特约评述

DOI:10.12211/2096-8280.2026-034

逆β-氧化途径工程化：从有机废弃物到中链脂肪酸

朱俊羿，肖婧，王少杰，苏海佳
（北京化工大学，绿色生物制造全国重点实验室，绿色化学品生物制造北京市重点实验室，国家生物炼制能源研发中心，北京合成生物制造技术创新中心，北京 100029）

摘要：全球有机废弃物产生量正逐年攀升，而传统处理工艺却难以实现废弃物中碳资源的高效回收与转化。逆β-氧化（RBO）途径作为一类循环型碳链延长平台，凭借其碳原子经济性高、能量输入形式单一、酶学组成精简等优势，其工程化改造为有机废弃物的“碳升级”提供了极具前景的合成生物学路径。现有综述多聚焦于工程化RBO途径的代谢工程改造策略，尚缺乏将其与有机废弃物处理相衔接的策略性视角。本文系统综述了工程化RBO途径的研究进展，涵盖途径移植与模块化重构、碳流重定向、还原力平衡调控及产物谱拓展等代谢工程策略，并分析了针对产物毒性的应对方法。在此基础上，本文进一步勾勒出RBO途径“模式底物-废弃物特征组分-真实复杂废弃物”的递进式研究路线图，并提出以合成共培养体系作为理性设计通向应用落地的衔接桥梁，系统分析了其弥合纯培养与混菌发酵之间鸿沟的潜力与挑战。围绕途径通量精准调控、新型酶挖掘、工业化应用菌株构建和开放环境鲁棒性提升等核心瓶颈，展望了未来将工程化RBO途径从实验室推向有机废弃物高值转化工业应用的研究方向。本文旨在融合合成生物学的设计能力与环境工程的场景认知，为推动工程化RBO途径从模式研究走向废弃物真实场景的高效应用提供理论支撑。

关键词：逆β-氧化；链延长；代谢工程；中链脂肪酸；有机废弃物；合成微生物群落；共培养

中图分类号：Q81　　**文献标志码：**A

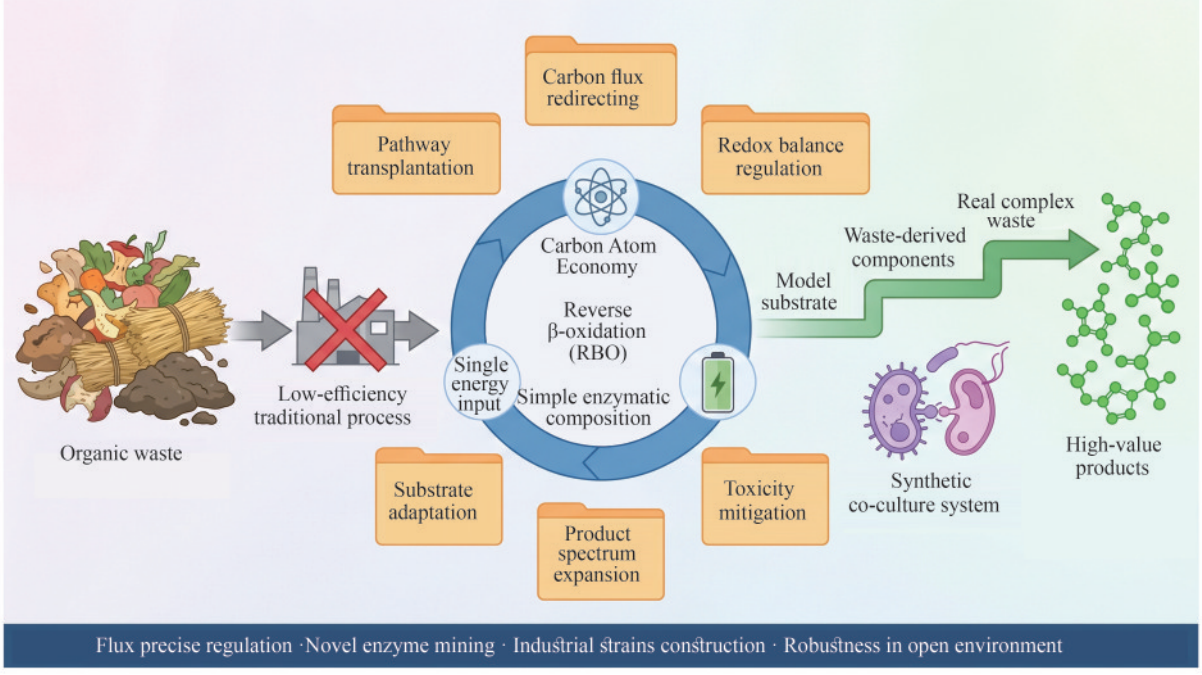
Engineering of reverse β-oxidation（RBO）pathway：converting organic waste into medium-chain fatty acids

ZHU Junyi，XIAO Jing，WANG Shaojie，SU Haijia
（*Beijing University of Chemical Technology*，*State Key Laboratory of Green Biomanufacturing*，*Beijing Key Laboratory of Green Chemicals Biomanufacturing*，*National Energy R&D Center for Biorefinery*，*Beijing Synthetic Bio-manufacturing Technology Innovation Center*，*Beijing 100029*，*China*）

Abstract: Global organic waste generation continues to rise year after year, while conventional treatment processes

收稿日期：2026-04-30 修回日期：2026-06-30
基金项目：国家自然科学基金（22578021，22308018）；北京自然科学基金（2252017）；中国教育部基础与交叉学科突破计划（JYB2025XDXM509）；中央高校基本科研业务费专项资金（buctrc202341，JD2621，PY2604）
引用本文：朱俊羿，肖婧，王少杰，苏海佳. 逆β-氧化途径工程化:从有机废弃物到中链脂肪酸[J]. 合成生物学，2026，7(5)：1202-1225
Citation：ZHU Junyi，XIAO Jing，WANG Shaojie，SU Haijia. Engineering of reverse β-oxidation（RBO）pathway：converting organic waste into medium-chain fatty acids[J]. Synthetic Biology Journal，2026，7(5)：1202-1225

are struggling to efficiently recover and convert the carbon resources contained in this type of waste. The reverse β-oxidation (RBO) pathway, a cyclic carbon chain elongation platform, offers distinct advantages, such as high carbon atom economy, single energy input form, and streamlined enzymatic composition. Engineering this pathway thus represents a highly promising synthetic biology route for the 'carbon upgrading' of organic waste. Existing reviews have largely focused on metabolic engineering strategies for the RBO pathway, yet a strategic perspective that explicitly connects these engineering efforts with organic waste processing remains lacking. This review systematically summarizes progress in engineering the RBO pathway, covering metabolic engineering strategies including pathway transplantation and modular reconstruction, carbon flux redirection, redox balance regulation, and product spectrum expansion, as well as approaches to counter product toxicity. Building upon this, we delineate a progressive research roadmap for the RBO pathway—"model substrates → characteristic waste components → real complex wastes"—and propose synthetic co-culture systems as a bridging link that connects rational design to practical application. We then systematically analyze the potential and challenges of such systems in closing the gap between pure-culture rational design and mixed-culture fermentation. Finally, focusing on key bottlenecks, including precise pathway flux regulation, mining of novel enzymes, construction of industrial strains, and enhancement of robustness in open environments, we offer perspectives on future research directions to advance the engineered RBO pathway from the laboratory toward industrial applications for high-value conversion of organic waste. This review aims to integrate the design capabilities of synthetic biology with the contextual understanding of environmental engineering, thereby providing theoretical support for transitioning engineered RBO pathways from model studies to efficient application in real waste scenarios.



Keywords: reverse β-oxidation pathway; chain elongation; metabolic engineering; medium-chain fatty acids; organic waste; synthetic consortia; co-culture

随着全球废弃物产生量持续增长，富含可利用碳源的有机废弃物逐渐成为资源化转化研究的重点对象。以食物垃圾为代表的有机组分在城市固体废弃物中占据较高比例，其高效处理与高值

转化有助于缓解环境压力并促进碳资源的循环利用[1]。在“双碳”战略与有关废弃物循环利用政策的推动下，发展有机废弃物可持续转化技术已成为污染减排与资源利用协同发展的有效途径[2-3]。

目前主流的卫生填埋、焚烧处理、传统堆肥和厌氧消化工艺对有机废弃物中单糖、短链有机酸和醇类等低值碳资源利用程度有限，碳流多以气体形式耗散，难以支撑深度减排目标。为此，处理理念需由被动“消纳”转向主动“碳升级”，即对废弃碳骨架实施精准重构与链长延伸，以合成高附加值产物[4-6]。然而，天然微生物体系下的碳代谢网络高度耦合且受制于热力学瓶颈，仅凭自发反应难以高效实现碳链的延伸与产物的定向合成。此时，合成生物技术的介入为破解上述困局提供了系统性的工具支撑：通过对底盘细胞代谢通路的工程化重构与途径酶的理性设计，合成生物学能够对废弃碳骨架实施精准的重排、延长与功能化修饰，从而将碳升级理念从理论构想转化为可放大的技术现实[7-10]。

在此背景下，碳链延长途径因其具备实现更高程度的碳固定与价值提升潜力而受到广泛关注（表1）。较为常见的碳链延长途径包括脂肪酸生物合成途径（fatty acid biosynthesis pathway， FAS）、萜类合成途径（terpenoid biosynthesis pathway）以及聚酮合成途径等（polyketide biosynthesis pathway， PKS）[11-13]。然而，这些途径都存在固有缺陷，如形成延伸单元的能量消耗高、代谢通路冗长且调控网络复杂、代谢途径通量普遍较低，从而导致最终产物的得率与滴度有限。与此形成鲜明对比的是，以逆β-氧化（reverse β-oxidation，RBO）途径为代表的循环型链延长途径展现出独特优势。该途径通过非脱羧克莱森缩合反应（Claisen condensation reaction）实现酰基辅酶A分子间的缩合，链延长过程无二氧化碳释放；其核心循环通常由硫解酶（thiolase， THL）、3-羟酰基辅酶A脱氢酶（3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase，HACD）、烯酰辅酶A水合酶（enoyl-CoA hydratase， ECH）、烯酰辅酶A还原酶（enoyl-CoA reductase， ECR）等少数酶促步骤组成，调控相对简明。与依赖ATP活化或脱羧缩合的链延长体系不同，RBO途径在循环延长过程中不直接消耗ATP，其还原力输入主要集中于3-羟酰基辅酶A脱氢反应和烯酰辅酶A还原反应，并可根据所选酶的辅因子偏好由NADH或NADPH提供。得益于循环缩合的反应特征，RBO途径可在不同起始酰基辅酶A和延伸循环次数下生成多种链长的脂肪酸及其衍生物，不仅拓展了产物多样性空间，也在碳原子保留和能量利用方面体现出优势，从而为有机废弃物资源化利用中的碳升级目标提供了具有潜力的技术路径[14-15]。

当前关于RBO途径的研究多集中于利用天然链延长菌群转化有机废弃物。然而，这类基于天然菌群的体系代谢机制尚不明确、过程可控性不佳，难以满足碳升级对精准调控的要求。合成生物学虽为RBO途径的工程化改造创造了可行条件，现有工作却多限于模式底物与纯菌体系，对复杂真实基质的适应性关注不足。反观环境工程领域，基于混合菌群的链延长工艺已在餐厨、污泥等场景中验证了其应用可行性与系统鲁棒性。上述两类研究恰好互为镜像：前者深耕机制解析却远离真实场景，后者扎根实践应用却缺乏机理支撑。本文以工程化RBO途径为主线，辅以传统菌群应用研究为参照，旨在融合合成生物学的设计能力与环境工程的场景认知，为推动工程化RBO途径

表1 RBO途径与其他代表性天然链延长途径的比较

Table 1 Comparison of RBO pathway and other representative natural chain-elongation pathways

链延长途径	延伸单元	每轮净增碳数	延伸单元碳保留率	能量输入
逆β-氧化（RBO）	乙酰辅酶A	+2C	2/2(100%)	无ATP消耗
脂肪酸合成途径（FAS）	丙二酰辅酶A	+2C	2/3(66.7%)	丙二酰辅酶A形成
聚酮合成途径（PKS）	通常为丙二酰辅酶A	通常+2C	通常为2/3(66.7%)	通常为丙二酰辅酶A形成
萜类合成途径	异戊烯基二磷酸（isopentenyl diphosphate, IPP）/二甲基烯丙基二磷酸（dimethylallyl diphosphate, DMAPP）	+5C	5/5(100%)	IPP、DMAPP形成

从模式研究走向废弃物真实场景的高效应用提供理论支撑。

1　RBO 途径的反应机制

RBO 途径最早被发现于克氏梭菌（*Clostridium kluyveri*）。1942 年，Barker 和 Taha 从自然界中分离获得一株可以利用乙醇和乙酸生长并积累己酸的 *C. kluyveri*，后续研究表明，该菌株通过 RBO 途径实现如乙酸等短链脂肪酸的碳链延伸[16]。除此之外，RBO 途径同样存在于众多具有链延长能力的微生物中。例如，埃氏巨型球菌（*Megasphaera elsdenii*）利用 RBO 反应将乳酸及其衍生中间体转化为短链或中链脂肪酸，而食一氧化碳梭菌（*Clostridium carboxidivorans*）则在合成更长链的酸和醇的过程中，采用类似的链延长反应。此外，一些产己酸细菌如食半乳糖醇产己酸菌（*Caproiciproducens galactitolivorans*）以及多种瘤胃和肠道微生物，也都携带有 RBO 相关的酶和代谢模块。随着研究的深入，研究人员发现 RBO 途径本质上是脂肪酸 β-氧化途径的逆过程：二者具有相同的核心酶类和循环反应步骤，但反应方向相反——RBO 途径以 C_2 单元进行碳链延长，而 β-氧化途径则以 C_2 单元进行碳链降解[17]。

从酶学组成来看，RBO 途径是一个以 5 种酶协同驱动的碳链延伸系统，包括 THL、HACD、ECH、ECR 以及硫酯酶（thioesterase，TES）。根据承担的功能差异，这 5 种酶可划分为三个模块：缩合模块、延伸模块和终止模块（图 1）[18]。

缩合模块是 RBO 途径的起始，负责启动碳链延伸反应。该模块以 THL 为核心，可识别不同链长的酰基辅酶 A 作为引物（primer）并以乙酰辅酶 A 作为延伸单元（extension unit），催化非脱羧克莱森缩合反应生成 3-酮酰基辅酶 A（3-ketoacyl-CoA），从而完成引物与延伸单元之间的碳—碳键连接[19]。

延伸模块是 RBO 途径的核心，负责碳链的循环延伸与中间产物的修饰。该模块由 4 种酶依次催化完成一轮 4 步酶促反应。第 1 步反应仍由 THL 催化。但此时其功能是衔接第 n 轮与第 n+1 轮循环，保证新一轮缩合反应的顺利进行。随后的 3 步反应则由 HACD、ECH 和 ECR 协同完成，将 3-酮酰基辅酶 A 转化为可供下一轮循环或终止模块识别的饱和酰基辅酶 A。具体而言，第 2 步反应由 HACD 催化，将 3-酮酰基辅酶 A 还原为 3-羟酰基辅酶 A（3-hydroxyacyl-CoA）[20]。该过程消耗还原力，是 RBO 途径种的第一次还原力输入，用于调整分子

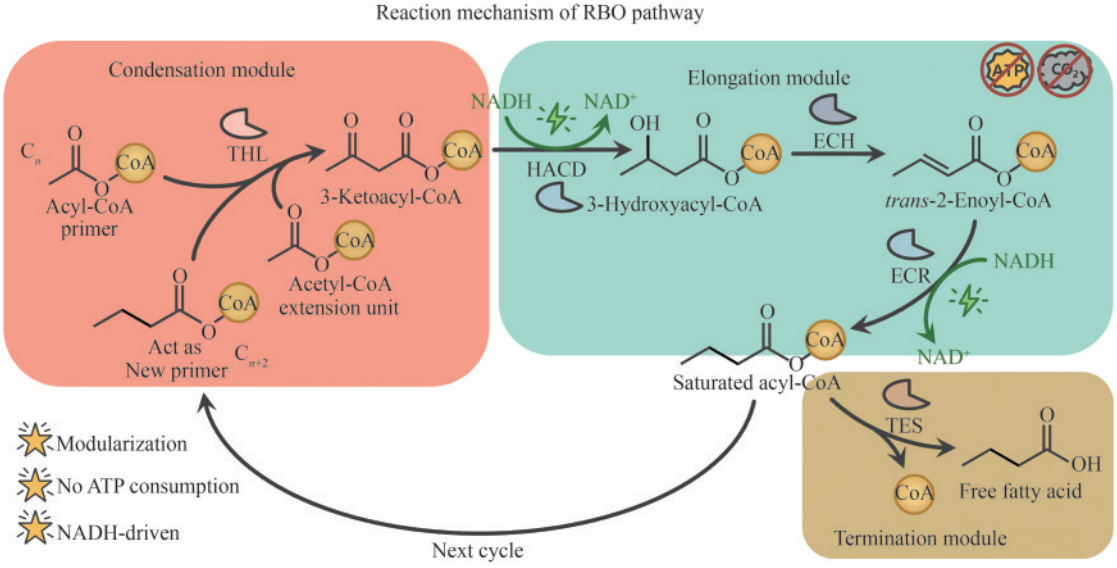


图 1　RBO 途径的反应机制

（THL—硫解酶；HACD—3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶；ECH—烯酰辅酶 A 水合酶；ECR—烯酰辅酶 A 还原酶；TES—硫酯酶）

Fig. 1　Reaction mechanism of the RBO pathway

(THL—Thiolase; HACD—3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; ECH—Enoyl-CoA hydratase; ECR—Enoyl-CoA reductase; TES—Thioesterase)

的还原状态。第3步反应由ECH催化，使3-羟酰基辅酶A脱水生成反式-2-烯酰辅酶A（*trans*-2-enoyl-CoA），为最终的还原反应引入反应性双键[21]。第4步反应由ECR催化，以还原力为驱动，将反式-2-烯酰辅酶A还原为饱和酰基辅酶A，完成一轮延伸循环[22]。该步骤是RBO途径中的第二次还原力输入。

终止模块一般由TES承担，负责将完成延伸的碳链分子从循环中释放。其作用机制在于，TES可识别延伸后的酰基辅酶A硫酯，并催化其硫酯键水解，从而生成游离脂肪酸并释放辅酶A基团。该步骤标志着RBO途径碳链延伸循环的正式终结[23]。

RBO途径独特的循环反应机制与能量驱动方式，赋予其作为合成生物学工程化平台的显著优势。首先，RBO途径以辅酶A而非酰基载体蛋白（acyl carrier protein， ACP）作为碳链载体，这一机制使其在延伸过程中不仅无需消耗ATP，还避免了CO_2损失，显著提升了能量利用效率和碳原子经济性。其次，该途径完全由还原力驱动，这种能量耦合方式有助于维持细胞的氧化还原平衡与生物量积累。此外，RBO途径的反应模块具有高度正交性与可编程性，符合合成生物学“即插即用”的设计理念[24]。从全局视角来看，RBO途径本身亦具备模块化特征，其以乙酰辅酶A为核心枢纽代谢物，向上可耦合多种碳源利用途径如：糖酵解（Embden-Meyerhof pathway， EMP）、WL途径（Wood-Ljungdahl pathway， WL pathway）等，实现底物谱的拓展；下可对接不同的下游转化途径，实现从基础碳源到各种高附加值脂肪酸衍生物的合成。

2 RBO途径的工程化改造进展

2.1 途径的跨宿主移植与模块化重构

尽管部分非模式微生物天然含有内源性RBO途径，使其在理论上具备作为工程化底盘的潜力，但受限于遗传背景认知不足与高效基因编辑工具的匮乏，针对该类宿主的理性代谢改造仍面临较高难度。在代谢工程语境下，本文所称的“黑箱”是指宿主虽然能够表现出链延长产物的合成能力，但其关键催化酶、调控节点、通量分配和酶间协同关系方面尚未被系统阐明，因而难以通过理性设计实现可预测调控。在这一意义上，非模式宿主中的天然链延长过程通常仍处于“黑箱”状态[25-26]。相比之下，大肠杆菌（*Escherichia coli*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）等模式宿主具备成熟的遗传操作体系与相对明晰的代谢调控网络。因此，将RBO途径从遗传操作受限的原始宿主中剥离并移植至上述模式宿主平台，是实现RBO途径工程化调控的更为现实且高效的替代策略。最早的模式宿主移植研究由Dellomonaco等于2011年展开，通过敲除*arcA*，引入FadR、AtoC和Crp蛋白突变体的方式解除了*E. coli*内源β-氧化途径的代谢调控，成功实现其功能逆转，在摇瓶中获得了2.2 g/L的丁醇[27]。尽管该研究首次在模式宿主中实现了RBO途径的组成型表达，但所进行的改造涉及多达11个基因，其表型是代谢网络剧烈扰动后的混沌结果，难以明确具体是哪些基因参与了RBO途径的产物合成过程，因此本质上仍属于“黑箱反应”。在此基础上，2012年Clomburg等基于*E. coli*内β-氧化通路的已知基因，预先推测出RBO途径的候选功能单元，分别为THL、HACD、ECH、ECR还有终止酶，并对相关酶进行了体外动力学表征及体内功能验证，最终阐明了由*E. coli*内源*Ec_atoB*、*Ec_fadB*、纤细褐藻（*Euglena gracilis*）来源的*Eg_ter*以及*Ec_yciA*组成的RBO途径框架，能够高效进行一轮碳链延长合成3.43 g/L丁酸。上述研究为RBO途径作为可调控、可移植的工程化代谢平台奠定了理论基础[28]。

工程化RBO途径通常可通过三种酶源模式构建：基于纯内源酶、基于纯异源酶以及内源/异源混合模式。基于纯内源酶的构建方式得益于与宿主表达环境更好的相容性以及内源性辅酶A代谢，但这些酶的天然生理功能通常与脂肪酸降解或相关代谢有关，可能会限制通量方向性和对链长的选择性（如*E. coli*内源的*Ec_fadA*、*Ec_fadE*、*Ec_ydiO*等），难以满足定制化目标产物的合成需求[29]。基于纯异源酶的构建方式可通过整体引入外源RBO模块拓展宿主的链延长能力。例如，在*S. cerevisiae*中引入由钩虫贪铜菌（*Cupriavidus*

necator）、产醇梭菌（*Clostridium autoethanogenum*）和齿垢密螺旋体（*Treponema denticola*）等来源酶组成的异源 RBO 模块后，己酸滴度由初始的 2 mg/L 提高至 33 mg/L [30]。混合模式则保留了部分与宿主相容性较好的内源酶，同时引入异源 RBO 途径酶强化关键反应。如在 *E. coli* 中引入富养罗尔斯通氏菌（*Ralstonia eutropha*）来源的 *Cn_bktB*、*Eg_ter* 并结合 *E. coli* 内源的 *Ec_fadB* 构建混合 RBO 模块，可以使橄榄酸（olivetolic acid，OLA）滴度从 0.1 mg/L 提升至 2.8 mg/L [31]。因此，与其认为内源酶或异源酶本身就具有绝对优势，构建高效的 RBO 途径更应侧重于识别那些在催化活性、表达水平和产物选择性上达到平衡的兼容酶模块。上述策略充分证明，通过优化 RBO 途径的酶学组成能够有效调节其在异源表达系统中的适配性与可塑性（图 2）。

2.2　碳流重定向与乙酰辅酶 A 再分配

在模式宿主中表达 RBO 途径虽能合成脂肪酸类目标产物，但也引发了一系列代谢问题，其中以碳通量失衡尤为突出。具体而言，碳流分布存在两方面挑战：一是碳源转化问题，葡萄糖、甘油等碳源除转化为乙酰辅酶 A 外，还可分流至多种代谢产物，导致碳利用效率降低；二是乙酰辅酶 A 的分配问题，该代谢节点既是 RBO 途径的引物和延伸单元，也是 TCA 循环（tricarboxylic acid cycle，TCA cycle）的关键前体，二者竞争同一底物，直接影响目标产物合成与核心代谢的协同性。

RBO 途径和 TCA 循环均涉及多步酶促反应，对乙酰辅酶 A 的整体转化速率有限，易导致代谢溢流，从而通过宿主的原生发酵途径积累大量副产物（如有机酸和醇类），*E. coli* 发酵中典型的乙酸积累即为代表 [32-33]。常规策略中，阻断这些竞争性途径可以有效减少副产物的生成并集中碳流，但也存在扰动细胞内代谢平衡的风险 [34]。针对这一困境，利用乙酰辅酶 A 合成酶（acetyl-CoA synthase，ACS）将溢出的乙酸重新同化为乙酰辅酶 A 成为缓解碳损失并维持代谢稳定的可选策略 [35]。值得一提的是，在不同氧气条件及碳源组

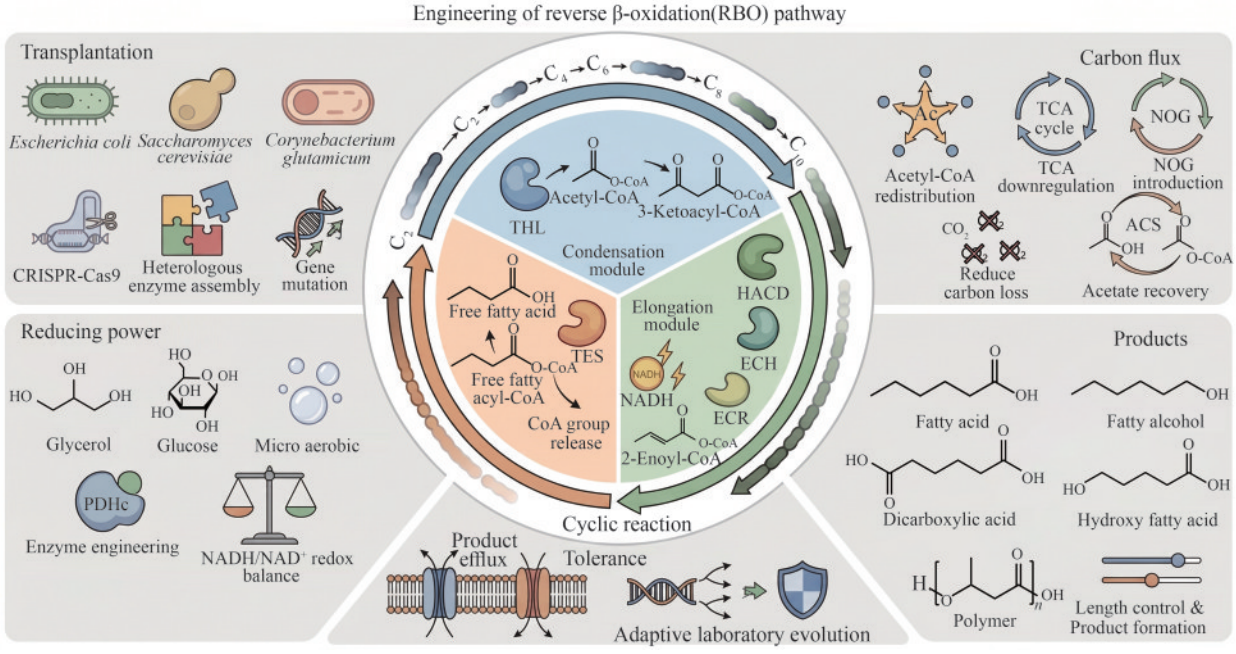


图 2　RBO 途径工程化改造研究进展

（THL—硫解酶；HACD—3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶；ECH—烯酰辅酶 A 水合酶；ECR—烯酰辅酶 A 还原酶；TES—硫酯酶；NOG—非氧化糖酵解途径；ACS—乙酰辅酶 A 合成酶；PDHc—丙酮酸脱氢酶系）

Fig. 2　Research progress of engineered RBO pathway

(THL—Thiolase; HACD—3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; ECH—Enoyl-CoA hydratase; ECR—Enoyl-CoA reductase; TES—Thioesterase; NOG—Non-oxidative glycolysis pathway; ACS—Acetyl-CoA synthase; PDHc—Pyruvate dehydrogenase complex)

合下，宿主呈现出差异化的代谢状态，其原生发酵途径的活性及碳流分布会随之变化。因此针对上述途径进行的遗传改造应基于特定的生理代谢背景指定相应的调控策略，以更精准地实现碳通量重定向。

另外，丙酮酸脱羧反应、磷酸戊糖途径（phosphopentose pathway， PPP）以及TCA循环中的氧化过程均伴随不可逆的CO_2释放，这些碳损失会降低以乙酰辅酶A为前体的目标产物的理论得率[36-37]。针对这一问题，Wang等[38]的研究通过引入一条与糖酵解和磷酸戊糖途径平行的非氧化糖酵解途径（non-oxidative glycolysis pathway，NOG pathway），该途径可将1分子葡萄糖转变为3分子乙酰辅酶A且不产生CO_2。NOG途径的引入优化了三条途径之间的碳分配，有效减少CO_2损失的同时提高目标产物1,3-丁二醇的产量。然而，NOG途径的碳原子经济性优势并不意味着其在工程化宿主中可以无限制地替代天然中心碳代谢。一方面，NOG途径重构了糖酵解、磷酸戊糖途径之间的通量关系，其表达强度需要精细调控[39]。Lin等[40]为构建依赖NOG途径进行糖分解的*E. coli*，需要同时进行多基因过表达、基因敲除和适应性进化，最终获得的菌株含有多处基因组突变，说明NOG途径作为主要糖分解途径时会对宿主生长和全局代谢造成较大压力。另一方面，由于磷酸戊糖途径是细胞NADPH再生和5-磷酸核糖供给的重要来源，若过度将碳流从磷酸戊糖途径导向NOG途径，可能扰乱胞内还原力平衡，进而影响细胞正常代谢活动[41]。综上所述，NOG途径更适合作为一种需要与宿主生长、还原力再生和目标产物合成需求相匹配的碳流重构策略。

在链延长宿主中，乙酰辅酶A作为中心代谢枢纽主要有两个流向：合成目标产物的RBO途径以及供应能量和生物合成的TCA循环。如何优化乙酰辅酶A在这两条途径之间的分配比例以实现产物合成效率的最大化，是亟需解决的代谢权衡问题[42]。在一项关于*E. coli*生产茶氨酸（L-theanine）的研究中，茶氨酸合成途径与TCA循环在α-酮戊二酸节点处存在竞争，研究人员利用酶约束代谢模型分析发现，适度降低TCA循环通量有利于将更多α-酮戊二酸导向茶氨酸合成，但过度削弱中心代谢又会影响底物利用和能量供应。因此，该研究选择通过调控*sucAB*表达和两阶段溶氧控制策略，在细胞生长、能量供给与产物合成之间实现动态平衡，最终将茶氨酸产量提高了1.44倍[43]。这一“适度削弱竞争通路、动态平衡前体与能量分配”的代谢调控逻辑，为解决RBO途径与TCA循环之间的碳通量分配问题提供了可供借鉴的思路。另外，代谢途径的专一性亦对产物合成构成关键影响。研究表明，*E. coli*中部分内源TES因具有较宽的底物谱，可能对RBO途径中的多种辅酶A硫酯中间体进行非特异性水解，从而提前终止链延长过程[44]。针对性敲除编码这些TES的基因，已被证实有助于提升目标产物的产量和纯度[45]。

除碳源转化和乙酰辅酶A分配问题外，RBO途径中的5种途径酶在宿主内的表达强度、折叠水平、底物亲和力和催化效率各异，导致各酶促反应步骤的实际通量并不完全一致。在多酶级联代谢途径中，若某一反应步骤的有效催化能力明显低于其他步骤，则该步骤会限制整个途径的最大通量，这一现象可被称为通量瓶颈效应，亦类似于“木桶效应”。为此，基于正交诱导型启动子（orthogonal inducible promoter）开发的独立基因表达调控技术可分别调节各途径酶的表达强度，为识别并缓解限速步骤、提高RBO途径整体通量提供了有效的解决方案[46-47]。

2.3 还原力供应与辅因子平衡

RBO途径通过输入NADH的方式生产还原型产物，属于NADH驱动型途径。因此，发酵过程中能否充足供应并有效再生NADH是实现高效生产的关键。目前，代谢工程中关于胞内NADH供给策略的研究主要在葡萄糖或甘油两种碳源以及好氧或微耗氧两种氧气条件下开展，不同碳源与氧气条件的组合导致胞内NADH的供应与消耗情况存在显著差异。多数研究选择甘油作为碳源，原因在于甘油还原程度较高，相较于等碳物质的量的葡萄糖，其在氧化为乙酰辅酶A的过程中可释放更多NADH；结合微耗氧发酵环境限制呼吸链对NADH的消耗，该组合能够最大程度将甘油

所提供的高浓度NADH池供给目标合成途径使用，其优势已在相关研究中得到验证[48-50]。此外，也有不少工作采用葡萄糖与微耗氧的组合[51-52]。从机制上看，微耗氧条件下使用葡萄糖作为碳源，是在NADH供应能力方面做出的妥协，以换取更高的能量产出、生物量积累以及比生长速率，缓解葡萄糖在NADH供应能力上的劣势。

值得一提的是，厌氧条件下RBO途径的运行是可行的，经典RBO天然宿主如*C. kluyveri*和*M. elsdenii*都是严格或兼性厌氧菌。从化学计量角度看，RBO途径的每一轮延伸循环需要2分子还原力（通常是NADH）用于还原3-酮酰基辅酶A和反式-2-烯酰辅酶A。因此，不同底物转化为乙酰辅酶A时能产生的NADH多寡，是决定理论碳摩尔转化率的重要因素（表2）。乙醇、乳酸和甘油等还原度较高的底物可提供额外的还原当量，因而有利于支持低氧条件下的链延长；葡萄糖则处于中间态，碳骨架和还原力的产生相对平衡；而乙酸则主要充当碳骨架供体，需要外部电子供体才能维持RBO活性。然而，仅凭底物还原程度的高低并不能决定基于RBO途径的生产体系的真实表现，其更应被视为一个理论框架，用于评估某一底物是否能为链延长供应充足的还原力。在工程宿主中，最优的底物-氧气组合取决于还原力供应、ATP生成、生物量形成、酶的表达水平以及产物毒性等多重因素之间的权衡，因此在实践中要实现高滴度、高得率和高产率，需要对碳源、氧气可用性、宿主生理状态以及途径表达进行协同优化。

作为乙酰辅酶A的关键前体，丙酮酸的胞内浓度和转化效率对RBO途径的生产能力十分关键。丙酮酸向乙酰辅酶A的转化由丙酮酸脱氢酶系催化，同时耦合NADH的产生。微好氧环境下通常伴随着相对较高的胞内NADH/NAD^+比值，丙酮酸脱氢酶系的活性则受到胞内NADH浓度的调控，高浓度NADH会抑制其催化能力[53]。有研究表明，利用丙酮酸脱氢酶系（pyruvate dehydrogenase complex，PDHc）的突变体可显著提升其在高NADH浓度下的活性，从而缓解PDHc活性受限所导致的丙酮酸积累和乙酰辅酶A可用性降低问题[54]。另外，敲除丙酮酸脱氢酶系调节蛋白*pdhR*解除转录抑制或直接过表达PDHc组分蛋白也被证明可有效增加宿主的丙酮酸转化能力[55-56]。

另外，对于丙酮酸代谢节点的优化，还可以通过代谢物响应型调控回路实现实时分流。Wang等[57]构建的胞内丙酮酸和对香豆酸浓度的双层动态调控系统，使细胞能够根据前体积累和下游转化状态自动协调中心代谢与产物合成，最终在5 L反应器中获得559.7 mg/L的咖啡酸（caffeic acid）。类似地，Li等[58]在*E. coli*中将温度响应元件与丙酮酸响应型生物传感器整合为多层分子开关，并以异丁胺合成为验证对象，使产物滴度提高3.31倍并在发酵罐中达到46.24 g/L。这些研究表明，丙酮酸作为乙酰辅酶A供应、NADH生成与氧化还原平衡的枢纽节点，其理性调控对于提高RBO途径的产物合成能力具有关键意义。

除了细胞整体的还原力供应能力以外，RBO途径中控制还原力输入的HACD与ECR同样值得关注。二者对还原力的同化速度及底物选择性，会显著影响整个途径的代谢通量。HACD通常为NADH依赖型酶，其底物结合口袋较为开放，能够稳定容纳不同链长与结构的酰基底物[59]。在酶表达量充足、NADH供应充分的前提下，HACD一般不会成为途径的限速步骤。然而，有研究指出HACD的底物选择性会影响THL的底物偏好，进而对产物的整体选择性产生调控作用[60]。这表明HACD在产物特异性方面具有潜在影响，值得

表2 不同底物转化为乙酰-CoA过程中的NADH生成情况比较

Table 2 NADH generation during substrate conversion to acetyl-CoA

碳源	等碳物质的量基准下的底物量（以6 mol C计）	转化为乙酰辅酶A的简化反应式	乙酰辅酶A生成量	NADH生成量	NADH/C (物质的量之比)	NADH/乙酰辅酶A
葡萄糖	1 mol	1葡萄糖→2乙酰辅酶A+2CO_2	2 mol	4 mol	0.667	2
甘油	2 mol	2甘油→2乙酰辅酶A+2CO_2	2 mol	6 mol	1.000	3
乙醇	3 mol	3乙醇→3乙酰辅酶A	3 mol	6 mol	1.000	2
乙酸	3 mol	3乙酸→3乙酰辅酶A	3 mol	0 mol	0.000	0
乳酸	2 mol	2乳酸→2乙酰辅酶A+2CO_2	2 mol	4 mol	0.667	2

进一步关注。相比之下，ECR对途径整体通量的影响更为关键。在工程化RBO途径中，一类特殊的反式-2-烯酰辅酶A还原酶（*trans*-2-enoyl CoA reductase，TER）被广泛应用。这类酶能够直接利用NADH库，在酰基辅酶A的生成方向上具有不可逆性，且热力学驱动力较强（$\Delta_r G^{\ominus}$<−50 kJ/mol）。目前，多种性能优良的TER已被验证，并广泛用于羧酸、丁醇、异丁醇等产物的合成[61-62]。由于TER催化的反应之后紧接途径的限速步骤——终止酶反应，因此TER的活性与匹配程度将直接影响下游反应的底物供应，筛选并选择合适的TER对提高产物的合成效率具有重要意义。值得注意的是，许多HACD与ECR展现出了对NADH和NADPH的共利用能力，但对这两种还原力供体的利用倾向与利用速率存在差异[63]。NADH在ATP供应上具有重要价值，而NADPH在细胞内多种物质合成反应中扮演重要角色。因此在构建工程化RBO途径时，如何根据还原力供需合理选择HACD与ECR的辅因子偏好，是需要审慎权衡的设计要点。

2.4 产物链长控制与产物谱拓展

RBO途径的迭代循环特征决定了底物经该途径后会产生不同碳链长度的产物，最终以混合物的形式释放。在发酵生产中，产物混杂不仅会降低实际得率，还会给后续分离纯化带来显著困难。先前的研究已经表明，RBO途径的链长控制本质上是缩合、延长和终止多个反应步骤共同作用的结果，其中THL与终止酶通常构成最直接的调控节点，而HACD/ECR则可能作为影响通量和中间体池分布的重要辅助调控因素。THL与终止酶分别直接参与链延长起始/缩合和酰基辅酶A中间体释放，是直接决定产物链长分布和产物特异性的关键节点。与此同时，HACD和ECR等延伸酶也不应被忽视：不同来源的HACD和ECR可能对不同链长的3-酮酰基辅酶A、3-羟酰基辅酶A或反式-2-烯酰辅酶A具有不同催化效率，从而通过改变中间体积累程度、循环通量以及延伸与终止之间的竞争关系，间接影响最终产物的链长分布[62，64-65]。迄今为止，传统的系统发育树分析以及酶分子改造结合高通量筛选技术，已成功获得多种具有目标产物催化活性的TES与终止酶，其中比较经典的如*E. coli*来源的*Ec_atoB*和*Ec_yciA*在丁酸的生产中表现良好[66-67]；*C. kluyveri*来源的*Ck_thlA*与*E. coli*来源的*Ec_tesA*及其截短型或突变体被证明有利于中链脂肪酸的合成[26，68]；而*C. necator*来源的*Cn_bktB*还可接受丙酰辅酶A作为底物，合成奇数碳链脂肪酸[44]。Vögeli等[65]开发的生物合成酶体外原型设计和快速优化技术（*in vitro* prototyping and rapid optimization of biosynthetic enzymes，*i*PROBE），甚至能够在体外从候选酶中直接筛选出最适合目标产物合成的RBO途径酶组合，经体内测试效果良好，证明可移植性极强。

RBO途径全程以辅酶A基团作为碳链载体的特性使得途径中的任一中间体均可作为终止节点实现产物释放，并通过选择不同的终止酶或偶联下游转化途径，能够将产物范围拓展至饱和脂肪酸以外的多种化合物（表3）。

其中，丁酸与己酸的生物合成相对较为成熟，针对途径通量进行优化后可以达到6.3 g/L和4 g/L[69]。在更长碳链脂肪酸的合成方面，已有研究在*E. coli*中实现了C_6～C_{10}混合脂肪酸的生产[72-73]，以及癸酸（C_{10}）的单独合成。此外，通过在*S. cerevisiae*中过表达来源于*T. denticola*的*ter*基因还可实现辛酸的合成，产量为60 mg/L[30]。相较于饱和脂肪酸，羟基脂肪酸的合成更为复杂。ω-羟基酸的生产需要依赖末端羟化酶引入额外的羟基，Clomburg等[74]于2015年利用RBO途径实现了ω-羟基脂肪酸混合物的合成，总产量超过0.8 g/L。另一类羟基脂肪酸的生产，如3-羟基脂肪酸等，则需要通过人为中断RBO途径循环并导出特定中间体来实现[75-77]。在二酸合成方面，相关研究多利用来源于褐色嗜热裂孢菌（*Thermobifida fusca*）的逆己二酸降解途径（reverse adipate degradation pathway）酶，且多集中于己二酸的生产。Yu等[86]、Cheong等[87]的工作分别报道了639 mg/L和2.5 g/L（生物反应器）的己二酸产量。近期，有研究首次在*C. glutamicum*中验证了RBO途径生产己二酸的可行性，产量为37.3 μg/L[89]。对于戊二酸的生产，则通过丙二酰辅酶A

表3 利用RBO途径进行脂肪酸及其衍生物合成的研究案例对比

Table 3 Comparison of various studies utilizing the RBO pathway for the synthesis of fatty acid and derivatives

产物种类	产物	碳源	产量	宿主	参考文献
脂肪酸	己酸	甘油	6.30 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[69]
	丁酸	甘油	4.0 g/L（摇瓶）	*E. coli****	
	丁酸	甘油	3.43 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[28]
	辛酸	葡萄糖	0.06 g/L（摇瓶）	*S. cerevisiae****	[30]
	癸酸	甘油	2.10 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[70]
	己酸	甘油	3.06 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[65]
	丁酸	甘油	4.90 g/L（摇瓶）	*E. coli****	
	己酸	乳酸	18%(摩尔分数)（摇瓶）	*Clostridiales bacterium* BL-6*	[71]
	脂肪酸混合物	甘油	1.30 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[72]
	脂肪酸混合物	甘油	15.67 g/L（3 L发酵罐）	*E. coli****	[73]
羟基脂肪酸	ω-羟基酸混合物	甘油	＞0.80 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[74]
	S-3-羟基丁酸	葡萄糖	2.08 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[75]
	R-3-羟基丁酸	葡萄糖	2.92 g/L（摇瓶）	*E. coli****	
	S-3-羟基戊酸	葡萄糖	0.31 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[76]
	R-3-羟基戊酸	葡萄糖	0.50 g/L（摇瓶）	*E. coli****	
	3-羟基酸混合物	葡萄糖	1.70 g/L（14.5 mmol/L，摇瓶）	*E. coli****	[77]
	3-羟基己酸	葡萄糖	0.02 g/L（0.17 mmol/L，摇瓶）	*E. coli****	[78]
脂肪醇	丁醇	葡萄糖	14.00 g/L（700 mL发酵罐）	*E. coli****	[27]
	丁醇	葡萄糖	26.20 g/L（500 mL发酵罐）	*C. tyrobutyricum***	[79]
	丁醇	乙醇、乙酸	0.30 g/L（4.0 mmol/L，摇瓶）	*C. kluyveri**	[80]
	己醇	乙醇、乙酸	0.40 g/L（3.9 mmol/L，摇瓶）	*C. kluyveri**	
	己醇	葡萄糖	0.09 g/L（摇瓶）	*C. tyrobutyricum***	[81]
	己醇	合成气	2.44 g/L（23.9 mmol/L，摇瓶）	*C. carboxidivorans**	[82]
	癸醇	甘油	10.05 g/L（500 mL发酵罐）	*E. coli****	[83]
	1,3-丁二醇	葡萄糖	0.86 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[84]
	1,3-丁二醇	葡萄糖	0.03 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[85]
二羧酸	己二酸	葡萄糖	0.64 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[86]
	己二酸	甘油	2.50 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[87]
	己二酸	葡萄糖、甘油	68.00 g/L（5 L发酵罐）	*E. coli****	[88]
	己二酸	葡萄糖	37.30 μg/L（摇瓶）	*C. glutamicum****	[89]
	戊二酸	葡萄糖、甘油	4.82 g/L（36.5 mmol/L，5 L发酵罐）	*E. coli****	[90]
	辛二酸	葡萄糖	0.013 g/L（75 μmol/L，摇瓶）	*E. coli****	[91]
聚合物	PHA	甲醇	0.34 g/L（摇瓶）	*M. extorquens***	[92]
	PHA	葡萄糖	6.50 g/L（摇瓶）	*R. eutropha***	[93]
	PHB	葡萄糖	2.10 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[94]
	PHA	葡萄糖、丙酸	0.46 g/L（摇瓶）	*E. coli****	[95]

注：1. 表中产量单位由mmol/L换算为g/L时，换算公式为：产量（g/L）=产量（mmol/L×分子量/1000；表中产量单位由μmol/L换算为g/L时，换算公式为：产量（g/L）=产量（μmol/L）×分子量/10^6。各产物对应的分子量数据来源于PubChem（https：//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov）。

2.***表示遗传操作成熟；**表示遗传操作难度中等；*表示遗传操作难度高。

（malonyl-CoA）和乙酰辅酶A缩合实现，产量达到4.82 g/L（36.5 mmol/L）[90]。此外，辛二酸的生产则沿用经典的RBO途径循环反应机制，产量为13 mg/L（75 μmol/L）[91]。

利用RBO途径进行脂肪醇类物质的生产是通过对酰基辅酶A分子直接进行还原并脱去辅酶A基团来实现的。由于这类产物普遍对细胞具有毒性，其生物合成具有难度。为了实现醇类产物的高效合成，Courtney等[64]构建了体外的RBO催化体系，系统考察了TER还原步骤、终止步骤和NADH/NADPH比例对醇产物链长的影响。Zhang等[79]借助规律成簇的间隔短回文重复序列（CRISPR）及其相关蛋白（CRISPR-Cas）的基因编辑系统对酪丁酸梭菌（*Clostridium tyrobutyricum*）进行改造，在分批发酵中实现了26.2 g/L的丁醇产量；随后，他们的另一项研究进一步利用该菌获得了91 mg/L的己醇[81]。Chen等[83]则在癸醇生产研究中取得了高选择性下的最高产量纪录，达到10.05 g/L。在二醇生产方面，目前关于α,ω-二醇合成的研究鲜有报道，这可能归因于末端羟化酶的低催化效率以及额外的还原力消耗。与之相对，1,3-丁二醇的合成已取得若干成功案例，相关研究多在*E. coli*中开展，例如Gulevich等[84-85]的两项工作将1,3-丁二醇的产量由27 mg/L逐步提升至856 mg/L。

RBO途径还可以用于聚酯的生产，这类材料兼具塑料的理化性能与良好的生物相容性。其中最具代表性的分子是聚羟基脂肪酸酯（polyhydroxyalkanoates， PHA）的合成，其核心在于利用PHA聚合酶对RBO途径产生的3-羟基脂肪酸中间体进行聚合反应。Huong等[93]在*R. eutropha*内发现了一条依赖RBO途径的PHA合成通路，成功获得了由3-羟基丁酸与3-羟基己酸共聚而成的聚（3-羟基丁酸酯-*co*-3-羟基己酸酯），产量可达6.5 g/L。此外，也有研究将PHA合成模块移植至*E. coli*中，用于生产聚3-羟基丁酸酯（polyhydroxybutyrate， PHB）和聚（3-羟基丁酸酯-*co*-3-羟基戊酸酯）[94]。Zhuang等[95]则首次在*E. coli*中以葡萄糖和丙酸为共底物成功合成同时含有C_6～C_{14}偶数链长、奇数链长单体的中链聚羟基脂肪酸酯，其中奇数链长单体占比达20.03%（摩尔分数）。

除上述产物类别外，RBO途径还可通过在不同酰基辅酶A中间体处引入特异性终止反应，或利用功能化引物/延伸单元，进一步拓展至酮类、α,β-不饱和羧酸及支链化合物等产物。例如，Lan等[96]将辅酶A依赖型链延长模块与丙酮生成途径偶联用于生产2-戊酮，产量可以达到240 mg/L。对于不饱和产物，已有研究通过改造RBO途径并在2-烯酰辅酶A等中间体处终止反应，实现了如α,β-不饱和羧酸的合成，如2-甲基-2-丁烯酸和（*E*）-2-甲基-2-戊烯酸的产量分别可达2.5 g/L和0.1 g/L[97]。支链化合物生产则是利用支链前体作为引物来源而实现的。例如Martin等[78]通过补加异丁酸实现了3-羟基-4-甲基戊酸的合成，产量约为300 mg/L（2.27 mmol/L）。总体而言，这些研究说明RBO途径具有较强的产物谱拓展潜力，但除个别不饱和羧酸产物外，多数非典型产物的研究仍以途径可行性验证为主，距离高效、稳定生产仍有较大提升空间。

2.5 产物耐受性与菌株鲁棒性提升

工程化的RBO途径能够产中链脂肪酸、醇类、酮类等多种产物，其中以中链脂肪酸为主。然而，中链脂肪酸的胞内积累对细胞具有毒性。其毒性机制主要涉及细胞内环境酸化和膜损伤，尤以后者为主导[98]。这些损伤限制了工程化RBO宿主的发酵性能，如何缓解产物毒性成为该领域关注的重点，多种策略应运而生。

产物外排是一种较为简单且有效的手段，核心原理在于加速中链脂肪酸从细胞内排出，从而缓解胞内环境酸化和中链脂肪酸掺入细胞膜所引发的Mg^{2+}等离子泄漏或细胞裂解[99]。Wu等[100]系统研究了*E. coli*中17个内源性转运蛋白或参与脂肪酸运输的转录激活因子对中链脂肪酸转运的影响，发现*mdtE*、*mdtC*、*acrE*过表达联合*cmr*基因敲除的组合有助于中链脂肪酸总产量的提升，并降低其胞内积累。另一项研究则指出敲除*ompF*并过表达*fadL*有助于维持*E. coli*的膜稳定性[101]。此外，Zhu等[102]通过对膜转运蛋白Tpo1进行工程化改造，使*S. cerevisiae*的中链脂肪酸产量显著提高，提升幅度达0.8~2.1倍。

然而，单一的产物外排无法从根本上增强细胞对有毒产物的耐受性，当细胞暴露于高浓度有毒产物的发酵液环境中时，其存活能力仍会受到

严重削弱[103]。相比之下，通过适应性实验室进化（adaptive laboratory evolution，ALE）对菌株进行耐受驯化使其积累抗性突变，才是解决问题的根本途径[104]。值得注意的是，无论针对酸类还是醇类产物，其耐受性提升机制具有相似性。一项关于增加*E. coli*对辛酸（C_8）耐受性驯化的研究记录了长达714 h的菌株适应性进化过程，结果表明驯化后菌株LAR1相较于亲本ML115的辛酸生产滴度由32 mg/L提高至180 mg/L，且最终生物量提高近3倍。同时，观察到驯化株细胞膜完整性和刚性显著增强，膜流动性下降[105]。类似地，另外一项针对异戊醇生产菌株进行的180天的驯化实验表明，驯化后的菌株NFG501对异戊醇的耐受能力由驯化前的1.5 g/L提升至5 g/L，细胞膜厚度与致密性均有所增加，且流动性降低[106]。综上所述，产物外排可以减轻有毒产物的胞内积累，缓解对细胞正常生命活动的影响；而适应性实验室进化则可以显著增加细胞在毒性环境里的存活能力，表现为最终生物量的提升。二者协同，有望更加有效地提高工程化菌株的生产性能。

3　工程菌株的底物适配与共培养转化

3.1　简单底物的利用

尽管以乙酰辅酶A为核心的RBO途径为多源低值碳的高值转化提供了潜在代谢桥梁，工程化宿主在对接真实有机废弃物时仍面临底物杂合性与适应性的严峻挑战。因此当前研究范式普遍遵循“由简至繁”策略，自模式底物渐次推进至废弃物特征组分，以解析宿主的代谢响应规律。本节沿此递进脉络，综述工程化RBO途径对接低值碳资源的研究进展，以期为构建面向真实场景的有机废弃物高值化利用体系厘清研究脉络（图3）。

葡萄糖因其存在广泛、代谢成熟通常被作为模式底物使用[107]。但相较之下，甘油尤其是纯化甘油常被用作生物柴油副产物粗甘油的模型组分，具有成本更加低廉且还原程度高的优势，在工程化RBO途径中更受青睐[108]。从工业化应用角度看，葡萄糖与甘油的选择并不能仅由还原力供应能力决定。葡萄糖或糖质水解液具有供应链成熟、组成稳定、发酵可控性强等优势，适合作为工程化RBO途径构建、标准化评价和放大验证的模式底物。但其原料成本相对较高，且第一代糖源可能面临来自粮食、饲料和土地资源的竞争压力[109]。粗甘油虽然价格较低，但通常含有甲醇、无机盐、皂化物、游离脂肪酸和脂肪酸甲酯等杂质，且组成随生物柴油原料和工艺波动，可能增加菌株适应、底物预处理和过程控制的难度[110-111]。此外，葡萄糖发酵中常见的乙酸溢流现象会导致碳损失和生长抑制，而甘油发酵虽有利于还原力供应，却更依赖氧化还原平衡和溶氧调控，并可

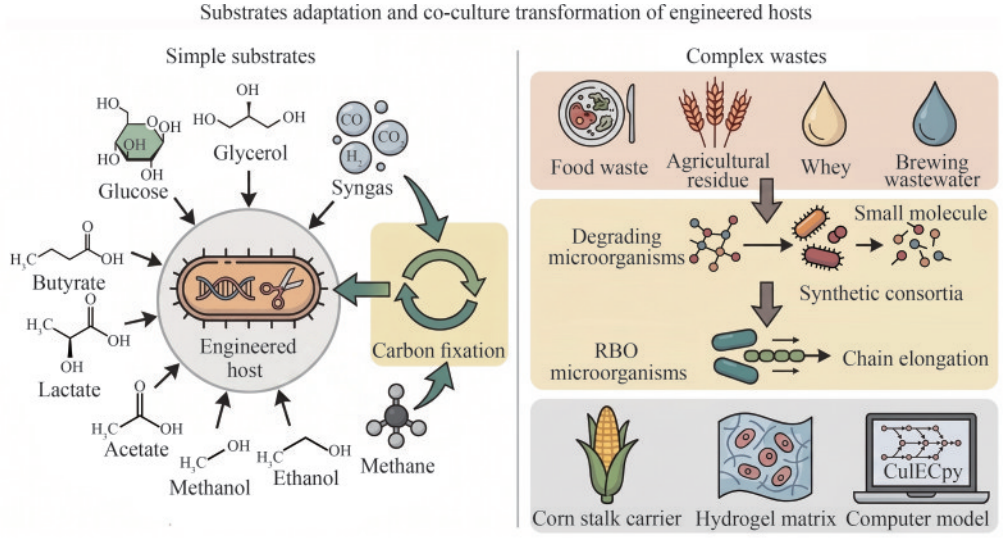


图3　工程化RBO菌株的底物适配策略

Fig. 3　Substrate adaptation strategies of engineered RBO strains

能伴随乙醇、甲酸、乙酸、琥珀酸等副产物的形成[112-113]。因此，工程化RBO途径的碳源选择应综合考虑底物价格、供应链稳定性、杂质组成、宿主适配性、副产物谱和下游分离纯化成本。

为拓展RBO途径的底物谱并推动其面向真实废弃物的应用，研究者已围绕多种补充碳源及有机废弃物特征组分开展了链延长效率与产物谱系的探索。丁酸盐与丙酸盐作为RBO途径可接受的底物，有时被用作补充碳源，以提高链延长的效率或生产奇数碳链脂肪酸。Martin等[78]以丁酸盐作为添加物，生产了22.5 mg/L的3-羟基己酸。而Tseng等[114]以丙酸盐作为额外添加物，在葡萄糖为主要碳源的发酵中生产了358 mg/L的正戊醇。乳酸、乙酸等有机酸类底物作为有机废弃物的特征组分，也被用作碳源进行研究。但相关研究仍局限于非模式宿主，例如Liu等[71]以乳酸为碳源，利用自行分离出的克氏梭菌属菌株进行发酵，在混合产物中检测到18%的己酸；Gois等[115]则系统研究了在非模式生物体系下利用乙酸进行链延长的代谢规则。相比之下，模式宿主对这类底物适配还需要更深入的研究，因其难以高效利用，且高浓度下具有毒性[116]。醇类底物如甲醇、乙醇等作为链延长宿主的碳源也受到关注。甲醇具有可规模化供应的优势，虽然对细胞存在一定毒性，但其成本低廉、供应稳定。一项整合了甲醇代谢和RBO途径的研究在嗜甲基红杆菌（*Methylorubrum extorquens*）成功实现了PHA的合成，证明了从甲醇经链延长合成脂肪酸类衍生物的可行性[92]。SchlaiB等[80]对克氏梭菌进行基因编辑后以乙醇驱动链延长，能够产生约0.3 g/L（4 mmol/L）的丁醇或0.4 g/L（3.9 mmol/L）的己醇。

此外，多种气体也被作为碳源进行链延长的尝试，其核心原理在于天然或人工构建的碳固定途径可以将气态碳源（如二氧化碳）同化，继而生成乙酰辅酶A并与RBO途径衔接。WL途径是其中最具代表性的碳固定途径。例如，Kottenhahn等[82]以非模式生物为底盘整合WL途径与RBO途径，以合成气（syngas）为碳源，利用食一氧化碳梭菌（*Clostridium carboxidivorans*）成功生产了2.4 g/L的己醇。甲烷作为碳源具有储量丰富、成本低廉及还原程度高等优势，但其分子化学惰性强、气体传质效率差并且代谢工程工具不完善，使其应用受到限制。Garg等[117]利用甲烷为碳源进行了链延长的研究，结果能够产生0.06 g/L的反式-2-丁烯酸（*trans*-2-butenoic acid）。

3.2 复杂有机废弃物类型与可进行的预处理

葡萄糖、甘油、短链酸醇等组成明确的简单底物可为工程化RBO途径的构建、评价和优化提供标准化研究基础。然而，在真实有机废弃物资源化场景中，这些底物通常不以单一、稳定和可直接利用的形式存在，而是嵌入在来源复杂、组成多变且可降解性差异显著的有机废弃物体系中。因此，连接简单底物研究与复杂底物转化的关键，在于如何设计复杂有机废弃物的底物解构过程，使其由组成多变的复杂基质定向转化为可为RBO途径提供的碳骨架和还原力的界面代谢物[118]。

这一底物解构过程首先受到有机废弃物基质特性的制约。按照来源和组成差异，有机废弃物可大致分为餐厨垃圾/食品废物、农业残留物、剩余污泥/市政污泥、废乳清/酿造废水/酒糟等食品加工副产物、粗甘油和油脂类废物等（表4）。不同废弃物中可被微生物利用的碳源形态差异较大：餐厨垃圾/食品废物通常富含淀粉、糖类、蛋白质和油脂，经水解酸化预处理后可生成葡萄糖、乳酸、乙酸、乙醇和丁酸等小分子产物；农业残留物一般需要通过物理、化学或酶法预处理破坏复杂结构，释放葡萄糖、木糖和乙酸等产物；污泥则富含细胞碎片、胞外聚合物、蛋白质和多糖，通常可通过热、碱、超声、游离氨或氧化预处理方式提高可生物降解COD和短链脂肪酸的释放；废乳清/酿造废水/酒糟等则常含有乳糖、乳酸、乙酸、乙醇等，成分相对简单，容易与乳酸型或乙醇型链延长过程衔接[119]。

对复杂有机废弃物进行预处理确实可在一定程度上降低RBO工程菌利用底物的难度，使复杂大分子碳源转化为可进入RBO网络的界面代谢物，然而，这不意味着复杂有机废弃物已经完全被转化为可被工程菌高效利用的标准化底物。一方面，预处理后的水解液中往往同时含有糖类、有机酸、醇类、氨氮、盐分、酚类化合物和脂肪酸等多种

表4 有机废弃物类型、预处理方式及其衍生微生物碳源种类

Table 4 Organic waste types, pretreatment methods, and the derived categories of microbial carbon sources

有机废弃物类型	主要组分	常见预处理手段	衍生微生物碳源
餐厨垃圾/食品废物	糖类、蛋白质、油脂、纤维素/半纤维素、无机盐	分拣除杂、破碎均质、油水分离、热处理、酶解、酸化	葡萄糖、果糖、乳糖、乙酸、挥发性脂肪酸、乳酸、乙醇
废乳清/酿造废水/酒糟/酒糟液	乳糖、乳酸、乙醇、乙酸、脂质、纤维素/半纤维素	固液分离、过滤/离心、热处理、pH调节、酶解、酸化发酵	葡萄糖、乳糖、半乳糖、乳酸、挥发性脂肪酸、乙醇
农林残余/木质纤维素水解液/秸秆/草汁	纤维素、半纤维素、木质素、果胶、糖类	物理破碎、化学/生物解构、酶解水解、脱毒调质、酸化	葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖、乙酸、乳酸
剩余污泥/市政污泥	糖类、蛋白质、细胞碎片、胞外聚合物	浓缩脱水、热水解、超声、碱处理、臭氧氧化、机械破碎、酶解	葡萄糖、甘油、挥发性脂肪酸、甘油
粗甘油/油脂类废物	甘油、游离脂肪酸、甲醇、盐分、皂化物	脱水、脱盐、脱甲醇、皂化物去除、油水分离、乳化、酶解	甘油、挥发性脂肪酸、乙醇、1,3-丙二醇
废气/合成气	CO、H_2、CO_2、CH_4、N_2	除尘、脱焦油、脱硫、脱卤、脱氮氧化物、除氧、除湿、压缩、气体组成调节	CO、CO_2、H_2、CH_4

组分，其浓度比例会随废弃物来源和预处理条件显著波动，并可能通过改变渗透压、pH和氧化还原状态等方式对细胞造成胁迫；另一方面，部分预处理过程还可能引入或释放抑制性物质，进一步影响细胞的正常生命活动。因此，从“简单底物”走向“真实废弃物”并不是单纯降低底物利用难度的问题，而是需要同时解决复杂组分降解、界面代谢物稳定供给、底物毒性缓解和碳流定向分配等多重挑战的系统工程[120]。

3.3 复杂有机废弃物的利用与合成微生物群落构建

幸运的是，天然链延长菌群早已在混合培养条件下实现了对复杂有机废弃物的有效转化，其底物适应性、群落鲁棒性与开放培养的可行性，恰为工程化体系的适配研究提供了重要参照。下文将简要回顾链延长菌群在废弃物处理中的研究进展，以期为工程菌株突破复杂底物利用瓶颈提供启示（表5）。

餐厨垃圾与农林残留物等复杂有机废弃物作为传统链延长菌群的底物受到广泛关注[127]。由于这类废弃物中富含碳水化合物、纤维素、木质纤维素等聚合物，同时盐度较高，单一链延长菌通常难以直接利用[128]。为解决这一问题，菌群采取分工协作策略：部分微生物将大分子降解为典型的小分子链延长底物，再由链延长菌转化为中链羧酸盐等链延长产物。这一方法在Duber等[129]的

表5 真实有机废弃物的链延长转化研究案例

Table 5 Case studies on chain elongation in the conversion of real organic waste

底物	发酵体系类型	主要结果	参考文献
食品废物提取液	混合菌群；单阶段半连续厌氧发酵；无外加电子供体	第2个运行周期己酸浓度为4.8 g/L；存在乳酸驱动的链延长	[121]
食品废物	混合菌群；长期厌氧发酵；无外加电子供体	49天时中链脂肪酸浓度达到29886.10 mg COD/L，其中己酸为主要产物，最高达到28191.66 mg COD/L；存在RBO和FAB两类链延长	[122]
酸乳清提取液	混合菌群；温度分相开放培养体系；无外加电子供体	实现111 mmol C/(L·d)的中链羧酸生产速率，其中己酸生产速率为81 mmol C/(L·d)	[123]
木质纤维素乙醇酒糟液	混合菌群；连续厌氧发酵	己酸、辛酸生产速率分别维持在(2.6±0.3) g/(L·d)和(0.27±0.04) g/(L·d)，该状态持续214天；存在链延长	[124]
剩余污泥/废活性污泥+乙醇	混合菌群；单阶段厌氧发酵；乙醇作为电子供体	10天后获得1889 mg/L己酸和3434 mg/L丁酸；存在链延长	[125]
食品废物+污水污泥	混合菌群；批式与半连续共发酵；无外加电子供体	在FW/SS=3∶1条件下运行90天，最高中链脂肪酸浓度为10441.31 mg COD/L，己酸占总产物的60.28%；存在链延长	[126]

注：表中案例多为天然或富集混合菌群，并非严格意义上的工程化RBO宿主，但其链延长核心通常由RBO循环介导，可作为工程化RBO体系面向真实废弃物应用的参照。

研究中得到体现：他们针对食品废物进行173天的开放培养发酵，分析微生物群落发现前期有多种需氧菌，如干酪乳酪杆菌（*Lacticaseibacillus casei*）、凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）、蜡状葡糖杆菌（*Gluconobacter cerinus*）等负责分解复杂组分，产生乳酸、乙酸等物质，随后产己酸菌属（*Caproiciproducens* sp.）等链延长菌株利用这些底物产生己酸。事实上，类似研究中的微生物群落分析结果均是如此，Battista等[130]对以食品废物冷凝液为底物的链延长发酵进行群落分析后得知卡氏假棒杆菌（*Pseudoclavibacter caeni*）等菌能够利用不同糖类产生小分子有机酸，被*C. kluyveri*等利用产生丁酸和己酸。以废弃乳清、酿造废水为代表的低聚体废弃物，富含糖类、甘油、乙酸、乙醇、乳酸等链延长直接底物，但这类废弃物的特性是酸醇浓度较高且成分动态变化。传统链延长菌群具备多种缓冲机制，可通过群落调节降低底物毒性，提升底物利用效率。Zhu等[131]基于酿酒废水的链延长发酵研究也证实了这一点：菌群结构随发酵液成分动态变化，其中*Caproiciproducens* sp.等链延长功能菌始终占据主导地位，而其他菌群的比例则相应调整，以维持整体功能的稳定。

上述研究表明功能互补机制在一定程度上缓解了对复杂底物的利用障碍，也体现了天然链延长菌群在开放培养条件下的底物适应性与群落鲁棒性。然而，这种优势并不意味着复杂废弃物中的碳流能够完全定向进入链延长产物。在真实有机废弃物发酵中，碳流的分配并非仅由链延长反应本身决定，还会受到产甲烷、产氢和其他竞争性微生物代谢的显著影响。在开放或半开放的厌氧菌群体系中，乙酸、H_2、CO_2等链延长所需的关键中间体亦可被产甲烷菌利用，并以CH_4和CO_2等气态产物形式逸散，使碳流偏离中链羧酸盐等目标产物[119]；产氢过程虽然不直接导致碳原子流失，但会造成还原力和电子供体的外排，间接削弱链延长所需的还原力供给[132]。在面向复杂废弃物的发酵应用时，仍需通过pH控制、缩短水力停留时间、接种物预处理、竞争菌群抑制、原位产物萃取等策略，尽可能削弱竞争代谢过程，将更多碳流和还原力导向链延长产物的合成[133-134]。

将上述情景延伸至基于RBO途径的工程菌体系，可以发现纯培养体系在对接有机废弃物时面临的瓶颈在于复杂废弃物中常同时含有聚合物、糖类、有机酸、醇类和抑制性组分，单一工程菌株难以兼具广谱降解、底物耐受和高效链延长能力。因此，面向复杂废弃物的RBO工程体系设计不应仅局限于单菌的底物谱拓展，而应根据底物复杂程度在预处理强化、单菌改造、合成共培养之间进行分层选择。对于成分相对明确或经过预处理的底物，可优先通过拓宽宿主底物利用能力、增强有机酸醇耐受性以及提高RBO途径通量来构建纯培养体系；而对于组成复杂、波动较大或含有难降解组分的废弃物，则更适合借鉴天然链延长菌群的功能分工逻辑，构建双菌或多菌的合成共培养体系（synthetic consortia）。在这一人工体系中，上游菌株负责复杂底物的降解，将其转化为下游菌株可利用的前体；下游菌株则执行链延长功能，将前体转化为目标产物[135]。这种“上游底物转化，下游碳链延长”的分工逻辑提示我们，合成共培养体系的构建应重点关注界面代谢物匹配、碳流与还原力定向分配、竞争代谢抑制以及群落稳定性控制。通过合理选择上游底物转化菌与下游链延长菌，并结合相应的辅助策略，合成共培养体系有望在保持较高可控性的同时提升对复杂废弃物的适应能力，成为连接纯培养工程菌体系与开放混合菌群体系的重要过渡方案。

在上述设计逻辑下，已有的合成共培养研究为工程化构建RBO共培养体系提供了不同层面的参考。首先，共培养体系的构建能够显著提升整体的产物合成能力。例如，一项关于*E. coli*合成2-甲基丁酸的研究表明，功能互补的双菌体系相较于单菌体系而言可以显著提升目标产物的合成效率，并缓解中间代谢产物的毒性积累[136]。另外一项关于白藜芦醇（resveratrol）的生产研究显示，合成共培养体系的生产效率较单菌体系提高了30倍[137]。此外，共培养体系中各菌种的选择需要谨慎考虑，为保障系统运行的长期稳定性，必须应对如外毒素及有毒副产物所引发的种间排斥问题[138]。

同时，有机废弃物底物带来的恶劣环境对工程菌的胁迫同样不容忽视[139]。为了应对环境胁

迫，将合成菌群进行固定化（immobilization）处理时提升系统稳定性的有效应对手段之一。例如，Wang 等[140]利用玉米秸秆开发的细胞固定化载体表现出了良好的生物相容性，细胞在该载体上能够持续维持良好的产氢性能；近年来，许多水凝胶材料也被广泛用作微生物群落的固定化基质，在废水处理、生物修复等恶劣工况条件下展现出应用潜力[141]。

近年来，基于基因组尺度代谢网络的共培养建模方法为复杂生物合成体系的理性构建提供了新的工具。例如，Xue 等[142]开发的 CulECpy 模型通过整合化学计量约束与酶约束，可用于预测共培养体系中的途径分配、瓶颈反应和初始接种比例，并已在樱花素（sakuranetin）、姜黄素（curcumin）、迷迭香酸（rosmarinic acid）、红景天苷（salidroside）和尸胺（cadaverine）等非 RBO 产物的共培养生产体系中显示出较好的预测能力。此外，OptCom、COMETS、MultiPlus 等模型也分别在多层级优化、动态通量平衡分析、空间结构和菌间代谢互作模拟方面具有优势，可为共培养体系中的菌种选择、代谢分工和菌间互作关系分析提供理论参考[143-145]。需要指出的是，虽然 RBO 途径驱动的链延长共培养体系已有实验报道，如由产乙酸/乙醇菌与链延长菌组成的合成共培养可实现 C_4~C_6 羧酸和醇类的合成[146]，但目前尚缺少 CulECpy、OptCom、COMETS 或类似模型直接用于 RBO 途径共培养体系构建并经湿实验系统验证的公开案例。因此，现阶段这些模型在 RBO 共培养体系设计中的应用更应被视为一种具有潜力的理论指导策略，其实际预测精度仍需结合 RBO 关键酶动力学、还原力分配、菌间底物交换和产物毒性等因素进行进一步验证。

4　总结与展望

与天然脂肪酸生物合成途径不同，RBO 途径作为一类碳原子和能量经济性平台已经从天然链延长微生物中发掘并广泛移植至模式宿主开展研究。尽管 RBO 途径在异源重构和代谢优化层面已经取得显著进展，但其从实验室工具迈向工业应用平台仍面临诸多核心瓶颈（图 4）。本文系统梳理了当前工程化 RBO 途径的代谢改造与优化策略，同时以天然链延长菌群利用低值废弃物的成功实

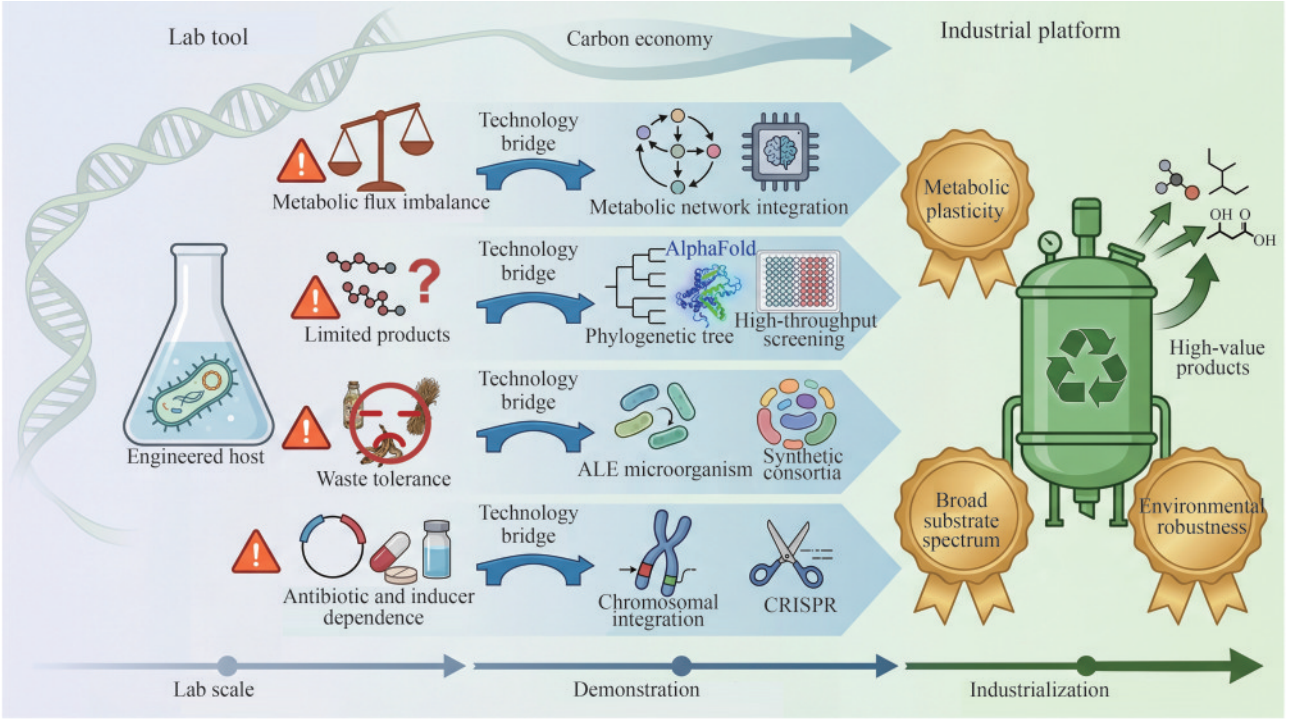


图 4　工程化 RBO 途径未来研究方向

Fig. 4　Future research directions of the engineered RBO pathway

践为启示，剖析了工程化RBO宿主适配真实废弃底物时面临的障碍，并探讨了可行的解决路径。

RBO途径内部各酶促反应的通量不匹配，仍是制约其整体代谢通量的核心因素，尽管正交诱导表达系统的初步应用缓解了这一问题，但目前学界对于如何精准调控RBO途径各步骤通量以最大化途径总通量的认知仍较为有限。除RBO途径内部的通量平衡问题以外，细胞层面的产物合成、生物质合成、碳源供给、还原力供给四大模块之间的动态协同匹配也需要开展更加深入的机制研究[147-148]。为应对上述问题，基因组规模代谢模型（genome-scale metabolic model， GEM）和机器学习方法（machine learning method）为RBO途径的优化提供了新的技术路径：GEM可用于系统评估RBO途径与宿主核心代谢之间的碳流、能量和还原力分配，而机器学习方法则有助于从多维实验数据中识别影响通量提升的关键酶组合和调控参数，从而指导RBO途径内部通量平衡优化和与宿主代谢网络的协同整合[149-150]。

基于RBO途径合成的产物仍多局限于丁酸、丁醇、己酸等常规中链化学品，而高价值衍生物的产量（滴度）普遍偏低，其核心原因在于目前已挖掘和表征的非天然产物特异性终止酶匮乏，且酶催化活性与底物特异性不佳。针对这一瓶颈，可基于现有酶资源，借助系统发育分析（phylogenetic analysis）和Blast序列比对挖掘、表征更多新型终止酶，拓展工具酶的种类和数量[151]。在获得候选酶的基础上，传统的理性与半理性设计酶改造方法虽可用于提升酶性能，但耗时费力、工作量大，且改造效果高度依赖于研究者对酶结构与理化性质的认知水平。因此，利用AlphaFold等蛋白质结构预测模型对现有酶进行结构解析与改造辅助，有望以较低成本提升酶对目标底物的选择性和催化活性[152]。同时，将高灵敏度、高特异性的高通量筛选技术与酶工程相结合，可进一步降低酶改造过程中的人力、物力与时间成本[153]。

在底物利用方面，工程化RBO宿主可高效利用的底物仍主要局限于葡萄糖、甘油等实验室模式碳源，难以适配实际有机废弃物基质。针对这一问题，一条可行路径是通过代谢工程改造结合适应性实验室进化，使工程菌株逐步获得对废弃物中典型链延长底物的利用能力和环境耐受性；但该策略仍需要攻克复杂代谢调控网络重构和能量供应效率不足等难题。另一条可行路径是借鉴天然微生物群落在真实废弃物环境中通过空间分隔、互惠共生和功能分工维持稳定代谢的特征，构建具有明确功能分工的合成共培养体系，以增强工程体系对复杂废弃物基质的转化能力[154-155]。然而，合成共培养体系仍面临诸多技术困境，包括人工菌群比例的精准调控与稳态维持、中间代谢产物的高效跨菌传递、毒性代谢产物的抑制缓解、不同菌种间营养竞争的平衡等，这些因素均制约了其实现类似天然菌群的空间和功能分化。此外，现实废弃物基质通常难以实现无菌处理，工程单菌或混菌体系的开放培养可行性以及对复杂恶劣环境的长期耐受性，仍需更深入的研究验证。

工程化RBO途径仍多依托质粒载体实现产物合成，需要依赖昂贵的抗生素和诱导剂维持质粒稳定性和目的基因的表达，此类工程菌株无法满足工业化放大生产的要求。未来亟需开发无诱导剂、无质粒的稳定表达系统，或将RBO途径关键基因整合至宿主基因组，以适配工业化大规模生产。已有研究通过CRISPR介导的多基因组整合构建了无抗生素、无质粒的*E. coli*生产菌株，证明了复杂异源途径染色体整合表达的可行性[156-159]。另外，可结合组成型启动子文库、RBS/5′-UTR优化、整合位点文库、基因拷贝数调节和CRISPR干扰（CRISPR interference， CRISPRi）等策略，对整合型RBO基因进行表达梯度重构，从而在不使用外源诱导剂的条件下尽可能恢复甚至接近质粒表达时的通量水平[160]。在此基础上，还需探索并优化与工程菌株适配的发酵工艺参数，最大化工业生产效率。总体而言，工程化RBO途径的未来研究核心，在于构建代谢可塑性强、底物谱广、环境鲁棒性强的基因工程菌株，从而更好地实现脂肪族类高价值衍生物高效、可持续的生物合成。

参 考 文 献

[1] COOK E，IONKOVA K，BHADA-TATA P, et al. What a WAste 3.0: global snapshot of solid waste management toward

circularity until 2050[M]. Washington, DC: World Bank, 2026.

[2] 国务院关于印发《固体废物综合治理行动计划》的通知(国发〔2025〕14号)[J]. 中华人民共和国国务院公报, 2026(2): 14-17.
Circular of the State Council on printing and issuing the action plan for comprehensive treatment of solid waste[J]. Gazette of the State Council of the People's Republic of China, 2026(2): 14-17.

[3] 国务院办公厅关于加快构建废弃物循环利用体系的意见(国办发〔2024〕7号)[J]. 中华人民共和国国务院公报, 2024 (6): 33-37.
Opinions of the General Office of the State Council on accelerating the construction of a waste-recycling system[J]. Gazette of the State Council of the People's Republic of China, 2024(6): 33-37.

[4] PACE S A，YAZDANI R，KENDALL A, et al. Impact of organic waste composition on life cycle energy production, global warming and water use for treatment by anaerobic digestion followed by composting[J]. Resources, Conservation and Recycling, 2018, 137: 126-135.

[5] ASGHAR R，AZIZ M A，OKLA M K, et al. Recycling of agricultural waste through anaerobic composting and its impact on soil biochemical health and *Zea mays* productivity[J]. Journal of Material Cycles and Waste Management, 2025, 27 (4): 2207-2220.

[6] ZIAEE F，MOKHTARANI N，POURROSTAMI NIAVOL K. Solid-state anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal waste and sawdust: impact of co-digestion ratio, inoculum-to-substrate ratio, and total solids[J]. Biodegradation, 2021, 32(3): 299-312.

[7] BAO T，QIAN Y C，XIN Y P, et al. Engineering microbial division of labor for plastic upcycling[J]. Nature Communications, 2023, 14: 5712.

[8] LI H，RIISAGER A，SARAVANAMURUGAN S, et al. Carbon-increasing catalytic strategies for upgrading biomass into energy-intensive fuels and chemicals[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(1)148-187

[9] KIM B C R，KLEINSTEUBER S，LAWSON C E. Carbon-efficient waste upcycling: combining syngas fermentation and chain elongation with synthetic consortia[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2025, 94: 103321.

[10] STRIK D P B T B, GANIGUE R. Editorial: Microbial chain elongation-carbon recovering biorefineries for the circular economy[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1448975.

[11] ZHANG F Z，OUELLET M，BATTH T S, et al. Enhancing fatty acid production by the expression of the regulatory transcription factor FadR[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14 (6): 653-660.

[12] YUAN J F，CHING C B. Mitochondrial acetyl-CoA utilization pathway for terpenoid productions[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 303-309.

[13] PARK J，RODRÍGUEZ-MOYÁ M，LI M, et al. Synthesis of methyl ketones by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(11): 1703-1712.

[14] LIU Y L，BENITEZ M G，CHEN J J, et al. Opportunities and challenges for microbial synthesis of fatty acid-derived chemicals (FACs) [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 613322.

[15] ZHOU W，WANG Y N，ZHANG J L, et al. A metabolic model of *Lipomyces starkeyi* for predicting lipogenesis potential from diverse low-cost substrates[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 148.

[16] BARKER H A，TAHA S M. *Clostridium kluyverii*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol[J]. Journal of Bacteriology, 1942, 43(3): 347-363.

[17] KALLSCHEUER N，POLEN T，BOTT M, et al. Reversal of β-oxidative pathways for the microbial production of chemicals and polymer building blocks[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 33-42.

[18] TARASAVA K，LEE S H，CHEN J, et al. Reverse β-oxidation pathways for efficient chemical production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2022, 49(2): kuac003.

[19] HEATH R J，ROCK C O. The claisen condensation in biology [J]. Natural Product Reports, 2002, 19(5): 581-596.

[20] ZHOU Y L，LV R，YE R D, et al. The 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1/2 form complex with *trans*-2-enoyl-CoA reductase involved in substrates transfer in very long chain fatty acid elongation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 704: 149588.

[21] AGNIHOTRI G，LIU H W. Enoyl-CoA hydratase reaction, mechanism, and inhibition[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003, 11(1): 9-20.

[22] KATO R，TAKENAKA Y，OHNO Y, et al. Catalytic mechanism of *trans*-2-enoyl-CoA reductases in the fatty acid elongation cycle and its cooperative action with fatty acid elongases[J]. Journal of Biological Chemistry, 2024, 300(2): 105656.

[23] CASWELL B T，DE CARVALHO C C, NGUYEN H, et al. Thioesterase enzyme families: functions, structures, and mechanisms[J]. Protein Science, 2022, 31(3): 652-676.

[24] YANG B W，LI Z L，ZHANG J Y, et al. Scalable secondary metabolite production in *Streptomyces* using a plug-and-play system[J]. Nature Biotechnology, 2026, 44(6): 1037-1049.

[25] LIU Y H，CHEN L，DUAN Y C, et al. Recent progress and prospects for chain elongation of transforming biomass waste into medium-chain fatty acids[J]. Chemosphere, 2024, 355: 141823.

[26] JEON B S，KIM E J，SEO H, et al. Molecular chain elongation mechanism for *n*-caproate biosynthesis by *Megasphaera hexanoica*[J]. Advanced Science, 2025, 12(44): e06069.

[27] DELLOMONACO C，CLOMBURG J M, Miller E N, et al. Engineered reversal of the β-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals[J]. Nature, 2011, 476(7360): 355-359.

[28] CLOMBURG J M，VICK J E，BLANKSCHIEN M D, et al. A synthetic biology approach to engineer a functional reversal of the β-oxidation cycle[J]. ACS Synthetic Biology, 2012, 1(11) 541-554

[29] GULEVICH A Y，SKOROKHODOVA A Y, DEBABOV V G. Evaluation of the efficiency of functional reversal of fatty acid β-oxidation in *Escherichia coli* upon the action of various native acyl-CoA dehydrogenases[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2022, 58(4): 361-367.

[30] GARCES DAZA F，HAITZ F，BORN A, et al. An optimized reverse β-oxidation pathway to produce selected medium-chain fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 71.

[31] TAN Z G，CLOMBURG J M，GONZALEZ R. Synthetic pathway for the production of olivetolic acid in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(8): 1886-1896.

[32] MILLARD P，ENJALBERT B，UTTENWEILER-JOSEPH S, et al. Control and regulation of acetate overflow in *Escherichia coli*[J]. eLife, 2021, 10: e63661.

[33] LIU M，DING Y M，CHEN H L, et al. Improving the production of acetyl-CoA-derived chemicals in *Escherichia coli* BL21(DE3) through *iclR* and *ArcA* deletion[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 10.

[34] YE T，DING W，AN Z X, et al. Increased distribution of carbon metabolic flux during *de novo* cytidine biosynthesis *via* attenuation of the acetic acid metabolism pathway in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1): 36.

[35] MILLARD P，GOSSELIN-MONPLAISIR T，UTTENWEILER-JOSEPH S, et al. Acetate is a beneficial nutrient for *E.coli* at low glycolytic flux[J]. The EMBO Journal, 2023, 42(15): EMBJ2022113079.

[36] ASPACIO D，LUU E，WORAKAENSAI S, et al. Engineering *Escherichia coli* pyruvate metabolism to generate noncanonical reducing power[J]. ACS Catalysis, 2024, 14(13) 9776-9784

[37] YE D Y，MOON J H，JUNG G Y. Recent progress in metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of various C_4 and C_5-dicarboxylic acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(29)10916-10931

[38] WANG J，ZHANG R H，ZHANG J L, et al. Tunable hybrid carbon metabolism coordination for the carbon-efficient biosynthesis of 1, 3-butanediol in *Escherichia coli*[J]. Green Chemistry, 2021, 23(21): 8694-8706.

[39] WANG T T，DING L J，LUO H Y, et al. Engineering a non-oxidative glycolysis pathway in *Escherichia coli* for high-level citramalate production[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23 (1): 233.

[40] 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.

[41] STINCONE A，PRIGIONE A，CRAMER T, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2015, 90(3): 927-963.

[42] ZHOU H，ZHANG Y W，LONG C P, et al. A citric acid cycle-deficient *Escherichia coli* as an efficient chassis for aerobic fermentations[J]. Nature Communications, 2024, 15: 2372.

[43] HAN H L，XUE B Y，SHAN G Q, et al. Systematic metabolic engineering and model-guided optimization for high-level production of L-theanine from xylose in *Escherichia coli*[J]. Advanced Science, 2026, 13(17): e21440.

[44] MCMAHON M D，PRATHER K L. Functional screening and *in vitro* analysis reveal thioesterases with enhanced substrate specificity profiles that improve short-chain fatty acid production in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 1042-1050.

[45] LIU J，MANDLAA，WANG J, et al. A strategy to enhance and modify fatty acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*: overexpression of acyl-CoA thioesterases[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 191.

[46] CUI W J，LIN X Y，HU R C, et al. Creation of an orthogonal and universal auto-inducible gene expression platform by reprogramming a two-component signal circuit for efficient production of industrial enzymes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 283: 137781.

[47] NASERI G，RAASCH H，CHARPENTIER E, et al. A versatile regulatory toolkit of arabinose-inducible artificial transcription factors for Enterobacteriaceae[J]. Communications Biology, 2023, 6: 1005.

[48] WONG M S，LI M，BLACK R W，Et al. Microaerobic conversion of glycerol to ethanol in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(10): 3276-3282.

[49] LIU H，LIU S，NING Y C, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of 1, 4-butanediol from crude glycerol[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2024, 12(1): 111660.

[50] BOECKER S，ESPINEL-RÍOS S，BETTENBROCK K, et al. Enabling anaerobic growth of *Escherichia coli* on glycerol in defined minimal medium using acetate as redox sink[J]. Metabolic Engineering, 2022, 73: 50-57.

[51] MARZAN L W，BARUA R，AKTER Y, et al. A single metabolite production by *Escherichia coli* BW25113 and its *pflA.cra* mutant cultivated under microaerobic conditions using glycerol or glucose as a carbon source[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(1): 161-168.

[52] MORI M，MARINARI E，DE MARTINO A. A yield-cost tradeoff governs *Escherichia coli*’s decision between fermentation and respiration in carbon-limited growth[J]. npj Systems Biology and Applications, 2019, 5: 16.

[53] SHEN L C，ATKINSON D E. Regulation of pyruvate dehydrogenase from *Escherichia coli* interactions of adenylate energy charge and other regulatory parameters[J]. Journal of Biological Chemistry, 1970, 245(22): 5974-5978.

[54] SUN Z T，DO P M，RHEE M S, et al. Amino acid substitutions at glutamate-354 in dihydrolipoamide dehydrogenase of *Escherichia coli* lower the sensitivity of pyruvate dehydrogenase to NADH[J]. Microbiology, 2012, 158 (Pt 5): 1350-1358.

[55] MAEDA S，SHIMIZU K，KIHIRA C, et al. Pyruvate dehydrogenase complex regulator (PdhR) gene deletion boosts glucose metabolism in *Escherichia coli* under oxygen-limited culture conditions[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(4): 437-443.

[56] ZHANG Y，LIN Z Q，LIU Q J, et al. Engineering of serine-deamination pathway, Entner-Doudoroff pathway and pyruvate dehydrogenase complex to improve poly(3-hydroxybutyrate) production in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 172.

[57] WANG X H，ZHAO C，LU X Y, et al. Balancing pyruvate node based on a dual-layered dynamic regulation system to improve the biosynthesis of caffeic acid in *Candida* glycerinogenes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(23)8981-8990

[58] LI Y，LIU M X，YANG C Y, et al. Engineering temperature-powered synthetic multilayer molecular bioswitch for high-level pyruvate derivative production in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(8)3127-3141

[59] KIM J，CHANG J H，KIM K J. Crystal structure and biochemical properties of the (*S*) -3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase PaaH1 from *Ralstonia eutropha*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 448(2): 163-168.

[60] BLAISSE M R，DONG H J，FU B, et al. Discovery and engineering of pathways for production of α-branched organic acids[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139 (41)14526-14532

[61] HU K，ZHAO M，ZHANG T L, et al. Structures of *trans*-2-enoyl-CoA reductases from *Clostridium acetobutylicum* and *Treponema denticola*: insights into the substrate specificity and the catalytic mechanism[J]. The Biochemical Journal, 2013, 449(1): 79-89.

[62] BOND-WATTS B B，WEEKS A M, CHANG M C Y. Biochemical and structural characterization of the *trans*-enoyl-CoA reductase from *Treponema denticola*[J]. Biochemistry, 2012, 51(34)6827-6837

[63] HOFFMEISTER M，PIOTROWSKI M，NOWITZKI U, et al. Mitochondrial *trans*-2-enoyl-CoA reductase of wax ester fermentation from *Euglena gracilis* defines a new family of enzymes involved in lipid synthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(6): 4329-4338.

[64] COURTNEY D K，SU Y，JACOBSON T B，et al. Relative activities of the β -ketoacyl-CoA and acyl-CoA reductases influence the product profile and flux in a reversed β-oxidation pathway[J]. ACS Catalysis, 2023, 13(9)5914-5925

[65] VÖGELI B，SCHULZ L，GARG S，et al. Cell-free prototyping enables implementation of optimized reverse β-oxidation pathways in heterotrophic and autotrophic bacteria [J]. Nature Communications, 2022, 13: 3058.

[66] WU J J，ZHANG X，XIA X D, et al. A systematic optimization of medium chain fatty acid biosynthesis *via* the reverse beta-oxidation cycle in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 115-124.

[67] GUEVARA-MARTÍNEZ M，PEREZ-ZABALETA M，GUSTAVSSON M, et al. The role of the acyl-CoA thioesterase “YciA” in the production of (*R*) -3-hydroxybutyrate by recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(9): 3693-3704.

[68] DENG X，CHEN L Q，HEI M H，et al. Structure-guided reshaping of the acyl binding pocket of ’TesA thioesterase enhances octanoic acid production in *E. coli*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 61: 24-32.

[69] LEE S H，HU Y，CHOU A, et al. Metabolic flux optimization of iterative pathways through orthogonal gene expression control: application to the β -oxidation reversal[J]. Metabolic Engineering, 2024, 82: 262-273.

[70] KIM S，GONZALEZ R. Selective production of decanoic acid from iterative reversal of β-oxidation pathway[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(5): 1311-1320.

[71] LIU B，POPP D，MÜLLER N, et al. Three novel *Clostridia* isolates produce *n*-caproate and *iso*-butyrate from lactate: comparative genomics of chain-elongating bacteria[J]. Microorganisms, 2020, 8(12): 1970.

[72] KIM S，CLOMBURG J M，GONZALEZ R. Synthesis of medium-chain length (C_6-C_{10}) fuels and chemicals *via* β -oxidation reversal in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(3): 465-475.

[73] WU J J，WANG Z，DUAN X G, et al. Construction of artificial micro-aerobic metabolism for energy-and carbon-efficient synthesis of medium chain fatty acids in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 53: 1-13.

[74] CLOMBURG J M，BLANKSCHIEN M D，VICK J E, et al. Integrated engineering of β-oxidation reversal and ω-oxidation pathways for the synthesis of medium chain ω-functionalized carboxylic acids[J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 202-212.

[75] TSENG H C，MARTIN C H，NIELSEN D R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of (*R*)- and (*S*)-3-hydroxybutyrate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(10): 3137-3145.

[76] TSENG H C，HARWELL C L，MARTIN C H, et al. Biosynthesis of chiral 3-hydroxyvalerate from single propionate-unrelated carbon sources in metabolically engineered *E. coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9(1): 96.

[77] GULEVICH A Y，SKOROKHODOVA A Y，DEBABOV V G. Biosynthesis of C_4-C_8 3-hydroxycarboxylic acids from glucose through the inverted fatty acid β-oxidation by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Biomolecules, 2024, 14(4): 449.

[78] MARTIN C H，DHAMANKAR H，TSENG H C, et al. A platform pathway for production of 3-hydroxyacids provides a biosynthetic route to 3-hydroxy-γ-butyrolactone[J]. Nature Communications, 2013, 4: 1414.

[79] ZHANG J，ZONG W M，HONG W, et al. Exploiting endogenous CRISPR-Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 49-59.

[80] SCHLAIß C，BAUR S T，MARSH J W, et al. Genetic modification of *Clostridium kluyveri* for heterologous *n*-butanol and *n*-hexanol production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2026, 92(4): e00058-26.

[81] WANG S J，ZHANG J，WANG P X, et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for hexanoic acid and hexanol production[J]. Bioresource Technology, 2026, 443: 133890.

[82] KOTTENHAHN P，PHILIPPS G，JENNEWEIN S. Hexanol biosynthesis from syngas by *Clostridium carboxidivorans* P7-product toxicity, temperature dependence and *in situ* extraction [J]. Heliyon, 2021, 7(8): e07732.

[83] CHEN J，GONZALEZ R. Engineering *Escherichia coli* for selective 1-decanol production using the reverse β-oxidation (rBOX) pathway[J]. Metabolic Engineering, 2023, 79: 173-181.

[84] GULEVICH A Y，SKOROKHODOVA A Y, DEBABOV V G. Optimization of 1,3-butanediol biosynthesis from glucose through the inverted fatty acid β-oxidation pathway by recombinant *Escherichia coli* strains[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2025, 61(3): 523-530.

[85] GULEVICH A Y，SKOROKHODOVA A Y，STASENKO A A, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1, 3-butanediol biosynthesis through the inverted fatty acid β-oxidation cycle[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2016, 52(1): 15-22.

[86] YU J L，XIA X X，ZHONG J J, et al. Direct biosynthesis of adipic acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 111(12): 2580-2586.

[87] CHEONG S，CLOMBURG J M，GONZALEZ R. Energy- and carbon-efficient synthesis of functionalized small molecules in bacteria using non-decarboxylative Claisen condensation reactions[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(5): 556-561.

[88] ZHAO M，HUANG D X，ZHANG X J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing adipic acid through the reverse adipate-degradation pathway[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 254-262.

[89] SHIN J H，ANDERSEN A J C，ACHTERBERG P, et al. Exploring functionality of the reverse β-oxidation pathway in *Corynebacterium glutamicum* for production of adipic acid[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 155.

[90] ZHAO M，LI G H，DENG Y. Engineering *Escherichia coli* for glutarate production as the C_5 platform backbone[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(16): e00814-18.

[91] GULEVICH A Y，SKOROKHODOVA A Y，DEBABOV V G. Biosynthesis of suberic acid from glucose through inverted fatty acid β-oxidation by recombinant *Escherichia coli* strains [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2025, 61(2): 238-246.

[92] ORITA I，UNNO G，KATO R, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate terpolymer from methanol *via* the reverse β-oxidation pathway in the presence of lanthanide[J]. Microorganisms, 2022, 10(1): 184.

[93] HUONG K H，ORITA I，FUKUI T. Microaerobic insights into production of polyhydroxyalkanoates containing 3-hydroxyhexanoate *via* native reverse β-oxidation from glucose in *Ralstonia eutropha* H16[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 21.

[94] JUNG H R，YANG S Y，MOON Y M, et al. Construction of efficient platform *Escherichia coli* strains for polyhydroxyalkanoate production by engineering branched pathway[J]. Polymers, 2019, 11(3): 509.

[95] ZHUANG Q Q，QI Q S. Engineering the pathway in *Escherichia coli* for the synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates consisting of both even- and odd-chain monomers[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 135.

[96] LAN E I，DEKISHIMA Y，CHUANG D S, et al. Metabolic engineering of 2-pentanone synthesis in *Escherichia coli*[J]. AIChE Journal, 2013, 59(9): 3167-3175.

[97] KIM S，CHEONG S，CHOU A, et al. Engineered fatty acid catabolism for fuel and chemical production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 42: 206-215.

[98] ROYCE L A，BOGGESS E，FU Y, et al. Transcriptomic

analysis of carboxylic acid challenge in *Escherichia coli*: beyond membrane damage[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89580.

[99] ROYCE L A，LIU P，STEBBINS M J, et al. The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(18): 8317-8327.

[100] WU J J，WANG Z，ZHANG X, et al. Improving medium chain fatty acid production in *Escherichia coli* by multiple transporter engineering[J]. Food Chemistry, 2019, 272: 628-634.

[101] TAN Z G，BLACK W，YOON J M, et al. Improving *Escherichia coli* membrane integrity and fatty acid production by expression tuning of FadL and OmpF[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 38.

[102] ZHU Z W，HU Y T，TEIXEIRA P G, et al. Multidimensional engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient synthesis of medium-chain fatty acids[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(1): 64-74.

[103] HUA S K，WANG Y Q，WANG L Y, et al. Regulatory mechanisms of acetic acid, ethanol and high temperature tolerances of acetic acid bacteria during vinegar production[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 324.

[104] CHEN C，LI Y W，CHEN X Y, et al. Application of adaptive laboratory evolution for *Yarrowia lipolytica*: a comprehensive review[J]. Bioresource Technology, 2024, 391: 129893.

[105] ROYCE L A，YOON J M，CHEN Y X, et al. Evolution for exogenous octanoic acid tolerance improves carboxylic acid production and membrane integrity[J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 180-188.

[106] GENG N F，LIU H，HAN H L, et al. Systematically engineering for efficient production of 3-methyl-1-butanol in *Escherichia coli*[J]. Advanced Science, 2026, 13(21): e20521.

[107] WANG Z Q，SONG H，KOLESKI E J, et al. A dual cellular–heterogeneous catalyst strategy for the production of olefins from glucose[J]. Nature Chemistry, 2021, 13(12): 1178-1185.

[108] WESTBROOK A W，MISCEVIC D，KILPATRICK S, et al. Strain engineering for microbial production of value-added chemicals and fuels from glycerol[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(4): 538-568.

[109] EWING T A，NOUSE N，VAN LINT M, et al. Fermentation for the production of biobased chemicals in a circular economy: a perspective for the period 2022–2050[J]. Green Chemistry, 2022, 24(17): 6373-6405.

[110] YANG F X，HANNA M A，SUN R C. Value-added uses for crude glycerol: a byproduct of biodiesel production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 13.

[111] BANSOD Y，GHASEMZADEH K，D'AGOSTINO C. Techno-economic assessment of biodiesel-derived crude glycerol purification processes[J]. RSC Sustainability, 2025, 3(6): 2605-2618.

[112] GECSE G，LABUNSKAITE R，PEDERSEN M, et al. Minimizing acetate formation from overflow metabolism in *Escherichia coli*: comparison of genetic engineering strategies to improve robustness toward sugar gradients in large-scale fermentation processes[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1339054.

[113] MURARKA A，DHARMADI Y，YAZDANI S S, et al. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(4): 1124-1135.

[114] TSENG H C，PRATHER K L J. Controlled biosynthesis of odd-chain fuels and chemicals *via* engineered modular metabolic pathways[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(44): 17925-17930.

[115] GOIS I M，BOWERS C M，KIM B C, et al. Acetate utilization strategy in chain-elongating bacteria determines butyrate *versus* medium-chain carboxylate production[J]. Nature Microbiology, 2026, 11(6): 1639-1651.

[116] HUA Q，JOYCE A R，PALSSON B Ø, et al. Metabolic characterization of *Escherichia coli* strains adapted to growth on lactate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4639-4647.

[117] GARG S，WU H，CLOMBURG J M, et al. Bioconversion of methane to C-4 carboxylic acids using carbon flux through acetyl-CoA in engineered *Methylomicrobium buryatense* 5GB1C[J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 175-183.

[118] WU Q L，BAO X，GUO W Q, et al. Medium chain carboxylic acids production from waste biomass: current advances and perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(5): 599-615.

[119] DE GROOF V，COMA M，ARNOT T, et al. Medium chain carboxylic acids from complex organic feedstocks by mixed culture fermentation[J]. Molecules, 2019, 24(3): 398.

[120] STRAZZERA G，BATTISTA F，GARCIA N H, et al. Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: a review[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 226: 278-288.

[121] CROGNALE S，BRAGUGLIA C M，GALLIPOLI A, et al. Direct conversion of food waste extract into caproate: metagenomics assessment of chain elongation process[J]. Microorganisms, 2021, 9(2): 327.

[122] ZHANG Y Y，BAI J Z，ZUO J E. Performance and mechanisms of medium-chain fatty acid production by anaerobic fermentation of food waste without external electron donors[J]. Bioresource Technology, 2023, 374: 128735.

[123] XU J J，HAO J X，GUZMAN J J L, et al. Temperature-phased conversion of acid whey waste into medium-chain carboxylic acids *via* lactic acid: no external e-donor[J]. Joule, 2018, 2(2): 280-295.

[124] SCARBOROUGH M J，LYNCH G，DICKSON M, et al. Increasing the economic value of lignocellulosic stillage

through medium-chain fatty acid production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 200.

[125] HE J G，LI L，ZHANG J，et al. Medium chain fatty acids production from simple substrate and waste activated sludge with ethanol as the electron donor[J]. Chemosphere, 2021, 283: 131278.

[126] ZHANG Y Y，BAI J Z，ZUO J E. Production of medium chain fatty acids through co-fermentation of food waste and sewage sludge without external electron donors[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022, 10(6): 108688.

[127] TIAN L Y，QI T Q，ZHANG F H, et al. Synthetic biology approaches to improve tolerance of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates[J]. Biotechnology Advances, 2025, 78: 108477.

[128] GAO Q W，ZHANG Y H，LI L L, et al. The stress of bioactive compounds on microbes in anaerobic digestion of food waste and mitigation strategies: a critical review[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 493: 152746.

[129] DUBER A，ZAGRODNIK R，GUTOWSKA N, et al. Single-*vs*. two-stage fermentation of an organic fraction of municipal solid waste for an enhanced medium chain carboxylic acids production — the impact of different pH and temperature[J]. Bioresource Technology, 2025, 415: 131697.

[130] BATTISTA F，ZENI A，ANDREOLLI M, et al. Treatment of food processing wastes for the production of medium chain fatty acids *via* chain elongation[J]. Environmental Technology & Innovation, 2024, 33: 103453.

[131] ZHU X Y，HUANG H H，HE Y, et al. A preliminary study on the feasibility of industrialization for n-caproic acid recovery from food wastewater: from lab to pilot[J]. Bioresource Technology, 2022, 366: 128154.

[132] STRIK D P B T B，GANIGUÉ R，ANGENENT L T. Editorial: Microbial chain elongation- close the carbon loop by connecting-communities[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 894490.

[133] SHRESTHA S，XUE S Q，RASKIN L. Competitive reactions during ethanol chain elongation were temporarily suppressed by increasing hydrogen partial pressure through methanogenesis inhibition[J]. Environmental Science & Technology, 2023, 57(8)3369-3379

[134] FERNÁNDEZ-BLANCO C，VEIGA M C，KENNES C. Effect of pH and medium composition on chain elongation with *Megasphaera hexanoica* producing C_4-C_8 fatty acids[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1281103.

[135] LIU Y，XUE B Y，LIU H, et al. Rational construction of synthetic consortia: key considerations and model-based methods for guiding the development of a novel biosynthesis platform[J]. Biotechnology Advances, 2024, 72: 108348.

[136] LIU Y，XUE B Y，WANG S J, et al. Model-guided rational construction of *Escherichia coli* synthetic consortia for enhanced 2-methylbutyric acid production[J]. Advanced Science, 2025, 12(22): e2416272.

[137] CAMACHO-ZARAGOZA J M, HERNÁNDEZ-CHÁVEZ G, MORENO-AVITIA F, et al. Engineering of a microbial coculture of *Escherichia coli* strains for the biosynthesis of resveratrol[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 163.

[138] ZHANG H R，WANG X N. Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2016, 37: 114-121.

[139] PEDRINO M，NARCIZO J P，AGUIAR I R, et al. Upgrading *Pseudomonas* sp. toward tolerance to a synthetic biomass hydrolysate enriched with furfural and 5-hydroxymethylfurfural [J]. ACS Omega, 2025, 10(6): 5449-5459.

[140] WANG S J，MA Z H，SU H J. Two-step continuous hydrogen production by immobilized mixed culture on corn stalk[J]. Renewable Energy, 2018, 121: 230-235.

[141] PORTIUS M，DANNEBERG C，POMPE T. Biomaterial approaches for engineering and analyzing structure and metabolic states of microbial consortia within biofilms[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2023, 81: 102916.

[142] XUE B Y，LIU Y，YANG C, et al. Co-cultivated enzyme constraint metabolic network model for rational guidance in constructing synthetic consortia to achieve optimal pathway allocation prediction[J]. Advanced Science, 2024, 11(9): e2306662.

[143] ZOMORRODI A R，MARANAS C D. OptCom: a multi-level optimization framework for the metabolic modeling and analysis of microbial communities[J]. PLoS Computational Biology, 2012, 8(2): e1002363.

[144] HARCOMBE W R，RIEHL W J，DUKOVSKI I, et al. Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics[J]. Cell Reports, 2014, 7(4): 1104-1115.

[145] JULIEN-LAFERRIÈRE A，BULTEAU L，PARROT D, et al. A combinatorial algorithm for microbial consortia synthetic design[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29182.

[146] DIENDER M，STAMS A J M，SOUSA D Z. Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 82.

[147] WU Z K，LIANG X Q，LI M K, et al. Advances in the optimization of central carbon metabolism in metabolic engineering[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 76.

[148] LI X W，WANG Y Y，CHEN X, et al. Modular deregulation of central carbon metabolism for efficient xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nature Communications, 2025, 16: 4551.

[149] FAURE L，MOLLET B，LIEBERMEISTER W, et al. A neural-mechanistic hybrid approach improving the predictive power of genome-scale metabolic models[J]. Nature Communications, 2023, 14: 4669.

[150] LAWSON C E，MARTÍ J M，RADIVOJEVIC T, et al. Machine learning for metabolic engineering: a review[J]. Metabolic Engineering, 2021, 63: 34-60.

[151] ZALLOT R，OBERG N，GERLT J A. Discovery of new enzymatic functions and metabolic pathways using genomic enzymology web tools[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 69: 77-90.

[152] JUMPER J，EVANS R，PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. Nature, 2021, 596(7873): 583-589.

[153] WANG B L，GHADERI A，ZHOU H, et al. Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(5): 473-478.

[154] WU L，WEI W，QIAN J, et al. Converting food waste into high-value medium chain fatty acids and long chain alcohols *via* chain elongation with an internally produced electron donor [J]. Green Chemistry, 2023, 25(24): 10567-10575.

[155] PARERA OLM I，SOUSA D Z. Upgrading dilute ethanol to odd-chain carboxylic acids by a synthetic co-culture of *Anaerotignum neopropionicum* and *Clostridium kluyveri*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 83.

[156] LI B L，LIU Z Q，LIU Y F, et al. Engineering plasmid-free, antibiotic-free, and inducer-free *Escherichia coli* strain for efficient 2’-fucosyllactose biosynthesis[J]. Bioresource Technology, 2026, 451: 134488.

[157] JERVIS A J，HANKO E K R，DUNSTAN M S, et al. A plasmid toolset for CRISPR-mediated genome editing and CRISPRi gene regulation in *Escherichia coli*[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(3): 1120-1129.

[158] FANG H，ZHAO J H，ZHAO X F, et al. Standardized iterative genome editing method for *Escherichia coli* based on CRISPR-Cas9[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(2): 613-623.

[159] DENG H Y，WANG J，MENG F, et al. Combining computer-aided enzyme design and chromosomal integration for plasmid-free biosynthesis of 1,5-pentanediol in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2026, 25(1): 67.

[160] WANG X L，LU L Y，LIU Q Y, et al. Integration site library for efficient construction of plasmid-free microbial cell factories in *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(44): 24687-24696.



通讯作者：苏海佳（1970—），女，教授，博士生导师。研究方向为合成生物学、生物分离、工业水处理、生物环境材料等。
E-mail：suhj@mail.buct.edu.cn



共同通讯作者：王少杰（1991—），男，副教授。研究方向为合成生物学与生物能源。
E-mail：wangshaojie@buct.edu.cn



第一作者：朱俊羿（2001—），男，博士研究生。研究方向为合成生物学。
E-mail：2023410048@buct.edu.cn

作者贡献声明

朱俊羿：提出概念、基本框架，提出研究方向，设计论文框架。
朱俊羿：设计研究思路，设计研究方案，研究方案可行性调查分析，实施研究过程。
朱俊羿：文献调研与整理。
朱俊羿、肖婧：确定研究对象范围，收集数据，采集、清洗与分析数据。
朱俊羿、肖婧：承担技术开发工作，绘制图谱。
朱俊羿、肖婧：参与撰写论文。
苏海佳、王少杰：起草论文，修订论文，审核论文。
苏海佳、王少杰：参与论文修订，论文最终版本修订。
所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突

苏海佳是本刊编委，在同行评议过程中未进行影响公平性的行为。其他作者没有利益冲突。