

# *ggs* 基因过表达对集胞藻 PCC 6803 甘油葡萄糖苷和甘油合成的影响

马培珍<sup>1,2</sup>, 谈晓明<sup>2</sup>, 吕雪峰<sup>2</sup>, 田继远<sup>1</sup>

1 青岛农业大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109

2 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

马培珍, 谈晓明, 吕雪峰, 等. *ggs* 基因过表达对集胞藻 PCC 6803 甘油葡萄糖苷和甘油合成的影响. 生物工程学报, 2016, 32(3): 347-354.

Ma PZ, Tan XM, Lü XF, et al. Effects of *ggs* over-expression on glycosylglycerol and glycerol biosynthesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Chin J Biotech, 2016, 32(3): 347-354.

**摘要:** 为了研究甘油葡萄糖苷磷酸合成酶 (GgpS) 在集胞藻 PCC 803 甘油葡萄糖苷和甘油合成中的作用, 本研究在前期获得高产甘油葡萄糖苷藻株的基础上分别过量表达来自于集胞藻 PCC 6803 自身和聚球藻 PCC 7002 的甘油葡萄糖苷磷酸合成酶基因 *ggs*, 并测定了在不同浓度 NaCl 胁迫时突变藻株的甘油葡萄糖苷和甘油积累量。结果发现获得的突变株甘油葡萄糖苷合成没有提高, 但是甘油合成显著增强。此外, 当培养基 NaCl 浓度从 600 mmol/L 提高到 900 mmol/L 时, 集胞藻 PCC 6803 自身 *ggs* 过表达藻株的甘油合成进一步提高 75%。这些结果显示了 GgpS 在将碳代谢流导入集胞藻甘油合成途径中的作用。研究成果也为进一步通过基因工程改造提高集胞藻甘油葡萄糖苷和甘油合成效率奠定了基础。

**关键词:** 甘油葡萄糖苷, 甘油, 集胞藻 PCC6803, *ggs* 基因, 基因工程

**Received:** July 5, 2015; **Accepted:** August 31, 2015

**Supported by:** The Shandong Province Science and Technology Development Project (No. 2014GSF121033), the State Oceanic Administration (SOA) Global Change and Air-Sea Interaction Program (No. GASI-03-01-02-05).

**Corresponding author:** Jiyuan Tian. Tel: +86-532-80662715; E-mail: jytian\_75@qau.edu.cn

山东省科技发展计划 (No. 2014GSF121033), 国家海洋局“全球变化与海气相互作用”专项 (No. GASI-03-01-02-05) 资助。

网络出版时间: 2015-10-21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20151021.1034.003.html>

# Effects of *ggs* over-expression on glycosylglycerol and glycerol biosynthesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803

Peizhen Ma<sup>1,2</sup>, Xiaoming Tan<sup>2</sup>, Xuefeng Lü<sup>2</sup>, and Jiyuan Tian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

**Abstract:** To study the roles of glucosylglycerol phosphate synthase (Ggps) in glucosylglycerol (GG) and glycerol biosynthesis, we over-expressed Ggps from either *Synechocystis* sp. PCC 6803 or *Synechococcus* sp. PCC 7002 in a *Synechocystis* strain with a high GG titer, and determined the GG and glycerol accumulation in the resultant mutants grown under different NaCl-stress conditions. Ion chromatography results revealed that GG yield was not improved, but glycerol production was significantly enhanced by over-expression of Ggps from *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*6803ggs*). In addition, increasing the NaCl concentration of medium from 600 to 900 mmol/L led to a further 75% increase of glycerol accumulation in the mutant strain with *6803ggs* over-expression. These findings show the role of *ggs* in driving the carbon flux to the glycerol biosynthesis pathway, and will be helpful for further improvement of GG and glycerol production in *Synechocystis*.

**Keywords:** glucosylglycerol, glycerol, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *ggs*, genetic engineering

集胞藻 *Synechocystis* PCC 6803 是一种单细胞淡水蓝藻, 具有与高等植物类似的光合系统, 一直被作为光合作用研究的模式生物<sup>[1]</sup>。由于其遗传改造方便、生长速度较快, 近年来集胞藻 PCC 6803 又被用作光合细胞工厂<sup>[2]</sup>, 用于合成氢气<sup>[3]</sup>、乙醇<sup>[4]</sup>、乙烯<sup>[5]</sup>、异戊二烯<sup>[6]</sup>、乳酸<sup>[7-8]</sup>、蔗糖<sup>[9]</sup>、脂肪酸<sup>[10]</sup>、脂肪醇<sup>[11]</sup>和脂肪烃<sup>[12]</sup>等多种生物燃料和化学品。虽然这些研究引起了学术界和工业界的广泛关注, 但是由于大多数产品价值和产率低, 因此目前仍处于研发阶段。在这种情况下, 发展一种利用蓝藻生产高附加值产物的技术路线, 将更具可行性和潜力, 也将推动蓝藻光合生物合成技术路线的产业化应用。

甘油葡萄糖苷 (Glucosylglycerol) 是一类由甘油分子与葡萄糖分子以糖苷键结合的物质, 由葡萄糖分子的构型、结合甘油分子的位

置分为多种; 其中作为天然渗透压抵抗分子的是 2-O-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-sn-glycerol (以下简称 GG)。GG 是一种大分子稳定剂, 可用于蛋白质药物等的长期保存<sup>[13]</sup>; 还是一种良好的化妆品添加剂, 具有保湿、抗氧化和抗衰老等功效, 可以消除洁面后皮肤的紧绷感<sup>[14]</sup>。日本传统发酵食品 (如清酒) 中也被发现含有 GG<sup>[15]</sup>; 研究发现 GG 还可能具有治疗过敏性呼吸系统疾病<sup>[16]</sup>、保护眼角结膜<sup>[17]</sup>和降低血糖<sup>[18]</sup>等多种人体保健功效。

除了化学<sup>[15]</sup>和酶催化<sup>[19]</sup>合成之外, GG 也可以被一些异养微生物<sup>[20]</sup>或光合自养蓝藻<sup>[21]</sup>合成。以集胞藻 PCC 6803 为例, 在细胞受到盐胁迫时, 甘油-3-磷酸和 ADP-葡萄糖会在甘油葡萄糖苷磷酸合成酶 (*ggs* 基因编码) 作用下生成甘油葡萄糖苷磷酸, 随后甘油葡萄糖苷磷酸又

被甘油葡萄糖苷磷酸酶 (*ggpP* 基因编码) 水解获得 GG。*ggtA*、*B*、*C* 和 *D* 基因编码一个 ABC 转运蛋白, 负责将胞外的 GG 转运到细胞内; 而 *GgpR* 是一个抑制 *ggpS* 基因转录的转录因子。本实验室前期工作敲除了集胞藻 PCC 6803 的 *ggtC* 和 *D* 基因, 使得部分 GG 产物分泌到胞外; 在此基础上敲除 *ggpR*, 又得到了 GG 产量进一步提高的藻株  $\Delta ggtCD\Delta ggpR$ <sup>[22]</sup> (以下简称  $\Delta\Delta$ )。虽然通过这些改造, 该藻株 GG 产量提高到约为野生型的 3 倍, 但是离产业化应用的要求仍有不小的距离。

通过前期合作研究, 我们发现集胞藻 PCC 6803 在 NaCl 胁迫条件下, 细胞除了积累 GG 外还会积累一定含量的甘油; 而表达外源的磷酸甘油磷酸酶, 可以实现甘油的大量合成<sup>[23]</sup>。虽然到目前为止集胞藻 PCC 6803 盐胁迫条件下甘油合成的生化途径还未被报道, 不过考虑到 GG 是由甘油和葡萄糖分子通过糖苷键连接而组成的, 甘油有可能就来源于 GG 的水解。

*GgpS* 催化 GG 合成的第一步反应, 其表达量增加是否会影响集胞藻 GG 和甘油的合成呢? 为了研究 *GgpS* 对 GG 和甘油合成的影响, 本研究在  $\Delta\Delta$  藻株的基础上分别过表达了来源于集胞藻 PCC 6803 或聚球藻 PCC 7002 的 *ggpS* 基因, 分析了这些基因工程改造对  $\Delta\Delta$  藻株在不同 NaCl 浓度下 GG 和甘油合成方面的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

集胞藻 PCC 6803 突变株  $\Delta\Delta$  由本实验室保存; 甘油葡萄糖苷标准品 (50%, W/W) 购自德国 Bitop 公司; 用于分子克隆的试剂盒购自

Omega 公司 (美国); DNA 引物在 Sangon 公司 (中国上海) 合成, 限制性内切酶购自 Fermentas 公司 (美国)。

### 1.2 仪器

离子色谱 ICS-3000 (DIONEX)、T 6 新锐可见光分光光度计 (北京普析通用)、DU800 NUCLEIC ACID/PROTEIN ANALYZER (BECKMAN COULTER)、GXZ-4300 智能光照培养箱 (宁波江南仪器厂)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 质粒和集胞藻突变株的构建

所有引物见表 1。大肠杆菌 *E. coli* DH5a 被用作分子克隆的宿主菌。用 *Kpn* I + *Nde* I 酶切 pXX47<sup>[24]</sup>, 回收得到约 600 bp 的启动子片段  $P_{cpCB}$ ; 将 pWD38 用相同的内切酶酶切, 回收得到约 8 kb 的载体片段; 将以上两个片段连接得到用于过表达集胞藻 PCC 6803 来源 *ggpS* (以下用 *6803ggpS* 表示) 的重组质粒 pPM2。

以聚球藻 PCC 7002 基因组为模板, 以 7002-*ggpS*-F/R (表 1) 为引物对, PCR 扩增得到约 1.5 kb 的 *ggpS* 基因片段, 用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行酶切以获得粘性末端; 将 pPM2 质粒用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 以获得 7 kb 的载体片段; 将上述片段连接得到用于过表达聚球藻 PCC 7002 来源 *ggpS* (以下用 *7002ggpS* 表示) 的重组质粒 pPM7。

将 pPM2 和 pPM7 转化集胞藻  $\Delta\Delta$ , 以补加壮观霉素、卡那霉素和氯霉素的 BG11 固体平板筛选得到转化子。转化子经多轮划线分离、液体传代和 PCR 鉴定, 分别获得分离完全的纯合突变株  $\Delta\Delta$ -PM2 和  $\Delta\Delta$ -PM7。

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
0168-1	ACCTCTCCACGCTGAATTAG
0168-2	TTCCAGGCCACATTGTTGTC
7002-ggpS-F	CATACCAACCCCTGGAGGTCT
7002-ggpS-R	TCTCGAGCTCTCCCCAGGTTAAGCA
6803-ggpS-F	TCCAGGCATATTAGTTCACACG
6803-ggpS-R	TCCAGGCATATTAGTTCACACG

### 1.3.2 集胞藻藻株的常规培养方法

将集胞藻各突变藻株在 BG11 固体平板、30 °C、30  $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  光照强度的条件下日常传代培养。在柱式反应器培养前，先从平板上刮取少量藻细胞至 BG11 液体培养基中，于 30 °C、30  $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、140 r/min 的条件下振荡培养至对数期；然后再将这些培养物按 1 : 10 (V/V) 的比例接种到新鲜 BG11 液体培养基中，在 30 °C、30–50  $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、通入空气的条件下继续培养至  $OD_{730}$  为 1.5–2.0。当需要时，加入壮观霉素至 20 mg/L、卡那霉素至 30 mg/L，氯霉素至 10 mg/L。

### 1.3.3 集胞藻藻株的柱式反应器培养方法

将常规液体培养到对数期的培养物，倒入灭菌的柱式光反应器内，接种体积为 200 mL，在 30 °C、100  $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、通入 5%  $\text{CO}_2$  (V/V) 的

条件下培养；待生长进入平台期 ( $OD_{730}=8-9$ ) 后，加入 BG11 配制的 5 mol/L NaCl 溶液至 NaCl 终浓度为 600 mmol/L，然后将藻细胞继续在上述条件下培养，每 2 天取样 1 mL 用于监测细胞生长 (新锐，可见分光光度计 T6)。在盐胁迫后的第 6 天取 1 mL 藻细胞样品，经 12 000 r/min 离心 5 min，将得到的上清液用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤，并稀释后用于离子色谱检测。

### 1.3.4 GG 和甘油的测定方法

离子色谱 ICS-3000 (DIONEX) 检测样品 GG 含量参考文献[22]中描述进行。检测器为配套的电化学检测器 (DIONEX)，使用内径为 4 mm  $\times$  250 mm 的 carbPac<sup>®</sup>A1 柱；淋洗液为 800 mmol/L NaOH，流速为 0.4 mL/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 过表达 *ggpS* 的重组质粒构建

$P_{\text{cpcB}}$  启动子是目前被鉴定在集胞藻中具有最强启动活性的启动子；使用该启动子，外源蛋白的表达量能达到集胞藻 PCC 6803 可溶性蛋白的 15%<sup>[25]</sup>。本实验室使用该启动子驱动乙烯合成酶在集胞藻 PCC 6803 表达亦获得了优于其他启动子的效果<sup>[23]</sup>。因此，我们选择用  $P_{\text{cpcB}}$  启动子驱动 *ggpS* 基因在  $\Delta\Delta$  藻株过量表达。

表 2 本研究中所用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	References
pWD38	$\text{Ap}^r$ , $\text{Cm}^r$ , <i>slr0168::Cm<sup>r</sup>-P<sub>petE</sub>-6803ggpS</i>	Du W, Tan XM, Lu XF, unpublished
pXX47	$\text{Ap}^r$ , $\text{Sp}^r$ , <i>slr0168::Sp<sup>r</sup>-P<sub>petE</sub>-6803ggpS</i>	[23]
pPM2	$\text{Ap}^r$ , $\text{Cm}^r$ , <i>slr0168::Cm<sup>r</sup>-P<sub>cpcB</sub>-6803ggpS</i>	This study
pPM7	$\text{Ap}^r$ , $\text{Cm}^r$ , <i>slr0168::Cm<sup>r</sup>-P<sub>cpcB</sub>-7002ggpS</i>	This study

通过酶切将  $P_{cpcB}$  启动子从 pXX47 载体<sup>[23]</sup> 中切下, 插入到实验室之前构建的 pWD38 载体, 即获得了用于过表达集胞藻 PCC 6803 来源的 *ggs* 基因的载体 pPM2。该载体具有 *slr0168* 中性位点上下游片段, 用于转化蓝藻后整合到基因组中; 而 *slr0168* 同源片段中间带有氯霉素抗性基因片段, 用于转化蓝藻后筛选蓝藻转化子; 同时同源片段之间的片段, 用于在整合到蓝藻基因组后驱动 6803*ggs* 基因过表达。另外, 通过 PCR 扩增获得了来源于聚球藻 PCC 7002 的 7002*ggs* 基因, 并以其替换 pPM2 载体上的 6803*ggs* 基因获得了质粒 pPM7。

## 2.2 过表达 6803*ggs* 或 7002*ggs* 的藻株基因型鉴定

由于蓝藻基因组具有多倍性<sup>[27]</sup>, 通过转化获得转化子需要在抗生素选择压力下多轮传代分离才可获得纯合的突变体。在本研究中, 我们选择同源整合位点两侧序列匹配的引物 0168-1/2 通过 PCR 确定转化子基因组 *slr0168* 位点是否有外源片段整合; 同时选择 *ggs* 基因特异引物 (6803-*ggs*-F 或 7002-*ggs*-F) PCR 以确认外源 *ggs* 基因导入并整合在 *slr0168* 位点。从图 1 的 PCR 结果 (泳道 1-4) 可见, 对照野生型藻株 *slr0168* 位点没有外源基因导入, 其 PCR 条带长度为 0.5 kb (泳道 1); 而  $\Delta\Delta$ -PM2 藻株 PCR 条带约为 3.8 kb, 却没有对照  $\Delta\Delta$  藻株的 0.5 kb 条带 (泳道 2)。这证明  $\Delta\Delta$ -PM2 藻株 *slr0168* 位点有约 3.3 kb 外源片段的插入且基因组分离完全; 以 6803-*ggs*-F/0168-2 引物对 PCR 扩增得到约为 1.5 kb 条带, 证明 6803*ggs* 基因整合到了  $\Delta\Delta$ -PM2 藻株的 *slr0168* 位点。图 1 (泳道 5-8) 的 PCR 结果也证明  $\Delta\Delta$ -PM7 藻株 *slr0168* 位点已被成功导入来源于聚球藻 PCC

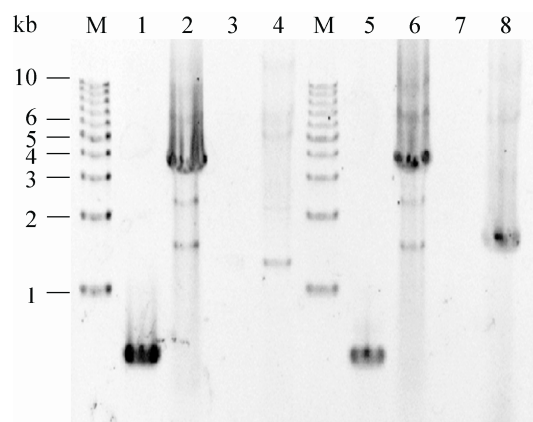


图 1 PCR 检测集胞藻突变藻株基因型

Fig. 1 Genotype determination of *Synechocystis* mutants by PCR. 1, 3, 5 and 7: wild type genome DNA was used as template. 2 and 4:  $\Delta\Delta$ -PM2 genome DNA was used as template. 6 and 8:  $\Delta\Delta$ -PM7 genome DNA was used as template. Primers 0168-1 and 0168-2 were used in lane 1, 2, 5 and 6. Primers 0168-2 and 6803-*ggs*-F were used in lane 3 and 4. Primers 0168-2 and 7002-*ggs*-F were used in lane 7 and 8.

7002 的 7002*ggs* 基因, 而且藻株基因组分离完全, 是纯合的突变株。

## 2.3 *ggs* 基因过量表达对盐胁迫下集胞藻细胞 GG 合成的影响

$\Delta\Delta$  在 600 mmol/L NaCl 胁迫第 6 天后 GG 分泌量约为 110 mg/L, 这与本实验室之前报道的实验结果<sup>[22]</sup>基本吻合; 而在 900 mmol/L NaCl 胁迫下,  $\Delta\Delta$  藻株 GG 分泌量略有提高。但是与  $\Delta\Delta$  藻株相比, 在 600 mmol/L NaCl 胁迫条件下  $\Delta\Delta$ -PM2 和  $\Delta\Delta$ -PM7 藻株 GG 合成甚至还略有降低 (分别减少 8% 和 7%); 在 900 mmol/L NaCl 胁迫条件下  $\Delta\Delta$ -PM2 藻株 GG 合成量略有提高 (10%), 但是并不显著 ( $P>0.05$ ), 而  $\Delta\Delta$ -PM7 藻株 GG 合成量约减少 4% (图 2A)。因此, 在  $\Delta\Delta$  藻株中分别过表达来自于集胞藻 PCC 6803 和聚球藻 PCC 7002 的 *ggs* 基因, 并未进一步提高藻株的 GG 合成。

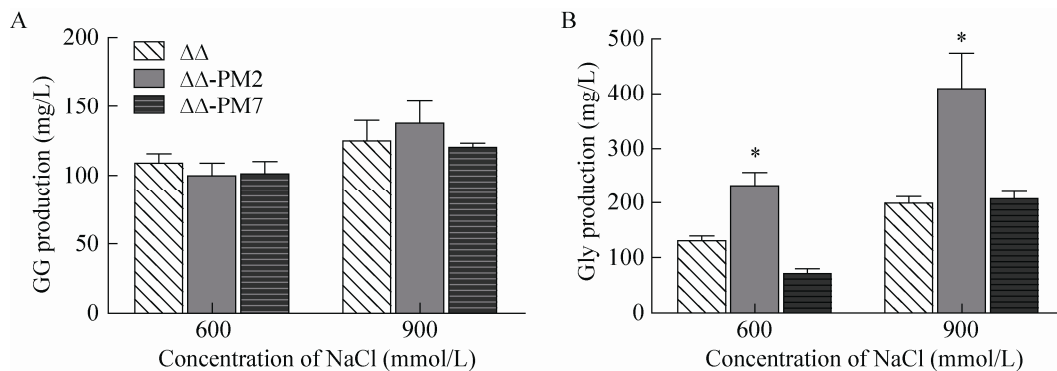


图 2 盐胁迫第 6 天各突变株在不同盐浓度下 GG (A) 和甘油合成量 (B)

Fig. 2 GG (A) and glycerol (B) production in different mutant strains cultured under salt-stressed conditions for 6 days. The glycerol production that was significantly improved compared with the  $\Delta\Delta$  mutant was indicated as star.

如前所述, GG 是集胞藻 PCC 6803 响应外界盐胁迫刺激而合成的一种渗透保护物质, 其合成途径关键基因 *ggsS* 的转录受到转录调控因子 GgpR<sup>[27]</sup>、Slr1588<sup>[28]</sup> 以及染色体 DNA 超螺旋程度<sup>[28]</sup> 等的多重调控。另外, Stirnberg 等发现在集胞藻 PCC 6803 中过表达 *ggsS*, 虽然 GgpS 蛋白含量明显提高, 但是在没有 NaCl 胁迫刺激条件下细胞仍然不能大量合成 GG; 而如果敲除 *ftsH2* 基因, 在盐胁迫条件下即使 *ggsS* 正常受诱导转录, GgpS 蛋白含量甚至还高于野生型藻株, 但是其 GgpS 酶活性和 GG 合成却显著低于野生型<sup>[30]</sup>。所以, 集胞藻 PCC 6803 GgpS 蛋白还受到 DNA-蛋白相互作用<sup>[29]</sup>、FtsH 蛋白酶修饰<sup>[30]</sup> 等翻译后修饰调控。集胞藻 PCC 6803 正是通过这些不同层次的调控手段保证了细胞只在需要的时候合成 GG, 并将 GG 含量保持在所需要的水平。因此, 本研究利用强启动子驱动了 *ggsS* 表达, 但是这并不能解除宿主细胞对 GgpS 蛋白在翻译后水平的调控; 过量表达的蛋白并未被激活, 可能是 GG 合成没有明显提高的主要原因。

#### 2.4 *ggsS* 基因过量表达对盐胁迫下集胞藻细胞甘油合成的影响

与之前报道<sup>[23]</sup> 采用 200 mmol/L NaCl 胁迫条件不同, 本研究中采用 600 和 900 mmol/L NaCl 胁迫条件; 而在这两种条件下, 集胞藻  $\Delta\Delta$  藻株甘油合成量均高于文献报道, 达到 133 和 199 mg/L (图 2B), 这说明甘油的合成在一定范围内随着 NaCl 浓度增加而提高。过表达 *6803ggsS* 之后, 甘油合成相对于  $\Delta\Delta$  藻株显著增加: 在 600 mmol/L NaCl 胁迫条件下提高了 79% (\* $P < 0.05$ ), 而在 900 mmol/L NaCl 胁迫条件下提高了 105% (\* $P < 0.05$ )。而过表达 *7002ggsS* 之后, 甘油合成相对于  $\Delta\Delta$  藻株没有显著提高。

当培养基中 NaCl 浓度从 600 提高到 900 mmol/L 后, *6803ggsS* 过表达菌株  $\Delta\Delta$ -PM7 的甘油积累量又进一步提高约 75% (图 2B)。甘油含量随 NaCl 浓度提高而增加的现象, 提示我们甘油可能也在集胞藻 PCC 6803 盐胁迫适应中发挥着某种作用。如前所述, 我们推测甘油合成来自于 GG 的水解。因此, 过表达 *6803ggsS* 很可能已短暂提高了细胞内的 GG 含量, 但是

宿主细胞感应到 GG 水平的变化,于是启动 GG 水解酶表达以将细胞内 GG 含量维持在所需要的水平。这提示我们要想在  $\Delta\Delta$  藻株基础上通过过表达 *ggpS* 提高 GG 产量还需要先鉴定和敲除负责 GG 分解的关键酶;而如果希望得到的目标产物是甘油,那么过表达 *ggpS* 和 GG 分解酶也将是有效的手段。

### 3 结论

*ggpS* 基因编码甘油葡萄糖苷磷酸合成酶,该酶催化集胞藻 PCC6803 GG 合成途径的关键步骤;敲除该基因,细胞不能合成 GG,并对盐胁迫敏感。在本研究中,来源于集胞藻 PCC 6803 和聚球藻 PCC 7002 的 *ggpS* 基因分别在高产 GG 的  $\Delta\Delta$  藻株中得到过表达,但是这一改造未能进一步提高 GG 的合成,但是显著提高了甘油的合成。另外,提高培养基盐浓度也被证实可以进一步促进甘油的积累。相关实验结果为将来进一步基因工程改造集胞藻以提高 GG 和甘油合成指明了方向。

### REFERENCES

- [1] Kaneko T, Tabata S. Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(11): 1171–1176.
- [2] Yu Y, You L, Liu D, et al. Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Mar Drugs*, 2013, 11(8): 2894–2916.
- [3] Bernát G, Waschewski N, Rögner M. Towards efficient hydrogen production: the impact of antenna size and external factors on electron transport dynamics in *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynth Res*, 2009, 99(3): 205–216.
- [4] Gao ZX, Zhao H, Li ZM, et al. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy Environ Sci*, 2012, 5(12): 9857–9865.
- [5] Zhu T, Xie X, Li Z, et al. Enhancing photosynthetic production of ethylene in genetically engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Green Chem*, 2015, 17(1): 421–434.
- [6] Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng*, 2009, 12(1): 70–79.
- [7] van der Woude AD, Angermayr SA, Puthan Veetil V, et al. Carbon sink removal: Increased photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803 in a glycogen storage mutant. *J Biotechnol*, 2014, 184: 100–102.
- [8] Zhou J, Zhang HF, Meng HK, et al. Production of optically pure D-lactate from CO<sub>2</sub> by blocking the PHB and acetate pathways and expressing D-lactate dehydrogenase in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Process Biochem*, 2014, 49(12): 2071–2077.
- [9] Du W, Liang F, Duan Y, et al. Exploring the photosynthetic production capacity of sucrose by cyanobacteria. *Metab Eng*, 2013, 19(10): 17–25.
- [10] Liu X, Sheng J, Curtiss III R. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 6899–6904.
- [11] Yao L, Qi F, Tan X, et al. Improved production of fatty alcohols in cyanobacteria by metabolic engineering. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7(1): 94–99.
- [12] Wang W, Liu X, Lu X. Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 69–74.
- [13] Sawangwan T, Goedl C, Nidetzky B. Glucosylglycerol and glucosylglycerate as enzyme stabilizers. *Biotechnol J*, 2010, 5(2): 187–191.
- [14] Klein J, Stumm G. Use of glucosylglycerol: US, 20110207681 A1. 2011-08-25.
- [15] Takenaka F, Uchiyama H, Imamura T. Identification of  $\alpha$ -D-glucosylglycerol in sake.

- Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(2): 378–385.
- [16] Krutmann J, Lentzen G, Schwarz T. Osmolytes for the treatment of allergic or viral respiratory diseases: US, 20110053896 A1. 2011-03-03.
- [17] Aizawa Kyo ST, Yasuhiro K, Koushi I, et al. Keratoconjunctival protecting agent, or keratoconjunctival disorder inhibiting agent: WO/2013/077433. 2013-05-30.
- [18] Okumura Hidenobu US. Blood glucose level suppressant and food inhibiting sharp increase in blood glucose level: JP, JP2004–331576. 2004-11-25.
- [19] Goedel C, Sawangwan T, Mueller M, et al. A high-yielding biocatalytic process for the production of 2-*O*-( $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-sn-glycerol, a natural osmolyte and useful moisturizing ingredient. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47(52): 10086–10089.
- [20] Roder A, Hoffmann E, Hagemann M, et al. Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 243(1): 219–226.
- [21] Hagemann M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiol Rev*, 2011, 35(1): 87–123.
- [22] Tan XM, Du W, Lu XF. Photosynthetic and extracellular production of glucosylglycerol by genetically engineered and gel-encapsulated cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(5): 2147–2154.
- [23] Savakis P, Tan XM, Du W, et al. Photosynthetic production of glycerol by a recombinant cyanobacterium. *J Biotechnol*, 2015, 195: 46–51.
- [24] Zhu T, Xie XM, Li ZM, et al. Enhancing photosynthetic production of ethylene in genetically engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Green Chem*, 2015, 17(1): 421–434.
- [25] Zhou J, Zhang H, Meng H, et al. Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria. *Sci Rep*, 2014, 4(11): 4500–4507.
- [26] Griese M, Lange C, Soppa J. Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, 323(2): 124–131.
- [27] Klähn S, Höhne A, Simon E, et al. The gene *ssl3076* encodes a protein mediating the salt-induced expression of *ggpS* for the biosynthesis of the compatible solute glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 2010, 192(17): 4403–4412.
- [28] Chen L, Wu LN, Zhu Y, et al. An orphan two-component response regulator Slr1588 involves salt tolerance by directly regulating synthesis of compatible solutes in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol BioSyst*, 2014, 10(7): 1765–1774.
- [29] Prakash JSS, Sinetova M, Zorina A, et al. DNA supercoiling regulates the stress-inducible expression of genes in the cyanobacterium *Synechocystis*. *Mol BioSyst*, 2009, 5(12): 1904–1912.
- [30] Stirnberg M, Fulda S, Huckauf J, et al. A membrane-bound FtsH protease is involved in osmoregulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803: the compatible solute synthesizing enzyme GgpS is one of the targets for proteolysis. *Mol Microbiol*, 2007, 63(1): 86–102.

(本文责编 陈宏宇)