特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-084

嗜热微生物底盘细胞开发及应用进展

卜旭莹[1,2]，郭玉汶[1,2]，李英俊[1,2]
（[1] 华中农业大学，生命科学技术学院，武汉 430070；[2] 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，武汉 430070）

摘要：嗜热微生物因其在高温条件下的独特代谢优势与工业适配性，或许将成为合成生物学与下一代工业生物制造的关键嗜热底盘细胞资源。然而，高温环境在赋予嗜热微生物独特优势的同时，也对遗传操作、蛋白质稳定性及代谢调控提出了更高要求。近年来，随着人工智能与机器学习技术的发展，嗜热底盘正逐步由试错改造向AI驱动的理性设计转变，为实现底盘性能的精准预测与定向优化提供了新的技术路径。本文系统综述了嗜热底盘细胞的研究背景与代表性菌株特点，重点总结了遗传操作工具的开发进展，包括基于内源CRISPR-Cas系统与外源耐热Cas蛋白的高效基因组编辑技术、启动子工程与动态调控元件的构建；阐述了嗜热底盘细胞在碳源谱拓宽、产物合成途径重构、底物转运优化及代谢通路动态调控等方面的工程化改造策略；介绍了人工智能与机器学习在嗜热底盘细胞理性设计中的最新应用，涵盖AI驱动的遗传元件设计、蛋白热稳定性改造、新型基因组编辑工具发掘以及代谢网络热力学建模等方向；梳理了其在生物能源、生物基化学品、耐热酶制剂及合成生物学工具开发等领域的应用成果。最后，本文分析了嗜热底盘细胞当前面临的遗传工具通用性、产物耐受性及代谢模型构建等挑战，并对精准编辑技术迭代、元件系统化、多组学指导的代谢工程、AI赋能的智能化底盘开发以及工业场景拓展等未来发展方向进行了展望。

关键词：嗜热微生物；嗜热底盘细胞；合成生物学；CRISPR-Cas；代谢工程；人工智能；高温生物制造

中图分类号：Q939.9；Q815　　**文献标志码：**A

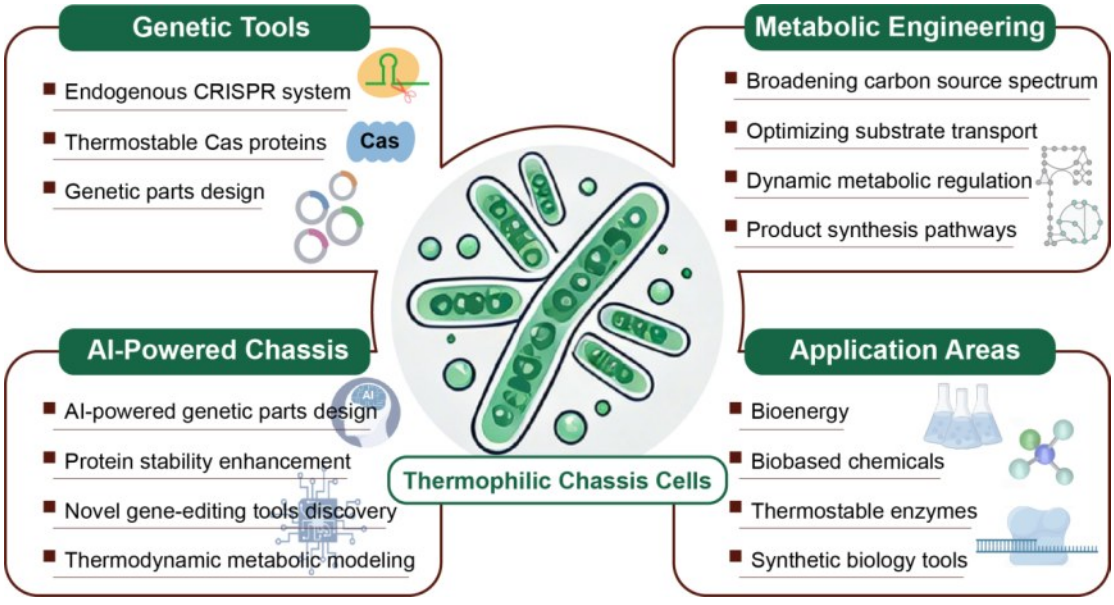
Thermophilic chassis cells: progress in development and application

BU Xuying[1,2], GUO Yuwen[1,2], LI Yingjun[1,2]
([1]*College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China*; [2]*National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, Hubei, China*)

Abstract: Thermophilic microorganisms, owing to their unique metabolic capabilities and industrial compatibility under high-temperature conditions, may become a key resource of thermophilic chassis cells for synthetic biology and next-generation industrial biotechnology. However, while high-temperature environments confer distinct advantages on thermophilic microorganisms, they also impose greater demands on genetic manipulation, protein stability, and

收稿日期：2026-08-19 修回日期：2026-11-02
基金项目：国家重点研发计划（2022YFA0912200）；国家自然科学基金（32170096）
引用本文：卜旭莹，郭玉汶，李英俊. 嗜热微生物底盘细胞开发及应用进展[J]. 合成生物学，2026，7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-084
Citation: BU Xuying, GUO Yuwen, LI Yingjun. Thermophilic chassis cells: progress in development and application[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-084

metabolic regulation. In recent years, with the rapid development of artificial intelligence and machine learning technologies, thermophilic chassis engineering has gradually shifted from trial-and-error approaches toward AI-driven rational design, providing new technological avenues for the precise prediction and targeted optimization of chassis performance. This study systematically reviews the research background of thermophilic chassis cells and the characteristics of representative strains. It focuses on summarizing the progress in the development of genetic manipulation tools, including efficient genome editing technologies based on endogenous CRISPR-Cas systems and exogenous thermostable Cas proteins, as well as the construction of promoter engineering and dynamic regulatory elements. The study elaborates on the engineering modification strategies for thermophilic chassis cells, covering the expansion of carbon source utilization spectra, the reconstruction of product synthesis pathways, the optimization of substrate uptake and transport, and the dynamic regulation of metabolic pathways. Furthermore, this study introduces the latest applications of artificial intelligence and machine learning in the rational design of thermophilic chassis cells, encompassing directions such as AI-driven genetic element design, protein thermostability engineering, the discovery of novel genome editing tools, and thermodynamic modeling of metabolic networks. It also reviews the application achievements in fields such as bioenergy, bio-based chemicals, thermostable enzyme preparations, and the development of synthetic biology tools. Finally, the study analyzes current challenges faced by thermophilic chassis cells, including the universality of genetic tools, product tolerance, and the construction of metabolic models. It also provides an outlook on future development directions, including the iteration of precision editing technologies, the systematization of synthetic biology components, multi-omics-guided metabolic engineering, AI-empowered intelligent chassis development, and the expansion of industrial application scenarios.



Keywords: Thermophilic microorganisms; Thermophilic chassis cells; Synthetic biology; CRISPR-Cas; Metabolic engineering; Artificial intelligence; High-temperature biomanufacturing

温度是影响微生物生长的关键因素，直接关系到生物大分子的功能和细胞结构的完整性[1]。在工业生物制造中，高温对反应器耐热性能、供热与冷却能耗以及细胞的氧化胁迫、膜稳定性和产物耐受性等提出了更高要求[2]，但高温工艺具有多重优势。首先，嗜热微生物能够耐受生物反

应器的高温条件，从而降低中温杂菌污染的风险；其次，高温可提高多糖等底物的溶解度，提升原料利用率，降低发酵液黏度，减轻匀浆和通气压力；此外，高温有利于通过蒸馏或气体提取获得挥发性产物，减少产物抑制，延长发酵周期，最终提高发酵产率[3-5]。

嗜热微生物涵盖细菌和古菌两大域。嗜热栖热菌（*Thermus thermophilus*）、嗜热脂肪地芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）、热厌氧杆菌（*Thermoanaerobacter* spp.）和热纤梭菌（*Clostridium thermocellum*）等嗜热细菌。冰岛硫化叶菌（*Sulfolobus islandicus*）、科达卡热球菌（*Thermococcus kodakarensis*）和强烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*）等嗜热古菌。这些菌株共同构成了类型丰富的嗜热底盘细胞资源库，为高温生物制造体系的构建提供了多样化宿主选择[6, 7]。

近年来，部分嗜热微生物的遗传操作与工程化改造取得了重要进展。进一步拓展了不同嗜热宿主的定向改造范围[8-10]，并为代谢通路的可编程调控提供了技术基础[11-13]。此外，人工智能技术的引入正在加速嗜热底盘从“试错式改造”向“数据驱动的精准设计”转变，在遗传元件设计、蛋白热稳定性预测及代谢网络建模等方面展现出巨大潜力。上述多层次进展的交叉融合，为嗜热底盘细胞的理性设计和应用拓展奠定了坚实基础。

本文将从嗜热微生物底盘细胞的研究背景出发，系统综述嗜热底盘创制的关键技术进展，包括遗传操作工具的建立、嗜热底盘细胞的工程化改造、代谢模型的构建及其在合成生物学中的应用及人工智能赋能等方面，并进一步探讨该领域面临的挑战与未来发展方向。

1 嗜热微生物概述

嗜热微生物是一类最适生长温度为45–80 ℃的微生物，广泛分布于火山、地热区（陆地、地下和海洋热泉）、温泉、堆肥及储油库等极端高温生境[14]。根据最适生长温度，它们通常可分为中度嗜热菌（45–60 ℃）、极端嗜热菌（60–80 ℃）和超嗜热菌（80–110 ℃），其中细菌多属于中度嗜热类群，而超嗜热菌则以古菌为主[15]。

嗜热微生物底盘细胞的研究可追溯至20世纪80年代，随着嗜热酶工业应用的兴起，研究者开始关注将嗜热菌本身作为宿主进行重组蛋白表达的可能性。早期的研究主要集中在模式嗜热菌如*G. stearothermophilus*的遗传操作上，但由于缺乏有效的转化系统和选择标记进展较为缓慢[16, 17]。

进入21世纪后，随着基因组测序技术的发展，多种嗜热菌的基因组信息被解析，为系统性理解嗜热菌的代谢和调控网络奠定了基础。2004年，*T. thermophilus* HB27和HB8的完整基因组序列被公布，揭示了其丰富的CRISPR-Cas系统资源和独特的代谢特征[18, 19]。2010年以来，以CRISPR-Cas为代表的基因编辑技术的突破，极大推动了嗜热微生物遗传操作工具的发展[20, 21]。与此同时，合成生物学的“设计-构建-测试-学习”循环策略也被引入嗜热底盘细胞的理性改造中，促进了嗜热菌在生物燃料、大宗化学品和高附加值产品生产中的应用[22]。

在嗜热细菌中，嗜热栖热菌的内源CRISPR-Cas系统开发取得了较为显著的进展。研究者利用HB27菌株内源的I-B型、I-C型和III-A/B型CRISPR-Cas系统，建立了多种基因编辑策略，并在特定实验条件下实现了目标基因的定向改造[23]。该菌同时具有高效的自然转化能力，仅需简单地将待转化的DNA添加到培养物中即可实现转化。在嗜热古菌领域，冰岛硫化叶菌也建立了较为完善的遗传操作体系。2009年，研究者建立了以*pyrEF*和*lacS*为遗传标记的遗传操作体系[24]；2016年，Li等利用该菌内源I-A型和III-B型CRISPR-Cas系统开展了基因组编辑研究，为其遗传操作工具的进一步开发提供了新的策略[25]。科达卡热球菌则建立了包含多种启动子和核糖体结合位点的元件文库，并实现了无标记敲除[26]。以上代表性菌株的遗传操作进展，为嗜热底盘细胞的工程化改造奠定了坚实基础。

目前已报道的嗜热底盘菌株涵盖了细菌、古菌和真菌的多个类群（表1），不同菌株在遗传可操作性、底物偏好和产物谱上各具特色。*T. thermophilus*凭借其自然转化能力和较为完善的遗传操作系统，成为遗传工具较为成熟的嗜热细菌之一[27]。*G. stearothermophilus*因与*Bacillus subtilis*

的亲缘关系在表达系统研究中积累深厚[28]。*Thermoanaerobacter* 属菌株在厌氧生产生物燃料方面具有天然优势[29]。*M. thermophila* 是真菌嗜热底盘的典型代表，在纤维素酶生产和蛋白质工程中应用广泛[30]。*S. islandicus* 是泉古菌门遗传工具最为完善的模式菌株（详见第2.2.1.1节）。*T. kodakarensis* 和 *P. furiosus* 则在超嗜热条件下展现了独特的代谢能力，尤其在产氢和特殊辅酶依赖反应中具有优势[31, 32]。

嗜热微生物对高温环境的出色耐受能力，源于其蛋白质、膜脂等生物大分子的特殊热稳定性。热稳定蛋白通常具有更致密的疏水核心、增强的离子对网络和特定的氨基酸组成偏好，而膜脂则通过调整脂肪酸饱和度（细菌）或形成甘油二烷基甘油四醚（GDGT）单层膜（古菌）来维持高温下的流动性与完整性[49]。这种多层次的热适应机制共同保障了嗜热微生物在高温环境中的生长与功能维持，但也使其工程化改造需要兼顾不同生物大分子之间的协同关系。例如，蛋白质稳定性与催化活性之间需要保持适当平衡[50]，膜脂组成的变化也可能进一步影响膜流动性、物质运输和能量代谢[51]。因此，在底盘改造过程中，对单一性状的优化需要与宿主整体热适应状态相协调。但这些独特的分子适应机制也赋予嗜热微生物重要的应用价值，使其在生物能源、生物冶金及环境生物修复等领域展现出广阔的应用价值，并为合成生物学提供了极具潜力的功能元件与底盘资源[52]。近年来，随着嗜热微生物遗传操作系统的建立（如基于内源CRISPR-Cas的高效基因组编辑工具）以及高温酶在常温宿主中的异源表达策略的成熟，嗜热底盘细胞的理性改造与规模化应用有潜力成为“下一代工业生物技术”（NGIB）的研究热点[53]。

表1 代表性嗜热底盘菌株

Table 1 Representative thermophilic chassis strains

比较指标	最适温度	遗传操作系统	质粒稳定性	转化效率/导入特征	多重编辑能力	主要应用方向	优势与局限	参考文献
Thermus thermophilus	65–72 ℃	内源I-B/I-C/III型CRISPR-Cas；耐热Cas9；同源重组；Cre/loxP系统	已有稳定维持体系	自然转化	已实现多类型编辑	耐热酶、高值化合物	遗传工具较完善、编辑类型丰富；但基因组含较大质粒，部分外源编辑工具需进一步适配	[10, 33-35]
Geobacillus stearothermophilus	55–65 ℃	同源重组；质粒系统；外源耐热Cas	菌株依赖	可遗传转化；效率受菌株和载体影响	已有一定拓展基础	耐热酶、生物燃料、蛋白质热稳定性改造	生长较快、遗传操作相对便利；但不同菌株间工具适配性存在差异	[28, 36, 37]
Thermoanaerobacter spp.	60–70 ℃	同源重组；marker-free；耐热Cas9	菌株依赖	自然感受态；转化效率是重要限制因素	已有多位点编辑探索	生物乙醇、丁醇	厌氧代谢适合溶剂生产；但遗传操作和培养条件相对复杂	[29, 38, 39]
Myceliophthora thermophila	45–50 ℃	CRISPR-Cas9/Cas12a；同源重组	缺乏系统数据	原生质体转化	已实现多位点编辑	生物基化学品、工业酶、重组蛋白	具有完善的蛋白加工、翻译后修饰和分泌能力；但生长周期较长、遗传操作复杂	[30, 40-42]
Sulfolobus islandicus	75–80 ℃	内源I-A/III-B型CRISPR-Cas；同源重组；CREAT	可复制质粒	可遗传转化；依赖宿主遗传背景	已实现多轮基因组编辑与基因组精简	基因组精简、古菌底盘开发	遗传工具较完善、基因组精简能力突出；但嗜酸嗜热条件限制应用范围	[24, 25, 43]
Thermococcus kodakarensis	85 ℃	同源重组；marker-free；质粒系统	可复制质粒	遗传转化体系成熟	可通过多轮编辑和遗传元件组合实现	耐热酶、生物燃料	遗传操作体系完善、遗传元件资源丰富；但严格厌氧且部分工具具有宿主依赖性	[26, 31, 44, 45]
Pyrococcus furiosus	100 ℃	内源I-A型CRISPR-Cas；自然感受态；同源重组	以染色体编辑为主	可高效摄取DNA	已实现单、双基因缺失	耐热酶、生物制氢	极端高温耐受性强；但严格厌氧、培养和遗传操作条件苛刻	[32, 46-48]

2　嗜热底盘细胞的遗传操作平台

嗜热微生物因其高温生长特性，在开放式发酵、降低冷却成本、减少杂菌污染和加速底物转化速率等方面展现出显著优势，已成为合成生物学和工业生物制造领域备受关注的底盘细胞候选[3, 54-56]。高温生物加工有助于降低污染风险[3]，相关研究表明，嗜热及耐热微生物微生物可在非灭菌条件下实现高效产物合成：*Bacillus sp.* 2–6 在 5 L 批次发酵中的 L-乳酸浓度达到 118.0 g/L，在 30 L 补料分批发酵中最高达到 182.0 g/L[54]；*Enterococcus faecium* QU 50 实现了至少 500 h 的非无菌开放式连续发酵，乳酸浓度达到 60.1 ± 3.25 g/L，体积生产强度为 6.49 ± 0.357 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$[55]。此外，嗜热产氢菌 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 在 73 °C、400 L 非无菌滴滤床反应器中实现产氢，氢气产率达到 2.8 mol H_2/mol[56]。这些研究为嗜热微生物在非灭菌发酵和连续化生物制造中的应用提供了实验依据。然而，嗜热底盘细胞的创制长期以来受限于遗传操作工具的匮乏，尤其是高温条件下常规 CRISPR-Cas 系统蛋白变性失活、转化效率低下等瓶颈严重制约了其应用。近年来，基于内源和外源耐热 CRISPR-Cas 系统的基因组编辑工具取得了突破性进展，遗传操作工具箱不断拓展，新型表达调控元件的开发也为嗜热底盘细胞的可编程设计提供了有力支撑（图 1）。

2.1　内源 CRISPR-Cas 系统的挖掘与开发

内源 CRISPR-Cas 系统与嗜热宿主具有天然的遗传兼容性，可有效避免外源核酸酶在高温条件下的活性受限问题，并已在多种嗜热微生物中被开发用于基因组编辑。

在细菌领域，嗜热栖热菌（*T. thermophilus*）HB27 携带 I-B、I-C 和 III 型等多种内源 CRISPR-Cas 系统，通过构建自我靶向 mini-CRISPR 和供体质粒，I-B 型敲除效率可达 100%，I-C 型达 95%，点突变效率达 100%[27]。该菌同时具有自然转化能力，仅需简单地将待转化的 DNA 添加到培养物中即可实现转化[23]。在嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）中，内源 II-A 型 CRISPR1 和 CRISPR3 系统被重编程用于基因组敲除和多基因编辑[57]。在 *Thermoanaerobacter kivui* 中，基于 I-B 型开发的 Hi-TARGET 工具可实现无疤痕删除、插

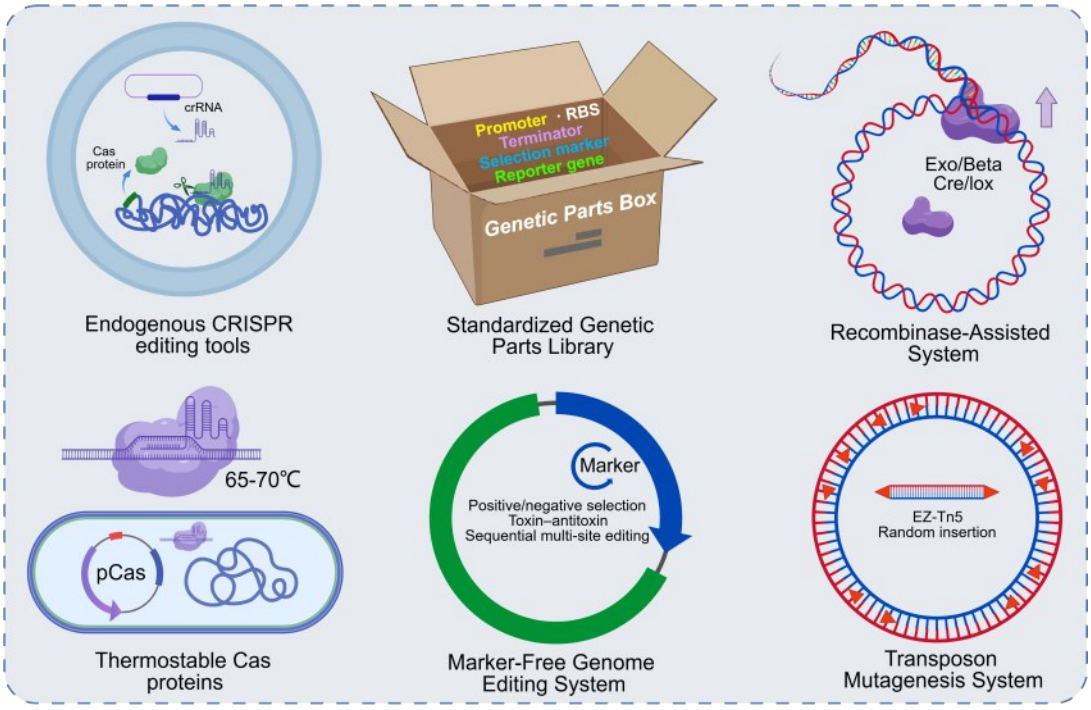


图 1　嗜热微生物的遗传操作工具

Fig. 1　Genetic manipulation tools for thermophiles

入和点突变，敲除效率达100%，点突变效率约49%[58]。在*Parageobacillus thermoglucosidasius*中，高度热稳定的I-B型系统通过调整crRNA长度实现编辑与转录抑制的切换，构建了全基因组CRISPRi文库，成功筛选核黄素高产菌株[59]。

在古菌领域，冰岛硫化叶菌（*Sulfolobus islandicus*）是泉古菌门中遗传操作体系最为完善的模式生物之一。该菌基因组编码一个I-A型CRISPR-Cas系统和两个III-B型系统（SisCmr-α和SisCmr-β），为多样化的基因组编辑提供了天然平台。Li等通过构建携带人工mini-CRISPR阵列和供体DNA的编辑质粒，重编程内源CRISPR系统以实现靶向DNA双链断裂，并由同源重组修复完成基因删除、插入和点突变等多种精准编辑[25]。此外，其内源III-B型CRISPR-Cas系统还被开发为基因敲低工具，通过设计靶向目标基因编码链的crRNA，介导III型核酸干涉复合物特异性切割目的基因的mRNA，从而降低基因表达水平[60]。近期，Yuan等进一步开发了CREAT（CRISPR-based genome trimming with a multi-homology-arm template）策略，该策略整合CRISPR靶向切割与多同源臂模板，可系统区分必需与非必需亚区域，并将鉴定出的必需基因组装为合成基因盒，实现目标区域的一步替换。通过连续八轮CREAT基因组修剪，冰岛硫化叶菌的基因组实现了20.8%的缩减，为古菌底盘细胞的理性设计提供了关键技术支撑[43]。除冰岛硫化叶菌外，*Pyrococcus yayanosii* A1基于III-B型系统构建了基因敲低系统，使淀粉酶基因mRNA下调至49.69%–67.05%[61]；*P. furiosus*的内源I-A型系统机制被解析，为编辑工具开发奠定基础[32]；*T. kodakarensis*的遗传操作体系也日臻完善[26, 44]。

这些研究表明，基于内源CRISPR-Cas系统的策略已在多种嗜热细菌和古菌中实现基因组编辑，为嗜热底盘细胞的进一步工程化改造提供了重要技术基础。然而，不同宿主所携带的CRISPR-Cas类型、靶序列识别规则及表达调控方式存在较大差异，工具开发往往具有较强的宿主特异性。因此，当宿主缺乏可利用的内源系统，或内源系统在靶位点选择、编辑类型和工程化拓展方面受到限制时，引入外源耐热Cas蛋白成为进一步拓展遗传操作范围的重要策略。

2.2 外源耐热Cas蛋白的表达与适配

外源耐热Cas蛋白的开发为高温条件下的基因编辑提供了新的工具选择，并有望拓展不同嗜热宿主的遗传操作范围。

研究者从多种嗜热菌中发掘并改造了多个耐热Cas9变体：源自*G. stearothermophilus*的GeoCas9是最具代表性的耐热Cas9蛋白之一，能够在70 °C保持活性，已成功应用于*Thermoanaerobacter*菌株的乙醇代谢通路改造[62]。而且GeoCas9在热纤梭菌（*Clostridium thermocellum*）中结合同源重组可实现基因位点突变，联合嗜热重组酶后编辑效率从12.5%提升至94%[63]。源自嗜热脱氮芽孢杆菌（*Geobacillus thermodenitrificans*）的热稳定Cas9在*T. kivui*中建立了首个高温基因组编辑系统，实现*adh*和*ldh*基因敲除及外源*adhE*基因的整合，编辑效率达90%，为高温合成气发酵细胞工厂的构建奠定了基础[9]。CaldoCas9同样源自该菌，在65 ℃下仍具靶向核酸酶活性，在*T. thermophilus*中突变体获得频率约90%[10]；通过“环工程”策略优化AtCas9获得的Z7变体显著提升编辑效率，该策略推广至GeoCas9和ThermoCas9后，在非规范PAM位点的编辑效率显著提升[64]。在耐热Cas12a方面，FnCas12a在43 ℃下具活性，并已用于中度嗜热菌*Bacillus smithii*的基因敲除[65]。此外，PAM宽松且温度耐受的CRISPR-Mb3Cas12a单转录单元系统已在特定实验条件下实现多重编辑，显示出进一步拓展嗜热微生物遗传操作工具的潜力[66]。上述外源耐热Cas蛋白的开发与工程化改造，极大地丰富了嗜热底盘细胞的遗传操作工具箱，为高温生物制造提供了关键技术支撑。

与内源CRISPR-Cas系统相比，外源耐热Cas策略具有更强的工具选择性和潜在可移植性，可通过更换Cas蛋白拓展PAM类型、靶位点范围及编辑模式[10]；但其实际应用需要解决Cas蛋白在宿主中的表达、核酸酶与向导RNA的匹配以及宿主DNA修复机制等适配问题[38]。因此，内源系统更强调“宿主兼容性”，外源耐热Cas则更强调

“工具可拓展性”，二者并非简单的替代关系，而是构建嗜热底盘遗传操作平台的两种互补策略（表2）。

因此，在实际底盘构建中，可根据宿主是否具有可利用的内源CRISPR系统、目标编辑类型以及外源Cas的热稳定性和表达适配性进行选择。对于内源系统已有研究基础的宿主，可优先评估其天然CRISPR-Cas资源；对于缺乏成熟内源工具的宿主，则可通过引入耐热Cas蛋白建立异源编辑体系。

2.3 遗传操作工具的拓展

随着内源和外源耐热CRISPR系统的不断完善，嗜热底盘细胞的遗传操作工具已从单一基因敲除拓展为涵盖多重编辑、基因整合、基因敲低及重组酶辅助系统的综合工具箱。

在 *P. thermoglucosidasius* 中已建立包含启动子、核糖体结合位点、终止子、抗性标记及报告基因的遗传元件库，并明确了其扩展潜力[67]；与此同时，在 *Bacillus methanolicus* 中整合了高效电转、CRISPR-Cas9多重编辑、中性整合位点及云平台代谢模型，成功实现了甲醇至L-精氨酸的过量生产[68]。此外，重组酶在嗜热菌开发中也发挥了重要作用：将 *Acidithiobacillus caldus* 的exo/beta重组酶引入 *C. thermocellum* 后，其I-B系统编辑效率从40%提升至71%，为嗜热菌中同源重组效率低下的普遍问题提供了有效解决方案[63]。在系统化平台建设方面，可在70 °C下工作的热稳定Cre/loxP系统在 *T. thermophilus* 中实现了92.6 kb大片段缺失[69]。然而，有效的报告基因系统是遗传操作的基础，基于内源 *TTP0042* 基因建立的热稳定β-半乳糖苷酶报告系统，结合质粒优化将无痕敲除突变体获取概率提高至10^{-2}[27]。除定向基因编辑外，转座子诱变也为嗜热底盘的全基因组功能筛选提供了重要工具。在极端嗜热菌 *T. thermophilus* HB27中，研究者建立了基于EZ-Tn5的转座子诱变体系，通过体外转座和突变基因组DNA转化，在染色体上获得了随机插入突变，为大规模筛选影响生长、代谢及工业表型的关键基因提供了新的技术手段[70]。与之相对应，穿梭质粒则是嗜热菌实现异源基因表达和代谢途径重构的重要基础工具。*Geobacillus spp.* 中进一步发展出模块化穿梭质粒系统，将复制子、筛选标记、启动子和报告基因进行模块化组合，为嗜热底盘的基因表达调控和代谢工程提供了更加灵活的平台[71]。

除了细菌宿主，真核嗜热底盘的遗传工具也取得了进展。在真核嗜热底盘 *M. thermophila* 中，基于5S rRNA－$tRNA^{Gly}$启动子引导的CRISPR/Cas9系统成功鉴定了调控纤维素酶表达的转录因子MtFKH1[72]。同时，*M. thermophila* 作为嗜热丝状真菌，兼具高温适应能力与真核细胞特有的蛋白质加工和分泌体系，在异源蛋白生产方面具有区别于细菌和古菌底盘的潜在优势。其完善的分泌途径能够促进重组蛋白向胞外转运，并可通过真核细胞特有的蛋白质折叠及翻译后加工过程，提高部分复杂蛋白的可生产性。因此，*M. thermophila* 在工业酶、分泌型重组蛋白以及部分需要特定真核加工的蛋白生产中展现出良好的应用潜力。近年来，围绕该菌已建立包括强启动子、5′UTR、信号肽及基因编辑在内的多种工程化工具，并实现了多种同源和异源蛋白的高效表达与分泌[30, 73, 74]。

同样地，在古菌领域，研究者于 *T.*

表2 内源与外源耐热CRISPR-Cas系统比较

Table 2 Comparison of endogenous and heterologous thermostable CRISPR-Cas systems

比较维度	内源CRISPR-Cas系统	外源耐热Cas系统
宿主适配性	通常具有较好的天然兼容性	需要针对宿主进行表达和功能适配
高温活性	通常与宿主生长温度相匹配	取决于Cas蛋白来源及其热稳定性
工具开发	依赖宿主已有CRISPR系统及其机制解析	可根据需要筛选不同来源的耐热Cas蛋白
PAM及靶位点	受内源系统识别规则限制	可通过更换Cas蛋白拓展PAM及靶位点范围
宿主迁移性	宿主特异性较强	具有潜在更强的跨宿主适配能力
主要优势	天然适配、编辑效率较高	工具类型和工程化空间更大
主要局限	宿主依赖性强、可利用系统有限	异源表达和宿主适配可能成为限制因素

kodakarensis 中构建了含76个组成型启动子、22个诱导型启动子和31个核糖体结合位点的元件文库，并利用高压诱导的毒素-抗毒素系统实现了无标记敲除[26]。在 *T. kodakarensis* 中，基于正向筛选与反向筛选的 marker-free 基因编辑技术可在完成目标基因删除后移除选择标记，从而实现连续、多位点的无标记基因改造[45]。这一技术与 CRISPR-Cas、重组酶及传统同源重组体系相互补，使嗜热底盘的遗传操作逐渐由单基因、单轮改造向随机功能筛选、模块化表达、多位点编辑和无标记连续改造发展。

总体而言，嗜热底盘遗传操作平台已由早期依赖同源重组和选择标记的单一改造方式，逐渐形成由内源 CRISPR-Cas、外源耐热 Cas 以及同源重组、位点特异性重组、转座子诱变、穿梭质粒和 marker-free 等辅助工具共同构成的多层次工具体系。不同工具在宿主适配性、编辑精度、可扩展性和工程化程度方面各具特点，未来嗜热底盘的进一步开发将更加依赖多种遗传工具之间的组合与协同。

3 嗜热底盘细胞的代谢工程改造

嗜热底盘细胞的高效生产性能依赖于系统性的工程化改造。与遗传元件和调控工具层面的底盘优化不同，代谢工程改造主要围绕嗜热底盘细胞“能够利用什么底物、合成什么产物以及如何协调生长与生产”等问题展开。近年来，研究者围绕碳源利用谱拓宽、产物合成途径构建、底物摄取与转运优化以及合成微生物群落构建等方向开展了大量工作，形成了多层次、多靶点的工程化改造策略（图2）。

3.1 碳源利用与底物摄取的拓宽

嗜热菌天然的底物谱通常较为有限，限制了其在廉价碳源利用方面的应用潜力。通过引入异源代谢途径和适应性进化，已成功拓宽多种嗜热菌的碳源利用范围。甲基营养型嗜热菌 *B. methanolicus* 可利用甲醇、甘露醇、阿拉伯糖醇和葡萄糖，通过工程化改造进一步拓展了其淀粉和木糖的利用能力，使中心碳代谢网络对多种碳源的适应性显著增强，展现了其作为甲醇基可持续生物制造平台的巨大潜力[75]。*T. kivui* 是最具代表性的嗜热产乙酸菌之一（最适生长温度66 °C），在 H_2+CO_2上的倍增时间小于2小时，是高温合成气转化的理想候选底盘之一。经对其进行适应性驯化，获得了以CO为唯一碳源和能源的CO-1分离株，该菌株可在CO和CO+H_2合成气中快速生长，

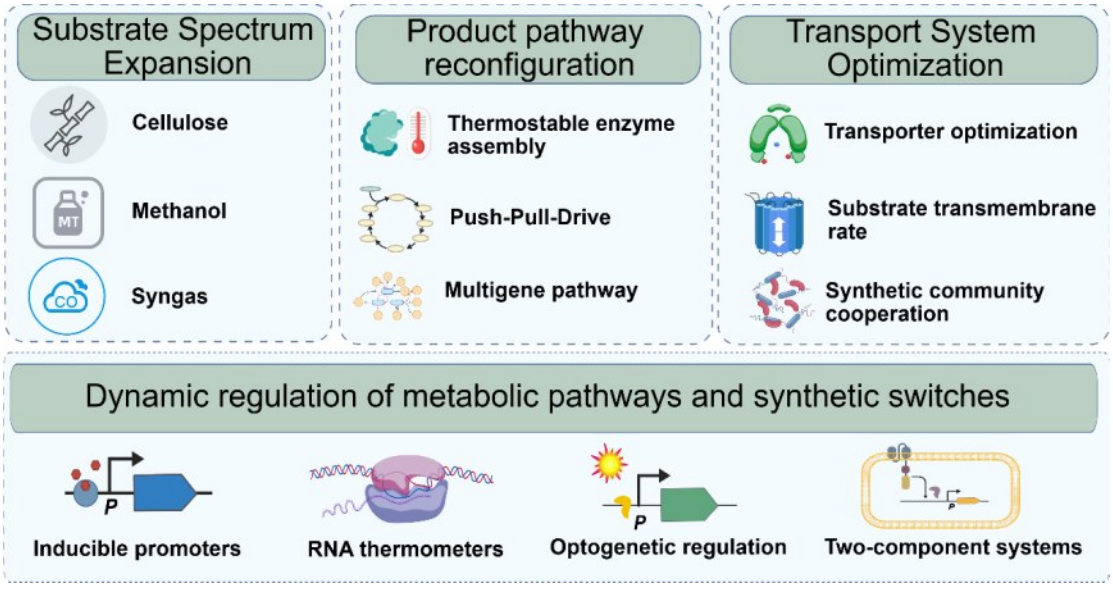


图2 嗜热底盘细胞工程化改造策略

Fig. 2 Engineering strategies for thermophilic chassis cells

该研究不仅拓宽了*T. kivui*的碳源利用范围，也为嗜热产乙酸菌的气体发酵应用奠定了重要基础[76]。在纤维素降解菌*C. thermocellum*的改造中，引入外源β-葡萄糖苷酶CaBglA解决了纤维二糖的反馈抑制问题，显著提升了纤维素糖化性能，染色体整合*caBglA*后实现了94%的纤维素-葡萄糖转化率；在此基础上，进一步表达双功能水解酶CcXyl0074，同时增强了纤维素酶和木聚糖酶活性，为木质纤维素生物炼制提供了升级版全细胞生物催化剂[77]。

碳源利用能力的拓宽不仅取决于胞内代谢途径，还依赖于底物进入细胞的效率。在嗜热菌中，底物摄取效率常受限于高温条件下膜流动性的变化和转运蛋白的热稳定性。针对这一问题，研究者通过同源重组和CRISPR介导的基因整合，在多种嗜热底盘细胞中实现了转运蛋白编码基因的过表达或异源引入，显著提升了底物的跨膜运输速率。在*B. methanolicus*中，对糖类转运系统的工程化改造使其能够利用淀粉和木糖等廉价碳源，为降低发酵原料成本提供了有效途径[75]。近年来，研究者进一步为该菌建立了包含高效电转方案、CRISPR-Cas9多重基因组编辑方法、多种中性整合位点及云平台基因组尺度代谢模型（iBM822）的综合合成生物学工具箱，成功实现了从甲醇至L-精氨酸的过量生产，并结合适应性进化提高了甲醇耐受性[68]。此外，通过引入异源木糖利用途径，该菌在甲醇浓度波动的条件下表现出更强的鲁棒性，甲醇与木糖的共消费摩尔比超过4：1，确立了其作为可持续甲醇基生物制造平台的潜力[68]。在合成微生物群落中，通过“转运系统特化”设计底物摄取系统的互补性，可减少菌株间的底物竞争。以*C. thermocellum*、*Thermoanaerobacter saccharolyticum*和*Anaerocellum bescii*等工程化嗜热菌为例，通过设计底物摄取系统的互补性，实现了纤维素降解菌株与产物合成菌株之间的底物分工和代谢通量优化[78]。此外，对*C. thermocellu*m糖摄取机制的深入解析，为进一步优化该菌株的底物转运效率提供了理论指导[79]。上述策略为嗜热合成微生物群落的理性设计奠定了重要基础。

总体来看，嗜热底盘碳源利用能力的拓展已由单纯增加代谢途径，逐渐发展为“底物摄取—胞内代谢—适应性进化”协同优化。对于复杂或廉价原料，扩大底物谱并不意味着所有底物均可被高效转化，转运效率、底物共利用能力以及不同代谢途径之间的通量协调仍是进一步提升碳源利用效率的关键。

3.2 目标产物合成途径的构建与优化

通过引入外源代谢途径和内源途径的重编程，嗜热底盘细胞已被改造为多种高价值化学品的生产平台。在*P. thermoglucosidasius*中引入源自多种嗜热微生物的热稳定酶变体构建了丁醇生产途径，实现了嗜热条件下1-丁醇的高效生产，为高温生物燃料生产提供了新路径[80]。以*C. thermocellum*为底盘，功能性表达了嗜热2,3-丁二醇合成途径，结合无细胞系统分析表明外源2,3-丁二醇脱氢酶活性及氧化还原平衡是关键限制因素，经对其代谢通路的重构，最终从纤维素出发获得了19.7 mM的2,3-丁二醇，代谢产率达到24%[81]。在构建异亮氨酸合成菌株时，研究者将来自*G. stearothermophilus*的热稳定苏氨酸脱氨酶整合至嗜热产甲烷古菌*Methanothermobacter marburgensis*基因组中，实现了仅由苏氨酸合成异亮氨酸的替代途径，为多基因生物合成途径在嗜热宿主中的应用开辟了道路[82]。此外，耐热性较强的中温菌地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）也被用于代谢工程研究。研究者通过“Push-Pull-Drive”代谢工程策略，从前体供应强化、磷酸转酮酶理性设计、非氧化糖酵解途径限速酶强化以及副产物乙酸积累等模块入手，对其杂合中心碳代谢途径进行了系统重编程，使胞内乙酰辅酶A池扩大了6.57倍，实现了乙酰辅酶A衍生化学品的碳高效生产[83]。

此外，基于基因组尺度代谢模型的分析也开始用于指导嗜热底盘的代谢途径设计。嗜热菌*Rhodothermus marinus*的基因组尺度代谢模型已被成功构建，模型预测的生长速率与实验数据高度一致，并通过导入*T. thermophilus*的*dxs*基因实现了类胡萝卜素产量的提升[84]；在*C. thermodepolymerans*中，基因组尺度代谢模型的开发与CRISPR技术的结合，正在推动该嗜热聚羟基

脂肪酸酯（PHA）生产菌株的系统代谢工程[85]。

上述研究表明，嗜热底盘的产物合成工程已由单一异源途径的导入逐步转向多层次代谢网络优化。目标产物的形成不仅取决于关键酶是否能够在高温下保持活性，还受到前体供应、氧化还原平衡、辅因子供给及副产物积累等因素的共同影响。因此，单独强化目标产物合成支路往往难以持续提高产量，需要结合中心碳代谢和细胞资源分配进行协同调控。嗜热底盘的代谢工程目标已由“构建一条能够合成目标产物的途径”进一步转向“形成能够持续提供前体和还原力、同时降低副产物形成及代谢负担的生产型代谢网络”。这也为后续通过动态调控协调细胞生长与产物合成提供了基础。

3.3 代谢通路的动态调控策略

传统的代谢工程改造通常采用“静态”策略，即对代谢途径进行持续性的激活或抑制，然而这种策略难以兼顾细胞生长与产物合成的阶段性需求。近年来，研究者开发了多种动态调控工具，实现了代谢通路在时空尺度上的可编程调控。

在可诱导启动子方面，*P. thermoglucosidasius* 中的氧敏感型Pldh启动子及基于PrplS、PgroES的半合成启动子库已通过sfGFP表达验证了活性范围，木糖（PxylA）和麦芽糖诱导系统为条件调控提供了选择[67]。在*T. kivui*中，鉴定出的两个糖诱导启动子在非诱导条件下表达水平极低，诱导后显著提升，实现了对核心代谢途径必需基因的“敲降”式调控[11]。在转录后调控层面，RNA温度计（RNA thermometer，RNAT）在嗜热系统中展现出独特优势。将RNAT（如*hsp17rep*）置于Cas9编码序列上游，可显著降低启动子泄漏导致的背景杀伤，该策略可推广至所有基于Cas9的方法[13]。在可诱导CRISPR-dCas9系统方面，研究者利用蓝光、红光/远红光、化学小分子及热触发等信号，构建了多层次的基因表达调控系统，使基因编辑获得时空可控性[86]。Opto-CRISPR技术通过光控Cas9/sgRNA转录、构建光敏Cas9蛋白、光笼化sgRNA等机制，使基因编辑获得“光开关”能力[87]。除了上述人工合成的调控元件，嗜热微生物自身的温度适应机制也为动态调控提供了天然范例。例如，*T. thermophilus* HB27编码的DhqSR双组分系统可感知低温信号，通过组氨酸激酶DhqS与应答调控蛋白DhqR的协同作用，调控莽草酸途径以应对低温胁迫[88]。这类天然调控模块可被进一步挖掘和改造，用于构建温度响应型智能底盘。

目前，层级代谢工程框架涵盖了从转录调控到翻译后修饰的多层次策略，为代谢网络的智能化、动态化改造提供了理论支撑[89]。基于代谢网络模型的最优途径设计平台（如CAVE）和异源途径设计工具已被开发，大幅提升了对于细胞代谢的模拟能力[90]。

然而，嗜热底盘动态调控系统仍主要集中于遗传工具和概念验证层面，其工业应用还受到调控信号传递、系统稳定性以及规模化过程控制等因素限制。依赖光信号的调控系统在大体积发酵体系中受到光传递距离和空间均一性的限制；化学诱导系统则需要考虑诱导剂成本、添加方式及规模化过程中的浓度控制。对于嗜热底盘而言，调控元件还需要在长期高温培养过程中保持结构和功能稳定，并与宿主自身的温度适应机制相协调。因此，嗜热底盘动态代谢工程的进一步发展不仅需要提高调控范围和响应速度，还需要兼顾调控系统的热稳定性、鲁棒性、诱导成本及规模化过程中的可操作性。相比依赖外部光或昂贵化学诱导剂的调控方式，利用温度、代谢物或细胞生理状态等发酵过程本身可获得的信号构建低成本、连续响应的调控系统，可能更适合嗜热底盘的工业化应用。

总体而言，动态调控为解决细胞生长与产物合成之间的资源竞争提供了新的工程化路径，但现阶段嗜热底盘的动态调控仍更多集中于遗传工具和概念验证层面。未来需要进一步将动态调控模块与代谢网络模型、过程参数监测以及发酵控制相结合，使代谢通量能够根据细胞生长状态和产物积累进行连续调整，从而推动嗜热底盘由静态代谢改造向面向生产过程的动态代谢优化转变。

4 AI技术赋能嗜热底盘细胞开发

随着合成生物学逐步从经验驱动走向数据驱

动，人工智能（AI）与机器学习（ML）技术正在深刻重塑嗜热底盘细胞的创制范式。AI的应用贯穿了遗传元件设计、蛋白工程、基因组编辑工具优化、代谢网络建模及系统代谢工程的全链条[91]（表3）。然而，与常温微生物相比，嗜热底盘可用于训练AI模型的实验数据相对有限，不同嗜热菌之间的遗传调控、蛋白结构和代谢特征也存在明显差异。因此，本节讨论了AI如何针对嗜热底盘开发中的特有问题提供设计和预测能力。

4.1 AI辅助遗传元件与编辑工具设计

嗜热底盘细胞的功能构建高度依赖于精确可控的遗传元件，如启动子、核糖体结合位点、5′非翻译区和终止子等。然而，传统启动子工程依赖天然序列的随机诱变和定向筛选，效率低下且无法满足复杂代谢网络的精细调控需求。机器学习技术能够从海量生物序列数据中学习隐蔽的结构-功能关系，为合成生物学元件的智能设计提供了全新路径[92]。对于遗传资源相对有限的嗜热底盘而言，AI的价值并不只是提高已有元件的筛选效率，更在于利用有限的实验数据建立序列与表达强度之间的关联，从而减少对随机突变和大规模实验筛选的依赖。

研究者将基因表达工程平台与机器学习相结合，在极端嗜热菌 *T. thermophilus* 中成功设计并功能验证了53种人工5′调控序列（ARES），这些序列整合了启动子和5′非翻译区，在 *T. thermophilus* 和大肠杆菌中表现出差异化的宿主特异性表达模式，显著拓展了 *T. thermophilus* 的遗传操作工具箱[12]。该研究的关键意义在于利用实验表达数据指导人工调控序列设计，使AI由单纯的序列分析工具进一步参与遗传元件的逆向设计，从而拓展了 *T. thermophilus* 中可利用的表达调控空间。此外，AI技术也正在多个层面介入革新基因组编辑工具的开发流程。目前AI已被用于Cas蛋白序列、结构和功能关系的挖掘，以及gRNA编辑效率和脱靶风险的预测。深度学习结合蛋白质结构预测和大规模序列分析，为从远缘同源蛋白中发现潜在编辑工具提供了新的技术路径；DeepSpCas9、DeepCRISPR等模型则表明，机器学习能够利用gRNA及靶位点特征预测编辑效率和脱靶风险[93-97]。这些方法目前主要在常温宿主或通用CRISPR体系中得到验证，因而其在嗜热菌中的应用仍需结合高温条件下Cas蛋白活性、RNA稳定性及DNA修复机制进行重新评估。

在嗜热底盘的特异性应用中，研究者基于冰岛硫化叶菌开发了CRISPR-COPIES计算流程，结合多组学信息整合，系统鉴定了13个人工CRISPR RNA靶向的8个染色体整合位点。通过利用内源I-A型CRISPR-Cas系统将报告基因 *lacS* 整合至这些位点，β-半乳糖苷酶活性测定揭示了显著的位点位置效应。作为概念验证，研究者利用这些位点过表达GrsB酶，成功调控了脂质醚组成。这些经过充分表征的染色体整合位点弥补了冰岛硫化叶菌作为细胞工厂的关键短板，为嗜热古菌的多重基因组工程和合成生物学提供了可靠框

表3 AI技术在嗜热底盘细胞开发中的应用

Table 3 AI driven development of thermophilic chassis cells

应用层级	AI技术	用途	嗜热底盘细胞中的应用	主要瓶颈	参考文献
遗传元件与编辑工具设计	机器学习、深度学习、多组学整合、序列预测	启动子/5′ UTR设计、gRNA效率预测、Cas蛋白挖掘、染色体整合位点筛选	*T. thermophilus* ARES人工5′调控序列设计；*S. islandicus* CRISPR-COPIES整合位点设计	嗜热菌遗传元件数据不足；跨物种迁移能力有限；高温条件下编辑体系参数缺失	[12, 92-98]
蛋白工程与热稳定性改造	机器学习、深度学习、生成式AI、Rosetta、ProteinMPNN、多模型集成	热稳定性预测、突变位点筛选、蛋白序列生成、催化效率预测、活性/稳定性协同优化	已出现嗜热蛋白热稳定性预测及 *P. thermoglucosidasius* 高温报告蛋白等实验验证	稳定性、活性和表达之间存在权衡；多位点协同效应难预测；嗜热蛋白数据集规模有限	[99-106]
代谢网络建模与通路设计	图神经网络、机器学习、生成式AI、主动学习	热力学参数预测、酶动力学预测、代谢通路搜索、AI-DBTL优化	dGbyG等工具为高温代谢热力学预测提供方法基础；AI-DBTL开始向自动化菌株设计发展	嗜热GEM数量少、高温热力学/动力学参数不足，直接实验验证有限	[107-110]

架[98]。计算辅助的基因组位点筛选能够直接服务于嗜热底盘遗传工具箱的构建，但该类方法与机器学习模型之间仍应加以区分，其核心贡献在于通过计算和多组学分析降低整合位点筛选的实验成本。

总体而言，AI辅助遗传元件与编辑工具设计在嗜热底盘中的应用仍处于早期阶段。其主要瓶颈在于嗜热菌遗传元件功能数据规模较小，不同嗜热菌之间的调控序列和表达机制存在较大差异，而现有AI模型大量依赖常温宿主数据训练。因此，如何建立具有高温条件特异性的遗传元件数据库，并提高模型跨嗜热菌种属的迁移能力，是该方向进一步发展的关键。

4.2 AI驱动的蛋白工程与热稳定性改造

嗜热蛋白的热稳定性是其工业应用的核心属性，但传统定向进化和理性设计策略存在筛选通量低、突变组合空间巨大等局限。AI技术的引入为蛋白热稳定性改造带来了效率跃升，使从序列到功能的直接预测成为可能。对于嗜热底盘而言，蛋白工程面临的核心问题不仅是提高蛋白的热稳定性，还需要在高温条件下兼顾催化活性、结构稳定性和表达水平。因此，AI可以通过序列、结构、进化和功能信息的联合建模缩小突变搜索空间，为高温环境下的蛋白优化提供候选方案。

在热稳定性预测方面，研究者构建了整合序列特征、结构特征和网络特征的多维度机器学习模型，可在测试集上以91%的准确率区分嗜热蛋白与常温蛋白，并在659个多点突变验证中达到96%的准确率[99]。该研究进一步揭示了芳香族残基在极端嗜热蛋白（>80 °C）稳定性中的关键作用，以及稳定化残基、静电相互作用和体积参数在不同温度适应性中的层级贡献。这类研究为识别与高温稳定性相关的序列和结构特征提供了数据基础，但其模型性能并不能直接等同于在具体嗜热底盘中的工程效果，仍需要针对目标蛋白和目标宿主进行实验验证。另一项基于1，498个细菌基因组的机器学习研究开发了利用蛋白质域频率预测最适生长温度（OGT）的随机森林模型，82.4%的预测误差在±10 °C以内，并揭示多胺代谢、tRNA甲基转移酶家族及CRISPR-Cas系统的富集与较高OGT呈正相关[100]。该研究解析了微生物耐热性的基因组特征，为AI解析耐热性分子特征提供了研究基础。在深度生成模型方面，GeoEvoBuilder框架通过自适应整合结构约束与进化约束，在单轮设计中可产生超过30%残基替换的功能性蛋白变体，其中二氢叶酸还原酶设计的催化效率提升了20倍、热稳定性提升了10 °C[101]。该研究证明生成式模型能够突破传统单点突变搜索的限制，但其验证对象并非嗜热底盘，因此更适合作为可迁移的技术基础，而不能直接视为嗜热菌中的应用案例。在嗜热底盘*P. thermoglucosidasius*中，研究者利用Rosetta和ProteinMPNN等计算工具生成组合突变文库，通过高温高通量筛选成功获得了热稳定性显著增强的荧光报告蛋白hsFAST，其体积仅为GFP的一半且无需氧气成熟，特别适用于极端厌氧嗜热菌的工程化改造[102]。该研究虽然并非完全由AI模型驱动，但体现了计算设计、高温筛选和嗜热底盘之间的协同作用：计算方法首先缩小突变空间，再利用嗜热宿主提供的高温筛选环境进行实际验证，从而提高高温功能蛋白的开发效率。此外，深度学习工具DLKcat通过预测催化效率筛选获得了嗜热饲料蛋白酶BSnpr，经定向进化和理性点突变后，该酶在60 °C条件下仍保持高度活性[103]。该研究进一步说明，AI预测与实验定向进化结合，可以将催化效率预测用于候选酶和突变体的优先级筛选，从而减少实验搜索空间。在计算理性设计方面，计算机辅助的折叠自由能计算与进化保守分析相结合，成功将*Paecilomyces thermophila*中的木聚糖酶改造为超嗜热酶，最适反应温度提升至85 °C，半衰期延长了11倍[104]。多维计算策略——整合ABACUS2、PROSS、Rosetta自由能计算和SPIRED机器学习预测——实现了α-半乳糖苷酶热稳定性与催化活性的协同优化[105]。基于稀疏卷积神经网络预测的突变位点经实验验证，使微生物转谷氨酰胺酶在60 °C下半衰期延长2.3倍，酶活性提升1.4倍[106]。上述研究表明，机器学习与结构计算、进化分析及实验筛选的组合能够提高热稳定性改造的候选突变筛选效率，但不同研究所采用的蛋白、宿主和温度条件存在差异，不能将其结果直接外推至所

有嗜热底盘。

目前，AI驱动蛋白工程在嗜热底盘中的主要限制包括高温蛋白数据集规模有限、稳定性与催化活性之间可能存在权衡，以及多位点组合突变的协同效应难以准确预测。尤其是现有蛋白AI模型大量依赖常温蛋白数据训练，如何构建具有明确温度条件标注的蛋白序列—结构—功能数据集，并将热稳定性、催化效率和表达水平纳入统一优化目标，是AI进一步服务于嗜热底盘蛋白工程需要解决的问题。

4.3 AI辅助的代谢网络建模与通路设计

嗜热底盘细胞的系统代谢工程依赖于对基因组尺度代谢网络（GEM）的精准建模和理性设计。AI技术的引入正在从热力学分析、通路预测到动力学模拟等多个层面提升代谢网络建模的精度和范围。与遗传元件和蛋白工程相比，AI在嗜热底盘代谢网络中的直接应用案例相对有限。目前已有研究更多集中于通用代谢模型和常温模式生物，而嗜热菌仍面临基因组尺度模型数量有限、代谢反应注释不足以及高温条件下热力学和动力学参数缺失等问题。

在代谢热力学分析方面，基于图神经网络开发的dGbyG工具将代谢反应标准吉布斯自由能预测误差中位数从5.33 kJ/mol降至4.11 kJ/mol，对人类代谢模型的反应覆盖度从64.14%提升至71.22%，为高温条件下代谢反应方向的准确判断提供了关键热力学数据[107]。然而，dGbyG目前的验证对象主要为人类和酵母代谢模型，并未在嗜热底盘中完成直接验证。因此，其在嗜热代谢工程中的意义主要体现在提供高温代谢热力学参数预测的潜在方法，有待开发至可用于嗜热菌的AI工具。在通路预测与逆向设计方面，研究者开发了能够构建热力学可行、碳和能量高效合成通路的计算工具，通过无缝融合已知生化反应与从头设计步骤，实现原子经济和能量平衡的通路构建[108]。机器学习方法还被用于预测酶动力学参数，与基因组覆盖度的动力学模型相结合，评估设计方案的有效性[109]。这些方法为嗜热底盘的代谢通路搜索、酶筛选和动力学参数补充提供了通用计算基础，但目前在嗜热菌中的直接实验验证仍较少。AI与自动化实验平台的深度融合，正在将生物制造的设计-构建-测试-学习（DBTL）循环进一步自动化。AI驱动的生物铸造厂能够集成语言模型、生成式AI和主动学习策略，自主完成遗传元件设计、菌株性能评估和下一轮实验方案选择[110]。然而，这类平台目前主要面向通用生物制造体系，在嗜热底盘中的系统应用仍处于探索阶段。对于嗜热底盘而言，未来更具价值的方向并非简单复制常温宿主中的AI-DBTL流程，而是将高温条件下的遗传、蛋白和代谢表型数据纳入模型，并建立针对嗜热底盘的专属设计—实验闭环。

总体而言，AI为嗜热底盘细胞开发提供了从遗传元件设计、蛋白功能优化到代谢网络规划的通用计算支撑，但目前不同层面的发展成熟度并不一致。遗传元件和蛋白工程已经出现一定的嗜热菌实验验证，而AI辅助代谢网络建模和通路设计仍更多依赖常温模型和通用算法。未来需要进一步建立嗜热菌专属的高温条件数据集，并将AI预测与高通量实验、基因组尺度代谢模型及自动化DBTL流程相结合，才能真正实现针对嗜热底盘特有生物学约束的智能化设计。

5 嗜热底盘细胞的应用场景

嗜热底盘细胞凭借其在高温下生长和代谢的独特优势，在生物燃料、化学品合成、酶制剂生产和环境修复等方向均展现出独特的应用价值（表4）。

5.1 生物能源生产

生物能源是嗜热底盘细胞最重要的应用方向之一。乙醇和丁醇作为可再生的液体燃料，其嗜热生物合成路径的构建近年来取得了多项重要进展。

在乙醇生产方面，*C. thermocellum*作为最具代表性的嗜热纤维素降解菌之一，其最适生长温度为60 ℃，能够通过独特的代谢途径将纤维素直接转化为乙醇、氢气和有机酸，在整合生物加工和整合生物糖化方面极具潜力[124]。针对嗜热菌普遍

表4 嗜热底盘细胞的应用

Table 4 Applications of thermophilic chassis cells

菌株	应用方向	产量性能	关键工艺	参考文献
Parageobacillus thermoglucosidasius TM242	乙醇生产	乙醇产量提升至 7.1% (v/v)，实际回收乙醇浓度5.1% – 5.3%(v/v)	连续培养/气提；葡萄糖为主要底物；采用原位微泡气提降低乙醇毒性	[111]
Parageobacillus thermoglucosidasius DSM 2542	1-丁醇生产	丁醇产量 0.4 g/L	嗜热发酵体系	[80]
Clostridium thermocellum	2,3-丁二醇生产	产量 19.7 mM	以纤维素为底物的工程菌发酵体系	[81]
Thermus thermophilus	环状 2,3-二磷酸甘油酸（cDPG）生产	最高 650 μM	全细胞催化；异源构建cDPG合成途径	[112]
Streptococcus thermophilus D4	胞外多糖生产	产量 3.7 g/L	培养基优化及分批补料培养	[113]
Clostridium thermocellum	纤维素糖化性能提升	纤维素-葡萄糖转化率达 94%	高温全细胞糖化体系	[77]
Bacillus licheniformis	乙酰辅酶A衍生化学品生产	胞内乙酰辅酶A池扩大6.57 倍	代谢工程改造；工程菌株培养	[83]
Bacillus methanolicus	甲醇与木糖共利用	甲醇/木糖共消费摩尔比 > 4:1	甲醇与木糖共底物培养	[114]
Thermus thermophilus HB27	体内定向进化博来霉素结合蛋白	蛋白热稳定性提高 17 °C	高温宿主筛选；体内定向进化	[115]
Thermoanaerobacterium AK17	褐藻水解物为底物生产乙醇	乙醇产率 0.45 g/g 底物	褐藻水解物为底物；高温厌氧发酵	[116]
Caldimonas thermodepolymerans DSM 15344	酒渣为原料生产聚(3-羟基丁酸酯) (PHB)	PHB产量 1.17 g/L	酒渣为碳源	[117]
Geobacillus thermoglucosidasius	核黄素生产	核黄素产量1034.5 mg/L	矿物盐培养基；葡萄糖-木糖混合碳源	[118]
Geobacillus sp.	金属蛋白酶生产	金属蛋白酶纯酶活性 646 U/mL（60 °C、pH 7.0、5 M NaCl）	2.5% casein 诱导产生耐热耐盐蛋白酶	[119]
Thermus thermophilus HB27	超氧化物歧化酶（SOD）生产	SOD纯度96%，比活性1412 U/mg蛋白；SOD产量提升1倍	工程菌株发酵；重组SOD表达	[27, 120]
Thermococcus kodakarensis KOD1	RS3 型抗性玉米淀粉	产率可达 40.70%	TK-PUL 13.83 U/g；90℃、11.55 h；随后双重高压热处理-冷却回生	[121]
Fervidobacterium islandicum AW-1	角蛋白肽生产	低分子量角蛋白肽产量4.4 g/L，纯化后得到0.8 g/L的生物活性肽，产率1.2%	羽毛等角蛋白为底物	[122]
Acetivibrio thermocellus	PET 塑料降解	利用ThermoARAi诱导系统实现PET降解	ThermoARAi 诱导表达系统；高温全细胞催化	[123]
Sulfolobus islandicus M.16.4	脂质醚组成调控（GDGT工程）	过表达 GrsB 使 GDGT-5 和 GDGT-6 含量提升至 12.35% 和 3.42%	染色体定点整合	[98]

存在的乙醇耐受性低这一关键瓶颈，研究者在*P. thermoglucosidasius*中采用微泡原位气提技术，通过连续培养将乙醇产量提升至7.1%，实际回收率达5.1% – 5.3%，突破了该菌天然耐受性不足的限制[111]。

在嗜热厌氧菌 *Thermoanaerobacterium* AK17中，通过敲除乳酸和乙酸副产物合成途径，成功构建了高效产乙醇的工程菌株，可在海藻水解液中稳定生产[116]。此外，极端嗜热菌*A. bescii*的最适生长温度约78 ℃，最高可达90 ℃，是已分离的最嗜热细菌之一，其强大的木质纤维素降解能力使其成为从植物生物质生产生物燃料的重要候选菌株[125]。在丁醇合成方面，由于丁醇具有比乙醇更高的能量密度、更低的挥发性和更好的与现有燃油基础设施的兼容性，被视为更具优势的下一代生物燃料。研究者在*P. thermoglucosidasius*

DSM 2542中引入来自多种嗜热微生物的热稳定酶变体，成功构建了嗜热丁醇生产途径，在限氧条件下丁醇产量达到0.4 g/L，为后续工业条件的优化奠定了基础[80]。在氢气生产方面，嗜热菌在高温发酵产氢领域亦展现出独特优势。多种嗜热发酵厌氧菌，如*Thermoanaerobacter*属物种，已被证实能够从木质纤维素生物质和大型藻类水解液中高效生产生物氢，为利用非粮原料产氢提供了可行路径[126]。

5.2 生物基化学品与高值产物合成

除燃料类产品外，嗜热底盘细胞已被成功改造为多种生物基化学品和高值产物的生产平台。

Caldimonas thermodepolymerans DSM 15344能够以酿酒副产物酒渣为底物，在优化条件下积累1.17 g/L PHB，占细胞干重的49.30%，并可在重复批次培养中保持相对稳定的生产性能，体现了嗜热底盘利用低值副产物进行生物基材料合成的潜力[117]。在生物活性物质生产中，利用*S. thermophilus* D4菌株开发的高效发酵平台，通过实验设计和分批补料策略优化，使生物量较传统培养基提升了7.5倍，胞外多糖产量达3.7 g/L[113]。在天然产物制造方面，*G. thermoglucosidasius*已被用于核黄素生产。通过引入异源核黄素合成基因簇并进一步调控前体供给、中心碳代谢和副产物形成，工程菌株在葡萄糖-木糖混合碳源条件下12 h发酵的核黄素产量达到1034.5 mg/L[118]。该研究证明了嗜热芽孢杆菌不仅能够利用多种糖源，还可通过代谢工程实现高值天然产物的高温合成。在具有耐热性的*B. methanolicus*中，研究者开发了系统的合成生物学使能技术，为甲醇等一碳原料的高温生物转化提供了新的底盘选择[68]。环状2,3-二磷酸甘油酸（cDPG）是一种从嗜热古菌中分离的相容溶质，可在极端条件下保护细胞蛋白。研究者将cDPG的生物合成途径导入*T. thermophilus*中，通过表达2-磷酸甘油酸激酶和环状二磷酸甘油酸合成酶，实现了cDPG的全细胞生产，浓度最高达到650 μM[112]。该研究展示了*T. thermophilus*作为全细胞工厂生产cDPG的可行性，为cDPG在化妆品和保健品领域的商业化应用奠定了基础。*T. kodakarensis*中引入外源的甲羟戊酸途径和萜类合酶，实现了异源萜类化合物（如柠檬烯和法尼烯）的生产，展示了嗜热古菌作为异源萜类合成平台的潜力[127, 128]。

总体来看，嗜热底盘在生物基化学品和高值产物领域的应用已由单纯利用其耐热生长特性，逐渐向多碳源利用、代谢通路重构以及高附加值产物合成拓展。

5.3 耐热酶制剂开发

嗜热菌是耐热酶的重要来源。由嗜热微生物产生的酶制剂具有热稳定性好、催化反应速率高、易于室温下保存等突出优势，在饲料加工、洗涤剂、纺织和食品工业中具有广泛的应用价值。

嗜热地芽孢杆菌（*Geobacillus thermoleovorans*）HBB208生产的金属蛋白酶在pH 8.0和70 °C条件下对有机溶剂和洗涤剂表现稳定，展现出在极端工业条件下的广阔应用前景[129]。此外，*G. stearothermophilus* TP-3具有高效生产纤维素酶的能力，经统计学优化后纤维素酶产量显著提升，为木质纤维素生物转化提供了新的酶资源[130]。在嗜热真菌*Chaetomium thermophilum*中，采用高效的“转录调控-酶分泌适应”协同纤维素降解网络，使还原糖产量提高60.6%[131]。此外，*Fervidobacterium*属细菌可进行羽毛降解和角蛋白肽规模化生产及纯化的工艺，为其在化妆品等领域的应用奠定了基础[132]。基于*T. thermophilus* HB27内源CRISPR基因编辑系统，研究者成功构建了高产超氧化物歧化酶（SOD）的HB27工程菌株[27]。嗜热来源的Mn-SOD表现出很高的热稳定性和优良的抗氧化能力，在医疗、化妆品、化工等领域具有广阔的应用前景[133]。嗜热古菌*T. kodakarensis*已被用于生产DNA聚合酶、淀粉水解酶和几丁质酶等，是热稳定性极强的嗜热底盘[44, 121, 134]。另外，*T. thermophilus* ET-1菌株中成功鉴定并表征了三种新型脂解酶——Ces1-ET、Est1-ET和Plp1-ET，构建了pTG-1双功能穿梭载体系统，可在大肠杆菌和*T. thermophilus* HB27中实现异源表达，而且三种重组酶在60 °C以上的高温环境下对表面活性剂、洗涤剂、二价阳离子和高盐环境表现出广泛的耐

受性[135]，这些特性使其在工业生物转化中具有重要应用价值。

5.4 合成生物学工具开发与高温定向进化平台

嗜热底盘细胞不仅是生产宿主，还是合成生物学工具开发和体内定向进化的理想平台。研究表明，高温菌可作为蛋白稳定性进化平台，实现体内连续定向进化，无需体外操作即可快速筛选得到高温稳定蛋白。

对于非模式嗜热微生物而言，高效、可调控的遗传工具是开展代谢工程和复杂基因线路构建的重要基础。近年来，嗜热微生物的遗传工具开发逐渐由基础基因编辑向精确、动态和可诱导的基因表达调控拓展。在可诱导系统开发中，基于*Acetivibrio thermocellus*开发的嗜热型L-阿拉伯糖诱导表达系统ThermoARAi，利用来自*G. stearothermophilus* T-6的阻遏蛋白和启动子元件，经系统优化后动态范围由5.4倍提高至175倍，并具有较低的背景表达[123]。该系统进一步用于纤维素全细胞糖化和无定形PET塑料薄片降解，表明可诱导表达工具能够直接支撑嗜热底盘的代谢工程和生物转化应用。此外，*P. thermoglucosidasius*的工程工具箱近年来也得到持续扩展，包括质粒表达、基因组编辑以及基因表达调控等技术，为其作为工业嗜热底盘开展代谢工程提供了更加完善的技术基础[67]。

与传统在中温宿主中进行蛋白表达后再开展热稳定性筛选相比，直接利用嗜热底盘作为筛选宿主，可以在与目标应用相近的高温环境中对蛋白的稳定性和功能进行筛选，从而将“表达—高温选择—功能评价”整合到同一体系中。以*T. thermophilus* HB27作为筛选宿主，通过体内定向进化获得了博来霉素结合蛋白的热稳定变体，在单轮筛选中即鉴定出可使转化子在77 °C下获得抗性的突变体，其热稳定性较野生型提高17 °C[115]。2025年的研究进一步展示了嗜热底盘在大规模耐热蛋白筛选中的应用。研究者利用*P. thermoglucosidasius*作为宿主，对约10^3–10^4规模的Y-FAST组合突变文库进行高温筛选，获得了具有增强热稳定性的荧光报告蛋白变体，说明嗜热底盘能够直接将高温环境转化为蛋白稳定性筛选压力[102]。利用嗜热菌*P. thermoglucosidasius*作为底盘，研究者对荧光蛋白FAST进行了高通量筛选，成功获得了荧光增强且耐热性显著提升的hyFAST变体，其体积仅为GFP的一半且无需氧气成熟，特别适用于工程化改造极端厌氧菌。在连续定向进化方面，MutaT7与生长偶联连续培养相结合的GCCDE体系能够将体内诱变、选择和富集整合到连续培养过程中，并以嗜热酶CelB为模型获得了低温活性增强且保持热稳定性的变体[136]。该研究虽然采用大肠杆菌作为实际筛选宿主，但其“体内诱变—生长偶联—连续筛选”的策略为嗜热底盘开展自动化蛋白进化提供了可借鉴的方法框架。

因此，嗜热底盘在该方向上的价值并不局限于“生产耐热酶”，而在于利用其高温生长环境建立直接面向热稳定性和高温功能的筛选压力，使其成为连接蛋白设计、文库构建与实验筛选的重要平台。

6 总结与展望

嗜热微生物底盘细胞因其在高温条件下独特的代谢优势和遗传可操作性，正逐步成为合成生物学与工业生物技术领域的重要平台。在遗传操作工具方面，基于内源CRISPR-Cas系统和外源耐热Cas蛋白的基因组编辑技术已取得突破性进展[9，10，31，32，57-59，61-66，98]，尤其是以*T. thermophilus*为代表的嗜热菌已实现高效率的基因敲除、点突变、大片段删除及转录调控[27]，为嗜热底盘细胞的改造提供了有力工具。同时，启动子工程、RNA温度计、光遗传调控及双组分信号系统的开发利用[11-13，67，87，88]，使代谢通路的动态调控成为可能。值得关注的是，人工智能（AI）与机器学习（ML）技术正在加速遗传操作工具的迭代升级。AI辅助的蛋白质结构聚类与生成式设计已成功发掘多种新型耐热Cas蛋白，而深度学习模型可辅助预测gRNA的靶向效率和潜在脱靶风险，为嗜热宿主中的编辑工具设计提供参考[96，97，99-106，137-140]。在底盘工程化改造方面，通过碳源谱拓宽、产物合成途径重构、转运系统优化及代谢通路动态调控等策略，嗜热菌已成功实现从纤维素、甲醇、

合成气等多种原料到乙醇、丁醇、PHA、cDPG等高价值产物的高效转化[76-78, 80-83, 114]。在此基础上，AI驱动的蛋白工程与代谢网络建模为底盘性能的进一步提升开辟了新路径。机器学习模型对蛋白热稳定性突变的预测，结合高温高通量筛选平台，已成功获得热稳定性荧光报告蛋白hsFAST等关键功能元件[141]；基于图神经网络的代谢热力学分析工具（如dGbyG）则为嗜热菌基因组尺度代谢模型（GEM）的构建提供了准确的热力学约束，推动代谢通路设计从经验试错走向理性预测[84, 107]。在应用层面，嗜热底盘细胞不仅在生物燃料和生物基化学品生产中展现出工业化潜力，其作为耐热酶表达平台和合成生物学工具开发宿主的价值也日益凸显[44, 80, 111-113, 115, 116, 118, 121, 122, 124, 125, 127-131, 133-136, 142, 143]。

与常温微生物底盘相比，嗜热底盘的优势和限制均与高温生长这一基本生物学特征密切相关。一方面，高温生长有利于降低环境微生物污染风险，并可与开放式、连续化发酵等过程强化策略结合，为降低灭菌和运行成本提供可能；另一方面，高温也对蛋白质折叠与稳定性、膜脂组成、代谢热力学以及产物耐受性提出了更高要求。因此，嗜热底盘的进一步工程化不能简单沿用常温模式菌的改造策略，而需要针对高温条件下的细胞稳态和代谢特征建立相应的工程化体系。近年来针对嗜热乙酸菌等底盘的研究也表明，遗传工具不足、复杂代谢工程难度较高以及工业条件下的菌株性能维持仍是限制其进一步应用的重要因素[144]。

然而，嗜热底盘细胞的进一步开发与应用仍面临若干挑战。首先，尽管遗传操作工具箱不断丰富，但与大肠杆菌、酿酒酵母等模式菌株相比，嗜热菌的质粒稳定性、转化效率及多重编辑能力仍有待提升。其次，高温条件下产物抑制效应显著（如乙醇耐受性普遍较低），需结合过程工程与代谢工程协同优化。此外，非模式嗜热微生物的代谢网络模型和系统生物学数据相对匮乏，限制了全局代谢通路的理性设计。最后，AI技术在嗜热底盘中的应用仍处于起步阶段，面临高质量训练数据稀缺、模型泛化能力不足以及湿实验验证周期长等现实瓶颈。

展望未来，随着合成生物学“设计-构建-测试-学习”策略在嗜热底盘中的深入应用，结合自动化高通量筛选、人工智能辅助的代谢网络建模及新型基因编辑工具的开发，嗜热底盘细胞即将实现精细化设计。为实现这一目标，需从以下几个方向协同推进。首先，遗传操作工具的持续迭代升级是精准改造的基础。可进一步开发基于CRISPRa/i的基因表达调控系统，实现内源基因的可诱导和可定量调控；同时，将碱基编辑和先导编辑等新一代编辑技术向嗜热系统移植，有望实现更精准的基因组改造[145, 146]。在这一过程中，AI不应仅用于单一编辑元件的筛选，而可进一步用于耐热Cas蛋白的序列与结构设计、gRNA活性预测以及编辑条件优化，从而降低嗜热系统中因候选工具数量有限而产生的试错成本。AI技术的深度介入将为此提供核心驱动力：一方面，生成式AI模型有望实现嗜热条件下新型基因编辑器的从头设计，突破天然蛋白的热稳定性限制；另一方面，主动学习算法与自动化实验平台的融合将自主完成编辑工具的优化迭代，大幅缩短开发周期[110, 141]。其次，合成生物学元件的系统化将为复杂代谢网络设计提供模块化工具。构建涵盖组成型、诱导型和响应型启动子的标准化元件库，开发适配高温条件的生物传感器和遗传逻辑线路，是实现动态调控的关键[147, 148]。与常温底盘相比，嗜热底盘更需要建立与高温生理状态相匹配的调控元件体系，使启动子、RNA元件和传感器的活性能够在目标温度范围内保持稳定。特别值得关注的是，基于双组分系统的温度响应元件的挖掘和改造，有望构建智能型温度调控回路[149, 150]。温度本身既是嗜热底盘生长所必需的环境条件，也可以进一步作为可编程的调控信号。已有研究表明，RNA热传感器及人工温度响应遗传线路能够将温度变化转化为可控的基因表达输出，为构建温度驱动的动态调控系统提供了基础[151]。未来，机器学习模型有望从嗜热菌基因组数据中大规模挖掘新型调控元件，并预测其在高温下的活性表现，从而建立嗜热底盘专用的标准化元件库[92, 152]。

此外，多组学指导的系统代谢工程将大幅提升改造效率。整合基因组、转录组、蛋白质组和代谢组数据，结合基因组规模代谢模型和机器学

习方法，可实现对代谢网络改造靶点的精准预测和快速验证[153，154]；适应性进化与理性设计相结合的半理性改造策略将在嗜热菌底物谱拓展和产物谱扩展中发挥更大作用[155，156]。对于嗜热底盘而言，多组学数据的整合还需要充分考虑温度对酶活性、代谢热力学和细胞资源分配的影响，从而避免直接套用常温条件下的代谢网络参数。近年来，酶效率与热力学约束被进一步整合到基因组尺度代谢模型中，表明将酶学参数与热力学信息共同纳入模型能够提高代谢工程设计的预测能力[151]。AI赋能的多尺度代谢模型将进一步整合酶动力学参数与热力学约束，实现对高温代谢通路的虚拟筛选与精准调控，推动嗜热底盘从单基因改造迈向系统层面的智能设计[108，109]。由此，AI在上述三个层面的作用可以进一步形成由设计-构建-测试-学习构成的闭环，将AI作为连接遗传工具、调控元件与系统代谢工程的共同设计框架，而并非单纯增加AI工具。

在应用层面，嗜热底盘的价值仍主要体现在高温条件能够带来的过程适配性和耐受性优势。利用嗜热菌的高温生长特性，可探索将高温发酵工艺与工业废热回收相结合，实现低成本的绿色生物制造；在开放无灭菌连续发酵工艺中，嗜热底盘的抗污染优势可转化为显著的经济效益[3，5，54-56]。同时，嗜热菌在极端酶制剂、药物中间体和功能食品配料等领域的高附加值产品开发具有巨大市场潜力，而*T. thermophilus*作为蛋白质热稳定性改造的筛选宿主，在酶工程领域展现出独特优势[157-159]。此外，温度响应机制可作为连接嗜热生理特征与智能底盘设计的重要切入点。对双组分系统以及RNA热传感器等温度响应模块的深入挖掘和重构，有望开发出具有自主调控能力的新一代智能底盘[160]。与单纯依赖外源诱导剂的调控方式相比，以温度作为输入信号能够利用嗜热发酵过程中本身存在的温度条件，实现对细胞生长、代谢通量或产物合成的动态调节，因此具有较强的嗜热底盘特异性[161]。

总体而言，嗜热底盘细胞的发展仍面临遗传操作工具有限、动态调控体系不完善、代谢网络解析不足、AI辅助底盘设计的数据与模型基础薄弱，以及实验室研究与工业化放大之间存在差距等瓶颈。嗜热底盘细胞未来的发展重点并非单纯扩大可生产的产物范围，而是建立能够适应高温环境、实现精准调控并支持系统设计的底盘工程体系，聚焦“工具迭代-元件标准化-AI驱动-工业落地”这一主线。日后，随着遗传操作工具、标准化调控元件、多组学建模和AI技术进一步融合，嗜热微生物底盘细胞有望在高温生物制造、耐热酶生产以及开放式和连续化发酵等特定场景中发挥更大的应用价值。

参 考 文 献

[1] Knapp B D, Huang K C. The effects of temperature on cellular physiology[J]. Annual Review of Biophysics, 2022, 51: 499-526.

[2] Sitara A, Hocq R, Horvath J, et al. Industrial biotechnology goes thermophilic: Thermoanaerobes as promising hosts in the circular carbon economy[J]. Bioresource Technology, 2024, 408: 131164.

[3] Zeldes B M, Keller M W, Loder A J, et al. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1209.

[4] Yu L P, Wu F Q, Chen G Q. Next-generation industrial biotechnology-transforming the current industrial biotechnology into competitive processes[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14 (9): 1800437.

[5] 邵明威,孙思勉,杨时茂,等. 基于极端微生物的生物制造[J]. 合成生物学, 2024, 5(6):1419-1436.
Shao M W, Sun S M, Yang S M, et al. Bioproduction based on extremophiles[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(6): 1419-1436.

[6] Taylor M, Van Zyl L, Tuffin I, et al. Genetic tool development underpins recent advances in thermophilic whole - cell biocatalysts[J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4(4): 438-448.

[7] Zhu D, Adebisi W A, Ahmad F, et al. Recent development of extremophilic bacteria and their application in biorefinery[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 483.

[8] Wei J, Li Y. CRISPR-based gene editing technology and its application in microbial engineering[J]. Engineering Microbiology, 2023, 3(4): 100101.

[9] Le Y, Sun J. CRISPR/Cas genome editing systems in thermophiles: current status, associated challenges, and future perspectives[M]//Gadd G M, Sariaslani S, eds. Advances in

Applied Microbiology. Amsterdam: Elsevier, 2022,118:1-30.

[10] Adalsteinsson B T, Kristjansdottir T, Merre W, et al. Efficient genome editing of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, using a thermostable Cas9 variant[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 9586.

[11] Zeldes B, Mittelstedt S, Baum C, et al. Sugar-inducible promoters for manipulation of core metabolic pathways in the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(12): e01641-25.

[12] Wong C F A, Zhang S, Tietze L, et al. Engineering artificial 5′ regulatory sequences for thermostable protein expression in the extremophile *Thermus thermophilus*[J]. Synthetic Biology, 2025, 10(1): ysaf016.

[13] Kammerdiener E K, Garcia S K, Bales M K, et al. Multilayered regulation by RNA thermometers enables precise control of Cas9 expression in *E. coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2026, 54(2): gkaf1495.

[14] Indriati G, Megahati R R P. Isolation of thermophilic bacteria and optimizing the medium growth conditions[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2018, 7 (1): 1457-1464.

[15] Gupta G, Srivastava S, Khare S, et al. Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment[J]. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, 2014, 7(2): 371-380.

[16] Liao H, McKenzie T, Hageman R. Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(3): 576-580.

[17] Koyama Y, Hoshino T, Tomizuka N, et al. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. [J]. Journal of Bacteriology, 1986, 166(1): 338-340.

[18] Ohtani N, Tomita M, Itaya M. The third plasmid pVV8 from *Thermus thermophilus* HB8: isolation, characterization, and sequence determination[J]. Extremophiles, 2012, 16(2): 237-244.

[19] Henne A, Brüggemann H, Raasch C, et al. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(5): 547-553.

[20] Menne A, Brüggemann H, Raasch C, et al. Next generation prokaryotic engineering: the CRISPR-Cas toolkit[J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(7): 575-587.

[21] Hille F, Richter H, Wong S P, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward[J]. Cell, 2018, 172(6): 1239-1259.

[22] Ye J W, Lin Y N, Yi X Q, et al. Synthetic biology of extremophiles: a new wave of biomanufacturing[J]. Trends in Biotechnology, 2023, 41(3): 342-357.

[23] Wei J, Shao Y, Liang Y, et al. A type III-associated Cas6 functions as a negative regulator of type IB CRISPR-Cas system in *Thermus thermophilus*[J]. Communications Biology, 2025, 8: 793.

[24] Deng L, Zhu H, Chen Z, et al. Unmarked gene deletion and host – vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*[J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 735-746.

[25] Li Y, Pan S, Zhang Y, et al. Harnessing Type I and Type III CRISPR-Cas systems for genome editing[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(4): e34.

[26] Li C, Xu J. Construction of Promoter-Ribosome Binding Site Library for Manipulating Gene Expression in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(6): 2181-2197.

[27] Wang J, Wei J, Li H, et al. High-efficiency genome editing of an extreme thermophile *Thermus thermophilus* using endogenous type I and type III CRISPR-Cas systems[J]. mLife, 2022, 1(4): 412-427.

[28] Drejer E B, Hakvåg S, Irla M, et al. Genetic tools and techniques for recombinant expression in thermophilic Bacillaceae[J]. Microorganisms, 2018, 6(2): 42.

[29] Le Y,Fu Y,Sun J. Genome editing of the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus* using thermostable Cas9[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 87(1): e01773-20.

[30] Luo Z, Gao Y, Guo X, et al. *Myceliophthora thermophila* as promising fungal cell factories for industrial bioproduction: From rational design to industrial applications[J]. Bioresource Technology, 2025, 419: 132051.

[31] Hileman T H, Santangelo T J. Genetics techniques for *Thermococcus kodakarensis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 195.

[32] Elmore J, Deighan T, Westpheling J, et al. DNA targeting by the type IG and type IA CRISPR – Cas systems of *Pyrococcus furiosus*[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(21): 10353-10363.

[33] Liang Y, Motawaa M, Bu X, et al. Construction of primary chassis cells with efficient protein expression in *Thermus thermophilus*[J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1): 163.

[34] Fujita A, Misumi Y, Koyama Y. Two versatile shuttle vectors for *Thermus thermophilus* – *Escherichia coli* containing multiple cloning sites, lacZα gene and kanamycin or

hygromycin resistance marker[J]. Plasmid, 2012, 67(3): 272-275.

[35] Murayama S, Omichi H, Doi T, et al. Development of new *Thermus thermophilus—Escherichia coli* shuttle vectors[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(12): e02102-25.

[36] Khaswal A, Chaturvedi N, Mishra S K, et al. Current status and applications of genus *Geobacillus* in the production of industrially important products-a review[J]. Folia Microbiologica, 2022, 67(3): 389-404.

[37] Shen P, Zhang L, Liu B, et al. Structure of *Geobacillus stearothermophilus* Cas9: insights into the catalytic process and thermostability of CRISPR-Cas9[J]. ACS Catalysis, 2024, 14(17): 13227-13235.

[38] Le Y, Liu X, Zhou S, et al. A thermostable Cas9-based genome editing system for thermophilic acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(10): e01170-25.

[39] Shao X, Zhou J, Olson D G, et al. A markerless gene deletion and integration system for *Thermoanaerobacter ethanolicus*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 100.

[40] Liu Q, Gao R, Li J, et al. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 1.

[41] Liu Q, Zhang Y, Li F, et al. Upgrading of efficient and scalable CRISPR-Cas-mediated technology for genetic engineering in thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 293.

[42] Li J, Zhang Y, Li J, et al. Metabolic engineering of the cellulolytic thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* to produce ethanol from cellobiose[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 23.

[43] Yuan G, Gao Z, Qi Y, et al. CREAT: A CRISPR-Based Genome Trimming Strategy for Systematic Identification of Dispensable Regions and Rapid Genome Reduction[J]. Advanced Science, 2026, 13(50): e76042.

[44] Aslam M, Horiuchi A, Simons J R, et al. Engineering of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* for chitin-dependent hydrogen production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(15): e00280-17.

[45] Gehring A M, Sanders T J, Santangelo T J. Markerless Gene Editing in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*[J]. Bio-protocol, 2017, 7(22): e2604.

[46] Khaerunnisa, Laksmi F A, Rahayuningsih M, et al. One-step rapid production of DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* system under optimized culture conditions[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2025, 55(8): 1066-1074.

[47] Lipscomb G L, Schut G J, Thorgersen M P, et al. Engineering hydrogen gas production from formate in a hyperthermophile by heterologous production of an 18-subunit membrane-bound complex[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(5): 2873-2879.

[48] Lipscomb G L, Stirrett K, Schut G J, et al. Natural competence in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* facilitates genetic manipulation: construction of markerless deletions of genes encoding the two cytoplasmic hydrogenases [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2232-2238.

[49] Takano K, Aoi A, Koga Y, et al. Evolvability of thermophilic proteins from archaea and bacteria[J]. Biochemistry, 2013, 52 (28): 4774-4780.

[50] Shi J, Yuan B, Yang H, et al. Recent advances on protein engineering for improved stability[J]. BioDesign Research, 2025, 7(1): 100005.

[51] Rhim J H, Zhou A, Amenabar M J, et al. Mode of carbon and energy metabolism shifts lipid composition in the thermoacidophile *Acidianus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2024, 90(2): e01369-23.

[52] Yadav J, Marwah H, Kumar C. Synthetic biology and metabolic engineering paving the way for sustainable next-gen biofuels: a comprehensive review[J]. Energy Advances, 2025, 4 (10): 1209-1228.

[53] Chen G Q, Jiang X R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 50: 94-100.

[54] Qin J, Zhao B, Wang X, et al. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus* sp. 2-6[J]. PLOS ONE, 2009, 4(2): e4359

[55] Abdel-Rahman M A, Tan J, Tashiro Y, et al. Non-carbon loss long-term continuous lactic acid production from mixed sugars using thermophilic Enterococcus faecium QU 50[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(6): 1673-1683.

[56] van Groenestijn J W, Geelhoed J S, Goorissen H P, et al. Performance and population analysis of a non-sterile trickle bed reactor inoculated with *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, a thermophilic hydrogen producer[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(5): 1361-1367.

[57] Ma S, Wang F, Zhang X, et al. Repurposing endogenous type II CRISPR - Cas9 system for genome editing in *Streptococcus thermophilus*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2024, 121 (2): 749 - 756.

[58] Sitara A, Hocq R, Lu A J, et al. Hi-TARGET: a fast, efficient and versatile CRISPR type IB genome editing tool for the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2025, 18(1): 49.

[59] Yang Z, Li Z, Li B, et al. A thermostable type IB CRISPR-Cas system for orthogonal and multiplexed genetic engineering[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 6193.

[60] Peng W, Feng M, Feng X, et al. An archaeal CRISPR type III-B system exhibiting distinctive RNA targeting features and mediating dual RNA and DNA interference[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(1): 406-417.

[61] Chen R, Lv Y, Zhang H, et al. An endogenous type III-B CRISPR-Cas based gene knockdown system in *Pyrococcus yayanosii* A1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(7): 1920-1932.

[62] Dai K, Qu C, Fu H, et al. Thermoanaerobacter Species: The Promising Candidates for Lignocellulosic Biofuel Production [J]. Synthetic Biology and Engineering, 2023, 1(1): 10005.

[63] Walker J E, Lanahan A A, Zheng T, et al. Development of both type I – B and type II CRISPR/Cas genome editing systems in the cellulolytic bacterium Clostridium thermocellum[J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: e00116.

[64] Zhang Y L, Huang D C, Duan M, et al. Loop engineering of AtCas9 for effective and broad genome editing[J]. Cell Insight, 2025, 4(6): 100286.

[65] Mohanraju P, Mougiakos I, Albers J, et al. Development of a Cas12a-based genome editing tool for moderate thermophiles [J]. The CRISPR Journal, 2021, 4(1): 82-91.

[66] Liu S, He Y, Fan T, et al. PAM - relaxed and temperature - tolerant CRISPR-Mb3Cas12a single transcript unit systems for efficient singular and multiplexed genome editing in rice, maize, and tomato[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23 (1): 156-173.

[67] Millgaard M, Escher B, Pogrebnyakov I, et al. The engineering toolbox of *Parageobacillus thermoglucosidasius*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2025, 109(1): 163.

[68] Liu P, Yuan Q, Yang X, et al. A synthetic biology toolkit for the plasmid-dependent and thermophilic methylotroph *Bacillus methanolicus*[J]. Cell Reports, 2026, 45(1): 116788.

[69] Hiratsu K, Nunoshiba T, Togawa Y, et al. Development of a thermostable Cre/lox-based gene disruption system and in vivo manipulations of the megaplasmid pTT27 in *Thermus thermophilus* HB27[J]. Plasmid, 2024, 131-132: 102730.

[70] Carr J F, Gregory S T, Dahlberg A E. Transposon mutagenesis of the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27[J]. Extremophiles, 2015, 19(1): 221-228.

[71] Reeve B, Martinez-Klimova E, de Jonghe J, DE JONGHE J, et al. The Geobacillus Plasmid Set: A Modular Toolkit for Thermophile Engineering[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5 (12): 1342-1347.

[72] Lai Y, Wang J, Xie N, et al. Identification of a novel forkhead transcription factor MtFKH1 for cellulase and xylanase gene expression in *Myceliophthora thermophila* (ATCC 42464) [J]. Microbiological Research, 2025, 294: 128097.

[73] Li J, Wang Y, Yang K, et al. Development of an efficient protein expression system in the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 236.

[74] Gong C, Yang X, Zhao X, et al. Semi-automated strain engineering and screening in the thermophilic fungus Myceliophthora thermophila for recombinant protein production[J]. Applied and environmental microbiology, 2026, 92(9): e00995-26.

[75] Brito L F, Friis M K, Zhu H, et al. Tools and Strategies for Engineering *Bacillus methanolicus*: A Versatile Thermophilic Platform for Sustainable Bioproduction from Methanol and Alternative Feedstocks[J]. Synthetic Biology and Engineering, 2025, 3(4): 10016.

[76] Hocq R, Horvath J, Stumptner M, et al. A megatransposon drives the adaptation of *Thermoanaerobacter kivui* to carbon monoxide[J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 4217.

[77] Wang X, Xiao M, Chen C, et al. Effective conversion of lignocellulose to fermentable sugars using engineered *Clostridium thermocellum* with co-enhanced cellulolytic and xylanolytic activities[J]. Bioresource Technology, 2025, 440: 133466.

[78] Tjo H, Blundin K, Conway J M. Designing thermophilic, synthetic microbial communities for consolidated bioprocessing[J]. BioDesign Research, 2025, 7(2): 100024.

[79] Yan F, Dong S, Liu Y J, et al. Deciphering cellodextrin and glucose uptake in *Clostridium thermocellum*[J]. mBio, 2022, 13 (5): e01476-22.

[80] Doménech P, Pogrebnyakov I, Jensen S I, et al. Metabolic engineering of *Parageobacillus thermoglucosidasius* for thermophilic production of 1-butanol[J]. AMB Express, 2025, 15(1): 75.

[81] Jilani S B, Ashok N, Bomble Y J, et al. Engineering *Clostridium thermocellum* for production of 2, 3-butanediol from cellulose[J]. Metabolic Engineering Communications, 2026, 22: e00269.

[82] Klein M, Hilts A S, Fennessy R T, et al. Markerless mutagenesis enables isoleucine biosynthesis solely from threonine in *Methanothermobacter marburgensis*[J]. Microbiology Spectrum, 2025, 13(6): e03068-24.

[83] Zhu J, Kang J, Liu M, et al. Engineering a non-oxidative glycolysis pathway in industrial *Bacillus licheniformis* for carbon-efficient production of acetyl-CoA derived biochemicals [J]. Chemical Engineering Journal, 2026, 534: 175024.

[84] Kristjansdottir T, Hreggvidsson G O, Gudmundsdottir E E, et al. A genome-scale metabolic reconstruction provides insight into the metabolism of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2025, 101(1): fiae167.

[85] Grybchuk-Ieremenko A, Lipovská K, Kouřilová X, et al. An initial genome editing toolset for *Caldimonas thermodepolymerans*, the first model of thermophilic polyhydroxyalkanoates producer[J]. Microbial Biotechnology, 2025, 18(2): e70103.

[86] 王清灏,曹浩博,吴雨璇,等. 可诱导的CRISPR-dCas9基因表达调控策略与方法[J]. 基因组学与应用生物学,2025,44(7): 750-763.
Wang Q H, Cao H B, Wu Y X, et al. Inducible CRISPR-dCas9 gene expression regulation strategies and methods[J]. Genomics and Applied Biology,2025,44(7):750-763.

[87] Huang H C, Wu L F, Liu K, et al. Opto-CRISPR: new prospects for gene editing and regulation[J]. Trends in Biotechnology, 2026, 44(1): 22-39.

[88] Bu X, Tao Y, Zhao C, et al. A novel two-component system regulates shikimate pathway for thermal adaptation in *Thermus thermophilus*[J]. Nucleic Acids Research, 2026, 54(4): gkag116.

[89] Chai T, Tao Y, Zhao C, et al. Hierarchical metabolic engineering for rewiring cellular metabolism[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2025, 49: fuaf047.

[90] Mao Z, Yuan Q, Li H, et al. CAVE: a cloud-based platform for analysis and visualization of metabolic pathways[J]. Nucleic acids research, 2023, 51(W1): W70-W77.

[91] Kong D, Qian J, Gao C, et al. Machine Learning empowering microbial cell factory: a comprehensive review[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2025, 197(8): 4897-4913.

[92] 王晟,王泽琛,陈威华,等. 基于人工智能和计算生物学的合成生物学元件设计[J]. 合成生物学,2023,4(3):422-443.
Wang S, Wang Z C, Chen W H, et al. Design of synthetic biology elements based on artificial intelligence and computational biology[J]. Synthetic Biology Journal,2023,4(3): 422-443.

[93] Qin Z, Deng Z, Li C, et al. AI sheds new light on genome editing[J]. Trends in Biotechnology, 2026, 44(3): 696-709.

[94] Faure G, Saito M, Wilkinson M E, et al. TIGR-Tas: A family of modular RNA-guided DNA-targeting systems in prokaryotes and their viruses[J]. Science, 2025, 388(6746): eadv9789.

[95] Li W, Jiang X, Wang W, et al. Discovering CRISPR-Cas system with self-processing pre-crRNA capability by foundation models[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 10024.

[96] Ruffolo J A, Nayfach S, Gallagher J, et al. Design of highly functional genome editors by modelling CRISPR – Cas sequences[J]. Nature, 2025, 645(8080): 518-525.

[97] Nijkamp E, Ruffolo J A, Weinstein E N, et al. Progen2: exploring the boundaries of protein language models[J]. Cell Systems, 2023, 14(11): 968-978. e963.e3.

[98] Boob A G, Zhang C, Pan Y, et al. Discovery, characterization, and application of chromosomal integration sites in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*[J]. Trends in Biotechnology, 2026, 44(4): 1167-1186.

[99] Reddy P R, Ridha F, Gromiha M M. Integrating sequence, structure, and graph-based features for elucidating the stability of thermophilic proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 2026, 438(4): 169593.

[100] Liu H, Zhu G, Chen L, et al. Machine learning prediction of bacterial optimal growth temperature from protein domain signatures reveals thermoadaptation mechanisms[J]. BMC Genomics, 2025, 26(1): 957.

[101] Liu J, You H, Guo Z, et al. GeoEvoBuilder: A deep learning framework for efficient functional and thermostable protein design[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2025, 122(41): e2504117122.

[102] Shin S M, Triola E K H, Granja-Travez R S, et al. Thermophilic Chassis-Enabled High-Throughput Selection of a Thermostable Fluorogenic Reporter[J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(10): 4100-4115.

[103] Wu Z, Wang Y, Lao Y, et al. Combining deep learning and protein engineering to develop a thermostable protease for aquafeed applications[J]. Food Bioscience, 2025, 74: 107908.

[104] Lu M, Li Z, Zhuang H, et al. Dual enhancement of thermostability and activity of xylanase through computer-

aided rational design[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(41): 15114-15124.

[105] Zou Y, Zheng P, Chen P, et al. Multidimensional computational strategies enhance the thermostability of alpha-galactosidase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 314: 144316.

[106] Song X, Han K, Xu P, et al. Thermostability engineering of microbial transglutaminase using artificial intelligence and investigation of its underlying mechanisms[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2026, 13(1): 29.

[107] Fan W, Hao Y, Hou X, et al. Unraveling principles of thermodynamics for genome-scale metabolic networks using graph neural networks[J]. Cell Systems, 2025, 16(10): 101393.

[108] Ahlawat Y K, Srivastava V, Samani M, et al. Computational strategies for maximizing biomass and metabolite yields for bioproduction[M]// Medicinal and Aromatic Plants: Current Research Status, Value-Addition to Their Waste, and Agro-Industrial Potential (Vol. I). Cham: Springer,2024:143-161.

[109] Chen Y, Gustafsson J, Tafur Rangel A, et al. Reconstruction, simulation and analysis of enzyme-constrained metabolic models using GECKO Toolbox 3.0[J]. Nature Protocols, 2024, 19(3): 629-667.

[110] Chen J, Singh N, Lu J, et al. Artificial intelligence‐powered biofoundries for protein engineering and metabolic engineering [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2025, 96: 103380.

[111] Ibenegbu C, Zimmerman W B, Hines M, et al. Toxicity reduction in continuous, high productivity ethanol fermentation by *Parageobacillus thermoglucosidasius* using in situ microbubble gas stripping[J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1): 137.

[112] de Rose S A, Finnigan W, Harmer N J, et al. Production of the extremolyte cyclic 2, 3-diphosphoglycerate using *Thermus thermophilus* as a whole-cell factory[J]. Frontiers in Catalysis, 2021, 1: 803416.

[113] Alfano A, Parecha D, D'Ambrosio S, et al. A Biotechnological Platform Based on the Newly Isolated *Streptococcus thermophilus* D4 to Obtain Viable Biomass and Exopolysaccharides for Enterocytes Wound Healing[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2025, 122(12): 3472-3485.

[114] Li B, Yang Z, Li Z, et al. Enabling genetic manipulation and robustness of *Bacillus methanolicus* for methanol-based bio-manufacturing[J]. Metabolic Engineering, 2025, 89: 121-134.

[115] Brouns S J, Wu H, Akerboom J, et al. Engineering a selectable marker for hyperthermophiles[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(12): 11422-11431.

[116] Moenaert A, Bjornsdottir B, Haraldsson E B, et al. Metabolic engineering of *Thermoanaerobacterium* AK17 for increased ethanol production in seaweed hydrolysate[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 135.

[117] Caminiti V, Kourilova X, Slosarova K, et al. Utilization of wine lees as a substrate for polyhydroxyalkanoates production by employing halophilic and thermophilic bacteria[J]. Polymer Degradation and Stability, 2025, 241: 111524.

[118] Yang Z, Sun Q, Tan G, et al. Engineering thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius* for riboflavin production[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(2): 363-373.

[119] Iqbalsyah T M, Malahayati, Atikah, et al. Purification and partial characterization of a thermo-halostable protease produced by *Geobacillus* sp. strain PLS A isolated from undersea fumaroles[J]. Journal of Taibah University for Science, 2019, 13(1): 850-857.

[120] Liu J G, Yin M M, Wang M, et al. Isolation and Purification of a Hyperthermostable Superoxide Dismutase from *Thermus thermophilus* HB27 Using Two-Stage Ultrafiltration[J]. Advanced Materials Research, 2012, 396: 1601-1604.

[121] Zeng J, Guo J, Yuan L. Optimization of Type III Resistant Cornstarch Preparation by TK - PUL Enzymatic Hydrolysis Synergistic Dual Autoclaving-Cooling Treatment Using Response Surface Methodology[J]. Starch-Stärke, 2025, 77(3): e202400151.

[122] Javier-López R, Kielbasa M, Armengaud J, et al. Transcriptomic and proteomic insights into feather keratin degradation by *Fervidobacterium*[J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1509937.

[123] Liu F, Chen C, Liu Y J, et al. Development of a thermophilic l-arabinose-inducible system in *Acetivibrio thermocellus (Clostridium thermocellum)* [J]. Metabolic Engineering, 2026, 93: 89-99.

[124] Daley S R, Kirby S, Sparling R. Adaptive evolution of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 on alternate carbon sources leads to altered fermentation profiles[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2024, 70(9): 370-383.

[125] Bing R G, Ford K C, Willard D J, et al. Engineering ethanologenicity into the extremely thermophilic bacterium *Anaerocellum (f. Caldicellulosiriuptor) bescii*[J]. Metabolic engineering, 2024, 86: 99-114.

[126] Orlygsson J, Scully S. Biotechnological Prospects of Thermoanerobacter AK15: End-Product Formation from Carbohydrates, Amino Acids, and Lignocellulosic and Macroalgae Hydrolysates[J]. International Journal of

Molecular Sciences, 2024, 25: 3490.

[127] Fuke T, Sato T, Jha S, et al. Phytoene production utilizing the isoprenoid biosynthesis capacity of *Thermococcus kodakarensis*[J]. Extremophiles, 2018, 22(2): 301-313.

[128] Liman G L, Hulko T, Febvre H P, et al. A linear pathway for mevalonate production supports growth of *Thermococcus kodakarensis*[J]. Extremophiles, 2019, 23(2): 229-238.

[129] Karaman S, Metin K. Purification and characterization of an extremely thermostable metalloprotease from *Geobacillus thermoleovorans* HBB208[J]. International Microbiology, 2025, 28(8): 2565-2578.

[130] Arya M, Chauhan G, Fatima T, et al. Statistical Optimization of Cellulase Production by A Novel Thermophilic Lignocellulolytic Bacterium Geobacillus stearothermophilus TP-3 from Tapovan Hot Spring in India[J]. Journal of Pure & Applied Microbiology, 2025, 19(2): 1085-1100.

[131] Yu X, Ma S, Wu X, et al. Integrated omics analysis of the cellulose co-degradation network of Chaetomium thermophilum[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2026, 19(1): 19.

[132] Jin H S, Park S Y, Kim J Y, et al. Fluorescence-based quantification of bioactive keratin peptides from feathers for optimizing large-scale anaerobic fermentation and purification [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2019, 24(1): 240-249.

[133] Islam M N, Rauf A, Fahad F I, et al. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62 (26): 7282-7300.

[134] Chen L, Fu D. Enhanced Performance of *Thermococcus kodakarensis* KOD1 Polymerase in PCR via Fusion to *Sulfolobus tokodaii* Sto7d[J]. Protein Expression and Purification, 2025: 106809.

[135] Valenzuela B, Cayo M, Solís-Cornejo F, et al. Production of Novel Thermostable Esterases from *Thermus thermophilus* Strain ET-1 in *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* HB27 Using the Bifunctional Expression System pTGT-1 and Characterization of the Recombinant Enzymes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2026, 27(3): 1372.

[136] Deng Y, Etheridge K, Ran X, et al. Growth-coupled continuous directed evolution by MutaT7 enables efficient and automated enzyme engineering[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(4): e02491-24.

[137] Kim H K, Kim Y, Lee S, et al. SpCas9 activity prediction by DeepSpCas9, a deep learning – based model with high generalization performance[J]. Science Advances, 2019, 5(11): eaax9249.

[138] Chuai G, Ma H, Yan J, et al. DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning[J]. Genome Biology, 2018, 19(1): 80.

[139] Toufikuzzaman M, Hassan Samee M A, Sohel Rahman M. CRISPR-DIPOFF: an interpretable deep learning approach for CRISPR Cas-9 off-target prediction[J]. Briefings in Bioinformatics, 2024, 25(2): bbad530.

[140] Chen Q, Chuai G, Zhang H, et al. Genome-wide CRISPR off-target prediction and optimization using RNA-DNA interaction fingerprints[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 7521.

[141] 朱岩,张志丹,覃培斌,等. 数据驱动的生物制造过程多组学分析与建模[J]. 生物工程学报,2025,41(3):1152-1178.
Zhu Y, Zhang Z D, Qin P B, et al. Data-driven multi-omics analysis and modeling of biomanufacturing processes[J]. Chinese Journal of Biotechnology,2025,41(3):1152-1178.

[142] Boulain J C, Dassa J, Mesta L, et al. Mutants with higher stability and specific activity from a single thermosensitive variant of T7 RNA polymerase[J]. Protein Engineering, Design & Selection, 2013, 26(11): 725-734.

[143] Blanchard K, Robic S, Matsumura I. Transformable facultative thermophile *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621 as a host strain for metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(15): 6715-6723.

[144] Bourgade B, Islam M A. Progresses and challenges of engineering thermophilic acetogenic cell factories[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1436583.

[145] Anzalone A V, Koblan L W, Liu D R. Genome editing with CRISPR – Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(7): 824-844.

[146] Kantor A, McClements M E, MacLaren R E. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(17): 6240.

[147] Nielsen A A, Der B S, Shin J, et al. Genetic circuit design automation[J]. Science, 2016, 352(6281): aac7341.

[148] Moser F, Tham E, González L M, et al. Light-controlled, high-resolution patterning of living engineered bacteria onto textiles, ceramics, and plastic[J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(30): 1901788.

[149] Groisman E A. Feedback control of two-component regulatory systems[J]. Annual Review of Microbiology, 2016, 70(1): 103-124.

[150] Chen S Y, Xu H, Wan X, et al. Refactoring two-component systems for tunable gene expression regulation and upgraded

bacterial sensing[J]. Cell Systems, 2026, 17(3).

[151] Gonzalez-Colell M, Gomes del Castillo M, Palau Gauthier M, et al. Temperature-dependent recombinase-based genetic circuits[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(24): 12055.

[152] Roy G, Prifti E, Belda E, et al. Deep learning methods in metagenomics: a review[J]. Microbial Genomics, 2024, 10(4): 001231.

[153] Cordova L T, Lu J, Cipolla R M, et al. Co-utilization of glucose and xylose by evolved *Thermus thermophilus* LC113 strain elucidated by 13C metabolic flux analysis and whole genome sequencing[J]. Metabolic engineering, 2016, 37: 63-71.

[154] Patra P, Disha B, Kundu P, et al. Recent advances in machine learning applications in metabolic engineering[J]. Biotechnology Advances, 2023, 62: 108069.

[155] Xu H, Lv N, Liu Y. Semi-rational design of psychrophilic cellobiose 2-epimerase for improved substrate affinity and enhanced low-temperature epimerization activity[J]. Bioresource Technology, 2026: 134363.

[156] Liang Y, Wang Q, Lu J, et al. Semi-rational engineering of leucine dehydrogenase for enhanced L-tert-leucine production [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 288: 138469.

[157] Aulitto M, Fusco S, Fiorentino G, et al. *Thermus thermophilus* as source of thermozymes for biotechnological applications: homologous expression and biochemical characterization of an α-galactosidase[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 28.

[158] Vavitsas K, Glekas PD, Hatzinikolaou DG. Synthetic biology of thermophiles: taking bioengineering to the extremes ? [J]. Applied Microbiology, 2022, 2(1): 165-174.

[159] Li J, Sun L, Huo YX. High-temperature catalytic platform powered by thermophilic microorganisms and thermozymes[J]. Synthetic Biology and Engineering, 2025, 3(1): 10001.

[160] Moon S, Ham S, Jeong J, et al. Temperature Matters: Bacterial Response to Temperature Change[J]. Journal of Microbiology, 2023, 61(3): 343-357.

[161] Choi J, Ahn J, Bae J, et al. 2022. Recent Synthetic Biology Approaches for Temperature- and Light-Controlled Gene Expression in Bacterial Hosts [J], Molecules, 2022, 27: 6798.



通讯作者： 李英俊（1987—），男，教授，博士，博士生导师。研究方向为嗜热微生物遗传与生物合成、益生菌工程与应用等。

E-mail：yingjun@mail. hzau. edu. cn



第一作者： 卜旭莹（1996—），女，博士。研究方向为极端微生物遗传与合成生物学。

E-mail：buxuyingyj@163. com

作者贡献声明：

李英俊、卜旭莹：提出概念、基本框架；卜旭莹、郭玉汶：文献调研与整理卜旭莹：承担绘制图表卜旭莹、郭玉汶、李英俊：起草论文、修订论文、审核论文卜旭莹、李英俊：参与论文修订、论文最终版本修订

所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突：

没有利益冲突