

评论

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-033

无细胞多酶分子机器赋能二氧化碳的高值利用及其挑战

刘建明, 曾安平

(西湖大学合成生物学与生物智造中心, 浙江 杭州 310030)

摘要: 二氧化碳等温室气体排放导致的全球气候变暖及相应的气候灾难日益严重, 开发高效二氧化碳捕获和利用技术迫在眉睫。利用生物制造技术固定二氧化碳是合成生物学工程科学的一个重要攻关方向, 其中挖掘和组装无细胞多酶分子机器赋能二氧化碳高值利用, 由于背景清晰、调控相对简单、副反应少和产率高等优点, 受到越来越多的关注。近期, James C. Liao 教授团队人工设计和开发了新型的多酶复合分子机器, 建立了用于二氧化碳固定的闭合循环反应-还原型乙醛酸-丙酮酸合成路径 (reductive glyoxylate-pyruvate synthesis cycle), 可以理论上实现 2 分子二氧化碳 (碳酸氢盐) 到 1 分子乙醛酸的合成反应, 并设计和尝试了反应过程中监控辅因子浓度以提高酶稳定性的策略。本文基于设计和组装体外多酶分子机器, 聚焦辅因子工程以及利用多酶分子机器固定二氧化碳所面临的挑战等角度讨论这篇工作并简述作者的相关思考。

关键词: 二氧化碳固定; 多酶分子机器; 无细胞催化; 辅因子工程; 酶稳定性

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Cell-free multi-enzyme machines for CO₂ capture, utilization and its associated challenges

LIU Jianming, ZENG Anping

(Center for Synthetic Biology and Biomanufacturing, Westlake University, Hangzhou 310030, Zhejiang, China)

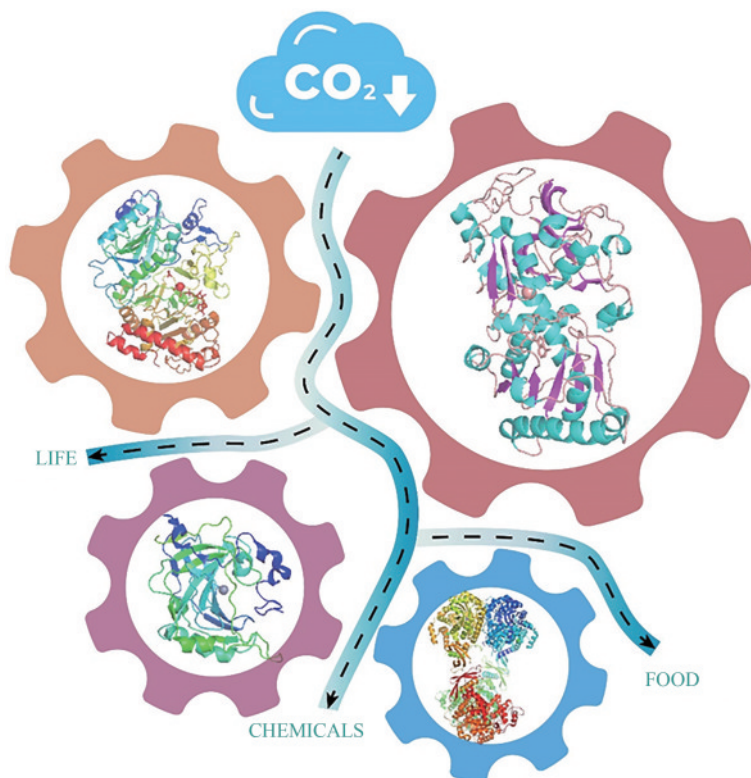
Abstract: Global warming, mainly caused by the emission of carbon dioxide, is becoming a serious problem, and it is urgent to develop efficient carbon dioxide capture and utilization technologies. The use of biomanufacturing technology to fix carbon dioxide is an important research direction in synthetic biology. The mining and *in vitro* assembly of cell-free multi-enzyme machines have the great potential to facilitate the conversion of carbon dioxide into high-value products. The advantages associated with cell-free biosynthesis, such as clear background, relatively simple metabolic regulation, and high-yield production, make it ideal for biomanufacturing. Recently, the team of James C. Liao designed and developed a novel multi-enzyme molecular machine, and established a reductive glyoxylate-pyruvate synthesis cycle, which can theoretically realize the conversion of 2 molecules of carbon dioxide (bicarbonate) to 1 molecule of glyoxylic acid. They also designed and developed a strategy to control the concentration of cofactors

收稿日期: 2022-06-09 修回日期: 2022-08-11

引用本文: 刘建明, 曾安平. 无细胞多酶分子机器赋能二氧化碳的高值利用及其挑战[J]. 合成生物学, 2022, 3(5): 825-832

Citation: LIU Jianming, ZENG Anping. Cell-free multi-enzyme machines for CO₂ capture, utilization and its associated challenges [J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(5): 825-832

during the reaction to improve the enzyme stabilities. In this comment, we discuss this work from the perspectives of *in vitro* multi-enzyme assembly and cofactor engineering, and point to associated challenges of carbon dioxide utilization by multi-enzyme machines.



Keywords: CO₂ fixation; *in vitro* multi-enzyme machines; cell-free synthetic biology; cofactor engineering; enzyme stability

面对日益严重的全球气候灾难，作为最主要温室气体，二氧化碳的减排和利用已经迫在眉睫。据世界气象组织报告，大气中的二氧化碳浓度在过去半个世纪急剧上升，至2021年全球平均浓度已经创下了近420 mL/m³的新高，随之带来全球气候变暖和相应环境灾害频发^[1]。为了全球应对这一巨大挑战，中国在2020年联合国大会上宣布实现“2030年前碳达峰，2060年前碳中和”的双碳目标。要达成该目标需要迫切地发展绿色低碳经济体系（如能源转型），大力减少二氧化碳的排放，同时需要开发高效经济的二氧化碳捕获、封存和资源化利用技术。2022年5月，国家发改委印发《“十四五”生物经济发展规划》，明确提出依托生物制造技术，向绿色低碳和可持续发展模式

转型。

二氧化碳高效生物利用是生物制造的重要发展方向^[2-3]，其中包括生物体直接利用，如植物微生物固碳和构建体外无细胞多酶分子机器固碳^[4]。其中无细胞多酶催化体系，由于自己独特的优势[包括背景清晰，摆脱细胞生长及内部复杂的调控网络；反应速度快，减少物质跨膜运输瓶颈；可操作性强，有助于聚焦对生物固碳途径（包括人工设计组装的全新二氧化碳固定途径）本身的验证和鉴定；易于挖掘高效的固碳元件等]，受到了广泛的关注，研究成果层出不穷。2022年2月，James C. Liao教授团队（原美国加利福尼亚大学洛杉矶分校）在*Nature Catalysis*上发表研究性论文“A cell-free self-replenishing CO₂-fixing system”

(Luo et al., 2022)^[5], 人工设计和开发了新颖的多酶催化反应体系用于二氧化碳的固定和生物利用(图1)。这一工作的最大特点在于成功组装了对氧不敏感的固碳反应途径, 并尝试建立了自动化的辅因子浓度监测和调控方法, 代表性地体现了多酶复合体系用于二氧化碳固定的理论前沿和现实挑战。本文将基于设计和组装体外多酶分子机器(包括结构依赖性的关键酶的筛选和改造)、聚焦辅因子工程和其浓度智能监控、从工程应用的角度分析二氧化碳利用的多酶分子机器开发所面临的挑战等3个角度简要介绍这篇工作, 并阐述作者自己的有关思考。

1 设计和组装多酶固碳分子机器

建立和组装多酶复合反应一般要经历以下几个步骤: ①反应路径的规划和设计; ②化学反应热力学的可行性分析; ③高效反应酶的挖掘、设计和改造; ④反应路径的组装和优化。Luo等首先

基于建立“自循环更新反应”(self-replenishing)的理念, 即固碳循环中的每个中间物都处于循环反应体系中, 可以实现自我更新和供给, 这样一方面便于产品的多样化(如C₂、C₃或C₄等产品), 另一方面是因为这样的设计可以避免外源物质的添加, 靠中间物积累效应自发启动化学反应进程(事实上所有的循环反应都具备这样的特质)。针对具体的固碳循环, 作者选取了该课题组前期建立的逆糖醛酸循环途径(reverse glyoxylate shunt, rGS)^[6]和苹果酰辅酶A-甘油酸循环途径(malyl-CoA-glycerate carbon fixation, MCG)^[7], 实现了丙酮酸间接固定二氧化碳产生乙酰辅酶A的净固碳循环, 巧妙绕开了丙酮酸通过脱羧反应生产乙酰辅酶A的传统方式。随后建立了新颖的还原型丙酮酸合成途径(reductive pyruvate synthesis, rPS), 作者首先对途径中的每个酶反应进行了热力学可行性分析, 最终通过高效酶的筛选和模块化组装, 实现了乙酰辅酶A间接固定二氧化碳到丙酮酸的闭合回路(图1)。结合rGS和rPS途径可以理论上实现2分子二氧化碳到1分子乙醛酸的合

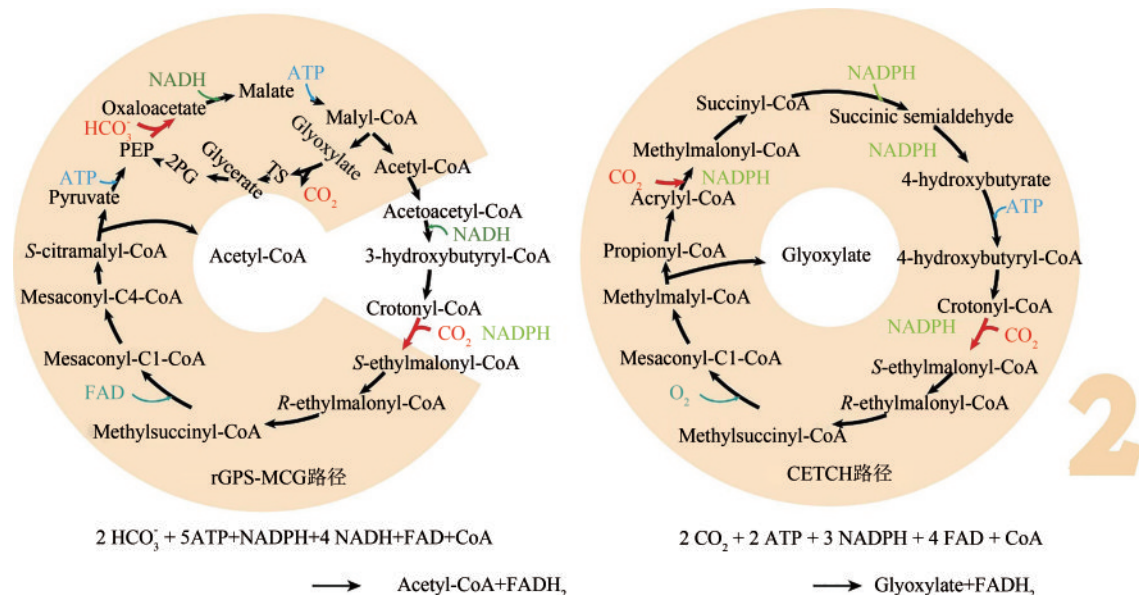


图1 人工设计的二氧化碳固定多酶分子机器rGPS-MCG路径和CETCH路径

(其中rGPS-MCG路径由体外19个酶组成, 需要NADPH、NADH、ATP、FAD和CoA等多种辅因子; 而CETCH路径由体外17个酶组成, 需要NADPH、ATP、FAD和CoA等多种辅因子)

TS—羟基丙二酸半醛; 2PG—2-磷酸甘油酸; PEP—磷酸烯醇式丙酮酸

Fig. 1 The artificial CO₂-fixation pathways rGPS-MCG and CETCH cycle

(The rGPS-MCG pathway consists of 19 enzymes and its function requires different cofactors, including NADPH, NADH, ATP, FAD and CoA;

The CETCH cycle consists of 17 enzymes and it requires NADPH, ATP, FAD and CoA as cofactors.)

TS—Tartronate semialdehyde; 2PG—2-phospho-D-glycerate; PEP—phosphoenolpyruvate

成反应, 这一闭合循环反应称为还原型乙醛酸-丙酮酸合成路径 (reductive glyoxylate-pyruvate synthesis cycle, rGPS)。rGPS 和 MCG 路径偶联构成了一个完整的闭合循环, 满足了所有中间产物的自我再生性能, 实现了二氧化碳固定反应, 奠定了多种 C₂、C₃、C₄ 或 C₅ 产品生产的理论可行性。

二氧化碳生物法固定通常有两种方式: 一种是二氧化碳直接固定, 二氧化碳通过羧化酶与底物直接结合发生羧化反应, 羧化酶的底物是二氧化碳或 HCO₃⁻; 另一种是二氧化碳间接固定, 指的是二氧化碳先被还原成甲酸、甲醇、CO 或者乙酸等中间产物, 然后通过其他酶将中间产物转化为目标产品^[8]。Luo 等所构建的 rGPS 途径依赖于第 1 种方式, 过程中选取了两种羧化酶: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, Ppc) 和巴豆酰辅酶 A 羧化酶 (crotonyl-CoA carboxylase/reductase, Ccr)。因为羧化酶往往是决定固碳反应速率的一个关键因素, 所以选择合适的羧化酶对组装高效的二氧化碳固定通路至关重要。以色列维兹曼科学研究所 Ron Milo 教授团队^[9]详细比较了多种羧化酶的性能, 包括酶反应速率、辅因子偏好和对氧气的耐受性等 (表 1), 为后续高效羧化酶的选择奠定了基础。从表 1 可以看出: Ppc 和 Ccr 这两种酶和其他的羧化酶相比, 都具有较高的羧化效率, Ccr 在饱和二氧化碳/HCO₃⁻ 条件下, 具有最高的比酶活速率 130 μmol/(min·mg)。Ppc 的比酶活速率也高达 35 μmol/(min·mg), 作为对比, 核酮糖-1,5-

二磷酸羧化酶 Rubisco 的比酶活速率只有约 3.5 μmol/(min·mg)。同时 Ccr 羧化酶也是德国马克斯·普朗克研究所 Tobias Erb 教授组设计的巴豆酰辅酶 A/乙基丙二酰辅酶 A/羟基丁酰辅酶 A (crotonyl-CoA/ethylmalonyl-CoA/hydroxybutyryl-CoA, CETCH) 循环的关键羧化酶^[10]。CETCH 循环由不同来源的 17 个酶组成, 它的固碳速率可以达到 5 nmol/(min·mg)。Luo 等建立的 rGPS-MCG 循环由 19 个酶组成, 其中 4 步酶反应与 CETCH 循环重叠, 但固碳速率有了明显提高, 最高时可达 28.5 nmol/(min·mg) (表 2)。

另外值得注意的一点, rGPS-MCG 和 CETCH 循环都由数十步反应组成, 众多的各生物元件在辅酶偏好性、催化活性、热稳定性、最适温度和 pH 等方面都可能存在差异。各个元件性质之间的差异将导致体外多酶分子机器反应系统适配性差, 从而影响催化效率。因此在设计体外多酶分子机器时, 反应路径应该尽量减少所需酶元件的种类, 并尽可能规避辅酶的使用, 设计简洁的固碳途径有助于提高多酶分子机器各个元件之间的适配性和互容性。最近中国科学院微生物研究所李寅研究员团队^[11]基于另外两个羧化酶——丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, Pyc) 和丙酮酸: 铁氧还原蛋白还原酶 (pyruvate: ferredoxin oxidoreductase, PFor), 设计了仅含 4 步酶反应的固碳循环 POAP (Pyc-Oxaloacetate acetylhydrolase-Acetate CoA ligase-PFor), 实现了 2 分子碳到 1 分子草酸的合成, 并且

表 1 固碳途径中关键酶-羧化酶性质比较^[5, 9]

Tab. 1 Enzymatic properties of different carboxylases

酶	EC 编号	催化的碳种类	比酶活速率 /[μmol/(min·mg)]	K _m /(mmol/L)	辅因子	氧气敏感性
Rubisco 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶	4.1.1.39	二氧化碳	3.5	0.01~0.02	—	—
Ppc 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶	4.1.1.31	HCO ₃ ⁻	35	0.06~0.2	—	—
Ccr 巴豆酰辅酶 A 羧化酶		二氧化碳	130	14	NADPH	—
Pyc 丙酮酸羧化酶	6.4.1.1	HCO ₃ ⁻	32	0.25~2.5	ATP	—
acetyl-CoA carboxylase 乙酰辅酶 A 羧化酶	6.4.1.2	HCO ₃ ⁻	18	0.7~1.7	ATP	—
propionyl-CoA carboxylase 丙酰辅酶 A 羧化酶	6.4.1.3	HCO ₃ ⁻	30	0.7~1.7	ATP	—
methylcrotonyl-CoA carboxylase 甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶	6.4.1.4	HCO ₃ ⁻	6	0.8~0.9	ATP	—
acetone carboxylase 丙酮羧化酶	6.4.1.6	二氧化碳	0.4	3×10 ⁻⁶	ATP	—
2-oxoglutarate carboxylase 2-氧代戊二酸羧化酶	6.4.1.7	HCO ₃ ⁻	15		ATP	—
PFor 丙酮酸:铁氧还原蛋白还原酶	1.2.7.1	二氧化碳	<1		TPP, Ferredoxin	+
2-ketoglutarate synthase 酮戊二酸:铁氧还原蛋白还原酶	1.2.7.3	二氧化碳	<1		TPP, Ferredoxin	+

表2 体外人工合成固碳途径性能比较

Tab. 2 Properties of *in vitro* carbon-fixation pathways

多酶途径	主要底物及浓度	主要产物及浓度	ATP/CO ₂ /(mol/mol)	多酶数量	反应条件	固碳速率 /[nmol/(min·mg)]
rGPS-MCG	0.4 mmol/L 巴豆酰辅酶 A+ 0.4 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸+ 100 mmol/L 碳酸氢钠	0.7 mmol/L 乙酰辅酶 A+ 0.4 mmol/L 甘油酸+ 1 mmol/L 苹果酸	2.5	19	20 mL, 6 h, pH 7.2	28.5
CETCH	0.2 mmol/L 丙酰辅酶 A+ 50 mmol/L 碳酸氢钠	0.54 mmol/L 乙醛酸	1	17	0.52 mL, 1.5 h, pH 7.5	5.0
POAP	20 mmol/L 乙酸钠+ 100 mmol/L 碳酸氢钠	0.023 mmol/L 草酸	1	4	50 °C, 厌氧, 20 min, pH 7.8	8.0
ASAP	100 mmol/L 甲醇(二氧化碳还原)	1280 mg/L 淀粉	0.5	11	4 h, 30 °C, pH 7.5	22.0

固碳效率达到了 8 nmol/(min·mg) (表 2)。但是 POAP 循环需要厌氧环境, 而且循环需要消耗大量的辅因子——ATP、NADPH 和铁氧还原蛋白, 限制了 POAP 循环的规模应用。

二氧化碳的间接固定则依赖于固定二氧化碳的衍生物, 其中一个代表性的工作是中国科学院天津工业生物技术研究所马延和研究员团队^[12]构建的人工淀粉合成途径 (the artificial starch anabolic pathway, ASAP), 二氧化碳首先通过电催化转变成甲醇或甲酸, 然后通过后续的多酶 (13 个酶) 级联催化反应合成淀粉。最近的另外一篇代表性工作是二氧化碳到葡萄糖的合成, 二氧化碳首先通过两步级联电催化反应转变成 CO, 然后生成乙酸, 乙酸再经过酵母菌代谢工程改造合成葡萄糖^[13]。这些创新性的工作都展示了二氧化碳的间接固定 (如化学催化和酶催化级联协同转换的方式) 的巨大应用前景, 为未来开发出多元的、高效的固碳途径提供了重要的参考。

2 聚焦辅因子工程

多酶体系生物合成的开发面临着许多过程工程问题, 诸如反应过程中辅因子的浓度监测和调控, 而这方面的工作很少。Luo 等在辅因子浓度智能监控方面进行了尝试, 建立了自动光学模块用于实时监测和控制辅因子浓度 (图 2)。rGPS-MCG 固碳路径需要添加多种辅因子, 包括 ATP、NADH、NADPH、FAD 和 CoA。这些辅因子的浓度和平衡对反应至关重要。作者选用了肌酸激酶

(creatine kinase) / 肌酸 (creatine phosphate) 系统用于再生 ATP, 并通过建立荧光素酶方法, 实时取样监测从而将 ATP 的浓度维持在 0.6~0.8 mmol/L, 因为过高的 ATP 浓度会对反应体系中的多种激酶有抑制作用。在反应体系中, NADH、NADPH 的平衡和再生则分别是通过外源添加甲酸脱氢酶/甲酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶/葡萄糖-6-磷酸来维持的。作者通过实时检测在 340 nm 的吸收波长维持反应体系中 NADH 和 NADPH 的浓度。至于 FAD 的再生, 作者通过在反应中添加二茂铁衍生物接受来自 FADH₂ 的电子用于 FAD 的再生, 而二茂铁/二茂铁衍生物的循环, 作者尝试了两种方案: 一种是通过电化学方法再生, 但是由于所使用的铂电极可能吸附辅酶 A 及其衍生物, 导致效果较差; 另外一种方案是通过加入辣根过氧化物酶/双氧水体系来实现的 (图 2)。作者建立了基于 300 nm 吸收波长的二茂铁衍生物浓度测定方法, 用于控制体系中 FAD 浓度, 进而严格控制双氧水的添加 (双氧水和二茂铁等物质对其他酶有毒性)。CETCH 途径也需要多种辅因子的参与, 如 NADPH、ATP、CoA、维生素 B₁₂ 和 O₂ 等, 其中 NADPH 和 ATP 的再生分别选取了不同的模块——甲酸脱氢酶和多聚磷酸激酶/多聚磷酸。

监测和调控反应过程中辅因子的浓度是 Luo 等文章的一大亮点, 也是 rGPS-MCG 路径呈现出优异的二氧化碳固定速率的关键因素, rGPS-MCG 固碳路径表现得比 CETCH 途径优越的一个重要方面可能是因为 Luo 等在反应中严格控制了多种辅因子的浓度, 尽可能避免了高浓度的辅因子对多酶的抑制作用。维持辅因子浓度可以为多酶复合反应

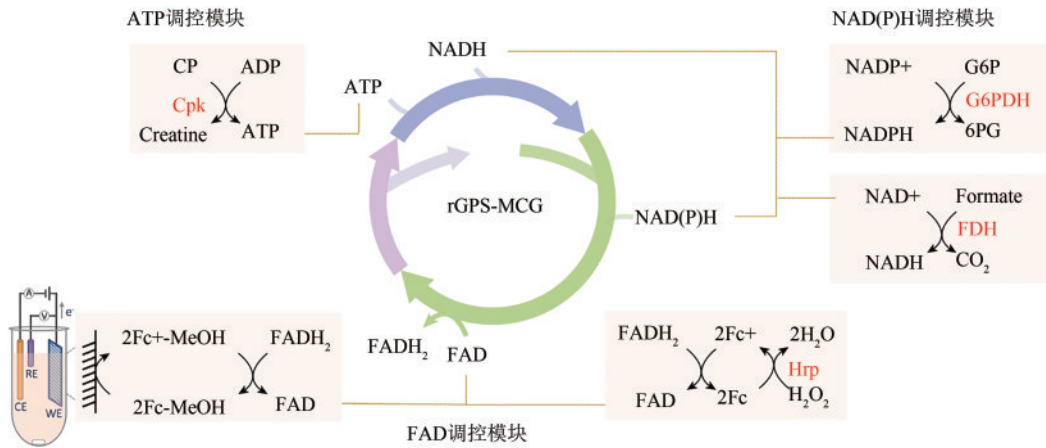


图2 辅因子浓度监测和调控

(rGPS-MCG 路径中辅因子 ATP, NAD (P) H, FAD 浓度的实时监测。ATP 调控模块: 肌酸激酶 Cpk 负责; NAD (P) H 调控模块: 甲酸脱氢酶 FDH 或 6 磷酸葡萄糖脱氢酶 G6PDH 负责; FAD 调控模块: 辣根过氧化物酶 Hrp 或电催化模块负责)

Fig. 2 Cofactor monitoring and regulation

(The cofactors in rGPS-MCG pathway, including ATP, NAD(P)H and FAD, are monitored. ATP regulation module, creatine phosphate kinase Cpk is responsible for ATP regeneration; NAD(P)H regulation module, formate dehydrogenase or glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PDH is responsible for NAD(P)H regeneration; FAD regulation module, horseradish peroxidase Hrp or electrochemical approach is used for FAD regeneration)

稳定运行提供众多优点: ①避免高浓度辅因子对酶元件的抑制作用, 如高 ATP 浓度会抑制反应途径中磷酸烯醇式丙酮酸合酶、苹果酸硫激酶等酶活性; 高双氧水浓度会对乙酰辅酶 A 合酶等多酶有抑制作用。②避免低浓度辅因子影响酶元件的活性, 如低双氧水浓度会影响 FAD 的再生和抑制甲基琥珀酰-CoA 脱氢酶的活性。③增加了多酶的稳定性和延长了多酶复合反应时间。④为构建鲁棒性高的多酶分子机器提供了重要参考。

3 利用多酶分子机器固定二氧化碳所面临的挑战

多酶复合生物催化反应用于二氧化碳固定和高值利用, 面临着诸多的挑战。

第 1 个挑战是如何提高反应底物的供给。这里需要澄清的一个问题是途径中所使用的真正底物是二氧化碳还是 HCO_3^- ? rGPS-MCG 完整循环真正固定的是 HCO_3^- 。二氧化碳与 HCO_3^- 性质完全不同, 二氧化碳与空气平衡时, 在 pH 7.4、20 °C 条件下在水中的溶解度仅为 0.012 mmol/L, 而 HCO_3^- 的浓度可以达到 0.26 mmol/L^[14-15]。二氧化碳的溶解度受 pH 影响较小, 而 HCO_3^- 的溶解度受 pH 影响较

大。高的底物浓度有助于提高化学反应动力学和酶转换效率, 因此使用碳酸氢盐的碳固定效率在通常条件下比使用二氧化碳的固碳效率高。因此, 开发高效的二氧化碳到 HCO_3^- 的转换模式, 比如使用具有高催化效率的碳酸酐酶 (carbonic anhydrase), 是固定和利用二氧化碳的前提。从途径设计的角度考虑, 如果羧化酶固定的是二氧化碳分子, 因为其溶解度低等问题, 则需要开发经济高效的碳捕捉和浓缩技术, 包括设计人工羧化体 (carboxysome)、碳酸氢盐主动转运蛋白等碳转运机制^[16]、优化挖掘高效的二氧化碳固定酶和代谢路径。

第 2 个挑战是多酶复合体系的稳定性、鲁棒性和适配性。人工设计的 rGPS-MCG 路径表现出一定的二氧化碳固定优势, 但是整个反应体系面临着很多的问题。首先, rGPS-MCG 反应路径鲁棒性和稳定性差, 反应体系需要严格控制辅因子和多种反应底物的浓度, 包括双氧水、二茂铁衍生物、甲酸等。而且, 即使在自动监测条件下, 多种酶易失活和不稳定, 需要每隔半小时补充新鲜的酶制剂。因为反应路径需要多种辅因子, 所带来的辅因子循环和平衡很难实现, 大尺度条件下精准控制更是无从谈起, 比如添加双氧水和过氧化物酶, 如果搅拌达不到要求, 会严重影响多种酶反

应。真正利用无细胞多酶催化实现工业生物合成的例子凤毛麟角，其中一个比较代表性的成功的工业案例是淀粉生产肌醇^[17]。中国科学院天津工业生物技术研究所张以恒研究员团队构建的体外合成途径由热稳定性高的4种酶组成，分别为来源于嗜嗜热古细菌的麦芽糖糊精磷酸化酶、磷酸葡萄糖转运酶、肌醇-3-磷酸合成酶和肌醇单磷酸酶，直链淀粉通过该四酶体系的“一锅法”催化形成肌醇，而且反应体系中不需要外源添加ATP、NADH等辅因子。这一体外多酶复合体系的成功开发和商业化为后续开发固定二氧化碳的多酶体系提供了重要的借鉴：挖掘耐高温的酶元件，提高酶的热稳定性和鲁棒性，减少反应过程中辅因子的用量等。

关于适配性，目前无细胞多酶复合体系生物合成基本上都是“一锅法”，普遍存在3个关键问题：①体系内反应组分相互（反馈）抑制；②酶反应最优条件不匹配；③间歇低效。解决上述问题急需开发新型生物合成体系，以克服体外多酶一锅合成系统的局限。新型生物合成体系应具有如下特点：①根据不同酶的特点和要求实现反应区域化；②根据合成途径的特点实现模块化；③可控连续高效转化。开发智能化多酶共固定、3D打印分子机器、产物原位分离技术等都是超越概念验证（proof-of-concept）[或者说克服概念陷阱（proof-of-concept trap）]值得关注的方向。

第3个挑战是如何利用绿能及人工光合作用进行基于二氧化碳的生物合成。二氧化碳化学性质稳定，这就意味着固定二氧化碳需要外部能量供给。从长远角度看，利用可持续能源，如光能、电能和氢能提供能量固定二氧化碳才能发挥合成生物学和生物制造赋能“碳中和”的目标。植物光合作用是吸收太阳能进行光反应合成ATP和NAD(P)H，用于驱动暗反应卡尔文循环合成糖。人工光合作用的目标之一是将光能转换成电能或氢能，然后通过电能或氢能驱动ATP和NAD(P)H的合成，或者通过电能活化二氧化碳分子转变成甲酸、甲醇、甲醛等中间活性物质，目前通过开发高效的催化剂，二氧化碳转变成甲酸、甲醇的法拉第效率已经超过或接近90%^[18-19]，甲酸或甲醇可以作为良好的一碳生物原料用于生物制造^[20]，

为二氧化碳的间接利用提供了一个可行性的方案。

利用生物制造技术固定二氧化碳机遇和挑战并存，James C. Liao教授团队开发的rGPS-MCG新型多酶复合反应为构建无细胞二氧化碳固定分子机器提供了重要参考，包括多酶组装和辅因子调控等。未来筛选稳定性和鲁棒性高的酶元件，组装多酶固碳体系和研究辅因子工程，开发绿能（太阳能，电能等）利用等策略会促进二氧化碳的高效利用，为真正解决碳中和问题提供方案。

参 考 文 献

- [1] PEPLOW M. The race to upcycle CO₂ into fuels, concrete and more[J]. *Nature*, 2022, 603(7903): 780-783.
- [2] LIU Z H, WANG K, CHEN Y, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO₂[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 274-288.
- [3] 任杰, 曾安平. 基于二氧化碳的生物制造: 从基础研究到工业应用的挑战[J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 854-862.
REN Jie, ZENG Anping. CO₂ based biomanufacturing: from basic research to industrial application[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(6): 854-862.
- [4] RASOR B J, VÖGELI B, LANDWEHR G M, et al. Toward sustainable, cell-free biomanufacturing[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 69: 136-144.
- [5] LUO S S, LIN P P, NIEH L Y, et al. A cell-free self-replenishing CO₂-fixing system[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(2): 154-162.
- [6] MAINGUET S E, GRONENBERG L S, WONG S S, et al. A reverse glyoxylate shunt to build a non-native route from C₄ to C₂ in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 116-127.
- [7] YU H, LI X Q, DUCHOUD F, et al. Augmenting the Calvin-Benson-Bassham cycle by a synthetic malyl-CoA-glycerate carbon fixation pathway[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2008.
- [8] HONG Y, REN J, ZHANG X Y, et al. Quantitative analysis of glycine related metabolic pathways for one-carbon synthetic biology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 64: 70-78.
- [9] BAR-EVEN A, NOOR E, LEWIS N E, et al. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(19): 8889-8894.
- [10] SCHWANDER T, VON BORZYSKOWSKI L S, BURGNER S, et al. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*[J]. *Science*, 2016, 354(6314): 900-904.
- [11] XIAO L, LIU G X, GONG F Y, et al. A minimized synthetic

- carbon fixation cycle[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(1): 799-808.
- [12] CAI T, SUN H B, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide[J]. *Science*, 2021, 373(6562): 1523-1527.
- [13] ZHENG T T, ZHANG M L, WU L H, et al. Upcycling CO₂ into energy-rich long-chain compounds *via* electrochemical and metabolic engineering[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(5): 388-396.
- [14] MANGAN N M, FLAMHOLZ A, HOOD R D, et al. pH determines the energetic efficiency of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(36): E5354-E5362.
- [15] 王凯, 刘子鹤, 陈必强, 等. 微生物利用二氧化碳合成燃料及化学品——第三代生物炼制[J]. *合成生物学*, 2020, 1(1): 60-70.
WANG K, LIU Z H, CHEN B Q, et al. Microbial utilization of carbon dioxide to synthesize fuels and chemicals — third-generation biorefineries[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(1): 60-70.
- [16] GIESSEN T W, SILVER P A. Engineering carbon fixation with artificial protein organelles[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 46: 42-50.
- [17] YOU C, SHI T, LI Y J, et al. An *in vitro* synthetic biology platform for the industrial biomanufacturing of myo-inositol from starch[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(8): 1855-1864.
- [18] MA W C, XIE S J, ZHANG X G, et al. Promoting electrocatalytic CO₂ reduction to formate *via* sulfur-boosting water activation on indium surfaces[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 892.
- [19] GUO W W, LIU S J, TAN X X, et al. Highly efficient CO₂ electroreduction to methanol through atomically dispersed Sn coupled with defective CuO catalysts[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(40): 21979-21987.
- [20] CLAASSENS N J, COTTON C A R, KOPLJAR D, et al. Making quantitative sense of electromicrobial production[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(5): 437-447.



通讯作者: 曾安平(1963—),男,讲席教授,博士生导师,德国工程院院士,西湖大学合成生物学与生物智造中心创始主任。研究方向为生物化工、合成生物学、新型软物质功能材料等。
E-mail: zenganping@westlake.edu.cn



第一作者: 刘建明(1985—),男,博士,副研究员。研究方向为食品合成生物学,生物制造,代谢工程等。
E-mail: liujianming@westlake.edu.cn