

• 合成生物技术 •

聚球藻 UTEX 2973 中光碳驱动的高密度燃料合成

李树斌^{1,2,3,4}, 孙韬^{1,5}, 陈磊^{1,2,3,4}, 张卫文^{1,2,3,4,5}

- 1 天津大学 化工学院 合成微生物学实验室, 天津 300072
- 2 教育部系统生物工程重点实验室, 天津 300072
- 3 教育部合成生物学前沿科学中心, 天津 300072
- 4 天津化学化工协同创新中心, 天津 300072
- 5 天津大学生物安全战略研究中心, 天津 300072

李树斌, 孙韬, 陈磊, 等. 聚球藻 UTEX 2973 中光碳驱动的高密度燃料合成. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2126–2138.

Li SB, Sun T, Chen L, et al. Light and carbon dioxide-driven synthesis of high-density fuel in *Synechococcus elongates* UTEX 2973. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2126–2138.

摘要: 发展“液态阳光”被认为是解决化石燃料枯竭的关键技术之一。 β -石竹烯是高性能的萜烯化合物, 作为潜在的航空高密度燃料备受瞩目。新型光合蓝细菌底盘聚球藻 UTEX 2973 倍增时间短至 1.5 h 且耐受高温高光, 利用光和 CO_2 合成 β -石竹烯具有很大的发展前景。为此, 文中在聚球藻 UTEX 2973 中通过构建 β -石竹烯合成途径、优化相关关键合酶、增强前体供应等一系列策略实现了在摇瓶中约 121.22 $\mu\text{g/L}$ β -石竹烯的合成 (96 h)。在此基础上, 通过培养条件的优化实现在光生物反应器中进行高密度培养, 最终 β -石竹烯产量达到约 212.37 $\mu\text{g/L}$ (96 h)。这是目前报道的蓝细菌底盘中 β -石竹烯的最高产量, 为未来利用光和 CO_2 直接合成高密度燃料打下基础。

关键词: 聚球藻 UTEX 2973, 高密度燃料, 液态阳光, β -石竹烯, 高密度培养

Light and carbon dioxide-driven synthesis of high-density fuel in *Synechococcus elongates* UTEX 2973

Shubin Li^{1,2,3,4}, Tao Sun^{1,5}, Lei Chen^{1,2,3,4}, and Weiwen Zhang^{1,2,3,4,5}

1 Laboratory of Synthetic Microbiology, School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education of China, Tianjin 300072, China

3 Frontier Science Center for Synthetic Biology, Ministry of Education of China, Tianjin 300072, China

4 Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin 300072, China

5 Center for Biosafety Research and Strategy, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Development of “liquid sunshine” could be a key technology to deal with the issue of fossil fuel depletion.

Received: February 28, 2020; **Accepted:** April 3, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31901017), National Key Research and Development Program of China (Nos. 2019YFA09004600, 2018YFA0903600, 2018YFA0903000).

Corresponding author: Tao Sun. Tel/Fax: +86-22-27406394; E-mail: tsun@tju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31901017), 国家重点研发计划 (Nos. 2019YFA09004600, 2018YFA0903600, 2018YFA0903000) 资助。

β -caryophyllene is a terpene compound with high energy density and has attracted attention for its potential application as a jet fuel. The high temperature and high light-tolerant photosynthetic cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 (hereafter *Synechococcus* 2973), whose doubling time is as short as 1.5 h, has great potential for synthesizing β -caryophyllene using sunlight and CO_2 . In this study, a production of $\sim 121.22 \mu\text{g/L}$ β -caryophyllene was achieved at 96 h via a combined strategy of pathway construction, key enzyme optimization and precursor supply enhancement. In addition, a final production of $\sim 212.37 \mu\text{g/L}$ at 96 h was realized in a high-density cultivation. To our knowledge, this is the highest production reported for β -caryophyllene using cyanobacterial chassis and our study provide important basis for high-density fuel synthesis in cyanobacteria.

Keywords: *Synechococcus elongates* UTEX 2973, high-density fuel, liquid sunshine, β -caryophyllene, high-density cultivation

过去的两个世纪,化石燃料为人类的经济带来了指数型增长,而如今我们正面临着这一增长带来的后果——气候变化、环境恶化、能源危机以及在未来大约 100 年的时间内因化石燃料的枯竭所带来的一系列问题。中国科学院院长、中科院院士白春礼研究员等在Joule杂志提出:在化石燃料枯竭的未来,“液态阳光”可能是解决问题的关键^[1]。“液态阳光”源于丰富的阳光、 CO_2 和水,属于可再生绿色液态燃料。一方面,利用太阳能可以减少我们对化石燃料的依赖,它是最丰富的能源资源,可以满足人类未来的能源需求;另一方面,2017 年全球燃烧化石燃料产生的 CO_2 排放量达到 33 亿t且这一数据在 2018 年又增长了 2%,是 CO_2 被自然吸收回陆地和海洋速率的两倍^[1]。因此,应用合成生物学开展 CO_2 的高效资源化利用,可同时缓解迫切的环境和能源压力,对我国经济、社会的可持续发展具有重大意义。

蓝细菌 (Cyanobacteria),也称蓝藻,是唯一可进行放氧光合作用的原核生物,在地球化学元素循环以及生态环境中具有重要作用^[2]。经由光合作用,每年大约有 2 580 亿t CO_2 被固定为有机物,而仅海洋中的两类蓝细菌——聚球藻和原绿球藻就可占到全球固碳的 20%以上^[3]。由于光合蓝细菌具有高效捕捉太阳能并固定 CO_2 的特性,应用合成生物学技术开发其作为“光驱动的自养型细胞工厂”生产生物燃料和化学品的研究近年来也引起广泛的关注;迄今为止,已有几十种燃料和化学品包括乙醇、正丁醇、异丁醛、异戊二

烯及 3-羟基丁酸等的生物合成途径得以在多种模式蓝细菌中构建表达,实现了从 CO_2 到这些产品的直接生物合成,同时达到了 CO_2 的利用及大宗化学品的绿色制造的目的,为社会的可持续发展提供了新思路,也为发展“液态阳光”技术起到重要的推动作用^[4-8]。

β -石竹烯 (β -caryophyllene, 简称为石竹烯)是一种双环倍半萜类化合物,分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$,由于其具有较高的能量密度和燃烧热,因此被列为下一代航空燃料^[9-10]。随着“微生物细胞工厂”的兴起,以微生物作为宿主生产化合物受到了更多的关注,为石竹烯的合成提供了新的思路。早在 2011 年,有研究者在工程菌内实现了石竹烯的异源生物合成^[11]。通过过表达黄花蒿 *Artemisia annua*来源的石竹烯合酶 (QHS1) 在光合蓝细菌集胞藻 PCC 6803 中实现了 $(46.4 \pm 2.9) \mu\text{g/L/week}$ 的石竹烯产量^[12]。

近几年新分离的聚球藻 *Synechococcus elongates* UTEX 2973,它能在 41°C 、 $1\ 500 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 以及 3% CO_2 的情况下达到最快 1.5 h 的倍增时间,这一生长速度基本与酿酒酵母一致^[13-14],远远超过目前几种模式蓝细菌。同时聚球藻 UTEX 2973 的基因组与被广泛研究的聚球藻 *Synechococcus elongates* PCC 7942 有 99.8% 的相似度,仅存在 55 个单碱基突变或插入缺失以及一个大的染色体翻转,这为聚球藻 UTEX 2973 中研究工作的开展奠定了很好的基础。同时,作为微生物细胞工厂,通过简单导入蔗糖转运蛋白即可得到与目前最好

的蔗糖生产者相似的蔗糖生产速率；这体现了聚球藻UTEX 2973 作为微生物细胞工厂的潜力。在本课题组先前的研究中，通过将编码Tfp菌毛组装蛋白的*pilN*导入聚球藻UTEX 2973，成功实现了聚球藻UTEX 2973 的自然转化，为聚球藻UTEX 2973 验证了包括超强启动子 P_{cpc560} 、 P_{psbA2} 、 P_{psbA3} ，诱导型启动子 P_{lac} 、 P_{trc} 等一系列启动子；验证基于核糖开关theoE*(riboswitch-E*)、theo/yitJ和xpt(C74U)/metE的诱导/抑制系统菌株；验证基于Hfq-MicC的sRNA工具，并在聚球藻UTEX 2973 中对其进行了进一步优化，用于对内源基因的可诱导控制^[15]，使得在聚球藻UTEX 2973 中进行复杂的代谢工程改造成为可能。

本研究中(图1)，为实现聚球藻UTEX 2973 中石竹烯的高效合成，首先在聚球藻UTEX 2973 中测试了一系列不同来源的石竹烯合酶，发现在

仅过表达石竹烯合酶的情况下无法检测到石竹烯的存在，通过引入来自大肠杆菌*Escherichia coli*的IspA以及北美冷杉*Abies grandis*的GPPS2 初步证实了在聚球藻UTEX 2973 中合成石竹烯的可行性，并确定拟南芥*Arabidopsis thaliana*来源的TPS21 在聚球藻UTEX 2973 中效果最佳。随后通过进一步引入来自酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*的异戊烯基二磷酸 δ -异构酶 (IDI1) 大幅提高了石竹烯的产量。在此基础上进一步尝试分别过表达*ispA*、*gpps*以及大肠杆菌、酿酒酵母和聚球藻UTEX 2973 内源的*idi1*。得出酿酒酵母来源的IDI1_{sc}对于聚球藻UTEX 2973 中石竹烯合成的关键作用，最后通过优化光生物反应器中的光照、pH实现了在光生物反应器中聚球藻UTEX 2973 的高密度培养和石竹烯的高效合成。

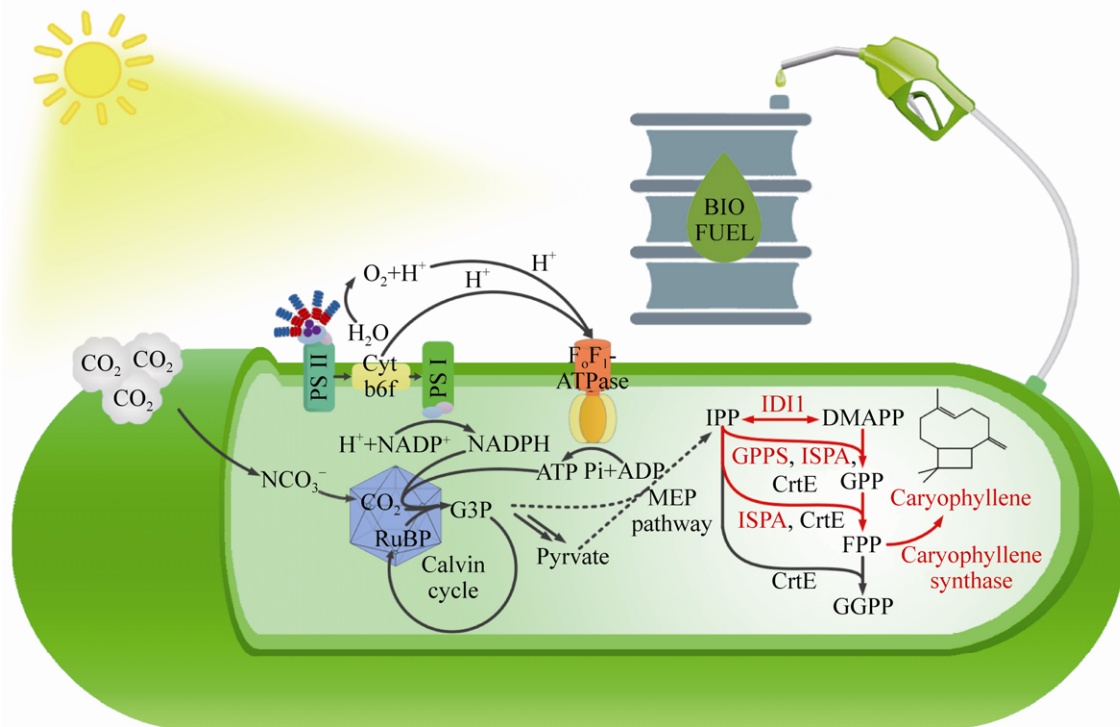


图1 以聚球藻UTEX 2973 为细胞工厂光合自养合成石竹烯的模型(其中红色标注的代谢途径为新引入或强化途径)

Fig. 1 Schematic model of photosynthetic autotrophic synthesis of caryophyllene using *S. elongates* UTEX 2973, in which the metabolic pathways marked in red were introduced or enhanced.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

本实验用到的野生型聚球藻UTEX 2973 及大肠杆菌Helper^[16]由中国科学院青岛生物能源与过程研究所吕雪峰研究员惠赠^[17]。大肠杆菌DH5 α 、大肠杆菌HB101 以及聚球藻UTEX 2973 由实验室保存。大肠杆菌DH5 α 用于质粒构建, 大肠杆菌HB101 用于作为接合转移质粒供体, 大肠杆菌Helper 用于接合转移辅助菌。pSIII-tps21、pSIII-tps23、pSIII-cscs和pSIII-qhs1 为本实验构建, 基于pBR322^[18]的于聚球藻UTEX 2973 中性位点NSIII处的整合型载体, 用于筛选不同来源的石竹烯合酶, 基因 *tps21* (NP_197784.2)^[19]、*tps23* (ABY79213)^[20]、*cscs* (AAU05952.1)^[21]、*qhs1* (AAL79181)^[22]经过对聚球藻UTEX 2973 序列优化, 由金维智公司(中国, 苏州) 合成。pSI-ispA、pSI-gpps-ispA、pSI-gpps-ispA-idi1_{sc}为本实验构建, 基于pBR322 于NSI的整合型载体, 以探究自萜烯前体DMAPP和IPP至FPP合成的途径对于石竹烯产量的影响, GPPS (AF513112.1) 由金维智公司合成, *IspA* (NP_414955) 扩增自大肠杆菌MG1655, *IDI1_{sc}* (NP_015208) 扩增自酿酒酵母BY4741。pSII-gpps、pSII-ispA、pSII-idi1_{sc}、pSII-idi1_{sc} 以及 pSII-idi1_{ec} 为本实验构建, 基于pBR322 于NSII位点的整合型载体, 用以探究GPPS、*IspA*、*IDI1_{sc}* 表达量及不同物种来源的*IDI1* 对于石竹烯产量的影响, *idi1_{ec}* 扩增自大肠杆菌MG1655, *idi1_{sc}* 扩增自酿酒酵母BY4741, *idi1_{sc}* 扩增自聚球藻UTEX 2973。

1.1.2 培养基

大肠杆菌培养采用标准LB培养基^[23], 培养根据对应质粒的抗性标记添加卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氯霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、壮观霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及氨苄青霉素 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (抗生素浓度为终浓度)。聚球藻UTEX 2973 培养采用标准BG11 培养基^[24], 对于

高密度培养用培养基额外添加 1 g/L HEPES, 用于调整并维持pH至 8.5, 固体培养基额外添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 3 g/L以及 1.5%琼脂粉, 灭菌后添加单独灭菌的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (36 g/L) 1 mL/L以及柠檬酸铁铵 (6 g/L) 1 mL/L; 蓝细菌突变株根据对应抗性标记添加卡那霉素 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、氯霉素 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、壮观霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.3 试剂与仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒小提试剂盒、凝胶纯化回收试剂盒, PCR纯化试剂盒、2 \times Taq Master Mix (Dye Plus)、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 以及 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit购自南京诺唯赞生物科技有限公司。限制性内切酶、DNA连接酶购自Thermo Fisher Scientific, 引物合成与测序由金维智公司完成。

蓝细菌和大肠杆菌平板的培养在上海博讯SPX-250B-G光照培养箱中进行, 液体菌株的培养在天津欧诺HNYC-202T叠加式光照摇床中进行。蓝细菌的高密度培养在配有可调光LED灯壳的Eppendorf BioFlo/CelliGen 310 7.5 L发酵罐中进行。

1.2 质粒与突变株构建

1.2.1 菌株构建

质粒提取、PCR纯化、胶回收等具体操作根据对应说明书进行。本实验中所用菌株见表 1, 克隆所用引物见网络版中附件, 菌株命名为 StrainXYZ, 其中X为NSI位点转入质粒的序号, Y为NSII位点转入质粒的序号, Z为NSIII位点转入质粒的序号, 0 代表该位点未转入质粒。

1.2.2 聚球藻UTEX 2973 的转化

根据先前报道的研究^[16], 对聚球藻UTEX2973 进行了优化。将带有pRL443 和pRL623 质粒的大肠杆菌HB101, 即Helper, 和带有目标质粒的大肠杆菌培养过夜, 然后以 1 : 50 (V/V) 的比例将其转移到含有合适抗生素的新鲜LB培养

表 1 研究中用到的菌株

Table 1 Strains used in this research

Strains	Genotype
Strain002	NSIII:: <i>P_{psba3}-tps21-kan^R</i> in WT
Strain003	NSIII:: <i>P_{psba3}-tps23-kan^R</i> in WT
Strain004	NSIII:: <i>P_{psba3}-cscs-kan^R</i> in WT
Strain005	NSIII:: <i>P_{psba3}-qhs1-kan^R</i> in WT
Strain202	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-spe^R</i> in Strain002
Strain203	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-spe^R</i> in Strain003
Strain204	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-spe^R</i> in Strain004
Strain205	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-spe^R</i> in Strain005
Strain302	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-RBS-gpps-spe^R</i> in Strain002
Strain303	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-RBS-gpps-spe^R</i> in Strain003
Strain304	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-RBS-gpps-spe^R</i> in Strain004
Strain305	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-RBS-gpps-spe^R</i> in Strain005
Strain402	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-RBS-gpps-P_{trc}-idiI_{sc}-spe^R</i> in Strain002
Strain403	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-RBS-gpps-P_{trc}-idiI_{sc}-spe^R</i> in Strain003
Strain404	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-RBS-gpps-P_{trc}-idiI_{sc}-spe^R</i> in Strain004
Strain405	NSI:: <i>P_{psba1}-ispA-RBS-gpps-P_{trc}-idiI_{sc}-spe^R</i> in Strain005
Strain422	NSII:: <i>P_{cpc560}-gpps-cm^R</i> in Strain402
Strain432	NSII:: <i>P_{cpc560}-ispA-cm^R</i> in Strain402
Strain442	NSII:: <i>P_{cpc560}-idiI_{sc}-cm^R</i> in Strain402
Strain352	NSII:: <i>P_{cpc560}-idiI_{ec}-cm^R</i> in Strain302
Strain362	NSII:: <i>P_{cpc560}-idiI_{se}-cm^R</i> in Strain302
Strain342	NSII:: <i>P_{cpc560}-idiI_{sc}-cm^R</i> in Strain302

基中。当细胞生长到对数期 (OD_{600} 约为 0.5) 时, 将 2 mL 每种大肠杆菌菌株离心后收集菌体, 并用 1 mL 新鲜 (LB) 培养基洗涤 2 次, 以去除所有抗生素, 然后重悬于 0.1 mL LB 培养基中, 混合在一起, 并孵育 30 min。将 1 mL 处于对数生长期的聚球藻 UTEX 2973 (OD_{750} 约为 0.5) 培养物离心并重悬于 0.2 mL BG11 培养基中 (当转化的菌株培养基含有抗生素时, 需要再洗涤 2 次)。然后将样品与上述大肠杆菌悬浮液混合并温育 30 min。将混合物涂布在铺有无菌滤膜 (孔径为 0.45 μm) 的含 5% (V/V) LB 的 BG11 琼脂平板上。在大约 100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照强度下孵育 24 h 后, 将滤膜转移到新的 BG11 琼脂平板上, 根据需

要添加抗生素 (例如 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素或 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)。

1.3 聚球藻 UTEX 2973 细胞量及干重检测方法

蓝细菌的细胞浓度通过 BioTek ELx808 酶标仪测量 OD_{750} 得出。蓝细菌的干重通过将 40 mL 菌液冷冻干燥后称重得到。

1.4 蓝细菌中石竹烯检测方法

将 30 mL 蓝细菌离心收集后在 15 mL 离心管中进行冷冻干燥, 利用甲醇-氯仿-水萃取的方法^[25]将菌体中的脂溶性物质提出, 氯仿相通过 GC-MS 检测测定石竹烯的含量。GC-MS 检测通过 Agilent 7890 进行, 配有 Agilent 5975 质谱检测器以及 HP-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm film; Restek, Bellefonte, PA, USA) 色谱柱。超高纯度氦气以 1 mL/min 的恒定流速用作载气, 柱箱温度最初在 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 然后以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 150 $^{\circ}\text{C}$, 再以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 280 $^{\circ}\text{C}$, 最后在 280 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min。质谱采用 SIM 模式, 特定识别荷质比 m/z 为 93、133、161、189、204 的离子峰。

1.5 实时定量 PCR (qRT-PCR)

通过 Direct-zolTM RNA MiniPrep 试剂盒 (Zymo, CA, USA) 提取总 RNA。按照起始 OD_{750} 为 0.1 将菌株接种于 20 mL 液体 BG11 培养基, 光照培养 48 h 后, 通过低温离心 (7 000 $\times g$, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 收集培养物 (体积 $\times OD_{750}$ = 5), 然后立即用液氮冷冻。根据制造商提供的方案进行 RNA 提取。按照制造商的规程 (南京诺唯赞生物科技有限公司), 使用 HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 合成 cDNA。将每种稀释液 1 μL (1%) 用作 qRT-PCR 的模板。使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (High ROX Premixed) (南京诺唯赞生物科技有限公司) 在 10 μL 反应体系中完成 qPCR 反应, 其中包含 5 μL 混合物, 2 μL dH₂O, 1 μL 模板和 1 μL 每个引物。反应通过 StepOnePlusTM

实时PCR系统 (Applied Biosystems, CA, USA) 进行。数据分析通过StepOnePlus分析软件 (Applied Biosystems, CA, USA) 和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行。编码 RNase P 亚基B的 *rnpB* 基因用作内参基因^[15]。qRT-PCR所用引物见网络版中附件。

2 结果与分析

2.1 石竹烯合酶在聚球藻UTEX 2973 中的表达

将 4 种不同来源的石竹烯合酶TPS21、TPS23、CSCS、QHS1 与超强启动子 P_{psba3} ^[15] 连接构建质粒pSIII-tps21、pSIII-tps23、pSIII-cscs以及pSIII-qhs1, 分别转入蓝细菌UTEX 2973 得到菌株 Strain002、Strain003、Strain004 和Strain005。分别培养 96 h后 (生长达到平台期) 检测, 发现均不能检出石竹烯含量。通过qRT-PCR检测 4 种石竹烯合酶均有较高的转录水平 (图 2), 推测几种石竹烯合酶均得到表达。

2.2 增强石竹烯合成前体FPP的积累

通过分析蓝细菌聚球藻UTEX 2973 内源的代谢途径, 发现蓝细菌内源仅存在同时拥有 3 种催化活性酶牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶CrtE, 能够催化DMAPP连续加成 3 个IPP依次合成牻牛儿基焦磷酸GPP、法尼基焦磷酸FPP以及牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸GGPP^[26], 不能有效地萜烯合成

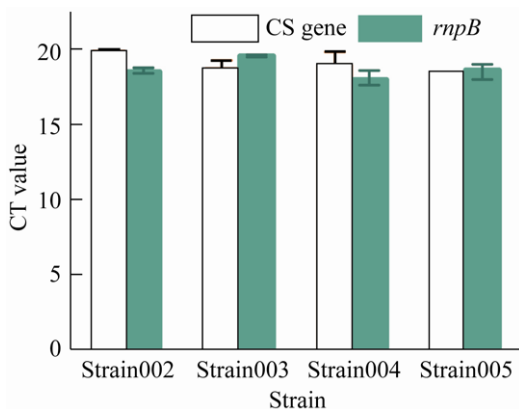


图 2 经qRT-PCR验证几种石竹烯合酶表达情况
Fig. 2 qRT-PCR validation of gene expression for several caryophyllene synthase.

途径的碳流截留在法尼基焦磷酸FPP以供给石竹烯的合成, 因此尝试在聚球藻UTEX 2973 中引入增强FPP合成的外源途径。

首先将pSI-ispA以及pSI-gpps-ispA分别转入菌株Strain002、Strain003、Strain004、Strain005 中, 获得菌株Strain202、Strain203、Strain204、Strain205 以及Strain302、Strain303、Strain304、Strain305, 以在聚球藻UTEX 2973 中引入来自北美冷杉的GPP合酶GPPS或者同时引入大肠杆菌的双功能的FPP合酶IspA (能够将DMAPP与IPP反应生成GPP, 并将GPP与IPP进一步反应生产FPP)。将这 8 个菌株培养 96 h后检测产量发现在仅引入 IspA 的菌株中仅Strain202 能够检测到很低的产量, 为 $(6.141 \pm 0.483) \mu\text{g/L}$ 。在引入GPPS和IspA 的菌株中除Strain304 外均能检测到产量, 分别为 $(14.316 \pm 1.221) \mu\text{g/L}$ 、 $(2.707 \pm 1.023) \mu\text{g/L}$ 以及 $(5.218 \pm 0.759) \mu\text{g/L}$, 产量依然很低 (图 3)。

在先前的研究中, 经由MEP途径合成的DMAPP: IPP的比例大概维持在 1: 6 左右^[27], 这

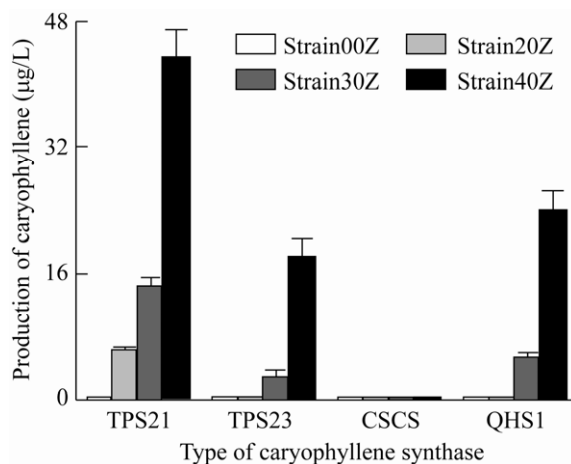


图 3 引入不同来源石竹烯合酶及不同前体合成途径的石竹烯产量 (横坐标代表 4 种合酶, 菌株中“Z”代表引入不同的石竹烯合酶)

Fig. 3 Production of caryophyllene after introducing caryophyllene synthase from different sources and different precursor synthesis pathways (x-axis represented the four kinds of synthase while “Z” in the strain represented the introduction of different synthase).

对于萜烯合成来说可能是不利的, 可以通过过表达 *idi1* 来改变这一比例^[28], 因此将 pSI-gpps-ispA-*idi1*_{sc} 分别转入菌株 Strain002、Strain003、Strain004 和 Strain005 中分别得到菌株 Strain402、Strain403、Strain404 和 Strain405, 经过 96 h 的培养之后, 仅有 Strain404 检测不到产量, 其余菌株均检测到较高的产量, 其中 Strain402 产量最高, 达到了 (43.373±3.496) μg/L。其他两个菌株的产量分别为 (18.139±2.236) μg/L 以及 (23.726±2.683) μg/L (图 3)。结果表明: 1) 在蓝细菌中拟南芥来源的 TPS21 对于石竹烯的合成有较好的表现, 此外黄瓜 *Cucumis sativus* 来源的石竹烯合酶没有表现出其活性; 2) 引入外源的 FPP 前体合成途径和平衡 IPP 和 DMAPP 对于石竹烯的合成有很大的促进。

2.3 探究前体合成途径限速酶, 并进一步提高石竹烯前体 FPP 合成

为了探究自 DMAPP 和 IPP 到 FPP 合成途径中的关键途径以及关键酶, 在 Strain402 中通过分别引入 pSII-gpps、pSII-ispA 和 pSII-*idi1*_{sc} 得到菌株 Strain422、Strain432 和 Strain442。分别培养 96 h 后检测石竹烯产量 (图 4), 发现过表达该三步酶均对蓝细菌中石竹烯的产量有促进作用, 其中过表达 *idi1*_{sc} 对石竹烯产量帮助最大, 使得石竹烯的产量达到了 (121.233±9.732) μg/L, 而过表达 *gpps* 或 *ispA* 仅可以使产量提高到 (66.971±4.269) μg/L 以及 (63.221±7.623) μg/L, 可以认为 *idi1* 是石竹烯合成中这几步反应中的关键限速酶。

此外不同来源的 *IDI1* 可能有不同的催化速率并将 DMAPP 与 IPP 的比例控制在不同的程度^[29], 对于萜烯的合成可能会有不同的影响。因此分别尝试了来自大肠杆菌、酿酒酵母以及蓝细菌内源的 *IDI1*, 因此在菌株 Strain302 中分别转入 pSII-*idi1*_{ec}、pSII-*idi1*_{se} 和 pSII-*idi1*_{sc}, 得到菌株 Strain352、Strain362 和 Strain342, 培养 96 h 检测石竹烯产量 (图 5), 发现来自酿酒酵母的 *IDI1*_{sc} 效果最好, 石竹烯产量达到 (103.583±12.348) μg/L。

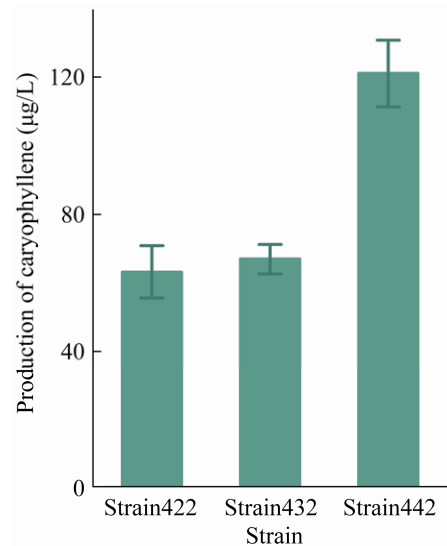


图 4 菌株 Strain402 中进一步过表达法尼基焦磷酸 FPP 合成途径中可能的限速酶 *IPA*、*GPPS*、*IDI1* 后石竹烯产量

Fig. 4 The production of caryophyllene after further overexpression of possible rate-limiting enzymes IPA, GPPS, IDI1 in the synthesis pathway of farnesyl pyrophosphate FPP in strain Strain402.

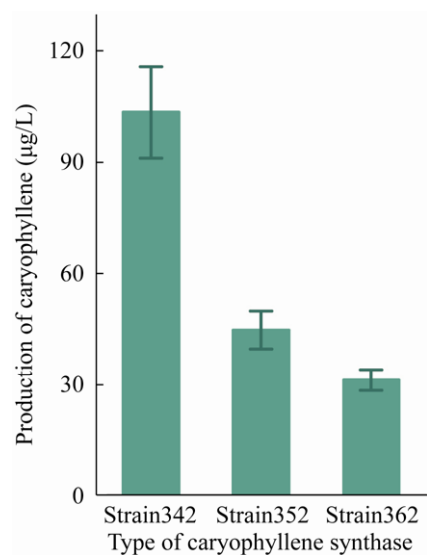


图 5 菌株 Strain302 中过表达不同来源 *idi1* 后石竹烯的产量

Fig. 5 The production of caryophyllene after overexpression of *idi1* from different sources in strain Strain302.

2.4 聚球藻 UTEX 2973 培养条件优化

聚球藻 UTEX 2973 是一种最新发现的蓝细菌,能够在高温 (41 °C) 高光 (500 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 的情况下快速生长^[30],但是其生长最适的温度、光照和 pH 等条件尚未见报道,因此为了优化聚球藻 UTEX 2973 的生长,获得更大的细胞密度和石竹烯产量,测试了其在不同温度、不同 pH 以及不同光照下的生长,确定最优的培养条件,为后续高密度培养生产石竹烯提供参考。

2.4.1 培养过程温度对于聚球藻 UTEX 2973 生长的影响

聚球藻 UTEX 2973 是一种能够耐受相对高温的蓝细菌,适当提高温度应当有助于它的生长,因此测试了其在 30 °C、38 °C、41 °C、45 °C 的生长,发现在 38 °C 和 41 °C 生长速度较快 (图 6),因此确定此为其培养温度。

2.4.2 pH 对聚球藻 UTEX 2973 生长的影响

培养基中的碳酸氢根离子是蓝细菌转运进入体内的 CO_2 的主要形式^[31],而培养基环境中的 pH 值会影响 CO_2 在水中的溶解及解离^[32],从而影响蓝细菌的固碳,因此不同 pH 可能对蓝细菌的生长产生不同的影响,测试了其在不同 pH 下的生长曲线,发现在 pH 为 8.5 时其生长速度最快 (图 7),因此确定为其培养 pH。

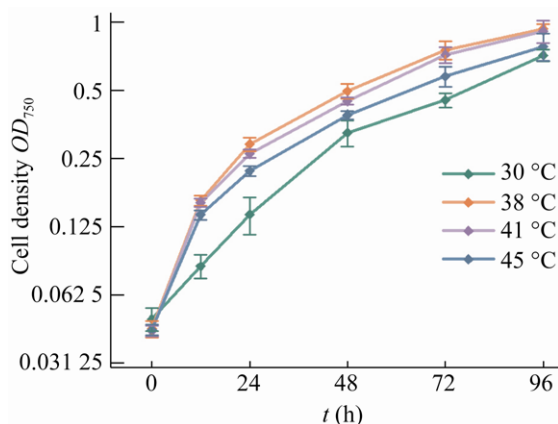


图 6 不同温度下聚球藻 UTEX 2973 的生长曲线
Fig. 6 Growth curves of *S. elongates* UTEX 2973 at different temperatures.

2.4.3 培养过程光照对于聚球藻 UTEX 2973 生长的影响

光照是蓝细菌能量的来源,聚球藻 UTEX 2973 能够在相对高的光照 (500 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 的情况下快速生长,最高甚至可耐受至 2 400 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ^[14],而光生物反应器中由于光程等因素与摇瓶实验不同,因此在光生物反应器测试了不同光照下蓝细菌的生长速度,在固定搅拌桨转速为 600 r/min、通入空气速度为 1 vvm 的情况下,发现在能达到的最大光照 1 000 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 蓝细菌的生长速度最快 (图 8)。

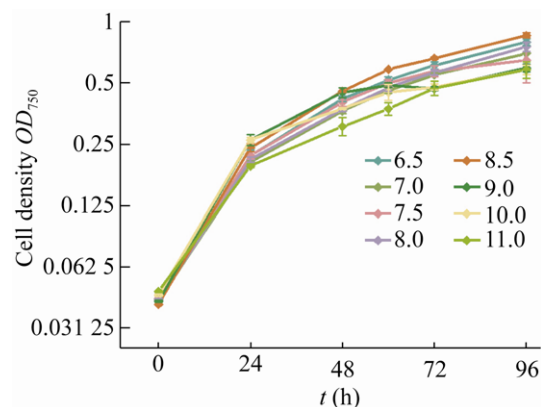


图 7 不同 pH 下聚球藻 UTEX 2973 的生长曲线
Fig. 7 Growth curves of *S. elongates* UTEX 2973 at different pH.

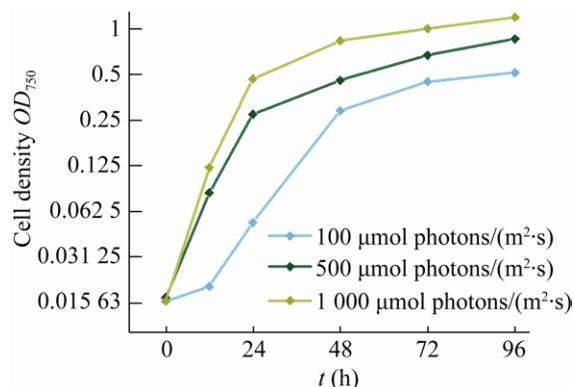


图 8 不同光照下聚球藻 UTEX 2973 在光生物反应器中的生长曲线
Fig. 8 Growth curves of *S. elongates* UTEX 2973 under different light densities in photobioreactor.

2.5 光生物反应器中高密度培养生产石竹烯

在上述确定的培养条件下, 将Strain442在光生物反应器中培养, 控制温度为38℃、pH为8.5、光照为1 000 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、搅拌浆转速为600 r/min、通入空气速度为1 vvm的情况下, 连续培养144 h, 从48 h开始, 每间隔24 h取样测定石竹烯产量, 发现石竹烯产量在96 h时达到最大(212.37 $\mu\text{g}/\text{L}$)并在120 h后开始衰减(图9)。

3 讨论

在本研究中, 我们成功在蓝细菌聚球藻UTEX 2973中构建了石竹烯的合成途径, 并通过一系列途径和培养条件的优化使得石竹烯产量达到了212.37 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

萜烯化合物是一类重要的天然化合物, 其代谢通路长且复杂, 合成酶特异性差、选择性低、效率低, 为萜烯在异源细胞工厂中合成造成了困难^[33-34]。蓝细菌由于其与植物叶绿体的亲缘性近, 为异源合成植物叶绿体内萜烯提供了基础, 同时由于其能高效合成类胡萝卜素类四萜化合物, 表明其MEP途径有相对高的效率^[35], 为萜烯等的合成提供了底物基础。

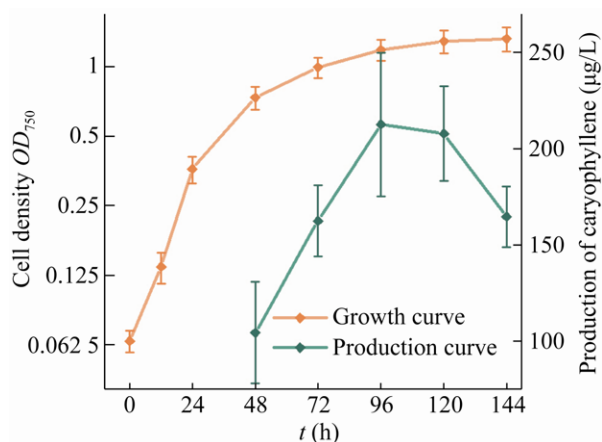


图9 聚球藻UTEX 2973突变株Strain442在光生物反应器中的生长和生产曲线

Fig. 9 Growth and production curves of *S. elongates* UTEX 2973 mutant Strain442 in photobioreactor.

在合成生物学推动下, 目前已在蓝细菌中实现了多种萜烯代谢物的生物合成, 除石竹烯外, 还有异戊二烯^[36-37]、柠檬烯^[38-39]、水芹烯^[40]、鲨烯^[41]、青蒿素前体紫穗槐二烯^[42]及虾青素^[43]等多种萜类化合物的研究。蓝细菌同其他多数原核生物相似, 其体内缺乏MVA途径, 为实现萜烯的高效合成, 现有研究主要分为内源MEP途径的加强、外源MVA途径的引入、萜烯合酶筛选及培养条件优化等。首先, 对于MEP途径而言, 其入口端的1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸合酶DXS与出口端的异戊烯基二磷酸 δ -异构酶IDI被认为是限速步骤^[36-44], 加强内源DXS的表达量提高了萜烯前体供给, 成功将异戊二烯的产量提高了20%^[36], 相比DXS, IDI1能够增加DMAPP/IPP的比例, 从而更有利于萜烯的合成, 过表达IDI能够使异戊二烯的产量获得两倍的提升^[36]。其次, 近期研究表明MEP途径中的4-羟基-3-甲基丁-2-烯-1-基二磷酸合酶IspG和2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸-胞嘧啶转移酶IspD同样可能是MEP途径的限速酶^[36-45], 其中对IspG的进一步强化使得异戊二烯产量提升了60%^[36]。此外, 也有研究者在蓝细菌体内引入了完整的MVA途径, 以增加萜烯前体的供应^[46]。但是, MVA途径相对较长, 完整的导入对于蓝细菌来说相对困难; 并且对于大部分萜烯合成途径来说, 萜烯合酶选择性差、效率低, 因此萜烯合酶的筛选和高表达对于萜烯合成也极为重要。在蓝细菌通过测试不同来源的萜烯合酶, 并通过超强启动子 P_{psba} 或者与高表达蛋白CpcB进行原位融合的方法以提高萜烯合酶的表达量, 取得了不错的成果, 其中利用超强启动子 P_{psba} 已实现了柠檬烯产量30倍的提升^[47], 而利用CpcB与萜烯合酶融合提高萜烯合酶的表达量使得水芹烯产量提高了100倍^[48]。另外由于蓝细菌生长和生产的唯一碳源是来自空气中的 CO_2 溶解于培养基后解离的碳酸氢根, 因此多数工作尝试了利用提高 CO_2 浓度或者补加碳酸氢根的方式提高碳源的供给,

从而提高产品的产量。例如在利用蓝细菌生产乙醇的研究中,通过将通入的空气换为 5%的CO₂使得摇瓶中乙醇的产量提高了 4 倍,达到了 0.4 g/L^[49]。

在本研究中,我们参考了很多早期研究的成果,例如选取了在聚球藻 UTEX 2973 中的强启动子 *P_{psba3}* 控制各种石竹烯合酶的表达,并以此筛选了石竹烯合酶,发现不同种源的石竹烯合酶在蓝细菌中活性和功能差距较大,也显示了在萜烯类物质的合成中合成酶筛选的重要性。随后我们成功通过引入外源的 FPP 合成途径以及过表达酵母来源的 IDI1_{sc} 在聚球藻 UTEX 2973 进一步提高了石竹烯的产量,其中引入 FPP 合成所需的 GPPS 和 ISPA 使得石竹烯产量提高到了可检测水平,证明了聚球藻 UTEX 2973 这一快速生长的蓝细菌作为“光合微生物细胞工厂”的可行性,进一步对于 GPP 合酶 GPPS 以及 FPP 合酶 ISPA 的过表达仅对产量有两倍左右的提升,而过表达酿酒酵母来源的异戊烯基二磷酸δ-异构酶 IDI1_{sc} 能够使产量有 6 倍的提升,这与先前的研究结果相一致^[36],同时我们也发现 IDI1 的来源同样对于萜烯的产量至关重要。最后我们通过光生物反应器中进一步提高培养过程的光照和通气,严格控制生长过程的 pH、温度等参数,使得聚球藻 UTEX 2973 的生物量有接近一倍的提升,同时石竹烯产量也得到了相应的提升,说明了培养条件尤其是光照强度和 CO₂ 的供给对于蓝细菌生物燃料产量的重要性,与先前的研究结果相一致^[49],进一步证明了先前研究的结果^[15-17]。

但是本研究中仅仅优化了从 DMAPP 和 IPP 到石竹烯的部分途径,并未引入/增强 MVA/MEP 途径的提高萜烯前体的供应或进行其他竞争途径的敲除,因此本研究中所得的石竹烯产量还有较大的提升空间。在接下来的工作中,可以通过加强内源 MEP 途径的限速酶,或引入外源的 MVA 途径,进一步提高前体供给,或者通过基因敲除、基因表达调控^[50-52]等方式弱化 FPP 向 GGPP 以及

鲨烯合成的碳流,以进一步提高 FPP 的供给。此外聚球藻 UTEX 2973 中有限的筛选标记数量限制了其连续多步改造的可能性,因此利用 CRISPR 等方式^[53-54]进行连续多步无痕操作是在其体内进行复杂代谢工程的基础。

本研究中,通过光生物反应器实现了对于聚球藻 UTEX 2973 的高密度培养,但是其细胞干重依然只达到了 (2.3±0.2) g/L,相比大肠杆菌^[55]和酿酒酵母^[56]等细胞工厂有较大的差距,这严重限制了其作为“光合微生物细胞工厂”的应用,需要在未来的研究中得到进一步的提高。

利用光合微生物细胞工厂实现生物燃料及大宗化学品的生物合成,相比传统化学合成立体选择性好,反应过程温和,环境污染少;相比传统基于酿酒酵母等的微生物细胞工厂,不需要大量的糖和有机碳源作为底物,避免了传统微生物细胞工厂成本高、“与人争粮”的弊端。此外光合微生物细胞工厂仅利用太阳能作为能量来源,CO₂ 作为底物即可合成生物燃料及大宗化学品,在化石燃料枯竭的未来,取之不尽的太阳能是最好的能量来源,而 CO₂ 是化石燃料燃烧和生物呼吸的必然产物,也是温室效应的主要原因。利用 CO₂ 作为碳源,既可以实现资源循环利用,又可以减缓温室效应。因此进一步优化以蓝细菌为底盘的微生物细胞工厂,选育更好的蓝细菌底盘细胞,以这种基于光合生物的“液态阳光”作为能源的主要发展方向之一,对于未来缓解能源紧缺实现可持续发展有着重要作用。

REFERENCES

- [1] Shih CF, Zhang T, Li JH, et al. Powering the future with liquid sunshine. *Joule*, 2018, 2(10): 1925–1949.
- [2] Atia A, Saad A. Review on freshwater blue-green algae (Cyanobacteria): occurrence, classification and toxicology. *Biosci Biotechnol Res Asia*, 2014, 11(3): 1319–1325.
- [3] Li WKW. Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton:

- measurements from flow cytometric sorting. *Limnol Oceanogr*, 1994, 39(1): 169–175.
- [4] Gao XY, Sun T, Pei GS, et al. Cyanobacterial chassis engineering for enhancing production of biofuels and chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(8): 3401–3413.
- [5] Kanno M, Carroll AL, Atsumi S. Global metabolic rewiring for improved CO₂ fixation and chemical production in cyanobacteria. *Nat Commun*, 2017, 8: 14724.
- [6] Anfelt J, Kaczmarzyk D, Shabestary K, et al. Genetic and nutrient modulation of acetyl-CoA levels in *Synechocystis* for n-butanol production. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 167.
- [7] Ku JT, Lan EI. A balanced ATP driving force module for enhancing photosynthetic biosynthesis of 3-hydroxybutyrate from CO₂. *Metab Eng*, 2018, 46: 35–42.
- [8] Wang YP, Sun T, Gao XY, et al. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO₂ in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab Eng*, 2016, 34: 60–70.
- [9] Meylemans HA, Quintana RL, Harvey BG. Efficient conversion of pure and mixed terpene feedstocks to high density fuels. *Fuel*, 2012, 97: 560–568.
- [10] Harvey BG, Meylemans HA, Gough RV, et al. High-density biosynthetic fuels: the intersection of heterogeneous catalysis and metabolic engineering. *Phys Chem Chem Phys*, 2014, 16(20): 9448–9457.
- [11] Reinsvold RE, Jinkerson RE, Radakovits R, et al. The production of the sesquiterpene β -caryophyllene in a transgenic strain of the cyanobacterium *Synechocystis*. *J Plant Physiol*, 2011, 168(8): 848–852.
- [12] Yang JM, Nie QJ. Engineering *Escherichia coli* to convert acetic acid to β -caryophyllene. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 74.
- [13] Salari R, Salari R. Investigation of the best *saccharomyces cerevisiae* growth condition. *Electron Phys*, 2017, 9(1): 3592–3597.
- [14] Ungerer J, Lin PC, Chen HY, et al. Adjustments to photosystem stoichiometry and electron transfer proteins are key to the remarkably fast growth of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *MBio*, 2018, 9(1): e02327-17, doi: 10.1128/mBio.02327-17.
- [15] Li SB, Sun T, Xu CX, et al. Development and optimization of genetic toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Metab Eng*, 2018, 48: 163–174.
- [16] Elhai J, Wolk CP. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol*, 1988, 167: 747–754.
- [17] Song K, Tan XM, Liang YJ, et al. The potential of *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 for sugar feedstock production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(18): 7865–7875.
- [18] Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, et al. Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 1977, 2(2): 95–113.
- [19] Chen F, Tholl D, D’Auria JC, et al. Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from Arabidopsis flowers. *Plant Cell*, 2003, 15(2): 481–494.
- [20] Köllner TG, Held M, Lenk C, et al. A maize (*E*)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell*, 2008, 20(2): 482–494.
- [21] Mercke P, Kappers IF, Verstappen FW, et al. Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 2012–2024.
- [22] Cai Y, Jia JW, Crock J, et al. A cDNA clone for β -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2002, 61(5): 523–529.
- [23] Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1951, 62(3): 293–300.
- [24] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev*, 1971, 35(2): 171–205.
- [25] Yang S, Lu SH, Yuan YJ. Cerium elicitor-induced phosphatidic acid triggers apoptotic signaling development in *Taxus cuspidata* cell suspension cultures. *Chem Phys Lipids*, 2009, 159(1): 13–20.
- [26] Pattanaik B, Lindberg P. Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. *Life (Basel)*, 2015, 5(1): 269–293.

- [27] Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(12): 1401–1426.
- [28] Phillips MA, D'Auria JC, Gershenzon J, et al. The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell*, 2008, 20(3): 677–696.
- [29] Adam P, Hecht S, Eisenreich W, et al. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12108–12113.
- [30] Yu JJ, Liberton M, Cliften PF, et al. *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂. *Sci Rep*, 2015, 5: 8132.
- [31] Burnap RL, Hagemann M, Kaplan A. Regulation of CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria. *Life (Basel)*, 2015, 5(1): 348–371.
- [32] Ji X, Verspagen JMH, Stomp M, et al. Competition between cyanobacteria and green algae at low versus elevated CO₂: who will win, and why? *J Exp Bot*, 2017, 68(14): 3815–3828.
- [33] Li MJ, Hou FF, Wu T, et al. Recent advances of metabolic engineering strategies in natural isoprenoid production using cell factories. *Nat Prod Rep*, 2020, 37(1): 80–99.
- [34] Pribat A, Boureau L, Mortain-Bertrand A, et al. Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis// Ramawat K, Mérillon JM. *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg: Springer, 2013: 2813–2851.
- [35] Vavitsas K, Fabris M, Vickers CE. Terpenoid metabolic engineering in photosynthetic microorganisms. *Genes*, 2018, 9(11): 520.
- [36] Gao X, Gao F, Liu D, et al. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO₂. *Energy Environ Sci*, 2016, 9(4): 1400–1411.
- [37] Chaves JE, Rueda-Romero P, Kirst H, et al. Engineering isoprene synthase expression and activity in cyanobacteria. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(12): 2281–2292.
- [38] Lin PC, Saha R, Zhang FZ, et al. Metabolic engineering of the pentose phosphate pathway for enhanced limonene production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci Rep*, 2017, 7: 17503.
- [39] Davies FK, Work VH, Beliaev AS, et al. Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Front Bioeng Biotechnol*, 2014, 2(21).
- [40] Formighieri C, Melis A. Regulation of β-phellandrene synthase gene expression, recombinant protein accumulation, and monoterpene hydrocarbons production in *Synechocystis* transformants. *Planta*, 2014, 240(2): 309–324.
- [41] Pattanaik B, Englund E, Nolte N, et al. Introduction of a green algal squalene synthase enhances squalene accumulation in a strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00125.
- [42] Choi SY, Lee HJ, Choi J, et al. Photosynthetic conversion of CO₂ to farnesyl diphosphate-derived phytochemicals (amorpha-4,11-diene and squalene) by engineered cyanobacteria. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 202.
- [43] Hasunuma T, Takaki A, Matsuda M, et al. Single-stage astaxanthin production enhances the nonmevalonate pathway and photosynthetic central metabolism in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(12): 2701–2709.
- [44] Halfmann C, Gu LP, Zhou RB. Engineering cyanobacteria for the production of a cyclic hydrocarbon fuel from CO₂ and H₂O. *Green Chem*, 2014, 16(6): 3175–3185.
- [45] Englund E, Shabestary K, Hudson EP, et al. Systematic overexpression study to find target enzymes enhancing production of terpenes in *Synechocystis* PCC 6803, using isoprene as a model compound. *Metabol Eng*, 2018, 49: 164–177.
- [46] Formighieri C, Melis A. Sustainable heterologous production of terpene hydrocarbons in cyanobacteria. *Photosynth Res*, 2016, 130(1): 123–135.
- [47] Wang X, Liu W, Xin CP, et al. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis

- limitations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(50): 14225–14230.
- [48] Formighieri C, Melis A. A phycocyanin-phellandrene synthase fusion enhances recombinant protein expression and β -phellandrene (monoterpene) hydrocarbons production in *Synechocystis* (cyanobacteria). *Metabol Eng*, 2015, 32: 116–124.
- [49] 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.
- [50] Sun T, Li SB, Song XY, et al. Re-direction of carbon flux to key precursor malonyl-CoA via artificial small RNAs in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 26.
- [51] Knoot CJ, Biswas S, Pakrasi HB. Tunable repression of key photosynthetic processes using Cas12a CRISPR interference in the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus* sp. UTEX 2973. *ACS Synth Biol*, 2019, 9(1): 132–143.
- [52] Huang CH, Shen CR, Li H, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S. elongatus* PCC 7942. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 196.
- [53] Wendt KE, Ungerer J, Cobb RE, et al. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 115.
- [54] Ungerer J, Pakrasi HB. Cpf1 is a versatile tool for CRISPR genome editing across diverse species of cyanobacteria. *Sci Rep*, 2016, 6: 39681.
- [55] Knorre WA, Deckwer WD, Korz D, et al. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* with computer-controlled optimal growth rate. *Ann New York Acad Sci*, 1991, 646(1): 300–306.
- [56] Raj AE, Kumar HSS, Kumar SU, et al. High-cell-density fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(5): 1130–1132.

(本文责编 郝丽芳)