

实验室适应性进化技术在光合蓝细菌底盘工程中的研究进展

高嘉玮^{1,2,3}, 朱晓飞^{1,2,3}, 孙韬^{1,2,3,4*}, 陈磊^{1,2,3}, 张卫文^{1,2,3,4}

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 天津大学生物安全战略研究中心, 天津 300072

高嘉玮, 朱晓飞, 孙韬, 陈磊, 张卫文. 实验室适应性进化技术在光合蓝细菌底盘工程中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3075-3094.

GAO Jiawei, ZHU Xiaofei, SUN Tao, CHEN Lei, ZHANG Weiwen. Advances in using adaptive laboratory evolution technology for engineering of photosynthetic cyanobacteria[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3075-3094.

摘要: 蓝细菌是唯一可进行放氧光合作用的原核微生物, 基于光合蓝细菌构建“自养型细胞工厂”具有广阔前景。但以蓝细菌作为底盘进行生物燃料及化学品的合成仍存在细胞耐受能力差、产量低等问题, 导致实现工业化生产的经济可行性还比较低, 亟需通过合成生物学等技术手段构建新的藻株。近年来, 实验室适应性进化(adaptive laboratory evolution, ALE)已被用于底盘工程中, 实现了优化生长速度、增加耐受性、加强底物利用和提高产品产量等目标。ALE 在提高蓝细菌鲁棒性方面取得了一定进展, 已获得了耐受高光、重金属离子、高盐和高浓度有机溶剂胁迫的进化藻株。但是, 蓝细菌中的 ALE 策略效率相对较低, 耐受各胁迫的分子机制并未阐释完全。本文综述了 ALE 相关技术策略及其在蓝细菌底盘工程中的应用, 讨论了如何借鉴其他微生物中 ALE 手段, 构建更大 ALE 突变文库、增加菌株的突变频率、缩短进化时间、探索多重胁迫耐受工程菌构建原则及研究策略等, 高效解析进化菌株的突变体库, 构建高产量、鲁棒性强的工程菌株等, 以期未来促进蓝细菌底盘的改造及其工程菌的规模化应用。

关键词: 光合蓝细菌; 实验室适应性驯化; 自养细胞工厂; 合成生物学

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903600); 国家自然科学基金(32070083)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903600) and the National Natural Science Foundation of China (32070083).

*Corresponding author. E-mail: tsun@tju.edu.cn

Received: 2023-02-23; Accepted: 2023-03-30; Published online: 2023-04-19

Advances in using adaptive laboratory evolution technology for engineering of photosynthetic cyanobacteria

GAO Jiawei^{1,2,3}, ZHU Xiaofei^{1,2,3}, SUN Tao^{1,2,3,4*}, CHEN Lei^{1,2,3}, ZHANG Weiwen^{1,2,3,4}

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

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

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

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

Abstract: Cyanobacteria are the only prokaryotes capable of oxygenic photosynthesis, which have potential to serve as “autotrophic cell factories”. However, the synthesis of biofuels and chemicals using cyanobacteria as chassis are suffered from poor stress tolerance and low yield, resulting in low economic feasibility for industrial production. Thus, it's urgent to construct new cyanobacterial chassis by means of synthetic biology. In recent years, adaptive laboratory evolution (ALE) has made great achievements in chassis engineering, including optimizing growth rate, increasing tolerance, enhancing substrate utilization and increasing product yield. ALE has also made some progress in improving the tolerance of cyanobacteria to high light intensity, heavy metal ions, high concentrations of salt and organic solvents. However, the engineering efficiency of ALE strategy in cyanobacteria is generally low, and the molecular mechanisms underpinning the tolerance to various stresses have not been fully elucidated. To this end, this review summarizes the ALE-associated technical strategies and their applications in cyanobacteria chassis engineering, following by discussing how to construct larger ALE mutation library, increase mutation frequency of strains and shorten evolution time. Moreover, exploration of the construction principles and strategies for constructing multi-stress tolerant cyanobacteria, and efficient analysis the mutant libraries of evolved strains as well as construction of strains with high yield and strong robustness are discussed, with the aim to facilitate the engineering of cyanobacteria chassis and the application of engineered cyanobacteria in the future.

Keywords: photosynthetic cyanobacteria; adaptive laboratory evolution; autotrophic cell factories; synthetic biology

蓝细菌(cyanobacteria), 也称蓝藻, 是一类光合自养型的原核微生物, 广泛存在于地球的水生和陆生环境中, 对生态学和生物地质化学发挥了重要的作用^[1]。蓝细菌凭借其可直接利用 CO₂ 和太阳能作为碳源和能源进行生物质合成的优势日益受到研究者的关注^[2]。目前, 以多种模式蓝细菌如集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC 6803 和聚球藻(*Synechococcus elongatus*)

PCC 7942 等为底盘已完成构建生产近百种燃料和化学品, 包括新一代生物燃料乙醇^[3]、丁醇^[4]、航空燃料前体法呢烯^[5]、天然抗氧化剂虾青素^[6]等, 充分证明了基于光合蓝细菌构建“自养型细胞工厂”的广阔前景。随着我国“双碳”目标的提出, 基于光合蓝细菌的 CO₂ 转化更是为发展低碳经济提供了新思路。

即便如此, 目前以蓝细菌作为底盘进行生

物燃料及化学品合成仍存在底盘耐受能力差、产量低等问题^[7],限制了其规模化应用的推进。在面对各种培养环境胁迫下的生长稳定性是细胞工厂高效生产的关键因素^[8]。在蓝细菌的培养过程中,特别是户外规模化培养条件下,不可避免地会遇到高光^[9]、高温^[10]、高盐^[11]和重金属离子^[12]等多种环境胁迫因子及产物的胁迫,严重影响底盘细胞生物量积累,进而影响细胞工厂的产量^[13]。为应对复杂、非理想化的工业培养过程,需要提高底盘蓝细菌的抗逆能力,使其具备对抗某一类或几类环境胁迫因子的鲁棒性^[14]。多数环境耐受性并不是简单地由单个基因控制^[15],而多靶点的基因改造工程十分复杂,加之胁迫耐受的分子机制尚未阐释完全,现阶段通过理性的遗传改造获得鲁棒性底盘的难度较大。

实验室适应性进化(adaptive laboratory evolution, ALE)实验^[16-17]是一种广泛应用的高效工具,既可以改善微生物表型,也可以研究生物现象的进化根源,寻求在预期发生进化的可控场景下观察微生物。ALE实验可以追溯到20世纪早期的受控进化研究报告^[18-19],微生物在选定的环境中长时间培养,以自然地选择那些获得有益突变的细胞。2018年,美国科学家 Frances H. Arnold、George P. Smith 和英国科学家 Sir Gregory P. Winter 由于开发酶的定向演化^[20]以及用于多肽和抗体的噬菌体展示技术^[21]获得诺贝尔化学奖。近年来,ALE技术在底盘工程中大放异彩,实现了对底盘多方面的改造,具体包括优化生长速度^[22]、增加耐受性^[23-24]、加强底物利用^[25]和提高产品产量^[26-27]。为促进构建光合蓝细菌鲁棒性底盘及其未来的规模化应用,本文讨论了目前已开发的ALE技术;围绕ALE技术在蓝细菌中的应用,总结已获得的若干胁迫响应基因,以期理性改造光合底盘打

下基础;最后对未来的研究方向进行了展望。本文对于全面深入解析光合蓝细菌底盘细胞对环境胁迫因子的耐受机理和调控机制及构建高效的“自养型细胞工厂”有重要促进作用。

1 ALE技术的基本原理

“物竞天择,适者生存”是自然界的普遍规律。在微生物进化过程中,遗传多样性为自发的适应进化提供了动力。自然界的生命体在不同的环境条件下经过数百甚至数千代,在长期演变中,生物群体遗传和表型的多样性为对环境变化适应提供了基础。随着合成生物学技术的不断发展,短时间内可产生大量突变并完成筛选的快速ALE技术不断涌现。

1.1 突变引入方式

ALE方法主要包括自发突变、诱变、修复基因突变3类(表1)。

ALE自发突变的操作方法主要是在摇瓶中连续分批培养并添加特定胁迫,传代过程中菌株产生自发突变、有益突变富集^[28]。

与传统微生物诱变技术相结合的方法主要包括化学试剂诱变、射线诱变和常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)等。化学诱变剂引起DNA分子碱基序列的损伤或修饰,导致修复和复制过程中的误读^[29]。为提高集胞藻PCC 6803对温度的耐受性,Tillich等^[30]测试了紫外线(Ultraviolet, UV)和甲基磺酸甲酯(methyl methanesulfonate, MMS)对集胞藻PCC 6803的非致死点突变的致死率和速率,确定UV的最佳剂量为10–50 J/m²,MMS的最佳剂量为0.1%或1%(体积分数),经过每种诱变剂各2轮的处理后,菌株的耐受温度有效提高了约2℃。使用x射线、γ射线、紫外线(ultraviolet, UV)进行物理诱变时,辐射将能量传递到生物体内,各分子产生电离和激发,

表 1 ALE 在合成生物学中的分类

Table 1 Classification of ALE in synthetic biology

Type	Strategy	Principle	Advantage	Disadvantage	References
Add stress to the culture environment		Pressure as a driving force to select phenotypic enhancement	Enrichment of favorable mutations during culture	Time-consuming and labor-intensive	[28]
Mutagenesis	Chemical mutagenesis	Construction of mutation library by chemical reagents (alkylation compounds, base analogues, antibiotics, etc.)	Efficient; Easy to operate	Most chemical mutagens are highly toxic and carcinogenic; The phenotype cannot be accurately attributed to a specific mutation; Easy to produce a large number of useless mutations	[29]
	Physical mutagenesis	Construction of mutation library by X-ray, γ -ray, ultraviolet (UV), atmospheric and room temperature plasma (ARTP), etc	Efficient; Easy to operate	The phenotype cannot be accurately attributed to a specific mutation; Easy to produce a large number of useless mutations	[30]
Gene repair system	Modified DNA polymerases	Construction of mutation library by reducing the fidelity of the replication process	Increase the frequency of spontaneous mutation; Applicable to strains with known genome	The fidelity DNA polymerase modification system needs to be removed; Possible adverse mutations	[31]
	Modified DNA mismatch repair system	Construction of mutation library by modifying dam-directed mismatch repair (DDMR)	Convenient operation; Applicable to strains with known mismatch repair systems, especially strains that cannot use genome editing technology	False-positive phenotypes may be produced, resulting in low efficiency; Possible adverse mutations	[32]
	Modified restriction-modification system	Construction of mutation library by disturbing R-M system	Increase the frequency of spontaneous mutation; Induce DNA breakage at multiple sites in the genome at the same time	This system leads to chromosomal restriction breaks, which might eventually cause cell death	[33-34]

引起细胞内一系列生化反应，从而产生突变。在 ARTP 突变 15 s 和 ALE 培养 40 d 后，获得了凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 突变株 ARTP-aleBC15，并显示出对 pH 2.5 和 0.3% 胆盐的耐受性，存活率为 22.4%^[31]。

通过修复基因突变进行 ALE 主要包括修饰

DNA 聚合酶、修饰错配修复系统以及修饰限制修正系统 3 类。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 DNA 聚合酶 III 负责基因组复制，通过修改编码 DNA 聚合酶 III 的基因，可以降低 DNA 复制的准确性。为建立基因组复制工程辅助持续进化 (genome replication engineering assisted continuous

evolution, GREACE), 选择编码大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DNA 聚合酶 III ϵ 亚基的 *dnaQ* 基因, 在温度敏感质粒 pKD46 上表达阿拉伯糖诱导启动子控制下的 DnaQ 突变体 KR5-2, 重建了 GREACE 系统。经过 7 次 ALE 转移后, 获得的赖氨酸超高产大肠杆菌 MU-1 在含有 150 g/L 赖氨酸的 EFB 培养基中最终的 OD_{600} 提高了约 10–18 倍^[32]。

错配修复系统在 DNA 复制过程中专门修复新合成的 DNA 链上的错配碱基。*mutS*、*mutL* 和 *mutH* 基因的产物通过识别不匹配的碱基和最多 4 个碱基的插入和缺失(insertions and deletions, InDels)并在最近的 GATC 序列上裂解未甲基化链来启动修复级联。为提高干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 在低 pH 值下的乳酸抗性, 删除了其基因组中编码 DNA 错配修复酶的基因 *mutS*。ALE 处理 100 d 后, pH 值为 2.5 时, 进化的菌株表现出更好的生长情况^[33]。

改变限制修正系统^[34]的表达可以导致限制性内切酶(restriction enzymes, REase)与同源甲基转移酶(methyltransferases, MTase)活性之间的不平衡。以携带 PaeR 7I RM 基因的大肠杆菌 MG1655 的 r^+m^+ 菌株作为亲本菌株, 经过 172 次传代后, ALE 的初始生长速率增加了大约 7 倍。 r^+m^+ 的生长速率和插入序列多态性基因型均优于对照组, 进化速度显著提高^[35]。

1.2 富集策略

恒化器可以精确地控制细胞生长速度、化学环境和选择压力, 能够高效富集有益突变。将大肠杆菌 BL21(DE3)暴露于持续热应激, 培养温度从 37 °C 提高到 42 °C 后, 进行 40 h 的恒化培养。不同时间段 σ 因子的表达水平协调全局基因表达, *rpoH*、*rpoD* 在温度升高时表达量较高。第二热休克 σ 因子基因 *rpoE* 在热应激后 10 min 内下调, 并逐渐恢复到非应激细胞的水

平。海藻糖、尸胺和肠杆菌素产量增加, 以应对热诱导的氧化应激。后期出现颗粒形成和细胞伸长现象。在后期高表达的基因 *spy*、*chiP*、*pqqL* 和 *ECD_02813* 经实验验证可提供耐热性, 荚膜多糖生物合成基因簇的表达有助于改善细胞在高温下的生长^[36]。

增加胁迫强度、减少营养源也是行之有效的富集策略。在持续的恒化培养大肠杆菌菌株 $\Delta frmA-\Delta tpiA$ 过程中, 向培养基中添加 0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)进行 *mdh*、*hps* 和 *phi* 的异源表达, 产生 1 个具有完整磷酸核酮糖(ribulose phosphate, RuMP)周期的大肠杆菌菌株。经过大约 400 d 培养, 种群对甲醇的吸收大幅增加, IPTG 不再是甲基化生长所必需的。进化菌株从还原的单碳化合物中构建其全部生物量。而后在仅含甲醇为碳源的培养基中, 在连续转移条件下进一步进化。经过 285 代, 进化菌株能够在大约 8 h 的倍增时间内生长^[37]。

1.3 高通量筛选技术

流式细胞仪能够对细胞进行自动分析和分选, 快速测量、存贮和显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列特征参量, 并根据预选的参量范围分选出所需细胞。

采用流式细胞仪测定基因组拷贝数的分布, 并与荧光法联用鉴定聚球菌 PCC 7942 群体中微倍体细胞, 利用微倍体细胞进行自然转化, 并用 PCR 和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)进行验证。0.35% 的琼脂浓度和 200 IU 的过氧化氢酶可以促进聚球菌 PCC 7942 在固体培养基上的生长。过氧化氢酶基因 *katG* 的过表达提高了生长速度, 通过降低氧化应激来促进生长。流式细胞仪分析表明高温和磷酸盐耗尽的细胞包含最低的基因组拷贝, 并显示出快速产生完全分离突变体的潜力, 最终

减少了完全分离进化菌株所需的时间^[38]。

在蓝细菌 *Synechocystis* cf. *salina* Wislouch (No. 192) 中使用化学诱变剂乙基甲烷磺酸盐 (ethyl methanesulfonate, EMS) 来产生聚羟基丁酸酯 (polyhydroxybutyrate, PHB) 产量增加的突变体。EMS 处理后 21 d, 细胞培养物在流式细胞仪上进行荧光激活细胞分选。采用脂质荧光染料染色, 筛选高脂含量突变体, 然后通过 HPLC 进行特定的 PHB 定量筛选。突变体中 2 个菌株的 PHB 产量、生物积累量和 PHB 体积密度显著提高^[39]。

单克隆菌落的分离、培养和挑取是微生物研究的关键操作。近年来液滴微流控技术的发展为自动化高通量微生物培养和筛选提供了新的解决方案。

微升级单细胞液滴筛选系统 (single-cell microliter-droplet screening system, MISS Cell), 可用于在 2.0–2.5 μL 的液滴中进行自动化高通量的微生物单克隆培养和分选。与固体板相比, MISS cell 用更少的资源产生了更多数量的单克隆菌落和更高的初始生长速率。MISS Cell 建立了自动高通量筛选谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamate*) 的工作流程, 并且 MISS Cell 可以作为一个通用平台, 在高通量应用中有效地生产单克隆菌落, 克服固体板的限制, 促进生物技术的快速发展。基于 MISS Cell 的微生物诱变筛选工作流程, 对谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 进行高谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 产量表型菌株的筛选。通过 ARTP 物理诱变获得突变体库后, 使用 MISS Cell 对突变体进行培养, 并进行单克隆菌落的分选, 最终鉴定出了高产谷氨酸的菌株。其培养物具有良好的单克隆性, 可用于分子克隆的培养和挑取^[40]。

基于荧光活化液滴分选 (fluorescence activated droplet sorting, FADS) 的集成微流控液滴分选平台可以长期培养液滴, 并对液滴进行分选。为了验证该平台的有效性, 对芽孢杆菌 (*Bacillus*) 的高荧光和低荧光混合菌株混合物进行了模型选择实验, 在 300 滴/s 的分选速度下实现了 45.6 倍的富集。进一步利用该平台从 ARTP 诱变的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的突变体文库中筛选出产 α -淀粉酶能力较高的突变体菌株, 分离得到 α -淀粉酶产量提高 50% 以上的克隆。与传统的微量平板筛选系统相比, 该平台大大加快了定向进化的过程, 同时显著降低了成本。此外, 该平台可广泛应用于其他微生物细胞工厂的菌外酶或代谢物的菌株工程^[41]。

2 ALE 在蓝细菌中的应用

考虑到蓝细菌对生物及非生物胁迫的鲁棒性不足问题, 近年来, ALE 技术主要应用于光合蓝细菌中重金属离子、高光、盐和有机溶剂等耐受性驯化 (图 1), 发现了若干重要基因, 对日后全面深入解析光合蓝细菌底盘细胞耐受环境胁迫因子的机理及调控机制具有重要促进作用。

2.1 重金属离子耐受

近年来, 重金属造成的环境污染问题十分严重, 包括污染源、进入食物链和威胁自然界生物的生长等^[42-43]。其中, 镉离子 (Cd^{2+}) 是对人类健康及水体生态系统最危险的重金属之一^[44]。金属镉的残留主要来自镍镉电池、色素等工业产品, 不可避免地造成大量水污染^[45]。利用蓝细菌去除水中 Cd^{2+} 等有毒金属离子近年来得到了广泛的应用, 被认为是一种很有前途的污水净化替代处理方法^[46]。但一般情况下, 当废水中 Cd^{2+} 浓度达到 0.89 $\mu\text{mol/L}$ 时, 大部分蓝细菌已经生长缓慢甚至不能生长^[47]。

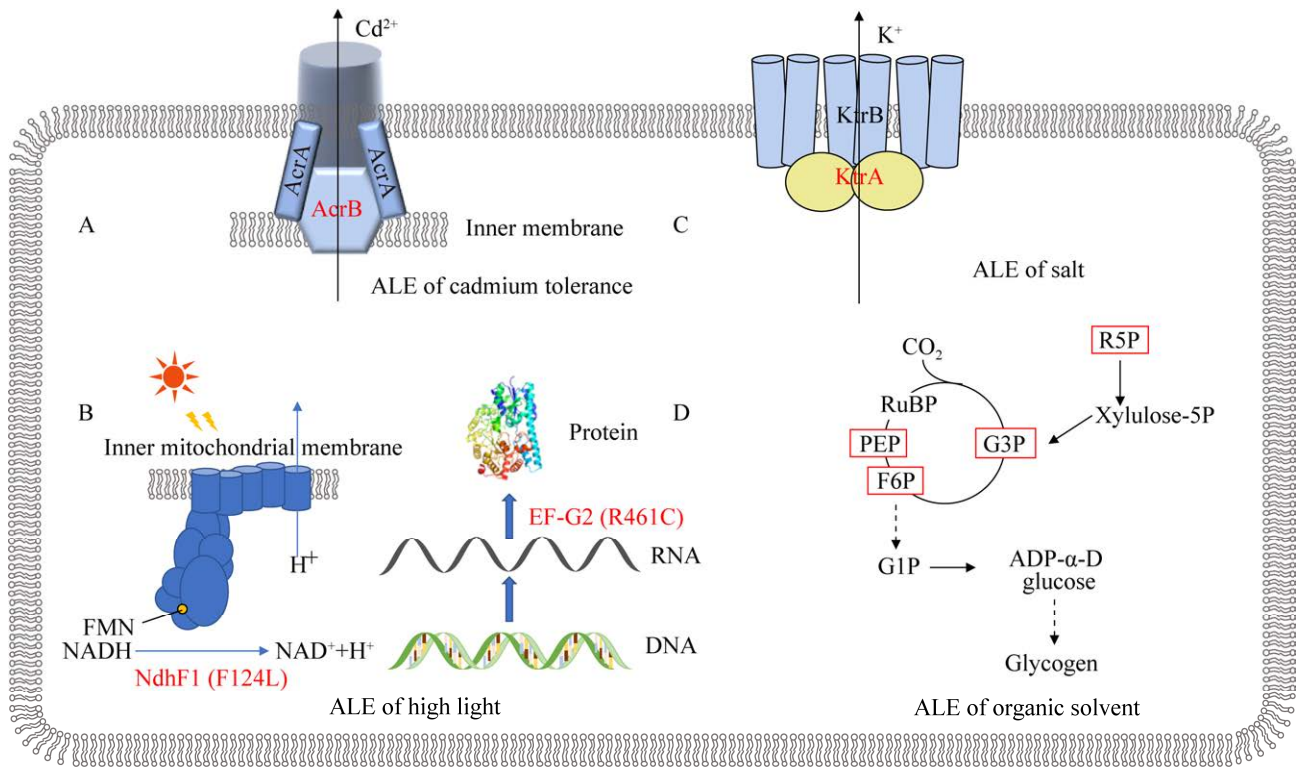


图1 应用于光合蓝细菌的 ALE 实验及发现的主要耐受机制 A: 基于集胞藻 PCC 6803 的镉离子耐受性驯化. B: 基于集胞藻 PCC 6803 的高光耐受性驯化. C: 基于集胞藻 PCC 6803 的盐耐受性驯化. D: 基于聚球藻 PCC 11801 的有机溶剂耐受性驯化

Figure 1 ALE experiment applied to photosynthetic cyanobacteria and the tolerance mechanisms revealed. A: Cadmium tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. B: High-light tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. C: Salt tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. D: Organic solvent tolerance in *Synechococcus elongatus* PCC 11801.

Cd^{2+} 首先限制光系统 I 的受体侧, 7 h 后, 在光的存在下, Cd^{2+} 干扰光系统 II^[48]。 Cd^{2+} 通过争夺酶和干扰膜电位迅速渗透到细胞中, 取代了其他重金属, 如 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 。 Cd^{2+} 毒性导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和谷胱甘肽以及含有巯基的蛋白的消耗^[49]。在另一项研究中, Cd^{2+} 触发了集胞藻 PCC 6803 整个代谢的重新整合, 该过程由 Slr1738 调控因子^[50]控制。同时, 也发现了一些与 Cd^{2+} 抗性相关的基因, 如集胞藻 PCC 6803^[44]中的 *slr10649*。 H_2O_2 和 NO 之间的协同信号通路提高了蓝细菌对 Cd^{2+} 胁迫的耐受性, 将 H_2O_2 和硝普钠(NO 供体)

应用于 $6 \mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 胁迫下, Cd^{2+} 毒性所致的胞外多糖含量、蛋白质含量、内源 NO 含量和酶促抗氧化剂谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(oxidase, POD)、过氧化氢酶(CAT)含量显著降低, ROS 水平也恢复正常。 H_2O_2 和 NO 之间的正交叉作用为蓝细菌提供了对 Cd 胁迫的耐受性^[51]。然而, NO 的整合阻碍了 H_2O_2 的信号传导机制, 降低了 H_2O_2 抵抗 Cd^{2+} 胁迫的潜力, 而 NO 的信号传导没有受到 H_2O_2 整合的阻碍, NO 可能释放蓝细菌的 Cd^{2+} 胁迫^[52]。总的来说, 蓝细菌对

Cd^{2+} 毒性的反应涉及各种复杂的反应机制。然而,到目前为止, Cd^{2+} 对蓝细菌毒性的详细机制仍未完全了解。

Xu 等^[28]基于实验室适应性驯化策略,对集胞藻 PCC 6803 在镉离子胁迫下经 802 d (128 代) 的连续传代,分离出一株能耐受高达 9.0 $\mu\text{mol/L}$ 镉离子的稳定驯化株(命名为 ALE-9.0)。初始菌株在 Cd^{2+} 浓度为 4.6 $\mu\text{mol/L}$ 时,表现出轻微的生长缺陷^[53]。ALE-9.0 对镉离子的耐受性从 4.6 $\mu\text{mol/L}$ 提高到 9.0 $\mu\text{mol/L}$,将集胞藻 PCC 6803 对于镉离子的耐受浓度提高了 50%。ALE 总是在全基因组、转录和代谢水平上带来全面的变化^[54]。随后,运用基因组重测序的技术,进一步结合单基因敲除、过表达等分子生物学分析,对驯化株中镉离子耐受性提高的机理进行了解析。这项工作确定了在蓝细菌中 6 个与镉离子耐受相关的基因和突变,其中编码阳离子或药物外排系统蛋白的 *slr0454* 的大片段缺失被发现直接有助于抵抗 Cd^{2+} 胁迫(图 1A); 5 个突变基因 *slr0623*、*slr0721*、*slr0798*、*slr0774* 和 *slr1753* 在 ALE-9.0 中被证明与 Cd^{2+} 耐受性有关。*Slr0454* 与大肠杆菌的细胞膜转运蛋白 AcrB 同源,已发现其介导了对镍、镉、钴等离子抗性的^[55]。研究发现,ALE-9.0 对锌和钴等其他重金属具有交叉耐受性;同时,ALE-9.0 对强光具有较高的抗性。废水中一定浓度的重金属离子会对蓝细菌的生长构成胁迫,具有重金属离子处理潜力的蓝细菌能够通过 ALE 强化耐受性,并有可能高效处理这些重金属离子污染物。废水中的重金属离子种类众多,其浓度也千差万别,ALE 用于强化蓝细菌重金属离子废水处理还有必要进一步深入研究。

2.2 高光耐受

尽管光在光合作用中起着至关重要的作用,但过量的光对光合生物是有害的,当光合蓝细菌

暴露在强光(high light, HL)下,其光合作用的效率及碳固定能力明显降低。由高光引发的光抑制(photoinhibition)及光保护(photoprotection)现象在光合蓝细菌中普遍存在。在自然环境中,太阳光最强可超过 2 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,远远超过了绝大多数光合蓝细菌的耐受范围^[56],菌体生长出现了显著抑制的表型^[57-58]。当光能收集系统吸收的光能超过各种细胞过程的能量消耗极限时,多余的能量会产生 ROS,对细胞成分造成严重的光损伤,从而破坏光系统 I 和 II (PSI/PSII),最终导致代谢分解^[59-60]。为了减少光抑制,维持能量供应和消耗之间的平衡,并保护光合装置免受光损伤,光合蓝细菌进化出多种机制来应对这个问题,现有的研究包括聚球菌 UTEX 2973 中高光耐受蛋白 HltA 含有一个功能性 PP2C 型蛋白磷酸酶结构域。PP2C 结构域属于细菌特异性 II 族家族,与环境应激反应磷酸酶 RsbU 密切相关。*hltA* 基因突变导致高光生长特有的严重缺陷^[61]。高光激活橙色类胡萝卜素蛋白(orange carotenoid protein, OCP),防止光合作用装置的破坏。在弱光下,OCP 被二聚体荧光恢复蛋白(fluorescent recovery protein, FRP)有效地失活。通过设计具有明确寡聚状态的 FRP 变体,使得 OCP 水平升高时显著提高 FRP 效率^[62]。集胞藻 PCC 6803 中 *IsiA* 的唯一半胱氨酸残基在非光化学猝灭中起关键作用。将 CP43 的缬氨酸 277 替换为 *IsiA* 的半胱氨酸 260,突变体(CP43V277C)的 PSII 输出下降,表明 *IsiA* 可以耗散多余的光能,激发能量从 CP43 相关的叶绿素 a 延迟转移到 PSII 反应中心^[63]。光驱动、光系统 I 介导的 ATP 合成在促进固氮酶反应中起着关键作用。异形胞中保留大量天线蛋白的菌株,在高光强下,表现出异常高的固氮酶活性。突变体中的 PSI 周围的循环电子流增加,有助于 ATP 的生成和异形胞中的固氮酶活性^[64]。

为了产生耐 HL 菌株, 通过运用 ALE 手段, Dann 等^[65]选择一种经过多年适应弱光培养的集胞藻 PCC 6803 实验室菌株(LT)作为初始菌株, 它在过程中失去了运动性, 不能主动逃避 HL, 必须在 ALE 期间进化出代谢适应。将 LT 暴露于 1% (体积分数)的 MMS (M)中, 或通过暴露于 UV-C (U)辐射。分别设计了几种适应菌株, 分别命名为 U、UM、UMU、UMM、UMUM、UMMM 和 UMUMM。在每一轮诱变后, 蓝细菌在不断增加的光强度下连续传代培养 5–25 个培养周期, 每个培养周期通常持续约 15 d。HL 适应菌株耐受光照强度从 LT 菌株诱变后的 $700 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 提高到 UMUM 培养诱变后的 $2\ 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。该 HL 适应菌株还可以应对户外条件下最大太阳辐照度的光强度 $3\ 000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。HL 适应菌株通过重测序鉴定出 NAD(P)H-醌氧化还原酶亚基 F (NdhF1)中 F124L 以及翻译延伸因子 EF-G2 中 R461C 这 2 种突变显著提高菌株的高光耐受性(图 1B)。根据 NDH 复合物在 CEF 和呼吸中的已知功能, NdhF1-F124L 增强了 CEF 活性和呼吸作用。在 $1\ 200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时, EF-G2-R461C 突变株光系统的稳定性显著增加, 可以保持类囊体蛋白复合物的完整性。在 HL 强度下, 2 种突变株的最大产氧呼吸比都较低, 这表明突变株更有效地缓解氧化应激。

Yoshikawa 等^[66]通过 ALE, 获得了一株耐强光集胞藻 PCC 6803 菌株(Tol)。在 $9\ 000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下, 野生型菌株的生长几乎停止, 但 Tol 菌株的生长没有受到抑制。在强光条件下, Tol 菌株的光系统 II 损伤得到了缓解, 并保持了正常的能量流。转录组数据表明, 在强光条件下, Tol 菌株的 *isiA* 表达增加, *isiA* 编码铁胁迫叶绿素结合蛋白, 在 HL 条件下, *isiA* 缺失导致光合功能完全破坏。通过全基因组序列分析和

逆向工程确定了 Tol 菌株 *hik26* 和 *slr1916* 的 2 个突变, 涉及耐强光胁迫。在 HL 条件下, *slr1916* 缺失会导致 PSI 含量增加。Hik26 编码一种双组分传感器组氨酸激酶, 它是双组分传感器-传感器系统的一个组成部分。在 HL 条件下, *hik26* 的缺失导致了严重的生长抑制, 而 *hik26* 突变的引入提高了 HL 的耐受性。PmgA 是集胞藻 PCC 6803 中涉及 HL 反应的调节因子。最近, 利用可诱导的 CRISPRi 抑制文库进行的综合实验表明, *pmgA* 和 *slr1916* 抑制克隆在应对包括光照条件在内的各种胁迫时表现出相似的生长特征。从一个低光下生长的菌株, 到一个可以在户外最大太阳辐照度中生长的菌株, ALE 发挥了重要作用, 是行之有效地提升蓝细菌底盘生物量、产物产量以及细胞工厂鲁棒性的重要策略。

2.3 盐耐受

大规模培养蓝细菌是工业生物技术应用所必需的; 然而, 大规模培养蓝细菌涉及大量用水^[67], 但地球上约 96.5%的水体是不适合直接用于生物技术的海水。因此, 利用海水作为一种替代品将减少大规模蓝细菌培养的淡水需求。高盐度是一种关键的非生物胁迫, 离子、渗透压和氧化应激会对蓝细菌的生长产生不利影响, 可能会干扰光合作用、破坏酶和蛋白质的官能基团等^[68]。通过表达相关转运蛋白来维持细胞内离子平衡是一种重要的抗盐胁迫策略。蓝细菌中已鉴定出一系列耐盐相关转运蛋白, 如不同的 Na^+/H^+ 反转运蛋白、Mrp 系统和 Na^+ 泵出 ATP 酶等。耐盐蓝细菌(*Euhalothece* sp.) Z-M001 在盐胁迫下 Mrp 系统的表达上调, 表明它们在高盐生境中的重要性^[69]。盐胁迫下, 在聚球藻(*Synechococcus elongatus*) UTEX 2973 中通过分别表达 21 个外源 Na^+/H^+ 相关的转运蛋白, 发现 3 个 Mrp 逆向转运蛋白可显著提高宿主

的耐盐性,其中来自于聚球藻(*Synechococcus* sp.) PCC 7002 的 Mrp 蛋白可使聚球藻 UTEX 2973 抗盐性提高 57.7%^[70]。耐盐性差的蓝细菌菌株通常会积累蔗糖或海藻糖,而耐盐性中等的菌株会积累葡萄糖甘油(glucoglycerol, GG),耐盐性高的菌株会分别合成甘氨酸甜菜碱(glycine betaine, GB)和谷氨酸甜菜碱^[71]。通过在聚球藻 UTEX 2973 中引入渗透相溶性物质甘油葡萄糖苷的合成途径,底盘抗盐性能提升了 62%^[72]。在盐胁迫下,聚球藻 7942 的脂质增强,饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA)降低。相比之下,单不饱和脂肪酸含量较对照组显著增加。不饱和脂肪酸的熔点低于 SFA 以维持膜流动性,这可能是蓝细菌抵御盐胁迫的一种适应性反应^[73]。

以集胞藻 PCC 6803 为研究对象,以海水盐度 3% NaCl 为选择压力,进行了长期 ALE 实验。盐胁迫 303 d 后,获得 8 株耐盐性较好的 ALE 菌株,其中 S2 的最大细胞密度是对照菌株的 2 倍以上,这些菌株在未来的海水培养中潜力巨大^[74]。S4 与对照株之间差异表达的基因富集在“K⁺跨膜转运”和“细胞 K⁺转运”通路上(图 1C),表明 ALE 实验可能改变了离子外排。此外,与对照菌株相比,大多数 ALE 生成菌株的细胞直径较小,这表明 ALE 生成菌株具有较高的表面/体积比,而且表面/体积比也可能影响离子流出。

2.4 下一代生物燃料耐受

由于化石燃料的广泛使用,产生的大量温室气体导致了污染、全球气候变化以及对许多生物体的有害影响,石油衍生燃料和化学品的替代品变得越来越必要^[75]。探索利用蓝细菌制造下一代生物燃料成为了新兴发展趋势。蓝细菌具有利用二氧化碳和太阳能,通过基因工程生产高价值化学品和下一代生物燃料的潜力^[47,76]。但用于大规模生产燃料和化学品的蓝细菌开发仍处于起步阶段。生物燃料和高价值化学品通

常对产生它们的微生物是有毒的^[77-78]。这些化学物质会破坏细胞膜,导致代谢物和离子的泄漏,影响细胞维持细胞功能的能力^[79-80]。因此,对于蓝细菌燃料或化学品生产的商业部署,有必要开发能够承受这些毒性作用的菌株。从响应调控文库中筛选发现基因 *slI0039* 和 *slr1037* 参与了集胞藻 PCC 6803 的 1-丁醇耐受性^[81-82]。*slr1037* 和 *slI0039* 共过表达使 1-丁醇耐受性提高 133%^[83]。过表达编码 RNA 聚合酶 σ 因子的 *sigB* 可以改善 1-丁醇耐受性^[84]。Ncl1460 作为 CoaR (CoA 生物合成调控 sRNA)是 *slr0847* (*coaD*)和 *slr0848* 操纵子的负调控子,定量蛋白质组学分析表明,CoaR 可能通过下调辅酶 a 的生物合成来调节对 1-丁醇的耐受性,从而降低脂肪酸代谢和能量代谢^[85-86]。

通过长期的实验进化过程,Wang 等^[87]在集胞藻 PCC 6803 中通过对丁醇的 0.20%、0.25%、0.30%、0.35%、0.40%、0.45%和 0.5% (体积分数)胁迫的 6 个阶段的适应,在连续 94 次传代后(395 d),最终进化出了耐受 0.5% (体积分数)丁醇的耐受株,对丁醇的耐受性较最初的 0.2% (体积分数)提高了 150%。通过代谢组学分析,3-磷酸甘油酸(3-phosphoglycerate, 3PG)、D-果糖 6-磷酸(D-fructose 6-phosphate, F6P)、D-葡萄糖 6-磷酸(D-glucose-6-phosphate G6P)、NADPH、磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)、D-核糖 5-磷酸(D-ribose 5-phosphate, R5P)等不稳定代谢产物以及在进化过程中受到了不同程度的调控,这些代谢物可能是提高丁醇耐受性的关键变化(图 1D)。

聚球藻 (*Synechococcus elongatus*) PCC 11801 具有快速生长、耐强光和固定 CO₂ 的能力,能够在高于 38 °C、400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照环境下生长;在 1% CO₂、1 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下

2.8 h 即可完成倍增;其关键中间代谢物水平较高且在高 CO₂ 和高温条件下生长速度更快^[88]。在 2 个连续培养超过 8 400 h 和 100 个连续传代的平行实验中,菌株进化到耐受 5 g/L 正丁醇、30 g/L 2,3-丁二醇,耐受浓度提高 100%。此外,正丁醇进化菌株可以耐受高达 32 g/L 的乙醇,从而使其成为通过代谢工程进行光合作用生产生物燃料的有前途的宿主。对正丁醇进化菌株的全基因组测序显示,编码翻译起始因子、RpoB 和 ABC 转运蛋白的许多应激反应基因发生突变。在 2,3-丁二醇进化菌株中,ClpC、不同的 ABC 转运体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和磷酸激酶基因被发现发生突变^[89]。即使在没有胁迫的情况下经过几次传代,进化的菌株仍然保持了耐受性,这表明这些变化是永久性的。此外,异丁醇具有更高的能量密度和更低的吸湿性,是一种很有吸引力的燃料。采用含 2 g/L 异丁醇的培养基进行长期传代培养,获得耐受 5 g/L 异丁醇的集胞藻 PCC 6803 菌株。耐受性菌株表现出对异丁醇以及乙醇、正丁醇和异戊醇的耐受力。同时,由于在进化菌株中引入了乙醇产生途径,其产量成功提高到对照菌株的 142%。突变分析表明,进化菌株中参与鞭毛的组装、运动的基因 *mcpA*、*hik43* 和参与毒素转运的基因 *envD* 突变可能与异丁醇耐受性增强有关^[90]。

将野生型鱼腥藻(*Anabaena* sp.) PCC 7120、多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*) ATCC 29413 和念珠藻(*Nostoc punctiforme*) ATCC 29133 分别暴露至法呢烯、月桂烯、芳樟醇和柠檬烯 4 种潜在生物燃料之中。柠檬烯和月桂烯的毒性最大,在 0.03 g/L 的浓度下,没有一个物种能存活 3 d。法呢烯毒性较小,3 种菌株均能耐受 0.1 g/L。芳樟醇的毒性最小,鱼腥藻 PCC 7120 的耐受性为 0.4 g/L,而另外 2 种丝状蓝细菌的耐受性为 0.45 g/L。分别将 3 种菌株暴露于逐渐

提高的生物燃料滴度,进行了 3 轮定向进化。念珠藻 ATCC 29133 对月桂烯和柠檬烯的耐受性增加到 0.06 g/L 和 0.12 g/L;对芳樟醇的耐受性,经过第 1 轮定向进化后,从初始的 0.45 g/L 增加到 0.54 g/L,此后没有发现进一步的改善;对法呢烯的耐受性由 0.1 g/L 提高到第 2 轮定向进化后的 0.21 g/L。鱼腥藻 PCC 7120 和多变鱼腥藻 ATCC 29413 对所有 4 种生物燃料都表现出较高的耐受性,并在 3 个定向进化周期中表现出持续的改善。多变鱼腥藻 ATCC 29413 对法呢烯的耐受性达到 0.43 g/L,对芳樟醇的耐受性达到 0.72 g/L。鱼腥藻 PCC 7120 对月桂烯的耐受性提高至 0.42 g/L。2 种菌株对柠檬烯的耐受性均提高至 0.36 g/L^[91]。在创建突变库的 12 个定向进化试验中,有 9 个试验对特定化学物质的耐受性持续增加,这表明进一步的定向进化试验可能会导致更高的耐受性。能够耐受高滴度生物燃料和化学物质的突变体可以通过基因工程产生相同的化学物质^[5,92]。如果微生物从细胞中输出生物燃料的能力增强,那么生物燃料耐受性的增加也会导致生产力的提高^[93]。随着可再生生物燃料需求的增加,为了开发经济上可行的生产系统,提高蓝细菌对生物燃料的耐受性是至关重要的。

3 蓝细菌中 ALE 技术未来研究方向

3.1 快速 ALE 技术

随着基础微生物学的新进展和工业发酵需求的不断增加,自发突变的发生率已不能满足实验室规模的进化实验。因此,需要更大的样本量和更高的突变率。为构建更大 ALE 突变文库、增加菌株的自发突变频率,随着代谢工程和合成生物学的发展,越来越多的工程策略被应用于提高 ALE 的效率。

ABC转运体参与集胞藻PCC 6803的脂质转运和耐酸胁迫在酸胁迫条件下,将其转运子亚基进行敲除,发现 $\Delta slr1045$ 细胞的磷脂酰甘油含量低于 WT 细胞,在培养基中添加磷脂酰甘油可以恢复酸胁迫条件下 $\Delta slr1045$ 细胞的生长; $\Delta sl10751$ 和 $\Delta sl11041$ 细胞表现出酸胁迫敏感性。在高低温胁迫条件下, $\Delta sl10751$ 和 $\Delta sl11041$ 细胞的生长速度与 WT 细胞相比表现出明显的生长迟缓。尼罗红染色显示 $\Delta slr1045$ 、 $\Delta sl10751$ 和 $\Delta sl11041$ 细胞比 WT 细胞有更多的脂质积累。这些结果表明,Slr1045、Sl10751 和 Sl11041 在集胞藻 PCC 6803 中作为脂质转运复合物共同发挥作用,并且在各种胁迫下生长是必不可少的^[94]。

CRISPR 系统的靶向性取决于目标 DNA 与 gRNA 的互补配对,以及对原间隔相邻基元 (protospacer adjacent motif, PAM)位点的特异识

别,可实现基因组规模的编辑^[95]。胞嘧啶脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)通过脱氨作用将 R-loop 中单链 DNA 中的胞嘧啶(C)转化为尿嘧啶(U),通过 DNA 复制和修复途径实现 U-G(鸟嘌呤)错配^[96]。因此, AID 可对转录过程中形成的单链 DNA 区域进行可诱导突变(图 2A)。大肠杆菌的 DNA 解旋酶 DnaB,与活化诱导 AID 融合形成酶复合物,在染色体中随机引入碱基编辑。DnaB-AID 相对于野生型的突变频率增加 2.5×10^3 倍,且在 4 轮编辑后 β -胡萝卜素的产量增加了 371.4%。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)中,通过将 AID 与解旋酶 Mcm2-7 复合体的一个亚基 MCM5 融合构建解旋酶 MCM5-AID。利用 MCM5-AID 技术,5 株菌株的平均编辑效率比原生基因组突变率高 $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3$ 倍,进行 8 轮编辑后, β -胡

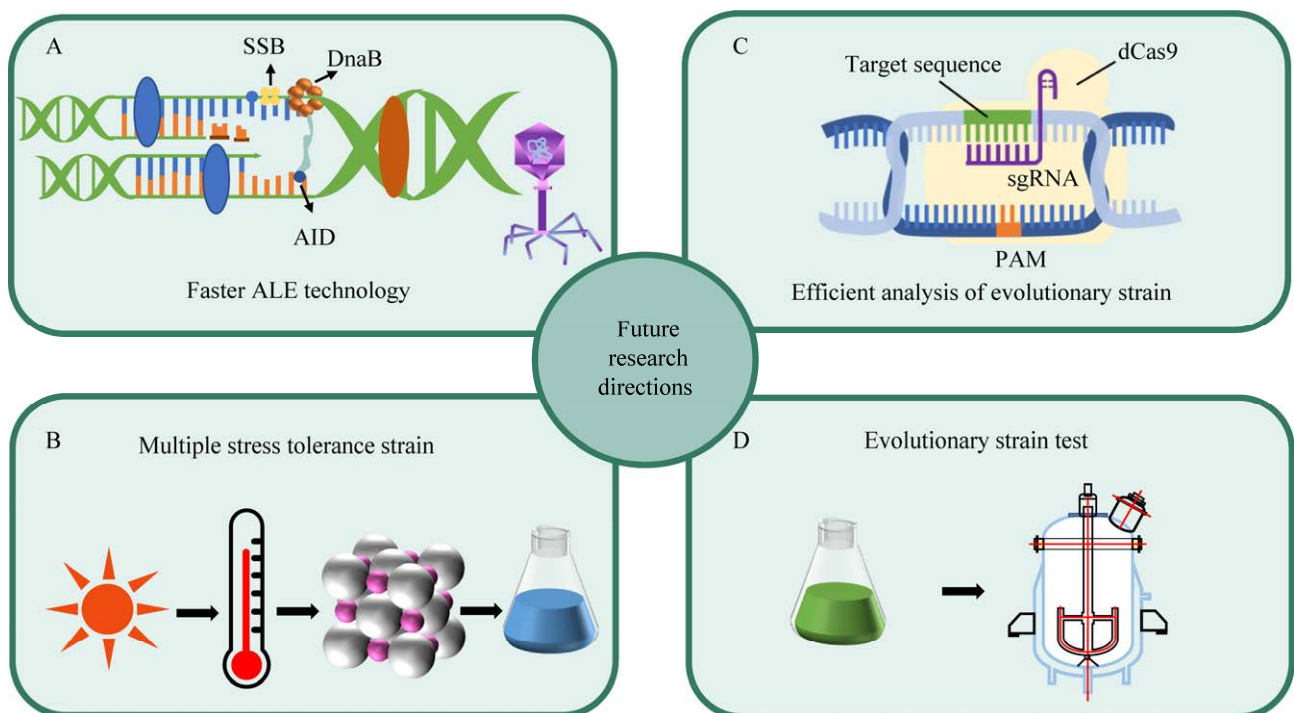


图2 蓝细菌中ALE技术未来研究方向 A: 快速ALE技术. B: 多元胁迫耐受底盘. C: 进化底盘高效解析. D: 进化底盘测试

Figure 2 Future research directions of ALE technology in cyanobacteria. A: Rapid ALE technology. B: Multiple stress-tolerant strain. C: Efficient analysis of evolutionary strain. D: Evolutionary strain test.

胡萝卜素产量提高了 75.4%^[97]。在酿酒酵母建立了有关基因组进化的随机碱基编辑(random base editing, rBE)系统。通过将非特异性单链 DNA (non-specific single-stranded DNA, ssDNA)结合蛋白融合到 AID 上, rBE 以全基因组的方式引入 C 到 T 突变。通过此方法,进行了耐 9%异丁醇酵母细胞工厂的连续基因组进化^[98]。由于 DNA 复制机制的守恒性, rBE 具有普遍适用性,理论上也可用于蓝细菌的基因组持续进化。噬菌体辅助连续进化是一种用于细菌细胞蛋白质进化的多功能连续方法。通过将实验室进化的诱变、基因表达、选择和复制离散映射到 M13 丝状噬菌体的生命周期上,并使用诱变质粒原位多样化^[99]。噬菌体辅助连续进化(phage-assisted continuous evolution, PACE)在进化过程中需要极少的干预,并且与传统方法相比,允许在更短的时间内进化出新的或改进的活性^[100]。腺嘌呤碱基编辑器(Adenine base editors, ABEs)的应用一直受到脱氧腺苷脱氨酶组分与 Cas 同系物 SpCas9 以外的有限相容性的限制。通过利用噬菌体辅助的非连续进化和连续进化进化了 ABE7.10 的脱氨酶组分,从而产生了 ABE8e。与 ABE7.10 相比, ABE8e 包含 8 个额外的突变,使活性(K_{app})增加 590 倍。当与各种 Cas9 或 Cas12 同源物配对时, ABE8e 大大提高了编辑效率。ABE8e 比 ABE7.10 处理性更强,有利于筛选、干扰调控区和多碱基编辑应用。通过在 TadA-8e 结构域引入一个额外的突变, Cas9 依赖和独立的 DNA 脱靶编辑以及转录组范围内 RNA 脱靶编辑的适度增加可以得到改善^[101]。如果能够将这些工具加以调整适用于光合蓝细菌,突变效率将会大大提高。

3.2 多元胁迫耐受底盘

光合蓝细菌对高光、高温和重金属离子等多种环境胁迫因子的耐受性差,是影响这一具

广阔前景的“自养型细胞工厂”经济可行性的的重要因素。虽然针对单个环境胁迫因子的机理及改造的研究已经逐步开展,挖掘出了一些抗逆元件,但现实中,工业化大规模培养条件下光合蓝细菌往往面临不止一种胁迫因子的多重胁迫的共同作用,例如,夏天户外培养所要面临的高温、高光,以烟道气作为碳源时所面对的高温、酸、重金属离子,利用海水培养时遇到的高盐、重金属离子以及蓝细菌用于废水处理时所面对的高光、重金属离子等多重胁迫(图 2B)。因此,鉴定多元逆境响应的元件更加重要。在热激胁迫中,聚球藻 PCC 7942 中双组分系统 RpaB 和 Rre1 有所响应, Hik34-Rre1 是激活热激响应的关键信号模块^[102]。同时, RpaB 可能很大程度上影响光照从暗到亮以及光照强度增加过程中的转录调控,对于高光响应同样具有重要作用^[103]。将海洋聚球藻(*Synechococcus*) WH 7803 暴露于对两两组合的光照、温度及紫外线胁迫下(低光低温、低光紫外、低光高温、高光紫外、高光低温、高光高温),通过比较转录组学,鉴定到低温紫外和低温高光胁迫诱导下特异响应的 DNA 结合蛋白编码基因 *dpsA*、多种组合胁迫下编码通用胁迫响应蛋白的基因 *uspG* 等^[104]。最近, Sun 等^[105]通过修饰错配修复系统,构建了 HS84 ($\Delta mutS::P_{cpcB560}-recA$)突变株,聚球菌 PCC 7942 突变率增加 130 倍,并利用保真机制缺陷与抑制性光强和温度的协同效应,进一步提高体内诱变强度,突变率提高了 1 000 倍。在聚球菌 PCC 7942 中利用此超突变系统,培养 4 d 后,进化菌株在 42 °C、2 500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和 45 °C、1 500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下仍能存活生长,并表现出最佳的高温高光(high temperature and high light, HLHT)适应性。将具有最好的 HTHL 耐受性的聚球菌突变体进行分析,确定有助于适应 HTHL 的基因组突变,发现位于编

码莽草酸激酶的基因上游非编码区域的 NC2 突变导致该基因的增强表达; 0336 (AtpA-C252Y) 发生点突变, 2 种突变方式均有效提高了聚球菌的 HTHL 耐受性。在聚球菌 PCC 7942 和集胞藻 PCC 6803 中过表达莽草酸激酶编码基因均提高了 HTHL 耐受性。

同时, 在先前的研究中已经积累了大量的与高光、有机溶剂和重金属离子等胁迫相关的耐受性突变株, 以及进行了大量相关的耐受性机制研究^[28,53,106], 同时鉴定了大量的相关耐受模块、元件, 这些也可用于其他蓝细菌底盘的多元抗逆改造。另外, 在已获得耐受菌株的基础上, 可继续进行其他胁迫因子的适应性实验室进化实验, 但需要注意的是, 蓝细菌对不同环境胁迫因子的响应及应对机制非常复杂, 可能存在彼此机制上的重叠性或者拮抗性。通过合成生物学策略来改善蓝细菌对多重胁迫因子的耐受性有赖于对多重耐受调控机理的深入解析, 对最终构建高产量的光合蓝细菌“自养型细胞工厂”具有重要的意义。

3.3 进化底盘的高效解析

为了帮助研究蓝细菌的表型-基因型关系, Yao 等^[107]在集胞藻 PCC 6803 中开发了一个 10 498 个克隆的可诱导的 CRISPRi 基因抑制文库, 针对所有基因进行抑制(图 2C)。每个克隆都表达 dCas9 和 1 个 sgRNA, 该 sgRNA 靶向蛋白编码开放阅读框(open the reading frame, ORF)或非编码 RNA(ncRNA)。将合成的 sgRNA 序列合并, 克隆到基因组整合载体中, 并转化到含有基因组整合的无水四环素(aTc)诱导的 dCas9 盒的集胞藻 PCC 6803 菌株。所得到的集胞藻 PCC 6803 克隆被合并, 并构成 CRISPRi 文库。在浊度控制器中, 随着时间的推移, 可以定量文库组成, 从而计算每个突变体的最大特定生长速率 μ , 更直观地解释突变体的适应度。使

用 CRISPRi 抑制文库来识别具有改良工业表型的潜在突变体, 然后筛选单个克隆进行验证。通过提供所有基因在特定条件下的适应度贡献, CRISPRi 文库揭示了蓝细菌解决某些生理挑战的模式。通过 CRISPRi 文库找到具有提高 L-乳酸产量的突变克隆, 发现抑制过氧还蛋白 *bcp2* 使生长速率提高 49%。将该文库转化到能够分泌 L-乳酸的集胞藻 PCC 6803 菌株, 并对产量最高的乳酸生成体进行分选, 以 sgRNAs 富集克隆, 这些 sgRNAs 分别靶向营养同化、中心碳代谢和循环电子流等。与基因敲除相比, CRISPRi 文库在工程生物生产中具有独特的优势, 因为必需基因的水平可以被滴定, 且必需基因能够扰动核心代谢网络。通过将 CRISPRi 文库与荧光分析相结合, 能够筛选数千个潜在的敲除基因, 以提高生产力, 协助进化菌株高效解析。

3.4 进化底盘测试

通过 ALE 构建完成的进化菌株已初步具备耐受某一种或几种胁迫因子的能力, 应用于工业生产将指日可待。实验室内进化完成的菌株, 通过基因组学解析获得了相关耐受模块与元件。将这些模块与元件加以改造, 有可能获得耐受胁迫更强, 某种产物生物量更高, 稳定性更强的进化菌株。促进进化菌株的中试使用与代谢工程测试成为日后工作的关键(图 2D)。进化菌株在中试放大过程中要对种子液接种量、胁迫因子基础浓度、胁迫因子补加策略、温度控制策略等方面进行优化。同时, 在中试放大过程中有可能面对由于高密度培养环境导致的 CO₂ 浓度、光照不足等问题, 需要进一步引入相关基因或调整培养设备以解决问题。通过 ALE 获得的进化菌株对胁迫的耐受可能来自于其他代谢通路的下调或放弃, 深度解析进化菌株胁迫耐受的机制, 将有利于进化菌株更深

层次的开发和应用。蓝细菌内代谢途径错综复杂,为提高某一产物的产量,需要将其竞争代谢的支路下调,对中心调控因子、关键酶加以改造,分析对菌株生产某产物的影响,最终筛选获得高产的工程菌株。菌株生产的产物积累到一定程度,对底盘细胞通常是有害的,可能会破坏细胞膜,影响底盘细胞维持细胞功能的能力,因此,需要将产物及时分离。同时如何通过代谢工程增大产物的初始原料供应,也成为扩大光合蓝细菌进化菌株在工业化生产过程中的重要问题之一。

4 总结

蓝细菌作为唯一进行有氧光合作用的原核生物,是研究光合生物领域重要的模式生物。基于光合蓝细菌的 CO₂ 转化,对于发展低碳经济目标的研究而言,具有重要的科学经济价值。以“双碳”目标为导向的蓝细菌细胞工厂研究把 ALE 运用于提高菌株耐受环境胁迫因子的驯化,初步有效地解决当前蓝细菌底盘耐受性差、鲁棒性不足的问题。合成生物学策略的应用,助力菌株突变频率增加,ALE 效率显著提升。当前蓝细菌耐受单一胁迫的研究已经初具规模,为后续构建多重耐受的底盘细胞提供了有效模块、元件。高通量筛选技术的更新换代,使得高效解析突变体库成为可能。工程菌株将进一步用于中试,更大限度地开发应用于生物燃料及化学品的合成,蓝细菌细胞工厂所面临的效率低、经济性差等问题有望得以解决。可以预期的是,随着代谢工程以及合成生物学的发展,蓝细菌对于各胁迫的耐受机理及调控机制将被逐步阐明,开发高产量、鲁棒性强的工程菌株将越来越有据可依,构建“自养型细胞工厂”指日可待。

REFERENCES

- [1] HAMILTON TL, BRYANT DA, MACALADY JL. The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic Oceans[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(2): 325-340.
- [2] STANIER RY, COHEN-BAZIRE G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1977, 31: 225-274.
- [3] ANDREWS F, FAULKNER M, TOOGOOD HS, SCRUTTON NS. Combinatorial use of environmental stresses and genetic engineering to increase ethanol titres in cyanobacteria[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 1-17.
- [4] GAO XY, SUN T, PEI GS, CHEN L, ZHANG WW. Cyanobacterial chassis engineering for enhancing production of biofuels and chemicals[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(8): 3401-3413.
- [5] PATTHARAPRACHAYAKUL N, LEE HJ, INCHAROENSAKDI A, WOO HM. Evolutionary engineering of cyanobacteria to enhance the production of α -farnesene from CO₂[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(49): 13658-13664.
- [6] HASUNUMA T, TAKAKI A, MATSUDA M, KATO Y, VAVRICKA CJ, KONDO A. Single-stage astaxanthin production enhances the nonmevalonate pathway and photosynthetic central metabolism in *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(12): 2701-2709.
- [7] JODLBAUER J, ROHR T, SPADIUT O, MIHOVILOVIC MD, RUDROFF F. Biocatalysis in green and blue: cyanobacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(9): 875-889.
- [8] GUDMUNDSSON S, NOGALES J. Cyanobacteria as photosynthetic biocatalysts: a systems biology perspective[J]. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(1): 60-70.
- [9] DOBSON Z, AHAD S, VANLANDINGHAM J, TOPORIK H, VAUGHN N, VAUGHN M, WILLIAMS D, REPERT M, FROMME P, MAZOR Y. The structure of photosystem I from a high-light-tolerant cyanobacteria[J]. *eLife*, 2021, 10: 67518.
- [10] OGBAGA CC, STEPIEN P, ATHAR HUR, ASHRAF M. Engineering Rubisco activase from thermophilic cyanobacteria into high-temperature sensitive plants[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(4): 559-572.

- [11] LI H, ZHAO QY, HUANG H. Current states and challenges of salt-affected soil remediation by cyanobacteria[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 669: 258-272.
- [12] PANDEY N, PATEL A, TIWARI S, PRASAD SM. Differential response of copper nanoparticles and ionic copper on growth, chlorophyll fluorescence, oxidative stress, and antioxidant machinery of two paddy field cyanobacteria[J]. *Ecotoxicology*, 2022, 31(6): 933-947.
- [13] SINETOVA MA, LOS DA. Lessons from cyanobacterial transcriptomics: universal genes and triggers of stress responses[J]. *Molecular Biology*, 2016, 50(4): 606-614.
- [14] JULLESSON D, DAVID F, PFLEGER B, NIELSEN J. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7): 1395-1402.
- [15] LI DJ, WANG L, ZHAO QY, WEI W, SUN YH. Improving high carbon dioxide tolerance and carbon dioxide fixation capability of *Chlorella* sp. by adaptive laboratory evolution[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 185: 269-275.
- [16] ZHENG YY, HONG KQ, WANG BW, LIU DY, CHEN T, WANG ZW. Genetic diversity for accelerating microbial adaptive laboratory evolution[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(7): 1574-1586.
- [17] HEMANSI, HIMANSHU, PATEL AK, SAINI JK, SINGHANIA RR. Development of multiple inhibitor tolerant yeast *via* adaptive laboratory evolution for sustainable bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126247.
- [18] ATWOOD KC, SCHNEIDER LK, RYAN FJ. Periodic selection in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1951, 37(3): 146-155.
- [19] NOVICK A, SZILARD L. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1950, 36(12): 708-719.
- [20] JUNG ST, LAUHLIR, ARNOLD FH. Cytochrome P450: taming a wild type enzyme[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(6): 809-817.
- [21] SMITH GP, PETRENKO VA. Phage display[J]. *Chemical Reviews*, 1997, 97(2): 391-410.
- [22] LACROIX RA, SANDBERG TE, O'BRIEN EJ, UTRILLA J, EBRAHIM A, GUZMAN GI, SZUBIN R, PALSSON BO, FEIST AM. Use of adaptive laboratory evolution to discover key mutations enabling rapid growth of *Escherichia coli* K-12 MG1655 on glucose minimal medium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 17-30.
- [23] ZHANG J, JIN B, FU J, WANG ZW, CHEN T. Adaptive laboratory evolution of *Halomonas bluephagenesis* enhances acetate tolerance and utilization to produce poly(3-hydroxybutyrate)[J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 3022.
- [24] FLETCHER E, FEIZI A, BISSCHOPS MMM, HALLSTRÖM BM, KHOOMRUNG S, SIEWERS V, NIELSEN J. Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 19-28.
- [25] ZHANG WP, CHENG Y, LI YD, DU GC, XIE GF, ZOU HJ, ZHOU JW, CHEN J. Adaptive evolution relieves nitrogen catabolite repression and decreases urea accumulation in cultures of the Chinese rice wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* XZ-11[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(34): 9061-9069.
- [26] GIBSON B, DAHABIEH M, KROGERUS K, JOUHTEN P, MAGALHÃES F, PEREIRA R, SIEWERS V, VIDGREN V. Adaptive laboratory evolution of ale and lager yeasts for improved brewing efficiency and beer quality[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2020, 11: 23-44.
- [27] GODARA A, KAO KC. Adaptive laboratory evolution of β -caryophyllene producing *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 1-13.
- [28] XU CX, SUN T, LI SB, CHEN L, ZHANG WW. Adaptive laboratory evolution of cadmium tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 1-15.
- [29] MOHSEN MG, JI DB, KOOL ET. Polymerase synthesis of four-base DNA from two stable dimeric nucleotides[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(18): 9495-9501.
- [30] TILLICH UM, LEHMANN S, SCHULZE K, DÜHRING U, FROHME M. The optimal mutagen dosage to induce point-mutations in *Synechocystis* sp. PCC6803 and its application to promote temperature tolerance[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49467.
- [31] LIU KY, FANG H, CUI FJ, NYABAKO BA, TAO TL, ZAN XY, CHEN HY, SUN WJ. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(14): 6363-6373.

- [32] WANG XW, LI QG, SUN CM, CAI Z, ZHENG XM, GUO X, NI XM, ZHOU WJ, GUO YM, ZHENG P, CHEN N, SUN JB, LI Y, MA YH. GREACE-assisted adaptive laboratory evolution in endpoint fermentation broth enhances lysine production by *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 1-13.
- [33] OVERBECK TJ, WELKER DL, HUGHES JE, STEELE JL, BROADBENT JR. Transient MutS-based hypermutation system for adaptive evolution of *Lactobacillus casei* to low pH[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(20): e01120-17.
- [34] BIRKHOLZ N, JACKSON SA, FAGERLUND RD, FINERAN PC. A mobile restriction-modification system provides phage defence and resolves an epigenetic conflict with an antagonistic endonuclease[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(6): 3348-3361.
- [35] ASAKURA Y, KOJIMA H, KOBAYASHI I. Evolutionary genome engineering using a restriction-modification system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(20): 9034-9046.
- [36] KIM S, KIM Y, SUH DH, LEE CH, YOO SM, LEE SY, YOON SH. Heat-responsive and time-resolved transcriptome and metabolome analyses of *Escherichia coli* uncover thermo-tolerant mechanisms[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 17715.
- [37] KELLER P, REITER MA, KIEFER P, GASSLER T, HEMMERLE L, CHRISTEN P, NOOR E, VORHOLT JA. Generation of an *Escherichia coli* strain growing on methanol via the ribulose monophosphate cycle[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5243.
- [38] RIAZ S, JIANG Y, XIAO M, YOU DW, KLEPACZ-SMÓLKA A, RASUL F, DAROCH M. Generation of miniploid cells and improved natural transformation procedure for a model cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 959043.
- [39] PRICE S, KUZHIUMPARAMBIL U, PERNICE M, HERDEAN A, RALPH P. Enhancement of cyanobacterial PHB production using random chemical mutagenesis with detection through FACS[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2023, 46(2): 297-306.
- [40] JIAN XJ, GUO XJ, CAI ZS, WEI LF, WANG LY, XING XH, ZHANG C. Single-cell microliter-droplet screening system (MISS Cell): an integrated platform for automated high-throughput microbial monoclonal cultivation and picking[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(3): 778-792.
- [41] YUAN HL, TU R, TONG XW, LIN YP, ZHANG YY, WANG QH. Ultrahigh-throughput screening of industrial enzyme-producing strains by droplet-based microfluidic system[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2022, 49(3): kuac007.
- [42] ZHANG JH, LI XC, GUO LQ, DENG ZM, WANG DW, LIU LS. Assessment of heavy metal pollution and water quality characteristics of the reservoir control reaches in the middle Han River, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 799: 149472.
- [43] COURTOIS P, RORAT A, LEMIERE S, GUYONEAUD R, ATTARD E, LEVARD C, VANDENBULCKE F. Ecotoxicology of silver nanoparticles and their derivatives introduced in soil with or without sewage sludge: a review of effects on microorganisms, plants and animals[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 253: 578-598.
- [44] CULLEN JT, MALDONADO MT. Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment[M]// *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012: 31-62.
- [45] JAISHANKAR M, TSETEN T, ANBALAGAN N, MATHEW BB, BEEREGOWDA KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals[J]. *Interdisciplinary Toxicology*, 2014, 7(2): 60-72.
- [46] CHEN L, ZHU Y, SONG ZD, WANG JX, ZHANG WW. An orphan response regulator Sll0649 involved in cadmium tolerance and metal homeostasis in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 103: 87-102.
- [47] AL-HOMAIDAN AA, ALABDULLATIF JA, AL-HAZZANI AA, AL-GHANAYEM AA, ALABBAD AF. Adsorptive removal of cadmium ions by *Spirulina platensis* dry biomass[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015, 22(6): 795-800.
- [48] TÓTH T, ZSIROS O, KIS M, GARAB G, KOVÁCS L. Cadmium exerts its toxic effects on photosynthesis via a cascade mechanism in the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(12): 2075-2086.
- [49] CASSIER-CHAUVAT C, CHAUVAT F. Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: recent advances[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 16(1): 871-886.
- [50] HOUOT L, FLOUTIER M, MARTEYN B, MICHAUT M, PICCIOCCHI A, LEGRAIN P, AUDE JC, CASSIER-CHAUVAT C, CHAUVAT F. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the

- metabolism of *Synechocystis* PCC6803, under the control of the Slr1738 regulator[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8(1): 1-16.
- [51] VERMA N, PRASAD SM. Interplay of hydrogen peroxide and nitric oxide: systemic regulation of photosynthetic performance and nitrogen metabolism in cadmium challenged cyanobacteria[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 27(10): 2181-2199.
- [52] VERMA N, PRASAD SM. Regulation of redox homeostasis in cadmium stressed rice field cyanobacteria by exogenous hydrogen peroxide and nitric oxide[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 2893.
- [53] SUN T, XU L, WU LN, SONG ZD, CHEN L, ZHANG WW. Identification of a new target slr0946 of the response regulator Slr0649 involving cadmium tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1582.
- [54] CONRAD TM, LEWIS NE, PALSSON BØ. Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science[J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7(1): 509.
- [55] KOBYLKA J, KUTH MS, MÜLLER RT, GEERTSMA ER, POS KM. AcrB: a mean, keen, drug efflux machine[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2020, 1459(1): 38-68.
- [56] HAREL Y, OHAD I, KAPLAN A. Activation of photosynthesis and resistance to photoinhibition in cyanobacteria within biological desert crust[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(2): 3070-3079.
- [57] CHO SH, JEONG Y, HONG SJ, LEE H, CHOI HK, KIM DM, LEE CG, CHO S, CHO BK. Different regulatory modes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to photosynthesis inhibitory conditions[J]. *mSystems*, 2021, 6(6): e00943-21.
- [58] OGAWA K, YOSHIKAWA K, MATSUDA F, TOYA Y, SHIMIZU H. Transcriptome analysis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mechanisms of photoinhibition tolerance under extreme high light conditions[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 126(5): 596-602.
- [59] ASADA K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 601-639.
- [60] CHAUX F, PELTIER G, JOHNSON X. A security network in PSI photoprotection: regulation of photosynthetic control, NPQ and O₂ photoreduction by cyclic electron flow[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 875.
- [61] WALKER PL, PAKRASI HB. A ubiquitously conserved cyanobacterial protein phosphatase essential for high light tolerance in a fast-growing *Cyanobacterium*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e01008-22.
- [62] SLUCHANKO NN, SLONIMSKIY YB, SHIRSHIN EA, MOLDENHAUER M, FRIEDRICH T, MAKSIMOV EG. OCP-FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3869.
- [63] BISWAS S, NIEDZWIEDZKI DM, PAKRASI HB. Introduction of cysteine-mediated quenching in the CP43 protein of photosystem II builds resilience to high-light stress in a cyanobacterium[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2022, 1863(7): 148580.
- [64] BANDYOPADHYAY A, YE Z, BENEDIKTY Z, TRTILEK M, PAKRASI HB. Antenna modification leads to enhanced nitrogenase activity in a high light-tolerant *Cyanobacterium*[J]. *mBio*, 2021, 12(6): e03408-21.
- [65] DANN M, ORTIZ EM, THOMAS M, GULJAMOW A, LEHMANN M, SCHAEFER H, LEISTER D. Enhancing photosynthesis at high light levels by adaptive laboratory evolution[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(5): 681-695.
- [66] YOSHIKAWA K, OGAWA K, TOYA Y, AKIMOTO S, MATSUDA F, SHIMIZU H. Mutations in hik26 and slr1916 lead to high-light stress tolerance in *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 343.
- [67] PATHAK J, RAJNEESH, MAURYA PK, SINGH SP, HÄDER DP, SINHA RP. Cyanobacterial farming for environment friendly sustainable agriculture practices: innovations and perspectives[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2018, 6: 7.
- [68] SWAPNIL P, RAI AK. Physiological responses to salt stress of salt-adapted and directly salt (NaCl and NaCl+Na₂SO₄ mixture)-stressed cyanobacterium *Anabaena fertilissima*[J]. *Protoplasma*, 2018, 255(3): 963-976.
- [69] YANG HW, SONG JY, CHO SM, KWON HC, PAN CH, PARK YI. Genomic survey of salt acclimation-related genes in the halophilic *Cyanobacterium euhalothece* sp. Z-M001[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 676.
- [70] CUI JY, SUN T, LI SB, XIE YR, SONG XY, WANG

- FZ, CHEN L, ZHANG WW. Improved salt tolerance and metabolomics analysis of *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 by overexpressing *mrp* antiporters[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 500.
- [71] KIRSCH F, KLÄHN S, HAGEMANN M. Salt-regulated accumulation of the compatible solutes sucrose and glucosylglycerol in cyanobacteria and its biotechnological potential[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2139.
- [72] CUI JY, SUN T, CHEN L, ZHANG WW. Salt-tolerant *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 obtained via engineering of heterologous synthesis of compatible solute glucosylglycerol[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 650217.
- [73] VERMA E, SINGH S, NIVESHKA, MISHRA AK. Salinity-induced oxidative stress-mediated change in fatty acids composition of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2019, 16(2): 875-886.
- [74] HU L, HE JY, DONG MJ, TANG X, JIANG PP, LEI AP, WANG JX. Divergent metabolic and transcriptomic responses of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to salt stress after adaptive laboratory evolution[J]. *Algal Research*, 2020, 47: 101856.
- [75] ADLER PR, del GROSSO SJ, PARTON WJ. Life-cycle assessment of net greenhouse-gas flux for bioenergy cropping systems[J]. *Ecological Applications*, 2007, 17(3): 675-691.
- [76] LIN PC, PAKRASI HB. Engineering cyanobacteria for production of terpenoids[J]. *Planta*, 2019, 249(1): 145-154.
- [77] KIM EM, EOM JH, UM Y, KIM Y, WOO HM. Microbial synthesis of myrcene by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(18): 4606-4612.
- [78] CHUBUKOV V, MINGARDON F, SCHACKWITZ W, BAIDOO EEK, ALONSO-GUTIERREZ J, HU QJ, LEE TS, KEASLING JD, MUKHOPADHYAY A. Acute limonene toxicity in *Escherichia coli* is caused by limonene hydroperoxide and alleviated by a point mutation in alkyl hydroperoxidase AhpC[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(14): 4690-4696.
- [79] QI YJ, WANG JL, LUAN GD, TAN XM, LÜ XF. Cyanobacteria cell factories for ethanol photosynthetic production: development and prospect[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(6): 891-909.
- [80] TURNER WJ, DUNLOP MJ. Trade-offs in improving biofuel tolerance using combinations of efflux pumps[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(10): 1056-1063.
- [81] NIU XF, ZHU Y, PEI GS, WU LN, CHEN L, ZHANG WW. Elucidating butanol tolerance mediated by a response regulator SII0039 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 using a metabolomic approach[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1845-1857.
- [82] CHEN L, WU LN, WANG JX, ZHANG WW. Butanol tolerance regulated by a two-component response regulator Slr1037 in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 1-13.
- [83] GAO XY, SUN T, WU LN, CHEN L, ZHANG WW. Co-overexpression of response regulator genes *slr1037* and *sll0039* improves tolerance of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to 1-butanol[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1476-1483.
- [84] KACZMARZYK D, ANFELT J, SÄRNEGRIM A, HUDSON EP. Overexpression of sigma factor SigB improves temperature and butanol tolerance of *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 182/183: 54-60.
- [85] SUN T, PEI GS, SONG XY, CHEN L, ZHANG WW. Discovery and application of stress-responsive sRNAs in cyanobacteria[M]//*Synthetic Biology of Cyanobacteria*. Singapore: Springer Singapore, 2018: 55-74.
- [86] SUN T, PEI GS, WANG JX, CHEN L, ZHANG WW. A novel small RNA CoaR regulates coenzyme A biosynthesis and tolerance of *Synechocystis* sp. PCC6803 to 1-butanol possibly via promoter-directed transcriptional silencing[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 1-14.
- [87] WANG YX, SHI ML, NIU XF, ZHANG XQ, GAO LJ, CHEN L, WANG JX, ZHANG WW. Metabolomic basis of laboratory evolution of butanol tolerance in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 1-12.
- [88] JAISWAL D, SENGUPTA A, SENGUPTA S, MADHU S, PAKRASI HB, WANGIKAR PP. A novel *Cyanobacterium Synechococcus elongatus* PCC 11802 has distinct genomic and metabolomic characteristics compared to its neighbor PCC 11801[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 191.
- [89] SRIVASTAVA V, AMANNA R, ROWDEN SJL, SENGUPTA S, MADHU S, HOWE CJ, WANGIKAR PP. Adaptive laboratory evolution of the fast-growing

- Cyanobacterium Synechococcus elongatus* PCC 11801 for improved solvent tolerance[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 131(5): 491-500.
- [90] MATSUSAKO T, TOYA Y, YOSHIKAWA K, SHIMIZU H. Identification of alcohol stress tolerance genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 using adaptive laboratory evolution[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 1-9.
- [91] JOHNSON TJ, HALFMANN C, ZAHLER JD, ZHOU RB, GIBBONS WR. Increasing the tolerance of filamentous cyanobacteria to next-generation biofuels via directed evolution[J]. *Algal Research*, 2016, 18: 250-256.
- [92] KIYOTA H, OKUDA Y, ITO M, HIRAI MY, IKEUCHI M. Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO₂[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 185: 1-7.
- [93] ALPER H, MOXLEY J, NEVOIGT E, FINK GR, STEPHANOPOULOS G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production[J]. *Science*, 2006, 314(5805): 1565-1568.
- [94] TAHARA H, MATSUHASHI A, UCHIYAMA J, OGAWA S, OHTA H. SII0751 and SII1041 are involved in acid stress tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Photosynthesis Research*, 2015, 125(1/2): 233-242.
- [95] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [96] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [97] WANG J, ZHAO DD, LI J, HU MZ, XIN XQ, PRICE MA, LI QY, LIU L, LI SW, ROSSER SJ, ZHANG CZ, BI CH, ZHANG XL. Helicase-AID: a novel molecular device for base editing at random genomic loci[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 67: 396-402.
- [98] PAN YJ, XIA SY, DONG C, PAN HJ, CAI J, HUANG L, XU ZN, LIAN JZ. Random base editing for genome evolution in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(10): 2440-2446.
- [99] ESVELT KM, CARLSON JC, LIU DR. A system for the continuous directed evolution of biomolecules[J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 499-503.
- [100] MILLER SM, WANG TN, LIU DR. Phage-assisted continuous and non-continuous evolution[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(12): 4101-4127.
- [101] RICHTER MF, ZHAO KT, ETON E, LAPINAITE A, NEWBY GA, THURONYI BW, WILSON C, KOBLAN LW, ZENG J, BAUER DE, DOUDNA JA, LIU DR. Author correction: phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 901.
- [102] KOBAYASHI I, WATANABE S, KANESAKI Y, SHIMADA T, YOSHIKAWA H, TANAKA K. Conserved two-component Hik34-Rrel module directly activates heat-stress inducible transcription of major chaperone and other genes in *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(2): 260-277.
- [103] YASUDA A, INAMI D, HANAOKA M. RpaB, an essential response regulator for high-light stress, is extensively involved in transcriptional regulation under light-intensity upshift conditions in *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2020, 66(2): 73-79.
- [104] GUYET U, NGUYEN NA, DORÉ H, HAGUAIT J, PITTEA J, CONAN M, RATIN M, CORRE E, Le CORGUILLÉ G, BRILLET-GUÉGUEN L, HOEBEKE M, SIX C, STEGLICH C, SIEGEL A, EVEILLARD D, PARTENSKY F, GARCZAREK L. Synergic effects of temperature and irradiance on the physiology of the marine *Synechococcus* strain WH7803[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1707.
- [105] SUN HL, LUAN GD, MA YF, LOU WJ, CHEN RZ, FENG DD, ZHANG SS, SUN JH, LU XF. Engineered hypermutation adapts cyanobacterial photosynthesis to combined high light and high temperature stress[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1238.
- [106] XIE YR, CHEN L, SUN T, JIANG JJ, TIAN LJ, CUI JY, ZHANG WW. A transporter Slr1512 involved in bicarbonate and pH-dependent acclimation mechanism to high light stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2021, 1862(1): 148336.
- [107] YAO L, SHABESTARY K, BJÖRK SM, ASPLUND-SAMUELSSON J, JOENSSON HN, JAHN M, HUDSON EP. Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1666.

(本文责编 郝丽芳)