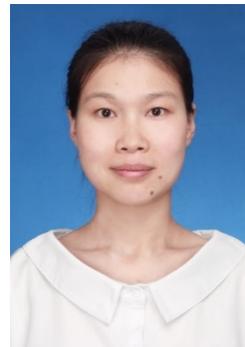


· 非粮原料开发利用 ·

汤红婷 中国科学院深圳先进技术研究院副研究员、硕士生导师，入选深圳市后备级人才、中国科学院特别研究助理。长期致力于异源途径与底盘细胞适配机制的研究，聚焦于利用合成生物学技术构建高效酵母细胞工厂，实现二氧化碳、纤维素等原料到天然产物、糖类、蛋白等高价化合物的生物炼制。主持国家自然科学基金青年项目、广东省自然科学基金面上项目等。相关成果以第一作者或通信作者发表于 *Nature Catalysis*、*Nature Synthesis*、*Journal of the American Chemical Society*、*Metabolic Engineering* 等期刊。



于涛 中国科学院深圳先进技术研究院研究员、博士生导师，国家高层次人才青年项目基金获得者，国家重点研发计划青年项目首席科学家。主持国家自然科学基金面上项目，参与国家重点研发计划合成生物学重点专项等。实验室研究领域是细胞合成代谢模式的构建与机制解析。团队致力于利用合成生物学方法，解决可持续制造、绿色能源的生物存储与粮食安全等重大问题。近5年来研究成果发表在 *Cell*、*Nature Catalysis* (2篇)、*Nature Metabolism*、*Nature Communications* 等国际知名期刊，其中“CO₂ 直接合成葡萄糖与脂肪酸”的成果入选2022年度“中国十大科技进展新闻”。



微生物利用 CO₂ 及其低碳衍生物为原料制备粮食类产物的研究进展

白振敏^{1,4}，郭姝媛^{2,3,4}，杨一群^{2,3,4}，庄周康^{2,3,4}，曹文兵^{2,3,4}，杨研^{1,4}，于涛^{2,3,4*}，汤红婷^{2,3,4*}

1 中海石油化学股份有限公司，北京 100029

2 中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 合成生物化学研究中心，广东 深圳 518055

3 中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 定量合成生物学重点实验室，深圳 518055

4 中国科学院深圳先进技术研究院 碳中和与粮食安全交叉创新联合实验室，广东 深圳 518055

资助项目：国家重点研发计划(2021YFA0911000)；国家自然科学基金(32071416)；广东省重点区域研究与发展计划项目(2022B1111080005)；深圳合成生物学创新研究院科研基金(JCHZ20200003)；深圳市科技计划(ZDSYS20210623091810032)；中国科学院战略重点研究项目(XDB0480000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0911000), the National Natural Science Foundation of China (32071416), the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (2022B1111080005), the Shenzhen Institute of Synthetic Biology Scientific Research Program (JCHZ20200003), the Shenzhen Key Laboratory for the Intelligent Microbial Manufacturing of Medicines (ZDSYS20210623091810032), and the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB0480000).

*Corresponding authors. E-mail: YU Tao, tao.yu@siat.ac.cn; TANG Hongting, tang23ht@mail.sysu.edu.cn

Received: 2024-02-28; Accepted: 2024-07-11; Published online: 2024-07-12

白振敏, 郭姝媛, 杨一群, 庄周康, 曹文兵, 杨研, 于涛, 汤红婷. 微生物利用 CO₂ 及其低碳衍生物为原料制备粮食类化合物的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2731-2746.

BAI Zhenmin, GUO Shuyuan, YANG Yiqun, ZHUANG Zhoukang, CAO Wenbing, YANG Yan, YU Tao, TANG Hongting. Microbial production of food compounds with carbon dioxide and derived low-carbon molecules as substrates[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2731-2746.

摘要: 微生物细胞工厂的构建和优化是实现绿色生物制造的重要环节和关键技术。现阶段, 过量二氧化碳(CO₂)排放和粮食短缺等问题已经引起了广泛关注, 这促进了利用人工微生物将 CO₂ 转化为粮食类化合物这一新兴研究方向的发展。该领域的研究不仅有助于实现“双碳”目标, 也对维护粮食安全具有重大意义。本文主要围绕葡萄糖、糖类衍生物、单细胞蛋白的生物合成及人工碳固定途径的开发及应用等方面, 对直接或者间接利用 CO₂ 制备粮食类化合物的研究进展进行了综述和展望。

关键词: 二氧化碳; 低碳原料; 粮食类化合物; 糖类衍生物; 单细胞蛋白

Microbial production of food compounds with carbon dioxide and derived low-carbon molecules as substrates

BAI Zhenmin^{1,4}, GUO Shuyuan^{2,3,4}, YANG Yiqun^{2,3,4}, ZHUANG Zhoukang^{2,3,4}, CAO Wenbing^{2,3,4}, YANG Yan^{1,4}, YU Tao^{2,3,4*}, TANG Hongting^{2,3,4*}

1 China BlueChemical Ltd., Beijing 100029, China

2 Center for Synthetic Biochemistry, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

3 CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

4 Carbon Neutrality and Food Security Cross-Innovation Joint Laboratory, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract: The construction and optimization of microbial cell factories are crucial steps and key technologies in achieving green biomanufacturing. As concern has been aroused regarding the excessive carbon dioxide (CO₂) emissions and food security, a new and promising research field, microbial conversion of CO₂ into food compounds, has emerged. The research in this field not only holds significant implications for achieving the carbon peaking and carbon neutrality goals but also plays a role in maintaining food security. This paper provides a comprehensive review and outlook of the research on utilizing CO₂ and its derived low-carbon chemicals for the production of food compounds, focusing on the production of glucose, sugar derivatives, and single-cell proteins and the development of artificial CO₂ fixation pathways.

Keywords: carbon dioxide; low-carbon chemicals; food compounds; sugars; single-cell protein

近年来,随着全球工业化步伐的加快,人类每年向大气中排放二氧化碳(CO₂)超过 350 亿 t,且呈现逐年增加的态势^[1]。资料显示,人为排放的 CO₂ 通过自然过程所吸收的量约为 54%,其中 24%通过海洋吸收,30%由陆地生态系统吸收,剩下的 46%则留存于大气中^[2]。CO₂ 持续累积导致其在大气圈中的浓度日渐升高,被认为是导致温室效应加剧、全球变暖的可能性因素。习近平总书记 2020 年 9 月在第七十五届联合国大会上提出“双碳”目标,即中国二氧化碳排放力争于 2030 年前达到峰值,努力争取于 2060 年前实现碳中和,旨在促进实现中国经济快速向高质量可持续发展转型。

当前,全球面临饥饿和营养不良危机的人口规模仍然巨大。世界粮食计划署通过对 59 个国家的调查发现,2023 年仍然有约 2.82 亿人面临严重的粮食短缺^[3]。预计到 2050 年,全球人口将达到近 90 亿-110 亿人,全球对食物的需求预计将增加 70%^[4-5]。农业为社会提供食物和许多原材料,但受限的可耕种地面积和气候变化使得农业领域面临日益严峻的挑战,几乎无法满足不断增长的粮食需求。

为了促进 CO₂ 的利用,同时缓解粮食短缺问题,开发不占用可耕种土地即可将 CO₂ 固定为粮食类化合物的研究受到了广大学者的关注。自然光合生物为地球生命体系演化繁衍提供了物质基础,虽然光合作用可以有效减少大气中的二氧化碳,但是其 CO₂ 利用速率有限,难以在完全转化过量排放的 CO₂ 的同时实现足量粮食的生产^[6]。因此,第三代生物炼制,即通过微生物细胞工厂将可再生能源和 CO₂ 转化为化学品,已经逐渐成为现阶段的研究热点^[7]。

目前,利用自养微生物,例如蓝细菌和微藻,构建以 CO₂ 为原料合成产物的途径是第三代生物炼制的重要技术之一。然而,天然自养微生物

的目标化合物生产种类少且产量较低、细胞生长慢、匮乏的遗传操作技术且产品难以分离,因此限制了其在工业上的实际应用^[8-9]。在过去几十年里,通过热、电化学等方法,将 CO₂ 转化为碳链长度为 C_{n≤3} 的简单低碳(C₁₋₃)化合物的研究取得了巨大进展^[10-13],但这些方法不适用于生产复杂结构的高碳产物,而微生物细胞工厂已被广泛、成功地应用于天然产物、大宗化学品、生物能源等高碳产物的生产。因此,将 CO₂ 衍生的 C₁₋₃ 化合物拓展为发酵原料,再通过微生物细胞工厂合成目标产物,为将 CO₂ 间接转化成高碳化合物提供了可靠的技术。此外,在异养微生物中构建固碳途径使其能够直接利用 CO₂,也成为了备受关注的技术,并已经取得了一定的研究成果^[14-15]。

碳水化合物和蛋白质是重要的粮食类化合物。碳水化合物,如葡萄糖、蔗糖和淀粉,是自然界中最丰富和广泛分布的有机物质之一,也是所有生物体的基本组成部分。2021 年,美国国家航空航天局(National Aeronautics and Space Administration, NASA)发起了一项世纪挑战,旨在将 CO₂ 转化为碳水化合物,实现可循环食品的制造,从而为未来太空探索提供重要的物质基础。此外,蛋白质是人类饮食中所必需的营养物质,在体内发挥着重要的作用。因此,本文主要聚焦于直接或者间接以 CO₂ 为原料制备粮食类化合物的相关研究,围绕以 CO₂ 衍生的低碳化合物为原料合成葡萄糖、糖类衍生物、单细胞蛋白及人工碳固定途径的开发及应用等方面的研究进展进行综述。

1 利用低碳化合物为原料高效合成葡萄糖

葡萄糖作为最重要的单糖分子,不仅是生物大分子的基本成分,还是生物体中最重要的能量分子,被广泛地应用于食品、发酵及医药等领域。

目前,工业生产葡萄糖的制备原理是原料中的淀粉经过酸水解或酶水解形成葡萄糖,大致过程是玉米或马铃薯等原料经过提取、液化、糖化、精制、结晶和干燥最终形成葡萄糖。最近,通过微生物细胞工厂利用 CO₂ 及其衍生的低碳化合物为原料合成葡萄糖的研究,不仅能减少葡萄糖制备成本,降低对粮食原料的消耗,还可缓解温室效应,推动可再生能源的绿色可持续制造。

中心碳代谢途径是生物体内碳元素流动和转化的网络系统,包括糖酵解途径、糖异生途径(gluconeogenesis)、柠檬酸循环(citric acid cycle, CCC)和磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)。糖酵解是细胞中最经典、最基础的葡萄糖消耗途径之一。在这一过程中,葡萄糖分子被分解为丙酮酸等产物,并生成 2 分子 ATP 和 2 分子 NADH,为细胞提供能量。糖异生途径为糖酵解的一种逆反应过程,过程中大多酶与糖酵解途径一致,是细胞进行葡萄糖合成的途径。

基于糖异生途径的设计和改造,多个团队已经实现 CO₂ 转化为葡萄糖的研究(表 1)。2016 年, Milo 团队^[16]在大肠杆菌中引入卡尔文循环(Calvin Benson Bassham cycle, CBB),并通过敲除负责催化 3-磷酸甘油酸(3-phosphoglycerate, 3PG)生成 2-磷酸甘油酸(2-phosphoglycerate, 2PG)的关键酶——磷酸甘油酸变位酶(phosphoglycerate mutase, gpmA/gpmM)来打断糖酵解途径,将整个中心碳代谢分为两个模块:一个包含上糖酵解、糖异生途径、CBB 循环;一个模块包含下糖酵解及三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环;该菌株经过适应性进化后,实现了大肠杆菌(*Escherichia coli*)利用 CO₂ 合成细胞生物质及 PPP 途径中的多个内源磷酸糖,如 6-磷酸己酮糖、4-磷酸赤藓糖,首次提出了通过工程菌株利用一碳合成糖的概念。2019 年,

Antoniewicz 团队^[17]首次在大肠杆菌中利用木糖合成葡萄糖,通过敲除 *E. coli* 中葡萄糖转变为葡萄糖 6-磷酸(glucose-6-phosphate, G6P)过程中的两个酶 PtsI 和 Glk,并进一步敲除糖酵解和 PPP 途径中的果糖激酶 pfkA 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, Zwf),打断其余的碳同化路径,最终产生(1.8±0.1) mmol/OD₆₀₀的葡萄糖。2022 年,于涛课题组报道了电化学-生物合成偶联将 CO₂ 转化为葡萄糖的研究,该研究通过打断酿酒酵母糖酵解的第 1 步,即敲除 3 个关键的己糖激酶,包括葡萄糖激酶 1 (glucokinase, Glk1)、己糖激酶 1 (hexokinase isoenzyme 1, Hxk1)、己糖激酶 2 (hexokinase isoenzyme 2, Hxk2),使得葡萄糖不能磷酸化形成 G6P,因而不能进入中心碳代谢被利用,形成葡萄糖泄露表型;随后,进一步敲除己糖激酶(N-acetylglucosamine kinase, YLR446W)以及葡萄糖激酶 2 (hexokinase, Emi2),过表达糖异生途径的关键酶和葡萄糖 1-磷酸酶(glucose 1-phosphate phosphatase, AgpP/Yihx)的编码基因,提高细胞中 G6P 和葡萄糖-1-磷酸(glucose 1-phosphate, G1P)向葡萄糖的转化量,最终实现乙醇和乙酸向葡萄糖的转化,产量在 2.0 g/L 左右^[18]。该工作为 CO₂ 通过电化学偶联微生物细胞工厂合成葡萄糖提供了概念性验证。2023 年,该课题组将底物拓展至一碳底物甲醇、二碳化合物乙二醇、三碳化合物异丙醇等,其中利用毕赤酵母作为底盘实现了甲醇合成葡萄糖,摇瓶产量达到 1.3 g/L;同时,为了进一步提高由乙醇转化生成葡萄糖的产量,过表达磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, Pck1)来增强糖异生途径、敲除糖酵解途径中的丙酮酸激酶(pyruvate kinase, Pyk1/Pyk2)以及敲除 1 型蛋白磷酸酶的调控亚基(regulatory subunit of type 1

protein phosphatase Glc7p, Reg1)缓解葡萄糖抑制作用,最终使得葡萄糖产量提高近 1 倍^[19]。吕雪峰课题组 2023 年的研究展示了通过改造蓝细菌的代谢底盘,包括敲除蓝细菌的 2 个葡萄糖激酶、表达糖异生的相关酶,最终实现利用聚球藻(*Synechococcus elongatus*) PCC 7942 生产葡萄糖,产量达到 2.0 g/L,经过 3 批次补料发酵,最终积累 5.0 g/L 葡萄糖,占固定碳通量的 70%以上^[20](表 1)。

2 低碳原料生物合成糖类衍生品

近年来,随着生物技术的迅猛发展,以甲醇等低碳原料生物制备糖类衍生品的研究逐渐受到关注。糖类衍生品作为一类重要的生物分子,在医药^[21]、食品、化妆品^[22]等领域具有广泛的应用前景,其中包括氨糖、肌醇、甘露糖、木糖醇等产品。

2.1 氨基葡萄糖

氨基葡萄糖(glucosamine, GlcN)是一种天然的氨基单糖,是功能性葡萄糖衍生品。氨基葡萄糖及其乙酰化衍生物 N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine, GlcNAc)已被广泛用于食品、化妆品和制药行业^[23]。传统的制备方式是通过从蟹壳和虾壳中提取的壳聚糖进行酸水解进行生产。微生物发酵法生产氨基葡萄糖作为环

境友好、条件温和、安全性高的一种生产方式,已经吸引了众多研究者的关注。目前氨基葡萄糖的生产主要以葡萄糖作为碳源,作为二氧化碳还原的产物,低碳原料的利用越来越多地受到研究者的关注。

Ma 等^[24]共利用葡萄糖和低碳原料甘油发酵,在大肠杆菌中实现了乙酰氨基葡萄糖的高效合成,通过敲除 *PfkA* 基因,提升了甘油的利用率,并且通过优化甘油和葡萄糖的比例,实现了生长和产物合成的平衡,最终在 5 L 发酵罐中产量达到了 179.70 g/L。Tang 等^[19]通过对酿酒酵母及毕赤酵母的工程化改造,过表达来源于多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)的葡萄糖胺-6-磷酸酶(glucosamine-6-phosphate phosphatase, GlmP)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的葡萄糖胺-6-磷酸脱氨酶(glucosamine-6-phosphate deaminase, GlmD),分别实现了甲醇、乙醇、甘油作为唯一碳源合成氨基葡萄糖,摇瓶发酵产量分别达到了 29.08、37.04 以及 41.69 mg/L。相较于葡萄糖作为碳源,低碳原料合成氨基葡萄糖的产量还有很大提升空间。

2.2 肌醇

肌醇是一种天然糖醇化合物,属于维生素 B 族中的一种,是人和动物生长的必需物质。肌醇广泛应用于医药工业、食品工业以及水产动

表 1 微生物细胞工厂利用低碳原料合成葡萄糖的产量

Table 1 The list of glucose production by microbial cell factories from low-carbon chemicals

Host	Substrates	Glucose production	References
<i>Escherichia coli</i>	Xylose	(1.8±0.1) mmol/ <i>OD</i> ₆₀₀	[17]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Acetic acid, ethanol	1.8 g/L from acetic acid; 2.3 g/L from ethanol	[18]
<i>Pichia pastoris</i>	Methanol, glycerol	Methanol as carbon source: 1.3 g/L in flask; 13.4 g/L in 1 L bioreactor Glycerol as carbon source: 13.8 g/L in 1 L bioreactor	[19]
<i>S. cerevisiae</i>	Ethanol	4.3 g/L in flask; 18.2 g/L in 1 L bioreactor;	[19]
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	CO ₂	2.0 g/L in flask; 5.0 g/L under fed-batch fermentation	[20]

物饲料中^[25-26]。肌醇的传统生产方式为以米糠饼粕为原料的水解植酸盐法,条件相对苛刻^[27]。2017年,张以恒教授团队设计构建了一条人工合成路径实现了以淀粉为原料合成肌醇,开创了生物法合成肌醇的先河^[28]。并且,通过优化迭代重组酶发酵工艺、肌醇分离提取工艺、优化体外多酶配比^[29-30],实现了肌醇的万吨级工业化生产,这一目标的实现标志着肌醇产业向可持续工业生产迈进重要一步。

微生物发酵法合成肌醇由于具有环境友好、操作流程简单等优势,正在受到越来越多的关注。肌醇的生物合成通过关键中间体 G6P 经过肌醇 1-磷酸合成酶(inositol-1-phosphate synthase, IPS)催化合成肌醇 1-磷酸,再经过肌醇单磷酸酶(inositol monophosphatase, IMP)催化合成肌醇。采用微生物发酵法合成肌醇的主要碳源类型包括淀粉、纤维素、蔗糖、木糖、葡萄糖等,以低碳原料作为碳源生产肌醇相对较少。

甘油和葡萄糖作为混合碳源,可用于肌醇的生产。Tang 等^[31]通过在大肠杆菌中优化 IPS 及 IMP 酶组合、过表达甘油激酶消除葡萄糖对甘油利用的抑制效应并且引入组成型启动子等策略,提升了细胞的生长以及肌醇产量,最终在 3 L 发酵罐中肌醇产量达到 76.00 g/L。You 等^[32]通过进一步在大肠杆菌中敲除 *pgi*、*pfkA*、*pykF* 等基因,增加中间体 G6P 供应,优化了碳源在细胞生长和肌醇生产中的代谢平衡,使得在 1 L 发酵罐中肌醇的产量达到 106.30 g/L。

最近,将 CO₂ 及其衍生的低碳化合物拓展为发酵原料的研究也获得了广泛关注。Wang 等^[33]在集胞藻 PCC 6803 中引入酿酒酵母来源的 IPS 和谷氨酸棒杆菌来源的 IMP,实现了以 CO₂ 为原料直接合成肌醇,随后通过过表达 IPS、调控竞争路径以及增加碳固定等策略使肌

醇产量达到了 12.72 mg/L。Tang 等^[19]通过在酿酒酵母和毕赤酵母中过表达内源肌醇单磷酸酶(inositol-3-phosphate synthase, Ino1),引入大肠杆菌来源肌醇单磷酸酶(inositol-1-monophosphatase, SuhB)以及肌醇转运蛋白(myo-inositol transporter, Itr1),分别实现了以甲醇、乙醇、甘油为唯一碳源生产肌醇,产量分别达到了 129.67、228.71、40.00 mg/L。这一研究扩大了肌醇合成的底物范围,但是肌醇产量还有进一步的优化空间。

2.3 木糖醇

木糖醇是一种五碳糖,是天然糖醇化合物,通常作为人造甜味剂用于食品和医药工业中。与蔗糖(4.0 cal/g)相比较,木糖醇的热量值较低(2.4 cal/g),但其相对甜度与蔗糖几乎相同。木糖醇的工业生产是采用雷尼镍催化剂,通过化学加氢过程将来自半纤维素水解液中的木糖转化为木糖醇^[34]。这种生产方式流程繁琐、不可持续。因此,采用微生物发酵的方式取代化学法具有很大的优势。

当前木糖醇的微生物生产集中在筛选及优化木糖代谢利用的菌株,赵惠民团队通过在酿酒酵母中通过对不同的基因元件进行从头组装设计,筛选得到了木糖利用性能优异的菌株^[35]。目前,以低碳原料作为唯一碳源生产木糖醇的研究较少。Tang 等^[19]通过敲除 *Tkl1* 和 *Tkl2* 基因减少木酮糖-5-磷酸的消耗,通过替换可逆的木糖激酶(xylulokinase, Xks1)为来源于枯草芽孢杆菌的不可逆磷酸酶(phosphatase, AraL),并敲除木糖醇脱氢酶基因 *Xyl2*,实现了在酿酒酵母中以乙醇为唯一碳源合成木糖醇,使其产量达到 4.30 mg/L。

2.4 蔗糖

蔗糖分子作为典型的二糖分子,在食品、医药、化工等领域广泛应用,并且是很多工业品的重要中间体。当前蔗糖的工业生产主要是

通过在甘蔗和甜菜中进行提取, 流程较为繁琐, 利用细胞工厂以低碳原料进行高效生物合成蔗糖将会极大地降低生产流程和生产成本。

蓝细菌作为一种重要的利用光合作用的宿主菌株, 成为开发蔗糖生产的重要细胞工厂^[36]。集胞藻中蔗糖的合成路径和植物中蔗糖合成路径一致, 蔗糖合成是由蔗糖磷酸合成酶(sucrose-phosphate synthase, SPS)和蔗糖磷酸磷酸化酶(sucrose-phosphate phosphatase, SPP)两个酶顺序催化将底物 UDP-葡萄糖和果糖-6-磷酸转化为蔗糖。Ducat 等^[37]首次将大肠杆菌来源的蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, CscB)引入到聚球藻 PCC 7942 中, 实现了蔗糖的分泌表达, 通过对 CscB 进行诱导表达, 并调整盐胁迫条件, 在聚球藻 PCC 7942 中蔗糖产量达到 2.70 g/L。Song 等^[38]在聚球藻 UTEX 2973 中引入 *CscB* 基因, 同时替换盐胁迫条件中钠离子为钾离子, 单次发酵蔗糖产量达到 3.50 g/L。Du 等^[39]在集胞藻 PCC 6803 的研究中, 发现同时过表达 SPS、SPP 以及葡萄糖焦磷酸酶(UDP-glucose pyrophosphorylase, UGP), 可以显著提升蔗糖合成能力。Qiao 等^[40]在集胞藻 PCC 7942 菌株中同样证明了过表达 *SPS* 基因能够显著提升蔗糖合成能力。

酵母作为模式生物, 以其为底盘细胞构建的微生物细胞工厂用于转化低碳原料合成蔗糖的研究也受到了关注。Tang 等^[19]通过在酿酒酵母中引入多拷贝集胞藻来源的 SPS、SPP 以及豌豆来源的蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, SUF1), 同时敲除蔗糖利用相关基因, 包括蔗糖酶基因 *Suc2*; 麦芽糖酶基因 *Mal12*、*Mal22*、*Mal32*; 异麦芽糖酶基因 *Ima1*、*Ima2*、*Ima3*、*Ima4* 和 *Ima5*, 实现了以低碳原料乙醇、甘油、异丙醇分别作为唯一碳源合成蔗糖, 摇瓶发酵产量分别为 1.17、2.35、0.38 g/L。由于毕赤酵母不能直接利用蔗糖, 因此直接在毕赤酵母中

引入 SPS、SPP 及 SUF1, 实现了以甲醇为唯一碳源合成蔗糖, 产量为 0.41 g/L。

2.5 淀粉

淀粉作为一类重要的多糖化合物, 是重要的糖类储存形式, 也是人类重要的粮食产品以及生物工业重要原料。淀粉的生产主要依赖于植物的种植, 包括大米、小麦、马铃薯等, 占用了大量的耕地面积。人口的快速增长以及气候变化的加剧导致耕地面积减少, 使得研究人员需要寻找其他更加高效的生产方式来生产淀粉。通过生物合成的方式来生产淀粉作为一种新的产业形式, 近年来吸引了越来越多的关注。目前的生物合成方式集中在体外生物转化法, 前期的研究集中在将纤维素通过酶法转化为淀粉^[41-44]。

Cai 等^[45]在体外从头构建了淀粉人工合成路径, 包括 C₁ 模块、C₃ 模块、C₆ 模块以及 C_n 模块; 首先 C₁ 模块通过热催化将二氧化碳转化为甲醇, 通过 C₃ 模块将甲醇转化为 D-甘油醛 3-磷酸, 通过 C₆ 模块将 D-甘油醛 3-磷酸转化为葡萄糖 6-磷酸, 最后通过 C_n 模块实现了葡萄糖 6-磷酸合成直链淀粉和支链淀粉, 其中直链淀粉产量达到 1.64 g/L, 支链淀粉产量达到 1.28 g/L。

微生物发酵法相较于酶法合成, 尽管其生产能效和生产速率相对较低, 但是具备工业放大流程简单、无需酶制剂及辅因子制备等优势, 在低碳利用转化领域也得到关注。Tang 等^[19]通过在酿酒酵母引入马铃薯来源的 α -葡聚糖磷酸化酶(α -glucan phosphorylase, PGP), 同时敲除糖原合成路径相关基因 *Glg1*、*Glg2*、*Glc3*、*Gsy1* 和 *Gsy2*, 在以乙醇为唯一碳源的培养条件下, 在酿酒酵母中淀粉产量达到了 343.84 mg/L。在毕赤酵母中引入 PGP 及敲除糖原合成基因, 在以甲醇为唯一碳源的培养条件下, 淀粉产量达到了 117.74 mg/L^[19]。未来利用代谢工程的手段, 淀粉合成的产量可能会进一步提升(表 2)。

表 2 以低碳原料为发酵原料合成糖类衍生物的研究

Table 2 Biosynthesis of carbohydrate from low carbon source

Product	Host	Titer	Carbon source	References
Glucosamine	<i>E. coli</i>	179.70 g/L	Glucose and glycerol	[24]
	<i>S. cerevisiae</i>	37.04 mg/L	Ethanol	[19]
		41.69 mg/L	Glycerol	
Myo-inositol	<i>P. pastoris</i>	29.08 mg/L	Methanol	[19]
	<i>Synechocystis</i>	12.72 mg/L	CO ₂	[33]
		<i>E. coli</i>	76.00 g/L	Glucose and glycerol
	<i>S. cerevisiae</i>	106.30 g/L	[32]	
		228.71 mg/L	Ethanol	
	40.00 mg/L	Glycerol		
Xylitol	<i>P. pastoris</i>	129.67 mg/L	Methanol	[19]
	<i>S. cerevisiae</i>	4.30 mg/L	Ethanol	[19]
Sucrose	<i>Synechocystis</i>	2.70 g/L	CO ₂	[37]
		3.50 g/L		[38]
		577.80 mg/L		[39]
	<i>S. cerevisiae</i>	1.17 g/L	Ethanol	[19]
		2.35 g/L	Glycerol	
		0.38 g/L	Isopropanol	
		0.41 g/L	Methanol	
Amylose	Cell free system	1.64 g/L	CO ₂	[45]
	<i>S. cerevisiae</i>	343.84 mg/L	Ethanol	[19]
	<i>P. pastoris</i>	117.74 mg/L	Methanol	[19]
Amylopectin	Cell free system	1.28 g/L	CO ₂	[45]

3 低碳原料生物合成单细胞蛋白

蛋白质是人类饮食中所必需的营养物质,在体内发挥着重要的作用。2019–2021年间,全球动物蛋白质消费量达到 3.276 83 亿 t,预计到 2025 年,其市场价值将达到 7.3 万亿美元^[46]。到 2050 年,世界每年需要生产 12.5 亿吨肉类和奶制品,才能满足当前消费水平下全球对动物源性蛋白质的需求^[47]。然而,由于饲料转化为肉类和乳制品的效率较低,通过增加肉类和乳制品产量几乎无法可持续地满足不断增长的蛋白质需求。

单细胞蛋白(single cell protein, SCP),也被称为微生物蛋白,常用微生物包括酵母、真菌、

藻类和细菌等^[48]。与传统的动植物蛋白相比,单细胞蛋白具有生产效率高、周期短、对环境影响小、更有利于人类健康和生态系统等优点^[49],能够缓解人口过度增长造成的世界粮食危机,并满足部分地区高蛋白质消费需求。单细胞蛋白含有人体必需的氨基酸、维生素和矿物质^[50],具有良好的营养价值。因此,单细胞蛋白不仅可以作为动物饲料使用,也逐渐被开发成适合人类食用的各种食品^[51-52]。

近些年,将 CO₂ 及其衍生的低碳化合物转化为高价值的单细胞蛋白的技术逐渐受到关注,其不仅能够促进一碳的利用,还能促进蛋白质的可持续发展^[47-53]。目前,有多种微生物利用不同的一碳原料进行 SCP 生产。

3.1 甲醇为原料生产单细胞蛋白

甲醇是一种清洁能源,作为价格低廉、来源充足的原料,被广泛用于单细胞蛋白生产。筛选细胞中蛋白含量高的菌株是将甲醇转化为 SCP 的重要方式。嗜有机甲基杆菌(*Methylobacterium organophilum*)的细胞成分分析显示其粗蛋白含量很高,并且具有所有必需氨基酸,因此,这种微生物被认为是生产单细胞蛋白质的候选菌株。以嗜有机甲基杆菌为底盘细胞,当初始甲醇浓度为 12.0 g/L 时,可达到最高的细胞干重(约 5.0 g/L),甲醇转化率为 0.42 g DCW/g^[54]。以产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)为研究对象,当发酵原料是 0.5% 甲醇时,产生 1.2 g 的 SCP (31% 的转化率),其中粗蛋白含量为 71.6%,纯蛋白含量为 58.0%。此外,将尿素作为氮源添加能促进产气肠杆菌的生长^[55]。

随着遗传操作技术的日益成熟,研究人员可以通过代谢工程的策略提高单细胞蛋白的生产。甲基营养酵母毕赤酵母因其天然的甲醇同化能力而成为以甲醇为原料合成 SCP 的理想宿主,与大豆、鱼、肉、全脂牛奶等传统食品相比,从毕赤酵母中获得的 SCP 含有更高比例的蛋白质。Meng 等^[56]首先通过适应性实验室进化(adaptive laboratory evolution, ALE)提高了毕赤酵母对甲醇的利用效率及对 33 °C 高温的耐受性,同时毕赤酵母的蛋白含量提高了 10%;进而通过加强氮代谢(过表达谷氨酰胺合成基因 *GLN1*)和损害细胞壁合成(敲除 *PAS_0305*,一种与甲醇胁迫下细胞壁厚度直接相关的基因),进一步增加了细胞的蛋白质含量;最后,该工程菌株实现了在中试规模 33 °C 补料分批培养中以甲醇为原料生产高水平的 SCP,生物量为 63.37 g DCW/L,甲醇转化率为 0.43 g DCW/g,蛋白质含量为 0.506 g/g DCW。紧接着,该研究团队发现敲除 *PAS_0305* 导致了细胞内海藻糖的积累,细胞壁

传感器被激活,导致细胞壁通透性的增加,进而激活高渗透压甘油(high-osmolarity glycerol, HOG)途径和细胞壁完整性(cell wall integrity, CWI)途径的信号转导。由于 CWI 途径的激活,敲除 *PAS_0305* 的菌株通过增加 β -1,3-葡聚糖含量和降低几丁质/甘露糖含量实现细胞壁重构,增强了其环境耐受性。此外, *PAS_0305* 的缺失可以减少向异化途径的碳流向,从而减少的碳损失,实现甲醇利用效率的提高^[57]。因此, *PAS_0305* 敲除菌株具有较高粗蛋白产量和甲醇转化率的优异表型,粗蛋白产量和甲醇转化率分别为 67.2% 和 0.46 g DCW/g^[57]。

3.2 CO₂ 为原料生产单细胞蛋白

自养细菌的 CO₂ 固定能力使其成为最适合以 CO₂ 为原料生产 SCP 的底盘细胞。其中,微藻一直被认为是弥补“蛋白质缺口”最有效的 SCP,是微生物蛋白的一种重要来源^[58]。微藻生长迅速,作为替代蛋白原料,具有较高的应用潜力。微藻利用二氧化碳作为碳源,进行含氧光合作用,从阳光或人工光中获取能量。人们对微藻作为食物的兴趣是由于它们的高营养价值,蓝藻细菌,特别是节螺旋菌和念珠菌,几个世纪前便已经在非洲和亚洲作为食物食用^[59]。它们具有较高的蛋白质含量(30.0%–80.0%),氨基酸组成平衡,维生素、矿物质、类胡萝卜素和多不饱和脂肪酸含量良好^[51]。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是我国国家卫生健康委员会近期批准的 36 种新食品原料之一^[60]。产品经藻种培养、发酵罐异养扩大培养、干燥等工艺制成,其主要营养成分蛋白质含量高于 30.0%、粗多糖高于 10.0%。此外,微藻还具有抗炎、抗菌、抗氧化、降血脂、抗癌等多种生物活性,在营养和制药领域具有吸引力^[61]。光合细菌的培养受到光照需求的限制,尽管自然光作为免费能源具有优势,但其捕获需要细胞

大面积去接触。使用人造光虽然是一种可行方案, 但会显著增加成本。

氢氧化菌(hydrogen oxidizing bacteria, HOB)主要是化学自养生物, 使用无机电子(H_2)和碳源(CO_2)来生长并产生生物物质, 为大型 CO_2 排放工业提供了一个回收工具, 以减少其碳足迹。将 HOB 用于生产饲料、食品或绿色化学物质是未来生物经济中最具挑战性、但也最有前途的技术之一。在高密度反应器中, HOB 能够实现每 kgH_2 转化 2.4 kg 干生物物质, HOB 每年可以产生数百吨生物物质。2017 年成立的芬兰初创公司 Solar Foods 利用 HOB 生产 Solein 的单细胞蛋白, 目前正在市场推广阶段; 通过消耗 H_2 、 O_2 和 CO_2 等原料, 生产粗蛋白含量为 65.0%–75.0% 的 SCP, 并且 CO_2 的转化率为 0.40 g DCW/g^[62]。

乙醇梭菌是一种厌氧的化能自养菌, 它利用 CO 或 CO_2 作为碳源, 通过 Wood-Ljungdahl 途径, 以 H_2 作为还原剂, 生产燃料乙醇、微生物蛋白等高附加值化学品。乙醇梭菌的蛋白含

量高、氨基酸种类齐全、平衡性较好, 无明确抗营养因子存在, 是构建一碳气体生物转化细胞工厂的理想微生物之一。北京首钢股份有限公司和中国农业科学院饲料研究所利用乙醇梭菌蛋白工艺, 以乙醇梭菌为发酵菌种, 以钢铁工业煤气(转炉煤气、高炉煤气)中的 CO 为主要原料, 以氨水为氮源, 并与其他微量元素一起组成培养基, 生产乙醇等清洁能源及菌体蛋白(粗蛋白含量超过 80.0%), 该成果已实现工业化, 工业生产能力达到了生物合成乙醇梭菌蛋白年产万吨级^[63](表 3)。

4 人工碳固定途径的开发及应用

CO_2 人工生物转化方式可分为两种: 直接 CO_2 利用和间接 CO_2 利用(图 1)。直接 CO_2 利用主要是利用羧基酶将 CO_2 转化为羧基, 之后通过固碳循环转化为目标产物。直接 CO_2 利用的关键是羧基酶, 已发现的羧基酶有 7 种, 包括二价金属依赖性羧化酶、ATP 依赖性羧化酶、氧化

表 3 利用不同低碳原料生产单细胞蛋白的研究

Table 3 Research on the production of single-cell proteins using different low-carbon raw materials

Strain	Carbon source	Strategy	Conversion rate (g/g)	Protein content (%)	References
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Methanol	Optimize C:N ratio	0.42	/	[54]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Methanol	Carbon source optimization, increasing temperature	0.31	71.6%	[55]
<i>P. pastoris</i>	Methanol	ALE, enhance nitrogen metabolism and damage	0.43	50.6%	[56]
		cell wall synthesis	0.46	67.2%	[57]
<i>Methylobacterium extorquens</i> ATCC 55366	Methanol	Express heterologous proteins	0.30	/	[64]
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Methane	Continuous fermentation, optimized conditions	0.70	58.8%	[65]
<i>Methylomonas</i> and <i>Methylophilus</i> spp.	Biogas	Mixed bacteria fermentation	0.66	41.0%	[66]
			0.87	/	[67]
Microalgae	CO_2	Light	/	30.0%–80.0%	[51]
H_2 -oxidizing bacteria	CO_2 , H_2	/	0.40	65.0%–75.0%	[62]
<i>Clostridium autoethanogenu</i>	CO , H_2	/	/	80.0%	[63]

还原依赖性羧化酶、底物活化羧化酶、硫胺素二磷酸(thiamine diphosphate, ThDP)依赖性羧化酶、多酶复合构建的羧化酶和异戊二烯化黄素单核苷酸(prenylation flavin mononucleotide, prFMN)依赖性羧化酶^[68]。目前,天然固碳途径是地球生物固碳的最主要方式,但因其代谢途径长而复杂且存在厌氧的途径酶,导致 CO₂ 转化效率低,从而未被大规模开发应用^[14,69-70]。因此,构建新的人工碳固定途径受到了广大学者们的关注并成为研究热点。

基于羧基酶,人工固碳途径的设计重构取得重要进展。2016年, Erb 实验室通过改造巴豆酰辅酶 A 成功设计构建了 CETC (crotonyl-coenzyme A (CoA)/ethylmalonyl-CoA/hydroxybutyryl-CoA) 循环,实现了 CO₂ 高效转化为乙醛酸,其碳转化效率是天然固碳途径的 5 倍^[71]。2022年,李寅实验室以酰基辅酶 A 羧化酶为基础,构建了目前最短的固碳循环 POAP (pyruvate carboxylase/oxaloacetate acetylhydrolase/acetate-CoA ligase/pyruvate synthase)循环,仅需 4 步便将 CO₂ 转化为草酸^[72]。2018年, Liao 实验室利用磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶构建了 MCG (malyl-CoA-glycerate)途径,在体内外均证实了途径的可行

性,同时证实了 MCG 途径的碳同化效率是目前天然途径的 2 倍^[73]。在此基础上,该实验室将 rGS (reductive glyoxylate synthesis)途径、rPS (reductive pyruvate synthesis)途径和 MCG 途径进行了整合,构建了 rGPS (reductive glyoxylate and pyruvate synthesis)固碳循环,该循环可以固定 CO₂ 产生多种代谢中间物,包括乙酰辅酶 A、苹果酸和丙酮酸等^[74]。

CO₂ 固定途径需要消耗大量能量,主要包括 ATP 和 NADH。自然界中固定 CO₂ 所需的能量大多通过光合作用获得,将光能转化为所需的 ATP 和 NADH。然而,目前的人工固碳途径无法直接利用叶绿体等能量转换器实现能量转化,ATP 和 NADH 供给主要以直接添加化合物的方式实现。例如,添加的甲酸可以通过甲酸脱氢酶转化为 CO₂,同时将 NAD⁺ 转化为 NADH;添加的多聚磷酸能被多聚磷酸激酶将高能磷酸键转移至 ADP,产生 ATP。为了开发更加可持续的能量供给方式, Erb 实验室通过提取植物的叶绿体膜,在光照条件下实现将 ADP 和 NAD⁺ 转化为 ATP 和 NADH,他们将此应用于 CETC 固碳循环,实现了 CO₂ 转化为目标化合物,但速率极低^[75]。

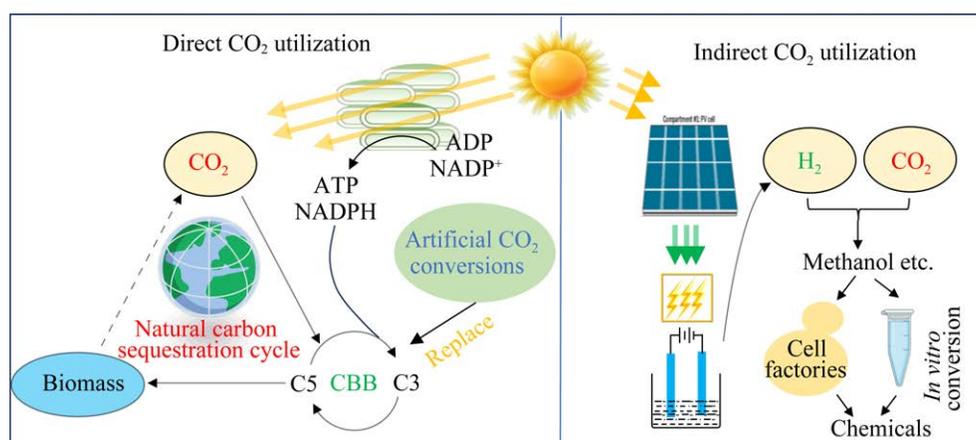


图 1 直接 CO₂ 利用和间接 CO₂ 利用方式

Figure 1 Schematic diagram of direct CO₂ utilization and indirect CO₂ utilization.

5 结语与展望

随着“第三代生物炼制”新概念的提出,以 CO_2 为原料进行生物合成不仅能够解决原材料的成本问题,还能够有效地缓解温室效应。利用二氧化碳等低碳原料制造粮食的主要策略包括体外生物转化和微生物发酵,其研究思路可参考张以恒教授提出的“大道至简,从上而下,以道御术”^[9]。体外生物转化的特点是化繁为简,实现在体外直接将底物转化为目标产品,具有生产速率和底物转化率优势。体外生物转化的核心是多酶分子机器的构造,通过对酶的定向进化,增加其稳定性、活性以及底物特异性,从而降低酶制剂使用成本、增加底物转化率、强化产品生产速率,使其在新质生物制造平台的开发中具有重要的竞争优势。针对体外生物转化的设计模式及应用场景,张以恒教授在一篇综述中已经进行了详细的介绍^[76]。微生物发酵法利用微生物作为多酶反应系统,能够在实现微生物生长的同时合成目标产品。尽管获得一个工业化菌株(达到合适的产量、得率、生产速率)需要经过数年的优化,但它的特点在于合成产品的多样性相较于体外生物转化更为丰富,微生物底盘可以快速切换目标产品。此外,微生物发酵无需酶制剂的纯化及辅因子的添加,并且还可以利用复杂原料,例如工业废料^[77]、食物残渣^[78]等,从而可以降低成本。本综述重点围绕微生物利用低碳原料合成粮食类产品的进展进行总结。

当前,通过工程化改造提高自养微生物 CO_2 的固碳能力,或者打造全新高效的固碳途径,都可以提高 CO_2 作为底物的可行性。近些年,基于热、电化学等方法将 CO_2 转化为简单低碳化合物取得了巨大进展。利用低碳化合物为发酵原料,偶联微生物细胞工厂技术,将 CO_2 转化为

高碳化合物,已经成为广受关注的研究方向。目前,以低碳分子为发酵原料,通过微生物细胞工厂已经实现了一系列粮食类化合物的生产,包括五碳糖木糖,六碳糖葡萄糖、肌醇、氨基葡萄糖,二糖蔗糖,多糖淀粉以及不同类型的SCP。然而,这些产物生物合成的研究还处于初级阶段,其产量距离工业化应用还存在一定差距。一方面原因是较低的底物利用效率。目前,尽管低碳分子例如甲醇、甲酸、乙醇、乙酸等的生物转化已被广泛研究,但其转化效率仍然低于糖类底物;而乙二醇、异丙醇、丙酸等的相关研究则非常有限。另一方面,产物合成途径与底盘细胞之间的适配性较差也是一个重要原因,例如异源酶表达活性差、内源竞争途径的干扰、目标产物的分泌等问题。因此针对微生物对 CO_2 等低碳原料制备粮食类产物的研究,未来需要利用合成生物学手段提高低碳原料的利用效率和产物的合成效率,以进一步增加粮食类化合物的产量。

REFERENCES

- [1] RITCHIE H. How do CO_2 emissions compare when we adjust for trade?[EB/OL]. [2024-07-12]. <https://ourworldindata.org/consumption-based-co2>.
- [2] CANADELL JG, Le QUÉRÉ C, RAUPACH MR, FIELD CB, BUITENHUIS ET, CIAIS P, CONWAY TJ, GILLET NP, HOUGHTON RA, MARLAND G. Contributions to accelerating atmospheric CO_2 growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(47): 18866-18870.
- [3] Global network against food crises[EB/OL]. [2024-07-12]. <https://www.fsinplatform.org/global-report-food-crises-2024>
- [4] PASTOR AV, PALAZZO A, HAVLIK P, BIEMANS H, WADA Y, OBERSTEINER M, KABAT P, LUDWIG F. The global nexus of food-trade-water sustaining environmental flows by 2050[J]. *Nature Sustainability*, 2019, 2: 499-507.
- [5] EIBL R, SENN Y, GUBSER G, JOSSEN V, van den BOS C, EIBL D. Cellular agriculture: opportunities

- and challenges[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2021, 12: 51-73.
- [6] 蔡韬, 刘玉万, 朱蕾蕾, 苏浩, 王钰, 王国坤, 张玲玲, 朱之光, 盛翔, 毕昌昊, 马红武, 田朝光, 张学礼, 吴洽庆, 孙媛霞, 江会锋, 马延和. 二氧化碳人工生物转化[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 4101-4114.
CAI T, LIU YW, ZHU LL, SU H, WANG Y, WANG GK, ZHANG LL, ZHU ZG, SHENG X, BI CH, MA HW, TIAN CG, ZHANG XL, WU QQ, SUN YX, JIANG HF, MA YH. Artificial bioconversion of carbon dioxide[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4101-4114 (in Chinese).
- [7] 谭天伟, 陈必强, 张会丽, 崔子恒. 加快推进绿色生物制造 助力实现“碳中和”[J]. *化工进展*, 2021, 40(3): 1137-1141.
TAN TW, CHEN BQ, ZHANG HL, CUI ZH. Accelerate promotion of green bio-manufacturing to help achieve “carbon neutrality”[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2021, 40(3): 1137-1141 (in Chinese).
- [8] 史硕博, 王禹博, 乔玮博, 吴龙昊, 刘子鹤, 谭天伟. 第三代生物炼制的挑战与机遇[J]. *科学通报*, 2023, 68(19): 2489-2503.
SHI SB, WANG YB, QIAO WB, WU LH, LIU ZH, TAN TW. Challenges and opportunities in the third-generation biorefinery[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2023, 68(19): 2489-2503 (in Chinese).
- [9] 张以恒. 中国哲学思想“道法术器”对生物制造的启示[J]. *合成生物学*, 2023, 4: 1-11.
ZHANG YHP. The Enlightenment of the Chinese Philosophy “Tao-Fa-Shu-Qi” to Industrial Biomanufacturing[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4: 1-11.
- [10] ROY S, CHEREVOTAN A, PETER SC. Thermochemical CO₂ hydrogenation to single carbon products: scientific and technological challenges[J]. *ACS Energy Letters*, 2018, 3(8): 1938-1966.
- [11] ROSS MB, de LUNA P, LI YF, DINH CT, KIM D, YANG PD, SARGENT EH. Designing materials for electrochemical carbon dioxide recycling[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2: 648-658.
- [12] JIA SH, MA XD, SUN XF, HAN BX. Electrochemical transformation of CO₂ to value-added chemicals and fuels[J]. *CCS Chemistry*, 2022, 4(10): 3213-3229.
- [13] GRIM RG, HUANG Z, GUARNIERI MT, FERRELL JR, TAO L, SCHAIDLE JA. Transforming the carbon economy: challenges and opportunities in the convergence of low-cost electricity and reductive CO₂ utilization[J]. *Energy & Environmental Science*, 2020, 13(2): 472-494.
- [14] LIU ZH, WANG K, CHEN Y, TAN TW, NIELSEN J. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO₂[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3: 274-288.
- [15] 王凯, 刘子鹤, 陈必强, 王萌, 张洋, 毕浩然, 周雅莉, 霍奕影, 谭天伟. 微生物利用二氧化碳合成燃料及化学品: 第三代生物炼制[J]. *合成生物学*, 2020, 1(1): 60-70.
WANG K, LIU ZH, CHEN BQ, WANG M, ZHANG Y, BI HR, ZHOU YL, HUO YY, TAN TW. Microbial utilization of carbon dioxide to synthesize fuels and chemicals: third-generation biorefineries[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(1): 60-70 (in Chinese).
- [16] ANTONOVSKY N, GLEIZER S, NOOR E, ZOHAR Y, HERZ E, BARENHOLZ U, ZELCBUCH L, AMRAM S, WIDES A, TEPPER N, DAVIDI D, BAR-ON Y, BAREIA T, WERNICK DG, SHANI I, MALITSKY S, JONA G, BAR-EVEN A, MILO R. Sugar synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*[J]. *Cell*, 2016, 166(1): 115-125.
- [17] DIAZ CAC, BENNETT RK, PAPOUTSAKIS ET, ANTONIEWICZ MR. Deletion of four genes in *Escherichia coli* enables preferential consumption of xylose and secretion of glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 168-177.
- [18] ZHENG TT, ZHANG ML, WU LH, GUO SY, LIU XJ, ZHAO JK, XUE WQ, LI JW, LIU CX, LI X, JIANG Q, BAO J, ZENG J, YU T, XIA C. Upcycling CO₂ into energy-rich long-chain compounds via electrochemical and metabolic engineering[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5: 388-396.
- [19] TANG HT, WU LH, GUO SY, CAO WB, MA WH, WANG X, SHEN JF, WANG ML, ZHANG QN, HUANG MT, LUO XZ, ZENG J, KEASLING JD, YU T. Metabolic engineering of yeast for the production of carbohydrate-derived foods and chemicals from C₁₋₃ molecules[J]. *Nature Catalysis*, 2024, 7: 21-34.
- [20] ZHANG SS, SUN JH, FENG DD, SUN HL, CUI JY, ZENG XX, WU YN, LUAN GD, LU XF. Unlocking the potentials of cyanobacterial photosynthesis for directly converting carbon dioxide into glucose[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 3425.
- [21] WANG J, ZHANG YK, LU Q, XING DM, ZHANG RS. Exploring carbohydrates for therapeutics: a review on future directions[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 756724.

- [22] CHOI KR, LEE SY. Systems metabolic engineering of microorganisms for food and cosmetics production[J]. *Nature Reviews Bioengineering*, 2023, 1: 832-857.
- [23] YANG YX, WANG JH, YAO MD, LI XQ, LU XQ, HE JY, ZHANG HW, TIAN BX, ZHOU J. An update on the review of microbial synthesis of glucosamine and N-acetylglucosamine[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(4): 93.
- [24] MA Q, SUN QW, TAN M, XIA L, ZHANG Y, YANG MY, ZHUO MY, ZHAO KX, LI YJ, XU QY, CHEN N, XIE XX. Highly efficient production of N-acetyl-glucosamine in *Escherichia coli* by appropriate catabolic division of labor in the utilization of mixed glycerol/glucose carbon sources[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(21): 5966-5975.
- [25] CHHETRI DR. Myo-inositol and its derivatives: their emerging role in the treatment of human diseases[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1172.
- [26] GONZALEZ-UARQUIN F, RODEHUTSCORD M, HUBER K. Myo-inositol: its metabolism and potential implications for poultry nutrition: a review[J]. *Poultry Science*, 2020, 99(2): 893-905.
- [27] LI YJ, HAN PP, WANG J, SHI T, YOU C. Production of myo-inositol: recent advance and prospective[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(3): 1101-1111.
- [28] YOU C, SHI T, LI YJ, HAN PP, ZHOU XG, ZHANG YHP. An *in vitro* synthetic biology platform for the industrial biomanufacturing of myo-inositol from starch[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(8): 1855-1864.
- [29] HAN PP, ZHOU XG, YOU C. Efficient multi-enzymes immobilized on porous microspheres for producing inositol from starch[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 380.
- [30] HAN PP, YOU C, LI YJ, SHI T, WU H, ZHANG YHP. High-titer production of myo-inositol by a co-immobilized four-enzyme cocktail in biomimetic mineralized microcapsules[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 461: 141946.
- [31] TANG EJ, SHEN XL, WANG J, SUN XX, YUAN QP. Synergetic utilization of glucose and glycerol for efficient myo-inositol biosynthesis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(4): 1247-1252.
- [32] YOU R, WANG L, SHI CR, CHEN H, ZHANG SS, HU MR, TAO Y. Efficient production of myo-inositol in *Escherichia coli* through metabolic engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 109.
- [33] WANG XS, CHEN L, LIU J, SUN T, ZHANG WW. Light-driven biosynthesis of myo-inositol directly from CO₂ in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 566117.
- [34] UMAI D, KAYALVIZHI R, KUMAR V, JACOB S. Xylitol: bioproduction and applications: a review[J]. *Frontiers in Sustainability*, 2022, 3: 826190.
- [35] DU J, YUAN YB, SI T, LIAN JZ, ZHAO HM. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(18): e142.
- [36] 鄱欣彤, 张杉杉, 毛绍名, 栾国栋, 罗泉, 吕雪峰. 蓝细菌光驱固碳合成蔗糖技术的发展与展望[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(8): 1411-1423.
- CHI XT, ZHANG SS, MAO SM, LUAN GD, LUO Q, Lü XF. Cyanobacteria based photosynthetic production of sucrose: development and prospect[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(8): 1411-1423 (in Chinese).
- [37] DUCAT DC, AVELAR-RIVAS JA, WAY JC, SILVER PA. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(8): 2660-2668.
- [38] SONG K, TAN XM, LIANG YJ, LU XF. The potential of *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 for sugar feedstock production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 7865-7875.
- [39] DU W, LIANG FY, DUAN YK, TAN XM, LU XF. Exploring the photosynthetic production capacity of sucrose by cyanobacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 17-25.
- [40] QIAO CC, DUAN YK, ZHANG MY, HAGEMANN M, LUO Q, LU XF. Effects of reduced and enhanced glycogen pools on salt-induced sucrose production in a sucrose-secreting strain of *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(2): e0202317.
- [41] YOU C, CHEN HG, MYUNG S, SATHITSUKSANOHN N, MA H, ZHANG XZ, LI JY, ZHANG YHP. Enzymatic transformation of nonfood biomass to starch[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(18): 7182-7187.
- [42] ZHANG YHP, YOU C, CHEN HG, FENG R. Surpassing Photosynthesis: High-efficiency and Scalable CO₂ Utilization Through Artificial Photosynthesis[M]. *ACS Symposium Series*.

- Washington, DC: American Chemical Society, 2012: 275-292.
- [43] ZHANG YHP. Simpler is better: high-yield and potential low-cost biofuels production through cell-free synthetic pathway biotransformation (SyPaB)[J]. *ACS Catalysis*, 2011, 1(9): 998-1009.
- [44] ZHANG YHP. Next generation biorefineries will solve the food, biofuels, and environmental trilemma in the energy-food-water nexus[J]. *Energy Science & Engineering*, 2013, 1(1): 27-41.
- [45] CAI T, SUN HB, QIAO J, ZHU LL, ZHANG F, ZHANG J, TANG ZJ, WEI XL, YANG JG, YUAN QQ, WANG WY, YANG X, CHU HY, WANG Q, YOU C, MA HW, SUN YX, LI Y, LI C, JIANG HF, WANG QH, MA YH. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide[J]. *Science*, 2021, 373(6562): 1523-1527.
- [46] BOHRER BM. An investigation of the formulation and nutritional composition of modern meat analogue products[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2019, 8(4): 320-329.
- [47] RITALA A, HÄKKINEN ST, TOIVARI M, WIEBE MG. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2009.
- [48] SUMAN G, NUPUR M, ANURADHA S, PRADEEP B. Single cell protein production: a review[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 4(9): 251-262.
- [49] CIANI M, LIPPOLIS A, FAVA F, RODOLFI L, NICCOLAI A, TREDICI MR. Microbes: food for the future[J]. *Foods*, 2021, 10(5): 971.
- [50] BOURDICHON F, CASAREGOLA S, FARROKH C, FRISVAD JC, GERDS ML, HAMMES WP, HARNETT J, HUYS G, LAULUND S, OUWEHAND A, POWELL IB, PRAJAPATI JB, SETO Y, TER SCHURE E, van BOVEN A, VANKERCKHOVEN V, ZGODA A, TUIJTELAARS S, HANSEN EB. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 154(3): 87-97.
- [51] 刘延峰, 邓梦婷, 陈坚. 微生物替代蛋白生物制造: 进展与展望[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(6): 1-5.
- LIU YF, DENG MT, CHEN J. Microbial alternative protein biomanufacturing: advances and perspectives[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(6): 1-5 (in Chinese).
- [52] 舒芹, 李凯凯, 全拓, 魏雪团. 微生物蛋白作为优质替代蛋白资源的应用研究[J]. *未来食品科学*, 2022, 2(2): 96-106.
- SHU Q, LI KK, QUAN T, WEI XT. Application and development of microbial proteins as high quality alternative protein resources: a review[J]. *Future Food Science*, 2022, 2(2): 96-106.
- [53] 傅晓莹, 乔玮博, 史硕博. 微生物利用一碳底物生产单细胞蛋白研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(3): 1-11.
- FU XY, QIAO WB, SHI SB. Microbial production of single cell proteins from single carbon substrates: a review[J]. *Food Science*, 2023, 44(3): 1-11 (in Chinese).
- [54] SIMÕES ACP, FERNANDES RP, BARRETO MS, MARQUES Da COSTA GB, de GODOY MG, FREIRE DMG, PEREIRA N Jr. Growth of *Methylobacterium organophilum* in methanol for the simultaneous production of single-cell protein and metabolites of interest[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2022, 60(3): 338-349.
- [55] GNAN SO, ABODREHEBA AO. Single-cell protein from methanol with *Enterobacter aerogenes*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 29(3): 355-357.
- [56] MENG J, LIU SF, GAO L, HONG K, LIU SG, WU X. Economical production of *Pichia pastoris* single cell protein from methanol at industrial pilot scale[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 198.
- [57] GAO L, MENG J, DAI WL, ZHANG ZK, DONG HF, YUAN QQ, ZHANG WY, LIU SG, WU X. Deciphering cell wall sensors enabling the construction of robust *P. pastoris* for single-cell protein production[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 178.
- [58] RAJA R, HEMAISWARYA S, ASHOK KUMAR N, SRIDHAR S, RENGASAMY R. A perspective on the biotechnological potential of microalgae[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2008, 34(2): 77-88.
- [59] PEREIRA AG, FRAGA-CORRAL M, GARCIA-OLIVEIRA P, OTERO P, SORIA-LOPEZ A, CASSANI L, CAO H, XIAO JB, PRIETO MA, SIMAL-GANDARA J. Single-cell proteins obtained by circular economy intended as a feed ingredient in aquaculture[J]. *Foods*, 2022, 11(18): 2831.
- [60] 中华人民共和国关于莱茵衣藻等 36 种“三新食品”的公告[EB/OL]. [2022-05-05]. <http://law.foodmate.net/show-217445.html>.
- [61] LAFARGA T, FERNÁNDEZ-SEVILLA JM, GONZÁLEZ-LÓPEZ C, ACIÉN-FERNÁNDEZ FG.

- Spirulina* for the food and functional food industries[J]. Food Research International, 2020, 137: 109356.
- [62] Solar-Foods-presentation [EB/OL]. [2019-03-09]. <https://cdn2.hubspot.net/hubfs/4422035/Solar-Foods-presentation-03-2019.pdf>.
- [63] 赵广立. 乙醇梭菌蛋白何以成了“香饽饽”[N]. 中国科学报, 2021-11-02(1).
- [64] BÉLANGER L, FIGUEIRA MM, BOURQUE D, MOREL L, BÉLAND M, LARAMÉE L, GROLEAU D, MÍGUEZ CB. Production of heterologous protein by *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 231(2): 197-204.
- [65] ØVERLAND M, TAUSON AH, SHEARER K, SKREDE A. Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals[J]. Archives of Animal Nutrition, 2010, 64(3): 171-189.
- [66] ZHA X, TSAPEKOS P, ZHU XY, KHOSHNEVISAN B, LU XW, ANGELIDAKI I. Bioconversion of wastewater to single cell protein by methanotrophic bacteria[J]. Bioresource Technology, 2021, 320(Pt A): 124351.
- [67] KHOSHNEVISAN B, TSAPEKOS P, ZHANG YF, VALVERDE-PÉREZ B, ANGELIDAKI I. Urban biowaste valorization by coupling anaerobic digestion and single cell protein production[J]. Bioresource Technology, 2019, 290: 121743.
- [68] YANG QY, GUO XX, LIU YW, JIANG HF. Biocatalytic C-C bond formation for one carbon resource utilization[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(4): 1890.
- [69] JIA DC, HE MY, TIAN Y, SHEN SH, ZHU XF, WANG YH, ZHUANG YP, JIANG WH, GU Y. Metabolic engineering of gas-fermenting *Clostridium ljungdahlii* for efficient co-production of isopropanol, 3-hydroxybutyrate, and ethanol[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(10): 2628-2638.
- [70] LIEW FE, NOGLE R, ABDALLA T, RASOR BJ, CANTER C, JENSEN RO, WANG L, STRUTZ J, CHIRANIA P, de TISSERA S, MUELLER AP, RUAN ZH, GAO A, TRAN L, ENGLE NL, BROMLEY JC, DANIELL J, CONRADO R, TSCHAPLINSKI TJ, GIANNONE RJ, et al. Carbon-negative production of acetone and isopropanol by gas fermentation at industrial pilot scale[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40: 335-344.
- [71] SCHWANDER T, SCHADA von BORZYSKOWSKI L, BURGNER S, CORTINA NS, ERB TJ. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*[J]. Science, 2016, 354(6314): 900-904.
- [72] XIAO L, LIU GX, GONG FY, ZHU HW, ZHANG YP, CAI Z, LI Y. A minimized synthetic carbon fixation cycle[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(1): 799-808.
- [73] YU H, LI XQ, DUCHOUD F, CHUANG DS, LIAO JC. Augmenting the Calvin-Benson-Bassham cycle by a synthetic malyl-CoA-glycerate carbon fixation pathway[J]. Nature Communications, 2018, 9: 2008.
- [74] LUO SS, LIN PP, NIEH LY, LIAO GB, TANG PW, CHEN C, LIAO JC. A cell-free self-replenishing CO₂-fixing system[J]. Nature Catalysis, 2022, 5: 154-162.
- [75] MILLER TE, BENEYTON T, SCHWANDER T, DIEHL C, GIRAULT M, McLEAN R, CHOTEL T, CLAUS P, CORTINA NS, BARET JC, ERB TJ. Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts[J]. Science, 2020, 368(6491): 649-654.
- [76] 石婷, 宋展, 宋世怡, 张以恒. 体外生物转化(*in vitro* BioTransformation, ivBT): 生物制造的新前沿[J]. 合成生物学, 2024, 5: 1-24.
- SHI T, SONG Z, SONG SY, ZHANG YHP. *In vitro* BioTransformation (ivBT): new frontier of industrial biomanufacturing[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5: 1-24.
- [77] RINALDI MA, TAIT S, TOOGOOD HS, SCRUTTON NS. Bioproduction of linalool from paper mill waste[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 892896.
- [78] JI MK, ZHENG TR, WANG ZY, LAI WJ, ZHANG LZ, ZHANG QY, YANG HY, MENG S, XU WH, ZHAO CH, WU Q, CHEN GQ. PHB production from food waste hydrolysates by *Halomonas bluephagenesis* Harboring PHB operon linked with an essential gene[J]. Metabolic Engineering, 2023, 77: 12-20.

(本文责编 郝丽芳)