

综述评论

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2016.04.020

长链燃料醇生物合成研究进展



XU Jing-liang

许敬亮, 陈小燕, 肖仕圆, 袁振宏

(中国科学院可再生能源重点实验室; 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室;
中国科学院广州能源研究所, 广东 广州 510640)

摘 要: 简单介绍了长链醇作为液体燃料的优良性能, 综述了长链醇生物合成的 3 条主要途径 (Ehrlich 途径、非发酵途径和光合途径), 并进一步从宿主菌株选择、耐受菌株选育、代谢通路疏通以及产醇工艺优化等方面概述了提高长链醇产量的方法, 最后对长链醇未来的研究方向进行了展望。

关键词: 长链醇; 生物合成; α -酮酸; Ehrlich 途径; 非发酵途径; 光合途径

中图分类号: TQ35

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2016)04-0140-07

引文格式: 许敬亮, 陈小燕, 肖仕圆, 等. 长链燃料醇生物合成研究进展[J]. 林产化学与工业, 2016, 36(4): 140-146.

Research Progress on Biosynthesis of Long Chain Fuel Alcohol

XU Jing-liang, CHEN Xiao-yan, XIAO Shi-yuan, YUAN Zhen-hong

(Key Laboratory of Renewable Energy; Guangdong Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development; Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This paper briefly introduced the excellent properties of long chain alcohols as liquid fuels and reviewed the three main biosynthesis pathways of long chain alcohols, i. e., Ehrlich pathway, non-fermentation pathway and photosynthetic pathway. The methods of improving the yield of long chain alcohol were summarized, such as choice of host strains, screening and breeding of tolerant strains, reconstruction of metabolic pathway, and optimization of long chain alcohol production process. And the future development direction of long chain alcohol was also suggested.

Key words: long chain alcohol; biosynthesis; α -keto acid; Ehrlich pathway; non-fermentation pathway; photosynthetic pathway

长链醇指含有四碳及四碳以上的直链或支链醇类, 如丁醇、异丁醇、异戊醇、活性戊醇等等。长链醇作为重要的有机化工原料, 在有机合成、化学制药、溶剂萃取等方面应用非常广泛。此外, 作为优良的生物质液体燃料, 具有比燃料乙醇更适合作为汽油运输燃料替代品的特性, 可替代或部分替代汽油作为发动机燃料, 减少汽油用量, 缓解化石燃料供应紧张的局面, 减轻我国对原油进口的依赖。作为汽油的高辛烷值组分, 长链醇可提高点燃式内燃机的抗爆震性, 使发动机运行更平稳; 作为有氧液体燃料, 长链醇掺混到汽油中, 可替代对水资源有污染的汽油增氧剂甲基叔丁基醚 (MTBE), 使燃烧更充分, 颗粒物、一氧化碳和挥发性有机物等大气污染物排放量平均降低 1/3 以上, 有效减少雾霾的产生。同时, 也可以有效消除火花塞、气门、活塞顶部及排气管、消声器等部位积炭的形成, 延长主要部件的使用寿命^[1-3]。因此, 积极开展长链醇类生产技术开发研究, 对于发展能源替代、维护国家能源安全、减轻环境污染等有着极为重要的意义。我国在《可再生能源中长期发展规划》、《可再生能源法》、《农业生物质能产业发展规划》等一系列重大政策法规中, 制定了确保燃料醇等生物质液体燃料优先发展的战略方向^[4-5]。作者简

收稿日期: 2015-08-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21176237); 国家 863 计划资助(2013AA065803); 广东省科技攻关项目(2013B010403021)

作者简介: 许敬亮(1977—), 男, 河南南阳人, 研究员, 博士, 主要从事燃料醇和酶工程技术开发研究; E-mail: xjl@ms.giec.ac.cn.

单介绍了长链醇的优良性能,综述了长链醇生物合成的3条主要途径,概述了提高长链醇产量的方法,展望了长链醇未来的发展方向,以期为我国长链醇产业的发展提供指导。

1 长链醇优点

甲醇、乙醇作为燃料醇虽然具有清洁、环保以及辛烷值高等优点,但是其作为车用燃料也存在一些缺点,比如热值较低,甲醇热值不到汽油热值的1/2,乙醇热值也仅为汽油的62%;对汽车部分橡胶部件容易产生溶胀现象,也会对某些金属部件产生腐蚀现象;易吸水,吸水后易与汽油分层,乙醇也只能在成品油出库阶段添加,给生产、储运和使用带来极大的不便。乙醇的汽化潜热大,理论空燃比下的蒸发温度大于常规汽油,影响混合气的形成及燃烧速度,导致汽车动力性、经济性和冷启动性的下降^[2-3]。

丁醇、戊醇等生物长链醇作为一种用途广泛的重要有机化工原料,从世界能源需求来看,是继乙醇之后的新型液体燃料。长链醇具有比乙醇更适合作为燃料的特性,譬如燃烧值和辛烷值与汽油更接近、具有更高的能量密度、低水溶性、能以更高的浓度和比例与汽油混合、无需对现有车辆发动机进行改型以及可利用现有的运输管道运送等诸多优点^[1,6-7]。随着世界化石资源的日渐匮乏、原油进口不确定因素的日渐增多,丁醇、戊醇等生物长链醇作为优良的生物质液体燃料,近年来成为世界科研工作者竞相研究的热点^[6-8]。各种醇类的理化特性比较如表1所示。

表1 各种醇类理化特性比较^[3,9-10]

Table 1 Comparison of physicochemical characteristics of different alcohols

类别 item	密度 (20 °C)/ (kg·L ⁻¹)	水溶性/ (mg·L ⁻¹) solubility	沸点/°C boiling point	汽化热/ (kJ·kg ⁻¹) vaporization heat	黏度 (20 °C)/ (mPa·s) viscosity	燃烧热/ (kJ·kg ⁻¹) combustion enthalpy	闪点/°C flash point		辛烷值 octane number ron	辛醇-水 分配系数 octanol water partition coefficient
							开口 open	闭口 closed		
甲醇 methanol	0.79	易溶 soluble	64.51	1088	0.59	2.27 × 10 ⁴	16	12	113	0.24
乙醇 ethanol	0.79	易溶 soluble	78.32	854	1.17	2.97 × 10 ⁴	16	14	114	0.74
正丙醇 <i>n</i> -propanol	0.80	2.2 × 10 ⁵	97.2	695	2.26	3.37 × 10 ⁴	22	16	112	3.31
异丙醇 isopropanol	0.79	易溶 soluble	82.4	662	2.43	3.3 × 10 ⁴	11.7	13	107	<0.28
丁醇 butanol	0.81	7.9 × 10 ⁴	117.7	582	2.95	3.61 × 10 ⁴	40	35	96	0.88
异丁醇 iso-butanol	0.80	9.3 × 10 ⁴	107.9	574	4.0	3.6 × 10 ⁴	27.5			8.51
正戊醇 1-amyl alcohol	0.81	2.3 × 10 ⁴	137.5	505	3.31(25 °C)	3.77 × 10 ⁴	51			1.16
3-甲基-1-丁醇 3-methyl-1-butanol	0.81	1.9 × 10 ⁴	130.8	486	4.2	3.77 × 10 ⁴	52			33.11
2-甲基-1-丁醇 2-methyl-1-butanol	0.82	2.8 × 10 ⁴	128	472	5.09	3.77 × 10 ⁴	46			23.4
汽油 gasoline	0.72 ~ 0.78	不溶 insoluble	40 ~ 210	310 ~ 340	0.28 ~ 0.59	4.6 × 10 ⁴	-20	-50	91 ~ 99	2 ~ 7
柴油 diesel	0.82 ~ 0.86	不溶 insoluble	180 ~ 370	250 ~ 300	3.0 ~ 8.0	3.3 × 10 ⁴	78	55	15 ~ 25	3.3 ~ 7.06
甲基叔丁基醚 methyl tert-butyl ether	0.74	1.8 × 10 ⁴	55.3	337	0.36	3.82 × 10 ⁴	-28		116	34.67

2 长链醇生物合成途径

2.1 Ehrlich 途径合成长链醇

早期长链醇的生物合成通常是以酿酒行业的副产物“杂醇油”形式存在,原料中的蛋白质、氨基酸经 Ehrlich 途径在酵母分泌的转氨酶、脱羧酶和醇脱氢酶的作用下分解而成,其主要成分为异戊醇、正戊醇、异丁醇、丙醇、异丙醇、己醇和庚醇等^[11]。1904年, Ehrlich 在比较异亮氨酸和异戊醇分子结构的相

似性时,发现在酵母发酵液中添加亮氨酸或异亮氨酸能够显著地提高杂醇油的产量,因此推测杂醇油生产可能来自于氨基酸^[12]。直到20世纪50~60年代,Sentheshanmuganathan首次证明 Ehrlich 途径主要是由转氨酶、脱羧酶和醇脱氢酶3种酶参与的反应^[12]。此后,Dickinson等利用¹³C标记的亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和蛋氨酸等为唯一氮源,证明酿酒酵母能在正常生理状态下,将氨基酸代谢为相应的长链醇^[13]。后来大量的研究结果证明杂醇油的产生的确来自于氨基酸的分解代谢^[11-14]。

氨基酸经由 Ehrlich 途径代谢产生杂醇油经过100多年的发展,仍是目前人类从酿酒行业提取长链醇的主要方法^[11]。当前一致的观点认为,杂醇油(长链醇)的生产合成是氨基酸在转氨酶的逆作用下,脱去氨基生成 α -酮酸, α -酮酸在脱羧酶的作用下生成 α -酮醛, α -酮醛再经还原产生长链醇。同时, α -酮醛也可以氧化生成相应的杂酸。杂醇油含量多少及各种醇之间的比例,对酒的风味影响很大。适量杂醇油,经酯化后,会产生有芳香气味的酯类化合物,对白酒具有一定的呈香作用。然而,含量过高则具有苦涩怪味,引起人体的不适和中毒症状^[11]。

2.2 非发酵途径合成长链醇

过去一直没有微生物能够经由葡萄糖直接大量合成长链醇类的报道,传统的葡萄糖发酵途径主要用来生产乙醇和直链1-丁醇^[7]。美国加州大学 Liao 的研究团队2008年在《Nature》上首次报道了通过非发酵途径合成高级支链醇的方法。他们利用氨基酸合成的共同前体物 α -酮酸为底物,在 α -酮酸脱羧酶和醇脱氢酶的作用下生产出比直链1-丁醇具有更高辛烷值的支链异丁醇、3-甲基-1-丁醇和2-甲基-1-丁醇等生物长链醇^[7]。该研究团队通过代谢途径改造,利用亮氨酸合成的共同前体物 α -酮异己酸为底物,在 α -异丙基苹果酸合酶基因 *leuA*、 α -异丙基苹果酸异构酶复合体基因 *leuC*, *leuD* 和异丙基苹果酸脱氢酶基因 *leuB* 等的代谢调控下,通过碳链延长,合成出了具6~8个碳原子的生物长链醇^[8]。该研究较好地利用了宿主细胞成熟的氨基酸合成代谢途径,将氨基酸合成途径与 α -酮酸的脱羧和还原途径相结合来生产长链醇。

在微生物中引入一些原来没有的代谢途径可能会造成宿主细胞的代谢紊乱,中间代谢物的累积也会引起细胞的毒性反应^[15]。为了提高目标醇类的产量,通过对生物体异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸和丙氨酸等氨基酸的合成途径进行改造,以获得更多的醇类,可以减少对生物体内原有合成代谢途径的改造。这一创新性的思想无疑为生物长链醇的生产合成开辟了一个新的探索方向。

按照 Liao 的设想, C_4 以上长链醇的生产合成可经由如下途径实现^[7-8]:丙酮酸在 *L*-异亮氨酸和 *L*-缬氨酸合成共同所需的乙酰乳酸合酶、乙酰乳酸变位酶和二羧酸脱水酶作用下生成 α -酮- β -甲基戊酸和 α -酮异戊酸, α -酮- β -甲基戊酸在脱羧酶和醇脱氢酶的作用下可合成出2-甲基-1-丁醇。 α -酮异戊酸与来自丙酮酸的乙酰辅酶A在 α -异丙基苹果酸合酶基因 *leuA*、 α -异丙基苹果酸异构酶复合体基因 *leuC*, *leuD* 和异丙基苹果酸脱氢酶基因 *leuB* 的联合作用下生成 α -酮异己酸,后者可在 α -酮酸脱羧酶和醇脱氢酶的继续作用下生成3-甲基-1-丁醇(具体见图1)。同时, α -酮异己酸在基因 *leuA*、*leuB*、*leuC* 和 *leuD* 的代谢调控下,又可通过碳链延长生成相应的 α -酮酸, α -酮酸继而在脱羧酶和醇脱氢酶的作用下可合成出对应的 $C_6 \sim C_x$ 的长链醇^[16]。目前,已有大量文献和专利报道了利用非发酵途径合成支链长链醇类^[17-19]。

2.3 光合途径合成长链醇

CO_2 作为一种主要的温室气体,其生物固定并转化为能源产品或化工产品是近年来的研究热点。光合微生物利用卡尔文循环(Calvin cycle),经 CO_2 的固定、固定 CO_2 的还原和 CO_2 受体的再生等步骤生成甘油醛-3-磷酸,甘油醛-3-磷酸在丙酮酸激酶等一系列酶或辅酶因子的作用下生成丙酮酸^[20]。丙酮酸再通过一系列的代谢转化,结合长链醇合成基因的克隆表达,就可以利用光合固碳途径合成长链醇^[20-22]。理论上,光合微生物通过卡尔文循环、还原三羧酸循环、乙酰辅酶A途径和甘氨酸途径等光合固碳途径的转化,完全可以经由丙酮酸等代谢中间物来生产合成长链醇类。

目前,研究者已成功利用类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 和荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*), 转化 CO_2 和非水态氢为乙醇^[21]。Deng 等^[20] 利用细长聚球蓝细菌 (*Synechococcus elongatus*) PCC 7942 为宿主菌, 克隆表达了来自运动发酵单孢菌中的丙酮酸脱羧酶基因 *pdh* 和乙醇脱氢酶基因 *kdh*, 首次使蓝细菌具备了利用 CO_2 和水合成乙醇的能力。

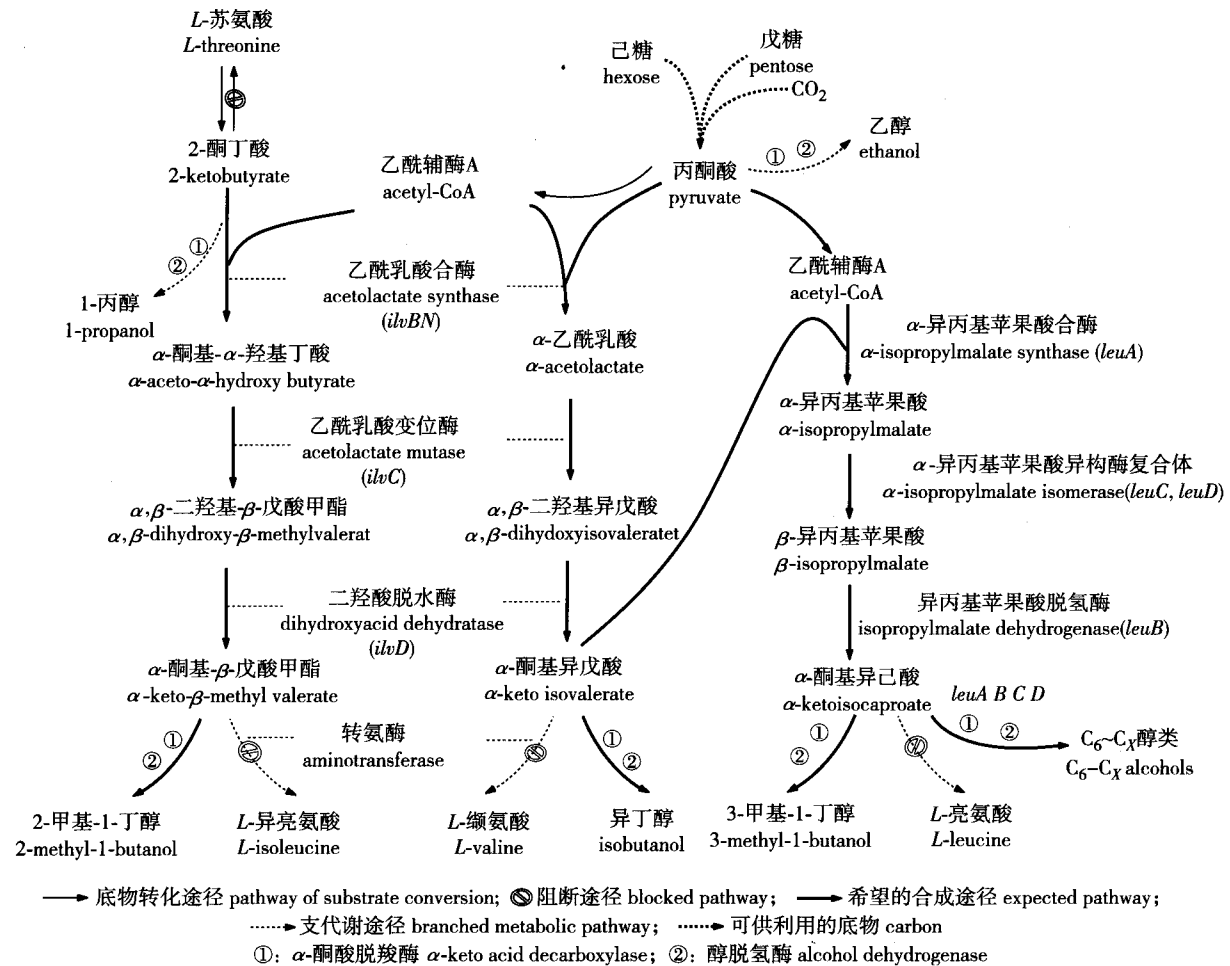


图1 非发酵途径合成长链醇

Fig. 1 Biosynthesis of long chain alcohol through non-fermentation pathway

Atsumi 等^[18] 也利用 *S. elongatus* PCC 7942 为宿主菌, 通过克隆表达来自乳酸链球菌中的酮酸脱羧酶基因 *kivd*、芽孢杆菌中的乙酰乳酸合酶基因 *alsS*, 以及来自大肠杆菌中乙酰乳酸变位酶基因 *ilvC* 和二羟酸脱水酶基因 *ilvD* 等, 使该菌能够直接利用 CO_2 生产合成异丁醛和异丁醇。该工程菌能够连续 8 d 保持高产异丁醛的活力, 最高产率可达 $6\ 230\ \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 远高于目前已经报道的产乙醇、氢气和脂肪酸的蓝细菌和微藻的生产能力。该研究通过在宿主菌中过量表达核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶基因, 有效提高了 *S. elongatus* PCC 7942 利用 CO_2 合成异丁醛和异丁醇的能力。研究表明: 利用光合微生物优异的光合固碳能力, 结合长链醇合成基因的整合表达, 将是未来长链醇生产合成的有效途径。

3 提高长链醇产量的方法

3.1 宿主菌选择

在所有长链醇生产合成中, 国外关于异丁醇的生产合成研究相对较多。目前, 异丁醇等生物长链醇生产所采用的宿主菌主要有大肠杆菌^[15]、谷氨酸棒杆菌^[23] 和枯草芽孢杆菌等^[18-20]。利用大肠杆菌作为宿主菌, 当长链醇进入菌株细胞膜后, 会与膜内的磷脂双分子层作用, 使膜的渗透性、流动性和无序性

增大,进而会对微生物产生毒害作用^[21]。研究表明:即使溶液中含体积分数为1%的异丁醇,也会引起大肠杆菌细胞膜结构的破坏,阻止糖和营养物质的转运,从而造成大肠杆菌生长的停滞^[21]。

谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌和酵母菌等作为目前工业生产中仍然广泛使用的菌株,它们的全基因组序列也早已测定完成^[24]。谷氨酸棒杆菌等具有较厚的细胞壁,细胞壁中含有的分枝菌酸能与多糖等连接,形成包裹于细胞壁的双分子层膜,能够限制细胞壁的渗透性,从而可以耐受更高浓度的异丁醇等长链醇^[25]。此外,其它氨基酸生产菌,比如黄色短杆菌、乳糖发酵短杆菌、短芽孢杆菌、粘质赛式杆菌等,也具备氨基酸合成所需的各种关键酶和基因,可以利用它们优异的 α -酮酸合成能力来生产长链醇。目前,国内外在利用谷氨酸棒杆菌为宿主菌,构建高产氨基酸(α -酮酸)基因工程菌方面的成功案例不胜枚举^[26-28]。因此,若能结合谷氨酸棒杆菌和枯草芽孢杆菌等优良的氨基酸(α -酮酸)合成能力和长链醇耐受能力,通过基因敲除和过量表达等分子操作手段,完全可以将其作为长链醇合成的高产宿主菌株。

3.2 长链醇耐受菌株选育

由于长链醇对细胞的毒性作用,使得发酵液中长链醇的含量往往很难达到较高的浓度,进而也会影响到长链醇的产量^[29]。因此,如何提高生产菌株对长链醇的耐受性,是提高长链醇产量的关键。目前多数研究认为,受转录因子调控的热休克蛋白等蛋白的表达与宿主细胞对醇的耐受性密切相关。长链醇高耐受性生产菌株的选育,可通过理性设计、随机突变、原生质体融合等育种手段获得^[30]。

目前对于长链醇耐受菌株的选育研究并不多,还仅限于丁醇耐受菌株的选育。Borden等^[31]从丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) ATCC 824 基因文库分离到了耐受丁醇基因,这些基因属于转录调节因子,表达这些基因后,宿主菌对丁醇的耐受能力提高了81%^[32]。Chen等^[33]利用亚硝基胍诱变方法,获得1株丁醇高产菌拜氏梭菌(*C. beijerinckii*) BA101,该突变菌株以8%的葡萄糖为底物,可产生20.9 g/L的丁醇。

3.3 长链醇合成代谢通路疏通

长链醇的生物合成无论是经由 Ehrlich 途径,还是经由非发酵途径亦或光合途径,都会经历共同的 α -酮酸脱羧和还原过程。因此,凡有助于提高 α -酮酸产量的方法,理论上对于最终提高长链醇的产量都是有益的。目前也有诸多的研究表明,通过疏通向 α -酮酸合成的代谢通路,能够显著提高长链醇的产量和选择性^[7,16]。

Atsumi等^[7]在大肠杆菌中过量表达基因 *ilvI*、*ilvH*、*ilvC* 和 *ilvD*,以疏导 α -酮异戊酸的有效生物合成。结果表明,通过过量表达基因 *ilvI*、*ilvH*、*ilvC* 和 *ilvD*,工程菌与对照菌相比,异丁醇产量可提高5倍,达23 mmol/L。德国 Ulm 大学的 Krause等^[34]通过敲除丙酮酸脱氢酶复合体亚基 E1p 编码基因 *aceE*、转氨酶 B 基因 *ilvE* 和丙酮酸:醌氧化还原酶基因 *pqo*,过量表达 *ilvB*、*ilvN*、*ilvC* 和 *ilvD* 基因, α -酮异戊酸的产量可高达(0.3 ± 0.03) g/g(以葡萄糖质量计),并计划通过进一步的代谢工程整合,得到更高的异丁醇产量。

3.4 长链醇产醇工艺优化

相对于乙醇而言,微生物对长链醇的耐受性远比乙醇要差,例如梭菌对丁醇比较敏感,耐丁醇体积分数通常不超过2%。而国际上报道的丁醇分批发酵的最高产量也仅为17~21 g/L,这也是造成丁醇等长链醇产醇浓度较低的主要原因^[29,33]。因此,如何提高长链醇的产醇浓度,减少长链醇对细胞的毒害,是提高长链醇产量的关键。

渗透气化作为一种效率高、能耗低的新型膜分离技术,因其流程简单、对微生物细胞无毒害等特点,在构造连续发酵生物反应器方面具有突出的优势而倍受世界各国科研工作者普遍关注。将发酵生产与渗透气化分离技术耦合,使长链醇及时从发酵生产体系中移走,既可解除产物的反馈抑制作用,又能提高长链醇的浓度,是近年来生物燃料分离工艺的研究前沿^[35]。此外,固定化细胞能够有效提高细胞对外界环境的刺激,可以较长时间、多次反复使用,提高发酵产醇的稳定性。因此,应用固定化细胞技术于长链醇的生产,对于提高微生物对长链醇的耐受性,实现长链醇生产的连续性和提高长链醇的产量是非

常有利的^[36]。

4 展望

在生物长链醇研发方面,正丁醇的发酵生产在我国具有一定的基础。上海植物生理生态研究所、微生物研究所、过程工程研究所、广州能源研究所、清华大学、北京化工大学、天津大学、华北制药、天冠集团和吉安新能源集团有限公司等诸多科研院所、高校和企业,经过多年的科研攻关,在发酵菌种遗传改造、发酵工艺优化以及中试示范工程建设等方面取得了一定的进展,部分正丁醇发酵技术工艺处于世界领先水平。然而除了异丁醇外,国内在其它具有支链结构的异戊醇和2-甲基-1-丁醇等长链醇的生物合成研究方面还鲜有涉及。鉴于开发替代能源的急迫性,以及长链醇作为液体燃料的优越性,我国迫切需要在长链醇生产菌种选育构建、产醇机理分析及高效产醇工艺优化等方面加大科研攻关力度。

木质纤维类生物质作为自然界中一类最丰富的自然资源,是未来生产燃料醇类最为理想的原料。然而,目前自然界尚缺乏有效的戊糖、己糖共代谢利用菌株,而半纤维素水解产生的木糖等五碳糖可达生物质干质量的5%~20%,这部分资源能否有效利用是决定木质纤维类生物质生物炼制是否具有经济效益的关键。因此,在长链醇生产合成工程菌构建过程中,若能有效整合引入相关木糖等五碳糖代谢基因,对于利用木质纤维原料实现长链醇的高效生产具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 袁振宏. 生物质能高效利用技术[M]. 北京:化学工业出版社,2015:1-21.
YUAN Zhen-hong. Technology on Biomass Energy Utilization with High Efficiency [M]. Beijing:Chemical Industry Press,2015:1-21.
- [2] 宋安东. 可再生能源的微生物转化技术[M]. 北京:科学出版社,2009:302-327.
SONG An-dong. Renewable Energy Conversion with Microbial Methods [M]. Beijing: China Science Publishing & Media Ltd., 2009: 302-327.
- [3] 刘娅,刘宏娟,张建安,等. 新型生物燃料:丁醇的研究进展[J]. 现代化工,2008,28(6):28-31,33.
LIU Ya, LIU Hong-juan, ZHANG Jian-an, et al. Research progress in new biofuel butanol[J]. Modern Chemical Industry, 2008, 28(6): 28-31, 33.
- [4] 石元春. 中国可再生能源发展战略研究丛书-生物质能卷[M]. 北京:中国电力出版社,2008:187-192.
SHI Yuan-chun. Chinese Renewable Energy Development Strategy Studies Series-Biomass Energy Volume [M]. Beijing:China Electric Power Press,2008:187-192.
- [5] 钱伯章. 生物质能技术与应用[M]. 北京:科学出版社,2010:1-8.
QIAN Bo-zhang. Biomass Energy Technology and Application [M]. Beijing:China Science Publishing & Media Ltd., 2010:1-8.
- [6] 肖仕圆,许敬亮,陈小燕,等. 异戊醇生物合成研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2014,34(12):112-117.
XIAO Shi-yuan, XU Jing-liang, CHEN Xiao-yan, et al. Research progress on isoamyl alcohol biosynthesis[J]. China Biotechnology, 2014, 34(12):112-117.
- [7] ATSUMI S, LIAO J C. Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008,19(5):414-419.
- [8] ZHANG Ke-chun, SAWAYA M R, EISENBERG D S, et al. Expanding metabolism for biosynthesis of non-natural alcohols[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(52):20653-20658.
- [9] 上海物竞化工科技有限公司. 化学品数据库[DB/OL]. [2015-08-01]. <http://www.basechem.org/>.
Shanghai Wujing Chemical Technology Co., Ltd. Chemical Database[DB/OL]. [2005-08-01]. <http://www.basechem.org/>.
- [10] 程能林. 溶剂手册[M]. 3版. 北京:化学工业出版社,2002.
CHENG Neng-lin. Solvent Handbook [M]. 3rd ed. Beijing:Chemical Industry Press,2002.
- [11] HAZELWOOD L A, DARAN J M, VAN MARIS A J A, et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production; A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8):2259-2266.
- [12] SENTHESHANMUGANATHAN S. The mechanism of formation of higher alcohols from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochemical Journal, 1960, 74(3):568-576.
- [13] DICKINSON J R, SALGADO L E, HEWLINS M J. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(10):8028-8034.

- [14] PERPÈTE P, DUTHOIT O, DE MAEYER S, et al. Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(1): 48-56.
- [15] ATSUMI S, CANN A F, CONNOR M R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(6): 305-311.
- [16] CONNOR M R, LIAO J C. Microbial production of advanced transportation fuels in non-natural hosts[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(3): 307-315.
- [17] 袁振宏. 能源微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 177-178.
YUAN Zhen-hong. Energy Microbiology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012: 177-178.
- [18] ATSUMI S, HIGASHIDE W, LIAO J C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(12): 1177-1180.
- [19] WAHLUND T M, CONWAY T, TABITA F R. Bioconversion of CO₂ to ethanol and other compounds[J]. American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry, 1996, 41(4): 1403-1406.
- [20] DENG M D, COLEMAN J R. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2): 523-528.
- [21] BRYNILDSEN M P, LIAO J C. An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*[J]. Molecular Systems Biology, 2009, 5(1): 1-13.
- [22] SMITH K M, CHO K M, LIAO J C. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 1045-1055.
- [23] 杨柳. 异戊醇生物合成工程菌构建研究[D]. 广州: 中国科学院广州能源研究所硕士学位论文, 2014.
YANG Liu. Studies on Genetic Microorganism Construction of Isoamyl Alcohol Biosynthesis [D]. Guangzhou: Master Degree Thesis of Guangzhou Institute of Energy Conversion, CAS.
- [24] KALINOWSKI J, BATHE B, BARTELS D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of *L*-aspartate-derived amino acids and vitamins[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104(1/2/3): 5-25.
- [25] 王鑫昕, 王少华, 李维, 等. 细菌的有机溶剂耐受机制[J]. 生物工程学报, 2009, 25(5): 641-649.
WANG Xin-xin, WANG Shao-hua, LI Wei, et al. Tolerant mechanisms of bacteria to organic solvents[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(5): 641-649.
- [26] 张星元, 李秀敏, 杨毅, 等. 谷氨酸棒杆菌的氨基酸输送系统的存在、功能及其在氨基酸生产上的重要性[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(3): 105-110.
ZHANG Xing-yuan, LI Xiu-min, YANG Yi, et al. The occurrence and functions of amino acid transport proteins in corynebacterium glutamicum[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2004, 23(3): 105-110.
- [27] LEUCHTENBERGER W, HUTHMACHER K, DRAUZ K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: Current status and prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(1): 1-8.
- [28] WITTMANN C. Analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2010, 120: 21-49.
- [29] LIU Si-qing, QURESHI N. How microbes tolerate ethanol and butanol[J]. New Biotechnology, 2009, 26(3/4): 117-121.
- [30] JIA Kai-zhi, ZHANG Yan-ping, LI Yin. Systematic engineering of microorganisms to improve alcohol tolerance[J]. Engineering in Life Sciences, 2010, 10(5): 422-429.
- [31] BORDEN J R, PAPOUTSAKIS E T. Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(9): 3061-3068.
- [32] 杨明, 刘力强, 牛昆, 等. 丙酮丁醇发酵菌的分子遗传改造[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(10): 109-114.
YANG Ming, LIU Li-qiang, NIU Kun, et al. Genetic features and modification of clostridium acetobutylicum and clostridium beijerinckii for acetone butanol and ethanol fermentation[J]. China Biotechnology, 2009, 29(10): 109-114.
- [33] CHEN C K, BLASCHEK H P. Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(2): 170-173.
- [34] KRAUSE F S, BLOMBACH B, EIKMANN B J. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-ketoisovalerate production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8053-8061.
- [35] VANE L M. A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, 80(6): 603-629.
- [36] LIENHARDT J, SCHRIPSEMA J, QURESHI N, et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 in an immobilized cell biofilm reactor[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 98(1): 591-598.