中国科学: 生命科学 2019 年 第 49 卷 第 6 期: 717 ~ 726
SCIENTIA SINICA Vitae lifecn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述

微藻生物燃料及高价值产物的代谢研究进展

郑艺[1,2,4], 王志鹏[3,7*], 蒋振雄[1,5], 王鹏[8], 尹晟[9], 马新雨[3], 许兵[1], 王鑫[1,6*]

1. Department of Plant and Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station TX 77840, USA;
2. 福建农林大学资源与环境学院, 福州 350002;
3. Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station TX 77840, USA;
4. Maryland Institute College of Art, Baltimore 21217, USA;
5. Department of Biology, Texas A&M University, College Station TX 77840, USA;
6. Department of Microbiology, Miami University, Oxford OH 45056, USA;
7. Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital; Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston MA 02115, USA;
8. 中山大学附属第一医院烧伤外科, 广州 510080;
9. Nutrition/Metabolism Laboratory, Department of Surgery, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston MA, 02138, USA

* 联系人, E-mail: wzpchem1991@gmail.com; xwang@miamioh.edu

收稿日期: 2018-12-17; 接受日期: 2019-01-16; 网络版发表日期: 2019-03-28

摘要 微藻是当今代谢工程领域最具潜力的燃料生物质来源之一. 其结构简单、基因可操作性强的特点使其可通过不同的代谢工程手段得到丰富多样的生物燃料和高价值产物. 本文系统地总结了近年来国内外利用微藻在脂质、氢气、乙烯、醇类、脂肪醇和脂肪烃、糖类、萜类及其他高价值产物的生产中取得的进展, 并通过介绍着眼于改变光合作用关键酶体或复合物以提升生物质产量的相关研究进展, 分析了生物质合成代谢途径的改变对上游光合作用的潜在影响. 结合系统生物学及生物信息学方法筛选高效的微藻株系, 改变碳流方向以提升生物质的合成效率, 实现高效地同源重组, 提高外源基因在微藻内的表达效率是微藻代谢工程亟待解决的问题. 本文在此基础上结合近年来各个交叉学科的发展趋势, 提出了若干改良微藻代谢的新模式, 以期对微藻代谢研究及后续的工程改造有所启示.

关键词 分子生物学, 基因工程, 微藻, 生物燃料, 碳流, 合成生物学, 代谢工程

生物燃料是传统化石燃料的理想替代品. 其中, 微藻生物质是当前最具潜力的生物燃料来源, 微藻利用太阳能固定CO_2并生成生物质, 是生产燃料和高价值副产物的理想细胞工厂. 微藻作为细胞工厂有众多优点, 例如其相较植物结构简单且基因可操作性强, 因此通过基因工程优化或加速进化进行微藻的选育已成为微藻生物燃料的研究核心. 微藻代谢工程常以蓝藻、衣藻等模型藻类为研究对象. 其中, 蓝藻虽然属于原核生物, 大量的研究表明, 优质微藻同样可进行有效的生物柴油[1,2]生产或通过糖化发酵获得乙醇[3]

引用格式: 郑艺, 王志鹏, 蒋振雄, 等. 微藻生物燃料及高价值产物的代谢研究进展. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 717–726
Zheng Y, Wang A Z P, Jiang Z X, et al. Advance in metabolic engineering of microalgae for biofuels and high-value compounds (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 717–726, doi: 10.1360/N052018-00287

© 2019 《中国科学》杂志社

等. 微藻基因工程的转化方法近十年也不断得到完善, 包括粒子轰击、电穿孔、病毒和农杆菌介导等[4]. 目前, 至少已有30个微藻菌种成功实现转化[5].

本文以目前领域内利用微藻进行的代谢工程进行总结, 以乙醇、丁醇、脂质、脂肪醇和脂肪烷烃、氢气、乙烯、萜类及其他高价值产物等七类重要产物为例分别阐述相关产生原理及代谢改造, 并进一步分析本领域目前存在的一些主要问题. 微藻的研究作为前沿科学方向对于基础生物化学、分子生物学、生物工程和化学生物学的教学同样重要[6]. 本文结合相关多学科的知识抛砖引玉, 以期对相关科研和基础教学有所帮助[7].

1 代谢工程在微藻生物燃料及高价值产物中的应用

传统的营养胁迫是增加微藻脂质和淀粉产量的主要方法. 相比之下, 代谢工程通过正向基因改造, 可以特异性地对藻株代谢路径进行修饰, 从而实现目标产物的积累[8]. 具体来说, 代谢工程基于细胞代谢途径, 通过关键酶基因或转录因子的控制, 改变细胞原有路径, 将光合碳输出有效分配于各个代谢路径, 从而高效地进行目标蛋白质、碳水化合物、脂质或氢分子(H_2)等物质的生物合成[9]. 对生物合成和分解的前体物质、关键调控酶、中间产物和最终产物代谢网络的清楚认识, 是建立转基因优化生物燃料生产策略的核心.

微藻中的生物质产生的源动力来源于光反应过程. 光系统中的电子传递将光能转化为化学能, 所得ATP和NADPH则用于驱动卡尔文循环的碳固定以及下游代谢的碳转化过程[10]. 在众多微藻代谢路径中, 对关键底物或通用底物的调控往往在很大程度上决定了代谢中的碳分流, 也决定了目标产物的产量积累. 例如, 丙酮酸(pyruvate)即为这一类关键底物之一, 其经由酶促反应可以生成多种目标产物. 在代谢工程改造中, 对丙酮酸代谢路径的研究可以在碳分流中起到重要作用, 也是代谢工程的重点研究对象(图1). 以下将结合最近的研究成果, 探讨代谢工程在微藻各类代谢及产物中的应用.

1.1 脂质

脂肪酸(fatty acid, FA)和甘油三脂(triglyceride, TG, 也称三酰基甘油酯, triglyceride, TAG)是微藻脂质主要成分, 其中甘油三脂可通过酸催化酯交换技术产生高级脂肪酸烷基脂并生产生物柴油, 故而脂肪酸和甘油三脂的代谢受到研究者的广泛关注. 微藻脂类的积累依赖于脂肪酸合成途径和甘油合成途径. 细胞质体中合成的脂肪酸转移到细胞质后, 进一步酯化合成二酰基甘油酯(diacylglycerol, DAG)和三酰基甘油脂[11]. 微藻乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)作为藻类控制脂肪酸合成的主要酶类, 其有效表达对控制脂质积累起着关键作用[12]. Tabatabaei等人[4]指出, 过表达ACC基因可以使羧化酶的转化效率增加2~3倍. 另有研究表明, 游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)合成的中间产物脂肪酰基-ACP(Acyl-ACP)是ACC活性的重要反馈抑制剂[13]. Liu等人[13]在集胞蓝藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803中引入了酰基载体蛋白硫酯酶(TE)并连续进行了五代遗传修饰, 由此获得的突变藻株可以每天133 mg/L的效率高效积累脂肪酸(C10~C18), 并能分泌到培养基中. 这证明了酰基载体蛋白硫酯酶Ⅰ(acyl-ACP thioesterase Ⅰ)的过表达可以解除合成的中间产物脂肪酰基-ACP对ACC活性的抑制. 另外, 与植物不同的是, 微藻脂质容易在下游发生β-氧化, Trentacoste等人[14]将假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)的多功能脂肪酶敲除后成功释放出游离脂肪酸, 验证了该酶破坏脂肪酸分解代谢和抑制β-氧化对脂类积累的作用, 且不影响细胞的正常生长. 此外微藻脂质的积累还可通过阻断其他碳水化合物合成的竞争途径来实现[14]. Wang课题组[15]通过敲除淀粉合成路径中的ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase)基因使衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)油脂总量增加了两倍(90%的TAG和10%FFA). 此外, 过表达转录因子以增强基因的转录速率、增加前体分子可用性、将脂质转运至胞外和用硫脂酶优化脂肪酸链的长度等手段将是今后发展增加微藻产油的重要策略.

1.2 氢气

氢气是众所周知的高效清洁能源, 微藻可通过生物质间接发酵或利用天然氢化酶(hydrogenase, HydA)直接诱导氢气产生. 在直接产氢的代谢工程中, 铁氧还蛋白或NAD(P)H的能量能直接用于氢化酶催化产氢的可逆反应. 这种不经过暗反应直接利用氢化酶产生

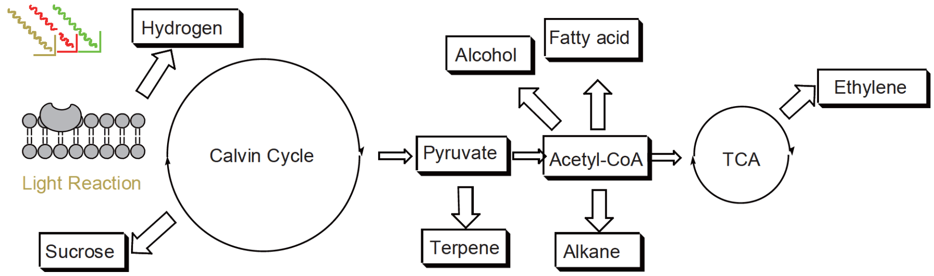

图 1　微藻细胞代谢过程(网络版彩图)

Figure 1　Overview of the metabolic process in microalgae cells (color online)

氢气的过程具有较高的光能转化效率，但缺陷在于氢化酶类对氧气极其敏感[16]．因此，利用微藻生产氢气的关键问题在于解决如何将氢化酶与光合过程中产生的氧气隔离开来, 从而提高产氢效率. 为了利用光反应中的能量直接生产氢气, 人们发展了两类策略. 其一是将产氧过程与产氢反应隔离于不同的细胞中，从而降低氧气对氢化酶的影响．其二，通过基因改造可以提高氢化酶对氧气的耐受程度和稳定性，从而提高氢气产量．Doebbe等人[17]通过己糖氢离子同向转运蛋白(hexose uptake protein, HUP1)的异源表达以增强莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)突变株中氢气的产生．微藻培养过程中的各种环境因素显著影响着氢气的产率，减少光合氧气的产量是微藻氢气生产的重点. 因此，今后的微藻产氢的研究重点将集中在解决氢化酶对氧气高度敏感的问题上，在提高光电子传递效率的同时优化产氢微藻的培养.

1.3　乙烯

乙烯作为挥发性烃类在工业、生态和农业中有广泛的应用. 乙烯合成酶(ethylene-forming enzyme, EFE)是乙烯合成途径的关键酶(图2). Takahama等人[18]通过在聚球藻(*Synechococcus elongatus*)PCC7942中插入丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringa*)的EFE基因使蓝藻细胞产生乙烯，但细胞生长速度因此降低，且该突变体具有遗传不稳定性．在此基础上，Ungerer等人[19]对香假单胞菌的EFE基因序列进行了修改和优化，提高了其稳定性，并在集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803内成功表达．该研究表明，改造后的PCC6803代谢路径稳定，并将高达5.5%的碳流有效转入三羧酸循环并最终合成乙烯．这一研究充分体现了利用细胞主代谢路径进行代谢工程研究的优势.

1.4　醇类

微藻代谢工程的一大类重要的产物是醇类，包括低级醇和高级醇类．乙醇作为典型的生物燃料是代谢工程最早也是最主要的产物之一．部分微藻具备天然的乙醇代谢途径，但要提高生产效率需对关键基因进行进一步的修饰．传统方法的低储能率和复杂工艺迫使人们开展由藻类代谢物直接转化乙醇的方式，目前也取得了较多成果[10,20]．需要指出的是，丙酮酸脱羧酶(pyruvate decaboxylase, PDC)和醇脱氢酶 II (alcohol-dehydrogenase，ADH)是乙醇合成的关键酶．Deng等人[21]通过在聚球藻PCC7942(*Synechococcus* sp. PCC7942)细胞内分别引入发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的PDC和ADH基因, 成功检测到分泌至培养基中的乙醇. 虽然这两个基因在RuBisCO的rbcLS操纵子的操控下可以高效表达, 但乙醇的产量却仍然较低. 由此，人们考虑酶的活性或是决定产量高低更重要的因素．因此，为了进一步提高乙醇产量，Gao等人[22]在集胞藻PCC6803(*Synechocystis* sp. PCC6803)同源重组PDC和活性更高的ADH基因，极大地提高了突变株的乙醇产率(最高达212 mg L^{-1} d^{-1})．该研究还同时指出下游聚-β-羟基丁酸酯的生物合成途径的破坏有助于乙醇的积累．在这一“活性重于表达量”的指导思想下，大量后续研究集中在了筛选乙醇代谢路径中高效关键酶．2011年，Joule Unlimited公司报告了其设计的高效乙醇光合微生物平台，代谢工程对微藻生物燃料商业化的推动性由此可见一斑.

与乙醇相比，异丁醇和1-丁醇具有更高的能量密度及与当前设施更好的兼容性，有望成为汽油的替代品之一．Atsumi等人[23]在聚球藻PCC 7942中设计了基于2-ketoacid decarboxylase的异丁醇合成路径．该路径有效利用了支链氨基酸代谢路径，将氨基酸合成路径

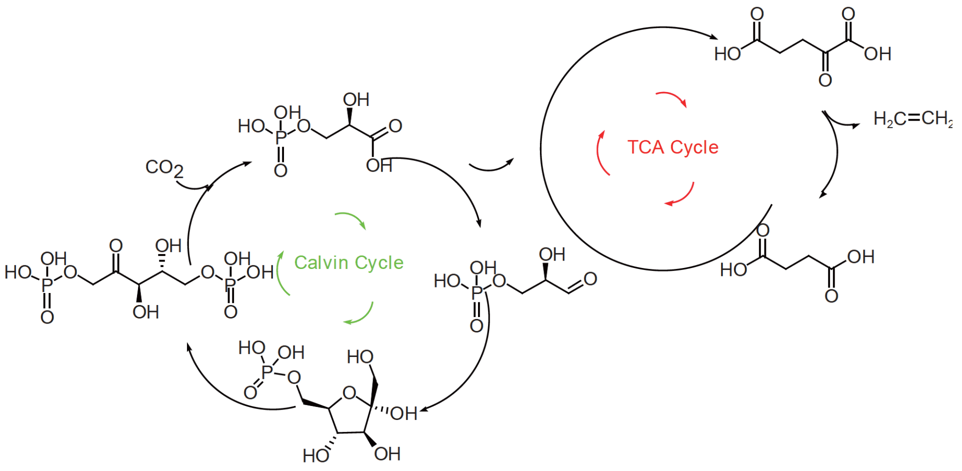

图 2 微藻通过暗反应与三羧酸循环产生乙烯的途径(网络版彩图)
Figure 2 Ethylene-generating pathway through carbon-fixation reaction and TCA cycle in microalgae (color online)

中支链酮酸有效转化成异丁醇前体异丁醛，从而实现高效高醇生产．1-丁醇的传统生产方法依赖丙酮丁醇梭菌的厌氧发酵路径，合成路径复杂，同时该路径中酶受多种调控，增加了代谢工程的难度．Lan和Liao[24]将5个关键的异源酶基因(*hbd*, *crt*, *adhE2*, *ter*和*atoB*)共同整合到聚球藻PCC7942基因组中，实现了第一代自养型改造菌株的1-丁醇的表达．研究者虽然通过提高*Ter*的活性以增加1-丁醇的产量，但相对于其他产物，其产率仍然很低．除了乙醇与丁醇外，其他高醇也可以由类似的代谢工程途径进行优化(图3).

1.5 脂肪醇和脂肪烷烃

脂肪醇是石油的重要成分和添加剂，脂肪烷烃则是石油燃料的主要成分．二者的生物合成路径都建立在脂肪酸合成的基础之上. 其中, 非天然的脂肪醇的合成途径在集胞藻中可通过异源表达脂肪酰辅酶A还原酶(fatty acyl-CoA reductase, FAR)基因来实现[25]. 例如, Tan等人[26]通过异源表达FAR成功检测到集胞藻产生的十六醇和十八醇．近年来关于脂肪烷烃合成路径的研究揭示了两个重要的酶家族，即酰基-酰基载体蛋白还原酶(acyl-acyl carrier protein reductase, AAR)和醛脱羰酶(aldehyde decarboxylase, ADO)[10,27], 也为微藻中烷烃的产生提供了可能. 考虑到ADO的低催化效率, 目前已有研究开始指向ADO活性的提升[28]. Wang等人[29]通过在集胞藻PCC6803过表达AAR和ADO基因使烷烃的产量倍增，进一步验证了这两个关键烷烃合成基因的作用．此外，一系列关于脂肪烷烃的研究发现，源自游离脂肪酸的acyl-ACP是烷烃合成的主要来源．通过过表达酰基ACP合成酶(acyl-ACP synthetase, AAS), AAR和ADO基因能有效增加烷烃的合成．由于脂肪醇和脂肪烷烃的直接底物都是acyl-ACP，增加acyl-ACP的碳流和关键酶的活性是实现脂肪醇和烷烃产量进一步增加的有效方法, 也是今后研究的重点之一.

1.6 糖类

运输载体的重要作用是可以运输外源碳源和营养物质至细胞内以促进微藻生长．微藻多属专性光合自养型微生物，严格依赖于光合作用产生的能量生长，无光的条件下不能通过胞外碳源(葡萄糖、果糖、木糖等)生长．Zaslavskaia等人[30]通过基因工程在三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)中引入外源的编码葡萄糖转运蛋白基因*glut1*或*hup1*后，在无光条件下下利用葡萄糖供其生长，其生长速度比野生型高了15倍．同样，McEwen等人[31]在聚球藻PCC 7942异源表达不同的糖类转运蛋白基因，观察对比微藻生长速率后发现突变株的生长速度明显高于野生型菌株．基因工程使微藻降低了对光照的依赖、改变微藻专性光合自养的特性、缩短生长周期的同时提高细胞浓度. 另外, 微藻胞内生物质的提取是微藻生物工艺生产的一个主要成本消耗，而产物的运输载体不仅简化了生物质提取过程，且胞内产物如FFA的向外运输将进一步增强胞内FFA的产生[32]．以聚球藻PCC7942为例，Niederholt-

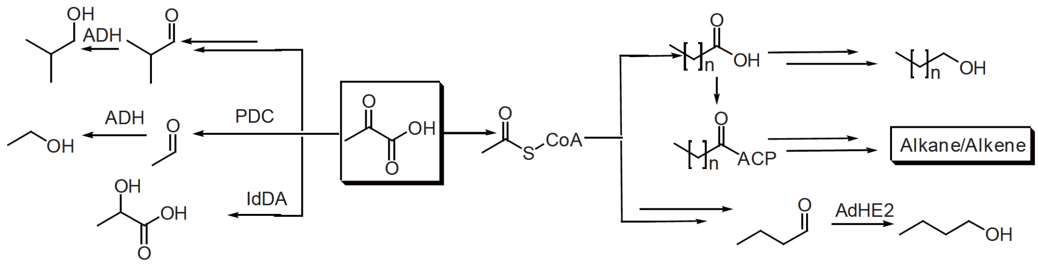

图 3　微藻类产生各种醇类的代谢途径与代谢工程
Figure 3　Alcohol generating metabolic pathway and metabolic engineering in microalgae species

meyer等人[33]表达编码转化酶和葡萄糖协调子的基因, 介导葡萄糖和果糖的分泌, 相似的乳酸脱氢酶和乳酸转运蛋白基因的表达让胞内乳酸可以跨膜运输到培养基中. Ducat等人[34]通过在聚球藻PCC 7942异源表达质子和蔗糖协同载体基因(symporter of protons and sucrose, *cscB*), 在蓝藻细胞中成功实现了高效蔗糖生产. 另外, 改造后的蓝藻相比野生株的光合效率也得到了极大的提高. 因此, 异源表达相关转运蛋白酶对于代谢产物的分泌至关重要.

1.7　萜类及其他高价值产物

萜类化合物是已知的最多样和有商业价值的天然有机化合物, 在制药、化妆品、食品工业等行业中广泛应用. 萜类合成有两个途径, 甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)和甲基-*D*-赤藓糖醇4-磷酸途径(methyl-*D*-erythritol 4-phosphate pathway, MEP). 由异戊二烯骨架单元起步, 萜烯合酶催化碳骨架的重排, 从而合成包括最简单的五碳异戊二烯以及复杂的二萜、三萜乃至橡胶等的聚合物.

利用微藻进行萜类天然产物的生产目前也取得了一定进展. Lindberg等人[35]通过在集胞藻PCC6803中异源表达葛麻的异戊二烯合酶(isoprene synthesis, *ispS*)基因, 实现了异戊二烯的积累. Halfmann课题组[36]在鱼腥藻PCC7120(*Anabaena* sp. PCC7120)中异源表达法尼烯合成基因并通过微藻内源MEP路径合成法尼烯. Lindberg课题组[37]通过敲除集胞藻PCC6803控制鲨烯转化的*slr2089*(*Shc*)基因, 使鲨烯在细胞内的积累比野生型高了70倍. 鲨烯作为高能量的长碳链化合物, 是航空燃料的潜在原料. 此外, Wang等人[38]在聚球藻PCC7942中证明了柠檬烯合成基因是MEP路径上决定柠檬烯合成的关键, 使蓝藻的柠檬烯生产能力提升了100倍. 类似的还有*L*-柠檬烯和红没药烯合成基因的异源表达和产物积累[39]. 目前, 已有多篇综述类文章对光合微生物及藻类平台的萜类工程进行了较为详细的介绍[40].

2　就如何提高代谢工程效率的若干探讨

分子生物学的技术无疑给微藻生物燃料的发展拓展了新的方向, 对代谢工程机制的深入研究和对基因操控工具的进一步完善使人们能更精确有效地进行基因操作. 但代谢工程对技术和设备的要求高, 且局限微藻代谢工程发展的问题始终未得到解决, 因此要提高代谢工程的效率, 重点在于解决以下问题.

2.1　微藻的筛选

微藻种类繁多, 目前已知的就有40000多种[41]. 但是, 已有的遗传操作常局限在几个常用模型微藻, 如莱茵衣藻、硅藻三角褐指藻[11]、集胞藻PCC6803等. 虽然关于一些模型微藻的物种信息不断增加完善, 但许多研究仍受限于微藻生物学信息的不充分性. 因此, 系统生物学、基因组学等系统研究方法在本领域内的应用变得尤为重要. 高通量DNA测序是基因组和转录组分析的关键技术, 基因组的测定能鉴定微藻代谢生物燃料的关键调节基因, 揭示基本代谢途径[11]. 但是, 目前对所有微藻物种的全基因组进行测序是不现实的, 藻类基因包括线粒体基因组(mitochondrial DNA)、叶绿体基因组(chloroplast DNA)和核基因组(nuclear DNA)的基因序列[42]. 因此, 可仅就某些有代表性的基因片段进行系统学分析, 建立以微藻某段特异性基因(如rDNA)为标准的数据库[42], 再将具有产能潜力的微藻进一步测序以筛选优良品种.

2.2 碳的固定和分配

生物碳固定是能源可持续性工作的重要组成部分. 微藻与植物类似, 均使用还原性戊糖磷酸循环, 即卡尔文循环(Calvin cycle)固定CO_2. 其中, 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)是卡尔文循环里碳固定酶. 虽然其在代谢过程中居于中心地位, 但它的效率却奇低[43]. 过去数十年人们对固碳效率研究的主要解决思路包括工程改进RuBisCO的羧化催化速率、提高RuBisCO的活化状态、改进卡尔文循环的再生阶段和富集CO_2浓度以抑制加氧酶反应[44]. 改进RuBisCO的主要障碍之一是CO_2和O_2的特异性和催化效率之间的反比关系[45]. RuBisCO活性更高的自然或工程突变株对CO_2的特异性识别降低, 迄今仍缺乏有效的RuBisCO分子工程实例[10]. 目前, 增加微藻中固碳效率最成功的方法只涉及RuBisCO的邻近途径和酶的修饰. 鉴于RuBisCO具有多样性并广泛存在于多个物种, 且某些天然突变体有较高的有效性. 因此, 可应用宏基因组调查筛选出更有效的RuBisCO突变体. 其次, 尽管RuBisCO是主要的碳固定酶, 但微藻还存在其他天然捕获CO_2的生物途径. 因此, 通过过表达其他替代性碳的利用途径, 研究微藻碳浓缩机制等[46,47]也是增加CO_2固定的另一重要策略.

在保证固碳效率的前提下, 进一步提高产物的积累需增强关键合成酶的表达, 其本质是在光合作用支持的基础上将碳流导向特定的代谢路径[34]. 研究者通过导向碳流向酰基ACP和过表达烷烃生物合成基因可使脂肪烷烃产量提高8.3倍, 且未影响细胞正常生长[29]. 自然条件下蓝藻细胞固定的碳元素只有不足1%会流向MEP生物合成路径, Wang等人[38]通过增强关键酶基因表达使柠檬烯产量提高了100倍, 可见碳流的调节将有不可估量的应用前景. 但是, 研究表明流向MEP合成路径的碳流增加减缓了光合作用电子流并导致NADPH的累积. 因此, 微调ATP/NADPH的比率可能是调节光合作用支持生物燃料及副产物生产的重要方向[38].

2.3 真核微藻之同源重组

同源重组能精确地实现目的基因的插入或敲除, 但真核微藻同源重组频率低. 目前, 较稳定的核转化主要还是依赖于随机插入诱变、强烈筛选和靶基因破坏[11]. 有研究指出莱茵衣藻中的反向遗传操作可依赖基于miRNA和siRNA的敲除方法[48,49]. 人工miRNA (amiRNA)基因沉默技术以内源miRNA的前体为基本骨架, 将其茎环结构中的miRNA/miRNA*序列替换为amiRNA/amiRNA*序列, 使产生的amiRNA作用于目标靶基因并实现对靶基因表达的抑制[50]. 但是, 目前构建人工miRNA载体的困难和转化体的筛选需要进一步的技术突破. 蓝藻细胞相对真核微藻来说更容易同源重组实现, 作为原核生物的蓝藻细胞在基因上的操作性更强[44], 且目前已完成或正在测定的蓝藻基因组序列超过170个[51]. 所以, 加强蓝藻细胞代谢工程研究以了解光合系统中代谢工程的前景对实现真核微藻生物工艺的应用有积极的促进作用.

2.4 外源基因的表达效果不佳

有研究指出大多外源基因的表达效率较低[4,52], 外源基因表达效率低是微藻代谢工程的主要问题之一. 鉴定和使用高效的启动子是目前常用的解决方法. 启动子是基因表达调控的重要顺式作用元件, 对基因的表达效率有着举足轻重的作用. 例如, Lindberg等人[35]通过光合作用启动子*psbA2*驱动异源*ispS*基因表达, 使异戊二烯依赖光强度表达增加. Ungerer课题组[19]利用豌豆*psbA*启动子推动异源*efe*基因在集胞藻6803高效表达并实现有效乙烯生产. 此外, 最近一项研究显示, 通过蛋白质融合策略以天然*cpc*启动子驱动集胞藻中的β-胡萝卜素高效表达实现了高效产物生产[53].

此外, 鉴于异源基因的活性不同, 基因组和蛋白组工程筛选也尤为重要. Neupert等人[54]通过遗传筛选得到高效表达的转基因莱茵衣藻. 另外, 有研究指出利用核糖体开关(riboswitches)可调控生物合成[55]. 密码子优化的荧光素酶[56]和蛋白转录因子也可促进基因表达. 相比传统的生物工业工作生物如大肠杆菌和酵母, 微藻还需进一步发展基因工具以及标准化载体和转化方案.

3 总结与展望

微藻以其结构简单、基因组可操作性强的特点被公认为替代化石燃料和生产其他具有较强经济价值代谢物的理想载体. 鉴于微藻不同于多数现有模式生物的自养代谢模式, 针对其碳代谢途径进行优化、调控

和编辑一直是代谢工程领域的研究热点．本文通过列举微藻自光反应而始，经卡尔文循环最终至糖酵解的碳代谢途径中重要的代谢中间物，全面剖析了包括氢气、糖类、萜类化合物、脂肪烃、脂肪酸、醇类及烯类化合物在内等物质的代谢途径[57]，进而举例阐明调控关键底物及通用底物表达在代谢工程中的重要性．同时, 基于不同生物质的代谢网络, 针对不同的代谢途径分析并提出了若干具有较高可行性的提高生物质产量的策略. 除此之外, 本文结合当今分子生物学的发展情况及现状从另一角度提出了优化代谢工程的其他可行途径[58]：通过结合系统生物学及基因组学筛选高效株系，修饰改造固碳关键复合物并改变碳流导向，开发适用于微藻的同源重组技术以及人为提高外源基因表达效率，更精准、高效的微藻代谢工程或可帮助人类缓解当今社会面临的能源缺乏问题.

合成生物学的发展改良了微藻细胞特性的同时也省去了众多繁杂的工艺步骤，为微藻燃料和高价值产物的生产提供了新方式．基因工程能有效提高目的产物的积累，但是关于工程基因的转录产物和合成蛋白质对代谢的影响问题还未能得到清晰的解答[59]．因此，利用分子生物学系统水平的技术，加强转录组学、蛋白组学、代谢分析的系统性研究将为微藻工程的瓶颈带来新的见解，这也是交叉学科研究的大势所趋[60]．研究表明，微藻的代谢变化可通过单个或多基因的调控来实现，但是代谢工程整体上具有很高的复杂性，且异源途径表达困难，需要综合理清各种生物质代谢过程中协同和竞争的关系．认识微藻生物质代谢的路径、提高微藻生长和产能效率、增强细胞在不利条件下的存活能力等都是让工程微藻生物质燃料实现从实验室转变成大规模生产的必要条件.

致谢　感谢Texas A&M University博士生Erol Can Vatansever提出的建议.

参考文献

1 Teo C L, Jamaluddin H, Zain N A M, et al. Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis* sp.. Renew Energy, 2014, 68: 1–5

2 Huang G H, Chen F, Wei D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Appl Energy, 2010, 87: 38–46

3 de Farias Silva C E, Bertucco A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. Proc Biochem, 2016, 51: 1833–1842

4 Tabatabaei M, Tohidfar M, Jouzani G S, et al. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: future of bioenergy in Iran. Renew Sustain Energy Rev, 2011, 15: 1918–1927

5 Radakovits R, Jinkerson R E, Darzins A, et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. Eukaryotic Cell, 2010, 9: 486–501

6 Tian J, Ma X Y, Wang Z P. The structure and function of protein glycosylation: example as O-linked β-*N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on serine/threonine residues (in Chinese). Chem Life, 2018, 38: 673–680 [田杰, 马新雨, 王志鹏. 从蛋白质糖基化的结构到功能:以丝氨酸/苏氨酸O-(N-乙酰)葡糖胺修饰为例. 生命的化学, 2018, 38: 673–680]

7 Wang Z P, Wang T, Ma X Y, et al. Rethink of the native base structures, base pairing, and functions through non-natural bases (in Chinese). Chem Life, 2017, 37: 946–951 [王志鹏, 王田, 马新雨, 等. 从人造碱基重议天然碱基结构、性质与功能. 生命的化学, 2017, 37: 946–951]

8 Wang Z A, Kurra Y, Wang X, et al. A versatile approach for site-specific lysine acylation in proteins. Angew Chem Int Ed, 2017, 56: 1643–1647

9 Wang Z A, Ding X Z, Tian C L, et al. Protein/peptide secondary structural mimics: design, characterization, and modulation of protein-protein interactions. RSC Adv, 2016, 6: 61599–61609

10 Ducat D C, Way J C, Silver P A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. Trends Biotech, 2011, 29: 95–103

11 Beer L L, Boyd E S, Peters J W, et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. Curr Opin Biotech, 2009, 20: 264–271

12 Dünahay T G, Jarvis E E, Zeiler K G, et al. Genetic engineering of microalgae for fuel production. Appl Biochem Biotechnol, 1992, 34-35: 331–339

13 Liu X, Brune D, Vermaas W, et al. Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, doi: 10.1073/pnas.1001946107

14 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
15 Wang Z T, Ullrich N, Joo S, et al. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryotic Cell, 2009, 8: 1856–1868
16 Kothari R, Pandey A, Kumar V, et al. Algae-Based Biohydrogen: Current Status of Bioprocess Routes, Economical Assessment, and Major Bottlenecks. Algae and Environmental Sustainability. New Delhi: Springer, 2015. 77–86
17 Doebbe A, Rupprecht J, Beckmann J, et al. Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: impacts on biological H2 production. J Biotech, 2007, 131: 27–33
18 Takahama K, Matsuoka M, Nagahama K, et al. Construction and analysis of a recombinant *Cyanobacterium* expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the psbAI locus. J Biosci Bioeng, 2003, 95: 302–305
19 Ungerer J, Tao L, Davis M, et al. Sustained photosynthetic conversion of CO_2 to ethylene in recombinant *Cyanobacterium Synechocystis* 6803. Energy Environ Sci, 2012, 5: 8998
20 Zhang H Y, Kuang Y L, Lin J. Research progress of harvesting technologies of energy microalgae (in Chinese). Chem Ind Eng Prog, 2013, 32: 2092–2098 [张海阳, 匡亚莉, 林喆. 能源微藻采收技术研究进展. 化工进展, 2013, 32: 2092–2098]
21 Deng MD, Coleman JR. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 523–528
22 Gao Z, Zhao H, Li Z, et al. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. Energy Environ Sci, 2012, 5: 9857–9865
23 Atsumi S, Higashide W, Liao J C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. Nat Biotechnol, 2009, 27: 1177–1180
24 Lan E I, Liao J C. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. Metabolic Eng, 2011, 13: 353–363
25 Wang Z P, Deng G. Discussion and classification of cofactors based on heir chemical essences and functions (in Chinese). Univ Chem, 2016, 31: 39–48 [王志鹏, 邓耿. 基于辅因子化学本质及功能的分类与讨论. 大学化学, 2016, 31: 39–48]
26 Tan X, Yao L, Gao Q, et al. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. Metabol Eng, 2011, 13: 169–176
27 Schirmer A, Rude M A, Li X, et al. Microbial biosynthesis of alkanes. Science, 2010, 329: 559–562
28 Jia C, Li M, Li J, et al. Structural insights into the catalytic mechanism of aldehyde-deformylating oxygenases. Protein Cell, 2015, 6: 55–67
29 Wang W, Liu X, Lu X. Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes. Biotechnol Biofuels, 2013, 6: 69
30 Zaslavskaia L A, Lippmeier J C, Shih C, et al. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. Science, 2001, 292: 2073–2075
31 McEwen J T, Machado I M P, Connor M R, et al. Engineering *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for continuous growth under diurnal conditions. Appl Environ Microbiol, 2013, 79: 1668–1675
32 Liu X, Sheng J, Curtiss III R. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci, 2011, 108: 6899–6904
33 Niederholtmeyer H, Wolfstädter B T, Savage D F, et al. Engineering cyanobacteria to synthesize and export hydrophilic products. Appl Environ MicroBiol, 2010, 76: 3462–3466
34 Ducat D C, Avelar-Rivas J A, Way J C, et al. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity. Appl Environ Microbiol, 2012, 78: 2660–2668
35 Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. Metabol Eng, 2010, 12: 70–79
36 Halfmann C, Gu L, Gibbons W, et al. Genetically engineering cyanobacteria to convert CO_2, water, and light into the long-chain hydrocarbon farnesene. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98: 9869–9877
37 Englund E, Pattanaik B, Ubhayasekera S J K, et al. Production of squalene in *Synechocystis* sp. PCC 6803. PLoS ONE, 2014, 9: e90270
38 Wang X, Liu W, Xin C, et al. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113: 14225–14230
39 Davies F K, Work V H, Beliaev A S, et al. Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Front Bioeng Biotechnol, 2014, 2: 21
40 Davies F K, Jinkerson R E, Posewitz M C. Toward a photosynthetic microbial platform for terpenoid engineering. Photosynth Res, 2015, 123: 265–284

41 Yu S Y, Zhao Q Y, Shi J P. Genetic engineering modification of microalgae to enhance CO_2 fixation and oil formation (in Chinese). China Biotechnol, 2012, 32: 117–124 [于水燕, 赵权宇, 史吉平. 固碳产油微藻的基因工程改造. 中国生物工程杂志, 2012, 32: 117–124]
42 Zhen Y, Yu Z G, Mi T Z. Application of molecular biology to microalgae classification research (in Chinese). J Ocean Univ China (Nat Sci), 2006, 36: 875–878 [甄毓, 于志刚, 米铁柱. 分子生物学在微藻分类研究中的应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36: 875–878]
43 Spreitzer R J, Salvucci M E. RUBISCO: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53: 449–475
44 Rosgaard L, de Porcellinis A J, Jacobsen J H, et al. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. J Biotech, 2012, 162: 134–147
45 Whitney S M, Houtz R L, Alonso H. Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO_2-sequestering enzyme, Rubisco. Plant Physiol, 2011, 155: 27–35
46 Bar-Even A, Noor E, Lewis N E, et al. Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 8889–8894
47 Ducat D C, Silver P A. Improving carbon fixation pathways. Curr Opin Chem Biol, 2012, 16: 337–344
48 Hu J, Deng X, Shao N, et al. Rapid construction and screening of artificial microRNA systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J, 2014, 79: 1052–1064
49 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
50 Zhang X H, Kong W W, Li Y, et al. Study of gene silencing by artificial miRNA (in Chinese). Biotechnol Bull, 2014, 4: 50–56 [张羡贺, 孔稳稳, 李勇, 等. 人工miRNA沉默基因的研究. 生物技术通报, 2014, 4: 50–56]
51 Reid EE, Ruhoff J R. Pelargonic acid. Organic Syntheses, 1943. 60
52 Sun M, Qian K, Su N, et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Biotech Lett, 2003, 25: 1087–1092
53 Formighieri C, Melis A. A phycocyanin·phellandrene synthase fusion enhances recombinant protein expression and β-phellandrene (monoterpene) hydrocarbons production in *Synechocystis (cyanobacteria)*. Metab Eng, 2015, 32: 116–124
54 Neupert J, Karcher D, Bock R. Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. Plant J, 2009, 57: 1140–1150
55 Croft M T, Moulin M, Webb M E, et al. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 20770–20775
56 Shao N, Bock R. A codon-optimized luciferase from Gaussia princeps facilitates the *in vivo* monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Curr Genet, 2008, 53: 381–388
57 Wang Z P, Ma X Y, Yan H J, et al. Discussion on introducing amino acid metabolism into bioorganic chemistry and chemical biology education (in Chinese). Univ Chem, 2018, 34: 24–32 [王志鹏, 马新雨, 颜惠娟, 等. 浅析氨基酸代谢在生物有机化学与化学生物学教学中的重要性. 大学化学, 2018, 34: 24–32]
58 Tian J, Wang Z P, Ma X Y, et al. Study of enzymatic reaction with the combination of bioinformatics and organic chemistry: an introduction and discussion of an undergraduate experiment abroad (in Chinese). Univ Chem, doi: 10.3866/PKU.DXHX201805027 [田杰, 王志鹏, 马新雨, 等. 将生物信息学与有机化学结合初探酶促反应原理与实践——介绍一个国外本科生实验并讨论其相关问题. 大学化学, doi: 10.3866/PKU.DXHX201805027]
59 Lechner A, Brunk E, Keasling J D. The need for integrated approaches in metabolic engineering. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8
60 Wang Z P, Qiu T, Yuan J Y. Discussion on functional mechanism and selection principles of metal elements in biological systems (in Chinese). Chin J Chem Edu, 2016, 37: 1–6 [王志鹏, 邱天, 袁金颖. 生命体系中金属元素的作用机理与选择原理. 化学教育, 2016, 37: 1–6]

Advance in metabolic engineering of microalgae for biofuels and high-value compounds

ZHENG Yi[1,2,4], WANG A. ZhiPeng[3,7], JIANG ZhenXiong[1,5], WANG Peng[8], YIN Sheng[9], MA XinYu[3], XU Bing[1] & WANG Xin[1,6]

1 Department of Plant and Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station TX 77840, USA;
2 Department of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
3 Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station TX 77840, USA;
4 Maryland Institute College of Art, Baltimore MD 21217, USA;
5 Department of Biology, Texas A&M University, College Station TX 77840, USA;
6 Department of Microbiology, Miami University, Oxford OH 45056, USA;
7 Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital; Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston MA 02115, USA;
8 Burn Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
9 Nutrition/Metabolism Laboratory, Department of Surgery, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston MA 02138, USA

Algal biofuel is considered as an alternative to fossil fuels. Due to the structure simplicity and genetic tractability of many microalgae, they are also gradually recognized as an ideal factory for the production of various metabolites of high commercial values. In this mini-review, we attempt to summarize recent development on metabolic engineering of microalgae to explore their metabolic versatility for the production of hydrogen, carbohydrates, terpenes, fatty acids, alcohols, aliphatic alkanes and alkenes. In addition, we also present key challenges facing algal engineering, and propose a few strategies that could leverage the advancement in systems biology and genomics. We foresee a bright future for microalgae studies to advance both research and technology development.

molecular biology, genetic engineering, microalgae, biofuel, carbon flux, synthetic biology, metabolic engineering

doi: 10.1360/N052018-00287