

扭托甲基红杆菌 AM1 代谢工程改造及甲醇基化学品合成研究进展

崔林^{1,2#}, 王晓雨^{1#}, 何洋³, 姚斌¹, 罗会颖^{1*}, 王晓璐^{1*}

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养与饲养国家重点实验室, 北京

2 中国农业科学院饲料研究所, 北京

3 中国农业科学院生物技术研究所, 北京

崔林, 王晓雨, 何洋, 姚斌, 罗会颖, 王晓璐. 扭托甲基红杆菌 AM1 代谢工程改造及甲醇基化学品合成研究进展[J]. 微生物学报, 2026, 66(9): 4520-4544.

CUI Lin, WANG Xiaoyu, HE Yang, YAO Bin, LUO Huiying, WANG Xiaolu. Metabolic engineering of *Methylorubrum extorquens* AM1 and its applications in methanol-based chemical biosynthesis: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(9): 4520-4544.

摘要: 甲醇因产量大、价格低等诸多优势被视为生物制造的理想非粮原料。扭托甲基红杆菌 (*Methylorubrum extorquens*) AM1 凭借其天然的甲醇利用特性而成为该领域重要的模式底盘菌株。本文对基于 *M. extorquens* 细胞工厂的甲醇生物制造研究进展进行了综述。首先, 探讨了 *M. extorquens* AM1 的甲醇代谢途径和适配的合成生物学工具。在此基础上, 总结了近年来针对菌株进行代谢工程改造以实现甲醇转化为重组蛋白、可降解材料、有机酸和萜类化合物等产物的研究成果, 并梳理了提升工程菌株产物合成能力的代谢工程策略。最后, 阐述了 *M. extorquens* AM1 细胞工厂的构建与应用局限并提出了未来研究方向。本综述将为 *M. extorquens* 细胞工厂的开发以及基于甲醇的工业产品生产提供重要参考。

关键词: 扭托甲基红杆菌; 代谢工程; 甲醇; 化学品生产; 生物制造策略

资助项目: 国家自然科学基金(32573271); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2024QC08); 畜禽营养与饲养全国重点实验室自主研究课题(2004DA125184G2613)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32573271), the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (Y2024QC08), and the Self-directed Research Projects of the State Key Laboratory of Animal Nutrition and Feeding (2004DA125184G2613).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: LUO Huiying, luohuiying@caas.cn; WANG Xiaolu, wangxiaolu@caas.cn

Received: 2026-07-09; Accepted: 2026-08-04; Published online: 2026-08-13

Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* AM1 and its applications in methanol-based chemical biosynthesis: a review

CUI Lin^{1,2#}, WANG Xiaoyu^{1#}, HE Yang³, YAO Bin¹, LUO Huiying^{1*}, WANG Xiaolu^{1*}

1 State Key Laboratory of Animal Nutrition and Feeding, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

2 Institute of Feed Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

3 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

Abstract: Methanol is regarded as an ideal non-food feedstock for biomanufacturing due to its abundant supply and low cost. *Methylobacterium extorquens* AM1 has become a prominent model chassis strain in this field, owing to its natural ability to utilize methanol. This review summarizes recent advances in methanol-based biomanufacturing via *M. extorquens* AM1 cell factories. First, the methanol metabolic pathways and compatible synthetic biology tools available for this strain are discussed. Subsequently, we highlight recent achievements in the metabolic engineering of this strain for the production of recombinant proteins, biodegradable materials, organic acids, and terpenoids. Building on these findings, we outline the metabolic engineering strategies that have been employed to enhance the biosynthetic capacity of engineered strains. Finally, we discuss the current limitations in constructing and applying *M. extorquens* AM1 cell factories and propose future research directions. This review will serve as a valuable reference for the development of *M. extorquens* cell factories and for the industrial production of methanol-derived products.

Keywords: *Methylobacterium extorquens*; metabolic engineering; methanol; chemicals production; biomanufacturing strategy

随着全球化学品与能源消费需求的持续攀升, 依赖于化石能源的生产模式正面临资源短缺与碳排放导致气候恶化的双重压力。凭借绿色、高效、可持续等优势, 生物制造成为推动我国未来经济增长的重要新质生产力^[1]。构建微生物细胞工厂并利用可再生原料进行高附加值化学品生产是绿色生物制造的主要方向之一。然而, 传统基于糖基原料的生物制造业正受到“与人争粮”等现实困境。因此, 亟需开发非粮、低成本的替代原料以拓展新型生物转化路径^[2]。其中, 可实现“负碳”生产的一碳原料[甲酸、甲醇、甲烷和二氧化碳(CO₂)等]凭借来源广泛和可再生性, 将在生物制造领域扮演起日益重要的角色^[3]。

在诸多一碳化合物中, 甲醇具有储量大、价格低和传质效率高等诸多优点, 是基于生物制造的化工产品生产的理想原料^[4]。目前, 甲醇的全球年产量超 1 亿 t, 且随着以煤炭、甲烷及二氧化碳为原料的制造工艺不断成熟, 将进一步为其生产开辟新的途径^[5]。此外, 与传统碳源(葡萄糖、木糖和甘油等)相比, 甲醇具有更强的还原性和更高的能量, 是理想的生物发酵底物^[6]。能够天然利用甲醇作为唯一碳源和能量源的甲基营养型微生物, 包括甲醇酵母和甲基营养型细菌, 是建立甲醇生物转化细胞工厂的潜在底盘菌株^[7]。

常见的甲醇酵母和甲基营养型细菌包括毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)和扭托甲基红杆菌

[*Methylobacterium extorquens*, 曾被称为扭托甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)] AM1 等。作为代表性的甲基营养型酵母, 毕赤酵母基于木酮糖单磷酸途径(xylulose monophosphate, XuMP)利用甲醇为唯一碳源进行增殖。毕赤酵母因其公认的安全性(generally recognized as safe, GRAS)、生长速度快及适合高密度发酵等特点, 目前已被广泛用作生产异源重组蛋白、高附加值化学品等的微生物细胞工厂^[8]。当以甲醇作为碳源时, 其代谢通量被限制在 XuMP 途径中而难以进入下游产物生成途径, 从而对产物产量造成了限制。此外, 该菌株还存在基因敲除效率低等缺陷^[9]。作为甲基营养型细菌的模式菌株, *M. extorquens* AM1 是一株好氧型兼性革兰氏阴性 α -变形菌^[10], 具有碳固定效率高、代谢灵活性强、可利用廉价培养基并实现高密度发酵和基因组测序注释数据完备等诸多优势, 但同时也存在生长周期长等缺陷^[11]。*M. extorquens* 中进行甲醇代谢的丝氨酸循环和乙基丙二酰辅酶 A 途径(ethylmalonyl-CoA pathway, EMCP)能

够形成丰富的辅酶 A 活化中间体, 为化学品的生产提供了充足的前体物^[12]。随着遗传操作工具被相继开发, *M. extorquens* AM1 已成为以甲醇为原料的生物制造研究的代表性底盘菌株^[13]。尤其具有应用价值的是, 在培养胁迫条件下 *M. extorquens* 会在胞内合成聚合物聚 3-羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)颗粒作为储存还原力和碳源的物质, 该物质可用于生产生物塑料。目前, 基于 *M. extorquens* AM1 以甲醇为原料的生物制造已被广泛用于合成多种高附加值化合物, 如重组蛋白、有机酸以及生物可降解聚合物等(图 1)^[5]。

本文首先总结了 *M. extorquens* AM1 的甲醇代谢途径及合成生物学工具开发的研究进展。在此基础上, 重点介绍了将其改造为细胞工厂, 以甲醇为原料生产化学品的最新研究成果。同时, 分析了提升菌株产物合成能力的策略。最后, 总结并展望了 *M. extorquens* AM1 作为下一代工业菌株用于生物制造所面临的挑战与未来研究方向。

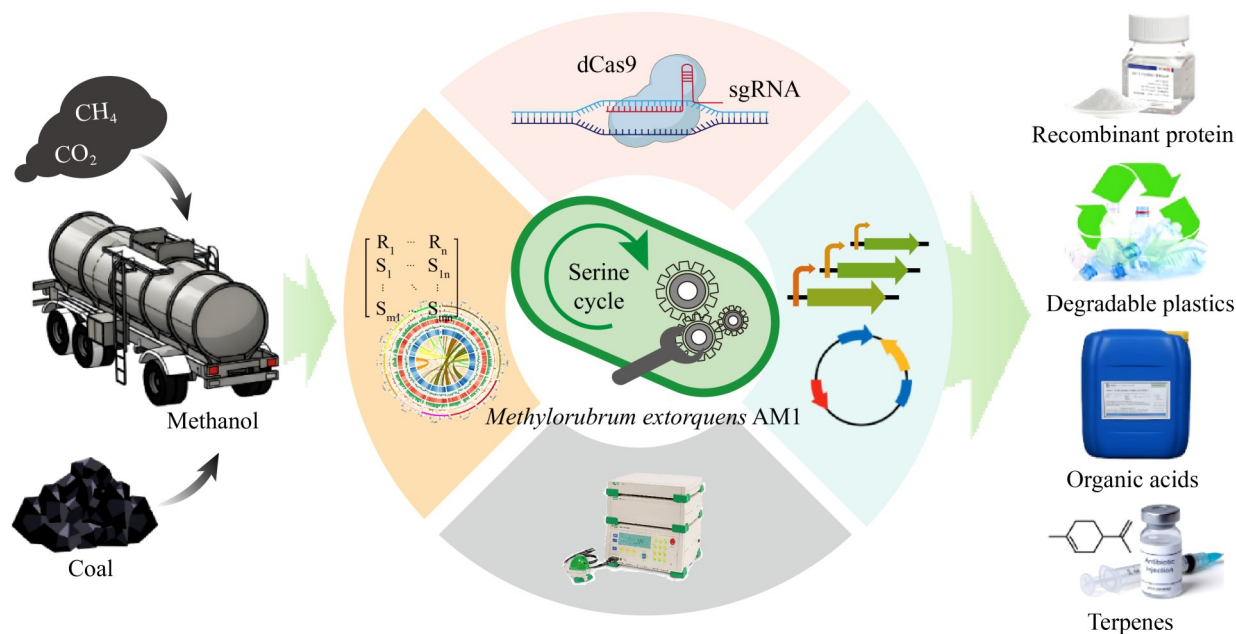


图1 利用*Methylobacterium extorquens* AM1合成化学品

Figure 1 Chemicals produced using *Methylobacterium extorquens* AM1.

1 *Methylobacterium extorquens* AM1 的甲醇代谢途径

M. extorquens AM1 的甲醇代谢包括甲醇氧化、甲醛同化和异化等过程, 有超过 100 个基因参与其中(图 2)^[14]。

1.1 甲醇氧化

M. extorquens AM1 中, 甲醇代谢的第一步是被氧化生成甲醛。这一反应是由位于周质空间内不需消耗还原力的吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)依赖型甲醇脱氢酶催化的^[15]。在这过程中, 甲醇脱氢酶中的 PQQ 吸收电子后传递给特异性的细胞色素 c_L , 而后再经 I 型细胞色素 c_H 传递至细胞色素 c 氧化酶, 最终传递给氧气^[16]。目前, *M. extorquens* AM1 已被鉴定出的甲醇脱氢酶有 2 种, 分别为 Ca^{2+} 依赖的 MxaF 型甲醇脱氢酶和 La^{3+} 依赖的 XoxF 型甲醇脱氢酶(图 2)^[17]。*M. extorquens* 中的 XoxF1 兼具甲醇和甲醛氧化活性, 在特定条件下可替代 MxaF 发挥功能。此外, XoxF1 及其旁系同源蛋白 XoxF2 还被认为参与了甲醇代谢相关基因的调控^[12]。Good 等^[18]研究表明, 当菌株以甲醇为碳源, 且培养基中外加 La^{3+} 时 PQQ-依赖型的乙醇脱氢酶(ExaF)也具有甲醇氧化活性。

甲醇被氧化成甲醛后有 2 种途径参与后续代谢: (1)经异化途径氧化生成 CO_2 ; (2)通过同化途径转变为细胞组分。

1.2 甲醛异化

甲基营养菌中的甲醛异化途径既是细胞免受甲醛毒害作用的自我保护机制, 也是 NAD(P)H 和 ATP 的重要来源。在 *M. extorquens* AM1 中, 甲醛经四氢叶酸(tetrahydrofolate, H_4F)依赖型和四氢甲基蝶呤(tetrahydromethanopterin, H_4MPT)依赖型途径发生进一步氧化。其中, 由于甲醛活化酶(formaldehyde-activating enzyme, Fae)的存在且亚甲基- H_4MPT 脱氢酶(methylene- H_4MPT dehydrogenase, Mtd)催化的反应为基本不可逆的

放能反应, 因此胞内大部分甲醛会被引导进入 H_4MPT 依赖型的途径进行转化(图 2)^[19]。首先, 甲醛与缺少末端 α -羟基戊二酰磷酸基团的去磷酸化 H_4MPT (dH_4MPT)自发缩合生成亚甲基- dH_4MPT ; 同时, 该反应也可由 Fae 催化发生; 亚甲基- dH_4MPT 随后在 MtdA ($NADP^+$ 依赖)和 MtdB [$NAD(P)^+$ 依赖]作用下被氧化为次甲基- dH_4MPT ; 其中, MtdB 是主要的催化酶, 而 MtdA 则可能主要作为 H_4F 依赖型酶发挥功能; 因此, 该过程主要生成 NADH, 而后其可直接进入呼吸链用于有氧能量代谢; 随后, 次甲基- dH_4MPT 在次甲基- dH_4MPT 环水解酶(methenyl- dH_4MPT cyclohydrolase, Mch)的催化下生成甲酰基- dH_4MPT ; 接着, 其通过甲酰基转移酶/水解酶复合体(formyltransferase/hydrolase complex, FhcABCD)催化依次生成甲酰基-甲烷咪喃和甲酸^[12]。最后, 甲酸在甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, Fdh)的催化下生成 CO_2 。*M. extorquens* AM1 中存在 4 种非同源的甲酸脱氢酶(Fdh1-Fdh4)。甲醛氧化每生成 1 分子 CO_2 的同时会生成 2 分子 NADH (图 2)^[20]。

1.3 甲醛同化

甲醛需经同化途径进入中心代谢以供给细胞生长所需前体和能量。在 *M. extorquens* AM1 中, 甲醛的同化依赖于 H_4F 和 H_4MPT 所分别介导的直接和间接途径。

甲醛能够在直接途径中通过非酶促反应和 H_4F 生成亚甲基- H_4F , 而后进入丝氨酸循环。然而, 间接途径是亚甲基- H_4F 生成的主要途径。在该途径中, 甲醛经 H_4MPT 依赖途径生成甲酸后, 在甲酸四氢叶酸连接酶(formyl- H_4F ligase, FtfL)催化下与 H_4F 发生缩合反应生成甲酰基- H_4F , 其在亚甲基- H_4F 环化水解酶(methenyl- H_4F cyclohydrolase, Fch)的催化下转化为次甲基- H_4F , 再经 MtdA 催化生成亚甲基- H_4F ; 在大多数已知细菌中, 这 2 步反应通常是由 *fold* 基因编码的双功能酶完成的; 随后, 亚甲基- H_4F 进入丝氨酸循环; 其中, MtdA 和 Fch 与丝氨酸

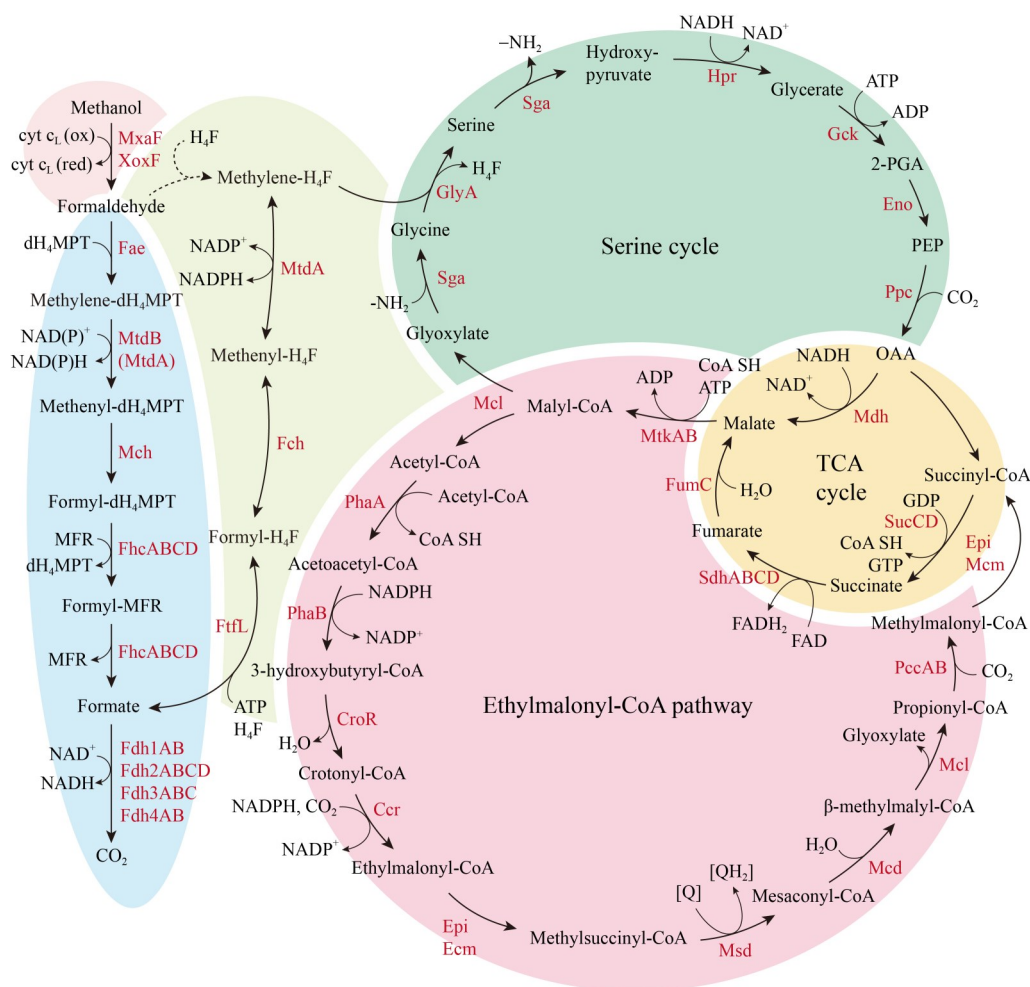


图2 *Methylobacterium extorquens* AM1的甲醇代谢途径

Figure 2 Methanol metabolic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1. MxaF: Methanol dehydrogenase; XoxF: Methanol dehydrogenase; Fae: Formaldehyde-activating enzyme; MtdA: Methylene-H₄MPT dehydrogenase; MtdB: Methylene-H₄MPT dehydrogenase; Mch: Methenyl-dH₄MPT cyclohydrolase; FhcABCD: Formyltransferase/hydrolase complex; Fdh: Formate dehydrogenase; Fch: Methenyl-H₄F cyclohydrolase; FtfL: Formyl-H₄F ligase; Sga: Serine: glyoxylate aminotransferase; GlyA: Serine hydroxymethyltransferase; Hpr: Hydroxypyruvate reductase; Gck: Glycerate kinase; Eno: Enolase; Ppc: Phosphoenolpyruvate carboxylase; Mdh: Methanol dehydrogenase; MtkAB: Malate thiokinase; Mcl: Malyl-CoA lyase; PhaA: Acetoacetyl-CoA thiolase; PhaB: Acetoacetyl-CoA reductase; CroR: Crotonase; Ccr: Crotonyl-CoA reductase; Epi: Ethylmalonyl-CoA/methylmalonyl-CoA epimerase; Ecm: Ethylmalonyl-CoA mutase; Msd: Methylsuccinyl-CoA dehydrogenase; Mcd: Mesoconyl-CoA hydratase; PccAB: Propionyl-CoA carboxylase; Mcm: Methylmalonyl-CoA mutase; SucCD: Succinyl-CoA synthetase; SdhABCD: Succinate dehydrogenase; FumC: Fumarase; cyt c_L(ox): Oxidized cytochrome c_L; cyt c_L(red): Reduced cytochrome c_L; dH₄MPT: Dephosphotetrahydromethanopterin; H₄F: Tetrahydrofolate; CoA: Coenzyme A; [Q]: Ubiquinone; [QH₂]: Ubiquinol; GDP: Guanosine diphosphate; GTP: Guanosine triphosphate; 2-PGA: 2-phosphoglycerate; PEP: Phosphoenolpyruvate; OAA: Oxaloacetate; TCA cycle: Tricarboxylic acid cycle; MFR: Methanofuran.

循环酶系会受到协同调控^[21]。

亚甲基-H₄F 与甘氨酸在丝氨酸羟甲基转移酶 (serine hydroxymethyltransferase, GlyA) 催化下生成丝氨酸, 同时释放 H₄F。丝氨酸在丝氨酸:乙醛酸氨基转移酶 (serine:glyoxylate aminotransferase, Sga) 的作用下生成羟基丙酮酸。而后在羟基丙酮酸还原酶 (hydroxypyruvate reductase, Hpr) 的催化下转变成甘油酸, 再由甘油酸激酶 (glycerate kinase, Gck) 催化生成 2-磷酸甘油酸^[12]。随后通过一系列与糖酵解和三羧酸循环部分共享的反应步骤生成苹果酸。经苹果酸硫激酶 (malate thiokinase, Mtk) 生成苹果酰辅酶 A。苹果酰辅酶 A 经苹果酰辅酶 A 裂解酶 (malyl-CoA lyase, Mcl) 催化生成乙酰辅酶 A 和乙醛酸。乙醛酸在 Sga 催化下再生为甘氨酸进入下一个循环。

乙醛酸持续再生才能维持丝氨酸循环的运行。与经典乙醛酸循环不同, *M. extorquens* AM1 具有一条基于辅酶 A 硫酯中间体的替代途径, 即 EMCP。首先, 2 个乙酰辅酶 A 分子缩合并经一系列辅酶 A 硫酯中间体转化生成 β -甲基苹果酰辅酶 A。 β -甲基苹果酰辅酶 A 随后裂解生成乙醛酸和丙酰辅酶 A。该途径包含了一些特有反应, 如由巴豆酰辅酶 A 还原酶 (crotonyl-CoA reductase, Ccr) 催化的巴豆酰辅酶 A 生成乙基丙二酰辅酶 A, 而后其由乙基丙二酰辅酶 A 变位酶 (ethylmalonyl-CoA mutase, Ecm) 催化生成甲基琥珀酰辅酶 A (图 2)^[12]。

丝氨酸途径理论上不会造成碳损失, 而且 1 分子甲醇还能同化 1 分子 CO₂, 但该过程需要消耗 ATP 与 NADH, 在某种程度上也属于碳损失^[22]。

2 合成生物学工具开发

合成生物学工具的开发是构建细胞工厂的先决条件^[23]。近年来, 研究者围绕 *M. extorquens* AM1 逐步构建了较为完善的遗传操作工具体系, 包括游离质粒载体及启动子等表达调控元件、

转化方法、基因编辑技术以及基因组规模代谢模型 (genome-scale metabolic modeling, GSM) 等, 为外源基因表达、代谢通路重构提供了支撑, 推动了甲醇生物制造研究。

2.1 基因表达载体

在构建目标产物合成通路的过程中, 代谢途径相关基因需以适当水平表达。目前, 在 *M. extorquens* AM1 中利用游离型质粒表达系统已成功实现了内源和异源蛋白的过表达。此外, 已有多个菌株适配的组成型和诱导型启动子被鉴定出来, 能够精准调控靶基因表达^[24]。

2.1.1 游离质粒载体

游离质粒载体是基因工程中不可或缺的工具, 其不但能用于工程菌株中合成代谢通路相关酶基因的表达, 还可作为便捷测试平台, 在酶基因筛选与染色体整合之间提供快速的中间验证^[23]。

基于 IncP 复制子的大型质粒 pRK310 (19 kb) 和 pVK100 (23 kb) 均能应用于 *M. extorquens* AM1 中。然而, 该类载体的使用受限于其大小和有限的酶切位点^[25]。在小型游离载体的构建方面, Marx 等^[25]从基于小型 IncP 复制子的质粒 pDN19 突变体库中分离出一个能在 *M. extorquens* 中稳定存在的突变体 pDN19X, 并衍生出了 pCM46、pCM48 以及广宿主载体 pCM62 等。基于此构建了目前在 *M. extorquens* AM1 中应用最广泛的表达载体 pCM80、pCM110 等 pCM 系列及 pTE 系列载体 (表 1)^[26]。Orita 等^[29]通过替换 pCM80 中的抗性基因构建了卡那霉素抗性的载体 pCM80Km。此外, Chubiz 等^[31]基于 pHC115 构建了利用诱导型启动子在 *M. extorquens* AM1 中表达红色荧光蛋白的表达载体 pLC290 和 pLC291。为进一步拓展适配质粒种类, Rohde 等^[32]和 Quynh Le 等^[33]分别利用在多种革兰氏阴性菌中均可稳定复制的广宿主载体 pBBR1MCS-3 和 pBBR1-MCS2 实现了在 *M. extorquens* AM1 中的外源基因表达 (表 1), 但该类载体也存在电转化效率较低的缺陷。

表1 适配*Methylobacterium extorquens* AM1菌株的常用载体

Table 1 Commonly used vectors for *Methylobacterium extorquens* AM1 strain

Vectors	Description	References
pCM433	<i>sacB</i> -based allelic exchange vector, antibiotics, Amp ^R , Cm ^R , Tet ^R , suicide plasmid	[27]
pK18mobSacB	pMB1 ori, RP4 <i>mob</i> , modified <i>sacB</i> , <i>lacZa</i> , Kan ^R , suicide plasmid	[28]
pREDSIX	Amp ^R , mobilizable, <i>oriV</i> , β -lactamase gene <i>bla</i> and P _{tuf} -mCherry, <i>oriT</i> of plasmid RP4	[24]
pRK310	IncP, <i>oriT</i> , Tet ^R	[25]
pVK100	IncP, Kan ^R , Tet ^R	[25]
pCM46	<i>traJ'</i> allele, <i>oriV</i> , Tet ^R , <i>oriT</i>	[25]
pCM80	pCM62 derivative, Tet ^R , P _{mxoF} <i>oriT</i> , pBR322 ori	[27]
pCM80Km	pCM62 derivative, Kan ^R , P _{mxoF} <i>oriT</i> , pBR322 ori	[29]
pCM48	<i>traJ'</i> allele, <i>oriV</i> , Tet ^R , <i>oriT</i>	[25]
pCM62	<i>traJ'</i> allele, <i>oriV</i> , Tet ^R , <i>oriT</i> , improved broad-host-range cloning vector	[25]
pCM110	<i>traJ'</i> allele, <i>oriV</i> , Tet ^R , <i>oriT</i> , P _{mxoF}	[30]
pHC115	<i>traJ'</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , Kan ^R , pBR322 ori	[31]
pBBRIMCS-3	ColE1 ori, pBBR1 Rep, <i>oriV</i> , Tet ^R	[32]
pBBR1-MCS2	ColE1 ori, pBBR1 Rep, <i>oriV</i> , Kan ^R	[33]
pMis1_1B	ColE1 ori, pBBR1 Rep, <i>oriV</i> , Kan ^R	[34]

除小分子量游离载体外，许多 α -变形菌拥有巨大质粒组成的多分区基因组并由 *repABC* 表达盒驱动在菌株中的垂直传递^[35]。Carrillo 等^[36]利用 *repABC* 表达盒、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)复制起点、抗生素(卡那霉素、庆大霉素、四环素等)抗性基因表达盒成功组装了适用于 *M. extorquens* AM1 的微型染色体。

单质粒在使用中会受限于载体分子量和酶切位点可用性。使用 2 种兼容的独立质粒可提高实验灵活性并简化工程菌株的开发流程。Pöschel 等^[34]开发了基于 pBBR1 的 *rep* 基因启动子区域发生突变的质粒 pMis1_1B；作为一种可被用于 *M. extorquens* 的新型游离载体，它能够与广泛使用的 pCM 系统质粒兼容，拓展了 *M. extorquens* AM1 的遗传操作工具箱。

2.1.2 启动子

启动子负责在宿主系统中驱动基因表达。为了实现酶蛋白表达量和作用时间上的精确调控，需开发适配 *M. extorquens* AM1 的覆盖不同表达强度的启动子^[37]。

目前已为 *M. extorquens* AM1 开发了一系列天

然组成型启动子(表 2)。Schada von Borzyskowski 等^[26]建立了基于荧光蛋白(mCherry)的组成型启动子筛选系统，挖掘和表征了一套不同强度的组成型启动子，以满足不同基因的表达调控需求，包括 P_{mxoF}、P_{fumC}、P_{coxB} 和 P_{tuf} 等，其强度排序为 P_{fumC}<P_{coxB}<P_{tuf}≈P_{mxoF}。其中，P_{mxoF} 是目前细胞工厂中最常用的组成型启动子^[24,38]。P_{mxoF} 的 T159C 突变(P_{mxoF}*)使其活性增加了 60%^[39]。同时，*M. extorquens* 内源启动子 P_{meta1_002} 和 P_{meta1_3616} 也在构建产物生产菌株时被用于调控合成途径中关键酶基因的表达^[40-41]。除内源启动子外，人工启动子 P_{tac}、大肠埃希氏菌来源启动子 P_{lac} 以及来自根瘤菌噬菌体 16-3 的强启动子 P_R 也被应用于 *M. extorquens* AM1 中^[26,40]。

在实际应用中，菌株中不受控的组成型表达系统可能会导致目标蛋白的过度生产和结构不稳定，从而对细胞造成损害。为规避上述缺陷，已有多种适配 *M. extorquens* AM1 的诱导型启动子被开发出来(表 2)。研究人员基于转录抑制因子 CymR 和 TetR 及相应操纵基因位点 cmtO 和 tetO，开发了分别以 4-异丙基苯甲酸

表2 应用于*Methylobacterium extorquens* AM1菌株中的启动子Table 2 Promoters used in the *Methylobacterium extorquens* AM1 strain

Promoter	Characteristics	Constitutive/inducible	References
P _{mxsF}	Promoter of endogenous <i>mxsF</i> gene	Constitutive	[38]
P _{mxsF*}	T159C mutation of P _{mxsF}	Constitutive	[39]
P _{fumC}	Promoter of endogenous <i>fumC</i> gene	Constitutive	[24]
P _{coxB}	Promoter of endogenous <i>coxB</i> gene	Constitutive	[24]
P _{tuf}	Promoter of endogenous <i>tuf</i> gene	Constitutive	[24]
P _{meta1_002}	Promoter of endogenous <i>meta1_002</i> gene	Constitutive	[40]
P _{meta1_3616}	Promoter of endogenous <i>meta1_3616</i> gene	Constitutive	[41]
P _R	Promoter from the rhizobial phage 16-3	Constitutive	[26]
P _{lac}	Promoter of <i>Escherichia coli</i> lactose operon	Constitutive	[40]
P _{tac}	Artificial promoter	Constitutive	[40]
P _{R/cmtO}	Cumate-inducible promoter	Inducible	[42]
P _{S6}	Cumate-inducible promoter	Inducible	[43]
P _{R/tetO}	Tetracycline-inducible promoter	Inducible	[31]
P _{AIlacO-1}	IPTG-inducible promoter	Inducible	[36]
HexR/P _{zwf1}	Glucose-inducible promoter	Inducible	[44]
XutR/P _{xutA}	Xylose-inducible promoter	Inducible	[44]
HpdR/P _{hpdH}	Levulinic acid-inducible promoter	Inducible	[44]
P _{sga}	Promoter of endogenous <i>sga</i> gene	Inducible	[45]

(cumate)或脱水四环素(anhydrotetracycline)作为诱导剂的启动子,如 P_{R/cmtO}、P_{S6}和 P_{R/tetO}等。这些启动子因具有基础表达水平低、诱导后表达水平高的特点而被广泛使用^[31,36,42-43]。此外,Carrillo 等^[36]构建了由异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)作为诱导剂的诱导型启动子;同时,为了克服该类启动子表达弱和渗漏问题,开发了一套由不同 lacO 调控的诱导型启动子,其诱导倍数在 6–36 倍之间;此外,由 P_{AI}和 P_L衍生的诱导型启动子,其最大强度介于强启动子 P_{mxsF}的 9%–166% 之间,这为蛋白质的可控过表达提供了新的可能。然而, IPTG 因其毒性和成本问题并不适合工业规模应用。因此,使用廉价的可再生底物作为诱导剂可能成为大规模生产生物化学品的可行策略^[46]。Sathesh-Prabu 等^[44]评估了由葡萄糖(HexR/P_{zwf1})、木糖(XutR/P_{xutA})和乙酰丙酸(HpdR/P_{hpdH})诱导的启动子系统在

M. extorquens AM1 中的功能,结果表明乙酰丙酸诱导系统展现出了最强的外源基因表达;该系统可调且控制严谨,基础表达水平极低,表达效率与广泛使用的强启动子(如 P_{mxsF}和 P_{L/O4})几乎相当。除外源杂合启动子外,Casaroli 等^[47]利用 *M. extorquens* 内源 *sga* 基因启动子(P_{sga})成功实现了依赖于甲醇诱导的绿色荧光蛋白的表达。

2.2 转化方法

将外源质粒导入宿主细胞是构建工程菌株的基本技术。接合转移和电穿孔转化方法已在 *M. extorquens* AM1 中获得了广泛应用。

接合转移是由质粒或转座子介导的借助性菌毛建立细胞间连接而实现的质粒的水平转移过程。在利用接合转移将外源质粒转入 *M. extorquens* AM1 的过程中,大肠埃希氏菌 S17-1λpir 是最常用的质粒供体菌株。Lim 等^[45]将基于 pCM433 的基因敲除载体通过接合转移转化到 *M. extorquens*

AM1 菌株中, 实现了 *phaR* 基因的敲除。Tekucheva 等^[48]将处于指数生长期的 *M. extorquens* AM1 受体菌株与等量的大肠埃希氏菌 S17-1 λ pir 供体菌混合并置于带有微孔滤膜的培养基上进行孵育; 随后洗涤滤膜并将细胞悬液涂布于选择性培养基上实现了 pCM160 及其衍生质粒向 *M. extorquens* 中的转化。虽然接合转移转化效率较高, 但该过程涉及复杂且费时的步骤。因此, 诸如电穿孔法等简单省时的方法更受青睐。

电穿孔法即通过瞬时的电脉冲在细胞质膜上形成孔道, 使核酸得以进入细胞质, 是目前所有转化方法中最为便捷且高效的方法。Toyama 等^[49-50]基于前期报道建立了适配 *M. extorquens* AM1 的电转化方法。对于 2 mm 电击杯, 采用 2.5 kV、400 Ω 、25 μ F; 对于 1 mm 间隙电击杯, 参数设置采用 2 kV、200 Ω 、25 μ F。Ledermann 等^[51]对上述方法进行了优化, 即使用 1 mm 间隙电击杯时将电击条件改为 2.15 kV 和 200 Ω 。Zhang 等^[52]利用电转化法成功将基因表达载体 pCM80 和基因敲除载体 pCM433 转入 *M. extorquens* AM1 中。

2.3 基因编辑系统

对 *M. extorquens* AM1 基因组进行精准、高效的遗传改造是工程菌株开发的关键。随着合成生物学的发展, 应用于该菌株的基因编辑技术也取得了系列突破, 包括基于正筛-反筛标记的同源重组、Cre/loxP 和转座系统等在内的多种技术为 *M. extorquens* AM1 的代谢工程改造提供了机遇(图 3)。

2.3.1 同源重组系统

基于自杀质粒的同源重组(homologous recombination, HR)系统依赖于含有抗生素抗性基因以及果聚糖蔗糖酶编码基因(*sacB*)的自杀质粒。其中, 抗生素抗性作为正向筛选标记赋予宿主抗生素抗性, 而 *SacB* 作为反向筛选标记, 可催化培养基中的蔗糖转化为对细胞有毒的果聚糖, 从而导致第二轮同源重组以实现基因的敲除或插入(图 3A)^[23]。作为在 *M. extorquens*

AM1 中应用最广的基因编辑技术, Zhang 等^[52]利用 pCM433 载体实现了对 PHA 合酶(PHA synthase, PhaC)编码基因 *phaC* 和丙酮酸氧化酶(pyruvate oxidase)编码基因 *poxB* 的敲除(表 1)。Orita 等^[28]利用 pK18mobSacB 载体将豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)来源的 PhaC^{N149S/D171G}突变体编码基因敲入了 *M. extorquens* AM1 基因组中(表 1)。尽管该系统已广泛应用于多种细菌物种, 但也容易产生假阳性、蔗糖抗性的克隆。Ledermann 等^[51]利用 pREDSIX 载体在 *M. extorquens* AM1 中建立了不依赖于 *SacB* 反选, 而是依靠抗性标记替换目标基因实现基因敲除的基因编辑系统, 并实现了对 *mxoF* 基因的敲除(表 1)。Van Woudenberg 等^[24]利用该系统成功敲除了菌株的 *phaC* 基因。

2.3.2 Cre/loxP 系统

Cre/loxP 系统不需要宿主蛋白和能量因子的辅助, 具有操作简单、适应性高等特点, 已经被用于各种物种的基因编辑。Cre 是来自 P1 噬菌体的重组酶。该蛋白天然具有内源核定位序列, 可经被动扩散进入真核生物细胞核。loxP (locus of X-over of P1)是一段 34 bp 的 DNA 序列, 该位点包括 2 个位于两端大小为 14 bp 的倒置重复序列, 以及一段 6 bp 的间隔序列组成。Cre 重组酶可特异性地识别 loxP 片段, 并引导其重组。Cre/loxP 系统能够实现基因敲除、基因功能鉴定以及外源基因整合等多种功能(图 3B)^[53]。Marx 等^[54]构建了适配 *M. extorquens* AM1 的 Cre/loxP 系统, 该系统由一个携带位于 loxP 位点之间卡那霉素抗性基因表达盒的等位交换载体, 以及一个表达 Cre 重组酶的质粒组成。Liang 等^[55]测试了 Cre/loxP 系统介导的甲羟戊酸合成途径相关酶表达盒在 *M. extorquens* AM1 基因组中的基因多拷贝整合的能力, 通过在高浓度卡那霉素(600 mg/L)培养基中对突变体进行筛选获得了携带 2-3 个拷贝的菌株。传统的 Cre/loxP 系统会随着使用次数的增多而逐渐在基因组中积累多个 loxP 位点, 进而影响基因组稳

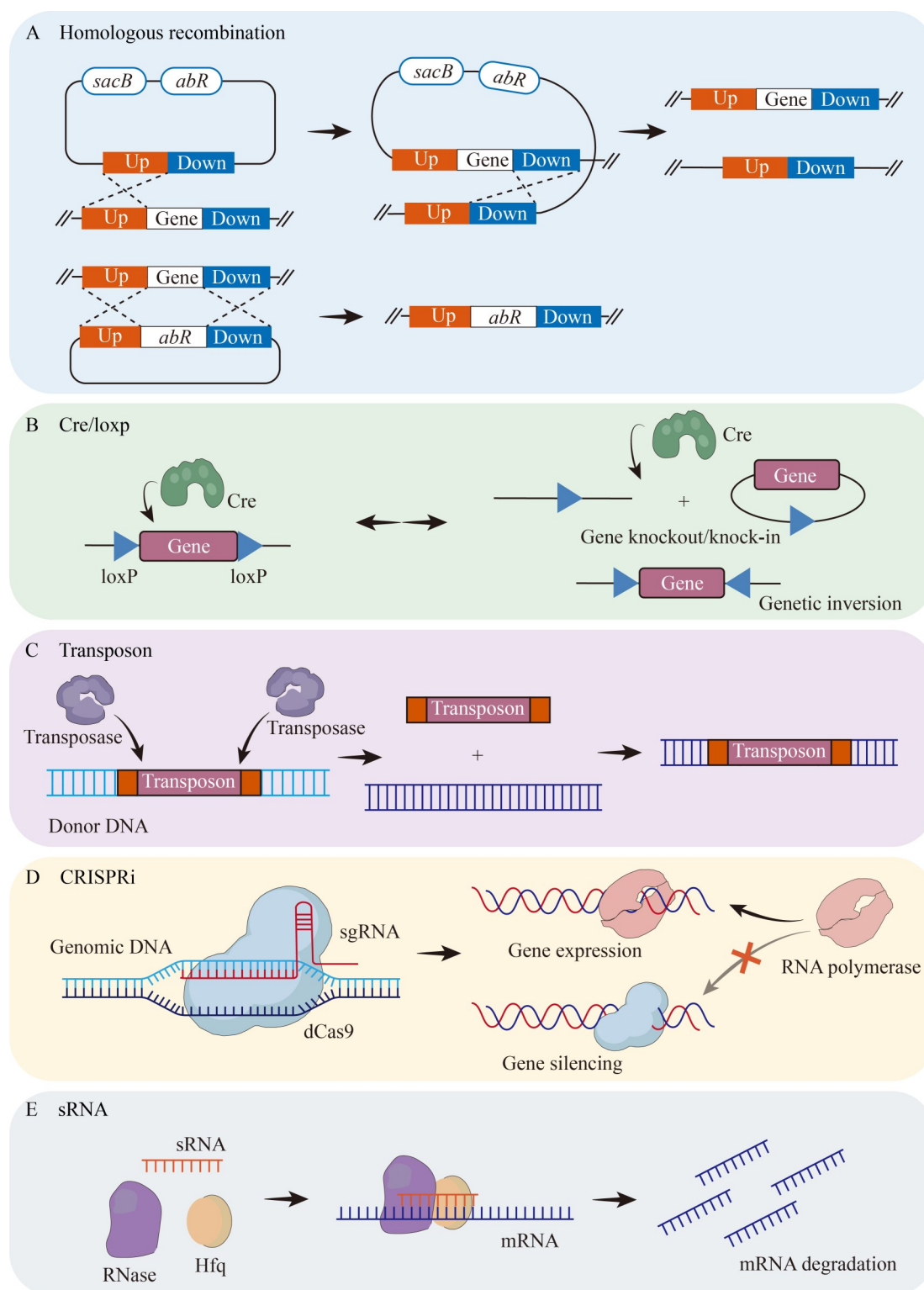


图3 适配*Methylobacterium extorquens* AM1的基因编辑工具

Figure 3 Gene editing tools adapted for *Methylobacterium extorquens* AM1. A: Homologous recombination; B: Cre/loxP; C: Transposon; D: CRISPRi; E: sRNA. *abR*: Antibiotic resistance gene.

定性。为解决这一问题, Zhu 等^[56]构建了基于单质粒 pSL-TP-cre-km, 包含 *miniHimarI* 转座子和可诱导的 cre-lox71/lox66 系统的基因组多位点整合工具, 并成功实现了外源基因的多轮整合。

2.3.3 转座系统

转座子是一类可在基因组中自主移动位置的 DNA 序列, 即 DNA 片段在负责“切割”和“连接”的转座酶帮助下, 在基因组中“复制粘贴”自身的过程。利用转座子系统可实现外源 DNA 片段的随机或定点插入^[57]。目前, 已在 *M. extorquens* AM1 中成功构建了多种类型的转座系统(图 3C)。Marx 等^[58]使用微型 Tn5 转座系统衍生而来的 *IsphoA/hah-Tc* 在 *M. extorquens* AM1 中实现了二氢甲烷蝶呤还原酶编码基因的筛选。Schada von Borzyskowski 等^[26]使用基于 pAG408 载体的微型 Tn5 转座系统实现了荧光蛋白 mCherry 编码基因在 *M. extorquens* AM1 基因组中的整合, 为外源基因表达盒在菌株染色体中的整合提供了一种高效的方案。

2.3.4 CRISPRi 和 sRNA 系统

为应对 *M. extorquens* 中必需基因敲除困难及代谢途径关键基因需动态调控的双重挑战, 作为 CRISPR/Cas9 系统衍生技术的 CRISPR interference (CRISPRi) 和反式作用小调控 RNA (trans-acting small regulatory RNA, sRNA) 系统提供了一种有效的基因调控策略。

CRISPRi 系统由一个保留了 DNA 结合能力而核酸酶失活的 Cas9 突变体(dCas9)和共表达的单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 组成。dCas9 与 sgRNA 形成的复合物会结合到与 sgRNA 互补的特异性 DNA 序列上, 从而阻断靶基因转录(图 3D)^[23]。Mo 等^[59]通过平衡失活的酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)来源 Cas9 (dCas9) 和 sgRNA 的启动子强度, 开发了适配 *M. extorquens* AM1 的 CRISPRi 系统; 通过靶向编码丝氨酸羟甲基转移酶编码基因 *glyA* 的不同位点, 可实现 41.9%–96.6% 的生长抑制效率;

同时, 其还能将菌株中的番茄红素脱氢酶编码基因 *crtI* 的表达水平降低 97.7%。

sRNA 是一种典型的细菌 RNA 调控因子, 其能在 RNA 伴侣蛋白 Hfq 的辅助下调控基因的表达(图 3E)^[60]。该系统具有构建简便、可逆调控和适用于高通量筛选等优势。Zhu 等^[61]成功在 *M. extorquens* AM1 中构建了基于大肠埃希氏菌来源 MicC 支架和内源伴侣蛋白 Hfq 组成的功能性 sRNA 系统; 通过利用 24 bp 反义 RNA 下调 *M. extorquens* AM1 菌株中茄红素脱氢酶编码基因 *crtI* 的表达, 工程菌株的类胡萝卜素产量降低了 86%。

2.4 基因组整合位点

尽管游离质粒载体已广泛用于基因表达, 但其在菌株中的不稳定性会导致质粒丢失。将基因表达盒整合至染色体能够避免这一问题, 同时, 还无需持续施加抗生素维持筛选压力, 更适用于工业菌株构建和长期连续发酵。已有研究表明, 位置效应会导致外源基因因插入基因组中的不同位点而影响其表达强度。同时, 插入位点选择不当还会对菌株的增殖产生负面影响^[56]。目前, *M. extorquens* AM1 中已有多个基因组位点被选择为外源基因表达盒的插入位点(表 3)。

聚 3-羟基丁酸酯解聚酶 C 是一种参与降解 PHB 的水解酶。该基因的破坏对 *M. extorquens* 的生长和 PHA 生产均无影响。Casaroli 等^[47]将构建的甲醇浓度传感器插入了 *depC* 位点, 编码纤维素合成酶基因的 *celABC* 操纵子已被确定为一个中性插入位点。Yuan 等^[27]将甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)来源的核酮糖单磷酸循环(ribulose monophosphate cycle, RuMP)相关酶编码基因表达盒敲入了该位点, 在菌株中构建了一条新型甲醇协同同化途径。*poxB* 基因的敲除能够显著降低 *M. extorquens* 的产乙酸能力, 从而提升以丙酮酸为前体物的产物产量。*attTn7* 是介于葡萄糖胺-6-磷酸合酶和 1,3-丙二醇脱氢酶编码基因之间的位点, 该位点是非编码区且外

表3 常用的基因组整合位点

Table 3 Commonly used genomic integration sites

Integration site	GenBank entry	Description	References
<i>depC</i>	MexAM1_META1p1079	Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase encoding gene	[47]
<i>celABC</i>	MexAM1_META1p1167-MexAM1_META1p1169	Cellulose synthase gene operon	[62]
<i>poxB</i>	MexAM1_META1p1455	Pyruvate oxidase encoding gene	[52]
<i>attTn7</i>	Between MexAM1_META1p4546 and MexAM1_META1p4547	An intergenic region between glucosamine-6-phosphate synthetase (GlmS) and which encodes 1,3-propanediol dehydrogenase (DhaT) encoding genes	[52]
<i>ccr</i>	MexAM1_META1p0178	Crotonyl-CoA reductase encoding gene	[28]

源基因的表达和稳定性良好^[63]。Zhang 等^[52]在利用 *M. extorquens* AM1 合成 D-乳酸的研究中, 将肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)来源的乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 分别整合到了 *poxB* 基因和 *attTn7* 位点^[52]。*M. extorquens* AM1 中的 Ccr 表达处于中等偏高水平。因此, Orita 等^[28]在构建三元聚合物 PHA 生产菌株时, 将乙基丙二酰辅酶 A 脱氢酶编码基因插入到了 *ccr* 基因的下游, 以实现其中等水平的表达。

2.5 基因组规模代谢模型

基因组规模代谢模型是一种基于生物体全基因组注释, 通过基因-蛋白质-反应关联构建所有已知代谢反应的知识库, 并利用数学约束模拟细胞代谢通量分布, 从而将基因型与表型联系起来的系统生物学工具, 在研究细菌代谢以及指导细胞工厂设计方面具有重要价值^[64]。van Dien 等^[65]建立了首个针对 *M. extorquens* AM1 中心代谢的化学计量模型, 以评估其以甲醇为碳源时的稳态生长能力, 该模型包含 20 个可逆反应和 47 个不可逆反应、65 种胞内代谢物以及实验测定的生物量组成。Peyraud 等^[66]构建了基因组规模代谢模型 iRP911, 其涵盖了编码 761 种蛋白质的 911 个基因, 包含 1 139 个反应和 977 种代谢物, 利用该模型模拟和实验研究鉴定出了在甲基营养型生长条件下的代谢网络。Yuan 等^[27]通过将丙二酰-CoA 途径和 RuMP 途径添加

到代谢模型 iRP911 中, 进行了 3-羟基丙酸生产菌株的计算机模拟重建。Ma 等^[67]利用代谢模型预测分析发现, 向菌株中引入光子通量能够有效提升其 3-羟基丙酸的生产效率, 以敲除了光合作用系统负调控因子编码基因 *ppsR* 的菌株为产物生产菌株, 3-羟基丙酸的产量和得率均提高了 2 倍以上。

3 基于 *Methylobacterium extorquens* 细胞工厂的生物制造

随着对菌株代谢特性研究的不断深入, 遗传操作工具和发酵工艺技术体系日益完善, 利用 *M. extorquens* 以甲醇为原料的化学产品生产成为其绿色生物制造的主要目标。此外, 该技术路径还具有产物易分离纯化、发酵污染风险低等优势。目前, *M. extorquens* AM1 细胞工厂已实现了多种产物的生产, 包括重组蛋白、聚合物、有机酸和萜类化合物等(表 4)^[68]。

3.1 重组蛋白

重组蛋白生产涵盖生物制药和酶制剂等诸多领域。*M. extorquens* AM1 虽蛋白表达量相对较低且缺少翻译后修饰机制, 但其在某些蛋白生产场景中仍具有独特优势(表 4)。含有 Ln^{3+} 的酶蛋白在多种生物学过程中发挥着重要功能。*M. extorquens* AM1 具有天然合成 Ln^{3+} 依赖型甲

表4 利用甲醇原料生产的化学品

Table 4 Chemicals produced using methanol as a feedstock

Classification	Products	Titer	Culture methods	References
Recombinant protein	Ln ³⁺ -dependent methanol dehydrogenase	–	Shake flask	[69]
	PQQ-dependent methanol dehydrogenase	–	Shake flask	[70]
	Methanol dehydrogenase 1	–	Shake flask	[71]
	Cry1Aa	4.5% of total cellular protein	Shake flask	[72]
	Haloalkane dehalogenase	10% of total cellular protein	Shake flask	[73]
Biodegradable polymer	PHB	43% of the dry weight of the cells	Shake flask	[74]
	3HV-3HHx-PHA	41% of the dry weight of the cells	Shake flask	[28]
Organic acids and platform chemicals	3-hydroxypropionic acid	69.8 mg/L	Shake flask	[41]
	3-hydroxypropionic acid	0.857 g/L	Fed-batch fermentation	[27]
	3-hydroxypropionic acid	1.75 g/L	Shake flask	[67]
	2-hydroxyisobutyric acid	2.1 g/L	Fed-batch fermentation	[32]
	Itaconic acid	31.6 mg/L	Shake flask	[45]
	D-lactate	8.39 g/L	Fed-batch fermentation	[52]
	Mevalonate	70 mg/L	Shake flask	[75]
	Methylsuccinic acid	60 mg/L	Shake flask	[75]
	Mevalonate	2.22 g/L	Fed-batch fermentation	[76]
	Mevalonate	2.59 g/L	Fed-batch fermentation	[77]
	1-butanol	15.2 mg/L	Shake flask	[40]
	Isobutanol	19 mg/L	Shake flask	[38]
Terpenoid	Patchoulol	–	Shake flask	[78]
	α -humulene	1.65 g/L	Fed-batch fermentation	[42]
Other	Violacein	11.7 mg/L	Shake flask	[33]
	Pregnenolone	100 mg/L	Shake flask	[48]
	Phloroglucinol	108.8 mg/L	Shake flask	[24]

醇脱氢酶的能力^[18]。因此,可作为蛋白合成平台用于 Ln³⁺ 依赖酶的表达。Huang 等^[69]利用 P_{mxoF} 启动子在 *M. extorquens* AM1 中实现了草栖剑菌(*Ensifer meliloti*)等来源的 Ln³⁺ 依赖型甲醇脱氢酶 XoxF 的表达。依赖 Ca²⁺ 的 PQQ 依赖型甲醇脱氢酶是甲基营养菌 C1 化合物代谢中的关键酶之一,也是电化学生物传感器和生物燃料电池领域极具应用前景的催化剂。Karaseva 等^[70]在 *M. extorquens* AM1 中实现了内源甲醇脱氢酶的重组表达,该重组酶被用于构建安培型生物传感器,检测限可低至 0.7 μ mol/L。Phan

等^[71]在 *M. extorquens* AM1 中利用 pCM110 和甲醇诱导启动子 P_{mxoF} 进行了甲酸脱氢酶 1 的同源表达,并通过优化 5' 非翻译区(5'-untranslated region, 5' UTR)和终止子实现了酶表达水平的提升;结果表明,使用 rrnB 终止子时酶产量提高了 1.6 倍,达到 2.1 mg/g 细胞湿重;利用甲醛活化酶编码基因 *fae* 的 5' UTR 效果最好,其表达量比对照序列高出 2.5 倍;将重组菌株作为全细胞生物催化剂应用于 CO₂ 的转化,甲酸盐生产效率达到了 5.0 mmol/(L·h)。来自苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 Cry1Aa 是一种杀虫

蛋白, 对多种鳞翅目昆虫均表现出高活性。Choi 等^[72]将 *cry1Aa* 基因置于启动子 P_{mxaF} 的控制下实现了其在 *M. extorquens* AM1 中的重组表达, 表达量达到了胞内总蛋白的 4.5%。卤代烷脱卤酶是多种卤代烃降解途径中的第一个酶, 其催化过程无须辅助因子参与, 在生物修复领域具有应用价值。Fitzgerald 等^[73]使用含有强启动子 P_{mxaF} 的表达载体, 在 *M. extorquens* AM1 中实现了来自自养黄色杆菌(*Xanthobacter autotrophicus*) 的卤代烷脱卤酶的表达, 在 PHB 合成缺陷型宿主菌株中表达量占到了细胞总蛋白的 10%。

3.2 可降解聚合物

PHA 作为不可降解石油基塑料的潜在替代品, 因具有良好的生物相容性和生物可降解性而受到广泛关注。

作为菌株中的天然产物, PHB 是 *M. extorquens* AM1 中研究最早、生产水平最高的天然聚合物。在氮源限制而碳源过量的条件下, 胞内乙酰辅酶 A 在乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶(acetoacetyl-CoA thiolase, PhaA)、乙酰乙酰-CoA 还原酶(acetoacetyl-CoA reductase, PhaB)和 PhaC 的催化下聚合形成 PHB 颗粒^[30]。Korotkova 等^[74]实现了 PHB 在 *M. extorquens* AM1 中的合成, 其产量可达细胞干重的 43% (表 4)。

由于仅由(R)-3-羟基丁酸[(R)-3-hydroxybutyrate, 3HB]组成的 PHA 具有高结晶性而导致材料硬且脆, 实际应用受限。将 3HB 与其他单体, 如(R)-3-羟基戊酸[(R)-3-hydroxyvalerate, 3HV]、(R)-3-羟基己酸[(R)-3-hydroxyhexanoate, 3HHx]、4-羟基丁酸(4-hydroxybutyrate)等进行共聚, 能够有效降低聚合物的结晶度和熔点, 提高材料柔韧性和加工性能^[28]。Orita 等^[29]通过将内源 *phaC* 替换为豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)来源的编码宽底物酶的 *phaC* 基因, 所获得菌株能够生产由 3HB、3HV 和 3HHx 组成的三元共聚物 PHA; 通过进一步引入 PhaC 双点突变体、哺乳动物来源乙酰辅酶 A 脱羧酶、杀虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)来源 NAD^+ 依赖型(S)-3-羟

基酰基辅酶 A 脱氢酶、(S)-特异性烯酰辅酶 A 水合酶、(S)-烯酰辅酶 A 水合酶和 β -酮硫解酶, 工程菌株以甲醇为碳源合成了由摩尔分数 5.4% 3HV 和 0.9% 3HHx 组成的三元共聚物 PHA, 其含量可占细胞干重的 41%^[28]。

3.3 有机酸与平台化学品

有机酸被广泛应用于食品、制药和纺织等行业, 以廉价甲醇为原料生产有机酸是提高生物制造经济性以实现其工业化生产的极具前景的选择。*M. extorquens* 独特的丝氨酸循环和 EMCP 不仅赋予了其高效的一碳同化能力, 还形成了丰富的辅酶 A 活化中间体库, 为有机酸及平台化学品的生物合成提供了代谢基础^[12]。目前, 已利用 *M. extorquens* AM1 成功实现了 3-羟基丙酸及丁二烯、异丁醇等的生物合成(表 4)。

作为一种平台化合物, 3-羟基丙酸不仅可被应用于生物可降解聚合物的合成, 还可作为生产丙烯酸和 1,3-丙二醇等重要基础化工产品的原料。Yang 等^[41]通过在 *M. extorquens* AM1 中表达橙色绿屈挠菌(*Chloroflexus aurantiacus*)来源编码具有醇脱氢酶和醛脱氢酶活性的双功能酶基因 *mcr*, 构建了丙二酰辅酶 A 途径用于 3-羟基丙酸生产, 产量可达 69.8 mg/L。Yuan 等^[27]通过进一步在菌株中引入外源 RuMP 途径将 3-羟基丙酸的产量提高到了 0.857 g/L。Ma 等^[67]通过删除光合作用的负调控因子进一步对 *M. extorquens* 进行了代谢工程改造, 在光照/黑暗交替的分批补料发酵中, 3-羟基丙酸产量提升到了 1.75 g/L。

2-羟基异丁酸(2-hydroxyisobutyric acid, 2-HIBA)是一种支链的 C4-羟基羧酸。作为平台化合物, 2-HIBA 易于转化为用于生产有机玻璃、涂料和油墨的聚甲基丙烯酸甲酯的前体。*M. extorquens* 中的 PHB 合成途径能够为其合成提供充足的(R)-3-羟基丁酰辅酶 A 前体。Rohde 等^[32]将来自马西利亚塞内加尔罗伯特塞穆赖菌(*Robertmurraya massiliosenegalensis*)的 3-羟基丁酰辅酶 A 特异的辅酶 B₁₂ 依赖的变位酶在 *M. extorquens* AM1 中进行表达, 实现了利用甲醇生产 2-HIBA, 产

量为 2.1 g/L。

衣康酸作为一种重要的基础化工原料，可用于生产性能优异的高分子材料。同时，衣康酸因其抗炎、抗菌及抗病毒作用也受到了医药领域的关注^[79]。Lim 等^[45]在 *M. extorquens* AM1 表达土曲霉(*Aspergillus terreus*)来源的顺乌头酸脱羧酶实现了衣康酸的生产，以甲醇为碳源的衣康酸最高产量为 31.6 mg/L。

D-乳酸可用于溶剂以及聚合物生产而被广泛应用于医药、农业和轻工等领域。Zhang 等^[52]对 *M. extorquens* 进行了工程化改造以实现 D-乳酸的高效生物合成，通过将肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)来源的 D-乳酸脱氢酶进行多拷贝染色体整合，并结合丙酮酸通量增强以及甲醇代谢强化，工程菌株在摇瓶培养中达到了 1.17 g/L 的 D-乳酸产量；在此基础上，对菌株进行了分批补料发酵并在菌株指数生长期补加 0.34 g/L 甲酸钠，最终 D-乳酸产量达到了 8.39 g/L。该研究为未来在 *M. extorquens* 中合成其他丙酮酸衍生化学品提供了参考。

二元羧酸是化学和制药工业的重要构成板块，也可用作螯合剂或食品添加剂。*M. extorquens* AM1 的 EMCP 中包含有多种对映异构、支链、饱和或不饱和的羧基化 C4 和 C5 酰基辅酶 A 酯类。其能够作为前体物用于生产目前尚未商业化的二元羧酸产品。Sonntag 等^[75]在 *M. extorquens* AM1 中过表达了大肠埃希氏菌来源酰基辅酶 A 硫酯水解酶 YciA，在菌株培养上清液中检测到了 70 mg/L 的中康酸和 60 mg/L 的 2-甲基琥珀酸。

在宿主菌株中引入外源的甲羟戊酸途径是提高细胞工厂萜烯类产物产量的有效措施之一。因此，针对 *M. extorquens* AM1 中的甲羟戊酸生产途径进行工程改造是其作为萜烯合成平台的第一步。Zhu 等^[76]构建了携带来自德国小蠊(*Blattella germanica*)的羟基甲基戊二酰辅酶 A 合酶编码基因 *hmgcs1* 和来自克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)的羟基甲基戊二酰辅酶 A 还原酶编码基因

hmgr 的操纵子并转入 *M. extorquens* AM1 中，实现了甲羟戊酸的生产；而后，通过引入来自杀虫铜菌的乙酰辅酶 A 硫解酶编码基因 *phaA*，所获得的最优工程菌株在分批补料发酵中的甲羟戊酸产量达到了 2.22 g/L。

EMCP 作为 *M. extorquens* AM1 中心碳代谢中的一种乙醛酸回补途径，涉及多种辅酶 A 结合的单羧酸和二羧酸，这些化合物作为化学工业的平台化学品具有应用价值^[12]。其中，巴豆酰辅酶 A 作为关键节点代谢物为产物的合成提供了充足前体，可用于生产 1-丁醇等高附加值化学品。作为大宗化学品(丙烯酸丁酯等)的前体，1-丁醇的能量密度接近汽油，可以较高比例与汽油混合，且与现有石油基础设施兼容，被认为是汽油替代品的更优选择。Hu 等^[40]在 *M. extorquens* AM1 中过表达齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)的反式烯酰辅酶 A 还原酶编码基因 *ter*、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)的醇脱氢酶编码基因 *adhE2* 以及内源巴豆酶编码基因 *cror* 的菌株，获得了 1-丁醇产量为 15.2 mg/L 的工程菌株。

代谢组学研究表明，当 *M. extorquens* AM1 以甲醇为碳源时，丙酮酸及其衍生物丙氨酸在胞内的浓度相当可观。作为一种丙酮酸衍生模式化合物，异丁醇可用作溶剂和化工中间体。Ma 等^[38]在引入乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)来源的 2-酮异戊酸脱羧酶突变体(Kivd^{S286T})和大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)来源的醇脱氢酶后，工程菌株实现了异丁醇的合成；过表达枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源的乙酰乳酸合酶基因使产物产量达到了 4 mg/L；进一步提升菌株的异丁醇耐受，增加 2-酮异戊酸脱羧酶和醇脱氢酶的拷贝并敲除乳酸脱氢酶基因，异丁醇的产量达到了 19 mg/L。

3.4 萜类化合物

萜类物质是植物中天然存在的一类多样的代谢物且其应用涵盖了香料、化妆品、天然色素以及药物^[80]。*M. extorquens* AM1 能够依赖甲

羟戊酸途径积累类胡萝卜素,这也为萜类物质的合成提供了丰富的前体(表4)。作为一种倍半萜醇,广藿香醇在香水和化妆品行业具有重要应用。Hurt等^[78]通过在 *M. extorquens* AM1 中表达广藿香(*Pogostemon cablin*)来源的广藿香醇合成酶,实现了广藿香醇的合成。 α -葑草烯因具有抗炎和抗癌的特性而受到了关注。Sonntag等^[42]在 *M. extorquens* AM1 中表达了来自红球姜(*Zingiber zerumbet*)的 α -葑草烯合酶和来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)合酶编码基因, α -葑草烯的产量达到了18 mg/L;进一步引入来自橙黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)的甲羟戊酸途径并结合对 α -葑草烯合酶和FPP合酶表达盒中核糖体结合位点的优化,使产物浓度提高了3倍;结合类胡萝卜素合成缺陷型突变菌株,最终产物产量达到了1.65 g/L。上述萜类化合物产量已具备工业化竞争力。

3.5 其他产物

作为一种水溶性好且耐热的化合物,PQQ具有强大的抗氧化活性,还能通过参与蛋白转运来调节酶的活性。*M. extorquens*具有天然PQQ强合成能力。李慧芝等^[81]以 *M. extorquens* AM1 为研究对象,结合诱变和高通量筛选技术,获得的高产株的PQQ产量达到54.0 mg/L,是出发菌株的3倍。

紫色杆菌素是一种具有益生活性的蓝紫色化合物。Quynh Le等^[33]通过在 *M. extorquens* AM1 中过表达紫色色小杆菌(*Chromobacterium violaceum*)来源黄素依赖型L-色氨酸氧化酶、2-亚氨基-3-(吡啶-3-基)丙酸二聚酶、前脱氧紫菌素合酶、原脱氧紫菌素单加氧酶和紫色杆菌素合酶编码基因实现了紫色杆菌素的合成,产量为11.7 mg/L。

与化学法相比,微生物催化甾醇合成能缩短生产流程,且反应具有更高的区域选择性和立体专一性。目前,通过在微生物中表达异源哺乳动物蛋白,并利用其进行甾体化合物的催

化合成已成为研究热点。*M. extorquens* AM1 作为潜在的优势菌株,不但可以甲醇为碳源和能源,且自身不具备甾醇分解代谢系统。Tekucheva等^[48]在 *M. extorquens* AM1 中成功表达了编码哺乳动物类固醇生成系统的细胞色素P450_{scc}(CYP11A1)编码基因及其天然氧化还原伴侣肾上腺皮质铁氧还蛋白和肾上腺皮质铁氧还蛋白还原酶;利用该工程菌株成功从胆固醇中获得了单一代谢产物孕烯醇酮;通过优化培养基组成、底物添加方式、生物量和通气量等条件孕烯醇酮产量超过100 mg/L。

作为一种聚酮化合物,间苯三酚的应用横跨医药、农业和精细化工等多个领域。Van Woudenberg等^[24]研究表明,在 *M. extorquens* AM1 中表达III型聚酮合酶编码基因 *phlD* 可实现甲醇向间苯三酚的转化,分批补料发酵96 h,产物产量达到108.8 mg/L。

4 提升目标产物合成的策略

利用微生物细胞工厂进行重组蛋白、可降解塑料以及有机酸等高值产品的绿色合成逐渐成为替代传统化石能源依赖的生产工艺的重要手段。为提升产物产量,已开发了针对 *M. extorquens* AM1 的多种代谢工程策略,包括提升菌株甲醇利用性能、碳流重分配与前体供给强化、辅因子与途径关键酶优化和消除产物再利用等。

4.1 提升甲醇代谢通量

在以甲醇为原料的生物制造体系中,提升底盘菌株的甲醇利用能力及其生长性能是构建高效细胞工厂的重要策略。*M. extorquens* AM1 通过丝氨酸循环进行甲醇同化生成乙酰辅酶A虽不会损失碳原子,但存在反应步骤多、高耗能力等缺陷。I型甲基营养菌代谢甲醇的RuMP途径比丝氨酸循环具有更明显的还原力和能量合成优势。Yuan等^[27]通过在 *M. extorquens* AM1 中过表达甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)来

源己糖-6-磷酸合酶编码基因 *hps*、己糖-6-磷酸异构酶编码基因 *phi*、磷酸果糖激酶编码基因 *pfk*、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶编码基因 *zwf*，构建了一条与内源丝氨酸循环协同进行甲醇同化的途径；该途径的引入使菌株的甲醇消耗速率和细胞增殖速率分别提高了 13.1% 和 16.5%。在摇瓶条件下，产物 3-羟基丙酸的产量提高了 3.1 倍(表 5)。*M. extorquens* AM1 的工业应用受限于其较低的甲醇耐受性。当甲醇浓度超过 1% 时会显著抑制菌株增殖。与理性改造相比，适应性实验室进化技术不需要深入了解复杂的遗传背景，普适性更强。通过适应性进化技术提升细胞的甲醇耐受性和利用能力能够使得甲醇作为碳源的发酵过程更为高效^[88]。Cui 等^[82]采用常压室温等离子体诱变结合适应性实验室进化获得了一株高甲醇耐受性突变株，在含 5% 甲醇的培养基中诱变菌株的最终细胞密度比野生型菌株高 7.1 倍(表 5)。Belkhelfa 等^[89]通过适应性进化获得的 *M. extorquens* 突变菌株能在 10% 甲醇条件下稳定生长。Lee 等^[5]获得了在 2.5% 甲醇中比生长速率提高 1.68 倍的突变菌株。Chiba 等^[90]

在添加 La^{3+} 的条件下对 *M. extorquens* 进行了适应性进化，获得了可耐受 7% 甲醇的突变菌株；在 5% 甲醇条件下，突变菌株的细胞得率与亲本菌株在 0.5% 甲醇条件下相当，但 PHA 含量提高了约 2.5 倍。野生型 *M. extorquens* AM1 菌株在培养中会生成大量胞外纤维素，进而形成团块，对菌株的吸光度值读数产生噪声；研究发现，一个由于转座子插入纤维素合酶基因 *celB* 而导致其失活的菌株的结块频率和严重程度均低于野生型；基于此，Delaney 等^[62]敲除了 *M. extorquens* AM1 中的 3 个纤维素合成相关基因(*celA*、*celB* 和 *celC*)以及一个功能未知片段，显著改善了菌株的生长性能。该底盘菌株已被广泛应用于 *M. extorquens* 微生物细胞工厂的构建^[24,91]。

微生物细胞工厂中前体供给不足通常是限制目标产物理论产率提升的核心瓶颈之一，它直接制约着碳流从中心代谢向特定合成支路的高效导入。*M. extorquens* AM1 中参与丝氨酸循环的多个基因受到 LysR 型转录调控因子 QscR 的正向调控。Liang 等^[83]通过构建功能特异强化

表5 提升目标产物合成的策略

Table 5 Strategies for enhancing target product synthesis

Strategies	Types	Products	Titer enhancement	References
Increasing the metabolic flux of methanol	Incorporating the RuMP cycle	3-hydroxypropionic acid	3.1-fold	[27]
	Adaptive laboratory evolution	–	Cell density was increased by 7.1-fold	[82]
	Mutation of QscR	Mevalonate	2.8-fold	[83]
	PHA synthase knockout	Mesaconic acid	5.0-fold	[84]
	Expression of YciA ^{F35L} mutant	Mesaconic acid	6.4-fold	[85]
Optimization of cofactor supply	Activation of the photosynthetic system	3-hydroxypropionic acid	3.0-fold	[67]
	Mixed carbon source cultivation	3-hydroxypropionic acid	1.6-fold	[39]
Improvement of strain product tolerance	Adaptive laboratory evolution	1-butanol	–	[86]
Elimination of product re-utilization	Isolated a dicarboxylic acid import mutant	Citramalic acid	1.4-fold	[87]
Culture medium and fermentation process optimization	Reduction of manganese ion concentration	Phloroglucinol	1.7-fold	[24]
	Two-phase fermentation	α -humulene	–	[42]

的 QscR 突变体改善了菌株中丝氨酸循环的碳通量; 该策略使胞内乙酰辅酶 A 的含量提高了 7%, 进而使甲羟戊酸的产量提高了 2.8 倍(表 5)。微生物进行目标产物生产时, 内源副产物合成途径会竞争性地分流胞内碳流, 从而造成碳损失, 制约菌株的生产性能。因此, 敲除或弱化副产物合成途径, 将代谢流精准导向目标产物, 已成为底盘菌株优化的关键策略之一。Sonntag 等^[84]通过敲除 PHA 合成酶基因 *phaC* 阻断了从 EMCP 流向 PHB 合成途径的非期望代谢流, 使产物中康酸和 2-甲基琥珀酸的产量提高了 5 倍(表 5)。Zhang 等^[52]通过破坏了 *M. extorquens* AM1 中的 PHB 合成途径, 将 D-乳酸的产量提高了 5.5 倍; 随后, 敲除丙酮酸氧化酶编码基因 *poxB* 使胞外 D-乳酸产量进一步提高了 40%, 而乙酸浓度被显著降低。然而, 在一些情况下, 该策略非但不能提升产物产量, 反而会对产物积累造成负面影响。Van Woudenberg 等^[24]敲除 PHA 合酶编码基因 *phaC* 并未提高间苯三酚的产量, 这可能是 *phaC* 缺陷型菌株对间苯三酚的毒性更为敏感所导致的。此外, 在 *M. extorquens* AM1 中, 有多条合成途径(包括醌类、藿烷类和类胡萝卜素等)会与 α -萜草烯合酶竞争前体 FPP。Sonntag 等^[42]构建了类胡萝卜素合成缺陷型菌株来提高前体供给, 将 α -萜草烯的产量提高了 30%。

此外, 工程菌株中催化产物合成代谢关键节点反应的酶活性及其表达也对目标产物的合成具有重要影响。酰基辅酶 A 硫酯酶能够水解酰基辅酶 A 酯并释放相应的酸。来源于流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的硫酯酶 YciA 可被用于在 *M. extorquens* AM1 中异源表达以生产二元羧酸。为提升产物产量, Pöschel 等^[85]对该酶的底物结合区域进行了工程改造。结果表明, 突变体 YciA^{F35L} 的表达使 2-甲基琥珀酸和中康酸的产量分别提高了 4.4 倍和 6.4 倍(表 5)。Zhu 等^[76]利用 *M. extorquens* AM1 实现了以甲醇为原料的甲羟戊酸生产, 且杀虫贪铜菌来源的

乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶编码基因 *phaA* 的表达进一步将产物产量提升了 20%。

4.2 辅因子供给优化

辅因子[如 ATP 和 NAD(P)H 等]作为代谢网络中不可或缺的“通用货币”, 在细胞工厂中承担着电子传递、能量耦联等关键角色。

作为 *M. extorquens* 菌株中甲醇代谢最为显著的瓶颈, 其通过丝氨酸循环进行甲醛同化的途径在 3 种天然甲醇利用途径中的能耗最高, 每合成 1 分子丙酮酸需要消耗 2 分子还原力和 2 分子 ATP^[68]。如利用 *M. extorquens* 细胞工厂生产需要消耗还原力的化学品时, 菌株自身的基础代谢会与产物合成竞争辅因子, 进而限制产物产量。通过引入外源高效同化路径或激活自身潜在辅因子供给途径能够实现产物产量的提升。Yuan 等^[27]通过将能量效率更高的异源 RuMP 途径引入 *M. extorquens* AM1 中, 菌株中的 NADPH 含量提高了 1.3 倍, 产物 3-羟基丙酸产量提高了 3.1 倍。*M. extorquens* AM1 基因组中存在一个天然光合作用的基因簇, 编码不产氧光合系统 II。Ma 等^[67]通过失活菌株中的负调控因子(PpsR)激活了光合作用系统, 显著提升了胞内 ATP 水平, 进而提高了 3-羟基丙酸的产量(表 5)。Mo 等^[39]通过适应性进化获得了高耐受甲酸、甲醛的 *M. extorquens* AM1 突变菌株; 以甲酸和甲醇混合碳源作为底物, 胞内 NADH 和 NADPH 的浓度分别比在甲醇上生长的菌株高出 2.29 倍和 2.35 倍; 以混合碳源进行的 3 L 发酵罐水平分批补料发酵结果表明, 3-羟基丙酸的最高产量达到了 2.47 g/L(表 5)。甲酸经由 *M. extorquens* AM1 的代谢可生成 NAD(P)H, 因此可用于在细胞工厂为产物的合成提供还原力。Cui 等^[92]通过在甲羟戊酸积累阶段添加 10 mmol/L 甲酸钠, 甲羟戊酸产率提高了 64.57%。Zhang 等^[52]利用甲酸钠和甲醇混合物作为原料, 菌株生物量和甲醇消耗量均高于仅以甲醇为碳源的对照组, D-乳酸浓度约提高了 50%。I 型甲基营养菌的 RuMP 途径耦合非氧化性磷酸戊糖途径

及糖酵解途径时, 每生成 1 分子乙酰辅酶 A, 会产生 1 分子 ATP 和 2 分子 NADH, 相较于丝氨酸循环具有明显的还原力和能量合成上的优势^[27]。

4.3 提升菌株产物耐受和消除产物再利用

提升细胞工厂对产物的耐受性并消除菌株对目标产物的再利用是实现产物高效生产的重要保障。Hu 等^[86]通过适应性实验室进化获得了对 1-丁醇耐受性增强的突变菌株(表 5)。Pöschel 等^[87]获得了一株二羧酸摄入缺陷型 *M. extorquens* AM1 突变体, 其 2-甲基琥珀酸的摄取显著减少, 中康酸的摄取则被完全阻止, 相应产物产量分别达到了 104 mg/L 和 85 mg/L; 此外, 在利用该菌株合成甲基苹果酸时, 相较于野生型菌株, 转运缺陷型菌株的产物产量提高了 1.4 倍(表 5)。Yang 等^[41]构建了基于 *M. extorquens* AM1 的 3-羟基丙酸合成菌株, 代谢组学分析和 ¹³C 标记实验结果表明, 菌株中存在一条还原性途径可对产物进行再利用; 通过敲除编码丙烯酸辅酶 A 还原酶的基因(*METAI_4251*), 显著降低了 3-羟基丙酸的降解速率从而增加了产物的积累。

4.4 培养基与发酵过程优化

菌株发酵是实现 *M. extorquens* AM1 细胞工厂目标产物高效生产的重要环节之一。作为一碳同化的模式菌株, 其培养基组成需兼顾其独特的甲基营养代谢特征与产物合成需求。

Van Woudenberg 等^[24]研究表明, 培养基中的锰离子和铁离子会促进产物间苯三酚的氧化聚合。通过降低培养基中锰离子浓度, 将间苯三酚的产量提高了 1.7 倍(表 5)。Orita 等^[29]通过降低培养基中的 Co^{2+} 浓度, 提升了 PHA 中的 (R)-3-羟基戊酸的比例。为了解决 *M. extorquens* AM1 工程菌株在传统培养基中的生长及甲羟戊酸产量不稳定问题, Cui 等^[77]开发了优化的培养基, 其中含有更高浓度的磷酸盐缓冲液和较低浓度的微量元素, 利用该培养基可显著稳定工

程菌株的生长。针对产物(尤其是还原性化学品)合成对能量与还原力的高需求, 两阶段发酵已成为一项被广泛验证的有效策略。第一阶段以细胞生长为主, 而在第二阶段使碳流最大程度地转向产物合成。Rohde 等^[32]在利用 *M. extorquens* AM1 于发酵罐水平生产 2-HIBA 过程中, 首先将菌株于氮源充足条件下培养以积累菌体, 而后在氮源消耗后随即进入产物合成的第二阶段。此外, 利用 *M. extorquens* AM1 合成 α -萜草烯的研究表明, 相关基因的组成型表达对菌株的生长具有严重的负面影响。为克服这一问题, Sonntag 等^[42]进行了两阶段分批补料发酵, 首先, 将菌株培养至 $\text{OD}_{600}=5-10$, 而后用 4-异丙基苯甲酸诱导产物合成代谢途径相关基因的表达, 实现了 α -萜草烯的高产(表 5)。

5 总结与展望

甲醇因来源广泛、价格低廉、运输存储便捷等优势, 展现出了成为传统生物制造原料替代品的巨大潜力。在此背景下, 开发高效的以甲醇为原料的细胞工厂是实现甲醇生物制造的关键, 也是助力我国“双碳”目标顺利实现的潜在有效措施^[5]。随着合成生物学技术的不断发展和人们对 *M. extorquens* AM1 以甲醇为唯一碳源时独特生理和代谢特征理解的不断加深, 其在重组蛋白、有机酸和萜类化合物的生物制造中展现出极大的应用潜力。因此, 高性能细胞工厂构建和应用研究成为目前的热点方向。

包括同源重组和 Cre/loxP 系统等在内的基因编辑技术为基于 *M. extorquens* AM1 的细胞工厂的构建提供了底层技术支撑。然而, 仍然存在操作周期长、编辑效率低、大片段基因组整合困难等诸多问题。作为目前最具变革性的遗传操作技术之一, CRISPR 系统凭借其设计简便、操作灵活、靶向精准等优势, 已迅速超越传统基因编辑工具。同时, 多样化的 Cas 效应蛋白不断被发现和改造, 进一步拓展了该系统的应用边界^[93]。尽管 Mo 等^[59]已在该菌株

中建立了 CRISPRi 系统用于基因转录调控, 但应用 CRISPR 系统介导基因编辑的研究尚未见报道。因此, 未来研究应着力于开发适配 *M. extorquens* AM1 的更高效、更精准的 CRISPR 衍生工具, 如 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1 系统、碱基编辑器^[94]及 IS110 系统^[95]等更为先进的技术, 为构建异源代谢途径提供新的策略, 进而缩短复杂代谢工程改造的周期, 提升菌株迭代效率。随着人工智能技术的飞速发展, 深度学习模型在高效基因编辑蛋白方面展现出了巨大潜力。在前期研究中, 本课题组开发了用于筛选和改造 Cas9 蛋白的深度学习模型 CasMiner 并成功挖掘了能够在水稻和玉米中实现高效基因编辑的新型 Cas9 蛋白^[96], 该工具在后续研究中将助力适配 *M. extorquens* 的 CRISPR 基因编辑系统开发。

当 *M. extorquens* 菌株以甲醇为碳源和能量源生长时, 为缓解甲醇氧化过程中产生的具有生理毒性的甲醛对细胞的损伤并获取还原力和能量, 84% 的甲醇将被氧化为 CO₂, 从而造成大量碳损失^[91]。相较于 *M. extorquens* 内源甲醇代谢途径丝氨酸循环, RuMP 途径虽然具有明显的还原力和能量合成优势, 但同样也会导致 30% 的碳损失。已有研究在 *M. extorquens* 中建立了基于卡尔文循环的 CO₂ 再利用途径, 但其效率低下, 并不能满足高效碳回收的目的^[91]。本课题组在前期针对天然一碳化合物利用菌株的研究中解析了基于代谢途径重构的卡尔文循环途径强化机制^[97]。在后续研究中将该机制与 *M. extorquens* 菌株中的碳回收途径相结合将有望显著提升菌株碳利用效率。虽然自然界微生物中存在着丰富的甲醇代谢途径, 为甲醇利用效率提升的 *M. extorquens* AM1 菌株的构建提供了参考^[27]。然而, 这些天然途径存在诸如速率慢、碳利用效率低等短板。为弥补天然途径的不足, 已有多种人工甲醇同化途径被开发出来, 如甲醇缩合循环(methanol condensation cycle, MCC)、甲醛酶途径(formolase pathway, FLS)和合成乙酰辅酶

A 途径(synthetic acetyl-CoA pathway, SACA)等^[98]。在未来研究中, 可将人工途径和 *M. extorquens* AM1 内源丝氨酸循环相结合重构成双途径甲醇同化过程。同时, 结合实验室适应性进化来克服外源途径的引入给菌株造成的代谢压力, 提高合成途径与底盘菌株之间的兼容性^[99]。

甲醇脱氢酶催化甲醇生成甲醛的性能和热力学特性较差是制约甲基营养菌工业化应用的因素之一^[68]。作为甲醇同化途径的关键酶, *M. extorquens* AM1 进行甲醇同化所利用的 PQQ 依赖型甲醇脱氢酶的催化效率存在劣势, 且该步骤需至少 25 个基因的参与^[100], 限制了菌株的甲醇利用速率。在前期研究中, 本课题组开发了人工智能驱动的酶蛋白大规模筛选、从头设计模型^[101-102]。利用该类工具, 高效的甲醇同化途径关键酶将不断被挖掘出来, 并基于此催生更具碳转化效率与热力学优势的人工转化途径, 为高效甲醇利用的 *M. extorquens* AM1 底盘菌株的构建带来了新机遇。与此同时, 基因组规模代谢模型已被应用于预测 *M. extorquens* AM1 代谢过程并指导对其工程改造, 大幅提升了细胞工厂优化的精准性^[27,67]。通过利用人工智能整合化学合成逻辑与细胞系统生物学知识, 利用基于多组学数据训练的大型语言模型, 进而生成细胞功能的层级化表征, 模拟细胞整体的物质和能量转化, 为实现智能、动态的代谢通路重建描绘路线图, 将为 *M. extorquens* 的代谢工程改造提供理论支撑^[103]。

甲醇的还原态低于葡萄糖, 氧化 1 g 甲醇需消耗高达 0.85 g 的氧气^[11]。这就导致高密度菌体培养的高耗氧与高产热问题对发酵设备的供氧及冷却能力要求更高, 运行成本也相对增加, 进而成为 *M. extorquens* 细胞工厂工业化应用的限制性因素。为了克服上述缺陷, 可对搅拌桨设计进行优化、增加通气量和提高罐压, 同时, 维持发酵液中稳定但较低的甲醇浓度。在菌株的代谢工程改造方面, 可开发甲醇和木糖等底物的共利用底盘菌株, 以降低甲醇氧化供能的

占比,从而降低总体耗氧量^[104]。此外,还可通过在菌株内过表达如透明颤菌属(*Vitreoscilla*)等来源的血红蛋白来提升菌株对氧气的利用能力^[105]。

合成生物学技术的快速发展和对菌株代谢特征认知的不断深入,将实现 *M. extorquens* AM1 的甲醇生物制造过程中诸多局限的突破,在提高底盘菌株碳利用效率的同时强化化学品生产。目前,以 *M. extorquens* AM1 为细胞工厂的产物合成研究主要集中于以 PHB 合成途径、乙基丙二酰辅酶 A 途径等中的中间代谢物为前体的相关合成途径。碳水化合物及其衍生物的合成主要以糖酵解途径中的中间代谢物为前体,其作为多种产品(包括食品、药品和特种化学品)的原料,应用场景日益扩展^[23]。理论上, *M. extorquens* AM1 能够提供充足的碳水化合物合成前体物质,例如糖-6-磷酸和葡萄糖-6-磷酸等。课题组在前期研究中对基于 *M. extorquens* 细胞工厂的饲用活性物质合成进行了探索。目前已成功实现了基于甲醇原料的肌醇、N-乙酰氨基葡萄糖等多种产物的合成。在未来的研究中,可进一步拓宽产物类别,不断拓展 *M. extorquens* AM1 细胞工厂的应用领域边界。

合成生物学技术突破的协同演进将铸就甲醇生物制造的创新基石,推动 *M. extorquens* AM1 细胞工厂从实验室走向工业化生产应用,为实现我国“碳中和”与可持续发展目标提供新路径。

作者贡献声明

崔林:初稿撰写、修改和插图绘制;王晓雨:初稿撰写、表格和插图修改、文献检索;何洋:文献检索和整理;姚斌:参与综述主题的选择并提供了该领域内的专业见解和建议;罗会颖:负责综述主题选择、文章撰写和修订;王晓璐:文献分析,综述主题选择、文章撰写及修改。

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] 汪琪琦,刘雪松,张燕飞,杜立.生物制造新食品原料产业化的机遇、挑战与监管驱动:以麦角硫因为例[J].合成生物学,2026,7(2):408-423.
Wang QQ, Liu XS, Zhang YF, Du L. Opportunities, challenges, and regulatory drivers for the commercial biomanufacturing of novel food ingredients: a case study of L-ergothioneine[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(2): 408-423 (in Chinese).
- [2] Clomburg JM, Crumbley AM, Gonzalez R. Industrial biomanufacturing: the future of chemical production[J]. Science, 2017, 355(6320): aag0804.
- [3] Orsi E, Nikel PI, Nielsen LK, Donati S. Synergistic investigation of natural and synthetic C1-trophic microorganisms to foster a circular carbon economy[J]. Nature Communications, 2023, 14: 6673.
- [4] 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.
- [5] Lee GM, Pham KN, Bang I, Ko S, Kim D. Integrated genomic and transcriptomic insights into methanol tolerance mechanisms in *Methylobacterium extorquens* AM1, identifying key targets for strain engineering[J]. Journal of Biological Engineering, 2025, 20(1): 2.
- [6] 陶雨莹,张尚杰,景艺文,信丰学,董维亮,周杰,蒋羽佳,章文明,姜岷.甲基营养型大肠杆菌构建策略的研究进展[J].化工进展,2021,40(7):3932-3941.
Tao YX, Zhang SJ, Jing YW, Xin FX, Dong WL, Zhou J, Jiang YJ, Zhang WM, Jiang M. Recent advances in the construction strategy of methylotrophic *Escherichia coli*[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2021, 40(7): 3932-3941 (in Chinese).
- [7] Pfeifenschneider J, Brautaset T, Wendisch VF. Methanol as carbon substrate in the bio-economy: metabolic engineering of aerobic methylotrophic bacteria for production of value-added chemicals[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2017, 11(4): 719-731.
- [8] Zhang QQ, Wang XL, Luo HY, Wang YR, Wang Y, Tu T, Qin X, Su XY, Huang HQ, Yao B, Bai YG, Zhang J. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for myo-inositol production by dynamic regulation of central metabolism[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 112.
- [9] Guo F, Dai ZX, Peng WF, Zhang SJ, Zhou J, Ma JF, Dong WL, Xin FX, Zhang WM, Jiang M. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for malic acid production from methanol[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(1): 357-371.
- [10] Govindaraju A, Good NM, Zytynick AM, Martinez-Gomez NC. Employing methylotrophs for a green economy: one-carbon to fuel them all and through metabolism redesign them[J]. Current Opinion in Microbiology, 2022, 67: 102145.
- [11] Schrader J, Schilling M, Holtmann D, Sell D, Filho MV, Marx A, Vorholt JA. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(2): 107-115.

- [12] Ochsner AM, Sonntag F, Buchhaupt M, Schrader J, Vorholt JA. *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(2): 517-534.
- [13] Feng J, Ma D, Gao SY, Liao Y, Feng J, Xu S, Wang X, Chen KQ. Recent advances in engineering heterotrophic microorganisms for reinforcing CO₂ fixation based on Calvin-Benson-Bassham cycle[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2023, 11(26): 9509-9522.
- [14] Zhang M, FitzGerald KA, Lidstrom ME. Identification of an upstream regulatory sequence that mediates the transcription of *mox* genes in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 11): 3723-3728.
- [15] 蔡鹏, 吴晓燕, 解林峰, 申益维, 高琳惠, 周雍进. 甲醇微生物转化最新进展[J]. 中国科学: 化学, 2024, 54(11): 2199-2218.
- Cai P, Wu XY, Xie LF, Shen YW, Gao LH, Zhou YJ. Advances in microbial bioconversion of methanol[J]. Scientia Sinica Chimica, 2024, 54(11): 2199-2218 (in Chinese).
- [16] 孙青, 刘德华, 陈振. 甲醇的生物利用与转化[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(10): 65-75.
- Sun Q, Liu DH, Chen Z. Research progress of methanol utilization and bioconversion[J]. China Biotechnology, 2020, 40(10): 65-75 (in Chinese).
- [17] Keltjens JT, Pol A, Reimann J, Op den Camp HJM. PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(14): 6163-6183.
- [18] Good NM, Vu HN, Suriano CJ, Subuyuj GA, Skovran E, Martinez-Gomez NC. Pyrroloquinoline quinone ethanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 extends lanthanide-dependent metabolism to multicarbon substrates[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(22): 3109-3118.
- [19] Vorholt JA. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(4): 239-249.
- [20] Park J, Heo Y, Jeon BW, Jung M, Kim YH, Lee HH, Roh SH. Structure of recombinant formate dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* (MeFDH1)[J]. Scientific Reports, 2024, 14: 3819.
- [21] Kalyuzhnaya MG, Lidstrom ME. QscR, a LysR-type transcriptional regulator and CbbR homolog, is involved in regulation of the serine cycle genes in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(4): 1229-1235.
- [22] 张韦, 宋中邦, 陈丽梅. 甲基营养微生物的甲醛代谢途径及其在环境生物技术中的应用[J]. 生命科学, 2012, 24(3): 266-273.
- Zhang W, Song ZB, Chen LM. Formaldehyde metabolic pathways in methylotroph and their applications in environmental biotechnology[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2012, 24(3): 266-273 (in Chinese).
- [23] Wang YH, Cui L, Ding LJ, Su XY, Luo HY, Huang HQ, Wang Y, Yao B, Zhang J, Wang XL. Unlocking the potential of *Cupriavidus necator* H16 as a platform for bioproducts production from carbon dioxide[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(12): 389.
- [24] Van Woudenberg BFJ, Elsayed SS, Schada von Borzyskowski L. Establishing and optimizing phloroglucinol biosynthesis from methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1 via strain engineering and medium optimization[J]. New Biotechnology, 2026, 94: 43-55.
- [25] Marx CJ, Lidstrom ME. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 8): 2065-2075.
- [26] Schada von Borzyskowski L, Remus-Emsermann M, Weishaupt R, Vorholt JA, Erb TJ. 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): 430-443.
- [27] Yuan XJ, Chen WJ, Ma ZX, Yuan QQ, Zhang M, He L, Mo XH, Zhang C, Zhang CT, Wang MY, Xing XH, Yang S. Rewiring the native methanol assimilation metabolism by incorporating the heterologous ribulose monophosphate cycle into *Methylobacterium extorquens*[J]. Metabolic Engineering, 2021, 64: 95-110.
- [28] Orita I, Unno G, Kato R, Fukui T. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate terpolymer from methanol via the reverse β -oxidation pathway in the presence of lanthanide[J]. Microorganisms, 2022, 10(1): 184.
- [29] Orita I, Nishikawa K, Nakamura S, Fukui T. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(8): 3715-3725.
- [30] Yoon J, Bae J, Kang S, Cho BK, Oh MK. Poly-3-hydroxybutyrate production in acetate minimal medium using engineered *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Bioresource Technology, 2022, 353: 127127.
- [31] Chubiz LM, Purswani J, Carroll SM, Marx CJ. A novel pair of inducible expression vectors for use in *Methylobacterium extorquens*[J]. BMC Research Notes, 2013, 6: 183.
- [32] Rohde MT, Tischer S, Harms H, Rohwerder T. Production of 2-hydroxyisobutyric acid from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 expressing (R)-3-hydroxybutyryl coenzyme A-isomerizing enzymes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(3): e02622-16.
- [33] Quynh Le HT, Anh Mai DH, Na JG, Lee EY. Development of *Methylobacterium extorquens* AM1 as a promising platform strain for enhanced violacein production from co-utilization of methanol and acetate[J]. Metabolic Engineering, 2022, 72: 150-160.
- [34] Pöschel L, Gehr E, Buchhaupt M. A pBBR1-based vector with IncP group plasmid compatibility for *Methylobacterium extorquens*[J]. MicrobiologyOpen, 2022, 11(5): e1325.
- [35] Pinto UM, Pappas KM, Winans SC. The ABCs of plasmid replication and segregation[J]. Nature Reviews

- Microbiology, 2012, 10(11): 755-765.
- [36] Carrillo M, Wagner M, Petit F, Dransfeld A, Becker A, Erb TJ. Design and control of extrachromosomal elements in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(11): 2451-2456.
- [37] Xie LF, Yu W, Gao JQ, Wang HY, Zhou YJ. *Ogataea polymorpha* as a next-generation chassis for industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2024, 42(11): 1363-1378.
- [38] Ma ZX, Zhang M, Zhang CT, Zhang H, Mo XH, Xing XH, Yang S. Metabolomic analysis improves bioconversion of methanol to isobutanol in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(6): 2000413.
- [39] Mo XH, Zhao Y, Zhu L, Zhang CT, Liu Z, Ma ZX, Bao K, Yang S. Adaptively evolved *Methylobacterium extorquens* with enhanced formate tolerance and its application in 3-hydroxypropionic acid production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2025, 91(9): e0256024.
- [40] Hu B, Lidstrom ME. Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* AM1 for 1-butanol production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 156.
- [41] Yang YM, Chen WJ, Yang J, Zhou YM, Hu B, Zhang M, Zhu LP, Wang GY, Yang S. 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.
- [42] Sonntag F, Kroner C, Lubuta P, Peyraud R, Horst A, Buchhaupt M, Schrader J. Engineering *Methylobacterium extorquens* for *de novo* synthesis of the sesquiterpenoid α -humulene from methanol[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 32: 82-94.
- [43] Pöschel L, Gehr E, Jordan P, Sonntag F, Buchhaupt M. Expression of toxic genes in *Methylobacterium extorquens* with a tightly repressed, cumate-inducible promoter[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2023, 116(12): 1285-1294.
- [44] Sathesh-Prabu C, Ryu YS, Lee SK. Levulinic acid-inducible and tunable gene expression system for *Methylobacterium extorquens*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 797020.
- [45] Lim CK, Villada JC, Chalifour A, Duran MF, Lu HY, Lee PKH. Designing and engineering *Methylobacterium extorquens* AM1 for itaconic acid production[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1027.
- [46] Sathesh-Prabu C, Tiwari R, Kim D, Lee SK. Inducible and tunable gene expression systems for *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 18079.
- [47] Casaroli VC, Orita I, Katayama S, Yurimoto H, Sakai Y, Fukui T. Methylophilic bacterium-based molecular sensor for the detection of low concentrations of methanol[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 132(3): 247-252.
- [48] Tekucheva D, Poshekhontseva V, Fedorov D, Karpov M, Novikova L, Zamalutdinov A, Donova M. Pregnenolone bioproduction in engineered methylobacteria: design and elaboration[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(22): 10975.
- [49] Toyama H, Anthony C, Lidstrom ME. Construction of insertion and deletion *mx* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 166(1): 1-7.
- [50] Ueda S, Matsumoto S, Shimizu S, Yamane T. Transformation of a methylotrophic bacterium, *Methylobacterium extorquens*, with a broad-host-range plasmid by electroporation[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991, 646(1): 99-105.
- [51] Ledermann R, Strebel S, Kampik C, Fischer HM. Versatile vectors for efficient mutagenesis of *Bradyrhizobium diazoefficiens* and other *Alphaproteobacteria*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(9): 2791-2799.
- [52] Zhang H, Chen SS, Liu Z, Yang S, Wang Y, Xing XH, Zhang C. Engineering *Methylobacterium extorquens* for the biosynthesis of D-lactic acid from methanol[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2025, 13(32): 12946-12956.
- [53] Eroshenko N, Church GM. Mutants of Cre recombinase with improved accuracy[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2509.
- [54] Marx CJ, Lidstrom ME. Broad-host-range Cre-lox system for antibiotic marker recycling in Gram-negative bacteria[J]. *BioTechniques*, 2002, 33(5): 1062-1067.
- [55] Liang WF, Sun MY, Cui LY, Zhang C, Xing XH. Cre/loxP-mediated multicopy integration of the mevalonate operon into the genome of *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 185(3): 565-577.
- [56] Zhu LP, Song YZ, Ma SN, Yang S. Heterologous production of 3-hydroxypropionic acid in *Methylobacterium extorquens* by introducing the *mcr* gene via a multi-round chromosomal integration system based on Cre-lox71/lox66 and transposon[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 5.
- [57] Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(5): 865-891.
- [58] Marx CJ, O'Brien BN, Breezee J, Lidstrom ME. Novel methylotrophy genes of *Methylobacterium extorquens* AM1 identified by using transposon mutagenesis including a putative dihydromethanopterin reductase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(2): 669-673.
- [59] Mo XH, Zhang H, Wang TM, Zhang C, Zhang C, Xing XH, Yang S. 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.
- [60] Sheng JT, Guan YY, Wang JL, Liu X, Xu ZH, Chen YL, Wu FQ, Chen GQ. Modulating *IlvA* encoding threonine deaminase for balanced growth and PHB synthesis by *Halomonas* grown in rich nitrogen source[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2026, 14: 89-100.
- [61] Zhu L, Song S, Yang S. Gene repression using synthetic small regulatory RNA in *Methylobacterium extorquens*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(6): 1027-1035.

- 2861-2875.
- [62] Delaney NF, Kaczmarek ME, Ward LM, Swanson PK, Lee MC, Marx CJ. Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62957.
- [63] Choi YJ, Bourque D, Morel L, Groleau D, Míguez CB. Multicopy integration and expression of heterologous genes in *Methylobacterium extorquens* ATCC 55366[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 753-759.
- [64] Kabimoldayev I, Nguyen AD, Yang L, Park S, Lee EY, Kim D. Basics of genome-scale metabolic modeling and applications on C1-utilization[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(20): fny241.
- [65] Van Dien SJ, Lidstrom ME. Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C3 and C4 metabolism[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 78(3): 296-312.
- [66] Peyraud R, Schneider K, Kiefer P, Massou S, Vorholt JA, Portais JC. Genome-scale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. BMC Systems Biology, 2011, 5(1): 189.
- [67] Ma ZX, Feng CX, Song YZ, Sun J, Shao Y, Song SZ, Wan B, Zhang C, Fan H, Bao K, Yang S. Engineering photo-methylotrophic *Methylobacterium* for enhanced 3-hydroxypropionic acid production during non-growth stage fermentation[J]. Bioresource Technology, 2024, 393: 130104.
- [68] Sarwar A, Lee EY. Methanol-based biomanufacturing of fuels and chemicals using native and synthetic methylotrophs[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8(3): 396-415.
- [69] Huang J, Yu Z, Groom J, Cheng JF, Tarver A, Yoshikuni Y, Chistoserdova L. Rare earth element alcohol dehydrogenases widely occur among globally distributed, numerically abundant and environmentally important microbes[J]. The ISME Journal, 2019, 13(8): 2005-2017.
- [70] Karaseva T, Fedorov D, Baklagina S, Ponamareva O, Alferov S, Ekimova G, Abdullatypov A, Trubitsina L, Mustakhimov I. Isolation and characterization of homologically expressed methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 for the development of bioelectrocatalytic systems[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10337.
- [71] Phan UT, Jeon BW, Kim YH. Microbial engineering of *Methylobacterium extorquens* AM1 to enhance CO₂ conversion into formate[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 168: 110264.
- [72] Choi YJ, Gringorten JL, Bélanger L, Morel L, Bourque D, Masson L, Groleau D, Míguez CB. Production of an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* by the methylotroph *Methylobacterium extorquens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5178-5182.
- [73] Fitzgerald KA, Lidstrom ME. Overexpression of a heterologous protein, haloalkane dehalogenase, in a poly-β-hydroxybutyrate-deficient strain of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 81(3): 263-268.
- [74] Korotkova N, Lidstrom ME. Connection between poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis and growth on C(1) and C(2) compounds in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(3): 1038-1046.
- [75] Sonntag F, Buchhaupt M, Schrader J. Thioesterases for ethylmalonyl-CoA pathway derived dicarboxylic acid production in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(10): 4533-4544.
- [76] Zhu WL, Cui JY, Cui LY, Liang WF, Yang S, Zhang C, Xing XH. 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.
- [77] Cui LY, Liang WF, Zhu WL, Sun MY, Zhang C, Xing XH. Medium redesign for stable cultivation and high production of mevalonate by recombinant *Methylobacterium extorquens* AM1 with mevalonate synthetic pathway[J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 119: 67-73.
- [78] Hurt A, Bibik JD, Martinez-Gomez NC, Hamberger B. Engineering terpene production pathways in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Microorganisms, 2024, 12(3): 500.
- [79] Zhang ZX, Chen C, Yang F, Zeng YX, Sun PK, Liu P, Li XJ. Itaconate is a lysosomal inducer that promotes antibacterial innate immunity[J]. Molecular Cell, 2022, 82(15): 2844-2857.e10.
- [80] Frey M, Gohr ST, Köllner TG, Bathe U, Lackus ND, Padilla-Gonzalez F, Ro DK, O'Connor SE, Degenhardt J, Tissier A. Biosynthesis of biologically active terpenoids in the mint family (Lamiaceae)[J]. Natural Product Reports, 2025, 42(11): 1887-1908.
- [81] 李慧芝, 康振, 李江华, 周景文, 堵国成. 常压室温等离子体诱变扭脱甲基杆菌 AM1 高产吡咯喹啉酮[J]. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1145-1149.
- Li HZ, Kang Z, Li JH, Zhou JW, Du GC. Mutagenesis of *Methylobacterium extorquens* AM1 for increasing pyrroloquinoline quinone production by atmospheric and room temperature plasma[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(8): 1145-1149 (in Chinese).
- [82] Cui LY, Wang SS, Guan CG, Liang WF, Xue ZL, Zhang C, Xing XH. 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): 1700679.
- [83] Liang WF, Cui LY, Cui JY, Yu KW, Yang S, Wang TM, Guan CG, Zhang C, Xing XH. 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.
- [84] Sonntag F, Müller JEN, Kiefer P, Vorholt JA, Schrader J, Buchhaupt M. High-level production of ethylmalonyl-

- CoA pathway-derived dicarboxylic acids by *Methylobacterium extorquens* under cobalt-deficient conditions and by polyhydroxybutyrate negative strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(8): 3407-3419.
- [85] Pöschel L, Guevara-Martínez M, Hörnström D, van Maris AJA, Buchhaupt M. Engineering of thioesterase YciA from *Haemophilus influenzae* for production of carboxylic acids[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(20): 6219-6236.
- [86] Hu B, Yang YM, Beck DAC, Wang QW, Chen WJ, Yang J, Lidstrom ME, Yang S. Comprehensive molecular characterization of *Methylobacterium extorquens* AM1 adapted for 1-butanol tolerance[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 84.
- [87] Pöschel L, Gehr E, Buchhaupt M. Improvement of dicarboxylic acid production with *Methylobacterium extorquens* by reduction of product reuptake[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(19): 6713-6731.
- [88] 汪淑贤, 方嘉煜, 张延平, 李寅, 朱泰承. 天然甲醇化学品细胞工厂改造进展与展望[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(8): 2747-2760.
- Wang SX, Fang JY, Zhang YP, Li Y, Zhu TC. Progress and perspectives of natural cell factories for chemical production from methanol[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(8): 2747-2760 (in Chinese).
- [89] Belkhelfa S, Roche D, Dubois I, Berger A, Delmas VA, Cattolico L, Perret A, Labadie K, Perdereau AC, Darii E, Pateau E, de Berardinis V, Salanoubat M, Bouzon M, Döring V. Continuous culture adaptation of *Methylobacterium extorquens* AM1 and TK 0001 to very high methanol concentrations[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1313.
- [90] Chiba T, Fukui T, Orita I. Adaptive laboratory evolution of *Methylobacterium extorquens* for lanthanide-dependent robust growth under high concentrations of methanol[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2026, 142(3): 262-269.
- [91] Schada von Borzyskowski L, Carrillo M, Leupold S, Glatter T, Kiefer P, Weishaupt R, Heinemann M, Erb TJ. An engineered Calvin-Benson-Bassham cycle for carbon dioxide fixation in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 423-433.
- [92] Cui LY, Yang J, Liang WF, Yang S, Zhang C, Xing XH. Sodium formate redirects carbon flux and enhances heterologous mevalonate production in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *Biotechnology Journal*, 2023, 18(2): 2200402.
- [93] Huang HC, Wu LF, Liu K, Ma BG. Opto-CRISPR new prospects for gene editing and regulation[J]. *Trends in Biotechnology*, 2026, 44(1): 22-39.
- [94] Hu JC, Sun Y, Li BS, Liu Z, Wang ZW, Gao Q, Guo MY, Liu GW, Zhao KT, Gao CX. Strand-preferred base editing of organellar and nuclear genomes using CyDENT[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(6): 936-945.
- [95] Hiraizumi M, Perry NT, Durrant MG, Soma T, Nagahata N, Okazaki S, Athukoralage JS, Isayama Y, Pai JJ, Pawluk A, Konermann S, Yamashita K, Hsu PD, Nishimasu H. Structural mechanism of bridge RNA-guided recombination[J]. *Nature*, 2024, 630(8018): 994-1002.
- [96] Xu GS, Li SZ, Li HY, Ren XP, Ding YK, Pang XL, Liu X, Tang QL, Tu T, Wang Y, Luo HY, Yao B, Tian J, Chen RM, Guan FF. CasMiner: a deep-learning tool for high-throughput mining and rational design of efficient Cas9[J]. *National Science Review*, 2026, 13(6): nwag090.
- [97] Ding LJ, Cui L, Wang YH, Dronsella B, Liu X, Luo HY, Huang HQ, Su XY, Bai YG, Zhang J, Tu T, Qin X, Wang Y, Wang YR, Yao B, Xue XL, Guo G, Wang XL. Fructose metabolism in Entner-Doudoroff pathway-deficient *Cupriavidus necator* H16 depends on the Calvin shunt[J]. *Microbiological Research*, 2025, 298: 128222.
- [98] Yang X, Zhang YF, Zhao GP. Artificial carbon assimilation: from unnatural reactions and pathways to synthetic autotrophic systems[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 70: 108294.
- [99] Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, Palsson BO, Feist AM. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 1-16.
- [100] Zhang M, Lidstrom ME. Promoters and transcripts for genes involved in methanol oxidation in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 4): 1033-1040.
- [101] Ding ZD, Xu GS, Miao RJ, Wu NF, Zhang W, Yao B, Guan FF, Huang HQ, Tian J. Rational redesign of thermophilic PET hydrolase LCCICCG to enhance hydrolysis of high crystallinity polyethylene terephthalates[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 453: 131386.
- [102] Wu SN, Xu GS, Su YP, Huang HQ, Xu XX, Zhang YH, Tian J, Zhang W, Zhang ZW, Liu B. Mining and rational design of psychrophilic catalases using metagenomics and deep learning models[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 31.
- [103] Zheng JB, Xu XY, Yang QR, Dong NQ, Li SZ. Artificial intelligence revolutionizes cellular metabolic pathway reconstruction[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2026, 51(4): 316-319.
- [104] Li YX, Zhai XX, Yu W, Feng D, Ali Shah A, Gao JQ, Zhou YJ. Production of free fatty acids from various carbon sources by *Ogataea polymorpha*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 78.
- [105] Tang RH, Weng CH, Peng XW, Han YJ. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* H16 for improved chemoautotrophic growth and PHB production under oxygen-limiting conditions[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 11-23.