特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-094

羟基萜烯合酶：催化机制、蛋白质工程与合成生物学应用

高天平，黄政瑜，李春秀，许建和
（华东理工大学生物反应器工程全国重点实验室，上海 200237）

摘要：萜醇类化合物因羟基的引入而改善亲水性、反应活性和生物活性，是医药、香料和精细化工领域的重要产品。然而，化学合成法步骤繁琐、选择性低、三废多；自然界通常采用由烃类萜烯合酶（HFTS）环化产烃再由细胞色素P450羟化的两步策略，但受到P450异源表达困难、依赖NAD(P)H-还原酶电子链等限制。羟基萜烯合酶（HTS）并非独立于萜烯合酶（TS）之外的新酶类，而是TS超家族中以有序水分子淬灭碳正离子、替代传统脱质子终止的变异型，可在单一活性位点将环化与羟化相偶联，一步产醇、无需NAD(P)H等氧化还原辅因子，为萜醇合成提供了一条更简洁的路径。本文首先阐述了HTS与HFTS在碳正离子终止方式上的本质区别，进而将HTS分为单羟基萜烯合酶（MHTS）和双羟基萜烯合酶（DHTS）两个亚类并比较其机制差异；随后综述了DHTS和MHTS的代表性酶学研究，归纳了HFTS向HTS转化的四类分子策略；最后讨论了HTS在萜醇细胞工厂构建中的应用前景及当前面临的催化效率低等问题。展望未来，随着基因组挖掘、结构生物学与人工智能辅助蛋白质设计的深度融合，有望在原子水平揭示水分子的时空组织机制，破解羟化功能与催化效率间的权衡，并通过酶、途径、底盘与工艺的协同优化，推动HTS在萜醇绿色生物制造中的产业化应用。

关键词：萜烯合酶；羟基化；碳正离子；水分子淬灭；蛋白质工程；萜醇；细胞工厂

中图分类号：Q819 **文献标志码：**A

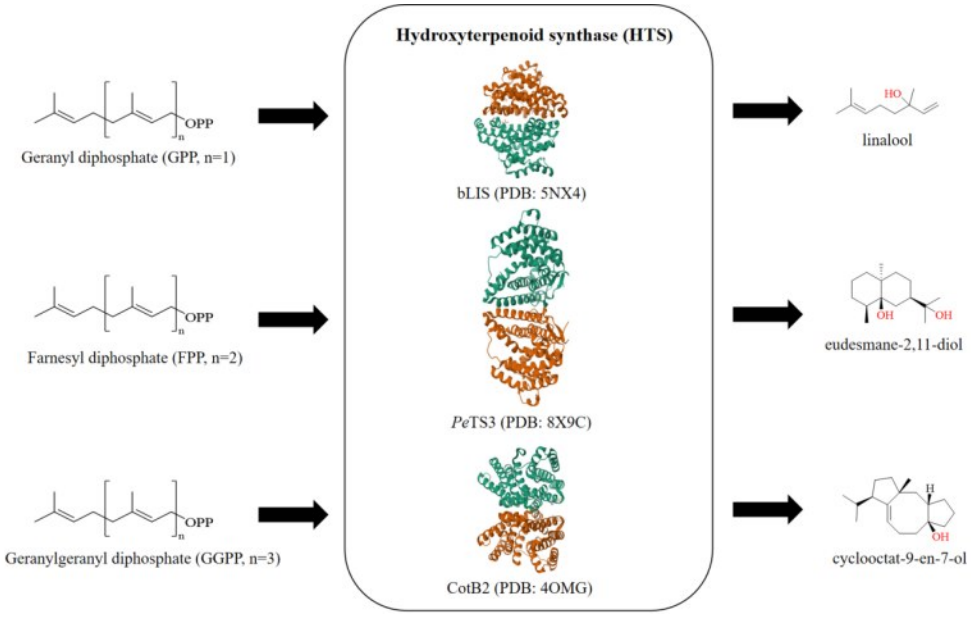
Hydroxyterpenoid synthases：catalytic mechanism，protein engineering，and synthetic biology applications

GAO Tianping，HUANG Zhengyu，LI Chunxiu，XU Jianhe
（*State Key Laboratory of Bioreactor Engineering*， *East China University of Science and Technology*， *Shanghai 200237*， *China*）

Abstract: Terpenols exhibit improved hydrophilicity, reactivity, and biological activity owing to the introduction of hydroxyl groups. They are therefore valuable products widely applied in pharmaceuticals, flavors and fragrances, and fine chemicals. However, their chemical synthesis involves cumbersome procedures and low selectivity. It also generates large amounts of waste, including waste gas, wastewater, and solid residue. Nature provides an alternative biosynthetic route via a two-step catalytic strategy. Hydrocarbon-forming terpene synthases (HFTSs) first cyclize the

收稿日期：2026-09-01 修回日期：2026-11-05
基金项目：国家自然科学基金（22478116）
引用本文：高天平，黄政瑜，李春秀，许建和. 羟基萜烯合酶:催化机制、蛋白质工程与合成生物学应用[J]. 合成生物学，2026，7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-094
Citation：GAO Tianping，HUANG Zhengyu，LI Chunxiu，XU Jianhe. Hydroxyterpenoid synthases：catalytic mechanism，protein engineering，and synthetic biology applications[J]. Synthetic Biology Journal，2026，7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-094

precursor to yield terpene hydrocarbons. These hydrocarbon products are then hydroxylated by cytochrome P450 enzymes. This biosynthetic route still faces substantial practical limitations. Heterologous expression of P450s remains difficult, and these enzymes critically depend on an NAD(P)H-dependent reductase electron-transfer chain. Hydroxyterpenoid synthases (HTSs) are not a new class of enzymes independent of terpenoid synthases (TSs). Instead, they are variants within the TS superfamily. They quench carbocation intermediates with ordered water molecules rather than adopting the conventional deprotonation termination pathway. These enzymes couple "cyclization" with "hydroxylation" within a single active site. They produce terpenols in one step and do not require redox cofactors such as NAD(P)H. This feature offers a more streamlined and favorable route for terpenol production. This review first elaborates on the fundamental distinction between HTSs and HFTSs in carbocation termination modes. It further divides HTSs into two subclasses: monohydroxy terpenoid synthases (MHTSs) and dihydroxy terpenoid synthases (DHTSs). The mechanistic differences between these two subclasses are systematically compared. Subsequently, this work reviews representative enzymatic studies on DHTSs and MHTSs. It also summarizes four categories of molecular strategies for converting native HFTSs into functional HTSs. Finally, we discuss the prospects of applying HTSs to the construction of efficient terpenol cell factories. Remaining practical challenges, such as insufficient catalytic efficiency, are also addressed. Looking forward, the integration of genome mining, structural biology, and artificial-intelligence-assisted protein design is expected to reveal the spatiotemporal organization of catalytic water molecules at the atomic level, resolve the trade-off between hydroxylation function and catalytic efficiency, and, through coordinated optimization of enzymes, pathways, chassis, and fermentation processes, accelerate the industrial application of HTSs in the green biomanufacturing of terpenols.



Keywords: terpenoid synthases; hydroxylation; carbocation; water quenching; protein engineering; terpenols; cell factories

萜类化合物在自然界中结构多样、分布广泛，目前已发现的萜类化合物超过10万种[1]。这类化合物以异戊二烯（isoprene，C_5H_8）为基本结构单元，根据分子中异戊二烯单元的数目可分为半萜（hemiterpene，C_5）、单萜（monoterpene，C_{10}）、倍半萜（sesquiterpene，C_{15}）、二萜（diterpene，

C_{20}）、二倍半萜（sesterterpene，C_{25}）、三萜（triterpene，C_{30}）、四萜（tetraterpene，C_{40}）和多萜（polyterpene）等不同类型[2]。萜类化合物在生物体内发挥着多种多样的生理功能，包括细胞膜成分（固醇类）[3-4]、光合色素（类胡萝卜素、叶绿素侧链）[5-8]、电子传递体（泛醌、质体醌）[9-10]、植物激素（赤霉素、脱落酸、油菜素内酯）[11-13]、防御化合物（植物抗毒素）以及信息素等[14]。

在种类繁多的萜类衍生物中，萜醇因其独特的理化性质和生物活性而占据重要地位。羟基的引入不仅能够提高化合物的水溶性，改善其药代动力学性质，还能够通过氢键增强其与生物大分子靶标结合的亲和力，因此许多临床药物属于萜醇及其衍生物。例如，二萜类化合物紫杉醇（paclitaxel）[15]对乳腺癌和卵巢癌具有良好疗效；倍半萜类化合物青蒿素（artemisinin）[16]及其衍生物用于治疗疟疾五环三萜皂苷类化合物如委陵菜来源的Poterinasides A-J[17]、藜麦三萜皂苷[18]、齐墩果酸（oleanolic acid）[19]等，具有抗炎、抗肿瘤、保肝等多种药理活性。在香料领域，单萜醇和倍半萜醇是天然香精的主要成分，包括薄荷醇（menthol）[20]、芳樟醇（linalool）[21]、香叶醇（geraniol）[22]、香茅醇（citronellol）[23]、龙脑（borneol）[24]、檀香醇（santalol）[25]、广藿香醇（patchoulol）[26]和红没药醇（bisabolol）[27]等数十种产品，广泛应用于食品、化妆品、日化和烟草行业[28-29]。

萜类化合物的生物合成起源于两个共同的C_5前体：异戊烯基焦磷酸（isopentenyl diphosphate，IPP）和二甲基烯丙基焦磷酸（dimethylallyl diphosphate，DMAPP）[30]。这两个前体的生物合成存在两条独立的途径：在大多数真核生物、古菌和部分原核生物中，甲羟戊酸（mevalonate，MVA）途径以乙酰辅酶A为原料合成IPP[31]；而在大多数细菌、蓝藻和植物质体中，2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸（2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate，MEP）途径以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸为原料合成IPP和DMAPP[32]。IPP在异戊烯基焦磷酸酯异构酶（isopentenyl diphosphate isomerase，IDI）的作用下可逆地转化为DMAPP[33]，二者在异戊烯基转移酶（prenyltransferase，PT）的催化下头尾缩合，生成不同链长的线性前体：香叶基焦磷酸（geranyl diphosphate，GPP，C_{10}前体）、法尼基焦磷酸（farnesyl diphosphate，FPP，C_{15}前体）、香叶基香叶基焦磷酸（geranylgeranyl diphosphate，GGPP，C_{20}前体）、香叶基法尼基焦磷酸（geranylfarnesyl diphosphate，GFPP，C_{25}前体）等[34-35]。

一分子DMAPP和不同个数IPP缩合生成寡聚异戊烯基焦磷酸[1]，该类底物在萜烯合酶（terpene synthase，缩写为TS）催化下启动多步级联碳正离子环化与骨架重排反应，产生结构多样的碳氢化合物（图1）。依据初始碳正离子的生成机制，萜烯合酶分为两大亚型：I型TS依靠保守的DDxxD与NSE/DTE金属结合基序螯合Mg^{2+}，形成三核镁离子簇结合底物的焦磷酸基团，该型TS通过解离底物焦磷酸基团产生烯丙基碳正离子；II型TS则以DxDD酸性基序作为质子供体，直接质子化烯烃双键启动环化级联反应[2]。

自然界还存在双功能萜烯合酶（Bifunctional Terpene Synthase）[1-2]，肽链同时融合I型与II型催化结构域，可串联两步环化反应。该类酶通常N端为含DxDD基序的II型结构域，先通过质子化机制将GGPP（或FPP）环化为焦磷酸酯化的三环中间体（如古巴基焦磷酸CPP）；随后中间体被转运至C端含DDxxD/NSE基序的I型结构域，经金属离子螯合解离焦磷酸基团，启动第二轮碳正离子级联环化与重排，最终生成复杂二萜（或倍半萜）母核。双功能TS在植物二萜生物合成中尤为普遍，典型代表如松香二烯合酶（abietadiene synthase）、左旋海松二烯合酶（levopimaradiene synthase）等；部分真菌二萜/倍半萜合酶亦采用类似的双结构域架构，是连接I型与II型催化逻辑的重要进化中间形态。

长期以来经典TS是萜类物质生物合成研究核心，但近年来大规模基因组挖掘工作揭示了部分与经典TS无同源性的萜烯环化酶。目前已表征的非经典萜环化酶包含UbiA型膜结合异戊烯基转移酶类环化酶、钒依赖卤过氧化物酶（Vanadium-dependent haloperoxidase，VHPO）家族环化酶、卤酸脱卤酶（Haloacid dehalogenase-like superfamily，HAD）超家族等[36-37]。

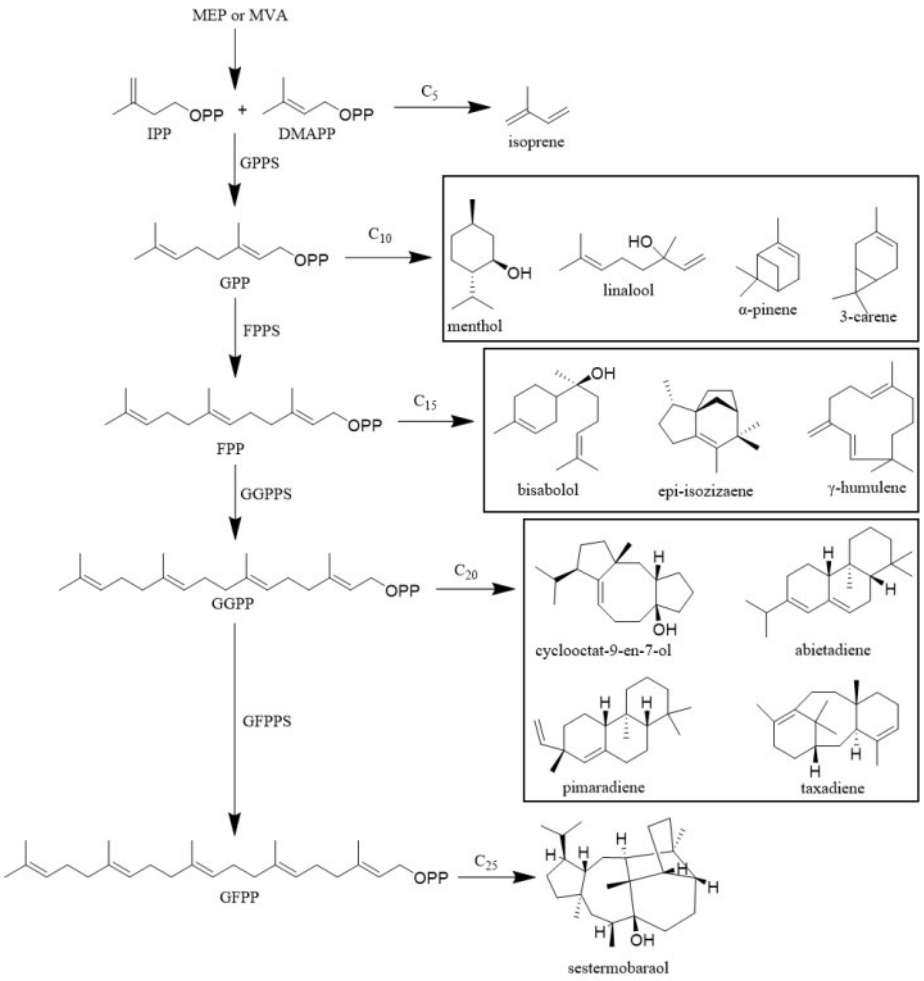


图1 不同萜类化合物的生物合成途径

Fig.1 Biosynthesis pathway of different terpenoids

1 萜醇的常规生产方法及其局限性

1.1 化学合成法

化学合成法是工业生产萜醇的传统方法，主要通过对人工提取的天然萜烯进行选择氧化来制备相应的萜醇。例如，工业上生产（-)-薄荷醇的经典路线就是以（+)-香茅醛（citronellal）为原料，经路易斯酸催化剂（如$ZnBr_2$）催化环化生成（-)-异胡薄荷醇（isopulegol），再经催化氢化[38-40]。再如化学法生产二羟基桉叶烷（dihydroxyeudesmane）[41]是以简单小分子为起始原料，先经脯氨醇催化的不对称Michael加成、Pd催化分子内Heck环化等多步C-C键构建反应组装得到桉叶烷双环母核dihydrojunenol；随后引入导向基团三氟乙基氨基甲酸酯调控底物反应活性，依次通过自由基C-H溴化-水解、三氟甲基双环氧乙烷（trifluoromethyl dioxirane，TFDO）介导的位点选择性叔碳C-H氧化分步引入两个羟基（图2a）。但化学氧化法存在以下缺点：首先是选择性问题[42]，萜类分子通常含有C-H键和C=C双键，化学氧化剂难以区分不同反应位点，导致多个位点氧化，生成混合产物，给分离纯化带来困难。其次是反应条件问题[43]，化学氧化通常需要高温、高压、强酸或强碱等苛刻条件，底物易分解或重排。第三是“三废”问题[44]，许多化学氧化剂含有重金属，反应后产生有毒有害的废弃物。

1.2 细胞色素P450单加氧酶介导的生物氧化

与化学氧化相比，生物催化法具有反应条件

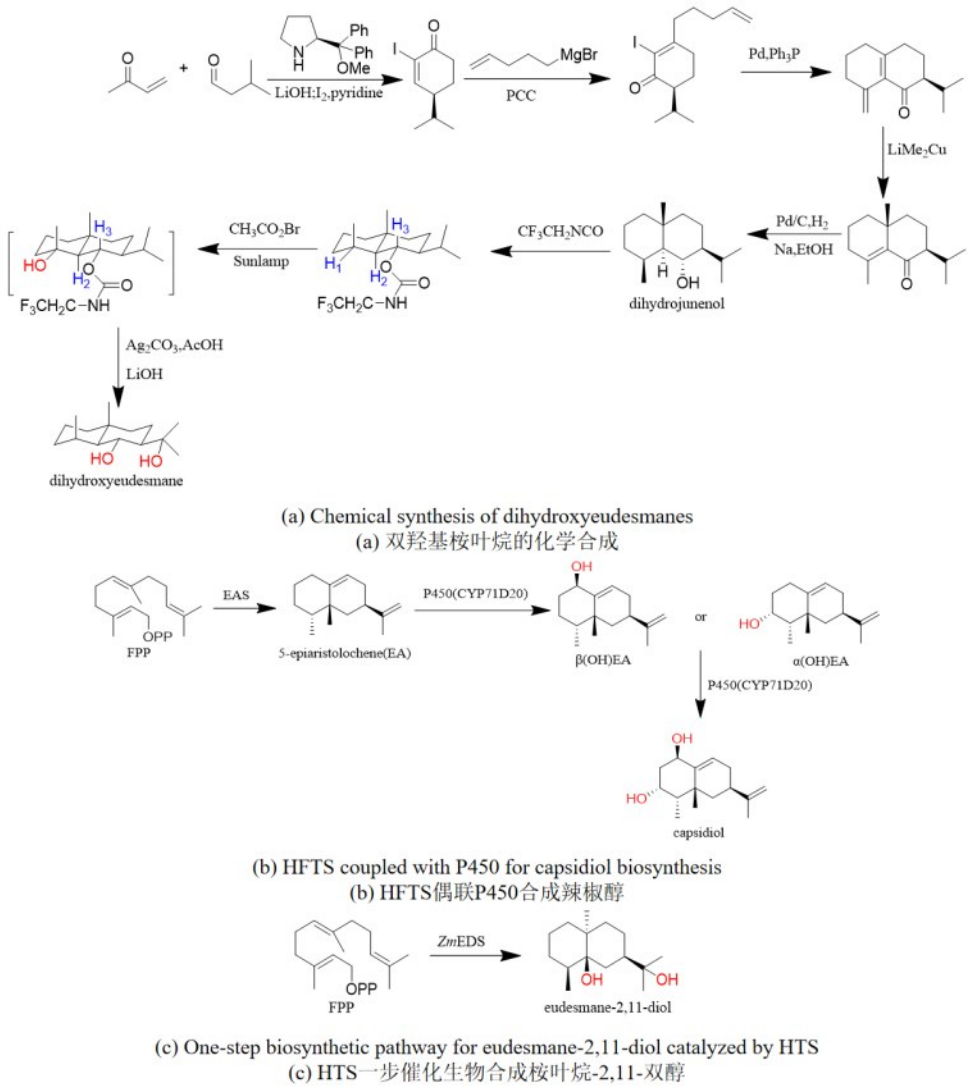


图 2　双羟基桉叶烷及其异构体的三条合成路径反应式对比（化学氧化法、P450 生物氧化法与 HTS 一锅多步级联法）

Fig.2　Comparison of three synthetic routes to dihydroxyeudesmane and its derivatives: chemical oxidation, P450-mediated biooxidation, and single HTS-catalyzed one-pot-but-multi-step synthesis

温和、选择性强、环境友好等优势，因此已成为萜醇合成研究的热点。在自然界中，萜醇的生物合成主要遵循烃类萜烯合酶（hydrocarbon-forming terpene synthase， HFTS）级联 P450 的两步策略。首先由 HFTS 催化线性前体环化生成萜烯骨架，随后由细胞色素 P450 单加氧酶（cytochrome P450，P450）催化惰性 C-H 键的选择加氧引入羟基[45]。P450 酶是一类含血红素辅基的氧化酶超家族[46-47]，以 NAD（P）H 作为电子供体，经过 CPR（Cytochrome P450 reductase）等氧化还原伴侣传递电子至血红素铁辅基[48]，其催化循环是一套分步电子传递与氧活化耦合的复杂过程[45-46，48]。

在萜类生物合成中[49]，P450 酶主要负责后修饰氧化步骤。例如辣椒醇（capsidiol）的生产[50-51]，底物 FPP 在 *epi*- 马兜铃烯合酶（epiaristolochene synthase， EAS）中生成 5-*epi*- 马兜铃烯（5-*epi*-EA），接着 CYP71D20 将其初次羟化生成单羟基产物 β（OH）EA 或 α（OH）EA，接着 CYP71D20 将单羟基产物再次羟化生成双羟化产物辣椒醇（图 2b）。再如，紫杉醇[47，52-54] 的生物合成也涉及多个 P450 酶，参与羟基化、环氧化、氧杂环丁烷形成以及氧化重排等步骤；又如青蒿素[55-57] 生物合成中的 CYP71AV1 能够连续催化紫穗槐 -4，11- 二烯（amorpha-4，11-diene）在 C12 位的三步氧化，生成

青蒿酸（artemisinic acid）途径中的醇、醛和酸。

尽管P450酶在天然产物合成中发挥着重要作用，但将其应用于萜醇异源合成仍面临挑战。首先是蛋白表达问题[58]，真核生物来源的P450大多是膜结合蛋白，通过*N*端疏水跨膜结构域定位于内质网膜表面。大肠杆菌等原核宿主缺乏内膜系统，膜结合的P450需经过基因修饰才能表达，表达时也容易形成包涵体[59]。即使在酵母等真核宿主中表达[60-61]，P450的表达水平也往往成为瓶颈，通常需共表达分子伴侣以促进蛋白折叠。其次是电子传递问题，P450催化反应需要NAD(P)H作为氧化还原辅因子提供还原力[62]，经由还原伴侣蛋白（如真核生物的细胞色素P450还原酶CPR，含FAD和FMN辅基）将电子传递到血红素铁中心。在异源宿主中重建高效的电子传递链并不容易，P450与CPR之间的不匹配往往导致电子泄漏和活性氧物种的产生[63]，不仅降低催化效率，还会对宿主细胞造成氧化损伤。第三是选择性问题[64]，尽管天然P450在其原生宿主中通常具有较好的选择性，但在异源环境中，由于底物浓度、膜环境和辅助蛋白的改变，P450产物选择性往往下降，同时产生多个羟化副产物。

综上所述，化学氧化法和P450生物氧化法在萜醇合成中均存在固有局限。表1进一步从反应流程、辅因子需求、遗传元件与底盘适配角度对比三种萜醇制备策略。需要特别说明，P450介导的萜醇合成属于HFTS-P450-CPR构成的多酶级联系统，而下文即将介绍的羟基萜烯合酶（hydroxyterpenoid synthase，HTS）依靠单一TPS分子完成环化和羟基化，二者不属于同一层级的催化单元，表格仅做工程应用层面的横向对比。图2围绕双羟基桉叶烷及其异构体进行了化学氧化法、P450生物氧化法与HTS单酶多步催化法三种合成路径的对比，可以得出HTS具有缩短产物合成路径的潜在优势。

2 羟基萜烯合酶的发现、定义与分类

2.1 HTS的发现

近年来，随着基因组挖掘和酶学研究的深入，一类特殊的萜烯合酶逐渐引起关注。这类酶不依赖P450等后修饰酶，而是能够以单一酶连续完成环化和羟化级联反应，从线性焦磷酸前体生成萜醇产物。这类酶被命名为羟基萜烯合酶（HTS）[65]。

HTS的发现拓展了人们对萜烯合酶催化功能的认识。其机制研究表明，I类萜烯合酶的活性位点可通过少数关键残基的改变来组织和利用水分子，影响产物以萜烯为主或是以萜醇为主，从而重塑产物选择性[66-67]。与P450路径相比，HTS酶法工艺具有反应步骤少、遗传元件简单等特点，在萜醇的合成生物学研究中具有广阔的应用前景。

2.2 HTS与HFTS的本质区别：碳正离子终止方式的分化

HTS与HFTS都属于I类萜烯合酶，具有典型的α螺旋催化折叠和保守的DDxxD和NSE/DTE金属结合基序，这些基序共同配位三个Mg^{2+}并触发

表1 化学氧化法、P450生物加氧法与HTS一锅多步法生产萜醇的比较

Table 1 Comparison of chemical oxidation, P450 bio-oxygenation and HTS one-pot-but-multi-step synthesis for terpenol production

比较维度	化学氧化法	P450生物加氧法	HTS一锅多步级联法
反应过程与步骤	多步化学反应，需保护/脱保护	两步酶促：1.HFTS环化生成萜烃；2.P450-CRR系统实现C-H羟基化；需要多蛋白协同	单酶分子内耦合级联：一个蛋白内部完成环化和水介导羟基化，仅需一次基因表达
辅因子/试剂需求	化学氧化剂（重金属氧化剂等）	NAD(P)H氧化还原辅因子	金属离子Mg^{2+}
环境影响	重金属污染、废物多	绿色	绿色
遗传元件数	不涉及	2–3个（HFTS基因 + P450基因+CPR还原伴侣基因）	1个（仅HTS编码基因）
底盘适配性	不涉及	较差，需重建完整电子传递链，P450膜蛋白折叠难度较高	较好，仅需萜类前体供应，无需氧化还原伴侣重构

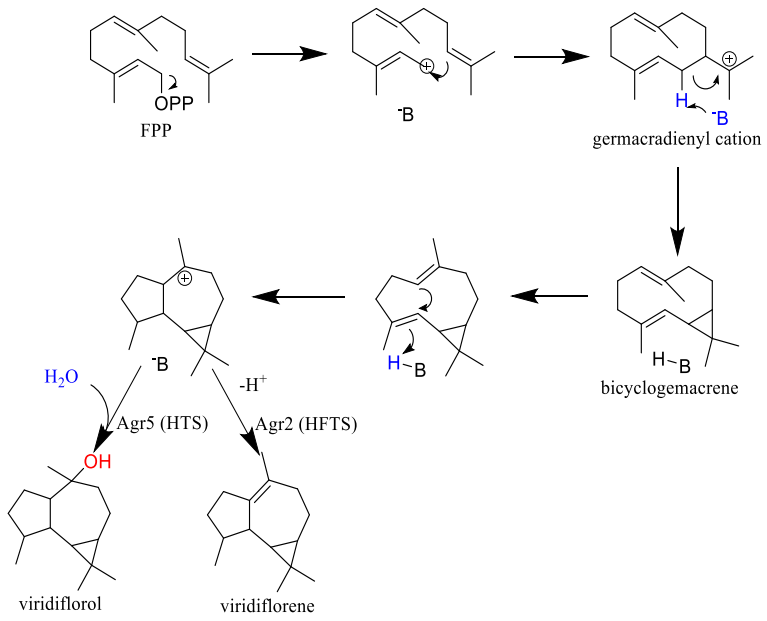


图 3　HFTS 与 HTS 的碳正离子终止机制比较

Fig.3　Comparison of carbocation termination mechanisms between HFTS and HTS

底物焦磷酸离去与碳正离子级联反应[68-69]。两者的核心区别在于碳正离子中间体的终止方式。如图 3 所示[70-71]，HFTS Agr2 和与 HTS Agr5 共享相同的碳正离子级联上游，中间体双环吉马烯（bicyclogermacrene）的 C2=C3 与 C6=C7 发生电子重排后 C2 与 C6 成键，同时在 C7 形成叔碳正离子。HTS Agr5 和 HFTS Agr2 产物分支仅发生在反应终点，若 C7 位正电荷被水分子捕获，则形成羟基得到 Agr5 的萜醇绿花白千层醇（viridiflorol），若 C7 位去质子则得到 Agr2 的萜烯绿花白千层烯（viridiflorene）。水捕获与脱质子化是一对彼此竞争的终止途径，二者的相对速率由活性口袋内水分子的可及性、氢键网络稳定性以及附近碱性/芳香残基的排布共同决定。当活性位点在碳正离子附近组织有可及的有序水分子时，水进攻并淬灭碳正离子而生成萜醇；若缺乏定位合适的水分子，碳正离子则发生脱质子化生成萜烯。

HTS 的羟化活性并非通过获得新的蛋白质结构域或催化残基实现[67]，而是通过活性中心内少数几个关键残基的协同作用，创造出能够结合和组织水分子的微环境。这些关键残基通常通过氢键网络将水分子锚定在碳正离子中间体附近的特定位置和取向上[65]，使其在适当的时机发动亲核进攻反应。这种调控方式表明，从 HFTS 到 HTS 的功能升级可通过少数残基的突变完成[69]，这为通过蛋白质工程将 HFTS 改造为 HTS 提供了理论依据。

2.3　MHTS 与 DHTS：HTS 内部的功能细分

根据催化过程中水分子捕获碳正离子的次数，HTS 可进一步细分为单羟基萜烯合酶（monohydroxyterpene synthase，MHTS）和双羟基萜烯合酶（dihydroxyterpene synthase，DHTS）。MHTS 在反应过程中仅发生一次水分子捕获，碳正离子被水淬灭后反应直接终止，反应位点生成羟基。但部分酶中羟基也可能借由分子内双键环化脱水而形成环醚，如 1，8-桉叶素（1，8-cineole），也可当作 MHTS 的亚类。而 DHTS 能发生二次水捕获，具有独特的再质子化后二次环化的机制，在单羟基中间体形成后启动碳正离子的级联反应，生成双醇产物。图 4 中的 MHTS HcS[72] 只发生一次水捕获得到终产物 hedycaryol；而 DHTS *Pe*TS3 中[65]，Tyr312 将 hedycaryol 再质子化，引发 C2－C7 二次环化形成桉叶烷双环碳正离子，继而经一次 1，2-氢转移将正电荷导向 C2，第二分子水进攻 C2，生成 eudesmane-2，11-diol。

综上，HTS 是I类萜烯合酶中以有序水分子淬灭碳正离子、替代传统脱质子终止的功能类型。

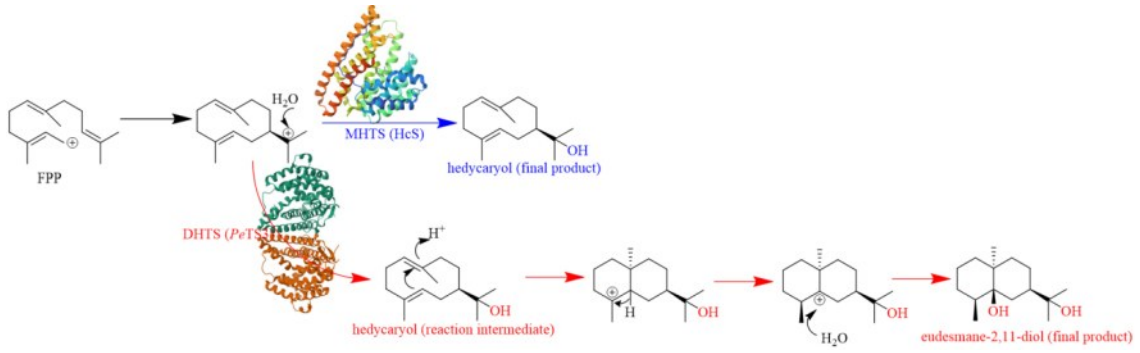


图4 MHTS与DHTS的催化机制比较（PDB编号：*Pe*TS3 apo态8X9C、复合态9KQW； HcS 4MC3）

Fig.4 Comparison of catalytic mechanisms between MHTS and DHTS (PDB ID: PeTS3 apo 8X9C and Mg^{2+}-PPi-BTAC complex 9KQW; HcS 4MC3)

依据水淬灭次数可分为MHTS（一次水淬灭）与DHTS（两次水淬灭）。该分类揭示水网络组织能力是HTS功能分化的核心，但目前受限于已表征的酶数量少、环醚与单醇终产物并不完全对应、且缺乏统一结构判据，分类体系仍有待进一步完善。MHTS目前发现较多且不少已经投入工业生产，但DHTS数量较少，迄今为止总共只发现五个，数量非常有限，其催化机制将在下文具体介绍。

3 双羟基萜烯合酶的研究进展

3.1 *Zm*EDS：首个植物源DHTS

2018年，Liang等[73]从*Zea mays*（玉米）中鉴定了首个双羟基萜烯合酶*Zm*EDS，这一发现正式确立了DHTS作为一类新型萜烯合酶的地位。*Zm*EDS以FPP为底物，催化生成的产物混合物中主产物为桉叶烷-2,11-二醇，同时伴生2-*epi*-α-桉叶醇、β-桉叶醇等单羟基倍半萜，以及2,3-*epi*-柳杉二醇、3-*epi*-柳杉二醇等二醇异构体。

为了阐明其催化机制，研究者进行了氘代水同位素标记实验，结果显示产物中的非交换性质子整合于C6位，这一结果支持了“环化-第一次水淬灭-hedycaryol中间体再质子化-第二次环化-第二次水淬灭”的复杂反应路径。如图5a所示，*Zm*EDS的完整碳正离子级联为FPP先解离焦磷酸并经C1-C10成键环化形成十元环吉马二烯基（germacradienyl）碳正离子，第一分子水随即进攻C11位三级碳正离子，淬灭生成单醇hedycaryol，随后hedycaryol的双键被活性位点残基再质子化并引发跨环环化，构建桉叶烷骨架，新生碳正离子经进一步重排迁移至C2位后被第二分子水淬灭，最终生成桉叶烷-2,11-二醇。

基于同源建模和定点突变研究，发现Phe303是双羟基化所必需的关键残基。当Phe303突变为Ala时，突变体几乎不能合成双羟基产物，主要积累单醇中间体hedycaryol，表明该突变阻断了再质子化和第二次环化步骤。尽管*Zm*EDS的发现具有里程碑意义，但该研究主要依赖同源建模和点突变表型分析，并未获得蛋白质晶体结构，关键残基的具体作用方式和水分子的精确位置仍属推测。而DHTS的首个晶体结构结晶解析以及关键残基与水分子的精细相互作用机制可以从下文3.3节介绍的*Pe*TS3中得到较为全面的认识。

3.2 *Tw*CS：产物分布比较专一的植物DHTS

2018年，Gao和Tong等[74]从药用植物雷公藤（*Tripterygium wilfordii*）中克隆并鉴定了*Tw*CS，这是第二个植物源的DHTS。*Tw*CS的催化产物以柳杉二醇（cryptomeridiol）为主，仅伴随少量的γ-桉叶醇和α-桉叶醇等单羟基副产物。*Tw*CS含有典型的I类TS保守元件，包括DDxxD、RRx8W和NSE/DTE。Arg268和Arg270通过氢键和盐桥作用与底物的焦磷酸基团相互作用，突变后酶活性几乎完全丧失。Trp277和Asp529则参与碳正离子的稳定和环化过程的调控。从图5b可以看出，*Tw*CS级联次序与*Zm*EDS明显不同。底物FPP离子化后

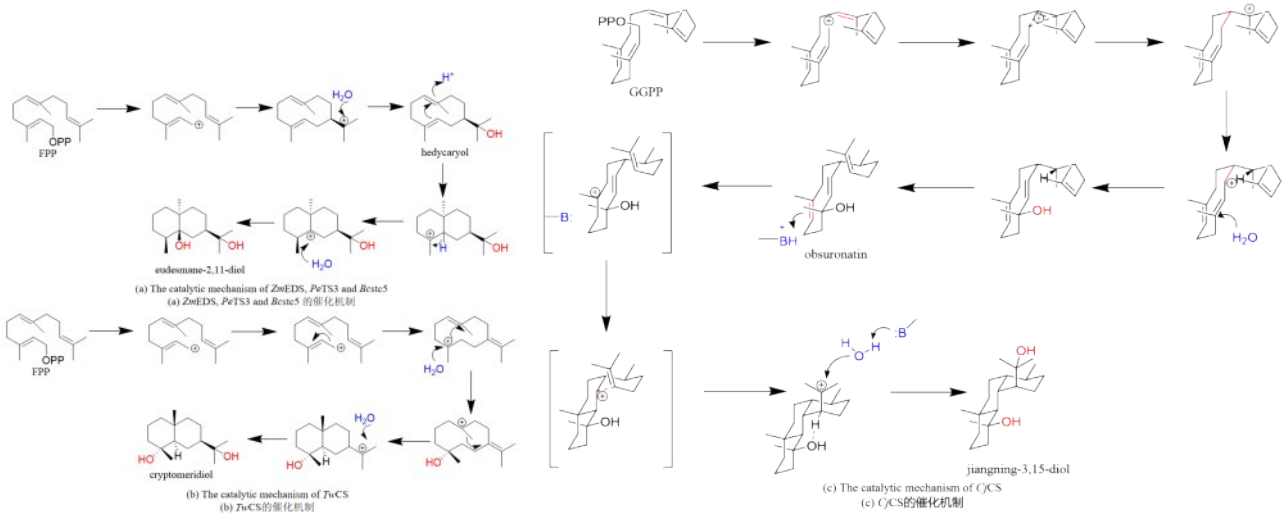


图 5　迄今已鉴定的双羟基萜烯合酶（DHTS）催化机制

Fig.5　Catalytic mechanisms of identified dihydroxyterpenoid synthases (DHTS) identified so far

先经连续环化形成十氢萘碳正离子，第一分子水在 C4 位进攻淬灭、引入 C4 羟基，此后残余双键继续参与环化并将正电荷导向 C11 位三级碳，第二分子水进攻 C11，最终生成柳杉二醇；该路径不经过 hedycaryol 中间体，两次水淬灭的位点与先后次序（先 C4 后 C11）也与 *Zm*EDS（先 C11、再于 C2 淬灭）形成鲜明对照。

为了评估 *Tw*CS 在合成生物学中的应用潜力，研究者进一步在酿酒酵母中构建了柳杉二醇的生物合成途径。通过过表达 tHMG1、IDI 和 ERG20 以增强前体 FPP 的供应，并利用 CRISPR-Cas9 技术下调 *erg*9 和敲除 rox1，最终在摇瓶培养中实现了 19.7 mg/L 的柳杉二醇产量。虽然这一产量距离工业化应用还有较大差距，但证明了利用单一 DHTS 在微生物中从头生物合成双羟基倍半萜的可行性。当然，*Tw*CS 的研究也具有与 *Zm*EDS 相似的局限性，即没有解析 DHTS 的蛋白晶体结构，导致双羟化过程中水分子的精确位置和质子传递路径缺乏直接的结构证据。同时 *Tw*CS 没有进行同位素标记实验，催化机制的推测主要基于序列分析和分子对接的结果，有待进一步验证。

3.3　*Cj*CS：首个细菌源二萜 DHTS

2025 年，Tabekoueng 和 Dickschat 等 [75] 从江宁噬几丁质菌 *Chitinophaga jiangningensis* 基因组中鉴定了 *Cj*CS，这是首次发现的催化形成双羟化二萜的细菌源 DHTS，从而将 DHTS 的底物范围从倍半萜拓展到了二萜。*Cj*CS 以 GGPP 为专一性底物，催化生成两类产物，一个化合物 obscuronatin 和一个新型的三环二萜二醇江宁-3，15-二醇（jiangning-3，15-diol）。序列分析显示 *Cj*CS 含有 I 类 TPS 典型的保守元件，包括 DDDLD 基序、NSE 三价金属结合基序、焦磷酸传感器 Arg179 和 RY 基序。

为了阐明其催化机制，研究者借助位置特异性 ^{13}C 标记前体，结合 ^{13}C NMR 追踪碳骨架的成键与重排，并利用立体选择性氘代试剂经化学关联确定产物的绝对构型，同时辅以密度泛函理论计算。反应从 GGPP 的 1，10-环化开始，第一分子水在多环碳正离子的 C3 位进攻淬灭，生成单羟基二萜 obscuronatin。随后酸性残基（BH^+）对 obscuronatin 的双键再质子化使得 C6 位形成碳正离子，引发第二次环化形成三环骨架，第二分子水在碱性残基（:B）的辅助下去质子化并进攻 C15，最终生成江宁-3，15-二醇（图 5c）。

DFT 计算显示，整个环化过程能垒较低且反应显著放热，证实了 DHTS 的通用机制。但该研究没有进行定点突变实验，参与水结合和质子传递的关键氨基酸残基未知。同时并未进行蛋白质结构建模或晶体学研究，酶的结构与催化选择性的关系尚不明确。而该部分 DHTS 缺失的内容可以从下述的 *Pe*TS3 的研究中得到。

3.4 *Pe*TS3：首个真菌源倍半萜DHTS

2025年，本实验室Huang和Li等[65]报道了来自扩展青霉（*Penicillium expansum*）的*Pe*TS3，这是首个晶体结构获得解析的DHTS，也是首个真菌来源的DHTS，标志着DHTS研究进入了原子水平的机制解析阶段。研究者分别解析*Pe*TS3的apo态和Mg^{2+}-PPi-BTAC态的晶体结构，分辨率分别达到1.68 Å和1.99 Å。晶体结构显示*Pe*TS3采用典型的I类TS α螺旋折叠，活性中心位于C端结构域的疏水口袋中。通过比较apo态和底物结合态的蛋白质结构，研究者发现了一个由残基246–253组成的柔性J/K loop区域，该区域在底物结合后发生显著的构象变化，像盖子一样覆盖在酶的活性口袋上方，通过诱导契合使活性口袋闭合。

更重要的是，结构清晰地揭示了双羟基化的分子基础：活性中心存在两个明确的水分子结合位点，分别由两组不同的氢键网络固定。第一组水分子由Tyr172、Cys197、Ser202和His84通过氢键网络精确组织，负责第一次水淬灭；第二组水分子则位于活性口袋的另一个位置，负责第二次水淬灭。而Tyr312被鉴定为启动再质子化的关键残基，其酚羟基在空间上恰好指向hedycaryol中间体的双键位置，能够提供质子引发第二次环化。定点突变实验系统验证了上述Tyr312的功能，当Tyr312突变为Phe后，酶无法完成再质子化步骤，产物由双醇转变为单羟基的hedycaryol中间体。参与第一组水氢键网络的Tyr172、His84等残基突变则会阻断第一次水淬灭，使反应转向脱质子生成萜烃；第二组水结合位点的关键残基突变同样会导致第二次水捕获失败，仅积累单羟基产物。上述突变体共同证实，双羟基化产物的形成高度依赖于水捕获网络与再质子化残基的协同作用，任一环节被破坏均会导致二醇合成能力的丧失。

与中山大学巫瑞波课题组合作的QM/MM计算[65]进一步支持了这一机制，且揭示了两个水分子先后进攻的精确时序和能垒。*Pe*TS3的研究不仅率先从晶体学探究DHTS的精细结构，同时首次在原子水平上阐明了DHTS时空精确调控两步水淬灭的完整机制，为理解DHTS的催化原理提供了蓝图。但与采用同位素标记验证反应路径的*Zm*EDS、*Cj*CS研究相比，该研究还缺少相应的实验佐证。

3.5 *Bc*Stc5：新发现的真菌DHTS

2026年，Coca-Ruiz[76]等在解析*Botrytis cinerea*的脱落酸生物合成长期争议时，发现了一个全新的真菌双羟基萜烯合酶*Bc*Stc5。该酶能催化FPP生成（4*S*，5*S*，7*R*，10*S*）-4β，10α-桉叶烷-5β，11-二醇。该酶和*Zm*EDS、*Pe*TS3同属桉叶烷二醇合酶，催化机制类似（图5a）。但该研究进行了二醇产量优化，大幅度提升了桉叶烷二醇的滴度。已被发现的五个DHTS中只有*Tw*CS有产物产量介绍，且产物滴度19.7 mg/L相比该研究的550 mg/L相差约28倍。研究者将经过大肠杆菌密码子优化的*Bc*stc5基因克隆至pET-28a（+）载体，与携带酿酒酵母来源甲羟戊酸（MVA）途径的pJBEI-2999质粒共转化大肠杆菌BL21（DE3），并强化了倍半萜前体法尼基焦磷酸（FDP）的胞内供给。针对37 ℃常规诱导条件下目的蛋白大量形成包涵体的问题，筛选确立18 ℃、0.5 mM IPTG诱导16 h的可溶性表达条件。最终*Bc*Stc5通过摇瓶培养生成的桉叶烷二醇滴度超过550 mg/L，为目前DHTS报道中最高的二醇产量。

对于酶本身及其产物均较为新颖的DHTS研究，机制解析通常综合运用两类手段：在产物合成途径的验证上，以同位素标记最为直接，可追踪质子与水分子的来源和去向（*Zm*EDS、*Cj*CS），并辅以定点突变打断特定步骤、捕获反应中间体（*Pe*TS3），以及通过计算化学计算各反应路径的能垒变化加以佐证（*Pe*TS3采用QM/MM、*Cj*CS采用DFT）；在酶三维结构的解析上，则以晶体学最为可靠，通过apo开放态与Mg^{2+}-PPi-BTAC复合态的结构比对，同时呈现活性口袋开合与水网络排布（*Pe*TS3），在缺乏晶体结构时则借助同源建模获取酶与底物的构象关系并指导定点突变（*Zm*EDS、*Tw*CS）。在此类以阐明机制为目标的研究之外，还可通过代谢路径工程增强DHTS的萜醇产量，达到机制研究难以实现的高产水平（*Bc*Stc5）。机制解析与代谢工程分别回答如何催化与如何高产，二者相辅相成，有望成为后续萜类合酶研究的两个主流方向。

尽管如此，DHTS 研究目前仍面临多重相互关联的空白。其根源在于已鉴定的 DHTS 数量过少、基础研究薄弱，难以从中归纳普遍规律；与之相应，高分辨率的晶体结构迄今仅有 *Pe*TS3 一例，多数酶仍然依赖同源建模，原子水平认识因而受到限制。作为 DHTS 核心特征的再质子化之后的二次环化的步骤，其质子供体的本质、转移路径与时空过程主要依靠静态结构和计算模拟推断，缺乏直接和实时的动态证据，而本可提供最直接证据的同位素标记实验又因门槛较高、难以广泛开展。此外，产物专一性较高的 DHTS 分子调控机制，包括水淬灭与脱质子之间的竞争、两次水淬灭的协调等目前尚不明确。这些空白相互交织，既制约着对 DHTS 催化原理的系统理解，也限制了其理性设计与工程化应用，是未来研究亟需突破的关键环节。

4　单羟基萜烯合酶（MHTS）的研究进展

4.1　天然 MHTS 的机制研究

4.1.1　Gd11olS：RQH 水定位模块的发现

来自 *Streptomyces coelicolor* 的吉马二烯-11-醇合酶（Gd11olS）[77] 以 FPP 为底物，主产物吉马二烯-11-醇的占比高达 92.4%，是研究单羟基化机制的理想体系。2021 年，Srivastava [77] 等通过分子动力学模拟和定点突变相结合的策略，阐明其主产物经一条中性中间体再水合的独特路径生成（图 6）。FPP 先经 C1－C10 环化形成吉马二烯阳离子，后者在 C1 脱质子生成有张力的中性双环中间体 isolepidozene，再由水分子进攻、开环水合得到吉马二烯-11-醇。围绕这条路径，研究以三类针对性的改造分别锁定、控制不同步骤的关键元件，削弱水捕获机制。

其一，芳香残基的阳离子-π 静电作用控制吉马二烯阳离子生成 isolepidozene 的路径走向。Trp312 位于法尼基链末端，稳定并引导吉马二烯阳离子脱质子形成 isolepidozene。突变体 W312F 中苯环仍能为 C1－C10 环化提供芳香稳定作用，却不足以支持向 isolepidozene 转化，碳正离子直接脱质子，主产物由吉马二烯-11-醇切换为烃类 germacrene A（占比 71.5%）。这说明改变芳香残基静电性质，能实现切换醇/烃路径切换。

其二，RQH 水定位模块在 C11 附近锚定催化水，负责 isolepidozene 的水合开环。Arg228、Gln313、His320 经氢键网络将一个水分子维持在 C11 附近，其中 His320 最关键，直接与水形成氢键；H320F 破坏了 G 螺旋与 RQH 间的水流，isolepidozene 因无法继续水合而积累至 43.2%，而 R228V、Q313A 的影响则较小。

其三，G 螺旋扭结区充当水通道门控并控制活性口袋闭合，保守的[187]VGGA 基序构成水分子进入的主要通道。Val187 为通道侧壁残基，V187N 既以更大侧链缩小孔隙、又以酰胺基把水束缚在通道外，isolepidozene 升至 77.9%；Gly188 是羟基化开关，侧链仅为氢原子、位阻最小，G188A 的甲基封堵使得水分子无法进入，羟化产物仅占 12%、烯烃 isolepidozene 的比例高达 88.4%。

横向比较可见，三类策略作用于不同环节：策略一借助芳香残基 Trp312 的阳离子-芳香环之间的静电堆叠作用决定碳正离子走向；策略二、三则分别通过 RQH 极性氢键网络锚定水、经 G 螺旋扭结门控水分子的进入与口袋闭合，共同决定水分子能否到达催化口袋并与 isolepidozene 发生水合

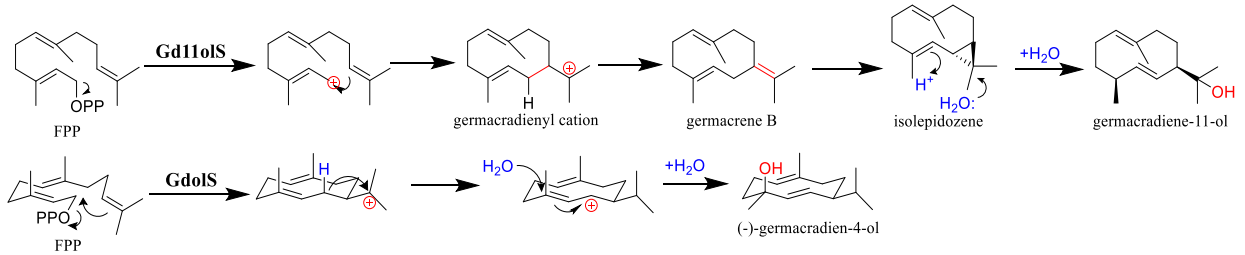


图 6　倍半萜单羟基合酶（MHTS）的典型催化路径

Fig.6　Typical catalytic pathways of sesquiterpene monohydroxysynthases (MHTS)

反应。其中仅调节阳离子-π堆叠作用（W312F）即可切换路径，为理性改造提供了拨动醇/烃路径开关的切入点。

4.1.2 GdolS：A176体积调控开关

来自*Streptomyces citricolor*的吉马二烯-4-醇合酶（GdolS）是另一个产物专一性极高的MHTS，其野生型产物（-）-吉马二烯-4-醇的占比大于98%，因而被用作MHTS机制研究的模板。其碳正离子路径如下（图6）：FPP经离子化与C1–C10环化形成吉马二烯阳离子，随即发生一次[1,3]-氢迁移，将正电荷导向C4形成稳定的烯丙基碳正离子，最终由一个来自溶液的水分子在产物释放前进攻C4淬灭碳正离子，生成（-）-吉马二烯-4-醇；H-1α与E-F环的运动限制水分子仅从碳正离子的*Re*面进入，从而保证羟基化的区域与立体专一性。

2024年，González Requena等[78]以非极性递增突变加上极性突变对照的策略，对G1/2螺旋扭结区进行系统突变，鉴定出Ala176是控制水分子捕获的关键效应子（与Gd11olS的Gly188[77]为同源功能位点）。第一组，将Ala176依次替换为侧链递增的非极性脂肪族残基，羟化比例随侧链基团的增大而梯度下降（A176V 91%、A176L 80%、A176I 44%、A176M仅10%），非羟化产物吉马烯A、吉马烯D相应积累；第二组，改用侧链体积更大的极性残基（A176T/Q/D），羟化率却维持在100%、与野生型一致。两组对照直接排除了侧链体积物理封堵水分子通道的假说，表明Ala176并非以空间位阻控水，而是通过维持活性口袋内催化水的氢键网络与局部极性环境来稳定水捕获和抑制脱质子。研究同时厘清了His150的角色：其咪唑环不参与活化或供给亲核水分子，而是协助碳正离子的稳定。

GdolS与Gd11olS虽以同源位点（Ala176/Gly188）共同充当醇和烃路径切换的开关，二者的成醇路径却形成鲜明对照（图6）。GdolS的吉马二烯阳离子经[1,3]-氢迁移后，在C4位被水直接淬灭，即典型的碳正离子水淬灭；Gd11olS则先形成中性中间体isolepidozene，再经水合开环成醇。由此可见，决定醇和烃分岔的关键因素并非口袋空间大小，而是局部极性大小与水的氢键网络的完整性。

4.1.3 其他的天然MHTS

除上述两个研究得较深入的细菌倍半萜MHTS外，更多天然的MHTS研究表明，水淬灭可由不同的结构元件实现，并普遍适用于单萜、倍半萜与二萜，在植物、真菌与细菌中趋同出现。

单萜MHTS：极性残基定位水和大口袋直接淬灭。来自*Streptomyces clavuligerus*的bCinS与bLinS[79]代表单萜成醇的两种方式。bCinS活性中心的Asn305、Asn220定位水分子，引导其进攻α-松油基碳正离子并进一步环化生成环醚1，8-桉叶素。bLinS则因口袋更大、缺芳香残基约束，由水直接淬灭芳樟基碳正离子而生成非环的芳樟醇。

倍半萜MHTS：环区构象门控与内部水分子通道。植物中，广藿香醇合酶（PTS）以FPP生成广藿香醇及多种副产物，是香料工业最重要的酶之一。2023年研究[69]发现Hα-1环是其水淬灭关键区，第458–461位的Lys-Lys-Arg-Glu四个保守残基经构象变化调节活性中心疏水性、控制水进入。真菌中，*Agrocybe aegerita*来源的Agr5催化FPP生成绿花白千层醇[70]，同源酶Agr2则在同一aromadendrenyl碳正离子上脱质子生成绿花白千层烯。分子动力学模拟揭示Agr5内有一条独特的水通道，V314充当控制水通量的阀门。V314突变成小侧链残基Gly和Ala可以促进羟基化；若突变成大侧链的Tyr，则会堵塞水分子通道，产物偏向成烃，这是首次在TPS中发现经内部水通道调控水通量的分子阀门。此外，avermitilol合酶（SaAS）[80]与石竹烷-1-醇（caryolan-1-ol）合酶[81]的晶体结构分别揭示了6-6-3三环骨架的反马氏跨环环化与初始反马氏环化的立体化学控制，其产物特异性主要源于环化方式，终末同样以水淬灭的方式生成醇。

二萜MHTS：近缘酶之间的醇和烃分支与正向转化。*Isodon rubescens*来源的*Ir*TPS2催化羟基化对映-海松烷型二萜nezukol[82]，而与其同源性高达98%的*Ir*KSL3a却直接脱质子生成异海松二烯（isopimaradiene）[67]。QM/MM与定点突变表明，*Ir*TPS2的Ser499、Thr527经氢键锚定进攻pimaren-8-yl碳正离子的水，*Ir*KSL3a相应位置的β-甲基侧链（Ile523）则阻挡水结合。将这些极性残基引入*Ir*KSL3a并辅以多点突变协同，方可使其获得水加

成能力、生成nezukol等羟化产物[67]。

综观这些天然MHTS，水淬灭的结构实现路径虽异，却可归为少数几类元件。以极性残基（Asn、Ser/Thr）锚定催化水、以活性位点环（Hα-1）的构象变化门控水分子进入、以蛋白内部水通道（V314）调节水通量，而口袋轮廓与芳香约束决定水淬灭位置。bLinS/bCinS、Agr5/Agr2、*Ir*TPS2/*Ir*KSL3a等近缘对照，以及向*Ir*KSL3a引入极性残基即获羟化的正向证据，都表明水控能力可经少数元件的增减而消除。这为理性拨动“醇/烃开关”提供了多样化靶点，也提示结构改造应着力恢复局部极性与水分子氢键网络。

4.2 经人工改造获得具有羟化功能的MHTS

与天然MHTS不同，该类酶以只生成烃类产物的HFTS为改造模板，通过定点突变、半理性设计等蛋白质工程手段，人为重建活性口袋内水分子锚定与调控网络，实现从“脱质子产烃”向“水淬灭产醇”的功能切换。综合已报道的HFTS向HTS改造案例，可归纳为四类分子改造策略：扩大活性口袋容积，为催化水分子预留结合空间；引入极性氨基酸残基，构建氢键网络锚定催化必须水分子；改造活性口袋内部的螺旋/loop构象门控元件，调控活性中心的水分子；改造芳香残基，调控碳正离子中间体的阳离子-π堆叠相互作用力。下面结合代表性案例分别阐述各类策略的改造逻辑、实现方式以及改造效果。

4.2.1 扩大活性口袋容积，为催化水分子预留结合空间

部分野生型HFTS的活性口袋整体上高度疏水且空间紧凑，其体积不足以同时容纳碳正离子中间体与一分子催化必需水，水分子无法靠近碳正离子，反应只能以脱质子终止方式生成萜烃。通过将口袋内部的大体积疏水芳香残基突变为侧链较小的残基，可以扩大口袋内腔，腾出容纳水分子的物理空间，为水进攻碳正离子创造前提条件。

代表性体系为天蓝色链霉菌（*Streptomyces coelicolor*）来源的*epi*-异姜烯合酶（*epi*-isozizaene synthase，EIZS），其野生型是高度专一的HFTS，几乎只生成烃类*epi*-isozizaene。晶体结构显示其活性口袋被Phe95、Phe198两个大体积苯丙氨酸残基占据，口袋空间狭小。Eaton等人将两个苯丙氨酸同时突变为丝氨酸（F95S/F198S双突变），双突变后活性口袋体积由野生型的279 Å³提升至391 Å³，空间增量使得水分子得以顺利进入催化口袋；改造后的突变体成功地获得羟基化能力，主产物α-红没药醇在18 ℃条件下占比65%，在4 ℃低温条件下可提升至74%。但口袋扩大会同时降低底物结合的空间约束，带来副产物增多的问题，突变体伴随约18%的橙花叔醇（4 ℃时约20%）以及约5%的β-姜黄烯等副产物，产物选择性相比野生型HFTS明显下降[83]。该案例证明，单纯扩大口袋可以实现HFTS向MHTS的功能转换，但仅解决了水分子进入催化口袋的空间问题，缺少定向锚定水分子的氢键网络，难以兼顾产物专一性。

4.2.2 引入极性氨基酸残基，构建氢键网络锚定催化必需水分子

若HFTS口袋已有足够空间，但缺少能够固定水分子的极性位点，游离水分子难以精准定位至碳正离子附近，那么碳正离子依旧有可能优先发生脱质子反应。在活性口袋邻近碳正离子中间体的关键位置，引入Glu、Gln、His等极性或带电残基，可搭建局部氢键网络，将溶液中的水分子定点锚定在碳正离子的进攻位置，驱动反应转向水淬灭产醇路径。

代表性体系为*Streptomyces pristinaespiralis*来源的芹子-4(15),7(11)-二烯合酶SdS，其野生型HFTS的主产物为烃类芹子二烯，占比86.7%。序列与分子模拟分析发现，K螺旋的保守位点Gly305紧邻着活性空腔，但因野生型甘氨酸残基没有极性侧链，故无法结合水分子。将该位点突变为带负电侧链的谷氨酸（G305E）时，新增的Glu侧链能提供氢键作用位点，可捕获并组织水分子。G305E单突变体获得单羟化活力，生成芹子-7(11)-烯-4-醇。经pH条件优化后，羟化产物占比提升至48%，成为主要产物。但该单点突变体由于仅引入局部极性位点，无法复刻天然MHTS完整协同水网络。突变后酶的动力学参数发生劣化，K_M由0.86 μmol/L升高至1.80 μmol/L，k_{cat}由7.0×10^{-3} s^{-1}降至4.0×10^{-3} s^{-1}，整体催化效率下降72.7%[84]。该策略的优点是仅需单点突变即可实现催化功能转换，

但短板在于单点引入的氢键网络稳定性有限，容易造成活性损失和副产物积累。

4.2.3 改造活性口袋螺旋/loop构象门控元件，调控进出活性中心的水分子

部分HFTS口袋本身具备容纳水分子的空间，但存在螺旋和loop所形成的空间门控屏障，阻碍水溶液中的催化必需水分子进入催化空腔。通过突变门控区域的保守残基，改变局部侧链位阻、重塑门控构象，可以打通水进入活性位点的微型通道，使水分子能够抵达碳正离子中间体附近。该类策略的天然对照来自Gd11olS的^{187}VGGA基序（G螺旋扭结的水通道门控）以及Agr5的V314水通道阀门。人工改造的案例以二萜合酶*Bj*KS为典型代表。

来自*Bradyrhizobium japonicum*的*ent*-贝壳杉烯合酶*Bj*KS是典型二萜HFTS，野生型专一性生成烃类*ent*-贝壳杉烯。序列比对参考植物的TPS羟基化开关残基，揭示Tyr136位于活性口袋入口的门控位置；对该位点开展饱和突变，所得Y136H突变体改变了局部口袋的入口构象，解除位阻屏障，允许水分子进入，突变体产生约60%的16α-羟基-*ent*-贝壳杉烷。接着进行组合突变，所得双突变体Y136L/L71Q，因优化了口袋微环境，使得产物专一性可以提升至94%。但门控残基的突变同样付出代价，所有获得羟化功能的突变体均出现k_{cat}下降现象，并且仍伴生海松二烯类烃副产物[85]。该策略的核心逻辑是打通水分子进入口袋的物理通道，但需要协调口袋内部的极性残基才能实现水分子的精准定位，仅改变门控构象似乎不足以实现高选择性的萜烯羟基化。

4.2.4 改造芳香残基，调控碳正离子–π键相互作用

在萜烯合酶催化过程中，活性口袋内Trp、Phe等芳香残基通过阳离子-π键静电作用稳定碳正离子中间体，同时影响中间体的后续反应走向，既可以促进中间体脱质子生成烯烃，也可以影响中间体空间取向，间接改变脱质子与水淬灭两条路径竞争的产物比例。诱变关键的芳香残基，可扰动阳离子-π键相互作用，削弱脱质子路径的竞争优势，从而让水淬灭成为优势反应。

该策略的典型参考案例来自天然MHTS Gd11olS的W312F突变实验。野生型的Trp312残基通过阳离子-π键相互作用引导碳正离子中间体发生脱质子，生成中性中间体isolepidozene。当Trp312突变为Phe后，上述静电作用强度下降，反应路径发生偏移，主产物由醇切换为萜烃[77]。目前直接利用该策略完成HFTS向HTS正向转变的公开案例相对较少，更多的案例是在天然MHTS上实现由产醇为主向退化为产烃为主的反向突变，证明该位点对醇和烃路径转化的调控能力，也为后续HFTS的改造提供了参考靶点。

横向对比四类改造策略可见，已有的正向改造实例（EIZS$^{F95S/F198S}$、SdS^{G305E}、*Bj*KS^{Y136H}等）大多只单独使用上述其中一类策略实现HFTS的羟基化功能。人工突变体普遍存在共性瓶颈，k_{cat}下降、K_M升高以及产物谱复杂化，改造后主产物选择性介于48%–74%，显著低于经过长期进化的天然MHTS（如GdolS＞98%、Gd11olS 92.4%）。其根源在于天然MHTS同时具备口袋空间、氢键锚定位点、水通道门控、芳香残基静电调控等多套相互协同的元件，共同完成水分子的时空精准调控。而现有人工改造大多只扰动单个局部位点，很难完整复刻天然酶精密协同的水调控网络，因此普遍出现功能获得与催化效率、产物选择性之间的权衡冲突。

综合天然与人工MHTS研究可以看出，水淬灭能力并非萜烯合酶不可改变的固有属性。在HFTS骨架基础上，通过上述四类策略，包括扩大疏水口袋腾出空间、引入极性残基搭建水锚定氢键网络、改造螺旋-loop门控打通水通道、扰动芳香残基的阳离子-π键相互作用，能够在产烃与产醇之间切换催化流向。其中EIZS、SdS、*Bj*KS属于从产烃HFTS向产醇HTS的正向改造。而Gd11olS、GdolS、PTS、Agr5等天然酶由醇变回烃的反向突变实验，从反方向上验证了上述水调控元件的必要性。

由HFTS向HTS的功能重构，是萜烯合酶蛋白质工程极具价值的研究方向。自然界已表征的天然MHTS、DHTS数量有限，大量性能优良的HFTS只能生成萜烃，缺少直接合成萜醇的能力。如果可以通过少量定点突变，将庞大的HFTS酶元件库改造为HTS，就能够绕开P450复杂电子传递系统，扩充萜醇合成可用酶资源库。但人工改造得到的HTS和经过长期进化形成的天然HTS之间

仍存在显著差距。天然HTS的活性口袋氢键网络、水分子锚定位点、构象门控等多套元件之间能相互协同适配，兼顾产物专一性与催化效率。而人工单点或双点突变体往往仅实现水分子局部可及，很难复刻完整水调控网络，因此经常伴随选择性下降和催化效率折损。

基于现有催化机制推演，HFTS向MHTS的功能分化，并不是酶凭空获得水淬灭能力，而是活性口袋关键残基发生突变，重塑口袋内部氢键网络与空间微环境，改变碳正离子终止阶段脱质子与水分子捕获两条竞争路径的平衡，让优势反应路径由产烃转向生成单羟基萜醇。如果要进一步实现DHTS的双羟基化能力，则还需要在此基础上引入功能性再质子化残基，并搭建第二套独立的水分子锚定网络。需要说明，目前已鉴定DHTS样本数量有限，尚缺乏祖先蛋白重建等直接演化证据，因此MHTS向DHTS分步演化的模式目前仍属于假说。但该机制为蛋白质工程提供了清晰思路：水锚定位点、介导再质子化的关键残基，可以作为分步迭代改造靶点，为海量成烃类萜烯合酶向萜醇、萜二醇合成酶的重构提供了理论参考。

5 HTS在萜醇合成生物技术中的应用

近年来，随着代谢工程与合成生物技术的发展，研究者已在大肠杆菌（*Escherichia coli*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）和粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）等底盘中构建了多种萜醇细胞工厂，部分已实现产业化。为厘清HTS在其中的真实贡献，本文按照终点羟基的引入方式将案例分为三类。第一类为真正的HTS，由单一合酶（或单蛋白双功能结构域）在环化反应终点以水淬灭碳正离子、一步产醇，无需P450酶；第二类为其他路径，包括双酶串联水淬灭、HTS产物再经双键还原，以及依赖P450介导的后修饰反应；第三类是高碳数与非常规骨架与理性工程。

5.1 萜醇细胞工厂的共性策略

上述萜醇细胞工厂的高滴度并非由单一萜醇合酶决定，而是酶分子改造与多层次代谢工程协同作用的结果，可归纳为“酶—途径—底盘—工艺”四个层面的共性策略。在酶分子层面，研究者通过N端截短、底物结合口袋的理性或半理性改造、融合标签定向进化以及蛋白融合等手段，提升萜醇合酶的可溶性表达、前体结合与催化效率，并借助蛋白支架、融合蛋白等多酶共定位方式强化底物通道运行效率；而在途径层面，通过过表达或改造异源GPPS/FPPS、采用ERG20$^{F96W/N127W}$等突变体重分配GPP/FPP通量[86]、系统强化MVA/MEP途径关键酶来扩充前体池，同时下调麦角固醇、角鲨烯等竞争途径并敲除中间体降解基因。

在底盘层面，利用线粒体、过氧化物酶体等细胞器区室化将途径酶元件与合成前体局部富集[87]、降低胞质毒性，辅以动态调控平衡生长与合成所需资源，并通过转运蛋白工程、细胞膜工程与耐受底盘的筛选缓解产物萜醇的挥发性与细胞毒性[88]。在工艺层面，普遍采用分批补料发酵与培养基优化解除产物抑制。上述策略在大肠杆菌、酿酒酵母、解脂耶氏酵母和粘质沙雷氏菌等不同底盘中组合使用，是后续各类萜醇实现高产的共同产量基础。因此，文献报道的产量应理解为系统代谢工程的综合结果，并非单一萜醇合酶的贡献。

5.2 HTS单酶“环化–水淬灭”一步产醇

在单萜方面，芳樟醇由芳樟醇合酶介导的水淬灭芳樟基正离子一步生成。Zhou等将月季（*Rosa chinensis*）来源、N端截短67个氨基酸的芳樟醇合酶t67OMcLIS引入酿酒酵母，并对其底物结合口袋的入口进行理性改造，通过降低入口疏水性与位阻提升其对GPP的催化效率；进而将合成途径同时区室化于细胞质与过氧化物酶体以利用局部前体池，再通过细胞融合构建二倍体工程菌株，使摇瓶产量达219.1 mg/L，最终经5 L分批补料发酵的芳樟醇产量达到2.6 g/L[89]。该产量是酶分子改造、前体供给、过氧化物酶体区室化与菌株倍性优化等多重策略协同贡献的综合结果。香叶醇由罗勒（*Ocimum basilicum*）来源的香叶醇

合酶（Geraniol synthase，GES）催化水分子淬灭香叶基正离子生成；Wang等在大肠杆菌中导入该酶，在系统强化MVA途径与前体供给的基础上，通过实验室进化获得E1融合标签，并建立高通量筛选系统调节酶的表达水平，使摇瓶培养中香叶醇产量达2124.1 mg/L[90]，这同样是酶表达调控与前体途径工程协同的结果。二者均由天然单萜MHTS直接催化、无需P450酶进行后修饰的产物。

在倍半萜方面，α-红没药醇由α-红没药醇合酶介导的水淬灭双环红没药基正离子生成。Li等选用耐萜类毒性的非模式底盘粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescens* HBQA7），异源表达洋蓟（*Cynara scolymus*）来源的（-）-α-红没药醇合酶*Cc*BOS并引入完整MVA途径，将合成途径与MVA基因多位点整合至染色体、构建无抗生素筛选体系；在此基础上敲除*slaB*、*adhE*等竞争途径基因与*arcA*、*iclR*全局调控因子，并引入*glf*、*glk*高效葡萄糖转运与活化系统，使其摇瓶滴度由3.5 g/L逐步提升至9.90 g/L，最终经50 L补料分批发酵，（-）-α-红没药醇滴度达到102.3 g/L[91]。广藿香醇由广藿香（*Pogostemon cablin*）来源的PTS催化生成，Peng等在解脂耶氏酵母中先筛选高活性PTS构建基线，再扩大MVA前体池、利用Cu^{2+}抑制型启动子下调角鲨烯合成竞争途径，并通过蛋白融合增强途径协同，最终在5 L发酵罐中广藿香醇产量达2.864 g/L[92]。这些高滴度均是酶元件、前体途径与底盘代谢工程协同作用的结果，而非单一酶元件的贡献。

二萜与二倍半萜方面，第一类路径已获得相应酶元件，但高滴度发酵的实现仍然有限：天然二萜DHTS *Cj*CS来自*Chitinophaga jiangningensis*，依靠两次水淬灭一步生成江宁-3,15-二醇[75]；人工改造突变体BjKS^{Y136H}将二萜HFTS改造为MHTS，能够合成16α-羟基-*ent*-贝壳杉烷[85]，目前仍主要停留于酶学验证阶段。在二倍半萜（C_{25}）体系中，在米曲霉（*Aspergillus oryzae*）中异源表达双功能二倍半萜合酶NfSS，依靠单蛋白一步水淬灭生成四环骨架sesterfisherol，无需P450参与后修饰[93]；来自*Streptomyces mobaraensis*的细菌I型二倍半萜合酶*Sm*TS1在生成多种烃类sestermobaraenes的同时，部分碳正离子中间体被水分子捕获生成sestermobaraol，同一级联反应中脱质子产烃与水捕获产醇的分支相互竞争，正是图3中两类终止机制在高碳数萜类体系中的重现[94]。这些高碳数案例的酶学元件已被验证，但受限于GFPP前体供给不足与发酵体系尚未系统优化，其滴度仍明显低于单萜与倍半萜，是后续细胞工厂构建的重点。

5.3 其他合成路径

双酶串联、两次水淬灭合成香紫苏醇（sclareol）。香紫苏醇由南欧丹参（*Salvia sclarea*）来源的两个二萜合酶先后催化：class II的*Ss*LPPS先将GGPP质子化环化、并在C8处发生水淬灭生成半日花-13-烯-8-醇焦磷酸（labda-13-en-8-ol diphosphate，LPP）；接着class I的*Ss*SS随后使焦磷酸解离、侧链碳正离子在C13再被水淬灭，引入第二个羟基[95]。这两步均为水淬灭、无需P450酶，是最接近HTS理念的多酶路径。在酿酒酵母中，该途径在常规前体与MVA途径改造的基础上，接着通过弱化营养感知途径、增强线粒体自噬以延长细胞时序寿命，可使香紫苏醇的产量提升70.3%（达20.1 g/L）。再结合中心代谢强化，最终补料分批发酵达25.9 g/L[96]。这一高滴度同样依赖前体途径、酶元件与细胞寿命、全局代谢改造的协同优化与调控，而非双酶本身的单独贡献。

HTS产物再经非P450双键还原合成香茅醇（citronellol）。香茅醇并非由其合酶直接介导水淬灭生成，而是先由香叶醇合酶催化的水淬灭生成香叶醇[97]，再由还原酶立体选择性还原C2=C3双键得到。Jiang等在酿酒酵母中以Erg20^{F96W}突变体替代野生型ERG20、增强GPP供给，引入长春花（*Catharanthus roseus*）来源的环烯醚萜合酶（iridoid synthase，*Cr*IS）将香叶醇还原为对映体纯（*S*）-香茅醇，并通过合成蛋白支架与蛋白融合使4个连续酶共定位以强化底物通道效率，同时敲除中间体降解基因ATF1，使摇瓶产量逐步提升至972 mg/L，最终经补料分批发酵达8.3 g/L[98]。该路径的羟基仍来自HTS的水淬灭，但需额外一步还原，故其高滴度不能完全归因于单酶HTS，而是前体供给、还原步骤与全局途径协同改造的结果。

依赖P450后修饰合成紫杉二烯-5α-醇（taxadien-5α-ol）。紫杉二烯醇由紫杉二烯经P450酶CYP725A4羟化生成，需要NAD(P)H-还原酶电子链提供还原力，是紫杉醇生物合成的关键中间体[52, 99]，与第一类的单酶介导的水淬灭形成本质区别；其异源合成需共表达CPR等还原伴侣并解决膜蛋白的折叠问题，是上述三类路径中辅因子依赖最强、重构难度最大的一类。

5.4 高碳数与非常规骨架与理性工程

HTS的水淬灭逻辑正向C_{25}及非常规骨架延伸，并逐渐由结构解析驱动。2025年Li等解析了*Kitasatospora viridis*二倍半萜合酶StvirS的晶体结构，对11个活性位点进行结构导向的改造，获得23个突变体与13种全新二倍半萜骨架，证明重塑C_{25}底物口袋可定向改变碳正离子级联与终止方式[100]。2026年Troycke等进一步以局部活性位点架构阐明多个二倍半萜合酶分歧级联的结构基础[101]，为在环化终点理性引入水淬灭提供了抓手。此外，由甲基转移酶催化前体甲基化形成的C_{11}、C_{16}等非经典萜类骨架[102-104]，其合酶逻辑与经典I类TS高度相似，提示从中挖掘具水淬灭活性的HTS、或改造HTS接受甲基化/杂原子取代的前体，有望获得具有全新香气与生物活性的萜醇。需要指出的是，StvirS等二倍半萜合酶目前主要在大肠杆菌等体系中完成酶学功能验证，研究重心仍在结构解析与骨架多样性挖掘，尚未进入高滴度发酵优化阶段；结合5.1所述共性策略，进一步强化GFPP前体供给、优化酶的表达与发酵工艺，是推动这些高碳数萜类HTS走向细胞工厂应用的关键所在。

6 总结与展望

羟基萜烯合酶（HTS）作为一类近年被系统认识的萜烯合酶，为萜醇生物合成提供了不同于“TS+P450”两酶级联的另一条路径：它仍属于萜烯合酶超家族，却以有序水分子介导的羟化终止替代了传统的碳正离子中间体脱质子终止，因而无需NAD(P)H等氧化还原辅因子，以单酶催化一步即可产醇。经过近十年研究，研究者已从细菌、真菌和植物中鉴定了多个MHTS和少数DHTS，初步阐明水淬灭碳正离子的分子机制，建立了由HFTS向HTS转化的若干理性设计策略，并在微生物细胞工厂中实现了部分萜醇的从头合成。综观全文，本领域方向虽多，但科学问题可进一步收敛为三条相互衔接的主线：水分子的时空调控机制、功能和效率权衡的突破，以及高效HTS细胞工厂的构建与调控。

第一，水分子的时空调控机制，这是认识和设计HTS的共同基础。一方面，已鉴定的HTS数量仍然有限，DHTS更仅有个位数报道，自然界中数量庞大的萜烯合酶中是否潜藏新的HTS类型仍有待探索。近年来，随着基因组挖掘技术的发展，大量新的萜类合酶被发现，其中包括许多非经典的萜类环化酶家族[36-37]，如UbiA型环化酶、钒依赖性卤过氧化物酶家族环化酶等，这些新家族中是否也存在HTS类酶，也是一个值得探索的方向。另一方面，除*Pe*TS3[65]外绝大多数HTS缺乏高分辨结构，对水分子如何进入、如何被精确组织、如何在正确时机进攻碳正离子，以及DHTS中“再质子化—二次环化”的质子供体本质、转移路径和两个水分子的时空协调，仍主要依赖结构建模与分子模拟，缺乏直接的动态证据，未来需综合X射线晶体学、冷冻电镜、时间分辨光谱、同位素标记与QM/MM计算，在原子水平和时间尺度上还原催化全过程。

第二，功能和效率权衡的突破，这是HTS从可设计走向可应用的关键。现有定点突变与半理性设计[70]虽能引入羟化新功能，却普遍以K_M升高、k_{cat}下降和选择性丢失为代价，难以同时优化活性、选择性与稳定性。近年来，以AlphaFold[105]为代表的人工智能辅助蛋白质结构预测以及计算从头设计技术取得突破性进展，为破解这一权衡提供了新工具：未来可在深入理解水控机制的基础上，借助AI结构预测与从头设计，协同安排水结合位点、口袋静电与构象门控，从头设计兼具高效羟化活性与高产物专一性的人工HTS，或对现有HTS进行活性中心的系统重塑，突破天然酶的进化限制。

第三，高效HTS细胞工厂的构建，这是将机

制认识最终转化为绿色制造的出口。尽管少数单萜醇、倍半萜醇已达到较高滴度乃至实现产业化应用，但多数高价值萜醇，特别是双羟基二萜、复杂三萜醇以及C_{25}以上高碳数和非常规骨架萜醇，其发酵产量仍然严重偏低。这需要在途径（强化前体供应、平衡MVA/MEP代谢流、消除竞争[33, 98]）、酶（通过蛋白质工程提升k_{cat}与选择性、降低产物抑制[90, 106]）、底盘（增强耐受性、减少挥发损失与细胞毒性[29, 91]）和工艺（两相发酵、原位分离、补料分批发酵[89]）四个不同层面进行协同优化。与之并行的是产物化学空间拓展：利用萜烯合酶的底物杂泛性，以非天然的异戊烯基焦磷酸类似物为底物，以便获得卤代、含氧/含硫杂环等非天然的萜醇[107-112]，结合C_{11}、C_{16}等非经典骨架[102, 113-114]与高碳数HTS的挖掘改造，有望为药物发现提供更加丰富的化学实体。将HTS与其他后修饰酶组合，还可进一步衍生出结构更加多样的萜醇。

总体而言，HTS研究仍处于机制解析与功能拓展的早期阶段：已鉴定元件数量有限、高分辨率结构稀缺、人工HTS的功能和效率的权衡尚未根本解决。围绕水分子时空调控、功能—效率权衡和高效细胞工厂这三条主线，随着基因组挖掘、结构生物学、计算模拟/人工智能辅助设计与合成生物学的深度融合[65, 70, 115-116]，有望发现更多新颖HTS、设计出更高效的人工HTS，并推动其在天然产物合成、医药中间体制备与绿色生物制造中发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

[1] CHRISTIANSON D W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(17): 11570-11648.

[2] HUANG Z Y, YE R Y, YU H L, et al. Mining methods and typical structural mechanisms of terpene cyclases[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2021, 8(1): 66.

[3] WRIESSNEGGER T, PICHLER H. Yeast metabolic engineering-targeting sterol metabolism and terpenoid formation[J]. Progress in Lipid Research, 2013, 52(3): 277-293.

[4] HOSHINO Y. Terpenoids and membrane dynamics evolution [J]. Frontiers in Ecology and Evolution, 2024, 12: 1345733.

[5] MAOKA T. Carotenoids as natural functional pigments[J]. Journal of Natural Medicines, 2020, 74(1): 1-16.

[6] MOISE A R, AL-BABILI S, WURTZEL E T. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis[J]. Chemical Reviews, 2014, 114(1): 164-193.[1]

[7] STRA A, ALMARWAEY L O, ALAGOZ Y, et al. Carotenoid metabolism: new insights and synthetic approaches[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 13: 1072061.

[8] TANG Q, LI Z, CHEN N, et al. Natural pigments derived from plants and microorganisms: classification, biosynthesis, and applications[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(2): 592-614.

[9] LIU M, LU S. Plastoquinone and ubiquinone in plants: biosynthesis, physiological function and metabolic engineering [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1898.

[10] SALINAS G, LANGELAAN D N, SHEPHERD J N. Rhodoquinone in bacteria and animals: two distinct pathways for biosynthesis of this key electron transporter used in anaerobic bioenergetics[J]. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 2020, 1861(11): 148278.

[11] BAJGUZ A, PIOTROWSKA-NICZYPORUK A. Biosynthetic pathways of hormones in plants[J]. Metabolites, 2023, 13 (8): 884.

[12] SHAH S H, ISLAM S, MOHAMMAD F, et al. Gibberellic Acid: A Versatile Regulator of Plant Growth, Development and Stress Responses[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2023, 42(12): 7352-7373.

[13] GAO Y L, MA X L, ZHANG Z X, et al. Brassinolides signaling pathway: tandem response to plant hormones and regulation under various abiotic stresses[J]. Horticulture Advances, 2024, 2(1): 27.

[14] HILLIER S G, LATHE R. Terpenes, hormones, and life: isoprene rule revisited[J]. Journal of Endocrinology, 2019, 242 (2): R9-R22.

[15] RONG D, WANG C, ZHANG X, et al. A novel taxane, difluorovinyl-ortataxel, effectively overcomes paclitaxel-resistance in breast cancer cells[J]. Cancer Letters, 2020, 491: 36-49.

[16] ZHENG D, LIU T, YU S, et al. Antimalarial Mechanisms and Resistance Status of Artemisinin and Its Derivatives[J]. Tropical Medicine and Infectious Disease, 2024, 9(9): 223.

[17] YANG D, HAN N, WANG Y W, et al. Pentacyclic Triterpenoid Saponins, Poterinasides A-J, from Silverweed Cinquefoil Roots Promising Hepatoprotective and Anti-inflammatory Agents[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2021, 86(16):

11220-11236.

[18] ZHANG Y, ZHU P C, WU L, et al. Unveiling the catalytical roles of three glycosyltransferases in triterpenoid saponins in quinoa[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(10): 4214-4227.

[19] JANNUS F, SAINZ J. Principal Bioactive Properties of Oleanolic Acid, Its Derivatives, and Analogues[J]. Molecules, 2024, 29(14): 3291.

[20] KAMATOU G P P, VERMAAK I, VILJOEN A M, et al. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties[J]. Phytochemistry, 2013, 96: 15-25.

[21] ZHANG L, SU Q F, WANG L S, et al. Linalool: a ubiquitous floral volatile mediating the communication between plants and insects[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2023, 61 (3): 538-549.

[22] CHEN W, VILJOEN A M. Geraniol – a review of a commercially important fragrance material[J]. South African Journal of Botany, 2010, 76(4): 643-651.

[23] BERGMAN M E, BHARDWAJ M, PHILLIPS M A. Cytosolic geraniol and citronellol biosynthesis require a Nudix hydrolase in rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*) [J]. The Plant Journal, 2021, 107(2): 493-510.

[24] MEI Y Q, LI L N, FAN L H, et al. The history, stereochemistry, ethnopharmacology and quality assessment of borneol[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 300: 115697.

[25] JONES C G, MONIODIS J, ZULAK K G, et al. Sandalwood fragrance biosynthesis involves sesquiterpene synthases of both the terpene synthase (TPS) -a and TPS-b subfamilies, including santalene synthases[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(20): 17445-17454.

[26] DEGUERRY F, PASTORE L, WU S Q, et al. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2006, 454(2): 123-136.

[27] ALVES GOMES ALBERTTI L, DELATTE T L, SOUZA DE FARIAS K, et al. Identification of the bisabolol synthase in the endangered candeia tree (*Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish)[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1340.

[28] ZHENG Y Y, CAO H X, BI J C, et al. Green biosynthesis of terpenoid-derived flavor and fragrance compounds: advances and strategic perspectives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2026, 74(8): 6569-6592.

[29] JIANG H, WANG X. Biosynthesis of monoterpenoid and sesquiterpenoid as natural flavors and fragrances[J]. Biotechnology Advances, 2023, 65: 108151.

[30] MA Y S, ZU Y X, HUANG S W, et al. Engineering a universal and efficient platform for terpenoid synthesis in yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2023, 120 (1): e2207680120.

[31] BASALLO O, PÉREZ L, LUCIDO A, et al. Changing biosynthesis of terpenoid precursors in rice through synthetic biology[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1133299.

[32] CHENG R, YANG S, WANG D, etal. Advances in the Biosynthesis of Plant Terpenoids: Models, Mechanisms, and Application[J]. Plants, 2025, 14(10): 1428.

[33] WANG Q, QUAN S, XIAO H. Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2019, 6: 6.

[34] COUILLAUD J, RICO J, RUBINI A, et al. Simplified *in vitro* and *in vivo* bioaccess to prenylated compounds[J]. ACS Omega, 2019, 4(4): 7838-7849.

[35] BARJA M V, RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN M. A simple *in vitro* assay to measure the activity of geranylgeranyl diphosphate synthase and other short-chain prenyltransferases [M]//RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN M, WELSCH R. Plant and food carotenoids: methods and protocols. New York, NY: Springer, 2020: 27-38.

[36] RUDOLF J D, CHANG C Y. Terpene synthases in disguise: enzymology, structure, and opportunities of non-canonical terpene synthases[J]. Natural Product Reports, 2020, 37(3): 425-463.

[37] BAUMGARTNER J T, LOZANO SALAZAR L I, VARGA L A, et al. Vanadium haloperoxidases as noncanonical terpene synthases[J]. Methods in Enzymology, 2024, 699: 447-475.

[38] VANDICHEL M, VERMOORTELE F, COTTENIE S, et al. Insight in the activity and diastereoselectivity of various Lewis acid catalysts for the citronellal cyclization[J]. Journal of Catalysis, 2013, 305: 118-129.

[39] ZULIANI A, COVA C M, MANNO R, et al. Continuous flow synthesis of menthol via tandem cyclisation-hydrogenation of citronellal catalysed by scrap catalytic converters[J]. Green Chemistry, 2020, 22(2): 379-387.

[40] MÄKI-ARVELA P, SIMAKOVA I L, VAJGLOVÁ Z, et al. One-pot synthesis of menthol from citral and citronellal over heterogeneous catalysts[J]. Catalysis Surveys from Asia, 2023, 27(1): 2-19.

[41] CHEN K, BARAN P S. Total synthesis of eudesmane terpenes by site-selective C-H oxidations[J]. Nature, 2009, 459(7248): 824-828.

[42] RESUL M F M G, REHMAN A, SALEEM F, et al. Recent advances in catalytic and non-catalytic epoxidation of terpenes: a pathway to bio-based polymers from waste biomass[J]. RSC Advances, 2023, 13(47): 32940-32971.

[43] HUNG K, CONDAKES M L, NOVAES L F T, et al. Development of a terpene feedstock-based oxidative synthetic approach to the *Illicium* sesquiterpenes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(7): 3083-3099.

[44] SÁNCHEZ-VELANDIA J E, GALLEGO-VILLADA L A, MÄKI-ARVELA P, et al. Upgrading biomass to high-added value chemicals: synthesis of monoterpenes-based compounds using catalytic green chemical pathways[J]. Catalysis Reviews, 2025, 67(2): 371-496.

[45] MEUNIER B, DE VISSER S P, SHAIK S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes[J]. Chemical Reviews, 2004, 104(9): 3947-3980.

[46] TANG M C, SHEN C, DENG Z, et al. Combinatorial biosynthesis of terpenoids through mixing-and-matching of sesquiterpene cyclase and cytochrome P450 pairs[J]. Organic Letters, 2022, 24(26): 4783-4787.

[47] ORTIZ DE MONTELLANO P R. Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes[J]. Chemical Reviews, 2010, 110 (2): 932-948.

[48] HE J, LIU X, LI C. Engineering electron transfer pathway of cytochrome P450s[J]. Molecules, 2024, 29(11): 2480.

[49] MALHOTRA K, FRANKE J. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated tailoring of triterpenoids and steroids in plants[J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2022, 18: 1289-1310.

[50] RALSTON L, KWON S T, SCHOENBECK M, et al. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-*epi*-aristolochene-1, 3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 393(2): 222-235.

[51] XU X, LI X, LIU D, et al. Structural classification, biosynthesis, metabolic engineering and ecological functions for the terpenes produced in tobacco[J]. Frontiers in Plant Science, 2026, 17: 1838605.

[52] URLACHER V B, GIRHARD M. Cytochrome P450 monooxygenases in biotechnology and synthetic biology[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(8): 882-897.

[53] YAN Y, WU J, HU G, et al. Current state and future perspectives of cytochrome P450 enzymes for C-H and C=C oxygenation[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7 (3): 887-899.

[54] JIANG B, GAO L, WANG H, et al. Characterization and heterologous reconstitution of *Taxus* biosynthetic enzymes leading to baccatin III[J]. Science, 2024, 383(6683): 622-629.

[55] TEOH K H, POLICHUK D R, REED D W, et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin[J]. FEBS Letters, 2006, 580(5): 1411-1416.

[56] RO D K, PARADISE E M, OUELLET M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. Nature, 2006, 440(7086): 940-943.

[57] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. Nature, 2013, 496(7446): 528-532.

[58] GUENGERICH F P. Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(12): 10964-10976.

[59] LI Z, JIANG Y, GUENGERICH F P, et al. Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(3): 833-849.

[60] HAUSJELL J, HALBWIRTH H, SPADIUT O. Recombinant production of eukaryotic cytochrome P450s in microbial cell factories[J]. Bioscience Reports, 2018, 38(2): BSR20171290.

[61] ZHOU A, ZHOU K, LI Y. Rational design strategies for functional reconstitution of plant cytochrome P450s in microbial systems[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2021, 60: 102005.

[62] CHENG Y, LUO L, TANG H, et al. Engineering the microenvironment of P450s to enhance the production of diterpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2024, 14(10): 4608-4618.

[63] DURAIRAJ P, LI S. Functional expression and regulation of eukaryotic cytochrome P450 enzymes in surrogate microbial cell factories[J]. Engineering Microbiology, 2022, 2(1): 100011.

[64] GUO J, MA X, CAI Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones[J]. New Phytologist, 2016, 210(2): 525-534.

[65] HUANG Z Y, XU K, LI W L, et al. Dihydroxy terpene synthase: spatiotemporally precise manipulation of water-mediated dihydroxylation via stepwise quenching of carbocations[J]. Journal of the American Chemical Society, 2025, 147(49): 45822-45831.

[66] LAUCHLI R, PITZER J, KITTO R Z, et al. Improved

selectivity of an engineered multi-product terpene synthase[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2014, 12(23): 4013-4020.

[67] JIN B, XU K, GUO J, et al. From functional plasticity of two diterpene synthases (*Ir*TPS2/*Ir*KSL3a) to enzyme evolution[J]. ACS Catalysis, 2024, 14(5): 2959-2970.

[68] JIA Q, BROWN R, KÖLLNER T G, et al. Origin and early evolution of the plant terpene synthase family[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022, 119(15): e2100361119.

[69] SRIVASTAVA P L, JOHNS S T, WALTERS R K, et al. Active site loop engineering abolishes water capture in hydroxylating sesquiterpene synthases[J]. ACS Catalysis, 2023, 13(21): 14199-14204.

[70] ZHOU J, GE M, LIN J, et al. Customizing natural products of sesquiterpene synthases by mechanism-based design and DeEnzyme_Score screening[J]. ACS Catalysis, 2026, 16(14): 13022-13032.

[71] ORBAN A, SHUKAL S, BIRK F, et al. *Agrocybe aegerita* serves as a gateway for identifying sesquiterpene biosynthetic enzymes in higher fungi[J]. ACS Chemical Biology, 2020, 15 (5): 1268-1277.

[72] BAER P, RABE P, CITRON C A, et al. Hedycaryol synthase in complex with nerolidol[J]. ChemBioChem, 2014, 15(2): 213-216.

[73] LIANG J, LIU J, BROWN R, et al. Direct production of dihydroxylated sesquiterpenoids by a maize terpene synthase [J]. The Plant Journal, 2018, 94(5): 847-856.

[74] TONG Y R, SU P, GUAN H Y, et al. Eudesmane-type sesquiterpene diols directly synthesized by a sesquiterpene cyclase in *Tripterygium wilfordii*[J]. Biochemical Journal, 2018, 475(17): 2713-2725.

[75] TABEKOUENG G B, GOLDFUSS B, DICKSCHAT J S. Mechanistic characterization of a terpene synthase for a diterpene diol from *Chitinophaga jiangningensis*[J]. Organic Letters, 2025, 27(38): 10821-10824.

[76] COCA-RUIZ V, HAUSMANN K, DRÄGER G, et al. Resolution of the ABA biosynthesis controversy: discovery of a dihydroxylating terpene synthase and its convergent evolution [J]. ACS Chemical Biology, 2026, 21(6): 1362-1372.

[77] SRIVASTAVA P L, ESCORCIA A M, HUYNH F, et al. Redesigning the molecular choreography to prevent hydroxylation in germacradien-11-ol synthase catalysis[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(3): 1033-1041.

[78] GONZÁLEZ REQUENA V, SRIVASTAVA P L, MILLER D J, et al. Single point mutation abolishes water capture in germacradien-4-ol synthase[J]. ChemBioChem, 2024, 25(23): e202400290.

[79] LEFERINK N G H, RANAGHAN K E, BATTYE J, et al. Taming the reactivity of monoterpene synthases to guide regioselective product hydroxylation[J]. ChemBioChem, 2020, 21(7): 985-990.

[80] GAYNES M N, OSIKA K R, CHRISTIANSON D W. Structure and mechanism of avermitilol synthase, a sesquiterpene cyclase that generates a highly strained 6-6-3 tricyclic alcohol[J]. Biochemistry, 2025, 64(24): 4830-4840.

[81] KUMAR R P, MATOS J O, BLACK B Y, et al. Crystal structure of caryolan-1-ol synthase, a sesquiterpene synthase catalyzing an initial anti-Markovnikov cyclization reaction[J]. Biochemistry, 2024, 63(21): 2904-2915.

[82] PELOT K A, HAGELTHORN D M, ADDISON J B, et al. Biosynthesis of the oxygenated diterpene nezukol in the medicinal plant Isodon rubescens is catalyzed by a pair of diterpene synthases[J]. PLOS ONE, 2017, 12(4): e0176507.

[83] EATON S A, CHRISTIANSON D W. Structure-based engineering of a sesquiterpene cyclase to generate an alcohol product: conversion of *epi*-isozizaene synthase into α-bisabolol synthase[J]. Biochemistry, 2024, 63(6): 797-805.

[84] SRIVASTAVA P L, JOHNS S T, VOICE A, et al. Simulation-guided engineering enables a functional switch in selinadiene synthase toward hydroxylation[J]. ACS Catalysis, 2024, 14 (14): 11034-11043.

[85] LI Y, MEI Y, SCHMIDT-DANNERT M, et al. The pursuit of a hydroxylation switch uncovers a key residue for various product outcomes in the *ent*-kaurene synthase from *Bradyrhizobium japonicum*[J]. Organic Letters, 2025, 27(15): 3942-3946.

[86] 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*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 17.

[87] YEE D A, DENICOLA A B, BILLINGSLEY J M, et al. Engineered mitochondrial production of monoterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 55: 76-84.

[88] JIN K, XIA H, LIU Y, et al. Compartmentalization and transporter engineering strategies for terpenoid synthesis[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 92.

[89] ZHOU P, ZHOU X, YUAN D, et al. Combining protein and organelle engineering for linalool overproduction in

Saccharomyces cerevisiae[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(26): 10133-10143.

[90] WANG X, CHEN J, ZHANG J, et al. Engineering *Escherichia coli* for production of geraniol by systematic synthetic biology approaches and laboratory-evolved fusion tags[J]. Metabolic Engineering, 2021, 66: 60-67.

[91] LI W, LIU D, GOU L, et al. Antibiotic-free high-yield (-)-α-bisabolol production in *Serratia marcescens* via metabolic engineering and genomic integration of mevalonate pathway genes[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2025, 12: 274-283.

[92] PENG Q Q, GUO Q, CHEN C, et al. High-level production of patchoulol in *Yarrowia lipolytica* via systematic engineering strategies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(11): 4638-4645.

[93] YE Y, MINAMI A, MANDI A, et al. Genome mining for sesterterpenes using bifunctional terpene synthases reveals a unified intermediate of di/sesterterpenes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(36): 11846-11853.

[94] HOU A, DICKSCHAT J S. The biosynthetic gene cluster for sestermobaraenes—discovery of a geranylfarnesyl diphosphate synthase and a multiproduct sesterterpene synthase from *Streptomyces mobaraensis*[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(45): 19961-19965.

[95] CANIARD A, ZERBE P, LEGRAND S, et al. Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 119.

[96] WU Z, GAO J, GAO N, et al. Engineering chronological lifespan toward a robust yeast cell factory[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2025, 122(46): e2515324122.

[97] JIANG G Z, YAO M D, WANG Y, et al. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 57-66.

[98] JIANG G, YAO M, WANG Y, et al. A "push-pull-restrain" strategy to improve citronellol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2021, 66: 51-59.

[99] GOU Y, JIANG X. Intricate metabolic network for paclitaxel biosynthesis[J]. Biodesign Research, 2024, 6: 0035.

[100] LI H, TROYCKE P, YIN Z, et al. Structure-guided engineering of a bacterial sesterterpene synthase for sesterviridene diversification[J]. Journal of the American Chemical Society, 2025, 147(38): 34901-34909.

[101] TROYCKE P, LI H, YANG K, et al. Local active-site architecture directs divergent carbocation cascades in sesterterpene synthases[J]. Journal of the American Chemical Society, 2026, 148(34): 36648-36661.

[102] IGNEA C, PONTINI M, MOTAWIA M S, et al. Synthesis of 11-carbon terpenoids in yeast using protein and metabolic engineering[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14(12): 1090-1098.

[103] IGNEA C, RAADAM M H, KOUTSAVITI A, et al. Expanding the terpene biosynthetic code with non-canonical 16 carbon atom building blocks[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 5188.

[104] PIECHULLA B, ZHANG C, EISENSCHMIDT-BÖNN D, et al. Non-canonical substrates for terpene synthases in bacteria are synthesized by a new family of methyltransferases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2021, 45(6): fuab024.

[105] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. Nature, 2021, 596(7873): 583-589.

[106] LI J X, FANG X, ZHAO Q, et al. Rational engineering of plasticity residues of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua*: product specificity and catalytic efficiency[J]. Biochemical Journal, 2013, 451(3): 417-426.

[107] MALICO A A, CALZINI M A, GAYEN A K, et al. Synthetic biology, combinatorial biosynthesis, and chemo-enzymatic synthesis of isoprenoids[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2020, 47(9): 675-702.

[108] JOHNSON L A, ALLEMANN R K. Engineering terpene synthases and their substrates for the biocatalytic production of terpene natural products and analogues[J]. Chemical Communications, 2025, 61(12): 2468-2483.

[109] FARALDOS J A, ZHAO Y, O'MAILLE P E, et al. Interception of the enzymatic conversion of farnesyl diphosphate to 5-*epi*-aristolochene by using a fluoro substrate analogue: 1-fluorogermacrene A from (2*E*,6*Z*)-6-fluorofarnesyl diphosphate [J]. ChemBioChem, 2007, 8(15): 1826-1833.

[110] DEMIRAY M, MILLER D J, ALLEMANN R K. Harnessing enzyme plasticity for the synthesis of oxygenated sesquiterpenoids[J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2019, 15: 2184-2190.

[111] WEIGEL B, LUDWIG J, WEBER R A, et al. Heterocyclic and alkyne terpenoids by terpene synthase-mediated biotransformation of non-natural prenyl diphosphates: access to new fragrances and probes[J]. ChemBioChem, 2022, 23 (21): e202200211.

[112] JÄGER B, BUDDE J L, BIRKE N, et al. Chemoenzymatic generation of thio-analogues of δ-cadinene, δ-cadinol, and a thio-diquinane using 8-thio-farnesylpyrophosphate[J]. Journal of Natural Products, 2025, 88(7): 1653-1662.

[113] MA M, LI M, WU Z, et al. The microbial biosynthesis of noncanonical terpenoids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 226.

[114] REUTER T, DIEMINGER L, STEIDLE S, et al. Non-canonical C_{16} homoterpene biosynthesis widespread in actinobacteria[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2025, 64(5): e202418613.

[115] KWAK S, CROOK N, YONEDA A, et al. Functional mining of novel terpene synthases from metagenomes[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 104.

[116] WEI X, NING W, MCCADDEN C A, et al. Exploring and expanding the natural chemical space of bacterial diterpenes [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 3721.



通讯作者：许建和（1963—），男，教授，博士生导师。研究方向为酶工程、合成生物学及生化反应工程。
E-mail：E-jianhexu@ecust. edu. cn



第一作者：高天平（2003—），女，硕士研究生。研究方向为萜类生物合成与酶分子工程。
E-mail：y30250622@mail. ecust. edu. cn

作者贡献声明：

高天平：综述选题、文献调研、筛选整理，文稿撰写；黄政瑜：文献补充调研、内容梳理，参与文稿修改；李春秀：参与综述框架讨论，文稿校对与内容修订；许建和：选题指导，获取基金；审阅全文，统筹定稿。
所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突：

作者声明无利益冲突。