

全局转录机制工程法筛选丁醇耐受大肠杆菌及性质

司海明^{1,2}, 韩瑞枝^{1,2}, 许国超^{1,2}, 董晋军^{1,2}, 倪晔^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要: 作者旨在采用一种快速有效的方法(全局转录机制工程方法)筛选一株具有较高丁醇耐受性的大肠杆菌。通过对全局转录因子 σ^{70} 进行随机突变,构建 $rpoD$ (编码 σ^{70} 因子)突变库。并采用高通量筛选的方法筛选获得丁醇耐受突变株 *E. coli* JM109/pHACM^{B8}, 并对该突变株的性质进行了研究。结果表明:丁醇耐受突变株 B8 能够耐受体积分数 2% 丁醇,且对其他有机溶剂也具有较高的耐受性,如体积分数 3% 异丁醇、体积分数 8% 乙醇、体积分数 4% 环己烷和体积分数 0.3% 甲苯。为进一步阐明了 B8 菌株丁醇耐受机制,分别对 B8 菌株和对照菌株 *E. coli* JM109/pHACM^{WT} 的生理特性进行了研究。结果显示突变株 B8 胞内的丁醇含量较对照菌株低 55%;且在酸性环境下比对照菌株生长更好;此外 Mg^{2+} 有助于提高菌株 B8 的丁醇耐受性。本研究为工业化应用中耐溶剂微生物菌株的构建提供了实验依据和理论基础。

关键词: 大肠杆菌;丁醇;有机溶剂耐受性;全局转录机制工程

中图分类号:Q 78 文章编号:1673-1689(2019)03-0076-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.011

Screening of Butanol-Tolerant *Escherichia coli* Strain by Global Transcription Machinery Engineering and Its Characterization

SI Haiming^{1,2}, HAN Ruizhi^{1,2}, XU Guochao^{1,2}, DONG Jinjun^{1,2}, NI Ye^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, we employed a fast and efficient approach, Global Transcription Machinery Engineering (gTME), to improve the butanol tolerance of *Escherichia coli*. The results show that one mutant *E. coli* JM109/pHACM^{B8} harboring $rpoD$ mutant B8 could tolerate 2% (v/v) butanol. Further studies showed that the mutant B8 also exhibited high tolerance to other organic solvents such as 3% (v/v) isopropanol, 8% (v/v) ethanol, 4% (v/v) cyclohexane and 0.3% (v/v) toluene. To further reveal the tolerance mechanism of the mutant, we investigated the physiological characteristics of both *E. coli* JM109/pHACM^{WT} and the mutant B8. The results show that the intracellular butanol

收稿日期: 2016-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(21276112, 31401634); 江苏省自然科学基金项目(BK20140135, BK20150003)。

* 通信作者: 倪晔(1975—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物催化与酶工程方面的研究。E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

引用本文: 司海明, 韩瑞枝, 许国超, 等. 全局转录机制工程法筛选丁醇耐受大肠杆菌及性质[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(03): 76-82.

concentration of mutant B8 was 55% lower and has improved acid tolerance compared with WT. In addition, Mg^{2+} was proved to have a beneficial effect on the butanol tolerance of B8 mutant. Our study provides experimental data and theoretical basis for constructing OST bacteria for industrial applications.

Keywords: *Escherichia coli*, butanol, organic solvent tolerance, global transcription machinery engineering

现代工业飞速发展的同时,随之出现了一系列问题,例如化石燃料(煤炭、石油等)极度消耗,环境污染日益加剧,雾霾现象愈发严重。为此,人们将关注焦点逐渐从化石能源转移至生物能源的开发和利用上,例如利用微生物生产乙醇和丁醇等生物燃料。但是,大多数有机溶剂对微生物细胞生长有抑制作用。它们能够破坏细胞膜、改变胞内 pH、引发胞内离子和代谢物质的丢失和蛋白的错误折叠,导致细胞受损甚至死亡^[1]。因此,构建具有较高有机溶剂耐受性的微生物菌株对生物能源的工业化生产具有重要意义。丁醇作为一种新型的、可再生的生物燃料,具有热值高,腐蚀性小和抗爆性好等优点^[2-4]。传统的丁醇生产菌株梭菌因其培养方式严格厌氧,代谢调控复杂,分子操作困难^[5-7],严重限制了微生物工业生产丁醇的经济性。大肠杆菌因其遗传背景清晰,分子操作简单,更有利于应用于丁醇的工业生产。但是由于大肠杆菌的溶剂耐受性较低,在体积分数 1% 丁醇压力下就停止生长^[8]。因此提高大肠杆菌的丁醇耐受性是提高丁醇产量的前提。

传统研究中,人们通过有机溶剂驯化,物理或化学诱变的方法获得溶剂耐受性菌株,但是这些方法耗时耗力而且获得的效果也微乎其微^[9-10]。随着后基因组时代的发展,众多研究者更多地采用代谢工程手段以及从基因组全局水平出发研究微生物表型与基因组转录之间的关系。2006 年,Alper 等首次提出全局转录调控机制(global transcription machinery engineering, gTME)的概念,指出全局转录因子可以直接或者间接的调控大肠杆菌内大多数基因的转录水平^[11]。近年来,有一些通过对全局转录因子操纵来改造微生物表型的报道。有报道通过对全局转录因子 cAMP 受体蛋白(CRP)进行随机突变得到能够耐受体积分数 1.2% 丁醇的大肠杆菌^[12]。Hong 等对大肠杆菌全局转录因子 Hha 突变来调控生物被膜的形成,从而降低微生物的致病性^[13]。也有

研究者通过对 *Saccharomyces cerevisiae* 中全局转录因子 *spt15* 进行突变,提高酵母菌株对木糖的耐受及利用率^[14]。 σ^{70} 全局转录因子作为大肠杆菌 RNA 聚合酶的一个亚基,其突变能够影响 RNA 聚合酶对启动子的识别,从而对大肠杆菌基因组中上千个基因的转录水平进行调控^[15-16]。Alper 等通过突变大肠杆菌全局转录因子 σ^{70} 的编码基因 *rpoD*, 将大肠杆菌的乙醇耐受性提高至 70 g/L^[17]。

作者通过随机突变全局转录因子 σ^{70} 筛选获得一株能够耐受体积分数 2% 丁醇的大肠杆菌 *E. coli* JM109/pHACM^{B8}, 其携带有 *rpoD* 突变基因 B8, 命名为突变株 B8。该突变株也能够耐受多种不同毒性的有机溶剂,如异丁醇,乙醇,环己烷,甲苯。通过比较对照菌株 *E. coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变株 B8 的生理特性,发现突变菌株 B8 较对照菌株 *E. coli* JM109/pHACM^{WT} 胞内的丁醇含量降低,且具有较好的低 pH 耐受性。此外,向培养基中添加 Mg^{2+} 有助于提高突变株 B8 对丁醇的耐受性。该研究为选育具有耐丁醇表型的微生物菌株奠定了基础并提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基 菌株: *E. coli* JM109 为本实验室保藏;质粒:携带了野生型 *rpoD* 基因的 pHACM 质粒由清华大学于慧敏教授惠赠。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, 固体培养基添加琼脂 20 g/L。必要时添加氯霉素 34 μ g/mL。

LBMg: 在 LB 培养基中添加 10 mmol/L 的 $MgSO_4$ 和 1 g/L 的葡萄糖。

1.1.2 酶、试剂、引物及相关试剂盒 正丁醇:购于国药集团;质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、DNA Marker、高保真酶:购自 TaKaRa 公司;随机突

变试剂盒(GeneMorph II Random Mutagenesis Kit): 安捷伦科技有限公司;引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成;测序由赛音生物技术(上海)有限公司完成。实验中所用引物为 p-*rpoD*-F5'-AACCTAGGAGCTCTGATTTAACGGCTTAAGTGCCG AAGAGC-3' 和 p-*rpoD*-R5'-TGGAAGCTTTAACG CCTGATCCGGCCTACCGATTA-3'。

1.2 方法

1.2.1 σ^{70} 随机突变库的构建 利用随机突变试剂盒,以携带有 *rpoD* 基因的质粒 pHACM 为模板,以 p-*rpoD*-F、p-*rpoD*-R 为引物对 *rpoD* (编码 σ^{70} 转录因子)进行随机突变。PCR 条件为:95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 57 °C 1 min, 72 °C 2 min, 反应 30 个循环后 72 °C 再延伸 10 min。对突变后的 *rpoD* 片段经凝胶电泳后切胶回收,以纯化后的 *rpoD* 片段为引物对 pHACM 进行全质粒大引物 PCR。反应结束后向 PCR 产物中加入 DpnI 酶消化模板质粒,PCR 产物经凝胶电泳后切胶回收。回收后的质粒按照常规热激方法,转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中,同时将未突变的质粒转化 *E. coli* JM109 感受态细胞后获得的菌株作为对照菌。37 °C 后培养 1.5 h 后涂布氯霉素固体平板中培养至单菌落出现,即获得 *rpoD* 随机突变库。随机挑取 10 个单菌落于液体 LB/Cm 培养基中,37 °C 过夜培养,分别提取其质粒并送至测序公司进行 *rpoD* 基因测序,将测序结果与野生型 *rpoD* 进行序列比对,初步计算突变库中 *rpoD* 的突变率。

1.2.2 丁醇耐受突变株的筛选 第一轮筛选:为获得一株具有较高丁醇耐受的大肠杆菌突变株,将 1.2.1 中构建的随机突变库中的单菌落接种于含有 LB/Cm 液体培养基的 24 深孔板中,当 $OD_{600} \approx 0.2$ 时,向培养基中加入体积分数 0.5% 丁醇,继续培养 8 h 后分别测定菌体在 OD_{600} 时的浓度。选取 OD_{600} 较高的前 10 株突变株进行复筛,复筛过程中以体积分数 0.1% 的梯度不断提高培养基中丁醇的体积分数,直到获得一株具有最高丁醇耐受性的菌株 D3。提取其质粒进行测序,然后重新转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中,验证其最大丁醇耐受体积分数。

第二轮筛选:为进一步提高大肠杆菌的丁醇耐受性,以携带有 *rpoD* 突变基因 D3 的质粒为模板,

按照 1.2.1 的方法再次构建随机突变库,按照一轮筛选的方法进行二轮筛选,直至获得一株最高丁醇耐受性的突变株 B8,提取其质粒进行测序。

1.2.3 突变株 B8 丁醇耐受性评估及验证 评估:以体积分数 1.2% 作为培养基中丁醇的起始体积分数,并按体积分数 0.1% 梯度逐步提高培养基中的丁醇体积分数,直至 B8 菌浓不再增加,从而确定其对丁醇的极限耐受体积分数。

验证:对筛选获得的丁醇耐受突变株提取质粒,重新转化 *E. coli* JM109 细胞中,以未突变的菌株作为对照,在体积分数 2% 丁醇下 37 °C 培养,每小时检测 OD_{600} ,验证菌株的丁醇耐受能力,以排除驯化的影响。

1.2.4 丁醇耐受突变株 B8 对其他有机溶剂的耐受性 取过夜培养的菌液按 2% 的接种体积分数转接于 LB/Cm 液体培养基中,待 OD_{600} 约为 0.2 时,分别向液体培养基中添加不同体积分数的异丁醇、乙醇、环己烷、甲苯,37 °C 继续培养 8 h 后,分别测定含不同有机溶剂培养基中的菌体浓度(OD_{600})。

1.2.5 胞内丁醇含量的测定 将生长至对数期的对照菌株 *E. coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变菌株 B8 在体积分数 0.8% 丁醇的 LB 液体培养基中培养 1.5 h。取菌液以 8 000 r/min, 4 °C 离心 10 min,再用 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)洗涤细胞一次,离心获得湿菌体。用 750 mg/L 的溶菌酶进行破壁后,离心取上清液 2 μ L,进行气相检测。气相条件为:安捷伦气相色谱仪配合 PEG20M 毛细管柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μ m);N₂ 作为载气;柱温从 60 °C 升至 120 °C, 10 °C/min,再以 15 °C/min 的速度升至 190 °C,保留 10 min。胞内丁醇含量以 μ g/mg 湿细胞表示。

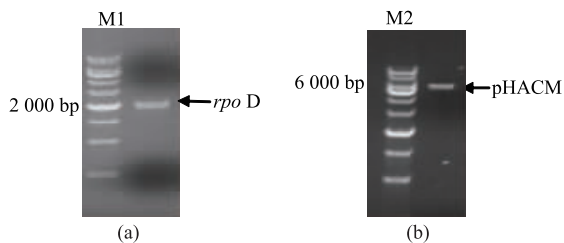
1.2.6 突变株 B8 对不同 pH 的耐受 将过夜培养的对照菌株 *E. coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变菌株 B8 按 2% 的接种体积分数分别转接于不同 pH 的 LB/Cm 液体培养基中,继续培养 8 h 后测定对照菌株和突变菌株的 OD_{600} 值。

1.2.7 Mg²⁺ 对 B8 耐受性的影响 将过夜培养的对照菌株 *E. coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变菌株 B8 按 2% 的接种体积分数分别转接于 LBG/Cm 和 LBGMg 液体培养基中,待 OD_{600} 约为 0.2 时,分别向液体培养基中添加体积分数 0.5% 的丁醇。通过每小时测定 OD_{600} 的值检测菌株的生长情况。

2 结果与分析

2.1 σ^{70} 随机突变库的构建

利用随机突变试剂盒,对质粒 pHACM 上携带的 *rpoD*(σ^{70} 的编码基因)进行随机突变。结果见图 1(a)。在 2 000 bp 处有条带,符合 *rpoD* 片段的理论值大小。对 *rpoD* 片段纯化回收,以此为引物, pHACM 为模板进行大质粒 PCR,获得大小为 6 000 bp 的片段,结果如图 1(b)。对获得的质粒用 *DpnI* 酶消化后,热转至 *E.coli* JM109 感受态细胞,通过 LB/Cm 平板筛选获得约 106 基因突变库。随机挑取 10 株菌进行测序,结果显示全部突变,所构建的突变库的突变率为 2~7 个核苷酸突变/基因。



M: Marker; 1: *rpoD* 突变片段; 2: 全质粒 PCR 扩增得到的 pHACM 质粒。

图 1 随机突变后的 *rpoD* 片段和全质粒扩增后的 pHACM-*rpoD* 质粒的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *rpoD*^M and pHACM-*rpoD*^M

2.2 丁醇耐受突变株的筛选

为了有效提高大肠杆菌对丁醇的耐受性,我们进行了两轮随机突变。在第一轮突变过程中,从 483 突变株中筛选获得 10 株在体积分数 0.5% 丁醇压力下生长较快的菌株($OD_{660} > 1.0$)。对这 10 株菌进一步丁醇梯度筛选(体积分数 0.1% 梯度逐步提高),结果显示当丁醇体积分数达到 1.2% 时,突变株 D3 长势最好, OD_{660} 达到了 0.76,其他 9 株突变株和对照菌株 OD_{660} 均低于 0.6(图 2(a))。提取突变株 D3 的质粒,经测序发现 *rpoD* 基因中两个碱基发生了突变,相应的氨基酸突变为 I41L、P97Q。

为了获得更高丁醇耐受性的大肠杆菌,我们以突变株 D3 的质粒为模板,进行第二轮突变。在 483 突变株中有 8 株菌的 OD_{660} 明显高于其他突变株。将这 8 株菌在丁醇体积分数 0.1% 梯度递增的液体培养基中培养,发现 B8 在体积分数 1.2% 丁醇下

OD_{660} 达到了 1.4,其他菌株 $OD_{660} < 1.0$ (图 2(b))。同时提取了突变株 B8 的质粒进行测序,发现在前面氨基酸突变的基础上,又增加了 E57D 这个位点的突变,即现在所得突变株突变位点为:I41L、E57D、P97Q。

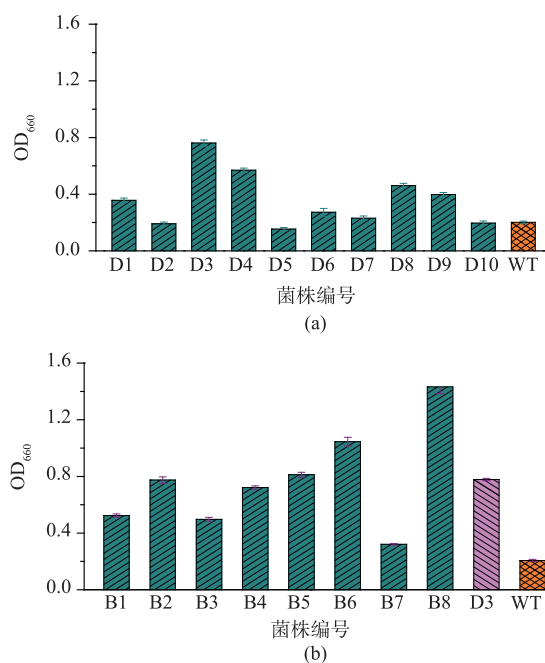


图 2 第一轮和第二轮筛选获得的丁醇耐受突变株在体积分数 1.2% 丁醇下的生长情况

Fig. 2 Cell growth of high butanol tolerant mutants in 1.2% butanol after the first and second round screening

2.3 突变株 B8 对丁醇极限耐受体积分数实验

为了进一步确定丁醇耐受突变株 B8 对丁醇的极限耐受体积分数。我们将携带有野生型 *rpoD* 的对照菌株 *E.coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变株 B8 分别在体积分数 1.2%~2.2% 丁醇递增的培养基中,37 °C 培养 8 h,测定各体积分数下菌株的 OD_{660} 值,见图 3。发现当丁醇体积分数达到 2.0% 时,B8 的 OD_{660} 达到 0.372,随着丁醇体积分数的增加,B8 停止生长,而对照菌株在体积分数 1.2% 的丁醇中就已经停止生长,表明我们筛选到的突变株 B8 最高能够耐受体积分数 2.0% 的丁醇,比对照菌株丁醇耐受性提高了近一倍。同时为了排除溶剂驯化造成的影响,我们提取质粒,重新转入 *E.coli* JM109 感受态细胞中,并与对照菌株同时在含有体积分数 2% 丁醇的 LB/Cm 培养基中培养 8 h,测定它们的生长曲线,见图 4。结

果表明, B8 的生长情况明显好于对照菌株, 排除了丁醇驯化的影响。先前研究报道, Bui 等人通过突变人工转录因子 ATF 结合过表达细胞膜相关基因的方法将大肠杆菌丁醇耐受性提高到体积分数 2.0%^[18]。这与我们筛选的菌株耐受体积分数相当, 但是本研究的方法更加简单、快速, 省去了繁杂的菌株构建过程。

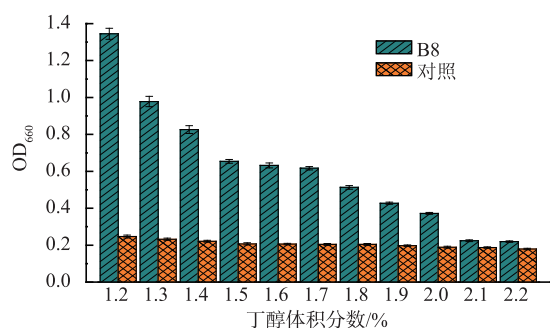


图 3 突变株 B8 丁醇耐受体积分数测定

Fig. 3 Butanol tolerance assay of mutant B8

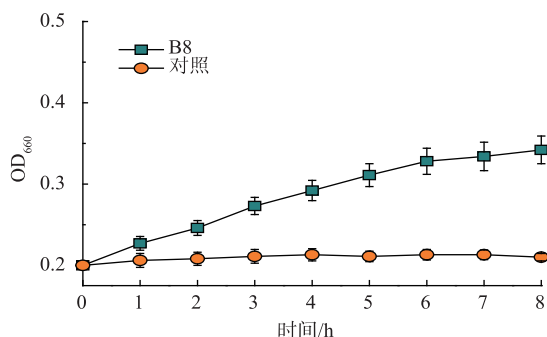


图 4 对照菌株 *E.coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变株 B8 在体积分数 2% 丁醇下的生长情况

Fig. 4 Growth curve of WT and mutant B8 in 2% butanol

2.4 B8 对其他有机溶剂的耐受性

突变株 B8 对丁醇表现出了较好的耐受性, 为了验证该突变株是否对其他有机溶剂也具有较好的耐受性, 我们通过向培养基中添加毒性程度不同的有机溶剂来证明该菌株的溶剂耐受性, 结果见图 5。突变株 B8 对异丁醇、乙醇、环己烷、甲苯的最大耐受体积分数分别为 3%、8%、4% 和 0.3%。而对照菌株在体积分数 1% 的异丁醇、3% 乙醇、1% 环己烷和 0.15% 甲苯中就停止生长, 表明我们筛选获得的突变株不仅能够耐受丁醇, 对其他有机溶剂的耐受性也有明显的提高, 说明该突变株对丁醇耐受机制与

对其他溶剂的耐受机制存在共性。先前也有研究表明, 大肠杆菌中与丁醇耐受相关基因对乙醇、异丁醇同样有较好的耐受性^[19]。这对利用耐受菌株在不同的两相生物催化体系中的应用具有重要意义。

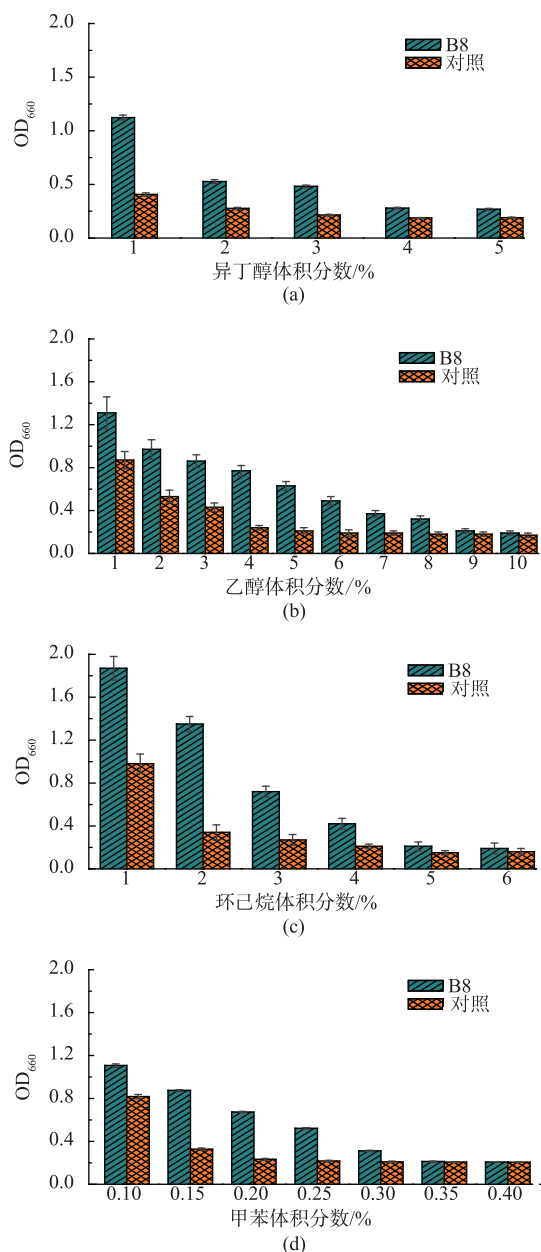


图 5 突变株 B8 对异丁醇、乙醇、环己烷、甲苯的耐受性

Fig. 5 Solvent tolerance of mutant B8 towards isobutanol, ethanol, cyclohexane and toluene

2.5 *E.coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变菌株 B8 胞内丁醇体积分数的测定

为进一步探究突变株 B8 丁醇耐受性提高的原因, 我们比较了对照菌株 *E.coli* JM109/pHACM^{WT} 和

突变株 B8 在体积分数 0.8% 在丁醇胁迫下胞内丁醇质量分数的变化。我们发现,在 37 °C 培养 1.5 h 后, B8 胞内丁醇的质量分数为 1.29 μg/mg, 明显低于对照菌株 2.86 μg/mg。由于丁醇能够透过细胞膜进入细胞, 不仅对细胞膜具有严重的破坏性, 而且可以破坏细胞内代谢平衡, 对细胞具有致命的杀伤力^[20]。实验结果表明, 突变株 B8 对丁醇有更好的抵御能力, 这也是突变株对丁醇具有较高耐受性的原因之一。

2.6 *E.coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变菌株 B8 对不同 pH 耐受的比较

细胞会产生大量能量来抵御外界有机溶剂的压力^[21], 且通过电子传递链产生 ATP 的同时会产生大量的 H⁺, 细胞会将这些 H⁺ 排除体外以维持胞内代谢平衡, 致使细胞生长环境的 pH 会降低。因此我们通过比较对照菌株和突变株 B8 在不同 pH 下的生长情况来进一步说明 B8 丁醇耐受性提高的原因。如图 6 所示, 除 pH 3.5 时对照菌株和突变株 B8 生长完全受到抑制外, 在其他 pH 环境下 B8 的生长状况都明显好于对照菌株。pH 为 5 时, B8 的 OD₆₀₀ 达到了 1.8, 表明在酸性条件下突变株 B8 的生长情况良好。进一步表明 B8 能够更好的适应在抵御压力过程中所造成的胞内和胞外的变化。

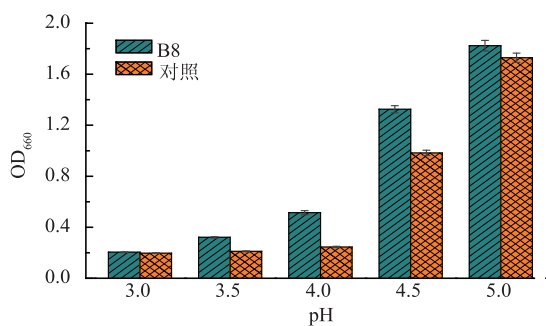


图 6 突变株 B8 在不同 pH 下的生长情况
Fig. 6 Growth of mutant B8 under different pHs

2.7 Mg²⁺对菌株耐受性的影响

早期研究发现, Mg²⁺能够提高 *P.putida* 对有机溶剂的耐受能力, 于是我们测定了 Mg²⁺对大肠杆菌突变株 B8 的耐受性的影响。结果见图 7。突变株 B8 和对照菌株在体积分数 0.5% 丁醇压力下, Mg²⁺的添加均能提高菌株对丁醇的耐受。在培养 10 h 后, 突变株 B8 的 OD₆₀₀ 由不加 M²⁺条件下的 2.45 提高至 2.81。Mg²⁺可以与细胞表面的电负性的脂多糖 LPS 螯合, 从而减少了细胞膜组分间的电子斥力, 使得细胞外膜变的更加稳定, 从而更有效的抵抗外界有机溶剂对细胞的破坏^[22-23]。

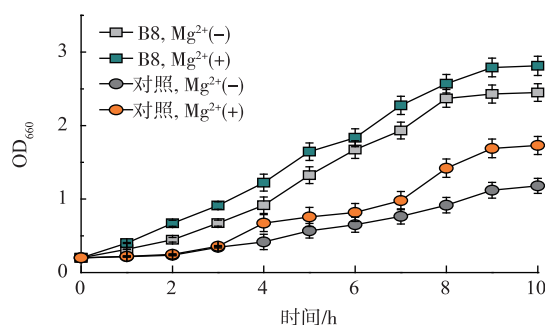


图 7 Mg²⁺对突变株 B8 和对照菌株耐受性的影响
Fig. 7 Effect of Mg²⁺ on butanol tolerance of B8 and WT strains

3 结语

大肠杆菌作为一种常用的平台工程菌株, 遗传背景清楚, 分子操作相对简单, 更有利于工业应用。利用全局转录机制工程来筛选丁醇耐受性菌株作为一种快速有效的方法, 为研究细胞复杂生理现象奠定了基础。作者采用随机突变全局转录因子 σ^{70} 的方法筛选获得了一株能够耐受体积分数 2% 丁醇的大肠杆菌突变株 B8, 并对对照菌株 *E.coli* JM109/pHACM^{WT} 和突变株 B8 与丁醇耐受相关的性质进行了研究, 初步探讨了大肠杆菌丁醇耐受性提高的原因。本研究为有效提高微生物菌株的丁醇耐受性提供了实验依据和理论基础。

参考文献:

- [1] SIKKEMA J, DE BONT J A M, POOLMAN B. Mechanisms of membranotoxicity of hydrocarbons[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59: 201-222.
- [2] LI Xin, LI Zhigang, SHI Zhongping. Effect of carbon/nitrogen ratio on butanol fermentation performances in two periods[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(11): 1168-1175. (in Chinese)

- [3] BRUNO T J, WOLK A, NAYDICH A. Composition-explicit distillation curves for mixtures of gasoline with four-carbon alcohols (butanols)[J]. **Energy Fuels**, 2009, 23: 2295-2306.
- [4] WANG Yun, NI Ye, SUN Zhihao, et al. Production of biobutanol from corn stover hydrolyzate by *Clostridium saccharobutylicum* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(9): 904-911. (in Chinese)
- [5] THORMANN K, FEUSTEL L, LORENZ K, et al. Control of butanol formation in *Clostridium acetobutylicum* by transcriptional activation[J]. **Journal of Bacteriology**, 2002, 184(7): 1966-1973.
- [6] SCOTCHER M C, RUDOLPH F B, BENNETT G N. Expression of abrB310 and SinR, and effects of decreased abrB310 expression on the transition from acidogenesis to solventogenesis, in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(4): 1987-1995.
- [7] DÜRRE P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/ isopropanol fermentation[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1998, 49: 639-648.
- [8] ATSUMI S, CANN A F, CONNOR M R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production[J]. **Metabolic Engineering**, 2008, 10: 305-311.
- [9] SHI D J, WANG C L, WANG K M. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2009, 36(1): 139-147.
- [10] BAJWA P K, SHIREEN T, D'AOUST F, et al. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2009, 104(5): 892-900.
- [11] ALPER H, STEPHANOPOULOS G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype[J]. **Metabolic Engineering**, 2007, 9(3): 258-267.
- [12] ZHANG H, CHONG H, CHING C B, et al. Engineering global transcription factor cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli* for improved 1-butanol tolerance[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 94(4): 1107-1117.
- [13] HONG S H, LEE J, WOOD T K. Engineering global regulator Hha of *Escherichia coli* to control biofilm dispersal[J]. **Microbial Biotechnology**, 2010, 3(6): 717-728.
- [14] LIU H, YAN M, LAI C, et al. gTME for improved xylose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010, 160(2): 574-582.
- [15] BURGESS R R, ANTHONY L. How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2001, 4: 126-131.
- [16] GRUBER T M, GROSS C A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space[J]. **Annual Review of Microbiology**, 2003, 57: 441-466.
- [17] ALPER H, MOXLEY J, NEVOIGT E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production[J]. **Science**, 2006, 314: 1565-1568.
- [18] BUI le M, LEE J Y, GERALDI A, et al. Improved n-butanol tolerance in *Escherichia coli* by controlling membrane related functions[J]. **Journal of Biotechnology**, 2015, 204: 33-44.
- [19] REYES L H, ABDELAAL A S, KAO K C. Genetic determinants for n-butanol tolerance in evolved *Escherichia coli* mutants: cross adaptation and antagonistic pleiotropy between n-butanol and other stressors[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013, 79(17): 5313-5320.
- [20] FERNANDES P, FERREIRA B S, CABRAL J M. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics[J]. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2003, 22(3): 211-216.
- [21] FU F, CHENG V W, WU Y, et al. Comparative proteomic and metabolomic analysis of *Staphylococcus warneri* SG1 cultured in the presence and absence of butanol[J]. **Journal of Proteome Research**, 2013, 12(10): 4478-4489.
- [22] WEBER F J, DE BONT J A. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes[J]. **Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes**, 1996, 1286(3): 225-245.
- [23] NIELSEN D R, LEONARD E, YOON S H, et al. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria[J]. **Metabolic Engineering**, 2009, 11(4-5): 262-273.