

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-077

一碳化合物生物利用的合成生物学研究进展

李健^{1,2}, 陈云^{1,2}, 刘海艳^{1,2}, 谭在高^{1,2}

(¹ 上海交通大学微生物代谢全国重点实验室, 上海 200240; ² 上海交通大学生命科学技术学院生物工程系, 上海 200240)

摘要: 一碳化合物 (C1, 包括 CO₂、CO、甲烷、甲醇及甲酸) 作为重要的含碳资源, 凭借其来源广泛、经济及可再生特性, 已成为生物制造领域的新型战略原料。近年来, 合成生物学与代谢工程技术的突破性进展显著推动了 C1 化合物的生物转化路径创新, 为碳中和目标下的绿色生物制造开辟了新范式。本文聚焦天然 C1 利用微生物的代谢网络优化、非天然 C1 利用途径的开发以及人工合成甲基营养菌的理性设计, 系统比较评估了不同微生物底盘在 C1 生物转化中的应用潜力及关键 C1 同化途径的代谢特征, 并综述了 2022–2025 年间该领域的前沿策略与技术成果。进一步对比分析了甲基营养菌的应用领域, 探讨了各类宿主在产物合成中的适配性, 探讨了当前存在的生物固碳效率低、人工固碳途径在体内难以高效运行、毒性中间体限制甲醇同化、人工甲基营养菌生长缓慢等难题。在此基础上, 进一步讨论了实验室进化、酶工程、人工途径设计等多种手段协同提升 C1 利用效率的潜力, 以及多学科交叉与人工智能在该领域发展中的重要作用, 以期为一碳驱动的可持续生物经济体系构建提供理论支撑。

关键词: 一碳化合物; 甲基营养型; 合成生物学; 代谢工程; 绿色生物制造

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Advances in the biological utilization of one-carbon compounds

LI Jian^{1,2}, CHEN Yun^{1,2}, LIU Haiyan^{1,2}, TAN Zaigao^{1,2}

(¹ State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; ² Department of Bioengineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: One-carbon (C1) compounds—including CO₂, CO, methane, methanol, and formate—have emerged as strategic feedstocks for next-generation biomanufacturing owing to their abundance, economic viability, and renewability. However, the efficient biological conversion of C1 substrates into valuable products is hampered by several fundamental challenges, including the low intrinsic efficiency of natural carbon fixation pathways, the thermodynamic and kinetic barriers in engineering efficient *de novo* artificial assimilation routes, the cytotoxic effects of reactive intermediates like formaldehyde, and the generally suboptimal industrial robustness and slow growth of

收稿日期: 2025-07-29 修回日期: 2025-10-10

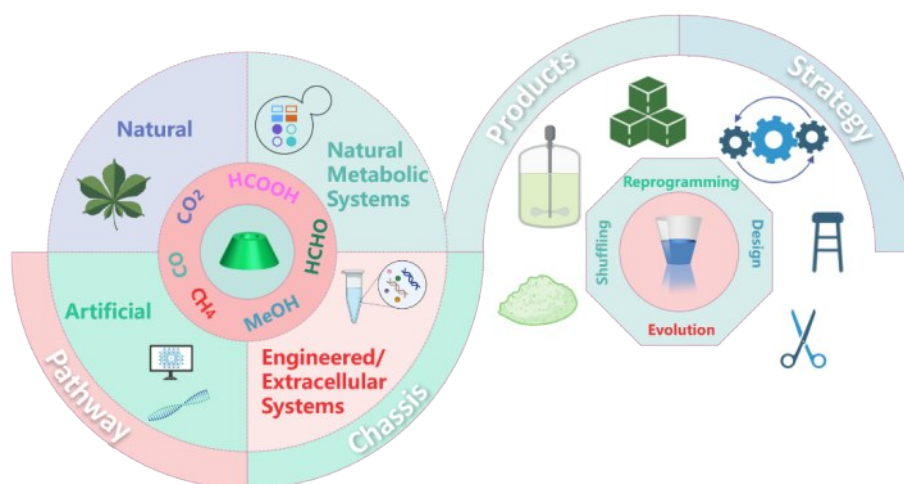
基金项目: 国家自然科学基金优秀青年基金项目 (32422047); 国家自然科学基金面上项目 (32371482)

引用本文: 李健, 陈云, 刘海艳, 谭在高. 一碳化合物生物利用的合成生物学研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6. DOI: 10.12211/2096-8280.2025-077

Citation: LI Jian, CHEN Yun, LIU Haiyan, TAN Zaigao. Advances in the biological utilization of one-carbon compounds[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6.

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-077

both native and synthetic C1-utilizing microbes. Recent breakthroughs in synthetic biology and metabolic engineering have substantially mitigated these constraints, thereby accelerating C1 bioconversion and establishing a novel paradigm for carbon-neutral, green biomanufacturing. This review systematically examines state-of-the-art strategies and technological milestones reported between 2022 and 2025, with a focus on (i) Metabolic rewiring of native C1-utilizing microorganisms to enhance both C1-assimilation efficiency and product-synthesis capacity, (ii) de novo design of non-natural C1 assimilation pathways to provide more efficient route for the construction of C1-utilizing cell factories, and (iii) engineering artificial C1-utilizing cell factories through reconstituting natural or artificial C1 assimilation modules in well-established industrial fermentation strains to establish platform strains for C1-based bioproduction. Moving beyond strategy description, we provide a comparative analysis of the metabolic characteristics, advantages, and limitations of key natural and synthetic C1 assimilation pathways. We further evaluate the applicability of various microbial hosts for the synthesis of target products ranging from biofuels and bulk chemicals to specialized metabolites. A critical discussion addresses the persistent technical bottlenecks, such as low activity of key C1 assimilation enzymes, poor biomanufacturing capabilities of natural C1-utilizing bacteria, and the challenges in achieving high flux through artificial pathways *in vivo*. Finally, we explore the synergistic potential of integrated solutions—combining adaptive laboratory evolution, enzyme engineering, computational modeling, and systems-level analysis—to boost C1 utilization. We conclude by highlighting the transformative role of interdisciplinary convergence and artificial intelligence in accelerating the design-build-test-learn cycle, thereby paving the way for a sustainable, C1-driven bioeconomy.



Keywords: one-carbon compounds; methylotrophy; synthetic biology; metabolic engineering; green biomanufacturing

随着化石资源日趋枯竭、碳循环失衡问题日益加剧，全球能源结构转型正推动生物制造范式向可持续方向加速变革。在此进程中，以 CO_2 、甲醇及甲酸为代表的C1化合物，凭借其可再生属性、碳闭环潜力及储运兼容性优势，已成为重构绿色化工产业链的核心要素^[1]。特别是甲醇，兼具液态高能量密度（32 MJ/L）与成熟工业化生产体系

（全球年产量超1亿吨），在碳捕获与生物精炼技术耦合中展现出独特的媒介价值，为负碳生物技术提供了关键切入点^[2]。这一技术变革的实现，本质上源于合成生物学与系统代谢工程的协同创新：通过深度解析天然C1代谢网络或者创制非天然C1同化模块，研究者成功构建了具有代谢鲁棒性的合成甲基营养菌^[3-7]；同时，基于动态调控、辅因

子工程及毒性中间体分流策略的整合应用, 工程化天然C1利用型微生物, 实现CO₂/甲醇向高附加值产物(如萜类、有机酸及生物材料)的高效定向转化, 标志着C1生物制造正从概念验证向工业应用迈进^[8-13]。

当前C1生物转化研究呈现“天然代谢网络工程化”与“人工代谢模块理性设计”协同并进的技术格局。在天然体系优化层面, 以毕赤酵母(*Komagataella phaffii*, *K. phaffii*)及多形汉逊酵母(*Ogataea polymorpha*, *O. polymorpha*)为代表的甲基营养菌, 通过对内源木酮糖单磷酸(Xylulose monophosphate, XuMP)途径的代谢流重编程, 已在氨基酸、萜类及脂肪醇等高附加值产物合成中展现工业化潜力^[11, 13-15]。然而, 其基因组规模代谢模型不完善、基因编辑效率低及表型异质性显著等问题, 严重制约了精准代谢调控与规模化生产。与之形成互补的是, 通过在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)等模式底盘内植入核酮糖单磷酸(Ribulose monophosphate, RuMP)途径、丝氨酸-苏氨酸循环(Serine threonine cycle, STC)、合成甲醇利用(Synthetic methanol assimilation, SMA)途径等C1同化模块, 研究者成功构建了可高效同化甲醇的“合成甲基营养菌”^[3, 7, 16, 17]。值得关注的是, 适应性实验室进化(Adaptive laboratory evolution, ALE)通过施加甲醇选择压力, 驱动合成菌株关键酶的协同表达优化, 能够显著提高合成甲基营养菌的甲醇转化率并且增强其代谢网络鲁棒性^[3, 6, 7], 为优化C1代谢网络的稳定性提供了新思路。这些系统性突破不仅验证了“设计-构建-测试-学习”(Design-build-test-learn, DBTL)循环在C1代谢工程中的普适性, 更推动了生物制造从实验室规模到中试生产的产业化跨越^[18]。

本文系统评述2022-2025年间C1生物转化领域的技术突破。首先从代谢机理层面解析RuMP途径、Wood-Ljungdahl(WL)途径等天然C1同化体系, 对比评估C1固定模块、产物合成模块等策略的能效边界及工业适配性; 其次, 对比甲基营养菌的应用领域: 横向比较基于大肠杆菌、酿酒酵母等构建的合成甲基营养菌与天然甲基营养菌的特点, 讨论了各类宿主的产物适配性; 最后探讨

了C1化合物的生物利用的机遇和挑战。

1 C1利用途径

C1的生物利用途径分为天然途径与人工途径两类。天然途径以自养微生物及甲基营养菌经长期进化形成的C1同化途径为主体, 包括Calvin-Benson-Bassham(CBB)循环、RuMP途径、XuMP途径及丝氨酸循环(Serine Cycle, SC)等(图1)。相比之下, 基于酶元件挖掘与途径重设计原则创制的人工合成途径具有突破自然进化限制的潜力, 如STC、SMA途径等(图2)。下文将对这些途径进行详细介绍。

1.1 CO₂利用途径

目前已经明确微生物内源的CO₂固定途径有六种, 分别是CBB循环、还原性三羧酸循环(Reductive tricarboxylic acid, rTCA)、Wood-Ljungdahl(WL)途径、3-羟基丙酸(3-hydroxypropanoate, 3-HP)循环、3-羟基丙酸/4-羟基丁酸(3-hydroxypropanoate/4-hydroxybutanoate, 3-HP/4-HB)循环、二羧酸酯/4-羟基丁酸酯(Dicarboxylate/4-hydroxybutanoate, DC/4-HB)循环^[19]。此外, 人工固碳途径也展现出良好应用前景。德国马克斯·普朗克陆地微生物研究所的Tobias J. Erb团队在该领域做出了系统性贡献。继开发CETCH(Crotonyl-CoA/ethylmalonyl-CoA/hydroxybutyryl-CoA)循环后, 其团队近三年又成功构建了THETA(The reductive tricarboxylic acid branch/4-hydroxybutyryl-CoA/ethylmalonyl-CoA/acetyl-CoA)、HOPAC(Hydroxypropionyl-CoA/acrylyl-CoA)和CORE(CO₂-reduction)等高效固碳循环^[20-22]。James C. Liao教授团队则开发了rGPS-MCG(Reductive glyoxylate and pyruvate synthesis-malyl-CoA-glycerate)循环固碳途径^[23]。

1.1.1 天然固碳途径

CBB循环是研究最深入的固碳途径(图1), 因其碳同化效率与代谢网络兼容性优势, 在光驱生物制造和合成自养体系构建中展现出独特价值^[24-26]。该途径的核心酶是核酮糖-1,5-二磷酸羧

化酶 (RubisCo), 催化 CO_2 和核酮糖-1,5-二磷酸 (ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP) 结合生成 2 分子 3-磷酸甘油酸 (3-phosphoglycerate, 3-PGA)。代谢流分配方面, 约 83.3% 的 3-PGA 通过糖异生重排再生 RuBP 以维持循环稳态, 剩余 16.7% 进入中心碳代谢, 为细胞的生长繁殖提供碳骨架。利用此途径固定 1 分子 CO_2 , 需消耗 3 分子 ATP 和 2 分子 NADPH^[27]。

rTCA 循环是绿色硫细菌等化能自养微生物的核心固碳途径 (图 1), 其通过逆向运行标准 TCA 循环的部分反应实现 CO_2 的还原性同化^[28]。此途径的有两个关键不可逆步骤: 铁氧还蛋白依赖的 α -酮戊二酸合酶 (KOR) 催化琥珀酰-CoA 与 CO_2 缩合生成 α -酮戊二酸和 ATP 依赖型柠檬酸裂解酶 (ACL) 催化柠檬酸裂解为草酰乙酸与乙酰 CoA^[28, 29]。

WL 途径以 Harland G. Wood 与 Lars G. Ljungdahl 两位科学家命名 (图 1), 是现存最古老的生物固碳途径, 广泛分布于乙酸生成菌等严格厌氧自养微生物中。该途径通过双支路偶联实现 CO_2 的完全还原: 1) 甲基支路: 1 分子 CO_2 在甲酸脱氢酶催化下形成甲酸, 然后与四氢叶酸 (THF) 结合并通过一系列氧化还原反应生成甲基四氢叶酸 (CH_3 -THF), 最终通过铁硫簇依赖的甲基转移酶形成甲基钴胺素 (CH_3 -CoFeSP); 2) 羰基支路: 1 分子 CO_2 在羰基氢酶/乙酰 CoA 合成酶复合体的催化下形成羰基中间体, 后与甲基支路产生的 CH_3 -CoFeS 结合形成乙酰 CoA。此途径将 CO_2 直接还原为乙酰 CoA, 因此又将其称为还原性乙酰 CoA 途径^[30]。与其它途径相比, Wood-Ljungdahl 途径所需的能量极低 (仅需 1 ATP/mol 乙酰 CoA), 在生物燃料的合成中得到了广泛的应用。

3-HP 循环是光能自养型绿弯菌特有的固碳途径 (图 1), 其以特征中间产物 3-HP 而命名。此途径为偶联的双循环反应, 涉及 19 步反应, 需要 13 个酶催化完成。此途径的关键固碳反应由乙酰 CoA 羧化酶和丙酰 CoA (propionyl-CoA) 羧化酶催化, 每轮循环可固定 3 分子 CO_2 生成 1 分子丙酮酸, 为细胞生物合成提供核心碳骨架^[31]。此途径具有高能量效率 (1ATP/ CO_2) 和高 CO_2 亲和力的特点, 这种代谢特性使其成为开发体外固碳系统

的理想模块^[22]。然而, 其复杂的反应拓扑结构、嗜热酶的最适温度及中间代谢物积累毒性, 导致异源重构效率低下。目前, 合成生物学研究主要聚焦于关键模块的局部利用, 例如 3-HP 的生物合成^[32]。

3-HP/4-HB 循环是嗜热古菌特有的自养固碳途径 (图 1), 以其标志性中间产物 3-HP 和 4-HB 而得名, 通过线性单循环机制实现 CO_2 的高效还原。途径与 3-HP 循环具有部分相同反应, 例如, 这两条途径的关键固碳反应都由乙酰 CoA 羧化酶和丙酰 CoA 羧化酶催化。通过 16 步酶促反应, 每轮循环可固定 2 分子 CO_2 生成 1 分子乙酰 CoA, 为古菌的生长发育提供核心驱动力。与 3-HP 循环类似, 此途径能量需求低 (1ATP/ CO_2) 且具有高 CO_2 亲和力, 可被模块化用于体外构建体外固碳途径^[33], 但是由于途径复杂、嗜热、厌氧等特点, 难于在异源微生物胞内重构。

DC/4-HB 循环是极端嗜热嗜酸菌特有的高效的固碳途径 (图 1), 通过 7 步与 3-HP/4-HB 循环共享的反应 (琥珀酰 CoA \rightarrow 乙酰乙酰 CoA \rightarrow 乙酰 CoA) 及独特的羧化步骤实现碳同化: 丙酮酸-铁氧还蛋白氧化还原酶催化的乙酰 CoA 和 CO_2 的羧化反应以及磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 羧化酶催化的 PEP 和 CO_2 的羧化反应^[34]。此途径条件更为苛刻, 需要高温、强酸、厌氧环境, 因此, 此途径在合成生物学的应用案例较少。

1.1.2 人工固碳途径

THETA (图 2) 循环是由 9 种不同宿主来源的 17 种酶构建的固碳循环。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Ppc) 和巴豆酰 CoA 羧化酶 (Ccr) 是该途径的关键固碳酶。每轮循环可固定 1 分子 CO_2 并同化 1 分子 HCO_3^- , 生成 1 分子乙酰 CoA。THETA 循环在体外可高效运行, 固碳效率远高于 CBB 循环等天然固碳途径。构成 THETA 循环的三个模块均能够再大肠杆菌体内运行, 这使它成为目前最有潜力在体内实现固碳的人工途径^[20]。

HOPAC 循环则整合了来自 6 个不同物种的 11 种酶 (图 2)。该循环包含氧化和还原两个部分: 氧化部分将丙二酰 CoA 转化为甲基丙二酰 CoA (methylmalonyl-CoA), 其关键固碳步骤为丙烯酰 CoA (acrylyl-CoA) 的羧化反应; 还原部分则将甲

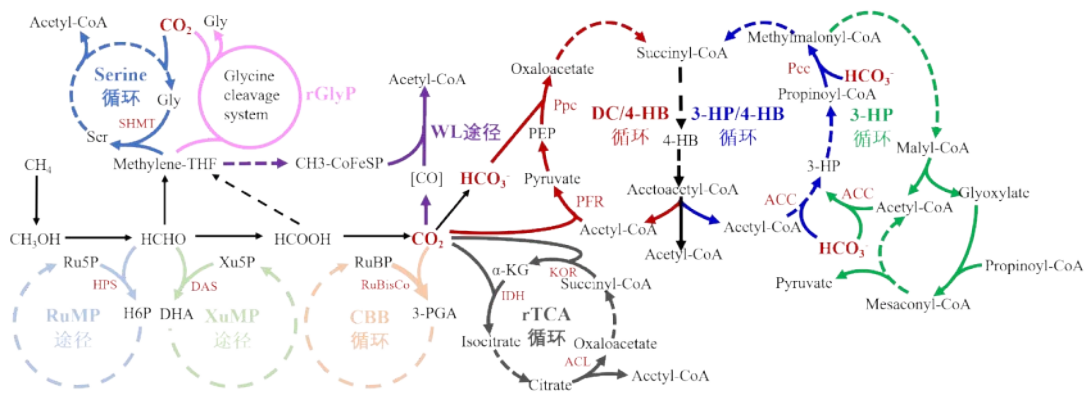


图1 天然的C1化合物代谢途径

(虚线表示多步反应。Ser, 丝氨酸; Gly, 甘氨酸; PEP, 磷酸烯醇式丙酮酸; DC, 二羧酸; 4-HB, 4-羟基丁酸; 3-HP, 3-羟基丙酸; Malyl-CoA, 苹果酰 CoA; H6P, 己酮糖-6-磷酸; Xu5P, 木酮糖-5-磷酸; DHA, 二羟丙酮; RuBP, 核酮糖-1,5-二磷酸; PGA, 3-磷酸甘油酸; α -KG, α -酮戊二酸; SHMT, 丝氨酸羟甲基转移酶; Ppc, PEP 羧化酶; PFR, 丙酮酸-铁氧还原蛋白氧化还原酶; Pcc, 丙酰 CoA 羧化酶; ACC, 乙酰 CoA 羧化酶; HPS, 己酮糖-6-磷酸合酶; DAS, 二羟丙酮合酶; RuBisCo, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶; IDH, 异柠檬酸脱氢酶; KOR, α -酮戊二酸合酶; ACL, ATP 依赖的柠檬酸裂解酶。)

Fig. 1 Natural metabolic pathways of one-carbon compounds

(Dotted lines indicate multi-step reactions. Ser, serine; Gly, glycine; PEP, phosphoenolpyruvate; DC, dicarboxylate; 4-HB, 4-hydroxybutanoate; 3-HP, 3-hydroxypropanoate; H6P, hexulose 6-phosphate; Xu5P, xylulose 5-phosphate; DHA, dihydroxyacetone; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; PGA, 3-phosphoglycerate; α -KG, α -ketoglutarate; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; Ppc, PEP carboxylase; PFR, pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; Pcc, propionyl-CoA carboxylase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; HPS, hexulose-6-phosphate synthase; DAS, dihydroxyacetone synthase; RuBisCo, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase; IDH, isocitrate dehydrogenase; KOR, α -ketoglutarate synthase; ACL, ATP-depencent citrate lyase.)

基丙二酰 CoA 还原为丙二酰 CoA, 关键固碳步骤是乙酰 CoA 羧化合成丙二酰 CoA。每轮循环可固定 2 分子 CO_2 , 其中一分子 CO_2 需在碳酸酐酶 (CA, carbonic anhydrase) 催化下形成 HCO_3^- , 再被同化利用, 生成 1 分子乙醇酸 (glycolate)。该循环与 3-HP 循环存在相似性, 但其能量效率更高, 固碳效率与 rGPS-MCG 循环相当。

CORE 循环仅需 6 步反应, 即可将 1 分子 CO_2 固定为 1 分子甲酸 (formate), 同时消耗 1 分子 NADPH 和 1 分子 ATP。该循环的核心固碳步骤是乙酰 CoA 羧化生成丙二酰 CoA。其最关键的步骤则由 β -酮酸裂解酶催化, 实现乙酰 CoA 与 3-氧代丙酸反应生成甲酰 CoA (formyl-CoA) 和乙酰乙酰辅酶 A (acetoacetyl-CoA)。此途径与丝氨酸途径结合, 可使大肠杆菌实现依赖 CO_2 的生长^[21]。

rGPS-MCG 循环整合了还原性乙醛酸与丙酮酸合成途径和苹果酰 CoA-甘油酸途径, 并因此得名 (图 2)。该循环是一种氧耐受的自催化固碳循环。其核心固碳反应由磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Ppc) 和巴豆酰辅酶 A 羧化酶 (Ccr) 催化。每轮循环可同化 1 分子 CO_2 和 1 分子 HCO_3^- , 生成 1 分子

乙酰 CoA。该途径的固碳效率显著高于自养生物和光合生物的内源途径^[23]。

1.2 甲醇、甲醛、甲酸同化途径

甲醇和甲酸可通过 CO_2 加氢制备, 是潜在的清洁碳原料, 具有生产工艺成熟稳定、价格低廉、易溶于水、细胞毒性低以及易于储存运输等优势, 是理想的微生物发酵原材料^[35, 36]。甲醛虽然具有强细胞毒性, 但它是多条 C1 代谢必须中间体^[37]。在相关酶的催化下, 甲醇、甲醛和甲酸可以相互转化, 随后通过以下途径实现碳同化 (表 1):

1.2.1 天然同化途径

核酮糖单磷酸 (RuMP) 途径 (图 1): 以核酮糖-5-磷酸 (Ru5P) 为缩合受体, 经己酮糖-6-磷酸合酶 (Hps) 催化甲醛与 Ru5P 生成己酮糖-6-磷酸 (H6P), 经异构化生成果糖-6-磷酸 (F6P) 后, 通过转酮醇酶/转醛醇酶介导的碳重排再生 Ru5P, 每同化 3 分子甲醇净输出 1 分子甘油醛-3-磷酸 (GAP)^[4]。

木酮糖单磷酸 (XuMP) 途径 (图 1): 毕赤酵

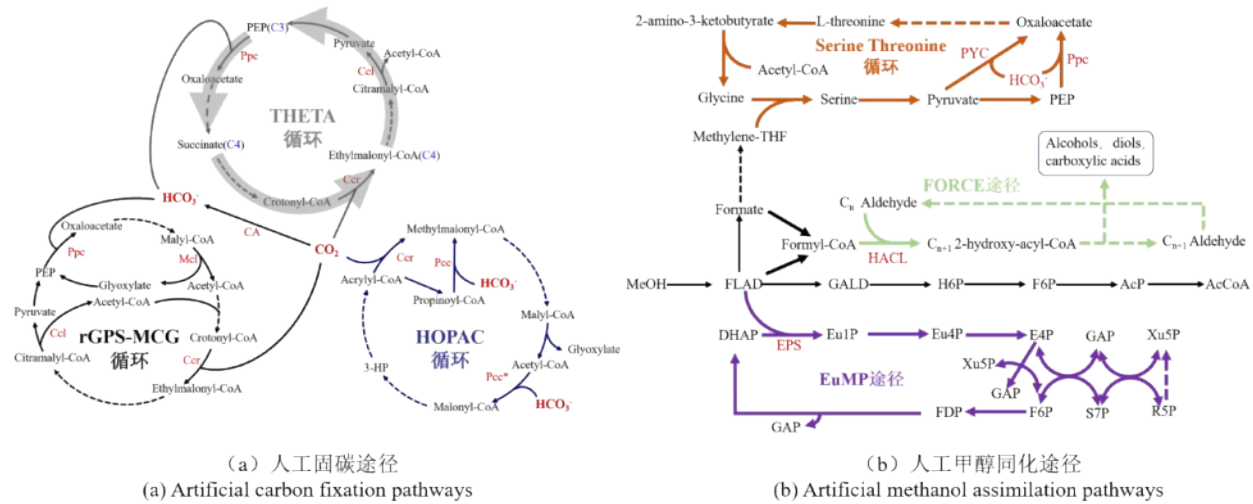


图2 人工设计的C1代谢途径

((a) 人工固碳途径。虚线表示多步反应。PEP, 磷酸烯醇式丙酮酸; 3-HP, 3-羟基丙酸; Ppc, PEP羧化酶; Ccl, 柠檬酰辅酶A裂解酶; Pcc, 丙酰CoA羧化酶; Ccr, 巴豆酰辅酶A羧化酶; Mcl, 苹果酰CoA裂解酶; CA, 碳酸酐酶。(b) 人工甲醇同化途径。虚线表示多步反应。MeOH, 甲醇; FLAD, 甲醛; GALD, 羟乙醛; H6P, 己糖-6-磷酸; F6P, 果糖-6-磷酸; AcP, 乙酰磷酸; AcCoA, 乙酰CoA; DHAP, 磷酸二羟丙酮; Eu1P, 赤酰酮糖-1-磷酸; Eu4P, 赤酰酮糖-4-磷酸; E4P, 赤酰糖-4-磷酸; GAP, 甘油醛-3-磷酸; Ru5P, 核酮糖-5-磷酸; Xu5P, 木酮糖-5-磷酸; R5P, 核糖-5-磷酸; S7P, 景天庚酮糖-7-磷酸; FDP, 果糖-1,6-二磷酸; PYC, 丙酮酸羧化酶; HAACL, 2-羟基酰-CoA裂解酶; GLAS, 羟乙醛合酶; HAS, 己糖-6-磷酸醛缩酶; PFK, 磷酸解酮酶; EPS, 赤酰酮糖-1-磷酸合酶。)

Fig. 2 Artificial metabolic pathways of one-carbon compounds

((A) Artificial carbon fixation pathways. Dotted lines indicate multi-step reactions. PEP, phosphoenolpyruvate; 3-HP, 3-hydroxypropanoate; Ppc, PEP carboxylase; Ccl, citramalyl-CoA lyase; Pcc, propionyl-CoA carboxylase; Ccr, crotonyl-CoA carboxylase; Mcl, malyl-CoA lyase; CA, carbonic anhydrase. (B) Artificial methanol assimilation pathways. Dotted lines indicate multi-step reactions. MeOH, methanol; FLAD, Formaldehyde; GALD, glycolaldehyde; H6P, hexose-6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; AcP, acetyl-phosphate; AcCoA, acetyl-CoA; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; Eu1P, erythrulose 1-phosphate; Eu4P, erythrulose 4-phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; Ru5P, ribulose 5-phosphate; Xu5P, xylulose 5-phosphate; R5P, ribose 5-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; FDP, fructose-1,6-bisphosphate; PYC, pyruvate carboxylase; HAACL, 2-hydroxyacyl-CoA lyase; EPS, erythrulose 1-phosphate synthase.)

母等甲基营养型酵母内源的甲醇同化途径, 其特征中间体为木酮糖-5-磷酸 (xylulose 5-phosphate, Xu5P), 关键酶为二羟丙酮合酶 (Das), 催化甲醛和 Xu5P 缩合裂解生成 GAP 和二羟丙酮 (dihydroxyacetone, DHA), 然后, 二羟丙酮被磷酸化形成磷酸二羟丙酮, 磷酸二羟丙酮和 GAP 通过糖异生作用和后续一系列的碳架重排反应重新生成 Xu5P。此途径同样可以将三分子甲醇同化生成一份子 GAP^[38]。

丝氨酸循环 (SC) (图1): 甲酸经四氢叶酸 (THF) 介导生成甲烯-THF (Methylene-THF), 在丝氨酸羟甲基转移酶 (SHMT) 催化下与甘氨酸缩合生成丝氨酸, 继而转化为磷酸烯醇式丙酮酸 PEP 并同化 CO₂ 形成草酰乙酸, 最终再生甘氨酸并输出乙酰 CoA。利用此途径同化 1 分子 C1 化合物和 1 分子 CO₂ 能够产生 1 分子乙酰 CoA。

还原性甘氨酸途径 (rGlyP) (图1): 甲酸与 THF 的结合后经一系列氧化还原反应生成的衍生产物甲烯-THF 通过甘氨酸裂解系统 (Glycine Cleavage System, GCS) 固定 CO₂ 合成甘氨酸并且重新生成一分子 THF, 甘氨酸经丝氨酸途径生成乙酰 CoA, 为细胞生长提供碳架和能量来源^[39, 40]。

1.2.2 人工同化途径

丝氨酸算算循环 (STC) (图2): 在丝氨酸循环的基础上, 重构苏氨酸裂解模块, 将毒性中间体羟基丙酮酸替换为 L-2-氨基-3-氧代丁酸, 实现低 CO₂ 依赖的甘氨酸再生。此途径更适配于大肠杆菌等模式生物^[17]。

甲酰辅酶 A 延伸 (FORCE) 途径 (图2): 甲酸在酰辅酶 A 合成酶的作用下形成甲酰-CoA, 甲酰-CoA 和甲醛在 2-羟基酰-CoA 裂解酶 (2-hydroxyacyl-CoA lyase, HAACL) 的催化下缩合形

表1 人工甲基同化途径与天然途径的对比

Table 1 Comparison between artificial and natural pathways of methylotrophy

Pathways	C1 substrates	Products	ATP consumption	NAD(P)H consumption	steps	others
XuMP	Methanol	GAP	1	0	10	-
RuMP	Methanol	GAP	1	0	8	-
rGlyP	Formate、CO ₂	Acetyl-CoA	1	3	7	-
SC	Formate、CO ₂	Acetyl-CoA	3	3	12	-
STC	Formate、CO ₂	Acetyl-CoA	4	4	14	Adaptability to low CO ₂ concentration
FORCE	Methanol	Organic acid	0	-	-	Wide product spectrum
EuMP	Methanol	GAP	1	0	11	-
SMA	Methanol	Acetyl-CoA	0	0	6	No ATP consumed

成乙醇酰-CoA，后者通过一系列氧化还原反应形成乙醛，然后甲酰-CoA在HACL的催化下迭代缩合进行碳链延长。利用FORCE途径每轮迭代缩合反应可以使碳链延伸一个碳原子，生成的产物可以通过一系列转化生成细胞生长所需的中心代谢物或者工业需要的化学品^[41, 42]。

赤酰糖单磷酸 (EuMP) 途径 (图2): 类似于RuMP和XuMP途径, EuMP途径以磷酸二羟丙酮为缩合底物, 经赤酰酮糖-1-磷酸合成酶催化生成赤酰糖-4-磷酸 (E4P), 通过碳重排再生底物并输出GAP^[43]。EuMP途径与RuMP途径催化模式相似, 且能量效率相当, 为C1化合物的生物利用提供了补充。

合成甲醇利用 (SMA) 途径 (图2): 利用乙醇醛合酶催化两个乙醛缩合生成羟乙醛, 后者与E4P缩合形成己糖-6-磷酸 (H6P), 然后异构化形成果糖-6-磷酸 (F6P), F6P在磷酸解酮酶催化下生成E4P和乙酰磷酸, 乙酰磷酸由磷酸乙酰基转移酶催化形成中心代谢物乙酰CoA, E4P可循环用于乙醇醛的缩合转化^[3]。SMA途径与2019年发表的SACA途径的功能相似^[44], 均能够将甲醇转化为acetyl-CoA。尽管SMA途径反应步骤较多, 需要的酶种类较SACA途径更复杂, 但是其体内兼容性更好, 能够使大肠杆菌以甲醇为唯一碳源进行生长。

1.3 甲烷利用途径

甲烷同化途径存在于嗜甲烷菌中, 此途径的关键酶是甲烷单加氧酶, 催化甲烷氧化生成甲醇的反应, 甲醇在醇脱氢酶的催化下形成甲醛, 后者经由SC或者RuMP途径被细胞利用^[15] (图1)。

2 C1利用途径的底盘宿主

2.1 自养微生物

自养微生物驱动的CO₂生物固定技术是实现负碳制造的核心路径, 通过整合光合或化能自养代谢网络, 可将温室气体直接转化为高附加值化学品。然而, 现有自养底盘细胞的工业化应用仍面临多重瓶颈, 例如, 嗜极生理特性限制常规发酵工艺适配; 倍增时间长 (典型蓝藻>8 h vs 大肠杆菌<0.5 h); 基因组注释完整度不足 (如非编码RNA功能注释率<30%); 基因编辑效率低下等。尽管如此, 通过合成生物学工具创新与代谢模型优化, 部分光合蓝藻、绿藻和化能异样菌的工程化研究获得了阶段性成功^[45-49], 其中细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*, *S. elongatus*), 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, *C. reinhardtii*) 和钩虫贪铜菌 (*Cupriavidus necator*, *C. necator*) 具有较强的工程化应用前景^[47, 50, 51], 下面将对这三种底盘细胞进行简要介绍 (表2)。

细长聚球藻: 原核蓝藻模式生物, 依赖完整的光系统II (PSII) 与CBB循环实现光驱CO₂固定, 其光合自养生长特性及高度清晰的基因组注释, 使其成为光合合成生物学的理想平台^[51, 52]。目前, 该底盘已成功应用于醇类、脂肪酸、糖类、萜类的光自养合成, 并展现出极端环境耐受性的工程化优势^[52-56]。

莱茵衣藻: 单细胞真核绿藻模式底盘, 其叶绿体驱动的光自养代谢与乙酸异生长的双重能力, 为真核合成生物学研究提供了更多选择性。

其完备的蛋白翻译后修饰系统及高效的固碳效率，使其在重组蛋白、脂质、多糖等产品的生物合成细胞工厂构建中受到青睐^[57, 58]。

钩虫贪铜菌：也称为富养罗尔斯通氏菌。是变形菌门中罕见的兼性能自养菌，通过氢气或者甲酸氧化提供能量，利用CBB循环实现固碳。通过基因组尺度代谢模型指导下的理性设计，结合CRISPR-Cas编辑系统，已推动其向多功能负碳细胞工厂转型，实现了糖类、氨基酸、生物材料、萜类等化学品的负碳制造^[48, 50, 59]。

2.2 天然甲基营养菌

甲醇、甲烷、甲酸、甲醛等C1化合物均可由CO₂直接制备，具有清洁可再生的优点。天然甲基营养菌内源的C1利用途径可高效利用这些C1底物作为唯一碳源，为负碳生物制造提供了天然底盘。基于CRISPR-Cas基因组编辑与合成基因线路设计，研究者已构建出多维度工程化的甲基营养菌，其代表性工业底盘包括：毕赤酵母、扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*, *M. extorquens*)、甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*, *B. methanolicus*)^[60]，此外，多形汉逊酵母凭借其出色的甲醇转化能力，逐步获得了合成生物学家的青睐^[61]。下面将对上述底盘进行详细介绍(表2)：

毕赤酵母是美国食品药品监督管理局认证的“一般认为安全(generally recognized as safe, GRAS)”的非常规酵母，具有强大的蛋白质合成和分泌能力，是工业上最常用的异源蛋白表达宿主之一^[62]。内源性的XuMP途径使毕赤酵母具有天然的甲醇利用能力，有效的基因编辑技术和丰富的基因工程工具的开发使它成为一个最有前景的甲基营养菌^[63]。目前利用毕赤酵母已经实现甲醇到脂肪酸及其衍生物、有机酸、萜类化合物等多种高价值化学品的转化^[62]。

扭脱甲基杆菌是甲基营养型模式菌株，第一次对它的报道要追溯至1961年，截至目前，已经对它的生理、代谢、遗传与分子机制进行了全面的研究。此外，内源的丝氨酸循环使扭脱甲基杆菌可能灵活利用甲醇、甲酸等多种C1底物，这些优势使它成为一个非常有应用前景的甲基营养

菌^[64]。目前，利用扭脱甲基杆菌已成功实现由甲醇或甲酸合成萜类、有机酸、重组蛋白等高价值产品^[35]。

甲醇芽孢杆菌是一种嗜热、甲基营养型的革兰氏阳性细菌，最适生长温度为50-55℃，这一特性使其在高温发酵中展现出独特工业优势：降低冷却能耗和染菌风险^[60]。近年来，甲醇芽孢杆菌的基因组信息、生长特性、遗传工具的开发有了较大进展，这为代谢网络精准调控奠定了基础^[65]。目前，已经成功实现基于甲醇芽孢杆菌的维生素、氨基酸合成的甲醇营养型细胞工厂的构建^[60]。

多形汉逊酵母是美国食品药品监督管理局认证的GRAS非常规酵母，利用XuMP途径进行甲醇的同化，因其具有耐高温、高密度发酵能力强、生长速率高、甲醇同化效率高等优点，近年来在合成生物制造领域得到越来越多的应用，已经实现由甲醇到萜类、脂肪酸及其衍生物、有机酸等多种高值化合物的合成^[61]。与其它三种甲基营养菌相比，多形汉逊酵母的遗传工具较少、基因编辑效率低^[66]。随着研究的深入，技术问题逐步得到解决，多形汉逊酵母将成为更有竞争力的工业微生物底盘^[61]。

除了上述介绍的菌株之外，在不同生态环境中分离新型更适合作为细胞工厂底盘的甲基营养菌，能够为甲基营养型细胞工厂的开发提供更多的选择性^[67, 68]。

2.3 合成甲基营养菌

大肠杆菌与酿酒酵母作为合成生物学与工业生物制造的经典模式底盘(表2)，凭借其高度成熟的基因编辑技术、规模化发酵体系及全基因组注释完整性，在代谢工程应用中展现出显著优势^[35, 69]。相较于自养与天然甲基营养菌，其核心优势体现在：1) 模块化遗传工具库完备；2) 代谢网络可塑性高，支持超过200种化学品异源合成；3) 工业适配性强，已建立FDA认证的大规模生产工艺^[35, 70]。因此，基于大肠杆菌和酿酒酵母构建合成甲基营养菌，成为负碳生物制造的另一个热点研究领域^[7, 71]。

天然C1同化途径在甲基营养型大肠杆菌的构

建中起到了重要的作用,例如, Madeleine Bouzon 教授团队在大肠杆菌中重构了 rGlyP,使其能够在以甲酸为唯一碳源的培养条件下进行生长^[72];陈振教授团队在大肠杆菌中重构 XuMP 途径,然后通过 ALE,得到了高效利用甲醇的工程菌,但是此菌株并不能以甲醇为唯一碳源进行生长,需要以 0.1 g/L 的酵母提取物作为甲醇的共同底物^[73]; Julia A. Vorholt 教授团队在基于 RuMP 途径的大肠杆菌基础上,进行了 285 代的 ALE,进一步提高甲醇同化能力,得到的甲基营养型大肠杆菌在甲醇为唯一碳源的培养条件下倍增时间为 8.5 h^[16],在上述工作的基础上继续进行 ALE,传代 1240 次后得到的甲基营养型大肠杆菌的倍增时间达到 4.3 h,优于甲基营养菌甲醇芽孢杆菌 (5 h),此合成甲基营养型大肠杆菌可利用甲醇合成乳酸、聚羟基丁酸、衣康酸、对羟基苯甲酸等多种化学品^[7]; James C. Liao 团队利用开发的新型工具 BAC (bacterial artificial chromosome),有效解决了甲醇利用途径中间体甲醛引起的 DPC (DNA-protein cross-linking) 致死问题,显著提高了 ALE 过程中有益突变积累效率,最终得到的依赖于 RuMP 途径的甲基营养型大肠杆菌倍增时间缩短到 3.5 h,是倍增时间最短的合成甲基营养型大肠杆菌^[5]。此外,人工 C1 同化途径在甲基营养型大肠杆菌构建中也发挥了重要的作用,例如 Arren Bar-Even 教授团队在大肠杆菌中构建了丝氨酸-苏氨酸循环,然后通过 200 天的 ALE,得到的工程菌可以在甲酸和 CO₂ 为碳源的培养条件下进行生长^[17]。江南大学刘立明教授团队利用人工设计的 SMA 途径,使大肠杆菌在甲醇为唯一碳源的培养条件下,倍增时间达到 4.5 h^[3]。

甲基营养型酿酒酵母的构建也取得了重大进展,引入 rGlyP、XuMP 途径能够使酿酒酵母高效利用甲醇或者甲酸等 C1 化合物合成多种高价值天然产物^[6, 40, 74, 75]。江南大学白仲虎教授团队在酿酒酵母中重构 XuMP 途径,然后通过能量平衡,区室化改造、ALE 等改造策略,得到了以甲醇为唯一碳源进行生长的工程酵母,并且实现了聚酮化合物合成,^[6]。

此外,基于非传统底盘微生物特殊生理特性的 C1 这为甲基营养型酿酒酵母细胞工厂的构建提

供了基础利用细胞工厂开发正成为合成生物学研究的前沿方向^[76-78]。解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*, *Y. lipolytica*) 凭借卓越的脂质积累能力及过氧化物酶体代谢区室化特性,在甲醇转化合成琥珀酸方面取得了显著的效果^[77]。粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*, *S. marcescens*) 对萜类和甲醇有很强的耐受性,这使其能够利用甲醇高效地合成萜类化合物^[76]。这些案例表明,非传统底盘的代谢多样性(如次级代谢物合成、极端环境适应)为 C1 生物炼制提供了超越模式菌株的独特解决方案。

2.4 无细胞系统

除细胞工厂外,无细胞的体外生物转化 (ivBT, in vitro biotransformation) 在 C1 化合物利用方面也展现出巨大潜力。中国科学院天津工业生物技术研究所马延和教授团队在该领域处于国际领先地位。继开创性实现 CO₂ 合成淀粉之后,该团队进一步建立了化学-酶耦合的 CO₂ 至己糖的合成途径:首先对关键酶进行改造,提升了天然酶活性、底物特异性,然后通过构建的 C1→C3→C6 的功能模块,体外实现了葡萄糖的高效合成,其转化率高于传统植物,产量达到了 11.4 g/L^[79]。在此基础上,该团队进一步设计了 C6→Cn 模块,通过对途径关键酶的理性改造以及 ivBT 反应体系的条件优化,成功实现了蔗糖、淀粉等多种较高分子量糖类的合成。其中,蔗糖的产量达到了 14 g/L 超越了工程酵母的发酵水平,显示出良好的应用前景^[80]。德国马克斯·普朗克陆地微生物研究所的 Tobias J. Erb 团队在体外固碳领域做出了系统性的工作,其团队利用构建的 THETA、HOPAC 和 CORE 等高效固碳循环^[20-22],实现了 CO₂ 的高效固定,效率远高于天然的 CBB 循环。

3 C1 利用途径的应用案例

3.1 基于 C1 的生物制造研究进展

自养型微生物细胞工厂、甲基营养型细胞工厂以及体外催化平台的建立,为基于 C1 的生物制

表2 本文提及的C1利用途径的宿主

Table 2 The hosts of C1 utilization pathways mentioned in this paper

Hosts	C1 pathway	Safety	Doubling Time	Features
<i>S. elongatus</i>	CBB	To be evaluated	6-12 h	Photoautotrophic, salt-tolerant
<i>C. reinhardtii</i>	CBB	GRAS	6-8 h	Photoautotrophic, eukaryotic expression system
<i>C. necator</i>	CBB	Industrial safety	4-6 h	facultative autotrophy, high metabolic flexibility, clear genetic background
<i>K. phaffii</i>	XuMP	GRAS	2-3 h	Efficient expression of proteins, high density fermentation, natural methylotroph
<i>M. extorquens</i>	SC	Industrial safety	3-5 h	Natural methylotroph, clear genetic background
<i>B. methanolicus</i>	RuMP	Industrial safety	1-1.5 h	Natural methylotroph, high temperature resistance
<i>O. polymorpha</i>	XuMP	GRAS	1.5-2 h	Wide substrate spectrum, natural methylotroph, high robustness
<i>E. coli</i>	RuMP、FORCE、SMA、rGlyP、EuMP、STC	Industrial safety	20-30 min	Clear genetic background, rapid growth, wide substrates spectrum
<i>S. cerevisiae</i>	XuMP、RuMP、rGlyP	GRAS	1.5-2 h	Clear genetic background, eukaryotic expression system, wide products spectrum,
<i>Y. lipolytica</i>	XuMP	GRAS	1.5-2 h	high lipid synthesis flux
<i>S. marcescens</i>	XuMP	Opportunistic infection	0.5-1 h	High robustness
Cell free	THETA、ACSP	-	-	High orthogonality, high efficiency

造奠定了基础。相关研究进展总结如表3所示。

表中所涉及的产物依据其化学形式和用途分为糖类及衍生物（甘露醇、蔗糖、葡萄糖、D-阿洛酮糖、赤藓糖醇、N-乙酰葡萄糖胺、肌醇）、有机酸类（乳酸、3-羟基丙酸、丁酸、琥珀酸、苹果酸、乙醇酸、乙醛酸、衣康酸、5-氨基乙酰丙酸、大麻酚酸）、萜类及挥发油类（法尼烯、柠檬烯、 α -红没药烯、乔松素、Zealexin A1）、氨基酸类（异亮氨酸、缬氨酸）、生物活性物质与次生代谢产物（虾青素、番茄红素、虫草素、聚3-羟基丁酸、核黄素、红没药醇、单细胞蛋白）、脂类及脂

肪酸衍生物（脂质、脂肪醇、脂肪酸）六大类。其商用价值概述如下：食品/保健品领域（蔗糖、D-阿洛酮糖、乳酸、虾青素、虫草素等）主打健康替代（低糖、抗氧化）和功能性需求；日化/香料工业（柠檬烯、法尼烯、脂肪醇）依赖其天然溶解性与香气；医药/生物材料（甘露醇、N-乙酰葡萄糖胺、聚乳酸）侧重安全辅料与组织修复；能源与环保（法尼烯生物燃料、可降解塑料）契合可持续发展趋势。高附加值产品如虾青素（\$5000-6000/kg）、虫草素（抗癌研究）和稀有人参皂苷驱动生物技术产业创新。

表3 基于C1的生物制造研究进展

Table 3 Progress in biomanufacturing research based on C1

Hosts	C1 pathway	Carbon source	Products	Titer	Ref.
<i>S. elongatus</i>	CBB	CO ₂	Mannitol	701 mg/L	[54]
	CBB	CO ₂	α -Farnesene	12.87 mg/L	[56]
	CBB	CO ₂	Sucrose	3.8 g/L	[81]
<i>C. reinhardtii</i>	CBB	CO ₂	Limonene	117 μ g/L	[82]
	CBB	CO ₂	Astaxanthin	23.5 mg/L	[83]
	CBB	CO ₂	Lipid	672 mg/L	[84]
<i>C. reinhardtii</i> + <i>E. coli</i>	CBB	CO ₂	Lycopene	1.48 mg/L	[85]
<i>C. necator</i>	CBB	CO ₂	N-acetylglucosamine	75.3 mg/L	[86]
	CBB	CO ₂	Myoinositol	1054.8 mg/L	[87]
	CBB	CO ₂	L-isoleucine	105 mg/L	[88]

续表

Hosts	C1 pathway	Carbon source	Products	Titer	Ref.
<i>C. necator</i>	CBB	CO ₂	Valine	319 mg/L	[88]
<i>S. elongatus</i> + <i>V. natriegens</i>	CBB	CO ₂	Lactate	472.1 mg/L	[89]
<i>S. elongatus</i> + <i>E. coli</i>	CBB	CO ₂	3-HP	120.3 mg/L	[26]
<i>S. elongatus</i> + <i>E. coli</i>	CBB	CO ₂	Pinocembrin	152.7 mg/L	[90]
<i>B. methylotrophicum</i>	WL	Methanol, HCO ₃ ⁻	Butyric acid	3.69 g/L	[91]
<i>K. phaffii</i>	XuMP	Methanol	α-Bisabolene	1.1 g/L	[92]
	XuMP	Methanol	Zealexin A1	102.5 mg/L	[93]
	XuMP	Methanol	Lactate	5.18 g/L	[94]
	XuMP	Methanol	Itaconic acid	28 g/L	[95]
	XuMP	Methanol	Fatty alcohol	5.6 g/L	[12]
	XuMP	Methanol	Fatty acid	23.4 g/L	[9]
	rGlyP	Methanol, HCO ₃ ⁻	Fatty alcohol	0.21 g/L	[74]
	XuMP-RuMP	Methanol	Erythritol	31.5 g/L	[96]
	XuMP	Methanol	Cordycepin	8.11 g/L	[97]
	XuMP	Methanol	3-HP	27 g/L	[98]
	XuMP	Methanol	single cell protein	0.506 g/g DCW	[10]
<i>M. extorquens</i>	SC	Methanol	3-HP	1.75 g/L	[99]
	SC	Methanol	Polyhydroxyalkanoate	11.07 g/L	[100]
	RuMP	Methanol	Riboflavin	2579 mg/L	[101]
<i>E. coli</i>	RuMP	Methanol	Itaconic acid	1 g/L	[7]
	RuMP	Methanol, xylose	D-allulose	98 mM	[102]
	rGlyP	Formate, CO ₂	Lactate	1.2 mM	[103]
	RuMP	Methanol, xylose	3-HP	437 mg/L	[104]
	RuMP	Methanol, xylose	D-glucaric acid	3.0 g/L	[105]
	FORCE	Methanol	Glycolate	5.2 g/L	[42]
<i>O. polymorpha</i>	XuMP	Methanol	Succinate	0.35 g/L	[27]
	XuMP	Methanol	Malate	13 g/L	[14]
	XuMP	Methanol	3-HP	7.10 g/L	[106]
	XuMP	Methanol	Fatty alcohol	3.6 g/L	[13]
	XuMP	Methanol	Fatty acid	15.9 g/L	[107]
	XuMP	Methanol	Lactate	3.8 g/L	[108]
<i>S. cerevisiae</i>	XuMP	Methanol, CO ₂ , 0.1% yeast extract	Cannabigerolic acid	18 μg/L	[75]
	rGlyP	Methanol, HCO ₃ ⁻	5-aminolevulinic acid	1.67 mg/L	[74]
<i>S. marcescens</i>	XuMP	Methanol, xylose	Bisabolol	1256.41 mg/L	[76]
Cell free	THETA	CO ₂ , HCO ₃ ⁻	Glyoxylate	760.3 μM	[20]
	ACSP	CO ₂	Glucose	11.4 g/L	[79]
	ACSP	CO ₂	sucrose	14 g/L	[80]

3.2 促进C1转化的合成生物学策略

近年来, 合成生物学技术成功突破了自养微生物、天然/合成甲基营养菌及无细胞系统等各类平台在C1生物制造工业化进程中的多重技术瓶颈, 成效显著。

3.2.1 光合自养微生物的改造策略

自养微生物细胞工厂的光驱代谢特性虽为CO₂直接转化提供了碳中和路径, 但其工业化应用面临双重限制:

(1) 光依赖性制约: 光合自养体系(如蓝藻、绿藻)依赖光能输入, 高密度发酵导致光穿透深

度受限；且光敏感产物易发生光降解，严重制约反应器放大与产物多样性^[90]；

(2) 代谢网络局限性：天然自养途径（如CBB循环）的碳通量集中于生物量合成，次级代谢产物谱狭窄，难以满足复杂化学品（如聚酮、生物碱）的合成需求。

针对上述瓶颈，合成生物学领域提出跨物种共培养策略：通过构建光合自养菌与异养工程菌的代谢分工系统，实现光能→有机碳源→高值产物的级联转化^[26, 89, 90]。此类系统不仅突破光限制与产物多样性壁垒，更通过模块化代谢分工实现碳/能流的高效再分配，为自养生物制造的工业化转型提供了创新范式。

3.2.2 甲基营养菌的改造策略

在甲基营养菌的工程化进程中，甲醛代谢平衡的精准调控是亟待突破的关键瓶颈。内源性甲醛脱氢酶（FrmA）介导的解毒途径虽可防止甲醛毒性积累，但其将甲醛氧化为CO₂的过程导致高达30%的碳损失，严重制约原料利用效率^[38]。然而，完全敲除该途径会引发甲醛过度积累，通过交联DNA-蛋白质（DPC）抑制细胞生长并破坏代谢活性^[38]。此外，合成甲基营养菌对单一碳源（尤其是甲醇）的代谢适应性和独立性一直是工业化进程中的关键挑战。针对上述难题，合成生物学家们采用了一下集中策略：

(1) 代谢优化缓解甲醛积累：构建甲醇氧化酶(Aox)/Das复合体，使甲醛生成与消耗形成代谢通道，将胞内甲醛浓度控制在安全阈值^[38]；过表达磷酸戊糖途径限速酶（如转酮醇酶TktA），提高同化途径前体Xu5P或Ru5P的供给，为甲醛同化提供充足受体，或者额外引入甲醇同化途径都能够有效地促进甲醛消耗^[6, 9, 38, 75, 93, 101]。

(2) 提升宿主对甲醛的耐受性：本课题组针对甲醛毒性问题，系统地修复了由甲醛引起的细胞膜损伤，构建了细胞膜上含有磷脂酰胆碱的大肠杆菌，使大肠杆菌对甲醛的耐受性提高64%，甲醇利用效率提升23倍^[104]；通过引入ROS清除系统，修复了由甲醛引起的活性氧（ROS）损伤，使甲醇利用效率提升30倍^[109]；通过协同表达修复蛋白，修复了由甲醛引起的DNA和蛋白质损伤，使甲醇利用效率提升50倍^[110]。

(3) ALE策略促进甲醇的同化及细胞的生长：多数工程化菌株需依赖木糖等辅助碳源维持基础代谢活性，这可能导致细胞对甲醇利用率降低。通过ALE与系统代谢工程的协同策略，可显著提升碳源代谢独立性，甚至可以使其在以甲醇为唯一碳源的培养条件下进行生长^[5-7, 16, 17, 40, 73, 75, 103, 111]，建立合理的实验室进化策略和有效的工具能够达到事半功倍的效果^[5, 111]。

(4) 酶的挖掘和工程化改造：关键酶的挖掘和改造对提高甲醇利用效率至关重要。例如，依赖于NAD⁺的甲醇脱氢酶（Mdh）催化的反应在热力学上是不利的，催化效率过低使其成为甲醇利用的限速步骤，天津工业生物技术研究王钰研究员团队构建了Mdh突变体文库，利用高通量筛选手段得到了高活性突变体Mdh^{T153P}，使甲醇同化效率提高了6.5倍^[112]。Ramon Gonzalez教授团队通过构建的体内筛查平台，成功挖掘到了更高效的2-羟酰基辅酶A合酶，并通过合理的改造使其催化速率提高了7倍，FORCE途径的通量因此提高14倍，乙醇酸的产量达到了其它工业菌株的同等水平^[42]。

(5) 其它策略

除了上述针对性策略外，还有一些其它的促进甲醇同化的方法，例如，设计更高效的人工C1利用途径：FORCE途径、SMA途径等相较于天然途径通常具有更高的通量或更精简的设计，更加适合用于构建合成甲基营养型细胞工厂；底物通道策略提高途径效率：通过构建途径中关键酶的多酶复合体或者将合成途径区室化可有效提高甲醇的利用效率^[4, 6, 13]。

4 机遇和挑战

温室气体如甲烷与CO₂浓度的持续攀升对全球气候构成严峻威胁，开发能够高效捕获与转化此类气体的生物技术已成为当务之急。在此背景下，来源广泛、成本低廉的C1化合物被视为推动负碳生物制造战略资源^[113]。其中，甲醇和甲酸因其良好的水溶性与固有的生物代谢途径而备受关注。甲醇更以其高能量密度和低细胞毒性，被认为是一种理想的生物制造碳源，其生物转化取得了重

大进展^[18, 35, 114]。当前研究主要聚焦两个方向：(1) 以系统代谢工程策略改造天然甲基营养菌，提升甲醇同化速率与目标产物合成能力^[96, 108]；(2) 在模式微生物中重构天然或人工甲醇同化途径，“自下而上”的创制合成甲基营养菌^[5, 71]。这两种策略均受限于甲醇同化效率低下以及甲醛等毒性中间体的累积抑制。针对上述瓶颈，挖掘并定向进化高效C1同化酶、系统优化代谢通量或者提高底盘细胞的甲醛耐受性、理性设计人工途径及ALE等手段已显示出显著成效，可有效提升细胞工厂的甲醇利用效率和鲁棒性^[5, 73, 104, 109, 110, 112]。特别是ALE技术，通过在长期进化中施加底物选择压力，可大幅提升C1利用工程菌的性能表现，而建立合理的进化策略与高效工具对该技术的成功实施至关重要。

以CO₂为代表的温室气体的利用一直是科学研究的重要方向。然而，因其化学惰性、低能量密度及溶解性等固有特性使其直接生物利用面临诸多挑战。例如，CO₂还原固定需要高昂的能量输入；经济高效的CO₂捕集技术是前提条件；CO₂的低溶解度限制了生物固碳速率。目前，CO₂的直接生物利用主要依托两种策略：一是基于工程化自养菌。天然自养菌普遍存在生长缓慢、基因编辑工具匮乏等局限^[115]。近年来，合成生物学工具的突破（如高效基因编辑系统与新型遗传工具的开发）为改造自养型细胞工厂提供了关键技术支撑^[116, 117]，推动了以CO₂为唯一碳源合成甘露醇、蔗糖、法尼烯等高价化学品的进程^[54, 56, 81, 118]。此外，“异养底盘自养化”作为一种补充策略展现出巨大潜力，例如，Diethard Mattanovich教授团队将CBB循环引入毕赤酵母，成功实现了以CO₂为碳源合成衣康酸和乳酸，开创了人工自养新范式^[119]。二是依托于人工构建的固碳途径进行CO₂的体外生物利用，例如，Tobias J. Erb团队设计的THETA循环，整合了来自9个物种的17种酶，可在体外将CO₂高效转化为acetyl-CoA，其固碳效率优于天然系统^[20]，然而，该类多酶系统难以实现体内应用，我们猜测主要源于以下原因：途径中关键中间代谢物被宿主内源酶催化产生分流，导致固碳循环中断^[20]；细胞能量供应不足以支撑CO₂的持续固定；体内环境导致固碳循环中特定酶

的活性降低，固碳循环通量降低。

除了直接生物利用外，通过电催化或光催化将CO₂转化为高能量密度的甲烷或甲醇，再将其作为发酵底物进行生物制造，被认为是另外一种颇具前景的负碳制造方案^[79, 80, 120]。该“两步法”路线的成功实施，不仅依赖于合成生物学构建高效利用C1底物的细胞工厂或者体外转化平台，还依赖于上游CO₂的低成本捕获与高效化学转化技术的突破。这构成了一个典型的交叉学科研究体系：材料学致力于开发新型吸附剂以实现空气中CO₂的富集^[121]，化学催化领域需设计高选择性、高活性的催化剂以实现CO₂至C1载体的高效转化^[122, 123]，而合成生物学则肩负着优化C1底物生物利用途径的最终环节^[124]。因此，推动化学、材料学与合成生物学等多学科深度融合，对系统性推进CO₂生物利用至关重要。

展望未来，人工智能的深度介入正逐渐为C1生物制造注入变革性力量，一方面，新型遗传操作系统与AI辅助的基因编辑策略，将极大提升对非模式C1底盘的精准操控能力^[125, 126]。另一方面，高通量自动化工作站与高通量筛选平台的构建将显著加速DBTL循环，提升C1生物制造研发效率^[127]。更为重要的是，随着AI驱动蛋白质从头设计及酶工程技术的日益成熟^[128, 129]，未来有望持续产出高活性、高稳定性的C1同化关键酶，并催生更具碳效率与热力学优势的人工转化途径。这些技术突破的协同演进，将共同构筑C1生物制造的创新基石，推动其从实验室走向规模化应用，为实现碳中和与可持续发展目标提供强有力的科技支撑。

参 考 文 献

- [1] O'KEEFFE S, GARCIA L, CHEN Y, et al. Bringing carbon to life via one-carbon metabolism [J]. *Trends in Biotechnology*, 2025, 43(3): 572-585.
- [2] 高教琪, 周雍进. 甲醇生物转化的机遇与挑战 [J]. *合成生物学*, 2020, 1: 158-173.
GAO J Q, ZHOU Y J. Advances in methanol biotransformation [J]. *Synthetic biology Journal*, 2020, 1: 572-585.
- [3] MENG X, HU G, LI X, et al. A synthetic methylotroph achieves accelerated cell growth by alleviating transcription-replication conflicts [J]. *Nature Communications*, 2025, 16

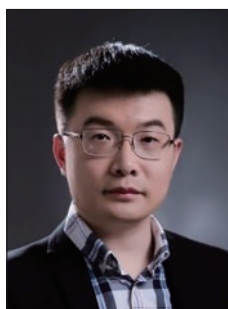
- (1): 31
- [4] MENG Q, WANG D, FU X, et al. Converting *Bacillus subtilis* 168 to a synthetic methylotroph by combinatorial metabolic regulation strategies [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(8): 4755-4763.
- [5] NIEH L Y, CHEN F Y H, JUNG H W, et al. Evolutionary engineering of methylotrophic *E. coli* enables fast growth on methanol [J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 8840.
- [6] ZHAN C J, LI X, LAN G, et al. Reprogramming methanol utilization pathways to convert *Saccharomyces cerevisiae* to a synthetic methylotroph [J]. *Nature Catalysis*, 2023, 6(5): 435-450.
- [7] REITER M A, BRADLEY T, BüCHEL L A, et al. A synthetic methylotrophic *Escherichia coli* as a chassis for bioproduction from methanol [J]. *Nature Catalysis*, 2024, 7(5): 560-573.
- [8] KRÜSEMANN J L, LINDNER S N. Bioproduction from methanol [J]. *Nature Catalysis*, 2024, 7(5): 472-474.
- [9] CAI P, WU X Y, DENG J, et al. Methanol biotransformation toward high-level production of fatty acid derivatives by engineering the industrial yeast *Pichia pastoris* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022, 119: e2201711119.
- [10] MENG J, LIU S, GAO L, et al. Economical production of *Pichia pastoris* single cell protein from methanol at industrial pilot scale [J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 198.
- [11] WU X Y, REN Y Y, CHEN S S, et al. Production of L-lactic acid from methanol by engineered yeast *Pichia pastoris* [J]. *Bioresource Technology*, 2025, 415: 131730.
- [12] SHEN Y W, CAI P, GAO L H, et al. Engineering high production of fatty alcohols from methanol by constructing coordinated dual biosynthetic pathways [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 412: 131396.
- [13] ZHAI X X, GAO J Q, LI X Y, et al. Peroxisomal metabolic coupling improves fatty alcohol production from sole methanol in yeast [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2023, 120: e2220816120.
- [14] WEFELMEIER K, SCHMITZ S, KÖSTERS B J, et al. Methanol bioconversion into C3, C4, and C5 platform chemicals by the yeast *Ogataea polymorpha* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 8.
- [15] KANG N K, CHAU T H T, LEE E Y. Engineered methane biocatalysis: strategies to assimilate methane for chemical production [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2024, 85: 103031.
- [16] KELLER P, REITER M A, KIEFER P, et al. Generation of an *Escherichia coli* strain growing on methanol via the ribulose monophosphate cycle [J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5423.
- [17] WENK S, RAINALDI V, SCHANN K, et al. Evolution-assisted engineering of *E. coli* enables growth on formic acid at ambient CO₂ via the serine threonine cycle [J]. *Metabolic Engineering*, 2025, 88: 14-24.
- [18] GREGORY G J, BENNETT R K, PAPOUTSAKIS E T. Recent advances toward the bioconversion of methane and methanol in synthetic methylotrophs [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 71: 99-116.
- [19] LIU L N. Advances in the bacterial organelles for CO₂ fixation [J]. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(6): 567-580.
- [20] LUO S S, DIEHL C, HE H, et al. Construction and modular implementation of the THETA cycle for synthetic CO₂ fixation [J]. *Nature Catalysis*, 2023, 6(12): 1228-1240.
- [21] SATANOWSKI A, MARCHAL D G, PERRET A, et al. Design and implementation of aerobic and ambient CO₂-reduction as an entry-point for enhanced carbon fixation [J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 3134.
- [22] MCLEAN R, Schwander T, CHRISTOPH DIEHL, et al. Exploring alternative pathways for the in vitro establishment of the HOPAC cycle for synthetic CO₂ fixation [J]. *Science Advances*, 2023, 9(24): eadh4299.
- [23] LUO S S, LIN P P, NIEH LY, et al. A cell-free self-replenishing CO₂-fixing system [J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(2): 154-162.
- [24] FENG J, LI X, TENG X, et al. Harnessing CO₂ fixation and reducing power recycling for enhanced polyhydroxyalkanoates industrial bioproduction [J]. *Metabolic Engineering*, 2025, 91: 204-216.
- [25] ZHU P, CHEN X. Converting heterotrophic *Escherichia coli* into synthetic C1-trophic modes [J]. *Trends in Chemistry*, 2022, 4(10): 860-862.
- [26] LI C, ZHENG H, LI Y, et al. Facilitated channeling of fixed carbon and energy into chemicals in artificial phototrophic communities [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2025, 147(6): 4707-4713.
- [27] FENG J, MA D, GAO S, et al. Recent advances in engineering heterotrophic microorganisms for reinforcing CO₂ fixation based on Calvin-Benson-Bassham Cycle [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2023, 11(26): 9509-9522.
- [28] PENG J H, LO S C, YU Y N, et al. Carbon fluxes rewiring in engineered *E. coli* via reverse tricarboxylic acid cycle pathway under chemolithotrophic condition [J]. *Journal of Biological Engineering*, 2025, 19(1): 20.
- [29] CUI Z Y, ZHONG Y T, SUN Z J, et al. Reconfiguration of the reductive TCA cycle enables high-level succinic acid production by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 8480.
- [30] PAN J, ZHANG X X, XU W, et al. Wood - Ljungdahl pathway found in novel marine Korarchaeota groups illuminates their evolutionary history [J]. *Msystems*, 2023, 8(4): e00305-23.
- [31] MATTOZZI M D, ZIESACK M, VOGES M J, et al.

- Expression of the sub-pathways of the *Chloroflexus aurantiacus* 3-hydroxypropionate carbon fixation bicycle in *E. coli*: Toward horizontal transfer of autotrophic growth [J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 16: 130-139.
- [32] QIN N, LI L Y, WAN X Z, et al. Increased CO₂ fixation enables high carbon-yield production of 3-hydroxypropionic acid in yeast [J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 1591.
- [33] SIMONE GIAVERI, NITIN BOHRA, CHRISTOPH DIEHL, et al. Integrated translation and metabolism in a partially self-synthesizing biochemical network [J]. *Science*, 385(6705): 174-178.
- [34] HARALD H, Martin G, ULRIKE J, et al. A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(22): 7851-7856.
- [35] SARWAR A, LEE E Y. Methanol-based biomanufacturing of fuels and chemicals using native and synthetic methylotrophs [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(3): 396-415.
- [36] YISHAI O, LINDNER S N, GONZALEZ DE LA CRUZ J, et al. The formate bio-economy [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 35: 1-9.
- [37] JIA M, LIU M, LI J, et al. Formaldehyde: an essential intermediate for C1 metabolism and bioconversion [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(11): 3507-3522.
- [38] WANG Y Y, LI R S, ZHAO F G, et al. Metabolic engineering of *Komagataella phaffii* for the efficient utilization of methanol [J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 198.
- [39] DRONSELLA B, ORSI E, SCHULZ-MIRBACH H, et al. One-carbon fixation via the synthetic reductive glycine pathway exceeds yield of the Calvin cycle [J]. *Nature Microbiology*, 2025, 10(3): 646-653.
- [40] BYSANI V R, ALAM A S, BAR-EVEN A, et al. Engineering and evolution of the complete reductive glycine pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for formate and CO₂ assimilation [J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 81: 167-181.
- [41] CHOU A, LEE S H, ZHU F, et al. An orthogonal metabolic framework for one-carbon utilization [J]. *Nature Metabolism*, 2021, 3(10): 1385-1399.
- [42] SEUNG HWAN LEE A C, MAREN NATTERMANN, FAYIN ZHU, JAMES M. CLOMBURG, NICOLE PACZIA, TOBIAS J. ERB, RAMON GONZALEZ. Identification of 2-hydroxyacyl-CoA synthases with high acyloin condensation activity for orthogonal one-carbon bioconversion [J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13: 12007–12020.
- [43] WU T, GÓMEZ-CORONADO P A, KUBIS A, et al. Engineering a synthetic energy-efficient formaldehyde assimilation cycle in *Escherichia coli* [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 8490.
- [44] LU X Y, LIU Y W, YANG Y Y, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1378.
- [45] DANG B T, BUI X T, TRAN D P H, et al. Current application of algae derivatives for bioplastic production: A review [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 347: 126698.
- [46] MEHDIZADEH ALLAF M, PEERHOSSAINI H. Cyanobacteria: model microorganisms and beyond [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(4): 696.
- [47] PESSOA J D S, DE OLIVEIRA C F M, MENA-CHALCO J P, et al. Trends on *Chlamydomonas reinhardtii* growth regimes and bioproducts [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2023, 70(6): 1830-1842.
- [48] DONATI S, JOHNSON C W. Optimizing *Cupriavidus necator* H16 as a host for aerobic C1 conversion [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2025, 93.
- [49] JIANG J, LI X, YANG K, et al. Photosynthetic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* with formate as a novel carbon source to the protein production [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 493: 152518.
- [50] MORLINO M S, SERNA GARCÍA R, SAVIO F, et al. *Cupriavidus necator* as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches [J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 69: 108264.
- [51] MADHU S, SENGUPTA A, SARNAIK A P, et al. Expanding the synthetic biology repertoire of a fast - growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2024, 121(9): 2974-2980.
- [52] LI Z, LI S, CHEN L, et al. Fast-growing cyanobacterial chassis for synthetic biology application [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, 44(3): 414-428.
- [53] SANTOS-MERINO M, GUTIÉRREZ-LANZA R, NOGALES J, et al. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 as a platform for bioproduction of omega-3 fatty acids [J]. *Life*, 2022, 12(6): 810.
- [54] PRITAM P, SARNAIK A P, WANGIKAR P P. Metabolic engineering of *Synechococcus elongatus* for photoautotrophic production of mannitol [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(8): 2363-2370.
- [55] WANG B, Cristal Zuniga, GUARNIERI M T, et al. Metabolic engineering of *Synechococcus elongatus* 7942 for enhanced sucrose biosynthesis [J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 80: 12-24.
- [56] RAUTELA A, YADAV I, GANGWAR A, et al. Photosynthetic production of α -farnesene by engineered *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 from carbon dioxide [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 396: 130432.
- [57] MA K, DENG L, WU H Z, et al. Towards green biomanufacturing of high-value recombinant proteins using

- promising cell factory: *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 1-14.
- [58] MASI A, LEONELLI F, SCOGNAMIGLIO V, et al. *Chlamydomonas reinhardtii*: a factory of nutraceutical and food supplements for human health [J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1185.
- [59] DELLA VALLE S, ORSI E, CREUTZBURG S C A, et al. Streamlined and efficient genome editing in *Cupriavidus necator* H16 using an optimised SIBR-Cas system [J]. *Trends in Biotechnology*, 2025, 43: 1470-1491.
- [60] YANG X T, ZHENG Z J, WANG Y. *Bacillus methanolicus*: an emerging chassis for low-carbon biomanufacturing [J]. *Trends in Biotechnology*, 2025, 43(2): 274-277.
- [61] XIE L F, YU W, GAO J Q, et al. *Ogataea polymorpha* as a next-generation chassis for industrial biotechnology [J]. *Trends in Biotechnology*, 2024, 42(11): 1363-1378.
- [62] GUO F, QIAO Y, XIN F, et al. Bioconversion of C1 feedstocks for chemical production using *Pichia pastoris* [J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(8): 1066-1079.
- [63] WU X Y, CAI P, YAO L, et al. Genetic tools for metabolic engineering of *Pichia pastoris* [J]. *Engineering Microbiology*, 2023, 3(4): 100094.
- [64] OCHSNER A M, SONNTAG F, BUCHHAUPT M, et al. *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 99(2): 517-534.
- [65] MÜLLER J E N, HEGGESET T M B, WENDISCH V F, et al. Methylotrophy in the thermophilic *Bacillus methanolicus*, basic insights and application for commodity production from methanol [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 99(2): 535-551.
- [66] NI X, ZHAI X X, YU W, et al. Dynamically regulating homologous recombination enables precise genome editing in *Ogataea polymorpha* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(9): 2938-2947.
- [67] JIA W, POUVREAU L, VAN DER GOOT A J, et al. Renewable methanol utilizing bacteria as future meat analogue: An explorative study on the physicochemical and texturing properties of *Methylobacillus flagellatus* biomass and fractions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2024, 151: 109832.
- [68] XU D Y, LEUNG K M, LAI G K K, et al. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* RX.G5M15, a methanol-metabolizing strain recovered from the sole of a shoe [J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2023, 13(9): e00451-24.
- [69] PONTRELLI S, CHIU T Y, LAN E I, et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 16-46.
- [70] SANFORD P A, WOOLSTON B M. Synthetic or natural? Metabolic engineering for assimilation and valorization of methanol [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 74: 171-179.
- [71] WEGAT V, FABARIUS J T, SIEBER V. Synthetic methylotrophic yeasts for the sustainable fuel and chemical production [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15: 113.
- [72] DELMAS V A, PERCHAT N, MONET O, et al. Genetic and biocatalytic basis of formate dependent growth of *Escherichia coli* strains evolved in continuous culture [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 200-214.
- [73] SUN Q, LIU D, CHEN Z. Engineering and adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* for improving methanol utilization based on a hybrid methanol assimilation pathway [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 10: 1089639.
- [74] GUO Y, ZHANG R, WANG J, et al. Engineering yeasts to Co-utilize methanol or formate coupled with CO₂ fixation [J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 84: 1-12.
- [75] QI M, ZHU C, CHENG C, et al. Rewiring methanol assimilation and reductive glycine pathways in *Saccharomyces cerevisiae* to increase one-carbon recovery [J]. *Green Chemistry*, 2025, 27(12): 3261-3271.
- [76] LIU D, WANG L, GOU L B, et al. Hybrid Methylotrophic pathway in *Serratia marcescens* for sustainable terpenoid biosynthesis [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(5): 1766-1776.
- [77] ZHANG S, GUO F, YANG Q, et al. Improving methanol assimilation in *Yarrowia lipolytica* via systematic metabolic engineering combined with compartmentalization [J]. *Green Chemistry*, 2023, 25(1): 183-195.
- [78] GAO B, ZHAO N, DENG J, et al. Constructing a methanol-dependent *Bacillus subtilis* by engineering the methanol metabolism [J]. *Journal of Biotechnology*, 2022, 343: 128-137.
- [79] YANG J G, SONG W, CAI T, et al. De novo artificial synthesis of hexoses from carbon dioxide [J]. *Science Bulletin*, 2023, 68(20): 2370-2381.
- [80] WANG Y Y, CHEN P, LI W W, et al. Cell-free synthesis of high-order carbohydrates from low-carbon molecules [J]. *Science Bulletin*, 2025, 70(14): 2266-2276.
- [81] YUN L, ZEGARAC R, DUCAT D C. Impact of irradiance and inorganic carbon availability on heterologous sucrose production in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1378573.
- [82] ZHAO M L, CAI W S, ZHENG S Q, et al. Metabolic engineering of the isopentenol utilization pathway enhanced the production of terpenoids in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(9): 577.
- [83] AMENDOLA S, KNEIP J S, MEYER F, et al. Metabolic

- engineering for efficient ketocarotenoid accumulation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(3): 820-831.
- [84] LIN J Y, SRI WAHYU EFFENDI S, NG I S. Enhanced carbon capture and utilization (CCU) using heterologous carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* for lutein and lipid production [J]. Bioresource Technology, 2022, 351: 127009.
- [85] KANG N K, KOH H G, CHOI Y, et al. Bioconversion of CO₂ into valuable bioproducts via synthetic modular co-culture of engineered *Chlamydomonas reinhardtii* and *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2025, 90: 57-66.
- [86] WANG X L, CHANG F F, WANG T T, et al. Production of N-acetylglucosamine from carbon dioxide by engineering *Cupriavidus necator* H16 [J]. Bioresource Technology, 2023, 379: 129024.
- [87] WANG X L, WANG K K, WANG L, et al. Engineering *Cupriavidus necator* H16 for heterotrophic and autotrophic production of myo-inositol [J]. Bioresource Technology, 2023, 368: 128321.
- [88] WANG L, YAO J H, TU T, et al. Heterotrophic and autotrophic production of L-isoleucine and L-valine by engineered *Cupriavidus necator* H16 [J]. Bioresource Technology, 2024, 398: 130538.
- [89] LI C F, WANG R Y, WANG J W, et al. A highly compatible phototrophic community for carbon-negative biosynthesis [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2022.
- [90] LI C F, YIN L, WANG J W, et al. Light-driven biosynthesis of volatile, unstable and photosensitive chemicals from CO₂ [J]. Nature Synthesis, 2023, 2(10): 960-971.
- [91] WANG J, LIAO Y, QIN J, et al. Increasing lysine level improved methanol assimilation toward butyric acid production in *Butyribacterium methylotrophicum* [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16: 10.
- [92] GAO L, HOU R, CAI P, et al. Engineering yeast peroxisomes for α -bisabolene production from sole methanol with the aid of proteomic analysis [J]. JACS Au, 2024, 4(7): 2474-2483.
- [93] NIU T, YAN X, WANG J, et al. Engineering of *Pichia pastoris* for the de novo synthesis of the sesquiterpene zealexin a1 from methanol [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(34): 12786-12794.
- [94] INOUE Y, YAMADA R, MATSUMOTO T, et al. Enhancing D-lactic acid production by optimizing the expression of D-LDH gene in methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2024, 17(1): 149.
- [95] SEVERINSEN M M, BACHLEITNER S, MODENESE V, et al. Efficient production of itaconic acid from the single-carbon substrate methanol with engineered *Komagataella phaffii* [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2024, 17(1): 98.
- [96] WANG S X, FANG J Y, WANG M Y, et al. Rewiring the methanol assimilation pathway in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for high-level production of erythritol [J]. Bioresource Technology, 2025, 427: 132430.
- [97] ZHAO B J, LI Y, ZHANG Y, et al. Low-carbon and overproduction of cordycepin from methanol using engineered *Pichia pastoris* cell factory [J]. Bioresource Technology, 2024, 413: 131446.
- [98] ÀVILA-CABRÉ S, ALBIOL J, FERRER P. Metabolic engineering of *Komagataella phaffii* for enhanced 3-hydroxypropionic acid (3-HP) production from methanol [J]. Journal of Biological Engineering, 2025, 19: 19.
- [99] MA Z X, FENG C X, SONG Y Z, et al. Engineering photo-methylotrophic *Methylobacterium* for enhanced 3-hydroxypropionic acid production during non-growth stage fermentation [J]. Bioresource Technology, 2024, 393: 130104.
- [100] CHANG W, YOON J, OH M-K. Production of polyhydroxyalkanoates with the fermentation of *Methylorubrum extorquens* using formate as a carbon substrate [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2022, 27(2): 268-275.
- [101] LI B, YANG Z, LI Z, et al. Enabling genetic manipulation and robustness of *Bacillus methanolicus* for methanol-based bio-manufacturing [J]. Metabolic Engineering, 2025, 89: 121-134.
- [102] GUO Q, ZHENG L J, ZHENG S H, et al. Enhanced biosynthesis of D-allulose from a D-xylose-methanol mixture and its self-inductive detoxification by using antisense RNAs in *Escherichia coli* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(26): 14821-14829.
- [103] KIM S, GIRALDO N, RAINALDI V, et al. Optimizing *E. coli* as a formatotrophic platform for bioproduction via the reductive glycine pathway [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1091899.
- [104] LI M K, SUN W J, WANG X, et al. A eukaryote-featured membrane phospholipid enhances bacterial formaldehyde tolerance and assimilation of one-carbon feedstocks [J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(12): 4074-4084.
- [105] CHEN W X, ZHWNF L J, LUO X, et al. Metabolic engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for enhanced conversion of d-xylose to d-glucaric acid mediated by methanol [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2025, 122: 1472-1483.
- [106] YU W, GAO J Q, YAO L, et al. Bioconversion of methanol to 3-hydroxypropionate by engineering *Ogataea polymorpha* [J]. Chinese Journal of Catalysis, 2023, 46: 84-90.
- [107] GAO J Q, LI Y, YU W, et al. Rescuing yeast from cell death enables overproduction of fatty acids from sole methanol [J]. Nature Metabolism, 2022, 4(7): 932-943.
- [108] WEFELMEIER K, SCHMITZ S, HAUT A M, et al. Engineering the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* for

- lactate production from methanol [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1223726.
- [109] LIU H Y, CHEN Y, LI J, et al. Scavenging intracellular reactive oxygen species to boost methanol assimilation [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 516: 164002.
- [110] ZHU C, CHEN Y, SUN W J, et al. Repair of DNA and protein damages caused by formaldehyde improves methanol assimilation [J]. *Fundamental Research*, 2025.
- [111] GUO F, LIU K, QIAO Y Y, et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: Crafting a synthetic methylotroph via self-reprogramming [J]. *Science Advances*, 2024, 10: 1-15.
- [112] QIAN J, FAN L, YANG J, et al. Directed evolution of a neutrophilic and mesophilic methanol dehydrogenase based on high-throughput and accurate measurement of formaldehyde [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2023, 8(3): 386-395.
- [113] PHAM D N, NGUYEN A D, LEE E Y. Outlook on engineering methylotrophs for one-carbon-based industrial biotechnology [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 449: 137769.
- [114] LI J J, GAO J Q, YE M, et al. Engineering yeast for high-level production of β -farnesene from sole methanol [J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 85: 194-200.
- [115] SRISAWAT P, HIGUCHI-TAKEUCHI M, NUMATA K. Microbial autotrophic biorefineries: Perspectives for biopolymer production [J]. *polymer journal*, 2022, 54(10): 1139-1151.
- [116] SHIN J, BAE J, LEE H, et al. Genome-wide CRISPRi screen identifies enhanced autolithotrophic phenotypes in acetogenic bacterium *Eubacterium limosum* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2023, 120 (6): e2216244120.
- [117] LI J, ZHANF L Y, XU Q, et al. CRISPR-cas9 toolkit for genome editing in an autotrophic CO₂-fixing *Methanogenic Archaeon* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e01165-22.
- [118] LEE J, YU H E, LEE S Y. Metabolic engineering of microorganisms for carbon dioxide utilization [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2025, 91: 103244.
- [119] MICHAEL BAUMSCHABL, Özge Ata, BERND M. MITIC, et al. Conversion of CO₂ into organic acids by engineered autotrophic yeast [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022, 119 (47): e2211827119.
- [120] YU M J, LI M L, ZHANG X Z, et al. Coupling Photocatalytic Reduction and Biosynthesis Towards Sustainable CO₂ Upcycling [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, 64(20): e202423995.
- [121] GEWEDA A E, ZAYED M E, KHAN M Y, et al. Mitigating CO₂ emissions: A review on emerging technologies/strategies for CO₂ capture [J]. *Journal of the Energy Institute*, 2025, 118: 101911.
- [122] TEDEEVA M A, KUSTOV A L, BATKIN A M, et al. Catalytic systems for hydrogenation of CO₂ to methanol [J]. *Molecular Catalysis*, 2024, 566: 114403.
- [123] WEI C J, DING H L, ZHANG Z Y, et al. Research progress of bimetallic catalysts for CO₂ hydrogenation to methane [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2024, 58: 872-891.
- [124] GAN Y M, MENG X, GAO C, et al. Metabolic engineering strategies for microbial utilization of methanol [J]. *Engineering Microbiology*, 2023, 3: 100081.
- [125] PACESA M, PELEA O, JINEK M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies [J]. *Cell*, 2024, 187(5): 1076-1100.
- [126] DIXIT S, KUMAR A, SRINIVASAN K, et al. Advancing genome editing with artificial intelligence: opportunities, challenges, and future directions [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 11: 1335901.
- [127] PETZOLD C J, MUKHOPADHYAY A. From bench to biofactory: high-throughput technologies and automated workflows to accelerate biomanufacturing [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2025, 94: 103320.
- [128] LANDWEHR G M, BOGART J W, MAGALHAES C, et al. Accelerated enzyme engineering by machine-learning guided cell-free expression [J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 865.
- [129] WATSON J L, JUERGENS D, BENNETT N R, et al. De novo design of protein structure and function with RFdiffusion [J]. *Nature*, 2023, 620(7976): 1089-1100.



通讯作者: 谭在高(1987—),男,上海交通大学生命科学技术学院研究员,博士生导师,国家自然科学基金优秀青年基金获得者。研究方向为微生物细胞工厂的人工创制。以通讯作者在 *Nature Catalysis*, *Biotechnology Advances*, *Fundamental Research*, *Chemical Engineering Journal*, *Biotechnology for Biofuels*, *Synthetic and Systems Biotechnology*, *ACS Synthetic Biology* 等发表多篇论文。目前担任工业生物技术领域期刊 *J Ind Microbiol Biotechnol* 的编委。

E-mail: ZTAN0918@sjtu.edu.cn

第一作者: 李健(1992—),男,博士后,研究方向为植物源药物分子的合成生物学研究。

E-mail: lij0813@163.com

