



甲醇微生物转化最新进展

蔡鹏¹, 吴晓燕^{1,2}, 解林峰^{1,2}, 申益维^{1,2}, 高琳惠^{1,2}, 周雍进^{1,2*}

1. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

2. 中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: zhouyongjin@dicp.ac.cn

收稿日期: 2024-07-07; 接受日期: 2024-10-12; 网络版发表日期: 2024-10-21

国家自然科学基金青年基金(编号: 22308352)和中国博士后科学基金面上项目(编号: 2023M733450)资助

摘要 甲醇生物转化是CO₂转化和可再生能源利用的有效方式, 是低碳生物转化研究领域的热点. 然而微生物在甲醇代谢模式下面临甲醇生物毒性大、甲醇耐受性低、代谢适配性差等诸多挑战, 导致了较低的生物合成效率. 本文综述了甲醇微生物转化近年来的研究现状, 重点总结了天然甲基营养型菌株与人工甲基营养型菌株的代谢途径改造与设计, 甲醇代谢过程的理性改造与进化工程策略, 甲醇发酵工艺现状等内容. 最后, 探讨了当前甲醇生物转化面临的挑战, 并为甲醇生物转化的产业化提出了可行的发展方向.

关键词 甲醇生物转化, 甲醇脱氢酶, 甲醛同化, 甲醇细胞工厂, 适应性进化

1 引言

生物制造被被誉为推动“第四次工业革命”的引擎, 也是国家规划的新质生产力的重要发展方向. 因此, 对生物制造产业提出了更加严格的要求, 亟需拓展新型非粮生物转化路线. 甲醇是一种价格低廉、来源广泛的大宗化学品, 我国每年产能近亿吨. 近年来, 基于甲烷或二氧化碳(CO₂)催化大规模制造绿色甲醇的工艺路线不断成熟, 为石化资源的可再生替代提供了稳定保证^[1]. 甲醇具有较高的能量和还原力, 是良好的生物发酵底物, 甲基营养型微生物可以利用甲醇作为碳和能量的唯一来源, 是建立未来甲醇生物转化循环经济的潜在细胞工厂^[2].

采用甲基微生物进行甲醇生物转化研究始于20世纪70年代飞利浦石油公司的单细胞蛋白(single cell

protein, SCP)项目, 随后甲醇酵母长期作为重组蛋白生产的标准菌株, 并积累了丰富的产业化经验^[3,4]. 甲醇细菌的工业潜力则源于其天然的化学品积累能力, 如聚羟基丁酸(polyhydroxybutyrate, PHB)^[5]和L-谷氨酸^[6], 均获得了较高产量. 然而, 受制于遗传背景知识的局限及基因编辑手段的缺乏, 甲醇细胞工厂改造严重滞后, 限制了碳转化效率以及产品谱拓展. 于是, 甲醇生物转化的研究部分转向基于模式生物底盘的人工甲基营养型菌株构建, 然而人工甲基营养型菌株研究同样面临困难, 大部分报道中甚至无法实现甲醇为唯一碳源的生长, 距离化学品生产仍有较大距离^[7]. 此外, 甲醇是一种易挥发且有毒的化合物, 需要针对甲醇的底物特性对生物发酵过程进行全面优化.

本文对甲醇生物转化过程的进展进行了全面综述, 主要包括天然甲醇微生物代谢途径、人工设计甲

引用格式: Cai P, Wu X, Xie L, Shen Y, Gao L, Zhou Y. Advances in microbial bioconversion of methanol. *Sci Sin Chim*, 2024, 54: 2199–2218, doi: 10.1360/SSC-2024-0161

醇代谢途径、甲醇代谢改造策略以及甲醇发酵工艺等,重点探讨了甲醇生物转化过程面临的科学问题,并对未来进行了展望,以期为甲醇生物转化研究提供新的思路。

2 天然甲醇微生物代谢途径

天然利用甲醇的微生物主要分为甲醇细菌和甲醇酵母,具有不同的甲醇代谢模式。其中甲醇细菌分布广泛,最具代表性的菌株为甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)和扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)^[8],而甲醇酵母仅分布于有限的几个属,如毕赤酵母属(*Komagataella*)、汉逊酵母属(*Ogataea*)和假丝酵母属(*Candida*)等,其中最具代表性的菌株为毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)和汉逊酵母(*Ogataea polymorpha*)^[9]。

与葡萄糖代谢时多碳底物分解模式相比,甲醇的生物利用则是通过缩合反应实现碳-碳链的延伸来获得代谢中间体,同时需要消耗部分碳源来提供反应能量,因此甲醇生物转化合成化学品面临更大的挑战。甲醇代谢途径中甲醛是核心物质,其生物毒性大,限制了代谢过程强化。

2.1 甲醇氧化过程

甲醇氧化为甲醛是甲醇代谢的第一步,主要由甲醇细菌中的甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, Mdh)或甲醇酵母中的醇氧化酶(alcohol oxidase, Aox)进行催化(图1)。在甲醇酵母中,Aox是一种含有FAD辅因子的同型八聚体,定位于过氧化物酶体。Aox通过两步氧化还原机制催化甲醇的氧化,首先是还原性半反应,甲醇被氧化,FAD被还原为FADH₂,然后是氧化性半反应,FADH₂被氧气(O₂)再氧化,产生过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂),同时生成甲醛^[10]。Aox对甲醇和氧的亲合力较低,因此*K. phaffii*进化出了严格的甲醇诱导系统,以甲醇为唯一的碳和能量来源生长时,会大量合成Aox蛋白^[11]。

Mdh根据电子受体不同主要分为革兰氏阴性菌的吡咯喹啉醌(pyrrro-quinoline quinone, PQQ)依赖型Mdh、革兰氏阳性菌的NAD依赖型Mdh两大类。在*M. extorquens*中,Mdh具有异四聚体 $\alpha_2\beta_2$ 结构,其中每个 α -亚基含有一个Ca²⁺离子和一个PQQ作为辅基^[12]。在

甲醇氧化过程中,Mdh结合的PQQ所吸收的电子被转移到独特的细胞色素c_L上,然后进一步通过I型细胞色素c_H转移到细胞色素c氧化酶上,最终转移到O₂上^[5]。PQQ依赖型Mdh需要特定的细胞质区域,在*M. extorquens*中PQQ生物合成的6个基因位于两个不同的簇中^[13]。大多数模式微生物缺乏复杂的PQQ生物合成途径^[14],限制了其在甲醇细胞工厂中的应用。在*B. methanolicus*等菌株中Mdh使用紧密连接的NAD作为辅因子,另外含有Ca²⁺和Mg²⁺用于增加辅酶亲和力。NAD依赖型Mdh位于细胞质中,通常为十聚体结构^[15]。NAD依赖型Mdh催化过程遵循Ping-Pong类型的反应机制,其中NAD(H)辅因子用作临时电子载体,底物的结合和产物的释放交替进行^[16]。NAD依赖型Mdh使用常规辅因子且没有特定的区域限制,因而广泛用于合成甲基营养菌株构建。

2.2 甲醛的同化

在甲醇细菌和甲醇酵母中发现主要存在3种不同的甲醛同化代谢途径:核酮糖单磷酸(ribulose monophosphate, RuMP)途径、木酮糖单磷酸(xylulose monophosphate, XuMP)途径和丝氨酸循环(Serine cycle)(图1)。

在*B. methanolicus*等甲醇细菌中甲醛通过RuMP循环途径被同化,其中甲醛首先通过3-己糖-6-磷酸合酶(3-hexulose-phosphate synthase, Hps)与5-磷酸核酮糖(ribulose 5-phosphate, Ru5P)缩合,然后在6-磷酸-3-己糖异构酶(6-phospho-3-hexuloisomerase, Phi)催化下异构形成果糖6-磷酸(fructose 6-phosphate, F6P),经RuMP循环最终进入中心碳代谢^[7]。在*K. phaffii*等甲醇酵母中甲醇氧化生成的甲醛一部分直接与5-磷酸木酮糖(xylulose 5-phosphate, Xu5P)进行反应,在二羟基丙酮合酶(dihydroxyacetone synthase, Das)催化下生成二羟基丙酮(dihydroxyacetone, DHA)和3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde 3-phosphate, GAP)。Das是一种硫胺素焦磷酸(thiamine pyrophosphate, TPP)依赖型转酮醇酶,催化产物GAP可直接进入中心代谢用于细胞或产物合成。两种途径都利用非氧化磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)进行五碳糖的再生^[17]。

丝氨酸循环首先在*M. extorquens* AM1中发现,该途径中核心一碳供体为亚甲基四氢叶酸,可以与甘氨酸缩合生成丝氨酸,随后经丝氨酸循环进入中心代谢。

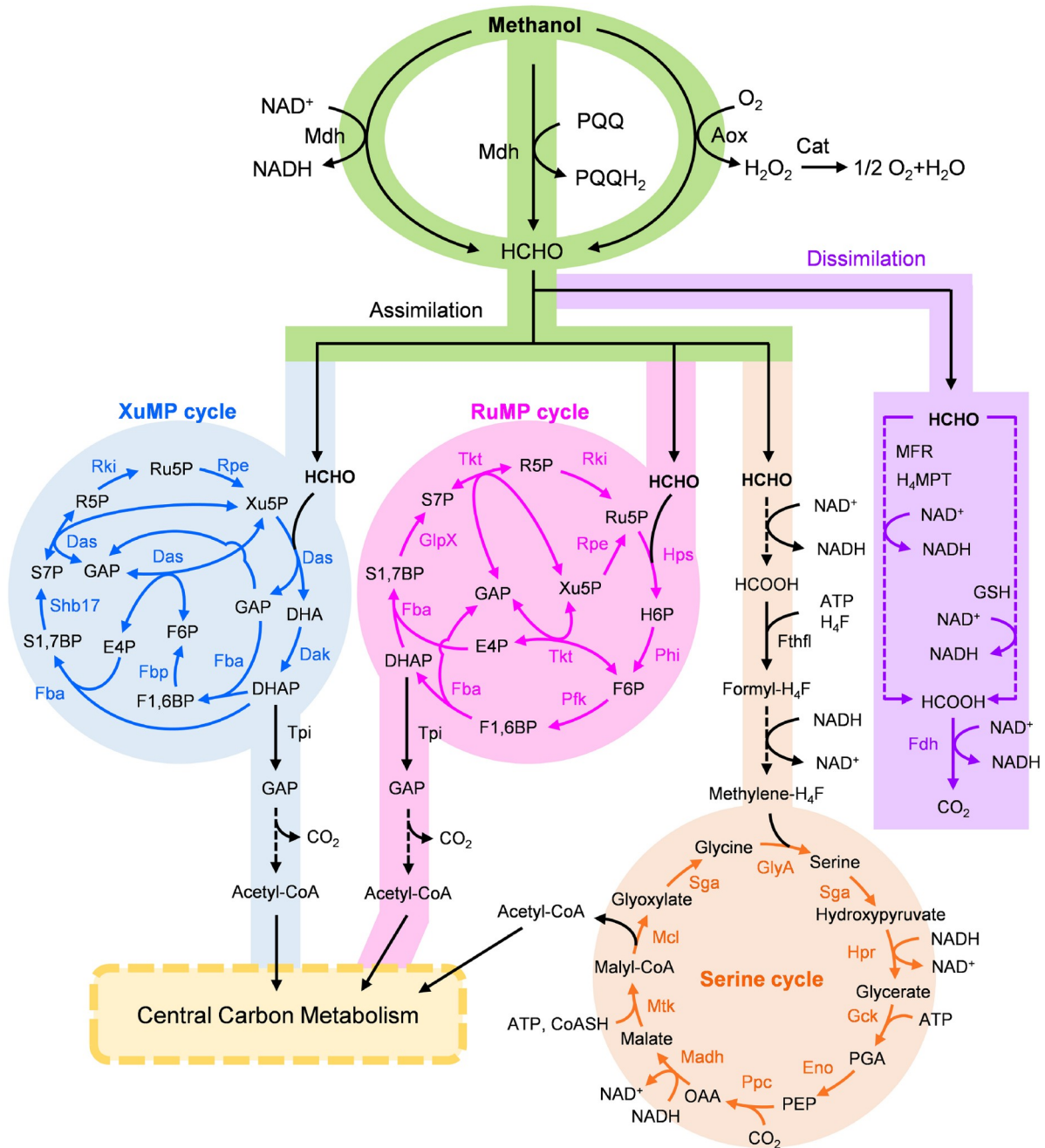


图 1 (网络版彩图)天然甲醇代谢途径。

Figure 1 (Color online) Natural methanol metabolism pathway. Abbreviations: Aox, alcohol oxidase; Mdh, methanol dehydrogenase; PQQ, pyrroloquinoline quinone; Xu5P, xylulose-5-phosphate; Das, dihydroxyacetone synthase; DHA, dihydroxyacetone; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; Dak, dihydroxyacetone kinase; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; Tpi, Triosephosphate isomerase; Fba, fructosebiphosphate aldolase/sedoheptulose-bisphosphate aldolase; F1,6BP, fructose-1,6-bisphosphate; Fbp, fructose biphosphatase; F6P, fructose-6-phosphate; E4P, erythrose-4-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; S1,7BP, sedoheptulose-1,7-bisphosphate; Shb17, sedoheptulose biphosphatase; R5P, ribose-5-phosphate; Rki, Ribose-5-phosphate ketol-isomerase; Ru5P, ribulose-5-phosphate; Rpe, ribulose-phosphate 3-epimerase; Hps, 3-hexulose-6-phosphate synthase; H6P, hexulose-6-phosphate; Phi, 6-phospho-3-hexuloisomerase; Tkt, transketolase; Pfk, 6-phosphofructokinase; GlpX, bifunctional fructose bisphosphatase/sedoheptulose biphosphatase; Fthfl, formate THF ligase; GlyA, serine hydroxymethyltransferase; Sga, serine glyoxylate aminotransferase; Hpr, hydroxypyruvate reductase; Gck, glycerate kinase; PGA, 2-phosphate-glycerate; Eno, enolase; PEP, phosphoenolpyruvate; Ppc, phosphoenolpyruvate carboxylase; OAA, oxaloacetate; Madh, malate dehydrogenase; Mtk, malate thiokinase; Mcl, malyl-CoA lyase; H4MPT, tetrahydromethanopterin; MFR, methanofuran; GSH, glutathione; Fdh, formate dehydrogenase.

亚甲基四氢叶酸可以通过直接或间接途径合成, 直接途径中甲醛直接与四氢叶酸(tetrahydrofolic acid, H_4F)自发缩合生成亚甲基四氢叶酸. 间接途径是亚甲基- H_4F 生成的主要途径, 该途径中甲醛在甲酸四氢叶酸连接酶(formyl- H_4F ligase, FtfL)催化下, 经四氢甲基蝶呤(tetrahydromethanopterin, H_4MPT)依赖途径与 H_4F 发生ATP依赖的缩合, 产生的甲酰基 H_4F 在亚甲基 H_4F 环化水解酶(methenyl- H_4F cyclohydrolase, Fch)的催化下转化为甲基 H_4F , 随后由NAD(P)依赖型亚甲基- H_4F 脱氢酶(methylene- H_4MPT /methylene- H_4F dehydrogenase, MtdA)催化转化为亚甲基- H_4F . 亚甲基- H_4F 与甘氨酸在丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, GlyA)催化下生成丝氨酸, 随后通过一系列与糖异生和TCA循环部分共享的催化步骤生成苹果酸, 经苹果酸硫激酶(malate thiokinase, MtkAB)生成苹果酰辅酶A(Malyl-CoA). Malyl-CoA经苹果酰辅酶A裂解酶(Malyl-CoA lyase, Mcl)催化生成乙酰CoA和乙醛酸. 乙酰CoA通过乙基丙二酰辅酶A途径进入中心代谢, 而乙醛酸通过再生为甘氨酸进入下一个循环^[5,13].

天然甲醇代谢途径分布广泛, 不同菌株代谢特点差异显著, 不同菌株基于三种主要甲醇代谢途径的生长参数如表1所示^[18-27]. 其中, 来源于*B. methanolicus*等甲醇细菌中的RuMP途径在物质和能量利用效率上具有一定优势, 且*B. methanolicus*等甲醇细菌能够耐受较高的温度, 因此能够以甲醇以较快的生长速率进行生物量的积累(表1), 在单细胞蛋白生产领域具有一定的应用潜力.

2.3 甲醛异化

甲醇酵母的甲醛异化过程中, 甲醛与还原形式的谷胱甘肽发生非酶促反应, 生成S-羟甲基谷胱甘肽(S-

hydroxymethylglutathione, GS- CH_2OH), 随后通过谷胱甘肽依赖性氧化途径, 包括NAD和谷胱甘肽依赖型甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, Fld)、S-甲酰谷胱甘肽水解酶(S-formylglutathione hydrolase, Fgh)和NAD依赖型甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, Fdh)的催化, 最终氧化为 CO_2 . 在*M. extorquens* AM1中甲醇脱氢酶产生的甲醛进一步被 H_4MPT 依赖途径氧化, 最终甲酸也在Fdh的催化下生成 CO_2 . *M. extorquens* AM1中存在三种非同源的甲酸脱氢酶: Fdh1、Fdh2和Fdh3. 无论甲醇酵母还是甲醇细菌中, 甲醛氧化每生成1分子 CO_2 的同时生成2分子NADH, 因此甲醛异化途径兼具了解毒与提供能量的功能.

3 人工甲醇代谢途径设计

天然甲基营养型微生物分布广泛, 具有丰富的一碳代谢途径, 为合成甲基营养细胞工厂构建提供了重要参考. 然而天然甲醇代谢途径存在代谢速率慢、利用效率低的问题, 导致微生物难以利用甲醇为唯一碳源高效生成生物量或化学品. 例如, 在RuMP循环中, 甲醛与Ru5P缩合后经一系列反应生成丙酮酸, 丙酮酸脱羧成乙酰CoA过程中释放一分子 CO_2 , 导致最大理论碳得率为67%^[8]; 利用CBB循环去固定甲醇氧化产生的 CO_2 , 需要消耗大量的ATP^[28]; 丝氨酸途径也需要额外的ATP供应来平衡和驱动热力学反应^[29].

为了提高碳转化效率, 降低能量消耗, 目前已经开发出许多人工甲醇同化途径, 以期弥补天然途径的不足, 实现更高效的甲醇生物转化. 人工创制途径包括甲醇缩合循环(methanol condensation cycle, MCC)、甲醛酶(formolase, Fls)途径、修饰丝氨酸循环(modified serine cycle, MSC)、高丝氨酸循环(homoserine

表 1 甲醇微生物甲醇培养时生长参数

Table 1 Growth parameters of methylophilic microorganisms cultivated on methanol as a C-source

Assimilation pathway	Strain	Biomass productivity (g _{CDM} L ⁻¹ h ⁻¹)	Dry cell weight (DCW, g L ⁻¹)	Cell yield in g _{CDM} /g _{MeOH}	Specific maximum growth rate μ_{max} (h ⁻¹)
XuMP cycle	<i>K. phaffii</i> <i>O. polymorpha</i>	0.26~11.6 ^[18,19]	26.6~105 ^[18-20]	0.43 ^[20]	0.15 ^[21]
RuMP cycle	<i>B. methanolicus</i> , <i>Methylophilus methylotrophus</i>	28.4 ^[18,22,23]	30~144 ^[18,22,23]	0.48~0.55 ^[18,22,23]	0.25~0.55 ^[18,22]
Serine cycle	<i>M. extorquens</i> , <i>Methylobacterium organophilum</i>	1.2~3.6 ^[24,25]	56.1~172 ^[24,26]	0.28~0.34 ^[24,27]	0.19 ^[24]

cycle)、羟酰辅酶A裂解酶(2-hydroxyacyl-CoA lyase, Hcl)途径、合成型乙酰CoA(synthetic acetyl-CoA, SACA)途径和赤藓糖单磷酸(erythrulose monophosphate, EuMP)循环等(图2)。

3.1 甲醇缩合循环

MCC途径通过将RuMP循环与非氧化性糖醇解相结合, 通过碳守恒和ATP不依赖的催化过程将甲醇转化为乙酰CoA衍生物^[28]。两个甲醛与两个Ru5P缩合进入同化途径生成乙酰CoA是MCC的核心。其中甲醛被RuMP循环同化生成F6P或Xu5P, 最后经F6P (F6P-phosphoketolas, Fpk)或X5P (X5P-phosphoketolase, Xpk)的催化生成乙酰磷酸, 最后经磷酸乙酰转移酶(phosphate acetyltransferase, Pta)催化形成乙酰CoA, 裂解下的磷酸糖继续转化为Ru5P进入下一个循环。MCC途径避免了由丙酮酸脱羧过程生成乙酰CoA, 具有高度的碳守恒性和ATP不依赖性, 大大提高了甲醇的碳转化效率。此外NAD依赖的甲醇脱氢酶催化甲醇氧化过程生成的NADH可以作为还原力驱动高级醇的生成, 在体外酶催化体系中成功将甲醇转化为乙醇或正丁醇。因此, MCC具有良好的工业应用潜力, 但尚未有效证实该途径在微生物细胞内的应用效果。

3.2 甲醛酶途径

研究人员在计算辅助蛋白质设计指导下, 基于卡宾催化剂ThDP催化原理, 人工创制了甲醛缩合酶Fls, 可以催化3分子甲醛聚合生成1,3-二羟基丙酮。1,3-二羟基丙酮进一步被二羟基丙酮激酶(dihydroxyacetone kinase, Dhak)磷酸化生成二羟基丙酮磷酸(dihydroxyacetone phosphate, DHAP)^[30]。FLS途径通过极少的催化步骤可将一碳(one carbon, C1)化合物快速同化至中心碳代谢网络, Fls酶的设计理念也开创了人工设计C1化合物高效代谢元件的先例, 并构建了全新的C1化合物同化途径, 且已成功应用于CO₂的固定。然而, 装载FLS途径的人工甲基营养型大肠杆菌(*Escherichia coli*)工程菌株仍然无法在以甲醇为唯一碳源最小成分培养基中生长^[31]。

3.3 修饰丝氨酸循环

丝氨酸循环途径是一种氧不敏感的C1同化途径, 可以将多种C1底物转化为乙酰CoA。修饰丝氨酸循环

(MSC)途径正是通过对来自*M. extorquens*的天然丝氨酸循环进行优化设计而来, 并在*E. coli*中进行了重构。MSC途径使用NAD依赖的甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, Faldh)简化了天然异化途径中甲醛氧化为甲酸盐的过程。与天然丝氨酸循环不同, 修饰丝氨酸循环使用丙氨酸而非丝氨酸作为氨基供体, 在丙氨酸-乙醛酸转氨酶(alanine-glyoxylate transaminase, Agt)催化下将乙醛酸与丙氨酸通过转氨作用形成甘氨酸。接着在丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, Shmt)催化下与来自甲醇的一碳供体亚甲基-H₄F发生缩合反应生成丝氨酸。丝氨酸通过丝氨酸脱水酶(serine dehydratase, Sdh)脱氨生成丙酮酸, 并进一步再生磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP), 随后以此转化为草酰乙酸和苹果酸, 最后在苹果酸硫激酶(malate thiokinase, Mtk)催化下生成乙酰CoA, 同时再生乙醛酸, 完成循环。修饰丝氨酸循环使用内源性谷氨酸-丙酮酸转氨酶(glutamate-pyruvate transaminase, Gpt)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, Gldh)进行氨同化。MSC途径消耗2个NADH、1个NADPH和3个ATP产生一个乙酰CoA^[32]。理论上, MSC途径可以赋予大肠杆菌以甲醇或甲酸盐为唯一碳源生长, 然而, 带有MSC途径的大肠杆菌工程菌仍依赖木糖或葡萄糖等辅助碳源进行C1化合物生物转化。

3.4 高丝氨酸循环

高丝氨酸循环途径(homoserine cycle)是以天然丝氨酸循环为基础, 基于最大化生物质产量和热力学有利性人工设计获得。主要核心反应依赖于两种混杂的甲醛凝聚醛缩酶——大肠杆菌内源丝氨酸醛缩酶(serine aldolase, Sal)和4-羟基-2-氧代丁酸酯醛缩酶(4-hydroxy-2-oxobutanoate aldolase, Hal)。在高丝氨酸循环中Sal催化甘氨酸直接与甲醛缩合生成丝氨酸, Sal催化反应绕过了亚甲基-H₄F, 然后丝氨酸被丝氨酸脱氨酶(serine deaminase, Sda)脱氨为丙酮酸, 避免了更长的甘油酸途径以及有毒中间体的生成。然后丙酮酸与甲醛在Hal作用下再次缩合生成非天然代谢物4-羟基-2-氧代丁酸酯(4-hydroxy-2-oxobutanoate, HOB), 随后经转氨酶(HOB aminotransferase, Hat)催化生成高丝氨酸。高丝氨酸经高丝氨酸激酶(homoserine kinase, Hsk)和苏氨酸合酶(threonine synthase, Ts)连续催化产生苏氨

Figure 2 (Color online) Synthetic metabolic networks of methanol. (a) Methanol condensation cycle, MCC; (b) modified serine cycle, MSC; (c) homoserine cycle; (d) erythrulose monophosphate pathway, EuMP; (e) formolase pathway, FLS; (f) synthetic acetyl-CoA pathway, SACA); (g) 2-hydroxyacetyl CoA lyase pathway, HACL.

酸. 最后, 苏氨酸被苏氨酸醛缩酶(threonine aldolase, Lta)裂解, 再生甘氨酸并产生乙醛, 乙醛可以进一步氧化为乙酰CoA进入中心代谢^[33]. 高丝氨酸循环有效利用甲醛同化反应取代了羧化反应, 并且与中枢代谢正交, 避免了复杂的代谢调节. 高丝氨酸循环途径只消耗1分子ATP生成乙酰CoA, 其效率优于修饰丝氨酸循环MSC. 然而目前醛缩酶催化活力较低, 未来采用蛋白质工程策略进一步提高其活力, 有望实现C1化合物经高丝氨酸循环途径高效生产乙酰CoA衍生化学品.

3.5 2-羟酰基CoA裂解酶途径

2-羟酰基-CoA裂解酶(2-hydroxyacyl CoA lyase, Hael)是一种参与哺乳动物 α -氧化的酶, 可催化不同链长的羧基分子和甲酰-CoA反应生成延长一个碳单元的2-羟酰基-CoA. 因此, HACL途径被设计用于全细胞生物转化系统中同化C1底物, 且不需要额外的能量输入. 甲醛可以通过酰基CoA还原酶(acyl-CoA reductase, Acr)转化为甲酰CoA. 甲醛与甲酰CoA在Hael催化下与甲醛发生缩合反应, 生成乙二醇酰基CoA, 随后被Acr还原形成乙醇醛, 再经醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, Adh)还原为乙醇酸盐, 进而可以作为细胞生长的底物^[7,34]. 该途径在动力学上有利, 具有一定的C1化合物生物转化潜力.

3.6 合成乙酰CoA途径

上述人工甲醇同化途径很大程度上与天然甲醇代谢网络重叠, 因此人工设计途径与内源代谢途径之间物质分配存在竞争挑战. 合成乙酰CoA途径(synthetic Acetyl-CoA, SACA)则仅通过4个步骤即可从甲醇生物合成乙酰CoA, 且不与已知甲醇代谢网络重叠. 首先, 甲醇被Mdh氧化为甲醛. 随后, 通过乙醇醛合酶(glycolaldehyde synthase, Gals)将两分子甲醛缩合成乙醇醛, 再经乙酰磷酸合酶(acetyl-phosphate synthase, Acps)以无机磷酸盐为辅因子生成乙酰磷酸(acetyl-phosphate, Acp). 最终, Acp在磷酸乙酰转移酶(acetyltransferase, Pta)催化下合成乙酰CoA进入中心代谢^[35]. SACA途径中, 甲醛转化为乙酰CoA在热力学上非常有利^[29]. 然而, 由于Gals和Acps的催化活性较低, 在大肠杆菌中SACA途径没有明显的甲醇利用效果, 该途径在工业宿主中的应用仍然是一个挑战.

3.7 单磷酸赤藓酮糖循环

单磷酸赤藓酮糖循环(erythrulose monophosphate, EuMP)的起始步骤为赤藓酮糖1-磷酸合成酶(erythrulose 1-phosphate synthase, Eps)催化的DHAP与甲醛的缩合反应, 生成一个四碳化合物——赤藓糖1磷酸(erythrulose 1-phosphate, Eu1P), 产物可以有D型或L型, D型产物在D-赤藓糖1-磷酸3-差向异构酶(D-erythrulose 1-phosphate 3-epimerase, EryC)催化下转化为L-Eu1P. 随后, 在L-赤藓糖1-磷酸异构酶(L-erythrulose 1-phosphate isomerase, LerI)和D-赤藓糖4-磷酸异构酶(D-erythrulose 4-phosphate isomerase, DerI)催化的连续异构化反应下, L-Eu1P转化为D-赤藓糖4-磷酸(E4P), 随后经PPP和糖酵解途径反应生成GAP, 同时再生DHAP^[36]. EuMP具有高效节能的特点, 理论上经三次循环可以由3分子甲醛生成1分子三碳化合物GAP. 然而, 该途径需要的代谢步骤较多, 且体内验证仍需要木糖作为辅助碳源.

当前, 人工设计的甲醇代谢途径大多数仅在体外多酶反应体系中实现了甲醇的同化, 而在细胞工厂实际应用中未得到有效验证. 其存在的主要问题是与底盘细胞的适配性, 细胞内复杂的代谢环境与众多代谢物可能干扰人工途径元件的催化过程, 降低了甲醇的生物转化效率. 未来仍然需要进一步解析甲醇代谢关键元件的催化机制, 强化代谢元件的环境适应性, 使其适用于不同底盘的胞内微环境, 发挥最大的催化效率. 另一方面还需考察途径各元件或代谢模块之间的适配性, 解析甲醇代谢途径的调控规律, 为人工甲醇代谢新途径的创制提供理论指导.

4 甲醇代谢理性改造

尽管天然甲基营养型菌株能够利用甲醇作为唯一原料进行生长, 但过去受制于对其遗传背景、生理过程以及代谢调控认知的不足, 以及遗传操作工具的缺乏, 甲基营养型菌株长期仅用于转化甲醇合成单细胞蛋白、PHB和氨基酸等少数产物. 虽然近年来, 甲醇酵母基因编辑工具有了较大的发展, 但天然甲醇代谢菌株改造经验积累依然十分有限. 对于甲醇细胞工厂的研究逐渐发展出人工甲基营养型的思路, 即在模式生物中人工构建和优化甲醇代谢途径^[7]. 尽管目前人

工甲基营养型菌株所报道的甲醇利用率通常比其天然菌株低1~2个数量级,但模式生物清晰的遗传背景及代谢规律使其在改造策略评估方面有着诸多优势,大量在人工合成甲基营养型菌株构建方面的努力同样为天然甲醇细胞工厂的改造提供了宝贵的借鉴。

4.1 甲醇氧化效率改善

通常在甲醇细菌中Mdh负责甲醇代谢的第一步,其较低的催化活性是限制甲醇代谢效率提升的关键因素之一。此外,异源基因与宿主底盘存在着适配性问题,进一步凸显了高效元件筛选在甲醇代谢研究中的重要性。在*E. coli*中异源表达不同来源的Mdh蛋白,筛选性能最佳的甲醇脱氢酶,能够有效提高人工甲基营养型*E. coli*的甲醇利用效率^[37,38]。Mdh存在内源性的激活蛋白,属于Nudix水解酶家族,能够与Mdh相互作用导致构象变化,使NAD和甲醇结合更紧密,从而有利于实现电子转移。过表达来自*B. methanolicus*的Act蛋白或来自*E. coli*的NudF,在调节甲醇利用方面均存在积极作用^[39]。人工合成甲基营养型*E. coli*的甲醇消耗速率达到每小时 7.7 mg L^{-1} ^[40]。甲醇酵母通常使用Aox来催化甲醇氧化,然而该过程生成 H_2O_2 ,造成了电子的浪费。针对这一问题,Zhan等^[41]在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)中设计了一种由Aox(来自*K. phaffii* X-33)和Mdh3(来自*B. methanolicus*, 伴随Act1激活蛋白)组成的甲醇氧化“双催化引擎”系统,成功构建*S. cerevisiae*人工甲基营养型细胞,实现了在1%甲醇为唯一碳源的MM培养基中生长。与Aox-XuMP单途径菌株相比,含有甲醇氧化双引擎重组菌株的最终生物量和甲醇利用率分别增加了28%和152%。在*K. phaffii*中,1分子甲醛经异化途径能够高效地生成2分子NADH,进行甲醛解毒的同时,为细胞提供能量和还原力。然而*S. cerevisiae*中甲醛的异化过程显著弱于*K. phaffii*,因此使用BmMdh3催化甲醇氧化的同时生成NADH,可以在一定程度上保护甲醇中的电子。另一方面,Aox的甲醇氧化效率比BmMdh3高2.3倍,在“双催化引擎”系统中Aox可以提供更多的甲醛用于同化。最近一项关于酵母甲醇同化的研究中,在*Yarrowia lipolytica*中构建了由甲醇细菌RuMP通路和部分甲醇酵母XuMP通路组成的嵌合途径,该人工甲基营养型菌株在葡萄糖和甲醇的混合培养基中72 h消耗了 0.42 g L^{-1} 甲醇^[42]。部分酵母XuMP途径驱动的快

速甲醛同化缓解了BsMdh催化的热力学不利的甲醇氧化反应。

NAD依赖型Mdh的异源催化效率十分有限,一方面由于其对甲醇底物亲和力较差,反而更容易催化更长链的醇类,如丙醇和丁醇^[43]。另一方面,Mdh的甲醛还原活性远超过甲醇氧化活性。对来自*B. methanolicus*的6种Mdh进行酶动力学测试发现,其对于甲醛的亲和力比甲醇高24~330倍,对应的催化效率高970~4500倍^[38]。这表明下游甲醛同化途径必须足够有高效,才能驱动Mdh催化甲醇氧化反应,同时避免甲醛在细胞中的积累。

4.2 甲醇同化途径碳通量优化

甲醇细菌来源的RuMP通路是*E. coli*和谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)等模式宿主中构建人工甲基型细胞最常用的途径。由于RuMP和XuMP甲醇同化途径能够形成代谢循环,因此途径中戊糖-5-磷酸化化合物的再生对提高整个途径的效率至关重要。多项研究均证实*E. coli*中Ru5P的再生不足以维持甲醇的高效同化。针对这一问题目前主要通过两种策略来增强甲醛同化循环。第一种策略是调节非氧化PPP途径。由于RuMP和XuMP循环与PPP途径共享大多数步骤,从理论上讲,只需要Hps和Phi两种酶即可同化甲醛。通过引入异源的非氧化PPP途径,以及敲除磷酸葡萄糖异构酶(glucose phosphate isomerase, Pgi)基因和甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, FrmA)基因,增加甲醛受体Ru5P的再生,显著改善了甲醇同化^[44]。第二种策略是弱化下游糖酵解途径。在工程化大肠杆菌MG1655 $\Delta frmA \Delta talA \Delta talB$ 中使用碘乙酸盐抑制其GAP下游的糖酵解途径,结合景天庚酮糖二磷酸酶(sedoheptulose biphosphatase, *glpX*)基因的过表达,使细胞内的Ru5P含量增加4倍,同时甲醛积累减少3倍,¹³C标记证实甲醇同化能力提高了2倍^[45]。

甲基营养微生物的甲醇异化途径是应对甲醛生物毒性的一种保护机制,同时生成NADH为细胞提供一定的能量。然而,解毒过程通常导致甲醇过度异化生成 CO_2 ,造成严重碳损失,进而影响目标化学品得率。有研究显示在分批补料发酵期间,甲醇经异化途径的碳通量甚至可以达到70%以上^[46]。然而,甲醇异化途径的完全阻断会导致甲醛快速积累,从而抑制整个细胞活力,不利于甲醇代谢^[47,48]。为了平衡甲醇同化、

细胞解毒以及能量供应三方面的物质分配, 必须对异化途径进行精准微调. 利用 *E. coli* 天然的甲醛诱导启动子 P_{frm} 及 *frmRAB* 操纵子^[49] 可以构建一套甲醛传感器 P_{frm} -*FrmR*, 对 *MDH*、*HPS* 和 *PHI* 基因的表达水平进行动态调控, 该系统利用甲醇合成生物质产量高达 0.35 g_{CDW}/g_{甲醇}^[50]. 然而, 在甲醇酵母中通常缺乏类似的生物传感器, 为了将甲醛异化途径调整至更合理的水平, Wu 等^[51] 采用启动子工程下调了 *K. phaffii* 异化途径关键基因 *FLD* 的转录水平, 该策略将甲醇生物转化合成 3-羟基丙酸的产量提高了 12% (图3). 调节甲醇氧化、甲醛同化及甲醛异化之间的平衡对于提高甲醇利用率至关重要. 未来在甲醇酵母中开发高效且灵敏的甲醇传感器系统, 根据细胞内甲醛浓度实时变化情况, 利用动态调控机制调节同化与异化途径的碳分配, 有望实现甲醇高效利用.

4.3 代谢途径的空间布局

与原核生物相比, 真核生物拥有亚细胞器, 区室化将有毒中间体与细胞其他部分隔离, 同时提高酶底物浓度和建立代谢通道效应. 甲醇酵母的甲醇代谢途径主要定位于过氧化物酶体, 并且过氧化物酶体在甲醇下诱导大量增殖. *K. phaffii* 的过氧化物酶体实际上含有甲醇同化所需的整套酶^[52] 系统, 其中 *Das* 可以催化甲醛与 Xu5P 聚合, 未被同化的甲醛会从过氧化物酶体溢出至细胞质进行异化反应. 这种自然进化的空间隔离能保甲醛在细胞中的最大化利用, 同时保持细胞的稳健性.

在甲醇酵母和 *S. cerevisiae* 中存在着类似的过氧化物酶体调控机制, 均由 *PEX* 基因家族控制过氧化物酶体的大小和数量以及跨过氧化物酶体膜的蛋白质输入^[53-55]. Zhan 等^[41] 在 *S. cerevisiae* 中敲除过氧化物酶体蛋白基因 *PEX31* 和 *PEX32*, 结合 *PEX5* 和 XuMP 循环的表达, 成功观察到过氧化物酶体体积和数量的增加, 并导致了甲醇利用的增强. 在甲醇细菌或 *E. coli* 中缺乏过氧化物酶体结构, 因此通常采用蛋白融合或是人工自组装策略来缩短催化酶之间的物理距离, 增加底物通道效应并驱动碳通量朝着同化方向进行. 例如, 使用柔性连接肽 (GGGGS), 将 *Mdh*、*Hps* 和 *Phi* 三个蛋白融合表达, 成功将甲醇氧化 V_{max} 提高了 5.8 倍, 甲醇至 F6P 的转化率提高了 1.3 倍^[56] (图3). Price 等^[57] 开发了一种无支架的自组装策略, 使用 SH3-配体对间的相

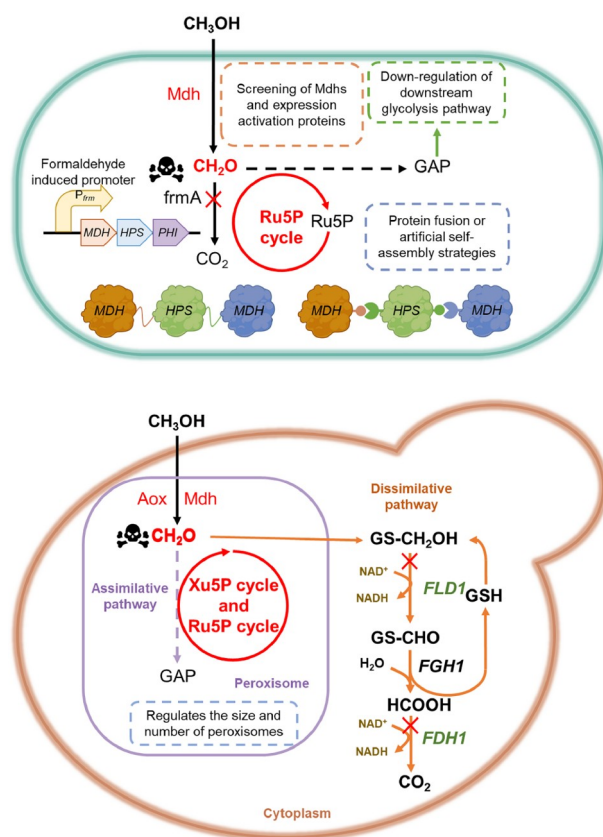


图3 (网络版彩图) 甲醇代谢理性改造. 甲醇代谢的理性改造策略包括: (1) 酶的筛选; (2) 糖酵解途径的下调; (3) 蛋白融合策略; (4) 同化途径强化; (5) 异化途径下调

Figure 3 (Color online) Rational design of methanol metabolism. Rational modification strategies of methanol metabolism include: (1) enzyme screening; (2) down-regulation of glycolytic pathway; (3) protein fusion; (4) assimilation pathway strengthen; (5) attenuation of dissimilation pathway.

互作用将 *Mdh*、*Hps* 和 *Phi* 组装成超分子酶复合物, 从而将甲醇向 F6P 的转化效率提高了 50 倍. 不同酶的表达水平还可以通过改变其特定配体的数量来调节. 这种空间工程改造提供了更稳定的酶结构, 强化了活性位点之间的底物通道, 提供了将途径平衡拉向中枢代谢的关键驱动力. 该策略不仅有助于克服甲醇脱氢热力学不利条件, 还可有效防止有毒中间体甲醛积累.

4.4 甲醇代谢氧化还原平衡

NAD 依赖型 *Mdh* 和 RuMP 循环组成的通路由于 ATP 和 NAD(P)H 再生水平较高, 通常被认为适合于构建人工甲基营养型菌株^[58-62]. 然而, 细胞的氧化还原状态也会直接影响 *Mdh* 活性, 较高的 NADH/NAD 比例

反而不利于甲醇氧化过程。尤其是在合成甲基营养型菌株额外补充葡萄糖等辅助碳源的情况下, 由TCA代谢通量产生的NADH进一步加剧了细胞内的还原力堆积。目前降低甲基营养细胞中的NADH/NAD比值的策略主要从增加NADH的消耗与减少NADH生成两个方面入手。

在*E. coli*中, 当NAD依赖型苹果酸脱氢酶基因*maldh*被敲除时, 菌株检测到更高的NAD/NADH比值, 并且在混合碳源(甲醇和葡萄糖)下的生长得到改善, 高达24%的甲醇碳进入中心代谢^[62]。此外, 该研究筛选到一个参与NAD转运和从头合成的转录调节因子*nadR*基因突变, 导致抑制因子活性降低, 进一步凸显了甲醇生长过程中NADH/NAD比例的重要性。细胞工厂合成化学品时通常需要大量的NAD(P)H提供还原力, 因此引入NADH依赖的合成途径, 可以将细胞内积累的NADH快速再生为NAD, 并偶联促进Mdh催化的甲醇氧化及化学品的合成。例如, 使用乳酸脱氢酶将NADH回收为NAD, 从而防止了甲醛的可逆还原, 有效提高了基于RuMP循环的甲醇氧化速率^[57]。

细胞中存在着一类NADH激酶, 可以实现NADH与NADPH的转换。Wang等^[40]在*E. coli*中表达来自*S. cerevisiae*的NADH激酶(NAD kinase, Pos5), 并构建了NADPH的再生体系, 显著降低了细胞内的NADH水平, 并将甲醇合成赖氨酸的产量提高了两倍。Wu等^[51]在*K. phaffii*甲醇代谢中测试了一系列内源及来自*S. cerevisiae*的NADH激酶, 其中内源的NADH激酶基因*KpUTR1*的过表达效果最佳, 改善了甲醇同化并将3-羟基丙酸产量提升12.8%。

5 甲醇利用的进化工程

过去数年中, 大量的研究尝试建立高效人工甲基营养型菌株, 然而理性策略指导下尚无法有效实现甲醇同化。随着合成生物学技术的快速发展, 已经在几种代表性天然甲醇微生物中建立起媲美模式微生物的基因编辑系统, 一定程度上突破了甲醇代谢改造的主要障碍。然而, 由于甲醇代谢与葡萄糖代谢存在着巨大的差异, 甲醇代谢的复杂性以及调控规律认知的严重不足仍然制约着甲醇细胞工厂的改造与优化。借鉴于自然进化过程中基因突变积累导致物种演化的机制, 酶的定向进化及实验室适应性进化(*adaptive la-*

boratory evolution, ALE)技术在近年来的甲醇代谢改造研究中扮演了重要角色。

5.1 甲醇脱氢酶Mdh的定向进化

酶是生物体中负责催化功能的大分子, 几乎参与细胞内所有代谢过程。酶作为生命活动的主要执行者, 也是微生物细胞工厂中的主要生产者, 其催化效率与底物结合特异性对代谢过程有着重要影响。然而, 蛋白质的结构非常复杂, 且性能受到诸多环境参数的影响, 增加了改造难度。“酶的定向进化”通过快速随机突变结合高效筛选方法, 能够在短时间内实现酶分子功能的优化或改造。

由于甲醇细菌的基因编辑系统发展尚不完善, 因此对于其甲醇代谢改造往往集中在培养过程与途径元件的优化上。如前文所述, NAD依赖型Mdh是大多数甲醇细菌同化途径的第一个酶, 其催化动力学性能较差, 并且倾向于氧化其他醇, 极大限制了甲醇代谢途径通量。Mdh的性能也被认为是在*E. coli*等模式微生物中构建人工甲基营养型菌株的重要障碍之一。因此, 有研究者尝试采用定向进化技术来提高Mdh的催化性能。为了提高来自*Cupriavidus necator* N-1的CnMdh2的催化性能, Liao等^[39]开发了一种基于Nash反应的高通量筛选方法, 通过体外文库生成、自动菌落挑选和测定, 成功发现三个位点突变(A26V、A31V和A169V), 组合变体CT4-1的 k_{cat}/k_m 较野生型提高了6倍。由于甲醛能够通过细胞膜扩散, 该方法无需细胞裂解, 通过与乙酰丙酮和乙酸铵反应来检测甲醇氧化产生的甲醛, 并根据颜色反映酶的催化效率, 大大简化了筛选程序, 并有效避免了细胞粗提取物中的背景干扰。然而, 该方法基于单克隆采集鉴定, 每代进化筛选通量仍然十分有限, 对于酶的定向进化而言, 通量往往决定着发现优异表型的概率。为了解决这一瓶颈Liu等^[63]开发了噬菌体连续辅助进化(phage-assisted continuous evolution, PACE)策略, 理论上培养一代耗时约10 min即可产量 $>10^9$ 突变体。基于甲醛生物传感器, 通过将噬菌体增殖速度与甲醇氧化生成甲醛的量相偶联, 对来自*B. methanolicus*的甲醇脱氢酶2 (BmMdh2)进行了噬菌体辅助非连续进化(phage-assisted non-continuous evolution, PANCE), BmMdh2突变体(Q5L、A363L)催化能力较野生型提升了3.5倍, 构建的工程菌株甲醇同化能力是CnMdh2 CT4-1的两倍。此外, 该研

究也发现所有关键突变氨基酸都位于Mdh蛋白NAD辅因子结合口袋附近的区域,也为后续进一步改造提供了理论指导。

“定向进化”不仅仅适用于单一的酶,还可以对一些重要的生物代谢途径中不同酶进行协同优化。2023年, Tian等^[64]在原核微生物中建立了正交DNA复制系统,命名为BacOREp。该系统利用一种天然存在于苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的溶源性噬菌体复制机器,设计了相应的易错正交DNA聚合酶,能够在不影响宿主基因组突变水平的情况下,实现体内代谢途径的连续定向进化。研究人员首先构建了一种基于异源RuMP通路的人工甲基营养型*B. thuringiensis*底盘,将来自*B. methanolicus* MGA3的Mdh和Mdh激活因子Act,来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的Hps、Phi以及NADH脱氢酶(NADH dehydrogenase, Ndh)分为两个基因簇,构建一个长度为12.3 kb的线性质粒。连续进化20代后,获得的突变菌株甲醇消耗量由0.7 g L⁻¹提升至8.3 g L⁻¹,增加了7.4倍。研究结果显示用于驱动第一个基因簇(包括Hps、Phi和Ndh蛋白)的低水平表达更有利于甲醇同化。基于正交复制的体内连续进化系统能够以高于基因组突变率6700倍的速度进化正交线性质粒上的目的基因,并在进化长基因簇时展现出优势,未来有望进一步应用于甲醇代谢途径的优化。

5.2 实验室适应性进化

菌株理性设计通常不足以实现所需的表型和生产能力,尤其理性改造及单元件优化策略无法支持高效的甲醇生物转化过程。ALE是在自然进化的基本原则指导下,研究适应性遗传变化分子机制常用方法之一。通过有益突变的积累,可以在实验室中快速获得目标表型菌株^[65],尤其是在面对“甲醇代谢黑箱模型”时,ALE可以克服知识与经验不足的缺陷,展现出巨大的优势,被应用到几乎所有人工甲基营养型菌株研究中(图4)。

人工甲基营养型菌株的理性构建通常无法支持甲醇的有效同化,需要借助ALE策略对代谢进行全局非理性强化。合成甲基营养型菌株ALE策略的一个关键因素是建立甲醇依赖性生长模式。通过对中心代谢关键基因阻断,将细胞生长与甲醇同化直接关联,一般需要另一种辅助碳源(如葡萄糖^[66]、木糖^[67,68]、核

糖^[69,70]、葡萄糖酸^[62]或丙酮酸等),底盘细胞不消耗甲醇时无法单独利用辅助碳源生长。通常在ALE初期阶段,大部分碳通量来自糖类等辅助碳源,而甲醇代谢通量极低。在计算机辅助分析下, Meyer等^[62]在*E. coli*中敲除了Entner-Doudoroff通路的6-磷酸葡萄糖酸脱水酶(phosphogluconate dehydratase, Edd)和PPP途径的核糖-5-磷酸异构酶(ribose-5-phosphate isomerase, Rpi),细胞仅能通过6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase, Gnd)催化的脱羧作用将葡萄糖酸分解代谢重定向到Ru5P的形成,进一步支持甲醛的同化过程。结合RuMP通路整合,工程菌株经ALE以及一系列优化后,在葡萄糖酸辅助下,甲醇吸收能力达到天然甲基营养生物相似水平(13.7 mmol g_{CDW}⁻¹ h⁻¹)^[71]。

Chen等^[69]将甲醇同化与五碳(C5)糖利用下的细胞生长相结合。通过敲除PPP途径的Rpi或磷酸核酮糖-3-差向异构酶(ribulose-phosphate 3-epimerase, Rpe),建立了Mdh-Hps-Phi途径依赖的木糖或核糖利用模式,经ALE成功筛选到比生长速率(μ)达到0.17 h⁻¹的菌株,甲醇和木糖以约1:1的摩尔比共同化。在此基础上进一步同时表达各种同功能酶,以最大限度地提高代谢通量平衡的灵活性,通过甲醇/木糖/氨基酸培养基的连续传代驯化,最终实现了人工甲基营养型*E. coli*菌株在单一甲醇培养基中的生长,倍增时间为8.5 h,尽管最大光密度(optical density, OD)值仅达到2.0^[60]。测序结果显示基因组拷贝数变异(copy number variation, CNV)是缓解细胞内DNA-蛋白质交联致死性的主要方式。最新的一项研究将人工甲基营养型*E. coli*的倍增时间缩短为4.3 h,并实现了多种化学品的甲醇生物转化合成^[72]。Espinosa等^[73]将天然*S. cerevisiae*在含有2%甲醇和0.1%酵母提取物的培养基中进行进化以增强甲醇的生长,经过230代后,与对照相比,甲醇培养物的生物量增加了44%。Zhan等^[41]使用一种工程模块电路(engineered module circuit, EMC)策略与ALE相结合,成功建立了能够利用甲醇作为唯一碳源*S. cerevisiae*。EMC策略包括3个步骤:在*S. cerevisiae*中重构异源甲醇利用途径以确定最佳甲醇利用模式;将甲醇利用途径分隔到*S. cerevisiae*过氧化物酶体中以减轻甲醛和H₂O₂的毒性;模块途径的优化。进化的乙醛酸-丝氨酸(gSerine)途径被确定为*S. cerevisiae*菌株吸收甲醛的关键互补途径^[41],并从甲醇实现了黄酮类化合物的合成。

对于天然甲基营养型微生物,尤其是甲醇酵母而

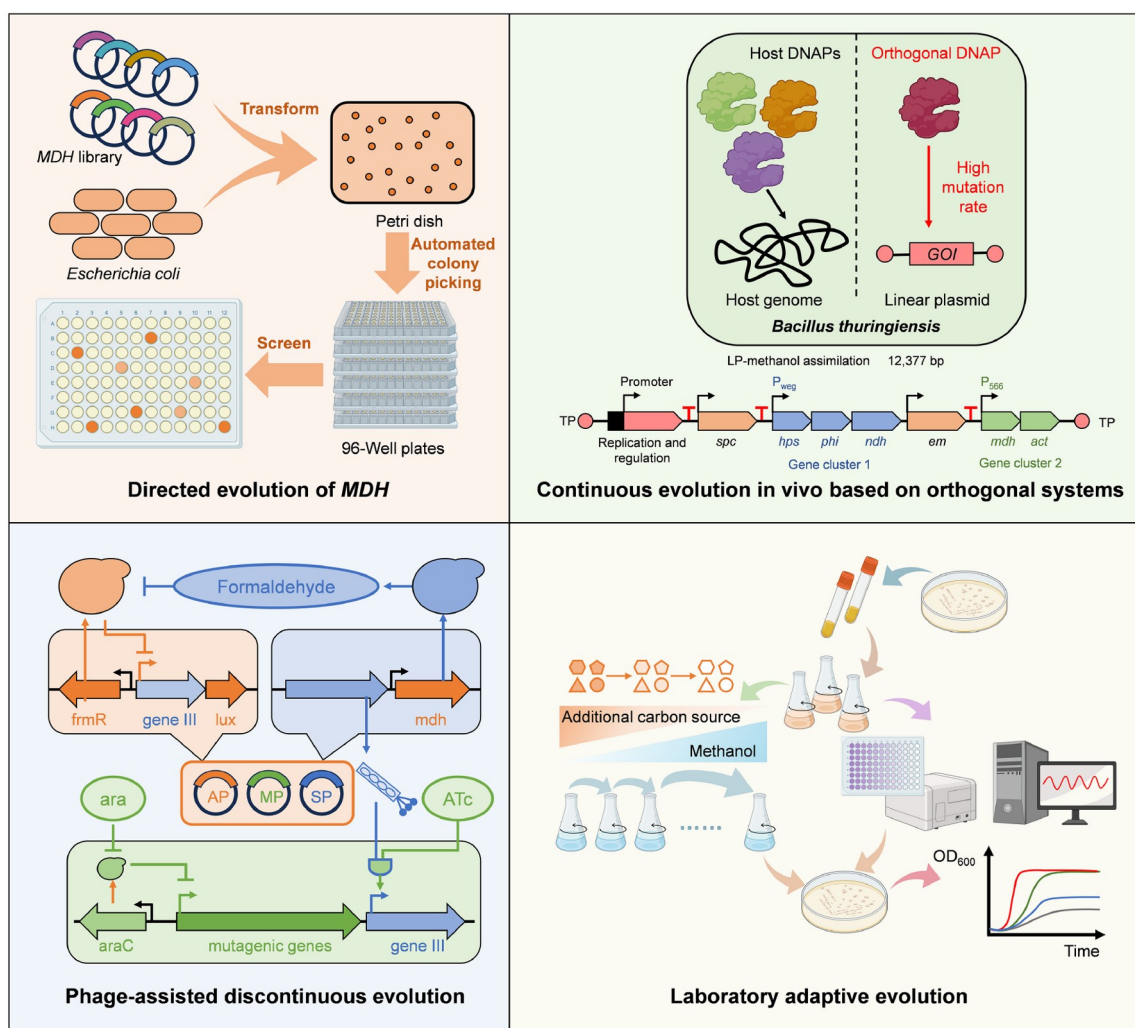


图4 (网络版彩图) 甲醇代谢的进化工程。甲醇代谢的进化工程主要研究方法包括: 酶的定向进化、正交的体内持续进化、噬菌体辅助进化、实验室适应性进化等, 可以显著提升甲醇代谢元件或途径的催化效率

Figure 4 (Color online) Evolutionary engineering of methanol metabolism. The primary research methods for evolutionary engineering of methanol metabolism include enzyme-directed evolution, orthogonal *in vivo* continuous evolution, phage-assisted evolution, and laboratory-adaptive evolution. These approaches can significantly enhance the catalytic efficiency of methanol metabolic elements or pathways.

言, 自然进化下的甲醇代谢途径足以支持自身细胞利用甲醇积累生物质。然而, 当构建甲醇细胞工厂引入外源途径时, 往往带来严重代谢压力。甲醇本身并非微生物的适宜碳源, 代谢过程中有毒中间物不可避免地会对细胞造成一定损伤, 需要消耗额外碳源及能量进行修复, 才能维持细胞基本生命活动。构建化学品细胞工厂, 通常使用强启动子强化代谢途径, 从而对细胞带来代谢扰动, 此外, 甲醇代谢与产物合成的双重胁迫可能会使细胞陷入代谢紊乱, 造成不可逆死亡。例如, 在 *O. polymorpha* 脂肪酸合成的研究中, 当阻断脂

肪酸活化途径后细胞便无法在甲醇培养基中生长, Gao等^[66]采用葡萄糖与甲醇混合碳源合ALE策略, 逐渐减少葡萄糖添加比例, 最终实现了脂肪酸生产菌株在甲醇培养基中的“起死回生”。测序结果显示驯化菌株降低了磷脂分解从而维持了磷脂稳态及细胞膜结构, 增加了菌株的鲁棒性^[74]。Moser等^[75]使用ALE的方法将 *K. phaffii* 进化了250代, 提高其利用甲醇的生长速度, 进化菌株重组蛋白的产量增加了2.5倍。

尽管截至目前, 仅有 *E. coli* 和 *S. cerevisiae* 实现了完全意义上的人工合成甲基营养型代谢模式, ALE仍

然在甲醇代谢强化研究中展现了无可比拟的优势与重要性, 结合成本不断降低的高通量DNA测序技术, 解析表型优化的内在分子机制, 能够为甲醇代谢改造提供大量全新的见解.

定向进化通常针对特定基因元件进行诱变, 然后筛选感兴趣表型的变异, 而ALE可用于积累和发现全基因组水平的有益突变, 并提高细胞的全局适应性. 尽管“ALE”与“定向进化”属于不同的范畴, 却都是提高酶或菌株甲醇代谢性能的重要技术, 尤其是ALE已成为提高合成途径与细胞底盘之间兼容性的有力工具^[76].

6 甲醇微生物发酵

甲醇是一种还原的C1化合物, 甲醇的单位碳还原度(CH_3OH , 每碳的还原度 κ 值为6)高于葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 每碳的还原度 κ 值为4)^[7], 甲醇等摩尔碳的能量($\Delta G^{0'} = -2870 \text{ kJ mol}^{-1}$)也远高于葡萄糖($\Delta G^{0'} = -4276.6 \text{ kJ mol}^{-1}$)^[17], 因此是微生物生产目标化合物的理想碳源. 近年来, 随着基因编辑障碍的逐渐突破, 甲醇微生物细胞工厂改造已由天然途径修饰逐渐转向人工定制的合成途径构建及优化^[7,77~79]. 然而, 随着甲醇生物转化产物谱不断拓展(甲醇生物转化合成化学品总结见表2), 越来越凸显出甲醇发酵工艺及设备开发的滞后性.

6.1 生物反应器发酵策略

生物反应器中一次性投料的批式发酵因操作简单而成为最常见的生物转化生产策略. 然而, 甲醇毒性导致在发酵过程必须保持较低的甲醇浓度来降低代谢压力, 避免生长抑制, 但会导致生物质积累速率与总量的降低, 进而影响产物的生产效率. 因此高起始底物浓度的批式发酵策略不适合于甲醇生物转化过程, 需要开发新的发酵策略适配于甲醇底物及代谢特性.

分批补料发酵(fed-batch fermentation)采用将底物逐渐添加到培养体系中的方式, 可以有效克服甲醇毒性抑制问题并实现高生物量和产物浓度积累. 目前甲醇分批补料发酵主要有两种方式. (1) 两阶段培养, 将生物反应器发酵分为两个阶段, 初始阶段采用适宜碳源, 如葡萄糖或甘油, 获得生产细胞的大量积累, 随后开始补加甲醇, 开启基因诱导表达及产物合成阶段. 为

了解其他碳源对甲醇代谢及产物合成途径基因的抑制, 有时会保留较短时间的碳源饥饿阶段. 两阶段发酵方式应用于多数甲醇微生物细胞工厂生产案例, 如莫纳可林J^[120,121]、洛伐他汀^[89,90]、 β -alanine^[101]、硫酸软骨素^[122]、苹果酸^[83]、乳酸^[123]等均通过该策略进行生产. (2) 单阶段培养, 即发酵全过程仅使用甲醇作为单一碳源. 发酵初始通常采用较低浓度的甲醇培养基, 待甲醇消耗后通过脉冲或流加的方式进行补料发酵. 该方法的重要基础是菌株的高鲁棒性, 优点是可以解除过高初始甲醇浓度对发酵过程的抑制, 又可以避免其他碳源切换至甲醇代谢模式造成的滞后效应. 本团队所构建的细胞工厂均采用该模式, 实现了高效甲醇生物转化合成脂肪酸^[19]、脂肪醇^[85,86]、3-羟基丙酸^[51]、 β -法尼烯^[87]等化学品. 单阶段培养的核心要素在于根据菌株生长导致的甲醇消耗速率变化情况精准控制培养基中的甲醇浓度. 多种方式均可实现甲醇浓度的实时检测, 例如, 根据*K. phaffii*甲醇代谢好氧的特征, 利用溶氧电极在线检测溶解氧(dissolved oxygen, DO)变化趋势控制甲醇补料, 或是利用基于半导体传感器的甲醇监测仪检测尾气中的甲醇含量. 此外, 专门开发的自动甲醇控制工作站可以更加精准地调节发酵过程. 1986年, Suzuki等在*Protomonas extorquens*利用甲醇生产聚羟基丁酸(PHB)的研究中, 通过特别设计的甲醇自动检测及补料系统将发酵培养基中的甲醇浓度精准控制在 $0.5 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$, 先将生物量积累至 70 g L^{-1} , 再通过限氮策略开启产物合成^[124], 170 h内实现了高达 149 g L^{-1} 的PHB积累, 得率达到 0.2 g/g 甲醇^[25].

自循环发酵(self-cycling fermentation, SCF)是一种半连续的、非稳态的、循环的先进发酵技术, 已被可提高许多生物转化过程的生产效率^[125,126]. SCF模式通常在耗尽限制性营养物质时触发循环过程, 包括去除工作体积的1/2, 然后补充相同数量的新鲜培养基. 许多与代谢和生长相关的参数, 包括DO、二氧化碳逸出率(carbon-dioxide escape rate, CER)、氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)和出口气体质量流量率, 已被用作SCF循环所需的自动反馈控制的控制参数^[127]. Tan等^[128]以嗜甲烷菌*Methylothermobacter buryatense*为对象研究甲醇发酵时发现, 分批补料发酵使生物质密度增加了26倍, 而自循环发酵(SCF)策略使单位体积生物质生产率提高了10倍. 与间歇式发酵相比, 两种先进发酵模式以克服甲醇的毒性抑制, 尤其

表 2 甲醇生物转化合成化学品

Table 2 Methanol bioconversion toward synthetic chemicals

产物	菌种	培养方式	培养基(辅助碳源)	产量(得率)	生产效率	生物量	参考文献
天然甲基营养型酵母							
Cordycepin	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in shake flasks	Minimal	2.7 g L ⁻¹	16 m g L ⁻¹ h ⁻¹	—	[80]
α -bisabolene	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in shake flasks	Minimal	1.1 g L ⁻¹	3.9 m g L ⁻¹ h ⁻¹	—	[81]
α -alkenes	<i>K. phaffii</i>	Batch in shake flasks	Minimal	1.6 mg L ⁻¹	—	—	[82]
Malic acid	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in shake flasks	Minimal	750 mg L ⁻¹	—	—	[83]
Citrinin	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch	Minimal	0.6 mg L ⁻¹	—	—	[84]
3-HP	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	48.2 g L ⁻¹ (23 mg/g methanol)	—	—	[51]
Free fatty acids	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	23.4 g L ⁻¹ (8 mg/g methanol)	108 m g L ⁻¹ h ⁻¹	193 in OD ₆₀₀	[19]
Fatty alcohols	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	5.6 g L ⁻¹ (11 mg/g methanol)	15.6 m g L ⁻¹ h ⁻¹	46.5 in OD ₆₀₀	[85]
Free fatty acids	<i>O. polymorpha</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	15.9 g L ⁻¹ (120 mg/g methanol)	88 m g L ⁻¹ h ⁻¹	26.6 g L _a ⁻¹ DCW	[66]
Fatty alcohols	<i>O. polymorpha</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	3.6 g L ⁻¹ (16 mg/g methanol)	12.9 m g L ⁻¹ h ⁻¹	—	[86]
β -Farnesene	<i>O. polymorpha</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	14.7 g L ⁻¹ (46 mg/g methanol)	48 m g L ⁻¹ h ⁻¹	60.9 in OD ₆₀₀	[87]
6-Methylsalicylic acid	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	2.2 g L ⁻¹	32.8 m g L ⁻¹ h ⁻¹	235 g L _b ⁻¹ WCW	[88]
Lovastatin	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	419 mg L ⁻¹	5 m g L ⁻¹ h ⁻¹	—	[89]
Monacolin J	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	594 mg L ⁻¹	—	475 g L ⁻¹ WCW	[90]
Patchoulol	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	2.5 g L ⁻¹ (21.5 mg/g _{DCW})	283 mg L ⁻¹ d ⁻¹	517 in OD ₆₀₀	[91]
Lycopene	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	714 mg L ⁻¹ (9.3 mg/g _{DCW})	5.2 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[92]
Heparin	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	2.1 g L ⁻¹	12.4 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[93]
(+)-Nootkatone	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glucose	208 mg L ⁻¹	1.9 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[94]
Glucose	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	13.4 g L ⁻¹	46.6 mg L ⁻¹ h ⁻¹	44.4 g L ⁻¹ DCW	[95]
Glutathione	<i>O. polymorpha</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	250 mg L ⁻¹ of TEG ^{d)} 1053 mg L ⁻¹ of TIG ^{e)}	—	55 g L ⁻¹ DCW	[96]
γ -Linoleic acid	<i>O. polymorpha</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glycerol	697 mg L ⁻¹	—	—	[97]
Dammarenediol-II	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in shake flasks	Complex ^{e)}	0.74 mg/g _{DCW}	—	—	[98]
Catharanthine	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex	0.62 mg L ⁻¹	—	170 in OD ₆₀₀	[99]
Malic acid	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in shake flasks	Complex	2.8 g L ⁻¹	—	—	[83]
D-Lactic acid	<i>K. phaffii</i>	Batch in test tube	Complex	3.5 g L ⁻¹ (0.22 g/g methanol)	36.2 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[100]
Dammarenediol-II	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in shake flasks	Complex, squalene	13.2 mg L ⁻¹ (1.1 mg/g _{DCW})	0.11 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[98]
Catharanthine	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex, mannitol	2.6 mg L ⁻¹	—	230 in OD ₆₀₀	[99]
β -Alanine	<i>K. phaffii</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex, glycerol	5.6 g L ⁻¹	—	123 in OD ₆₀₀	[101]
合成甲基营养型酵母							
Succinic acid	<i>Y. lipolytica</i>	Batch	Complex	0.92 g L ⁻¹	—	—	[102]
Pyruvate	<i>S. cerevisiae</i>	Batch	Minimal	0.26 g L ⁻¹ (0.25 g/g Methanol)	—	—	
天然甲基营养型细菌							
Mevalonate	<i>M. extorquens</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	2.7 g L ⁻¹ (0.085 g/g methanol)	6.6 mg L ⁻¹ h ⁻¹	23.3 in OD ₆₀₀	[103]

(续表2)

产物	菌种	培养方式	培养基(辅助碳源)	产量(得率)	生产效率	生物量	参考文献
2-Hydroxyisobutyric acid	<i>M. extorquens</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	2.1 g L ⁻¹	—	—	[104]
1-Butanol	<i>M. extorquens</i>	Batch in shake flasks	Minimal	25.5 mg L ⁻¹	0.35 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[105]
α -Humulene	<i>M. extorquens</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	1.7 g L ⁻¹	15.9 mg L ⁻¹ h ⁻¹	30 g L ⁻¹ DCW	[106]
Itaconic acid	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	31.6 mg L ⁻¹	—	—	[107]
Mesaconic	<i>M. extorquens</i>	Batch in shake flasks	Minimal	70 mg L ⁻¹	2.3 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[108]
5-Aminovalerate	<i>B. methanolicus</i>	Batch in shake flasks	Minimal	23.7 mg L ⁻¹	—	—	[109]
Violacein	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Batch in shake flasks	Minimal	68 mg L ⁻¹	—	—	[110]
Violacein	<i>M. extorquens</i>	Batch in shake flasks	Minimal, acetate	118 mg L ⁻¹	—	—	[110]
Acetoin	<i>B. methanolicus</i>	Batch in shake flasks	Minimal, xylose (inducer)	0.42 g L ⁻¹ (70 mg/g methanol)	—	—	[111]
3-hydroxypropionic acid	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	0.86 g L ⁻¹	—	3.4 g L ⁻¹ DCW	[112]
Cadaverine	<i>B. methanolicus</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex	10.2 g L ⁻¹	—	61 g L ⁻¹ DCW	[113]
L-glutamate	<i>B. methanolicus</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex	72.2 g L ⁻¹	—	—	[114]
γ -Aminobutyric acid	<i>B. methanolicus</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex	9 g L ⁻¹	—	48 g L ⁻¹ DCW	[114]
L-lysine	<i>B. methanolicus</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex, DL-methionine, L-threonine, L-leucine	65 g L ⁻¹	—	34 g L ⁻¹ DCW	[115]
L-lysine	<i>B. methanolicus</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex, DL-methionine	11 g L ⁻¹	—	55 g L ⁻¹ DCW	[115]
合成甲基营养型细菌							
Succinic acid	<i>E. coli</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal, glucose, citric acid	68.5 g L ⁻¹	—	—	[116]
1-Butanol	<i>E. coli</i>	Batch in test tube	Minimal, xylose	2.0 g L ⁻¹	—	—	[69]
Acetone	<i>E. coli</i>	Fed-batch in test tube	Minimal, glucose	~10 mM	—	—	[117]
Acetone	<i>E. coli</i>	Fed-batch in test tube	Minimal (HDA), glucose	~13 mM	—	—	[117]
Ethanol	<i>E. coli</i>	Batch in test tube	Minimal, xylose	4.6 g L ⁻¹	0.05 g g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹	—	[69]
Ethanol	<i>E. coli</i>	Batch in test tube	Complex, xylose	36.3 mM	—	—	[32]
Acetate	<i>E. coli</i>	Batch in test tube	Complex, xylose	37 mM	—	—	[32]
D-Allulose	<i>E. coli</i>	Fed-batch in bioreactor	Complex, xylose	70.7 mM (0.51 mM/mM methanol)	0.80 mM h ⁻¹	4.1 in OD ₆₀₀	[118]
Acetone	<i>E. coli</i>	Fed-batch in shake flasks	Complex, glucose	45 mM	—	—	[44]
PHB	<i>E. coli</i>	Batch in shake flasks	Minimal	0.32 mg L ⁻¹	—	—	—
Lactic acid	<i>E. coli</i>	Batch in shake flasks	Minimal	284 mg L ⁻¹ (0.147 g/g methanol)	12.7 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	—
PABA	<i>E. coli</i>	Batch in shake flasks	Minimal	199.9 g L ⁻¹ (0.018 g/g methanol)	2.6 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[72]
Itaconic acid	<i>E. coli</i>	Fed-batch in bioreactor	Minimal	1.0 g L ⁻¹	15.0 mg L ⁻¹ h ⁻¹	46 in OD ₆₀₀	—
1,3-Propanediol	<i>E. coli</i>	Fed-batch in shake flasks	Complex, glucose	32.7 mg L ⁻¹	1.4 mg L ⁻¹ h ⁻¹	—	[119]

a) DCW: dry cell weight; b) WCW: wet cell weight; c) Complex: contain yeast extract; d) TEG: total extracellular glutathione; e) TIG: total Intracellular Glutathione; *K. phaffii*: *Komagataella phaffii*; *O. polymorpha*: *Ogataea polymorpha*; *Y. lipolytica*: *Yarrowia lipolytica*; *M. extorquens* AM1: *Methylobacterium extorquens* AM1; *B. methanolicus*: *Bacillus methanolicus*; *E. coli*: *Escherichia coli*

是SCF循环的迟滞期可以忽略不计, 从而更有效地生产细胞, 未来有望从单细胞蛋白质进一步拓展到化学品的生物合成。

6.2 甲醇发酵工艺难点

尽管近年来甲基营养型微生物的遗传和生化知识得到迅速扩充, 但与糖基发酵相比, 其生物过程工程技术发展的案例很少, 基本仍然延续传统发酵工艺进行微调。然而甲基营养型微生物特定的生理学和营养需求特征与传统微生物培养存在重要区别, 将对过程工厂设计产生影响, 尤其是以化学品生产为目标的发酵过程。

甲基营养型微生物需氧量较高, 尤其是发酵后期, 氧气供应成为阻碍菌株高密度生长的重要因素。工业上由于成本问题通常无法实现纯氧供应, 往往采用搅拌与通气量联合罐压控制^[129]方式提供氧气。近期一项甲醇生产单细胞蛋白的中试研究显示, 在500 L发酵罐中使用300 r/min搅拌以及最大1.5 vvm的通气, 发酵72 h最高生物量细胞干重(dry cell weight, DCW)达到63.37 g L⁻¹, 甲醇转化率为0.43 g_{DCW}/g^[20]。该研究同时反映了甲醇生物转化的另一个重要难点, 即产热严重问题。甲醇微生物好氧代谢模式导致热量输出增加, 从而提高了对发酵系统的冷却要求。为了降低额外的冷却成本, 一种可行的方式是使用耐热的甲基营养型微生物, 例如*B. methanolicus*和*O. polymorpha*, 报道其能够耐受50℃的高温^[4]。甲醇的易挥发性往往导致产物得率远低于糖基发酵^[78], 因此也对甲醇生物发酵工艺及新型生物反应器设计提出了新的要求。在甲醇发酵过程中, 高细胞密度或是易沉淀产物时常造成DO电极等插入式传感器表面覆盖导致的失灵, 凸显了多因素联合控制或人工取样检测验证在保证发酵过程稳定性中的重要性。

甲醇发酵过程中氧气供应、温度控制、甲醇补加策略之间存在微妙的平衡, 仍然需要积累更多的案例经验或开发基于代谢模型的甲醇补料策略^[130], 结合菌株性能的升级来进一步提高甲醇生物转化得率。此外, 廉价的无机盐培养基应该首先被推荐用于甲醇发酵过程, 一方面降低发酵及下游产物分离成本, 另一方面避

免复杂底物对甲醇微生物造成的代谢扰动, 有助于发现甲醇代谢及发酵过程中关键科学问题, 并突破核心技术因素限制。

7 总结与展望

甲醇生物转化起始于40年前, 并经历了长期的低谷。近年来, 全世界范围内对于低碳经济的倡议将甲醇生物转化又推上了历史舞台。随着DNA测序及合成成本的不断降低, 积累了大量甲醇微生物组学知识, 对于这些信息的挖掘与解析, 为甲醇细胞工厂构建提供了坚实的基础。此外, 基于CRISPR-Cas9的基因编辑技术^[131,132]、自动化生物铸造厂“Biofoundry”^[133]以及AI辅助的代谢模型等新技术的快速发展^[134], 大大提高了甲醇代谢底盘的开发速度和甲醇微生物的驯化速度。

人工甲基营养型细胞通过异源重构甲醇代谢途径, 试图建立高效的甲醇转化体系。然而不仅需要面对代谢途径运转效率底下的问题, 还需要妥善应对异源甲醇同化模块与底盘细胞自身代谢网络的适配问题, 因此仅获得了个别成功案例, 且基本属于概念验证阶段, 菌株的真实生产能力尚未得到进一步验证。相较而言, 随着基因编辑工具等限制的逐渐解除, 天然甲醇微生物的优势逐渐显现^[135], 面临的挑战转向甲醇耐受性强化、甲醛生物毒性解除、异源产物合成效率提高等主要问题。未来, 基于大量组学数据及AI辅助构建高质量的甲醇代谢模型, 通过对代谢通量的模拟及催化元件和代谢途径的全新设计, 有望打破现阶段僵化的甲醇代谢模式, 实现高碳得率甲醇代谢。此外, ALE也是应对甲醇和甲醛细胞毒性问题的重要策略, 有望提高细胞的鲁棒性, 结合生物信息学问题及反向代谢工程验证, 可以为甲醇细胞工厂优化提供新的理论指导。过程工程也是真正实现甲醇生物转化不可忽视的重要环节, 针对甲醇底物特殊性质, 设计新型生物反应器及发酵补料新策略, 最大化实现底物利用及产物转化效率。在未来科研界的共同努力下, 应优先建立基于甲醇生物转化的低碳生产工艺示范, 为甲醇生物转化注入信心并将其推向工业化水平。

参考文献

- 1 Shih CF, Zhang T, Li J, Bai C. *Joule*, 2018, 2: 1925–1949

- 2 Olah GA. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 2636–2639
- 3 De S, Mattanovich D, Ferrer P, Gasser B. *Essays Biochem*, 2021, 65: 293–307
- 4 Xie L, Yu W, Gao J, Wang H, Zhou YJ. *Trends Biotechnol*, 2024, doi: 10.1016/j.tibtech.2024.03.007
- 5 Ochsner AM, Sonntag F, Buchhaupt M, Schrader J, Vorholt JA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 517–534
- 6 Heggeset TMB, Krog A, Balzer S, Wentzel A, Ellingsen TE, Brautaset T. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 5170–5181
- 7 Wang Y, Fan L, Tuyishime P, Zheng P, Sun J. *Trends Biotechnol*, 2020, 38: 650–666
- 8 Gan Y, Meng X, Gao C, Song W, Liu L, Chen X. *Eng Microb*, 2023, 3: 1–14
- 9 Yurimoto H, Oku M, Sakai Y. *Int J Microbiol*, 2011, 2011: 1–8
- 10 Vonck J, Parcej DN, Mills DJ. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0159476
- 11 Hartner FS, Glieder A. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 39
- 12 Williams PA, Coates L, Mohammed F, Gill R, Erskine PT, Coker A, Wood SP, Anthony C, Cooper JB. *Acta Crystlogr D Biol Crystlogr*, 2005, 61: 75–79
- 13 Chistoserdova L, Chen SW, Lapidus A, Lidstrom ME. *J Bacteriol*, 2003, 185: 2980–2987
- 14 Peiro C, Vicente CM, Jallet D, Heux S. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 907861
- 15 Arfman N, Hektor HJ, Bystrykh LV, Govorukhina NI, Dijkhuizen L, Frank J. *Eur J Biochem*, 1997, 244: 426–433
- 16 Hektor HJ, Kloosterman H, Dijkhuizen L. *J Biol Chem*, 2002, 277: 46966–46973
- 17 Fabarius JT, Wegat V, Roth A, Sieber V. *Trends Biotechnol*, 2021, 39: 348–358
- 18 Shay LK, Hunt HR, Wegner GH. *J Industrial Microbiol*, 1987, 2: 79–85
- 19 Cai P, Wu X, Deng J, Gao L, Shen Y, Yao L, Zhou YJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2201711119
- 20 Meng J, Liu S, Gao L, Hong K, Liu S, Wu X. *Microb Cell Fact*, 2023, 22: 198
- 21 Guo F, Qiao Y, Xin F, Zhang W, Jiang M. *Trends Biotechnol*, 2023, 41: 1066–1079
- 22 Mogren H. SCP from methanol—the Norprotein process. *Process biochem*, 1979, 14: 2–4
- 23 Schendel FJ, Bremmon CE, Flickinger MC, Guettler M, Hanson RS. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 963–970
- 24 Belanger L, Figueira MM, Bourque D, Morel L, Beland M, Laramée L, Groleau D, Miguez CB. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 231: 197–204
- 25 Suzuki T, Yamane T, Shimizu S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 24: 370–374
- 26 Kim P, Kim JH, Oh DK. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003, 19: 357–361
- 27 Kim SW, Kim P, Lee HS, Kim JH. *Biotechnol Lett*, 1996, 18: 25–30
- 28 Bogorad IW, Chen CT, Theisen MK, Wu TY, Schlenz AR, Lam AT, Liao JC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 15928–15933
- 29 Zhao T, Li Y, Zhang Y. *Green Chem*, 2021, 23: 7852–7864
- 30 Siegel JB, Smith AL, Poust S, Wargacki AJ, Bar-Even A, Louw C, Shen BW, Eiben CB, Tran HM, Noor E, Gallaher JL, Bale J, Yoshikuni Y, Gelb MH, Keasling JD, Stoddard BL, Lidstrom ME, Baker D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3704–3709
- 31 Wang X, Wang Y, Liu J, Li Q, Zhang Z, Zheng P, Lu F, Sun J. *Bioresour Bioprocess*, 2017, 4: 41
- 32 Yu H, Liao JC. *Nat Commun*, 2018, 9: 3992
- 33 He H, Höper R, Dodenhöft M, Marlière P, Bar-Even A. *Metab Eng*, 2020, 60: 1–13
- 34 Chou A, Clomburg JM, Qian S, Gonzalez R. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 900–906
- 35 Lu X, Liu Y, Yang Y, Wang S, Wang Q, Wang X, Yan Z, Cheng J, Liu C, Yang X, Luo H, Yang S, Gou J, Ye L, Lu L, Zhang Z, Guo Y, Nie Y, Lin J, Li S, Tian C, Cai T, Zhuo B, Ma H, Wang W, Ma Y, Liu Y, Li Y, Jiang H. *Nat Commun*, 2019, 10: 1378
- 36 Wu T, Gómez-Coronado PA, Kubis A, Lindner SN, Marlière P, Erb TJ, Bar-Even A, He H. *Nat Commun*, 2023, 14: 8490
- 37 Müller JEN, Meyer F, Litsanov B, Kiefer P, Potthoff E, Heux S, Quax WJ, Wendisch VF, Brautaset T, Portais JC, Vorholt JA. *Metab Eng*, 2015, 28: 190–201
- 38 Krog A, Heggeset TM, Muller JE, Kupper CE, Schneider O, Vorholt JA, Ellingsen TE, Brautaset T. *PLoS One*, 2013, 8: e59188
- 39 Wu TY, Chen CT, Liu J, Bogorad IW, Damoiseaux R, Liao JC. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 4969–4983
- 40 Wang X, Wang X, Lu X, Ma C, Chen K, Ouyang P. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 17
- 41 Zhan C, Li X, Lan G, Baidoo EEK, Yang Y, Liu Y, Sun Y, Wang S, Wang Y, Wang G, Nielsen J, Keasling JD, Chen Y, Bai Z. *Nat Catal*, 2023, 6: 435–450
- 42 Ma Y, Li W, Mai J, Wang J, Wei Y, Ledesma-Amaro R, Ji XJ. *Green Chem*, 2021, 23: 780–787

- 43 Wang J, Qin R, Guo Y, Ma C, Wang X, Chen K, Ouyang P. *Green Chem Eng*, 2023, 4: 199–211
- 44 Bennett RK, Gonzalez JE, Whitaker WB, Antoniewicz MR, Papoutsakis ET. *Metab Eng*, 2018, 45: 75–85
- 45 Woolston BM, King JR, Reiter M, Van Hove B, Stephanopoulos G. *Nat Commun*, 2018, 9: 2387
- 46 Vanz AL, Lünsdorf H, Adnan A, Nimtz M, Gurramkonda C, Khanna N, Rinas U. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 103
- 47 Yu Y, Yang J, Zhao F, Lin Y, Han S. *BMC Genomics*, 2022, 23: 366
- 48 Witthoff S, Schmitz K, Niedenfuhr S, Noh K, Noack S, Bott M, Marienhagen J. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81: 2215–2225
- 49 Rohlhill J, Gerald Har JR, Antoniewicz MR, Papoutsakis ET. *Metab Eng*, 2020, 57: 247–255
- 50 Rohlhill J, Sandoval NR, Papoutsakis ET. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 1584–1595
- 51 Wu X, Cai P, Gao L, Li Y, Yao L, Zhou YJ. *ACS Sustain Chem Eng*, 2023, 11: 6445–6453
- 52 Rußmayer H, Buchetics M, Gruber C, Valli M, Grillitsch K, Modarres G, Guerrasio R, Klavins K, Neubauer S, Drexler H, Steiger M, Troyer C, Al Chalabi A, Krebühl G, Sonntag D, Zellnig G, Daum G, Graf AB, Altmann F, Koellensperger G, Hann S, Sauer M, Mattanovich D, Gasser B. *BMC Biol*, 2015, 13: 80
- 53 van der Klei IJ, Yurimoto H, Sakai Y, Veenhuis M. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763: 1453–1462
- 54 Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Bouard D, Aitchison JD, Rachubinski RA. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 665–677
- 55 Yan M, Rayapuram N, Subramani S. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17: 376–383
- 56 Fan L, Wang Y, Tuyishime P, Gao N, Li Q, Zheng P, Sun J, Ma Y. *ChemBioChem*, 2018, 19: 2465–2471
- 57 Price JV, Chen L, Whitaker WB, Papoutsakis E, Chen W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 12691–12696
- 58 Keller P, Reiter MA, Kiefer P, Gassler T, Hemmerle L, Christen P, Noor E, Vorholt JA. *Nat Commun*, 2022, 13: 5243
- 59 Keller P, Noor E, Meyer F, Reiter MA, Anastassov S, Kiefer P, Vorholt JA. *Nat Commun*, 2020, 11: 5403
- 60 Chen FYH, Jung HW, Tsuei CY, Liao JC. *Cell*, 2020, 182: 933–946.e14
- 61 Sun Q, Liu D, Chen Z. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 10: 1089639
- 62 Meyer F, Keller P, Hartl J, Gröninger OG, Kiefer P, Vorholt JA. *Nat Commun*, 2018, 9: 1508
- 63 Roth TB, Woolston BM, Stephanopoulos G, Liu DR. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 796–806
- 64 Tian RZ, Zhao RZ, Guo HY, Yan K, Wang CY, Chen L, Lv XQ, Li JH, Liu L, Du GC, Chen J, Liu YF. *Nat Chem Biol*, 2023, 19: 1504–1512
- 65 Mavrommati M, Daskalaki A, Papanikolaou S, Aggelis G. *Biotechnol Adv*, 2022, 54: 107795
- 66 Gao J, Li Y, Yu W, Zhou YJ. *Nat Metab*, 2022, 4: 932–943
- 67 Tuyishime P, Wang Y, Fan L, Zhang Q, Li Q, Zheng P, Sun J, Ma Y. *Metab Eng*, 2018, 49: 220–231
- 68 Wang Y, Fan L, Tuyishime P, Liu J, Zhang K, Gao N, Zhang Z, Ni X, Feng J, Yuan Q, Ma H, Zheng P, Sun J, Ma Y. *Commun Biol*, 2020, 3: 217
- 69 Chen CT, Chen FYH, Bogorad IW, Wu TY, Zhang R, Lee AS, Liao JC. *Metab Eng*, 2018, 49: 257–266
- 70 Hennig G, Haupka C, Brito LF, Rückert C, Cahoreau E, Heux S, Wendisch VF. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 3617
- 71 Zhu T, Zhao T, Bankefa OE, Li Y. *Biotechnol Adv*, 2020, 39: 107467
- 72 Reiter MA, Bradley T, Büchel LA, Keller P, Hegedis E, Gassler T, Vorholt JA. *Nat Catal*, 2024, 7: 560–573
- 73 Espinosa MI, Gonzalez-Garcia RA, Valgepea K, Plan MR, Scott C, Pretorius IS, Marcellin E, Paulsen IT, Williams TC. *Nat Commun*, 2020, 11: 5564
- 74 Wang S, Wang Y, Yuan Q, Yang L, Zhao F, Lin Y, Han S. *Green Chem*, 2023, 25: 8845–8857
- 75 Moser JW, Prielhofer R, Gerner SM, Graf AB, Wilson IBH, Mattanovich D, Dragosits M. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 49
- 76 Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, Palsson BO, Feist AM. *Metab Eng*, 2019, 56: 1–16
- 77 Chen AY, Lan EI. *Biotechnol J*, 2020, 15: e1900356
- 78 Gao LH, Cai P, Zhou YJ. *Chin J Biotech*, 2021, 37: 1–14 (in Chinese) [高琳惠, 蔡鹏, 周雍进. 生物工程学报, 2021, 37:1-14.]
- 79 Zhang W, Song M, Yang Q, Dai Z, Zhang S, Xin F, Dong W, Ma J, Jiang M. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 260
- 80 Tan H, Wang L, Wang H, Cheng Y, Li X, Wan H, Liu C, Liu T, Li Q. *Synth Syst Biotechnol*, 2023, 8: 242–252
- 81 Gao L, Hou R, Cai P, Yao L, Wu X, Li Y, Zhang L, Zhou YJ. *JACS Au*, 2024, 4: 2474–2483
- 82 Cai P, Li Y, Zhai X, Yao L, Ma X, Jia L, Zhou YJ. *Bioresour Bioprocess*, 2022, 9: 58
- 83 Guo F, Dai Z, Peng W, Zhang S, Zhou J, Ma J, Dong W, Xin F, Zhang W, Jiang M. *Biotech Bioeng*, 2021, 118: 357–371
- 84 Xue Y, Kong C, Shen W, Bai C, Ren Y, Zhou X, Zhang Y, Cai M. *J Biotechnol*, 2017, 242: 64–72
- 85 Shen Y, Cai P, Gao L, Wu X, Yao L, Zhou YJ. *Bioresour Tech*, 2024, 412: 131396

- 86 Zhai X, Gao J, Li Y, Grininger M, Zhou YJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2220816120
- 87 Li J, Gao J, Ye M, Cai P, Yu W, Zhai X, Zhou YJ. *Metab Eng*, 2024, 85: 194–200
- 88 Gao L, Cai M, Shen W, Xiao S, Zhou X, Zhang Y. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 77–90
- 89 Liu Y, Bai C, Xu Q, Yu J, Zhou X, Zhang Y, Cai M. *Bioresour Bioprocess*, 2018, 5: 22
- 90 Liu Y, Tu X, Xu Q, Bai C, Kong C, Liu Q, Yu J, Peng Q, Zhou X, Zhang Y, Cai M. *Metab Eng*, 2018, 45: 189–199
- 91 Luo G, Lin Y, Chen S, Xiao R, Zhang J, Li C, Sinskey AJ, Ye L, Liang S. *J Agric Food Chem*, 2023, 71: 2049–2058
- 92 Zhang X, Wang D, Duan Y, Zheng X, Lin Y, Liang S. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84: 463–470
- 93 Zhang Y, Wang Y, Zhou Z, Wang P, Xi X, Hu S, Xu RR, Du G, Li J, Chen J, Kang Z. *Green Chem*, 2022, 24: 3180–3192
- 94 Wriessnegger T, Augustin P, Engleder M, Leitner E, Müller M, Kaluzna I, Schürmann M, Mink D, Zellnig G, Schwab H, Pichler H. *Metab Eng*, 2014, 24: 18–29
- 95 Tang H, Wu L, Guo S, Cao W, Ma W, Wang X, Shen J, Wang M, Zhang Q, Huang M, Luo X, Zeng J, Keasling JD, Yu T. *Nat Catal*, 2023, 7: 21–34
- 96 Ubiyovk VM, Ananin VM, Malyshev AY, Kang HA, Sibirny AA. *BMC Biotechnol*, 2011, 11: 8–19
- 97 Khongto B, Laoteng K, Tongta A. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20: 1555–1562
- 98 Liu XB, Liu M, Tao XY, Zhang ZX, Wang FQ, Wei DZ. *J Biotechnol*, 2015, 216: 47–55
- 99 Gao J, Zuo Y, Xiao F, Wang Y, Li D, Xu J, Ye C, Feng L, Jiang L, Liu T, Gao D, Ma B, Huang L, Xu Z, Lian J. *Nat Synth*, 2023, 2: 231–242
- 100 Yamada R, Ogura K, Kimoto Y, Ogino H. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35: 37–45
- 101 Miao L, Li Y, Zhu T. *Bioresour Bioprocess*, 2021, 8: 89
- 102 Zhang S, Guo F, Yang Q, Jiang Y, Yang S, Ma J, Xin F, Hasunuma T, Kondo A, Zhang W, Jiang M. *Green Chem*, 2023, 25: 183–195
- 103 Liang WF, Cui LY, Cui JY, Yu KW, Yang S, Wang TM, Guan CG, Zhang C, Xing XH. *Metab Eng*, 2017, 39: 159–168
- 104 Rohde MT, Tischer S, Harms H, Rohwerder T. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83: e02622–16
- 105 Hu B, Yang YM, Beck DAC, Wang QW, Chen WJ, Yang J, Lidstrom ME, Yang S. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 84
- 106 Sonntag F, Kroner C, Lubuta P, Peyraud R, Horst A, Buchhaupt M, Schrader J. *Metab Eng*, 2015, 32: 82–94
- 107 Lim CK, Villada JC, Chalifour A, Duran MF, Lu H, Lee PKH. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1027
- 108 Sonntag F, Buchhaupt M, Schrader J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 4533–4544
- 109 Brito LF, Irla M, Nærdal I, Le SB, Delépine B, Heux S, Brautaset T. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 686319
- 110 Quynh Le HT, Anh Mai DH, Na JG, Lee EY. *Metab Eng*, 2022, 72: 150–160
- 111 Drejer EB, Chan DTC, Haupka C, Wendisch VF, Brautaset T, Irla M. *Green Chem*, 2020, 22: 788–802
- 112 Yuan XJ, Chen WJ, Ma ZX, Yuan QQ, Zhang M, He L, Mo XH, Zhang C, Zhang CT, Wang MY, Xing XH, Yang S. *Metab Eng*, 2021, 64: 95–110
- 113 Irla M, Heggset TMB, Nærdal I, Paul L, Haugen T, Le SB, Brautaset T, Wendisch VF. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1481
- 114 Irla M, Nærdal I, Brautaset T, Wendisch VF. *Industrial Crops Products*, 2017, 106: 12–20
- 115 Brautaset T, Jakobsen ØM, Degnes KF, Netzer R, Nærdal I, Krog A, Dillingham R, Flickinger MC, Ellingsen TE. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 951–964
- 116 Zhang W, Zhang T, Song M, Dai Z, Zhang S, Xin F, Dong W, Ma J, Jiang M. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 2803–2811
- 117 Bennett RK, Dillon M, Gerald Har JR, Agee A, von Hagel B, Rohlhill J, Antoniewicz MR, Papoutsakis ET. *Metab Eng*, 2020, 60: 45–55
- 118 Guo Q, Liu MM, Zheng SH, Zheng LJ, Ma Q, Cheng YK, Zhao SY, Fan LH, Zheng HD. *J Agric Food Chem*, 2022, 70: 14255–14263
- 119 Wang C, Ren J, Zhou L, Li Z, Chen L, Zeng AP. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 2483–2493
- 120 Bai C, Liu Y, Chen X, Qian Z, Liu H, Zhou X, Zhang Y, Cai M. *Bioresour Bioprocess*, 2020, 7: 32
- 121 Zhu Q, Liu Q, Yao C, Zhang Y, Cai M. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: 10187–10199
- 122 Jin X, Zhang W, Wang Y, Sheng J, Xu R, Li J, Du G, Kang Z. *Green Chem*, 2021, 23: 4365–4374
- 123 Bachleitner S, Severinsen MM, Lutz G, Mattanovich D. *Metab Eng*, 2024, 85: 133–144
- 124 Suzuki T, Yamane T, Shimizu S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 24: 366–369
- 125 Wang J, Chae M, Beyene D, Sauvageau D, Bressler DC. *Bioresour Tech*, 2021, 330: 124969
- 126 Wang J, Chae M, Sauvageau D, Bressler DC. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 193
- 127 Tan Y, Stein LY, Sauvageau D. *Sci Rep*, 2022, 12: 13154

- 128 Tan Y, Stein LY, Sauvageau D. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2023, 46: 969–980
- 129 Liu WC, Gong T, Wang QH, Liang X, Chen JJ, Zhu P. *Sci Rep*, 2016, 6: 18439
- 130 Boojari MA, Rajabi Ghaledari F, Motamedian E, Soleimani M, Shojaosadati SA. *Microb Biotechnol*, 2023, 16: 1344–1359
- 131 Cai P, Duan X, Wu X, Gao L, Ye M, Zhou YJ. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 7791–7805
- 132 Wu X, Cai P, Yao L, Zhou YJ. *Eng Microbiol*, 2023, 3: 100094
- 133 Tellechea-Luzardo J, Otero-Muras I, Goñi-Moreno A, Carbonell P. *Trends Biotechnol*, 2022, 40: 831–842
- 134 Peña DA, Gasser B, Zanghellini J, Steiger MG, Mattanovich D. *Metab Eng*, 2018, 50: 2–15
- 135 Sanford PA, Woolston BM. *Curr Opin Biotechnol*, 2022, 74: 171–179

Advances in microbial bioconversion of methanol

Peng Cai¹, Xiaoyan Wu^{1,2}, Linfeng Xie^{1,2}, Yiwei Shen^{1,2}, Linhui Gao^{1,2}, Yongjin Zhou^{1,2*}

¹ Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author (email: zhouyongjin@dicp.ac.cn)

Abstract: Methanol bioconversion represents a critical approach for addressing the global climate crisis and achieving sustainable low-carbon production. However, microorganisms encounter significant challenges under methanol metabolism, including biological toxicity, low methanol tolerance, and tight metabolic adaptation, resulting in reduced cell growth and chemical production. This review provides an overview of recent advancements in engineering microbial conversion of methanol, with a particular emphasis on reconstructing and designing of metabolic pathways in both natural and synthetic methylotrophs. It also discussed rational redesign and adaptive evolution strategies in regulating methanol metabolism, alongside the current state of methanol fermentation processes. Finally, we discussed the current challenges of methanol bioconversion and put forward the future direction for the industrialization of methanol bioconversion.

Keywords: methanol biotransformation, methanol dehydrogenase, formaldehyde assimilation, methanol cell factory, adaptive evolution

doi: [10.1360/SSC-2024-0161](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0161)