

微藻基因工程在高价值化合物生产上的应用

王康^{1,2}, 崔玉琳^{1,3}, 高政权⁴, 孟春晓⁴, 秦松^{1,3}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源保护重点实验室, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 4. 滨州医学院 药学院, 山东 烟台 264003)

摘要: 微藻在生产蛋白质、油脂、色素等方面具有作为细胞工厂的潜力, 在解决传统生物量生产和市场未来的一些局限性方面发挥着推进作用。基因工程促进了微藻的改良, 推动了微藻的产业化进程。本文综述了近年来微藻基因工程的研究进展以及基因工程在微藻生产生物燃料、医药等方面的应用。本文能为基因工程技术在微藻中的研究及应用提供思路, 从而使微藻以及微藻产品变得更具有经济竞争力。

关键词: 微藻; 细胞工厂; 高价值化合物; 基因工程

中图分类号: Q-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2021)12-0142-08

DOI: 10.11759/hyxx20191122003

微藻是一类分布广泛的光合自养单细胞生物的总称, 包括了许多原核和真核的种类, 它们通过细胞代谢可以产生多糖、蛋白质、色素、脂质等多种高价值化合物, 这使其在食品保健、医药、生物燃料等领域具有很好的开发前景。微藻的规模化养殖在解决传统生物量生产和市场未来的一些局限性方面发挥着推进作用, 例如, 从微藻中提取高价值副产品使基于微藻的可再生能源成为经济可行的选择^[1]。此外, 工业上用于生物量生产的一些绿藻在国际市场上被认为是安全的, 这说明直接以微藻细胞为原料, 通过简单的处理和加工来生产微藻产品是可行的^[2]。然而, 直接利用微藻生产高价值化合物较为困难且产量低^[3], 这使得大多数的微藻产品经济效益低下。为了改变这一现状, 通过基因工程技术引入外源基因来提高细胞代谢物的含量已经成为高产藻株选育的一种重要的手段。本文综述了微藻基因工程的研究进展及基因工程在高价值微藻产品生产上的应用, 以期基因工程技术在提高微藻产品经济竞争力中发挥重要的作用。

1 微藻的基因工程

单细胞微藻在学术研究和工业生物技术应用方面具有独特的优势, 其原因主要有三点: 1) 微藻以光合固碳为主的生活方式; 2) 细胞内可合成多种高价值的天然产物; 3) 对高通量技术的适应性^[4]。微藻的基因工程从一个基因开始, 操作或导入该基因就

会获得所需要的表型^[5], 这种技术可以改善藻类的代谢, 并通过引入外源基因以获得所需要的高价值化合物, 如重组蛋白质、色素以及其他代谢产物^[6]。将基因元件(启动子、转录调控区域、核糖体结合位点、开放阅读框、终止子等)有机地连接起来, 便形成了功能基因模块^[7], 把功能基因模块导入已有生物网络, 异源表达出底盘细胞不能合成的产物或对已有的产物进行优化, 在药物、能源、食品等方面已有突出进展。

1.1 原核微藻的基因工程

原核微藻是地球上最古老的一类生物之一, 主要以蓝藻(也被称为蓝细菌)为主, 螺旋藻、集胞藻等都属于原核微藻。相对于真核微藻, 原核微藻更容易获得高的生物量积累, 这是建立生产高价值化合物细胞工厂的有利条件。目前, 在一些蓝藻中已经建立了成熟的遗传转化体系, 包括合适的外源基因插入位点、基因表达调控元件、筛选标记基因以及转化方法等。

收稿日期: 2019-11-22; 修回日期: 2020-09-16

基金项目: 国家自然科学基金(31972815)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 31972815]

作者简介: 王康(1995—), 男, 山东济宁人, 博士研究生, 主要从事微藻代谢工程和分子遗传学的研究, 电话: 13258052731, E-mail: wangkangsdut@126.com; 孟春晓(1976—), 通信作者, 女, 山东淄博人, 教授, 主要从事微藻生理学和微藻分子遗传学的研究, E-mail: mengchunxiao@126.com; 秦松(1968—), 通信作者, 男, 山东掖县人, 研究员, 主要从事分子藻类学研究, E-mail: sqin@yic.ac.cn

螺旋藻具有很高的蛋白质含量,且适合规模化养殖。目前,我国的螺旋藻生物量产量能够达到 10 000 t/a(细胞干重)。但是,螺旋藻细胞内较高的核酸酶活性抑制了外源基因的整合,使螺旋藻遗传转化体系的构建变得极为困难。集胞藻拥有一套天然的转化系统且遗传背景清晰,在集胞藻中可以通过同源重组的方法将外源基因整合到染色体上,是目前基因工程研究最常用的藻株之一^[8]。

1.2 真核微藻的基因工程

由外源基因编码的蛋白质通常在细胞核或叶绿体中表达,建立高效的转化体系有利于提高微藻潜在的应用价值,因此许多科学家和公司正向这样的方向发展。在对微藻进行设计时,应考虑两个转化系统的特性,选择合适的转化系统达到自己的目的。目前,莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是最先进的微藻平台,其有两套成熟的转化系统:核转化系统及叶绿体转化系统,并在科学研究中得到了广泛的应用^[9]。外源基因表达的难题促进了微藻基因工程领域的研究,加快了启动子及筛选标记在转基因微藻中的应用速度。但是,目前已成功实现外源基因转化的微藻种类仍然有限。对于新的藻种的转化,特别是具有重要商业价值的微藻,将有更多的工作有待进一步开展。

1.2.1 核转化

微藻的遗传操作需要稳定的核转化,并且能够高效地表达重组蛋白质或关键酶以提高目标化合物的产量。但是外源 DNA 核表达的低效一直是难以解决的问题,目前,已经提出位置效应、RNA 沉默、过度紧凑的染色质结构和非常规的表观遗传效应作为杜氏藻中外源蛋白核表达低效的可能原因^[10]。此外,也有报道称低表达水平可能是由于外源 DNA 的随机整合^[11],这种现象也被认为是外源 DNA 的染色质结构或调节元件对宿主基因组中整合位点产生的影响^[10],基因编辑技术的应用将会促进这一问题的解决。

1.2.2 叶绿体转化

叶绿体转化利用 DNA 同源重组机制,在外源基因两个侧翼加入底盘细胞叶绿体基因组中两段相邻的同源序列,从而较精确地控制外源基因插入叶绿体基因组中的功能基因之间,避免产生位置效应。并且该转化系统表达的重组蛋白质不需要翻译后修饰^[12],可以成功地在叶绿体基因组中获得外源蛋白质的高产率。

要进行微藻叶绿体的稳定转化,必须选择合适的基因插入位点,外源基因的插入应当不影响微藻的正常生存。目前,已有许多微藻的叶绿体基因组完成测序,为外源基因在叶绿体的精确定位奠定了基础。然而,藻类叶绿体作为一个新兴的转基因平台,其进展大部分都集中在重组蛋白质的研究上,对其他高价值化合物的研究较少,取得的进展也不多。

2 基因工程的应用:微藻细胞工厂的产品

2.1 生物燃料

微藻因高碳水化合物、高脂质含量、生长速度快、对环境适应性强等优势,已经成为生物燃料生产的替代原料之一^[1, 13]。对能源需求的不断增加和生物燃料生产路线不断进步增加了微藻作为第 3 代生物燃料潜力的研究^[14]。但是,微藻生物燃料的商业化由于经济特性差而受到阻碍,基因工程技术在生物燃料生产中显示出了很有前景的结果,是目前克服这一挑战最有希望的策略之一^[15]。

2.1.1 生物柴油

在同样的条件下,微藻的光合生产率要比高等植物高数十倍,这也使一些微藻细胞中的脂肪酸合成反应异常活跃,能够在细胞中形成高达 70% 的油脂含量^[16]。单细胞的微藻不仅具有较高的生物量生产力和快速积累油脂的能力,还能够解决传统油料作物与粮食作物关于土地竞争的问题,使其成为大规模生产生物柴油的资源^[17-19]。通过基因工程和代谢工程改善微藻的脂质含量是生产具有经济竞争力的微藻生物燃料的先决条件^[20],许多研究已经实现了微藻中脂质的过量生产^[21]。

脂肪酸的生物合成途径是以丙酮酸合成的乙酰辅酶 A 为底物,经乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)的催化后进入脂肪酸合成途径。因此, Li 等^[20]在三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)叶绿体中过表达了 ACCCase,从而使细胞中的脂质过量生产,这种方法为工业上利用微藻生物反应器生产高价值化合物提供了强有力的技术支撑。然而,之前有研究报道了乙酰辅酶 A 羧化酶基因在硅藻(*Cyclotella cryptica* 和 *Navicula saprophila*)的表达导致了 ACCCase 活性的增加,但没有显著的脂质增加^[22],这可能是由于靶基因的随机整合和 ACCCase 在胞浆而非叶绿体中的非

特异性表达以及 ACCase 的抑制作用所致^[11]。基因编辑 CRISPR/Cas9 技术在微藻能源领域的应用也取得了令人鼓舞的成果,有研究者应用 CRISPR/Cas9 技术对微拟球藻(*Nannochloropsis gadatana*)的一个转录调控因子(ZnCys)作了基因敲除和部分沉默,使突变株的脂质产率比野生型提高了一倍,其原因在于 ZnCys 的敲除导致了部分蛋白合成受阻,而相应的碳源转而用于脂类合成^[19]。

脂肪酸合成酶(FAS)的核心酰基载体蛋白(ACP)与硫酯酶(TE)的相互作用调控着脂肪酸的释放,这决定了脂肪酸链的长度和性质^[23]。Blatti 等^[23]以莱茵衣藻为模型,证明了 ACP 和 TE 之间相互作用控制藻类叶绿体内脂肪酸的水解机制。表征藻类 FAS 的结构域及不同蛋白质之间的相互作用将会对优化微藻中脂肪酸生物合成酶的异源表达发挥重要的作用,从而显著改变转基因藻株的脂肪酸谱。事实上,短链脂肪酸更适于生物柴油的生产,因为较高的短链脂肪酸含量能够改善生物柴油的冷流特性^[24],因此, Liu 等^[25]将对短链脂肪酸特异的酰基-ACP 硫酯酶基因转入野生型集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803)中,显著提高了藻细胞短链脂肪酸含量。

目前,藻类学家正致力于在微藻细胞中过表达脂肪酸合成相关基因,以及下调脂肪酸 β -氧化和脂酶水解相关基因的研究^[16]。这些研究将有助于提高细胞内脂肪酸的含量,以在不久的将来更加经济地生产藻类生物柴油。

2.1.2 生物乙醇

近年来报道了很多用于生产生物乙醇的藻类,比如紫球藻(*Porphyridium cruentum*)、四肩突四鞭藻(*Tetraselmis suecica*)、链带藻(*Desmodesmus* sp.)以及工程蓝藻。其中,利用工程蓝藻(如 *Synechocystis* sp. PCC 6803 和 *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7992)直接生产乙醇的方法已经取得了很大的进展,在大肠杆菌和酿酒酵母中生产生物乙醇的研究促进了这一进程^[14]。

微藻细胞内通过光合作用积累的碳水化合物有利于生物乙醇的产生,然而,“光发酵”在自然界是行不通的,需要通过基因工程方法对微藻原有的生物化学途径进行遗传改造,从而有效地生产生物乙醇。Dexter 等^[8]利用同源重组系统将来源于运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的丙酮酸脱羧酶(PDC)和乙醇脱氢酶(ADH II)基因整合到集胞藻 PCC 6803 染色体中,促进了生物乙醇的生产。为了提高光合蓝

藻系统中的乙醇产量,需要解决的一个问题是蓝藻细胞的低乙醇耐受性。Song 等^[26]在集胞藻 PCC 6803 中发现了一个与乙醇耐受性直接相关的转录因子 *Slh0794*,该基因可以作为基因工程的有价值靶标,以进一步改善集胞藻对乙醇的耐受性。此外, Yoshikawa 等^[27]通过代谢工程研究发现烟酰胺辅酶 [NAD(P)H]脱氢酶基因的敲除显著提高了乙醇产量,敲除该基因的藻株较对照藻株提高了 145%。研究微藻生物乙醇的关键是要提高微藻生产乙醇的能力,在经济上减小化石能源的优势,使微藻生物乙醇成为可行的选择。

2.1.3 生物氢

不同于生物柴油和生物乙醇,氢气的燃烧仅产生水(H_2O),不会产生污染物质和二氧化碳(CO_2),能够缓解全球变暖和污染问题^[28]。微藻在阳光下通过叶绿体氢化酶(HydA1 和 HydA2)催化从 H_2O 中提取质子(H^+)和电子(e^-)并将其利用直接制氢^[29]。有报道表明氧气(O_2)的存在会不可逆地抑制叶绿体氢化酶的活性^[30-32],并且也对转录和蛋白质成熟也有抑制作用^[33]。

目前已经确定了产生耐 O_2 氢化酶的策略,即一方面改造耐受 O_2 的藻类内源性氢化酶^[34],另一方面可以在微藻中异源表达 O_2 耐受性氢化酶^[35]。定点突变可用于内源性氢化酶的修饰^[36],随机和定点突变都有助于获得具有高 O_2 耐受性氢化酶的微藻突变株^[37]。Xu 等^[35]将桃红莱硫菌 (*Thiocapsa roseopersicina*)的 O_2 耐受性氢化酶基因 *hydS* 和 *hydL* 转入集胞藻 PCC 7942 中,得到了一种重组蓝藻产氢系统。然而,能够转入微藻的 O_2 耐受性氢化酶基因太少。于是, Xu 等^[38]在莱茵衣藻中引入了一条消耗 O_2 新的途径,即将大肠杆菌的丙酮酸氧化酶(PoX, 消耗 O_2 催化丙酮酸脱羧成乙酰磷酸和 CO_2)转入衣藻,在不影响生长的情况下将 H_2 的产量增加到野生型的 2 倍。另外,在微藻叶绿体中引入 O_2 的螯合剂也可以有效地清除细胞中的 O_2 。固氮根瘤菌(*Rhizobia*) 中的豆血红蛋白(leghemoglobins, LbA)可以螯合并运输 O_2 , 且已经证明 *lba*(豆血红蛋白基因)的表达可以提高 H_2 的产率^[39],因此,将 *hemH*(亚铁螯合酶)基因和 *lba* 基因整合到衣藻叶绿体中获得了高表达的 HemH-LbA 蛋白,从而通过增强呼吸速率提高了藻类 H_2 产量^[40]。了解 H_2 生产途径的分子基础以及基因工程技术的应用可以增强微藻生物氢的产生,以促进微藻生物氢的工业化生产。

2.2 医药与保健功能食品

商业上用于食品和膳食补充剂生产的微藻在国际上被认为是安全的^[2], 因此, 微藻及微藻产品在医药工业中的应用正逐步受到人们的重视。近年来, 一些重组治疗蛋白质已经在微藻中成功表达, 微藻中一些重要药用成分的应用也被广泛研究。

2.2.1 重组治疗蛋白质

重组蛋白质通常在藻类叶绿体基因组中表达。在藻类叶绿体中表达的重组蛋白质之所以特别有吸引力, 是因为该细胞器含有适于使用合成生物学方法进行遗传操作的最小基因组, 并且转基因可以精确定位于特定的基因组位点, 适合重组蛋白质高水平、可调节和稳定的表达^[41]。近几年, 重组治疗性蛋白质在微藻叶绿体表达的技术已经日趋成熟。研究重点已经转移到生物技术的应用和微藻叶绿体作为蛋白质工厂的开发上, 并通过在质体中添加新的基因来制造有价值的重组产品, 比如单克隆抗体、免疫毒素等蛋白质产品。

到目前为止, 单克隆抗体的生产成本一直是非常昂贵的。利用基因工程技术在原核或真核表达系统中生产单克隆抗体不仅能够降低成本, 还可以最大程度降低抗体的鼠源性, 从而降低甚至消除人体对抗体的排斥反应。Hempel 等^[42]在三角褐指藻中引入外源基因以产生针对马尔堡病毒(*Marburg virus*)核蛋白的单克隆 IgG 抗体, 并经过多种测试证实了抗体的安全性和耐受性; 另外, 有研究者利用细胞结合实验和表面等离子体共振对三角褐指藻产生的抗乙型肝炎重组 IgG 分别与两个人类 Fc γ 受体(Fc γ RI 和 Fc γ RIIIa)的结合能力进行了表征, 结果表明藻源性抗体可与 Fc γ RI 和 Fc γ RIIIa 结合, 并且其与 Fc γ RIIIa 的亲合力是正常人 IgG1 的 3 倍^[43]; 这些研究突出了微藻作为单克隆抗体的稳定和低成本表达平台的潜力。此外, 微藻还是生产免疫毒素的极具吸引力的宿主, Tran 等^[44]设计了一种由 B 细胞表面分子 CD22 的单链抗体(scFv)与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)外毒素 A(PE40)的结构域 II 和结构域 III 融合而成免疫毒素基因 22PE40, 经过修饰的毒素无法与细胞结合, 产生的免疫毒素的毒性比天然外毒素 A 低 100 倍, 因此更加安全。目前, 藻类学家们正致力于重组蛋白质遗传工具和生产条件的优化^[45-49], 以提高微藻叶绿体外源蛋白表达的产量。

选择一个高活性的启动子是实现重组蛋白质高

效表达的关键, 因此许多研究集中在通过研究启动子的效率来提高微藻中的重组蛋白质产量^[10, 50]。对于微藻中的外源基因表达, 已开发出多种不同的启动子, 但大多数是组成型启动子或内源性诱导启动子, 它们的应用仅限于目标宿主和产品, 且调控能力有限。因此, Lee 等^[50]在莱茵衣藻中成功开发出了一种由调节蛋白质 AlcR 和控制 *alcA* 基因表达的启动子(*PalcA*)组成的可用于重组蛋白质生产的外源诱导型启动子 AlcR-*PalcA* 系统, 使靶基因的表达响应乙醇的诱导。尽管重组蛋白质表达水平较低, 但这个系统的开发对于重组蛋白质的生产具有重要的意义。

传统蛋白质生物制品的生产成本昂贵且对技术要求苛刻, 需要精密的发酵设备, 昂贵的下游加工、冷藏和运输成本以及无菌输送方法^[41]。相比之下, 微藻重组治疗蛋白质的生产更加经济可持续。目前, 在微藻中生产的生物药物已经被批准用于商业生产, 并且少数药物已经在动物实验中进行了测试^[51]。然而, 在微藻基因工程药物完全取代传统表达系统的生物药物之前, 还需要大量的基础研究对微藻生物药物的安全性进行验证。

2.2.2 保健功能食品

微藻可作为功能性产品的来源。研究表明, 微藻及微藻产品有增加人体免疫力、抗肿瘤和对心血管系统保健的作用, 对一些疾病有预防和治疗作用。微藻作为食品的开发已有几十年的历史, 随着对微藻营养作用的不断阐明, 人们越来越重视微藻保健功能食品的开发与利用。以类胡萝卜素为例, 微藻来源的天然 β -胡萝卜素比人工合成的更容易被人体吸收, 在医药行业中更令人关注。为了提高 β -胡萝卜素产量, Chen 等^[52]合成了编码 297 个氨基酸的 *psy* 基因 (891 bp), 并在栅藻(*Scenedesmus* sp. CPC2)中表达, 使重组藻株 β -胡萝卜素含量提高了 3 倍; 酮类胡萝卜素(ketocarotenoids)作为膳食补充剂需求量是很大的, 但是大多数藻类和高等植物没有胡萝卜素酮酶活性, 不合成酮类胡萝卜素。因此, 将来源于雨生红球藻(*Haematococcus puvialis*)的一些基因转入其他藻株(如衣藻、盐藻)中表达以合成酮类胡萝卜素是未来工厂化的一种很有前景的方法^[53]。编码 β -胡萝卜素酮酶和 β -胡萝卜素羟化酶的 *bkt* 和 *bch* 基因, 是雨生红球藻虾青素合成所必需的关键酶基因, Zheng 等^[54]将含有 *bkt* 和 *bch* 基因的两种载体共转化到莱茵衣藻中, 获得了比野生型多累积 34% 的虾青素。这表明

外源 *bkt* 和 *bch* 基因在藻细胞中成功表达, 并负责催化转基因藻类中虾青素的生物合成。Anila 等^[55]也通过转基因的方法验证了杜氏盐藻生产虾青素的可行性。然而, 在具有生长优势的藻株中表达虾青素的研究处于起步阶段, 存在的问题依旧是产量低下, 还需要不断地优化以提高产量。本实验室在集胞藻 PCC 6803 中构建了便于表达外源基因的遗传转化体系, 在此基础上, 转化了来源于雨生红球藻的 *bkt* 和 *crtr-b* 基因并检测到较高的虾青素产率, 但是还需要进一步优化以提高微藻积累虾青素的能力^[56]。

2.3 动物饲料和饲料添加剂

微藻是昆虫幼虫、幼鱼及贝类的天然饵料。因此, 藻类学家提出了把经过基因改造的衣藻和眼点微拟球藻(*Nannochloropsis oculata*)用于向有害昆虫(如蚊子幼虫)经口传递毒素或将疫苗和生长激素递送到养殖的鱼类和贝类体内^[57-59]。这不仅可以提高养殖鱼类和贝类幼体的成活率, 还避免了对抗生素产生抗性的病原体与废水一起传播, 从而造成严重的环境污染的风险。同样地, 一些工业化微藻的安全性和营养价值也为家禽和家畜提供了“功能化饲料”的可能性, 例如, 在衣藻中表达的植酸酶(磷酸六肌醇酶)提高了家禽和家畜对植酸的利用效率并减少了植酸的排泄^[60-61], 这证明了在不需蛋白质纯化的情况下可以直接利用转基因微藻作为食品添加剂提供膳食酶。目前, 本实验室正在建立等鞭金藻(*Tisochrysis lutea*)转基因体系, 在金藻中表达抗菌肽, 提高金藻的饵料价值, 为水产养殖开辟新途径^[62]。

3 微藻基因工程的瓶颈与展望

尽管藻类是生产各种高价值化合物的最有前景的资源, 但其大规模应用还存在一些环境和经济上的瓶颈。例如, 目前仅有少数微藻产品能够以生态友好和经济可行的方式进行规模化生产, 而使用微藻作为化石燃料替代原料的所有实践都是不成功的。到目前为止, 还没有任何工业规模的设施能够同时满足环境友好和经济可行而进行大规模藻类生物燃料的生产。有研究者已经提出从微藻中提取高价值的副产品以提高基于微藻的生物燃料的经济性^[1]; 也可以从筛选优势藻株出发, 开发稳定高产的藻株以维持低成本的规模化养殖并改进上下游工艺、完善发酵工艺, 从而提高经济效益。除此之外, 还必须寄希望于微藻领域的初创企业对微藻生物燃料以及

其他高价值产物的突破, 这可能需要更多的研究和开发资金支持并通过公共补贴与较低成本的传统产业形成竞争。

高效率且稳定的遗传转化体系仍是制约微藻基因工程的瓶颈问题, 需要通过尝试不同的转化方法、优化转化条件、筛选合适的表达载体和启动子来提高转化效率。随着高通量测序技术的不断进步, 更多藻株的基因组将会被解码, 许多未知功能的基因也会被注释, 这会促进科学家们对藻类的研究以及微藻基因工程的发展。值得一提的是, 基因编辑 CRISPR/Cas9 技术在微藻研究领域的应用也取得了令人鼓舞的成果, 研究者已经实现了对靶基因的精确敲除或敲低^[63-66]。有理由相信, CRISPR/Cas9 技术将帮助人们以更快的速度来对目的基因进行编辑, 不仅仅是理解它们的功能, 更重要的是对目标基因的改造。总而言之, 在微藻的合成生物学未取得实质性进展之前, 基因工程仍然是改造微藻的最有效手段。

参考文献:

- [1] JAGADEVAN S, BANERJEE A, BANERJEE C, et al. Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 185-205.
- [2] NORZAGARAY-VALENZUELA C D, GERMAN-BAEZ L J, VALDEZ-FLORES M A, et al. Establishment of an efficient genetic transformation method in *Dunaliella tertiolecta* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 150: 9-17.
- [3] 张学成, 杨官品. 微藻基因工程及微藻产品高值化[J]. *海洋科学*, 2000, 24(11): 24-26.
ZHANG Xuecheng, YANG Guanpin. Microalgal gene engineering and product advancement[J]. *Marine Sciences*, 2000, 24(11): 24-26.
- [4] SCAIFE M A, SMITH A G. Towards developing algal synthetic biology[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(3): 716-722.
- [5] HLAVOVA M, TUROCY Z, BISOVA K. Improving microalgae for biotechnology—From genetics to synthetic biology[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 1194-1203.
- [6] RASALA B A, MAYFIELD S P. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses[J]. *Photosynthesis Research*, 2015, 123(3): 227-239.
- [7] 李伟, 吴广畏, 杨玉萍, 等. 后基因组时代的真菌天

- 然产物发现[J]. 菌物学报, 2015, 34(5): 914-926.
- LI Wei, WU Guangwei, YANG Yuping, et al. Discovery of fungal natural product in the post-genomic era[J]. *Mycosystema*, 2015, 34(5): 914-926.
- [8] DEXTER J, FU P C. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production[J]. *Energy and Environmental Science*, 2009, 2(8): 857-864.
- [9] SCAIFE M A, NGUYEN G T, RICO J, et al. Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host[J]. *Plant Journal*, 2015, 82(3): 532-546.
- [10] AKBARI F, ESKANDANI M, KHOSROUSHAHI A Y. The potential of transgenic green microalgae; a robust photobioreactor to produce recombinant therapeutic proteins[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(11): 2783-2796.
- [11] HUERLIMANN R, HEIMANN K. Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, 33(1): 49-65.
- [12] RAVI A, GUO S, RASALA B, et al. Separation options for phosphorylated osteopontin from transgenic microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 585-600.
- [13] SHUBA E S, KIFLE D. Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 81: 743-755.
- [14] DE FARIAS SILVA C E, BERTUCCO A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(11): 1833-1842.
- [15] RANDHAVA K S, RELPH L E, ARMSTRONG M C, et al. Biofuel production: tapping into microalgae despite challenges[J]. *Biofuels*, 2017, 8(2): 261-271.
- [16] MILANO J, ONG H C, MASJUKI H H, et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 58: 180-197.
- [17] DASGUPTA C N, SUSEELA M R, MANDOTRA S K, et al. Dual uses of microalgal biomass: An integrative approach for biohydrogen and biodiesel production[J]. *Applied Energy*, 2015, 146: 202-208.
- [18] MANDOTRA S K, KUMAR P, SUSEELA M R, et al. Fresh water green microalga *Scenedesmus abundans*: a potential feedstock for high quality biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 156(2): 42-47.
- [19] AJJAWI I, VERRUTO J, AQUI M, et al. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35: 647-652.
- [20] LI D W, XIE W H, HAO T B, et al. Constitutive and chloroplast targeted expression of acetyl-CoA carboxylase in oleaginous microalgae elevates fatty acid biosynthesis[J]. *Marine Biotechnology*, 2018, 20(5): 566-572.
- [21] XUE J, NIU Y F, HUANG T, et al. Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricoratum* for boosting neutral lipid accumulation[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 27: 1-9.
- [22] DUNAHAY T G, JARVIS E E, ROESSLER P G. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*[J]. *Journal of Phycology*, 1995, 31(6): 1004-1012.
- [23] BLATTI J L, BELD J, BEHNKE C A, et al. Manipulating fatty acid biosynthesis in microalgae for biofuel through protein-protein interactions[J]. *PloS One*, 2012, 7(9): e42949.
- [24] TEO W S, LING H, YU A Q, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid short- and branched-chain alkyl esters biodiesel[J]. *Biotechnology of Biofuels*, 2015, 8(1): 1-9.
- [25] LIU X, SHENG J, CURTISS III R. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(17): 6899-6904.
- [26] SONG Z, CHEN L, WANG J, et al. A transcriptional regulator SII0794 regulates tolerance to biofuel ethanol in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2014, 13(12): 3519-3532.
- [27] YOSHIKAWA K, TOYA Y, SHIMIZU H. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for enhanced ethanol production based on flux balance analysis[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, 40(5): 791-796.
- [28] SINGH H, DAS D. *Biofuels from microalgae: biohydrogen*[M]. Cham: Springer, 2018: 201-228.
- [29] KRUSE O, RUPPRECHT J, BADER K P, et al. Improved photobiological H₂ production in engineered green algal cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(40): 34170-34177.
- [30] STRIPP S T, GOLDET G, BRANDMAYR C, et al. How oxygen attacks [FeFe]-hydrogenases from photosynthetic organisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(41): 17331-17336.
- [31] MULDER D W, BOYD E S, SARMA R, et al. Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA^{ΔEFG}[J]. *Nature*, 2010, 465(7295): 248-251.
- [32] MILRAD Y, SCHWEITZER S, FELDMAN Y, et al. Green algal hydrogenase activity is outcompeted by carbon fixation before inactivation by oxygen takes place[J]. *Plant Physiology*, 2018, 177(3): 918-926.

- [33] OEY M, SAWYER A L, ROSS I L, et al. Challenges and opportunities for hydrogen production from microalgae[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(7): 1487-1499.
- [34] CHANG C H, KING P W, GHIRARDI M L, et al. Atomic resolution modeling of the ferredoxin: [FeFe] hydrogenase complex from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biophysical Journal*, 2007, 93(9): 3034-3045.
- [35] XU Q, YOUSEPH S, SMITH H O, et al. Development of a novel recombinant cyanobacterial system for hydrogen production from water[C]// Washington D C. DOE Genomics: GTL Contractor-Grantee Workshop III. Rockville: J. Craig Venter Institute, 2005: 63.
- [36] LONG H, KING P W, GHIRARDI M L, et al. Hydrogenase/ferredoxin charge-transfer complexes: effect of hydrogenase mutations on the complex association[J]. *Journal of Physical Chemistry A*, 2009, 113(16): 4060-4067.
- [37] GHIRARDI M L, ZHANG L, LEE J W, et al. Microalgae: a green source of renewable H₂[J]. *Trends Biotechnology*, 2000, 18(12): 506-511.
- [38] XU F Q, MA W M, ZHU X G. Introducing pyruvate oxidase into the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* increases oxygen consumption and promotes hydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(17): 10648-10654.
- [39] WU S, HUANG R, XU L, et al. Improved hydrogen production with expression of *hemH* and *lba* genes in chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 146(3): 120-125.
- [40] WU S, XU L, HUANG R, WANG Q. Improved biohydrogen production with an expression of codon-optimized *hemH* and *lba* genes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2610-2616.
- [41] TAUNT H N, STOFFELS L, PURTON S. Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals[J]. *Bioengineered*, 2018, 9(1): 48-54.
- [42] HEMPEL F, MAURER M, BROCKMANN B, et al. From hybridomas to a robust microalgal-based production platform: molecular design of a diatom secreting monoclonal antibodies directed against the *Marburg virus* nucleoprotein[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 131-140.
- [43] VANIER G, STELTER S, VANIER J, et al. Alga-made anti-Hepatitis B antibody binds to human Fcγ receptors[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13: 1700496.
- [44] TRAN M, HENRY R E, SIEFKER D, et al. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(11): 2826-2835.
- [45] GIMPEL J A, HYUN J S, SCHOEPP N G, et al. Production of recombinant proteins in microalgae at pilot greenhouse scale[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(2): 339-345.
- [46] RAMOS-MARTINEZ E M, FIMOENARI L, SAKURAGI Y. High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(9): 1214-1224.
- [47] LAUERSEN K J, HUBER I, WICHMANN J, et al. Investigating the dynamics of recombinant protein secretion from a microalgal host[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 215: 62-71.
- [48] BRAUN-GALLEANI S, BAGANZ F, PURTON S. Improving recombinant protein production in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast using vivid Verde Fluorescent Protein as a reporter[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(8): 1289-1297.
- [49] CARRERA-PACHECO S E, HANKAMER B, OEY M. Optimising light conditions increases recombinant protein production in, *Chlamydomonas reinhardtii*, chloroplasts[J]. *Algal Research*, 2018, 32: 329-340.
- [50] LEE S, YONG J L, CHOI S, et al. Development of an alcohol-inducible gene expression system for recombinant protein expression in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(4): 1-8.
- [51] DYU Y M, PURTON S. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins[J]. *Microbiology*, 2018, 164(2): 113-121.
- [52] CHEN C Y, KAO A L, TSAI Z C, et al. Expression of synthetic phytoene synthase gene to enhance β-carotene production in *Scenedesmus* sp. CPC2[J]. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(11): 1700268.
- [53] VILA M, GALVAN A, FERNANDEZ E, et al. Ketocarotenoid biosynthesis in transgenic microalgae expressing a foreign β-C-4-carotene oxygenase gene[M]. Totowa: Humana Press, 2012: 283-295.
- [54] ZHENG K J, WANG C G, XIAO M, et al. Expression of *bkt* and *bch* genes from *Haematococcus pluvialis* in transgenic *Chlamydomonas*[J]. *Science China Life Sciences*, 2014, 57(10): 1028-1033.
- [55] ANILA N, SIMON D P, CHANDRASHEKAR A, et al. Metabolic engineering of *Dunaliella salina* for production of ketocarotenoids[J]. *Photosynthesis Research*, 2016, 127(3): 321-333.
- [56] LIU Y, CUI Y, CHEN J, et al. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 to produce astaxanthin[J]. *Algal Research*, 2019, 44: 101679.
- [57] KANG S, ODOM O W, THANGAMANI S, et al. Toward mosquito control with a green alga: Expression of Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

- (Bti) in the chloroplast of *Chlamydomonas*[J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29(3): 1377-1389.
- [58] SIRIPORNADULSIL S, DABROWSKI K, SAYRE R. Microalgal vaccines[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2007, 616: 122-128.
- [59] LI S S, TSAI H J. Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2009, 26(2): 316-325.
- [60] YOON S M, KIM S Y, LI K F, et al. Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(3): 553-563.
- [61] ERPEL F, RESTOVIC F, ARCE-JOHNSON P. Development of phytase-expressing *Chlamydomonas reinhardtii* for monogastric animal nutrition[J]. BMC Biotechnology, 2016, 16(1): 29-35.
- [62] BO Y, WANG K, WU Y, et al. Establishment of a chloroplast transformation system in *Tisochrysis lutea*[J]. Journal of Applied Phycology, 2020, 32: 2959-2965.
- [63] JIANG W, BRUEGGEMAN A J, HORKEN K M, et al. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Eukaryotic Cell, 2014, 13(11): 1465-1469.
- [64] SHIN S E, LIM J M, KOH H G, et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27810.
- [65] HU G R, FAN Y, ZHENG Y L, et al. Photoprotection capacity of microalgae improved by regulating the antenna size of light-harvesting complexes[J]. Journal of Applied Phycology, 2020, 32(2): 1027-1039.
- [66] WANG Q, LU Y, XIN Y, et al. Genome editing of model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by CRISPR/Cas9[J]. Plant Journal, 2016, 88(6): 1071-1081.

Application of microalgae genetic engineering in the production of high-value compounds

WANG Kang^{1,2}, CUI Yu-lin^{1,3}, GAO Zheng-quan⁴, MENG Chun-xiao⁴, QIN Song^{1,3}

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China)

Received: Nov. 22, 2019

Key words: microalgae; cell factory; high-value compounds; genetic engineering

Abstract: Microalgae has the potential to be a cell factory in the production of proteins, oils, and pigments and is crucial in solving problems of traditional biomass production and future market. Genetic engineering promotes the improvement and industrialization of microalgae. In this paper, the research progress of microalgae genetic engineering and genetic engineering application in the microalgae production of biofuels and medicines are reviewed. This article can provide some ideas for the research and application of genetic engineering technology in microalgae, thereby facilitating microalgae and microalgae products to become more economically competitive.

(本文编辑: 杨悦)