

# 异养微生物固定 CO<sub>2</sub> 的合成生物学研究进展

胡贵鹏<sup>1</sup>, 宋伟<sup>1</sup>, 高聪<sup>2</sup>, 郭亮<sup>2</sup>, 陈修来<sup>2</sup>, 刘立明<sup>2</sup>

1 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

胡贵鹏, 宋伟, 高聪, 郭亮, 陈修来, 刘立明. 异养微生物固定 CO<sub>2</sub> 的合成生物学研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1339-1350.

HU GP, SONG W, GAO C, GUO L, CHEN XL, LIU LM. Advances in synthetic biology of CO<sub>2</sub> fixation by heterotrophic microorganisms. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1339-1350.

**摘 要:** 人类活动造成大气二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 浓度不断升高, 使当今世界面临着气候变化的重大危机。微生物 CO<sub>2</sub> 固定为实现地球“碳中和”提供了一条有前景的绿色发展路线。与自养微生物相比, 异养微生物具有更快的生长速度和更先进的遗传工具, 但是其固定 CO<sub>2</sub> 的能力还很有限。近年来, 基于合成生物学技术强化异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定受到诸多关注, 主要包括优化能量供给、改造羧化途径以及基于异养微生物间接固定 CO<sub>2</sub>。本综述将围绕上述 3 个方面重点讨论异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定的研究进展, 为将来更好地利用微生物 CO<sub>2</sub> 固定技术实现“碳达峰、碳中和”提供参考。

**关键词:** 二氧化碳固定; 合成生物学; 代谢工程; 碳达峰; 碳中和

## Advances in synthetic biology of CO<sub>2</sub> fixation by heterotrophic microorganisms

HU Guipeng<sup>1</sup>, SONG Wei<sup>1</sup>, GAO Cong<sup>2</sup>, GUO Liang<sup>2</sup>, CHEN Xiulai<sup>2</sup>, LIU Liming<sup>2</sup>

1 School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Human activities increase the concentration of atmospheric carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), which

**Received:** August 19, 2021; **Accepted:** December 7, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904900); National Natural Science Foundation of China (22108099, 22038005); the National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-08)

**Corresponding author:** LIU Liming. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2019YFA0904900); 国家自然科学基金 (22108099, 22038005); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (LITE2018-08)

leads to global climate warming. Microbial CO<sub>2</sub> fixation is a promising green approach for carbon neutral. In contrast to autotrophic microorganisms, heterotrophic microorganisms are characterized by fast growth and ease of genetic modification, but the efficiency of CO<sub>2</sub> fixation is still limited. In the past decade, synthetic biology-based enhancement of heterotrophic CO<sub>2</sub> fixation has drawn wide attention, including the optimization of energy supply, modification of carboxylation pathway, and heterotrophic microorganisms-based indirect CO<sub>2</sub> fixation. This review focuses on the research progress in CO<sub>2</sub> fixation by heterotrophic microorganisms, which is expected to serve as a reference for peaking CO<sub>2</sub> emission and achieving carbon neutral by microbial CO<sub>2</sub> fixation.

**Keywords:** CO<sub>2</sub> fixation; synthetic biology; metabolic engineering; carbon peaking; carbon neutral

人类活动造成了大气二氧化碳浓度不断升高, 2015 年大气 CO<sub>2</sub> 浓度已超过象征性重大基准 400 mg/L, 使得当今世界面临着气候变化的重大危机<sup>[1]</sup>。2020 年 9 月 22 日, 习近平总书记在 75 届联合国大会郑重地向全世界宣布, 中国将力争于 2030 年前实现“碳达峰”, 2060 年前实现“碳中和”<sup>[2]</sup>。为了实现这一重大战略目标, 迫切需要开发高效的 CO<sub>2</sub> 封存或转化技术。

长期以来, 基于植物的 CO<sub>2</sub> 封存一直是维持地球碳循环的关键, 据统计, 每年通过植被捕获的 CO<sub>2</sub> 约 570 亿 t<sup>[3]</sup>。然而, 由于植物生长速度较慢, 且与农业活动争夺土地资源, 很难继续通过扩大植被面积在短期内实现全球碳中和。近些年来, 基于物理和化学的 CO<sub>2</sub> 封存技术不断被开发, 包括 CO<sub>2</sub> 海洋封存、CO<sub>2</sub> 地质封存、CO<sub>2</sub> 氧化后燃烧、CO<sub>2</sub> 膜分离等。当前阶段, 这些技术是作为天然光合作用封存 CO<sub>2</sub> 最重要的补充, 对于缓解大气 CO<sub>2</sub> 浓度起到了重要作用。然而, 这些技术目前尚且存在一些缺点, 如操作成本高以及可能产生潜在的环境危害<sup>[4]</sup>。

微生物 CO<sub>2</sub> 固定为实现“碳中和”提供了一条有前景的新途径, 利用微生物细胞工厂作为转化 CO<sub>2</sub> 的催化剂, 具有绿色环保、能源消耗少等优点, 并且可以生产一系列高附加值化学

品<sup>[5]</sup>。固定 CO<sub>2</sub> 的微生物包括自养微生物和异养微生物, 自养微生物可以以 CO<sub>2</sub> 为唯一碳源实现细胞生长, 但目前利用自养微生物固定 CO<sub>2</sub> 生产化学品的研究在工业上的应用还比较有限, 可能与其较慢的生长速度和相对低的生长强度有关。异养微生物虽然不能以 CO<sub>2</sub> 作为唯一碳源进行生长, 但是微生物 CO<sub>2</sub> 固定现象最早是在异养微生物中发现的 (1940 年在戊糖丙酸杆菌中首次发现<sup>[6]</sup>)。随后, CO<sub>2</sub> 固定现象被证明在异养微生物中是普遍存在的, 包括工业模式微生物大肠杆菌和酿酒酵母。

由于异养微生物的生长速度更快、基因操作工具更为先进, 近些年异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定受到科学界越来越多的关注。本综述围绕异养微生物固定 CO<sub>2</sub> 的两个本质问题 (能量供给与 CO<sub>2</sub> 羧化途径), 重点讨论了近 5 年来用于增强异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定效率的代谢工程与合成生物学策略, 最后对基于异养微生物构建 CO<sub>2</sub> 固定间接模块进行了总结。

## 1 优化能量供给增强异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定

### 1.1 内源能量重排驱动异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定

在工业发酵领域, 异养微生物以葡萄糖等有机化合物为原料生产目标化学品。在这个过

程中,糖质原料还需要燃烧成 CO<sub>2</sub> 和水,以产生细胞生长和其他生命活动所需要的能量<sup>[7]</sup>。因此,异养微生物的发酵过程通常是伴随着 CO<sub>2</sub> 的释放。然而,在异养微生物生产某些特定化学品的过程中,可以将释放的 CO<sub>2</sub> 进行重吸收并用于目标化学品的积累(图 1)。例如,当酿酒酵母以半乳糖和葡萄糖为底物生产乙醇时,会同时产生 CO<sub>2</sub> 和多余的还原力 NADH,多余的 NADH 理论上刚好可以用于 CO<sub>2</sub> 固定,因为 CO<sub>2</sub> 中碳的化合价处于最高位+4 价,而 NADH 可以为 CO<sub>2</sub> 向乙醇(碳的平均化合价为-2)的转化过程提供电子<sup>[8]</sup>。基于该原理,Guadalupe-Medina 等率先将来源于蓝细菌的 *prk* 和 *rbcLXS* 基因引入到酿酒酵母中,在中心碳代谢构建了具有 CO<sub>2</sub> 固定功能的卡尔文循环支路。研究表明,该途径可以成功将乙醇生产过程释放的 CO<sub>2</sub> 重新固定至中心代谢途径,并最终使得乙醇对底物(葡萄糖和半乳糖)的得率提高了 10%<sup>[9]</sup>。类似地,当酿酒酵母利用木糖作为底物生产乙醇时,卡尔文循环支路的构建也被证明可以降低生产过程中 CO<sub>2</sub> 的释放量<sup>[10-11]</sup>。理论上来说,基于氧化还原平衡驱动的异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定可以拓展至其他产品的应用,尤其是当目标产物中碳的氧化态高于底物中碳的氧化态时,整个胞内的还原力过剩时,重吸收 CO<sub>2</sub> 的效果可能会更好<sup>[12]</sup>。

## 1.2 外源能量供给系统的引入

内源能量重排驱动的异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定具有严格的产品依赖性,为了使异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定可以结合更多的化学品生产过程,可以在异养微生物体内引入外源的能量供给系统(图 1)。目前,被证明在异养微生物体内具备功能的外源能量供给系统包括人工电子通道、氢气利用系统、视紫红质光系统以及半导体纳米捕光系统。在这些策略中,部分研究还处于初

步功能验证阶段,尚未与 CO<sub>2</sub> 固定的研究相结合,例如人工电子通道只被可以实现电子的跨膜运输<sup>[13]</sup>,视紫红质光系统被证明可以驱动大肠杆菌的鞭毛运动<sup>[14-15]</sup>。相比之下,氢气利用系统已被证明可以驱动大肠杆菌将 CO<sub>2</sub> 还原为甲酸<sup>[16]</sup>。到目前为止,与异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定相结合最好的能量捕获系统是半导体纳米捕光系统,此类系统最初被应用于化能自养微生物的 CO<sub>2</sub> 固定,例如当热醋穆尔氏菌自组装膜定位 CdS 纳米粒子时,工程菌捕获光能驱动 CO<sub>2</sub> 固定的量子产率可以达到 2.44%<sup>[17]</sup>。基于外膜蛋白 OmpA 锚定镉离子吸附蛋白 PbrR 优化 CdS 纳米颗粒自组装程序后,该系统可以用于大肠杆菌捕获光能生产氢气。近期,一项报道了在大肠杆菌中构建自组装硫化镉捕光系统<sup>[18]</sup>,实现了光能驱动人工 CO<sub>2</sub> 固定途径提高苹果酸和丁酸碳得率,为异养微生物利用异源能量促进化学品生产提供了重要参考<sup>[19]</sup>。

## 2 改造羧化途径增强异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定

### 2.1 强化羧化途径促进特定化学品生产

在异养微生物生产化学品的过程中,理论上需要多余的还原力才能实现 CO<sub>2</sub> 固定的净收益。然而,当某种特定化学品的生产依赖羧化路径(如磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化反应<sup>[20]</sup>和丙酮酸羧化反应<sup>[21]</sup>)时,也可以实现非冗余能量驱动的 CO<sub>2</sub> 固定净收益(图 1)。一个典型的案例是大肠杆菌以葡萄糖为底物经过磷酸烯醇式丙酮酸羧化途径固定 CO<sub>2</sub> 生产琥珀酸的过程。经化学计量计算,葡萄糖通过 PEP 还原途径转化为琥珀酸的过程是缺乏 NADH 的,按照氧化还原平衡理论,这种情况不利于异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定。然而,PEP 羧化途径仍被证明是大肠杆菌合成琥珀酸的最佳途径<sup>[22-23]</sup>。我们

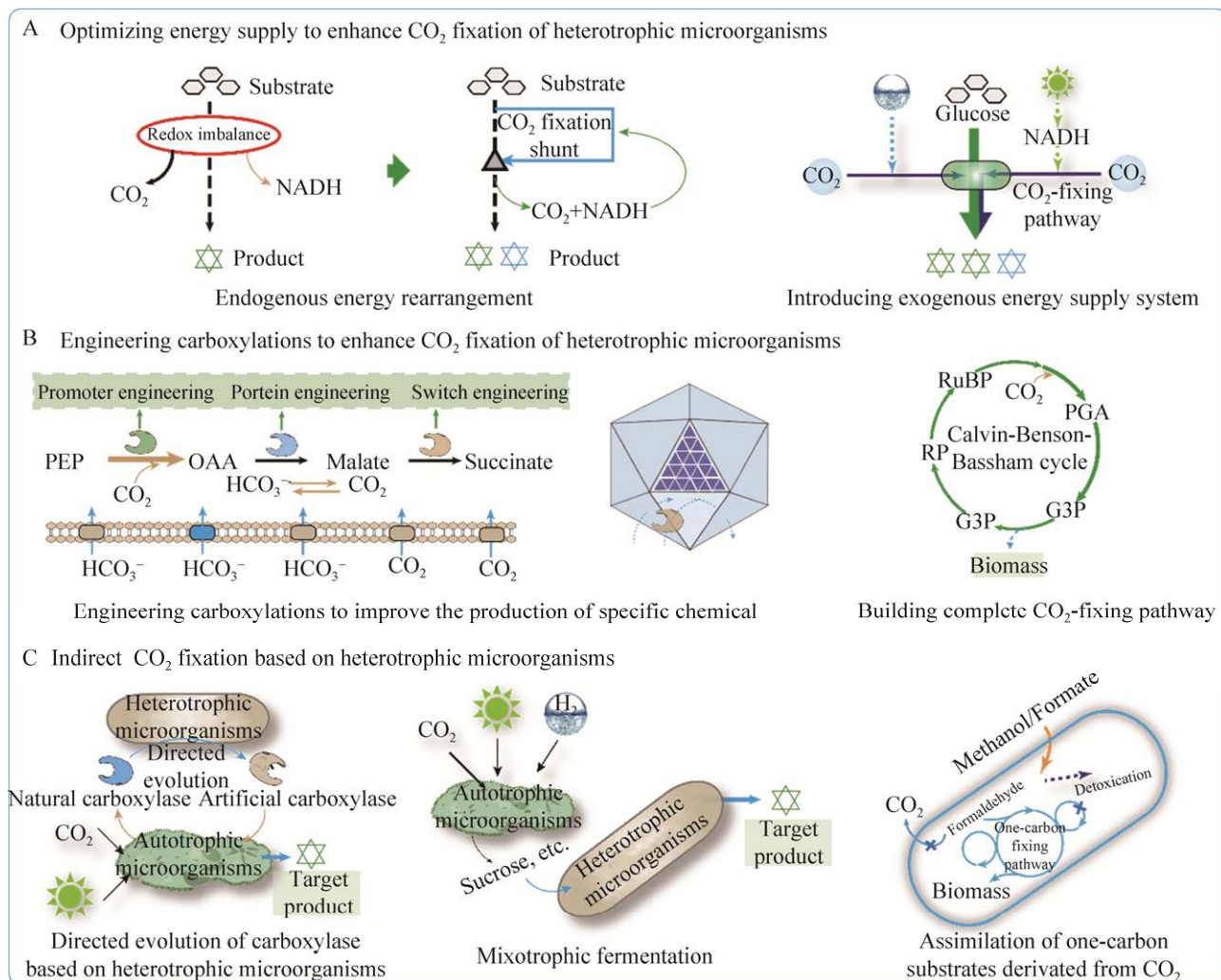


图1 强化异养微生物固定 CO<sub>2</sub> 生产化学品的策略

Figure 1 Strategies for enhancing CO<sub>2</sub> fixation and chemical production by heterotrophic microorganisms.

推测, 引起该现象的原因是产品合成的路径依赖性, 因为与氧化 TCA 途径和乙醛酸途径相比, PEP 还原途径更为简短, 从而减少了生化反应过程中的能量损失, 这种能量损失超过了 CO<sub>2</sub> 固定所需要的能量 (还原当量), 因此细胞利用 PEP 羧化途径生产琥珀酸所呈现出来的整体效率仍然最高。该理论也同样适用于苹果酸的发酵生产过程, 当在苹果酸生产菌株中引入卡尔文循环支路时, 大肠杆菌同时利用卡尔文循环支路和 PEP 羧化支路固定 CO<sub>2</sub> 生产苹果酸

时, 整个转化过程是缺乏 NADH 的, 但由于路径和 ATP 的协同驱动力, 该菌株生产苹果酸的产量是目前文献报道的最高值<sup>[24]</sup>。

为了强化路径依赖型 CO<sub>2</sub> 固定作用并进一步提高目标化学品的生产性能, 研究者通常会筛选催化效率更高的羧化酶在底盘宿主中过量表达。例如, 在大肠杆菌中过量表达来源于产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*) 的 PEP 羧激酶, 显著增强了 PEP 羧化 CO<sub>2</sub> 合成草酰乙酸 (苹果酸合成的前体) 的效率, 使得

大肠杆菌生产苹果酸的生产强度达到文献报道最高的 0.77 g/(L·h)<sup>[25]</sup>。此外,还可以通过优化异养微生物胞内 CO<sub>2</sub> 浓度来增强路径依赖型 CO<sub>2</sub> 固定效率,例如引入自养微生物的无机碳 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub>) 转运蛋白<sup>[26]</sup>或者碳酸酐酶<sup>[27]</sup>。在执行该策略的过程中,需要注意的一个关键点是异源蛋白的表达强度。研究表明,当在大肠杆菌中过量表达来源于蓝细菌的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运蛋白 SbtA 和 BicA 时,虽然 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的转运效率显著提高,但是琥珀酸的产量却有所下降并且细胞生长受到抑制,原因可能是 CO<sub>2</sub> 转运和 CO<sub>2</sub> 固定出现了失衡,或者膜转运蛋白的过量表达增加了细胞负担<sup>[26]</sup>。为了解决这一问题,可以通过启动子工程<sup>[20]</sup>、RBS 工程<sup>[28]</sup>或开关工程<sup>[29]</sup>对关键蛋白的表达量进行调试。例如,当利用弱启动子表达 SbtA 和 BicA,同时利用强启动子表达 PEP 羧激酶时,琥珀酸的产量提升最为明显,较对照组提高了 37.5%<sup>[20]</sup>。此外,对于不同的羧化反应,所需要引入的无机碳转运蛋白可能有所不同<sup>[30]</sup>,例如丙酮酸羧化酶主要利用气体 CO<sub>2</sub> (CO<sub>2[q]</sub>)<sup>[21]</sup>,可能引入 CO<sub>2[q]</sub>转运蛋白能够达到更好的效果。

强化异养微生物羧化途径的另一个潜在策略是构建人工羧酶体。在蓝藻及某些化能自养菌中,羧酶体通过包裹 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (RubisCO) 和碳酸酐酶,提高 RubisCO 周围的 CO<sub>2</sub> 浓度来提高固碳效率<sup>[31]</sup>。近年来,在异养微生物中构建完整羧酶体已经实现,通过在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中引入来源于那不勒斯硫杆菌羧酶体的 10 个编码基因,原子力电子显微镜观察到形态与原宿主体内很相似的六面体结构,细胞生长实验表明,含有该六面体的工程菌株具有更高的 CO<sub>2</sub> 固定效率<sup>[32]</sup>。上述案例是异源构建羧酶体的首例,但是羧酶体自组装的效率还有待提升,因为羧酶体编码基

因在大肠杆菌中的表达水平比那不勒斯硫杆菌低十余倍<sup>[33]</sup>。近期,研究者将来源于原绿球藻的羧酶体编码基因与分子伴侣 GroEL/S 和 RbcX 在大肠杆菌中进行协同表达,并利用启动子工程对表达水平进行优化,最后实现了羧酶体以更完整的结构和更高的效率实现了自组装,并基于 <sup>13</sup>C 示踪实验验证了羧酶体可以将 CO<sub>2</sub> 固定到中心代谢产物 (如:乙酰 CoA、苹果酸) 上<sup>[34]</sup>。由于人工羧酶体的构建需要表达很多外源蛋白,对宿主会造成较大的代谢负担,目前还未用于异养微生物固定 CO<sub>2</sub> 生产化学品的过程。

## 2.2 构建完整 CO<sub>2</sub> 固定途径

随着合成生物学的发展<sup>[35]</sup>,研究者尝试在异养微生物体内构建来源于自养微生物的完整 CO<sub>2</sub> 固定循环,例如卡尔文循环<sup>[36-37]</sup>、3-羟基丙酸循环<sup>[38]</sup>、HWLS 途径<sup>[19]</sup>以及羟丙二酰-CoA 途径<sup>[39]</sup>。2013 年,研究者尝试将完整的 3-羟基丙酸循环引入大肠杆菌,然而结果表明,该途径在大肠杆菌体内只具有模块化作用,无法完整地运行,原因可能是异源长路径引入造成了较大的代谢负荷并且缺乏足够的能量驱动<sup>[40]</sup>。为了解决这个难题,以色列研究人员将卡尔文循环引入大肠杆菌,结合基因组编辑和适应性进化将整个代谢途径分成了 2 个模块,TCA 循环模块负责代谢丙酮酸供给能量 (ATP 和 NADH),卡尔文循环模块则利用 TCA 循环提供的能量固定 CO<sub>2</sub> 以合成细胞生长所需要的代谢物。最终,<sup>13</sup>C 示踪实验表明,细胞中几乎所有糖类物质以及关键氨基酸的合成都是以 CO<sub>2</sub> 为碳源,这一项重要研究被认为是合成生物学的重大进展,该菌株也被称为是首个“半自养菌株”<sup>[41-42]</sup>。

基于“半自养菌株”的构建,研究者尝试在异养微生物体内同时构建完整 CO<sub>2</sub> 固定途径和

外源能量供给模块, 并采用长时间的适应性进化技术, 以实现将异养微生物改造成完全的自养微生物<sup>[43]</sup>。2020年, 研究者在大肠杆菌体内同时构建卡尔文循环和甲酸能量供给系统, 在适应性进化 300 d 后, 大肠杆菌实现了以 CO<sub>2</sub> 为碳源合成全部生物量<sup>[44]</sup>; 类似的, 在利用甲醇作为供能系统的毕赤酵母中构建卡尔文循环并结合长期的适应性进化后, 毕赤酵母也实现了以 CO<sub>2</sub> 积累生物量的自养生长<sup>[45]</sup>。这两项研究在合成生物学和 CO<sub>2</sub> 固定领域具有划时代的意义, 但是目前这些人工自养微生物距离工业应用还有很大距离, 除了倍增速度比较低之外, 甲酸/甲醇能量供给系统还会伴随着大量的 CO<sub>2</sub> 释放 (目前 CO<sub>2</sub> 释放量大于吸收量)。

为了实现人工自养微生物的工业应用, 未来首先关注更高效能量系统的构建与适配, 例如构建简易的光系统, 实现无碳排放的能量供给, 并驱动完整 CO<sub>2</sub> 固定的运行, 再利用适应性进化技术, 不断驯化获得快速生长的人工自养菌株。此外, 还可以通过关注异养微生物内源未被挖掘的潜在碳固定途径以减少外源引入蛋白所带来的代谢负荷, 例如德国研究者利用计算机技术挖掘出大肠杆菌内源 Gnd-Entner-Doudoroff 循环具备 CO<sub>2</sub> 固定高热力学驱动力<sup>[46]</sup>。当更加简易高效的光能驱动系统与异养微生物内源 CO<sub>2</sub> 固定途径相结合, 相信在不久的将来可以实现人工自养微生物高效捕获 CO<sub>2</sub> 生产高值产品<sup>[47]</sup>。

### 3 基于异养微生物间接固定 CO<sub>2</sub> 的合成生物学研究

#### 3.1 基于异养微生物定向进化羧化酶

羧化酶是生物固定 CO<sub>2</sub> 最重要的元件, 然而在自养微生物体内, 羧化酶的催化性能却不一定是最优的<sup>[48]</sup>。近年来, 利用快速生长的异

养微生物作为改造自养微生物羧化酶的宿主引起了广泛关注 (图 1)。例如, 利用大肠杆菌中定向进化蓝细菌来源的 RuBisCO, 使得改造后的蛋白在不降低 CO<sub>2</sub> 亲和力的同时催化效率提高 3 倍, 将突变体重新引入蓝细菌后, 其光合作用的效率可以提高约 55%<sup>[49]</sup>。为了获得更高效的改造效率, 需要建立更便捷的通量筛选体系。为此, 研究者基于中间产物毒性原理建立了生长表观体系, 并且成功应用于 RuBisCO 的非理性改造, 获得了效率提升更为明显的突变体<sup>[50]</sup>。类似的方法还应用于丙酰辅酶 A 羧化酶 (PCC) 的改造, 基于草酰乙酸有效性遗传筛选系统的建立, 双突变体 PCC(N220I/I391T) 的  $k_{cat}/K_m$  显示总体催化效率提高了 94 倍。

近期, 大肠杆菌表达系统还被应用于异源表达植物来源的 RuBisCO (多亚基组成, 很难在细菌表达系统中具有活性)。基于大量实验尝试, 最终研究者发现, 同时表达分子伴侣 Cpn60/Cpn20、RuBisCO 积累因子 1 和 2、RbcX 以及 BSD2 时, 来源于拟南芥的 RuBisCO 可以在大肠杆菌具备功能。该成果将为植物 RuBisCO 的定向进化提供重要底盘, 为强化植物的光合作用奠定重要基础<sup>[51]</sup>。

#### 3.2 自养与异养微生物的混菌发酵

除了作为定向进化羧化酶的宿主外, 异养微生物还可以与自养微生物进行混菌发酵<sup>[52]</sup>。在混菌发酵的过程中, 自养微生物首先将 CO<sub>2</sub> 转化成其本身容易积累的代谢产物 (如: 蔗糖), 然后该代谢产物作为异养微生物的原料, 用于生产目标化学品<sup>[53-54]</sup> (图 1)。自养与异养微生物的混菌发酵综合了两类微生物各自的优点, 包括自养微生物以 CO<sub>2</sub> 为唯一碳源进行生长的能力, 以及异养微生物高效的遗传改造工具和高效的合成能力。多项研究表明, 混菌发酵体系相比单菌发酵体系拥有更好的稳定性和鲁棒



性<sup>[55-56]</sup>、更高的底物利用效率<sup>[57-59]</sup>以及目标化学品生产能力<sup>[60-64]</sup>。

自养与异养微生物的混菌发酵性能的一个关键因素是培养体系的营养条件,例如当限制氮源供应时,由细长聚球藻和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)组成的混菌体系可以更高效地积累多羟基烷烃酸盐<sup>[65]</sup>。为了更精准地为混菌体系提供最优培养条件,研究者基于基因组规模网络模型分析群落通量平衡<sup>[66]</sup>,并开发了组学数据指导的交叉喂养技术<sup>[67]</sup>。除此之外,当前用于改进自养与异养混菌发酵最有效的策略是设计互利共生体系,包括强化菌种之间的物质交换和能量交换。能量交换的案例相对较少,如强化硫还原泥土杆菌(*Geobacter metallireducens*)和竹节状甲烷鬃毛菌(*Methanosaeta harundinacea*)的种间电子传递可以促进混菌体系甲烷的合成<sup>[68]</sup>。相比之下,强化物质交换应用较为广泛,例如,细长聚球藻利用蔗糖喂养大肠杆菌,而后者的接种可以反过来促进细长聚球藻的生长,该互利共生体系被证明能够保持更好的代谢灵活性,从而将稳定发酵的时间延长至2-3个月<sup>[56]</sup>。此外,细长聚球藻还可以与维氏固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)实现互利共生,前者为后者提供碳源(蔗糖),而后者则为前者提供氮源(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sup>[69]</sup>。近期的研究还表明,强化两种微生物细胞间的物质交换还可以使个体物种的代谢发生不可预见的重排,从而实现混菌体系积累非原生代谢产物。如永达尔梭菌和丙酮丁醇梭菌混菌体系积累非原生代谢产物异丙醇<sup>[70]</sup>。

### 3.3 基于异养微生物同化 CO<sub>2</sub> 衍生一碳化合物

CO<sub>2</sub> 可以通过多种简单的化学途径(如:CO<sub>2</sub> 的电化学还原、CO<sub>2</sub> 的氢化)高效地转化为甲酸、甲醇和甲醛等其他一碳化合物<sup>[71-72]</sup>。近

期,代谢工程学者重点关注微生物固定这些 CO<sub>2</sub> 衍生的一碳化合物,期望最终可以将生物一碳资源利用与化学 CO<sub>2</sub> 还原过程相整合,形成新型高效的杂合 CO<sub>2</sub> 转化体系(图1)。关于微生物固定 CO<sub>2</sub> 衍生一碳化合物的研究进展主要可概括为三个方面:设计新型一碳代谢路径、构建一碳化合物自养菌株以及利用混合碳源生产高值化学品<sup>[73]</sup>。到目前为止,针对 CO<sub>2</sub> 衍生一碳化合物所设计的新途径包括 FLS 途径<sup>[74]</sup>、人工乙酰辅酶 A 途径<sup>[75]</sup>以及还原甘氨酸途径<sup>[76]</sup>。其中,在微生物体内应用最成功的人工一碳固定途径是还原甘氨酸途径,该途径的模块化构建和适应性进化可以使大肠杆菌实现完全依赖甲酸的生长<sup>[77]</sup>。除了人工一碳代谢路径外,天然一碳利用途径的移植和进化也可以实现人工一碳自养菌株的构建<sup>[78]</sup>。例如,将天然甲醇固定途径—磷酸核酮糖(RuMP)循环整合到大肠杆菌中,并结合适应性进化和甲醛解毒策略,使大肠杆菌完全利用甲醇实现细胞生长<sup>[79]</sup>。

CO<sub>2</sub> 衍生一碳化合物的另一个重要研究是与糖质原料作为混合碳源以促进微生物生产化学品的产量或提高目标产品对糖质原料的碳得率<sup>[80-81]</sup>。通过删除大肠杆菌本源磷酸戊糖途径中的必需基因,并引入 RuMP 途径,构建了一株依赖甲醇生长的营养缺陷型菌株,实现了对甲醇和木糖摄取速度达到1:1,并且目标产品乙醇和1-丁醇的产量分别达到4.6 g/L和2.0 g/L<sup>[82]</sup>。此外,将大肠杆菌改造可以利用甲醛和乙醇为底物的菌株,实现了目标产品1,3-丙二醇的产量达到17.35 mmol/L<sup>[83]</sup>。

## 4 展望

异养微生物 CO<sub>2</sub> 固定拥有广泛的应用前景,但相关研究尚处于初步发展阶段,仍然存

在很多不足,例如:CO<sub>2</sub>固定效率低、产业放大困难等<sup>[84]</sup>。未来几年的研究重点应当还是围绕CO<sub>2</sub>固定途径和能量供给这两个本质进行展开。关于CO<sub>2</sub>固定途径,可以基于代谢网络模型和化学计量学设计在热力学/动力学上效率更高、且对能量需求更低的新途径<sup>[85-88]</sup>,并尝试将这些途径引入异养微生物。关于能量供给,可以针对异养微生物发展光电子转化效率更高的人工光合系统<sup>[89-90]</sup>、设计电驱动CO<sub>2</sub>固定效率更高的电化学系统<sup>[91-92]</sup>,以及挖掘新型无机化学能驱动系统<sup>[93]</sup>。基于新型CO<sub>2</sub>固定途径和能量供给的设计,还可以进一步尝试构建生长性能更优的人工自养微生物,以及在人工自养底盘上重组特定产物合成途径从而实现目标化学品的积累<sup>[94]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Hu G, Li Y, Ye C, et al. Engineering microorganisms for enhanced CO<sub>2</sub> sequestration. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(5): 532-547.
- [2] 沈辉, 麦耀华, 王士涛. 特约主编寄语. *太阳能*, 2021(5): 2.  
Shen H, Mai YH, Wang ST. Send word from special chief editor. *Solar Energy*, 2021(5): 2 (in Chinese).
- [3] Hicks N, Vik U, Taylor P, et al. Using prokaryotes for carbon capture storage. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(1): 22-32.
- [4] 卞化, 孙新晓, 袁其朋. 代谢工程改造异养微生物固定CO<sub>2</sub>研究进展. *生物工程学报*, 2019, 35(2): 195-203.  
Bian H, Sun XX, Yuan QP. Advances in metabolic engineering of heterotrophic microorganisms for CO<sub>2</sub> fixation: a review. *Chin J Biotech*, 2019, 35(2): 195-203 (in Chinese).
- [5] Liu ZH, Wang K, Chen Y, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO<sub>2</sub>. *Nat Catal*, 2020, 3(3): 274-288.
- [6] Saini R, Kapoor R, Kumar R, et al. CO<sub>2</sub> utilizing microbes—a comprehensive review. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(6): 949-960.
- [7] Weusthuis RA, Lamot I, Van Der Oost J, et al. Microbial production of bulk chemicals: development of anaerobic processes. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(4): 153-158.
- [8] Dugar D, Stephanopoulos G. Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(12): 1074-1078.
- [9] Guadalupe-Medina V, Wisselink HW, Luttik MA, et al. Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 125.
- [10] Li YJ, Wang MM, Chen YW, et al. Engineered yeast with a CO<sub>2</sub>-fixation pathway to improve the bio-ethanol production from xylose-mixed sugars. *Sci Rep*, 2017, 7: 43875.
- [11] Xia PF, Zhang GC, Walker B, et al. Recycling carbon dioxide during xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(2): 276-283.
- [12] Yang CH, Liu EJ, Chen YL, et al. The comprehensive profile of fermentation products during *in situ* CO<sub>2</sub> recycling by Rubisco-based engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 133.
- [13] Jensen HM, Albers AE, Malley KR, et al. Engineering of a synthetic electron conduit in living cells. *PNAS*, 2010, 107(45): 19213-19218.
- [14] Walter JM, Greenfield D, Bustamante C, et al. Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin. *PNAS*, 2007, 104(7): 2408-2412.
- [15] Wang Y, Li Y, Xu T, et al. Experimental evidence for growth advantage and metabolic shift stimulated by photophosphorylation of proteorhodopsin expressed in *Escherichia coli* at anaerobic condition. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(5): 947-956.
- [16] Roger M, Brown F, Gabrielli W, et al. Efficient hydrogen-dependent carbon dioxide reduction by *Escherichia coli*. *Curr Biol*, 2018, 28(1): 140-145.e2.
- [17] Sakimoto KK, Wong AB, Yang P. Self-photosensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production. *Science*, 2016, 351(6268): 74-77.
- [18] Guo J, Suástegui M, Sakimoto KK, et al. Light-driven fine chemical production in yeast biohybrids. *Science*, 2011, 29(6): 949-960.



- 2018, 362(6416): 813-816.
- [19] Hu GP, Li ZH, Ma DL, et al. Light-driven CO<sub>2</sub> sequestration in *Escherichia coli* to achieve theoretical yield of chemicals. *Nat Catal*, 2021, 4(5): 395-406.
- [20] Yu JH, Zhu LW, Xia ST, et al. Combinatorial optimization of CO<sub>2</sub> transport and fixation to improve succinate production by promoter engineering. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(7): 1531-1541.
- [21] Brown SH, Bashkirova L, Berka R, et al. Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(20): 8903-8912.
- [22] Ahn JH, Seo H, Park W, et al. Enhanced succinic acid production by *Mannheimia* employing optimal malate dehydrogenase. *Nat Commun*, 2020, 11: 1970.
- [23] Zhang X, Jantama K, Moore JC, et al. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *PNAS*, 2009, 106(48): 20180-20185.
- [24] Hu G, Zhou J, Chen X, et al. Engineering synergetic CO<sub>2</sub>-fixing pathways for malate production. *Metab Eng*, 2018, 47: 496-504.
- [25] Moon SY, Hong SH, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid. *Biochem Eng J*, 2008, 40(2): 312-320.
- [26] Zhu LW, Zhang L, Wei LN, et al. Collaborative regulation of CO<sub>2</sub> transport and fixation during succinate production in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 17321.
- [27] Wang D, Li Q, Li WL, et al. Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Enzym Microb Technol*, 2009, 45(6/7): 491-497.
- [28] Xu P, Xu P, Gu Q, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nat Commun*, 2013, 4: 1409.
- [29] Yang Y, Lin Y, Wang J, et al. Sensor-regulator and RNAi based bifunctional dynamic control network for engineered microbial synthesis. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3043.
- [30] Schwander T, Schada Von Borzyskowski L, Burgener S, et al. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*. *Science*, 2016, 354(6314): 900-904.
- [31] Kerfeld CA, Melnicki MR. Assembly, function and evolution of cyanobacterial carboxysomes. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, 31: 66-75.
- [32] Bonacci W, Teng PK, Afonso B, et al. Modularity of a carbon-fixing protein organelle. *PNAS*, 2012, 109(2): 478-483.
- [33] Fan C, Cheng S, Sinha S, et al. Interactions between the termini of lumen enzymes and shell proteins mediate enzyme encapsulation into bacterial microcompartments. *PNAS*, 2012, 109(37): 14995-15000.
- [34] Zhang Y, Zhou J, Zhang Y, et al. Auxiliary module promotes the synthesis of carboxysomes in *E. coli* to achieve high-efficiency CO<sub>2</sub> assimilation. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(4): 707-715.
- [35] Herz E, Antonovsky N, Bar-On Y, et al. The genetic basis for the adaptation of *E. coli* to sugar synthesis from CO<sub>2</sub>. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1-10.
- [36] Gong F, Liu G, Zhai X, et al. Quantitative analysis of an engineered CO<sub>2</sub>-fixing *Escherichia coli* reveals great potential of heterotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 86.
- [37] Tseng IT, Chen YL, Chen CH, et al. Exceeding the theoretical fermentation yield in mixotrophic rubisco-based engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2018, 47: 445-452.
- [38] Herter S, Fuchs G, Bacher A, et al. A bicyclic autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathway in *Chloroflexus aurantiacus*. *J Biol Chem*, 2002, 277(23): 20277-20283.
- [39] Scheffen M, Marchal DG, Beneyton T, et al. A new-to-nature carboxylation module to improve natural and synthetic CO<sub>2</sub> fixation. *Nat Catal*, 2021, 4(2): 105-115.
- [40] Mattozzi Md, Ziesack M, Voges MJ, et al. Expression of the sub-pathways of the *Chloroflexus aurantiacus* 3-hydroxypropionate carbon fixation bicycle in *E. coli*: toward horizontal transfer of autotrophic growth. *Metab Eng*, 2013, 16: 130-139.
- [41] Antonovsky N, Gleizer S, Noor E, et al. Sugar synthesis from CO<sub>2</sub> in *Escherichia coli*. *Cell*, 2016, 166(1): 115-125.
- [42] Schada Von Borzyskowski L, Carrillo M, Leupold S, et al. An engineered Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Metab Eng*, 2018, 47: 423-433.

- [43] Fuchs G. Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol*, 2011, 65: 631-658.
- [44] Gleizer S, Ben-Nissan R, Bar-On YM, et al. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO<sub>2</sub>. *Cell*, 2019, 179(6): 1255-1263.e12.
- [45] Gassler T, Sauer M, Gasser B, et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(2): 210-216.
- [46] Satanowski A, Dronsella B, Noor E, et al. Awakening a latent carbon fixation cycle in *Escherichia coli*. *Nat Commun*, 2020, 11: 5812.
- [47] Hädicke O, von Kamp A, Aydogan T, et al. OptMDF pathway: identification of metabolic pathways with maximal thermodynamic driving force and its application for analyzing the endogenous CO<sub>2</sub> fixation potential of *Escherichia coli*. *PLoS Comput Biol*, 2018, 14(9): e1006492.
- [48] Pottier M, Gilis D, Boutry M. The hidden face of rubisco. *Trends Plant Sci*, 2018, 23(5): 382-392.
- [49] Durão P, Aigner H, Nagy P, et al. Opposing effects of folding and assembly chaperones on evolvability of rubisco. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(2): 148-155.
- [50] Cai Z, Liu G, Zhang J, et al. Development of an activity-directed selection system enabled significant improvement of the carboxylation efficiency of rubisco. *Protein Cell*, 2014, 5(7): 552-562.
- [51] Aigner H, Wilson RH, Bracher A, et al. Plant rubisco assembly in *E. coli* with five chloroplast chaperones including BSD2. *Science*, 2017, 358(6368): 1272-1278.
- [52] 张丽, 宋馨宇, 陈磊, 等. 光合微生物混菌体系的应用和研究进展. *生物工程学报*, 2020, 36(4): 652-665. Zhang L, Song XY, Chen L, et al. Recent progress in photosynthetic microbial co-culture systems. *Chin J Biotech*, 2020, 36(4): 652-665 (in Chinese).
- [53] Li T, Li CT, Butler K, et al. Mimicking lichens: incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 55.
- [54] Weiss TL, Young EJ, Ducat DC. A synthetic, light-driven consortium of cyanobacteria and heterotrophic bacteria enables stable polyhydroxybutyrate production. *Metab Eng*, 2017, 44: 236-245.
- [55] Fradinho JC, Domingos JM, Carvalho G, et al. Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. *Bioresour Technol*, 2013, 132: 146-153.
- [56] Hays SG, Yan LLW, Silver PA, et al. Synthetic photosynthetic consortia define interactions leading to robustness and photoproduction. *J Biol Eng*, 2017, 11: 4.
- [57] Argun H, Kargi F, Kapdan IK. Effects of the substrate and cell concentration on bio-hydrogen production from ground wheat by combined dark and photo-fermentation. *Int J Hydrog Energy*, 2009, 34(15): 6181-6188.
- [58] Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, et al. H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Lett*, 1998, 20(2): 143-147.
- [59] Song X, Diao J, Yao J, et al. Engineering a central carbon metabolism pathway to increase the intracellular acetyl-CoA pool in *Synechocystis* sp. PCC 6803 grown under photomixotrophic conditions. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(4): 836-846.
- [60] Argun H, Kargi F, Kapdan IK. Hydrogen production by combined dark and light fermentation of ground wheat solution. *Int J Hydrog Energy*, 2009, 34(10): 4305-4311.
- [61] Ban S, Lin W, Wu F, et al. Algal-bacterial cooperation improves algal photolysis-mediated hydrogen production. *Bioresour Technol*, 2018, 251: 350-357.
- [62] Jiao YQ, Navid A, Stewart BJ, et al. Syntrophic metabolism of a co-culture containing *Clostridium cellulolyticum* and *Rhodospseudomonas palustris* for hydrogen production. *Int J Hydrog Energy*, 2012, 37(16): 11719-11726.
- [63] Liu C, Luo G, Wang W, et al. The effects of pH and temperature on the acetate production and microbial community compositions by syngas fermentation. *Fuel*, 2018, 224: 537-544.
- [64] Zhang L, Chen L, Diao J, et al. Construction and analysis of an artificial consortium based on the

- fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 to produce the platform chemical 3-hydroxypropionic acid from CO<sub>2</sub>. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 82.
- [65] Löwe H, Hobmeier K, Moos M, et al. Photoautotrophic production of polyhydroxyalkanoates in a synthetic mixed culture of *Synechococcus elongatus cscB* and *Pseudomonas putida cscAB*. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 190.
- [66] Benito-Vaquerizo S, Diender M, Parera Olm I, et al. Modeling a co-culture of *Clostridium autoethanogenum* and *Clostridium kluyveri* to increase syngas conversion to medium-chain fatty-acids. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 3255-3266.
- [67] Zuñiga C, Li CT, Yu G, et al. Environmental stimuli drive a transition from cooperation to competition in synthetic phototrophic communities. *Nat Microbiol*, 2019, 4(12): 2184-2191.
- [68] Rotaru AE, Shrestha PM, Liu FH, et al. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy Environ Sci*, 2014, 7(1): 408-415.
- [69] Smith MJ, Francis MB. A designed *A. vinelandii*-*S. elongatus* coculture for chemical photoproduction from air, water, phosphate, and trace metals. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(9): 955-961.
- [70] Charubin K, Papoutsakis ET. Direct cell-to-cell exchange of matter in a synthetic *Clostridium* syntrophy enables CO<sub>2</sub> fixation, superior metabolite yields, and an expanded metabolic space. *Metab Eng*, 2019, 52: 9-19.
- [71] Bar-Even A. Formate assimilation: the metabolic architecture of natural and synthetic pathways. *Biochemistry*, 2016, 55(28): 3851-3863.
- [72] Schuchmann K, Müller V. Direct and reversible hydrogenation of CO<sub>2</sub> to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science*, 2013, 342(6164): 1382-1385.
- [73] Bar-Even A, Noor E, Flamholz A, et al. Design and analysis of metabolic pathways supporting formatotrophic growth for electricity-dependent cultivation of microbes. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827(8/9): 1039-1047.
- [74] Siegel JB, Smith AL, Poust S, et al. Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway. *PNAS*, 2015, 112(12): 3704-3709.
- [75] Lu X, Liu Y, Yang Y, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1378.
- [76] Gonzalez De La Cruz J, Machens F, Messerschmidt K, et al. Core catalysis of the reductive glycine pathway demonstrated in yeast. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(5): 911-917.
- [77] Kim S, Lindner SN, Aslan S, et al. Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(5): 538-545.
- [78] Keller P, Noor E, Meyer F, et al. Methanol-dependent *Escherichia coli* strains with a complete ribulose monophosphate cycle. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5403.
- [79] Chen FY, Jung HW, Tsuei CY, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol. *Cell*, 2020, 182(4): 933-946.e14.
- [80] Tashiro Y, Hirano S, Matson MM, et al. Electrical-biological hybrid system for CO<sub>2</sub> reduction. *Metab Eng*, 2018, 47: 211-218.
- [81] 高琳惠, 蔡鹏, 周雍进. 甲醇酵母代谢工程研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 966-979.  
Gao LH, Cai P, Zhou YJ. Advances in metabolic engineering of methylotrophic yeasts. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 966-979 (in Chinese).
- [82] Chen CT, Chen FY, Bogorad IW, et al. Synthetic methanol auxotrophy of *Escherichia coli* for methanol-dependent growth and production. *Metab Eng*, 2018, 49: 257-266.
- [83] Meng H, Wang C, Yuan Q, et al. An aldolase-based new pathway for bioconversion of formaldehyde and ethanol into 1,3-propanediol in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(4): 799-809.
- [84] 肖建勋, Pier-Luc Tremblay, 张甜. 蓝细菌固碳合成乳酸技术的发展与展望. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1229-1236.  
Xiao JX, Pier-Luc T, Zhang T. Production of lactate from carbon fixation by cyanobacteria: development and prospect. *Chin J Biotech*, 2021, 37(4): 1229-1236 (in Chinese).

- 
- [85] Bar-Even A, Flamholz A, Noor E, et al. Thermodynamic constraints shape the structure of carbon fixation pathways. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1817(9): 1646-1659.
- [86] Bar-Even A, Noor E, Lewis NE, et al. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *PNAS*, 2010, 107(19): 8889-8894.
- [87] Bar-Even A, Noor E, Milo R. A survey of carbon fixation pathways through a quantitative lens. *J Exp Bot*, 2012, 63(6): 2325-2342.
- [88] Boyle NR, Morgan JA. Computation of metabolic fluxes and efficiencies for biological carbon dioxide fixation. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 150-158.
- [89] Liu C, Gallagher JJ, Sakimoto KK, et al. Nanowire-bacteria hybrids for unassisted solar carbon dioxide fixation to value-added chemicals. *Nano Lett*, 2015, 15(5): 3634-3639.
- [90] Nichols EM, Gallagher JJ, Liu C, et al. Hybrid bioinorganic approach to solar-to-chemical conversion. *PNAS*, 2015, 112(37): 11461-11466.
- [91] Bajracharya S, Yuliasni R, Vanbroekhoven K, et al. Long-term operation of microbial electrosynthesis cell reducing CO<sub>2</sub> to multi-carbon chemicals with a mixed culture avoiding methanogenesis. *Bioelectrochemistry*, 2017, 113: 26-34.
- [92] Zhang X, Wu Z, Zhang X, et al. Highly selective and active CO<sub>2</sub> reduction electrocatalysts based on cobalt phthalocyanine/carbon nanotube hybrid structures. *Nat Commun*, 2017, 8: 14675.
- [93] Pachiadaki MG, Sintes E, Bergauer K, et al. Major role of nitrite-oxidizing bacteria in dark ocean carbon fixation. *Science*, 2017, 358(6366): 1046-1051.
- [94] Kerfeld CA. Rewiring *Escherichia coli* for carbon-dioxide fixation. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(10): 1035-1036.

(本文责编 陈宏宇)