

产异丁醇关键基因在大肠杆菌中表达的研究

潘超强¹ 高强^{1*} 郑春阳² 孟庆艳¹ 段强¹ 冯少龙¹

(1. 天津科技大学 生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室 工业酶国家工程实验室 天津 300457)

(2. 天津强微特生物科技有限公司 天津 300384)

摘要:【目的】改造大肠杆菌缬氨酸合成途径,使其能够代谢合成异丁醇。【方法】将乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) 1.2829 的 2-酮异戊酸脱羧酶基因(*kivD*)和醇脱氢酶基因(*adhA*)串联克隆到大肠杆菌 DH5 α 宿主中表达。【结果】经过改造的宿主菌发酵 24 h 后异丁醇产量为 0.12 g/L。酶活测定实验发现, *kivD* 和 *adhA* 基因在宿主菌中均得到表达,但由于 *KivD* 的低表达量导致宿主菌最终的异丁醇合成能力偏低。通过研究温度和 pH 对 *KivD* 和 *AdhA* 酶活的影响,最终选定二者的最适温度为 30 °C,最适 pH 为 6.5。【结论】通过向宿主菌导入外源异丁醇合成基因能够改造其自身代谢途径,从而合成异丁醇。

关键词: 2-酮异戊酸脱羧酶, 醇脱氢酶, 大肠杆菌 DH5 α , 异丁醇

Coexpression of two essential isobutanol synthesis genes in *Escherichia coli*

PAN Chao-Qiang¹ GAO Qiang^{1*} ZHENG Chun-Yang² MENG Qing-Yan¹
DUAN Qiang¹ FENG Shao-Long¹

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, National Engineering Laboratory for Industry Enzymes, Tianjin 300457, China)

(2. Robustnique Corporation Ltd., Tianjin 300384, China)

Abstract: [Objective] *E. coli* DH5 α modified the valine biosynthesis pathway to biosynthesize

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CB707401); 国家 863 计划项目(No. 2012AA021302); 天津市滨海新区自主创新重大项目(No. 2011-BK120014)

*通讯作者: Tel: 86-22-60601599; 邮箱: gaoqiang@tust.edu.cn

收稿日期: 2011-10-27; 接受日期: 2011-12-30

isobutanol. **[Methods]** The 2-ketoisovalerate decarboxylase gene (*kivD*) and alcohol dehydrogenase gene (*adhA*) of *Lactococcus lactis* 1.2829 were tandemly cloned and expressed in *E. coli* DH5 α . **[Results]** The yield of isobutanol by the engineered *E. coli* was only 0.12 g/L by 24 h fermentation. Further results revealed that the insufficient KivD activity is the bottleneck for the isobutanol biosynthesis. A series of experiments also showed that the optimal temperature and pH for both KivD and AdhA are 30 °C and pH 6.5, respectively. **[Conclusion]** Isobutanol fermentation by cloning and expressing essential genes in host is feasible.

Keywords: 2-Ketoisovalerate decarboxylase, Alcohol dehydrogenase, *E. coli* DH5 α , Isobutanol

由于公众对全球变暖以及世界范围内能源安全的担忧,使得由可再生资源生产生物质燃料越来越受到重视^[1-3]。尽管微生物发酵产乙醇已经有很长的历史,而且在生物质燃料中扮演重要角色,但是由于它有低能量密度、高蒸汽压、高吸湿性这些缺点而不能作为汽油的理想替代品^[4]。相比较而言,长链醇拥有高能量密度、低腐蚀性、低吸湿性、更易与汽油和柴油混合以及与现今的设备更好的相容性等特点,使其成为潜在的新型可再生能源替代品和燃料添加剂^[5]。用丙酮丁醇梭菌发酵生产正丁醇已经拥有近百年的历史,最近也正受到极大的关注^[6]。近年来,通过大肠杆菌代谢生产正丁醇,以及正丙醇、异丁醇、2-甲基正丁醇、3-甲基正丁醇等长链醇都被证明是可行的^[5,7-11]。最近研究人员又成功地在细长聚球蓝细菌内通过光合 CO₂ 循环生产异丁醛和异丁醇^[12]。2010年3月17日,异丁醇被美国 Le Mans Series (ALMS) 学会宣布其为第五能源。然而现今世界范围内异丁醇的生产仍然主要依靠石油为原料进行化学合成,但是随着石油价格的持续上涨,以及石油化工引起的环境污染问题等制约了其进一步发展,从而使由可再生资源生产异丁醇展示了良好的发展前景。

过去的研究表明,自然界中尚未发现能够由葡萄糖合成异丁醇的原核生物。目前研究人员通过特定的基因工程技术对一些宿主菌进行改造获得合成异丁醇的能力。2007年美国 UCLA 的

研究小组首次向大肠杆菌内导入酮酸脱羧酶和醇脱氢酶基因以改造其缬氨酸合成途径从而成功合成异丁醇^[5],此后分别于2010年和2011年在谷氨酸棒杆菌和解纤维梭菌内利用此套系统实现了异丁醇的生物合成^[4,13]。国内林丽华等^[14]也利用相似的系统进行了异丁醇生物合成,产量达到3 g/L。

异丁醇的生物合成途径是将缬氨酸前体 2-酮异戊酸通过 2-酮异戊酸脱羧酶(KivD)代谢成异丁醛,然后由醇脱氢酶(AdhA)还原成异丁醇(图1)。大肠杆菌自身没有 2-酮异戊酸脱羧酶和以辅酶 I 为辅酶的醇脱氢酶,因此需要外源引进这两个基因并使其表达。本研究将乳酸乳球菌 1.2829 的 *kivD* 和 *adhA* 基因单独或串联克隆到大肠杆菌 DH5 α 宿主中进行表达,从而合成异丁醇,并研究了 KivD 和 AdhA 酶活的最适温度和 pH。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 1.2829 购自中国科学院微生物研究所普通微生物菌种保藏管理中心,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保藏。质粒 pZY507 由德国斯图加特大学 Georg A. Sprenger 教授赠送,质粒载体 pMD19-T Simple Vector 购自宝生物(大连)公司。

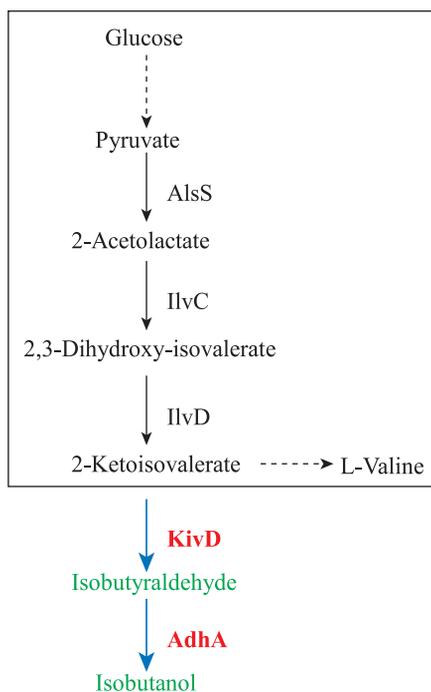


图 1 异丁醇生物合成途径

Fig. 1 The pathway for isobutanol production

注: 方框内是大肠杆菌缬氨酸合成途径, KivD 为 2-酮异戊酸脱羧酶, AdhA 为醇脱氢酶。

Note: The pathway in block is valine biosynthesis pathway of *E. coli*, KivD is 2-ketoisovalerate decarboxylase and AdhA is alcohol dehydrogenase.

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶 *Sac* I、*Bam*H I、*Sal* I、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒与细菌质粒小提试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Renogen Biolab 科技有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、2-酮异戊酸、异丁醛、异丁醇与辅酶 I (NADH)购自美国

Sigma 公司; 其它试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基和培养条件: 大肠杆菌培养和转化子筛选采用 LB 培养基, 发酵培养基为添加终浓度 0.2 mol/L 葡萄糖的 LB 培养基。转化子筛选培养基添加抗生素为氨苄青霉素(终浓度为 100 mg/L)和盐酸四环素(终浓度为 50 mg/L)。培养条件为 37 °C 或 30 °C、200 r/min。

1.1.4 引物: 根据 GenBank 中乳酸乳球菌基因组序列设计 PCR 反应引物(表 1, 下划线部分为酶切位点), 并委托北京华大基因技术有限公司合成。引物 1-s、1-as 用于扩增 2-酮异戊酸脱羧酶基因 *kivD*。引物 2-s、2-as 用于扩增醇脱氢酶基因 *adhA*。

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pZY507-*kivD*、pZY507-*adhA*、pZY507-*kivD-adhA* 的构建: 这 3 种表达质粒的构建如图 2 所示。乳酸乳球菌基因组 DNA 的提取参照文献[15]进行。使用引物 1、2 分别进行目的基因 *kivD* 和 *adhA* 的 PCR 扩增, 反应条件: 95 °C 5 min; 92 °C 45 s, 63 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共 32 个循环; 72 °C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。质粒提取、DNA 片段与载体的酶切和连接分别参照相应的产品说明书进行, 大肠杆菌转化参照文献[15]进行。

1.2.2 KivD 和 AdhA 酶的表达: 将经过基因改造后筛选得到的大肠杆菌 *E. coli*-K、*E. coli*-A、*E. coli*-X (分别含有质粒 pZY507-*kivD*、pZY507-*adhA*、pZY507-*kivD-adhA*)过夜活化后按 1:100 接入发酵培养基, 37 °C、200 r/min 培养, 当

表 1 PCR 反应引物
Table 1 PCR primers

Primer	Gene	Sequence (5'→3')	Restriction	Size (bp)
1-s	<i>kivD</i>	CGAGCTCAATAAAATATGGAGGAATGCGATG	<i>Sac</i> I	31
1-as	<i>kivD</i>	CGCGGATCCACCATTATCCAAGAAAAATG	<i>Bam</i> H I	29
2-s	<i>adhA</i>	CGGATCCTTTTATATATAGAGGAGACTTTCTT	<i>Bam</i> H I	32
2-as	<i>adhA</i>	GACGTCGACAAATTTTTTCGAATTCATCTGC	<i>Sal</i> I	30

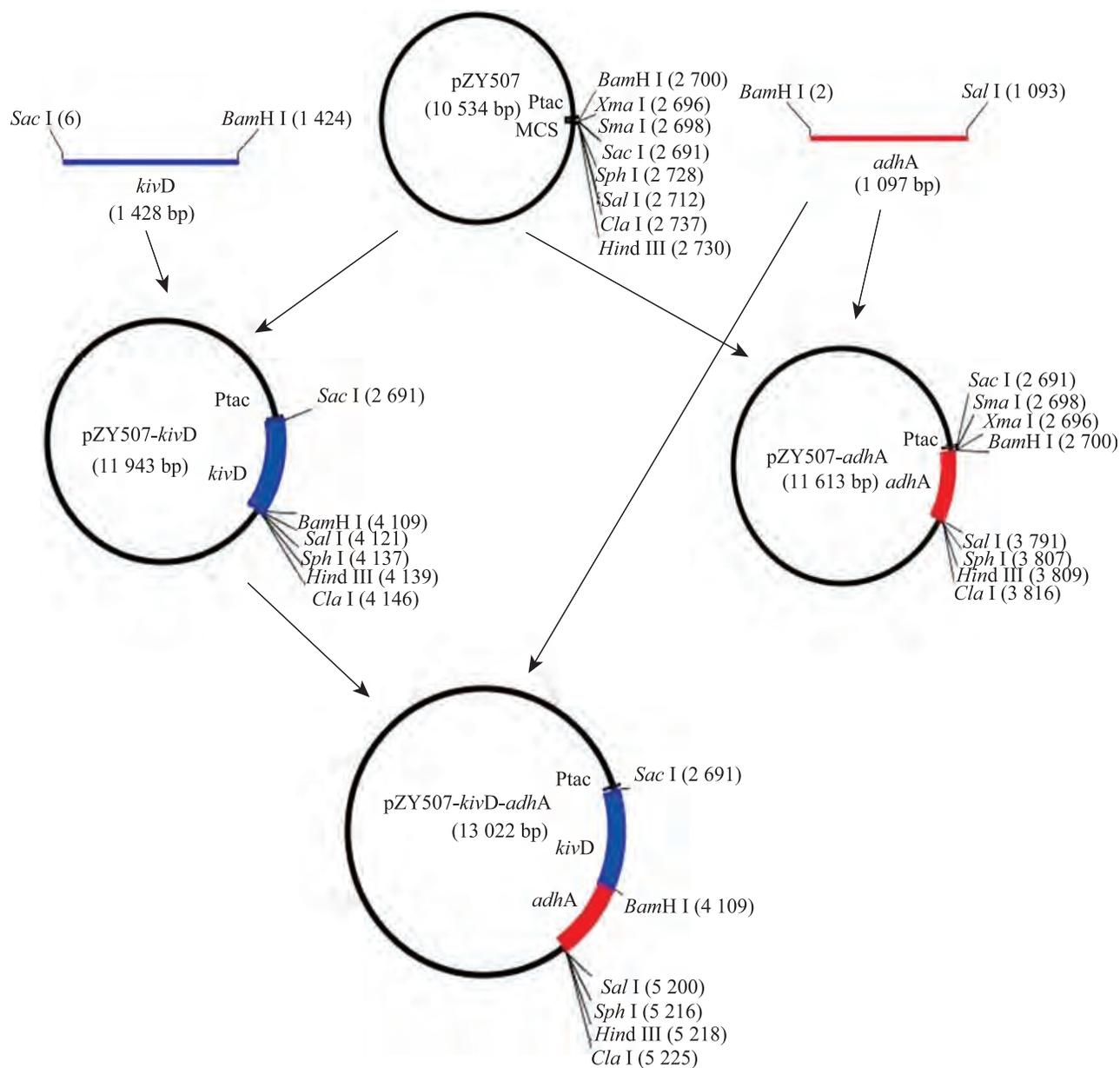


图2 表达载体 pZY507-*kivD*、pZY507-*adhA* 和 pZY507-*kivD-adhA* 的构建

Fig. 2 Construction of the expression vectors pZY507-*kivD*, pZY507-*adhA* and pZY507-*kivD-adhA*

OD_{600} 达到 0.4 时添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 30 °C、200 r/min 培养 8 h 以诱导工程菌中 KivD 和 AdhA 酶的表达。

1.2.3 KivD 和 AdhA 酶的粗提: 将方法 1.2.2 得到的菌体离心(7 000 r/min, 4 °C, 10 min), 再用预冷的 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 6.5)洗涤 3 遍, 最后重悬于磷酸钠缓冲液中。用超声波破碎仪破

碎菌体重悬液(功率 400 W, 工作 2 s/间隔 4 s, 共 20 min), 离心(12 000 r/min, 4 °C, 10 min), 取上清液即为粗酶液。

1.2.4 异丁醇发酵: 将基因工程菌 *E. coli*-K、*E. coli*-A、*E. coli*-X 活化后按 1:100 接入于 LB 种子培养基, 37 °C、200 r/min 培养过夜后再以 1:100 接种于发酵培养基, 当 OD_{600} 达到 0.4 时添加 IPTG

至终浓度 1 mmol/L, 30 °C、200 r/min 发酵 24 h。

1.2.5 异丁醛、异丁醇和残糖测定: 发酵液中异丁醛与异丁醇产量采用 Agilent 7890 气相色谱仪结合 G1888 顶空进样器测定。色谱条件: Polyethylene Glycol HP-INNOWax 色谱柱, FID (250 °C)检测器; 进样口压力 4.754 3 psi; 初始柱温 40 °C 保持 2 min, 再以 15 °C/min 的速率升到 110 °C 保持 4.5 min; 氢气流量 30 mL/min, 空气流量 400 mL/min, 氮气流量 30 mL/min; 顶空条件: 炉温 50 °C, 环温 60 °C, 传输管温 100 °C, 平衡时间 5 min, 加压 0.4 min, 注射 1 min, 重复测定 3 次取均值。发酵液残糖使用 SBA-40C 型生物传感分析仪测定, 重复测定 3 次取均值。

1.2.6 KivD 和 AdhA 酶活测定与蛋白电泳检测: KivD 和 AdhA 酶活测定分别参照文献[16]和[17]进行, 在 4 mL 反应体系中, KivD 和 AdhA 粗酶液的加入量分别为 500 μ L 与 15 μ L, 重复测定 2 次取均值。粗酶液中蛋白含量使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定, 重复测定 3 次取均值。粗酶液的蛋白电泳检测参照文献[15]进行。

2 结果与分析

2.1 表达质粒的构建与鉴定

以乳酸乳球菌(*L. lactis*) 1.2829 的总 DNA 为模板, 按照方法 1.2.1 用引物 1、2 分别进行 PCR 扩增。1%的琼脂糖凝胶电泳检测发现, 在 1.4 kb 和 1.1 kb 附近分别有特异的单一 DNA 条带(图 3), 与目的基因片段大小一致。将 PCR 产物与 pMD19-T Simple Vector 连接后委托北京华大基因技术有限公司进行测序, 经过比对, PCR 产物与目的基因序列 *kivD* 和 *adhA* 基本一致。按图 2 所示, 将质粒载体 pZY507 与相应的 DNA 片段进行酶切、连接并转化入大肠杆菌 DH5 α 宿主, 然后在选择培养基上挑取单菌落、提取质粒进行酶切验证和 PCR 验证, 最后经过 DNA 测序验证, 逐步构建得到改造菌株 *E. coli*-K (含有表达质粒 pZY507-*kivD*)、

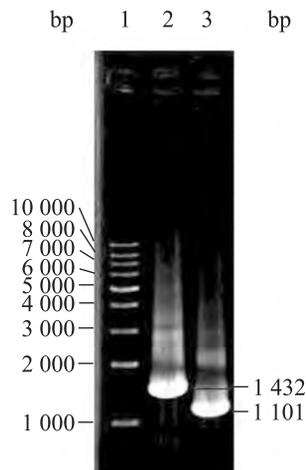


图 3 *L. lactis* 1.2829 目的基因 PCR 产物

Fig. 3 PCR products of the target genes of *L. lactis* 1.2829

注: 1: 1 kb DNA 分子量标准; 2: 引物 1-s 与 1-as 的 PCR 产物; 3: 引物 2-s 与 2-as 的 PCR 产物。

Note: 1: 1 kb DNA ladder; 2: PCR product by primers 1-s and 1-as; 3: PCR product by primers 2-s and 2-as.

E. coli-A (含有表达质粒 pZY507-*adhA*) 和 *E. coli*-X (含有表达质粒 pZY507-*kivD*-*adhA*), 其中表达质粒 pZY507-*kivD*、pZY507-*adhA* 为 *tac* 启动子下的单顺反子系统, pZY507-*kivD*-*adhA* 为 *tac* 启动子下的双顺反子系统, 且导入的 2 个外源基因均携带自身的核糖体结合位点。

2.2 温度和 pH 对 KivD 与 AdhA 酶活的影响

按照方法 1.2.3 分别制备 *E. coli*-K、*E. coli*-A、*E. coli*-X 的 KivD 或/与 AdhA 粗酶液。按照方法 1.2.6 进行 KivD 和 AdhA 的酶活性研究, 温度和 pH 对 KivD 和 AdhA 酶活的影响结果见图 4-11。

2.2.1 温度对 KivD 酶活的影响: 温度对酶活的影响分为两部分: 随着温度的升高, (1) 瞬时酶反应速率提高, 对酶活为正影响; (2) 酶失活速率升高, 对酶活为负影响。因此, 温度对酶活的影响取决于二者的强弱。由图 4 和图 5 发现, 随着温度的上升, 瞬时反应速率的提高对酶活的正影响逐渐被高温引起酶失活的负影响所掩盖, 而且随着体系温度升高, 酶反应完成程度也逐渐下降,

因此较低的温度有利于酶较长时间的反应。由图可知, 25 °C、30 °C、35 °C 的反应体系最终酶反应完成程度相差不大, 但是鉴于 25 °C 反应体系中初始酶活较低以及当环境温度太高时(≥ 35 °C) 细胞老化较快, 不利于长时间发酵, 因此之后的酶反应实验以及发酵实验均采用 30 °C。

2.2.2 pH 对 KivD 酶活的影响: 根据图 6 和图 7, pH 变化对 KivD 酶活有较大影响, pH 6.5 为 KivD

酶的最适 pH, 而且酸性 pH 对 KivD 酶活的影响比碱性 pH 更为显著。

2.2.3 温度对 AdhA 酶活的影响: 图 8 和图 9 结果显示, 随着温度的上升, 瞬时反应速率的提高对酶活的正影响逐渐被高温引起酶失活的负影响所掩盖, 而且随着体系温度升高, 酶反应完成程度也逐渐下降, 因此较低的温度有利于酶较长时间的反应。由于 25 °C 和 30 °C 的酶反应速率

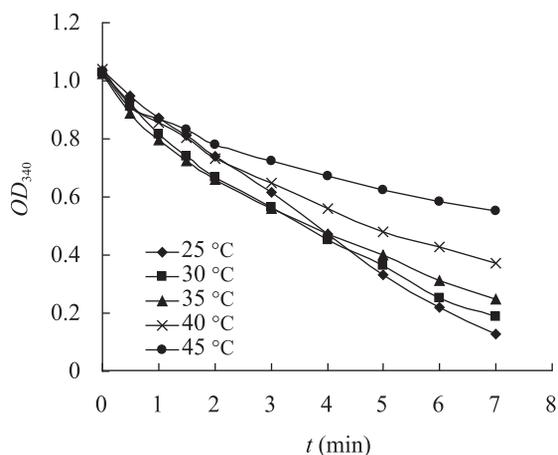


图 4 温度对 *E. coli*-K 粗酶液的 KivD 酶反应过程的影响

Fig. 4 Effect of temperature on KivD activity in *E. coli*-K crude extract

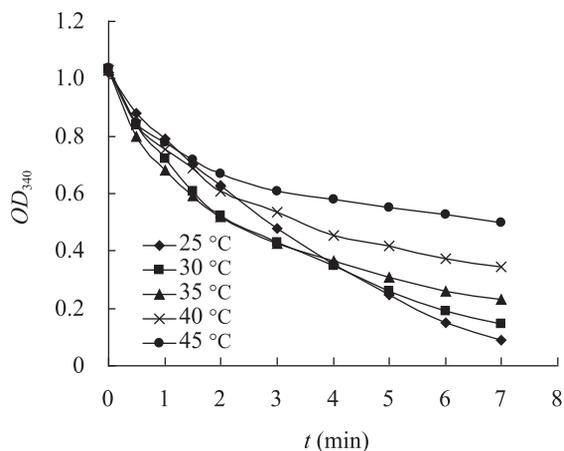


图 5 温度对 *E. coli*-X 粗酶液的 KivD 酶反应过程的影响

Fig. 5 Effect of temperature on KivD activity in *E. coli*-X crude extract

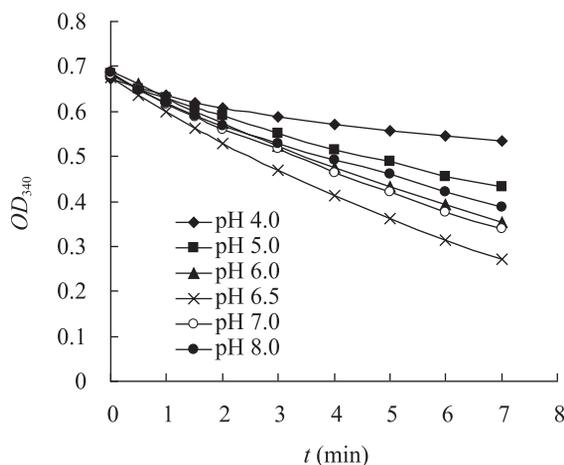


图 6 pH 对 *E. coli*-K 粗酶液的 KivD 酶反应过程的影响
Fig. 6 Effect of pH on KivD activity in *E. coli*-K crude extract

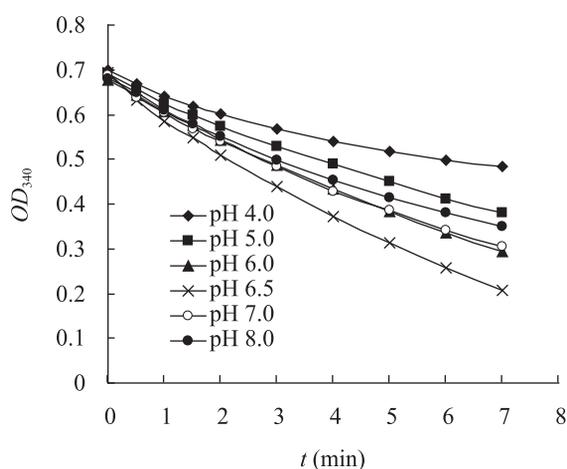


图 7 pH 对 *E. coli*-X 粗酶液的 KivD 酶反应过程的影响
Fig. 7 Effect of pH on KivD activity in *E. coli*-X crude extract

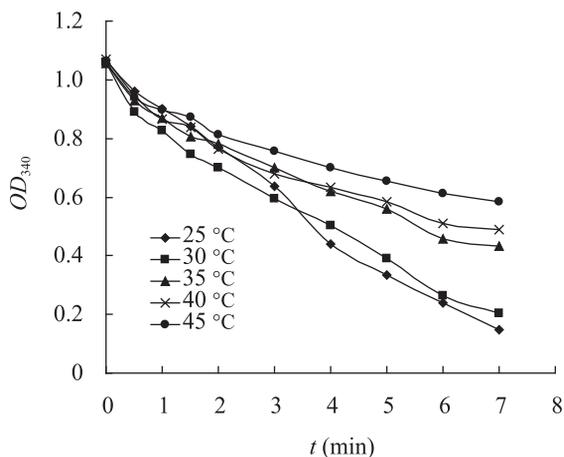


图8 温度对 *E. coli-A* 粗酶液的 AdhA 酶反应过程的影响

Fig. 8 Effect of temperature on AdhA activity in *E. coli-K* crude extract

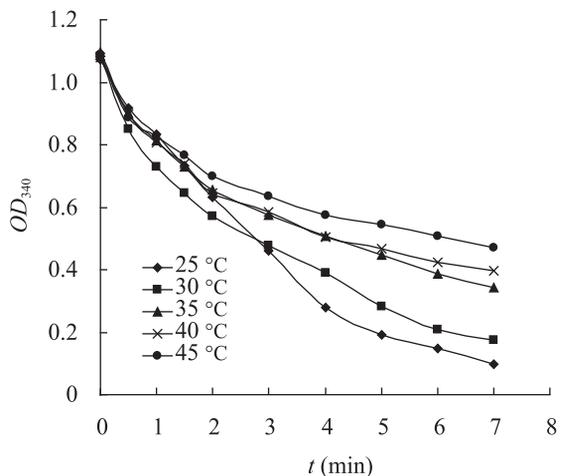


图9 温度对 *E. coli-X* 粗酶液的 AdhA 酶反应过程的影响

Fig. 9 Effect of temperature on AdhA activity in *E. coli-X* crude extract

相差不大以及体系反应程度的微小差异, 考虑到较高的温度有利于菌体的生长代谢, 因此之后实验的酶反应温度以及发酵实验均采用 30 °C。

2.2.4 pH 对 AdhA 酶活的影响: 图 10 和图 11 结果表明, pH 对 AdhA 酶活有较大影响, pH 6.5 为 AdhA 酶的最适 pH, 而且碱性 pH 对 AdhA 酶活的影响比酸性 pH 更为显著。

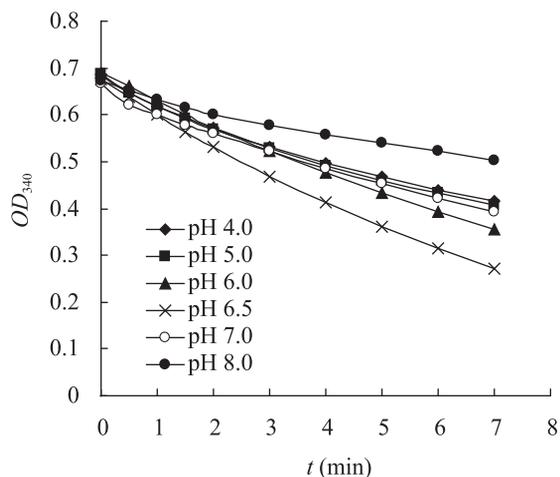


图10 pH 对 *E. coli-A* 粗酶液的 AdhA 酶反应过程的影响

Fig. 10 Effect of pH on AdhA activity in *E. coli-A* crude extract

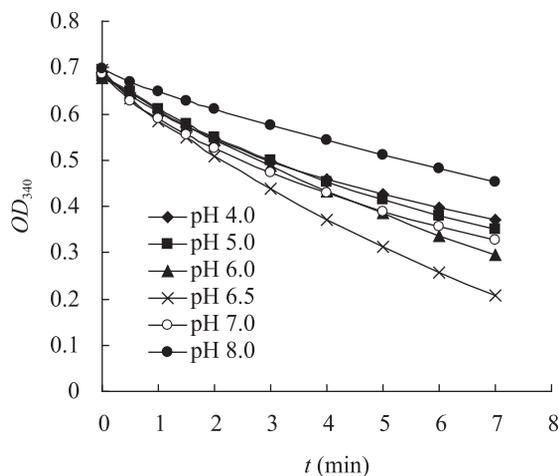


图11 pH 对 *E. coli-X* 粗酶液的 AdhA 酶反应过程的影响

Fig. 11 Effect of pH on AdhA activity in *E. coli-X* crude extract

2.3 粗酶液中蛋白含量测定与蛋白电泳结果

按照方法 1.2.6 测定了粗酶液中蛋白含量, 结果见表 2, 粗酶液蛋白电泳结果见图 12。由图 12 发现 KivD 在 *E. coli-K* 中成功表达, AdhA 在 *E. coli-A* 中成功表达, KivD 和 AdhA 在 *E. coli-X* 中成功表达, 但是由酶蛋白条带的亮度可以看出 KivD 的表达量明显低于 AdhA。

表2 改造菌株粗酶提取液中蛋白含量
Table 2 The protein content of crude extract in transformation strains

改造菌株 Transformant	粗酶液中蛋白含量 Protein content (mg/L)
<i>E. coli</i> -K	409±18
<i>E. coli</i> -A	582±26
<i>E. coli</i> -X	636±24

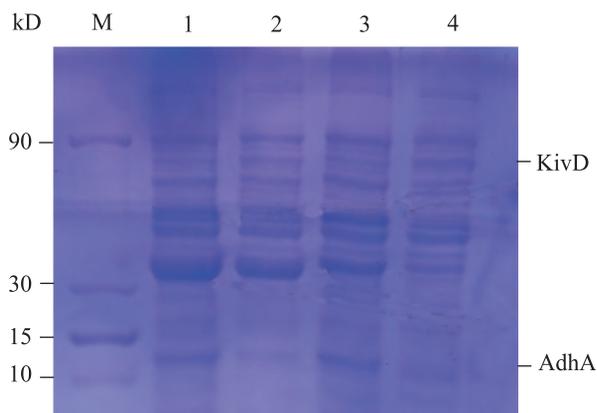


图12 基因工程菌的 SDS-PAGE

Fig. 12 SDS-PAGE of the engineered strains

注: M: 蛋白质分子量标准; 1: *E. coli*-X; 2: *E. coli*-A; 3: *E. coli*-K; 4: *E. coli* DH5α.

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: *E. coli*-X; 2: *E. coli*-A; 3: *E. coli*-K; 4: *E. coli* DH5α.

2.4 发酵产物及残糖测定结果

按方法 1.2.5 测定发酵液中异丁醛与异丁醇的产量和残糖量, 结果见表 3。由表 3 发现只有串联克隆表达 *kivD* 和 *adhA* 基因的菌株 *E. coli*-X 才能够合成异丁醇。菌株 *E. coli*-K 由于缺少将异丁醛还原成异丁醇的醇脱氢酶, 其发酵液中只有

痕量的异丁醛但没有异丁醇。异丁醛产量低有可能是因为由于异丁醛的积累对 *KivD* 乃至宿主自身造成了抑制, 使得异丁醛不再继续积累。

3 讨论

虽然目前尚未发现能够天然发酵产异丁醇的微生物, 但通过合成生物学手段改造的代谢工程菌株已经可以在实验室规模初步实现这一目的。如 UCLA 的研究小组在大肠杆菌中过量表达了缬氨酸合成路线上游的 3 个基因(*alsS*、*ilvC*、*ilvD*), 并敲除了相关代谢旁路的关键基因(*adhE*、*ldhA*、*frdAB*、*fnr* 和 *pta*)后, 通过 112 h 的长时间补料发酵, 异丁醇最终产量可达到 22 g/L^[5], 证明了利用基因工程菌发酵生产异丁醇具有潜在的工业化前景。

本研究构建的基因工程菌株 *E. coli*-K (含有表达质粒 pZY507-*kivD*)、*E. coli*-A (含有表达质粒 pZY507-*adhA*)和 *E. coli*-X (含有表达质粒 pZY507-*kivD*-*adhA*)分别表达了 *KivD*、*AdhA* 和 *KivD* 与 *AdhA* 酶活力, 表明质粒 pZY507 中 *tac* 启动子下的单、双顺反子系统可单独或共同表达 *kivD* 与 *adhA* 基因。与表达的酶活相对应, *E. coli*-K 只产微量的中间体异丁醛, *E. coli*-A 不产异丁醛与异丁醇, 只有 *E. coli*-X 发酵 24 h 异丁醇产量为 0.12 g/L。虽然 *E. coli*-X 的异丁醇产量与国内外的研究结果有较大差距, 但本实验进一步证明了这条合成路线具有可实行性, 并为下一

表3 改造菌株发酵产物与残糖测定

Table 3 Contents of fermentation products and residual sugar of the transformant strains

改造菌株 Transformant	异丁醛 Isobutyraldehyde (g/L)	异丁醇 Isobutanol (g/L)	残糖 Residual sugar (g/L)
<i>E. coli</i> DH5α	0	0	1.55±0.22
<i>E. coli</i> -K	0.032±0.006	0	1.82±0.18
<i>E. coli</i> -A	0	0	2.37±0.27
<i>E. coli</i> -X	trace	0.127±0.019	2.15±0.33

阶段的研究奠定了基础。酶活测定中粗酶液添加量的不同和 SDS-PAGE 结果证实, 异丁醇产量不高的原因是 KivD 的酶量表达远低于 AdhA, 此现象是否由基因串联表达所引起有待于进一步研究, 但该实验结果揭示了 KivD 的表达量成为合成异丁醇的瓶颈。今后如能采用源自高酶活菌株的 *kivD* 基因重新构建表达质粒, 或大幅度提高现有 *kivD* 基因的表达, 并结合性能优良的大肠杆菌宿主与优化培养条件等措施, 则异丁醇产量应有较大提高。

参 考 文 献

- [1] Lin YL, Blaschek HP. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45(3): 966–973.
- [2] Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, et al. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production[J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(5): 855–866.
- [3] Gao Q, Zhang M, McMillan JD, et al. Characterization of heterologous and native enzyme activity profiles in metabolically engineered *Zymomonas mobilis* strains during batch fermentation of glucose and xylose mixtures[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 98-100(1/9): 341–355.
- [4] Smith KM, Cho KM, Liao JC. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 1045–1055.
- [5] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. Nature, 2008, 451(7174): 86–89.
- [6] Borden JR, Papoutsakis ET. Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(9): 3061–3068.
- [7] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(6): 305–311.
- [8] Atsumi S, Liao JC. Directed evolution of *Methanococcus jannaschii* citramalate synthase for biosynthesis of 1-propanol and 1-butanol by *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(24): 7802–7808.
- [9] Cann AF, Liao JC. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(1): 89–98.
- [10] Connor MR, Liao JC. Engineering of an *Escherichia coli* strain for the production of 3-methyl-1-butanol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(18): 5769–5775.
- [11] Shen CR, Liao JC. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(6): 312–320.
- [12] Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(12): 1177–1180.
- [13] Higashide W, Li YC, Yang YF, et al. Metabolic Engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(8): 2727–2733.
- [14] 林丽华, 郭媛, 庞浩, 等. 大肠杆菌中表达关键基因产异丁醇的研究[J]. 生物技术, 2011(3): 19–23.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [16] de la Plaza M, Fernández de Palencia P, Peláez C, et al. Biochemical and molecular characterization of α -ketoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 238(2): 367–374.
- [17] Atsumi S, Wu TY, Eckl EM, et al. Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 651–657.