

## PEMAJUAN BIOLOGI SINTETIK MIKROB DALAM MEMACU KERANGKA BIOLOGI KEJURUTERAAN (ENGBio) DAN BIOEKONOMI KITARAN DI MALAYSIA

## ADVANCING MICROBIAL SYNTHETIC BIOLOGY TO DRIVE ENGINEERING BIOLOGY (ENGBio) AND CIRCULAR BIOECONOMY DEVELOPMENT IN MALAYSIA

Matthlessa Matthew Minggu<sup>a,b</sup>, Nur Anisza Hanoum Naseron<sup>a,c</sup>, Peer Mohamed Abdul<sup>d,e</sup>, Zool Hilmi Ibrahim<sup>f</sup>, Kumar Sudesh<sup>g,h</sup>, Ahmad Bazli Ramzi<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Institut Biologi Sistem (INBIOSIS), Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>b</sup>Natural Resources and Environment Board Sarawak, 18th-20th Floor, Menara Pelita, Jalan Tun Abdul Rahman Yaakub, Petra Jaya, 93050 Kuching, Locked Bag 2103, Sarawak, Malaysia

<sup>c</sup>Politeknik Nilai, Kompleks Pendidikan Nilai, Bandar Enstek, 71760 Labu, Negeri Sembilan, Malaysia

<sup>d</sup>Jabatan Kejuruteraan Kimia dan Proses, Fakulti Kejuruteraan dan Alam Bina, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>e</sup>Pusat Penyelidikan Teknologi Proses Mampan (CESPRO), Fakulti Kejuruteraan dan Alam Bina, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>f</sup>Petronas Research Sdn Bhd (PRSB), Lot 3288 & 3289, Off Jalan Ayer Itam, Kawasan Institusi Bangi, 43000, Kajang, Selangor, Malaysia

<sup>g</sup>Ecobiomaterial Research Laboratory, School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Gelugor, Penang, 11800, Malaysia

<sup>h</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

### Article history

Received

28 March 2025

Received in revised form

7 August 2025

Accepted

8 August 2025

Published Online

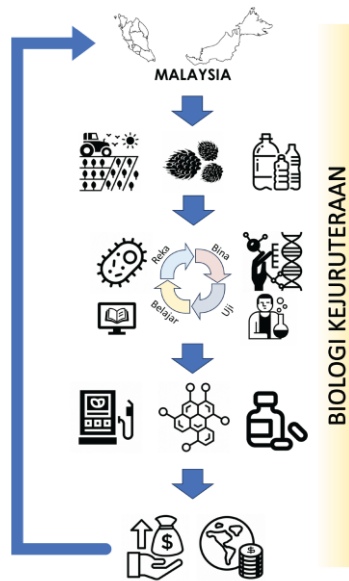
16 June 2026

\*Corresponding author  
bazliramzi@ukm.edu.my

### Abstract

Environmental sustainability is very important to ensure the country's sustainable economic development in the long term. Advances in synthetic biology and microbial engineering have grown rapidly to meet the global need to develop sustainable and effective biological-based products (bioproducts) via Engineering Biology (EngBio) framework. Bioproduction and biorefining methods, which use renewable raw materials such as plant biomass and industrial waste to produce biological products,

## Graphical abstract



can be used as modular platforms to produce low carbon bioproducts. Guided by the cyclical bioeconomic model, this review study focuses on using synthetic biology and microbial engineering in the research and production of bioproducts, especially for studies involving local research groups. Emphasis is placed on the development of microorganisms as chassis and genetic building blocks that can be used in biotransformation and biomanufacturing, such as the production of monomers, polymers, and bio-based fuels. The important role of synthetic biology and microbial engineering in helping the development of sustainable bioproducts and circular bioeconomy in Malaysia was also discussed to provide a framework for synthetic biology and EngBio in Malaysia, in line with the Malaysian Biotechnology Policy 2.0 (2022–2030).

**Keywords:** Microbial synthetic biology, Engineering Biology, biomanufacturing, biosynthesis of monomers and polymers, biofuels, low-carbon bioproducts, circular bioeconomy

## Abstrak

Kelestarian alam sekitar adalah amat penting untuk memastikan pembangunan ekonomi negara yang mampan dalam jangka masa panjang. Kemajuan dalam bidang biologi sintetik dan kejuruteraan mikrob telah berkembang pesat untuk memenuhi keperluan global bagi pembangunan produk berasaskan biologi (bioproduk) melalui kerangka Biologi Kejuruteraan (EngBio). Kaedah biopengeluaran dan biopenapisan, yang menggunakan bahan mentah boleh diperbaharui seperti biojisim tumbuhan dan sisa industri untuk menghasilkan produk biologi, boleh dijadikan platform bermodul bagi penghasilan bioproduk karbon rendah. Berpandukan model bioekonomi kitaran, kajian ulasan ini memberi tumpuan kepada penggunaan biologi sintetik dan kejuruteraan mikrob dalam penyelidikan and penghasilan bioproduk terutamanya bagi kajian melibatkan kumpulan penyelidikan tempatan. Penekanan diberikan kepada pembangunan mikroorganisma sebagai casis dan blok binaan genetik yang boleh digunakan dalam biotransformasi dan biopembuatan, seperti penghasilan monomer, polimer dan bahan api berasaskan biologi. Peranan penting biologi sintetik dan kejuruteraan mikrob dalam membantu pembangunan bioproduk lestari dan bioekonomi kitaran di Malaysia turut dibincangkan untuk menyediakan rangka kerja biologi sintetik dan ekosistem EngBio di Malaysia, selari dengan Dasar Bioteknologi Malaysia 2.0 (2022–2030).

**Kata kunci:** Biologi sintetik mikrob, Biologi Kejuruteraan (EngBio), biopembuatan, biosintesis monomer dan polimer serta biofuel, bioproduk rendah karbon, bioekonomi kitaran

© 2026 Penerbit UTM Press. All rights reserved

## 1.0 PENGENALAN

Di bawah Dasar Bioteknologi Negara (DBN), kerajaan Malaysia memberi tumpuan terhadap inisiatif sains kepada perniagaan untuk memanfaatkan pertumbuhan pesat sektor biologi dan teknologi untuk transformasi dan pembangunan ekonomi [1], [2]. Dasar DBN dilaksanakan dalam tiga fasa sepanjang 15 tahun. Fasa ini melibatkan pembangunan kapasiti (2005-2010), sains kepada perniagaan (2011-2015) dan memperkenalkan syarikat Malaysia ke peringkat global (2016-2020) [2]. Kajian Impak DBN dari 2005 hingga 2020 mendapati industri bioteknologi telah berjaya meningkatkan bilangan syarikat tempatan bertaraf dunia, mewujudkan banyak peluang pekerjaan dan menyumbang 5% kepada Keluaran Dalam Negeri Kasar (KDNK) negara [3]. Selaras dengan Rancangan Malaysia Kedua Belas, kerajaan Malaysia telah memperkenalkan Dasar Bioteknologi

Malaysia 2.0 (2022–2030) sebagai kesinambungan daripada DBN 2005-2020 [3]. Untuk mengurangkan pergantungan kepada sumber tenaga fosil dan mencapai pelepasan sifar karbon menjelang 2050, Pelan Tindakan Biojisim Kebangsaan menggalakkan penggunaan produk pertanian dan tenaga [4]. Untuk menjadikan Malaysia sebuah negara bioinovasi berteknologi tinggi yang maju, makmur, inklusif dan mampan menjelang 2030, dasar ini akan menyokong pertumbuhan sektor bioekonomi negara dengan tumpuan kepada pembangunan ekosistem bioteknologi moden tempatan. Salah satu komponen utama ekosistem ini adalah pemerkasaan sektor bioindustri tempatan melalui kegiatan R&D&I&C antara institusi tempatan dengan kerjasama industri.

Di peringkat global, penggunaan teknologi terkehadapan seperti biologi sintetik dan kejuruteraan metabolik telah membolehkan penyelesaian berasaskan biologi secara pantas

seiring dengan keperluan bioekonomi yang lestari. Sehubungan ini, kajian rumusan ini memfokuskan kepada aplikasi biologi sintetik bagi pembangunan strem dan enzim ke arah penghasilan ekonomi kitaran dalam industri biojistik dan pengurusan sisa pepejal di negara ini. Penekanan diberikan terhadap enzim rekombinan dan sebatian bio-kimia seperti bioplastik dan biobahan api yang terhasil daripada mikrob terubahsuai secara biologi.

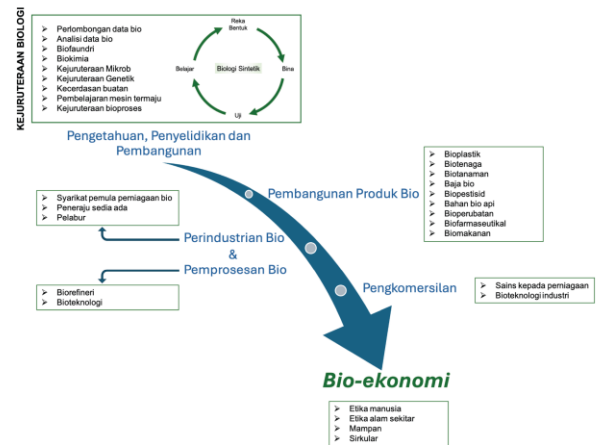
## 2.0 BIOLOGI KEJURUTERAAN (EngBio) UNTUK INOVASI MAMPAN

### 2.1 Aplikasi Biologi Sintetik Dalam Pembangunan Ekosistem Biologi Kejuruteraan (EngBio)

Pembangunan bioekonomi melalui bioteknologi dan biokejuruteraan semakin didorong oleh kemajuan dalam teknologi terkehadapan merangkumi bidang biologi sintetik, kejuruteraan mikrob, sains data, pembelajaran mesin termaju serta kecerdasan buatan. Biologi sintetik secara umumnya ditakrifkan dengan rekabentuk bahagian, peranti dan sistem biologi dan rekabentuk semula sistem biologi sedia ada [5]. Bidang biologi sintetik dan biokejuruteraan telah berkembang dan telah dijadikan sebagai teknologi pemboleh bagi pembangunan ekosistem Biologi Kejuruteraan (EngBio) yang menekankan pembangunan dan pengkomersialan produk sebagai bio-solusi [6]. Secara prinsipnya, EngBio ditakrifkan sebagai penerapan prinsip kejuruteraan seperti modulariti, penyeragaman dan reka bentuk boleh ramal kepada sistem biologi melalui pendekatan biologi sintetik bagi menghasilkan penyelesaian bioteknologi yang boleh diskala dan lestari [7], [8]. Ekosistem inovasi EngBio merangkumi pembangunan strem atau bioproduct yang dibangunkan melalui kitaran lalaran Rekabentuk-Bina-Uji-Belajar (DBTL) dan peningkatan skala bioproduct tersebut menggunakan kaedah bioproses dan biopembuatan [9].

Teknologi berasaskan biologi sintetik sedang giat diperluaskan bagi pembangunan inovasi karbon-rendah yang bukan sahaja dapat membantu mengurangkan kebergantungan pada bahan api fosil, tetapi ia juga berpotensi untuk memodenkan sektor perindustrian untuk menjadi hijau dan mampan [9].

Untuk beralih daripada konsep idea saintifik kepada penghasilan bioproduct memerlukan penyelidikan yang berterusan, pertukaran ilmu pengetahuan dan kerjasama di antara para penyelidik. Dalam usaha untuk memaksimumkan manfaat EngBio dalam mendorong pertumbuhan berlandaskan bioekonomi yang holistik dan rendah karbon, penglibatan dan kerjasama aktif antara semua pihak berkepentingan seperti komuniti saintifik, pihak kerajaan dan pelabur adalah faktor penentu utama (Rajah 1).

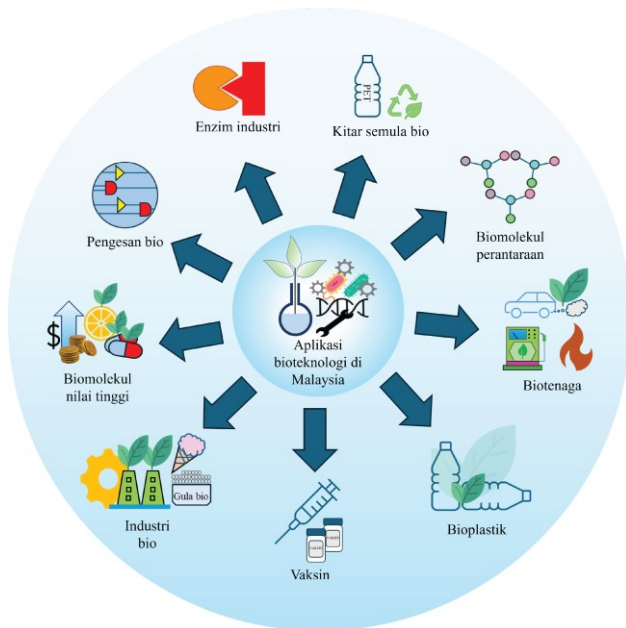


**Rajah 1** Gambaran ringkas ekosistem bioekonomi berasaskan Biologi Kejuruteraan (EngBio) menggunakan Biologi Sintetik sebagai teknologi pemboleh

### 2.2 Mikrob Dan Enzim Sebagai Bio-Solusi Kepada Permasalahan Tempatan

Mikroorganisma dan enzim merupakan biomangkin mesra alam, selamat dan berkesan untuk tindak balas kimia dan biokimia. Mikrob boleh digunakan secara langsung atau kejuruteraan genetik untuk menghasilkan pelbagai biokimia semasa proses pembuatan bahan bio. Enzim adalah pemangkin semula jadi yang sangat spesifik. Ia secara selektif mengaktifkan tindak balas kimia dengan protein tanpa memerlukan tenaga atau pelarut organik [10]. Kepakaran penyelidik Malaysia dalam pelbagai bidang bioteknologi, seperti biologi sintetik, biologi molekul, dan kejuruteraan genetik, telah memperkukuh pembangunan mikroorganisma dan enzim untuk inovasi bioteknologi.

Inovasi ini merangkumi pembangunan strem dan enzim sebagai bio-solusi untuk aplikasi biopenukaran, biopembuatan dan bio-kitar semula, yang menonjolkan potensi Malaysia dalam bidang sains dan teknologi. Dalam kerangka 10-10 MySTIE, teknologi mikrob dan enzim telah diutamakan sebagai sebahagian daripada kategori teknologi biosains [11]. Rajah 2 menunjukkan himpunan bioproduct yang telah dilaporkan oleh kumpulan-penyelidikan di Malaysia menggunakan teknologi biosains.



**Rajah 2** Himpunan bioproduct yang dihasilkan di Malaysia menggunakan teknologi biosains

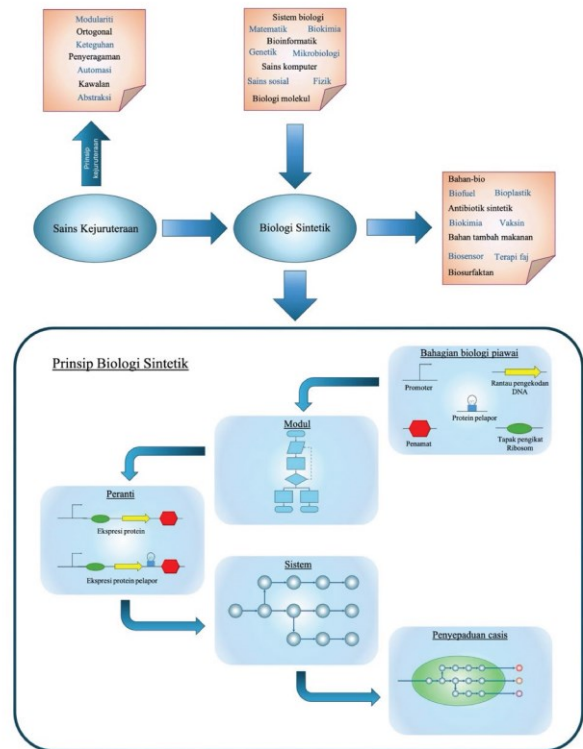
### 2.3 Biologi Sintetik Sebagai Teknologi Pendaya Baharu Di Malaysia

Sejak kemunculannya pada tahun 2000, biologi sintetik telah berkembang pesat sebagai bidang transdisiplin yang dinamik, menggabungkan pelbagai bidang biologi, kejuruteraan dan pemodelan komputer untuk mereka bentuk bahagian biologi baru, peranti dan sistem biologi sedia ada agar menjadikan sistem biologi kejuruteraan lebih sistematik dan boleh diramal [8], [12]. Untuk meningkatkan prestasi organisma dan laluan biologi, prinsip asas biologi sintetik menekankan reka bentuk rasional, modulariti dan penyeragaman [8]. Aplikasi pendekatan biologi sintetik, terutamanya dalam kawalan ekspresi gen yang diprogramkan di peringkat pengawalseliaan telah berjaya dalam meningkatkan keupayaan untuk mereka bentuk dan mengoptimumkan sistem biologi dengan lebih berkesan [13].

Penggunaan mikrob sebagai platform utama dapat menghasilkan dan meningkatkan pengeluaran pelbagai jenis produk berasaskan biologi dengan cara yang lebih sistematik dan bermodul seperti dalam Rajah 3.

Dalam biologi sintetik, casing mikrob merupakan organisma hidup yang menyediakan rangka kerja selular untuk pembangunan laluan genetik bagi penghasilan produk yang dikehendaki [8]. Pemilihan casing mikrob yang ideal adalah penting dalam biologi sintetik untuk mempertingkatkan kecekapan pengeluaran produk biologi [14], [15], [16]. Casing mikrob yang ideal perlu mempunyai beberapa sifat penting, termasuk maklumat genetik yang diketahui, keperluan pemakanan yang mudah, toleransi terhadap tekanan, kadar pertumbuhan yang pesat,

alat untuk manipulasi genom, sistem rembesan yang cekap dan ketahanan terhadap keadaan yang melampau [17], [18].



**Rajah 3** Gambaran skematik bagi prinsip dan aplikasi biologi sintetik

Biologi sintetik juga membolehkan reka bentuk dan pembinaan laluan metabolik baru dengan menggabungkan bahagian genetik daripada organisma yang berbeza. Kejuruteraan genetik, teknik penyuntingan genom dan penggunaan alat perkomputeran merupakan komponen penting dalam menghasilkan bahan kimia yang dikehendaki dengan prestasi tinggi (Rajah 3).

Alat reka bentuk bantuan komputer telah merevolusikan bidang biologi sintetik dengan membolehkan mereka bentuk dan mengoptimumkan sistem biologi secara tepat. Penyelidik menggunakan alatan bioinformatik dan in siliko untuk menganalisis dan memanipulasi urutan DNA, sementara model perkomputeran digunakan untuk meramalkan kelakuan sistem kejuruteraan [12], [19], [20]. Alat perisian seperti SnapGene [21] dan Benchling [22] sering digunakan bagi proses mereka bentuk konstruk plasmid dan menyediakan simulasi eksperimen secara in siliko, sekali gus meningkatkan kecekapan dan kebolehulangan proses pembinaan pembangunan stren. OptKnock [23] dan COBRA [24] membantu penyelidik memodelkan rangkaian, meramal dan mengenal pasti laluan kesesakan untuk mengoptimumkan laluan metabolik untuk penghasilan molekul sasaran [10]. GECKO 3.0 pula

membantu dalam mereka bentuk mikrob sintetik yang lebih cekap dengan mensimulasikan pengaruh had enzim dan kapasiti protein terhadap keberkesanan laluan metabolik yang direka [25], [26]. Dengan mengoptimalkan reka bentuk laluan sintetik melalui model perkomputeran dan alat bioinformatik, masa dan sumber yang diperlukan untuk ujian eksperimen dapat dikurangkan [10], [20], [21].

Pendekatan terkini menggabungkan biologi sintetik dan kecerdasan buatan (AI) termasuk pembelajaran mesin (ML) untuk meningkatkan keupayaan dalam pengoptimuman penghasilan sesuatu biomolekul melalui peramalan dan simulasi laluan biosintetik dan reka bentuk konstruk bagi setiap kitaran DBTL. Dengan menggunakan set data experimental dan data simulasi, aplikasi berasaskan ML yang dipanggil *Automated Recommendation Tool* (ART) telah dibangunkan [26]. Melalui model ramalan keberangkalian (*probabilistic predictive model*), platform ART telah membolehkan penyelidik untuk membuat simulasi penghasilan metabolit dan seterusnya menghasilkan stren mikrob terjurutera metabolik melalui kitaran DBTL bersepadu [26]. Penggunaan kaedah ML dalam kejuruteraan metabolik in siliko menggunakan algoritma-algoritma metahueristik (*metaheuristic algorithms*) telah dibangunkan oleh kumpulan penyelidik tempatan. Antaranya, kaedah *Particle Swarm Optimization Minimization of Metabolic Adjustment* (PSOMOMA) telah digunakan bagi penentuan kadar pertumbuhan dan penghasilan asid suksinik tertinggi dalam *Escherichia coli* terubahsuai secara biologi

[27]. Gen-gen yang perlu dinyahaktifkan seperti *ackA*, *pta*, *ghrA* dan *dctA* dapat diramal secara in siliko bagi simulasi kadar fluks tertinggi terhadap penghasilan asid suksinik [27]. Pendekatan baharu menggunakan Algoritma Bersepadu berdasarkan Kebolehpercayaan (*Reliability-Based Integrating algorithm*) atau dikenali sebagai algoritma RBI, telah membolehkan simulasi pembangunan stren mutan *E. coli* dan *Saccharomyces cerevisiae* [28]. Dengan mengguna pakai dataset sedia ada termasuk model metabolik berskala genom (*genom-scale metabolic model*; GSMM), rangkaian pengawal atur (*gene regulatory networks*; GRNs) dan data pengekspresan gen, simulasi pertumbuhan (penghasilan biojisim) dapat dilaksanakan selain penghasilan terbanyak bagi asid suksinik dalam *E. coli* dan etanol dalam *S. cerevisiae* [28]. Kebolehan dalam membuat simulasi stren akan membantu proses pemilihan set gen-gen secara optimum dan pantas dan tanpa memerlukan pelaksanaan aktiviti makmal basah (*wet lab*) yang memakan masa dan kos. Justeru, penggabungan peralatan in siliko dalam strategi kejuruteraan stren memainkan peranan penting dalam proses pembangunan dan pemprototaipan bioproduct secara pantas dan bersepadu.

#### 2.4 Pembangunan Stren dan Enzim Rekombinan Sebagai Agen Pengurai Biojisim Tumbuhan

Teknologi penghasilan enzim rekombinan melalui kejuruteraan mikrob dan bioproses memainkan peranan penting dalam bioteknologi industri.

**Jadual 1** Penghasilan enzim dengan kepelbagaian kefungsiannya bagi kegunaan industri melalui kejuruteraan genetik oleh kumpulan-kumpulan di Malaysia

Jenis enzim	Casis	Strategi kejuruteraan	Aplikasi	Sumber rujukan
Lipase termostabil	<i>Pichia pastoris</i> stren GS115 (his4)/ plasmid pPICZaA	Ekspre gen L2 lipase termostabil daripada <i>Bacillus</i> sp. L2 termofilik	Detergen, pembangunan perisa, biosensor dan perawatan sisa air	[31]
Lipase	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ekspre gen <i>GlaEst1</i> , enzim lipase yang sensitif kepada hormon daripada <i>Glaciozyma antarctica</i>	Biokatalisis	[32]
Hemiselulase xilanase termostabil	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspre gen xilanase (xyng) ekstraselular daripada <i>Aspergillus fumigatus</i> af293 menggunakan isyarat peptida M5 pada graphene oksida oleh sel <i>E. coli</i> yang tidak bergerak	Biokatalisis	[33]
Hemiselulase xilanase	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspre Endo-1,4- $\beta$ -xilanase daripada <i>Aspergillus fumigatus</i> pada <i>E. coli</i> dengan menggunakan protein nukleasi ais <i>Erwinia ananas</i> (InaA)	Prebiotik, pemanis tiruan, suplemen dalam makanan ternakan	[34]
	<i>Lactococcus lactis</i>	Ekspre xilanase dengan peptida isyarat USP45 daripada protein rembesan laktokokus, USP45 dan Spk1 daripada <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Enzim hidrolitik	[35]

Jenis enzim	Casis	Strategi kejuruteraan	Aplikasi	Sumber rujukan
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspresi xilanase pada <i>E. coli</i> melalui protein nukleasi ais terpotong <i>Erwinia ananas</i> IN-10 (InaA)	Enzim hidrolitik	[36]
Hemiselulase	<i>P. pastoris</i> X-33	Ekspresi gen $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AnabfA) daripada <i>Aspergillus niger</i> ATCC 120120	Hidrolisis hemiselulosa kenaf	[37]
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspresi enzim $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (Abfa) ekstraselular daripada <i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08 menggunakan peptida isyarat M5	Industri pulpa dan kertas, agen peluntur, sintesis oligosakarida dan prarawatan lignoselulosa	[38]
Selulase $\alpha$ -amilase	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> stren SO	Ekspresi gen SR74 $\alpha$ -amilase daripada <i>Geobacillus stearothermophilus</i> SR74 tanpa penggunaan metanol	Biokatalisis	[39]
Selulase	<i>P. pastoris</i>	Ekspresi selobiohidrolase (CbhlI), endoglukanase (EglB) dan $\beta$ -glukosidase (BglA) daripada <i>Trichoderma virens</i>	Enzim hidrolitik untuk hidrolisis biojisim tandan kosong kelapa sawit	[40]
	<i>P. pastoris</i> X-33	Ekspresi gen selobiohidrolase 7B (CBH7B) daripada kulat termofilik <i>Thielavia terrestris</i>	Hidrolisis selulosa	[41]
	<i>P. pastoris</i>	Ekspresi gen selobiohidrolase daripada <i>Humicola insolens</i> ATCC16454	Hidrolisis selulosa	[42]
Xilitol	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspresi gen xilitol-5-fosfat dehidrogenase (XPDH) daripada <i>Clostridium difficile</i>	Gula bio	[43]
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspresi gen xilosa reduktase (XR) daripada <i>Neurospora crassa</i> dalam sel <i>E. coli</i> yang tidak bergerak pada nanotiub karbon berbilang dinding	Gula bio	[44]
Protein antibeku	<i>P. pastoris</i>	Ekspresi gen Afp1 daripada <i>Glaciozyma antarctica</i>	Bahan tambah makanan, perubatan	[45]
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspresi gen AFP4 daripada <i>Geobacillus antarctica</i> P112	Bahan tambah makanan, perubatan	[46]
Malto-oligosakarida (MOS)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ekspresi gen siklodekstrin glukano transferase (CGTase) dan maltogenik amilase (MAG1) daripada <i>Bacillus lehensis</i> G1	Pengganti gula dan lemak, pengawet tiruan, enkapsulasi bahan makanan dan agen anti-staling	[47]
Enzim bercabang glikogen (glgB)	<i>E. coli</i> BL21 Star™ (DE3)	Ekspresi enzim glikogen bercabang Geo-05 daripada <i>G. mahadia</i>	Pemprosesan makanan dan minuman, industri nutraseutikal	[48]
Enzim L-laktat dehidrogenase	<i>E. coli</i> SZ85	Ekspresi berlebihan gen L-lidh daripada <i>E. faecalis</i> KK1	Industri makanan, farmaseutikal, perubatan, dan pertanian	[49]

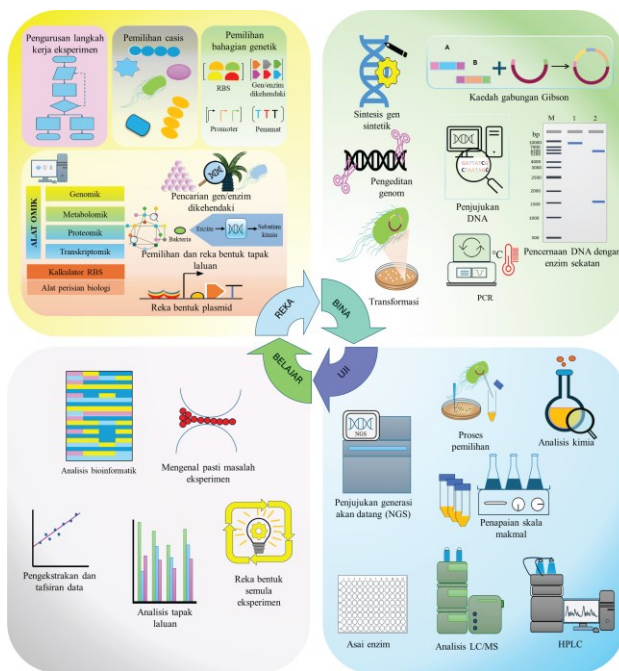
Enzim lipase memainkan peranan penting dalam pelbagai proses biokimia dan mempunyai aplikasi yang luas dalam industri termasuk detergen, tambahan makanan dan bioremediasi [29]. Enzim pengurai biojisim berlignoselulosa seperti selulase dan hemiselulase adalah penting untuk menguraikan lignoselulosa kepada monosakarida

[30]. Dalam industri makanan, enzim seperti protein antibeku dan L-laktat dehidrogenase digunakan untuk mengawet makanan, meningkatkan rasa, tekstur dan memanjangkan jangka hayatnya [29]. Beberapa enzim industri utama, seperti lipase, enzim pengurai lignoselulosa dan enzim untuk teknologi makanan dan biopenukaran biojisim tumbuhan,

telah dihasilkan oleh penyelidik di Malaysia (Jadual 1).

## 2.5 Kerangka Reka Bentuk-Bina-Uji-Belajar (DBTL) Untuk Pemprototaipan Pantas

Gabungan biologi sintetik dan kejuruteraan mikrob dijangka akan mempercepatkan pembangunan kilang sel mikrob yang berkesan untuk aplikasi biopembuatan yang mampan dan bioekonomi kitaran, seterusnya menyokong matlamat DBN 2.0 untuk memajukan produk berasaskan bio di Malaysia. Rangka kerja iteratif DBTL merupakan antara komponen utama yang digunakan dalam EngBio bagi pemprototaipan pantas bioproduk seperti protein, enzim dan stren [22], [50]. Rajah 4 menunjukkan cara kitaran DBTL mempercepatkan pembangunan dan pengoptimuman stren mikrob melalui kaedah dan aplikasi biologi sintetik dan sel sintetik.



**Rajah 4** Kitaran iteratif DBTL bagi pembangunan stren dan enzim menggunakan strategi biologi sintetik

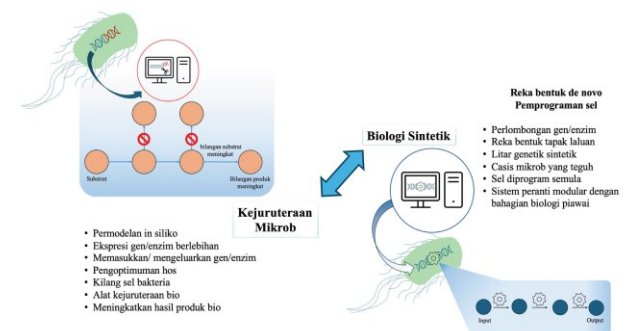
Kerangka DBTL ini telah menjadi platform penyambung dan pemula bagi kerjasama berasaskan kerjasama penyelidikan menggunakan instrumen dan fasiliti automatik dan bersepadu yang dipanggil sebagai biofoundri (*biofoundry*) [51]. Fasiliti biofoundri ini telah digunakan untuk penghasilan prototaip secara pantas seperti yang dilaporkan daripada kumpulan penyelidikan di UK dan US di mana sebatian bio-monomer dan bio-farmaseutikal berjaya dihasilkan kurang daripada 90 hari [52], [53]. Selari dengan ini, UKM Biofoundry telah ditubuhkan untuk merencanakan kegiatan R&D&I berlandaskan fasiliti biofoundri untuk meningkatkan kapasiti

pembangunan stren dan enzim secara bersepadu dan automasi di Malaysia [54].

## 2.6 Pembangunan Stren Untuk Penghasilan Bioproduk Karbon Rendah

Bagi penghasilan bio-produk secara lestari, penekanan kini adalah terhadap pembangunan produk karbon rendah selari dengan konsep bioekonomi kitaran [55]. Berikutan permintaan tinggi dan keperluan semasa terhadap proses dengan jejak karbon rendah, sektor industri utama termasuk sektor kimia, minyak dan gas makin menekankan penggunaan bahan-bahan dan proses yang lebih mesra alam dan mampan melalui sistem gelung tertutup terutamanya dari segi pengurangan pembebasan gas CO<sub>2</sub> secara jitu dan menyeluruh [56]. Produk-produk alternatif kepada bahan bersumberkan fosil seperti plastik, bahan api, bahan material dan komoditi kimia kini telah mendapat permintaan tinggi terutamanya untuk bioekonomi kitaran menggunakan proses pembuatan neutral karbon dan negatif karbon selain daripada pengurangan sisa dan penghasilan plastik terbiodegradasikan [57], [58].

Penghasilan monomer bersumberkan biologi dan polimer boleh terbiodegradasi seperti bio-monomer plastik dan biopolimer dapat dilaksanakan menggunakan teknologi kejuruteraan mikrob, bioproses dan biologi sintetik (Rajah 5).



**Rajah 5** Sinergi antara biologi sintetik dan kejuruteraan mikrob untuk aplikasi bioteknologi industri dan inovasi karbon rendah

Antara biopolimer yang makin mendapat perhatian adalah polihidroksialkanoat (PHA), iaitu sejenis bioplastik terbiodegradasikan yang dihasilkan oleh bakteria sebagai tenaga dan sumber karbon intraselular [59], [60], [61]. Banyak kajian telah menggunakan biojisim lignoselulosa daripada sisa pertanian dan perhutanan sebagai substrat alternatif kos rendah bagi penghasilan PHA sebagai inovasi karbon rendah (Rosenboom, Langer & Traverso 2022; Vu et al. 2020). Sisa pelepah dan tandan

kosong kelapa sawit digunakan sebagai substrat gula untuk pengeluaran PHA, manakala efluen kilang kelapa sawit diubah menjadi asid organik campuran dan gliserol sebagai substrat untuk mengurangkan kos pengeluaran PHA [62]. Selain mikrob jenis liar yang dipencilkan dari persekitaran

tempat, stren-stren rekombinan yang dibangunkan telah menunjukkan keupayaan yang lebih tinggi untuk menghasilkan PHA dengan lebih cekap seperti ditunjukkan dalam Jadual 2.

**Jadual 2** Strategi kejuruteraan mikrob penghasil PHA oleh kumpulan-kumpulan penyelidikan di Malaysia

Casis	Substrat	Strategi kejuruteraan	Jenis polimer asal/direka bentuk	Sumber rujukan
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 dan <i>Cupriavidus necator</i> H16	Glukosa	Pengekspresan gen PET hidrolase secara ortogonal di dalam stren rekombinan bakteria penghasil PHA, stren PETase <i>P. putida</i> dan <i>C. necator</i>	PHA	[50]
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> 14-3b	Glukosa	Pengekspresan gen <i>FucO</i> bagi penghasilan enzim furfural reduktase rekombinan dalam bakteria penghasil PHA, stren <i>pFucO P. extremaustralis</i>	PHA	[63]
<i>Cupriavidus necator</i> PHB4	Glukosa, fruktosa, sukrosa, molase tebu, minyak sawit, minyak isirong sawit mentah (CPKO), gliserol	Ekspresi gen <i>phaC<sub>RP</sub></i> daripada <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> BSRT1-1	Poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (P(3HB-ko-3HHx))	[64]
<i>Cupriavidus necator</i> Re2058/ pCB113	Campuran minyak isirong sawit mentah (CPKO) dan sap batang pokok kelapa sawit (OPTS)	Rekombinan <i>C. necator</i> Re2058/pCB113 direka bentuk daripada <i>C. necator</i> H16 (ATCC 17699) dengan plasmid pCB113 yang mengandungi gen sintase PHA <i>R. aetherivorans</i> dan gen hidrolase enoil-KoA khusus (R) <i>P. aeruginosa</i>	Poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (P(3HB-ko-3HHx))	[65]
<i>Escherichia coli</i> BL21 CodonPlus(DE3)-RIL	Glukosa dengan tambahan leusin sebagai prekursor 3H4MV	Plasmid pBBR1phaP(D4N)CJ <sub>Ac</sub> AB <sub>Re</sub> NSDG direka bentuk untuk ekspresi enzim metabolisme leusin (LdhA dan HadAIBC) daripada <i>Clostridium difficile</i> dan enzim biosintetik PHA (PhaPC <sub>JAc</sub> dan PhaAB <sub>Re</sub> ) daripada <i>Aeromonas caviae</i> dan <i>Ralstonia eutropha</i> menggunakan <i>E. coli</i> yang kodon optimum	Poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksi-4-metilvalerat)	[66]
<i>Escherichia coli</i> NS1391 pengeluar berlebihan leusin	Glukosa	Plasmid pTTQldhAhadAIBC <sub>cd</sub> untuk ekspresi enzim metabolisme leusin (LdhA dan HadAIBC) daripada <i>Clostridium difficile</i>	Poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksi-4-metilvalerat)	[66]
<i>Cupriavidus necator</i> PHB4	Minyak isirong sawit mentah (CPKO)	Ekspresi gen PHA sintase daripada <i>Chromobacterium</i> sp. USM2	P(3HB-ko-3HHx)	[67]
	Sisa minyak masak sawit	Ekspresi gen PHA sintase daripada <i>Aeromonas caviae</i> (PHB4/pBBREE32d13)	P(3HB-ko-3HHx)	[68]
<i>Escherichia coli</i> JM109	Glukosa	Plasmid pGEM <sup>+</sup> CABex untuk ekspresi <i>phbC<sub>P5</sub></i> daripada <i>Pseudomonas</i> sp. USM 4-55	Poli(3-hidroksibutirat)	[69]
	Glukosa	Plasmid pGEM <sup>+</sup> - <i>phaCAB<sub>Re</sub></i> untuk ekspresi enzim E11-4 PhaC <sub>Re</sub> mutan G4X daripada <i>R. eutropha</i>	Poli(3-hidroksibutirat)	[70]

Selain digunakan sebagai produk akhir, plastik sintetik juga kian mendapat perhatian ramai pihak bagi kegunaan kitar semula dan kitar naik secara

biologi [71], [72]. Antaranya sisa plastik yang sedang dikaji untuk proses bioteknologi adalah plastik polietilena tereftalat (PET) yang umumnya digunakan

secara meluas dalam pembungkusan makanan, botol plastik dan tekstil sintetik [73]. Kajian telah menunjukkan bahawa enzim hidrolitik seperti PETase yang dapat menguraikan PET kepada monomer boleh guna, sangat berpotensi untuk pendekatan bio kitar semula plastik PET [74], [75].

Enzim PETase, yang pertama kali dikenal pasti daripada *Ideonella sakaiensis* oleh penyelidik di Jepun [76], telah mendapat perhatian meluas dalam bidang biodegradasi plastik kerana keupayaannya menghidrolisis polietilena tereftalat (PET) secara efisien pada suhu sederhana. Pendekatan kejuruteraan protein secara in siliko telah digunakan oleh penyelidik tempatan di mana PETase dari *Vibrio palustris* telah dikaji dengan menggunakan alatan pengkomputeran termasuk pengedokan molekul dan simulasi dinamik molekul (MD) [77]. Simulasi MD juga diaplikasi bagi melihat kesan penukaran residu tapak aktif enzim lipase KV1 dari *Acinetobacter haemolyticus*, terhadap peningkatan pengikatan pada plastik PET secara in siliko [78]. Aktiviti enzim rekombinan PETase dari *I. sakaiensis* juga telah ditingkatkan melalui reka bentuk dan penghasilan agregat enzim bersilang PETase dengan *Amylopectin* (Amy) di dalam sistem pengekspresan *E. coli* [79]. Penggunaan agregat enzim bersilang PETase dengan menggunakan modul bersilang Amy dan juga *dialdehyde amylopectin* (DAA) jenis baharu telah dibuktikan dapat meningkatkan aktiviti penguraian PET apabila dibandingkan dengan PETase bebas tanpa agregat [79] [80]. Menggunakan kaedah kejuruteraan biologi, enzim IsPETase ini telah dihasilkan di dalam *P. putida* dan *C. necator* yang merupakan bakteria model penghasil PHA [50]. Sistem ortogonal yang dinamakan pSEV-Ortho-PHA (pSVOP) ini telah dibangunkan bagi membolehkan pengekspresan enzim PETase di dalam kedua-dua casis bakteria menggunakan bahagian genetik termasuk penggalak Trc, replikon pBBR1, protein penambah dan jujukan isyarat terpilih [50].

Bagi membolehkan plastik dikitar naik untuk penghasilan produk dengan nilai tambah, pelbagai strem mikrob telah dan sedang dibangunkan untuk mengurai dan mengasimilasi monomer PET bagi penghasilan produk industri seperti PHA, laikopina dan asid mukonik [81], [82], [83]. Dengan menggunakan pendekatan kejuruteraan mikrob, bakteria penghasil PHA iaitu *C. necator* dan *P. putida* telah direka bentuk secara biologi untuk mengekspres enzim pengurai PET [50]. Dengan menggunakan enzim penghidrolisis PET dipaparkan pada permukaan bakteria penghasil PHA, strategi kejuruteraan biologi ini akan membantu membangunkan casis baharu bagi penggunaan PET sebagai salah satu sisa bagi proses biotransformasi dan kitar naik secara biologi [72], [84]. Pendekatan melibatkan konsortium buatan mikrob juga makin mendapat perhatian dalam usaha semasa dalam mengolah and menukarkan plastik sintetik kepada plastik berasaskan bio baharu seperti poli(etilena furanoat) (PEF) [72].

## 2.7 Aplikasi Kejuruteraan Mikrob Untuk Pembangunan Biobahan Api

Biobahan api dibahagikan kepada generasi pertama hingga keempat berdasarkan sumber dan proses pengeluaran [85]. Biobahan api generasi pertama biobahan api generasi pertama diperbuat daripada tanaman makanan termasuk jagung dan tebu manakala biobahan api generasi kedua adalah berteraskan penggunaan sisa biojisim berlignoselulosa termasuk daripada tanaman bukan makanan seperti tandan buah kosong kelapa sawit (EFB) dan pelepah kelapa sawit (OPF) [86], [87]. Biobahan api generasi ketiga dihasilkan menggunakan alga dan mikroalga [85], manakala biobahan api generasi keempat menghasilkan bahan api melalui fotosintesis dan karbon dioksida yang melibatkan mikroorganisma yang diubah suai secara genetik seperti mikroalga, yis, kulat, dan sianobakteria [88].

Bioetanol dan biodiesel adalah antara biobahan api yang telah dilaporkan dihasilkan menggunakan fermentasi mikrob dari kumpulan penyelidikan di Malaysia. Bioetanol ialah alkohol yang dihasilkan oleh mikroorganisma apabila karbohidrat seperti kanji atau gula ditapai [89], [90]. Penghasilan bioetanol oleh gabungan kulat dan yis menggunakan EFB dan OPF [91] dan efluen kilang kelapa sawit (POME) [92] dapat dijadikan sebagai contoh kepada penghasilan bio-solusi melalui pendekatan ekonomi kitaran. Biodiesel adalah ester alkil rantai panjang yang dihasilkan melalui transesterifikasi trigliserida daripada lemak haiwan atau minyak sayuran menggunakan alkohol rantai pendek [93], [94], [95], [96]. Berbanding diesel fosil, biodiesel mempunyai jejak karbon yang rendah, lebih mesra alam dan kurang toksik dengan nombor oktana dan kandungan haba yang lebih tinggi [97]. Sumber bahan mentah utama untuk biodiesel termasuk biji minyak yang boleh dimakan dan tidak boleh dimakan seperti kelapa sawit, kacang soya, biji serai, bunga matahari dan kelapa sawit, yang menyumbang kira-kira 79% daripada pengeluaran global [98].

Minyak daripada mikroalga dan mikroorganisma berminyak (oleaginous) menawarkan alternatif yang lebih menjimatkan berbanding minyak sayuran [99]. Mikroorganisma berminyak boleh menghasilkan minyak lebih daripada 20% berat kering biojisimnya. Sebagai contoh, mikroalga boleh menghasilkan sehingga 100 kali lebih banyak minyak daripada kacang soya, menghasilkan 5,000 hingga 20,000 gelen minyak setahun [100]. Kajian terdahulu telah menunjukkan bahawa minyak mikroalga *Nannochloropsis oculata* boleh diubah kepada 92% biodiesel melalui transesterifikasi bermangkin metanol dan kalsium metoksida [101]. Selain itu, teknik pemprosesan biologi bersepadu menyediakan strategi kos efektif untuk menghasilkan biodiesel tanpa menggunakan enzim tambahan [102], seperti yang dihasilkan mikroorganisma berminyak *Rhizopus* sp. [103].

Biogas dan biohidrogen semakin mendapat perhatian di Malaysia sebagai alternatif gas boleh diperbaharui [104], [105], [106]. Pelbagai strem termasuk bakteria anaerobik telah dipencil dan dikaji bagi penghasilan biometana daripada POME seperti *Bacillus toyonensis* strem BCT-71120, *Stenotrophomonas rhizophila* strem e-p10, dan *Chlorella* sp. [107], [108]. Satu tan POME dilaporkan dapat menjana sebanyak 28 m<sup>3</sup> biogas dan 2.4 tan metana setiap tahun, bersamaan dengan 3.4 juta

liter diesel [109]. Bagi biohidrogen, terdapat empat proses yang telah dilaporkan termasuk penapaian gelap oleh mikroorganisma anaerobik, biofotosianobakteria dan alga dalam air, fotofermentasi gabungan fotobakteria, atau sistem hibrid yang menggabungkan kegelapan dan fotofermentasi [110]. Jadual 3 memaparkan fermentasi biohidrogen daripada sisa industri minyak sawit yang dilaporkan oleh kumpulan penyelidikan di Malaysia.

**Jadual 3** Penyelidikan fermentasi biohidrogen oleh kumpulan-kumpulan penyelidikan di Malaysia

Casis	Substrat	Jenis reaktor	Proses	Suhu (°C)	Hasil	Sumber rujukan
Kombinasi kultur yang diperkaya (terutamanya <i>Thermoanaerobacterium</i> sp.)	Efluen kilang kelapa sawit (POME)	Sistem reaktor kelompok penjujukan anaerobik dua peringkat	Penapaian gelap	55 dan 37	2.52 mol H <sub>2</sub> /mol gula	[111]
Kombinasi bakteria anaerobik yang dikumpul daripada enap cemar	Efluen kilang kelapa sawit (POME) dirawat dengan 1% (b/i) HNO <sub>3</sub>	Penapaian kelompok	Penapaian gelap	60	1.04 mol H <sub>2</sub> /mol glukosa	[112]
Kombinasi bakteria yang diperkaya dengan enap cemar anaerobik	Efluen kilang kelapa sawit (POME) dirawat dengan 0.8% (b/i) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Penapaian kelompok	Penapaian gelap	60	1.24 mol H <sub>2</sub> /mol glukosa	[112]
Bakteria anaerobik yang dicampur dalam keadaan termofilik	5.2 g/L glukosa	Penapaian kelompok	-	60	1.92 mol H <sub>2</sub> /mol glukosa	[113]
Sel bakteria termofilik pengeluar hidrogen tidak bergerak pada karbon teraktif berbutir	Xilosa dan glukosa	Penapaian kelompok penjujukan	Penapaian gelap	60	1.77 mol H <sub>2</sub> /mol substrat enap cemar-GAC nisbah 1:2	[114]
<i>Clostridium butyricum</i>	POME dirawat terlebih dahulu dengan haba alkali	Penapaian kelompok	Penapaian gelap	37	2.18 mol H <sub>2</sub> /mol karbohidrat	[114]
<i>Enterobacter</i> sp. KBH6958	OPEFB prarawatan AFEX	Penapaian kelompok	-	37	1.68 mol H <sub>2</sub> /per mol sugar	[115]
Enapcemar dirawat mengandungi arkea metanogenik yang telah dinyahaktifkan	Tandan buah kosong kelapa sawit yang dirawat dengan asid sulfurik	Penapaian kelompok	Penapaian gelap	35	1.98 mol H <sub>2</sub> /mol xilosa	[116]
<i>Clostridium butyricum</i> EB6	Efluen kilang kelapa sawit (POME)	Penapaian kelompok	-	37	3345 mL H <sub>2</sub> /L-POME	[117]
<i>Clostridium butyricum</i> EB6	Glukosa	Penapaian kelompok	-	37	948 mL H <sub>2</sub> /L-med	[117]
<i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i> N1-4 (ATCC 13564)	10 g/L glukosa	Penapaian kelompok	-	37	3.1 mol H <sub>2</sub> /mol glukosa	[118]

Sehingga kini, majoriti penghasilan biobahan api oleh kumpulan penyelidikan di Malaysia menggunakan mikrob jenis liar yang dipencilkan dari persekitaran tempatan. Dengan kemajuan terkini dalam teknologi Omik dan pembangunan stren, pendekatan kejuruteraan mikrob dijangka akan dapat meningkatkan lagi kebolehpayaan stren-stren terjurutera biologi bagi aplikasi biopemangkinan dan biotransformasi [63], [72]. Penggunaan teknologi terkehadapan seperti teknologi CRISPR-Cas akan membantu dalam menyediakan alatan genetik dengan tujuan untuk meningkatkan lagi kapasiti casis mikrob untuk kegunaan fermentasi jitu dan industri biopembuatan [119]. Kaedah penyuntingan genom CRISPR-Cas9 juga telah diadaptasi untuk meningkatkan jumlah lipid yang dihasilkan oleh stren mikroalga terjurutera biologi seperti *Chlamydomonas* sp. [120] dan *Chlorella* sp. [121].

### 3.0 KESIMPULAN

Secara umumnya, kajian ulasan ini bukan sahaja membincangkan kegunaan biologi sintetik dan bioekonomi di Malaysia, tetapi juga potensi ekosistem EngBio untuk menggalakkan aktiviti proses biopembuatan dan bioekonomi kitaran di negara ini. Ini akan menjadi asas untuk menyediakan rangka kerja biologi sintetik dan kejuruteraan mikrob bagi dasar sedia ada dan pengukuhan dasar baharu seperti Dasar Bioteknologi Negara (DBN) berlandaskan EngBio di Malaysia. Aplikasi biologi sintetik dan kejuruteraan mikrob menggunakan substrat karbon alternatif seperti sisa biojisim, minyak sawit dan plastik boleh meningkatkan produktiviti kilang sel mikrob dan menyediakan inovasi karbon rendah bagi mengetengahkan aktiviti bioekonomi kitaran.

Pendekatan bioteknologi terkehadapan ini membawa kepada pengeluaran pelbagai sebatian yang mampan dan cekap, menyediakan alternatif yang mampan kepada bahan api fosil dan meningkatkan keselamatan tenaga dengan mengoptimumkan laluan pengeluaran untuk pelbagai bahan berasaskan bio di Malaysia.

### Penghargaan

Kerja penyelidikan ini disokong oleh dana penyelidikan Fundamental Research Grant Scheme (FRGS/1/2023/STG01/UKM/02/8) dari Kementerian Pengajian Tinggi Malaysia dan geran penyelidikan Yayasan Penyelidikan Antarfika Sultan Mizan (RB-2023-001).

### Deklarasi Percanggahan Kepentingan

Penulis mengisytiharkan bahawa tiada sebarang percanggahan kepentingan berkaitan dengan penerbitan karya ini.

### Rujukan

- [1] Abuduxike, G., S. M. Aljunid, and S. Sulong. 2012. Main Challenges in Developing Biotechnology Industry in Malaysia: Perspectives from the Innovative Biotechnology Firms. *BMC Public Health*. 12(Suppl. 2): A25. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-S2-A25>.
- [2] Arujanan, M. 2007. Enhancing Awareness of Biotechnology in Malaysia: The Role of an NGO. *Asia-Pacific Biotech News*. 11(8): 464–467. <https://doi.org/10.1142/S021903030700050X>.
- [3] Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi. 2022. *Dasar Bioteknologi Negara 2.0*. Putrajaya: MOSTI. Accessed [date accessed]. Available online: <https://www.mostfi.gov.my/wp-content/uploads/2022/09/Dasar-Bioteknologi-Negara-2.0-1.pdf>.
- [4] Ab Aziz, I. F., et al. 2024. Lignocellulosic Biomass-Derived Biogas: A Review on Sustainable Energy in Malaysia. *Journal of Oil Palm Research*. <https://doi.org/10.21894/jopr.2024.0021>.
- [5] Ramzi, A. B. 2018. Metabolic Engineering and Synthetic Biology. In *Omics Applications for Systems Biology*, edited by W. M. Aizat, H.-H. Goh, and S. N. Baharum, 81–95. Vol. 1102 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-98758-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-98758-3_6).
- [6] Symons, J., et al. 2024. Engineering Biology and Climate Change Mitigation: Policy Considerations. *Nature Communications*. 15(1): 2669. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46865-w>.
- [7] Sloan, W. T., and T. L. Gómez-Borraz. 2023. Engineering Biology in the Face of Uncertainty. *Interface Focus*. 13(4): 20230001. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2023.0001>.
- [8] Clarke, L., and R. Kitney. 2020. Developing Synthetic Biology for Industrial Biotechnology Applications. *Biochemical Society Transactions*. 48(1): 113–122. <https://doi.org/10.1042/BST20190349>.
- [9] Royal Academy of Engineering. n.d. *Engineering Biology: A Priority for Growth*. London: Royal Academy of Engineering.
- [10] Joshi, N. M., and B. Gharia. 2024. Harnessing the Power of Life: Synthetic Biology for Next-Generation Chemical Synthesis. *Journal of Pharmaceutical Research Science and Technology*. 8: 28–44.
- [11] Academy of Sciences Malaysia. 2020. *10-10 MySTIE Framework*. Kuala Lumpur: Academy of Sciences Malaysia.
- [12] Ramzi, A. B., S. N. Baharum, H. Bunawan, and N. S. Scrutton. 2020. Streamlining Natural Products Biomanufacturing with Omics and Machine Learning Driven Microbial Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8: 608918. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.608918>.
- [13] Seo, S. W., et al. 2013. Synthetic Biology: Tools to Design Microbes for the Production of Chemicals and Fuels. *Biotechnology Advances*. 31(6): 811–817. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.012>.
- [14] Chi, H., et al. 2019. Engineering and Modification of Microbial Chassis for Systems and Synthetic Biology. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 4(1): 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.12.001>.
- [15] Liu, J., X. Wu, M. Yao, W. Xiao, and J. Zha. 2020. Chassis Engineering for Microbial Production of Chemicals: From Natural Microbes to Synthetic Organisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 66: 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.06.013>.
- [16] Zhang, M. M., Y. Wang, E. L. Ang, and H. Zhao. 2016. Engineering Microbial Hosts for Production of Bacterial Natural Products. *Natural Product Reports*. 33(8): 963–987. <https://doi.org/10.1039/C6NP00017G>.
- [17] Beites, T., and M. V. Mendes. 2015. Chassis Optimization as a Cornerstone for the Application of Synthetic Biology-

- Based Strategies in Microbial Secondary Metabolism. *Frontiers in Microbiology*. 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00906>.
- [18] García-Granados, R., J. A. Lerma-Escalera, and J. R. Morones-Ramírez. 2019. Metabolic Engineering and Synthetic Biology: Synergies, Future, and Challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7: 36. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00036>.
- [19] Kitano, S., C. Lin, J. L. Foo, and M. W. Chang. 2023. Synthetic Biology: Learning the Way toward High-Precision Biological Design. *PLOS Biology*. 21(4): e3002116. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002116>.
- [20] Schroeder, W. L., P. F. Suthers, T. C. Willis, E. J. Mooney, and C. D. Maranas. 2024. Current State, Challenges, and Opportunities in Genome-Scale Resource Allocation Models: A Mathematical Perspective. *Metabolites*. 14(7): 365. <https://doi.org/10.3390/metabo14070365>.
- [21] SnapGene. n.d. SnapGene Software. Accessed June 2026. [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com).
- [22] Benchling. n.d. Benchling: Cloud-Based Platform for Biotech R&D. Accessed June 2026. <https://www.benchling.com/>.
- [23] Burgard, A. P., P. Pharkya, and C. D. Maranas. 2003. OptKnock: A Bilevel Programming Framework for Identifying Gene Knockout Strategies for Microbial Strain Optimization. *Biotechnology and Bioengineering*. 84(6): 647–57. <https://doi.org/10.1002/bit.10803>.
- [24] Schellenberger, J., et al. 2011. Quantitative Prediction of Cellular Metabolism with Constraint-Based Models: The COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*. 6(9): 1290–1307. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.308>.
- [25] Chen, Y., et al. 2024. Reconstruction, Simulation and Analysis of Enzyme-Constrained Metabolic Models Using GECKO Toolbox 3.0. *Nature Protocols*. 19(3): 629–67. <https://doi.org/10.1038/s41596-023-00931-7>.
- [26] Radivojević, T., Z. Costello, K. Workman, and H. Garcia Martin. 2020. A Machine Learning Automated Recommendation Tool for Synthetic Biology. *Nature Communications*. 11: 4879.
- [27] Lee, M. K., M. S. Mohamad, Y. W. Choon, K. Mohd Daud, N. A. Nasarudin, M. A. Ismail, Z. Ibrahim, S. Napis, and R. O. Sinnott. 2020. Comparison of Optimization-Modelling Methods for Metabolites Production in *Escherichia coli*. *Journal of Integrative Bioinformatics*. 17: 20190073.
- [28] Ananda, R., K. M. Daud, and S. Zainudin. 2025. RBI: A Novel Algorithm for Regulatory-Metabolic Network Model in Designing the Optimal Mutant Strain. *PeerJ Computer Science*. 11: 1–29.
- [29] Eskandari, A., T. C. Leow, M. B. A. Rahman, and S. N. Oslan. 2024. Recent Insight into the Advances and Prospects of Microbial Lipases and Their Potential Applications in Industry. *International Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00498-7>.
- [30] Chukwuma, O. B., M. Rafatullah, H. A. Tajarudin, and N. Ismail. 2020. Lignocellulosytic Enzymes in Biotechnological and Industrial Processes: A Review. *Sustainability*. 12(18): 7282. <https://doi.org/10.3390/su12187282>.
- [31] Sabri, S., R. N. Z. R. A. Rahman, T. C. Leow, M. Basri, and A. B. Salleh. 2009. Secretory Expression and Characterization of a Highly Ca<sup>2+</sup>-Activated Thermostable L2 Lipase. *Protein Expression and Purification*. 68(2): 161–66. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.08.002>.
- [32] Tahir, H. M., R. N. Z. R. A. Rahman, A. T. C. Leow, and M. S. M. Ali. 2020. Expression, Characterisation and Homology Modelling of a Novel Hormone-Sensitive Lipase (HSL)-Like Esterase from *Glaciozyma antarctica*. *Catalysts*. 10(1): 58. <https://doi.org/10.3390/catal10010058>.
- [33] Nor Ashikin, N. A. L., S. F. Z. Mohd Fuzi, S. A. Abdul Manaf, N. H. Abdul Manas, S. Md Shaarani @ Md Nawati, and R. Md Illias. 2022. Optimization and Characterization of Immobilized *E. coli* for Engineered Thermostable Xylanase Excretion and Cell Viability. *Arabian Journal of Chemistry*. 15(6). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103803>.
- [34] Wee, M. Y. J., N. I. W. Azelee, S. Pachelles, A. M. A. Murad, F. D. A. Bakar, and R. M. Illias. 2022. Bioconversion of Pineapple Pomace for Xylooligosaccharide Synthesis Using Surface Display of Xylanase on *Escherichia coli*. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 12(12): 6003–14. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01041-0>.
- [35] Roslan, A. M., A. Mustafa Kamil, C. Chandran, A. A. L. Song, K. Yusoff, and R. Abdul Rahim. 2020. Secretion of Recombinant Xylanase in *Lactococcus lactis* Using Signal Peptides Usp45 and Spk1. *Biotechnology Letters*. 42(9): 1727–33. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02894-1>.
- [36] Wee, M. Y. J., A. M. Abdul, F. D. Abu Bakar, K. O. Low, and R. Md Illias. 2019. Expression of Xylanase on *Escherichia coli* Using a Truncated Ice Nucleation Protein of *Erwinia ananas* (InaA). *Process Biochemistry*. 78: 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.005>.
- [37] Jaafar, N. R., S. N. Ayob, N. H. Abd Rahman, F. D. Abu Bakar, A. M. A. Murad, and R. M. Illias. 2021. Rational Protein Engineering of  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* for Improved Catalytic Hydrolysis Efficiency on Kenaf Hemicellulose. *Process Biochemistry*. 102: 349–59. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.12.012>.
- [38] Yamani, L. N., M. A. Jonet, A. Baktir, R. M. Illias, and N. N. T. Pusaningsih. 2017. An Extracellular  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase in *Escherichia coli* Using Secretory Expression System. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 19(3): 531–39.
- [39] Nasir, N. S. M., C. T. Leow, S. N. H. Oslan, A. B. Salleh, and S. N. Oslan. 2020. Molecular Expression of a Recombinant Thermostable Bacterial Amylase from *Geobacillus stearothermophilus* SR74 Using Methanol-Free *Meyerozyma guilliermondii* Strain SO Yeast System. *BioResources*. 15(2): 3161–72. <https://doi.org/10.15376/biores.15.2.3161-3172>.
- [40] Kamaruddin, S., F. D. A. Bakar, and A. M. A. Murad. 2021. Optimization of Mixed Cellulase Enzymes for the Degradation of Oil Palm Empty Fruit Bunch. *Sains Malaysiana*. 50(12): 3547–56. <https://doi.org/10.17576/jsm-2021-5012-07>.
- [41] Woon, J. S., M. M. Mackeen, N. M. Mahadi, R. M. Illias, A. M. Abdul Murad, and F. D. Abu Bakar. 2016. Expression and Characterization of a Cellobiohydrolase (CBH7B) from the Thermophilic Fungus *Thielavia terrestris* in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 63(5): 690–98. <https://doi.org/10.1002/bab.1431>.
- [42] Ali, A. S. M., F. D. A. Bakar, R. M. Illias, O. Hassan, and A. M. A. Murad. 2015. Cloning, Heterologous Expression and Characterisation of a Recombinant Cellobiohydrolase from *Humicola insolens* ATCC16454 in *Pichia pastoris*. *Malaysian Applied Biology*. 44(4): 19–26.
- [43] Abdullah, N., R. M. Illias, L. K. Oon, N. R. Jaafar, N. M. Sukri, and R. A. Rahman. 2022. Metabolic Pathway Modification for Production of Xylitol from Glucose in *Escherichia coli*. *Jurnal Teknologi*. 84(3): 151–62. <https://doi.org/10.11113/jurnalteknologi.v84.18228>.
- [44] Abd Rahman, N. H., J. Md. Jahim, M. S. Abdul Munaim, R. A. Rahman, S. F. Z. Fuzi, and R. Md. Illias. 2020. Immobilization of Recombinant *Escherichia coli* on Multi-Walled Carbon Nanotubes for Xylitol Production. *Enzyme and Microbial Technology*. 135: 109495. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109495>.
- [45] Md Tab, M., et al. 2017. Characterization and Potential Applications of a Recombinant Antifreeze Protein from an Antarctic Yeast *Glaciozyma antarctica* Produced in *Pichia pastoris*. *Malaysian Applied Biology*. 46(1): 213–18.
- [46] Hashim, N. H. F., et al. 2014. Molecular Cloning, Expression and Characterisation of Afp4, an Antifreeze Protein from *Glaciozyma antarctica*. *Polar Biology*. 37(10): 1495–1505. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1539-1>.
- [47] Jaafar, N. R., et al. 2021. Synergistic Action of Cyclodextrin Glucanotransferase and Maltogenic Amylase Improves the Bioconversion of Starch to Malto-Oligosaccharides. *Process Biochemistry*. 103: 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.02.002>.

- [48] Mohtar, N. S., M. B. Abdul Rahman, R. N. Z. R. Abd Rahman, T. C. Leow, A. B. Salleh, and M. N. Mat Isa. 2016. Expression and Characterization of Thermostable Glycogen Branching Enzyme from *Geobacillus mahadia* Geo-05. *PeerJ*. 2016(12): 1–12. <https://doi.org/10.7717/peerj.2714>.
- [49] Mulok, T. E. T. Z., M. L. Chong, Y. Shirai, R. A. Rahim, and M. A. Hassan. 2009. Engineering of *E. coli* for Increased Production of L-Lactic Acid. *African Journal of Biotechnology*. 8(18): 4597–4603.
- [50] Minggu, M. M., N. A. H. Naseron, H. S. A. Shaberi, N. A. N. Muhammad, S. N. Baharum, and A. B. Ramzi. 2023. Seamless and Orthogonal Expression of Genetic Parts in Polyhydroxyalkanoate (PHA)-Producing Bacterial Chassis for Plastic Bio-Upcycling Applications. *MethodsX*. 11: 102434. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102434>.
- [51] Hillson, N., et al. 2019. Building a Global Alliance of Biofoundries. *Nature Communications*. 10(1): 2040. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10079-2>.
- [52] Casini, A., et al. 2018. A Pressure Test to Make 10 Molecules in 90 Days: External Evaluation of Methods to Engineer Biology. *Journal of the American Chemical Society*. 140(12): 4302–16. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13292>.
- [53] Robinson, C. J., et al. 2020. Rapid Prototyping of Microbial Production Strains for the Biomanufacture of Potential Materials Monomers. *Metabolic Engineering*. 60: 168–82. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2020.04.008>.
- [54] Karim, M. n.d. INBIOSIS Lancar Biofoundry Pertama di Malaysia. *Berita UKM*. Accessed October 10, 2024. <https://www.ukm.my/berita/berita/ukm/inbiosis-lancar-biofoundry-pertama-di-malaysia/>.
- [55] Carruthers, D. N., and T. S. Lee. 2022. Translating Advances in Microbial Bioproduction to Sustainable Biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10: 968437. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.968437>.
- [56] Sonnendecker, C., et al. 2022. Low Carbon Footprint Recycling of Post-Consumer PET Plastic with a Metagenomic Polyester Hydrolase. *ChemSusChem*. 15(9): e202101062. <https://doi.org/10.1002/cssc.202101062>.
- [57] Rosenboom, J.-G., R. Langer, and G. Traverso. 2022. Bioplastics for a Circular Economy. *Nature Reviews Materials*. 7(2): 117–37. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>.
- [58] Scown, C. D. 2022. Prospects for Carbon-Negative Biomufacturing. *Trends in Biotechnology*. 40(12): 1415–24. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.09.004>.
- [59] Kalia, V. C., S. K. S. Patel, K. K. Karthikeyan, M. Jeya, I.-W. Kim, and J.-K. Lee. 2024. Manipulating Microbial Cell Morphology for the Sustainable Production of Biopolymers. *Polymers*. 16(3): 410. <https://doi.org/10.3390/polym16030410>.
- [60] Sudesh, K. 2013. Bio-Based and Biodegradable Polymers. In *Polyhydroxyalkanoates from Palm Oil: Biodegradable Plastics*. 3–36. SpringerBriefs in Microbiology. Berlin and Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-33539-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33539-6_2).
- [61] Thomas, T., et al. 2020. PHA Production and PHA Synthases of the Halophilic Bacterium *Halomonas* sp. SF2003. *Bioengineering*. 7(1): 29. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7010029>.
- [62] Hassan, M. A., et al. 2013. Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates from Renewable Oil-Palm Biomass. *Biomass and Bioenergy*. 50: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.10.014>.
- [63] Ramzi, A. B., M. M. Minggu, U. S. Ruslan, M. H. Fikri Khairi, and P. M. Abdul. 2022. Expression of Furfural Reductase Improved Furfural Tolerance in Antarctic Bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *Sains Malaysiana*. 51(10): 3163–70. <https://doi.org/10.17576/jsm-2022-5110-04>.
- [64] Trakunjae, C., et al. 2022. Biosynthesis of P(3HB-co-3HHx) Copolymers by a Newly Engineered Strain of *Cupriavidus necator* PHB-4/pBBR\_CnPro-phaCRp for Skin Tissue Engineering Application. *Polymers*. 14(19). <https://doi.org/10.3390/polym14194074>.
- [65] Murugan, P., P. Chhajer, A. Kosugi, T. Arai, C. J. Brigham, and K. Sudesh. 2016. Production of P(3HB-co-3HHx) with Controlled Compositions by Recombinant *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113 from Renewable Resources. *Clean – Soil, Air, Water*. 44(9): 1234–41. <https://doi.org/10.1002/clen.201500714>.
- [66] Saika, A., Y. Watanabe, K. Sudesh, and T. Tsuge. 2014. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxy-4-Methylvalerate) by Recombinant *Escherichia coli* Expressing Leucine Metabolism-Related Enzymes Derived from *Clostridium difficile*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117(6): 670–75. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.006>.
- [67] Anis, S. N. S., N. Md Iqbal, S. Kumar, and A. A. Amirul. 2013. Effect of Different Recovery Strategies of P(3HB-co-3HHx) Copolymer from *Cupriavidus necator* Recombinant Harboring the PHA Synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. *Separation and Purification Technology*. 102: 111–17. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.09.036>.
- [68] Kamilah, H., T. Tsuge, T. A. Yang, and K. Sudesh. 2013. Waste Cooking Oil as Substrate for Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate): Turning Waste into a Value-Added Product. *Malaysian Journal of Microbiology*. 9(1): 51–59. <https://doi.org/10.21161/mjm.45012>.
- [69] Tan, Y., et al. 2010. Cloning and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) Biosynthesis Genes from *Pseudomonas* sp. USM 4-55. *Journal of Basic Microbiology*. 50(2): 179–89. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900138>.
- [70] Normi, Y. M., et al. 2005. Characterization and Properties of G4X Mutants of *Ralstonia eutropha* PHA Synthase for Poly(3-Hydroxybutyrate) Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Macromolecular Bioscience*. 5(3): 197–206. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400181>.
- [71] Abu-Thabit, N. Y., C. Pérez-Rivero, O. J. Uwaezuoke, and N. C. Ngwuluka. 2022. From Waste to Wealth: Upcycling of Plastic and Lignocellulosic Wastes to PHAs. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 97(12): 3217–40. <https://doi.org/10.1002/jctb.6966>.
- [72] Omar, M. N., M. M. Minggu, N. A. Nor Muhammad, P. M. Abdul, Y. Zhang, and A. B. Ramzi. 2024. Towards Consolidated Bioprocessing of Biomass and Plastic Substrates for Semi-Synthetic Production of Bio-Poly(Ethylene Furanoate) (PEF) Polymer Using Omics-Guided Construction of Artificial Microbial Consortia. *Enzyme and Microbial Technology*. 177: 110429. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2024.110429>.
- [73] Satta, A., G. Zampieri, G. Loprete, S. Campanaro, L. Treu, and E. Bergantino. 2024. Metabolic and Enzymatic Engineering Strategies for Polyethylene Terephthalate Degradation and Valorization. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 23(2): 351–83. <https://doi.org/10.1007/s11157-024-09688-1>.
- [74] Tournier, V., et al. 2020. An Engineered PET Depolymerase to Break Down and Recycle Plastic Bottles. *Nature*. 580(7802): 216–19. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.
- [75] Yoshida, S., et al. 2016. A Bacterium That Degrades and Assimilates Poly(Ethylene Terephthalate). *Science*. 351(6278): 1196–99. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>.
- [76] Yoshida, S., et al. 2016. A Bacterium That Degrades and Assimilates Poly(Ethylene Terephthalate). *Science*. 351(6278): 1196–99. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>.
- [77] Buhari, S. B., N. Ghahremani Nezhad, Y. M. Normi, F. Mohd Shariff, and T. C. Leow. 2025. Homology Modeling and Thermostability Enhancement of *Vibrio parvulus* PETase via Hydrophobic Interactions. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.
- [78] Khairul Anuar, N. F. S., R. Abdul Wahab, F. Huyop, Y. M. Normi, H. A. Oyewusi, and E. Susanti. 2024. In Silico

- Mutagenesis on Active Site Residues of *Acinetobacter haemolyticus* Lipase KV1 for Improved Binding to Polyethylene Terephthalate (PET). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.
- [79] Lin, L. Y., N. R. Jaafar, J. G. Ling, F. Huyop, F. D. Abu Bakar, R. A. Rahman, and R. M. Illias. 2024. Cross-Linked Enzyme Aggregates of Polyethylene Terephthalate Hydrolase (PETase) from *Ideonella sakaiensis* for the Improvement of Plastic Degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 263: 130284. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130284>.
- [80] Lee, Y. L., N. R. Jaafar, F. Huyop, F. D. A. Bakar, R. A. Rahman, and R. Md Illias. 2025. Functionalization of Amylopectin as a Strategy to Improve Polyethylene Terephthalate Hydrolase-Cross-Linked Enzyme Aggregate (sPETase-CLEA) in Plastic Degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 306: 141492.
- [81] Bao, T., Y. Qian, Y. Xin, J. J. Collins, and T. Lu. 2023. Engineering Microbial Division of Labor for Plastic Upcycling. *Nature Communications*. 14(1): 5712. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40777-x>.
- [82] Carniel, A., et al. 2024. From Trash to Cash: Current Strategies for Bio-Upcycling of Recaptured Monomeric Building Blocks from Poly(Ethylene Terephthalate) (PET) Waste. *Green Chemistry*. 26(10): 5708–43. <https://doi.org/10.1039/D4GC00528G>.
- [83] Diao, J., Y. Hu, Y. Tian, R. Carr, and T. S. Moon. 2023. Upcycling of Poly(Ethylene Terephthalate) to Produce High-Value Bio-Products. *Cell Reports*. 42(1): 111908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111908>.
- [84] Tiso, T., et al. 2021. Towards Bio-Upcycling of Polyethylene Terephthalate. *Metabolic Engineering*. 66: 167–78. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.03.011>.
- [85] Love, J. 2022. Microbial Pathways for Advanced Biofuel Production. *Biochemical Society Transactions*. 50(2): 987–1001. <https://doi.org/10.1042/BST20210764>.
- [86] Faiz Norrahim, M. N., M. A. Ahmad Farid, A. A. Lawal, T. A. Tengku Yasim-Anuar, M. H. Samsudin, and A. A. Zulkifli. 2022. Emerging Technologies for Value-Added Use of Oil Palm Biomass. *Environmental Science: Advances*. 1(3): 259–75. <https://doi.org/10.1039/D2VA00029F>.
- [87] Lim, Y. F., et al. 2021. Review of Biowastes to Energy in Malaysia: Current Technology, Scalability and Socioeconomic Analysis. *Cleaner Engineering and Technology*. 4: 100257. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100257>.
- [88] Moravvej, Z., M. A. Makarem, and M. R. Rahimpour. 2019. The Fourth Generation of Biofuel. In *Second and Third Generation of Feedstocks*. 557–97. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815162-4.00020-3>.
- [89] Mohamed Ghazali, M. F. S., M. Mustafa, N. A. I. Mohd Zainudin, and N. A. Abd Aziz. 2021. Improvement of Bioethanol Production in Consolidated Bioprocessing (CBP) via Consortium of *Aspergillus niger* B2484 and *Trichoderma asperellum* B1581. *Pertanika Journal of Science and Technology*. 29(1). <https://doi.org/10.47836/pjst.29.1.17>.
- [90] Yaverino-Gutiérrez, M. A., et al. 2024. Perspectives and Progress in Bioethanol Processing and Social Economic Impacts. *Sustainability*. 16(2): 608. <https://doi.org/10.3390/su16020608>.
- [91] Hong, L. S., D. Ibrahim, and I. C. Omar. 2012. Oil Palm Frond for the Production of Bioethanol. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1: 007–011.
- [92] Alam, Md. Z., N. A. Kabbashi, and S. N. I. S. Hussin. 2009. Production of Bioethanol by Direct Bioconversion of Oil-Palm Industrial Effluent in a Stirred-Tank Bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36(6): 801–08. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0554-7>.
- [93] Keasling, J., H. Garcia Martin, T. S. Lee, A. Mukhopadhyay, S. W. Singer, and E. Sundstrom. 2021. Microbial Production of Advanced Biofuels. *Nature Reviews Microbiology*. 19(11): 701–15. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00577-w>.
- [94] Khan, N., K. Sudhakar, and R. Mamat. 2021. Role of Biofuels in Energy Transition, Green Economy and Carbon Neutrality. *Sustainability*. 13(22): 12374. <https://doi.org/10.3390/su132212374>.
- [95] Malode, S. J., K. K. Prabhu, R. J. Mascarenhas, N. P. Shetti, and T. M. Aminabhavi. 2021. Recent Advances and Viability in Biofuel Production. *Energy Conversion and Management*. X. 10: 100070. <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2020.100070>.
- [96] Rathore, D., et al. 2022. Bioengineering to Accelerate Biodiesel Production for a Sustainable Biorefinery. *Bioengineering*. 9(11): 618. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110618>.
- [97] Singh, R. 2022. Production of Biofuels Options by Contribution of Effective and Suitable Enzymes: Technological Developments and Challenges.
- [98] Yu, W.-L., W. Ansari, N. G. Schoepp, M. J. Hannon, S. P. Mayfield, and M. D. Burkart. 2011. Modifications of the Metabolic Pathways of Lipid and Triacylglycerol Production in Microalgae. *Microbial Cell Factories*. 10(1): 91. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-91>.
- [99] Rohan, M. 2022. Role of Synthetic Biology in Biodiesel Production. *Current Synthetic and Systems Biology*. 10: 002.
- [100] Hemaiswarya, S., R. Raja, I. S. Carvalho, R. Ravikumar, V. Zambare, and D. Barh. 2012. An Indian Scenario on Renewable and Sustainable Energy Sources with Emphasis on Algae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96(5): 1125–35. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4487-0>.
- [101] Teo, S. H., A. Islam, T. Yusaf, and Y. H. Taufiq-Yap. 2014. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* Microalgae's Oil to Biodiesel Using Calcium Methoxide Catalyst. *Energy*. 78: 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.07.045>.
- [102] Elshahed, M. S. 2010. Microbiological Aspects of Biofuel Production: Current Status and Future Directions. *Journal of Advanced Research*. 1(2): 103–11. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.03.001>.
- [103] Hasni, M. H., F. B. Ahmad, and A. Z. Athoillah. 2023. The Production of Microbial Biodiesel from Cellulose-Derived Fungal Lipid via Consolidated Bioprocessing. *Environmental Technology and Innovation*. 30: 103123. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103123>.
- [104] Awe, O. W., Y. Zhao, A. Nzihou, D. P. Minh, and N. Lyczko. 2017. A Review of Biogas Utilisation, Purification and Upgrading Technologies. *Waste and Biomass Valorization*. 8(2): 267–83. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9826-4>.
- [105] Hashim, H., and W. S. Ho. 2011. Renewable Energy Policies and Initiatives for a Sustainable Energy Future in Malaysia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15(9): 4780–87. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.073>.
- [106] Mahmud, S. S., et al. 2022. Enhancement of Biohydrogen Production from Palm Oil Mill Effluent (POME): A Review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 47(96): 40637–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.07.225>.
- [107] Mahmud, S. S., J. M. Jahim, P. M. Abdul, A. A. I. Luthfi, and M. S. Takriff. 2021. Techno-Economic Analysis of Two-Stage Anaerobic System for Biohydrogen and Biomethane Production from Palm Oil Mill Effluent. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 9(4): 105679. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105679>.
- [108] Said, M., A. S. Sitanggang, R. Juliana, S. P. Estuningsih, and A. Fudholi. 2021. Production of Methane as Bio-Fuel from Palm Oil Mill Effluent Using Anaerobic Consortium Bacteria. *Journal of Cleaner Production*. 282: 124424. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124424>.
- [109] Aziz, N. I. H. A., M. M. Hanafiah, and S. H. Gheewala. 2019. A Review on Life Cycle Assessment of Biogas Production: Challenges and Future Perspectives in Malaysia. *Biomass and Bioenergy*. 122: 361–74. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.047>.
- [110] Budiman, P. M., and T. Y. Wu. 2018. Role of Chemicals Addition in Affecting Biohydrogen Production through Photofermentation. *Energy Conversion and Management*

- 165: 509–27. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.058>.
- [111] Maaroff, R. M., et al. 2019. Biohydrogen Production from Palm Oil Mill Effluent (POME) by Two-Stage Anaerobic Sequencing Batch Reactor (ASBR) System for Better Utilization of Carbon Sources in POME. *International Journal of Hydrogen Energy*. 3395–3406. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.06.013>.
- [112] Mahmud, S. S., J. M. Jahim, and P. M. Abdul. 2017. Pretreatment Conditions of Palm Oil Mill Effluent (POME) for Thermophilic Biohydrogen Production by Mixed Culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42(45): 27512–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.178>.
- [113] Engliman, N. S., P. M. Abdul, S. Y. Wu, and J. M. Jahim. 2017. Influence of Iron (II) Oxide Nanoparticle on Biohydrogen Production in Thermophilic Mixed Fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42(45): 27482–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.224>.
- [114] Jamali, N. S., J. Md Jahim, and W. N. R. Wan Isahak. 2016. Biofilm Formation on Granular Activated Carbon in Xylose and Glucose Mixture for Thermophilic Biohydrogen Production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41(46): 21617–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.092>.
- [115] Abdul, P. M., et al. 2016. Effects of Changes in Chemical and Structural Characteristic of Ammonia Fibre Expansion (AFEX) Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch Fibre on Enzymatic Saccharification and Fermentability for Biohydrogen. *Bioresource Technology*. 211: 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.135>.
- [116] Chong, P. S., et al. 2013. Enhancement of Batch Biohydrogen Production from Prehydrolysate of Acid Treated Oil Palm Empty Fruit Bunch. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(22): 9592–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.154>.
- [117] Chong, M. L., N. A. Abdul Rahman, R. A. Rahim, S. A. Aziz, Y. Shirai, and M. A. Hassan. 2009. Optimization of Biohydrogen Production by *Clostridium butyricum* EB6 from Palm Oil Mill Effluent Using Response Surface Methodology. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34(17): 7475–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.088>.
- [118] Alalayah, W. M., M. S. Kalil, A. A. H. Kadhum, J. M. Jahim, and N. M. Alauj. 2008. Hydrogen Production Using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *International Journal of Hydrogen Energy*. 33(24): 7392–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.09.066>.
- [119] Husaini, C. U. N., et al. 2023. The CRISPR Technology: A Promising Strategy for Improving Dark Fermentative Biohydrogen Production Using *Clostridium* spp. *International Journal of Hydrogen Energy*. 48(61): 23498–23515. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.03.162>.
- [120] Nguyen, T. H. T., S. Park, J. Jeong, Y. S. Shin, S. J. Sim, and E. Jin. 2020. Enhancing Lipid Productivity by Modulating Lipid Catabolism Using the CRISPR-Cas9 System in *Chlamydomonas*. *Journal of Applied Phycology*. 32(5): 2829–40. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02172-7>.
- [121] Lin, W.-R., and I.-S. Ng. 2020. Development of CRISPR/Cas9 System in *Chlorella vulgaris* FSP-E to Enhance Lipid Accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*. 133: 109458. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109458>.