

# 进化工程在蓝细菌生物学和生物技术研究中的应用\*

马依凡<sup>1,2,3</sup> 孙绘梨<sup>3,4,5\*\*</sup> 毛绍名<sup>1,2\*\*</sup> 栾国栋<sup>3,4,5</sup> 吕雪峰<sup>3,4,5</sup>

(1 中南林业科技大学生命科学与技术学院 长沙 410004)

(2 中南林业科技大学 林业生物技术湖南省重点实验室 长沙 410004)

(3 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)

(4 山东能源研究院 青岛 266101 5 青岛新能源山东省实验室 青岛 266101)

**摘要** 蓝细菌是光合作用、叶绿体起源和植物进化等基础生物学研究的重要模式生物,也作为极具潜力的微生物光合平台在固碳合成领域引起广泛关注。蓝细菌基础生物学研究和生物技术开发过程中面临大量的复杂生理和代谢表型改造需求,理性的靶向改造技术往往难以取得理想效果。进化工程不依赖于对微生物遗传背景和代谢网络的认识,在微生物复杂生理耐受表型改造和相关功能机制解析方面有着显著的技术优势,在蓝细菌基础生物学和生物技术研究中也发挥了重要作用。结合进化工程的技术特点和实施案例,在蓝细菌基础科学机制解析和光合生物制造技术开发两条路线上,对进化工程的应用进展进行了总结并对未来发展方向进行了展望。

**关键词** 蓝细菌 进化工程 生理耐受性 适应性进化 光合作用

**中图分类号** Q93-3

进化工程(evolutionary engineering)又称适应性实验室进化(adaptive laboratory evolution,ALE),是指模拟自然界“物竞天择、适者生存”的进化规律,在具有选择压力的特定环境条件下对微生物细胞进行长期传代培养,通过筛选和富集基因组优势突变,获得具有目标表型的进化菌株的微生物育种技术<sup>[1]</sup>。适应性实验室进化实验最早报道于20世纪50年代,即Novick和Szilard<sup>[2]</sup>在恒化器培养过程中诱导大肠杆菌自发突变;类似技术后来被广泛应用于大肠杆菌、酵母等模式微生物以及工业微生物的研究和改造中,在提高细胞生理耐受性、底物利用谱及目标代谢物产量等特性上取得了良好的应用效果<sup>[3,4]</sup>。近年来,随着生物信息学和DNA测序技术的发展,通过对进化工程菌株进行多维组学分析,结合生理生化测试,还可以对决定进化表型的内在机制进行解析,进而指导新一代工业微生物的理性设计与改造<sup>[1]</sup>。

蓝细菌是一类能够进行放氧型光合作用的原核微生物,被认为是地球上最古老和最大的细菌类群之一<sup>[5]</sup>。根据古生物化石分析发现,蓝细菌可能现于34亿年前,是最早的放氧生物,对地球含氧环境生成和生物圈发展维持起到了至关重要的作用<sup>[6-9]</sup>。此外,蓝细菌能够放氧、固碳和固氮<sup>[10-11]</sup>这三种特性,使其成为地球生态系统三大重要元素的提供者,在地球生物化学循环中发挥着重要作用。蓝细菌被认为与植物叶绿体具有相同祖先,其光合作用机制与高等植物和真核微藻高度相似<sup>[12]</sup>,而且具有结构简单、生长快速、生活史简单、遗传操作便捷等特点,因此蓝细菌一直作为模式生物被应用于光合作用、叶绿体起源和植物进化等基础生物学研究<sup>[13]</sup>。近年来,蓝细菌又被视为极具潜力的微生物光合平台,能够利用光能将二氧化碳和水转化为生物质和各类代谢产物,达到固碳减排和清洁生产的双重效果;应用合成生物学和代谢工程技术,蓝细菌天然代谢网络还能够得到有效重塑和拓展,用于各类非天然代谢产物的合成<sup>[14-19]</sup>,在生物燃料和生物基化学品绿色合成方面展现了巨大潜力。

收稿日期:2023-05-06 修回日期:2023-05-31

\* 国家自然科学基金(32270103、32070084)资助项目

\*\*通讯作者,电子邮箱:sunhl@qibebt.ac.cn;msm526@163.com

无论是面向重要生理和代谢机制解析的蓝细菌基础生物学研究,还是面向固碳合成的蓝细菌光合生物制造技术开发,都面临大量涉及细胞生长、抗逆、光合、固碳等复杂表型的改造需求。于前者而言,为解析未知的生理代谢机制,往往以获得具有特定表型的突变体为前提,在此基础上结合系统生物学技术逆向挖掘功能突变及相关机制;于后者而言,蓝细菌平台相比大肠杆菌、酿酒酵母等模式生物体系缺乏高效、丰富的遗传操作工具,各类复杂、多维表型的改造难以通过理性设计和靶向操作的技术流程完成,而更多依赖于非理性、非靶向式的菌株改造模式。针对上述背景,进化工程以其不依赖于对遗传背景和基因型-表型关系的先验知识的“黑箱”式操作模式而发挥重要作用<sup>[20]</sup>。本文将结合近期进化工程技术发展趋势和成功应用案例,从基础科学机制解析和光合生物制造技术开发两个方向对进化工程在蓝细菌菌株改造领域的应用进行介绍和展望。

1 进化工程的原理和方法

进化工程模拟自然的“变异-选择”过程,在一定选

择压力下,人工筛选出具有特定优良性状的菌株。变异是微生物群体中基因型和表型多样性的来源,这是获得具有目标表型进化菌株的基础。选择决定进化方向,合适的选择压力和筛选策略对进化效率至关重要。

1.1 变异来源

根据变异来源,在蓝细菌中应用的进化工程方法包括长期适应性实验室进化、理化诱变、转座子诱变、CRISPRi 和超突变进化(表 1)。在长期适应性实验室进化中,天然情况下细胞的自发突变提供了进化动力,然而细胞基因组复制保真性极高,尽管蓝细菌具有相对较快的生长速率和较大的种群规模,但通过连续传代以积累自发有利突变往往要经历较长的时间周期。例如,在集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 藻株(以下简称集胞藻 PCC 6803)的镉离子耐受性进化过程中,Xu 等<sup>[21]</sup>经过 802 天(128 代)的连续传代,才将集胞藻 PCC 6803 的镉离子耐受限度从 4.6  $\mu\text{mol/L}$  提高到至 9.0  $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 不同变异引入方法的优缺点比较

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of different mutation introduction methods

类型	策略	优点	缺点
自发突变	在选择压力下进行长期连续传代以积累自发突变	利用自然存在的变异机制,无须额外实验干预,技术难度低	1. 进化周期长;2. 人力成本较高;3. 变异位点随机,无法控制变异范围
理化诱变	使用最佳剂量的 UV、MNNG、MMS 或 EMS 对细胞进行诱变处理,然后在特定选择压力下筛选或在逐渐升高的选择压力下进行传代,在传代中通常结合多种理化诱变因子进行多轮处理	丰富变异类型,提高突变频率	1. 造成大量细胞损伤,降低效率;2. 引入大量变异,其中可能包括较多的无用或不利突变;3. 变异位点随机,无法控制变异范围
转座子诱变	构建体内转座子标记诱变系统,然后在特定选择压力下筛选,或直接观测特定表型并筛选	1. 可以引发随机或定向突变;2. 便于定位转座子的插入基因或位置	1. 转座子插入位置可能具有一定偏好性,限制突变范围;2. 多数会导致基因表达中断,偶尔会引发蛋白质功能改变,因此变异类型有限;3. 对基因组进行饱和突变的成本较高
CRISPRi 抑制文库	合成针对目标基因或目标途径的 gRNA,构建 CRISPRi 文库并转化蓝细菌构建突变体文库。然后在特定选择压力下筛选,或直接观测特定表型并筛选	能够对特定基因或途径进行精确抑制	1. 只能导致基因抑制;2. 针对大范围基因设计合成 gRNA 的成本较高
超突变技术	敲除或过表达细胞复制保真机制中的关键基因,并使用环境胁迫诱发细胞的超突变状态,然后在特定选择压力下筛选,或在逐渐升高的选择压力下进行传代培养	1. 较高突变率可以缩短进化周期,并提高进化效率;2. 边诱变边筛选的体内连续诱变方式减少了人工干预;3. 引入突变的方式较为温和,筛选获得的进化藻株中无用或不利突变较少	1. 变异位点随机,无法控制变异范围;2. 面对不同胁迫类型和胁迫强度,需要探索适配的突变率强度

为了提高蓝细菌进化效率,往往需要进行人工干预,打破基因组复制的高度保真模式,提高细胞传代过程的变异率。理化因子诱变是微生物育种领域最经典的人工干预手段,目前在蓝细菌中应用的理化诱变手段包括 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍 (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, MNNG)、甲基磺酸甲酯 (methylmethanesulphonate, MMS)、甲基磺酸乙酯 (ethyl methane sulfonate, EMS) 等三种化学诱变剂和紫外线 (UV) 物理诱变策略 (图 1)。不同诱变方法导致的变异类型有所差异。例如, MMS 可以烷基化 DNA, 多数形成 GC 到 TA 或 TA 到 GC 的转变, UV 诱导 DNA 中嘧啶二聚体形成, 主要导致鸟嘌呤/胞嘧啶到腺苷/胸腺嘧啶的转变<sup>[22]</sup>, 因此在进化工程实践过程中通常交替使用不同类型的诱变方法以丰富变异类型。例如, Dann 等<sup>[23]</sup> 对平行传代的 6 个批次的集胞藻 PCC 6803 细胞以不同实施次序进行 UV 和 MMS 复合诱变, 成功获得了高光耐受能力显著提升的进化藻株。

除理化因子诱变技术之外, 基于生物学过程的诱变策略在蓝细菌进化工程中也有所发展和应用。转座子诱变是最具代表性的生物诱变技术, 其将转座子片段在微生物基因组中进行随机或定向插入, 通常会破坏基因读码框进而导致转录和翻译失败, 偶尔会产生

功能改变的蛋白质 (图 1)。在蓝细菌中, 转座子随机整合技术被用于全基因组突变文库的构建, 进而支撑在光合、固碳、生长、节律、氧敏感性、固氮、色素降解等相关生理和代谢表型方面发生异常的突变体的筛选<sup>[24-28]</sup>。CRISPR 技术的迅速发展驱动了新型生物诱变策略的开发, 通过将 dCAS9 元件 (失去切割活性的 CAS9 蛋白) 与全基因组规模的 sgRNA 文库结合, 理论上可以实现对细胞中绝大多数基因的表达式抑制, 该技术被称为 CRISPRi<sup>[29]</sup> (图 1)。Yao 等<sup>[30]</sup> 在集胞藻 PCC 6803 中成功开发 CRISPRi 技术, 并构建了全基因组规模的基因抑制文库, 进而成功挖掘到了与集胞藻 PCC 6803 乳酸耐受和合成相关的功能基因。超突变技术是另一种新兴的生物诱变策略, 其通过遗传操作对微生物细胞基因组复制保真机制进行扰动, 提高复制过程的突变率来达到加速突变积累和表型进化的效果<sup>[31]</sup>。本实验室近期在聚球藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (聚球藻 PCC 7942) 中开发了超突变系统 (图 1), 通过基因复制保真机制缺陷和环境胁迫的协同扰动诱发了细胞超突变状态, 将细胞突变率提高了三个数量级, 为蓝细菌生理耐受表型的获得提供了可靠的进化工程新工具, 实现了蓝细菌高温、高光耐受表型的高效连续进化<sup>[31]</sup>。

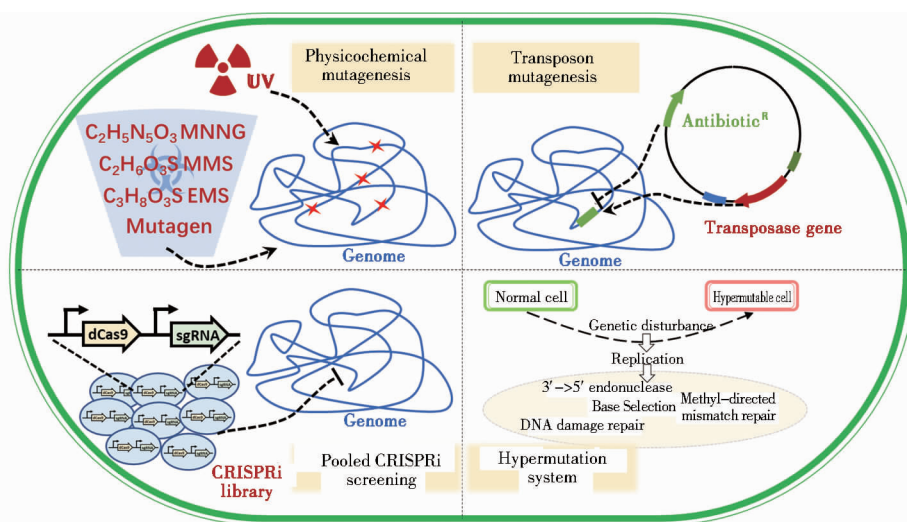


图 1 理化诱变、转座子诱变、CRISPRi 抑制文库和超突变进化原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of physicochemical mutagenesis, transposon mutagenesis, pooled CRISPRi screening and hypermutation system

## 1.2 自动化培养和高通量筛选策略

在提高变异速率、加速突变富集过程的基础上, 如何准确、高效的从大量子代群体中将具有目标表型的

进化菌株分选出来, 是决定进化工程效率的另一个核心问题, 自动化培养和高通量筛选可以在这一方向上为提高进化效率发挥重要作用。在自动化培养方面,

Tillich 等<sup>[32-33]</sup>在集胞藻 PCC 6803 的高温适应性进化过程中应用了集成温度控制、细胞浓度检测、光照培养和液体处理的自动筛选培养系统,极大减少了人力成本,同时提高了对目标表型进行筛选过程中环境参数的控制稳定性。Cao 等<sup>[34]</sup>开发了基于液滴的微流体平台,能够在蓝细菌连续培养过程中对一种或两种营养物质的添加进行自动化控制,并监测其生物质积累速度,从而实现蓝细菌培养的高通量组合优化。该平台在蓝细菌对高盐耐受性等浓度控制型的生理耐受表型优化方面有一定应用前景。对于高通量筛选方法,目前在蓝细菌中应用流式细胞仪实现了转座子诱变后色素降解受损突变体的筛选<sup>[27]</sup>。此外,通过使用聚羟基丁酸脂 (PHB) 具有高亲和力的脂质荧光染料,Price 等<sup>[35]</sup>应用流式细胞仪在 EMS 诱变后的细胞群体中筛选获得了 PHB 高产菌株,展现了应用高通量筛选平台提高进化工程应用效果的可观潜力。

## 2 进化工程在蓝细菌基础生物学研究的应用

作为最早出现的放氧型光合生物,蓝细菌在地球大气氧化和好氧生物进化过程中扮演了至关重要的角色<sup>[8]</sup>;现阶段,蓝细菌仍然广泛分布在地球各类生态系统中,提供了生物圈 25% 以上的初级生产力,在氧、碳、氮、磷等重要元素的生物化学循环中发挥重要作用。长期以来,蓝细菌被用作模式生物进行光合、固碳、固氮等重要生理和代谢机制的解析,也是研究微生物-环境互作关系的重要模式体系。在未知功能机制解析中,传统正向遗传学策略发挥了决定性作用,而其关键环节即在于首先获得目标功能上发生显著变化的突变体,进而借助遗传、生化及各类组学技术对决定相关功能的基因特征进行解析。应用进化工程手段可以筛选获得蓝细菌在特定环境条件下的功能缺陷突变体或适应特定胁迫环境的耐受型突变体,结合对突变体在形态、生理、遗传方面的变化分析,即可解析其与环境因子的互作模式,拓宽对光合、固碳、固氮为代表的蓝细菌重要生物和生态功能的机制认识<sup>[25-26, 36-38]</sup>。

### 2.1 应用进化工程获得缺陷突变体

30 多亿年前,古代蓝细菌是第一批面临缺氧或无氧环境并通过重建代谢过程来适应有氧环境而生存的生物,其适应痕迹可能残留在当前蓝细菌的基因组中。作为阐明蓝细菌对低氧环境潜在适应机制的第一步,Terauchi 等<sup>[25]</sup>对模式蓝细菌集胞藻 PCC 6803 进行了

转座子诱变,并从转座子标记突变文库中筛选分离获得 5 个在微氧条件下表现出生长缺陷的突变体。在其中一个突变体中,卡那霉素抗性基因片段插入基因组并同时删除了两个开放阅读框 (*slr0577* 和 *slr0578*) 的部分片段。研究人员进而构建了 *slr0577* 敲除突变株和 *slr0578* 敲除突变株,并对其在微氧条件下的生长进行评价,发现只有 *slr0578* 部分缺失的突变株表现出生长缺陷,并在好氧条件下生长正常,这表明该基因编码的参与嘌呤代谢的 n5-羧氨基咪唑核糖核苷酸合成酶 PurK,对集胞藻 PCC 6803 对低氧环境的适应具有重要生理意义。

固氮酶是一种催化固氮作用的易受氧影响的金属酶。为了探究非异形胞蓝细菌中固氮酶如何与含氧光合作用共存,Tomatsu 等<sup>[26]</sup>在非异形蓝藻 *Leptolyngbya boryana* 中开发了体内转座子标记的正向遗传学方法,并成功筛选出异常固氮生长的突变体,通过基因组重测序确定了突变体中转座子的插入位点,从而为蓝细菌固氮和含氧光合作用之间氧气悖论的分子机制研究提供了有潜力的研究平台。

### 2.2 应用进化工程获得针对特定环境因素的耐受突变体

在现代光合作用机制研究中,经常使用敌草隆 (dichlophenyl dimethylurea, DCMU) 等除草剂处理蓝细菌细胞以实现 PSII 等重要光合系统元件和反应的靶向阻断,进而分析和表征其各类光合参数变化。而在更早期的研究中,解析光合作用机制的重要策略之一即是通过使用抑制和致死剂量的各类除草剂处理蓝细菌细胞,采用进化工程策略筛选获得具有相应抗性的突变藻株,进而对突变体细胞光化学活性、光系统关键蛋白质含量等参数进行检测和分析,最终挖掘鉴定参与光合作用重要功能组分 (表 2)。基于以上研究流程,在聚球藻 PCC 7942 中通过 MNNG 进行化学诱变,成功获得了 DCMU<sup>[36]</sup>、蓝藻素 (cyanobacterin)<sup>[37]</sup>、苯达松 (bentazone)<sup>[38]</sup> 的耐受藻株。进一步机制研究表明,DCMU 耐受藻株对电子传递抑制剂阿特拉津 (atrazine) 和 2-庚基-4-羟基喹啉-N-氧化物 (2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-n-oxide, HQNO) 具有交叉抗性,并表现出 34 kDa 类囊体膜蛋白含量的改变;Cyanobacterin 在醌结合位点之前作用于 PSII 中的某个蛋白质,并抑制电子从  $Q_A$  到  $Q_B$  的传递。此外,Bentazone 耐受藻株中 PsbO 的表达上调可能赋予了其对由于 Bentazone 与 PSII 结合而产生的活性氧 (ROS) 的抗性。

表 2 进化工程在蓝细菌基础生物学的应用

Table 2 Application of evolutionary engineering to basic biology of cyanobacteria

出发藻株	胁迫因素	改造情况	传代时长	进化方法	引文
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	微氧条件	微氧条件下生长缺陷	—	转座子诱变	[25]
<i>Leptolyngbya boryana</i>	固氮异常	微氧固氮下生长缺陷	—	转座子诱变	[26]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	DCMU	在 1 $\mu\text{mol/L}$ DCMU 条件下存活	—	MNNG 诱变	[36]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Cyanobacterin	4.7 $\mu\text{mol/L}$ Cyanobacterin 条件下生长没有受到抑制		MNNG 诱变	[37]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Bentazone	在含有 0.1 mmol/L Bentazone 的固体培养基中存活		MNNG 诱变	[38]
<i>Synechococcus leopoliensis</i> 和 <i>Anabaena variabilis</i>	高浓度 $\text{CO}_2$	失败	750 代	自发突变	[39]
<i>Trichodesmium erythrum</i>	高浓度 $\text{CO}_2$	固氮速率和生长速率提高	4.5 年	自发突变	[40]
<i>Nodularia spumigena</i> strain AV2	噬藻体	在噬藻体存在条件下不发生裂解	22 周	自发突变	[41]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	有毒氨基酸	在含有 1 mmol/L 精氨酸、组氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸的 TCM 培养基中维持正常生长速率	160 天	自发突变	[42]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	2-nonanone	在 100 $\mu\text{mol/L}$ 2-壬酮条件下存活	—	转座子诱变	[28]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	缺氮或缺硫	缺氮或缺硫条件下呈现非漂白表型	—	转座子诱变	[8]
<i>Microcystis aeruginosa</i>	高盐	对 NaCl 的耐受性从 10 g/L 提高至 14 g/L	约 160 天	自发突变	[43]

到 21 世纪末,大气中的二氧化碳浓度预计将翻一番,这将对光合生物的生理和生态产生重要影响。Low-Décarie 等<sup>[39]</sup>将包括 *Synechococcus leopoliensis* 和 *Anabaena variabilis* 在内的 7 种淡水浮游植物在 1 000 ppm 二氧化碳环境下以三种培养模式进行传代,然而在超过 750 代的培养周期中,并没有提高藻株对高二氧化碳的适应性,这可能与维持二氧化碳浓度的方式有关。在培养室空气中维持了设定的二氧化碳浓度,尽管在培养初期的培养介质中能够检测到相应二氧化碳浓度,但是由于细胞的吸收,在培养过程中二氧化碳浓度出现了下降。Hutchins 等<sup>[40]</sup>在传代培养过程中使用了配制好浓度的空气/二氧化碳混合物进行鼓泡以维持培养介质中的二氧化碳浓度,对海洋蓝细菌 *Trichodesum* 在高浓度二氧化碳条件下进行了适应性进化。将其在 750 ppm 二氧化碳浓度下传代培养 4.5 年后,即使将其转移至较低二氧化碳水平(380 ppm)下,其固氮速率和生长速率也显著高于出发菌株,并且在磷限制条件下具有更快的生长速率,这意味着进化藻株在营养更有限、更酸化的未来海洋中具有潜在优势。

固氮蓝细菌和相应噬藻体之间的相互作用在全球生物地球化学循环中发挥了重要作用。Coloma 等<sup>[41]</sup>

分离并表征了一种被命名为 vB\_NpeS-2AV2 的新型噬藻体,并将其与海洋蓝细菌 *Nodularia* sp. Strain AV2 进行 22 周的半连续共培养,成功获得了对该噬藻体具有抗性的进化藻株。Cairns 等<sup>[44]</sup>进一步研究发现,相比具有噬藻体抗性的进化藻株,无噬藻体抗性的蓝细菌 *Nodularia* sp. Strain AV2 在与 vB\_NpeS-2AV2 相互作用中,由于病毒的裂解作用,其氮释放量显著增加,这可能对其周边环境浮游植物生长产生促进作用。此外,具有噬藻体抗性表型的进化蓝细菌具有短丝状形态,相比原始长细丝形态的浮力降低,这可能降低其争夺光线的能力。该研究通过对比分析证明了蓝藻-噬菌体相互作用对生态系统、生物地球化学循环和浮游群落动态的影响潜力。

相比现在蓝细菌生长的天然环境,植物细胞内环境无疑具有更丰富的生物化学成分;在原始内共生事件中,蓝细菌“祖先”适应了异养细胞内的环境,经过长期进化与寄主细胞形成了植物细胞为其提供生化物质、维持其光合功能,同时其又为寄主细胞提供能量和还原力的“共生”关系。而现代蓝细菌却对植物细胞能够合成的典型生物化学成分敏感,通过进化工程提高蓝细菌细胞对各类生物化学成分的适应性有助于探索

原始叶绿体(内共生体)的形成与进化机制。Hosoda 等<sup>[42]</sup>发现在培养异养模式原生动物嗜热四膜虫的一种营养丰富的合成培养基(TCM)中,1 mmol/L 精氨酸、组氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和苏氨酸会对集胞藻 PCC 6803 的生长造成严重抑制;因此其采用进化工程策略,对集胞藻 PCC 6803 进行连续传代培养,并在培养过程中逐渐提高培养基中“有毒”氨基酸浓度;经过 160 天连续传代后(40 次转接,181 代),集胞藻 PCC 6803 进化藻株在含有 1 mmol/L 各种“有毒”氨基酸的 TCM 培养基中的生长速率恢复至正常水平(相比无“有毒”氨基酸的培养基),展示了蓝细菌基因组面对异养生物细胞丰富生物化学成分内环境适应需求的良好可塑性。

挥发性有机化合物是由细菌、真菌、植物和动物产生的各种有机分子(醇类、酮类、醛类、酸类、萜类、含硫化合物等),在自然群落生物之间的交流中起着重要作用,被认为是生态微生物学中的“信息化学物质”。微生物挥发物酮显示出不同类型的生物活性,其中,2-壬烷酮(2-nonanone)和 2-十一烷酮(2-undecanone)通过抑制 PSII 中的电子传递,对聚球藻 PCC 7942 的光合系统产生了明显抑制。Koksharova 等<sup>[28]</sup>通过转座子诱变,在 100  $\mu\text{mol/L}$  2-壬烷酮条件下筛选获得耐受进化藻株,而野生型在该浓度条件下的生长被完全抑制。进一步研究表明,转座子定位于涉及细胞壁形成、维持、功能和参与 DNA 代谢的蛋白质,表明 2-壬烷酮可能作用于蓝细菌细胞中涉及不同机制的多个靶点,这有助于了解有机体之间以挥发性有机化合物作为交流工具的化学相互作用的复杂分子机制,其中酮类耐受性的新基因和突变信息也可能应用于酮类物质合成的生物技术开发。

### 3 进化工程在蓝细菌光合生物制造底盘生理耐受性优化上的应用

蓝细菌是光合生物制造技术的重要底盘,在实验室规模上,基于蓝细菌的光合生物制造已经实现了多种生物燃料和生物基化学品的定向光合合成。然而,在实际户外大规模培养过程中,蓝细菌光合细胞工厂会面临各种严苛的环境胁迫,为了保证生物量和代谢产品稳定、高效合成和积累,需要优化蓝细菌光合生物制造底盘的生理耐受性。各种环境胁迫对微生物细胞造成的影响是多方面、多层次的;而细胞在环境压力下也会启动引发调控网络、代谢网络剧烈变动的应激机

制以抵抗环境胁迫、维持细胞内稳态<sup>[45]</sup>。针对微生物细胞生理耐受这种机制复杂、靶点不清的表型,相比于“设计-合成-分析”的靶向性操作模式,不依赖于对遗传背景和代谢网络先验认识的进化工程策略在多种微生物复杂表型改造中被认为是最有前途的策略<sup>[20,46]</sup>。由于不同蓝细菌藻株具有不同生理特征和生物化学品合成情况,因此其生理耐受性改造需求有所差异,以下按照光合生物制造底盘藻株进行分类,将进化工程在集胞藻 PCC 6803、聚球藻 PCC 7942、速生聚球藻 PCC 11801 及代表性丝状蓝细菌中的应用情况进行介绍。

#### 3.1 集胞藻 PCC 6803

由于较早获得全基因组序列信息并且具有较高的遗传转化效率,集胞藻 PCC 6803 一直处于蓝细菌合成生物技术研究的最前沿。目前,在集胞藻 PCC 6803 中已经实现了乳酸、乙醇、角鲨烯、红没药烯、类菌胞素氨基酸等 10 余种生物燃料和生物基化学品的合成<sup>[47]</sup>;而针对规模化培养的需求,集胞藻 PCC 6803 作为重要光合细胞工厂开发底盘也广泛应用于蓝细菌抗逆功能机制的认识和改造中,应用进化工程策略已经成功提升了其对溶剂<sup>[48-49]</sup>、盐<sup>[50]</sup>、酸<sup>[51]</sup>、重金属<sup>[21]</sup>、高光<sup>[23, 52]</sup>及高温等多种胁迫因素的耐受性<sup>[32, 53]</sup>,并促进了相关功能机制的解析。

在蓝细菌光合细胞工厂培养中,高浓度产物可能会对细胞生长和代谢形成反馈式抑制或对细胞产生毒性,从而降低光驱固碳合成过程的整体效率,通过进化工程提高底盘细胞对有毒产物的耐受性是提高其产量的重要策略。在含有 2 g/L 异丁醇培养条件下,集胞藻 PCC 6803 的生长速率被抑制了 50%,Matsusako 等<sup>[49]</sup>在含有 2 g/L 异丁醇培养基中对集胞藻 PCC 6803 经过 76 天的连续传代培养,最终获得的进化藻株在 2 g/L 异丁醇条件下的生长没有受到抑制,并且能够在 5 g/L 异丁醇条件下生长,而野生型在该条件下死亡。同时,进化藻株表现出对乙醇、正丁醇、异戊醇等其他醇类物质的耐受能力提高,进一步将乙醇合成途径导入进化藻株和野生型,对乙醇耐受能力提高的进化藻株的乙醇产量相比对照藻株提高了 142%,验证了提高对有毒产物耐受能力从而提高产量策略的可行性。

着眼未来大规模培养的经济和环境可行性,在蓝细菌光合生物制造技术工业化应用中海水或工业废水的使用将具有极大意义。然而海水和工业废水中含有高浓度盐离子,会造成高渗透压胁迫,破坏细胞内外渗透压平衡,导致细胞失水、萎缩。另外,进入胞内的无



机离子会破坏光合系统,抑制光合效率,触发过氧化胁迫,进一步导致细胞内稳态失衡<sup>[54-56]</sup>。因此,有必要对集胞藻 PCC 6803 底盘细胞的高盐胁迫耐受性进行优化。Hu 等<sup>[50]</sup>在 3% NaCl 条件下(接近海水中盐浓度)对集胞藻 PCC 6803 进行了长期适应性实验室进化,每隔 7 天对藻株进行传代,经过 303 天传代培养筛选获得了多个进化藻株,其中在 3% NaCl 条件下的生长速率最高为野生型的 150%,最大细胞浓度相对野生型提高了 1 倍以上。

光照和温度是光合作用过程最主要和最常见的环境影响因素,也是户外规模化培养中无论使用何种培养介质都会面临的波动因素,因此提高底盘细胞对温度和光照胁迫的耐受性是蓝细菌进化工程研究的热点问题。针对高光胁迫,Yoshikawa 等<sup>[52]</sup>以 7 000  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  为初始培养光照(光源为日本林时计的点光源 LED 灯,初始  $OD_{730}$  为 0.01,在此条件下,野生型集胞藻 PCC 6803 的生长受到轻微抑制),在 52 天(23 代)传代培养过程中逐渐提高培养光强,最终获得了在 9 000  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下(野生型集胞藻 PCC 6803 在该条件下的生长被完全抑制)生长速率与常规培养条件下野生型生长速率一致的进化藻株。对进化藻株的遗传和生化分析则表明,*isiA* 过表达或 *hik26* 基因内的点突变可以增强集胞藻 PCC 6803 藻株对高光胁迫的耐受性,其可能通过降低叶绿素含量和减少 PSII 损伤来维持高光下稳定的生长速率。Dann 等<sup>[23]</sup>同样采用进化工程策略对集胞藻 PCC 6803 藻株的高光耐受性进行了优化。初始评价表明,野生型集胞藻 PCC 6803 在 700  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下(与前一研究采用了光质不同的光源,具体为捷克 MC1000 培养器中的暖白光 LED 灯,初始接种  $OD_{730}$  为 0.05)的生长受到抑制,在 1 100  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下死亡。因此,从 700  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光照条件下开始逐渐提高胁迫的光照强度,在传代的 900 多天里,平行传代的 6 个批次藻株经过不同排列的 UV 和 MMS 诱变,最终获得了在生长速率、生物质积累、色素含量、光合生理参数方面具有不同表型的 6 种进化藻株。这 6 种进化藻株在 2 000  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  高光条件下的生物量积累与常规培养条件下的出发藻株相似,并且能够在超过陆地最大太阳辐照度的光照强度下生长[3 000  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]。同时,基因组测序在进化藻株中鉴定到 612 个不同突变,其中 2

个代表性突变(NdhF1-F124L 和 EF-G2-R461C)被证明能够通过不同机制提高藻株对高光的适应性。而针对高温胁迫,Tillich 等<sup>[53]</sup>对集胞藻 PCC 6803 进行 MMS 和 UV 诱变后,对高温耐受性突变株进行筛选,通过多轮反复“诱变—恢复—筛选”操作(历时超过 200 天),最终获得了 45℃/23 ~ 26℃ 昼夜循环条件下稳定生长的进化藻株(初始藻株在 43℃/23 ~ 26℃ 的日夜循环中死亡)。

### 3.2 聚球藻 PCC 7942

聚球藻 PCC 7942 是第一支被证明可以进行外源 DNA 自然转化的蓝细菌藻株,也是探索原核生物生物钟系统功能机制的主要模式生物。同时,聚球藻 PCC 7942 也具有较高生物技术应用潜力,相比集胞藻 PCC 6803(代时 5.1 h),该藻株生长速率更快(代时 4.1 h),而且细胞内染色体拷贝数(2 ~ 6)也远少于集胞藻 PCC 6803(25 ~ 500),在遗传改造和基因型稳定性方面具有一定优势。因此,聚球藻 PCC 7942 也广泛被应用于光合细胞工厂以合成各类生物技术产品(蔗糖、海藻糖、脂肪酸、法尼烯、亚油酸、正丁醇、异丙醇等)<sup>[57-58]</sup>。本实验室前期针对聚球藻 PCC 7942 复杂生理抗逆表型的改造需求进行了新型高效进化工程工具的开发。为了提升适应性进化效率,首先对聚球藻 PCC 7942 中与基因组复制突变率相关的功能基因进行系统挖掘,进而通过多靶点协同改造(*mutS* 基因敲除与 *recA* 基因过量表达)获得了基因组复制突变率提升 100 倍的重组菌株。在此基础上,发现当采用非致死型温度和光照条件培养基基因组复制保真缺陷型菌株时,其复制突变率可进一步提高至对照的 1 000 ~ 8 000 倍,也就意味着超突变菌株在培养过程中可以产生大量携带基因组突变的子代细胞。采用上述超突变系统,经过仅 10 天的“诱变—筛选”流程即获得了大量耐受高温、高光胁迫的进化菌株;通过基因型回补后进化菌株恢复了遗传稳定性(即突变率恢复到野生型水平),而其能够在野生型不能存活的高温[45℃、500  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]和高光[42℃、1 500  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]条件下快速生长,并且在更高光照强度下[42℃、2 500  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]表现出最佳生长速率,在极端温度和光照条件下[45℃、1 500  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]也能快速生长。通过全基因组重测序结合反向遗传学分析,最终鉴定发现了 FoF1-ATP 合成酶  $\alpha$  亚基 C252Y 点突变以及莽草酸激酶编码基因启动子位点突变(导致该基因表达上调)是决定聚球藻 PCC 7942

高温、高光耐受能力的主效突变。该工作丰富了蓝细菌进化工程工具包,并展现了进化工程在优化蓝细菌生理功能、解析抗逆功能机制上的巨大潜力<sup>[31]</sup>。

### 3.3 速生聚球藻 PCC 11801

以天然具有高生长速率、高固碳能力的蓝细菌藻株为底盘,构建生长和合成潜力可能接近异养体系的蓝细菌光合细胞工厂是推进光合生物制造工业化应用的重要方向,而与之相应的生理耐受性改造也同样被关注。2018 年从印度孟买 Powai 湖水样中分离获得了速生蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC 11801 (聚球藻 PCC 11801),其具有生长速率快(倍增时间 2.3 h 通空气条件,不依赖高浓度 CO<sub>2</sub>)、可以自然转化、可海水培养(700 mmol/L NaCl 条件下的生长速率是无盐条件下的约 50%)、耐高光能力<sup>[59]</sup>。同时,研究人员还对聚球藻 PCC 11801 进行代谢工程改造实现了琥珀酸合成,培养 5 天的产量为 0.93 g/L,证实了其作为光合生物制造底盘的潜力<sup>[60]</sup>。Srivastava 等<sup>[61]</sup>对聚球藻 PCC 11801 对醇类的耐受性进行了评价,发现野生型藻株能耐受 6 g/L 乙醇、10 g/L 异丙醇、3~4 g/L 异丁醇、2~3 g/L 正丁醇、10~12 g/L 叔丁醇、20 g/L 2,3-丁二醇、4 g/L 异戊醇;将该藻株分别在逐渐升高的正丁醇和 2,3-丁二醇条件下进行传代培养,在某一胁迫浓度下,当适应藻株的生长速率与野生型一致或没有进一步提升时即提高胁迫浓度,最终经过约 100 代(总共时长 500 天以上)连续培养,获得了可耐受 5 g/L 正丁醇和 30 g/L 2,3-丁二醇的进化藻株;而正丁醇耐受进化藻株还表现出对乙醇(22 g/L)、异丙醇(18 g/L)、异丁醇(8 g/L)的交叉耐受性;2,3-丁二醇耐受进化藻株同样表现出对乙醇(22 g/L)、异丙醇(15 g/L)、正丁醇(4 g/L)、异丁醇(7 g/L)、叔丁醇(15 g/L)、异戊醇(5 g/L)的交叉耐受性。该工作展现了进化工程优化速生聚球藻对多元醇类物质抗逆能力的有效性,也为后期以聚球藻 PCC 11801 为底盘,构建光驱固碳产醇细胞工厂及相关技术体系奠定了良好基础。

### 3.4 丝状蓝细菌

丝状蓝细菌在自然界中分布广泛,能够生存于各种水域环境中,具有较强适应性和生存能力,常用于多细胞调节机制、固氮机制等方面的研究<sup>[62]</sup>。丝状蓝细菌生长速率较慢,遗传改造难度也较大,但是由于其具有较强适应能力和吸附能力,以及便于收集的丝状菌体结构,在农业、工业废水治理中仍然具有较高应用潜力<sup>[63]</sup>。同时,部分丝状蓝藻能天然合成多种生物活性

物质<sup>[64]</sup>,通过合理培养条件优化和生物技术改造,也可能在光合生物制造领域实现应用。*Anabaena* sp. PCC 7120、*Anabaena variabilis* ATCC 29413 和 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 是丝状蓝细菌研究中常用的模式菌株,Johnson 等<sup>[65]</sup>评价了这 3 种菌株对法呢烯、月桂烯、芳樟醇和柠檬烯等 4 种潜在生物燃料的耐受性,并进行了 12 个适应性实验室进化实验。以野生型(WT)作为对照,研究人员对 12 个进化菌群在含有上述 4 种生物燃料培养基中的生长情况进行了测定;使用 SYTO® 9 荧光测定培养物活力(荧光强度和活细胞数量有关),通过多种活力指标的显著性分析和比较,最终确认了 3 个耐受性提高的进化藻株,所获得的 *Anabaena* sp. PCC 7120 进化藻株对法呢烯的耐受浓度从 0.1 g/L 提高至 0.32 g/L, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 进化藻株对芳樟醇的耐受浓度从 0.4 g/L 提高至 0.72 g/L,而 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 进化藻株对芳樟醇的耐受浓度从 0.45 g/L 提高至 0.54 g/L。

*Fremyella diplosiph* 是一种丝状变色蓝细菌,能够适应低光、低温的培养环境,还具有一种被称为互补色驯化(complementary chromatic acclimation, CAA)的独特能力,能够调节自身光合受体以适应不同光质和光强,为适应和有效利用不同深度水体中的光照奠定了基础。*Fremyella diplosiph* 在微生物感知和响应其环境变化的相关研究中有重要应用,同时还具备适合大规模培养的应用潜力,然而该藻株的生物学和生物技术应用却受制于其对盐(NaCl)的敏感性,在低至 200 mmol/L NaCl 条件下, *Fremyella diplosiph* 光合色素积累和细胞形态即会受到严重损伤;Tabatabai 等<sup>[66]</sup>报道称白光下 10 g/L 的氯化钠、红光和绿光下 20 g/L 的氯化钠可抑制 *Fremyella diplosiph* 生长。为提升 *Fremyella diplosiph* 藻株的盐耐受性,Tabatabai 等<sup>[66]</sup>采取热诱导突变策略,进行 15 min 的 42℃ 热休克诱变,进而在含有 20 g/L NaCl 的固体培养基上筛选获得了可以在含有 20 g/L NaCl 液体培养基中保持正常生长速率(与野生型在无 NaCl 条件的生长速率相当)以及维持正常藻胆蛋白、叶绿素 a 含量的进化藻株。在该研究中,还发现突变株中的关键耐盐机制元件三重 ATP 非依赖性周质转运蛋白(three-fold increase in tripartite ATP-independent periplasmic transporters solute receptor)溶质受体的基因转录水平相比野生型上调了 3 倍,这可能在进化藻株对高浓度盐的适应过程起着关键作用。进化工程在蓝细菌生理耐受性优化方面的应用见表 3。



表 3 进化工程在蓝细菌生理耐受性优化方面的应用

Table 3 Application of evolutionary engineering to the optimization of physiological tolerance of cyanobacteria					
出发藻株	改造表型	改造情况	改造时长	进化方法	引用
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	丁醇	在 0.5% (V/V) 丁醇浓度下的生长没有受到抑制	395 天	自发突变	[48]
	异丁醇	在 5 g/L 异丁醇条件下能够生长	76 天	自发突变	[49]
	高盐	3% NaCl 条件下的生长速率最高为野生型的 150%	303 天	自发突变	[50]
	高光	能够在 9 000 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照下生长	52 天	自发突变	[52]
	高光	能够在 3 000 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照下生长	900 多天	UV 和 MMS 诱变结合适应性进化	[23]
	高温	能够在 45℃/23 ~ 26℃ 的日夜循环条件下稳定生长	1 年	适应性进化结合 MMS 诱变和 UV 诱变	[53]
	酸	能在 pH 5.5 条件下生长	3 个月	自发突变	[51]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	高温高光	极端温度和光照条件下[45℃、1 500 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]快速生长	2 周内	超突变系统体内连续诱变	[31]
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC11801	正丁醇和 2,3-丁二醇	正丁醇耐受进化藻株表现出对乙醇(22 g/L)、异丙醇(18 g/L)、异丁醇(8 g/L)的交叉耐受性,2,3-丁二醇耐受进化藻株表现出对乙醇(22 g/L)、异丙醇(15 g/L)、正丁醇(4 g/L)、异丁醇(7 g/L)、叔丁醇(15 g/L)、异戊醇(5 g/L)的交叉耐受性	500 多天	自发突变	[61]
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413, <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133	法呢烯、月桂烯、芳樟醇和柠檬烯	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 对法呢烯的耐受性提高至 0.32 g/L, <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 对芳樟醇的耐受性提高至 0.72 g/L, <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133 对芳樟醇的耐受性提高至 0.54 g/L	-	自发突变	[65]
<i>Fremyella diplosiphon</i>	高盐	在 20 g/L NaCl 液体培养基中的生长没有受到抑制	-	高温诱导突变	[66]

4 总结与展望

进化工程在蓝细菌基础生物学研究与生物技术开发中已经进行了广泛应用,有效促进了对蓝细菌光合、固氮、节律、环境适应等重要生理代谢机制的认识,也通过提高各类底盘藻株的生理耐受性而在光合生物制造技术发展与应用中发挥了重要作用。着眼未来,蓝细菌进化工程技术的开发和应用可以在以下几个方面获得进一步发展。第一,目前进化工程主要应用于蓝细菌生长与耐受相关表型的优化和提高,而面向光合生物制造技术的发展应用,在直接提高产物合成能力上的应用则鲜见报道;在未来,通过生长偶联目标产品合成,或发展高通量筛选方法将有望驱动实现进化工程直接优化蓝细菌光合细胞工厂生产效能。第二,为了实现可持续规模化培养和生产过程,需要进一步提高对蓝细菌工程藻株基因组稳定性的重视。进化是一把双刃剑,通过微生物的自发突变,或结合体内或体外诱变,微生物细胞的进化动力可以为目标表型筛选提

供表型或遗传多样性;同时,尽管体外诱变处理或体内诱变元件可以被消除,蓝细菌相对较高的自发突变也会造成遗传和表型的不稳定,尤其在长期工业化培养中会面临较大的种群规模。在蓝细菌光合生物制造中,已经观察到由于生产负荷导致回复突变和生产力下降的现象,其策略之一就是生产与细胞生长偶联,以减少微生物利益(生长率或适应性)与生物技术优先级(高生产力)之间的冲突,并通过进化获得更快同时生产力更高的突变体。同时,在生理耐受表型优化方面,由于在实际户外规模化培养条件下,藻株往往同时面临氧化胁迫、盐胁迫、极端 pH、高温、高光等多重压力,并且胁迫的强度呈波动性变化,实验室获得的具有单一胁迫压力耐受能力的进化藻株在具有复杂多元环境胁迫的户外规模化条件下可能也会丧失其生长优势。可能的解决策略是同时使用组合胁迫因素对野生型藻株进行进化工程改造,或在天然或人工改造的具有某种耐受表型藻株的基础上对其他耐受表型进行进化,抑或是同时利用靶向或非靶向策略实现决

定不同进化表型的遗传特征在同一底盘上的有机重组。第三,需要进一步提高进化工程效率。总体来看,尽管目前蓝细菌中已经应用了多种诱变方法,但是相对于大肠杆菌和酵母中全局转录机器工程(global transcriptional machinery engineering)、噬菌体辅助连续进化(phage-assisted continuous evolution)等各种快速诱变技术依然有较大开发空间。同时,类似于恒化培养器的连续自动化培养装置和高通量筛选方法的开发和应用也是提高蓝细菌进化工程改造效率的重要方向。第四,尽管随着基因组测序的发展可以简单鉴定出进化菌株中的突变位点,但是识别表型相关功能性突变、挖掘表型背后的分子生理机制仍然是该领域的重点和难点。多组学技术的发展和蓝细菌中合成生物学工具的开发可能会助力于基因型变量与表型变量之间的关系探究。

### 参考文献

- [ 1 ] Sandberg T E, Salazar M J, Weng L L, et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 1-16.
- [ 2 ] Novick A, Szilard L. Experiments with the Chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1950, 36 (12): 708-719.
- [ 3 ] LaPanse A J, Krishnan A, Posewitz M C. Adaptive Laboratory Evolution for algal strain improvement: methodologies and applications. *Algal Research*, 2021, 53: 102122.
- [ 4 ] Lee S, Kim P. Current status and applications of adaptive laboratory evolution in industrial microorganisms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(6): 793-803.
- [ 5 ] Osanai T, Kanesaki Y, Nakano T, et al. Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2  $\sigma$  factor *SigE*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(35): 30653-30659.
- [ 6 ] Kanan M W, Rozenman M M, Sakurai K, et al. Reaction discovery enabled by DNA-templated synthesis and *in vitro* selection. *Nature*, 2004, 431(7008): 545-549.
- [ 7 ] Kremer B, Kazmierczak J. Cellularly preserved microbial fossils from ~ 3.4 Ga deposits of South Africa: a testimony of early appearance of oxygenic life? *Precambrian Research*, 2017, 295: 117-129.
- [ 8 ] Lyons T W, Reinhard C T, Planavsky N J. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*, 2014, 506 (7488): 307-315.
- [ 9 ] Kasting J F, Howard M T. Atmospheric composition and climate on the early Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2006, 361 (1474): 1733-1742.
- [ 10 ] Gonzalez-Esquer C R, Shubitowski T B, Kerfeld C A. Streamlined construction of the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-fixing organelle via protein domain fusions for use in plant synthetic biology. *The Plant Cell*, 2015, 27(9): 2637-2644.
- [ 11 ] Stal L J. [49] Nitrogen fixation in cyanobacterial mats. *Methods in Enzymology*. Amsterdam: Elsevier, 1988: 474-484.
- [ 12 ] Martin W, Rujan T, Richly E, et al. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(19): 12246-12251.
- [ 13 ] Howe C J, Barbrook A C, Koumandou V L, et al. Evolution of the chloroplast genome. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2003, 358 (1429): 99-106.
- [ 14 ] Sun T, Li S B, Song X Y, et al. Toolboxes for cyanobacteria: recent advances and future direction. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(4): 1293-1307.
- [ 15 ] Li S B, Sun T, Xu C X, et al. Development and optimization of genetic toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Metabolic Engineering*, 2018, 48: 163-174.
- [ 16 ] Wang B, Eckert C, Maness P C, et al. A genetic toolbox for modulating the expression of heterologous genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 276-286.
- [ 17 ] Lu X F. A perspective: Photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 742-746.
- [ 18 ] Melis A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, 2009, 177(4): 272-280.
- [ 19 ] Oliver J W K, Atsumi S. Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis. *Photosynthesis Research*, 2014, 120(3): 249-261.
- [ 20 ] Gong J X, Zheng H J, Wu Z J, et al. Genome shuffling: progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6): 996-1005.
- [ 21 ] Xu C X, Sun T, Li S B, et al. Adaptive laboratory evolution of cadmium tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology*

- for Biofuels, 2018, 11(1): 1-15.
- [22] Ennis D G. Mutagenesis. Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2001: 1-8.
- [23] Dann M, Ortiz E M, Thomas M, et al. Enhancing photosynthesis at high light levels by adaptive laboratory evolution. Nature Plants, 2021, 7(5): 681-695.
- [24] Watabe K, Mimuro M, Tsuchiya T. Development of a high-frequency *in vivo* transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(11): 2017-2026.
- [25] Terauchi K, Sobue R, Furutani Y, et al. Isolation of cyanobacterial mutants exhibiting growth defects under microoxic conditions by transposon tagging mutagenesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. The Journal of General and Applied Microbiology, 2017, 63(2): 131-138.
- [26] Tomatsu C, Uesaka K, Yamakawa H, et al. *In vivo* transposon tagging in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. FEBS Letters, 2018, 592(10): 1634-1642.
- [27] Perelman A, Shaltiel J, Sendersky E, et al. Use of flow cytometry for efficient isolation of cyanobacterial mutants deficient in modulation of pigment level. BioTechniques, 2004, 36(6): 948-952.
- [28] Koksharova O A, Popova A A, Plyuta V A, et al. Four new genes of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 are responsible for sensitivity to 2-nonanone. Microorganisms, 2020, 8(8): 1234.
- [29] Huang C H, Shen C R, Li H, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S. elongatus* PCC 7942. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-11.
- [30] Yao L, Shabestary K, Björk S M, et al. Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes. Nature Communications, 2020, 11(1): 1-13.
- [31] Sun H L, Luan G D, Ma Y F, et al. Engineered hypermutation adapts cyanobacterial photosynthesis to combined high light and high temperature stress. Nature Communications, 2023, 14(1): 1-20.
- [32] Tillich U M, Wolter N, Franke P, et al. Screening and genetic characterization of thermo-tolerant *Synechocystis* sp. PCC6803 strains created by adaptive evolution. BMC Biotechnology, 2014, 14(1): 1-15.
- [33] Tillich U M, Wolter N, Schulze K, et al. High-throughput cultivation and screening platform for unicellular phototrophs. BMC Microbiology, 2014, 14(1): 1-13.
- [34] Cao J L, Russo D A, Xie T, et al. A droplet-based microfluidic platform enables high-throughput combinatorial optimization of cyanobacterial cultivation. Scientific Reports, 2022, 12: 15536.
- [35] Price S, Kuzhiumparambil U, Pernice M, et al. Enhancement of cyanobacterial PHB production using random chemical mutagenesis with detection through FACS. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2023, 46(2): 297-306.
- [36] Golden S S, Sherman L A. Biochemical and biophysical characterization of herbicide-resistant mutants of the unicellular cyanobacterium, *Anacystis nidulans* R2. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1984, 764(2): 239-246.
- [37] Mallipudi L R, Gleason F K. Characterization of a mutant of *Anacystis nidulans* r2 resistant to the natural herbicide, cyanobacterin. Plant Science, 1989, 60(2): 149-154.
- [38] Bagchi S N, Pistorius E, Michel K. A *Synechococcus* sp. PCC 7942 mutant with a higher tolerance towards bentazone. Photosynthesis Research, 2004, 75: 171-182.
- [39] Low-Décarie E, Jewell M D, Fussmann G F, et al. Long-term culture at elevated atmospheric CO<sub>2</sub> fails to evoke specific adaptation in seven freshwater phytoplankton species. Proceedings Biological Sciences, 2013, 280(1754): 20122598.
- [40] Hutchins D A, Walworth N G, Webb E A, et al. Irreversibly increased nitrogen fixation in *Trichodesmium* experimentally adapted to elevated carbon dioxide. Nature Communications, 2015, 6(1): 1-7.
- [41] Coloma S E, Dienstbier A, Bamford D H, et al. Newly isolated *Nodularia* phage influences cyanobacterial community dynamics. Environmental Microbiology, 2017, 19(1): 273-286.
- [42] Hosoda K, Habuchi M, Suzuki S, et al. Adaptation of a cyanobacterium to a biochemically rich environment in experimental evolution as an initial step toward a chloroplast-like state. PLoS One, 2014, 9(5): e98337.
- [43] Melero-Jiménez I J, Martín-Clemente E, García-Sánchez M J, et al. Adaptation of the toxic freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to salinity is achieved by the selection of spontaneous mutants. Phycological Research, 2019, 67(3): 192-201.
- [44] Cairns J, Coloma S, Sivonen K, et al. Evolving interactions between diazotrophic cyanobacterium and phage mediate nitrogen release and host competitive ability. Royal Society Open Science, 2016, 3(12): 160839.
- [45] Rutherford B J, Dahl R H, Price R E, et al. Functional genomic study of exogenous n-butanol stress in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1935-1945.
- [46] Portnoy V A, Bezdán D, Zengler K. Adaptive laboratory

- evolution; harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22 (4): 590-594.
- [47] Toepel J, Karande R, Klähn S, et al. Cyanobacteria as whole-cell factories: current status and future perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*, 2023, 80: 102892.
- [48] Wang Y X, Shi M L, Niu X F, et al. Metabolomic basis of laboratory evolution of butanol tolerance in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13 (1): 1-12.
- [49] Matsusako T, Toya Y, Yoshikawa K, et al. Identification of alcohol stress tolerance genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 using adaptive laboratory evolution. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 1-9.
- [50] Hu L, He J Y, Dong M J, et al. Divergent metabolic and transcriptomic responses of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to salt stress after adaptive laboratory evolution. *Algal Research*, 2020, 47: 101856.
- [51] Uchiyama J, Kanesaki Y, Iwata N, et al. Genomic analysis of parallel-evolved cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under acid stress. *Photosynthesis Research*, 2015, 125(1): 243-254.
- [52] Yoshikawa K, Ogawa K, Toya Y, et al. Mutations in hik26 and slr1916 lead to high-light stress tolerance in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Communications Biology*, 2021, 4: 343.
- [53] Tillich U M, Lehmann S, Schulze K, et al. The optimal mutagen dosage to induce point-mutations in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its application to promote temperature tolerance. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49467.
- [54] Berry S, Esper B, Karandashova I, et al. Potassium uptake in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mainly depends on a Ktr-like system encoded by slr1509 (ntpJ). *FEBS Letters*, 2003, 548(1-3): 53-58.
- [55] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 651-681.
- [56] Reed R H, Richardson D L, Stewart W D P. Osmotic responses of unicellular blue-green algae (cyanobacteria): changes in cell volume and intracellular solute levels in response to hyperosmotic treatment. *Plant, Cell & Environment*, 1986, 9(1): 25-31.
- [57] Satta A, Esquirol L, Ebert B E. Current metabolic engineering strategies for photosynthetic bioproduction in cyanobacteria. *Microorganisms*, 2023, 11(2): 455.
- [58] Gao X Y, Sun T, Pei G S, et al. Cyanobacterial chassis engineering for enhancing production of biofuels and chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100 (8): 3401-3413.
- [59] Jaiswal D, Sengupta A, Sohoni S, et al. Genome features and biochemical characteristics of a robust, fast growing and naturally transformable cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 isolated from India. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1-13.
- [60] Shinjinee S, Damini J, Annesha S, et al. Metabolic engineering of a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 for photoautotrophic production of succinic acid. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 89.
- [61] Srivastava V, Amanna R, Rowden S J L, et al. Adaptive laboratory evolution of the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 for improved solvent tolerance. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 131 (5): 491-500.
- [62] Potapova T V, Koksharova O A. Filamentous cyanobacteria as a prototype of multicellular organisms. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2020, 67(1): 17-30.
- [63] Markou G, Georgakakis D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 2011, 88 (10): 3389-3401.
- [64] Tan L T. Pharmaceutical agents from filamentous marine cyanobacteria. *Drug Discovery Today*, 2013, 18 (17-18): 863-871.
- [65] Johnson T J, Halfmann C, Zahler J D, et al. Increasing the tolerance of filamentous cyanobacteria to next-generation biofuels via directed evolution. *Algal Research*, 2016, 18: 250-256.
- [66] Tabatabai B, Arumanayagam A S, Enitan O, et al. Identification of a halotolerant mutant via *in vitro* mutagenesis in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *Current Microbiology*, 2017, 74(1): 77-83.

## Application of Evolutionary Engineering in Cyanobacterial Biology and Biotechnology Research

MA Yi-fan<sup>1,2,3</sup> SUN Hui-li<sup>3,4,5</sup> MAO Shao-ming<sup>1,2</sup> LUAN Guo-dong<sup>3,4,5</sup> LV Xue-feng<sup>3,4,5</sup>

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

(2 Hunan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China)

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

(4 Shandong Energy Institute, Qingdao 266101, China)

(5 Qingdao New Energy Shandong Laboratory, Qingdao 266101, China)

**Abstract** Cyanobacteria have long been used as model organisms in basic biological research on topics such as photosynthesis, chloroplast origins and plant evolution. Additionally, due to their fast growth, simple culture techniques and convenient genetic manipulation, cyanobacteria have gained increasing attention in photosynthetic bio-manufacturing. One strategy for studying cyanobacteria is to first obtain mutants with specific phenotypes, and then further analyze their functional mutations and related mechanisms. Moreover, in the development of photosynthetic biomanufacturing technologies, enhancing the physiological tolerance of chassis cells is of significant importance for the large-scale application of cyanobacteria photosynthetic cell factories. Evolutionary engineering offers significant advantages in the acquisition of mutants and the optimization of complex physiological tolerance phenotypes, as it does not require knowledge of the microbial genetic background and metabolic network. This paper reviews the progress of evolutionary engineering in the analysis of cyanobacteria physiological metabolism mechanisms and the optimization of physiological tolerance in cyanobacteria photosynthetic biomanufacturing chassis, and meanwhile it also discusses the challenges and future directions of evolutionary engineering in cyanobacteria applications.

**Key words** Cyanobacteria Evolutionary engineering Physiological tolerance Adaptive evolution Photosynthesis