

БИОДИЗЕЛЬ ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ: ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ЛИПИДОВ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Микроскопические водоросли рассматриваются как один из наиболее перспективных продуцентов липидов для производства биодизеля. В обзоре представлены результаты исследований по увеличению экспрессии генов, непосредственно включенных в биосинтез жирных кислот. Повышение эффективности механизмов поглощения солнечной энергии и фиксации диоксида углерода влияет на продуктивность микроводорослей. Блокирование экспрессии генов, ответственных за синтез крахмала, изменяет баланс в сторону увеличения количества липидов в клетке. Изменение длины углеродной цепи жирных кислот в сторону ее укорочения важно в технологии производства биодизеля. Управление путями катаболизма липидов — еще одно из направлений повышения их количества. И, наконец, использование методов анализа транскриптома позволяет глубже изучить процессы интенсивного накопления липидов в стрессовых условиях с целью управления этими процессами.

Введение

Наиболее важными причинами всплеска интереса к производству биодизеля из микроскопических водорослей (микроводорослей) являются увеличивающиеся объемы использования жидких топлив, что влечет за собой быстрое сокращение запасов ископаемых углеводородов и беспрецедентное увеличение количества парниковых газов — основной причины глобального потепления [1]. По сравнению с другими источниками липидов, такими как животные жиры, традиционно возделываемые масличные сельскохозяйственные культуры и масличная пальма, микроводоросли выделяются рядом существенных преимуществ: 1) количество получаемого масла на единицу площади намного выше по сравнению с традиционными маслосодержащими культурами за счет более эффективной конверсии солнечного света [2, 3]; 2) микроводоросли можно выращивать в разнообразных условиях — пресная, солоноватая, морская вода являются

идеальными для культивирования многих видов, даже сточные воды предприятий и городских канализаций, обогащенные неорганическими ионами (NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}) пригодны для культивирования множества видов [4]; 3) в процессе фотосинтеза микроводоросли адсорбируют значительное количество CO_2 , превращая в энергию химических связей и биомассу; эффективное поглощение диоксида углерода из атмосферы может приостановить угрожающие изменения климата планеты, связанные с парниковым эффектом [4, 5], поскольку для получения 100 т биомассы микроводорослей расходуются 183 т атмосферного диоксида углерода [6]; 4) микроводоросли могут служить сырьем для многих видов топлива — биодизеля, этанола, водорода, метана, которые легко разрушаются в окружающей среде и поэтому могут более эффективно использоваться, чем традиционные виды топлив [7]; 5) биомасса микроводорослей может быть переработана с получением таких ценных продуктов, как каротиноиды, омега-3-жирные кислоты, стеролы, а также другие пигменты и антиоксиданты [8].

Микроводоросли, насчитывающие более 50 тыс. видов, встречаются в самых различных экосистемах. На сегодня изучено около 30 тыс. видов [9], но для интенсивного коммерческого культивирования, всплеск которого наблюдается в последние 40–50 лет, используются всего несколько видов микроводорослей [10]. Крупномасштабное выращивание водорослей начато в 60-х годах XX столетия в Японии [11], и первым объектом была *Chlorella*. Впоследствии увеличивались производственные мощности по выращиванию микроводорослей, а также расширялось количество используемых видов. Так, например, в 1980 г. во всем Азиатском регионе производство *Chlorella* составляло 1 т в месяц, а в 1996 г. — 2000 т в месяц только лишь в Японии [12]. Второй по значимости среди культивируемых микроводорослей яв-

ляется *Spirulina*, за которой следует *Dunaliella salina*, служащая источником β-каротина. Особенно динамично производство этих микроводорослей стало возрастать в конце прошлого столетия [10].

Энергетический кризис середины 70-х годов подтолкнул развитые страны к поиску альтернативных источников жидких топлив, что повлекло значительные инвестиции в научные исследования, связанные с изучением новых технологий получения возобновляемых углеводородов. Внимание многих исследователей было обращено на масличные культуры, традиционно выращиваемые для получения растительных масел, использовавшихся издревле в пищевых целях. Растительные жиры стали основой сырьевой базы биодизеля первого поколения. Особенно ярко прослеживается стремительный рост производства биодизеля в последнее десятилетие. Производство биодизеля в странах Европейского Союза увеличилось с 1,9 млн т в 2004 г. до 3,2 млн т в 2005 г. и до 4,9 млн т в 2006 г. [13]. В 2011 г. в странах ЕС произведено 22,117 млн т биодизеля [14]. Еще более активными темпами нарастало производство биодизеля в США: если в 2008 г. было произведено 21,73 млн т, то в 2011 г. — уже более 31,5 млн [15]. Однако критические замечания и протесты относительно использования пищевых масел в качестве сырья для производства биодизеля заставили правительства многих стран переориентироваться на другие источники растительных жиров, среди которых наиболее перспективными являются липиды из микроводорослей.

Проблема получения биодизеля из микроводорослей обсуждалась более 50 лет назад [18], но только кризис 70-х подтолкнул правительства США и Японии к финансированию программ получения энергии из микроводорослей [5, 19]. Хотя содержание общих липидов в расчете на сухую массу в разных видах микроводорослей широко варьирует — от 2 % у сине-зеленых (роды *Anabaena* и *Oscillatoria*) до 75 % у диатомовых (род *Phaeodactylum*) [16, 17] — среди фотосинтезирующих организмов эта группа растений представлена наиболее эффективными продуцентами липидов, из которых впоследствии с помощью простых химических превращений получают биодизель [6].

Для производства биодизеля необходимо иметь технологию получения липидов, в которой центральное место занимает штамм — продуцент липидов. Идеальным объектом в этом смысле может быть штамм с высоким потенциалом к накоплению липидов без стрессовых условий, способный переносить значительную инсоляцию и нагрев, а клетки такого штамма должны быть крупными и с тонкой мембраной. Штамм должен быть устойчивым к высоким концентрациям кислорода, а клетки обладали бы способностью к росту при одновременном накоплении липидов, формируя при этом хлопьеобразные колонии. Вместе с тем такой штамм должен быть стабильным и устойчивым к различным инфекциям. Ему также должно быть присуще такое ценное свойство, как выделение синтезированных липидов в окружающую среду, и это далеко не все требования к высокотехнологичному штамму.

Очевидно, что без дальнейшего изучения физиологии, биохимии и генетики таких микроводорослей с применением современных методов метабомики и геномики невозможно разработать эффективные подходы к направленному изменению важных их характеристик с целью получения высоко-эффективных штаммов-продуцентов липидов. Последнее может быть достигнуто с помощью генетической инженерии. Поэтому настоящий обзор посвящен основным направлениям улучшения штаммов микроводорослей с использованием методов генетической инженерии.

Жирнокислотный состав и биосинтез липидов микроводорослей

Микроводоросли синтезируют широкий спектр липидов: три- и диглицериды, фосфо- и гликолипиды, углеводороды и др. [6, 16, 17, 20, 21]. Сначала изучение липидов микроводорослей проводилось с точки зрения их пищевой и фармацевтической ценности [22–26], однако в последние 15–20 лет наблюдается все больший интерес к их использованию в качестве сырья для производства биодизеля [5, 17, 27, 28–33].

Липиды, встречающиеся в микроводорослях, подразделяют по их химическим свойствам, как и обычно, на два больших класса — по-

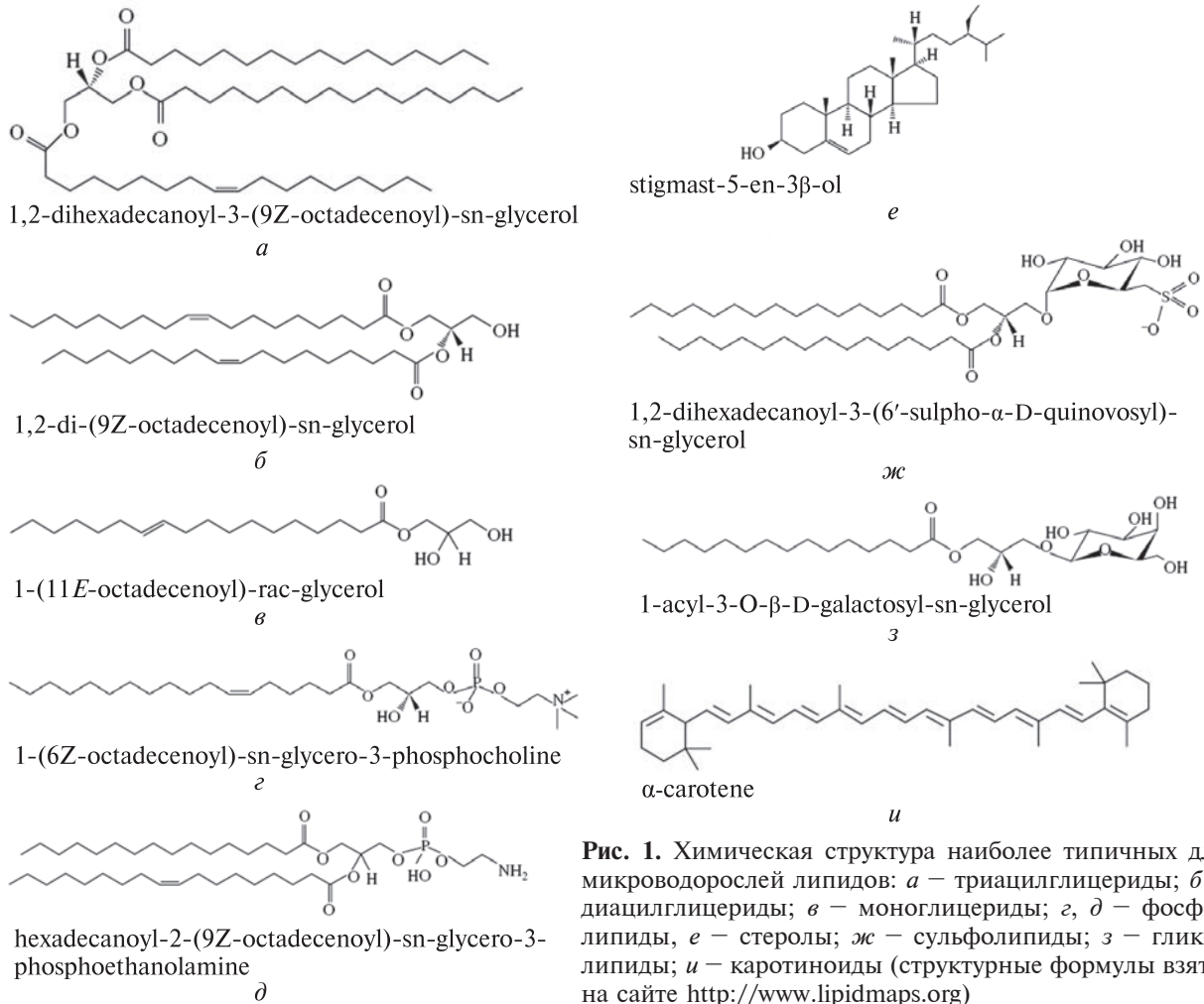


Рис. 1. Химическая структура наиболее типичных для микроводорослей липидов: *a* – триацилглицериды; *b* – диацилглицериды; *v* – моноглицериды; *z*, *d* – фосфолипиды, *e* – стеролы; *ж* – сульфолипиды; *з* – гликолипиды; *и* – каротиноиды (структурные формулы взяты на сайте <http://www.lipidmaps.org>)

лярные и нейтральные, которые часто называют простыми, или неполярными [34]. Основные их структурные формулы представлены на рис. 1 [3]. К нейтральным относятся три-, ди- и моноглицериды, воски, изопrenoидные липиды (например каротиноиды). К полярным относятся фосфолипиды (например, фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин и др.) и гликолипиды (в комбинации олигосахаридов и липидов), а также отдельной важной подгруппой являются гликолипиды – эфиры жирных кислот и глицерола (например моногалактозилдиглицерол), в которых одна из гидроксигрупп глицерола объединена с молекулой сахара, формируя таким образом сложные эфиры жирных кислот.

Системные сведения о качественном состав-

ве липидов микроводорослей важны в свете того, что этот показатель имеет важное значение для дальнейших процессов химического превращения с целью получения биодизеля. Существующие технологии переработки масел, полученных из семян растений, оптимизированы под сырье, содержащее не менее 95 % триглицеридов. Качественные и количественные характеристики липидов, получаемых из микроводорослей, в значительной степени зависят от используемых видов, состава культуральной среды, условий культивирования и сбора урожая микроводорослей. Так, например, во многих исследованиях показано, что композиция липидов в значительной мере варьирует в зависимости от стадии цикла развития, питательной среды и чередования

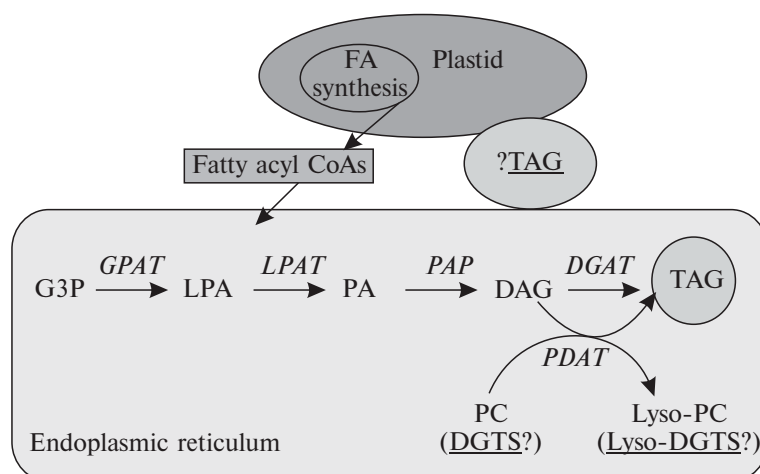


Рис. 2. Три основных пути формирования триглицеридов в клетках *Chlamydomonas reinhardtii*. Подчеркнуты недостаточно изученные этапы, требующие дополнительной проверки и подтверждения: DAG – диацилглицерол, GPAT – глицерол-3-фосфат, LPAT – ацилтрансфераза лизофосфатидной кислоты, LPA – лизофосфатидная кислота, PA – фосфатидная кислота, PAP – фосфатаза фосфатидной кислоты, TAG – триацилглицерол, DGTS – диацилглицеролтриметилгомосерин (схема из сайта: http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag_algae/index.htm)

световой/темновой фаз в течение суток [16, 17, 35–38].

Для понимания, каким образом можно повлиять на процессы образования жирных кислот и их метаболизма в клетках микроводорослей, необходимо кратко рассмотреть основные процессы, в которые они вовлечены. Вследствие разнообразия липидов существует большое количество путей их биосинтеза. В целом, можно выделить три основных этапа их синтеза, к которым относятся: биосинтез жирных кислот, синтез триглицеридов и, наконец, их мобилизация в олеосомы, как это изображено на рис. 2 [39].

В работах [20, 21, 40, 41] подробно рассмотрен путь синтеза жирных кислот с последующим превращением их в триглицериды. Так, на первом этапе при участии ацетил-КоА-карбоксилазы как катализатора из CO_2 , АТФ и ацетил-КоА формируется малонил-КоА (рис. 3) [42–45]. Затем полученный малонил используется в приращении ацильной группы как основной источник углерода [46]. На следующей стадии происходит перенос ацильной группы, который характеризуется включением протеинового кофактора или ацилпереносащего белка (АСР) и двух молекул ацетил-КоА. В то время как комплекс малонил-КоА/АСР

высокоспецифичен, ацетил-КоА/АСР имеет меньшее сродство и может реагировать с другими низкомолекулярными компонентами ацил-КоА, такими как пропионил-КоА, и давать, таким образом, начало приращению к разному количеству атомов углерода, приводящему к ветвлению жирных кислот. Несмотря на довольно распространенное ветвление жирных кислот у бактериальных липидов, это явление встречается у микроводорослей довольно редко. Синтезированные жирные кислоты включаются в липидные компоненты либо хлоропластов, либо эндоплазматического ретикула [47]. Эти пути использует глицерол-3-фосфат как «леса» для последовательного присоединения жирных кислот, восполняемых ацил-КоА.

Происхождение и метаболический путь ацетил-КоА для такой реакции – важная точка регуляции этой части пути синтеза липидов. Ацетил-КоА может быть получен в процессе гликолиза, локализованного в пластидах или цитозоле, или же непосредственно из цикла Кальвина (световая фаза). Цитозольный гликолиз в растительных клетках тесно связан с деградацией сахарозы, в результате чего образуются фруктозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфат и, наконец, фосфоенолпируват. Последний мо-

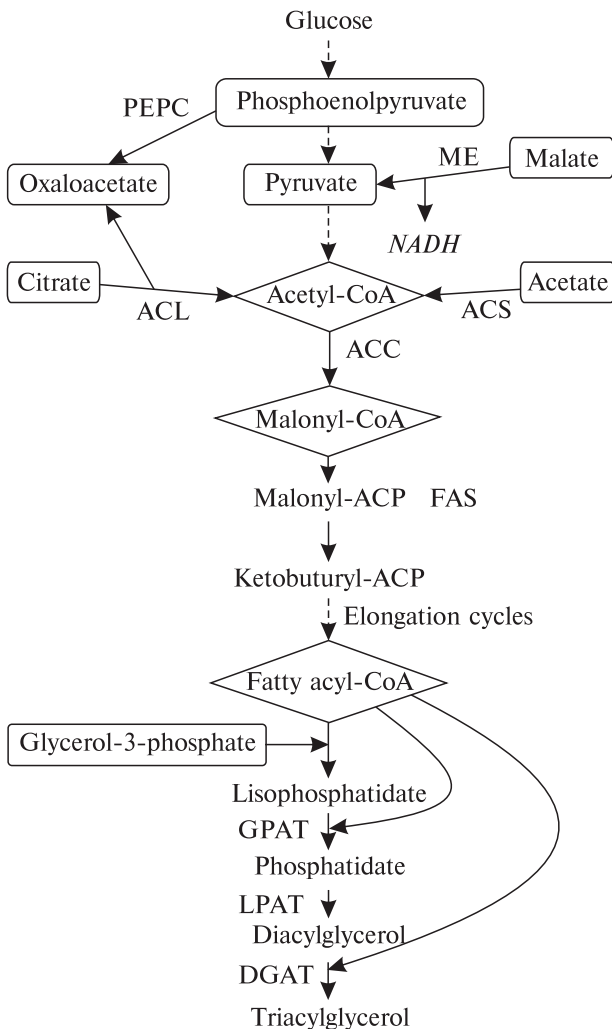


Рис. 3. Синтез жирных кислот и триацилглицеролов [40]

жет быть легко перенесен в хлоропласты, вовлекаясь там в различные пути метаболизма, одним из которых является синтез жирных кислот. Детальное обсуждение регуляции синтеза липидов можно найти в работе [48], где также обсуждается возможность использования ацетил-КоА и малонил-КоА в хлоропластах.

Указанный цикл – не единственный. Существует еще так называемый кругооборот жирных кислот – путь, при котором используются присутствующие в клетке жирные кислоты, например, липиды мембран. Показано, что в быстрорастущих клетках липидный метаболизм сосредоточен на синтезе липид-

ных мембран [41, 49]. Большинство липидов в таком случае синтезируются вновь. Например, в случае синтеза в стрессовых условиях только половина из увеличивающегося количества липидов синтезируется заново, в то время как остальные из накопленных липидов являются результатом переработки существующих жирных кислот, например, содержащихся в мембранах клетки или органелл.

Регуляция метаболизма триглицеридов происходит на нескольких уровнях в зависимости от внутреннего состояния клетки и внешних воздействий на нее. Так, показано повышение активности специфической к мембранным липидам ацилгидролазы в клетках *D. salina* при дефиците азота [36]. Подобные процессы проходят и в дрожжевых клетках: наблюдается снижение активности разрушающей триглицериды липазы на обедненных средах. Авторы предполагают, что жирные кислоты преимущественно сохраняются и аккумулируются в виде триглицеридов только для того, чтобы стать быстро мобилизуемыми для выхода из дефицита питания [49].

Применение методов генетической инженерии микроводорослей с целью повышения эффективности накопления липидов

В многочисленных обзорах обсуждаются как традиционные методы селекции микроводорослей по тем или иным интересующим исследователей признакам, так и генно-инженерные подходы с целью получения высокоэффективных штаммов [6, 50–52]. В последнее время нами проведены исследования по оценке биоэнергетического потенциала одной из самых больших отечественных коллекций штаммов микроводорослей – IBASU-A [53–55]. По сложившимся классическим подходам для повышения синтеза липидов необходимы изменения в путях их биосинтеза. Вначале кратко остановимся на работах, в которых предпринимались попытки изменения жирнокислотного синтеза у высших «традиционных» масличных растений. Исследования проводились на более ранних стадиях, с одной стороны, в направлении повышения экспрессии генов, включенных непосредственно в биосинтез жирных кислот, и с другой – в направлении «выключения» генов, ответственных за катабо-

лизм жирных кислот. Один из главных этапов синтеза — превращение ацетил-КоА в малонил-КоА, катализируемый ацетил-КоА-карбоксилазой (АКоАК) (рис. 3). Однако несколько попыток использования стратегии повышения экспрессии гена, ответственного за синтез ацетил-КоА-карбоксилазы, привели к несколько неожиданным результатам. Несмотря на увеличившуюся в 2–3 раза активность ацетил-КоА-карбоксилазы в трансформированных диатомовых водорослях *Cyclotella cryptica* и *N. saprophila* увеличение синтеза липидов не произошло [5, 56]. Констатировали также повышенную экспрессию АКоАК, клонированной из *A. thaliana*, в рапсе (*B. napus*) и картофеле (*Solanum tuberosum*) [57, 58]. Однако в результате получили лишь на 6 % больше жиров в трансгенном рапсе по сравнению с контрольным не трансформированным сортом. В клубнях трансгенного картофеля наблюдали пятикратное увеличение содержания триглицеридов (с 0,0116 до 0,0580 мг/г сырой массы). Это может свидетельствовать о том, что уровни АКоАК являются лимитирующим фактором как раз в клетках, которые обычно не специализированы для хранения больших количеств липидов. Предпринимались попытки увеличения количества и других ферментов, принимающих участие в синтезе жирных кислот. Например, увеличение экспрессии гена, кодирующего 3-кетоацил-АСР-синтазу, который клонирован из шпината, не привело к увеличению уровня жирных кислот в трансгенных табаке, рапсе и арабидопсисе [59].

В целом можно сказать, что повышение экспрессии генов, задействованных в липидном синтезе, не имело сколько-нибудь серьезного влияния на повышение уровня липидов в трансгенных растениях. Однако стоит заметить, что повышенная экспрессия глицерол-3-фосфат дегидрогеназы в семенах рапса привела к повышению масла в семенах на 40 % [60]. Этот фермент принимает участие в синтезе глицерол-3-фосфата, необходимого для формирования триацилглицеролов. Такой результат дает основание предполагать, что как раз гены, вовлеченные в формирование триглицеролов, являются ключевым звеном, влияющим на их количество в клетке. Некоторые исследования подтверждают эти предположения. Так, овер-

экспрессия генов, ответственных за синтез глицерол-3-фосфат ацилтрансферазы, кислой лизофосфатид ацилтрансферазы или диацилглицерол ацилтрансферазы, приводила к значительному повышению синтеза липидов в растениях [61–64]. Учитывая полученные результаты, следует в первую очередь прилагать усилия в сторону повышения экспрессии этих генов для большего выхода триглицеридов в микроводорослях.

По справедливому замечанию Schuhmann et al. [65], прекурсоры и энергия, необходимые для синтеза липидов, поставляются за счет фотосинтеза и фиксации диоксида углерода. Из этого следует, что логично направлять усилия на улучшение клеточных механизмов поглощения солнечной энергии и углерода. Светопоглощающий комплекс играет центральную роль в процессе фотосинтеза. Фотосинтезирующие организмы легко адаптируются к условиям освещенности, увеличивая световосприимчивую антенну при низкой интенсивности света и, наоборот, уменьшая ее при возрастании светового потока. Однако часто получаемая клеткой световая энергия превосходит фотосинтетические способности клетки, и ее небезопасный избыток рассеивается с помощью флюоресценции хлорофилла. Клетки, находящиеся близко к поверхности, получают большое количество световой энергии, в то же время клетки, находящиеся в глубине, получают оптимальное для фотосинтеза излучение. В работе Polle et al. [66] показано, что с помощью РНК-технологии был уменьшен уровень светопоглощающего белка II (LHC — light-harvesting complex), что привело к изменению цвета культуры и улучшило ее светопоглощающие способности. Это в свою очередь способствовало увеличению ростовых характеристик при высокой интенсивности освещения. В другой работе использовали иную стратегию — получен мутантный клон путем инсерции в ДНК, что привело к редукции размеров антенны [66]. Интересный подход к улучшению фотосинтетических способностей, который, возможно, сыграет значительную роль в повышении продуктивности микроводорослей, предпринят O'Neill et al. [68].

Помимо повышения эффективности светопоглощения проводились и работы по улуч-

шению механизмов ассимиляции углерода. Возможность изменения поглощения углерода представителем диатомовых — *P. tricornutum* — с помощью переноса генов, которые клонированы из разных организмов, ответственных за транспорт глюкозы, показана Zaslavskaja et al. [68]. Однако экономически оправданная биотехнология усвоения углерода находится скорее всего в механизмах концентрации CO₂ [69] или фиксации, катализируемой энзимами [70].

Другой возможный подход к повышению уровня липидов в клетках — блокирование метаболических путей синтеза высокоэнергетических соединений, таких как крахмал. Как известно, для синтеза крахмала необходимы те же исходные вещества, что и для синтеза липидов. Другими словами, это два процесса, конкурирующих за исходные субстраты — углеводы [71, 72]. В ряде публикаций [73–76] обсуждаются результаты исследований двух крахмал-дефицитных штаммов *C. reinhardtii* — *stab* и *sta7*, содержащих мутации в генах АДФ-глюкозо пиррофосфорилазе и изоамилазе соответственно. В работе [4] сообщается о повышенных уровнях триглицеридов в этих штаммах при стрессе на фоне недостатка азота. Work et al. [77] сообщают об аналогичных результатах на мутантных по изоамилазе штаммах *sta7-10* *C. reinhardtii*. В другом дефицитном по крахмалу мутантном штамме *Chlorella pyrenoidosa* также установлено повышение уровня полиненасыщенных жирных кислот [78]. В своих статьях Li et al. [79, 80] показали, что мутантный по локусу *STA6* штамм *C. reinhardtii* накапливает в 10 раз больше липидов по сравнению с диким штаммом.

Стоит отметить, что удачные изменения метаболизма в сторону повышения уровня липидов достигнуты не только в высших растениях, но и в дрожжах и бактериях. Генно-инженерные манипуляции с *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* по гиперэкспрессии или «выключению» генов привели к довольно широкой модуляции всех метаболических путей. Такие модификации труднодостижимы в отношении микроводорослей, но они могут быть выполнимы с видами, для которых разработаны методики генетической трансформации, и соответствующими селективными маркерами.

Примером одной из удачных всеобъемлющих модификаций *E. coli* можно назвать 20-кратное увеличение синтеза липидов как результат увеличения экспрессии генов (включая ацетил-КоА карбоксилазу), ответственных за синтез и выключение генов, продукты которых участвуют в процессе окисления [81]. В других исследованиях показано, что длинноцепочечные жирные кислоты могут ингибировать синтез жирных кислот и что это ингибирование может быть обеспечено экспрессией специфических тиостераз [82, 83].

Уменьшение расхода липидов в процессе клеточного катаболизма — еще один путь повышения их содержания в клетке. Активирование генов, включенных в биосинтез, и деактивирование генов, участвующих в β-окислении жирных кислот, в некоторых случаях приводит к повышению уровня липидов. Для этого чаще всего используют либо методы мутагенеза, либо методику антисмысловых РНК, приводящие к эффекту «молчания» генов [84–86]. Moellering et al. [87], используя методику антисмысловых РНК с целью понижения экспрессии гена, ответственного за размер липидных капель, получили трансгенные клоны *C. reinhardtii* с увеличенными размерами жировых глобул. В то же время это не повлияло на общее количество триглицеридов в трансгенах. Однако при использовании таких подходов не все так однозначно: выключение генов, принимающих участие в процессах катаболизма жирных кислот, приводило к последствиям, пагубно влияющим на рост и пролиферацию клеток. Так, например, деактивация пероксисомальной длинноцепочечной ацил-КоА-синтетазы в арабидопсисе ингибировала распад жиров в семенах, тем самым повышая их уровень. Однако процессы нормального развития семян также тормозились без дополнительных источников азота [88]. Подобную картину наблюдали при блокировании 3-кетотацил-КоА тиолазы в *Arabidopsis thaliana* [89]. Другие проблемы, связанные с уменьшением/отключением катаболизма жирных кислот, заключаются во множественности ферментов с дублирующими функциями на всех ступенях их окисления, что препятствует полному блокированию процесса разрушения липидов. Примером могут служить короткоцепочечные

ацил-КоА оксидазные ферменты ACSX3 и ACSX4 в арабидопсисе. Растения с единичными мутациями ACSX3 или ACSX4 имели нормальный распад жиров и развитие семян, в то время как мутантные по обеим ACSX3 и ACSX4 нежизнеспособны, вероятнее всего, из-за полной элиминации ацил-КоА оксидазной активности [90]. В некоторых исследованиях ингибирование жирнокислотного окисления приводило к неожиданным результатам. Так, в нескольких публикациях [91–93] авторы сообщают не только о повышении количества внутриклеточных свободных жиров, но и о случаях их секреции за пределы клетки.

Если рассматривать проблему всецело, то дело не только в увеличении количества липидов, но и в их качественном составе. Для производства биодизеля наиболее подходят жирные кислоты с длиной углеродного остова 12–14 атомов. Основная масса микроводорослей синтезируют липиды с длиной цепи в 14–20 атомов углерода. Фермент ацил-АСР тиостераза отвечает за длину цепи и для нее характерна видоспецифичность: в различных организмах под воздействием этого фермента формируются липиды разной длины. В работах [83, 94] представлены результаты, показывающие возможность изменения длины жирных кислот за счет трансформации конструкции, в состав которой включен ген тиостеразы (12:0-смещенной), клонированный из *Umbellularia californica*. В полученных трансгенных линиях *A. thaliana* и *E. coli* наблюдали существенные изменения качественного состава липидов в сторону увеличения количества лауриновой кислоты (C12). Подобным же образом ген тиостеразы (14:0-смещенной), клонированный из *Cinnamomum camphorum* и трансформированный в *A. thaliana* и *E. coli*, существенно повлиял на уровень миристиновой кислоты (C14) в сторону его повышения [95]. В недавно опубликованной работе с использованием этих же конструкций авторы сообщают о подобных изменениях в трансгенной микроводоросли *Phaeodactylum tricorutum* [96]. Выход лауриновой кислоты вырос на 6,2 % и миристиновой на 12 % по отношению к исходному нетрансгенному клону. Для производства бензина и авиационного топлива используют жирные кислоты с еще более ко-

роткими углеродными цепями. Для укорочения традиционно используют гидрокрекинг. Но с целью уменьшения затрат можно воспользоваться методами генной инженерии. Например, гиперэкспрессия 8:0- и 10:0-смещенной тиостеразы в рапсе, клонированной из *Cuphea hookeriana*, привела к увеличению синтеза короткоцепочечных жирных кислот [97].

Рассмотренные пути повышения количества и изменения качества жирных кислот в традиционно выращиваемых для этих целей растениях вполне могут быть применимы и к микроводорослям. По мнению Radakovits et al. [98], еще одна важная особенность вполне может быть рассмотрена в качестве альтернативного пути повышения накопления липидов микроводорослями. Это сложные изменения экспрессии генов в стрессовых условиях — при недостатке азотного питания, когда прекращаются процессы пролиферации и начинается активный синтез липидов и крахмала [21]. В таком случае повышенная экспрессия генов, ответственных за синтез липидов, может быть полезной, если будет контролироваться индуцибельным промотором, который можно активировать на определенной стадии развития клетки и при определенной плотности суспензии. Примерами таких промоторов в микроводорослях могут служить чувствительный к меди промотор у *C. reinhardtii* [99] и нитрат, чувствительный у представителей диатомовых [100].

И наконец, в недавних публикациях открываются новые подходы, заключающиеся в попытках анализа транскриптома микроводорослей с целью осмысления происходящих в стрессовых условиях процессов интенсивного накопления липидов. Одной из первых в этом направлении стала работа [101], в которой авторы сообщают о секвенировании генома и развитии метода трансформации для *Nannochloropsis gaditana*. Упомянутые исследования позволили определить узкие места синтеза триглицеридов, что позволило выработать дальнейшую стратегию улучшения данного штамма по увеличению синтеза липидов. Среди потенциальных мишеней — гены, задействованные в синтезе триглицеридов (*Nga21116*, *Nga02737*), а также гены триацилглицерол липазы (*Nga30958*, *Nga30749*) и ацил-КоА окси-

дазы (*Nga03053*, *Nga04370.1*, *Nga30819*). Крім того, інтересні для дослідження в отношении підвищеної експресії гени вуглеродної ангидрази і транспортази бикарбонатів. В роботі Wan et al. [102] також використано підхід транскриптомного аналізу одноклеточної поцвенної жовто-зеленої мікродорослі *Eustigmatos cf. polyphem*. В результаті проведених досліджень виявлені основні шляхи біосинтезу і катаболізму більшості вуглеводів, жирних кислот, каротиноїдів і триглицеролів в *Eustigmatos cf. polyphem*. Отримані дані будуть використані в основі молекулярно-генетических досліджень в області функціональної геноміки для корекції усилий в області метаболічної інженерії, направлених на підвищення якісних характеристик мікродорослей як сировини для виробництва біопалива.

В.И. Корховой, Я.Б. Блюм

Institute of Food Biotechnology and Genomics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: korkhovy_v@ukr.net

BIODIESEL FROM MICROALGAE: WAYS OF INCREASING EFFECTIVENESS OF LIPIDS ACCUMULATION BY GENETIC ENGINEERING METHODS

Microalgae are viewed as one of the most perspective producer of lipids for biodiesel production. The review shows the results of researches of genes' expression increase actually included in fatty acids biosynthesis. The increase of effectiveness of solar energy absorption and carbon dioxide fixation influences the microalgae productivity. Blocking expression of genes that are responsible for starch synthesis, changes the balance towards the quantity growth of lipids in the cell. The change of the length in fatty acids carbon backbone chain towards its shortening is important in the technology of biodiesel production. Operating processes of lipids' catabolism is another way of increasing their quantity. And at last using the methods of transcription analysis allows us to get deeper into the process of intensive accumulation of lipids in stressful conditions for the purpose of directing these processes.

В.И. Корховой, Я.Б. Блюм

БІОДИЗЕЛЬ З МІКРОВОДОРОСТЕЙ: ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ НАКОПИЧЕННЯ ЛІПІДІВ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Мікроскопічні водорості розглядаються як один з найбільш перспективних продуцентів ліпідів для виробництва біодизеля. В огляді представлено ре-

зультати досліджень по збільшенню експресії генів, які безпосередньо беруть участь у синтезі жирних кислот. Підвищення ефективності механізмів поглинання сонячної енергії та фіксації діоксиду вуглецю впливає на продуктивність мікродорослей. Блокування експресії генів, відповідальних за синтез крохмалю, змінює баланс в бік збільшення ліпідів у клітині. Зменшення довжини вуглецевого ланцюга важливе в технології виробництва біодизеля. Керування шляхами катаболізму ліпідів – ще один з напрямів збільшення їх кількості. І, насамкінець, використання методів аналізу транскриптома дозволяє глибше вивчити процеси інтенсивного накопичення ліпідів в умовах стресу з метою керування цими процесами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Parry M., Arnell N., Nicholls R. et al. Millions at risk: defining critical climate change threats and targets // *Global Environ. Change.* – 2001. – **11**. – P. 181–183.
2. Schenk P.M., Thomas-Hall S.R., Stephens E. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production // *Bioenerg. Res.* – 2008. – **1**. – P. 20–43.
3. Greenwell H.C., Laurens L.M.L., Shields R.J. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges // *J. R. Soc. Interface.* – 2010. – **7**. – P. 703–726.
4. Wang Z.T., Ullrich N., Joo S. et al. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starch-less *Chlamydomonas reinhardtii* // *Eukaryot. Cell.* – 2009. – **8**, № 12. – P. 1856–1868.
5. Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roesler P. A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. – Department of Energy, Golden, CO, 1998.
6. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // *Biotech. Adv.* – 2007. – **25**. – P. 294–306.
7. Delucchi M.A. A Lifecycle Emission Model (LEM): Lifecycle emissions from transportation fuels; motor vehicles, transportation modes, electricity use, heating and cooking fuels / Institute of Transport Studies, Univ. California : Davis, 2003.
8. Wang B., Li Y., Wu N., Lan C.Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – **79**. – P. 707–718.
9. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and phyecology* / Ed. A. Richmond. – Oxford : Blackwell publ., 2004. – 588 p.
10. Borowitzka M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters // *J. Biotechnol.* – 1999. – **70**. – P. 313–321.
11. Tsukada O., Kawahara T., Miyachi S. Mass culture of

- Chlorella* in Asian countries // Biological Solar Energy Conversion / Eds A. Mitsui et al. – New York : Acad. Press, 1977. – P. 363–365.
12. Lee Y.K. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim // J. Appl. Phycol. – 1997. – 9. – P. 403–411.
 13. Li Q., Du W., Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – 80. – P. 749–756.
 14. European Biodiesel Board. The EU biodiesel industry. Available online: <http://www.ebb-eu.org/stats.php> (accessed on 18 January 2012).
 15. TUSNBB. Production statistics. Available online: <http://www.biodiesel.org/production/production-statistics> (accessed on 18 January 2012).
 16. Басова М.М. Жирнокислотный состав липидов некоторых видов микроводорослей // Альгология. – 2005. – 15. – P. 415–436.
 17. Sharma K.K., Schuhmann H., Schenk P.M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production // Energies. – 2012. – 5. – P. 1532–1553.
 18. Oswald W.J., Golueke C.G. Biological transformation of solar energy // Adv. Appl. Microbiol. – 1960. – 2. – P. 223–262.
 19. Usui N., Ikenouchi M. Energy Convers. Manage. 38 (suppl. 1), S487. – 1997.
 20. Hu D.W., Liu H., Yang C.L., Hu E.Z. The design and optimization for light-algae bioreactor controller based on Artificial Neural Network-Model Predictive Control // Acta Astronaut. – 2008. – 63. – P. 1067–1075.
 21. Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances // Plant J. – 2008. – 54. – P. 621–639.
 22. Brockerhoff H., Hoyle R.J., Hwang P.C., Litchfield C. Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals // Lipids. – 1968. – 3. – P. 24–29.
 23. Radmer R.J., Parker B.C. Commercial applications of algae : Opportunities and constraints // J. Appl. Phycol. – 1994. – 6. – P. 93–98.
 24. Becker E.W. Microalgae in human and animal nutrition // Handbook of Microalgal Culture / Ed. A. Richmond. – Oxford : Blackwell Publ., 2004. – P. 312–351.
 25. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – 101. – P. 87–96.
 26. Milledge J.J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. – 2011. – 10. – P. 31–41.
 27. Roessler P.G., Brown L.M., Dunahay T.G. et al. Genetic-engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae // ACS Symp. Ser. – 1994. – 566. – P. 255–270.
 28. Sawayama S., Inoue S., Dote Y., Yokoyama S.-Y. CO₂ fixation and oil production through microalga // Energy Convers. Manage. – 1995. – 36. – P. 729–731.
 29. Banerjee A., Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals // Crit. Rev. Biotechnol. – 2002. – 22. – P. 245–279.
 30. Scott S.A., Davey M.P., Dennis J.S. et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects // Curr. Opin. Biotechnol. – 2010. – 21. – P. 277–286.
 31. Quinn J.C., Catton K., Wagner N., Bradley T.H. Current large-scale US biofuel potential from microalgae cultivated in photobioreactors // Bioenerg. Res. – 2012. – 5, № 1. – P. 49.
 32. Singh A., Nigam P.S., Murphy J.D. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels // Biores. Technol. – 2011. – 102. – P. 10–16.
 33. Ahmad A.L., Mat Yasin N.H., Derek C.J.C., Lim J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production : A review // Renewable and Sustainable Energy Rev. – 2011. – 15. – P. 584–593.
 34. Christie W.W. Lipid analysis. – Bridgewater, NJ: Oily Press, 2003.
 35. Sato N., Murata N., Ueta N. Effect of growth temperature on lipid and fatty acid composition in the blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans* // Biochim. biophys. acta. – 1979. – 572. – P. 19–28.
 36. Cho S.H., Thompson G.A.Jr. Properties of a fatty acid hydrolase preferentially attacking monogalactosyldiacylglycerols in *Dunaliella salina* chloroplasts // Biochim. biophys. acta. – 1986. – 878. – P. 353–359.
 37. Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae // J. Phycol. – 1994. – 30. – P. 972–979.
 38. Fidalgo J.P., Cide A., Torres E. et al. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana* // Aquaculture. – 1998. – 166, № 1/2. – P. 105–116.
 39. Li-Beisson Y. Triacylglycerol biosynthesis in eukaryotic microalgae // http://lipidlibrary.aocs.org/plant-bio/tag_algae/index.htm
 40. Courchesne N.M.D., Parisien A., Wang B., Lan C.Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches // J. Biotechnol. – 2009. – 141. – P. 31–41.
 41. Roessler P.G. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency // Arch. Biochem. Biophys. – 1988. – 267. – P. 521–528.

42. Davis M.S., Solbiati J., Cronan J.E.Jr. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 37. – P. 28593–28598.
43. Kim K.H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase // Ann. Rev. Nutr. – 1997. – **17**. – P. 77–99.
44. Li S.J., Cronan J.E.Jr. Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis // J. Bacteriol. – 1993. – **175**, № 2. – P. 332–340.
45. Sendl A., Schliack M., Loser R. et al. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic // Atherosclerosis. – 1992. – **94**, № 1. – P. 79–85.
46. Ohlrogge J., Browse J. Lipid biosynthesis // Plant Cell. – 1995. – **7**. – P. 957–970.
47. Riekhof W.R., Sears B.B., Benning C. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr // Eukaryot. Cell. – 2005. – **4**. – P. 242–252.
48. Post-Beittenmiller D., Roughan G., Ohlrogge J.B. Regulation of plant fatty acid biosynthesis; analysis of acyl-coenzyme A and acyl-acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts // Plant Physiol. – 1992. – **100**. – P. 923–930.
49. Kurat C.F., Natter K., Petschnigg J. et al. Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**. – P. 491–500.
50. Rosenberg J.N., Oyler G.A., Wilkinson L., Betenbaugh M.J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution // Curr. Opin. Biotech. – 2008. – **19**. – P. 430–436.
51. Hallmann A. Algal transgenics and biotechnology // Transgen. Plant J. – 2007. – **1**. – P. 81–98.
52. Georgianna D.R., Mayfield S.P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels // Nature. – 2012. – **488**. – P. 329–335.
53. Царенко П., Борисова О., Блюм Я.Б. Водорості як об'єкт біоенергетики. Мікродорості IBASU-A – перспективні продуценти біомаси як джерела сировини для біопалива // Вісн. НАН України. – 2011. – № 5. – С. 49–54.
54. Царенко П.М., Борисова О.В., Блюм Я.Б. Мікродорості колекції IBASU-A – ресурс біомаси для отримання біодизеля // Доп. НАН України. – 2012. – № 11. – С. 172–178.
55. Корховий В.І., Пірко Я.В., Царенко П.М. Генетична диференціація штамів *Votryococcus braunii* Kütz. – продуцентів ліпідів – за допомогою RAPD фінгерпринтингу // Доп. НАН України. – 2011. – № 2. – С. 144–149.
56. Dunahay T.G., Jarvis E.E., Roessler P.G. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila* // J. Phycol. – 1995. – **31**. – P. 1004–1011.
57. Klaus D., Ohlrogge J.B., Neuhaus H.E., Dormann P. Increased fatty acid production in potato by engineering of acetyl-CoA carboxylase // Planta. – 2004. – **219**. – P. 389–396.
58. Roesler K., Shintani D., Savage L. et al. Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds // Plant Physiol. – 1997. – **113**. – P. 75–81.
59. Dehesh K., Tai H., Edwards P. et al. Overexpression of 3-ketoacyl-acyl-carrier protein synthase III_s in plants reduces the rate of lipid synthesis // Plant Physiol. – 2001. – **125**. – P. 1103–1114.
60. Vigeolas H., Waldeck P., Zank T., Geigenberger P. Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seedspecific promoter // Plant Biotechnol. J. – 2007. – **5**. – P. 431–441.
61. Jain R.K., Coffey M., Lai K. et al. Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes // Biochem. Soc. Trans. – 2000. – **28**. – P. 959–960.
62. Jako C., Kumar A., Wei Y. et al. Seed-specific overexpression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight // Plant Physiol. – 2001. – **126**. – P. 861–874.
63. Lardizabal K., Effertz R., Levering C. et al. Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean // Plant Physiol. – 2008. – **148**. – P. 89–96.
64. Taylor D.C., Katavic V., Zou J. et al. Field testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield // Mol. Breed. – 2002. – **8**. – P. 317–322.
65. Schuhmann H., Lim D.K.Y., Schenk P.M. Perspectives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae // Biofuels. – 2012. – **3**. – P. 71–86.
66. Polle J.E., Kanakagiri S.D., Melis A. tla1, a DNA insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size // Planta. – 2003. – **217**. – P. 49–59.
67. O'Neill B.M., Mikkelsen K.L., Gutierrez J.L. et al. An exogenous chloroplast genome for complex sequence manipulation in algae // Nucl. Acids Res. – 2012. – **40**. – P. 2782–2792.
68. Zaslavskaja L.A., Lippmeier J.C., Shih C. et al. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic or-

- ganism through metabolic engineering // Science. — 2001. — **292**. — P. 2073–2075.
69. Raven J.A. Inorganic carbon acquisition by eukaryotic algae: four current questions // Photosynth. Res. — 2010. — **106**. — P. 123–134.
 70. Whitney S.M., Houtz R.L., Alonso H. Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco // Plant Physiol. — 2011. — **155**. — P. 27–35.
 71. Rawsthorne S. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants // Prog. Lipid Res. — 2002. — **41**. — P. 182–196.
 72. Weselake R.J., Taylor D.C., Rahman M.H. et al. Increasing the flow of carbon into seed oil // Biotechnol. Adv. — 2009. — **27**. — P. 866–878.
 73. Mouille G., Maddelein M.L., Libessart N. et al. Pre-amylopectin processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants // Plant Cell. — 1996. — **8**. — P. 1353–1366.
 74. Posewitz M.C., King P.W., Smolinski S.L. et al. Identification of genes required for hydrogenase activity in *Chlamydomonas reinhardtii* // Biochem. Soc. Trans. — 2005. — **33**. — P. 102–104.
 75. Posewitz M.C., Smolinski S.L., Kanakagiri S. et al. Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell. — 2004. — **16**. — P. 2151–2163.
 76. Zabawinski C., Van Den Koornhuysen N., D'Hulst C. et al. Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase // J. Bacteriol. — 2001. — **183**. — P. 1069–1077.
 77. Work V.H., Radakovits R., Jinkerson R.E. et al. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* *sta7–10* starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains // Eukaryot. Cell. — 2010. — **9**. — P. 1251–1261.
 78. Ramazanov A., Ramazanov Z. Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content // Phycol. Res. — 2006. — **54**. — P. 255–259.
 79. Li Y.T., Han D.X., Hu G.R. et al. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol // Metab. Eng. — 2010. — **12**. — P. 387–391.
 80. Li Y., Han D., Hu G., Sommerfeld M., Hu Q. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii* // Biotechnol. Bioeng. — 2010. — **107**. — P. 258–268.
 81. Lu X., Vora H., Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production // Metab. Eng. — 2008. — **10**. — P. 333–339.
 82. Jiang P., Cronan J.E. Jr. Inhibition of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* in the absence of phospholipid synthesis and release of inhibition by thioesterase action // J. Bacteriol. — 1994. — **176**. — P. 2814–2821.
 83. Voelker T.A., Davies H.M. Alteration of the specificity and regulation of fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase // J. Bacteriol. — 1994. — **176**. — P. 7320–7327.
 84. De Riso V., Raniello R., Maumus F. et al. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* // Nucl. Acids. Res. — 2009. — № 41. — e96.
 85. Molnar A., Bassett A., Thuenemann E. et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant J. — 2009. — **58** — P. 165–174.
 86. Zhao T., Wang W., Bai X., Qi Y. Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas* // Plant J. — 2009. — **58**. — P. 157–164.
 87. Moellering E.R., Benning C. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii* // Eukaryot. Cell. — 2010. — **9**. — P. 97–106.
 88. Fulda M., Schnurr J., Abbadi A., Heinz E. Peroxisomal acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. — 2004. — **16**. — P. 394–405.
 89. Germain V., Rylott E.L., Larson T.R. et al. Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings // Plant J. — 2001. — **28**. — P. 1–12.
 90. Rylott E.L., Rogers C.A., Gilday A.D. et al. *Arabidopsis* mutants in short- and medium-chain acyl-CoA oxidase activities accumulate acyl-CoAs and reveal that fatty acid beta-oxidation is essential for embryo development // J. Biol. Chem. — 2003. — **278**. — P. 21370–21377.
 91. Michinaka Y., Shimauchi T., Aki T. et al. Extracellular secretion of free fatty acids by disruption of a fatty acyl-CoA synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biosci. Bioeng. — 2003. — **95**. — P. 435–440.
 92. Nojima Y., Kibayashi A., Matsuzaki H. et al. Isolation and characterization of triacylglycerol-secreting mutant strain from yeast, *Saccharomyces cerevisiae* // J. Gen. Appl. Microbiol. — 1999. — **45**. — P. 1–6.
 93. Scharnewski M., Pongdontri P., Mora G. et al. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in acyl-CoA synthetases secrete fatty acids due to interrupted fatty acid recycling // FEBS J. — 2008. — **275**. — P. 2765–2778.
 94. Voelker T.A., Worrell A.C., Anderson L. et al. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants // Science. — 1992. — **257**. — P. 72–74.

95. Yuan L., Voelker T.A., Hawkins D.J. Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1995. – 92. – P. 10639–10643.
96. Radakovits R., Eduafo P.M., Posewitz M.C. Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum* // Metab. Eng. – 2011. – 13. – P. 89–95.
97. Dehesh K., Jones A., Knutzon D.S., Voelker T.A. Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB 2, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana* // Plant J. – 1996. – 9. – P. 167–172.
98. Radakovits R., Jinkerson R.E., Darzins Al., Posewitz M.C. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production // Eukaryot. Cell. – 2010. – 9, № 4. – P. 486–501.
99. Quinn J.M., Merchant S. Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas* Cyc6 gene function as targets for transcriptional activators // Plant Cell. – 1995. – 7. – P. 623–638.
100. Poulsen N., Kroger N. A new molecular tool for transgenic diatoms // FEBS J. – 2005. – 272. – P. 3413–3423.
101. Radakovits R., Jinkerson R.E., Fuerstenberg S.I. et al. Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana* // Nat. Commun. – 2012. – 3. – P. 686.
102. Wan L.L., Han J., Sang M. et al. De novo transcriptomic analysis of an oleaginous microalga: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels // PLoS One. – 2012. – 7, № 6. – P. 1371.

Поступила 28.05.13