



Chlamydomonas reinhardtii as a novel photobioreactor to produce recombinant proteins

ARTICLE INFO

Article Type

Analytical Review

Authors

Shamriz S.¹ PhD,
Ofoghi H.*¹ PhD

How to cite this article

Shamriz S, Ofoghi H. Chlamydomonas reinhardtii as a novel photobioreactor to produce recombinant proteins. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 211-221.

¹Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Biotechnology Department,
Iranian Research Organization for
Science & Technology, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 56277193
Fax: +98 (21) 56276636
ofoghi@irost.ir

Article History

Received: November 25, 2017
Accepted: February 27, 2018
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Microalgae are microscopic algae found in a wide range of habitats including freshwater and marine systems. Over the last decades, biotechnological processes based on microalgae have been receiving increasing interest due to their potential to produce large quantities of valuable products used as human food supplements, pharmaceuticals and animal feed. Microalgae have also been proved as an efficient and cost-effective platform for recombinant protein production. Most progress in this field has been achieved using *Chlamydomonas reinhardtii*, a photosynthetic unicellular alga which has been mostly considered as a model organism in different studies. High growth rate, ease of cultivation, well-established genetics and the ability to perform post-translational modifications are the most beneficial attributes that have made *C. reinhardtii* an attractive system for the expression of recombinant proteins. In this review, we focus on *C. reinhardtii* as a novel platform for the development of advanced recombinant products and compare them with other commonly used expression systems. We also present a comprehensive overview of its structure, life cycle, culture systems, and media in detail and then discuss the strategies for engineering its three different genomes to produce recombinant cells. Finally, algal culture collections in the world are introduced.

Keywords Algae; Cloning; Genetic Engineering; Recombinant Protein Production

CITATION LINKS

[1] Construction of ... [2] Expression in ... [3] An overview of ... [4] FDA biopharmaceutical ... [5] Production of recombinant ... [6] High level ... [7] Human calcitonin ... [8] Cloning and expression ... [9] Comparison of tobacco ... [10] Evaluation of ... [11] Large-scale biodiesel ... [12] Biomass and lipid ... [13] A bright future for ... [14] High-value ... [15] Transgene expression in ... [16] Expression of plastid ... [17] Synthetic biology ... [18] The *Chlamydomonas* ... [19] *Chlamydomonas* ... [20] The *Chlamydomonas* ... [21] The *Chlamydomonas* ... [22] Tools and techniques... [23] Transmission of mitochondrial ... [24] The microalga *Chlamydomonas* ... [25] Genetic engineering of ... [26] Microalgae as ... [27] Algal transgenics ... [28] Strategies for high-level ... [29] High-frequency ... [30] Expression of the arylsulfatase ... [31] Copper response element ... [32] The flanking regions ... [33] The HSP70A promoter ... [34] Transcriptional regulation ... [35] A synthetic gene coding ... [36] The bacterial phleomycin ... [37] Insertion mutagenesis of *Chlamydomonas* ... [38] Expression of a foreign gene ... [39] Establishment of an efficient ... [40] A *Streptomyces rimosus* ... [41] A eubacterial gene ... [42] An engineered *Streptomyces* ... [43] The CRY1 gene in ... [44] Generation of *Chlamydomonas* ... [45] Evaluation of three ... [46] Molecular analysis ... [47] Stable nuclear ... [48] The argininosuccinate ... [49] RH highly specific ... [50] Localization of the ... [51] Stable nuclear ... [52] Micro-algae come ... [53] Codon usage tabulated ... [54] Translation efficiency ... [55] Effect of linker length ... [56] Minimal extent of ... [57] Chloroplast DNA ... [58] Methodologies for ... [59] Sub-micron gold ... [60] A simple, low-cost ... [61] Tools for chloroplast ... [62] Chloroplast genetic ... [63] Transformation of ... [64] The ARG9 gene encodes ... [65] Transgenic expression of ... [66] Site-specific mutagenesis ... [67] Chloroplast transformation ... [68] The *Klebsiella* ... [69] Engineering the chloroplast ... [70] Heat-stable oral ... [71] Robust expression ... [72] Production of therapeutic ... [73] Foot-and-mouth ... [74] Enhanced chloroplast ... [75] Specific roles of ... [76] The sequence and ... [77] Heterologous expression ... [78] Production of ... [79] Genetics and ... [80] Photobioreactors for ... [81] Scale-down ... [82] The effect of ... [83] Nutritional studies ... [84] Closed photobioreactors ... [85] Photobioreactors for ... [86] Cytochrome f and ... [87] Mitotic replication ... [88] The assimilation ... [89] Metabolic control ... [90] Urate oxidase ... [91] Amide metabolism... [92] Engineering photosynthetic... [93] Growing phototrophic ... [94] Cutting edge of ... [95] The CO₂ ... [96] Mixotrophic growth ...

ریزجلبک کلامیدوموناس رینهارتی: کارخانه‌ای سبز برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب

شبنم شمعیز PhD

پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

حمیده افقی* PhD

پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده

با توجه به کاربرد گسترده پروتئین‌ها در زمینه‌های مختلف علمی و صنعتی و عدم امکان استخراج بهینه و مقرون به صرفه آنها از منابع طبیعی، بهترین راه چاره برای دستیابی به منبعی نامحدود از این مولکول‌های پیچیده زیستی استفاده از تکنولوژی پروتئین نو ترکیب است. طی دهه‌های گذشته پیشرفت‌های حاصل در زمینه مهندسی ژنتیک و دست‌ورزی موجودات مختلف منجر به توسعه شمار زیادی از سیستم‌های بیانی برای تولید انواع مختلف پروتئین‌ها به صورت محلول و فعال زیستی شده است. امروزه یکی از مطرح‌ترین سیستم‌های بیان برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب، ریزجلبک‌ها هستند. ریزجلبک‌ها گروه بزرگی از موجودات فتوسنتزکننده میکروسکوپی هستند که در اکوسیستم‌های آبی زندگی می‌کنند. بیشتر پیشرفت‌ها در این زمینه با استفاده از کلامیدوموناس رینهارتی (*Chlamydomonas reinhardtii*)، ریزجلبک یوکاریوتی تک‌سلولی و فتوسنتزکننده، به عنوان موجود مدل حاصل شده است. در این مطالعه ابتدا سیستم‌های بیانی مختلف و مزایای سیستم کلامیدوموناس رینهارتی مورد بررسی قرار گرفته، سپس به شرح تفصیلی ساختار و چرخه زندگی این جلبک استراتژی‌های موجود برای مهندسی هر سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی آن به منظور تولید سویه‌های نو ترکیب و انواع سیستم‌ها و محیط کشت‌های مورد نیاز برای کشت آن پرداخته و در پایان مراکز کشت و نگهداری ریزجلبک‌ها، از جمله کلامیدوموناس رینهارتی در جهان را معرفی می‌کنیم.

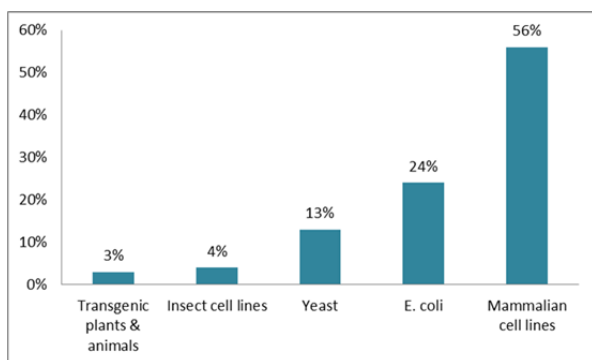
کلیدواژه‌ها: ریزجلبک، مهندسی ژنتیک، پروتئین نو ترکیب، همسانه‌سازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۸

* نویسنده مسئول: ofoghi@irost.ir

بوده و در شکل عملکردی و فعال زیستی خود باشند. پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی DNA نو ترکیب منجر به توسعه شمار زیادی از سیستم‌های بیانی بر پایه انواع سلول‌های زنده و موجودات شده است. اولین مرحله در تولید پروتئین نو ترکیب، همسانه‌سازی DNA هدف، سپس بیان و تولید پروتئین در سیستم بیانی منتخب است. انواع مختلف سیستم‌های بیانی شامل باکتری‌ها، مخمرها، کپک‌ها، سلول‌های پستانداران و حشرات، گیاهان، جلبک‌ها و حیوانات ترانسژنیک است. درصد استفاده از هر کدام از این سیستم‌های بیانی مختلف در تولید مواد دارویی زیستی در نمودار ۱ نشان داده شده است [3, 4]. کیفیت پروتئین، عملکرد، سرعت تولید و میزان محصول از مهم‌ترین فاکتورهایی هستند که در هنگام انتخاب سیستم بیانی مناسب برای تولید پروتئین نو ترکیب باید مد نظر قرار گیرند. ویژگی‌های انواع سیستم‌های بیانی در جدول ۱ مقایسه شده است [5]. همان‌طور که دیده می‌شود هر سیستم بیانی مزایا و معایب خاص خود را دارد (نمودار ۱؛ جدول ۱).



نمودار ۱) درصد استفاده از هر کدام از سیستم‌های بیانی مختلف در تولید مواد دارویی زیستی [3, 4]

جدول ۱) مقایسه انواع سیستم‌های بیانی [5]

ویژگی‌ها	باکتری	مخمر	سلول پستانداران	حیوانات ترانسژنیک	گیاهان ترانسژنیک
مدت زمان تولید	کوتاه	متوسط	طولانی	طولانی	طولانی
هزینه تولید	متوسط	متوسط	زیاد	زیاد	کم
هزینه افزایش مقیاس	زیاد	زیاد	زیاد	زیاد	کم
هزینه نگهداری	ارزان	ارزان	گران	گران	ارزان
دمای نگهداری	-۲۰°C	-۲۰°C	نیترژن مایع	نیترژن مایع	دمای اتاق
محصول تکثیر	آسان	آسان	سخت	امکان‌پذیر	آسان
قندگذاری	ندارد	نادرست	درست	درست	گاهی انجام می‌شود
تغییرات پس از ترجمه	خیر	تا حدودی	بله	بله	بله
تولید پروتئین‌های چند زیرواحدی	خیر	خیر	خیر	بله	بله
میزان محصول	متوسط	زیاد	متوسط/زیاد	زیاد	زیاد
احتمال خطر (آلودگی با پاتوژن‌های انسانی)	بله	نامعلوم	بله	بله	نامعلوم
مسائل اخلاقی	کم	متوسط	متوسط	زیاد	متوسط
سطح ایمنی	پایین	نامعلوم	متوسط	بالا	بالا

با توجه به مزایای گسترده گیاهان نسبت به سایر سیستم‌های بیانی، طی چند دهه گذشته برای تولید پروتئین‌ها و سایر

مقدمه

پروتئین‌ها کاربرد گسترده‌ای در صنعت و داروسازی دارند. در ابتدا تولید پروتئین به روش خالص‌سازی پروتئین از منابع طبیعی صورت می‌گرفت که فرآیندی سخت، گران و زمان‌بر به شمار می‌آمد. با اختراع همسانه‌سازی DNA توسط استنلی کوهن و هربرت بویر، مهندسی ژنتیک که امکان انتقال سریع و راحت ژن میان انواع گونه‌های زیستی را فراهم می‌سازد، پا به عرصه حیات گذاشت [1]. این کشف منجر به توسعه و تولید انواعی از پروتئین‌های نو ترکیب با کاربردهای صنعتی و درمانی شد. اولین داروی مورد تایید FDA که با استفاده از تکنولوژی DNA نو ترکیب تولید شد، انسولین انسانی بود که توسط الی/لیلی در ۱۹۸۲ تولید شد و توسعه یافت [2]. با ورود به هزاره سوم تقاضای جهانی برای پروتئین‌های نو ترکیب به شدت افزایش یافت. پیدایش درمان‌های جدید براساس پروتئین‌های نو ترکیب انسانی و افزایش نیاز به پروتئین‌هایی با کاربرد تشخیصی و صنعتی، نیروی اصلی پیش‌برنده در توسعه میزبان‌های بیانی جدید، ایمن و مقرون به صرفه برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب بود. پروتئین‌های زیستی نسبت به انواع شیمیایی از مزایای بسیاری برخوردارند، زیرا اختصاصی‌تر عمل کرده و تاثیر بیشتری بر سلول‌ها و بافت‌های هدف دارند که این امر منجر به کاهش اثرات سوء دارو و در مقابل بهبود روند درمان می‌شود. البته این اثرات زمانی دیده می‌شود که پروتئین‌ها پایدار

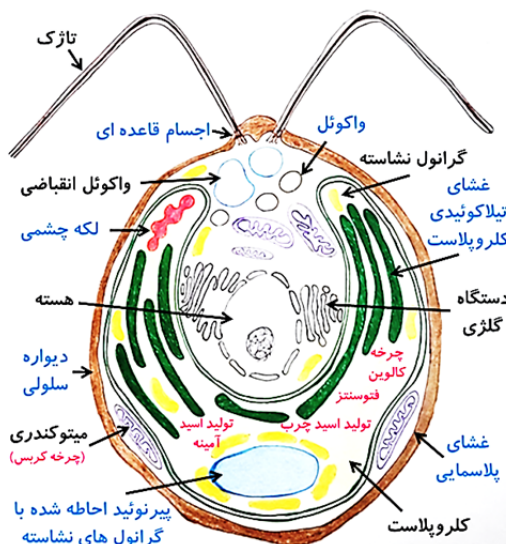
پروکاریوتی است. ریبوزوم‌ها و RNA پلیمراز موجود در کلروپلاست مشابه انواع باکتریایی بوده و اکثر ژن‌ها مشابه ایران‌های باکتریایی به صورت واحدهای پلی‌سیسترونی سازمان یافته‌اند [16, 17]. رده‌بندی کلأمیدوموناس رینهاردتی (<http://www.MetaMicrobe.com>) در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲) رده‌بندی کلأمیدوموناس رینهاردتی

فرمانرو (سلسله)	گیاهان
زیرفرمانرو (زیرسلسله)	گیاهان سبز
Infrakingdom	کلروفیتا- جلبک سبز
دسته	کلروفیتا- جلبک سبز- algae vertes
زیردسته	Chlorophytina
رده	Chlorophyceae
راسته	کلأمیدومونادالس
خانواده	کلأمیدوموناسه
جنس	کلأمیدوموناس
گونه	کلأمیدوموناس رینهاردتی

ریخت‌شناسی کلأمیدوموناس رینهاردتی

کلأمیدوموناس رینهاردتی موجود تک‌سلولی بیضی‌شکلی است که ۱۰ تا ۲۰ میکرومتر طول داشته، دارای چند میتوکندری، دو تاژک قدامی برای حرکت و جفت‌گیری، یک پیرنوئید بزرگ برای تثبیت CO₂، یک لکه چشمی حساس به نور برای جهت‌یابی در هنگام شنا و یک کلروپلاست دارای دستگاه فتوسنتز و محلی برای انجام مسیرهای متابولیکی مهم، است. تک کلروپلاست کلأمیدوموناس رینهاردتی هسته را احاطه کرده و حدود ۴۰ تا ۶۰٪ حجم سلول را اشغال می‌کند [18]. دیواره سلولی این جلبک اساساً متشکل از گلیکوپروتئین‌های غنی از هیدروکسی‌پرولین بوده و هیچ سلولزی در ساختار آن وجود ندارد [19] (شکل ۱).



شکل ۱) ساختار سلولی کلأمیدوموناس رینهاردتی

ژنوم کلأمیدوموناس رینهاردتی

کلأمیدوموناس رینهاردتی دارای سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی است. ژنوم هسته‌ای بزرگ‌ترین ژنوم است. این ژنوم حدود ۱۰۰ تا ۱۱۰ میلیون جفت‌باز و ۱۵۰۰۰ ژن داشته، متشکل از ۱۷ کروموزوم بوده و غنی از GC (۶۵٪) است. وراثت ژن‌های هسته از

محصولات نو ترکیب استفاده گسترده‌ای از آنها شده است [9-6]. با این وجود این سیستم نیز معایب و محدودیت‌های خاص خود را دارد که از جمله آنها می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود: رشد اکثر گیاهان کند است، احتمال شارش ژن بین محصولات گیاهی وجود دارد، فرآیندهای پایین‌دستی پردازشگران بوده و منجر به کاهش کیفیت و میزان محصول نو ترکیب می‌شود. ریزجلبک‌ها جایگزین مناسب سیستم‌های گیاهی در زمینه تولید محصولات نو ترکیب هستند [10]. از دیرباز ریزجلبک‌ها، به عنوان منبعی برای استخراج مواد طبیعی موثر و باارزش، مورد توجه بسیاری از صنایع بوده‌اند [11, 12]. طی دهه‌های اخیر استفاده از ریزجلبک‌ها به عنوان میزبانی مقرون به صرفه برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب مورد بحث و بررسی بسیاری قرار گرفته است. به دلیل چرخه زندگی ساده، ژنوم شناخته شده و کشت آسان کلأمیدوموناس رینهاردتی (*Chlamydomonas reinhardtii*) بیشتر پیشرفت‌ها در این زمینه، روی این ریزجلبک انجام شده است. مزایای اصلی کلأمیدوموناس رینهاردتی به عنوان سیستم بیانی شامل موارد زیر است [13-15]:

- ۱) فرآیند انتقال ژن هدف ساده بوده و سویه‌های نو ترکیب در مدت کوتاهی حدود ۴ تا ۶ هفته تولید می‌شوند.
- ۲) سرعت رشد، تقسیم و تکثیر بالا بوده و دستیابی به یک تراکم سلولی بالا در نور و هوادهی مناسب در مدت زمان کوتاهی میسر می‌شود.
- ۳) کشت این جلبک‌ها به نسبت ساده بوده نیازهای غذایی آنها محدود است. بنابراین افزایش مقیاس کار آسان و مقرون به صرفه است. علاوه بر این امکان کشت آن به سه صورت فتوتروفیک، هتروتروفیک و میکسوتروفیک وجود دارد.
- ۴) توانایی اعمال بسیاری از تغییرات پس از ترجمه را دارد.
- ۵) هر سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی آن به خوبی شناخته شده و امکان مهندسی هر سه ژنوم به منظور تولید سلول‌های نو ترکیب میسر است.
- ۶) پروموتورها، UTRها و نشانگرهای شناخته شده‌ای برای بیان ژن هدف وجود دارند؛ هر چند مطالعات به منظور یافتن قدرتمندترین پروموتورها هنوز ادامه دارد.
- ۷) از موجودات ایمن محسوب می‌شود. این ویژگی مزیت بسیار مهمی بوده زیرا امکان استفاده از کل سلول نو ترکیب را به عنوان ماده غذایی، دارو یا واکسن خوراکی میسر می‌سازد.
- ۸) احتمال آلودگی آن با پاتوژن‌های انسانی وجود ندارد.
- ۹) احتمال شارش ژن بین گیاهان، خصوصاً زمانی که در فتوبیوراکتورها و سیستم‌های بسته کشت داده شود، وجود ندارد.

ریزجلبک سبز کلأمیدوموناس رینهاردتی

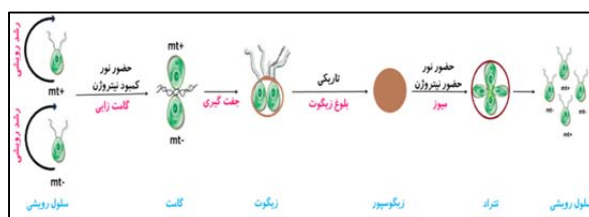
طی دهه‌های گذشته ریزجلبک سبز کلأمیدوموناس رینهاردتی مورد مطالعه و بررسی بسیاری قرار گرفته است. مطالعه این جلبک به درک تکامل سلول‌ها، تشکیل ساختارها و اندامک‌های سلولی مانند تاژک، کلروپلاست و میتوکندری و بسیاری از فعالیت‌های سلولی در یوکاریوت‌ها مانند حرکت و رشد سلولی، تولیدمثل، فتوسنتز و تنفس سلولی و نیز شناخت ژنتیک سلول کمک شایانی کرده است. علاوه بر این، طی دهه‌های گذشته پتانسیل کلأمیدوموناس رینهاردتی در زمینه تولید سوخت و انرژی مانند هیدروژن و متان زیستی و بیان نو ترکیب آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، واکسن‌ها و سایر محصولات نو ترکیب مورد توجه و مطالعه بسیاری قرار گرفته است. از نظر رده‌بندی، این ریزجلبک متعلق به یوکاریوت‌ها بوده اما مشابه سایر جلبک‌های سبز و گیاهان دارای پلاستیدی با منشا

طریق کراس‌های مندلی بین گامت مادری و پدری صورت می‌گیرد. تعیین توالی ژنوم کلایمیدوموناس رینهاردتی در سال ۲۰۰۷ کامل شد [19, 20].

کلروپلاست ژنوم خاص خود را داشته که پلاستوم نامیده می‌شود. پلاستوم DNA حلقوی متشکل از حدود ۲۰۰ کیلوگفت‌باز و ۹۹ ژن است، غنی از AT (۶۶٪) بوده و تنها از گامت مادر به ارث می‌رسد. ۲۰٪ توالی پلاستوم را DNA تکراری تشکیل می‌دهد [21]. کلروپلاست کلایمیدوموناس رینهاردتی حالت پلی‌پلوئیدی داشته و حدود ۵۰ تا ۸۰ کپی یکسان از پلاستوم در آن دیده می‌شود [22]. ژنوم میتوکندریایی کوچک و خطی بوده و حدود ۱۶ جفت‌باز و ۱۲ ژن دارد. ژنوم میتوکندری از گامت پدری به ارث می‌رسد [23].

چرخه زندگی کلایمیدوموناس رینهاردتی

کلایمیدوموناس رینهاردتی هاپلوئید بوده و به‌صورت دو نوع جفت متمایز از نظر ژنتیکی (mt+) و (mt-) وجود دارد. این دو نوع سلول به‌صورت غیرجنسی از طریق تقسیم دوتایی تکثیر یافته و در زمان نیاز چرخه جنسی را طی می‌کنند. کمبود نیتروژن منجر به جفت‌گیری گامت‌های مخالف شده و سلول دیپلوئید (زیگوسپور) تشکیل می‌شود. زیگوسپور دیواره خارجی بسیار محکمی داشته که از آن در مقابل شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌کند. زمانی که سطح نیتروژن به حالت عادی برگردد، تقسیم جنسی یا میوز انجام شده و چهار سلول هاپلوئید (دو تا از هر جفت) ایجاد می‌شود (شکل ۲) [19].



شکل ۲) چرخه زندگی کلایمیدوموناس رینهاردتی؛ mt مخفف واژه mate است.

مهندسی ژنتیک کلایمیدوموناس رینهاردتی

کلایمیدوموناس رینهاردتی موجودی مدل برای انجام مطالعات جامع در زمینه مهندسی ژنتیک و نیز میزبان بیانی برای بیان ژن‌های هدف خارجی در ریزجلبک‌ها است. طی سال‌های گذشته، تحقیقات گسترده‌ای روی این جلبک انجام شده و روش‌های موثر و قدرتمندی برای مهندسی ژنتیکی هر سه ژنوم هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی آن ابداع شده است. با وجود پیشرفت و موفقیت‌های حاصل، مهندسی ژنوم میتوکندری به‌منظور تولید محصولات نو ترکیب رایج نیست. در جدول ۳ مزایا و معایب مهندسی ژنوم هسته‌ای و کلروپلاستی به‌منظور تولید سلول‌های نو ترکیب با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

انتقال ژن هدف به ژنوم هسته‌ای

روش انتقال: طی دو دهه گذشته، انتقال ژن هدف به ژنوم هسته‌ای کلایمیدوموناس رینهاردتی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و روش‌های مختلفی شامل بمباران ریزذره‌ای (بیولستیک)، ورتکس در حضور DNA پلاسمیدی و ذرات شیشه‌ای، هم‌زدن در حضور DNA و silicon carbide whiskers، الکتروپوریشن و آلودگی با آگروباکتریوم برای انتقال ژن هدف به داخل سلول توسعه یافته‌اند [26-28]. از میان تمام این روش‌ها، ورتکس جلبک و DNA در حضور ذرات شیشه‌ای به دلیل عدم نیاز به تجهیزات خاص

و هزینه کم روش ارجح و مقدم است. در این فرآیند عمل سایشی ذرات شیشه باعث ایجاد منافذ موقتی در دیواره و غشای سلول گشته که از طریق آنها DNA هدف وارد سلول می‌شود. کارایی این روش زمانی افزایش می‌یابد که از جهش‌یافته‌های فاقد دیواره سلولی یا دارای نقص در دیواره استفاده شود زیرا نبود دیواره ورود DNA را تسهیل می‌کند [29]. یک مشکل اصلی در انتقال DNA به ژنوم هسته‌ای نبود امکان نو ترکیبی همولوگ بوده که منجر به ورود ژن هدف به‌صورت تصادفی در داخل ژنوم می‌شود. در نتیجه غربالگری جهش‌یافته‌های حاصل به‌منظور جداسازی انواعی با بیشترین میزان بیان پروتئین هدف کاری بس دشوار و زمان‌بر خواهد بود.

پروموترها و مارکرهای مورد استفاده

فاکتورهای مختلفی بر بیان ژن‌های هسته‌ای تأثیرگذار هستند که از آنها می‌توان در بیان ژن هدف استفاده کرد [30]. بر این اساس پروموترها و نشانگرهای مختلفی به‌منظور بیان موثر ژن هدف توسعه یافته‌اند که در جدول‌های ۴ و ۵، به ترتیب، ذکر شده‌اند.

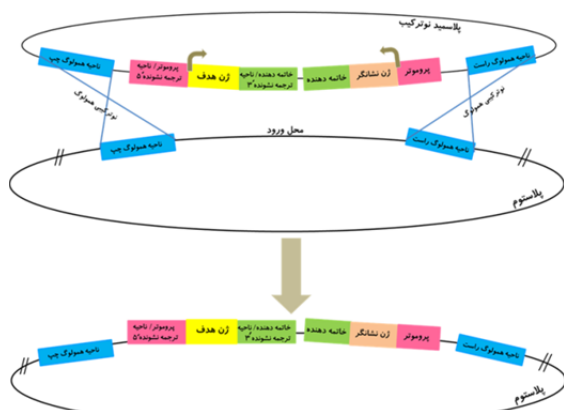
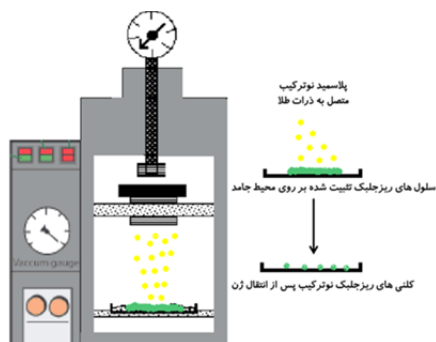
جدول ۳) مقایسه مزایا و معایب مهندسی ژنوم هسته‌ای و کلروپلاستی کلایمیدوموناس رینهاردتی

محدودیت‌ها	مزایا	مهندسی ژنتیک کلایمیدوموناس رینهاردتی
- ورود ژن هدف به ژنوم به‌صورت تصادفی انجام شده که منجر به اعمال اثرات اپی‌ژنتیک و خاموشی ژن می‌شود. - ساختار ژنوم فشرده بوده و مهندسی آن را دشوار می‌سازد. - میزان محصول نو ترکیب کم است.	- اعمال تغییرات پس از ترجمه - قندگذاری	ژنوم هسته‌ای [15, 24]
- ژن به‌صورت هدفمند از طریق نو ترکیبی همولوگ وارد ناحیه خاصی از ژنوم کلروپلاست می‌شود. - خاموشی ژن وجود ندارد. - امکان بیان چندین ژن به طور همزمان به صورت اپران وجود دارد. - انتقال ژن هدف و مهندسی ژنتیک پلاستوم ساده‌تر بوده و از آنجایی که هر سلول کلایمیدوموناس رینهاردتی فقط یک کلروپلاست دارد دستیابی به سویه‌های هموپلاسم و بیان یکنواخت آسان است. - بیان قدرتمند بوده و میزان محصول نو ترکیب بالا است. - کلروپلاست دارای چپرون‌ها و دی‌سولفید ایزومرازهایی است که به تاخوردگی صحیح پروتئین‌های پیچیده کمک می‌کند. - کلروپلاست به‌عنوان اتاقکی از محصول نو ترکیب در برابر پروتئین‌های سلولی محافظت می‌کند.	- قندگذاری انجام نمی‌شود.	ژنوم کلروپلاستی [1, 15, 25]

ریزجلیک کلامیدوموناس رینهاردتی: کارخانه‌ای سبز برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب ۲۱۵ نوکلئوتید سوم کدون G یا C است [53]. بهینه‌سازی ژن بر خاموشی ژن در مرحله نسخه‌برداری و تغییرات پس از نسخه‌برداری نیز بسیار موثر است [54].

انتقال ژن هدف به کلروپلاست کلامیدوموناس رینهاردتی

از آنجایی که کلامیدوموناس رینهاردتی از معدود موجوداتی است که انتقال کلروپلاستی در آن به‌خوبی مطالعه و بررسی شده است، به‌عنوان موجود مدل برای مطالعات مولکولی و ژنتیکی ژنوم کلروپلاستی انتخاب شده است. علاوه بر این، کلروپلاست محل انجام بسیاری از مسیرهای بیوسنتزی مهم بوده و جایی است که پروتئین‌های محلول و پروتئین‌های غشایی در آن ذخیره می‌شوند. بنابراین این اندامک محل مناسبی برای سنتز و تجمع محصولات نوترکیب ارزشمند است [22, 26, 55]. برخلاف انتقال هسته‌ای، ورود ژن هدف به پلاستوم از طریق نوترکیبی همولوگ بوده و انتقال به‌صورت دقیق به محل خاصی درون پلاستوم انجام می‌شود (شکل ۳). به‌منظور انجام نوترکیبی و انتقال پایدار ژن، DNA هدف باید دارای توالی‌های همولوگ با پلاستوم به‌صورت دنباله در دو طرف خود باشد. به‌طور معمول این توالی‌ها حدود یک‌کیلوگفت‌باز در هر سمت ژن هدف هستند [56]. با این وجود با توالی‌های کوتاه‌تر نیز انتقال موثر صورت گرفته است. پلاستوم تنها از مادر (mt+) به ارث رسیده و پلاستوم پدر (mt-) طی فرایند جفت‌گیری از بین می‌رود [18, 57]. علاوه بر این، گروه‌های ژنی می‌توانند به‌صورت اپران وارد پلاستوم شده و هیچ اثر خاموشی ژنی بر آنها اعمال نمی‌شود [17]. مزایای کلروپلاست به‌طور کامل در جدول ۳ شرح داده شده است (شکل ۳).



شکل ۳) انتقال ژن هدف به کلروپلاست کلامیدوموناس رینهاردتی

روش‌های انتقال ژن به کلروپلاست کلامیدوموناس رینهاردتی

رایج‌ترین روش برای انتقال ژن هدف به کلروپلاست کلامیدوموناس رینهاردتی مباران ریزدراهی بوده که در اکثر موارد از دستگاه PDS-

جدول ۴) پروموتورهای هسته‌ای مورد استفاده‌ای در بیان ژن هدف در کلامیدوموناس رینهاردتی

پروموتور	منبع	توضیحات	مرجع
cyc6	کلامیدوموناس رینهاردتی	سیتوکروم c6	[31]
psaD	کلامیدوموناس رینهاردتی	پروتئین کمپلکس فتوسنتز I	[32]
hsp70A	کلامیدوموناس رینهاردتی	پروتئین شوک حرارتی 70A	[33]
nia1	کلامیدوموناس رینهاردتی	نیترا ترادوکناز	[34]
cop	کلامیدوموناس رینهاردتی	Chlamyopsin	[35]
rbcs2	کلامیدوموناس رینهاردتی	Small subunit of ribulosebisphosphat carboxylase	[36]
CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus	Cauliflower mosaic virus 35S	[37]
Nos	کلامیدوموناس رینهاردتی	نوپالین سنتاز	[38]
Nos	آگروباکتریوم تومیفاسینس (Agrobacterium tumefaciens)	Nopaline synthase from Agrobacterium tumefaciens	[38]
β -2-tub	کلامیدوموناس رینهاردتی	بتا-۲-توبولین	[30]

جدول ۵) نشانگرهای مورد استفاده در انتقال ژن هدف به ژنوم هسته‌ای کلامیدوموناس رینهاردتی

ژن نشانگر	محصول ژن	اساس گزینش	مرجع
Ble	پروتئین اتصال فلئومایسین	مقاومت به ژنوسین/فلئومایسین	[36, 39]
aphVIII	آمینوگلیکوزید ۳-فسفوترانسفراز	مقاومت به پاروموایسین	[40]
aadA	آمینوگلیکوزید ۳-آدنیل ترانسفراز	مقاومت به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین	[41]
aph7	آمینوگلیکوزید ۳-فسفوترانسفراز	مقاومت به هیگرومایسین	[42]
CRY1-1	پروتئین ریبوزومی سیتوسولیک S14	مقاومت امتین	[43, 44]
GAT	گلی فسفات آمینوترانسفراز	مقاومت به گلی فسفات	[45]
ALS	استولاکتات سنتاز	مقاومت به متیل سولفومتورون	[46]
NIT1	نیترا ترادوکناز	رشد در حضور نمک نیترا	[47]
ARG7	آرجینین سوکسینات لیاز	رشد در عدم حضور آرژنین	[48, 49]
NIC7	کوئینولینات سنتار	رشد در عدم حضور نیکوتینامید	[50]
OEE1	Oxygen-evolving enhancer protein1	رشد فتواتوتروفیک	[51]

نقش اینترون

بررسی‌ها نشان داده‌اند که حضور اینترون‌ها برای بیان موثر و فعال اکثر ژن‌های هسته‌ای در کلامیدوموناس رینهاردتی ضروری است. اگرچه ژن هدف نباید دارای اینترون‌های خودی باشد زیرا حذف صحیح این اینترون‌ها طی فرایند پیرایش امکان‌پذیر نیست. بنابراین ترکیبی از ژن هدف به همراه اینترون‌های همولوگ طراحی ایده‌آلی به‌منظور بیان موثر هسته‌ای است [52].

بهینه‌سازی کدون‌های ژن هدف

معمولاً فراوانی کدون‌های ژن هدف و میزبان بیانی با یکدیگر متفاوت هستند. نبود tRNAهای سازگار با کدون‌های مورد استفاده در ژن هدف منجر به قرارگیری اسیدهای آمینه اشتباه در رشته و ترجمه ناقص و کوتاه‌شدن زنجیره پلی‌پپتیدی می‌شود. یک روش موثر برای کاهش یا حذف این مشکل بهینه‌سازی ژن هدف بوده که در آن کدون‌های نادر ژن هدف با کدون‌های غالب میزبان بیانی عوض می‌شوند. بهینه‌سازی کدون‌های ژن هدف براساس فراوانی کدون‌های ژنوم هسته‌ای یک روش موثر در افزایش میزان بیان است. ژنوم هسته‌ای غنی از GC بوده و تقریباً در ۸۵٪ موارد

مشابه پلاستوم کلامیدوموناس رینهاردتی غنی از A/T بوده و بیان آن در کلروپلاست جهش یافته های ARG9 منجر به بازیابی سنتز آرژینین و احیا جهش یافته های اگزوتروف به انواع پروتوتروف می شود [53, 64]. نشانگرهای انتخاب برای انتقال ژن هدف به کلروپلاست کلامیدوموناس رینهاردتی در جدول ۶ ذکر شده اند.

جدول ۶ نشانگرهای مورد استفاده در انتقال ژن هدف به پلاستوم کلامیدوموناس رینهاردتی

ژن مارکر	محصول ژن	اساس گزینش	مرجع
<i>aadA</i>	آمینوگلیکوزید ۳- آدنیل ترانسفراز	مقاومت به اسپکتینومایسین و استرپتومایسین	[65]
<i>aphA6</i>	آمینوگلیکوزید ۳- ترانسفراز	مقاومت به کانامایسین	[61]
<i>rrnS&rrnL point mutation</i>	16S and 23S	مقاومت به اسپکتینومایسین، استرپتومایسین و اریترومایسین	[59]
<i>psbA mutant</i>	پروتئین D1 فتوسیتیم II	رشد فتواتوتروفیک	[66]
<i>atpB</i>	β subunit of ATP synthase	احیای قدرت فتوسنتز	[67]
<i>nifH</i>	بتا-گلوکورونیداز	احیای قدرت فتوسنتز	[68]
<i>psbA</i>	پروتئین D1 فتوسیتیم II	احیای قدرت فتوسنتز	[46]
<i>tscA</i>	Small RNA that participates in trans- splicing of the <i>psaA</i> transcript	احیای قدرت فتوسنتز	[69]
<i>arg9</i>	استیل اورنیتین آمینو ترانسفراز	احیای قدرت سنتز آرژینین در سویه های جهش یافته اگزوتروف	[64]

پروموتور، نواحی ۳' و ۵' ترجمه نشونده (3' & 5' UTRs)

بیشترین میزان بیان ژن هدف در کلروپلاست زمانی حاصل می شود که از پروموتورها و UTRهای اندوژن مربوط به ژن هایی با بیشترین میزان بیان مانند زیرواحد بزرگ ریبولوزیسی فسفات کربوکسیلاز [70]، پروتئین های D1 و D2 فتوسیتیم II (به ترتیب *psbA* و *psbD*) [71, 72] و زیرواحد آلفا-آدنوزین تری فسفاتاز (*atpA*) [73] استفاده شود. اگرچه مطالعات برای یافتن پروموتورها و UTRهای قدرتمند هنوز در حال انجام بوده و ادامه دارد اما تا به اکنون، براساس غلظت پروتئین نوترکیب، بهترین نتایج با عناصر تنظیمی *psbA* خصوصاً در سویه های دارای نقص در *psbA* [72] و نیز *psaA/5'UTR* به دست آمده است [74]. علاوه بر این سیستم های بیانی قابل تنظیم به منظور کنترل بیان ژن هدف در کلروپلاست نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند. این سیستم ها خصوصاً زمانی حائز اهمیت هستند که محصول ژن هدف برای سلول سمی بوده یا باعث تداخل در رشد سلول شود. اطلاعات به دست آمده از مطالعات مختلف نشان داده اند که پایداری mRNA و تجمع آن از طریق پروموتور و 5'UTR تعیین می شود. مطالعات انجام شده نشان دهنده حضور نواحی خاص درون 5'UTR هستند که بر پایداری mRNA تاثیرگذار بوده و می توان از آنها برای افزایش بیان ژن هدف استفاده کرد. علاوه بر این، ساختارهای ثانویه ایجاد شده در 5'UTR مربوط به mRNAهای پلاستییدی عناصر کلیدی برای تنظیم در سطح ترجمه هستند [75]. در مقابل، 3'UTR به نسبت تاثیر کمی بر میزان بیان ژن هدف دارد، هر چند برخی مطالعات نشان داده اند که توالی و ساختار 3'UTR ها نقش مهمی در تنظیم طول سازی، خاتمه پایداری و تجمع mRNA دارند. پروموتورهای کلروپلاستی در جدول ۷ ذکر شده اند [76].

1000/He برای انجام این انتقال استفاده می شود. قبل از بمباران، سلول های کلامیدوموناس رینهاردتی باید روی محیط کشت جامد پخش و ثابت شوند. دستگاه بمباران با استفاده از فشار بالای هلیوم DNA تثبیت شده روی ذرات طلا یا تنگستن را به سمت سلول های ثابت شده کلامیدوموناس رینهاردتی که در فشار ساب اتمسفری قرار دارند، شلیک می کند. از این تکنیک برای سویه های دارای دیواره نیز می توان استفاده کرد [58, 59].

فاکتورهای مختلفی شامل نوع، اندازه، سرعت ذرات، فاصله تا سلول های تثبیت شده، تعداد سلول های هدف بمباران، خطی یا حلقوی بودن پلاسمید نوترکیب و غلظت DNA هدف همگی در بهبود و افزایش کارایی انتقال ژن با استفاده از این تکنیک نقش دارند. ذرات طلا از نظر شکل و اندازه یک دست و یکنواخت هستند و با سایر مواد واکنش شیمیایی نمی دهند. حداکثر انتقال پایدار زمانی حاصل می شود که ریزترین ذرات طلا مورد استفاده قرار گیرند، احتمالاً به این دلیل که سلول دچار آسیب کمتری شده و سریع تر بهبود می یابد. در مقابل ذرات تنگستن از نظر شکل و اندازه نامنظم و ناهمگون بوده، گاهی برای سلول سمی هستند و می توانند DNA هدف متصل به خود را مرور زمان تجزیه کنند. مزیت ذرات تنگستن به طلا ارزان تر بودن آنها است [58, 59].

با وجود کارایی بالای این روش، قیمت بالای دستگاه بمباران و مواد مورد استفاده باعث شد تا روش های ساده تر و مقرون به صرفه تری پیشنهاد شوند. روش جایگزین بمباران ریز ذره ای، هم زدن سوسپانسیونی از سلول های فاقد دیواره (پروتوپلاست) یا دارای نقص در دیواره، DNA و ذرات شیشه ای با استفاده از ورتکس است. به نظر می رسد در اثر عمل فرسایشی ذرات شیشه ای منافذی روی سلول و غشای کلروپلاست ایجاد می شوند که موجب ورود مستقیم DNA به کلروپلاست می شوند. در این روش دیواره سلولی به عنوان سد فیزیکی عمل کرده و مانع ورود DNA می شود. دیواره سلولی را می توان از طریق جهش یا هضم آنزیمی با استفاده از اتولیزین (آنزیمی که طی فرایند جفت گیری فعال است) از بین برد [60]. همان طور که گفته شد کلروپلاست کلامیدوموناس رینهاردتی دارای ۸۰ کپی از پلاستوم است و برای دستیابی به سویه های هموپلاسم تمام این ۸۰ کپی باید نوترکیب شوند.

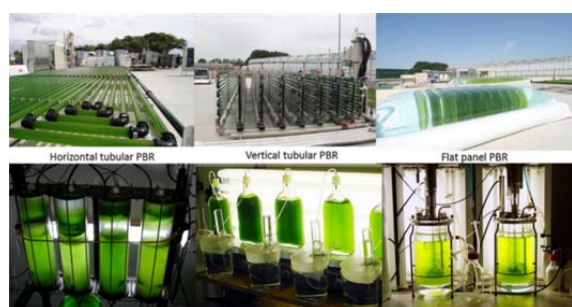
نشانگر انتخاب

به طور معمول گزینش سویه های ترانسفورم شده با استفاده از ژن های باکتریایی که موجب ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکی خاص می شوند، صورت می گیرد [61, 62]. به دلیل مسایل و نگرانی های زیستی و ایمنی و امکان انتقال ژن به جنس های باکتریایی استفاده از چنین نشانگرهای آنتی بیوتیکی در محصولات تجاری نامطلوب است. به همین دلیل تلاش شده است تا روش ها و استراتژی هایی جایگزین شوند که با محیط زیست و طبیعت سازگار باشند از جمله ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی به واسطه جهش نقطه ای در ژن های کلروپلاستی [63]. احیای قدرت فتوسنتزی با استفاده از ژن های فتوسنتزی که باعث تبدیل جهش یافته های غیر فتوسنتزی به انواع فتوتروف می شوند [61] و نشانگرهای متابولیکی که باعث احیای جهش یافته های اگزوتروف به انواع پروتوتروف می شوند [64]. برای مثال استیل اورنیتین آمینو ترانسفراز (ARG9) یک آنزیم ضروری در مسیر متابولیکی آرژینین است که در هسته کلامیدوموناس رینهاردتی کد شده و سپس به کلروپلاست منتقل می شود. جهش یافته های ARG9 اگزوتروف بوده و تنها قادر به رشد در حضور آرژینین هستند. ژن *ARG9* آرابیدوپسیس تالیانا

خلوص بالا امکان‌پذیر است. در سیستم‌های بسته شدت و طول موج نور، چرخه‌های تاریکی/روشنایی و سایر متغیرها به راحتی قابل کنترل هستند. امکان تامین نور سیستم‌های بسته از طریق منابع طبیعی و مصنوعی، هر دو، وجود دارد. به طور معمول فتوبیوراکتورهای آزمایشگاهی با نورهای مصنوعی نوردهی شده و دمای آنها به راحتی قابل کنترل است. فتوبیوراکتورهایی با مقیاس بالاتر از آزمایشگاه توسط نور خورشید نوردهی شده و کنترل دمای آنها سخت‌تر و نیازمند هزینه‌های بیشتری است [80]. در شکل ۵ برخی از سیستم‌های بسته آزمایشگاهی و صنعتی نشان داده شده‌اند.



شکل ۴) سیستم بازکشت ریزجلبک



شکل ۵) فتوبیوراکتورهای (سیستم بسته) کشت ریزجلبک

پارامترهای عمومی رشد

دسترسی به منبع نور و شدت و طول موج آن از موثرترین پارامترها بر میزان رشد جلبک‌ها از جمله کلامیدوموناس رینهاردتی، خصوصاً در شرایط کشت فتوتروفیک است. حضور نور و شدت آن بر میزان فتوسنتز و در نتیجه رشد و تکثیر سلولی تاثیرگذار است. افزایش شدت نور (تا حد بهینه) و میزان دسترسی به نور باعث افزایش میزان رشد می‌شود. نفوذ موثر نور درون فتوبیوراکتورها خصوصاً در کشت‌های غلیظ که میزان نور دریافتی در مناطق مختلف برابر نیست، یک فاکتور محدودکننده رشد به شمار می‌آید. از طرف دیگر دسترسی به منبع نور و شدت نور بیش از حد نیاز منجر به مهار نوری رشد می‌شود. طول موج بهینه برای انجام فتوسنتز در محدوده ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر است [82]. کلامیدوموناس رینهاردتی به طور معمول در دمای ۲۰°C تا ۲۵°C رشد بهینه را دارد. این بازه دمایی برای سایر ریزجلبک‌ها گسترده‌تر و معمولاً بین ۱۵°C تا ۳۰°C است. میزان pH محیط معمولاً به واسطه جذب CO₂ و تولید O₂ نوسان داشته اما در محدوده خاصی نزدیک به خنثی بر رشد تاثیر منفی ندارد. محدوده pH بهینه برای رشد کلامیدوموناس رینهاردتی ۶/۵ تا ۸ است [83]. میزان O₂ در محیط کشت باید کنترل شود تا به سطح بازدارندگی نرسد زیرا غلظت‌های بالای O₂ بر فتوسنتز تاثیر منفی دارد. گاز CO₂ با غلظت ۵% در هوا به محیط اضافه می‌شود و کمبود آن در شرایط فتوتروفی منجر به ایجاد تغییرات متابولیک و تجمع میزان زیادی نشاسته می‌شود. به منظور هوادهی و جلوگیری از رسوب و سایه‌اندازی سلول‌ها در محیط کشت که باعث تداخل در نفوذ نور می‌شود، از هم‌زدن و مخلوط کردن استفاده می‌شود. برای دستیابی به حداکثر میزان رشد، کشت‌ها باید به طور مداوم هم‌زده شوند [19, 84, 85].

جدول ۷) پروموتورهای مورد استفاده‌ای در بیان ژن هدف در کلروپلاست کلامیدوموناس رینهاردتی

پروموتور	منبع	توضیحات	مرجع
<i>rbcL</i>	کلامیدوموناس رینهاردتی	Large subunit of ribulosebiphosphate carboxylase	[70]
<i>psbA</i>	کلامیدوموناس رینهاردتی	D1 photosystem II reaction center protein	[72]
<i>psbD</i>	کلامیدوموناس رینهاردتی	D2 photosystem II reaction center protein	[71]
<i>atpA</i>	کلامیدوموناس رینهاردتی	زیر واحد آلفا ATP	[73]

بهینه‌سازی کدون

درصد GC پلاستوم نسبت به ژنوم هسته‌ای بسیار کمتر و حدود ۳۳% است و در ۸۰% موارد کدون‌های دارای نوکلئوتید A/T در جایگاه سوم نسبت به انواع دارای G/C غالب‌تر هستند. بنابراین به منظور افزایش میزان بیان، باید ژن هدف براساس کدون‌های غالب پلاستوم بهینه‌سازی و مجدد سنتز شود [53, 77, 78].

انتقال ژن هدف به میتوکندری کلامیدوموناس رینهاردتی

ورود ژن هدف به میتوکندری مشابه کلروپلاست بوده و DNA از طریق نوترکیبی همولوگ وارد ژنوم می‌شود [79]. به منظور افزایش بیان ژن، بهینه‌سازی کدون نیز باید انجام شود. ژنوم میتوکندری ۴۷/۵% GC داشته و در ۵۱/۳۵% موارد در جایگاه سوم کدون، نوکلئوتید G یا C قرار دارد [53]. انتقال ژن هدف به میتوکندری اولین بار با استفاده از بمباران ذره‌ای و احیای عملکردی تنفسی جهش‌یافته‌های دارای نقص در ژن *cob* میتوکندری که کدکننده سیتوکروم b است، انجام شد [79]. به دلیل تعداد بیشتر میتوکندری‌ها در هر سلول ظاهر شدن کلنی‌های نوترکیب روی محیط انتخابی نسبت به انتقال کلروپلاستی، زمان‌برتر است. مطالعات زیادی روی انتقال ژن هدف به میتوکندری انجام شده‌اند اما هنوز انتقال میتوکندریایی یک فرآیند رایج نیست.

سیستم‌های کشت ریزجلبک

بسته به نیاز سویه و محصول هدف، سیستم مورد استفاده برای کشت و شرایط رشد متفاوت است. ریزجلبک‌ها در سیستم‌های باز و بسته قابل کشت هستند. در هر دو سیستم، کشت ریزجلبک به روش کشت پیوسته بوده که در آن محیط کشت جدید پیوسته وارد سیستم شده و محیط کشت مصرف‌شده با سرعت ثابت خارج می‌شود. سیستم‌های باز عموماً به صورت استخرهای باز کم عمق هستند [80]. سیستم باز از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده، ساخت آن آسان و تمیزکردن آن راحت‌تر است. این سیستم برای کشت در حجم بالا و تولید میزان زیادی توده زیستی (بیومس) مناسب است. مشکل این سیستم ضعیف بودن کنترل شرایط از جمله دما و میزان نور، بهره‌وری پایین، پخش CO₂ در محیط و عدم استفاده بهینه از آن، نیاز به منطقه‌ای وسیع برای ساخت سیستم، مخلوط کردن و هوادهی نامناسب، احتمال آلودگی بالا و تبخیر سریع آب است. در شکل ۴ سه نوع از این سیستم‌های باز نشان داده شده‌است.

سیستم‌های بسته عموماً فتوبیوراکتورها هستند. مزیت اصلی این سیستم کنترل بهتر پارامترهای کشت بوده و از آن برای کشت سویه‌های حساس که قدرت رقابت با سایر موجودات در سیستم‌های باز را ندارند، استفاده می‌شود [81]. در این نوع از سیستم‌های کشت تولید محصولات با ارزش مانند داروها و مواد زیستی و نیز محصولات نوترکیب تحت استانداردهای ایمنی و با

انواع کشت و محیط کشت‌های مورد استفاده برای رشد کلامیدوموناس رینهاردتی

نیازهای رشد کلامیدوموناس رینهاردتی آب، منبع کربن و نیتروژن و عناصر جزئی هستند. سه محیط کشت رایج آزمایشگاهی برای کشت شامل تریس-استات-فسفات (TAP)، محیط کشت حداقلی^[86] و محیط کشت با درصد بالای نمک سوکا^[87] هستند. محیط کشت حداقلی فاقد منبع کربن آلی بوده و برای کشت فتوتروفیک از آن استفاده می‌شود، در حالی که دو محیط دیگر غنی از کربن آلی بوده و برای کشت هتروتروفیک و میکسوتروفیک از آنها استفاده می‌شود.

به‌منظور تامین نیتروژن مورد نیاز برای رشد کلامیدوموناس رینهاردتی می‌توان از منابع نیتروژن غیرآلی مثل آمونیوم، نیترات و نیتريت استفاده کرد^[88]. علاوه بر این منابع نیتروژن آلی مانند اوره^[89]، آدنین^[90]، استامید^[91] نیز برای کشت و رشد کلامیدوموناس رینهاردتی مفید هستند.

براساس منبع کربن مورد استفاده سه نوع کشت وجود دارد:

۱) کشت فتوتروفیک که نیازمند نور و CO_2 به‌عنوان منبع کربن غیرآلی است. در شرایط فتوتروفیک کلامیدوموناس رینهاردتی قادر است در محیط کشت حداقل حاوی نمک‌ها، نیتروژن، فسفر، پتاسیم و عناصر جزئی رشد کند. نور تامین‌کننده انرژی لازم برای حفظ و رشد سلولی بوده و به شکل ATP درون سلول تجمع می‌یابد. وقتی میزان نور بیشتر از ظرفیت فتوسنتزی سلول باشد، تنهای بخشی از آن جذب شده و بخش اعظم آن به‌صورت گرما هدر می‌رود^[92]. به‌طور معمول میزان نور برای رشد فتوتروفیک کلامیدوموناس رینهاردتی در محدوده ۵۰-۱۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه برای شدت نور کم و ۱۲۰۰-۳۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه برای شدت نور بالا است^[18].

۲) کشت هتروتروفیک که در آن از منابع کربنی آلی به‌عنوان منبع انرژی و کربن استفاده می‌شود؛ به‌عبارتی دیگر کلامیدوموناس رینهاردتی قادر به رشد در تاریکی در حضور یک منبع کربن آلی است. مزیت این کشت نسبت به کشت فتوتروفیک حذف محدودیت نور، تراکم سلولی و بهره‌وری بیشتر و هزینه کمتر فرآیند است^[93]. علاوه بر این، پروتئازهای القاشونده توسط نور در کلروپلاست کمتر فعال شده و باعث کاهش میزان تجزیه پروتئین در زمان رشد می‌شود^[94]. کلامیدوموناس رینهاردتی تنها زمانی قادر به رشد هتروتروفیک است که منبع کربن آلی آن استات باشد. بهترین منابع استات آمونیوم و استیک اسید است. استات به‌طور مستقیم و طی یک مرحله تحت تأثیر استیل CoA سنتاز تبدیل به استیل CoA شده و وارد چرخه گلیکسالات می‌شود. این چرخه باعث تولید یک مولکول سوکسینات از دو مولکول استات گشته که در چرخه کربس برای تولید انرژی مصرف می‌شود^[95].

۳) کشت میکسوتروفیک که ترکیبی از دو روش بالا بوده و در آن هر دو منبع کربنی آلی و غیرآلی متابولیزه می‌شود. کشت میکسوتروفیک موثرترین روش برای کشت کلامیدوموناس رینهاردتی است زیرا اثر محدودیت نور کمتر اعمال می‌شود. نتایج نشان داده‌اند زمانی که از غلظت مناسب استات استفاده شود این روش منجر به تولید بیشترین میزان توده زیستی (بیومس) می‌شود^[96].

مراکز کشت و نگهداری ریزجلبک‌ها در جهان

بسیاری از ریزجلبک‌ها از جمله سویه‌های کلامیدوموناس را می‌توان از مراکز اصلی نگهداری جلبک‌ها در جهان تهیه نمود. از بزرگ‌ترین این مراکز می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- 1) Chlamydomonas Culture Collections (<http://www.chlamy.org>) at Minnesota University, USA.
 - 2) Culture Collection of Algae at Goettingen University (SAG), Germany (<http://www.uni-goettingen.de/en/184982.html>)
 - 3) Culture Centre of Algae and Protozoa (CCAP) (<http://www.ccap.ac.uk>) in United Kingdom
- از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم دسترسی آسان به سویه‌ها و وکتورهای لازم برای تولید محصولات نوترکیب، دشواری نگهداری طولانی‌مدت سویه‌های مهندسی‌شده و سویه‌های خریداری و تهیه‌شده از بانک‌های ریزجلبک بین‌المللی، عدم دسترسی به تجهیزات لازم، زمین و آب مورد نیاز برای کشت در مقیاس بالا، خصوصاً در شرایط استریل و عدم توانایی کنترل آلودگی در بسیاری از موارد است.

به‌منظور حل محدودیت‌های حاضر در زمینه تحقیقات جلبکی، خصوصاً در ایران، پیشنهاد می‌شود علاوه بر ایجاد بانک سویه‌های ریزجلبک و نگهداری آنها، انجمنی خاص تحقیقات جلبکی ایجاد شود تا محققان علاقه‌مند به فعالیت در این زمینه، بتوانند به‌آسانی یافته‌ها و تجربیات حاصل از تحقیقات خود را با یکدیگر به اشتراک گذاشته و از امکانات موجود به‌طور مشترک بهره‌مند شوند.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: شبنم شمعیز (نویسنده اول)، نگارنده مقاله (۴۰٪)؛ حمیده افقی (نویسنده دوم)، نگارنده مقاله/پژوهشگر اصلی (۶۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر منبع مالی نداشته است.

منابع

- 1- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973;70(11):3240-4.
- 2- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, et al. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(1):106-10.
- 3- Kinch MS. An overview of FDA-approved biologics medicines. Drug Discov Today. 2015;20(4):393-8.
- 4- Rader RA. FDA biopharmaceutical product approvals and trends in 2012. Bioprocess Int. 2013;11(3):18-27.
- 5- Demail AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv. 2009;27(3):297-306.
- 6- Kordbacheh F, Ofoghi H, Akbarzadeh A, Jafari M, Salmanian AH. High level expression and chloroplast targeting of human calcitonin (hCT) in transgenic tobacco plants. Transgenic Plant J. 2011;5(1):57-61.
- 7- Ofoghi H, Mironova R, Moazami N, Domonskv N, Ivanov I. Human calcitonin tetrameric gene: Comparative expression in yeast and transgenic potato plants. Biotechnol Biotechnol Equip. 1999;13(1):20-4.
- 8- Ofoghi H, Moazami N, Domonsky NN, Ivanov I. Cloning and expression of human calcitonin genes in transgenic potato plants. Biotechnol Lett. 2000;22(7):611-5.
- 9- Ofoghi H, Moazami N, Ivanov I. Comparison of tobacco etch virus and tobacco mosaic virus enhancers for

- 28- Potvin G, Zhang Z. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnol Adv.* 2010;28(6):910-8.
- 29- Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(3):1228-32.
- 30- Davies JP, Weeks DP, Grossman AR. Expression of the arylsulfatase gene from the beta 2-tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(12):2959-65.
- 31- Quinn JM, Kropat J, Merchant S. Copper response element and Crr1-dependent Ni(2+)-responsive promoter for induced, reversible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell.* 2003;2(5):995-1002.
- 32- Fischer N, Rochaix JD. The flanking regions of Psad drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics.* 2001;265(5):888-94.
- 33- Schroda M, Blöcker D, Beck CF. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 2000;21(2):121-31.
- 34- Loppes R, Radoux M, Ohresser MC, Matagne RF. Transcriptional regulation of the Nia1 gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promoter. *Plant Mol Biol.* 1999;41(5):701-11.
- 35- Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P. A synthetic gene coding for the Green Fluorescent Protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 1999;19(3):353-61.
- 36- Stevens DR, Rochaix JD, Purton S. The bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet.* 1996;251(1):23-30.
- 37- Tang DK, Qiao SY, Wu M. Insertion mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation and heterologous DNA. *Biochem Mol Biol Int.* 1995;36(5):1025-35.
- 38- Hall LM, Taylor KB, Jones DD. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene.* 1993;124(1):75-81.
- 39- Guo SL, Zhao XQ, Tang Y, Wan C, Alam MA, Ho SH, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *J Biotechnol.* 2013;163(1):61-8.
- 40- Sizova I, Fuhrmann M, Hegemann P. A *Streptomyces rimosus* aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene.* 2001;277(1-2):221-9.
- 41- Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW, Boynton JE. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: Integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics.* 1997;145(1):97-110.
- 42- Berthold P, Schmitt R, Mages W. An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist.* 2002;153(4):401-1.
- 43- Nelson JA, Savereide PB, Lefebvre PA. The CRY1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: Structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation. *Mol Cell Biol.* 1994;14(6):4011-9.
- 44- Neupert J, Karcher D, Bock R. Generation of expression of human calcitonin gene in transgenic potato plant. *Key Eng Mater.* 2005;277-279:7-11.
- 10- Moazez Y, Rajabi Memari H, Ofoghi H, Roayaei M, Nabati Ahmadi D. Evaluation of *Spirulina platensis* resistance to different antibiotics to find a selectable marker for genetic transformation. *Jundishapur J Microbiol.* 2013;6(7):e5456.
- 11- Moazami N, Ashori AR, Ranjbar R, Tangestani M, Eghtesadi R, Sheykhi Nejad A. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass Bioenergy.* 2012;39:449-53.
- 12- Moazami N, Ranjbar R, Ashori AR, Tangestani M, Sheykhi Nejad A. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. *Biomass Bioenergy.* 2011;35(5):1935-9.
- 13- Manuell AL, Mayfield SP. A bright future for *Chlamydomonas*. *Genome Biol.* 2006;7(9):327.
- 14- Barrera DJ, Mayfield SP. High-value recombinant protein production in microalgae. In: Richmond A, Emeritus, Hu Q. *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology.* 2nd edition. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. pp. 532-44.
- 15- Doron L, Segal N, Shapira M. Transgene expression in microalgae-from tools to applications. *Front Plant Sci.* 2016;7:505.
- 16- Barkan A. Expression of plastid genes: Organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. *Plant Physiol.* 2011;155(4):1520-32.
- 17- Scharff LB, Bock R. Synthetic biology in plastids. *Plant J.* 2014;78(5):783-98.
- 18- Harris EH. The *Chlamydomonas* sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. Oxford: Academic Press; 2009.
- 19- Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001;52:363-406.
- 20- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science.* 2007;318(5848):245-50.
- 21- Maul JE, Lilly JW, Cui L, De Pamphilis CW, Miller W, Harris EH, et al. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: Islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell.* 2002;14(11):2659-79.
- 22- Purton S. Tools and techniques for chloroplast transformation of *Chlamydomonas*. In: León R, Galván A, Fernández E, editors. *Transgenic microalgae as green cell factories, advances in experimental medicine and biology.* 616th Volume. New York: Springer; 2007. pp. 34-45.
- 23- Boynton JE, Harris EH, Burkhart BD, Lamerson PM, Gillham NW. Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(8):2391-5.
- 24- Rasala BA, Mayfield SP. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioeng Bugs.* 2011;2(1):50-4.
- 25- Purton S, Szaub JB, Wannathong T, Young R, Economou CK. Genetic engineering of algal chloroplasts: Progress and prospects. *Russ J Plant Physiol.* 2013;60(4):491-9.
<https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443713040146>
- 26- Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep.* 2005;24(11):629-41.
- 27- Hallmann A. Algal transgenics and biotechnology. *Transgenic Plant J.* 2007;1(1):81-98.

- of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Maliga P. Chloroplast biotechnology: Methods and protocols. New York City: Humana Press; 2014. pp. 401-11.
- 61- Bateman JM, Purton S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: Expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet* MGG. 2000;263(3):404-10.
 - 62- Gutiérrez CL, Gimpel J, Escobar C, Marshall SH, Henríquez V. Chloroplast genetic tool for the green microalgae *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales)(1). *J Phycol*. 2012;48(4):976-83.
 - 63- Newman SM, Boynton JE, Gillham NW, Randolph-Anderson BL, Johnson AM, Harris EH. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: Molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*. 1990;126(4):875-88.
 - 64- Remacle C, Cline S, Boutaffala L, Gabilly S, Larosa V, Rosario Barbieri M, et al. The ARG9 gene encodes the plastid-resident N-acetyl ornithine aminotransferase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(9):1460-3.
 - 65- Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(15):4083-9.
 - 66- Przibilla E, Heiss S, Johanningmeier U, Trebst A. Site-specific mutagenesis of the D1 subunit of photosystem II in wild-type *Chlamydomonas*. *Plant Cell*. 1991;3(2):169-74.
 - 67- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*. 1988;240(4858):1534-8.
 - 68- Cheng Q, Day A, Dowson-Day M, Shen GF, Dixon R. The *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase Fe protein gene (*nifH*) functionally substitutes for the *chlL* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329(3):966-75.
 - 69- Kindle KL, Richards KL, Stern DB. Engineering the chloroplast genome: Techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(5):1721-5.
 - 70- Dreesen IA, Charpin-El Hamri G, Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J Biotechnol*. 2010;145(3):273-80.
 - 71- Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, et al. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnol J*. 2007;5(3):402-12.
 - 72- Rasala BA, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso RM, Behnke CA, et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J*. 2010;8(6):719-33.
 - 73- Sun M, Qian K, Su N, Chang H, Liu J, Shen G. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol Lett*. 2003;25(13):1087-92.
 - 74- Michelet L, Lefebvre-Legendre L, Burr SE, Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. *Plant Biotechnol J*. 2011;9(5):565-74.
 - 75- Suay L, Salvador ML, Abesha E, Klein U. Specific roles of 5' RNA secondary structures in stabilizing transcripts in chloroplasts. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(15):4754-61.
 - Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J*. 2009;57(6):1140-50.
 - 45- Bruggeman AJ, Kuehler D, Weeks DP. Evaluation of three herbicide resistance genes for use in genetic transformations and for potential crop protection in algae production. *Plant Biotechnol J*. 2014;12(7):894-902.
 - 46- Kovar JL, Zhang J, Funke RP, Weeks DP. Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation. *Plant J*. 2002;29(1):109-17.
 - 47- Kindle KL, Schnell RA, Fernández E, Lefebvre PA. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J Cell Biol*. 1989;109(6 Pt 1):2589-601.
 - 48- Debuchy R, Purton S, Rochaix JD. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: An important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J*. 1989;8(10):2803-9.
 - 49- Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, Ossowski S, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*. 2009;58(1):165-74.
 - 50- Ferris PJ. Localization of the *nic-7*, *ac-29* and *thi-10* genes within the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*. 1995;141(2):543-9.
 - 51- Mayfield SP, Kindle KL. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(6):2087-91.
 - 52- Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett*. 2010;32(10):1373-83.
 - 53- Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):292.
 - 54- Tuller T, Waldman YY, Kupiec M, Ruppin E. Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3645-50.
 - 55- Shamriz S, Ofoghi H, Moazami N. Effect of linker length and residues on the structure and stability of a fusion protein with malaria vaccine application. *Comput Biol Med*. 2016;76:24-9.
 - 56- Dauvillee D, Hilbig L, Preiss S, Johanningmeier U. Minimal extent of sequence homology required for homologous recombination at the *psbA* locus in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts using PCR-generated DNA fragments. *Photosynth Res*. 2004;79(2):219-24.
 - 57- Umen JG, Goodenough UW. Chloroplast DNA methylation and inheritance in *Chlamydomonas*. *Genes Dev*. 2001;15(19):2585-97.
 - 58- Coll JM. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: A review. *Span J Agric Res*. 2006;4(4):316-30.
 - 59- Randolph-Anderson B, Boynton JE, Dawson J, Dunder E, Eskes R, Gillham NW, et al. Sub-micron gold particles are superior to larger particles for efficient biolistic transformation of organelles and some cell types. *BioRad Bull*. 2015.
 - 60- Economou C, Wannathong T, Szaub J, Purton S. A simple, low-cost method for chloroplast transformation

- microalgae. Rev Environ Sci Bio Technol. 2013;12(2):131-51.
- 86- Gorman DS, Levine RP. Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1965;54(6):1665-9.
- 87- Sueoka N. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1960;46(1):83-91.
- 88- Thacker A, Syrett PJ. The assimilation of nitrate and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. New Phytol. 1972;71(3):423-33.
- 89- Hodson RC, Williams SK, Davidson WR Jr. Metabolic control of urea catabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*. J Bacteriol. 1975;121(3):1022-35.
- 90- Pineda M, Fernández E, Cárdenas J. Urate oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii*. Physiologia Plantarum. 1984;62(3):453-7.
- 91- Gresshoff PM. Amide metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. Arch Microbiol. 1981;128(3):303-6.
- 92- Mussnug JH, Thomas-Hall S, Rupprecht J, Foo A, Klassen V, McDowell A, et al. Engineering photosynthetic light capture: Impacts on improved solar energy to biomass conversion. Plant Biotechnol J. 2007;5(6):802-14.
- 93- Chen GQ, Chen F. Growing phototrophic cells without light. Biotechnol Lett. 2006;28(9):607-16.
- 94- Adam Z, Clarke AK. Cutting edge of chloroplast proteolysis. Trends Plant Sci. 2002;7(10):451-6.
- 95- Spalding MH. The CO₂-concentrating mechanism and carbon assimilation. Stern D. The *Chlamydomonas* sourcebook: Organellar and metabolic processes. 2nd Volume. Cambridge: Academic Press; 2009. pp. 257-301.
- 96- Moon M, Kim CW, Park WK, Yoo G, Choi YE, Yang JW. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. Algal Res. 2013;2(4):352-7.
- 76- Rott R, Liveanu V, Drager RG, Stern DB, Schuster G. The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. Plant Mol Biol. 1998;36(2):307-14.
- 77- Jones CS, Luong T, Hannon M, Tran M, Gregory JA, Shen Z, et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(5):1987-95.
- 78- Tran M, Van C, Barrera DJ, Pettersson PL, Peinado CD, Bui J, et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;110(1):E15-22.
- 79- Boynton JE, Gillham NW. [25] Genetics and transformation of mitochondria in the green alga *Chlamydomonas*. IN: Hirs CHW, Timasheff SN. Methods in enzymology. 264th Volume. Amsterdam: Elsevier; 1996. pp. 279-96.
- 80- Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. Bioresour Technol. 2008;99(10):4021-8.
- 81- Sastre RR, Csögör Z, Perner-Nochta I, Fleck-Schneider P, Posten C. Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors-a conceptual approach. J Biotechnol. 2007;132(2):127-33.
- 82- Brown TJ, Geen GH. The effect of light quality on the carbon metabolism and extracellular release of *Chlamydomonas reinhardtii* dangeard. J Phycol. 1974;10(2):213-20.
- 83- Sager R, Granick S. Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. Ann N Y Acad Sci. 1953;56(5):831-8.
- 84- Wang B, Lan CQ, Horsman M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. Biotechnol Adv. 2012;30(4):904-12.
- 85- Acien Fernández FG, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E. Photobioreactors for the production of