

· 综 述 ·

一碳气体生物转化合成油脂类化学品的研究进展

王薇廷¹, 焦子悦¹, 侯千姿¹, 郭树奇^{1,2}, 费强^{1,2*}

1 西安交通大学 化学工程与技术学院, 陕西 西安 710049

2 西安市一碳化合物生物转化技术重点实验室, 陕西 西安 710049

王薇廷, 焦子悦, 侯千姿, 郭树奇, 费强. 一碳气体生物转化合成油脂类化学品的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2866-2883.

WANG Weiting, JIAO Ziyue, HOU Qianzi, GUO Shuqi, FEI Qiang. Research progress in bioconversion of C1 gases into oleochemicals[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2866-2883.

摘 要: 通过改造或强化工业微生物, 实现以一碳气体为原料生物合成能源和平台化学品, 对减少化石资源消耗和温室气体排放具有重大意义。嗜甲烷菌、微藻和产乙酸菌能天然利用甲烷、二氧化碳或一氧化碳等一碳气体, 将其转化为不同碳链长度的油脂类化学品, 在绿色生物制造领域备受关注。本文围绕生物油脂类化学品的低碳生物合成, 全面总结了微生物作为细胞工厂利用一碳气体合成油脂类化学品的研究进展, 详细介绍了一碳细胞工厂的油脂合成相关代谢途径, 并从基因表达调控、代谢路径重构以及发酵过程优化等角度, 系统阐述并探讨了一碳气体合成油脂类化学品技术的研究进展和应用前景, 为实现一碳气体的高效生物利用及发展碳循环生物经济模式提供了理论支持。
关键词: 一碳气体; 油脂类化学品; 嗜甲烷菌; 微藻; 产乙酸菌; 生物合成

Research progress in bioconversion of C1 gases into oleochemicals

WANG Weiting¹, JIAO Ziyue¹, HOU Qianzi¹, GUO Shuqi^{1,2}, FEI Qiang^{1,2*}

1 School of Chemical Engineering and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

2 Xi'an Key Laboratory of C1 Compound Bioconversion Technology, Xi'an 710049, Shaanxi, China

Abstract: The utilization of C1 gases (CH₄, CO₂, and CO) for the production of oleochemicals applied in the energy and platform chemicals through microbial engineering has emerged as a

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103500); 国家自然科学基金(22178281, 22108219); 陕西省杰出青年科学基金(2022JC-09); 陕西高校青年创新团队项目

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103500), the National Natural Science Foundation of China (22178281, 22108219), the Science Fund for Distinguished Young Scholars of Shaanxi Province (2022JC-09), and the Youth Innovation Team of Shaanxi Universities.

*Corresponding author. E-mail: feiqiang@xjtu.edu.cn

Received: 2024-02-05; Accepted: 2024-04-24; Published online: 2024-07-16

promising approach to reduce greenhouse gas emissions and decrease dependence on fossil fuel. C1 gas-utilizing microorganisms, such as methanotrophs, microalgae, and acetogens, are capable of converting C1 gases as the sole substrates for cell growth and oleochemical synthesis with different carbon-chain lengths, garnering considerable attention from both scientific community and industry field for sustainable biomanufacturing. This paper comprehensively reviews recent advancements in the development of engineered cell factories utilizing C1 gases for the production of oleochemicals, elucidating the key metabolic pathways of biosynthesis. Furthermore, this paper highlights the research progress and prospects in optimizing gene expression, metabolic pathway reconstruction, and fermentation conditions for efficient oleochemical production from C1 gases. This review provides valuable insights and guidance for the efficient utilization of C1 gases and the development of carbon cycling-based bioeconomy.

Keywords: C1 gas; oleochemicals; methanotrophs; microalgae; acetogens; biosynthesis

随着工业经济的发展以及石化资源的过度消耗,全球气候变化成为人类面临的共同挑战。国际能源署发布的《全球能源评论》指出,2022年全球温室气体的排放量仍然呈现增长趋势,其中二氧化碳(CO_2)排放量达到 363 亿 $\text{t}^{[1]}$,甲烷(CH_4)排放量达到 113 亿 t CO_2 当量^[2]。此外,一氧化碳(CO)是合成气、工业尾气及劣质天然气的主要成分,我国的 CO 年均排放量也达到 23.58 亿 t CO_2 当量^[3]。近年来为实现低碳可持续发展目标,开发高效的一碳气体利用和转化

技术已得到学术界和产业界的广泛关注^[4-6]。目前,通过化学催化可在高能耗条件下将一碳气体(CH_4 、 CO_2 和 CO)转化为短链化学品($\text{C}<4$),但使用该策略将一碳气体转化为中长碳链化学品仍存在较大挑战^[7]。自然界中存在多种能够利用一碳气体的微生物,它们通过体内多种代谢路径,可在常温常压条件下将一碳气体转化为中长碳链的化学品(图 1)。因此,开发一碳气体的生物转化技术,可为生物制造路线提供新质原料和产品^[8-9]。

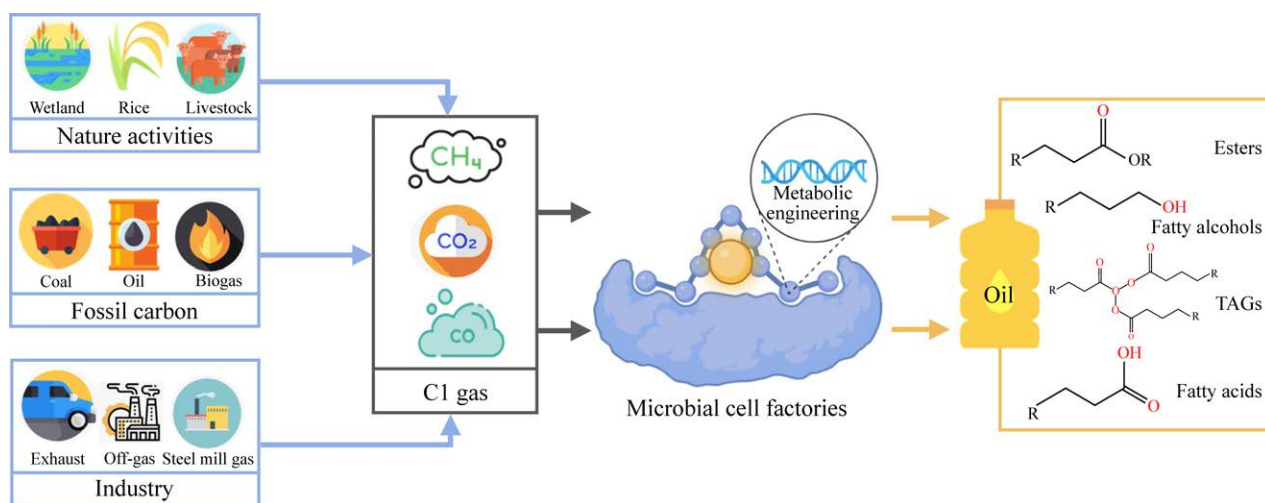


图 1 基于微生物转化的一碳气体高值化利用生产油脂化学品

Figure 1 Microbial conversion of C1 gases for high-value utilization in the production of oleochemicals.

油脂类化学品是一大类脂肪酸衍生物,包括脂肪酸、脂肪醇、烷(烯)烃、脂肪酸甲/乙酯、蜡酯、甘油二酯和甘油三酯等中长碳链的化学品,可广泛应用于能源、医药、营养化学品等领域^[10]。微生物生产油脂类化学品具有碳中性和可再生的优势。利用微生物来源的油脂类化学品替代传统的化石燃料和天然动植物油,也被认为是绿色生物制造的经典范例,该方案预计将为燃料供应、油脂营养品生产和温室气体减排提供全新技术路径。目前利用一碳气体可直接合成油脂类化学品的天然微生物主要包括好氧性嗜甲烷菌、微藻和产乙酸菌。随着对一碳气体利用机制的不断揭示和合成生物学技术的持续发展,优化天然固碳途径可以有效提升微生物固碳效率,并显著增强从一碳气体原料到油脂类化学品的生产效能^[11]。因此,开发利用一碳气体为原料的生物制造新途径,一方面能够利用 CH_4 和 CO_2 进行“碳汇”以减缓气候危机;另一方面可以利用废碳资源替代传统的糖基原料,建立生物制造新路径,有效促进生物经济的可持续发展。

本文对近年来天然一碳气体利用微生物以 CH_4 、 CO_2 和 CO 为原料合成油脂类化学品的相关技术进行综述,重点讨论不同微生物转化上述不同一碳气体的代谢途径和改造策略,为一碳气体低碳生物合成技术发展提供参考。

1 甲烷基油脂类化学品的生物合成

1.1 嗜甲烷菌的生物油脂合成路径

嗜甲烷菌(methanotrophs)是甲基营养菌的一个分支。根据是否以氧气作为电子受体,嗜甲烷菌可分为好氧性嗜甲烷菌和厌氧性嗜甲烷菌。好氧性嗜甲烷菌因倍增时间短、鲁棒性强以及生产实践利用潜能高等特性,受到了广泛

的关注^[12]。因此,本文主要围绕好氧性嗜甲烷菌的相关研究进行论述。

根据甲烷同化途径的差异,目前将好氧性嗜甲烷菌主要分为 Group I (γ -变形菌)、Group II (α -变形菌)和 Group III (疣微菌门)。Group I 型通过单磷酸核酮糖(ribulose monophosphate, RuMP)途径同化 CH_4 ,其胞质内膜呈束状排列,主要富含 C16 脂肪酸;Group II 型通过丝氨酸(serine)途径同化 CH_4 ,其胞质内膜沿细胞壁排列,主要脂肪酸为 C18;Group III 型先氧化 CH_4 产生能量和 CO_2 ,再通过卡尔文(Calvin-Benson-Bassham, CBB)途径实现 CO_2 的碳固定和碳同化^[12]。好氧性嗜甲烷菌脂肪酸合成是一种典型的 II 型脂肪酸合成系统。如图 2 所示,乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl CoA carboxylase, Acc)作用下转化为丙二酰辅酶 A,作为脂肪酸合成的起始物质。随后,通过脂肪酸合酶复合体(fatty acid synthase type II, FAS II)催化逐步合成长链脂酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)。脂酰 ACP 在硫脂酶(thioesterase, Tes)的水解作用下释放游离脂肪酸,进入细胞质或转化成磷脂^[13]。

1.2 甲烷基生物油脂细胞工厂的构建

好氧性嗜甲烷菌脂质的主要来源为其细胞内膜中的组分。2017 年, Dong 等^[14]首次通过绿色生物制造工艺成功将嗜甲烷菌(*Methyloburymicrobium buryatense*)菌株的细胞膜脂转化为绿色柴油;由于其核心代谢途径与细胞内膜合成密切相关,这类微生物能够高效合成大量长链脂肪酸;通过增强脂肪酸合成前体乙酰辅酶 A 的供应,可有效提高脂肪酸的产量,为绿色燃料的生产提供了可行的途径。Henard 等^[15]研究发现,在 *M. buryatense* 菌株中引入磷酸转酮酶(phosphoketolase, PKT)途径能够实现 5-磷酸核酮糖(ribulose-5-phosphate,

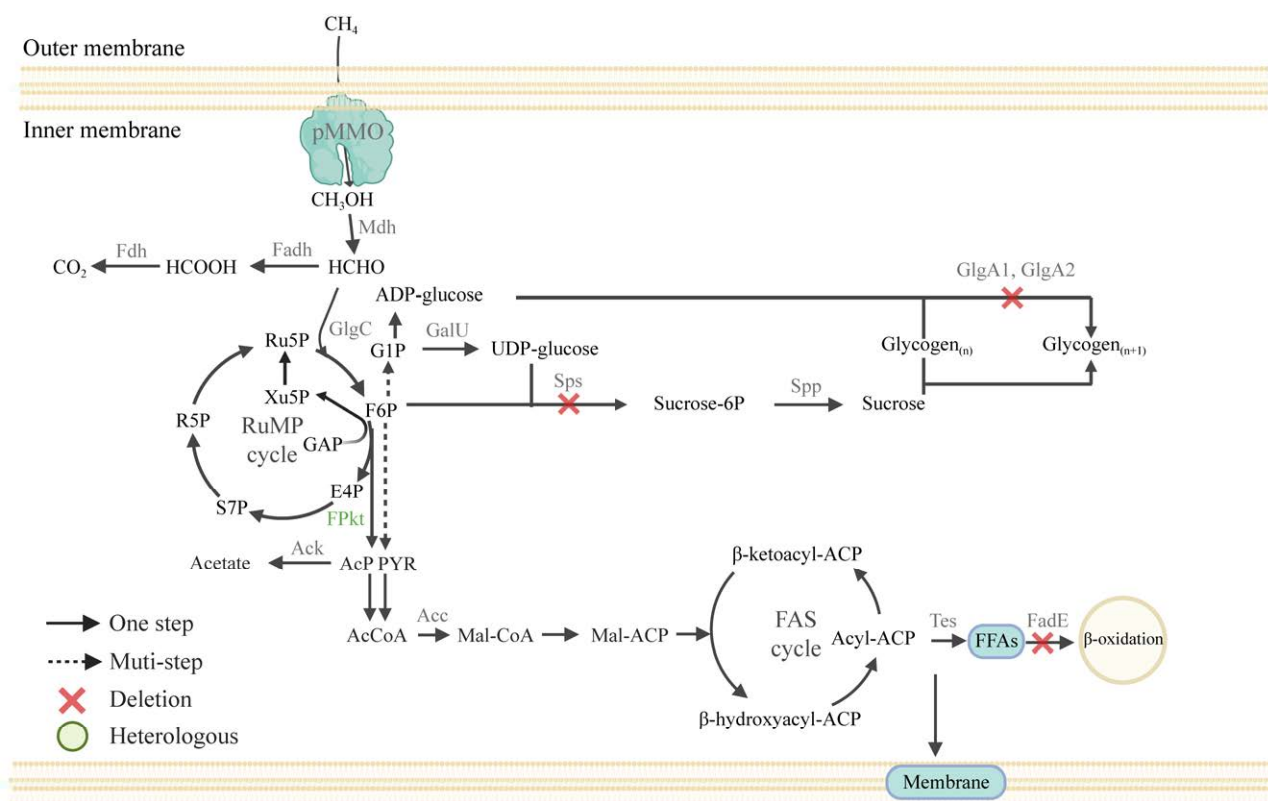


图 2 好氧性嗜甲烷菌生物转化 CH_4 合成脂质途径

Figure 2 Lipid biosynthesis pathway by methane fixation in aerobic methanotrophs. pMMO: Particulate methane monooxygenase; Mdh: Methanol dehydrogenase; Fadh: Formaldehyde dehydrogenase; Fdh: Formate dehydrogenase; G1C: ADP-glucose pyrophosphorylase; GalU: Glucose-1-phosphate adenylyltransferase; GlgA: Glycogen synthase; Sps: Sucrose-6-phosphate synthase; Spp: Sucrose-6-phosphate phosphatase; FPkt: Fructose-6-phosphate phosphoketolase; Acc: Acetyl-CoA carboxylase; Ack: Acetate kinase; Tes: Thioesterase; FadE: Acyl-CoA dehydrogenase; Ru5P: Ribulose-5-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; E4P: Erythrose 4-phosphate; S7P: Sedoheptulose-7-phosphate; Xu5P: Xylulose-5-phosphate; R5P: Ribose-5-phosphate; GAP: Glyceraldehyde-3-phosphate; G1P: Glucose-1-phosphate; UDP-glucose: Uridine diphosphate glucose; Sucrose-6P: Sucrose-6-phosphate; PYR: Pyruvate; AcP: Acetyl phosphate; CoA: Coenzyme A; AcCoA: Acetyl-CoA; Mal-CoA: Malonyl-CoA; ACP: Acyl carrier protein; Mal-ACP: Malonyl-ACP; FFAs: Free fatty acids.

Ru5P)再生, 在提高甲烷到乙酰辅酶 A 的转化率的同时, 有效避免了源自糖酵解途径中丙酮酸的脱羧带来的碳损失和 ATP 消耗(图 2), 最终将细胞内乙酰辅酶 A 的浓度和油脂得率均提高至原来的 2 倍。Fei 等^[16]在阻断 *M. buryatense* 糖原合成路径的基础上, 通过优化高密度发酵工艺将油脂含量从 4.9% 提升至 9.5%, 油脂产率提高了 3 倍。

Demidenko 等^[13]基于整合转录组学数据的代谢网络模型分析发现, *M. buryatense* 菌株中脂肪酸高效积累的关键在于提高脂肪酸合成前体(乙酰辅酶 A)的供应, 通过敲除乙酸激酶和过表达乙酰辅酶 A 羧化酶, 最终获得的工程菌株脂肪酸的积累量达到 111.0 mg/g 细胞干重(dry cell weight, DCW) (表 1)。

表 1 嗜甲烷菌生物转化甲烷合成脂质进展

Table 1 Bioconversion of methane for the production of lipids

Strains	Products	Genetic modifications	Titer (mg/L)	Yield (mg/g DCW)	Productivity (mg/(L·h))	References
<i>Methylotheobacterium buryatense</i>	Lipids	None	960.0	–	13.3	[14]
<i>M. buryatense</i>	Lipids	Overexpress <i>pktB</i>	927.0	–	9.7	[15]
<i>M. buryatense</i>	Lipids	Knock out <i>glgA1</i> , <i>glgA2</i> , and <i>sps</i>	1 400.0	–	45.4	[16]
<i>M. buryatense</i>	Lipids	None	82.4	–	–	[17]
<i>Methylomonas methanica</i>	Lipids	None	–	79.0	–	[18]

1.3 嗜甲烷菌合成生物油脂的工艺优化

发酵条件(CH_4 和 O_2 的供应)和操作模式(分批发酵、连续发酵和高密度发酵)可有效调控好氧性嗜甲烷菌中油脂的积累。Fei 等^[16]研究发现高密度发酵相较于分批发酵更有利于促进菌株的生长和油脂产率提高,两种发酵模式下的生物量和油脂产率分别为 15.3 g/L、45.4 mg/(L·h)和 10.2 g/L、13.4 mg/(L·h),油脂产率提高了 3 倍。Gilman 等^[17]研究发现,在 *M. buryatense* 的 O_2 限制条件下的连续发酵模式中,生物量、油脂含量和油脂产量显著增长;在这种条件下,菌株的生物量、油脂含量和油脂产量分别达到 0.77 g/L、10.7%和 82.4 mg/L;相较于 CH_4 限制条件,分别增加了 171%、105%和 179%。Burdette^[18]研究发现嗜甲烷菌(*Methylomonas methanica*)在 25 °C 培养条件下,油脂得率随 Cu^{2+} 浓度的增加而提高,最高达到 79.0 mg 脂肪酸甲酯/g CH_4 。

2 CO_2 基油脂类化学品的生物合成

2.1 微藻的油脂类化学品合成路径

CO_2 是主要的温室气体之一,也是一种丰富的碳资源。微藻作为具有产氧光合作用能力的原核或真核微生物,能够将大气中的 CO_2 固

定并转化为自身的储能有机物,是利用光能直接转化 CO_2 为高值化合物的主要微生物。凭借其高脂质含量、高光合效率、易于培养、快速生长以及对环境的强大适应性等特点,微藻被认为是生产生物油脂的理想微生物^[19]。真核微藻主要通过依赖于乙酰辅酶 A 的肯尼迪途径(Kennedy pathway)和不依赖于乙酰辅酶 A 的磷脂酰化甘油酰基转移酶(phospholipid:diacylglycerol acyltransferase, PDAT)途径合成甘油三酯(triacylglycerol, TAG),实现 CO_2 到油脂的转化。以蓝藻(cyanobacteria)为代表的原核微藻以膜脂作为合成油脂类化学品的前体^[20]。图 3 展示了微藻生物转化 CO_2 合成油脂类化学品的主要合成途径。近年来,由于基于蓝藻类微生物的合成生物技术发展迅速^[21],已通过改造细胞工厂实现了多种脂肪酸衍生物的生物合成。

2.2 CO_2 基油脂类化学品细胞工厂的构建

2.2.1 游离脂肪酸

由于蓝藻中的脂肪酸主要来源于膜脂,过表达醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, AldE)和酰基-ACP 还原酶(acyl-ACP reductase, Aar)被证明是实现蓝藻中脂肪酸高产的有效策略^[22]。硫酯酶 Tes 在脂肪酸生物合成中具有重要功能,可将脂肪酸伸长循环的中间产物酰基-ACP 转化为游离脂肪酸。考虑到蓝藻基因组中并未发现编码催化链解离的 *tes* 基因,研究人员主要通过

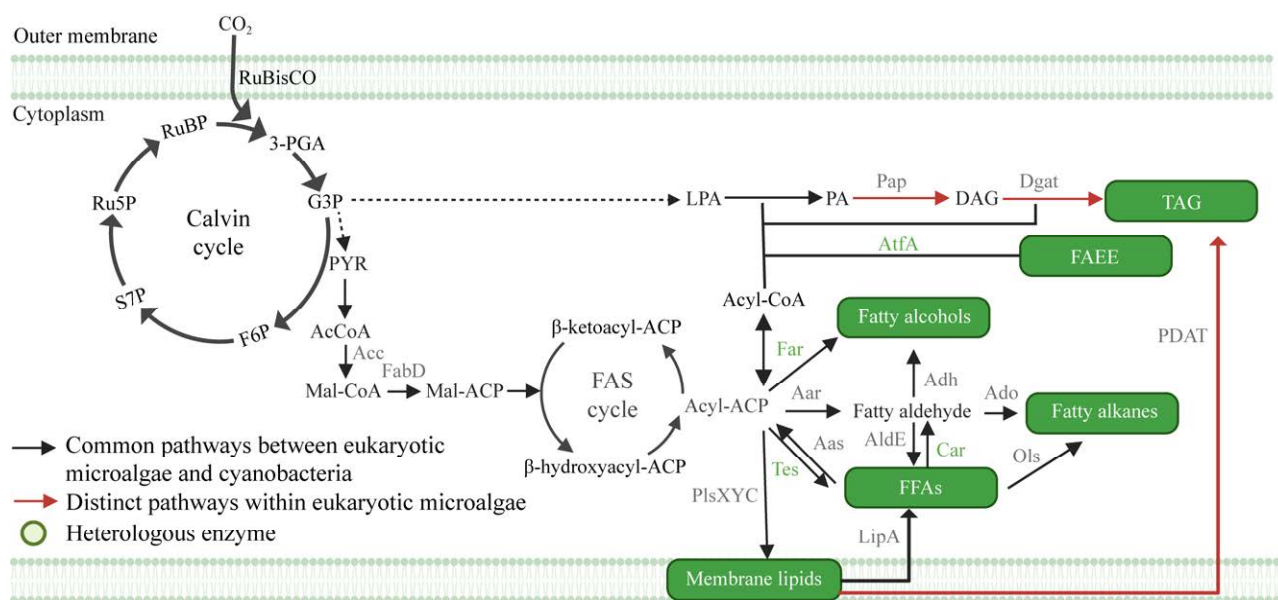


图3 微藻生物转化 CO_2 合成油脂类化学品途径

Figure 3 Overview of native and synthetic pathways for biosynthesis of oleochemicals in microalgae. Pap: Phosphatidic acid phosphatase; Dgat: Diacylglycerol acyltransferase; AtfA: Wax ester synthase; PDAT: Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase; Acc: Acetyl-CoA carboxylase; FabD: Malonyl-CoA:ACP transacylase; Far: Fatty acid reductase; Aar: Acyl-ACP reductase; Aas: Acyl-acyl carrier protein synthetases; Tes: Thioesterase; Adh: Alcohol dehydrogenase; Ado: Aldehyde deformylating oxygenase; AldE: Aldehyde dehydrogenase; Car: Carboxylic acid reductase; Ols: Olefin synthase; LipA: Lipase; PlsC: Lysophosphatidic acid acyltransferase; PlsX: Phosphate acyltransferase; PlsY: Acylglycerol-phosphate acyltransferase; Ru5P: Ribulose-5-phosphate; RuBP: Ribulose-1,5-bisphosphate; 3-PGA: 3-phosphoglycerate; G3P: Glyceraldehyde-3-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; S7P: Sedoheptulose-7-phosphate; PYR: Pyruvate; CoA: Coenzyme A; AcCoA: Acetyl-CoA; Mal-CoA: Malonyl-CoA; ACP: Acyl carrier protein; Mal-ACP: Malonyl-ACP; LPA: Lysophosphatidic acid; PA: Phosphatidic acid; DAG: Diacylglycerol; TAG: Triacylglycerol; FFAs: Free fatty acids; FAEE: Fatty acid ethyl esters. Solid arrows denote single-step reactions, whereas dashed arrows represent multi-step reactions.

在蓝藻中引入不同来源的外源 Tes 实现胞内脂肪酸的积累。来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)、不动杆菌(*Acinetobacter baylyi*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和花生(*Arachis hypogaea*)的 Tes 均可在蓝藻中功能性表达,从而产生长链脂肪酸(C16–C18)^[20]。为了使产物链长度多样化,研究人员也将来自加州伞形花(*Umbellularia californica*)和四径厌氧球菌(*Anaerococcus tetradius*)的 Tes 引入蓝藻,用于生产中链脂肪酸(C8–C12)^[23]。此外,在生产 C12 脂肪酸的聚球藻(*Synechococcus*

sp.) PCC 7002 中,用浮游硅藻(*Chaetoceros*) GSL56 来源的 FabH 替换天然 FabH 也可将 C12 脂肪酸的产量增加 5 倍^[24]。

脂酰 ACP 合成酶(acyl-ACP synthetase, Aas)能够将脂肪酸重新激活为脂酰-ACP,失活该酶除了可促进脂肪酸的生产,还能促进其分泌。在敲除 *aas* 基因的重组集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC 6803、聚球藻(*Synechococcus elongatus*) PCC 7942 和聚球藻 7002 中均检测到胞外脂肪酸,表明脂肪酸可通过主动或被动运输输出到蓝藻细胞外^[25]。在失活脂酰 ACP 合成酶的基础上进

一步敲除细胞表面蛋白, 减弱肽聚糖的屏障作用, 可使胞外脂肪酸产量提高 1.2 倍^[26]。研究人员发现在聚球藻 PCC 7942 中过表达耐药结节细胞分化(resistance nodulation cell division, RND)超家族的基因 *rndA1* 和 *rndB1* 也会增强脂肪酸的外排^[27]。然而, 最新一项研究表明, 在高产 1-辛醇的集胞藻 PCC 6803 中过表达 RND 外排泵, 如 *AcrA* (*sll0180*)、*AcrB* (*slr2131*)或 *TolC* (*slr1270*), 并不会进一步提高 1-辛醇的产量, 表明 RND 转运体可能在脂肪酸衍生产物的转运过程中发挥不同的作用^[28]。Kizawa 等^[29]发现转录因子 LexA 控制蓝藻脂肪酸生物合成中的一组基因(*fabD*、*fabH*、*fabF*、*fabG*、*fabZ* 和 *fabI*), 敲除该转录因子会使 *fabD*、*fabH*、*fabF* 和 *fabG* 基因的表达水平上调, 从而促进脂肪酸的积累。此外, 研究人员发现参与碳氮代谢的转录因子 *cyAbrB2* 的表达量对脂肪酸合成起调控作用, 而且这种调控作用不依赖于其对脂肪酸合成途径酶活性的影响, 敲除该转录因子可使脂肪酸产量增加约 2 倍^[30]。

2.2.2 烷(烯)烃

烷烃和烯烃是汽油、柴油和航空煤油的主要成分之一。2010 年, Schirmer 等^[31]首次揭示了集胞藻 PCC 6803 中烷(烯)烃的生物合成途径。通过酰基-ACP 还原酶催化, 脂酰-ACP 或酰基辅酶 A 还原为长链脂肪醛, 随后由脂肪醛脱甲酰加氧酶 (aldehyde deformylating oxygenase, ADO)催化其生成 C_{n-1} 烷(烯)烃(图 4)。通过优化烷(烯)烃合成元件, 结合代谢工程改造可以提高蓝藻产烷(烯)烃的能力。吕雪峰研究组^[32]通过增加集胞藻 PCC 6803 中 *Aar-Ado* 基因的拷贝数, 阻断聚羟基丁酸酯(poly- β -hydroxybutyrate, PHB)的生物合成途径, 将烷(烯)烃产量提高了 8 倍, 达到了 26 mg/L。Mendez-Perez 等^[33]在聚球藻 PCC 7002 中发现了烯烃的另一种合成途

径, 利用模块化的 I 型聚酮合酶(olefin synthase, OIs), 脂酰-ACP 前体被拉长并脱羧以合成末端 1-烯烃(图 3), 通过用 P_{sba} 启动 *ols* 基因的表达, 将烯烃产量提高至 4.2 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{OD}_{730} \text{ unit})$ 。此外, 通过引入小球藻(*Chlorella variabilis*) NC64A 来源的脂肪酸光羧化酶编码基因 *fap* 以及荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) Pf-5 来源的金属脂肪酸脱羧酶编码基因 *undA* 和 *undB* 均提高了蓝藻烷(烯)烃产量^[34-35]。脂肪酸光羧化酶介导脂肪酸向烷烃的光驱动转化, 在增强脂肪酸前体合成的蓝藻中引入来源于 *C. variabilis* 的脂肪酸光羧化酶, 重组菌烷烃产量增加 19 倍, 达到 77 mg/g DCW^[34]。Yunus 等^[35]首次揭示了蓝藻中链烃(C8-C12)的生物合成过程, 通过引入表达元件优化的 *undB* 基因与 C12 特异性的硫酯酶编码基因 *UcFatB1*, 十一烯烃合成途径的碳通量提高了 10 倍, 产量增加至 231.07 mg/L。

2.2.3 脂肪醇

脂肪醇在化妆品和制药领域广泛应用^[36]。蓝藻合成脂肪醇主要有两个途径: 一是脂酰-ACP 经 *Aar* 催化生成脂肪醛, 再还原为脂肪醇; 二是脂酰-CoA 直接由脂酰-CoA 还原酶(fatty acid reductase, FAR)转化为脂肪醇^[37]。吕雪峰研究组在集胞藻 PCC 6803 中表达了来源于小鼠(mouse)、荷荷巴(*Jojoba*)和拟南芥(*A. thaliana*)的 7 个 FAR 后发现, 来源于荷荷巴的 FAR 催化能力最强, 脂肪醇产量达到 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[37]。在此基础上, 该研究组通过增加 FAR 编码基因的拷贝数, 阻断 PHB 和糖原合成途径, 脂肪醇产量进一步提高至 761 $\mu\text{g}/\text{g DCW}$ ^[38]。此外, 通过将海杆菌(*Marinobacter aquaeolei*) VT8 的脂酰-CoA 还原酶 *Maqu_2507* 引入蓝藻, 并阻断烷(烯)烃合成途径, 脂肪醇产量提高至 2.87 mg/g DCW^[39]。Yunus 等^[34]通过将海洋分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)的羧酸还原酶(carboxylic acid reductase,

CAR)引入蓝藻,并强化脂肪酸前体的供应,最终脂肪醇产量达 68 mg/g DCW。在此基础上,Yunus 等^[40]将 1-辛醇合成途径引入蓝藻,通过引入枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(phosphopantetheinyl transferase, SFP),结合启动子和核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)优化及外源补充辛酸,1-辛醇产量提高至 905.7 mg/L。

2.2.4 脂肪酸酯

脂肪酸乙酯(fatty acid ethyl ester, FAEE)可作为柴油的替代品。蓝藻中 FAEE 的合成主要是通过表达蜡酯合酶(wax ester synthase, WS),并强化乙醇及乙酰辅酶 A 的合成来实现。Lee 等^[41]通过 4 种策略对该过程进行了优化:(1) 引入不动杆菌(*A. baylyi*)来源的蜡酯合酶合成 FAEE;(2) 引入运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)来源的丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶构建乙醇生物合成途径;(3) 引入异源磷酸酮酶途径提高胞内乙酰辅酶 A 水平;(4) 培养优化;最终将 FAEE 产量提高至 50.0 mg/g DCW (图 4),但考虑到乙醇副产物的出现,蜡酯合酶对乙醇的低底物特异性可能是蓝藻生产 FAEE 的瓶颈。

2.2.5 甘油二酯

甘油二酯(diacylglycerol, DAG)作为一种结构脂质,在食品和医药等领域广泛应用^[42]。它由 2 个脂肪酸链与甘油基连接而成,具有 3 种异构体形式:1,2-DAG、1,3-DAG 和 2,3-DAG。研究表明,食用 DAG (特别是 1,3-DAG)可以改善高胆固醇血症、高甘油三酯症和动脉粥样硬化^[43]。微生物油脂合成过程中产生的 1,2-DAG、1,3-DAG 主要来源于 TAG 的分解转化。根据脂肪酶的立体选择性,可将 TAG 水解为 1,2-DAG 和 1,3-DAG。然而,由于 1,3-DAG 的产量较低,且目前缺少相关的微生物工程改造策略用于其生产,限制了 1,3-DAG 的大规模合成。鉴于真

核微藻具有高油脂含量,它们被视为潜在的 1,3-DAG 合成平台。

2.2.6 甘油三酯

甘油三酯作为生物体内重要的能量储存形式,在食品加工和生物燃料生产等领域广泛应用^[44]。通过过表达 Kennedy 途径关键酶二酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)可以显著提高 TAG 含量和多不饱和脂肪酸比例。在三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)中过表达 DGAT2,中性脂质含量增加了 35.0%,二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)占比增加了 76.2%^[45]。过表达 Kennedy 途径的其他酶也可显著提高 TAG 含量^[46]。虽然 Acc 是脂肪酸合成途径的限速酶,但在不同藻种中对该酶进行过表达并不一定提高 TAG 的含量^[47-48]。此外,调控细胞内还原力 NADPH 的供应可有效提升 TAG 合成能力。增强产油硅藻(*Fistulifera solaris*)中的 NADPH 的供应将油脂产率提高了 1.5 倍^[49]。在微拟球藻(*Nannochloropsis*)中过表达 NADP⁺依赖型苹果酸酶将 TAG 产量提高 38%^[50]。

2.3 微藻合成油脂类化学品的工艺优化

微藻的生长和油脂产量受多种环境因素影响,其中大量元素(如氮、磷、硫)对微藻的油脂含量起着重要作用。在氮饥饿条件下,微藻将碳骨架重新分配以合成脂质,从而提高油脂含量,这已在多种微藻中得到验证,例如富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)、杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)、斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)和小球藻(*Chlorella* sp.)等^[51]。相比之下,磷饥饿则可能通过不同的途径影响微藻的脂质合成,尤其在微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)和索氏小球藻(*Chlorella sorokiniana*)等菌种中表现出差异。磷限制条件下,*Nannochloropsis* sp. 的油脂含量可显著增加^[52],而在 *C. sorokiniana* 中,碳流更多地转向碳水化合物化合物的合成^[53]。磷

饥饿相比于氮饥饿而言,对微藻脂质合成途径的调控效果较弱。此外,硫限制和高盐胁迫也能增强微藻油脂的合成能力^[54]。

光照、温度和 pH 等环境因素也会影响微藻的生长和脂质合成。高光胁迫有助于微藻的油脂积累且可有效改善微藻中脂肪酸组成。通过对栅藻(*Scenedesmus* sp.)、单针藻(*Monoraphidium* sp.)、小球藻(*Chlorella vulgaris*)、*C. reinhardtii*、集胞藻 PCC 6803 和聚球藻 PCC 7942 等进行强光照射,实现了中性脂质含量的显著提升,增幅达到 300%^[55-56]。此外,高温和低温胁迫能够促进微藻中油脂的积累,其中高温条件促使微藻合成中性脂质,而低温条件下则有利于磷脂的合成^[57],研究发现,在温度为 10 °C 和 32 °C 时,原核小球藻(*Auxenochlorella protothecoides*)的脂质含量高于 28 °C 时,并且高温对其脂质含量的影响更为显著^[58]。微藻生长代谢受 pH 值影响显著,不同藻种最适生产油脂的 pH 值也有所差异,如索氏小球藻(*C. sorokiniana*)在 pH 值

超过 10.0 时生产油脂,而栅藻(*Scenedesmus* sp.)在 pH 值超过 6.0 时,油脂含量会随 pH 值的增加而下降^[59]。综上,上述的胁迫培养均能不同程度地提高微藻油脂含量,但使用特点和作用机理等各有不同,需要根据藻种来选择合适的油脂高产环境(表 2)。

3 CO 基油脂类化学品的生物合成

3.1 产乙酸菌的油脂类化学品的合成路径

合成气以 CO 和 H₂ 为主要组分,是一种重要的化工原料。目前,合成气发酵微生物主要以产乙酸菌(*acetogens*)为代表^[65],此类微生物主要通过伍德-永达尔(Wood-Ljungdahl, WL)途径同化 CO 和 CO₂ 进行生长并完成中心代谢(图 4)。该途径被认为是厌氧条件下最节能的 CO₂ 固定途径之一,通过逐步还原 CO₂ 生成乙酰辅酶 A 及其衍生物。WL 途径的一个显著特点是利用 1 分子的 ATP 固定一碳气体形成乙酰辅酶 A,然

表 2 微藻转化二氧化碳合成油脂类化学品进展

Table 2 Progress in the bioconversion of carbon dioxide to oleochemicals by microalgae

Strains	Products	Genetic modifications	Titer (mg/L)	Yield (mg/g DCW)	Productivity (mg/(L·h))	References
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	FFA	Knock out <i>aas</i> and introduce <i>tesA</i> and <i>rbcLS</i>	131.5	70.0	0.3	[25]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	FFA	Introduce <i>tesA</i>	331.0	199.2	2.0	[60]
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	FFA	Knock out <i>aas</i> and introduce <i>tesA</i>	6 400.0	360.0	1.5	[61]
<i>Chlorella vulgaris</i>	FFA	None	29.5	None	None	[62]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Alk(a/e)nes	Introduce <i>undB</i> , <i>UcFatB1</i> , and <i>fap</i>	231.1	134.2	None	[35]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Alk(a/e)nes	Introduce <i>ado</i> and <i>aar</i>	None	7.5	None	[63]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Fatty alcohols	Knock out <i>aas</i> and introduce <i>car</i> and <i>sfp</i>	905.7	None	4.7	[40]
<i>S. elongatus</i> PCC 7942	FAEEs	Introduce <i>atfA</i> , <i>pdC adh</i> , <i>xpkA</i> , and <i>pta</i>	15.1	50.0	None	[41]
<i>Desmodesmus</i> sp.	Lipids	None	419.6	None	None	[64]

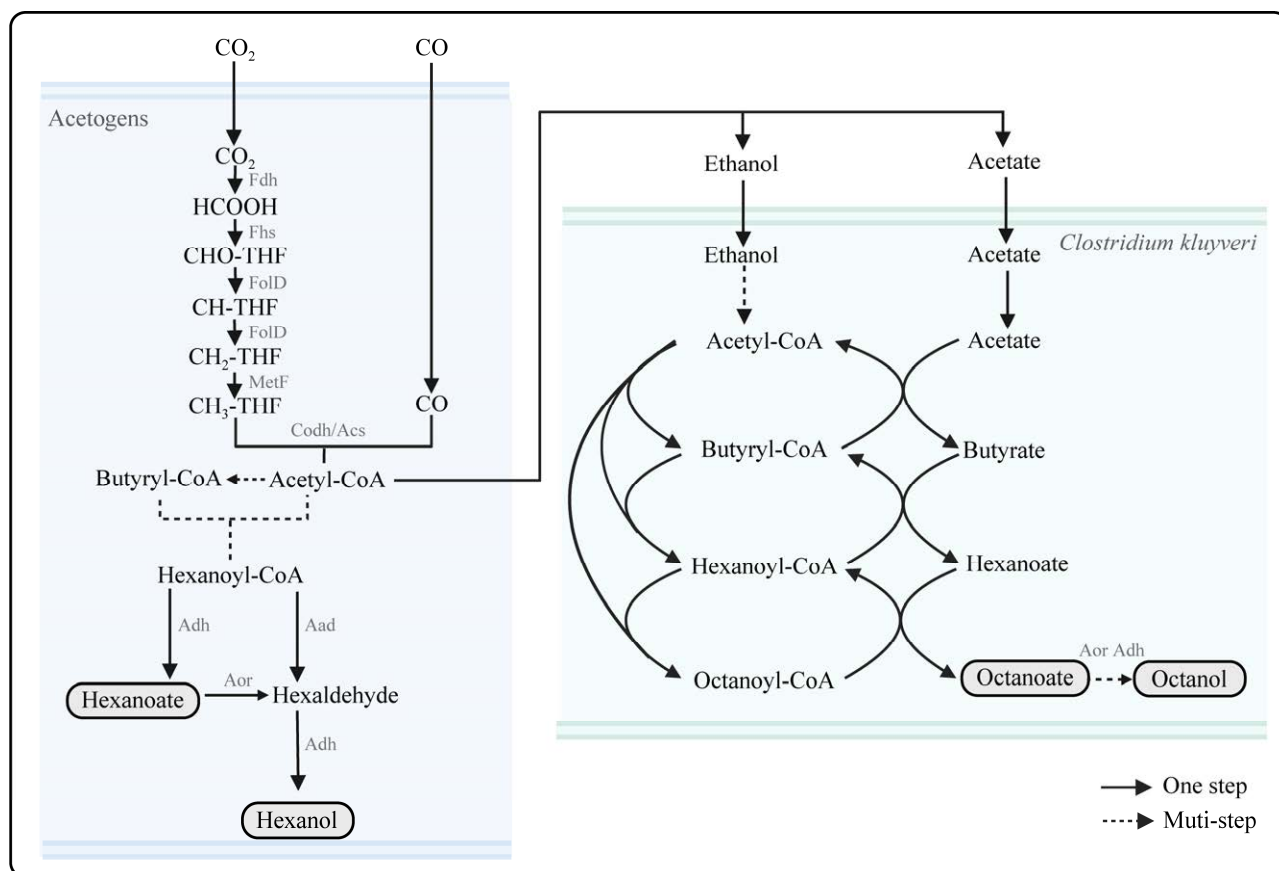


图 4 合成气厌氧发酵生产中链脂肪酸和脂肪醇途径

Figure 4 The pathway for anaerobic fermentation production of medium-chain fatty acids and fatty alcohols from syngas. Fdh: Formate dehydrogenase; Fhs: Formyl-tetrahydrofolate synthetase; FolD: Methenyl-tetrahydrofolate cyclohydrolase; MetF: Methylene-tetrahydrofolate reductase; Codh/Acs: Carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase; Adh: Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase; Aad: Acetaldehyde dehydrogenase; Aor: Aldehyde ferredoxin oxidoreductase; CHO-THF: Formyl-tetrahydrofolate; CH-THF: Methenyl-tetrahydrofolate; CH₂-THF: Methylene-tetrahydrofolate; CH₃-THF: Methyl-tetrahydrofolate; CoA: Coenzyme A.

后在乙酸激酶的作用下通过底物水平磷酸化形成乙酸，同时生成 1 分子 ATP，这个过程净消耗能量为 0。因此，乙酸和乙醇是大多数产乙酸菌最典型的天然产物。只有少数菌株，如食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)，能够合成己酸和己醇。此外，当产乙酸菌与其他微生物共同培养时，碳链的延长可达八碳(图 4)。关于短链脂肪酸和脂肪醇的合成已有多篇综述对相关工作进行了总结和评价^[66]，本文主要聚

焦于中链脂肪酸和脂肪醇的生物合成研究。

3.2 CO 基油脂类化学品细胞工厂的构建

食一氧化碳梭菌(*C. carboxidivorans*)具备合成己酸和己醇的能力，是一种比较有代表性的产乙酸菌。Wirth 等^[67]于 2021 年首次阐明了 *C. carboxidivorans* 内部己酸和己醇合成路径的关键基因簇，即己酰辅酶 A 合成酶基因簇 1 和 2 (hexanoyl-CoA synthesis cluster 1 and 2, *hcs1* and *hcs2*)；研究人员采用组成型启动子和

诱导型启动子,将 *hcs1* 和 *hcs2* 导入伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)进行异源表达,共获得 4 个重组菌株;发酵产物分析结果显示,这 4 个重组菌株在自养和异养条件下均能够合成己酸(0.48–4.15 mmol/L);此外,*hcs1* 也成功转入糖乙酸多丁醇梭菌(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)进行异养发酵,合成了 0.8 mmol/L 己酸和 5.2 mmol/L 己醇。粘液真杆菌(*Eubacterium limosum*)也具备利用合成气合成己酸的能力,然而其具体的代谢途径尚未被深入解析^[68]。Lauer 等^[69]于 2022 年成功在扬氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)中实现了己醇的生物合成,这标志着合成气转化领域的重要进展;首先,通过引入来源于丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)的己醇合成基因簇,并使用合成气作为底物进行发酵,成功地实现了 15 mg/L 己醇的生产;随后,通过应用 CRISPR/Cas9 技术消除选择标记,并插入 *C. carboxidivorans* 来源的己醇合成基因簇,己醇产量进一步提高至 251 mg/L,并成功在 2 L 发酵罐中实现了 393 mg/L 己醇的生产。早期研究表明 *C. ljungdahlii* 和巴奇嗜碱菌(*Alkalibaculum bacchi*)都能够利用合成气将己酸还原为己醇^[70]。Liu 等^[71]的研究结果显示,*A. bacchi* 单独培养时己酸转化率仅为 63.6%,而与丙酸梭菌(*Clostridium propionicum*)混合发酵时,己酸转化率高达 90.7%。这表明通过混合培养两种或多种菌种,可以实现己醇的连续转化,为生物合成气制备中链脂肪醇的研究提供了新的思路和方法。Dykstra 等^[72]在自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)中引入不同来源的乙醇乙酰转移酶后发现,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)来源的醇乙酰基转移酶的引入可使重组菌株产生 0.2 mmol/L 的乙酸乙酯;在补充乙醇后,乙酸乙酯的产量提高了 1.5 倍,而补充丁醇,重组菌株可以生产 4.5 mmol/L 乙酸

丁酯。这项研究的结果为利用微生物合成生物燃料提供了新的可能,进一步推动了生物技术领域的发展。

尽管合成气生物转化制备己酸和己醇具有巨大潜力,但相关研究仍相对较少。随着近期对 *C. carboxidivorans* 己酸和己醇的代谢途径的完全解析,为相关研究提供了重要的基础和方向,必将助力推进该研究的快速发展和突破。此外,从热力学角度看,只有当底物能够提供足够的能量以维持细胞生长时,才能够实现一碳气体到多碳化合物的转化。由于从乙酰辅酶 A 流向己酸或己醇的代谢支路均会进一步消耗 ATP,因此采用副产物途径减弱或增强能量合成会是提高己酸或己醇产量的有效策略。

3.3 产乙酸菌产油发酵工艺优化

合成气发酵通常分为两个阶段,在产酸阶段,细胞呈指数增长,主要产生乙酸和乙醇,同时伴有少量的 CO₂ 和 H₂ 产生,在产溶剂阶段,细胞处于稳定期或衰亡期,会将有机酸转化为相应的有机醇。不同培养条件会影响菌株中链脂肪酸/醇的生产。pH 值、温度、微量元素是厌氧生物转化过程中最重要的几个因素^[66]。保持发酵过程中的 pH 稳定性可显著提高己酸产量。Fernández-Naveira 等^[73]发现,在控制 pH 为 5.75 的合成气发酵中,己醇的最高产量可达到 0.85 g/L。温度是另一个关键环境因素,直接影响产乙酸菌的生长、底物转化和代谢途径。尽管 37 °C 是大多数产乙酸菌的最佳生长温度,但最新研究表明,低温更有利于碳链延伸和中链脂肪酸/醇的积累,研究发现虽然 *C. carboxidivorans* P7 在 25 °C 的低温培养下迟滞期延长、代谢活性降低,但是己醇和己酸的产量分别达到 8.21 mmol/L 和 9.02 mmol/L^[74]。Phillips 等^[75]通过在限定培养基(无酵母提取物、MES 缓冲液和铜)中增加 10 倍的钼酸盐,使 *C. carboxidivorans*

中己醇和己酸的产量分别提高至 0.94 g/L 和 0.36 g/L。最新的研究表明, *C. carboxidivorans* P7在合成气发酵过程中加入少量油醇可以显著提高己醇的产量,在进一步添加乙醇的条件下,己醇产量可高达 8.45 g/L,这是目前报道的产乙酸菌纯培养发酵生产己醇的最高水平^[76]。

此外,通过两种或多种纯菌的混合培养也可以实现合成气到中链脂肪酸/醇的转化,该过程通常分为两个阶段,第一阶段是将合成气转化为乙酸和乙醇等短链脂肪酸/醇,第二阶段是将短链酸/醇延长为中链脂肪酸/醇。克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)和多种食气梭菌,如 *C. acetium* DSM 1496、*C. ljungdahlii*、*C. autoethanogenum* 和 *C. carboxidivorans* 共培养,可以用于生产中链脂肪酸/醇^[77]。Richter等^[78]将 *C. ljungdahlii* 与 *C. kluyveri* 共培养,并优化气液传质和在线提取脂肪酸/醇,实现了 4.70 g/L 己醇和 0.78 g/L 辛醇的生产。Fernández-Blanco等^[79]开发了利用 *C. acetium* DSM 1496 和 *C. kluyveri* 的新型合成共培养体系,利用合成气生产己酸,其中乙醇作为外源电子剂,在生物反应器中实现 8.0 g/L 己酸的生产(表 3)。

4 挑战与展望

鉴于合成生物技术和绿色生物制造工艺的快速发展,微生物通过其特有生物功能可将多

种一碳气体原料转化为油脂类化学品。但受限于一碳气体生物利用效率低和转化途径有限等,目前生物转化一碳气体合成油脂类化学品仍存在诸多问题亟待解决。嗜甲烷菌内膜与核心代谢相关联,能生产大量长链脂肪酸(C16–C18),但其合成的磷脂是功能性脂质,积累有限。通过开发高效精准的基因编辑技术、利用组学挖掘解析嗜甲烷菌油脂积累机制、优化其脂质合成途径等方法,可有效增加嗜甲烷菌的油脂积累。微藻具有油脂含量高和光合效率高等优势,但在大规模培养中面临生产和采收成本高等难题。如希望利用合成生物学策略改造微藻以生产高值产物如二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)和 EPA 等,设计高效低成本的培养系统尤为重要。钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)是一种极具潜力的化能自养菌,具有强大的 CO₂ 固定转化能力,并能够合成游离脂肪酸和烷烃等产品^[80],但在培养过程中需要通入大量的氢气,导致发酵过程控制成本较高,因此设计更为高效和安全的生物反应器对于 *C. necator* 的工业应用至关重要。虽然重组菌株的固碳效率仍有待提高,且需要甲酸或甲醇作为能量来源,但通过深入研究固碳机理、改良固碳酶以及构建全新的人工固碳途径,有望实现人工自养微生物生产油脂类化学品的目标。研究人员已经成功构建了自养型的 *E. coli* 和毕赤酵母

表 3 产乙酸菌生物转化合成气合成中链脂肪酸和脂肪醇进展

Table 3 Progress in the bioconversion of syngas to medium-chain fatty acids and fatty alcohols by acetogens

Strains	Products	Substrates	Titer (g/L)	References
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	Hexanoate	Syngas+Mo	0.4	[75]
<i>Clostridium carboxidivorans</i> P7	Hexanol	CO+Ethanol	8.5	[76]
<i>Clostridium ljungdahlii</i> + <i>Clostridium kluyveri</i>	Hexanol	Syngas	4.7	[78]
<i>C. ljungdahlii</i> + <i>C. kluyveri</i>	Octanol	Syngas	0.8	[78]
<i>Clostridium acetium</i> + <i>C. kluyveri</i>	Hexanoate	Syngas+Ethanol	8.0	[79]

(*Pichia pastoris*)^[81-82], 同时利用多组学分析、理性设计等方法, 深入挖掘和优化异养微生物的天然固碳途径, 可进一步减少外源基因引入所带来的中心代谢负荷, 以实现最大限度的生物汇碳。近期, Qin 等^[83]借助全基因组代谢模型计算等方法开发了多种策略, 提高了重组酵母菌的碳酸氢盐的摄取, 强化了 CO₂ 固定效率, 最终将 3-羟基丁酸产量提高到 11.25 g/L, 接近最大理论产量。因此, 通过深入研究和优化天然固碳途径, 可为生物转化一碳气体合成油脂类化学品所面临的多重挑战提供解决方案, 推动该领域的发展和应用。

此外, 随着生物-化学耦合催化体系的不断完善和适配, 借助可再生能源有望解决生物还原 CO₂ 过程中对能量的需求。已有研究表明, 将光能或电能与产乙酸菌相耦合, 将促进产乙酸菌的生长和产物形成, 结合生物转化已能够实现 CO₂ 转化为葡萄糖和游离脂肪酸等有机物^[84-85]。未来可以考虑将电化学系统与自养型微生物如微藻、*C. necator* 等相结合, 或者与强化 CO₂ 固定途径的异养型微生物结合, 以提高产物产量、拓展产物种类并提高整体收益。此外, 提高固碳酶的催化效率、开发新型高效的生物反应器增强气液传质以及提高能量供给是解决大规模应用问题的关键途径。利用乙酸的解脂耶氏酵母与产乙酸菌进行两阶段培养也实现了脂质的生产^[86-87], 为扩大生产规模和提高产量提供了新的思路和方法。

相较于主要依赖石油裂解和动植物油脂作为原料的油脂类化学品生产传统工艺, 基于一碳气体的低碳生物合成技术不仅有助于缓解能源供应压力, 还能实现温室气体减排。从全生命周期的角度考虑, 一碳气体生物合成技术实现了“零碳”甚至为“负碳”, 这是其与传统发酵产业的本质区别^[88]。优化发酵参数和改进生物

反应器设计是将一碳气体生物合成油脂类化学品工业化的关键^[89]。将物理、化学和电化学与生物过程相结合已成为克服一碳气体利用微生物固碳瓶颈和提高经济可行性的有效手段^[90-91]。在产品提取方面, 充分考虑生物体的脂质组成及上下游技术的关联性, 在提取过程中不仅能够减少能源消耗、提高产品得率, 还能够兼顾效率和经济性。综上, 利用一碳气体生物合成油脂类化学品, 有助于克服生物油脂合成对糖基原料的依赖。虽然一碳生物转化技术依然面临多种挑战, 但随着对一碳利用微生物的深入挖掘和探索, 有望实现高效的一碳生物制造, 助力化学工业和生物产业的可持续发展, 推动生物技术革新及低碳经济建设。

REFERENCES

- [1] IEA. Global energy review: CO₂ emissions in 2022 [EB/OL]. [2024-01-01]. <https://www.iea.org/reports/CO2-emissions-in-2022>.
- [2] IEA. Global methane tracker 2022[EB/OL]. [2024-01-01]. <https://www.iea.org/reports/global-methane-tracker-2022>.
- [3] 王悦琳, 晁伟, 蓝晓程, 莫志朋, 佟淑环, 王铁峰. 合成气生物发酵法制乙醇的研究进展[J]. 化工学报, 2022, 73(8): 3448-3460.
WANG YL, CHAO W, LAN XC, MO ZP, TONG SH, WANG TF. Review of ethanol production via biological syngas fermentation[J]. CIESC Journal, 2022, 73(8): 3448-3460 (in Chinese).
- [4] HU LZ, GUO SQ, WANG B, FU RZ, FAN DD, JIANG M, FEI Q, GONZALEZ R. Bio-valorization of C1 gaseous substrates into bioalcohols: potentials and challenges in reducing carbon emissions[J]. Biotechnology Advances, 2022, 59: 107954.
- [5] GAO ZX, GUO SQ, CHEN YH, CHEN HS, FU RZ, SONG QQ, LI S, LOU WY, FAN DD, LI Y, YANG SH, GONZALEZ R, FEI Q. A novel nutritional induction strategy flexibly switching the biosynthesis of food-like products from methane by a methanotrophic bacterium[J]. Green Chemistry, 2024, 26: 7048-7058.
- [6] 侯千姿, 郭心怡, 焦子悦, 费强. 好氧性嗜甲烷菌生物能供给与调控的研究进展[J]. 化工进展, 2023,

- 42(1): 86-93.
- HOU QZ, GUO XY, JIAO ZY, FEI Q. Research progress on energy supply and regulation of aerobic methanotrophs[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2023, 42(1): 86-93 (in Chinese).
- [7] 贾德臣, 姜卫红, 顾阳. 食气梭菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 374-387.
- JIA DC, JIANG WH, GU Y. Research progresses in gas-fermenting clostridia[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 374-387 (in Chinese).
- [8] FEI Q, GUARNIERI MT, TAO L, LAURENS LML, DOWE N, PIENKOS PT. Bioconversion of natural gas to liquid fuel: opportunities and challenges[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(3): 596-614.
- [9] ZHANG CY, FU RZ, KANG LX, MA YQ, FAN DD, FEI Q. An upcycling bioprocess for sustainable aviation fuel production from food waste-derived greenhouse gases: life cycle assessment and techno-economic analysis[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 486: 150242.
- [10] MARELLA ER, HOLKENBRINK C, SIEWERS V, BORODINA I. Engineering microbial fatty acid metabolism for biofuels and biochemicals[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 39-46.
- [11] COMESAÑA-GÁNDARA B, GARCÍA-DEPRAECT O, SANTOS-BENEIT F, BORDEL S, LEBRERO R, MUÑOZ R. Recent trends and advances in biogas upgrading and methanotrophs-based valorization[J]. *Chemical Engineering Journal Advances*, 2022, 11: 100325.
- [12] 郭树奇, 焦子悦, 费强. 基于化学品生物合成的嗜甲烷菌人工细胞构建及应用进展[J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 1017-1029.
- GUO SQ, JIAO ZY, FEI Q. Progress in construction and applications of methanotrophic cell factory for chemicals biosynthesis[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(6): 1017-1029 (in Chinese).
- [13] DEMIDENKO A, AKBERDIN IR, ALLEMANN M, ALLEN EE, KALYUZHAYAYA MG. Fatty acid biosynthesis pathways in *Methylomicrobium buryatense* 5G(B1)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 7: 2167.
- [14] DONG T, FEI Q, GENELOT M, SMITH H, LAURENS LML, WATSON MJ, PIENKOS PT. A novel integrated biorefinery process for diesel fuel blendstock production using lipids from the methanotroph, *Methylomicrobium buryatense*[J]. *Energy Conversion and Management*, 2017, 140: 62-70.
- [15] HENARD CA, SMITH HK, GUARNIERI MT. Phosphoketolase overexpression increases biomass and lipid yield from methane in an obligate methanotrophic biocatalyst[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 152-158.
- [16] FEI Q, PURI AW, SMITH H, DOWE N, PIENKOS PT. Enhanced biological fixation of methane for microbial lipid production by recombinant *Methylomicrobium buryatense*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 129.
- [17] GILMAN A, LAURENS LM, PURI AW, CHU F, PIENKOS PT, LIDSTROM ME. Bioreactor performance parameters for an industrially-promising methanotroph *Methylomicrobium buryatense* 5GB1[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 182.
- [18] BURDETTE MD. Production of biodiesel-like components by the type I methanotroph *Methylomonas methanica*[D]. Clemson: Master's Thesis of Clemson University, 2013.
- [19] WIJFFELS RH, BARBOSA MJ. An outlook on microalgal biofuels[J]. *Science*, 2010, 329(5993): 796-799.
- [20] WANG L, CHEN LY, YANG SH, TAN XM. Photosynthetic conversion of carbon dioxide to oleochemicals by cyanobacteria: recent advances and future perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 634.
- [21] 崔金玉, 张爱娣, 栾国栋, 吕雪峰. 微藻光驱固碳合成技术的发展现状与未来展望[J]. *合成生物学*, 2022, 3(5): 884-900.
- CUI JY, ZHANG AD, LUAN GD, LYU XF. Engineering microalgae for photosynthetic biosynthesis: progress and prospect[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(5): 884-900 (in Chinese).
- [22] KAISER BK, CARLETON M, HICKMAN JW, MILLER C, LAWSON D, BUDDE M, WARRENER P, PAREDES A, MULLAPUDI S, NAVARRO P, CROSS F, ROBERTS JM. Fatty aldehydes in cyanobacteria are a metabolically flexible precursor for a diversity of biofuel products[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58307.
- [23] SU HF, LIN JF. Biosynthesis pathways of expanding carbon chains for producing advanced biofuels[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 109.
- [24] GU HY, JINKERSON RE, DAVIES FK, SISSON LA, SCHNEIDER PE, POSEWITZ MC. Modulation of medium-chain fatty acid synthesis in *Synechococcus* sp.

- PCC 7002 by replacing FabH with a *Chaetoceros* ketoacyl-ACP synthase[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 690.
- [25] RUFFING AM. Improved free fatty acid production in cyanobacteria with *Synechococcus* sp. PCC 7002 as host[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2014, 2: 17.
- [26] LIU XY, SHENG J, CURTISS R 3rd. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(17): 6899-6904.
- [27] KATO A, TAKATANI N, USE K, UESAKA K, IKEDA K, CHANG YJ, KOJIMA K, AICHI M, IHARA K, NAKAHIGASHI K, MAEDA SI, OMATA T. Identification of a cyanobacterial RND-type efflux system involved in export of free fatty acids[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(12): 2467-2477.
- [28] YUNUS IS, WANG ZX, SATTAYAWAT P, MULLER J, ZEMICHAEL FW, HELLGARDT K, JONES PR. Improved bioproduction of 1-octanol using engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(6): 1417-1428.
- [29] KIZAWA A, KAWAHARA A, TAKASHIMA K, TAKIMURA Y, NISHIYAMA Y, HIHARA Y. The LexA transcription factor regulates fatty acid biosynthetic genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2017, 92(2): 189-198.
- [30] KAWAHARA A, SATO Y, SAITO Y, KANEKO Y, TAKIMURA Y, HAGIHARA H, HIHARA Y. Free fatty acid production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is enhanced by deletion of the cyAbrB2 transcriptional regulator[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 220: 1-11.
- [31] SCHIRMER A, RUDE MA, LI XZ, POPOVA E, del CARDAYRE SB. Microbial biosynthesis of alkanes[J]. *Science*, 2010, 329(5991): 559-562.
- [32] WANG WH, LIU XF, LU XF. Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 69.
- [33] MENDEZ-PEREZ D, BEGEMANN MB, PFLEGER BF. Modular synthase-encoding gene involved in α -olefin biosynthesis in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(12): 4264-4267.
- [34] YUNUS IS, WICHMANN J, WÖRDENWEBER R, LAUERSEN KJ, KRUSE O, JONES PR. Synthetic metabolic pathways for photobiological conversion of CO₂ into hydrocarbon fuel[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 201-211.
- [35] YUNUS IS, ANFELT J, SPORRE E, MIAO R, HUDSON EP, JONES PR. Synthetic metabolic pathways for conversion of CO₂ into secreted short-to medium-chain hydrocarbons using cyanobacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 14-23.
- [36] ZHOU YD, REMÓN J, JIANG ZC, MATHARU AS, HU CW. Tuning the selectivity of natural oils and fatty acids/esters deoxygenation to biofuels and fatty alcohols: a review[J]. *Green Energy & Environment*, 2023, 8(3): 722-743.
- [37] TAN XM, YAO L, GAO QQ, WANG WH, QI FX, LU XF. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(2): 169-176.
- [38] QI FX, YAO L, TAN XM, LU XF. Construction, characterization and application of molecular tools for metabolic engineering of *Synechocystis* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(10): 1655-1661.
- [39] YAO L, QI FX, TAN XM, LU XF. Improved production of fatty alcohols in cyanobacteria by metabolic engineering[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 94.
- [40] YUNUS IS, JONES PR. Photosynthesis-dependent biosynthesis of medium chain-length fatty acids and alcohols[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 59-68.
- [41] LEE HJ, CHOI J, LEE SM, UM Y, SIM SJ, KIM Y, WOO HM. Photosynthetic CO₂ conversion to fatty acid ethyl esters (FAEEs) using engineered cyanobacteria[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(6): 1087-1092.
- [42] LEE YY, TANG TK, PHUAH ET, TAN CP, WANG Y, LI Y, CHEONG LZ, LAI OM. Production, safety, health effects and applications of diacylglycerol functional oil in food systems: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(15): 2509-2525.
- [43] LEE WJ, ZHANG Z, LAI OM, TAN CP, WANG Y. Diacylglycerol in food industry: synthesis methods, functionalities, health benefits, potential risks and drawbacks[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 97: 114-125.
- [44] ZHU Z, YUAN GZ, FAN XR, FAN Y, YANG M, YIN YL, LIU J, LIU Y, CAO XP, TIAN J, XUE S. The

- synchronous TAG production with the growth by the expression of chloroplast transit peptide-fused ScPDAT in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 156.
- [45] NIU YF, ZHANG MH, LI DW, YANG WD, LIU JS, BAI WB, LI HY. Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(11): 4558-4569.
- [46] MUÑOZ CF, WEUSTHUIS RA, D'ADAMO S, WIJFFELS RH. Effect of single and combined expression of lysophosphatidic acid acyltransferase, glycerol-3-phosphate acyltransferase, and diacylglycerol acyltransferase on lipid accumulation and composition in *Neochloris oleoabundans*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1573.
- [47] ROESSLER PG. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1988, 267(2): 521-528.
- [48] LIANG MH, WANG L, WANG QM, ZHU JH, JIANG JG. High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(15): 2423-2441.
- [49] OSADA K, MAEDA Y, YOSHINO T, NOJIMA D, BOWLER C, TANAKA T. Enhanced NADPH production in the pentose phosphate pathway accelerates lipid accumulation in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris*[J]. *Algal Research*, 2017, 23: 126-134.
- [50] JEON S, KOH HG, CHO JM, KANG NK, CHANG YK. Enhancement of lipid production in *Nannochloropsis salina* by overexpression of endogenous NADP-dependent malic enzyme[J]. *Algal Research*, 2021, 54: 102218.
- [51] KUMAR A, BERA S. Revisiting nitrogen utilization in algae: a review on the process of regulation and assimilation[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2020, 12: 100584.
- [52] LIANG JB, IQBAL S, WEN F, TONG MM, LIU JH. Phosphorus-induced lipid class alteration revealed by lipidomic and transcriptomic profiling in oleaginous microalga *Nannochloropsis* sp. PJ12[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(9): 519.
- [53] JIN XJ, GONG SQ, YANG BJ, WU JY, LI T, WU HL, WU HB, XIANG WZ. Transcriptomic analysis for phosphorus limitation-induced β -glucans accumulation in *Chlorella sorokiniana* SCSIO 46784 during the early phase of growth[J]. *Algal Research*, 2021, 54: 102208.
- [54] PANAHY Y, YARI KHOSROUSHAHI A, SAHEBKAR A, HEIDARI HR. Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2019, 9(2): 182-194.
- [55] 孙翰, 刘进. 真核微藻脂质代谢工程的研究进展和展望[J]. *合成生物学*, 2023, 4(6): 1140-1160.
- SUN H, LIU J. Research progress and prospects in lipid metabolic engineering of eukaryotic microalgae[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(6): 1140-1160 (in Chinese).
- [56] MALTSEV Y, MALTSEVA K, KULIKOVSKIY M, MALTSEVA S. Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition[J]. *Biology*, 2021, 10(10): 1060.
- [57] SHIN H, HONG SJ, YOO C, HAN MA, LEE H, CHOI HK, CHO S, LEE CG, CHO BK. Genome-wide transcriptome analysis revealed organelle specific responses to temperature variations in algae[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37770.
- [58] XING GL, YUAN HL, YANG JS, LI JY, GAO QX, LI WL, WANG ET. Integrated analyses of transcriptome, proteome and fatty acid profilings of the oleaginous microalga *Auxenochlorella protothecoides* UTEX 2341 reveal differential reprogramming of fatty acid metabolism in response to low and high temperatures[J]. *Algal Research*, 2018, 33: 16-27.
- [59] MANDOTRA SK, KUMAR P, SUSEELA MR, NAYAKA S, RAMTEKE PW. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 201: 222-229.
- [60] AFRIN S, KHAN MRI, ZHANG WY, WANG YS, ZHANG WW, HE L, MA G. Membrane-located expression of thioesterase from *Acinetobacter baylyi* enhances free fatty acid production with decreased toxicity in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2842.
- [61] KATO A, TAKATANI N, IKEDA K, MAEDA SI, OMATA T. Removal of the product from the culture medium strongly enhances free fatty acid production by genetically engineered *Synechococcus elongatus*[J].

- Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 141.
- [62] ORTIZ MONTOYA EY, CASAZZA AA, ALIAKBARIAN B, PEREGO P, CONVERTI A, de CARVALHO JCM. Production of *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids in a tubular photobioreactor continuously fed with air enriched with CO₂ at different concentrations[J]. Biotechnology Progress, 2014, 30(4): 916-922.
- [63] KNOOT CJ, PAKRASI HB. Diverse hydrocarbon biosynthetic enzymes can substitute for olefin synthase in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 1360.
- [64] PREMARATNE M, LIYANAARACHCHI VC, NISHSHANKA GKSH, NIMARSHANA PHV, ARIYADASA TU. Nitrogen-limited cultivation of locally isolated *Desmodesmus* sp. for sequestration of CO₂ from simulated cement flue gas and generation of feedstock for biofuel production[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(4): 105765.
- [65] FLAIZ M, SOUSA DZ. Accelerate acetogenic bioproduction: acetogens as sustainable producers of biocommodities[J]. Current Opinion in Systems Biology, 2024, 37: 100500.
- [66] DEBABOV VG. Acetogens: biochemistry, bioenergetics, genetics, and biotechnological potential[J]. Microbiology, 2021, 90(3): 273-297.
- [67] WIRTH S, DÜRRE P. Investigation of putative genes for the production of medium-chained acids and alcohols in autotrophic acetogenic bacteria[J]. Metabolic Engineering, 2021, 66: 296-307.
- [68] LIU C, LUO G, LIU HP, YANG ZY, ANGELIDAKI I, O-THONG S, LIU GQ, ZHANG SC, WANG W. CO as electron donor for efficient medium chain carboxylate production by chain elongation: microbial and thermodynamic insights[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 390: 124577.
- [69] LAUER I, PHILIPPS G, JENNEWEIN S. Metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* for the production of hexanol and butanol from CO₂ and H₂[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 85.
- [70] PEREZ JM, RICHTER H, LOFTUS SE, ANGENENT LT. Biocatalytic reduction of short-chain carboxylic acids into their corresponding alcohols with syngas fermentation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(4): 1066-1077.
- [71] LIU K, ATIYEH HK, STEVENSON BS, TANNER RS, WILKINS MR, HUHNKE RL. Mixed culture syngas fermentation and conversion of carboxylic acids into alcohols[J]. Bioresource Technology, 2014, 152: 337-346.
- [72] DYKSTRA JC, van OORT J, YAZDI AT, VOSSSEN E, PATINIOS C, van der OOST J, SOUSA DZ, KENGEN SWM. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for ethyl acetate production from CO[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 243.
- [73] FERNÁNDEZ-NAVEIRA Á, VEIGA MC, KENNES C. Effect of pH control on the anaerobic H-B-E fermentation of syngas in bioreactors[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2017, 92(6): 1178-1185.
- [74] RAMIÓ-PUJOL S, GANIGUÉ R, BAÑERAS L, COLPRIM J. Incubation at 25 °C prevents acid crash and enhances alcohol production in *Clostridium carboxidivorans* P7[J]. Bioresource Technology, 2015, 192: 296-303.
- [75] PHILLIPS JR, ATIYEH HK, TANNER RS, TORRES JR, SAXENA J, WILKINS MR, HUHNKE RL. Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: medium development and culture techniques[J]. Bioresource Technology, 2015, 190: 114-121.
- [76] OH HJ, GONG G, AHN JH, KO JK, LEE SM, UM Y. Effective hexanol production from carbon monoxide using extractive fermentation with *Clostridium carboxidivorans* P7[J]. Bioresource Technology, 2023, 367: 128201.
- [77] de ARAÚJO CAVALCANTE W, LEITÃO RC, GEHRING TA, ANGENENT LT, SANTAELLA ST. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: a review[J]. Process Biochemistry, 2017, 54: 106-119.
- [78] RICHTER H, MOLITOR B, DIENDER M, SOUSA DZ, ANGENENT LT. A narrow pH range supports butanol, hexanol, and octanol production from syngas in a continuous co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with in-line product extraction[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1773.
- [79] FERNÁNDEZ-BLANCO C, VEIGA MC, KENNES C. Efficient production of n-caproate from syngas by a co-culture of *Clostridium acetivum* and *Clostridium kluyveri*[J]. Journal of Environmental Management, 2022, 302(Pt A): 113992.
- [80] 叶伟, 李芮, 姜卫红, 顾阳. 二氧化碳微生物转化与体外酶催化体系研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(6): 1223-1245.

- YE W, LI R, JIANG WH, GU Y. Microbial conversion and *in vitro* enzymatic catalysis for carbon dioxide utilization: a review[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(6): 1223-1245 (in Chinese).
- [81] BANG J, HWANG CH, AHN JH, LEE JA, LEE SY. *Escherichia coli* is engineered to grow on CO₂ and formic acid[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5: 1459-1463.
- [82] GASSLER T, SAUER M, GASSER B, EGERMEIER M, TROYER C, CAUSON T, HANN S, MATTANOVICH D, STEIGER MG. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 210-216.
- [83] QIN N, LI LY, WAN XZ, JI X, CHEN Y, LI CK, LIU P, ZHANG YJ, YANG WJ, JIANG JF, XIA JY, SHI SB, TAN TW, NIELSEN J, CHEN Y, LIU ZH. Increased CO₂ fixation enables high carbon-yield production of 3-hydroxypropionic acid in yeast[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 1591.
- [84] JIN S, JEON Y, JEON MS, SHIN J, SONG Y, KANG S, BAE JY, CHO S, LEE JK, KIM DR, CHO BK. Acetogenic bacteria utilize light-driven electrons as an energy source for autotrophic growth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(9): e2020552118.
- [85] 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.
- [86] ROBLES-IGLESIAS R, NICAUD JM, VEIGA MC, KENNES C. Integrated fermentative process for lipid and β -carotene production from acetogenic syngas fermentation using an engineered oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 389: 129815.
- [87] ROBLES-IGLESIAS R, FERNÁNDEZ-BLANCO C, NICAUD JM, VEIGA MC, KENNES C. Unlocking the potential of one-carbon gases (CO₂, CO) for concomitant bioproduction of β -carotene and lipids[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024, 271: 115950.
- [88] LIANG BB, FU RZ, MA YQ, HU LZ, FEI Q, XING XH. Turning C1-gases to isobutanol towards great environmental and economic sustainability *via* innovative biological routes: two birds with one stone[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 107.
- [89] 朱佛代, 杨福胜, 张锋, 代敏, 费强. 甲烷生物转化膜反应器的 CFD 模拟[J]. *高校化学工程学报*, 2019, 33(3): 603-610.
- ZHU FD, YANG FS, ZHANG F, DAI M, FEI Q. CFD simulation of a membrane bioreactor for methane bioconversion[J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2019, 33(3): 603-610 (in Chinese).
- [90] 焦子悦, 黄小涵, 郭树奇, 王新宇, 钟超, 费强. 微生物固碳的电子供给策略研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(7): 2396-2409.
- JIAO ZY, HUANG XH, GUO SQ, WANG XY, ZHONG C, FEI Q. Electron supply strategies for microbial carbon fixation: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(7): 2396-2409 (in Chinese).
- [91] WEN DH, FANG WW, LIU YM, TU T. Valorization of carbon dioxide with alcohols[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2024, 35(7): 109394.

(本文责编 郝丽芳)