萜类合成生物学研究进展

汪建峰^①, 蒙海林^②, 王勇^{①*}^① 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 200032^② 广州中国科学院先进技术研究所, 生物工程研究中心, 广州 511458

* 联系人, E-mail: yongwang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2015-03-16; 接受日期: 2015-05-21

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB72114)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2012AA02A701)、国家自然科学基金(批准号: 31170101, 31301017, 21305150)、国家自然科学基金委员会-中国科学院学科发展战略研究合作项目(批准号: L1222037)和上海市自然科学基金(批准号: 14JC1406900)资助

doi: 10.1360/N052015-00050

摘要 萜类合成生物学的研究已经使萜类微生物异源合成显示出了巨大的应用潜力。但由于植物源萜类代谢的复杂性, 大量萜类合成途径仍未获得完全解析。因此当前大部分萜类仅能通过微生物异源合成获得非常简单的中间体, 并且大多数产物的产量仍然较低, 通常局限在毫克每升的水平。针对以上 2 个亟待突破的瓶颈, 本文将从萜类合成途径解析与下游途径装配, 高产萜类底盘细胞设计与构建, 以及萜类异源合成系统的适配性研究 3 个方面阐述萜类合成生物学研究的最新策略与进展。

关键词萜类
合成生物学
途径解析
途径装配
系统适配

萜类化合物是广泛存在于植物、微生物等生物体中的一类天然产物家族。目前已经报道的萜类化合物超过 55000 余种^[1]。由于其繁多的种类和复杂的结构, 萜类在药物、食品、化妆品以及生物能源等领域均具有重要的价值, 如抗疟疾药物青蒿素^[2]、抗癌药物紫杉醇^[3]、抗氧化剂番茄红素^[4]、新型甜味剂甜菊糖苷^[5]、香料成分广藿香醇^[6]和香紫苏醇^[7]等均为萜类化合物。目前萜类化合物主要从植物中提取, 但大部分萜类在其原产植物中的含量非常低, 制备过程容易受到许多杂质组分干扰。而且很多珍稀药用植物生长缓慢, 受严格的地域和气候条件限制。以紫杉醇为例, 其原产自濒危的珍稀植物红豆杉(*Taxus chinensis*), 一株生长 100 年的红豆杉树通过传统的方式仅可获得约 300 mg 的紫杉醇, 而治疗一个癌症病人大约需要消耗 3~6 棵树龄 100 年的红豆杉树皮资源^[3]。

少数在植物中含量较高的萜类, 例如, 在原产植株甜叶菊(*Stevia rebaudiana*)中含量达到叶子干重 5%~12% 的甜菊糖苷, 由于总糖苷中的糖基化组分非常多样, 某些高品质组分的含量相对较低, 纯化过程中很难去除影响产品口感的低品质组分和一些杂质成分^[5]。因此从植物提取的方式具有效率低、产量低、品质差、成本高、生产不稳定等诸多缺点, 远满足不了人类需求。研究人员利用传统植物代谢工程的方法对植物体进行遗传改造, 试图提高目标萜类的产量和减少副产物的合成, 但仍旧摆脱不了植物体系的复杂性、遗传操作不成熟和生长缓慢等特点, 无法取得根本性的改善。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等模式微生物具有生长快、背景清晰、遗传操作体系简单成熟、安全性高、易于大规模

引用格式: 汪建峰, 蒙海林, 王勇. 萜类合成生物学研究进展. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 1040-1050

Wang J F, Meng H L, Wang Y. Research advances in synthetic biology of terpenoids. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 1040-1050, doi: 10.1360/N052015-00050

模培养等优点^[8]. 因此利用合成生物学的理性设计思想, 高效地元件集成与装配技术以及人工生命体系的优化适配方法, 可以简单地在微生物宿主中重构珍稀萜类合成途径, 然后经过底盘细胞前体合成途径、全局代谢网络和产物运输等模块的工程化改造, 实现目标化合物的高产、稳产^[9,10]. 经过十多年的研究, 目前大量的萜类化合物已经在微生物中获得了异源合成, 少数萜类的产量达到了可观的水平^[11](表 1). 这其中最令人振奋的研究是, 2006 年 Keasling 研究组^[20]的研究人员将青蒿来源的基因在酵母工程菌中重新组装, 实现了青蒿素前体——青蒿酸的微生物合成. 经过近 10 年的努力, 他们将酵母合成青蒿酸的产量提高到了 25 g/L^[2]. 该研究不仅表明通过合成生物学的设计, 实现珍稀天然产物的异源生物合成的可行性, 其研究结果也显示这一技术的巨大优势和应用潜力.

虽然萜类的微生物异源合成研究在某些方面取得了一定的突破, 但目前仍然面临许多亟待解决的问题. (i) 大部分珍稀药用萜类的合成途径仍然没有获得完全解析. 即使是相对简单的青蒿素, 其从头合成途径仍未完全解析. 对于某些更复杂的萜类, 往往仅解析了萜类合酶或少数几步后修饰反应, 而在这些已解析的反应步骤之间仍然间隔地存在很多未知的步骤. 对于更多的萜类, 它们的合成途径仍一无所知. 因此萜类合成途径的解析是实现更多更复杂萜类异源合成的前提. (ii) 虽然 Keasling 等人在酿酒酵母中成功获得了 25 g/L 的青蒿酸, 但更多萜类工程菌株的产量仍局限在毫克或数克每升的水平. 因此研究人员需要开发更高产的底盘细胞、更高效途径

装配方法和人工生物系统的适配技术, 把更多萜类的微生物合成技术推向产业应用. 本文将从重要萜类合成模块挖掘、萜类底盘细胞开发和高效下游途径装配和系统适配 3 个方面来讨论萜类异源合成研究的最新进展.

1 重要萜类合成途径挖掘与异源途径的装配

复杂萜类的合成一般先由萜类合酶催化骨架形成, 经由细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP)催化羧基/羟基化修饰, 以及糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)催化糖基化修饰. 基因组学的研究表明在大多数种子植物体中萜类合酶的数量至少达到 40 个, 部分植物中超过 100 个^[21]. 作为植物体最大酶家族之一, CYPs 的数量一般超过 200 个, 其中很多 CYPs 参与萜类等次级代谢^[22]. 此外, GTs 的数量也往往达到数百个^[23]. 不同萜类合酶负责催化不同数目的 C5 前体单元——异戊烯基焦磷酸(isopentyl diphosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP), 形成各种链状和环状的萜类骨架, 包括单萜、倍半萜、二萜、三萜等. 而 CYPs 和 GTs 往往有其特定的底物和催化位点选择性, 可以对萜类骨架进行广泛的后修饰. 因此植物萜类是一个纷繁复杂的次级代谢网络. 即便是研究最透彻的模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 仍然有大量的萜类代谢没有阐明.

在过去几十年中, 研究人员针对萜类生物合成途径的解析做了大量的工作. 由于植物次级代谢往往发生在特定的组织器官, 并需要某些物理或化学等因子诱导. 因此在早期的研究中, 研究人员主要通过组织进行诱导处理, 然后尝试直接从组织破碎液中分离相关酶蛋白. 根据部分获得的蛋白序列设计简并引物制作探针, 利用探针与 cDNA 文库杂交最终获取完整的基因. Colby 等人^[24]采用这种方法从荷兰薄荷油腺中成功地获得了柠檬烯合酶基因. 但该方法效率低、失败率高, 很难有效地阐明某个完整的萜类合成途径. 大量珍稀药用植物基因组、转录组和表达序列标签(expressed sequence tag, EST)文库测序的开展更进一步揭示了植物萜类代谢的多样性, 并让研究人员直接获得了大量潜在的萜类次级代谢基因. 如何摆脱植物体系的复杂性, 快速鉴定基因功能是后基因组时代的关键课题^[25]. 传统基因工程技术

表 1 几种重要萜类的异源合成水平

萜类化合物或中间体	宿主	产量
紫苏子醇(perillyl alcohol)	大肠杆菌	105 mg/L ^[12]
紫穗槐二烯(amorphadiene)	大肠杆菌	27 g/L ^[13]
紫穗槐二烯	酿酒酵母	40 g/L ^[14]
青蒿酸(artemisinic acid)	酿酒酵母	25 g/L ^[2]
紫杉二烯(taxadiene)	大肠杆菌	1 g/L ^[3]
香紫苏醇(sclareol)	大肠杆菌	1.5 g/L ^[15]
左旋海松二烯(levopimaradiene)	大肠杆菌	700 mg/L ^[16]
次丹参酮二烯(miltiradiene)	酿酒酵母	488 mg/L ^[17]
铁锈醇(ferruginol)	酿酒酵母	10 mg/L ^[15]
人参皂苷 CK(ginsenoside CK)	酿酒酵母	1.4 mg/L ^[18]
番茄红素(lycopene)	大肠杆菌	3.52 g/L ^[19]
β -胡萝卜素(β -carotene)	大肠杆菌	2.1 g/L ^[15]

的发展已经为研究者们提供了各种种属来源的基因表达体系, 包括细菌、真菌、哺乳动物细胞和植物细胞等。而合成生物学技术的应用不仅进一步改善了这些宿主的表达特性, 更提供了一系列萜类高产底盘细胞或某个萜类中间体的高产工程菌株(如青蒿素前体——紫穗槐二烯^[13,14]、紫杉醇前体——紫杉二烯^[3]等)。利用这些高产底盘细胞良好地表达特性或提供的充足前体, 可以快速地测试和鉴定潜在的萜类合成基因, 从深度(更完整合成途径的解析)和广度(更多不同萜类化合物途径的获取)两个方面解析植物萜类代谢。

萜类合酶一般容易在微生物中功能表达, 而且能直接利用微生物少量内源 IPP/DMAPP 前体合成相应产物, 因此早在 20 世纪 90 年代, 大量萜类合酶就已被成功鉴定, 如柠檬烯合酶^[24]、紫穗槐二烯合酶^[26]、蛇麻烯合酶^[27]等。研究人员还将萜类高产底盘细胞开发成了萜类合酶模块的筛选平台, 可以更快地从各种来源的 DNA 文库中鉴定未知的萜类合酶。因此在后基因组和合成生物学时代, 萜类合酶的鉴定将变得更加方便。CYPs 是一种膜蛋白, 需要共表达相应还原型辅酶 II(NADPH)依赖的氧化还原蛋白(NADPH-CYP reductase, CPR)才能正常行使功能。在原核细胞如大肠杆菌中, CYPs 很难实现活性表达^[28]。有关 CYPs 的解析是目前萜类合成途径研究的难点, 也是制约复杂萜类微生物从头合成的首要因素。酵母细胞是目前表达和鉴定 CYPs 的重要系统, 但其仍存在着很大局限性。很多情况下需要采用哺乳动物细胞, 甚至植物细胞等更高等的表达体系。华盛顿州立大学的 Croteau 研究组^[29]经过多年的努力, 运用红豆杉 cDNA 文库同源杂交方法获得了一系列含潜在 CYP 基因的克隆, 然后在酿酒酵母、昆虫等宿主细胞中表达这些基因, 通过添加底物进行体外酶活检测, 陆续鉴定了紫杉醇合成途径中紫杉二烯母核 5 α -, 10 β -, 13 α -, 2 α -, 7-C 位点的 CYP 羟化酶基因(图 1A)。2010 年, 麻省理工学院和塔夫茨大学的研究人员首先利用合成生物学的方法构建了紫杉二烯产量达到 1 g/L 的大肠杆菌工程菌株, 然后在该菌株中成功表达了紫杉二烯-5 α -羟化酶, 并获得了约 58 mg/L 的 5 α -紫杉二烯醇^[3]。从 IPP/DMAPP 前体到紫杉醇共涉及 19 步生化反应, 因此紫杉醇全合成途径的解析仍然具有很大难度, 但 Croteau 等人的研究作为完全解析紫杉醇合成途径和开展紫杉醇的异源合成研究

打下了很好的基础。目前红豆杉的全转录组信息已经被报道, 结合应用基因组学和合成生物学的研究手段会为紫杉醇全合成途径的解析提供强大动力^[30,31]。另外一个比较成功的例子是丹参酮(tanshinones)合成途径挖掘及其中间体异源合成。丹参酮是产自传统中药材丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)中的一种具有重要药理活性的二萜类化合物。在尚无丹参酮生物合成途径相关报道的情况下, Cui 等人^[32]利用简单的比较转录组方法分析了根部组织诱导与未诱导条件下的转录变化, 首次发现并鉴定了二萜合酶柯巴基焦磷酸合酶(copalyl diphosphate synthase, smCPS)和类贝壳杉烯合酶(ent-kaurene synthase like, smKSL)负责丹参酮前体次丹参酮二烯(miltiradiene)的合成。随后 Zhou 等人^[33]在酿酒酵母装配了由 smCPS 和 smKSL 组成的异源途径, 并经优化后使菌株在 15 L 反应器中能合成 365 mg/L 的次丹参酮二烯。为了继续挖掘次丹参酮二烯前体的后修饰酶, 更深入解析丹参酮的合成途径, Guo 等人^[15]又分析了丹参的 EST 文库, 初步获得了约 300 个 CYP 的重叠群(isotigs), 随后结合 RNA-seq 测序技术对转录水平进行分析, 发现了 14 个 CYP 基因的转录明显上调。随后克隆了其中 6 个在根部明显上调的基因, 结合体外酶活分析成功地鉴定了能催化次丹参酮二烯生成铁锈醇(ferruginol)的 CYP76AH1 基因。将 CYP76AH1 和丹参的 CPR 基因引入到前期构建的产丹参酮酵母工程菌中, 成功地实现了铁锈醇的从头合成。

和所有天然产物一样, 复杂多样的糖基化形式决定了萜类化合物多样的生理活性以及水溶性、口感品质等。相比膜蛋白 CYP, GT 更容易在微生物细胞中克隆表达, 但 GT 的重要功能和多样性决定了其解析的复杂性和重要性毫不亚于 CYP。以重要甜味剂——甜菊糖苷(steviolglycosides, SGs)为例, 仅在原产植物甜叶菊中就存在着 30 多种以甜菊醇(steviol)为母核的不同糖基化产物(图 1C), 如含 4 个糖基的高品质组分莱鲍迪苷 A(rebaudioside A, RA)^[5]。为了解析这些不同糖基化产物形成的分子机制, 本课题组基于前期构建的甜叶菊 RNA 序列数据库, 对甜菊糖生物合成途径的关键酶进行了广泛地挖掘。通过在静息细胞中共表达候选的细胞色素 P450 基因和糖基转移酶基因, 解析和鉴定了甜菊糖生物合成途径中未知的两个关键酶, 并在大肠杆菌底盘细胞中重构了从

头合成甜菊糖苷类化合物的非天然合成途径. 经一系列理性设计的表达条件优化, 使大肠杆菌中甜菊糖生物合成的关键中间体产量得到大幅度提高, 并成功地获得了其主要组分 RA. 该研究为实现甜菊糖苷等重要二萜类化合物的合成生物制造奠定了基础, 同时为改造大肠杆菌成为复杂萜类化合物异源合成的底盘细胞提供了成功范例^[34]. 但经过近十余年的研究仍未鉴定催化甜菊糖单糖苷(steviolmonoside)形成甜菊糖二糖苷(steviolbioside)的 UGT^[5]. 人参(*Panaxquinquefolius* L.)含有丰富的三萜类皂苷化合物, 具有增加机体免疫力和减缓衰老等多种重要的生理功能. 前期的大量研究工作已经阐明了皂苷前体原人参二醇(protopanaxadiol, PPD)的生物合成, 并在酵母细胞中成功地重构了 PPD 的合成途径, 实现了 PPD 的从头合成^[35]. 但是由于负责 PPD 第一步糖基化修饰的 UGT 还未解析, 因此无法获得糖基化修饰的人参皂苷. Yan 等人^[18]收集了美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中的 9 个 *Panax* EST 文库的数据, 组装了获得了 479689 条 cDNA 序列, 并从中鉴定了 158 条长度>1320 bp 的潜在 UGT 基因, 通过进一步的聚类分析后, 选取了其中的 16 条序列进行实验验证, 获得了催化人参皂苷合成的第一个糖基转移

酶 UGTPg1. 随后研究人员将 UGTPg1 引入到了产 PPD 的酵母工程菌中, 实现了珍稀人参皂苷组分 K 的从头合成. 该工作为更多糖基化形式的人参皂苷的微生物合成提供了基础.

除了基于对原产植物特定代谢途径进行解析然后装配异源途径的策略外, 随着各种不同生物来源次级代谢相关酶资源的积累以及这些酶催化特性的多样性, 将这些不同来源甚至原属于不同途径但功能相关元件组合装配可以形成非天然的途径目标产物合成. 许多三萜皂苷是中药材的重要活性成分, 如前述的人参皂苷. 柴胡(*Bupleurum*)属植物含有丰富的柴胡皂苷(saikosaponins), 被广泛用于感冒、发烧以及炎症紊乱等常见疾病的治疗. 研究发现柴胡皂苷以齐墩果烷(oleanane), 又称 β -香树脂烷型(β -amyrin), 乌苏烷(ursane), 又称 α -香树脂烷型(α -amyrin), 羽扇豆烷(Lupane)类三萜骨架为母核, 经过广泛的羟基化和糖基化修饰形成约 120 余种不同的化合物. 目前在柴胡中尚未有与柴胡皂苷合成相关的 P450 或氧化还原酶被报道. 但是在其他植物次级代谢研究中, 已经积累了丰富的酶元件^[36], 例如, 分别来自于甘草(*Glycyrrhiza uralensis*), 粗燕麦(*Avena strigosa*), 蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*), 大豆(*Glycine max*), 葡萄(*Vitis vinifera*)和长春花(*Catharanthus roseus*)对

图 1 二萜化合物紫杉醇、甜菊糖苷及重要三萜母核 β -香树脂精的结构式及相关合成途径

A: 紫杉醇分子式及其生物合成羟基化位点. 红色位点的羟基化酶已鉴定, 蓝色位点羟基化酶仍然未知; B: β -香树脂精结构式及其潜在的羟基化位点. 通过对 β -香树脂精不同位点的羟基化可以形成多样的三萜类化合物

β -amyrin 骨架 C-11, C-12, C-13, C-16, C-22, C-23, C-28, C-30 位点(图 1B)进行修饰的 P450 酶等。于是 Moses 等人^[36]结合运用原产植物途径解析和异源元件挖掘的策略, 最终将 *Glycyrrhiza glabra* 来源的 β -香树脂烷型合成酶, 拟南芥来源的 CPR——AtATR1, 柴胡 (*Bupleurum falcatum*) 源的 CYP716Y1, *M. truncatula* 来源的 CYP716A12 以及欧洲山芥 (*Barbarea vulgaris*) 来源的 UGT73C11 装配到了酿酒酵母萜类高产菌株中, 从头合成了皂苷单糖基化修饰产物。该研究的成功充分表明了已知的次级代谢数据库相关资源可以为更复杂萜类化合物异源合成提供重要的元件, 而且随着更多异源途径的阐明, 这些信息将变得更加重要, 因此将在工程菌株全基因组靶点的改造中发挥越来越大的作用。

2 高产萜类底盘细胞的设计与构建

2.1 萜类底盘细胞的拓展

经过十多年的发展, 大肠杆菌和酿酒酵母等模式微生物以其简单的遗传操作方法、清晰的遗传背景、生长迅速以及成熟的大规模发酵工艺等优势成为了常用的萜类底盘细胞^[8]。利用这些微生物宿主, 研究人员陆续构建了一系列萜类高产工程菌株。大肠杆菌和酿酒酵母等虽具有良好的表达特性, 但由于缺乏 P450 氧化还原蛋白、蛋白折叠问题或者无法进行有效细胞定位等原因, 很多时候难以活性表达一些植物次级代谢的重要酶, 如原核表达细胞色素 P450 酶。因此利用简单的模式植物表达系统可以有效地进行萜类合成相关基因功能的验证和一些复杂萜类的异源合成。近年来研究人员随将目光瞄准了遗传操作相对简单、背景较清晰的模式植物, 如烟草 (*Nicotiana benthamiana*)^[37]、人参根组织 (ginseng root)^[38]、小立碗藓 (*Physcomitrella patens*)^[39]。烟草是一种成熟的植物表达系统, 具有相对完善的遗传操作系统, 目前已经成功地用于多种萜类的异源合成, 如青蒿酸^[40]。近来 Liu 等人^[41]将利用转录组挖掘的方法解析了小白菊内酯的合成途径并将其导入了烟草中, 迅速实现了小白菊内酯的从头合成。小立碗藓是一种低等苔藓植物, 它的全基因组信息已经公布。相比其他植物, 其基因组较小, 仅为 500 Mb 左右。基因组分析发现小立碗藓次级代谢相关的基因较少, 仅含有一个二萜合酶, 且糖基转移酶和 P450 酶等修

饰酶均远少于其他植物。如小立碗藓中的 P450 酶为 71 个, 而模式植物拟南芥中达到 246 个。小立碗藓核基因组能够发生高效的基因重组, 可以高效地敲除内源基因或引入外源基因来进行基因组编辑, 仅需花费 2~3 个月的时间就可建立稳定的转基因细胞株。小立碗藓简单的背景和方便的基因操作方法有利于净化其内源代谢, 减少萜类前体的分流, 消除其对异源产物进行的未知修饰等。另外经济高效和简单的培养方式已经让小立碗藓被广泛地用于植物光生物反应器中。近来研究人员将短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 的二萜合酶引入到了小立碗藓表达系统中, 成功地合成了紫杉醇前体紫杉二烯^[30]。

2.2 萜类底盘细胞前体途径优化

在自然界中萜类的基本构建单元二甲基丙烯基焦磷酸和异戊烯基焦磷酸 (IPP/DMAPP) 主要存在着甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 和 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 (methyl-D-erythritol phosphate, MEP) 途径提供, 前者主要存在于真核细胞中, 后者存在于真细菌和植物质体中。过去的十多年里, 研究人员通过启动子工程、基因敲除等对 MVA 途径或者 MEP 途径的开展了大量的工作来解除限速步骤, 包括强化关键基因表达和弱化、敲除相关的分支途径等策略, 均有效地提高了萜类的合成^[3]。Paddon 等人^[2]通过对酿酒酵母 MVA 途径的改造最终获得了能够合成 40 g/L 紫槐二烯的高产菌株。但目前研究中仍然缺乏有效的手段快速、准确地分析经过某种改造后, 整个途径中基因表达谱、代谢物谱等动态变化。因此无法获得有效的信息去确定新的代谢瓶颈, 提出新的改造策略。为了解决这个难题, Weaver 等人^[42]以大肠杆菌工程菌的异源 MVA 前体途径和紫槐二烯合酶 (amorpho-4,11-diene synthase, ADS) 组成的局部网络为对象, 结合已经报道的酶动力学参数和选择反应监测质谱 (selective reaction monitoring mass spectrometry) 方法获取的酶蛋白丰度数据, 构建了常微分方程模型来描述途径中代谢流量变化与各基因表达之间的关系。已有的报道表明途径中的甲羟戊酸激酶受到 FPP 中间体的抑制, 因此甲羟戊酸激酶可能是 MVA 途径下一步改造的潜在靶点。但利用以上模型进行全局敏感性分析 (global sensitivity analysis) 发现焦磷酸金合欢酯 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 积累对甲羟戊酸激酶的抑制作用不是途径的限

速步骤, 而且作者在实验中也换用了对 FPP 抑制不敏感的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)甲羟戊酸激酶成功地验证了模型预测的结果. 此外, 模型分析还发现了萜类合酶 ADS 的表达是途径的限速步骤, 并获得了实验的验证. 这种局部网络的动力学分析方法可以更理性地指导寻找途径的限速步骤. 在此基础上, 整合基因表达过程各层次的数据(如 mRNA 转录, 蛋白翻译等)和相关过程的动力学参数, 可以构建更精细的数学模型, 指导研究者在改造过程中选取合适的生物元件, 包括启动子、核糖体结合位点等基因表达元件强度或者具有不同调控特性的酶等. 随着各种高效 DNA 装配技术的出现, 如 Gibson 组装、In-fusion 等技术^[43], 在合成生物学研究中可以将不同强度的调控元件与某一途径中的各基因进行装配, 快速获得尽可能多的改造组合, 迅速完成对途径的改造^[44,45]. Zou 等人^[45]利用交叉重叠体外装配(cross-lapping *in vitro* assembly, CLIVA)的 DNA 组装技术对 MEP 途径多个关键基因及铁流簇合成相关基因进行了快速装配, 在短时间内测试了多种组合对 MEP 途径代谢通量的影响.

2.3 萜类底盘细胞全局网络优化

除了对萜类前体途径进行不断地改造外, 底盘细胞全局网络的优化是进一步提高萜类合成的重要方面. 这是因为微生物在经历长期的自然进化后, 形成了复杂的代谢网络和调控机制, 很难自发地大量合成某种代谢物, 特别是其本身并不合成的异源产物. 为了将碳流和能量流尽可能多地导向目标代谢物的合成, 必须从全基因组水平出发对底盘细胞全局网络进行系统改造. 来自中心代谢途径的乙酰辅酶 A 是 MVA 途径的直接前体来源. 在酿酒酵母细胞中乙酰辅酶 A 的合成是分区化分布的, 如胞质溶胶(cytosol)、线粒体(mitochondria)、过氧化酶体(peroxisomes)^[46]. 通常情况下, 胞质溶胶中的乙酰辅酶 A 是萜类等异源产物合成的主要前体来源. 为了提高乙酰辅酶 A 的供应, Chen 等人^[47]在酿酒酵母中过表达了乙酰辅酶 A 合成酶(acetyl-CoA synthase, ACS)基因 ACS1 或 ACS2 成功地使胞质内乙酰辅酶 A 的合成提高了 2~5 倍. 随后他们进一步开发了能够充分供应乙酰辅酶 A 的酵母细胞工厂, 使倍半萜檀香烯(α -santalene)的产量提高了 4 倍. 另外, Zhao 等人^[48]在改造大肠杆菌 MEP 途径 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸合

酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS)基因 *dxs*, 异戊烯基二磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI)基因 *idi* 关键基因等基础上, 通过对中心代谢中途径中与 NADPH 和 ATP 合成相关基因进行多轮次的改造后, 使 β 胡萝卜素的产量达到了 2.1 g/L. 这些例子说明对全局网络的是进一步改善萜类合成的重要方面.

近年来, 大量微生物的全基因组水平代谢网络模型(genome scale of metabolic network model, GSMM)成功地构建和用于微生物工业菌株遗传改造^[49]. 同时基于 GSMM 模型, 研究人员也开发了一系列的约束算法, 包括代谢流量平衡分析(flux balance analysis, FBA)、最小代谢流量调节分析(minimization of metabolic adjustment, MOMA), 最小化调节开关分析(regulatory on/off minimization, ROOM)等, 用于预测不同约束条件下潜在的改造靶点. Meng 等人^[50]在 FBA, MOMA 等经典算法的基础上, 开发了通量分布比较分析(FDCA)和 LMOMA 两套不同的算法, 并将该算法应用于大肠杆菌和酿酒酵母等萜类异源合成体系改造靶点的预测, 并获得了一系列潜在强化、敲除、弱化靶点. 在获得了全基因组水平的大量潜在靶点后, 必须具备高效地染色体编辑技术对染色体上的这些靶点进行快速改造, 并将有效的靶点进行高效地集成. 为此, Wang 等人^[51]开发了功能强大的多元自动化染色体改造方法(multiplex automated genome engineering, MAGE), 可在数天内快速完成对细胞染色体的重新洗牌. 在 MAGE 实验中, 研究人员首先对大肠杆菌限制修饰系统进行了改造, 大大提高了单链 DNA 寡核苷酸的整合效率. 然后开发了自动化的实验装备, 实现了 λ Red 重组过程各步骤自动化开展, 显著地提高了染色体改造的效率. 为了测试 MAGE 强大功能, 作者选择了 24 个与萜类合成相关的基因靶点, 针对这些基因 RBS 序列, 分别设计了简并的单链寡核苷酸引物. 然后利用 MAGE 技术将这 24 种寡核苷酸引物组成的混合物不断地整合到宿主染色体相应位点. 结果表明, 仅经 3 天后, 就能创造出数以亿计的突变克隆. 该方法首次实现了针对多个不同染色体位点的同时改造, 将染色体工程技术提升到了一个更高的水平. CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas (CRISPR associated)技术是最新开发的一个更简易高

效的染色体编辑技术^[52]. CRISPR/Cas 是天然存在于细菌和古细菌中的一种免疫系统. 一个完整的 CRISPR/Cas 系统由 crRNA(CRISPR-derived RNA), tracrRNA(trans-activating RNA)和 Cas9 蛋白组成. crRNA 负责识别入侵的靶点序列, crRNA: tracrRNA 与 Cas9 蛋白结合, 然后引导 Cas9 对 DNA 双链进行切割. 研究人员利用 CRISPR/Cas 具有的这种特异性识别和染色体双链切割功能, 将 CRISPR/Cas 开发成了高效的基因组编辑技术. 该方法即有极高的重组效率, 又能完成多个靶点的同时改造. 因此将在工程菌株全基因组靶点的改造中发挥越来越大的作用.

3 萜类异源合成系统的适配性研究

在完成了萜类异源体系中下游途径, 前体合成途径等功能模块的装配和各自优化后, 如何简化细胞网络的复杂性, 使得各功能模块之间实现最佳的适

配是实现萜类异源合成体系最优化的关键^[53]. 以前体合成和下游途径这两个模块为例, 从细胞经济学的角度考虑, 对这两个模块最理想适配最直观的理解是前体合成模块的基因表达水平和代谢流量水平能够在时间和空间两个尺度上与下游合成模块相匹配(图 2). 例如, 在时间尺度上, 当细胞的前体供应过量, 引起中间产物积累时, 可以上调下游途径基因表达来增加中间体的消耗或适当下调前体途径基因表达减慢前体的合成. 反之, 当前体供应不足时, 可以适当降低下游途径基因表达或者强化前体途径基因表达, 达到平衡细胞代谢的目的. 另外在空间尺度上, 原植物中萜类次级代谢往往定位特定部位或者细胞器中, 可以实现功能模块的各元件之间或者模块与模块之间尽可能的距离上接近, 从而起到提高酶和中间代谢物局部浓度, 加速代谢物在生化反应途径中的传递以及减少中间产物的毒害等作用. 针对以上时间和空间两个方面的考虑, 研究人员将精细

图 2 萜类异源合成系统适配策略(网络版彩色)

A: 设计动态响应回路实现时间尺度上细胞代谢流的动态优化; B: 设计支架(蛋白、核酸)实现空间尺度上细胞代谢途径酶的区域化分布

设计后的动态调控回路和辅助支架设计应用到了萜类异源体系的优化适配中,成功地提高了目标产物的合成。

早在 2001 年, Farmer 和 Liao^[54]以细胞内代谢物乙酰磷酸作为指示剂,通过设计响应乙酰磷酸胞内浓度的动态调控回路来调控异源番茄红素合成途径的表达。当乙酰磷酸过量积累时,表明糖酵解代谢流量过剩,因此通过强化下游途径的表达,增强 MEP 途径前体丙酮酸和 3-磷酸甘油醛的消耗,从而减少糖酵解途径代谢溢流形成乙酰磷酸,同时强化番茄红素合成。在这样的调控回路中,首先需要确定系统的关键代谢物,这些代谢物的积累往往会直接影响产物的合成,或者对细胞产生毒害,如 MVA 途径的前体乙酰辅酶 A、萜类通用前体 IPP/DMAPP、倍半萜前体 FPP 等。然后必须找到能够对关键代谢物的浓度产生不同响应的调控因子,才能实现调控回路的设计。对于乙酰辅酶 A 等中心代谢相关的代谢物,细胞自身往往存在着非常严谨的响应系统。因此可以直接利用或者对它们进行改造以满足需要的调控特性即可。由于自身不存在萜类次级代谢,通常野生型大肠杆菌 MEP 途径的代谢流很低,同时由于 MEP 途径的调控研究仍然不成熟,因此还未发现大肠杆菌 MEP 途径是否存在类似调控因子能够响应途径中关键的中间代谢物。其次大肠杆菌本身不存在 MVA 途径,因此从外源引入大肠杆菌中的 MVA 途径和萜类下游合成途径也没有存在类似的调控回路。针对这些缺乏可用的调控因子的前体合成和异源模块,如何进行调控回路的设计来满足模块内部和模块之间的适配呢?研究表明,FPP 是倍半萜合成的直接前体,需要实现很强的 FPP 代谢流量,才能满足萜类的大量合成需要。在引入优化后的 MVA 途径的大肠杆菌萜类合成高产菌株中,由于下游模块随着细胞生长等动态变化,即使是经过优化的下游萜类合成模块,其表达强度也往往无法和前体合成途径模块的强度实现动态的适配。于是 Dahl 等人^[55]利用转录组分析的方法,发现了能够对萜类代谢中间体 FPP 作出压力响应的调控元件。利用该调控元件设计了控制紫槐二烯和甲羟戊酸合成途径的动态回路,有效地提高了紫槐二烯的合成。

在空间尺度的设计上,为了模拟次级代谢在植物细胞器内的区域化分布,研究人员设计了酶融合表达,蛋白质或核酸支架等方法来实现特定功能生化途径的各个酶在异源宿主中有序分布。目前,已经

有一些文章报道通过空间控制的策略成功地提高了目的产物的产量。例如,Conrado 等人^[56]总结了融合蛋白的策略。融合蛋白的策略可以很容易拉近两个酶之间的空间距离(需摸索合适的 linker),利于连续的两个反应的进行。但是,这种策略的缺点也是显而易见的,融合蛋白通常只限于两个酶,更多酶的融合通常难以实现(如功能性表达)。另外,这种策略也不能改变两个酶之间的计量学关系。支架的策略可以突破融合蛋白策略的限制。自然界中存在着蛋白与蛋白、蛋白与 DNA 或蛋白与 RNA 之间的相互作用,这些蛋白与目的酶融合表达,再通过设计含有一定间隔、数量、种类“挂钩”的支架(蛋白、DNA 或 RNA 支架)，“挂钩”与融合的目的酶识别,从而使几个目的酶之间在空间上接近并按一定顺序排列。Duber 等人^[57]通过设计蛋白支架使大肠杆菌中异源 MVA 途径的各个模块在空间上互相接近,最终使产物的合成提高了 77 倍。蛋白支架在数量上不受限制,但需要表达额外的蛋白,可能会对宿主增加负担。在酿酒酵母中,可以利用宿主自身的细胞器(如线粒体)作为异源合成的工厂,不仅可以利用线粒体中合成的前体物质,也可以减少外源酶与产物的空间距离,减少胞质中反应的干扰。

4 展望

萜类合成生物学的研究已经使萜类异源合成显示出了巨大的应用潜力。虽然植物萜类代谢的复杂性,制约了更多珍稀萜类化合物的解析。但是随着药用植物基因组测序工作的大规模开展以及后基因组时代的到来,更多萜类次级代谢的合成途径必将获得更全面的解析。同时合成生物学的发展也将为相关基因的功能鉴定提供一系列适宜的底盘细胞。在底盘细胞的改造方面,过去十多年合成生物学的发展和萜类异源合成的研究已经为研究者们提供了较完善的遗传操作平台和一些高产的萜类底盘细胞。为了更进一步优化底盘细胞,满足更多萜类,更复杂萜类大量合成的需要,将开发更多的理性设计方法和更强大的遗传操作平台,如途径动力学的分析、高效的染色体编辑技术等。在实现了细胞功能元件或模块的各自优化后,需要从系统层次提出工程化的手段解决模块与模块之间的适配问题,最终构建各种高效、稳定、可控的萜类合成细胞工厂。

参考文献

- 1 Christianson D W. Unearthing the roots of the terpenome. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12: 141–150
- 2 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528–532
- 3 Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330: 70–74
- 4 Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 612–616
- 5 Ceunen S, Geuns J M. Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function. *J Nat Prod*, 2013, 76: 1201–1228
- 6 Jeong J B, Choi J, Lou Z, et al. Patchouli alcohol, an essential oil of *Pogostemon cablin*, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16: 184–190
- 7 Schalk M, Pastore L, Mirata M A, et al. Toward a biosynthetic route to sclareol and amber odorants. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 18900–18903
- 8 Zhang H, Wang Y, Pfeifer B A. Bacterial hosts for natural product production. *Mol Pharm*, 2008, 5: 212–225
- 9 Wang J, Xiong Z, Meng H, et al. Synthetic biology triggers new era of antibiotics development. *Subcell Biochem*, 2012, 64: 95–114
- 10 Mitchell W. Natural products from synthetic biology. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15: 505–515
- 11 Immethun C M, Hoynes-O'Connor A G, Balassy A, et al. Microbial production of isoprenoids enabled by synthetic biology. *Front Microbiol*, 2013, 4: 75
- 12 Alonso-Gutierrez J, Chan R, Batth T S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. 2013, 19: 33–41
- 13 Tsuruta H, Paddon C J, Eng D, et al. High-level production of amorphadiene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2009, 4: e4489
- 14 Westfall P J, Pitera D J, Lenihan J R, et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E111–E118
- 15 Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12108–12113
- 16 Leonard E, Ajikumar P K, Thayer K, et al. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 13654–13659
- 17 Dai Z, Liu L, Huang L, et al. Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 2845–2853
- 18 Yan X, Fan Y, Wei W, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast. *Cell Res*, 2014, 24: 770–773
- 19 Sun T, Miao L, Li Q, et al. Production of lycopene by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 1515–1522
- 20 Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440: 940–943
- 21 Chen F, Tholl D, Bohlmann J, et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J*, 2011, 66: 212–229
- 22 Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J*, 2011, 66: 194–211
- 23 Lao J, Oikawa A, Bromley J R, et al. The plant glycosyltransferase clone collection for functional genomics. *Plant J*, 2014, 79: 517–529
- 24 Colby S M, Alonso W R, Katahira E J, et al. 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *J Biol Chem*, 1993, 268: 23016–23024
- 25 Yonekura-Sakakibara K, Saito K. Functional genomics for plant natural product biosynthesis. *Nat Prod Rep*, 2009, 26: 1466–1487
- 26 Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester H J, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of amorphadiene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 381: 173–180
- 27 Steele C L, Crock J, Bohlmann J, et al. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies Grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *J Biol Chem*, 1998, 273: 2078–2089
- 28 Chang M C, Eachus R A, Trieu W, et al. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 274–277

- 29 Guerra-Bubb J, Croteau R, Williams R M. The early stages of taxol biosynthesis: an interim report on the synthesis and identification of early pathway metabolites. *Nat Prod Rep*, 2012, 29: 683–696
- 30 Qiao F, Cong H, Jiang X, et al. *De novo* characterization of a *Cephalotaxus hainanensis* transcriptome and genes related to paclitaxel biosynthesis. *PLoS One*, 2014, 9: e106900
- 31 Li S T, Zhang P, Zhang M, et al. Transcriptional profile of *Taxus Chinensis* cells in response to methyl jasmonate. *BMC Genomics*, 2012, 13: 295
- 32 Cui G, Huang L, Tang X, et al. Candidate genes involved in tanshinone biosynthesis in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* revealed by cDNA microarray. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 2471–2478
- 33 Zhou Y J, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 3234–3241
- 34 Wang J F, Li S Y, Wang Y. Pathway mining-based integration of critical enzyme parts for *de novo* biosynthesis of steviolglycosides sweetener in *Escherichia coli*. *Cell Res*, 2015, doi: 10.1038/cr.2015.111
- 35 Dai Z, Liu Y, Zhang X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metab Eng*, 2013, 20: 146–156
- 36 Moses T, Pollier J, Almagro L, et al. Combinatorial biosynthesis of sapogenins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 α hydroxylase from *Bupleurum Falcatum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 1634–1639
- 37 Hasan M, Kim S H, Jeon J H, et al. Metabolic engineering of *Nicotiana benthamiana* for the increased production of taxadiene. *Plant Cell Rep*, 2014, 33: 895–904
- 38 Cha M, Shim S H, Kim S H, et al. Production of taxadiene from cultured ginseng roots transformed with taxadiene synthase gene. *BMB Rep*, 2012, 45: 589–594
- 39 Anterola A, Shanle E, Perroud P F, et al. Production of taxa-4(5),11(12)-diene by transgenic *Physcomitrella patens*. *Transgenic Res*, 2009, 18: 655–660
- 40 van Herpen T W, Cankar K, Nogueira M, et al. *Nicotiana benthamiana* as a production platform for artemisinin precursors. *PLoS One*, 2010, 5: e14222
- 41 Liu Q, Manzano D, Tanic N, et al. Elucidation and in planta reconstitution of the parthenolide biosynthetic pathway. *Metab Eng*, 2014, 23: 145–153
- 42 Weaver L J, Sousa M M, Wang G, et al. A kinetic-based approach to understanding heterologous mevalonate pathway function in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112: 111–119
- 43 Ellis T, Adie T, Baldwin G S. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integr Biol (Camb)*, 2011, 3: 109–118
- 44 Nowroozi F F, Baidoo E E, Ermakov S, et al. Metabolic pathway optimization using ribosome binding site variants and combinatorial gene assembly. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 1567–1581
- 45 Zou R, Zhou K, Stephanopoulos G, et al. Combinatorial engineering of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway using cross-lapping *in vitro* assembly (CLIAV) method. *PLoS One*, 2013, 8: e79557
- 46 Chen Y, Siewers V, Nielsen J. Profiling of cytosolic and peroxisomal acetyl-coa metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 2012, 7: e42475
- 47 Chen Y, Daviet L, Schalk M, et al. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-coa metabolism. *Metab Eng*, 2013, 15: 48–54
- 48 Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving beta-carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42–50
- 49 Xu C, Liu L, Zhang Z, et al. Genome-scale metabolic model in guiding metabolic engineering of microbial improvement. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 519–539
- 50 Meng H, Wang Y, Hua Q, et al. *In silico* analysis and experimental improvement of taxadiene heterologous biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioproc E*, 2011, 16: 205–215
- 51 Wang H H, Isaacs F J, Carr P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460: 894–898
- 52 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 53 Mampel J, Buescher J M, Meurer G, et al. Coping with complexity in metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 52–60
- 54 Farmer W R, Liao J C. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat Biotechnol*, 2000, 18:

533–537

- 55 Dahl R H, Zhang F, Alonso-Gutierrez J, et al. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 1039–1046
- 56 Conrado R J, Varner J D, DeLisa M P. Engineering the spatial organization of metabolic enzymes: mimicking nature's synergy. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19: 492–499
- 57 Dueber J E, Wu G C, Malmirchegini G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 753–759

Research Advances in Synthetic Biology of Terpenoids

WANG JianFeng¹, MENG HaiLin² & WANG Yong¹

1 CAS Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;

2 Bioengineering Research Center, Guangzhou Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 511458, China

Synthetic biology research has immensely boosted the development and industrial application of microbial terpenoid biosynthesis. Owing to the complexity of plant terpenoid metabolism, a number of terpenoid biosynthetic pathways have remained unknown or been incompletely elucidated. Thus, for most terpenoids, only their simple intermediates can be *de novo* biosynthesized through heterologous biosynthesis in microbes. Furthermore, the yield of these terpenoid intermediates remains very low, ranging from hundreds of micrograms to several milligrams. To discuss these two issues, this review elucidates the recent advances and new strategies in terpenoid synthetic biology based on three aspects: terpenoid pathway elucidation and artificial assembly, design and construction of microbial chassis with efficient precursor supply, and systematic adaption of chassis metabolism and downstream pathways.

terpenoids, synthetic biology, pathway elucidation, pathway assembly, system adaption

doi: 10.1360/N052015-00050