

综述

系统生物学和合成生物学研究在生物燃料生产菌株改造中的应用

赵心清¹, 白凤武¹, 李寅²

1 大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 基于生物质资源生产环境友好的生物燃料, 对经济和社会的可持续发展具有重要意义, 但其生产成本高的问题十分突出, 而高效生产菌株的获得是解决这一问题的根本出路。以下综述了利用系统生物学研究所获得的信息进行菌种改造的过程, 重点论述了生产菌株胁迫耐受性方面的研究进展, 并讨论了系统生物学、合成生物学和代谢工程技术在改造生物燃料生产菌株中的应用, 展望了合成生物学在构建高效生物能源生产菌株方面应用的前景。

关键词: 系统生物学, 合成生物学, 代谢工程, 生物燃料, 菌株改造

Application of systems biology and synthetic biology in strain improvement for biofuel production

Xinqing Zhao¹, Fengwu Bai¹, and Yin Li²

1 School of Life Science and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Biofuels are renewable and environmentally friendly, but high production cost makes them economically not competitive, and the development of robust strains is thus one of the prerequisites. In this article, strain improvement studies based on the information from systems biology studies are reviewed, with a focus on their applications on stress tolerance improvement. Furthermore, the contribution of systems biology, synthetic biology and metabolic engineering in strain development for biofuel production is discussed, with an expectation for developing more robust strains for biofuel production.

Keywords: systems biology, synthetic biology, metabolic engineering, biofuels, strain improvement

与石油基液体燃料相比, 生物燃料不仅生产原料是可再生的生物质资源, 而且燃烧产生的 CO₂ 可以被植物光合作用吸收, 可显著降低温室气体的净排量, 对经济和社会的可持续发展具有十分重要的

意义, 因此得到了国内外学者和政府的高度重视。然而, 目前生物燃料生产成本过高的问题仍然十分突出, 以燃料乙醇为例, 在美国燃料乙醇生产主要靠政府的税收优惠政策, 而我国的燃料乙醇生产则

Received: June 9, 2010; Accepted: June 13, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA10Z358), National Natural Science Foundation of China (No. 30500011).

Corresponding author: Yin Li. Tel: +86-10-64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA10Z358), 国家自然科学基金 (No. 30500011) 资助。

依赖国家直接财政补贴。

利用微生物发酵生产生物燃料的生产成本主要由原料成本和能耗成本构成。使用廉价易得的以农作物秸秆为代表的木质纤维素类物质生产生物燃料, 替代成本高而且潜在影响粮食安全的淀粉质原料, 是降低生物燃料生产原料成本的根本出路, 但纤维素类物质的生物转化还存在效率低等诸多问题^[1-2]。提高发酵终点产物浓度, 节省后续分离的能耗及废糟液量, 进而节省废糟液处理的能耗, 以及提高发酵温度, 使发酵系统在夏季高温季节可以使用循环冷却水替代能耗高、设备投资大的低温冷却水, 节省发酵系统运行能耗, 是节省能耗的两个主要方向。不论是拓宽发酵底物利用廉价的原料, 还是提高发酵终点产物浓度和发酵温度, 都有赖于构建性能优良的菌株。

近年来, 利用系统生物学研究获得的信息深入理解环境因素对细胞生理代谢的影响, 并指导代谢工程操作, 以及基于合成生物学理论, 定向设计全新的代谢途径, 都取得了很大进展。本文综述了这些研究在构建生物燃料高效生产菌株方面的进展, 并展望了系统生物学和合成生物学研究在构建高效生物燃料生产菌株中的应用。

1 系统生物学与生物燃料生产菌种构建

1.1 系统生物学方法改造菌株与传统方式的比较

传统方法改造菌株往往通过菌种的多次随机诱变和定向筛选, 或者通过菌种的驯化获得优良的生产菌株, 但存在的问题是改造过程随机性很大, 因此非常费时费力, 而且对菌种性能提高的机制认识不足。随着人们对代谢途径和调节机制认识的深入, 代谢工程技术得到了较快发展, 通过过量表达或敲除代谢途径关键酶基因, 实现对代谢网络的定向优化^[3]。如 Ingram 小组通过在大肠杆菌中过量表达运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶 *PDC* 和乙醇脱氢酶 *ADH2*, 成功构建了工程菌种 KO11, 其乙醇发酵速率与酿酒酵母接近^[4]。然而代谢工程操作对于多基因决定的性状难以实现理想的效果, 尤其是对于控制机制不是很清楚的代谢途径, 无法找到合适的基因靶点进行操作。反向代谢工程的发展通过对性能

提高的突变体的代谢途径进行分析, 寻找提高菌株生理性能的关键靶点, 从而实现代谢途径的定向改造, 也取得了一定成功^[5]。近年来发展的基因组改造 (Genome shuffling)^[6]和全局转录工程机制工程 (Global transcription machinery engineering, gTME)^[7]为菌种改造提供了新的思路, 即通过对菌株基因组规模的重组或者基因组规模的转录水平的控制获得代谢网络优化的菌株, 但以上这些操作仍然涉及到突变的不定向性和对大量突变体进行筛选。而且, 由于细胞内部代谢网络的相互作用和调节机制的存在, 一些与代谢途径表面上似乎没有关系的基因, 其表达水平或者表达产物也可能对代谢网络的优化具有重要的影响, 同时, 过量表达某一个基因或者某几个基因可能引起代谢网络整体平衡的失调, 从而影响代谢工程的成功^[8]。因此, 如何寻找这些影响代谢途径优化的关键基因, 并且达到对代谢网络的平衡调控, 是代谢工程操作的重要研究内容。

系统生物学的发展, 已经可以使人们从基因组规模去全面理解细胞的代谢网络, 包括组成代谢途径的结构基因、细胞代谢复杂的调节机制, 以及遗传和环境扰动对细胞全局代谢的影响, 从而建立组学规模的代谢模型, 对可能的基因工程操作效果进行评价和预测, 并通过对基因工程操作后获得的菌株的代谢网络分析, 从而更好地指导代谢工程操作手段, 改善细胞的生理功能和生产性状^[8]。系统生物学研究涉及到生物信息学、数学、分子生物学以及化学工程学等多学科的交叉和整合, 使人们对复杂生命现象的了解更加全面和深入。利用系统生物学研究思想指导菌株改造的流程见图 1。

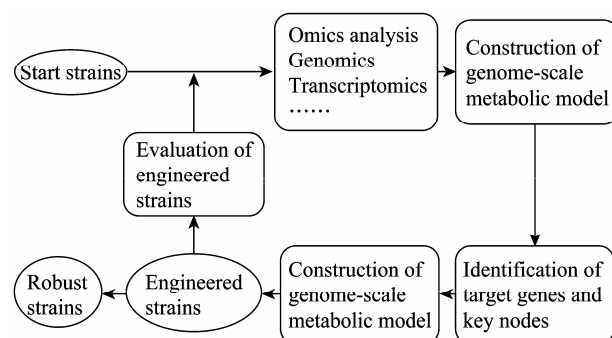


图 1 利用系统生物学工具改造菌株的流程

Fig. 1 Scheme of the improvement of microbial strains using systems biology tools.

系统生物学发展的不同阶段出现了不同的名词,包括系统生物技术^[9]、系统代谢工程^[10]和最新提出的工业系统生物学^[11]等。这些名词代表了系统生物学研究不同阶段的不同侧重点,现分别讨论如下:

系统生物技术 (Systems biotechnology)^[9]:利用系统生物学的高通量组学数据建立代谢模型,设计具有优化的代谢能力的细胞,强调各种组学工具在生物技术领域的应用,以及借助组学工具,在对细胞在不同遗传和环境条件扰动下的整体代谢水平变化理解的基础上进行代谢模型的构建和修饰。

系统代谢工程 (Systems metabolic engineering)^[10]:即利用计算机工具建立的基因组规模计量模型和基因工程操作对细胞进行系统规模的代谢工程改造,以生产高附加值产品。强调在对细胞代谢进行基因组规模的整体认识的基础上进行代谢工程改造。

工业系统生物学 (Industrial systems biology)^[11]:利用系统生物学研究手段建立可预测的基因组规模代谢模型,并提出有效的改造策略,提高基因组信息已知的工业生产宿主的生产能力和生产效率,提高工业生物技术产品的经济性和可持续性发展能力。强调系统生物学在生产工业生物技术产品中的应用,注重组学数据的整合,以提高代谢模型的可预测性,并进行代谢工程操作的有效性开发。

可以看出,随着系统生物学的发展,系统生物学工具在工业生产宿主选育中的应用也从最初的单一组学研究,到多种组学工具的联合使用和数据整合;从定性研究生物系统,到对生物系统进行定量分析和基因组规模模型建立;从对生产宿主在不同环境条件和遗传扰动下细胞内部变化的理解,到利用所得到的数据进行菌种改造和过程优化。

1.2 酿酒酵母的系统生物学研究与燃料乙醇生产

酿酒酵母是燃料乙醇生产最常用的工业宿主。对酿酒酵母的基因组学、蛋白组学和代谢组学研究获得了很多有用的信息,为指导高效燃料生产菌种构建的代谢工程操作奠定了基础。Jens Nilson 研究小组构建了酿酒酵母基因组规模的系统生物学模型,并设计了降低甘油产率提高乙醇收率的代谢工程操作策略,进一步的代谢工程操作证明,在酿酒酵母中过量表达链球菌 *Streptococcus mutants* 的

3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 *GAPN* 获得的突变体,甘油收率下降了 40%,乙醇收率提高了 3%,在混合糖发酵基因工程菌中过量表达该基因,利用葡萄糖、木糖混合糖发酵生产乙醇的收率提高了 25%^[12]。瑞典 Lund University 的研究小组对所构建的重组酵母与对照菌株进行了转录组学分析,发现在木糖上生长较好的菌株中有 13 个基因在所有重组菌中变化都比较明显,并进一步进行了这些基因的过量表达和敲除实验,发现其中 5 个基因的操作提高了在木糖上的有氧生长,最明显的提高了 173%^[13]。

对在木糖上发酵良好的菌株 *S. cerevisiae* TMB3400 与亲本菌株进行了蛋白组学的分析,发现突变体中木糖脱氢酶、木糖还原酶以及 *TKL1* 和 *ALD6* 等酶基因的表达明显上调,与前期对突变体的理性遗传改造设计相符合,值得指出的是,该研究发现蛋白组研究的结果与同等实验条件下的转录组研究结果不相符,表明酿酒酵母蛋白的翻译后修饰或者转录后修饰过程对代谢的影响较大^[14]。此外,该研究还发现在突变体和对照菌种中存在非酿酒酵母来源的蛋白,说明工业菌株中的蛋白和基因组组成存在异质性,即工业微生物菌种与实验室菌种存在基因组组成的差异。类似的结论也在其他研究有所报道,如美国杜克大学对巴西利用甘蔗生产燃料乙醇的工业酵母 JAY270 和其单倍体菌株 JAY291 的基因组测序发现,与实验室模式酵母菌种 S288C 相比较,JAY270 菌株的染色体结构存在明显差异,包括 6 号染色体上有 9.1 kb 和 19.3 kb 的大片段而在 S288C 中没有发现,此外在 JAY270 中某些基因拷贝数增加,如负责细胞内重要的小分子 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 循环的 *SAM4* 和 *SAM5* 基因在 S288C 中有 2 个拷贝,但在 JAY270 中有 4 个拷贝;负责微生物 B6 代谢的 *SNO2* 和 *SNZ2* 基因在 JAY270 中有 9 个拷贝,而在 S288C 中只有 4 个拷贝,同时还发现 *SNO2* 和 *SNZ2* 的表达在 JAY270 中也明显高于模式酵母,而这两个基因与细胞的氧化胁迫有关,其拷贝数的增加可能与 JAY270 较强的耐受氧化胁迫的性能有关。另外 *HAP1* 调控的基因在 JAY270 中的表达也明显高于 S288C,这些基因与发酵过程密切相关^[15]。以上结果都表明,在工业酵母中存在有利于

其进行工业发酵和抵抗工业生产过程中的胁迫耐受性的基因组成和表达调控方式, 在构建基因组规模代谢模型的时候, 应该充分考虑工业菌种与实验室模式菌种的差异, 以及不同酵母菌株间的差异, 从而得到更完善的模型。

1.3 系统生物学在生物燃料生产菌耐性研究中的应用

系统生物学能提供对复杂系统的深刻认识, 因此对多基因控制的性状的研究能起到重要的推动作用。生物燃料生产过程中, 生产菌可能经历各种胁迫因素的压力, 首先燃料乙醇和生物丁醇等生物燃料本身对细胞就具有很大的毒性; 其次, 生产菌在工业生产环境中可能遇到的高温和低 pH 等条件, 原料水解物中存在的抑制性化合物, 如糠醛、乙酸等^[16-17]。提高生产菌对这些环境条件的耐受性, 有助于提高发酵终点的产物浓度, 同时降低生产的能耗, 对于生产的经济性具有重要意义。近年来对酿酒酵母和梭菌等生物燃料生产菌的转录组学、蛋白组学和代谢组学研究结果对于深入了解细胞在环境胁迫下的反应, 寻找关键基因进行代谢工程改造奠定了基础^[18-28]。虽然早期对实验室菌株的研究集中在短暂乙醇冲击下细胞全局基因转录的反应, 但对工业酵母在工业发酵条件下的转录组学研究表明, 不同菌株对乙醇胁迫的反应存在一定的可比性^[18], 如乙醇胁迫下, 细胞能量代谢、脂类代谢、细胞表面蛋白、细胞胁迫反应相关的基因均表达上调, 值得指出的是, 即使在过量糖存在条件下, 糖酵解和三羧酸循环途径相关的很多基因的表达也出现上调, 表明细胞在乙醇胁迫下能量代谢对细胞活性是非常关键的。

与实验室菌株不同的是, 工业菌株还存在长期发酵条件下对胁迫条件的适应相关基因表达的变化, 而且相关基因很多都是在实验室酵母中没有发现的功能未知的新基因^[28], 这再次提示了不同菌株遗传背景和不同的环境条件对组学研究结果的影响。对胁迫耐受菌株与野生型的转录组学和/或蛋白组学比较研究, 可发现与胁迫反应和胁迫耐受性相关的基因和/或蛋白, 加深对胁迫耐受机理的认识, 同时通过对关键靶基因的改造, 可有效提高生产菌

的胁迫耐受性。如对实验室菌株和工业酿酒酵母菌株在 5%乙醇中转录组学分析揭示, 酪氨酸生物合成基因可能与乙醇耐性密切相关, 进一步对相关基因进行过量表达或者添加酪氨酸, 发现菌株对乙醇的耐受性的确得到了提高^[20]。目前国内外对乙醇、丁醇以及纤维素水解物中乙酸和糠醛等抑制性物质对生产菌株全基因组的表达影响研究非常活跃^[20-28], 这些研究揭示了大量差异表达的基因和蛋白, 为进一步深入研究提高生产菌株的胁迫耐受性, 选育生产效率提高的工业菌株提供了基础。

值得提出的是, 在系统生物学研究过程中, 对细胞基因组、转录组、蛋白组和代谢组等组学研究将获得大量的信息, 因此只有对所获得的信息进行深入挖掘和整合, 才有可能充分利用这些信息指导进一步的基因工程操作。Bonneau 等提出了通过对不同环境因素下基因组表达水平动态变化的研究寻找控制细胞功能网络模块的转录因子的路线, 对 400 多个微阵列数据进行分析, 建立了包括 72 个转录因子和 9 个环境因子的模型, 成功预测了未知环境影响下细胞转录组的动态变化, 证明了虽然复杂生物系统的描述给系统生物学研究带来了挑战, 但细胞内部代谢网络的变化与外部的环境扰动存在可预见的主要模式^[29], 同时, 这项研究也提示了利用系统生物学工具研究生物燃料生产菌的构建须紧密结合工业生产的实际环境条件, 强调了工业生产相关环境下菌株的生理性能在菌株构建中的重要作用^[2]。

2 合成生物学研究与生物燃料生产

虽然系统生物学可加深人类对复杂系统的认识, 但系统生物学研究往往揭示了多个基因对复杂系统的调控, 而对于多基因控制的系统进行代谢工程改造还存在周期长、效率低的问题, 因而菌种的选育往往还需要依赖传统的诱变、杂交以及菌种驯化等手段。虽然基因组改组和全局转录机制工程等技术可加快对微生物进行全基因组规模的改造, 但这些操作仍然属于非定向的改造, 因此仍需要筛选大量的突变体。如果说系统生物学工具使人们可以最大限度地利用细胞的合成潜能, 那么合成生物学的发展使人们可以利用物理学方法类似的模块构建

和组装形成新的生命有机体,从而人工设计新的高效生命系统进行生物燃料的生产。2010年5月,美国生物学家 Venter 实验小组宣布成功创造了世界上首个人造生命,即人工合成的 1.08 Mbp 丝状支原体 *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 基因组在山羊支原体 *Mycoplasma capricolum* 细胞中成功表达,使这一新产生的生命能自我生长、繁殖,这是合成生物学发展史上的里程碑^[30],标志着人工制造生命体的技术已进入了一个新的时代。

2.1 合成生物学与系统生物学和代谢工程

合成生物学的基本研究思路是利用生物零件 (Parts),如启动子、核糖体结合位点、RNA、酶编码基因等组装成装置 (Devices),即代谢途径或调解环路,并将装置进一步组建成生命系统 (Systems),包括根据人类的意愿从头设计合成新的生命过程或生命体,以及对现有生物体进行重新设计^[31]。合成生物学其核心是按照工程学的方法设计和改造生命系统,而且这个生命系统的特征是可以预测的。然而成功组建生命系统的前提是对复杂生命系统的深刻认识。系统生物学研究所获得的大量不同水平的信息可作为理解生命系统的基础,在这个基础上合成生物学才可能成功加工制作复杂的生物机器^[32]。

合成生物学与代谢工程操作存在部分交叉^[33]。代谢工程操作可以合并来自不同生物的已有的途径,并可以通过对已知途径的改造生产新的产品,但合成生物学与代谢工程的最大差别是,合成生物学设计的代谢通路可以是全新的,不受已有生命系统中的代谢路径的限制,即代谢途径的每一步都可以独立设计,目标是通过模块的搭建快速配置生物机器。这一点对于生物燃料的生产非常重要,因为无论是燃料乙醇、生物丁醇还是生物柴油,其生物合成都受到细胞内部代谢的严格调控,而从头设计代谢途径可以避免这种代谢调控,而且可以在所设计的每一步反应中使用来自不同宿主的酶,或者通过蛋白质的定向进化获得新的酶用于模块的搭建。

系统生物学、合成生物学和代谢工程研究都可以促进生物燃料的生产效率,但侧重点有所不同。如利用廉价底物,包括木质纤维素、糖蜜及其他农林废弃物等生产生物燃料的过程中,代谢工程操作

着眼于宿主细胞已有代谢途径的敲除和/或过量表达,以及对底物转运蛋白和产物转运过程的修饰,系统生物学的研究可提供宿主细胞已经代谢工程改造后的突变体细胞在不同培养条件和不同基因改造后的生理特征和产物合成情况,从而提供更多更有效的靶点用于代谢工程改造,而合成生物学则着眼于从头设计全新的代谢途径或全新的生命系统进行生物燃料的生产,同时也可以通过模块的优化和重建,改造原有的生命系统,进行生物燃料的有效生产。合成生物学与代谢工程的概念常被很多学者混淆,如在异源宿主中建立生物燃料的代谢途径,早期的代谢工程研究已有很多这样的例子,现在将其称之为合成生物学研究,但是简单地通过基因工程手段引入新的代谢途径,实质上并没有超越原来代谢工程定义的范畴。

2.2 合成生物学模块的优化与生物燃料生产

目前合成生物学还处于发展的初期阶段,其主要的限制性因素在于:1)对生物元件(包括酶蛋白和启动子等)特性的理解还不够深入;2)所构建的代谢通路的不可预测性,如对基因调节元件的不可控制性;3)多个条件环路存在时构建与检测的复杂性;4)不同元件的不可协调性;5)不同细胞间的可变性,由于细胞生理特性的差异导致构建的效果不一致^[34]。但近期相关研究为利用合成生物学研究生产生物燃料奠定了良好基础。利用合成生物学研究生物燃料生产有两个重要组成因素:一个是所使用的宿主细胞,其次是所针对的代谢途径^[35]。利用大肠杆菌和酵母菌细胞工厂生产生物燃料的代谢工程操作已取得了很大的进步,但藻类生物也将成为生物燃料生产的有利宿主。美国学者 James Liao 实验室将 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶基因在细长聚球藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 中过量表达,使这种蓝藻可以直接利用光能和 CO₂ 生产异丁醇^[36]。与生物柴油不同,工程藻产生的异丁醇容易回收,生产过程无须经过细胞破碎,极大地节省了成本,提高了生产效率,这也提示了蓝藻可作为未来合成生物学手段构建生物燃料生产宿主的一个理想选择。值得指出的是,以上研究中得到的异丁醇作为长链醇的一种,正成为新的生物燃料的研究热点。

长链醇是指包括含有四碳或五碳的直链醇或支链醇, 包括丁醇、异丁醇、异戊醇等。与乙醇相比, 长链醇具有更高的能量密度和更低的吸湿性, 更适合作为汽油代替品。

重建生物燃料合成途径的一个典型例子是在酵母菌中对丁醇代谢途径的搭建^[37]。美国加州大学伯克利分校的 Keasling 教授研究组研究了来自放线菌、大肠杆菌、酿酒酵母、梭菌等不同生物的不同酶基因组合由乙酰辅酶 A 合成丁醇的产量, 发现其中特定组合的酶可产生最高水平的丁醇 (2.5 mg/L)。虽然产量还非常低, 但是这项研究体现了利用合成生物学手段构建细胞系统中优化生物学元件的重要性。对长链醇的代谢工程研究为合成生物学优化也为搭建生物燃料代谢途径的模块优化提供了很好的借鉴。美国加州大学洛杉矶分校的 James Liao 研究组在大肠杆菌中引入了 2-酮酸脱氢酶 (KDCs) 和乙醇脱氢酶 ADH, 从而可利用宿主菌氨基酸合成的中间产物 2-酮酸生产多种长链醇^[38]。这项代谢工程研究的成功提示利用合成生物学手段建立新的代谢途径的可行性。

在生物制氢研究方面, Zhang 等利用 13 个酶的无细胞系统设计了自然情况下不存在的一系列反应生产了氢气, 氢气收率大大高于生物发酵制氢, 而且反应条件温和 (30℃, 常压)^[39]。反应中使用的这 13 个酶催化的途径是从头设计的, 虽然这个工作利用的是无细胞体系, 但这个设计思路可用于利用合成生物学手段构建能生产这些酶的细胞体系, 从而实现利用廉价的底物合成相关酶系, 进一步降低生产成本。

3 展望

过去几年见证了系统生物学和合成生物学的飞速发展, 以及系统生物学工具在生物燃料生产菌株构建方面的应用^[40-42]。系统生物学研究揭示了宿主在不同的发酵环境条件下和不同遗传改造后整体细胞代谢网络的调整情况, 有助于识别关键的靶基因进行代谢工程改造。利用合成生物学手段定向设计和构建高效生物燃料生产菌的研究还需要依赖系统生物学提供更多相关代谢途径和生产宿主的特性信

息, 以及基因组规模代谢工程操作对生物燃料合成途径的优化。

未来生物燃料生产菌株改造的一个重要目标是对木质纤维素资源的高效生物转化。纤维素是地球上来源最丰富的生物质资源, 可作为生物能源生产的廉价底物, 降低大规模生产的成本。利用纤维素原料首先需要利用纤维素酶等降解酶系将纤维素分子转变成可发酵利用的糖, 而里氏木霉 *Trichoderma reesei* 是重要的纤维素酶生产菌种, 其基因组序列的公布为相关的系统生物学研究奠定了良好的基础^[43], 但目前对丝状真菌的组学研究还不够深入, 相关的基因组规模的代谢模型和基因组工程改造还处于起步阶段^[44]。随着丝状真菌遗传改造系统的不断完善, 以及利用蛋白质工程人工设计酶分子技术的进步, 提高纤维素酶的产量, 以及优化复合酶系统的组分比例, 提高纤维素酶的活力等目标将逐步实现, 纤维素生物物质的高效转化将成为可能^[45]。近年来通过异源表达纤维素酶降解酶系, 已经在不同宿主系统中实现了纤维素原料的有效利用。美国加州大学伯克利分校的 Keasling 研究组通过整合木聚糖酶基因实现了在大肠杆菌生产生物柴油^[46], 酵母菌细胞展示技术也可提供高效的降解酶系进行燃料乙醇的生产^[47], 这些代谢工程研究的成功为未来利用合成生物学手段建立高效纤维素生物物质转化的细胞工厂提供了基础。高效共发酵五碳糖和六碳糖的发酵菌株的构建也是未来生物燃料生产宿主构建的一个重点。自然环境中存在的某些微生物可以有效分解纤维素原料, 寻找高效的降解酶系或者定向改造纤维素降解酶系, 将为合成生物学构建高效菌株提供更好的生物组件。

可以预见, 随着系统生物学研究的不断发展和更多组学数据的获得, 以及合成生物学研究的不断成熟, 更高效的生物燃料生产宿主将成功构建, 生物物质转化效率将大幅度提高, 生物能源生产过程的经济性也将得到明显提高, 从而使生物燃料能得到更广泛的生产和应用。

REFERENCES

- [1] Lynd LR, Laser MS, Bransby D, *et al.* How biotech can

- transform biofuels. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**: 169–172.
- [2] Zhang Y, Zhu Y, Zhu Y, *et al.* The importance of engineering physiological functionality into microbes. *Trends Biotechnol*, 2009, **27**: 664–672.
- [3] Na D, Kim TY, Lee SY. Construction and optimization of synthetic pathways in metabolic engineering. *Curr Opin Microbiol*, 2010, **13**: 363–370.
- [4] Jarboe LR, Grabar TB, Yomano LP, *et al.* Development of ethanologenic bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007, **108**: 237–261.
- [5] Jin YS, Alper H, Yang YT, *et al.* Improvement of xylose uptake and ethanol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an inverse metabolic engineering approach. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 8249–8256.
- [6] Shi DJ, Wang CL, Wang KM. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, **36**: 139–147.
- [7] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, *et al.* Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, **314**: 1565–1568.
- [8] Zhao XQ, Jiang RJ, Bai FW. Directed evolution of promoter and cellular transcription machinery and its application in microbial metabolic engineering—a review. *Chin J Biotech*, 2009, **25**: 1312–1315.
- 赵心清, 姜如娇, 白凤武. 启动子和细胞全局转录机制的定向进化在微生物代谢工程中的应用. *生物工程学报*, 2009, **25**: 1312–1315.
- [9] Lee SY, Lee DY, Kim TY. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol*, 2005, **23**: 349–358.
- [10] Kim TY, Sohn SB, Kim HU. Strategies for systems-level metabolic engineering. *Biotechnol J*, 2008, **3**: 612–623.
- [11] Otero JM, Nielsen J. Industrial systems biology. *Biotech Bioeng*, 2010, **105**: 439–447.
- [12] Bro C, Regenber B, Förster J, *et al.* In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab Eng*, 2006, **8**: 102–111.
- [13] Bengtsson O, Jeppsson M, Sonderegger M, *et al.* Identification of common traits in improved xylose-growing *Saccharomyces cerevisiae* for inverse metabolic engineering. *Yeast*, 2008, **25**: 835–847.
- [14] Karhumaa K, Pählman AK, Hahn-Hägerdal B, *et al.* Proteome analysis of the xylose-fermenting mutant yeast strain TMB 3400. *Yeast*, 2009, **26**: 371–382.
- [15] Argueso JL, Carazzolle MF, Mieczkowski PA, *et al.* Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res*, 2009, **19**: 2258–2270.
- [16] Fischer CR, Klein-Marcuschamer D, Stephanopoulos G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab Eng*, 2008, **10**: 295–304.
- [17] Nicolaou SA, Gaida SM, Papoutsakis ET. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metab Eng*, 2010, **12**: 307–331.
- [18] Zhao XQ, Bai FW. Mechanism of yeast ethanol tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J Biotechnol*, 2009, **27**: 849–856.
- [19] Mao S, Luo Y, Zhang T, *et al.* Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield. *J Proteome Res*, 2010, **9**: 3046–3061.
- [20] Hirasawa T, Yoshikawa K, Nakakura Y, *et al.* Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *J Biotechnol*, 2007, **131**: 34–44.
- [21] Pham TK, Wright PC. The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation. *J Proteome Res*, 2008, **7**: 4766–4774.
- [22] Li BZ, Yuan YJ. Transcriptome shifts in response to furfural and acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86**: 1915–1924.
- [23] Lin FM, Qiao B, Yuan YJ. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**: 3765–3776.
- [24] Ding MZ, Tian HC, Cheng JS, *et al.* Inoculum size-dependent interactive regulation of metabolism and stress response of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by comparative metabolomics. *J Biotechnol*, 2009, **144**: 279–286.
- [25] Alexandre H, Ansanay GV, Dequin S, *et al.* Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 2001, **498**: 98–103.
- [26] Chandler M, Stanley GA, Rogers P, *et al.* A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol*, 2004, **54**: 427–454.
- [27] Wu H, Zheng X, Araki Y, *et al.* Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. *Appl Environ*

- Microbiol*, 2006, **72**: 7353–7358.
- [28] Marks VD, Sui H, Erasmus D, *et al.* Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Res*, 2008, **8**: 35–52.
- [29] Bonneau R, Facciotti MT, Reiss DJ, *et al.* A predictive model for transcriptional control of physiology in a free living cell. *Cell*, 2007, **131**: 1354–1365.
- [30] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010. DOI: 10.1126/science.1190719.
- [31] Wang JS, Qi QS. Synthetic biology for metabolic engineering: a review. *Chin J Biotech*, 2009, **25**: 1296–1302.
王俊姝, 祁庆生. 合成生物学与代谢工程. *生物工程学报*, 2009, **25**: 1296–1302.
- [32] Barrett CL, Kim TY, Kim HU, *et al.* Systems biology as a foundation for genome-scale synthetic biology. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17**: 488–492.
- [33] Prather KLJ, Martin CH. *De novo* biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, **19**: 468–474.
- [34] Kwok R. Five hard truths for synthetic biology. *Nature*, 2010, **463**: 288–290.
- [35] Khalil AS, Collins J. Synthetic biology, applications come of age. *Nat Rev Genet*, 2010, **11**: 367–379.
- [36] Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol*, 2009, **27**: 1177–1180.
- [37] Steen EJ, Chan R, Prasad N, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb Cell Fact*, 2008, **7**: 36.
- [38] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, **452**: 86–90.
- [39] Zhang YHP, Evans BR, Mielenz JR, *et al.* High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway. *PLoS ONE*, 2007, **2**: e456. doi:10.1371/journal.pone.0000456.
- [40] Mukhopadhyay A, Redding AM, Rutherford BJ, *et al.* Importance of systems biology in engineering microbes for biofuel production. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, **19**: 228–234.
- [41] Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb Cell Fact*, 2010, **9**: 3.
- [42] Clomburg JM, Gonzalez R. Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86**: 419–434.
- [43] Martinez D, Berka RM, Henrissat B. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol*, 2008, **26**: 553–560.
- [44] Jouhten P, Pitkänen E, Pakula T, *et al.* ¹³C-metabolic flux ratio and novel carbon path analyses confirmed that *Trichoderma reesei* uses primarily the respirative pathway also on the preferred carbon source glucose. *BMC Syst Biol*, 2009, **3**: 104.
- [45] Wen F, Nair N, Zhao H. Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, **20**: 412–419.
- [46] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, *et al.* Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, **463**: 559–562.
- [47] Wen F, Sun J, Zhao H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 2010, **76**: 1251–1260.