

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01121

遗传改造微生物代谢途径生产新型柴油燃料的研究进展

付爱思, 刘然, 朱静, 刘天罡

武汉大学药学院, 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 武汉 430071

摘要: 生物柴油是一种能替代柴油的可再生燃料, 然而通过植物油料化学转酯化生产的第一代生物柴油在性能和生产工艺上有很多缺点。近年来随着合成生物学和代谢工程的迅速发展, 通过选择合适的微生物并利用各种生物技术改造其代谢合成途径, 如脂肪酸合成途径、异戊二烯合成途径, 研究人员能利用微生物直接生产性能更加优越、品质更高的新型第二代生物柴油——长链烷烃。文章总结了目前遗传改造微生物代谢途径生产新型柴油的研究进展, 并指出目前该领域存在的问题以及今后的发展方向。

关键词: 新型生物柴油; 脂肪酸途径; 异戊二烯途径; 代谢工程; 合成生物学

Genetic engineering of microbial metabolic pathway for production of advanced biodiesel

FU Ai-Si, LIU Ran, ZHU Jing, LIU Tian-Gang

Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Science, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract: Biodiesel is a renewable biofuel and alternative diesel, but the first generation of biodiesel, which has many defects in properties and in production methods, mainly comes from the chemical transesterification of triglyceride from plant oil. With the fast development in the field of synthetic biology and metabolic engineering, the researchers can choose suitable microbes and engineer its metabolic pathways, such as fatty acid biosynthesis pathway and isoprenoid biosynthesis pathway, to directly produce the second generation of advanced biodiesel--long chain hydrocarbons, which have better properties and quality using the newest biotechnology techniques. In this review, we summarized the research progress about microbial production of advanced biodiesel and also pointed the deficiencies and future direction in this new field.

Keywords: advanced biodiesel; fatty acid pathway; isoprenoid pathway; metabolic engineering; synthetic biology

几个世纪以来, 常规的化石能源一直支撑着人类文明的发展。但是由于化石能源的不可再生性, 地球亿万年积存下的宝贵资源在人类高强度开采与消费下最终会消耗殆尽^[1]。我国不是化石资源大国,

这不仅使我国今后可能面临资源枯竭所带来的种种社会问题, 同时过度使用化石资源所带来的气候变化、环境污染等问题也将使我国付出巨大的代价。能源供应问题将成为制约我国未来社会经济可持续

收稿日期: 2011-04-18; 修回日期: 2011-08-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2011CBA00806)和国家自然科学基金(编号: 310400861)资助

作者简介: 付爱思, 硕士研究生, 专业方向: 合成生物学与代谢工程。Tel: 027-68754629; E-mail: flashfas@whu.edu.cn

通讯作者: 刘天罡, 博士, 教授, 研究方向: 合成生物学与代谢工程。E-mail: liutg@whu.edu.cn

网络出版时间: 2011-9-5 8:12:53

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110905.0812.002.html>

发展的重要因素。

为了实现国家能源的独立性和可再生性,目前世界各国掀起了一场能源和化工领域的绿色革命,即用“细胞工厂与生物合成”^[2]代替传统的化工工艺。与化工合成相比较,生物合成具有高效、环保等优点,是可持续发展的必然方向。用生物合成代替化工合成,也就是在细胞工厂内改造各种代谢途径,以达到高效生产目标产物的目的。目前,各国的科研人员都在尝试利用生物技术以可再生生物资源为原料生产生物燃料和各种化工原料和产品,并已经取得了一定的成功。在燃料方面,市场上已经有两种产品汽油的替代品生物乙醇和柴油的替代品生物柴油;在化工领域,通过对微生物的遗传改造可以利用再生生物资源生产多聚羟基丁酸^[3](一种生物可降解塑料)1,3-丙二醇^[4](地毯纤维的单体)和异戊二烯^[5](合成橡胶的前体)等化工原料,而且已经产业化,并创造着巨大的利润和带来良好的社会效益^[6]。

与传统的化石柴油相比,生物柴油具有可再生、无毒、可降解的特点。根据所用柴油机的不同,其既可以单独使用,又可以与化石柴油混合使用,并能有效减少有害气体和颗粒物的排放,是优质的化石柴油替代品^[7],故又称其为“绿色柴油”。目前上市的生物柴油主要来源于大豆、油菜籽或者棕榈油中三酰甘油的体外转酯化反应^[8],我们称其为第一代生物柴油,其成分为脂肪酸甲酯或乙酯。这种利用粮食作物为原料生产生物柴油的方法会产生与人争粮的情况并且会占用大量的耕地^[9];此外这种方法需要额外的化学或生物转酯化过程,生产成本较高,生产工艺较为复杂,而且产生的生物柴油分子在结构上取决于原料中三酰甘油的酰基部分,因此不易进行进一步改进从而提高其使用性能。为了提高生物柴油的实用性和应用范围,一部分科研人员着力于开发新的催化方法和工艺流程^[10-16],寻找更

高效的转酯酶以及优化酶的使用方法^[17-23],扩展可利用的原料范围^[24-29]。以上这些方法是在传统的生物柴油生产路线上进行的改进和优化,虽然能产生一定的效果,但仍然不能摆脱一系列的高能耗生产过程,这甚至可能导致生产生物燃料的能量投入大于其能量产出^[30]。因此另一些科研人员希望通过改造微生物的代谢途径,使其能利用非粮油类原料,如纤维素生物质,直接在生物体内生产生物柴油。目前,利用遗传改造的微生物,研究人员不但能生产第一代生物柴油,而且能生产出两类新型生物柴油:脂肪烷烃、法尼烯。其燃烧效率更高,结构和性质上更接近甚至优于化石柴油,并且经过进一步的遗传改造,其结构和性能有可能得到进一步提升(表 1)。

1 生产新型柴油代谢途径的选择

目前研究人员主要利用生物体内广泛存在的一些主代谢途径来生产生物燃料,这些途径的代谢速率和碳利用效率都较高,并且人们对其了解较为深入,易于进行相应改造。例如,利用微生物的发酵途径生产生物乙醇,利用氨基酸生物合成途径生产一系列高级醇(目前能产生的最大碳链长度为 7)^[31-33]。但现有柴油是由碳 9 至碳 23 的烃类组成,平均碳链长度为 16,其中 75%为烷烃,25%为芳香族化合物。其凝固温度在-9.5 左右,十六烷值 50~60。以上两条代谢途径的产品均不能满足这些柴油燃料的基本要求,目前能用于生产生物柴油的代谢途径只有脂肪酸合成途径以及异戊二烯合成途径(图 1)。

2 脂肪酸代谢途径生产新型柴油

脂肪酸合成途径在细胞内主要用于合成细胞膜的基本成分,是细胞生长和存活的必要途径。如何在相应的细胞工厂中提高脂肪酸合成途径的转化率和生产效率,是利用该途径生产新型柴油的关键。

表 1 3 种柴油燃料的比较

名称	来源	生产过程	可再生性	产品	结构可优化潜力
化石柴油生产方式	石油	化学合成	不可再生	烷烃与芳香族化合物的混合物	无
第一代生物柴油生产方式	植物油	生物合成结合化学合成	可再生	脂肪酸乙酯或脂肪酸甲酯	小
新型生物柴油生产方式	纤维素/太阳能和二氧化碳	生物合成	可再生	脂肪酸乙酯或脂肪酸甲酯/脂肪烷烃/法尼烯	很大

因此, 如果我们要利用脂肪酸合成途径来生产新型生物柴油就必须突破这些调控, 使大肠杆菌为生产新型柴油提供充足的原料。

2.2 脂肪酸合成途径的改造

2.2.1 乙酰辅酶 A 羧化酶是关键限速酶

ACC催化脂肪酸合成的第一步反应, 是整个脂肪酸合成的关键限速酶, 其活性极大的影响了整个脂肪酸合成的速度。原核生物和植物质体中的ACC属于同一类型, 称为原核型ACC。它具有 4 个亚基: 生物素羧基载体蛋白亚基, 生物素羧化酶亚基, 转羧酶的两个亚基 α 和 β 。酵母、人、大多数植物胞质溶胶中的ACC属于同一类型, 称为真核型ACC。其生物素羧化酶、转羧酶和生物素羧基载体蛋白均位于同一条肽链上^[44]。

Cronan等^[45]将编码大肠杆菌ACC的 4 个亚基的基因按照 $accB$ 、 $accC$ 、 $accD$ 、 $accA$ 的顺序克隆到同一个质粒上, 并在噬菌体T7 启动子的控制下表达, 能显著提高大肠杆菌体内丙二酰辅酶A的含量。但是单独提高ACC的含量对于提高脂肪酸产量这一目标是远远不够的。高表达ACC并且引入硫酯酶以缓解长链脂肪酰ACP对整个系统的反馈抑制能将菌体内的丙二酰辅酶A的浓度提高 100 倍, 但是脂肪酸的合成效率却只提高了 6 倍。

2.2.2 抑制 β -氧化降解途径以积累脂肪酸

如果我们想要利用微生物细胞内的脂肪酸以及脂肪酸代谢中间产物生产生物柴油, 我们就必须抑制甚至中断其脂肪酸降解途径—— β -氧化降解途径。

根据前人研究经验, 中断 β -氧化降解途径的第一个或第二个基因都可以积累脂肪酸。吕雪峰等^[46]在大肠杆菌中敲除了编码该途径第一步反映酶——脂酰辅酶A合成酶的基因 $fadD$, 脂肪酸的产量提高了 3 倍。此外, 敲除编码 β -氧化降解途径第二步反应酶——脂酰辅酶A脱氢酶的基因 $fadE$ 对脂肪酸的合成也有很大的影响。Steen等^[47]在大肠杆菌中敲除了 $fadE$ 基因, 脂肪酸的产量提高了 4 倍, 在表达硫酯酶的情况下达到了 1.2 g/L 的产量。

2.2.3 利用代谢工程的方法提高脂肪酸产量

根据前人积累的研究成果, 吕雪峰等^[46]利用代谢工程的方法对大肠杆菌实验室菌株BL21(DE3)进行了 4 步遗传改造(图 2): 第一步, 过量表达大肠杆菌ACC以增加底物丙二酰辅酶A的量; 第二步, 过量表达去掉前导肽的大肠杆菌硫酯酶来减弱脂肪酰ACP对脂肪酸合成的抑制作用; 第三步, 异源表达一种以中链脂肪酰ACP为最适底物的植物硫酯酶从而调节产物组分, 且进一步解除抑制作用; 第四步, 敲除编码脂肪酰辅酶A合成酶的 $fadD$ 基因中断

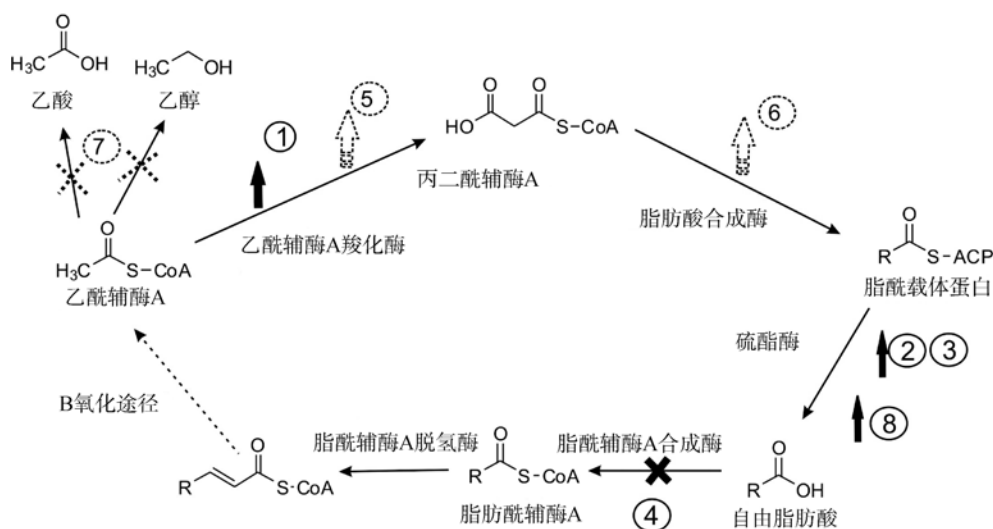


图 2 利用代谢工程对大肠杆菌进行改造生产脂肪酸

图中数字对应文中描述的改进步骤, 实线箭头和交叉代表能符合预期提高脂肪酸产量的改造步骤, 虚线箭头和交叉代表没能符合预期提高脂肪酸产量的改造步骤。

β -氧化途径以积累自由脂肪酸。通过改造使得大肠杆菌脂肪酸含量达到了 2.5 g/L, 产量提高了上百倍。2010 年, 刘天罡等^[38]在上一代改造菌株的基础上又有做了一系列改造(图 2), 分别为: 第五步, 异源表达ACC; 第六步, 过量表达酰基乙酰载体蛋白; 第七步, 提高大肠杆菌中乙酰辅酶A的浓度; 第八步, 调整体内硫酯酶的浓度。第二代大肠杆菌脂肪高产菌株产量能达到 4.5 g/L, 生产效率达到 0.04 g/h/g细胞干重, 产物转化率达到理论值的 20%, 是目前世界上报道的脂肪酸产量最高的大肠杆菌。同年, Keasling等^[47]在大肠杆菌K系列菌株中敲除了 *fadD*基因和*fadE*基因, 并过量表达大肠杆菌硫酯酶, 得到的突变株有 1.2 g/L的脂肪酸产量。由于相关工作的巨大成功, 美国LS9 能源公司已经在佛罗里达建立工厂, 使利用微生物发酵生产脂肪酸新型生物柴油进入商业化论证阶段。

2.3 利用脂肪酸及其代谢中间物生产生物柴油

脂肪酸及其代谢中间物并不是我们进行生物合成的最终产物。在“细胞工厂”中的生物合成过程可以分为两个阶段: 首先我们对脂肪酸合成途径进行

改造, 使其产生大量的脂肪酸或者其中间产物; 其次我们需要引入一些修饰酶, 将脂肪酸或者其中间代谢产物转化为我们需要的目的产物(图 3)。

2.3.1 脂肪酸甲酯或乙酯的生产

原料来源和生产技术等问题严重限制了第一代生物柴油的可应用范围^[48]。利用微生物体内的酶催化酯化反应直接生产生物柴油能省去成本很高的体外转酯步骤^[49]。2003 年, Kalscheuer等^[50]在一种不动杆菌(*Acinetobacter baylyi*)中发现了生物柴油生产的关键酶——蜡酯合成酶/二酰基甘油酰基转移酶(*WS/DGAT*), 其具有广泛的底物选择性, 能够催化不同链长的脂酰辅酶A与乙醇反应生成脂肪酸乙酯。将编码*WS/DGAT*的*atfA*基因与运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)中产生乙醇的两个关键酶——乙醇脱氢酶和丙酮酸脱羧酶的*adhE*和*pdc*基因引入大肠杆菌中, 重组菌株在提供脂肪酸的情况下脂肪酸乙酯的浓度可达 1.28 g/L^[51]。通过进一步优化发酵条件, 脂肪酸乙酯产量最终达到细胞干重的 $25.4 \pm 1.1\%$ ^[52]。而通过遗传改造提高脂肪酸产量的同时共表达*WS/DGAT*的重组菌株, 在提供乙醇的情况

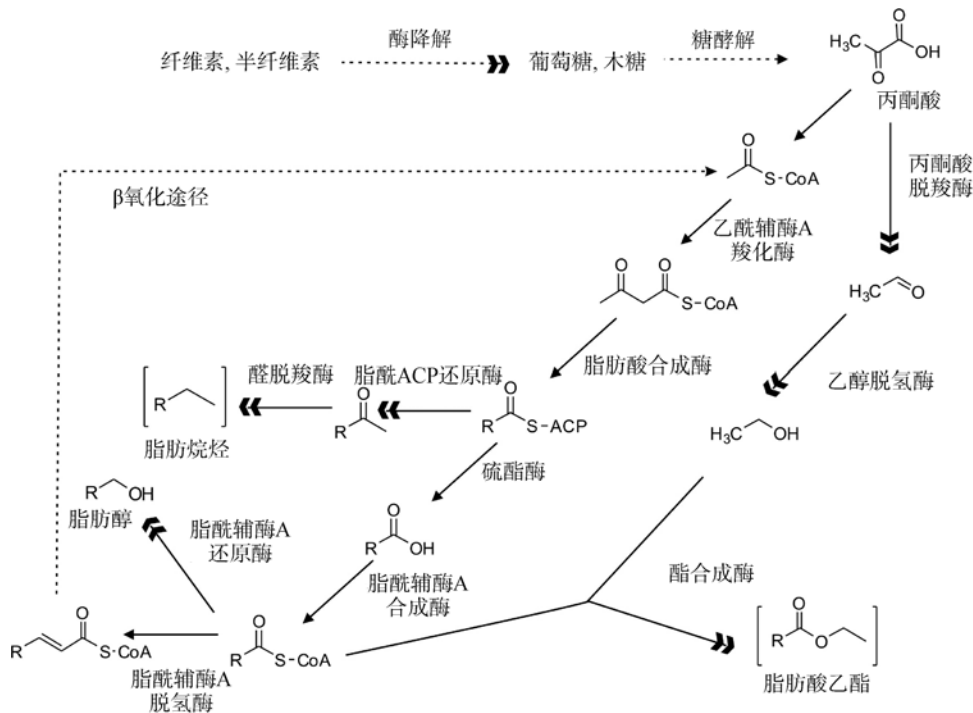


图 3 在大肠杆菌中利用脂肪酸代谢途径生产新型柴油等化学成分

虚线代表多酶催化过程, 实线代表单一酶催化过程; 单箭头表示大肠杆菌中原本具有的代谢途径, 双箭头代表人为引入的代谢途径; 括号内的产物代表生物柴油。

下, 脂肪酸乙酯的产量得到了大幅度提升^[53]。目前, 结合前人的研究成果, 人们能在大肠杆菌中构建出一条高效的脂肪酸乙酯从头合成代谢途径: 过表达 *accBCDA* 基因提高脂肪酸合成水平; 敲除 *fadE* 基因中断 β -氧化途径, 过表达硫酯酶释放更多的自由脂肪酸, 解除脂肪酸合成途径抑制; 过表达 *fadD* 基因以提高脂酰辅酶 A 产量; 过表达 *adhE* 和 *pdc* 基因构建乙醇合成途径; 同时过表达 *atfA* 基因将产生的脂肪酸和乙醇缩合产生生物柴油。通过优化培养条件, 脂肪酸乙酯的产量可达到 0.92 g/L^[54]。通过构建不同的从头合成途径, 人们还能调控大肠杆菌利用不同的原料, 如半纤维素、生产脂肪酸乙酯^[47]。此外, 吕雪峰等^[55]成功地在集胞藻 (*Synechocystis sp. PCC6803*) 中构建了产生脂肪酸乙酯的生物合成途径。

目前, 利用生产效率较高的产油微生物(如微藻), 合成油脂再进行体外转酯生产脂肪酸甲酯的产量平均可达到 1 200 加仑/英亩/年(不考虑藻类的收集, 油料的提取纯化, 体外转酯反应等消耗的能量)^[7], 与之相比直接利用微生物生产生物柴油的能力还较低, 因此各国的研究者还在不断的寻找生产脂肪酸乙酯的新方法以及优化原有方法使其适用于大规模工业生产。

2.3.2 脂肪烷烃的生产

脂肪酸除了能转化为脂肪酸酯外还可以转化为脂肪烷烃。从结构上看, 脂肪烷烃更加接近于现有的化石来源柴油, 是十分理想的柴油替代物。

Dumesic 等^[56]利用化学催化的方法将来源于纤维素的糖类转化为液体烷烃。但是利用化学的方法进行这种转化的成本高、工艺复杂, 不是理想的烷烃生产方法。威斯康辛大学的 Lennen 等^[57]通过代谢工程的手段, 将大肠杆菌中的 *fadD* 基因敲除, 过量表达 *ACC* 的 4 个亚基, 以及引入加州月桂 (*Umbellularia californica*) 的酰基-酰基载体蛋白硫酯酶, 并通过代谢途径的调整和优化使大肠杆菌的脂肪酸产量提高了 6 倍; 同时, Lennen 等将脂肪酸的生物合成与化学催化结合起来, 利用 Pd/C 催化的方法将大肠杆菌产生的脂肪酸转化为烷烃(主要成分为 11 碳烷烃), 产量达到了 0.44 g/L。

考虑到烷烃广泛存在于自然界中, 例如植物表皮的蜡质层、昆虫的信息素, 在很多生物体内都应

具有利用脂肪酸代谢产物生产烷烃的代谢途径。最近 Schirmer 等^[24]成功鉴定了蓝细菌中烷烃的合成途径: 脂肪酰 ACP 首先在脂肪酰 ACP 还原酶的作用下形成脂肪醛, 然后脂肪醛经醛脱羧基酶催化脱羧基生成相应的烷烃。他随后又将存在于各种蓝细菌中的一系列脂肪酰 ACP 还原酶和醛脱羧基酶基因分别导入到大肠杆菌中, 成功地在大肠杆菌中生产出了含奇数碳的烷烃。其中最高产量菌株的烷烃产量能达到 300 mg/L, 并且产生的烷烃 80% 是位于细胞外, 这将有利于烷烃产物的提取。

另一方面, 考虑到烷烃的生物合成的直接原料脂肪酰 ACP 是脂肪酸合成途径的中间产物, 吕雪峰等^[58]直接在蓝细菌中过量表达 *ACC* 以提高细胞内脂肪酰 ACP 的含量, 也能提高蓝细菌脂肪烷烃的产量。并且通过对不同的蓝细菌生产的烷烃成分比较, 证明了通过选择不同种类的蓝细菌与操控代谢途径的修饰酶, 我们能调节和控制生产出来的烷烃的性质。

烷烃合成途径的鉴定使人们具备了利用基因工程手段改造微生物生产烷烃的基本条件。目前利用大肠杆菌直接生产烷烃还处在起步阶段, 最高产量为 0.3 g/L, 并且产生的烷烃中还含有一定比例的烯烃^[59]。因此对该合成途径中各步反应催化机理和调控手段等问题的研究, 将有助于对该合成途径的改造进而提高烷烃的产量以及控制产物的成分比例^[60,61]。

3 异戊二烯途径生产新型柴油

以前, 人们主要关注的是异戊二烯类化合物的药学或者营养学价值。在大肠杆菌和酿酒酵母中, 科研人员已经成功的利用异戊二烯途径生产出青蒿酸(一种抗疟有效成分)^[62,63], 而这些工程菌同样可被用于新型柴油的生产。目前, 利用异戊二烯生物合成途径能够产生多种产品, 包括 α -法尼烯、 β -法尼烯、桉烯、 γ -蛇麻烯、长叶烯、 β -红没药烯等。其中一些化合物可被用于生物燃料的生产, 如法尼烯, 其经过氢化产生的法尼烷被认为是很好的生物柴油分子^[31]。

利用异戊二烯途径生产生物柴油首先需要解决的是如何更好的生产通用前体异戊二烯焦磷酸(IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)。在自然条件下有两条代谢途径能生产这两种前体物质: 甲羟戊酸途径和非甲羟戊酸途径。大肠杆菌采用的是后一种途径, 该途径以丙酮酸和 3-磷酸甘油醛作为原料。通

过优化大肠杆菌中原有的非甲羟戊酸途径^[64-67]或者将外源的甲羟戊酸途径引入大肠杆菌中^[68]可以提高 IPP 和 DMAPP 的产量。产生的 IPP 和 DMAPP 按照头尾相连的机制可依次形成牻牛儿基焦磷酸(C₁₀)、法尼基焦磷酸(C₁₅)、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(C₂₀)。这 3 种代谢产物再经过不同的萜烯合成酶和萜烯修饰酶作用可转化为各种产品。例如: 在大肠杆菌中引入来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的异戊二烯焦磷酸磷酸酶可将异戊二烯焦磷酸转化为异戊烯醇^[69], 引入不同的萜烯合成酶可将牻牛儿基焦磷酸转化为多种结构的单萜类化合物(图 4), 其中蒎烯、桉烯以及萜品烯被认为是潜在的下一代航空燃料成分^[70], 而引入来自酵母的磷酸酶^[71]和植物来源的萜烯合成酶^[72]可将法尼基焦磷酸分别转化为法尼醇和法尼烯, 其中法尼烯可以作为新型生物柴油的前体^[73], 其被氢化后生成法尼烷, 在大肠杆菌中法尼烯的产量可达到 14 g/L 以上; 另外, 碳链长度大于 30 的异戊二烯类化合物同样能被用作生产燃料的原料^[74,75]。

但是单独地提高某种酶的活性, 一味地增加代谢效率或者将外源的甲羟戊酸途径引入大肠杆菌, 都可能导致大肠杆菌自身的调节功能和代谢系统的

紊乱。过度表达某一基因可能会耗尽原料或者某些前体物质^[76], 过多的外源蛋白表达会增大微生物的生存压力^[77], 引入外源的代谢途径虽然能克服原有代谢途径的相关调控限制, 但也容易导致代谢途径中各种酶活力的失衡从而限制了碳流动和/或者导致有毒中间产物的积累^[31], 这些对于整个代谢途径的正常运行都是有害的。因此仍然需要对改造后的代谢途径进行进一步的优化。

同时, 考虑到萜烯合成酶和萜烯修饰酶主要是来源于植物, 而植物基因编码使用的密码子与原核生物有所不同, 使得这些酶更容易在真核生物的体系内表达。目前, 通过改造酵母的异戊二烯途径也能生产多种产品, 并且其中一些产品的产量优于在大肠杆菌中的产量^[62]。

4 异戊二烯途径和脂肪酸途径生产新型生物柴油的比较

异戊二烯途径和脂肪酸途径均可以产生多种生物燃料或者生物燃料前体。其中异戊二烯途径来源的法尼烯经过氢化后形成的法尼烷以及脂肪酸途径来源的脂肪烷烃或脂肪酸酯(如十五烷和棕榈酸乙

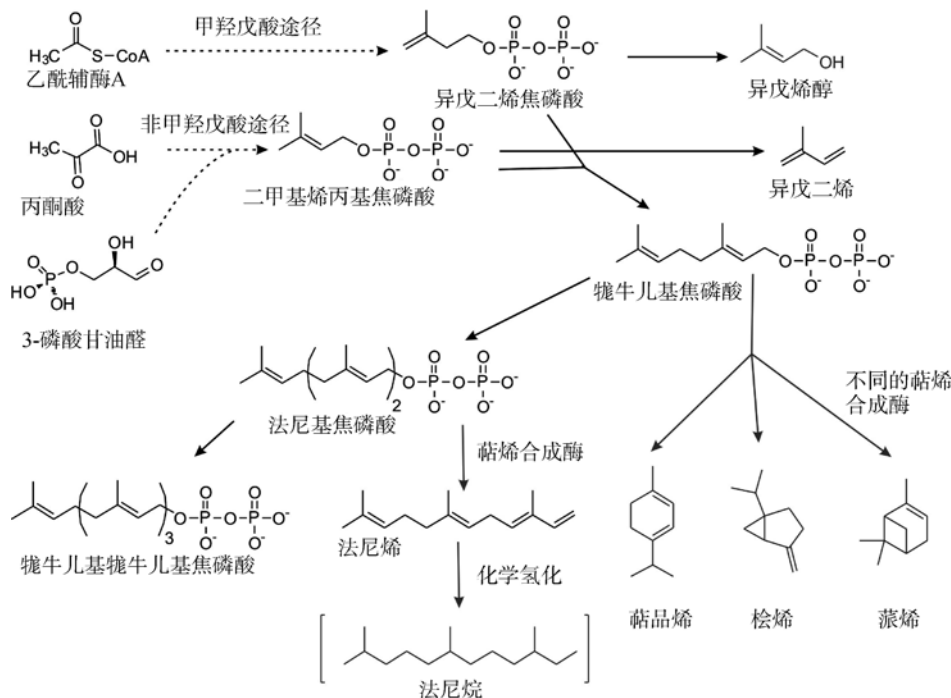


图 4 利用异戊二烯途径生产新型生物柴油等生物燃料

虚线代表多酶催化过程, 实线代表单一酶催化过程; 括号内产物为新型生物柴油。

酯)都是良好的柴油替代品。相比传统的短链醇,它们在水中的溶解性较低,如果产生的生物柴油能够分泌到细胞外,我们能够用离心分离的方式将这些产物从发酵菌提取液中分离,因此减少了原来采用蒸馏的方式提取所消耗的大量能量^[53,70]。同时它们都具有更高的燃烧值且便于运输,是理想的柴油替代品^[78]。

但由于具有多个不饱和双键,法尼烯的辛烷值和抗氧化稳定性都较低,只能作为生产柴油分子的前体,必须经过氢化转化为具有很高辛烷值且良好低温流动性的法尼烷后才能作为柴油燃料直接使用。但是化学的氢化过程会增加生产的花费并导致产量的总体下降。

相比之下,脂肪酸途径来源的脂肪酸酯类,可以通过引入不同的修饰酶来改变其组成成分进而调节其辛烷值和低温流动性。由于不同燃料的成分各有不同,人们希望可以根据不同的使用需求对生物燃料分子进行相应的改造。第一代生物柴油,由于其脂肪酸部分来源于植物油,结构不易进行改变,这被认为是改造优化人工设计柴油(Designer Biodiesel)的一大障碍^[79]。在微生物中,通过表达不同的硫酯酶可以产生不同碳链长度的自由脂肪酸,从而进一步生成不同链长的脂肪酸酯^[80]。脂肪酸酯的不饱和度也能通过操控不饱和脂肪酸生物合成的关键调控因素来进行调节^[39]。通过表达脂肪酸支链合成的相关酶,还可以在碳链上引入支链^[81]。总的来说,通过不同的代谢工程操作,能够使微生物产生出多种不同结构的脂肪酸酯类化合物^[53]。

相比脂肪酸乙酯,脂肪酸途径来源的十五烷具有更高的辛烷值(95)。虽然十五烷的合成过程需要经过脱羧基作用,使其碳利用率有所下降。但十五烷完全是由碳、氢两种元素组成,并且碳链长度适

中,结构上与现有的化石柴油十分相似,具有更高的燃烧值和良好的流动性。而与法尼烯相比,两者具有相似的燃烧值,但脂肪烷烃的理论生产效率更高,能更充分的将原料转化为产品;从结构上看,法尼烯含有一些支链和不饱和双键,这虽然能提高其流动性但是却降低了其十六烷值,因此其作为新型柴油使用前需要额外的化学氢化步骤以保证其十六烷值达到柴油使用标准(表 2)。

5 宿主微生物的选择

对微生物进行遗传改造生产新型柴油还需要考虑的问题是选择合适的宿主菌。根据不同的生产需求权衡以下 3 个方面:(1)宿主菌自身具有的代谢能力和效率。例如,宿主菌是否具有较快的生长速度和高效的原料转化效率,是否能直接利用廉价、广泛存在的原料;(2)生产新型柴油的发酵环境以及新型柴油分子本身对宿主的影响。例如,柴油分子或代谢中间物的积累是否会抑制宿主细胞膜的稳定性从而抑制其大量生长。在大规模的生产发酵过程中,人们希望宿主菌能够忍耐较高的产物浓度同时能承受较低的 pH 值和较高的培养温度以提高发酵过程中的抗污染能力;(3)对宿主代谢相关知识的了解和对其基因改造的可能性。例如,虽然自然界存在着大量的产油微生物,但是其不具备直接生产生物柴油的代谢途径,同时人们缺乏对其进行基因改造的工具和相关知识^[82]。这也就限制了人们利用和进一步改造产油微生物生产生物柴油的可能。总的来说,理想宿主应该同时具有以下特点:生长速率快,代谢效率和原料转化率高,可利用底物广泛,对大规模发酵的生存环境和高浓度的代谢产物耐受性高,易于进行遗传代谢改造^[83]。根据所利用生产原料的不同,我们可以选择不同的宿主菌。

表 2 利用不同的代谢途径以葡萄糖为底物生产新型柴油的理论产量

产品	代谢途径	代谢总产率	利用葡萄糖产量 (加仑/吨)	燃烧热 (兆焦耳/公斤)	燃烧热产率	是否需要进一步 化学转化
法尼烯	甲羟戊酸途径	25%	71	-47.0	75%	需要
法尼烯	非甲羟戊酸途径	29%	83	-47.0	87%	需要
软脂酸乙酯	脂肪酸途径	35%	98	-39.4	88%	不需要
十五烷	脂肪酸途径	29%	90	-47.0	87%	不需要

注:表格的数据部分来自文献^[78]。理论总产率和燃烧热产率是通过利用代谢流分析方式计算得出。燃烧热数值并不适用于表格内的所有烷烃,47兆焦耳/公斤只是一个适用于长链的烷烃的近似数值。

5.1 淀粉和单糖

目前的生物燃料生产中, 甘蔗来源的蔗糖, 玉米来源的淀粉都是良好的发酵原料, 能被各种微生物直接利用, 并且具有很高的转化效率, 但是考虑到粮食问题, 该方法在很多地区都无法应用。其只能为我们提供一个生产效率的标准, 以此来评价利用其他原料生产生物燃料的效率水平。

5.2 纤维素生物质

相比食物性来源的淀粉, 纤维素生物质的来源更丰富、价格更低廉, 是生产新型柴油理想的原料。虽然自然界存在着一些能降解纤维素的微生物, 但其往往不适用于大规模工业生产^[84], 且不易进行基因改造^[85]。而适用于工业大规模生产的大肠杆菌等菌株则不能直接利用纤维素。因此, 一些科学家着重研究如何提高植物的纤维素产量^[86,87], 另一些科学家着重研究如何将植物生产的纤维素和木质素降解为工业生产菌能直接利用的简单碳水化合物^[88,89]。此外, 随着生物技术的飞速发展, 在掌握了大量的大肠杆菌代谢信息和基因改造工具的基础上, 利用代谢工程、系统生物学^[90]和合成生物学^[91]的方法人们能在大肠杆菌中人为构建出以不同物质, 如纤维素生物质为起始原料的生物柴油合成途径。目前, Steen等^[47]通过基因工程已经得到了能直接利用植物半纤维素生产生物柴油的大肠杆菌菌株。

5.3 太阳能和二氧化碳

以上这些微生物宿主都是异养型的微生物, 不具有光合作用的能力, 这也就意味着生物柴油生产所需的原料最初都是来源于植物的光合作用。虽然这种方式生产的生物柴油是利用植物近期固定的二氧化碳, 燃烧这种生物柴油不会引起碳循环的失衡, 但是这种方式会把生物柴油的生产分成原料的生产、制备和微生物的发酵生产两个阶段并且会提高生产成本(原料的成本占生产成本的很大部分)^[83,90]。因而如何更好的衔接这两个阶段成为了生产生物柴油的又一挑战。目前, 利用藻类生产生物燃料在这方面取得了一定的进展。与植物相比较, 藻类具有更高的光和作用效率, 更重要的是其具有更高的遗传可操作性^[7]。目前, 随着基因测序技术和生物信息学的飞速发展, 人们能鉴定某一藻类中与生物柴油

生产相关的代谢途径以及这些途径中所涉及的基因^[92], 这为人们通过代谢工程手段对藻类进行改造生产生物柴油提供了可能。

此外, 原核藻类中的蓝细菌自身具有生产脂肪烃的代谢途径, 同时其繁殖速度快, 容易进行遗传改造。因此人们希望能在蓝细菌体内构建出高效的生物柴油生产途径, 从而在一个生物体系内将光合作用途径和生物柴油合成途径结合起来, 实现直接利用太阳能和二氧化碳生产生物柴油的目的^[55,93,94]。虽然该方法还处在理论探索阶段, 但这为以后的新型柴油生产提供了新的思路。也许在未来我们可以利用这种光能生产方式在海洋、荒漠等不适宜种植粮食作物的广大区域生产生物柴油。

6 展望

6.1 代谢途径的进一步改造

虽然关于脂肪酸合成途径的文献非常多, 表面上已经被研究得很透彻, 但仍有很多研究工作与我们的预期存在较大的差异。我们在脂肪酸合成途径改造过程中所提到的八个步骤的基础上构建了近百种的突变株, 其中只有几个步骤产生了一定的效果。而且在第二代高产脂肪酸菌株的基础上, 我们很难再进一步大幅度地提高产量。这也就说明了我们的距离全面掌握和认识这个众所周知的生物代谢途径还有很大一段距离。

为了进一步认识脂肪酸合成途径, 刘天罡等^[38]针对大肠杆菌中的脂肪酸合成途径的研究建立了一套无细胞系统, 该系统不但能准确地确定大肠杆菌脂肪合成途径的限速步骤, 并定量的指示该系统为达到最大反应效率所需要的特定因子的量。通过该系统, 很多已有的结论得到了验证, 还揭示了很多脂肪酸合成途径中的新现象, 而且这些体外实验的结论都被相应的体内实验所验证。无细胞系统还能被广泛应用于其他微生物体内脂肪酸合成途径甚至是其他的代谢途径的分析, 为我们进一步改造微生物的代谢途径提供有针对性的准确信息。

6.2 合成生物学在生产新型柴油中的应用

为了满足工业化生产的需求, 我们还需要对构建的生物柴油合成途径进行进一步的调节和改造。利用无细胞系统提供的信息, 我们能够推测整个代

谢途径中的限速步骤和调控机理并进行有目的的定向改造。而合成生物学为我们实现这一定向的改造提供了一种有效的方法,其能有效的减少用于构建基因的时间并且提高改造的可预测性和可靠性^[95]。合成生物学将不同的催化过程和调节机理看作是执行特定功能的生物模块,通过人工合成一些生物模块并将这些模块引入到原有的代谢途径或者按一定顺序组装起来构建全新的代谢、调控途径可以改变原有代谢途径的平衡水平或者产生符合人们需求的特定结构的化合物。虽然目前该方法还不够成熟,不能完全准确的预测所构建代谢途径的产物和产量,但也取得了很多的进展。例如,在蛋白质水平上,通过外源基因密码子优化能提高外源基因的表达^[96],采用不同强度的启动子,不同拷贝数的质粒调节基因的表达水平^[97,98],使用人工合成的核糖体结合位点或改造转录因子的方式调控基因表达过程^[99,100],在代谢途径水平上,通过在异戊二烯途径中引入不同的萜烯合成酶,可以生产不同结构的萜类化合物^[70];在脂肪酸合成途径中引入具有不同的底物特异性的硫酸酯酶,可以产生各种链长的脂肪酸^[80],在微生物中表达人为设计的蛋白质骨架将合成途径中的各种酶组合起来构成酶催化复合体,能大幅度提高合成途径的效率^[101];而在代谢途径中采用具有不同催化反应机理的酶,能促进整个生物反应进行的更加完全^[102]。此外,系统生物学的使用,例如基因组学,转录组学,蛋白组学,代谢组学,代谢流组学都将有助于人们鉴定、整合、设计新的代谢途径。目前新型生物柴油应用于生产的最大障碍就在于其产量还不能达到工业生产的要求,因此如何利用好合成生物学这一手段,是构建高效生物合成途径的关键所在。

参考文献(References):

- [1] Panwar NL, Kaushik SC, Kothari S. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renew Sust Energ Rev*, 2011, 15(3): 1513–1524. DOI
- [2] 张延平, 李寅, 马延和. 细胞工厂与生物炼制. 化学进展, 2007, 19(7/8): 1076–1083. DOI
- [3] Steinbuchel A. Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: perspectives and impacts. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(6): 607–613. DOI
- [4] Nakamura CE, Whited GM. Metabolic engineering for the microbial production of 1, 3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(5): 454–459. DOI
- [5] Park JH, Lee SY. Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(5): 454–460. DOI
- [6] Liu TG, Khosla C. Genetic engineering of *Escherichia coli* for biofuel production. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 53–69. DOI
- [7] Vasudevan PT, Briggs M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35(5): 421–430. DOI
- [8] Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(30): 11206–11210. DOI
- [9] Fargione J. Is bioenergy for the birds? An evaluation of alternative future bioenergy landscapes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(44): 18745–18746. DOI
- [10] Baroutian S, Aroua MK, Raman AAA, Sulaiman NMN. A packed bed membrane reactor for production of biodiesel using activated carbon supported catalyst. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 1095–1102. DOI
- [11] de Boer K, Bahri PA. Supercritical methanol for fatty acid methyl ester production: A review. *Biomass Bioenerg*, 2011, 35(3): 983–991. DOI
- [12] Dubé MA, Tremblay AY, Liu J. Biodiesel production using a membrane reactor. *Bioresour Technol*, 2007, 98(3): 639–647. DOI
- [13] Guerreiro L, Pereira PM, Fonseca IM, Martin-Aranda RM, Ramos AM, Dias JML, Oliveira R, Vital J. PVA embedded hydrotalcite membranes as basic catalysts for biodiesel synthesis by soybean oil methanolysis. *Catal Today*, 2010, 156(3–4): 191–197. DOI
- [14] Jitputti J, Kitiyanan B, Rangsunvigit P, Bunyakiat K, Attanatho L, Jenvanitpanjakul P. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. *Biochem Eng J*, 2006, 116(1): 61–66. DOI
- [15] Wang LY, Yang JC. Transesterification of soybean oil with nano-MgO or not in supercritical and subcritical methanol. *Fuel*, 2007, 86(3): 328–333. DOI
- [16] Sakuragi H, Kuroda K, Ueda M. Molecular Breeding of Advanced Microorganisms for Biofuel Production. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 416931. DOI
- [17] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92(5): 405–416. DOI
- [18] Noureddini H, Gao X, Philkana RS. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour Technol*, 2005, 96(7): 769–777. DOI
- [19] Sanchez F, Vasudevan PT. Enzyme catalyzed production

- of biodiesel from olive oil. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, 135(1): 1–14. [DOI](#)
- [20] Soumanou MM, Bornscheuer UT. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2003, 105(11): 656–660. [DOI](#)
- [21] de Oliveira D, Di Luccio M, Faccio C, Rosa CD, Bender JP, Lipke N, Menoncin S, Amroginski C, de Oliveira JV. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Appl Biochem Biotechnol*, 2004, 115(1–3): 771–780. [DOI](#)
- [22] Chang HM, Liao HF, Lee CC, Shieh CJ. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *J Chem Technol Biotechnol*, 2005, 80(3): 307–312. [DOI](#)
- [23] Lai CC, Zullaikah S, Vali SR, Ju YH. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. *J Chem Technol Biotechnol*, 2005, 80(3): 331–337. [DOI](#)
- [24] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. *J Am Oil Chem Soc*, 2001, 78(7): 703–707. [DOI](#)
- [25] Abdulla R, Chan ES, Ravindra P. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: a critical review. *Crit Rev Biotechnol*, 2011, 31(1): 53–64. [DOI](#)
- [26] Endalew AK, Kiros Y, Zanzi R. Heterogeneous catalysis for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil (JCO). *Energy*, 2011, 36(5): 2693–2700. [DOI](#)
- [27] Koh MY, Ghazi TIM. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. *Renew Sust Energ Rev*, 2011, 15(5): 2240–2251. [DOI](#)
- [28] McGinn PJ, Dickinson KE, Bhatti S, Frigon JC, Guiot SR, O'Leary SJ. Erratum to: Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. *Photosynth Res*, 2011. [DOI](#)
- [29] Qiul JL, Fan XH, Zou HY. Development of biodiesel from inedible feedstock through various production processes. review. *Chem Tech Fuels Oil*, 2011, 47(2): 102–111. [DOI](#)
- [30] Chen H, Chen GQ. Energy cost of rapeseed-based biodiesel as alternative energy in China. *Renewable Energy*, 2011, 36(5): 1374–1378. [DOI](#)
- [31] Peralta-Yahya PP, Keasling JD. Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnol J*, 2010, 5(2): 147–162. [DOI](#)
- [32] Jarboe LR, Zhang X, Wang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO. Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 761042. [DOI](#)
- [33] Clomburg JM, Gonzalez R. Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(2): 419–434. [DOI](#)
- [34] Handke P, Lynch SA, Gill RT. Application and engineering of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* for advanced fuels and chemicals. *Metab Eng*, 2011, 13(1): 28–37. [DOI](#)
- [35] White SW, Zheng J, Zhang YM, Rock CO. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74(1): 791–831. [DOI](#)
- [36] Kurth DG, Gago GM, de la Iglesia A, Bazet Lyonnet B, Lin TW, Morbidoni HR, Tsai SC, Gramajo H. ACCase 6 is the essential acetyl-CoA carboxylase involved in fatty acid and mycolic acid biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 8): 2664–2675. [DOI](#)
- [37] Lin TW, Melgar MM, Kurth D, Swamidass SJ, Purdon J, Tseng T, Gago G, Baldi P, Gramajo H, Tsai SC. Structure-based inhibitor design of AccD5, an essential acyl-CoA carboxylase carboxyltransferase domain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(9): 3072–3077. [DOI](#)
- [38] Liu TG, Vora H, Khosla C. Quantitative analysis and engineering of fatty acid biosynthesis in *E. coli*. *Metab Eng*, 2010, 12(4): 378–386. [DOI](#)
- [39] Fujita Y, Matsuoka H, Hirooka K. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol*, 2007, 66(4): 829–839. [DOI](#)
- [40] Magnuson K, Jackowski S, Rock CO, Cronan JE Jr. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 1993, 57(3): 522–542. [DOI](#)
- [41] Davis MS, Cronan JE Jr. Inhibition of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. *J Bacteriol*, 2001, 183(4): 1499–1503. [DOI](#)
- [42] Heath RJ, Rock CO. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1996, 271(18): 10996–11000. [DOI](#)
- [43] Heath RJ, Rock CO. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1996, 271(4): 1833–1836. [DOI](#)
- [44] Cronan JE Jr, Waldrop GL. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog Lipid Res*, 2002, 41(5): 407–435. [DOI](#)
- [45] Davis MS, Solbiati J, Cronan JE Jr. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28593–28598. [DOI](#)
- [46] Lu XF, Vora H, Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 333–339. [DOI](#)
- [47] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu ZH, Schirmer A, McClure A, Del Cardayre SB, Keasling JD. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, 463(7280): 559–562. [DOI](#)

- [48] Huber GW, Iborra S, Corma A. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chem Rev*, 2006, 106(9): 4044–4098. [DOI](#)
- [49] Stöveken T, Steinbüchel A. Bacterial acyltransferases as an alternative for lipase-catalyzed acylation for the production of oleochemicals and fuels. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(20): 3688–3694. [DOI](#)
- [50] Kalscheuer R, Steinbüchel A. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *J Biol Chem*, 2003, 278(10): 8075–8082. [DOI](#)
- [51] Kalscheuer R, Stolting T, Steinbüchel A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology*, 2006, 152(Pt 9): 2529–2536. [DOI](#)
- [52] Elbahloul Y, Steinbüchel A. Pilot-scale production of fatty acid ethyl esters by an engineered *Escherichia coli* strain harboring the p (Microdiesel) plasmid. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4560–4565. [DOI](#)
- [53] Keasling JD, Hu Z, Somerville C, Church G, Berry D, Friedman L, Schirmer A, Brubaker S, Del Cardayre SB. Production of fatty acids and derivatives thereof. WO2007136762. 2007. [DOI](#)
- [54] Duan Y, Zhu Z, Cai K, Tan X, Lu X. De novo biosynthesis of biodiesel by *Escherichia coli* in optimized fed-batch cultivation. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20265. [DOI](#)
- [55] Lu XF. A perspective: photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6): 742–746. [DOI](#)
- [56] Heath RJ, Rock CO. Enoyl-acyl carrier protein reductase (fabI) plays a determinant role in completing cycles of fatty acid elongation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1995, 270(44): 26538–26542. [DOI](#)
- [57] Lennen RM, Braden DJ, West RM, Dumesic JA, Pfleger BF. A process for microbial hydrocarbon synthesis: Overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* and catalytic conversion to alkanes. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(2): 193–202. [DOI](#)
- [58] Tan XM, Yao L, Gao QQ, Wang WH, Qi FX, Lu XF. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 169–176. [DOI](#)
- [59] Schirmer A, Rude MA, Li XZ, Popova E, del Cardayre SB. Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*, 2010, 329(5991): 559–562. [DOI](#)
- [60] Warui DM, Li N, Nørgaard H, Krebs C, Bollinger JM Jr, Booker SJ. Detection of formate, rather than carbon monoxide, as the stoichiometric coproduct in conversion of fatty aldehydes to alkanes by a cyanobacterial aldehyde decarbonylase. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(10): 3316–3319. [DOI](#)
- [61] Krebs C, Bollinger JM Jr, Booker SJ. Cyanobacterial alkane biosynthesis further expands the catalytic repertoire of the ferritin-like 'di-iron-carboxylate' proteins. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(2): 291–303. [DOI](#)
- [62] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940–943. [DOI](#)
- [63] Chang MCY, Keasling JD. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(12): 674–681. [DOI](#)
- [64] Farmer WR, Liao JC. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(5): 533–537. [DOI](#)
- [65] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(5): 612–616. [DOI](#)
- [66] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Characterization of lycopene-overproducing *E. coli* strains in high cell density fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(5): 968–974. [DOI](#)
- [67] Yuan LZ, Rouvière PE, Larossa RA, Suh W. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab Eng*, 2006, 8(1): 79–90. [DOI](#)
- [68] Dennis M, Kolattukudy PE. A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5306–5310. [DOI](#)
- [69] Withers ST, Gottlieb SS, Lieu B, Newman JD, Keasling JD. Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(19): 6277–6283. [DOI](#)
- [70] Renninger NS, Ryder JA, Fisher KJ. Jetfuel compositions and methods of making and using same. WO2008130492, 2008.
- [71] Song LS. A soluble form of phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* capable of converting farnesyl diphosphate into *E*, *E*-farnesol. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, 128(2): 149–158. [DOI](#)
- [72] Martin DM, Fäldt J, Bohlmann J. Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the *TPS-d* subfamily. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 1908–1927. [DOI](#)
- [73] Renninger NS, McPhee DJ. Fuel compositions including farnesane and farnesene derivatives and methods of

- making and using same. WO2008045555, 2008.
- [74] Shiba Y, Paradise EM, Kirby J, Ro DK, Keasling JD. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. *Metab Eng*, 2007, 9(2): 160–168. [DOI](#)
- [75] Yoon SH, Kim JE, Lee SH, Park HM, Choi MS, Kim JY, Shin YC, Keasling JD, Kim SW. Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(1): 131–139. [DOI](#)
- [76] Lombardi A, De Simone G, Natri F, Galdiero S, Della Morte R, Staiano N, Pedone C, Bolognesi M, Pavone V. The crystal structure of alpha-thrombin-hirunorm IV complex reveals a novel specificity site recognition mode. *Protein Sci*, 1999, 8(1): 91–95. [DOI](#)
- [77] Goff SA, Goldberg AL. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of lon and other heat shock genes. *Cell*, 1985, 41(2): 587–595. [DOI](#)
- [78] Rude MA, Schirmer A. New microbial fuels: a biotech perspective. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(3): 274–281. [DOI](#)
- [79] Knothe G. “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels*, 2008, 22(2): 1358–1364. [DOI](#)
- [80] Mayer KM, Shanklin J. Identification of amino acid residues involved in substrate specificity of plant acyl-ACP thioesterases using a bioinformatics-guided approach. *BMC Plant Biol*, 2007, 7: 1. [DOI](#)
- [81] Li Y, Florova G, Reynolds KA. Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH). *J Bacteriol*, 2005, 187(11): 3795–3799. [DOI](#)
- [82] Dindi H, Sengupta S, Gonzon A. Catalytic process for converting renewable resources into paraffins for use as diesel blending stocks. WO20080312480, 2008.
- [83] Fischer CR, Klein-Marcuschamer D, Stephanopoulos G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 295–304. [DOI](#)
- [84] Demain AL, Newcomb M, Wu JH. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(1): 124–154. [DOI](#)
- [85] Tyurin MV, Desai SG, Lynd LR. Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(2): 883–890. [DOI](#)
- [86] Zheng Y, Pan ZL, Zhang RH, Labavitch JM, Wang DH, Teter SA, Jenkins BM. Evaluation of different biomass materials as feedstock for fermentable sugar production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 137–140(1–12): 423–435. [DOI](#)
- [87] Somerville C. Biofuels. *Curr Biol*, 2007, 17(4): R115–R119. [DOI](#)
- [88] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35(5): 377–391. [DOI](#)
- [89] Lynd LR, Laser MS, Bransby D, Dale BE, Davison B, Hamilton R, Himmel M, Keller M, McMillan JD, Sheehan J, Wyman CE. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(2): 169–172. [DOI](#)
- [90] Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*, 2007, 315(5813): 801–804. [DOI](#)
- [91] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol*, 2008, 3(1): 64–76. [DOI](#)
- [92] Rismani-Yazdi H, Haznedaroglu BZ, Bibby K, Peccia J. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: Pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *Bmc Genomics*, 2011, 12(1): 148. [DOI](#)
- [93] Tan XM, Yao L, Gao QQ, Wang WH, Qi FX, Lu XF. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 169–176. [DOI](#)
- [94] Liu XY, Sheng J, Curtiss R III. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 6899–6904. [DOI](#)
- [95] Lee SK, Chou H, Ham TS, Lee TS, Keasling JD. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(6): 556–563. [DOI](#)
- [96] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(7): 346–353. [DOI](#)
- [97] Landrain TE, Carrera J, Kirov B, Rodrigo G, Jaramillo A. Modular model-based design for heterologous bioproduction in bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(3): 272–279. [DOI](#)
- [98] Santos CNS, Stephanopoulos G. Combinatorial engineering of microbes for optimizing cellular phenotype. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(2): 168–176. [DOI](#)
- [99] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, 9(3): 258–267. [DOI](#)
- [100] Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, 403(6767): 339–342. [DOI](#)
- [101] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, Moon TS, Petzold CJ, Ullal AV, Prather KLJ, Keasling JD. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753–759. [DOI](#)

- [102] Bond-Watts BB, Bellerose RJ, Chang MCY. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(4): 222–227. [DOI](#)