

## 阻断集胞藻 6803 PHB 合成途径提高胞内 NADPH 含量

解鹏, 周杰, 张海峰, 李寅

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要:** 蓝藻是探索利用太阳能生产化学品的重要微生物, 但产量低限制了蓝藻化学品的工业应用。提高宿主还原力水平是提高微生物合成化学品产量的重要手段。为提高集胞藻细胞内 NADPH 含量, 利用同源重组方法, 获得敲除聚羟基丁酸酯 PHB 合酶编码基因 *phaC* 和 *phaE* 的集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 突变体 S.Δ*phaC*&E。PCR 结果证明突变体 S.Δ*phaC*&E 基因组中 *phaC* 和 *phaE* 已完全被氯霉素抗性基因取代。生长曲线结果显示 S.Δ*phaC*&E 的生长与野生型无明显差异, 说明敲除 *phaC* 和 *phaE* 对蓝藻生长的影响很小。用气相色谱检测胞内 PHB 含量, 野生藻 S.wt 中 PHB 为细胞干重的 2.3%, 而突变体 S.Δ*phaC*&E 中没有 PHB 生成, 该结果说明敲除 *phaC* 和 *phaE* 能够有效阻断集胞藻中 PHB 合成。通过对野生藻与突变体进一步比较分析, 发现 S.Δ*phaC*&E 胞内 NADPH 浓度明显提高, 在第 3 天时差异最为明显, S.Δ*phaC*&E 胞内 NADPH 浓度是 S.wt 的 2.85 倍。总之, 敲除 *phaC* 和 *phaE* 不仅可以通过阻断副产物 PHB 的合成, 而且还节约了 NADPH, 使胞内还原力 NADPH 的水平明显提高。因此为提高蓝藻化学品产量提供了可以改变碳流向和具有充足还原力的工程集胞藻。

**关键词:** 蓝藻, 集胞藻, PHB 合成途径, 代谢工程, NADPH

## Increasing reductant NADPH content via metabolic engineering of PHB synthesis pathway in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Juan Xie, Jie Zhou, Haifeng Zhang, and Yin Li

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Cyanobacteria have become attractive hosts for renewable chemicals production. The low productivity, however, prevents it from industrial application. Reductant NAD(P)H availability is a chief hurdle for the production of reductive metabolites in microbes. To increase NADPH content in *Synechocystis* sp. PCC 6803, PHB synthase encoding gene *phaC* and *phaE* in *Synechocystis* was inactivated by replacing *phaC*&E genes with chloromycetin resistance cassette via homologous recombination. PCR analysis showed that mutant S.Δ*phaC*&E with complete genome segregation was generated. The comparison between growth curves of S.wt and S.Δ*phaC*&E indicated the knockout of *phaC* & *phaE* genes did not affect obviously the cell

**Received:** October 13, 2010; **Accepted:** November 15, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30970103), Natural Science Foundation of Beijing (No. 5102026).

**Corresponding author:** Jie Zhou. Tel: +86-10-64807485; E-mail: jiezhouw@im.ac.cn

Yin Li. Tel: +86-10-64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 30970103), 北京市自然科学基金 (No. 5102026) 资助。

growth. Gas chromatography analysis showed that the accumulation of PHB in wild type was about 2.3% of the dry cell weight, whereas no PHB was detected in the mutant *S.ΔphaC&E*. The data indicated that inactivation of PHB synthase gene *phaC* and *phaE* interrupted the synthesis of PHB. Further comparative study of wild type and mutant demonstrated that NADPH content in *S.ΔphaC&E* was obviously increased. On the third day, the NADPH content in *S.ΔphaC&E* was up to 1.85 fold higher than that in wild type. These results indicated that deleting PHB synthase gene *phaC* and *phaE* not only can block the synthesis of PHB, but also can save NADPH to contribute reductant sink in cyanobacteria. Hence, the engineered cyanobacterial strain *S.ΔphaC&E*, in which carbon flux was redirected and NADPH was increased, will be a potential host strain for chemicals production in cyanobacteria.

**Keywords:** cyanobacteria, *Synechocystis*, PHB synthesis pathway, metabolic engineering, NADPH

蓝藻 (Blue-green algae) 又称蓝细菌 (Cyanobacteria), 是一类能进行放氧光合作用的光合自养原核生物, 能够利用二氧化碳和太阳能快速繁殖。此外, 蓝藻具有细胞结构简单、遗传背景清楚、易于基因操作等特点。因此, 随着全球能源匮乏及气候变暖的加剧, 蓝藻成为生产可再生化学品的潜在理想宿主。通过基因工程改造, 已实现在蓝藻中生产异丁醛、乙醇和氢等化学品<sup>[1-5]</sup>。但由于产量低, 限制了蓝藻化学品在工业领域的广泛应用。

集胞藻 6803 是一种单细胞蓝藻, 已于 1996 年首次完成了基因组序列的测定, 遗传背景清楚, 易于操作。所以本研究对集胞藻 6803 进行代谢途径改造。

还原力 NADPH 是参与生物能量及碳代谢的重要辅助因子, 具体包括参与微生物细胞内还原型生物合成、抗氧化、氧化胁迫等多个氧化还原反应<sup>[6-7]</sup>。目前, 改变还原力流向已成为提高工业微生物化学品

产量的有效方法<sup>[8]</sup>。近年来的研究进展表明, 通过代谢工程改造提高胞内 NADPH 含量可提高需 NADPH 依赖型关键酶催化合成的化合物产量, 如 L 型氨基酸、脂类、多酚等<sup>[9-11]</sup>。因此, 通过代谢工程改造提高胞内 NADPH 含量将有利于集胞藻生产化学品。

聚羟基脂肪酸 (Polyhydroxyalkanoate, 简称 PHA) 是一类广泛存在于微生物中的高分子聚脂, 其中聚-β-羟基丁酸酯 (Poly-β-Hydroxybutyrate, 简称 PHB) 是最常见的一种。在正常生长条件下, 有些蓝藻细胞可以积累少量 PHB 作为碳源和能量储藏物质<sup>[12]</sup>。在限氮条件下, 流向 PHB 合成途径的碳源增加, PHB 含量可达蓝藻细胞干重的 38%<sup>[13-14]</sup>。根据已报道的研究结果<sup>[12,19]</sup>, PHB 作为细胞内的碳源和能源储备物质, 有利于细菌适应外界环境, 增强生存能力。目前尚未有关于 PHB 合成途径敲除对细胞影响的报道。由图 1 集胞藻 PHB 合成途径示

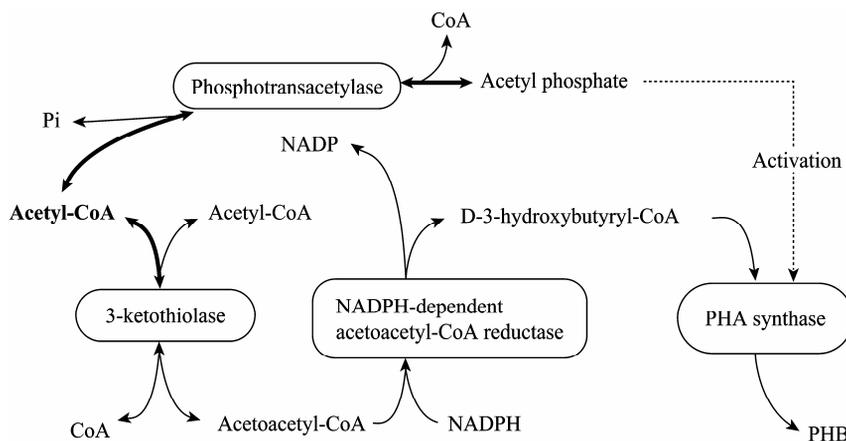


图 1 集胞藻 PHB 合成途径示意图<sup>[13]</sup>

Fig. 1 PHB synthesis pathway in *Synechocystis*<sup>[13]</sup>.

意图<sup>[13]</sup>可知, PHB 是由乙酰辅酶 A 在相应的酶催化下聚合而成, 该过程消耗 NADPH, 而 PHB 合酶作为该合成途径中的最后一个酶而成为 PHB 合成的关键酶之一。正常生长状态下细胞中虽有一定的 PHB 合成, 但当细胞处于正常生长环境时, PHB 不发挥作用, 故推测集胞藻中此途径的敲除对细胞影响不大。

对于用于生产化学品的集胞藻而言, PHB 的合成消耗了目标化学品合成所需的还原力 NADPH 及碳源, 不利于进行目标化学品的生产。因此, 阻断集胞藻中 PHB 合成途径, 一方面可减少碳源在 PHB 合成上的消耗; 另一方面, 可使 PHB 合成中所需消耗的 NADPH 得以积累, 提高了胞内 NADPH 的含量, 从而利于工程集胞藻合成目标化学品。

本研究通过同源重组方法, 用氯霉素抗性基因取代集胞藻 6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) 基因组中 PHB 合酶编码基因 *phaC* 和 *phaE*, 获得 PHB 合成途径被成功阻断并伴有细胞内 NADPH 含量提高的集胞藻突变体 *S.ΔphaC&E*, 为进一步开发集胞藻生产化学品, 提高目标产品的产量奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、质粒 pUC18、质粒 pRL271、集胞藻 6803 均为本实验室保存。

### 1.2 试剂

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 限制性内切酶、去磷酸化酶 CIP、T4 DNA 连接酶均购自 NEB(北京)有限公司; 质粒 DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、细菌 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 抗生素购自 Amresco 公司; 其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 引物合成和测序由上海英骏生物工程有限公司完成。

### 1.3 基因敲除载体 pUC-HR 的构建

载体 pUC-HR 示意图见图 2。通过 PCR 分别从集胞藻 6803 基因组中克隆到 PHB 合酶基因 *phaC* 和 *phaE* 上、下游各 600 bp 片段, 分别命名为 up、down。用融合 PCR 方法将 down 片段与来自质粒 pRL271 的氯霉素抗性基因 *catP* 相融合<sup>[15]</sup>, 获得融合片段 down-Cm, 并将其插入到质粒 pUC18 的 *Xba* I 位点, 得到中间载体 pUC-Cmdown。将 up 片段插入到中间载体 pUC-Cmdown 的 *Sac* I 和 *Bam* H I 位点, 构建带有 up-Cm-down 结构的用于 PHB 合酶基因敲除载体 pUC-HR。所用引物序列如需要可向作者索要。

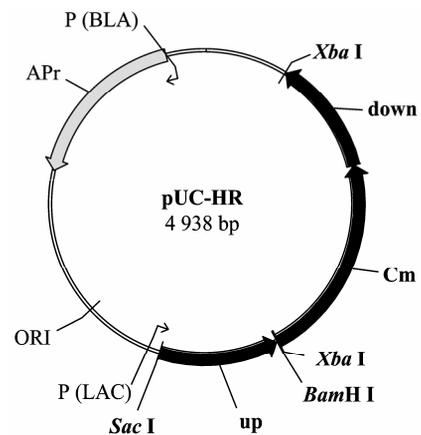


图 2 基因敲除载体 pUC-HR

Fig. 2 Diagram of gene knockout vector pUC-HR.

### 1.4 蓝藻的转化、筛选及鉴定

集胞藻 6803 置于光照培养箱 (GXZ-280c, 宁波江南仪器厂) 中振荡培养, 温度为 30 °C, 光强为 100  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , 振荡频率为 130 r/min, 培养基为 BG-11 培养基<sup>[15]</sup>。利用自然转化方法并参考文献中<sup>[17]</sup>关于提高转化效率的优化条件, 用构建好的载体 pUC-HR 转化集胞藻 6803, 用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素筛选转化子。分别提取野生藻、转化子的基因组 DNA 作为模板, 用 up 片段 5'引物和 down 片段的 3'端引物进行 PCR 扩增, 鉴定基因组完全分离的突

变体 *S.ΔphaC&E*。1% 琼脂糖电泳后使用凝胶成像仪 (EC3, UVP) 检测扩增产物。

### 1.5 RNA 提取及 RT-PCR

用 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 提取野生藻 *S.wt* 和突变体 *S.ΔphaC&E* 的总 RNA。用不含 RNA 酶的 DNA 酶处理提取的总 RNA, 以去除残留的 DNA。用 Quant 反转录酶进行反转录, 为检测可能残留的 DNA 污染, 用 *Taq* 聚合酶代替反转录酶为对照。按扩增基因靠近 3' 末端 400~500 bp 的原则设计引物, 对反转录产物进行 PCR 扩增<sup>[4]</sup>。之后用 1% 的琼脂糖电泳检测。

### 1.6 蓝藻生长的测定

按比例分别接种野生藻 *S.wt* 和基因敲除藻 *S.ΔphaC&E*, 确保两种藻细胞的起始  $OD_{730}$  一致, 均为 0.2。吸光度测量使用 UNICO 型号为 7200 spectrophotometer 的紫外-可见分光光度计。光照振荡培养, 每隔 24 小时取藻液测定  $OD_{730}$ , 并以此做出生长曲线, 比较野生藻 *S.wt*、基因敲除藻 *S.ΔphaC&E* 之间生长差异。

### 1.7 胞内 PHB 含量测定

参照文献用气相色谱测定胞内 PHB 含量<sup>[14,16]</sup>。所用气相色为岛津公司的 GC2010 气相色谱仪, 色谱柱为 DB-5 毛细管柱, 柱长 30 m, 内径 320 μm。柱温 170 °C, 检测器温度 250 °C, 载气  $N_2$  0.14 MPa, 使用氢焰检测。

取 80 mg 左右干细胞于酯化管中, 加入 2 mL 酯化液 (含有 2 g/L 苯甲酸、3% (V/V) 浓硫酸的甲醇溶液) 和 2 mL 氯仿, 加盖密闭, 100 °C 酯化反应 4 h。冷却至室温后, 加入 1 mL 去离子水, 充分振荡混匀, 静置分层。待氯仿相与水相完全分离后, 取氯仿相进行气相色谱分析。使用内标法定量分析胞内的 PHB 含量。

### 1.8 胞内 NADPH 含量测定

根据文献方法<sup>[17-18]</sup>, 使用酶标仪 (SpectraMax 190, Molecular Devices) 测定蓝藻细胞内的 NADPH 含量。分别取处于对数生长期的野生藻及突变体

30 mL ( $OD_{730} \approx 0.8$ ), 离心收集细胞。加入 1 mL 0.3 mol/L 高氯酸, 1 mmol/L EDTA, 充分振荡 30 s, 裂解细胞。离心弃细胞碎片, 取上清。取 0.5 mL 上清, 加入 0.1 mL 2 mol/L  $K_2CO_3$  中和反应。取上清, 检测细胞液在 340 nm 的吸光度。根据 NADPH 浓度与  $OD_{340}$  关系的标准曲线, 确定胞内 NADPH 的浓度。

## 2 结果

### 2.1 蓝藻基因敲除载体 pUC-HR 的构建

经 DNA 测序分析可知, 从集胞藻 6803 基因组中克隆的 PHB 合成酶基因 *phaC* 上游 600 bp 片段 up 和 *phaE* 下游 600 bp 片段 down, 及从质粒 pRL271<sup>[15]</sup> 克隆的氯霉素抗性基因 *catP* (1 050 bp), 序列均正确。

如载体酶切产物琼脂糖凝胶电泳图谱所示 (图 3), 用 *Xba* I 进行酶切, 载体被切成 3.3 kb 和 1.6 kb 片段; 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行酶切, 分别切出约 4.3 kb 和 0.6 kb 片段, 两组酶切结果均与预期得到的片段大小相符。同时对基因敲除载体 pUC-HR 中的 up-Cm-down 片段进行 DNA 测序分析, 证明 pUC-HR 中的 up-Cm-down 的方向及序列正确。因此表明集胞藻 6803 基因 *phaC* 和 *phaE* 敲除载体 pUC-HR 构建成功。

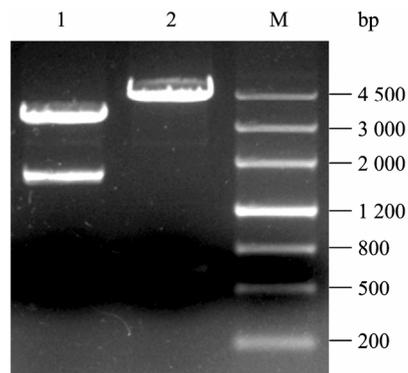


图 3 敲除载体 pUC-HR 酶切产物的凝胶电泳图谱

Fig. 3 Identification of plasmid pUC-HR by restriction enzyme digestion. 1: pUC-HR digested with *Xba* I; 2: pUC-HR digested with *Sac* I and *Bam*H I; M: DNA marker III.

## 2.2 敲除 *phaC* 和 *phaE* 的集胞藻 6803 突变体 S. $\Delta$ *phaC&E* 的获得

为敲除集胞藻 6803 基因组中的 PHB 合酶编码基因 *phaC* 和 *phaE*，用构建的基因敲除载体 pUC-HR 转化集胞藻 6803。经过反复抗生素筛选，用基因 *phaC* 上游片段 up5'端和 *phaE* 下游 down3'端引物分别对转化子和野生型蓝藻基因组 DNA 进行 PCR 扩增，如图 4 所示，以野生藻为模板则扩增得到 3.4 kb 片段，而以转化子基因组 DNA 为模板扩增得到大小在 2.26 kb 片段，与预期的大小相符，证明集胞藻 6803 基因组中 *phaC* 和 *phaE* 基因 (约 2.2 kb) 完全被氯霉素抗性基因 *catP* (约 1 kb) 取代，已成功得到基因组完全分离的基因敲除突变体 S. $\Delta$ *phaC&E*。

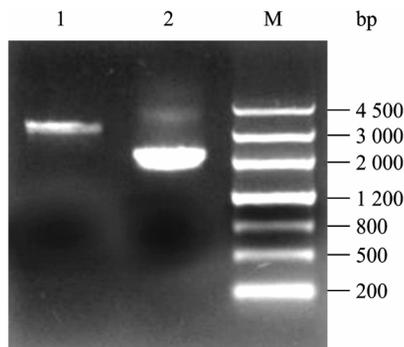


图 4 集胞藻完全分离基因敲除突变体 S. $\Delta$ *phaC&E* 的 PCR 验证

Fig. 4 Identification of complete segregation *Synechocystis* mutant S. $\Delta$ *phaC&E* by PCR. 1: S.wt; 2: S. $\Delta$ *phaC*; M: DNA marker III.

为进一步从转录水平证明 *phaC* 和 *phaE* 失活，对突变体及野生型进行了 RT-PCR 比较分析。如图 5 所示，以野生藻 S.wt cDNA 为模板检测不到氯霉素抗性基因片段，但以基因敲除藻 S. $\Delta$ *phaC&E* 的 cDNA 为模板，可检测到氯霉素抗性基因片段。同时，以野生藻 S.wt 的 cDNA 为模板可检测到 PHB 合酶基因片段，但以基因敲除藻 S. $\Delta$ *phaC* 的 cDNA 为模板，则检测不到 PHB 合酶片段。因此，RT-PCR 结果进一步证明，蓝藻突变体 S. $\Delta$ *phaC&E* 中 PHB 合酶编码基因已经被氯霉素抗性基因取代。

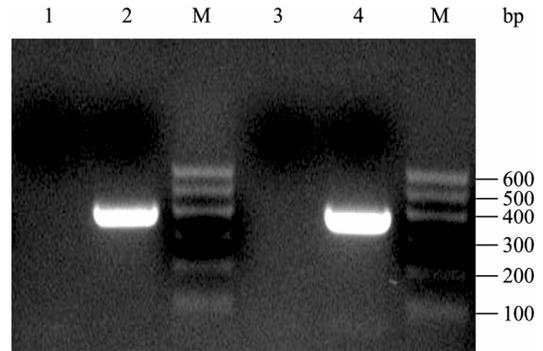


图 5 RT-PCR 鉴定基因敲除集胞藻突变体 S. $\Delta$ *phaC&E*  
Fig. 5 Identification of the transcription of chloramphenicol resistance gene and PHB synthase gene in *Synechocystis* mutant S. $\Delta$ *phaC&E* by RT-PCR. 1: transcription of *catP* in S.wt; 2: transcription of chloramphenicol resistance gene in S. $\Delta$ *phaC&E*; M: DNA marker I; 3: transcription of PHB synthase gene in S. $\Delta$ *phaC&E*; 4: transcription of PHB synthase gene in S.wt.

## 2.3 蓝藻生长的测定

成功构建蓝藻突变体 S. $\Delta$ *phaC&E* 后，对野生型及突变体的生长进行了比较研究。从生长曲线 (图 6) 可以看出，PHB 合酶基因敲除蓝藻突变体 S. $\Delta$ *phaC&E* 的生长虽然略低于野生藻 S.wt，但差异不大。这说明 PHB 合酶编码基因的敲除基本不影响蓝藻的生长。

## 2.4 集胞藻胞内 PHB 含量检测

为检测敲除 *phaC* 和 *phaE* 能否阻断蓝藻 PHB 的

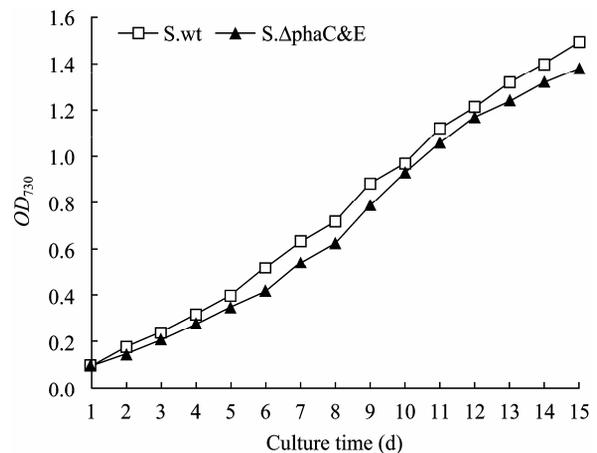


图 6 野生集胞藻 S.wt 和集胞藻突变体 S. $\Delta$ *phaC&E* 的生长曲线

Fig. 6 Growth curves of S.wt and *Synechocystis* mutant S. $\Delta$ *phaC&E*.

合成,对野生藻和突变体的胞内 PHB 含量进行了测定。结果发现,野生藻 S.wt 中 PHB 积累约为细胞干重的 2.3% ( $2.30\pm 0.12$ ),而基因敲除突变体 S. $\Delta$ phaC&E 中没有 PHB 的积累 ( $0.00\pm 0.05$ ),说明 *phaC* 和 *phaE* 的敲除能够阻断蓝藻中 PHB 的合成。

## 2.5 胞内 NADPH 含量检测

由于 PHB 的合成是消耗 NADPH,因此对突变体和野生型胞内 NADPH 含量进行了比较分析。根据文献[17-18]中的 NADPH 检测方法,对野生藻 S.wt 和突变体 S. $\Delta$ phaC&E 中的 NADPH 进行测定,得到 NADPH 浓度与  $OD_{340}$  对应关系的标准曲线,公式为:  $y=10.333x-0.111$ ,  $R^2=0.998$ 。其中,  $x$  为  $OD_{340}$ ;  $y$  为 NADPH 浓度 (mmol/L)。根据标准曲线,得到 NADPH 含量随培养时间变化曲线,如图 7 所示,突变体 S. $\Delta$ phaC&E 胞内的 NADPH 含量明显提高,为野生藻 S.wt NADPH 含量的 2.85 倍。说明集胞藻 6803 细胞中 PHB 合成途径的阻断,可以使胞内 NADPH 含量提高。

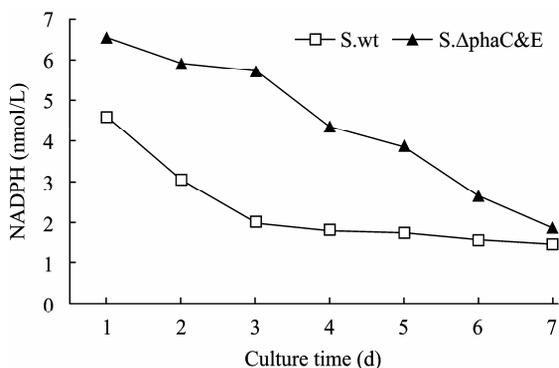


图 7 野生集胞藻 S.wt 和集胞藻突变体 S. $\Delta$ phaC&E 胞内 NADPH 的检测结果

Fig. 7 Detection of cellular NADPH contents of S.wt and *Synechocystis* mutant S. $\Delta$ phaC&E.

## 3 讨论

利用代谢工程技术敲除生物代谢途径中的关键基因,并结合辅因子工程技术,改变代谢流分布,构建新的代谢途径,在微生物代谢工程中具有重要作用<sup>[6]</sup>。

本研究结合代谢工程和辅因子工程的方法,以蓝藻 PHB 合成途径为改造对象,通过敲除 PHB 合酶基因成功阻断集胞藻 6803 中 PHB 的合成,获得胞内还原力 NADPH 含量明显提高的工程蓝藻 S. $\Delta$ phaC&E。由于集胞藻 6803 的基因组是多拷贝的,因此我们通过对转化子的反复多轮筛选,得到基因组完全分离的蓝藻基因敲除突变体 S. $\Delta$ phaC&E。在正常培养条件下集胞藻 6803 细胞内是有 PHB 积累的。Hein's 等通过在大肠杆菌中表达集胞藻 6803 PHB 合酶基因 *phaC* 和 *phaE*,使大肠杆菌中可以产生 PHB 来证明 PHB 合酶是蓝藻 PHB 合成的关键酶<sup>[19]</sup>。而本工作通过在蓝藻中敲除 PHB 合酶基因阻断 PHB 合成,更直接证明 PHB 合酶是集胞藻 6803 PHB 合成途径的关键酶。在本研究正常培养条件下,野生藻 S.wt 可以积累细胞干重 2.3% 的 PHB 作为碳源和能量储备,这与前人的实验结果相一致<sup>[12]</sup>。同时发现阻断 PHB 合成对蓝藻的生长影响很小。推测原因应与 PHB 的生理功能有关。根据已报道的研究结果<sup>[19]</sup>,PHB 作为细胞内的碳源和能源储备物质,有利于细菌适应外界环境,增强生存能力。正常生长状态下虽有一定的 PHB 合成,但当细胞处于正常生长环境时 PHB 不发挥作用,同时 PHB 的合成途径与蓝藻生长的途径无关联,所以它的敲除对正常环境下生长的细胞影响不大。因此,敲除 PHB 合成酶编码基因阻断 PHB 合成,可以实现蓝藻中碳流的重新分配,即把原本用于合成 PHB 的碳源用于目标化学品的合成,使细胞内有限的碳源得到更有效地利用,从而提高蓝藻目标化学品的产量。

PHB 合成途径需要有还原力 NADPH 的参与<sup>[13]</sup>,而本研究通过阻断 PHB 合成得到胞内 NADPH 含量增加的工程蓝藻也进一步证明了这一点。还原力 NADPH/NADH 是参与微生物代谢的重要辅助因子,而微生物细胞内具有实现 NADPH 与 NADH 相互转化的能力。近期 McNeely 等<sup>[20]</sup>的研究结果表明,增加蓝藻胞内还原力水平,可以提高蓝藻相应代谢产物水平,如乙酸,琥珀酸等。因此,本研究实现胞内 NADPH 含量提高,这将为蓝藻合成还原型化合

物提供充足的还原力, 为进一步提高蓝藻化学品产量, 开发蓝藻产醇类、脂类等化学品奠定基础。

综上所述, 本研究通过敲除 PHB 合成酶编码基因 *phaC* 和 *phaE* 成功阻断了集胞藻 6803 中的 PHB 合成, 实现胞内还原力 NADPH 的有效积累, 并且与野生藻相比, 突变体蓝藻 S.Δ*phaC&E* 的生长没有受到影响。本实验一方面由于成功阻断 PHB 的合成, 可以实现蓝藻中碳流的重新分配, 为提高目标化学品产量作了碳源重新分配上的准备; 另一方面提高了蓝藻胞内 NADPH 水平, 为实现蓝藻产化学品、提高目标产物产量提供了充足的还原力。因此, 本研究所建立的成功阻断 PHB 合成途径同时实现 NADPH 提高的蓝藻突变体 S.Δ*phaC&E*, 为蓝藻产化学品作了碳源和还原力方面的准备, 为蓝藻产醇类、脂类等还原型化学品、提高化学品产量提供了理想菌株。

## REFERENCES

- [1] Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(12): 1177–1180.
- [2] Cadoret JP, Bernard O. Lipid biofuel production with microalgae: potential and challenges. *J Soc Biol*, 2008, 202(3): 201–211.
- [3] Ghirardi ML, Dubini A, Yu JP, et al. Photobiological hydrogen-producing systems. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(1): 52–61.
- [4] Deng MD, Coleman JR. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(2): 523–528.
- [5] Zhou J, Li Y. Engineering cyanobacteria for fuels and chemicals production. *Protein Cell*, 2010, 1(3): 207–210.
- [6] Xia WL, Wang Z, Wang Q, et al. Roles of NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cell death. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(1): 12–19.
- [7] Ying WH. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(2): 179–206.
- [8] Qin Y, Dong ZY, Liu LM, et al. Manipulation of NADH metabolism in industrial strains. *Chin J Biotech*, 2009, 25(2): 161–169.
- [9] Chemler JA, Fowler ZL, McHugh KP, et al. Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Metab Eng*, 2010, 12(2): 96–104.
- [10] Bartek T, Blombach B, Zonnchen E, et al. Importance of NADPH supply for improved L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Prog*, 2010, 26(2): 361–371.
- [11] Suagee JK, Corl BA, Crisman MV, et al. De novo fatty acid synthesis and NADPH generation in equine adipose and liver tissue. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2010, 155(3): 322–326.
- [12] Philippis RD, Ena A, Guastini M, et al. Factor affecting poly-β-hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple-non-sulfur bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 103(2/4): 187–194.
- [13] Asada Y, Miyake M, Miyake J, et al. Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria --the metabolism and potential for CO<sub>2</sub> recycling. *Int J Biol Macromol*, 1999, 25(1/3): 37–42.
- [14] Panda B, Mallick N. Enhanced poly-β-hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 44(2): 194–198.
- [15] Castenholz RW. Culturing methods for cyanobacteria. *Meth Enzym*, 1988, 167: 68–93.
- [16] Beaulieu M, Beaulieu Y, Melinard J, et al. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 61(1): 165–169.
- [17] Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ. Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J Biol Chem*, 2001, 276(41): 38320–38328.
- [18] Senior PJ. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. *J Bacteriol*, 1975, 123(2): 407–418.
- [19] Hein S, Tran H, Steinbüchel A. *Synechocystis* sp. PCC 6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Archives Microbiol*, 1998, 170(3): 162–170.
- [20] Mcneely K, Xu Y, Byrant N, et al. Redirecting reductant flux into hydrogen production via metabolic engineering of fermentative carbon metabolism in a cyanobacterium. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(15): 5032–5038.