

## 合成生物学与代谢工程

王俊姝<sup>1</sup>, 祁庆生<sup>1,2</sup>

1 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2 山东大学 国家糖工程技术研究中心, 济南 250100

**摘要:** 随着 DNA 重组技术的日趋成熟, 代谢工程的理论和应用已经得到了迅速发展。合成生物学是近年来蓬勃发展的一门新兴学科, 在许多领域都具有重要的应用。以下从改造细胞代谢的关键因子、代谢途径的调节和宿主细胞与代谢途径构建的关系等方面详细讨论了合成生物学的最新进展和合成生物学在代谢工程领域的应用。

**关键词:** 合成生物学, 代谢工程, 代谢途径, 基因表达调控, 宿主细胞

## Synthetic biology for metabolic engineering—a review

Junshu Wang<sup>1</sup>, and Qingsheng Qi<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

2 National Glycoengineering Research Center, Shandong University Jinan 250100, China

**Abstract:** In the last few decades, with the development of recombinant DNA technology, metabolic engineering has made tremendous advances. Synthetic biology is a newly and rapidly emerging discipline. It has great potential in assisting and simplifying the study of metabolic engineering. This review focuses on the recent development of synthetic biology and its application in optimizing metabolic pathway and engineering cellular chassis.

**Keywords:** synthetic biology, metabolic engineering, metabolic pathway, regulation of gene expression, cellular chassis

代谢工程(Metabolic engineering)亦称途径工程(Pathway engineering), 是根据已知细胞代谢网络知识对细胞代谢途径进行合理设计, 并利用分子生物学手段, 如 DNA 重组技术等对细胞代谢途径以及代谢途径调控进行改造以积累目的产物的应用学科<sup>[1-3]</sup>。经过 20 余年的发展, 随着多种微生物全基因组测序的完成以及对微生物代谢网络的系统认识, 代谢工程的改造范围已经发展到涉及跨种属多基因

的联合协同表达及其调控。通过组合不同来源的多种酶分子来构建新的代谢途径既可以省略化学合成中间产物的纯化工作, 同时可以更简便更节能地实现生物燃料、天然复杂产物的化学中间产物及其衍生物的合成。不同于传统的以生产蛋白质因子或工业酶为目标的蛋白多肽单基因表达, 在代谢途径改造过程中, 编码催化代谢途径中关键酶的基因并不需要高度表达, 因为目的基因的过量表达会消耗细

**Received:** March 10, 2009; **Accepted:** July 2, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30870022), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707803), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z218).

**Corresponding author:** Qingsheng Qi. Tel: +86-531-88365628; Fax: +86-531-88565610; E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30870022), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2007CB707803), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA02Z218)资助。

胞中可用于生成目的代谢产物的代谢物。同时, 外源代谢途径的中间产物还可能对宿主细胞造成毒害作用从而导致终产物产量的减少。因此, 在代谢工程中必须将代谢途径中每个酶的表达量限制在一定范围内, 实现多基因的联合协同表达。尽管目前已有很多成熟的控制基因表达的系统, 例如 *lac* 启动子系统等, 但是能达到代谢工程要求的多基因、多水平的精确调控的系统还很少。另外, 很多高附加值产品并没有天然的代谢途径, 即缺少合成这些产品的天然酶分子, 限制了利用微生物生产的可行性<sup>[4]</sup>。合成生物学的出现为代谢工程中这些问题的解决提供了新的思路 and 工具(图 1)<sup>[5-6]</sup>。

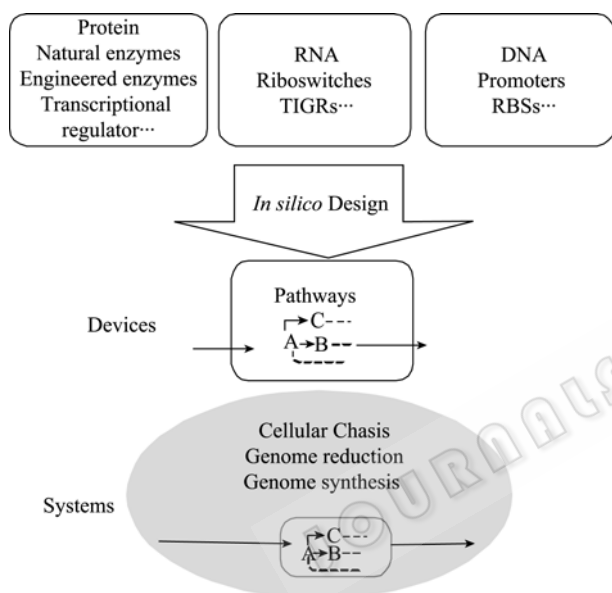


图 1 合成生物学在代谢工程中的应用

Fig. 1 Application of synthetic biology in metabolic engineering.

## 1 合成生物学的概念

合成生物学(Synthetic biology)的定义是随着时间不断变化和改进的<sup>[7]</sup>。目前, 合成生物学的主要研究内容是通过人工设计和构建新的生物学元件来合成新的生物学系统, 例如酶分子、基因环路、甚至生命; 或是改造自然界存在的生物系统和生物过程<sup>[7-8]</sup>。合成生物学的发展是以分子生物学、细胞生物学、系统生物学和生物信息学为基础的。和大多数的合成生物学家一样, 笔者认为合成生物学与传统的分子生物学和细胞生物学的不同之处在于合成

生物学强调人工设计和构建核心元件(Core Components)。随着合成生物学的发展, 这些生物学元件被赋予工程学上的模块化性质, 每一个生物学元件都有详细的生物学特征描述, 可以在更大规模的设计中与其他元件进一步组合成具有特定生物学功能的生物学装置(Device)。就像工程师利用已有的物理学元件, 根据物理学原理设计电路, 进一步组建有功能的集成电路甚至中央处理器一样, 合成生物学工作者可以利用标准化的元件和装置设计, 实现更大规模的生物工程改造。合成生物学的特点之一就是标准化和简便性, 即利用标准化的生物学元件, 可以简便地实现大规模的生物学途径的构建, 达到生物合成的目的。利用合成生物学构建的具有详细生物学特征的生物学元件来构建代谢途径具有更好的可预测性, 可以简化代谢工程的过程, 提高代谢工程改造的效率, 同时也为构建复杂的生物学系统提供技术支持<sup>[9]</sup>。

合成生物学中 BioBrick(生物砖头)的概念是由麻省理工学院的 Tom Knight 和 Drew Endy 提出的, 指可以像电子元件一样组装的生物学元件。现在已经成为标准化生物学元件的一个商标。BioBrick 标准生物学元件是由核酸编码的具有生物学功能的生物学元件、生物装置以及生物系统。BioBrick 中的每一个生物学元件, 例如启动子、核糖体结合位点(RBS)都以载体形式保存, 元件的上游下游分别为 *EcoR* I、*Xba* I 和 *Spe* I、*Pst* I 4 个酶切位点。向载体中插入目的片段时, 只需根据片段插入的位置选择酶切位点组合。例如, 载体经过 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切, 产生可在前端插入片段的前端载体 (Front vector, FV), 对应的插入元件采用 *EcoR* I 和 *Spe* I, 产生插入载体前端的前端插入 (Front insert, FI)。利用 *Xba* I 和 *Spe* I 是同尾酶的特性, 在连接酶的作用下, 前端插入即可插入前端载体, 而产生的新载体仍具有这 4 个酶切位点。同样的, 载体经 *Spe* I、*Pst* I 酶切作用产生后端载体, 插入元件采用 *Xba* I、*Pst* I 酶切产物后端插入。经过一步插入操作后得到的新载体仍具有上述的 4 个酶切位点, 并可重复利用相同的酶切位点进行进一步构建, 因此每一步构建均采用相同的 4 个酶切位点, 减少了构建工作中对生物学元件具体碱基及特征细节的考虑, 这种独

特的方式使得表达载体的基本零件如启动子、复制子、抗性筛选标记甚至载体本身的替换简便易行,简化了构建工作。

## 2 合成生物学在代谢工程中的应用

### 2.1 代谢途径中关键酶的改造

催化生化反应的酶分子是代谢途径的关键,也是合成生物中的基本元件。代谢工程中,在宿主细胞中构建一条新的代谢途径,通常要过量表达来自异源的编码代谢途径关键酶的基因。由于密码子使用偏好的不同,在宿主菌中表达异源基因可能会遇到酶活力低的问题。利用 DNA 合成技术,合成密码子优化的基因可以提高酶分子的表达水平和生化反应的效率<sup>[10]</sup>。Keasling 小组在构建大肠杆菌生产萜类化合物的代谢中,根据大肠杆菌密码子使用偏好性,合成了青蒿酸合酶(Amorphadiene synthase)的编码基因。利用优化后的基因极大地提高了该酶在大肠杆菌中的表达水平,从而将最终的萜类产物提高了 10~300 倍<sup>[11]</sup>。

通过随机突变、定向进化等实验方法与计算机辅助模拟方法结合还可以改造天然酶分子的特性以更好地完成代谢途径的某一任务<sup>[12]</sup>。 $\gamma$ -葎草烯合酶( $\gamma$ -humulene synthase)可以催化单一底物法呢基焦磷酸(Farnesyl diphosphate, FPP)生成 52 种不同的倍半萜烯分子。通过计算机模拟反应中心的活性位点,应用点突变技术,Keasling 小组构建了一系列只催化生成一种或几种倍半萜烯分子的 $\gamma$ -葎草烯合酶,即具有更高专一性的 $\gamma$ -葎草烯合酶<sup>[13]</sup>。

通过计算机辅助设计,模拟活性位点的结构,可以人工设计和构建自然界不存在的酶分子,可以催化自然界不存在的酶反应<sup>[14-15]</sup>。目前通过这种方法已成功构建催化 Kemp elimination 反应的酶分子<sup>[14]</sup>;以及以 4-羟基-4-(6-甲基-2 萘基)-2-丁酮为底物,催化逆醛醇缩合反应的酶分子 retro-aldolase<sup>[15]</sup>。在生物界不存在催化上述反应的天然酶分子。在理论上,通过这种方法可以设计合成目的产物代谢途径中的任一反应的酶分子,这种方法可以大大扩展代谢工程的应用范围。

### 2.2 代谢途径的构建

随着 DNA 重组技术的发展,代谢工程可以在宿

主菌中表达异源基因来构建宿主细胞没有的新的代谢途径。例如,通过表达富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)的聚羟基脂肪酸酯(PHA)合成基因,大肠杆菌(*Escherichia coli*)可以利用糖酵解途径产生的前体物乙酰辅酶 A 积累的 PHB 达细胞干重的 85.8%<sup>[16]</sup>,而大肠杆菌原来是不能合成 PHB 的。通过跨种属组合表达来自丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)的乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶基因 *thl*、大肠杆菌(*E. coli*)的乙酰乙酰辅酶 A 转移酶基因 *atoAD*、来自丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)乙酰乙酸脱羧酶基因 *adc*,和来自拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)的乙醇脱氢酶基因 *adh*,首次在大肠杆菌内人工构建了异丙醇的代谢途径,摇瓶发酵最大产量可达到 81.6 mmol/L,较野生菌株(30 mmol/L)有较大提高<sup>[17]</sup>。

如果目的产物合成的代谢途径未知,就要采用从头合成代谢途径(*De novo* biosynthetic pathways)的方法<sup>[18]</sup>。同传统的生物代谢途径构建不同,从头合成代谢途径在代谢途径未知的情况下,采用化学上逆合成分析(Retro-synthetic analysis)的方法学,以一个化合物为目标,构建可能的生物代谢途径,即逆生物合成方法(Retro-biosynthetic approach)<sup>[18]</sup>。这种方法扩大了生物合成的范围,特别是合成自然界中不存在的天然生物合成途径的化合物。目前已经有多种计算机算法可以用于从自然界已知的酶分子以及酶反应类型构建可能的代谢途径<sup>[19-23]</sup>。但应用这种方法成功的例子还很少。主要的限制原因有理论上的可行途径过多难以验证,以及催化特定反应的酶分子需要蛋白质水平的改造<sup>[18]</sup>。

### 2.3 代谢途径中多基因的调控表达(Tuning the expression level of multiple genes simultaneously)

上述代谢途径构建中就采用了最简单的操纵子的概念在新宿主中建立原来没有的代谢途径,而操纵子是合成生物学中最简单最原始的装置。在代谢途径的构建中设计合理的操纵子来调控多基因的同时表达可以实现合成生物学中简化的特点。但是,细胞是非常复杂的系统,细菌对外界的环境压力有一系列的反应,包括生长速率的调节、热激反应(Heat shock response)、压力反应(Stress response)、严谨反应(Stringent response)等<sup>[24-25]</sup>。由于宿主细胞

不能自发地调整外源基因的表达, 人工高水平表达重组外源基因引起宿主细胞的上述反应, 会进一步引起质粒的不稳定、细胞的裂解和细胞遗传信息的改变。因此, 代谢工程中要避免这种情况的发生, 就需要精确调控外源基因的表达<sup>[26-27]</sup>。这时合成生物学中精确设计和生物学装置的概念就显得极为重要了。

一般情况下, 协调多基因表达的方法是每个基因的表达采用不同强度的启动子来分别调控。目前代谢工程中常用的启动子有组成型启动子(Constitutive promoter)和诱导型启动子(Inducible promoter), 如 lac、arabinose 启动子。组成型启动子是一类保证下游基因持续转录而不受调节的启动子。它不需要诱导剂(Inducer)的作用, 可以启动下游基因持续表达。因此, 在低价值化学品和药物生产中使用组成型启动子可以节约成本。诱导型的启动子是基因表达调控最常用、最简单的方法, 它可以根据需要定时定量表达。但在实际应用中, 诱导型启动子只能对基因表达实现粗略地表达调控, 即全部开启或关闭, 而不能根据细胞内代谢情况对基因表达水平实现精细调控。启动子工程<sup>[28]</sup>(Promoter engineering)可以构建出适合代谢工程表达要求的不同强度的启动子。理论上, 保持调控蛋白结合位点序列不变, 通过改造启动子-10 区和-35 区的序列, 以及其间的 16 个碱基即可构建一系列具有不同启动强度的启动子<sup>[26,29-31]</sup>, 形成满足不同表达强度需求的启动子库。Gregory Stephanopoulos 小组通过易错 PCR 技术构建了 PL- $\lambda$ 启动子突变库, 筛选得到近 200 个不同强度的启动子, mRNA 水平启动强度范围相差 325 倍。在大肠杆菌产番茄红素的代谢途径中, 应用不同强度的启动子调控关键酶 1-脱氧-D-木酮糖磷酸(DXP)合酶的表达水平, 将番茄红素的产量提高到 2.5 mg/L<sup>[29]</sup>。

核糖开关(Riboswitch)是一种可以在蛋白质翻译水平上调控一系列基础代谢途径的 RNA 调控元件。核糖开关位于 mRNA 5'非编码区, 并具有 2 个功能结构域, 负责识别和结合配体的适体结构域(Aptamer domain)和负责调控基因表达的结构域(Expression platform)。适体结构域能够识别小分子

的配体并与其结合, 并产生了 mRNA 的构象变化, 通过形成茎环结构、促进 mRNA 自我剪接、影响核糖体与 mRNA 的结合力等机理影响 mRNA 的活力, 从而影响下游基因的表达。核糖开关是基础代谢过程的重要调控手段。据预测, 近 2%的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)基因受到相应核糖开关的调控<sup>[32]</sup>。自然界中已经证实的有 10 类核糖开关, 识别的配体分别是辅酶 B12、硫胺素焦磷酸、S-腺苷甲硫氨酸、FMN 黄素单核苷酸、赖氨酸、嘌呤(鸟嘌呤、腺嘌呤)、喹啉、S 腺苷同型半胱氨酸、葡糖胺-6-磷酸以及 2 个核苷组成的 cyclic di-GMP。近年来发展起来的体外筛选技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)可以在体外筛选具有高度亲和力和专一性的小分子核酸适体(Aptamer)<sup>[33-35]</sup>。由于 RNA 分子结构功能域有很强的模块特点, 应用不同的适体和基因表达调控结构域, 可以构建对特定配体小分子依赖的表达调控核糖开关<sup>[36]</sup>。核糖开关的调控是配体浓度依赖模式, 因此可以进行定量调控<sup>[37-38]</sup>。Michael 小组首次证明核酸适体分子在体内也能识别其配体, 利用卡那霉素和托普霉素的适体成功构建核糖开关, 并证明该核糖开关可以配体浓度依赖模式调控基因表达<sup>[37]</sup>。如果通过 SELEX 获得可以识别细胞代谢物的适体, 即可构建可以实时监测细胞内代谢产物浓度、并根据浓度变化调控基因表达的核糖开关。因此, 同启动子相比, 核糖开关是可以根据细胞代谢情况精确调节基因表达和优化代谢途径的有利工具。

原核操纵子基因间的序列可以直接影响 mRNA 的加工和稳定性, 通过改变基因间的区域(Tunable intergenic regions, TIGRs)可以调控操纵子内多基因的表达水平<sup>[31,39]</sup>。Keasling 小组构建了包含 mRNA 二级结构、RNA 酶切位点、核糖体结合位点的基因间区域分子库, 适当组合使用这些 TIGRs 可以调控同一操纵子中不同基因的表达水平。应用这个系统, Keasling 小组成功将甲羟戊酸产量提高了 7 倍<sup>[39]</sup>。

上述的合成生物学元件, 如可调启动子、核糖开关、基因间区域等较传统的分子生物学工具调控基因表达水平的方式更加精确。并且可以模块化地使用在代谢途径构建的工作中, 实现多基因差异水

平的调控表达<sup>[40-41]</sup>。同时,由于合成生物学中生物元件详细的物理、生物学特征描述,这些生物元件的使用可以大大简化代谢工程的工作,使多酶系统的代谢调节更简便易行(图 2)。

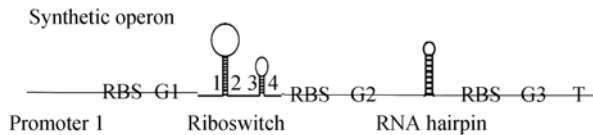


图 2 合成生物学标准元件构建的操纵子

Fig. 2 Construction of synthetic operon with standard parts.

## 2.4 宿主细胞的改造

宿主细胞是代谢途径和生物装置发挥生物学功能的基础。宿主细胞不仅能保存、复制生物装置的遗传信息,并提供转录和翻译等机制,还要利用环境中的资源为生物装置提供能量、还原力和基础物质。稳定而良好的宿主细胞是实验室规模、大规模生产的必要条件。良好的宿主细胞首先应该具有长期培养的遗传稳定性,至少在产物快速积累时期具有遗传稳定性。遗传稳定性是指宿主细胞能够稳定保存携带基因的载体,并且宿主细胞不会抑制异源基因的表达。在此基础上,微生物应能在最简单培养基上生长以减少原料成本适应工业化生产。遗传背景清楚并能利用简单廉价的碳源、无机氮、磷和硫盐合成全部生物大分子的宿主细胞将对高效利用廉价原料大量积累高附加值产物有重要意义。为避免异源代谢途径的中间产物或最终产物对细胞的毒害作用,代谢工程的另一个特征是要在适宜生长的时期抑制代谢途径中相关基因的表达,而在产物积累时期开启基因的表达。最后,由于产物的生成需要多个酶分子的催化转化作用,宿主细胞应该能够同时协调代谢途径中多基因的表达。

然而,细胞是一个非常复杂的系统,对于外源基因的表达或环境影响会做出相应的反应<sup>[42-43]</sup>。大多数宿主细胞具有抑制外源基因表达以减少外源 DNA 遗传负担的能力<sup>[25,44]</sup>。引起细胞内外源 DNA 的不稳定性的原因有转座子、插入片段(Insertion sequence element)、隐藏性致病基因(Cryptic virulence genes)、缺陷型噬菌体、整合酶、位点专一性重组作用、协助 DNA 倒置、复制或删除的 DNA 重

复片段<sup>[45]</sup>等。为构建稳定维持外源基因的宿主细胞,可以对细胞进行一系列合理的改造。

利用合成生物学的方法改造宿主细胞主要有 2 种策略:识别细胞的最小基因组(Minimal genome)和人工全基因组合成。

维持细胞正常生长的最小基因组包括维持细胞在丰富培养基上维持正常生长的基因。Blattner 工作组通过序列比对,精确删除基因组中上述引起 DNA 不稳定的 DNA 片段和非必须功能的基因,例如与感染人宿主相关的基因,以及应对特殊环境的相关基因。将 *E. coli* MG1655 菌株的基因组减少 15.27%。获得的菌株在丰富培养基上的生长速度没有明显降低。并且较野生菌具有更好的染色体及染色体外 DNA 分子的遗传稳定性、更高的电转化效率<sup>[44]</sup>。这一研究成果说明了具有最小基因组细胞的可行性。最小基因组既能够为细胞的生长和繁殖提供必要的分子机制和能量,又减少了不必要的代谢途径、基因调控环路和非必需功能基因,减少宿主细胞的遗传背景,提高代谢效率。

另外,随着近年来 DNA 合成技术的发展,目前已经可以以合理的价格合成大小约 5 万碱基的 DNA 片段。DNA 合成技术的成熟和目前基因组信息的极大丰富为人工合理设计和合成遗传信息甚至人工合成基因组创造了可能性,大大促进了宿主细胞遗传改造的进程<sup>[46-47]</sup>。目前 Wimmer 小组最早报道了不依靠天然模板从头合成脊髓灰质炎病毒(Polio virus)的研究<sup>[48]</sup>。该小组成功的合成了脊髓灰质炎病毒的全长 cDNA,成功地在细胞中得到转录和复制,并成功转染转基因小鼠。以合成的病毒 cDNA 基因组为模板指导合成的蛋白质具有与天然病毒蛋白质相似的感染能力。人工合成的脊髓灰质炎病毒和野生型病毒具有同样的神经致病力。该结果证明了人工合成病毒基因组的可行性。Venter 等实现了人工全合成 phi2X174 噬菌体的基因组(5386 bp)并成功感染大肠杆菌细胞<sup>[49]</sup>。最近,他们又合成了目前发现的基因组最小的原核生物——生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*)的基因组片段,同时在酵母中完成了组装<sup>[50-51]</sup>。基因组大规模的体外合成是构建人工细胞工作的第一步,更使得人工构建最佳的宿主细胞成为可能。借助系统生物学,通

过人工设计和优化,可以更合理地选择基因组遗传信息,包括必需的功能和途径,删减遗传冗余而创造具有最简化的遗传背景宿主细胞<sup>[8,45,52-54]</sup>。

### 3 结论与展望

合成生物学的快速发展已经为代谢工程提供了更系统更有力的分子生物学工具,今后将在代谢工程领域发挥更大的作用。尤其是在系统生物学(Systems biology)、生物信息学的知识背景下,以及电脑辅助设计工具(Computer-aided design tools)的协助下,更将扩大代谢工程改造的范围,加速代谢工程的发展。

### REFERENCES

- [1] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**(5013): 1668–1675.
- [2] Stephanopoulos G, Vallino JJ. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, 1991, **252**(5013): 1675–1681.
- [3] Nielsen J. Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**(3): 263–283.
- [4] Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass: volume I—results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas; DOE/GO-102004-1992, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (US): 2004.
- [5] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol*, 2008, **3**: 64–76.
- [6] Tyo KE, Alper HS, Stephanopoulos GN. Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells. *Trends Biotechnol*, 2007, **25**(3): 132–137.
- [7] Benner SA, Sismour AM. Synthetic biology. *Nat Rev Genet*, 2005, **6**(7): 533–543.
- [8] Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK, et al. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Mol Syst Biol* (2006-05-16). <http://www.nature.com/msb/journal/v2/n1/full/msb4100073.html>.
- [9] Voigt CA. Genetic parts to program bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17**(5): 548–557.
- [10] Damaso MCT, Almeida MS, Kurtenbach E, et al. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(10): 6064–6072.
- [11] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 796–802.
- [12] Yoshikuni Y, Dietrich JA, Nowroozi FF, et al. Redesigning enzymes based on adaptive evolution for optimal function in synthetic metabolic pathways. *Chem Biol*, 2008, **15**(6): 607–618.
- [13] Yoshikuni Y, Ferrin TE, Keasling JD. Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature*, 2006, **440**(7087): 1078–1082.
- [14] Rothlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, et al. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*, 2008, **453**(7192): 190–195.
- [15] Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, et al. De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science*, 2008, **319**(5868): 1387.
- [16] Kang Z, Wang Q, Zhang H, et al. Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**(2): 203–208.
- [17] Hanai T, Atsumi S, Liao JC. Engineered synthetic pathway for isopropanol production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(24): 7814–7818.
- [18] Prather KLJ, Martin CH. De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, **19**(5): 468–474.
- [19] Pharkya P, Burgard AP, Maranas CD. OptStrain: a computational framework for redesign of microbial production systems. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004: 2367–2376.
- [20] McShan DC, Rao S, Shah I. PathMiner: predicting metabolic pathways by heuristic search. *Bioinformatics*, 2003, **19**(13): 1692–1698.
- [21] Hatzimanikatis V, Li C, Ionita JA, et al. Exploring the diversity of complex metabolic networks. *Bioinformatics*, 2005, **21**(8): 1603–1609.
- [22] Li C, Henry CS, Jankowski MD, et al. Computational discovery of biochemical routes to specialty chemicals. *Chem Eng Sci*, 2004, **59**(22/23): 5051–5060.
- [23] Ellis L, Roe D, Wackett LP. The University of Minnesota biocatalysis/biodegradation database: the first decade. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(Database Issue): D517.
- [24] Wick LM, Egli T. Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, **89**: 1–46.
- [25] Gill RT, Valdes JJ, Bentley WE. A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2000, **2**(3): 178–189.
- [26] Jensen PR, Hammer K. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58** (2/3): 191–195.
- [27] Mijakovic I, Petranovic D, Jensen PR. Tunable promoters

- in systems biology. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**(3): 329–335.
- [28] Nevoigt E, Fischer C, Mucha O, *et al.* Engineering promoter regulation. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **96**(3): 550–558.
- [29] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, *et al.* Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(36): 12678–12683.
- [30] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, **9**(3): 258–267.
- [31] Jensen PR, Hammer K. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(1): 82–87.
- [32] Mandal M, Boese B, Barrick JE, *et al.* Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, 2003, **113**(5): 577–586.
- [33] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, **346**(6287): 818–822.
- [34] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng*, 2007, **24**(4): 381–403.
- [35] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, **249**(4968): 505.
- [36] Bauer G, Süss B. Engineered riboswitches as novel tools in molecular biology. *J Biotechnol*, 2006, **124**(1): 4–11.
- [37] Werstuck G, Green MR. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science*, 1998, **282**(5387): 296.
- [38] Bayer TS, Smolke CD. Programmable ligand-controlled riboregulators of eukaryotic gene expression. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 337–343.
- [39] Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, *et al.* Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**: 1027–1032.
- [40] Franckl B. Key building blocks of natural product biosynthesis and their significance in chemistry and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1979, **18**(6): 429–439.
- [41] Farmer WR, Liao JC. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 533–537.
- [42] Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, *et al.* Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 2002, **297**(5584): 1183–1186.
- [43] Rosenfeld N, Young JW, Alon U, *et al.* Gene regulation at the single-cell level. *Science*, 2005, **307**(5717): 1962–1965.
- [44] Posfai G, Plunkett G, Feher T, *et al.* Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 2006, **312**(5776): 1044–1046.
- [45] Sanden AM, Prytz I, Tubulekas I, *et al.* Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **81**(2): 158–166.
- [46] Zimmer C. GENOMICS: tinker, tailor: can venter stitch together a genome from scratch? *Science*, 2003, **299**: 1006–1007.
- [47] Pennisi E. Synthetic biology: synthetic biology remakes small genomes. *Science*, 2005, **310**: 769–770.
- [48] Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 2002, **297**: 1016–1018.
- [49] Smith HO, Hutchison CA, Pfannkoch C, *et al.* Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phi2X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(26): 15440–15445.
- [50] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, *et al.* Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2008, **319**(5867): 1215–1220.
- [51] Endy D. Genomics: reconstruction of the genomes. *Science*, 2008, **319**(5867): 1196–1197.
- [52] Barrett CL, Kim TY, Kim HU, *et al.* Systems biology as a foundation for genome-scale synthetic biology. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17**(5): 488–492.
- [53] Chan LY, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. *Mol Syst Biol* (2005-09-13). <http://www.nature.com/msb/journal/v1/n1/synopsis/msb4100025.html>.
- [54] Kolisnychenko V, Plunkett G, Herring CD, *et al.* Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Res*, 2002, **12**: 640–647.