زیست شناسی مصنوعی متابولیت های ثانویه از طریق روش های متابولومیک

۱- مریم بمپور۲- سعید رضایی زارچی

۱- کارشناس ارشد بیوفیزیک دانشگاه پیام نور تفت
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تفت

Email: golsacmss@gmail.com
Email: srezaei_۲۰۰٦@yahoo.com

چکیده

بسیاری از متابولیت های ثانویه میکروبی دارای ارزش بیوتکنولوژیکی بالایی برای پزشکی، کشاورزی و صنایع غذایی هستند. یکی از ابزارهای ضروری در جعبه ابزار زیست شناسی مصنوعی، متابولومیک است. این بررسی نقش محوری متابولومیک را برای میکروبیولوژی مصنوعی متابولیسم ثانویه، از جمله نقش حیاتی آن در کشف ترکیبات جدید در میکروب‌ها، بررسی محصولات جانبی مسیرهای متابولیک مهندسی شده، همچنین شناسایی گلوگاه‌های اصلی برای تولید بیش از حد ترکیبات نشان می‌دهد. ما با برجسته کردن چالش‌های باقیمانده و پیشرفت‌های تکنولوژیکی اخیر که متابولومیک را به سمت تحقق پتانسیل خود به عنوان یک فناوری سنگ بنای میکروبیولوژی مصنوعی سوق می‌دهد، نتیجه‌گیری می‌کنیم.

کلمات کلیدی: متابولیک، زیست شناسی مصنوعی، متابولیسم ثانویه

۱. مقدمه

متابولیت‌های ثانویه دسته مهمی از ترکیبات بسیار ارزشمند را تشکیل می‌دهند که طیف وسیعی از کاربردها را شامل می‌شوند، از جمله داروها (مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، عوامل ضد تومور، سرکوب‌کننده‌های ایمنی)، مواد شیمیایی کشاورزی (مانند آفت‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها، ضد تغذیه)، سوخت‌های زیستی (مانند اسکوالن، اولرزین‌های افزودنی غذایی) به عنوان مثال کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، اسانس ها). یک تخمین آماری در سال ۲۰۰۵ تقریباً ۲۳۰۰۰ متابولیت میکروبی فعال زیستی شناخته شده را گزارش کرد که حدود ۱۶۵۰۰ مورد از آنها فعالیت آنتی بیوتیکی را نشان دادند [۲].

با این حال، این ترکیبات معمولاً در مقادیر بسیار کم (یا اصلاً) در شرایط آزمایشگاهی معمولی در گونه هایی که از آن منشاء می گیرند تولید می شوند. خوشبختانه، پیشرفت‌های اخیر در میکروبیولوژی مصنوعی ممکن است یک راه جایگزین بالقوه برای دسترسی به این گنجینه محصولات طبیعی فراهم کند. زیست‌شناسی مصنوعی، که هدف آن طراحی مجدد سیستم‌های بیولوژیکی برای اهداف و کاربردهای جدید است، انتقال یک مسیر بیوسنتزی متابولیت ثانویه را از ارگانیسم منشأ آن به میزبان‌های هترولوگ سازگارتر امکان‌پذیر می‌سازد، جایی که ترکیبات مورد نظر یا پیش‌سازهای آنها را می‌توان با تیترهای دلخواه تولید کرد. [۹]. یکی از ابزارهای مهم در جعبه ابزار زیست شناسی مصنوعی متابولومیک است که کل مکمل متابولیت های کوچک را در یک نمونه بیولوژیکی فهرست بندی می کند [۶].

کاربردهای متابولومیک عمومی در زیست شناسی مصنوعی اخیراً توسط الیس و گوداکر [۴] مورد بررسی قرار گرفته است که بر ادغام متابولومیک، فلوکسومیکس و مدل سازی متابولیک در طراحی و بهینه سازی میکروب های مهندسی شده تمرکز کرده اند.

در این بررسی، هدف ما نشان دادن نقش متابولومیک به طور خاص به عنوان یک ابزار تحقیقاتی در زیست شناسی مصنوعی متابولیسم ثانویه است. ما ابتدا اهمیت متابولیسم ثانویه میکروبی را برای زیست شناسی مصنوعی توصیف می کنیم. سپس پتانسیل بهره برداری از متابولومیک برای کشف ترکیبات جدید و مسیرهای بیوشیمیایی در میکروب ها را مورد بحث قرار می دهیم. نقش محوری متابولومیک در مهندسی مسیر با مثال هایی در مورد شناسایی محصولات جانبی و گلوگاه های اصلی برای تولید بیش از حد ترکیبات مورد علاقه نشان داده شده است.

علاوه بر این، ما در مورد پتانسیل متابولومیک، ادغام شده با مدل‌سازی متابولیک، به عنوان مبنایی برای پروژه‌های زیست‌شناسی مصنوعی در مقیاس بزرگ بحث می‌کنیم: متابولومیک می‌تواند برای ارائه اطلاعات کلیدی برای بهبود مدل‌های پیش‌بینی و کمک به طراحی مسیرهای مصنوعی به کمک رایانه استفاده شود. .

در نهایت، ما پیشرفت‌های مهمی را در روش‌های تحلیلی که می‌توانند از جدیدترین روندها در میکروبیولوژی مصنوعی پشتیبانی کنند، برجسته می‌کنیم.

۲. متابولیسم ثانویه و زیست شناسی مصنوعی

استخراج ژنوم باکتری، خوشه‌های ژن بیوسنتزی ثانویه متعددی را نشان داده است که به طور بالقوه برای ترکیبات جدید با ارزش بیوتکنولوژیکی بالا کدگذاری می‌کنند. این خوشه های ژنی یک منبع طبیعی تقریبا تمام نشدنی متابولیت های ثانویه برای میکروبیولوژیست های مصنوعی را تشکیل می دهند [۱].

ماهیت بسیار مدولار ماشین‌های بیوسنتزی که مسئول تولید متابولیت‌های ثانویه هستند، آنها را به یک هدف جذاب برای استراتژی‌های زیست‌شناسی مصنوعی تبدیل می‌کند، هم از طریق بازسازی خوشه‌های ژنی برای تولید مؤثرتر محصول خود و هم با ترکیب مجدد ماژول‌ها برای افزایش کسر فضای شیمیایی قابل دسترسی به سیستم های تولید بیولوژیکی. این رویکرد مهندسی منطقی را می توان با ادغام با جهش زایی تصادفی و مدل سازی متابولیک بیشتر تقویت کرد [۹].

پیشرفت‌های اخیر در سنتز ژنوم چنین استراتژی‌هایی را در مقیاس نسبتاً بزرگ واقعی می‌سازد. یک مثال برجسته از مهندسی بیوسنتز متابولیت ثانویه، تولید بیش از حد آرتمیسینیک اسید پیش ساز آرتمیزینین با استفاده از رویکرد زیست شناسی مصنوعی است.

ژن‌های کدکننده آنزیم‌های شرکت‌کننده در مراحل متوالی در مسیرهای بیوسنتزی آرتمیزینین از ساکارومایسس سرویزیه، درمنه آنوآ و اشرشیاکلی انتخاب شدند، که به دو اپرون مونتاژ شده و به یک سویه میزبان E. coli تبدیل شدند. متعاقبا چندین مرحله بهینه سازی به منظور دستیابی به تولید ترکیب کارآمد انجام شد. با نشان دادن قدرت یک استراتژی زیست شناسی مصنوعی مدولار، همان مسیر ایزوترپنوئیدی نیز به سمت بیوسنتز تاکسادین، پیش ساز داروی ضد سرطان تاکسول که به طور بالینی انجام می شود، طراحی شد و به افزایش تیتر تقریباً ۱۵۰۰۰ برابری در E. coli دست یافت.

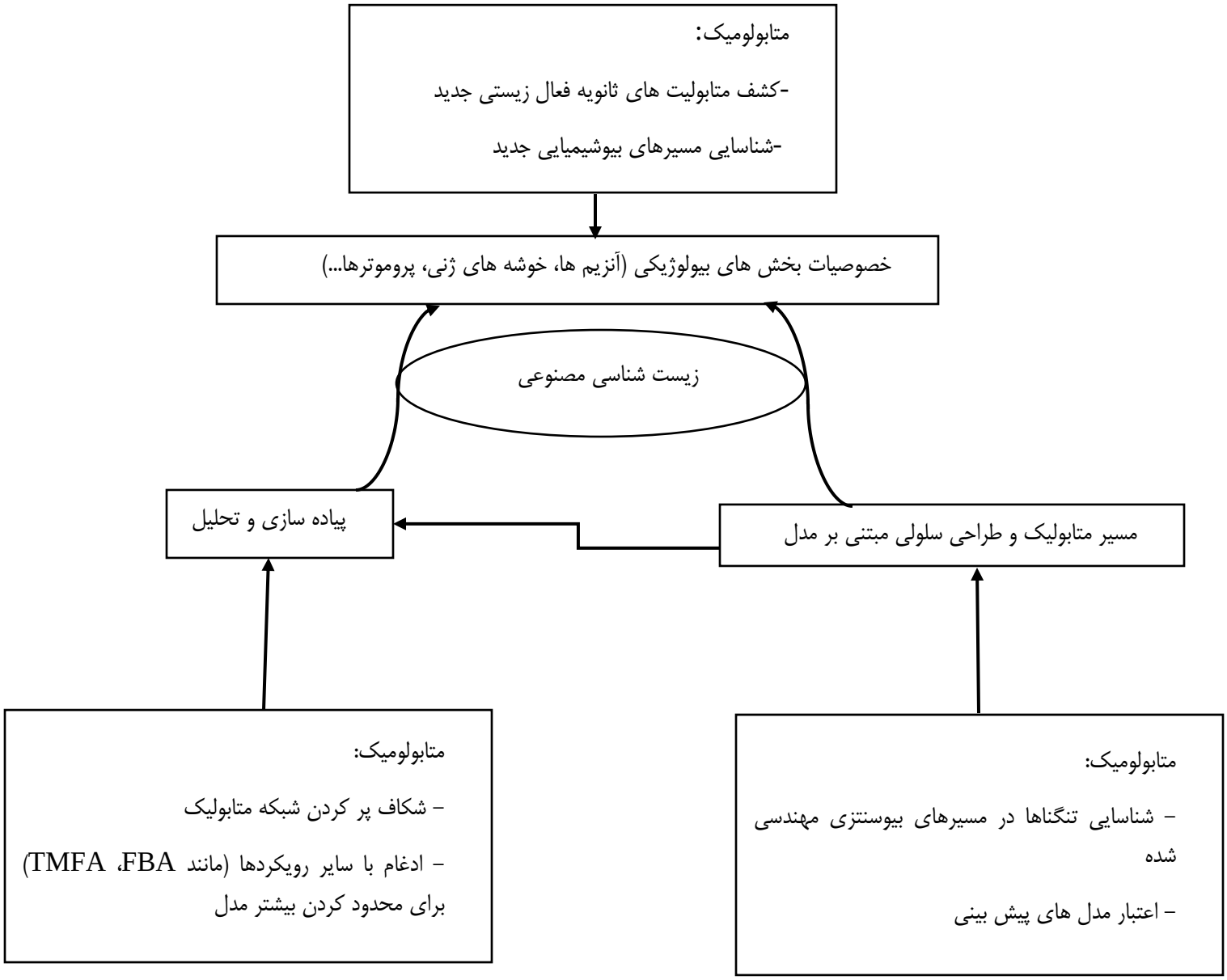
در حال حاضر، ابزارهایی برای مهندسی بیوسنتزی مشابه تولیدکنندگان متابولیت ثانویه معمولی مانند اکتینومیست ها نیز در حال توسعه هستند. توسعه میزبان‌های کاهش‌یافته با ژنوم برای بیان هترولوگ مسیرهای متابولیک مهندسی شده مورد علاقه، جزء مهم دیگری را برای جعبه ابزار زیست‌شناسی مصنوعی فراهم می‌کند، زیرا از تداخل متابولوم ثانویه درون‌زای پیچیده جلوگیری می‌کند. یک مثال قابل توجه که کاربرد میزبان های به حداقل رسیده توسط ژنوم برای تولید متابولیت های ثانویه را نشان می دهد، بیان بسیار کارآمد آنتی بیوتیک های هترولوگ (استرپتومایسین، سفامایسین C و پلادینولید) و پیش ساز ایزوترپنوئید گیاهی، آمورفادین، در یک سویه به حداقل رسیده از ژنوم از Streptomyces averilis است. [۱۴]

۳. متابولومیک و میکروبیولوژی مصنوعی

متابولومیک تجزیه و تحلیل جامع همه متابولیت ها (یا به عبارت واقعی تر: بسیاری) در یک نمونه بیولوژیکی است.از آنجایی که متابولومیک آخرین مرحله در آبشار omics است، نزدیکترین به فنوتیپ، تصویر فوری مستقیمی از وضعیت فیزیولوژیکی سلول در یک زمان خاص و تحت شرایط خاص ارائه می دهد [۱۲].

پیشرفت‌های اخیر در مطالعات متابولومیک توسط پیشرفت‌هایی در روش‌های تحلیلی در ترکیب با توسعه‌های نرم‌افزاری برای تفسیر داده‌های تجربی انجام شده است. تحقیقات گسترده در زمینه متابولومیک به نوبه خود نیروی محرکه ای برای بهبود ابزارهای تحلیلی، به ویژه در مورد طیف سنجی جرمی (MS) است. طیف سنجی جرمی به دلیل تطبیق پذیری آن در طراحی آزمایشی (تحلیل جهانی یا هدفمند، MS پشت سر هم برای اطلاعات ساختاری)، دقت جرمی بالا و حساسیت بالای آن برای شناسایی و کمی سازی (نسبتا و مطلقا) بسیار یک پلت فرم مورد علاقه برای مطالعات متابولومیک بوده است. متابولیت های کم فراوانی [۳].

برای کاربردهای میکروبیولوژیکی، MS بیشتر در ترکیب با کروماتوگرافی مایع (LC-MS)، با کروماتوگرافی گازی (GC-MS) و الکتروفورز مویرگی (EC-MS) به میزان کمتری استفاده می شود. همه این روش‌ها با موفقیت برای نمونه‌های میکروبیولوژیکی به کار گرفته شده‌اند، و این فناوری اکنون برای کاربردهای در مقیاس بزرگ به اندازه کافی بالغ شده است. در زیست شناسی مصنوعی متابولیسم ثانویه، متابولومیک می تواند نقش های مهمی را ایفا کند، هم به عنوان یک کشف و هم به عنوان یک ابزار اشکال زدایی (خلاصه شده در شکل ۱). [۷]



شکل۱- نقش متابولومیک در زیست شناسی مصنوعی متابولیسم ثانویه

۴. متابولومیک برای کشف ترکیبات جدید در میکروب ها

در ساده‌ترین کاربرد، متابولومیک می‌تواند برای شناسایی و تعیین کمیت متابولیت‌های ثانویه، یا محصولات خوشه‌های ژن متابولیت ثانویه یتیم که توسط استخراج ژنوم آشکار شده‌اند یا محصولات مورد نظر یک سویه مهندسی شده، استفاده شود. مورد اول به ویژه هنگام استفاده از رویکرد متابولومیک مقایسه ای امیدوارکننده است.

با مقایسه مشخصات متابولیک یک سویه نوع وحشی و جهش یافته‌های آن در جایی که ممکن است یک مسیر بیوسنتزی ثانویه خاموش بیدار شود، می‌توان متابولیت‌های جدیدی را که هنوز مشخص نشده‌اند، به سادگی با شناخت توده‌های فراوان متفاوت از عصاره‌های دو سویه شناسایی کرد. شناسایی اخیر یک ترکیب فعال زیستی جدید سنتز شده توسط یک خوشه ژنی پلی کتید سنتاز نوع I (PKS) در تولیدکننده کونگوسیدین و اسپیرامایسین Streptomyces ambofaciens موردی است.

در این مطالعه، تولید بیش از حد متابولیت(های) کدگذاری شده توسط نوع رمزآلود PKS I در S. ambofaciens با بیان یک ژن فعال کننده احتمالی خاص مسیر (۰۴۸۴samR)، که عضوی از LuxR بزرگ متصل به ATP را کد می کند، به دست آمد. LAL) خانواده. تجزیه و تحلیل پروفایل متابولیکی مقایسه‌ای عصاره‌های میسلیوم متانولی از سویه مزدوج که در آن خوشه ژن مرموز PKS ایجاد شد و سویه حاوی ناقل خالی دو گونه توده اصلی را نشان داد که در اولی شناسایی شدند اما در دومی وجود نداشتند.

خالص‌سازی بیشتر با HPLC نیمه آماده‌سازی و شفاف‌سازی ساختار با آنالیز رزونانس مغناطیسی هسته‌ای پروتون (۱ H NMR) تأیید کرد که این پیک‌ها با چهار ماکرولید گلیکوزیله ۵۱ عضوی جدید، به نام استامبومایسین‌های A-D مطابقت دارند. هر چهار ترکیب فعالیت ضد تکثیری علیه رده های سلولی سرطانی نشان دادند و پتانسیل ایجاد عامل ضد تومور را دارند [۸].

۵. متابولومیک و ساخت مدل پیش بینی برای پروژه های زیست شناسی مصنوعی در مقیاس بزرگ

یکی از مراحل حیاتی در ساخت مسیرهای بیوشیمیایی مصنوعی، شناسایی یک ارگانیسم میزبان مناسب است که بتواند مسیرهای متابولیک جدید را در خود جای دهد. این کار را می توان با مدل های متابولیکی در مقیاس ژنوم و پیش بینی در سیلیکو فنوتیپ یک ارگانیسم مهندسی شده توسط تعدادی از رویکردهای مبتنی بر محدودیت تسهیل کرد. در حال حاضر ساختن مدل‌های محاسباتی لازم از حاشیه‌نویسی ژنوم با توان عملیاتی بالا نسبتاً ساده است، همانطور که مدل‌سازی مقایسه‌ای اخیر ۳۷ گونه اکتینومیست نشان می‌دهد. [۵]

با این حال، برای کاربرد در زیست شناسی مصنوعی، مدل ها باید به صورت دستی و با جزئیات تنظیم شوند. در این فرآیند، متابولومیک با ارائه اطلاعاتی برای اعتبارسنجی و اصلاح مدل، این پتانسیل را دارد که نقش مهمی ایفا کند. ادغام پروفایل‌های متابولیک اندازه‌گیری شده تجربی می‌تواند اهدافی را برای پر کردن شکاف شبکه متابولیک موجودات مدل نشان دهد. در ارگانیسم مدل جدید توالی‌یابی شده Chlamydomonas reinhardtii ، تجزیه و تحلیل متابولومیک ۵۷ متابولیت را شناسایی کرد که نمی‌توانند توسط شبکه متابولیک پیش‌نویس ساخته شده از حاشیه‌نویسی ژنوم تولید شوند، که نشان می‌دهد واکنش‌های گمشده یا مسیرهای جایگزین برای توضیح بیشتر.

در خط موازی اعتبارسنجی، مجموعه داده های omics اضافی را می توان برای بهبود بیشتر کیفیت مدل ادغام کرد. برای مثال، در S. coelicolor تولیدکننده آنتی بیوتیک نشان داده شده است که یک مدل محاسباتی متابولیسم در مقیاس ژنوم، شارها را در طول تغییر متابولیک به تولید متابولیت ثانویه به درستی پیش‌بینی می‌کند، و این شارها به شدت با تغییرات مشاهده‌شده در سطوح رونوشت ژن مرتبط هستند.

اختلاف بین شار پیش‌بینی‌شده و سطح رونوشت منجر به شناسایی و تصحیح موفقیت‌آمیز خطاهای مدل‌سازی می‌شود. همان استراتژی برای تجزیه و تحلیل دقیق یک آنتی بیوتیک صنعتی بیش از حد تولید کننده، Streptomyces clavuligerus، برای مشخص کردن تغییرات در متابولیسم که بیش از حد تولید کننده را از یک سویه نوع وحشی متمایز می کند، اعمال شد [۱۰].

همراه با اطلاعات ژنومی اضافی، این داده‌ها روی یک سویه تکامل‌یافته (که توسط جهش‌زایی تصادفی ایجاد شده‌اند) می‌توانند استراتژی‌های مهندسی جدید مهمی را برای ایجاد مستقیم بیش از حد تولیدکنندگان متابولیت‌های ثانویه مورد علاقه پیشنهاد کنند.

۶. چشم اندازهای آینده

علیرغم شکوفایی اخیر در روش شناسی و انتشارات اثبات مفهوم و تحقق فزاینده پتانسیل آن برای حمایت از تحقیقات زیست شناسی مصنوعی، متابولومیک میکروبی هنوز تعدادی چالش از جمله مسائل فنی و محدودیت های تفسیر داده ها را ارائه می دهد. در حال حاضر، استفاده از پلتفرم‌های جداسازی مکمل برای متابولومیک مبتنی بر LC-MS، پوشش یک چشم‌انداز شیمیایی ناهمگن بزرگ را ممکن می‌سازد.

با این حال، شناسایی متابولیت توسط MS به دلیل تنوع شیمیایی و ساختاری بسیار زیاد برای هر توده شناسایی‌شده، یک مرحله محدودکننده سرعت در جریان کار متابولومیک، به ویژه برای روشن کردن ساختارهای جدید با دانش قبلی کمی باقی

می‌ماند. تاکنون، شناسایی جرم عمدتاً بر اساس تطبیق جرم شناسایی‌شده با پایگاه‌های داده جرمی موجود و/یا مقایسه زمان ماند و طیف‌های جرمی با ترکیبات استاندارد معتبر است.

در حال حاضر هیچ مخزن زمان نگهداری آزادانه ای برای متابولیت ها وجود ندارد که احتمالاً به دلیل تنوع قابل توجه در تنظیمات آزمایشی (و در نتیجه زمان نگهداری) در بین آزمایشگاه ها است [۱۳]. علاوه بر این، برخلاف پروتئومیکس، الگوریتم‌های کارآمدی که می‌توانند به طور منطقی الگوهای تکه تکه شدن جرم را برای طیف متابولیت‌های MS پشت سر هم پیش‌بینی و مقایسه کنند (مانند MetFrag) هنوز نیاز به توسعه بیشتر دارند.

بنابراین، تلاش برای توسعه چنین کتابخانه‌ها و ابزارهای (نیمه خودکار) برای جمع‌آوری داده‌ها از پایگاه‌های داده (مانند MassBank، Metlin، HMDB، PubChem) و حاشیه‌نویسی داده‌ها باید در اولویت قرار گیرد. آینده. جدیدترین ساختارهای متابولیت فعال جدید، طبیعی یا ایجاد شده توسط مسیرهای مصنوعی، توسط متابولومیک مبتنی بر LC-MS شناسایی و با تجزیه و تحلیل NMR مشخص شده‌اند.

یکی از رایج‌ترین چالش‌ها در شفاف‌سازی ساختار مبتنی بر NMR، حساسیت کم ذاتی آن است: در حالی که مقدار تنها چند میکروگرم برای تعیین فرمول توسط آنالیز MS بیش از اندازه کافی است، با وجود انقلاب‌های اخیر، برای تعیین ساختار توسط NMR کافی نیست. پیشرفت‌هایی که تکنیک‌های طیف‌سنجی NMR را در مقیاس نانومول حساس کرده است.

از سوی دیگر، عصاره‌های میکروبی شکسته نشده (یا «کثیف») معمولاً حاوی مخلوط‌های پیچیده‌ای از اجزا هستند که اغلب به طیف‌های NMR منجر می‌شوند که به دلیل همپوشانی پیک قابل‌توجه، تفسیر آنها دشوار است. این منطقه ای است که زیست شناسی مصنوعی قادر خواهد بود بدهی خود را به متابولومیک بازپرداخت کند: زمانی که بیدار کردن خوشه های ژنی متابولیت ثانویه جدید با بازسازی و تولید محصول نهایی در سطوح بالا و شاید حتی در اندامک های اختصاصی ممکن شود، خالص سازی مقادیر کافی برای شفاف سازی سریع ساختار مبتنی بر NRM بسیار ساده تر خواهد بود. رویکرد مهندسی زیست شناسی مصنوعی نیازمند سطحی از کنترل دقیق است که به ندرت در سیستم های بیولوژیکی به دست می آید. [۱۱]

۷. نتیجه گیری

ترکیب اخیر زیست شناسی مصنوعی با فناوری میکروسیال به دلیل توانایی آن در نظارت و دستکاری سیستم ها در سطح تک سلولی به صورت خودکار، با توان بالا و کنترل میکرو محیطی، توجه را به عنوان یک استراتژی به سوی پیشرفت در این جهت به خود جلب کرده است. برای پشتیبانی از این توسعه، به‌روزرسانی‌های جعبه ابزار متابولومیکس نیز مورد نیاز است. اولین قدم‌ها به

سمت تکنیک‌های پروفایل متابولیک مبتنی بر میکروسیال‌ها قبلاً انجام شده است، و اخیراً استراتژی‌هایی برای تجزیه و تحلیل متابولومیک سلولی نیز گزارش شده است.

چالش های کلیدی باقی مانده شامل توسعه تکنیک های تشخیص بسیار حساس، طیف گسترده ای از قابلیت شناسایی متابولیت مورد نیاز و امکان ادغام تجزیه و تحلیل متابولیک با دستگاه های میکروسیال است. روش‌های قوی شیمی تحلیلی پیشرفته و پیشرفت‌های تکنولوژیکی مورد بحث در بالا، در ترکیب با توسعه مداوم روش‌های محاسباتی جدید برای تفسیر داده‌ها، به تقویت نقش متابولومیک به عنوان قوی‌ترین متحد زیست‌شناسی مصنوعی کمک خواهد کرد.

۸. مراجع

[1] Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. and Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2). Nature 417, 141–147.

[2] Bérdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. (Tokyo) 58, 1–26.

[3] Dettmer, K., Aronov, P.A. and Hammock, B.D. (2007) Mass spectrometrybased metabolomics. Mass Spectrom. Rev. 26, 51–78.

[4] Ellis, D.I. and Goodacre, R. (2011) Metabolomics-assisted synthetic biology. Curr. Opin. Biotechnol. 23, 1–7

[5] Henry, C.S., DeJongh, M., Best, A.A., Frybarger, P.M., Linsay, B. and Stevens, R.L. (2010) High-throughput generation, optimization and analysis of genomescale metabolic models. Nat. Biotechnol. 28, 977–۹۸۲.

[6] Hollywood, K., Brison, D.R. and Goodacre, R. (2006) Metabolomics: current technologies and future trends. Proteomics 6, 4716–4723.

[7] Kersten, R.D. and Dorrestein, P.C. (2009) Secondary metabolomics: natural products mass spectrometry goes global. ACS Chem. Biol. 4, 599–601.

[8] Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G.L. and Aigle, B. (2011) Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in Streptomyces ambofaciens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 6258–6263.

[9] Medema, M.H., Alam, M.T., Breitling, R. and Takano, E. (2011) The future of industrial antibiotic production: from random mutagenesis to synthetic biology. Bioeng. Bugs 2, 230–233

[10] Medema, M.H., Alam, M.T., Heijne, W.H., van den Berg, M.A., Muller, U., Trefzer, A., Bovenberg, R.A., Breitling, R. and Takano, E. (2011) Genome-wide gene expression changes in an industrial clavulanic acid overproduction strain of Streptomyces clavuligerus. Microb. Biotechnol. 4, 300–305.

[11] Medema, M.H., Breitling, R., Bovenberg, R. and Takano, E. (2011) Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. Nat. Rev. Microbiol. 9, 131–137.

[12] Nielsen, J. and Oliver, S. (2005) The next wave in metabolome analysis. Trends Biotechnol. 23, 544–546

[13] Patti, G.J. (2011) Separation strategies for untargeted metabolomics. J. Sep. Sci. 34, 3460–3469.

[14] Ro, D.K., Paradise, E.M., Ouellet, M., Fisher, K.J., Newman, K.L., Ndungu, J.M., Ho, K.A., Eachus, R.A., Ham, T.S., Kirby, J., Chang, M.C., Withers, S.T., Shiba, Y., Sarpong, R. and Keasling, J.D. (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature 440, 940–943