

DOI: 10.16306/j.1008-861x.2023.02.013

UDP-糖基供体在中药苷类成分生物合成中的应用及研究进展

卢欣欣, 牛腾飞, 赵淑娟, 王峥涛, 王如锋

上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海中药标准化研究中心(上海 201203)

【摘要】 尿苷二磷酸(UDP)-糖基供体是三萜、黄酮和蒽醌等中药活性成分糖基化修饰的重要组成前体。近年来, 通过代谢工程策略合成苷类化合物已取得一定进展, 但 UDP-糖基供体在不同类型的底盘细胞中产量普遍偏低, 极大地限制了中药苷类化合物的高效生物合成。作者从 UDP-糖基供体的生物合成、循环再生以及代谢合成途径中关键基因调控、代谢模块优化等方面, 重点综述了 UDP-糖基供体在苷类成分合成中供应的研究进展, 并展望了 UDP-糖基供体在生物合成中的挑战和发展方向, 以为今后苷类成分的生物合成相关研究提供借鉴。

【关键词】 UDP-糖基供体; 苷类化合物; 代谢调控; 生物合成

Application and advances of UDP-sugar donors in biosynthesis of glycosides

LU Xinxin, NIU Tengfei, ZHAO Shujuan, WANG Zhengtao, WANG Rufeng

The Ministry of Education (MOE) Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China

ABSTRACT Uridine diphosphate (UDP)-sugar donors are key precursors for glycosylation modification of active ingredients of traditional Chinese medicine, such as triterpenoids, flavonoids, and anthraquinones. In recent years, some progress has been made in the synthesis of glycosides by metabolic engineering strategies, but the low yield of UDP-sugar donors in various chassis cells limits the efficient biosynthesis of traditional Chinese medicine glycosides. In this review, the research progress in the supply of UDP-sugar donors in the synthesis of glycosides were reviewed from the aspects of biosynthesis, recycling and regeneration of UDP-sugar donors as well as the regulation of key genes in the metabolic synthesis pathway and optimization of metabolic modules. Furthermore, research challenges and development directions of UDP-sugar donors in glycosides biosynthesis were discussed, in order to provide a reference for further research on glycoside biosynthesis.

KEYWORDS UDP-sugar donors; glycosides; metabolic regulation; biosynthesis

以尿苷二磷酸(UDP)-糖为糖基供体合成的苷类化合物是一类重要的化学成分, 主要来源于药用植物的提取分离^[1]。但由于药用植物中所含化学成分种类和结构十分复杂, 同时又存在一系列的化学同系物, 导致目标成分提取分离难度较大、得率较

低。这不仅限制了一些稀有活性苷类成分的获取, 而且还浪费了大量的紧缺药用资源, 尤其不利于珍稀濒危药用植物的保护与可持续利用。借助化学合成手段, 可以实现目标产物的获取, 但由于化学合成难以有效控制立体化学反应和糖基化位点, 使

[基金项目] 上海市自然科学基金资助项目(20ZR1458200); 上海市“科技创新行动计划”启明星项目(20QA1408800); 中国博士后科学基金项目(2021T140466, 2020M681371)

[作者简介] 卢欣欣, 女, 在读硕士生, 主要从事中药资源与生物技术研究

[通信作者] 牛腾飞, 博士; E-mail: niutf@shutcm.edu.cn。王如锋, 副研究员; E-mail: wrffrw0801@shutcm.edu.cn

收稿日期: 2022-11-01; 修回日期: 2022-12-14

得苷类成分的大规模生产难度较大^[2]。随着生物技术的高速发展,植物细胞培养技术逐渐成为获取苷类成分的方法之一,但其存在成本高、产量低、周期长的缺点。随着苷类化合物市场需求的日益增长,以可持续性高、操作条件温和为特点的微生物发酵合成苷类化合物成为当前研究热点。本文重点综述了 UDP-糖基供体在苷类成分异源生物合成中的应用及研究进展,主要包括 UDP-糖基供体的生物合成途径、循环再生以及代谢合成途径中关键基因调控、代谢模块优化等策略;并进一步展望了 UDP-糖基供体在苷类化合物合成中的挑战和研究方向,以期对中药苷类化合物的生物合成提供研究借鉴。

1 苷类化合物的分类

苷类化合物根据其母核结构可划分为三萜皂苷、甾体皂苷、黄酮苷、苯丙素苷、蒽醌苷和生物碱糖苷等,见表 1 和表 2。目前,三萜皂苷、甾体皂苷和黄酮苷等成分的化学和药理方面的研究相对较多。

三萜皂苷元由 6 个异戊二烯单体缩合而成,根据母核结构的不同又可分为多种类型的皂苷,如达玛烷型和羊毛甾烷型皂苷等。研究表明,达玛烷型皂苷(如人参皂苷 Rg3、Rd 等)对癌症和神经系统疾病具有显著的治疗作用^[3-5];羊毛甾烷型皂苷具有抗炎、抗菌、抗癌、抗氧化等作用^[6-9];环阿屯烷型皂苷在心血管疾病、消化系统疾病、癌症的防治方面具有显著疗效^[10];β-香树脂烷型皂苷(如甘草次酸和甘草酸等)在临床中常作为抗炎、抗癌和保肝药物使用^[11];α-香树脂烷型皂苷多数具有抑菌作用^[2,12]。

根据甾体母核 C-17 侧链构型的不同,可分为甾体皂苷和强心苷两类。甾体皂苷具有治疗心脑血管疾病、抗肿瘤、降血糖和免疫调节的功效^[13-14]。强心苷可根据 C-17 位侧链所含有不饱和内酯环的大小,划分为甲型强心苷(强心甾烯类)、乙型强心苷(海葱甾二烯或蟾蜍甾二烯),临床上用于治疗心力衰竭和心律失常等心脏疾病。

黄酮苷可根据糖苷键的类型分为 O-糖苷和 C-糖苷。氧苷通常以 3-O-糖苷、7-O-糖苷形式存在^[15-17],如槲皮素-3-O-鼠李糖苷和芹菜素-7-O-葡萄糖苷。碳苷主要以 6-C-糖苷形式存在^[18],如芹菜素-6-C-葡萄糖苷。研究表明,黄酮苷具有显著的抗氧化、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗糖尿病等药理活性^[19-21]。

在天然蒽醌类化合物中以二聚物最为常见,如

大黄中的主要有效成分大黄素(1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌)具有泻下作用^[22],豆豉植物根中的奎尼糖苷化合物用作杀菌剂和杀虫剂以及肿瘤细胞的生长抑制剂^[23-24]。

苯丙素可分为苯丙酸类、香豆素和木脂素三类。苯丙素苷具有抗氧化、抗菌、抗炎等作用^[25],如红景天中的红景天苷具有治疗神经退行性疾病的潜力^[27],松柏苷具有抗组胺释放的作用^[28]。

生物碱是一类含氮的碱性有机化合物,可分为甾类、吲哚类、异喹啉类等。甾类生物碱多以糖苷形式存在于植物中^[28],如白英中的 α-茄碱、α-卡茄碱等具有抗肿瘤活性^[29]。吲哚类生物碱种类较多、结构复杂,具有治疗心血管疾病、抗炎的药理活性^[30],如钩藤中的单萜吲哚生物碱糖苷 3-α-二氢卡丹宾碱有降血压作用^[31]。

在苷类成分中,糖基化修饰使其具有独特的药理活性,糖基的类型和数目对糖苷化合物的生物活性具有显著影响^[32]。糖基化修饰主要是在糖基转移酶的催化作用下,将 UDP-糖基供体所带的糖基转移至糖基受体,从而生成糖苷。因此,UDP-糖基供体在苷类成分的合成与应用中发挥着重要作用。

2 UDP-糖基供体的生物合成及循环再生

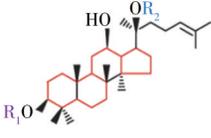
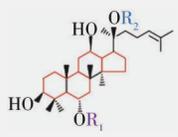
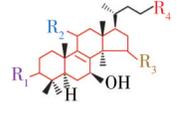
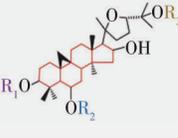
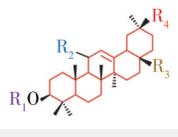
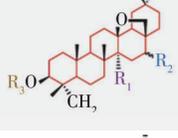
2.1 UDP-糖基供体的生物合成

生物体中主要存在胸苷二磷酸糖、鸟苷二磷酸糖、UDP-糖、胞苷一磷酸糖等多种糖基供体,它们之间可以进行相互转化。UDP-糖作为常见糖基供体,包括 UDP-葡萄糖(UDPG)、UDP-葡萄糖醛酸(UDP-GlcA)、UDP-鼠李糖(UDP-Rha)、UDP-木糖(UDP-Xyl)、UDP-半乳糖(UDP-Gal)和 UDP-阿拉伯糖(UDP-Ara)等。

在 UDP-糖基供体生物合成途径中,葡萄糖在己糖通道蛋白作用下进入胞内,随后由己糖激酶转化为 6-磷酸葡萄糖。6-磷酸葡萄糖在葡萄糖磷酸变位酶和葡萄糖-1-磷酸尿嘧啶转移酶作用下形成 UDPG。以 UDPG 为起始化合物,经过一步或多步酶促反应转化为 UDP-Rha,UDP-葡萄糖-4-异构酶(UGE1)或半乳糖-4-异构酶催化 UDPG 可以合成 UDP-Gal,UDP-葡萄糖脱氢酶催化 UDPG 得到 UDP-GlcA,然后 UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶(UAXS)或 UDP-木糖合酶(UXS)催化 UDP-GlcA 脱羧生成 UDP-Xyl。UDP-木糖-4-异构酶(UXE)催化 UDP-Xyl 的 C-4 位羟基构型转变生成 UDP-Ara。见图 1。

表 1 三萜皂苷的主要化学结构

Tab. 1 Main chemical structures of triterpenoid saponins

骨架	化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	原人参二醇	H	H	—	—
	人参皂苷 Rb1	Glc-Glc	Glc-Glc	—	—
	人参皂苷 Rb2	Glc-Glc	Glc-Ara(<i>p</i>)	—	—
	人参皂苷 Rc	Glc-Glc	Glc-Ara(<i>l</i>)	—	—
	人参皂苷 Rd	Glc-Glc	Glc	—	—
	人参皂苷 F2	Glc	Glc	—	—
	人参皂苷 Rg3	Glc-Glc	H	—	—
	人参皂苷 Rh2	Glc	H	—	—
	原人参三醇	H	H	—	—
	人参皂苷 Re	Glc-Rha	Glc	—	—
	人参皂苷 Rg1	Glc-Rha	Glc	—	—
	人参皂苷 Rg2	Glc	H	—	—
	人参皂苷 Rf	Glc-Glc	H	—	—
	人参皂苷 Rh1	Glc	H	—	—
	人参皂苷 F1	H	Glc	—	—
		羊毛脂醇	H	H	H
灵芝酸 A		=O	=O	OH	COCH ₂ CHCH ₃ COOH
灵芝酸 A-15-O-葡萄糖苷		=O	=O	Glc	COCH ₂ CHCH ₃ COOH
灵芝酸 A-26-O-葡萄糖苷		=O	=O	OH	COCH ₂ CHCH ₃ AcGlc
	环黄芪醇	H	H	H	—
	黄芪皂苷 I	Xyl(2, 3-diAc)	Glc	H	—
	黄芪皂苷 IV	Xyl	H	H	—
	黄芪皂苷 V	Xyl-Glc	H	Glc	—
	黄芪皂苷 VII	Xyl	Glc	Glc	—
	齐墩果酸	H	H	COOH	CH ₃
	甘草次酸	H	=O	CH ₃	COOH
	甘草酸	GlcA-GlcA	=O	CH ₃	COOH
	柴胡皂苷元 F	OH	OH	H	—
	柴胡皂苷 a	OH	OH	Fru-Glc	—
	柴胡皂苷元 G	OH	α-OH	H	—
	柴胡皂苷 d	OH	α-OH	Fru-Glc	—
	乌苏酸	H	CH ₃	COOH	—
	积雪草酸	OH	CH ₂ OH	COH	—
	积雪草苷	OH	CH ₂ OH	COOGlc-Glc-Rha	—

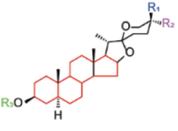
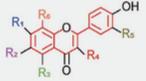
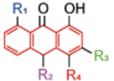
注:以不同颜色区分基团。基团对应的颜色,R₁为紫色、R₂为蓝色、R₃为姜黄色、R₄为红色。

2.2 UDP-糖基供体的循环再生 UDP-糖基供体循环再生体系可以通过减轻高浓度 UDP 对糖基转移酶的抑制作用,从而有效提高产率。在焦磷酸化酶和蔗糖合酶的 UDP-糖基供体循环再生体系中,UDP-糖焦磷酸化酶是 1-磷酸糖转化为 UDP-糖途径中的关键酶,利用该酶可在体外构建 UDPG 和

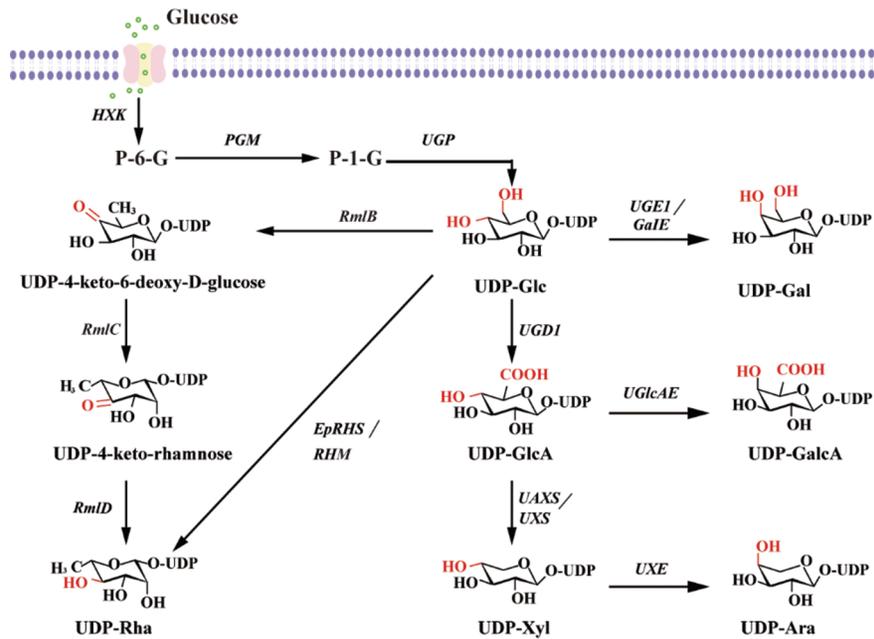
UDP-Gal 循环体系。例如, Ichikawa 等^[33]利用 UDP-焦磷酸激酶(USP)和 GalE 的级联催化反应合成 UDP-Gal,并应用于 *N*-乙酰氨基葡萄糖的糖基化修饰得到寡糖,进一步通过强化丙酮酸激酶的表达,使 UDP 与磷酸烯醇丙酮酸转化生成 UTP 和丙酮酸,从而促进 UDPG 的合成,见图 2A。此外,利用

表2 甾体苷、黄酮苷、苯丙素苷、蒽醌苷和生物碱糖苷的主要化学结构

Tab. 2 Main chemical structures of steroidal glycosides, flavonoid glycosides, phenylpropanoid glycosides, anthraquinone glycosides and alkaloid glycosides

骨架	化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
	螺甾烷醇	H	H	H	—	—	—
	蒺藜皂苷 I	H	CH ₃	Glc-Gal-Xyl-Glc	—	—	—
	蒺藜皂苷 II a	H	CH ₃	Glc-Gal	—	—	—
	蒺藜皂苷 II b	CH ₃	H	Glc-Gal	—	—	—
	芦丁	OH	H	OH	OGlc-Rha	OH	H
	木犀草素	OH	H	OH	H	OH	H
	木犀草素-6-C-葡萄糖苷	OH	Glc	OH	H	OH	Glc
	木犀草素-8-C-葡萄糖苷	OH	H	OH	H	OH	H
	大黄酚	OH	=O	CH ₃	H	—	—
	大黄酚-8-葡萄糖苷	Glc	=O	CH ₃	H	—	—
	大黄酚-8-龙胆双糖苷	Glc-Glc	=O	CH ₃	H	—	—
	芦荟苷	OH	Glc	CH ₂ OH	CH ₃	—	—
	苯丙酸	CH ₂ CH ₂ COOH	H	H	—	—	—
	红景天苷	CH ₂ CH ₂ OGlc	H	OH	—	—	—
	异红景天苷 D2	CH ₂ CH ₂ OH	H	OGlc	—	—	—

注:以不同颜色区分基团。基团对应的颜色,R₁为蓝色、R₂为紫色、R₃为青色、R₄为红色、R₅为青黄色、R₆为姜黄色。



P-6-G: 6-磷酸葡萄糖; P-1-G: 1-磷酸葡萄糖; UDP-Glc: UDP-葡萄糖; UDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose: UDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖; UDP-4-keto-rhamnose: UDP-4-酮-鼠李糖; HXK: 己糖激酶; PGM: 葡萄糖磷酸变位酶; UGP: 葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶; RmlB: UDP-葡萄糖-4, 6-脱水酶; RmlC: UDP-4-酮-6-脱氧-葡萄糖异构酶; RmlD: UDP-4-酮-鼠李糖还原酶; EpRHS/RHM: UDP-鼠李糖合酶; UGE1: UDP-葡萄糖-4-异构酶; GalE: 半乳糖-4-异构酶; UGlcAE: UDP-葡萄糖醛酸异构酶。

图1 UDP-糖基供体的生物合成途径

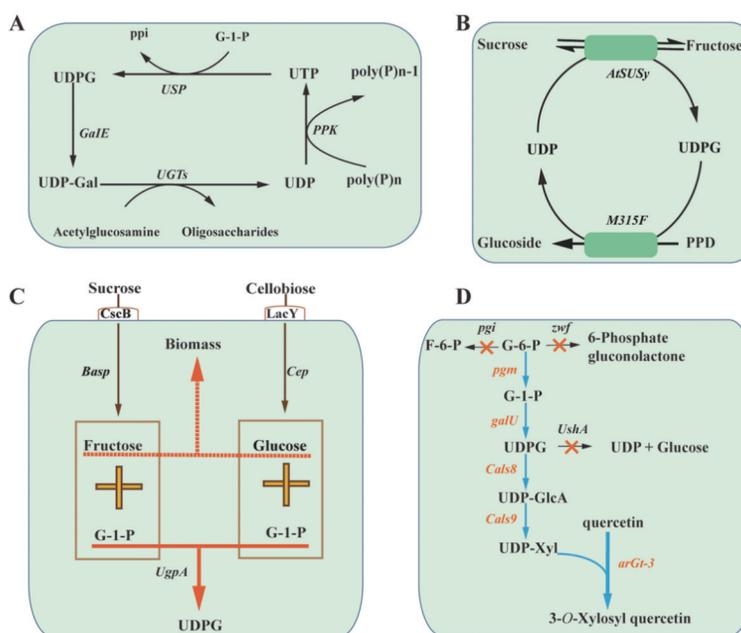
Fig. 1 Biosynthetic pathways of UDP-sugar donors

多聚磷酸激酶(PPK)和多聚磷酸盐[$\text{poly}(\text{P})_n$]替换价格昂贵的丙酮酸激酶和磷酸烯醇丙酮酸^[33],可有效降低成本,使该体系的规模化生产成为可能。蔗

糖合酶可催化蔗糖和 UDP 一步生成 UDPG 和果糖,见图 2B。与焦磷酸化酶循环再生系统相比,后者反应步骤简单,无需消耗能量,UDP-糖基供体合成效

率更高。利用蔗糖合酶 1、UDP-鼠李糖合酶与黄酮醇-7-*O*-鼠李糖基转移酶组成 UDP-Rha 再生系统,成功构建产黄酮苷的工程菌株^[34]。Ma 等^[35]构建了一种 UDPG 循环再生系统并应用于人参皂苷 Rh2 的生物合成,通过蔗糖合酶与糖基转移酶突变体 Yjic 交替反应实现了 UDPG 的循环供应,Rh2 产量

达到 3.7 g/L。尽管利用 UDP-糖基供体循环再生系统合成苷类可有效提高产量,但 UDP-糖基供体的供应仍是苷类成分高效合成的限制性因素。因此,需要进一步利用代谢工程策略增加 UDP-糖基供体的供应以提高苷类化合物的合成效率。



A 为基于磷酸激酶的 UDP-Gal 循环再生途径。UTP:尿苷三磷酸;Acetylglucosamine:乙酰葡萄糖胺;Oligosaccharides:寡糖;PPK 基因:编码多聚磷酸激酶;poly(P)_n:多聚磷酸盐;USP:编码 UDP-焦磷酸激酶;GalE:编码 UDP-半乳糖-4-异构酶。B 为基于蔗糖合酶的 UDPG 循环再生途径。Sucrose:蔗糖;Fructose:果糖;PPD:原人参二醇;Glucoside:葡萄糖苷。C 为以蔗糖和纤维二糖为碳源的 UDPG 合成途径。Fructose:果糖;Glucose:葡萄糖;Cellobiose:纤维素二糖;Biomass:生物质;CscB:蔗糖渗透酶;LacY:纤维二糖渗透酶;Basp:编码蔗糖磷酸化酶;UgpA:编码 UDP-1-磷酸转移酶;Cep:编码纤维二糖磷酸化酶。D 为重构 UDP-Xyl 合成途径。F-6-P:6-磷酸果糖;G-6-P:6-磷酸葡萄糖;G-1-P:1-磷酸葡萄糖;6-Phosphate gluconolactone:6-磷酸葡萄糖酸内酯;quercetin:槲皮素;3-*O*-Xylosyl quercetin:3-*O*-木糖基槲皮素;pgm:编码葡萄糖磷酸变位酶;galU:编码葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶;Cals8:编码 UDPG 脱氢酶;Cals9:编码 UDP-GlcA 脱氢酶;UshA:编码 UDPG 水解酶;zwf:编码 D-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;pgi:编码磷酸葡萄糖异构酶。

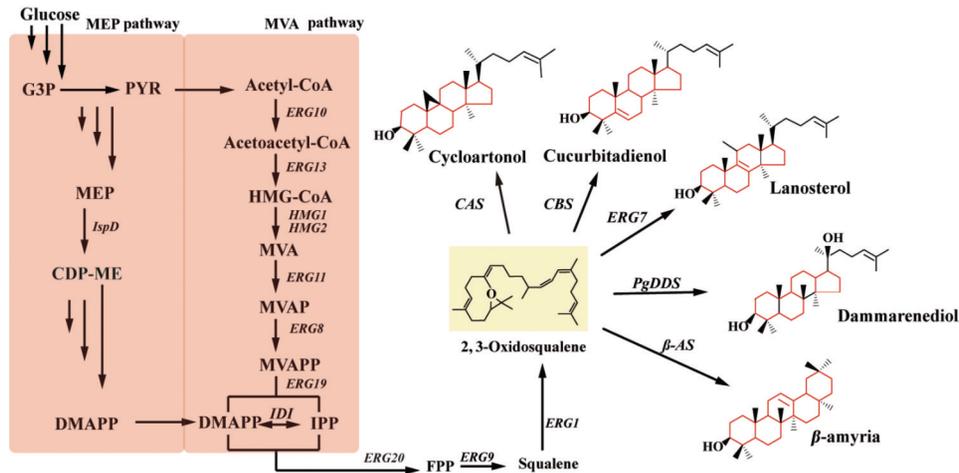
图 2 代谢工程改造 UDP-糖合成途径

Fig. 2 Modification of UDP-sugars synthesis pathways by metabolic engineering

3 UDP-糖基供体在苷类成分生物合成中的应用

3.1 UDP-糖基供体在皂苷生物合成中的应用 皂苷元的生物合成途径主要包括甲羟戊酸途径和 2-*C*-甲基-*D*-赤藓糖醇-4-磷酸途径。二甲基烯丙基二磷酸酯和异戊酰焦磷酸两个前体物质,经多步催化合成 2,3-环角鲨烯,再经 β -香树酯合酶、环阿屯醇合酶、达玛烯二醇合酶 3 种环化酶分别催化生成齐墩果烷型皂苷元、环阿屯烷皂苷元、达玛烷型皂苷元^[36-38],见图 3。最后,以 UDP-糖为糖供体,在糖基转移酶催化作用下糖基化修饰皂苷元生成相应皂苷。

近年来,越来越多的文献报道了代谢工程改造微生物异源生物合成皂苷的研究,尤其是以人参皂苷为代表的研究,见表 3。王金鹤等^[39]在酿酒酵母中表达葡萄糖磷酸变位酶 1、葡萄糖磷酸变位酶 2 和 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 1,有效促进了胞内 UDPG 的积累,从而使人参皂苷 F1 的产量达到 450.5 mg/L。Ren 等^[40]在酿酒酵母中引入拟南芥来源的 UDP-葡萄糖脱氢酶(*AtUGD1*),将酵母胞内 UDPG 转化为 UDP-GlcA,促进金盏花苷 E 的合成。由此可见,增加 UDP-糖基供体的供应可以促使苷元进一步转化,有效提高皂苷的生物合成效率。



MEP pathway: 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸酯通路; G3P: 3-磷酸甘油醛; PYR: 丙酮酸; yIspD: 2-C-甲基-D-赤藓糖醇 4-磷酸胞苷转移酶; CDP-ME: 4-二磷脂酰-2-C-甲基赤藓糖醇; DMAPP: 二甲基烯丙基二磷酸; Acetyl-CoA: 乙酰辅酶 A; Acetoacetyl-CoA: 乙酰乙酰辅酶 A; ERG10: 乙酰乙酰辅酶 A 转移酶; ERG13: HMG-CoA 合成酶; HMG-CoA: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A; HMG1/2: 3-羟基-3-甲基戊二酸 CoA 还原酶 1/2; MVA: 甲羟戊酸; ERG11: 甲羟戊酸激酶; MVAP: 5-磷酸甲羟戊酸; ERG8: 磷酸甲羟戊酸激酶; MVAPP: 甲羟戊酸-5-焦磷酸酯; ERG19: 二磷酸戊二酸酯; IDI: 异戊烯基二磷酸异构酶; IPP: 异戊烯基二磷酸; ERG20: 法呢基二磷酸合成酶; FPP: 法呢基二磷酸酯; ERG9: 角鲨烯合酶; Squalene: 角鲨烯; ERG1: 角鲨烯环氧酶; 2,3-Oixdosqualene: 2,3-氧化角鲨烯; CAS: 环阿屯醇合成酶; CBS: 葫芦二烯醇合成酶; Cycloartenol: 环阿屯醇; Cucurbitadienol: 葫芦二烯醇; ERG7: 羊毛甾醇合成酶; Lanosterol: 羊毛脂醇; PgDDS: 达玛烯二醇合成酶; Dammareniol: 达玛烯二醇; β -AS: β -香树脂合酶; β -amyrin: β -香树脂醇。

图 3 皂苷前体生物合成途径

Fig. 3 Saponin precursors biosynthetic pathways

表 3 人参皂苷的异源生物合成

Tab. 3 Heterologous biosynthesis of ginsenosides

化合物	糖供体	受体	宿主	基因调控	产量(mg/L)	文献
人参皂苷 Rg3	UDP-Glc	PPD	<i>S. cerevisiae</i>	<i>PgDDS</i> \uparrow , <i>ATR2.1</i> \uparrow , <i>tHMG1</i> \uparrow , <i>ERG20</i> \uparrow , <i>PgERG1</i> \uparrow , <i>ERG9</i> \uparrow , <i>UGTPg45</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>UGTPg29</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow	3.5 μ mol/g 细胞干重	[3]
人参皂苷 CK	UDP-Glc	PPD	<i>Y. lipolytica</i>	<i>ERG1</i> \uparrow , <i>ERG9</i> \uparrow , <i>ERG12</i> \uparrow , <i>ERG19</i> \uparrow , <i>ERG20</i> \uparrow , <i>tHMG1</i> \uparrow , <i>OpDs</i> \uparrow , <i>PPDS-ATR1</i> (<i>P. ginseng</i> , <i>A. thaliana</i>) \uparrow , <i>UGT1</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow	161.8	[5]
GA-3-O-glucoside	UDP-GlcA UDP-Glc	GA	<i>E. coli</i>	<i>UGT73C11</i> (<i>B. vulgaris</i>) \uparrow		[11]
人参皂苷 Rh2	UDP-Glc	PPD	<i>E. coli</i>	<i>AtSUSy</i> (<i>A. thaliana</i>), <i>YjiC</i> (<i>B. Subtilis168</i>) \uparrow	3 000.7	[35]
人参皂苷 F1	UDP-Glc	PPT	<i>S. cerevisiae</i>	<i>SynPgDDS</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>SynPgPPDS</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>SynPgPPT</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>Pg3-29</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>AtCPR1</i> (<i>A. thaliana</i>) \uparrow	450.5	[39]
人参皂苷 Rh2	UDP-Glc	PPD	<i>S. cerevisiae</i>	<i>UGT51</i> (semi-rational design), <i>PgPPDS</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>ATR1/ATR2</i> (<i>A. thaliana</i>) \uparrow , <i>PGM1</i> \uparrow , <i>UGP1</i> \uparrow , Δ EGH1	300.0	[43]
人参皂苷 Rh2	UDP-Glc	PPD	<i>S. cerevisiae</i>	<i>synPgCPR1</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>tHMG1</i> \uparrow , <i>ERG20</i> \uparrow , <i>ERG10</i> \uparrow , <i>ERG9</i> \uparrow , <i>synDDS</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>synPPDS</i> (<i>P. ginseng</i>) \uparrow , <i>ERG13</i> \uparrow , <i>ERG12</i> \uparrow , <i>ERG8</i> \uparrow , <i>ERG10</i> \uparrow , <i>ERG19</i> \uparrow , <i>IDI1</i> \uparrow , <i>UGTPg50-HV</i> \uparrow	179.3	[44]

3.1.1 供给模块优化 皂苷生物合成途径的构建主要包括皂苷苷元供给模块和 UDP-糖供给模块两部分^[41]。例如在皂苷苷元供给模块中,通过点突变降低羊毛脂醇合成酶(ERG7)的活力,使 2,3-氧化角鲨烯更多地转化为三萜类化合物^[42]。王金鹤等^[39]利用强启动子 P_{TDH3} 分别控制 *PgPPDS* 和 *ATR1/*

ATR2 基因,人参皂苷 Rh2 的产量达到 6.08 mg/L。UDP-糖基供体供给模块中包含 3 个关键基因 *HXK1*、*PGM*、*UGP*, 为了提高 UDPG 的合成通量, Zhuang 等^[43] 分别利用启动子 P_{PGK1} 、 P_{FBA1} 、 P_{TDH3} 及终止子 T_{ADH1} 、 T_{TDH2} 、 T_{TPI1} 控制 *PGM1*、*PGM2*、*UGP1* (见图 1), 将其整合至酵母染色体, UDPG 产量达到

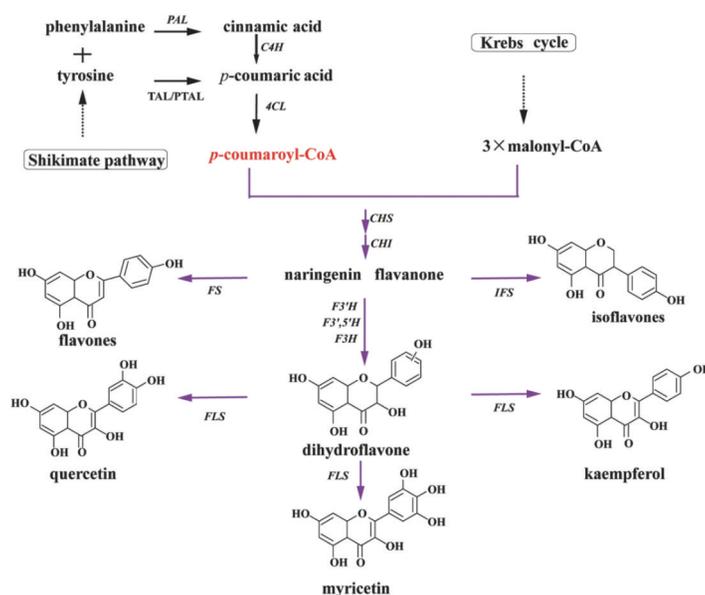
44.30 mg/L,是起始菌株的 8.65 倍。上述研究表明,增强糖基供体的合成,可以有效平衡糖基供体与受体的供应,从而实现微生物高效合成目标皂苷。

3.1.2 关键基因调控 过表达合成途径关键基因,可以有效增加前体化合物的代谢通量、提高目标产物的积累量。PGM1 和 UGP1 是 UDPG 生物合成途径中的限速酶。在酵母菌株中过表达 UGP1,工程菌株 ZYM7(4)-E 合成的 Rh2 比对照菌株 ZYM7(4)-EM 提高了 65%^[44]。将 *tHMG1*,*ERG9*,*ERG20* 和人参皂苷 CK 合成途径关键基因 *OpDs*,*PPDS*,*ATRI* 与 *UGT1* 整合至酵母基因组的多拷贝位点上,在 5 L 的发酵体系中重组菌株可生产 161.8 mg/L 人参皂苷 CK^[7]。Lu 等^[45]在酵母中过表达糖基转移酶与拟南芥来源的蔗糖合酶,实现级联反应,使 UDPG 高效再生,通过分批补料发酵非天然 PPT 型人参皂苷可达到 8.66 g/L。除过表达关键基因之外,将合成途径中的关键酶进行融合表达也是重要的代谢策略

之一。通过强化中间体的物质传输,减少中间体扩散、降解、转化引起的损失,可实现目标产物的高效积累。

3.2 UDP-糖基供体在黄酮苷生物合成中的应用

黄酮类化合物生物合成途径见图 4。以葡萄糖作为碳源,经莽草酸途径合成酪氨酸,酪氨酸氨酰化酶将酪氨酸转化为对香豆酸,在 4-酰基辅酶 A 连接酶、查尔酮合成酶、黄酮醇合成酶作用下生成黄酮醇,再经黄酮合成酶、异黄酮合成酶、黄酮-3-羟化酶等催化生成相应苷元,进而在糖基转移酶的催化作用下合成多种黄酮苷。目前已有多种黄酮苷的异源合成报道,见表 4。研究人员通过过表达 UDP-鼠李糖合成酶,调控相关途径基因供应适量的山柰酚,实现了山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷产量的显著增加^[43]。平衡供应糖供体(UDP-或 dTDP-鼠李糖)和糖基受体(山柰酚)可有效促进山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷的生物合成速率。



phenylalanine: 苯丙氨酸; tyrosine: 酪氨酸; shikimate pathway: 莽草酸途径; cinnamic acid: 肉桂酸; *p*-coumaric acid: *p*-香豆酸; *p*-coumaroyl-CoA: *p*-香豆酰辅酶 A; malonyl-CoA: 丙二酰辅酶 A; flavones: 黄酮; naringenin flavanone: 柚皮素黄烷酮; isoflavones: 异黄酮; dihydroflavone: 二氢黄酮; kaempferol: 山柰酚; myricetin: 肉豆蔻素; PAL: 苯丙氨酸解氨酶; TAL/PTAL: 酪氨酸脱氨酶; C4H: 肉桂酸-4-羟化酶; 4CL: 4-香豆酰-CoA 合成酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; F3H: 黄烷酮-3-羟化酶; F3'H: 黄酮-3'-羟化酶; F3',5'H: 黄酮-3',5'-羟化酶; FLS: 黄酮合成酶; IFS: 异黄酮合成酶; FLS: 黄酮醇合成酶; 实线代表单个生物合成步骤,虚线代表多步合成步骤。

图 4 黄酮生物合成途径

Fig. 4 Biosynthesis pathway of flavonoids

3.2.1 供给模块优化 提高内源 UDP-糖供给模块也是构建高产黄酮苷工程菌株的重要环节。研究表明,在重组菌株中引入由磷酸葡萄糖变位酶、UGP 组成的 UDPG 生物合成途径^[47],但胞内合成 UDPG 含量仍然不足,导致大黄素-6-*C*-葡萄糖苷和木犀草

素-6-*C*-葡萄糖苷产量较低,故进一步引入葡萄糖激酶和葡萄糖渗透蛋白,增强 UDPG 合成通量,糖苷的产量提高了 1.4 倍。此外,在重组菌株中引入蔗糖渗透酶、蔗糖磷酸化酶、尿苷酰转移酶,可以实现以蔗糖为碳源合成 UDPG,紫云英苷产量从 570 mg/L

表4 黄酮苷异源生物合成

Tab. 4 Heterologous biosynthesis of flavonoid glycosides

化合物	糖供体	受体	宿主	基因调控	产量(mg/L)	文献
山柰酚-3-O-鼠李糖苷	UDP-Rha	山柰酚	<i>E. coli</i>	<i>TAL</i> (<i>S. espanaensis</i>), <i>Os4CL</i> (<i>O. sativa</i>), <i>PeCHS</i> and <i>PeFLS</i> (<i>P. eurameri-cana</i>), <i>AtUGT78D1</i> (<i>A. thaliana</i>), <i>RHM2</i> ↑, <i>ppSA</i> ↑, <i>tktA</i> ↑, <i>aroG</i> ↑, <i>tyrA</i> ↑, Δ <i>tyrR</i> , Δ <i>pheA</i> , Δ <i>icdA</i>	57	[46]
大黄素-6-C-葡萄糖苷	UDP-Glc	大黄素	<i>E. coli</i>	<i>glk</i> (<i>Z. mobilisi</i>), <i>pgm2</i> (<i>B. licheniformis</i>) ↑, <i>galU</i> (<i>E. coli</i> K-12), <i>glf</i> (<i>Z. mobilisi</i>), <i>UGT708D1</i> (<i>Glycine max</i>), <i>GtUF6CGT1</i> (<i>Gentiana triflora</i>)	9.0	[47]
木犀草素-6-C-葡萄糖苷	UDP-Glc	木犀草素	<i>E. coli</i>	<i>glk</i> (<i>Z. mobilisi</i>), <i>pgm2</i> (<i>B. licheniformis</i>) ↑, <i>galU</i> (<i>E. coli</i> K 12) ↑, <i>glf</i> (<i>Z. mobilisi</i>), <i>UGT708D1</i> (<i>Glycine max</i>), <i>GtUF6CGT1</i> (<i>Gentiana triflora</i>)	14.0	[47]
黄芪甲苷	UDP-Glc	山柰酚	<i>E. coli</i>	<i>Cist3h::CufIs</i> (<i>C. sinensis C.unshiu</i>), <i>ATUGT78D2</i> (<i>A. thaliana</i>)	1 738.5±24.8	[48]
槲皮素-3-O-木糖苷	UDP-Xyl	槲皮素	<i>E. coli</i>	<i>nfa44530</i> (<i>N. farcinica</i>), <i>galU</i> (<i>E. coli</i> K12), <i>calS8</i> and <i>calS9</i> (<i>M. echinos-pora</i>), <i>arGt-3</i> (<i>A. thaliana</i>), Δ <i>pgi</i> , Δ <i>zwf</i> , Δ <i>UshA</i>	23.8	[55]
槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸	UDP-GlcA	槲皮素	<i>E. coli</i>	<i>Ugd</i> (<i>E. coli</i>) ↑, <i>VvUGT</i> (<i>V. vinifera</i>) ↑, Δ <i>arnA</i>	687.0	[56]
槲皮素-3-O-半乳糖苷	UDP-Gal	槲皮素	<i>E. coli</i>	<i>OsUGE</i> (<i>Oryza sativa</i>) ↑, <i>PhUGT</i> (<i>Petunia hybrid</i>) ↑,	280.0	[56]

增加至 1 708 mg/L^[48], 见图 2C。在大肠杆菌中引入纤维二糖磷酸化途径与鼠李糖合酶组成的 UDP-Rha 合成途径, UDP-Rha 的产量达到 82.2 mg/L^[49]。由于合成 UDP-Rha 需要 NADPH 作为辅因子, 通过进一步构建以 NADPH 为还原剂的 UDP-Rha 合成模块, 重组菌株中槲皮素鼠李糖苷的产量高达 3 522 mg/L。Li 等^[50]在大肠杆菌中共表达来源于矮牵牛的糖基转移酶和 GalE, 进一步引入 Pgm 和 GalU 重构 UDPG 合成途径, 提高 UDPG 合成通量, 可以有效促进槲皮素-3-O-半乳糖苷的积累。Wang 等^[51]在大肠杆菌中引入 LacY, Cep 和 UgpA (UDP-1-磷酸转移酶), 重构 UDPG 合成途径, 使染料木苷产量高达 41.5 mg/L。上述研究结果表明, 通过强化 UDPG 合成途径关键基因的表达、引入以纤维二糖为前体的 UDPG 合成途径, 可以有效促进 UDPG 的积累, 从而提高目标糖苷的产量。

3.2.2 关键基因适配调控 为提高花青素-3-O-葡萄糖苷(C3G)的产量, 研究人员将大肠杆菌来源的 UDPG 合成途径(由尿苷单磷酸激酶 UMK、核苷二磷酸激酶 NDPK、葡萄糖磷酸变位酶 PGM、GalU 组成)构建至谷氨酸棒状杆菌中^[52], 但将该模块与花青素合酶、糖基转移酶共表达后并没有提高 C3G 的产量。推测其原因为大肠杆菌来源的 UDPG 合成途径基因的过表达, 可能激活了谷氨酸棒状杆菌中的 UDPG 降解途径^[53]。鉴于在谷氨酸棒状杆菌中过表达 GalU 可增加海藻糖产量^[54], 故仅过表达 UDPG 合成途径的两个关键基因 *pgm*, *galU*, 发现谷氨酸棒

杆菌中 C3G 产量为 31.8 mg/L, 比对照菌株提高了 4.2 倍^[53]。由此可知, 仅简单将途径基因构建至宿主细胞中, 并不能轻易提高糖基供体的积累量, 需要通过考察关键基因的删减、增加或适配调控, 才能有效提高 UDP-糖基供体的产量。

3.2.3 代谢流分配 在黄酮生物合成途径中, 酪氨酸是重要的前体化合物, 过表达莽草酸途径相关酶可显著增加酪氨酸的积累^[52], 见图 4。Yang 等^[46]发现山柰酚-3-O-鼠李糖苷的合成中过表达 RHM 可以提高 UDP-Rha 的产量, 但是山柰酚-3-O-鼠李糖苷的产量并没有明显变化, 这可能由于山柰酚的供应不足而导致。故进一步敲除 *tyrR* (编码酪氨酸转录因子)、*pheA* (编码预苯酸脱水酶)、*icdA* (编码异柠檬酸脱氢酶) 基因, 阻断酪氨酸的旁路途径, 促进山柰酚的进一步积累, 使 UDP-糖供体与糖受体供应平衡, 最终山柰酚-3-O-鼠李糖苷产量达到 57 mg/L^[46]。上述研究表明, UDP-糖供体与糖受体之间的平衡对糖苷产量的增加至关重要。

此外, Pandey 等^[55]在大肠杆菌中采用代谢调控策略, 成功将槲皮素-3-O-木糖苷产量提高至 23.78 mg/L。首先, 通过过表达 GalU、UDPG 脱氢酶和 UDP-GlcA 脱羧酶, 增加 UDP-Xyl 合成途径的代谢流, 提高胞内 UDP-Xyl 的含量; 进一步敲除了大肠杆菌的内源性基因磷酸葡萄糖异构酶和 D-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 以阻止葡萄糖-6-磷酸转化成果糖-6-磷酸和 6-磷酸葡萄糖内酯, 敲除 UDP-葡萄糖水解酶阻断 UDPG 降解通路, 见图 2D。因此, 阻断前体支路代

谢途径可以有效促进代谢流转化生成 UDP-糖基供体,从而促进糖苷的生物合成。协同引入 UDP-糖基供体生物合成途径和阻断支路代谢途径是提高目标产物产量的有效策略之一。

4 小结与展望

近年来,随着中药苷类成分研究的不断深入,越来越多的具有优良生物活性的药用化合物被报道,且逐步应用于临床,如用于心脑血管疾病防治的心脑舒通,其主要成分是蒺藜果实总皂苷。目前,由于人口增长、环境恶化等因素导致药用植物供不应求,市场急需拓展药用植物的生产模式,开辟中药资源发展新途径,为中药资源长期可持续利用创造新的条件。随着代谢工程和合成生物学技术的发展,利用微生物合成药用植物活性成分已成为新的研究热点。

目前,利用微生物底盘细胞生产苷类化合物已经得到广泛应用。随着代谢工程、合成生物学、蛋白质工程和微生物学的发展,越来越多的研究报道构建皂苷、黄酮苷生物合成的底盘细胞、调控代谢途径增加苷类化合物合成途径的代谢通量,这些极大地促进了苷类的异源生物合成向规模化和产业化方向发展。但是,天然产物的生物合成途径大都需要 P450 酶的参与,由于 P450 酶具有区域性表达、催化效率较低、催化机制复杂等特性,限制了天然产物的生产效率。因此,利用冷冻电镜技术、晶体结构解析 P450 酶的催化机理,酶工程技术定向进化 P450 酶,改善 P450 酶的催化效率,可以有效提高糖苷化合物的合成效率。

苯丙素苷、蒽醌糖苷和生物碱糖苷等糖苷的异源生物合成鲜有报道,严重阻碍了苯丙素苷、蒽醌糖苷和生物碱糖苷的药物开发与临床应用。因此,后续研究可利用第三代测序技术、多组学技术和大数据分析技术挖掘天然产物生物合成途径的功能基因,解析天然产物生物合成途径;再利用合成生物学技术在微生物体内完成苯丙素苷、蒽醌糖苷和生物碱糖苷合成途径的重构,实现糖苷化合物细胞工厂的构建。这不仅为新型糖苷化合物的研发指明了方向,也为糖苷化合物的异源生物合成和工业化生产提供了指导。

参考文献:

[1] THIBODEAUX C J, MELANCON C E, LIU H W. Natural-product

sugar biosynthesis and enzymatic glycodiversification [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(51): 9814-9859.

- [2] JANG E, INN K S, JANG Y P, et al. Phytotherapeutic activities of *sanguisorba officinalis* and its chemical constituents: a review [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(2): 299-318.
- [3] WANG P, WEI Y, FAN Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts [J]. *Metab Eng*, 2015, 29: 97-105.
- [4] LU J, YAO L, LI J X, et al. Characterization of UDP-glycosyltransferase involved in biosynthesis of ginsenosides Rg1 and Rb1 and identification of critical conserved amino acid residues for its function [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(36): 9446-9455.
- [5] YAN X, FAN Y, WEI W, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6): 770-773.
- [6] SOHRETOGLU D, HUANG S. *Ganoderma lucidum* polysaccharides as an anti-cancer agent [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(5): 667-674.
- [7] XU J W, ZHAO W, ZHONG J J. Biotechnological production and application of ganoderic acids [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(2): 457-466.
- [8] CHANG T S, WU J Y, WANG T Y, et al. Uridine diphosphate-dependent glycosyltransferases from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 catalyze the 15-*O*-glycosylation of ganoderic acid A [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 34-69.
- [9] CHANG T S, CHIANG C M, KAO Y H, et al. A New triterpenoid glucoside from a novel acidic glycosylation of ganoderic acid via recombinant glycosyltransferase of *Bacillus subtilis* [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 34-57.
- [10] WANG Y P, LI X Y, SONG C Q, et al. Effect of astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice [J]. *Acta Pharmacol Sinica*, 2002, 23(3): 263-266.
- [11] LU X C, ZHANG L, FENG X D, et al. Biosynthesis of glycyrrhetic acid-3-*O*-monoglucose using glycosyltransferase UGT73C11 from *Barbarea vulgaris* [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2017, 56(51): 14949-14958.
- [12] SHUKLA A, M. RASIK A, N. DHAWAN B. Asiaticoside-induced elevation of antioxidant levels in healing wounds [J]. *Pharmacol Res*, 1999, 13(1): 50-54.
- [13] LI F, XU Q, ZHENG T, et al. Metabonomic analysis of *allium macrostemon bunge* as a treatment for acute myocardial ischemia in rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88: 225-234.
- [14] LEE M S, YUET J C, KONG S K, et al. Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(11): 1248-1254.
- [15] YANG X, JIANG Y, YANG J, et al. Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2015, 44(1): 93-104.

- [16] HIROMOTO T, HONJO E, NODA N, et al. Structural basis for acceptor-substrate recognition of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase from *Clitoria ternatea* [J]. *Protein Sci*, 2015, 24(3): 395-407.
- [17] XIAO J, MUZASHVILI T S, GEORGIEV M I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 321(6): 1145-1156.
- [18] VEITCH N C, GRAYER R J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 281(10): 1626-1695.
- [19] LIN L, LIU A, LIU J, et al. Protective effects of scutellarin and breviscapine on rain and heart ischemia in rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(3): 327-332.
- [20] GANESHPURKAR A, SALUJA A K. The pharmacological potential of rutin [J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(2): 149-164.
- [21] COURTS F L, WILLIAMSON G. The occurrence, fate and biological activities of C-glycosyl flavonoids in the human diet [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(10): 1352-1367.
- [22] JIA X, IWANOWYCZ S, WANG J, et al. Emodin attenuates systemic and liver inflammation in hyperlipidemic mice administrated with lipopolysaccharides [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2014, 239(8): 1025-1035.
- [23] DERKSEN C H, NIEDERLANDER A G, BEEK T. A nalysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 978(1-2): 119-127.
- [24] DELIBERTO S T, WERNER S J. Review of anthraquinone applications for pest management and agricultural crop protection [J]. *Pest Manag Sci*, 2016, 72(10): 1813-1825.
- [25] ZHANG Y, SHI J, NI Y, et al. Tracing the mass flow from glucose and phenylalanine to pinoresinol and its glycosides in *Phomopsis* sp. XP-8 using stable isotope assisted TOF-MS [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18495.
- [26] ZHANG L, YU H, SUN Y, et al. Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 564(1-3): 18-25.
- [27] HEMM M R, RIDER S D, OGAS J, et al. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots [J]. *Plant J*, 2004, 38(5): 765-778.
- [28] VALERY M. Astonishing diversity of nabural surfactants: 6. Biologically active marine and terrestrial alkaloid glycosides [J]. *Liqids*, 2005, 40(11): 1081-1104.
- [29] 吴桐, 王建农. 茄科植物糖苷生物碱抗肿瘤活性及其构效关系研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(12): 2142-2147.
- WU T, WANG J N. Research progress on antitumor activity and structure-activity relationship of glycoalkaloids from *Solanaceae* plants [J]. *Natural Product Research and Development*, 2020, 32(12): 2142-2147.
- [30] WU Y, ZHANG Z X, HU H, et al. Novel indole C-glycosides from *isatis indigotica* and their potential cytotoxic activity [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(2): 288-292.
- [31] AISAKA K, HATTORI Y, KIHARA T, et al. Hypotensive action of 3a-dihydrocadambine, an indole alkaloid glycoside of *uncaria hooks* [J]. *Planta Medica*, 1985, 51(5): 424-427.
- [32] 裴月湖, 娄红祥, 张卫东, 等. 天然药物化学(第7版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 267-268.
- PEI Y H, LOU H X, ZHANG W D, et al. *Natural Medicinal Chemistry (7th Edition)* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016: 267-268.
- [33] ICHIKAWA Y, WANG R, WANG C. Regeneration of sugar nucleotide for enzymatic oligosaccharide synthesis [J]. *Meth Enzymol*, 1994, 247: 107-127.
- [34] NOGUCHI T, SHIBA T. Use of *Escherichia coli* polyphosphate kinase for oligosaccharide synthesis [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(8): 1594-1596.
- [35] MA W, ZHAO L, MA Y D, et al. Oriented efficient biosynthesis of rare ginsenoside Rh2 from PPD by compiling UGT-Yjic mutant with sucrose synthase [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 146: 853-859.
- [36] THAPA S B, PANDEY R P, BASHYAL P, et al. Cascade biocatalysis systems for bioactive naringenin glucosides and quercetin rhamnoside production from sucrose [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(19): 7953-7969.
- [37] TANSAKUL P, SHIBUYA M, KUSHIRO T, et al. Dammarenediol-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis, in *Panax ginseng* [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(22): 5143-5149.
- [38] 徐晓双, 张福生, 秦雪梅. 三萜皂苷生物合成途径及关键酶的研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2014, 16(11): 2440-2448.
- XU X S, ZHANG F S, QIN X M. Research advances on triterpenoid saponins biosynthesis and it's key enzymes [J]. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, 2014, 16(11): 2440-2448.
- [39] 王金鹤, 王冬, 李畏娟, 等. 酿酒酵母工程菌 UDP-葡萄糖供给模块的优化与人参皂苷 F1 生产 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(9): 4596-4604.
- WANG J H, WANG D, LI W X, et al. Optimization of UDP-glucose supply module and production of ginsenoside F1 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 44(9): 4596-4604.
- [40] REN S, SUN Q, ZHANG L, et al. Sustainable production of rare Oleanane-type ginsenoside Ro with an artificial glycosylation pathway in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Green Chem*, 2022, 24(21): 8302-8313.
- [41] CHU L L, MONTECILLO J A V, BAE H. Recent advances in the metabolic engineering of yeasts for ginsenoside biosynthesis [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 139.
- [42] GUO H, WANG H, CHEN T, et al. Engineering critical amino residues of lanosterol synthase to improve the production od

- triterpenoids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. ACS Synth Biol, 2022, 11(8): 2685-2696.
- [43] ZHUANG Y, YANG G Y, CHEN X, et al. Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh2 in yeast via repurposing a key promiscuous microbial enzyme[J]. Metab Eng, 2017, 42: 25-32.
- [44] WANG P, WEI W, YE W, et al. Synthesizing ginsenoside Rh2 in *Saccharomyces cerevisiae* cell factory at high-efficiency [J]. Cell Discov, 2019, 5: 5.
- [45] LU Z, XU X L, TIAN Y N, et al. Single site mutations of glycosyltransferase with improved activity and regioselectivity for directed biosynthesis of unnatural protopanaxatriol-type ginsenoside product[J]. Mol Catal, 2021, 515: 111937.
- [46] YANG S M, HAN S H, KIM B G, et al. Production of kaempferol 3-O-rhamnoside from glucose using engineered *Escherichia coli* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(8): 1311-1318.
- [47] SHRESTHA A, PANDEY R P, DHAKAL D, et al. Biosynthesis of flavone C-glucosides in engineered *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(3): 1251-1267.
- [48] PEI J, DONG P, WU T, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for astragaloside biosynthesis [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(42): 7966-7972.
- [49] GU N, QIU C, ZHAO L, et al. Enhancing UDP-Rhamnose supply for rhamnosylation of flavonoids in *Escherichia coli* by regulating the modular pathway and improving NADPH availability[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(35): 9513-9523.
- [50] LI G, ZHU F, WEI P, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for hyperoside biosynthesis [J]. Microorganisms, 2022, 10(3): 628.
- [51] WANG Z, LI X, DAI Y Q, et al. Sustainable production of genistin from glycerol by constructing and optimizing *Escherichia coli* [J]. Meta Eng, 2022, 74: 206-219.
- [52] LIM C G, WONG L, BHAN N, et al. Development of a recombinant *Escherichia coli* strain for overproduction of the plant pigment anthocyanin [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(18): 6276-6284.
- [53] ZHA J, ZANG Y, MATTOZZI M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anthocyanin production [J]. Microb Cell Fact, 2018, 17(1): 143.
- [54] PADILLA L, MORBACH S, KRAMER R, et al. Impact of heterologous expression of *Escherichia coli* UDP-glucose pyrophosphorylase on trehalose and glycogen synthesis in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(1): 3845-3854.
- [55] PANDEY R P, MALLA S, SIMKHADA D, et al. Production of 3-O-xylosyl quercetin in *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(5): 1889-1901.
- [56] KIM S Y, LEE H R, PARK K S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of flavonoid-O-glucuronides and flavonoid-O-galactoside [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(5): 2233-2242.

(编辑:杨轶舜)

(上接第 60 页)

- [15] 韩林,王敏.原儿茶酸通过 CD36/AMPK 信号通路改善高脂诱导血管内皮氧化损伤及作用机制研究[C]//中国食品科学技术学会第十七届年会摘要集.西安:中国食品科学技术学会, 2020: 244-245.
- HAN L, WANG M. Effects of protocatechuic acid on high-fat induced vascular endothelial oxidative damage through CD36/AMPK signaling pathway and its mechanism [C]//Abstract of 17th Annual Meeting of Chinese Institute of Food Science and Technology. Xi'an: Conference of Chinese Institute of Food

Science and Technology, 2020: 244-245.

- [16] 上海市药品监督管理局.上海市药品监督管理局关于上海市中药配方颗粒质量标准(第三批)的公示[EB/OL](2021-10-18)[2022-01-28].<https://yjj.sh.gov.cn/zx-yp/20211018/ed368c058c6d45fb88745f434471df57.html>.
- Shanghai Municipal Drug Administration. Public notice of Shanghai Drug Administration on quality standards of traditional Chinese medicine formula granules in Shanghai (the third batch) [EB/OL](2021-10-18)[2022-01-28].<https://yjj.sh.gov.cn/zx-yp/20211018/ed368c058c6d45fb88745f434471df57.html>.

(编辑:杨轶舜)