

ДЖОЗЕФІН А. ¹* (<https://orcid.org/0000-0002-8149-7439>)

КУМАР Т.С. ² (<https://orcid.org/0000-0002-9981-9141>)

АШОК КУМАР С. ³ (<https://orcid.org/0000-0001-5682-8972>)

ДХАРАНІ Г. ² (<https://orcid.org/0000-0003-1250-5594>)

КІРУБАГАРАН Р. ² (<https://orcid.org/0000-0001-6299-1776>)

¹ Кафедра досліджень, Академія вищої освіти та досліджень,
Мінакії, Ченнаї-600 078, Тамілнад, Індія

² Відділ морської біотехнології, Національний інститут океанічних технологій,
Міністерство наук про Землю, Уряд Індії, Паллікаранай, Ченнаї-600 100, Тамілнад, Індія

³ Центр біотехнології, Університет Анни, Ченнаї-600 025, Тамілнад, Індія

* Адреса для листування: ajosephineanthony@gmail.com

ПОКРАЩЕНА БІОМАСА, ЛІПІДИ ТА БІОАКТИВНІ СПОЛУКИ З ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ МІКРОВОДОРОСТЕЙ НА ОСНОВІ CRISPR-CAS9, CRISPRІ ТА ASGARD: ПЕРСПЕКТИВНИЙ РУБІЖ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

Реферат. В останні роки гена інженерія досягла значних успіхів у використанні потенціалу мікроводоростей для різних цілей, включаючи збільшення виробництва біомаси, біопалива, очищення стічних вод та синтез цінних біологічно активних сполук. Наше попереднє дослідження довело, що генетичні модифікації *Chlorella vulgaris* Beijer. з використанням випадкового мутагенезу значно підвищують вміст ліпідів, що робить її більш придатною для виробництва біопалива. Однак ефективні інструменти генної інженерії все ще не здатні одночасно збільшувати загальне виробництво біомаси та біологічно активних сполук. У цьому огляді обговорюються найновіші інструменти

Надійшла до редакції 11.10.2024. Після доопрацювання 26.11.2024. Підписана до друку 30.11.2024.

Опублікована 10.06.2025

Ц и т у в а н н я . Джозефін А., Кумар Т.С., Ашок Кумар С., Дхарані Г., Кірубагаран Р. 2025. Покращена біомаса, ліпіди та біоактивні сполуки з генетично модифікованих мікроводоростей на основі crispr-cas9, crisprі та asgard: перспективний рубіж у біотехнології. *Альгологія*. 35(2): 85–103.

<https://doi.org/10.15407/alg35.02.85>

This is open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

та стратегії використання для удосконалення біотехнологічного потенціалу штамів мікроводоростей, від культивування до сучасних методів редагування генів, таких як кластерні регулярно розташовані короткі паліндромні повтори (CRISPR) та CRISPR-асоційований білок 9 (CRISPR-Cas9). Численні дослідження показали, що метод цільових нуклеаз є визначним прогресом у маніпуляціях з геномом, забезпечуючи неперевершену точність. Новий варіант CRISPR, відомий як техніка CRISPRi, дає значні результати при роботі з мікроводоростями навіть у нестресових умовах. Крім того, для усунення труднощів, пов'язаних з високим вмістом гуаніну-цитозину в ДНК мікроводоростей, разом з CRISPRi було досліджено новий підхід — адаптивне однонаправляюче допоміжне регулювання ДНК (ASGARD), що забезпечив вищий вміст ліпідів і білків, завдяки чому його широко застосовують у виробництві. В огляді аналізуються переваги та недоліки різних інструментів генної інженерії, а також обговорюються складність і точність, необхідні для генетичної модифікації, і результуючий потенціал для покращення продуктивності біомаси, ліпідів і біоактивних сполук у морських мікроводоростей.

Ключові слова: мікроводорості, *Chlorella vulgaris*, генетична інженерія, CRISPR-Cas9, біомаса, біопаливо, біоактивні сполуки

Вступ

Останнім часом спостерігається підвищений інтерес до культивування стійких та екологічно чистих джерел біоенергії для задоволення зростаючих потреб у паливних ресурсах. Мікроскопічні організми привернули значну увагу завдяки своєму величезному потенціалу як відновлюваних ресурсів для різних біопродуктів, включаючи пігменти, енергію та інші цінні сполуки. Мікроводорості мають ряд переваг над вищими рослинами, які традиційно використовували для біотехнологічних цілей, зокрема не потребують площі орних земель та прісної води. Завдяки швидкому росту та здатності продукувати більшу біомасу вони є привабливим варіантом для великомасштабного промислового вирощування (Emmanuel et al., 2022). Однак пошук стійких та екологічно чистих джерел біомаси й біоактивних сполук, а також ефективне культивування мікроводоростей з одночасним отриманням більшої біомаси та вищого продукування біоактивних сполук у межах одного штаму, безсумнівно, залишається серйозною проблемою.

Модифікація мікроводоростей за допомогою різних інструментів генної інженерії є перспективним шляхом подолання існуючих проблем шляхом оптимізації виходу сполук з високою доданою вартістю. Крім того, генетично модифіковані мікроводорості продемонстрували свій потенціал для виробництва біоактивних сполук із широким застосуванням у різних

галузях промисловості, включаючи фармацевтику, косметику та нутрицевтики. Вводячи або посилюючи експресію певних генів, мікродорості можна запрограмувати на синтез біоактивних молекул, таких як антиоксиданти, пігменти, ліпіди, каротиноїди та інші нові сполуки з доданою вартістю. Це не тільки забезпечує постійне та відновлюване джерело цих сполук, але й зменшує потребу в екологічно токсичних процесах екстракції (Sundaram et al., 2023). Зелена мікродорість *Chlorella vulgaris*, відома як одна з «клітинних фабрик» завдяки високому вмісту ліпідів та сполук з високою доданою вартістю, є об'єктом багатьох досліджень по стимулюванню виробництва біомаси, біопалива та біоактивних сполук шляхом генетичних модифікацій. Окрім хлорели для досліджень залучають багато інших видів мікродоростей, які є також цільовими для виробництва вищих біоактивних сполук шляхом застосування методів генної інженерії.

Метою роботи був всебічний аналіз сучасних стратегій генної інженерії, що застосовуються для підвищення виходу біомаси та біоактивних сполук у морських видах мікродоростей.

Поширені генно-інженерні модифікації в мікродоростях

Інсерційний мутагенез ДНК був першим типом експериментів, які зробили відкриття щодо впливу укороченої хлорофілової антени на фотосинтетичну продуктивність у модельному організмі *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard. Зокрема, мутації в генах, що кодують хлоропласт-локалізовану сигнальну частинку розпізнавання (CpSRP) у штаммах *tla3* та *tla4* *C. reinhardtii*, продемонстрували підвищену ефективність перетворення сонячної енергії та збільшення фотосинтетичної продуктивності під час масового культивування в умовах інтенсивного опромінення (Polle et al., 2003; Henning, Anastasios, 2014). Хоча інсерційний мутагенез ДНК має перевагу в тому, що картування геномних інсерцій вимагає меншої кількості трансформантів для повного насичення ядерного геному, його недолік у тому, що ідентифікація гена, відповідального за мутантний фенотип, стає складнішою (Dent et al., 2001). Крім того, надмірна експресія рівня рибулозобісфосфаткарбоксилази-оксигенази (RuBisCO) шляхом мутагенезу штаму *Synechocystis* 6803 викликала посилення фотосинтетичної активності та вищої продуктивності жирних кислот. Аналогічно, шляхом спрямованого мутагенезу *gbcL* було створено варіант RuBisCO зі зниженою активністю, що призвело до збільшення швидкості виробництва водню та підвищеного рівня загальних ліпідів у *C. reinhardtii* порівняно з диким типом (Esquivel et al., 2017). Це був новітній поступ у підходах до генної інженерії для підвищення фотосинтетичної

ефективності мікрободоростей та їхньої загальної продуктивності (Hu et al., 2023).

Найефективнішими підходами генетичної модифікації щодо зміни фізіологічних, морфологічних та генетичних ознак водоростей вважалися випадковий мутагенез з використанням фізичних та хімічних мутагенів, редагування геному та адаптивні лабораторні процеси оцінки (Trovao et al., 2022). Попередні дослідження генетичної модифікації шляхом випадкового мутагенезу з використанням ультрафіолетового світла (УФ) та 5'флуородезоксиуридину (5'FDU) у *C. vulgaris* показали посилення продукування ліпідів клітинами цього виду (Anthony et al., 2015). Встановлено 1,79-кратне збільшення виробництва ліпідів клітинами *C. vulgaris* з УФ мутацією та 1,39-кратне збільшення — з мутацією 5'FDU. Найважливішою стратегією при впровадженні генетичної модифікації є підтримка виходу біомаси, оскільки мутації іноді можуть впливати на швидкість росту. Наші результати підтвердили цю стратегію — УФ-мутації не погіршили швидкість росту, оскільки спостерігалось лише незначне зниження виробництва біомаси порівняно зі штамом дикого типу *C. vulgaris*. Цікаво, що співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот у штамі з УФ-мутацією становило 76 % : 24% порівняно зі штамом дикого типу (45% : 55%), що свідчить про придатність ліпідів з мутантного штаму для виробництва біопалива. Значна зміна альфа-спіралей і бета-складчастих шарів у мутантів карбокситрансферазного домену ферментів ацетилкарбоксилази є причиною посилення виробництва ліпідів у штаммах з УФ-мутацією (Anthony et al., 2015). На додаток до цього дослідження, аналіз транскриптомів довів, що стеароїл-АЦП-десатураза та дельта-4-десатураза жирних кислот, ймовірно, є ключовими ферментами, що сприяють помітному переходу від ненасичених до насичених жирних кислот. Цей зсув допомагає підтримувати баланс на користь насичених жирних кислот над ненасиченими, що є критичним аспектом для оптимізації ефективності біодизелю (Josephine et al., 2022).

Аналогічно, Xing et al. (2021) продемонстрували вплив лазерного випромінювання та гетеротрофного культивування на біомасу та продуктивність ліпідів у прісноводних штаммах *Chlorella*. Значне збільшення біомаси та продукції ліпідів спостерігалось після впливу на ці штами випромінювання, індукованого лазером на основі ітрію та алюмінію гранату, легованого неодимом (Nd:YAG), протягом 8 хв та 12 хв відповідно. У дослідженні Schuler et al. (2020) мутанти *C. vulgaris* з дефіцитом хлорофілу, що мають жовте (MT01) та біле (MT02) забарвлення, були отримані за допомогою хімічно індукованого випадкового мутагенезу. MT01 мав показники росту, подібні до дикого типу, тоді як

MT02 показав дещо нижчий ріст за гетеротрофних умов. Однак за підвищеної інтенсивності світла штами мали підвищений вміст пігментів та білка.

Завдяки підвищеному вмісту білка мутантні штами є перспективними кандидатами для розробки інноваційних харчових добавок та функціональних продуктів харчування (Schuler et al., 2020). Використання стратегії індукції короткочасного високого освітлення для гетерологічної експресії гена *CrtYB*, що охоплює як активність фітоенсинтази (*psy*), так і циклізації лікопену (*lcyb*) у *S. reinhardtii*, виявило значне збільшення рівня β -каротину та виходу лютеїну. Це феноменальне досягнення демонструє одночасне підвищення вмісту β -каротину та лютеїну у фототрофно модифікованих клітинах і відкриває нові шляхи для підвищення синтезу каротиноїдів у мікрowodоростях, що свідчить про широкі перспективи для їхнього застосування (Rathod et al., 2020).

Однак найбільш відповідний підхід для конкретного застосування буде відрізнятися залежно від конкретних цілей та критеріїв дослідження, оскільки кожен метод має свої переваги та обмеження. Наприклад, хімічний мутагенез пропонує простоту та економічну ефективність, проте він несе ризик виникнення токсичних або небезпечних мутацій (Khan et al., 2009). З іншого боку, фізичний мутагенез, хоча й відносно ефективний, може призвести до вищих витрат і потребувати спеціального обладнання (Bleisch et al., 2022). Незважаючи на це, багато дослідників використовують такі випадкові мутагенні підходи, хоча їхнє застосування не гарантує потенційної точності. Тому пошук нових та інноваційних методів генної інженерії продовжується.

Передові підходи генної інженерії мікрowodоростей

Класична генетика, або генетика прямого впровадження, базується на спостереженні за фенотипами та ідентифікації послідовностей генів, відповідальних за певні ознаки, які часто виникають внаслідок природних або індукованих мутацій. У цьому підході спочатку визначається фенотип, тоді як основний генотип залишається невідомим. І навпаки, зворотна генетика починається з навмисних змін відомої послідовності генів шляхом випадкових або цілеспрямованих мутацій, що призводить до помітних змін у фенотипі, які висвітлюють функцію гена або групи генів (Zakhrabekova et al., 2013; Hlavova et al., 2015). Як альтернатива, менш специфічний підхід, такий як метод таргетного індукування локальних уражень у геномах (TILLING), застосовується для утворення гетеродуплексів, спричинених мутаціями, індукованими хімічними мутагенами, без введення чужорідного генетичного матеріалу (Henikoff et al., 2004;

Gilchrist et al., 2006). По суті, TILLING поєднує хімічний мутагенез з високопродуктивним скринінгом для виявлення точкових мутацій. Незважаючи на потенційну точність цілеспрямованих методів, визначення конкретних геномних мішеней може бути складним завданням. Генетичні зміни часто впливають на кілька генів, ускладнюючи виділення мутантів з бажаними ознаками та потенційно ставлячи під загрозу їхню життєздатність і моделі росту (Henikoff et al., 2004; Gilchrist et al., 2006). Однак існує обмежена кількість досліджень, в яких використовують метод TILLING на видах мікрободоростей для збільшення біомаси та виробництва біоактивних сполук.

Цільова інактивація генів шляхом гомологічної рекомбінації давно визнана потужним методом для з'ясування функції генів. Однак її широке впровадження гальмувалося через різні проблеми, включаючи низьку ефективність правильної інтеграції сконструйованих конструкцій у хромосому цільову ділянку, трудомісткий та тривалий характер процедур відбору/скринінгу, а також потенціал для непередбачуваних мутагенних наслідків (Саресчі, 2005). На противагу цьому, нокдаун генів, опосередкований РНК-інтерференцією (RNAi), довів швидко, економічно ефективно та високопродуктивно альтернативу гомологічній рекомбінації в клітинах водоростей (Zhang, Hu, 2014). При високій інтенсивності освітлення маніпулювання мутантом CAO (хлорофілід, оксигеназа, яка перетворює хлорофіл *a* на *b*) за допомогою RNAi та введення варіанта гена CAO в лінію нокауту CAO, який містить 5'-кінцеве подовження мРНК, що кодує сайт зв'язування для трансляційного репресора Nab1, призвело до отримання мутантів. Вони демонстрували суттєво підвищену швидкість фотосинтезу та дворазове збільшення продуктивності біомаси порівняно зі штамми дикого типу (Negi et al., 2020). Аналогічно, зниження експресії піруватдегідрогеназної кінази у *Nannochloropsis salina* за допомогою RNAi індукувало зміни у складі жирних кислот, що призвело до прискореного накопичення триацилгліцеролів та вмісту ліпідів без негативного впливу на ріст клітин навіть за сильного світлового стресу (Ma et al., 2017). Тим не менш, нокдаун, опосередкований RNAi, страждає від неповноти й мінливості в різних експериментах та лабораторіях, нестабільної спадковості фенотипу, непередбачуваних позацільових ефектів та лише тимчасового пригнічення активності генів. Ці обмеження перешкоджають можливості безпосередньо корелювати фенотип із генотипом та звужують практичну корисність технології RNAi (McManus, Sharp, 2002; Greiner et al., 2017).

Новаторська технологія, широко відома як «редагування геному», використовує сконструйовані нуклеази, що містять специфічні для

послідовності ДНК-зв'язуючі домени, злиті з неспецифічним модулем розщеплення ДНК (Urnov et al., 2010). Ці гібридні нуклеази сприяють точним та ефективним генетичним змінам, індукуючи цільові дволанцюгові розриви ДНК (DSB), і тим самим активують клітинні механізми репарації ДНК, в тому числі схильне до помилок негомологічне з'єднання кінців (NHEJ) та гомологічно-спрямовану репарацію (HDR) (Wu, Kanaar, 2006). Таким чином, інноваційні досягнення в генетичній модифікації призвели до зміни парадигми від традиційних методів трансформації ДНК за допомогою вектора. Такі методи, як цинково-пальцеві нуклеази (ZFN), ефекторні нуклеази, подібні до активаторів транскрипції (TALEN), та білок 9, пов'язаний із кластерними регулярно розташованими короткими паліндромними повторами (CRISPR), здійснили революцію в редагуванні специфічних геномних локусів з підвищеною ефективністю (Gaj et al., 2013; Gupta, Musunuru, 2014). ZFN та TALEN сприяють різноманітним генетичним змінам, ініціюючи дволанцюгові розриви ДНК, які в свою чергу провокують схильне до помилок негомологічне з'єднання кінців або механізми репарації, спрямовані на гомологію, у визначених геномних сайтах.

Перше редагування генів за допомогою ZFN успішно застосовано у *Chlamydomonas reinhardtii*, де ZFN були спеціально розроблені для впливу на ген COP3 (ген, що кодує світлоактивованій іонний канал родопсину-1), використовуючи стійкість до паромоміцину як маркер активності. Це дослідження показало, що тимчасова експресія ZFN не викликає жодної клітинної токсичності, призводячи до стабільної трансформації колоній (Sizova et al., 2013). Аналогічно, Greiner et al. (2017) використовували ZFN для досягнення надійного редагування генів шляхом гомологічної рекомбінації в різних штаммах *Chlamydomonas*, включаючи дикі типи. Незважаючи на переваги редагування геному за допомогою ZFN, цей метод має кілька потенційних недоліків. Одна з проблем полягає у складності збирання доменів цинкових пальців для ефективного зв'язування великої послідовності нуклеотидів з високою спорідненістю (Ramirez et al., 2008). Щоб подолати цю перешкоду, був розроблений репозиторій з відкритим кодом компонентів цинкових пальців разом із протоколами скринінгу, спрямованими на ідентифікацію ZFN, які демонструють високу спорідненість зв'язування з бажаними послідовностями. Однак, незважаючи на ці зусилля, процес отримання оптимізованих ZFN залишається трудомістким (Maeder et al., 2008; Maeder, 2009). Крім того, ще одним потенційним викликом є обмежені можливості вибору цільового сайту.

З іншого боку, кілька досліджень задокументували генетичну модифікацію різних видів мікродоростей за допомогою методу TALEN. Зокрема, його використали для посилення шляхів метаболізму ліпідів у геномі діатомової водорості *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Daboussi et al., 2014; Nao et al., 2018). Takahashi et al. (2018) досягли збільшення вмісту ліпідів у зеленій мікродорості *Coccomyxa* sp. Ще одне успішне застосування TALEN включало ефективну мутацію генів нітратредуктази та ацилтрансферази у *Nannochloropsis oceanica* Suda & Miyashita, що призвело до збільшення виробництва ліпідів (Kurita et al., 2020). Хоча метод TALEN пропонує перспективні можливості редагування генів, їхній більший розмір порівняно з ZFN створює практичні труднощі. Стандартне кодування TALEN охоплює приблизно 3 кб, що значно більше, ніж розмір кодування ZFN в 1 кб. Ця різниця в розмірах ускладнює доставку та експресію всередині клітин, особливо якщо розглядати терапевтичне застосування, що залежить від вірусних векторів, хоча в результаті прикладених зусиль щодо диверсифікації кодуючих послідовностей TALE-повторів пропонуються потенційні рішення цієї проблеми (Holkers et al., 2013; Yang et al., 2013).

Отже, враховуючи недоліки цих методологій, на перший план виходить метод CRISPR-Cas9, що виділяється своєю простотою та ефективністю, особливо в контексті дослідження мікродоростей. На відміну від складних експериментальних установок, необхідних для ZFN та TALEN, CRISPR-Cas9 пропонує більш простий підхід (Park et al., 2019). Greiner et al. (2017) удосконалили методи редагування генів, адаптованих до різних штамів *Chlamydomonas* sp., включаючи дикий тип CC-125, використовуючи цинково-пальцеві нуклеази (ZFN), а також CRISPR-Cas9, отриманий від *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus pyogenes*, як генетично кодованих, так і рекомбінантних. Крім того, вони розробили протоколи, що дозволяють швидко ізолювати неселектуючі генні мутанти. Завдяки цьому підходу ключові гени фоторецепторів були порушені, що призвело до створення подвійних мутантів, таких як chr1, chr2 та uvr8 phot. Під час тестування ефективності цієї методики характеристика мутантів, зокрема chr1, chr2 та mat3, підтвердила корисність мутантів фоторецепторів для просування фізіологічних досліджень. Примітно, що порушення генів було досягнуто в 5–15% попередньо відібраних клонів, а ZFN сприяли надійному та передбачуваному редагуванню генів шляхом гомологічної рекомбінації, тоді як Cas9 переважно індукував порушення генів шляхом вставки котрансформованої ДНК (Greiner et al., 2017).

Системи CRISPR-Cas9 також використовуються бактеріями та археями для протидії вірусним та плазмідним інвазіям шляхом точного тарге-

тування та заглушення чужорідних нуклеїнових кислот за допомогою CRISPR РНК (crRNA) (Jinek et al., 2012). У підмножині цих систем зріла crRNA утворює комплекс з транс-активуючою crRNA (tracrRNA), що призводить до структури з двох РНК. Така структура служить орієнтиром для спрямування CRISPR-асоційованого білка Cas9 для індукції дволанцюгових розривів (DSB) у цільовій ДНК. Зокрема, в ділянках, комплементарних послідовності, що вказує на crRNA, нуклеазний домен Cas9 HNH розщеплює комплементарний ланцюг ДНК, тоді як RuvC-подібний домен Cas9 розщеплює некомплеметарний ланцюг. Примітно, що конструювання подвійної tracrRNA:crRNA в одну РНК-химеру також дозволяє утворювати специфічні для послідовності Cas9 DSB. Це відкриття розкрило нове сімейство ендонуклеаз, що використовують подвійні РНК для точного сайт-специфічного розщеплення ДНК, та підкреслює потенціал використання цієї системи для РНК-програмованого редагування геному (Jinek et al., 2012).

Лін та Нг (Lin, Ng, 2020) зробили першу спробу модифікації генів за допомогою технології на основі CRISPR/Cas9 у двох видах *Chlorella*, а саме *C. sorokiniana* та *C. vulgaris*. Спочатку плазмиду, отриману з *Agrobacterium tumefaciens*, що містить фрагмент mGFP, за допомогою електропорації було введено у клітини штамів *C. sorokiniana* та *C. vulgaris* FSP-E. Цей результат підтвердив ефективність доставки плазмиди, опосередкованої *Agrobacterium*, для вставки генів у *Chlorella* sp. Крім того, була сконструйована пламіда з подібною архітектурою, що містить фрагмент Cas9 разом з sgRNA, спрямованою на ген десатурази омега-3 жирних кислот (fad3). Ця нова конструкція продемонструвала помітне покращення зі збільшенням вмісту ліпідів на 46% у *C. vulgaris* FSP-E. Наступне дослідження (Kim et al., 2021) продемонструвало можливість редагування геному в *C. vulgaris* UTEX395 з використанням системи CRISPR/Cas9. Зокрема, було ефективно відредаговано два цільові гени — нітрат-редуктазу (NR) та аденінфосфорибозилтрансферазу (APT). Мутанти з відредагованим геномом і позначені як nr та apt, були створені з використанням систем CRISPR-Cas9, опосередкованих як ДНК, так і/або рибонуклеопротеїнами (RNP). Результати цього дослідження підкреслюють практичність та ефективність редагування геному, опосередкованого CRISPR/Cas9, у *C. vulgaris* UTEX395. Загалом це дослідження надає цінні емпіричні докази потенційного застосування технології CRISPR/Cas9 для маніпулювання геномом *C. vulgaris* UTEX395, пропонуючи практичні методи генетичної модифікації (Kim et al., 2021).

Враховуючи ці багатообіцяючі результати, штами мікродоростей, створені за допомогою методології CRISPR/Cas9, являють собою переконливу альтернативу для виробництва сталої енергії у вигляді

біопалива, фармацевтичних препаратів та спектру екологічно чистих продуктів з доданою вартістю. Крім того, дослідники розробили новий варіант методики CRISPR, відомий як CRISPRi (кластеризована регулярно розташована коротка паліндромна повторна інтерференція), який пропонує неінвазивний підхід і дає бажані результати навіть у нестресових умовах. Ця інноваційна технологія має величезний потенціал для подальшого розвитку генетичних маніпуляцій, відкриваючи шлях для різноманітного застосування в різних галузях промисловості (Sunipa, Gour, 2021). У дослідженні Pei-Hsun, I-Son (2017) методика CRISPRi вперше була застосована для модуляції експресії екзогенно введеного гена *gfp* як доказу концепції, так і ендогенного гена фосфоенолпіруваткарбоксілази (PEPC), PEPC1, як доказу функції у *C. reinhardtii*. Результати дослідження показали вражаючу ефективність (94%) та стабільність, що охоплює сім поколінь у регуляції генів, опосередкованій CRISPRi, у *C. reinhardtii*, про що свідчить регуляція гена RFP. Крім того, ген PEPC1 регулює синтез білків, вирішальних для регуляції потоку вуглецю, що надходить у цикл трикарбонових кислот, тим самим впливаючи на розподіл вуглецевих субстратів, особливо в умовах конкуренції з синтезом ліпідів. Штами, в яких вміст CgPEPC1 був знижений, демонстрували зменшене забарвлення хлорофілу, але підвищену концентрацію біомаси та прискорені темпи накопичення ліпідів. Ці результати підкреслюють можливість та ефективність транскрипційного заглушення на основі CRISPRi у *C. reinhardtii*, тим самим розширюючи можливості для підвищення виходу та продуктивності продуктів, отриманих з мікрободоростей (Pei-Hsun, I-Son, 2017).

Незважаючи на багато спроб генетичних модифікацій *C. vulgaris*, маніпуляції з ДНК все ще залишаються серйозною проблемою через високий вміст гуанін-цитозину (GC) у ДНК. Lin et al. (2022) розробили новий підхід за допомогою 20 гуанінів для дизайну sgRNA, який називається «Адаптивна ДНК з одним направляючим механізмом (ASGARD)», та поєднання з системою dCas9, пов'язаною з інтерференцією CRISPR, для подолання проблемних моментів у клітинах трьох видів мікрободоростей: *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* та *C. variabilis*. Основні переваги та недоліки різних методів редагування генів, про які йдеться у цьому огляді, представлені в таблиці.

Переваги генетичних модифікацій CRISPR-Cas9, CRISPRi та ASGARD для виробництва біомаси, ліпідів та біоактивних сполук

Завдяки технології редагування генів CRISPR-Cas9 значно покращився вміст ліпідів та виробництво сполук з високою доданою вартістю. З метою підвищення виробництва ліпідів у морських зелених мікрободоростях

Tetraselmis sp. було досліджено новий підхід, спрямований на біосинтез вуглеводів (Chang et al., 2020).

Таблиця. Переваги та недоліки новітніх методів редагування генів у мікрободоростях

| Метод редагування генів | Перевага методу | Недоліки | Джерело |
|--|---|---|---|
| Випадковий мутагенез | Підвищує вміст ліпідів у клітинах мікрободоростей | Застосування випадкові та недостатньо точні | Khan et al., 2009; Anthony et al., 2015; Bleisch et al., 2022 |
| Фізичний мутагенез | Відносно ефективний | Більш затратний та потребує спеціального обладнання. | |
| Хімічний мутагенез | Пропонує простоту та економічну ефективність | Ризик появи токсичних або небезпечних мутацій | |
| ДНК-інсерційний мутагенез | Картування геномних вставок вимагає меншої кількості трансформантів для повного насичення ядерного геному. Підвищена фотосинтетична активність та вміст ліпідів у мікрободоростях | Ідентифікація гена, відповідального за мутантний фенотип, стає складнішою | Dent et al., 2001; Polle et al., 2003; Henning, Anastasios, 2014 |
| Локальні ураження геному, індуковані таргетуванням (TILLING) | Утворює гетеродуплекси, спричинені мутаціями, індукованими хімічними мутагенами, без введення чужорідного генетичного матеріалу. TILLING поєднує хімічний мутагенез із високопродуктивним скринінгом для виявлення точкових мутацій | Визначення конкретних геномних мішеней може бути складним завданням. Генетичні зміни часто впливають на кілька генів, ускладнюючи виділення мутантів з бажаними ознаками | Henikoff et al., 2004; Gilchrist et al., 2006 |
| Цільова інактивація генів шляхом гомологічної рекомбінації | Потужний метод для з'ясування функції генів | Низька ефективність правильної інтеграції отриманих конструкцій у цільовий хромосомний сайт | Caracchi, 2005 |
| Нокдаун генів, опосередкований РНК-інтерференцією (RNAi) | Призводить до збільшення біомаси та збільшення накопичення триацилгліцеролів і вмісту ліпідів без негативного впливу на ріст клітин у <i>Nannochloropsis</i> sp. | Страждає від неповноти, мінливості в різних експериментах, нестабільної фенотипової спадковості, непередбачуваних нецільових ефектів та лише тимчасового пригнічення активності генів | Zhang, Hu, 2014; Greiner et al., 2017; Ma et al., 2017; McManus, Sharp, 2002; Negi et al., 2020 |

| | | | |
|---|---|---|--|
| Нуклеази з цинковими пальцями (ZFN) | Тимчасова експресія ZFN не викликала жодної клітинної токсичності, натомість призвела до стабільної трансформації колоній у клітинах мікроводоростей, що спричинило збільшення біомаси | Основною проблемою є складність збирання цинкових пальцевих доменів для ефективного зв'язування великої послідовності нуклеотидів з високою спорідненістю | Ramirez et al., 2008; Sizova et al., 2013; Greiner et al., 2017 |
| Ефекторні нуклеази, подібні до активатора транскрипції (TALEN) | Метод пропонує перспективні можливості редагування генів, що призводить до мутацій, які сприяють збільшенню вироблення ліпідів у клітинах мікроводоростей | Їхній більший розмір порівняно з ZFN створює практичні труднощі, хоча зусилля щодо диверсифікації кодуючих послідовностей TALE-повторів пропонують потенційні рішення цієї проблеми | Holkers et al., 2013; Yang et al., 2013; Daboussi et al., 2014; Hao et al., 2018; Takahashi et al., 2018 |
| Блок 9, пов'язаний з кластерними регулярно розташованими короткими паліндромними повторами (CRISPR) (CRISPR-Cas9) | Більш ефективний завдяки своїй простоті та результативності, особливо в генній інженерії мікроводоростей. Мутації, спричинені CRISPR-Cas9, призвели до значно вищого виробництва ліпідів у <i>Chlorella</i> sp. та <i>Chlamydomonas</i> sp. | Питання виробництва сталої енергії у вигляді водоростевого біопалива та екологічно чистих продуктів із доданою вартістю залишається невивченим | Lin, Ng, 2020; Kim et al., 2021 |
| Кластерні регулярно розташовані короткі паліндромні повтори, що впливають на інтерференцію (CRISPRi) | Значна ефективність та стабільність, що охоплюють сім поколінь у регуляції генів, опосередкованій CRISPRi, у <i>C. reinhardtii</i> , що призводить до посиленого накопичення ліпідів | Маніпуляції з ДНК все ще залишаються серйозною проблемою через високий вміст гуанін-цитозину (GC) | Pei-Hsun, I-Son, 2017 |
| Адаптивне однонаправляюче допоміжне регулювання ДНК (ASGARD) | Новий підхід за допомогою 20 гуанінів для дизайну sgRNA, який долає вузькі місця за допомогою інструменту CRISPRi. ASGARD у поєднанні з CRISPRi збільшив вміст білка та ліпідів у <i>Chlorella sorokiniana</i> | Потребує більшої точності та ефективності щодо регуляторних механізмів, що керують метаболізмом мікроводоростей | Lin et al., 2022 |

Через конкурентний характер шляхів синтезу вуглеводів та ліпідів баланс змістився в бік виробництва ліпідів шляхом пригнічення синтезу крохмалю, який в основному регулюється ферментом АДФ-глюкозопірофосфорилази (AGP). Мутанти AGP з втратою функції були створені шляхом використання системи доставки рибонуклеопротейну (RNP) CRISPR-Cas9. Хоча мутанти AGP демонстрували незначне зниження росту, вміст ліпідів у їхніх клітинах зазнав феноменального збільшення порівняно з диким типом в умовах азотного голодування. Цей успішний інструмент метаболічної інженерії підкреслює потенціал методів генетичного редагування, таких як CRISPR-Cas9 RNP, у морських мікроводоростях з точки зору високого виробництва ліпідів (Chang et al., 2020).

Аналогічно, у *C. vulgaris* було сформовано сегмент Cas9 разом зі спеціально розробленою однонаправленою РНК (sgRNA), спрямованою на ген десатурази омега-3 жирних кислот (*fad3*). Ця плазмідна конструкція призвела до помітного збільшення накопичення ліпідів у *C. vulgaris*, що демонструє ефективність CRISPR-Cas9 у посиленні виробництва ліпідів, створюючи прецедент для подальшого розвитку генетичної модифікації в межах роду *Chlorella* (Lin, Ng, 2020). Метод CRISPRi, що використовувався у *C. reinhardtii*, спрямований на фермент PEPC, показав посилене виробництво біомаси та значне збільшення швидкості накопичення ліпідів у клітинах водоростей (Pei-Hsun, I-Son, 2017). Завдяки регуляції генів за допомогою CRISPRa-VP64 (CRISPRa) збільшується вміст білка, а при використанні CRISPRi з ASGARD збільшується вміст білка та ліпідів у *Chlorella sorokiniana*. Цей новий дизайн і технологія розкрили великий потенціал генно-регуляторного підходу для біопереробки та біоіндустрії (Lin et al., 2022).

Dhokane et al. (2023) наголошують на прогресі в біоінженерії на основі методу CRISPR, спрямованого на покращення виробництва ключових біомолекул у промислових умовах, а також на важливість використання систем CRISPR-Cas у мікроводоростях. Као та Нг (Као, Ng, 2017) провели експерименти для оцінки ефективності векторного CRISPRi у впливі на ген *CgPEPC1*. Їхня успішна маніпуляція потоком вуглецю призвела до збільшення виробництва ліпідів, демонструючи потенціал CRISPRi для точної модуляції експресії генів у *C. reinhardtii* з метою покращення бажаних ознак. Дослідження Ліна та Нг (Lin, Ng, 2020) показали, що нокаут за допомогою техніки Cas9 створив мутант, спрямований на ген десатурази омега-3 жирних кислот, що призвело до збільшення виробництва ліпідів на 46%. Вид *Tetraselmis* також був генетично модифікований за допомогою нокауту та техніки Cas9, що збільшило

виробництво ліпідів шляхом впливу на ген АДФ-глюкозопірофосфорилази (Chang et al., 2020). Цікаво, що техніка нокауту та нокіну в поєднанні з інструментом Cas9, що використовується в *Nannochloropsis gaditana*, дозволила подвоїти виробництво ліпідів порівняно зі штамом дикого типу (Verruto et al., 2018).

Бек та ін. (Baek et al., 2018) повідомили про значне збільшення продукції зеаксантину шляхом застосування генної інженерії CRISPR-Cas9 у *C. reinhardtii*. Аналогічно, Song et al. (2020) застосували технологію CRISPR/Cas9, опосередковану RNP, у *C. reinhardtii* для досягнення значного збільшення виробництва зеаксантину. Вони досягли цього, порушивши ген зеаксантинеоксидази (ZEP) та лікопенепсилонциклази, що призвело до зростання виходу зеаксантину на 60% порівняно зі штамом дикого типу. У наступному дослідженні (Song et al., 2022), впливаючи на гени ZEP та ADP глюкозопірофосфорилази, був створений подвійний мутант, що призвело до накопичення лютеїну, зеаксантину та ліпідів в умовах дефіциту азоту. Цей підхід підвищив продуктивність олії на 81%, демонструючи посилене виробництво макулярного пігменту у *C. reinhardtii*. Ці висновки слугують ключовою віхою в просуванні ідеї використання генетичних маніпуляцій для підвищення продукційного потенціалу мікроводоростей, тим самим прокладаючи шлях для подальших досліджень у цій галузі для підвищення ефективності виробництва енергії та біоактивних речовин.

Заключення

Узагальнено найновіші відомості щодо підходів та методів генної інженерії мікроводоростей, що використовуються для збільшення біомаси та виробництва біоактивних молекул, а також їхні переваги та недоліки. Незважаючи на прогрес у біоінженерії на основі CRISPR, застосування цих методів на мікроводоростях залишається відносно невивченим через певні обмеження, такі як підвищення точності та ефективності інструментів редагування геному, глибше розуміння регуляторних механізмів метаболізму мікроводоростей, оптимізація умов росту та методів їхнього культивування. Необхідні подальші дослідження для сталої та масштабної комерціалізації біоактивних продуктів з морських мікроводоростей.

Автори вдячні керівництву Академії вищої освіти та досліджень Мінакші за підтримку.

Список літератури

- Anthony J., Rangamaran V.R., Gopal D., Shivasankarasubbiah K.T., Thilagam M.L., Peter Dhassiah M., Padinjattayil D.S., Valsalan V.N., Manambrakat V., Dakshinamurthy S., Thirunavukkarasu S., Ramalingam K. 2015. Ultraviolet and 5'Fluorodeoxyuridine Induced Random Mutagenesis in *Chlorella vulgaris* and Its Impact on Fatty Acid Profile: A New Insight on Lipid-Metabolizing Genes and Structural Characterization of Related Proteins. *Mar. Biotechnol.* 17(1): 66–80.
- Baek K., Yu J., Jeong J., Sim S.J., Bae S., Jin E. 2018. Photoautotrophic production of macular pigment in a *Chlamydomonas reinhardtii* strain generated by using DNA-free CRISPR-Cas9 RNP-mediated mutagenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 115(3): 719–728.
- Bleisch R., Freitag L., Ihadjadene Y., Sprenger U., Steingröwer J., Walther T., Krujatz F. 2022. Strain Development in Microalgal Biotechnology – Random Mutagenesis Techniques. *Life.* 12(7): 961.
- Capecchi M.R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* 6(6): 507–512.
- Chang K.S., Kim J., Park H., Hong S.J., Lee C.G., Jin E. 2020. Enhanced lipid productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis* sp. using a DNA-free CRISPR-Cas9 RNP method. *Biores. Technol.* 303: 122932.
- Daboussi F., Leduc S., Maréchal A., Dubois G., Guyot V., Perez-Michaut C., Amato A., Falcatore A., Juillerat A., Beurdeley M., Voytas D.F., Cavarec L., Duchateau P. 2014. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology. *Nat. Commun.* 5: 3831.
- Dent R.M., Han M., Niyogi K.K. 2001. Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends Plant Sci.* 6(8): 364–371.
- Dhokane D., Shaikh A., Yadav A., Giri N., Bandyopadhyay A., Dasgupta S., Bhadra B. 2023. CRISPR-based bioengineering in microalgae for production of industrially important biomolecules. *Front Bioeng. Biotechnol.* 26(11): 1267826.
- Emmanuel S.O., Onome E., Charles O.O., Timothy P.C.E., Raphael N., Chukwudozie K.I., Abiodun O., Joshua I.O. 2022. Microalgae biorefinery: An integrated route for the sustainable production of high-value-added products. 16: 100323.
- Esquível M.G., Matos A.R., Marques Silva J. 2017. Rubisco mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* display divergent photosynthetic parameters and lipid allocation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(13): 5569–5580.
- Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. 2013. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31(7): 397–405.
- Gilchrist E.J., O'Neil N.J., Rose A.M., Zetka M.C., Haughn G.W. 2006. TILLING is an effective reverse genetics technique for *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genom.* 7: 262.

- Greiner A., Kelterborn S., Evers H., Kreimer G., Sizova I., Hegemann P. 2017. Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell*. 29(10): 2498–2518.
- Gupta R.M., Musunuru K. 2014. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Invest.* 124(10): 4154–4161.
- Hao X., Luo L., Jouhet J., Rébeillé F., Maréchal E., Hu H., Pan Y., Tan X., Chen Z., You L., Chen H., Wei F., Gong Y. 2018. Enhanced triacylglycerol production in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by inactivation of a Hotdog-fold thioesterase gene using TALEN-based targeted mutagenesis. *Biotechnol. Biofuels*. 11: 312.
- Henikoff S., Till B.J., Comai L., Division B.S., Hutchinson F., Washington S.H. 2004. Perspectives on Translational Biology TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Cancer Res.* 135(2): 630–636.
- Henning K., Anastasios M. 2014. The chloroplast signal recognition particle (CpSRP) pathway as a tool to minimize chlorophyll antenna size and maximize photosynthetic productivity. *Biotechnol. Adv.* 32: 66–72.
- Hlavova M., Turoczy Z., Bisova K. 2015. Improving microalgae for biotechnology – From genetics to synthetic biology. *Biotechnol. Adv.* 33(6): 1194–1203.
- Holkers M., Maggio I., Liu J., Janssen J.M., Miselli F., Mussolino C., Recchia A., Cathomen T., Gonçalves M.A. 2013. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucl. Acids Res.* 41(5): e63.
- Hu J., Wang D., Chen H., Wang Q. 2023. Advances in Genetic Engineering in Improving Photosynthesis and Microalgal Productivity. *Int. J. Mol. Sci.* 24(3): 1898.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096): 816–821.
- Josephine A., Vijaya Raghavan R., Kumar T.S., Nagendran N., Dharani G., Kirubakaran R. 2022. An insight into the influence of random mutagenesis on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* – a transcriptome study. *Biomass Conv. Bioref.* 14(13): 1–16.
- Khan S., Al-Qurainy F., Anwar F. 2009. Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environ. We Int. J. Sci. Techol.* 4: 1–21.
- Kim J., Chang K.S., Lee S., Jin E. 2021. Establishment of a Genome Editing Tool Using CRISPR-Cas9 in *Chlorella vulgaris* UTEX395. *Int. J. Mol. Sci.* 22(2): 480.
- Kurita T., Moroi K., Iwai M., Okazaki K., Shimizu S., Nomura S., Saito F., Maeda S., Takami A., Sakamoto A., Ohta H., Sakuma T., Yamamoto T. 2020. Efficient and multiplexable genome editing using Platinum TALENs in oleaginous microalga, *Nannochloropsis oceanica* NIES-2145. *Gen. Cells.* 25(10): 695–702.
- Lin W.R., Ng I.S. 2020. Development of CRISPR/Cas9 system in *Chlorella vulgaris* FSP-E to enhance lipid accumulation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 133: 109458.

- Lin J.Y., Lin W.R., Ng I.S. 2022. CRISPRa/i with Adaptive Single Guide Assisted Regulation DNA (ASGARD) mediated control of *Chlorella sorokiniana* to enhance lipid and protein production. *Biotechnol. J.* 17(10): e2100514.
- Ma X., Yao L., Yang B., Lee Y.K., Chen F., Liu J. 2017. RNAi-mediated silencing of a pyruvate dehydrogenase kinase enhances triacylglycerol biosynthesis in the oleaginous marine alga *Nannochloropsis salina*. *Sci. Rep.* 7: 11485.
- Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Sander J.D., Voytas D.F., Joung J.K. 2009. Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat. Prot.* 4(10): 1471–1501.
- Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Osiaik A., Wright D.A., Anthony R.M., Eichinger M., Jiang T., Foley J.E., Winfrey R.J., Townsend J.A., Unger-Wallace E., Sander J.D., Müller-Lerch F., Fu F., Pearlberg J., Göbel C., Dassie J.P., Pruett-Miller S.M., Porteus M.H., Sgroi D.C., Iafrate A.J., Dobbs D., McCray P.B., Jr., Cathomen T., Voytas D.F., Joung J.K. 2008. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol. Cell.* 31(2): 294–301.
- McManus M.T., Sharp P.A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 3(10): 737–747.
- Negi S., Perrine Z., Friedland N., Kumar A., Tokutsu R., Minagawa J., Berg H., Barry A.N., Govindjee G., Sayre R. 2020. Light regulation of light-harvesting antenna size substantially enhances photosynthetic efficiency and biomass yield in green algae. *Plant J.* 103: 584–603.
- Park S., Nguyen T.H.T., Jin E. 2019. Improving lipid production by strain development in microalgae: Strategies, challenges and perspectives. *Biores. Technol.* 292: 121953.
- Pei-Hsun K.I., I-Son N. 2017. CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biores. Technol.* 245(Pt B): 1527–1537.
- Polle J.E., Kanakagiri S.D., Melis A. 2003. TLA1, a DNA insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta.* 217(1): 49–59.
- Ramirez C.L., Foley J.E., Wright D.A., Müller-Lerch F., Rahman S.H., Cornu T.I., Winfrey R.J., Sander J.D., Fu F., Townsend J.A., Cathomen T., Voytas D.F., Joung J.K. 2008. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat. Methods.* 5(5): 374–375.
- Rathod J.P., Vira C., Lali A.M., Prakash G. 2020. Metabolic engineering of *Chlamydomonas reinhardtii* for enhanced β -carotene and lutein production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 190(4): 1457–1469.
- Schüler L., Greque de Moraes E., Trovão M., Machado A., Carvalho B., Carneiro M., Maia I., Soares M., Duarte P., Barros A., Pereira H., Silva J., Varela J. 2020. Isolation and Characterization of Novel *Chlorella vulgaris* Mutants With Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8: 469.
- Sizova I., Greiner A., Awasthi M., Kateriya S., Hegemann P. 2013. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J.* 73(5): 873–882.

- Song I., Kim J., Baek K., Choi Y., Shin B., Jin E. 2020. The generation of metabolic changes for the production of high-purity zeaxanthin mediated by CRISPR-Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbial. Cell Fact.* 19(1): 220.
- Song I., Kim S., Kim J., Oh H., Jang J., Jeong S.J., Baek K., Shin W.S., Sim S.J., Jin E. 2022. Macular pigment-enriched oil production from genome-edited microalgae. *Microbial. Cell Fact.* 21(1): 27.
- Sunipa S., Gour G.S. 2021. CRISPR mediated Lipid Enhancement in Microalgae. *Res. J. Biotechnol.* 16: 220–226.
- Takahashi K., Ide Y., Hayakawa J., Yoshimitsu Y., Fukuhara I., Abe J., Kasai Y., Harayama S. 2018. Lipid productivity in TALEN-induced starchless mutants of the unicellular green alga *Coccomyxa* sp. strain Obi. *Algal Res.* 32: 300–307.
- Trovão M., Schüler L.M., Machado A., Bombo G., Navalho S., Barros A., Pereira H., Silva J., Freitas F., Varela J. 2022. Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain Improvement towards Industrial Production. *Mar Drugs.* 20(7): 440.
- Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 11(9): 636–646.
- Verruto J., Francis K., Wang Y., Low M.C., Greiner J., Tacke S., Kuzminov F., Lambert W., McCarren J., Ajjawi I., Bauman N., Kalb R., Hannum G., Moellering E.R. 2018. Unrestrained markerless trait stacking in *Nannochloropsis gaditana* through combined genome editing and marker recycling technologies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 115(30): E7015–E7022.
- Wyman C., Kanaar R. 2006. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* 40: 363–383.
- Xing W., Zhang R., Shao Q., Meng C., Wang X., Wei Z., Sun F., Wang C., Cao K., Zhu B., Gao Z. 2021. Effects of laser mutagenesis on microalgae production and lipid accumulation in two economically important fresh *Chlorella* strains under heterotrophic conditions. *Agronomy.* 11: 961.
- Yang L., Guell M., Byrne S., Yang J.L., De Los Angeles A., Mali P., Aach J., Kim-Kiselak C., Briggs A.W., Rios X., Huang P.Y., Daley G., Church G. 2013. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucl. Acids Res.* 41(19): 9049–9061.
- Zakhrabekova S.M., Gough S., Lundh L., Hansson M. 2013. Functional Genomics and Forward and Reverse Genetics Approaches for Identification of Important QTLs in Plants. *Proc. Azerbaijan Natl. Acad. Sci.* 68: 23–28.
- Zhang C., Hu H. 2014. High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. *Mar. Gen.* 16: 63–66.

Josephine A. ¹ (<https://orcid.org/0000-0002-8149-7439>)

Kumar T.S. ² (<https://orcid.org/0000-0002-9981-9141>)

Ashok Kumar S. ³ (<https://orcid.org/0000-0001-5682-8972>)

Dharani G. ² (<https://orcid.org/0000-0003-1250-5594>)

Kirubakaran R. ² (<https://orcid.org/0000-0001-6299-1776>)

¹ Department of Research, Meenakshi Academy of Higher Education and Research, Chennai-600 078, Tamil Nadu, India

² Marine Biotechnology Division, National Institute of Ocean Technology, Ministry of Earth Sciences, Government of India, Pallikaranai, Chennai-600 100, Tamil Nadu, India

³ Centre for Biotechnology, Anna University, Chennai-600 025, Tamil Nadu, India

Enhanced biomass, lipid and bioactive compounds from crispr-cas9, crispri and asgard based genetically modified microalgae: a promising frontier in biotechnology

In recent years, genetic engineering has witnessed a remarkable shift towards harnessing the potential of microalgae for various applications including enhanced biomass production, biofuel production, wastewater treatment and the synthesis of valuable bioactive compounds. Our previous study has proven that genetic modifications of *Chlorella vulgaris* Beijer. using random mutagenesis significantly enhanced the lipid content, making it more ideal for biofuel production in *C. vulgaris*. However, efficient genetic engineering tools are still lacking in their ability to simultaneously augment the overall production of biomass and bioactive compounds. The present review discusses the most recent tools and strategies that are used to engineer microalgal strains, from culturing to modern gene-editing techniques like Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and CRISPR associated protein 9 (CRISPR-Cas9). Numerous studies have reported that targeted nucleases represent a remarkable advancement in genome manipulation, offering unparalleled precision. A novel variant of CRISPR, known as CRISPRi technique was reported to yield significant outcomes in microalgal species even under non-stressful conditions. Further, to curtail the bottlenecks due to high guanine-cytosine contents of DNA in microalgae, a new approach such as Adaptive Single Guide Assisted Regulation DNA (ASGARD) was explored along with CRISPRi, which yielded higher lipid and protein contents, thus finding indispensable applications in industry. Hence, this review effectively conveys the advantages and disadvantages associated with various genetic engineering tools and the complexity and precision required in genetic modification and the resulting potential for improved biomass, lipid and bioactive compounds productivity in marine microalgal species.

Key words: microalgae, *Chlorella vulgaris*, genetic engineering, CRISPR-Cas9, biomass, biofuel, bioactive compounds

Citation. Josephine A., Kumar T.S., Ashok Kumar S., Dharani G., Kirubakaran R. 2025. Enhanced biomass, lipid and bioactive compounds from crispr-cas9, crispri and asgard based genetically modified microalgae: a promising frontier in biotechnology. *Algologia*. 35(2): 85–103. <https://doi.org/10.15407/alg35.02.85>