

合成高级醇的微生物细胞工厂研究进展

刘增然, 张光一

河北经贸大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061

刘增然, 张光一. 合成高级醇的微生物细胞工厂研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1421-1430.

Liu ZR, Zhang GY. Advance in producing higher alcohols by microbial cell factories. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1421-1430.

摘要: 高级醇疏水性好, 能量密度高, 能与汽油随意混合; 用微生物发酵可再生材料生产高级醇燃料替代矿物燃料是发展趋势。文中综述了构建合成高级醇的酿酒酵母和大肠杆菌细胞工厂的研究和相关技术平台。重点介绍了依赖 CoA 的梭菌途径和 α -酮酸介导的非发酵途径的构建, 分析了各自的特点, 总结了生产高级醇的微生物细胞工厂的构建策略; 提出高级醇工业化生产要解决的问题和研究方向。

关键词: 高级醇, α -酮酸, 氨基酸代谢, 系统代谢工程

Advance in producing higher alcohols by microbial cell factories

Zengran Liu, and Guangyi Zhang

College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, Hebei, China

Abstract: Higher alcohols have a high energy density, low hygroscopicity and can be mixed with gasoline at any ratio. It is the trend to replace fossil fuels with biofuels produced via microbial fermentation of renewable resources. We reviewed the progress in the development of engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* that can produce higher

Received: June 4, 2013; **Accepted:** August 19, 2013

Supported by: Technology Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Human Resources and Social Security of Hebei (No. 2011-226), Science Research Foundation of the Higher Education Institutions of Hebei Province (No. ZH2012056), Program of Key Developing Discipline of Hebei University of Economics and Business.

Corresponding author: Zengran Liu. Tel/Fax: +86-311-87655680; E-mail: liuzengran@163.com

河北省留学人员科技活动择优资助项目 (No. 2011-226), 河北省高等学校科学研究计划项目 (No. ZH2012056), 河北经贸大学校级重点发展学科支持项目资助。

网络出版时间: 2013-09-23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130923.1041.002.html>

alcohols, as well as the related technology platforms. We mainly focused on the construction of CoA-dependent pathways and α -keto acid mediated non-fermentative pathways, analyzed their respective characteristics, and summarized the construction strategies. The problems to be solved and future research direction were also discussed.

Keywords: higher alcohols, α -keto acid, amino acid metabolism, system metabolic engineering

全球能量需求增加, 矿物能源枯竭、价格飙升、环境破坏, 促进了生物燃料的开发^[1], 醇燃料的研究生产引起了各国的高度重视。乙醇作为首先开发的醇燃料, 吸湿性高、能量密度低、不能用管道输送^[2]。而丁醇、戊醇等长链高级醇, 能量密度高、疏水性好、易纯化、与现有矿物能源基础设施兼容^[2-3], 已成为新的研发热点。

食品行业一直通过微生物发酵生产发酵食品和酒饮料, 并通过长期选择使其获得所需的优良性状。随着对微生物遗传代谢机理的了解和高通量测序及 DNA 重组技术的发展, 已经能够基于微生物自身代谢, 通过合理设计、修饰代谢途径, 改变相关酶的转运调节功能, 生产各种化学品。构建微生物细胞工厂生产生物燃料替代汽油、柴油和航空燃料^[4]已是可行, 很多合成途径已被成功引入酿酒酵母、大肠杆菌等菌株。但是除了 1-丁醇, 其他高级醇的微生物细胞工厂开发仍然面临不少困难^[3], 如表达量低, 不能通过自有代谢途径合成, 破坏细胞膜结构, 影响必需生理过程, 降低微生物生存能力^[4]。

要构建微生物细胞工厂、提高目标化学品的产量和细胞耐受性, 急切需要选择合适的微生物菌株, 采用创新战略和工具来构建目标产品的有效合成途径^[1], 优化下游发酵和纯化过程。因此, 本文概括了构建生产高级醇的大肠杆菌和酿酒酵母细胞工厂的研究进展, 总结了生产高级醇的微生物细胞工厂构建策略、存在问题和研究方向, 以期对我国微生物生产醇燃料的研究有所借鉴。

1 微生物细胞工厂构建技术平台

1.1 代谢工程

代谢工程通过高表达代谢途径关键酶、修饰细胞膜转运蛋白、敲除竞争途径^[5]等手段优化细胞调控功能、产生异源代谢物、扩大底物利用范围、提高细胞活性和代谢物产量^[6], 提高生产企业的市场竞争能力。微生物代谢工程研究中, 目标化学品的代谢途径选择直接影响其产量^[7], 途径构建需要修饰多个相互依赖的步骤^[8], 克服多个障碍, 包括酶选择、基因表达验证、代谢中间产物和蛋白质平衡、竞争途径敲除^[9]。途径构建后, 需要进一步提高产量和生产效率, 并保持细胞活力^[1,9]。要满足这些要求, 代谢工程需要与代谢物检测技术和细胞耐受适应技术结合^[8], 需要与系统生物学、合成生物学和进化工程整合^[1], 其中组学分析是选择代谢工程目标不可缺少的手段^[5]。

1.2 进化工程

产品毒性是微生物改造中的常见问题, 微生物细胞工厂要规模生产醇燃料, 需要增加细胞的产品耐受性^[4-5]。进化工程可大大提高微生物细胞对多种胁迫因子的耐受能力^[10]、发酵介质中有毒物质的耐受能力^[11]及产品毒性耐受能力, 优化目标化学品的产量^[4]。一般应用策略是设计合理的外部环境, 使细胞在选择压下连续培养实现定向进化, 筛选有益性状 (如产物耐受性) 的突变株^[1,12]; 然后分析基因变化, 确定表型改变的相关基因^[1]。

研究证明在葡萄糖受限的情况下, 酿酒酵母的葡萄糖信号途径的基因发生突变以适应环境改

变^[13]；采用 UV 处理和麦芽三糖胁迫进化的方法，提高了 α -葡萄糖苷转运蛋白的表达^[14]。Atsumi 等^[15]通过适应进化研究，发现大肠杆菌的异丁醇耐受基因，并将相关基因用于生产菌株构建，提高了菌株的异丁醇耐受性。提高细胞产物耐受性的可能机理包括膜输出蛋白表达、膜蛋白修饰、热激蛋白改造、胁迫应答基因激活，这些策略可用于提高微生物醇燃料的耐受性^[4]，其中具转运功能的膜输送蛋白有很大的开发潜力^[16]。

1.3 系统代谢工程

系统代谢工程将系统生物学、合成生物学和进化工程技术与代谢工程结合在一起，为代谢工程提供技术平台，以利于构建新的代谢途径和代谢酶、修饰已有代谢途径、优化目标化学品的产量^[1]。借助系统代谢工程平台的方法和策略，可以使微生物细胞的遗传和代谢网络完全重构或改造，使细胞产生的目标化学品达到工业生产水平^[5]。

科学家已经用系统代谢工程方法，构建了新的代谢途径、代谢产物、细胞调节回路，也正在构建各种微生物细胞工厂以有效生产各种化学品^[17-18]。代谢工程、合成生物学及系统生物学近 10 年的发展，为高效合成醇燃料的代谢途径构建铺平道路^[19-20]。系统代谢工程将在高级醇生产菌株构建中起重要作用^[21]，并改善目标醇合成的选择性、增加细胞的醇耐受性、扩大底物利用范围，进而提高醇的产量^[7,21]。

用系统代谢工程手段构建微生物细胞工厂的策略包括：底物利用改造、转运蛋白修饰、辅酶优化、副产物消除和产物前体富集、适应进化、代谢途径构建及优化、计算机模拟和组学分析、建立基因组规模代谢网络模型、复合基因组工程。一般是借助计算机模拟、组学分析确定可行的异源代谢途径^[22]或目标基因，使细胞合成目标化学品，然后通过通量扩展、蛋白改造、产物耐受定

向进化^[3,5,19]等方法使细胞获得高产量、高产品毒性耐受^[1]等优良性能。目标化学品不同，采用的代谢工程方法和路径也不同。

2 生产高级醇的潜在微生物

梭状芽胞杆菌是丁醇的天然生产者，很多微生物具有产生醇燃料的潜力^[23]，研究最多的是大肠杆菌、酿酒酵母、枯草芽胞杆菌，其他菌属如发酵单胞菌属、肠球菌属、红球菌属、毕赤酵母属、假丝酵母属、假单胞菌属和克雷伯氏菌属也是潜在生产者^[24]。

2.1 梭状芽胞杆菌

梭状芽胞杆菌可以通过乙酰 CoA 合成正丁醇^[25]，有几种梭状芽胞杆菌能在合适的发酵条件下产生大量丁醇^[21]。但梭状芽胞杆菌是严格厌氧菌，生长慢、丁醇耐受低、需要严格控制发酵条件，生理性能和遗传性能了解少，遗传改造方法缺乏，难以满足大规模生产要求^[20,26-27]。梭状芽胞杆菌的这些固有缺点，促进了其他微生物菌株的开发。

2.2 大肠杆菌

大肠杆菌生长快、培养简单、操作方便，遗传稳定、代谢易于控制、基因修饰表达技术成熟，是生产醇燃料的潜在受体。很多研究借助代谢工程方法对大肠杆菌进行遗传改造，使其有效产生醇燃料，但醇燃料具有微生物毒性，达到一定浓度会毒害大肠杆菌细胞，难适于工业生产。

2.3 酿酒酵母

酿酒酵母在工业发酵条件下生长旺盛，代谢网络了解深刻，基因改造技术成熟，环境胁迫耐受性强，可耐受高达 20% 的乙醇，工业上用于生产多种代谢物，具有发酵利用木质纤维材料生产醇燃料的潜力^[24,28]。

已经证明酿酒酵母的支链氨基酸、芳香族氨基酸和含硫氨基酸通过Ehrlich途径^[29]降解,经脱氨生成 α -酮酸; α -酮酸不进入中心碳代谢途径,而是在 α -酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶作用下,转化成相应的杂醇^[15,30](图1),如1-丙醇、正丁醇、异丁醇、3-甲基-1-丁醇(异戊醇)、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-戊醇,赋予酒饮料浓郁的芳香味。

这一非发酵途径从理论上为生产醇燃料提供了机会^[23],借助该途径生产醇燃料,受体相容性好,能避免异源途径引起的细胞代谢失衡;合成途径不需要CoA,避开三羧酸循环产能途径,不影响细胞产能,利于细胞生长。因此,通过Ehrlich

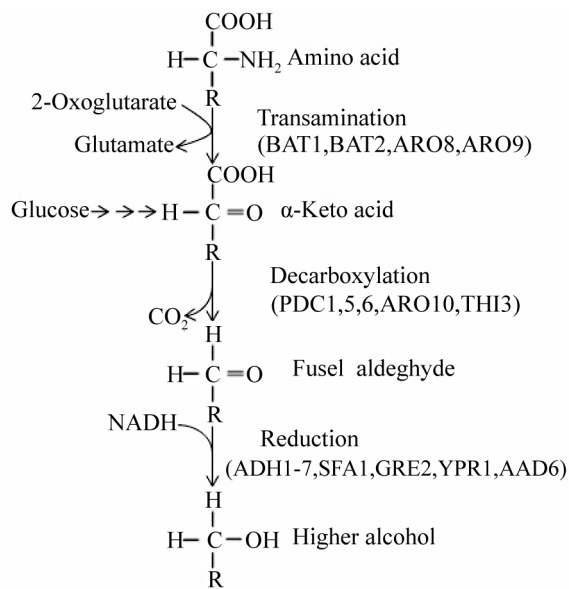


图1 支链氨基酸、芳香族氨基酸和含硫氨基酸代谢产生高级醇的Ehrlich途径

Fig.1 Ehrlich pathway for higher alcohol production by metabolizing branched-chain amino acids, aromatic amino acids, and sulfur-containing amino acid. BAT1/BAT2: mitochondrial or cytosolic branched-chain amino acid aminotransferases; ARO8/ARO9: aromatic amino acid aminotransferases I/II; ARO10: phenylpyruvate decarboxylase; THI3: carboxylase; SFA1, formaldehyde dehydrogenase; GRE2: 3-methylbutanal reductase; YPR1: NADPH-dependent aldo-keto reductase; AAD6: aryl-alcohol dehydrogenases.

途径修饰,可以使酿酒酵母成为经济有效地生产高级醇的细胞工厂。

3 高级醇的合成途径构建

构建合成高级醇的微生物细胞工厂研究目前主要依赖2个途径:梭菌的正丁醇合成途径和酿酒酵母的 α -酮酸介导的非发酵途径。

3.1 依赖CoA的正丁醇合成途径构建

将梭菌的正丁醇合成途径在大肠杆菌中异源表达,可使其合成丁醇(图2)。Atsumi等^[31]通过

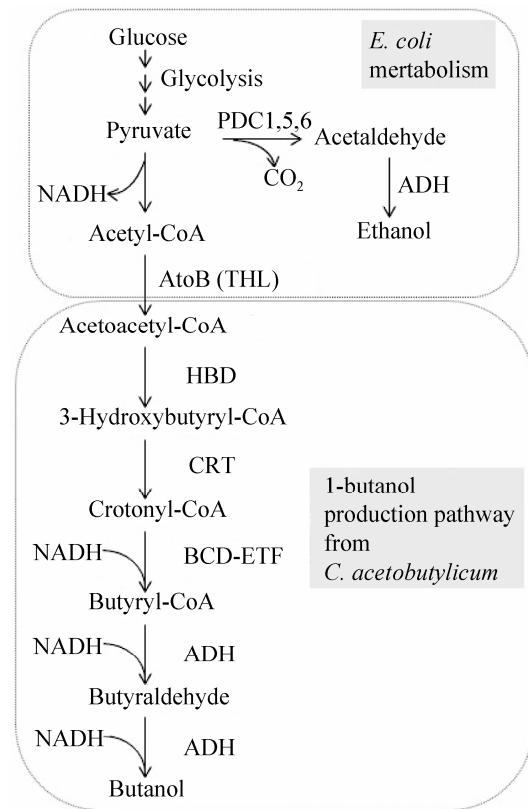


图2 依赖CoA的梭菌丁醇合成途径在大肠杆菌中的构建

Fig. 2 Schematics of development of CoA-dependent clostridial 1-butanol pathway in *E. coli*. AtoB: acetyl-CoA acetyltransferase; THL: acetoacetyl-CoA thiolase; HBD: 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; CRT: crotonase; BCD: butyryl-CoA dehydrogenase; ETF: electron transfer flavoprotein; ADH: alcohol dehydrogenase; PDC1, 5, 6: pyruvate decarboxylases.

启动子修饰、竞争途径敲除,使丁醇产量提高到373 mg/L; Inui等^[32]在正丁醇代谢途径构建中,采用多基因共表达载体、不同启动子调控、敲除竞争途径的策略,使产量高达1.2 g/L; Nielsen等^[33]采用多顺反子表达载体,表达量达到580 mg/L; Shen等^[34]通过设计具有NADH和乙酰CoA驱动力的正丁醇合成途径,使正丁醇产量达到30 g/L。Steen等^[2]采用类似策略,首次在酿酒酵母中引入正丁醇合成途径,用来自大肠杆菌、酿酒酵母、真氧产碱杆菌和山丘链霉菌的同工酶基因取代梭菌丁醇合成途径的基因,但正丁醇产量仅为2.5 mg/L。这些研究为生物能合成新途径的构建提供了新机会,但该途径对氧敏感、依赖CoA^[20],途径引入可能导致细胞代谢失衡,丁醇积累可引起细胞毒性^[35]、降低细胞活性,产量难达到工业生产要求。因此,高效表达高级醇需要寻找与宿主相容的途径。

3.2 α -酮酸介导的非发酵途径构建

为了克服梭菌丁醇合成途径的限制,加利福尼亚大学的研究人员^[35]首次提出借助支链氨基酸合成途径和 α -酮酸降解的Ehrlich途径合成长链醇的策略,该策略利用微生物的固有途径产生燃料醇合成的直接前体,避开CoA介导的途径、避免乙酰-CoA的区域问题。

3.2.1 大肠杆菌的改造

借助 α -酮酸途径合成长链醇的策略成功用于大肠杆菌改造。引入底物广谱的 α -酮酸脱羧酶(KivC)和乙醇脱氢酶(ADH)2个异源酶,延伸大肠杆菌固有的支链氨基酸代谢途径,可有效生产C4/C5醇如1-丁醇、异丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇;通过LeuABCD催化的碳链延伸策略合成C5-C8非天然醇如1-戊醇、1-己醇、3-甲基-1-戊醇、4-甲基-1-戊醇、4-甲基-1-己醇、5-甲基-1-庚醇等(图3)。加利福尼亚大学科研工作者对提高

高级醇产量进行广泛研究^[33,35-41]。研究证明用蛋白工程方法扩大2-异丙基苹果酸合成酶(LeuA)的结合部位,提高其底物适应性,可催化 α -酮酸的碳链连续延伸,最终获得C4-C8的高级醇混合物^[36,41];通过消除反馈抑制和敲除竞争途径可提高目标醇的生成^[38-39];协同调控转氢酶基因和NAD激酶基因可实现NADH到NADPH的高效转化,使异丁醇产量提高30%^[42];随机诱变和氨基酸类似物作为选择压可进一步提高目标醇的产量^[40];在生物反应器配备除气装置使异丁醇产量提高到50 g/L^[37],这是目前报道的最高产量。为了提高异丁醇生产量,Trinh等^[43]通过分析大肠杆菌的中心代谢,设计最佳途径,使中心代谢重构,引入的异丁醇合成途径变为专性厌氧途径,异丁醇产率从0.29提高到0.41 g/g葡萄糖。但大肠杆菌细胞的醇耐受性差是目前的最大挑战,如异丁醇耐受浓度不高于1.5%^[9]。

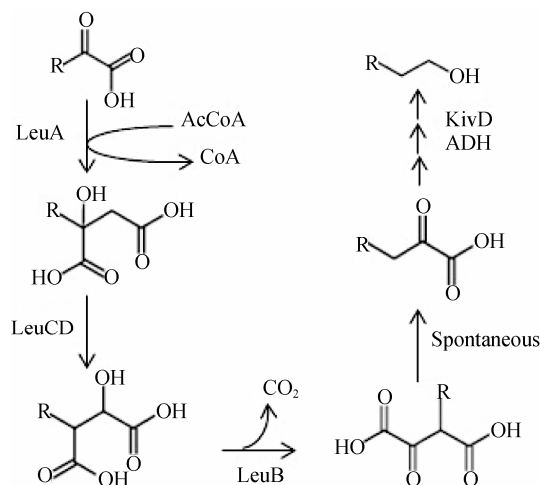


图3 LeuABCD催化的 α -酮酸碳链延伸途径构建

Fig. 3 Engineered pathways for chain elongation of α -keto acids catalyzed by LeuABCD. LeuA: 2-isopropylmalate synthase; LeuCD: isopropylmalate isomerase complex; LeuB: 3-isopropylmalate dehydrogenase; KivD: 2-keto acid decarboxylases (*Lactococcus lactis*).

3.2.2 酿酒酵母改造

研究表明酿酒酵母的醇耐受性高(丁醇耐受为2%),是高级醇的天然产生者,其缬氨酸、亮氨酸等氨基酸代谢可产生异丁醇、异戊醇等高级醇。因此,基于这些自有代谢途径、通过代谢流修饰提高高级醇产量可行。一般构建策略是过表达相关基因,使氨基酸代谢中间产物 α -酮酸降解还原合成高级醇;敲除竞争途径,提高高级醇产量(图4);通过环境适应筛选,提高细胞的群体感应能力和高级醇的耐受能力。

近年酿酒酵母表达高级醇得到广泛研究(表1)。Chen等^[9]在厌氧条件下同时过表达缬氨酸代谢途径的乙酰乳酸合成酶(ILV2)、二羟酸脱水酶(ILV3)、乙酰羟酸还原异构酶(ILV5)和细胞质支链氨基酸转氨酶(BAT2),使酵母厌氧生成异丁醇的产量增加9倍。Lee等^[44]过表达乳酸乳球菌的 α -酮异戊酸脱羧酶(KivD),在细胞质中过表达ILV2、ILV3、ILV5,使异丁醇产量达151 mg/L。Matsuda

等^[45]在细胞质中构建缬氨酸合成途径,过表达ILV2c、ILV3c和ILV5c,同时过表达KivD和乙醇脱氢酶(ADH6)使异丁醇产量增加2倍。Kondo等^[46]过表达KDC、ADH6、ILV2,敲除丙酮酸脱羧酶1基因(*pdcl*),使异丁醇产量提高13倍,得率6.6 mg/g葡萄糖。Brat等^[47]敲除线粒体缬氨酸合成途径的*ilv2*、*ilv3*和*ilv5*基因,在细胞质中构建缬氨酸合成途径,并过表达酮异戊酸脱羧酶(ARO10)和ADH2,使异丁醇的产量提高到630 mg/L,得率高达15 mg/g葡萄糖;通过进一步在细胞质中过表达木糖异构酶(XylA)、转醛醇酶(TAL1)、木酮糖激酶(XKS1),使酿酒酵母可以直接利用D-木糖产生丁醇^[48]。最近Branduardi等^[49]发现了氨基酸合成丁醇新途径,以甘氨酸为底物,通过氨基酸降解途径和乙醛酸、 β 乙基苹果酸、 α -酮戊酸中间产物,最后合成正丁醇和异丁醇混合物。目前所构建的酿酒酵母细胞,高级醇产量都非常低。如何提高高级醇的产生量是困扰酿酒酵母细胞工厂构建的主要问题。

表1 酿酒酵母细胞工厂生产高级醇

Table 1 Higher alcohol production from engineered *Saccharomyces cerevisiae*

Substrate	Strategy	Product	Yield (mg/g)	Reference
Glucose	Overexpress ILV2, ILV3, ILV5 and BAT2 Overexpress KivD	Isobutanol	3.9	[9]
Glucose	Overexpress ILV2, ILV3 and ILV5 in the cytosol Overexpress KivD and ADH6	Isobutanol	7.6	[44]
Glucose	Overexpress ILV2c, ILV3c and ILV5c in the cytosol Delete <i>pdcl</i> gene	Isobutanol	3.2	[45]
Glucose	Overexpress ILV2, Kivd and ADH6 Delete mitochondrial <i>ilv2</i> , <i>ilv3</i> and <i>ilv5</i> genes	Isobutanol	6.6	[46]
Glucose	Overexpress ARO10 and ADH2 Overexpress ILV2, ILV3, and ILV5 in the cytosol Delete mitochondrial <i>ilv2</i> , <i>ilv3</i> and <i>ilv5</i> genes	Isobutanol	15	[47]
Xylose	Overexpress ILV2, ILV3, and ILV5 in cytosol Overexpress XylA, TAL1, XKS1	Isobutanol	—	[48]
Glycine	Glycine as the sole nitrogen source	Isobutanol Butanol	3.9 6.1	[49]

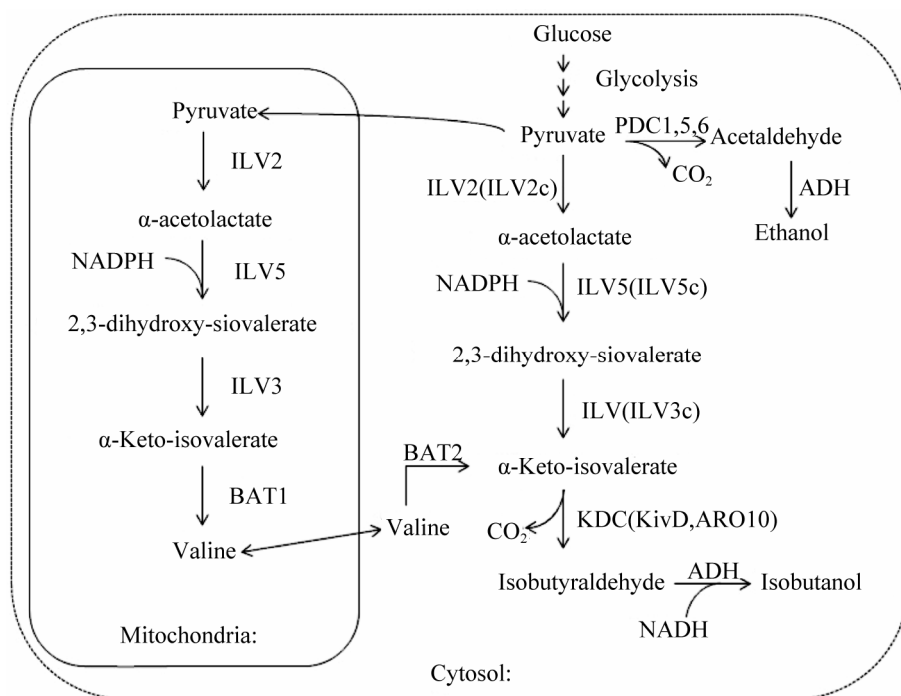


图4 生产高级醇的酿酒酵母的构建

Fig. 4 Construction of engineered *S. cerevisiae* producing higher alcohols. LV2c, ILV3c and ILV5c, ILV2, ILV3, and ILV5 with mitochondria transit peptides encoding sequence deleted.

研究发现高级醇产生受酮酸溢出机制调控^[2], 增加支链氨基酸转氨酶的活性可以促进异戊醇和异丁醇的生成^[50]; 在氨基酸合成条件下, 线粒体氨基酸转氨酶(BAT1)高表达, 在氨基酸分解代谢条件下, BAT2高表达^[51]; Matsuda等^[28]认为引入外源基因是提高酿酒酵母高级醇产量的有效方法。尽管对Ehrlich途径许多基因的调控有不少研究, 但均未考虑途径的网络关系; 高级醇的产生是氮源代谢、生成量很低; 酿酒酵母氨基酸代谢网络包括Ehrlich途径研究较少, 对氮源代谢生产化学品的研究较少, 因此用酿酒酵母生产高级醇还需要从系统水平进行相关研究。

4 展望

如何提高醇耐受性和生产效益是未来微生物

细胞工厂有效合成高级醇面临的挑战, 需要创新性工程方法对其代谢系统进行改造。酿酒酵母的醇耐受性好, 能通过Ehrlich途径代谢氨基酸合成高级醇, 具有工业化生产高级醇的潜力, 但产量不高、合成途径存在高度反馈抑制调节^[52], 难以商业化生产。

提高酿酒酵母合成高级醇的产量和效率需要借助计算机模拟和组学分析等系统方法建立基因组规模代谢网络模型, 以更好地进行代谢工程改造和菌株构建。以氨基酸代谢为基础, 结合系统代谢工程手段, 深入研究酿酒酵母的氨基酸代谢调控规律, 建立氨基酸代谢网络; 研究高级醇与关键中间产物 α -酮酸的复杂关系, 建立代谢通量分布; 对Ehrlich途径相关的酶及调控, 醇氧化还原与细胞培养条件的关系, 醇排泄到胞外的机理等进一步研

究；探讨利用自身氨基酸代谢和LeuABCD催化的 α -酮酸碳链延伸途径高效生产高级醇混合物的可能性；有针对性地敲除与中心代谢无关的基因，减少反馈抑制，提高细胞中心代谢适应性，保持细胞活性，提高高级醇的工业生产水平和得率。相信通过系统代谢工程改造酿酒酵母将成为有效生产高级醇的细胞工厂。

REFERENCES

- [1] Lee JW, Na D, Park JM, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(6): 536–546.
- [2] Steen EJ, Chan R, Prasad N, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb Cell Fact*, 2008, 7(1): 36–43.
- [3] Koffas MA. Expanding the repertoire of biofuel alternatives through metabolic pathway evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(4): 965–966.
- [4] Dunlop MJ. Engineering microbes for tolerance to next generation biofuels. *Biotechnol Biofuels*, 2011, 4: 32.
- [5] Liu P, Jarboe LR. Metabolic engineering of biocatalysts for carboxylic acids production. *Comput Struct Biotechnol J*, 2012, 3(4): e201210011.
- [6] Nevoigt E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72(3): 379–412.
- [7] Lee SJ, Lee SJ, Lee DW. Design and development of synthetic microbial platform cells for bioenergy. *Front Microbiol*, 2013, 4: 92.
- [8] Feng X, Mouttaki H, Lin L, et al. Characterization of the central metabolic pathways in *Thermoanaerobacter* sp. strain X514 via isotopomer-assisted metabolite analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(15): 5001–5008.
- [9] Chen X, Nielsen KF, Borodina I, et al. Increased isobutanol production in *S. cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnol Biofuels*, 2011, 4: 21.
- [10] Martin C, Marcet M, Almazan O, et al. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresour Technol*, 2007, 98(9): 1767–1773.
- [11] Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Oliva JM, et al. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *J Ind Microbiol Biot*, 2010, 37(11): 1211–1220.
- [12] Cakar ZP, Turanli-Yildiz B, Alkim C, et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(2): 171–182.
- [13] Kao KC, Sherlock G. Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genet*, 2008, 40(12): 1499–1504.
- [14] Liu ZR, Zhang GY, Sun YP. Mutagenizing brewing yeast strain for improving fermentation property of beer. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106 (1): 33–38.
- [15] Atsumi S, Wu TY, Machado IM, et al. Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 2010, 6: 449.
- [16] Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmidski HL, et al. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 487.
- [17] Na D, Kim TY, Lee SY. Construction and optimization of synthetic pathways in metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 13(3): 363–370.
- [18] Prather KL, Martin CH. *De novo* biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(5): 468–474.
- [19] Nielsen J, Keasling JD. Synergies between

- synthetic biology and metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 693–695.
- [20] Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb Cell Fact*, 2010, 9(1): 3–15.
- [21] Kharkwal S, Karimi IA, Chang MW, et al. Strain improvement and process development for biobutanol production. *Recent Pat Biotechnol*, 2009, 3(3): 202–210.
- [22] Chaturachai S, Furusawa C, Shimizu H. An in silico platform for the design of heterologous pathways in nonnative metabolite production. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13(1): 93.
- [23] Peralta-Yahya PP, Zhang F, del Cardayre SB, et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, 2012, 488(7411): 320–328.
- [24] Donaldson GK, Huang LL, Maggio-Hall LA, et al. Fermentive production of four carbon alcohols: US, 20080182308. 2008-07-03.
- [25] Yan Y, Liao JC. Engineering metabolic systems for production of advanced fuels. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(4): 471–479.
- [26] Lee SY, Park JH, Jang SH, et al. Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(2): 209–228.
- [27] Zheng YH, Li LZ, Xian M, et al. Problems with the microbial production of butanol. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(9): 1127–1138.
- [28] Matsuda F, Furusawa C, Kondo T, et al. Engineering strategy of yeast metabolism for higher alcohol production. *Microb Cell Fact*, 2011, 10(1): 70–79.
- [29] Ehrlich F. Über die Bedingungen Zusammenhang mit dem eiveissaufbau Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau. *Ber Dtsch Chem Ges*, 1907, 40: 1027–1047.
- [30] Cordente AG, Curtin CD, Varela C, et al. Flavour-active wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(3): 601–618.
- [31] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 305–311.
- [32] Inui M, Suda M, Kimura S, et al. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 77(6): 1305–1316.
- [33] Nielsen DR, Leonard E, Yoon SH, et al. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metab Eng*, 2009, 11(4-5): 262–273.
- [34] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, et al. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 2905–2915.
- [35] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451(7174): 86–89.
- [36] Zhang KS, Sawaya MR, Eisenberg DS, et al. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20653–20658.
- [37] Baez A, Cho KM, Liao JC. High-flux isobutanol production using engineered *E. coli*: a bioreactor study with in situ product removal. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(5): 1681–1690.
- [38] Connor MR, Liao JC. Engineering of an *Escherichia coli* strain for the production of 3-methyl-1-butanol. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(18): 5769–5775.
- [39] Cann AF, Liao JC. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(1): 89–98.
- [40] Connor MR, Cann AF, Liao JC. 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(4): 1155–1164.
- [41] Marcheschi RJ, Li H, Zhang K, et al. A synthetic recursive“+1” pathway for carbon chain elongation. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(4): 689–697.
- [42] Shi A, Zhu X, Lu J, et al. Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination

- for improving isobutanol production. *Metab Eng*, 2013, 16: 1–10.
- [43] Trinh CT, Li J, Blanch HW, et al. Redesigning *Escherichia coli* metabolism for anaerobic production of isobutanol. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(14): 4894–4904.
- [44] Lee WH, Seo SO, Bae YH, et al. Isobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of 2-ketoisovalerate decarboxylase and valine biosynthetic enzymes. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2012, 35(9): 1467–1475.
- [45] Matsuda F, Kondo T, Ida K, et al. Construction of an artificial pathway for isobutanol biosynthesis in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(11): 2139–2141.
- [46] Kondo T, Tezuka H, Ishii J, et al. Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 2012, 159(1-2): 32–37.
- [47] Brat D, Weber C, Lorenzen W, et al. Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *S. cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5: 65.
- [48] Brat D, Boles E. Isobutanol production from d-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2013, 13(2): 241–244.
- [49] Branduardi P, Longo V, Berterame NM, et al. A novel pathway to produce butanol and isobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 68.
- [50] Lilly M, Bauer FF, Styger G, et al. The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res*, 2006, 6(5): 726–743.
- [51] Colón M, Hernández F, López K, et al. *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PLoS ONE*, 2011, 6(1): e16099.
- [52] Peralta-Yahya PP, Keasling JD. Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnol J*, 2010, 5(2): 147–162.

(本文责编 陈宏宇)