

DOI: 10.13376/j.cbls/2019051

文章编号: 1004-0374(2019)04-0372-13



吕雪峰, 中国科学院青岛生物能源与过程研究所研究员, 博士生导师, 目前担任中国科学院青岛生物能源与过程研究所副所长, 中国科学院生物燃料重点实验室主任。1997年山西大学化学系本科毕业, 2005年美国新墨西哥大学化学系生物化学专业博士毕业, 2005–2008年, 在美国斯坦福大学化学系从事生物工程博士后研究。吕雪峰团队主要从事微生物代谢工程和合成生物学研究, 以蓝藻和丝状真菌为主要研究对象, 系统应用合成生物学和代谢工程技术手段, 开发新型微生物细胞工厂, 打通了多种能源、化工、医药产品的生物合成技术路线。在蓝藻光驱固碳合成方向, 吕雪峰团队设计构建了蔗糖、甘油葡萄糖苷、乙醇、脂肪醇、脂肪烃等一系列产品的光驱合成路线, 开发了多种高效的光合细胞工厂。

蓝细菌光驱固碳细胞工厂的合成生物学开发策略

张杉杉, 栾国栋, 吕雪峰*

(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, 青岛 266101)

摘要: 光合生物制造技术是指以光合自养生物为底盘, 通过光合固碳过程, 将太阳能和二氧化碳直接转化为生物燃料和生物基化学品的全新生物制造模式。发展光合生物制造技术可以同时实现固碳减排和清洁生产。蓝细菌是极具潜力的微生物光合底盘, 也为光合生物制造技术开发高效的光驱固碳细胞工厂提供了重要平台。着眼于未来的规模化应用需求, 蓝细菌光驱固碳细胞工厂需要在物质能量转化效率、工业过程中的生长和生产稳定性以及与工程过程的适配性这三方面进一步提升。现从光能的捕集和利用、碳源的固定和转化、逆境胁迫的适应以及工程过程的适配这四个角度, 介绍了如何应用合成生物学工具和策略, 人工设计、开发进而优化蓝细菌光驱固碳细胞工厂, 以满足光合生物制造技术大规模应用的需要; 最后, 总结、介绍了本领域的最新研究进展, 并对未来发展方向进行了展望。

关键词: 蓝细菌; 光合作用; 固碳; 光合生物制造; 细胞工厂; 合成生物学

中图分类号: Q93; Q-3 **文献标志码:** A

Synthetic biology strategies to develop efficient cyanobacterial photosynthetic cell factory

ZHANG Shan-Shan, LUAN Guo-Dong, LV Xue-Feng*

(Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

Abstract: Photosynthetic bio-manufacturing technology refers to a new bio-manufacturing model that uses photosynthetic autotrophic organisms as chassis to directly convert solar energy and carbon dioxide into biofuels and bio-based chemicals through photosynthetic carbon fixation. The development of photosynthetic bio-manufacturing technology can simultaneously achieve the effects of carbon sequestration and clean production.

收稿日期: 2018-07-26; 修回日期: 2019-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770092, 31600034); 山东省重大基础研究项目; 青岛创业创新领军人才计划

*通信作者: E-mail: lvxf@qibebt.ac.cn

Cyanobacteria are highly promising microbial photosynthetic chassis and important platforms for the development of efficient photosynthetic cell factories. For scaling up the photosynthetic bio-manufacturing technology, the cyanobacteria photosynthetic cell factories need to be further improved in terms of material and energy conversion efficiency, growth and production stability in industrial processes, and adaptability to engineering processes. To achieve the above objectives, efforts should be made to optimize the cyanobacteria chassis characteristics of capture and utilization of light energy, fixation and transformation of carbon sources, adaptation of stress and engineering processes. This review summarized the recent progress on application of synthetic biology tools and strategies for artificial design and development of cyanobacteria cell factories to meet the requirements of up-scaled photosynthetic biomanufacturing. The future development directions would also be prospected.

Key words: cyanobacteria; photosynthesis; carbon fixation; photosynthetic biomanufacturing; cell factory; synthetic biology

资源与环境是人类社会存在与发展的基础性要素, 而建立在石化原料炼制基础上的传统经济发展模式正面临资源与环境的双重危机。石化原料的大量消耗和不可再生性动摇了经济发展的物质基础, 而化工炼制过程则对自然环境造成了严重污染, 社会的可持续发展迫切需要新的、变革性的经济发展模式^[1]。生物制造是指以微生物细胞工厂的人工设计和开发为基础, 以可再生资源为底物, 以环境友好型生物炼制过程为生产模式的技术体系, 其以绿色、经济、可持续的特点逐渐成为社会经济新发展模式的重要选择和全新动力^[2]。光合生物制造是一种全新的生物制造模式, 是指以光合自养生物为底盘, 通过合成生物学和代谢工程设计与改造, 利用光合固碳过程直接合成生物燃料和生物基化学品的相关技术和工程体系。与传统的生物炼制技术体系相比, 光合生物制造技术可以在单一平台上将太阳能和二氧化碳直接转化为生物能源或生物基化学品, 过程简单而产物明确, 能够同时起到固碳减排和清洁生产的效果, 对于缓解能源危机、减轻环境污染并促进社会可持续发展具有重要意义^[3-4]。

蓝细菌是最古老、最原始的光合微生物, 被普遍认为是最具潜力的光合生物制造微生物底盘之一。蓝细菌可以进行植物型光合放氧, 生长迅速, 而且作为原核微生物, 结构简单、遗传操作体系成熟而便捷; 随着合成生物学和代谢工程技术手段的发展, 已经可以在蓝细菌底盘藻株中实现外源/人工代谢途径的组装和调控, 实现对光合代谢网络的广泛修饰和深度重塑, 对光合碳流与能量流的人工重新定向^[3,5]。以此为基础, 在蓝细菌中已经实现了数十种天然和非天然代谢产物的定向光合合成^[6], 胞内碳流的40%~60%可以被导向目标产品的合成与分泌^[7-8], 展现了以蓝细菌为光合平台, 实

现生物能源产品和生物基化学品高效光驱固碳合成的巨大潜力。

然而, 现阶段蓝细菌光驱固碳生物制造技术还处于初级阶段, 亟需走向系统化、规模化、产业化推广和应用来助力社会经济可持续发展, 而实现这一愿景的重要前提和根本保证则是新型蓝细菌光驱固碳细胞工厂的开发, 以实现光能驱动下更高的物质能量转化效率、更强的光驱合成稳定性以及大规模应用。针对上述目标, 本文将从光能的捕集和利用、碳源的固定和转化、逆境胁迫的适应以及工程过程的适配这四个层面, 着重介绍应用合成生物学工具和策略, 人工设计和开发新型蓝细菌光合细胞工厂底盘藻株和工程藻株, 提升光合生物制造技术应用潜力的最新研究进展和发展方向。

1 光能的捕集和转化

光合作用是蓝细菌自养生长和代谢的基础, 光能是蓝细菌细胞工厂固碳、生长以及定向合成的直接驱动力。然而, 蓝细菌天然藻株的光合效率处于极低的水平, 对光能的利用效率远低于10%, 大量传递到蓝细菌光合系统的光能被无效耗散^[9], 造成这种低效的光能利用的原因有三个: (1) 蓝细菌对太阳光的捕集波段狭窄; (2) 蓝细菌对太阳光的捕集效率较低; (3) 蓝细菌对吸收光能的传递和利用效率较差。突破蓝细菌天然光合系统的机制性瓶颈, 提升底盘藻株和工程藻株对光能的捕集和利用效率是开发高效光驱固碳细胞工厂的重要方向。

1.1 拓宽光能捕集区间

绝大多数蓝细菌藻株只能吸收太阳能中可见光波段(400~700 nm)的能量进行光合作用, 对占据太阳光能量中很大比例的红外波段(> 700 nm)的利用极为罕见; 而可见光波段中, 蓝细菌光系统的主要

吸收峰在 660~700 nm 波段,对绿光波段(450~550 nm)的吸收同样较弱。拓宽蓝细菌的吸收光谱,使其在更广的波段范围内捕集、利用光能,可以直接为蓝细菌细胞工厂的光合固碳和生理代谢提供更大的动力。

早在 20 世纪 70 年代,在极端嗜盐古菌 *Halobacterium salinarum* 中就发现了一种称为视紫红质(rodopsin)的色素蛋白复合体,由视蛋白(opsin)和视黄醛(retinene)共价结合而成。此类视紫红质可以吸收光能,发挥质子泵的作用进行 ATP 合成,而其吸收波段完整覆盖绿光波段^[10]。荷兰阿姆斯特丹大学的 Chen 等^[11]在集胞藻 PCC6803 中成功实现了一种古菌类型的视紫红质蛋白(proteorhodopsin)的功能表达,该工程藻株中每个细胞内有大约 10^5 个视紫红质蛋白,平均分布在类囊体膜和细胞质膜上;视紫红质的存在可以在工程藻株中形成额外的跨膜质子动力势,提供更多的 ATP,然而该蛋白的表达却给细胞造成了很重的代谢负担,因此,要真正地促进工程藻株生长还有很多实际工作待完善。

而实现蓝细菌对红外波段的有效利用将是挑战性更强的任务。虽然计算生物学分析显示,放氧型光合作用可利用的最大波长在 780 nm^[12],然而很长一段时间里,自然界中罕有发现能够吸收利用红外波段能量进行光合作用的蓝细菌藻株。2010 年,悉尼大学的研究人员首次发现并鉴定了一种新型叶绿素——叶绿素 f^[13];2014 年,宾夕法尼亚大学的 Donald Bryant 团队首次证实,在一种海洋蓝细菌 *Leptolyngbya* sp. strain JSC-1 中,存在可以吸收远红光的基因,经过鉴定发现包含 21 个相关功能基因的基因簇,其中与红外波段吸收相关的色素正是叶绿素 f,进一步的比较基因组学分析发现,在至少 12 种蓝细菌中均可能存在与远红光吸收相关的同源基因簇^[14];2018 年,帝国理工大学的研究人员发现一种嗜热蓝细菌 *Chroococciopsis thermalis* 可以实现红外波段-可见光波段光能利用模式的切换:由于叶绿素 f 的存在,该藻可以在红外波段光照条件下,关闭叶绿素 a 系统,让叶绿素 f 发挥主导作用,利用能量密度更低的红外光进行光合作用^[15]。上述发现中,与红外波段利用相关的基因簇和功能组分复杂、庞大,而且主要存在于各种非模式藻株中,认识和改造非常困难;但其已经为未来实现蓝细菌底盘藻株和工程藻株对红外波段的有效捕集和利用打开了新的窗口,结合应用系统生物学、合成生物学的各种工具和手段,将此类系统移植到模式蓝细

菌中,补充甚至替代功能存在重叠的光系统 I 和 II,将是未来拓展蓝细菌可利用光谱,提升其光合固碳和生长效率的重要发展方向^[9,14]。

1.2 提高光能捕集效率

蓝细菌亿万年进化过程中,为了适应自然界中更为普遍的低光强环境,采用了最大限度堆积捕光天线以增加光能捕获总量的策略。天然藻株中捕光天线结构复杂、尺寸较大,往往填满类囊体膜的周边空间,虽然可以保证低光照强度下光能的最大捕集,却无法适应蓝细菌光合细胞工厂在高光照条件下的生物量快速积累和代谢产物快速合成的需要。为了提高蓝细菌在高光照培养下的光能捕集效率,简化、缩小捕光天线复合体成为一种可行的路线。

神户大学的 Joseph 等^[16]以集胞藻 PCC6803 为模式,通过敲除 *apcE* 基因(编码将藻胆体固定在类囊体膜上的锚定蛋白),降低了捕光天线密度,优化了高光条件下的捕光效率,将工程藻株的生长速度提高了 60%;加州大学伯克利分校的 Melis 团队发现,蓝细菌中藻蓝蛋白的含量和组成与其对不同光照条件的适应性密切相关,缺失了别藻蓝蛋白- α 和别藻蓝蛋白- β 的工程藻株在 625 nm 波段的特征吸收峰也会消失,而其在高光强下的生物量积累能力却会有大幅提高(>30%)^[17]。着眼于未来户外、规模化培养条件中潜在的环境节律性波动,应用合成生物学工具改造蓝细菌光能捕集系统,使其可以根据光照环境“智能”调节自身捕光色素的组成和结构,以优化不同条件下的光合效率,将是改善蓝细菌底盘藻株和工程藻株光能吸收综合效率的可行选择。

1.3 光能传递和利用效率的优化

蓝细菌在光合作用中经光系统 II 从水的光解中获得电子,在电子传递链中传递给光系统 I,进而驱动 NADP^+ 形成 NADPH。在电子传递过程中起主要作用的线性电子传递链产生 ATP 和 NADPH 的比率是 1.28:1;而卡尔文循环中 ATP 和 NADPH 利用的比率是 1.5:1,显然天然的光合作用中光反应和暗反应之间能量和还原力合成消耗比率不平衡;针对这一不平衡的缺陷,蓝细菌进化出了替代电子流(alternative electron flow, AEF)途径来进行更多的 ATP 供给,优化 ATP/NADPH 供应比率。

神户大学的 Akihiko Kondo 团队在集胞藻 PCC6803 中,过量表达 NADPH:氧-氧化还原酶(NADPH: oxygen oxidoreductase)编码基因 *fbv3*,来强化 NADPH:黄素氧化还原酶模块的丰度,加强工程藻株中的 AEF 途径,强化电子传递效率,利用氧气的光还原

力促进 NADP⁺ 的再生和光合放氧, 增加胞内 ATP 供应, 成功提高了光合放氧速率、胞内 ATP 含量以及卡尔文循环周转速, 工程藻株生物量积累和生长速率均得到有效提升^[18]。

1.4 小结和展望

光能的捕集和利用是蓝细菌光合代谢和生理网络运行的动力基础。现阶段通过拓宽光能捕集波段、提高光能捕集效率、优化光能传递和利用效率等策略来提高光能捕集和利用整体效率的尝试已经取得成功, 证明通过合成生物学策略和技术优化蓝细菌天然光合系统, 进而提高光驱固碳生长和生物合成的整体效能是充分可行的。在未来, 为了真正突破提升微生物天然光合系统效率的机制性瓶颈, 实现微生物光合系统的人工设计和重构, 还需要重点通过对光能的捕捉传递、光合与光呼吸耦合、光反应-暗反应适配等关键机制和过程的解析, 促进光合元件的模块化设计、重构、组装、调控及适配, 探索减少电子传递能量损失, 从而最大限度提升蓝细菌光合细胞工厂对太阳能的利用效率。

2 碳源的固定和转化

利用捕集的太阳能进行二氧化碳 (CO₂) 的固定和转化是蓝细菌进行一切光合生理代谢的起点。光合作用分为光反应和暗反应这两个明显分开又有机结合的阶段。光反应中利用太阳能完成水的光解, 形成 ATP 和 NADPH; 暗反应中利用光反应提供的化学能和还原力, 通过卡尔文循环固定 CO₂ 并将输出的有机碳用于细胞生长代谢, 超出正常生长所需的有机碳通过糖原和 PHB 合成等天然碳汇机制储存起来, 以满足黑暗和胁迫条件下的能量和物质需求。蓝细菌光驱固碳细胞工厂开发的核心就是通过对天然代谢网络的深度修饰和导入非天然/人工代谢途径, 实现光合碳流网络的延伸和扩展, 将卡尔文循环中固定的碳流更多地导向目标产品的合成。提升蓝细菌底盘藻株和工程藻株中对碳源的固定和转化效率, 是对捕集的太阳能充分利用的保证, 也是提升光驱固碳细胞工厂效能的关键。而着眼于无机碳吸收、浓缩、固定、定向输出的全过程, 提高碳源的固定和转化能力的策略主要包括以下几种: (1) 强化碳源的吸收和浓缩; (2) 提高无机碳的固定效率; (3) 开发新的无机碳固定途径; (4) 降低无机碳的损失; (5) 拓展碳源利用范围。

2.1 无机碳吸收和浓缩效率的优化

自然环境中, 蓝细菌进行光合自养所面临的环

境中 CO₂ 浓度极低 (0.04%), 为了提升固碳效率, 蓝细菌进化出了高效的无机碳运输和浓缩机制 (CO₂ concentrating mechanism), 可吸收环境中 CO₂ 和碳酸氢根并浓缩在羧酶体中, 来激发以 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶为代表的固碳酶、固碳途径的效能。无机碳的高效运输和浓缩从源头上影响着对于光驱碳源固定和转化的效率。在蓝细菌中已经鉴定到了 5 种类型的无机碳吸收/浓缩元件, 其中 3 种用于碳酸氢根的吸收 (BicA、SbtA、BCT1), 2 种 (NDH-I3、NDH-I4) 用于 CO₂ 的吸收^[19]。Kamennya 等^[20]进行了通过强化无机碳源吸收捕集速率来提高光合固碳整体效率的探索, 首先在 PCC6803 中增加了一个碳酸氢根转运蛋白基因 (*bicA*) 的拷贝, 采用“铵缺乏”条件诱导型启动子控制新增 BicA 拷贝的表达。进入诱导表达状态时, *bicA* 过表达藻株在空气环境下表现出高于对照 1 倍的生长速度; 然而在高浓度 CO₂ 供应条件下, 工程藻株的生长速度弱于野生型藻株, 但最终积累的饱和细胞浓度仍有显著提升 (20%)。为了解除高浓度 CO₂ 环境对 BicA 蛋白潜在的别构调控 (抑制) 效应, 研究人员向新增的 BicA 拷贝中引入了单点突变 (T485G), 工程藻株的碳酸氢根转运速率可以在 BicA 野生型过表达藻株的基础上提高 1 倍, 光合放氧速率也进一步提升。工业大规模蓝细菌培养过程中, 使用 CO₂ 浓度极高的烟道气等进行碳源补充是一种重要的选择, 该研究表明基于此可通过 CO₂ 捕集、浓缩机制的强化和优化来进一步提升光合固碳整体效率。

2.2 碳源固定效率的强化

二氧化碳经过吸收并在羧酶体中浓缩, 而后通过卡尔文循环进行固定, 强化卡尔文循环中的关键节点酶和限速酶的表达丰度和活性, 也是提高光合固碳整体效率的重要策略。高等植物中已经鉴定了一系列对卡尔文循环固碳效率影响较大的关键节点蛋白, 包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)、景天庚酮糖 1,7-二磷酸酶 (sedoheptulose 1,7-bisphosphatase, SBPase)、果糖二磷酸醛缩酶 (fructose-bisphosphate aldolase, FBA) 以及转酮醇酶 (transketolase, TK) 等。针对蓝细菌固碳效率的提高, UCLA 的 James Liao 团队通过在聚球藻 PCC7942 光合合成异丁醛的工程藻株中过量表达异源 RuBisCO (来自 *S. elongatus* PCC6301), 有效提高了固碳效率和异丁醛产量。瑞典乌普萨拉大学的 Lindblad 团队在集胞藻 PCC6803 中针对卡尔文循环关键节点进

行了更系统的研究,对 RuBisCO、SBPase、FBA 以及 TK 等 4 个酶进行了过量表达并分析了其对光合固碳和细胞生长的影响,结果发现在中等光照强度 ($100 \mu\text{mol/L photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 下, RuBisCO、SBPase 以及 FBA 的过量表达有效提升了聚球藻的光合放氧速率、细胞生长速度以及生物量积累速率,虽然转酮醇酶的过量表达能够促进生物量的积累 (42%),但会造成细胞的漂白现象,该研究证实, RuBisCO、SBPase、FBA 以及 TK 等卡尔文循环关键节点蛋白的过量表达可以提升藻株整体固碳效率,从源头上优化蓝细菌光合生长和生物量积累的能力^[21]。在后续工作中,该团队的研究人员在强化了上述基因表达的底盘细胞中引入乙醇合成途径,有效提高了工程藻株乙醇产量 (最高提升 69%) 和总固碳量^[22]。De Porcellinis 等^[23]发现在聚球藻 PCC7002 中过量表达 SBPase 可以有效促进工程藻株的光合放氧和生长速率,而且,该酶的过量表达会引发卡尔文循环中各种组分 (包括 RuBisCO 和 FBA 等) 的上调表达,同时抑制糖酵解和戊糖磷酸循环中酶的丰度。由于该酶表达造成的全局性效应, PCC7002 中碳水化合物代谢模式和碳流分配机制发生了显著的重构,光合固碳速率和非储备性碳水化合物合成效率均有提高,这无疑对于光合生物制造平台而言具有重要意义。

2.3 天然固碳网络的扩展

在卡尔文循环之外,引入或激活新的固碳途径,增加固碳系统的冗余度和鲁棒性也是提高蓝细菌底盘细胞固碳效能的可行选择。蓝细菌中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 可以催化三碳的磷酸烯醇式丙酮酸向四碳的草酰乙酸转化,过程中固定一个 CO_2 分子。Durall 等^[24]在集胞藻 PCC6803 中过量表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶,发现重组藻株在低光照强度下的生长速率和固碳速率均提高,而高光照条件下效果并不明显,其原因可能是在极低的光照强度下, RuBisCO 等固碳元件的活性受到抑制,无法充分发挥效能,此时 PEPC 发挥补充功能,促进细胞生物量的积累。江南大学和中科院微生物所的研究人员近期的研究发现,通过将 PEPC 与苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH) 共同表达,可以更加有效地增加 PEPC 途径对固碳效能的强化效果,重组藻株的 ATP 供应显著增加,碳源固定和苹果酸合成能力也得到加强^[25]。

近年来,通过新酶设计、遗传资源深度挖掘,合成、组装新的 CO_2 固定途径已经取得众多进

展^[26-30]。在未来针对蓝细菌独特的光合代谢和生理背景,选择、移植适配程度高的新固碳途径,将极大地扩展蓝细菌底盘藻株和工程藻株的固碳空间和能力,为提高光合固碳效率提供新的助力。

2.4 碳损失的降低

卡尔文循环中固定下来的有机碳流用于细胞代谢过程中,还会面临重新损失的问题。例如,光合作用中卡尔文循环的重要节点三碳代谢物甘油醛-3-磷酸,进入中心代谢向重要节点化合物乙酰-CoA 转化过程中,难以避免地会丢掉一个碳,也就意味着光合固碳的最大生物经济性受到了损失。加州大学洛杉矶分校的 James Liao 团队此前在大肠杆菌中已经设计了非氧化酵解途径 (NOG) 用于将一分子葡萄糖分解成为 3 分子的乙酰-CoA,避免了经典的模式酵解途径中两个碳的损失,实现了碳的最大理论转化率^[31]。将此种理念用于蓝细菌的改造时,研究人员设计了“苹果酰 CoA-甘油酸 (malylyl-CoA-glycerate, MCG) 途径”用于聚球藻 PCC7942 代谢网络的改造;基于 MCG 途径,一分子的三碳底物 (磷酸烯醇式丙酮酸) 可以净吸收一分子的 CO_2 , 将乙醛酸转化为两分子的乙酰-CoA,该过程避免了碳损失。在聚球藻 PCC7942 中采用该策略,有效提高了胞内 CoA 的含量,证明该策略在提高光合生物固碳效率方面有效可行^[32]。

2.5 碳源利用范围的扩展

基于光合作用的生物制造过程只能发生在光照条件下,而户外规模化培养环境下,蓝细菌的生长和固碳合成将不可避免地受到昼夜节律的影响,而这种昼夜节律适配的模式难以满足生物制造技术稳定、连续的要求。因此,突破光合固碳对光照的依赖,实现连续、稳定的蓝细菌固碳生长和代谢,一种重要的选择是引入有机碳源利用机制,使蓝细菌底盘藻株和工程藻株实现兼容光合自养和化能异养的二维代谢模式。

加州大学戴维斯分校的 Shota Atsumi 团队系统研究了蓝细菌对有机糖原料的利用。通过向聚球藻 PCC7942 中导入特异性的转运蛋白和关键代谢机制,实现了 PCC7942 对葡萄糖、木糖以及蔗糖的利用,在昼夜交替环境下,显著提升了蓝细菌工程藻株生物量积累的速度和连续性^[33]。以木糖代谢能力的改造为例,通过导入大肠杆菌来源的 XylE 转运蛋白基因,使 PCC7942 获得了吸收转运木糖的能力,而进一步导入木糖代谢的两个关键基因 *xyIA* 和 *xyIB*,使工程藻株获得了利用木糖生长的能力,

使其在光照条件下的生长显著加快。具有糖类代谢能力的工程藻株在进行化学品光驱固碳合成的能力上也具有优势。向具备葡萄糖利用能力的重组藻株中导入 2,3- 丁二醇合成途径后, 重组工程藻在昼夜交替 (12:12 h) 条件下实现了丁二醇的连续合成, 相比不能进行葡萄糖利用的藻株, 丁二醇产量提高 2~3 倍, 而且丁二醇总量中的 60% 由葡萄糖提供^[34]。在后续研究中, 该团队又通过对蓝细菌代谢背景的系统修饰, 特别是针对酵解途径和卡尔文循环的改造, 实现了蓝细菌对 CO₂ 和葡萄糖的同步、高效利用。其主要策略是将吸收的葡萄糖导向氧化性戊糖磷酸途径以加强 5- 磷酸核酮糖 (作为 CO₂ 固定的前体物质) 的供应, 同时敲除卡尔文循环的抑制性调控因子 CP12 以解除 5- 磷酸核酮糖向 1,5- 二磷酸核酮糖转化的限制, 从而使工程藻株在吸收利用葡萄糖的同时大幅提升了光合固碳效率, 即在工程藻株中有机碳源的利用促进了无机碳的固定^[35]。除糖类以外, 改造蓝细菌工程藻株吸收利用大宗化学品甘油的研究也取得成功, 通过导入甘油转运蛋白、甘油激酶、3- 磷酸甘油脱氢酶以及一个解毒基因, 成功实现了 PCC7942 对甘油的利用^[36]。

2.6 小结和展望

碳源的固定和利用能力是控制光合细胞工厂合成效能的关键节点, 提高碳源输入速率将成为目标代谢产物合成的有效驱动力^[37]。上述研究已经表明, 从强化碳源吸收固定、降低碳源代谢损失、扩展碳源利用范围和途径这几个角度可以强化蓝细菌底盘藻株光合生长、固碳和合成效能。在未来, 针对碳源向目标代谢产物的高效定向输出, 其工程核心在于对胞内物质流和能量流更加有效的控制, 而实现这一点需要对以产品合成为导向的人工碳汇模块与固碳底盘的天然碳汇模块之间的适配关系进行更深入、全面的解析和诠释^[38-39]。在此基础上, 通过目标产品的高效合成为藻株的光驱固碳提供更强的驱动力, 通过碳素和能量的有效输出来驱动光合固碳效率的提高。

3 逆境胁迫的适应

未来的光合生物制造技术在实际应用中必需走向户外、走向开放式环境, 在工业级生产工艺和条件下, 面临远比实验室环境严苛的物理、化学、生物类型的威胁。面临严苛的环境和工艺, 蓝细菌细胞工厂生理和代谢的稳定性就成为光合生物制造技术成功规模化应用的关键。因此, 突破逆境胁迫对

蓝细菌光合固碳为基础的生理和代谢功能的抑制, 优化光合底盘藻株在逆境胁迫下的工作稳定性, 开发能够适应规模化应用需求的抗逆型蓝细菌底盘藻株和工程藻株, 将是未来蓝细菌代谢工程和合成生物学研究的重要方向。

3.1 逆境胁迫类型和基本改造策略

基于经济和环境上的整体考虑, 未来的光合生物制造技术的规模化应用需要走向户外, 走向开放式环境, 而要在规模化条件下实现稳定、高效的蓝细菌光驱固碳合成过程, 要面临的主要逆境胁迫来自以下几方面。(1) 户外真实环境下, 光照强度和温度呈周期性节律变化, 而其峰值远远超过蓝细菌培养的适宜温度; 而且户外环境中温度和光照的动态变化具备高度的重合性, 自然光照最强时往往也是环境温度的峰值阶段, 集中的高温高光胁迫会对蓝细菌造成严重的生理损伤, 进而影响藻株生物量和目标产物的合成积累; 而夜间黑暗、低温的环境无疑也非常不适宜蓝细菌生理和代谢活性的稳定保持。(2) 考虑到经济和环境成本, 在未来大规模培养工艺中, 可能需要以海水和工业废水而不是纯净的淡水配置培养体系, 而其中高浓度的盐、重金属、强氧化/还原剂以及其他潜在的毒性因子会严重影响蓝细菌的正常生长, 也会对目标产物的有效光合合成造成显著的扰动^[40-43]。(3) 规模化培养中使用的大体积海水或工业废水很难进行彻底的灭菌处理, 而开放式条件又为环境中其他各种污染生物的入侵创造了良好的条件, 为了抑制生物污染, 极端 pH (酸、碱) 或高浓度盐等严苛条件常常被用于蓝细菌培养以抑制生物污染^[44-46], 然而, 此类条件在抑制杂菌的同时也会对蓝细菌的生长和代谢造成负担和抑制。(4) 在追求定向的高效光驱固碳合成的过程中, 各种天然或非天然代谢产物和中间物容易在蓝细菌胞内或胞外形成高浓度积累, 进而对藻株的生长和代谢形成反馈式的抑制, 从而降低了光驱固碳合成过程的整体效率。

针对规模化培养环境中的各种潜在的逆境抑制因素, 一方面需要系统地进行培养策略、培养工艺、培养装备的针对性预研, 通过技术和工艺的优化设计, 充分发挥蓝细菌细胞工厂的潜能^[45,47]; 另一方面, 也需要提升蓝藻底盘藻株和工程藻株的鲁棒性, 保证胁迫条件下光合细胞工厂生物量和目标产品稳定、高效的生产和积累。因此, 提升蓝细菌底盘藻株和工程藻株的生理功能鲁棒性和適切性将有效推动光合生物制造技术在户外开放式环境下的稳定

运行, 筛选天然鲁棒性强、稳定性好的蓝细菌底盘藻株是一个潜在选项。然而, 此类藻株往往缺乏清晰的遗传背景和成熟的遗传操作体系, 而且, 现阶段蓝细菌代谢工程和合成生物学领域的突破都是在集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803、聚球藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 以及聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 这几种模式藻株中取得的, 其遗传操作的简便性、遗传和生理背景的清晰认识都是成功开发光驱固碳细胞工厂的重要保证^[48]。鉴于此, 采用合成生物学和代谢工程策略、手段, 对模式藻株的生理和代谢鲁棒性进行优化和提升仍然是开发抗逆型光驱固碳细胞工厂的重要策略, 相关的设计和开发原则需要系统的进一步探索。整体上, 现阶段藻株抗逆性能的合成生物学改造策略分为两种: (1) 异源抗逆元件的引入; (2) 内源抗逆机制的强化。下面将针对这两种策略分别进行介绍。

3.2 应用异源抗逆元件提高蓝细菌底盘藻株抗逆性能

嗜极端 / 耐极端微生物是指能够在严苛 - 极端的环境条件下生存和生长的微生物种类, 长期的自然进化过程赋予了其在严苛环境中生存和生长需要的抗逆元件和机制, 应用此类抗逆相关元件和机制来改善模式微生物底盘细胞的生理鲁棒性已经被证实具有很好的效果^[49-51]。蓝细菌广泛地分布在各种不同类型的生态环境中, 其种质资源的多样性为探索、挖掘各种抗逆性元件, 以靶向性改造、优化蓝细菌模式藻株提供了良好的基础。应用上述策略改造蓝细菌淡水藻株的高盐耐受性取得了显著的效果。*Aphanothece halophytica* 是一种耐盐能力很强的蓝细菌藻株, 能够适应在 3 mol/L 浓度 NaCl 的高渗环境下生长^[52], 在该藻株中已经鉴定到了一系列与盐耐受性相关, 在高盐环境下活跃表达的元件^[53-54]。其中, 将盐离子从胞内泵出胞外以减轻胞内压力的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白由 *nhaP* 基因编码, Waditee 等^[55] 在只能在淡水中生长的聚球藻 PCC7942 中过量表达该基因, 获得了可以耐受 0.5 mol/L 浓度 NaCl 胁迫的工程藻, 在重组藻株中进一步表达来自大肠杆菌的过氧化氢酶基因 *katE* 时, 还可以优化藻株在海水中生长的能力。甘氨酸甜菜碱的合成和积累是 *Aphanothece halophytica* 藻株中另一种重要的抵抗胞外高渗胁迫的耐盐机制。与之相比, 淡水藻聚球藻 PCC7942 和鱼腥藻 PCC7120 则会在胞内合成并积累蔗糖或海藻糖来作为渗透压保护剂。向鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120 中导入甜菜碱合成途径后可以显著提升工程藻株的耐盐能力^[56-57]。此外, 来自

Aphanothece halophytica 藻株的丝氨酸羟甲基转移酶 (Serine hydroxymethyltransferase, SHMT) 编码基因也被发现是改善淡水藻耐盐能力的有效靶点。SHMT 蛋白是光合放氧微生物光呼吸途径的重要组成部分, 催化丝氨酸向甘氨酸的转化, 并为细胞代谢提供活化的一碳单位, 是核酸、蛋白质以及众多生物活性物质合成所必需的。将 *Aphanothece halophytica* 的 SHMT 编码基因在聚球藻 PCC7942 中过量表达, 工程藻株在常规条件下的生理表型不会受到显著影响, 而在 0.3 mol/L 浓度 NaCl 盐胁迫条件下的生长则提升了 1 倍^[58]。系统生物学和代谢网络模拟工具的发展促进了对于极端环境条件下功能元件和途径的准确预测, 此类元件和机制导入模式藻株, 可以升级模式藻株中原有元件和机制, 也可以提高细胞生理耐受机制的功能冗余度, 从而有效拓宽蓝细菌底盘藻株和工程藻株面临环境波动时的生理适应空间^[59]。

3.3 强化蓝细菌内源性抗逆机制以提高底盘藻株的抗逆能力

面临环境波动时, 微生物细胞中各种生理保护机制会被激发, 而调控网络也会发生结构性变化以保持细胞内稳态和细胞生存能力。针对此类内源性抗逆途径和机制的表达时序与强度进行优化和加强, 也是改善微生物细胞生理功能鲁棒性和适切性的重要策略。蓝细菌中具有全局性生理和代谢影响的热激蛋白系统和转录调控系统, 已经被证实是强化底盘藻株和工程藻株抗逆能力的有效靶点。

热激蛋白是细菌热响应系统最重要的组成部分。在多种环境胁迫下, 以 GroESL 系统为代表的热激蛋白都会上调表达, 以减弱变性蛋白的凝集并促进大量新生蛋白质的功能折叠^[60-61]。热激蛋白的过量表达已经在多种不同类型微生物的多维环境耐受性改造中发挥作用^[50,62-63]。在鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120 中, 通过过量表达 GroESL 提高了重组藻株在高温和高盐环境下的生长能力^[64]; 在集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 中, 过量表达一种热激蛋白基因 *clpB1* 使重组藻株面对热胁迫的存活率提高了近 20 倍, 而把 *clpB1* 与另一种重要的热激蛋白基因 *dnaK2* 同时过量表达, 藻株的热耐受性还能进一步提高^[65]; 在聚球藻 PCC7942 中, 为了优化藻株在户外环境下的生长能力, 研究人员过量表达了编码一种重要小热激蛋白的 *hspA* 基因, 获得的工程藻株对高温、高光、高盐的耐受能力都有了显著提高, 而且可以在户外密闭式反应器的海水培养基中连续生长^[66]。

针对细胞代谢网络的层级控制系统进行扰动和改造, 可以实现全局层面上的遗传信息传递和调控网络的重定向, 进而引发细胞鲁棒性和适切性向着环境胁迫进行适应性调整。转录因子是调控细胞代谢网络层级控制模式的主要靶点, 在蓝细菌中通过引入异源的或者人工合成的转录因子^[67-68], 或者对内源性全局转录因子进行扰动^[69-70]来改造、优化底盘藻株和工程藻株的抗逆性能已有成功例子。在集胞藻 PCC6803 中, 一种重要的 sigma 因子的编码基因 *sigB* 被发现与藻株的温度和光照的耐受性有显著关系, 该基因调控着胞内多种压力应激元件和途径的表达 (热激蛋白、相容性物质合成等)^[71]。*sigB* 的缺失降低了藻株对低温、高光、高盐的耐受性^[71], 而 *sigB* 的过量表达则会提升藻株对高温、丁醇的耐受性^[72]。在鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120 中, 过量表达 DNA 结合蛋白编码基因 *all3940* 赋予了工程藻株对重金属、紫外、盐、高温等多种环境胁迫的耐受性, 而其机制可能与藻株蛋白质组的显著变化有直接关系^[73]。

目前, 针对蓝细菌底盘藻株内源性抗逆系统的改造主要还是表达时序和强度的调控。在未来, 针对关键的靶点元件本身的结构和功能进行定向筛选和理性设计, 将进一步提升抗逆表型优化的空间, 使光驱固碳细胞工厂更好地适应规模化条件下的需求。

3.4 小结和展望

严苛的工业过程和环境条件是实现蓝细菌光合生物制造技术规模化、稳定化应用的严重挑战。要在户外大规模条件实现高效、稳定的蓝细菌光驱固碳过程, 需多维度和多视角地改造模式蓝细菌藻株, 使其适应多样性逆境条件。系统生物学和反向遗传学技术的应用促使了大量内源-异源抗逆元件、途径和机制的鉴定, 这为深度重塑蓝细菌底盘藻株和工程藻株的生理鲁棒性和抗逆能力提供了丰富的素材。而未来在抗逆元件的深入挖掘和广泛应用之外, 另一个重点发展方向将是鉴定、优化, 甚至人工设计应对环境胁迫的响应性“智能”调控元件, 以在光合细胞工厂中实现动态、柔性的抗逆调控模式, 将胞内有限的物质流和能量流在代谢产物合成和逆境胁迫适应中实现最合理的分配, 保证复杂环境下光驱固碳合成的效率最大化。

4 工程过程的适配

尽管现阶段光驱固碳细胞工厂的产物合成效能

已经得到极大的提高, 光合生物制造技术的规模化应用却仍然受到严重限制, 除了工程藻株规模化培养时在复杂、严苛环境下生长和生产的稳定性受到挑战之外, 另一个重要瓶颈在于现有的生物质和产品采收技术对水、电、设备的需求和耗费较大, 严重降低了全技术链条的经济与环境效费比。在规模化培养过程中, 为了从培养体系中采收藻细胞生物质, 需要通过离心、过滤等手段进行浓缩、脱水, 因为蓝细菌细胞体积较小, 过滤难度很大, 而其细胞实际密度又与水的密度接近, 因此离心和过滤的效率都较低而耗费却很高, 其采收成本可占到整个规模化培养过程全成本的 60% 以上。为了降低采收难度, 可以通过向培养体系中加入高浓度的金属离子或聚合物来改变细胞表面特性, 诱导细胞聚集、絮凝, 然而此类环境诱导絮凝手段在增加操作需求的同时, 也增加了后续生物质处理、纯化的复杂程度, 并具有潜在的环境污染问题。此外, 对于油脂、糖原等难以进行胞外分泌的产物, 在回收蓝细菌生物质后, 通常还需要对藻体进行破碎, 而无论是机械破碎, 还是化学裂解, 都会进一步增加经济和环境成本, 降低光合生物制造技术的经济竞争力。着眼于光合生物制造技术规模化应用的经济竞争力, 采用合成生物学手段优化蓝细菌细胞工厂的采收、提取特性, 将对提升相关技术全链条的经济效益具有极大的意义。

4.1 优化蓝细菌底盘藻株的采收性能

自絮凝是一种简单且经济的生物质采收方法, 它不依赖于化学诱导剂的添加, 既节约成本又绿色环保^[74]。自然界中已经鉴定到多种具有自絮凝特性的微藻藻株, 其细胞可以合成多糖或糖蛋白作为絮凝剂, 使相邻细胞黏连或改变其表面电荷的相互作用, 从而实现自絮凝^[75-76]。但是, 蓝细菌在生长过程中持续合成的表面促絮凝物质会大量消耗细胞用于生长的能量和营养物质, 或者由于自絮凝而产生光遮蔽现象影响其生长, 所以对蓝细菌自絮凝的阶段和时间的有效控制非常重要。此前, 研究人员已经证实酵母中使用乙醇诱导型启动子调控絮凝元件的表达, 可以成功实现对酵母细胞自絮凝过程的人工控制^[77]。针对蓝细菌规模化培养和采收的需求, 借鉴上述策略, 通过功能基因组学、合成生物学和代谢工程技术方法, 实现对天然或人工絮凝机制的精准调控将是提高蓝细菌底盘细胞采收效能的重要方向。

微生物细胞的物理形态 (大小和形状) 对生物

质的采收性能具有重要影响, 具有较大尺寸和体积的细胞可以显著简化、易化过滤和沉降的工序。在大肠杆菌中, 针对细胞形态的改造策略已经成功地提高了 PHB 合成细胞工厂的应用潜力^[78-80]。以大肠杆菌为代表的短杆状细菌中, 一种名为 FtsZ 的细胞骨架蛋白, 在细胞分裂和细胞形态发育过程中发挥着重要作用^[81]。作为一种类微管蛋白, FtsZ 在细胞中会定向聚集组装, 形成 Z 环结构进而引导细胞形态发育, 而其功能组装过程又受到其他多种蛋白的介导和调控。Jordan 等^[82] 针对聚球藻 PCC7942 中对 FtsZ 有重要调控作用的 Min 系统进行改造, 使用茶碱调控的核糖开关系统调节了 Min 系统 4 种不同组分 (MinC、MinD、MinE、Cdv3) 的表达丰度, 结果发现 MinC 和 Cdv3 的丰度变化可以用于有效调节聚球藻 PCC7942 细胞形态。当 MinC 和 Cdv3 的表达得到加强时, 胞内 Z 环形成受干扰, 细胞正常分裂受到抑制, 单细胞的长度可以被延长至微米级别, 这种加长细胞在正常的重力环境下表现出更好的沉降趋势和能力, 而此种性状对细胞的采收是非常有利的。此外, 这种加长细胞在机械处理环境下, 更容易破碎, 可以简化对下游工序的要求, 降低胞内代谢产物回收的成本。另一种潜在的细胞形态改造靶点是 MreB 蛋白, 该蛋白是一种细菌类肌动蛋白, 参与了一种重要的肽聚糖合成和组装过程, 而这种肽聚糖对细胞的加长具有重要影响^[83-84]。在鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120 中, Hu 等^[85] 通过 *mreB* 基因的失活, 获得了长度增加一倍的丝状蓝藻细胞, 而这种改变并不影响藻株的正常生长。在另一种丝状蓝藻 *Fremyella diplosiphon* 中, 调控 *mreB* 基因表达的转录因子 BolA 蛋白的丰度, 也被报道对藻株的形态发育具有重要影响, *bolA* 基因过量表达的藻株中出现了长度增加 5 倍的藻丝^[86]。

细胞形态之外, 细胞表面特性对于蓝细菌生物质的采收性能也有重要意义。规模化培养的微藻生物质的采收普遍采用絮凝的策略, 通过各种化学物质 (碱性物质、金属盐、聚电解质等) 的加入来改变细胞表面电荷状况, 引发细胞凝聚。这种诱发型细胞凝聚受到多种因子的影响, 包括细胞大小、形状、表面电荷特性以及胞外聚合物性质等^[87]。通过改造、修饰细胞表面形态特性来降低其对化学诱导剂的依赖是降低絮凝过程成本, 提高规模化培养收益的潜在策略。Fedeson 和 Ducat^[88] 通过对聚球藻 PCC7942 细胞表面形态进行深入解析和改造, 获得了该藻株的优质表面展示效果, 进而以细胞表面的

SomA 蛋白为靶点进行了 α -FLAG- 标签的展示; α -FLAG- 标签对 A 蛋白具有亲和性, 将表面覆盖有 A 蛋白的磁珠加入培养体系就可以将工程藻细胞吸附至磁珠上, 然后将培养体系置于特定磁场内就能通过磁珠的吸附完成蓝藻细胞的可控定向聚集。该策略现阶段距离实用性还有很远的路要走, 但其无疑提供了一种潜在的提高蓝细菌底盘细胞采收效能的方向。

4.2 开发蓝细菌细胞可控裂解技术

对于无法进行胞外分泌的蓝细菌光合生物产品, 在细胞生物质采收后, 为了对胞内目标产物进行精炼和浓缩, 通常还需要对细胞进行破碎处理, 以释放内容物。这种提取过程需要繁琐、昂贵的下游提取工艺, 通过物理、化学的手段促进内容物的释放^[89-91], 这些处理极大地增加了整个过程的成本, 降低了全链条的环境友好性。因此, 开发经济、高效的细胞破碎技术将有利于提高光合生物制造技术经济和环保上的竞争力。

Liu 等^[92-94] 以合成脂肪酸的蓝细菌工程藻株为模式, 开发了一系列新颖的蓝细菌可控裂解技术, 基于环境响应型细胞裂解系统的应用, 实现了简单可控的细胞破碎和产物提取过程。为了取代传统的机械-化学破碎方法, 研究人员首先将来自噬菌体的穿孔素-内溶素 (holin-endolysin) 裂解系统导入集胞藻 PCC6803 中, 用镍离子诱导型启动子控制; 当诱导穿孔素和内溶素表达时, 细胞胞外被膜的肽聚糖层就会被靶向性地降解, 最终导致整个细胞的裂解; 经过 24 h 镍诱导裂解后, 通过显微观察可以发现工程蓝细菌藻株被成功裂解, 大量细胞内容物被释放, 证实该策略成功实现了温和、可控的蓝细菌细胞裂解^[92]。为了减少对环境不利的镍离子的使用, 研究人员以 CO₂ 缺乏条件感知系统控制微生物酯酶的表达, 进一步开发了更加智能、环保的细胞可控裂解绿色回收系统 (Green-recovery)。基于该系统, 当反应器中补气终止, CO₂ 供应不足时酯酶就会被诱导表达, 将游离脂肪酸从膜甘油二酯层上裂解并释放, 同时破坏细胞膜, 引发细胞裂解^[93]。该系统存在的主要问题是, 酯酶的表达和工作需要藻细胞的光合作用提供能量, 因此裂解过程需要在光照条件下进行, 以防止光遮蔽现象不能对藻细胞进行浓缩。为了克服这一问题, 研究人员又开发了一套不依赖于光照的“热回收” (Thermo-recovery) 系统, 使用热稳定型酯酶, 在蓝细菌细胞生物质进行回收前就预先进行表达, 再在细胞浓缩后进行热处理诱导酯酶工作, 裂解细胞并释放脂肪酸^[94]。

4.3 小结和展望

长期以来, 蓝细菌光合细胞工厂的开发视角和开发策略集中在藻株自身生长、代谢和抗逆性能的优化上, 针对整个光合生物制造技术链条全过程效益的考虑则较为不足, 而下游的生物质和产物采收提取过程恰恰是整个光合生物制造技术链条中主要的成本来源。要从经济角度上彻底突破光合生物制造技术大规模推广的瓶颈, 除了过程工程、装备工程层面的系统升级, 也需要从藻株本身能入手, 应用系统生物学、代谢工程和合成生物学策略与手段, 解析光合微生物采收特性相关的代谢、结构和功能机制, 实现光合微生物细胞聚集、絮凝和定向吸附功能的人工设计和定向应用, 开发与培养过程和工程技术适配的智能、环保、经济的产物分泌和提取技术, 从而全面推动光驱固碳生物制造技术体系的规模化应用和产业化推广。

5 总结和展望

蓝细菌在自然界中数量众多、分布广泛, 存在于陆地、淡水和海洋等各种生命环境中^[95]。作为重要的光合自养原核微生物, 蓝细菌可以进行植物型放氧光合作用, 能够利用太阳能将二氧化碳和水高效地转化为各类碳水化合物, 是地球碳-氧循环的重要参与者^[96]。全球范围内, 蓝细菌利用太阳能的效率高达 400~500 太瓦 (1 太瓦 = 1×10^{12} 瓦), 以此为动力完成了占全球总量 20%~30% 的有机碳固定, 为地球生命过程提供了至关重要的初级生产力^[95]。与大肠杆菌和酿酒酵母等经典的异养微生物底盘细胞相比, 蓝细菌底盘细胞在遗传操作工具的丰富性和有效性上还有很大的欠缺, 还无法实现从单基因到全途径的准确调控、从单碱基到全基因组的精细操作, 这些技术上的障碍限制了对蓝细菌光合生理代谢机制的合成生物学认识理解, 也限制了高效光驱固碳生物制造技术的进一步发展应用。近年来, 蓝细菌遗传操作工具和平台的发展应用也逐渐得到了重视, 通过深度转录组发掘结合人工设计改造已经鉴定、开发了一系列不同类型的启动子, 可以实现靶标基因表达的强力提高或时序控制^[97-98]; 通过以 CRISPR 系统和小 RNA 技术等新兴工具的引入、应用和优化, 可以实现对靶标序列的精准识别、多靶点同时调控以及大片段 DNA 的有效操作^[99-100]。相关内容近期有综述论文进行了详细介绍^[101], 本文不做详细展开。在未来, 蓝细菌合成生物技术平台和工具的系统完善和升级, 将进一步支持、推动

各种高效能光驱固碳细胞工厂的开发, 驱动单细胞层面上对蓝细菌胞内能量流和碳流的精准定向控制, 将光驱固碳网络按照人工设计进行扩展和延伸, 最终实现各种生物燃料产品和生物基化学品的合成。而光合生物制造技术的发展和推广, 则是要在更广大的时空尺度上实现这种人工设计的光驱固碳定向合成过程。着眼于规模化、系统化、产业化发展目标, 作为光驱固碳生物制造技术核心的光合细胞工厂, 需要在复杂的环境和过程中稳定地实现物质能量的高效输入和定向输出。一方面, 这需要通过过程工程、装备工程的系统开发为充分发挥光合细胞工厂效能创造适宜的环境和过程; 另一方面, 根据规模化培养环境和过程工艺的需要, 针对性地对蓝细菌光合底盘藻株和工程藻株进行定制设计和深度重塑, 使藻株生理和代谢特性向着工程过程的需要发生定向转变, 实现种质优化升级与工程工艺创新的相互融合、相互促进, 从而最大程度上释放光驱固碳合成的内在潜力。在未来, 合成生物学、系统生物学、先进代谢工程技术以及人工智能技术的交叉应用, 必将突破微生物光合生理代谢的机制性瓶颈, 实现蓝细菌光驱固碳定向合成的人工设计和全面重塑, 为合成生物制造的技术腾飞与产业落地提供强大的助力。

[参 考 文 献]

- [1] Keasling JD, Chou H. Metabolic engineering delivers next-generation biofuels. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 298-9
- [2] Zhang Y, Zhu Y, Zhu Y, et al. The importance of engineering physiological functionality into microbes. *Trends Biotechnol*, 2009, 27: 664-72
- [3] Lu X. A perspective: photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnol Adv*, 2010, 28: 742-6
- [4] Woo HM. Solar-to-chemical and solar-to-fuel production from CO₂ by metabolically engineered microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 45: 1-7
- [5] Melis A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Sci*, 2009, 177: 272-80
- [6] Oliver JW, Atsumi S. Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis. *Photosynth Res*, 2014, 120: 249-61
- [7] Gao ZX, Zhao H, Li ZM, et al. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy Environ Sci*, 2012, 5: 9857-65
- [8] 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: 1400-11
- [9] Blankenship RE, Tiede DM, Barber J, et al. Comparing

- photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement. *Science*, 2011, 332: 805-9
- [10] Walter JM, Greenfield D, Liphardt J. Potential of light-harvesting proton pumps for bioenergy applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21: 265-70
- [11] Chen Q, van der Steen JB, Dekker HL, et al. Expression of holo-proteorhodopsin in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab Eng*, 2016, 35: 83-94
- [12] Pettai H, Oja V, Freiberg A, et al. Photosynthetic activity of far-red light in green plants. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1708: 311-21
- [13] Chen M, Schliep M, Willows RD, et al. A red-shifted chlorophyll. *Science*, 2010, 329: 1318-9
- [14] Gan F, Zhang S, Rockwell NC, et al. Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light. *Science*, 2014, 345: 1312-7
- [15] Nurnberg DJ, Morton J, Santabarbara S, et al. Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll f-containing photosystems. *Science*, 2018, 360: 1210-3
- [16] Joseph A, Aikawa S, Sasaki K, et al. Increased biomass production and glycogen accumulation in *apcE* gene deleted *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Amb Express*, 2014, 4: 17
- [17] Kirst H, Formighieri C, Melis A. Maximizing photosynthetic efficiency and culture productivity in cyanobacteria upon minimizing the phycobilisome light-harvesting antenna size. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1837: 1653-64
- [18] Hasunuma T, Matsuda M, Senga Y, et al. Overexpression of *flv3* improves photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 by enhancement of alternative electron flow. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 493
- [19] Price GD. Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Photosynth Res*, 2011, 109: 47-57
- [20] Kamennaya NA, Ahn S, Park H, et al. Installing extra bicarbonate transporters in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 enhances biomass production. *Metab Eng*, 2015, 29: 76-85
- [21] Liang F, Lindblad P. Effects of overexpressing photosynthetic carbon flux control enzymes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Metab Eng*, 2016, 38: 56-64
- [22] Liang FY, Englund E, Lindberg P, et al. Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio. *Metab Eng*, 2018, 46: 51-59
- [23] De Porcellinis AJ, Norgaard H, Brey LMF, et al. Overexpression of bifunctional fructose-1,6-bisphosphatase/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to enhanced photosynthesis and global reprogramming of carbon metabolism in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Metab Eng*, 2018, 47: 170-183
- [24] Durall C, Rukminasari N, Lindblad P. Enhanced growth at low light intensity in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 by overexpressing phosphoenolpyruvate carboxylase. *Algal Res*, 2016, 16: 275-81
- [25] Hu G, Zhou J, Chen X, et al. Engineering synergetic CO₂-fixing pathways for malate production. *Metab Eng*, 2018, 47: 496-504
- [26] Schwander T, von Borzyskowski LS, Burgener S, et al. A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*. *Science*, 2016, 354: 900-4
- [27] Gong FY, Cai Z, Li Y. Synthetic biology for CO₂ fixation. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 1106-14
- [28] Bar-Even A, Noor E, Lewis NE, et al. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 8889-94
- [29] Berg IA, Kockelkorn D, Buckel W, et al. A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. *Science*, 2007, 318: 1782-6
- [30] Bonacci W, Teng PK, Afonso B, et al. Modularity of a carbon-fixing protein organelle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 478-83
- [31] Bogorad IW, Lin TS, Liao JC. Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation. *Nature*, 2013, 502: 693-7
- [32] Yu H, Li X, Duchoud F, et al. Augmenting the Calvin-Benson-Bassham cycle by a synthetic malyl-CoA-glycerate carbon fixation pathway. *Nat Commun*, 2018, 9: 2008
- [33] McEwen JT, Machado IM, Connor MR, et al. Engineering *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for continuous growth under diurnal conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 1668-75
- [34] McEwen JT, Kanno M, Atsumi S. 2,3 Butanediol production in an obligate photoautotrophic cyanobacterium in dark conditions via diverse sugar consumption. *Metab Eng*, 2016, 36: 28-36
- [35] Kanno M, Carroll AL, Atsumi S. Global metabolic rewiring for improved CO₂ fixation and chemical production in cyanobacteria. *Nat Commun*, 2017, 8: 14724
- [36] Kanno M, Atsumi S. Engineering an obligate photoautotrophic cyanobacterium to utilize glycerol for growth and chemical production. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 69-75
- [37] Nozzi N, Oliver J, Atsumi S. Cyanobacteria as a platform for biofuel production. *Front Bioeng Biotechnol*, 2013, 1: 7
- [38] Qiao C, Duan Y, Zhang M, et al. Effects of reduced and enhanced glycogen pools on salt-induced sucrose production in a sucrose-secreting strain of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84: e02023-17
- [39] David C, Schmid A, Adrian L, et al. Production of 1,2-propanediol in photoautotrophic *Synechocystis* is linked to glycogen turn-over. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115: 300-11
- [40] Maza-Marquez P, Gonzalez-Martinez A, Martinez-Toledo MV, et al. Biotreatment of industrial olive washing water by synergetic association of microalgal-bacterial consortia in a photobioreactor. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24: 527-38
- [41] Jiang LQ, Pei HY, Hu WR, et al. The feasibility of using complex wastewater from a monosodium glutamate factory

- to cultivate *Spirulina subsalsa* and accumulate biochemical composition. *Bioresour Technol*, 2015, 180: 304-10
- [42] Iijima H, Nakaya Y, Kuwahara A, et al. Seawater cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 drastically alters amino acid composition and glycogen metabolism. *Front Microbiol*, 2015, 6: 326
- [43] Pade N, Erdmann S, Enke H, et al. Insights into isoprene production using the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 89
- [44] Post FJ, Borowitzka LJ, Borowitzka MA, et al. The protozoa of a western Australian hypersaline lagoon. *Hydrobiologia*, 1983, 105: 95-113
- [45] Zhu Z, Luan G, Tan X, et al. Rescuing ethanol photosynthetic production of cyanobacteria in non-sterilized outdoor cultivations with a bicarbonate-based pH-rising strategy. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 93
- [46] Touloupakis E, Cicchi B, Benavides AMS, et al. Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poteroiochromonas* sp.). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 1333-41
- [47] Luan G, Lu X. Tailoring cyanobacterial cell factory for improved industrial properties. *Biotechnol Adv*, 2018, 36: 430-42
- [48] Gao X, Sun T, Pei G, et al. Cyanobacterial chassis engineering for enhancing production of biofuels and chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 3401-13
- [49] Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmidt HL, et al. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 487
- [50] Luan G, Dong H, Zhang T, et al. Engineering cellular robustness of microbes by introducing the GroESL chaperonins from extremophilic bacteria. *J Biotechnol*, 2014, 178: 38-40
- [51] Pan J, Wang J, Zhou ZF, et al. IrrE, a global regulator of extreme radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*, enhances salt tolerance in *Escherichia coli* and *Brassica napus*. *PLoS One*, 2009, 4: e4422
- [52] Brock TD. Halophilic blue-green algae. *Arch Microbiol*, 1976, 107: 109-11
- [53] Laloknam S, Tanaka K, Buaboocha T, et al. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a betaine transporter active at alkaline pH and high salinity. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 6018-26
- [54] Wutipraditkul N, Waditee R, Incharoensakdi A, et al. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains NapA-type Na⁺/H⁺ antiporters with novel ion specificity that are involved in salt tolerance at alkaline pH. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 4176-84
- [55] Waditee R, Hibino T, Nakamura T, et al. Overexpression of a Na⁺/H⁺ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 4109-14
- [56] Singh M, Sharma NK, Prasad SB, et al. The freshwater cyanobacterium *Anabaena doliolum* transformed with ApGSMT-DMT exhibited enhanced salt tolerance and protection to nitrogenase activity, but became halophilic. *Microbiology*, 2013, 159: 641-8
- [57] Waditee-Sirisattha R, Singh M, Kageyama H, et al. *Anabaena* sp. PCC7120 transformed with glycine methylation genes from *Aphanothece halophytica* synthesized glycine betaine showing increased tolerance to salt. *Arch Microbiol*, 2012, 194: 909-14
- [58] Waditee-Sirisattha R, Kageyama H, Tanaka Y, et al. Overexpression of halophilic serine hydroxymethyltransferase in fresh water cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 results in increased enzyme activities of serine biosynthetic pathways and enhanced salinity tolerance. *Arch Microbiol*, 2017, 199: 29-35
- [59] Zhu L, Zhu Y, Zhang Y, et al. Engineering the robustness of industrial microbes through synthetic biology. *Trends Microbiol*, 2012, 20: 94-101
- [60] Bhagwat AA, Apte SK. Comparative analysis of proteins induced by heat shock, salinity, and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *J Bacteriol*, 1989, 171: 5187-9
- [61] Chapman E, Farr GW, Usaite R, et al. Global aggregation of newly translated proteins in an *Escherichia coli* strain deficient of the chaperonin GroEL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 15800-5
- [62] Tomas CA, Welker NE, Papoutsakis ET. Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 4951-65
- [63] Zingaro KA, Papoutsakis ET. GroESL overexpression imparts *Escherichia coli* tolerance to i-, n-, and 2-butanol, 1,2,4-butanetriol and ethanol with complex and unpredictable patterns. *Metab Eng*, 2013, 15: 196-205
- [64] Chaurasia AK, Apte SK. Overexpression of the groESL operon enhances the heat and salinity stress tolerance of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 6008-12
- [65] Gonzalez-Esquer CR, Vermaas WFJ. ClpB1 overproduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 increases tolerance to rapid heat shock. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 6220-7
- [66] Su HY, Chou HH, Chow TJ, et al. Improvement of outdoor culture efficiency of cyanobacteria by over-expression of stress tolerance genes and its implication as bio-refinery feedstock. *Bioresour Technol*, 2017, 244: 1294-303
- [67] Lin Z, Zhang Y, Wang J. Engineering of transcriptional regulators enhances microbial stress tolerance. *Biotechnol Adv*, 2013, 31: 986-91
- [68] Zhang HF, Chong HQ, Ching CB, et al. Engineering global transcription factor cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli* for improved 1-butanol tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94: 1107-17
- [69] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, 314: 1565-8
- [70] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, 9: 258-67

- [71] Nikkinen HL, Hakkila K, Gunnelius L, et al. The SigB sigma factor regulates multiple salt acclimation responses of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol*, 2012, 158: 514-23
- [72] Kaczmarzyk D, Anfelt J, Sarnegrim A, et al. Overexpression of sigma factor SigB improves temperature and butanol tolerance of *Synechocystis* sp PCC6803. *J Biotechnol*, 2014, 182: 54-60
- [73] Narayan OP, Kumari N, Bhargava P, et al. A single gene *all3940* (Dps) overexpression in *Anabaena* sp. PCC 7120 confers multiple abiotic stress tolerance via proteomic alterations. *Funct Integr Genomics*, 2016, 16: 67-78
- [74] Wan C, Alam MA, Zhao XQ, et al. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. *Bioresour Technol*, 2015, 184: 251-7
- [75] Alam MA, Wan C, Guo SL, et al. Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. *J Biosci Bioeng*, 2014, 118: 29-33
- [76] Guo SL, Zhao XQ, Tang Y, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *J Biotechnol*, 2013, 163: 61-8
- [77] Li Q, Zhao XQ, Chang AK, et al. Ethanol-induced yeast flocculation directed by the promoter of TPS1 encoding trehalose-6-phosphate synthase 1 for efficient ethanol production. *Metab Eng*, 2012, 14: 1-8
- [78] Jiang XR, Wang H, Shen R, et al. Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation. *Metab Eng*, 2015, 29: 227-37
- [79] Jiang XR, Chen GQ. Morphology engineering of bacteria for bio-production. *Biotechnol Adv*, 2016, 34: 435-40
- [80] Wang Y, Wu H, Jiang X, et al. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. *Metab Eng*, 2014, 25: 183-93
- [81] Erickson HP, Anderson DE, Osawa M. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74: 504-28
- [82] Jordan A, Chandler J, MacCready JS, et al. Engineering cyanobacterial cell morphology for enhanced recovery and processing of biomass. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83: e00053-17
- [83] Daniel RA, Errington J. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell*, 2003, 113: 767-76
- [84] Rueff AS, Chastanet A, Dominguez-Escobar J, et al. An early cytoplasmic step of peptidoglycan synthesis is associated to MreB in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2014, 91: 348-62
- [85] Hu B, Yang GH, Zhao WX, et al. MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol*, 2007, 63: 1640-52
- [86] Singh SP, Montgomery BL. Regulation of BofA abundance mediates morphogenesis in *Fremyella diplosiphon*. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1215
- [87] Gonzalez-Fernandez C, Ballesteros M. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. *J Appl Phycol*, 2013, 25: 991-9
- [88] Fedeson DT, Ducat DC. Cyanobacterial surface display system mediates engineered interspecies and abiotic binding. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 367-74
- [89] Lee SJ, Yoon BD, Oh HM. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol Tech*, 1998, 12: 553-6
- [90] Ohshima T, Sato M. Bacterial sterilization and intracellular protein release by a pulsed electric field. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004, 90: 113-33
- [91] Kurihara T, Esaki N. Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: occurrences, reaction mechanisms, and applications. *Chem Rec*, 2008, 8: 67-74
- [92] Liu X, Curtiss R 3rd. Nickel-inducible lysis system in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21550-4
- [93] Liu X, Fallon S, Sheng J, et al. CO₂-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 6905-8
- [94] Liu XY, Curtiss R. Thermorecovery of cyanobacterial fatty acids at elevated temperatures. *J Biotechnol*, 2012, 161: 445-9
- [95] Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, et al. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature*, 1979, 277: 293-4
- [96] Hohmann-Marriott MF, Blankenship RE. Evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 515-48
- [97] Li S, Sun T, Xu C, et al. Development and optimization of genetic toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Metab Eng*, 2018, 48: 163-74
- [98] 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: 4500
- [99] Niu TC, Lin GM, Xie LR, et al. Expanding the potential of CRISPR-Cpf1 based genome editing technology in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *ACS Synth Biol*, 2018, 8: 170-80
- [100] Sun T, Li S, Song X, 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
- [101] Sun T, Li SB, Song XY, et al. Toolboxes for cyanobacteria: recent advances and future direction. *Biotechnol Adv*, 2018, 36: 1293-307