增加了技术复杂性和其实际应用的成本。而 *E. coli* 可以在有氧条件下生长,用其制备导电纳米线可以有更多应用。Liu 等和 Ueki 等将组装致病性 *E. coli* 菌毛蛋白基因的人工操纵子导入到非致病性大肠杆菌 *E. coli* 中,得到了一株非致病性菌株,可以表达与致病性大肠杆菌 *E. coli* 相同的 IV 型菌毛,其形态和导电率均与 *G. sulfurreducens* 中表达的导电纳米线相似^[40-41]。未来的工作应促进其在 *E. coli* 底盘中异源表达,更好地应用于生物电化学系统^[41]。但由于 *G. sulfurreducens* 导电纳米线的单体蛋白自组装过程较为复杂,且整个过程需要多种蛋白的系统辅助,因而目前尚未有在 *E. coli* 成功移植的报道。

1.3 基于合成分泌电子传递中间体的构建策略

电子可以通过微生物与电极直接接触或使用可溶性电子传递中间体实现电子转移^[1,42]。使用介质介导电子转移有几个优点:(1) 电子传递中间体理论上是不会被耗尽的^[43];(2) 在基于三维空间的培养液中基于电子传递中间体的电子传递过程没有空间限制,而通过菌体与电极直接接触的电子转移仅限于电极的二维表面^[44]。目前,人工添加电子传递中间体如中性红^[45]、

甲基紫精^[46]等已成功用于生物电化学系统,并表现出良好的电子转移能力。然而人工外源电子传递中间体也存在一些缺点,如稳定性差、寿命短、成本高,以及在大规模应用中的可持续性不确定等。如果能使微生物细胞自主合成和分泌电子传递中间体则可能克服使用外源小分子电子传递中间体的缺点^[47]。

一些微生物能够自主合成黄素、醌类和吩嗪类等可溶性氧化还原活性代谢物作为电子穿梭介质在细胞内外环境之间传递电子^[48]。这些电化学活性代谢物既可以携带胞内代谢过程产生的电子以还原态分泌出细胞,远距离将电子转移给胞外电子受体并以氧化态返回细胞内被重新还原,也可以以氧化态分泌出细胞,在被胞外电子供体还原后携带电子返回细胞内部参与胞内代谢活动^[13]。具有自主合成分泌电子传递中间体能力的典型微生物主要是 *P. aeruginosa* 和 *S. oneidensis*。*P. aeruginosa* 可以合成分泌含氮杂环的吩嗪类代谢物,*S. oneidensis* 则可自主合成分泌黄素分子^[21,49]。但这些天然电活性微生物产生电子传递中间体的效率偏低,电子传递效率有限,往往无法满足燃料电池和生物电合成等领域的需求。同时又由于基因工程操作方法不够成熟,天然电活性微生物很难通过实现相关合成酶的过表达来强化电子传递中间体的合成效率。与天然电活性微生物相比,*E. coli* 的遗传背景清晰且基因工程操作方法成熟。通过合成生物学方法将电子传递中间体合成途径移植到 *E. coli*,进而过表达与电子传递中间体合成相关的酶,将是提高电子传递中间体合成效率并进一步提高电子传递效率的有效策略^[50]。

Mouhib 等将核黄素生物合成基因 *ribABDEC* 导入 *E. coli* 中同时共表达 Mtr 途径以增强工程菌株的电子传递能力。与野生型 *E. coli* 菌株相比,黄素单核苷酸和核黄素的分泌在工程菌株

中增加了 3 倍。计时电流法显示当共表达 Mtr 途径和黄素生物合成基因时, 电流比野生型增加了约 3.4 倍, 而当单独表达黄素生物合成基因时电流增加了约 2.3 倍。这表明黄素生物合成提供了一条不依赖 Mtr 细胞色素的独特电子传递途径, 但 Mtr 途径和黄素生物合成共同表达会产生最高的电子传递效率。因此, 未来的工作应侧重于平衡这 2 个组成部分的表达水平, 以达到最优的电子转移效果^[51]。Feng 等将来自 *P. aeruginosa* PAO1 的吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylate, PCA) 合成基因簇 *phzA1B1C1D1E1F1G1* 在 *E. coli* BL21(DE3) 中异源表达, 工程菌株成功获得了可以自主合成和分泌 PCA 作为电子传递中间体实现电极和微生物细胞之间电子传递的能力^[47,50]。在此基础上, da Silva 等将 *P. aeruginosa* PAO1 吩嗪衍生物绿脓菌素 (pyocyanin, PYO) 的完整生物合成途径成功引入 *E. coli*, 将该途径中的 9 个基因分成 2 个模块, 其中第一个质粒包含生产 PCA 的基因 *phzA1-G1*, 第二个质粒含有将 PCA 转换为 PYO 所需的基因 *phzM* 和 *phzS*。最终 PYO 的积累滴度达到为 18.8 mg/L。这项工作开发的工程 *E. coli* 菌株可用于 PYO 作为电子传递中间体的电发酵系统和微生物燃料电池系统(图 5A)^[52]。在此基础上, Simoska 等使用同样的合成生物学策略构建能够自主合成和分泌 PYO 的工程 *E. coli* 菌株。利用其不断产生分泌 PYO 的能力, 该工程电化学菌株作为阳极液修复再生组分被进一步应用于水基氧化还原液流电池 (redox flow battery, RFB) 中, 并成功完成 10 次充放电循环(图 5B)^[53]。

2 展望

如前所述, 通过合成生物学方法将 *E. coli* 改造为电活性微生物可以通过在 *E. coli* 中异源构

建介导电子传递的 MtrCAB 复合体、导电纳米线和电子传递中间体的合成代谢通路 3 种策略实现。迄今为止, 异源构建介导电子传递的 MtrCAB 复合体和电子传递中间体的合成代谢通路两种策略的相关研究工作已经取得了一定的突破。所获的工程化电活性 *E. coli* 也已经成功应用于一些目标化合物的制备, 微生物燃料电池和氧化还原液流电池等领域。但基于异源表达导电纳米线构建工程化电活性 *E. coli* 的成功案例却未见报道。其原因主要是 *G. sulfurreducens* 导电纳米线的电子传输机理尚未完全阐明。同时 *E. coli* 中异源表达 *G. sulfurreducens* 导电纳米线面临涉及多基因调控和单体蛋白自组装等多种挑战。因此, 在未来研究中针对通过导电纳米线异源构建获得电活性 *E. coli* 这一策略, 需要在准确揭示电子传递机理为基础, 系统性地开发一套全新的技术体系以实现导电纳米线在 *E. coli* 中的异源功能性重构, 从而最终将 *E. coli* 转变为电活性微生物。

目前, 合成生物学的研究主要集中在人工生物通路的设计以及天然生物系统的重新构建和改造, 以高效生产药物、复杂天然产物、生物基化学品和生物能源。对于体内合成生物学系统, 一个技术挑战是还原力的消耗和供应之间的平衡。生物电化学技术提供了一种新颖、有效且有前景的方法, 来缓解和消除目标产物和生物燃料合成过程中的还原力供给失衡的问题。对于基因工程模式微生物 *E. coli*, 通过合成生物学方法将其转变为电活性微生物后, 胞外还原力可以经由在 *E. coli* 中异源表达的电子传递管路输入细胞内部, 从而调控细胞内的还原力水平进而将工程化电活性 *E. coli* 作为电活性底盘细胞利用电极供给的外源电子驱动目标反应。然而, 在这些系统中, 细胞内电子介质仍然是天然辅酶。辅酶转向外源性合成途径仍

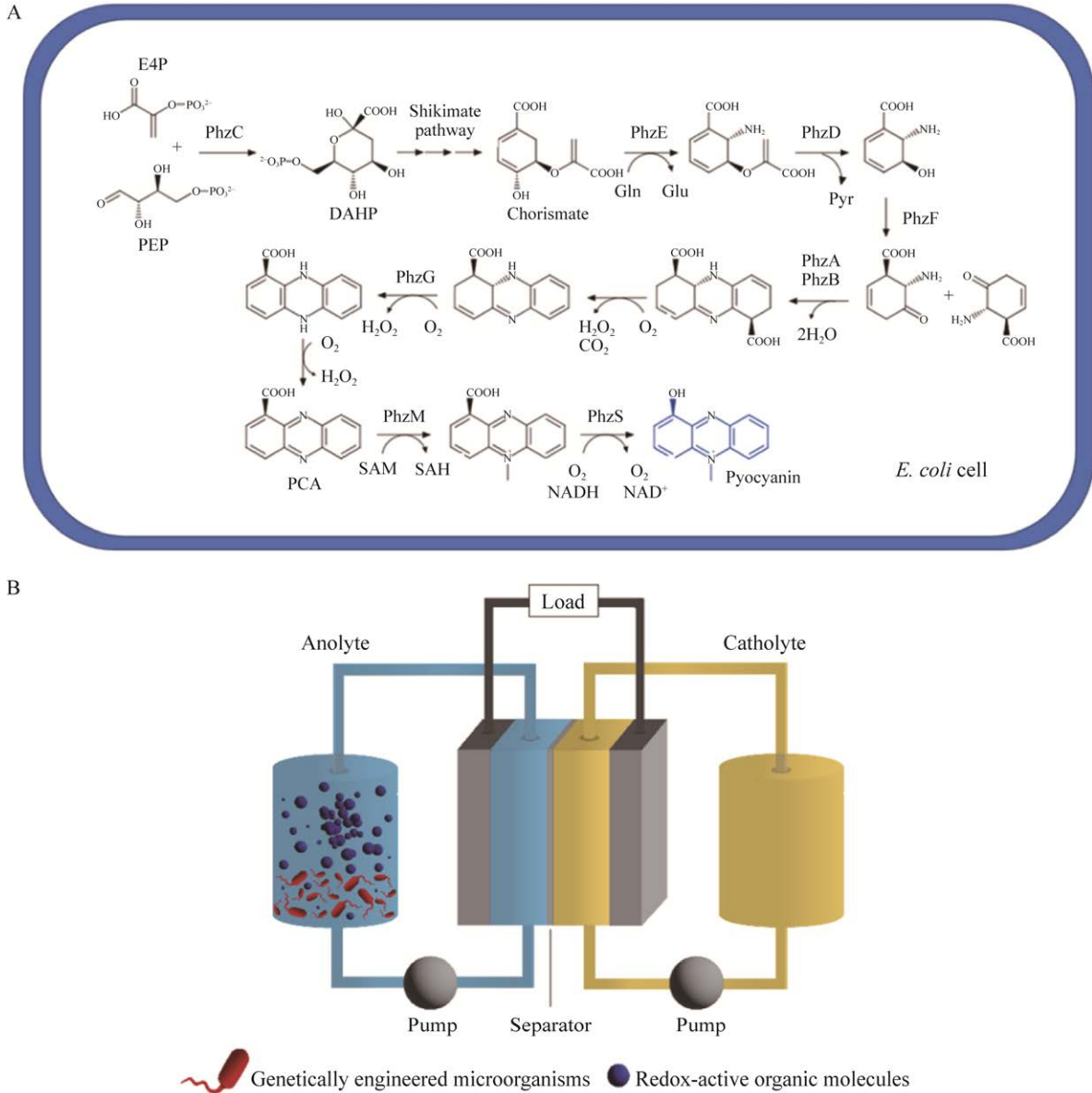


图5 大肠杆菌中的绿脓素生物合成模块的构建(A)^[52]及产绿脓素电活性大肠杆菌用于氧化还原液流电池(B)^[53]

Figure 5 Schematic representation of the modules constructed for pyocyanin biosynthesis in *Escherichia coli* (A)^[52] and Pyocyanin-producing electroactive *Escherichia coli* used in redox flow battery (B). E4P: Erythrose-4-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; PCA: Phenazine-1-carboxylic acid; Pyr: Pyruvate^[53].

会扰乱细胞内的氧化还原平衡，这会使整个系统减慢甚至停止。一种可行的解决方案是开发基于仿生辅酶的生物正交氧化还原系统，并将其整合到可表达辅酶转运蛋白的电活性底盘细

胞中。具体来说，构成合成途径的氧化还原酶的辅酶偏好可以通过蛋白质工程方法从天然辅酶转为仿生辅因子(例如，烟酰胺单核苷酸、烟酰胺核苷或烟酰胺胞嘧啶二核苷酸等)。仿生辅

酶可以通过核苷酸转运蛋白转运到细胞内, 被外源电子还原, 最终被合成途径消耗。外源合成途径完全由外源电子驱动, 避免了对细胞内氧化还原平衡的干扰, 彻底摆脱了外源合成途径对天然辅酶的依赖, 更有利于细胞的长期存活和目标产物的高效生产。

参考文献

- [1] SHI L, DONG HL, REGUERA G, BEYENAL H, LU AH, LIU J, YU HQ, FREDRICKSON JK. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(10): 651-662.
- [2] ABREVAYA XC, SACCO NJ, BONETTO MC, HILDING-OHLSSON A, CORTÓN E. Analytical applications of microbial fuel cells. Part I: biochemical oxygen demand[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 63: 580-590.
- [3] ABREVAYA XC, SACCO NJ, BONETTO MC, HILDING-OHLSSON A, CORTÓN E. Analytical applications of microbial fuel cells. Part II: toxicity, microbial activity and quantification, single analyte detection and other uses[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 63: 591-601.
- [4] PANT D, SINGH A, van BOGAERT G, IRVING OLSEN S, SINGH NIGAM P, DIELS L, VANBROEKHOVEN K. Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters[J]. *RSC Advances*, 2012, 2(4): 1248-1263.
- [5] FRANKS AE, NEVIN KP. Microbial fuel cells, a current review[J]. *Energies*, 2010, 3(5): 899-919.
- [6] MOHAN SV, VELVIZHI G, MODESTRA JA, SRIKANTH S. Microbial fuel cell: critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 40: 779-797.
- [7] LU L, REN ZJ. Microbial electrolysis cells for waste biorefinery: a state of the art review[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 215: 254-264.
- [8] CLAUWAERT P, RABAEY K, AELTERMAN P, de SCHAMPHELAIRE L, PHAM TH, BOECKX P, BOON N, VERSTRAETE W. Biological denitrification in microbial fuel cells[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(9): 3354-3360.
- [9] RABAEY K, van de SOMPEL K, MAIGNIEN L, BOON N, AELTERMAN P, CLAUWAERT P, de SCHAMPHELAIRE L, PHAM HT, VERMEULEN J, VERHAEGE M, LENS P, VERSTRAETE W. Microbial fuel cells for sulfide removal[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(17): 5218-5224.
- [10] RABAEY K, ROZENDAL RA. Microbial electrosynthesis-revisiting the electrical route for microbial production[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(10): 706-716.
- [11] SADHUKHAN J, LLOYD JR, SCOTT K, PREMIER GC, EILEEN HY, CURTIS T, HEAD IM. A critical review of integration analysis of microbial electrosynthesis (MES) systems with waste biorefineries for the production of biofuel and chemical from reuse of CO₂[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 56: 116-132.
- [12] ERABLE B, FÉRON D, BERGEL A. Microbial catalysis of the oxygen reduction reaction for microbial fuel cells: a review[J]. *ChemSusChem*, 2012, 5(6): 975-987.
- [13] CHEN H, SIMOSKA O, LIM K, GRATTIERI M, YUAN MW, DONG FY, LEE YS, BEAVER K, WELIWATTE S, GAFFNEY EM, MINTEER SD. Fundamentals, applications, and future directions of bioelectrocatalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2020, 120(23): 12903-12993.
- [14] ROSS DE, FLYNN JM, BARON DB, GRALNICK JA, BOND DR. Towards electrosynthesis in *Shewanella*: energetics of reversing the mtr pathway for reductive metabolism[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16649.
- [15] PATIL SA, HÄGERHÄLL C, GORTON L. Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems[J]. *Bioanalytical Reviews*, 2012, 4(2/3/4): 159-192.
- [16] TAN Y, ADHIKARI RY, MALVANKAR NS, WARD JE, NEVIN KP, WOODARD TL, SMITH JA, SNOEYENBOS-WEST OL, FRANKS AE, TUOMINEN MT, LOVLEY DR. The low conductivity of *Geobacter uraniireducens* pili suggests a diversity of extracellular electron transfer mechanisms in the genus *Geobacter*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 980.
- [17] MALVANKAR NS, LOVLEY DR. Microbial nanowires for bioenergy applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27: 88-95.
- [18] KRIGE A, SJÖBLM M, RAMSER K, CHRISTAKOPOULOS P, ROVA U. On-line Raman spectroscopic study of cytochromes' redox state of biofilms in microbial fuel cells[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2019, 24(3): 646.
- [19] SIMOSKA O, SANS M, FITZPATRICK MD, CRITTENDEN CM, EBERLIN LS, SHEAR JB, STEVENSON KJ. Real-time electrochemical detection of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine metabolites using

- transparent carbon ultramicroelectrode arrays[J]. *ACS Sensors*, 2019, 4(1): 170-179.
- [20] GLASSER NR, KERN SE, NEWMAN DK. Phenazine redox cycling enhances anaerobic survival in *Pseudomonas aeruginosa* by facilitating generation of ATP and a proton-motive force[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 92(2): 399-412.
- [21] WANG Y, KERN SE, NEWMAN DK. Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(1): 365-369.
- [22] QU YP, FENG YJ, WANG X, LOGAN BE. Use of a coculture to enable current production by *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3484-3487.
- [23] CLARKE TA, EDWARDS MJ, GATES AJ, HALL A, WHITE GF, BRADLEY J, REARDON CL, SHI L, BELIAEV AS, MARSHALL MJ, WANG ZM, WATMOUGH NJ, FREDRICKSON JK, ZACHARA JM, BUTT JN, RICHARDSON DJ. Structure of a bacterial cell surface decaheme electron conduit[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(23): 9384-9389.
- [24] FREGUIA S, VIRDIS B, HARNISCH F, KELLER J. Bioelectrochemical systems: microbial versus enzymatic catalysis[J]. *Electrochimica Acta*, 2012, 82: 165-174.
- [25] FREGUIA S, MASUDA M, TSUJIMURA S, KANO K. *Lactococcus lactis* catalyses electricity generation at microbial fuel cell anodes via excretion of a soluble quinone[J]. *Bioelectrochemistry*, 2009, 76(1/2): 14-18.
- [26] KECK A, RAU J, REEMTSMA T, MATTES R, STOLZ A, KLEIN J. Identification of quinoide redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Shingomonas xenophaga* BN₆[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4341-4349.
- [27] CHEN H, DONG FY, MINTEER SD. The progress and outlook of bioelectrocatalysis for the production of chemicals, fuels and materials[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 225-244.
- [28] DONALD JW, HICKS MG, RICHARDSON DJ, PALMER T. The c-type cytochrome OmcA localizes to the outer membrane upon heterologous expression in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(14): 5127-5131.
- [29] LIENEMANN M, TERAVEST MA, PITKÄNEN JP, STUNS I, PENTTILÄ M, AJO-FRANKLIN CM, JÄNTTI J. Towards patterned bioelectronics: facilitated immobilization of exoelectrogenic *Escherichia coli* with heterologous pili[J]. *Microbial Biotechnology*, 2018, 11(6): 1184-1194.
- [30] SCHUERGERS N, WERLANG C, AJO-FRANKLIN CM, BOGHOSSIAN AA. A synthetic biology approach to engineering living photovoltaics[J]. *Energy & Environmental Science*, 2017, 10(5): 1102-1115.
- [31] GESCHER JS, CORDOVA CD, SPORMANN AM. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(3): 706-719.
- [32] SCHUETZ B, SCHICKLBERGER M, KUERMANN J, SPORMANN AM, GESCHER J. Periplasmic electron transfer via the c-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(24): 7789-7796.
- [33] JENSEN HM, ALBERS AE, MALLEY KR, LONDER YY, COHEN BE, HELMS BA, WEIGLE P, GROVES JT, AJO-FRANKLIN CM. Engineering of a synthetic electron conduit in living cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(45): 19213-19218.
- [34] SU L, FUKUSHIMA T, PRIOR A, BARUCH M, ZAJDEL TJ, AJO-FRANKLIN CM. Modifying cytochrome *c* maturation can increase the bioelectronic performance of engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(1): 115-124.
- [35] ATKINSON JT, SU L, ZHANG X, BENNETT GN, SILBERG JJ, AJO-FRANKLIN CM. Real-time bioelectronic sensing of environmental contaminants[J]. *Nature*, 2022, 611(7936): 548-553.
- [36] WU ZQ, WANG JS, LIU J, WANG Y, BI CH, ZHANG XL. Engineering an electroactive *Escherichia coli* for the microbial electrosynthesis of succinate from glucose and CO₂[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 1-14.
- [37] WU ZQ, WANG J, ZHANG X, BI C. Engineering an electroactive *Escherichia coli* for the microbial electrosynthesis of succinate by increasing the intracellular FAD pool[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 146: 132-142.
- [38] STURM-RICHTER K, GOLITSCH F, STURM G, KIPF E, DITTRICH A, BEBLAWY S, KERZENMACHER S, GESCHER J. Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 186: 89-96.
- [39] MAYR JC, GROSCH JH, HARTMANN L, ROSA LFM, SPIESS AC, HARNISCH F. Resting *Escherichia coli* as chassis for microbial electrosynthesis: production of chiral alcohols[J]. *ChemSusChem*, 2019, 12(8): 1631-1634.

- [40] LIU XY, WALKER DJF, NONNENMANN SS, SUN DZ, LOVLEY DR. Direct observation of electrically conductive pili emanating from *Geobacter sulfurreducens*[J]. *mBio*, 2021, 12(4): e0220921.
- [41] UEKI T, WALKER DJF, WOODARD TL, NEVIN KP, NONNENMANN SS, LOVLEY DR. An *Escherichia coli* chassis for production of electrically conductive protein nanowires[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(3): 647-654.
- [42] SAUNDERS SH, TSE ECM, YATES MD, OTERO FJ, TRAMMELL SA, STEMP EDA, BARTON JK, TENDER LM, NEWMAN DK. Extracellular DNA promotes efficient extracellular electron transfer by pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 919-932.e19.
- [43] BRUTINEL ED, GRALNICK JA. On the Role of Endogenous Electron Shuttles in Extracellular Electron Transfer[M]//Microbial Metal Respiration. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 83-105.
- [44] CHUKWUBUIKEM A, BERGER C, MADY A, ROSENBAUM MA. Role of phenazine-enzyme physiology for current generation in a bioelectrochemical system[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(4): 1613-1626.
- [45] HARRINGTON TD, MOHAMED A, TRAN VN, BIRIA S, GARGOURI M, PARK JJ, GANG DR, BEYENAL H. Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 195: 57-65.
- [46] AULENTA F, CATERVI A, MAJONE M, PANERO S, REALE P, ROSSETTI S. Electron transfer from a solid-state electrode assisted by methyl viologen sustains efficient microbial reductive dechlorination of TCE[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(7): 2554-2559.
- [47] FENG J, LU QH, LI K, XU S, WANG X, CHEN KQ, OUYANG PK. Construction of an electron transfer mediator pathway for bioelectrosynthesis by *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 590667.
- [48] LIU X, SHI L, GU JD. Microbial electrocatalysis: redox mediators responsible for extracellular electron transfer[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(7): 1815-1827.
- [49] SANTOS CA, NOBRE B, DA SILVA TL, PINHEIRO H, REIS A. Dual-mode cultivation of *Chlorella protothecoides* applying inter-reactors gas transfer improves microalgae biodiesel production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 184: 74-83.
- [50] FENG J, QIAN Y, WANG Z, WANG X, XU S, CHEN K, OUYANG P. Enhancing the performance of *Escherichia coli*-inoculated microbial fuel cells by introduction of the phenazine-1-carboxylic acid pathway[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 275: 1-6.
- [51] MOUHIB M, REGGENTE M, BOHGOSSIAN AA. Implementation of a flavin biosynthesis operon improves extracellular electron transfer in bioengineered *Escherichia coli*[J]. *bioRxiv* 2023.
- [52] da SILVA AJ, CUNHA JS, HREHA T, MICOCCHI KC, SELISTRE-de-ARAÚJO HS, BARQUERA B, KOFFAS MAG. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 15-25.
- [53] SIMOSKA O, RHODES Z, CARROLL E, PETROSKY KN, MINTEER SD. Biological anolyte regeneration system for redox flow batteries[J]. *Chemical Communications*, 2023, 59(15): 2142-2145.

李盛英, 山东大学微生物技术国家重点实验室教授, 博士研究生导师, 国家杰出青年基金获得者。现任中国微生物学会常务理事、普通微生物专委会主任委员、中国海洋湖沼学会理事和中国生物工程学会合成生物学专委会委员。李盛英教授主要从事微生物天然产物生物合成、细胞色素 P450 单加氧酶与液体生物燃料研究, 在 *Nature Catalysis*、*Nature Chemistry*、*Nature Communications*、*PNAS*、*JACS* 等著名国际学术期刊发表 SCI 论文 100 余篇。目前担任 *Engineering Microbiology* 执行主编、*BMC Biotechnology* 高级编委及 *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*、《合成生物学》、《微生物学报》等期刊编委。



陈辉, 山东大学微生物技术国家重点实验室教授, 博士研究生导师, 国家海外高层次青年人才、山东省泰山学者青年专家获得者。陈辉教授主要从事生物电合成体系相关研究, 在建立电能与化学能之间的灵活转化模式的基础上实现了多种目标化合物的高效制备, 为绿色生物制造的发展贡献了新方法, 新体系和新应用。近年来先后在 *Chemical Reviews*、*Nature Catalysis*、*JACS*、*ACS Catalysis*、*ChemSusChem* 等国际学术刊物上发表论文 30 余篇。

