

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸合成相关酶有助于 1,4-丁二醇 转化为 4-羟基丁酸

张鑫, 陈国强

清华大学生命科学学院, 北京 100084

摘要: 4-羟基丁酸 (4-HB) 不仅具有医学应用价值, 而且是合成生物材料 P3HB4HB 的重要前体。在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 参与情况下, 大肠杆菌 *Escherichia coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD) 可以把 1,4-丁二醇 (1,4-BD) 转化为 4HB。为提高 4HB 产率, 通过过表达烟酸磷酸核糖转移酶 (PncB) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸合成酶 (NadE) 增加胞内 NAD 含量, 从而加速 1,4-BD 转化反应的进行。结果表明, PncB-NadE 的表达使 1,4-BD 转化率比对照组增加 13.03%, 由 10 g/L 的 1,4-BD 得到 4.87 g/L 的 4HB, 单位细胞的 4HB 产量由 1.32 g/g 提高 40.91% 至 1.86 g/g。因此 PncB 和 NadE 可用于促进 1,4-BD 转化为 4HB。

关键词: 4-羟基丁酸, 1,4-丁二醇, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD), 烟酸磷酸核糖转移酶, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸合成酶

Enzymes related with NAD synthesis promote conversion of 1,4-butanediol to 4-hydroxybutyrate

Xin Zhang, and Guoqiang Chen

School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: Besides medical application, 4-hydroxybutyrate (4-HB) is a precursor of P3HB4HB, a bioplastic showing excellent physical properties and degradability. *Escherichia coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD) can transform 1, 4-butanediol (1,4-BD) into 4HB with participation of cofactor NAD. To enhance productivity, nicotinic acid phosphoribosyltransferase (PncB) and nicotinamide adenine dinucleotide synthetase (NadE) were overexpressed to increase intracellular nicotinamide adenine dinucleotide concentration and promote reaction process. The shake flask fermentation result showed that the conversion rate increased by 13.03% with help of PncB-NadE, leading to 4.87 g/L 4HB from 10 g/L 1,4-BD, and productivity was increased by 40.91% to 1.86 g/g. These results demonstrated that expression of PncB and NadE is beneficial for conversion of 1,4-BD to 4HB.

Keywords: 4-hydroxybutyric acid, 1,4-butanediol, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nicotinic acid

Received: May 23, 2011; Accepted: June 8, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2010AA101607).

Corresponding author: Guoqiang Chen. Tel: +86-10-62783844; Fax: +86-10-62794217; E-mail: chengq@mail.tsinghua.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2010AA101607) 资助。

phosphoribosyltransferase, NAD synthetase

4-羟基丁酸 (4-hydroxybutyrate, 4HB) 作为神经递质是 γ -氨基丁酸的代谢物, 以很低的含量存在于哺乳动物大脑中, 在医学、药学领域里被认为是一种神经递质, 对于自我平衡调整和产生有规律的睡眠等方面起着非常重要的作用^[1]。4-羟基丁酸可经氧化转变为琥珀酸半醛、琥珀酸, 最终进入三羧酸循环而被代谢降解^[2-3]。琥珀酸半醛脱氢酶缺陷的患者会在体液中积累很高浓度的 4-羟基丁酸, 并表现出迟钝、癫痫等症状^[4]。4-羟基丁酸具有与盐酸氯胺酮类似的麻醉效果, 且能刺激体内荷尔蒙素的分泌, 因而被归为管制药品^[5-6]。

4-羟基丁酸的另一常见用途是作为生物塑料聚 3-羟基丁酸酯 4-羟基丁酸酯 (P3HB4HB) 的合成前体, 它在共聚物中的比例直接影响着最终 P3HB4HB 的材料学性质和降解性^[7-11]。尽管 4-羟基丁酸可在厌氧菌克氏梭菌 *Clostridium kluyveri* 对乙醇、乙酸发酵过程中产生^[12], 也存在于古细菌勤奋金属球菌 *Metallosphaera sedula* 等的 3-羟基丁酸/4-羟基丁酸固碳途径中^[13], 却不能在罗氏真养菌 *Ralstonia eutropha*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 等常用的 PHA 合成菌中形成。因此需要添加结构相关碳源, 如 4-羟基丁酸、 γ -丁内酯或者 1,4-丁二醇作为 4-羟基丁酸的来源^[14-17], 这些添加物主要以石化产品为原料经化学转化制备^[18-20]。

张磊等利用来源于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* KT2442 的醇脱氢酶 (DhaT) 和醛脱氢酶 (AldD) 催化完成 1,4-丁二醇向 4-羟基丁酸的转化^[21]。这里 DhaT 和 AldD 的催化作用需要辅酶因子 NAD 的参与 (图 1)。

对辅酶因子的调节是代谢工程改造中的一个重要手段, 提高胞内 NADH 水平已成功用于促进合成还原性产物如 1,3-丙二醇^[22]、琥珀酸^[23]、丁醇^[24]等。同理, 提高胞内 NAD 含量可能促进 1,4-丁二醇向 4-羟基丁酸的转化。烟酸磷酸核糖转移酶 (Nicotinic

Acid Phosphoribosyltransferase, PncB) 和 NAD 合成酶 (NAD Synthetase, NadE) 是大肠杆菌 NAD 合成途径的两个关键酶, 单独表达时均使胞内 NAD (H) 总量提高约 2.5 倍, 共表达时能够提高近 7 倍, 且 NAD 增加量要多于 NADH 增量^[25]。因此, 本研究通过在 *E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD) 中共表达 *pncB-nadE* 基因, 提高 1,4-丁二醇向 4-羟基丁酸的转化效率。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与引物

菌种 *Escherichia coli* S17-1 为清华大学微生物实验室保存。质粒 pZL-dhaT-aldD 由本实验室前期构建^[21]。本文所用菌种、质粒及引物序列见表 1。

fastpfu DNA 聚合酶以及用于基因克隆的 *E. coli* DH5 α 为北京全式金生物技术有限公司产品。各种限制性内切酶为 Fermentas 产品。质粒提取、胶回收试剂盒为博迈德公司产品。

1.2 培养基及培养条件

质粒构建过程以及摇瓶种子液均采用 LB 培养基。摇瓶发酵培养基为另外添加了 10 g/L 1,4-丁二醇的 LB 培养基。根据重组菌携带质粒的抗性向灭菌冷却后的培养基中加入抗生素, 其中氨苄青霉素浓度为 100 mg/L, 卡那霉素浓度为 50 mg/L。

培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min。除摇瓶发酵培养时间为 48 h 外, 其余情况均培养 12 h。

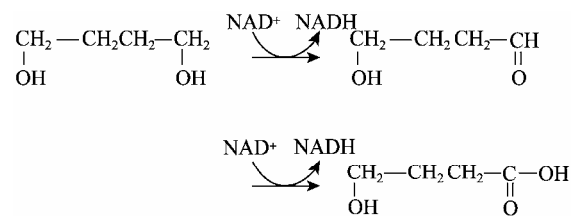


图 1 1,4-丁二醇向 4-羟基丁酸的转化反应

Fig. 1 Conversion of 1,4-BD to 4HB.

表 1 本研究中所使用的菌种、质粒和引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

		Relevant characteristics	Sources
Strains			
<i>E. coli</i> S17-1	<i>F-λ- ilvG- rfb-50 rph-1</i>		Lab stock
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F-φ80d lacZAM15Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk⁻,mk⁺) supE44λ-thi-1gyrA96 relA1 phoA</i>		Lab stock
<i>E. coli</i> MG1655	<i>F- l- rph-1</i> (wild-type)		Lab stock
Plasmids			
pZL-dhaT-aldD	pBBR1MCS2 derived, harboring gene <i>dhaT</i> and <i>aldD</i> from <i>Pseudomonas putida</i> KT2442		[21]
pEn	pMD19-TSimple derived, Promoter of pyruvate decarboxylase (Ppdc) from <i>Zyomonas mobilis</i>		[26]
pEnpncB	pEn derivatived with <i>pncB</i> fragment downstream Ppdc		This study
pEnnadE	pEn derivatived with <i>nadE</i> fragment downstream Ppdc		This study
pEnpncBnadE	pEn derivatived with <i>pncB</i> and <i>nadE</i> both downstream Ppdc		This study
Primers name	Primer sequence (5'-3')		
pncBF	<u>CGAGCTC</u> ATGACACAATTCGCTTCTCC		This study
pncBR	GCTCTAG <u>ACTCCCTGATGATATTA</u> ACTGGC		This study
nadEF	<u>CGAGCTC</u> TTCAATGACATTGCAACAAC		This study
nadER	GCTCTAG <u>ACGCACAATCCAATATG</u> TGCA		This study

1.3 NAD (H) 含量测定

按照已报道方法提取胞内 NAD 和 NADH^[22], 略有修改。将 3 mL 摇瓶发酵菌液于 4 °C 离心收集细胞, 弃上清。将细胞用冰冷的去离子水洗涤 2 次后充分重悬于 0.2 mL 去离子水中。加入 50 μL 0.4 mol/L HCl (提取 NAD) 或者 0.4 mol/L KOH (提取 NADH), 充分混匀后在冰上放置 10 min。NAD 提取液在 50 °C 水浴, NADH 提取液在 30 °C 水浴。10 min 后迅速移到冰上加入 50 μL 0.4 mol/L KOH (提取 NAD) 或者 0.4 mol/L HCl (提取 NADH) 进行中和。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。上清液即为 NAD (H) 的提取液, 将其移至新的离心管中, 立即检测。

含量测定采用酶循环法, 反应体系为 (1 mL): 450 μL HEPES 缓冲液 (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 0.15 mol/L, pH 7.4);

200 μL 5-乙基吩嗪硫酸盐 (PES, 4 mg/mL); 200 μL 噻唑蓝 (MTT, 5 g/L); 50 μL 乙醇; 50 μL 的 600 U/mL 乙醇脱氢酶 (ADH)。上述反应液混匀后 37 °C 温育 5 min, 加入 50 μL 的 NAD (H) 的提取液起始反应。测定 5 min 内 OD₅₇₀ 的变化。吸光度-时间曲线的斜率反应出提取液中 NAD (H) 的浓度。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞干重的测定

培养结束后, 12 000 r/min、10 min 离心收集菌体, 然后用去离子水洗涤、离心, 去掉菌体表面粘附的培养基成分。将得到的细胞在抽真空条件下冰冻干燥至恒重, 测定细胞干重 (Dry cell weight, DCW)。

1.4.2 产物浓度的测定

4-羟基丁酸的分析方法参考文献[21], 取菌液离心后上清进行冰干、酯化和气相色谱分析。

2 结果与分析

2.1 *pncB/nadE* 基因表达质粒的构建

以 *E. coli* MG1655 基因组 DNA 为模板, 表 1 中相应引物用 *fastpfu* DNA 聚合酶对基因 *pncB* 和 *nadE* 进行 PCR 扩增。反应程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 20 s, 58 °C 复性 20 s, 72 °C 延伸 45/30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min。

将 *pncB/nadE* 基因的 PCR 回收片段和表达载体 pEn 分别进行 *Sac* I/*Xba* I 酶切, 连接后化学法转入 *E. coli* DH5 α 感受态中, 阳性克隆经 *Eco*R I/*Xho* I 双酶切, 得到目的基因表达单元和载体骨架两条带 (图 2), 证明质粒 pEnpncB 和 pEnnadE 构建成功。再用 *Avr* II/*Xho* I 酶切 pEnnadE, 回收 *nadE* 表达单元一段, 将其插入经 *Nhe* I/*Xho* I 酶切的 pEnpncB 中, 因为 *Avr* II 和 *Nhe* I 是同尾酶, 因此两片段可相连得到质粒 pEnpncBnadE。经 *Xba* I 酶切验证正确后与质粒 pZL-dhaT-aldD 一起经电击法转入 *E. coli* S17-1 感受态, 获得重组菌株。已有报道, 基于 pBBR1MCS2 所构建的质粒能够与 pMD19-T Simple 的衍生质粒共存^[26], 因此, 这里的 pZL-dhaT-aldD 和 pEnpncBnadE 能够协同作用。进一步质粒提取证实了两质粒的相容性。

2.2 重组菌摇瓶发酵结果

以 *E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD) 为参照, 验证 PncB-NadE 表达对 1,4-丁二醇转化的影响 (表 2)。

野生型大肠杆菌也能由 1,4-丁二醇合成少量 4-羟基丁酸, 却不能进一步代谢利用 4-羟基丁酸^[16,21,27]。另外, 基因 *dhaT* 和 (或) *aldD* 在嗜水气假单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 4AK4 与 *E. coli* S17-1 中显示出相似的作用效果, 而 *A. hydrophila* 4AK4 (pZL-dhaT-aldD) 的 55 h 发酵结果显示 4-羟基丁酸积累量不断上升^[21]。可推断 *E. coli* S17-1 重组菌的 4-羟基丁酸积累量以及 1,4-丁二醇的消耗量在发酵过程中应是逐渐增大的, 因此, 这里以 48 h 发酵后的结果作为讨论依据。

对照组 *E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD) 由 10 g/L 的 1,4-丁二醇合成 4.31 g/L 4-羟基丁酸, 转化率 (mol/mol%) 为 36.44%。而同条件下, *E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD, pEnpncBnadE) 则得到 4.87 g/L 4-羟基丁酸, 1,4-丁二醇的转化率为 41.18%, 比对照组提高 13.03%。计算单位细胞量的 4-羟基丁酸产率能够更直接说明 PncB-NadE 的作用。对照组单位细胞产率为 1.32 g/g, 实验组相应值为 1.86 g/g。综上所述, PncB-NadE 的共表达明显促进 4-羟基丁酸的合成。

尽管如此, 仍有近 60% 的 1,4-丁二醇未被利用, 这是因为醇脱氢酶 (DhaT) 对 1,4-丁二醇活性不高, 且发酵后期会进一步减弱^[21], 所以, 需要筛选出更有效的酶来催化反应以充分利用 1,4-丁二醇。

此外, PncB-NadE 的表达同时导致细胞干重下降。可能是因为胞内 NAD 的增加导致氧化还原态失衡, 影响了细胞的正常代谢。细胞总量减少是转化

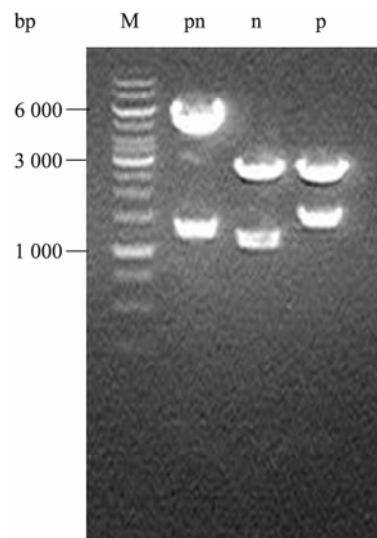


图 2 质粒 pEnpncB、pEnnadE、pEnpncBnadE 的酶切图谱

Fig. 2 Characterization of pEnpncB, pEnnadE, pEnpncBnadE. M: 1 kb DNA marker; p: pEnpncB digested with *Eco*R I/*Xho* I, two bands were 1 532 bp and 2 706 bp; n: pEnnadE digested with *Eco*R I/*Xho* I, two bands were 1 173 bp and 2 706 bp; pn: pEnpncBnadE digested with *Xba* I, two bands were 1 155 bp and 4 238 bp.

表 2 重组菌摇瓶发酵生产 4-羟基丁酸

Table 2 Production of 4-hydroxybutyric acid by *E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD, pEnpncBnadE) and *E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD)

Strains	DCW (g/L)	4-hydroxybutyric acid (g/L)	Conversion rate (%)
S17-1 (pZL-dhaT-aldD)	3.27±0.21	4.31±0.04	36.44±0.36
S17-1 (pZL-dhaT-aldD, pEnpncBnadE)	2.60±0.02	4.87±0.04	41.18±0.09

Strains were cultured at 37 °C, 200 r/min for 48 h. 10 g/L 1,4-butanediol was added into LB medium before sterilization. DCW: dry cell weight.

率不能充分提高的另一原因, 可通过添加葡萄糖等有利碳源来刺激细胞生长, 进而增加 1,4-丁二醇利用率。

2.3 NAD (H) 含量测定

酶循环反应中吸光度-时间曲线的斜率正比于提取液中 NAD (H) 的浓度。结果证明 PncB-NadE 的表达确实能提高胞内 NAD (H) 浓度 (图 3)。结合表 2 计算单位质量细胞内 NAD 和 NADH 含量变化, *E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD, pEnpncBnadE) 比 *E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD) 中 NAD 和 NADH 含量分别提高 2.04 倍和 2.74 倍。

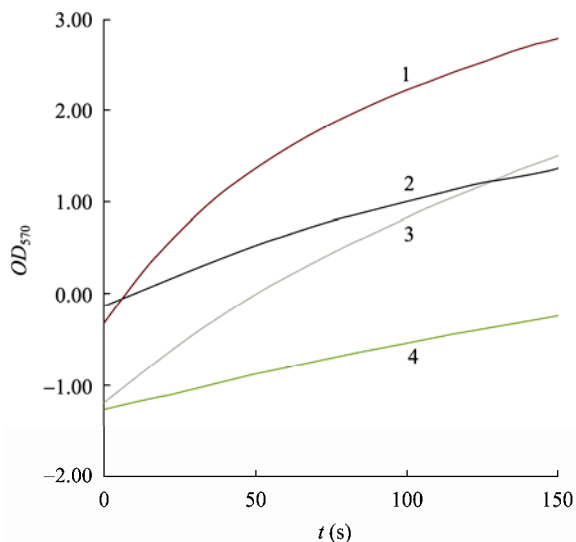


图 3 重组菌 NAD (H) 含量测定

Fig. 3 Relative concentration of NAD (H) in different recombinants. 1: NAD (*E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD, pEnpncBnadE)); 2: NAD (*E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD)); 3: NADH (*E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD, pEnpncBnadE)); 4: NADH (*E. coli* S17-1 (pZL-dhaT-aldD)).

3 结论

4-羟基丁酸被广泛应用于医学研究、生物材料合成。基于张磊等构建的由 1,4-丁二醇合成 4-羟基丁酸通路^[21]及 NAD 在其中所起作用, 本研究通过表达 NAD 合成途径中的烟酸磷酸核糖转移酶 PncB 和 NAD 合成酶 NadE, 将胞内 NAD 含量提高了 2.04 倍, 同时使单位细胞的 4-羟基丁酸产量由 1.32 g/g 升至 1.86 g/g, 而 1,4-丁二醇的转化率也比对照组提高了 13.03%。因此, 对于以 1,4-丁二醇为底物合成 4-羟基丁酸的反应, 引入 PncB 和 NadE 能够通过提高 NAD 供给来促进转化反应的进行。

REFERENCES

- [1] Ye F, Dong FW. Review of analysis methods of γ -hydroxybutyrate and its derivatives. *Merch Qual*, 2011(S3): 156-157.
叶峰, 董凤伟. γ -羟基丁酸及其相关物分析研究综述. *商品与质量*, 2011(S3): 156-157.
- [2] Kaufman EE, Nelson T. An overview of γ -hydroxybutyrate catabolism: the role of the cytosolic NAD⁺-dependent oxidoreductase EC 1.1.1.19 and of a mitochondrial hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase in the initial, rate-limiting step in this pathway. *Neurochem Res*, 1991, 16(9): 965-974.
- [3] Wong CGT, Chan KFY, Gibson KM, et al. Gamma-hydroxybutyric acid: neurobiology and toxicology of a recreational drug. *Toxicol Rev*, 2004, 23(1): 3-20.
- [4] Gibson KM, Hoffmann GF, Hodson AK, et al. 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an

- inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics*, 1998, 29(1): 14–22.
- [5] Drasbek KR, Christensen J, Jensen K. Gamma-hydroxybutyrate—a drug of abuse. *Acta Neurol Scand*, 2006, 114(3):145–156.
- [6] Efe C, Straathof AIJ, van der Wielen LAM. Options for biochemical production of 4-hydroxybutyrate and its lactone as a substitute for petrochemical production. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(6): 1392–1406.
- [7] Saito Y, Doi Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16(2): 99–104.
- [8] Saito Y, Nakamura S, Hiramitsu M, et al. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polym Int*, 1996, 39(3): 169–174.
- [9] Ishida K, Wang Y, Inoue Y. Comonomer unit composition and thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)s biosynthesized by *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, 2001, 2(4): 1285–1293.
- [10] Doi Y, Kanesawa Y, Kunioka M, et al. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 1990, 23(1): 26–31.
- [11] Mukai K, Doi Y, Sema Y, et al. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnol Lett*, 1993, 15(6): 601–604.
- [12] Söhling B, Gottschalk G. Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol*, 1996, 178(3): 871–880.
- [13] Berg IA, Kockelkorn D, Buckel W, et al. A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science*, 2007, 318(5857): 1782–1786.
- [14] Hiramitsu M, Koyama N, Doi Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*. *Biotechnol Lett*, 1993, 15(5): 461–464.
- [15] Kunioka M, Kawaguchi Y, Doi Y. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 30(6): 569–573.
- [16] Hein S, Söhling B, Gottschalk G, et al. Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 153(2): 411–418.
- [17] Liu SJ, Steinbüchel A. A novel genetically engineered pathway for synthesis of poly(hydroxyalkanoic acids) in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(2): 739–743.
- [18] Efe C, Straathof AIJ, van der Wielen LAM. Options for biochemical production of 4-hydroxybutyrate and its lactone as a substitute for petrochemical production. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(6): 1392–1406.
- [19] Qiu YN. Overview of the production method and application of γ -butyrolactone (γ -BL). *Sci-Tech Info Dev Econ*, 2008, 18(34): 83–84.
邱娅男. γ -丁内酯的生产方法及其应用综述. *科技情报开发与经济*, 2008, 18(34): 83–84.
- [20] Jing S, Guan LJ. Introduction about properties of 1,4-butanediol and processing technique. *Chem Eng Equip*, 2011(2): 137–138.
景森, 关丽娟. 1,4-丁二醇性能及各种生产工艺介绍. *化学工程与装备*, 2011(2): 137–138.
- [21] Zhang L, Shi ZY, Wu Q, et al. Microbial production of 4-hydroxybutyrate, poly-4-hydroxybutyrate, and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by recombinant microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(5): 909–916.
- [22] Zhang YP, Huang ZH, Du CY, et al. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metab Eng*, 2009, 11(2): 101–106.
- [23] Sánchez AM, Bennett GN, San KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng*, 2005, 7(3): 229–239.
- [24] Nielsen DR, Leonard E, Yoon SH, et al. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metab Eng*, 2009, 11(4/5):262–273.
- [25] Heuser F, Schroer K, Lütz S, et al. Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Eng Life Sci*, 2007, 7(4): 343–353.
- [26] Li ZJ, Shi ZY, Jian J, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2010, 12(4): 352–359.
- [27] Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol*, 2011, [Epub ahead of print].