

重构甲醇利用途径促进毕赤酵母甲醇和 CO₂ 的共利用

王家孟^{1,2,3}, 张贝宁^{1,2,3}, 李远^{1,2,3}, 白仲虎^{1,2,3,4*}, 杨艳坤^{1,2,3*}

- 1 江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡
- 2 江南大学, 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡
- 3 江南大学, 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡
- 4 郑州工程技术学院, 河南 郑州

王家孟, 张贝宁, 李远, 白仲虎, 杨艳坤. 重构甲醇利用途径促进毕赤酵母甲醇和 CO₂ 的共利用[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2148-2158.

WANG Jiameng, ZHANG Beining, LI Yuan, BAI Zhonghu, YANG Yankun. Reconstruction of methanol utilization pathway enhances co-utilization of methanol and CO₂ in *Komagataella phaffii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(5): 2148-2158.

摘要: 【目的】工程化构建还原性甘氨酸途径(reductive glycine pathway, rGlyP)是实现甲醇与 CO₂ 协同利用的有效策略, 但该途径的高效运转受限于胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)供给不足。毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)内源醇氧化酶(alcohol oxidase, AOX)途径氧化甲醇产生过氧化氢而非 NADH, 导致能量浪费并引发氧化胁迫。为解决这一瓶颈, 本研究通过重构甲醇氧化途径并结合区室化策略, 优化碳通量与能量代谢。【方法】以生长曲线和甲醇利用速率为指标, 在敲除内源 *aox1* 和 *aox2* 的底盘菌株中对 5 种不同来源的 NAD⁺ 依赖型甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, MDH)进行筛选, 以确定最佳 MDH, 并对其甲醇诱导浓度进行优化。进一步采用区室化策略, 利用 1 型过氧化物酶体靶向信号(peroxisomal targeting signal 1, PTS1)信号肽将 MDHN1T 靶向定位至过氧化物酶体, 实现了甲醇氧化与甲醛解毒的空间偶联。【结果】筛选确定源自杀虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)的 MDHN1T 具有最佳催化性能, 并优化出其最适甲醇诱导浓度为 0.6%。重组菌株在甲醇/CO₂ 共利用条件下, 甲醇消耗速率提升至 28.98 mg/d, 胞内 NAD⁺ 和 NADH 总量提升至原来的 1.3 倍, NADH/NAD⁺ 提升至原来的 1.2 倍, 生物量达到出发菌株的 2.2 倍。【结论】本研究成功缓解了 rGlyP 的还原力匮乏问题, 促进了毕赤酵母对甲醇和 CO₂ 的共利用, 为构建高效利用一碳资源的微生物细胞工厂提供了优质的底盘细胞及理论依据。

关键词: 毕赤酵母; 甲醇脱氢酶; 还原性甘氨酸途径; 区室化策略; CO₂ 固定; 一碳资源利用

资助项目: 国家自然科学基金(32370054)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32370054).

*Corresponding authors. E-mail: BAI Zhonghu, baizhonghu@jiangnan.edu.cn; YANG Yankun, yangyankun@jiangnan.edu.cn

Received: 2025-12-11; Accepted: 2026-01-15; Published online: 2026-01-21

Reconstruction of methanol utilization pathway enhances co-utilization of methanol and CO₂ in *Komagataella phaffii*

WANG Jiameng^{1,2,3}, ZHANG Beining^{1,2,3}, LI Yuan^{1,2,3}, BAI Zhonghu^{1,2,3,4*}, YANG Yankun^{1,2,3*}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

3 Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Bioactive Product Processing, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

4 Zhengzhou University of Technology, Zhengzhou, Henan, China

Abstract: [Objective] The engineering of the reductive glycine pathway (rGlyP) in *Komagataella phaffii* (syn. *Pichia pastoris*) represents a promising strategy for the co-utilization of methanol and CO₂. However, the efficiency of this pathway is constrained by the insufficient supply of intracellular reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), as the native alcohol oxidase (AOX) pathway generates hydrogen peroxide rather than NADH, leading to energy loss and oxidative stress. To overcome this bottleneck, this study reconstructed the methanol oxidation pathway and employed a subcellular compartmentalization strategy to optimize the carbon flux and energy metabolism. **[Methods]** Five different sources of NAD⁺-dependent methanol dehydrogenase (MDH) were screened in an *aox1/aox2*-deficient strain by using the growth curve and methanol utilization rate as indicators to determine the optimal MDH, and the methanol induction concentration was optimized. Subsequently, a compartmentalization strategy was employed by fusing the peroxisomal targeting signal 1 (PTS1) to MDHN1T, which targeted the enzyme to the peroxisome to spatially couple methanol oxidation with formaldehyde detoxification. **[Results]** The MDHN1T derived from *Cupriavidus necator* had the best catalytic performance, and the optimum methanol induction concentration was optimized to be 0.6%. Under co-utilization conditions, the engineered strain achieved a methanol consumption rate of 28.98 mg/d, with the total intracellular NAD_{total} pool, NADH/NAD⁺ ratio, and biomass being 1.3, 1.2, and 2.2 folds, respectively, of those in the parental strain. **[Conclusion]** This study successfully alleviates the redox cofactor imbalance in the rGlyP and enhances co-utilization of methanol and CO₂ in *K. phaffii*, providing a robust chassis and a theoretical basis for the development of microbial cell factories utilizing one-carbon resources.

Keywords: *Komagataella phaffii*; methanol dehydrogenase (MDH); reductive glycine pathway (rGlyP); compartmentalization strategy; CO₂ fixation; one-carbon resource utilization

甲醇和 CO₂ 是廉价且来源丰富的可再生一碳资源, 在生物制造领域展现出替代化石燃料的巨大潜力。二氧化碳和甲醇的生物固定与利

用对实现碳中和目标具有重要意义。构建高效的微生物细胞工厂, 可在温和条件下将一碳资源转化为化学品、生物燃料、可降解材料等高

价值产物^[1]，这对实现全球碳中和目标具有重要的战略意义，已成为研究热点^[2-4]。

人工设计的还原性甘氨酸途径(reductive glycine pathway, rGlyP)能够有效固碳，已在多种微生物中用于将 CO₂ 转化为生物量和化学品^[5-7]。毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)具有完备且较为高效的甲醇利用途径(methanol utilization pathway, MUTP)，通过工程化改造 rGlyP，实现了对甲醇和 CO₂ 的共利用^[8]。rGlyP 的高效运转高度依赖充足的还原力供给，而毕赤酵母本身的甲醇代谢主要依赖于醇氧化酶(alcohol oxidase, AOX)系统，该系统氧化甲醇生成甲醛并伴随过氧化氢的积累，这一过程不仅不产生还原力，反而因抗氧化需求消耗额外的还原力^[9]。因此，改造现有的甲醇利用途径，解决还原力供需失衡问题，并偶联 rGlyP，是提高甲醇和 CO₂ 协同利用效率的关键科学问题。

甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, MDH)存在于自然界的一类天然甲醇营养菌中，能催化甲醇生成甲醛。根据电子受体的不同，甲基营养菌中的 MDH 可分为 3 类：吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)依赖型 MDH、氧依赖型醇氧化酶以及烟酰胺腺嘌呤双核苷酸 NAD⁺依赖型 MDH。其中，NAD⁺依赖型 MDH 氧化甲醇生成甲醛，消耗 NAD⁺并生成还原力 NADH^[10-11]。MDH 在氧化甲醇的同时能为 rGlyP 提供更多的还原力，是重构 MUTP 的理想分子。

K. phaffii A05 是前期构建的含重组 rGlyP 的重组菌株，可协同利用甲醇和 CO₂，但其生长受限于还原力供给^[8]。本研究将 5 种不同生物来源的 NAD⁺依赖型 MDH 引入毕赤酵母，通过敲除内源 *aox1* 和 *aox2* 基因以消除背景干扰，筛选获得最优 MDH。在此基础上，采用区室化策略，将最优 MDH 定位于过氧化物酶体，重构了甲醇利用途径。将其与 rGlyP 耦合，探究胞内 NADH 水平及甲醇利用效率的改变，以期为微生物发酵工业中一碳资源的综合利用提供依据和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

K. phaffii GS115 购自 ThermoFisher Scientific 公司。*K. phaffii* A05 为本课题组 Li 等^[8]构建，其表型为甘氨酸缺陷型且强化了 rGlyP，可在常压大气环境下协同固定甲醇和 CO₂。本研究使用的质粒模板有 pBB1、pAI05、pA0R、pGAPZB 等 4 种，均由本实验室构建并保存。

本研究所用的质粒如表 1 所示。本研究所用菌株如表 2 所示。

1.1.2 培养基

LLB (low-salt Luria-Bertani)培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 5.0。

LB (Luria-Bertani)培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。

YPD (yeast extract peptone dextrose)培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 胰蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0。

MDG (minimal dextrose glycine)培养基(g/L): 无氨基酵母氮源 YNB 13.40, 葡萄糖 20.00, 甘氨酸 1.13。

表1 本研究所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Source
pBB1 MDH2 IV 9	Cam ^R	This study
pBB1 MDH3 IV 9	Cam ^R	This study
pBB1 MDHBS IV 9	Cam ^R	This study
pA0R MDHLXT II 7	Amp ^R	This study
pA0R MDHN1T II 7	Amp ^R	This study
pA0R ACT1 II 7	Amp ^R	This study
pGAPZB MDHN1T	Zeocin ⁺	This study
pGAPZB MDHN1T(p)	Zeocin ⁺	This study
pAI05-sg PNS IV 9	Zeocin ⁺	Lab stock
pAI05-sg PNS II 7	Zeocin ⁺	Lab stock
pAI05-sg <i>aox1</i>	Zeocin ⁺	This study
pAI05-sg <i>aox2</i>	Zeocin ⁺	This study

表2 本研究所用的菌株

Table 2 Strains used in this study

Strains	Characteristics	Source
<i>K. phaffii</i> GS115	PNS I 6::Ppa. Rad52	Lab stock
1Δ-GS115	<i>K. phaffii</i> GS115, <i>aox1</i> Δ	This study
2Δ-GS115	<i>K. phaffii</i> GS115, <i>aox1</i> Δ <i>aox2</i> Δ	This study
2Δ-MDH2	<i>K. phaffii</i> GS115, <i>aox1</i> Δ <i>aox2</i> Δ, P _{AOXI} -MDH2, P _{AOXI} -ACT1	This study
2Δ-MDH3	<i>K. phaffii</i> GS115, <i>aox1</i> Δ <i>aox2</i> Δ, P _{AOXI} -MDH3, P _{AOXI} -ACT1	This study
2Δ-MDHBS	<i>K. phaffii</i> GS115, <i>aox1</i> Δ <i>aox2</i> Δ, P _{AOXI} -MDHBS, P _{AOXI} -ACT1	This study
2Δ-MDHLXT	<i>K. phaffii</i> GS115, <i>aox1</i> Δ <i>aox2</i> Δ, P _{AOXI} -MDHLXT	This study
2Δ-MDHN1T	<i>K. phaffii</i> GS115, <i>aox1</i> Δ <i>aox2</i> Δ, P _{AOXI} -MDHN1T	This study
A05	<i>K. phaffii</i> GS115- <i>Shm1</i> Δ <i>Shm2</i> Δ <i>Gly1</i> Δ <i>Agt</i> Δ, P _{GAP} -MIS1-1	Lab stock
A05-MDHN1T(p)	A05, P _{AOXI} -MDHN1T (PTS1)	This study

若要配制固体培养基则需再加入 20.0 g/L 的琼脂。添加抗生素时氯霉素、氨基青霉素工作浓度为 100.0 μg/mL, 博来霉素工作浓度为 25.0 μg/mL。

BMMH (buffered minimal methanol histidine) 培养基(g/L): 磷酸钾缓冲液(pH 6.0) 0.100 mol/L, 无氨基酵母氮源 YNB 13.400, 甲醇 0.1%–2.0% (体积分数), 组氨酸 0.004。

MMF (buffered minimal methanol formic acid)培养基(g/L): 无氨基酵母氮源 YNB 13.40, 甲醇 0.6%, 甲酸 1.84。

1.2 基因的合成以及质粒的构建

外源甲醇脱氢酶基因经密码子优化后, 均由江苏赛索飞生物科技有限公司合成。根据来源, 分别命名为 MDH2 和 MDH3 [甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)^[12-15]], MDHLXT [解木糖赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus xylanilyticus*)^[16]], MDHN1T [杀虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)^[17-20]] 以及 MDHBS [嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)^[21-23]]。

使用 PCR 扩增 MDH 基因片段以及 GS115 基因组 II 7 同源臂、IV 9 同源臂、P_{AOX} 启动子、AOXtt 终止子片段, 以原始质粒为模板得到线性质粒骨架片段, 再利用 Gibson 组装法连接质粒骨架和片段。

1.3 酵母工程菌株的构建

首先利用 CRISPR-Cas9 基因敲入/敲除系统敲除酵母中原有的 *aox1*, 获得 1Δ-GS115。在此基础上再将 *aox2* 敲除, 得到 2Δ-GS115 底盘细胞。

使用相应引物(表 3)和质粒 DNA 模板进行 PCR 扩增, 得到相应质粒上带有同源臂的 MDH 表达盒、ACT1 表达盒片段, 利用实验室现有的 CRISPR-Cas9 基因敲入/敲除系统敲入底盘菌株中。对于无需 ACT1 的 2 种 MDH (MDHLXT、

表3 PCR所用引物

Table 3 Primers for PCR

Primer names	Primer sequences (5'→3')
MDH2-F	CATATGAAGAACCCTGTCTGCA
MDH2-R	TTAATGGTGATGATGATGATGCATCG
MDH3-F	ATGACCAACACTCAATCTGCTTTC
MDH3-R	TTAATGATGATGATGATGATGCATAGCG
MDHBs-F	CATATGAAGCCGCGAGTGGT
MDHBs-R	TTAATGGTGATGGTGATGATGATCTTCTT
MDHLXT-F	CATATGAGCGATGTTCTGAAACAGTT
MDHLXT-R	TTAATGGTGATGATGATGATGACTCAGG
MDHN1T-F	CATATGACCCATCTGAATATCGCAAAT
MDHN1T-R	TTAATGGTGATGATGATGATGCATGG
ACT1-F	CATATGGGTAAACTGTTCTGAAGAAAAGAC
ACT1-R	TTAATGATGGTGGTGATGGTGCA

MDHN1T), 直接插入至中性位点II 7; 剩下 3 种 MDH 表达盒插入至IV 9 位点, 同时将 ACT1 表达盒插入菌株II 7 位点^[24]。

质粒 DNA 模板: 统一采用质粒 DNA 小提试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行提取, 提取方法见试剂盒说明书。

PCR 反应体系(50 μ L): PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (TaKaRa 公司) 25 μ L, 质粒 DNA 模板 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2.5 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 3 min。

过氧化物酶体区室化: 将过氧化物酶体信号肽 PTS1 添加至 MDH 的 C 端。对于需要 ACT1 激活的 MDH, 在对 MDH 定位的同时也使用 PTS1 对 ACT1 进行定位。

1.4 菌株生长曲线的测定

先将菌株接种至 5 mL YPD 或 MDG 液体培养基中, 培养 1–2 d, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 5 mL 无菌水吹吸洗涤 2 遍。接种至 BMMH 培养基或 MMF 培养基, 初始 OD_{600} 为 0.2、0.4 或 0.5, 进行发酵培养。每隔 1 d 或 2 d 进行取样, 使用酶标仪对菌株的 OD_{600} 值进行测定, 每个实验生物学重复 3 次。

1.5 菌株甲醇利用率和还原力的测定

使用高效液相色谱检测甲醇含量。对收集的菌液在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 用 0.22 μ m 滤膜过滤处理。HPLC 中色谱柱规格: Aminex HPX-87H 色谱柱(9 μ m, 1 300 mm \times 7.8 mm, Bio-Rad 公司), 流动相: 5 mmol/L H₂SO₄, 流速设置为 0.6 mL/min, 柱温设置为 50 $^{\circ}$ C, 运行 22 min。配制不同浓度梯度的甲醇溶液, 根据峰面积与浓度的对应关系绘制标准曲线。

采用高通量破碎仪对细胞进行破碎, 再使用 NAD⁺/NADH 检测试剂盒(WST-8 法)(上海碧云天生物技术股份有限公司)对菌株 NAD 总量

和 NADH/NAD⁺进行测定, 每个实验进行 3 次平行重复, 采用 *t* 检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 构建缺陷型酵母菌株并筛选最优 MDH

毕赤酵母中存在 AOX 系统, 该系统能将甲醇转化为甲醛, AOX 系统包括 AOX1 和 AOX2 两种酶。研究表明, 在同一菌株中不同来源的 MDH 表达效果并不相同^[10]。为筛选出效果最佳的 MDH, 本研究采用 CRSPR-Cas9 技术敲除毕赤酵母中的 *aox1* 和 *aox2*, 构建双缺陷型底盘细胞 2 Δ -GS115, 并将不同 MDH 分别转入 2 Δ -GS115, 以便更好地观察 MDH 的作用。同时本研究构建了 AOX1 单缺陷型菌株, 用于对比。

首先测定了甲醇浓度为 1.2% 和 1.6% 时的生长曲线。结果显示, 只有 2 Δ -MDHN1T 菌株的生长显著高于其余菌株, 在 1.2% 甲醇培养基中, 其 OD_{600} 值最高达到 1.3, 而对照菌株的 OD_{600} 值最高仅为 0.6 (图 1A), MDHN1T 显现出的优势最强, 能够部分回补 AOX 缺失导致的生长缺陷。

缺陷型菌株在 1.2% 和 1.6% 甲醇浓度下的生物量显著低于 GS115 野生型菌株, 这证实了 AOX 是毕赤酵母主要的甲醇氧化酶。通过与野生型、AOX1 单缺陷和双缺陷型菌株对比发现, MDH 能在毕赤酵母中催化甲醇脱氢氧化, 但其活性弱于 AOX (图 1)。

如图 1 所示, 2 Δ -MDHN1T 菌株在甲醇浓度为 1.2% 时的生长曲线普遍高于 1.6%, 推测可能存在一个最适甲醇浓度, 能使 2 Δ -MDHN1T 菌株的生长达到最优。

2.2 培养重组菌株的最适甲醇浓度

鉴于 MDHN1T 菌株在较低甲醇浓度下生长更优, 进一步对甲醇诱导浓度进行了优化。选取 0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7% 这 5 个浓度进行梯度测定, 最终确定了 0.6% 为最佳甲醇浓

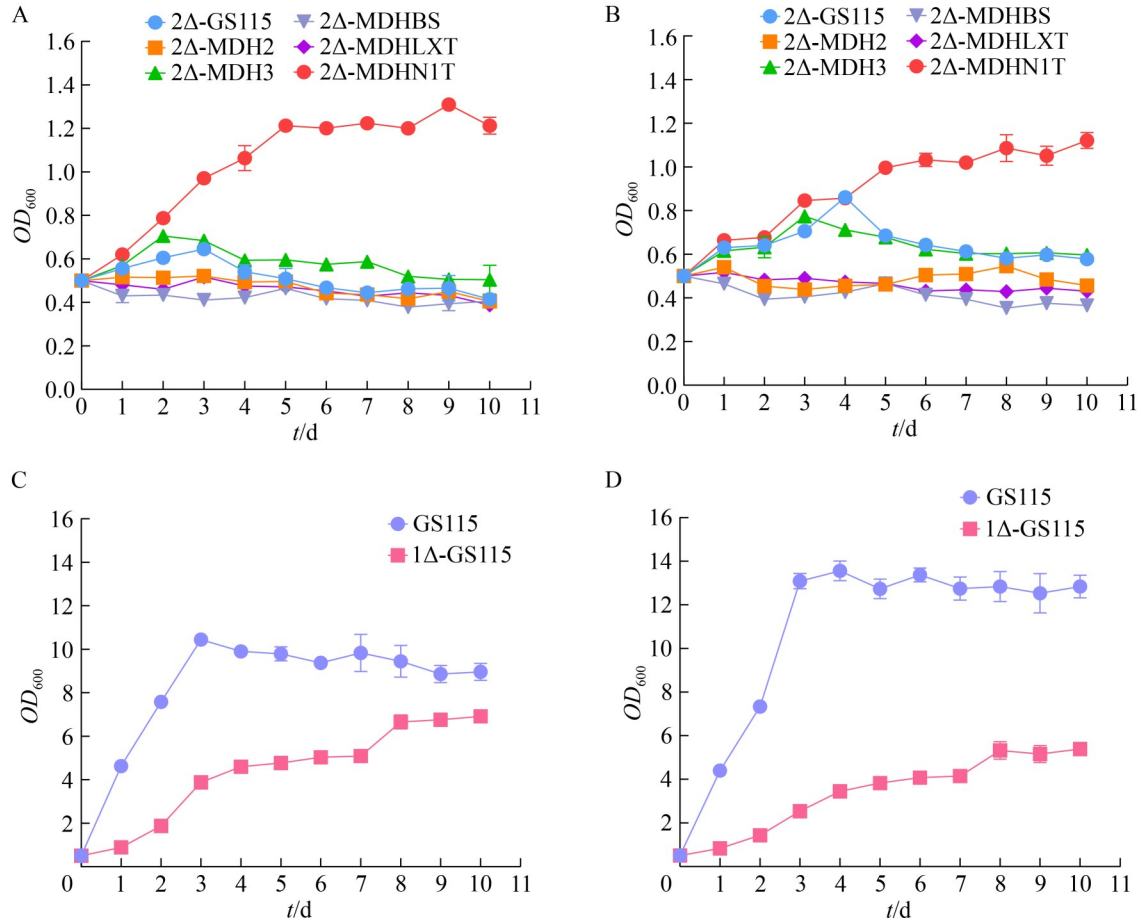


图1 不同菌株在不同甲醇浓度下的生长曲线

Figure 1 Growth curves of different strains at varying methanol concentrations. A, C: 1.2% methanol concentration; B, D: 1.6% methanol concentration.

度。在 0.6% 甲醇浓度下, 菌株 OD_{600} 值最高达到 2.3 (图 2D)。

2.3 最适甲醇浓度下重组菌株的生长曲线和甲醇利用率

在优化的 0.6% 甲醇浓度下, 评估了各重组菌株的生长及底物消耗情况。除 2 Δ -MDHN1T 菌株外, 其余菌株均无法有效利用甲醇生长。

第 8 天时, 2 Δ -MDHN1T 菌株呈现最高的 OD_{600} 值, 其数值为 2.5 (图 3A)。与对照 2 Δ -GS115 菌株相比, 2 Δ -MDHN1T 菌株的甲醇消耗速率约为 4.09 mg/d (图 3B), 显著高于仅靠扩散挥发或微量代谢消耗的对照组。该结果进一步确立了

MDHN1T 作为毕赤酵母甲醇代谢重构的首选 MDH。

2.4 重构 MUTP 偶联 rGlyP 促进甲醇和 CO_2 协同利用

四氢叶酸连接酶(formate-THF ligase, Mis1-1) 具有 3 种功能, 可催化甲酸与四氢叶酸(THF)结合生成甲酰-四氢叶酸(10-formyl THF), 还具有亚甲基四氢叶酸环化水解酶活性和亚甲基四氢叶酸脱氢酶活性。A05 中过表达 Mis1-1 增强了 rGlyP 中的四氢叶酸再生系统的运行, 导致细胞中还还原力的不足。毕赤酵母 A05 中的醇氧化酶 AOX 系统发挥作用时产物之一为 H_2O_2 , H_2O_2

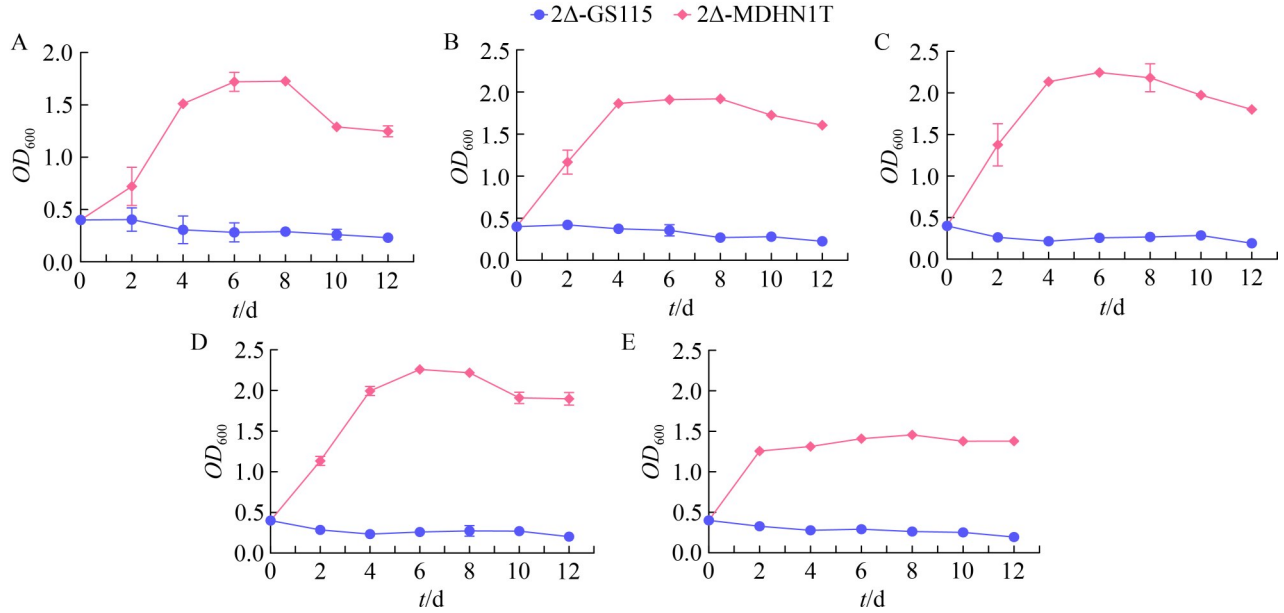


图2 2Δ-GS115和2Δ-MDHN1T在不同甲醇浓度梯度的生长曲线

Figure 2 Growth curves of 2Δ-GS115 and 2Δ-MDHN1T under different methanol concentration gradients. A: 0.3%; B: 0.4%; C: 0.5%; D: 0.6%; E: 0.7%.

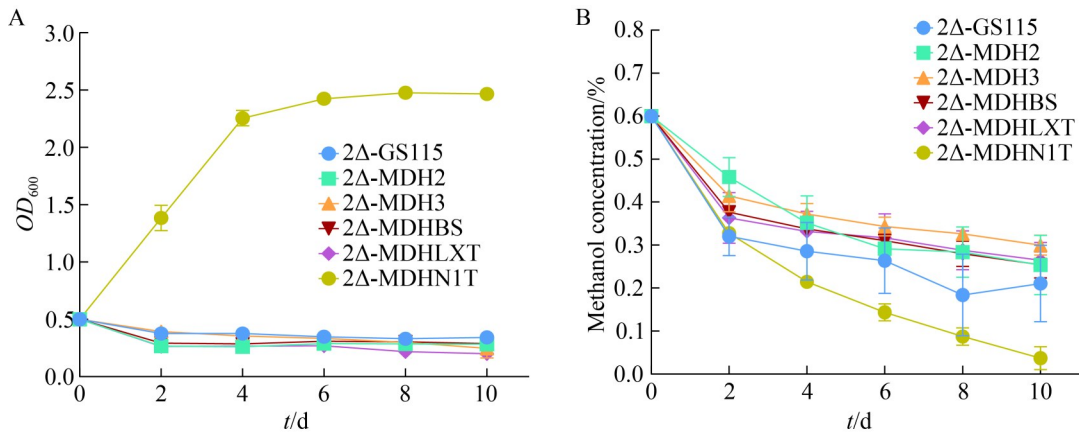


图3 0.6%甲醇浓度下表达MDH的2Δ-GS115菌株的生长曲线和甲醇消耗

Figure 3 Growth curves and methanol consumption of 2Δ-GS115 strain expressing MDH at 0.6% methanol concentration. A: Growth curves; B: Methanol consumption.

的氧化同样需要还原力。同时，甲醇氧化为甲醛，甲醛是一种细胞毒性物质，对细胞有毒害作用。

为解决 rGlyP 面临的还原力瓶颈及甲醛毒性问题，将筛选出的最佳 MDH 即 MDHN1T 引入 Li 等^[8]构建的毕赤酵母 A05 中。采用区室化策

略，将 MDHN1T 定位于过氧化物酶体，从而重构甲醇利用途径，获得重组菌株 A05-MDHN1T(p)。代谢设计原理如图 4 所示，MDHN1T 在过氧化物酶体内将甲醇氧化为甲醛，同时将 NAD^+ 转化为 NADH 。这一设计具有双重优势：(1) 空间隔离，将有毒中间体甲醛限制在过氧化物酶体内，

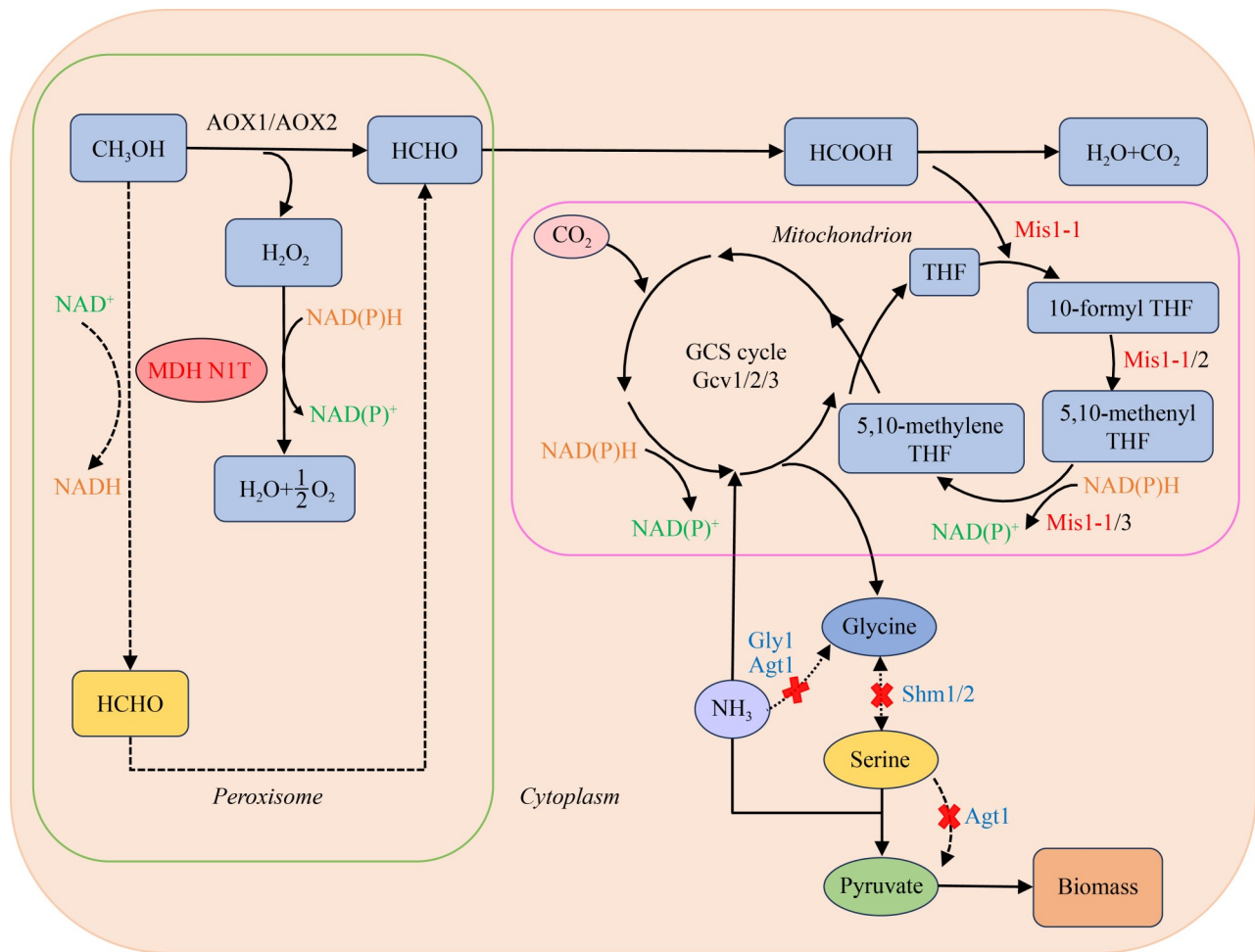


图4 A05菌株 NAD^+/NADH 代谢途径示意图

Figure 4 Diagram of the pathway of NAD^+/NADH metabolism in A05. Red indicates overexpressed enzymes, including: formate-THF ligase (MIS1-1); Blue indicates knocked-out enzymes, including: glyoxylate aminotransferase 1 (Agt1), serine hydroxymethyl transferase 1/2 (Shm1/2), and threonine aldolase 1 (Gly1).

减轻对胞质的毒害；(2) 能量偶联，产生的 NADH 可直接供给 rGlyP 中甲酸还原反应及甘氨酸裂解系统(GCS)循环，并通过异化途径增强 CO_2 固定效率。

使用 MMF 培养基对 A05-MDHN1T(p) 进行发酵，测定菌株的生长曲线。结果显示，经过 10 d 培养，A05 菌株的 OD_{600} 值达到了 2.5，A05-MDHN1T(p) 菌株的 OD_{600} 值达到了 5.5，提升了约 1.2 倍(图 5A)。对于甲醇的消耗情况，A05 菌株和 A05-MDHN1T(p) 菌株的甲醇利用率如图 5B 所示，引入 MDHN1T 后甲醇消耗

速率明显加快，A05 菌株的甲醇消耗速率为 17.88 mg/d，而 A05-MDHN1T(p) 菌株的甲醇消耗速率为 28.98 mg/d，是 A05 菌株的 1.62 倍。

同时对发酵至第 6 天的 A05 菌株和 A05-MDHN1T(p) 菌株进行收集，并测定其 NAD 总量和 NADH/NAD^+ 。2 种菌株的 $\text{NAD}_{\text{total}}$ 分别为 1.64 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.21 $\mu\text{mol/L}$ ，A05-MDHN1T(p) 菌株的 NAD 总含量是出发菌株的 1.3 倍(图 5C)。对于 NADH/NAD^+ 比值，A05-MDHN1T(p) 菌株 (2.08) 是 A05 菌株 (1.75) 的 1.2 倍(图 5D)。这说明 MDH 能够显著改善胞内还原力供给。

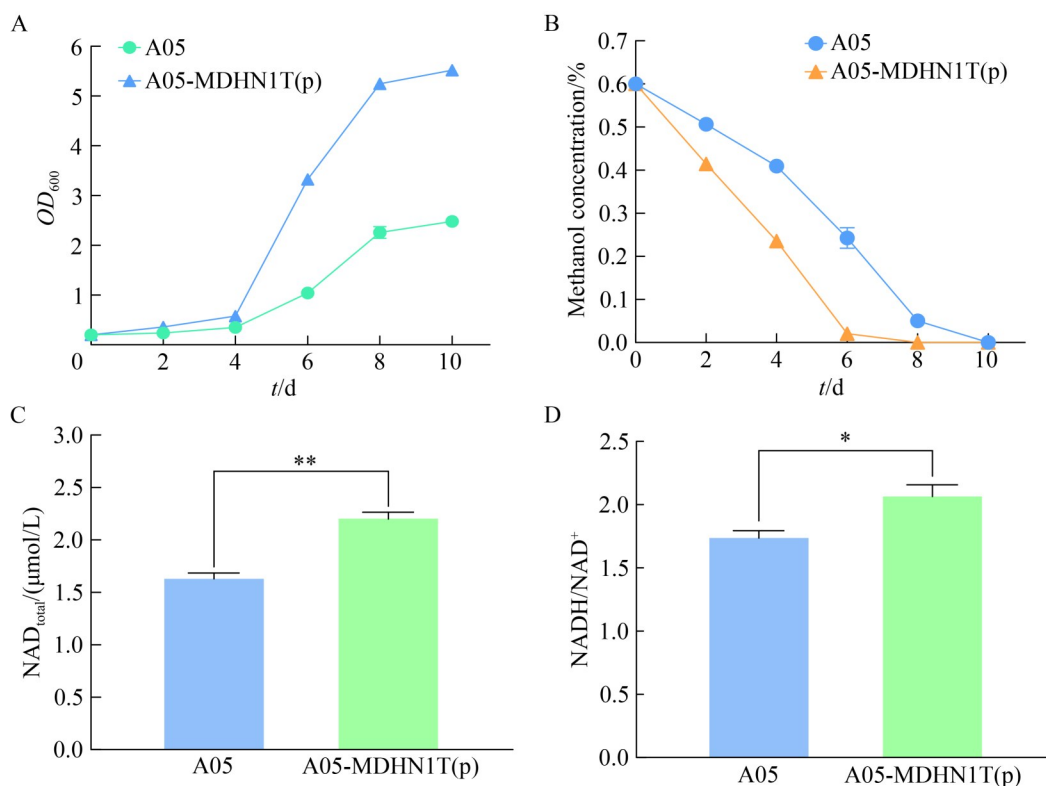


图5 0.6%甲醇浓度下引入MDHN1T对A05菌株的影响

Figure 5 Effect of introducing MDHN1T at a 0.6% methanol concentration on the A05 strain. A: Growth curves; B: Methanol consumption; C: Total NAD; D: NADH/NAD⁺. **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

上述数据表明，通过过氧化物酶体区室化表达 MDHN1T，成功重构了甲醇利用途径，显著改善了胞内还原力供给，偶联 rGlyP，大幅提升了毕赤酵母对甲醇和 CO₂ 的协同利用效率。

3 讨论与结论

一碳化合物的综合利用是发酵工程领域的重要研究方向。本研究将具有高催化效率的甲醇脱氢酶(MDH)与区室化代谢工程策略相结合，成功强化了毕赤酵母菌株 A05 的甲醇代谢能力。改造后的 A05 菌株 NAD 总量提升了 30% (图 5C)，NADH/NAD⁺ 提升了 20% (图 5D)，OD₆₀₀ 值提升了 120% (图 5A)，甲醇利用率提升了 62% (图 5B)，重组菌株繁殖速率加快、发酵效率提升，这标志着在开发能够高效共利用甲醇与 CO₂ 的毕赤酵母细胞工厂方面取得了关键进展，增强了后

续重组菌株作为底盘细胞利用甲醇和 CO₂ 生产单细胞蛋白或高附加值化合物的优势和潜能。

本研究通过区室化策略对甲醇利用途径进行空间重构，能够有效解耦甲醇氧化的能量生成过程与有毒中间体甲醛的代谢过程，从而系统性提升细胞性能^[12]。具体而言，将外源优化的 MDH 酶与内源途径进行区室化整合，解决了 2 个主要问题：甲醇氧化的能量需求与甲醛同化的还原力需求之间的冲突，以及甲醛毒性对细胞活力的抑制^[25]。

MDH 的区室化设计可能优化了胞内的氧化还原平衡。在天然甲醇代谢中，甲醛既作为同化前体，又是异化途径底物，碳流分配存在固有损耗^[25-26]。同时，区室化可能将甲醛限制在特定细胞器(过氧化物酶体)内，减少了其扩散至胞质造成的氧化应激和酶抑制。当胞内 NADH

水平提高后, 依赖还原力的 CO₂ 固定途径(重构的 rGlyP)得以更有效地运行, 进而提升生物量。然而, 胞内甲醛含量的提升可能为异化途径提供更多底物, 实现了甲醇衍生还原力与 CO₂ 固定过程的耦合。同时, 毕赤酵母本身存在的甲醛同化途径可能也因更多的甲醇利用而得到加强, 重组工程菌株生物量得到进一步提升。

细胞生长(*OD*₆₀₀)与甲醇利用率的大幅提升也是上述代谢再平衡的直接体现。减少的碳损失和毒性压力为细胞积累了更多可用于生长的前体和能量。这解释了本工程菌株相较于仅优化单一途径的菌株, 在整体碳转化效率上表现出协同增强效应。

此外, 表达水平的差异也是导致不同外源 MDH 表现差异的关键因素之一。本研究采取了一些措施尽量减少表达水平带来的差异: 不同来源的 MDH 在相同的表达载体基础上构建, 采用相同的重组菌株构建方法、相同的诱导型启动子、相同的诱导表达条件, 且对 MDH 基因进行密码子优化以适应毕赤酵母偏好。在此基础上重组菌株表现出的显著差异主要由 MDH 的活性引起。对于筛选出的较优突变体, 未来可以通过蛋白质工程改造、分子进化等技术, 获得在毕赤酵母中更稳定、更易折叠的 MDH 突变体, 以及共表达分子伴侣帮助蛋白正确折叠等措施使 MDH 在毕赤酵母中得到更好的应用。

Wang 等^[27]在 *Butyribacterium methylotrophicum* 中重构 rGlyP, 成功协同利用甲醇和 CO₂, 本研究在真核宿主毕赤酵母中取得了类似的协同效应, 但途径不同。这证明了能量/还原力供给强化是实现 C1 化合物共利用的一个普适性关键。与在 *Saccharomyces cerevisiae* 中通过区室化构建一碳营养型微生物的开创性工作^[12]相比, 本研究直接在天然甲基营养菌毕赤酵母中进行优化, 起点更高, 获得的性能提升幅度也更为显著。最近的一项前沿工作通过在毕赤酵母中组装由甲醇/甲酸氧化模块和还原甘氨酸途径(rGlyP)组成的人工 MFORG 途径, 成功实现了甲醇与

CO₂ 的共固定^[28], 进一步证明利用毕赤酵母固定 CO₂ 的可行性。本研究在结合 rGlyP 的基础上对毕赤酵母固有甲醇利用途径进行改造和区室化, 使其更适应于 rGlyP。

基于本研究成果, 后续研究可尝试进行生物反应器水平的扩大培养。还原力与生长的提升是 CO₂ 同化增强的间接证据, 后续可以精确量化重组工程菌株对 CO₂ 的利用。未来研究可以集中于利用此底盘生产特定高附加值产物, 验证其工业应用潜力; 进一步通过系统生物学方法(如转录组分析等)解析改造后全局代谢网络的动态变化, 为理性设计提供更深入的见解。

作者贡献声明

王家孟: 实验操作、研究构思设计、数据收集和处理, 论文撰写与修改; 张贝宁: 实验操作和数据收集; 李远: 协助实验操作; 白仲虎: 研究构思、实验指导、论文润色; 杨艳坤: 基金支持、项目管理、提出构想、实验思路设计、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Bachleitner S, Severinsen MM, Lutz G, Mattanovich D. Overexpression of the transcriptional activators Mxr1 and Mit1 enhances lactic acid production on methanol in *Komagataella phaffii*[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 85: 133-144.
- [2] Bernhardsgrütter I, Stoffel GM, Miller TE, Erb TJ. CO₂-converting enzymes for sustainable biotechnology: from mechanisms to application[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 67: 80-87.
- [3] Gleizer S, Ben-Nissan R, Bar-On YM, Antonovsky N, Noor E, Zohar Y, Jona G, Krieger E, Shamshoum M, Bar-Even A, Milo R. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂[J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1255-1263.e12.
- [4] Guo YK, Liao Y, Wang J, Ma C, Qin JL, Feng J, Li Y, Wang X, Chen KQ. Methylotrophy of *Pichia pastoris*: current advances, applications, and future perspectives for methanol-based biomanufacturing[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(5): 1741-1752.
- [5] Yishai O, Bouzon M, Döring V, Bar-Even A. *In vivo* assimilation of one-carbon via a synthetic reductive

- glycine pathway in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(9): 2023-2028.
- [6] Bar-Even A, Noor E, Flamholz A, Milo R. Design and analysis of metabolic pathways supporting formatotrophic growth for electricity-dependent cultivation of microbes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1827(8/9): 1039-1047.
- [7] Cotton CA, Edlich-Muth C, Bar-Even A. Reinforcing carbon fixation: CO₂ reduction replacing and supporting carboxylation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 49: 49-56.
- [8] Li K, Yang SJ, Liu XX, Liu CL, Bai ZH, Yang YK. Low-concentration CO₂ directly captured by glycine-auxotrophic *Komagataella phaffii* through endogenous reductive glycine pathway[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2025, 5(3): 1016-1026.
- [9] Meng J, Liu SF, Gao L, Hong K, Liu SG, Wu X. Economical production of *Pichia pastoris* single cell protein from methanol at industrial pilot scale[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 198.
- [10] 凡立稳, 王钰, 郑平, 孙际宾. 一碳代谢关键酶: 甲醇脱氢酶的研究进展与展望[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 530-540.
Fan LW, Wang Y, Zheng P, Sun JB. Methanol dehydrogenase, a key enzyme of one-carbon metabolism: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(2): 530-540 (in Chinese).
- [11] 杨金星, 王钰. NAD⁺依赖型甲醇脱氢酶的改造和应用[J]. *生物加工过程*, 2024, 22(6): 591-600.
Yang JX, Wang Y. Engineering and application of NAD⁺-dependent methanol dehydrogenase[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2024, 22(6): 591-600 (in Chinese).
- [12] Zhan CJ, Li XW, Lan GX, Baidoo EEK, Yang YK, Liu YZ, Sun Y, Wang SJ, Wang YY, Wang GK, Nielsen J, Keasling JD, Chen Y, Bai ZH. Reprogramming methanol utilization pathways to convert *Saccharomyces cerevisiae* to a synthetic methylotroph[J]. *Nature Catalysis*, 2023, 6(5): 435-450.
- [13] Bozdag A, Komives C, Flickinger MC. Growth of *Bacillus methanolicus* in 2 M methanol at 50 °C: the effect of high methanol concentration on gene regulation of enzymes involved in formaldehyde detoxification by the ribulose monophosphate pathway[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(7): 1027-1038.
- [14] Yi J, Lee J, Sung BH, Kang DK, Lim G, Bae JH, Lee SG, Kim SC, Sohn JH. Development of *Bacillus methanolicus* methanol dehydrogenase with improved formaldehyde reduction activity[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 12483.
- [15] Fan LW, Wang Y, Tuyishime P, Gao N, Li QG, Zheng P, Sun JB, Ma YH. Engineering artificial fusion proteins for enhanced methanol bioconversion[J]. *ChemBioChem*, 2018, 19(23): 2465-2471.
- [16] Le TK, Ju SB, Lee HW, Lee JY, Oh SH, Kwon KK, Sung BH, Lee SG, Yeom SJ. Biosensor-based directed evolution of methanol dehydrogenase from *Lysinibacillus xylanilyticus*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1471.
- [17] Wu TY, Chen CT, Liu JT, Bogorad IW, Damoiseaux R, Liao JC. Characterization and evolution of an activator-independent methanol dehydrogenase from *Cupriavidus necator* N-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(11): 4969-4983.
- [18] Bennett RK, Steinberg LM, Chen W, Papoutsakis ET. Engineering the bioconversion of methane and methanol to fuels and chemicals in native and synthetic methylotrophs[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 81-93.
- [19] Chen FYH, Jung HW, Tsuei CY, Liao JC. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 933-946.e14.
- [20] Keller P, Noor E, Meyer F, Reiter MA, Anastassov S, Kiefer P, Vorholt JA. Methanol-dependent *Escherichia coli* strains with a complete ribulose monophosphate cycle[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5403.
- [21] Sheehan MC, Bailey CJ, Dowds BC, McConnell DJ. A new alcohol dehydrogenase, reactive towards methanol, from *Bacillus stearothersophilus*[J]. *The Biochemical Journal*, 1988, 252(3): 661-666.
- [22] Whitaker WB, Jones JA, Bennett RK, Gonzalez JE, Vernacchio VR, Collins SM, Palmer MA, Schmidt S, Antoniewicz MR, Koffas MA, Papoutsakis ET. Engineering the biological conversion of methanol to specialty chemicals in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 49-59.
- [23] Kim S, Lindner SN, Aslan S, Yishai O, Wenk S, Schann K, Bar-Even A. Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(5): 538-545.
- [24] Cai P, Duan XP, Wu XY, Gao LH, Ye M, Zhou YJ. Recombination machinery engineering facilitates metabolic engineering of the industrial yeast *Pichia pastoris*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(13): 7791-7805.
- [25] Guo F, Qiao YY, Xin FX, Zhang WM, Jiang M. Bioconversion of C1 feedstocks for chemical production using *Pichia pastoris*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(8): 1066-1079.
- [26] Gao L, Meng J, Dai WL, Zhang ZK, Dong HF, Yuan QQ, Zhang WY, Liu SG, Wu X. Deciphering cell wall sensors enabling the construction of robust *P. pastoris* for single-cell protein production[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 178.
- [27] Wang J, Li SJ, Ma CX, Zhang R, Qin JL, Chen KQ, Wang X. Enhancing the co-utilization of methanol and CO₂ into 1-butanol by equipping synergistic reductive glycine pathway in *Butyrivacterium methylotrophicum*[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 419: 132071.
- [28] Guo YK, Zhang R, Wang J, Qin RR, Feng J, Chen KQ, Wang X. Engineering yeasts to co-utilize methanol or formate coupled with CO₂ fixation[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 84: 1-12.