

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-048

合成甲基营养细胞工厂同化甲醇的研究进展及未来展望

张卉^{1,2}, 袁姚梦^{3,4}, 张翀^{3,4}, 杨松^{1,2,5}, 邢新会^{3,4}

(¹ 青岛农业大学生命科学院, 山东 青岛 266109; ² 青岛农业大学, 山东省应用真菌重点实验室, 山东 青岛 266109; ³ 清华大学化学工程系生物化工研究所, 工业生物催化教育部重点实验室, 北京 100084; ⁴ 清华大学合成与系统生物学研究中心, 北京 100084; ⁵ 青岛农业大学, 青岛生物沼气环境微生物国际合作基地, 山东 青岛 266109)

摘要: 甲醇具有来源广、易储存运输、原料价格竞争力强等优势, 被视为极具潜力的生物制造非糖基碳源资源。常用的模式底盘微生物研究历史长、认知清楚、操作工具多, 在工程化改造中具有显著优势。近年来, 通过借鉴天然甲基营养型微生物的甲醇利用途径对模式底盘进行改造, 获得具备高效利用甲醇能力的合成甲基营养细胞工厂的研究日益受到关注。本文系统综述合成甲基营养细胞工厂的甲醇氧化、同化基因及其调控元件, 和以共用糖基碳源结合适应性进化策略为主的核酮糖单磷酸途径重构及甲醇同化途径设计构建的研究现状, 进而结合合成甲基营养细胞工厂面临的挑战进行展望, 提出基于全基因组靶向基因编辑技术结合实验室适应性进化策略构建更高效合成甲基营养细胞工厂的研究方向。

关键词: 甲醇; 合成甲基营养细胞工厂; 生物元件; 核酮糖单磷酸途径; 实验室适应性进化

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A

Research progresses and future prospects of synthetic methylotrophic cell factory for methanol assimilation

ZHANG Hui^{1,2}, YUAN Yaomeng^{3,4}, ZHANG Chong^{3,4}, YANG Song^{1,2,5}, XING Xinhui^{3,4}

(¹School of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China; ²Shandong Province Key Laboratory of Applied Mycology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China; ³Key Lab of Industrial Biocatalysis, Ministry of Education, Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ⁴Center for Synthetic and Systems Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ⁵Qingdao International Center on Microbes Utilizing Biogas, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China)

Abstract: Methanol is an important and attractive non-sugar carbon source for industry biotechnology due to its advantages of available source, easy storage, convenient transportation and competitive price. The widely-studied microorganisms such as *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* and *Saccharomyces cerevisiae* have a long research history, clear genetic background and a number of matured genetic tools, showing their potential in engineering cell factories for bioproduction. With the accumulated knowledge of native methylotrophs in recent years,

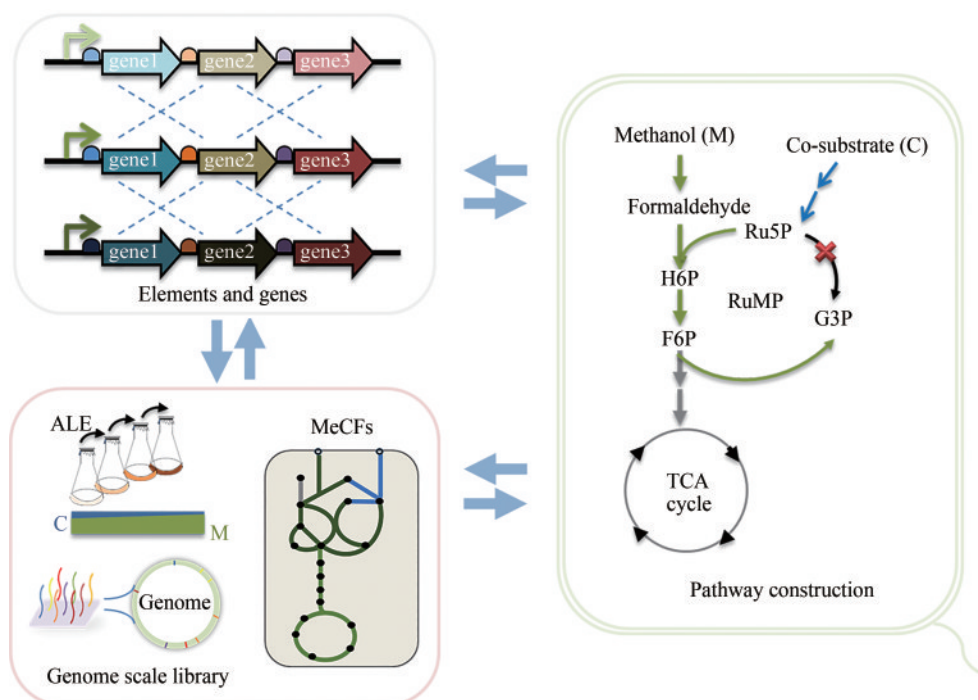
收稿日期: 2020-06-15 修回日期: 2021-01-11

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0901500)

引用本文: 张卉, 袁姚梦, 张翀, 杨松, 邢新会. 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

Citation: ZHANG Hui, YUAN Yaomeng, ZHANG Chong, YANG Song, XING Xinhui. Research progresses and future prospects of synthetic methylotrophic cell factory for methanol assimilation[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(2): 222-233

these traditional industrial microorganisms have been engineered as methylotrophic cell factories (MeCFs) capable of using methanol as the major carbon and energy source. In this article, we review the recent research progress including genes involved in the methanol oxidation, assimilation and regulatory elements of MeCFs. We also summarized the strategies based on the adaptive laboratory evolution which applies sugar as the co-substrate to construct the ribulose monophosphate (RuMP) cycle, as well as strategies for designing and tuning methanol assimilation pathway. In the synthetic MeCFs, the construction of the RuMP cycle requires the introduction of three heterologous enzymes, i.e., methanol dehydrogenase encoded by *mdh*, 3-hexulose 6-phosphate synthase encoded by *hps* and 6-phospho 3-hexuloisomerase encoded by *phi*. These enzymes can be further engineered to improve activities through protein engineering and directed evolution. Meanwhile, genes involved in methanol oxidation and assimilation pathways can be finely tuned to exhibit dynamic expression. To further improve methanol utilization of the synthetic MeCFs, the co-substrate for supporting growth has been developed to propel methanol assimilation, which rationally designs a methanol dependent growth model, and thus provides an ideal starting point for subsequent long-term adaptive laboratory evolution experiments. At the end, we discuss the challenges of engineering the synthetic MeCFs, and summarize the future prospects for improving the efficiency of methanol utilization through the combined strategies of genome-wide targeted gene editing and adaptive laboratory evolution.



Keywords: methanol; synthetic methylotrophic cell factory; biological elements; ribulose monophosphate pathway; adaptive laboratory evolution

生物经济成为绿色可持续产业和社会发展的重要模式，其核心是生物制造。然而，不可再生的化石资源和与人争粮的糖基原料已经难以作为最优原料支撑工业生物制造的应用发展^[1]，同时

木质纤维素原料目前仍存在预处理技术和经济性的局限，因此寻找合适的非糖替代原料是生物制造的重要挑战^[2]。廉价和来源广泛的有机碳一原料甲醇，主要可以由煤和天然气生产，并且通过

沼气或城市固体废物产生的二氧化碳与电解生成的氢气进行反应获得可再生的甲醇^[3-5]。与传统的糖基原料相比,甲醇具有更高还原性,可作为碳源生产包括长链醇、有机酸和碳氢化合物在内的高附加值的化学物质^[6-7]。

自然界中存在大量以甲醇为碳源的甲基营养型微生物,其独特的代谢机制使得它们能够以甲醇为唯一碳源和能源合成细胞生长需要的物质和能量^[8-9]。目前,自然界发现的利用甲醇的甲基营养型微生物主要包括甲基细菌和酵母菌,这些甲基微生物可以利用不同类型的甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenases, Mdh),包括吡咯喹啉醌(pyrrroloquinoline quinone, PQQ)依赖的Mdh^[10]、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)依赖的Mdh^[11]、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)依赖的醇氧化酶(Aods)^[12]。尽管利用天然甲基营养型细菌将甲醇转化成甲羟戊酸^[13-14]、3-羟基丙酸^[15]和蛇麻烯^[16]等化学产品的研究已经取得一些进展,但由于存在遗传背景不完全清楚、遗传工具相对较少以及甲醇利用率偏低等局限,制约了天然甲基营养型细菌的广泛应用发展^[17-18]。近年来,以遗传操作与工程化改造更为便捷的模式底盘微生物为基础,将其代谢网络重塑为能以甲醇作为碳源合成高附加值化学品的合成甲基营养细胞工厂成为重要发展方向。现有的研究一般利用模式底盘微生物(大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌、酿酒酵母等),通过引入天然甲基营养型微生物的甲醇同化途径^[19],包括丝氨酸循环途径(serine cycle)、核酮糖单磷酸途径(ribulose monophosphate cycle, RuMP)、木酮糖单磷酸途径(xylulose monophosphate cycle, XuMP)或核酮糖二磷酸途径(ribulose biphosphate cycle, RuBP)构建合成甲基营养细胞工厂,其中存在于天然甲基营养型微生物中的RuMP能够通过3-己酮糖-6-磷酸合成酶(3-hexulose-6-phosphate synthase, Hps)直接将甲醇氧化产物甲醛与核酮糖-5-磷酸(Ru5P)缩合生成己酮糖-6-磷酸(H6P),该过程可更高效利用辅因子及能量,被认为是十分有效的有机碳一同化途径^[20]。本文系统综述了合成甲基营养细胞工厂的关键生物元件、核酮糖单磷酸途径

(RuMP)构建与甲醇同化途径设计优化的研究现状,进而结合合成甲基营养细胞工厂面临的机遇和挑战,对未来的研究方向进行展望。

1 合成甲基营养细胞工厂中甲醇氧化、同化基因及其调控元件

合成甲基营养细胞工厂中氧化甲醇的第一步反应,一般选用来源于革兰氏阳性天然甲基营养菌且NAD为辅助因子的Mdh。主要原因是NAD依赖的Mdh在好氧和厌氧条件下都能将甲醇脱氢产生电子,用于生成代谢产物^[21]。然而,该类Mdh催化甲醇活性偏低是合成甲基营养细胞工厂构建的一个重大瓶颈^[22-24],亟需开发更加高效的Mdh。Witthoff等^[25]首先在谷氨酸棒状杆菌中构建了RuMP途径,发现异源表达来源于甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)的Mdh和内源激活蛋白(endogenous activator protein, Act)效果最佳。在大肠杆菌中,Müller等^[26]发现了来自甲醇芽孢杆菌(*B. methanolicus*)的Mdh2最有效。随后,Wu等^[27]首次发现源于非甲基营养菌的钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator* N-1)中的Mdh2在大肠杆菌中具有催化活性,并且通过酶定向性进化Mdh2,使其对甲醇催化效率提高6倍。Whitaker等^[22]也发现非甲基营养的嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)中的Mdh在大肠杆菌中具有一定催化活性,其氧化甲醇的 K_m 值较低,更加有利于甲醇氧化。最近,为了解决Mdh催化效率低的问题,Roth等^[28]用甲醛传感器开发噬菌体辅助非连续进化(PANCE)方法,对来自甲醇芽孢杆菌的Mdh2进行进化,使其催化活性提高3.5倍,为Mdh进一步改造提供了理论基础。甲醇氧化生成的甲醛,可以被RuMP途径中的Hps和6-磷酸-3-己酮糖异构酶(Phi)同化进入下游中心代谢。需要注意的是,除了Mdh、Hps和Phi之外,近年来还有研究报道通过计算并加以人工设计改造的酶,如甲醛酶(Fls)^[29]和乙醇醛合成酶(Gal)^[30]构建全新的代谢路径实现甲醛同化进入下游代谢。

研究者还发现通过蛋白组装策略构建的多酶复合物,可以快速固定甲醛,显著提高甲醇利用

效率。例如, Price等^[31]利用无支架的蛋白自组装策略,使用SH3配体的相互作用获得Mdh-Hps-Phi的工程化超分子酶复合物,使得体外果糖-6-磷酸(F6P)的产量提高了97倍,最终的甲醇体外消耗速率提高了2.3倍。同样,Fan等^[32]通过融合蛋白策略,将嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)来源的Mdh与甲醇芽孢杆菌(*B. methanolicus* MGA3)来源的Hps和Phi进行融合表达,利用最优柔性连接肽(GGGGS)₃和(GGGGS)₆连接Mdh、Hps与Phi,形成的融合蛋白酶提高了甲醇氧化及转化成F6P的效率。在Mdh-Hps-Phi多酶复合物的级联反应中,通过酶复合物降低了酶分子的空间距离,提高甲醛转化成F6P的代谢效率,强化了甲醇消耗。

此外,在合成甲基营养细胞工厂中,甲醇被Mdh氧化产生甲醛,而甲醛对细胞具有毒性,因此,甲醛诱导型启动子(P_{frm})对于细胞工厂的构建十分重要。 P_{frm} 是大肠杆菌中的天然启动子,受FrmR蛋白的负反馈调控,只有在甲醛存在条件下,FrmR才会优先与甲醛结合,从而解除对启动子 P_{frm} 抑制,启动下游基因表达^[33-34]。利用这一特点,Rohllill等构建了基于 P_{frm} 诱导基因表达盒(*mdh-hps-phi*)表达的质粒,避免了甲醛胞内积累,实现了对*mdh-hps-phi*操纵子的动态调控^[35]。

2 合成甲基营养细胞工厂中构建RuMP同化甲醇

天然甲基营养细胞工厂中的RuMP主要包括三个模块:包含Hps和Phi的甲醛固定模块;将F6P转化成C₃中间代谢物丙酮酸的转化模块;甲醛受体Ru5P再生的碳重排模块,其中高效的甲醛受体再生是甲醇同化的关键所在^[5, 23, 36]。由于典型底盘细胞工厂拥有完整的糖酵解途径和三羧酸循环途径,在其中引入天然甲基营养型微生物RuMP关键基因*mdh*、*hps*和*phi*,利用其代谢产生的中间产物,并以糖基碳源作为辅助碳源,可以实现对甲醇的氧化同化。目前的研究策略主要包括:增强甲醛受体再生;共用糖基碳源结合实验室适应性

进化策略增强甲醇同化;合成甲基营养细胞工厂中甲醛代谢和还原力动态调控。

2.1 增强甲醛受体再生

合成甲基营养细胞工厂中甲醛受体Ru5P不足是限制甲醇同化效率的关键原因,阻断F6P进入氧化型磷酸戊糖途径的代谢流,提高非氧化戊糖磷酸途径(non-oxidative pentose phosphate pathway, PPP)相关基因的表达,是增强Ru5P再生的一种策略。此外,异源表达编码果糖二磷酸醛缩酶(Fba)和景天庚酮糖二磷酸酶(Glpx)的基因(图1),并结合提高本源的6-磷酸果糖激酶(Pfk)、转酮酶(Tkt)、核酮糖磷酸差向异构酶(Rpe)和核糖磷酸异构酶(Rpi)的表达量,是增强Ru5P再生的另一策略。基于这些策略,Bennett等^[36-38]在合成甲基营养细胞工厂构建时,敲除编码磷酸葡萄糖异构酶的基因*pgi*,阻断了F6P进入氧化型磷酸戊糖途径的代谢流,并过表达甲醇芽孢杆菌中编码五种酶(Pfk, Fba, Glpx, Rpe和Tkt)的基因,强化了Ru5P的前体物供给,从而显著改善了甲醇在大肠杆菌中的同化效率。同样,Woolston等^[23]过表达编码Glpx的基因,并利用小分子抑制剂(碘乙酸盐)减少糖酵解途径代谢流量,同样提高了甲醇同化进入大肠杆菌中心碳代谢的效率。最近,Rohllill等^[39]利用甲醛诱导启动子 P_{frm} 过表达*pfk*、*fba*、*glpx*、*rpe*和*tkt*,实现动态调控Ru5P再生,促进甲醇同化过程。

2.2 共用糖基碳源结合实验室适应性进化策略强化甲醇同化

由于在合成甲基营养细胞工厂中引入RuMP途径的代谢通量偏少,目前研究者普遍以添加糖基碳源结合实验室适应性进化(adaptive laboratory evolution, ALE)策略构建甲醇利用的合成甲基营养细胞工厂^[40]。其中,共用的糖基碳源被用于生成Ru5P,而甲醇主要提供合成甲基细胞中心代谢所需的碳源。因此,根据不同共用糖基碳源的代谢途径,计算模拟设计出不同的营养缺陷菌株,进而结合ALE策略以增强合成甲基营

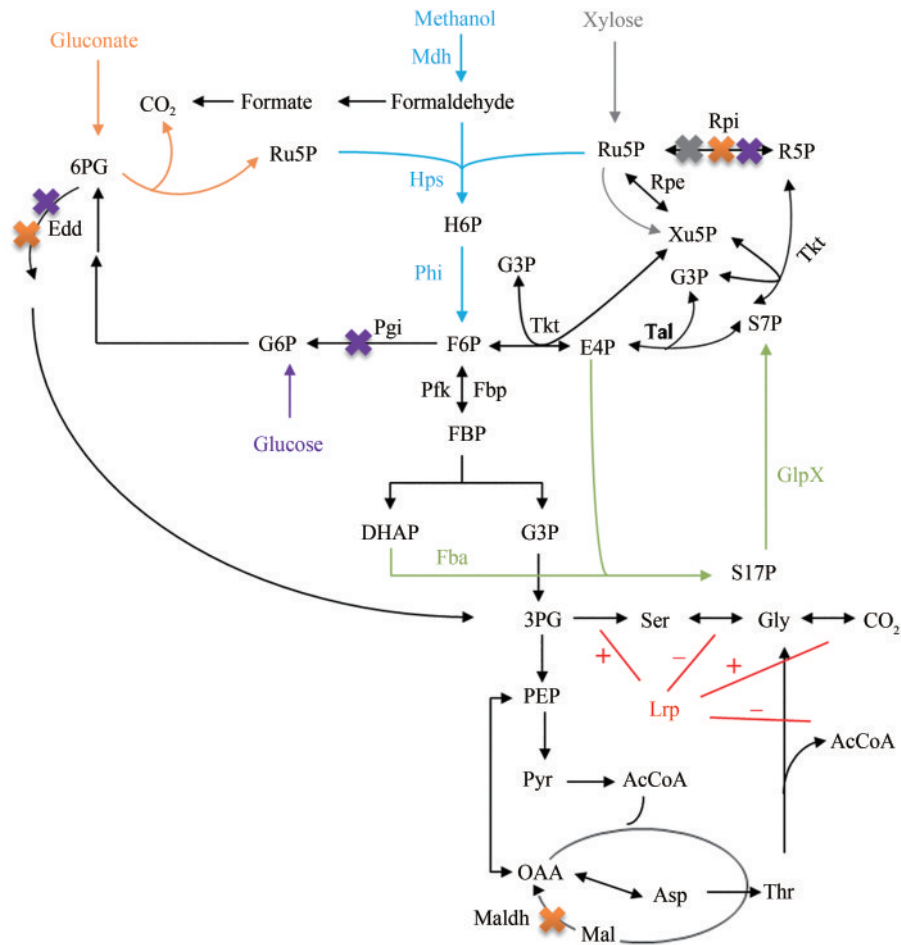


图1 基于共用糖基碳源的合成甲基营养细胞工厂构建的代谢途径^[36-38, 41-45]

(蓝色指示代表 RuMP 途径; 橘色, 紫色和灰色号分别指示在合成甲基营养细胞工厂构建中敲除 *edd*、*rpi* 和 *maldh*, 并以葡萄糖酸为共用糖基的代谢途径, 敲除 *edd*、*rpi* 和 *pgi* 并以葡萄糖为共用糖基的代谢途径以及敲除 *rpi* 以木糖为共用糖基的代谢途径; 绿色指示代表异源表达 *glpX* 和 *fba* 的基因; 红色指示代表亮氨酸响应调控蛋白的调控, 其中 “+” 代表激活途径, “-” 代表抑制途径)

Fig. 1 The construction of the synthetic methylotrophic cell factory based on the sugar as the co-substrate^[36-38, 41-45]

[The blue represents the Rump pathway; the orange, purple and gray represent the metabolic pathway of knocking out genes (*edd*, *rpi* and *maldh*) based on the gluconate as the co-substrate, knocking out genes (*edd*, *rpi* and *pgi*) using glucose as the the co-substrate, knocking out the gene *rpi* based on the xylose as the co-substrate, respectively; the green represents the heterologous expression of genes *glpX* and *fba*. The red represents the regulation of leucine-responsive protein, in which “+” represents the activation pathway and “-” represents the inhibition pathway]

养细胞工厂利用甲醇的代谢通量。Meyer 等^[41] 首先基于模拟代谢网络分析, 发现在大肠杆菌底盘中敲除编码磷酸葡萄糖酸脱水酶的基因 *edd* 和编码核糖磷酸异构酶的基因 *rpi* (图 1) 且引入甲醇同化途径, 以葡萄糖酸为共用糖基碳源, 并加入 0.1 g/L 酵母粉和 20 mmol/L 丙酮酸作为辅助碳源, 通过传代培养初次获得依赖甲醇生长的进化菌株 MeSV1.1。随后, 通过敲除进化菌株 MeSV1.1 编码苹果酸脱氢酶的基因 *maldh* 以平衡胞内氧化还

原状态, 进而获得更依赖甲醇生长的适应性进化菌株 MeSV2.1 和 MeSV2.2。而最终进化菌株 MeSV2.2 在 5 mmol/L 葡萄糖酸和 500 mmol/L 甲醇作为碳源的情况下, 培养 100 h 后 OD₆₀₀ 达到 1.3, 甲醇消耗速率达到了 (13±7)mmol/(g·h)(以 CDW 计), 接近天然的甲基营养菌。Bennett 等^[42] 以葡萄糖为共用糖基碳源, 使进化的大肠杆菌获得甲醇依赖性生长的特性, 进化菌株的比生长速率可以达到 0.15 h⁻¹。Chen 等^[43] 以木糖为共用糖基碳源时,

通过 ALE 实验, 进化菌株能够以等摩尔比消耗甲醇和木糖, 获得 0.17 h^{-1} 的比生长速率。Tuyishime 等^[44]以木糖为甲醇依赖生长工程菌的辅助糖基碳源, 最终在谷氨酸棒杆菌进化菌株 MX-11 中实现部分利用甲醇合成谷氨酸。此外, 有研究者发现某些氨基酸 (如苏氨酸) 作为甲醇的共同利用底物, 可以明显提高甲醇利用效率, 而且激活氨基酸的代谢途径 (即敲除亮氨酸响应调控蛋白 Lrp), 也可以提高合成甲基营养细胞工厂同化甲醇效率 (图 1)^[45]。除此之外, 表 1^[46]总结了目前合成甲基营养细胞工厂构建中, 共用糖基碳源增强甲醇同化的研究进展。不同于上述工作, Liao 课题组 2020 年最新研究报道利用代谢途径理性设计与适应性进化策略, 首次实现大肠杆菌底盘中构建的合成甲基营养细胞工厂能够以甲醇作为唯一碳源和能源进行生长, 最终获得的进化菌株倍增时间 8.5 h, 进化菌株 SM1 在 72 h 内生物量 OD_{600} 值达到 2^[24]。

实验室适应性进化的结果如表 2 所示, 进化菌株突变基因的基本特点是降低了利用共用糖基碳源的相关酶催化活性, 从而实现降低本源的碳代谢途径和能量代谢途径 (如糖酵解途径、Entner-Doudoroff 途径和 TCA 循环) 的代谢流, 以维持胞内碳代谢流和氧化还原的平衡状态。值得注意的是 Liao 课题组近期研究结果也发现甲醛脱毒途径相关基因的突变, 即进化菌株 CFC526.16 编码 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因发生 SNP 突变, 调低了 Entner-Doudoroff 途径代谢通量, 从而实现 RuMP 途径、糖酵解途径和磷酸戊糖途径的代谢平衡。此外, 该研究还发现在进化过程中存在插入序列介导的基因组上基因拷贝数动态变化现象, 一段富含甲醇同化途径和糖异生途径所需基因的 DNA 大片段 (约 70 kb) 随着细胞进化代数增加而相应增加片段拷贝数, 这一动态变化是与进化菌株的高效甲醇同化代谢过程相一致的^[24]。

表 1 共用糖基碳源增强甲醇同化

Tab. 1 Enhancement of methanol assimilation based on the sugar as the co-substrate

碳源	宿主	Mdh、Hps 和 Phi 来源	甲醇同化进展	文献
甲醇和酵母抽提物	大肠杆菌	嗜热脂肪芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌	39% 三羧酸循环中间产物和 53% 糖酵解中间产物被 ^{13}C 甲醇标记, 实现柚皮素合成	[22]
	大肠杆菌	嗜热脂肪芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌	增强核酮糖-5-磷酸再生和甲醇同化, 增加 3-磷酸甘油酸和磷酸烯醇式丙酮酸的 ^{13}C 甲醇标记量	[38]
	大肠杆菌	嗜热脂肪芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌	$P_{\beta m}$ 控制动态调控酶的活性, 增加大肠杆菌在甲醇中的生长速率	[39]
甲醇和葡萄糖	谷氨酸棒状杆菌	甲醇芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌	甲醇消耗速率为 $1.7 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$	[25]
	大肠杆菌	嗜热脂肪芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌	增加甲醇进入中间代谢物的碳通量	[38]
甲醇和葡萄糖酸盐	大肠杆菌	甲醇芽孢杆菌, 甲基鞭毛杆菌, 甲基鞭毛杆菌	通过实验室适应性进化, 24% 甲醇进入中心碳代谢, 甲醇可作为主要生长碳源	[41]
甲醇和木糖	大肠杆菌	钩虫贪铜菌, 甲醇芽孢杆菌, 甲基鞭毛杆菌	通过实验室适应性进化, 甲醇和木糖大约以 1:1 的摩尔比共同消耗, 进化菌株的生长速率为 $(0.17 \pm 0.006) \text{ h}^{-1}$, 并利用甲醇生产乙醇和丁醇	[43]
	大肠杆菌	甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌	进化的 Mdh2 突变体最大反应速度增加 3.5 倍, 甲醇进入突变菌株中心代谢物的碳通量是未突变菌株的 2 倍	[28]
	谷氨酸棒状杆菌	嗜热脂肪芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌	高达 63% 的 ^{13}C 甲醇进入细胞内代谢物	[44]
甲醇和核糖	大肠杆菌	甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌, 甲醇芽孢杆菌	40% 的甲醇进入中心碳代谢途径	[26]
	谷氨酸棒状杆菌	甲醇芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌	25% 的 ^{13}C 标记出现在糖酵解和磷酸戊糖途径中间代谢物	[46]

表2 甲醇依赖菌株通过ALE获得的有利突变

Tab. 2 Summary of mutations obtained by adaptive laboratory evolution in synthetic methanol-dependent strains

宿主	基因名称	基因功能	基因突变类型	依赖甲醇生长的预测功能	文献
大肠杆菌	<i>frmA</i>	谷胱甘肽依赖的甲醛脱氢酶	移码突变	促进甲醛氧化为CO ₂ ,提供额外的NADH	[24]
	<i>fdoG</i>	甲酸脱氢酶	移码突变	促进甲酸氧化为CO ₂ ,提供额外的NADH	
	<i>gltA</i>	柠檬酸合成酶	转座子插入	降低三羧酸循环的碳通量,插入转座子元件	
	<i>ptsH</i>	编码Hpr的蛋白酶	转座子插入	破坏磷酸糖转移酶系统,插入转座子元件	
	<i>pgi</i>	磷酸葡萄糖异构酶	基因内缺失	提高磷酸葡萄糖异构酶酶活,增加细胞生长所需的NADPH	
大肠杆菌	<i>gntR</i>	DNA结合转录抑制子	碱基置换	改变葡萄糖酸摄取量	[41]
	<i>frmA</i>	谷胱甘肽依赖的甲醛脱氢酶	移码突变	失活甲醛氧化途径,甲醛用于同化途径	
	<i>nadR</i>	DNA结合转录抑制子/烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶	碱基置换	改变NAD ⁺ /NADH比值	
大肠杆菌	<i>ptsI</i>	组成磷酸转移酶系统的酶I	基因内缺失	降低葡萄糖消耗速率	[42]
	<i>icd</i>	异柠檬酸脱氢酶	基因内缺失	降低三羧酸循环的碳通量,以维持细胞氧化还原平衡	
大肠杆菌	<i>zwf</i>	6-磷酸葡萄糖脱氢酶	碱基置换	调低Entner-Doudoroff途径通量	[43]
	<i>pykF</i>	丙酮酸激酶I	基因内插入	调低糖酵解途径通量	
	<i>cyaA</i>	腺苷酸环化酶	基因内插入	降低三羧酸循环相关酶的转录水平,改变NAD ⁺ /NADH比值	
	<i>deoD</i>	嘌呤核苷磷酸化酶	基因内插入	提供甲醛固定受体	
	<i>frmAB, yaiO</i>	甲醛脱毒操纵子,外膜蛋白	基因间缺失	增加细胞内甲醛浓度	
	<i>atfR</i>	碳水化合物代谢的多功能调节子	碱基置换	提高醇脱氢酶和木糖激酶的催化活性以强化甲醇和木糖的利用效率	
谷氨酸棒状杆菌	<i>metY</i>	邻乙酰高丝氨酸甲基化酶	碱基置换	提高宿主对甲醇的耐受性	[44]
	<i>mtrA</i>	参与细胞形态、抗生素易感性、渗透保护在内的基因功能的多重调控子	碱基置换	通过调节类谷氧还蛋白和NAD ⁺ 合成酶,参与维持细胞内氧化还原状态	
	<i>cgl2030, ctaE</i>	预测的ATP激酶,细胞色素C氧化酶亚基蛋白酶	碱基置换	改变能量代谢	

2.3 合成甲基营养细胞工厂中甲醛代谢和还原力动态调控

在合成甲基营养细胞工厂构建中,引入异源MdhS不仅生成甲醛,还会伴随还原力(还原性烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, NADH)的产生。从热力学角度分析, NADH的积累会增加催化反应的吉布斯自由能,不利于合成甲基营养细胞工厂氧化甲醇的第一步反应。在以糖基作为碳源生长时, TCA循环同样也产生NADH,而天然甲基营养型细菌普遍缺少完整的TCA循环,这就有利于NADH平衡,而且有研究证明较低代谢活性的TCA有利于甲醇同化^[20]。基于此, Keller等^[40]在开展进化甲醇依赖菌株研究时,通过代谢流平衡分析(FBA)证实了在葡萄糖酸盐和甲醇的双碳

源下,生长不需要完整的TCA循环,进而将TCA循环中依赖于NADH的苹果酸脱氢酶(Maldh)的基因敲除,以增加进化菌株对甲醇的依赖性。同样, Rohlhill等^[39]也将干扰甲醛代谢的基因*maldh*敲除,并使用甲醛诱导型启动子P_{frm}调控磷酸戊糖途径的*rpe*和*tkt*基因表达。除此之外,为了克服NADH积累,驱动甲醇氧化, Price等^[31]利用蛋白质工程手段改造RuMP关键酶活性时,使用大肠杆菌来源的乳酸脱氢酶(Ldh)催化丙酮酸,从而循环再生NAD⁺(图2)以促进甲醇转化。在合成甲基营养细胞工厂构建中,多余的NADH通过转化酶再生为NADPH,从而有利于生产赖氨酸^[47]和1,3-丙二醇^[48]等高消耗NADPH的化学品。

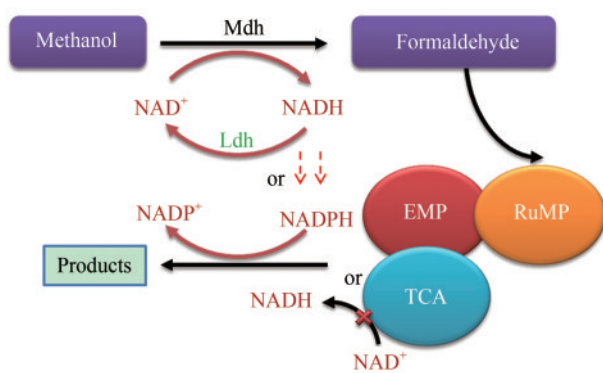


图2 细胞工厂内甲醛代谢和还原力的动态调控

Fig. 2 Dynamic regulation of formaldehyde metabolism and reducing power in the cell factory

3 其他途径在合成甲基营养细胞工厂中同化甲醇的应用

除了RuMP途径，还可以引入并改造丝氨酸循环途径和XuMP途径构建合成甲基营养细胞工厂。而且，有研究者通过计算设计出简化有机碳一同化途径的新颖酶，通过人工合成甲醇利用途径以实现甲醇的高效利用。

Liao课题组^[49]首先在大肠杆菌中重构扭脱甲基杆菌(*Methylorubrum extorquens*)的丝氨酸循环途径，以木糖作为共底物碳源，实现1分子甲酸和1分子碳酸氢盐生成1分子乙酰辅酶A，该过程消耗3分子ATP和1分子NADH。最近，Bar-Even课题组^[50]构建的高丝氨酸循环途径是依赖于大肠杆菌本源丝氨酸醛缩酶(*serine aldolase, SAL*)和4-羟基-2-氧代丁酸酯醛缩酶(*4-hydroxy-2-oxobutanoate aldolase, HAL*)的两个混杂甲醛醛缩酶反应，该途径只消耗1分子ATP生成乙酰辅酶A，其效率优于改良的丝氨酸循环。在XuMP途径重构的研究中，姜岷教授课题组初次在酿酒酵母细胞基因组上整合毕赤酵母甲醇代谢途径，实现酿酒酵母同化甲醇以增加生物量^[51]。

Bogorad等^[52]将非氧化糖酵解(NO_G)与RuMP途径相结合，将甲醇转化为乙酰辅酶A，形成了一种不依赖ATP的非氧化糖酵解甲醇缩合途径(MCC)。基于计算设计的甲醛酶(Fls)途径、合成乙酰辅酶A(SACA)途径和2-羟酰基辅酶A裂解酶(Ha_{cl})途径都是能够代谢甲醛的线性途

径，是甲醇同化的可行性选择^[29, 30, 53]。其中，合成SACA途径是现有途径最短、ATP非依赖和氧气不敏感的甲醇同化途径，可获得体外50%的甲醇同化效率^[30]。最近，中国科学院天津工业生物技术研究所的马延和研究员课题组通过计算筛选出苯甲酰甲酸酯脱羧酶(Gals)和转醛缩酶(TalB^{F178Y})两种工程酶进行人工反应，构建了新的体外C₁同化途径(乙醇醛同化途径)，优化该途径使其碳效率达到88%^[54]。

总之，计算设计获得新颖途径能力的不断增强，可以加快碳同化效率，减少能量消耗，为高效同化甲醇合成甲基营养细胞工厂的工程化改造提供新思路。

4 合成甲基营养细胞工厂面临的挑战及未来展望

合成甲基营养细胞工厂的构建，是基于天然甲基营养型微生物，借鉴其转化和利用甲醇的代谢机制，利用工程化方法改造底盘细胞，从而构建甲醇依赖型合成甲基营养菌株。由于模式底盘细胞的遗传背景清晰、遗传操作工具丰富、可工程化利用的生物元件成熟，蛋白质工程改造和代谢产物生物传感器的不断发展，为合成甲基营养细胞工厂的创制提供了基础保障^[55-56]。

最近Liao课题组突破性获得以甲醇作为唯一碳源和能源生长的大肠杆菌进化菌株^[24]，为深入研究合成甲基营养细胞工厂起到重要的推动作用。不过相比于天然甲基微生物倍增时间为3~4 h，合成甲基细胞工厂生长效力还显著偏低^[24]，如何进一步提高其生长速率和生物量得率，以实现合成甲基细胞工厂高效催化甲醇转化成高附加值化学产品仍是研究焦点。目前以甲醇为唯一碳源和能源的合成甲基营养菌株构建面临着巨大挑战，存在三大主要问题亟需解决。第一，甲醇和甲醛等物质对细胞的毒性问题^[57]。即使是天然甲基微生物，对有机醇类的耐受也有一定局限^[14, 58-60]。谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌等非甲基细菌对甲醇耐受性更低，为了解决这个问题，一方面，可以从甲醇依赖的谷氨酸棒状杆菌或大肠杆菌的ALE实验

中获得相关基因的突变位点,开展甲醇耐受的组合突变改造;另一方面,可以利用全基因组规模CRISPRi技术开发的高通量基因型和表型关联方法对菌体的耐受机制展开研究,获得提升耐受性的关键功能基因位点^[61-62],此外也可以借鉴其他有机醇的耐受机制加以改造^[59]。第二,甲醛和甲醛受体的合理匹配问题。胞内甲醛不足导致RuMP途径同化效率低的问题,可通过蛋白质设计策略和甲醇生物传感器辅助PANCE的高通量筛选更高效异源Mdhs来解决^[28],而针对甲醛过量积累导致的细胞毒性,可以设计甲醛生物传感器动态调控甲醛合成与同化的代谢过程。而解决甲醛受体再生问题,主要通过精细表达异源RuMP相关基因,或挖掘RuMP潜在局部转录调控子从转录层面进行系统优化调控^[19]。第三,理性设计结合ALE,驱动RuMP代谢流合理分配及向下游代谢途径转化。其中,通过增加前体物的含量、敲除旁支途径使得RuMP代谢流在甲醇的选择压力下向下游代谢模块途径拖拽。最近以CO₂为碳源的自养型大肠杆菌^[63]和酵母菌^[64]的研究充分证实理性设计和ALE相结合进行微生物代谢重塑的可行性。

然而,由于ALE自发突变率很低,需要通过长期连续传代培养以富集突变。近年来,包括CRISPRi^[61]、CRISPRa^[65]、CREATE^[66]在内的CRISPR技术的迅速发展为在全基因组范围内定制化设计基因型干扰和突变奠定了基础。在连续传代方面,近几年,eVOLVER作为可定制的自动化细胞培养的集成装置,根据用户需求提供自动化培养生长的实验参数,可以实现快速重新配置以适应几乎所有的自动化连续培养实验^[67]。我们自主研发的基于液滴微流控技术的高通量自动化微生物连续培养系统(MMC)^[68],可实现稳定传代100代,显著提升微生物适应性进化、耐受性表型样本获取的效率。未来需要将基于CRISPR的全基因组靶向基因编辑技术与高通量自动化ALE技术结合起来,能够大幅度提升合成甲基营养细胞工厂的构建效率,最终突破目前面临的构建以甲醇为唯一碳源的人工合成甲基营养细胞工厂的“生命暗物质”瓶颈,为发展基于高效合成甲基营养细胞工厂的生物制造提供技术基础。

符号说明

3PG	—	3-磷酸甘油酸 (3-phosphoglycerate)
6PG	—	6-磷酸葡萄糖酸 (6-phosphogluconate)
AcCoA	—	乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)
DHAP	—	磷酸二羟丙酮 (dihydroxyacetone phosphate)
E4P	—	赤藓糖-4-磷酸 (erythrose 4-phosphate)
Edd	—	磷酸葡萄糖酸脱水酶 (phosphogluconate dehydratase)
F6P	—	果糖-6-磷酸 (fructose 6-phosphate)
Fba	—	果糖二磷酸醛缩酶 (fructose bisphosphate aldolase)
G3P	—	3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde 3-phosphate)
G6P	—	葡萄糖-6-磷酸 (glucose 6-phosphate)
GlpX	—	景天庚酮糖二磷酸酶 (sedoheptulose bisphosphatase)
GltA	—	柠檬酸合成酶 (citrate synthase)
Gly	—	甘氨酸 (glycine)
H6P	—	己酮糖-6-磷酸 (hexulose 6-phosphate)
Hps	—	3-己酮糖-6-磷酸合成酶 (3-hexulose 6-phosphate synthase)
Mal	—	苹果酸 (malate)
Maldh	—	苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase)
Mdh	—	甲醇脱氢酶 (methanol dehydrogenase)
NADH	—	还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide hydride)
NADPH	—	还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydride)
OAA	—	草酰乙酸 (oxaloacetate)
PEP	—	磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate)
Pfk	—	磷酸果糖激酶 (phosphofruktokinase)
Pgi	—	磷酸葡萄糖异构酶 (phosphoglucose isomerase)
Phi	—	6-磷酸-3-己酮糖异构酶 (6-phospho 3-hexuloisomerase)
PYC	—	丙酮酸 (pyruvate)
R5P	—	核糖-5-磷酸 (ribose 5-phosphate)
Rpe	—	核酮糖磷酸差向异构酶 (ribulose phosphate epimerase)
Rpi	—	核糖磷酸异构酶 (ribose phosphate isomerase)
Ru5P	—	核酮糖-5-磷酸 (ribulose 5-phosphate)
S7P	—	景天庚酮糖-7-磷酸 (sedoheptulose 7-phosphate)
Ser	—	丝氨酸 (serine)
Tal	—	转醛酶 (transaldolase)
Thr	—	苏氨酸 (threonine)
Tkt	—	转酮酶 (transketolase)
Xu5P	—	木酮糖-5-磷酸 (xylulose 5-phosphate)

参考文献

- [1] CLOMBURG J M, CRUMBLEY A M, GONZALEZ R. Indus-

- trial biomanufacturing: the future of chemical production[J]. *Science*, 2017, 355(6320): 38.
- [2] ZHU T, ZHAO T, BANKEFA O E, et al. Engineering unnatural methylotrophic cell factories for methanol-based biomanufacturing: challenges and opportunities[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 39: 107467.
- [3] MARTENS J A, BOGAERTS A, DE KIMPE N, et al. The chemical route to a carbon dioxide neutral world[J]. *Chemsuschem*, 2017, 10(6): 1039-1055.
- [4] OLAH G A. Beyond oil and gas: the methanol economy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(18): 2636-2639.
- [5] ZHANG M, YUAN X J, ZHANG C, et al. Bioconversion of methanol into value-added chemicals in native and synthetic methylotrophs[J]. *Current Issues Molecular Biology*, 2019, 33: 225-236.
- [6] SCHRADER J, SCHILLING M, HOLTMANN D, et al. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(2):107-115.
- [7] ZHANG W M, SONG M, YANG Q, et al. Current advance in bioconversion of methanol to chemicals[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 260.
- [8] CHISTOSERDOVA L, KALYUZHNYAYA M G. Current trends in methylotrophy[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(8): 703-714.
- [9] CUI J, GOOD N M, HU B, et al. Metabolomics revealed an association of metabolite changes and defective growth in *Methylobacterium extorquens* AM1 overexpressing ecm during growth on methanol[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154043.
- [10] ANTHONY C, GHOSH M. The structure and function of the PQQ-containing quinoprotein dehydrogenases[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1998, 69(1): 1-21.
- [11] KROG A, HEGGESET T M, MÜLLER J E, et al. Methylotrophic *Bacillus methanolicus* encodes two chromosomal and one plasmid born NAD⁺ dependent methanol dehydrogenase paralog with different catalytic and biochemical properties[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59188.
- [12] GUNKEL K, VAN DIJK R, VEENHUIS M, et al. Routing of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase: an alternative peroxisomal protein-sorting machinery[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(3): 1347-1355.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] LENNART S V B, REMUS-EMSERMANN M, WEISHAUPT R, et al. A set of versatile brick vectors and promoters for the assembly, expression, and integration of synthetic operons in *Methylobacterium extorquens* AM1 and other alphaproteobacteria[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(4): 430.
- [18] CARRILLO M, WAGNER M, PETIT F, et al. Design and control of extrachromosomal elements in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(11): 2451-2456.
- [19] CHISTOSERDOVA L. Modularity of methylotrophy, revisited[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(10): 2603-2622.
- [20] MÜLLER J E, MEYER F, LITSANOV B, et al. Core pathways operating during methylotrophy of *Bacillus methanolicus* MGA3 and induction of a bacillithiol-dependent detoxification pathway upon formaldehyde stress[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(6): 1089-1100.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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(1): 2387.
- [24] 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.
- [25] WITTHOFF S, SCHMITZ K, NIEDENFÜHR S, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methanol metabolism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 2215-2225.
- [26] MÜLLER J E N, MEYER F, LITSANOV B, et al. Engineering *Escherichia coli* for methanol conversion[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 190-201.

- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] LU X, LIU Y, YANG Y, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1378.
- [31] PRICE J V, CHEN L, WHITAKER W B, et al. Scaffoldless engineered enzyme assembly for enhanced methanol utilization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(45): 12691-12696.
- [32] FAN L, WANG Y, TUYISHIME P, et al. Engineering artificial fusion proteins for enhanced methanol bioconversion[J]. 2018, 19(23): Chembiochem, 2465-2471.
- [33] OSMAN D, PIERGENTILI C, CHEN J, et al. The effectors and sensory sites of formaldehyde-responsive regulator FrmR and metal-sensing variant[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(37): 19502-19516.
- [34] DENBY K J, IWIG J, BISSON C, et al. The mechanism of a formaldehyde-sensing transcriptional regulator[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38879.
- [35] ROHLHILL J, SANDOVAL N R, PAPOUTSAKIS E T. Sort-seq approach to engineering a formaldehyde-inducible promoter for dynamically regulated *Escherichia coli* growth on methanol[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(8): 1584-1595.
- [36] 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.
- [37] BRAUTASET T, JAKOBSEN M Ø M, FLICKINGER M C, et al. Plasmid-dependent methylotrophy in thermotolerant *Bacillus methanolicus*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(5): 1229-1238.
- [38] MÜLLER J E, HEGGESET T M, 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.
- [39] 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.
- [40] KELLER P, NOOR E, MEYER F, et al. Methanol-dependent *Escherichia coli* strains with a complete ribulose monophosphate cycle[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5403.
- [41] MEYER F, KELLER P, HARTL J, et al. Methanol-essential growth of *Escherichia coli*[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1508.
- [42] 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.
- [43] CHEN C T, CHEN F Y, BOGORAD I W, et al. Synthetic methanol auxotrophy of *Escherichia coli* for methanol-dependent growth and production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 257-266.
- [44] TUYISHIME P, WANG Y, FAN L, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for methanol-dependent growth and glutamate production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 220-231.
- [45] GONZALEZ J E, BENNETT R K, PAPOUTSAKIS E T, et al. Methanol assimilation in *Escherichia coli* is improved by co-utilization of threonine and deletion of leucine-responsive regulatory protein[J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 67-74.
- [46] 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.
- [47] 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(1): 17.
- [48] WANG C, REN J, ZHOU L, 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.
- [49] 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(1): 3992.
- [50] HE H, HOPER R, DODENHOFT M, et al. An optimized methanol assimilation pathway relying on promiscuous formaldehyde-condensing aldolases in *E. coli*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 60: 1-13.
- [51] DAI Z, GU H, ZHANG S, et al. Metabolic construction strategies for direct methanol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 2017, 245(pt b): 1407-1412.

- [52] BOGORAD I W, CHEN C T, THEISEN M K, et al. Building carbon-carbon bonds using a biocatalytic methanol condensation cycle[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(45): 15928-15933.
- [53] CHOU A, CLOMBURG J M, QIAN S, et al. 2-Hydroxyacyl-CoA lyase catalyzes acyloin condensation for one-carbon bio-conversion[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(9): 900-906.
- [54] YANG X, YUAN Q, LUO H, et al. Systematic design and *in vitro* validation of novel one-carbon assimilation pathways[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 142-153.
- [55] ZHANG J, JENSEN M K, KEASLING J D. Development of biosensors and their application in metabolic engineering[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 28: 1-8.
- [56] ROGERS J K, TAYLOR N D, CHURCH G M. Biosensor-based engineering of biosynthetic pathways[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 84-91.
- [57] CHEN N H, DJOKO K Y, VEYRIER F J, et al. Formaldehyde stress responses in bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 257.
- [58] CUI L Y, WANG S S, GUAN C G, et al. Breeding of methanol-tolerant *Methylobacterium extorquens* AM1 by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis combined with adaptive laboratory evolution[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(6): e1700679.
- [59] HU B, YANG Y M, BECK D A, et al. Comprehensive molecular characterization of *Methylobacterium extorquens* AM1 adapted for 1-butanol tolerance[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 84.
- [60] HU B, LIDSTROM M E. Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* AM1 for 1-butanol production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 1-10.
- [61] WANG T M, GUAN C G, GUO J H, et al. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2475.
- [62] MO X H, ZHANG H, WANG T M, et al. Establishment of CRISPR interference in *Methylobacterium extorquens* and application of rapidly mining a new phytoene desaturase involved in carotenoid biosynthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(10): 4515-4532.
- [63] 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.
- [64] FABARIUS J T, WEGAT V, ROTH A, SIEBER V. Synthetic methylotrophy in yeasts: towards a circular bioeconomy[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 39(4):348-358.
- [65] DONG C, FONTANA J, PATEL A, et al. Synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2489.
- [66] GARST A D, BASSALO M C, PINES G, et al. Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(1): 48-55.
- [67] WONG B G, MANCUSO C P, KIRIAKOV S, et al. Precise, automated control of conditions for high-throughput growth of yeast and bacteria with eVOLVER[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(7): 614-623.
- [68] JIAN X J, GUO X J, WANG J, et al. Microbial microdroplet culture system (MMC): An integrated platform for automated, high-throughput microbial cultivation and adaptive evolution[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(6): 1724-1737.



通讯作者：杨松(1977—),男,博士,教授。主要研究方向为代谢工程和系统组学。
E-mail: yangsong1209@163.com



通讯作者：邢新会(1963—),男,博士,教授。主要研究方向为生物化工,合成生物学,生物育种。
E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn



第一作者：张卉(1996—),女,在读硕士。主要研究方向为微生物代谢工程。
E-mail: zhanghui_96@126.com