

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-079

微生物中一碳代谢网络构建的进展与挑战

郭姝媛^{1,2}, 吴良焕^{1,2}, 刘香健^{1,2}, 王博^{1,2}, 于涛^{1,2}

(¹ 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; 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, 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 广东 深圳 518055)

摘要: 利用来源广、价格低、易制备且储量丰富的一碳化合物作为底物, 通过构建甲基营养型细胞工厂, 生物合成多种高附加值化学品, 不仅可以促进一碳资源的洁净利用, 同时可以缓解能源短缺、环境污染等问题。因此, 深入了解甲基营养型微生物(天然型和合成型)的一碳代谢网络, 是高效利用一碳化合物进行生物炼制的关键。本文综述了多种一碳化合物(甲烷、甲醇、甲酸和二氧化碳)生物炼制的研究进展, 主要包括两个部分: (1) 甲基营养型微生物(天然型和合成型)的关键代谢酶及多种代谢网络; (2) 基于多种甲基营养型微生物进行生物合成的研究现状。文章最后讨论了一碳化合物作为底物进行生物转化所面临的主要瓶颈, 并据此提供可行的研究策略, 以期推动一碳化合物作为原材料进行生物炼制的工业化进程。

关键词: 甲基营养型微生物; 一碳代谢; 一碳化合物; 生物转化; 代谢工程

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A

Developing C₁-based metabolic network in methylotrophy for biotransformationGUO Shuyuan^{1,2}, WU Lianghuan^{1,2}, LIU Xiangjian^{1,2}, WANG Bo^{1,2}, YU Tao^{1,2}

(¹Center for Synthetic Biochemistry, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China; ²CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China)

Abstract: One carbon (C₁) substrates have generated increasing attention as abundantly available feedstock for biotransformation to produce biofuels and valuable chemicals. Especially, these bioproducts are not only promoting the economic development, but also meet the societal needs for clean energy and environmental protection. Microbial cell factories (MCF) that efficiently convert raw materials to useful chemicals are highly desirable for C₁ based biomanufacturing. Furthermore, more and more attention is being paid to study how the native and synthetic methylotrophic MCFs are capable of utilizing C₁ compounds including methane, methanol, formic acid and carbon dioxide (CO₂) as raw

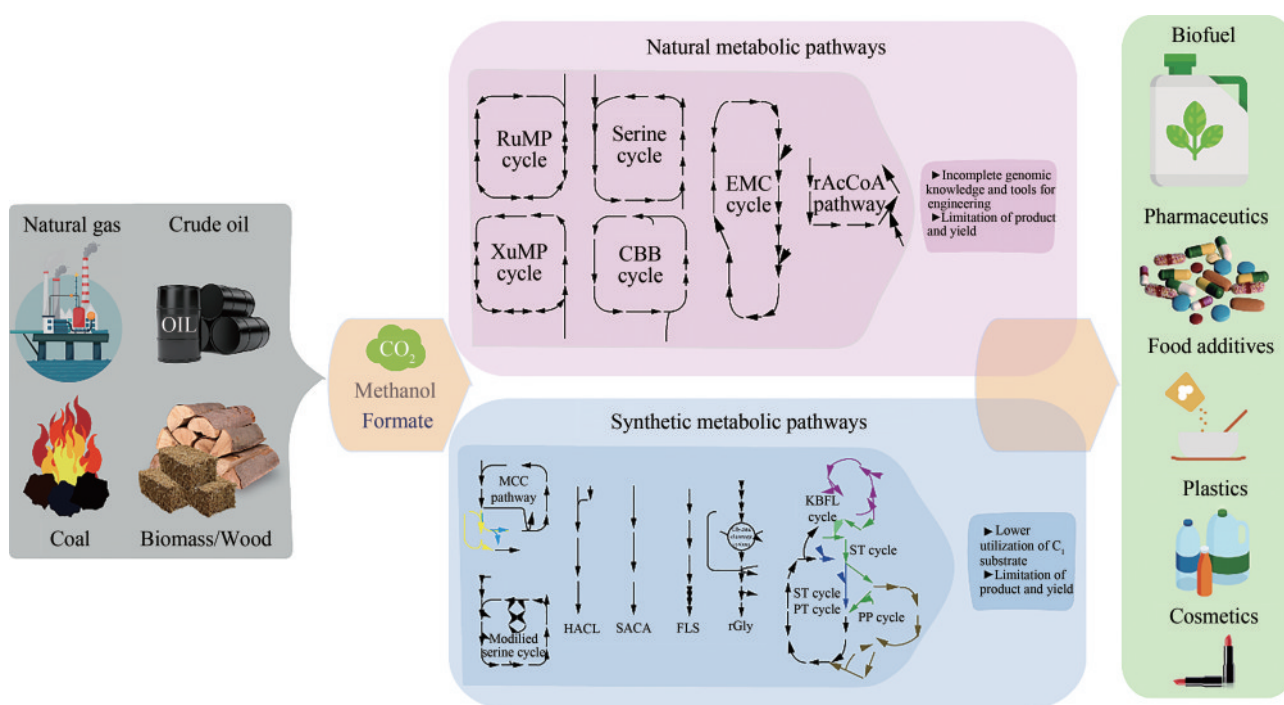
收稿日期: 2021-07-23 修回日期: 2021-10-21

基金项目: 中国博士后科学基金(2020M682973); 国家重点研发计划(2020YFA0907800); 国家自然科学基金(32071416); 广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515110927); 深圳合成生物学创新研究院项目(JCHZ20200003; DWKF20190003; ZTXM20203004)

引用本文: 郭姝媛, 吴良焕, 刘香健, 王博, 于涛. 微生物中一碳代谢网络构建的进展与挑战[J]. 合成生物学, 2022, 3(1): 116-137

Citation: GUO Shuyuan, WU Lianghuan, LIU Xiangjian, WANG Bo, YU Tao. Developing C₁-based metabolic network in methylotrophy for biotransformation[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(1): 116-137

materials for biosynthesis. Native methylotrophs have multiple pathways for C_1 utilization so that they can grow with methanol or formate as the sole carbon and energy source. Engineering synthetic methylotrophs are based on available metabolic knowledge and advanced genome engineering tools to modify the platform microorganisms. Hence, it is the key to explore the C_1 -based metabolic networks of methylotrophy in depth for constructing highly effective methylotrophic cell factory to convert C_1 substrates. In this review, we firstly summarize in detail key natural pathways for C_1 -substrate assimilation and bioproducts produced by native methylotrophs. Then we introduce synthetic methylotrophs and major chemical products derived through engineering *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* and *Saccharomyces cerevisiae*. In the field of synthetic methylotrophs, many studies focus on utilizing methanol or CO_2 as the sole carbon source and energy source to construct the MCFs for bio-transformation. In the end, we discuss the barriers and challenges for developing robust methylotrophic cell factory to convert C_1 substrates, and highlight strategies for commercializing the biotransformation of C_1 based substrates.



Keywords: methylotrophs; one-carbon metabolism; C_1 compounds; biotransformation; metabolic engineering

当前, 随着工业制造技术的进步, 全球的精细化工产品已达7万多种^[1], 不仅能够满足人们的日常所需, 同时也推动了经济的飞速发展。但是, 大规模的化工生产导致化石资源(如煤炭、石油等)短缺, 环境污染(如温室效应、空气污染等)加重, 极大限制了未来经济的快速、绿色、可持续发展, 打破了地球原有的生态平衡, 威胁到人类的正常生活。因此, 迫切需要发展绿色制造手段, 弥补化工生产的不足, 辅助推动传统工业制

造大变革^[2]。20世纪伊始, 生物制造被广泛应用于化工、医药领域, 已经能够实现乙醇、丙酮等常见化工产品或抗生素等药品的生物转化。随着分子生物学技术和发酵工程领域的发展, 利用常规生物系统, 结合基因工程化改造和多样化的发酵手段, 高效利用一碳化合物(甲烷、甲酸、甲醇与二氧化碳等)生物合成高附加值化学品, 逐渐成为生物制造领域的研究热点。

一碳底物(one-carbon, C_1)是一类具有单个

碳原子的化合物,可分为:气态 C_1 化合物,包括甲烷(methane, CH_4)、二氧化碳(carbon dioxide, CO_2)、一氧化碳(carbon monoxide, CO);液态 C_1 化合物,包括甲醇(methanol, CH_3OH)、甲醛(formaldehyde, HCOH)、甲酸(formate, $HCOOH$)^[3]。上述一碳底物都具有来源广泛、制备容易、价格低廉的特点,各自的特点决定了其在生物制造领域的应用前景。首先,基于CO的研究,大多聚焦以合成气作为底物(CO为主,含有 H_2 、 CO_2 等的混合气体),利用气态有氧或无氧发酵,实现化合物的生产^[4]。但是,目前该方式存在的问题有产品种类较少(如乙醇、乙酸、2,3-丁二醇),产量较低,所用菌株多为杨氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*),不利于工程化改造^[5],因此本文不做重点讨论。 CH_4 和 CO_2 作为温室效应的主要气体,高效利用二者不仅可以缓解能源问题,还可以缓解温室效应,是当前研究的热点。但是,由于 CO_2 本身较弱的亲电性而不易被激活,非自养生物在以 CO_2 作为 C_1 底物进行生物转化时,面临着能量供应缺乏、代谢供应不足、转化效率低、高能耗等多种问题^[3],因此,当前的研究大多聚焦于提高固碳效率^[6-7], CO_2 的催还还原^[8], CO_2 和甲酸的共应用^[7-8]等方面,力求实现非自养微生物能够高效利用 CO_2 生长,而仅以 CO_2 作为碳源和能源进行化学品的高效生产鲜有报道。与 CO_2 相比,甲烷作为天然气的主要成分,其本身富含能量、具有更强的还原性,在生物转化过程中能够获得更高的产量和转化率,美中不足,气态的甲烷不易存储和运输,且生物发酵过程中,气液界面物质交换的低速传递限制了其高效的生物利用。甲酸和甲醇均可来源于甲烷的氧化、劣质煤炭和生物废料的转化、 CO_2 的还原等方式,二者来源丰富且富含高能,是生物转化的理想原材料^[8-9]。相比于价格较为昂贵的甲酸,甲醇作为全球五大商品之一,其制备方式容易且多样化^[10],使得其成本日渐低廉,逐渐成为上述 C_1 化合物中最具工业化应用潜力的底物原材料,因而大量研究聚焦于甲醇的生物转化。因此,针对丰富的 C_1 底物,挖掘并构建高效的微生物细胞工厂,是推进 C_1 化合物生物利用的关键。

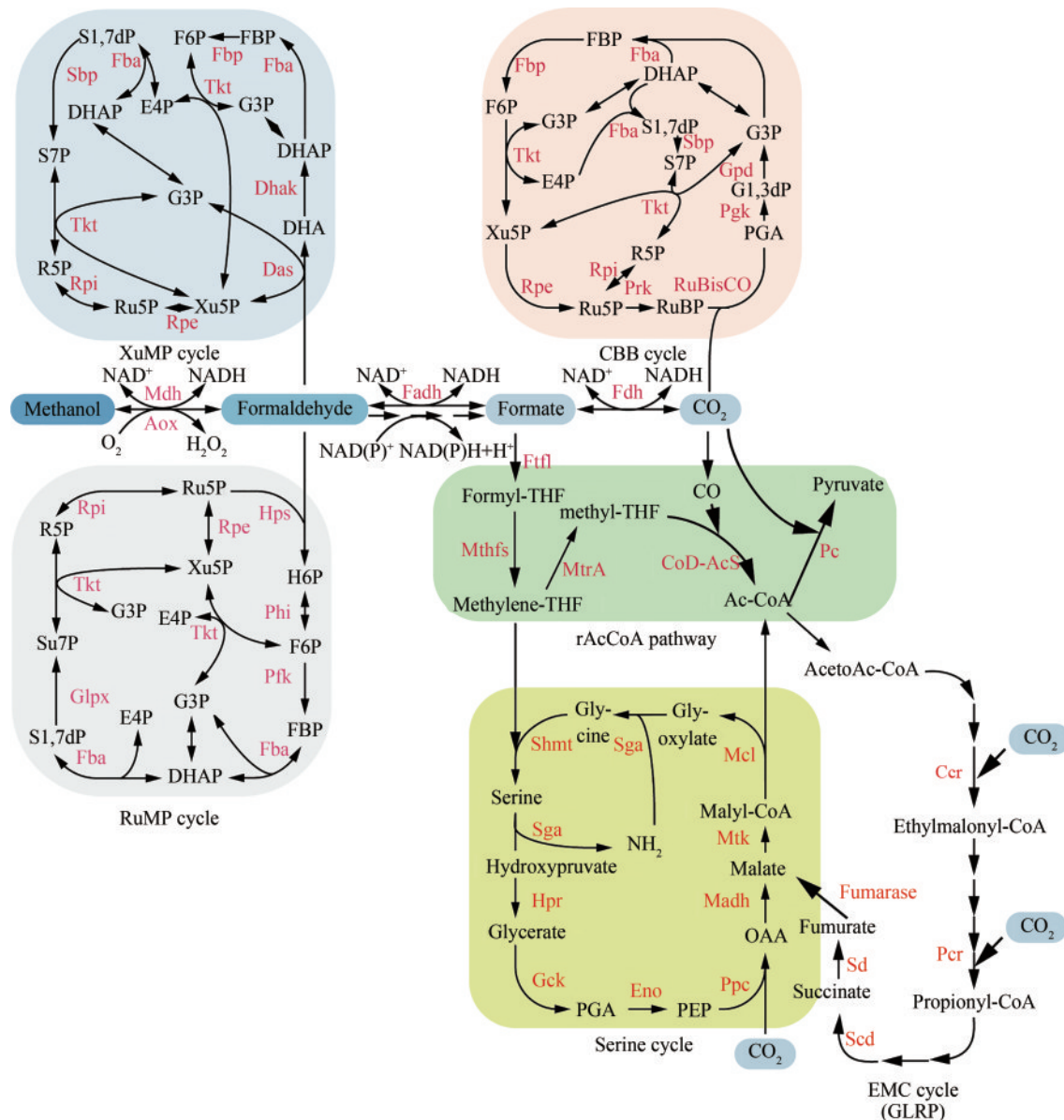
甲基营养型微生物(methylotrophs)是一类能够利用 C_1 化合物(甲醇、甲烷、甲酸和其他甲基

物质)作为唯一碳源和能源进行生长的微生物^[11],大致可分为两类:天然甲基营养型微生物和合成甲基营养型微生物。天然甲基营养型微生物可以通过自身的代谢途径实现对 C_1 化合物的利用,而合成甲基营养型微生物是结合丰富的基因编辑手段,改造模式微生物,使其利用 C_1 化合物高效生产目标产物。因此,探寻并发掘天然的甲基营养型微生物,解析其 C_1 化合物的代谢途径,不仅有利于化合物的生产,也为后续打造合成甲基营养型微生物奠定基础;打造合成甲基营养型微生物,不仅有利于拓宽 C_1 底物的利用范围,增强 C_1 底物的利用率,而且有利于增加 C_1 底物生物制造可行性,二者相辅相成。

因此,本文结合现有的研究成果,介绍了天然甲基营养型微生物利用甲醇、甲烷、甲酸和二氧化碳作为底物进行生物转化的关键酶和代谢途径,并概括了据此形成的多种化学品。其次,介绍了基于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)3种常见的微生物构建合成甲基营养型微生物的多种形式及相应产物;最后,探讨了当前重点研究的 CO_2 、 CH_3OH 、 $HCOOH$ 3种 C_1 底物进行生物转化所面临的瓶颈与挑战,以期后续的研究提供方向。

1 天然甲基营养型微生物的代谢网络

目前,研究发现多种天然甲基营养型微生物,通过自身的代谢途径实现对一碳化合物的利用。整体代谢网络大致上可分为3个模块:一碳底物的氧化模块(即甲烷、甲醇、甲醛的氧化)、同化模块(即 C_1 化合物进入中心代谢的途径)、异化模块(即甲烷等一碳物质最终转变为 CO_2)^[12]。甲烷、甲醇、甲酸和 CO_2 4种一碳底物的代谢网络一脉相承,甲烷和甲醇经相应的氧化酶(如甲烷氧化酶、甲醇氧化酶等)转变后,均会形成甲醛,甲醛作为大多数甲基营养型微生物一碳代谢网络的中心代谢物,既可介导同化途径实现 C_1 底物的生物利用,也可氧化形成甲酸,并经过甲酸脱氢酶生成 CO_2 ,有助于微生物脱毒(图1)。其中,同化途径作为主要的 C_1 代谢模式,有氧条件下,主要包括

图1 天然C₁利用途径Fig. 1 C₁ metabolic networks of native methylotrophs

途径 (Pathway): 一磷酸核酮糖途径 (ribulose monophosphate, RuMP)、一磷酸木酮糖途径 (xylulose monophosphate, XuMP)、卡尔文循环 (Calvin-Benson-Bassham, CBB)、还原型乙酰CoA (reductive acetyl-CoA, rAcCoA)、乙基丙二酰CoA途径 (ethylmalonyl-CoA, EMC);

酶 (Enzyme): 甲醇脱氢酶 (methanol dehydrogenase, Mdh)、酒精氧化酶 (alcohol oxidases, Aox)、甲醛脱氢酶 (formaldehyde dehydrogenase, Fadh)、甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, Fdh)、己糖磷酸合成酶 (hexulose phosphate synthase, Hps)、磷酸己糖异构酶 (phosphohexulose isomerase, Phi)、6-磷酸果糖激酶 (6-phosphofructokinase, Pfk)、果糖二磷酸醛缩酶 (fructose biphosphate aldolase, Fba)、果糖二磷酸/景天庚酮糖-二磷酸酯酶 (bifunctional fructose biphosphate/sedoheptulose biphosphatase, Glpx)、3-磷酸核酮糖异构酶 (ribulose-phosphate 3-epimerase, Rpe)、转酮酶 (transketolase, Tkt)、5-磷酸核糖异构酶 (ribose-5-phosphate isomerase, Rpi)、二羟丙酮合成酶 (dihydroxyacetone synthase, Das)、二羟丙酮激酶 (dihydroxyacetone kinase, Dhak)、景天庚酮糖合成酶 (sedoheptulose synthase, Sbp)、果糖二磷酸酯酶 (fructose biphosphatase, Fbp)、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)、磷酸核酮糖激酶 (phosphoribulokinase, Prk)、磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase, Pkg)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Gpd)、甲酸-THF连接酶 (formate-THF ligase, Ftf1)、亚甲基-THF合成酶 (methylene-THF synthase, Mthfs)、甲基-THF还原酶 (methylene-THF reductase, MtrA)、丝氨酸-羟甲基转移酶 (serine hydroxymethyltransferase, Shmt)、丝氨酸-乙醛酸氨基转移酶 (serine glyoxylate aminotransferase, Sga)、羟基丙酮还原酶 (hydroxypyruvate reductase, Hpr)、甘油酸激酶 (glycerate kinase, Gck)、烯醇化酶 (enolase, Eno)、PEP羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, Ppc)、苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, Madh)、苹果酸硫激酶 (malate thiokinase, Mtk)、苹果酰CoA裂解酶 (malyl-CoA lyase, Mcl)、CO脱氢酶-乙酰CoA合成酶

复合体 (CO dehydrogenase-acetyl-CoA-synthase complex, CoD-AcS)、丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, Pc)、巴豆酰 CoA 还原酶 (crotonyl-CoA reductase/carboxylase, Ccr)、丙酰 CoA 羧化酶 (propionyl-CoA carboxylase, Pcr)、琥珀酰 CoA 脱水酶 (succinyl-CoA dehydratase, Scd)、琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, Sd)；

代谢物 (Metabolites)：6-磷酸己酮糖 (hexulose 6-phosphate, H6P)、6-磷酸果糖 (fructose-6-phosphate, F6P)、5-磷酸木酮糖 (xylulose 5-phosphate, Xu5P)、5-磷酸核酮糖 (ribulose-5-phosphate, Ru5P)、5-磷酸核糖 (ribose-5-phosphate, R5P)、3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde-3-phosphate, G3P/GAP)、4-磷酸赤藓糖 (erythrose-4-phosphate, E4P)、7-磷酸景天庚酮糖 (sedoheptulose-7-phosphate, S7P/Su7P)、磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP)、草酰乙酸 (oxaloacetate, OAA)、二羟丙酮 (dihydroxyacetone, DHA)、磷酸二羟丙酮 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP)、3-磷酸甘油酸 (3-phosphoglycerate, PGA)、1,3-二磷酸甘油酸 (glycerate-1,3-bisphosphate, G1, 3dP)、1,7-二磷酸景天庚酮糖 (sedoheptulose-1,7-bisphosphate, S17dP)、二磷酸核酮糖 (ribulose bisphosphate, RuBP)

一磷酸核酮糖途径 (ribulose monophosphate pathway, RuMP)、乙醛酸再生途径 (glyoxylate regeneration pathway, GLRP)、丝氨酸途径 (serine pathway)、还原型乙酰 CoA 途径 (reductive acetyl-CoA pathway, rAcoAP)、卡尔文循环 (Calvin-Benson-Bassham cycle, CBB cycle)、一磷酸木酮糖途径 (xylulose monophosphate pathway, XuMP)。XuMP 途径多见于天然甲醇酵母当中，如毕赤巴斯德酵母 (*Pichia pastoris*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) 等；大多甲醇和甲烷营养菌可通过 RuMP 途径代谢甲醛，如甲醇芽孢杆菌 (*Bacillus methanolicus*)、荚膜甲基球菌 (*Methylococcus capsulatus* Bath)；部分甲醇和甲烷营养菌以 serine 途径作为主要的 C_1 代谢途径，如扭脱甲基杆菌 (*Methylobacterium extorquens*)、甲基弯菌 (*Methylosinus trichosporium*

OB3b) 等；甲酸营养菌 [如罗尔斯通菌 (*Cupriavidus necator*)] 通过 rAcoAP 途径，可利用甲酸和 CO_2 两种一碳底物；以 CBB 循环作为主要 C_1 代谢途径的天然甲基营养菌较少，如甲酸营养菌、甲烷营养菌 (*Methylococcus infernorum*)^[13-14]。厌氧甲烷营养菌 (*Candidatus Methyloirabilis*) 也以 CBB 循环作为主要的 C_1 代谢途径^[11, 14]。因而，利用已知的代谢途径，据此构建目标产物的合成途径，即可实现目标化合物的生产。当前，通过改造天然甲基营养型微生物，利用其本身的一碳代谢网络，已实现多种化合物的生物合成，如化工产品、天然产物、食品添加剂等 (表 1)。因此，本部分详细阐述了天然甲基营养型微生物所具有的关键代谢酶和代谢途径，并总结了基于此合成的多种化合物。

表 1 天然甲基营养型细胞工厂及其产物

Tab. 1 Chemicals produced by native methylotrophs

宿主	发酵培养基	产物(产量)	备注	参考文献
巴斯德毕赤酵母	甲醇,基础盐培养基	6-甲基水杨酸(2.2 g/L)	① 表达磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (<i>Aspergillus nidulans</i>)、6-甲基水杨酸合成酶 (<i>Aspergillus terreus</i>)；② 5 L 生物反应器	[15]
	甲醇,葡萄糖,基础盐培养基	香柏酮(208 mg/L)	① 表达前二烯加氧酶(<i>Hyoscyamus muticus</i>)、细胞色素 P450 还原酶(<i>Arabidopsis thaliana</i>)、缬烯合酶 (<i>Callitropsis nootkatensis</i>)、乙醇脱氢酶 (<i>Pichia pastoris</i>)、部分羟基戊二酰辅酶 A 还原酶 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)；② 补料分批	[16]
	葡萄糖(40 g/L),草酸(0.2 g/L),酵母提取物(7.5 g/L),蛋白胨(10 g/L),基础盐培养基	透明质酸 (2.5 MDa; 0.8~1.7 g/L)	① 表达透明质酸合成酶 2 (<i>Xenopus laevis</i>)、UDP-葡萄糖脱氢酶 (<i>Xenopus laevis</i>)、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 (<i>P. pastoris</i>)、UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶 (<i>P. pastoris</i>)、磷酸葡萄糖异构酶 (<i>P. pastoris</i>)；② 1 L 生物反应器	[17]
	甲醇(1%),组氨酸(0.05%),生物素(0.01%)	富马酸(0.76 g/L),苹果酸(42.28 g/L),琥珀酸(9.42 g/L)	① 表达丙酮酸羧化酶 (<i>Pichia pastoris</i>)、苹果酸脱氢酶 1 (<i>Pichia pastoris</i>)、富马酸酶 (<i>Pichia pastoris</i>)；② 0.6 L 生物反应器	[18]

续表

宿主	发酵培养基	产物(产量)	备注	参考文献
汉逊酵母	酵母提取物(1%), 蛋白胨(2%), 葡萄糖(2%)	番茄红素(1.141 $\mu\text{g/g}$ 细胞干重), β -胡萝卜素(339 $\mu\text{g/g}$ 细胞干重)	①表达香叶酰二磷酸合成酶(<i>Erwinia uredovora</i>)、茄红素合成酶(<i>Erwinia uredovora</i>)、茄红素去饱和酶(<i>Erwinia uredovora</i>)、番茄红素环化酶(<i>Ficus carica</i>); ②摇瓶培养	[19]
	甲醇(0.5%), 甘油, 基础盐培养基	单那可林 J(593.9 mg/L), 洛伐他汀(250.8 mg/L)	①途径分割策略; ②5 L 生物反应器	[20]
	甲醇(0.5%), 甘油, 基础盐培养基	洛伐他汀(419 mg/L)	①表达洛伐他汀合成模块 B-C-A-F-D-G (<i>Aspergillus terreus</i>)、细胞色素 P450 还原酶(<i>Aspergillus terreus</i>)、磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(<i>Aspergillus nidulans</i>)、他汀外排蛋白(<i>Aspergillus terreus</i>); ②5 L 生物反应器	[21]
	甲醇(0.2%), 胆碱(0.2%), 葡萄糖(0.25%)	青霉素(1 mg/L)	①表达非核糖体肽合成酶(<i>Penicillium chrysogenum</i>)、异青霉素 N 合成酶(<i>Penicillium chrysogenum</i>)、异青霉素素 N 酰基转移酶(<i>Penicillium chrysogenum</i>)、苯乙酰 CoA 连接酶(<i>Penicillium chrysogenum</i>); ②恒化器	[22]
	甲醇, 基础盐培养基	L-谷氨酸(58 g/L)	①50 $^{\circ}\text{C}$ 培养; ②补料分批	[23]
	甲醇(150 mmol/L), 酵母提取物(0.25 g/L), 基础盐培养基	L-赖氨酸(11 g/L)	①表达天冬氨酸激酶(<i>Bacillus methanolicus</i>); ②3 L 生物反应器	[24]
	甲醇(150 mmol/L), 基础盐培养基	L-赖氨酸(65 g/L), L-谷氨酸(28 g/L)	①表达丙酮酸羧化酶(<i>Bacillus methanolicus</i>)、高丝氨酸脱氢酶(<i>Bacillus methanolicus</i>); ②3 L 生物反应器	[25]
	甲醇(200 mmol/L), 酵母提取物(0.025%), 基础盐培养基	L-赖氨酸(777 mg/L)	①表达赖氨酸外排基因(<i>Corynebacterium glutamicum</i>); ②500 mL 摇瓶发酵	[26]
	甲醇(200 mmol/L), 酵母提取物(0.025%), 基础盐培养基	尸胺(11.3 g/L)	①表达赖氨酸脱羧酶(<i>Escherichia coli</i>); ②3 L 生物反应器	[27]
	甲醇(200 mmol/L), 诱导剂, 基础盐培养基	尸胺(10.2 g/L)	①诱导的启动子系统和 θ -and rolling circle-复制系统; ②3 L 生物反应器	[28]
扭脱甲基杆菌 AM1	甲醇(200 mmol/L), 5'-磷酸吡哆醛(20 $\mu\text{mol/L}$), 基础盐培养基	γ -氨基丁酸(9 g/L)	①表达谷氨酸脱羧酶(<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>); ②3 L 生物反应器	[29]
	甲醇(0.5%), 琥珀酸(0.5%), 基础盐培养基	聚羟基烷酸酯 (PHA, 35.1% \pm 4.36%)	①表达 PHA 合成酶(<i>Aeromonas caviae</i>); ② Co^{2+} 缺陷条件; ③摇瓶培养	[30]
	甲醇(125 mmol/L), 琥珀酸(20 mmol/L), 乙胺(20 mmol/L), 基础盐培养基	1-丁醇(15.2 mg/L)	①表达烯酰辅酶 A 还原酶(<i>Treponema denticola</i>)、乙醇脱氢酶(<i>Clostridium acetobutylicum</i>)、巴豆酸酶(<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1); ②摇瓶培养	[31]
	甲醇(240 mmol/L), 基础盐培养基	衣康酸(31.6 mg/L \pm 5.5 mg/L)	①表达乌头酸脱羧酶(<i>Aspergillus terreus</i>); ②2 L 生物反应器	[32]
	甲醇(125 mmol/L), 基础盐培养基	1-丁醇(25.5 mg/L)	①适应性进化筛选突变株耐受丁醇达到 0.5%; ②摇瓶培养	[33]
	甲醇(1%), 基础盐培养基	甲羟戊酸(2.67 g/L)	①生物感应器辅助; ②产率 0.55 mol 乙酰 CoA/mol 甲醇; ③5 L-生物反应器	[34]
	甲醇(3 g/L), 基础盐培养基	2-羟基异丁酸(2.1 g/L)	①表达(R)-3-羟基丁基辅酶 A 特异性辅酶 B ₁₂ 依赖性诱变酶(<i>Bacillus massiliosenegalensis</i> JC6); ②产率 0.11 g/g 甲醇, 生物反应器	[35]

续表

宿主	发酵培养基	产物(产量)	备注	参考文献
	甲醇(125 mmol/L), 琥珀酸(15 mmol/L), 基础盐培养基	3-羟基丙酸(69.8 mg/L)	①表达丙二酰辅酶A还原酶(<i>Chlorofexus aurantiacus</i>); ②摇瓶培养	[36]
	甲醇(0.5%), 琥珀酸(15 mmol/L), 基础盐培养基	3-羟基丙酸(0.857 g/L)	① $\Delta hprA$, 表达己糖磷酸合成酶(<i>Bacillus methanolicus</i>)、磷酸己糖异构酶(<i>Bacillus methanolicus</i>)、磷酸果糖激酶(<i>Bacillus methanolicus</i>)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(<i>Bacillus methanolicus</i>)、丙二酰辅酶A还原酶(<i>Chlorofexus aurantiacus</i>); ②2.5 L生物反应器	[37]
	甲醇(125 mmol/L), 琥珀酸(15 mmol/L), 基础盐培养基	异丁醇(19 mg/L)	① $\Delta ldhA$, 表达2-酮异戊酸脱羧酶(<i>Lactococcus lactis</i>)、醇脱氢酶(<i>Lactococcus lactis</i>)、乙酰乳酸合酶(<i>Bacillus subtilis</i>); ②摇瓶培养	[38]
	甲醇(123 mmol/L), 基础盐培养基	甲基富马酸, (2S)-甲基琥珀酸(0.65 g/L)	① $\Delta phaC$, 表达硫酯酶; ②摇瓶培养; 产率0.17 g/g 甲醇; ③钴缺陷条件	[39]
	甲醇(123 mmol/L), 基础盐培养基	α -蛇麻烯(1.65 g/L)	①表达 α -蛇麻烯合成酶(<i>Zingiber zerumbet</i>)、法尼焦磷酸合成酶(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)、异源甲基戊酸途径; ②2.4 L生物反应器	[40]
	甲醇(1%), 基础盐培养基	甲基戊酸(2.22 g/L)	①表达 HMG-CoA 合成酶(<i>Enterococcus faecalis</i>), HMG-CoA 还原酶(<i>Enterococcus faecalis</i>)、乙酰乙酰 CoA 硫解酶(<i>Ralstonia eutropha</i>); ②产率28.4 mg/g 甲醇, 5 L生物反应器	[41]
	甲醇, 琥珀酸盐, 基础盐培养基	丁二烯前体(0.6 mg/L)	①表达羟乙烷基噻唑激酶(<i>Escherichia coli</i>)、磷酸异戊烯基激酶(<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>)、乙醇脱氢酶(<i>Clostridium acetobutylicum</i>); ②摇瓶培养	[42]
扭脱甲基杆菌 ATCC 55366	甲醇, 基础盐培养基	绿色荧光蛋白(4 g/L)	①表达不同的启动子; 产率80 mg/g 甲醇; ②20 L生物反应器	[43]
	甲醇(1%), 异丙基苯甲酸(20 mg/L), 基础盐培养基	功能性聚羟基脂肪酸酯(PHA), 35.1% \pm 4.36%	①表达聚羟基脂肪酸酯合成酶2(<i>Pseudomonas fluorescens</i> GK13); ②含有碳碳双键的功能性 PHA; 3. 摇瓶培养	[44]
甲基杆菌 MB200	甲醇(1.2%), 基础盐培养基	乙醛酸(14.38 mg/mL)	①表达羟基丙酮酸还原酶(<i>M. extorquens</i>); ②摇瓶培养	[45]
	甲醇(1.2%), 基础盐培养基	L-丝氨酸(11.4 g/L)	①表达丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT, <i>M. extorquens</i>); ②静息发酵	[46]
	甲醇(1.2%), 基础盐培养基	L-丝氨酸(6.6 g/L)	①表达甲醇脱氢酶(<i>Methylobacterium</i> sp. MB200); ②静息发酵	[47]
	甲醇(1.2%), 基础盐培养基	L-丝氨酸(9.1 g/L)	Δgnd (6-磷酸葡萄糖脱氢酶)	[48]
甲基杆菌 MB126	甲醇(125 mmol/L), 基础盐培养基	(R)-3-羟基丁酸(2.8 g/L)	① Δhbd (3-羟基丁酸降解酶)、 Δlip (疏辛酸合成酶) ②2 L生物反应器	[49]
<i>Protomonas extorquens</i> NR-1	甲醇(1%), 基础盐培养基	L-丝氨酸(54.5 g/L)	①静息发酵; ②2 L生物反应器, 产率0.183 mol 丝氨酸/mol 甲醇	[50]
甲基菌属糖原 ATCC 突变体	甲醇(0.5%), 蛋白胨(3 g/L), 基础盐培养基	L-谷氨酸(38.3 g/L), L-苏氨酸(11 g/L), L-赖氨酸(5.6 g/L)	①NTG 突变获取不同突变体, RV3、AL119、DHL122; ②5 L生物反应器	[51]
嗜甲基菌属 <i>Methylotrophus</i>	甲醇(500 mmol/L), 硫酸铵	L-赖氨酸(112 mmol)	①表达ED途径; ②1 L生物反应器	[52]
甲烷球菌属 <i>Mariapaludis</i>	甲酸, 乙酸(10 mmol/L), 丙酮酸(20 mmol/L), 丙氨酸(1 mmol/L), CO ₂ /H ₂	香叶醇	①表达香叶醇合成酶(<i>Ocimum basilicum</i>); ②产率4.6 mg/g 甲酸	[53]

1.1 一碳化合物的氧化模块

1.1.1 甲烷的氧化

甲烷氧化菌中存在的甲烷氧化酶 (methane monooxygenase, MMO) 可以转变甲烷为甲醇, 主要有两种形式: 微粒型 MMO (particulate MMO, pMMO) 和可溶型 MMO (soluble MMO, sMMO)^[54]。前者广泛存在于甲烷营养菌中, 是一种膜结合蛋白, 但是该酶反应所需的辅因子尚未清晰; 后者仅存在于特定类型的甲烷氧化菌中, 需要 NADH 作为辅因子提供还原力; 同时具有两种 MMO 的甲烷氧化菌, 其 MMO 的表达受到胞内铜离子浓度的影响, 铜离子浓度高, 主要表达 pMMO, 铜离子浓度低, 主要表达 sMMO^[55]。研究表明在细胞中表达 pMMO 和 sMMO 后, pMMO 对甲烷的氧化效率更高, 细胞生长率强于 sMMO^[54]。

1.1.2 甲醇的氧化

甲醇氧化为甲醛是甲醇生物利用的限速步骤。前期研究表明, 天然的甲基营养型微生物将甲醇转变为甲醛, 主要有 4 种甲醇利用酶: NAD 依赖的甲醇脱氢酶 (methanol dehydrogenase, MDH)、吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 依赖的 MDH、*N,N*-二甲基-4-亚硝基苯胺-氧化还原酶 (*N,N*-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase, MNO) 及醇氧化酶 (alcohol oxidase, AOX)^[11]。前 3 种存在于细菌中, AOX 主要存在于甲醇酵母当中。PQQ 依赖的 MDH 主要存在于革兰氏阴性菌中 (如 *Methylophilus methylotrophus*), 还原型 PQQ (PQQH₂) 首先转移 2 个电子至呼吸链上的细胞色素 CL, 然后经由细胞色素 CL 传递 2 个电子至最终电子受体, 即氧化酶^[56], 此时该酶转化 O₂ 为水。天然甲醇酵母利用 AOX 将甲醇转化为甲醛, 在此过程中, O₂ 转变为副产物过氧化氢, 有毒的过氧化氢被催化酶 (catalase, CTA) 分解成水和 O₂; 值得注意的是 AOX 和 CTA 均定位在过氧化物酶体中, 甲醇氧化过程也发生在过氧化物酶体中^[57]。甲醇氧化酶-MNO 存在于部分革兰氏阳性甲基营养菌 (如 *Amycolatopsis*、*Mycobacterium*) 中^[58], 与 NADPH 结合紧密^[59], 结构与 III 型乙醇脱氢酶类似^[60]。NAD 依赖的 MDH 主要来自于革兰氏阳性

甲基营养菌 (如 *Bacillus*), 转化过程中产生 NADH, 可存储于细胞中用于其他的代谢活动^[56]。此外, 当细胞内甲醛被快速消耗并维持在较低水平时, NAD-MDH 活性更佳, 对甲醇的氧化能力更强^[56]。因此, 相比于 PQQ-MDH 和 AOX, NAD-MDH 在有氧和无氧条件下均具有氧化活性且反应机制容易, 具有更加高效的能量转化能力^[61], 已被广泛应用于合成甲基营养型微生物代谢底盘的构建。

当前, 来自于 *B. methanolicus* 的 NAD-MDH^[62] 已被成功用于 *E. coli* 甲醇代谢底盘的构建^[63-64]。该酶活性依赖于内源的激活蛋白 (an endogenous activator, ACT), 它可促进 MDH 对甲醇的利用, 但酶本身对于甲醇的亲合力较低, 而对乙醇的亲合力更高^[56], 因而所构建的工程菌甲醇转化率较低。为了进一步提高甲醇转化率, 众多研究聚焦于该酶的筛选、挖掘、工程化改造, 以期得到高效的 NAD-MDH。James C. Liao 实验室^[65] 2016 年报道了来源于 *Cupriavidus necator* N-1 的 NAD 依赖的甲醇脱氢酶 (Mdh2), 该酶来源于革兰氏阴性菌, 可产生 NADH, 对甲醇的亲合力明显高于 *B. methanolicus*, 且不依赖于内源激活蛋白, 特异性较强; 随后, 作者通过多轮易错 PCR 构建 Mdh2 突变体文库, 结合高通量筛选的方式, 得到的 Mdh2 CT4-1 对甲醇的亲合力比原先提高 6 倍, K_{cat}/K_m [L/(mol·s)] 达到 9.3 (野生型为 1.6), 具有更好的催化活性和转化效率。Whitaker 等^[66] 2017 年在 *E. coli* 中分别引入来自革兰氏阳性菌 *B. stearothermophilus* 的 BsMdh 和 *B. methanolicus* 的 BmMdh2, 发现 BsMdh 具有更强的甲醇转化能力, 通过体内实验表明 BsMdh 的活性大约为 16 mU/mg, 而 BmMdh2 的活性仅为 8 mU/mg。此外, David R. Liu 实验室^[67] 利用噬菌体辅助的非连续进化的方式筛选 BmMdh2 突变体, 最终得到的 BmMdh2 Q5L-A164P-A363L 突变体活性提高了 3.5 倍, K_{cat}/K_m [L/(mol·s)] 达到 1.08 (野生型为 0.23), 但是低于 CnMdh2 CT4 (4.77); 随后, 作者进一步通过体内同位素标记实验证明, 在该酶的作用下, 经过 ¹³C 标记的甲醇进入中心碳代谢的比例高于对照菌株 (BmMdh wt、CnMdh2 CT4-1) 2 倍多, 说明虽然突变体活性低于 Mdh2

CT4-1, 但是体内的甲醇利用率明显提高。

1.1.3 甲醛的氧化

甲醛是甲醇和甲烷作为 C_1 底物进入中心代谢进行生物合成的中间代谢物, 高浓度甲醛会抑制细胞生长, 因此高效的甲醛代谢系统可以促进细胞对甲醇和甲烷的利用。大多细胞具有自身的甲醛氧化酶 (formaldehyde dehydrogenase, FADH), 可氧化甲醛形成甲酸, 再经由甲酸脱氢酶形成 CO_2 , 完成甲醛代谢, 促进微生物有效脱毒^[61]。根据所需的辅助因子, FADH 可分为4类: ①需要 NAD 作为辅助因子, 包括仅以 NAD 作为辅因子的 FADH^[68]、NAD-GSH 双辅因子 FADH^[57, 69]、NAD-硫醇依赖性 FADH^[70]; ②不需要辅因子, 可直接氧化甲醛; ③细胞色素辅助的 FADH (如 PQQ-FADH), 该类 FADH 通常不是甲醛特异性酶, 源自甲基营养菌, 活性较低^[70]; ④四氢叶酸 (tetrahydrofolate, THF)、四氢甲氨蝶呤 (tetrahydromethanopterin, H4MPT) 作为辅助因子, 该途径是最常见的甲醛氧化途径, 广泛存在于多种甲基营养菌中。此过程中, 以 THF 或 H4MPT 作为辅因子的微生物, 甲醛经过亚甲基-THF (H4MPT)-脱氢酶 [methylene-THF (H4MPT) dehydrogenase, Mtd]、亚甲基-THF (H4MPT)-环化酶 [methenyl-H4MPT cyclohydrolase, Mch], 分别形成带有 THF 和 H4MPT 的甲酰基化合物; 前者经过甲酰-THF 合成酶 (formyl-THF synthase, Fhs) 形成甲酸; 后者经过甲酰-H4MPT 转移/水解复合体 [formyl-THF (H4MPT) transferase/hydrolase-complex, Fhc] 形成甲酸^[70]。总之, 由于甲醛毒性对微生物正常生长的影响, 其体内均形成多种代谢甲醛的形式, 为 C_1 底物的生物利用提供了更多有效的研究策略。

1.1.4 甲酸的氧化

甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, FDH) 广泛存在于多种微生物中, 可氧化甲酸为 CO_2 , 是细胞脱毒的最后一步, 也是 C_1 底物异化途径的最后一步。目前发现的甲酸脱氢酶可利用 THF、NAD、NADP^[71]、细胞色素等作为辅助因子, 所生成的 NADH 或 NADPH 可用于细胞其他的生命活动; 以 THF 作为辅因子的甲酸营养菌, 通过

rACoA 途径即可实现微生物利用甲酸进行生长。

1.2 天然甲基营养型微生物的代谢途径

1.2.1 RuMP 和 XuMP 途径

RuMP、XuMP 虽然存在于不同类型的甲基营养型微生物中, 但本质上十分相似, 都是甲醛结合五碳糖进行碳原子重排, 一碳分子经由糖酵解途径完成碳流向下传递的过程, 而五碳糖再生保证循环持续运转^[61]。前者利用 5-磷酸核酮糖 (ribulose 5-phosphate, Ru5P) 作为底物, 甲醛经由己糖磷酸合成酶 (hexulose phosphate synthase, HPS) 转变为 6-磷酸己酮糖 (hexulose 6-phosphate, H6P) 后, 再通过磷酸己糖异构酶 (phosphohexulose isomerase, PHI) 转变为 6-磷酸果糖 (fructose-6-phosphate, F6P) 进入中枢碳代谢。后者利用 5-磷酸木酮糖 (xylulose 5-phosphate, Xu5P) 作为底物, 二羟丙酮合成酶 (dihydroxyacetone synthase, DAS) 可将甲醛和 Xu5P 转变为 3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde-3-phosphate, G3P) 和二羟丙酮 (dihydroxyacetone, DHA), DHA 可利用二羟丙酮激酶 (dihydroxyacetone kinase, DHAK) 进一步转化成 DHAP, 从而进入中心代谢。

RuMP 途径中, 3 mol 甲醛形成 1 mol 丙酮酸时, 伴随 G3P、Xu5P 和 4-磷酸赤藓糖 (erythrose-4-phosphate, E4P) 的形成; 此外, 已有研究报道, *B. methanolicus*^[72] 和 *P. pastoris*^[73] 中均存在两种酶, 1,7-双磷酸景天庚糖酶 (sedoheptulose 1,7-bisphosphatase, SBP) 和转醛酶 (transaldolase, TAL), 前者可将 1,7-双磷酸景天庚糖转变为 7-磷酸景天庚糖 (sedoheptulose-7-phosphate, S7P), 后者将 F6P 和 E4P 转变为 S7P 和 G3P; S7P 和 G3P 经由转酮酶 (transketolase, TKL) 重新转变为 Xu5P 和 5-磷酸核糖 (ribose 5-phosphate, R5P), 从而完成五碳糖的再生循环。因此, 将磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway, PPP) 与 RuMP 或 XuMP 相结合, 加速五碳糖的再生, 是提高 C_1 底物利用率的常用策略, 如 Bennett 等^[74] 通过表达多个 PPP 途径的酶提高内源 Ru5P 的含量, 详见表 2。

表2 合成甲基营养型细胞工厂及其产物

Tab.2 Chemicals produced by synthetic methylotrophs

宿主	主要途径	C ₁ 底物	共培养底物	产品(产量)	特点	主要策略	参考文献
谷氨酸棒状杆菌	RuMP	甲醇	核糖(20/100 mmol/L); 葡萄糖(50 mmol/L)	尸胺(1.5 g/L)	首次将甲醇转化为非天然产物-尸胺	①表达 RuMP 相关酶; ② <i>Ald</i> (乙醛脱氢酶), <i>Afadh</i> (甲醛脱氢酶); ③表达赖氨酸脱羧酶(<i>E. coli</i>)	[75]
	RuMP	甲醇(15 g/L)	木糖(4 g/L)	L-谷氨酸(230 mg/L)	①甲醇是主要的碳源, 甲醇和木糖的利用率达到 7.04:1; ②进化菌株甲醇耐受浓度为 15 g/L	①表达 RuMP 相关酶; ② <i>AdhE</i> (甲醛脱氢酶)、 <i>Ald</i> (乙醛脱氢酶)、 <i>ArpiB</i> (核糖磷酸异构酶); ③表达木酮糖激酶、木酮糖异构酶; ④过表达 PPP 途径、ED 途径相关酶	[76]
	RuMP	甲醇	木糖(4 g/L)	L-谷氨酸(90 mg/L)	①甲醇和木糖共利用可以明显提高细胞增长; ②甲醇木糖利用率为 3.83:1; ③胞内细胞 ¹³ C 甲醇标记度达到 63%	①表达 RuMP 相关酶; ② <i>AdhE</i> (甲醛脱氢酶)、 <i>Ald</i> (乙醛脱氢酶); ③表达木酮糖激酶、木酮糖异构酶; ④ <i>ArpiB</i> (核糖磷酸异构酶)	[77]
大肠杆菌	RuMP	甲醇(60 mmol/L)	葡萄糖、木糖、蛋白胨的混合物(1 g/L); 酵母提取物(1 g/L)	橘皮素(3.5 mg/L)	首次报道 <i>E. coli</i> 利用甲醇合成黄酮类物质	①表达 RuMP 相关酶; ② <i>AfmA</i> (甲醛脱氢酶); ③表达香豆酰 CoA 连接酶、查尔酮合成酶	[66]
	RuMP	甲醇(6.4 g/L)	葡萄糖(30~100 g/L)、酵母提取物(1 g/L);	琥珀酸(68.75 g/L)	①厌氧发酵加入甲醇提高琥珀酸产率 0.98 g/g±0.11 g/g 甲醇; ②甲醇氧化形成的 NADH 有助于琥珀酸形成	①表达 RuMP 相关酶; ② 5 L 生物反应器	[78]
	MSC	甲醇(200 mmol/L); 甲酸(20 mmol/L); CO ₂	木糖(30 mmol/L)	乙醇(36 mmol/L)	①首次报道基于丝氨酸循环构建合成甲基营养菌; ②甲醇加入可以增加乙醇产量达到 62%, 甲醇利用率为 0.7 mmol/(L·h) (以 OD ₆₀₀ 计), 木糖与甲醇消耗率为 1:0.7	①表达丝氨酸途径相关酶; ②表达丙氨酸-乙醛酸转氨酶(Agt)、丝氨酸脱氢酶(Sdh)、苹果酸硫激酶(Mtk)、苹果酰 CoA 裂解酶(Mcl)等; ③表达乙醛脱氢酶(Pdup)、乙醇脱氢酶(AdhB); ④ <i>AaceB</i> <i>AglcB</i> <i>AgcvP</i> <i>Agcl</i> <i>AfrdB</i> <i>AldhA</i>	[79]
	RuMP	甲醇	葡萄糖(30 g/L), 酵母提取物(10 g/L)	丙酮(45.0 mmol/L ± 8.7 mmol/L)	①两种策略共同提高甲醇利用率; ② <i>E. coli</i> 利用甲醇合成丙酮	① <i>ApiG</i> (6-磷酸葡萄糖异构酶)、 <i>AfmA</i> (甲醛脱氢酶); ②表达 RuMP 途径相关酶; ③表达磷酸核糖异构酶(rpe)、转酮酶(tkt); ④表达二磷酸果糖醛缩酶(fba)、景天庚糖双磷酸酶(glpX)、磷酸果糖激酶(pfk)	[74]

续表

宿主	主要途径	C ₁ 底物	共培养底物	产品(产量)	特点	主要策略	参考文献
	RuMP	甲醇(3.2 g/L), 甲醛(0.15 g/L)	葡萄糖(8~9 g/L), 硫酸素焦磷酸盐(0.46 g/L)	1,3-丙二醇(508.3 mg/L±9.1 mg/L)	①首次实现利用甲醇和丙酮酸合成1,3-丙二醇; ②缩短途径,并有效提高1,3-丙二醇产量	①表达甲醇脱氢酶; ②表达甲醇脱氢酶; ③表达羟丁酸醛缩酶、酮酸脱羧酶、1,3-丁二酸氧化还原酶	[80]
	HACL	甲醛		乙醇酸(1.2 g/L)	①首次报道 HACL 途径,可以转化甲酸和甲醛; ②首次利用甲醛合成乙醇酸和羟基异丁酸	表达羟酰 CoA 裂解酶(<i>RuHACLG390N</i> , <i>Rhodospirillales bacterium</i>)、酰基 CoA 还原酶(<i>LmACR</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>)	[81]
	RuMP	甲醇(250 mmol/L) 提取物(2 g/L)	葡萄糖(10 g/L), 酵母	丙酮(58 mmol/L)	①显著提升甲醇向丙酮的转化; ②构建了甲醇依赖的菌株底盘	① <i>Δpgi</i> (6-磷酸葡萄糖异构酶)、 <i>Δedd</i> (磷酸葡萄糖酸脱氢酶)、 <i>ΔrpiAB</i> (核糖磷酸异构酶)、 <i>ΔfrmA</i> (甲醛脱氢酶); ②表达 RuMP 相关酶	[82]
	RuMP	甲醇(50~100 mmol/L)	葡萄糖(50 mmol/L), 酵母提取物(1 g/L)	L-赖氨酸(0.1 g/L)	甲醇氧化所得的 NADH 转变为 NADPH 用于赖氨酸生产	①表达 RuMP 相关酶、 <i>ΔfrmA</i> (甲醛脱氢酶); ②表达 Nudix 水解酶、NADH 激酶(<i>POS5</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>); ③表达赖氨酸合成途径相关酶(<i>lysC</i> , <i>dapA</i> , <i>dapB</i>)	[64]
	RuMP	甲醇	木糖, 核糖	乙醇(4.6 g/L); 1-丁醇(2 g/L)	①构建甲醇依赖型木糖菌株; ②甲醇与木糖利用率为1:1	①表达 RuMP 相关酶; ② <i>ΔadhE</i> (甲醛脱氢酶)、 <i>Δald</i> (乙醛脱氢酶)、 <i>ΔrpiAB</i> (核糖磷酸异构酶); ③表达腺苷酸环化酶	[83]

XuMP 途径是甲醇酵母的主要甲醇代谢途径, 其中涉及的 AOX、CTA 及 DAS 均定位在过氧化物酶体中, DAS 活性可被葡萄糖抑制, 被甲醇所诱导^[57]。由于甲醇酵母中, 甲醇代谢主要发生在过氧化物酶体中, 区室化作用有利于降低甲醛毒性, 可显著提高化合物产量, 如番茄红素^[84]。当前, *P. pastoris* 已被用于多种化合物和蛋白质的生物合成(表1), 如洛伐他汀^[20]、透明质酸^[17]等; 关于汉逊酵母的研究较少, 如利用汉逊酵母生产青霉素^[22]。最近, 大连化物所的周雍进研究组^[85]开发了高效的汉逊酵母基因编辑工具, 能够有效提高其同源重组效率, 并利用其进行脂肪醇的生物合成研究。

1.2.2 Serine 途径和 GLRP 途径

广义的丝氨酸途径主要包括3个部分: 第1部分是以 C₁ 化合物(甲烷、甲醇或甲醛)起始, 经

过多级氧化反应, 形成亚甲基-THF (CH₂-THF) 的中间产物。第2部分是以甘氨酸 (C₂) 起始, 结合1分子 CH₂-THF, 形成丝氨酸 (C₃), C₃ 化合物经过一系列转化后, 形成磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP), 随后羧化引入1分子 CO₂, 形成 C₄ 化合物草酰乙酸 (oxaloacetate, OAA), OAA 经过苹果酸脱氢酶转变为苹果酸 (C₄) (malate, MAL)。经过上述两部分后, 完成两种 C₁ 化合物的利用。第3部分主要是乙醛酸的再生过程。MAL 在苹果酸硫激酶 (malate thiokinase, MTK) 的作用下, 形成苹果酸单酰-CoA。随后苹果酸单酰-CoA 被分解为 C₂ 化合物乙醛酸和乙酰 CoA, 乙醛酸经过丝氨酸-乙醛酸氨基转移酶 (serine glyoxylate aminotransferase, SGA) 形成甘氨酸, 从而构成完整的丝氨酸循环^[11]。

细胞中, 乙酰 CoA 参与多种生命活动, 而经

典的乙醛酸循环^[86]可以利用乙酰 CoA 和 OAA 作为底物, 经过柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS)、顺乌头酸酶 (aconitase, AT) 和异柠檬酸裂解酶 (isocitrate lyase, ICL), 再生成琥珀酸和乙醛酸。但是, 部分甲基营养菌 (如 *M. extorquens*) 中缺乏异柠檬酸裂解酶, 乙醛酸的再生是通过乙基丙二酰 CoA 途径 (ethylmalonyl-CoA, EMC) 完成的, 该途径也被称为 GLRP^[11, 86]。EMC 途径不仅存在于天然甲基营养菌中, 部分非甲基营养菌也拥有该途径, 如红杆菌 (*Rhodobacter*) 和链霉菌 (*Streptomyces*)。该途径大约有 10 步反应, 中间产物涉及 C₂、C₃、C₄ 化合物, 包括多种独特的辅酶 A 中间体, 可用于多种工业化合物的生产^[87], 如聚羟基烷酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA)、3-羟基丁酸 (3-hydroxybutyrate, 3-HB)^[30]、3-羟基丙酸 (3-hydroxypropionic acid, 3-HP)^[36] 等, 见表 1。

1.2.3 rACoAP 途径

许多天然的甲酸和甲烷营养菌中均存在还原型乙酰 CoA 途径, 即 Wood-Ljungdahl pathway, 该类菌株可以利用甲酸作为唯一碳源和能源进行生长。该途径中, 以 THF 作为辅助因子, 甲酸转变为 CH₂-THF 后, 可以进一步转化为 5-甲基-THF。随后, 结合 CO 和 CoA 直接形成乙酰 CoA, 乙酰 CoA 在丙酮酸合酶 (pyruvate synthase, PC) 的作用下, 羧化结合 1 分子 CO₂, 最终形成丙酮酸^[88]。在此过程中, 不仅可以利用甲酸, 同时可以结合 2 分子 CO₂ (CO 可来源于 CO₂), 具有充分的一碳利用能力。能量方面, 虽然该过程第 1 步 (甲酸转化为甲酰-THF) 需要消耗 1 分子 ATP, 但是随后可产生 NADPH 用于后续能量供应。目前, 已有研究报告利用该途径进行香叶醇的生物合成^[53]。

1.2.4 CBB 途径和 rPPC 途径

存在另一种广义的 CBB 循环, 又称为还原型磷酸戊糖循环 (reductive pentose phosphate cycle, rPPC), 是甲酸营养菌 (*Cupriavidus necator*)^[8] 和少数甲烷营养菌^[89] 的另一种固碳形式。甲酸氧化形成 CO₂ 后, 结合 1,5-二磷酸核酮糖 (ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP) 在 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCo) 的作用下, 转变为 G3P 进入中心碳代谢途径。但是, 该途径需要消耗过多的还原力和 ATP,

既不经济, 也不利于微生物生长^[88]。最近有研究报道, 在 *P. pastoris* 中引入 RuBisCO 和磷酸核酮糖激酶 (phosphoribulokinase, PRK), 首次实现天然甲醇酵母利用 CO₂ 作为唯一碳源即可生长^[90]。

2 合成甲基营养型微生物的代谢网络

天然的甲基营养型微生物具有丰富的 C₁ 代谢酶和代谢途径, 理论上, 据此构建下游的生物合成途径, 即可实现微生物利用 C₁ 底物作为唯一的碳源和能源支撑生长并高产目标化合物。但是, 由于天然的甲基营养型微生物存在数据库资源和遗传信息不完善、基因编辑工具缺乏与产物转化率低下等问题, 使 C₁ 底物大规模应用于工业生产这一目标至今没有实现。因此, 结合天然甲基营养型微生物中发现的 C₁ 代谢途径, 如 RuMP、丝氨酸途径, 赋予模式微生物对 C₁ 化合物的高效利用能力, 从头构建合成型甲基营养微生物, 并实现目标化合物的高产, 逐渐成为研究热点。此外, 近几年的研究中, 通过计算机设计全新的酶蛋白, 打造人造 C₁ 代谢途径, 亦成为高效利用 C₁ 底物的又一有效策略。当前, 大多数研究均在 *E. coli* 当中开展, 仅有少量研究以 *C. glutamicum* 和 *S. cerevisiae* 作为研究对象, 研究的主要内容包括两个: ①以 C₁ 底物作为唯一碳源和能源支撑微生物快速生长, 涉及的 C₁ 底物为甲醇、甲酸和 CO₂; ②高效利用甲醇和 CO₂ (甲酸辅助) 进行生物合成。因此, 本部分概括了上述 3 种模式生物作为研究对象, 针对两个主要研究内容, 所进行的代谢网络构建和生物合成探究。

2.1 大肠杆菌

目前, *E. coli* 是研究最深入的原核模式生物, 多种 C₁ 底物 (甲醇、甲酸、CO₂) 的生物利用已经在 *E. coli* 中陆续开展。其中, 关于甲醇的研究成果最为丰富, 涉及代谢途径的挖掘、代谢底盘的改造与优化、共培养底物的优化、生物合成化合物等多个方面, 并且已有研究报道 *E. coli* 可以利用甲醇作为唯一碳源和能源正常生长^[91]。关于甲酸和 CO₂ 的研究成果相对较少, 研究侧重于甲酸或 CO₂

的充分利用、已知代谢途径的改造及新途径的挖掘^[92]，当前已经实现 *E. coli* 可以利用甲酸^[93] 或 CO_2 ^[94-95] 作为唯一碳源生长，但是生长情况较弱，有待进一步提高。

2.1.1 甲醇

工程化改造 *E. coli*，形成合成型甲醇营养菌的研究策略可以分为两种：引入天然甲醇利用通路和打造全新的甲醇代谢途径。前一种主要是通过引入或塑造天然存在的甲醇利用途径（如 RuMP、XuMP），结合代谢底盘的辅助改造，代谢流微调，底物和发酵条件优化，目标产物合成途径的构建等，最终实现 *E. coli* 能够在含有甲醇的培养基中生长并合成目标产物；后一种主要是结合计算机辅助设计和蛋白质工程，发现能够提升甲醇代谢能力或缩短已知代谢途径的酶，从而打造全新的甲醇代谢途径，弥补天然途径中的不足，以期实现更高的甲醇利用效率，包括甲醇缩合循环（methanol condensation cycle, MCC）、甲醛酶途径（formolase, FLS）、合成型乙酰 CoA 途径（synthetic acetyl-CoA, SACA）、羟酰辅酶 A 裂解酶途径（2-hydroxyacyl-CoA lyase, HACL）、修饰丝氨酸循环（modified serine cycle, MSC）（图2）。

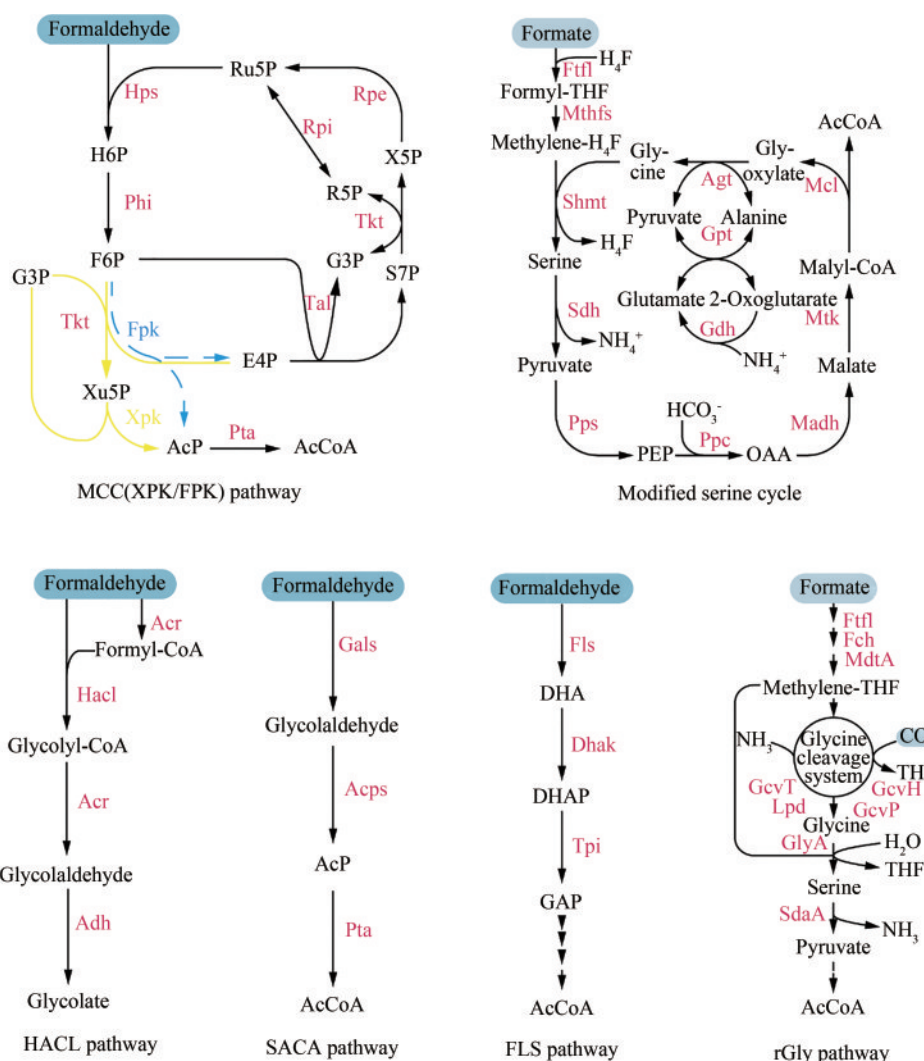
天然甲醇利用途径在前面已经有详细的介绍，不再赘述。当前，大量研究聚焦于整合 RuMP 于 *E. coli* 中，以期实现 *E. coli* 利用甲醇作为唯一碳源和能源支撑微生物生长；2015 年的研究通过在 *E. coli* 中整合多种不同来源的 RuMP 中的关键基因，发现来源于 *B. methanolicus* 菌株的 MDH2、HPS、PHI 能够更好地利用甲醇^[63]；2018 年的研究表明，通过增强甲醛的消耗，降低 TCA 代谢，减少 NADH 的产生可以促进甲醇利用^[96]；随后，通过在 *E. coli* 中加入甲醛感应元件，降低 NADH 的产生，并加强 Ru5P 的再生，进一步提高甲醇的利用^[97]；2020 年 8 月，Liao 团队^[91] 发表在 *Cell* 上的文章，首次实现了甲醇作为唯一碳源支持 *E. coli* 生长，并且在 8.5 h 中 OD 值可达到 2。上述研究从“零”到有实现了 *E. coli* 利用甲醇作为唯一碳源支撑微生物生长的能力。此外，已有众多研究报道 *E. coli* 利用甲醇（葡萄糖或酵母提取物作为辅助碳源）进行生物合成，对底盘的改造均以 RuMP 途径为基础，包括柚皮素、乙醇、丙酮、琥珀酸、赖

氨酸等，见表 2，但是均未实现甲醇作为唯一碳源。值得关注的是，2018 年 *Nature Communications* 首次报道了基于 MSC 构建成型甲醇营养菌生成乙醇，此前大多改造均利用 RuMP 途径，因而该文章是天然甲醇利用途径的应用突破^[79]。

最早的合成途径来自 Liao 实验室的 MCC 途径，其将非氧化糖酵解（nonoxidative glycolysis, NOG）途径和 RuMP 途径结合，利用体外无细胞体系实现甲醇的利用。该途径中，F6P 或 X5P 可通过一步反应直接生成乙酰磷酸，随后转化为乙酰 CoA，不仅避免丙酮酸脱羧所造成的碳损失，同时减少 ATP 的消耗；但是至今没有研究报道该途径在体内的应用情况。随后，美国 David Baker 实验室设计并人工合成了以甲醛酶为核心的 FLS 途径，仅通过 2 步即可实现甲醛到二羟丙酮磷酸（dihydroxyacetone phosphate, DHAP）的转化（消耗 1 分子 ATP），而 RuMP 途径中从甲醛到 DHAP 需要 4 步反应，因而该反应极大缩短了 C_1 底物进入中枢代谢的步骤；同时，此途径可以甲酸作为底物，经过乙酰 CoA 合成酶（acetyl-CoA synthase, ACS）和乙醛脱氢酶（acetaldehyde dehydrogenase, ACDH）转变为甲醛，过程中需要消耗 1 分子 NADH^[98]。2019 年报道了两条合成途径，一条来自天津工业生物技术研究所江会峰团队^[99] 报道的 SACA 途径，通过计算设计合成的乙醇醛合成酶（glycolaldehyde synthase, GALS）、乙酰磷酸合成酶（acetyl-phosphate synthase, ACPS）可以通过三步反应快速转化甲醛为乙酰 CoA，不需要消耗 ATP、无碳损失，可惜的是文章中仅在体外实验中验证了该途径的作用，而在 *E. coli* 中没有明显的甲醇利用效果；另一条途径来自美国 Ramon 实验室所设计的 HACL 途径，该实验室筛选两种酶，RuHACL 和酰基辅酶 A 还原酶（acyl-CoA reductase, ACR），首次实现 C_1 化合物甲醛至 C_2 化合物乙醇酸（glycolate）的转变，该途径同样可用甲酸为底物，经由甲酰 CoA 转变为甲醛^[81]。

2.1.2 甲酸和二氧化碳

目前，*E. coli* 主要是通过还原型甘氨酸途径（reductive glycine pathway, rGlyP）利用甲酸和 CO_2 ，仅有少量研究借助 CBB 循环实现一碳物质的转化。首先，rGlyP 可以利用甲酸和 CO_2 两种 C_1 化

图2 合成C₁利用途径Fig. 2 C₁ metabolic networks of synthetic methylotrophs

途径 (Pathway): 甲醛缩合循环 (methanol condensation cycle, MCC)、5-磷酸木酮糖磷酸转酮酶 (xylulose-5-phosphate phosphoketolase, XPK)、6-磷酸果糖磷酸转酮酶 (fructose-6-phosphate phosphoketolase, FPK)、羧基辅酶A裂解酶 (2-hydroxyacyl-coenzyme A lyase, HACL)、合成型乙酰辅酶A (synthetic acetyl-CoA, SACA)、甲醛酶 (formolase, FLS)、还原型甘氨酸 (reductive glycine, rGly);

酶 (Enzyme): 己糖磷酸合成酶 (hexulose phosphate synthase, Hps)、磷酸己糖异构酶 (phosphohexulose isomerase, Phi)、3-磷酸核酮糖异构酶 (ribulose-phosphate 3-epimerase, Rpe)、转酮酶 (transketolase, Tkt)、5-磷酸核糖异构酶 (ribose-5-phosphate isomerase, Rpi)、转醛酶 (transaldolase, Tal)、磷酸酰基转移酶 (phosphate acetyltransferase, Pta)、甲酸-THF 连接酶 (formate-THF ligase, Ftf)、亚甲基-THF 合成酶 (methylene-THF synthase, Mthfs)、丝氨酸-羟甲基转移酶 (serine hydroxymethyltransferase, Shmt)、丝氨酸脱水酶 (serine dehydratase, Sdh)、PEP 羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, Ppc)、PEP 合成酶 (phosphoenolpyruvate synthase, Pps)、苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, Madh)、苹果酸硫激酶 (malate thiokinase, Mtk)、苹果酰 CoA 裂解酶 (malyl-CoA lyase, Mcl)、丙氨酸-乙醛转氨酶 (alanine-glyoxylate transaminase, Agt)、谷氨酸-丙酮转氨酶 (glutamate-pyruvate transaminase, Gpt)、谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, Gdh)、酰基辅酶A 还原酶 (acyl-CoA reductase, Acr)、乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, Adh)、乙醇醛合成酶 (glycolaldehyde synthase, Gals)、乙酰磷酸合成酶 (acetyl-phosphate synthase, Acps)、二羟丙酮激酶 (dihydroxyacetone kinase, Dhak)、亚甲基-THF 环水解酶 (5, 10-methenyl-THF cyclohydrolase, Fch)、亚甲基-THF 脱氢酶 (5, 10-methylene-THF dehydrogenase, MdtA)、甘氨酸切割系统 THP (glycine cleavage system-THP protein, Gcv)、硫辛酰脱氢酶 (lipoamide dehydrogenase, Lpd)、SHMT=GlyA, 丝氨酸脱氨酶 (serine deaminase, SdaA);

代谢物 (Metabolites): 6-磷酸己酮糖 (hexulose 6-phosphate, H6P)、6-磷酸果糖 (fructose-6-phosphate, F6P)、5-磷酸木酮糖 (xylulose 5-phosphate, Xu5P)、5-磷酸核酮糖 (ribulose-5-phosphate, Ru5P)、5-磷酸核糖 (ribose-5-phosphate, R5P)、3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde-3-phosphate, G3P/GAP)、4-磷酸赤藓糖 (erythrose-4-phosphate, E4P)、7-磷酸景天庚酮糖 (sedoheptulose-7-phosphate, S7P)、乙酰磷酸 (acetyl-phosphate, AcP)、磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP)、草酰乙酸 (oxaloacetate, OAA)、二羟丙酮 (dihydroxyacetone, DHA)、磷酸二羟丙酮 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP)

合物, 代谢途径整体结构与 rACoAP 类似, 同样是借助 THF 作为辅助因子, 通过引入 THF 循环, 从而实现甲酸和 CO_2 的利用^[8]。该途径有 3 个优点: ①仅通过一个酶, 甘氨酸裂解酶复合体 (glycine cleavage system, GCS) 即可完成中间产物 $\text{CH}_2\text{-THF}$ 向 C_2 甘氨酸的转化, 而 rACoAP 涉及众多辅助酶且许多至今未知。②与丝氨酸途径和 CBB 途径相比, 该途径更加经济节能, 具有高效的甲酸利用能力; 该途径产生 1 分子乙酰 CoA 需要消耗 6 分子甲酸, 而前两者分别需要 11 分子甲酸和 7 分子甲酸^[8]。③该途径的中间产物 (甘氨酸、丝氨酸) 与中心代谢关联较少, 不像 rACoAP (乙酰 CoA) 和丝氨酸途径 (苹果酸、乙醛酸等) 的中间产物与多种代谢有密切联系, 因而可以避免考虑复杂的代谢流。2018 年, Arren Bar-Even 实验室^[100-101]通过在 *E. coli* 中构建 rGlyP, 在体内证明了该途径可以利用 C_1 底物支撑微生物生长。同年, Lee Sang Yup 实验室^[102]在 *E. coli* 中引入 rGlyP 和 FDH (*Candida boidinii*), 首次实现了 *E. coli* 仅利用甲酸和 CO_2 即可轻微生长 (不需要添加葡萄糖)。2020 年先后发表了两篇文章, 通过引入不同来源的酶构建 rGlyP, 引入不同来源的 FDH 达到提供能量和还原力的作用, 均实现了 *E. coli* 利用甲酸作为唯一碳源支撑微生物生长; 2020 年初的文章中, 利用 ALE 实现改造菌株在甲酸和 CO_2 中生长的倍增时间不到 8 h, 生物量达到 2.3 g CDW/mol 甲酸^[93]; Lee Sang Yup 实验室^[103]2020 年中所发表的文章是 2018 年工作的延续, 作者进一步对底盘进行改造, 引入多种来源的 FDH 并调整胞内细胞色素泛素氧化酶 (*bo₃*、*bd-I*) 的表达水平, 最终菌株仅以甲酸和 CO_2 作为碳源, OD 能够在 450 h 达到 7.38 (1.3 L 发酵罐)。关于利用 CO_2 作为主要碳源的研究较少, 现有的两篇通过在 *E. coli* 中引入 CBB 循环固定 CO_2 ; 2016 年 Ron Milo 实验室首次实现 *E. coli* 利用 CO_2 (丙酮酸作为辅助底物) 合成中枢代谢的各种糖类物质, 此时能量部分由丙酮酸所介导的 TCA 循环所提供^[94]; 2019 年, 该实验室利用 CO_2 和甲酸一起作为底物, 结合 ALE, 最终实现 *E. coli* 利用 CO_2 作为唯一碳源支撑生长的目的, 此时由甲酸氧化提供能量^[95]。

此外, 研究发现了几种人工改造的合成型甲酸和 CO_2 利用途径, 目前关于这些途径的研究多聚

焦于体外研究, 没有被大量应用于生物合成。大致可分为 3 类:

(1) 甲酸和 CO_2 作为共同底物 包括丝氨酸-苏氨酸循环 (serine-threonine cycle, STC)、丙酮酸-甲酸裂解酶 (pyruvate formate-lyase, PFL)-苏氨酸循环 (PFL-threonine cycle, PTC)、酮丁酸-甲酸裂解酶 (ketobutyrate formate-lyase, KBFL) 循环 (KBFL cycle, KBFLC)。其中, STC 类似与丝氨酸循环, THF 作为辅助因子, 利用甲酸和固定 CO_2 的方式与之相同, 不同点在于 OAA 裂解形成天冬氨酸而不是 MAL; PTC 循环中甲酸的利用方式不同于 STC 循环, 不需要 THF 作为辅助因子, 甲酸和乙酰 CoA 在 PFL 的作用下直接形成丙酮酸; KBFLC 不同于上述途径, 丙酰-CoA 和甲酸在 KBFL 的作用下 2-酮丁酸, 随后固定无机碳源, 终产物为乙醛酸 (图 3)。

(2) 仅利用甲酸作为底物 如 PFL-磷酸转酮酶 (phosphoketolase, PKT) 循环 (PFL-PKT cycle, PPC), 该途径中, PKT 转化 Xu5P 为酰基磷酸和 G3P, 酰基磷酸可以转化为乙酰 CoA, 从而和甲酸在 PFL 的作用下形成丙酮酸; 此外, 甲酸可还原为甲醛, 从而通过 RuMP、FLS 途径代谢。

(3) 仅以 CO_2 作为底物 巴豆酰基 CoA-乙基丙二酰 CoA-羟基丁酸酰基 CoA (crotonyl-CoA/ethylmalonyl-CoA/hydroxybutyryl-CoA, CETCH) 循环^[104]。由于甲酸和 CO_2 之间的相互转化关系, 赋予了上述途径更加丰富的利用空间。

2.2 谷氨酸棒状杆菌

目前, 关于 *C. glutamicum* 的 C_1 利用研究主要聚焦于甲醇的代谢。2013 年 Bott 实验室^[105]研究发现, *C. glutamicum* 内源存在甲醇转化为 CO_2 的一系列酶, 乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADHA) 可以催化甲醇转变为甲醛, 甲醛可由乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase, ALD) 或以硫醇作为辅因子的 FADH (*adhE*) 转变为甲酸, 随后甲酸经内源 FDH (*fdhF*) 转变为 CO_2 ; 该文章首次完整展示了 *C. glutamicum* 中甲醛脱毒的所有基因, 为后续的改造研究奠定了基础。随后的研究中, 通过敲除 *adhE* 和 ALD, 阻断 *C. glutamicum* 中甲醇至

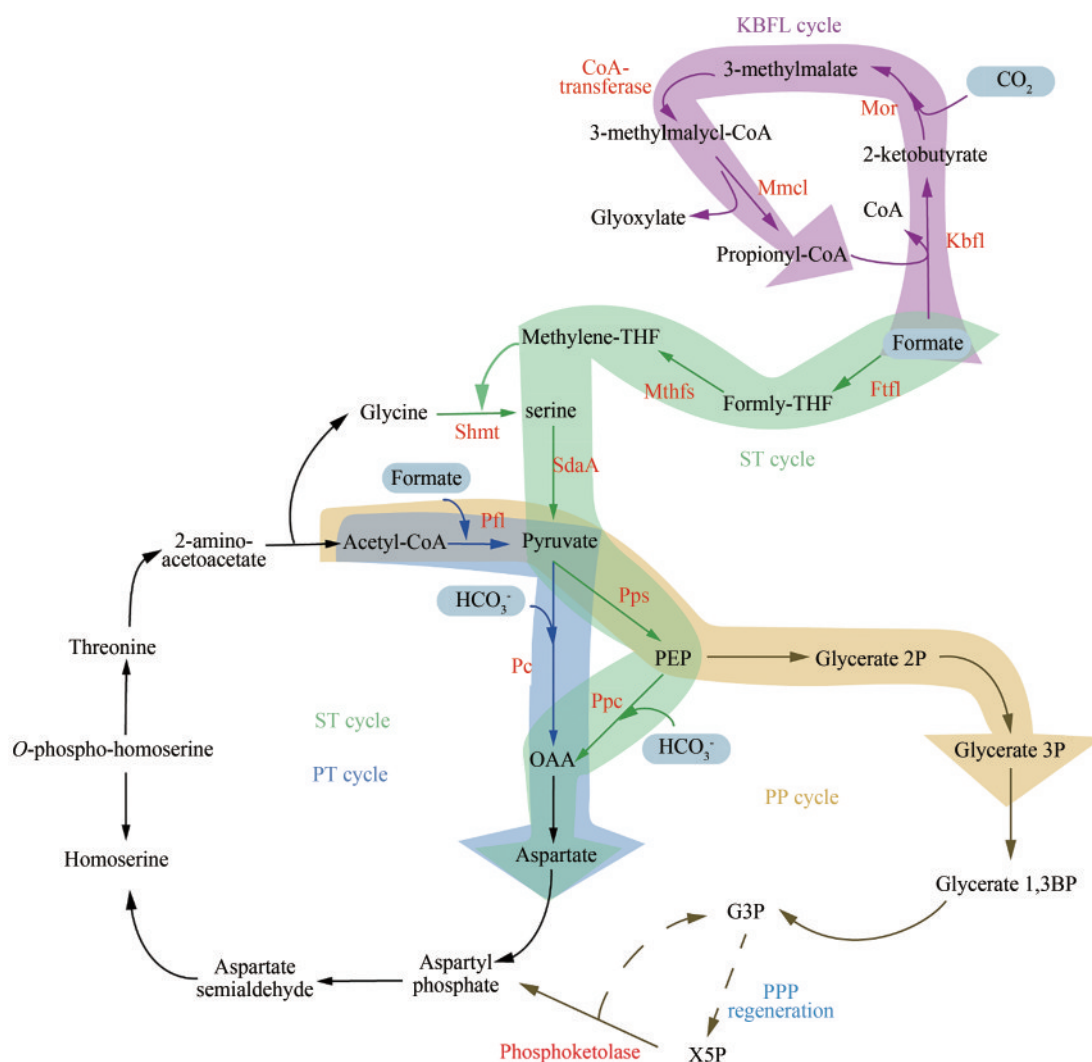


图3 合成甲酸利用途径

Fig. 3 Synthetic metabolic networks for formate utilization

途径 (Pathway): 丝氨酸-苏氨酸 (serine-threonine, ST)、丙酮酸-甲酸裂解酶 & 苏氨酸 (pyruvate formate lyase & threonine, PT)、酮丁酸甲酸裂解酶 (ketobutyrate formate-lyase, KBFL)、丙酮酸-甲酸裂解酶 & 磷酸转酮酶 (pyruvate formate lyase & phosphoketolase, PP);

酶 (Enzyme): 甲酸-THF 连接酶 (formate-THF ligase, Ftf1)、亚甲基-THF 合成酶 (methylene-THF synthase, Mthfs)、丝氨酸-羟甲基转移酶 (serine hydroxymethyltransferase, Shmt)、PEP 羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, Ppc)、PEP 合成酶 (phosphoenolpyruvate synthase, Pps)、丝氨酸脱氨酶 (serine deaminase, SdaA)、丙酮酸-甲酸裂解酶 (pyruvate formate-lyase, Pfl)、丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, Pc)、甲基苹果酸氧化还原酶 (methylmalate oxidoreductase, Mor)、甲基苹果酰-CoA 裂解酶 (methylmalyl-CoA lyase, Mmcl)

CO₂ 的转化途径, 并引入 RuMP, 以葡萄糖或核糖辅助甲醇利用, 利用甲醇合成尸胺^[75]; 以木糖和甲醇作为主要碳源, 生物合成谷氨酸^[76-77]; 2020 年孙际宾团队^[76] 通过适应性进化, 将菌株所耐受的甲醇浓度提高到 15 g/L, 且甲醇与木糖利用率为 7.04 : 1; 大大提高了甲醇的利用效率。但是, 截至目前, 并没有研究实现 *C. glutamicum* 以甲醇作为唯一碳源和能源支撑其生长。

2.3 酿酒酵母

作为真核模式生物, *S. cerevisiae* 具有详细的基因信息, 完善的数据库和多样的基因编辑工具, 被广泛应用于细胞工厂的构建。由于 *S. cerevisiae* 本身对甲醇和甲醛具有更高的耐受性^[106], 因此 *S. cerevisiae* 在 C₁ 的生物转化中具有广阔的应用前景。当前, 仅有少量文献报道了关于合成型“甲醇酵母”的研究, 研究内容停留在 *S. cerevisiae* 的菌株

选择和生长两个方面,没有实现任何一种 C_1 化合物作为唯一底物原材料即可支撑微生物正常生长目的。南京工业大学姜岷实验室^[107]首次在*S. cerevisiae*中引入RuMP和XuMP,赋予其对甲醇的利用能力,但是其在甲醇当中的生长能力有待提高。澳大利亚的Paulsen实验室^[108]结合转录组学数据,对比了两类常见的酵母品系(CEN.PK和S288C)在甲醇当中的生长情况,发现CEN.PK更适用于构建合成型“甲醇酵母”。随后,Paulsen实验室^[109]发表在*Nature Communications*的研究,通过对*S. cerevisiae* CEN.PK113-5D进行适应性进化,发现其具有天然的甲醇利用能力,进化后可在含有甲醇和酵母提取物的培养基中生长。此外,Arren Bar-Even实验室^[110]研究表明,rGlyP在*S. cerevisiae*中具有很强的甲酸代谢能力,该研究首次报道了*S. cerevisiae*通过rGlyP利用甲酸和 CO_2 。因此,根据已有的 C_1 代谢途径重构*S. cerevisiae*代谢底盘,并结合ALE,能够进一步发掘其对 C_1 底物的利用潜力^[111]。

3 结语

本综述总结了基于天然和合成型甲基营养型微生物利用 C_1 底物进行生物合成的主要代谢网络及现有产品。已发掘的天然甲基营养菌大多直接利用甲醇或 CO_2 作为 C_1 底物,通过自身所具有的一磷酸核酮糖途径、丝氨酸途径和还原型乙酰CoA途径,完成 C_1 底物向中枢代谢的转运,产物主要为氨基酸类(如丝氨酸、赖氨酸、谷氨酸等)、PHA或PHB;天然甲醇酵母主要利用一磷酸木酮糖途径,产物除了氨基酸和小分子有机酸,还有他汀类药物。虽然天然甲基营养型微生物能够高效利用 C_1 底物,但是缺乏完善的基因组信息和基因编辑工具,因而在进一步提升底物利用率、目标物产量及产物转化率方面,都具有较大的困难。当前,随着高通量测序和多组学技术的发展,针对已被广泛应用的天然甲基营养型微生物建立数据库,提供更加全面和丰富的基因信息,可以有效提高其生物合成的应用范围;此外,基于天然甲基营养型微生物开发高效的基因编辑工具,提高菌株自身的同源重组效率,可以有效增加其用

于生物合成的操作可行性。近年来,关于毕赤酵母的基因信息和数据库资源日渐丰富,已有多项研究聚焦于优化毕赤酵母的基因编辑方法,如开发高效的CRISPRi(clustered regularly interspaced short palindromic repeat interference)系统^[112-113];敲除Ku70(ATP依赖的DNA解旋酶)^[114]、引入Rad52(DNA修复蛋白)提高非同源重组效率^[115];此外,针对天然甲基营养菌的基因编辑手段也逐渐增多,如优化CRISPRi系统中dCas9启动子^[116]、开发sRNA(small regulatory RNA)系统用于抑制基因表达^[117-118]。合成甲基营养型微生物能够弥补其在基因编辑上的不足,但是却存在 C_1 底物利用效率低的问题,导致微生物不能以甲醇或 CO_2 作为唯一碳源和能源快速生长。当前,虽有少量研究实现*E. coli*利用甲醇或 CO_2 进行生长,但是距离产物合成及工业化应用还有较远的距离。目前,合成型甲基营养微生物的研究策略主要依赖于代谢底盘的改造(如天然甲醇利用途径的引入)、打造全新的代谢途径(如还原型甘氨酸途径,甲醛酶途径)、关键酶的挖掘(如高效MDH的筛选)、适应性进化(如葡萄糖、木糖等多底物偶联进化)等;最近的文章将纳米材料应用于 CO_2 的固定,结合多条已有的 C_1 利用途径,有效提高了 CO_2 的转化效率,展示了纳米材料在生物转化研究中的应用前景^[119],为未来的 C_1 化合物的高效利用提供更有效的思路。

值得注意的是,两种类型的甲基营养型微生物都面临同样的问题,即底物毒性耐受性问题。多种 C_1 底物,如甲烷、甲醇的代谢网络一脉相承,高度的相似性伴随而来的是甲醛毒性的问题,甲醛积累而引起的细胞毒性,是导致微生物不能正常生长的根本原因,也限制了甲基营养微生物底物利用率的提高^[120]。因此加强细胞对毒性物质的代谢能力,或者提高细胞对毒性物质的耐受性,是实现 C_1 底物高效利用的重中之重^[121]。针对这一问题,目前的主要手段均为适应性进化,虽然能够在一定程度上提高微生物的甲醛耐受能力,但是所需时间较长,且现有研究均没有突破甲醛毒性所带来的生长限制;未来,利用多种诱变手段加快进化速度,加强对甲醛致毒机制的剖析,同时结合不同微生物自身的特点(如酵母的区室化效应)^[122],是微生物突破生长瓶颈的有效途径。

总之, 充分提升C₁底物利用率和目标产物转化率, 以生物制造推动新型工业化改革, 对世界经济的可持续发展具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] CLOMBURG J M, CRUMBLEY A M, GONZALEZ R. Industrial biomanufacturing: The future of chemical production[J]. Science, 2017, 355(6320): aag0804.
- [2] 谭天伟, 陈必强, 张会丽, 等. 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 T W, CHEN B Q, ZHANG H L, et al. Accelerate promotion of green bio-manufacturing to help achieve “carbon neutrality”[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2021, 40(3): 1137-1141.
- [3] SINGH A K, KISHORE G M, PAKRASI H B. Emerging platforms for co-utilization of one-carbon substrates by photosynthetic organisms[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 53: 201-208.
- [4] DÜRRE P, EIKMANN B J. C₁-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 35: 63-72.
- [5] KOPKE M, HELD C, HUJER S, et al. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(29): 13087-13092.
- [6] SCHEFFEN M, MARCHAL D G, BENEYTON T, et al. A new-to-nature carboxylation module to improve natural and synthetic CO₂ fixation[J]. Nature Catalysis, 2021, 4(2): 105-115.
- [7] COTTON C A, EDLICH-MUTH C, BAR-EVEN A. Reinforcing carbon fixation: CO₂ reduction replacing and supporting carboxylation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 49-56.
- [8] YISHAI O, LINDNER S N, GONZALEZ DE LA CRUZ J, et al. The formate bio-economy[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2016, 35: 1-9.
- [9] WANG Y, FAN L W, TUYISHIME P, et al. Synthetic methylotrophy: A practical solution for methanol-based biomanufacturing[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(6): 650-666.
- [10] WU Y S, JIANG Z, LU X, et al. Domino electroreduction of CO₂ to methanol on a molecular catalyst[J]. Nature, 2019, 575(7784): 639-642.
- [11] CHISTOSERDOVA L, LIDSTROM M E. Aerobic methylotrophic prokaryotes[M]//ROSENBERG E. The prokaryotes[M]. German: Springer Reference, 2013: 267.
- [12] 高教琪, 周雍进. 甲醇生物转化的机遇与挑战[J]. 合成生物学, 2020, 1(2): 158-173.
GAO J Q, ZHOU Y J. Advances in methanol bio-transformation[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(2): 158-173.
- [13] DEN CAMP H J M O, ISLAM T, STOTT M B, et al. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*[J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(5): 293-306.
- [14] ETTWIG K F, BUTLER M K, LE PASLIER D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. Nature, 2010, 464(7288): 543-548.
- [15] GAO L M, CAI M H, SHEN W, et al. Engineered fungal polyketide biosynthesis in *Pichia pastoris*: a potential excellent host for polyketide production[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 77.
- [16] WRIESSNEGGER T, AUGUSTIN P, ENGLEDER M, et al. Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic engineering of *Pichia pastoris*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 18-29.
- [17] JEONG E, SHIM W Y, KIM J H. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 185: 28-36.
- [18] ZHANG T, GE C Y, DENG L, et al. C₄-dicarboxylic acid production by overexpressing the reductive TCA pathway[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(9): fmv052.
- [19] ARAYA-GARAY J M, FEIJOO-SIOTA L, ROSA-DOS-SANTOS F, et al. Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β -carotene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2483-2492.
- [20] LIU Y Q, TU X H, XU Q, et al. Engineered monoculture and co-culture of methylotrophic yeast for *de novo* production of monacolin J and lovastatin from methanol[J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 189-199.
- [21] LIU Y Q, BAI C X, XU Q, et al. Improved methanol-derived lovastatin production through enhancement of the biosynthetic pathway and intracellular lovastatin efflux in methylotrophic yeast[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2018, 5: 22.
- [22] GIDIJALA L, KIEL J A K W, DOUMA R D, et al. An engineered yeast efficiently secreting penicillin[J]. PLoS One, 2009, 4(12): e8317.
- [23] BRAUTASET T, JAKOBSEN Ø M, JOSEFSEN K D, et al. *Bacillus methanolicus*: a candidate for industrial production of amino acids from methanol at 50 °C[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(1): 22-34.
- [24] JAKOBSEN Ø M, BRAUTASET T, DEGNES K F, et al. Overexpression of wild-type aspartokinase increases L-lysine production in the thermotolerant methylotrophic bacterium *Bacillus methanolicus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(3): 652-661.
- [25] BRAUTASET T, JAKOBSEN Ø M, DEGNES K F, et al. *Bacillus methanolicus* pyruvate carboxylase and homoserine dehydrogenase I and II and their roles for L-lysine production from methanol at 50 °C[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 951-964.
- [26] NÆRDAL I, NETZER R, IRLA M, et al. L-lysine production by *Bacillus methanolicus*: genome-based mutational analysis and L-lysine secretion engineering[J]. Journal of Biotechnol-

- gy, 2017, 244: 25-33.
- [27] NAERDAL I, PFEIFENSCHNEIDER J, BRAUTASET T, et al. Methanol-based cadaverine production by genetically engineered *Bacillus methanolicus* strains[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(2): 342-350.
- [28] IRLA M, HEGGESET T M B, NÆRDAL I, et al. Genome-based genetic tool development for *Bacillus methanolicus*: θ -and rolling circle-replicating plasmids for inducible gene expression and application to methanol-based cadaverine production[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1481.
- [29] IRLA M, NÆRDAL I, BRAUTASET T, et al. Methanol-based γ -aminobutyric acid (GABA) production by genetically engineered *Bacillus methanolicus* strains[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 106: 12-20.
- [30] ORITA I, NISHIKAWA K, NAKAMURA S, et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(8): 3715-3725.
- [31] HU B, LIDSTROM M E. Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* AM1 for 1-butanol production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 156.
- [32] LIM C K, VILLADA J C, CHALIFOUR A, et al. Designing and engineering *Methylobacterium extorquens* AM1 for itaconic acid production[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1027.
- [33] HU B, YANG Y M, BECK D A C, et al. Comprehensive molecular characterization of *Methylobacterium extorquens* AM1 adapted for 1-butanol tolerance[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 84.
- [34] LIANG W F, CUI L Y, CUI J Y, et al. Biosensor-assisted transcriptional regulator engineering for *Methylobacterium extorquens* AM1 to improve mevalonate synthesis by increasing the acetyl-CoA supply[J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 159-168.
- [35] ROHDE M T, TISCHER S, HARMS H, et al. Production of 2-hydroxyisobutyric acid from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 expressing (*R*)-3-hydroxybutyryl coenzyme A-isomerizing enzymes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(3). DOI: 10.1128/aem.02622-16.
- [36] YANG Y M, CHEN W J, YANG J, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid in engineered *Methylobacterium extorquens* AM1 and its reassimilation through a reductive route[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 179.
- [37] YUAN X J, CHEN W J, MA Z X, et al. Rewiring the native methanol assimilation metabolism by incorporating the heterologous ribulose monophosphate cycle into *Methylobacterium extorquens*[J]. Metabolic Engineering, 2021, 64: 95-110.
- [38] MA Z X, ZHANG M, ZHANG C T, et al. Metabolomic analysis improves bioconversion of methanol to isobutanol in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Biotechnology Journal, 2021, 16(6): e2000413.
- [39] SONNTAG F, MÜLLER J E N, KIEFER P, et al. High-level production of ethylmalonyl-CoA pathway-derived dicarboxylic acids by *Methylobacterium extorquens* under cobalt-deficient conditions and by polyhydroxybutyrate negative strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(8): 3407-3419.
- [40] SONNTAG F, KRONER C, LUBUTA P, et al. Engineering *Methylobacterium extorquens* for *de novo* synthesis of the sesquiterpenoid α -humulene from methanol[J]. Metabolic Engineering, 2015, 32: 82-94.
- [41] ZHU W L, CUI J Y, CUI L Y, et al. Bioconversion of methanol to value-added mevalonate by engineered *Methylobacterium extorquens* AM1 containing an optimized mevalonate pathway[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(5): 2171-2182.
- [42] YANG J, ZHANG C T, YUAN X J, et al. Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* AM1 for the production of butadiene precursor[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 194.
- [43] BÉLANGER L, FIGUEIRA M M, BOURQUE D, et al. Production of heterologous protein by *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 231(2): 197-204.
- [44] HÖFER P, CHOI Y J, OSBORNE M J, et al. Production of functionalized polyhydroxyalkanoates by genetically modified *Methylobacterium extorquens* strains[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9: 70.
- [45] SHEN P H, WU B. Over-expression of a hydroxypyruvate reductase in *Methylobacterium* sp. MB200 enhances glyoxylate accumulation[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2007, 34(10): 657.
- [46] SHEN P H, CHAO H J, JIANG C J, et al. Enhancing production of L-serine by increasing the *glyA* gene expression in *Methylobacterium* sp. MB200[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(3): 740-750.
- [47] CHAO H, WU B, SHEN P. Overexpression of the methanol dehydrogenase gene *mxhF* in *Methylobacterium* sp. MB200 enhances L-serine production[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(4): 390-396.
- [48] LI X, WU B, ZHOU K, et al. Deletion of gene *gnd* encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase promotes L-serine biosynthesis in a genetically engineered strain of *Methylobacterium* sp. MB200[J]. Biotechnology Letters, 2019, 41(1): 69-77.
- [49] HÖLSCHER T, BREUER U, ADRIAN L, et al. Production of the chiral compound (*R*)-3-hydroxybutyrate by a genetically engineered methylotrophic bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(16): 5585-5591.
- [50] HAGISHITA T, YOSHIDA T, IZUMI Y, et al. Efficient L-serine production from methanol and glycine by resting cells of *Methylobacterium* sp. strain MN₄₃[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(10): 1604-1607.
- [51] MOTOYAMA H, ANAZAWA H, KATSUMATA R, et al. Amino acid production from methanol by *Methylobacillus glyco-*

- genes* mutants: isolation of L-glutamic acid hyper-producing mutants from *M. glycogenes* strains, and derivation of L-threonine and L-lysine-producing mutants from them[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(1): 82-87.
- [52] ISHIKAWA K, GUNJI Y, YASUEDA H, et al. Improvement of L-lysine production by *Methylophilus methylotrophus* from methanol via the entner-doudoroff pathway, originating in *Escherichia coli*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(10): 2535-2542.
- [53] LYU Z, JAIN R, SMITH P, et al. Engineering the autotroph *Methanococcus maripaludis* for geraniol production[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 577-581.
- [54] KALYUZHNAIA M G, PURI A W, LIDSTROM M E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria[J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 142-152.
- [55] NIELSEN A K, GERDES K, MURRELL J C. Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*[J]. Molecular Microbiology, 1997, 25(2): 399-409.
- [56] WHITAKER W B, SANDOVAL N R, BENNETT R K, et al. Synthetic methylotrophy: engineering the production of biofuels and chemicals based on the biology of aerobic methanol utilization[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33: 165-175.
- [57] HARTNER F S, GLIEDER A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts[J]. Microbial Cell Factories, 2006, 5: 39.
- [58] PARK H, LEE H, RO Y T, et al. Identification and functional characterization of a gene for the methanol: *N,N'*-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase from *Mycobacterium* sp. strain JC1 (DSM 3803)[J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 2): 463-471.
- [59] BYSTRYKH L V, GOVORUKHINA N I, DIJKHUIZEN L, et al. Tetrazolium-dye-linked alcohol dehydrogenase of the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica* is a three-component complex[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 247(1): 280-287.
- [60] NAGY I, VERHEIJEN S, DE SCHRIJVER A, et al. Characterization of the *Rhodococcus* sp. NI86/21 gene encoding alcohol: *N,N'*-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase inducible by atrazine and thiocarbamate herbicides[J]. Archives of Microbiology, 1995, 163(6): 439-446.
- [61] ZHU T C, ZHAO T X, BANKEFA O E, et al. Engineering unnatural methylotrophic cell factories for methanol-based biomanufacturing: challenges and opportunities[J]. Biotechnology Advances, 2020, 39: 107467.
- [62] KROG A, HEGGESET T M B, MÜLLER J E N, et al. Methylotrophic *Bacillus methanolicus* encodes two chromosomal and one plasmid born NAD⁺ dependent methanol dehydrogenase paralogs with different catalytic and biochemical properties[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59188.
- [63] MÜLLER J E N, MEYER F, LITSANOV B, et al. Engineering *Escherichia coli* for methanol conversion[J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 190-201.
- [64] WANG X, WANG X L, LU X L, et al. Methanol fermentation increases the production of NAD(P)H-dependent chemicals in synthetic methylotrophic *Escherichia coli*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 17.
- [65] WU T Y, CHEN C T, LIU J T J, et al. Characterization and evolution of an activator-independent methanol dehydrogenase from *Cupriavidus necator* N-1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(11): 4969-4983.
- [66] WHITAKER W B, JONES J A, BENNETT R K, et al. Engineering the biological conversion of methanol to specialty chemicals in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 49-59.
- [67] ROTH T B, WOOLSTON B M, STEPHANOPOULOS G, et al. Phage-assisted evolution of *Bacillus methanolicus* methanol dehydrogenase 2[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(4): 796-806.
- [68] TSURU D, ODA N, MATSUO Y, et al. Glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: survey of functional groups with special regard for cysteine residues[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(8): 1354-1357.
- [69] GUTHEIL W G, HOLMQUIST B, VALLEE B L. Purification, characterization, and partial sequence of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*: a class III alcohol dehydrogenase[J]. Biochemistry, 1992, 31(2): 475-481.
- [70] VORHOLT J A. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(4): 239-249.
- [71] HATRONGJIT R, PACKDIBAMRUNG K. A novel NADP⁺-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: Screening, purification and characterization[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(7): 557-561.
- [72] MÜLLER J E N, HEGGESET T M B, WENDISCH V F, et al. Methylotrophy in the thermophilic *Bacillus methanolicus*, basic insights and application for commodity production from methanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(2): 535-551.
- [73] RÜBMAIER H, BUCHETICS M, GRUBER C, et al. Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle[J]. BMC Biology, 2015, 13: 80.
- [74] BENNETT R K, GONZALEZ J E, WHITAKER W B, et al. Expression of heterologous non-oxidative pentose phosphate pathway from *Bacillus methanolicus* and phosphoglucose isomerase deletion improves methanol assimilation and metabolite production by a synthetic *Escherichia coli* methylotroph[J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 75-85.
- [75] LEBMEIER L, PFEIFENSCHNEIDER J, CARNICER M, et al. Production of carbon-13-labeled cadaverine by engineered *Corynebacterium glutamicum* using carbon-13-labeled methanol as co-substrate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(23): 10163-10176.
- [76] WANG Y, FAN L W, TUYISHIME P, et al. Adaptive laboratory

- ry evolution enhances methanol tolerance and conversion in engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 217.
- [77] TUYISHIME P, WANG Y, FAN L W, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for methanol-dependent growth and glutamate production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 220-231.
- [78] ZHANG W M, ZHANG T, SONG M, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high yield production of succinic acid driven by methanol[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(12): 2803-2811.
- [79] YU H, LIAO J C. A modified serine cycle in *Escherichia coli* converts methanol and CO₂ to two-carbon compounds[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3992.
- [80] WANG C, REN J, ZHOU L B, et al. An aldolase-catalyzed new metabolic pathway for the assimilation of formaldehyde and methanol to synthesize 2-keto-4-hydroxybutyrate and 1, 3-propanediol in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(11): 2483-2493.
- [81] CHOU A, CLOMBURG J M, QIAN S, et al. 2-Hydroxyacyl-CoA lyase catalyzes acyloin condensation for one-carbon bioconversion[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(9): 900-906.
- [82] BENNETT R K, DILLON M, GERALD HAR J R, et al. Engineering *Escherichia coli* for methanol-dependent growth on glucose for metabolite production[J]. Metabolic Engineering, 2020, 60: 45-55.
- [83] CHEN C T, CHEN F Y H, BOGORAD I W, et al. Synthetic methanol auxotrophy of *Escherichia coli* for methanol-dependent growth and production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 257-266.
- [84] LEE P C, YOON Y G, SCHMIDT-DANNERT C. Investigation of cellular targeting of carotenoid pathway enzymes in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(3/4): 227-233.
- [85] GAO J Q, GAO N, ZHAI X X, et al. Recombination machinery engineering for precise genome editing in methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*[J]. iScience, 2021, 24(3): 102168.
- [86] ANTHONY C. How half a century of research was required to understand bacterial growth on C₁ and C₂ compounds; the story of the serine cycle and the ethylmalonyl-CoA pathway[J]. Science Progress, 2011, 94(Pt 2): 109-137.
- [87] ALBER B E. Biotechnological potential of the ethylmalonyl-CoA pathway[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(1): 17-25.
- [88] BAR-EVEN A. Formate assimilation: the metabolic architecture of natural and synthetic pathways[J]. Biochemistry, 2016, 55(28): 3851-3863.
- [89] KHADEM A F, POL A, WIECZOREK A, et al. Autotrophic methanotrophy in *verrucomicrobia*: *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV uses the Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(17): 4438-4446.
- [90] 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 CO₂[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(2): 210-216.
- [91] CHEN F Y H, JUNG H W, TSUEI C Y, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol[J]. Cell, 2020, 182(4): 933-946.e14.
- [92] BANG J, AHN J H, LEE J A, et al. Synthetic formatotrophs for one-carbon biorefinery[J]. Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 2021, 8(12): 2100199.
- [93] KIM S, LINDNER S N, ASLAN S, et al. Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway[J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16(5): 538-545.
- [94] ANTONOVSKY N, GLEIZER S, NOOR E, et al. Sugar synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*[J]. Cell, 2016, 166(1): 115-125.
- [95] GLEIZER S, BEN-NISSAN R, BAR-ON Y M, et al. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂[J]. Cell, 2019, 179(6): 1255-1263.
- [96] WOOLSTON B M, KING J R, REITER M, et al. Improving formaldehyde consumption drives methanol assimilation in engineered *E. coli*[J]. Nature Communications, 2018, 9: 2387.
- [97] ROHLHILL J, GERALD HAR J R, ANTONIEWICZ M R, et al. Improving synthetic methylotrophy via dynamic formaldehyde regulation of pentose phosphate pathway genes and redox perturbation[J]. Metabolic Engineering, 2020, 57: 247-255.
- [98] SIEGEL J B, SMITH A L, POUST S, et al. Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(12): 3704-3709.
- [99] LU X Y, LIU Y W, YANG Y Q, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1378.
- [100] YISHAI O, BOUZON M, DÖRING V, et al. *In vivo* assimilation of one-carbon via a synthetic reductive glycine pathway in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(9): 2023-2028.
- [101] DÖRING V, DARI E, YISHAI O, et al. Implementation of a reductive route of one-carbon assimilation in *Escherichia coli* through directed evolution[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(9): 2029-2036.
- [102] BANG J, LEE S Y. Assimilation of formic acid and CO₂ by engineered *Escherichia coli* equipped with reconstructed one-carbon assimilation pathways[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(40): E9271-E9279.
- [103] BANG J, HWANG C H, AHN J H, et al. *Escherichia coli* is engineered to grow on CO₂ and formic acid[J]. Nature Microbiology, 2020, 5(12): 1459-1463.
- [104] SCHWANDER T, VON BORZYSKOWSKI L S, BURGNER S, et al. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*[J]. Science, 2016, 354(6314): 900-904.
- [105] WITTHOFF S, MÜHLROTH A, MARIENHAGEN J, et al. C₁

- metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: an endogenous pathway for oxidation of methanol to carbon dioxide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(22): 6974-6983.
- [106] YASOKAWA D, MURATA S, IWAHASHI Y, et al. Toxicity of methanol and formaldehyde towards *Saccharomyces cerevisiae* as assessed by DNA microarray analysis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(6): 1685-1698.
- [107] DAI Z X, GU H L, ZHANG S J, et al. Metabolic construction strategies for direct methanol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1407-1412.
- [108] ESPINOSA M I, WILLIAMS T C, PRETORIUS I S, et al. Benchmarking two *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains for growth and transcriptional response to methanol[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2019, 4(4): 180-188.
- [109] ESPINOSA M I, GONZALEZ-GARCIA R A, VALGEPEA K, et al. Adaptive laboratory evolution of native methanol assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5564.
- [110] GONZALEZ DE LA CRUZ J, MACHENS F, MESSERSCHMIDT K, et al. Core catalysis of the reductive glycine pathway demonstrated in yeast[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(5): 911-917.
- [111] 袁姚梦, 邢新会, 张翀. 微生物细胞工厂的设计构建:从诱变育种到全基因组定制创制[J]. 合成生物学, 2020, 1(6): 656-673.
- YUAN Y M, XING X H, ZHANG C. Progress and prospective of engineering microbial cell factories: from random mutagenesis to customized design in genome scale[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(6): 656-673.
- [112] YANG Y K, LIU G Q, CHEN X, et al. High efficiency CRISPR/Cas9 genome editing system with an eliminable episomal sgRNA plasmid in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 138: 109556.
- [113] WENINGER A, HATZL A M, SCHMID C, et al. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 235: 139-149.
- [114] LIU Q, SHI X N, SONG L L, et al. CRISPR-Cas9-mediated genomic multiloci integration in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 144.
- [115] CAI P, DUAN X P, WU X Y, et al. Recombination machinery engineering facilitates metabolic engineering of the industrial yeast *Pichia pastoris*[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(13): 7791-7805.
- [116] MO X H, ZHANG H, WANG T M, et al. Establishment of CRISPR interference in *Methyloburum extorquens* and application of rapidly mining a new phytoene desaturase involved in carotenoid biosynthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(10): 4515-4532.
- [117] ZHU L P, SONG S Z, YANG S. Gene repression using synthetic small regulatory RNA in *Methyloburum extorquens*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(6): 2861-2875.
- [118] NOH M, YOO S M, YANG D, et al. Broad-spectrum gene repression using scaffold engineering of synthetic sRNAs[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(6): 1452-1461.
- [119] HU G P, LI Z H, MA D L, et al. Light-driven CO₂ sequestration in *Escherichia coli* to achieve theoretical yield of chemicals[J]. Nature Catalysis, 2021, 4(5): 395-406.
- [120] STINGELE J, SCHWARZ M S, BLOEMEKE N, et al. A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair [J]. Cell, 2014, 158(2): 327-338.
- [121] 张卉, 袁姚梦, 张翀, 等. 合成甲基营养细胞工厂同化甲醇的研究进展及未来展望[J]. 合成生物学, 2021, 2(2): 222-233.
- ZHANG H, YUAN Y M, ZHANG C, et al. Research progresses and future prospects of synthetic methylotrophic cell factory for methanol assimilation[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(2): 222-233.
- [122] HAMMER S K, AVALOS J L. Harnessing yeast organelles for metabolic engineering[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(8): 823-832.



通讯作者: 于涛(1986—),男,博士,研究员。主要从事酿酒酵母的合成生物学研究。

E-mail: tao.yu@siat.ac.cn



第一作者: 郭姝媛(1991—),女,博士,博士后。主要从事基于酿酒酵母的甲醇生物转化及产物合成研究。

E-mail: sy.guo@siat.ac.cn