

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-050

二氧化碳微生物转化与体外酶催化体系研究进展

叶伟¹, 李芮^{1, 2}, 姜卫红¹, 顾阳¹

(¹中国科学院分子植物科学卓越创新中心, 中国科学院合成生物学重点实验室, 上海 200032; ²河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004)

摘要: 二氧化碳 (CO₂) 是主要的温室气体, 但同时也是一种储量巨大、廉价、安全且易得的可再生资源。在我国“碳达峰、碳中和”战略目标的驱动下, 如何有效减少 CO₂ 排放并转而利用这一重要碳资源已成为当前的研究热点与重点, 这同时也加快了 CO₂ 捕集、利用与封存 (carbon capture, utilization and storage, CCUS) 技术的发展和革新。生物转化是实现 CO₂ 利用的主要路径之一, 既能够直接催化、转化 CO₂ 合成目标产物, 也可以与化学催化路径相耦合实现对 CO₂ 来源的有机低碳资源 (如甲醇、甲酸、乙酸) 的有效转化及定向合成, 因此有望在国家“双碳”目标的实现中发挥重要作用。本文对近年来 CO₂ 生物转化的研究进展进行了梳理和总结, 指出了现有技术路线的特点和不足, 并对今后的研究重点和方向提出了建议。总体而言, CO₂ 生物利用技术目前尚处于起步阶段。基于化能自养细菌的合成气 (CO₂/CO) 发酵生产乙醇虽已实现工业化, 但仍需要进一步优化和提高 CO₂ 的转化利用效率, 并获得除乙醇外更多的高值产品, 从而提升整个技术路线的经济性。而其他的 CO₂ 生物转化路径, 无论是化学-生物发酵耦合还是体外酶催化, 目前离大规模应用还有较大距离, 需要进一步优化技术体系和降低成本来满足工业化需求。

关键词: 二氧化碳; 有机低碳; 生物利用; 体外酶催化; 高附加值产品

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

Microbial conversion and *in vitro* enzymatic catalysis for carbon dioxide utilization: a review

YE Wei¹, LI Rui^{1, 2}, JIANG Weihong¹, GU Yang¹

(¹CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, CAS-Key Laboratory of Synthetic Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; ²College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China)

Abstract: Carbon dioxide (CO₂) is the main greenhouse gas, but it also represents an abundant, cost-effective, safe, and easily accessible carbon resource. Driven by the national goals to achieve “carbon peaking and carbon neutrality”,

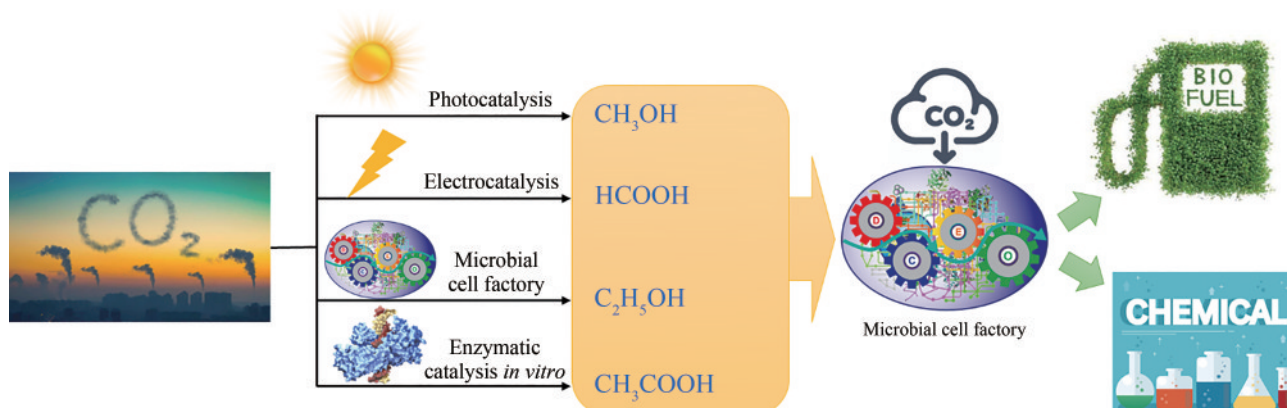
收稿日期: 2023-07-11 修回日期: 2023-09-18

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0901500); 上海市科学技术委员会科研项目 (21DZ1209100); 中国科学院洁净能源创新研究院合作基金项目 (DNL202013)

引用本文: 叶伟, 李芮, 姜卫红, 顾阳. 二氧化碳微生物转化与体外酶催化体系研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(6): 1223-1245

Citation: YE Wei, LI Rui, JIANG Weihong, GU Yang. Microbial conversion and *in vitro* enzymatic catalysis for carbon dioxide utilization: a review[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(6): 1223-1245

there has been an increasing interest in recent years in effective reduction of CO₂ emission and utilization of this one-carbon resource, thereby accelerating the development of carbon capture, utilization, and storage (CCUS) technologies. Biological conversion plays a major role in CCUS. This approach enables the transformation of CO₂ into desired products through either direct biological catalysis or in combination with chemical catalysis (using CO₂-derived organic compounds such as methanol, formic acid, and acetic acid). Thus, biological CO₂ fixation and conversion represents a promising solution for both utilization of greenhouse gas or industrial waste gases and sustainable production of bulk chemicals and fuels. However, the current state of biotransformation technology for CCUS is still in its infancy, leaving ample room for improvement in the efficiency, yield, and cost-effectiveness. In this review, we briefly summarize recent advances in biological utilization of CO₂, highlight the characteristics and limitations of the existing technologies, and also propose future research directions. Our aim is to provide a valuable reference to researchers in this field. Overall, industrial application of CO₂ bioconversion remains in its nascent phase. Although industrial-scale ethanol production through syngas (CO₂/CO) fermentation by chemoautotrophic bacteria has made significant strides, there is still a need for further improvement in the conversion efficiency of CO₂. In addition, gas fermentation should consider more value-added products beyond ethanol to enhance the economic viability of this technology. Other CO₂ bioutilization technologies, such as the coupling of chemical and biological conversion and *in vitro* enzymatic catalysis, have yet to bridge the gap to large-scale applications. Therefore, further optimization of these technical systems and reduction of production cost are essential to meet the needs of industrial applications.



Keywords: carbon dioxide; organic low carbon; biological utilization; *in vitro* enzymatic catalysis; value-added products

绿色可持续生产模式是实现我国“碳达峰、碳中和”战略目标的重要路径，其核心问题是如何高效利用CO₂而不是将其作为废气处理。基于现有的成熟技术路线，CO₂已在诸多领域得到应用，如用于尿素、甲醇和水杨酸等化合物的合成^[1]、生产冷却剂和制冷剂、促进油田开采和残余油气提取、作为溶剂用于天然材料提取等^[2-4]。与之相比，将CO₂转化为高价值化学品是一种更好的选择^[5]。一个创新性的解决方案是通过生物路线定

向转化CO₂合成各种目标产物，从而在实现大宗及精细化学品生物制造的同时促进减排。生物转化路线有其特定优势，包括反应条件温和、原料气体的组成组分宽泛以及适合于合成中、长碳链复杂结构化合物等^[6-7]。

在现有的CO₂生物转化路线中，通过微生物发酵吸收CO₂并将其转化为目标产品具有良好的工业应用前景。相较于植物，微生物的固碳效率更高且更便于人工改造。目前已知的可利用CO₂的天然

自养型微生物按能量需求类型大致可分为化能、光能以及电能自养微生物三种类型^[8-11]。其中,化能自养微生物以氢气或其他有机化合物作为能量供体,尤为适合传统发酵工业的高密度发酵模式,且其中的一些发酵产品如乙醇已实现工业化生产。随着近年来相关研究的广泛开展,CO₂生物转化利用技术也呈现多元化发展,涉及单一微生物发酵,多细胞体系,化学-微生物耦合系统以及体外酶催化等诸多方面^[12-15]。这些生物转化技术路径各具特色和优势,适合特定的应用场景,但也存在不同的局限性。基于此,本文对这方面的研究内容进行了梳理和总结,重点介绍了该领域近期的主要研究进展,并展望了未来的发展方向。

1 微生物直接转化利用CO₂

1.1 自养微生物固碳

自养微生物可利用多种能量形式同化代谢CO₂。光能自养型微生物主要是指微藻^[16]和光合细菌^[17]。可固定CO₂的微藻以单细胞的绿藻(*Chlorophyta*)和蓝藻(*Cyanophyceae*)居多;光合细菌则主要包括类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)和沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)等。而化能自养型微生物,如氢细菌、铁细菌、一氧化碳细菌、硫化氢细菌和硝化细菌等,则是通过氧化亚铁化合物、硫化氢、亚硝酸盐等有机物产生电子,再经过电子传递链驱动CO₂固定。

1.1.1 微藻固碳

微藻是一类光合微生物^[18],包括:原核微藻(如蓝藻);真核微藻[如绿藻、硅藻(*Bacillariophyta*)以及金藻门(*Chrysophyta*)藻类等]。它们可以吸收不同来源(包括大气、工业废气和可溶性碳酸盐等)的CO₂^[18],并将其进一步转化为具有更高商业价值的化合物,例如脂质、色素、化妆品、药物、生物聚合物、辅酶等^[19-20]。微藻繁殖方式简单,环境适应性强^[9],生长周期短,易于大规模培养,其固碳效率通常是陆生植物的10~50倍^[21-22]。此外,一些微藻对于CO₂有极高的耐受性和转化效率^[23]。目前,已实现大规模培养和生产的

微藻主要属于栅藻属(*Scenedesmus* sp.)、小球藻属(*Chlorella* sp.)、杜氏藻属(*Dunaliella* sp.)和螺旋藻属(*Spirulina* sp.)等^[24]。在原核微藻中,蓝藻光合效率较高,能吸收较宽波谱范围内的太阳光。其不仅在叶绿素吸收光谱范围内有很高的光合速率,在620 nm和560 nm处也有较高的光吸收效率^[25],因此拥有比高等植物更广的光能利用范围。

微藻通过光合作用固定CO₂并将其转化为生物质,进而合成化学品。在光合作用第一阶段,微藻从阳光中捕获和储存能量,通过电子传递链将ADP和NADP⁺转化为携带能量的分子ATP和NADPH,并产生氧气;在第二阶段,微藻将通过卡尔文-本森循环利用先前生成的ATP和NADPH捕获CO₂产生有机化合物^[26]。例如,研究者通过在集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803)中表达来自运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PyDC)及其自身内源性乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH),并破坏副产物聚-β-羟基丁酸(poly-β-hydroxybutyrate)的生物合成途径,实现了乙醇生产效率的提升,乙醇产量和产率可分别达到5.5 g/L和212 mg/(L·d)^[27]。此外,Wang等^[28]在集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803)中构建了3-羟基丙酸(3-HP)合成途径,然后通过增强丙二酰辅酶A还原酶(malonyl-CoA reductase, MCR)基因的表达、增加前体及NADPH供应、阻断旁路途径等策略,将更多的碳代谢流引导至3-HP的合成,经过改造后的集胞藻培养6 d后可合成837.18 mg/L 3-HP。其他多种产品如异丁醛和乳酸也已在代谢工程改造(如过表达相关产物形成酶,或者减少竞争途径的通量等策略)的集胞藻(*Synechocystis* sp.)和长聚球藻(*Synechococcus elongates*)中成功合成^[29-30]。

目前,许多企业已经搭建了光生物反应器来进行微藻培养以减少CO₂的排放量并将其转化利用。例如,Seambiotic公司的试点工厂搭建了1000 m²的开放式光生物反应器,用于培养各种微藻以吸收CO₂^[31]。但总体而言,目前的微藻培养系统在大规模应用时仍存在问题,包括安装和运营成本高、难以控制培养条件、细菌或外来藻类污染、不稳定的光照条件和天气等^[32-33]。因

此, 筛选获得性能优良的微藻菌株以及设计更为高效和经济可行的微藻培养系统至关重要^[34]。此外, 在设计和搭建微藻培养系统时还应注重生命周期分析, 能源平衡和成本评估, 以确认是否具有经济可行性^[35]。

1.1.2 光合细菌固碳

光合细菌 (photosynthetic bacteria, PSB) 是一类革兰氏阴性菌, 可以在厌氧条件下进行不释放氧气的光合作用。光合细菌在自然界碳、氮、硫等元素的循环中起着重要的作用, 其利用叶绿素固定光能, 以分子氢、还原性硫化物或有机物为电子供体。因此, 光合细菌的光合作用与植物和藻类不同, 是一个厌氧过程, 不产生氧气^[36]。在光合作用过程中, 光合细菌能以不同的硫化物 (如硫化物、硫单质、亚硫酸盐及硫代硫化物) 作为电子供体实现 CO₂ 的吸收和固定^[37]。

紫色光合细菌 (purple photosynthetic bacteria, PPB) 作为一类典型的光合细菌, 具有鲁棒性好和代谢多样性的特点^[38]。许多研究已经证明 PPB 是一个良好的生物制品光自养生产平台。例如, 研究者在类球红细菌 (*R. sphaeroides*) 中实现合成蒎烯 (pinene)^[39] 和瓦伦西亚烯 (valencene)^[40], 在荚膜红细菌 (*R. capsulatus*) 中合成丛粒藻烯 (botryococcene) 等^[41]。此外, 深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 在厌氧条件下, 能够利用合成气中的 CO 作为唯一的碳和能量来源^[42-43]; 当其暴露于 CO 环境时, CO 脱氢酶 (CODH) 和 CO 不敏感的氢化酶催化 CO 氧化生成 CO₂ 和 H₂, 然后通过 CBB 循环进一步将 CO₂ 同化为生物质和聚合物。因此, PPB 也被认为是生产聚合物的优良底盘细胞^[38]。此外, 沼泽红假单胞菌 (*R. palustris*) 在厌氧光照条件下能利用 CO₂ 为碳源, 以硫化氢和一些中间产物为氢供体产生氢气, 而氢气可在酶的作用下还原 CO₂ 成甲烷, 因此在废水净化及产甲烷方面也有一定的应用前景^[44]。随着基因工程的发展, 研究者对多种光合细菌进行了遗传改造和优化, 以提高它们对 CO₂ 的吸收和利用能力。杜翠红^[45] 以沼泽红假单胞菌为宿主菌, 将卡尔文循环的固碳关键酶——1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶 (Rubisco) 导入该菌中进行表达, 工程菌在光合自养生长时的 Rubisco 酶活比野生型菌

株提高了一倍, 其比固碳率 (单位菌体单位时间内固定 CO₂ 的量) 也比野生型菌株提高了一倍左右。Heinrich 等^[46] 通过在 *R. rubrum* 中引入大肠杆菌 (*Escherichia coli* MG1655) 的膜结合转氢酶编码基因 *PntAB* 和真氧产碱杆菌 (*Ralstonia eutropha* H16) 的 NADPH 依赖性乙酰乙酰辅酶 A 还原酶编码基因 *phaB1*, 成功合成了聚-3-羟基丁酸酯-co-3-羟基戊酸酯 (PHBV) 这一共聚物, 其产量占细胞干重的 5.1%。但是需要指出的是, 目前光合细菌利用 CO₂ 技术依旧存在光损耗较大以及固碳效率较低的问题。在实验室中, 可以通过构建一些特殊反应器、采用透光材料以及人工光源来一定程度地改善上述问题, 但在工业化应用中, 出于经济性考虑则很难复制实验室的设备和工艺, 这也是目前实现这一技术大规模应用的主要瓶颈之一。

1.1.3 氢细菌固碳

氢细菌是化能自养细菌中生长速度最快的细菌^[17, 47]。已发现的氢细菌有 18 个属, 近 40 个种^[48]。氢细菌具有很强的 CO₂ 固定转化能力, 并将 CO₂ 转化为菌体细胞物质^[49]、胞内多糖^[50]、胞外多糖^[51]、聚-3-羟基丁酸酯 (PHB)^[52] 等。此外, 氢细菌可以耐受较高浓度的 CO₂^[53]。例如, 有研究者报道了一株新分离出的氢细菌 YN-1, 该菌株在高浓度 CO₂ (40%) 条件下表现出良好的生长状态, 连续培养 76 h 后的细胞干重可达到 13.4 g/L, 固碳量为 18.08 g(CO₂)/L^[53]。钩虫贪铜菌 (*Capriavidus necator*) 作为一种氢细菌, 可以利用混合气体 (H₂、O₂ 和 CO₂) 作为底物进行生长。在有氧条件下, *C. necator* 通过 CBB 循环固定 CO₂, 并能够在自然环境的 CO₂ 浓度下生长, 倍增时间为 21 h^[54]。尤其值得一提的是, *C. necator* 天然具有较强的 PHB 合成能力, 其在细胞内的含量可以达到总生物量的 70% 以上^[55]。

鉴于氢细菌是兼性自养菌, 因此也可利用混合营养方式培养氢细菌, 使其在保持生长的同时维持较高的固碳水平^[56]。需要指出的是, 氢细菌在吸收和利用 CO₂ 时需要消耗氢气, 因此培养过程中需要通入大量的氢气^[57]; 而工业规模的气体发酵都是在加压条件下进行, 设备运行和过程控制成本较高, 因此设计和构建高效、高安全性的生物反应器对于氢细菌的工业应用至关重要^[57]。

1.1.4 产乙酸菌固碳

产乙酸菌是革兰氏阳性厌氧细菌，能够利用CO或者CO₂和H₂实现自养生长，其主要代谢产物是乙酸，因此而得名^[58]。产乙酸菌主要通过还原性乙酰辅酶A途径实现固碳，这一途径也被称为Wood-Ljungdahl (WL)途径^[59]。除了乙酸这一主要产物外，产乙酸菌在气体发酵时也能够合成其他一些次要产物，如乙醇、乳酸、丁醇、2,3-丁二醇等^[60-61]。食气梭菌是主要的产乙酸菌，已报道的食气梭菌主要包括永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*)、自产醇梭菌 (*Clostridium autoethanogenum*)、食一氧化碳梭菌 (*Clostridium carboxidivorans*)等^[62]，均具有潜在的重要工业应用价值。其中，基于自产醇梭菌的钢厂尾气合成乙醇技术已经实现工业规模生产^[61]。

目前，大部分产乙酸菌尚缺乏高效的分子遗传操作工具，但少数具有良好工业应用前景的产乙酸菌，如永达尔梭菌^[63]、自产醇梭菌^[64]、克氏梭菌 (*Clostridium coskatii*)、伍氏醋酸杆菌 (*Acetobacterium woodii*)^[65]等已经能够进行分子水平的菌种改造^[66]。研究者通过对这些产乙酸菌的代谢工程设计和改造，成功实现利用CO₂等一碳气体合成除乙醇以外的其他高值产品。例如，研究者通过在永达尔梭菌和伍氏醋酸杆菌中引入丙酮合成途径，实现了以一碳气体作为原料制备丙酮^[67-68]；Ueki等^[69]将异源丁酸合成途径整合到永达尔梭菌的染色体上，实现了工程菌利用一碳气体合成丁酸。此外，研究者将来源于丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)的丁醇合成基因簇导入永达尔梭菌和自产醇梭菌中表达，并强化电子转运蛋白编码基因 *etfAB* 的表达，实现了这两株食气梭菌通过气体发酵合成丁醇^[62, 70]。除了这些有机酸/醇以外，研究者还以克氏梭菌作为底盘细胞构建了PHB的合成途径，实现了PHB的合成^[71]；这些研究进展充分展示了产乙酸菌在实现一碳气体生物转化合成高值化学品方面的巨大潜力。

1.2 微生物减碳

淀粉质和糖基类原料一直是工业微生物发酵

的常用底物。在微生物有氧发酵这些底物的过程中，总是伴随着CO₂的释放。以糖酵解途径为例，每消耗1分子葡萄糖生成2分子乙酰辅酶A会释放2分子的CO₂，从而造成较多的碳流失。因此，如何减少上述发酵过程中的碳损失、实现“减碳”乃至“零碳”排放一直是该领域的研究重点。

1.2.1 非氧化糖酵解(NOG)途径

研究者设计并构建了一种非氧化糖酵解途径 (NOG途径)，实现从糖到乙酰辅酶A的完全碳转化，理论上可将糖或磷酸糖分解成枢纽性代谢物 (如乙酰辅酶A) 而不损失任何碳^[72]。如图1所示，首先，3个6-磷酸果糖 (F6P) 分子被磷酸酮醇酶 (phosphoketolase) 分解为3个乙酰磷酸 (AcP) 和3个4-磷酸赤藓糖 (E4P) 分子；随后，3个AcP分子继续被转化为3个乙酰辅酶A分子。而3个E4P分子则经过一系列的碳重排反应再生成2个F6P分子，重新进入新一轮代谢。因此，NOG途径是一个循环途径，在糖分解代谢为乙酰辅酶A的过程中实现了完全的碳守恒，并且可以与额外的CO₂固定途径配合发挥功能。例如，NOG途径可以偶联Calvin-Benson-Bassham (CBB)途径，将CO₂先通过CBB途径转化为F6P，最终通过NOG途径产生乙酰辅酶A^[72]，而乙酰辅酶A可作为前体物质进一步合成酸、醇等能源物质。

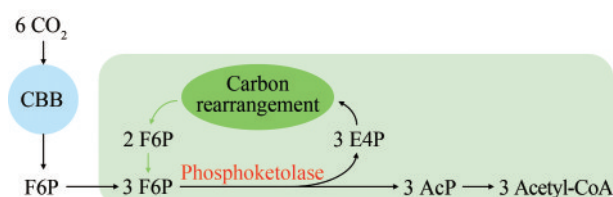


图1 非氧化糖酵解 (NOG) 途径示意图

F6P—6-磷酸果糖；AcP—乙酰磷酸；E4P—4-磷酸赤藓糖

Fig. 1 Schematic diagram of the non-oxidative glycolysis (NOG) pathway

F6P—Fructose 6-phosphate; AcP—Acetyl phosphate; E4P—Erythrose 4-phosphate

由于绝大多数微生物依赖于EMP途径来完成糖分解代谢，此过程中必会造成碳损失。因此，研究者设计了一种依靠NOG途径的碳分解代谢来支持生长的大肠杆菌，进一步显示了NOG途径的潜在优势^[73]。该菌株的天然糖代谢途径被阻断，从而迫使细胞使用NOG途径来合成乙酰辅酶A^[73]。这种

NOG 依赖型人工大肠杆菌代表了一类新的固碳微生物底盘。

此外, 已有相关研究证明将NOG 通路引入大肠杆菌可以提高多种能源和化学品的产量。例如, 在代谢网络计算分析的指导下, 将青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) 中编码磷酸酮醇酶 (phosphoketolase) 的 *fxpk* 基因引入大肠杆菌, 构建了NOG 通路, 避免了糖酵解途径中的碳损失, 从而增加了乙酰辅酶 A 前体的供应, 提高了丙酮的产量^[74]。此外, 计算机模拟还显示了NOG 途径在生产新型有用物质如内酰胺和异戊醇方面的潜力^[75]。

1.2.2 混合营养发酵

混合营养发酵 (mixotrophic fermentation) 是指在一些自养型微生物在糖代谢过程中通过其自身的固碳途径将释放的 CO_2 再回用的发酵过程^[76]。这一发酵方式可以更有效地利用糖基原料, 减少碳流失, 从而实现比异养型微生物的糖发酵更高的碳得率。

(1) 糖酵解与 WL 途径耦联

自然界中存在多种天然的 CO_2 固定途径^[77], 其中, WL 途径是目前已知的反应步骤最少且能量消耗最少的一种天然生物固碳途径。该途径由甲基分支反应和羧基分支反应两个通路组成。在甲基分支反应中, CO_2 在各种酶的催化下, 先后形成甲酸、甲酰四氢叶酸、亚甲基四氢叶酸、甲基四氢叶酸等, 最终与羧基分支反应中的羧基形成乙酰辅酶 A。在羧基分支反应中, CO 和 CO_2 在 CODH 的催化下先形成羧基, 随后羧基与辅酶 A 和甲基在一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶 A 合成酶 (CODH/ACS) 的催化下形成乙酰辅酶 A^[67]。WL 途径主要存在于产乙酸菌 (如梭菌、穆尔氏菌等) 和一些古细菌 (如产甲烷菌) 中^[6]。

研究者在永达尔梭菌中引入丙酮丁醇梭菌来源的丙酮合成途径, 采用混合碳源 (糖/一碳气体) 发酵策略, 使得糖酵解途径产生的 CO_2 被 WL 途径重新利用, 减少了糖酵解途径的碳流失, 提升了碳得率^[78]。此外, 有研究者提出一种称为厌氧、非光合作用 (ANP) 的混合营养发酵概念^[76], 即将糖酵解和 WL 途径结合起来, 利用后者捕获前者释放出的 CO_2 来产生丙酮酸和乙酰辅酶 A (图2)。

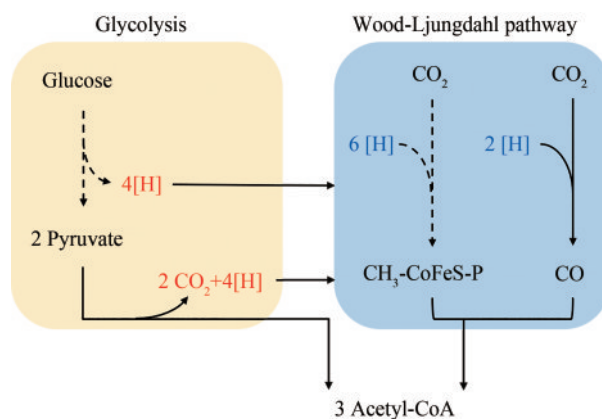


图2 糖酵解途径耦联 Wood-Ljungdahl 途径示意图

(虚线箭头表示多步反应)

Fig. 2 Schematic diagram of the coupling of glycolysis pathway and Wood-Ljungdahl pathway (Dashed arrows indicate multi-step reactions)

糖酵解过程每代谢 1 分子葡萄糖产生 2 分子乙酰辅酶 A, 就会释放 2 分子 CO_2 以及 8 个电子, 这 2 分子的 CO_2 和 8 个电子恰好满足 WL 途径的固碳需求, 从而产生额外的 1 分子乙酰辅酶 A。而 Diner 等^[79] 在永达尔梭菌中将 EMP 途径以及 WL 途径与甲羟戊酸 (MVA) 途径耦联, 使用果糖和合成气 (H_2 , CO_2 和 CO) 作为底物, 实现甲羟戊酸和异戊二烯的合成。

(2) 糖酵解途径与 Rubisco 耦联

卡尔文循环是光合作用中碳反应的一部分, 而 Rubisco 是卡尔文循环中决定碳同化速率的关键酶。通过 Rubisco 的催化, 1 分子 CO_2 被整合到 1 个五碳糖分子 1,5-二磷酸核酮糖 (RuBP) 上, 从而实现固碳。因此, 研究者尝试将糖酵解途径与 Rubisco 酶偶联 (图3), 从而减少前者的碳流失, 提高碳得率^[80-82]。在 Li 等^[83] 的研究中, 他们构建了一株包含两种异源酶——Rubisco 和磷酸核酮糖激酶 (PrkA) 的大肠杆菌工程菌, 成功实现了在糖酵解过程中 CO_2 的回收。他们还提出了两种替代方法, 即过表达转酮醇酶 I (TktA) 或缺失染色体上的 *zwf* 基因 (分别命名为 JB/pTA 和 MZB), 以进一步增强从糖酵解到基于 Rubisco 的途径的碳流, 使得 CO_2 产率 (消耗 1 mol 葡萄糖的 CO_2 产量) 和排放量 (产生单位摩尔乙醇所伴随的 CO_2 排放量) 分别减少了 81% 和 40%^[83]。此外, 通过研究上述的 Rubisco 和 PrkA 的突变体, 研究者发现其具有更快的 CO_2 催化速度和更好的底物选择性^[81, 84]。

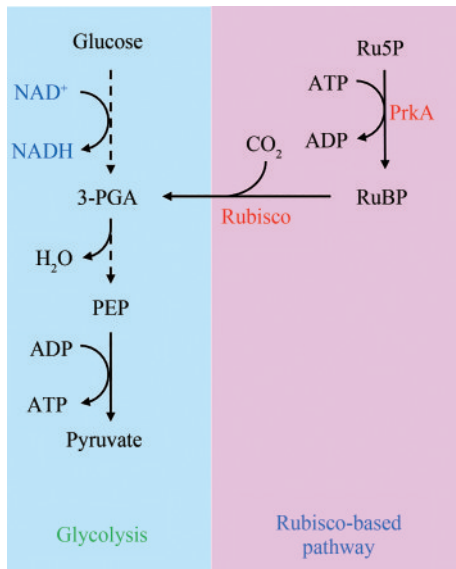


图3 糖酵解途径耦联Rubisco示意图

(虚线箭头表示多步反应)

3-PGA—3-磷酸甘油酸; PEP—磷酸烯醇丙酮酸; Ru5P—5-磷酸核酮糖; RuBP—1,5-二磷酸核酮糖; PrkA—磷酸核酮糖激酶

Fig. 3 Schematic diagram of the coupling of glycolysis pathway and Rubisco

(Dashed arrows indicate multi-step reactions)

3-PGA—3-Phosphoglycerate; PEP—Phosphoenolpyruvate;
Ru5P—Ribulose-5-phosphate; RuBP—Ribulose-1,5-bisphosphate;
PrkA—phosphoribulokinase

Kanno 等^[85]也对长聚球藻 PCC7942 的碳代谢进行了改造, 增强其对于 CO₂ 的吸收, 以提高葡萄糖利用效率, 从而增加产物得率。在这项研究中, 他们对糖酵解途径和卡尔文循环进行了重设计, 以增加葡萄糖的碳通量并将其定向至 Rubisco 催化的碳固定途径。工程菌在连续光照条件下高效利用 CO₂ 和葡萄糖, 实现了 2,3-丁二醇的合成, 其产量和产率分别为 12.6 g/L 和 1.1 g/(L·d)。

2 基于化学-微生物耦合体系的 CO₂ 转化

除了上述的 CO₂ 直接转化利用路径, 另一种可行的方案是将捕获的 CO₂ 先通过化学催化转化为甲醇、甲酸、乙醇和乙酸等简单结构的液态有机碳源^[86], 然后再通过微生物转化这些有机碳源合成更多高附加值产品, 从而在提高碳原子经济性的同时实现 CO₂ 减排。由于化学催化 CO₂ 转化的速率极快, 而微生物利用有机碳源相对于气态 CO₂ 而言

不会受到气-液传质效率的限制, 因此, 上述化学-生物耦合技术路线可有效提升 CO₂ 转化利用的效率并拓展可合成产物的种类, 具有潜在的工业应用前景。

2.1 甲醇生物利用

甲基营养菌 (主要包括甲基营养细菌和酵母) 具有天然利用甲醇等一碳化合物并以其作为唯一碳源和能源进行生长的能力^[87]。在所有的甲基营养菌中, 甲醇代谢的第一步是氧化成甲醛, 这一生化反应可由酵母中的醇氧化酶或原核生物中的甲醇脱氢酶 (methanol dehydrogenase, MDH) 催化完成^[88-91]。甲基营养型酵母中的甲醇氧化过程需要 O₂ 作为电子受体^[92], 而原核生物中的甲醇脱氢酶则通常使用吡咯喹啉醌或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 作为电子受体^[88]。作为甲醇氧化的产物, 甲醛在细胞内倾向于与蛋白质和 DNA 等大分子反应并发生交联, 进而阻碍细胞生长^[93-95]。因此, 甲基营养菌需要在甲醛产生和甲醛消耗通量之间达到良好的平衡, 减少细胞内的甲醛累积。此外, 不同的甲基营养菌具有不同的甲醇同化和异化途径, 从而产生多样化的代谢产物。例如, 脂肪酸和氨基酸是甲醇在有氧代谢条件下产生的, 而有机酸和生物燃料则是通过厌氧代谢甲醇产生的^[96]。

脂肪酸及其衍生物是油脂化工品、食品、生物燃料和材料生产的基础原料^[97], 而酵母细胞工厂是合成脂肪酸类化合物的理想平台微生物之一。其中, 多形汉逊酵母 (*Ogataea polymorpha*) 是目前应用较为广泛的一种甲基营养型酵母, 具有快速生长、耐热及遗传工具的可用性等优势^[98-101]。Zhou 等^[102]在多形汉逊酵母中, 通过适应性实验室进化与理性代谢工程改造相结合的方式提高细胞对甲醇的耐受能力, 并实现了甲醇生物转化高效合成脂肪酸。该研究团队还在多形汉逊酵母中构建过氧化物酶体耦联甲醇代谢和脂肪醇合成途径, 实现了甲醇生物转化高效合成脂肪醇^[103]。

有机酸尤其是低分子量羧酸已广泛应用于食品、制药、化妆品、洗涤剂、聚合物和纺织工业^[104]。基于糖基原料通过微生物发酵生产有机酸

已经有较多的研究报道。为了进一步降低原料成本,近年来研究者开始关注甲醇生物转化合成有机酸。Dai等^[105]聚焦酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),通过引入并表达源自毕赤酵母的甲醇代谢模块实现了甲醇生产丙酮酸。此外,Zhu等^[106]将甲羟戊酸途径引入扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens* AM1)中,通过进一步的改造和优化,最优工程菌株能够以甲醇为唯一碳源发酵合成甲羟戊酸,在分批补料发酵模式下的甲羟戊酸产量达到2.22 g/L。

除了上述几类主要产品外,基于甲醇细胞工厂合成的新产物也拓展至生物能源和燃料。例如, Ma等^[107]首次在扭脱甲基杆菌中构建了异丁醇生物合成途径,并通过代谢组学分析找到了从丙酮酸至异丁醇代谢通路的限制步骤,进而重新设计这一途径提高了异丁醇的产量。Chen等^[108]通过删除磷酸戊糖途径的关键基因,并表达来自单磷酸核酮糖途径的甲醇脱氢酶、3-己酮糖-6-磷酸合酶(3-hexulose-6-phosphate synthase, Hps)和6-磷酸-3-己糖异构酶(6-phospho-3-hexuloisomerase, Phi),构建了能在木糖或核糖为碳源基本培养基上生长的甲醇依赖型大肠杆菌菌株,菌株生长速率达到 0.17 h^{-1} ,该菌株被进一步改造以实现合成乙醇和正丁醇,最终产量分别为4.6 g/L和2.0 g/L,且同位素示踪实验结果显示,乙醇和正丁醇中的碳分别有43%和71%来自甲醇。

2.2 甲酸生物利用

甲酸也可作为有机碳源被甲基营养菌所利用^[109-110],并且存在异化和同化两种路径。甲酸的异化过程是经由甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)催化被氧化为 CO_2 ,从而为微生物的生长和代谢提供还原力,但这一过程也可能造成一定量的碳流失^[111]。甲酸的同化路径则主要借助两个生化反应:①甲酸首先与四氢叶酸形成甲酰基四氢叶酸。该反应由甲酸-四氢叶酸亚连接酶(formate tetrahydrofolate ligase, FTL)介导,需要消耗ATP。甲酰基四氢叶酸随后被还原生成亚甲基四氢叶酸,最后进入丝氨酸循环、Wood-Ljungdahl途径以及还原甘氨酸途径^[112](图4)。②甲酸与乙酰辅酶A生

成丙酮酸。

目前已知的天然甲酸利用微生物的甲酸耐受和代谢能力不甚理想^[113-114],而一些酵母和细菌虽然具有出色的甲酸耐受度,但并不能有效利用甲酸^[115]。因此,研究者尝试设计人工代谢途径以及微生物细胞工厂实现甲酸利用效率的提升^[116],其中,大肠杆菌是所选择的主要底盘微生物。例如, Kim等^[117]通过过量表达参与THF循环和丝氨酸利用途径的基因,构建了能够利用甲酸形成生物质的的大肠杆菌菌株,并通过适应性实验室进化显著提高了菌株在无糖条件下利用甲酸的能力。Yishai等^[118]通过在大肠杆菌中整合来自扭脱甲基杆菌的甲基四氢叶酸连接酶、5,10-亚甲基-四氢叶酸-环化水解酶、5,10-亚甲基-THF脱氢酶,以及过表达甘氨酸裂解系统的4种蛋白质(H蛋白、T蛋白、P蛋白和L蛋白)实现了甲酸代谢合成甘氨酸和丝氨酸;同时,研究者还引入甲酸脱氢酶来优化细胞内的还原力供给,以及敲除若干旁路的代谢酶,最终实现大肠杆菌工程菌共利用甲酸和 CO_2 进行生长。Lee等^[119]在大肠杆菌中引入 CO_2 和甲酸同化途径,表达两个甲酸脱氢酶基因,调节代谢通量并优化细胞色素 $bo3$ 和 $bd-I$ 泛醇氧化酶的表达水平,使菌株能够在 CO_2 和甲酸为碳源条件下生长。

此外,一些非模式微生物也被设计和改造用于实现甲酸利用。例如, Hong等^[120]为了整合还原甘氨酸途径(rGP)以吸收 CO_2 和甲酸,将源自哥特沙克尿酸菌(*Gottschalkia acidurici*)的甘氨酸合成酶编码基因引入巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*)中,工程菌实现对外源甲酸的同化代谢。进一步的分析结果表明,甘氨酸合成酶的表达对巴氏梭菌的产物合成也有很大影响,一个有趣的发现是2-氧丁酸盐(2-OB)作为巴氏梭菌的代谢中间体,其分泌完全由甘氨酸合成酶的表达触发。

总体而言,相较于甲醇,甲酸的生物转化利用研究起步较晚,进展相对缓慢,许多基础的生理和代谢机制还有待探究,从而能够为更有效地设计和构建甲酸细胞工厂提供借鉴和参考。

2.3 乙酸生物利用

CO_2 不仅可以通过化学路径转化为甲醇、甲酸

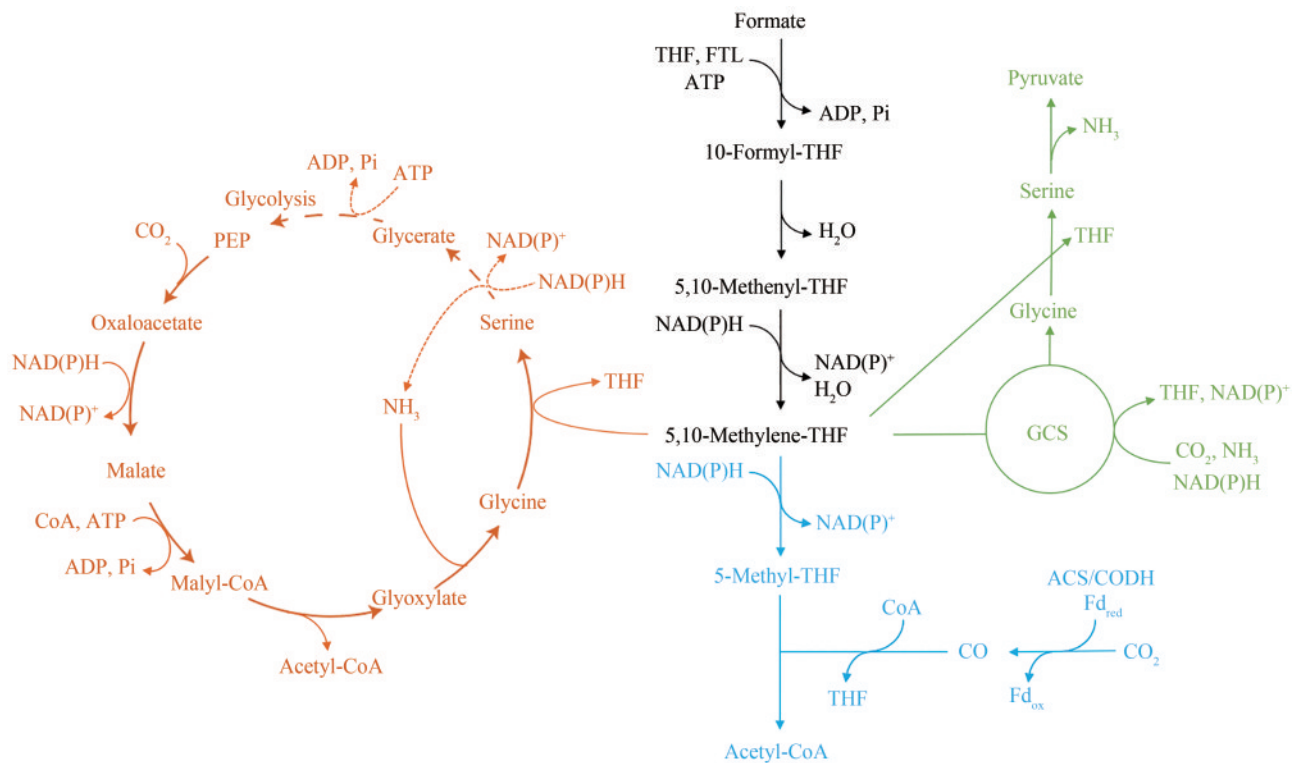


图4 甲酸同化途径

PEP—磷酸烯醇丙酮酸；GCS—甘氨酸裂解系统

(橙色表示丝氨酸途径；蓝色表示Wood-Ljungdahl途径；绿色表示还原性甘氨酸途径。虚线箭头表示多步反应)

Fig. 4 Formate-assimilating pathways

PEP—Phosphoenolpyruvate;GCS—Glycine cleavage system

(Orange represents serine pathway; Blue indicates the Wood-Ljungdahl pathway; Green represents reducing glycine pathway.

Dashed arrows indicate multi-step reactions)

等有机一碳物质，也可以直接转化为乙酸等二碳化合物。

许多工业微生物均具有利用乙酸的能力，例如大肠杆菌^[121]、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)^[122]、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[123]、酿酒酵母^[124]、隐球酵母 (*Cryptococcus curvatus*)^[125]、黏红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)^[126]、解脂耶氏酵母^[127]和米曲霉等^[128]。由于纯乙酸对微生物较强的抑制作用，因此工业发酵中多采用乙酸盐如乙酸钠和乙酸铵作为底物。近年来，研究者已经构建了一系列微生物细胞工厂利用乙酸盐合成多样化的目标产品，包括有机酸类如苹果酸^[128]、琥珀酸^[129-130]、乙醇酸^[131-132]、丙酮酸^[133]、衣康酸^[134-135]、3-羟基丙酸^[121-122, 136-138]、甲羟戊酸^[139]，有机醇类如一元醇^[124, 140-142]、2,3-丁二醇^[143]，以及酯类如聚羟基脂肪酸酯^[123, 144-145]、微生物脂质^[125-127, 146-150]、乙酸异丁酯^[151]等。需要指

出的一点是，由于乙酸盐的能量含量低以及同化过程中需要消耗ATP，因此以乙酸盐作为唯一碳源发酵时的微生物生物量通常较低，从而会影响最终的目标产物浓度^[152]。所以，在实际应用中，乙酸盐通常与其他传统有机碳源如葡萄糖作为共底物以获得更多的能量供应。此外，研究者使用多样化的发酵策略来提高乙酸盐的利用率，例如连续/重复补加乙酸、pH耦合补料分批发酵、两阶段培养（葡萄糖用于细胞生长，乙酸在葡萄糖耗尽后用于产物合成）、高细胞密度发酵等^[152]。

2.4 乙醇生物利用

乙醇在化学工业、医疗卫生、食品工业、农业生产等领域都有广泛的用途，其最重要的应用无疑是作为能源工业的基础燃料。基于微生物发酵获得的生物乙醇也是目前绿色生物制造领域的

主要产品之一，它可以单独或与汽油混配制成乙醇汽油作为汽车燃料。作为产品的同时，乙醇也可作为原料进一步合成其他高附加值产品。

大肠杆菌具有双功能的乙醇氧化还原酶(aldehyde/alcohol dehydrogenase, AdhE)，其在厌氧条件下可催化乙酰辅酶A先还原为乙醛，再还原为乙醇^[153]。虽然AdhE催化的两步反应都是可逆的，但由于*adhE*转录速度不足^[154]，大肠杆菌无法利用乙醇作为唯一的碳源和能源进行生长。为了解决上述问题，研究者筛选并获得了AdhE蛋白突变体AdhE^{A267T/E568K}，该突变体在以乙醇为唯一碳源和能源时的有氧生长能力获得改善^[154]。基于此，研究者继续构建大肠杆菌细胞工厂来利用乙醇合成目标产品。Liang等^[155]利用来自玉米迪基氏菌(*Dickeya zae*)的乙醛脱氢酶(由*ada*编码)和来自酿酒酵母的乙醇脱氢酶(由*adh2*编码)在大肠杆菌中构建了乙醇利用途径(EUP)，并与聚羟基丁酸酯以及多聚异戊二烯醇的合成途径相匹配，实现工程菌株在有氧条件下以乙醇为唯一碳源进行生长，并在补充少量氨基酸的条件下实现合成聚羟基丁酸酯以及多聚异戊二烯醇。Lu等^[156]研究了两种乙醇消耗途径对3-羟基丙酸合成以及TCA循环、糖异生途径和转氢酶的影响，进而对3-羟基丙酸合成途径进行了优化，最终在全细胞生物催化体系中的3-羟基丙酸产量达到13.17 g/L。此外，Wang等^[157]将双功能氧化还原酶AdhE的突变体AdhE^{A267T/E568K}引入大肠杆菌中，构建了乙醇利用途径，使其以乙醇为底物进行有氧生长，然后将乙醇利用途径与异丙醇生物合成途径耦联，并通过优化启动子和增加NADPH供应的策略，将乙醇高效转化为异丙醇。

3 体外酶催化转化CO₂

体外酶催化技术是模仿微生物体内代谢途径，在无细胞环境中利用单酶或组合酶及辅酶将底物转化为目标化合物的生物技术^[158]。该技术可调控性强、副反应少、产品得率高、反应速度快，在生物制造领域展现出巨大潜力，近年来在CO₂固定与转化研究中也应用。体外酶催化技术具有优异的选择性(立体特异性、区域和化学选择性)、

高反应效率，并且反应条件温和，对环境没有任何副作用^[159-162]。但该技术同样存在一些缺点和局限性，例如酶易失活、回收困难以及成本高。根据已知的生物固碳途径和反应类型，可用于CO₂体外酶催化体系的生物酶主要包括两大类：①氧化还原酶，例如甲酸脱氢酶、CO₂还原酶、CO脱氢酶、重塑固氮酶；②裂解酶，例如碳酸酐酶和脱羧酶^[162]。而根据CO₂转化路径涉及的反应步骤数量，一般可将体外酶催化体系分为单酶和多酶系统。

3.1 CO₂的体外单酶转化

3.1.1 甲酸脱氢酶

甲酸脱氢酶是一类重要的氧化还原酶。CO₂通过甲酸脱氢酶在辅因子NADH的作用下可被转化为甲酸。基于这一催化机制，研究人员利用NADH依赖型的甲酸脱氢酶来转化CO₂，并对其体外催化性能进行了探究。为了提高甲酸脱氢酶的稳定性(特别是循环稳定性)，Jiang等^[163]将来自博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的甲酸脱氢酶封装在了毫米级的溶胶-凝胶(包括硅胶、藻酸盐-硅胶、羟基磷灰石-多糖凝胶等)载体中进行使用。由于载体提供了有利于维持酶蛋白三维结构的微环境，因此这些固定化的甲酸脱氢酶在体外催化CO₂还原时表现出高活性和高稳定性。但在该体系中，NADH等辅因子作为牺牲试剂而并未实现再生。

由于辅因子的成本很高，因此需要在CO₂酶促转化的同时实现辅因子再生。Yadav等^[164]构建了一个人工光合作用系统，用于从CO₂中高效人工光合生产甲酸(2 h生产110.55 μmol甲酸)，虽然该系统中的NADH可再生，但再生效率很低(<25%)。随后，该研究团队又报道了一种基于石墨烯的光-生物耦合催化体系(CCG-BODIPY)，该体系进一步提高了NADH的再生率(54.02%)，同时将甲酸产量提高至每2 h 144.2 μmol^[165]。近年来，有许多研究者致力于提高辅因子的再生率和再生速率以降低体外酶催化转化CO₂的成本，虽然有一些成效，但仍然有很长的一段路要走。

3.1.2 一氧化碳脱氢酶

一氧化碳是工业合成气的主要组分，且可以通过催化加氢较容易地转化成甲醇。CODH在电

子供体如NADH、NADPH、MV²⁺等协助下,可将CO₂转化为CO^[166]。根据在产乙酸菌、产甲烷菌和光合细菌等多种微生物中的表达情况,CO脱氢酶有两种类型,即具有[MoSCu]活性位点的非氧敏感型酶和含有[Fe₄S₄Ni]的氧敏感酶。前者来源于食羧寡氧菌(*Oligotropha carboxidovorans*)等需氧细菌,其CO氧化速率极低(约为100 s⁻¹),且由于Cu中心还原不足,因此基本不具备催化CO₂还原为CO的能力;后者来源于热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*)、生氢一氧化碳嗜热菌(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*)和巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkerii*)等专性厌氧菌,也被称为[NiFe] CODH,既可氧化CO,也可还原CO₂^[167-169]。

受体内酶促反应的启发,研究者们构建了体外酶促反应系统以促进CO₂还原为CO。Shin等^[170]首次实现了利用热醋穆尔氏菌来源的[NiFe] CODH在体外电催化CO₂还原为CO,且该反应过程中几乎检测不到过电位,证明[NiFe] CODH非常适合于电催化还原CO₂。但在该反应体系中,酶活性会受pH等因素的影响而降低,导致CO₂转化效率下降。为了解决这一难题,Armstrong等^[168]构建了一个电催化与CODH耦合的反应体系用于转化CO₂,即将[NiFe] CODH固定在热解石墨电极上,提高CO₂和CO之间相互转换的效率。随后,他们又将光催化与酶催化结合起来,构建了一个人工光合作用系统,实现了CO₂高效转化为甲醇^[171-172]。

3.1.3 固氮酶

除了可以直接将CO₂转化为CO的[NiFe] CODH外,自然界中也存在其他类型的氧化还原酶可以催化这一还原反应。例如,研究者^[173]发现一种来自棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)的固氮酶,它也可以催化CO₂还原为CO,从而拓展了此类酶的选择范围。上述固氮酶还可催化N₂还原为氨^[173]。基于这一功能,研究者拟探究该酶是否还能够催化CO₂还原为甲烷。尽管实验结果给出了否定的答案^[173],但有趣的是,当研究者将该酶中靠近FeMo辅因子活性位点的几个关键氨基酸残基进行突变后,所获得的突变体即可催化CO₂形成甲烷^[174]。通过进一步的改造,该固氮酶的突变体

甚至能够催化CO₂与乙炔反应以合成丙烯^[174]。上述研究充分展示了这类固氮酶的应用潜力。

3.1.4 碳酸酐酶和脱羧酶

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)是一种代表性的裂解酶。研究者在1933年从红细胞中发现了第一个碳酸酐酶^[175],此后又从植物^[176]和微生物^[177]中发现了该酶。迄今为止,碳酸酐酶已被发现普遍存在于哺乳动物、植物、藻类和细菌中,其主要负责CO₂和碳酸氢盐之间的相互转化,以维持血液和其他组织中的酸碱平衡(CO₂+H₂O→H⁺+HCO₃⁻)^[162]。根据酶的来源及其结构折叠,碳酸酐酶存在α、β、γ、δ、ζ、θ和η等几种类型,它们之间的结构相似性很低,但都具有包含二价锌离子或相关金属离子的活性位点^[178-180]。

基于碳酸酐酶的酶学特性,它们已被应用于CO₂的捕获、封存以及转化利用中的多个技术单元。包括吸收、膜分离和沉降/矿化等^[181]。在使用碳酸酐酶捕获CO₂时,必须配合使用碱性溶剂(例如单乙醇胺、碳酸钾或甲基二乙醇胺)以中和释放的质子^[181]。该反应过程的条件相对苛刻(温度为50~125 °C、高浓度的有机胺等),容易导致酶变性,降低酶活性和稳定性。因此,研究者^[182]开发了一种基于碳酸钾的从燃煤烟气中吸收CO₂的工艺,并联合使用碳酸酐酶以加速CO₂的吸收;在此过程中,为了提高酶的稳定性,碳酸酐酶被固定在无孔硅基纳米粒子上,固定化的碳酸酐酶在经过60 d的反应历程后,依旧保持了较高的催化活性,而游离的碳酸酐酶的催化活性则显著下降。

脱羧酶在胞内可以催化底物进行羧化反应,从而提高胞内有毒化合物的亲水性以降低其对亲脂性生物组分(如细胞膜、蛋白质等)的亲合力^[162, 183]。由于脱羧酶也可以催化CO₂的羧化,因此该酶也在生物固碳研究中得到关注,并借助其羧化作用实现体外催化CO₂转化利用。根据Faber等^[184]的报道,目前至少已经开发了四种酶促羧化反应,包括:①环氧化物羧基化,如Ensign等^[185]使用黄杆菌(*Xanthobacter* Py2)的细胞提取物催化环氧丙烷与CO₂进行羧化反应生成乙酰乙酸和β-羟基丁酸,但由于无法纯化参与反应的脱羧酶,该反应很难被应用于体外酶催化系统;②芳烃羧基化,如Aresta等^[186]利用湖泊陶厄氏菌(*Thauera*

aromatica) 细胞提取物或部分纯化的苯磷酸酶催化 CO_2 和苯酚羧基化, 合成对羟基苯甲酸; ③ 杂芳烃羧基化, 如 Omura 等^[187] 利用来自巨型芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的吡咯-2-羧酸脱羧酶催化吡咯与 CO_2 的羧化, 生成吡咯-2-羧酸酯 (一种潜在的农业除草剂); ④ 脂肪族羧基化, 如 Miyazaki 等^[188] 成功利用来自酿酒酵母的丙酮酸脱羧酶实现乙醛与 CO_2 羧化合成丙酮酸。

3.2 基于体外多酶系统的 CO_2 转化

多酶级联反应在生物体内广泛存在, 反应过

程是由多种酶催化底物形成目标产物。在细胞内利用 CO_2 合成目标产物 (尤其是高附加值产物) 通常就是一个多酶级联反应。基于此, 研究者在近年来也构建了多种体外多酶系统将 CO_2 转化为各类化学品。

3.2.1 CO_2 转化为甲醇

通过多酶级联系统将 CO_2 转化为甲醇被认为是极具应用前景的路径之一 [图 5(a)]。Yoneyama 等^[189] 首次报道了以甲酸脱氢酶和甲醇脱氢酶为催化剂以及吡咯喹啉酮为辅因子实现将 CO_2 还原为甲醇。此外, 上述研究还提到辅因子的类型对 CO_2 还原反应有很大影响, 合适的辅因子可以提高多酶

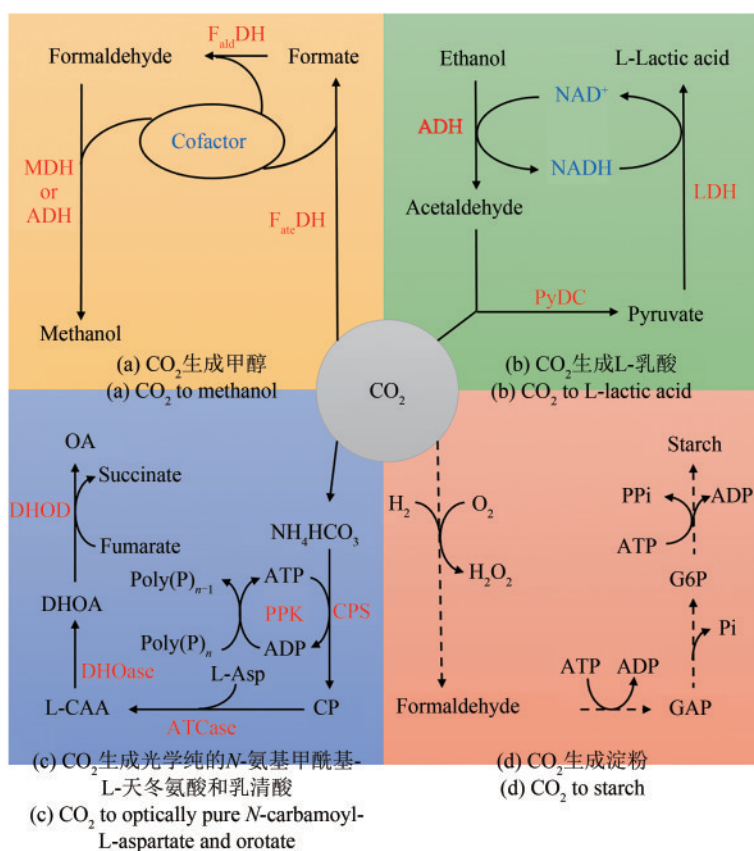


图5 体外多酶级联催化 CO_2 生成各种产物

(虚线箭头表示多步反应)

$F_{ald}DH$ —甲酸脱氢酶; $F_{ald}DH$ —甲醛脱氢酶; MDH—甲醇脱氢酶; ADH—乙醇脱氢酶; PyDC—丙酮酸脱羧酶; LDH—乳酸脱氢酶; CPS—羧基磷酸合酶; PPK—多磷酸激酶; CP—羧基磷酸; ATCase—天冬氨酸甲酰转移酶; L-CAA—*N*-氨基甲酰基-L-天冬氨酸; DHOase—二氢乳清酸酶; DHOA—二氢乳清酸; DHOD—二氢乳清酸脱氢酶; OA—乳清酸; GAP—3-磷酸甘油醛; G6P—6-磷酸葡萄糖

Fig. 5 Conversion of CO_2 to various products by multi-enzyme cascade catalysis *in vitro*

(Dashed arrows indicate multi-step reactions)

$F_{ald}DH$ —Formate dehydrogenase; $F_{ald}DH$ —Formaldehyde dehydrogenase; MDH—Methanol dehydrogenase; ADH—Alcohol dehydrogenase; PyDC—Pyruvate decarboxylase; LDH—Lactate dehydrogenase; CPS—Carbamoyl phosphate synthase; PPK—Polyphosphate kinase; CP—Carbamoyl phosphate; ATCase—Aspartate carbamoyl-transferase; L-CAA—*N*-Carbamoyl-L-aspartate; DHOase—Dihydroorotase; DHOA—Dihydroorotate; DHOD—Dihydroorotate dehydrogenase; OA—Orotate; GAP—Glyceraldehyde 3-phosphate; G6P—Glucose 6-phosphate

级联反应的速率^[189]。此后, Dave等^[161]报道了一种以甲酸脱氢酶、甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, F_{ald}DH)以及乙醇脱氢酶这三种脱氢酶为催化剂, NADH为辅因子的体外反应体系, 也可将CO₂还原为甲醇。此外, 多酶反应通常对反应介质的pH值高度敏感, 应在较低的pH值和离子强度以及较高的温度下进行, 但这样的条件又通常会导致天然酶的变性失活^[190]。因此, 研究者采用固定化介质的方法来提高酶的稳定性。例如, Dave等^[161]将上述三种脱氢酶共封装在多孔硅溶胶-凝胶基质中用于催化CO₂转化为甲醇, 与游离酶相比, 固定化酶反应体系的甲醇产率和产量均显著增加。

为了构建更稳定和高效的CO₂体外酶催化体系, Jiang等^[191-194]设计和测试了不同的固定化方法和载体来模拟细胞内的微环境。例如, 甲酸脱氢酶、甲醛脱氢酶和乙醇脱氢酶被海藻酸盐-二氧化硅复合材料包封, 与游离酶相比, 酶的活性、储存稳定性以及可重复使用性均显著提高, 储存60 d且重复使用超过10次后的甲醇产率仍可保持在76%以上^[191]。然而, 将三种酶固定在一个载体内通常存在一些局限性, 例如不同酶之间的相互作用可能会影响其活性以及固定化过程中单个酶的催化行为难以控制^[162]。为此, 研究者对这三种酶的固定方法及载体做了一系列改进, 实现CO₂向甲醇的高效且高选择性转化^[192-194]。

然而, 上述CO₂体外多酶转化体系均要消耗辅因子, 极大地增加了转化过程的成本。因此, 这也促使研究者聚焦于实现这一过程中的辅因子再生或再利用。Wang等^[195]将反应体系中的酶(甲酸脱氢酶、甲醛脱氢酶、乙醇脱氢酶和谷氨酸脱氢酶)和NADH固定在不同的聚苯乙烯颗粒上, 并以谷氨酸在谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)作用下生成的酮戊二酸来驱动NADH原位再生。这种固定化多酶反应体系显著提升了NADH的利用率, 但相较于游离型多酶反应体系, 前者的酶活性和甲醇产率均偏低, 需要进一步优化。此外, 为了提高多酶反应系统的活性, Galarnea等^[196]比较了甘油脱氢酶(glycerol dehydrogenase, GlyDH)、亚磷酸盐脱氢酶(phosphite dehydrogenase, PTDH)和光合系统这三种不同的NADH再生系统, 发现

亚磷酸盐脱氢酶系统中的NADH再生效率最高。随后, 他们将甲酸脱氢酶(F_{alc}DH)、甲醛脱氢酶(F_{ald}DH)、乙醇脱氢酶(ADH)和亚磷酸盐脱氢酶(PTDH)共包在磷脂-二氧化硅纳米胶囊(phospholipid-silica nanocapsules, NPS)中, 将固定化多酶体系的酶活性提高至游离酶体系的55倍。

3.2.2 CO₂转化为中、长碳链产物

相比于化学结构相对简单的甲醇等产物, 通过体外多酶体系转化CO₂合成具有较高价值的三碳及以上的中、长碳链化合物是更具挑战性的工作。2011年, Wang等^[197]设计了一种相对简单的多酶途径将CO₂和乙醇转化为L-乳酸, 反应过程如图5(b)所示: ①在NAD⁺存在下, 乙醇脱氢酶将乙醇氧化为乙醛; ②丙酮酸脱羧酶催化CO₂和乙醛合成丙酮酸; ③在NADH存在的情况下, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)将丙酮酸还原为L-乳酸。2016年, 德国的马克斯-普朗克陆地微生物研究所Tobias J. Erb团队^[198]报道了一种非天然的酶催化固碳新途径(CETCH循环), 包括来自动物、植物、微生物的17种酶, 并通过对CETCH循环的数轮优化逐步提高固碳效率, 实现利用CO₂体外合成苹果酸盐。随后, 该研究团队又通过整合上述CETCH循环和β-羟基天冬氨酸循环(BHAC)实现体外酶催化CO₂合成多种萜烯和聚酮类化合物^[199]。此外, 通过在反应体系中引入四种回补模块(anaplerotic modules)来补充CETCH循环中消耗的代谢中间体, 该团队还实现了利用CO₂体外合成复杂化合物6-脱氧红霉内酯B(6-deoxyerythronolide B)^[200]。上述的研究工作展示了CETCH循环在CO₂高值化利用中的应用潜力。2020年, Li等^[201]构建了一种新的体外多酶系统, 用于将CO₂转化为光学纯的N-氨基甲酰基-L-天冬氨酸和乳清酸。他们利用氨甲酰磷酸合酶(CPS)、天冬氨酸氨甲酰转移酶(ATCase)、二氢乳清酸酶(DHOase)和二氢乳清酸脱氢酶(DHOD)这4种级联酶一锅法将原料转化为产品, 同时偶联多磷酸激酶(PPK)用于ATP再生[图5(c)]。在最佳反应条件和底物浓度下, 3 h内该反应体系可生成19.2 mmol/L N-氨基甲酰基-L-天冬氨酸, 从而合成了15.5 mmol/L乳清酸。而在添加的L-天冬氨酸的基础上, N-氨基甲酰基-L-天冬氨酸和乳清酸的产

率分别达到96.0%和93.3%。这项工作突出了利用体外生物制造平台生产光学纯*N*-氨基甲酰基-L-天冬氨酸和乳清酸的便利性,为利用可再生原料合成高附加值商品化学品提供了一条新途径。2021年,中国科学院天津工业生物技术研究所的科研团队^[202]又报道了一种CO₂和H₂合成淀粉的化学-生物杂合的无细胞转化途径[图5(d)]。该途径包含11个核心反应步骤,并对3个关键酶进行了蛋白设计和改造。在H₂的驱动下,该体外酶反应体系的CO₂转化淀粉的速率达到22 nmol/min,比玉米中的淀粉合成速率高出约8.5倍。该研究克服了化学和生物协同催化的障碍,实现体外高效合成淀粉分子,为无细胞体系酶催化制造淀粉提供了一个全新的路径。

4 问题与展望

现有生物制造产业主要依托于淀粉质以及糖类有机原料,存在“与人争粮”的争议以及经济性问题,亟须推进原料利用途径的变革。以CO₂为代表的一碳资源来源广泛且储量巨大,但目前尚未得到全面、有效利用。一碳生物技术和低碳生物产业的发展有望实现“零碳”甚至是“负碳”生物制造,将引领新一代生物制造产业模式并成为未来绿色经济发展的重要路径之一,有望在我国“双碳”目标实现过程中发挥重要作用。

CO₂生物转化的核心是四价碳的还原。自养微生物可以在常温下实现对CO₂的还原,但由于CO₂的化学惰性,上述转化过程普遍存在能效低、速率慢的问题。如何进一步提高生物固碳的反应速度,接近或达到化学转化CO₂的效率,同时实现碳流定向分配以高效合成目标产物是未来的研究重点,其中的一些关键问题和技术难点包括:①克服CO₂的化学惰性以实现对其的转化和利用需要高效的能量输入,因此,拓展生物体的能量传递通道、提高能量传递效率是关键。在这方面,采用一些人工电子传递元件如蛋白导线、量子点连接器等,可以实现生物体直接利用高密度形式的能量,有望克服这一技术瓶颈,但在经济性上需要综合考量。②生物固碳元件活性低,固碳途径长且复杂,综合效率低。这就需要我们发掘、改造

和设计更高效的CO₂还原元件,优化天然固碳途径或者创建全新的人工固碳途径,实现CO₂的高效生物还原。③将吸收和同化的CO₂高效转化为目标产物是能否最终实现CO₂高值化利用的关键。但生物体吸收的CO₂通常会用于细胞生长以及与生长密切相关的代谢物合成,将这些碳源定向合成目标产物并非易事,需要通过对物质代谢网络的整体调节来促进碳流重新分配,并增强其到目标化学品的代谢通量。

一些模式微生物,如大肠杆菌和酿酒酵母等,具有遗传背景清晰、分子工具完备等优势,近年来利用其创建人工的一碳细胞工厂并已成为研究热点,但相关研究成果主要局限于概念验证以及实验室测试,细胞性能以及技术路线距离工业应用仍有较大距离。此外,工业生产企业来源的CO₂通常伴随多种杂质,比如烷烃、烯烃、焦油等,对于微生物具有较大毒性,需要在实际应用中予以重视。

构建化学-微生物耦合催化体系可以有效规避单纯生物催化过程中CO₂的惰性问题。通过化学催化可将CO₂高效转化为甲醇、甲酸等液态有机一碳原料。由于不再存在气液传质效率的限制问题,这些有机一碳物质相对于CO₂而言更易被生物体系所转化。但目前的生物体系(无论是微生物细胞还是体外酶催化系统)对于上述有机一碳原料的转化和利用仍存在效率低、有显示度的产品少且产量低等诸多不足,亟待进一步改善和提升。此外,体外酶催化体系虽然比微生物发酵路线在转化有机一碳原料时具有更高的反应速率,但目前的固碳途径多依赖ATP供能,成本偏高。因此,未来体外酶催化固碳研究的重点之一是设计出能够利用其他能量形式的生物酶。

参 考 文 献

- [1] ARESTA M, DIBENEDETTO A. Utilisation of CO₂ as a chemical feedstock: opportunities and challenges[J]. Dalton Transactions, 2007(28): 2975-2992.
- [2] GUPTA H, FAN L S. Carbonation-calcination cycle using high reactivity calcium oxide for carbon dioxide separation from flue gas[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2002, 41(16): 4035-4042.

- [3] LEUNG D Y C, CARAMANNA G, MAROTO-VALER M M. An overview of current status of carbon dioxide capture and storage technologies[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 39: 426-443.
- [4] MARKEWITZ P, KUCKSHINRICH S W, LEITNER W, et al. Worldwide innovations in the development of carbon capture technologies and the utilization of CO₂[J]. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5(6): 7281-7305.
- [5] MIKKELSEN M, JØRGENSEN M, KREBS F C. The teraton challenge. A review of fixation and transformation of carbon dioxide[J]. *Energy & Environmental Science*, 2010, 3(1): 43-81.
- [6] 李婉麒, 杨凤娟, 贾德臣, 等. 合成气的生物利用与定向转化[J]. *化工进展*, 2023, 42(1): 73-85.
- LI W Q, YANG F J, JIA D C, et al. Biological utilization and conversion of syngas[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2023, 42(1): 73-85.
- [7] XIAO L, LIU G X, GONG F Y, et al. A minimized synthetic carbon fixation cycle[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(1): 799-808.
- [8] ZHAO T T, FENG G H, CHEN W, et al. Artificial bioconversion of carbon dioxide[J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2019, 40(10): 1421-1437.
- [9] MAHESHWARI N, KRISHNA P K, THAKUR I S, et al. Biological fixation of carbon dioxide and biodiesel production using microalgae isolated from sewage waste water[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(22): 27319-27329.
- [10] LIAO J C, MI L, PONTRELLI S, et al. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(5): 288-304.
- [11] 谢丽, 杜诗云, 卜凡. 同型产乙酸菌研究进展及其环境生物技术应用[J]. *同济大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(1): 67-73, 108.
- XIE L, DU S Y, BU F. Homoacetogen and its application in environmental biotechnology[J]. *Journal of Tongji University (Natural Science)*, 2018, 46(1): 67-73, 108.
- [12] TAN X Y, NIELSEN J. The integration of bio-catalysis and electrocatalysis to produce fuels and chemicals from carbon dioxide[J]. *Chemical Society Reviews*, 2022, 51(11): 4763-4785.
- [13] TALEKAR S, JO B H, DORDICK J S, et al. Carbonic anhydrase for CO₂ capture, conversion and utilization[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 74: 230-240.
- [14] KAJLA S, KUMARI R, NAGI G K. Microbial CO₂ fixation and biotechnology in reducing industrial CO₂ emissions[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(2): 149.
- [15] MAHESHWARI N, THAKUR I S, SRIVASTAVA S. Role of carbon-dioxide sequestering bacteria for clean air environment and prospective production of biomaterials: a sustainable approach[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(26): 38950-38971.
- [16] BARATI B, ZENG K, BAEYENS J, et al. Recent progress in genetically modified microalgae for enhanced carbon dioxide sequestration[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2021, 145: 105927.
- [17] 王竞, 周集体, 张晶晶, 等. 固定CO₂氢细菌的筛选及其培养条件优化[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(3): 271-275.
- WANG J, ZHOU J T, ZHANG J J, et al. Screening and culture conditions of hydrogen oxidizing bacteria[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2000, 6(3): 271-275.
- [18] WANG B, LI Y Q, WU N, et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(5): 707-718.
- [19] KUMAR K, DASGUPTA C N, NAYAK B, et al. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(8): 4945-4953.
- [20] SKJÅNES K, REBOURS C, LINDBLAD P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, 33(2): 172-215.
- [21] CHENG J, HUANG Y, FENG J, et al. Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing *Chlorella* PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 144: 321-327.
- [22] CHEAH W Y, SHOW P L, CHANG J S, et al. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 184: 190-201.
- [23] SOLOVCHENKO A, KHOZIN-GOLDBERG I. High-CO₂ tolerance in microalgae: possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(11): 1745-1752.
- [24] ZHANG A, CARROLL A L, ATSUMI S. Carbon recycling by cyanobacteria: improving CO₂ fixation through chemical production[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(16): fnx165.
- [25] 康瑞娟. 蓝藻的光合碳代谢特征及调控[D]. 北京: 中国科学院大学, 2004.
- KANG R J. Characteristics and regulation of photosynthetic carbon metabolism in cyanobacteria[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Science, 2004.
- [26] ZHAO B T, SU Y X. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 31: 121-132.
- [27] GAO Z X, ZHAO H, LI Z M, et al. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria[J]. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5(12): 9857-9865.

- [28] WANG Y P, SUN T, GAO X Y, et al. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO₂ in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 34: 60-70.
- [29] ANGERMAYR S A, VAN DER WOUDE A D, CORREDDU D, et al. Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 99.
- [30] ATSUMI S, HIGASHIDE W, LIAO J C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(12): 1177-1180.
- [31] DE MORAIS M G, DE MORAIS E G, DUARTE J H, et al. Biological CO₂ mitigation by microalgae: technological trends, future prospects and challenges[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2019, 35(5): 78.
- [32] GUPTA P L, LEE S M, CHOI H J. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(9): 1409-1417.
- [33] SUH I S, LEE C G. Photobioreactor engineering: design and performance[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2003, 8(6): 313-321.
- [34] CHEN C Y, YE H K L, AISYAH R, et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 71-81.
- [35] YEN H W, HU I C, CHEN C Y, et al. Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 166-174.
- [36] 李金洋, 刘荣厚, 袁海荣. 沼气生物脱硫反应器的选择和设计[J]. *农机化研究*, 2007, 29(3): 174-177.
LI J Y, LIU R H, YUAN H R. Selection and design of the biogas biological desulphurization reactor[J]. *Journal of Agricultural Mechanization Research*, 2007, 29(3): 174-177.
- [37] 李金洋, 敖永华, 刘庆玉. 沼气脱硫方法的研究[J]. *农机化研究*, 2008, 30(8): 228-230.
LI J Y, AO Y H, LIU Q Y. The research of biogas desulphurization technology[J]. *Journal of Agricultural Mechanization Research*, 2008, 30(8): 228-230.
- [38] SRISAWAT P, HIGUCHI-TAKEUCHI M, NUMATA K. Microbial autotrophic biorefineries: perspectives for biopolymer production[J]. *Polymer Journal*, 2022, 54(10): 1139-1151.
- [39] WU X M, MA G, LIU C Y, et al. Biosynthesis of pinene in purple non-sulfur photosynthetic bacteria[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 101.
- [40] BEEKWILDER J, VAN HOUWELINGEN A, CANKAR K, et al. Valencene synthase from the heartwood of Nootka cypress (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(2): 174-182.
- [41] KHAN N E, NYBO S E, CHAPPELL J, et al. Triterpene hydrocarbon production engineered into a metabolically versatile host—*Rhodobacter capsulatus*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(8): 1523-1532.
- [42] REVELLES O, TARAZONA N, GARCÍA J L, et al. Carbon roadmap from syngas to polyhydroxyalkanoates in *Rhodospirillum rubrum*[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(2): 708-720.
- [43] REVELLES O, BENEROSO D, MENÉNDEZ J A, et al. Syngas obtained by microwave pyrolysis of household wastes as feedstock for polyhydroxyalkanoate production in *Rhodospirillum rubrum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1412-1417.
- [44] 王西傅, 刘之慧, 詹毅, 等. 净化有机废水的光合细菌 S₁ 和 S₂ 菌株的分离鉴定[J]. *太阳能学报*, 1993, 14(1): 43-47.
WANG X P, LIU Z H, ZHAN Y, et al. The isolation and identification of photosynthetic bacteria S₁ and S₂ in purifying process of organic waste water[J]. *Acta Energetica Sinica*, 1993, 14(1): 43-47.
- [45] 杜翠红. 沼泽红假单胞菌 RubisCO 基因的克隆与表达及其固定二氧化碳特性的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2003.
DU C H. Cloning and expression of RubisCO gene from *Rhodospseudomonas palustris* for CO₂ fixation[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2003.
- [46] HEINRICH D, RABERG M, STEINBÜCHEL A. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from unrelated carbon sources in engineered *Rhodospirillum rubrum*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(8): fmv038.
- [47] 李艳丽, 胡佳俊, 付小花, 等. 非光合微生物菌群好氧固定 CO₂ 的研究[J]. *工业微生物*, 2009, 39(5): 1-6.
LI Y L, HU J J, FU X H, et al. CO₂ fixation with non-photosynthetic microbial flora under aerobic condition[J]. *Industrial Microbiology*, 2009, 39(5): 1-6.
- [48] 彭艳丽, 赵华章, 杨亲正, 等. 微生物及酶固定二氧化碳的研究进展[J]. *化学与生物工程*, 2010, 27(7): 10-13.
PENG Y L, ZHAO H Z, YANG Q Z, et al. Progress in microbial and enzyme immobilization of carbon dioxide[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2010, 27(7): 10-13.
- [49] BOWIEN B, SCHLEGEL H G. Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1981, 35: 405-452.
- [50] NISHIHARA H, IGARASHI Y, KODAMA T, et al. Production and properties of glycogen in the marine obligate chemolithoautotroph, *Hydrogenovibrio marinus*[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, 75(6): 414-416.
- [51] NGUYEN B T, KODAMA T, MINODA Y. Extracellular polysaccharide formed by *Pseudomonas hydrogenovorax*

- autotrophic culture and its physiological activities[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44(12): 2925-2930.
- [52] VOLOVA T G, ZHILA N O, KALACHEVA G S, et al. Effects of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) reserves on physiological-biochemical properties and growth of *Ralstonia eutropha*[J]. *Research in Microbiology*, 2013, 164(2): 164-171.
- [53] BAE S, KWAK K, KIM S, et al. Isolation and characterization of CO₂-fixing hydrogen-oxidizing marine bacteria[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(5): 442-448.
- [54] CLAASSENS N J, BORDANABA-FLORIT G, COTTON C A R, et al. Replacing the Calvin cycle with the reductive glycine pathway in *Cupriavidus necator*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 30-41.
- [55] ISHIZAKI A, TANAKA K, TAGA N. Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO₂[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(1/2): 6-12.
- [56] KIM S W, KIM J H, JEON S, et al. Effect of hyperthermophilic *Aeropyrum pernix* chaperonins on the soluble expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* alginate lyase in *E.coli*[C/OL]. 한국생물공학회 학술대회 학술대회 자료: 2011 추계학술대회 및 국제심포지움, 2011: 225[2023-06-01]. https://www.dbpia.co.kr/journal/articleDetail?nodeId=NODE02256717&language=ko_KR&hasTopBanner=true. KIM S W, KIM J H, JEON S, et al. Effect of hyperthermophilic *Aeropyrum pernix* chaperonins on the soluble expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* alginate lyase in *E.coli*[C/OL]. *Proceedings of the Korean Society of Biotechnology: 2011 Autumn Conference and International Symposium*, 2011: 225[2023-06-01]. https://www.dbpia.co.kr/journal/articleDetail?nodeId=NODE02256717&language=ko_KR&hasTopBanner=true.
- [57] YU J. Fixation of carbon dioxide by a hydrogen-oxidizing bacterium for value-added products[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(7): 89.
- [58] IGARASHI K, KATO S. Extracellular electron transfer in acetogenic bacteria and its application for conversion of carbon dioxide into organic compounds[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(16): 6301-6307.
- [59] BENGELSDORF F R, BECK M H, ERZ C, et al. Bacterial anaerobic synthesis gas (syngas) and CO₂ + H₂ fermentation[M/OL]. *Advances in applied microbiology*. Amsterdam: Elsevier, 2018: 143-221[2023-06-01]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065216418300029?via%3Dihub>.
- [60] SCHUCHMANN K, MÜLLER V. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(14): 4056-4069.
- [61] SCHIEL-BENGELSDORF B, DÜRRE P. Pathway engineering and synthetic biology using acetogens[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(15): 2191-2198.
- [62] 贾德臣, 姜卫红, 顾阳. 食气梭菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 374-387.
- JIA D C, JIANG W H, GU Y. Research progresses in gas-fermenting clostridia[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 374-387.
- [63] HUANG H, CHAI C S, LI N, et al. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Clostridium ljungdahlii*, an autotrophic gas-fermenting bacterium[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(12): 1355-1361.
- [64] LIEW F, HENSTRA A M, KÖPKE M, et al. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 104-114.
- [65] STRAUB M, DEMLER M, WEUSTER-BOTZ D, et al. Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 178: 67-72.
- [66] 姚伦, 周雍进. 一碳化合物生物利用和转化研究进展[J]. *化工进展*, 2023, 42(1): 16-29.
- YAO L, ZHOU Y J. Progress in microbial utilization of one-carbon feedstocks for biomanufacturing[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2023, 42(1): 16-29.
- [67] HOFFMEISTER S, GERDOM M, BENGELSDORF F R, et al. Acetone production with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 37-47.
- [68] BANERJEE A, LEANG C, UEKI T, et al. Lactose-inducible system for metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(8): 2410-2416.
- [69] UEKI T, NEVIN K P, WOODARD T L, et al. Converting carbon dioxide to butyrate with an engineered strain of *Clostridium ljungdahlii*[J]. *mBio*, 2014, 5(5): e01636-14.
- [70] BOMAR M, HIPPE H, SCHINK B. Lithotrophic growth and hydrogen metabolism by *Clostridium magnum*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 83(3): 347-349.
- [71] FLÜCHTER S, FOLLONIER S, SCHIEL-BENGELSDORF B, et al. Anaerobic production of poly(3-hydroxybutyrate) and its precursor 3-hydroxybutyrate from synthesis gas by autotrophic clostridia[J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(9): 3271-3282.
- [72] BOGORAD I W, LIN T S, LIAO J C. Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation[J]. *Nature*, 2013, 502(7473): 693-697.
- [73] LIN P P, JAEGER A J, WU T Y, et al. Construction and evolution of an *Escherichia coli* strain relying on nonoxidative glycolysis for sugar catabolism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018,

- 115(14): 3538-3546.
- [74] YANG X Y, YUAN Q Q, ZHENG Y Y, et al. An engineered non-oxidative glycolysis pathway for acetone production in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(8): 1359-1365.
- [75] MIYOSHI K, KAWAI R, NIIDE T, et al. Functional evaluation of non-oxidative glycolysis in *Escherichia coli* in the stationary phase under microaerobic conditions[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2023, 135(4): 291-297.
- [76] FAST A G, SCHMIDT E D, JONES S W, et al. Acetogenic mixotrophy: novel options for yield improvement in biofuels and biochemicals production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 33: 60-72.
- [77] 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.
- [78] JONES S W, FAST A G, CARLSON E D, et al. CO₂ fixation by anaerobic non-photosynthetic mixotrophy for improved carbon conversion[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12800.
- [79] DINER B A, FAN J, SCOTCHER M C, et al. Synthesis of heterologous mevalonic acid pathway enzymes in *Clostridium ljungdahlii* for the conversion of fructose and of syngas to mevalonate and isoprene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(1): e01723-17.
- [80] GREENE D N, WHITNEY S M, MATSUMURA I. Artificially evolved *Synechococcus* PCC 6301 Rubisco variants exhibit improvements in folding and catalytic efficiency[J]. *The Biochemical Journal*, 2007, 404(3): 517-524.
- [81] MUELLER-CAJAR O, MORELL M, WHITNEY S M. Directed evolution of rubisco in *Escherichia coli* reveals a specificity-determining hydrogen bond in the form II enzyme [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(49): 14067-14074.
- [82] ZHUANG Z Y, LI S Y. Rubisco-based engineered *Escherichia coli* for *in situ* carbon dioxide recycling[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 150: 79-88.
- [83] LI Y H, OUYANG F Y, YANG C H, et al. The coupling of glycolysis and the Rubisco-based pathway through the non-oxidative pentose phosphate pathway to achieve low carbon dioxide emission fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 187: 189-197.
- [84] PARIKH M R, GREENE D N, WOODS K K, et al. Directed evolution of RuBisCO hypermorphs through genetic selection in engineered *E. coli*[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2006, 19(3): 113-119.
- [85] KANNO M, CARROLL A L, ATSUMI S. Global metabolic rewiring for improved CO₂ fixation and chemical production in cyanobacteria[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14724.
- [86] KAMKENG A D N, WANG M H, HU J, et al. Transformation technologies for CO₂ utilisation: current status, challenges and future prospects[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 409: 128138.
- [87] QUAYLE J R, FERENCI T. Evolutionary aspects of autotrophy [J]. *Microbiological Reviews*, 1978, 42(2): 251-273.
- [88] PFEIFENSCHNEIDER J, BRAUTASET T, WENDISCH V F. Methanol as carbon substrate in the bio-economy: metabolic engineering of aerobic methylotrophic bacteria for production of value-added chemicals[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2017, 11(4): 719-731.
- [89] LEDEBOER A M, EDENS L, MAAT J, et al. Molecular cloning and characterization of a gene coding for methanol oxidase in *Hansenula polymorpha*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13(9): 3063-3082.
- [90] CREGG J M, MADDEN K R, BARRINGER K J, et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1989, 9(3): 1316-1323.
- [91] SAKAI Y, TANI Y. Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (*AOD1*) from the formaldehyde-producing asporogeneous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2[J]. *Gene*, 1992, 114(1): 67-73.
- [92] YURIMOTO H, SAKAI Y, KATO N. Methanol metabolism[M/OL]//*Hansenula polymorpha: biology and applications*. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2002: 61-75[2023-06-01]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/3527602356.ch5>.
- [93] CHEN F Y H, JUNG H W, TSUEI C Y, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 933-946.e14.
- [94] YURIMOTO H, OKU M, SAKAI Y. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis[J]. *International Journal of Microbiology*, 2011, 2011: 101298.
- [95] YURIMOTO H, KATO N, SAKAI Y. Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism[J]. *Chemical Record*, 2005, 5(6): 367-375.
- [96] ZHANG W M, ZHANG T, WU S H, et al. Guidance for engineering of synthetic methylotrophy based on methanol metabolism in methylotrophy[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(7): 4083-4091.
- [97] FILLET S, ADRIO J L. Microbial production of fatty alcohols [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(9): 152.
- [98] 熊向华, 刘志敏, 陈惠鹏. 多形汉逊酵母研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(5): 771-774.
- XIONG X H, LIU Z M, CHEN H P. Advances in the research of *Hansenula polymorpha*[J]. *Letters in Biotechnology*, 2006, 17(5): 771-774.
- [99] KATA I, SEMKIV M V, RUCHALA J, et al. Overexpression of the genes *PDC1* and *ADH1* activates glycerol conversion to

- ethanol in the thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*[J]. *Yeast*, 2016, 33(8): 471-478.
- [100] 钱卫东, 施春阳, 王婷. 多形汉逊酵母作为细胞工厂的应用研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(4): 55-59.
QIAN W D, SHI C Y, WANG T. Progress in research on the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* cell factory[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(4): 55-59.
- [101] 刘爽, 高教琪, 薛闯, 等. 多形汉逊酵母提高生长性能的培养基优化[J]. *生物加工过程*, 2020, 18(1): 117-125.
LIU S, GAO J Q, XUE C, et al. Medium optimization for growth of *Ogataea polymorpha*[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2020, 18(1): 117-125.
- [102] GAO J Q, LI Y X, 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.
- [103] ZHAI X X, GAO J Q, LI Y X, et al. Peroxisomal metabolic coupling improves fatty alcohol production from sole methanol in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(12): e2220816120.
- [104] BECKER J, WITTMANN C. Advanced biotechnology: metabolically engineered cells for the bio-based production of chemicals and fuels, materials, and health-care products[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(11): 3328-3350.
- [105] DAI Z X, GU H L, ZHANG S J, et al. Metabolic construction strategies for direct methanol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1407-1412.
- [106] ZHU W L, CUI J Y, CUI L Y, et al. Bioconversion of methanol to value-added mevalonate by engineered *Methylobacterium extorquens* AM1 containing an optimized mevalonate pathway [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(5): 2171-2182.
- [107] MA Z X, ZHANG M, ZHANG C T, et al. Metabolomic analysis improves bioconversion of methanol to isobutanol in *Methylorubrum extorquens* AM1[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(6): e2000413.
- [108] CHEN C T, CHEN F Y H, BOGORAD I W, et al. Synthetic methanol auxotrophy of *Escherichia coli* for methanol-dependent growth and production[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 257-266.
- [109] YISHAI O, LINDNER S N, DE LA CRUZ J G, et al. The formate bio-economy[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 35: 1-9.
- [110] Engineered *E. coli* using formic acid and CO₂ as a C₁-refinery platform strain[R/OL]. (2018-09-18) [2023-05-01]. <https://www.eurekaalert.org/news-releases/475081>.
- [111] BAR-EVEN A, NOOR E, FLAMHOLZ A, et al. Design and analysis of metabolic pathways supporting formatotrophic growth for electricity-dependent cultivation of microbes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Bioenergetics*, 2013, 1827(8/9): 1039-1047.
- [112] 徐蓉, 邓王姝颖, 姜卫红, 等. 甲酸生物利用的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1031-1040.
XU R, DENG W S Y, JIANG W H, et al. Progress in biological utilization of formic acid[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1031-1040.
- [113] CROWTHER G J, KOSÁLY G, LIDSTROM M E. Formate as the main branch point for methylotrophic metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(14): 5057-5062.
- [114] DRAKE H L, KÜSEL K, MATTHIES C. Acetogenic prokaryotes [M/OL]// DWORKIN M, FALKOW S, ROSENBERG E, et al. *The Prokaryotes*. New York: Springer, 2006[2023-06-01]. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30742-7_13.
- [115] 郭峰, 张尚杰, 蒋羽佳, 等. 一碳资源在酵母中的利用与转化 [J]. *化工进展*, 2023, 42(1): 30-39.
GUO F, ZHANG S J, JIANG Y J, et al. Biotransformation of one-carbon resources by yeast[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2023, 42(1): 30-39.
- [116] 毛雯. 利用定向进化提高基因工程大肠杆菌的甲酸利用能力[D]. 天津: 天津大学, 2020.
MAO W. Directed evolution to improve formate utilization in genetically engineered *E. coli*[D]. Tianjin: Tianjin University, 2020.
- [117] KIM S J, YOON J, IM D K, et al. Adaptively evolved *Escherichia coli* for improved ability of formate utilization as a carbon source in sugar-free conditions[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 207.
- [118] YISHAI O, BOUZON M, DÖRING V, et al. *In vivo* assimilation of one-carbon via a synthetic reductive glycine pathway in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(9): 2023-2028.
- [119] BANG J, HWANG C H, AHN J H, et al. *Escherichia coli* is engineered to grow on CO₂ and formic acid[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(12): 1459-1463.
- [120] HONG Y, ARBTER P, WANG W, et al. Introduction of glycine synthase enables uptake of exogenous formate and strongly impacts the metabolism in *Clostridium pasteurianum*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(3): 1366-1380.
- [121] LAMA S M, KIM Y, NGUYEN D T, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from acetate using metabolically-engineered and glucose-grown *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 320(Pt A): 124362.
- [122] CHANG Z S, DAI W, MAO Y F, et al. Enhanced 3-hydroxypropionic acid production from acetate via the malonyl-CoA pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 9:

- 808258.
- [123] YANG S Y, LI S H, JIA X Q. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate from acetate by engineered *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(6): 793-800.
- [124] WEI N, QUARTERMAN J, KIM S R, et al. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast[J]. Nature Communications, 2013, 4: 2580.
- [125] HUANG X F, SHEN Y, LUO H J, et al. Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid[J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 395-401.
- [126] GONG G P, ZHANG X, TAN T W. Simultaneously enhanced intracellular lipogenesis and β -carotene biosynthesis of *Rhodotorula glutinis* by light exposure with sodium acetate as the substrate[J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122274.
- [127] CHEN L, YAN W, QIAN X J, et al. Increased lipid production in *Yarrowia lipolytica* from acetate through metabolic engineering and cosubstrate fermentation[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(11): 3129-3138.
- [128] KÖVILEIN A, UMPFENBACH J, OCHSENREITHER K. Acetate as substrate for L-malic acid production with *Aspergillus oryzae* DSM 1863[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 48.
- [129] LI Y J, HUANG B, WU H, et al. Production of succinate from acetate by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(11): 1299-1307.
- [130] HUANG B, YANG H, FANG G C, et al. Central pathway engineering for enhanced succinate biosynthesis from acetate in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(4): 943-954.
- [131] LI W, CHEN J, LIU C X, et al. Microbial production of glycolate from acetate by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 291: 41-45.
- [132] YU Y, SHAO M Y, LI D, et al. Construction of a carbon-conserving pathway for glycolate production by synergetic utilization of acetate and glucose in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 61: 152-159.
- [133] DA Y Y, LIU Z H, ZHU R, et al. Coupling of glucose and acetate for the production of pyruvate by engineered *Escherichia coli*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 170: 107990.
- [134] NOH M H, LIM H G, WOO S H, et al. Production of itaconic acid from acetate by engineering acid-tolerant *Escherichia coli* W[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(3): 729-738.
- [135] MERKEL M, KIEFER D, SCHMOLLACK M, et al. Acetate-based production of itaconic acid with *Corynebacterium glutamicum* using an integrated pH-coupled feeding control[J]. Bioresource Technology, 2022, 351: 126994.
- [136] ZHOU S F, LAMA S M, JIANG J H, et al. Use of acetate for the production of 3-hydroxypropionic acid by metabolically-engineered *Pseudomonas denitrificans*[J]. Bioresource Technology, 2020, 307: 123194.
- [137] LAI N Y, LUO Y C, FEI P, et al. One stone two birds: biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from CO₂ and syngas-derived acetic acid in *Escherichia coli*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(3): 144-152.
- [138] LEE J, CHA S, KANG C E, et al. Efficient conversion of acetate to 3-hydroxypropionic acid by engineered *Escherichia coli*[J]. Catalysts, 2018, 8(11): 525.
- [139] XU X, XIE M, ZHAO Q A, et al. Microbial production of mevalonate by recombinant *Escherichia coli* using acetic acid as a carbon source[J]. Bioengineered, 2018, 9(1): 116-123.
- [140] LEE H M, JEON B Y, OH M K. Microbial production of ethanol from acetate by engineered *Ralstonia eutropha*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2016, 21(3): 402-407.
- [141] YANG H, ZHANG C, LAI N Y, et al. Efficient isopropanol biosynthesis by engineered *Escherichia coli* using biologically produced acetate from syngas fermentation[J]. Bioresource Technology, 2020, 296: 122337.
- [142] SONG H S, SEO H M, JEON J M, et al. Enhanced isobutanol production from acetate by combinatorial overexpression of acetyl-CoA synthetase and anaplerotic enzymes in engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(8): 1971-1978.
- [143] NOVAK K, KUTSCHA R, PFLÜGL S. Microbial upgrading of acetate into 2,3-butanediol and acetoin by *E. coli* W[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 177.
- [144] CHEN J, LI W, ZHANG Z Z, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of polyhydroxyalkanoates using acetate as a main carbon source[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 102.
- [145] SHI L L, DA Y Y, ZHENG W T, et al. Production of polyhydroxyalkanoate from acetate by metabolically engineered *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(3): 290-294.
- [146] GONG Z W, ZHOU W T, SHEN H W, et al. Co-fermentation of acetate and sugars facilitating microbial lipid production on acetate-rich biomass hydrolysates[J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 102-108.
- [147] LIU L J, ZHAO Y, JIANG X X, et al. Lipid accumulation of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation using

- acetate and ammonium[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 262: 342-346.
- [148] HU P, CHAKRABORTY S, KUMAR A, et al. Integrated bioprocess for conversion of gaseous substrates to liquids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(14): 3773-3778.
- [149] QIAN X J, GORTE O, CHEN L, et al. Continuous self-provided fermentation for microbial lipids production from acetate by using oleaginous yeasts *Cryptococcus podzolicus* and *Trichosporon porosum*[J]. *Renewable Energy*, 2020, 146: 737-743.
- [150] ZHANG W, WU J, ZHOU Y J, et al. Enhanced lipid production by *Rhodotorula glutinis* CGMCC 2.703 using a two-stage pH regulation strategy with acetate as the substrate [J]. *Energy Science & Engineering*, 2019, 7(5): 2077-2085.
- [151] TASHIRO Y, DESAI S H, ATSUMI S. Two-dimensional isobutyl acetate production pathways to improve carbon yield [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7488.
- [152] GONG G P, WU B, LIU L P, et al. Metabolic engineering using acetate as a promising building block for the production of bio-based chemicals[J]. *Engineering Microbiology*, 2022, 2 (4): 100036.
- [153] KESSLER D, LEIBRECHT I, KNAPPE J. Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*[J]. *FEBS Letters*, 1991, 281(1/2): 59-63.
- [154] MEMBRILLO-HERNÁNDEZ J, ECHAVE P, CABISCOL E, et al. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(43): 33869-33875.
- [155] LIANG H, MA X Q, NING W B, et al. Constructing an ethanol utilization pathway in *Escherichia coli* to produce acetyl-CoA derived compounds[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 65: 223-231.
- [156] LU J F, WANG Y Y, XU M C, et al. Efficient biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from ethanol in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127907.
- [157] WANG Y Y, LU J F, XU M C, et al. Efficient biosynthesis of isopropanol from ethanol by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(41): 13857-13864.
- [158] LI G W, WEI X L, WU R, et al. Stoichiometric conversion of maltose for biomanufacturing by *in vitro* synthetic enzymatic biosystems[J]. *BioDesign Research*, 2022, 2022: 9806749.
- [159] ARESTA M, DIBENEDETTO A, QUARANTA E. Reaction mechanisms in carbon dioxide conversion[M/OL]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016[2023-06-01]. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-46831-9>.
- [160] ARESTA M, QUARANTA E, LIBERIO R, et al. Enzymatic synthesis of 4-OH-benzoic acid from phenol and CO₂: the first example of a biotechnological application of a carboxylase enzyme[J]. *Tetrahedron*, 1998, 54(30): 8841-8846.
- [161] OBERT R, DAVE B C. Enzymatic conversion of carbon dioxide to methanol: enhanced methanol production in silica sol-gel matrices[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(51): 12192-12193.
- [162] SHI J F, JIANG Y J, JIANG Z Y, et al. Enzymatic conversion of carbon dioxide[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(17): 5981-6000.
- [163] LU Y, JIANG Z Y, XU S W, et al. Efficient conversion of CO₂ to formic acid by formate dehydrogenase immobilized in a novel alginate-silica hybrid gel[J]. *Catalysis Today*, 2006, 115 (1/2/3/4): 263-268.
- [164] YADAV R K, BAEG J O, OH G H, et al. A photocatalyst - enzyme coupled artificial photosynthesis system for solar energy in production of formic acid from CO₂[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(28): 11455-11461.
- [165] YADAV R K, BAEG J O, KUMAR A, et al. Graphene-BODIPY as a photocatalyst in the photocatalytic-biocatalytic coupled system for solar fuel production from CO₂[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2014, 2(14): 5068-5076.
- [166] SULTANA S, SAHOO P C, MARTHA S, et al. A review of harvesting clean fuels from enzymatic CO₂ reduction[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(50): 44170-44194.
- [167] APPEL A M, BERCAW J E, BOCARSLY A B, et al. Frontiers, opportunities, and challenges in biochemical and chemical catalysis of CO₂ fixation[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(8): 6621-6658.
- [168] PARKIN A, SERAVALLI J, VINCENT K A, et al. Rapid and efficient electrocatalytic CO₂/CO interconversions by carboxydotherrmus hydrogenoformans CO dehydrogenase I on an electrode[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(34): 10328-10329.
- [169] ÜNLÜ A, DUMAN-ÖZDAMAR Z E, ÇALOĞLU B, et al. Enzymes for efficient CO₂ conversion[J]. *The Protein Journal*, 2021, 40(4): 489-503.
- [170] SHIN W, LEE S H, SHIN J W, et al. Highly selective electrocatalytic conversion of CO₂ to CO at -0.57 V (NHE) by carbon monoxide dehydrogenase from *Moorella thermoacetica* [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(48): 14688-14689.
- [171] WOOLERTON T W, SHEARD S, REISNER E, et al. Efficient and clean photoreduction of CO₂ to CO by enzyme-modified TiO₂ nanoparticles using visible light[J]. *Journal of the*

- American Chemical Society, 2010, 132(7): 2132-2133.
- [172] WOOLERTON T W, SHEARD S, PIERCE E, et al. CO₂ photoreduction at enzyme-modified metal oxidenanoparticles [J]. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(7): 2393-2399.
- [173] SEEFELDT L C, RASCHE M E, ENSIGN S A. Carbonyl sulfide and carbon dioxide as new substrates, and carbon disulfide as a new inhibitor, of nitrogenase[J]. *Biochemistry*, 1995, 34(16): 5382-5389.
- [174] YANG Z Y, MOURE V R, DEAN D R, et al. Carbon dioxide reduction to methane and coupling with acetylene to form propylene catalyzed by remodeled nitrogenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(48): 19644-19648.
- [175] MELDRUM N U, ROUGHTON F J W. Carbonic anhydrase. its preparation and properties[J]. *The Journal of Physiology*, 1933, 80(2): 113-142.
- [176] GIRI A, CHAUHAN S, SHARMA T, et al. Recent advances in enzymatic conversion of carbon dioxide into value-added product[M/OL]//PANT D, KUMAR NADDA A, PANT K K, et al. *Advances in carbon capture and utilization*. Singapore: Springer, 2021: 313-326[2023-06-01]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-16-0638-0_14.
- [177] VEITCH F P, BLANKENSHIP L C. Carbonic anhydrase in bacteria[J]. *Nature*, 1963, 197(4862): 76-77.
- [178] JENSEN E L, CLEMENT R, KOSTA A, et al. A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(8): 2094-2106.
- [179] WU Z H, NAN Y, ZHAO Y, et al. Immobilization of carbonic anhydrase for facilitated CO₂ capture and separation[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2020, 28(11): 2817-2831.
- [180] DEL PRETE S, NOCENTINI A, SUPURAN C T, et al. Bacterial α -carbonic anhydrase: a new active class of carbonic anhydrase identified in the genome of the Gram-negative bacterium *Burkholderia territorii*[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020, 35(1): 1060-1068.
- [181] SAVILE C K, LALONDE J J. Biotechnology for the acceleration of carbon dioxide capture and sequestration[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(6): 818-823.
- [182] ZHANG S H, LU H, LU Y Q. Enhanced stability and chemical resistance of a new nanoscale biocatalyst for accelerating CO₂ absorption into a carbonate solution[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(23): 13882-13888.
- [183] 梁珊, 宗敏华, 娄文勇. 酶法催化二氧化碳制备高附加值化学品研究进展[J]. *化学学报*, 2019, 77(11): 1099-1114.
- LIANG S, ZONG M H, LOU W Y. Recent advances in enzymatic catalysis for preparation of high value-added chemicals from carbon dioxide[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2019, 77(11): 1099-1114.
- [184] GLUECK S M, GÜMÜS S, FABIAN W M F, et al. Biocatalytic carboxylation[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(1): 313-328.
- [185] ALLEN J R, ENSIGN S A. Carboxylation of epoxides to beta-keto acids in cell extracts of *Xanthobacter* strain Py2[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(5): 1469-1472.
- [186] ARESTA M, DIBENEDETTO A. Development of environmentally friendly syntheses: use of enzymes and biomimetic systems for the direct carboxylation of organic substrates[J]. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2002, 90(2): 113-128.
- [187] OMURA H, WIESER M, NAGASAWA T. Pyrrole-2-carboxylate decarboxylase from *Bacillus megaterium* PYR2910, an organic-acid-requiring enzyme[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 253(2): 480-484.
- [188] MIYAZAKI M, SHIBUE M, OGINO K, et al. Enzymatic synthesis of pyruvic acid from acetaldehyde and carbon dioxide [J]. *Chemical Communications*, 2001(18): 1800-1801.
- [189] KUWABATA S, TSUDA R, YONEYAMA H. Electrochemical conversion of carbon dioxide to methanol with the assistance of formate dehydrogenase and methanol dehydrogenase as biocatalysts[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(12): 5437-5443.
- [190] BASKAYA F S, ZHAO X Y, FLICKINGER M C, et al. Thermodynamic feasibility of enzymatic reduction of carbon dioxide to methanol[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162(2): 391-398.
- [191] XU S W, LU Y, LI J A, et al. Efficient conversion of CO₂ to methanol catalyzed by three dehydrogenases co-encapsulated in an alginate-silica (ALG-SiO₂) hybrid gel[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2006, 45(13): 4567-4573.
- [192] SUN Q Y, JIANG Y J, JIANG Z Y, et al. Green and efficient conversion of CO₂ to methanol by biomimetic coimmobilization of three dehydrogenases in protamine-templated titania[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2009, 48(9): 4210-4215.
- [193] JIANG Y J, SUN Q Y, ZHANG L, et al. Capsules-in-bead scaffold: a rational architecture for spatially separated multienzyme cascade system[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19(47): 9068-9074.
- [194] WANG X L, LI Z, SHI J F, et al. Bioinspired approach to multienzyme cascade system construction for efficient carbon dioxide reduction[J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(3): 962-972.
- [195] EL-ZAHAB B, DONNELLY D, WANG P. Particle-tethered NADH for production of methanol from CO₂ catalyzed by coimmobilized enzymes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*,

- 2008, 99(3): 508-514.
- [196] CAZELLES R, DRONE J, FAJULA F, et al. Reduction of CO₂ to methanol by a polyenzymatic system encapsulated in phospholipids-silica nanocapsules[J]. *New Journal of Chemistry*, 2013, 37(11): 3721-3730.
- [197] TONG X D, EL-ZAHAB B, ZHAO X Y, et al. Enzymatic synthesis of L-lactic acid from carbon dioxide and ethanol with an inherent cofactor regeneration cycle[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(2): 465-469.
- [198] SCHWANDER T, SCHADA VON BORZYSKOWSKI L, BURGNER S, et al. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*[J]. *Science*, 2016, 354(6314): 900-904.
- [199] SUNDARAM S, DIEHL C, CORTINA N S, et al. A modular *in vitro* platform for the production of terpenes and polyketides from CO₂[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(30): 16420-16425.
- [200] DIEHL C, GERLINGER P D, PACZIA N, et al. Synthetic anaplerotic modules for the direct synthesis of complex molecules from CO₂[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(2): 168-175.
- [201] LI Z L, SHEN S, LI Z M. Towards the conversion of CO₂ into optically pure *N*-carbamoyl-L-aspartate and orotate by an *in vitro* multi-enzyme cascade[J]. *Green Chemistry*, 2020, 22(17): 5798-5805.
- [202] CAI T, SUN H B, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide[J]. *Science*, 2021, 373(6562): 1523-1527.



通讯作者: 顾阳(1977—),男,研究员。研究方向为一碳生物转化。
E-mail: ygu@cemps.ac.cn



第一作者: 叶伟(1995—),男,实验师。研究方向为微生物代谢调控与代谢工程。
E-mail: wye@cemps.ac.cn



第一作者: 李茵(2001—),女,硕士研究生。研究方向为微生物代谢调控与代谢工程。
E-mail: lirui21@cemps.ac.cn