

· 综 述 ·

基于糖原代谢调控的蓝细菌光合细胞工厂优化研究进展

郑思妮^{1,2}, 孙绘梨^{2,3,4}, 毛绍名¹, 栾国栋^{2,3,4}, 吕雪峰^{2,3,4}

1 中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物燃料重点实验室, 山东 青岛 266101

3 山东能源研究院, 山东 青岛 266101

4 青岛新能源山东省实验室, 山东 青岛 266101

郑思妮, 孙绘梨, 毛绍名, 栾国栋, 吕雪峰. 基于糖原代谢调控的蓝细菌光合细胞工厂优化研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(2): 592-604.

ZHENG SN, SUN HL, MAO SM, LUAN GD, LÜ XF. Engineering the glycogen metabolism in cyanobacterial photosynthetic cell factories: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 592-604.

摘 要: 蓝细菌是重要的光合自养微生物, 也是最具潜力的光合微生物底盘之一, 被广泛应用于光驱固碳细胞工厂的开发。糖原是蓝细菌最重要的天然碳汇物质, 糖原代谢对蓝细菌光合碳流的分配和调控具有重要意义。为了优化蓝细菌光合细胞工厂的合成效能, 驱动更多的光合碳流重定向至目标代谢产物的合成, 已经有多种策略和方法被成功开发用于调控蓝细菌的糖原代谢和糖原含量。然而, 作为具有全局效应的重要碳汇机制, 针对糖原代谢的调控往往对蓝细菌底盘藻株的光合生理和代谢网络造成复杂的影响, 在不同光合细胞工厂合成效能优化上取得的效果也不尽相同。文中梳理了蓝细菌糖原代谢工程的最新进展, 对糖原代谢调控造成的生理、代谢影响进行了介绍和分析, 进而对通过糖原代谢调控来优化光合细胞工厂效能的研究前景进行了展望。

关键词: 蓝细菌; 光合细胞工厂; 糖原; 代谢工程; 光合作用

Received: March 19, 2021; **Accepted:** April 19, 2021; **Published online:** May 10, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31770092, 32070084)

Corresponding authors: MAO Shaoming. E-mail: msm526@163.com

LUAN Guodong. Tel: +86-532-80662711; E-mail: luangd@qibebt.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31770092, 32070084)

Engineering the glycogen metabolism in cyanobacterial photosynthetic cell factories: a review

ZHENG Sini^{1,2}, SUN Huili^{2,3,4}, MAO Shaoming¹, LUAN Guodong^{2,3,4}, LÜ Xuefeng^{2,3,4}

1 College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

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

3 Shandong Energy Institute, Qingdao 266101, Shandong, China

4 Qingdao New Energy Shandong Laboratory, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: Cyanobacteria are important photosynthetic autotrophic microorganisms and are considered as one of the most promising microbial chassis for photosynthetic cell factories. Glycogen is the most important natural carbon sink of cyanobacteria, playing important roles in regulating its intracellular carbon distributions. In order to optimize the performances of cyanobacterial photosynthetic cell factories and drive more photosynthetic carbon flow toward the synthesis of desired metabolites, many strategies and approaches have been developed to manipulate the glycogen metabolism in cyanobacteria. However, the disturbances on glycogen metabolism usually cause complex effects on the physiology and metabolism of cyanobacterial cells. Moreover, the effects on synthesis efficiencies of different photosynthetic cell factories usually differ. In this manuscript, we summarized the recent progress on engineering cyanobacterial glycogen metabolism, analyzed and compared the physiological and metabolism effects caused by engineering glycogen metabolism in different cyanobacteria species, and prospected the future trends of this strategy on optimizing cyanobacterial photosynthetic cell factories.

Keywords: cyanobacteria; photosynthetic cell factory; glycogen; metabolic engineering; photosynthesis

出现于 35 亿年前的蓝细菌是地球生态环境的重要塑造者和参与者。作为最古老的原核光合自养微生物,蓝细菌光合放氧代谢直接驱动了地球大气环境从无氧到有氧的转变过程;直到现在,广泛分布于海洋、陆地、淡水以及各种极端环境的蓝细菌,仍然贡献了全球范围内 20%左右的总固碳量,为生物圈碳、氮、氧循环提供了必不可少的初级生产力^[1-3]。蓝细菌通过光合作用固定的有机碳除直接用于细胞生长和代谢维持外,很大一部分将通过碳汇机制在胞内储存,以保证胁迫、饥饿条件下能够获得充足的物质和能量以维持正常的代谢和生存^[4-6]。

糖原是最具代表性、也是最重要的蓝细菌天然碳汇物质,作为一种支链 α -葡聚糖大分子,其在动物、真菌和其他细菌细胞中也作为胞内储备碳源而广泛存在^[6]。蓝细菌中,糖原含量受到多种遗传和环境因素的影响,其占细胞生物质干重的比例在 5%–20%的范围,而在某些特殊的种属或特殊的环境条件下甚至可达到 50%以上^[7-8]。

除了重要的进化和生态意义之外,过去 20 年来,蓝细菌还作为一种极具潜力的光合生物技术平台而引起广泛关注。与高等植物、真核微藻和光合细菌等其他光合生物体系相比,

蓝细菌结构相对简单、生长速度更快、遗传操作系统成熟高效^[9]。基于迅速发展的系统生物技术、合成生物技术以及代谢工程技术^[10-11]，可以对蓝细菌的遗传、生理、代谢、形态特征进行定向设计和改造，使之满足在生物合成、生物医疗和环境修复等不同场景进行光合固碳、发挥特定功能的需要^[12-16]。特别是在光驱固碳合成领域，以蓝细菌为平台设计、构建光合细胞工厂，驱动二氧化碳直接定向转化为生物燃料和生物基化学品，已经被视为解决全球能源和资源危机、实现绿色可持续发展的重要技术路线^[9,17-18]。实现高效的蓝细菌光驱固碳合成，其核心在于实现对胞内光合碳流和能量流的定向调控，以促进生物质和生物制品的高效积累^[19-21]。糖原代谢作为蓝细菌中最重要的天然碳汇机制，对其进行人工改造和调控无疑对光合细胞工厂的碳流优化、对提升光驱固碳合成过程的整体效率具有重要意义^[19,22]。

近年来，随着蓝细菌糖原代谢途径的逐渐解析^[23-24]，采用各种合成生物学和代谢工程技术对糖原合成和糖原含量进行定制化改造已经成为现实，在此过程中糖原代谢在蓝细菌光驱能量和物质转化过程中的作用也得到了新的阐释。本文从靶点、策略、效果等层面系统总结了蓝细菌糖原代谢调控的最新进展，介绍了其对糖原代谢扰动的蓝细菌底盘细胞与工程藻株光合生理和代谢的影响，探讨了该策略在未来高效光合细胞工厂和光合生物制造技术开发过程中的应用前景。

1 蓝细菌糖原代谢调控靶点和调控策略

1.1 蓝细菌糖原代谢途径

目前，蓝细菌的糖原代谢途径已经得到清

楚的解析 (图 1)^[25]。从结构上看，蓝细菌糖原是一种大分子量、高分支度的 α -聚葡萄糖，其合成起始于葡萄糖-1-磷酸腺苷转移酶 (glucose-1-phosphate adenylyltransferase, GlgC) 催化前体物质葡萄糖-1-磷酸 (glucose-1-phosphate, G-1-P) 和 ATP 生成葡萄糖-ADP (ADP-glucose, ADP-G)；再由糖原合成酶 (glycogen synthase, GlgA) 催化将 ADP-G 中的糖基部分以 α -1,4-糖苷键连接到糖原分子主链上，实现糖链的延伸；糖原分子的支链则以 α -1,6-糖苷键与主链相连，反应由 1,4- α -葡聚糖分支酶 (1,4-alpha-glucan branching enzyme, GlgB) 催化。糖原的降解和利用途径则相对简单，糖原磷酸化酶 (glycogen phosphorylase, GlgP) 可直接将糖原主链水解生成 G-1-P 单体；糖原去分支酶 (glycogen debranching enzyme, GlgX) 则负责水解连接糖原主链-支链的 α -1,6-糖苷键，以促进分支上葡萄糖残基的释放。蓝细菌糖原代谢网络中，GlgC 的活性被认为是调控糖原合成速率和糖原含量的关键限速步骤^[26]。针对上述代谢靶点，在集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803、聚球藻 (*Synechococcus* sp.) PCC 7942 以及聚球藻 (*Synechococcus* sp.) PCC 7002 等多种模式蓝细菌中已经通过敲除、敲低和过量表达等策略，实现了糖原含量的调节^[27-31]。针对糖原代谢这一具有重要全局影响效应的天然碳汇机制，蓝细菌还进化出了复杂的多层级调控模式，以实现胞内碳代谢对环境变化的快速响应^[32-34]。例如，近期集胞藻 PCC 6803 中一个受全局性氮代谢调控因子 NtcA 激活的碳流调控因子 CfrA (carbon flow regulator A, *sl10994*)，其含量被证实对糖原合成起到决定性调控作用，糖原含量随着该蛋白丰度的提高而增加，而且这种调控作用不依赖于对糖原合成途径活性的影响^[35]。然而，此类调控机制往往对全局层面转录、翻译造成广泛的

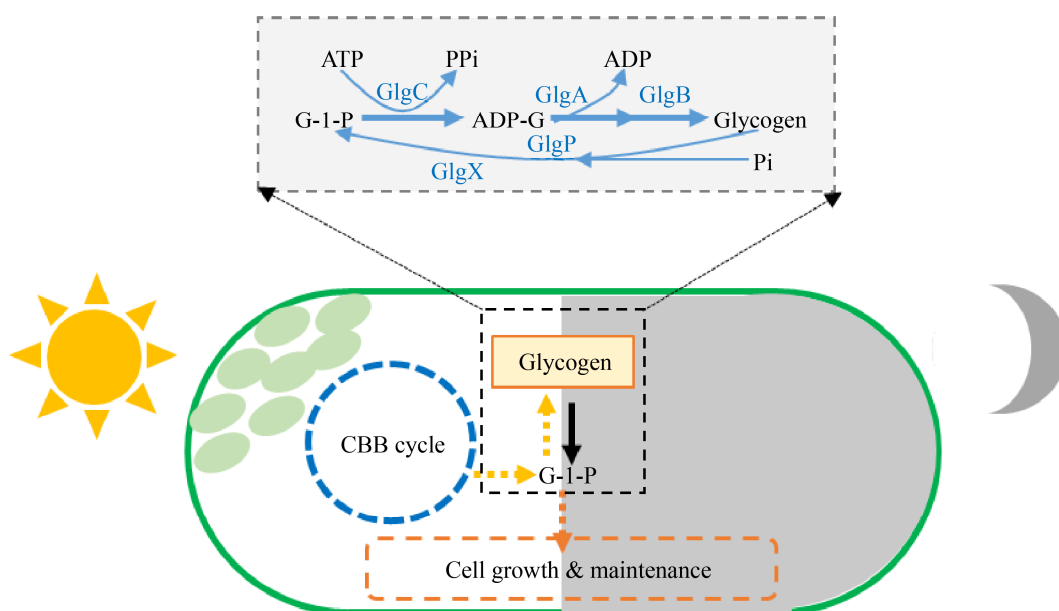


图 1 蓝细菌糖原代谢途径和功能

Figure 1 Glycogen metabolism in cyanobacteria. CBB cycle: Calvin-Benson-Bassham cycle; ATP: adenosine triphosphate; G-1-P: glucose-1-phosphate; ADP-G: ADP-glucose; PPi: pyrophosphate; Pi: inorganic phosphate; ADP: adenosine diphosphate; GlgC: glucose-1-phosphate adenylyltransferase; GlgA: glycogen synthase; GlgB: 1,4- α -glucan branching enzyme; GlgP: glycogen phosphorylase; GlgX: glycogen debranching enzyme.

影响，因此难以有效地从中抽提糖原代谢本身对细胞生理和代谢的影响，因此本文将重点介绍直接围绕糖原代谢途径的认识和改造进展。

1.2 蓝细菌糖原合成的阻断和弱化

在蓝细菌代谢工程领域，普遍地将糖原合成和积累视为目标产物合成的重要竞争途径，通过抑制糖原合成、减少糖原含量，从而将更多的胞内碳流用于细胞生长和产物合成的策略，已经在蓝细菌底盘藻株和细胞工厂优化中进行了广泛的尝试。针对催化糖原合成关键限速基因 *glgC* 的敲除和抑制在降低蓝细菌糖原含量方面取得了最好的效果。2003 年，Miao 等通过同源重组策略成功构建了 *glgC* 基因缺失的集胞藻 PCC 6803 突变株，该藻株完全丧失了糖原合成和积累能力^[27]，随后在聚球藻 PCC 7942 和 PCC 7002 中，*glgC* 的缺失也被证实具有相

同的效果^[29,36]。除了通过基因敲除实现 *GlgC* 催化活性的完全缺失外，采用 CRISPRi、small RNA 等柔性工具调节 *GlgC* 蛋白丰度，进而实现糖原合成和糖原积累情况动态调控的策略也取得了很好的效果。瑞典皇家理工学院的研究人员在集胞藻 PCC 6803 中建立了基于 dCAS9 诱导表达的 CRISPRi 调控平台，在引入靶向于 *glgC* 基因的单链引导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 后，可以诱导实现 *glgC* 基因表达水平的有效下调。在缺氮条件下 (野生型藻株中糖原将大量积累)，可以将 *glgC* 转录水平降低 90%，糖原含量降低 75% 以上^[30]。天津大学张卫文团队则基于 small RNA (sRNA) 工具进行了集胞藻 *glgC* 基因的表达调控研究，以 *glgC* 表达框的 5' 端 24 个碱基为靶标，将具有与之配对序列的 sRNA-MicC 支架以及外源 Hfq 伴侣蛋白共同

表达,成功使 *glgC* 的表达水平降低了 90%以上,糖原含量同样有了 75%以上的下调,与前一个工作在表型上 (*glgC* 表达与糖原含量) 取得很好的印证关系^[31]。上述工作中,CRISPRi 和 sRNA 工具都在转录水平上进行 *glgC* 表达的下调,笔者实验室则在前期工作中,以聚球藻 PCC 7942 为模式,将其天然启动子替换为强启动子 *P_{trc}*,并向 5'非编码区域插入了茶碱响应型核糖开关元件,实现了翻译水平上的 *glgC* 表达控制,通过茶碱剂量的调节有效地实现了糖原含量在野生型藻株水平 40%–300%范围内的调控^[37]。

除 GlgC 外,糖原合成途径另一个关键蛋白 GlgA 同样可作为糖原代谢调控的有效靶点,然而不同藻株中在其改造和调控效果上存在一定的差异。在聚球藻 PCC 7942 中,只有一个 *glgA* 基因,其缺失将导致突变株失去糖原合成能力^[28]。然而,在集胞藻 PCC 6803 和聚球藻 PCC 7002 基因组上则各编码两个 *glgA* 基因。PCC 6803 中,敲除单个 *glgA* 基因对糖原含量几乎不造成影响,而 PCC 7002 中,敲除任意一个 *glgA* 基因都将导致糖原含量下降 40%左右;当 2 个 *glgA* 基因同时失活时,无论是 PCC 6803 还是 PCC 7002 的突变株的糖原积累都将被完全阻断,表明两拷贝的 *glgA* 基因在上述 2 个藻株代谢背景中产生了不同的冗余互补关系^[29,38]。

1.3 蓝细菌糖原降解途径调控

以降低蓝细菌胞内糖原积累、优化光合碳流分配为目标,除了阻断或者弱化石糖原合成外,加强糖原降解是另一种潜在策略,然而迄今都没有成功的报道。糖原降解过程中,糖原磷酸化酶 GlgP 催化糖原支链末端葡萄糖残基磷酸化,以葡萄糖-1-磷酸的形式释放。在集胞藻 PCC 6803 中,2 个 *glgP* (*sll1356* 和 *slr1367*) 基因的敲除都会引起细胞生物量中糖原含量的增加^[24,39]。此前,已有大肠杆菌中通过过量表

达 *glgP* 降低糖原含量的报道^[40],因此理论上蓝细菌中 *glgP* 的过量表达也应该起到加速糖原降解、降低糖原含量、驱动碳流重定向的效果。然而,Ducat 等在聚球藻 PCC 7942 的产蔗糖藻株中验证该策略时发现,过量表达其内源 *glgP*,不仅不能优化蔗糖合成效率,反而使产量降低 10%^[41]。究其原因,蓝细菌中糖原代谢受到细胞内外多种因素的影响,以使其快速响应、发挥储备碳源的作用,而其中 GlgC 作为糖原代谢网络的关键节点,其活性受到多种代谢物的别构抑制和激活。因此糖原降解活性的增强极有可能因为改变胞内营养物质丰度(如无机磷酸盐),进而激活 GlgC 活性,引发代偿性的糖原合成强化,从而无法起到优化蔗糖合成的效果^[42]。

1.4 蓝细菌糖原合成和积累的强化

除了作为重要的生物燃料和生物基化学品光驱固碳合成平台之外,蓝细菌生物质本身也被视为新型的发酵原料来源,从这一角度上分析,提高蓝细菌细胞中糖原合成和积累以作为新型发酵糖原料来源无疑也具有重要意义。除了培养策略优化外,近年来也有部分通过代谢工程改造强化糖原合成、促进糖原积累的研究工作,而其采用的策略可以归纳为强化糖原合成和弱化石糖原降解两条路线。在强化糖原合成方向上,笔者实验室前期报道,在聚球藻 PCC 7942 的衍生工程藻株中,通过过量表达 *glgC* 基因可以有效强化糖原合成,将糖原含量增加 30%–50%,结合下游合成途径优化,促进了盐胁迫条件下蔗糖的合成^[43]。而弱化石糖原降解方向上,Shimakawa 等发现,通过同时敲除集胞藻 PCC 6803 中糖原磷酸化酶 GlgP 的 2 个编码基因 (*slr1356* 和 *sll1367*),可以有效阻断糖原降解,获得 1 个糖原磷酸化活性完全消除的突变株。在持续光照条件下,该藻株的糖原含量相比野生型对照略有提高 (7%);而在昼夜循环

条件下,该藻株的糖原含量在光照阶段和黑暗阶段则相较野生型大幅提升 250%和 450%^[39]。然而需要注意的是,糖原合成和积累强化策略的效果受到培养条件和藻株差异性的影响。Comer 等在聚球藻 PCC 7002 中对过量表达 *glgC* 和敲除 *glgP* 这两种策略的效果进行了直接比较,结果发现在昼夜交替和持续光照 2 种条件下,经过 4–8 d 的培养后,无论是总生物质还是糖原的生产,*glgC* 过表达藻株相比野生型 PCC 7002 都无任何优势,而 *glgP* 缺失藻株的生物量和糖原量则都有了 15%–20% 的提高^[44]。比较而言,阻断糖原降解无疑是提高聚球藻 PCC 7002 含糖生物质合成的更有效的策略。

2 糖原代谢调控在蓝细菌光驱固碳合成中的作用

天然蓝细菌光驱固碳合成技术的一个核心目标是将卡尔文循环中固定下来的有机碳更多地重定向至目标产物的合成途径中,而调控糖原代谢出发点也正是促进碳流重新分配,从而提高各种天然或非天然代谢产品的合成效率。如前所述,随着合成生物学和代谢工程的发展,蓝细菌糖原代谢和糖原合成在一定程度上已经实现了定制化改造,以此为基础,在蓝细菌光驱固碳细胞工厂开发过程中,研究人员大量尝试了通过糖原代谢调控来优化代谢流的策略,本部分将具体介绍这一领域的相关进展(表 1)。

2.1 弱化糖原合成驱动碳流重定向

糖原是蓝细菌最主要的碳汇物质,其含量占细胞干重的比例通常会随着培养时间的延长而逐步增加至 20% 以上,某些藻株中甚至可高达 50%^[8]。在蓝细菌光合细胞工厂开发中,将糖原储存的碳导向目标产物的合成无疑是极具吸引力的选择(图 2A),而该策略在海洋聚球藻

PCC 7002 底盘上开发的细胞工厂优化中取得了最好的应用效果。作为天然具有良好高温高光耐受性、较快生长速度,且可以使用海水进行培养的蓝细菌底盘藻株,PCC 7002 已经被系统地改造,用于进行各类生物燃料和生物基化学品的合成。2014 年, Jacobsen 等在源于 PCC 7002 底盘、可进行甘露醇合成的光合细胞工厂中,同时敲除 2 个 *glgA* 基因,将糖原占细胞干重的比例由 14% 降至检测不到的水平,而甘露醇占总生物量的比例则由 9.5% 提高至 31.8%,也就意味着糖原合成途径的阻断有效促进了碳流向甘露醇合成途径的重新分配^[45]。近期,笔者实验室以 PCC 7002 为底盘进行乙醇光合细胞工厂开发,以 2 个 *glgA* 基因为靶点,同时整合了 2 个乙醇合成途径的编码模块,以期起到同时加强乙醇合成并阻断糖原合成的作用^[46]。糖原合成的阻断在提高乙醇合成效率上取得了良好的效果,携带 1 个乙醇合成途径编码模块并缺失 1 个 *glgA* 基因的藻株,经过 10 d 培养仅能合成约 0.4 g/L 的乙醇,与之相比携带 2 个乙醇合成途径编码模块并缺失全部 2 个 *glgA* 基因的藻株乙醇产量则提高了 5 倍以上,达到 2.2 g/L,表明糖原合成阻断与乙醇合成强化产生了显著的协同效应^[46]。值得注意的是,要将糖原中储存的碳重定向至目标产物的合成,往往还需要结合蓝细菌代谢网络的进一步优化。例如,在重要的模式藻株 PCC 6803 中,除糖原外,聚羟基丁酸酯 (polyhydroxybutyrate, PHB) 的合成也可以起到碳汇的作用,并在糖原合成受阻时得到显著上调以吸收重新分配的碳流,无疑会减弱糖原调控的效果。2016 年, Namakoshi 等在以集胞藻 PCC 6803 为底盘的乙醇光合细胞工厂中敲除糖原合成关键基因 *glgC* 后,将乙醇产量从 210 mg/L 提升至 297 mg/L,而在此基础上阻

断 PHB 合成途径则可以将产量进一步提高至 332 mg/L。采用高密度 (初始接种 OD_{730} 达到 50)、高光强培养策略时,该藻株的乙醇合成强度达到了 2.01 g/(L·d),为已报道的最高水平^[47]。2014 年,James Liao 团队以光驱固碳合成异丁醇的聚球藻 PCC 7942 细胞工厂为模式,采用 ^{13}C 标记结合代谢通量分析的策略对糖原合成途径缺失引发碳流重新分配的影响进行了精确分析,结果表明在对数生长阶段,*glgC* 基因的缺失可以使每个细胞的异丁醇合成效率提高 60%至 80%,胞内碳流向异丁醇的分配比率提高 2.5 倍,达到 52%,充分证明糖原调控对碳流重分配的显著影响^[48]。

2.2 阻断糖原合成驱动有机酸分泌

除了影响基于人工合成途径获得的代谢产物合成外,糖原合成途径的缺失还可以在限氮条件下直接驱动蓝细菌底盘细胞的有机酸合成和分泌。限氮条件下,蓝细菌野生型藻株细胞蛋白合成和细胞增殖受到抑制,而糖原合成将显著上调以储存“过载”的碳流。当糖原合成途径被阻断,通过卡尔文循环固定并持续输入代谢网络的碳流无法被以碳汇形式储存而只能进入三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 等中心代谢途径,进而导致各种有机酸的大量合成并释放至胞外。这种“能量溢出 (energy spilling)”现象作为一种普适的代谢适应策略,已经在多种蓝细菌的糖原缺失株中发现^[49],在部分报道中有机酸的积累量甚至可以占到原本糖原含量的 30%–60%^[38]。不同蓝细菌藻株的糖原缺失株中,合成并分泌的有机酸种类和机制存在一定差别。集胞藻 PCC 6803 底盘的 *glgC* 和 *glgA* 缺失突变体在限氮条件下主要分泌丙酮酸和 α -酮戊二酸 (α -ketoglutaric acid, AKG)^[38,50],而且 ^{13}C 标记的代谢通量分析证实了这些有机酸的合成主要源于光合作

用中新固定的碳,而非胞内原先储存的碳,其合成和分泌量还会随着光照强度的提高 (光合效率提高) 而增加^[50]。而聚球藻 PCC 7942 的糖原缺失突变体,在限氮环境下则主要合成和分泌琥珀酸、富马酸和 α -酮戊二酸,且其分泌效率与培养环境的 pH 值密切相关,只有当培养基的 pH 达到 10 以上时才能检测到明显的有机酸分泌^[51]。聚球藻 PCC 7002 中,糖原合成缺失突变体在限氮条件下合成并分泌的有机酸类型与 PCC 6803 和 PCC 7942 存在显著差异,可以在其培养基中检测到丙酮酸、琥珀酸、乙酸酯、 α -酮戊二酸和 α -酮基异己酸等多种产物,且以 α -酮基异己酸为主,其比例随着限氮培养时间的延长而逐渐增加^[52]。未来,结合相关合成途径和分泌机制的理性改造和优化,糖原合成缺失型蓝细菌底盘的有机酸合成效率有望得到进一步提升。

2.3 强化糖原合成扩大储备碳库

在上述例子中,蓝细菌光合细胞工厂的产物合成与细胞生长为偶联状态,在“边生长,边合成”的模式下,糖原合成与目标产物合成将竞争光合作用中固定下来的有机碳流。阻断糖原合成,有利于碳流向目标产物合成的重定向。然而,当目标产物的合成和积累与细胞生长完全或者部分解除耦合关系时,糖原积累与目标产物合成之间将不再具有直接竞争关系,在这种“先生长,再合成”的模式下,糖原合成反而需要进行强化以利于产物合成 (图 2B)。蓝细菌在盐胁迫环境下,将在胞内合成并积累蔗糖等相容性物质以抵御高渗胁迫;向蓝细菌中导入来自大肠杆菌的蔗糖透性酶基因 *cscB* 即可驱动蔗糖分泌至胞外并大幅提高蔗糖产量^[41]。笔者实验室在前期研究中开发了基于聚球藻 PCC 7942 的两阶段产糖策略,即先在正常条件下培养细胞积累生物量,继而对细胞进行盐胁迫进

行蔗糖合成和分泌,在此种模式下,蓝细菌的糖原代谢与蔗糖合成表现出复杂的互作关系。在产糖工程藻株 (PCC 7942-*ΔNS3::cscB*) 中,使用茶碱响应型核糖开关调控蔗糖合成关键基因 *glgC* 表达和糖原含量,结果表明糖原合成的逐步抑制和糖原含量的逐步降低无法促进而会抑制盐胁迫环境下蔗糖的合成和积累。而另一方面,当使用强启动子 *PcpcB* 进行 *glgC* 过量表达时,糖原含量的提高也无法直接提高蔗糖的产量;但在此基础上结合蔗糖合成途径的强化时,也即同时过量表达蔗糖合成关键基因蔗糖-6 磷酸合成酶与糖原合成关键酶 *GlgC* 时,才可以最终实现蔗糖产量的显著增加^[43]。在该研究中,蓝细菌工程藻株的细胞被培养至对数末期,而加入盐胁迫诱导蔗糖合成时,细胞生长则完全被抑制。在该模式下,前期 *glgC* 过量表达促进了细胞中糖原含量的增加,在后期进入蔗糖合成阶段时,储备的糖原起到了碳库的作用,结合蔗糖合成途径的强化,就可以驱动更多的碳流用于蔗糖合成^[42]。

2.4 强化糖原合成驱动代谢链延伸

在上述蓝细菌蔗糖合成细胞工厂的代谢网络改造中,糖原合成和积累作为“碳库”以“储碳-释碳”的模式调节蔗糖的合成,过量表达 *glgC* 以加强糖原的合成和积累在第一阶段细胞生物量积累过程中起作用,而第二阶段则是糖原中储存的碳“释放”至中心代谢发挥作用。近期,笔者实验室又发现了强化糖原合成以提高目标产物合成效率的一种新作用模式(图 2C)。在进行蓝细菌光驱固碳合成海藻糖细胞工厂的开发中,以糖原为直接转化前体的“麦芽寡糖基海藻糖合酶 *maltooligosyl trehalose synthase*-麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶 *maltooligosyl trehalose trehalohydrolase* (MTS-MTH 途径)”被证明具有

最高的合成效率,工程藻株中的糖原先由 MTS 转化为麦芽寡糖基海藻糖,进而被 MTH 水解生成海藻糖单体。在此基础上,设计了过量表达 *glgC* 以增加糖原合成,为 MTS-MTH 途径提供更多转化底物的策略,结果成功使海藻糖产糖提高 15%^[53]。该工作中,加强的糖原合成不再是作为碳库,而是作为海藻糖合成前体而发挥直接作用,也为采用了类似途径的蓝细菌光驱固碳合成细胞工厂的改造提供了良好的借鉴。

3 糖原代谢调控在蓝细菌细胞中的生理效应

如上所述,蓝细菌糖原代谢调控在改变细胞光合碳流分配、优化目标产物合成效率上取得了良好的应用效果。然而,作为蓝细菌适应昼夜循环和环境波动的主要碳汇机制,糖原代谢的扰动往往还会对细胞的生理鲁棒性(生长和抗逆)造成影响,甚至进而影响光合细胞工厂的合成效能,而这将是下一步以糖原代谢为靶点,进行更高效代谢工程策略开发过程中需要考虑的重要因素。

3.1 糖原合成缺陷对蓝细菌适应黑暗和昼夜循环条件的影响

自然环境中蓝细菌的糖原储备主要支持其黑暗条件下无法进行光合作用时的生长和代谢所需。在黑暗状态下,糖原作为细胞异化代谢的主要底物,以保证细胞中能量状态的维持,因此糖原合成和糖原积累的阻断无疑将严重影响蓝细菌在昼夜循环条件下的生长和代谢^[49]。集胞藻 PCC 6803 的 *glgC* 和 *glgA* 缺失突变体在昼夜交替条件下与野生型藻株相比细胞活力显著降低,其平板培养的菌落形成率降低 10 倍以上^[38]。而聚球藻 PCC 7942 和聚球藻 PCC 7002 的糖原合成缺陷型突变体在黑暗条件下,呼吸

表 1 糖原代谢调控对蓝细菌光驱固碳合成的影响

Table 1 Effects of engineering glycogen metabolism on cyanobacterial photosynthetic biosynthesis

Hosts	Products	Strategies & Genotypes	Effects	References
PCC 7002	Mannitol	Blocking glycogen synthesis; <i>ΔglgAI-ΔglgAII</i>	Glycogen contents in biomass were reduced from 14% to undetected levels, mannitol contents were increased from 9.5% to 31.8%	[45]
PCC 7002	Ethanol	Blocking glycogen synthesis coupled with enhancing ethanol synthesis; <i>ΔglgAI:PrbcL-pdcZM-slr1192-ΔglgAII-PrbcL-pdcZM-slr1192</i>	Ethanol production was increased from 0.4 g/L to 2.2 g/L	[46]
PCC 6803	Ethanol	Blocking glycogen synthesis; <i>ΔglgC</i>	Ethanol production was increased from 210 mg/L and 47.7 mg/(g DCW·d) to 297 mg/L and 70.5 mg/(g DCW·d)	[47]
PCC 7942	Isobutanol	Blocking glycogen synthesis; <i>ΔglgC</i>	Intracellular carbon partitioning ratio to isobutanol was increased by 2.5-fold (to 52%)	[48]
PCC 7942	Sucrose	Enhancing glycogen synthesis to enlarge the “carbon pool” for sucrose production; <i>NS2::PcpcB-glgC</i>	Glycogen contents were increased from 300 to 500 mg/g DCW, and sucrose production was increased from 400 to 500 mg/g DCW	[43]
PCC 7942	Trehalose	Enhancing glycogen synthesis to provide more precursor for trehalose synthesis; <i>NS2::PcpcB-glgC</i>	Glycogen contents were not significantly influenced and trehalose production was increased by 15%	[53]

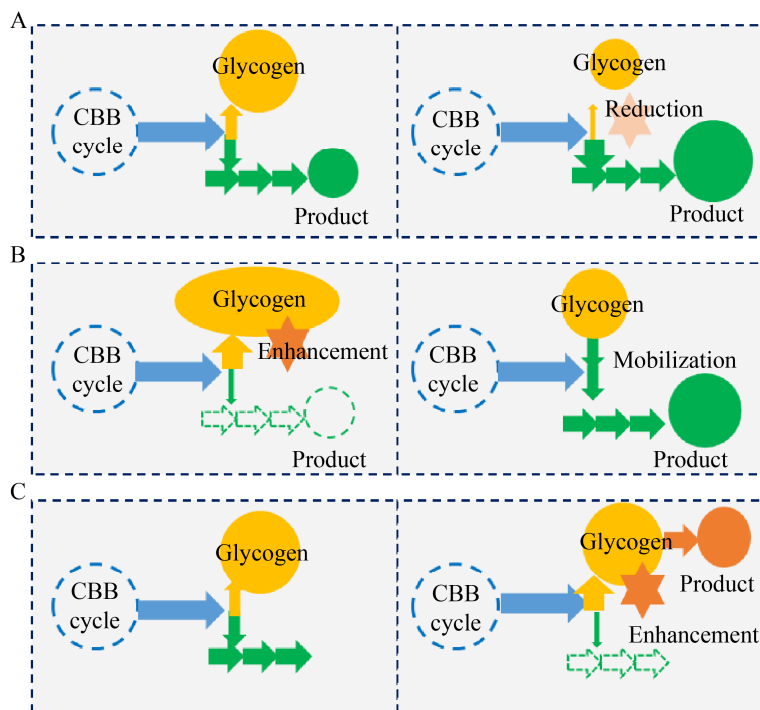


图 2 蓝细菌光合细胞工厂的糖原代谢调控策略

Figure 2 Engineering glycogen metabolism to optimize cyanobacterial photosynthetic cell factories. (A) Blocking or weakening glycogen synthesis to drive more carbon flow toward production of the desired metabolites. (B) A two-step mode including the enhancement of synthesis and storage of glycogen and the mobilization of the stored glycogen. (C) Enhancing glycogen synthesis to facilitate the production of desired metabolites which use glycogen as a precursor.

速率相比野生型对照会降低 50%以上,充分表明糖原作为主要的碳汇物质,支撑细胞在黑暗状态下维持代谢的重要意义。

3.2 糖原合成缺陷对蓝细菌光合生长的影响

传统上普遍认为糖原主要作为蓝细菌光合生理和代谢的储备碳源,用于支持黑暗或者饥饿状态下的细胞生长和维持,然而针对糖原合成缺陷的蓝细菌突变株的分析发现,即使在持续光照条件下糖原合成和糖原储备的缺失也会对细胞光合放氧和正常生长产生不利影响。以集胞藻 PCC 6803 为例,2003 年 Miao 等首次报道,敲除 *glgC* 基因将导致突变株细胞在持续光照条件下放氧速率降低 25%^[27];2012 年,Gründel 等则报道 2 个 *glgA* 基因同时失活也将使 PCC 6803 的光合放氧速率下降 20%左右^[38]。类似现象随后在其他藻株中也同样被发现,在聚球藻 PCC 7942 的 *glgA* 和 *glgC* 的缺失突变体中,其最大光合放氧速率甚至降低 50%以上^[28-29,36]。伴随光合光氧活性降低,糖原合成缺陷藻株的固碳能力和生长速度也会相应受到影响。¹³C 标记代谢通量分析显示,PCC 7942 和 PCC 7002 中,*glgC* 基因的缺失突变体固碳效率分别降低 28%和 15%,而细胞生长和生物量积累的速率也相应下降^[48,54]。

蓝细菌糖原合成缺陷藻株中光合生长能力的降低可能是“碳汇限制 (sink limitation)”机制引发的。作为天然碳汇机制,糖原的合成主要接受光合碳流和能量流中超过细胞正常生长和维持之外的“溢出”部分,当糖原合成被抑制时,细胞中心代谢不足以完全消耗全部光合碳流时,则可能以类似反馈抑制的模式对细胞的光合和固碳活性进行限制。从这一角度分析,理论上可以通过人工碳汇机制的引入来对糖原合成缺陷导致的光合能力损伤进行修复。James

Liao 团队利用聚球藻 PCC 7942 进行异丁醇合成研究结果证实了上述假设。如前所述,PCC 7942 的 *glgC* 基因缺失突变体中,光合固碳效率降低了 28%,细胞生长也受到抑制;而在此基础上引入异丁醇合成途径则可以一定程度上解除上述抑制效应,且光合固碳能力的恢复程度与异丁醇的合成效率成正比^[48]。上述结果充分表明,将糖原代谢调控与人工代谢合成途径的设计优化结合起来,有望同时达到缓解生理鲁棒性损伤并实现碳流重定向的效果,进而驱动光合细胞工厂中二氧化碳向目标产物的稳定转化。

3.3 糖原合成缺失对蓝细菌逆境胁迫耐受能力的影响

除了影响蓝细菌正常培养条件的光合生长外,蓝细菌的糖原合成缺失突变株对逆境胁迫环境的适应能力往往也受到一定程度的影响。例如,集胞藻 PCC 6803 中 *glgC* 与 *glgA* 缺失都将导致细胞对高光胁迫敏感性显著提高^[38],PCC 7942 中相应的突变体也出现光饱和点下降的缺陷^[28]。而耐盐性的降低则是蓝细菌糖原合成缺失突变株中存在的另一种普遍现象,在集胞藻 PCC 6803、聚球藻 PCC 7942 以及 PCC 7002 的多种 *glgA* 和 *glgC* 缺失突变体中都得到证实^[27-29,36]。蓝细菌糖原合成缺失突变株逆境胁迫耐受能力的下降可能也与其碳汇机制的损伤密切相关。面对逆境胁迫,蓝细菌细胞需要更充足的物质和能量供应以维持内稳态;而另一层面上,逆境胁迫往往又会损伤蓝细菌的光合系统,降低光合效率,进一步加剧胞内能量供应的不足。2018 年,Cano 等证实糖原合成/降解循环在蓝细菌能量缓冲机制中起到决定性作用^[49]。同样,野生型藻株中糖原储存也可能通过提供额外的物质和能量来间接参与到逆境胁迫耐受过程中;而糖原缺陷株也可能因为缺乏类似的机制而导致抵抗逆境胁迫能力的降低^[42]。

着眼未来光合生物制造技术的工程化、规模化应用, 针对逆境胁迫的适应能力和耐受能力将是蓝细菌光合细胞工厂开发中必须考虑的因素。户外、开放式培养过程中, 蓝细菌光合细胞工厂对极端温度和光照、对培养液中的高盐和高 pH 冲击、对各种毒性代谢中间体和终端产物的耐受能力, 将很大程度上决定大体积、长时间生产过程中二氧化碳是否能够稳定、高效地转化为目标产物。基于此, 因为糖原代谢调控而造成的细胞生理适切性和鲁棒性损伤将有必要采取其他改造策略进行修补^[14,55]。

4 总结与展望

蓝细菌光合生物制造技术发展为同时实现固碳减排和绿色合成的目标提供了理想的解决方案, 而优质的蓝细菌光合细胞工厂则是光合生物制造技术的核心, 从根本上决定了太阳能驱动下二氧化碳资源化、高值化利用的效率和稳定性。作为蓝细菌中最重要、最具代表性的天然碳汇机制, 糖原代谢长期以来一直是光合细胞工厂开发和优化过程中重要的调控靶点。在阐明糖原代谢网络的基础上, 随着各种基因操作工具的不断发展和策略已经逐渐成熟, 在光合细胞工厂改造和优化过程中的应用也取得了一定的成效。然而需要注意的是, 糖原除了作为蓝细菌中最重要天然碳汇物质, 发挥“缓存”碳流和能量流的作用之外, 还对蓝细菌细胞抵抗逆境胁迫、调节氧化还原平衡等生理功能具有重要意义。因此, 虽然调节糖原代谢可以调控蓝细菌光合碳流分配, 一定程度上驱动更多的碳分配至目标产物的合成途径中, 但该策略同时也会对细胞的生理适切性和鲁棒性造成损伤, 影响细胞的光合固碳效率和逆境胁迫耐受能力。因此, 未来蓝细菌高效光驱固碳细胞工厂

的设计和优化过程中, 在通过糖原代谢调控优化碳流的同时, 也有必要针对可能被糖原代谢影响的生理和代谢参数, 如氧化还原平衡、ATP/NADPH 平衡、光合固碳-呼吸比等, 进行适配性调整和优化, 甚至引入新的保护和缓冲机制, 以消除糖原代谢扰动造成的不利影响。同时, 针对糖原合成缺陷型蓝细菌工程藻株在适应昼夜循环、黑暗环境方面的不足, 实现稳定、持续的光合生物制造过程, 结合光伏、储能技术开发新的蓝细菌培养体系和工程设备也将是值得考虑的方向。

REFERENCES

- [1] Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, et al. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature*, 1979, 277(5694): 293-294.
- [2] Rousseaux C, Gregg W. Interannual variation in phytoplankton primary production at a global scale. *Remote Sens*, 2013, 6(1): 1-19.
- [3] Flombaum P, Gallegos JL, Gordillo RA, et al. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(24): 9824-9829.
- [4] Damrow R, Maldener I, Zilliges Y. The multiple functions of common microbial carbon polymers, glycogen and PHB, during stress responses in the non-diazotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front Microbiol*, 2016, 7: 966.
- [5] Nakamura Y, Takahashi J, Sakurai A, et al. Some cyanobacteria synthesize semi-amylopectin type alpha-polyglucans instead of glycogen. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(3): 539-545.
- [6] Ball SG, Morell MK. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 207-233.
- [7] Aikawa S, Nishida A, Ho SH, et al. Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 88.
- [8] Song K, Tan XM, Liang YJ, et al. The potential of *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 for sugar feedstock production. *Appl Microbiol Biotechnol*,

- 2016, 100(18): 7865-7875.
- [9] Angermayr SA, Hellingwerf KJ, Lindblad P, et al. Energy biotechnology with cyanobacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(3): 257-263.
- [10] Sengupta A, Pakrasi HB, Wangikar PP. Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(13): 5457-5471.
- [11] Sun T, Li S, Song X, et al. Toolboxes for cyanobacteria: recent advances and future direction. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1293-1307.
- [12] Lin TY, Wen RC, Shen CR, et al. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural to 2,5-furandicarboxylic acid by a syntrophic consortium of engineered *Synechococcus elongatus* and *Pseudomonas putida*. *Biotechnol J*, 2020, 15(6): e1900357.
- [13] Huo M, Wang L, Zhang L, et al. Photosynthetic tumor oxygenation by photosensitizer-containing cyanobacteria for enhanced photodynamic therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(5): 1906-1913.
- [14] Luan G, Lu X. Tailoring cyanobacterial cell factory for improved industrial properties. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(2): 430-442.
- [15] Zhang MY, Qiao CC, Luan GD, et al. Systematic identification of target genes for cellular morphology engineering in *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1608. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01608.
- [16] Fedeson DT, Ducat DC. Cyanobacterial surface display system mediates engineered interspecies and abiotic binding. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(2): 367-374.
- [17] Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(12): 1177-1180.
- [18] Lu XF. A perspective: photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6): 742-746.
- [19] Zhou J, Zhu T, Cai Z, et al. From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 2.
- [20] Angermayr SA, Paszota M, Hellingwerf KJ. Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(19): 7098-7106.
- [21] Chwa JW, Kim WJ, Sim SJ, et al. Engineering of a modular and synthetic phosphoketolase pathway for photosynthetic production of acetone from CO₂ in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 under light and aerobic condition. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(8): 1768-1776.
- [22] Xue Y, He QF. Cyanobacteria as cell factories to produce plant secondary metabolites. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 3: 57. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00057.
- [23] Miao X, Wu Q, Wu G, et al. Changes in photosynthesis and pigmentation in an *agp* deletion mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp.. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(5): 391-396.
- [24] Fu J, Xu X. The functional divergence of two *glgP* homologues in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 260(2): 201-209.
- [25] Zilliges Y. Glycogen, a dynamic cellular sink and reservoir for carbon. *The cell biology of cyanobacteria*. Norfolk: Caister Academic Press, 2014: 189-210.
- [26] Wilson WA, Roach PJ, Montero M, et al. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34(6): 952-985.
- [27] Miao X, Wu Q, Wu G, et al. Sucrose accumulation in salt-stressed cells of *agp* gene deletion-mutant in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 218(1): 71-77.
- [28] Suzuki E, Ohkawa H, Moriya K, et al. Carbohydrate metabolism in mutants of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 defective in glycogen synthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(10): 3153-3159.
- [29] Xu Y, Guerra LT, Li Z, et al. Altered carbohydrate metabolism in glycogen synthase mutants of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: cell factories for soluble sugars. *Metab Eng*, 2013, 16: 56-67.
- [30] Yao L, Cengic I, Anfelt J, et al. Multiple gene repression in cyanobacteria using CRISPRi. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(3): 207-212.
- [31] 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.
- [32] Iijima H, Watanabe A, Takanobu J, et al. *rre37* overexpression alters gene expression related to the tricarboxylic acid cycle and pyruvate metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci World J*, 2014: 921976.
- [33] Mo H, Xie X, Zhu T, et al. Effects of global transcription factor NtcA on photosynthetic production of ethylene in recombinant *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 145.
- [34] Kaniya Y, Kizawa A, Miyagi A, et al. Deletion of the

- transcriptional regulator cyAbrB2 deregulates primary carbon metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol*, 2013, 162(2): 1153-1163.
- [35] Muro-Pastor MI, Cutillas-Farray Á, Pérez-Rodríguez L, et al. CfrA, a novel carbon flow regulator, adapts carbon metabolism to nitrogen deficiency in cyanobacteria. *Plant Physiol*, 2020, 184(4): 1792-1810.
- [36] Guerra LT, Xu Y, Bennette N, et al. Natural osmolytes are much less effective substrates than glycogen for catabolic energy production in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J Biotechnol*, 2013, 166(3): 65-75.
- [37] Chi X, Zhang S, Sun H, et al. Adopting a theophylline-responsive riboswitch for flexible regulation and understanding of glycogen metabolism in *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Front Microbiol*, 2019, 10: 551.
- [38] Gründel M, Scheunemann R, Lockau W, et al. Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, 2012, 158(12): 3032-3043.
- [39] Shimakawa G, Hasunuma T, Kondo A, et al. Respiration accumulates Calvin cycle intermediates for the rapid start of photosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78(12): 1997-2007.
- [40] Alonso-Casajús N, Dauvillée D, Viale AM, et al. Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* Gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2006, 188(14): 5266-5272.
- [41] Ducat DC, Avelar-Rivas JA, Way JC, et al. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(8): 2660-2668.
- [42] Luan G, Zhang S, Wang M, et al. Progress and perspective on cyanobacterial glycogen metabolism engineering. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(5): 771-786.
- [43] Qiao CC, Duan YK, Zhang MY, 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(2): e02023-e02017.
- [44] Comer AD, Abraham JP, Steiner AJ, et al. Enhancing photosynthetic production of glycogen-rich biomass for use as a fermentation feedstock. *Front Energy Res*, 2020, 8: 93. DOI: 10.3389/fenrg.2020.00093.
- [45] Jacobsen JH, Frigaard NU. Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO₂ in a cyanobacterium. *Metab Eng*, 2014, 21: 60-70.
- [46] Wang M, Luan GD, Lu XF. Engineering ethanol production in a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002 through simultaneously removing glycogen synthesis genes and introducing ethanolgenic cassettes. *J Biotechnol*, 2020, 317: 1-4.
- [47] Namakoshi K, Nakajima T, Yoshikawa K, et al. Combinatorial deletions of *glgC* and *PhaCE* enhance ethanol production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biotechnol*, 2016, 239: 13-19.
- [48] Li X, Shen CR, Liao JC. Isobutanol production as an alternative metabolic sink to rescue the growth deficiency of the glycogen mutant of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Photosynth Res*, 2014, 120(3): 301-310.
- [49] Cano M, Holland SC, Artier J, et al. Glycogen synthesis and metabolite overflow contribute to energy balancing in cyanobacteria. *Cell Rep*, 2018, 23(3): 667-672.
- [50] Carrieri D, Paddock T, Maness PC, et al. Photo-catalytic conversion of carbon dioxide to organic acids by a recombinant cyanobacterium incapable of glycogen storage. *Energy Environ Sci*, 2012, 5(11): 9457.
- [51] Benson PJ, Purcell-Meyerink D, Hocart CH, et al. Factors altering pyruvate excretion in a glycogen storage mutant of the cyanobacterium, *Synechococcus* PCC7942. *Front Microbiol*, 2016, 7: 475.
- [52] Jackson SA, Eaton-Rye JJ, Bryant DA, et al. Dynamics of photosynthesis in a glycogen-deficient *glgC* mutant of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(18): 6210-6222.
- [53] Qiao Y, Wang W, Lu X. Engineering cyanobacteria as cell factories for direct trehalose production from CO₂. *Metab Eng*, 2020, 62: 161-171.
- [54] Hendry JJ, Prasanna C, Ma F, et al. Rerouting of carbon flux in a glycogen mutant of cyanobacteria assessed via isotopically non-stationary ¹³C metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(10): 2298-2308.
- [55] Gao XY, Sun T, Pei GS, et al. Cyanobacterial chassis engineering for enhancing production of biofuels and chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(8): 3401-3413.

(本文责编 郝丽芳)