

## 青岛能源所在蓝细菌光合生物合成乙醇方面取得系列进展

乙醇是生产规模最大、应用程度最高的可再生生物液体燃料。现阶段，生物乙醇的主要来源是采用含糖量丰富的农业生物质为原料的生物炼制过程，以“玉米乙醇”最具代表性，然而其“与粮争地、与人争粮”的原料供应模式引发了极大的社会争议；以木质纤维素等农业、林业废弃物为原料的纤维素乙醇合成技术缓解了“粮食乙醇”在原料供应上的不足，但是纤维素原料的预处理及酶解糖化过程需要消耗大量能量、水和纤维素酶，从而极大地拉高了生产成本。与生物炼制过程相比，通过光合微生物平台将二氧化碳和太阳能直接转化为乙醇的技术路线（CO<sub>2</sub> To Ethanol, CTE）减少了原材料预处理、底物提炼过程的损耗，也节省了对淡水和用地的需求，在经济性与可持续性上表现出更大的潜力与优势。

中国科学院青岛生物能源与过程研究所微生物代谢工程团队在蓝细菌光合生物合成乙醇技术方面取得了系列研究进展。该团队以重要的模式蓝细菌集胞藻PCC6803（*Synechocystis* sp. PCC6803）为底盘藻株，将来自运动发酵单胞菌的PdcZM-AdhIIZM（丙酮酸脱羧酶-II型醇脱氢酶）途径导入PCC6803，打通了乙醇光合合成路线，实现了工程藻株中乙醇的合成与分泌；针对蓝细菌生理和代谢背景特性分析，使用来自集胞藻PCC6803自身的NADPH依赖型的II型醇脱氢酶基因slr1192替换AdhIIZM后，成功地优化了乙醇合成途径与底盘藻株的适配性，使乙醇产量提高了50%；在此基础上结合竞争性途径敲除和代谢途径拷贝数强化等策略，最终获得了具有较强乙醇光合合成能力的工程藻株Syn-HZ24，在柱式反应器中经过28天培养后，乙醇产量达到5.5g/L，合成速率0.2g/L/day，处于国际领先水平。上述结果奠定了该团队在蓝细菌乙醇方向上的研究基础，已经发表于《能源与环境科学》（*Energy & Environmental Science*, Gao, et al, 2012, 5:9857 – 9865）。

为了进一步提升蓝细菌工程藻株乙醇光合合成的潜力，该团队采用体外重构和动态分析的策略对新发展的PdcZM-slr1192途径的催化特性进行了深入挖掘。首先脱离复杂的胞内环境在胞外重新构建该途径，以纯化后的酶（PdcZM/slr1192）、底物（丙酮酸，Pyruvate）、辅因子（NADPH/NADH/TPP）、金属离子（Mg<sup>2+</sup>）以及中间产物（乙醛，acetaldehyde）对整个途径的催化效率影响分别进行定量的滴定分析，结果发现影响乙醇合成的限制因素是PdcZM而非slr1192；在总蛋白浓度设置恒定的条件下，PdcZM-slr1192的浓度比为4:6时，全途径具有最大的乙醇合成催化活性。为了验证Cell free条件下获得的结果，研究人员在集胞藻PCC6803中构建了PdcZM-slr1192浓度配比不同的工程菌株，通过代谢工程结合酶活与蛋白含量分析实验，证实了现有工程藻株中PdcZM的表达量和活性是乙醇合成能力的首要限制因素。此外，体外重构体系中的滴定数据结合蓝细菌胞内代谢物的实际含量分析还显示，提高NADPH和丙酮酸的供应量也应该是提高乙醇合成效率的重要选择。上述结果明确了蓝细菌乙醇光合工程藻株进一步改造的方向，已经发表于生物能源期刊Biotechnology for Biofuels（Luan, et al, 2015, 8:184）。

基于已经开发的蓝细菌乙醇光合工程藻株，该团队又进一步探索了光合细胞工厂的扩大化培养技术。光合生物制造通常在户外、开放式、未灭菌的条件下进行，因此经常面临各种模式的生物污染的严重威胁进而导致扩大培养的失败。研究人员在进行工程藻株Syn-HZ24的开放式、规模化培养中发现，其乙醇合成与积累过程受到了微生物污染的严重影响。通过分析和鉴定，确定了Pannonibacter phragmitetus为乙醇光合合成的主要威胁来源，该菌可以以乙醇为唯一碳源进行生长，迅速消耗工程藻株合成的乙醇并在培养体系中大量增殖。通过对Pannonibacter phragmitetus和Syn-HZ24的生理和生化分析，研究人员提出提高培养体系pH值来抑制Pannonibacter phragmitetus侵染并恢复乙醇光合合成的设想（Bicarbonate-based Integrated Carbon Capture System, BICCS），并在实验室柱式反应器和户外薄膜挂袋两种体系下进行了验证，结果表明该策略可以有效解决Syn-HZ24在开放式培养过程中的生物污染问题，在规模化培养9天后乙醇产量达到0.9g/L，而常规pH条件下的对照体系中无乙醇积累。此部分工作鉴定了一种工程蓝细菌规模化培养过程中新的生物污染模式，并针对性地设计、验证了解决方案，对光合细胞工厂培养的工业化、规模化发展有普遍的借鉴意义。该工作近期发表于Biotechnology for Biofuels（Zhu, et al, 2017, 10:93）。

上述研究获得国家自然科学基金、“863”计划、山东省泰山学者项目、山东省自然科学基金以及青岛市创新领军人才项目的支持。

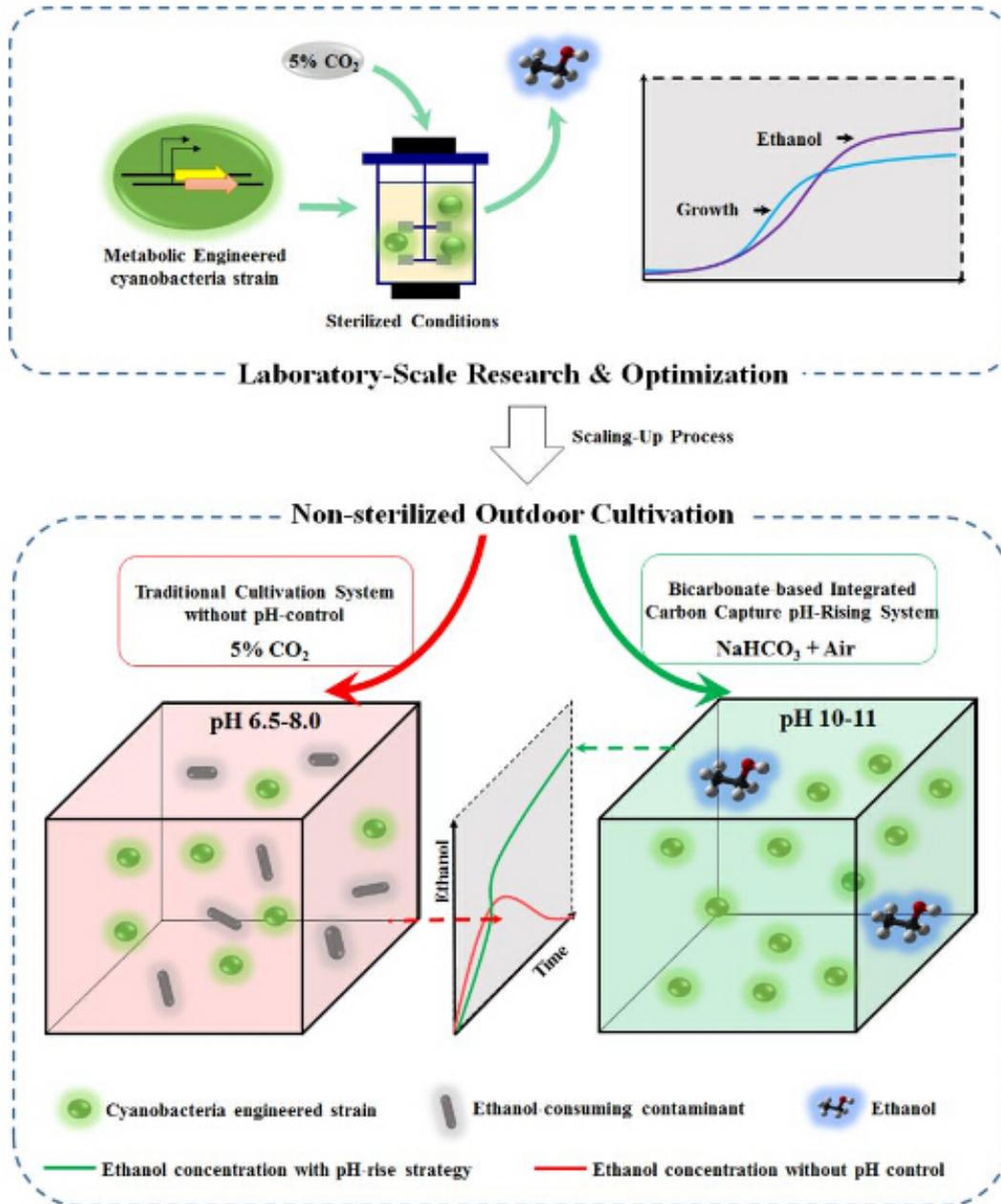


图1. 采用BICCS补碳策略提高培养体系pH值以抑制杂菌污染并恢复乙醇合成



图2. 蓝细菌乙醇光合工程藻株的实验室培养和户外规模化培养

原文地址：<http://www.china-nengyuan.com/tech/107328.html>