微藻代谢工程改造研究进展及展望

陈百灵¹, 白凤武^{1,2}, 赵心清^{1*}

1. 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240;

2. 大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024

* 联系人, E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-04-05; 接受日期: 2017-05-10; 网络版发表日期: 2017-05-18

国家自然科学基金(批准号: 21536006)资助

摘要 微藻种类繁多, 分布广泛, 很多微藻能通过自身代谢生产油脂、色素、多糖等高价产品。但通常情况下, 微藻生产高价产品时存在产物含量低以及细胞采收成本高等缺点, 限制了微藻产品的实际应用。为了有效开发利用微藻资源, 研究如何利用遗传改造技术选育藻株, 提高其代谢物含量, 并改善微藻采收效率十分重要。近年来, 利用代谢工程改造微藻取得了显著进展, 此外, 微藻基因组编辑及合成生物学研究也不断深入, 这些遗传改造技术的不断进步和创新, 必将提高微藻重要代谢物的生产效率, 以满足人类不断增长的能源、食品和制药工业需求。

关键词 微藻, 代谢工程, 合成生物学, 高价产品, 基因组编辑

微藻种类多样, 广泛存在于自然界, 可利用光合作用或环境废水中的营养物质等, 通过自身代谢合成多种高价值化合物, 如三酰甘油(triacylglyceride, TAG)、多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)、叶绿素、类胡萝卜素、多糖和藻胆蛋白等。同时, 通过遗传改造可将微藻作为细胞工厂生产疫苗、免疫毒素和重组蛋白等^[1-4]。此外, 与绿色植物相比, 微藻具有生长迅速、不与粮争地、环境适应能力强等优点, 使其成为非常有潜力的可持续资源, 在能源、食品、环境和医药等领域有广泛的应用前景^[5]。

虽然利用微藻代谢产物生产高价产品有很多优点, 但其代谢产物含量少、生物量低、采收困难等一系列因素造成其经济成本过高, 极大地限制了微藻资源的开发利用。与不可再生化石能源相比, 利用微藻

生产生物能源仍然不具备竞争力。对微藻进行代谢工程改造提高生产生物燃料和高价产品的效率, 已成为近年来研究的热点^[6]。深入了解遗传操作和代谢调控机制, 有利于更好地开发利用微藻资源。虽然已建立了一些微藻种类的遗传转化体系, 但转化效率低、转化子不稳定等现象仍广泛存在。目前的遗传改造策略多是通过单个基因的操作来改变代谢产物含量, 但大多收效甚微^[5]。近年来, 众多新技术的出现, 为微藻高效代谢工程改造提供了可能。随着基因组学、转录组学、蛋白组学和代谢组学的发展, 微藻的代谢调控机制可以在不同层次得以全面揭示, 为更好地进行定向调控提供契机。系统生物学分析结合基因功能验证可寻找代谢途径过程中的关键基因和转录因子^[7], 进而利用转录工程策略, 整体调控代谢通路, 增加代

引用格式: 陈百灵, 白凤武, 赵心清. 微藻代谢工程改造研究进展及展望. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 554-562

Chen B L, Bai F W, Zhao X Q. Metabolic engineering of microalgae: a review and future prospects. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 554-562, doi: 10.1360/N052017-00087

谢物产量^[5]. 基于成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas核酸酶系统基因组编辑技术的出现, 为藻类遗传改造提供了有利的工具^[8-10]. 此外, 利用合成生物学技术, 可在微藻中重新设计或引入新的代谢途径生产高价值产品^[11]. 系统生物学、基因组编辑以及合成生物学的进展, 为微藻的代谢工程改造提供了更高效的技术方法. 本文对微藻代谢工程改造的研究进展进行综述, 并对相关研究的未来发展趋势进行了展望.

1 微藻资源的应用

1.1 生物能源

已有研究表明, 微藻具有生产生物柴油、氢气、生物乙醇等生物能源的重要潜能. 微藻细胞能储存大量油脂, 其中大部分以TAG的形式存在, 是生产生物柴油的理想资源^[12]. 微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)在氮胁迫条件下能积累高达干重68.5%的油脂, 大部分以TAG形式存在^[13]. 虽然微藻能积累大量油脂, 但很难与生长同步, 是微藻生产生物柴油的限制因素^[14]. 科研人员对氮胁迫诱导微藻油脂积累的机制开展了大量研究, 找出了影响微藻脂类合成的关键基因和转录因子^[15]. 微藻在轻度缺氧和厌氧条件下可以利用氢化酶作为催化剂生产氢气^[16]. 可自身在黑暗厌氧条件下直接产乙醇, 也可作为细菌和酵母发酵的碳源生产生物乙醇, 目前已有通过代谢工程方法改造原核蓝藻(*Cyanobacteria*)生产乙醇的相关报道^[17-22]. 虽然已有大量研究报道了微藻生产生物能源的优势, 但成本依然是瓶颈问题, 依靠传统的育种技术和工程优化不能从根本上解决问题, 还需要利用遗传改造等新方法才有可能从根本上解决微藻生物产能的瓶颈. 例如, 通过过表达叶绿体氢化酶(chloroplast hydrogenase, *HydA*)基因^[23]和抑制光系统II氧复合体蛋白(oxygen-evolving enhancer protein, *PsbO*)基因的表达^[24], 小球藻的产氢能力提高7~10倍.

1.2 高附加值产品

微藻因富含 ω -3脂肪酸、色素和多糖等高附加值化合物被广泛应用于人类食品、动物饲料添加剂和化妆品等领域, 是商业化生产 ω -3脂肪酸和类胡萝卜

素的重要来源^[25,26]. ω -3多不饱和脂肪酸中, 二十碳五烯酸(eicosatetraenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)有重要的医疗和保健作用. EPA能够帮助降低体内胆固醇和甘油三酯的含量, 预防脑溢血和高血压等心血管疾病^[27]. DHA俗称脑黄金, 是大脑和视网膜的重要组成部分, 维持神经细胞生长和功能的重要元素, 对胎儿的智力和视力发育至关重要^[28-30]. 此外, 微藻中含有叶绿素、 β -胡萝卜素、 α -胡萝卜素、叶黄素、番茄红素、玉米黄质和虾青素等多种色素^[31]. 这些色素中, 叶黄素和虾青素具有强抗氧化活性, 对人类的健康非常有益, 可应用于化妆品和食品工业. 虾青素由于具有超强的抗氧化能力和保健功效, 利用传统的雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)生产天然虾青素的产量已不能满足市场的需求, 如何提高虾青素的含量是个亟待解决的问题. 此外, 微藻还富含多糖, 具有抗氧化、抗菌、抗病毒及降血糖等活性. 虽然微藻富含多种高附加值产物, 但商业化生产成功的案例并不多, 如何降低生产成本对其进行高效利用是微藻应用迫切需要解决的问题^[32].

2 构建微藻细胞工厂相关代谢工程改造技术研究进展

代谢工程和合成生物学的出现, 为微藻的高效利用提供了可能. 对微藻进行遗传改造需要首先建立遗传转化系统, 在此基础上可结合系统生物学分析, 寻找关键的代谢工程改造靶点, 对其进行代谢工程改造.

2.1 微藻遗传转化系统研究进展

进行微藻代谢工程改造, 首先需要稳定的遗传转化方法. 微藻的遗传转化方法主要有基因枪、玻璃珠、电转化和农杆菌介导等. 基因枪转化法操作成熟, 但需要昂贵的设备费用高, 玻璃珠转化简单费用低廉, 但原生质体再生困难^[33]. 电转化方法简单易操作, 被认为是一个非常有效的方法, 转化体系已经在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)^[34]、小球藻(*Chlorella vulgaris*)^[35]、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)^[36]和微拟球藻(*Nannochloropsis*)^[37]中取得成功. 本课题组^[38]利用电转化建立了斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)的遗传转化系统, 为进一步进行代谢工程改造提供了基础. 虽然一些微藻已建立

了较为成熟的电转化体系,但仍存在转化效率低、转入外源基因不稳定等问题。农杆菌介导的遗传转化具有操作简便、转化率高、可低拷贝和大片段整合外源基因在宿主染色体上等优点,已经在植物中广泛应用^[39],在部分微藻如莱茵衣藻^[40]、小球藻^[41]、斜生栅藻^[42]、微拟球藻^[43]和杜氏盐藻(*Dunaliella bardawil*)^[44]等中取得成功。影响微藻遗传转化效率有很多因素,启动子是重要因素之一。已有研究证明,嵌合启动子和合成启动子能提高莱茵衣藻的转化效率,热休克蛋白(*HSP70A*)和核酮糖二磷酸羧化酶(*RBCS2*)嵌合启动子较*RBCS2*启动子转化效率能提高8倍^[45],而合成启动子较*HSP70A-RBCS2*转化效率又有所提高^[46],此外启动子上游或下游加入内含子序列也能增加转化效率^[47]。藻株状态、培养条件及转化参数等均会影响转化效率。此外,建立高效遗传转化体系必须根据藻种特性选择合适的方法和条件进行。

2.2 基因组编辑技术

基因组编辑技术主要有转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术、锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)技术和CRISPR/Cas核酸酶系统。这些技术已被广泛用于模式生物、经济动植物的遗传操作,在微藻中亦有成功应用实例^[48]。Sizova等人^[49]通过筛选特异性及亲和力最强的ZFN与外源DNA共转化莱茵衣藻,实现了以抗性荧光标记作为靶基因的定点敲除,并建立了莱茵衣藻ZFN基因组资源库^[50]。TALNE技术充当转录活化因子激活了莱茵衣藻ABC转运蛋白3(ABC transporter 3, *HLA3*)^[51]和芳基硫酸酯酶(periplasmic arylsulfatase, *ARS*)基因^[52]的过表达。利用TALNE技术结合巨核酶技术(meganucleases)定向修饰三角褐指藻基因组,定向突变和基因插入效率分别达到了56%和27%,通过破坏其UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase, UGPase),使TAG含量增加了45倍^[53]。ZFN和TALEN是由蛋白质引导的基因组编辑方法,其关键在DNA特异结合蛋白模块的设计和修饰,CRISPR/Cas核酸酶系统是由RNA发挥“定点”作用,无需对DNA结合蛋白模块本身进行修饰改造,只需设计特异性gRNA(guide RNA),操作更容易^[48]。此外,CRISPR/Cas系统可设计多条gRNA,实现多位点同步编辑^[54]。目前,CRISPR/Cas系统已被用于莱茵衣藻^[8,55,56]、三角褐指

藻^[9]及微拟球藻^[10]基因组编辑。Jiang等人^[55]实现了Cas9核酸酶和gRNA在莱茵衣藻中的瞬时表达,但转化子不能稳定遗传,Cas9核酸酶的持续表达可能会对细胞产生毒性,为了避免Cas9核酸酶对细胞的毒性和降低脱靶效率,Shin等人^[8]直接电转化向莱茵衣藻中导入Cas9核酸酶和gRNA,转化效率提高了100倍。CRISPR/Cas技术遗传改造莱茵衣藻,提高了其生产玉米黄质和光合作用的能力^[56]。我国学者利用CRISPR/Cas技术对微拟球藻硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)进行编辑,5bp碱基的敲除就破坏了硝酸还原酶基因功能,CRISPR/Cas编辑技术为进一步改造微拟球藻提供了基础^[10]。研究人员曾尝试验证Cas9核酸酶的表达情况,但实验均失败,猜测与Cas9核酸酶在微藻中表达会对细胞产生毒害作用或者蛋白含量太低有关^[9,10,55]。已有研究证明,微藻叶绿体转化体系稳定且容易编辑,可以构建稳定的叶绿体转化体系生产目的蛋白。如何能够提高基因编辑技术的准确率、降低脱靶效应和提高转化子的稳定性是应用于微藻遗传改造的前提。更多关于CRISPR/Cas系统在微藻中的应用总结见表1。

2.3 微藻代谢工程改造研究进展

多次内共生和基因的水平转移及进化过程,导致微藻不同种属之间出现较高水平的遗传多样性,生理和代谢过程存在显著差异^[57,58]。代谢工程期望通过遗传改造细胞最大程度地生产代谢产物降低成本,微藻系统发育多样性和遗传转化方法的限制,导致微藻代谢工程进展缓慢,目前研究也多局限于莱茵衣藻和三角褐指藻等模式藻种,代谢产物多集中于油脂合成领域。微藻代谢工程多通过单个基因的表达和敲除实现,例如,在三角褐指藻中表达绿藻来源的 $\Delta 5$ 延伸酶($\Delta 5$ -elongase)其DHA含量提高8倍^[59],敲除丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)其中性脂含量增加82%^[60]。此外,通过反义和干扰RNA技术抑制多功能脂肪酶/磷脂酶/酰基转移酶活性,海藻藻(*Thalassiosira pseudonana*)总脂含量增加2~3倍且生长不受影响^[61]。通过在莱茵衣藻^[62]和小球藻^[63]中表达经过修饰的八氢番茄红素去饱和酶(phytoene desaturase, *PDS*)基因,类胡萝卜素含量增加并获得除草剂抗性。代谢工程也能调控微藻的光合作用,敲除莱茵衣藻中的光捕获复合物(light-harvesting complex proteins, LHCBM)1, 2和3,叶绿素含量下降50%,光渗透率增加

表 1 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在微藻中的应用

物种名称	转化元件	靶基因	转化方法	突变频率	参考文献
莱茵衣藻	pBlueScript	雷帕霉素敏感基因(<i>FKB12</i>)	电转化	$<1 \times 10^{-9}$	[55]
莱茵衣藻	Cas9 蛋白、sgRNA 和线性化载体 pCr202 或 pCr112	叶绿体 SRP43 基因(<i>CpSRP43</i>) 镁原卟啉 IX S-腺苷甲硫氨酸-O-甲基转移酶基因(<i>ChlM</i>)	电转化	$\sim 1 \times 10^{-7}$	[8]
莱茵衣藻	Cas9 蛋白和 sgRNA	玉米黄素环氧酶基因(<i>ZFP</i>) 叶绿体 SRP 受体(<i>CpFtsy</i>)	电转化	0.46×10^{-2}	[56]
三角褐指藻	pKS diaCas9_sgRNA	叶绿体信号识别颗粒 54 基因(<i>CpSRP54</i>)	基因枪	0.31	[9]
微拟球藻	表达框	硝酸还原酶基因(<i>NR</i>)	电转化	$1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2}$	[10]

了 4 倍,在一定光照强度下转化子生长量提高了 85%^[64].

微藻代谢途径复杂,简单的单基因操作很难得到商业化生产藻株,例如,在莱茵衣藻中表达 β -胡萝卜素酮化酶(β -carotene ketolase, *BKT*)基因,检测到基因表达但未检测到酮类胡萝卜素^[65],降低其八氢番茄红素去饱和酶基因的表达水平,类胡萝卜素水平却未发生改变^[66],推测与微藻中存在其他的限速步骤或体内小 RNA 系统导致基因沉默阻碍代谢调控有关^[67, 68]. 转录工程可以通过调控关键元件(如转录因子),同时调节一条代谢途径上的多个组分,达到增加代谢产物的目的^[5],通过表达、突变和修改启动子区域的转录结合结构域等策略来调控代谢过程. Ngan 等人^[69]在莱茵衣藻中鉴定并表达触发细胞溶质脂类积累的关键开关 MYB 家族磷饥饿响应转录因子 1 (MYB-family transcription factor Pi starvation response 1, *PSR1*),增加了细胞内脂质的含量, *PSR1* 还与莱茵衣藻中淀粉积累有关^[70],过表达还能增加淀粉含量和引起特定淀粉代谢基因的表达上调. 突变控制莱茵衣藻细胞静止和增殖的转录因子三酰基甘油酰基水解酶 7 (compromised hydrolysis of triacylglycerols 7, *CHT7*),在不影响生长的情况下能促进 TAG 的积累^[71]. 此外,加州大学研究者开发了一种 CRISPR 支架 RNA (scaffold RNAs, *scRNA*) 技术能调节基因的转录,同时实现对不同基因的激活和抑制,已在酵母和人类细胞中验证其功能^[72]. 转录工程在微藻中还处于起步阶段,对不同微藻转录因子的挖掘和功能的深入研究,将有助于更好地利用转录工程队微藻进行改造.

目前对微藻的代谢调控机制了解不多,限制了微藻的遗传改造进程. 系统生物学高效整合组学数据信息和构建基因组规模代谢网络模型,从整体水平认识

微藻的代谢途径和基因调控网络,为微藻遗传改造提供背景信息. 通过重构小球藻的初级代谢网络,并结合代谢组学和代谢流分析方法展开基础研究,利用动态流分析解析了其氮代谢特征,发现自养条件下对氨氮的吸收主要通过谷氨酸脱氢酶途径,而异养条件下氮同化几乎完全依赖于谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶 (glutamine synthetase-glutamate synthase) 催化的偶联反应^[73]. 基于基因组水平上的代谢网络重构,根据光源、波长分辨和光子通量光学建模定量预测莱茵衣藻生长^[74],基于约束模型,探明其在光生物反应中培养时物理光限制下呼吸作用的机制^[75],为研究藻类代谢途径提供了范例. 利用特异的染色质签名和转录组学数据,在莱茵衣藻筛选到转录因子 *PSR1*,其过表达增加了胞内脂类含量,而且未影响生长^[69]. 此外,系统生物学数据能够帮助预测新的合成途径在细胞工厂中是否可行, Cho 等人^[76]已成功预测了异丁醇、3-羟基丙酸酯和丁酰 CoA 的生物合成. 系统生物学分析有助于理解微藻代谢系统的复杂性,但目前的相关研究多集中在莱茵衣藻和三角褐指藻等模式微藻,预计未来将有更多微藻的系统生物学分析结果将被揭示,有助于对多种具有不同特色的微藻进行代谢工程操作.

遗传转化方法、基因组编辑技术、转录工程、系统生物学等技术的发展,将有助于深入解析微藻的代谢调控机制,为遗传改造微藻提供靶点. 但目前的代谢工程主要集中在静态水平,科学家已开始尝试研究动态的代谢调控方法并提出“精准代谢工程”理念,期望代谢系统能够响应不同的外界信号生产不同的代谢物,提高经济效益^[77],目前精准代谢工程尚未在微藻中开展研究.

2.4 利用合成生物学技术进行微藻菌株改造

合成生物学期望通过重新配置、设计和构建新的代谢途径和整个过程或者新的系统生产目的产物^[11]. 大肠杆菌和酵母已利用合成生物学技术实现产业化, 如利用解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)商业化生产EPA^[78]. 但微藻的合成生物学研究仍处于探索阶段, 仅限于莱茵衣藻和三角褐指藻等几种模式藻株. 将粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)来源的木酮糖还原酶经过密码子优化转入莱茵衣藻细胞, 可以获得0.38 g/L的木糖醇产量^[79], 异源表达植物广藿香(*Pogostemon cablin*)来源的醇合酶(patchoulol synthase, PTS)能合成倍半萜^[80]. 此外, 已利用合成生物学技术改造莱茵衣藻叶绿体系统直接生产霍乱^[2]、疟疾疫苗^[4]和免疫毒素^[81]等重组蛋白. 酵母和细菌也能通过改造生产重组蛋白, 但一些糖基化蛋白不能准确表达和翻译后修饰^[82]. 与酵母和细菌相比, 微藻可以直接利用二氧化碳和光生长, 有利于二氧化碳减排和降低生产成本, 对其进行遗传改造生产高价值产品具有良好的前景. 微藻基因组编辑技术还刚刚起步, 其不断深入的进展, 也将为微藻的合成生物学改造提供有力支撑.

系统生物学分析、合成生物学研究以及基因组编辑都将极大地促进微藻的代谢工程改造, 其与微藻高效育种的联系见图1.

图1 利用微藻代谢工程改造生产生物能源及高值产品路线图(网络版彩图)

3 构建微藻细胞工厂存在的问题及解决方法

自然界存在大量的不同微藻藻种, 这些藻株各自具有独特的代谢特征. 例如, 本研究组^[83]研究的海洋微拟球藻在特定条件下可生产大量的特殊脂肪酸C16:2. 在充分挖掘利用微藻天然资源的基础上, 利用微藻的代谢工程改造, 可以进一步扩大微藻的遗传多样性, 并更加定向控制微藻的代谢途径, 从而达到低成本生产生物燃料和高值产品的目的.

利用微藻代谢工程改造目前还存在以下问题:

(i) 高效率且稳定的遗传转化体系仍是制约微藻代谢工程和合成生物学的瓶颈问题, 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.

(ii) 借助系统生物学方法对微藻的整体代谢网络有了初步的了解, 但很多代谢调控机制并未阐明, 目前仍处于研究基因功能层面.

(iii) 微藻系统生物学研究虽积累了大量数据, 但欠缺分析和整合.

(iv) 微藻细胞小、浓度低导致采收困难、采收成本高也是限制微藻利用的重要原因. 微藻产品多存在于细胞内, 对微藻藻株进行改造, 促进代谢物分泌, 也是关键的研究问题^[6].

针对以上问题, 需要继续深入微藻的系统生物学研究, 尤其是微藻代谢的动态研究, 全面了解微藻的代谢调控机制. 可以结合系统生物学和计算生物学技术深入挖掘数据信息, 可以利用RNA干扰和CRISPR/Cas系统编辑技术对微藻基因组进行精准编辑和遗传操作, 了解其基因功能和阐明代谢机制.

本研究组在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞絮凝的分子机制及利用遗传改造构建可诱导的酵母絮凝进行细胞采收方面开展了大量研究, 通过代谢工程改造酵母获得乙醇诱导酵母絮凝实现酵母高效率乙醇生产^[84,85], 通过导入酿酒酵母的絮凝基因*FLO1*, 实现了斜生栅藻的细胞自絮凝^[86], 后续可在微藻中导入来自絮凝酵母或者微藻本身的絮凝基因, 并调控微藻的絮凝, 从而实现微藻的低成本采收.

微藻的油脂及色素等产品多在环境胁迫条件下产生(如氮限制、强光等), 虽然控制胁迫条件成功提高了微藻产品的含量, 但比较关键的问题是胁迫条件抑制了细胞生长, 导致终产物的总量降低. 本研究组^[87,88]对

酿酒酵母环境胁迫耐性分子机制进行了深入分析,发现控制基因合适的表达强度,可以提高环境胁迫耐性. 同样的思路可用于微藻胁迫的控制,控制胁迫的程度和胁迫起始时间及维持时间,也许有助于保持微藻生长和代谢物积累的平衡,利用微藻环境胁迫耐性的代谢工程改造,在不严重影响微藻细胞生长的情况下,促进微藻生产能源和高值产品.

4 总结与展望

近年来,由于微藻能合成多种高价值化合物,如三酰甘油、多不饱和脂肪酸、叶绿素、类胡萝卜

素、多糖和藻胆蛋白等,可应用于生物能源、药品、食品和化妆品添加剂等领域引起广泛关注. 理想的微藻应具有生长迅速、目的产品大量形成、采收和提取容易等优点. 代谢工程和合成生物学技术的发展将妥善解决上述难题,对微藻代谢途径和代谢调控信息的进一步理解,将为微藻代谢工程改造和合成生物学研究提供良好基础^[89]. 微藻高效遗传转化技术、基因组编辑、系统生物学和转录工程等技术的进一步发展,将为建立高效的微藻细胞工厂提供更丰富的信息和更高效的技术方法,提高微藻代谢工程研究的效率.

致谢 感谢台湾成功大学张嘉修老师的帮助和合作.

参考文献

- Guarnieri M T, Pienkos P T. Algal omics: unlocking bioproduct diversity in algae cell factories. *Photosynth Res*, 2015, 123: 255–263
- Gregory J A, Topol A B, Doerner D Z, et al. Alga-produced *cholera* toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 3917–3925
- Jones C S, Luong T, Hannon M, et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 1987–1995
- Tran M, Van C, Barrera D J, et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E15–E22
- Bajhaiya A K, Ziehe Moreira J, Pittman J K. Transcriptional engineering of microalgae: prospects for high-value chemicals. *Trends Biotech*, 2017, 35: 95–99
- Gomaa M A, Al-Haj L, Abed R M M. Metabolic engineering of cyanobacteria and microalgae for enhanced production of biofuels and high-value products. *J Appl Microbiol*, 2016, 121: 919–931
- Reijnders M J M F, van Heck R G A, Lam C M C, et al. Green genes: bioinformatics and systems-biology innovations drive algal biotechnology. *Trends Biotech*, 2014, 32: 617–626
- Shin S E, Lim J M, Koh H G, et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep*, 2016, 6: 27810
- Nymark M, Sharma A K, Sparstad T, et al. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Sci Rep*, 2016, 6: 24951
- Wang Q, Lu Y, Xin Y, et al. Genome editing of model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by CRISPR/Cas9. *Plant J*, 2016, 88: 1071–1081
- Khraiweh B, Jijakli K, Swift J, et al. Prospective applications of synthetic biology for algal bioproduct optimization. In: *Biomass and Biofuels from Microalgae*. Berlin: Springer International Publishing, 2015. 137–154
- Guschina I A, Harwood J L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res*, 2006, 45: 160–186
- Bondioli P, Della Bella L, Rivolta G, et al. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresour Tech*, 2012, 114: 567–572
- Klok A J, Martens D E, Wijffels R H, et al. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. *Bioresour Tech*, 2013, 134: 233–243
- Goncalves E C, Koh J, Zhu N, et al. Nitrogen starvation-induced accumulation of triacylglycerol in the green algae: evidence for a role for ROC40, a transcription factor involved in circadian rhythm. *Plant J*, 2016, 85: 743–757
- Dubini A, Ghirardi M L. Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen. *Photosynth Res*, 2015, 123: 241–253
- Aikawa S, Joseph A, Yamada R, et al. Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. *Energ*

- [Environ Sci](#), 2013, 6: 1844–1849
- 18 Deng M D, Coleman J R. Ethanol synthesis by genetic engineering in *Cyanobacteria*. *Appl Environ Microb*, 1999, 65: 523–528
- 19 Dexter J, Fu P. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. [Energ Environ Sci](#), 2009, 2: 857–864
- 20 Ji S Q, Wang B, Lu M, et al. Direct bioconversion of brown algae into ethanol by thermophilic bacterium *Deftuittalea phaphyphila*. [Biotechnol Biofuels](#), 2016, 9: 81
- 21 Sulfahri, Ni'matuzahroh, Manuhara S W. Studies on The Hungate technique for ethanol fermentation of algae *Spirogyra hyalina* using *Saccharomyces cerevisiae*. [Biofuels](#), 2017, 8: 367–372
- 22 Ueda R, Hirayama S, Sugata K, et al. Process for the production of ethanol from microalgae. US Patent, 5578472, 1996-11-26
- 23 Chien L F, Kuo T T, Liu B H, et al. Solar-to-bioH₂ production enhanced by homologous overexpression of hydrogenase in green alga *Chlorella* sp. DT. [Int J Hydrogen Energ](#), 2012, 37: 17738–17748
- 24 Lin H D, Liu B H, Kuo T T, et al. Knockdown of PsbO leads to induction of HydA and production of photobiological H₂ in the green alga *Chlorella* sp. DT. [Bioresour Tech](#), 2013, 143: 154–162
- 25 Borowitzka M A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. [J Appl Phycol](#), 2013, 25: 743–756
- 26 Leu S, Boussiba S. Advances in the production of high-value products by microalgae. [Ind Biotech](#), 2014, 10: 169–183
- 27 Saravanan P, Davidson N C, Schmidt E B, et al. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. [Lancet](#), 2010, 376: 540–550
- 28 Das U N. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. [Nutrition](#), 2003, 19: 62–65
- 29 Spite M. Deciphering the role of n-3 polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators in health and disease. [Proc Nutr Soc](#), 2013, 72: 441–450
- 30 李文宗, 王磊. 长链多不饱和脂肪酸EPA、DHA的基因工程研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32: 1–7
- 31 Urtubia H O, Betanzo L B, Vásquez M. Algae-organisms for imminent biotechnology: microalgae and cyanobacteria as green molecular factories: tools and perspectives. In: *Algae-Organisms for Imminent Biotechnology*. Rijeka: InTechOpen, 2016
- 32 李健, 张学成, 胡鸿钧, 等. 微藻生物技术产业前景和研发策略分析. *科学通报*, 2012, 57: 23–31
- 33 Qin S, Lin H, Jiang P. Advances in genetic engineering of marine algae. [Biotech Adv](#), 2012, 30: 1602–1613
- 34 Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, et al. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*, 1998, 148: 1821–1828
- 35 Chow K C, Tung W L. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. [Plant Cell Rep](#), 1999, 18: 778–780
- 36 Zhang C, Hu H. High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. [Mar Genom](#), 2014, 16: 63–66
- 37 Li F, Gao D, Hu H. High-efficiency nuclear transformation of the oleaginous marine *Nannochloropsis* species using PCR product. [Biosci Biotech Biochem](#), 2014, 78: 812–817
- 38 Guo S L, Zhao X Q, Tang Y, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. [J Biotech](#), 2013, 163: 61–68
- 39 王柳英, 林祥志, 娄素琳, 等. 农杆菌转化体系在药用微藻中的研究进展. *中南药学*, 2016, 10: 1084–1089
- 40 Pratheesh P T, Vineetha M, Kurup G M. An efficient protocol for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. [Mol Biotechnol](#), 2014, 56: 507–515
- 41 Cha T S, Yee W, Aziz A. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. [World J Microbiol Biotechnol](#), 2012, 28: 1771–1779
- 42 Cheng R, Ma R, Li K, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. [Microbiol Res](#), 2012, 167: 179–186
- 43 Cha T S, Chen C F, Yee W, et al. Cinnamic acid, coumarin and vanillin: alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis* sp.. [J Microbiol Methods](#), 2011, 84: 430–434
- 44 Anila N, Chandrashekar A, Ravishankar G A, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil*. [Eur J Phycol](#), 2011, 46: 36–44
- 45 Wu J, Hu Z, Wang C, et al. Efficient expression of green fluorescent protein (GFP) mediated by a chimeric promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. [Chin J Ocean Limnol](#), 2008, 26: 242–247
- 46 Scranton M A, Ostrand J T, Georgianna D R, et al. Synthetic promoters capable of driving robust nuclear gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. [Algal Res](#), 2016, 15: 135–142
- 47 Lumbreras V, Stevens D R, Purton S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. [Plant J](#), 1998, 14: 441–447
- 48 林根妹, 杨官品. 基因组编辑技术及其在微藻中的应用. *海洋科学*, 2016, 40: 149–155

- 49 Sizova I, Greiner A, Awasthi M, et al. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J*, 2013, 73: 873–882
- 50 Reyon D, Kirkpatrick J R, Sander J D, et al. ZFNGenome: a comprehensive resource for locating zinc finger nuclease target sites in model organisms. *BMC Genomics*, 2011, 12: 83
- 51 Han G, Wang Y, Fei X, et al. Expression activation and functional analysis of HLA3, a putative inorganic carbon transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 2015, 82: 1614–1625
- 52 Gao H, Wright D A, Li T, et al. TALE activation of endogenous genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res*, 2014, 5: 52–60
- 53 Daboussi F, Leduc S, Maréchal A, et al. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nat Commun*, 2014, 5: 3831
- 54 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 55 Jiang W, Brueggeman A J, Horken K M, et al. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, 2014, 13: 1465–1469
- 56 Baek K, Kim D H, Jeong J, et al. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Sci Rep*, 2016, 6: 30620
- 57 Merchant S S, Prochnik S E, Vallon O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 2007, 318: 245–250
- 58 Dorrell R G, Smith A G. Do red and green make brown?: perspectives on plastid acquisitions within Chromalveolates. *Eukaryot Cell*, 2011, 10: 856–868
- 59 Hamilton M L, Haslam R P, Napier J A, et al. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metab Eng*, 2014, 22: 3–9
- 60 Ma Y H, Wang X, Niu Y F, et al. Antisense knockdown of pyruvate dehydrogenase kinase promotes the neutral lipid accumulation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 100
- 61 Trentacoste E M, Shrestha R P, Smith S R, et al. Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 19748–19753
- 62 Liu J, Gerken H, Huang J, et al. Engineering of an endogenous phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation and enhanced biosynthesis of carotenoids. *Process Biochem*, 2013, 48: 788–795
- 63 Liu J, Sun Z, Gerken H, et al. Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 5069–5079
- 64 Oey M, Ross I L, Stephens E, et al. RNAi knock-down of LHCBM1, 2 and 3 increases photosynthetic H₂ production efficiency of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE*, 2013, 8: e61375–12
- 65 León R, Couso I, Fernández E. Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotech*, 2007, 130: 143–152
- 66 Vila M, Couso I, León R. Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process Biochem*, 2008, 43: 1147–1152
- 67 Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 2009, 58: 165–174
- 68 Cerutti H, Ma X, Msanne J, et al. RNA-mediated silencing in algae: biological roles and tools for analysis of gene function. *Eukaryot Cell*, 2011, 10: 1164–1172
- 69 Ngan C Y, Wong C H, Choi C, et al. Lineage-specific chromatin signatures reveal a regulator of lipid metabolism in microalgae. *Nat Plants*, 2015, 1: 15107
- 70 Bajhaiya A K, Dean A P, Zeef L A, et al. PSR1 is a global transcriptional regulator of phosphorus deficiency responses and carbon storage metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 2015, 170: 1216–1234
- 71 Tsai C H, Warakanont J, Takeuchi T, et al. The protein compromised hydrolysis of triacylglycerols 7 (CHT7) acts as a repressor of cellular quiescence in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 15833–15838
- 72 Zalatan J G, Lee M E, Almeida R, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*, 2015, 160: 339–350
- 73 吴超. 高产油微藻基于基因组的初级代谢网络重构和代谢流分析. 博士学位论文. 北京: 清华大学, 2015
- 74 Chang R L, Ghamsari L, Manichaikul A, et al. Metabolic network reconstruction of *Chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 518–518

- 75 Cogne G, Rüger M, Bockmayr A, et al. A model-based method for investigating bioenergetic processes in autotrophically growing eukaryotic microalgae: application to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Prog*, 2011, 27: 631–640
- 76 Cho A, Yun H, Park J H, et al. Prediction of novel synthetic pathways for the production of desired chemicals. *BMC Syst Biol*, 2010, 4: 35
- 77 McNerney M P, Watstein D M, Styczynski M P. Precision metabolic engineering: the design of responsive, selective, and controllable metabolic systems. *Metab Eng*, 2015, 31: 123–131
- 78 Xue Z, Sharpe P L, Hong S P, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 734–740
- 79 Pourmir A, Noor-Mohammadi S, Johannes T W. Production of xylitol by recombinant microalgae. *J Biotech*, 2013, 165: 178–183
- 80 Lauersen K J, Baier T, Wichmann J, et al. Efficient phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Metab Eng*, 2016, 38: 331–343
- 81 Tran M, Henry R E, Siefker D, et al. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 2826–2835
- 82 Hlavova M, Turoczy Z, Bisova K. Improving microalgae for biotechnology—from genetics to synthetic biology. *Biotech Adv*, 2015, 33: 1194–1203
- 83 Wan C, Bai F W, Zhao X Q. Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01. *Biochem Eng J*, 2013, 78: 32–38
- 84 He L Y, Zhao X Q, Bai F W. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with the *FLO1*-derivative gene isolated from the flocculating yeast SPSC01 for constitutive flocculation and fuel ethanol production. *Appl Energ*, 2012, 100: 33–40
- 85 Li Q, Zhao X Q, Chang A K, et al. Ethanol-induced yeast flocculation directed by the promoter of *TPS1* encoding trehalose-6-phosphate synthase 1 for efficient ethanol production. *Metab Eng*, 2012, 14: 1–8
- 86 白凤武, 赵心清. 转基因絮凝微藻的构建及其在微藻采收中的应用. 中华人民共和国专利, ZL201210192978.3, 2012-09-26
- 87 Zhao X Q, Bai F W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J Biotech*, 2009, 144: 23–30
- 88 Zhao X, Xiong L, Zhang M, et al. Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering. *Bioresour Tech*, 2016, 215: 84–91
- 89 Kliebenstein D J. Synthetic biology of metabolism: using natural variation to reverse engineer systems. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 19: 20–26

Metabolic engineering of microalgae: a review and future prospects

CHEN BaiLing¹, Bai FengWu^{1,2} & ZHAO XinQing¹

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;
2 School of Life Science & Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

Microalgae are widely distributed in nature, which can produce lipids, pigments, polysaccharides, as well as other high-value products through cell metabolism. However, low product content and high cost of cell harvesting negatively impact the practical application of microalgae. To utilize microalgal resources more effectively, it is necessary to modify the microalgae strains with genetic modification technologies for producing specific metabolites efficiently. Genome editing, metabolic engineering and synthetic biology tools are being developed for accelerating the production of important metabolites to meet the growing demands of energy, food and pharmaceutical industries using microalgae. The recent progress of related studies is summarize in this review, with future prospects provided.

microalgae, metabolic engineering, synthetic biology, high-value products, genome editing

doi: [10.1360/N052017-00087](https://doi.org/10.1360/N052017-00087)