

# 大肠杆菌异源生产丁醇途径组装及启动子优化

唐玮, 李键, 陈军, 杨晟

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 中国科学院合成生物学重点实验室, 上海 200032

唐玮, 李键, 陈军, 等. 大肠杆菌异源生产丁醇途径组装及启动子优化. 生物工程学报, 2012, 28(11): 1328-1336.

Tang W, Li J, Chen J, et al. Butanol pathway construction and promoter optimization in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2012, 28(11): 1328-1336.

**摘要:** 启动子优化是合成生物学研究的重要工具, 可以通过不同强度的启动子调控基因转录水平以优化生物途径。丁醇是一种多用途的基础化工原料, 目前有很多代谢工程手段应用在大肠杆菌的丁醇异源表达中, 但是并没有进行启动子的精细调控。文中以大肠杆菌为宿主构建异源丁醇合成途径, 通过 DNA assembler 的方法一步组装不同强度启动子组合的丁醇合成途径以优化丁醇合成。以强启动子 Alper PLTetO1 或弱启动子 Alper BB 转录硫解酶, 以强启动子 Braatsch 20 或弱启动子 Braatsch 10 转录丁醇合成操纵子, 共构建成 4 种不同质粒。结果表明以 Alper PLTetO1 转录硫解酶, Braatsch 10 转录丁醇合成操纵子的组合获得最高的丁醇产量 28 mg/L, 与其他组合相比丁醇产量提高了 3~5 倍。

**关键词:** 快速组装, 启动子优化, 丁醇

## Butanol pathway construction and promoter optimization in *Escherichia coli*

Wei Tang, Jian Li, Jun Chen, and Sheng Yang

Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

**Abstract:** Promoter optimization is a useful tool in synthetic biology. Fusing promoters of various strengths to genes is a good method to get the best gene overexpression level. Butanol can be used as an intermediate in chemical synthesis and as a solvent for a wide variety of chemical and textile industry applications. At present, multiple metabolic engineering strategies have been attempted for butanol production in non-native host *Escherichia coli*. But there were little work on promoter optimization. We

**Received:** May 10, 2012; **Accepted:** May 31, 2012

**Supported by:** Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2012BAD32B07).

**Corresponding author:** Sheng Yang. Tel: +86-21-54924173; E-mail: syang@sibs.ac.cn

国家科技支撑计划 (No. 2012BAD32B07) 资助。

fused *thlA* (thiolase) with strong promoter Alper PLTetO1 or weak promoter Alper BB, operon with strong promoter Braatsch 20 or weak promoter Braatsch 10 by fast assemble method DNA assembler in *Escherichia coli*. The experimental results showed *thlA* with strong promoter Alper PLTetO1, operon with weak promoter Braatsch 10 got best butanol concentration 28mg/L, which increased at least 3~5 fold compared with other combination.

**Keywords:** DNA assembler, promoter optimization, butanol

通过优化启动子调节基因转录水平,疏通限速步骤,可达到提高目标产物产量的目的<sup>[1-2]</sup>。但是利用强启动子并不一定有效,因为一些目的基因的表达产物或中间代谢产物可能对菌体有毒性,从而抑制菌体生长<sup>[3-4]</sup>,例如有研究表明在大肠杆菌中过表达编码磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的基因 *pck* 会给菌体生长带来负担<sup>[5]</sup>;并且因为大多数的生物过程都是由多个基因相互影响的,很难通过调控一个基因得到最优化的途径。利用不同强度的启动子与不同基因的组合表达可以获得性状最优的组合<sup>[6]</sup>。大肠杆菌是常用的异源表达宿主<sup>[7]</sup>,已有前人通过易错 PCR 获得了不同强度的启动子可用于途径优化,Alper 和 Braatsch 等人构建了一系列不同强度的组成型启动子,其中 Alper 系列包括强启动子 Alper PLTetO1 和弱启动子 Alper BB 等,Alper PLTetO1 的启动子强度是 Alper BB 的两倍<sup>[8]</sup>,Braatsch 系列包括强启动子 Braatsch 20 和弱启动子 Braatsch 10 等,Braatsch 20 的启动子强度是 Braatsch 10 的两倍<sup>[9]</sup>,可以利用这些不同强度的启动子与途径中不同的基因进行组合,通过检测产物获得最优化的菌株。

传统工业上利用丙酮丁醇梭菌生产丁醇<sup>[10-11]</sup>,近年来通过大肠杆菌异源合成丁醇成为研究热点<sup>[12-13]</sup>。丁醇合成途径中相关的有编码硫解酶的 *thlA* 基因、*bcs*-operon 以及醛/醇脱氢酶基因

*adhE1* 和 *adhE2*。其中的 *bcs*-operon 由基因 *crt*、*bcd*、*etfAB*、*hbd* 组成,分别编码巴豆酸酶、丁酰辅酶 A 脱氢酶,负责电子转移的黄素蛋白亚基,β-羟-丁酰辅酶 A 脱氢酶。有文献报道了 *ter* 基因编码的反式-2-烯酰辅酶 A 还原酶 (*trans*-2-enoyl-CoA reductase),可以通过不可逆的反应为代谢流提供驱动力,替代丙酮丁醇梭菌来源 *bcd* 和 *etfAB* 可疏通大肠杆菌丁醇合成途径<sup>[14]</sup>。本研究用 *ter* 基因代替了 *bcd* 和 *etfAB* 构建了优化的 *bcs*-operon (包括 *crt*、*ter* 和 *hbd* 基因,简称 operon)。由于大肠杆菌内源的醇脱氢酶能够用于丁醇的合成<sup>[15]</sup>,本研究将强启动子 Alper PLTetO1 或弱启动子 Alper BB,强启动子 Braatsch 20 或弱启动子 Braatsch 10 分别与 *thlA*, operon 进行组合,用 DNA assembler 方法<sup>[16]</sup>快速组装丁醇合成途径,获得最优的启动子组合的大肠杆菌丁醇生产菌株。这种启动子优化方法也可以在其他的途径优化中得到广泛的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 Top10,酵母菌株 BY4742 和质粒 pYES2 均为本实验室保藏,pLY15 质粒由本实验室构建和保藏,pMD18-T simple 购自 TaKaRa 公司,启动子序列由 GeneScript 公司合成。

### 1.2 酶和试剂

限制性内切酶购自宝生物公司和

Fermentas; 质粒 DNA 小量试剂盒、PCR 纯化试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen, 酵母质粒提取试剂盒购自索莱宝生物公司; 琼脂购自上海捷倍思生物技术有限公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。PCR 反应使用的耐热 DNA 聚合酶为 *Taq* (MBI Fermentas) 或者 *KOD* (Toyobo)。

### 1.3 培养基

大肠杆菌培养使用 LB (Luria-Bertani) 培养基: 胰化蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g 溶于 1 L 蒸馏水中, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

酵母培养使用 YPD (Yeast extract peptone dextrose) 培养基: 1% 酵母提取物, 2% 胰化蛋白胨, 2% 葡萄糖, 如果配成固体的再加 2% 的琼脂, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 其中葡萄糖需要单独灭菌。

酵母转化子筛选使用基本盐培养基 (SC-ura3): 1) 酵母基本氮源 (Yeast nitrogen base, YNB, 无氨基酸或硫酸铵): 0.34 g, 硫酸铵: 1 g, YNB+硫酸铵溶于 50 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 单独灭菌。2) 葡萄糖: 4 g (溶于 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中配成 40% 的溶液, 单独灭菌。3) 琼脂 4 g (溶于 48 mL 的 ddH<sub>2</sub>O 中单独灭菌)。4) 需要添加的氨基酸配成 100× 的母液, 过滤除菌: 12 mg 组氨酸 (His), 18 mg 赖氨酸 (Lys), 60 mg 亮氨酸 (Leu), 溶于 6 mL 的 ddH<sub>2</sub>O 中, 过滤除菌。在上述物品灭菌后, 稍微冷却一下, 将 YNB、硫酸铵和葡萄糖都加入液体琼脂中, 再加入 2 mL 的过滤除菌的氨基酸混合液, 倒板。

TB 发酵培养基 (500 mL): 1) 将下列组分溶解在 300 mL ddH<sub>2</sub>O 中: 蛋白胨 6 g, 酵母提取物 12 g, 甘油 2 mL。各组分溶解后高压灭菌, 冷却到 60 °C。2) 将 1.155 g 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 8.215 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶在足量的 ddH<sub>2</sub>O 中, 使终体积为 100 mL。高压灭菌。3) 将 10 g 葡萄糖溶于 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 将 3 种溶液混合均匀。

## 1.4 方法

### 1.4.1 根据启动子和基因设计合适的 RBS (核糖体结合位点) 序列

利用在线网站 (<https://salis.psu.edu/software/forward>) 设计最优的 RBS 序列。

### 1.4.2 设计同源臂引物

利用 pLY15 (含有丁醇合成途径基因 *thlA* 以及 operon) 质粒和人工合成的启动子为模板, 设计同源臂, 引物如表 1 所示。

### 1.4.3 制备启动子片段和丁醇合成途径的片段

用引物 WA-BB-U 和 WA-BB-TLA-D 扩增弱启动子片段 Alper BB-RBS, 引物 SA-PLTetO1-U 和 SA-PLTetO1-TLA-D 扩增强启动子片段 Alper PLTetO1-RBS, 引物 WB-10-U 和 WB-10-CRT-D 扩增弱启动子片段 Braatsch 10-RBS, 引物 SB20-U 和 SB20-CRT-D 扩增强启动子片段 Braatsch 20-RBS。

用引物 TLA-SA-U 和 TLA-SB-D 扩增带有强启动子与强启动子组合的同源臂的 *thlA* 片段 (S-*thlA*-S), 引物 TLA-SA-U 和 TLA-WB-D 扩增带有强启动子弱启动子组合的同源臂的 *thlA* 片段 (S-*thlA*-W), 引物 TLA-WA-U 和 TLA-SB-D 扩增带有弱启动子强启动子组合的同源臂的 *thlA* 片段 (W-*thlA*-S), 引物 TLA-WA-U 和 TLA-WB-D 扩增带有弱启动子与弱启动子组合的同源臂的 *thlA* 片段 (W-*thlA*-W), 引物 CRT-SB-U 和 HBD-pYES2-D 扩增带有强启动子同源臂的 operon 片段 (S-operon), 引物 CRT-WB10-U 和 HBD-pYES2-D 扩增带弱启动子

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
WA-BB-U	CGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCCAATCCGACGTCTAAGAGACCA
WA-BB-TLA-D	TTCTCTACCTCCTTAATATCCCCGATCTTGGACCGGTCAGTGCCTCTGCTGATGTG
TLA-WA--U	GTCCAAGATCGGGGATATTAAGGAGGTAGAGAATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTG
TLA-WB-D	TTATAGCATTTTAGCCTTTAATTGTCAATAGGTTTAGCCTCATAATCTTTCAAATGACTG
WB-10-U	CAGTCATTTGAAAGATTATGAGGCTAAACCTATTGACAATTAAGGCTAAAATGCTATAA
WB-10-CRT-D	ATAATTTAACCTCCCTACTGTGTTATTTGGTGACAGATTTGTGGAATTATAGCATTTTAG
CRT-WB10-U	TCACCAAATAACACAGTAGGGAGGTTAAATTATGGAACATAACAATGTCATCCTTG
SA-PLTetO1-U	CGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCCAATCCGACGTCTAAGAAACCA
SA-PLTetO1-TLA-D	ATGACCGACCTCCTTATATCCCCTATCTTAAGATAGGGTCAGTGCCTCTGCTGATGTGC
TLA-SA-U	CTTAAGATAGGGGATATAAGGAGGTCGGTCATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAGT
TLA-SB-D	TTATATGTGAATCACAGTGATATGTCAAGTATTTAGCCTCATAATCTTTCAAATGACTG
SB20-U	CAGTCATTTGAAAGATTATGAGGCTAAAATACTTGACATATCACTGTGATTCACATATAA
SB20-CRT-D	CATTTTTTACCTCCTTCTTGTGTTGTTGTCGCTACCGATTTTCGCATATTATATGTGAATC
CRT-SB-U	GCGACAAACAACAAGAAGGAGGTAATAAATGGAACATAACAATGTCATCCTTG
HBD-pYES2-D	GATCCACTAGTAACGCGCCAGTGTGCTGGAATTCATCCTTCTTTCTTCTATCATATC

同源臂的 operon 片段 (W-operon), KOD 酶扩增, PCR 条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 68 °C 延 2 min, 35 个循环; 68 °C 延伸 10 min, 16 °C 保温 10 min。

#### 1.4.4 组建不同强度启动子的丁醇合成途径

用 *EcoR* I 酶切酵母-大肠杆菌穿梭载体 pYES2 (氨苄抗性), 回收线性化载体, 回收 Alper PLTetO1-RBS、AlperBB-RBS、Braatsch 20-RBS、Braatsch 10-RBS、S-thlA-S、S-thlA-W、W-thlA-S、W-thlA-W、S-operon、W-operon 片段, 进行不同强度的启动子和片段的组装, 构建 4 种不同强度组合的质粒, 如表 2 所示。

#### 1.4.5 转化酵母 BY4742

将构建 4 种质粒所需的回收片段进行混合,

用核酸定量仪进行定量, 载体片段约 500 ng, 其他片段为 300 ng, 用真空浓缩仪浓缩到 4  $\mu$ L, 电转化酵母菌株 BY4742<sup>[16]</sup>, 电击条件: 电压 1.5 kV, 电容 25  $\mu$ F, 电阻 200  $\Omega$ , 菌液涂布在 SC-ura3 的筛选板上, 置于 30 °C 培养箱中培养 2~4 d 会出现白色的明显菌落。

#### 1.4.6 质粒 PCR 验证

挑取明显的酵母菌落, 用酵母试剂盒提取酵母质粒, 进行质粒 PCR 验证 *thlA* 以及 operon 片段。

#### 1.4.7 酵母质粒转化大肠杆菌 Top10 以及质粒的酶切验证

利用化学转化法转化构建的质粒到大肠杆菌 Top10 中, 用质粒提取试剂盒抽提质粒后用 *Hind* III 进行酶切验证。

表 2 不同强度的启动子与片段的组合

Table 2 Combination of different promoters and fragments

Plasmid	Genotype	Fragments
pTY02	AlperPLTetO1-thlA-Braatsch20-operon	pYES2 linear vector AlperPLTetO1-RBS S-thlA-S Braatsch20-RBS S-operon
pTY03	AlperPLTetO1-thlA-Braatsch10-operon	pYES2 linear vector Alper PLTetO1-RBS S-thlA-W Braatsch10-RBS W-operon
pTY04	AlperBB-thlA-Braatsch20-operon	pYES2 linear vector AlperBB-RBS W-thlA-S Braatsch 20-RBS S-operon
pTY05	AlperBB-thlA-Braatsch10-operon	pYES2 linear vector AlperBB-RBS W-thlA-W Braatsch 10-RBS W-operon

#### 1.4.8 丁醇含量测定

发酵方法: 96 孔板深孔发酵, 培养基为 TB 发酵培养基, 在微好氧、30 °C 的条件下发酵 100 h。

丁醇含量测定条件: 取上述样品清液 0.2 mL 与 0.8 mL 内标液混匀, 以配置有 Grace 公司产品 ECTM-WAX 毛细管色谱柱的安捷伦公司 7890 型气相色谱仪进行测定。进样量 1  $\mu$ L, 分流比 25 : 1。分析条件为: 柱温 85 °C, 氮气 34.5 kPa, 5.5 min 后, 升温至 150 °C; 氮气 206.85 kPa, 保持 3 min, 氢气 30 mL/min, 空气 400 mL/min, 尾吹 25 mL/min; 进样区温度 250 °C, 氢火焰检测区温度为 300 °C。

## 2 结果与分析

### 2.1 设计最优 RBS 序列

根据启动子和基因的组合设计最优的 RBS

序列, 结果如表 3 所示。

### 2.2 制备片段和线性化载体

扩增启动子 AlperPLTetO1-RBS、AlperBB-RBS、Braatsch 20-RBS、Braatsch 10-RBS 和丁醇合成途径相关基因片段 S-thlA-S、S-thlA-W、W-thlA-S、W-thlA-W、S-operon、W-operon, 用 *EcoR* I 酶切载体 pYES2, 获得的片段纯化后电泳图谱如图 1 所示。

### 2.3 不同启动子强度的质粒构建

将纯化片段混合浓缩电转酵母 BY4742, 用 DNA assembler 方法组装不同强弱启动子组合的质粒 pTY02、pTY03、pTY04 和 pTY05。提取酵母质粒进行质粒 PCR, 确定质粒的正确性。如图 2 和图 3 所示, 证明 *thlA* 和 operon 片段同时存在于构建的质粒上。

表 3 Alper 系列和 Braatsch 系列的启动子序列以及最优 RBS 序列

Table 3 Sequence of promoter and RBS

Promoter	Promoter sequence (5'-3')	RBS sequence (5'-3')
AlperPLTetO1	CACAATTCCGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGA CATTAAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTT TCGTCTTACCTCGAGTCCCTATCAGTGATAGAGATT GACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATC AGCAGGACGCACTGACCATTCCGACGTCTAAGAAA CCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGT ATCACGAGGCCCTTTCGTCTTACCTCGAGTCCCTAT CAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAG ATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGACC	CTATCTTAAGATAGGGGATATAAGG AGGTCGGTC
Alper BB	CAATTCGGACGTCTAAGAGACCATTATTATCGTGACA TTAACCTATAAGAACAGGCGTGTCCAGGAGGCCCTTT CGTCTTACCTCGAGTCCCTATCAGTGACAGAGATT GACACCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATC AGCAGGACGCACTGACC	GGTCCAAGATCGGGGATATTAAGG AGGTAGAGA
Braatsch 20	AATACTTGACATATCACTGTGATTCACATATAATATGC GAAATC	GGTAGGCGACAAACAACAAGAAG GAGGTAAAAA
Braatsch 10	ACCTATTGACAATTAAGGCTAAAATGCTATAATTCC ACAAATC	TGTCACCAAATAACACAGTAGGGA GGTTAAATT

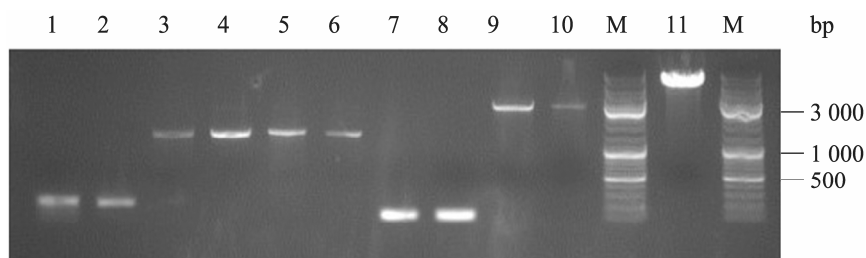


图 1 利用设计的含有同源臂的引物 PCR 扩增启动子和丁醇合成途径基因

Fig. 1 Amplification of promoter and butanol biosynthesis genes with the design of the containing homologous arm primer. 1: Alper PLTetO1-RBS; 2: AlperBB-RBS; 3: S-thlA-S; 4: S-thlA-W; 5: W-thlA-S; 6: W-thlA-W; 7: Braatsch 20-RBS; 8: Braatsch 10-RBS; 9: S-operon; 10: W-operon; 11: linear vector pYES2; M: DNA marker.

## 2.4 反转大肠杆菌后质粒 *Hind* III 酶切验证

将酵母质粒反转大肠杆菌 Top10 后, 抽提大肠杆菌质粒用 *Hind* III 进行酶切验证。结果见图 4, 证明质粒构建正确。

## 2.5 发酵丁醇产量测定

挑取验证正确的大肠杆菌, 利用 96 孔板发酵 100 h, 用气相色谱测定丁醇产浓度, 结果如图 5 所示, 证明 pTY03 组合的质粒产丁醇浓度最

高, 达到 28 mg/L, 是其他启动子组合的 3~5 倍。

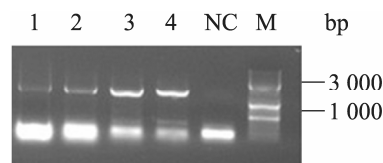
图 2 质粒 PCR 验证组装的 4 种质粒的 *thlA* 片段

Fig. 2 Identification of *thlA* fragment by PCR. 1: pTY02; 2: pTY03; 3: pTY04; 4: pTY05; NC: negative control; M: DNA marker.

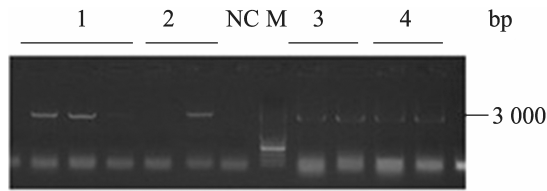


图3 质粒 PCR 验证组装的 4 种质粒的 operon 片段  
Fig. 3 Identification of operon fragment by PCR. 1: pTY02; 2: pTY03; 3: pTY04; 4: pTY05; NC: negative control; M: DNA marker.

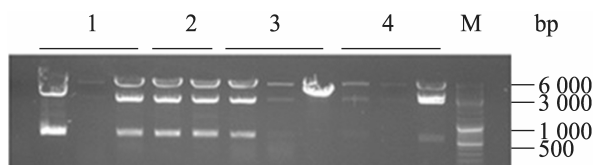


图4 *Hind* III 酶切验证丁醇途径组装质粒  
Fig. 4 Identification of butanol way assembly plasmid by enzyme digestion.

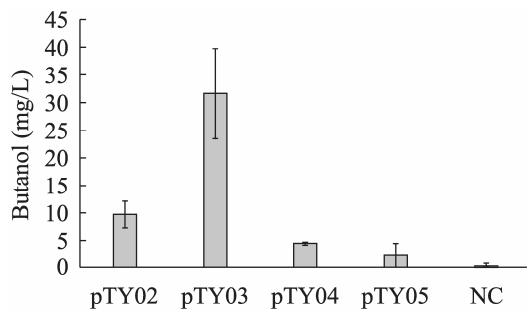


图5 含有 4 种组合的质粒的大肠杆菌 Top10 发酵 100 h 后的丁醇情况  
Fig. 5 Four different combination plasmids fermentation results by *Escherichia coli* Top 100 after 100 h. NC: negative control.

### 3 讨论

生物代谢途径很少由一个基因控制, 大多都是通过多个基因的相互作用<sup>[17]</sup>, 所以代谢工程改造需要平衡代谢流以获得最优的效果<sup>[18-19]</sup>。通过强启动子提高转录水平不一定能获得最优的目

标产物的产量, 甚至会抑制宿主的生长。而通过不同强度启动子的精细调控可以更好地平衡多个基因的相互作用, 获得最优的结果。本研究利用 DNA assembler 方法快速组装了不同强度启动子组合的丁醇合成途径。DNA assembler 是一种利用酵母的高同源重组效率<sup>[20]</sup>从而把目的片段一次性在酵母体内进行组装的方法, 耗时短, 效率高, 避免了传统的酶连技术所需的酶切连接等步骤, 同时解除了酶切位点对操作的限制<sup>[21-22]</sup>, 更加符合合成生物学日益发展的需要<sup>[23]</sup>。但是进行组装的片段不能出现较长的相同序列, 以免发生重组, 引起片段缺失。本研究在梭菌天然生产丁醇的途径基础上进行改造, 利用大肠杆菌启动子库, 优化 RBS 序列, 将 *thlA* 基因以及构建的优化的 operon 基因与不同强度的启动子进行组合, 根据最后的发酵结果可以看出 pTY03 质粒丁醇含量最高, 达到 28 mg/L, 与其他的启动子组合相比丁醇产量提高了 3~5 倍。这可能是因为 *thlA* 是整个途径中的第一步, *thlA* 的强转录保证了前体的供应充足, 而丁醇的产生会给宿主带来负担, 甚至影响宿主的生长, 用弱启动子转录后续丁醇合成操纵子相对更好地平衡了代谢流, 达到最好的效果。另外, 由于同一个 operon 上的 3 个基因表达强度不一定一致, 我们可以通过将 operon 上的基因进行重排, 或者用单顺反子的形式进行基因的进一步细化表达。除启动子优化外, 还有一些常用于提高异源表达产物量的方法<sup>[24]</sup>: 1) 敲除副产物途径和竞争途径的基因, 将代谢流尽可能引向目标产物<sup>[25]</sup>; 2) 考虑异源表达的酶之间的相互作用, 通过酶的天然选择来达到提高目标产物的目的<sup>[26]</sup>; 3) 优化表达, 对

表达基因进行密码子优化, 修饰 SD 序列和 RBS 位点<sup>[27]</sup>; 4) 蛋白质工程方面的改造<sup>[28-29]</sup>, 包括有理设计<sup>[30]</sup>和无理设计<sup>[31]</sup>; 5) 发酵工程方面改造, 改变发酵条件和底物等, 提高产物产量等。如进一步优化大肠杆菌异源生产丁醇途径, 则可考虑通过启动子优化与酶的天然组合、支路途径敲除、过表达、发酵条件优化<sup>[12]</sup>等代谢工程手段结合进一步提高丁醇产量。

## REFERENCES

- [1] Nevoigt E, Kohnke J, Fischer CR, et al. Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(8): 5266–5273.
- [2] Jensen PR, Hammer K. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 58(2/3): 191–195.
- [3] Jin YS, Ni HY, Laplaza JM, et al. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 495–503.
- [4] Gorgens JF, van Zyl WH, Knoetze JH, et al. The metabolic burden of the PGK1 and ADH2 promoter systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 73(3): 238–245.
- [5] Chao YP, Patnaik R, Roof WD, et al. Control of gluconeogenic growth by pps and pck in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1993, 175(21): 6939–6944.
- [6] Lu C, Jeffries T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(19): 6072–6077.
- [7] Clomburg JM, Gonzalez R. Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(2): 419–434.
- [8] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12678–12683.
- [9] Braatsch S, Helmark S, Kranz H, et al. *Escherichia coli* strains with promoter libraries constructed by Red/ET recombination pave the way for transcriptional fine-tuning. *Biotechniques*, 2008, 45(3): 335–337.
- [10] Lee SY, Park JH, Jang SH, et al. Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(2): 209–228.
- [11] Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 2001, 183(16): 4823–4838.
- [12] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 305–311.
- [13] 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.
- [14] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, et al. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*, 2011, 77(9): 2905–2915.
- [15] Berezina OV, Zakharova NV, Brandt A, et al. Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(2): 635–646.
- [16] Shao Z, Zhao H. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(2): e16.
- [17] Schaaff I, Heinisch J, Zimmermann FK. Overproduction of glycolytic-enzymes in yeast. *Yeast*, 1989, 5(4): 285–290.
- [18] Kauffman KJ, Prakash P, Edwards JS. Advances in flux balance analysis. *Curr Opin Biotech*, 2003, 14(5): 491–496.



- 
- [19] Nielsen J. It is all about metabolic fluxes. *J Bacteriol*, 2003, 185(24): 7031–7035.
- [20] Iizasa E, Nagano Y. Highly efficient yeast-based *in vivo* DNA cloning of multiple DNA fragments and the simultaneous construction of yeast/*Escherichia coli* shuttle vectors. *Biotechniques*, 2006, 40(1): 79–83.
- [21] DeJong JM, Liu YL, Bollon AP, et al. Genetic engineering of Taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(2): 212–224.
- [22] Yan YJ, Kohli A, Koffas MAG. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microb*, 2005, 71(9): 5610–5613.
- [23] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *Acs Chem Biol*, 2008, 3(1): 64–76.
- [24] Keasling JD, Chou H. Metabolic engineering delivers next-generation biofuels. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(3): 298–299.
- [25] Fell DA, Thomas S. Physiological control of metabolic flux—the requirement for multisite modulation. *Biochem J*, 1995, 311(Pt1): 35–39.
- [26] Steen EJ, Chan R, Prasad N, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7: 36.
- [27] Park YS, Seo SW, Hwang S, et al. Design of 5'-untranslated region variants for tunable expression in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(1): 136–141.
- [28] Leisola M, Turunen O. Protein engineering: opportunities and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(6): 1225–1232.
- [29] Chiang SJ. Strain improvement for fermentation and biocatalysis processes by genetic engineering technology. *J Ind Microbiol Biot*, 2004, 31(3): 99–108.
- [30] Machielsen R, Looger LL, Raedts J, et al. Cofactor engineering of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase by computational design. *Eng Life Sci*, 2009, 9(1): 38–44.
- [31] Petrounia IP, Arnold FH. Designed evolution of enzymatic properties. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11(4): 325–330.