



甲醇芽孢杆菌：下一代工业生物技术的新型底盘

刘盼¹, 毕亚宁^{1,2}, 王钰^{1*}

1. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308;

2. 天津科技大学, 生物工程学院, 天津 300457

* 联系人, E-mail: wang_y@tib.cas.cn

收稿日期: 2024-01-12; 接受日期: 2024-03-06; 网络版发表日期: 2024-05-28

中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDC0110201)、国家自然科学基金(批准号: 32222004、32070083)和中国科学院青年创新促进会(批准号: 2021177)资助

摘要 甲醇是绿色生物制造的新一代非粮可再生原料, 具有来源丰富、价格低廉、能量密度高等优势. 甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)是一种革兰氏阳性、嗜热的兼性甲基营养细菌, 通过烟酰胺腺嘌呤双核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)依赖型甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, Mdh)和核酮糖单磷酸循环(ribulose monophosphate, RuMP)同化甲醇, 能够在50°C~55°C条件下利用甲醇快速生长并合成包括L-谷氨酸和L-赖氨酸在内的多种高附加值产品, 是下一代工业生物技术的新型底盘. *B. methanolicus*模式菌株MGA3的基因组、转录组、蛋白组和代谢组等组学信息已被解析, 为了解其遗传代谢特征, 进行代谢工程改造奠定基础. 但是, 相比于大肠杆菌等模式微生物底盘, *B. methanolicus*的基因编辑和调控使能技术较为落后. 本文总结了*B. methanolicus*的遗传和生理特征、可用的基因表达元件和工具, 以及生物合成应用进展, 讨论亟需突破的研究方向, 展望了*B. methanolicus*在工业生物技术中的应用前景.

关键词 甲醇芽孢杆菌, 甲醇, 下一代工业生物技术, 生物制造, 基因编辑

利用生物技术生产燃料和化学品替代石油衍生产物, 能够显著降低碳排放, 助力工业生产向低碳转型^[1]. 但目前工业生物制造主要使用来自农作物的糖质原料作为碳源, 存在“与人争地、争粮”的潜在风险. 开发使用一碳底物等非粮原料进行化学品生物制造的可能性引起科研界和产业界的广泛兴趣^[2]. 甲醇是煤炭化工、页岩气化工和工农业废弃物气化的初级平台产品, CO₂氢化或电还原制备甲醇的工艺也日渐成熟^[3]. 近年来我国甲醇产能持续增长, 已超8300万吨/年, 占国际总量59%^[4]. 从工农业废弃物和CO₂生产甲醇使得

其具有可再生资源的属性^[5]. 此外, 甲醇的生产不受季节变化和天气条件的影响, 这与大多数农业来源的原料形成鲜明对比, 是非常重要的优势. 甲醇的平均还原度高于葡萄糖等底物, 这意味着它具有更高的能量密度, 可以提高生物合成的转化率^[6]. 最后, 由于甲醇易挥发, 发酵产物中残留的甲醇可以很容易地从产品中去除, 这对于降低生物产品下游加工成本至关重要^[6,7]. 这些特点使得甲醇成为生物制造中粮食原料的理想替代. 研究甲醇生物转化技术, 发展基于甲醇的生物制造产业, 将成为解决生物制造原料供应瓶颈的突

引用格式: 刘盼, 毕亚宁, 王钰. 甲醇芽孢杆菌: 下一代工业生物技术的新型底盘. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1159–1172

Liu P, Bi Y N, Wang Y. *Bacillus methanolicus*: a novel microbial chassis for next-generation industrial biotechnology (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 1159–1172, doi: 10.1360/SSV-2023-0212

破口^[2].

目前生物制造常用的工业微生物底盘, 如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等, 具有清晰的遗传背景, 成熟的基因编辑等使能技术等优势, 已广泛用于众多生物燃料、材料、化学品的生物制造. 但是, 这些工业微生物底盘不能利用甲醇作为碳源. 虽然经过代谢改造和适应性进化, 研究者已经成功构建获得人工甲基营养菌株^[8~10]. 然而, 甲醇同化途径的引入增加非天然甲基营养菌株代谢负荷, 造成甲醇利用速度慢, 生物合成效率较低, 不能满足工业需求^[11]. 此外, 这些常用的工业微生物底盘的最适生长温度是30℃~37℃, 具有较高的发酵污染风险和温控成本. 甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)是一种天然甲基营养细菌, 能够在50℃下高效利用甲醇进行生长^[12], 是甲醇生物转化的理想底盘.

“下一代工业生物技术”是一种高效率生物制造技术, 其核心是利用生长环境或原料特殊的极端微生物作为底盘细胞, 建立开放、无灭菌的连续发酵生产体系, 具有能耗低、生产效率高等优势^[13]. 目前应用开发比较成熟的下一代工业生物技术微生物底盘是嗜盐微生物盐单胞菌(*Halomonas*). 其可以在开放的、未灭菌的条件下进行生物合成, 甚至利用海水培养基进行连续开放发酵, 积累聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHA) 等生物基产品^[13]. *B. methanolicus*同样具有下一代工业生物技术所需微生物底盘的许多特征. 首先, 它是一种嗜热微生物, 能够耐受50℃以上高温; 其次, 它也能够适应低成本的海水培养基, 生长速度和生物量与使用去离子水制备的培养基相当; 最后, 它能够高效利用甲醇作为唯一碳源进行物质合成^[14]. 随着近年来在遗传特征分析、遗传工具开发以及代谢工程改造等方面的研究不断深入和拓展^[15~17], *B. methanolicus*将在甲醇生物代谢与转化研究中发挥关键作用, 成为甲醇生物经济和下一代工业生物技术的重要微生物底盘.

1 甲醇芽孢杆菌的发现与特性

*B. methanolicus*是一种能够利用甲醇等一碳化合物作为唯一碳源和能源进行生长的甲基营养细菌^[18]. *B. methanolicus*菌株主要分离自土壤、废水处理系统

和火山温泉样品中, 细胞呈杆状, 可形成椭圆形的内生孢子, 但在50℃以上温度下, 其孢子萌发能力较差^[12]. 1974年, Snedecor等人^[19]首次报道能够利用甲醇为唯一碳源生长的混合培养物, 随后的十几年内更多甲基营养细菌被分离出来^[20~22]. 其中一些菌株最初被归类为短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*), 到1992年被重新归类为*B. methanolicus*^[14]. *B. methanolicus*是一种兼性甲基营养细菌, 除了利用甲醇外, 还能利用数量有限的替代碳源, 包括甘露醇、葡萄糖和阿拉伯醇等^[12,23,24]. *B. methanolicus*利用甘露醇和甲醇的生长速率较快, 但利用葡萄糖和阿拉伯醇生长较慢^[12,23,24]. *B. methanolicus*对甲醇的耐受是诱导型的, 需要首先在低浓度的甲醇中进行预培养^[25]. 模式菌株*B. methanolicus* MGA3在含有甲醇的最低限度维生素培养基(minimal vitamin, MV)中的最大生长速率为0.48/h, 在补充0.5 g/L酵母粉时则达到0.8/h; 但在37℃时, 其最大生长速率仅为50℃时的一半^[12]. 除了温度, 初始甲醇浓度也是影响菌体生长的因素之一. 在Bozdag等人^[26]的研究中, 当甲醇浓度为10~25 mmol/L时, MGA3菌株的生长速率达到最大值, 约为0.65/h, 而当甲醇浓度超过25 mmol/L时, 生长速率随着甲醇浓度升高而下降, 在2 mol/L时降至0.23/h^[26]. 而相同条件下, MGA3菌株利用甘露醇和葡萄糖的生长速率则不受底物浓度影响, 分别为0.53/h和0.34/h^[26]. MGA3菌株在含有0.048 g/L酵母粉的MV培养基中利用阿拉伯醇的生长速率为0.15/h, 相同条件下利用甲醇和甘露醇的生长速率分别为0.46/h 和0.36/h^[24].

除能够利用甲醇, *B. methanolicus*还是一种嗜热的革兰氏阳性需氧细菌, 能够在35℃~60℃的温度下生长, 但最适生长温度为50℃~55℃. 高温培养在生物生产过程中往往是有利的. 首先, 由于甲醇本身的毒性以及能够利用甲醇的微生物较少, 结合高温培养条件能够大大降低发酵污染风险^[27], 从而减少因控制污染带来的高额成本和环境负担. 其次, 微生物的代谢活动不断产生热量, 为将发酵系统控制在最适生长温度范围内, 需要用冷却水降温. 因此, 与中温条件(30℃~37℃)相比, 较高的生长温度使得需要使用的冷却水显著减少, 从而降低相关成本^[28,29]. 另外, 高温能够提高生物过程部分酶的催化活性从而提高生物转化效率, 大大缩短发酵时间^[18,30,31]. 基于这些优势, *B. methanolicus*成为有机一碳化合物的生物代谢和转化

研究中非常重要的一种底盘宿主。

1992年, Arfman等人^[14]分离出菌株*B. methanolicus* PB1, 其作为模式菌株被英国工业、食品与海洋细菌保藏中心(National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria, NCIMB)保藏(NCIMB 13113)。该菌株能够在100%海水的甲醇培养基中生长, 表现出与在去离子水培养基中相似的生物量和生长速率^[32]。研究发现, 大多数*B. methanolicus*可以在2%的氯化钠中生长, 但不能在5%的氯化钠中生长^[14,32]。*B. methanolicus*代谢利用甲醇、耐高温、适应低成本海水基质的这些特征, 使其成为下一代工业生物技术新型底盘的重要候选者(图1)。

2 甲醇芽孢杆菌的遗传特性

MGA3(ATCC 53907)和PB1(NCIMB 13113)菌株作为模式菌株受到广泛研究, 二者的基因组、转录组、蛋白组和代谢组等组学信息的解析为*B. methanolicus*的甲醇代谢机制研究和代谢工程改造提供重要基础^[15~17,33]。MGA3和PB1菌株的基因组大小为3.4 Mb, GC含量分别为38.5%和39.0%。MGA3菌株含有两个大小分别为69 kb和19 kb的质粒pBM69和pBM19, 而PB1菌株只含有一个大小为20 kb的质粒pBM20。pBM19和pBM20分别编码与甲醇代谢相关的甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, Mdh)基因*mdh*和核酮糖单磷酸(ribulose monophosphate, RuMP)循环途径基因, 而pBM69编码许多未知功能蛋白^[25,34]。去除pBM19的MGA3菌株不能利用甲醇生长, 但在甘露醇中的生长速率明显加快^[18], 目前还不清楚pBM20对PB1菌株的甲基营养生长是否是必需的。除磷酸核酮糖3-差向异构酶(ribulose-phosphate 3-epimerase, Rpe)基因外, pBM19和pBM20携带的基因都具有同源性, 但pBM20的磷酸果糖激酶(6-phosphofructokinase, Pfk)基因, 由于两个核苷酸插入引起移码突变以及伴随形成终止密码子而失去功能, 因此PB-1菌株需要招募染色体上的*pfk*基因补充RuMP途径所需的Pfk活性^[15]。Mdh催化甲醇氧化是*B. methanolicus*代谢甲醇的第一步, *mdh*基因最初是从*B. methanolicus* C1中克隆和鉴定的^[35]。在MGA3和PB1菌株中, 除质粒上携带的*mdh*基因外, 还有两个染色体基因拷贝^[15]。MGA3菌株染色体上的*mdh2*和*mdh3*基因编码的蛋白之间有96%的同源性, 与

pBM19上*mdh*编码的蛋白的同源性分别为61%和62%。菌株PB1质粒上*mdh*基因编码的Mdh与其染色体编码的两个Mdh分别有92%和59%的同源性, 与pBM19编码的Mdh有93%的同源性^[15]。Mdh全长约385个氨基酸, 其氨基酸序列与烟酰胺腺嘌呤双核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 依赖的III型醇脱氢酶相似, 不同于I型长链含锌酶和II型短链缺锌酶。Mdh催化活性需要一种Nudix水解酶家族的激活蛋白(activator protein, Act), 它通过参与释放结合的NAD(H)辅因子发挥作用^[36~38]。Mdh是十聚体蛋白, 其亚基分子量约为43 kD, 每个亚基包含一个非共价但紧密结合的NAD(H)辅因子、一个锌原子和一个或两个镁原子^[39]。加入纯化的Act蛋白可以使体外Mdh活性提高约40倍^[38]。在甲醇或者甘露醇营养条件下, MGA3细胞都维持较高的*mdh*转录水平^[25], Mdh可占细胞总蛋白的30%^[40], 这意味着*B. methanolicus*在不同的营养条件下保持着较高的氧化甲醇的能力。

甲醇在Mdh的氧化作用下转化为甲醛, 后者可通过四氢叶酸(tetrahydrofolate, THF)线性异化途径或者RuMP环化异化途径代谢(图2)^[41,42]。¹³C标记实验证明MGA3菌株将甲醛氧化为CO₂的线性异化途径^[43]。在*B. methanolicus*基因组中未发现甲醛脱氢酶基因, 但鉴定到甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, Fdh)基因及其辅助蛋白基因, 双功能亚甲基四氢叶酸脱氢酶/亚甲基四氢叶酸环水解酶(5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, Fdh)基因以及甲酸四氢叶酸连接酶(formate-tetrahydrofolate ligase, Fhs)基因(图2)^[15]。该途径广泛地分布在甲基营养细菌中, 除缓解甲醛毒性和产生能量外, 还为细胞中的生物合成反应提供重要的一碳单位^[44]。

在RuMP途径中(图2), 甲醛首先与5-磷酸核酮糖(ribulose-5-phosphate, Ru5P)在3-己糖-6-磷酸合成酶(3-hexulose-6-phosphate synthase, Hps)的作用下缩合形成6-磷酸己酮糖(hexulose-6-phosphate, H6P)。随后, H6P在6-磷酸-3-己糖异构酶(6-phospho-3-hexulose isomerase, Phi)的催化下进一步转化为6-磷酸果糖(fructose-6-phosphate, F6P)。F6P在磷酸果糖激酶(6-phosphofructokinase, Pfk)作用下转化为果糖-1,6-二磷酸(fructose-1,6-bisphosphate, FBP), 消耗一分子腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)。FBP通过果糖-1,6-二磷酸醛缩

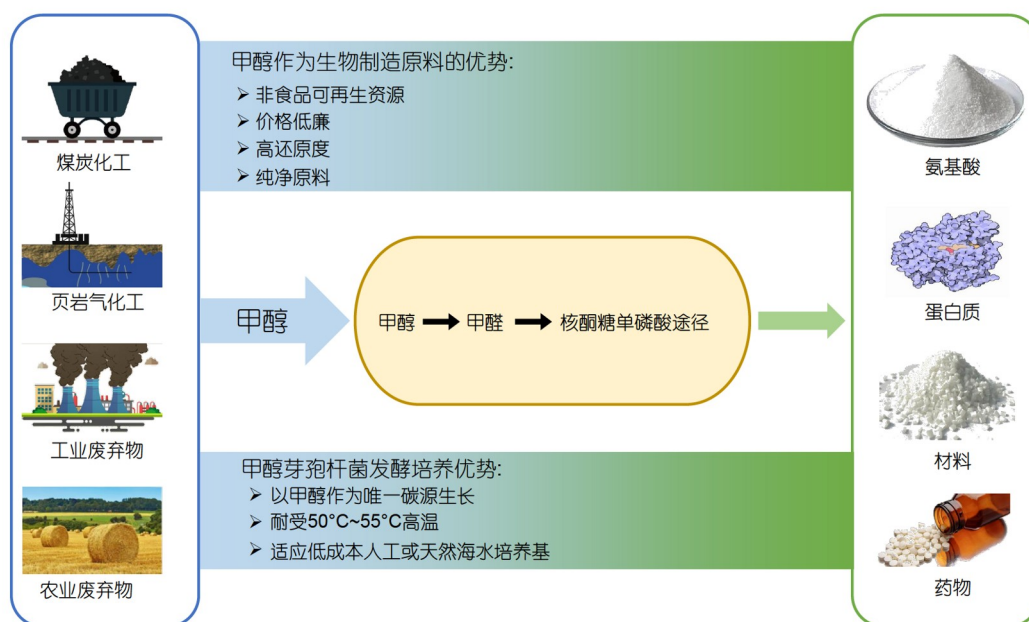


图 1 甲醇芽孢杆菌作为生物制造底盘的优势

Figure 1 Advantages of *Bacillus methanolicus* as a biomanufacturing chassis

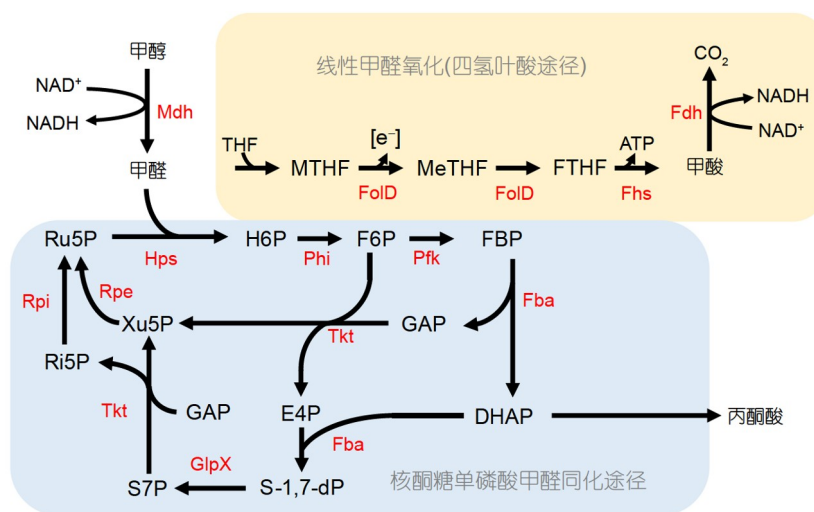


图 2 *B. methanolicus* 甲醇代谢示意图. MTHF, 亚甲基四氢叶酸; MeTHF, 甲基四氢叶酸; FTHF, 甲酸四氢叶酸

Figure 2 Schematic diagram of methanol metabolism pathway in *B. methanolicus*. MTHF, methylene tetrahydrofolate; MeTHF, methenyl tetrahydrofolate; FTHF, formate tetrahydrofolate

酶(fructosebisphosphate aldolase, Fba)裂解产生甘油醛-3-磷酸(glyceraldehyde-3-phosphate, GAP) 和磷酸二羟丙酮(dihydroxyacetone phosphate, DHAP). DHAP可通过糖酵解转化为丙酮酸, 生成一分子NAD(P)H和两分子ATP, 为细胞生命活动提供能量. GAP则通过再生途

径重新产生Ru5P: 在转酮酶(transketolase, Tkt) 催化下, GAP与F6P反应生成5-磷酸木酮糖(xylulose-5-phosphate, Xu5P) 和4-磷酸赤藓糖(erythrose-4-phosphate, E4P); E4P和DHAP在Fba作用下反应生产景天庚酮糖-1,7-二磷酸(sedoheptulose-1,7-bisphosphate, S-1,7-dP),

S-1,7-dP在双功能果糖二磷酸酶/七糖二磷酸酶(bifunctional fructose biphosphatase/sedoheptulose biphosphatase, GlpX)作用下生成7-磷酸景天庚酮糖(sedoheptulose-7-phosphate, S7P); S7P和GAP在醛缩酶的作用下生成Xu5P和5-磷酸核糖(ribose-5-phosphate, Ri5P). Xu5P和Ri5P分别在Rpe和5-磷酸核糖异构酶(ribose-5-phosphate isomerase, Rpi)的作用下再生Ru5P. 由于RuMP途径中GlpX催化的反应是放能的, 为Ru5P的再生提供驱动力, 所以RuMP途径具有较高的甲醛同化效率^[45].

非标记定量蛋白质组学分析显示, MGA3在不同温度(50℃和37℃)和不同碳源(甲醇和甘露醇)上生长时, 在检测的1000个蛋白质中, 分别有203和109个表达水平存在显著差异^[33]. 在生长温度比较中, 参与氨基酸代谢(29%)、辅因子/维生素代谢(20%)和脂肪代谢(11%)的蛋白质占显著差异蛋白质的一半以上; 而在碳源比较中, 差异蛋白主要参与中心代谢(33%)、氨基酸代谢(18%)和辅因子/维生素代谢(10%). 在甲醇上生长时, 除5-磷酸核糖异构酶Rpi外, RuMP循环途径蛋白表达上调. 此外, 在质粒和染色体上同时具有编码基因时, 只有质粒基因编码的蛋白表达上调, 这和转录组分析结果相符^[25], 说明pBM19携带基因对甲醇代谢的重要性. pBM19和染色体编码的一些同功酶也表现出酶学性质上的差异, 例如染色体编码的二磷酸酶GlpX^C是果糖-1,6-二磷酸酶, 而pBM19编码的GlpX^P主要作为七糖二磷酸酶发挥作用^[46]. 令人意外的是, 甲醛线性化途径的蛋白在菌株利用甲醇生长时没有上调, 而该途径被认为对于在甲醇上生长过程中的能量产生和甲醛解毒非常重要^[47]. 在代谢水平上, 不同生长速率下, *B. methanolicus*甲醇代谢产生的大部分胞内代谢物没有明显差异, 只有柠檬酸和磷酸烯醇式丙酮酸在低生长速率时处于较高水平^[25]. 而无论培养条件如何, FBP是*B. methanolicus*甲醇代谢最丰富的代谢物^[25]. 基因组、转录组、蛋白组和代谢组的变化可能有助于阐明促进或抑制生物合成步骤的因素, 深化对细胞代谢的理解, 为代谢工程提供菌株改良的思路.

3 甲醇芽孢杆菌的基因工具发展

为充分发挥*B. methanolicus*在工业生物技术中的潜在应用价值, 研究者致力于开发可用于该底盘的代

谢重编程工具方法. 首先, 有效的转化方法是进行代谢重编程的先决条件. 已报道的*B. methanolicus*的外源DNA转化方法包括原生质体法和电穿孔法. 原生质体法转化效率约为 10^5 cfu/ μ g DNA, 与许多革兰氏阳性细菌的转化效率相当, 但原生质体的制备十分繁琐, 难度较大^[48]. Jakobsen等人^[25,49]开发电穿孔方法, 虽然转化效率仅有 $10^3\sim10^4$ cfu/ μ g DNA, 但这是目前*B. methanolicus*中最常用的转化方法. 值得注意的是, *B. methanolicus*编码一种限制性内切酶BmeTI, 与BclI识别相同的序列(5'-TGATCA-3'). 菌株本身DNA的该位点被甲基化酶修饰为TGm6ATCA, 从而免受BmeTI限制性内切酶切^[50]. 因此, 通过使用缺乏BmeTI限制位点的质粒或者在外源DNA上引入甲基化修饰可以增加成功转化的概率^[48].

适用于*B. methanolicus*的质粒必须能够在高温条件下复制, 它们的复制起点一般包括: pUB110, pTHT15, pTA1060和pBS72等^[51]. 目前已经报道不同来源的用于*B. methanolicus*的质粒载体, 例如*E. coli*-枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)穿梭载体pHCMC04, pEN1和pHP13^[48,52], *E. coli*-嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)穿梭载体pNW33N^[53], 以及*E. coli*-金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)穿梭载体pUB110S^[54]等都被证明能够在*B. methanolicus* MGA3菌株中复制. pHP13衍生的质粒pTH1mp和pHCMC04衍生的质粒pBV2mp分别采用滚环式和 θ 型复制, 因此可以在*B. methanolicus*中兼容^[54]. 在质粒拷贝数方面, pUB110和pNW33N分别属于高拷贝和中拷贝质粒, 而pHCMC04和pHP13为低拷贝质粒^[54]. 此外, 以pUC18为骨架, 插入可能含有染色体复制起点(pmr-1)和pBM19复制起点的DNA片段构建的穿梭载体pDQ507和pDQ508被证明能够在*B. methanolicus*稳定存在(表1)^[48].

启动子是宿主有效表达异源蛋白所必需的元件. 使用来自质粒pBM19的可诱导的*mdh*基因启动子可使目标基因在*B. methanolicus* MGA3中的表达水平提高2~5倍^[46,55,56]. 一种巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)来源的木糖诱导启动子P_{xytA}被证明能够在*B. methanolicus*中起作用, 并具备严谨性和剂量效应^[54,57]. 由于*B. methanolicus*不具有木糖利用途径, 因此不存在宿主对诱导剂的代谢问题. Irla等人通过转录组测序分析鉴定到一个*B. methanolicus*内源的甘露醇诱导启动子

表 1 *B. methanolicus*的质粒载体

Table 1 Plasmid vectors for *B. methanolicus*

名称	复制子起源	拷贝数	物种来源	参考文献
pDQ507	pmr-1	低拷贝	<i>B. methanolicus</i>	[48]
pDQ508	pBM19	低拷贝	<i>B. methanolicus</i>	[48]
pEN1	—	—	<i>B. subtilis</i>	[48]
pHCMC04	pBS72	低拷贝(3±1)	<i>B. subtilis</i>	[54]
pHP13	pTA1060	低拷贝(5±1)	<i>B. subtilis</i>	[54]
pNW33N	pTHT15	中拷贝(19±2)	<i>G. stearothermophilus</i>	[54]
pUB110	pUSB110	高拷贝(25±1)	<i>S. aureus</i>	[54]

P_{mtlR} , 并通过-35区优化实现对基因的可控表达^[54]. 然而, 相比于其他常用微生物底盘, *B. methanolicus*的基因表达调控元件仍然相对匮乏. MGA3菌株转录组分析揭示其内源启动子和核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)的序列特征^[16]. 其中, 启动子-10区保守序列为TATAaT(大写字母代表序列保守性较高的序列), -35区为ttgana (序列保守性较低), 二者平均距离为16.6 bp, -10区到转录起始位点的平均距离为6.7 bp. RBS的保守序列为aGGaGg, 到起始密码子的平均距离为7.4 bp. 研究者基于转录数据挖掘到一个赖氨酸核糖开关, 并成功用于基因表达调控; 同时, 还预测和验证10个不同强度的内源启动子, 为*B. methanolicus*的基因表达调控提供新的工具^[58]. 未来, 根据这些已报道的特征挖掘更多不同表达强度的内源启动子, 或者通过人工设计等方法构建人工启动子文库有望解决*B. methanolicus*基因表达调控元件不足的问题.

抗生素抗性基因和营养缺陷型是构建重组细胞最常用的选择标记, 目前仅报道抗生素抗性标记在*B. methanolicus*中的应用. 对于抗生素抗性标记, 需要考虑抗生素和抗药性机制的高温适用性^[59]. 通过定向进化或者高温筛选获得的耐受高温的抗生素抗性基因已被报道^[60,61]. 除氨苄青霉素在72℃下的半衰期仅为3.3 h, 卡那霉素、新霉素、氯霉素和红霉素等几种抗生素在高温下都足够稳定^[59], 其中新霉素、氯霉素和红霉素抗性标记在*B. methanolicus*中均被报道使用^[48]. 随着宏基因组学和极端环境微生物的不断勘探, 新的耐热抗生素和抗生素抗性基因将不断出现, 以满足嗜热微生物的重组细胞转化子筛选的需求^[62,63].

报告蛋白对于测试、开发和改进细菌表达系统非常重要. 由于生长温度较高, 许多用于其他细菌的传统

报告蛋白在*B. methanolicus*中无法使用或者效果不佳. 绿色荧光蛋白GFPuv被证明在*B. methanolicus* MGA3菌株中是有效的, 但只有当温度从50℃降低到40℃至少30 min, 蛋白质正确折叠并产生发色团后, 才能测量荧光^[53]. 比较有效的报告蛋白是来自凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)的耐热的β-半乳糖苷酶LacZ^[64], 其编码基因已经在MGA3菌株中成功表达, 用于蓝白斑筛选. 此外, 耐受70℃的GFP变体^[65]、耐受50℃的红色荧光蛋白mCherry^[66]以及来自*B. stearothermophilus*的耐热报告分子PheB^[67]均被报道, 是潜在*B. methanolicus*报告蛋白的候选者.

在工业生物生产中, 因为存在不稳定和抗生素依赖的问题, 质粒往往不被使用. 因此开发针对宿主染色体的基因编辑工具至关重要, 例如成簇规律间隔短回文重复序列/Cas蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas)系统, 以实现基因的敲入、敲除和表达调控. 目前还没有针对*B. methanolicus*的基因编辑技术被报道, 仅建立基于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)来源的dCas9(dead Cas9)的CRISPRi(CRISPR interference)系统, 可以实现基因的表达弱化^[68]. 但*S. pyogenes*的Cas9(SpCas9)在42℃以上就失去切割活性, 因此无法实现用于高温条件下的基因敲入或者敲除^[69]. 为解决该问题, Mougiakos等人^[69]在对高温史密斯芽孢杆菌(*Bacillus smithii*)进行基因编辑时, 首先在55℃条件下培养细胞, 使编辑模板与染色体DNA发生同源重组, 然后在37℃条件下培养细胞, 诱导SpCas9表达, 切割DNA, 杀死未发生同源重组的菌株, 实现反向筛选, 从而实现基因敲除和敲入^[69]. 这为开发*B. methanolicus*等嗜热菌株基因编辑工具提供思路. 此外, 该课

题组还表征嗜热脱氮土杆菌(*Geobacillus thermodenitrificans*)来源的热稳定Cas9(ThermoCas9)^[70], 发现它在20~70℃的较宽温度范围内均具有催化活性, 并开发在55℃下对*B. smithii*进行基因编辑的遗传工具^[71]. 但是CRISPR/Cas系统在不同宿主中表现出不同程度的毒性和DNA切割活性, 因此如何实现ThermoCas9在*B. methanolicus*中可控表达, 平衡细胞毒性和编辑效率, 是亟需开展的重要基础工作.

4 甲醇芽孢杆菌的甲醇代谢特性与化合物合成

甲基营养菌可以通过甲醇氧化还原酶将甲醇转化为甲醛, 然后同化甲醛用于合成细胞生物量^[72]. 根据电子受体的不同, 负责甲醇氧化的酶主要分为三类, 分别是吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)依赖型Mdh, 氧依赖型醇氧化酶(O_2 -dependent alcohol oxidase, Aod)以及NAD依赖型Mdh. PQQ依赖型Mdh存在于扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)等细菌中, 其催化反应的电子受体是细胞色素 c , 需要15个基因参与电子传递, 且产生的还原力难以直接用于化合物合成^[73]. 氧依赖型Aod主要存在于甲基营养型酵母中, 它能将甲醇转化为过氧化氢和甲醛, 该过程的质子利用效率较低. *B. methanolicus*利用NAD依赖型Mdh氧化甲醇, 该反应只需一个酶参与, 且辅因子经过还原后可形成NADH, 能够直接为生物合成提供还原力^[74]. 这是*B. methanolicus*利用甲醇进行化合物生产的一个优势.

甲醇利用的第二个关键模块是甲醛同化和异化. 甲醛在异化途径中被氧化为 CO_2 , 产生的质子为生物过程提供能量. 天然的甲醛同化途径包括三种, 分别是木酮糖单磷酸(xylulose monophosphate, XuMP)循环、丝氨酸循环和RuMP循环^[72]. XuMP循环和丝氨酸循环分别存在于甲基营养酵母和*M. extorquens*中, 而*B. methanolicus*则通过RuMP循环同化甲醛. 在这三种途径中, 丝氨酸循环的固碳效率最高, 可以固定3 mol CO_2 和3 mol 甲醛形成3 mol 乙酰辅酶A, 但它也是最耗能的途径, 每产生1 mol 乙酰辅酶A消耗2 mol 还原当量和2 mol ATP; 而XuMP循环每产生1 mol 乙酰辅酶A产生2 mol NADH, 但需要消耗1 mol ATP; 与其他两种途径相比, RuMP循环具有最高的能量效率,

每产生1 mol 乙酰辅酶A可产生2 mol NADH和1 mol ATP^[75].

此外, *B. methanolicus*的甲醇代谢是质粒依赖型的^[34], 质粒上代谢基因的多拷贝可能是*B. methanolicus*表现出较高的甲醇利用能力的另一个原因. *B. methanolicus*能够耐受高达2 mol/L浓度的甲醇, 在补料分批发酵中能够以约7 g L⁻¹ h⁻¹的速率消耗甲醇, 甲醇向细胞生物量的转化率可达到0.48 g/g^[12]. 因此, *B. methanolicus*被认为是一种极具前景的以甲醇为底物进行化合物合成的底盘细胞, 已被开发用于合成L-谷氨酸、L-赖氨酸、戊二胺、 γ -氨基丁酸、5-氨基戊酸、乙偶姻和萜类等多种高附加值化合物(表2)^[76].

*B. methanolicus*代谢甲醇产生丙酮酸, 丙酮酸在丙酮酸羧化酶的作用下产生草酰乙酸, 然后分流产生柠檬酸或者天冬氨酸, 分别进入L-谷氨酸和L-赖氨酸合成途径. 柠檬酸循环途径产生前体 α -酮戊二酸, 通过两条途径合成L-谷氨酸: 一是 α -酮戊二酸在L-谷氨酸脱氢酶 (glutamate synthase, GOGAT) 的还原性氨基化作用下生成L-谷氨酸; 二是谷氨酸合成酶催化从L-谷氨酰胺到 α -酮戊二酸的转氨反应, 生成两个分子L-谷氨酸^[49]. *B. methanolicus*只含有一个由yweB编码的L-谷氨酸脱氢酶, 其对L-谷氨酸、氨和 α -酮戊二酸的 K_m 值分别为250 mmol/L, 10 mmol/L和20 mmol/L, 因此推测主要催化L-谷氨酸的合成反应^[81]. *B. methanolicus*中gltAB和gltA2编码两个不同的GOGAT, 但同源性只有27%, 说明它们是独立进化的^[15]. 然而, α -酮二酸也可以通过经 α -酮戊二酸脱氢酶(2-oxoglutarate dehydrogenase, OGDH) 转化为TCA循环的下一个中间产物琥珀酸辅酶A. 野生型*B. methanolicus* MGA3具有较低的OGDH活性, 因此能够天然积累较多的L-谷氨酸, 50℃补料分批发酵的产量超过60 g/L^[15,82]. 相比之下, 尽管在遗传上非常相似, 但相同条件下*B. methanolicus* PB1的L-谷氨酸产量仅为1.6 g/L左右^[15]. *B. methanolicus* MGA3合成L-谷氨酸的生理意义是作为一种相容性溶质应对高盐环境的渗透胁迫, 两个L-谷氨酸合成酶基因在高盐胁迫下表达上调, 在含有0.5 mol/L NaCl或者KCl的培养基中L-谷氨酸的产量提高9倍, 而且在渗透胁迫条件下合成的L-谷氨酸大部分被排出胞外^[83].

另一方面, 碳流进入天冬氨酸分支后, 将合成L-赖氨酸、L-蛋氨酸和L-苏氨酸. 首先, 天冬氨酸在天冬氨酸激酶(aspartokinase, AK)的作用下磷酸化, 然后被天

表 2 *B. methanolicus*利用甲醇生物合成化学品

Table 2 Bioproduction of chemicals from methanol by *B. methanolicus*

产品	产量(g/L)	培养方式	参考文献
L-谷氨酸	69	补料分批发酵	[77]
L-赖氨酸	65	补料分批发酵	[77]
戊二胺	11.3	补料分批发酵	[78]
γ -氨基丁酸	9.0	补料分批发酵	[79]
(R)-乙偶因	0.42	补料分批发酵	[7]
5-氨基戊酸	0.02	摇瓶发酵	[80]
C30萜类化合物	0.024	摇瓶发酵	[76]

冬氨酸半醛脱氢酶氧化成天冬氨酸半醛, 天冬氨酸半醛或者在4-羟基-四氢二吡啶甲酸合成酶的作用下生成2,3,4,5-四氢二氢吡啶甲酸酯进入L-赖氨酸合成途径, 或者在高丝氨酸脱氢酶的作用下生成L-蛋氨酸和L-苏氨酸的前体高丝氨酸。L-赖氨酸合成途径的第一步AK和最后一步二氨基庚二酸脱羧酶被证明是提高*B. methanolicus*的L-赖氨酸产量的重要靶点^[84]。*B. methanolicus*中*dapG*, *lysC*和*yclM*三个基因各编码一种AK, 过表达三个基因分别能将L-赖氨酸的产量提高2、10和60倍^[31]。由*dapG*编码的AK的D375E突变体对二氨基庚二酸的反馈抑制不敏感, 该突变体的过表达能够使摇瓶中L-赖氨酸的产量增加17倍^[85]。此外, *B. methanolicus* NOA2的高丝氨酸营养缺陷型突变株能够产生37 g/L的L-赖氨酸, 但需要额外补充L-苏氨酸和L-蛋氨酸^[86]。高丝氨酸脱氢酶是将代谢流向副产物L-苏氨酸和L-蛋氨酸的关键节点, 高丝氨酸脱氢酶发生突变的菌株L-赖氨酸产量提高, 相反其过表达会导致L-赖氨酸产量降低^[77]。研究发现, 甲醇浓度过高不利于生物量和氨基酸积累, 通过控制甲醇浓度在150 mmol/L以内可以实现对*B. methanolicus*的高密度细胞培养, 从而提高产物产量^[77]。在此基础上, 使用L-赖氨酸类似物进行诱变筛选获得的*B. methanolicus* NOA2#13A52-8A66突变株能够生产65 g/L的L-赖氨酸^[77]。对突变菌株基因组分析发现, L-精氨酸、L-半胱氨酸等其他氨基酸生物合成途径中发生突变可能对L-赖氨酸积累是有益的^[87]。此外, 过表达*C. glutamicum*来源的L-赖氨酸外排蛋白被证明对于提高*B. methanolicus*菌株L-赖氨酸产量是有效的^[87]。

除了氨基酸, 最近代谢工程改造的*B. methanolicus* MGA3也被用于生产多种化学品。通过在*B. methanoli-*

cus MGA3中表达来源于*E. coli*的赖氨酸脱羧酶基因和热硫氧硫杆菌 (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*) 的谷氨酸脱羧酶基因, 可分别对L-赖氨酸和L-谷氨酸脱氨, 生产戊二胺和 γ -氨基丁酸^[78,80]。通过异源表达乙酰乳酸合成酶和乙酰乳酸脱羧酶基因, 以及过表达丙酮酸合成基因簇, 成功改造*B. methanolicus* MGA3菌株在50℃下利用甲醇生产乙偶姻^[7]。*B. methanolicus*中存在核黄素合成途径基因操纵子 (包括3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸合成酶基因*ribAB*、二氧四氢喋呤合酶基因*ribH*、核黄素合成酶基因*ribE*和双功能脱氢酶/还原酶基因*ribDG*) , 因此可以天然产生少量的核黄素。通过过表达编码核黄素生物合成途径的同源或异源基因簇, 可以提高核黄素产量。添加亚致死水平的氯霉素, 可增加携带核黄素合成相关基因的质粒拷贝数, 提高核黄素产量。在此基础上, 通过甲醇补料分批发酵, 核黄素产量达到523 mg/L^[88]。此外, 2023年, Liu等人^[89]从黄酒中分离得到一株产 β -呋喃果糖苷酶的*B. methanolicus* LB-1, 建立以乳糖和蔗糖为原料经转糖作用酶促合成益生菌三糖低聚果糖的方法。这些研究为开发利用甲醇合成绿色化学品的*B. methanolicus*工程菌提供了启发和参考。

5 展望

甲醇因其生产原料丰富、生产工艺成熟、价格低廉、能量密度高等优势, 已经成为一种极具吸引力的用于生物制造的非粮原料。嗜热的甲基营养细菌*B. methanolicus*能够在50℃~55℃高温条件下, 利用低成本的甲醇无机盐培养基快速生长, 具有天然过量合成氨基酸的能力, 是下一代工业技术的新底盘之一。两

个 *B. methanolicus* 分离株 MGA3 和 PB1 的基因组测序有助于全面了解涉及甲基营养和生物合成的基因和途径。结合转录组和蛋白质组分析, 揭示该微生物的甲醇代谢机制, 使其成为甲基营养代谢调控和生物合成研究的模式菌株。许多参与甲醇异化和同化途径, 以及 L-赖氨酸和 L-谷氨酸生物合成途径的关键酶已被表征, 为通过代谢工程构建利用甲醇合成氨基酸的高产菌株打下基础。尽管 *B. methanolicus* 具有工业生物制造应用的巨大潜力, 但仍存在一些问题亟需解决。首先, 甲醇的毒性导致大多数甲基营养微生物对甲醇的耐受性有限, 这是工业化规模甲醇发酵的限制因素之一。虽然 *B. methanolicus* 能够耐受 2 mol/L 的甲醇, 但其最适生长的甲醇浓度为 25 mmol/L, 较高的甲醇浓度会降低生长速率。适应性进化是提高菌株甲醇耐受性的有效策略。其次, 甲醇氧化是甲醇利用的第一步, 也是影响甲醇利用速率的关键。因此, 要进一步提高甲醇的利用效率, 可通过酶的定向进化和理性设计, 结合高通量筛选技术, 获得高活性的 Mdh 突变体。此外, 调节甲醇氧化和甲醛同化之间的平衡是提高甲醇利用率的关键。NAD⁺ 依赖型 Mdh 催化的甲醇-甲醛转化反应为可逆反应, 而目前报道的 NAD⁺ 依赖型 Mdh 对甲醛的亲合性以及甲醛还原反应的催化速率大幅高于甲醇氧化, 因此甲醇氧化生成的甲醛极易被重新被还原为甲醇,

从而影响甲醇的利用。通过构建 Mdh-Hps-Phi 的多酶融合蛋白, 构建甲醛代谢通道, 可以有效避免甲醛积累, 提高甲醇生物转化效率^[90]。构建人工的甲醇协同代谢途径是提高甲醇利用效率的另外一种策略。例如, 将 RuMP 循环与丝氨酸循环结合构建协同同化途径, 可以使细胞生长速度提高 16.5%, 甲醇消耗率提高 13.1%^[91]。

相比于常用的工业微生物, *B. methanolicus* 可合成的产品类型仍然有限, 主要原因是遗传改造工具严重不足。虽然已经开展许多研究工作, 涉及基因转化方法、质粒、启动子元件、选择标记、基因干扰方法等, 但缺少有效的基因编辑工具是代谢重编程 *B. methanolicus* 的主要瓶颈。为了推动 *B. methanolicus* 在下一代工业生物技术中的应用, 需要加速优化和拓展现有的代谢重编程使能技术体系。例如, 通过感受态制备、电击条件等优化提高外源 DNA 的转化效率, 进一步结合组学技术筛选和构建启动子、RBS 等表达调控元件库, 扩大基因工程工具包, 通过诱变、进化或者筛选获得新的嗜热 CRISPR/Cas 系统, 或者开发其他如自杀质粒系统和 Red 重组酶辅助系统, 实现大片段的基因敲除和敲入, 推动 *B. methanolicus* 底盘的开发, 从而为以甲醇等一碳化合物为原料的工业生物制造提供高性能菌种。

参考文献

- Shi T Q, Darvishi F, Cao M, et al. Editorial: design and construction of microbial cell factories for the production of fuels and chemicals. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1198317
- Zhang W, Song M, Yang Q, et al. Current advance in bioconversion of methanol to chemicals. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 260
- Wang Y, Fan L, Tuyishime P, et al. Synthetic methylotrophy: a practical solution for methanol-based biomanufacturing. *Trends Biotechnol*, 2020, 38: 650–666
- Chen W. Mature technology, enterprises already involved have a leading advantage (in Chinese). *Environ Econ*, 2019, 20: 20–23 [陈婉. 技术成熟, 已涉足企业有先行优势. 环境经济, 2019, 20: 20–23]
- Schrader J, Schilling M, Holtmann D, et al. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria. *Trends Biotechnol*, 2009, 27: 107–115
- Whitaker W B, Sandoval N R, Bennett R K, et al. Synthetic methylotrophy: engineering the production of biofuels and chemicals based on the biology of aerobic methanol utilization. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 33: 165–175
- Drejer E B, Chan D T C, Haupka C, et al. Methanol-based acetoin production by genetically engineered *Bacillus methanolicus*. *Green Chem*, 2020, 22: 788–802
- Chen F Y H, Jung H W, Tsuei C Y, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol. *Cell*, 2020, 182: 933–946.e14
- Lessmeier L, Pfeifenschneider J, Carnicer M, et al. Production of carbon-13-labeled cadaverine by engineered *Corynebacterium glutamicum* using carbon-13-labeled methanol as co-substrate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 10163–10176

- 10 Fabarius J T, Wegat V, Roth A, et al. Synthetic methylotrophy in yeasts: towards a circular bioeconomy. *Trends Biotechnol*, 2021, 39: 348–358
- 11 Gan Y, Meng X, Gao C, et al. Metabolic engineering strategies for microbial utilization of methanol. *Eng Microbiol*, 2023, 3: 100081
- 12 Schendel F J, Bremmon C E, Flickinger M C, et al. L-lysine production at 50 degrees C by mutants of a newly isolated and characterized methylotrophic *Bacillus* sp. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 963–970
- 13 He H T, Zheng S, Chen G Q. “Next Generation Industrial Biotechnology” based on halophilic bacteria and their synthetic biology (in Chinese). *J Integr Technol*, 2022, 11: 1–12 [何宏韬, 郑爽, 陈国强. 基于嗜盐菌合成生物学的下一代工业生物技术. 集成技术, 2022, 11: 1–12]
- 14 Arfman N, Dijkhuizen L, Kirchhof G, et al. *Bacillus methanolicus* sp. nov., a new species of thermotolerant, methanol-utilizing, endospore-forming bacteria. *Int J Systematic Bacteriology*, 1992, 42: 439–445
- 15 Heggeset T M B, Krog A, Balzer S, et al. Genome sequence of thermotolerant *Bacillus methanolicus*: features and regulation related to methylotrophy and production of L-lysine and L-glutamate from Methanol. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 5170–5181
- 16 Irla M, Neshat A, Brautaset T, et al. Transcriptome analysis of thermophilic methylotrophic *Bacillus methanolicus* MGA3 using RNA-sequencing provides detailed insights into its previously uncharted transcriptional landscape. *BMC Genomics*, 2015, 16: 73
- 17 Carnicer M, Vieira G, Brautaset T, et al. Quantitative metabolomics of the thermophilic methylotroph *Bacillus methanolicus*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 92
- 18 Brautaset T, Jakobsen Ø M, Josefsen K D, et al. *Bacillus methanolicus*: a candidate for industrial production of amino acids from methanol at 50°C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 22–34
- 19 Snedecor B, Cooney C L. Thermophilic mixed culture of bacteria utilizing methanol for growth. *Appl Microbiol*, 1974, 27: 1112–1117
- 20 Al-Awadhi N, Egli T, Hamer G. Growth characteristics of a thermotolerant methylotrophic *Bacillus* sp. (NCIB 12522) in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 29: 485–493
- 21 Dijkhuizen L, Arfman N, Attwood M M, et al. Isolation and initial characterization of thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 1988, 52: 209–214
- 22 Brooke A G, Watling E M, Attwood M M, et al. Environmental control of metabolic fluxes in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains. *Arch Microbiol*, 1989, 151: 268–273
- 23 López M G, Irla M, Brito L F, et al. Characterization of D-Arabitol as newly discovered carbon source of *Bacillus methanolicus*. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1725
- 24 Delepine B, Lopez M G, Carnicer M, et al. Charting the metabolic landscape of the facultative methylotroph *Bacillus methanolicus*. *mSystems*, 2020, 5: e00745–00720
- 25 Jakobsen Ø M, Benichou A, Flickinger M C, et al. Upregulated transcription of plasmid and chromosomal ribulose monophosphate pathway genes is critical for methanol assimilation rate and methanol tolerance in the methylotrophic bacterium *Bacillus methanolicus*. *J Bacteriol*, 2006, 188: 3063–3072
- 26 Bozdag A, Komives C, Flickinger M C. 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 Industrial Microbiol Biotechnol*, 2015, 42: 1027–1038
- 27 Chen A Y, Lan E I. Chemical production from methanol using natural and synthetic methylotrophs. *Biotechnol J*, 2020, 15: e1900356
- 28 Tsujimoto N, Gunji Y, Ogawa-Miyata Y, et al. L-Lysine biosynthetic pathway of *Methylophilus methylotrophus* and construction of an L-lysine producer. *J Biotechnol*, 2006, 124: 327–337
- 29 Motoyama H, Yano H, Terasaki Y, et al. Overproduction of L-lysine from Methanol by *Methylobacillus glycogenes* derivatives carrying a plasmid with a mutated *dapA* Gene. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3064–3070
- 30 Abdel-Banat B M A, Hoshida H, Ano A, et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 861–867
- 31 Jakobsen Ø M, Brautaset T, Degnes K F, et al. Overexpression of wild-type aspartokinase increases L-lysine production in the thermotolerant methylotrophic bacterium *Bacillus methanolicus*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 652–661
- 32 Komives C F, Cheung L Y Y, Pluschke S B, et al. Growth of *Bacillus methanolicus* in seawater-based media. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32: 61–66
- 33 Muller J E N, Litsanov B, Bortfeld-Miller M, et al. Proteomic analysis of the thermophilic methylotroph *Bacillus methanolicus* MGA3. *Proteomics*, 2014, 14: 725–737

- 34 Brautaset T, Jakobsen Ø M, Flickinger M C, et al. Plasmid-dependent methylotrophy in thermotolerant *Bacillus methanolicus*. *J Bacteriol*, 2004, 186: 1229–1238
- 35 de Vries G E, Arfman N, Terpstra P, et al. Cloning, expression, and sequence analysis of the *Bacillus methanolicus* C1 methanol dehydrogenase gene. *J Bacteriol*, 1992, 174: 5346–5353
- 36 Arfman N, Hektor H J, Bystrykh L V, et al. Properties of an NAD(H)-containing methanol dehydrogenase and its activator protein from *Bacillus methanolicus*. *Eur J Biochem*, 1997, 244: 426–433
- 37 Hektor H J, Kloosterman H, Dijkhuizen L. Identification of a magnesium-dependent NAD(P)(H)-binding domain in the nicotinoprotein methanol dehydrogenase from *Bacillus methanolicus*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 46966–46973
- 38 Kloosterman H, Vrijbloed J W, Dijkhuizen L. Molecular, biochemical, and functional characterization of a nudix hydrolase protein that stimulates the activity of a nicotinoprotein alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem*, 2002, 277: 34785–34792
- 39 Vonck J, Arfman N, De Vries G E, et al. Electron microscopic analysis and biochemical characterization of a novel methanol dehydrogenase from the thermotolerant *Bacillus* sp. C1. *J Biol Chem*, 1991, 266: 3949–3954
- 40 Arfman N, Watling E M, Clement W, et al. Methanol metabolism in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains involving a novel catabolic NAD-dependent methanol dehydrogenase as a key enzyme. *Arch Microbiol*, 1989, 152: 280–288
- 41 de Vries G E, Kues U, Stahl U. Physiology and genetics of methylotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, 75: 57–70
- 42 Kato N, Yurimoto H, Thauer R K. The Physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 70: 10–21
- 43 Pluschkell S B, Flickinger M C. Dissimilation of [^{13}C]methanol by continuous cultures of *Bacillus methanolicus* MGA3 at 50°C studied by ^{13}C NMR and isotope-ratio mass spectrometry. *Microbiology*, 2002, 148: 3223–3233
- 44 Vorholt J. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch Microbiol*, 2002, 178: 239–249
- 45 Wang X, Wang Y, Liu J, et al. Enhanced methanol utilization in genetically engineered *Escherichia coli* by directed evolution (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2017, 33: 101–109 [王晓璐, 王钰, 刘娇, 等. 利用定向进化提高基因工程大肠杆菌的甲醇利用能力. 生物技术通报, 2017, 33: 101–109]
- 46 Stolzenberger J, Lindner S N, Persicke M, et al. Characterization of fructose 1,6-bisphosphatase and sedoheptulose 1,7-bisphosphatase from the facultative ribulose monophosphate cycle methylotroph *Bacillus methanolicus*. *J Bacteriol*, 2013, 195: 5112–5122
- 47 Chistoserdova L. Modularity of methylotrophy, revisited. *Environ Microbiol*, 2011, 13: 2603–2622
- 48 Cue D, Lam H, Dillingham R L, et al. Genetic manipulation of *Bacillus methanolicus*, a gram-positive, thermotolerant methylotroph. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 1406–1420
- 49 Muller J E N, Heggeset T M B, Wendisch V F, et al. Methylotrophy in the thermophilic *Bacillus methanolicus*, basic insights and application for commodity production from methanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 535–551
- 50 Cue D, Lam H, Hanson R S, et al. Characterization of a restriction-modification system of the thermotolerant methylotroph *Bacillus methanolicus*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1107–1111
- 51 Drejer E, Hakvåg S, Irla M, et al. Genetic tools and techniques for recombinant expression in thermophilic bacillaceae. *Microorganisms*, 2018, 6: 42
- 52 Nguyen H D, Nguyen Q A, Ferreira R C, et al. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid*, 2005, 54: 241–248
- 53 Nilasari D, Dover N, Rech S, et al. Expression of recombinant green fluorescent protein in *Bacillus methanolicus*. *Biotechnol Prog*, 2012, 28: 662–668
- 54 Irla M, Heggeset T M B, Nærdal I, et al. Genome-based genetic tool development for *Bacillus methanolicus*: theta- and rolling circle-replicating plasmids for inducible gene expression and application to methanol-based cadaverine production. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1481
- 55 Markert B, Stolzenberger J, Brautaset T, et al. Characterization of two transketolases encoded on the chromosome and the plasmid pBM19 of the facultative ribulose monophosphate cycle methylotroph *Bacillus methanolicus*. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 7
- 56 Stolzenberger J, Lindner S N, Wendisch V F. The methylotrophic *Bacillus methanolicus* MGA3 possesses two distinct fructose 1,6-bisphosphate aldolases. *Microbiology*, 2013, 159: 1770–1781
- 57 Rygus T, Hillen W. Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 35: 594–599

- 58 Irla M, Hakvåg S, Brautaset T. Developing a riboswitch-mediated regulatory system for metabolic flux control in thermophilic *Bacillus methanolicus*. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 4686
- 59 Peteranderl R, Shotts E.B. J, Wiegel J. Stability of antibiotics under growth conditions for thermophilic anaerobes. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 1981–1983
- 60 Hoseki J, Yano T, Koyama Y, et al. Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus*. *J Biochem*, 1999, 126: 951–956
- 61 Lipscomb G L, Conway J M, Blumer-Schuetz S E, et al. A highly thermostable kanamycin resistance marker expands the tool kit for genetic manipulation of *Caldicellulosiruptor bescii*. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 4421–4428
- 62 Poli A, Finore I, Romano I, et al. Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules. *Microorganisms*, 2017, 5: 25
- 63 Vakhlu J, Sudan A K, Johri B N. Metagenomics: future of microbial gene mining. *Ind J Microbiol*, 2008, 48: 202–215
- 64 Kovacs A T, van Hartskamp M, Kuipers O P, et al. Genetic tool development for a new host for biotechnology, the thermotolerant bacterium *Bacillus coagulans*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 4085–4088
- 65 Frenzel E, Legebeke J, van Stralen A, et al. *In vivo* selection of sfGFP variants with improved and reliable functionality in industrially important thermophilic bacteria. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 8
- 66 Reeve B, Martinez-Klimova E, de Jonghe J, et al. The *Geobacillus* plasmid set: a modular toolkit for thermophile engineering. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 1342–1347
- 67 Bartosiak-Jentys J, Eley K, Leak D J. Application of *pheB* as a reporter gene for *Geobacillus* spp., enabling qualitative colony screening and quantitative analysis of promoter strength. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 5945–5947
- 68 Schultenkämper K, Brito L F, López M G, et al. Establishment and application of CRISPR interference to affect sporulation, hydrogen peroxide detoxification, and mannitol catabolism in the methylotrophic thermophile *Bacillus methanolicus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103: 5879–5889
- 69 Mougiakos I, Bosma E F, Weenink K, et al. Efficient genome editing of a facultative thermophile using mesophilic spCas9. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 849–861
- 70 Daas M J A, van de Weijer A H P, de Vos W M, et al. Isolation of a genetically accessible thermophilic xylan degrading bacterium from compost. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 210
- 71 Mougiakos I, Mohanraju P, Bosma E F, et al. Characterizing a thermostable Cas9 for bacterial genome editing and silencing. *Nat Commun*, 2017, 8: 1647–1657
- 72 Wang J, Qin R, Guo Y, et al. Engineering the native methylotrophs for the bioconversion of methanol to value-added chemicals: current status and future perspectives. *Green Chem Eng*, 2023, 4: 199–211
- 73 Zhang W, Zhang T, Wu S, et al. Guidance for engineering of synthetic methylotrophy based on methanol metabolism in methylotrophy. *RSC Adv*, 2017, 7: 4083–4091
- 74 Sarwar A, Lee E Y. Methanol-based biomanufacturing of fuels and chemicals using native and synthetic methylotrophs. *Synth Syst Biotechnol*, 2023, 8: 396–415
- 75 Zhan C, Li X, Yang Y, et al. Strategies and challenges with the microbial conversion of methanol to high-value chemicals. *Biotech Bioeng*, 2021, 118: 3655–3668
- 76 Hakvåg S, Nærdal I, Heggeset T M B, et al. Production of value-added chemicals by *Bacillus methanolicus* strains cultivated on mannitol and extracts of seaweed *saccharina latissima* at 50°C. *Front Microbiol*, 2020, 11: 680
- 77 Brautaset T, Jakobsen Ø M, Degnes K F, et al. *Bacillus methanolicus* pyruvate carboxylase and homoserine dehydrogenase I and II and their roles for L-lysine production from methanol at 50°C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 951–964
- 78 Nærdal I, Pfeifenschneider J, Brautaset T, et al. Methanol-based cadaverine production by genetically engineered *Bacillus methanolicus* strains. *Microb Biotechnol*, 2015, 8: 342–350
- 79 Irla M, Nærdal I, Brautaset T, et al. Methanol-based γ -aminobutyric acid (GABA) production by genetically engineered *Bacillus methanolicus* strains. *Industrial Crops Products*, 2017, 106: 12–20
- 80 Brito L F, Irla M, Nærdal I, et al. Evaluation of heterologous biosynthetic pathways for methanol-based 5-Aminovalerate production by thermophilic *Bacillus methanolicus*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 686319
- 81 Krog A, Heggeset T M B, Ellingsen T E, et al. Functional characterization of key enzymes involved in L-glutamate synthesis and degradation in

- the thermotolerant and methylotrophic bacterium *Bacillus methanolicus*. [Appl Environ Microbiol](#), 2013, 79: 5321–5328
- 82 Brautaset T, Williams M D, Dillingham R D, et al. Role of the *Bacillus methanolicus* citrate synthase II gene, *citY*, in regulating the secretion of glutamate in L -lysine-secreting mutants. [Appl Environ Microbiol](#), 2003, 69: 3986–3995
- 83 Frank C, Hoffmann T, Zelder O, et al. Enhanced glutamate synthesis and export by the thermotolerant emerging industrial workhorse *Bacillus methanolicus* in response to high osmolarity. [Front Microbiol](#), 2021, 12: 640980
- 84 Mills D A, Flickinger M C. Cloning and sequence analysis of the meso-diaminopimelate decarboxylase gene from *Bacillus methanolicus* MGA3 and comparison to other decarboxylase genes. [Appl Environ Microbiol](#), 1993, 59: 2927–2937
- 85 Nærdal I, Netzer R, Ellingsen T E, et al. Analysis and manipulation of aspartate pathway genes for L -lysine Overproduction from Methanol by *Bacillus methanolicus*. [Appl Environ Microbiol](#), 2011, 77: 6020–6026
- 86 Hanson R S, Dillingham R, Olson P, et al. Production of L -lysine and some other amino acids by mutants of *B. methanolicus*. In Mary E. Lidstrom, F. Robert Tabita eds. Microbial Growth on C1 Compounds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1996
- 87 Nærdal I, Netzer R, Irla M, et al. L -lysine production by *Bacillus methanolicus*: genome-based mutational analysis and L -lysine secretion engineering. [J Biotechnol](#), 2017, 244: 25–33
- 88 Klein V J, Brito L F, Perez-Garcia F, et al. Metabolic engineering of thermophilic *Bacillus methanolicus* for riboflavin overproduction from methanol. [Microb Biotechnol](#), 2023, 16: 1011–1026
- 89 Liu J, Ma Y, Zhang M, et al. Biosynthesis of lactosucrose by a new source of β -fructofuranosidase from *Bacillus methanolicus* LB-1. [J Biosci Bioeng](#), 2023, 135: 118–126
- 90 Fan L, Wang Y, Tuyishime P, et al. Engineering artificial fusion proteins for enhanced methanol bioconversion. [Chem Bio Chem](#), 2018, 19: 2465–2471
- 91 Yuan X J, Chen W J, Ma Z X, et al. Rewiring the native methanol assimilation metabolism by incorporating the heterologous ribulose monophosphate cycle into *Methylobacterium extorquens*. [Metab Eng](#), 2021, 64: 95–110

***Bacillus methanolicus*: a novel microbial chassis for next-generation industrial biotechnology**

LIU Pan¹, BI YaNing^{1,2} & WANG Yu¹

1 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China;

2 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Methanol, with the advantages of abundant resources, low price, and high reduction degree of carbon, is a new non-food and renewable feedstock for green biomanufacturing. *Bacillus methanolicus* is a gram positive, thermophilic, and facultative methylotrophic bacterium that assimilates methanol through nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) dependent methanol dehydrogenase (Mdh) and ribulose monophosphate cycle (RuMP) pathway. It grows rapidly using methanol at 50°C~55°C and produces a variety of high value added products including L-glutamate and L-lysine, representing a novel microbial chassis for the next generation of industrial biotechnology. The omics information including genome, transcriptome, proteome and metabolome of *B. methanolicus* MGA3 has been analyzed, providing basic knowledge for understanding its genetic and metabolic characteristics and conducting metabolic engineering. However, compared to the model microbial chassis such as *Escherichia coli*, the enabling technology of gene editing and regulation for *B. methanolicus* is relatively backward. In this review, we summarize the genetic and physiological characteristics, available gene expression elements and tools, and biosynthetic application advances of *B. methanolicus*, discuss the urgent research directions for breakthroughs, and prospect the application foreground of *B. methanolicus* in industrial biotechnology.

***Bacillus methanolicus*, methanol, next generation industrial biotechnology, biomanufacturing, gene editing**

doi: [10.1360/SSV-2023-0212](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0212)



王钰, 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员, 国家自然科学基金优秀青年科学基金获得者. 曾在山东大学和上海交通大学学习, 2016年加入天津工业生物技术研究所, 2022年破格晋升研究员. 主要从事工业微生物的基因编辑育种和一碳原料的生物转化研究, 以第一或通讯作者在*Nature Communications*, *Trends in Biotechnology*, *Nucleic Acids Research*, *Metabolic Engineering*等期刊发表论文40余篇, 申请专利40余项. 获得《麻省理工科技评论》亚太区“35岁以下科技创新35人”、“伦世仪教育基金”杰出青年学者、日本生物工学会DaSilva Award等荣誉, 兼任天津市青年联合会常务委员、中国生物工程学会青年工作委员会和一碳生物技术专委会委员、中国遗传学会微生物遗传专委会委员、天津微生物学会理事、中国科学院青年创新促进会生命分会副会长等.