

· 综述 ·

## 微生物合成抗癌药物埃博霉素的研究进展

龚国利, 贾琳, 黄菲菲, 许重要

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 西安 710021)

**[摘要]** 埃博霉素(epothilones)是黏细菌纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)产生的一类聚酮次级代谢产物,与临床上广泛应用的抗肿瘤化疗药物紫杉醇具有相同的稳定微管活性,且对紫杉醇耐药的肿瘤细胞亦具有活性。目前多个埃博霉素药物在进行临床试验。其中发酵产量成为该药研发的重点。文中综述埃博霉素在生物合成方面的相关研究进展,主要介绍近年来通过遗传和生化等途径对埃博霉素基因簇结构特征以及合成酶特性方面的相关研究和前景。

**[关键词]** 埃博霉素;生物合成;抗癌药物;紫杉醇

**[中图分类号]** R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2009)16-1515-06

### Current status of the biosynthesis of the anti-tumor agents, epothilones

GONG Guo-li, JIA Lin, HUANG Fei-fei, XU Zhong-yao

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

**[Abstract]** Epothilones, naturally produced by the myxobacterium *Sorangium cellulosum*, are cytotoxic polyketides that mimic the effects of taxol on cancer cells (i. e., microtubule stabilization). Currently there are several epothilones or their chemically modified derivatives undergoing clinical evaluation for cancer treatments in humans. Food and Drug Administration (FDA) of USA has granted approval of Ixempra, a product of Bristol-Myers Squibb Company, for cancer treatments in humans in October 2007. This review presented recent progress in the biosynthesis of epothilones with respect to the gene cluster and the biosynthesis enzyme through genetic and biochemical pathway.

**[Key words]** epothilones; biosynthesis; antitumor; taxol

埃博霉素(Epothilones)是一类十六元环的大环内酯化合物,最早由 Reichenbach 和 Höfle 等在 1987 年从黏细菌纤维堆囊菌中分离得到<sup>[1]</sup>。它们具有的类似紫杉醇微管蛋白聚合和抑制微管解聚的活性使它成为了新一代抗有丝分裂药物,其作用机制与紫杉醇类药物类似,可与微管蛋白结合导致癌细胞无法顺利进行有丝分裂,进而使癌细胞产生凋亡。埃博霉素在抗肿瘤谱、抗肿瘤活性、安全性、水溶性及合成方法等方面均优于紫杉醇,有望发展成为比紫杉醇更有效的抗肿瘤药物<sup>[2]</sup>。目前急需深入探

讨埃博霉素生物合成基因簇的结构特点及其生物合成的具体过程以便发展一种高效灵活的遗传学操纵技术和组合生物学技术来快速、大通量的发酵制备埃博霉素及其衍生物得到有良好应用价值的抗癌药。本文阐述了近年来通过遗传和生化等途径对埃博霉素基因簇结构特征以及这些活性物质具体生物合成过程方面的研究进展和前景。

#### 1 多聚酮(PKSs)和非核糖体肽(NRPS)生物合成的酶复合体和基因簇

多聚酮和非核糖体肽化合物是复杂天然产物中的两大家族,分别由简单的羧酸和氨基酸单体构成,具有重要的医药和农用化学品的特性,其生物分子的结构极其复杂多样。虽然两者利用的底物不同,但他们的生物合成均是在一个大的多功能蛋白的控制

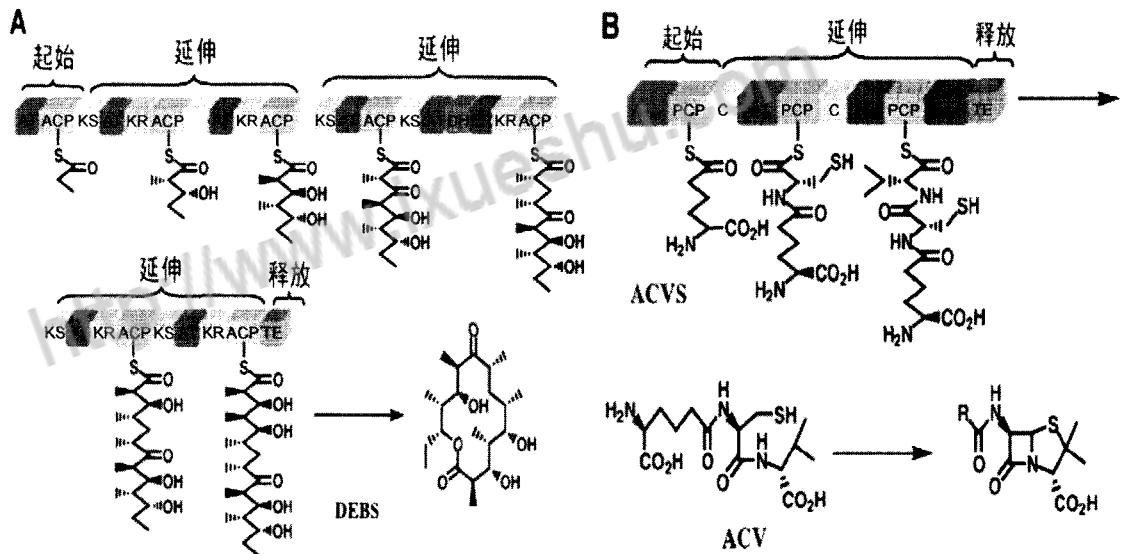
**[基金项目]** 陕西省教育厅自然科学专项(09JK346),陕西科技大学科研启动基金项目(引进博士科研启动基金 BJ08-17)

**[作者简介]** 龚国利,男,博士,讲师,研究方向:微生物制药技术。  
联系电话:(029)86168590,E-mail:gongguoli@sust.edu.cn。

下完成的,前者命名为 PKSs,后者命名为 NRPS。两种复合酶均包含线性、连续重复的活性区域称之为模块,每个模块可催化多聚酮或多肽连的一轮延伸并进行适当的修饰,最后解链得到相应的产物<sup>[3]</sup>。

红霉素 PKS 编码基因簇序列的测定揭示了 PKS 基因以及其编码的蛋白的模块结构如图 1 所示。PKSs 基因簇(大小在 10 ~ 100 kb 左右不等)一般包括大约 2 ~ 4 kb 的负载模块 (loading module), 一个线性组织的、每个大约 4 ~ 5.5 kb 的中间模块 (某些 PKS 的模块数可以达到 20 个), 以及 1 个小的硫酯酶 (TE) 或释放域。每一个模块含有 3 ~ 6 个域,其功能与其他相似功能的 PKS 域同源。所有的模块均含有 1 个酮合成酶 (ketosynthase, KS), 1 个酰基转移酶 (acyltransferase, AT) 和 1 个酰基载体蛋白 (acyl carrier protein) 的域,这些域对于聚酮链的二碳氮源的得加长是必需的。此外,模块还可能含有酮

单元氧化态修饰的 1 ~ 3 个酶——1 个酮基还原酶 (KR), 1 个 KR + 还原酶, 和 1 个 KR + DK + 烯酰基 (ER)。1 个模块中的 1 个域编码 1 个二碳单元结构。PKS 中模块的顺序决定了编码的结构,模块的数量决定加入的二碳单元的数量 (或模块的链长度)。在非核糖体肽合成酶 (NRPS) 中也有相似的模块结构,每个模块含有腺苷酰化 (adenylation, A), 缩合 (condensation, C) 和硫化 (thiolation, T) 域 (其中 A-PCP 结构域成对的出现在每个起缩合延伸作用的模块中), 共同作用于氨基酸使其添加到延伸的寡肽上。此外此模块还可能含有 3 个结构域——差向异构化结构域 (epimerization)、N-甲基化结构域 (N-methylation)、氧化结构域 (oxidation)。NRPS 与 PKSs 基因簇相似,其模块的顺序、特性和数量分别决定了氨基酸寡肽的性质和长短。如图 1 所示。



A: 红霉素前体 DEBS 生物合成的 PKS; B: 头孢霉素前体 ACVS 生物合成的 NRPS

图 1 多聚酮 (PKSs) 和非核糖体肽 (NRPS) 基因簇的结构

## 2 埃博霉素生物合成的酶复合体及其基因簇

埃博霉素的生物合成主要由 I 型聚酮合成酶完成,这些酶是大型的多功能复合体,以一种模块的方式组织,催化对羧酸残基的连续缩合。每一个蛋白具有 1 个或多个模块,每个模块具有能够延长和执行聚酮链形成的几个分散的域。执行延长聚酮链的模块中必需含有  $\beta$ -酮酰合成酶 ( $\beta$ -ketoacyl synthase, KS), 酰基转移酶 (acyltransferase, AT) 和酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 3 个功能域。其他如  $\beta$ -酮基还原酶 ( $\beta$ -ketoreductase, KR), 脱氢酶

(dehydratase, DH), 烯酰还原酶 (enoyl reductase, ER), 甲基转移酶 (methyltransferase, MT), 或硫酯酶 (thioesterase, TE) 的功能域也可能存在。模块和各域的线性排列顺序与埃博霉素的合成过程相一致。目前已完成了纤维堆囊菌菌株 SMP44 和 Soce90 中产埃博霉素的 PKS 全基因簇的分子克隆和测序<sup>[5]</sup>。

由纤维堆囊菌 SMP44 分离的埃博霉素生物合成基因簇包括大约 56 kb 的 7 个基因。这些基因编码 PKS——*epoA*, *epoC*, *epoD*, *epoE* 和 *epoF* 分成 9 个

模块:1个锚锭模块(loading module),1个非核糖体肽合成酶模块(nonribosomal peptide synthetase module),8个聚酮合成酶模块(polyketide synthase modules),和1个P450环氧酶(P450 epoxidase)。EpoB蛋白是一个非核糖体肽合成酶(NRPS),催化epo中的噻唑形成。EpoK是一个环氧酶P450催化脱氧epothilone形成epothilone(即将epoC和D环化形成

epoA和B)<sup>[6]</sup>。

由纤维堆囊菌Soce90分离的Epothilone生物合成基因簇大约68.75kb包括1个聚酮合成酶的9个模块、1个非核糖体肽合成酶模块、1个P450环氧酶和两个推论的抗生素转运蛋白。其合成Epothilones的基因簇与SMP44菌中PKS具有极高的同源性<sup>[7]</sup>。其基因簇模块结构如图2所示。

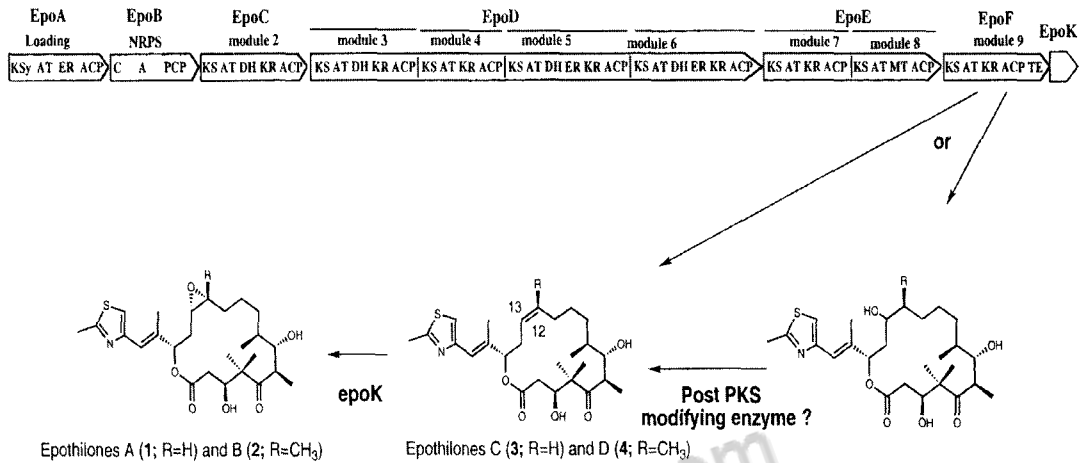


图2 埃博霉素生物合成基因簇的模块结构

### 3 埃博霉素的生物合成过程

埃博霉素的生物合成过程首先是脱氧埃博霉素的形成,后者以乙酰辅酶A或丙酰辅酶A为起始原料,经多步程序化反应产生。分析埃博霉素的生物

合成的多功能酶复合物的基因簇及其蛋白结构,我们可以把埃博霉素的生物合成途径分为5个阶段,即链的引发、噻唑环的形成、链的延长、链的终止以及最后对合成产物的修饰<sup>[8]</sup>。见图3。

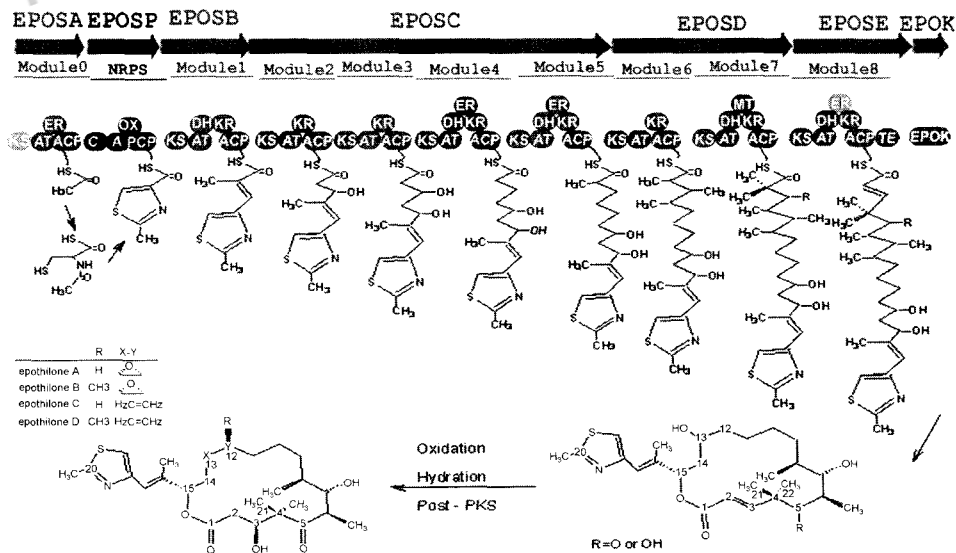


图3 埃博霉素的生物合成的具体步骤

#### 3.1 链的引发(即脱辅基合成酶翻译后的活化)

埃博霉素PKSs中的每个模块包含1个由75~90个

氨基酸组成的酰基载体蛋白结构域,而NRPS有个类似的肽酰载体蛋白结构域<sup>[9]</sup>。此域携带1个长

20个氨基酸的磷酸泛酰巯基乙胺功能团,它是在磷酸泛酰巯基乙胺转移酶的催化下由 COA 共价结合到翻译后脱辅基酶蛋白的保守丝氨酸残基上形成的。此时 PKSs/NRPS 由脱辅基的非活化状态 (apo-synthase) 转变到结合辅基的活性状态 (holo-synthase), 可以支持特定的多聚酮或多肽链的起始、延伸和终止。磷酸泛酰巯基乙胺辅基作为一个活动的载体臂, 同时与酰基单体和延伸链共价结合, 携带 PKS 和 NRPS 合成的中间物由一个酶转移到另一个酶的活性位点上, 终止于复合酶 KS 域的半胱氨酸 (cys) 巯基上。在链的延伸过程中都会形成共价连接的 acyl-s-ACP/PCP 酶中间体, 每个 ACP/PCP 必须携带磷酸泛酰巯基乙胺残基否则的话链的延伸将中断。如, Epothilones PKSs 中有 9 个 ACP 和 1 个 PCP 位点。

**3.2 链的起始和噻唑环的形成** 活化的单体单元先与 ACP/PCP 的 SH 作用。催化此反应的酶为 PKSs/PCPs 酶复合体中的一个酶单体, 称为 ACP-酰基转移酶 (即 AT), 所产生的酰基并不留在 ACP 上而是转移到另一酶单体的半胱氨酸的巯基上, 在第一轮链延伸中作为供体。PKSs 中的起始单元是硫酯酰-CoA 类似于脂肪酸合成酶, 常为乙酰-CoA 或丙二酰-CoA。而相应的 NRPS 的构件单体并不是类似的氨酰基-CoA, 因为它的水解产物不稳定, 每个氨基酸是在专一的腺苷酸结构域被活化的, 类似于氨酰 tRNA 合成酶, 此酶位于 holo-PCP 域的上游, 催化产生氨酰腺苷酸复合物中间体 (氨酰-AMP) 从而被 PCP 的 SH 基捕获产生氨酰-S-PCP, 作为链起始的供体<sup>[11]</sup>。

埃博霉素包含特殊的起始单元 2-甲基噻唑 (如图 1)。五元噻唑杂环是通过天然产物半胱氨酸侧链的环化脱水形成。PKS 和 NRPS 模块在可能的操纵子的 5' 端通过某种机制共翻译得到起始单元。

epoA 编码 EPOSA, I 型多聚酮合成酶模块中的一个模块, 包含 1 个经修饰的  $\beta$  酮酰合成酶 (KSQ), 1 个酰基转移酶 (AT), 1 个烯酰还原酶 (ER) 和 1 个酰基载体蛋白结构域。尽管位于 EPOSA 氨基酸末端的 KSQ 结构域 KS 活性位点处的半胱氨酸被酪氨酸所取代而可能不具备活性。通过序列比较和模块分析预测 EPOSA 编码的 AT 与乙酰基团相连。EPOSA 中的 ER 结构域可能失去功能因为 ER 模块中典型高度保守区中精氨酸被谷氨酸所取代。EPOSA 通过将乙酰基团加载到酶复合物上

最终形成 2-甲基噻唑环的一部分来引发埃博霉素的生物合成。实验证明经同源重组使 epoA 失活将阻断埃博霉素的合成。

epoP 编码 EPOSP, 是一个无核糖肽合成酶模块, 具有 1 个杂环化、1 个酰基酸化、1 个可能的氧化酶和 1 个硫化 (肽酰载体蛋白) 结构域。EPOSP 模块包含一个经修饰的缩合结构域 (即所谓的杂环化结构域) 这个域涉及到 5 元噻唑杂环的形成。

据推测 EPOSP 通过酰基酸化活化 cys, 并结合活化的 cys 形成氨酰-S-PCP, 通过酶上结合的 cys 与由 EPOSA 提供的乙酰-S-ACP 缩合, 并通过分子内环化脱水形成最初的噻唑环。

EPOSP 中酰基酸化核心序列间嵌入 1 个特殊的结构域, 这个结构域与 NAD(P)H 氧化酶和还原酶有相似性, 这个特殊的结构可能参与将起初的 2-甲基二氢噻唑环氧化成 2-甲基噻唑。

**3.3 链的延伸和转移 (KS 域)** PKS 和 NRPS 的延伸策略相同, 延长的链以酰基-S-酶的形式结合在 ACP/PCP 域的上游作为亲电体并被下游模块的亲核体所攻击, 从而迫使链作定向转移。在 PKS 中, 多聚酮酰基连从 ACP 转移到下游模块的 KS 域的 cys 活性位点上, 与此同时通过脱羧酰化作用链与丙二酰-S-ACP 缩合形成  $\beta$ -酮脂酰-S-ACP。通过类似的途径, NRPS 上的肽酰-S-PCP<sub>n-1</sub> 被下游的氨酰-S-PCP<sub>n</sub> 上的氨基所攻击产生典型的肽键。此外, PKS 中的 KS-ACP 域成对的存在于每个模块中, 这两个结构域之间还可能存在着酮基还原、脱氢和双键还原修饰域, 它们决定了最终产物的氧化态。同样, NRPS 的 C-PCP 核心结构域周围也有一个或多个修饰结构域。因而链经修饰后再转移到下一轮的延伸中。

埃博霉素形成 EPOSP 后, 2-甲基噻唑环起始单元定向转移到 pks 的 EPOSB 上 (由 epoB 编码), 有待进一步延长。epothilone 生物合成顺序与其编码 pks 的基因簇模块顺序相一致。经 EPOSB (1 个模块), EPOSC (4 个模块), EPOSD (2 个模块) 和 EPOSE (1 个模块) 催化 8 个羧酸单位的结合并经适当的修饰产生 EPOTHILONES 的碳框架。

EPOS 中的 KSs 一致性在 42% ~ 85% 之间。模块 2 ~ 8 中的 KSs 有着共同的高度保守的 DtaCSSsL 模块 (小写字母目标是非很保守的氨基酸) 在半胱氨酸活性位点的附近。模块 I 中的 ks 有轻微的差异是 QTACSTSL, 并且这个 ks 与数据库中的整个 ks 相

似性极低不超过 48%，且与其他 EPOS 中的 KSs 相似性也仅为 42% ~ 48%。这个差异说明了这样一个事实：在接受了来自 NRPS 的 PCP 结构域的前体底物模块 I 中的 KS 催化 2-甲基-4-羧基噻唑和一个甲基-丙二酰基的缩合。

**3.4 链的终止与释放** 当 PK 或 NRP 酰基连延伸循环到最下游的 ACP/PCP 域使全长的酰基链将被释放而出现终止，并再生出完整的酶复合物重复使用。最终的酰基-S-ACP/PCP 链从各自的合成酶上释放有两条途径：一种是水对链进行攻击，发生分子间的缩合最终链被水解释放；另一种是被酰基链自身的羟基或氨基所俘获发生分子内的缩合产生内酯或环肽。多功能酶复合体中催化连终止的酶单元是位于酶的羧基末端  $25 \times 10^3 \sim 35 \times 10^3$  的多肽片断，此片断命名为硫酯酶结构域 (TE)。TE 中有一个 Ser 活性位点，酰基链从最后一个 ACP/PCP 位点转移到 Ser 位点产生过渡中间体 acyl-o-TE。这个酰基-酶共价体经水接或环化作用而解离下来，发生哪种作用取决于进攻分子的亲核特性<sup>[12]</sup>。

催化 Epothilone PKS 链的终止的 TE 酶连结在模块 8 (EPOSE) 的碳末端。其催化作用属于第二种，在酶的催化下通过聚酮链的羟基进行分子内的俘获产生 16 元大环内酯类的化合物并得以释放。

**3.5 终产物的修饰** 一旦成熟的多聚酮或多肽链从泛酰辅基上释放后，随后需经过辅助酶的进一步修饰。这种晚期的修饰可赋予终产物生物学活性。这种修饰酶大多数有自身的合成途径，其编码基因位于 PKSs 和 NRPSs 基因簇的附近，主要有：羟化酶、糖基转移酶、甲基转移酶。

epoF 位于 epoE 的碳末端。经间隔序列分析表明其间没有转录终止子，说明 epoF 和 epoE 基因是共转录的。其编码的产物辅助修饰酶 EPOSF 是一个由 420 个氨基酸组成的蛋白，与细胞色素 P450 氧化酶具有很高的相似性，其可能参与 Epothilone 在 C12 ~ C13 之间环氧键的形成。

此外，据同源性分析表明位于 PKSs 基因簇附近的 orf3 和 orf14 (如图 4 所示) 可能参与次级代谢产物 Epothilone 的胞外分泌。

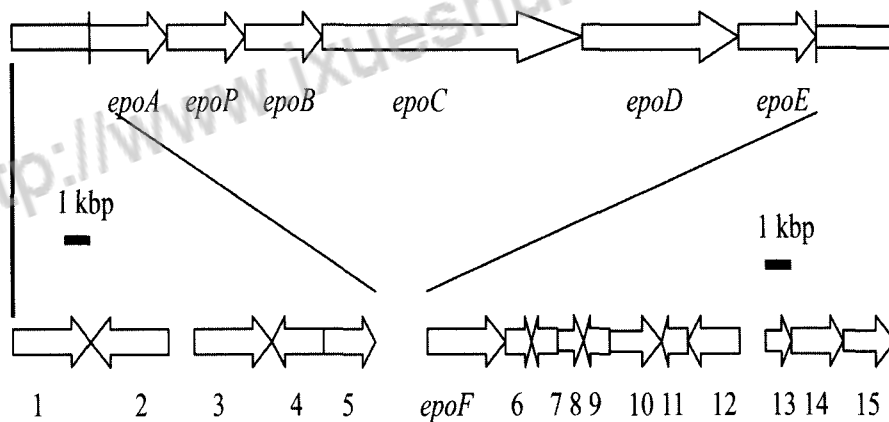


图 4 埃博霉素生物合成 PKSs 基因簇的开放阅读框结构

#### 4 埃博霉素组合生物合成的研究前景

埃博霉素的全基因簇已经测序，并已建立了埃博霉素生物合成基因簇的模型<sup>[13]</sup>。同时发现埃博霉素的发酵产物，除了 Epothilones A 和 B 外，还分离得到了 37 种天然埃博霉素的同系物，其中以 Epothilone C 和 Epothilone D 产量最高达  $3 \sim 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，其余大多数埃博霉素同系物产量仅为  $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这些同系物的发现为埃博霉素的组合生物合成研究的开展提供了良好的证据。

利用埃博霉素类化合物模块结构的特点可对其进行生物化学组合合成<sup>[14]</sup>，另外研究人员已经搞清

楚了埃博霉素的生物合成途径，知道了相应的酶和底物，因此可以通过重组基因的技术克隆这些酶或改造这些酶，从而使埃博霉素的结构按人们的意志得到改造。埃博霉素合成酶是一个大的多功能酶，由独立活化位置的各种催化单元装配而成，因此改变酶中的功能区即可影响到生成的埃博霉素的结构就可以人为的生成很多新的结构类型，结合把这些功能区的顺序打乱然后重新组合起来的办法，就可产生一个超级结构多样性的埃博霉素分子库。

利用生物组合合成技术可在 4 个层次上对埃博霉素产物链进行改造：① 链长，这个要取决于多聚

酮合成酶模块的数量。②链的引发和延伸过程中所选择的底物,这是由酰基转移酶的结构域所控制。③终产物上某个缩合单元上酮基的还原程度(其在一定程度上受每个模块内在化学组成的限制,如酮还原后才能出现脱水,脱水后才能发生烯酯酰还原)这由每个模块中一些修饰酶结构域活性的有无所决定。④产物中心携带的基团,这是由产生立体中心取代基的酶所控制。同样,对非核糖体肽来说模块的数量、类型、每个氨基酸的构型以及每个模块对链的修饰(如N-甲基化、异构化、环化)4个方面是可以改造的。理论上通过改变以上4个因素,可组合出非常多的产物,组合新产物的潜能主要取决于每个模块的分子识别能力以及遗传操作工具的优化。

组合新产物很大程度上受限于下游模块对上游加工改造的模块的识别接受能力。目前对影响链转移的因素知道的很少,可能存在两种模式:一种是主要决定于蛋白和蛋白之间的识别,这属于非选择性的将延伸链从供体模块上转移到下游;与此相对应的另一种模式是分子和蛋白之间的识别,受体模块积极的识别天然底物的专一性结构而在一定程度上排斥加工修饰的类似物。

事实上,每个模块对功能缺失、功能改变以及新功能的加入有一定的接受能力。因而探索组合产物最主要的还取决于发展一种高效灵活的遗传学技术来快速、方便和大通量的操纵埃博霉素基因簇。目前有两种常用策略:一个是同源重组,可取代或缺失产生菌中的基因片断(可以是单个碱基对也可以是整个模块),此策略的缺点是黏细菌生长缓慢且对其遗传操作系统的背景知识了解很少,因而技术操作繁琐困难;另一策略是利用替代宿主的方法,合成PKS和NRPS的微生物主要有G<sup>-</sup>细菌、G<sup>+</sup>细菌以及丝状真菌。因而可将基因转到细菌真菌等遗传操作背景很清楚的菌株里,但同样有许多待解决的问题诸如:启动子兼容性和密码子使用的不同;埃博霉素基因簇不便于遗传学操作;翻译的酰基载体蛋白需经翻译后加上辅基才能运行;此外埃博霉素生物合成前体中包括一些不常见的底物如甲基丙二酰-CoA,而这些底物并不是每个生物中都能合成的;最后整个生物合成过程所涉及的酶也并不是每个生物中都有的。但理论上这些问题随着分子生物学的发展同时辅助化学方法得以解决。目前利用链霉菌、黏细菌、大肠杆菌作为宿主系统对埃博霉素的基因

簇异源表达已经成功,这为埃博霉素的组合生物合成奠定了坚实的基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] REICHENBACH H, HÖFLE G. Discovery and development of the epothilones; a novel class of antineoplastic drugs[J]. *Drugs R D*, 2008, 9(1): 1-10.
- [2] HUNT JT. Discovery of ixabepilone[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(2): 275-281.
- [3] VILLANUEVA C, VUILLEMIN AT, DEMARCHI M, et al. Ixabepilone: a new active chemotherapy in the treatment of breast cancer[J]. *Womens Health (Lond Engl)*, 2009, 5(2): 115-121.
- [4] LARKIN JM, KAYE SB. Epothilones in the treatment of cancer[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2006, 15(6): 691-702.
- [5] LEE JJ, KELLY WK. Epothilones; tubulin polymerization as a novel target for prostate cancer therapy[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2009, 6(2): 85-92.
- [6] MUTKA SC, CARNEY JR, LIU YQ, et al. Heterologous production of epothilone C and D in escherichia coli[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(4): 1321-1330.
- [7] MÜLLER R. Biosynthesis and heterologous production of epothilones[J]. *Fortschr Chem Org Naturst*, 2009, 90: 29-53.
- [8] GONG GL, SUN X, LIU XL, et al. Mutation and a high-throughput screening method for improving the production of Epothilones of *Sorangium* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34(9): 615-623.
- [9] WANG J, ZHANG H, YING L, et al. Five new epothilone metabolites from *Sorangium cellulorum* strain So0157-2[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2009. [Epub ahead of print].
- [10] TANG L, SHAH S, CHUNG L, et al. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster[J]. *Science*, 2000, 287(5453): 640-642.
- [11] ALTMANN KH, MEMMERT K. Epothilones as lead structures for new anticancer drugs pharmacology, fermentation, and structure-activity-relationships[J]. *Prog Drug Res*, 2008, 66(1): 273, 275-334.
- [12] ZIRKLE R, LIGON JM, MOLNÁR I. Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of *Sorangium cellulorum* So ce 26 in *Streptomyces lividans* [J]. *Microbiology*, 2004, 150(8): 2761-2774.
- [13] BODE BH, MÜLLER R. Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(7): 577-588.
- [14] ADRIOL JL, DEMAİN AL. Genetic improvement of processes yielding microbial products[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(2): 187-214.

编辑:王宇梅/接受日期:2009-06-22