

粘质沙雷氏菌中乙偶姻合成途径 调控基因的鉴定

张燎原¹ 徐泉明¹ 孙建安² 魏东芝^{2*} 沈亚领^{2*}

(1. 福建农林大学, 生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建 福州 350002; 2. 华东理工大学, 鲁华生物技术研究所, 生物反应器国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 粘质沙雷氏菌 H30 中控制乙偶姻合成的调控因子 *budR* 被克隆和鉴定。序列分析表明调控因子 *budR* 与液化沙雷氏菌 MG1 中乙偶姻合成调控因子 *slaR* 同源性达 80%, 属 *lysR* 型调控因子。调控因子 *budR* 突变可导致粘质沙雷氏菌无法合成乙偶姻, 引起培养液 pH 快速下降和菌体生长缓慢, 而在培养过程中维持 pH7.0, 突变菌的生长可获得恢复, 暗示 *budR* 的功能为调控粘质沙雷氏菌发酵过程中性产物乙偶姻的合成, 以阻止发酵液过度酸化。

关键词: 粘质沙雷氏菌; 乙偶姻; 调控基因; 序列分析; 功能鉴定

中图分类号: S476+.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)04-0706-06

Identification of the Regulatory Gene Controlling the Acetoin Fermentation Pathway in *Serratia marcescens* H30

ZHANG Liao-yuan¹, XU Quan-ming¹, SUN Jian-an²,
WEI Dong-zhi^{2*}, SHEN Ya-ling^{2*}

(1. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Fujian Agriculture and Forestry University, Ministry of Education, Fuzhou 350002, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, New World Institute of Biotechnology, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: A *lysR* type regulatory gene, *budR* involved in acetoin biosynthetic pathway, was cloned and identified from *Serratia marcescens* H30. Sequence analysis showed that the *budR* gene shared 80% identities with the *slaR* gene from *S. liquefaciens* MG1. Inactivation of the *budR* gene could result in the absence of acetoin production accompanied with rapid acidification of the broth and entered the stationary phase in advance during the culture. However, when the culture pH was maintained at 7.0, the growth of *budR* mutant strain could be relieved, suggesting *budR* gene promoted the neutral compound (acetoin) production to counteract lethal acidification of the broth.

Key words: *Serratia marcescens*; acetoin; regulatory gene; sequence analysis; function identification

2,3-丁二醇(2,3-butanediol)是一种重要的生物基化学品,广泛用于化工、食品、航空航天燃料等领域,可用于制备聚合物、油墨、香水、熏蒸剂、增湿剂、软化剂、增塑剂、药物手性载体等^[1-2]。而乙偶姻(acetoin, AC)是广泛应用于食品行业中的食用香料,在微生物发酵过程中伴随2,3-丁二醇合成代谢过程中产生^[3-5]。

收稿日期: 2011-12-04 修回日期: 2012-05-18

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2011J05048)和福建省教育厅 A 类科技项目(JA11089)

作者简介: 张燎原(1979—),男,博士,主要从事工业微生物代谢调控研究, E-mail: zliaoyuan@126.com; * 通讯作者。

在自然界中有许多微生物能够合成乙偶姻和 2,3-丁二醇,研究较多的主要包括克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)以及气单胞菌属(*Aeromonas*)等^[6-9]。在微生物中,乙偶姻和 2,3-丁二醇的生物合成共用一条途径,彼此为前体和产物关系,该途径包含 3 个酶,分别为 α -乙酰乳酸合成酶、 α -乙酰乳酸脱羧酶和 2,3-丁二醇脱氢酶,糖类物质经糖酵解途径合成丙酮酸,两分子丙酮酸在 α -乙酰乳酸合成酶的作用下生成乙酰乳酸和二氧化碳,随后乙酰乳酸经 α -乙酰乳酸脱羧酶脱羧作用合成乙偶姻,乙偶姻在 2,3-丁二醇脱氢酶的作用下进一步生成 2,3-丁二醇^[10-11]。目前,肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)、产气肠杆菌(*E. aerogenes*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)中乙偶姻和 2,3-丁二醇的合成途径相关基因已被克隆和鉴定,其合成途径基因由一 *lysR* 型调控因子 *budR*、结构基因 *budA*(编码 α -乙酰乳酸脱羧酶)、*budB*(编码 α -乙酰乳酸合成酶)和 *budC*(编码 2,3-丁二醇脱氢酶)组成^[12-13]。在肺炎克雷伯氏菌和产气肠杆菌中,调控基因 *budR* 和结构基因 *budABC* 构成一操纵子,而在枯草芽孢杆菌中, *budC* 基因独立于 *budRAB* 操纵子之外,其转录表达不受调控基因 *budR* 的调控^[14]。

近年来,我们报道了一株粘质沙雷氏菌 H30 有较高的乙偶姻和 2,3-丁二醇产量,具有工业开发的潜力^[9,15],并对其代谢途径合成乙偶姻的两个基因(*aceA*(α -乙酰乳酸脱羧酶)和 *aceB*(α -乙酰乳酸合成酶))进行了报道^[16],发现两基因的上游有一转录方向相反的基因序列,同源性分析表明该基因序列为一 *lysR* 型调控基因,命名为 *budR*。在本文中,我们对 *budR* 基因进行了克隆、描述和功能分析,结果表明 *budR* 调控乙偶姻的生物合成以阻止发酵过程中发酵液的过度酸化。

1 材料与方法

1.1 材料

粘质沙雷氏菌 H30 (*S. marcescens* H30) 和 *E. coli* S17-1 λ pir 为实验室保藏菌种。自杀载体 pUT-Km1 为鲁华生物技术研究所提供。DNA 聚合酶、T4 连接酶和限制性内切酶(*Kpn* I 和 *Sca* I) 购自 TaKaRa 公司; DNA marker 购自天根生化科技有限公司;卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(AMP)和 IPTG 购自 Sigma 公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和基因组提取试剂盒购自北京博大泰克有限公司。其余试剂为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 粘质沙雷氏菌 H30 和 *E. coli* S17-1 λ pir 均采用 LB 培养基。粘质沙雷氏菌液体培养条件为:30 °C 和 200 r/min 培养 12 h; *E. coli* S17-1 λ pir 液体培养条件为:37 °C 和 200 r/min 培养 12 h,平板培养在 37 °C 条件下倒置培养 16 h,卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL; *budR* 突变菌分别采用 LB 培养基、LB + 10 g/L 葡萄糖(w/v)培养基和 LB + 10 g/L 葡萄糖(w/v)培养基(磷酸缓冲液维持 pH7.0)培养,卡那霉素终质量浓度为 100 μ g/mL 培养条件为 30 °C 和 200 r/min 培养 24 h。

1.2.2 粘质沙雷氏菌 H30 基因组 DNA 提取 按照北京博大泰克有限公司基因组提取试剂盒说明书对过夜培养的粘质沙雷氏菌 H30 进行操作,提取的基因组 DNA 溶解在 TE 缓冲液中,-20 °C 保存待用。

1.2.3 基因序列获取与 PCR 扩增 在粘质沙雷氏菌基因组中搜索我们之前已克隆 *aceA* 和 *aceB* 基因序列,在此基础上运用 BioEdit 7.0 分析两基因的上游序列,并根据上游序列设计引物 *budR1*: CCC GTG TTT TTC GTT CAT G 和 *budR2*: ATG CCG CTT TAC CCC CAA C。以提取的粘质沙雷氏菌 H30 基因组 DNA 为模板,以 *budR1* 和 *budR2* 为引物进行 PCR 扩增反应,PCR 产物在质量分数为 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳 1 h,紫外灯下观察条带并拍照。检测后将获得的特异性 DNA 条带用胶回收试剂盒回收,进行商业测序。测序结果提交 NCBI,同时进行 ORF(开放阅读框)分析和 BLAST 比对。

1.2.4 同源重组自杀载体的构建 根据 *budR* 基因序列设计引物 *KbudR1*: CTC GGT ACC GAA TGA CGC CCG TTA TGT T (下划线为 *Kpn* I 酶切位点)和 *KbudR2*: GTG AGT ACT GCT GCT GTT TGT GGT AGC G (下划线为 *Sca* I 酶切位点),以粘质沙雷氏菌 H30 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增其中约 600 bp 片段,扩增产物回收后进行分步酶切(*Kpn* I 和 *Sca* I),经再次回收后与预先酶切好的自杀载体 pUTKm1 连接,连接产物转化至 *E. coli* S17-1 λ pir 感受态细胞,从而构建好同源重组载体 pUT-*budR*。

1.2.5 *budR* 基因突变菌构建 双亲本杂交参考 De Lorenzo 方法进行^[17]。分别过夜培养粘质沙雷氏菌 H30 和 *E. coli* S17-1 λ pir/pUT-*budR*,以质量分数为 1% 的接种量转接新鲜 LB 液体培养基进行

培养, OD_{600} 至 0.5 左右时(约 2.5 h) 放置冰水浴 取 50 μ L 粘质沙雷氏菌培养液和 400 μ L *E. coli* S17-1 λ pir/pUT-budR 培养液至离心管中进行混合, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下进行离心(4 000 r/min) 去除上清液, 加入 500 μ L 灭菌双蒸水进行悬浮, 同样条件离心和去除上清液, 加入 100 μ L 新鲜 LB 液体培养基重悬浮菌体, 取 5 μ L 重悬浮菌液点至预先准备好的置有 0.22 μ m 膜的平板上, 正置培养 12 h 后, 用 1 mL LB 液体培养基将膜上培养的菌体洗涤下来, 取 100 μ L 洗涤下的菌液涂布在含有 100 μ g/mL 卡那霉素和 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上进行筛选, 长出的菌落经特异性引物 KbudR3: CGGGATC-CCCCGTGTTTTTCG(与 *budR* 基因上游互补) 和 KbudR4: GAAGTAAGTTGCCGCGAGTG(与 pUTKm1 载体互补) 进行 PCR 鉴定。

1.2.6 *budR* 突变菌表型分析 将 *budR* 突变菌和粘质沙雷氏菌 H30 接种 LB 液体培养基中培养 12 h, 以 1% 的接种量分别转接至 LB、LB + 10 g/L 葡萄糖(*w/v*) 和 LB + 10 g/L 葡萄糖(*w/v*) (磷酸缓冲液维持 pH7.0) 培养基中培养 24 h, 每组实验重复 3 次, 取平均值, 测定乙偶姻的合成、菌体密度(OD_{600}) 以及培养液 pH 的变化, 乙偶姻的合成通过 VP 实验进行定性分析, VP 实验参考 Kovacicova 等人方法^[14]。

1.2.7 序列分析 测序结果 ORF(开放阅读框) 分析采用 GenBank 中的 ORFs finder 程序, 序列同源性和多序列比对分别采用 GenBank 中 BLASTp 比对程序和 Clustalx 1.83 软件。

2 结 果

2.1 *budR* 基因克隆

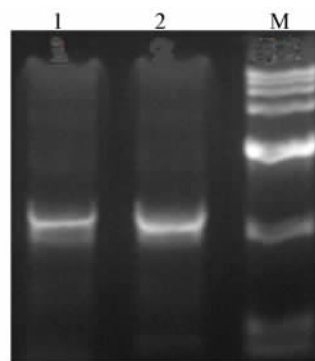
根据 *aceA* 和 *aceB* 基因上游序列, 设计引物 *budR1* 和 *budR2*, 进行 PCR 扩增, 如图 1 所示, 扩增产物在约 1 300 bp 的位置获得了特异性条带, 扩增产物的大小与预期相符, 将条带进行切胶回收和测序。测序结果显示扩增产物大小为 1 353 bp。将测序结果提交 NCBI 在线分析程序 ORFs finder 进行分析, 结果表明该序列含有一大小为 1 086 bp 的开放阅读框, 命名为 *budR*, 提交 NCBI 数据库, 登录号为 GU585939.1。

2.2 序列分析

将 *budR* 基因翻译成氨基酸序列提交 GenBank 在线比对程序 BLASTp 进行同源性分析, 结果表明 *budR* 基因属于 lysR 型调控因子, 其与来源液化沙雷氏菌 MG1(*S. liquefaciens* MG1) 中 *slaR* 和普城沙雷氏菌(*S. plymuthica* RVH1) 中 *budR* 编码的调控蛋白序列同源性最高, 分别达到 80% 和 76%, 而与肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae* 342) 中 *budR* 和产酸克雷伯氏菌(*K. oxytoca* KCTC1686) 中 *budR* 编码的调控因子序列同源性也分别达到 46% 和 45% (图 2)。文献的研究结果表明这些调控因子在四菌中均为控制乙偶姻和 2,3-丁二醇合成的调控因子^[13,18-19], 说明我们 PCR 扩增获得的序列很有可能与乙偶姻的合成有调控关系。

2.3 *budR* 基因突变菌构建

根据测序结果设计引物 KbudR1 和 KbudR2 扩增 *budR* 基因中约 600 bp 片段用于进行同源交换, 如图 3A 所示, 在大小约为 600 bp 的位置出现一条清晰的条带, 与预期要扩增的大小一致, 将条带切胶回收和酶切后连接至 pUTKm1 构建自杀载体 pUT-budR, 转化至 *E. coli* S17-1 λ pir 感受态细胞, 阳性菌落抽提质粒和酶切, 结果如图 3B 所示, 经 Kpn I 和 Sca I 酶切后, 获得大小不同的两条带, 大的为载体, 小的约为 600 bp, 表明 pUT-budR 自杀载体构建成功。将 *E. coli* S17-1 λ pir/pUT-budR 与粘质沙雷氏菌 H30 进行双亲本杂交, 以 100 μ g/mL 卡那霉素和 100 μ g/mL 氨苄青霉素为压力进行 *budR* 突变菌株筛选。*budR* 突变菌的验证由特异性引物 KbudR3(与 *budR* 上游序列互补) 和 KbudR4(与 pUTKm1 载体互补) 进行菌落 PCR 验证, 以野生粘质沙雷氏菌 H30 为对照, 如图 3C 所示, *budR* 突变菌中扩增出一特异性条带, 而对照野生粘质沙雷氏菌 H30 并未扩增出, 说明自杀载体 pUT-budR 已插入 *budR* 基因中, *budR* 突变菌构建成功。

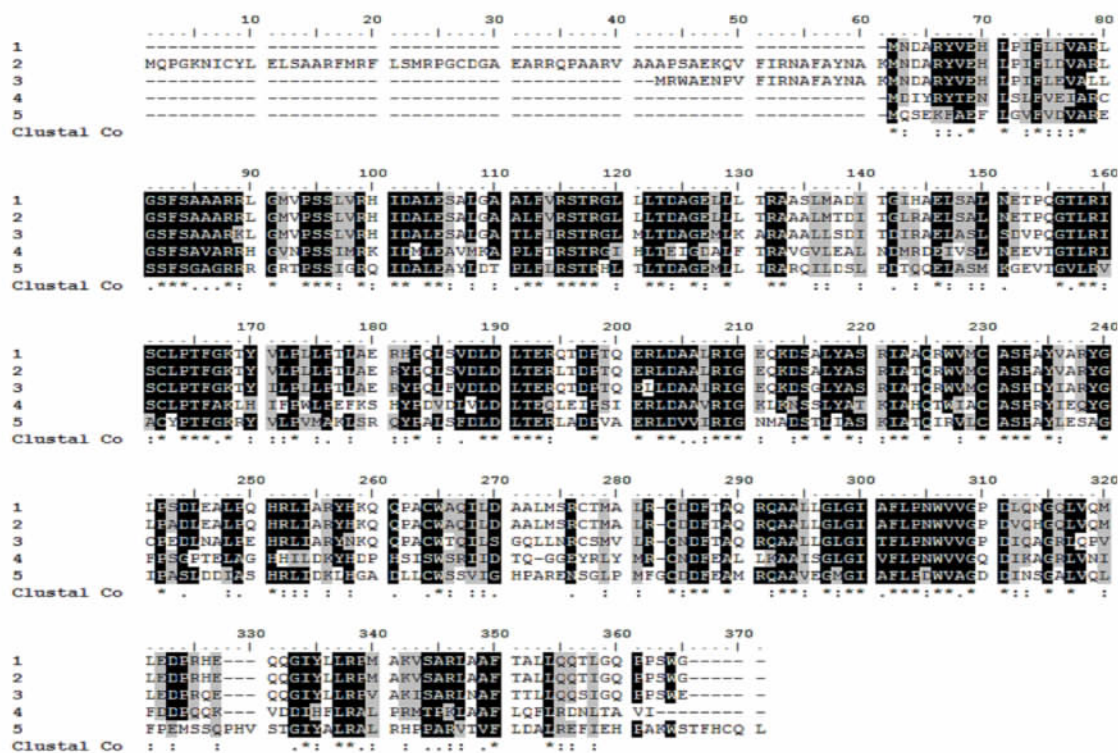


泳道 1 和 2: PCR 扩增产物。

泳道 M: DNA marker DL15 000 (15, 10, 7.5, 5, 2.5, 1, 0.25 kb)。

图 1 *budR* 基因 PCR 扩增产物电泳图

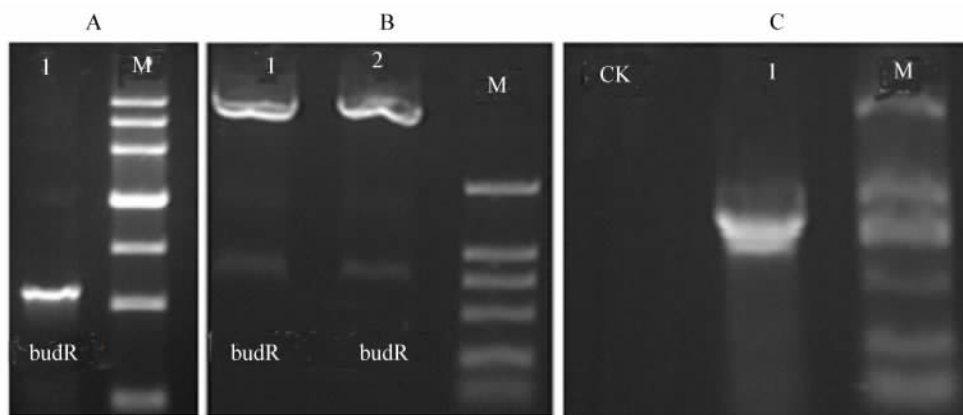
Fig. 1 PCR products analysis of *budR* gene from *S. marcescens* H30



1, *S. marcescens* H30; 2, *S. liquefaciens* MG1; 3, *S. plymuthica* RVH1; 4, *K. Pneumoniae* 342; 5, *K. oxytoca* KCTC1686.

图 2 *budR* 基因编码蛋白序列同源性分析

Fig. 2 Alignment analysis of the deduced amino acid sequences encoded by *budR* gene from *S. marcescens* H30 with the corresponding proteins from other strains



A: PCR 扩增 *budR* 基因 600 bp 片段; B: 自杀载体 pUT - *budR* 双酶切验证; C: *budR* 突变菌的 PCR 验证)。

A, Amplification of the 600 bp fragment of *budR* gene by PCR; B, Identification of the suicide vector pUT - *budR* with Kpn I - Sea I double digestion; C, Confirmation of the *budR* mutant by PCR.

泳道 M (A): DNA marker IV (7, 5.5, 3.5, 2, 1, 0.5 kb); 泳道 M (B): DNA marker DL 2 000 (2, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1 kb); 泳道 M (C): DNA marker DL 2 000 (2, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1 kb)。

图 3 *budR* 基因突变菌株构建

Fig. 3 Construction of the *budR* mutant through insertional inactivation

2.4 *budR* 突变对菌体合成乙偶姻的影响

将 *budR* 突变菌和野生粘质沙雷氏菌 H30 接种至 LB + 10 g/L 葡萄糖 (*w/v*) 培养基中进行培养, 采用 VP 实验对发酵液中乙偶姻进行定性分析, 结果如图 4 所示, *budR* 突变菌的培养液 VP 实验结果呈阴性, 表明 *budR* 基因在粘质沙雷氏菌中调控乙偶姻的生物合成, 而野生粘质沙雷氏菌的培养液 VP 实验结果呈阳性, 表明培养过程有乙偶姻合成, 有趣的是 *budR* 突变菌在培养过程中呈现出快速进入稳定期,

且最终比野生粘质沙雷氏菌生物量低很多(图 5 B 所示),暗示 *budR* 基因的失活导致乙偶姻途径的缺失,进而引起 *budR* 突变菌培养过程中更多的碳源流向酸性途径。

2.5 *budR* 突变对菌体生长和酸性产物合成的影响

为了系统的考察 *budR* 基因突变对粘质沙雷氏菌生长和酸性产物合成的影响,将 *budR* 突变菌和野生粘质沙雷氏菌 H30 分别接种至 LB、LB + 10 g/L 葡萄糖 (*w/v*) 和 LB + 10 g/L 葡萄糖 (*w/v*) (磷酸缓冲液维持 pH7.0) 培养基中进行培养,取样测定培养液的菌体密度 (OD_{600}) 和 pH 结果如图 5 所示,在 LB 培养基中 *budR* 突变菌和野生菌在菌体生长和 pH 变化上表现出类似的变化(图 5 A),这种类似的变化在于培养基中不含有糖类物质,两菌在培养过程中所经历的代谢途径相同,因此,在菌体生长和 pH 变化上表现出相似性。在 LB + 10 g/L 葡萄糖 (*w/v*) 培养基中 *budR* 突变菌和野生菌的生长和 pH 变化呈现出显著的差异(图 5 B),*budR* 突变菌经短暂的对数期(6 h)后快速的进入稳定期,该过程伴随着 pH 的快速下降,这可能与乙偶姻途径失活导致碳源流向酸性产物有关,酸性产物的过多产生引起 pH 的不断下降,进而

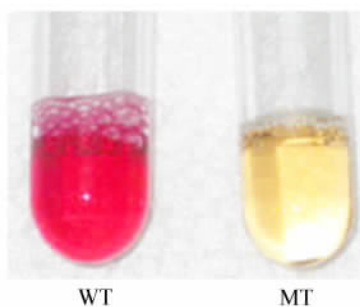


图 4 VP 实验定性分析粘质沙雷氏菌 H30 和 *budR* 突变菌产乙偶姻

Fig. 4 Voges Proskauer assays for acetoin production by *S. marcescens* H30 (WT) and its *budR* mutant (MT) cultured in LB medium with 1% glucose

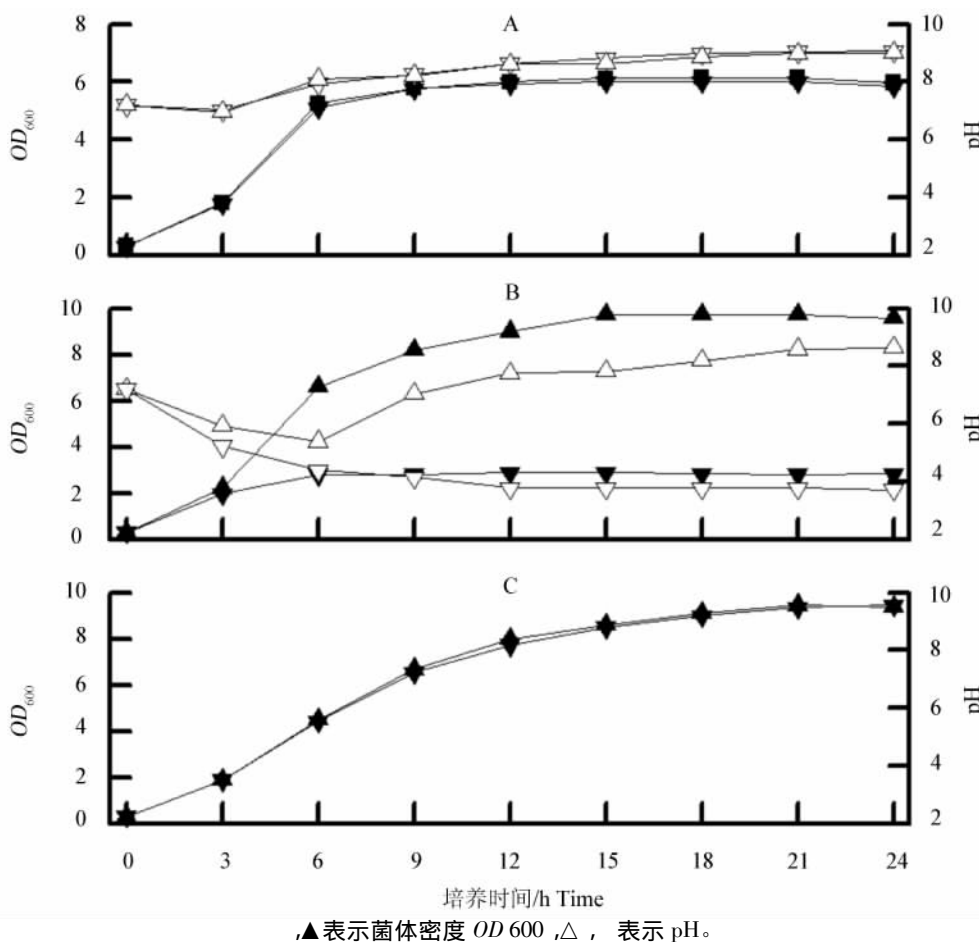


图 5 *budR* 突变菌(倒三角形)和野生菌(正三角形)生长及过程 pH 分析

Fig. 5 Analysis of the growth and pH evolution during the culture by *S. marcescens* H30 and its *budR* mutant cultured in LB medium (A), LB medium with 1% glucose (B) and LB medium with 1% glucose buffered to pH7.0 (C)

导致菌体生长快速进入稳定期,而野生菌在 15 h 后才进入稳定期,培养液 pH 呈现出先下降后上升变化,最终野生菌的菌体密度和 pH 分别为 9.4 和 8.64,而 *budR* 突变菌的菌体密度和 pH 分别仅为 2.9 和 3.72。在 LB + 10 g/L 葡萄糖 (*w/v*) (磷酸缓冲液维持 pH7.0) 培养基中 *budR* 突变菌和野生菌在生长上的差异可以通过控制 pH 获得恢复(图 5 C),暗示 *budR* 突变菌与野生菌在 LB + 10 g/L 葡萄糖 (*w/v*) 培养基中的生长差异与培养液 pH 的变化相关。

3 讨论

在过去的研究中,我们筛选到一株具有工业生产潜力的乙偶姻和2,3-丁二醇生产菌粘质沙雷氏菌H30,鉴定了合成途径中编码 α -乙酰乳酸脱羧酶和 α -乙酰乳酸合成酶的*aceA*与*aceB*基因^[16]。在本文中,我们通过对基因组的比对分析,获得了*aceA*上游一*lysR*型调控因子,命名为*budR*。序列比对表明该调控因子与液化沙雷氏菌中调控乙偶姻合成调控因子*slaR*同源性达80%,暗示该因子在粘质沙雷氏菌H30合成乙偶姻过程中具有调控作用。进一步的基因突变发现*budR*突变后粘质沙雷氏菌H30无法合成乙偶姻,出现发酵液迅速酸化、菌体生长缓慢现象,而通过pH的控制可解除突变菌生长缓慢,恢复至与野生菌一样的生长状态。这些结果表明微生物合成乙偶姻和2,3-丁二醇的生理意义为平衡酸性和中性产物的合成,以防止微生物周围环境pH过低导致自身难以生存。总之,在本研究中鉴定了粘质沙雷氏菌H30中调控乙偶姻和2,3-丁二醇合成的调控基因*budR*,*budR*基因呈现调控粘质沙雷氏菌发酵过程中性产物和酸性产物之间的平衡作用,以抵制发酵液过度酸化,维持菌株自身的生存。

参考文献:

- [1]Garg S K, Jain A. Fermentative production of 2,3-butanediol: A review[J]. Bioresource Technol, 1995, 51: 103-109.
- [2]Xiu Z L, Zeng A P. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78: 917-926.
- [3]纪晓俊, 黄和, 杜军, 等. 3-羟基丁酮的合成及应用进展[J]. 现代化工, 2008, 28(4): 18-22.
- [4]Xiao Z J, Liu P H, Qin J Y, et al. Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74: 61-68.
- [5]Liu Y F, Zhang S L, Yong Y C, et al. Efficient production of acetoin by the newly isolated *Bacillus licheniformis* strain[J]. Process Biochemistry, 2011, 46: 390-394.
- [6]Barret E L, Collins E B, Hall B J, et al. Production of 2,3-butanediol from whey by *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*[J]. J Dairy Sci, 1983, 66(12): 2507-2514.
- [7]De Mas C, Jansen N B, Tsao G T. Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*[J]. Biotech Bioeng, 1987, 31: 366-377.
- [8]Sablayrolles J M, Goma G. Butanediol production by *Aerobacter aerogenes* NRRB199: Effect of initial substrate concentration and aeration agitation[J]. Biotech Bioeng, 1984, 26: 148-155.
- [9]Zhang L Y, Shen Y L, Wei D Z, et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30[J]. Bioresource Technol, 2010, 101: 1961-1967.
- [10]Celinska E, Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol-current state and prospects[J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(6): 715-725.
- [11]Ji X J, Huang H, Li S, et al. Enhanced 2,3-butanediol production by altering the mixed acid fermentation pathway in *Klebsiella oxytoca*[J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(4): 731-734.
- [12]Mayer D, Schlensog V, Bock A. Identification of the transcriptional activator controlling the butanediol fermentation pathway in *Klebsiella terrigena*[J]. J Bacteriol, 1995, 177(18): 5261-5269.
- [13]Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P, et al. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*[J]. J Bacteriol, 1993, 175: 1392-1404.
- [14]Kovacikova G, Lin W, Skorupski K. Dual regulation of genes involved in acetoin biosynthesis and motility/biofilm formation by the virulence activator *AphA* and the acetate-responsive *LysR*-type regulator *AlsR* in *Vibrio cholerae*[J]. Mol Microbiol, 2005, 57(2): 420-433.
- [15]Zhang L Y, Shen Y L, Wei D Z, et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant serrawettin mutant of *Serratia marcescens* H30[J]. J Ind Microbiol Biot, 2010, 37(8): 857-862.
- [16]张燎原, 孙建安, 魏东芝, 等. 粘质沙雷氏菌中乙偶姻合成途径基因克隆、序列分析及表达[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(5): 987-992.
- [17]De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, et al. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria[J]. J Bacteriol, 1990, 172(11): 6568-6572.
- [18]Rao B, Zhang L Y, Sun J A, et al. Characterization and regulation of the 2,3-butanediol pathway in *Serratia marcescens*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, DOI 10.1007/s00253-011-3608-5.
- [19]Moons P, Van Houdt R, Vivijis B, et al. Integrated regulation of acetoin fermentation by quorum sensing and pH in *Serratia plymuthica* RVH1[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(10): 3422-3427.