

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-051

面向高效光驱固碳产醇的蓝细菌合成生物技术研究进展

孙绘梨^{1, 2, 3}, 崔金玉^{1, 2, 3}, 栾国栋^{1, 2, 3}, 吕雪峰^{1, 2, 3}

(¹ 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 中国科学院生物燃料重点实验室, 山东 青岛 266101; ² 山东能源研究院, 山东 青岛 266101; ³ 青岛新能源山东省实验室, 山东 青岛 266101)

摘要: 蓝细菌能够直接利用二氧化碳和太阳能通过光合作用生产乙醇, 为提供绿色生物燃料提供了一条有前途的可持续路线。光驱固碳合成乙醇是最具代表性的蓝细菌光合生物制造技术。乙醇并不属于典型的蓝细菌天然代谢物, 蓝细菌产醇细胞工厂的构建需要通过向基因组中导入异源的丙酮酸脱羧酶并结合异源/内源醇脱氢酶的过量表达来实现; 在过去二十多年间, 通过蛋白、途径、底盘、工艺层面的系统优化, 蓝细菌产醇细胞工厂的效能得到有效提高, 乙醇成为目前产量最高、产率最高、碳流分配率最高的蓝细菌代谢工程产物。本文总结并比较了“蓝细菌生物质炼制产醇”“蓝细菌固碳产糖-产醇”“蓝细菌固碳直接产醇”等三种光驱固碳产醇技术路线, 并以构建光合细胞工厂驱动二氧化碳一站式转化为乙醇的技术路线为主, 从乙醇合成途径优化与强化、蓝细菌光合碳代谢网络的调节与重塑、代谢网络模型与计算机辅助设计引导细胞工厂构建和优化三个方面对蓝细菌高效光驱固碳合成乙醇的技术发展历程和基本现状进行了介绍, 特别是强调了计算生物学、系统代谢工程、生物材料嵌合等研究手段在本领域的应用进展; 在此基础上, 也从新型底盘开发、高通量筛选技术应用、细胞工厂的稳定性与鲁棒性优化等角度对蓝细菌固碳产醇的未来发展方向进行了展望。

关键词: 蓝细菌; 光合生物制造; 合成生物学; 代谢工程; 乙醇

中图分类号: Q815 文献标志码: A

Progress of cyanobacterial synthetic biotechnology for efficient light-driven carbon fixation and ethanol production

SUN Huili^{1, 2, 3}, CUI Jinyu^{1, 2, 3}, LUAN Guodong^{1, 2, 3}, LYU Xuefeng^{1, 2, 3}

(¹Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China; ²Shandong Energy Institute, Qingdao 266101, Shandong, China; ³Qingdao New Energy Shandong Laboratory, Qingdao 266101, Shandong, China)

Abstract: The utilization of solar energy and carbon dioxide by cyanobacterial cell factories for photosynthetic ethanol production represents a promising and sustainable route towards green biofuels. Ethanol is one of the most

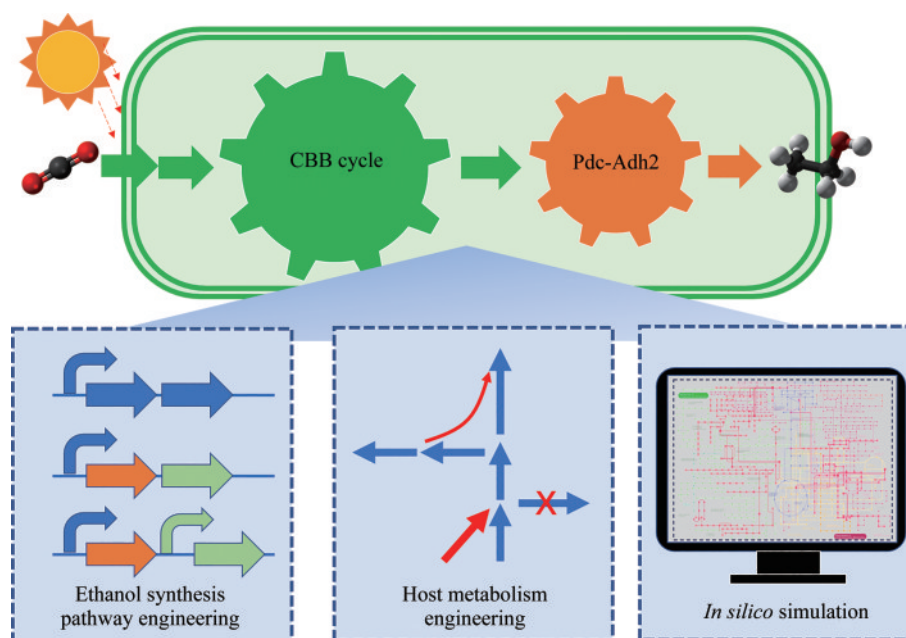
收稿日期: 2023-07-17 修回日期: 2023-08-24

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFA0909700); 国家自然科学基金 (32270103, 32070084); 山东省博士后创新项目 (SDCX-ZG-202202036); 中国博士后科学基金第70批面上项目 (2021M703320)

引用本文: 孙绘梨, 崔金玉, 栾国栋, 吕雪峰. 面向高效光驱固碳产醇的蓝细菌合成生物技术研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(6): 1161-1177

Citation: SUN Huili, CUI Jinyu, LUAN Guodong, LYU Xuefeng. Progress of cyanobacterial synthetic biotechnology for efficient light-driven carbon fixation and ethanol production[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(6): 1161-1177

representative products of the cyanobacterial photosynthetic biomanufacturing technology. Cyanobacterial ethanol production systems could serve as models for developing and optimizing advanced synthetic biology and metabolic engineering strategies. While most known cyanobacterial species lack the ability to synthesize and accumulate ethanol, the introduction and overexpression of heterologous pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase (heterologous or native) are required to enable ethanol synthesis in cyanobacteria. In the past decades, the performance of ethanol-producing cyanobacterial cell factories has been significantly improved through systematic optimization of proteins, pathways, chassis cells, and cultivation techniques. Cyanobacterial ethanol production technology has yielded the highest titer, productivity, and carbon partitioning ratio among all current cyanobacterial biomanufacturing systems. Recent advances have led to further improved efficiency of cyanobacterial ethanol photosynthetic production. Based on extensive systems biology data and rapidly developing computer modeling technologies, more accurate simulations of cyanobacterial physiological characteristics and metabolic networks have become possible. These simulations facilitate the identification of potential modification targets, thereby enhancing ethanol production capacity and guiding the design of next-generation alcohol-producing cell factories. With a more comprehensive understanding of cyanobacteria physiology and metabolism, systematic genome modifications and pathway optimizations have been performed, resulting in further improved ethanol productivity and final titers. Concurrently, efforts have been made to improve model strains and evaluate newly emerging non-conventional strains to establish more robust and efficient ethanol production processes. In conclusion, this review summarizes and compares three technological routes of light-driven carbon fixation and ethanol production in cyanobacteria, introduces the technological development trajectory and basic status of efficient light-driven carbon fixation for ethanol synthesis by cyanobacteria, provides valuable and up-to-date insights to facilitate the development of more promising cyanobacterial ethanol photosynthetic production technologies and explores future challenges and directions in this dynamic field.



Keywords: cyanobacteria; photosynthetic biomanufacturing; synthetic biology; metabolic engineering; ethanol

全球范围内，对化石能源的长期依赖导致了大气中二氧化碳和其他温室气体排放的持续增加，

这被认为是引发全球性气候危机的主要原因；发展绿色、环保的生物燃料制造技术有助于降低对

化石燃料的依赖性,并促进社会的可持续发展^[1-2]。生物乙醇是最具代表性、也是最先实现商业化应用的生物燃料产品,已经作为燃料添加剂甚至替代燃料而被广泛使用,并产生了巨大的经济效益^[3-5]。目前,在燃料乙醇得到广泛应用美国、巴西以及欧盟地区,生物乙醇主要以酿酒酵母为底盘,通过对大宗糖原料的发酵炼制而获取,而作为发酵原料的糖则主要通过对玉米、甘蔗等富糖生物物质的处理而制备,这一路线也是“第一代生物燃料”技术体系的典型代表^[6-7]。该技术体系原料易得、工艺成熟,因此得以迅速实现产业化应用和商业化推广;但毋庸置疑的是,其从面世之初就面临着“与人争粮、与粮争地”的巨大社会争议,特别是在全球粮食危机加剧的大背景下,其向广大发展中国家和欠发达地区的推广应用面临愈加严峻的限制和挑战。为发展更具可持续性、可推广性的生物乙醇技术和产业,拓展生物乙醇炼制的原料来源,发展更加高效的生产技术和工艺体系,成为生物乙醇技术发展的核心问题。以此为引导,逐渐发展形成了秸秆纤维素、非粮能源作物等非粮生物物质为原料的第二代生物燃料技术和以大宗藻类生物物质为原料的第三代生物燃料技术。然而,相比较于第一代技术,后续技术由于在原料可及性、原料处理成本以及原料炼制效率方面的显著劣势,其在产业应用方面迟迟未取得突破^[8-9]。

以创建“碳中和”的可持续发展型社会经济模式为目标,跳出“二氧化碳→生物质→糖→乙醇”的传统链条,直接开发“二氧化碳→乙醇”的新型制造路线无疑具有极大的吸引力和应用前景,这意味着绕开植物种植的时空需求以及生物质制糖的成本需求,直接实现“负碳”型燃料产品制备和“零碳”型能源供应模式。随着催化科学和材料科学的发展,“二氧化碳→乙醇”的直接转化在化学层面早已取得突破,而且随着催化剂与催化装置的优化设计和开发,其选择性与效率也在不断提升^[10-12];然而,该技术路线的工程放大仍然受制于催化剂稳定性、反应条件维持、工程装置成本等问题,因此在短期内难以实现成熟的商业应用。随着合成生物学和代谢工程技术的发展,基于生物学过程的“二氧化碳→乙醇”直接

转化技术同样取得了突破。以天然具备固碳能力的微生物细胞为底盘,或者将二氧化碳固定元件与途径导入大肠杆菌、酿酒酵母等经典异养底盘细胞,都可以实现对二氧化碳的固定与转化,使之成为生物绿色合成的原料;在此基础上,进一步整合乙醇合成途径,理论上即可实现二氧化碳向乙醇的定向转化^[13]。

蓝细菌,又称蓝藻、蓝绿藻,是一类能进行放氧型光合作用的原核微生物,广泛分布在地球各类生态环境中,是生物圈初级生产力的主要供应者之一^[14-16]。传统上,蓝细菌作为光合作用研究的模式体系而被关注;近年来,又因其具有生长速度快、光合效率高、细胞结构简单、遗传操作便捷等优势,而被认为是极具潜力的微生物光合平台^[17-19]。以蓝细菌为底盘,应用合成生物技术进行代谢网络重塑,已经成功实现数十种天然和非天然代谢产品的光驱固碳合成,而其中,乙醇是最早报道也最具代表性的蓝细菌代谢工程产品^[20-22]。自1999年首个蓝细菌光驱固碳合成乙醇细胞工厂报道以来^[21],通过蛋白、途径、底盘、工程层面的系统优化,蓝细菌固碳产醇已成为目前产率、产量、碳流分配率最高的蓝细菌光合生物制造技术,也成为蓝细菌合成生物学和代谢工程技术的代表性模式体系,对其他类型光合细胞工厂的发展和优化具有很好的示范性与引领性^[22]。笔者团队此前已经对蓝细菌固碳产醇技术的发展历史进行了介绍^[23-24],本文则将在前期总结的基础上,重点介绍本领域在应用计算生物学、系统代谢工程、生物-材料嵌合技术优化蓝细菌产醇细胞工厂效能方面的最新进展,并对该技术的未来发展方向和面临的挑战进行展望。

1 基于蓝细菌的固碳产醇路线

蓝细菌是地球上最早出现的放氧型光合生物,也是唯一能够进行放氧型光合作用的原核微生物类群,在地球大气从无氧到有氧、从高碳到低碳的转变过程中起到至关重要的作用。现阶段,蓝细菌仍然是地球初级生产力的重要来源,供应了全球范围内20%~30%的固碳量。相比于高等植物,蓝细菌具有更快的固碳和生长速度、更简单

的细胞结构和生活史, 因此更适于进行集约化、立体式的培养, 以实现对土地和水资源更高效的利用^[25-26]。以蓝细菌的工程化、规模化培养为基础, 最终达到固定二氧化碳制造乙醇的目的, 理论上存在以下三种路线(图1)。

1.1 基于蓝细菌含糖生物质利用的发酵合成乙醇路线

培养蓝细菌收获细胞生物质后, 可以提取其中以糖原为代表的碳水化合物, 进而利用酿酒酵母等异养型产醇细胞工厂发酵生产乙醇。相比于植物纤维素, 蓝细菌糖原结构和组成更加简单, 提取难度较低, 仅需简单的处理即可用作发酵, 是极具潜力的新型发酵糖原料。在这一方向上, 主要通过代谢和过程优化, 达到调控蓝细菌光合碳代谢网络、加强胞内糖原的合成与积累、提高含糖生物质的生产速度的目的^[27]。部分蓝细菌藻株天然即具有较高的糖原含量, 例如2016年报道的速生聚球藻 *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, 其在最适生长条件下 [42 °C, 光强 1500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$], 胞内糖原含量可以达到细胞干重的 50%, 是非常理想的糖原生产藻株^[28]。通过培养条件优化可以进一步有效提升蓝细菌细胞中的糖原含量, 例如, Aikawa 等^[29] 以海洋聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 (聚球藻 PCC 7002) 为对象, 针对藻株培养过程的光、盐、碳、氮等多种因素进行优化, 最终通过采用高光照、高二氧化碳供应并结合适度

限氮的策略, 有效提高了该藻株的糖原合成与积累, 在 7 d 培养过程中实现了 3.5 g/L 的糖原生产, 平均速率达到 0.5 g/(L·d), 而在此过程中细胞生物质也实现 7.2 g/L 的积累 (糖原占比 49.8%)。除了直接利用天然藻株之外, 通过合成生物学和代谢工程手段直接调节蓝细菌天然代谢, 也可以实现糖原的高效积累, 其中代表性的工作为 Comer 等^[30] 在聚球藻 PCC 7002 中评价了加强糖原合成与弱化糖原降解两种改造策略在提高糖原积累方面的作用效果, 发现在持续光照和光暗交替两种模式下, 只有弱化糖原降解的策略 (敲除糖原降解酶) 可以提高藻株的生物量和糖原含量 (幅度为 15%~20%), 意味着其更适合作为潜在的含糖生物质生产藻株。

1.2 基于蓝细菌定向产糖的发酵合成乙醇路线

除了以生物质形式在胞内积累糖原外, 蓝细菌还可以被开发为光驱固碳产糖细胞工厂, 直接定向转化二氧化碳合成并分泌小分子糖类物质。蔗糖是一类重要的生物发酵原料, 而大量蓝细菌藻株在盐胁迫条件下会合成并在胞内积累蔗糖, 以抵抗胞外高渗胁迫^[31]。2012年, Ducat 等^[32] 向聚球藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (聚球藻 PCC 7942) 中导入来自大肠杆菌的蔗糖转运蛋白 CscB, 首次实现蓝细菌分泌型定向产糖, 随后十余年间, 通过系统的代谢工程改造和底盘优化, 蓝细菌光驱固碳合成蔗糖的效率和产量得到显著

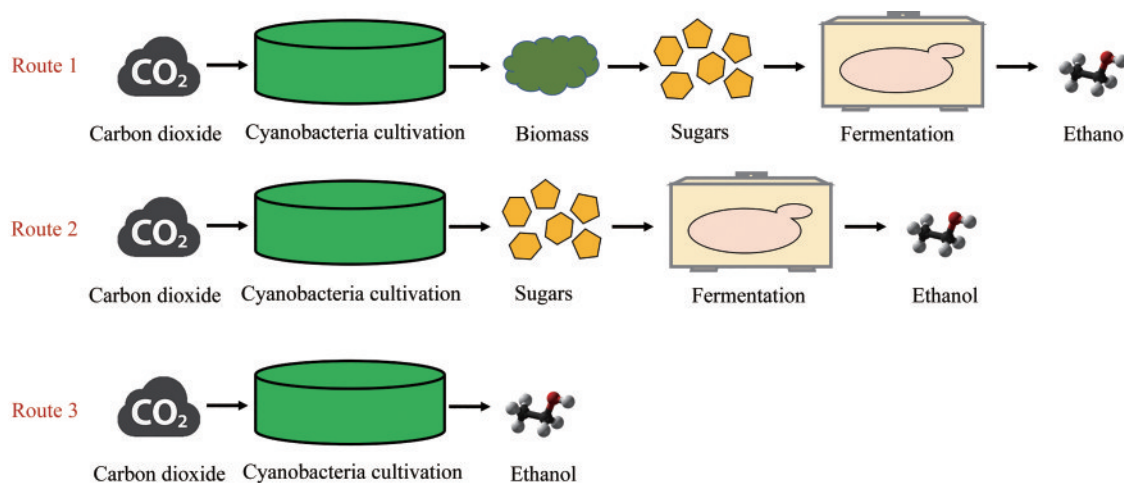


图1 蓝细菌固定二氧化碳合成乙醇的三种发展路线

Fig. 1 Three routes for cyanobacterial ethanol production from carbon dioxide

提升, 可实现单批次 8 g/L 的蔗糖生产^[28, 33]。近期, 笔者团队同样以聚球藻 PCC 7942 为底盘, 通过阻断内源性葡萄糖激酶活性, 成功实现了聚球藻光驱固碳合成葡萄糖, 有效拓展了蓝细菌产糖网络^[34]。以蓝细菌为平台, 定向转化二氧化碳合成蔗糖和葡萄糖等重要的发酵原料, 进而通过异养发酵即可实现乙醇的合成^[35]。而除了这种离位的糖类利用模式外, 同样还可以进行产糖藻株与产醇菌株的共培养, 原位实现对蓝细菌细胞分泌糖类物质的利用与转化, 理论上既可以节省糖类物质分离纯化制备的成本, 也可以减少产糖过程外部杂菌入侵污染的可能性, 在未来无疑也非常具有探索的价值^[36-38]。

1.3 蓝细菌直接光驱固碳合成乙醇路线

本质上, 上述两条路线还是间接性的固碳产糖路线, 基于蓝细菌利用二氧化碳转化合成的碳水化合物能够作为异养微生物体系发酵原料这一理念, 将蓝细菌作为固碳平台与经典的生物乙醇细胞工厂和发酵体系进行对接。与之对比, 更具吸引力、也是本文将重点介绍的是蓝细菌直接光驱固碳合成乙醇的技术路线。乙醇并不是天然蓝细菌藻株的典型代谢产物, 自然界中仅发现少数藻株在暗培养模式下能够合成微量的乙醇。通过将异源合成途径导入到蓝细菌基因组中, 即可将天然的光合固碳网络与人工构建的乙醇合成通路有效地连接起来, 实现二氧化碳向乙醇的定向转化, 这可以省去异养发酵的过程, 极大提高整个过程的效率^[21]。此前, 佐治亚理工大学的研究团队通过过程模拟和热力学计算, 对蓝细菌直接固碳产醇技术进行了全生命周期碳排放足迹评估^[39]。研究人员发现, 相较于经典异养发酵产醇体系, 蓝细菌固碳产醇体系的乙醇浓度较低, 导致乙醇分离制备过程的能量消耗较大, 是全过程碳足迹的主要“贡献”源; 而同时蓝细菌生物质总量较低, 难以通过废弃生物质的利用来获取热量或电力并进行能量抵消。如果将蓝细菌光驱固碳产醇体系与天然气热电系统耦合, 以最终生产 0.5%~5% 浓度乙醇为预设进行过程评估, 则获得 1 MJ 乙醇能量的全生命周期温室气体净排放量范围在 29.8~

12.3 g CO₂e (二氧化碳当量), 相比传统汽油燃料的碳足迹减少了 67%~87%^[39]。近期, 研究人员进一步对评估模型进行修正, 发现当配以生物质热电体系来进行二氧化碳捕集和储存时, 有望实现整体负碳排放水平的乙醇制备, 获得 1 MJ 乙醇能量的过程的温室气体净排放量为 -19 g CO₂e^[40]。上述评估结果表明, 通过与生物质或者天然气为原料的热电系统联产, 蓝细菌固碳产醇技术将有可能具备供应“碳中性”燃料产品的应用前景; 同时值得注意的是, 全周期评估还表明, 培养体系积累的乙醇浓度对于蓝细菌固碳产醇系统的能量耗费和碳足迹具有决定性影响, 提高乙醇生产水平是降低技术成本和碳足迹的重要方向。

2 乙醇合成途径优化与强化

如前所述, 蓝细菌光驱固碳产醇细胞工厂的构建和优化基础是人工导入乙醇合成途径, 而该途径通常由两步催化反应组成: 来自运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 的丙酮酸脱羧酶 (pyruvate decarboxylase, Pdc) 催化丙酮酸脱羧形成乙醛^[21], 来自集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (集胞藻 PCC 6803) 或者大肠杆菌的 2 型醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, Adh2) 消耗 NAD(P)H 转化乙醛为乙醇^[41-42]。热力学分析显示, 得益于丙酮酸脱羧与乙醛还原反应极佳的热力学优势, Pdc-Adh2 途径在蓝细菌代谢网络所有潜在的乙醇合成途径中具有最高的驱动力^[43], 而 Pdc 和 Adh2 两种酶的活性、丰度和配比对工程藻株的乙醇产率和产量至关重要。蓝细菌光合产乙醇相应的优化策略如表 1 所示。

此前, 针对 *adh2* 基因的优化, 已经显著提升了蓝细菌产醇细胞工厂的效能。最先使用的运动发酵单胞菌 *adh2* 基因^[21], 偏好以 NADH 为辅因子, 而蓝细菌中还原力的主要形式是 NADPH, 采用集胞藻 PCC 6803 来源的偏好以 NADPH 为辅因子的 *slr1192* 基因进行替代后, 显著增强了乙醛还原催化步骤与蓝细菌代谢背景的适配性, 将乙醇产率提高了 50%^[41], 而该基因随后也被广泛应用于蓝细菌产醇细胞工厂的构建中。相比于 Adh2, 丙酮酸脱羧酶催化活性被认为是整个途径速率的

表1 蓝细菌光合产乙醇的优化策略及效果

Table 1 Optimization strategies for ethanol production by cyanobacteria photosynthesis

策略	菌株	操作	效果	参考文献
优化Adh2的活性	PCC 6803	采用集胞藻 PCC 6803 来源的偏好使用 NADPH 为辅因子的 <i>slr1192</i> 基因替代运动发酵单胞菌 <i>adh2</i> 基因	增强了乙醛还原催化步骤与蓝细菌代谢背景的适配性,将乙醇产率提高了 50%	[41]
优化 Pdc 与 Adh2 的实际丰度和配比	PCC 6803	使用 5 种强度不同的 RBS 分别控制 <i>pdc</i> 与 <i>adh2</i> 的表达,并进行组合,评价其乙醇产量及酶活	发现乙醇合成通量更强烈地决定于 <i>pdc</i> 而非 <i>adh2</i> 的表达强度和丰度,在 5 种 RBS 控制的不同 <i>pdc</i> 表达强度的突变体中, <i>pdc</i> 表达强度最高的藻株乙醇合成能力最强,培养 7 d 时的乙醇含量约为 1 g/L	[44]
强化卡尔文循环以提高蓝细菌固碳效率并加强乙醇合成	PCC 6803	分别将 RuBisCo、SBPase、FBA 或 TK 基因与 Pdc-Adh2 途径共表达	分别将乙醇产量提高了 55%、67%、37% 和 69%,同时,总生物量也分别增加 7.7%、15.1%、8.8% 和 10.1%	[45]
		在表达 Pdc-Adh2 途径的基础上,共表达 FBA 与 TK 基因	相比于单独表达 FBA 藻株的乙醇产量提高 9 倍以上	[46]
		在表达 Pdc-Adh2 途径的基础上,共表达 SBPase 与 FBA 基因	相比 FBA 单独表达藻株的乙醇产量提高 2.5 倍	[46]
加强蓝细菌底盘藻株对无机碳源的吸收	PCC 7942	在表达 Pdc-Adh2 途径的基础上,过量表达 <i>ictB</i> 、 <i>ecaA</i> 以及 <i>groESL</i>	提高了在模拟烟道气条件下藻株的生物物质含量(提高约 4 倍,0.9 g/L, 72 h)和乙醇含量(提高约 20 倍,0.2 g/L, 72 h)	[47]
敲除丙酮酸消耗途径,并将 TCA 循环中的碳流重新导回丙酮酸节点以增强乙醇合成前体供应	PCC 6803	在表达 Pdc-Adh2 途径的基础上,敲除了 PEP 合成酶(PpsA)基因,催化糖原合成的关键酶(GlgC)基因,并过量表达大肠杆菌来源的苹果酸酶(MacB)基因	乙醇产量提升至 1.09 g/L(7 d)	[48]
阻断糖原合成途径	PCC 7002	将两个乙醇合成途径(Pdc-Adh2)拷贝整合至基因组中两个糖原合成酶(GlgA)编码基因的位点,从而同时加强乙醇合成通量并阻断糖原合成途径竞争	在实验室环境柱式反应器中乙醇产量达到 2.2 g/L(10 d),在户外挂袋式培养中乙醇产量达到 0.8 g/L(7 d)	[49]
阻断糖原和 PHB 的合成途径	PCC 6803	敲除糖原合成关键基因 <i>glgC</i>	乙醇产量从 0.212 g/L(3 d)提高至 0.297 g/L(3 d)	[50]
		在以上基础上进一步敲除 <i>phaCE</i> 基因以阻断 PHB 合成路径	乙醇产量提高至 0.332 g/L(3 d)	[50]
		对以上藻株进行缺氮处理	乙醇产量达到 0.6 g/L(3 d)	[50]
共培养“碳汇”工程策略	PCC 6803	将敲除 <i>glgC</i> 和 <i>phaA</i> 基因以阻断糖原和 PHB 合成途径的藻株和整合了 Pdc-Adh2 途径的工程藻株进行共培养	双菌体系中的乙醇产量达到 4.6 g/L(25 d),而单平台藻株(基因组同时进行乙醇合成途径整合和糖原、PHB 合成途径阻断)的产量 4.1 g/L(25 d)	[51]
补充还原力供应	PCC 6803	过量表达内源 G6PDH 编码基因 <i>zwf</i> ,并导入 Pdc-Adh2 途径	乙醇产量从 0.44 g/L 增加到 0.59 g/L(14 d),同时生物量积累增加了 50%	[42]
向蓝细菌培养体系中添加金属氧化物以介导 NADPH 再生	PCC 6803	在培养体系中添加 MgO 或 Fe ₂ O ₃	乙醇产量达到 5.1 g/L 或 4.851 g/L(25 d)	[52]
区室化合成乙醇并靶向性模拟缺氮环境	PCC 7120	在异形胞中使用特异性启动的 <i>hupS</i> 启动子控制 Pdc-Adh2 的表达	乙醇产量达到 1.68 g/L(23 d)	[53]
		在以上基础上,使用特异性靶向异形胞的 CRISRPi 基因表达系统抑制 <i>glgA</i> 的表达	乙醇产量提高了 27%	[54]
通过优化的基因组尺度代谢网络模型,预测乙醇/生物量耦合突变体	PCC 6803	预测最优突变体为通过 13 个基因的敲除来达到耦联乙醇合成和细胞生长的效果	预测乙醇产量为 3.498 g/L(4 d)	[55]

控制节点,对同型乙醇发酵过程的效率有更大的影响,挖掘和应用更高效的*pdc*基因对提高乙醇合成通量具有重要意义^[56]。早在2002年,Raj等^[57]即从棕榈酵母菌*Zymobacter palmae*中鉴定并克隆了一个新的*pdc*基因,其编码的丙酮酸脱羧酶(PdcZP)比普遍使用的运动发酵单胞菌同源蛋白(PdcZM)具有更高的比活性和丙酮酸底物亲和性。然而,近期的一项研究显示,在集胞藻PCC 6803中用PdcZP替代PdcZM时,不仅无法提高乙醇产量,反而导致工程藻株的生物量和乙醇积累速率都大幅降低,意味着该基因编码产物与蓝细菌代谢网络无法适配,也无法发挥其原本的催化活力优势^[58]。鉴于此,以已经证实与蓝细菌底盘具有高度适配性的PdcZM基因为基础,通过理性设计或定向进化策略进行改造,或许更可能获得兼具效率与适配性的Pdc突变体,进而提高乙醇产量。

此前,笔者团队采用体外重构的策略,对Pdc-Adh2产醇途径进行动态滴定分析^[56],发现相较于*slr1192*编码的Adh2,Pdc的催化活性对产醇途径的效率影响更大,对于现阶段的产醇蓝细菌细胞工厂而言,提高Pdc的活性和表达强度是更可靠的策略。近期,Bartasun等^[44]结合系统的体内遗传改造,量化分析了Pdc和Adh2对集胞藻PCC 6803中产醇通量的影响。研究人员首先基于绿色荧光蛋白强度信号分析,鉴定了集胞藻PCC 6803中一系列具有不同翻译强度的核糖体结合位点序列,进而选择不同强度的核糖体结合位点序列分别与Pdc和Adh2编码基因进行组合,构建多顺反子表达矩阵,在转化获得重组藻株后,分析乙醇合成效率并量化Pdc与Adh2的实际丰度。在此基础上,系统分析了核糖体结合位点序列/强度、操作子中基因位置以及代谢网络修饰对乙醇合成通量的影响。通过蛋白定量和乙醇合成通量的共同分析,研究人员发现乙醇合成通量更强烈地决定于Pdc而非Adh2的表达强度和丰度;在蛋白质丰度水平,Pdc丰度与乙醇产量具有强烈的正相关性($R^2=0.89$),而Adh2的影响则相对较小($R^2=0.44$);同时高水平的Pdc表达甚至会带动Adh2的表达,二者具有一定的相关性($R^2=0.51$),高表达的Adh2对Pdc的表达则无此效应^[44]。该研究还以乙醇合

成为例,对蓝细菌代谢工程中人工操纵子的构建策略进行了探索,发现操纵子中5'端起始位置基因的表达水平会对后续基因的表达具有严重影响,这意味着翻译耦联机制的存在^[59]。

3 蓝细菌光合碳代谢网络的调节与重塑

如上所述,仅仅通过将包含两个基因的Pdc-Adh2途径,以“插件”形式整合至蓝细菌基因组中,即可将其转化为光驱固碳产醇细胞工厂;而在此基础上,通过途径整体或者关键节点(Pdc)的强化表达,可以有效“拓宽”乙醇合成线路的通量。若要进一步加强乙醇合成效率,无疑还需对蓝细菌光合代谢网络进行重塑和强化,以实现卡尔文循环中固定的碳流更稳定、更高效地重定向至乙醇合成途径。结合领域内近期的研究进展,以下将从强化固碳能力、加强前体供应、弱化竞争途径、加强还原力供应等几个方面介绍产醇细胞工厂的代谢网络优化研究进展(表1)。

3.1 提升底盘细胞固碳能力

在光自养培养模式下,蓝细菌细胞工厂中合成乙醇所需的碳和能量均是由光合作用直接提供的,因此强大的碳固定和转化过程将是高效生产乙醇的重要前提。作为优化光合细胞工厂的常用策略^[17, 60],卡尔文循环的强化已经被用于提高蓝细菌的固碳效率并加强乙醇合成。Liang等^[61]系统评估了卡尔文循环中关键蛋白对集胞藻PCC 6803光合固碳、生长和产醇的影响,发现过量表达核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCo)、景天庚酮糖-1,7-二磷酸化酶(sedoheptulose-1,7-biphosphatase, SBPase)、果糖1,6-二磷酸醛缩酶(fructose biphosphate aldolase, FBA)以及转酮酶(transketolase, TK),均能改善集胞藻PCC 6803细胞在中等光照强度[100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]条件下的光合效率和细胞生长速度。将上述4个基因在集胞藻PCC 6803中与Pdc-Adh2途径进行共表达,可以分别将乙醇产量提高55%、67%、37%和69%,而总生物量(细胞生物质干重与乙醇产量的

总和)也分别增加7.7%、15.1%、8.8%和10.1%^[45]。同时,需要注意的是,在重组藻株的代谢网络中,乙醇合成途径的碳分配率(即乙醇合成所消耗的碳在细胞总固碳量中的比例)会随着卡尔文循环固碳能力的增强而明显增加,因此可以推断,当异源途径(如Pdc-Adh2)在蓝细菌代谢网络中被激活时,其可以作为补充的碳汇机制来缓冲过载的光合作用碳通量。近期,该研究团队报道,将上述基因(RuBisCo、SBPase、FBA、TK)进行组合表达,可以进一步提升重组菌株的产醇效果。通过FBA与TK的共表达,可以比单独表达FBA藻株的乙醇产量提高9倍以上,而SBPase与FBA的过量表达,可以比FBA单表达藻株的乙醇产量提高2.5倍,进一步显示了优化卡尔文循环关键节点蛋白表达在提高重组藻株产醇效能上的巨大潜力^[46]。

在卡尔文循环的直接固碳环节之外,加强蓝细菌底盘藻株对无机碳源的吸收,同样有利于提高细胞工厂的固碳和产醇效能。此前,Kamennaya等^[62]在集胞藻PCC 6803中过量表达碳酸氢盐转运体编码基因**bicA**,将重组藻株在空气培养过程中的生长速度提高了2倍。近期,Chou等^[47]将类似策略应用于聚球藻PCC 7942产醇细胞工厂的改善上,通过过量表达另外一个碳酸氢盐转运体编码基因**ictB**^[63]、碳酸酐酶编码基因**ecaA**^[64]以及分子伴侣系统**groESL**^[65],最终成功提升了产醇细胞工厂的固碳能力和抗逆能力,使其可以利用模拟工厂烟道气(CO₂含量为25%、SO₂含量为80~90 μL/L、NO含量为90~100 μL/L)中的二氧化碳进行稳定生长和产醇。

3.2 加强乙醇合成前体供应

以蓝细菌为底盘进行乙醇合成细胞工厂构建,人工构建的乙醇合成途径(Pdc-Adh2)与固碳代谢网络之间的接口是丙酮酸这一重要的代谢物,为了提高二氧化碳向乙醇的转化率,一方面,可以通过乙醇合成途径的优化和强化发挥“拉”(pull)的作用,另一方面,也需要加强碳流向丙酮酸的分配、减少丙酮酸向下游其他代谢途径的分流,最终提高丙酮酸的丰度,从“推”(push)

的角度加强乙醇合成途径的前体供应。Gao等^[48]以集胞藻PCC 6803为底盘,以运动发酵单胞菌来源的Pdc和大肠杆菌来源的Adh2(*yqhD*)构建乙醇合成途径并导入中性位点,获得了能够合成乙醇的出发藻株。在此基础上,敲除了催化丙酮酸向磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)转化的PEP合成酶PpsA、催化糖原合成的关键酶GlgC,成功将重组藻株的乙醇生产能力提高了50%。进一步,研究人员还通过过量表达大肠杆菌来源的苹果酸酶(malic enzyme, MacB)^[66],将TCA循环中的碳流重新导回丙酮酸节点,使乙醇产量从0.7 g/L提升至1.09 g/L(7 d),此过程中前4天培养的乙醇产率达到0.248 g/(L·d)。苹果酸酶的过量表达,在上述工作提升乙醇合成能力的过程发挥了关键作用,其不仅减少了整个光合碳代谢网络的碳损失、提升了碳原子经济性,而且在提高丙酮酸丰度的同时还能够加强NADPH的供应,为乙醇合成提供更多的还原力。值得注意的是,该细胞工厂0.248 g/(L·d)的乙醇产率是以空气中的二氧化碳为碳源而实现的,表明采用系统代谢工程优化细胞碳代谢网络后,集胞藻PCC 6803的固碳产醇能力确实得到了极大的提升^[48]。

3.3 弱化底盘细胞碳汇通量

加强蓝细菌底盘的光合固碳效率,可以起到拓源、增加整体碳流供应的效果,在此基础上还需要进行碳流分配的优化调控,而除了加强乙醇途径之外,对竞争性途径进行弱化,迫使碳流分配至乙醇合成途径中也具有重要意义。相比经典的异养微生物底盘,蓝细菌具有独特的碳汇机制,光合作用固定的碳流和能量中超出细胞生长和维持所需的部分,通常将以糖原和聚羟基丁酸酯(poly-β-hydroxybutyrate, PHB)等大分子的形式进行储备,发挥“碳汇”的作用。阻断糖原和PHB的合成途径,迫使细胞将更多的碳流导向目标产物的合成途径中,已成为蓝细菌光合细胞工厂优化的常见策略^[27]。笔者团队以海洋聚球藻PCC 7002为底盘,设计了将两个乙醇合成途径(Pdc-Adh2)拷贝整合至基因组中两个糖原合成酶(glycogen synthase, GlgA)编码基因的位点,达

到同时加强乙醇合成通量并阻断糖原合成途径竞争的效果。重组藻株在实验室环境柱式反应器中培养10 d后,乙醇产量达到2.2 g/L。研究团队对该藻株还进行了户外培养测试,虽然糖原合成途径的缺失影响了其生存鲁棒性,在户外挂袋式培养中藻细胞的生长状态仅能维持3 d,但其产醇过程却在7 d培养过程中始终保持,最终乙醇产量达到0.8 g/L^[49]。Namakoshi等^[50]在集胞藻PCC 6803产醇细胞工厂中敲除糖原合成关键基因*glgC*,将细胞工厂的乙醇产量从0.212 g/L提高至0.297 g/L;进一步敲除另外一种潜在碳汇物质PHB的合成路径,能将乙醇产量提高至0.332 g/L。对上述细胞工厂进行缺氮处理,乙醇产量将达到0.6 g/L,未进行碳汇途径阻断的对照体系中乙醇产量却会显著降低,上述结果充分证明对碳汇途径的改造能够有效激发光驱固碳细胞工厂的合成潜力^[27]。近期,Velmurugan等^[51]提出了应用“碳汇”工程优化蓝细菌光驱固碳产醇能力的一种新型策略,区别于传统单平台的模式,研究人员构建了两种不同的集胞藻PCC 6803工程藻株,第一种藻株进行糖原和PHB合成途径的阻断,使其细胞正常生长代谢需求之外的碳流无法以碳汇形式储存,而是以葡萄糖、乙酸、琥珀酸等形式分泌至培养体系中,并被整合了乙醇合成途径的第二种工程藻株所吸收和利用。采用上述共培养策略,双菌体系中的乙醇产量达到4.7 g/L,相较于单平台藻株(基因组同时进行乙醇合成途径整合和糖原、PHB合成途径阻断)的产量(4.1 g/L)有了大幅提升。

3.4 加强乙醇合成的还原力供应

除了作为乙醇合成前体的丙酮酸之外,蓝细菌固碳产醇细胞工厂中还原力的供应情况同样极大地影响乙醇合成效率。目前广泛使用的集胞藻PCC 6803来源的Adh2(*slr1192*基因编码),偏好于以NADPH为辅因子催化乙醛还原反应,与蓝细菌中高NADPH、低NADH的代谢特点有较好的适配性^[56, 67-68]。在此基础上,通过生理和代谢调控策略,进一步优化NADPH的供应,是提升光驱固碳产醇效能的重要方向。Choi等^[42]设计了改造蓝细菌碳代谢网络、补充还原力供应的策略,通过

在集胞藻PCC 6803中过量表达内源G6PDH编码基因*zwf*,发现细胞内NADPH浓度可增加1.5倍;在此基础上,导入Pdc-Adh2产醇途径后,所获得重组藻株与没有过表达*zwf*的对照菌株相比,乙醇产量增加了33%,细胞生物量积累也增加了50%。近期,Velmurugan等^[52]发展了向蓝细菌培养体系中添加金属氧化物以介导NADPH再生,促进光驱固碳产醇的新策略。此前,已有研究结果表明,金属氧化物(含碳TiO₂等)可以催化NADH的再生^[69-70],受此启发,研究人员首先通过体外实验证实,当存在稳定电子供体时,无需氧化还原酶的存在,金属氧化物即可以直接介导NADP向NADPH的转化;进一步,研究人员向集胞藻PCC 6803产醇细胞工厂培养体系中添加MgO和不同浓度的NADPH,以保证合成过程中的还原力供应,最终成功将乙醇产量提高2倍,培养25 d后,乙醇累积量达到5.1 g/L^[52],在不进行遗传改造的前提下,成功实现了产醇细胞工厂的还原力供应优化。

3.5 区室化分割与靶向性环境胁迫模拟

目前,绝大多数的蓝细菌光驱固碳合成乙醇研究是在单细胞蓝细菌底盘藻株中进行的,但近期,Ehira等^[53]在丝状蓝细菌鱼腥藻*Anabaena* sp. PCC 7120(鱼腥藻PCC 7120)中进行了相关尝试。鱼腥藻PCC 7120是代表性的多细胞丝状蓝细菌,此前广泛应用于固碳、固氮、细胞分化的研究中,而作为固碳产醇藻株的开发底盘,其作为丝状藻株具有潜在的采收优势^[71];此外,该藻株在缺氮条件下,每条藻丝中,每隔10~15个细胞会异化形成1个具有固氮能力的异形胞,其在生理和代谢层面与正常营养细胞具有显著差异,这也使其具有了进行区室化代谢工程策略研究的天然便利性。研究人员将Pdc-Adh2途径使用在异形胞中特异性启动的*hupS*启动子进行控制并导入鱼腥藻PCC 7120基因组,实现了该途径在异形胞中的特异表达,最终达到蓝细菌细胞固碳(营养细胞)和产醇(异形胞)活动的空间分隔,所构建的细胞工厂结合乙醇气提工艺,在培养23 d后乙醇产量达到1.68 g/L。此前有研究表明,缺氮条件下蓝细菌

中丁醇、乳酸等多种异源化合物合成会加强^[72-73]，因此，该研究团队进一步提出了通过阻断谷氨酰胺合成来模拟缺氮环境、促进乙醇合成的设想。缺氮条件下，异形胞中固氮酶固定的氨会被营养细胞中的谷氨酰胺合成酶（GlnA）迅速代谢，而在异形胞中特异性地抑制GlnA合成不会影响藻株整体的正常生长，仅仅是在异形胞中形成模拟缺氮条件，这有可能会有利于乙醇合成。基于此，该团队开发了特异性靶向异形胞的CRISRPi基因表达抑制工具，对异形胞中谷氨酰胺合成酶基因的表达进行了抑制，最终成功将乙醇产量提高了27%^[54]。

4 代谢网络模型与计算机辅助设计引导细胞工厂构建和优化

前文总结介绍了基于代谢途径的局部和静态分析而发展出来的蓝细菌光驱固碳产醇细胞工厂优化策略，但此类策略通常未将乙醇合成途径与宿主生理背景和代谢网络之间的相互作用纳入分析，尤其是缺乏对蓝细菌特有光合固碳特性的考量。在产醇细胞工厂合成能力优化趋于瓶颈的情况下，从全局层面对包含光合、固碳、生长、产醇等活动的代谢背景网络进行整体认识和分析，进而发现新的代谢工程靶点，逐渐成为蓝细菌光驱固碳产醇细胞工厂设计优化的重要方向。数学建模已经成为微生物生物技术研究中的重要工具，全基因组尺度的代谢网络模型（genome-scale metabolic network model, GEM）可以涵盖微生物细胞基因组中全部基因、蛋白、生化反应、代谢以及其相关剂量关系的功能信息，也因此成为能够最有效地反映全细胞代谢状态与规律的研究工具^[74]。近年来，蓝细菌研究领域海量的系统生物学数据（蛋白组、转录组、代谢组以及通量组）为发展蓝细菌全基因组代谢网络模型提供了关键的数据支撑，特别是通量组数据，其能够反映在特定条件下细胞中整体代谢反应的量化特征，以同位素标记方法为引导，据此构建的非稳态代谢通量分析（isotopically nonstationary metabolic flux analysis, INST-MFA）可以有效支撑代谢工程靶点

选择与策略设计，提高细胞工厂构建的效率。

此前，Sengupta等^[75]通过构建集胞藻PCC 6803代谢网络模型成功预测敲除腺苷磷酸激酶基因和磷酸转乙酰酶基因、乙酸激酶基因可以显著提升乙醇合成通量，并在后续研究中得到实验验证，初步证实代谢网络模型辅助靶点预测策略的有效性^[76]。随后的多项工作则均预测了ATP/NADPH代谢平衡对于提高蓝细菌固碳产醇能力的重要性。2014年，Endrich等^[77]以集胞藻PCC 6803的化学计量代谢网络为基础，结合多种方法分析后预测了阻断环式电子传递和其他替代电子传递机制、降低光合电子传递链中ATP/NADPH比率以提高乙醇合成通量的潜在策略。2015年，Knoop等^[78]对产醇细胞工厂的代谢网络进行重构分析，发现对蓝细菌而言，其细胞生长偏好于高ATP/NADPH比率而乙醇合成则偏好于低ATP/NADPH比率，其结果与前述Endrich等预测的ATP/NADPH比率调控策略是相符的。

在优化碳流分配的策略之外，实现产物合成与细胞生长的耦联，也是光合细胞工厂开发和优化的潜在策略，其可以支撑更便捷和高通量的菌株与工艺优化。Testa等^[55]在此前报道的集胞藻PCC 6803的全基因组代谢网络模型的基础上^[79]，将乙醇合成途径整合至模型中，结合最新的实验数据和现象对模型进行修正（糖原代谢、TCA循环、磷酸转酮酶途径、光呼吸），获得了包含709个可逆/非可逆反应、80个置换反应、535个代谢物的全基因组代谢网络模型；以此为基础，研究人员以将乙醇生产和藻株生产实现耦合为目标，进行基因敲除和表达调控靶点的预测^[55]。采用混合整数线性规划策略对双层规划问题进行优化表述，最终预测获得了5个突变体，其中，最优突变体的设计为通过NADH/NADPH代谢网络的平衡来实现。为了提供重组的还原力，需要将NADH-谷氨酸合成酶、磷酸甘油醛脱氢酶、甘油-3-磷酸脱氢酶和Ⅱ型NADH脱氢酶等还原力消耗途径进行敲除和阻断，从而迫使细胞通过乙醇合成来进行还原力消耗；同时，还需要对NAD(P)⁺转氢酶亚基进行敲除，以防止NADH向NADPH的转化，需要对磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）合成酶基因进行敲除以避免上游碳通量向糖酵解途径的分流。光自

养条件下的乙醇产量预测达到了3.498 g/L (4 d), 相比较于已报道的最高水平提高了235%。当然, 要达到所预测的最优效果, 将涉及多达13处遗传改造和调控, 其显著高于此前基于GEM模型的代谢优化策略所涉及的遗传改造需求, 对于目前的蓝细菌代谢工程和合成生物技术而言仍然是巨大的挑战, 但这无疑为发展新型产醇细胞工厂指明了方向。更重要的是, 实现产醇-生长的耦合, 意味着可以以生长和固碳为选择表型, 更便捷地进行产醇能力的优化和筛选。

5 总结和展望

近二十年来, 随着系统生物学和合成生物学的飞速发展, 蓝细菌光驱固碳合成乙醇技术的开发研究已经取得了长足的进步, 乙醇也成为了目前生产水平最高的蓝细菌代谢工程产品。然而, 着眼实际的工程应用和产业推广, 光驱固碳产醇技术距离成为可靠的绿色生物燃料制造路线还有很长的路要走。相较于成熟的酿酒酵母、运动发

酵单胞菌产醇体系, 蓝细菌光驱固碳产醇产量低 (<10 g/L)、产率低 [<0.5 g/(L·d)]、规模小, 而且在兼容性、适配性工艺和装备体系开发上也严重滞后。通过新型培养策略、新型光生物反应器、乙醇原位提取回收和浓缩纯化装置的开发和应用, 可以在平台与过程层面为稳定的二氧化碳定向转化提供保障和支撑; 但从根本上看, 提升光合固碳产醇路线应用潜力的关键仍然在于高效能细胞工厂的开发, 获得生长快、抗逆性强、乙醇产量高的蓝细菌光合细胞工厂, 才能有效降低全技术链条的过程成本、提高技术的经济竞争性。针对这一目标, 还需要在以下方向上进行重点攻关 (图2)。

5.1 固碳产醇细胞工厂新型底盘开发

目前, 蓝细菌光驱固碳产醇细胞工厂的开发主要是以集胞藻 PCC 6803、聚球藻 PCC 7942、聚球藻 PCC 7002 等代表性模式藻株为底盘完成的, 此类藻株的优势在于遗传背景清晰、遗传改造便捷, 但普遍面临生长速度慢、抗逆能力差等问题,

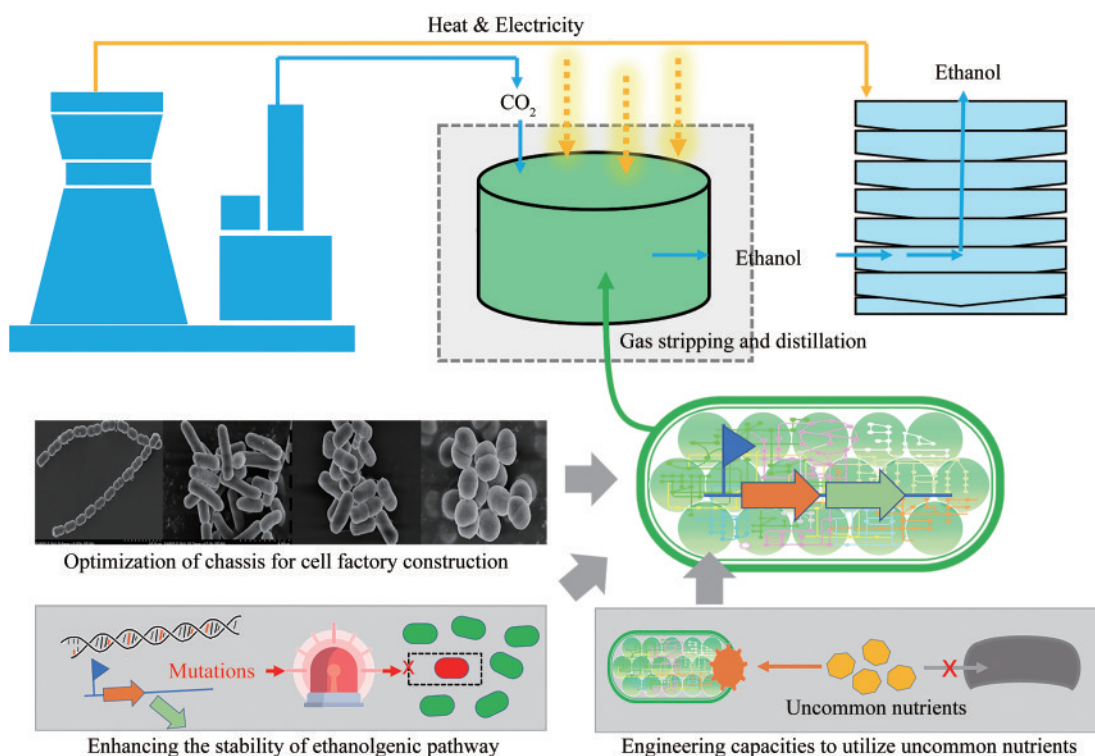


图2 蓝细菌光驱固碳产醇细胞工厂未来发展方向

Fig. 2 Trends for engineering novel cyanobacterial ethanolgenic cell factories

难以适应工业培养的严苛条件和过程工艺。充分挖掘蓝细菌种质多样性资源,以生长速度快、抗逆能力强、光合效率高的非模式藻株进行细胞工厂构建,是解决上述问题的潜力方案。近年来,研究人员已经先后发现了聚球藻 UTEX 2973^[80]、聚球藻 *Synechococcus elongatus* PCC 11801 (聚球藻 PCC 11801)^[81]、聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 11901^[82] 等速生藻株,普遍具有耐高温、耐高光、生物量积累速度快的特点,并已经成为开发新型光合细胞工厂的备选底盘^[28, 83-84]。近期, Srivastava 等^[85] 以生物燃料合成为导向,对聚球藻 PCC 11801 进行了适应性驯化,通过连续 100 代传代后,所获得的进化藻株获得了对超过 30 g/L 乙醇的耐受能力,为后续产乙醇细胞工厂的构建奠定了良好的基础。

同时,高通量筛选方法的应用将有助于优良底盘的快速进化和筛选。Sara Abalde-Cela 等^[86] 开发了一种定制的基于荧光的乙醇检测方法,并将其应用于基因工程乙醇生产蓝细菌的高通量分析。研究人员首先将产乙醇基因工程集胞藻 PCC 6803 菌株 SAA012 包裹在直径 90 mm 的微滴中。同时采用只封装 BG11 培养基的液滴以及封装有野生型集胞藻 PCC 6803 的液滴作为阴性对照。其中产生了 19% 的空滴, 22%、26%、17%、9% 和 7% 的微滴分别包含 1、2、3、4 和 5 个细胞。将微滴孵育 48 h,乙醇浓度累积到光学检测装置灵敏度极限以上的水平。随后将其注入微流体装置进行微注射,将乙醇分析成分添加到初始液滴中并进行孵育。其中,乙醇被乙醇氧化酶催化形成乙醛和过氧化氢,过氧化氢与 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪反应能够形成荧光分子。研究人员对酶促反应体系和试剂浓度进行了优化,荧光检测的吸光度值与乙醇浓度可以形成良好的线性关系,并且基于电极的分析成分与液滴的融合避免了分析成分通过光漂白或二次产物的形成而降解。最后,将液滴再次注入微流控芯片进行荧光检测。通过荧光强度可以良好地区分含有 BG11 的液滴(背景荧光)、含有野生型集胞藻 PCC 6803 的液滴(叶绿素存在导致的较高荧光强度)以及含有乙醇和产乙醇工程菌 SAA012 的液滴(高荧光)。并且,在包裹 SAA012 的 6275 个液滴中可以区分出其中 22% 的液滴总体

呈现相当于野生型集胞藻 PCC 6803 的低荧光,而 78% 的群体呈现高荧光,对应于微滴中乙醇的存在。目前该方法还没有应用到蓝细菌乙醇高产菌株的优化上,但类似的高通量筛选方法已经显示出了巨大的潜力,比如基于响应长链烷烃的生物传感器在蓝细菌中的应用已经助力了高产烷烃菌株的筛选,将其产量提高了 13 倍^[87]。未来将乙醇合成途径的半理性设计与优化,或者高产乙醇蓝细菌底盘的适应性进化及高通量筛选方法的结合和应用将有助于获得更高水平的乙醇生产菌株。

5.2 乙醇合成途径稳定性强化

除了乙醇合成的通量参数(产量、产率等)之外,影响产醇细胞工厂工程化培养的另一个重要因素是乙醇合成能力的稳定性,或者说细胞工厂中乙醇合成途径的稳定性^[88]。在长周期、大体积培养过程中,微生物细胞基因组中将积累大量的突变,而因此丢失乙醇合成能力的异质化细胞往往因为减少了乙醇合成导致的碳损失而获得生长优势,并逐渐在培养菌群中占据主导位置,最终导致乙醇水平的下降^[88]。为了解决这一问题,一方面可以从遗传机制的角度去改造、优化复制保真机器,降低基因组复制突变率,删除基因组上的转座子等可移动遗传元件,最大程度上减少“非产醇”型细胞出现的概率^[89-90];另一方面,可以将产醇元件在基因组上与生长必需基因进行“物理锁定”,置于同一表达盒中,一旦产醇元件丢失或者出现“乱码”,则大概率影响下游生长必需基因的功能,从而使突变体无法获得生长优势并被逐渐淘汰。

5.3 产醇细胞工厂非常规营养物质利用能力改造

在蓝细菌产醇细胞工厂培养过程中,生物污染问题同样会严重影响培养的稳定性和整体产出。在无法严格灭菌的工程化培养体系中,环境中的其他微生物极易入侵培养体系,与产醇蓝细菌细胞竞争培养基中有限的营养物质,进而抑制蓝细菌生长和产醇活性。对蓝细菌代谢网络进行改造,使其可以利用天然的微生物难以利用的非常规营养衍生物,将是降低生物污染风险的有效策略^[91]。

近期, Selao 等^[92]向聚球藻 PCC 7002 基因组中导入了亚磷酸利用途径和三聚氰胺降解途径, 所获得的重组藻株可以利用三聚氰胺和亚磷酸分别为唯一氮源和磷源进行生长, 而环境中的其他微生物难以利用上述两种物质, 从而显著降低了开放式培养中生物污染的风险。基于此类途径和底盘进行产醇细胞工厂的构建无疑将有效提高光驱固碳产醇过程的稳定性, 甚至因节省防控措施和利用低成本物料而起到降低生产成本的效果。

综上所述, 虽然现阶段蓝细菌光驱固碳产醇技术在技术、工程、产业等环节中都存在大量困难和挑战, 但在“双碳”战略实施的大背景下, 随着合成生物技术和绿色生物制造技术的蓬勃发展, 结合光伏技术、光学工程、材料科学、过程工程等学科的交叉融合, 以蓝细菌为平台的一站式二氧化碳定向转化制备乙醇技术, 必将逐渐成熟, 并在我国未来能源供应体系中发挥积极作用。

参 考 文 献

- [1] KENNES D, ABUBACKAR H N, DIAZ M, et al. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016, 91(2): 304-317.
- [2] KEASLING J D, CHOU H. Metabolic engineering delivers next-generation biofuels[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(3): 298-299.
- [3] THANGAVELU S K, AHMED A S, ANI F N. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 56: 820-835.
- [4] TABAH B, PULIDINDI I N, CHITTURI V R, et al. Utilization of solar energy for continuous bioethanol production for energy applications[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(29): 24203-24209.
- [5] AGARWAL A K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines[J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2007, 33(3): 233-271.
- [6] WEBER C, FARWICK A, BENISCH F, et al. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1303-1315.
- [7] RUDE M A, SCHIRMER A. New microbial fuels: a biotech perspective[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(3): 274-281.
- [8] HIMMEL M E, DING S Y, JOHNSON D K, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. *Science*, 2007, 315(5813): 804-807.
- [9] JI S Q, WANG B, LU M, et al. Direct bioconversion of brown algae into ethanol by thermophilic bacterium *Deftluviitalea phaphyphila*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 81.
- [10] LI H F, LIU T F, WEI P F, et al. High-rate CO₂ electroreduction to C₂₊ products over a copper-copper iodide catalyst[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(26): 14329-14333.
- [11] WEI J A, YAO R W, HAN Y, et al. Towards the development of the emerging process of CO₂ heterogenous hydrogenation into high-value unsaturated heavy hydrocarbons[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(19): 10764-10805.
- [12] CHEN J E, ZHA Y J, LIU B, et al. Rationally designed water enriched nano reactor for stable CO₂ hydrogenation with near 100% ethanol selectivity over diatomic palladium active sites [J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(10): 7110-7121.
- [13] LIU Z H, WANG K, CHEN Y, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO₂[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 274-288.
- [14] WATERBURY J B, WATSON S W, GUILLARD R R L, et al. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium[J]. *Nature*, 1979, 277(5694): 293-294.
- [15] ROUSSEAU C, GREGG W. Interannual variation in phytoplankton primary production at a global scale[J]. *Remote Sensing*, 2014, 6(1): 1-19.
- [16] FLOMBAUM P, GALLEGOS J L, GORDILLO R A, et al. Present and future global distributions of the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(24): 9824-9829.
- [17] ATSUMI S, HIGASHIDE W, LIAO J C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(12): 1177-1180.
- [18] ANGERMAYR S A, HELLINGWERF K J, LINDBLAD P, et al. Energy biotechnology with cyanobacteria[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(3): 257-263.
- [19] LU X F. A perspective: photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 742-746.
- [20] OLIVER J W K, ATSUMI S. Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis[J]. *Photosynthesis Research*,

- 2014, 120(3): 249-261.
- [21] DENG M D, COLEMAN J R. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 523-528.
- [22] DEXTER J, ARMSHAW P, SHEAHAN C, et al. The state of autotrophic ethanol production in cyanobacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(1): 11-24.
- [23] 齐允晶, 王家林, 栾国栋, 等. 蓝细菌乙醇光合细胞工厂的发展与展望[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(6): 891-909.
- QI Y J, WANG J L, LUAN G D, et al. Cyanobacteria cell factories for ethanol photosynthetic production: development and prospect[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(6): 891-909.
- [24] LUAN G D, LU X F. Engineering cyanobacteria for efficient photosynthetic production: ethanol case study [M/OL]// *Cyanobacteria biotechnology*. 2021: 237-266[2023-07-01]. <https://doi.org/10.1002/9783527824908.ch8>.
- [25] FERNÁNDEZ F G A, REIS A, WIJFFELS R H, et al. The role of microalgae in the bioeconomy[J]. *New Biotechnology*, 2021, 61: 99-107.
- [26] RAHUL S M, SUNDARAMAHALINGAM M A, SHIVAMTHI C S, et al. Insights about sustainable biodiesel production from microalgae biomass: a review[J]. *International Journal of Energy Research*, 2021, 45(12): 17028-17056.
- [27] LUAN G D, ZHANG S S, WANG M, et al. Progress and perspective on cyanobacterial glycogen metabolism engineering [J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(5): 771-786.
- [28] SONG K, TAN X M, LIANG Y J, et al. The potential of *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 for sugar feedstock production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 7865-7875.
- [29] AIKAWA S, NISHIDA A, HO S H, et al. Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 88.
- [30] COMER A D, ABRAHAM J P, STEINER A J, et al. Enhancing photosynthetic production of glycogen-rich biomass for use as a fermentation feedstock[J]. *Frontiers in Energy Research*, 2020, 8: 93.
- [31] HAGEMANN M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(1): 87-123.
- [32] DUCAT D C, AVELAR-RIVAS J A, WAY J C, et al. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(8): 2660-2668.
- [33] LIN P C, ZHANG F Z, PAKRASI H B. Enhanced production of sucrose in the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 390.
- [34] ZHANG S S, SUN J H, FENG D D, et al. Unlocking the potentials of cyanobacterial photosynthesis for directly converting carbon dioxide into glucose[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 3425.
- [35] DUAN Y K, LUO Q, LIANG F Y, et al. Sucrose secreted by the engineered cyanobacterium and its fermentability[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2016, 15(5): 890-896.
- [36] HAYS S G, YAN L L W, SILVER P A, et al. Synthetic photosynthetic consortia define interactions leading to robustness and photoproduction[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2017, 11(1): 4.
- [37] SANTOS-MERINO M, YUN L S, DUCAT D C. Cyanobacteria as cell factories for the photosynthetic production of sucrose [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1126032.
- [38] 郝欣彤, 张彬彬, 毛绍名, 等. 蓝细菌光驱固碳合成蔗糖技术的发展与展望[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(8): 1411-1423.
- CHI X T, ZHANG S S, MAO S M, et al. Cyanobacteria based photosynthetic production of sucrose: development and prospect[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(8): 1411-1423.
- [39] LUO D X, HU Z S, CHOI D G, et al. Life cycle energy and greenhouse gas emissions for an ethanol production process based on blue-green algae[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(22): 8670-8677.
- [40] ARORA P, CHANCE R R, FISHBECK T, et al. Lifecycle greenhouse gas emissions for an ethanol production process based on genetically modified cyanobacteria: CO₂ sourcing options[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2020, 14(6): 1324-1334.
- [41] GAO Z X, ZHAO H, LI Z M, et al. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria[J]. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5(12): 9857-9865.
- [42] CHOI Y N, PARK J M. Enhancing biomass and ethanol production by increasing NADPH production in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 213: 54-57.
- [43] ASPLUND-SAMUELSSON J, JANASCH M, HUDSON E P. Thermodynamic analysis of computed pathways integrated into the metabolic networks of *E. coli* and *Synechocystis* reveals contrasting expansion potential[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 223-236.
- [44] BARTASUN P, PRANDI N, STORCH M, et al. The effect of

- modulating the quantity of enzymes in a model ethanol pathway on metabolic flux in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. PeerJ, 2019, 7: e7529.
- [45] LIANG F Y, ENGLUND E, LINDBERG P, et al. Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio[J]. Metabolic Engineering, 2018, 46: 51-59.
- [46] ROUSSOU S, ALBERGATI A, LIANG F Y, et al. Engineered cyanobacteria with additional overexpression of selected Calvin-Benson-Bassham enzymes show further increased ethanol production[J]. Metabolic Engineering Communications, 2021, 12: e00161.
- [47] CHOU H H, SU H Y, CHOW T J, et al. Engineering cyanobacteria with enhanced growth in simulated flue gases for high-yield bioethanol production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 165: 107823.
- [48] GAO E B, WU J H, YE P L, et al. Rewiring carbon flow in *Synechocystis* PCC 6803 for a high rate of CO₂-to-ethanol under an atmospheric environment[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1211004.
- [49] WANG M, LUAN G D, LU X F. Engineering ethanol production in a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002 through simultaneously removing glycogen synthesis genes and introducing ethanolgenic cassettes[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 317: 1-4.
- [50] NAMAKOSHI K, NAKAJIMA T, YOSHIKAWA K, et al. Combinatorial deletions of *glgC* and *phaCE* enhance ethanol production in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 239: 13-19.
- [51] VELMURUGAN R, INCHAROENSAKDI A. Co-cultivation of two engineered strains of *Synechocystis* sp. PCC 6803 results in improved bioethanol production[J]. Renewable Energy, 2020, 146: 1124-1133.
- [52] VELMURUGAN R, INCHAROENSAKDI A. Metal oxide mediated extracellular NADPH regeneration improves ethanol production by engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 148.
- [53] EHIRA S, TAKEUCHI T, HIGO A. Spatial separation of photosynthesis and ethanol production by cell type-specific metabolic engineering of filamentous cyanobacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(3): 1523-1531.
- [54] HIGO A, EHIRA S. Spatiotemporal gene repression system in the heterocyst-forming multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(4): 641-646.
- [55] LASRY TESTA R, DELPINO C, ESTRADA V, et al. *In silico* strategies to couple production of bioethanol with growth in cyanobacteria[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(8): 2061-2073.
- [56] LUAN G D, QI Y J, WANG M, et al. Combinatory strategy for characterizing and understanding the ethanol synthesis pathway in cyanobacteria cell factories[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 184.
- [57] RAJ K C, TALARICO L A, INGRAM L O, et al. Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene (*pdC*) and comparison to bacterial homologues[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 2869-2876.
- [58] QUINN L, ARMSHAW P, SOULIMANE T, et al. *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase is less effective than that of *Zymomonas mobilis* for ethanol production in metabolically engineered *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. Microorganisms, 2019, 7(11): 494.
- [59] LEVIN-KARP A, BARENHOLZ U, BAREIA T, et al. Quantifying translational coupling in *E. coli* synthetic operons using RBS modulation and fluorescent reporters[J]. ACS Synthetic Biology, 2013, 2(6): 327-336.
- [60] ZHOU J, ZHU T C, CAI Z, et al. From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 2.
- [61] LIANG F Y, LINDBLAD P. Effects of overexpressing photosynthetic carbon flux control enzymes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 56-64.
- [62] KAMENNAYA N A, AHN S, PARK H, et al. Installing extra bicarbonate transporters in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 enhances biomass production[J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 76-85.
- [63] PRICE G D, BADGER M R, WOODGER F J, et al. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(7): 1441-1461.
- [64] KUPRIYANOVA E V, SINETOVA M A, BEDBENOV V S, et al. Putative extracellular α -class carbonic anhydrase, EcaA, of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 is an active enzyme: a sequel to an old story[J]. Microbiology, 2018, 164(4): 576-586.
- [65] ZINGARO K A, TERRY PAPOUTSAKIS E. GroESL overexpression imparts *Escherichia coli* tolerance to *i*-, *n*-, and

- 2-butanol, 1,2,4-butanetriol and ethanol with complex and unpredictable patterns[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 196-205.
- [66] YOSHIKAWA K, HIRASAWA T, SHIMIZU H. Effect of malic enzyme on ethanol production by *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119 (1): 82-84.
- [67] TAKAHASHI H, UCHIMIYA H, HIHARA Y. Difference in metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic cultures of *Synechocystis* sp. PCC 6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(11): 3009-3018.
- [68] VIDAL R, LÓPEZ-MAURY L, GUERRERO M G, et al. Characterization of an alcohol dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 that responds to environmental stress conditions via the Hik34-Rre1 two-component system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(13): 4383-4391.
- [69] JIANG Z Y, LÜ C Q, WU H. Photoregeneration of NADH using carbon-containing TiO₂[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2005, 44(12): 4165-4170.
- [70] SHI Q, YANG D, JIANG Z Y, et al. Visible-light photocatalytic regeneration of NADH using P-doped TiO₂ nanoparticles[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 43(1/2/3/4): 44-48.
- [71] LUAN G D, LU X F. Tailoring cyanobacterial cell factory for improved industrial properties[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(2): 430-442.
- [72] ANFELT J, KACZMARZYK D, SHABESTARY K, et al. Genetic and nutrient modulation of acetyl-CoA levels in *Synechocystis* for n-butanol production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 167.
- [73] VAN DER WOUDE A D, ANGERMAYR S A, PUTHAN VEETIL V, et al. Carbon sink removal: Increased photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803 in a glycogen storage mutant[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 184: 100-102.
- [74] KOCABAŞ P, ÇALIK P, ÇALIK G, et al. Analyses of extracellular protein production in *Bacillus subtilis*- I : genome-scale metabolic model reconstruction based on updated gene-enzyme-reaction data[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 127: 229-241.
- [75] SENGUPTA T, BHUSHAN M, WANGIKAR P P. Metabolic modeling for multi-objective optimization of ethanol production in a *Synechocystis* mutant[J]. *Photosynthesis Research*, 2013, 118(1/2): 155-165.
- [76] REPPAS N B. Metabolic switch: 20120164705[P/OL]. 2012-06-28[2023-07-01]. <http://www.freepatentsonline.com/y2012/0164705.html>.
- [77] ERDRICH P, KNOOP H, STEUER R, et al. Cyanobacterial biofuels: new insights and strain design strategies revealed by computational modeling[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13 (1): 128.
- [78] KNOOP H, STEUER R. A computational analysis of stoichiometric constraints and trade-offs in cyanobacterial biofuel production[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3: 47.
- [79] KNOOP H, GRÜNDEL M, ZILLIGES Y, et al. Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: the metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(6): e1003081.
- [80] YU J J, LIBERTON M, CLIFTEN P F, et al. *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8132.
- [81] JAISWAL D, SENGUPTA A, SOHONI S, et al. Genome features and biochemical characteristics of a robust, fast growing and naturally transformable cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 isolated from India[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 16632.
- [82] WŁODARCZYK A, SELÃO T T, NORLING B, et al. Newly discovered *Synechococcus* sp. PCC 11901 is a robust cyanobacterial strain for high biomass production[J]. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 215.
- [83] SENGUPTA S, JAISWAL D, SENGUPTA A, et al. Metabolic engineering of a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 for photoautotrophic production of succinic acid[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 89.
- [84] SENGUPTA A, PRITAM P, JAISWAL D, et al. Photosynthetic co-production of succinate and ethylene in a fast-growing cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 11801[J]. *Metabolites*, 2020, 10(6): 250.
- [85] SRIVASTAVA V, AMANNA R, ROWDEN S J L, et al. Adaptive laboratory evolution of the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 for improved solvent tolerance[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 131(5): 491-500.
- [86] ABALDE-CELA S, GOULD A, LIU X, et al. High-throughput detection of ethanol-producing cyanobacteria in a microdroplet

- platform[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2015, 12 (106): 20150216.
- [87] CHEN D D, XU S M, LI S L, et al. Directly evolved AlkS-based biosensor platform for monitoring and high-throughput screening of alkane production[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(3): 832-841.
- [88] DU W, BURBANO P C, HELLINGWERF K J, et al. Challenges in the application of synthetic biology toward synthesis of commodity products by cyanobacteria *via* “direct conversion” [M/OL]//ZHANG W W, SONG X Y. Synthetic biology of cyanobacteria. Singapore: Springer, 2018: 3-26 [2023-07-01]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-0854-3_1.
- [89] PIENKOS P T. Pilot scale integrated biorefinery for producing ethanol from hybrid algae: cooperative research and development final report, CRADA number CRD-10-389[R/OL]. 2013[2023-07-01]. <https://www.osti.gov/biblio/1111200/>.
- [90] SCHULZE K, LANG I, ENKE H K, et al. The use of fluorescence microscopy and image analysis for rapid detection of non-producing revertant cells of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Synechococcus* sp. PCC7002[J]. BMC Research Notes, 2015, 8: 160.
- [91] MOTOMURA K, SANO K, WATANABE S, et al. Synthetic phosphorus metabolic pathway for biosafety and contamination management of cyanobacterial cultivation[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(9): 2189-2198.
- [92] SELÃO T T, WŁODARCZYK A, NIXON P J, et al. Growth and selection of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 using alternative nitrogen and phosphorus sources[J]. Metabolic Engineering, 2019, 54: 255-263.



通讯作者：吕雪峰(1974—)，男，研究员，博士生导师，中国科学院青岛生物能源与过程研究所所长。研究方向为合成生物学与绿色生物制造，在光驱固碳产能蓝细菌的人工设计与构建及真菌天然产物药物等。

E-mail: lvxf@qibebt.ac.cn



第一作者：孙绘梨(1995—)，女，博士后。研究方向为蓝细菌合成生物技术研究，包括光驱固碳细胞工厂的构建和底盘细胞生理功能认识与改造。

E-mail: sunhl@qibebt.ac.cn