

DOI: 10.13376/j.cbls/2017095

文章编号: 1004-0374(2017)08-0707-06

· 发现的历程 ·



**编者按:** 异戊二烯主要用于生产合成橡胶, 还用于生产多种精细化工品及黏合剂和润滑剂。目前异戊二烯完全由石化原料生产。随着全球气候变暖和化石资源的日益短缺, 构建以廉价生物质或CO<sub>2</sub>为原料的异戊二烯生物法合成线路已引起研究者的极大关注。中国科学院上海植物生理生态研究所杨琛课题组在蓝细菌中构建异戊二烯合成途径, 利用代谢流量分析和代谢组学分析指导蓝细菌中异戊二烯合成途径的设计和改造, 通过循环鉴定合成途径限速步骤和解除限速步骤, 逐步提高异戊二烯合成途径的代谢通量, 最终经过一系列改造后获得的工程菌可将光合作用所固定的碳的40%用于异戊二烯的合成, 产量高达1.26 g/L。除了高效合成异戊二烯,

该研究所构建的工程菌还可以作为平台, 构建光合自养细胞工厂, 合成各种萜类化合物。

## 吃进“废气”, 吐出“宝贝” ——记代谢工程改造光合细胞工厂生产异戊二烯

高翔

(中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200032)

异戊二烯是重要的大宗基础原料, 主要用于生产合成橡胶, 用以制造轮胎; 另外, 异戊二烯还用于生产黏合剂和润滑剂。目前世界上绝大部分异戊二烯是利用石油基原料进行生产, 即利用溶剂萃取蒸馏分离炼油副产物中的C5馏分进行分离提取。该方法依赖于不可再生的化石原料, 成本高且C5馏分分离异戊二烯纯度低。而随着人类社会和世界经济的迅速发展, 对能源的消耗也越来越大, 80%以上的能源来自不可再生的石化能源<sup>[1]</sup>, 有限石化能源不断枯竭, 在将来会被耗尽; 同时, 伴随着化石燃料大量消耗, 大气中的CO<sub>2</sub>浓度在过去150年内提高了25%, 可能造成全球变暖并导致环境问题。因此, 研究人员开始积极探索可再生的清洁能源作为石化能源的替代品, 并发展新的技术来降低大气中CO<sub>2</sub>的浓度, 从而缓解人类社会对能源需求的压力以及环境污染问题, 而生物法合成异戊二烯是一条可能的途径。自然界中异戊二烯可以通过多种植物, 包括苔藓植物、被子植物和裸子植物, 在胁迫条件下合成和释放到空气中<sup>[2]</sup>。然而, 收集植物

释放的异戊二烯在经济上不可行, 因此寻找一种可持续的、利用微生物改造生产异戊二烯的方法引起研究者的广泛关注。异戊二烯是疏水小分子, 沸点低(34℃), 因此很容易通过细胞膜而和微生物细胞快速分离, 可以避免高产异戊二烯对细胞产生毒性, 同时简化产物分离过程, 有利于利用微生物的方法来生产异戊二烯。目前已通过遗传改造大肠杆菌(*Escherichia coli*), 成功地建立了一种高效合成高纯度异戊二烯的发酵法<sup>[3]</sup>。发酵法利用葡萄糖作为底物来合成异戊二烯, 其底物成本较高, 而且存在与人争粮的争议。

本研究选择利用光合法来合成异戊二烯, 即利用光能固定CO<sub>2</sub>来直接生产异戊二烯。不仅可以减少对化石资源的依赖, 还可以降低大气中CO<sub>2</sub>的浓度从而缓解温室效应。光合微生物, 尤其是蓝细菌, 因其光合效率显著高于植物(目前报道蓝细菌光合

收稿日期: 2017-06-30

通信作者: E-mail: gaoxiang6803@gmail.com

作用的效率为3%~9%，而植物 $\leq 0.25\% \sim 3\%$ <sup>[4]</sup>，无需占用农作物使用的耕地，易于规模化培养，而且遗传操作简单便于改造，受到广泛的关注<sup>[5]</sup>。目前，通过代谢工程改造蓝细菌细胞工厂可以高效利用CO<sub>2</sub>合成多种生物燃料和生物基化学品。因此，本研究选择遗传改造蓝细菌来生产异戊二烯。

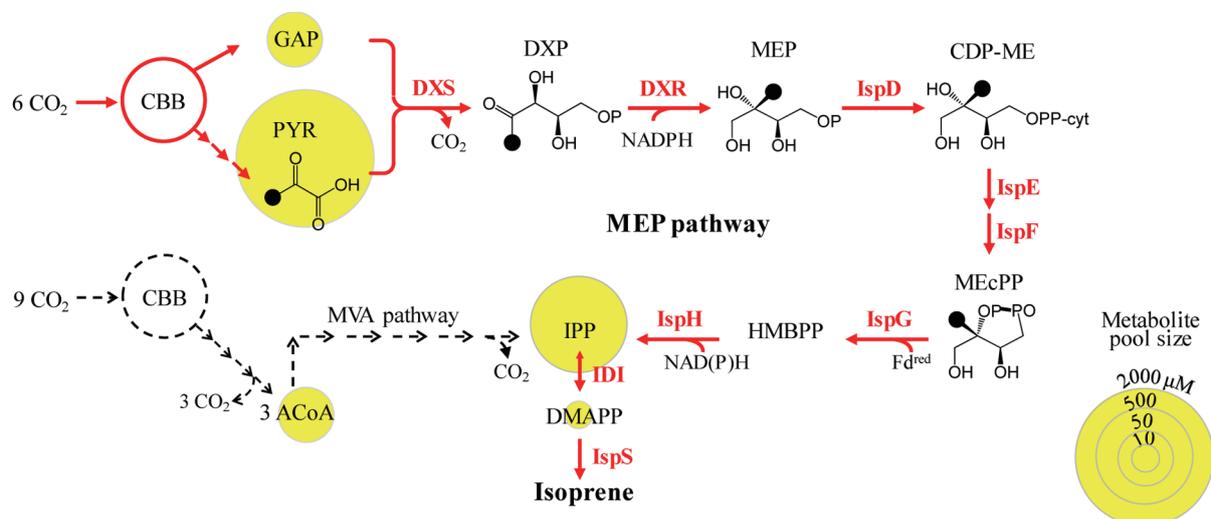
异戊二烯是最简单的萜类化合物，通过定位在叶绿体中的异戊二烯合酶 (IspS) 直接催化二甲基丙烯基焦磷酸 (DMAPP) 裂解生成焦磷酸和异戊二烯<sup>[2]</sup>。现有两条途径来合成萜类化合物的五碳通用前体异戊二烯基焦磷酸 (IPP) 和 DMAPP：一条是甲羟戊酸 (MVA) 途径，主要位于植物的细胞质以及其他所有真核生物细胞中，以乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 为底物；另一条是甲基赤藓糖醇磷酸途径 (MEP) 途径，主要位于细菌、蓝细菌、绿藻和植物的质体中。遗传改造微生物合成萜类化合物的研究把 MEP 途径和 MVA 途径作为重要的改造靶点来提高前体 DMAPP 和 IPP 的供应<sup>[6-7]</sup>，进而提高萜类化合物的产量。在 *E. coli* 中，通过导入外源的 MVA 途径提高萜类化合物的产量显著高于改造内源的 MEP 途径<sup>[8-9]</sup>，如在 *E. coli* 中引入外源的 MVA 途径和表达异戊二烯合酶基因，合成异戊二烯的产量高达 60 g/L<sup>[3]</sup> (产量约为改造 MEP 途径的 10 倍)。但是，研究表明异氧微生物 *E. coli* 和光自养的蓝细菌之间有很大的差异，包括胞内代谢物的浓度、辅因子的丰度和内源或 (和) 外源表达的酶活性，这导致 *E. coli* 代谢工程研究的成功案例通常不能直接应用于蓝细菌<sup>[10-11]</sup>。向蓝细菌集胞藻 6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) 中引入外源的 MVA 途径和异戊二烯合酶，光合法生产异戊二烯的产量仅有 0.3 mg/L，与优化内源的 MEP 途径相比，产量仅提高 2.5 倍<sup>[12]</sup>。另一方面，*E. coli* 中 MEP 途径的遗传改造也取得一些重要进展<sup>[13-14]</sup>，主要包括过表达 MEP 途径中多个限速酶来提高 MEP 代谢通量，最终提高萜类化合物的产量。但是原核生物内源的 MEP 途径由于受到宿主细胞严谨调控，且其调控机制还未完全解析，因此解除调控和优化 MEP 途径来高产萜类化合物仍有很大的挑战。而与 *E. coli* 等异氧微生物快速高效的代谢工程改造相比，光合微生物其代谢工程改造周期较长，因此基于对代谢途径通量控制的分析来理性指导代谢途径改造尤为关键。

首先，通过分析比较蓝细菌中利用 MEP 途径和 MVA 途径合成萜类化合物通用前体 IPP 和 DMAPP 发现：合成 1 分子的 IPP 或 DMAPP，MEP 途径仅

需要核酮糖 -1,5- 二磷酸羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 固定 6 分子的 CO<sub>2</sub>，而 MVA 途径却需要固定 9 分子的 CO<sub>2</sub> (图 1)。考虑到卡尔文循环 (Calvin cycle) 中的 Rubisco 底物转换数 (turnover number) 较低<sup>[15]</sup>，MEP 途径可以有效提高蓝细菌 C 利用效率，从而有利于快速合成萜类化合物。同时，本研究分别测定了光自养蓝细菌聚球藻 7942 (*Synechococcus elongatus* PCC7942) 和异氧微生物 *E. coli* BL-21 (被用于导入 MVA 途径高产异戊二烯的宿主菌) 胞内 MEP 途径直接前体 (丙酮酸 (Pyruvate) 和 3- 磷酸 - 甘油醛 (GAP)) 和 MVA 途径直接前体 (Acetyl-CoA) 的浓度。聚球藻 7942 中 GAP 和 Pyruvate 浓度分别是 *E. coli* 的 5 倍和 11 倍，相反，其 Acetyl-CoA 的浓度却仅为 *E. coli* 的 5%。考虑到聚球藻 7942 胞内 Acetyl-CoA 浓度较低，而且 MVA 途径的第一步反应 (i.e., 缩合 2 分子的 Acetyl-CoA) 在热力学上是不利的反应<sup>[16]</sup>，因此推测在聚球藻 7942 推动 MVA 途径的驱动力不足。另一方面，GAP 和 Pyruvate 的浓度相对较高，在聚球藻 7942 中有利于推动 C 流进入 MEP 途径。因此，本研究选择 MEP 途径在蓝细菌中利用 CO<sub>2</sub> 生产异戊二烯。

异戊二烯合酶 (IspS) 催化 DMAPP 直接生成异戊二烯，其由 *ispS* 基因编码，分布在多种植物中<sup>[2]</sup>。本研究分别克隆多种不同植物来源的 *ispS* 基因，并进行密码子优化和启动子优化，总共获取 20 株工程菌。获得的 3 株产量较高的工程菌，其中使用 *P<sub>trc</sub>* 控制表达蓝桉 (*Eucalyptus globulus*) 来源的经过密码子优化的 *ispS* 的工程菌合成异戊二烯的产量最高：7.7 mg/L。而野生型的聚球藻 7942 检测不到异戊二烯的生成。对表达 *ispS* 工程菌中的 IspS 粗酶液酶活和合成异戊二烯的产量进行相关性分析，发现 IspS 酶活与异戊二烯的产量正相关，该结果也说明 IspS 催化的反应是合成异戊二烯的限速步骤。

为提高前体 DMAPP 和 IPP 的供应来进一步提高蓝细菌合成异戊二烯的产量，可过表达编码 1- 脱氧木酮糖 -5- 磷酸合酶 (DXS) 的基因 *dxs*。之前研究显示，在蓝细菌中，过表达 *dxs* 可以提高萜类化合物的产量<sup>[18-19]</sup>。但本研究发现过表达 *dxs* 之后，工程菌的产量仅提高 20%，而且菌株的生长受到严重抑制。为分析其原因，通过 LCMS 定量测定了工程菌胞内 MEP 途径中间代谢物的浓度，发现胞内 IPP 浓度高达 773  $\mu\text{mol/L}$ ，是野生型聚球藻 7942 胞内 IPP 浓度 (7.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 100 倍，而工程菌胞内 DMAPP/IPP 的比值仅为 0.02，这一比值要远低于



代谢工程改造表达IspS蓝细菌工程菌胞内GAP、Pyruvate (PYR)、Acetyl-CoA (ACoA)以及IPP和DMAPP的浓度用黄色圆圈指示, 黑色圆圈表示代谢流量分析实验中 $^{13}\text{C}$ 标记的C来自Pyruvate。

图1 蓝细菌中MEP途径合成异戊二烯<sup>[17]</sup>

之前报道的可释放异戊二烯的葛藤叶片中 DMAPP/IPP 的比值 (i.e., 2.04)<sup>[20]</sup>。如此低的 DMAPP/IPP 的比值可能影响异戊二烯合酶的活性。为验证这一推测, 在 *E. coli* 中表达并纯化 IspS, 体外条件下测试 DMAPP/IPP 的比值对 IspS 酶活的影响。体外酶反应体系中 DMAPP 浓度 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 固定不变, IPP 浓度由 0  $\mu\text{mol/L}$  梯度增加到 800  $\mu\text{mol/L}$ 。发现添加 IPP 之后, IspS 活性受到不同程度的抑制。当 IPP 浓度为 400  $\mu\text{mol/L}$  时, IspS 的比酶活降低了 90%, 说明高浓度的 IPP 严重抑制 IspS 的活性。因此, 推测提高胞内 DMAPP/IPP 的比值可以提高合成异戊二烯的通量。为提高工程菌胞内 DMAPP/IPP 的比值, 本研究过表达不同物种来源的 IPP 异构酶 (IDI), 催化 IPP 与 DMAPP 相互转化。通过 LCMS 定量测定胞内代谢物发现, 同时过表达 DXS 和 IDI 的工程菌胞内 IPP 的浓度显著降低, 仅为 1.8  $\mu\text{mol/L}$ , 而 DMAPP/IPP 的比值提高至 2.67, 与仅表达 *dxs* 的工程菌相比提高了 130 倍, 这一比值与葛藤叶片中 DMAPP/IPP 的比值相当。相应地, 与仅表达 DXS 的工程菌相比, 同时过表达 DXS 和 IDI 的工程菌合成的异戊二烯产量提高 65%, 与推测相吻合。而且研究还发现, 过表达 IDI 之后, 菌株的生长恢复正常。

由于 IspS 催化效率很低, 特别是对 DMAPP 的亲合力很低 ( $K_m$  值很高: 0.5~8 mmol/L)。推测 IDI 和 IspS 的融合蛋白可能会使 IspS 活性位点附近 DMAPP 的局部浓度提高, 从而提高 IspS 催化效率,

进而提高异戊二烯的产量。本研究构建了 IDI 与 IspS 的融合蛋白, IDI 与 IspS 之间通过连接肽连接, 有两种不同的连接方式: IDI 位于 IspS 的 N 端或 C 端。通过对融合蛋白进行同源模建分析发现, 当 IDI 位于 IspS 的 N 端 (IDI-IspS) 时, IDI 与 IspS 活性位点之间距离仅为 39  $\text{\AA}$ , 而 IDI 位于 C 端的融合蛋白 (IspS-IDI), 其 IDI 与 IspS 活性位点之间的距离为 56  $\text{\AA}$ , 显然 IspS 位于融合蛋白 C 端时, 两个酶的活性位点之间的距离更近, 催化效率可能更高。为了验证这一推测, 本研究构建了表达融合蛋白的工程菌, 发现利用组成型启动子  $P_{cp}$  表达杨树来源的 IspS 和酿酒酵母来源的 IDI 的工程菌中, 表达融合蛋白的菌株合成异戊二烯的产量显著高于非融合蛋白菌株, 特别是 IDI-IspS 融合蛋白, 产量提高 3.3 倍, 证实 IDI-IspS 融合蛋白可溶性表达活性更高。而之前有研究表明融合蛋白之间的连接肽会影响融合蛋白的催化效率, 因此本研究利用 4 种不同连接肽来表达融合蛋白, 有长链的、短链的、柔性的和刚性的, 结果发现, 表达不同连接肽的融合蛋白菌株中, 异戊二烯的产量并没有显著的差异。为解析表达融合蛋白提高异戊二烯产量的机制, 在 *E. coli* 中分别过表达和纯化 IDI-IspS、IspS-IDI、IspS、IDI 这四种蛋白。在体外测试中添加等摩尔的 IDI-IspS、IspS-IDI 和游离的 IspS 与 IDI 蛋白分子, 定量分析单位时间内合成异戊二烯的分子数。通过向反应体系中添加 IPP 起始由 IDI 与 IspS 催化的连续反应, 然后测量单位时间内释放异戊二烯的量。IDI-IspS

融合蛋白合成异戊二烯的速率是两个混合的游离蛋白的 2.2 倍,可能是该融合蛋白中 IDI 与 IspS 之间形成分子通道,使得 DMAPP 分子可以快速地由 IDI 的活性中心进入 IspS 的活性中心。同时,利用 Western Blot 分析表达融合蛋白的工程菌,发现融合蛋白可以显著提高 IspS 可溶性表达量,这也是工程菌提高异戊二烯产量的重要机制之一。

为鉴定表达融合蛋白工程菌中 MEP 途径的限速步骤,本研究利用动态流量分析方法 (kinetic flux profiling, KFP) 来分析 MEP 途径中每一步酶反应的动态流量变化<sup>[21]</sup>。首先用滤纸在 BG11 平板上培养表达 IDI-IspS 的工程菌,生长至对数中期将滤纸快速切换至 BG11 + 10 mmol/L 3-<sup>13</sup>C-Pyruvate 平板上,在不同的时间点 (e.g., 10、30、60、120 s) 迅速收集细胞,提取胞内代谢物,利用 LC-MS/MS 检测细胞内 MEP 途径各个中间代谢物的浓度及其同位素标记异构体分布的变化。<sup>13</sup>C-Pyruvate 会进入 MEP 途径,第一个代谢物 (DXP) 到最后一个代谢物 (IPP/DMAPP) 都会依次被带上 <sup>13</sup>C 标记 (图 1),各个代谢物未被标记的浓度 ( $X^U$ ) 与总浓度 (标记和未标记代谢物总浓度:  $X^T$ ) 的比值 ( $X^U/X^T$ ) 会随时间增加而逐渐降低,  $X^U/X^T$  变化的速率由每一步酶反应的流量和该代谢物的胞内浓度决定。结果显示,MEcPP 未标记的比值降低的速率要显著低于其上游的代谢物,如脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (DXP)。随后,通过计算每一步酶反应的相对流量,发现 IspG 的流量最低,说明 IspG 为表达融合蛋白的工程菌中 MEP 途径的限速步骤。为了疏通 IspG 限速步骤,分别表达两种不同物种来源的 IspG,发现可以显著提高异戊二烯的产量。同时,对表达 IspG 的工程菌进行动态流量分析发现, IspG 的限速被疏通。

最后,为了进一步提高最终获取的两株工程菌 (一株  $P_{uc}$  启动子控制诱导型表达,一株  $P_{cp}$  启动子控制组成型表达) 合成异戊二烯的产量,本研究设计了一个小型的光反应器,连续通入 5% CO<sub>2</sub> 进行连续培养,并对培养温度、通气速率、光照强度进行优化。其中诱导型的工程菌需要添加 IPTG,培养 21 d 后异戊二烯的产量高达 1.26 g/L,合成速率达 4.26 mg/L/h。而组成表达的工程菌,不需要添加任何诱导剂,可以有效降低规模化培养的成本,在培养 21 d 之后其产量也能达到 0.79 g/L,合成速率为 2.46 mg/L/h。同时,研究发现一个有趣的现象,工程菌在培养的前 3 d,细胞快速生长,为生长期;3~9 d,异戊二烯的合成速率最高。这一特征对工业

上利用高浓度的蓝细菌合成异戊二烯非常理想。随后分析工程菌中光合作用固定的 CO<sub>2</sub> 用于合成生物质组分和生产异戊二烯之间的 C 流量分配。在整个 21 d 的培养过程中,诱导型工程菌和组成型工程菌中分别有 40% 和 22% 的光合作用固定的 C 用于生产异戊二烯;而与野生型聚球藻 7942 相比,两株高产异戊二烯的工程菌用于合成生物质组分的 C 流量并没有受到显著的影响,其光合作用固定的 CO<sub>2</sub> 的总 C 流量分别提高了 55% 和 28%。对应地,本研究分析了工程菌光合作用过程中 O<sub>2</sub> 的释放能力,发现与野生型相比,诱导型工程菌和组成型工程菌中 O<sub>2</sub> 的释放速率分别提高了 20%~80% 和 40%~180%,说明高产异戊二烯可以显著提高蓝细菌光系统的活性。最后通过 <sup>13</sup>C 标记的 NaHCO<sub>3</sub> 实验分析 Rubisco 固定 CO<sub>2</sub> 的产物 3-磷酸-甘油酸未标记比率随时间的变化来指示碳固定速率,发现和野生型相比,诱导型工程菌和组成型工程菌固定 CO<sub>2</sub> 的速率分别提高了 76% 和 48%,该结果说明生产异戊二烯的工程菌可以提高光合效率,这可能是工程菌中提高异戊二烯产量的一个有利因素。

本研究通过代谢工程设计和改造蓝细菌细胞工厂,其合成异戊二烯的产量高达 1.26 g/L,平均合成速率为 4.26 mg/L/h。该速率远超过目前文献中报道的光自养微生物合成萜类化合物的合成速率 ( $3 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-2}$  mg/L/h)<sup>[17]</sup>,而且与目前文献中报道的基因工程蓝细菌合成产量较高的化合物,如脂肪酸和异丁醇的合成速率相当。随后,在此基础上预估了工程菌规模化培养之后合成异戊二烯的理论产量值,为每年 0.16~0.32 kg/m<sup>2</sup>;而用于生产天然橡胶 (*cis*-1,4-polyisoprene) 的橡胶树,其每年异戊二烯的产量约为 0.03~0.15 kg/m<sup>2</sup><sup>[22]</sup>,所以获得的蓝细菌工程菌株应用前景很好。最后,因为本研究获取的工程菌可以高效利用光合作用合成萜类化合物的前体 DMAPP 和 IPP,所以该工程菌还可以作为平台宿主菌,构建光合细胞工厂合成各种萜类化合物,为利用光合细胞工厂直接将 CO<sub>2</sub> 转化为高价值萜类化合物打下良好的基础。

## 后记

2009 年春天,作为一名听众在台下聆听师兄师姐们考研成功的经验,当时我就想:如果明年的今天我也能站在台前是多么美好的一件事。那一年夏天武汉特别热,但也正因为暑假坚持每天去图书馆复习,最终才有机会进入中国科学院上海生命科

学研究院的大家庭。2010年，我很幸运地进入了上海植物生理生态研究所。那年秋天，同样是坐在台下首次聆听第一作者讲坛一位师姐的故事，当时我在想着，几年后我也能够站在第一作者讲坛该多好啊。幸运的是我来了，虽然是经历了六年之久。这几年让我从对科研生活懵懵懂懂，到现在真正体验到科研生活的喜怒哀乐；有收获时的欣喜和激动，是它让我对自己的实验充满了无限的动力；也有多次失败后的失落和挫败感，让我有时对自己的能力产生怀疑，最终克服困难，收获不一样的喜悦。这也是科研生活最大的吸引力，充满各种不确定因素，让我不断思考，并坚定地沿着最初的设想走下去。经历了这几年的科研生活，我对科研的很多方面都有了一些新的认识。

第一，关于勤劳。我一直深信勤能补拙，因为我一直认为自己不是一个聪明的人，所以多学一点、多做一点才有可能更好。刚进入实验室实习和轮转的时候，主要是学习和掌握实验技能，这个时候我总是让师兄多给我安排些实验，让我尝试更多的实验技术。这样在实验室的每一天都很充实，很开心，也学到很多东西。但师兄跟我说：做实验的时候你要多想想，不要只顾着埋头去做。当时觉得科研不就是多做实验吗，做的越多出成果越多吗？以至于在一年级的時候还去跟杨老师说，我这个实验是不是太少。但后来的实验让我逐渐深刻地体会到这样做的弊端：没有充分的文献调研就开始做实验，结果一直做不出来，最后发现问题出在实验设计或实验方法本身；更有甚者，发现自己辛辛苦苦做出来的实验结果，其实前人的文献里就可以直接查到。所以，课题确定前，自己要详细查阅相关领域文献，要清楚该领域目前的研究现状，包括已有的基础和存在的问题，清楚课题的意义和创新性。从而初步设想需要用哪些预实验达到什么目的，最好能用最少的预实验来获得最多的信息，来确定这个课题的可行性。而不是一开始还没有想清楚就去做，最后得到一堆无用数据。所以研究不能盲目，要合理分配时间和精力，要把自己的勤奋和努力用的恰到好处；在实验之前和之后多思考，这样才会使实验更加高效。

第二，关于实验中出現负面结果和其他问题。随着课题研究的深入，开展的实验越来越多，会发现有时候总是得到一些负面结果，这个时候先不要气馁，不要在心理上排斥这些负面结果。要静下心来分析，在排除技术性的问题之后，去思考是什么

原因造成与实验预期或者文献报道不一样的结果。通过重复实验去思考可能的原因，也可以尝试其他的方法，做到胆大心细，大胆假设、小心验证。对于实验中遇到的各种各样的问题，同样要学会去面对，分析问题出现的可能原因，然后设计实验针对性排除，最终找到解决方法。

第三，要经常与导师和同学之间讨论和交流。我很高兴能遇到杨琛老师，从她的身上可以感受到她对科研的热爱和执着的追求，充满了正能量。她给了我比较自由的空间，自己合理设计和安排实验，而且每周进行一次讨论，分析实验结果和出现的问题，讨论下一步的实验计划。在这几年的时间里，每周我最期待的就是周一和她讨论，得到正面结果时会迫不及待地想和她分享，得到负面结果或出现问题时更想和她讨论，因为每次总会得到她的鼓励，指导我去怎样分析。所以每周讨论完之后，我总感觉浑身充满了力量，特别想去做实验，而且觉得自己的工作很有意义。平时和同学之间讨论的时候，大家会从不同的角度思考问题，非常利于培养良好的科研思维。

这几年对我来说最重要和最宝贵的是做科研的经历和体会：让我体验到真实科研生活中的酸甜苦辣，让我明白怎样去合理分配自己的时间和精力，让我学会怎样去分析问题、解决问题，让我体会到与导师和同学讨论交流的乐趣。这些让我对自己有一个清晰的定位，并相信自己的科研生活会越来越精彩。

**致谢：**感谢杨琛研究员对本工作的悉心指导和支持，感谢高方、刘邓、张昊、聂小群、王甜甜的帮助。

#### [参 考 文 献]

- [1] Dudley B. BP statistical review of world energy [M]. Pureprint Group: London, 2014
- [2] Sharkey TD, Gray DW, Pell HK, et al. Isoprene synthase genes form a monophyletic clade of acyclic terpene synthases in the TPS-B terpene synthase family. *Evolution*, 2013, 67: 1026-40
- [3] Whited GM, Feher FJ, Benko DA, et al. Development of a gas-phase bioprocess for isoprenemonomer production using metabolic pathway engineering. *Ind Biotechnol*, 2010, 6: 152-63
- [4] Dismukes GC, Carrieri D, Bennette N, et al. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19: 235-40
- [5] Golden SS, Brusslan J, Haselkorn R. Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome. *Methods Enzymol*,

- 1987, 153: 215-31
- [6] Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, et al. Terpenoids: Opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm*, 2008, 5: 167-90
- [7] Davies FK, Jinkerson RE, Posewitz MC. Toward a photosynthetic microbial platform for terpenoid engineering. *Photosynth Res*, 2015, 123: 265-84
- [8] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 796-802
- [9] Morrone D, Lowry L, Determan MK, et al. Increasing diterpene yield with a modular metabolic engineering system in *E. coli*: comparison of MEV and MEP isoprenoid precursor pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 1893-906
- [10] Lan EI, Liao JC. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. *Metab Eng*, 2011, 13: 353-63
- [11] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, et al. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 2905-15
- [12] Bentley FK, Zurbriggen A, Melis A. Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene. *Mol Plant*, 2014, 7: 71-86
- [13] Yuan LZ, Rouviere PE, LaRossa RA, et al. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab Eng*, 2006, 8: 79-90
- [14] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330: 70-4
- [15] Tcherkez GG, Farquhar GD, Andrews TJ. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 7246-51
- [16] Lan EI, Liao JC. ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 6018-23
- [17] Gao X, Gao F, Liu D, et al. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO<sub>2</sub>. *Energy Environ Sci*, 2016, 9: 1400-11
- [18] Halfmann C, Gu L, Zhou R. Engineering cyanobacteria for the production of a cyclic hydrocarbon fuel from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. *Green Chem*, 2014, 16: 3175-85
- [19] Kudoh K, Kawano Y, Hotta S, et al. Prerequisite for highly efficient isoprenoid production by cyanobacteria discovered through the over-expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and carbon allocation analysis. *J Biosci Bioeng*, 2014, 118: 20-8
- [20] Zhou C, Li Z, Wiberley-Bradford AE, et al. Isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate/isopentenyl diphosphate ratio measured with recombinant isopentenyl diphosphate isomerase and isoprene synthase. *Anal Biochem*, 2013, 440: 130-6
- [21] Yuan J, Bennett BD, Rabinowitz JD. Kinetic flux profiling for quantitation of cellular metabolic fluxes. *Nat Protoc*, 2008, 3: 1328-40
- [22] Rasutis D, Soratana K, McMahan C, et al. A sustainability review of domestic rubber from the guayule plant. *Ind Crops Prod*, 2015, 70: 383-94