

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-023

从CO₂到有机物——碳中和的微藻绿色生物制造

孙中亮, 陈辉, 王强

(河南大学省部共建作物逆境适应与改良国家重点实验室, 河南 开封 475004)

摘要: 微藻可以利用太阳能固定CO₂并转化为有机物, 其作为合成生物物质的细胞工厂具有众多生物学和工程学优点。当前, 全球正面临着碳减排和资源短缺的双重压力, 通过微藻固碳合成化合物技术的攻关和突破, 实现直接利用微藻固定CO₂, 有望建立以CO₂为原料、以太阳能为能源, 规模化生产大宗食物、能源、化学品和医药保健品的未来新兴绿色生物制造产业, 对于解决当前面临的粮食安全、环境污染和能源紧缺等问题具有战略意义。本文从光驱自养的角度, 首先总结了微藻作为细胞工厂生产平台化合物、生物能源和高附加值化合物的途径、底盘改造策略等最新进展, 进而对该技术的未来发展方向进行展望。最后, 提出了微藻作为合成生物学高效底盘细胞, 其广泛应用还应该从建立标准化的藻类基因与基因组编辑技术体系、深刻理解合成物质在藻细胞中的代谢流和控制机制以及提高生物量产率和光合作用效率等几个环节进行攻关, 以加强微藻绿色生物制造产业的可控性和可复制性。

关键词: 微藻; CO₂; 平台化合物; 生物能源; 高附加值化合物; 合成生物学

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

From CO₂ to value-added products—carbon neutral microalgal green biomanufacturing

SUN Zhongliang, CHEN Hui, WANG Qiang

(State Key Laboratory of Crop Stress Adaptation and Improvement, School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: Currently, our world is facing the dual pressure of carbon emission reduction and resource shortage. China has also put forward a goal of reaching CO₂ emission peak by 2030 and achieving carbon neutrality by 2060. At present, the production and manufacture of fuels and bulk chemical products mainly rely on petrochemical refining, which is facing the challenges of high risk of production safety, great pressure of environmental protection, and contradiction between supply and demand of oil and gas resources. In this context, the use of microalgae for direct CO₂ fixation is expected to establish large-scale biomanufacturing with CO₂ as raw material and sunlight as energy source,

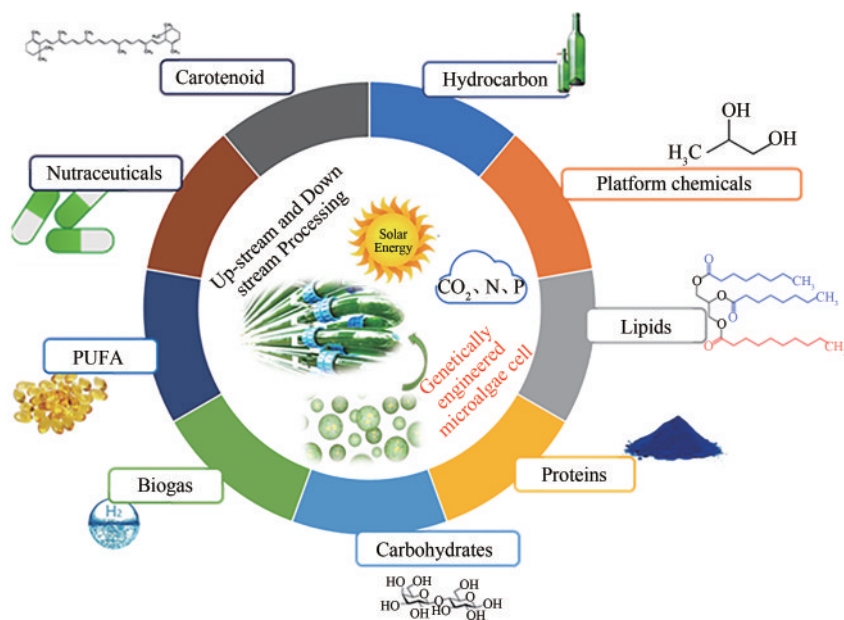
收稿日期: 2022-04-15 修回日期: 2022-08-17

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFA0909600); 国家自然科学基金 (32170138, 32102819, 31870041); 河南省高校科技创新团队 (22IRTSTHN024); 河南省自然科学基金 (212300410024); 河南省科技攻关项目 (222102110131); 高等学校学科创新引智计划 (#D16014)

引用本文: 孙中亮, 陈辉, 王强. 从CO₂到有机物——碳中和的微藻绿色生物制造[J]. 合成生物学, 2022, 3(5): 953-965

Citation: SUN Zhongliang, CHEN Hui, WANG Qiang. From CO₂ to value-added products—carbon neutral microalgal green biomanufacturing[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(5): 953-965

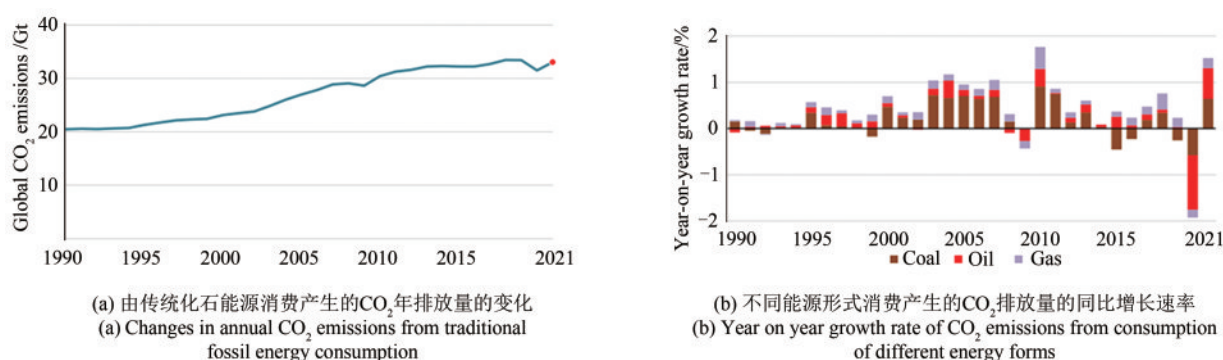
this is a new manufacturing mode that breaks away from the route of petrochemical industry, and has the typical characteristics of low carbon, recyclable, green, and clean. This emerging green industry is of strategic significance for solving the current issues of food security and energy shortages, through sustainable production of food, energy, chemicals, and pharmaceuticals. In addition, microalgae possess great potential in environment protection, thanks to their strong stress resistance, effective remediation of eutrophic elements such as nitrogen and phosphorus from wastewater, and simultaneous removal of SO_x and NO_x during CO_2 utilization in flue gas. Therefore, compared with heterotrophic chassis cells, microalgae-based synthetic biology and bio-manufacturing also play a role in carbon sequestration and emission reduction, and microalgae have then attracted much attention in recent years as “green cell factories”. From the perspective of light-driven autotrophy, we summarize the latest progress of microalgae as a cell factory, introduce chassis transformation strategies, and then look into the future development of this technology. In particular, improved genetic manipulation and larger cultivation scales are critical for microalgae to serve as high efficiency chassis for synthetic biology, whereas promising directions include establishment of standardized systems for algal genome editing, deep understanding of metabolic flux and control for robust biosynthesis, as well as improvement of biomass productivity and photosynthesis efficiency. All in all, this review provides a useful reference to establish controllable and replicable processes for microalgae green biomanufacturing.



Keywords: microalgae; carbon dioxide; carbon platform compound; bio-energy; high-value compounds; synthetic biology

随着世界经济的发展和人口的不断增多，能源（石油、煤炭、天然气等）需求量大幅增加，导致非可再生资源日益减少。传统能源燃烧产生的 CO_2 是导致全球温室效应的主要原因之一，产生的其他污染物如 SO_x 、 NO_x 、粉尘等是造成生态环境恶化的主要元凶。2022年4月，国际能源署（International Energy Agency, IEA）发布 Global

Energy Review 2021^[1]，数据表明，自1990年以来，全球二氧化碳排放持续增长[图1(a)]，随着全球经济从新冠疫情中逐渐复苏，2021年全球 CO_2 排放量达到363亿吨，创历史新高，比2020年增加6%[图1(b)]。这一方面说明当前温室气体减排压力巨大，另一方面也表明国际社会一致主张强化的气候变化应对措施尚不够完善。因此，改

图1 1990—2021年间全球CO₂排放情况Fig. 1 The Global CO₂ emissions from 1990 to 2021

进生产方式、开发清洁的可再生能源、减少碳排放已成为当前产学研界关注的热点。

目前,固碳的方法主要有物理封存、化学转化和生物固定^[2-4]。生物固定是利用植物的光合作用,将CO₂转化为碳水化合物,以有机碳的形式固定在植物体内或土壤中,被认为是缓解全球温室效应最具前景的方法^[5-6]。在自然界中,微藻是一类单细胞或简单多细胞的光合微生物,主要由蓝藻、绿藻和硅藻等种类组成,广泛分布在淡水和海洋系统中。微藻以不到高等植物1%的生物量为地球提供了超过50%的初级生产力和氧气,是光合效率最高的生物类群^[7]。又因为微藻具有利用光能固定CO₂并通过各种代谢途径快速合成蛋白质、核酸、脂质等生物大分子和各种次级代谢产物的优势,而备受关注^[8-10]。

21世纪初,工程学思想策略与现代生物学、系统科学及合成科学相互融合,发展成为“合成生物学”,采用自下而上的策略,重编、改造天然的或设计合成新的生物体系,以揭示生物规律并利用生物规律合成生物产品^[8]。由此开启了以生物体机能进行大规模物质加工与物质转化、为社会发展提供工业商品的生物制造新行业。微藻可以利用太阳能固定CO₂并转化为一系列有机物,其作为合成生物物质的细胞工厂具有众多生物学优点,例如比植物细胞的结构简单且基因可操作性强、具有成熟的遗传操作系统、能够实现基因组大片段敲除和转入并稳定遗传、能够通过调整合成路径抑制与生产无关的合成途径等^[9, 11-13]。此外,微藻还具有生长速率快,环境适应能力强,能够直接利用废水和工业烟气等工农业废弃物,

能够在沿海滩涂、盐碱地等地培养从而不与农作物争地等诸多工程学优势,是一种经济可行、环境友好和可持续发展的生物固碳技术^[10, 14-15]。

当前,能源和大宗化工产品的生产制造主要依赖于石化炼制,面临着生产安全风险高、环保压力大、油气资源供需矛盾等挑战。大力发展基于微藻高效转化CO₂生产有机物的生物制造产业,有望解决当前面临的能源危机和化工产品不可持续生产的问题,同时达到缓解温室效应的效果。近年来,微藻作为细胞工厂高效转化CO₂生产有机物得到越来越多的关注。本文将对平台化合物、生物能源、高附加值化合物3类产品的合成生物学及生物制造的研究进展与技术进步进行总结与分析,同时展望其对双碳背景下合成生物学发展带来的契机以及光驱动有机物生产的前景。

1 平台化合物

平台化合物是指可作为生产精细和特殊功能化学产品的单体物质,如丙二醇、异戊二烯、3-羟基丙氨酸等。据估计,全球每年以石油、煤炭和天然气为基础原料生产的平台化合物约3.3亿吨^[16]。由于化学合成平台化合物的方法存在能耗高、步骤繁多以及使用有毒催化剂等问题,再加上石化资源日益减少,人们开始更多关注可再生的生物合成路径。2004年,美国能源部(DOE)确定了12种可从生物质中获得的化学单体物质作为潜在的平台化合物^[17]。随着生物合成技术的成熟,生物基平台化合物市场在2021—2031年间的

复合年增长率预计将达到8%，市场销售额预计将达到230亿美元^[18]。微藻可以利用太阳能，在自养条件下转化CO₂合成某些平台化合物，是生物基平台化合物的重要来源。

1.1 丙二醇

丙二醇是生产不饱和聚酯、环氧树脂、聚氨酯树脂等化学品的重要原料，是一类C₃平台化合物，在食品、医药和美妆等领域应用广泛^[19-21]。目前，制备丙二醇的方法主要是催化转化石油行业衍生物，与化学催化法相比，生物法具有条件温和、环境污染小等优点^[22]。利用光合作用，蓝藻可以直接转化太阳能和CO₂合成所需的化合物，同时借助合成生物学技术，对蓝藻的合成途径进行改造，可以实现CO₂到丙二醇的合成。Hirokawa等^[23]在*S. elongatus* PCC7942中导入甘油合成及转化生产1,3-丙二醇的相关酶，实现了从CO₂到1,3-丙二醇的光合生产全过程，结合培养条件优化，经过14天1,3-丙二醇的滴度达到288 mg/L。应用化学计量代谢模型预测与计算机模拟等合成生物学技术策略，该团队^[24-25]对1,3-丙二醇合成途径进一步改造，筛选获得的菌株合成1,3-丙二醇的滴度达到了1220 mg/L。为了解决合成途径中关键作用酶甘油脱水酶的氧敏感不相容的问题，Liu等^[26]提出蓝藻异形胞自然分化的空间隔离策略，选用兼性厌氧菌（*Klebsiella pneumoniae*）和严格厌氧菌（*Clostridium butyricum*）基因来源的1,3-丙二醇生产基因与启动子串联排列，组装成1,3-丙二醇光合生产模块，通过同源重组整合到鱼腥藻PCC7120菌株中，产量提高了1.7倍。

Li等^[27]报道了将甲基乙二醛合酶、甘油脱氢酶和乙醛还原酶导入蓝藻*S. elongatus* PCC7942中以实现1,2-丙二醇生产，同时将1,2-丙二醇的合成途径设计为依赖于NADPH的途径，减少中间产物羟基丙酮的积累，提高1,2-丙二醇的产量至150 mg/L。研究发现，1,2-丙二醇中约1/4的碳来源于糖原，其余的碳来源于卡尔文循环中的CO₂，David等^[28]将*mgsA*、*yqhD*、*adh*导入*Synechocystis* sp. PCC6803以实现1,2-丙二醇的生产，通过培养条件优化1,2-丙二醇的含量在细胞稳定期可达到1 g/L。

1.2 异戊二烯

异戊二烯是生产橡胶和胶黏剂的关键中间体，也是化学工业中常用的单体物质。传统的生产方法是从原油冶炼中获得。2013年Matos等^[29]模拟10 t级生产规模对比了光合自养微藻和发酵异养细菌两种可再生的异戊二烯生产方法，指出光合微藻自养直接转化CO₂合成异戊二烯的理论潜力更大。

Gao等^[30]在动态通量分析和代谢流分析的基础上，对比了甲基赤藓糖醇磷酸（methylerythritol phosphate, MEP）途径与甲基戊酸途径的碳转化率和前体驱动力，并最终选择在蓝藻细胞中设计MEP途径以生产异戊二烯，大幅度提升了异戊二烯产量（1.2 g/L）。此后，从减轻异戊二烯合酶与藻胆蛋白的β亚基融合后表达障碍以及改进反应底物二甲烯丙基焦磷酸等方面入手，Chaves等^[31]筛选出了最佳的异戊二烯转化体，进一步提高了异戊二烯的产量，达到了12.3 mg/g。Pade等^[32]从工程学角度优化了重组工程蓝藻的培养条件，发现低浓度的NaCl有助于异戊二烯产量的提高。

除丙二醇和异戊二烯外，作为能够将CO₂转化为有机物的天然宿主，微藻还可进行烯烃、羧酸以及其他醇类如2,3-丁二醇等平台化合物的生物学合成（表1）。鉴于太阳能和CO₂的可再生特性，设计与构建蓝藻细胞工厂进行平台化合物物质的生产被认为是未来具备巨大应用潜力的一种可持续生产模式。

2 生物能源

生物能源可开发的种类众多且来源广泛，在众多生产生物能源的原料中，微藻由于光合作用效率高、生长速度快、油脂含量高、不占用耕地、可以利用废水废气培养以及可以全年生产等优势，使其成为第三代生物能源的典型代表^[43]。微藻生物能源有多种形式，例如固态的生物炭，液态的生物柴油、生物原油、生物乙醇，气态的生物氢、生物燃气、合成气等^[10, 44-45]。

表1 蓝藻细胞工厂生产平台化合物

Tab. 1 Production of platform compound by cyanobacteria cell factory

表达产物	合成聚合物	表达株系	最终产率/[mg/(L·d)]	参考文献
1,3-丙二醇	聚酯、聚醚、聚氨酯、PTT	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	61	[25]
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	8	[33]
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	20.6	[34]
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7120	2.3	[26]
1,2-丙二醇	聚丙二醇	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	15	[27]
		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	100	[28]
异戊二烯	橡胶	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	60	[30]
		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	1.7	[35]
乙烯	聚乙烯、聚苯乙烯、PVC、聚酯	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	2104	[36]
		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	19.2	[37]
3-羟基丙酸	聚 3-羟基丙酸	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	139.5	[38]
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	329.5	[39]
2,3-丁二醇	树脂	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	54.36	[40]
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	300	[41]
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	110	[40]
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	100	[42]

2.1 生物柴油

微藻细胞合成油脂后，经分离萃取、甲酯化等步骤，转化成可市售的生物柴油，其中影响其经济性的关键因素是细胞中油脂的含量^[46]。微藻产生的油脂含量因藻种不同而存在差异，但是通过不同的途径调节脂质代谢，可以改变或提高油脂产量，如调节营养元素供给和周围环境条件（pH、温度和光照等）^[47-48]，引入外源植物激素等。然而，利用上述条件诱导培养是耗时的，有时会导致微藻生物量产量降低，且微藻细胞对诱导条件做出响应的机制还不清楚，怎样平衡生物量生长与油脂含量积累的协调关系仍是未来需要关注的方向。

微藻组学与信号传导技术的发展以及相关生物合成途径的解析加强了对藻细胞基因调控、代谢物变化、蛋白质活性和相互作用的理解^[49]，进而推动了利用合成生物学技术手段提高微藻油脂生产的研究进程，针对基因元件和代谢途径的改造优化已经被用于提高微藻油脂的产量（表2），主要策略是通过上调或下调藻细胞中编码特定酶的基因的表达，构建转基因微藻藻株，促进不同藻种中碳水化合物或油脂的积累。基因工程、代

谢工程和合成生物学等方法的介入将促进微藻作为一个更加优质的生物柴油载体 的发展，并促进生物柴油的工业化和商业化。

2.2 生物氢

微藻细胞产氢技术主要包括发酵产氢（光发酵产氢、暗发酵产氢和光暗联合发酵产氢）和光合作用产氢（直接生物光解产氢和间接生物光解产氢）^[59]。不同培养工艺对氢产量有显著影响。此外，还有一些工程方法可以提高生物产氢效率，如微藻-细菌耦合生物产氢、添加亚硫酸氢钠、多藻种混合培养、固定化微藻细胞以提高光照利用率和改进光生物反应器等^[60-61]。

利用合成生物学技术，可以通过有针对性地修改或设计相关的酶来构建工程菌株显著提高藻细胞中氢的产量和产率（表3）。氧气能抑制氢化酶基因的表达进而限制氢化酶的活性，改变氢化酶的结构可以增加氢化酶对氧的耐受性，研究人员通过突变特定的氨基酸，改变了氢化酶表面的气体结合位点，阻止与氧气结合从而保护具有催化功能的活性中心^[68]。研究人员还设计了一种复合酶，将氢化酶与具有铁还原功能的蛋白融合在

表2 基因工程和代谢工程方法用于提高微藻油脂产量

Tab. 2 Genetic engineering and metabolic engineering methods are used to improve the yield of microalgae lipid

藻株	操作方法	有益结果	油脂含量或产率	参考文献
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	过表达内源性苹果酸脱氢酶	油脂含量增加250%	57.8%	[50]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Lobosphaera incise</i> 中的 GPAT 基因 (LiGPAT) 在莱茵衣藻中过表达	TAG 含量比野生型增加 50%	50.0%	[51]
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	转化反义结构体, 阻止脂质分解代谢	油脂含量比野生型增加 230%	18.8%	[52]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	过表达 II 型甘油二酯酰基转移酶 (DGAT2D) 基因	TAG 含量增加 35%	37.2%	[53]
<i>Chlorella spp</i>	拟南芥激酶的上调和过表达	油脂产量增加 110.4%	27.5%	[54]
<i>Nannochloropsis</i>	过表达新型 bZIP1 转录因子 NobZIP1N	油脂含量增加而不影响微藻生长	40%	[55]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	使用 CRISPR-Cas9 敲除磷脂酶 A2 基因	油脂含量可达 64.25%	80.92 mg/(L·d)	[56]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	使用 CRISPR-Cas9 RNP 方法产生葡萄糖焦磷酸化酶基因 (AGP) 突变的突变体	油脂含量比野生型增加 274%	57.67%	[56]
<i>Nannochloropsis</i>	通过插入突变产生突变体 <i>Mut68</i>	脂肪酸甲酯含量和产量分别比野生型增加 34% 和 75%	78.3 mg/(L·d)	[57]
<i>Planktochlorella nurekis</i>	利用细胞松弛素 B 和秋水仙碱调控 DNA 水平	油脂含量比野生型增加 10%~60%	12%~26%	[58]

表3 提高微藻产氢率的多种基因工程方法

Tab. 3 Various genetic engineering methods for improving hydrogen production rate of microalgae

藻株	操作方法	有益结果	氢气产量或产率	参考文献
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	设计光诱导系统, 利用该系统设计蓝光诱导产氢转基因藻类	成功激活了人工 miRNA, 提高微藻的产氢能力	20 $\mu\text{L}/(\text{L}\cdot\text{h})$	[62]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	将大肠杆菌的丙酮酸氧化酶和过氧化氢酶基因整合到衣藻叶绿体基因组中	生物氢产量增加了 2 倍	1.04 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$	[63]
<i>Chlorella sp.</i> DT.	敲除 <i>psbO</i> 基因	生物氢产量比野生型提高了 9 倍	350 mL/L	[64]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	截短捕光天线	氢气产量比野生型增加 6 倍	30 mL/L	[65]
<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	添加抑制光合和呼吸作用电子传递链的抑制剂	氢气产量增加了 30 倍	1.25 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$	[66]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	热诱导人工 miRNA 表达系统	氢气合成增加 60%	90 $\mu\text{L}/\text{mg Chl}$	[67]

一起, 从而将电子从铁氧还蛋白转移到氢化酶, 提高了生物产氢率^[69]。此外, 抑制 RuBisCO 以减弱 Calvin-Benson 循环也有利于电子向氢化酶转移。RuBisCO 由叶绿体基因编码的大亚基和细胞核基因编码的小亚基组成, 其大亚基突变体和小亚基突变体的生物氢产率均高于野生株在硫缺乏时的产氢效率^[70]。高效率获取光能是光自养条件下生物产氢的第 1 步, 捕光天线尺寸的减小可以减少高光抑制, 提高捕光效率和光能利用率, 从而增加生物氢产量, 生物氢产率可以达到野生株的 4~8 倍^[71]。

如前所述, 氧气能抑制氢化酶活性, 如果能隔绝氧气, 氢化酶的活性就能得到维持和增强, 进而使生物氢产量增加 (图 2)。基于合成生物学技术, 我们通过在 *E. coli* 中异源表达一系列编码羧

酶体外壳蛋白与外壳结合蛋白的基因, 成功获得结构完整且稳定的羧酶体外壳, 同时筛选到可介导外源蛋白定位至羧酶体壳内的靶向定位肽^[72]。随后运用该靶向定位肽介导氧气敏感型 [FeFe] 氢酶及其电子传递相关蛋白定位至羧酶体壳内, 成功构建出结构稳定且功能完整的纳米级产氢羧酶体, 并证实羧酶体壳内的低氧微环境可显著提升氢酶的催化效率。该研究在提供创新型生物制氢方案的同时, 为后续进一步利用微藻构建产氢细胞工厂奠定了研究基础。

尽管针对提高微藻生物产氢效率的研究已经有很多, 但是目前生物氢生产水平仍不足以工业化和商业化。如何将生物学方法和工程学手段相结合, 有效提高微藻生物产氢效率, 仍需要进一步探索。

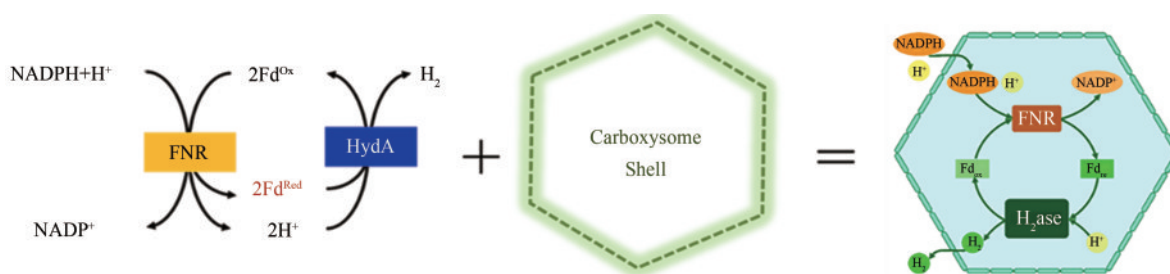


图2 微藻产氢体系的构建

Fig. 2 Schematic of structure and working mode of the Shell-HydA nanoreactor

(Our study provides innovative bio-hydrogen production strategy and new insights into the shelf-assembly of carboxysome and selective permeability of carboxysome shell as well, and paves the way for engineering carboxysome shell-based nanoreactors to recruit specific enzymes for diverse catalytic reactions)

2.3 生物乙醇

利用微藻制备生物乙醇的方法有两种：其一是微藻生物质提供高含量的碳水化合物，在酿酒酵母的发酵作用下产生乙醇；其二是微藻细胞直接生产乙醇。在第一类利用微藻生产乙醇的途径中，获取高含量碳水化合物的藻株对制备生物乙醇具有重要意义。由于藻细胞中的碳水化合物是乙醇最直接的转化原料，而碳水化合物的积累通常发生在对细胞生长不利的环境下，例如缺氮、缺磷、缺硫等，这一定程度上限制了微藻生物量的积累，不利于提高乙醇产率^[73]。相比于微藻合成生物学技术提高碳水化合物（如淀粉）含量用于乙醇发酵而言，构建微藻细胞直接生产乙醇的代谢途径，是近年来得到广泛关注的生物乙醇生产模式^[74]。

Chochois等^[75]采用电转化方法在莱茵衣藻中插入外来基因引起突变，建立了大型的突变文库，以有效筛选到高淀粉含量的藻株，有利于后续的乙醇发酵。相比而言，利用微藻细胞直接合成乙醇更具有开发价值。但是乙醇并不是微藻的天然代谢产物，构建能够合成乙醇的微藻细胞工厂需要导入外源乙醇合成途径。现阶段，所有开发的光合细胞工厂中乙醇合成途径都基于丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶的催化作用^[74]。丙酮酸脱羧酶以代谢物丙酮酸为底物，催化脱羧反应生成乙醛，乙醇脱氢酶以NADPH或NADH为辅因子，将乙醛还原为乙醇。以蓝藻为底盘藻株开发合成乙醇的细胞工厂时，普遍使用来自运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 中的 PdcZM-AdhIIZM 途径，该

途径也普遍应用于其他微生物乙醇合成细胞工厂的构建^[76]。Algenol公司通过在蓝藻中替换来自棕榈发酵细菌 *Zymobacter palmae* 的丙酮酸脱羧酶基因 *pdcZP*（一种比运动发酵单胞菌来源的 *pdcZM* 更高效的丙酮酸脱羧酶），实现了乙醇产量 10%~20% 的提高，进而将 *slr1192* 基因替代 *adhIIZM* 基因，并采用铜离子诱导型启动子 *PziaA* 驱动 *pdczp-sl1192* 的表达，30 d 乙醇产量达到 7.1 g/L^[77]。美国 Joule 公司在聚球藻 PCC7002 中引入 1 个 *pdcZM* 基因和 2 个不同来源的 *adh* 基因构建细胞工厂，进而又敲除硫辛酸合成途径，工程藻株 13 d 乙醇产量为 5.62 g/L^[78-79]。

乙醇是最早以合成生物学方法实现光驱固碳的生物燃料产品，但是基于微藻底盘合成的相关技术距离真正的系统化、规划化、产业化应用仍然有相当长的路途。

3 高附加值化合物

高附加值化合物通常是指动物、植物或微生物的次级代谢产物，常被用作化妆品、食品添加剂、药品以及保健品等，具有较高的经济价值。藻类中高附加值化合物主要包括碳水化合物、生物碱、类胡萝卜素、萜类以及类固醇激素等^[80]。随着合成生物学的发展，通过引入外源基因等方法重新设计底盘细胞，将上述种类的高附加值化合物的完整合成途径在合适的底盘细胞中重组，可显著提高化合物的合成效率。目前在合成生物学领域，一些模式微藻藻种作为底盘细胞具有生

长快、基因组和代谢途径背景清晰、遗传操作技术成熟等优势,已经被用来合成多种高附加值化合物。表4梳理了近年来微藻底盘细胞合成高附加值产品的发展状况。

表4 微藻底盘细胞中高附加值化合物的生物合成

Tab. 4 Biosynthesis of high value-added compounds by microalgae chassis cells

分类	藻株	合成产物	参考文献
原核藻	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	对香豆酸	[81]
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	叶黄素	[82]
	<i>Synechococcus elongatus</i> UTEX 2973	柠檬烯	[83]
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	乳酸	[84]
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	虾青素	[85]
	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	法尼烯	[86]
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	柠檬烯	[87]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	类异戊二烯	[88]
真核藻	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	木糖醇	[89]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	倍半萜	[90]
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	DHA	[91]
	<i>Bacillariophyta</i>	没药烯	[92]
	<i>Nannochloropsis</i>	EPA	[93]
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	岩藻黄质	[94]

相对于真核藻类,原核藻类生物合成的相关技术较为成熟。目前利用不同的蓝藻底盘已成功合成虾青素、对香豆酸、柠檬烯和叶黄素等(表4)。真核藻的合成生物学研究仍处于探索阶段,其中莱茵衣藻的研究及应用较为广泛,是真核微藻合成生物学和基因工程的模式生物。近年来,有研究利用莱茵衣藻表达VP28蛋白,将表达该外源蛋白的藻喂养虾可显著控制虾的白斑病^[95]。将粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)来源的木酮糖还原酶经过密码子优化后转入莱茵衣藻细胞,可以获得0.38 g/L的木糖醇产量^[89],异源表达植物广藿香(*Pogostemon cablin*)来源的醇合酶(patchoulol synthase, PTS)能在莱茵衣藻中合成倍半萜^[90]。此外,也有报道利用合成生物学技术改造莱茵衣藻的叶绿体系统直接生产霍乱、疟疾疫苗和免疫毒素等重组蛋白^[96-98]。然而,由于缺乏有效的表达元件、低转基因滴度和比较评估的缺失阻碍了莱茵衣藻作为绿色底盘细胞的进一步发展。有学者系统评估了莱茵衣藻现有表达元件,并结合启动子工程,创建了新的合成表达元件,改进了莱茵

衣藻作为合成生物学底盘细胞的应用效果^[99]。对于其他真核藻类,不同生物技术的开发及利用也越来越丰富。例如,在微拟球藻中导入高活力的外源甘油二酯酰基转移酶(DGAT),使其定位于叶绿体内质网膜,提高了对EPA的活力,减少了EPA在氧化途径中的降解,使得甘油三酯(TAG)中EPA的比重提高5倍,对于以微拟球藻为原料,开发高品质可食用油脂具有重要意义^[93]。海洋微藻三角褐指藻也是真核藻类的模式生物,其胞内萜类化合物岩藻黄质的合成主要通过1-脱氧-D-木酮糖5-磷酸合酶途径实现,构建编码该酶基因Dxs的表达质粒并整合到三角褐指藻基因组中,得到的Dxs转化体的岩藻黄质含量是野生型藻株的2.4倍^[94]。此外,在杜氏盐藻和小球藻中也实现了CRISPR技术的应用,在纤丝裸藻中实现了利用农杆菌介导的遗传转化,在小环藻中实现了内含子介导的基因表达增强,这些技术的开发均为未来构建改造微藻细胞工厂工业化生产高附加值化合物奠定了基础^[99-101]。

不论是真核藻类,还是原核藻类作为底盘细胞合成高附加值化合物或其他生物制品,其合理选择是生物合成路径构建成功的决定因素之一。微藻细胞作为表达的载体,为目的产物的合成提供了初始零件,决定了生物合成采用的底物和代谢通量,而底物和代谢通量决定了目的产物合成的性质与产量。因此,根据实际生物合成途径选择合适的底盘微藻细胞,并对参与代谢过程的酶和调控因子加以优化,将大大提高光驱固碳方法异源表达生物制品的靶向性。

4 总结与展望

微藻作为底盘细胞,能够通过光合作用直接转化CO₂合成蛋白、核酸等生物大分子以及其他各种次级代谢产物,进而通过合成生物学技术对各种合成途径进行改造与优化,可进一步有目的地生产各种藻源和非藻源的生物制品。相对于异养底盘细胞,微藻光合成生物学的发展、应用和推广在完成生物制造的同时还起到固碳减排的效果,因此引起了科研界和产业界的广泛关注。为了有效开发利用微藻资源,推动微藻合成生物学服务

于人类生产、生活,需要从上游细胞工厂构建到下游微藻培养工程等多个环节逐一梳理存在的 key 问题,并有针对性地推动问题的解决。

首先,构建高版本无痕工业化微藻细胞工厂的前提是精准高效稳定的遗传转化体系以及针对微藻基因与基因组的编辑技术体系的系统建立。建立精准高效稳定的遗传转化体系需要通过尝试不同的转化方法,优化培养条件、转化条件,并筛选合适的表达载体和启动子^[102]。此外,如何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进行微藻遗传改造的前提。采用多轮基因编辑方法构建特定功能的藻株时,无痕化编辑手段和大片段基因切除技术也是需要重点关注的方向。

其次,代谢流的深刻理解与调控是高效合成目标产物的基础。具体地,基于某种目标产物在藻细胞中的代谢途径,通过关键酶基因或转录子的控制,改变细胞原有代谢路径,将光合碳输出有效分配于指定代谢途径,从而高效地进行目标蛋白质或碳水化合物或脂质等物质的生物合成。这其中,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晰认识,是建立以微藻为底盘细胞高效合成产品的核心。

再次,微藻细胞的生物量积累和目标物质的产率决定了生产工艺的可行性。造成微藻细胞生物量偏低的原因有很多,包括反应器、光照以及温度等,而最终生产工艺的效率是以细胞生物量和目标产物的滴度共同衡量的。因此,通过技术手段对微藻代谢的单个或多个基因进行调控以提高目标产物的积累往往具有偶然性和较差的鲁棒性,这是因为细胞中各种生物物质的代谢过程具有协同和竞争的关系,只有认识微藻生物物质代谢的路径、提高微藻生长和产能效率、增强细胞在不利条件下存活能力等方可让工程化微藻细胞工厂从实验室走向大规模生产。

最后,光合效率的提高是促进微藻合成生物学发展的根本问题。微藻的光能转化效率最高可达 8%~10%,而在实际培养过程中仅为 1%~2%^[103]。对构建微藻细胞工厂而言,设计、组装并优化适配高光效的光合作用功能模块,有助于解决实际培养中光合效率偏低的问题。此外,通过

优化反应器结构和培养过程控制,也可以在一定程度上提高微藻光能转化效率,增加目标产物的产率。例如,在跑道池中增加扰动,可以提高微藻培养液的混合强度,提高光暗循环频率,减少光抑制;通过在线监测和连续培养技术,维持营养盐浓度及藻液浓度相对恒定,可以有效提高微藻光能转化效率,进而提高生物量产率。

综上所述,光合作用是地球上几乎一切生命活动的能量和物质来源,而微藻通过光合作用贡献了超过 50% 的地球氧气和初级生产力。采用现代合成生物学技术,对微藻底盘细胞进行理性设计与系统改造,以提高微藻光合作用及其驱动的物质能量代谢效率,最终获得可生物合成的重要代谢产物的工业化微藻细胞工厂,服务于未来工程化应用,具有重大意义。

参 考 文 献

- [1] IEA. Global Energy Review 2021 [R/OL]. IEA, 2021. <https://www.iea.org/reports/global-energy-review-2021>.
- [2] ESPOSITO R A, MONROE L S, FRIEDMAN J S. Deployment models for commercialized carbon capture and storage[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(1): 139-146.
- [3] DETHERIDGE A, HOSKING L J, THOMAS H R, et al. Deep seam and minesoil carbon sequestration potential of the South Wales Coalfield, UK[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 248: 109325.
- [4] SANNA A, STEEL L, MAROTO-VALER M M. Carbon dioxide sequestration using NaHSO₄ and NaOH: a dissolution and carbonation optimisation study[J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, 189: 84-97.
- [5] SONG Z L, LIU H Y, STRÖMBERG C A E, et al. Phytolith carbon sequestration in global terrestrial biomes[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 603/604: 502-509.
- [6] SMITH P. Soil carbon sequestration and biochar as negative emission technologies[J]. *Global Change Biology*, 2016, 22(3): 1315-1324.
- [7] WANG Q. Microbial photosynthesis[M]. Singapore: Springer Singapore, 2020.
- [8] CHEN H, WANG Q. Microalgae-based green bio-manufacturing-how far from us[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 832097.
- [9] CHEN H, WANG Q. Regulatory mechanisms of lipid biosynthesis in microalgae[J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2021, 96(5): 2373-2391.
- [10] CHEN H, WANG X Y, WANG Q. Microalgal biofuels in Chi-

- na: The past, progress and prospects[J]. GCB Bioenergy, 2020, 12(12): 1044-1065.
- [11] NG I S, KESKIN B B, TAN S I. A critical review of genome editing and synthetic biology applications in metabolic engineering of microalgae and cyanobacteria[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(8): e1900228.
 - [12] NADUTHODI M I S, CLAASSENS N J, D'ADAMO S, et al. Synthetic biology approaches to enhance microalgal productivity[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(10): 1019-1036.
 - [13] POLINER E, FARRÉ E M, BENNING C. Advanced genetic tools enable synthetic biology in the oleaginous microalgae *Nannochloropsis* sp[J]. Plant Cell Reports, 2018, 37(10): 1383-1399.
 - [14] ZHANG X, CHEN H, CHEN W X, et al. Evaluation of an oil-producing green alga *Chlorella* sp. C2 for biological DeNO_x of industrial flue gases[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(17): 10497-10504.
 - [15] ZHENG S Y, CHEN S Y, ZOU S Y, et al. Bioremediation of Pyropia-processing wastewater coupled with lipid production using *Chlorella* sp[J]. Bioresource Technology, 2021, 321: 124428.
 - [16] PACHAPUR V L, SARMA S J, BRAR S K, et al. Platform chemicals[M]//Platform Chemical Biorefinery. Amsterdam: Elsevier, 2016: 1-20.
 - [17] WERPY T, PETERSEN G. Top Value added chemicals from biomass: volume i—results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas[R]. US Department of Energy, Office of Scientific and Technical Information (OSTI), 2004.
 - [18] FACT. MR. Bio-based Platform Chemicals Market[R/OL]. 2021. <https://www.factmr.com/report/5366/biobased-platform-chemicals-market>.
 - [19] MORALES-DELANUEZ A, HERNÁNDEZ-CASTELLANO L E, MORENO-INDIAS I, et al. Use of glycerol and propylene glycol as additives in heat-treated goat colostrum[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(3): 2756-2761.
 - [20] TIAN C L, LIU L, XIA M Q, et al. The evaluations of menthol and propylene glycol on the transdermal delivery system of dual drug-loaded lyotropic liquid crystalline gels[J]. AAPS Pharm-SciTech, 2020, 21(6): 224.
 - [21] FIUME M M, BERGFELD W F, BELSITO D V, et al. Safety assessment of propylene glycol, tripropylene glycol, and PPGs as used in cosmetics[J]. International Journal of Toxicology, 2012, 31(5 Suppl): 245S-260S.
 - [22] LEE C S, AROUA M K, DAUD W M A W, et al. A review: conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2015, 42: 963-972.
 - [23] HIROKAWA Y, DEMPO Y, FUKUSAKI E, et al. Metabolic engineering for isopropanol production by an engineered cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, under photosynthetic conditions[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(1): 39-45.
 - [24] HIROKAWA Y, MATSUO S, HAMADA H, et al. Metabolic engineering of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for improvement of 1,3-propanediol and glycerol production based on in silico simulation of metabolic flux distribution[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 212.
 - [25] HIROKAWA Y, MAKI Y, HANAI T. Improvement of 1,3-propanediol production using an engineered cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* by optimization of the gene expression level of a synthetic metabolic pathway and production conditions[J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 192-199.
 - [26] LIU H Y, NI J, XU P, et al. Enhancing light-driven 1,3-propanediol production by using natural compartmentalization of differentiated cells[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(10): 2436-2446.
 - [27] LI H, LIAO J C. Engineering a cyanobacterium as the catalyst for the photosynthetic conversion of CO₂ to 1,2-propanediol[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12(1): 4.
 - [28] DAVID C, SCHMID A, ADRIAN L, et al. Production of 1,2-propanediol in photoautotrophic *Synechocystis* is linked to glycogen turn-over[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(2): 300-311.
 - [29] MATOS C T, GOUVEIA L, MORAIS A R C, et al. Green metrics evaluation of isoprene production by microalgae and bacteria[J]. Green Chem, 2013, 15(10): 2854-2864.
 - [30] GAO X, GAO F, LIU D, et al. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO₂[J]. Energy & Environmental Science, 2016, 9(4): 1400-1411.
 - [31] CHAVES J E, MELIS A. Biotechnology of cyanobacterial isoprene production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(15): 6451-6458.
 - [32] PADE N, ERDMANN S, ENKE H K, et al. Insights into isoprene production using the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 89.
 - [33] WANG Y, TAO F, NI J, et al. Production of C₃ platform chemicals from CO₂ by genetically engineered cyanobacteria[J]. Green Chemistry, 2015, 17(5): 3100-3110.
 - [34] HIROKAWA Y, MAKI Y, TATSUKE T, et al. Cyanobacterial production of 1,3-propanediol directly from carbon dioxide using a synthetic metabolic pathway[J]. Metabolic Engineering, 2016, 34: 97-103.
 - [35] CHAVES J E, RUEDA-ROMERO P, KIRST H, et al. Engineering isoprene synthase expression and activity in cyanobacteria[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(12): 2281-2292.
 - [36] VEETIL V P, ANGERMAYR S A, HELLINGWERF K J. Ethylene production with engineered *Synechocystis* sp PCC 6803

- strains[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 34.
- [37] DURALL C, LINDBERG P, YU J P, et al. Increased ethylene production by overexpressing phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 16.
- [38] WANG Y P, CHEN L, ZHANG W W. Proteomic and metabolomic analyses reveal metabolic responses to 3-hydroxypropionic acid synthesized internally in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 209.
- [39] LAN E I, CHUANG D S, SHEN C R, et al. Metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic 3-hydroxypropionic acid production from CO₂ using *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 163-170.
- [40] KANNO M, ATSUMI S. Engineering an obligate photoautotrophic cyanobacterium to utilize glycerol for growth and chemical production[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(1): 69-75.
- [41] MCEWEN J T, KANNO M, ATSUMI S. 2, 3 Butanediol production in an obligate photoautotrophic cyanobacterium in dark conditions via diverse sugar consumption[J]. Metabolic Engineering, 2016, 36: 28-36.
- [42] NOZZI N E, CASE A E, CARROLL A L, et al. Systematic approaches to efficiently produce 2,3-butanediol in a marine cyanobacterium[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(11): 2136-2144.
- [43] CHOWDHURY H, LOGANATHAN B. Third-generation biofuels from microalgae: a review[J]. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2019, 20: 39-44.
- [44] ARUN J, VARSHINI P, PRITHVINATH P K, et al. Enrichment of bio-oil after hydrothermal liquefaction (HTL) of microalgae *C. vulgaris* grown in wastewater: bio-char and post HTL wastewater utilization studies[J]. Bioresource Technology, 2018, 261: 182-187.
- [45] XU S N, ELSAYED M, ISMAIL G A, et al. Evaluation of bio-ethanol and biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* grown in biodiesel waste glycerol: a sequential integrated route for enhanced energy recovery[J]. Energy Conversion and Management, 2019, 197: 111907.
- [46] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(3): 294-306.
- [47] RAN W Y, WANG H T, LIU Y H, et al. Storage of starch and lipids in microalgae: biosynthesis and manipulation by nutrients[J]. Bioresource Technology, 2019, 291: 121894.
- [48] SINGH P, KUMARI S, GULDHE A, et al. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, 55: 1-16.
- [49] GUARNIERI M T, PIENKOS P T. Algal omics: unlocking bio-product diversity in algae cell factories[J]. Photosynthesis Research, 2015, 123(3): 255-263.
- [50] XUE J, NIU Y F, HUANG T, et al. Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation[J]. Metabolic Engineering, 2015, 27: 1-9.
- [51] ISKANDAROV U, SITNIK S, SHTAIDA N, et al. Cloning and characterization of a GPAT-like gene from the microalga *Lobosphaera incisa* (Trebouxiophyceae): overexpression in *Chlamydomonas reinhardtii* enhances TAG production[J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(2): 907-919.
- [52] TRENTACOSTE E M, SHRESTHA R P, SMITH S R, et al. Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(49): 19748-19753.
- [53] NIU Y F, ZHANG M H, LI D W, et al. Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Marine Drugs, 2013, 11(11): 4558-4569.
- [54] FAN J H, NING K, ZENG X W, et al. Genomic foundation of starch-to-lipid switch in oleaginous *Chlorella* spp[J]. Plant Physiology, 2015, 169(4): 2444-2461.
- [55] LI D W, BALAMURUGAN S, YANG Y F, et al. Transcriptional regulation of microalgae for concurrent lipid overproduction and secretion[J]. Science Advances, 2019, 5(1): eaau3795.
- [56] SHIN Y S, JEONG J, NGUYEN T H T, et al. Targeted knockout of phospholipase A2 to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production[J]. Bioresource Technology, 2019, 271: 368-374.
- [57] RYU A J, KANG N K, JEON S, et al. Development and characterization of a *Nannochloropsis* mutant with simultaneously enhanced growth and lipid production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 38.
- [58] SZPYRKA E, BRODA D, OKLEJEWICZ B, et al. A non-vector approach to increase lipid levels in the microalga *Planktochlorella nurekis*[J]. Molecules, 2020, 25(2): 270.
- [59] GOSWAMI R K, MEHARIYA S, OBULISAMY P K, et al. Advanced microalgae-based renewable biohydrogen production systems: a review[J]. Bioresource Technology, 2021, 320: 124301.
- [60] CHEN C Y, CHANG H Y, CHANG J S. Producing carbohydrate-rich microalgal biomass grown under mixotrophic conditions as feedstock for biohydrogen production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2016, 41(7): 4413-4420.
- [61] LAKATOS G, BALOGH D, FARKAS A, et al. Factors influencing algal photobiohydrogen production in algal-bacterial co-cultures[J]. Algal Research, 2017, 28: 161-171.
- [62] WANG Y T, JIANG X Q, HU C X, et al. Optogenetic regulation of artificial microRNA improves H₂ production in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 257.
- [63] 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.
- [64] 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[J]. Bioresource Technology, 2013, 143: 154-162.
- [65] KOSOUROV S N, GHIRARDI M L, SEIBERT M. A truncated antenna mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* can produce more hydrogen than the parental strain[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36(3): 2044-2048.
- [66] BURROWS E H, CHAPLEN F W R, ELY R L. Effects of selected electron transport chain inhibitors on 24-h hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3062-3070.
- [67] LI H, LIU Y M, WANG Y T, et al. Improved photobio-H₂ production regulated by artificial miRNA targeting *psbA* in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 36.
- [68] YANG D W, SYN J W, HSIEH C H, et al. Genetically engineered hydrogenases promote biophotocatalysis-mediated H₂ production in the green alga *Chlorella* sp. DT[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2019, 44(5): 2533-2545.
- [69] YACOBY I, POCHKEKAILOV S, TOPORIK H, et al. Photosynthetic electron partitioning between [FeFe]-hydrogenase and ferredoxin: NADP⁺-oxidoreductase (FNR) enzymes *in vitro*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(23): 9396-9401.
- [70] LOSH J L, YOUNG J N, MOREL F M M. Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton[J]. The New Phytologist, 2013, 198(1): 52-58.
- [71] 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.
- [72] LI T P, JIANG Q Y, HUANG J F, et al. Reprogramming bacterial protein organelles as a nanoreactor for hydrogen production[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5448.
- [73] JOHN R P, ANISHA G S, NAMPOOTHIRI K M, et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 186-193.
- [74] LUAN G D, QI Y J, WANG M, et al. Combinatory strategy for characterizing and understanding the ethanol synthesis pathway in cyanobacteria cell factories[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 184.
- [75] CHOCHOIS V, DAUVILLÉE D, BEYLY A, et al. Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and-independent pathways differ in their requirement for starch metabolism[J]. Plant Physiology, 2009, 151(2): 631-640.
- [76] HE M, WU B, QIN H, et al. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 101.
- [77] GAO Z X, ZHAO H, LI Z M, et al. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria[J]. Energy Environmental Science, 2012, 5(12): 9857-9865.
- [78] REPPAS N. Metabolic switch: US20120164705A1[P]. 2012.
- [79] DEXTER J, ARMSHAW P, SHEAHAN C, et al. The state of autotrophic ethanol production in Cyanobacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(1): 11-24.
- [80] BILAL M, RASHEED T, AHMED I, et al. High-value compounds from microalgae with industrial exploitability-a review[J]. Frontiers in Bioscience (Scholar Edition), 2017, 9(3): 319-342.
- [81] GAO E B, KYERE-YEBOAH K, WU J H, et al. Photoautotrophic production of *p*-coumaric acid using genetically engineered *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803[J]. Algal Research, 2021, 54: 102180.
- [82] LEHMANN M, VAMVAKA E, TORRADO A, et al. Introduction of the carotenoid biosynthesis α -branch into *Synechocystis* sp. PCC 6803 for lutein production[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 699424.
- [83] LIN P C, ZHANG F Z, PAKRASI H B. Enhanced limonene production in a fast-growing cyanobacterium through combinatorial metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering Communications, 2021, 12: e00164.
- [84] VARMAN A M, YU Y, YOU L, et al. Photoautotrophic production of D-lactic acid in an engineered cyanobacterium[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 117.
- [85] HASUNUMA T, TAKAKI A, MATSUDA M, et al. Single-stage astaxanthin production enhances the nonmevalonate pathway and photosynthetic central metabolism in *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(12): 2701-2709.
- [86] HALFMANN C, GU L P, GIBBONS W, et al. Genetically engineering cyanobacteria to convert CO₂, water, and light into the long-chain hydrocarbon farnesene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(23): 9869-9877.
- [87] WANG X, LIU W, XIN C P, et al. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(50): 14225-14230.
- [88] LAUERSEN K J. Eukaryotic microalgae as hosts for light-driven heterologous isoprenoid production[J]. Planta, 2019, 249(1): 155-180.
- [89] POURMIR A, NOOR-MOHAMMADI S, JOHANNES T W. Production of xylitol by recombinant microalgae[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 165(3/4): 178-183.
- [90] LAUERSEN K J, BAIER T, WICHMANN J, et al. Efficient

- phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 331-343.
- [91] 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[J]. Metabolic Engineering, 2014, 22: 3-9.
- [92] TANAKA T, MAEDA Y, SUHAIMI N, et al. Intron-mediated enhancement of transgene expression in the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* towards bisabolene production[J]. Algal Research, 2021, 57: 102345.
- [93] WEI H H, SHI Y, MA X N, et al. A type-I diacylglycerol acyltransferase modulates triacylglycerol biosynthesis and fatty acid composition in the oleaginous microalga, *Nannochloropsis oceanica*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 174.
- [94] EILERS U, BIKOULIS A, BREITENBACH J, et al. Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(1): 123-129.
- [95] LANH P T, NGUYEN H M, DUONG B T T, et al. Generation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii* expressing VP28 protein as oral vaccine candidate for shrimps against White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection[J]. Aquaculture, 2021, 540: 736737.
- [96] GREGORY J A, TOPOL A B, DOERNER D Z, et al. Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(13): 3917-3925.
- [97] 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.
- [98] TRAN M, VAN C, BARRERA D J, et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(1): E15-E22.
- [99] HU L N, FENG S Y, LIANG G F, et al. CRISPR/Cas9-induced β -carotene hydroxylase mutation in *Dunaliella salina* CCAP19/18[J]. AMB Express, 2021, 11(1): 83.
- [100] BECKER I, PRASAD B, NTEFIDOU M, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated nuclear transformation of a biotechnologically important microalga-euglena gracilis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12): 6299.
- [101] KIM J, CHANG K S, LEE S, et al. Establishment of a genome editing tool using CRISPR-Cas9 in *Chlorella vulgaris* UTEX395[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 480.
- [102] LIN W R, TAN S I, HSIANG C C, et al. Challenges and opportunity of recent genome editing and multi-omics in cyanobacteria and microalgae for biorefinery[J]. Bioresource Technology, 2019, 291: 121932.
- [103] PERIN G, BELLAN A, BERNARDI A, et al. The potential of quantitative models to improve microalgae photosynthetic efficiency[J]. Physiologia Plantarum, 2019, 166(1): 380-391.



通讯作者：王强(1973—)，男，教授，博士生导师，河南大学“杰出人才特区支持计划”特聘教授。主要从事光合微生物研究，以光合作用研究模式材料蓝细菌和小球藻为研究对象，立足光合作用与合成生物学，聚焦环境问题，围绕微藻环境适应、生物能源与生物减排等科学问题，开展系统性研究。
E-mail: wangqiang@henu.edu.cn



第一作者：孙中亮(1989—)，男，博士，副教授。主要从事微藻培养工程和藻基生物产品开发相关研究，包括利用新型光生物反应器高密度培养微藻以及虾青素、多不饱和脂肪酸高附加值产品的工程化制备。
E-mail: zlsun@henu.edu.cn