

## 甲基营养菌的研究进展

晁红军<sup>1,2,3</sup> 宋修鹏<sup>1,2,3</sup> 孙继华<sup>1,2,3</sup> 申佩弘<sup>1,2,3</sup> 武波<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 广西 南宁 530005)

(2. 微生物及植物遗传工程教育部重点实验室 广西 南宁 530005)

(3. 广西大学生命科学与技术学院 广西 南宁 530005)

**摘要:** 甲基营养菌是一类能够利用一碳化合物作为唯一碳源和能源的微生物, 它们在自然界分布广泛。研究表明, 甲基营养菌能够直接利用一碳化合物, 将其转化成自身代谢的一碳单位, 并为生物体提供能源和碳骨架, 这组成了一碳代谢的主要部分, 它是一种新的代谢体系, 可以作为一种新的代谢模式来研究生物代谢和生物进化。本文结合本实验室 *Methylobacterium* sp. MB200 的研究情况, 主要从分类学、代谢途径、基因组学和应用等方面, 论述了甲基营养菌的研究进展。

**关键词:** 甲基营养, 甲基杆菌, 一碳化合物, 一碳代谢

## Advances in Methylootrophy

CHAO Hong-Jun<sup>1,2,3</sup> SONG Xiu-Peng<sup>1,2,3</sup> SUN Ji-Hua<sup>1,2,3</sup> SHEN Pei-Hong<sup>1,2,3</sup> WU Bo<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization of Guangxi, Nanning, Guangxi 530005, China)

(2. Key Laboratory of Microbial and Plant Genetics Engineering of the Ministry of Education, Nanning, Guangxi 530005, China)

(3. The College of Life Science and Technology Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China)

**Abstract:** Methylootrophy is a kind of widespread microbe which can use carbon compound as their only carbon and energy sources. It has been reported that methylootrophy can directly use one carbon compound to transform into their own metabolic one carbon unit, then these one metabolic one carbon units can be used as energy and carbon skeleton by organisms, which is a main part in one carbon metabolism. Because this is a novel metabolic system, it can be used in the study of biological metabolism and evolution. Based on the previous study about *Methylobacterium* sp. MB200 in our lab, here we summarized the research improvements about methylootrophy from their taxonomy, metabolism, genomics and applications.

**Keywords:** Methylootroph, Methylootrophic bacteria, One carbon compound, One carbon metabolism

甲基营养菌(Methylootrophy), 又称为甲基利用菌, 是一类能够利用非 C-C 键低碳化合物(如甲烷、甲醇、甲醛、甲酸、甲基胺类等)的微生物, 由于这类细菌多为杆状, 因此, 也称为甲基杆菌(Methylootrophic bacteria)等<sup>[1-5]</sup>, 但有些也可以利用

多碳化合物(如甘油、丙二酸、丁二酸、延胡索酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、乳酸、丙酮酸等)<sup>[2,6]</sup>。有氧甲基杆菌也是一类能够以非 C-C 键的还原性碳化合物作为唯一碳源和能源的生物<sup>[4]</sup>。最早是在 20 世纪初发现了具有甲基营养能力的细菌, 它们在自然界中分布广泛,

基金项目: 广西青年科学基金资助项目(No. 0832011); 广西科技攻关项目(No. 033002-5); 广西大学科研基金项目(No. X081074)

\* 通讯作者: Tel: 86-771-3239283; E-mail: wubogxu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-13; 接受日期: 2009-06-24

但直到 20 世纪六、七十年代对它们的生化性质研究才引起研究者的重视<sup>[7,8]</sup>。近年来,通过实验模型估算表明,每年大概有 83~273 百万吨甲醇释放到大气中(其中活体植物为主要来源),甲烷每年的释放量约为 600 百万吨。虽然还未见有对全球甲基胺类物质进行模型估算,但它们也广泛存在于海洋和淡水环境中,而且既参与碳的动态循环,又参与氮循环<sup>[7,9]</sup>。由于甲基营养菌能够将自然界取之不尽的一碳化合物变为自身代谢的碳源和能量,因此,深入研究甲基营养菌的代谢具有非常重要的意义。

近几十年的研究表明,甲基营养菌的代谢属于一种新的代谢体系,它可以作为一种新的代谢模式来理解生物代谢和生物进化。在这个体系内,甲基营养菌有一套独立的代谢功能模式,但是目前已知的甲基营养菌中存在多种代谢形式<sup>[8]</sup>。国外对于甲基营养菌研究已经比较深入,并且在应用方面进行了广泛研究,但是国内的研究较少,而且起步也比较晚<sup>[10,11]</sup>。

我们实验室从沼气池残渣中分离出 200 多株能以甲醇为唯一碳源生长的细菌,其中一株初步鉴定为 *Methylobacterium* sp. MB200<sup>[10,12,13]</sup>。研究表明, *M. sp. MB200* 可以以甲醇、乙醇、丁二酸等作为唯一碳源,但不能利用甲酸、甲胺和甘氨酸,并且具有丝氨酸代谢途径<sup>[10]</sup>。通过分子生物学的方法,先后克隆了 *mxoF* 基因和丝氨酸循环中 *sga*<sup>[14]</sup>、*hpr*、*glyA* 等基因,突变这些基因后, *M. sp. MB200* 失去利用甲醇的能力,但能够以丁二酸作为碳源。通过过量表达 *sga* 基因,乙醛酸积累量提高了 2 倍<sup>[10]</sup>;过量表达 *glyA* 基因后, L-serine 产量提高 4.4 倍<sup>[15]</sup>。根据 *M. sp. MB200* 利用碳源的不同和一碳途径的特点,我们采用转座子诱变技术构建了突变体库,分析其一碳代谢途径,并进一步研究甲基营养菌代谢与氨基酸、辅酶等代谢的关系,为它们的生产研究打下了基础,相关研究正在进行中<sup>[16]</sup>。另外,随着越来越多甲基营养菌基因组测序的完成,利用 DNA 微阵列技术在全基因组和转录组水平上研究它们的一碳代谢也具有重要的意义。

因此,本文主要从分类学、代谢途径、基因组学和应用等方面,结合 *Methylobacterium* sp. MB200 的研究情况<sup>[10,12-14,16]</sup>,介绍甲基营养菌的研究进展,希望能推动国内相关研究的发展。

## 1 分类

许多已知的甲基营养菌都具有专一性,它们不利用任何包含 C-C 键的化合物。然而,在能利用甲醇的细菌中,也有许多可以在多碳化合物或一碳(C<sub>1</sub>)化合物上生长。甲基杆菌可以根据其功能进行区分:一类是能够利用甲烷的,称为“甲烷利用菌”(Methanotrophs),它可以根据是否存在内膜系统进一步分类<sup>[2]</sup>;另一类是能够利用甲醇和其它甲基化合物,但是不能利用甲烷的<sup>[4]</sup>。许多甲基杆菌也能利用 N<sub>2</sub> 作为氮源,因此又被认为是固氮生物,另外,有些甲基杆菌能够通过铵盐和硝酸盐的转化影响氮循环<sup>[1]</sup>;也有一些甲基杆菌可以利用甲硫类化合物,它们在硫循环中起到重要的作用<sup>[17,18]</sup>;还有一些甲基杆菌能够在卤化甲烷类化合物上生长<sup>[19]</sup>,可能在这些污染物的脱毒方面起到重要的作用<sup>[4]</sup>。所以,甲基营养菌是环境中一类重要的微生物群落。

表 1 列出的是已知甲基营养菌的主要代谢途径和分类,至今还未发现单一的菌株全部具有这些类型的代谢。系统发生学分类主要是根据生理生化特征来分的,能够利用丝氨酸循环进行甲醛同化的归为  $\alpha$ -变形杆菌纲;所有不能利用甲烷的限制性专一甲基杆菌归为  $\beta$ -变形杆菌纲(*Methylophaga* 除外);所有利用核酮糖单磷酸循环进行甲醛同化的甲烷利用菌归为  $\gamma$ -变形杆菌纲,已知的所有革兰氏阳性甲基杆菌都存在核酮糖单磷酸循环(表 1)。对于甲烷利用菌,有丝氨酸循环的  $\alpha$ -变形杆菌称为 I 型菌株,而含有核酮糖单磷酸途径的  $\gamma$ -变形杆菌纲称为 II 型菌株<sup>[2,4]</sup>。

甲基营养型酵母(Methylotrophic yeast)能够以甲醇、甲烷、甲酸等化合物作为碳源,它是甲基营养菌中的一大类,是主要的真核甲基营养菌(Eucaryotic methylotroph),部分甲基营养型酵母可以将甲醇作为唯一碳源和能源<sup>[1,20]</sup>。所有已知的甲基营养型酵母分别属于毕赤酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)<sup>[20,21]</sup>。

### 1.1 甲烷营养菌

甲烷营养菌是甲基营养菌的一个亚群,它能以甲烷作为唯一碳源和能量来源。在大多数含有甲烷和氧气的环境中,包括极端环境(pH 和温度),都发现它们的存在<sup>[2,22-24]</sup>。它们具有特殊的内膜系统<sup>[2]</sup>,膜堆积状的属于 I 型菌株,在细胞周边是环状细胞

表 1 有氧甲基营养菌分类<sup>[4]</sup>(缩写: RuMP, 核酮糖单磷酸途径; CBB, 卡尔文循环)  
Table 1 Characteristics of aerobic methylotrophic bacteria<sup>[4]</sup>  
(Abbreviations: RuMP, ribulose monophosphate; CBB, Calvin-Benson-Bassham)

种类 Group	主要同化途径 Major assimilation pathway	能否固氮 N <sub>2</sub> fixing	系统发生学分类 Phylogenetic position
Obligate methylotrophs			
Type I methanotrophs			
<i>Methylomonas</i>	RuMP	能	γ-Proteobacteria
<i>Methylobacter</i>	RuMP	能	γ-Proteobacteria
<i>Methylococcus</i>	RuMP	能	γ-Proteobacteria
<i>Methylobacterium</i>	RuMP	否	γ-Proteobacteria
<i>Methylosphaera</i>	RuMP	否	γ-Proteobacteria
<i>Methylocaldum</i>	RuMP	否	γ-Proteobacteria
Type II methanotrophs			
<i>Methylosinus</i>	Serine	能	α-Proteobacteria
<i>Methylocystis</i>	Serine	能	α-Proteobacteria
<i>Methylocella</i>	Serine	能	α-Proteobacteria
Restricted facultative methylotrophs			
Methanol utilizers			
<i>Hyphomicrobium</i>	Serine	否	α-Proteobacteria
<i>Methylophilus</i>	RuMP	否	β-Proteobacteria
<i>Methylobacillus</i>	RuMP	否	β-Proteobacteria
<i>Methylophaga</i>	RuMP	否	γ-Proteobacteria
Facultative methylotrophs			
<i>Methylobacterium</i>	Serine	否	α-Proteobacteria
<i>Aminobacter</i>	Serine	否	α-Proteobacteria
<i>Methylohabdus</i>	Serine	否	α-Proteobacteria
<i>Methylopila</i>	Serine	否	α-Proteobacteria
<i>Methylosulfonomonas</i>	Serine	否	α-Proteobacteria
<i>Marinosulfonomonas</i>	Serine	否	α-Proteobacteria
<i>Paracoccus</i>	CBB	否	α-Proteobacteria
<i>Xanthobacter</i>	CBB	能	α-Proteobacteria
<i>Ancylobacter (Microcycus)</i>	CBB	能	α-Proteobacteria
<i>Thiobacillus</i>	CBB	否	α-Proteobacteria
<i>Rhodopseudomonas</i>	CBB	否	α-Proteobacteria
<i>Rhodobacter</i>	CBB	否	α-Proteobacteria
<i>Acetobacter</i>	RuMP	未知	γ-Proteobacteria
<i>Bacillus</i>	RuMP	未知	Gram-positive (low G+C)
<i>Mycobacterium</i>	RuMP	未知	Gram-positive (high G+C)
<i>Arthrobacter</i>	RuMP	未知	Gram-positive (high G+C)
<i>Amycolatopsis (Nocardia)</i>	RuMP	未知	Gram-positive (high G+C)

膜或者是 *Methylocella* 囊状膜的属于 II 型菌株 (*Methylosinus* 和 *Methylocystis*)<sup>[24]</sup>。现在报道的大多数甲烷利用菌都是专一性甲基杆菌, 不能利用含 C-C 键的化合物, 但也有报道的兼性分枝杆菌能够利用甲烷<sup>[25]</sup>, 还有 I 型甲烷利用菌能够利用葡萄糖<sup>[26]</sup>。许多甲烷利用菌能够在甲醇上生长<sup>[1,2]</sup>, 也

有一些甲烷利用菌具有固氮酶, 能够以 N<sub>2</sub> 作为氮源, 主要是 *Methylococcus* 和 *Methylosinus*<sup>[2]</sup>。甲烷利用菌代谢中既有丝氨酸循环, 又有 RuMP 循环, 但是迄今为止, 还未发现自养甲烷利用菌。

1.2 非利用甲烷的甲基营养菌  
能够利用甲醇和其他甲基化合物但不能利用甲

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

烷的细菌,比那些利用甲烷的细菌具有更广泛的多样性。迄今为止,大多数革兰氏阳性的 $\alpha$ -变形杆菌纲菌株属于兼性甲基杆菌,而 $\beta$ -变形杆菌纲和 $\lambda$ -变形杆菌纲菌株既有专一性甲基杆菌,也有限制兼性甲基杆菌<sup>[1]</sup>。在这些菌株中,大多数能够利用甲醇和甲基化合物,但是只有少数可以利用甲胺类化合物;也有一些能够利用其他甲基化合物,但是不能利用甲醇<sup>[1]</sup>。

除了光合细菌的光合细胞膜外,非利用甲烷的甲基营养菌不能产生甲烷营养菌特有的内膜系统。而能够利用甲醇的光合细菌利用它作为电子受体进行光合作用,但在许多时候,甲醇也作为碳源<sup>[27]</sup>。

甲基营养菌广泛分布在陆地、淡水和海洋等栖息地<sup>[1]</sup>。在海洋环境中,能够利用甲烷的细菌分布特别广泛,它们可能在透光区的碳循环中发挥一定作用<sup>[1]</sup>。而粉红色甲基杆菌是植物叶面常见的一种体表寄生菌,它们之间存在一种共生互利的关系<sup>[28,29]</sup>。

其他研究的甲基营养菌有 *Methylobacterium* sp. CPA1<sup>[30]</sup>、*Methylobacterium* *salsuginis* sp. nov.<sup>[11]</sup>、*Methylococcus* *capsulatus* Bath<sup>[31]</sup>、*Methylobacterium* *oryzae* sp. nov.<sup>[32]</sup>、*Methylobacterium* *platani* sp. nov.<sup>[33]</sup>、*Rhodopseudomonas* *palustris*、*Methanosarcina*

*mazei*<sup>[34]</sup>、*Rhodobacter* *sphaeroides*、*Roseobacter* *denitrificans*<sup>[35]</sup>、*Rhodobacter* *capsulatus*、*Methylobacterium* *iners* sp. nov. 和 *Methylobacterium* *aerolatum* sp. nov.<sup>[36]</sup>、*Methylobacterium* *persicinum* sp. nov.、*Methylobacterium* *komagatae* sp. nov.、*Methylobacterium* *brachiatum* sp. nov.、*Methylobacterium* *tardum* sp. nov. 和 *Methylobacterium* *gregans* sp. nov.<sup>[37]</sup>、*Methylobacterium* *jeotgali* sp. nov.<sup>[38]</sup>、*Methylobacterium* *phyllosphaerae* sp. nov.<sup>[39]</sup>等。

## 2 代谢途径

对于大多数生物的代谢而言,都是通过糖酵解等途径将多碳化合物分解成小分子化合物(乙酰CoA等),然后进入卡尔文循环(三羧酸循环),并进一步为生物体生长发育提供能量和碳骨架。但是甲基营养菌通常不依赖于糖酵解等途径,而是通过一碳化合物的直接同化转变成可利用的物质(亚甲基四氢叶酸等),然后通过丝氨酸循环等途径进入卡尔文循环。因此,能够在还原性C<sub>1</sub>化合物上生长的生物,需要有专一的生化途径提供能量和进行碳代谢。迄今为止,这些代谢途径仅知道了一部分,如图1。

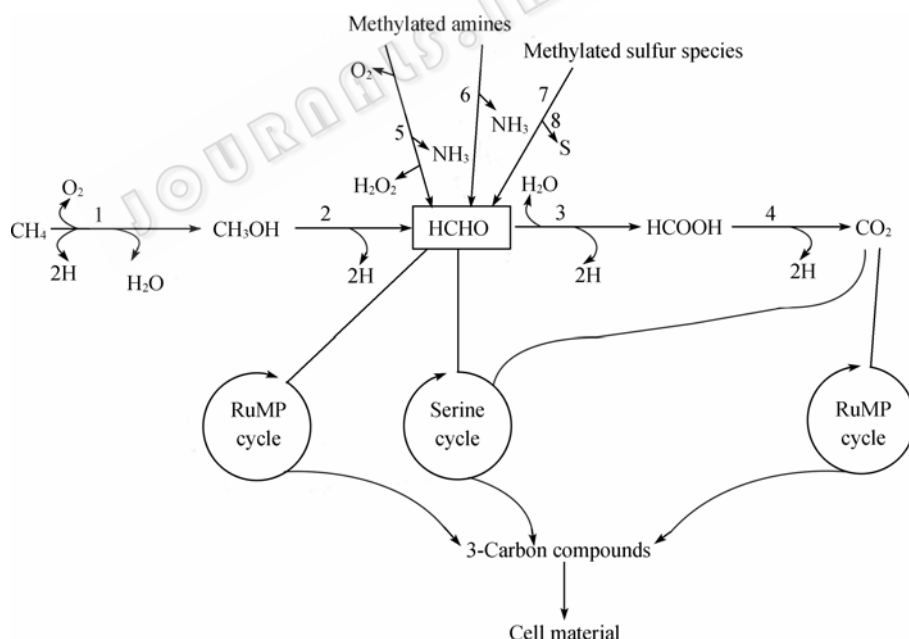


图1 有氧甲基杆菌一碳代谢途径<sup>[4]</sup>

Fig. 1 Metabolism of one-carbon compounds in aerobic methylotrophic bacteria<sup>[4]</sup>

注: 1: 甲烷单加氧酶; 2: 甲醇脱氢酶; 3: 甲醛氧化系统; 4: 甲酸脱氢酶; 5: 卤化甲烷氧化系统; 6: 甲胺氧化酶; 7: 甲胺脱氢酶; 8: 甲硫脱氢酶、氧化酶。

Note: 1: Methane monooxygenase; 2: Methanol dehydrogenase; 3: Formaldehyde oxidation system; 4: Formate dehydrogenase; 5: Halomethane oxidation system; 6: Methylated amine oxidases; 7: Methylated amine dehydrogenase; 8: Methylated sulfur dehydrogenase or oxidase.



*M. extorquens* AM1 的甲醇代谢开始于外周胞质的甲醇或甲胺氧化,而甲醛的进一步同化作用和异化作用发生在胞浆中<sup>[40]</sup>。已经证明,在 *M. extorquens* AM1 的 C<sub>1</sub> 代谢过程中,共有超过 100 个基因参与,它们分别属于一系列特殊的代谢形式,这包括甲醇氧化、甲胺氧化、甲醛氧化、甲酸氧化和丝氨酸循环,但是大多数基因位于少数几个较大的基因簇上<sup>[8]</sup>。由于已知的甲基营养菌基因簇目前已进行了较为全面的分析,因此寻找剩余甲基营养一碳代谢基因可能需要更全面的方法。下面以 *M. 菌 extorquens* AM1 为主介绍一下一碳代谢途径。

## 2.1 甲醇氧化

甲醇氧化是由甲醇脱氢酶催化的,这个酶是细菌 C<sub>1</sub> 代谢途径的关键酶。在 *M. extorquens* AM1 中,甲醇脱氢酶的活性是受碳源调节的,在生长过程中,有甲醇存在的条件比缺少它而提供多碳底物时提高 3~6 倍<sup>[40]</sup>。

已证明在 *M. extorquens* AM1 中,至少有 25 个基因参与了甲醇的氧化反应。这些基因分布在 3 个不同的基因座上: *mx*a、*mx*b、*mx*c。在 *mx*a 基因簇中,有 14 个基因(*mx*aFJGIRSACKLDEHB)的转录方向相同,还有一个额外的基因(*mx*aW)转录方向相反。甲醇脱氢酶分别由 *mx*aF 基因和 *mx*aI 基因编码的 2 个大小亚基组成: *mx*aF 基因约有 1.8 kb, 编码 66 kD 多肽,是甲醇脱氢酶的功能区; *mx*aI 基因有 290 bp, 编码 8.5 kD 多肽,其功能现在还不是很清楚<sup>[41]</sup>。*mx*aG 基因编码细胞色素 c<sub>L</sub>; *mx*aD 基因编码 17 kD 的外周蛋白,它直接或间接催化甲醇脱氢酶和细胞色素 c<sub>L</sub> 的相互作用,这个结构域的其他基因也具有其他聚合和调节功能。在 *mx*b 基因座上,有 2 个另外的调节基因和合成 PQQ 辅基所需的基因 *pqqABC/DE*。其他 2 个已知的 *pqq* 基因残基存在于基因组的其他基因簇上。另外,有 2 个调节基因 *mx*cQE 位于 *mx*c 基因簇上。5 个 *mox* 调节基因经鉴定表明,有 4 个推测编码传感蛋白-激酶/反应调节因子发夹结构(MxbDM 和 MxcQE)的 2 个元件,第 5 个反应调节因子应该是 MxaB<sup>[40,42]</sup>。

在所有研究的革兰氏阴性甲基营养菌中,甲醇氧化是通过吡咯酮-酮蛋白样酶-甲醇脱氢酶作用的,这个酶催化甲醇氧化成甲醛<sup>[41]</sup>。甲醛是甲基营养菌同化和异化代谢途径的中间产物;在甲烷营养菌中,甲烷经甲烷单加氧酶氧化成甲醇后,再经甲

醇脱氢酶进一步氧化<sup>[41]</sup>。由于甲基化反应生成甲醇,特别是来自于植物的反应,这使其在自然界中普遍存在<sup>[1,29]</sup>。甲醇通过 3 类酶的作用氧化成甲醛,第 1 类是革兰氏阴性甲基杆菌中的酮蛋白甲醇脱氢酶<sup>[43]</sup>;第 2 类是杆状细菌中发现的与 NAD 相连的酶<sup>[44]</sup>;第 3 类是在革兰氏阳性菌中发现的甲醇: N,N'-二甲基-4-亚硝基苯胺氧化还原酶<sup>[45,46]</sup>。一般来说,无论是产生还原的细胞色素,还是还原的吡啶核酸,甲醇氧化都是一个能量储存过程<sup>[4]</sup>。许多细菌的 *mx*aF 基因已经被克隆和研究<sup>[41]</sup>,如: *Methylococcus capsulatus*(Bath)<sup>[31]</sup>、*Methylobacterium album* BG8、*Methylobacterium universalis* FAM5、*Methylobacterium petroleiphilum* PM1、*Burkholderiales strains* RZ18-153 和 *B. FAM1*<sup>[47]</sup>、*Pseudomonas putida* HK5<sup>[42]</sup>、*Beggiatoa alba* B18LD<sup>[48]</sup>、*Pseudomonas aeruginosa*<sup>[49]</sup>等。

*mx*aF 基因在甲基营养菌中广泛存在,其氨基酸序列预测分析表明,它的部分序列在许多甲基营养菌中具有高度的序列保守性<sup>[41,50-52]</sup>。以 *mx*aF 基因为探针,通过杂交分析,可以进行甲基营养菌鉴定。基于 *mx*aF 基因部分序列构建的进化树与 16S rRNA 序列构建的比较显示,它们具有相似的拓扑结构。这表明,甲基营养菌的表型可能是从一个共同的祖先演变来。

我们从 *M. sp.* MB200 突变体库中克隆到了 *mx*aF 基因。序列表明,它的部分序列与 *Methylobacterium lusitanum* MP2 中 *mx*aF 基因的同源性最高,同源性达到 99%,与 16S rDNA 分析结果相同;定点突变 *M. sp.* MB200 *mx*aF 基因后,突变体菌体颜色变浅,甲醇营养缺陷,未检测到 L-丝氨酸的产生;过量表达 *mx*aF 基因后,甲醇脱氢酶酶活和 L-丝氨酸的产量明显提高(数据未公布)。

## 2.2 甲醛和甲酸的氧化

大多数甲烷代谢所需的还原能量是利用甲醛氧化作用产生的,并通过甲酸代谢释放出 CO<sub>2</sub>。在甲基营养菌中,甲醛氧化成甲酸是通过多酶系统完成的<sup>[2]</sup>,而在许多 C<sub>1</sub> 复合物(如甲烷、甲醇、甲胺等)进一步氧化过程中,甲酸氧化成 CO<sub>2</sub> 是重要的一步。已经证明,在 *M. extorquens* AM1 中,有 4 个异源甲酸脱氢酶的基因簇,分别编码 4 种异源甲酸脱氢酶: 两个编码 NAD 相连的 FDHs(FDH1 和 FDH2),一个细胞色素相连的 FDH(FDH3),以及 FDH4<sup>[53]</sup>。

革兰氏阴性甲基营养菌利用丝氨酸途径作为甲醛固定的最初途径<sup>[2]</sup>。

### 2.3 甲烷氧化

在甲烷营养菌中, 甲烷单加氧酶能够催化甲烷生成甲醇, 这些酶的使用可以作为甲烷营养菌的一个重要特征。甲醛在分解和合成代谢中都作为一个中间产物, 并以独特的通路成为合成中间体。在甲烷利用菌中, 发现了 2 条甲醛同化途径, 即丝氨酸循环途径和 RuMP 途径<sup>[2]</sup>。

另外, 这些特殊的异化代谢途径还包括三甲胺、二甲胺、卤化甲烷等甲基胺类的氧化, 以及甲基硫化物的利用, 叶酸相关的甲醛氧化途径, 甲醛循环氧化途径, 甲酸氧化等。

### 2.4 *Methylobacterium extorquens* AM1

*M. extorquens* AM1 是一种兼性甲基营养菌, 它通过丝氨酸循环进行 C<sub>1</sub> 同化作用。除了 C<sub>1</sub> 化合物(甲醇和甲醛)外, 它也可以在 C<sub>2</sub>(乙醇和乙醛)、C<sub>3</sub>(丙酮酸)和 C<sub>4</sub>(丁二酸)化合物上生长。*M. extorquens* AM1 并不具备经典的乙醛酸支路, 而使用一种替代通路——新的乙醛酸再生循环, 在利用 C<sub>1</sub> 和 C<sub>2</sub> 化合物过程中, 再生乙醛酸, 它包括一系列通过 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 和 C<sub>5</sub> 羧酸进行的反应。这条代谢途径已经基本确定清楚, 相关的基因也已经确定, 但还有一些反应还未知<sup>[54]</sup>。

### 2.5 甲基营养型酵母

甲基营养型酵母含有特殊的酶催化甲醇氧化和一碳同化, 这不同于其他甲基营养菌。在甲基营养型酵母中, 甲醇氧化成甲醛的过程发生在过氧化物酶体(Peroxisomes)中, 而随后的氧化和同化过程主要发生在胞质溶胶中。甲基营养型酵母没有其他甲基营养菌中特有的甲醇脱氢酶, 而它主要通过一类非特异性的醇脱氢酶(Alcohol oxidase, AO)开始甲醇氧化过程。醇脱氢酶有 8 个亚基组成, 分子量约为 600 kD。甲基营养型酵母中甲醇氧化的另一个重要的酶是过氧化氢酶(Catalase, CAT), 它主要在甲醇氧化成甲醛的过程中去除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的毒副作用, 另外它也可以发挥超氧化物酶的作用<sup>[1,20]</sup>。甲醇代谢的第 3 个重要酶是二羟丙酮合成酶(Dihydroxyacetone synthase, DHAS), 它存在于过氧化物酶体中, 是木酮糖-5-磷酸循环的组成部分, 催化甲醛同化, 由一分子甲醛和一分子木酮糖-5-磷酸生成 2 分子 C<sub>3</sub> 化合物(二羟丙酮和甘油醛-3-磷酸)。正是由于过氧化

物酶体中这 3 种酶 AO、CAT、DHAS 的作用, 才使甲基营养型酵母能够利用甲醇<sup>[20,55]</sup>。甲醇营养所需的酶都存在于胞质溶胶中。

## 3 基因组学

*M. extorquens* AM1 的测序工作已基本完成<sup>[8,40,56]</sup>, 基因组全长 6 Mb, GC 含量为 68%, 这可以用于发现新基因、在基因组范围内进行代谢分析和代谢工程研究。它的一碳氧化、甲醛和甲酸的一碳转化、甲酸氧化、色氨酸循环、乙醛酸循环再生、单羟基丙酮循环、三羧酸循环和类胡萝卜素合成途径的相关基因已经确定<sup>[8]</sup>。由于类胡萝卜素有多种工业用途, 因此, 在这种细菌的代谢工程中, 类胡萝卜素的生物合成途径是一个潜在的研究目标。在全基因组水平上, 利用微阵列技术研究不同生理条件下, *M. extorquens* AM1 的基因表达变化情况, 获得的数据可以用来进一步鉴定之前的研究数据, 以及揭示甲基营养菌与铁、硫、叶绿素的产生和聚酮化合物合成的关系, 可以更好的分析代谢途径和甲基营养所需的基因<sup>[57]</sup>。

另外, 许多甲基营养菌基因组测序工作已经完成, 包括 *M. extorquens* AM1<sup>[8]</sup>、*Methylococcus capsulatus* Bath<sup>[31]</sup>、*Rhodospseudomonas palustris*、*Methanosarcina mazei*<sup>[34]</sup>、*Rhodobacter sphaeroides*、*Roseobacter denitrificans*<sup>[35]</sup>、*Rhodobacter capsulatus*、*Methylobacterium chloromethanicum* CM4、*Methylobacterium chloromethanicum* CM4、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、*Methylobacterium populi* BJ001、*Methylobacterium* sp. 4-46、*Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831、*Methylobacterium extorquens* PA1、*Methylobacterium nodulans* ORS 2060 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2009)。

随着越来越多甲基营养菌株全基因组测序工作的完成, 生物信息学、转录组学、蛋白质组学、微阵列分析<sup>[57]</sup>等已经成为应用基因组信息研究他们代谢途径的方法。

## 4 应用

近年的研究表明, 甲基营养细菌具有重要的商业用途, 可以进行单细胞蛋白生产<sup>[8]</sup>。利甲基营养细菌的这种特殊代谢可以生产胞外多糖, 这已

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

经作为一种商业化的食品添加剂<sup>[9]</sup>。甲基营养菌通过利用甲醇进行氨基酸生产,包括:L-丝氨酸<sup>[58]</sup>、L-苏氨酸<sup>[59]</sup>、L-谷氨酸<sup>[60]</sup>、L-赖氨酸<sup>[61]</sup>。氨基酸的生产已经广泛用于食品和饲料添加剂、药物、化妆品、高聚物、农业化合物等<sup>[62-65]</sup>。另外,甲基杆菌可以用来工业化生产各种辅酶(辅酶 Q<sub>10</sub>)、维生素(VB<sub>12</sub>)和聚- $\beta$ -羟基丙酮等。这类菌分泌的粉红色类胡萝卜素可以作为着色剂在食品工业中应用,并且具有广泛的商业价值<sup>[3]</sup>。

甲基营养型酵母已经广泛用作外源基因的表达系统,并且具有较好的商业用途。其中,*Candida boidinii*、*Pichia methanolica*、*Pichia pastoris* 和 *Hansenula polymorpha* 已经发展成了较为成熟的异源基因表达系统<sup>[21,66]</sup>。

甲基营养细菌在有氧条件下,能够利用一碳化合物作为唯一的碳源和能源,它们可以作为生物催化剂,将甲醇转化为有价值的产品。由于甲醇具有丰富、可溶性、清洁、成本低廉等特点,所以,它是一种很好的可选择原料的替代品。甲基营养细菌由于含有特殊的代谢途径、遗传可操作性强(尤其是甲醇利用菌)等优点,因此,研究它利用甲醇转化成高附加值的产品具有重要的意义。

另外,分泌粉红色物质的甲基杆菌可以作为环境污染的指标。有些菌可以生长在废气(烟尘)中,它们可以利用废气中的多环芳香烃和长链脂肪烃,从而能以这些细菌进行车辆污染的生物监测。甲基杆菌还具有一定的耐辐射能力,可以作为食品和包装工业杀菌检测的指标。*M. thiocyanatum* 具有耐受和降解较高水平的氰酸酯和硫氰酸盐的功能,因此可以利用它通过生物法处理各种工厂排出的硫氰类化合物<sup>[3]</sup>。

## 5 讨论

甲基营养菌是一类能够利用包括非 C-C 键低碳化合物的微生物。甲基杆菌属最早是在上个世纪初分离获得,是研究比较广泛的甲基营养细菌,它主要分布在 $\alpha$ -脞细菌门(Proteobacteria), $\alpha$ -脞细菌亚门( $\alpha$ -Proteobacteria), $\alpha$ -变形菌纲( $\alpha$ -Epsilonproteobacteria),根瘤菌目(Rhizobiales),甲基杆菌科(Methylobacteriaceae),甲基杆菌属(*Methylobacterium*)中<sup>[67]</sup>。研究表明,它具有独特的一碳代谢途径,这为我们研究生物代谢途径及进化的多样性提供了更为

广泛的依据<sup>[68]</sup>。有些甲基营养菌可以利用多种一碳化合物(包括甲烷、甲醇等),这为解决环境污染问题提供了一个更为方便的方法,同时,它的代谢过程又生成很多有价值的物质,这就可以通过它的代谢作用,将环境中的有害物质变废为宝,因此,研究它的代谢途径具有极其重要的意义。

虽然甲基杆菌属菌株可以利用甲醇来生产单细胞蛋白等物质,但其生物转化率却比较低。通过甲基杆菌代谢途径的研究,分析如何筛选到优质、高产的菌株,并通过基因工程进行改造,进一步获得高效、高产的重组菌株也具有一定的意义。

迄今为止,只发现非甲烷营养甲基营养菌具有利用甲基胺类物质的能力<sup>[7,9]</sup>。另外,有些甲烷利用菌可以与贝类、蛤蚌和须腕动物类等以共生体的形式存在,它们的16S rDNA序列分析属于I型甲烷利用菌,但是,还未在纯培养环境中获得<sup>[69]</sup>。自然界中,大多数的甲烷利用菌都是严格厌氧的,如何分离、获得纯培养菌株,并进一步研究,还需要大量的工作。

致谢:感谢美国西雅图华盛顿大学的 Mary E Lidstrom 教授在甲基营养菌代谢方面给与的指导和帮助;感谢美国威斯康辛大学麦迪逊分校的 William S Reznikoff 教授在 Tn5 转座子结构及诱变技术方面的指导和帮助;感谢英国南安普敦大学的 Chris Anthony 教授在甲醇脱氢酶结构及酶学特性分析方面的指导和帮助。

## 参考文献

- [1] Anthony C. The Biochemistry of Methyloprophs. New York: Academic Press, 1982.
- [2] Hanson RS. Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(2): 439-471.
- [3] Green PN. Methylobacterium. Dworkin M, et al. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. New York: Springer New York, 2006, pp.257-265.
- [4] Lidstrom ME. Aerobic Methyloprophic Prokaryotes, Dworkin M, et al. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. New York: Springer, 2006, pp.618-634.
- [5] Lidstrom ME, Stirling DI. Methyloprophs: genetics and commercial applications. *Annu Rev Microbiol*, 1990, **44**: 27-58.
- [6] Green P, Genus I. *Methylobacterium* Patt, Cole and Hanson 1976, 228<sup>AL</sup> emend. Green and Bousfield 1983, 876. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual



- of Systematic Bacteriology. New York: Springer, 2005, 2nd, 2, part C, pp.567–571.
- [7] King GM. Ecological aspects of methane oxidation, a key determinant of global methane dynamics. Marshall KC. *Advances in Microbial Ecology*. New York: Plenum Press, 1993, **12**, pp.431–468.
- [8] Chistoserdova L, Chen SW, Lapidus A, *et al.* Methylophily in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *J Bacteriol*, 2003, **185**(10): 2980–2987.
- [9] Chistoserdova L, Lapidus A, Han C, *et al.* Genome of *Methylobacillus flagellatus*, molecular basis for obligate methylophily, and polyphyletic origin of methylophily. *J Bacteriol*, 2007, **189**(11): 4020–4027.
- [10] Shen PH, Wu B. Over-expression of a hydroxypyruvate reductase in *Methylobacterium* sp. MB200 enhances glyoxylate accumulation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, **34**(10): 657–663.
- [11] Wang X, Sahr F, Xue T, *et al.* *Methylobacterium salsuginis* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(Pt 8): 1699–1703.
- [12] 欧倩, 王亚莉, 申佩弘, 等. 产 L-丝氨酸的甲醇利用菌 MB119 的筛选与鉴定. *广西农业生物科学*, 2007, **26**(3): 201–204.
- [13] 欧倩, 韦东, 武波. 丝氨酸生产菌的筛选及静息细胞培养系统中 L-丝氨酸的合成. *氨基酸和生物资源*, 2006, **28**(3): 41–44.
- [14] 申佩弘, 王亚莉, 武波. 甲醇利用菌 MB200 丝氨酸乙醛酸氨基转移酶基因(*sga*)的克隆、突变及对产 L-丝氨酸的影响. *工业微生物*, 2008, **38**(1): 18–22.
- [15] Shen P, Chao H, Jiang C, *et al.* Enhancing production of L-serine by increasing the *glyA* gene expression in *Methylobacterium* sp. MB200. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, doi 10.1007/s12010-009-8551-x.
- [16] 申佩弘, 晁红军, 宋修鹏, 等. 利用双标记 mTn5 构建甲基杆菌 MB200 突变体库的研究. *山西农业科学*, 2008, **36**(11): 26–30.
- [17] Anandham R, Indiragandhi P, Madhaiyan M, *et al.* Thiosulfate Oxidation and mixotrophic growth of *Methylobacterium goeisingense* and *Methylobacterium fujisawaense*. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, **19**(1): 17–22.
- [18] Kelly DP, Murrell JC. Microbial metabolism of methanesulfonic acid. *Arch Microbiol*, 1999, **172**(6): 341–348.
- [19] Leisinger T, Braus-Stromeier SA. Bacterial growth with chlorinated methanes. *Environ Health Perspect*, 1995, **103** (Suppl 5): 33–36.
- [20] van der Klei IJ, Yurimoto H, Sakai Y, *et al.* The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylophily yeast. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1763**(12): 1453–1462.
- [21] Gellissen G. Heterologous protein production in methylophily yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**(6): 741–750.
- [22] Bodrossy L, Holmes EM, Holmes AJ, *et al.* Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov.. *Arch Microbiol*, 1997, **168**(6): 493–503.
- [23] Bowman JP, McCammon SA, Skerratt JH. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes. *Microbiology*, 1997, **143**( Pt 4): 1451–1459.
- [24] Dedysh SN, Liesack W, Khmelenina VN, *et al.* *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(Pt 3): 955–969.
- [25] Reed WM, Dugan PR. Isolation and characterization of the facultative methylophily *Mycobacterium* ID-Y. *J Gen Microbiol*, 1987, **133**(5): 1389–1395.
- [26] Zhao SJ, Hanson RS. Variants of the obligate methanotroph isolate 761M capable of growth on glucose in the absence of methane. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**(4): 807–812.
- [27] Quayle JR, Pfennig N. Utilization of methanol by rhodospirillaceae. *Arch Microbiol*, 1975, **102**(3): 193–198.
- [28] Trifonova R, Postma J, van Elsas JD. Interactions of plant-beneficial bacteria with the ascomycete *Coniochaeta ligniaria*. *J Appl Microbiol*, 2009, **106**(6): 1859–1866.
- [29] Holland MA, Polacco JC. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1994, **45**(1): 197–209.
- [30] Omi R, itsumori K, Yamauchi T, *et al.* Expression, purification and preliminary X-ray characterization of DL-2-haloacid dehalogenase from *Methylobacterium* sp. CPA1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2007, **63**(Pt 7): 586–589.
- [31] Ward N, Larsen O, Sakwa J, *et al.* Genomic insights into methanotrophy: the complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *PLoS Biology*, 2004, **2**(10): e303.
- [32] Madhaiyan M, Larsen O, Sakwa J, *et al.* *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylophily, l-aminocyclopropane-l-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(Pt 2): 326–331.
- [33] Kang YS, Kim J, Shin HD, *et al.* *Methylobacterium*

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- platani* sp. nov., isolated from a leaf of the tree *Platanus orientalis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(Pt 12): 2849–2853.
- [34] Deppenmeier U, Johann A, Hartsch T, *et al.* The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2002, **4**(4): 453–461.
- [35] Swingley WD, Sadekar S, Mastrian SD, *et al.* The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol*, 2007, **189**(3): 683–690.
- [36] Weon HY, Kim BY, Joa JH, *et al.* *Methylobacterium iners* sp. nov. and *Methylobacterium aerolatum* sp. nov., isolated from air samples in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58**(Pt 1): 93–96.
- [37] Kato Y, Asahara M, Goto K, *et al.* *Methylobacterium persicinum* sp. nov., *Methylobacterium komagatae* sp. nov., *Methylobacterium brachiatum* sp. nov., *Methylobacterium tardum* sp. nov. and *Methylobacterium gregans* sp. nov., isolated from freshwater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58**(Pt 5): 1134–1141.
- [38] Aslam Z, Lee CS, Kim KH, *et al.* *Methylobacterium jeotgali* sp. nov., a non-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(Pt 3): 566–571.
- [39] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW, *et al.* *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, **59**(Pt 1): 22–27.
- [40] Zhang M, FitzGerald KA, Lidstrom ME. Identification of an upstream regulatory sequence that mediates the transcription of *mox* genes in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology*, 2005, **151**(Pt 11): 3723–3728.
- [41] McDonald IR, Murrell JC. The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(8): 3218–3224.
- [42] Promden W, Vangnai AS, Pongsawasdi P, *et al.* Disruption of quinoprotein ethanol dehydrogenase gene and adjacent genes in *Pseudomonas putida* HK5. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, **280**(2): 203–209.
- [43] Goodwin PM, Anthony C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol*, 1998, **40**: 1–80.
- [44] Arfman N, Hektor HJ, Bystrykh LV, *et al.* Properties of an NAD(H)-containing methanol dehydrogenase and its activator protein from *Bacillus methanolicus*. *Eur J Biochem*, 1997, **244**(2): 426–433.
- [45] Bystrykh LV, Govorukhina Natalya I, Dijkhuizen L, *et al.* Tetrazolium-dye-linked alcohol dehydrogenase of the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis Methanolica* is a three-component complex. *Eur J Biochem*, 1997, **247**(1): 280–287.
- [46] Bystrykh LV, Vonck J, van Bruggen EF, *et al.* Electron microscopic analysis and structural characterization of novel NADP(H)-containing methanol: N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductases from the gram-positive methylotrophic bacteria *Amycolatopsis Methanolica* and *Mycobacterium gastri* MB19. *J Bacteriol*, 1993, **175**(6): 1814–1822.
- [47] Kalyuzhnaya MG, Hristova KR, Lidstrom ME, *et al.* Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. *J Bacteriol*, 2008, **190**(11): 3817–3823.
- [48] Jewell T, Huston SL, Nelson DC. Methylotrophy in freshwater *Beggiatoa alba* strains. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(17): 5575–5578.
- [49] Mennenga B, Kay CW, Gorisch H. Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: the unusual disulfide ring formed by adjacent cysteine residues is essential for efficient electron transfer to cytochrome c550. *Arch Microbiol*, 2009, **191**(4): 361–367.
- [50] Suzuki R, Lisdiyanti P, Komagata K, *et al.* *mxoF* gene, a gene encoding alpha subunit of methanol dehydrogenase in and false growth of acetic acid bacteria on methanol. *J Gen Appl Microbiol*, 2009, **55**(2): 101–110.
- [51] Hazen TC, Chakraborty R, Fleming JM, *et al.* Use of gene probes to assess the impact and effectiveness of aerobic in situ bioremediation of TCE. *Arch Microbiol*, 2009, **191**(3): 221–232.
- [52] Chen Y, Dumont MG, Cebon A, *et al.* Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes. *Environ Microbiol*, 2007, **9**(11): 2855–2869.
- [53] Chistoserdova L, Crowther GJ, Vorholt JA, *et al.* Identification of a fourth formate dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 and confirmation of the essential role of formate oxidation in methylotrophy. *J Bacteriol*, 2007, **189**(24): 9076–9081.
- [54] Korotkova N, Lidstrom ME, Chistoserdova L. Identification of genes involved in the glyoxylate regeneration cycle in *Methylobacterium extorquens* AM1, including two new genes, *meaC* and *meaD*. *J Bacteriol*, 2005, **187**(4): 1523–1526.
- [55] Veenhuis M, Salomons FA, Van Der Klei IJ. Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: a structure/function

- analysis. *Microsc Res Tech*, 2000, **51**(6): 584–600.
- [56] Vuilleumier S, Chistoserdova L, Lee MC, *et al.* *Methylobacterium* genome sequences: a reference blueprint to investigate microbial metabolism of C<sub>1</sub> compounds from natural and industrial sources. *PLoS One*, 2009, **4**(5): e5584.
- [57] Okubo Y, Jitsumori K, Yamauchi T, *et al.* Implementation of microarrays for *Methylobacterium extorquens* AM1. *Omics*, 2007, **11**(4): 325–340.
- [58] Hagishita T, Yoshida T, Izumi Y, *et al.* Efficient L-serine production from methanol and glycine by resting cells of *Methylobacterium* sp. strain MN43. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60**(10): 1604–1607.
- [59] Motoyama H, Yano H, Ishino S, *et al.* Effects of the amplification of the genes coding for the L-threonine biosynthetic enzymes on the L-threonine production from methanol by a gram-negative obligate methylotroph, *Methylobacillus glycogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42**(1): 67–72.
- [60] Motoyama H, Anazawa H, Katsumata R, *et al.* Amino acid production from methanol by *Methylobacillus glycogenes* mutants: isolation of L-glutamic acid hyper-producing mutants from *M. glycogenes* strains, and derivation of L-threonine and L-lysine-producing mutants from them. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**(1): 82–87.
- [61] Gunji Y, Yasueda H. Enhancement of L-lysine production in methylotroph *Methylophilus methylotrophus* by introducing a mutant LysE exporter. *J Biotechnol*, 2006, **127**(1): 1–13.
- [62] Brautaset T, Jakobsen OM, Josefsen KD, *et al.* *Bacillus methanolicus*: a candidate for industrial production of amino acids from methanol at 50 degrees C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**(1): 22–34.
- [63] Ikeda M. Amino acid production processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2003, **79**: 1–35.
- [64] Udo Mueller, Susanna Huebner. Economic Aspects of Amino Acids Production. Faurie R, Thommel J. Microbial production of L-amino acids, Advances in biochemical engineering/Biotechnology, New York: Springer, Berlin Heidelberg, 2003, pp.137–170.
- [65] Marx A, Wendisch VF, Kelle R, *et al.* Protein line and amino acid-based product family trees. Kamm B, Gruber PR, Kamm M. Biorefineries—industrial processes and products. Status quo and future directions. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2006, pp.201–216.
- [66] Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, *et al.* New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*—a comparison. *FEMS Yeast Res*, 2005, **5**(11): 1079–1096.
- [67] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer-Verlag, 2005.
- [68] Chistoserdova L, Vorholt JA, Thauer RK, *et al.* C<sub>1</sub> transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea. *Science*, 1998, **281**(5373): 99–102.
- [69] Distel DL, Cavanaugh CM. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *J Bacteriol*, 1994, **176**(7): 1932–1938.

## 栏目介绍

## 生物实验室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度,深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果,交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室,以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。

<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>