

单萜类化合物的微生物合成

张帆¹, 王颖¹, 李春^{1,2}

1 北京理工大学 化学与化工学院 生物化工研究所 医药分子科学与制剂工程工信部重点实验室, 北京 102488

2 清华大学 化学工程系, 北京 100084

张帆, 王颖, 李春. 单萜类化合物的微生物合成. 生物工程学报, 2022, 38(2): 427-442.

ZHANG F, WANG Y, LI C. Microbial synthesis of monoterpenoids: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 427-442.

摘要: 单萜类化合物是萜类化合物的一种, 一般具有挥发性和较强的香气, 部分单萜还具有抗氧化、抗菌、抗炎等生理活性, 是医药、食品和化妆品工业的重要原料。近年来, 利用微生物异源合成单萜类化合物的研究引起了科研人员的广泛关注, 但因产量低、生产成本高等限制了其大规模应用。合成生物学的迅猛发展为微生物生产单萜类化合物提供了新的手段, 通过改造微生物细胞可以得到不同种类的重组菌株, 用于生产不同性能的单萜类化合物。文中将围绕单萜类化合物生物合成途径的设计与改造、高产单萜类化合物底盘细胞的设计与优化等几个方面阐述合成生物学应用于微生物生产单萜类化合物中的最新策略与进展。

关键词: 单萜类化合物; 代谢途径; 微生物; 合成生物学

Microbial synthesis of monoterpenoids: a review

ZHANG Fan¹, WANG Ying¹, LI Chun^{1,2}

1 Key Laboratory of Medical Molecule Science and Pharmaceutics Engineering, Ministry of Industry and Information Technology, Institute of Biochemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 102488, China

2 Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: Monoterpenoids that belong to the terpenoids family are usually volatile and have strong aroma. Some monoterpenoids also have antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities, which make them important raw materials for medicine, food and cosmetics industry. In recent years, the

Received: February 19, 2021; **Accepted:** May 17, 2021; **Published online:** June 17, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905700); National Natural Science Foundation of China (22078020)

Corresponding author: WANG Ying. Tel/Fax: +86-10-68911359; E-mail: wy2015@bit.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0905700); 国家自然科学基金 (22078020)

heterologous synthesis of monoterpenoids by microorganisms has attracted extensive attention. However, its large-scale application is greatly hampered by the low yield and high production cost. Nowadays, the rapid development of synthetic biology provides new approaches for enhancing the production of monoterpenoids by microorganisms. Different kinds of recombinant strains can be obtained via engineering of microbial cells to produce a variety of monoterpenoids with different properties. This paper summarized the latest strategies and progress in the application of synthetic biology to produce monoterpenoids by microorganisms, including the design and modification of biosynthetic pathway, as well as the design and optimization of high-yield monoterpenoids producing chassis cells.

Keywords: monoterpenoids; metabolic pathway; microorganism; synthetic biology

单萜类化合物是指分子骨架由两个异戊二烯单位构成、含 10 个碳原子的化合物，可以分为无环单萜、单环单萜、双环单萜及三环单萜^[1]。单萜类化合物是萜类化合物中分子量最小的成员，一般具有挥发性和较强的香气，普遍存在于天然植物中^[2]，因其在药物、生物燃料和农业等方面的广泛应用以及在精油、香料生产上的大量需求而受到了人们的极大关注。比如，作为最大的植物天然产物之一的薄荷醇，就是环状单萜的一种。目前，薄荷醇的价格为 96.8 元/100 g，市场需求量较大，预计到 2030 年，全球合成薄荷醇市场规模将增长至 3.09 亿美元。柠檬烯是另一种具有重要生理学活性的环状单萜，近几年在我国的市场需求量也呈现逐年上升的趋势，据调查显示，2020 年全球柠檬烯市场总值超过了 20 亿元，预计 2026 年可以增长至 25 亿元。

研究者发现，单萜类化合物易被人体吸收后转移到血液中，具有治疗多种疾病的功能。例如，左旋薄荷醇具有镇咳、抑菌等作用，外用可以清凉止痒，内服可以治疗头痛及鼻咽炎症等^[3]。香叶醇是一种无环单萜，具有玫瑰香气和广泛的药理作用，常被用于香水、化妆品和临床抗癌药物的生产^[4]，其价格为 522 元/100 g，市场需求量也较大，新思界产业研究中心发布的

《2020–2025 年中香叶醇市场分析及发展前景研究报告》显示，预计 2025 年中国香叶醇需求量将达到 1 000 t^[5]。某些单萜烯及其衍生物，如单萜蒎烯和柠檬烯，具有较高的燃烧热值、较低的凝固点，使它们可以成为汽油、柴油等传统燃料的环保替代品^[6]。此外，还有一些单萜类化合物，如香芹酚和香叶烯，对微生物和昆虫的毒害作用比较大，经常被用作抗生素和杀虫剂^[7]。因此，单萜化合物的高效合成在工业、农业、医药等领域都具有重要的意义。

目前，几种重要单萜类化合物的主要来源是植物提取或化学合成。单萜类化合物一般存在于高等植物的分泌组织中，大部分是沸点较低的挥发油中主要的组成部分^[8]，可通过热分解等方法提取获得。然而，植物提取的方法存在含量低、植物培养周期长、提取成本高等缺陷，对生态环境也有较大破坏，无法满足当今社会绿色可持续生产的要求。随后开发的化学合成方法，虽然相对提高了单萜类化合物的生产效率，但反应过程复杂、环境污染风险高。另外，由于单萜类化合物的分子结构复杂、具有特异的亲和力，所以化学特异合成以及高效分离的难度较大。为了解决这些问题，实现单萜类化合物的绿色可持续合成与应用，研究者

利用代谢工程、合成生物学和发酵工程等方法,开发出了具有自组装、反应条件温和、环境友好特性的生物合成策略,利用微生物来生产高附加值的单萜类化合物^[9]。近年来,多种微生物(例如大肠杆菌和酿酒酵母)已经被用作生产单萜类化合物的底盘宿主,设计改造为高效微生物细胞工厂,用于生产不同的单萜^[10],如柠檬烯和香叶醇。某些单萜类化合物如薄荷醇虽然微生物合成的报道较少,但其生物合成途径已经获得解析^[11],具有广阔的生物合成前景。

合成生物学作为一门多学科交叉科学,使用合成线路和其他工程组件来实现对动态调节系统的控制,从而探究自然生物现象,开发新的细胞功能,极大地推动了代谢工程、生物工程等研究的发展^[12-14]。在天然产物代谢的背景下,研究者可以利用传感器和调节元件的多样性,将它们整合到基因网络中,并应用自己的设计来构建、优化特定的天然产物代谢途径和宿主细胞^[15]。随着合成生物学的发展,越来越多的代谢工程策略和生物工艺优化方法被应用于提高单萜的产量^[16]。具体案例见表1。

1 单萜类化合物的生物合成途径

与其他萜类化合物的生物合成途径相比,单萜类化合物的生物合成途径较短,可以分为3个模块:从碳源到异戊烯焦磷酸酯(isopentenyl pyrophosphate, IPP)和二甲基丙烯焦磷酸酯(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)的“上游”合成途径、从IPP和DMAPP到目标单萜的“中游”合成途径以及从目标单萜到其他化合物的“下游”合成途径(图1)。

在“上游”合成途径中,微生物利用碳源代谢合成IPP和DMAPP主要是通过两条途径:4-磷酸甲基赤藓糖醇(methylerythritol 4-phosphate, MEP)途径和甲羟戊酸(mevalonate,

MVA)途径。MEP途径已被证实存在于原核生物、绿藻以及高等植物中,MVA途径主要存在于真核生物体内。之后,微生物可以利用IPP和DMAPP合成香叶基焦磷酸(geranylpyrophosphate, GPP),通过环化、甲基化等反应进一步合成单萜类化合物,即本文中所提到的“中游”合成途径。但是,单萜类化合物在微生物体内往往会继续被代谢成其他化合物,自动形成了“下游”合成途径。

通过将单萜类化合物的生物合成途径进行模块化分析可以得出目前在微生物中合成单萜类化合物所面临的主要问题:上游途径的前体供应不足、中游途径的关键酶限速以及下游途径的目标单萜发生内源代谢。本文将按照“上、中、下”3个模块对单萜类化合物微生物合成中的相关研究进行总结,并围绕单萜类化合物生产中存在的问题及解决策略展开讨论。

2 单萜类化合物上游合成途径的强化

如上文所述,本文中所说的上游途径是指碳源进入微生物体内被代谢合成IPP和DMAPP的过程(图1)。在原核生物中可通过自身的MEP途径合成:以丙酮酸(pyruvate)和3-磷酸甘油醛(DL-glyceraldehyde 3-phosphate, G3P)为前体,在5-磷酸脱氧木酮糖合成酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, Dxs)催化下缩合形成脱氧木酮糖-5-磷酸(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP),5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, Dxr)催化DXP发生分子内重排和还原反应生成甲基赤藓醇-4-磷酸(MEP)。随后,MEP经4-二磷酸胞嘧啶-2-甲基赤藓糖醇合酶(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate cytidylyltransferase, Ispd)、4-二磷酸胞嘧啶-2-甲基赤藓糖醇激酶(2-C-methyl-D-

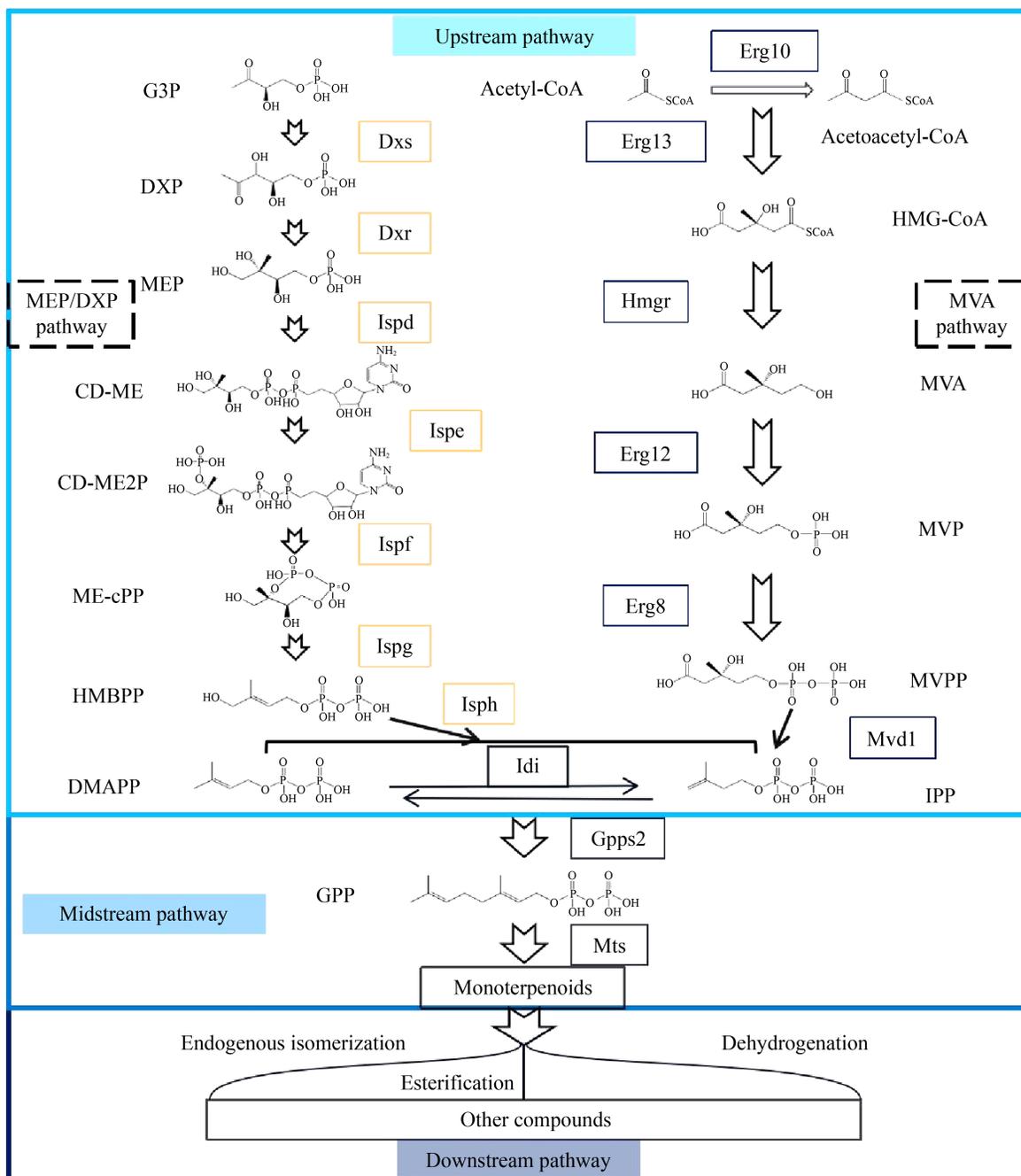


图1 微生物体内的单萜类化合物合成途径

Figure 1 Biosynthesis of monoterpenoids in microorganisms.

erythritol-4-phosphate kinase, Ispe)、甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸合酶 (2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, Ispf)、甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸还原酶 (2-C-methyl-D-erythritol-

2,4-cyclodiphosphate reductase, Ispg) 和羟甲基-丁烯-4-焦磷酸还原酶 (hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase, Isph) 5个酶的催化反应生成 IPP 和 DMAPP。在真核生物

中则是通过内源的 MVA 途径进行合成：乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 在乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶 (acetoacetyl-CoA thiolase, Erg10) 的催化作用下生成乙酰乙酰辅酶 A, 乙酰乙酰辅酶 A 在羟甲基戊二烯辅酶 A 还原酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, Erg13) 的催化作用下生成羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxymethylglutaryl-CoA, HMG-CoA), HMG-CoA 接下来被羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, Hmgr) 还原生成甲羟戊酸 (MVA), 甲羟戊酸在甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase, Erg12)、磷酸甲羟戊酸激酶 (phosphomevalonate kinase, Erg8)、甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶 (mevalonate pyrophosphate decarboxylase, Mvd1) 以及异戊烯焦磷酸异构酶 (isopentenyl diphosphate isomerase, Idi) 的催化作用下生成 IPP 和 DMAPP。

然而, 由于仅通过微生物自身的内源反应合成的单萜产量远不足以用于工业生产。因此, 研究者通过设计和改造微生物的内源代谢途径或者引入异源代谢途径来优化上游途径模块, 以获得更多的前体物质, 从而强化微生物细胞中目标单萜类化合物的生产能力。

2.1 内源代谢途径的设计与优化提高前体供应

通过设计优化微生物体内的内源代谢途径, 提高前体供应量, 是提高单萜类化合物产量比较常见的策略之一。它的优点是利用微生物自身的代谢反应, 操作相对容易、成功率高。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 是微生物合成中常用的模式菌株, 主要通过 MEP 途径进行类异戊二烯的生物合成, 在引入单萜合酶后可以实现部分单萜化合物的合成^[16]。然而, 大肠杆菌内源的 MEP 途径所提供的前体供应

量不足, 导致单萜合成产量很低。在 MEP 途径中, Dxs、Dxr、Idi 被证明是此途径中的限速酶^[17]。研究者通过启动子工程等过表达限速酶基因提高其表达水平或引入经密码子优化的高效外源限速酶等手段, 重新设计优化 MEP 途径, 成功地增加了前体供应, 从而提高了目标单萜的产量。例如, Du 等在大肠杆菌中引入编码香叶基焦磷酸合酶的基因 (*gpps*) 和柠檬烯合酶的基因 (*ls*), 实现了柠檬烯的合成, 但产量仅为 4.87 mg/L。随后, 他们通过过表达 MEP 途径中的关键酶 Dxs 和 Idi, 使柠檬烯的产量最终提高至 17.4 mg/L^[18]。过表达 MEP 途径中的关键酶是萜类合成中的常用手段, 如 Matthews 等在大肠杆菌中过表达 Dxs, 使类胡萝卜素产量提高了 10.8 倍^[19]。

在 Gibson 组装等技术出现之后, 通过把强度不同的调控元件与目的基因进行装配, 可以获得多样化的改造方案, 从而提高了对目标途径优化的效率^[20]。Zou 等通过运用交叉体外重叠 (cross-lapping *in vitro* assembly, CLIVA) 的 DNA 组装技术, 成功对铁硫簇合成的相关基因以及 MEP 途径的多个关键酶基因进行了快速组装, 提高了 MEP 途径的代谢通量^[21]。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*) 在萜类化合物的合成中发挥着重要作用, 因其可以利用内源 MVA 途径合成较多的前体化合物 IPP 和 DMAPP, 被广泛用于单萜类化合物的生产中。例如, 芳樟醇是链状单萜类化合物, 具有抗病毒感染、镇静等作用。Herrero 等在酿酒酵母中表达了来源于仙女扇的 (S)-芳樟醇合酶的基因, 成功引入了芳樟醇的合成代谢通路, 构建了能有效生产芳樟醇的重组酿酒酵母^[22]。芳樟醇在酿酒酵母中的合成前体来源于 MVA 途径, 目前已经发现羟甲基戊二酸甲酰辅酶 A 还原酶 (Hmgr) 是 MVA 途径

表 1 大肠杆菌和酿酒酵母工程菌生产单萜的实例

Table 1 Examples of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce monoterpenoids

Hosts	Monoterpenoids	Metabolic engineering strategies	Titer (mg/L)	References
<i>E. coli</i>	Pinene	<ul style="list-style-type: none"> • Adaptive laboratory evolution and overexpression of the efflux pump • Error-prone PCR and DNA shuffling • Creating TIGR libraries and screening • Pinene biosynthesis in shake flasks 	166.50	[23]
	α -pinene	<ul style="list-style-type: none"> • Heterologous MVA pathway from <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>S. cerevisiae</i> • GPP synthase from <i>Abies grandis</i> • α-pinene synthase from <i>Pinus taeda</i> 	970.00	[24]
	Geraniol	<ul style="list-style-type: none"> • Heterologous MVA pathway from <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>S. cerevisiae</i> • GPP synthase from <i>Abies grandis</i> • Geraniol synthase from <i>Osmium basilicum</i> 	2 000.00	[25]
	Limonene	<ul style="list-style-type: none"> • Heterologous MVA pathway from <i>S. cerevisiae</i> • GPP synthase from <i>Abies grandis</i> • Limonene synthase from <i>Mentha spicata</i>, codon-optimized and truncated 	2 700.00	[26]
	Myrcene	<ul style="list-style-type: none"> • Heterologous MVA pathway from <i>S. cerevisiae</i> • Isopentenyl diphosphate isomerase Idi from <i>E. coli</i> • GPP synthase Gpps2 from <i>Abies grandis</i>, codon-optimized and truncated • Myrcene synthase from <i>Quercus ilex</i>, codon-optimized and truncated 	58.19	[27]
<i>S. cerevisiae</i>	Pinene	<ul style="list-style-type: none"> • Erg20^{F96W-N127W} overexpressed • Pinus taeda pinene synthase expressed • N-terminus truncation (from 2A to 51P) of PtPS (obtaining tPtPS) • Idi1 and Maf1 overexpressed • Using the strong promoter 	11.70	[28]
	Geraniol	<ul style="list-style-type: none"> • Thmgr and Idi1 overexpressed • Erg20^{F96W-N127W} overexpressed • Tailoring truncation of CrGES • Enhancing GPP accessibility for t3CrGES 	1 680.00	[29]
	Limonene	<ul style="list-style-type: none"> • Catalyzing IPP and DMAPP to NPP (cis-GPP) • Planting LS that converts NPP to limonene • Orthogonal limonene biosynthetic (OLB) pathway composed of SINDPS1 • Regulating gene <i>erg20</i> by the glucose-sensing promoter HXT1 	917.70	[30]
	Linalool	<ul style="list-style-type: none"> • Selecting the truncated linalool synthase t67OMcLIS • The whole MVA pathway overexpressed • Introduction of an Erg20^{F96W/N127W} variant • Directing evolution of t67OMcLIS 	53.14	[31]

的限速酶。Rico 等在酿酒酵母中成功表达芳樟醇合酶后, 通过过表达 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶的催化结构域, 进一步增强了该菌株的 MVA 途径, 最终使芳樟醇的产量得到明显提高^[32]。Zhou 等为了提高前体化合物 GPP 的合成量, 在酿酒酵母中过表达了整个 MVA 途径, 使芳樟醇在酿酒酵母中的产量成功提高到 36.48 mg/L^[31]。增强上游途径前体供应是很多萜类化合物合成的关键步骤, 笔者课题组通过过表达 MVA 途径的关键酶基因, 提供了足够的前体, 使最终构建的菌株在摇瓶中产生了 213.7 mg/L 左右的 α -香树脂醇^[33]。

2.2 异源代谢途径的设计与优化提高前体供应

除了对微生物的内源代谢途径进行设计改造之外, 研究者们开发出了在微生物体内引入异源代谢途径或表达多个异源蛋白的方法, 提高单萜类化合物合成的前体供应。这种方法的优点在于异源代谢途径不易受微生物的内源性调控, 从而达到减少耗损的效果, 进而增加前体 IPP、DMAPP 的供应量。Martin 等首次把异源 MVA 途径引入大肠杆菌中, 使紫穗槐二烯的最终产量提高了 6.5 倍, 达到 112.2 mg/L^[34]。Alonso-Gutierrez 等通过引入编码 MVA 途径的 7 个全部基因和编码香叶基焦磷酸合酶 (geranylpyrophosphate synthase, Gpps)、柠檬烯合酶 (limonene synthase, Ls)、细胞色素 P450 酶的中下游合成基因来改造大肠杆菌, 在补料分批发酵的培养条件下, 最终柠檬烯和紫苏醇的生物合成量分别可累积到 400 mg/L 和 100 mg/L^[35]。Yang 等在大肠杆菌中引入了异源 MVA 途径, 并且共表达了香叶基焦磷酸合酶基因 (*gpps2*) 和 α -蒎烯合酶基因 (*pt30*), 成功构建了带有 α -蒎烯生物合成途径的工程菌株, 在摇瓶和补料分批发酵条件下, 分别累积 α -蒎烯的产量为

5.44 mg/L 和 0.97 g/L^[24]。

虽然在微生物体内引入异源代谢途径能够有效地提高上游化合物的供应量, 但是由于微生物本身缺乏对异源代谢途径的调控, 所以可能会引起微生物自身代谢通量的失衡, 积累对细胞不利的中间产物, 最终产生有害的影响。因此, 上游合成途径的调控可以与中、下游合成途径的调节结合, 以达到最优的代谢调控效果。

3 单萜类化合物中游合成途径的优化

单萜类化合物的中游合成途径是指 DMAPP 与 IPP 在香叶基焦磷酸合酶 (geranylpyrophosphate synthase, Gpps) 的作用下缩合生成异戊烯基二磷酸前体化合物-香叶基焦磷酸 (GPP), 然后在单萜合酶 (monoterpene synthase, Mts) 的作用下通过环化、甲基化、乙酰化、重排等反应生成各种单萜类化合物。所以, 外源基因的表达在中游合成途径中起到了关键作用。现代生物技术和生物工程的快速发展为研究者们提供了不同来源的基因表达系统, 包括细菌、真菌和动植物细胞等。随着合成生物学的强势加入, 可以进一步改善宿主的合成水平, 从而开发了一系列的单萜高产工程菌株。

中游合成途径的设计与优化主要包括途径的解析、关键酶的挖掘与表征, 以及这些酶催化特性的加强等。本文重点对后两个方面进行介绍。

3.1 关键酶的挖掘与功能验证

在中游合成途径中, GPP 的合成与利用决定了单萜类化合物的最终产量。因此, 香叶基焦磷酸合酶 (GPP 合酶, Gpps) 与单萜合酶作为单萜合成的关键酶, 其挖掘与功能验证是单萜生物合成过程中的重要环节。

3.1.1 香叶基焦磷酸合酶的挖掘与功能验证

香叶基焦磷酸合酶是单萜生物合成途径中

的限速酶, 催化 IPP 和 DMAPP 缩合反应生成 GPP, 为单萜类化合物的合成提供直接前体。绝大多数 Gpps 都是同型二聚体, 底物结合位点包含“DDXXD”和“FQXXDDXD” 2 个区域。Burke 等第一次从薄荷属植物中分离得到了由 2 个亚基组成的二聚体 Gpps 蛋白, 筛选 cDNA 文库后得到了 *gpps* 基因的序列^[36]。Yu 等从品种为“738”的薄荷中克隆得到了 *gpps* 基因的全长序列, 对其序列特征、结构和功能等进行生物信息学分析后, 初步比较了 *gpps* 基因大亚基在薄荷不同组织中的表达强度, 为 *gpps* 基因表达载体的构建奠定了基础^[37]。

在大肠杆菌中, Gpps 通常是异源表达。Burke 等以加拿大红豆杉的 *gpps* 序列为杂交探针, 从大冷杉 (*Abies grandis*, *A. grandis*) 的 cDNA 文库中分离出 4 个具有较高序列同源性的基因, 随后在大肠杆菌中表达时, 他们发现大冷杉来源的 Gpps 可以催化 IPP、DMAPP 只产生 GPP^[38]。此外, Zhou 等发现法尼基焦磷酸合酶基因 *ispa* 的突变可以避免法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 的合成, 提高 GPP 的积累量, 从而提高单萜类化合物的产量^[39]。

在酿酒酵母中, 没有专一的 Gpps, 而是由法尼基焦磷酸合酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, Fpps/Erg20) 催化 IPP 与 DMAPP 缩合生成 GPP 之后, 继续催化 GPP 与 IPP 缩合生成 FPP。由于 GPP 与 Erg20 的活性位点结合紧密, 几乎不会被释放出来, 因而大部分 GPP 进一步合成了 FPP, 导致 GPP 积累不足。因此, 对酿酒酵母内源的 FPP 合酶进行改造或挖掘特异性强的 Gpps 是增强 GPP 供应的重要措施。Deng 等将啤酒花中的 Gpps 引入到酿酒酵母中合成 (S)-芳樟醇, 最终产量增加了 69.7%^[40]。Liu 等在酿酒酵母中表达了改造后的 Erg20^{K197G} 突变体, 增加了 GPP 的合成量, 最终检测到目标产

物香叶醇的产量增加至 36.04 mg/L^[41]。

3.1.2 单萜合酶的挖掘与功能验证

单萜合酶 (Mts) 是单萜类化合物生物合成过程中的另一个关键酶, 一般来说, 它们可以直接利用微生物体内少量的 GPP 合成相应的化合物。到目前为止, 已经有大量的单萜合酶被成功鉴定, 如柠檬烯合酶、香叶醇合酶、蒎烯合酶、薄荷醇合酶等。例如, Sarria 等在大肠杆菌中分别表达了来自大冷杉 (*A. grandis*)、火炬松 (*Pinus taeda*, *P. taeda*)、欧洲云杉 (*Picea abies*, *P. abies*) 的蒎烯合酶基因, 发现来自 *A. grandis* 的蒎烯合酶的活性最高, 产生的蒎烯也最多^[42]。

目前, 单萜合酶大多来源于植物, 如冷杉、柠檬、罗勒、鼠叶草等。虽然不同来源单萜合酶的基因序列相似性不高, 但是它们都有 2 个基本的保守基序: “DDXXD”的天冬氨酸富集区和“NSE/DTE”序列。这 2 个基序都与二价金属离子的结合有关, 进而影响底物活化的水平。

单萜合酶发挥功能需要二价金属离子的参与, 催化过程包括使 GPP 形成香叶基碳正离子中间体, 然后去质子化形成月桂烯、香叶醇等无环单萜, 或者经过环化、重排、脱氢等反应形成单环单萜。Kim 等根据文献筛选得到了 3 个有潜力的月桂烯合酶 (myrcene synthase, Ms) 并导入大肠杆菌中进行功能验证, 发现只有栎树来源的 Ms 可以合成月桂烯^[27]。Cheng 等利用 UniProt 数据库获得了多种柠檬烯合酶 (Ls) 的信息, 他们选择了柑橘属植物的柠檬烯合酶 (limonene synthase from *Citrus*, LSs)、茄属植物的柠檬烯合酶 (limonene synthase from *Nightshades*, ShLs) 以及藜香属植物的柠檬烯合酶 (limonene synthase from *Agastache rugosa*, ArLS) 作为候选酶, 导入酿酒酵母后, 发现只有截短的 LSs 可以合成柠檬烯^[30]。

3.2 关键酶的优化

由于单萜的异源生物合成途径比其他萜类化合物的途径短得多,所以关键酶对产物积累的影响更为显著。目前,已经报道了许多提高关键酶活性和表达水平的策略,比如酶的定向进化、融合蛋白表达等。

3.2.1 关键酶的定向进化

酶的定向进化依赖于随机诱变和高通量筛选,可以赋予酶更强大的催化效率和有效克服代谢通量节点的功能。单萜合酶活性和稳定性的提高有利于从 Fpps 中竞争获得更多的必需中间体 GPP,使碳流流向单萜类化合物,最终提高目标产物的产量。Tashiro 等通过实验室进化,在大肠杆菌和蓝细菌中分离出了比野生型酶性能更好的蒎烯合酶变体,成功将前体化合物 GPP 更有效地引入单萜生产的代谢通道,最终蒎烯的产量提高至 140 mg/L^[43]。该课题组还通过改造香叶醇合酶 (geraniol synthase, Ges),提高了 Ges 的表达水平,使香叶醇产量提高 3 倍左右^[44]。Keasling 团队通过计算机辅助设计对蛇麻烯合酶 (hempene synthase, Hum) 进行突变后,促进 Hum 的正确折叠,从而使得 Hum 的可溶性表达增加,蛇麻烯产量提高了 1 000 倍^[45]。

3.2.2 关键酶的融合表达

关键酶的融合表达可以增强底物隧道效应、提高酶的底物浓度和减少底物传递过程的消耗,是生物工程菌构建中的常用策略。融合蛋白表达和生物支架的构建是常见的融合表达手段,在单萜类化合物的合成中也得以应用。

融合蛋白是一种多功能蛋白质,来源于可能含有不同酶基因的单核苷酸序列。这种结构使得一种酶的活性位点面向另一种酶,从而通过连续的催化生物反应直接引导中间产物。融合蛋白之间的空间距离降低了底物的传输损失,加快了反应速率。Sarria 等将来源于 *A. grandis*、

P. taeda、*P. abies* 的 Gpps 和 Ps 分别进行蛋白质融合,构建了 9 个蛋白质融合体,其中有 5 个融合蛋白显著提高了蒎烯的产量,最高提高了 52%。微生物利用融合酶系统使化合物实现高度的局部积累和交换,从而克服必需中间体(如 GPP) 渗漏造成的代谢负担,减轻甚至消除其对宿主的反馈抑制作用和毒性^[42]。

将催化同一代谢途径的酶通过可编程的支架方式在宿主细胞的特定区域进行空间共定位也是一种有效的融合表达方式。这一策略可以平衡整个途径的流量,减轻代谢负担,从而优化目标产物的产量^[46]。

生物合成支架策略最初受展示底物通道和可编程核苷酸-蛋白质相互作用的天然合成酶复合体的启发,典型的 3 种类型是基于核酸的分子支架、基于蛋白质的分子支架和基于微室的分子支架。Dueber 等在大肠杆菌中构建了以肌动蛋白聚合开关 N-WASP 的 GTPase 结合域 (the GTPase binding domain from the actin polymerization switch N-WASP, Gbd)、接头蛋白 CRK 的同源结构域 (Src homology 3 domain from the adaptor protein CRK, Sh3) 和接头蛋白 syntrophin 的同源结构域 (the PSD95/DlgA/Zo-1 domain from the adaptor protein syntrophin, PdZ) 蛋白为基础的分子支架,在这个支架上连接乙酰辅酶 A 硫解酶 (acetoacetyl-CoA thiolase, Atob)、酶羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, Hmgs) 和 Hmgr (甲羟戊酸途径中的 3 个酶),可以拉近这 3 个酶的空间距离,然后通过改变分子支架的个数来优化途径酶的表达量,最终,将甲羟戊酸的滴度提高了 77 倍,达到 5 mmol/L^[47]。Kang 等通过使用具有极强亲和力但长度较短的“肽对”,开发了无支架的模块化酶组装体。在大肠杆菌中,将外源引入的上游 MVA 途径的最后一种酶

与下游类胡萝卜素途径的第一种酶组装, 形成通路节点, 使类胡萝卜素产量增加 5.7 倍; 采用相同的策略使酿酒酵母中番茄红素产量增加 58%^[48]。Conrado 等通过基因融合将单个酶转化为特定结合独特 DNA 序列的锌指结构域, 然后将其表达在带有一个合理设计的包含锌指位点的 DNA 支架的细胞中, 锌指结构域与相应的 DNA 序列特异性结合, 使代谢物白藜芦醇、1,2-丙二醇和甲羟戊酸的效价分别增加了 5 倍、4.5 倍和 2.5 倍^[49]。

虽然生物支架在单萜类化合物生产中的应用研究尚不多, 但在很多萜类化合物的合成中已有成功应用, 为该类化合物的高效合成提供了很好的借鉴。

4 单萜类化合物下游合成途径的弱化

为了减轻单萜类化合物对微生物的毒性,

细胞一般会通过内源性异构化、脱氢或酯化作用把单萜转化为其他化合物。Ferrara 等发现柠檬烯在解酯耶氏酵母中会被氧化成紫苏酸^[50]; Chubukov 等也发现柠檬烯会被大肠杆菌有氧呼吸过程中形成的活化氧氧化成柠檬烯-1-氢过氧化物 (或柠檬烯-2-氢过氧化物)^[51]。Tashiro 等发现酿酒酵母具有将体内的单萜转化为其他化合物的能力, 比如可以将香叶醇转化为芳樟醇、橙花醇、香茅醇^[43]。Pardo 等发现香叶醇在微生物体内会被转化为乙酸香叶酯, 而香茅醇会被转化为乙酸香茅酯等^[52] (图 2)。

因此, 在代谢工程中, 通过阻止单萜的体内生物转化、截断或弱化单萜的下游途径, 可以有效地提高目标单萜的产量。Zhao 等通过分别敲除 NADPH 氧化还原酶的编码基因 (*ore2*) 和醇乙酰转移酶的编码基因 (*atf1*) 后, 降低了香叶醇的内源代谢, 分批发酵后香叶醇的产量分别

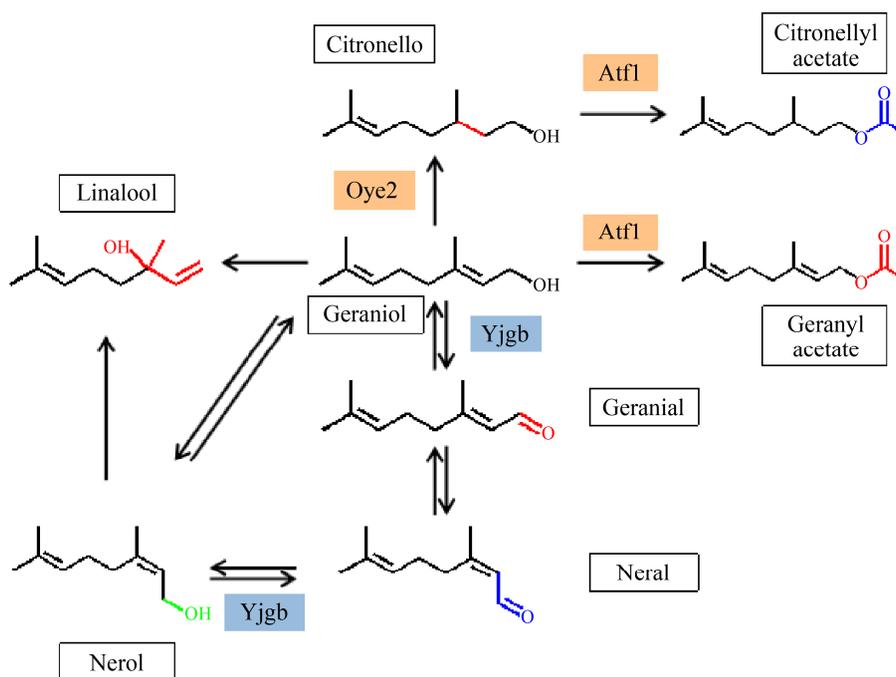


图 2 单萜类化合物在微生物体内的生物转化途径

Figure 2 Bioconversion pathways of monoterpenoids in microorganism. Orange: from *S. cerevisiae*, blue: from *E. coli*.

提高了 1.7 倍和 1.6 倍^[53]。Zhou 等通过敲除与植物香叶醇脱氢酶高度同源的大肠杆菌体内的 *yjgb* 基因后, 香叶醇的消耗率显著降低, 其产量达到 129.7 mg/L^[39]。Liu 等探索了一种逆转化方法获得了香叶醇的近似理论生产率, 他们从大肠杆菌中鉴定出了乙酰酯酶 (acetylsterase, Aes), 可以将乙酸香叶酯转化为香叶醇, 在分批补料发酵条件下香叶醇产量增加至 2.0 g/L^[25]。

5 底盘细胞的改造

大多数单萜的毒性会抑制底盘细胞的生长, 降低途径酶的生物活性, 影响代谢通路的生产效率, 从而最终导致目标单萜的生物合成量不高。在利用合成生物学技术对单萜异源体系的上中下游途径各自优化后, 单萜产量的持续增加会加剧产物对细胞的影响, 最终导致总产量不高, 限制了其工业化应用。因此, 如何增强底盘细胞的鲁棒性, 提高细胞对单萜类化合物的耐受性也成为了构建高效单萜生产菌株的关键问题。提高细胞耐受性的方法可以分为 2 种: 增强毒性分子流出的外排工程和提高底盘细胞对毒性产物的耐受性工程。

5.1 外排工程

利用外排泵是减少细胞内有毒化合物积累和促进下游分离的一种有效策略。Dunlop 等发现, 在大肠杆菌中, AcrAB-TolC 系统作为外排泵, 可以将溶剂、抗生素和其他药物分子通过双层膜输送到培养基中。该系统由作为内膜转运蛋白的 AcrB、作为膜融合蛋白的 AcrA 和作为外膜蛋白的 TolC 组成^[54]。Foo 等研究表明, 通过定向进化得到的大肠杆菌天然 AcrB 中 4 个突变 (N189H、T678S、Q737L 和 M844L) 可以提高正辛烷和 α -蒎烯的流出效率^[55]。其他一些工程研究集中于 AcrB-TolC 外排泵的调节因子上, 如 Aono 等发现 MarA 是一种转录激活因

子, 而 AcrR 是一种转录抑制因子^[56]。MarA 的过表达或 AcrR 的缺失均可显著增强大肠杆菌中香叶醇的流出。与此同时, 在大肠杆菌中引入异源耐溶剂外排泵也取得了成功。Tomko 等在筛选了疏水物/两亲物外排泵 (HAE1) 家族的 43 个非天然泵后, 确定了几个可能增加大肠杆菌在香叶醇、乙酸香叶酯、 α -蒎烯和柠檬烯排出的候选泵^[57]。在酿酒酵母中, 没有发现单萜的天然外排泵, 但可以引入异源转运蛋白来运输单萜。异源转运蛋白通常来自具有天然烃耐受特性的微生物 (如古菌域、恶臭假单胞菌属、水生海洋杆菌属和博库姆碱杆菌属)。Wang 等表达了来自古菌域的 ATP 转运蛋白 GcABC-G1, 使酿酒酵母对 (+)-3-蒎烯、D-柠檬烯和 β -蒎烯的耐受性分别增加了 30 倍、7 倍和 3 倍^[58]。因此, 由相关压力诱导或负责微生物在高碳氢化合物浓度下存活的转运蛋白, 也将是单萜耐受工程的潜在候选物。

另外, 研究者们开发了一种基于阴离子交换树脂的智能策略, 称为原位产物回收 (*in situ* product removal, ISPR)。这种方法使用一个包含树脂流化床和生物反应器的柱子, 专门捕获有毒产物并将其从培养基中去除^[59], 有利于减轻化合物毒性对底盘细胞的影响, 可以应用于单萜类化合物的生物合成中。

5.2 耐受性工程

外排工程是将胞内产物排到胞外, 从而降低胞内产物的积累, 而耐受性工程则是提高宿主对有细胞毒性产物的抵抗力, 这一策略需要全面了解单萜的细胞毒性机制。Hu 等发现, 作为小的疏水化合物, 单萜倾向于粘附或渗透到细胞膜上, 导致膜流动性、渗透性和饱和脂肪酸比率增加, 最终导致膜功能受损^[60]。然而, Brennan 等称, 柠檬烯对酵母的胁迫并未导致细胞膜流动性、结构完整性或脂肪酸组成以及麦

角固醇生物合成的改变,但观察到细胞壁损伤以及与细胞壁完整性 (cell wall integrity, CWI) 信号通路相关的几个基因的上调,表明细胞壁而非细胞膜是柠檬烯细胞毒性的目标。他们还通过适应性进化确定,截短蛋白 Tcb3p 可以减轻细胞壁损伤以及抑制柠檬烯胁迫下的 CWI 信号通路,使酿酒酵母对柠檬烯的耐受性提高了 9 倍^[61]。Liu 等观察到柠檬烯氢过氧化物和未氧化的柠檬烯对大肠杆菌会产生不同的毒性,这两种细胞毒性所造成的影响可能是由培养条件、细胞状态、单萜的滴度及其组成决定的^[62]。据报道,在许多情况下,单萜通过活性氧在大肠杆菌和酿酒酵母中的细胞内积累诱导氧化应激^[63]。例如,柠檬烯提高了抗氧化酶的活性,并提高了酿酒酵母中抗氧化剂的水平。随后添加活性氧清除剂,如酿酒酵母的谷胱甘肽和半胱氨酸以及大肠杆菌的半胱胺和硫脲,显著减轻了单萜对细胞生长的抑制。然而,Chueca 等又发现在香芹酚和柠檬醛的合成细胞中,活性氧使大肠杆菌失活的机理并不遵循与柠檬烯相同的途径,因为在有氧条件下,既没有观察到芬顿反应,也没有观察到通过三羧酸循环产生烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH),这表明了单萜细胞毒性机制的复杂性^[64]。同时,通过筛选大肠杆菌基因库,研究人员发现通过同源重组 DNA 修复和诱导 SOS 反应来维持 DNA 序列的正确性,可以提高香叶醇耐受性^[65]。

综上,单萜的细胞毒性机制可能与细胞膜和细胞壁的损伤或氧化应激有关,但具体机制尚未解析,许多现有的理论也不一致。鉴于此,研究者们虽然开发了几种通过操纵外排泵、改变膜特性和激活应激反应基因来耐受细胞毒性的策略,但主要还是通过文库筛选而不是理性设计来确定的。因此,解析单萜细胞毒性的分

子机制并通过理性设计开发减轻细胞毒性的方法是未来的研究方向之一。

6 其他策略

除上述常用策略以外,还有很多可以提高单萜产量的方法。改变目标产物的合成场所是一种有效的微生物生产复杂结构天然产物的策略,比如将目标单萜的代谢途径定位到线粒体中。Yee 等将香叶醇的合成途径靶向到线粒体,以防止 GPP 被细胞质中的麦角甾醇途径消耗,与香叶醇的细胞质生产菌株相比,线粒体香叶醇生产菌株的产量提高了 6 倍^[66]。单萜类化合物多具有较强的挥发性,所以微生物的培养过程及条件同样重要,在培养基上层加入有机相,可以将单萜类化合物萃取到有机相中,既减少了对细胞的毒害,也降低了因产物挥发造成的损失^[67]。例如,在生产过程中加入邻苯二甲酸丁二酯作为溶剂后,柠檬烯的最小抑菌浓度与不加有机溶剂的系统相比提高 700 倍^[68]。Liu 等在发酵时添加了肉豆蔻酸异丙酯,形成两相系统,减少了产物的挥发,产量有明显提升^[25]。

组合设计与优化也是构建复杂合成系统的一种有效策略。Song 等在酿酒酵母中构建了两条香叶香叶醇 (geranylgeraniol, GGOH) 的生物合成途径,通过启动子强度微调、整合位点变异等组合策略,得到一系列 GGOH 产量在 18.45–161.82 mg/L 之间的菌株,最后通过优化培养基,最高产量进一步提高到 437.52 mg/L^[69]。

随着生物信息学的快速发展,近年来对微生物天然产物的生物合成途径解析也取得了重大突破,有利于为单萜类化合物的合成发掘更具有生产前景的底盘细胞。比如,链霉菌基因组中包含着极为丰富的天然产物生物合成基因簇资源,包括单萜类化合物^[70]。Yamada 等在工程链霉菌宿主中对 13 个萜类化合物的合成基

因簇进行了异源表达, 用来研究了对应活性物的生化特征^[71]。综上, 我们需要根据不同的生产需要及目的产物, 选择合适的底盘微生物和合适的策略。

7 总结与展望

近年来, 单萜类化合物的微生物生产取得了很大的进展。在早期的研究中, 天然的 MEP 途径作为主要的调节目标获得了较大的关注, 大多数研究集中在该途径关键酶的过表达上, 然而单纯依靠这种策略未能实现单萜的工业生产。引入更强的异源 MVA 途径, 弥补了 MEP 途径的不足。该策略随后与一系列优化方法相结合, 例如限速酶的功能改善、代谢流的控制以及宿主鲁棒性的提高, 可以进一步提高生产效率。

虽然以上方法很大程度上提高了单萜类化合物的产量, 但目前大多数单萜生物合成离大规模生产还有很大的距离。为了解决这一问题, 在单萜生产的未来研究中, 可以考虑对复杂的代谢系统进行系统分析, 利用合成生物学理念和技术, 结合基因组学、蛋白组学、代谢组学等方法, 从基因改造到过程优化进行系统整合以更有效地提高目标产品的生产效率和产量。此外, 由于单萜类化合物大多对细胞毒性较强, 限制了其积累, 而且微生物耐受高浓度单萜类化合物的机制也尚不清晰, 如何获得可以耐受高浓度单萜类化合物的底盘细胞也是提高该类化合物产量的关键之一。通过对不同环境中微生物的筛选、对已有底盘微生物的诱变, 结合高通量检测方法获得对单萜类化合物耐受性较强的微生物, 并基于此进行分析和改造, 可以进一步阐释微生物耐受高浓度单萜类化合物的机制, 获得高耐受性的工程菌, 从而提高单萜类化合物的产量。在单萜类化合物的合成中,

不仅很多终产物对细胞有较强毒害作用, 某些中间代谢物如 GPP 对细胞也有一定的毒性。在常规代谢调控中增加了前体化合物 GPP 的合成量以后, 还要关注 GPP 积累造成的毒性, 避免细胞遭受毒害。因此, 挖掘更高效的单萜合酶, 提升 GPP 向单萜转化的速率, 平衡整个单萜类化合物的代谢合成通路或充分利用细胞器工程降低中间代谢物对细胞生长的影响也是以后研究的重要方向之一。

综上, 合成生物学的发展将进一步为单萜类化合物的生物合成提供先进的技术手段, 将微生物构建成高效的细胞工厂。微生物底盘宿主的改造、基因线路从头设计与重构和代谢改向等, 将不仅为单萜类化合物的合成, 也为其他萜类化合物的合成提供思路和借鉴。随着生产瓶颈和限制因素的不断突破, 我们可以预期单萜类化合物的微生物合成将取得更大的发展。

REFERENCES

- [1] Kabir A, Cacciagrano F, Tartaglia A, et al. Analysis of Monoterpenes and Monoterpenoids. *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Amsterdam: Elsevier Press, 2020: 274-286.
- [2] Picollo MI, Toloza AC, Mougabure Cueto G, et al. Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. *Fitoterapia*, 2008, 79(4): 271-278.
- [3] 刘通, 王加高, 吕新宇, 等. L-薄荷醇的合成工艺研究. *精细化工*, 2019, 36(8): 1634-1637.
Liu T, Wang JG, Lv XY, et al. Study on synthesis technology of L-menthol. *Fine Chem*, 2019, 36(8): 1634-1637 (in Chinese).
- [4] Sharma S, Hameed S, Fatima Z. Monoterpenoid geraniol improves anti-mycobacterial drug efficiency by interfering with lipidome and virulence of *Mycobacteria*. *Infect Disord Drug Targets*, 2020, 20(4): 467-485.
- [5] 新思界产业研究中心. 2020-2024 年中国香叶醇市场分析 & 发展前景研究报告. 北京: 新思界国际信息咨询有限公司, 2020: 20-24.
Xinsijie industry research center. Market analysis and

- development prospects of geraniol in China from 2020 to 2024. Beijing: Xinsijie International Information Consulting Co., Ltd., 2020: 20-24 (in Chinese).
- [6] Gupta P, Phulara SC. Metabolic engineering for isoprenoid-based biofuel production. *J Appl Microbiol*, 2015, 119(3): 605-619.
- [7] Akhlaghi M, Tarighi S, Taheri P. Effect of antimicrobial peptides and monoterpenes on control of fire blight. *Span J Agric Res*, 2020, 18(2): e1002.
- [8] Geron C, Rasmussen R, R Arnts R, et al. A review and synthesis of monoterpene speciation from forests in the United States. *Atmos Environ*, 2000, 34(11): 1761-1781.
- [9] Yeung AWK, Tzvetkov NT, Gupta VK, et al. Current research in biotechnology: exploring the biotech forefront. *Curr Res Biotechnol*, 2019, 1: 34-40.
- [10] Kim J, Salvador M, Saunders E, et al. Properties of alternative microbial hosts used in synthetic biology: towards the design of a modular chassis. *Essays Biochem*, 2016, 60(4): 303-313.
- [11] Lange BM. Biosynthesis and biotechnology of high-value p-menthane monoterpenes, including menthol, carvone, and limonene. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 148: 319-353.
- [12] Birchfield AS, McIntosh CA. Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products — a minireview. *Curr Plant Biol*, 2020, 24: 100163.
- [13] Keasling JD. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metab Eng*, 2012, 14(3): 189-195.
- [14] 张先恩. 2017 合成生物学专刊序言. *生物工程学报*, 2017, 33(3): 311-314.
Zhang XE. Preface for special issue on synthetic biology (2017). *Chin J Biotech*, 2017, 33(3): 311-314 (in Chinese).
- [15] 曲俊泽, 陈天华, 姚明东, 等. ABC 转运蛋白及其在合成生物学中的应用. *生物工程学报*, 2020, 36(9): 1754-1766.
Qu JZ, Chen TH, Yao MD, et al. ABC transporter and its application in synthetic biology. *Chin J Biotech*, 2020, 36(9): 1754-1766 (in Chinese).
- [16] Zhang L, Xiao WH, Wang Y, et al. Chassis and key enzymes engineering for monoterpenes production. *Biotechnol Adv*, 2017, 35(8): 1022-1031.
- [17] Lv X, Xu HM, Yu HW. Significantly enhanced production of isoprene by ordered coexpression of genes *dxs*, *dxr*, and *idi* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6): 2357-2365.
- [18] Du FL, Yu HL, Xu JH, et al. Enhanced limonene production by optimizing the expression of limonene biosynthesis and MEP pathway genes in *E. coli*. *Bioresour Bioprocess*, 2014, 1(1): 10.
- [19] Matthews PD, Wurtzel ET. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(4): 396-400.
- [20] Nowroozi FF, Baidoo EE, Ermakov S, et al. Metabolic pathway optimization using ribosome binding site variants and combinatorial gene assembly. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(4): 1567-1581.
- [21] Zou R, Zhou K, Stephanopoulos G, et al. Combinatorial engineering of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway using cross-lapping *in vitro* assembly (CLIVA) method. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79557.
- [22] Herrero O, Ramón D, Orejas M. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for *de novo* production of aromatic monoterpenes in wine. *Metab Eng*, 2008, 10(2): 78-86.
- [23] Niu FX, He X, Wu YQ, et al. Pinene, tolerance, evolution, modular co-culture engineering. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1623.
- [24] Yang J, Nie Q, Ren M, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of alpha-pinene. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 60.
- [25] Liu W, Xu X, Zhang R, et al. Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 58.
- [26] Willrodt C, David C, Cornelissen S, et al. Engineering the productivity of recombinant *Escherichia coli* for limonene formation from glycerol in minimal media. *Biotechnol J*, 2014, 9(8): 1000-1012.
- [27] Kim EM, Eom JH, Um Y, et al. Microbial synthesis of myrcene by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(18): 4606-4612.
- [28] 陈天华, 张若思, 姜国珍, 等. 产蒎烯人工酵母细胞的构建. *化工学报*, 2019, 70(1): 179-188.
Chen TH, Zhang RS, Jiang GZ, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for pinene production. *CIESC J*, 2019, 70(1): 179-188 (in Chinese).
- [29] Jiang GZ, Yao MD, Wang Y, et al. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2017, 41: 57-66.

- [30] Cheng S, Liu X, Jiang G, et al. Orthogonal engineering of biosynthetic pathway for efficient production of limonene in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth Biol, 2019, 8(5): 968-975.
- [31] Zhou PP, Du Y, Xu NN, et al. Improved linalool production in *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution of linalool synthase and overexpression of the complete mevalonate pathway. Biochem Eng J, 2020, 161: 107655.
- [32] Rico J, Pardo E, Orejas M. Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(19): 6449-6454.
- [33] Yu Y, Rasool A, Liu H, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for high yield production of α -amyrin via synergistic remodeling of α -amyrin synthase and expanding the storage pool. Metab Eng, 2020, 62: 72-83.
- [34] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. Nat Biotechnol, 2003, 21(7): 796-802.
- [35] Alonso-Gutierrez J, Chan R, Batth TS, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. Metab Eng, 2013, 19: 33-41.
- [36] Burke CC, Wildung MR, Croteau R. Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. PNAS, 1999, 96(23): 13062-13067.
- [37] 于盱, 王海棠, 冯美英, 等. 薄荷 *GPPS* 基因的克隆与表达分析. 江西农业学报, 2013, 25(7): 25-29.
Yu X, Wang HT, Feng MY, et al. Cloning and expression analysis of gene *GPPS* in mint. Acta Agric Jiangxi, 2013, 25(7): 25-29 (in Chinese).
- [38] Burke C, Croteau R. Geranyl diphosphate synthase from *Abies grandis*: cDNA isolation, functional expression, and characterization. Arch Biochem Biophys, 2002, 405(1): 130-136.
- [39] Zhou J, Wang CL, Yoon SH, et al. Engineering *Escherichia coli* for selective geraniol production with minimized endogenous dehydrogenation. J Biotechnol, 2014, 169: 42-50.
- [40] Deng Y, Sun MX, Xu S, et al. Enhanced (S)-linalool production by fusion expression of farnesyl diphosphate synthase and linalool synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl Microbiol, 2016, 121(1): 187-195.
- [41] Liu JD, Zhang WP, Du GC, et al. Overproduction of geraniol by enhanced precursor supply in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol, 2013, 168(4): 446-451.
- [42] Sarria S, Wong B, Martín HG, et al. Microbial synthesis of pinene. ACS Synth Biol, 2014, 3(7): 466-475.
- [43] Tashiro M, Kiyota H, Kawai-Noma S, et al. Bacterial production of pinene by a laboratory-evolved pinene-synthase. ACS Synth Biol, 2016, 5(9): 1011-1020.
- [44] Tashiro M, Fujii A, Kawai-Noma S, et al. Directed evolution and expression tuning of geraniol synthase for efficient geraniol production in *Escherichia coli*. J Gen Appl Microbiol, 2017, 63(5): 287-295.
- [45] 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.
- [46] Lee H, DeLoache WC, Dueber JE. Spatial organization of enzymes for metabolic engineering. Metab Eng, 2012, 14(3): 242-251.
- [47] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. Nat Biotechnol, 2009, 27(8): 753-759.
- [48] Kang W, Ma T, Liu M, et al. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux. Nat Commun, 2019, 10(1): 4248.
- [49] Conrado RJ, Wu GC, Boock JT, et al. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. Nucleic Acids Res, 2012, 40(4): 1879-1889.
- [50] Ferrara MA, Almeida DS, Siani AC, et al. Bioconversion of R-(+)-limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Braz J Microbiol, 2013, 44(4): 1075-1080.
- [51] Chubukov V, Mingardon F, Schackwitz W, et al. Acute limonene toxicity in *Escherichia coli* is caused by limonene hydroperoxide and alleviated by a point mutation in alkyl hydroperoxidase AhpC. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(14): 4690-4696.
- [52] Pardo E, Rico J, Gil JV, et al. *De novo* production of six key grape aroma monoterpenes by a geraniol synthase-engineered *S. cerevisiae* wine strain. Microb Cell Fact, 2015, 14: 136.
- [53] Zhao J, Li C, Zhang Y, et al. Dynamic control of ERG20 expression combined with minimized endogenous downstream metabolism contributes to the

- improvement of geraniol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 17.
- [54] Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmidski HL, et al. Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 487.
- [55] Foo JL, Leong SSJ. Directed evolution of an *E. coli* inner membrane transporter for improved efflux of biofuel molecules. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 81.
- [56] Aono R, Tsukagoshi N, Yamamoto M. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1998, 180(4): 938-944.
- [57] Tomko TA, Dunlop MJ. Engineering improved bio-jet fuel tolerance in *Escherichia coli* using a transgenic library from the hydrocarbon-degrader *Marinobacter aquaeolei*. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 165.
- [58] Wang Y, Lim L, DiGiustini S, et al. A specialized ABC efflux transporter GcABC-G1 confers monoterpene resistance to *Grosmannia clavigera*, a bark beetle-associated fungal pathogen of pine trees. *New Phytol*, 2013, 197(3): 886-898.
- [59] Eggert A, Maßmann T, Kreyenschulte D, et al. Integrated *in situ* product removal process concept for itaconic acid by reactive extraction, pH-shift back extraction and purification by pH-shift crystallization. *Sep Purif Technol*, 2019, 215: 463-472.
- [60] Hu F, Liu J, Du G, et al. Key cytomembrane ABC transporters of *Saccharomyces cerevisiae* fail to improve the tolerance to D-limonene. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(8): 1505-1509.
- [61] Brennan TCR, Williams TC, Schulz BL, et al. Evolutionary engineering improves tolerance for replacement jet fuels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(10): 3316-3325.
- [62] Liu J, Zhu Y, Du G, et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to D-limonene-induced oxidative stress. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(14): 6467-6475.
- [63] Chueca B, Pagán R, García-Gonzalo D. Oxygenated monoterpenes citral and carvacrol cause oxidative damage in *Escherichia coli* without the involvement of tricarboxylic acid cycle and Fenton reaction. *Int J Food Microbiol*, 2014, 189: 126-131.
- [64] Chueca B, Pagán R, García-Gonzalo D. Differential mechanism of *Escherichia coli* inactivation by (+)-limonene as a function of cell physiological state and drug's concentration. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94072.
- [65] Shah AA, Wang C, Yoon SH, et al. RecA-mediated SOS response provides a geraniol tolerance in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2013, 167(4): 357-364.
- [66] Yee DA, DeNicola AB, Billingsley JM, et al. Engineered mitochondrial production of monoterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2019, 55: 76-84.
- [67] 田宁, 咸漠, 胡仰栋, 等. 产香叶醇重组大肠杆菌发酵培养基的优化. *林产化学与工业*, 2015, 35(4): 131-137.
- Tian N, Xian M, Hu YD, et al. Optimization of medium for production of geraniol by the recombinant *Escherichia coli*. *Chem Ind For Prod*, 2015, 35(4): 131-137 (in Chinese).
- [68] Brennan TC, Turner CD, Krömer JO, et al. Alleviating monoterpene toxicity using a two-phase extractive fermentation for the bioproduction of jet fuel mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(10): 2513-2522.
- [69] Song TQ, Ding MZ, Zhai F, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for geranylgeraniol overproduction by combinatorial design. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14991.
- [70] 肖丽萍, 邓子新, 刘天罡. 链霉菌底盘细胞的开发现状及其应用. *微生物学报*, 2016, 56(3): 441-453, 330.
- Xiao LP, Deng ZX, Liu TG. Progress in developing and applying *Streptomyces* chassis. *Acta Microbiol Sin*, 2016, 56(3): 441-453, 330 (in Chinese).
- [71] Yamada Y, Arima S, Nagamitsu T, et al. Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host. *J Antibiot*, 2015, 68(6): 385-394.

(本文责编 陈宏宇)