

生物丁醇合成途径中关键酶及其基因的研究进展

何景昌, 张正波, 裘娟萍

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州, 310014)

摘 要 生物丁醇是一种清洁的新型能源,已应用于与汽油调合,乙醇-柴油混合燃料的助溶剂等,成为替代石油能源的新型燃料之一。文中阐述了利用丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)发酵生产 ABE(丙酮、丁醇、乙醇)的生物合成途径、代谢途径中的关键酶及基因工程技术改造其基因的最新研究进展,分析了提高溶剂产量和构建基因工程菌过程中存在的问题,并展望了未来的发展前景和研究方向。

关键词 生物丁醇, 新型能源, 生物合成, 基因工程菌

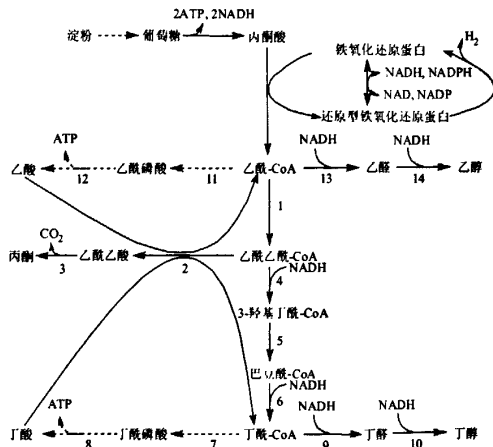
丁醇是重要的精细化工原料,也是新型的可再生能源,有着十分广泛的用途。生物丁醇具有高能量、可混合性、低挥发性、污染少等优点,可以取代乙醇作为一种可再生的燃料添加剂^[1]。现今丁醇生产主要依靠化学法,需要消耗大量石油,但随着石油储量的减少和价格持续上涨,加上石油化工造成的环境污染问题;另外,生物乙醇和生物柴油等其它生物燃料自身也存在许多不足,使生物丁醇展示了良好的发展前景^[2]。

作为发酵主要产物的丁醇,虽然比乙醇具有更光明的发展前景,然而实际发酵过程中丁醇转化碳源的产率要比乙醇低的多,因此限制了丁醇燃料的发展。为了让 ABE 发酵在工业生产上较化学法生产更具有竞争力,ABE 发酵必须在短时间内达到较高产量。从长远利益看,提高溶剂产量首要考虑的方法是改良菌种,以达到提高 ABE 产量的目的^[3]。随着代谢工程、基因工程技术的迅速发展,丙酮丁醇梭菌基因组测序研究的完成^[4],构建高转化率、遗传稳定的基因工程菌成为研究热点,深入理解和分析丙酮丁醇发酵代谢途径,为工程菌的构建和代谢调控提供理论依据。

1 丙酮丁醇的生物合成途径

丙酮丁醇发酵包括 2 个不同的时期:产酸期和产溶剂期。产酸阶段,细胞处于指数生长期,主要产生乙酸、丁酸、H₂ 和 CO₂,有机酸的产生引起了发酵液 pH 的下降;随着有机酸积累到一定阶段(pH 达到 4.3),发酵进入产溶剂期,此时细胞处于稳定期,产生的乙酸和丁酸在这一阶段转变为 ABE,随着发酵的进行,丙酮丁醇梭菌开始衰老,活力下降,加上底物的

消耗,溶剂的毒害作用,使菌体开始自溶或生成孢子,发酵逐渐由微弱最终达到静止结束^[6],具体代谢途径见图 1。



1-硫解酶(THL, *thl*); 2-乙酰乙酰-CoA: 乙酸/丁酸: CoA 转移酶(CoAT, *ctfA-B*); 3-乙酰乙酰-CoA 脱氢酶(AADC, *adc*); 4-3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶(BHBD, *hbd*); 5-巴豆酸酶(CRO, *crt*); 6-丁酰-CoA 脱氢酶(BCD, *bcd*); 7-磷酸丁酰转移酶(PTB, *ptb*); 8-丁酸激酶(BK, *buk*); 9-丁酰脱氢酶(BAD, *aad*); 10-丁醇脱氢酶(BDH, *bdhAB*); 11-磷酸乙酰转移酶(PTA, *pta*); 12-乙酸激酶(AK, *ack*); 13-乙醛脱氢酶(ALDH, *aad*); 14-乙醇脱氢酶(EDH, *edh*)

图 1 丙酮丁醇发酵代谢途径

ABE 是丙酮丁醇代谢途径的终产物,整个代谢途径有 3 个重要的中间代谢产物:乙酰-CoA、乙酰乙酰-CoA 和丁酰-CoA,这 3 个产物引起了有机酸和溶剂的产生,对中间代谢产物的分析,有助于全面深入了解丁醇的生物合成。乙酰-CoA 在辅酶 A 和丙酮酸-铁氧化还原酶(PFOR)的存在下,由糖酵解的产物丙酮酸生成;乙酰-CoA 经过硫解酶(THL)的催化生成乙酰乙酰-CoA,乙酰乙酰-CoA 再经过 3-羟基丁

第一作者: 硕士研究生(裘娟萍教授为通讯作者)。

收稿日期: 2008-10-31

酰-CoA 脱氢酶 (BHBD)、巴豆酸酶 (CRO)、丁酰-CoA 脱氢酶 (BCD) 催化进而生成丁酰-CoA, 这 3 个中间代谢产物位于代谢途径的分支点, 在产酸和产溶剂过程中起着重要作用。

2 丙酮丁醇发酵代谢途径中产溶剂的关键酶

目前, 随着丙酮丁醇代谢主要途径详细的阐述和深入的研究, 人们发现许多对溶剂产生具有关键作用的酶, 如乙酰乙酸脱羧酶 (AADC), 丁醇脱氢酶 (BDH) 等, 但由于整个代谢途径涉及的产物种类多, 含量少, 因此对代谢途径中酶的研究变得比较困难。Lee 等根据基因组序列分析构建了包括 502 个反应和 479 种代谢产物的代谢网络^[6], 这有利于研究代谢途径中酶和蛋白的特性及作用, 其中丙酮丁醇梭菌代谢主要途径涉及到的关键酶主要有以下几种。

2.1 丙酮合成中的关键酶

从乙酰乙酰-CoA 催化生成丙酮的代谢中, CoA 转移酶 (CoAT) 和乙酰乙酸脱羧酶发挥着重要作用, 它们被认为是诱导溶剂产生的关键酶^[7]。CoA 转移酶由 α 、 β 亚基组成, 结构为 $\alpha_2\beta_2$, 2 亚基分子量因不同种而异, 在丙酮丁醇梭菌 ATCC 824 中, 2 亚基分子量分别为 22.7 ku 和 23.7 ku^[8]。*ctfA*、*B* 分别编码 CoA 转移酶 α 、 β 亚基, 它们是 *sol* 操纵子的一部分。CoA 转移酶能够吸收发酵初期产生的乙酸和丁酸, 以减少乙酸和丁酸对细胞的毒害作用^[9]。乙酰乙酸脱羧酶分子量 330 ku, 由 12 个相同的亚基组成, 每个亚基分子量为 28 ku^[10], 乙酰乙酸脱羧酶催化乙酰乙酸生成丙酮和 CO_2 , 最适 pH 为 6.0。

2.2 丁醇合成中的关键酶

丙酮丁醇代谢途径中, 从丁酰-CoA 生成丁醇, 丁醇脱氢酶和醛/醇脱氢酶 (AAD) 起着重要作用。丁醇脱氢酶分子量为 82 ± 2 ku, 由 2 个同功酶 (I 和 II) 组成, 分子量都为 42 ku^[11], 其中丁醇脱氢酶 I 在丁醇形成较低浓度时发挥作用, 醛/醇脱氢酶和丁醇脱氢酶 II 在丁醇形成浓度较高时起作用, 并且醛/醇脱氢酶促使初始溶剂的形成, 而丁醇脱氢酶 II 则使丁醇继续生成。丁醇脱氢酶 I、II 分别由 *bdhA* 和 *bdhB* 编码, 它们的最适 pH 都是 5.5^[12]。醛/醇脱氢酶分子量大小为 96 ku, 由基因 *aad* (也称 *adhE*) 编码, 其氨基酸序列与大肠杆菌醛/醇脱氢酶具有 56% 的同源性^[13]。

2.3 乙醇合成中的关键酶

乙醇代谢合成过程中, 从乙酰辅酶 A 生成乙醇,

醛/醇脱氢酶和乙醇脱氢酶 (EDH) 起着重要作用。丙酮丁醇梭菌 DSM 792 中, EDH 由 1 个亚基组成, 分子量大小为 44 ku, 由基因 *edh* 编码。乙醇脱氢酶在较高 pH 下不稳定, 最适 pH 在 7.8~8.5。

3 产丙酮丁醇基因工程菌的构建

目前为止, 丙酮丁醇基因工程菌的研究在基因克隆、定位、功能分析和表达调控方面取得了较快进展。其中有关工程菌的构建在丙酮丁醇梭菌和大肠杆菌上分别取得了成功, 主要表现在以下 2 方面: 第 1, 利用基因高效表达和基因敲除技术改造丙酮丁醇梭菌; 第 2, 将控制溶剂产生的代谢途径引入遗传操作成熟的大肠杆菌, 在一定范围内改变大肠杆菌的代谢途径, 使大肠杆菌能够产生丙酮、丁醇, 为构建高产丙酮丁醇基因工程菌提供了新的思路。

3.1 丙酮丁醇梭菌工程菌的构建

近些年来, 涉及孢子形成、溶剂耐受性和胁迫抗性等影响溶剂产生的基因成为研究热点。其中许多基因被克隆并在丙酮丁醇梭菌中高效表达, 如编码 CoA 转移酶的基因 *ctfA*、*B*, 编码乙酰乙酸脱羧酶的基因 *adc*, 编码丁醇脱氢酶的基因 *bdh* 等; 另外, 许多研究者采用基因敲除方法, 使编码乙酸、丁酸支路关键酶的基因或阻遏丙酮、丁醇合成的基因失活, 以切断生成乙酸、丁酸的代谢支路或解除对丙酮、丁醇合成的阻遏, 如编码丁酸激酶 (BUK) 的基因 *buk*、溶剂抑制基因 *solR* 等。如今, 随着基因高效表达^[14]和基因敲除系统^[15, 16]的迅速发展, 利用基因工程构建高产丙酮丁醇菌的研究引起了越来越多研究者的关注。

1990 年代以来, 随着丙酮、丁醇的广阔应用前景和分子生物学技术的发展, 许多国外学者开始对丙酮丁醇梭菌进行基因工程的研究。1993 年, Mermelstein 等人^[17]构建了 1 个包含 *ace* 操纵子 (*adc*, *ctfA* 和 *ctfB*) 的质粒 pFNK6, 并成功转化丙酮丁醇梭菌 ATCC 824, 首次构建了丙酮丁醇基因工程菌, 该菌株比对照菌株 ABE 的产量分别提高了 95%, 37% 和 90%, 研究表明了运用基因工程手段能够提高溶剂产量。

为研究醛/醇脱氢酶在丙酮丁醇发酵中的生理机能, Nair 等人^[18]用载有 *aad* 基因的质粒 pCAAD 转化不产丙酮和丁醇的缺陷型丙酮丁醇梭菌 M5 (缺失 pSOL1 质粒), 结果显示 *aad* 的表达恢复了丁醇脱氢酶 (BYDH) 的活力, 一定程度上提高了乙醛脱氢酶 (ALDH)、丁醇脱氢酶和乙醇脱氢酶的活性, 工程菌

也恢复了产丁醇的能力,但并未产生丙酮,也未提高乙醇产量,表明了醛/醇脱氢酶在丁醇形成中具有重要作用。另外,Harris等^[19]在*SolR*缺失型丙酮丁醇梭菌*SolRH*中克隆表达*aad*基因,构建了工程菌株*SolRH*(pTAAD),发酵后ABE产量分别达到8.2 g/L、17.6 g/L、2.2 g/L,总溶剂达到28 g/L,ABE的浓度有了较大的提高,但*aad*在野生菌中的表达并不能提高溶剂产量,表明溶剂抑制基因*SolR*失活对*aad*过量表达以提高溶剂产量是必要的。Harris等人^[20]将含有*aad*基因的质粒pTAAD转化丁酸激酶缺陷型菌株PJC4BK,构建的工程菌株PJC4BK(pTAAD)发酵后丁醇、丙酮的产量和对照菌株产量基本一致,表明*aad*的表达并不影响丙酮、丁醇的产量,值得注意的是2菌株发酵产生的丁醇都能达到17 g/L,远远超过了丁醇发酵的毒害限制13 g/L,同时乙醇的产量由原来的2.6 g/L提高到4.5 g/L,这说明丁酸激酶的失活能够提高溶剂产量。

目前,溶剂抑制基因、热休克蛋白表达基因的研究报道相对较少,但研究表明它们对溶剂的产生及其菌体的生理特性都有重要影响。Nair等人^[21]通过同源重组沉默了丙酮丁醇梭菌溶剂抑制基因*SolR*,构建了基因工程菌*SolRB*和*SolRH*,2株工程菌产生了较高浓度的ABE,其产量分别为8.1 g/L、17.8 g/L、1.0 g/L,总溶剂能够达到26.9 g/L,表明通过解除抑制基因作用能够明显提高溶剂的产量。Tomas等人^[22]构建了携有控制热休克蛋白的*groESL*操纵子的质粒pGROE1,并转入丙酮丁醇梭菌ATCC 824使*groESL*得到高效表达,构建了基因工程菌株pGROE1,过量表达*groESL*提高了丙酮、丁醇的产量和细胞对丁醇的耐受性,同时该菌株细胞内代谢活性周期的持续时间比对照菌株延长了2.5倍。

另外,孢子形成一定程度上也能影响溶剂的产生^[23],Harris等人^[24]通过将控制孢子形成的基因*spo0A*在丙酮丁醇梭菌ATCC 824失活和高效表达,分别构建了SKO1和pMPSOA工程菌株,结果表明SKO1基本不产丙酮、丁醇,发酵后期细胞呈杆状,不形成梭状孢子;而pMPSOA产生较多的丁醇,并且能够形成梭状孢子,说明*spo0A*是控制溶剂产生和孢子形成的一个转录调控因子。为了研究*SpoIIE*在控制溶剂产生和孢子形成的作用,Scotcher等人^[25]构建了工程菌株pMS*spo*和pAS*spo*,分别高效表达*SpoIIE*和降低*SpoIIE*的表达,结果显示*SpoIIE*过量表达不能提高溶剂产量;相反,*SpoIIE*的下调使丙

酮、丁醇和乙醇的产量分别提高了43%,110%和225%,并且使孢子延期形成,形态也发生了改变,这表明*SpoIIE*并不直接影响溶剂产生,但它影响孢子形成。

为了提高发酵后丁醇/丙酮比率,使发酵利于向着更具吸引力的产物丁醇发展,Tummala等人^[26]利用反义RNA(asRNA)技术抑制编码CoA转移酶的基因*ctfB*表达的同时,构建了含有*aad*基因的质粒pAADB1,转入丙酮丁醇梭菌并高效表达,构建了基因工程菌株pAADB1,发酵后结果显示,丁醇/丙酮比率4.89,比对照比率1.83有了较大的提高,丁醇的产量比对照菌株高2.8倍,乙醇的产量比对照菌株高23倍,能够达到9.2 g/L,是迄今为止报道过最高的乙醇产量。此外,Ryan等人^[27]研究也发现,在*ptb*启动子下*aad*的过量表达和*ctfAB*的减量调节,构建的工程菌株824(pCASAAD)提高了丁醇产量,减少了丙酮生成,总溶剂达到30 g/L,同时也提高了醇/丙酮的比率,但进一步研究发现*thl*的过量表达和*ctfAB*的减量调节并没有引起溶剂产量和醇/丙酮比率的提高,所以要使丁醇产量得到提高,必须运用代谢调控手段提高丁酰-CoA,减少乙酰-CoA的积累。总之,通过基因工程技术修饰丙酮丁醇合成的代谢途径,更有利于我们得到高产量的丁醇,提高生物发酵法生产ABE的竞争力。

3.2 大肠杆菌(*Escherichia coli*)工程菌的构建

近年来,人们利用基因工程技术对大肠杆菌的代谢途径进行加工改造,构建的大肠杆菌工程菌能够产生丙酮、丁醇。Bermejo等人^[28]构建了一个包含合成丙酮的操纵子*cet4*(*adc*,*ctfAB*和*thl*)的质粒pACT,并成功转化大肠杆菌,首次在大肠杆菌中构建了产丙酮的工程菌,工程菌发酵后能够产生大约2.32 g/L的丙酮。另外,Atsumi、Inui等^[29,30]分别克隆了丙酮丁醇梭菌中合成丁醇途径的关键基因*thl*、*hbd*、*crt*、*bcd-etfB-etfA*、*adhE*,使其控制的疏解酶、3-羟基丁酰-CoA脱氢酶、巴豆酸酶、丁酰-CoA脱氢酶和醛/醇脱氢酶在大肠杆菌中成功表达,工程菌发酵后分别产生1.03 g/L、1.18 g/L丁醇,结果表明克隆丁醇合成中编码关键酶的基因,进一步在大肠杆菌中进行表达,构建的大肠杆菌工程菌能够产生丁醇。目前利用大肠杆菌工程菌生产丁醇的产量虽然不高,但这为产丙酮丁醇大肠杆菌的基因工程研究奠定了良好的基础。在大肠杆菌中构建新的丁醇生产系统,作为一种新型生产丁醇的途径,必将成为今后

研究高产丁醇的发展方向之一。

4 问题和展望

发酵法生产 ABE 由于能够解决能源危机、可利用再生资源、对环境友好等优点,展示了其美好的应用前景。但在实际生产过程中也存在着许多待以解决的难题,如原料价格高、菌种溶剂产量低、产物分离难等。因此,针对以上主要问题,为提高丁醇的产率,可从以下几个方面考虑:1,选用能被菌株利用的廉价原料,如木薯、甘薯等;对于难以被菌株利用的纤维质原料,如小麦秸秆、农业残余物等^[31, 32],是可再生能源,它来源丰富,且不与人类争粮,可以利用重组 DNA 遗传技术构建能够利用纤维质的工程菌株,同时结合酸和酶水解预处理技术,转变纤维素为糖类,从而减少丙酮丁醇发酵对粮食的消耗,降低生产成本。2,利用基因工程和代谢工程技术,构建耐丁醇和高产丙酮丁醇基因工程菌株,解除产物对丙酮丁醇梭菌的抑制作用。3,针对发酵丙酮丁醇过程中产物分离回收难的问题,可采用气提法、液液浸提、渗透萃取等回收技术^[33],一方面减少代谢产物对菌种的毒害作用,另一方面能降低丙酮、丁醇分离成本。尽管目前丙酮丁醇基因工程菌的生产能力还没有达到预期的目标,但随着基因工程和代谢工程的不断发展和成熟,基因工程菌将在生物法生产丙酮丁醇的工业化生产中发挥重要的作用。相信在不久的将来,利用基因工程菌以可再生资源为原料生产丙酮、丁醇必将向传统的化学法提出强有力的挑战,成为运用生物技术生产重要化工原料的重要途径之一。

参考文献

- 1 Richard VN. Biobutanol enters battle of the alcohols [J]. Chemistry World, 2008, 5(2): 21~21
- 2 Rubin, EM. Genomics of cellulosic biofuels [J]. Nature, 2008, 454(7206): 841~845
- 3 Woods DR. The genetic engineering of microbial solvent production [J]. Trends Biotechnol, 1995, 13(7): 259~264
- 4 Nöling J, Breton G, Omelchenko MV, et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum* [J]. J Bacteriol, 2001, 183(16): 4 823~4 838
- 5 Jones DT, Woods DR. Acetone-butanol fermentation revisited [J]. Microbiol Rev, 1986, 50(4): 484~524
- 6 Lee J, Yun H, Feist AM, et al. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80(5): 849~862
- 7 Andersch W, Bahl H, Gottschalk G. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* [J]. Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1983, 18(6): 327~332
- 8 Petersen DJ, Cary JW, Vanderleyden J, et al. Sequence and arrangement of genes encoding enzymes of the acetone-production pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. Gene, 1993, 123(1): 93~97
- 9 Hartmanis MGN, Klason T, Gatenbeck S. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1984, 20: 66~71
- 10 Petersen DJ, Bennett GN. Purification of acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and cloning of the acetoacetate decarboxylase gene in *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(11): 3 491~3 498
- 11 Welch RW, Rudolph FB, Papoutsakis ET. Purification and characterization of the NADH-dependent butanol dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) [J]. Arch Biochem Biophys, 1989, 273(2): 309~318
- 12 Walter KA, Bennett GN, Papoutsakis ET. Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes [J]. J Bacteriol, 1992, 174(22): 7 149~7 158
- 13 Nair RV, Bennett GN, Papoutsakis ET. Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. J Bacteriol, 1994, 176(3): 871~885
- 14 Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, et al. The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium* [J]. J Microbiol Methods, 2007, 70(3): 452~464
- 15 Shao L, Hu S, Yang Y, et al. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum* [J]. 2007, Cell Res. 17: 963~965
- 16 Mermelstein LD, Papoutsakis ET. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage Φ 3T methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(4): 1 077~1 081
- 17 Mermelstein LD, Papoutsakis ET, Petersen DJ, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon [J]. Biotechnol Bioeng, 1993, 42(9): 1 053~1 060
- 18 Nair RV, Papoutsakis ET. Expression of plasmid-encoded *aad* in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production [J]. J Bacteriol, 1994, 176(18): 5 843~5 846
- 19 Harris LM, Blank L, Desai RP, et al. Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains

- of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated *solR* gene [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2001, 27(5): 322~328
- 20 Harris LM, Desai RP, Welker NE, et al. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant; need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition [J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 67(1): 1~11
 - 21 Nair RV, Green, EM, Watson DE. Regulation of the *sol* locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor [J]. J Bacteriol, 1999, 181(1): 319~330
 - 22 Tomas CA, Welker NE, Papoutsakis ET. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(8): 4 951~4 965
 - 23 Paredes CJ, Alsaker KV, Papoutsakis ET. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology [J]. Nat Rev, 2005, 3(12): 969~978
 - 24 Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET. Northern, morphological and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. J Bacteriol, 2002, 184(13): 3 586~3 597
 - 25 Scotcher MC, Bennett GN. *SpoIIE* regulates sporulation but does not directly affect solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. J Bacteriol, 2005, 187(6): 1 930~1 936
 - 26 Tummala SB, Junne SG, Papoutsakis ET. Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations [J]. J Bacteriol, 2003, 185(12): 3 644~3 653
 - 27 Sillers R, Al-Hinai MA, Papoutsakis ET. Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations [J]. Biotechnol Bioeng, 2008, [Epub ahead of print]
 - 28 Bermejo LL, Welker NE, Papoutsakis ET. Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 genes in *Escherichia coli* for acetone production and acetate detoxification [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(3): 1 079~1 085
 - 29 Atsumi S, Cann AF, Connor MR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production [J]. Metab Eng, 2007, [Epub ahead of print]
 - 30 Inui M, Suda M, Kimura S, et al. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 77(6): 1 305~1 316
 - 31 Qureshi N, Li XL, Hughes S, et al. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum* [J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(3): 673~680
 - 32 Zverlov VV, Berezina O, Velikodvorskaya GA, et al. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union; use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 71(5): 587~597
 - 33 Dürre P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49(6): 639~648

Progress in Crucial Enzymes and Gene Involved in Biobutanol Synthesis

He Jingchang, Zhang Zhengbo, Qiu Juanping

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT Biobutanol is a clean, new-style energy which can be substitute for gasoline, and widely applied to mixing with gasoline and used as a co-solvent of ethanol-diesel blend fuel. This paper introduces the latest research progress on biosynthetic pathway, crucial enzymes and gene modification during ABE fermentation by *Clostridium acetobutylicum*; also discussed the problems on increasing solvent yield and construction of engineering strains. Finally, the developing prospect and research direction were also predicted.

Key words biobutanol, new-style energy, biosynthesis pathway, gene engineering strain

政策
法规
标准

美英食品、农产品推出卫生标签新规

美国发布了强制性原产国标签最终规定,要求从2009年3月16日起对切肉、碎牛肉、鸡和羊肉、猪肉、野生及人工养殖鱼及贝类、易腐农产品(新鲜及速冻果蔬)、人参、花生等预包装实施强制性原产国名称标注,但加工食品中成分除外;同时,对零售商及供应商提出产品记录保存要求。英国农业部也计划完善食品营养标签的直观显示内容,要求超市和食品企业对生产或销售的食物产品标示更清楚的信息标签。