

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-106

## 真核微藻合成生物学研究进展和展望

张旭<sup>1,2</sup>, 路延笃<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup> 海洋生物活性物质与生物制品海南工程研究中心, 海南 海口 570228; <sup>2</sup> 海南大学生命健康学院, 海南 海口 570228; <sup>3</sup> 海南大学海洋生物与水产学院, 海南 海口 570228)

**摘要:** 真核微藻作为一类重要的生物资源, 可以直接利用CO<sub>2</sub>和光能合成有机物, 且自身就可合成多种天然产物, 其作为合成生物学细胞工厂具有天然优势。然而, 真核微藻的化合物合成产量较低的问题仍制约着其产业化发展。通过代谢工程与合成生物技术改造微藻, 不仅能有效提升目标产物的产量, 还进一步拓宽了其可合成的天然产物范围。本文围绕几种研究较多的真核微藻种类展开讨论, 从遗传元件的开发、基因编辑技术的应用和基因表达与调控策略等方面介绍了合成生物学在真核微藻领域的研究进展。讨论了人工智能技术和多组学数据在微藻培养条件筛选以及代谢途径优化中的应用潜力, 并结合实际应用展现了微藻细胞工厂在高值化合物合成方面工程化改造的结果。最后对微藻底盘细胞的应用前景和发展方向进行了展望, 包括“定向微藻底盘”的构建、人工智能技术在微藻底盘设计中的应用、新型细胞器定位信号以及微藻底盘综合利用等, 旨在为真核微藻合成生物学提供一定的指导。

**关键词:** 微藻; 人工智能; 代谢工程; 合成生物学; 高值化合物

**中图分类号:** Q816 **文献标志码:** A

## Research progress and prospects of synthetic biology with eukaryotic microalgae

ZHANG Xu<sup>1,2</sup>, LU Yandu<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>Engineering and Research Center of Marine Bioactives & Bioproducts of Hainan Province, Haikou 570228, Hainan, China; <sup>2</sup>School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; <sup>3</sup>School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China)

**Abstract:** Eukaryotic microalgae can efficiently synthesize bioactive and functional compounds by directly utilizing carbon dioxide and light energy. While naturally possessing the ability to synthesize lipids, pigments, terpenes, and various secondary metabolites, microalgae present unique advantages in the construction of cell factories through synthetic biology. However, in practice, such a strategy still faces challenges such as relatively slow growth rates of

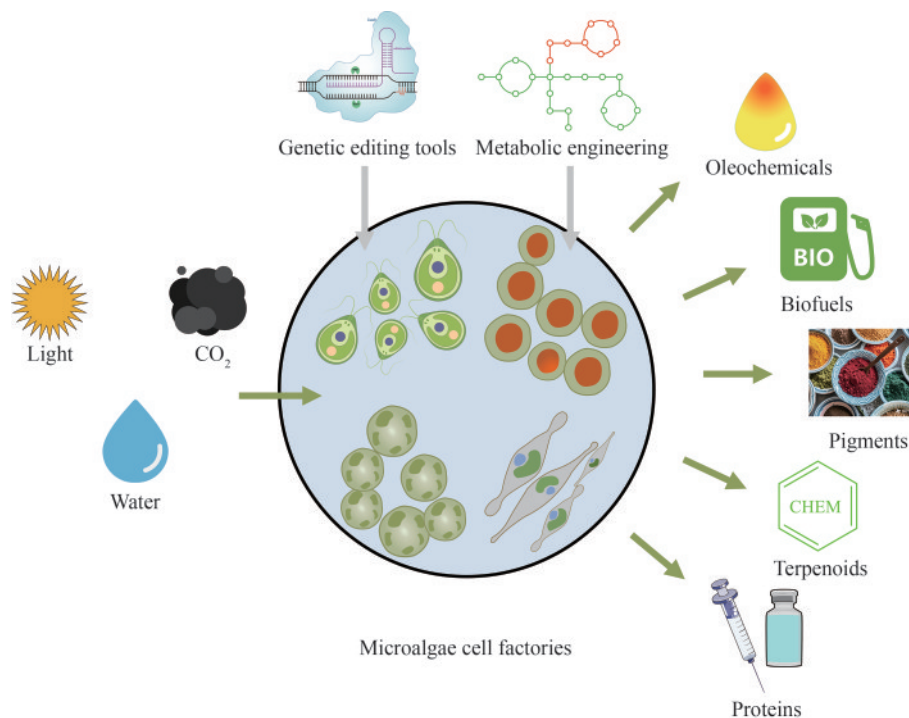
收稿日期: 2025-12-26 修回日期: 2026-02-28

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项(2021YFA0909600); 国家自然科学基金(32560020, 32370380); 海南省重点研发项目(ZDYF2024XDNY244); 海南省自然科学基金(322QN250); 海南省外国专家项目(G20230607016E); 海南热带海洋学院水产南繁联合开放课题(2023SCNFKF04)

引用本文: 张旭, 路延笃. 真核微藻合成生物学研究进展和展望[J]. 合成生物学, 2026, 7(2): 335-356

Citation: ZHANG Xu, LU Yandu. Research progress and prospects of synthetic biology with eukaryotic microalgae[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(2): 335-356

microalgae, limited accumulation of target products, and high cultivation costs. These issues impose constraints on its large-scale production and industrial application. Metabolic engineering and synthetic biology techniques provide effective ways to enhance the performance of microalgae in response to these issues. Systematic modifications of the central metabolic network and product synthesis pathways can optimize intracellular carbon flow allocation, improve photosynthetic efficiency, and enhance the ability to synthesize target products. These measures significantly broaden the range of products that microalgae can synthesize. This article discusses important progress in the development of genetic elements such as promoters, terminators, and screening markers for model species such as *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis* sp., and *Phaeodactylum tricornutum*, which have been extensively studied. The successful application of genome editing technologies such as CRISPR/Cas9 in microalgae has made gene knockout, knock in, and precise regulation possible. In addition, representative metabolic regulation strategies in the field of synthetic biology are reviewed, with a particular focus on the optimization and reconstruction of metabolic networks, the application of “push-pull-block” regulation strategies and subcellular organelles engineering, as well as the supplementation of cofactors, aiming to enhance the accumulation of high-value compounds in microalgae and/or adjust the relative composition of metabolites. Moreover, the application potential of the integration of artificial intelligence (AI) technology and multi-omics data in the screening of microalgal cultivation conditions and metabolic pathway optimization is highlighted. Finally, an outlook on the application prospects and development directions of microalgae chassis cells is provided, including the construction of “directed microalgae chassis”, the application of artificial intelligence technology in microalgae chassis design, novel organelle targeting signals, and the integrated utilization of microalgae chassis, aiming to provide guidance for the synthetic biology of eukaryotic microalgae.



**Keywords:** microalgae; artificial intelligence; metabolic engineering; synthetic biology; high-value products

全球能源危机和气候变暖等因素改变了当前工业化学品的生产模式，其中工业生物制造凭借

过程简单、技术难度低特点等在生产多样化产品方面具有很大优势<sup>[1]</sup>。底盘微生物在该领域中扮

演着不可或缺的角色<sup>[2]</sup>，其不仅是生物制造的基础平台，也是推动生物制造领域技术进步的核心。因此，性能良好的微生物底盘细胞的设计与优化对包括化工、制药以及生物燃料在内的各个行业都有重大影响<sup>[3-5]</sup>。这一情况吸引了众多学者纷纷投身于优质微生物底盘的开发与探索工作之中<sup>[6]</sup>。微藻是一类具有光合作用能力的微生物类群，其分布极为广泛，几乎在地球上的所有环境中都能发现它们的踪迹。据报道，目前全世界发现的微藻种类已经超过了60000种。其中，研究较为广泛的包括螺旋藻、小球藻、莱茵衣藻、微拟球藻等，它们能够天然产生广泛的有价值的生物化合物<sup>[7]</sup>，包括色素、脂肪酸、蛋白质、淀粉、多糖等，这些物质可以作为生物燃料<sup>[8]</sup>、抗氧化剂并且在食品和医药等领域具有广泛的应用<sup>[9]</sup>，为建立专门的平台细胞工厂提供了强大的基础。除了能够天然产生如此多的天然化合物之外，微藻还具有多种优势，是利用低成本原料实现高价值化学品工业化生产的理想选择。这些优势包括：生长速度快，对环境适应性强，能够在各种环境中生长（包括淡水、海水甚至废水），不占用耕地进行培养，不会与粮食作物形成竞争。微藻的这些优势使其在生物技术产业中具有广泛的应用前景，有望推动可持续发展和绿色制造的实现。

基因工程的不断发展以及多组学信息的日益丰富，进一步推动了微藻工程化操作的发展，提高了微藻合成高价值化合物的能力。合成生物学为微藻的代谢工程提供了一系列的工具包，比如革命性的CRISPR/Cas9系统、双向启动子的设计等，这些研究领域的进步使得人工设计、合成新型微藻光合细胞工厂成为现实，有效促进了光合代谢的深度重塑与光合碳流的精确调控，使CO<sub>2</sub>在太阳能驱动下向各种天然和非天然目标产物的定制化转化。为了在微藻中开展高效的合成生物学研究，有必要全面了解迄今为止已开展的微藻代谢工程研究。本文全面考察了微藻合成生物学当前的发展，涵盖了可利用底盘细胞的探索、高效的分子工具以及用于生产各种高值化合物的代谢工程方案，并阐述了提高多不饱和脂肪酸、生物燃料、天然色素、萜类化合物产量的代谢工程策略，本文致力于为这一蓬勃发展的领域提供未来研究的思路与方向，最终，微藻的可

利用能力将在构建下一代可持续生物经济的进程中扮演至关重要的角色。

## 1 关键底盘微藻

### 1.1 莱茵衣藻

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 作为一种单细胞真核绿藻，因其简单的培养条件、快速增殖速率（8 h即可完成一次分裂）及较高的光合效率，被誉为“绿色酵母”。其全基因组测序已经完成并且具备成熟的遗传操作技术<sup>[10]</sup>，是目前极少数在细胞核、叶绿体和线粒体均可以实现遗传操作的微藻<sup>[11]</sup>。研究者已利用巴龙霉素、潮霉素、博来霉素等筛选标记基因建立了多种稳定转化体系，CRISPR/Cas9系统的引入极大推动了莱茵衣藻的精确编辑能力，通过Cas9 RNP复合物介导的瞬时编辑策略，实现了高效无标记突变体构建。其他编辑工具如Cas12a也被引入用于多基因敲除或代谢通路重构<sup>[12]</sup>。莱茵衣藻已经成为解析光合电子传递链以及作为真核合成生物学底盘构建的核心模式生物，在高值化合物（如萜烯类化合物的异源合成）合成<sup>[13-15]</sup>和重组蛋白（如疫苗、免疫毒素等）生产领域应用广泛。

### 1.2 微拟球藻

微拟球藻 (*Nannochloropsis* sp.) 是真眼点藻纲的一类单细胞真核生物，在淡水和海洋中均有分布，以球形形态存在，与其他真核微藻最大的不同在于其仅含有叶绿素a而缺失其他类型叶绿素。这类微藻具有高光合效率、高生物量及三酰甘油 (triacylglycerol, TAG) 积累能力，因其能在营养限制条件积累大量脂质而备受关注，据报道，其脂质产量可超过干重的60%，已经成为一种有前景的脂质生产平台，为了进一步提高脂质产量和生产力，已针对微拟球藻提出了多种代谢工程和合成生物学方法，这些方法旨在优化代谢途径，增强生物合成能力，以生产各种脂质化学品和高值化合物<sup>[16]</sup>。

### 1.3 三角褐指藻

硅藻作为海洋生态系统的高效光能转化者，贡献了约40%的海洋初级生产力和20%的全球碳固定，同时驱动氮、硅等关键元素的生物地球化学循环<sup>[17]</sup>。与其他硅藻物种相比，三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种“非典型硅藻”，其呈现为卵形、梭形、三出放射形三种形态，并且其细胞没有常见的硅质壳，这使其在分裂繁殖时藻体体积不会缩小，而其他多数硅藻(如羽纹纲种类)的分裂受硅质壳结构制约。三角褐指藻对不同生长条件表现出显著的适应性<sup>[18]</sup>，能够在广泛的盐度、温度以及光照强度下生长，在0℃下仍可繁殖，而其他硅藻(如角毛藻)在低温下生长停滞，因此三角褐指藻成为研究最全面的硅藻，其被认为是生物燃料和高价值可再生资源(如二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸、岩藻黄素等)的重要微藻资源。

## 2 基因工程技术与工具开发

高效的遗传改造技术及成熟的遗传操作工具将显著提升细胞工厂的构建与开发效率。近年来，合成生物技术的迅猛发展，促使微藻基因表达控制元件的储备日益丰富，包括启动子、终止子和内含子等。将各类合成生物学元件与目标基因或代谢途径导入底盘藻株，是实现底盘藻株合成生物学改造的关键环节，而这一过程的顺利开展，又高度依赖与底盘藻株相匹配的基因表达及整合策略<sup>[19-20]</sup>。

### 2.1 基因表达的控制元件

启动子的选择是遗传转化的关键所在，由于不同微藻群体之间的遗传多样性，很难在微藻中建立通用的遗传载体，来自病毒的CaMV35S和SV40启动子被用作通用启动子<sup>[7]</sup>，但是异源启动子在微藻中通常难以被有效识别和实现精准调控<sup>[21]</sup>。因此，来自特定微藻的内源启动子被认为是构建载体的最有效启动子<sup>[22]</sup>，例如热休克蛋白和微管蛋白在莱茵衣藻中高度表达<sup>[23]</sup>。因此，其

常用于驱动衣藻中多种基因的组成型核表达。然而，对于一些基因组信息不明确的微藻种类来说，难以找到合适有效的内源启动子。除了选择合适的启动子之外，还可以对启动子进行调节和优化，例如，在核心启动子区上游引入热HSP70A启动子的调控元件，可以显著增强RBCS2启动子的转录活性<sup>[23]</sup>。同时，可以通过模拟来自莱茵衣藻高表达基因的天然顺式基序元件、结构等合成藻类启动子原件，从而获取具有较强功能的启动子。终止子对基因表达效率也有很大的影响，有研究以荧光素酶为报告基因研究了7个启动子和3个终止子对莱茵衣藻转基因表达效率的影响，发现psaD-psaD启动子-终止子表达盒的效率在所有组合中最高，可以积累可溶性蛋白0.4%的荧光素酶蛋白。内含子同样是基因表达的重要调控元件，外源基因在微藻中表达效率低下往往与缺乏必要的内含子有关。按顺序掺入内含子可以促进靶基因的表达，该现象称为内含子介导增强(intron-mediated enhancement, IME)，在高等植物中普遍存在。虽然IME的作用机制尚不清楚，但其应用已经拓展到微藻领域。在莱茵衣藻二萜类化合物表达工具包的构建中引入RBCS2内含子(ribulose biphosphate carboxylase small subunit 2, RBCS2i)，最终实现了二萜化合物香紫苏醇的高效生产<sup>[15]</sup>。在广藿香醇合成酶(pogostemon cablin benth patchoulol synthase, PcPs)基因编码序列内部插入了rbc2i1，增强基因表达效率，从而实现了广藿香醇在莱茵衣藻中的稳定表达，并获得最高约877 mg/g CDW的产量<sup>[24]</sup>。可见，在莱茵衣藻中已经发现了许多具有表达增强作用的内含子，插入内含子以增强转基因表达水平的方法在微藻中已取得了成功。

### 2.2 多基因共表达

在微藻基因工程领域，选择具有稳定遗传特性且转化效率可控的技术体系是实验成功的关键要素。目前主流的遗传转化方法主要包含四类：玻璃珠转化、电击转化、基因枪转化和农杆菌介导转化法，需要注意的是，在选择转化方法时，必须考虑多重因素，例如底盘细胞的结构、状态、和转化目标(细胞核或叶绿体)等。将多个外源

基因共同导入细胞时，一种方法是采用共转化策略，即同时使用多个载体。然而，这种方法往往导致共表达效率低下，并且需要多种筛选标记。另一种更常用的方法是将两个或多个表达盒连接到一个单一载体上进行转化。尽管如此，这种方法仍存在一些局限性，其中最突出的问题是各基因编码的蛋白质表达量可能不均衡。2A肽是解决这些问题的手段之一，2A肽通常由18~22个氨基酸组成，可以诱导重组蛋白自我剪切，第一个研究的2A肽是来源于口蹄疫病毒的F2A，目前用到的2A肽一般有4种，P2A、T2A、E2A、F2A分别来源于四种不同的病毒。两个或多个酶可以通过连接肽串联成一个蛋白，例如酶A-linker-酶B，这样可以减少中间产物泄漏，避免竞争途径消耗底物<sup>[25]</sup>。最新发现的RIAD/RIDD短肽相互作用标签，可以让代谢通路中的多个关键酶彼此靠近，形成“人工代谢支架”，提升底物流转效率，减少副反应<sup>[26]</sup>。

### 2.3 微藻基因编辑技术

基因编辑技术的出现揭开了基因工程的新时代，过去使用最广泛的基因编辑工具是锌指核酸酶（zincfinger nuclease, ZFN）和转录激活剂样效应核酸酶（transcription activator-like effector nuclease, TALEN）。ZFN技术能够通过产生靶向DNA双链断裂（DNA double-strand break, DSB），促进同源重组模板的插入，从而提高基因编辑效率，然而ZFN技术在微藻中的应用只有少数几例报道且均是在莱茵衣藻中完成的，通过优化ZFN的核酸酶结构域，特别是引入S418R和K441E的突变，提高了基因编辑效率<sup>[27]</sup>。之后进一步优化ZFN技术，采用电转化替代玻璃珠转化，转化效率显著提高，获得阳性克隆的数量相比原方法增加了约50倍。还测试了不同的同源定向修复模板的影响，并且和Cas9进行了比较，对于DNA双链断裂后通过同源重组修复的可能性大约是Cas9的10倍<sup>[28]</sup>。TALEN技术介导的靶向基因失活和靶向序列插入已经在三角褐指藻中得到了验证<sup>[29]</sup>，这对改造硅藻代谢方面具有重要意义，通过靶向UDP-葡萄糖焦磷酸化酶获得了脂类产量显著提高

的硅藻株系，其TAG含量比对照组高出45倍；采用相同的方法三角褐指藻中的一个脲酶基因<sup>[30]</sup>和一个硝酸还原酶基因<sup>[31]</sup>都已被敲除。

2012年研究人员揭示了CRISPR/Cas9系统的功能机制，随后该系统逐渐应用到微藻领域<sup>[32]</sup>。首先在莱茵衣藻中成功运用，研究发现，在转化后24 h内，Cas9和sgRNA基因能够在莱茵衣藻中表达，并成功引起目标基因的DNA序列修饰，三个外源基因以及一个内源基因均显示出Cas9介导的靶向修饰，尽管瞬时表达成功，但在尝试获得稳定转化的莱茵衣藻时遇到了困难，在16次转化实验中，只成功获得了一个突变子，成功率非常低<sup>[21]</sup>。随后为了提高编辑效率，将sgRNA基因插入到内含子中，并将这个内含子嵌入到Cas9基因的编码区，从而使莱茵衣藻的编辑效率提高了50倍<sup>[33]</sup>。之后CRISPR/Cas9技术被成功应用于其他微藻（如三角褐指藻、微拟球藻等）。然而，研究人员发现，Cas9的稳定表达可能对某些藻类细胞具有毒性，为降低脱靶风险并避免细胞毒性，他们尝试了多种方法，其中，将核定位信号肽与Cas9基因融合可以有效增强核DNA靶向效率，预组装的Cas9蛋白和sgRNA形成核糖核蛋白复合物（RNP），已实现对莱茵衣藻的基因组编辑<sup>[34]</sup>，也在三角褐指藻和其他几个物种中实现<sup>[35-36]</sup>。例如Jin团队<sup>[37]</sup>利用CRISPR/Cas9 RNP体系在莱茵衣藻中敲除了玉米黄质环化酶基因，以达到同时积累黄体素和玉米黄质的目的，使其玉米黄质的含量升高了56倍，产率升高了47倍。

## 3 典型的代谢调控策略

已有多微藻（如微拟球藻、莱茵衣藻、三角褐指藻等）通过代谢工程改造，成功突破天然代谢网络限制，成为许多非天然产物的高效合成平台<sup>[38]</sup>（如表1所示）。代谢调控一般涉及对一个或多个基因的直接操作，表现形式主要包括三种：①将来自其他生物体的基因（异源基因）添加其中，以实现所需表型；②利用非原生启动子增强现有基因表达，实现更强或诱导型表达调控；③通过使用RNA干扰技术（RNA interference, RNAi）或基因敲除技术降低特定基因的表达水平。

**表1** 微藻底盘细胞中高值化合物的生物合成  
**Table 1** Biosynthesis of high value-added compounds  
 by microalgae

物种	藻种	产物	产量	参考文献	
绿藻门	莱茵衣藻	香紫苏醇	656 mg/L	[15]	
	莱茵衣藻	虾青素	23.5 mg/L	[39]	
	莱茵衣藻	叶黄素	8.9 mg/g	[40]	
	莱茵衣藻	$\beta$ -胡萝卜素	22.8 mg/g	[40]	
	莱茵衣藻	玉米黄素	5.24 mg/L	[41]	
	莱茵衣藻	柠檬烯	117 $\mu$ g/L	[42]	
	莱茵衣藻	( <i>E</i> )- $\alpha$ -红没药烯	11.5 mg/L	[43]	
	莱茵衣藻	木糖醇	0.38 g/L	[44]	
	莱茵衣藻	百秋李醇	1.03 mg/L	[24]	
	莱茵衣藻	并环萜烯	2.86 mg/L	[45]	
	莱茵衣藻	$\beta$ -石竹烯	854.7 $\mu$ g/L	[46]	
	金藻门	微拟球藻	Casbene	1.8 mg/g	[47]
		微拟球藻	角黄素	4.7 mg/g	[48]
		微拟球藻	虾青素	7.3 mg/g	[25]
微拟球藻		叶绿素b	—	[49]	
硅藻门	三角褐指藻	香叶醇	0.309 mg/L	[50]	
	三角褐指藻	羽扇豆醇	13 $\mu$ g/g	[51]	
	三角褐指藻	大麻二酚酸	0.55 mg/L	[52]	
	三角褐指藻	紫黄质	4.48 mg/g	[5]	
	三角褐指藻	白桦脂酸	0.1 mg/g	[53]	
	三角褐指藻	EPA	116.9 mg/g	[54]	
	三角褐指藻	岩藻黄素	6.53 mg/g	[55]	

利用代谢工程和合成生物学策略来提高微藻细胞工厂效率，对于促进微藻大规模生产高值化合物至关重要。目前，有关微藻高值化合物的合成生物学改造多聚焦在以下几方面。

### 3.1 微藻细胞代谢网络的优化与重构

代谢途径的优化和重构是当前合成生物学和代谢工程领域的研究热点之一，通过内源途径优化和外源途径构建可以优化微藻的代谢网络，提高高值化合物的合成效率。脂肪酸是微藻中重要的代谢产物，微拟球藻的天然脂质生产率要远高于其他种类的微藻，其富含TAG以及 $\omega$ -3长链多不饱和脂肪酸。在TAG的合成中，过表达内源甘油-3-磷酸酰基转移酶（glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT）或异源GPAT酶使TAG的含量分别上升了42%和51%，在此基础上进一步共同表达异源甘油

二酰基转移酶（diacylglycerol acyltransferase, DGAT）、溶血磷脂酸酰基转移酶（lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAT），TAG较野生型含量增加了1.2倍。在特定脂肪酸的研究中，研究人员在微拟球藻中发现了一个源于聚酮合酶（polyketide synthase, PKS）系统的酰基-酰基载体蛋白硫酰酶（acyl-ACP thioesterase, NoTE1），该酶过表达可以使 $C_{16}/C_{18}$ 单不饱和脂肪酸含量增加，而敲除该酶会导致 $C_{20}$ 不饱和脂肪酸的增加。引入异源CpTE酶可显著提高 $C_{8:0}$ 和 $C_{10:0}$ 脂肪酸在总脂质和甘油三酯中的含量，从而实现对不同链长脂肪酸的碳分布的精确操控<sup>[56]</sup>。此外多不饱和脂肪酸DHA和EPA的调控多集中于脂肪酸去饱和酶（fatty acid desaturase, FAD）和延长酶（fatty acid elongase, FAE）的基因调控，具体的调控手段在下文详细阐述。同样的，对微藻中类胡萝卜素、藻胆素等色素的研究最为简单直接的方法就是过表达藻体的内源酶。例如：雨生红球藻作为一种天然的虾青素合成藻株，在其叶绿体中过表达内源的八氢番茄红素脱氢酶（phytoene desaturase, PDS）基因，总类胡萝卜素与叶绿素显著提高了252%和86%<sup>[57]</sup>， $\beta$ -胡萝卜素酮化酶基因的过表达导致总类胡萝卜素和虾青素含量提高了2~3倍。

通过基因工程技术，可以将外源合成途径引入微藻细胞，使其能够实现非天然代谢产物的生物合成。引入莱茵衣藻的 $\beta$ -胡萝卜酮酶（ $\beta$ -carotenoid ketolase, BKT）基因，使微拟球藻能够在非胁迫条件下积累大量角黄素，并提高了EPA的产量<sup>[48]</sup>，进一步引入雨生红球藻的 $\beta$ -胡萝卜素羟化酶，在微拟球藻中实现了虾青素的合成。通过将来自丝状真菌的木糖还原酶（xylose reductase, XR）基因引入莱茵衣藻的叶绿体基因组，从而促进了木糖醇的生产<sup>[44]</sup>。在海洋硅藻三角褐指藻中表达大麻的大麻二酚酸合成酶（cannabidiolic acid synthase, CBDAS）基因成功构建了大麻素的新型生产平台<sup>[58]</sup>。

### 3.2 “推-拉-阻”策略

外源合成途径引入微藻细胞后，往往会在内源代谢网络引起竞争，导致底物向目标产物的转化有限。因此通过优化代谢通量来强化碳流定向

分配,是提升目标产物产量的关键策略之一。在传统代谢工程实践中,广泛采用“推-拉-阻”(push-pull-block)调控策略以系统性重构代谢网络。其中,“推”是指提升代谢产物前体库的水平;“拉”是指通过强化限速酶表达增强转化效率;“阻”是指通过敲除或抑制竞争支路与副产物生成途径。三者协同作用,可实现代谢流的定向重分配,从而有效提高目标产物的合成效率。微藻中的脂肪酸具有重要生物活性,乙酰辅酶A作为脂肪酸合成的关键前体,其胞内浓度可通过乙酰辅酶A合成酶(acetyl-CoA synthase, ACS)调控,该酶催化丙酮酸生成乙酰辅酶A。在莱茵衣藻中过量表达内源的叶绿体乙酰辅酶A合成酶(ACS2),使酰基辅酶A库水平较野生型高出60%,并且提高了脂质含量<sup>[59]</sup>,另一项同样的研究中发现,ACS的过表达突变体在培养条件优化后,脂质产量比对照组高1.16倍,达到0.46 g/L<sup>[60]</sup>。这些研究通过增加乙酰辅酶A库的水平引起下游脂肪酸合成效率提升,这一过程被称为“推”。在二萜类光合细胞工厂构建过程中,在莱茵衣藻中表达香紫苏来源的两种关键基因,可将内源GGPP导向香紫苏醇的合成<sup>[15]</sup>,这一过程被称为“拉”;在莱茵衣藻高效生产玉米黄质的研究中通过CRISPR/Cas9敲除番茄红素环化酶基因,可有效阻断叶黄素的合成,将代谢通量导向 $\beta$ -胡萝卜素分支,使玉米黄质产量提高了1.9倍,这一过程被称为“阻”<sup>[61]</sup>。

### 3.3 区室化策略

传统代谢工程通常将外源复杂代谢途径直接构建于细胞质中,但由于宿主代谢网络高度复杂,往往导致代谢通量受限、关键中间体积累甚至对细胞产生毒性。因此,在微藻合成生物学研究中,单纯依赖胞质表达已难以满足高效合成需求。相较于原核生物如大肠杆菌,真核微藻具有高度区室化的细胞结构。其细胞内包含叶绿体、线粒体、内质网、过氧化物酶体、脂滴等多种细胞器。这些细胞器在物理化学环境(pH、氧化还原状态)、底物与辅因子供应、代谢酶分布及膜结构隔离等方面存在显著差异,为代谢通量的定向分配和有毒中间体的空间隔离提供了天然优势。基于此,

区室化合成生物学策略逐渐成为微藻代谢工程的重要方向。2015年,研究学者通过融合N端靶向序列与GFP的策略,首次在微拟球藻实现了细胞质、内质网、线粒体、叶绿体等多个亚细胞结构的体内定位,为微拟球藻的区室化研究打下基础<sup>[62]</sup>。Liu等<sup>[25]</sup>通过叶绿体转运肽(CTP)引导虾青素合成酶进入微拟球藻叶绿体,实现了虾青素含量133倍提升;叶绿体还是许多倍半萜类物质合成的优势亚细胞场所,如 $\alpha$ -红没药烯只在叶绿体中合成的产量较细胞质中高出24倍以上<sup>[63]</sup>。过氧化物酶体是脂肪酸 $\beta$ 氧化的主要场所,可以提供更多的乙酰辅酶A,Zhang等<sup>[64]</sup>将聚羟基丁酸酯(poly hydroxybutyrate, PHB)合成途径构建在莱茵衣藻的过氧化物酶体中最终实现PHB产量21.6 mg/g干重,较胞质中合成提升3600倍。这些实验结果有力印证,亚细胞区室化定向设计能够高效提升微藻细胞工厂的目标产物合成效率。除此之外,内质网可以为多种膜结合酶提供结合位点,细胞色素P450系统通常锚定于内质网膜<sup>[65]</sup>,因此目标产物依赖P450催化(例如甾醇与三萜类化合物),内质网是更合适的区室。而脂滴内部呈现高度疏水的脂质环境,因此特别适合用于合成和积累萜类化合物等强脂溶性产物。

### 3.4 优化辅因子水平

基因工程改造的微藻藻株容易出现细胞生长迟缓的情况,这可能是因为能量和营养物质从“细胞生长”向“产物合成”转移,从而抑制了生物量的积累,或者是因为新的异源途径的整合增加了额外的消耗量,从而导致辅因子水平失衡,因此为了平衡生物质和新化合物,必须补充新的辅因子<sup>[66]</sup>。微藻中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)是调节细胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)含量的重要代谢工程靶点<sup>[67]</sup>。脂质生物合成尤其需要大量的NADPH,通过过表达戊糖磷酸途径关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶强化NADPH供应,成功使三角褐指藻脂质含量提升2.7倍,最高达55.7%干重<sup>[68]</sup>。从微拟球藻中克隆得到葡萄

糖-6-磷酸脱氢酶基因 (*NoG6PD*), 将其异源表达于小球藻中, 使小球藻葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性提升 2.19 倍、NADPH 供应显著增加, 最终同样实现中性脂质含量最高提升 3.09 倍, 脂质产量达 76.17 mg/L。这一策略表明, 合理优化辅因子水平是微藻代谢工程中高附加值产物合成的关键手段, 为构建高效光合细胞工厂提供了可行路径。

## 4 人工智能在微藻生产中的应用

人工智能正在为微藻合成生物学研究提供更高效的技术手段<sup>[69]</sup>。通过对培养过程数据、组学数据以及代谢信息的综合分析, 研究人员能够更精准地优化微藻的培养条件和代谢调控策略, 同时更准确地识别、分类不同工程藻株及其生长与产物积累模式, 从而为构建高效、稳定的工程微藻藻株提供更多支持。

### 4.1 AI 辅助优化培养条件

在微藻合成生物学中, 人工智能正逐渐成为研究微藻生长与代谢调控的重要工具, 其在优化培养条件方面发挥了突出作用。微藻的生长受到光照、温度、pH、营养盐浓度、CO<sub>2</sub> 浓度等多种因素的共同影响, 依靠传统经验或单一因素实验的方法往往难以准确把握这些因素之间的复杂关系, 也难以预测微藻在大规模培养中的表现。而人工智能可以更简单地处理这些多变量和非线性关系, 通过分析大量实验数据, 帮助研究人员更高效地设计培养方案, 实现稳定生长与高效生产。Rodríguez 等<sup>[70]</sup> 将 ANFIS 模型首次用于模拟 *Dunaliella tertiolecta* 的辅助培养过程, 结合模糊逻辑与神经网络, 不仅实现了对微藻培养过程的精确模拟和预测, 也为优化培养条件和提高生物燃料产量提供了重要依据, 同时也凸显了人工智能技术在微藻培养与分析中的关键作用。利用人工神经网络-遗传算法 (ANN-GA) 策略对不饱和脂肪酸的生产条件进行优化, 使得不饱和脂肪酸产量较此前研究提升 66.79%<sup>[71]</sup>。Peter 等提出了一种结合半连续培养与人工智能图像识别的智能微藻培养系统, 用于高效、低成本地监测小球藻 (*C. vulgaris*) 的

生长过程, 并优化其生物量及生化成分 (脂质、蛋白质、碳水化合物等) 的积累<sup>[72]</sup>。在最终的生产阶段, 利用机器学习对培养过程进行实时分析和预测, 可以及时调控生长趋势, 保持系统稳定提高微藻生长效率, 使生物质产量更加稳定<sup>[73]</sup>。

### 4.2 AI 调控代谢网络

在微藻合成生物学研究中, 对其复杂的代谢网络进行解析以及精准调控是推动其规模化应用以及产业化发展的关键问题。多组学技术的快速发展积累了大量数据, 研究人员可以在基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等多个层面揭示微藻的代谢过程与调控机制。然而这些数据规模庞大、错综复杂, 使用传统方法进行处理很难将这些信息有效地整合起来, 更难从中找到关键信息。人工智能的应用为解析微藻基因组学特征, 揭示代谢调控规律和优化代谢网络提供了新的思路与方法<sup>[74]</sup> (图1)。

微藻合成生物学也同样涉及新酶筛选与路径构建。传统方法依赖序列比对与相关数据库, 而 AI 模型能够通过大规模蛋白质序列训练, 预测未知蛋白的功能或催化特性。近年来, 基于神经网络的蛋白结构预测与功能分类模型显著提高了酶功能预测的准确性, 使研究者能够更快速地筛选适合微藻表达的候选酶。微藻代谢网络复杂, 各个代谢模块之间的相互作用极其复杂, 远不是简单的“加减法”关系可以描述的。而 AI 模型可以为我们提供精准的“导航工具”, 在复杂的代谢网络中找到控制目标产物合成的关键反应, 给出明确的优化靶点, 有助于我们更快地设计出高效的微藻细胞工厂<sup>[75]</sup>。

## 5 微藻作为细胞工厂的实际应用

微藻因其遗传操作工具基本完备、安全性高、环境胁迫耐受性强及副产物低等特点使其在多种化合物的生物合成方面具有独特的优势 (表1)。合成生物技术的发展 and 工具的开发, 极大地促进了微藻底盘细胞工程改造与应用的发展。本节主要对近年来利用微藻底盘细胞生产多不饱和脂肪酸、生物燃料、色素、萜烯类以及重组蛋白等化合物的应用实例进行了总结。

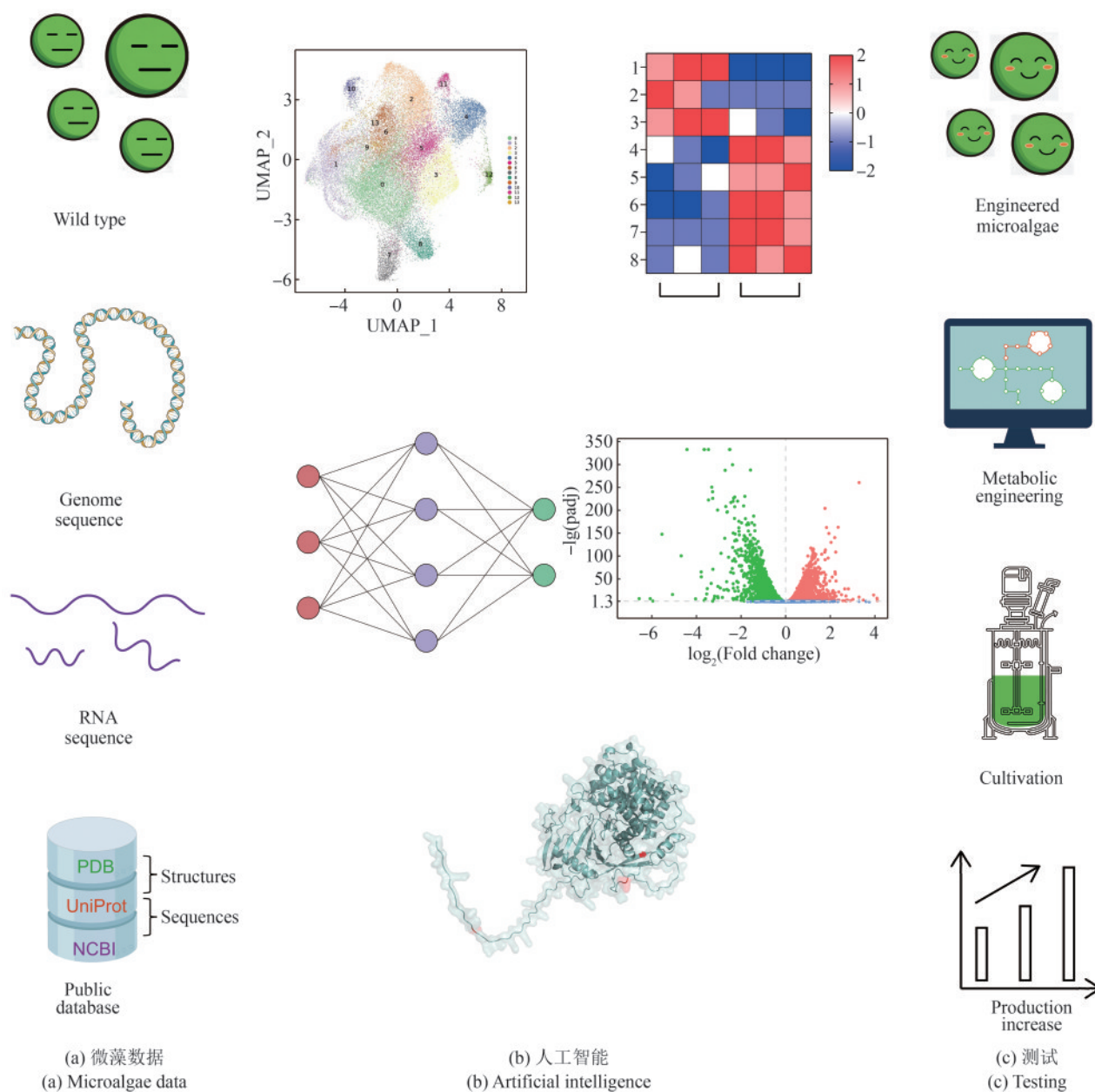


图1 人工智能技术在微藻合成生物学中的潜在应用

Fig.1 Potential applications of artificial intelligence in microalgal synthetic biology

## 5.1 多不饱和脂肪酸

长链多不饱和脂肪酸 (long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA) 是由 18、20、22 个碳原子组成的直链脂肪酸，通常分为  $\omega$ -3 和  $\omega$ -6 两大类。自然界中 LC-PUFA 主要存在于鱼油中，是人类饮食中的必需品，因其在心血管健康、神经发育和抗炎功能中的关键作用，被广泛用于婴幼儿配方奶粉、膳食补充剂和医药领域<sup>[76]</sup>。尽管

海洋鱼油是 LC-PUFA 的主要来源，但全球渔业资源因过度捕捞、海水污染以及气候变化等因素正面临严峻挑战。微藻因其可持续培养能力、高脂质含量及可工程化特性<sup>[77-79]</sup>，成为工业化生产 LC-PUFA 的理想底盘生物。

微藻脂肪酸的从头合成始于叶绿体中<sup>[80]</sup>，通过卡尔文循环固定  $\text{CO}_2$  生成丙酮酸，并转化为乙酰 CoA。乙酰 CoA 经羧化酶催化生成丙二酰 CoA，随后通过 4 步酶促反应（缩合、还原、脱水、再还

原)实现脂肪酸链的两碳延伸<sup>[81]</sup>,最终形成16碳或18碳的饱和脂肪酸,并由去饱和酶引入双键生成不饱和脂肪酸(图2)。为实现LC-PUFA的商业化生产并提升经济性,通过基因工程技术调控微藻中脂肪酸去饱和酶(FAD)和延长酶(FAE)的基因表达,可以显著提升多不饱和脂肪酸的合成能力。例如Hamilton等<sup>[82]</sup>发现在海洋硅藻*P. tricornutum*中整合金牛驼球藻(*Ostreococcus tauri*)来源的 $\Delta 5$ -FAE基因,使细胞内多不饱和脂肪酸的含量尤其是DHA的生物合成通量提升了8倍,进一步整合 $\Delta 6$ -FAD协同表达,DHA的含量得到进一步提升,达到总脂肪酸的11.4%。

EPA因其在人类健康和营养方面的潜力而备受关注<sup>[83]</sup>。微藻中,EPA代谢合成途径涉及多级酶促反应: $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶( $\Delta 9$ -FAD)催化硬脂酸( $C_{18:0}$ )生成油酸( $C_{18:1}^{\Delta 9}$ ),随后通过 $\Delta 12$ -FAD、 $\Delta 6$ -FAD、 $\Delta 5$ -FAD的连续去饱和作用形成花生四烯酸( $C_{20:4}^{\Delta 5,8,11,14}$ ),最后由 $\omega$ -3-FAD介导生成EPA,该合成途径的关键酶还包括 $\Delta 6$ -脂肪酸延长酶( $\Delta 6$ -FAE),其通过催化 $C_{18:3}^{\Delta 6,9,12}$ 延伸为 $C_{20:3}^{\Delta 8,11,14}$ 为后续去饱和和反应提供前体<sup>[84-85]</sup>(图2)。为了进一步提升微藻中EPA的合成能力,研究者们开发出了多种代谢工程策略。具体包括:①通过基因过表达强化关键酶活性,促进多不饱和脂肪酸积累,研究表明,在海洋微拟球藻CCMP1779, $\Delta 5$ -FAD或 $\Delta 12$ -FAD的过表达能够使EPA积累量提升25%<sup>[86]</sup>, $\Delta 6$ -FAD的过表达使藻株中EPA含量达到了62.35 mg/g DCW,较野生型增加1.53倍,同时观察到总脂质含量显著增加了1.7倍。相似的策略在三角褐指藻中进行展现了类似的结果, $\Delta 5$ -FAD和 $\Delta 6$ -FAD的过表达诱导多不饱和脂肪酸尤其是EPA的含量提升<sup>[87-88]</sup>。除了 $\omega$ -3合成途径的相关基因之外,真核微藻EPA合成通路中最后一个酶 $\omega$ -3FAD也在多项研究中被提及<sup>[86, 89]</sup>。敲低 $\omega$ -3FAD不仅会导致EPA含量的降低,还会导致海洋微拟球藻中总脂的降低,而过表达 $\omega$ -3FAD的藻株最适条件下经过10天的补料分批发酵EPA产量可以达到292 mg/L,最高可以达到49 mg/(L·d)的生产率<sup>[85]</sup>。②采用多基因协同调控,同时整合一条代谢通路上的两个或多个基因实现EPA产量的提升,如在海洋微拟球藻同时表达莱茵衣藻来源的二酰基甘油酰基转移酶

CrDGTT1与其内源的脂肪酸延长酶 $\Delta 0$ -ELO1,通过优化培养条件,采用补料分批发酵工艺,在为期9天的发酵周期中,EPA的产量可以达到115.6 mg/L<sup>[90]</sup>。三角褐指藻中内源丙二酰辅酶A酰基载体蛋白转酰基酶(MCAT)与去饱和酶5b(*PtD5b*)的共表达,同样验证了多代谢位点的协同表达可以显著增强LC-PUFA的积累,更是实现了85.35  $\mu$ g/mg的EPA产率。

## 5.2 生物燃料

在全球能源需求激增与化石燃料危机背景下,微藻生物燃料作为第三代和第四代生物燃料的核心方向,展现出不可替代的生态与经济价值。相较于传统生物燃料,微藻无需占用耕地,可利用海水、废水或盐碱地生长,避免与粮食生产竞争,同时具备高光合效率、快速增殖等能力。其脂质含量高,经转化可产生生物柴油、生物氢、生物乙醇等<sup>[91-92]</sup>。此外,微藻在碳捕获和资源循环方面具有显著的减排效益,与碳中和目标高度契合。

使用合成生物学、系统生物学和分子生物学等工具在不影响生物质生产的情况下提高脂质含量是利用微藻生产生物柴油的关键,三酰甘油(TAG)作为生物燃料原料的首选成分,其可以通过酯交换反应生成生物柴油,如脂肪酸甲酯、脂肪酸乙酯等<sup>[93]</sup>。通过基因工程调控TAG合成途径中的关键酶(如GPAT和DGAT)<sup>[94]</sup>,可显著提升微藻脂质产量并改变脂肪酸组成。三角褐指藻中*AGPAT1*过表达使TAG增加1.8倍<sup>[95]</sup>,*GPAT2*过表达使TAG增加2.9倍<sup>[96]</sup>,微拟球藻中*NoDGAT1A*过表达TAG含量增加了2.4倍,*DGAT2*过表达使中性脂含量提高69%,缺氮条件下进一步增加到129%<sup>[97]</sup>。异源表达植物*DGAT*基因(如欧洲油菜*DGAT2*<sup>[98]</sup>、拟南芥*DGAT*<sup>[99]</sup>)或外源添加植物激素,可显著提升微藻脂质合成效率,实现中性脂含量倍增(最高达100%),并且可以引起多不饱和脂肪酸比例优化(如 $\alpha$ -亚麻酸增至12%)。

当前微藻脂质合成调控研究已形成多维度协同优化体系:基于代谢工程策略,通过过表达脂肪酸及TAG生物合成通路关键基因(如*DGAT*、*GPAT*),以增强碳流量定向输送<sup>[100-104]</sup>同时靶向抑

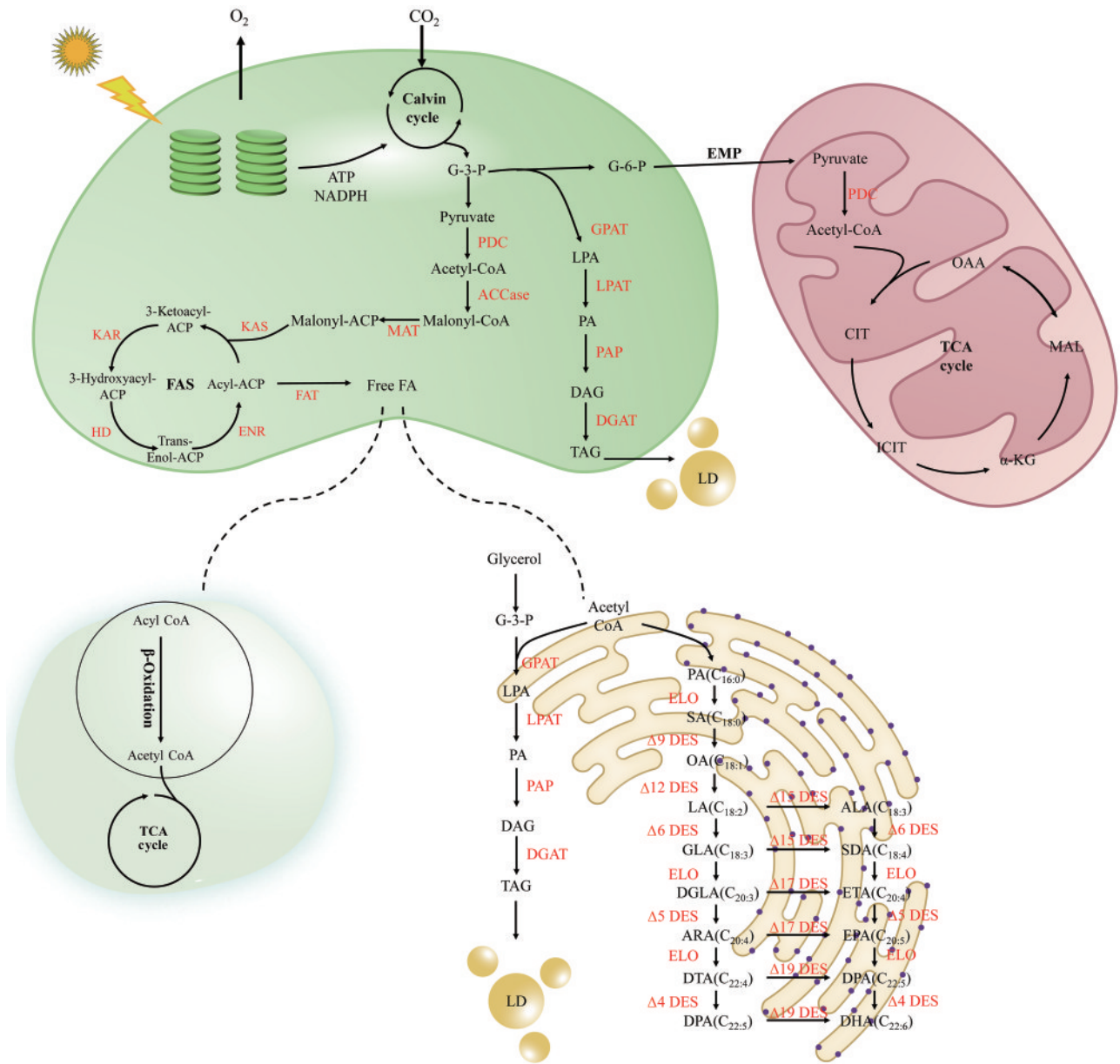


图2 微藻中脂质代谢途径

(G-3-P—甘油醛三磷酸; LPA—溶血磷脂酸; PA—磷酸二酰甘油; DAG—二酰甘油; TAG—三酰甘油; G-6-P—葡萄糖-6-磷酸; CTT—柠檬酸; ICTT—异柠檬酸; α-KG—α-酮戊二酸; MAL—苹果酸; OAA—草酰乙酸; OA—油酸; LA—亚油酸; ALA—α-亚麻酸; GLA—γ-亚麻酸; SDA—十八碳四烯酸; DGLA—二高-γ-亚麻酸; ETA—二十碳四烯酸; ARA—花生四烯酸; EPA—二十碳五烯酸; DTA—二十二碳四烯酸; DPA—二十二碳五烯酸; DHA—二十二碳六烯酸; GPAT—甘油-3-磷酸酰基转移酶; LPAT—溶血磷脂酸酰基转移酶; PAP—磷酸二酰甘油磷酸酶; DGAT—甘油二酰基转移酶; PDC—丙酮酸脱氢酶复合体; ACCase—乙酰辅酶A羧化酶; MAT—丙二酰辅酶A: ACP转酰酶; KAS—3-酮酰基-ACP合成酶; KAR—3-酮酰基-ACP还原酶; HD—3-羟基酰基-ACP脱水酶; ENR—烯酰-ACP还原酶; FAT—酰基-ACP硫酯酶; ELO—延长酶; DES—去饱和酶)

Fig.2 Lipid metabolic pathways in microalgae

(G-3-P—glyceraldehyde 3-phosphate; LPA—lysophosphatidic acid; PA—phosphatidic acid; DAG—diacylglycerol; TAG—triacylglycerol; G-6-P—glucose-6-phosphate; CTT—Citrate; ICTT—iscitrate; α-KG—α-ketoglutarate; MAL—malate; OAA—oxaloacetate; OA—oleic acid; LA—linoleic acid; ALA—α-linolenic acid; GLA—γ-linolenic acid; SDA—stearidonic acid; DGLA—dohomo-γ-linolenic acid; ETA—eicosatetraenoic acid; ARA—arachidonic acid; EPA—eicosapentaenoic acid; DTA—docosatetraenoic acid; DPA—docosapentaenoic acid; DHA—docosahexaenoic acid; GPAT—glycerol-3-phosphate acyltransferase; LPAT—lysophosphatidic acid acyltransferase; PAP—phosphatidic acid phosphatase; DGAT—diacylglycerol acyltransferase; PDC—pyruvate dehydrogenase complex; ACCase—acetyl-Coa carboxylase; MAT—acetoacetyl-CoA: ACP transferase; KAS—3-ketoacyl-ACP synthase; KAR—3-ketoacyl-ACP reductase; HD—3-hydroxyacyl-ACP dehydratase; ENR—enoyl-ACP reductase; FAT—Acyl-ACP thioesterase; ELO—elongase; DES—desaturase)

制竞争性代谢通路, 如利用通过 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除或 RNA 干扰技术下调淀粉合成及脂质降解相关基因表达, 实现碳流量定向重分配<sup>[105]</sup>; 同时, 转录因子工程可全局性激活脂质合成基因簇<sup>[106-109]</sup>, 而外源植物激素(如 IAA)则可以从生理信号传导层面有助于脂质的积累<sup>[110-115]</sup>。这些策略的整合应用, 显著提高了微藻脂质含量(提升幅度达 30%~50%)及生物燃料转化效能。

### 5.3 天然色素

类胡萝卜素是应用广泛的天然色素, 具有抗氧化特性, 参与细胞保护及信号调控。人类无法自身合成, 需从植物或藻类中获取, 目前已发现约 600 种天然类胡萝卜素。其中  $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素和虾青素在食品和医药领域尤为重要。微藻作为高效、可持续的天然色素来源, 正成为替代传统植物的新兴生产途径, 具有显著商业潜力。

微藻中类胡萝卜素的合成主要通过 MEP 途径, 该途径以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸为起始原料, 经过多步反应生成关键前体 IPP 和 DMAPP<sup>[116]</sup>。两者缩合后形成香叶基香叶基二磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP,  $C_{20}$ ), 并由八氢番茄红素合酶催化生成八氢番茄红素( $C_{40}$ ), 再经脱氢、环化等步骤转化为番茄红素, 最终合成  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[117-118]</sup>。 $\beta$ -胡萝卜素可通过两种分支路径进一步修饰:  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶将其氧化为玉米黄质,  $\beta$ -胡萝卜素酮醇酶则催化生成虾青素。整个过程以 MEP 途径为核心, 依赖多种关键酶逐步构建类胡萝卜素骨架并分化出不同色素分子(如虾青素)<sup>[119-120]</sup>。

虾青素作为自然界中抗氧化活性卓越的类胡萝卜素<sup>[121-123]</sup>, 其生物活性特征使其在功能性食品、高端营养补充剂、生物医药及饲料添加剂领域占据重要地位<sup>[124-126]</sup>。目前全球虾青素市场约 80% 的供给量源自微藻生物合成体系, 其中雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)与佐夫色绿藻(*Chromochloris zofingiensis*)被公认为工业化生产的核心菌株资源<sup>[127-129]</sup>。为了突破虾青素工业化生产中面临的高培养成本与低产量瓶颈, 通过代谢工程和合成生物技术定向改造底盘藻株的代谢网

络成为首选。作为一种天然虾青素超累积型微藻, 雨生红球藻在逆境胁迫响应与虾青素合成调控方面展现独特优势, 现已成为商业化生物合成虾青素的核心底盘生物体系<sup>[127, 130]</sup>。有研究表明, 通过将优化的八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, pds)基因整合到雨生红球藻的叶绿体基因组中, 成功使虾青素的含量和产量分别提高了 67% 和 90%, 并且促进了其他类胡萝卜素的合成<sup>[57]</sup>。近年来, 佐夫色绿藻因能够在异养高密度培养下积累虾青素而越来越受到关注, 其虾青素生物合成主要依赖于  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶( $\beta$ -carotenoid ketolase, BKT)介导的玉米黄质(zeaxanthin)直接酮基化反应, 而非  $\beta$ -类胡萝卜素羟化酶( $\beta$ -carotenoid hydroxylase, CHYb)催化的角黄素(canthaxanthin)羟基化途径。这一特征性合成机制与雨生红球藻存在显著差异, 后者主要通过 CHYb 催化角黄素连续羟基化生成虾青素, 并伴随中间产物积累<sup>[131]</sup>, 并且添加赤霉素-3(gibberellic acid-3, GA3)会显著上调虾青素合成相关基因表达, 促进虾青素产量达到 0.34 g/L, 相比对照组高出 89%, 与精氨酸联合使用会进一步提高虾青素产量, 在 7.5 L 发酵罐中, GA3 和 100  $\mu$ mol/L 精氨酸联合处理组的虾青素产量达到 0.39 g/L, 比单独使用 GA3 高出 18%<sup>[132]</sup>。同时, 研究人员探索和优化培养条件以获取更多的虾青素产量, 缺氮和高光照条件显著提高了佐夫色绿藻中虾青素的含量, 通过半连续培养和缺氮条件, 虾青素的产率达到 3.3 mg/(L·d)<sup>[133]</sup>。除了这两种研究较多的微藻之外, 研究人员还相继利用莱茵衣藻<sup>[134]</sup>、微拟球藻<sup>[25, 135]</sup>等实现了虾青素的高效合成。这些发现突出了微藻在虾青素生产中的巨大潜力, 并证明了通过基因工程策略增强微藻虾青素生物合成的有效性。

### 5.4 高值萜类化合物

萜类化合物是一类具有结构多样性和广泛生物活性的天然产物, 存在于植物、微生物和昆虫等生物体中<sup>[136]</sup>。这类化合物的应用领域涵盖食品、药品、化妆品及农用化学品等多个门类。然而, 传统植物源萜类化合物的获取面临着产量低、纯度差以及高能耗等问题, 另外, 因为萜类化合

物结构复杂,其化学合成不仅困难而且成本高昂。因此,利用微生物细胞工厂通过代谢工程实现萜类化合物的生物合成成为一种有效的替代策略<sup>[137-138]</sup>。模式生物如大肠杆菌和酵母已被广泛用于萜类化合物的生产<sup>[139-141]</sup>,相比于传统发酵微生物,微藻等光合微生物展现出独特的萜类合成优势,其通过光能驱动CO<sub>2</sub>固定直接合成高附加值产物,兼具高效光合作用和快速生长特性。尤为突出的是,微藻自身可以通过两种主要的酶促途径合成萜类:MVA和MEP途径均可以高效供给萜类前体IPP/DMAPP(图3),在莱茵衣藻二萜合成研究中已得到证实,通过强化MEP途径使香紫苏醇产量达到656 mg/L<sup>[15]</sup>。这种自养型代谢优势结合遗传工程策略,使微藻成为极具潜力的萜类生物合成平台<sup>[14]</sup>。另外一种人工设计的代谢通路IUP途径也成功应用于微藻萜类化合物的合成<sup>[42]</sup>。

莱茵衣藻作为光合真核微藻的典型模式生物,在萜类化合物合成平台开发领域展现出持续的技术突破,2016年,Lauersen团队<sup>[24]</sup>率先通过表达广藿香(*Pogostemon cablin* Benth)的倍半萜类合酶基因在光合真核微藻中实现倍半萜类化合物百秋李醇的生物合成,标志着萜类代谢工程在微藻体系的里程碑式进展。随后,研究进一步扩展到倍半萜 $\alpha$ -红没药烯的合成,通过过表达大冷杉(*Abies grandis*)的红没药烯合成酶(*Abies grandis* bisabolene synthase, AgBs)并结合光生物反应器优化策略显著提升产量<sup>[43]</sup>;同期该团队的另一项研究证实莱茵衣藻可通过整合植物源二萜合酶基因(如casbene synthase、taxadiene synthase等)成功合成casbene、taxadiene及13R(+)-manoyl oxide等二萜类产物,凸显其多萜类合成的代谢可塑性<sup>[14]</sup>。2019年,Papaefthimiou团队<sup>[142]</sup>通过叶绿体基因组工程将岩蔷薇(*Cistus creticus*)的copal-8-ol diphosphate synthase(*CcCLS*)基因导入衣藻,构建香紫苏醇(sclareol)的高效合成通路,为萜类产物的亚细胞区室化调控提供新范式。至2025年,研究通过整合青蒿(*Artemisia annua*) $\beta$ -石竹烯合成酶的异源表达、MEP通路的模块优化及光自养高密度培养策略,在莱茵衣藻中实现航空燃料前体 $\beta$ -石竹烯的规模化合成,其光自养条件下产量达854.7  $\mu$ g/L<sup>[46]</sup>。除莱茵衣藻外,三角褐指藻及微

拟球藻等微藻体系亦被开发为萜类生物合成的替代底盘,通过CRISPR/Cas9基因编辑、亚细胞定位研究、代谢通量重定向策略,逐步突破复杂萜类化合物的合成瓶颈,推动微藻合成萜类化合物向工业级应用方向迈进。

## 5.5 重组疫苗

微藻细胞在疫苗开发领域的研究价值早已引起科学家的重视,作为基因工程抗原表达平台,微藻展现出独特的生物相容性与免疫调节特性,近年来微藻细胞中生产了多种多样的重组蛋白。例如在肠道免疫系统和口服疫苗开发等相关领域,针对金黄色葡萄球菌、人乳头瘤病毒、流感病毒、乙型肝炎病毒、艾滋病病毒、埃博拉病毒等传染性病原体,可分别在微藻细胞内实现多种不同抗原的表达<sup>[143-146]</sup>;在非传染性领域,已针对I型糖尿病、动脉粥样硬化症、高血压、过敏、乳腺癌等疾病研制出一系列微藻疫苗<sup>[147-148]</sup>。在动物病原体疫苗开发领域,微藻细胞的应用也已展现出显著潜力,已有诸多成功先例。针对口蹄疫病毒、猪瘟病毒、白斑综合征病毒等病原体,科研人员已成功研制出多种微藻疫苗<sup>[149-152]</sup>。这些成果表明,微藻细胞在动物疫苗研发中具有重要作用,为预防动物疫病提供了新的策略和技术支持。纵观这些研究多集中于莱茵衣藻作为表达体系进行抗原基因的表达,但仍有大量有潜力的微藻种类在未来有望成为重组疫苗生产的经济高效平台。

## 6 未来发展趋势

微藻合成生物学的未来发展将呈现多学科融合、智能驱动和应用导向的趋势。从全球生物制造格局来看,微藻不再只是“潜力资源”,而将逐步转向“功能化底盘平台”。其未来将逐步完成由工具完善向底盘定制升级,由经验驱动向数据驱动转型,由单产物优化向网络级重构发展的升级。“定向微藻底盘”构建与理性化设计将成为未来发展的核心趋势。当前多数研究仍以模式微藻为基础开展改造,但未来的发展将更加注重构建“产物导向型底盘”。不同类别产物(如脂质、萜类、

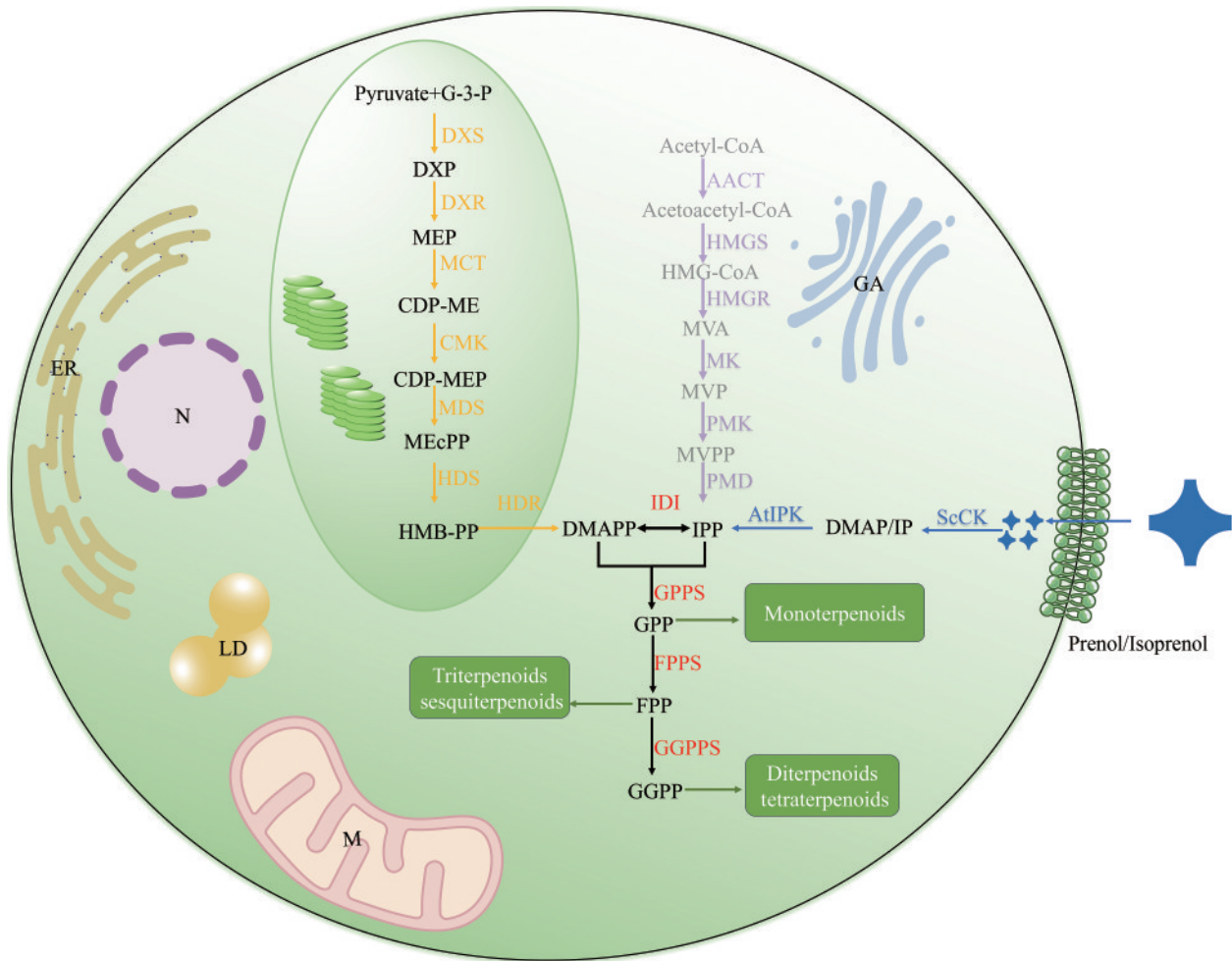


图3 微藻中萜类化合物合成途径

(G-3-P—甘油醛-3-磷酸; DXP—1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸; MEP—2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸; CDP-ME—4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇; CDP-MEP—4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇-2-磷酸; MEcPP—2-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环二磷酸; HMB-PP—4-羟基-3-甲基-2-丁烯基二磷酸; DMAPP—二甲基烯丙基焦磷酸; IPP—异戊烯基焦磷酸; GPP—香叶基焦磷酸; FPP—法尼基焦磷酸; GGPP—香叶基香叶基焦磷酸; HMG-CoA—3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A; MVA—甲羟戊酸; MVP—甲羟戊酸-5-磷酸; MVPP—甲羟戊酸焦磷酸; DMAP—二甲基烯丙基磷酸; IP—异戊烯基磷酸; DXS—1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶; DXR—1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶; MCT—2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸胞苷转移酶; CMK—4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶; MDS—2-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环二磷酸合酶; HDS—4-羟基-3-甲基-2-丁烯基二磷酸合酶; HDR—4-羟基-3-甲基-2-丁烯基二磷酸还原酶; IDI—异戊烯基焦磷酸异构酶; GPPS—香叶基焦磷酸合酶; FPPS—法尼基焦磷酸合酶; GGPPS—香叶基香叶基焦磷酸合酶; AACT—乙酰乙酰辅酶A硫解酶; HMGS—3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA合酶; HMGR—3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA还原酶; MK—甲羟戊酸激酶; PMK—磷酸甲羟戊酸激酶; PMD—二磷酸甲羟戊酸脱羧酶; ScCK—胆碱激酶; AtIPK—异戊烯基焦磷酸激酶)

Fig.3 Biosynthetic pathways of terpenoid compounds in microalgae

(G-3-P—glyceraldehyde 3-phosphate; DXP—1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP—2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; CDP-ME—4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol; CDP-MEP—4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 2-phosphate; MEcPP—2-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate; HMB-PP—4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl diphosphate; DMAPP—dimethylallyl diphosphate; IPP—isopentenyl diphosphate; GPP—geranyl diphosphate; FPP—farnesyl diphosphate; GGPP—geranylgeranyl diphosphate; HMG-CoA—3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; MVA—mevalonic acid; MVP—mevalonate-5-phosphate; MVPP—mevalonate diphosphate; DMAP—dimethylallyl monophosphate; IP—isopentenyl monophosphate; DXS—1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; DXR—1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; MCT—2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase; CMK—4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase; MDS—2-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; HDS—4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl diphosphate synthase; HDR—4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl diphosphate reductase; IDI—isopentenyl diphosphate isomerase; GPPS—geranyl diphosphate synthase; FPPS—farnesyl diphosphate synthase; GGPPS—geranylgeranyl diphosphate synthase; AACT—acetoacetyl-CoA thiolase; HMGS—3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; HMGR—3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; MK—mevalonic acid kinase; PMK—phosphomevalonate kinase; PMD—diphosphomevalonate decarboxylase; ScCK—*Saccharomyces cerevisiae* choline kinase; AtIPK—*Arabidopsis thaliana* isopentenyl phosphate kinase)

甾醇、色素、蛋白药物等)对前体供应、能量分配和细胞器定位的需求是不同的,因此未来微藻底盘将趋向分化,根据高值化合物类型的不同构建特定的“定向微藻底盘”。同时,通过代谢网络简化与竞争路径系统移除,构建低副产物流失的“极简微藻底盘”也将成为重要方向。同时,动态调控也会变得越来越重要。比如,在细胞生长初期优先生物量积累,当细胞达到一定密度后,再启动产物合成通路。通过这样的分阶段控制,可以在保证生长的同时提高产量。总体来看,未来的目标是根据合成化合物的不同建立可调节、可控制的“定向微藻底盘”,让微藻合成产物更加有序和高效。

今后人工智能与自动化驱动的“数字化微藻设计”将成为主流模式。依托已有的多组学数据资源,借助AlphaFold等深度学习工具在设计阶段就对关键酶和代谢路径进行预测和筛选。通过整合数据分析与模型计算,可以在改造前评估不同策略可能带来的代谢变化,从而减少盲目尝试。设计、构建、测试和学习的循环过程将更加规范和高效,有助于缩短研发时间,提高成功率。这种以数据为基础的研究模式,将为微藻在规模化生产中的应用提供重要支撑。细胞器工程与空间代谢重构将成为进一步的发展方向。真核微藻具有叶绿体、线粒体、内质网、脂滴、过氧化物酶体等多重亚细胞结构,这为“空间隔离型代谢设计”提供了天然优势。前文已经提到目前微藻中少数的区室化策略集中在叶绿体与过氧化物酶体中,未来可以在不同细胞器中构建代谢模块,将关键通路定向表达于特定细胞器中,减少中间产物损耗和其他代谢途径干扰。未来,围绕脂滴、内质网、线粒体等细胞器定位信号的开发与应用将为微藻生物合成提供新的策略。

未来微藻合成生物学的发展不会再局限于只生产一种产品。由于微藻培养仍然需要较高的成本,仅依靠单一产物合成往往难以实现盈利。因此,多产品协同开发和微藻的综合利用将成为更加现实的发展方向。具体来说,可以优先提取附加值较高的目标产物,如天然色素、不饱和脂肪酸或其他高值化合物;在提取主要产品之后,剩余的藻体生物量仍然含有蛋白质、脂类或碳水化

合物,这部分物质可以根据成分特点进行进一步加工,比如制备水产或畜禽饲料添加剂等。或者可以利用工业排放的CO<sub>2</sub>作为碳源、各类废水作为培养基,在引导微藻合成高附加化合物的同时起到环境治理的作用,从而实现“减排-利用-增值”的优化途径。通过这种分步骤、分层次的利用方式,使同一批微藻发挥多重价值,提高整体收益。

总体来看,微藻合成生物学未来的发展趋势可以概括为:从“通用型设计”走向“定向底盘构建”,从“经验驱动”走向“智能预测”,从“单一产物优化”走向“微藻综合利用”。在碳中和背景和绿色制造需求不断增强的全球趋势下,微藻有望在可持续生物制造体系中占据更加重要的位置。

## 7 结 论

微藻通过光合作用固定二氧化碳并合成多种高附加值产物。真核或原核微藻均可以合成多种高附加值产物如多不饱和脂肪酸、生物燃料、色素、萜烯类、重组疫苗等,其应用领域涵盖食品、能源与医药制剂制备等。和原核表达体系相比,真核微藻可以完成蛋白质翻译后的修饰和正确折叠,在开发疫苗及重组蛋白时更具优势。此外,微藻作为水产养殖领域的优质天然饵料来源,适于开发鱼、虾、贝、蟹等水产动物的口服疫苗。微藻还是研究光合作用的重要模式体系,是极具潜力的微生物光合生物制造平台,开发基于微藻的光合生物制造技术,能够同步实现固碳减排与绿色生物制造的双重目标,通过光能驱动实现二氧化碳的资源化转化与高值化利用

然而,微藻在合成生物学应用中还存在一些挑战与问题,其中最核心的问题是生产成本与产量的不平衡,除持续优化培养条件与生物反应器设计制造外,基因工程和合成生物技术的发展是解决该问题的全新策略。通过基因组学、蛋白质组学与多维代谢物组学可进一步理解微藻代谢调控相关信息,揭示微藻代谢途径的关键酶和主要的转录调控因子,进行代谢网络的优化和重构。人工智能相关技术的引入为微藻合成生物学的未来发展带来了深远影响,最为直观的是AI能够整

合并分析来自多组学的大规模数据,从而加速功能基因的挖掘与代谢网络的解析。这种研究方式有助于揭示微藻复杂的生理调控机制,为代谢途径的精确改造提供依据;基于机器学习和深度学习的模型可用于预测关键酶的功能、代谢通量分布及产物合成效率等,可用于指导基因编辑与代谢工程设计,这将显著提高目标产物的合成效率与稳定性<sup>[153]</sup>;人工智能还可与自动化高通量实验平台结合,实现培养条件优化、代谢路径筛选和表型评估的智能化与高效化<sup>[154-155]</sup>。

综上所述,近年来,微藻底盘的工程化改造在基因操作、转录调控、遗传元件开发及代谢工程等领域成果显著,使其成为许多天然产物合成的优质底盘宿主。随着学术研究和工业需求的多样化,微藻底盘系统仍有进一步改造升级的空间,比如提高模式藻株的工程应用效能、突破工业藻株的遗传改造屏障,在技术工具、超大规模培养等方面需要持续投入,尤其需要开发“可编辑、可控制、可放大”的新兴光合微藻底盘。总之,随着微藻合成途径解析,代谢工程及人工智能技术在微藻领域越来越深入的应用,持续优化微藻细胞工厂高效合成高值化合物,不断缩小与常规模式物种间的差距,微藻细胞工厂必将为绿色可持续发展做出贡献。

## 参 考 文 献

- [1] CLOMBURG J M, CRUMBLEY A M, GONZALEZ R. Industrial biomanufacturing: the future of chemical production [J]. *Science*, 2017, 355(6320): aag0804.
- [2] LIU J Q, WANG X, DAI G Z, et al. Microbial chassis engineering drives heterologous production of complex secondary metabolites[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 59: 107966.
- [3] NIELSEN J, KEASLING J D. Engineering cellular metabolism [J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1185-1197.
- [4] ROSALES-MENDOZA S, PAZ-MALDONADO L M, SORIANO-GUERRA R E. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(3): 479-494.
- [5] SUN Y, XIN Y, ZHANG L Y, et al. Enhancement of violaxanthin accumulation in *Nannochloropsis oceanica* by overexpressing a carotenoid isomerase gene from *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 942883.
- [6] ZHANG J, HANSEN L G, GUDICH O, et al. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine [J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 341-347.
- [7] LU Y D, ZHANG X, GU X P, et al. Engineering microalgae: transition from empirical design to programmable cells[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(8): 1233-1256.
- [8] RASHID N, UR REHMAN M S, SADIQ M, et al. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 40: 760-778.
- [9] GUEDES A C, AMARO H M, MALCATA F X. Microalgae as sources of high added-value compounds: a brief review of recent work[J]. *Biotechnology Progress*, 2011, 27(3): 597-613.
- [10] SALOMÉ P A, MERCHANT S S. A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(8): 1682-1707.
- [11] MELERO-COBO X, GALLEMÍ M, CARNICER M, et al. MoCloro: an extension of the *Chlamydomonas reinhardtii* modular cloning toolkit for microalgal chloroplast engineering [J]. *Physiologia Plantarum*, 2025, 177(1): e70088.
- [12] FERENCZI A, FELLBAUM M, CHEW Y P, et al. Comparison of CRISPR/Cas9 and Cas12a for gene editing in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Algal Research*, 2024, 84: 103796.
- [13] EINHAUS A, BAIER T, ROSENSTENGEL M, et al. Rational promoter engineering enables robust terpene production in microalgae[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(4): 847-856.
- [14] LAUERSEN K J, WICHMANN J, BAIER T, et al. Phototrophic production of heterologous diterpenoids and a hydroxy-functionalized derivative from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 116-127.
- [15] EINHAUS A, STEUBE J, FREUDENBERG R A, et al. Engineering a powerful green cell factory for robust photoautotrophic diterpenoid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 82-90.
- [16] 孙翰, 刘进. 真核微藻脂质代谢工程的研究进展和展望[J]. *合成生物学*, 2023, 4(6): 1140-1160.
- [16] SUN H, LIU J. Research progress and prospects in lipid metabolic engineering of eukaryotic microalgae[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(6): 1140-1160.
- [17] BOWLER C, VARDI A, ALLEN A E. Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2010, 2: 333-365.
- [18] SPILLING K, BRYNJÓLFSDÓTTIR Á, ENSS D, et al. The effect of high pH on structural lipids in diatoms[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(5): 1435-1439.
- [19] 崔金玉, 张爱娣, 栾国栋, 等. 微藻光驱固碳合成技术的发展

- 现状与未来展望[J]. 合成生物学, 2022, 3(5): 884-900.
- CUI J Y, ZHANG A D, LUAN G D, et al. Engineering microalgae for photosynthetic biosynthesis: progress and prospect[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(5): 884-900.
- [20] GU X P, DENG Y, WANG A Q, et al. Engineering a marine microalga *Chlorella* sp. as the cell factory[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 133.
- [21] JIANG W Z, 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.
- [22] GAN Q H, YU X J, JIANG X, et al. Systematic approach for dissecting promoters and designing transform systems in microalgae[J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1): 127.
- [23] SCHRODA M, BLÖCKER D, BECK C F. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*[J]. The Plant Journal, 2000, 21(2): 121-131.
- [24] 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.
- [25] LIU M J, YU L H, ZHENG J, et al. Turning the industrially relevant marine alga *Nannochloropsis* red: one move for multifaceted benefits[J]. New Phytologist, 2024, 244(4): 1467-1481.
- [26] KANG W, MA T, LIU M, et al. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4248.
- [27] SIZOVA I, GREINER A, AWASTHI M, et al. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases[J]. The Plant Journal, 2013, 73(5): 873-882.
- [28] GREINER A, KELTERBORN S, EVERS H, et al. Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9[J]. The Plant Cell, 2017, 29(10): 2498-2518.
- [29] DABOUSSI F, LEDUC S, MARÉCHAL A, et al. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3831.
- [30] WEYMAN P D, BEERI K, LEFEBVRE S C, et al. Inactivation of *Phaeodactylum tricorutum* urease gene using transcription activator-like effector nuclease-based targeted mutagenesis[J]. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13(4): 460-470.
- [31] MCCARTHY J K, SMITH S R, MCCROW J P, et al. Nitrate reductase knockout uncouples nitrate transport from nitrate assimilation and drives repartitioning of carbon flux in a model pennate diatom[J]. The Plant Cell, 2017, 29(8): 2047-2070.
- [32] 朱振, 田晶, 江静, 等. 微藻叶绿体细胞器工厂研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1218-1234.
- ZHU Z, TIAN J, JIANG J, et al. Progress in microalgae chloroplast organelle factory development[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1218-1234.
- [33] JIANG W Z, WEEKS D P. A gene-within-a-gene Cas9/sgRNA hybrid construct enables gene editing and gene replacement strategies in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Algal Research, 2017, 26: 474-480.
- [34] 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.
- [35] SERIF M, DUBOIS G, FINOUX A L, et al. One-step generation of multiple gene knock-outs in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by DNA-free genome editing[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3924.
- [36] CUI X Y, XIN Y, XIAO Y, et al. High-efficiency genome editing of *Chlorella* sp. by CRISPR/Cas9[J]. Plant Biotechnology Journal, 2026, 24(4): 2123-2125.
- [37] BAEK K, YU J, JEONG J, et al. Photoautotrophic production of macular pigment in a *Chlamydomonas reinhardtii* strain generated by using DNA-free CRISPR-Cas9 RNP-mediated mutagenesis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(3): 719-728.
- [38] 孙中亮, 陈辉, 王强. 从CO<sub>2</sub>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.
- SUN Z L, CHEN H, WANG Q. From CO<sub>2</sub> to value-added products: carbon neutral microalgal green biomanufacturing[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(5): 953-965.
- [39] AMENDOLA S, KNEIP J S, MEYER F, et al. Metabolic engineering for efficient ketocarotenoid accumulation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(3): 820-831.
- [40] RATHOD J P, VIRA C, LALI A M, et al. Metabolic engineering of *Chlamydomonas reinhardtii* for enhanced β-carotene and lutein production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 190(4): 1457-1469.
- [41] SONG I, KIM J, BAEK K, et al. The generation of metabolic changes for the production of high-purity Zeaxanthin mediated by CRISPR-Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 220.
- [42] ZHAO M L, CAI W S, ZHENG S Q, et al. Metabolic engineering of the isopentenol utilization pathway enhanced the production of terpenoids in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Marine Drugs, 2022, 20(9): 577.
- [43] WICHMANN J, BAIER T, WENTNAGEL E, et al. Tailored carbon partitioning for phototrophic production of (*E*)-α-bisabolene from the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 211-222.
- [44] POURMIR A, NOOR-MOHAMMADI S, JOHANNES T W. Production of xylitol by recombinant microalgae[J]. Journal of

- Biotechnology, 2013, 165(3-4): 178-183.
- [45] LI M J, MA S L, ZHAO J L, et al. Efficient photoproduction of a high-value sesquiterpene pentalenene from the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Journal, 2025, 123(2): e70354.
- [46] DOU X T, LI M J, GE Y L, et al. Photoproduction of aviation fuel  $\beta$ -caryophyllene from the eukaryotic green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2025, 122(3): 698-709.
- [47] DU Z Y, BHAT W W, POLINER E, et al. Engineering *Nannochloropsis oceanica* for the production of diterpenoid compounds[J]. mLife, 2023, 2(4): 428-437.
- [48] LIU M J, ZHENG J, YU L H, et al. Engineering *Nannochloropsis oceanica* for concurrent production of canthaxanthin and eicosapentaenoic acid[J]. Bioresource Technology, 2024, 413: 131525.
- [49] KOH H G, KANG N K, JEON S, et al. Heterologous synthesis of chlorophyll b in *Nannochloropsis salina* enhances growth and lipid production by increasing photosynthetic efficiency[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2019, 12(1): 122.
- [50] FABRIS M, GEORGE J, KUZHIUMPARAMBIL U, et al. Extrachromosomal genetic engineering of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* enables the heterologous production of monoterpenoids[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(3): 598-612.
- [51] LAUERSEN K J. Eukaryotic microalgae as hosts for light-driven heterologous isoprenoid production[J]. Planta, 2019, 249(1): 155-180.
- [52] FANTINO E, AWWAD F, MERINDOL N, et al. Bioengineering *Phaeodactylum tricorutum*, a marine diatom, for cannabinoid biosynthesis[J]. Algal Research, 2024, 77: 103379.
- [53] D'ADAMO S, SCHIANO DI VISCONTE G, LOWE G, et al. Engineering the unicellular alga *Phaeodactylum tricorutum* for high-value plant triterpenoid production[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(1): 75-87.
- [54] ZOU L G, BALAMURUGAN S, ZHOU T B, et al. Potentiation of concurrent expression of lipogenic genes by novel strong promoters in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(11): 3006-3015.
- [55] CEN S Y, LI D W, HUANG X L, et al. Crucial carotenogenic genes elevate hyperaccumulation of both fucoxanthin and  $\beta$ -carotene in *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Algal Research, 2022, 64: 102691.
- [56] WANG Q T, FENG Y B, LU Y D, et al. Manipulating fatty-acid profile at unit chain-length resolution in the model industrial oleaginous microalgae *Nannochloropsis*[J]. Metabolic Engineering, 2021, 66: 157-166.
- [57] GALARZA J I, GIMPEL J A, ROJAS V, et al. Over-accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* through chloroplast genetic engineering[J]. Algal Research, 2018, 31: 291-297.
- [58] FANTINO E, MESSAABI A, MÉRINDOL N, et al. Extrachromosomal expression of functional *Cannabis sativa* cannabidiolic acid synthase in *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Algal Research, 2025, 85: 103889.
- [59] RENGEL R, SMITH R T, HASLAM R P, et al. Overexpression of acetyl-CoA synthetase (ACS) enhances the biosynthesis of neutral lipids and starch in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Algal Research, 2018, 31: 183-193.
- [60] CHEN D, YUAN X, LIANG L M, et al. Overexpression of acetyl-CoA carboxylase increases fatty acid production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnology Letters, 2019, 41(10): 1133-1145.
- [61] JANG J, BAIER T, KNEIP J S, et al. High-yield Zeaxanthin production in *Chlamydomonas reinhardtii* via advanced metabolic pathway engineering[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts and Bioproducts, 2025, 18(1): 77.
- [62] MOOG D, STORK S, REISLÖHNER S, et al. *In vivo* localization studies in the stramenopile alga *Nannochloropsis oceanica*[J]. Protist, 2015, 166(1): 161-171.
- [63] WICHMANN J, EGGERT A, ELBOURNE L D H, et al. Farnesyl pyrophosphate compartmentalization in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* during heterologous (*E*)- $\alpha$ -bisabolene production[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 190.
- [64] ZHANG H, MA S L, DOU X T, et al. Harnessing algal peroxisomes for efficient poly hydroxybutyrate production[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(8): 3312-3321.
- [65] LIU X N, ZHU X X, WANG H, et al. Discovery and modification of cytochrome P450 for plant natural products biosynthesis[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 5(3): 187-199.
- [66] LI C, TAO F, NI J, et al. Enhancing the light-driven production of D-lactate by engineering *Cyanobacterium* using a combinational strategy[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9777.
- [67] YAMORI W, SHIKANAI T. Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67: 81-106.
- [68] XUE J, BALAMURUGAN S, LI D W, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in microalgae by enhancing NADPH supply [J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 212-221.
- [69] 江洪, 吕洁, 高倩. AI赋能生物制造研发现状与趋势[J]. 中国

- 生物工程杂志, 2026, 46(1): 133-140.
- JIANG H, LYU J, GAO Q. Artificial intelligence-enabled biomanufacturing: research status and trends[J]. *China Biotechnology*, 2026, 46(1): 133-140.
- [70] RODRÍGUEZ M B R. Simulation of an assisted culture medium for production of *Dunaliella tertiolecta*[J]. *Algal Research*, 2020, 47: 101838.
- [71] FERNÁNDEZ IZQUIERDO P, CERÓN DELAGADO L, ORTIZ BENAVIDES F. An artificial neuronal network coupled with a genetic algorithm to optimise the production of unsaturated fatty acids in *Parachlorella kessleri*[J]. *Artificial Intelligence in Agriculture*, 2024, 13: 32-44.
- [72] PETER A P, CHEW K W, PANDEY A, et al. Artificial intelligence model for monitoring biomass growth in semi-batch *Chlorella vulgaris* cultivation[J]. *Fuel*, 2023, 333: 126438.
- [73] RUTLAND H, YOU J, LIU H X, et al. A systematic review of machine-learning solutions in anaerobic digestion[J]. *Bioengineering*, 2023, 10(12): 1410.
- [74] LIAO L J, XIE M J, ZHENG X S, et al. Molecular insights fast-tracked: AI in biosynthetic pathway research[J]. *Natural Product Reports*, 2025, 42(5): 911-936.
- [75] KUGLER A, STENSJÖ K. Machine learning predicts system-wide metabolic flux control in cyanobacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 82: 171-182.
- [76] RYCKEBOSCH E, BRUNEEL C, TERMOTE-VERHALLE R, et al. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil[J]. *Food Chemistry*, 2014, 160: 393-400.
- [77] PATIL V, KÄLLQVIST T, OLSEN E, et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed[J]. *Aquaculture International*, 2007, 15(1): 1-9.
- [78] NADUTHODI M I S, SÜDFELD C, AVITZIGIANNIS E K, et al. Comprehensive genome engineering toolbox for microalgae *Nannochloropsis oceanica* based on CRISPR-Cas systems[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(12): 3369-3378.
- [79] WEI L, XIN Y, WANG Q T, et al. RNAi-based targeted gene knockdown in the model oleaginous microalgae *Nannochloropsis oceanica*[J]. *The Plant Journal*, 2017, 89(6): 1236-1250.
- [80] CAGLIARI A, MARGIS R, DOS SANTOS MARASCHIN F, et al. Biosynthesis of triacylglycerols (TAGs) in plants and algae[J]. *International Journal of Plant Biology*, 2011, 2(1): e10.
- [81] OHLROGGE J, BROWSE J. Lipid biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 957-970.
- [82] HAMILTON M L, HASLAM R P, NAPIER J A, et al. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricorutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 22: 3-9.
- [83] TURCHINI G M, NICHOLS P D, BARROW C, et al. Jumping on the omega-3 bandwagon: distinguishing the role of long-chain and short-chain omega-3 fatty acids[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2012, 52(9): 795-803.
- [84] MUÑOZ C F, SÜDFELD C, NADUTHODI M I S, et al. Genetic engineering of microalgae for enhanced lipid production[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 52: 107836.
- [85] ZHENG J, SHI Y, YU L H, et al. Modulation of an omega-3 fatty acid desaturase for eicosapentaenoic acid biosynthesis in the alga *Nannochloropsis oceanica*[J]. *Algal Research*, 2025, 85: 103877.
- [86] POLINER E, PULMAN J A, ZIENKIEWICZ K, et al. A toolkit for *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 enables gene stacking and genetic engineering of the eicosapentaenoic acid pathway for enhanced long-chain polyunsaturated fatty acid production[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 298-309.
- [87] PENG K T, ZHENG C N, XUE J, et al. Delta 5 fatty acid desaturase upregulates the synthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(35): 8773-8776.
- [88] ZHU B H, TU C C, SHI H P, et al. Overexpression of endogenous delta-6 fatty acid desaturase gene enhances eicosapentaenoic acid accumulation in *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 57: 43-49.
- [89] YAN T T, WANG K X, FENG K X, et al. Remodeling of the 3D chromatin architecture in the marine microalgae *Nannochloropsis oceanica* during lipid accumulation[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 129.
- [90] LIU J, LIU M J, PAN Y F, et al. Metabolic engineering of the oleaginous alga *Nannochloropsis* for enriching eicosapentaenoic acid in triacylglycerol by combined pulling and pushing strategies[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 69: 163-174.
- [91] HO S H, YE X T, HASUNUMA T, et al. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae: a critical review[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(8): 1448-1459.
- [92] ZHANG C F, LI S N, HO S H. Converting nitrogen and phosphorus wastewater into bioenergy using microalgae-bacteria consortia: a critical review[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 126056.
- [93] HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 621-639.
- [94] KLAITONG P, FA-AROONSAWAT S, CHUNGJATUPORNCHAI W. Accelerated triacylglycerol production and altered fatty acid

- composition in oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 61.
- [95] BALAMURUGAN S, WANG X, WANG H L, et al. Occurrence of plastidial triacylglycerol synthesis and the potential regulatory role of AGPAT in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2017, 10(1): 97.
- [96] WANG X, LIU S F, LI R Y, et al. TAG pathway engineering via GPAT2 concurrently potentiates abiotic stress tolerance and oleaginicacy in *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2020, 13(1): 160.
- [97] LI D W, CEN S Y, LIU Y H, et al. A type 2 diacylglycerol acyltransferase accelerates the triacylglycerol biosynthesis in heterokont oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 229: 65-71.
- [98] AHMAD I, SHARMA A K, DANIELL H, et al. Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of brassica diacylglycerol acyltransferase 2[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(4): 540-550.
- [99] ZHANG L, WANG S, HAN J C, et al. Manipulation of triacylglycerol biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica* by overexpressing an *Arabidopsis thaliana* diacylglycerol acyltransferase gene[J]. *Algal Research*, 2022, 61: 102590.
- [100] CUI Y L, ZHAO J L, WANG Y C, et al. Characterization and engineering of a dual-function diacylglycerol acyltransferase in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2018, 11(1): 32.
- [101] KASAI Y, TSUKAHARA T, IKEDA F, et al. Metabolic engineering using iterative self-cloning to improve lipid productivity in *Coccomyxa*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 11742.
- [102] ZOU L G, CHEN J W, ZHENG D L, et al. High-efficiency promoter-driven coordinated regulation of multiple metabolic nodes elevates lipid accumulation in the model microalga *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 54.
- [103] MUÑOZ C F, WEUSTHUIS R A, D'ADAMO S, et al. Effect of single and combined expression of lysophosphatidic acid acyltransferase, glycerol-3-phosphate acyltransferase, and diacylglycerol acyltransferase on lipid accumulation and composition in *Neochloris oleoabundans*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1573.
- [104] CHUNGJATUPORNCHAI W, FA-AROONSAWAT S. Enhanced triacylglycerol production in oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by co-overexpression of lipogenic genes: plastidial LPAAT1 and ER-located DGAT2[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 131(2): 124-130.
- [105] CHANG K S, KIM J R, PARK H W, et al. Enhanced lipid productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis* sp. using a DNA-free CRISPR-Cas9 RNP method[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 303: 122932.
- [106] KWON S, KANG N K, KOH H G, et al. Enhancement of biomass and lipid productivity by overexpression of a bZIP transcription factor in *Nannochloropsis salina*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(2): 331-340.
- [107] 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.
- [108] LEE H, SHIN W S, KIM Y U, et al. Enhancement of lipid production under heterotrophic conditions by overexpression of an endogenous bZIP transcription factor in *Chlorella* sp. HS2[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(10): 1597-1606.
- [109] LIN Y H, LI Y Y, WU X B, et al. NgAP2a targets *KCS* gene to promote lipid accumulation in *Nannochloropsis gaditana*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(19): 10305.
- [110] YU Z, PEI H Y, JIANG L Q, et al. Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two algae[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 904-914.
- [111] ALISHAH ARATBONI H, RAFIEI N, USCANGA-PALOMEQUE A C, et al. Design of a nanobiosystem with remote photothermal gene silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* to increase lipid accumulation and production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 61.
- [112] KRZEMIŃSKA I, SZYMAŃSKA M, CIEMPIEL W, et al. Auxin supplementation under nitrogen limitation enhanced oleic acid and MUFA content in *Eustigmatos calaminaris* biomass with potential for biodiesel production[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 594.
- [113] WANG Y, HU Y B, MO J Z, et al. Bioprospecting of *Chlamydomonas reinhardtii* for boosting biofuel-related products production based on novel aggregation-induced emission active extracellular polymeric substances nanoprobe[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 399: 130636.
- [114] PATNAIK R, KUMAR BAGCHI S, RAWAT I, et al. Nanotechnology for the enhancement of algal cultivation and bioprocessing: bridging gaps and unlocking potential[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 406: 131025.
- [115] RAFIEI N, ALISHAH ARATBONI H, ALEMZADEH A, et al. Nano-regulation of gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*: harnessing AuNPs for remotely switchable lipid biosynthesis via antisense oligonucleotides[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(6): 1694-1704.
- [116] PANIAGUA-MICHEL J, OLMOS-SOTO J, RUIZ M A.

- Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 892: 1-12.
- [117] LIU J, MAO X M, ZHOU W G, et al. Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis*[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 319-327.
- [118] HUANG J J, LIN S L, XU W W, et al. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(5): 597-618.
- [119] LIU J, SUN Z, GERKEN H, et al. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(6): 3487-3515.
- [120] WAN X, ZHOU X R, MONCALIAN G, et al. Reprogramming microorganisms for the biosynthesis of astaxanthin via metabolic engineering[J]. *Progress in Lipid Research*, 2021, 81: 101083.
- [121] ZHAO T, YAN X J, SUN L J, et al. Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 91: 354-361.
- [122] KUMAR S, KUMAR R, DIKSHA, et al. Astaxanthin: a super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2022, 62(9): 1064-1082.
- [123] NAIR A, AHIRWAR A, SINGH S, et al. Astaxanthin as a king of ketocarotenoids: structure, synthesis, accumulation, bioavailability and antioxidant properties[J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(3): 176.
- [124] AMBATI R R, PHANG S M, RAVI S, et al. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications: a review[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 128-152.
- [125] GALASSO C, OREFICE I, PELLONE P, et al. On the neuroprotective role of astaxanthin: new perspectives? [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(8): 247.
- [126] STACHOWIAK B, SZULC P. Astaxanthin for the food industry[J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2666.
- [127] SHAH M M, LIANG Y M, CHENG J J, et al. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 531.
- [128] ZHANG Y, SHI M C, MAO X M, et al. Time-resolved carotenoid profiling and transcriptomic analysis reveal mechanism of carotenogenesis for astaxanthin synthesis in the oleaginous green alga *Chromochloris zofingiensis*[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2019, 12(1): 287.
- [129] ZHANG Y, YE Y, BAI F, et al. The oleaginous astaxanthin-producing alga *Chromochloris zofingiensis*: potential from production to an emerging model for studying lipid metabolism and carotenogenesis[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2021, 14(1): 119.
- [130] DEBNATH T, BANDYOPADHYAY T K, VANITHA K, et al. Astaxanthin from microalgae: a review on structure, biosynthesis, production strategies and application[J]. *Food Research International*, 2024, 176: 113841.
- [131] ZHANG Y, YE Y, DING W, et al. Astaxanthin is ketolated from Zeaxanthin independent of fatty acid synthesis in *Chromochloris zofingiensis*[J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(3): 883-897.
- [132] CHEN Q H, LIU M M, MI W J, et al. Regulation mechanism of gibberellic acid-3 for astaxanthin biosynthesis in heterotrophic growing *Chromochloris zofingiensis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(46): 25574-25585.
- [133] SRIVASTAVA A, KALWANI M, CHAKDAR H, et al. Biosynthesis and biotechnological interventions for commercial production of microalgal pigments: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 352: 127071.
- [134] PEROZENI F, CAZZANIGA S, BAIER T, et al. Turning a green alga red: engineering astaxanthin biosynthesis by intragenic pseudogene revival in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(10): 2053-2067.
- [135] CECCHIN M, CAZZANIGA S, MARTINI F, et al. Astaxanthin and eicosapentaenoic acid production by S4, a new mutant strain of *Nannochloropsis gaditana*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 117.
- [136] GERSHENZON J, DUDAREVA N. The function of terpene natural products in the natural world[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(7): 408-414.
- [137] IMMETHUN C M, HOYNES-O'CONNOR A G, BALASSY A, et al. Microbial production of isoprenoids enabled by synthetic biology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 75.
- [138] WANG C L, LIWEI M, PARK J B, et al. Microbial platform for terpenoid production: *Escherichia coli* and yeast[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2460.
- [139] LIU C L, XUE K, YANG Y K, et al. Metabolic engineering strategies for sesquiterpene production in microorganism[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 42(1): 73-92.
- [140] ZHANG G, WANG H, ZHANG Z, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for terpenoids production: advances and perspectives[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 42(4): 618-633.
- [141] MA Y R, WANG K F, WANG W J, et al. Advances in the metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for the production of terpenoids[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 281: 449-456.
- [142] PAPAETHIMIOU D, DIRETTO G, DEMURTAS O C, et al. Heterologous production of labdane-type diterpenes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Phytochemistry*, 2019, 167: 112082.

- [143] DREESEN I A, CHARPIN-EL HAMRI G, FUSSENEGGER M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 145(3): 273-280.
- [144] DEMURTAS O C, MASSA S, FERRANTE P, et al. A *Chlamydomonas*-derived human papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61473.
- [145] BAÑUELOS-HERNÁNDEZ B, MONREAL-ESCALANTE E, GONZÁLEZ-ORTEGA O, et al. Algevir: an expression system for microalgae based on viral vectors[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1100.
- [146] STOFFELS L, TAUNT H N, CHARALAMBOUS B, et al. Synthesis of bacteriophage lytic proteins against *Streptococcus pneumoniae* in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(9): 1130-1140.
- [147] OCHOA-MÉNDEZ C E, LARA-HERNÁNDEZ I, GONZÁLEZ L M, et al. Bioactivity of an antihypertensive peptide expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 240: 76-84.
- [148] 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.
- [149] SUN M, QIAN K X, SU N, et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(13): 1087-1092.
- [150] HE D M, QIAN K X, SHEN G F, et al. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts[J]. Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, 2007, 55(1): 26-30.
- [151] 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.
- [152] 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.
- [153] YU H, DENG H X, HE J H, et al. UniKP: a unified framework for the prediction of enzyme kinetic parameters[J]. Nature Communications, 2023, 14: 8211.
- [154] WANG X X, XIN Y, REN L H, et al. Positive dielectrophoresis-based Raman-activated droplet sorting for culture-free and label-free screening of enzyme function *in vivo* [J]. Science Advances, 2020, 6(32): eabb3521.
- [155] TENG S Y, YEW G Y, SUKAČOVÁ K, et al. Microalgae with artificial intelligence: a digitalized perspective on genetics, systems and products[J]. Biotechnology Advances, 2020, 44: 107631.



**通讯作者:** 路延笃(1982—),男,教授,博士生导师。研究方向:以建立藻源生物活性物质与生物制品产业体系为目标,在热带海洋生物活性物质开发、合成生物学体系建立和海洋生物制品生产体系构建方面开展研究。

E-mail: ydlu@hainanu.edu.cn



**第一作者:** 张旭(1997—),男,博士研究生。研究方向:以光合微藻为研究对象,利用合成生物技术推动高价值功能制品的微生物制造体系构建。

E-mail: 24110710000062@hainanu.edu.cn