

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-047

生物燃料高效生产微生物细胞工厂构建研究进展

晏雄鹰, 王振, 娄吉芸, 张皓瑜, 黄星宇, 王霞, 杨世辉

(湖北大学生命科学学院, 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要: 生物燃料替代化石燃料可解决当前全球正面临的能源危机和环境危机。通过筛选、改造微生物, 利用可再生资源高效生产具有经济效益和社会效益的生物燃料已成为可持续生物制造的重大发展方向。基于系统生物学理解并设计细胞工厂生物燃料的合成途径与调控网络, 利用合成生物学手段开发高产稳产微生物细胞工厂是实现生物燃料经济生产的重要手段。本文概述了当前生物燃料的主要种类及对应的代谢途径, 并总结了当前主要生物燃料的生产情况。重点介绍从微生物物质代谢、能量代谢、生理代谢和信息代谢四个方面去认识、改造、开发微生物底盘细胞使其成为高产稳产的生物能源细胞工厂。此外, 本文也对当前生物能源的生产瓶颈和挑战进行了总结, 并从酶元件库的挖掘、合成途径的创建与优化、底盘细胞的理解和性能改善、发酵工艺的智能控制等方面提出了未来的发展方向和目标任务, 强调了在未来的研究中, 信息技术(IT)和生物技术(BT)交叉融合是能源细胞工厂构建的发展趋势, 可为高效生物燃料细胞工厂的构建提供工具和资源, 加速生物能源的产业化进程。

关键词: 合成生物学; 生物燃料; 微生物细胞工厂; 代谢工程; 信息技术; 生物技术

中图分类号: Q939.97 文献标志码: A

Progress in the construction of microbial cell factories for efficient biofuel production

YAN Xiongying, WANG Zhen, LOU Jiyun, ZHANG Haoyu, HUANG Xingyu, WANG Xia, YANG Shihui

(State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China)

Abstract: Biofuels are important supplements and alternatives to fossil fuels, which can alleviate the current global energy crisis and environmental pollution. Using microbes mined from nature or engineered in the lab to produce biofuels from renewable biomass of both economic and social benefits has become a major direction of sustainable biomanufacturing. It is necessary to develop robust microbial cell factories through synthetic biology for efficient and economic biofuel production, combining the strategy of systems biology to understand and design the synthetic pathways for biofuels and regulatory networks in microbes. This review discussed the major types of biofuels, the

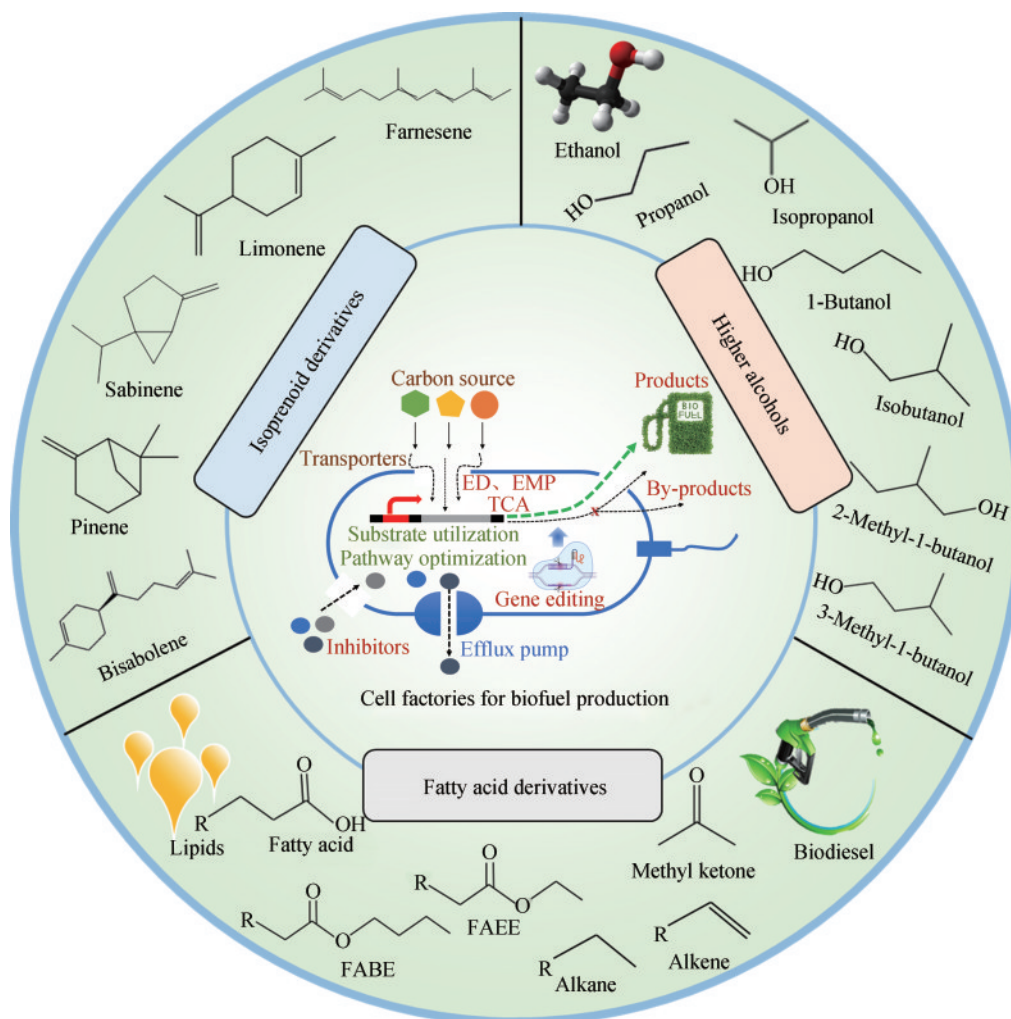
收稿日期: 2023-07-02 修回日期: 2023-08-30

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFA0911800); 国家自然科学基金(22108064, 21978071); 湖北省科技厅重大科技创新计划(2021BAD001)

引用本文: 晏雄鹰, 王振, 娄吉芸, 张皓瑜, 黄星宇, 王霞, 杨世辉. 生物燃料高效生产微生物细胞工厂构建研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(6): 1082-1121

Citation: YAN Xiongying, WANG Zhen, LOU Jiyun, ZHANG Haoyu, HUANG Xingyu, WANG Xia, YANG Shihui. Progress in the construction of microbial cell factories for efficient biofuel production[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(6): 1082-1121

corresponding metabolic pathways, and current progress for producing these biofuels, including bioethanol, higher alcohols, biodiesel, fatty acid derivatives and isoprenoid derivatives. The strategies to understand, construct, and engineer synthetic microbial chassis as cell factories for diverse biofuel production were summarized, especially from substance metabolism, energy balance, physiological modification, and information regulation. In addition, current status and challenges for microbial biofuel production were analyzed. The insufficient understanding of natural biosynthetic pathways and the functions of biological components, lack of genetic manipulation tools for non-model biofuel chassis cells, low efficiency of gene editing, incompatibility between different heterologous pathways and chassis cells, toxicity of heterologous products and metabolic intermediates to cell factories, inhibition of many stress factors when using cheap renewable resources as raw materials, and engineering obstacles in industrial scale-up are the barriers and challenges to the industrial biofuel production. However, the rapid development of artificial intelligence and bioinformatics provides new solutions to these challenges. Finally, this review proposed future directions and key tasks based on the need for biofuel commercialization, emphasizing the combination of information technology and biotechnology as the trend in developing biofuel cell factories, which can provide tools and resources for strain engineering and accelerate the industrialization process of biofuels.



Keywords: synthetic biology; biofuels; microbial cell factories; metabolic engineering; information technology; biotechnology

石油资源短缺以及化石燃料燃烧所引发的环境污染问题,对人类社会可持续发展造成了严重冲击。开发清洁高效的替代能源以减少化石能源的使用已成为全球共识。绿色生物制造是以工业生物技术为核心技术手段,使用微生物和廉价、可持续的生物资源,如木质纤维素、藻泥、二氧化碳等实现原料、过程及产品绿色化的新生产模式。生物能源由于其可再生性、环境友好性和高效性而受到越来越多的关注。生物能源根据其原料和生产方式的不同可分为固体成型燃料、液体燃料(燃料乙醇、生物柴油、生物丁醇、生物脂肪烃等)、气体燃料(生物氢气、生物甲烷、生物质合成气等)和生物电等不同产品类型,其中受到最多关注的是生物液体燃料^[1]。生物液体燃料可补充或替代汽油、柴油、重油,用于公路运输、海洋运输、航空运输等交通领域,其原料可来自于谷物或植物油等可食用生物质,也可来自于农业废弃物、禽畜粪便、工业有机废水、城市生活垃圾等廉价生物质。近年来,全球主要国家为积极应对能源短缺、保障经济社会可持续发展,均将大力发展合成生物液体燃料纳入了国家重大战略规划。

随着基因工程、代谢工程、系统生物学与合成生物学等生物技术的不断发展,研究人员逐渐开辟了一条利用微生物合成生物液体燃料的绿色生产模式。生产原料逐渐由第一代淀粉和油脂原料向第二代非粮生物质原料(如木质纤维素等)转变,生物燃料产品也由传统的燃料乙醇、生物柴油扩展至生物高级醇、生物脂肪烃等品种。生物燃料绿色生产的核心是获得高产稳产微生物细胞,将可再生原料高效转化为目标产品,微生物细胞工厂的性能是决定生物燃料经济生产的关键。通过代谢工程改造策略,许多微生物尤其化能异养型微生物已被成功开发用于生物燃料生产,包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)等模式工业微生物及运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)等非模式工业微生物。

在利用微生物生产生物燃料的放大过程中,

严酷的工业发酵环境常会导致工程菌株的生产速率和产量明显降低,有时甚至完全丧失。因此,还需要对微生物细胞继续设计、优化和适配以提高重组菌株的生产性能与鲁棒性。进一步深入系统研究模式底盘细胞,同时挖掘更多具有不同优良特性的非模式微生物底盘细胞,进而合理设计、优化生物燃料合成途径与底盘细胞,可以提高产品产量,拓展生物燃料品种,并可为其他生物基产品的绿色生物制造提供理论依据与改造工具^[2-3]。基于系统生物学,可以深入解析微生物底盘细胞代谢途径、调控网络及调控机制,结合合成生物学“设计—构建—测试—学习”(design-build-test-learn, DBTL)策略,对能源微生物底盘细胞进行多维度的理性或半理性改造,挖掘、设计生物元件与线路,构建、优化能源产品合成途径,系统整合代谢途径的时空调控,构建高效的生物燃料微生物细胞工厂,最终实现多元化燃料产品的理性设计及产业化发展^[3]。

对此,本文聚焦生物液体燃料,对不同生物燃料品种的代谢路径和生产现状进行了总结,回顾了微生物底盘细胞和途径优化的数据和合成生物学驱动的方法,并着重介绍了高效能源细胞工厂构建的方向及策略,探讨了制约高效能源微生物底盘细胞理性设计与细胞工厂应用的瓶颈与对策。

1 生物液体燃料

生物液体燃料是以液体为储能方式的可再生能源形式,是指以生物质为原料经发酵提纯或者生化合成方式制得的乙醇或油类等液体燃料。目前主要包括生物柴油、生物乙醇、生物航煤等,生产制造方式各异,其中以生物柴油、生物乙醇在全球范围内的应用及研发最广泛和成熟^[4]。本部分就当前主要的生物液体燃料产品类型、合成途径及其生产状况进行概述。

1.1 生物乙醇

生物乙醇是目前世界上应用最广泛的可再生能源,可以单独或与汽油混配制成乙醇汽油用作

汽车燃料，最高混合含量达85%。目前，全球生物乙醇的产量约9000万吨，市值约6000亿元，且呈逐年递增趋势^[5]。目前，燃料乙醇主要生产国家为美国（4600万吨/年）和巴西（约2500万吨/年），分别以玉米、甘蔗等粮食与经济作物为原料，存在“与人争粮，与粮争地”的问题，增长空间有限。因此，越来越多的研究转向以木质纤维素等可再生非粮生物质为原料的第二代生物乙醇的生产。

目前应用于乙醇大规模工业化生产的微生物菌株主要是酿酒酵母。酿酒酵母具有完整的糖酵解途径（Embden-Meyerhof-Parnas pathway，EMP途径），在葡萄糖代谢过程中，糖酵解产生的丙酮酸经丙酮酸脱羧酶（pyruvate decarboxylase，PDC）催化脱羧生成乙醛，随后在乙醇脱氢酶（alcohol dehydrogenase，ADH）催化下还原乙醛生成乙醇。酿酒酵母因其长期工业应用而成为以玉米淀粉等粮食作物为原料进行乙醇生产的主要菌株。运动发酵单胞菌是另一种具有工业应用前景的天然乙醇生产菌株，该菌株通过转运蛋白Glf（glucose facilitator）以协助扩散的方式进行糖的转运，此过程不需要消耗能量，可以转运葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖和甘露糖等。与酿酒酵母的EMP途径相比，运动发酵单胞菌特殊的厌氧（Entner-Doudoroff，ED）途径具有较低的产能效率，在发酵过程中产生更少的生物质，同时实现葡萄糖向乙醇的高效转化（98% vs 90%~93%）。此外，运动发酵单胞菌乙醇发酵速率[5.67 g/(g·h)]比酿酒酵母[0.67 g/(g·h)]更高，并且具有耐受酸性pH等优点^[6-7]，成为优良的纤维素乙醇生产菌株，美国DuPont公司曾使用此菌株实现了年产8.3万吨纤维素乙醇的工业化生产。

木质纤维素是目前地球上储量最丰富的可再生生物质资源，经过预处理和酶解糖化后能产生可发酵糖，如葡萄糖、木糖和阿拉伯糖等。然而，在以木质纤维素为原料生产生物乙醇时，严苛的预处理释放可发酵糖的过程中会产生有机酸和酚醛类化合物等不利于工业菌株生长的抑制物，这些抑制物的存在不仅会破坏菌株的细胞膜与核酸结构，影响乙醇工业菌株的生长，还会降低乙醇的产量^[8]。为实现纤维素水解液的高效利用，传

统的物理、化学诱变以及实验室适应性进化策略和近代基因工程手段均已被用于发酵菌株的抑制物耐受性改造。本课题组通过在酸性pH条件下适应性进化运动发酵单胞菌获得了两株耐受pH 3.5的菌株3.5M和3.6M，并通过全基因组测序和转录组学研究揭示了其耐酸性机制与改造靶点^[9]。此外，还发现在运动发酵单胞菌中全局转录调节因子Hfq对菌株抗逆性具有重要的作用^[10]。Tang等^[11]证实Hfq通过上调硫酸盐同化和半胱氨酸合成来降低乙醇诱导下的活性氧，并通过酵母内质网隔离筛选系统（yeast endoplasmic reticulum sequestration screening system，YESS）鉴定了DnaK和DnaJ与Hfq互作来调节细胞热休克反应以应对乙醇胁迫。Geng等^[12]删除运动发酵单胞菌中的四个内源质粒后获得重组菌株ZMNP，该菌株具有更好的木糖母液利用率和抑制物耐受性，有望成为下一代纤维素乙醇底盘细胞。工程菌株的改造提高了微生物菌株的环境适应性（鲁棒性），为其在纤维素乙醇生产中的应用奠定了基础。

除了天然产乙醇的酿酒酵母和运动发酵单胞菌外，在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中引入来自运动发酵单胞菌中编码丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶的基因，也实现了乙醇的异源生产^[13]。为了提高重组菌株的稳定性及乙醇产量，将乙醇生产相关基因整合到大肠杆菌基因组上，并阻断琥珀酸的合成途径能有效提高乙醇产量至54.4 g/L，达到理论产量的95%^[14-15]。但异源乙醇生产重组菌株的乙醇耐受性、利用废弃生物质能力及生产强度较低，明显弱于天然产乙醇的酿酒酵母和运动发酵单胞菌，需要进一步通过合成生物学手段提高重组菌株的生长与生产性能。

1.2 生物高级醇

生物高级醇一般是指含有三个及三个以上碳的直链或支链醇。与乙醇相比，多碳高级醇的辛烷值更接近汽油，具有和汽油相似的能量密度，同时具备不吸湿与腐蚀性低的优良特性，能与汽油达到更高的混合比，提高车辆的燃油效率，被认为是最具前景的燃油替代品。可用作液体燃料的多碳高级醇主要包括三碳醇（正丙醇、异丙

醇)、四碳醇(正丁醇、异丁醇、2-丁醇和2,3-丁二醇)、五碳醇(正戊醇、2-甲基-1-丁醇和3-甲基-1-丁醇)等。这些高级醇具有可观的市场价格和广阔的市场前景(表1)。

正丙醇和异丙醇是化工生产中重要的产品和原料,可用作汽油添加剂,工业生产的正丙醇和异丙醇主要用于涂料、医药、农药、化妆品等领域。正丙醇与异丙醇均可以通过微生物发酵法获得,正丙醇的生产通过酮酸途径实现,2-酮丁酸是氨基酸生物合成途径中的中间体,几乎在所有生物体中都能合成,2-酮丁酸在2-酮酸脱羧酶(KdcA)和醇脱氢酶(ADH)的作用下生成正丙醇(图1)。以葡萄糖为底物,在大肠杆菌中将天然苏氨酸途径与异源柠檬酸合成酶结合可产生3.5 g/L正丙醇^[17]。与正丙醇不同,异丙醇以乙酰辅酶A作为合成中间体在酶的催化下生成丙酮,再在二级醇脱氢酶的作用下生成异丙醇。将异丙醇天然

生产微生物拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)的异丙醇生产途径引入大肠杆菌中可以实现异丙醇生产(最高13.6 g/L)^[19](表1)。

正丁醇具有与汽油非常相似的理化性质和热力学性质,具有比乙醇更高的能量密度,可以在未改性的汽油管道中运输,并且在无需改进发动机的条件下可与汽油以更高的比例混合。正丁醇生物合成途径主要包括3类:CoA依赖的合成途径、ACP依赖的合成途径和2-酮酸合成途径(图1)。产丁醇梭菌是天然的正丁醇生产菌株,即通过糖酵解或磷酸戊糖途径将各种单糖化合物转化为乙酰辅酶A,并通过进一步的碳链延伸来合成丁醇等长碳链产物。从乙酰辅酶A到丁醇需要经过多步反应,其中最直接控制丁醇合成的是一类醛/醇脱氢酶,可催化丁酰辅酶A至丁醛以及丁醛至丁醇这两步反应。相对而言,利用2-酮酸和ACP依赖的途径合成丁醇的研究报道相对较少,

表1 微生物生产多碳醇总结

Table 1 Summary of microbial production of higher carbon chain alcohols

产物 Product	价格 Price (元/t)	宿主 Host	发酵方式 Fermentation	原料 Substrate	滴度 Titer (g/L)	参考文献 Reference
Propanol	7000~7400	<i>E. coli</i>	Fed-batch	Glucose or glycerol	10.3	[16]
		<i>E. coli</i>	Shake flask	Glucose	3.5	[17]
Isopropanol	6500~7500	<i>E. coli</i>	Fed-batch with gas stripping	Glucose	143	[18]
		<i>E. coli</i>	Shake flask	Glucose	13.6	[19]
1-Butanol	8550	<i>C. acetobutylicum</i>	Bioreactor	Glucose	20.3	[20]
		<i>E. coli</i>	Bioreactor with gas stripping	Glucose	30	[21]
		<i>C. tyrobutyricum</i>	Bioreactor	Mannitol	20.5	[22]
Isobutanol	8100	<i>E. coli</i>	Capped flask	Glucose	22	[23]
		<i>E. coli</i>	Bioreactor	Glucose	56	[24]
		<i>Z. mobilis</i>	Shake flask	Glucose	4	[25]
		<i>C. thermocellum</i>	Consolidated bioprocessing	Cellulose	5.4	[26]
		<i>C. glutamicum</i>	Shake flask	Glucose	20.8	[27]
		<i>S. cerevisiae</i>	NA	Glucose	5.8	[28]
2,3-Butanediol	10 000	<i>S. marcescens</i>	Shake flask	Glucose	42.5	[29]
		<i>S. marcescens</i>	Fed-batch	Sucrose	152	[30]
		<i>Z. mobilis</i>	Shake flask	Glucose	13.3	[31]
2-Methy-1-butanol	15 500	<i>B. flavum</i>	Shake flash	Glucose; duckweed	19.5/17.5	[32]
		<i>E. coli</i>	Shake flask	Glucose	1.25	[33]
		<i>C. crenatum</i>	Shake flask	Glucose	5.26	[34]
3-Methy-1-butanol	22 000	<i>E. coli</i>	Shake flask; two-phase fermentation	Glucose	9.5	[35]
		<i>B. flavum</i>	Shake flask	Glucose; duckweed	0.79/0.78	[32]
		<i>C. crenatum</i>	Shake flask	Glucose	3.78	[34]

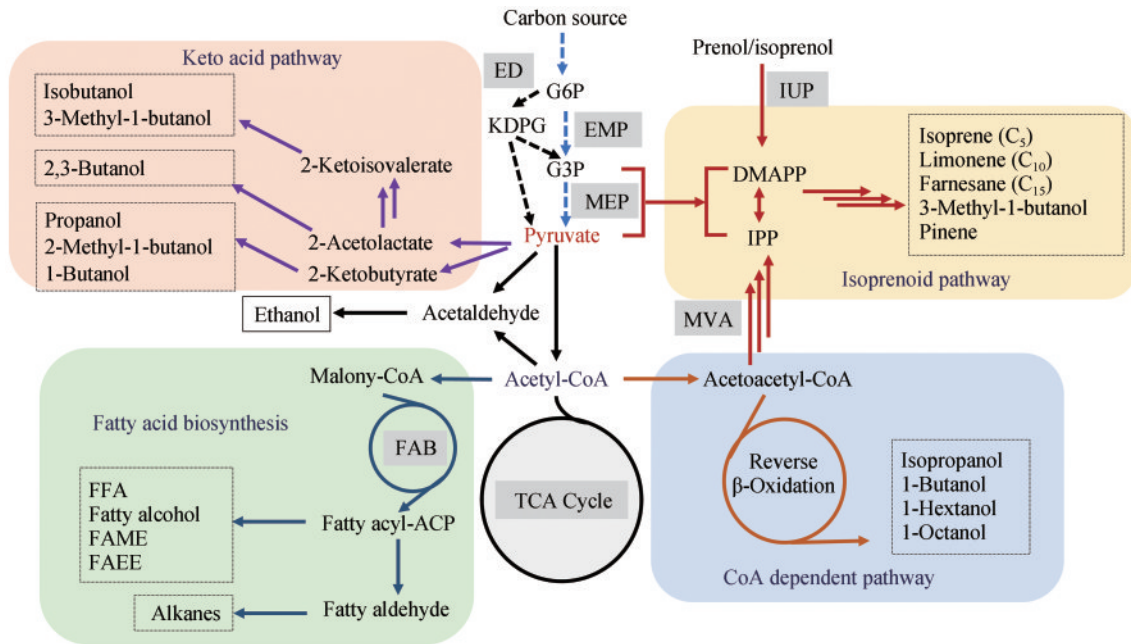


图1 生物燃料合成代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathways for biofuel production

ED—Entner-Doudoroff pathway; EMP—Embden-Meyerhof-Parnas pathway; FAB—Fatty acid biosynthesis; IUP—Isopentenol utilization pathway; MEP—2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway; MVA—Mevalonate pathway

主要是聚焦于一些不具备天然丁醇合成能力的底盘细胞，但丁醇产量普遍较低^[36]，尚不具备工业生产价值，如恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[37]、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[37]、丁醇耐受性高的短小乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)^[38]，乙酰辅酶A前体丰富的解脂耶氏酵母^[39]、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)^[40-41]、集胞藻 (*Synechocystis*)^[42-43]、酿酒酵母^[44-46]等 (表1)。而产丁醇梭菌，包括丙酮丁醇梭菌和拜氏梭菌，是迄今唯一实现量产的一类丁醇合成微生物，在丁醇发酵的稳定性以及操作简便性方面具有优势。

异丁醇、2-甲基-1-丁醇和3-甲基-1-丁醇等支链高级醇的生物合成依赖于支链氨基酸代谢途径。在支链氨基酸代谢途径中，相应的中间体 α -酮酸可以通过脱羧和还原的方式合成支链醇 (图1)，例如，缬氨酸与亮氨酸的中间体 α -酮异戊酸在 α -酮酸脱羧酶和醇脱氢酶的作用下合成异丁醇，在亮氨酸合成途径中合成3-甲基-1-丁醇；异亮氨酸合成中间体2-酮-3-甲基戊酸也通过相应的脱羧还原合成2-甲基-1-丁醇。自然界中还没有高产异丁醇的天然菌株，一般利用缬氨酸代谢途径，在大肠杆菌^[47]、枯草芽孢杆菌^[48]、酿酒酵母^[49]和谷

氨酸棒状杆菌^[50]等宿主微生物中构建人工异丁醇合成途径 (Ehrlich途径)。近年来，异丁醇的生物合成备受关注，其中大多数都集中在通过改造各种菌株，使其异丁醇产量更高或原料利用率更高 (表1)。美国加州大学洛杉矶分校James C. Liao教授课题组^[23]筛选了来自不同物种的 α -酮酸脱羧酶并将其与酿酒酵母的醇脱氢酶ADH2组合引入大肠杆菌，在大肠杆菌中成功构建异丁醇合成代谢途径，并通过削弱竞争途径，加强丙酮酸向缬氨酸的代谢流，取得了异丁醇最高产量22 g/L及理论转化率86%的成果。美国Gevo公司与该团队合作，利用酿酒酵母作为底盘细胞实现了淀粉到异丁醇的商业化生产，并将其用作航空燃料原料。目前通过合成生物学手段，在梭菌、枯草芽孢杆菌、运动发酵单胞菌和真氧产碱杆菌 (*Ralstonia eutropha*)、谷氨酸棒状杆菌等不同底盘细胞中异源表达异丁醇代谢途径相关基因以及代谢途径优化，实现了异丁醇的异源合成和产量提升^[25]。与异丁醇生产类似，通过在钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*)中引入非天然代谢途径生产支链醇，组合碳链延伸途径、异亮氨酸生物合成途径和脱羧反应实现了2-甲基-1-丁醇和3-甲基-1-丁醇的高效

生产, 产量分别为5.26 g/L和3.78 g/L^[34]。

2,3-丁二醇(2,3-butandiol, 2,3-BDO)是另外一种航空燃料的添加剂, 具有和其他液体燃料如乙醇(29.1 kJ/g)类似的高燃烧热(27.2 kJ/g)。天然的2,3-BDO生产微生物有克雷伯菌属、黏质沙雷氏菌、产气肠杆菌和假单胞菌等^[30, 51-52](表1)。通过离子束突变构建的肺炎克雷伯菌SDM菌株在葡萄糖补料分批发酵中可产生150 g/L的2,3-BDO, 产率为0.48 g/g, 生产速率为4.21 g/(L·h)^[51]。微生物中的2,3-BDO生物合成途径有三种酶: 乙酰乳酸合酶(AIs)、乙酰乳酸脱羧酶(AldC)和丁二醇脱氢酶(Bdh), 它们依次将丙酮酸转化为 α -乙酰乳酸、乙酰脲, 然后是2,3-丁二醇(图1)。2,3-BDO途径具有较好的生物适配性, 通过在大肠杆菌、蓝藻、运动发酵单胞菌中这些非天然的微生物中引入2,3-BDO途径均可以实现2,3-BDO生产^[31, 53-55]。

1.3 生物柴油

生物柴油是一类长链脂肪酸甲酯(fatty acid methyl ester, FAME)/乙酯(fatty acid ethyl esters, FAEE), 由植物、动物或微生物源油脂与短链醇(甲醇和乙醇)通过酯交换反应生成, 可作为石油柴油的替代品^[56-57]。2021年以来生物柴油价格上涨至10 500元/吨, 年均价8740元/吨; 出口均价上涨至1535美元/吨, 年均价1320美元/吨。

生物柴油制备的原料包括食用植物油、非食用植物油、动物脂肪以及微藻和真菌油, 大约95%的生物柴油由可食用作物生产, 然而粮食作物价格的飙升使这些原料成本增加^[58-59], 因此工业废弃油脂以及厨余废弃油脂成为生物柴油制备的主要原料, 另外产脂质的藻类、真菌也作为生物柴油生产的第三代原料^[60-61]。

微生物合成脂肪酸以乙酰辅酶A为前体, 经乙酰辅酶A羧化酶(ACC)催化生成丙二酰辅酶A, 然后在脂肪酸合成酶的作用下经过酰基转移、缩合、还原、脱水、再还原等连续反应进行碳链的循环延伸合成, 该过程需要ATP及辅因子NADPH的参与(图1)。脂肪酸的生物合成对生物膜合成至关重要, 显著的扰动可能导致微生物膜

组分改变造成严重的生长缺陷^[62]。因此脂肪酸的合成和降解受到严格调控, 是代谢工程改造的关键靶点^[63-64]。大肠杆菌脂肪酸生物合成受到酰基-ACP的反馈抑制, 但这种抑制可以通过硫代酯酶的过表达释放, 从而使游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)积累^[65]。积累的FFA可以通过酰基-CoA连接酶转化为酰基-CoA, 进而通过脂肪酰基辅酶A还原酶转化为脂肪醇, 或者通过酯合酶与内源性合成的乙醇酯化为脂肪酸乙酯。脂肪酸的生物合成研究在众多微生物中都有研究(表2), 其中以天然的产油酵母以及模式微生物中研究较为深入。

传统的脂肪酸合成途径存在高能量需求和复杂调控问题, 但是脂肪酸降解途径, 即逆向 β -氧化途径能够与辅酶A硫酯中间体作用, 直接使用乙酰辅酶A进行酰基碳链延伸, 不需要ATP依赖激活丙二酰辅酶A, 也不需要NADPH作为辅因子, 这一特性使相关能源产品的合成具有最大的碳利用效率。如最早被发现能够利用乙醇和乙酸为底物生产丁酸的克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)可以通过天然 β -氧化途径合成中链脂肪酸^[2]。通过突变*E. coli*的*fadR*、*atoC*以及*crp*基因, 并敲除*arcA*、*adhE*、*pta*和*frdA*基因构建的逆向 β -氧化途径可产生至少6 g/L的脂肪酸^[90]。通过整合硫解酶、水解酶、脱氢酶、还原酶以及来自高等植物湿地萼距花(*Cuphea palustris*)的硫酯酶CpTE, 在酿酒酵母中构建出了人工逆向 β -氧化途径, 可以生产中链脂肪酸(C₈~C₁₀), 但是目前产量仍较低^[91]。

目前, 最常用于脂质积累的产油微生物包括微藻、细菌和酵母, 例如解脂耶氏酵母^[92]、弯曲隐球菌(*Cryptococcus curvatus*)^[93]、内脏隐球菌(*Cryptococcus vishniacii*)^[94]、斯达油脂酵母(*Lipomyces starkeyi*)^[95]、圆红冬孢酵母(*Rhodospidium toruloides*)^[96]、黏红酵母(*Rhodotorula glutinis*)^[97]、星云湖酵母(*Rhodospiridiobolus fluvialis*)^[98]、浅白隐球菌(*Cryptococcus albidus*)^[99]。其中解脂耶氏酵母由于遗传工具可行性与完备性, 是当前70种产油酵母中研究最为广泛的, 而且在生长速率和脂质产量方面通常比细菌和微藻更有优势^[100]。通过使用“Push-and-Pull”策略, 联合过表达ACC1和DGA1

表2 微生物生产脂肪酸和脂肪烃总结

Table 2 Summary of microbial production of fatty acids and alkanes

类别 Class	产物 Product	宿主 Host	发酵方式 Fermentation	底物 Substrate	产量 Titer/(g/L)	参考文献 Reference	
Fatty acids	Lipid	<i>Y. lipolytica</i>	3-L bioreactor	Glucose	90.00	[66]	
			Shake flask	Fructose	5.51	[67]	
			Shake flask	Sucrose	9.15	[67]	
			2-L bioreactor	Galactose	3.22	[68]	
			3-L, fed-batch	Hydrolysate	16.50	[69]	
			<i>E. coli</i>	0.45-L, fed-batch	Glucose	21.50	[70]
			<i>L. starkeyi</i>	Shake flask	Glucose and xylose	12.60	[71]
			<i>Thraustochytrid</i> T18	7-L, fed-batch	Glucose and xylose	87.00	[72]
		Fatty acid	<i>S. cerevisiae</i>	1-L bioreactor, fed-batch	Glucose	33.40	[73]
			<i>R. opacus</i>	6.6-L, fed-batch	Glucose	50.20	[74]
			<i>C. glutamicum</i>	Shake flask	Glucose	1.07	[75]
		Fatty acid ethyl esters	<i>Y. lipolytica</i>	Shake flask	Glucose	0.137	[76]
			<i>R. toruloides</i>	1-L, fed-batch	Glucose	9.97	[77]
		Wax ester	<i>A. baylyi</i>	Shake flask	Glucose	1.82	[78]
		Methyl ketone		<i>E. coli</i>	2-L, fed-batch	Glucose	3.40
<i>P. putida</i>	Test tube			Glucose	1.10	[80]	
Heavy oils		<i>A. melanogenum</i>	10-L bioreactor	Glucose	43.00	[81]	
Alkanes	Short chain alkane (C ₂ ~C ₅)	<i>E. coli</i>	Bioreactor	Glycerol	0.11~0.14	[82]	
	Medium chain alkane (C ₆ ~C ₁₂)	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Bioreactor	CO ₂	0.026	[83]	
			5-L, fed-batch	Glucose	1.01	[84]	
			6.6-L, fed-batch	Glucose	0.58	[85]	
			5-L, fed-batch	Glucose	2.5	[86]	
		<i>E. coli</i>	Shake flask	Glucose	0.26	[87]	
	Long chain alkane (C ₁₃ ~C ₂₂)	<i>R. opacus</i>	6.6-L, fed-batch	Glucose	5.2	[74]	
<i>A. melanogenum</i>			10-L bioreactor	Glucose	32.5	[88]	
<i>S. cerevisiae</i>			NA	Glucose	86 µg/g	[89]	

显著提高了解脂耶氏酵母的脂质产量，在生物反应器中脂质含量达到61.7%，葡萄糖转化率和生产强度分别为0.195 g/g和0.143 g/(L·h)^[101]。Lazar等通过增加胞内G3P浓度增强TAG合成，同时过表达己糖激酶改善果糖代谢和引入转化酶更好地利用蔗糖，实现了以蔗糖为唯一碳源的9.15 g/L的脂质产量^[67]，此菌株也被证实可从糖蜜和粗甘油中生产脂质^[102]。除此之外，大肠杆菌作为模式微生物也被用作脂肪酸生产的底盘细胞。Davis等^[103]通过过表达脂肪酸合成的关键酶ACC，有效提高大肠杆菌中脂肪酸生物合成速率。通过敲除*fadD*和过表达ACC与一种植物来源的硫脂酶，在大肠杆菌中实现了脂肪酸的高效生产（2.5 g/L），并用于生物柴油生产^[64]。

酯交换法是目前生物柴油制备应用最广泛的方法，主要包括化学催化和酶催化法。与化学催化相比，酶法酯交换具有反应条件温和，环境友好，易于分离副产物甘油等优点。脂肪酶（lipase）是酶法催化生产生物柴油使用最广泛的酶，主要是从细菌、真菌中分离，催化羧基酯键的断裂^[104]。尽管酶法催化制备生物柴油已取得了很大进展，但其在使用过程中需要进行脂肪酶的提取、纯化和固定化等工序，造成了生物柴油生产成本的提高。与酶法催化相比，以微生物为载体进行全细胞催化生产生物柴油可免去上述工序，更具有成本优势。Kyotani等^[105]将米曲霉菌丝体固定在由聚氨酯泡沫制成的生物质支撑颗粒里进行生物柴油的全细胞催化，通过向培养基中添加橄榄

油和油酸能显著增强脂肪酶的活性。Matsumoto等^[106]通过开发一种酵母表面展示系统,将米曲霉来源的脂肪酶展示在细胞表面,经72 h实现了效率78.3%的脂肪酸甲酯酵母全细胞催化合成。近年来,采用代谢工程改造已经在酵母和大肠杆菌等模式微生物中实现了生物柴油的从头合成。Kascheuer等^[107]通过引入运动发酵单胞菌来源的丙酮酸脱羧酶和醇脱氢酶实现乙醇生产;进一步表达贝氏不动杆菌(*Acinetobacter baylyi*)来源的非特异性酰基转移酶ADP1,以葡萄糖和油酸为底物,FAEE生产滴度为1.28 g/L,占细胞重26%;其次,通过共表达来自植物荷荷巴的产醇双功能酰基辅酶A还原酶和来自*A. baylyi*的ADP1,大肠杆菌在油酸条件下可产生脂肪酸丁酯。Steen等^[108]通过在大肠杆菌中引入乙醇和脂肪酸生产途径,实现了以葡萄糖为唯一碳源的FAEE合成,产量为674 mg/L。

1.4 生物脂肪烃

长直链烃类化合物(脂肪烃)是液体化石燃料的主要组成部分,具有高能量密度、低吸湿性和低挥发性等优点。根据碳原子数不同,烃类分为短链烃($C_2\sim C_5$)、中链烃($C_6\sim C_{12}$)、长链烃($C_{13}\sim C_{22}$)以及超长链烃($C_{23}\sim C_{32}$)。不同碳链长度的脂肪烃也有不同的功能,典型的油类燃料如汽油的主要组成成分是 $C_4\sim C_{10}$ 的中链及短链烃,柴油及航空燃料的主要成分是 $C_8\sim C_{18}$ 的中链及长链烃^[109]。目前,已经发现许多天然微生物具有合成脂肪烃的能力,包括藻类、细菌、酵母、丝状真菌等^[110]。从产业规模分析,2021年全球脂肪烃溶剂和稀释剂市场规模达到207.3亿元,市场年复合增长率预估为6.17%,具有一定的发展前景。

微生物合成脂肪烃是在脂肪酸合成代谢途径的基础上,以脂肪酰-酰基载体蛋白、脂肪酸或脂肪醛等物质为基础,可通过脂肪醛脱羧基、脂肪酸脱羧、头对头的烃类化合物生物合成及聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)途径四种方式合成。利用脂肪醛脱羧基合成烃类存在于大多数产烃微生物中,以脂肪醛为底物,经过醛脱羧酶(aldehyde decarbonylase, AD)催化脱去羧基,生

成脂肪烃和 CO_2 或CO,其中AD广泛存在于植物、昆虫、蓝藻中。Kang等^[109]在酿酒酵母中对植物、昆虫和蓝藻来源的AD酶进行鉴定,研究发现来自细长聚球藻(*Synechococcus elongatus*)和瓦氏鳕球藻(*Crocospaera watsonii*)的醛脱甲酰化加氧酶(aldehyde deformylating oxygenase, ADO)具有与蓝藻AD相同的功能,能将脂肪醛转化为相应的 C_{n-1} 烷烃和烯烃,其中过表达CwADO烷烃浓度最高为0.13 mg/L(OD_{600}),动态调控CwADO表达使脂肪烃的产量增加到0.2 mg/L(OD_{600})。脂肪烃生物合成途径在多种蓝藻中被发现和报道,除了上述利用酰基还原酶(acyl reductase, AAR)和AD催化脂肪酰-ACP生成脂肪烃外,还可以通过烯炔合酶(olefin synthase, OLS)从脂肪酸合成烯炔^[111-112]。

脂肪酸脱羧反应得到的产物主要是末端烯炔。脂肪酸氧化脱羧通过脂肪酸脱羧酶催化完成,常见的脂肪酸脱羧酶包括*Jeotglicoccus species*来源的细胞色素P450酶OleT_{JE}和非血红素单核铁氧化酶UndA及UndB^[113-114]。上述脂肪酸脱羧酶被用于在许多细胞工厂(如大肠杆菌和酿酒酵母)中产生末端烯炔。Liu等^[115]通过删除酰基辅酶A合成基因(*fadD*)和过表达酰基辅酶A羧化酶、硫脂酶A和OleT_{JE},使用工程化大肠杆菌产生96.7 mg/mL的脂肪烃。Zhou等^[116]在生产脂肪酸的酵母菌株中过表达OleT_{JE}、UndA和UndB,均能实现1-烯炔的合成,但是产量较低,仅有1~6 mg/L,进一步将酿酒酵母中的电子转移系统与UndB共表达,1-烯炔的产量提高了50%。此外,引入来源于*Homo sapiens*的长链脂肪酸转运蛋白FATP1实现了35 mg/L 1-烯炔的生产,其中80%烯炔分泌至培养基中。

除了上述两种方式,在一些细菌如藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)和希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*)中还能通过脂肪酸头对头缩合进行内部烯炔的生物合成,此反应在OleABCD复合体作用下进行,OleA将 β -酮酰基CoA转化为中间体后与脂肪酰CoA缩合形成 β -酮酸,随后在NADPH依赖性的OleD作用下还原成 β -羟基酸,最终在OleC作用下形成烯炔,此过程需要辅因子NADPH和

ATP参与,其中OleB的功能仍未有明确解析^[117-118]。Beller等^[119]在大肠杆菌中过表达OleABCD酶编码的基因,获得了40 μg/L的烯烃。

许多天然产烃微生物都存在产量过低的问题,因此,改造天然的脂肪烃生产的微生物底盘细胞或将脂肪烃生物合成途径导入到常见的模式底盘细胞(如大肠杆菌、酿酒酵母)中是当前脂肪烃研究的主要方法。通过对野生型不透明红球菌(*Rhodococcus opacus*)中参与烃类化合物降解的单加氧酶基因*alk-1*进行敲除,使长链烃的产量达到了5.2 g/L^[74]。十七烷和十七烯是集胞藻属中脂肪烃的主要成分,含量约为细胞干重的0.1%^[120]。将Calvin-Benson-Bassham来源的3-磷酸甘油醛(3-PGA)重新定向至酰基ACP,并增强烷烃生物合成基因的表达,能提高集胞藻烷烃的产量和生产效率,与野生型菌株相比提高了8.3倍^[83]。将来自蓝藻的烷烃生物合成基因在大肠杆菌和聚合球菌中异源表达,大肠杆菌中产生烷烃的浓度范围为5~40 mg/L^[110]。通过优化参与脂肪烃合成的遗传元件,结合代谢模型对脂肪烃合成的靶点改造预测,并对相关基因进行过表达和敲除,获得了425 mg/L的脂肪烃产量,最终脂肪烃产量在补料分批发酵条件下提高到2.5 g/L^[86]。除此之外,一些非模式底盘细胞如解脂耶氏酵母也被用于生产各种烷烃化合物。解脂耶氏酵母具有高效的脂肪酸合成能力,将其酰基-ACP和酰基辅酶A代谢进行定向分配,并将脂肪生成与氮饥饿反应解耦,改造后的菌株烷烃产量为23.3 g/L,脂肪醇产量为2.15 g/L^[76]。不同微生物脂肪烃合成案例见表2。但是当前脂肪烃的合成还处于实验室阶段,离工业化还有一段距离。

1.5 生物萜类

萜类化合物是分子骨架以异戊二烯单元(C₅单元)为基本结构单元的化合物及其衍生物。萜类化合物具有作为生物燃料和其他商业产品应用的广阔前景,目前很多公司如美国Amyris、瑞士Evolva、荷兰Isobionics等都以细菌或酵母作为底盘细胞来生产商用萜类物质。萜类化合物中的单萜(C₁₀)以及倍半萜(C₁₅)具有替代柴油和汽油

的潜力,如单萜中的蒎烯、桉烯和柠檬烯,倍半萜中的法尼烯与甜没药烯等,特别是法尼烯因其良好的低温性能、高十六烷值和低温室气体排放被认为是合适的航空燃料替代品,引起了广泛的研究兴趣^[121-125]。预测至2027年,全球法尼烯市场规模将达到40.7亿元,全球法尼烯市场复合增长率预估为0.51%,具有一定的市场前景,但其大规模发酵生产的实现及成本是商业化经济生产的制约因素。武汉大学刘天罡教授团队^[126]进一步将法尼烯拓展为维生素E家族的前体物质,拓宽了法尼烯在生物医药领域的应用。

萜类化合物的生物合成途径主要包括甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA途径)和2-甲基赤藓糖醇-4-磷酸途径(2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, MEP途径)(图1)。MVA途径普遍存在于古细菌、真核微生物、植物以及包括哺乳动物细胞在内的真核生物中。乙酰辅酶A首先经不同的酶催化得到甲羟戊酸,然后甲羟戊酸转化生成异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)和二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)。MEP途径主要存在于大多数细菌、藻类和植物的叶绿体中。丙酮酸和甘油醛-3-磷酸在1-脱氧-D-木酮糖-5磷酸合酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXPS)的催化下缩合生成1-脱氧-D-木酮糖-5磷酸(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP);DXP经异构、磷酸化、环化等步骤形成MEP,然后再经相关酶催化磷酸化、环化形成IPP;IPP被异戊烯基焦磷酸异构酶催化为其同分异构体DMAPP。与MEP途径相比,MVA途径需要的辅因子量更低^[127]。上述两个途径生成的DMAPP和IPP经缩合产生香叶酰焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP),GPP作为萜类化合物生物合成的重要前体物质进入后续途径。研究人员还构建了一条以异戊二烯醇或者戊二烯醇作为起始底物的异戊醇利用途径(isopentenol utilization pathway, IUP),利用来源于酿酒酵母的胆碱激酶(choline kinase, ScCK)和MVA途径自身的异戊基激酶(isopentenyl phosphate kinase, IPK)依次催化两步磷酸化反应合成IPP和DMAPP,可用于萜类化合物的生产。相较于MVA和MEP途径,IUP途径只需要ATP作为辅因子,仅需两步反

应, 途径更简单, 不和中心碳代谢竞争碳流^[128]。目前通过代谢工程改造, 已经实现了多种萜类化合物的微生物生产(表3)。

单萜化合物蒎烯、桉烯、柠檬烯(C₁₀)的生物合成通常由MEP或MVA途径生成GPP, 然后在蒎烯、桉烯和柠檬烯合酶的催化作用下生产。通过引入外源MVA代谢途径并整合不同来源的蒎烯合成酶(pinene synthases), 在大肠杆菌中实现了不同类型蒎烯的生物合成, 之后结合诱变和优化蒎烯合成途径, 蒎烯产量提升至140 mg/L^[145]。利用生物合成途径正交优化, 在解脂耶氏酵母中蒎烯产量为19.6 mg/L, 比初始产量显著提高218倍。以废食用油和木质纤维素水解液为原料时成功获得33.8 mg/L和36.1 mg/L蒎烯^[130]。在大肠杆菌中引入外源MVA途径, 并表达来自大冷杉(*Abies grandis*)的GPP合成酶以及来自鼠尾草(*Salvia pomifera*)的桉烯合成酶(sabinene synthase), 桉烯摇瓶产量达82.18 mg/L, 发酵罐中达2.65 g/L^[133]。在酿酒酵母中表达鼠尾草的桉烯合成酶, 桉烯的滴度可达17.5 mg/L。同样, 通过引入异源代谢途径以及代谢工程和合成生物学改造, 实现了大肠

杆菌和酿酒酵母中以葡萄糖为碳源的柠檬烯合成, 产量分别为1.29 g/L和917.7 mg/L^[135, 138]。倍半萜化合物法尼烯、甜没药烯的生物合成是在法尼烯、甜没药烯合酶作用下催化MEP或MVA来源的FPP产生。通过利用来自青蒿(*Artemisia annua*)和挪威云杉(*Picea abies*)的萜类合成酶, 以及MVA代谢途径, 美国Amyris公司利用大肠杆菌和酿酒酵母生产法尼烯, 产量达到1.1 g/L和728 mg/L。在毕赤酵母中, 通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)介导染色体基因整合构建过表达MVA途径和 α -法尼烯合酶基因的菌株文库, 经优化筛选得到的最佳毕赤酵母菌株的 α -法尼烯产量也达到了2.56 g/L^[141]。将来自于大冷杉的甜没药烯合酶[(*E*)- α -bisabolene synthase]基因*Ag1*在大肠杆菌中异源表达, 甜没药烯的产量可达400 mg/L左右, 经过一系列代谢工程手段, 在大肠杆菌和酿酒酵母中的产量最终能达到900 mg/L左右^[143]。另外, 在大肠杆菌中过表达*nudB*和*nema*能将C₅中间体IPP和DMAPP转化为异戊烯醇和异戊醇, 通过MVA途径获得2.23 g/L 3-甲基-3-丁烯-1-醇、150 mg/L 3-甲基-2-丁烯-1-醇和300 mg/L

表3 微生物生类异戊二烯类燃料总结

Table 3 Summary of microbial production of isoprenoid-derived fuels

产物 Product	宿主 Host	发酵方式 Fermentation	底物 Substrate	产量 Titer/(g/L)	参考文献 Reference
Pinene	<i>E. coli</i>	Shake flask	Glucose	0.14	[129]
	<i>Y. lipolytica</i>	Shake flask	Hydrolysate	0.036	[130]
	<i>C. glutamicum</i>	Shake flask	Glucose	27 μ g/g	[131]
	<i>R. sphaeroides</i>	Shake flask	CO ₂	0.54 mg/L	[132]
Sabinene	<i>E. coli</i>	5-L bioreactor	Glycerol	2.65	[133]
	<i>S. cerevisiae</i>	Shake flask	Glucose	0.018	[134]
Limonene	<i>E. coli</i>	Shake flask	Glucose	1.29	[135]
		3.1-L, two-phase	Glycerol	3.6	[136]
	<i>Y. lipolytica</i>	1.5-L; fed-batch	Glycerol	0.17	[137]
	<i>S. cerevisiae</i>	Shake flask	Glucose	0.92	[138]
Farnesene	<i>E. coli</i>	Shake flask	Glycerol	8.74	[139]
	<i>S. cerevisiae</i>	NA	NA	104.3	Amyris
	<i>P. pastoris</i>	Shake flask	Oleic acid; sorbitol	2.56	[140]
	<i>Y. lipolytica</i>	1-L; fed-batch	Glucose	2.56	[141]
		200 t; fed-batch	Cane syrup	130	[142]
Bisabolene	<i>E. coli</i>	Shake flask	Glucose	0.91	[143]
	<i>S. cerevisiae</i>	Shake flask	Mannose; glucose	0.99	[4]
	<i>R. capsulatus</i>	Shake flask	Glucose	1.08	[144]

3-甲基-1-丁醇，而通过MEP途径获得的异戊烯醇产量为60 mg/L，其效率远低于使用酮酸途径产生的4.4 g/L 3-甲基-1-丁醇^[146-147]。

在生物燃料候选化合物中，倍半萜化合物具有高能量密度、高燃烧热和低冰点特性，被认为是未来新型的高能液体燃料，然而其应用于航空燃料领域的可行性分析仍处于理论阶段。武汉大学刘天罡教授团队^[148]从现有文献报道中收集了122种倍半萜骨架化合物并进行饱和化处理，结合基团贡献法和高斯量子化学方法，对化合物的体积热值、燃烧热、密度、冰点、闪点、比冲等6种性能参数进行计算评估，根据不同性能筛选标准，筛选出17个具有良好预测性能的倍半萜化合物。随后在酿酒酵母中实现了17个化合物的生物合成，通过途径优化、关键基因拷贝数调整、增加前体供应，构建了9种化合物的高效合成菌株。该研究系统评估了倍半萜作为航空燃料的潜力，对倍半萜应用于燃料领域具有重要的指示。另外，该团队致力于萜烯类化合物微生物合成，确定了三萜生物合成的新酶机制，增强了对自然界萜烯类化合物生物合成的理解^[149]。

2 生物燃料合成微生物底盘

长链醇、脂肪酸酯、萜类及烷烃等化合物由于其各自拥有特殊的性质，成为生物乙醇之外的理想生物燃料。尽管可以利用微生物天然代谢途径或通过代谢工程改造实现这些化合物及其前体的生产，但这些途径往往需要进行重新设计、优化、适配以提高生产效率。因此，系统研究已知模式底盘细胞，同时挖掘更多具有不同优良特性的非模式微生物底盘细胞，通过系统生物学方法理解与合成生物学手段进行设计、构建和优化，可以拓展生物燃料的品种，提高微生物燃料细胞工厂的生产性能，推动生物燃料向产品多元化与产业化方向发展。

用于生物燃料合成的模式微生物底盘细胞包括酿酒酵母、大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌等。这些模式微生物具有清晰的遗传背景和完善的基因编辑工具，被广泛用于生物燃料的生产。此外，一些非模式微生物如高生长速率的需钠弧菌 (*Vibrio*

natriegens)、高转化效率的拜氏不动杆菌 (*Acinetobacter beijerinckii*)、天然乙醇生产菌株运动发酵单胞菌、一碳化合物利用菌株杨氏梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*)、产乙醇梭菌 (*Clostridium autoethanogenum*) 等也被广泛用于生物燃料的生产。然而，与模式菌株相比，非模式菌株的遗传改造工具相对缺乏，导致其代谢工程改造较为困难。上述模式微生物与非模式微生物的详细特性、进展与应用可参考相关综述^[150]。部分生物燃料生产的模式微生物与非模式微生物底盘细胞的特性见表4。

大肠杆菌是研究最为广泛和深入的模式原核微生物，生长速度快，可利用多种底物进行有氧或厌氧生长。其遗传背景清晰、遗传操作工具多样的优点使其成为生产多种能源产品的重要模式微生物底盘细胞^[151]。大肠杆菌自身不具备生产生物燃料的能力，通过代谢工程手段将异源生物燃料合成引入大肠杆菌中能够实现相应生物燃料的合成，如乙醇、正丙醇、丁醇、异丁醇、脂肪酸以及各种萜类化合物等。

酿酒酵母是研究最为广泛且深入的模式真核微生物，酿酒酵母除了拥有一系列合成生物学技术体系、丰富的生物元件库以及海量数据库外，其长期作为工业生产菌株已经建立成熟的商业模式，是生物燃料生产的高效微生物底盘细胞。在酿酒酵母中已经实现了生物乙醇、生物异丁醇的工业化生产。

谷氨酸棒杆菌是氨基酸生产的重要模式菌株，具有广泛的底物谱，可以同时利用混合物中的各种碳源，包括糖类（如葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等），醇类（如乙醇和肌醇等），有机酸及其盐（如乙酸、柠檬酸盐、乳酸盐、丙酸盐和丙酮酸盐等）。目前，在谷氨酸棒杆菌中建立了完备的基因组代谢网络模型、单链DNA重组、碱基编辑等基因编辑工具以及代谢途径组装方法。这些工具和方法的开发使得谷氨酸棒杆菌的底物利用谱得到了进一步扩展，同时也成功设计了许多代谢途径与调控策略，用于生产有机酸、醇类、蛋白质等多种生物化学品^[152]。谷氨酸棒杆菌体内存在的独特的脂质稳态机制也有望使它成为脂肪酸类生物能源生产的潜在主力^[75]。

表4 部分模式与非模式微生物底盘细胞特性

Table 4 Characteristics of partial model and non-model microbial chassis cell

类别 Class	菌株 Strain	生长条件 Growth condition	安全性 Safety status	基因组大小 Genome size /Mb	底物 Substrates	基因组修饰工具 Genome manipulation tools	产物 Products
Model microbes	<i>E. coli</i>	Facultative aerobic	Not GRAS	4.64	Pentose, hexose, glycerol, starch	Various tools	Alcohols, fatty acids and terpenoids
	<i>S. cerevisiae</i>	Facultative aerobic	GRAS	11.8 16 chromosomes	Starch, sucrose, hexose	Various tools	Terpenoids, nature products
Non- model microbes	<i>C. glutamicum</i>	Facultative aerobic	GRAS	3.28	Sugars, alcohols, organic acid	HR, CRISPR-Cas9 CRISPR-Cpf1/dCpf1	Alcohols, aminol acid
	<i>Y. lipolytica</i>	Facultative aerobic	GRAS	20.5 6 chromosomes	Glucose, glycerol, sucrose, starch, inulin, cellobiose	NHEJ, ZFN, TALEN CRISPR-Cas9 (CRISPRi/CRISPRa)	Lipid, FAAE, terpenoids, Alkanes
	<i>Z. mobilis</i>	Facultative anaerobic	GRAS	2.2 4 plasmids	Glucose, sucrose, fructose	HR, CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas 12a, Endogenous Type-I-F CRISPR-Cas system	Ethanol, isobutanol, 2,3-butanediol, PHB
	<i>C. thermocellum</i>	Strictly anaerobic	Not GRAS	3.56	Hydrolysate	Endogenous I-B CRISPR system; Heterologous II CRISPR system	Ethanol, isobutanol
	<i>C. acetobutylicum</i>	Strictly anaerobic	Not GRAS	4.1	Glucose	CRISPR-Cas9/dCas9	Acetone, ethanol, butanol

解脂耶氏酵母是天然脂质生产的非模式真核微生物，具有丰富的底物利用谱，如利用葡萄糖、甘油、蔗糖、淀粉、菊粉、纤维二糖等碳源进行生长^[153]。其丰富的乙酰辅酶A能为大量的生物燃料化合物提供充足的前体^[154-155]，使得解脂耶氏酵母被设计用于如脂质类衍生物、法尼烯、番茄红素等生物燃料和高价值化学品的生产。很多重要的合成生物学工具和元件在解脂耶氏酵母中得到了开发和应用，如DNA组装技术、编辑技术和计算工具^[156]。这些工具的开发进一步加快了以解脂耶氏酵母为底盘细胞的微生物细胞工厂的构建。

运动发酵单胞菌是天然的乙醇生产菌株，是目前已知唯一可在厌氧条件下利用ED途径的微生物，具有葡萄糖代谢速率快、乙醇产量高（可达理论最高产量的98%）、对高浓度乙醇（体积分数16%）耐受性好等工业生产特性^[157]。运动发酵单胞菌遗传操作工具也相对完备，除了常规的同源重组和CRISPR-Cas9基因编辑方法，本课题组已经成功开发了基于外源CRISPR-Cas12a以及内源I-F型CRISPR-Cas系统的基因编辑体系^[158-159]。另外，通过对组学数据的研究，挖掘并鉴定了不同

强度的启动子、RBS以及抗逆相关的生物元件^[157]。运动发酵单胞菌还可被改造用于2,3-丁二醇、异丁醇等能源产品的生物合成^[25, 31]；同时，运动发酵单胞菌在利用纤维素类生物质进行生物炼制生产生物能源的优势逐渐显现，具有作为木质纤维素生物燃料微生物细胞工厂的潜力^[160]。

丙酮丁醇梭菌和拜氏梭菌是丁醇生产的主要工业菌株，能够利用淀粉、糖蜜等糖原料发酵生产大宗化学品丁醇、丙酮和丁酸等。相比于模式微生物，产丁醇梭菌的遗传改造操作更加匮乏，仅靠自身的重组系统实现基因删除的难度大。针对这一问题，研究人员开发了不依赖同源重组的基因编辑工具，优化了产丁醇梭菌的同源重组效率以及突变体筛选方式。基于CRISPR-Cas系统的基因编辑技术也使产丁醇梭菌遗传操作效率显著提升^[161]，极大推进了丙酮丁酸梭菌作为生物燃料底盘细胞的发展。

热纤梭菌是高效降解木质纤维素的主要菌株之一，其分泌的纤维小体这一超分子酶系复合物受到广泛关注和研究^[162]。热纤梭菌作为厌氧、嗜热的革兰氏阳性细菌，能够将糖化和发酵过程整

合为一步,即纤维素分解和乙醇生产同时进行,美国达特茅斯学院Lee Lynd教授课题组以该菌株为模式,提出一体化生物加工(consolidated bioprocessing, CBP)的概念。在此基础上,中国科学院青岛生物能源与过程研究所的崔球研究员和冯银刚研究员团队^[163]另辟蹊径,提出了基于纤维小体全菌催化剂的木质纤维素“整合生物糖化”(consolidated bio-saccharification, CBS)策略,一方面采取类似CBP方式有机整合酶的生产和水解步骤,节约了酶成本;另一方面在下游发酵步骤上进行一定程度分立,将可发酵糖作用于下游平台化学品,相比CBP具有显著的产品出口灵活性^[163]。在以木质纤维素为原料生产异丁醇时,异丁醇生产途径被引入到热纤梭菌中,实现了以纤维素为底物生产5.4 g/L异丁醇^[26]。

为了生产所需的生物燃料,必须将燃料合成途径引入至微生物中,微生物宿主的选择通常由几个因素决定,包括碳源(木质纤维素、二氧化碳、甲醇、甲烷等)、底物和产物毒性以及培养条件。非模式微生物需要在模式微生物大肠杆菌和酿酒酵母表现不佳的特定条件下进行生物燃料生产。因此,一系列的生物燃料代谢途径被引入到不同的宿主中,构建高效的微生物细胞工厂成为生物燃料工业化生产的关键问题。

3 生物燃料微生物细胞工厂改造方向及策略

微生物细胞工厂是生物绿色制造的核心,综合系统生物学与合成生物学对微生物底盘细胞进行理性设计、改造与重构能够实现以廉价生物质为原料的能源化学品、营养化学品、医药中间体以及生物塑料等多种化学品的生产,能有效解决传统化学合成带来的环境污染和化石原料过度使用造成的能源枯竭等问题。物质代谢和能量代谢是微生物的主要代谢活动,是微生物细胞工厂构建过程中的主要改造靶点。通过物质代谢改造能提高细胞工厂对底物的利用速率,拓宽其底物利用多样性,降低产品生产过程中冗余副产物的产生,使碳代谢流最大程度地流向目标产品。通过

能量代谢改造能为细胞的化学品生产过程提供充足的能量及辅因子,平衡还原力,促进目标化合物的高效生产。近年来,生物信息与测序技术的快速发展产生了大量的组学数据,通过对这些组学数据进行整理和分析,越来越多与微生物生长、形态、胁迫耐受性相关的关键基因被挖掘、鉴定,并指导微生物细胞工厂的设计与改造。与此同时,合成生物学的发展为细胞工厂的改造赋予了大量的使能技术,包括基因组的合成与组装、基因编辑、蛋白质结构预测和从头设计、细胞和基因回路工程、无细胞合成等,大大缩短了细胞工厂的开发迭代周期,同时使得研究人员可以更精确地进行细胞工厂的理性设计与改进^[164]。

本部分从微生物自身的物质代谢和能量代谢出发,总结了当前生物燃料细胞工厂的改造策略;并结合微生物在实际生产过程中的瓶颈问题,就微生物生理代谢提出改造策略;最后结合信息技术、组学数据、代谢网络模型以及动态调控提出优化微生物细胞工厂的信息代谢策略。

3.1 物质代谢改造

3.1.1 中心碳代谢改造

中心碳代谢(central carbon metabolism, CCM)是微生物细胞生长的主要能量来源,同时可为燃料及其他化学品的合成提供前体和辅因子。传统意义上,CCM主要包括糖酵解(glycolysis)、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA循环)以及戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway, PPP),在某些缺乏完整EMP途径的微生物中,则以2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸途径(Entner-Doudoroff pathway, ED途径)代替。CCM系统由复杂的代谢反应网络组成并受到多种因子的调控。因此,对CCM的改造与工程设计将碳通量重新分配到需要的代谢物前体至关重要。

磷酸烯醇式丙酮酸-磷酸转移酶系统(phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system, PTS)是广泛存在于细菌、真菌和一些古细菌中的一种碳水化合物转运系统,能够转运葡萄糖、果糖、甘露糖、乳糖和半乳糖等多种糖类物质^[165]。在以PTS介导糖转运的微生物中,1 mol葡萄糖转运需要消耗1 mol磷

酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP), 而 PEP 是合成许多重要化合物的关键前体物质, 因此为了提高化合物的产量, 通常的方法是降低或失活 PTS 转运系统表达以提高 PEP 供给使代谢流更多流向目标代谢产物^[166]。然而, PTS 糖转运系统的降低或失活会严重抑制菌株在葡萄糖中的生长, 通过适应性进化则能够提高葡萄糖的利用能力。除此之外, 调节半乳糖透性酶 (GalP) 和葡萄糖激酶 (Glc) 在 PTS 失活菌株中的表达也能有效提高葡萄糖利用速率及生长速率^[167]。此外, 通过引入运动发酵单胞菌来源的葡萄糖促扩散蛋白 (Glf) 和葡萄糖激酶 (Glc) 也能有效提高大肠杆菌葡萄糖利用效率^[168]。

EMP 途径和 ED 途径是异养微生物细胞中最丰富的碳水化合物异化途径, 为异养微生物的物质代谢建立了基础^[169]。EMP 途径由 10 个酶促步骤组成, 每摩尔葡萄糖产生 2 mol 丙酮酸、NADH 和 ATP。而 ED 途径仅需要 5 步酶促反应将葡萄糖氧化产生 2 mol 丙酮酸, 但每摩尔葡萄糖仅产生 1 mol NADH (NADPH) 和 ATP。实际上, 尽管 ED 途径在能量获取方面效率较低, 但在热力学上比 EMP 途径更有利。此外, ED 途径葡萄糖定量酶促反应所需的蛋白质量更少^[170]。因此, ED 途径在辅因子平衡以及葡萄糖消耗速率上更优于 EMP 途径, 被广泛设计和应用于化合物的高效生产^[27, 171]。在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中引入来自运动发酵单胞菌 ED 途径的相关基因, 提高了葡萄糖的消耗速率, 促进了丙酮酸的积累, 分别实现了 13.6 g/L 与 20.8 g/L 异丁醇的生产^[27, 172-173]。

三羧酸循环和戊糖磷酸途径是微生物中辅因子 NADPH 再生的主要来源。为了提高 NADPH 再生效率, 常见的策略是通过 PPP 删除葡萄糖-6-磷酸异构酶 (PGI) 或 6-磷酸果糖激酶 (PFK) 来重新引导碳流量, 但是会抑制细胞生长。通过引入 NADPH 消耗途径, 如聚羟基丁酸酯 (poly-3-hydroxybutyrate, PHB) 合成途径, 能在一定程度上恢复细胞生长, 并通过控制葡萄糖浓度实现 PHB 增产^[174]。其次, 过表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Zwf) 或 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (Gnd) 也能增加胞内 NADPH 浓度。Kim 等^[175] 在大肠杆菌中共表达 *zwf* 与 *glpX* 显著增加了 NADPH 依赖型的氢气

生产。

丙酮酸作为重要的中间代谢物, 可用于乙醇、乙酰辅酶 A、乳酸及多种多碳高级醇的合成 (图 1)^[23], 通过增强丙酮酸的合成速率和降低丙酮酸的消耗速率可有效提高目标化合物的产量。对运动发酵单胞菌中的丙酮酸脱羧酶进行调控, 削弱碳源向乙醇的合成, 使乳酸、异丁醇的产量分别提高至 64 mmol/L (65% 最大理论转化率) 和 160 mmol/L (70% 最大理论转化率)^[176]。

乙酰辅酶 A 是微生物物质代谢的关键中间体, 既是 TCA 循环的起始, 也是脂肪酸生物合成的重要前体, 同时也可以被转化成多种化学物质, 包括正丁醇、1,4-丁二醇、丁酸酯、聚 3-羟基丁酸酯及萜类化合物等^[177-181]。微生物胞内乙酰辅酶 A 的积累主要受到丙酮酸脱氢酶复合体 (PDHC) 的活性影响。由于乙酰辅酶 A 在胞内的合成受到丙酮酸和还原性烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 的影响, 在厌氧条件下 PDHC 活性较低, 通过对编码 PDHC 复合酶的 *lpd* 基因进行突变, 能有效地增强 PDHC 在厌氧条件下的活性, 降低其对 NADH 的敏感性^[182]。将大肠杆菌中的 *lpd* 基因替换成肺炎克雷伯菌非敏感性基因 *lpdA*, 可提高菌株积累乙酰辅酶 A 的能力, 显著提高了大肠杆菌在微氧条件下 1,4-丁二醇的产量^[183]。其次, 过表达 PDHC 中的相关基因 (*aceEF*、*lpd*) 同样可提高 PDHC 的活性。该改造策略已经被应用并实现了正丁醇、脂肪酸和其他化学品的产量提升^[184-185]。除此之外, 乙酰辅酶 A 通量还可以通过乙酸途径进行调控^[186], Zha 等^[187] 通过敲除 *ackA-pta* 基因降低了乙酰辅酶 A 向乙酸的生成, 在同时过表达乙酰辅酶 A 合成酶 (Acs) 基因的条件下使得丙二酰辅酶 A 的产量提高了 4 倍。其次, 过表达 Acs 和 TesA 基因可使大肠杆菌以乙酸为底物生产 1 g/L 脂肪酸, 在木质纤维素稀酸水解液中可产生 0.43 g/L 脂肪酸^[188]。因此, 强化乙酸向乙酰辅酶 A 的转化, 也是提高目的产物合成的有效策略之一。

3.1.2 底物利用宽泛性改造

为了积极应对原料价格的波动对生物燃料市场的影响, 有必要开发不同底物利用的微生物细胞工厂, 以最大限度地利用生物质中的碳源提高生物燃料的产量。木质纤维素是地球上最丰富的

可再生资源，也是第二代生物炼制的主要原料。木质纤维素经过预处理与纤维素酶水解后会释放可被微生物发酵利用的单糖，包括D-木糖、L-阿拉伯糖等五碳糖和D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖等六碳糖，但是绝大多数微生物只能利用其中的部分糖作为碳源。因此，引入不同碳源的代谢途径，扩大微生物底物利用谱，实现对纤维素水解液中多种碳源的共利用，有助于实现生物能源的经济生产。

早期研究显示，酿酒酵母具有木糖代谢途径的相关基因^[189]，包括木糖还原酶（xylose reductase, XR）和木糖醇脱氢酶（xylitol dehydrogenase, XDH）。木糖运输至胞内主要通过非特异性的转运系统，包括以浓度差为推动力的、低亲和性的促进扩散系统和以质子动力势为推动力的木糖-质子同向运输系统。进入胞内的木糖经过异构途径转化为木酮糖，再被木酮糖激酶（xylulokinase, XKS）磷酸化为木酮糖-5-磷酸，从而进入下游代谢途径^[190]。但是，在以木糖为唯一碳源条件下，酿酒酵母菌株生长极其缓慢，不能利用木糖产生乙醇^[191]。相关研究显示，酿酒酵母不能有效利用木糖的主要原因是由于内源性的XR和XDH活性太低，同时代谢生成的磷酸化木酮糖-5-磷酸对细胞有抑制毒性。通过引入外源的XR和XDH编码基因或者引入异源XI途径，即引入木糖异构酶编码基因，可以重构酿酒酵母菌株的木糖代谢途径^[192-193]。依赖于辅因子的XR和XDH在酿酒酵母重组菌株中可以提高乙醇产量，但不依赖辅因子的XI途径的木糖发酵菌株具有更高的乙醇得率^[194-195]。此外，为提高木糖转化为乙醇的效率，还可同时考虑引入木糖转运系统，如引入来源于季也蒙迈耶氏酵母（*Meyerozyma guilliermondii*）的己糖转运体突变体Mgt05196、Gal2-N376F和Hxt7-F79S等^[196-199]。

运动发酵单胞菌作为天然的乙醇生产菌株，野生型只能以葡萄糖、果糖和蔗糖为发酵底物。为了扩大运动发酵单胞菌的底物利用谱，Zhang等^[200-202]将来源于大肠杆菌的木糖异构酶（xylose isomerase, XI）、木酮糖激酶（xylulokinase, XK）、酮糖转移酶（transketolase, TKT）和转二羟丙酮基酶（transaldolase, TAL）基因在运动发酵单胞菌中进

行异源表达，得到的重组菌株能够直接利用木糖生产乙醇。此外，通过过表达来自大肠杆菌的阿拉伯糖代谢途径的5个基因：L-阿拉伯糖异构酶基因（*araA*）、核酮糖激酶基因（*araB*）、5-磷酸核酮糖异构酶基因（*araD*）、转二羟丙酮基酶基因（*talB*）和酮糖转移酶基因（*tktA*），得到了能直接发酵阿拉伯糖的重组菌株^[203]。野生型谷氨酸棒杆菌只携带一个编码木酮糖激酶的基因*xylB*，缺乏木糖异构酶基因，因而不能利用木糖，但可以从环境中吸收木糖^[204]。在谷氨酸棒杆菌中重构木糖同化途径，使其能够生长，并产生有机酸和氨基酸等产物^[204-206]。经代谢工程改造后的谷氨酸棒杆菌可以以和葡萄糖相当的消耗速率利用戊糖，因此被认为是一种以木质纤维素生物质生产燃料和化学品的优良底盘细胞^[204, 207-209]。尽管野生型谷氨酸棒杆菌不产生乙醇，但通过引入运动发酵单胞菌中的丙酮酸脱羧酶基因（*pdC*）和乙醇脱氢酶基因（*adhB*），实现了厌氧条件下以葡萄糖为原料的乙醇生产。同时，通过提高糖酵解酶，包括葡萄糖-6-磷酸异构酶（PGI）、6-磷酸果糖激酶（PFK）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）、丙酮酸激酶（PYK）和磷酸丙糖异构酶（TPI）的表达水平，进一步提高了乙醇的产量和产率^[210]。该代谢工程策略也被应用于由葡萄糖、木糖和阿拉伯糖组成的混合糖生产乙醇的重组菌株构建^[210]。

除了利用木质纤维素为原料外，C₁分子如CO₂、甲醇、甲酸盐也是生物技术过程中极具潜力的合成生物制造原料。目前能够利用C₁分子的微生物包括：可以利用甲基化合物作为唯一碳源进行生长和代谢的天然甲基营养微生物，以及经代谢工程改造和/或适应性进化获得的甲醇营养菌株（如大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌）。通过对天然甲醇酵母进行代谢工程改造，实现了初级代谢产物乙醇、异丁醇、2,3-BDO和次级代谢产物包括聚酮类、萜类、脂肪酸衍生物等的合成^[211-215]。对天然甲基营养微生物研究发现其代谢网络大致分为三个模块：氧化模块（单碳化合物的氧化）、同化模块（单碳化合物进行中心代谢途径）和异化模块（一碳化合物转化为二氧化碳）。其中甲醇脱氢酶（MDH）能将甲醇氧化为甲醛，甲醛则能进一步通过乙醛酸再生途径（GLRP）、核酮糖单磷酸途径

(ribulose monophosphate, RuMP)、还原乙酰辅酶 A 途径 (Wood-Ljungdahl pathway, WLP)、丝氨酸途径 (serine pathway)、木糖单磷酸途径 (xylulose monophosphate, XuMP) 和 CBB 循环 (Calvin-Benson-Bassham cycle, CBB cycle, Calvin 循环) 被同化进入中心碳代谢^[216-217], 其中 RuMP 是使用最广泛的甲醇同化途径。Keller 等^[218] 通过在缺失磷酸异构酶 (TpiA) 和 *S*-(羟甲基)谷胱甘肽脱氢酶 (FrmA) 的大肠杆菌中引入甲醇脱氢酶、3-己酮糖-6-磷酸合酶 (Hpi)、6-磷酸-3-己酸异构酶后, 经过 250 代实验室进化, 实现了以甲醇为唯一碳源的甲基化营养型大肠杆菌。Yu 等^[219] 通过对大肠杆菌的丝氨酸循环进行修饰, 实现了甲醇到乙醇的合成。然而, 由于甲醇对细胞具有一定的毒性, 且甲醇同化效率低, 所以目前甲醇生物转化合成生物化学品的效率远远低于葡萄糖生物合成效率。西湖大学曾安平教授课题组提出了一种无 ATP 和 NADPH 参与的化学酶系统, 依赖于重新设计的甘氨酸裂解系统, 通过甲醇和 CO₂ 偶联进行氨基酸和丙酮酸的生物合成, 实现了从甲醇和 CO₂ 到甘氨酸、丝氨酸和丙酮酸克级水平的合成^[220], 为使用低廉生物原料生产高价值化学品提供了指导。

二氧化碳 (CO₂) 是第三代生物制造的主要原料, 设计和开发微生物底盘细胞直接利用二氧化碳生产燃料和化学品能极大程度地缓解能源枯竭与环境问题。自然界中存在 6 种二氧化碳固定途径: Calvin 循环、3-羟基丙酸双循环 (3-hydroxypropionate bicycle, 3-HP)、还原乙酰辅酶 A 循环 (Wood-Ljungdahl pathway, WLP)、还原性三羧酸循环 (reductive TCA, rTCA)、二羧酸/4-羟基丁酸循环 (dicarboxylate/4-hydroxybutyrate cycle, DC/4-HB)、3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环 (3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle, 3HP-4HB), 其中 Calvin 循环分布最广, 研究最为透彻, 但是耗能多、途径复杂、酶活低, WLP 途径耗能最少、途径最短, 但是途径不成环。此外, 最新的研究又报道了三种以前未知的天然固碳途径: 还原性己酮糖磷酸途径 (reductive hexulose-phosphate pathway, RHP)、天然还原性甘氨酸循环 (natural reductive glycine, nrGly) 以及逆向氧化 TCA 循环 (reverse oxidative TCA cycle, roTCA)^[221]。为了提高 CO₂ 固定的效率,

减少过程中 CO₂ 的损失, 多种人工固碳途径也被开发与应用, 包括巴豆酰辅酶 A/乙基丙二酰辅酶 A/羟基丁酰辅酶 A 循环 [crotonyl-coenzyme A (CoA)/ethylmalonyl-CoA/hydroxybutyryl-CoA, CETCH cycle]、还原甘氨酸途径 (reductive glycine pathway, rGlyP)、合成苹果酰辅酶 A 甘油酸途径 (synthetic malyl-CoA-glycerate pathway)、合成乙酰基辅酶 A 循环 (synthetic acetyl-CoA cycle, SACA cycle) 以及甲酰胺酶途径 (formalase pathway)^[221]。Gleizer 等^[222] 在大肠杆菌中引入 RuBisCO 固碳酶后经过实验室连续进化, 实现了大肠杆菌的自养生长。通过在甲基营养性毕赤酵母中添加 8 个外源基因和删除 3 个天然基因, 能够将过氧化物酶体甲醇同化途径设计成类似 Calvin 循环的二氧化碳固定途径, 此菌株可以以 0.008 h⁻¹ 的比生长速率在 CO₂ 作为唯一碳源条件下生长, 进一步通过适应性进化, 比生长速率提高至 0.018 h⁻¹^[223]。最新研究报道, 通过耦合电催化与生物合成方式, 先将 CO₂ 和水转化为化学小分子乙酸, 后经工程改造的酿酒酵母生物催化可合成葡萄糖和游离的脂肪酸等高附加值产物, 该新途径为人工和半人工合成“粮食”提供了新的技术^[224]。尽管目前已经实现了二氧化碳人工合成“粮食”和以二氧化碳作为唯一碳源的异养微生物的自养生长, 当前二氧化碳捕捉效率和微生物生长速率仍有待于进一步研究和优化^[225], 电化学与生物技术的结合有望突破二氧化碳的高效利用。

3.2 能量代谢改造

还原力和 ATP 是能量代谢的关键调控因素。细胞在代谢葡萄糖等底物时产生还原力和 ATP, 在合成生物燃料等化学品时需要还原力和 ATP。还原力和 ATP 供给量若小于需求量, 会影响产品的转化率和合成效率。此外, 细胞生长和稳态维持也需要足够的还原力和 ATP^[226]。

胞内 ATP 主要由 ATP 相关酶代谢调控以及氧化磷酸化水平调控^[227]。胞内 NADH、电子传递链 (electron transfer chain, ETC)、ATP 合酶的活性是胞内 ATP 水平调节的主要位点。为了增强 ATP 供应, 可以通过添加 ATP 能量底物、控制 pH、

ATP生成与消耗代谢工程改造以及调控电子传递链实现。在发酵体系中添加能量底物柠檬酸后,地衣芽孢杆菌中聚- γ -谷氨酸的产量提升至35 g/L^[228]。研究表明,在酿酒酵母中引入拟南芥来源的线粒体ATP6基因能显著提高ATP合酶的活性从而导致胞内ATP水平升高和抗逆性增强^[229]。在大肠杆菌中异源表达来自琥珀酸放线杆菌的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PCK)基因能促进ADP向ATP的转化,使细胞生长得到明显的改善,琥珀酸的产量提升约60%^[230]。在蓝藻中重构ATP驱动的丙二酰辅酶A合成途径同样显示有利于正丁醇产量的提升^[42]。提高胞内NADH水平也是增加胞内能量水平的有效策略之一,如在枯草芽孢杆菌中过表达转氢酶UdhA,能有效提高胞内NADH和ATP水平,使细胞生长速率提高83%,异丁醇产量提高至6.12 g/L^[231]。电子传递链对于ATP合成至关重要,但是电子传递链调节机制复杂,破坏其中任一环节都会影响ATP合成,目前电子传递链活性调控主要用于下调胞内ATP水平,通过添加抑制剂阻止电子传递从而阻碍ATP合成。

细胞内的还原力主要来源于糖酵解、脂肪酸氧化以及TCA循环。还原力的胞内含量和所处的状态会影响生物合成途径中关键酶的效率。在生物燃料生产中,很多代谢途径需要NADH/NADPH的参与,如异丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇等支链醇的合成需要2个NADPH参与,正丁醇与脂肪酸合成途径需要4个NADH提供还原力,利用MEP或MVA途径合成萜类化合物则需要大量NADPH的参与。因此,平衡胞内还原力能最大限度地维持细胞的稳态,有利于反应向特定的方向进行,促进目标产物的积累。

为了优化生产过程中还原力的供给,可从采取四个策略进行,包括:调节胞内还原力的合成与再生,改变关键酶的辅因子偏好性,消耗冗余的辅因子,以及引入非天然辅因子。在调节胞内辅因子合成与再生方面,通过激活转氢酶和NAD激酶的联合表达能有效提高胞内NADPH水平,实现异丁醇产量的提升^[232];单独过表达转氢酶基因 $udhA$ 能催化 $NADP^+$ 转换为 NAD^+ ,使胞内NADH含量增加,最终丁醇产量提高25.6%。过表达 $NADP^+$ 依赖性的基因也能有效提高胞内NADPH

水平。Zhan等^[233]在地衣芽孢杆菌中过表达来自苏云金芽孢杆菌的 $NADP^+$ 型甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 $gapN$,成功实现了胞内NADPH/NADP⁺水平的提高,并使异丁醇产量提升至7.81 g/L。此外,ED途径也常因其高效的NADPH生成效率,被用作EMP的替代途径,如通过在大肠杆菌中构建运动发酵单胞菌来源的ED代谢途径并利用RBS文库调控相关基因的表达,重组大肠杆菌的NADPH水平较野生型提高25倍,有效提升了萜类化合物的产量^[171],该途径同时也适用于大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中异丁醇产量的提升^[172]。由于糖酵解途径产生的NADH与部分生物燃料合成路径辅因子偏好性不匹配会导致胞内氧化还原力的不平衡,如将异丁醇代谢途径中的NADPH偏好的醇脱氢酶替换成NADH偏好性,可以部分提高异丁醇在微氧条件下的产量^[234]。为了进一步平衡异丁醇代谢路径的还原力,对路径中NADPH依赖性的酮酸还原异构酶IIVc进行定向改造,使其变成NADH偏好性,实现了异丁醇的完全厌氧发酵生产^[235],相关策略与途径也被用于缬氨酸的高效生产^[236]。

当细胞中还原力过剩时,细胞通常会合成依赖NADH的副产物以消耗多余的NADH,或者可通过吸收氧气氧化多余的NADH。为了避免碳源的流失,常需要引入额外的途径消耗冗余的辅因子。由于辅因子受到严格的调节并参与复杂的代谢网络,引入人工非天然辅因子有助于调节胞内的氧化还原稳态。中国科学院大连化学物理研究所赵宗保研究员团队^[237]通过交叉筛选获得了偏好性非天然辅因子烟酰胺胞嘧啶二核苷酸(nicotinamide cytosine dinucleotide, NCD)的苹果酸酶突变体,成功构建依赖于NCD的正交氧化还原体系,并将NCD关联的氧化还原配对拓展至亚磷酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、甲酸脱氢酶等氧化还原元件。该团队进一步创制了细胞内源胞嘧啶核苷三磷酸CTP(cytidine triphosphate)和烟酰胺单核苷酸NMN(nicotinamide mononucleotide)原位合成NCD的NCD合酶,构建了NCD自给平台菌株,并将其成功用于构建高选择性物质的代谢途径。该策略有助于在代谢水平进行正交氧化还原途径调控,为生物能源产品的高效生产提供了新策略^[238]。

3.3 生理代谢改造

微生物作为重要的能源燃料细胞工厂，在利用廉价的可再生资源为原料进行目的产品的发酵生产过程中会受到诸多生理或非生理胁迫压力，包括高温、氧气、渗透压、pH扰动、抑制物、高浓度底物、有毒的代谢产物或副产物等，这些胁迫因子会造成微生物生长缓慢、代谢失衡，有时甚至完全丧失生产性能等问题（图2）。因此对微生物进行生理代谢改造以增强菌株的鲁棒性是提高微生物细胞工厂产量（titer）、转化率（yield）和生产速率（productivity）的关键。

传统的诱变和实验室适应性进化（adaptive laboratory evolution, ALE）是提高菌株鲁棒性的一种行之有效的策略^[239]（图2）。Royce等^[240]在使用辛酸驯化大肠杆菌的过程中得到了1株对辛酸、己酸、癸酸、正丁醇和异丁醇耐受性都增强的菌株。本课题组通过ALE方法得到了运动发酵单胞菌耐酸菌株3.6M，所得菌株在酸性pH条件下

生长和乙醇产量都有明显改善^[9]。何明雄教授团队通过全局转录机制工程gTME（global transcription machinery engineering）使用易错PCR对转录因子RpoD进行突变，得到了3株糠醛耐受菌株，揭示了全局转录因子对抑制物耐受性和乙醇生产的重要性^[241]，该课题组后续研究还通过对运动发酵单胞菌进行多轮ARTP诱变，得到了能够耐受乙酸和低pH的菌株AQ8-1和AC8-9^[242]。运动发酵单胞菌改造增强木质纤维素水解物抑制剂耐受性的研究进展可参考相关综述文章^[243]。此外，在酿酒酵母中，基于非理性方法，首先使用Golden Gate组装进行包含多个抗逆基因线路的多重抗逆防御系统的菌株库构建，然后模拟燃料乙醇工厂发酵的培养基、高温、高糖、乙醇毒害等环境，筛选得到了1株抗逆高产乙醇酿酒酵母菌株A233，糖利用率提升近50%，乙醇产量提升6.9%^[244]。

由于适应性实验室进化存在筛选复杂、周期长、工作量大等问题，挖掘抗逆性元件和潜在靶点，对微生物细胞进行理性改造，成为提高微生物

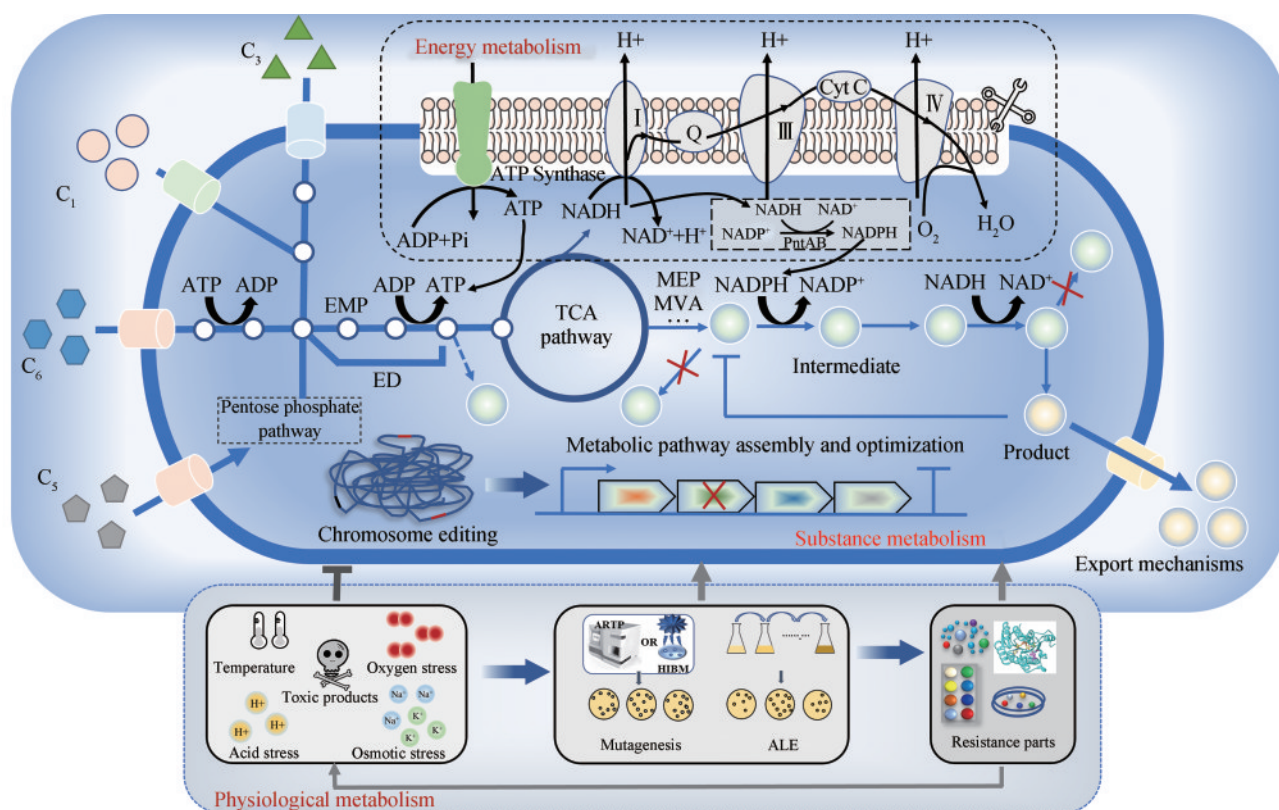


图2 微生物底盘细胞物质代谢、能量代谢和生理代谢改造策略

Fig. 2 The modification strategies of material metabolism, energy metabolism and physiological metabolism for microbial chassis cell

物抗逆性的一种重要策略(图2)。随着下一代测序(next generation sequence, NGS)与系统生物学方法的发展,越来越多的抗逆元件在微生物中被挖掘与应用,这些抗逆元件主要包括调控细胞壁和细胞膜、DNA修复、氧化应激、相容性溶质、能量产生和信号转导的相关基因以及外排泵、热激蛋白和全局转录因子等^[245]。过表达与细胞壁合成相关的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)来源的UDP-N-乙酰氨基葡萄糖-1-羧基乙基转移酶的*murA2*基因不仅能增强大肠杆菌对乙醇、正丁醇、异丁醇的耐受性,而且能使乙醇工业生产菌株KO11在发酵过程中保持良好的活力,进而合成更多的乙醇^[246]。由于外界胁迫会造成微生物细胞膜损伤,因此,对细胞膜合成和代谢相关的基因操作在增强微生物对胁迫的耐受性和提高其生产性能方面有着较为显著的效果。过表达磷脂酰丝氨酸合酶PssA和顺反异构酶Cti增强了大肠杆菌对有机酸的耐受性并提高重组菌株的辛酸和总脂肪酸产量;除此之外,过表达*pssA*对酸处理的木质纤维素预处理过程中产生的抑制物也表现出更强的耐受性^[247-248]。外排泵作为一类通过质子动力将有毒物质排到胞外的膜转运蛋白,对增强微生物鲁棒性具有较好的效果。过表达ABC转运蛋白超家族耐多药转运体亚基MdlB能提高大肠杆菌对异戊烯醇的耐受性,产量也随之提高了12%,但是对其他醇类物质的耐受性没有明显改善^[249]。除了上述相关策略,对热激蛋白编码基因(*groELS*、*dnaK*、*dnaJ*、*hspJ*等)^[250-251]、DNA修复相关基因(*recA*、*uvrD*)^[252-253]、氧化应激基因(*fpr*、*gshI*、*gltI*等)和全局转录因子(*crp*、*rpoD*)过表达都可以在一定程度上提高微生物对抑制物的耐受性。

近年来,大量研究表明微生物硫代谢与众多胁迫压力相关,胞内含硫化合物的浓度与微生物抗逆性密切相关。强化硫同化路径有利于增强胞内半胱氨酸的积累,降低胁迫条件下胞内活性氧积累,增强微生物对胁迫因子的耐受性^[254-255]。外源添加半胱氨酸能增强运动发酵单胞菌对糠醛、乙酸和乙醇的耐受性,实现有毒水解液中乙醇产率的提升(45%)^[254]。半胱氨酸还可用于合成谷胱甘肽参与胞内氧化还原的稳定。在酿酒酵母中过表达双功能谷胱甘肽合成基因能提高酿酒酵母在

胁迫环境中的耐受性,过表达与谷胱甘肽合成相关的基因*GSHI*、*CYS3*、*GLRI*能显著提高酿酒酵母对纤维素水解液抑制物的耐受性,乙醇产量从8.2 g/L提高到14 g/L^[256]。除此之外,H₂S作为重要的硫代谢中间产物,主要通过硫酸盐同化以及含硫氨基酸的异化分解产生,越来越多的研究表明,H₂S在动植物和细菌中作为一种内源性信号分子与ROS在胁迫响应和耐药性中有着广泛且复杂的相互作用,共同参与调节胞内氧化应激反应^[257-258]。在大肠杆菌中,半胱氨酸异化分解产生的H₂S能整合游离的Fe²⁺来抑制芬顿反应产生有毒的羟基自由基,降低胞内的氧化压力。这一现象在运动发酵单胞菌中也有类似发现,对H₂S合成的相关基因进行过表达和敲除,发现H₂S含量的变化与菌株抑制物耐受性成正相关关系^[254, 259]。

3.4 信息代谢改造

微生物物质、能量及生理代谢的调整受到外界环境及内部信息系统的调控。当环境条件发生变化或细胞处于胁迫环境时,微生物胞内代谢网络能够迅速响应环境的变化并调控相应的基因表达以适应环境的改变,提高细胞在不同环境下的抗逆性。这种全局性的基因表达调控系统通常会受到某些有特定功能的蛋白质或者RNA的调控。例如,微生物接收内外物理、化学与生理信号,通过双组分系统(two-component systems, TCS)将感知特定环境的刺激传递给相应的反应调节蛋白(response regulator)以调控相应的基因表达,适应环境改变。另外,微生物也常常有多个Sigma(σ)因子,可以通过引导RNA聚合酶转录不同的基因来实现基因表达水平的调控^[260]。此外,一种非编码功能的sRNA和6S RNA也可作为全局调控工具介导微生物的抗逆性^[261],对DNA进行表观遗传修饰也能实现全局基因的表达调控^[262]。对这些全局调控因子的挖掘和微生物代谢调控机制的理解能更好地指导高效微生物细胞工厂的设计与构建。

测序技术和生物信息技术的发展,为理解微生物细胞工厂并实现高效构建和发展提供了技术支撑(图3)。生物信息技术的发展为通过构建微

不同分子之间的相互关系^[264]。通过对发酵丝孢酵母 (*Trichosporon fermentans*) CICC136、圆红冬孢酵母 (*Rhodotorula toruloides*) NP11 和解脂耶氏酵母 CLIB122 进行基因组学比较发现发酵丝孢酵母具有高度的基因重复和独特基因, 与脂肪酸延伸和降解相关的基因多出3~4倍, 这可能是其能利用工农业废弃物更有效积累脂质的关键原因。与其他产油微生物的系统发育分析表明, 发酵丝孢酵母菌的产脂能力是在属分化后的进化过程中获得的^[265]。

基因组数据的积累及其与转录组学、蛋白质组的整合为生物功能与调控元件的挖掘奠定了基础, 通过对sRNA转录组学数据及生物信息预测分析, Contreras课题组^[266]发现了运动发酵单胞菌中15个新的sRNA, 经过实验验证确定Zms2、Zms6和Zms18这3种sRNA与乙醇胁迫相关。进而利用转录组数据和生物信息学分析筛选了运动发酵单胞菌中的天然顺式调控区域, 根据长度、基因功能、相对基因技术以及在其他生物中的保守性, 确定了36个具有潜在调控功能的5' UTR, 通过功能验证发现UTR-ZMO0347可调控下游基因*hfq*的表达, 使其在乙醇胁迫条件下表达下调^[267]。这一结果为运动发酵单胞菌胁迫条件下细胞响应调控网络提供了新的思路。

除此之外, 随着下一代测序技术与系统生物学方法的发展, 越来越多的抗逆元件在微生物中被挖掘与应用来应对微生物在工业应用中的胁迫环境, 提高微生物工业生产中的产物浓度与生产强度。对耐酸谷氨酸棒杆菌转录组学分析发现, 与原始菌株相比, 耐酸菌株在酸胁迫条件下硫代谢、铁转运和中心碳代谢途径相关基因出现了不同程度的差异表达, 进一步实验发现KatA和Dps协同介导细胞内ROS清除, 过表达转录调控因子McbR有助于提高菌株酸的耐受性^[268]。为了提高运动发酵单胞菌对木质纤维素水解液中抑制物的耐受性, 对运动发酵单胞菌木糖利用菌株在糠醛条件下的转录组学数据分析发现, 硫同化路径表达上调, 过表达操纵子基因*cysCND*能有效增强菌株对糠醛的耐受性。因此, 对组学数据的深入分析和挖掘推进了微生物工业化应用进程。

另外, 基于组学数据也可以挖掘代谢途径构

建需要的启动子及RBS等生物元件, 例如, 结合双荧光报告基因系统的建立及转录组与蛋白质组学数据的挖掘, 对运动发酵单胞菌中的启动子、RBS进行了预测与鉴定, 成功鉴定了19个强启动子、9个中等强度启动子、10个弱启动子以及4个不同强度的RBS, 进而在此工作的基础上, 成功挖掘并鉴定了3个乙醇诱导性启动子P₀₄₀₅、P₀₄₃₅和P₀₀₃₈。此研究为运动发酵单胞菌代谢工程改造提供了更多可用生物元件^[269-270]。基于甲醇芽孢杆菌全基因组转录组数据, 挖掘并鉴定了1个赖氨酸核糖开关和10个启动子^[271]。Zhou等^[272]根据转录组学数据筛选并鉴定了104个来自大肠杆菌的天然启动子5' UTR复合物, 在转录水平上强度为PBAD启动子的0.007%~4630%, 在翻译水平上变化为0.1%~137%, 这些表征和构建的PUTR (promoter-5'-UTR complexes) 可以作为即插即用的合成生物学工具箱用于微调代谢网络以生产目标化合物。

3.4.2 动态调控网络的构建与应用

代谢工程中的调控方式分为静态调控和动态调控, 静态调控是指通过设计和改造基因编码的组件对目标代谢通路进行代谢流的改变以期达到目标产物合成的目的^[273]。启动子类型和强度、核糖体结合位点强度以及载体的拷贝数改变均属于静态调控范围。除此之外, 敲除影响目标代谢产物积累的竞争途径来最大限度提高目标代谢产物的产量也是典型的静态调控的方式。静态调控因其设计简单、效果显著、周期短的特点在底盘细胞构建中被广泛应用, 但是细胞在生长过程中会因为生长资源、发酵条件、辅因子平衡和中间代谢物及代谢终产物积累而受到抑制导致代谢负担, 最终降低了整体TRY性能^[274]。因此, 构建高产量、高产率和高效价的微生物细胞工厂需要细胞生长和产物生产之间的平衡, 为此, 基因表达的时空精准调控对于优化和精确控制复杂的代谢通量至关重要。在应对发酵过程中ATP或辅因子失衡以及代谢物积累到毒性水平等代谢失衡问题时, 动态调控是代谢途径优化中最有效的策略之一。动态控制是通过控制阀 (例如启动子) 实现的, 该控制阀由相应的传感器 (例如转录因子) 调节, 该传感器监测信号分子并将其传达给控制器。信号分子可以是反映细胞代谢状态的中间副产物或

与途径无关的分子^[275]。

为了应对有毒代谢中间产物和外界环境变化对细胞生长和代谢造成的影响,一些能在某些特定的物理或化学信号刺激后的启动子被开发和应用。天然响应外界调控包括常见的各类化学药品诱导型启动子如 P_{lac} 和 P_{tet} , Qiu等^[25, 276]使用 P_{tet} 启动子在运动发酵单胞菌中对异丁醇合成途径中乙酰乳酸合成酶Als进行调控,降低有毒的乙酰乳酸积累,提高异丁醇产量至4.01 g/L。对外界环境响应型启动子包括响应pH的 P_{GAS} ,热诱导的融合启动子 P_L ,溶解氧响应的启动子 P_{nar} ,光诱导型启动子 P_{c120} 和蓝光诱导AraC二聚体家族等^[277-281]。通过将发酵过程分为高氧诱导生产阶段和低氧诱导生产阶段,溶解氧响应的启动子 P_{nar} 已经成功应用于大肠杆菌D-乳酸、2,3-丁二醇和1,3-丙二醇合成的动态调控,产量分别为113.12 g/L、48.0 g/L、15.8 g/L^[279]。另外,响应胞外pH扰动的跨膜单组分调节器CadCA被应用于解决D-木糖氧化途径中D-木糖酸瞬时积累所造成的培养基酸化问题,可以最大程度地减少过多D-木糖酸积累对细胞生长的影响,使得乙二醇产量提高了170%^[282]。在酿酒酵母中构建的OptoEXP光控制开关的启动子 P_{c120} 在黑暗状态下失活无法开启转录,在蓝光照射下可以启动下游基因的表达,从而实现了蓝光和黑暗诱导的生产模式间的细胞代谢状态切换,异丁醇的产量达到3.37 g/L^[280]。

基于启动子-转录因子构建的动态调控是目前研究最多的,转录因子能与特定的代谢物及启动子区域特定的DNA结合,从而达到激活或抑制下游基因表达的效果。脂肪酸合成过程中丙二酰辅酶A是重要的中间产物,调节丙二酰辅酶A途径中响应丙二酰辅酶A传感器的核心是转录因子FapR。FapR及其同源操纵子序列在大肠杆菌中异源表达,将该传感器应用于负反馈调节脂肪酸合成途径,使产量提高了33%^[283]。Xu等^[284]使用Fap和PGAP的顺式作用模块构建了基于FapR的丙二酰辅酶A调控因子型生物传感器,实现了有毒中间体丙二酰辅酶A的平衡调控,使脂肪酸产量提高了2.1倍。Keasling课题组^[285]基于酰基辅酶A响应性开发了动态传感器-调节系统(DSRS)以调节脂肪酸乙酯生产基因的表达,FapR传感器动态调节乙醇生产

的丙酮酸脱羧酶和醇脱氢酶以及脂肪酸积累的酰基辅酶A合酶和蜡酯合酶。最终使脂肪酸乙酯产量提高3倍(达到1.5 g/L),效价由最大理论产量的8%提升到28%。

基因表达调控是生物体内基因表达的控制调节,是一个具有多层次性和复杂性的过程。基因表达调控包括基因水平、转录水平、翻译水平、转录后水平和翻译后水平等多个层次的调控,在时间和空间上对细胞中基因的表达起到调节作用。然而,由于基因表达调控过程十分复杂,在基因表达过程中可能对宿主细胞产生毒害或致死作用,制约了基因功能的研究或细胞模型的建立等相关研究。尽管不同的原核细胞或真核细胞表达调控系统得到了发展,但是目前的表达调控系统仍存在一定的局限性。例如,对于原核生物而言,其调控表达系统诱导过程缓慢、效率低,缺乏诱导特异性和表达的精确调控等,限制了表达系统的应用。故而期望出现更丰富严谨的基因调控系统,使基因的时空表达受到高效的严谨控制,有效使用细胞的资源。基于T7 RNA聚合酶(T7 RNAP)及 P_{T7} 启动子之间特异性和高效性识别而建立的T7表达系统是目前在大肠杆菌中表达外源蛋白最强大的表达系统之一,已经被广泛应用于蛋白质的表达^[286-287]。用阿拉伯糖启动子(P_{araBAD})、鼠李糖启动子(P_{rhaBAD})和四环素启动子(P_{tet})替换 P_{lacUV5} 来启动T7 RNAP,与BL21(DE3)相比,构建的工程菌株对诱导剂具有更高的敏感性、更低的渗透能力,并成功用于提高膜蛋白的生产^[288]。

动态调控需要筛选关键的调控位点和转录因子,人工筛选十分复杂,借助人工智能设计构建代谢网络和模拟代谢动力学可以快速寻找。调控网络描述了转录因子、相关蛋白及其靶基因之间的相关关系。Liu等^[289]借助人工智能在大肠杆菌中设计、构建并绘制了一个全面的调控网络库,调节网络通过重新编程细胞代谢来应对环境和遗传的干扰;预测了110120个特定突变82个调节因子,在首轮筛选中表明调控网络库是普遍适用的,其中变体OmpR_S181K产生10.6 g/L异丁醇,比对照提高1.4倍。清华大学邢新会教授和张翀副教授团队^[290]通过对胞内色氨酸产生响应的前导肽类传感器TnaC协调RNA聚合酶、核糖体和Rho转录终

止因子三种大分子在转录翻译过程中的动力学行为, 调节重要的细菌种间信号分子吡啶的合成, 并且通过构建的流式-测序 (FACS-seq) 高通量分析流程验证了 TnaC 的功能, 提出了背后可能的动力学机制。

随着对微生物群体感应机制 (quorum sensing, QS) 的深入研究, 基于群体感应的动态调控也被用于细胞生长与生产过程解耦。群体感应调控是原核生物中来自费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 的 LuxR 和产生酰基高丝氨酸内酯的 LuxI 酶组合, 通过调控细胞密度依赖性基因 *luxI* 和 *luxR* 的表达水平, 改变触发基因表达的切换时间, 目前该系统已应用到 1,4-丁二醇、甜没药烯及通过触发切换三羧酸循环重定向为异丙醇的生产研究中^[291-293]。

3.4.3 代谢网络模型的构建和应用

随着微生物的全基因组序列等高通量数据持续增加, 生物信息学策略也不断涌现, 从而使全局性和系统性解析、设计和调控微生物生理代谢

功能成为可能 (图3)。基于基因组序列注释和详细生化信息整合的基因组规模代谢网络模型 (genome scale of metabolic network model, GSMM) 的出现, 可以更准确地预测和理解微生物胞内的代谢微观机理, 并对设计行为做出响应。以 GSMM 为基础, 已经开发了大量计算算法 (包括 Optknock、OptForce、OptCouple、OptORF、k-OptForce、CiED、MOMA、ROOM、RobustKnock、ReacKnock、FSEOF、EMILiO、OptReg、OptGene、RegKnock、FOCuS、GACOFAB、OptSTrain) 来预测基因修饰或精确定位提高目标代谢产物产量的基因改造靶点^[294]。此外, 利用比较基因组学分析方法, 可以在不同背景条件下进行代谢假设分析, 以寻找潜在的代谢工程改造靶点。目前, 基于基因组规模代谢模型的菌株设计和表型预测分析已在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌和酿酒酵母等多种微生物中得到实现^[4-5] (表5), 经过多年的修正和完善之后, 模型预测的准确性

表5 典型微生物代谢网络模型及其应用总结

Table 5 Summary of typical microbial metabolic network models and their application

菌株 Strain	模型 Model	基因、反应与代谢物 Genes, reactions and metabolites	时间 Time	应用 Applications	参考文献 Reference
<i>E. coli</i>	iJE660	660,627,438	2000	NR	[295]
	iJR904	904,931,625	2003	1,4-BDO production	[296]
	iAF1260	1260,2077,1039	2007	Fatty acid production	[297]
	iJO1366	1366,2251,1136	2011	NR	[298]
	iML1515	1515,2719,1192	2017	NR	[299]
<i>B. subtilis</i>	iBsu1103	1103,1437,1138	2009	NR	[300]
	iBsu1103V2	1147,1742,1456	2013	NR	[301]
	iBsu1147	1147,1742,1456	2013	Riboflavin, cellulase, 2,3-butanediol and isobutanol production	[48]
	iBsu1144	1144,1955,1103	2017	Serine alkaline protease production	[302]
	ec-iY0844	844,1020,988	2019	Poly- γ -glutamic acid production	[303]
<i>C. glutamicum</i>	iCW773	773,1207,950	2017	L-lysine and hyaluronic acid production	[304-305]
	iJM658	658,1065,984	2016	NR	[306]
<i>S. cerevisiae</i>	iFF708	708,1175,584	2003	Ethanol production	[307]
	iND750	750,1149,646	2004	NR	[308]
	iLL672	672,1038,636	2005	NR	[309]
	iLN800	800,1446,1013	2008	NR	[310]
	iMM904	904,1412,1228	2009	2,3-BDO production	[311]
	Yeast1	832,962,813	2008	NR	[312]
	Yeast8	1133,3949,2680	2019	NR	[313]

注: NR represents no report.

已显著提高。结合基因组规模的代谢网络模型, 预测菌株改造靶点, 实现相关基因的敲除和过表达能更大程度提高菌株改造的效率, 提高目的化合物的产量^[314-316]。

OptKnock是代谢网络模型算法中的首批方法之一, 已成功用于大肠杆菌中使乳酸产量提高25%~75%^[317], 并将厌氧条件下酿酒酵母2,3-丁二醇的产量提高至2.3 g/L^[318]; 在GSMM指导下, 筛选并敲除了包括乙醇脱氢酶(AdhE)、丙酮酸甲酸裂解酶(Pfl)、乳酸脱氢酶(Ldh)和苹果酸脱氢酶(Mdh)在内的4个基因位点, 实现了1,4-BDO在大肠杆菌的异源高效生产^[183]。Ranganathan等^[319]采用OptForce算法针对大肠杆iAF1260模型对脂肪酸合成进行预测, 通过过表达*fadZ*、*tesA*以及敲除*fadD*基因, 使脂肪酸(C₁₄~C₁₆)的产量达到1.7 g/L, 得率为0.14 g/g葡萄糖。另外, Kim等^[74]通过在*Rhodococcus opacus*中构建了由1316个代谢反应和1270个代谢物组成的代谢网络模型, 发现三酰甘油、脂肪酸、脂肪酸酯和长链烃类化合物的实际最高产率分别是理论最高产率的93.8%、80.4%、31.8%和10.3%。

酿酒酵母作为乙醇天然生产的真核模式微生物, 已经构建了13个基因组规模的代谢网络模型。Bro使用iFF708模型和MOMO算法, 对乙醇作为目标产物进行代谢调控, 利用LIGANS数据库中的生化反应, 对每个基因插入进行模型评估, 从而筛选出56个可能的代谢反应; 再经过热力学限制分析, 引入外源酶GapN这一策略可完全消除甘油形成, 乙醇收率提升10%^[316]; 基于酿酒酵母iMM904模型, 使用OptKnock算法设计生产2,3-丁二醇的酿酒酵母菌株, 通过破坏乙醇脱氢酶途径, 并引入*B. subtilis*和*E. aerogenes*的2,3-丁二醇生物合成途径, 最终在厌氧条件下获得2.29 g/L产量以及0.113 g/g得率^[318]。

同样作为乙醇发酵模式菌株的运动发酵单胞菌, 已建立了5个基于不同约束方法和条件的中小型代谢模型和4个全基因组代谢网络模型。这些模型从不同角度对运动发酵单胞菌的相关生理特征进行模拟, 为更好地理解 and 改造运动发酵单胞菌提供了新的设计策略和指导^[320]。

4 总结与展望

就生物燃料而言, 乙醇由于代谢途径简单及市场规模大等原因相较于其他生物燃料更有优势, 在较长时间内仍然是一种重要的生物燃料。生物技术的进步将推动异丁醇等多碳醇、脂肪酸及其衍生物、萜类及其衍生物等具有更好燃烧性能生物燃料的发展, 其中一些长链生物燃料可以用作或转化为市场需求不断增长的航空燃料或生物柴油。本文着重介绍了各类生物燃料的生物合成情况, 提出了从微生物物质代谢、能量代谢、生理代谢以及信息代谢四个方面着手设计与构建高效生物燃料微生物细胞工厂的策略。

结合系统生物学、合成生物学和代谢工程等技术, 以模式或非模式微生物底盘构建细胞工厂合成生物燃料已取得显著成果, 然而现阶段绝大部分目标产品的合成还远没有达到工业化生产的要求, 亟待实现产量及产率的突破。因此, 还需要继续深入挖掘和研究生物燃料合成路径中的关键生物元件, 设计并重构底盘细胞的代谢模式, 优化合成路径与代谢网络的适配性, 同时结合过程工程技术, 研发配套的发酵工艺和智能控制策略。系统与合成生物学时代下, 不断革新的生物技术(biotechnology, BT)和飞速发展的信息技术(information technology, IT)为生物燃料高效生产微生物细胞工厂的构建与优化提供了丰富的工具和资源。

酶是细胞进行代谢催化、实现目标产品合成的基本功能单元, 是细胞工厂构建的关键。基于深度学习、分子动力学分析、AlphaFold2结构预测等方法, 结合蛋白质功能的理解, 并借助蛋白质的保守位点和晶体结构分析, 开发生物燃料合成关键酶的定向改造及理性/半理性设计技术, 可获得具有高活性、高选择性以及高稳定性的功能酶元件。例如, 将异丁醇合成途径中酮酸还原异构酶IlvC的辅因子偏好性从NADP向NADH的转变能平衡胞内还原力水平, 实现异丁醇厌氧条件生产^[235]。借助人工智能技术与人工神经网络, 对庞大的生物信息学数据进行分析及结构模拟, 不仅能辅助定向进化, 还可以实现蛋白质的从头设计, 以此为基础可以创造非天然代谢途径和产品, 拓

展生物合成产品的边界。谭天伟院士团队^[321]利用葡萄糖为底物、天冬氨酸为前体物质，设计了一条无需添加昂贵的维生素B₁₂的1,3-PDO生产途径，为全新1,3-PDO生物合成提供了重要的技术支持，有望在工业中发挥重要作用。

对酶元件的高通量组装以及基因组高效编辑技术为微生物细胞工厂的构建提供了有效工具。通过现有工具的整合开发新的适合于非模式底盘细胞的遗传改造工具；挖掘新型核酸编程酶，采用定向进化结合计算机辅助设计改造酶活性，开发高效基因编辑及多元基因编辑技术；同时结合基因组合成与基因组迭代编辑与进化，有望实现高产菌株的高效构建。例如，对*SpCas9*蛋白进行基因工程改良后，其突变体VRQR-*SpCas9*、VRER-*SpCas9*、EQR-*SpCas9*可以识别不同的PAM序列；突变体c*SpCas9*和*SpCas9*-HF降低了与目标DNA之间的非特异性结合，能够实现85%的靶向效率^[322-323]。提高Cas蛋白和gRNA表达水平、降低重复序列之间gRNA同源重组能有效提高多基因编辑效率^[324]。破坏微生物限制-修饰系统的防御系统能提高转化效率和基因编辑效率，编辑质粒的循环迭代消除能大大缩短编辑周期和烦琐的操作步骤^[325]。最近，有研究表明，人工智能可以预测靶向RNA而非DNA的CRISPR-Cas工具的靶向和脱靶活动，将深度学习模型与CRISPR-Cas结合，能够以不同方式控制基因表达，开发基于CRISPR-Cas的新疗法^[326]，相关原理也可以用于微生物底盘细胞高效基因编辑工具的开发和应用中。除此之外，高效基因编辑工具的开发能加速对生物燃料底盘细胞的基因组精简，去除非必需DNA区域可以赋予微生物很多有益性状，例如基因型稳定性和表型有效性。基因组精简后的微生物基因组更稳定，生长速率及细胞密度、产品产量更高^[327-328]。

理性设计构建获得的工程菌株需通过全局系统优化技术进一步提升其生产性能。借助人工智能技术，整合生物燃料生产菌株生理、代谢及组学数据构建高精度数学模型。基于数学模型和代谢预测信息，围绕生物燃料底盘细胞生长与生产耦联/解耦联，解除底盘细胞生长与生产过程中的代谢流竞争，调节还原力供给与氧化还原平衡，有助于增强目的产品合成途径与底盘细胞的适配

性，提升产物合成能力，增强菌株生产性能。此外，利用生物支架与人工细胞器及群体感应系统、核糖开关等策略实现途径的时空调控，构建动态感应细胞内、外信号输入的多向性转录调控系统，实现生长与生产的精准调控，同样有助于提高异源人工代谢途径与底盘细胞的适配性。再者，还可以借助各种计算机辅助设计（computer aided design, CAD）工具增强理性设计，提高设计的可预测性^[329-330]；并结合代谢网络模型精准预测异源途径的代谢效率和催化活性，降低异源途径对底盘细胞内源代谢途径的影响，实现高效的生物燃料代谢途径的构建。例如，通过高通量蛋白质和途径工程促进底物利用和生物燃料的合成，包括木糖代谢酶筛选^[331]、木糖代谢途径优化^[332]和提升酵母抗逆性，提高纤维素乙醇产量^[333]。

异源生物燃料与中间代谢产物对底盘细胞的毒性以及以廉价可再生资源为原料时胁迫因子对菌株的抑制作用是现阶段高效微生物细胞工厂构建和优化所面临的难题。一方面可通过传统诱变和实验室适应性进化手段获得对应目的产品的耐受菌株；另一方面，基于进化代谢工程的高通量筛选技术，构建能够感知目标产物、细胞中间代谢物浓度信号的生物传感器，同时基于目标产物的合成规律，优化生物传感器的响应灵敏度与阈值，构建高效响应的进化筛选体系，有助于获得性状稳定、抗逆性高的工程菌株。除此之外，结合多组学数据分析，挖掘抗逆性元件和潜在靶点也是提高微生物细胞工厂抗逆性的关键^[245]。通过对这些抗逆元件的应用能有效提高底盘细胞对胁迫因子的耐受性，缩短工业化进程和成本。

计算机辅助下的自动化、智能化检测有助于实现对生物燃料放大生产过程中菌株的在线监测，为菌株的高产稳产改造提供原位实时数据支撑。通过建立生物过程多尺度参数分析理论与技术体系，结合自动化和智能化的检测设备如远红外、拉曼在线光谱分析及原位定量质谱等，对菌种在工业生产中的数据进行收集与实时反馈，开发一套批量化和实时自动化的数据预处理程序，实现对发酵过程的及时反馈调节控制，将有助于提高发酵过程的控制效率，显著加快生产工艺的开发进度。此外，利用大数据与人工智能方法，筛选

发酵过程关键敏感参数作为监测点, 整合实时监测数据, 建立数学模型, 动态模拟分析底盘细胞与环境的适配, 进一步提高功能模块与工业菌株的适配性, 有助于强化工业菌株高强度生产的功能稳定性。

可以预期, 在未来的研究中, 随着现代生物技术(BT)和信息技术(IT)的进一步发展和交叉融合, 各项技术日渐成熟; 底盘细胞理解逐步深入, 生物元件库不断扩充, 人工代谢途径的设计、构建、优化和适配更加合理、便捷, 发酵工艺优化与控制日趋智能化; 这些都将为生物燃料的高效、绿色、低成本合成带来重大突破, 推动产业化可持续发展。

参 考 文 献

- [1] 马晓焉, 王雪芹, 马炼杰, 等. 高级醇的微生物绿色制造[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1721-1736.
MA X Y, WANG X Q, MA L J, et al. Microbial green manufacturing of higher alcohols[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1721-1736.
- [2] LIU Y Z, CRUZ-MORALES P, ZARGAR A, et al. Biofuels for a sustainable future[J]. Cell, 2021, 184(6): 1636-1647.
- [3] ZHANG J Z, CHEN Y C, FU L H, et al. Accelerating strain engineering in biofuel research *via* build and test automation of synthetic biology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 67: 88-98.
- [4] PERALTA-YAHYA P P, ZHANG F Z, DEL CARDAYRE S B, et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels[J]. Nature, 2012, 488(7411): 320-328.
- [5] WU B, WANG Y W, DAI Y H, et al. Current status and future prospective of bio-ethanol industry in China[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2021, 145: 111079.
- [6] PANESAR P S, MARWAHA S S, KENNEDY J F. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2006, 81(4): 623-635.
- [7] ROGERS P L, LEE K J, SKOTNICKI M L, et al. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*[M/OL]//Advances in biochemical engineering/biotechnology: microbial reactions. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1982: 37-84 [2023-06-01]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/3540116982_2.
- [8] BHATIA S K, JAGTAP S S, BEDEKAR A A, et al. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges[J]. Bioresource Technology, 2020, 300: 122724.
- [9] YANG Q, YANG Y F, TANG Y, et al. Development and characterization of acidic-pH-tolerant mutants of *Zymomonas mobilis* through adaptation and next-generation sequencing-based genome resequencing and RNA-Seq[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 144.
- [10] YANG S H, PELLETIER D A, LU T Y S, et al. The *Zymomonas mobilis* regulator *hfq* contributes to tolerance against multiple lignocellulosic pretreatment inhibitors[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 135.
- [11] TANG Y, WANG Y, YANG Q, et al. Molecular mechanism of enhanced ethanol tolerance associated with *hfq* overexpression in *Zymomonas mobilis*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1098021.
- [12] GENG B N, LIU S Y, CHEN Y H, et al. A plasmid-free *Zymomonas mobilis* mutant strain reducing reactive oxygen species for efficient bioethanol production using industrial effluent of xylose mother liquor[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1110513.
- [13] INGRAM L O, CONWAY T, CLARK D P, et al. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(10): 2420-2425.
- [14] OHTA K, BEALL D S, MEJIA J P, et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(4): 893-900.
- [15] INGRAM L O, GOMEZ P F, LAI X, et al. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 58(2/3): 204-214.
- [16] CHOI Y J, PARK J H, KIM T Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1-propanol[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(5): 477-486.
- [17] ATSUMI S, LIAO J C. Directed evolution of *Methanococcus jannaschii* citramalate synthase for biosynthesis of 1-propanol and 1-butanol by *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(24): 7802-7808.
- [18] INOKUMA K, LIAO J C, OKAMOTO M, et al. Improvement of isopropanol production by metabolically engineered *Escherichia coli* using gas stripping[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(6): 696-701.
- [19] JOJIMA T, INUI M, YUKAWA H. Production of isopropanol by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 77(6): 1219-1224.
- [20] XU M M, ZHAO J B, YU L, et al. Engineering *Clostridium acetobutylicum* with a histidine kinase knockout for enhanced *n*-butanol tolerance and production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(2): 1011-1022.

- [21] SHEN C R, LAN E I, DEKISHIMA Y, et al. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(9): 2905-2915.
- [22] YU M R, DU Y M, JIANG W Y, et al. Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and *n*-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 881-889.
- [23] ATSUMI S, HANAI T, LIAO J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. Nature, 2008, 451(7174): 86-89.
- [24] YU H, WANG N, HUO W B, et al. Establishment of BmoR-based biosensor to screen isobutanol overproducer[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 30.
- [25] QIU M Y, SHEN W, YAN X Y, et al. Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for anaerobic isobutanol production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 15.
- [26] LIN P P, MI L, MORIOKA A H, et al. Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 44-52.
- [27] HASEGAWA S, JOJIMA T, SUDA M, et al. Isobutanol production in *Corynebacterium glutamicum*: suppressed succinate by-production by *pckA* inactivation and enhanced productivity via the Entner-Doudoroff pathway[J]. Metabolic Engineering, 2020, 59: 24-35.
- [28] DUNDON C A, ARISTIDOU A, HAWKINS A, et al. Methods of increasing dihydroxy acid dehydratase activity to improve production of fuels, chemicals, and amino acids: US20120015417[P]. 2012-01-19.
- [29] RAO B, ZHANG L Y, SUN J A, et al. Characterization and regulation of the 2,3-butanediol pathway in *Serratia marcescens*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 2147-2159.
- [30] ZHANG L Y, SUN J A, HAO Y L, et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(8): 857-862.
- [31] YANG S H, MOHAGHEGHI A, FRANDE M A, et al. Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for 2, 3-butanediol production from lignocellulosic biomass sugars[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 189.
- [32] SU H F, LIN J F, WANG Y H, et al. Engineering *Brevibacterium flavum* for the production of renewable bioenergy: C4-C5 advanced alcohols[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(9): 1946-1958.
- [33] CANN A F, LIAO J C. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(1): 89-98.
- [34] SU H F, CHEN H, LIN J F. Enriching the production of 2-methyl-1-butanol in fermentation process using *Corynebacterium crenatum*[J]. Current Microbiology, 2020, 77(8): 1699-1706.
- [35] CONNOR M R, CANN A F, LIAO J C. 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(4): 1155-1164.
- [36] NAWAB S, WANG N, MA X Y, et al. Genetic engineering of non-native hosts for 1-butanol production and its challenges: a review[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 79.
- [37] NIELSEN D R, LEONARD E, YOON S H, et al. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria[J]. Metabolic Engineering, 2009, 11(4/5): 262-273.
- [38] BEREZINA O V, ZAKHAROVA N V, BRANDT A, et al. Reconstructing the clostridial *n*-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 635-646.
- [39] YU A Q, ZHAO Y K, PANG Y R, et al. An oleaginous yeast platform for renewable 1-butanol synthesis based on a heterologous CoA-dependent pathway and an endogenous pathway[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 166.
- [40] WANG M M, HU L J, FAN L H, et al. Enhanced 1-butanol production in engineered *Klebsiella pneumoniae* by NADH regeneration[J]. Energy & Fuels, 2015, 29(3): 1823-1829.
- [41] WANG M M, FAN L H, TAN T W. 1-Butanol production from glycerol by engineered *Klebsiella pneumoniae*[J]. RSC Advances, 2014, 4(101): 57791-57798.
- [42] LAN E I, LIAO J C. ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16): 6018-6023.
- [43] LAN E I, RO S Y, LIAO J C. Oxygen-tolerant coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase facilitates efficient photosynthetic *n*-butanol biosynthesis in cyanobacteria[J]. Energy & Environmental Science, 2013, 6(9): 2672.
- [44] BRANDUARDI P, LONGO V, BERTERAME N M, et al. A novel pathway to produce butanol and isobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 68.
- [45] LIAN J Z, SI T, NAIR N U, et al. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 139-149.
- [46] SI T, LUO Y Z, XIAO H, et al. Utilizing an endogenous pathway for 1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metabolic Engineering, 2014, 22: 60-68.
- [47] FELPETO-SANTERO C, ROJAS A, TORTAJADA M, et al. Engineering alternative isobutanol production platforms[J]. AMB Express, 2015, 5: 32.
- [48] HAO T, HAN B B, MA H W, et al. *In silico* metabolic

- engineering of *Bacillus subtilis* for improved production of riboflavin, Egl-237, (*R, R*)-2,3-butanediol and isobutanol[J]. *Molecular BioSystems*, 2013, 9(8): 2034-2044.
- [49] BUIJS N A, SIEWERS V, NIELSEN J. Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17(3): 480-488.
- [50] SMITH K M, CHO K M, LIAO J C. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3): 1045-1055.
- [51] MA C Q, WANG A L, QIN J Y, et al. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(1): 49-57.
- [52] CELIŃSKA E, GRAJEK W. Biotechnological production of 2,3-butanediol—current state and prospects[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6): 715-725.
- [53] KAY J E, JEWETT M C. Lysate of engineered *Escherichia coli* supports high-level conversion of glucose to 2,3-butanediol [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 32: 133-142.
- [54] SHIN H D, YOON S H, WU J R, et al. High-yield production of meso-2,3-butanediol from celloextrin by engineered *E. coli* biocatalysts[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 367-373.
- [55] NOZZI N E, ATSUMI S. Genome engineering of the 2,3-butanediol biosynthetic pathway for tight regulation in cyanobacteria[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(11): 1197-1204.
- [56] CONNOR M R, ATSUMI S. Synthetic biology guides biofuel production[J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 2010: 541698.
- [57] FORTMAN J L, CHHABRA S, MUKHOPADHYAY A, et al. Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(7): 375-381.
- [58] ISSARIYAKUL T, DALAI A K. Biodiesel from vegetable oils [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 31: 446-471.
- [59] KAMARAJ R, RAO Y K S S, BALAKRISHNA B. Biodiesel blends: a comprehensive systematic review on various constraints[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(29): 43770-43785.
- [60] VERMA S, KUILA A. Involvement of green technology in microalgal biodiesel production[J]. *Reviews on Environmental Health*, 2020, 35(2): 173-188.
- [61] YADAV A K, KUILA A, GARLAPATI V K. Biodiesel production from *Brassica juncea* using oleaginous yeast[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2022, 194(9): 4066-4080.
- [62] BUDIN I, DE ROND T, CHEN Y, et al. Viscous control of cellular respiration by membrane lipid composition[J]. *Science*, 2018, 362(6419): 1186-1189.
- [63] CHO H, CRONAN J E JR. Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis (*) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(9): 4216-4219.
- [64] LU X F, VORA H, KHOSLA C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production[J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 333-339.
- [65] JIANG P, CRONAN J E JR. Inhibition of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* in the absence of phospholipid synthesis and release of inhibition by thioesterase action[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(10): 2814-2821.
- [66] QIAO K J, WASYLENKO T M, ZHOU K, et al. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(2): 173-177.
- [67] LAZAR Z, DULERMO T, NEUVÉGLISE C, et al. Hexokinase—a limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 26: 89-99.
- [68] LAZAR Z, GAMBOA-MELÉNDEZ H, LE COQ A M C, et al. Awakening the endogenous Leloir pathway for efficient galactose utilization by *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 185.
- [69] NIEHUS X, CRUTZ-LE COQ A M, SANDOVAL G, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to enhance lipid production from lignocellulosic materials[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 11.
- [70] XIAO Y, BOWEN C H, LIU D, et al. Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(5): 339-344.
- [71] ZHAO X, KONG X L, HUA Y Y, et al. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2008, 110(5): 405-412.
- [72] MERKX-JACQUES A, RASMUSSEN H, MUISE D M, et al. Engineering xylose metabolism in thraustochytrid T18[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 248.
- [73] YU T, ZHOU Y J, HUANG M T, et al. Reprogramming yeast metabolism from alcoholic fermentation to lipogenesis[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1549-1558.e14.
- [74] KIM H M, CHAE T U, CHOI S Y, et al. Engineering of an oleaginous bacterium for the production of fatty acids and fuels [J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(7): 721-729.
- [75] IKEDA M, TAKAHASHI K, OHTAKE T, et al. A futile metabolic cycle of fatty acyl coenzyme A (acyl-CoA) hydrolysis and resynthesis in *Corynebacterium glutamicum* and its disruption leading to fatty acid production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(4): e02469-20.
- [76] XU P, QIAO K J, AHN W S, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation

- fuels and oleochemicals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(39): 10848-10853.
- [77] ZHANG Y, PENG J, ZHAO H M, et al. Engineering oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* for overproduction of fatty acid ethyl esters[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14 (1): 115.
- [78] LUO J, EFIMOVA E, LOSOI P, et al. Wax ester production in nitrogen-rich conditions by metabolically engineered *Acinetobacter baylyi* ADP1[J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: e00128.
- [79] GOH E B, BAIDOO E E K, BURD H, et al. Substantial improvements in methyl ketone production in *E. coli* and insights on the pathway from *in vitro* studies[J]. Metabolic Engineering, 2014, 26: 67-76.
- [80] DONG J E, CHEN Y, BENITES V T, et al. Methyl ketone production by *Pseudomonas putida* is enhanced by plant-derived amino acids[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(8): 1909-1922.
- [81] XIN F H, ZHANG Y, XUE S J, et al. Heavy oils (mainly alkanes) over-production from inulin by *Aureobasidium melanogenum* 9-1 and its transformant 88 carrying an inulinase gene[J]. Renewable Energy, 2017, 105: 561-568.
- [82] AMER M, TOOGOOD H, SCRUTTON N S. Engineering nature for gaseous hydrocarbon production[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 209.
- [83] WANG W H, LIU X F, LU X F. Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 69.
- [84] WANG J L, YU H Y, SONG X J, et al. The influence of fatty acid supply and aldehyde reductase deletion on cyanobacteria alkane generating pathway in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2018, 45(5): 329-334.
- [85] CHOI Y J, LEE S Y. Microbial production of short-chain alkanes[J]. Nature, 2013, 502(7472): 571-574.
- [86] FATMA Z, HARTMAN H, POOLMAN M G, et al. Model-assisted metabolic engineering of *Escherichia coli* for long chain alkane and alcohol production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 46: 1-12.
- [87] SONG X J, YU H Y, ZHU K. Improving alkane synthesis in *Escherichia coli* via metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(2): 757-767.
- [88] LIU Y Y, CHI Z, WANG Z P, et al. Heavy oils, principally long-chain *n*-alkanes secreted by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* strain P5 isolated from mangrove system[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41 (9): 1329-1337.
- [89] BERNARD A, DOMERGUE F, PASCAL S, et al. Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that *Arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex[J]. The Plant Cell, 2012, 24(7): 3106-3118.
- [90] DELLOMONACO C, CLOMBURG J M, MILLER E N, et al. Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals[J]. Nature, 2011, 476(7360): 355-359.
- [91] LIAN J Z, ZHAO H M. Reversal of the β -oxidation cycle in *Saccharomyces cerevisiae* for production of fuels and chemicals[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(3): 332-341.
- [92] LAZAR Z, LIU N, STEPHANOPOULOS G. Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(11): 1157-1170.
- [93] CHATTERJEE S, MOHAN S V. Microbial lipid production by *Cryptococcus curvatus* from vegetable waste hydrolysate[J]. Bioresource Technology, 2018, 254: 284-289.
- [94] DEEBA F, PRUTHI V, NEGI Y S. Converting paper mill sludge into neutral lipids by oleaginous yeast *Cryptococcus vishniacii* for biodiesel production[J]. Bioresource Technology, 2016, 213: 96-102.
- [95] XAVIER M C A, CORADINI A L V, DECKMANN A C, et al. Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors[J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 118: 11-19.
- [96] CASTAÑEDA M T, NUÑEZ S, GARELLI F, et al. Comprehensive analysis of a metabolic model for lipid production in *Rhodospiridium toruloides*[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 280: 11-18.
- [97] LIU Y T, WANG Y P, LIU H J, et al. Enhanced lipid production with undetoxified corn cob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy [J]. Bioresource Technology, 2015, 180: 32-39.
- [98] POONTAWEE R, YONGMANITCHAI W, LIMTONG S. Lipid production from a mixture of sugarcane top hydrolysate and biodiesel-derived crude glycerol by the oleaginous red yeast, *Rhodospiridiobolus fluvialis*[J]. Process Biochemistry, 2018, 66: 150-161.
- [99] FEI Q, CHANG H N, SHANG L A, et al. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 2695-2701.
- [100] QIN L, LIU L, ZENG A P, et al. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts[J]. Bioresource Technology, 2017, 245(Pt B): 1507-1519.
- [101] TAI M, STEPHANOPOULOS G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production[J]. Metabolic Engineering,

- 2013, 15: 1-9.
- [102] RAKICKA M, LAZAR Z, DULERMO T, et al. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 104.
- [103] DAVIS M S, SOLBIATI J, CRONAN J E JR. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(37): 28593-28598.
- [104] BORRELLI G M, TRONO D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9): 20774-20840.
- [105] KYOTANI S, NAKASHIMA T, IZUMOTO E, et al. Continuous interesterification of oils and fats using dried fungus immobilized in biomass support particles[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991, 71(4): 286-288.
- [106] MATSUMOTO T, FUKUDA H, UEDA M, et al. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4517-4522.
- [107] KALSCHUEER R, STÖVEKEN T, LUFTMANN H, et al. Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1373-1379.
- [108] STEEN E J, KANG Y S, BOKINSKY G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass [J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 559-562.
- [109] KANG M K, ZHOU Y J, BUIJS N A, et al. Functional screening of aldehyde decarbonylases for long-chain alkane production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16: 74.
- [110] SCHIRMER A, RUDE M A, LI X Z, et al. Microbial biosynthesis of alkanes[J]. *Science*, 2010, 329(5991): 559-562.
- [111] LADYGINA N, DEDYUKHINA E G, VAINSHTEIN M B. A review on microbial synthesis of hydrocarbons[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(5): 1001-1014.
- [112] JAROENSUK J, INTASIAN P, WATTANASUEPSIN W, et al. Enzymatic reactions and pathway engineering for the production of renewable hydrocarbons[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 309: 1-19.
- [113] RUI Z, HARRIS N C, ZHU X J, et al. Discovery of a family of desaturase-like enzymes for 1-alkene biosynthesis[J]. *ACS Catalysis*, 2015, 5(12): 7091-7094.
- [114] RUI Z, LI X, ZHU X J, et al. Microbial biosynthesis of medium-chain 1-alkenes by a nonheme iron oxidase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(51): 18237-18242.
- [115] LIU Y, WANG C, YAN J Y, et al. Hydrogen peroxide-independent production of α -alkenes by OleT_{JE} P450 fatty acid decarboxylase[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 28.
- [116] ZHOU Y J, HU Y T, ZHU Z W, et al. Engineering 1-alkene biosynthesis and secretion by dynamic regulation in yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(2): 584-590.
- [117] FRIAS J A, GOBLIRSCH B R, WACKETT L P, et al. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of the OleC protein from *Stenotrophomonas maltophilia* involved in head-to-head hydrocarbon biosynthesis[J]. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2010, 66(Pt 9): 1108-1110.
- [118] FRIAS J A, RICHMAN J E, ERICKSON J S, et al. Purification and characterization of OleA from *Xanthomonas campestris* and demonstration of a non-decarboxylative Claisen condensation reaction[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(13): 10930-10938.
- [119] BELLER H R, GOH E B, KEASLING J D. Genes involved in long-chain alkene biosynthesis in *Micrococcus luteus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(4): 1212-1223.
- [120] TAN X M, YAO L, GAO Q Q, et al. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(2): 169-176.
- [121] ANTHONY J R, ANTHONY L C, NOWROOZI F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(1): 13-19.
- [122] YOON S H, LEE S H, DAS A, et al. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E. coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(3/4): 218-226.
- [123] YOON S H, LEE Y M, KIM J E, et al. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(6): 1025-1032.
- [124] MARTIN V J J, PITERA D J, WITHERS S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(7): 796-802.
- [125] LEAVELL M D, MCPHEE D J, PADDON C J. Developing fermentative terpenoid production for commercial usage[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 37: 114-119.
- [126] YE Z L, SHI B, HUANG Y L, et al. Revolution of vitamin E production by starting from microbial fermented farnesene to isophytol[J]. *The Innovation*, 2022, 3(3): 100228.

- [127] LI M J, HOU F F, WU T, et al. Recent advances of metabolic engineering strategies in natural isoprenoid production using cell factories[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(1): 80-99.
- [128] CHATZIVASILEIOU A O, WARD V, EDGAR S M, et al. Two-step pathway for isoprenoid synthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(2): 506-511.
- [129] TASHIRO M, KIYOTA H, KAWAI-NOMA S, et al. Bacterial production of pinene by a laboratory-evolved pinene-synthase [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(9): 1011-1020.
- [130] WEI L J, ZHONG Y T, NIE M Y, et al. Biosynthesis of α -pinene by genetically engineered *Yarrowia lipolytica* from low-cost renewable feedstocks[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(1): 275-285.
- [131] KANG M K, EOM J H, KIM Y, et al. Biosynthesis of pinene from glucose using metabolically-engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(10): 2069-2077.
- [132] WU X M, MA G, LIU C Y, et al. Biosynthesis of pinene in purple non-sulfur photosynthetic bacteria[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 101.
- [133] ZHANG H B, LIU Q, CAO Y J, et al. Microbial production of sabinene—a new terpene-based precursor of advanced biofuel [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 20.
- [134] IGNEA C, PONTINI M, MAFFEI M E, et al. Engineering monoterpene production in yeast using a synthetic dominant negative geranyl diphosphate synthase[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(5): 298-306.
- [135] WU J H, CHENG S, CAO J Y, et al. Systematic optimization of limonene production in engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(25): 7087-7097.
- [136] ROLF J, JULSING M K, ROSENTHAL K, et al. A gram-scale limonene production process with engineered *Escherichia coli* [J]. *Molecules*, 2020, 25(8): 1881.
- [137] CHENG B Q, WEI L J, LV Y B, et al. Elevating limonene production in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* via genetic engineering of limonene biosynthesis pathway and optimization of medium composition[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2019, 24(3): 500-506.
- [138] CHENG S, LIU X, JIANG G Z, et al. Orthogonal engineering of biosynthetic pathway for efficient production of limonene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(5): 968-975.
- [139] YOU S P, YIN Q D, ZHANG J Y, et al. Utilization of biodiesel by-product as substrate for high-production of β -farnesene via relatively balanced mevalonate pathway in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 228-236.
- [140] LIU Y H, JIANG X, CUI Z Y, et al. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for production of α -farnesene[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 296.
- [141] LIU H, CHEN S L, XU J Z, et al. Dual regulation of cytoplasm and peroxisomes for improved A-farnesene production in recombinant *Pichia pastoris*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(6): 1563-1573.
- [142] MEADOWS A L, HAWKINS K M, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production[J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 694-697.
- [143] PERALTA-YAHYA P P, OUELLET M, CHAN R, et al. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 483.
- [144] ZHANG Y, SONG X H, LAI Y M, et al. High-yielding terpene-based biofuel production in *Rhodobacter capsulatus*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(6): 1545-1552.
- [145] SARRIA S, WONG B, GARCÍA MARTÍN H, et al. Microbial synthesis of pinene[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(7): 466-475.
- [146] ZADA B, WANG C L, PARK J B, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed isoprenoid alcohols and their derivatives[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 210.
- [147] LIU H W, WANG Y, TANG Q, et al. MEP pathway-mediated isopentenol production in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 135.
- [148] HUANG Y L, YE Z L, WAN X K, et al. Systematic mining and evaluation of the sesquiterpene skeletons as high energy aviation fuel molecules[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(23): e2300889.
- [149] TAO H, LAUTERBACH L, BIAN G K, et al. Discovery of non-squalene triterpenes[J]. *Nature*, 2022, 606(7913): 414-419.
- [150] 杨永富, 耿碧男, 宋皓月, 等. 合成生物学时代基于非模式细菌的工业底盘细胞研究现状与展望[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 874-910.
- YANG Y F, GENG B N, SONG H Y, et al. Progress and perspective on development of non-model industrial bacteria as chassis cells for biochemical production in the synthetic biology era[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 874-910.
- [151] WANG C L, PFLEGER B F, KIM S W. Reassessing *Escherichia coli* as a cell factory for biofuel production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 45: 92-103.
- [152] BECKER J, ROHLES C M, WITTMANN C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 122-141.
- [153] TSIGIE Y A, WANG C Y, TRUONG C T, et al. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102

- (19): 9216-9222.
- [154] ZHU Q, JACKSON E N. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 36: 65-72.
- [155] LI H B, ALPER H S. Enabling xylose utilization in *Yarrowia lipolytica* for lipid production[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(9): 1230-1240.
- [156] LARROUDE M, ROSSIGNOL T, NICAUD J M, et al. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(8): 2150-2164.
- [157] WANG X, HE Q N, YANG Y F, et al. Advances and prospects in metabolic engineering of *Zymomonas mobilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 57-73.
- [158] SHEN W, ZHANG J, GENG B N, et al. Establishment and application of a CRISPR-Cas12a assisted genome-editing system in *Zymomonas mobilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 162.
- [159] ZHENG Y L, HAN J M, WANG B Y, et al. Characterization and repurposing of the endogenous Type I-F CRISPR-Cas system of *Zymomonas mobilis* for genome engineering[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(21): 11461-11475.
- [160] YANG S H, FEI Q, ZHANG Y P, et al. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals[J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(6): 699-717.
- [161] LI Q, CHEN J, MINTON N P, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(7): 961-972.
- [162] TAFUR RANGEL A E, CROFT T, GONZÁLEZ BARRIOS A F, et al. Transcriptomic analysis of a *Clostridium thermocellum* strain engineered to utilize xylose: responses to xylose versus cellobiose feeding[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 14517.
- [163] LIU Y J, LI B, FENG Y G, et al. Consolidated bio-saccharification: leading lignocellulose bioconversion into the real world[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107535.
- [164] ZHANG X N, LIU C L, DAI J B, et al. Enabling technology and core theory of synthetic biology[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(8): 1742-1785.
- [165] GALINIER A, DEUTSCHER J. Sophisticated regulation of transcriptional factors by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429(6): 773-789.
- [166] WANG Q Z, WU C Y, CHEN T, et al. Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in *Escherichia coli ptsG* mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(2): 89-93.
- [167] HERNÁNDEZ-MONTALVO V, MARTÍNEZ A, HERNÁNDEZ-CHAVEZ G, et al. Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(6): 687-694.
- [168] SNOEP J L, ARFMAN N, YOMANO L P, et al. Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(7): 2133-2135.
- [169] MIAO R, XIE H, HO F M, et al. Protein engineering of α -ketoisovalerate decarboxylase for improved isobutanol production in *Synechocystis* PCC 6803[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 42-48.
- [170] PASTOR J M, BORGES N, PAGÁN J P, et al. Fructose metabolism in *Chromohalobacter salexigens*: interplay between the Embden-Meyerhof-Parnas and Entner-Doudoroff pathways[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18: 134.
- [171] NG C Y, FARASAT I, MARANAS C D, et al. Rational design of a synthetic Entner-Doudoroff pathway for improved and controllable NADPH regeneration[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 86-96.
- [172] LIANG S X, CHEN H, LIU J, et al. Rational design of a synthetic Entner-Doudoroff pathway for enhancing glucose transformation to isobutanol in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(3): 187-199.
- [173] NODA S, MORI Y, OYAMA S, et al. Reconstruction of metabolic pathway for isobutanol production in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 124.
- [174] KABIR M M, SHIMIZU K. Fermentation characteristics and protein expression patterns in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly(3-hydroxybutyrate) production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(2): 244-255.
- [175] KIM Y M, CHO H S, JUNG G Y, et al. Engineering the pentose phosphate pathway to improve hydrogen yield in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(12): 2941-2946.
- [176] LIU Y, GHOSH I N, MARTIEN J, et al. Regulated redirection of central carbon flux enhances anaerobic production of bioproducts in *Zymomonas mobilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 261-274.
- [177] ATSUMI S, CANN A F, CONNOR M R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 305-311.
- [178] TROTTER C L, BABU G S, WALLACE S. Engineering biology for sustainable 1,4-butanediol synthesis[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(3): 286-288.
- [179] BAEK J M, MAZUMDAR S, LEE S W, et al. Butyrate

- production in engineered *Escherichia coli* with synthetic scaffolds[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(10): 2790-2794.
- [180] LI Y, WANG Y, WANG R X, et al. Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for continuous co-production of bioethanol and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) [J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(6): 2588-2601.
- [181] TIPPMANN S, FERREIRA R, SIEWERS V, et al. Effects of acetoacetyl-CoA synthase expression on production of farnesene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(6): 911-922.
- [182] KIM Y, INGRAM L O, SHANMUGAM K T. Dihydrolipoamide dehydrogenase mutation alters the NADH sensitivity of pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(11): 3851-3858.
- [183] YIM H, HASELBECK R, NIU W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(7): 445-452.
- [184] BOND-WATTS B B, BELLEROSE R J, CHANG M C Y. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(4): 222-227.
- [185] XU P, GU Q, WANG W Y, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1409.
- [186] FARMER W R, LIAO J C. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 3205-3210.
- [187] ZHA W J, RUBIN-PITEL S B, SHAO Z Y, et al. Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(3): 192-198.
- [188] XIAO Y, RUAN Z H, LIU Z G, et al. Engineering *Escherichia coli* to convert acetic acid to free fatty acids[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 76: 60-69.
- [189] BATT C A, CARYALLO S, EASSON D D JR, et al. Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, 28(4): 549-553.
- [190] BRUINENBERG P M, DE BOT P H M, VAN DIJKEN J P, et al. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1984, 19(4): 256-260.
- [191] WENGER J W, SCHWARTZ K, SHERLOCK G. Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(5): e1000942.
- [192] LEE S M, JELLISON T, ALPER H S. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 122.
- [193] CAO L M, TANG X L, ZHANG X Y, et al. Two-stage transcriptional reprogramming in *Saccharomyces cerevisiae* for optimizing ethanol production from xylose[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 150-159.
- [194] CADETE R M, DE LAS HERAS A M, SANDSTRÖM A G, et al. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 167.
- [195] ZHANG G C, KONG I I, WEI N, et al. Optimization of an acetate reduction pathway for producing cellulosic ethanol by engineered yeast[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(12): 2587-2596.
- [196] FARWICK A, BRUDER S, SCHADEWEG V, et al. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(14): 5159-5164.
- [197] WANG C Q, BAO X M, LI Y W, et al. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 79-88.
- [198] LI H B, SCHMITZ O, ALPER H S. Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(23): 10215-10223.
- [199] REIDER APEL A, OUELLET M, SZMIDT-MIDDLETON H, et al. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19512.
- [200] ZHANG M, EDDY C, DEANDA K, et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*[J]. *Science*, 1995, 267(5195): 240-243.
- [201] DUNN K L, RAO C V. Expression of a xylose-specific transporter improves ethanol production by metabolically engineered *Zymomonas mobilis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(15): 6897-6905.
- [202] DUNN K L, RAO C V. High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(11): 2228-2240.
- [203] DEANDA K, ZHANG M, EDDY C, et al. Development of an

- Arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(12): 4465-4470.
- [204] KAWAGUCHI H, VERTÈS A A, OKINO S, et al. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3418-3428.
- [205] MEISWINKEL T M, GOPINATH V, LINDNER S N, et al. Accelerated pentose utilization by *Corynebacterium glutamicum* for accelerated production of lysine, glutamate, ornithine and putrescine[J]. Microbial Biotechnology, 2013, 6(2): 131-140.
- [206] EBERHARDT D, JENSEN J V K, WENDISCH V F. L-citrulline production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* from glucose and alternative carbon sources[J]. AMB Express, 2014, 4(1): 85.
- [207] SASAKI M, JOJIMA T, KAWAGUCHI H, et al. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85(1): 105-115.
- [208] SASAKI M, JOJIMA T, INUI M, et al. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(4): 691-699.
- [209] KAWAGUCHI H, SASAKI M, VERTÈS A A, et al. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 77(5): 1053-1062.
- [210] JOJIMA T, NOBURYU R, SASAKI M, et al. Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(3): 1165-1172.
- [211] DONG C, QIAO J, WANG X P, et al. Engineering *Pichia pastoris* with surface-display minicellulosomes for carboxymethyl cellulose hydrolysis and ethanol production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 108.
- [212] SIRIPONG W, WOLF P, KUSUMOPUTRI T P, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isobutanol and isobutyl acetate[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 1.
- [213] YANG Z L, ZHANG Z S. Production of (2R,3R)-2,3-butanediol using engineered *Pichia pastoris*: strain construction, characterization and fermentation[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 35.
- [214] MEESAPYODSUK D, CHEN Y, NG S H, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* to produce ricinoleic acid, a hydroxy fatty acid of industrial importance[J]. Journal of Lipid Research, 2015, 56(11): 2102-2109.
- [215] GAO J Q, LI Y X, YU W, et al. Rescuing yeast from cell death enables overproduction of fatty acids from sole methanol[J]. Nature Metabolism, 2022, 4(7): 932-943.
- [216] WEGAT V, FABARIUS J T, SIEBER V. Synthetic methylotrophic yeasts for the sustainable fuel and chemical production[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 113.
- [217] JIANG W, HERNÁNDEZ VILLAMOR D, PENG H D, et al. Metabolic engineering strategies to enable microbial utilization of C₁ feedstocks[J]. Nature Chemical Biology, 2021, 17(8): 845-855.
- [218] KELLER P, REITER M A, KIEFER P, et al. Generation of an *Escherichia coli* strain growing on methanol via the ribulose monophosphate cycle[J]. Nature Communications, 2022, 13: 5243.
- [219] YU H, LIAO J C. A modified serine cycle in *Escherichia coli* converts methanol and CO₂ to two-carbon compounds[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3992.
- [220] LIU J M, ZHANG H, XU Y Y, et al. Turn air-captured CO₂ with methanol into amino acid and pyruvate in an ATP/NAD(P) H-free chemoenzymatic system[J]. Nature Communications, 2023, 14: 2772.
- [221] SANTOS CORREA S, SCHULTZ J, LAUERSEN K J, et al. Natural carbon fixation and advances in synthetic engineering for redesigning and creating new fixation pathways[J]. Journal of Advanced Research, 2023, 47: 75-92.
- [222] GLEIZER S, BEN-NISSAN R, BAR-ON Y M, et al. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂[J]. Cell, 2019, 179(6): 1255-1263.e12.
- [223] GASSLER T, SAUER M, GASSER B, et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(2): 210-216.
- [224] ZHENG T T, ZHANG M L, WU L H, et al. Upcycling CO₂ into energy-rich long-chain compounds via electrochemical and metabolic engineering[J]. Nature Catalysis, 2022, 5(5): 388-396.
- [225] CAI T, SUN H B, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide[J]. Science, 2021, 373(6562): 1523-1527.
- [226] DE KOK S, KOZAK B U, PRONK J T, et al. Energy coupling in *Saccharomyces cerevisiae*: selected opportunities for metabolic engineering[J]. FEMS Yeast Research, 2012, 12(4): 387-397.
- [227] HARA K Y, KONDO A. ATP regulation in bioproduction[J].

- Microbial Cell Factories, 2015, 14: 198.
- [228] YOON S H, DO J H, LEE S Y, et al. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(7): 585-588.
- [229] ZHANG X X, LIU S K, TAKANO T. Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (*AtMtATP6*) confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(7): 1289-1294.
- [230] SINGH A, SOH K C, HATZIMANIKATIS V, et al. Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(1): 76-81.
- [231] QI H S, LI S S, ZHAO S M, et al. Model-driven redox pathway manipulation for improved isobutanol production in *Bacillus subtilis* complemented with experimental validation and metabolic profiling analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93815.
- [232] SHI A Q, ZHU X N, LU J, et al. Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production[J]. Metabolic Engineering, 2013, 16: 1-10.
- [233] ZHAN Y Y, XU Y, LU X C, et al. Metabolic engineering of *Bacillus licheniformis* for sustainable production of isobutanol [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2021, 9(51): 17254-17265.
- [234] ATSUMI S, WU T Y, ECKL E M, et al. Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 651-657.
- [235] BASTIAN S, LIU X, MEYEROWITZ J T, et al. Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(3): 345-352.
- [236] HAO Y N, MA Q, LIU X Q, et al. High-yield production of L-valine in engineered *Escherichia coli* by a novel two-stage fermentation[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 198-206.
- [237] GUO X J, LIU Y X, WANG Q A, et al. Non-natural cofactor and formate-driven reductive carboxylation of pyruvate[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(8): 3143-3146.
- [238] WANG X Y, FENG Y B, GUO X J, et al. Creating enzymes and self-sufficient cells for biosynthesis of the non-natural cofactor nicotinamide cytosine dinucleotide[J]. Nature Communications, 2021, 12: 2116.
- [239] QURESHI A S, ZHANG J, BAO J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. Bioresource Technology, 2015, 189: 399-404.
- [240] ROYCE L A, YOON J M, CHEN Y X, et al. Evolution for exogenous octanoic acid tolerance improves carboxylic acid production and membrane integrity[J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 180-188.
- [241] TAN F R, DAI L C, WU B, et al. Improving furfural tolerance of *Zymomonas mobilis* by rewiring a sigma factor RpoD protein[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 5363-5371.
- [242] WU B, QIN H, YANG Y W, et al. Engineered *Zymomonas mobilis* tolerant to acetic acid and low pH via multiplex atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 10.
- [243] YANG Y F, HU M M, TANG Y, et al. Progress and perspective on lignocellulosic hydrolysate inhibitor tolerance improvement in *Zymomonas mobilis*[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2018, 5(1): 6.
- [244] XU K, QIN L, BAI W X, et al. Multilevel defense system (MDS) relieves multiple stresses for economically boosting ethanol production of industrial *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Energy Letters, 2020, 5(2): 572-582.
- [245] 常瀚文, 郑鑫铃, 骆健美, 等. 抗逆元件及其在高效微生物细胞工厂构建中的应用进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 13-34.
- CHANG H W, ZHENG X L, LUO J M, et al. Tolerance elements and their application progress on the construction of highly-efficient microbial cell factory[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(6): 13-34.
- [246] YUAN Y B, BI C H, NICOLAOU S A, et al. Overexpression of the *Lactobacillus plantarum* peptidoglycan biosynthesis *murA2* gene increases the tolerance of *Escherichia coli* to alcohols and enhances ethanol production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(19): 8399-8411.
- [247] TAN Z G, KHAKBAZ P, CHEN Y X, et al. Engineering *Escherichia coli* membrane phospholipid head distribution improves tolerance and production of biorenewables[J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 1-12.
- [248] TAN Z G, YOON J M, NIELSEN D R, et al. Membrane engineering via trans unsaturated fatty acids production improves *Escherichia coli* robustness and production of biorenewables[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 105-113.
- [249] FOO J L, JENSEN H M, DAHL R H, et al. Improving microbial biogasoline production in *Escherichia coli* using tolerance engineering[J]. mBio, 2014, 5(6): e01932.
- [250] SUO Y K, LUO S, ZHANG Y N, et al. Enhanced butyric acid

- tolerance and production by Class I heat shock protein-overproducing *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(8): 1145-1156.
- [251] ABDULLAH-AL-MAHIN, SUGIMOTO S, HIGASHI C, et al. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* DnaK[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(13): 4277-4285.
- [252] WU C D, ZHANG J, DU G C, et al. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 238-241.
- [253] LUO J M, SONG Z Y, NING J, et al. The ethanol-induced global alteration in *Arthrobacter simplex* and its mutants with enhanced ethanol tolerance[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(21): 9331-9350.
- [254] YAN X Y, WANG X, YANG Y F, et al. Cysteine supplementation enhanced inhibitor tolerance of *Zymomonas mobilis* for economic lignocellulosic bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 349: 126878.
- [255] YANG S H, FRANDEN M A, WANG X A, et al. Transcriptomic profiles of *Zymomonas mobilis* 8b to furfural acute and long-term stress in both glucose and xylose conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 13.
- [256] KIM D, HAHN J S. Roles of the Yap1 transcription factor and antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 5069-5077.
- [257] SHATALIN K, SHATALINA E, MIRONOV A, et al. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria[J]. *Science*, 2011, 334(6058): 986-990.
- [258] AROCA A, BENITO J M, GOTOR C, et al. Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(17): 4915-4927.
- [259] MIRONOV A, SEREGINA T, NAGORNYKH M, et al. Mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(23): 6022-6027.
- [260] GAO X, JIANG L, ZHU L Y, et al. Tailoring of global transcription sigma D factor by random mutagenesis to improve *Escherichia coli* tolerance towards low-pHs[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 224: 55-63.
- [261] LAL A, KRISHNA S, SESHASAYEE A S N. Regulation of global transcription in *Escherichia coli* by Rsd and 6S RNA[J]. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2018, 8(6): 2079-2089.
- [262] ADHIKARI S, CURTIS P D. DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(5): 575-591.
- [263] XU Y, ZHAO Z, TONG W H, et al. An acid-tolerance response system protecting exponentially growing *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1496.
- [264] GUARNIERI M T, LEVERING J, HENARD C A, et al. Genome sequence of the oleaginous green alga, *Chlorella vulgaris* UTEX 395[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018, 6: 37.
- [265] SHEN Q, CHEN Y, JIN D F, et al. Comparative genome analysis of the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* reveals its potential applications in lipid accumulation[J]. *Microbiological Research*, 2016, 192: 203-210.
- [266] CHO S H, LEI R, HENNINGER T D, et al. Discovery of ethanol-responsive small RNAs in *Zymomonas mobilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(14): 4189-4198.
- [267] CHO S H, HANING K T, SHEN W, et al. Identification and characterization of 5' untranslated regions (5'UTRs) in *Zymomonas mobilis* as regulatory biological parts[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2432.
- [268] XU N, LV H F, WEI L, et al. Impaired oxidative stress and sulfur assimilation contribute to acid tolerance of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(4): 1877-1891.
- [269] YANG Y F, SHEN W, HUANG J, et al. Prediction and characterization of promoters and ribosomal binding sites of *Zymomonas mobilis* in system biology era[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 52.
- [270] YANG Y F, RONG Z Y, SONG H Y, et al. Identification and characterization of ethanol-inducible promoters of *Zymomonas mobilis* based on omics data and dual reporter-gene system[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, 67(1): 158-165.
- [271] IRLA M, HAKVÅG S, BRAUTASET T. Developing a riboswitch-mediated regulatory system for metabolic flux control in thermophilic *Bacillus methanolicus*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4686.
- [272] ZHOU S H, DING R P, CHEN J, et al. Obtaining a panel of cascade promoter-5'-UTR complexes in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(6): 1065-1075.
- [273] HOLTZ W J, KEASLING J D. Engineering static and dynamic

- control of synthetic pathways[J]. *Cell*, 2010, 140(1): 19-23.
- [274] ZHUANG K, YANG L, CLUETT W R, et al. Dynamic strain scanning optimization: an efficient strain design strategy for balanced yield, titer, and productivity. DySScO strategy for strain design[J]. *BMC Biotechnology*, 2013, 13: 8.
- [275] FARMER W R, LIAO J C. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(5): 533-537.
- [276] SKERRA A. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1994, 151(1/2): 131-135.
- [277] YIN X, SHIN H D, LI J H, et al. *Pgas*, a low-pH-induced promoter, as a tool for dynamic control of gene expression for metabolic engineering of *Aspergillus niger*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(6): e03222-16.
- [278] ZHOU L, NIU D D, TIAN K M, et al. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(5): 560-568.
- [279] HWANG H J, KIM J W, JU S Y, et al. Application of an oxygen-inducible *nar* promoter system in metabolic engineering for production of biochemicals in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(2): 468-473.
- [280] ZHAO E M, ZHANG Y F, MEHL J, et al. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production[J]. *Nature*, 2018, 555(7698): 683-687.
- [281] ROMANO E, BAUMSCHLAGER A, AKMERIÇ E B, et al. Engineering AraC to make it responsive to light instead of arabinose[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(7): 817-827.
- [282] BAÑARES A B, VALDEHUESA K N G, RAMOS K R M, et al. A pH-responsive genetic sensor for the dynamic regulation of D-xylonic acid accumulation in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(5): 2097-2108.
- [283] LIU D, XIAO Y, EVANS B S, et al. Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl-CoA sensor-actuator[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(2): 132-140.
- [284] XU P, LI L Y, ZHANG F M, et al. Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(31): 11299-11304.
- [285] ZHANG F Z, CAROTHERS J M, KEASLING J D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(4): 354-359.
- [286] LANDICK R. Active-site dynamics in RNA polymerases[J]. *Cell*, 2004, 116(3): 351-353.
- [287] STUDIER F W, MOFFATT B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1986, 189(1): 113-130.
- [288] DU F, LIU Y Q, XU Y S, et al. Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 189.
- [289] LIU R M, LIANG L Y, FREED E F, et al. Engineering regulatory networks for complex phenotypes in *E. coli*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4050.
- [290] WANG T M, ZHENG X, JI H N, et al. Dynamics of transcription-translation coordination tune bacterial indole signaling[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(4): 440-449.
- [291] SOMA Y, HANAI T. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 7-15.
- [292] LIU H W, LU T. Autonomous production of 1, 4-butanediol via a *de novo* biosynthesis pathway in engineered *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 135-141.
- [293] KIM E M, WOO H M, TIAN T, et al. Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 44: 325-336.
- [294] LANDON S, REES-GARBUTT J, MARUCCI L, et al. Genome-driven cell engineering review: *in vivo* and *in silico* metabolic and genome engineering[J]. *Essays in Biochemistry*, 2019, 63(2): 267-284.
- [295] EDWARDS J S, PALSSON B O. The *Escherichia coli* MG1655 *in silico* metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(10): 5528-5533.
- [296] REED J L, VO T D, SCHILLING C H, et al. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR)[J]. *Genome Biology*, 2003, 4(9): R54.
- [297] FEIST A M, HENRY C S, REED J L, et al. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information [J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3: 121.
- [298] ORTH J D, CONRAD T M, NA J, et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011[J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7: 535.
- [299] MONK J M, LLOYD C J, BRUNK E, et al. iML1515, a knowledgebase that computes *Escherichia coli* traits[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(10): 904-908.
- [300] HENRY C S, ZINNER J F, COHOON M P, et al. iBsu1103: a

- new genome-scale metabolic model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(6): R69.
- [301] TANAKA K, HENRY C S, ZINNER J F, et al. Building the repertoire of dispensable chromosome regions in *Bacillus subtilis* entails major refinement of cognate large-scale metabolic model[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): 687-699.
- [302] KOCABAŞ P, ÇALIK P, ÇALIK G, et al. Analyses of extracellular protein production in *Bacillus subtilis*-I : genome-scale metabolic model reconstruction based on updated gene-enzyme-reaction data[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 127: 229-241.
- [303] MASSAIU I, PASOTTI L, SONNENSCHN N, et al. Integration of enzymatic data in *Bacillus subtilis* genome-scale metabolic model improves phenotype predictions and enables *in silico* design of poly- γ -glutamic acid production strains[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 3.
- [304] ZHANG Y, CAI J Y, SHANG X L, et al. A new genome-scale metabolic model of *Corynebacterium glutamicum* and its application[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 169.
- [305] CHENG F Y, YU H M, STEPHANOPOULOS G. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 276-289.
- [306] MEI J, XU N, YE C, et al. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic network of *Corynebacterium glutamicum* S9114[J]. *Gene*, 2016, 575(2 Pt 3): 615-622.
- [307] FÖRSTER J, FAMILI I, FU P, et al. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network[J]. *Genome Research*, 2003, 13(2): 244-253.
- [308] DUARTE N C, HERRGÅRD M J, PALSSON B Ø. Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model[J]. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1298-1309.
- [309] KUEPFER L, SAUER U, BLANK L M. Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genome Research*, 2005, 15(10): 1421-1430.
- [310] NOOKAEW I, JEWETT M, MEECHAI A, et al. The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism[J]. *BMC System Biology*, 2008, 2: 71.
- [311] MO M L, PALSSON B O, HERRGÅRD M J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast[J]. *BMC Systems Biology*, 2009, 3: 37.
- [312] HERRGÅRD M J, SWAINSTON N, DOBSON P, et al. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(10): 1155-1160.
- [313] LU H, LI F, SÁNCHEZ B J, et al. A consensus *S. cerevisiae* metabolic model Yeast8 and its ecosystem for comprehensively probing cellular metabolism [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3586.
- [314] LEE S J, LEE D Y, KIM T Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and *in silico* gene knockout simulation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7880-7887.
- [315] BODOR Z, TOMPOS L, NECHIFOR A C, et al. *In silico* analysis of 1,4-butanediol heterologous pathway impact on *Escherichia coli* metabolism[J]. *Revista De Chimie*, 2019, 70 (10): 3448-3455.
- [316] BRO C, REGENBERG B, FÖRSTER J, et al. *In silico* aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(2): 102-111.
- [317] FONG S S, BURGARD A P, HERRING C D, et al. *In silico* design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 91(5): 643-648.
- [318] NG C Y, JUNG M Y, LEE J, et al. Production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by *in silico* aided metabolic engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 68.
- [319] RANGANATHAN S, TEE T W, CHOWDHURY A, et al. An integrated computational and experimental study for overproducing fatty acids in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(6): 687-704.
- [320] 杨永富, 耿碧男, 宋皓月, 等. 运动发酵单胞菌底盘细胞研究现状 & 展望[J]. *合成生物学*, 2021, 2(1): 59-90.
- YANG Y F, GENG B N, SONG H Y, et al. Progress and perspectives on developing *Zymomonas mobilis* as a chassis cell[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(1): 59-90.
- [321] LI M D, ZHANG Y, LI J C, et al. Biosynthesis of 1,3-propanediol *via* a new pathway from glucose in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(7): 2083-2093.
- [322] HAEUSSLER M, CONCORDET J P. Genome editing with CRISPR-Cas9: can it get any better? [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2016, 43(5): 239-250.
- [323] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-495.
- [324] ZHANG Y P, WANG J, WANG Z B, et al. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1053.

- [325] O'CONNELL MOTHERWAY M, O'DRISCOLL J, FITZGERALD G F, et al. Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation and targeted mutagenesis in *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. *Microbial Biotechnology*, 2009, 2(3): 321-332.
- [326] WESSELS H H, STIRN A, MÉNDEZ-MANCILLA A, et al. Prediction of on-target and off-target activity of CRISPR-Cas13d guide RNAs using deep learning[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2023[2023-07-10]. <https://www.nature.com/articles/s41587-023-01830-8>.
- [327] PÓSFAI G, PLUNKETT G 3RD, FEHÉR T, et al. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2006, 312(5776): 1044-1046.
- [328] FAN X, ZHANG Y T, ZHAO F J, et al. Genome reduction enhances production of polyhydroxyalkanoate and alginate oligosaccharide in *Pseudomonas mendocina*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 2023-2031.
- [329] HILLSON N, CADDICK M, CAI Y Z, et al. Building a global alliance of biofoundries[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2040.
- [330] CHAO R, MISHRA S, SI T, et al. Engineering biological systems using automated biofoundries[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 98-108.
- [331] HUGHES S R, BUTT T R, BARTOLETT S, et al. Design and construction of a first-generation high-throughput integrated robotic molecular biology platform for bioenergy applications [J]. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2011, 16(4): 292-307.
- [332] YUAN Y, DU J, ZHAO H. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering [M/OL]//*Methods in molecular biology*, 2013, 985: 177-209 [2023-06-01]. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-299-5_10.
- [333] SI T, CHAO R, MIN Y H, et al. Automated multiplex genome-scale engineering in yeast[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15187.



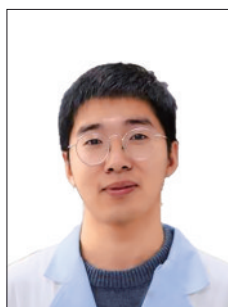
通讯作者: 杨世辉(1971—),男,博士,教授,“省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室”副主任。研究方向为微生物代谢工程、合成生物学以及生物能源与绿色生物制造等。

E-mail: Shihui.Yang@hubu.edu.cn



通讯作者: 王霞(1988—),女,博士,讲师。研究方向为合成生物学与微生物代谢工程。

E-mail: xxwang@hubu.edu.cn



第一作者: 晏雄鹰(1998—),男,博士研究生。研究方向为微生物代谢工程与合成生物学。

E-mail: xiongying.Yan@stu.hubu.edu.cn