

综述与专论

DOI: 10.11949/0438-1157.20190618

植物天然产物的微生物合成与转化

薛海洁, 王颖, 李春

(北京理工大学化学与化工学院生化工程系, 北京 100081)

摘要: 植物天然产物是一类结构复杂、性能多样的次级代谢产物, 广泛应用于食品、药品、化妆品等多个领域。目前植物天然产物的主要来源依赖于从植物中提取, 这种生产方式周期长且占用大量耕地。微生物细胞因其生长周期短、操作简便、环境友好、大规模发酵可控等优势而被广泛研究用以替代传统的植物提取法。目前利用微生物细胞工厂合成和转化植物天然产物已成为研究的热点, 实现了萜类、黄酮、生物碱、皂苷等多种植物天然产物的合成和转化。本文分别从从头合成和生物转化的角度综述了微生物细胞工厂在植物天然产物合成中的应用, 为更加系统、深入地研究植物天然产物的微生物合成与转化提供参考。

关键词: 微生物细胞工厂; 植物天然产物; 生物转化; 萜类; 黄酮; 生物碱

中图分类号: Q 819

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 0438-1157 (2019) 10-3825-11



Microbial synthesis and transformation of plant-derived natural products

XUE Haijie, WANG Ying, LI Chun

(Department of Biochemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: Plant-derived natural products are a class of secondary metabolites with complex structures and diverse properties, which are widely used in food, medicine, cosmetics and other fields. At present, the main source of plant-derived natural products is direct extraction from plants, which is time consuming and farming land occupying. Microbial synthesis has been studied to produce plant-derived natural products for the advantages of short growth cycle, mature manipulating methods and controllable large-scale fermentation. Nowadays, it has attracted many attentions to achieve biosynthesis and transformation of plant-derived natural products employing microbial cells. Many kinds of natural products such as terpenoids, flavonoids, alkaloids and saponins have been successfully synthesized in microbes. In this review, the applications of microbial cell factories in the synthesis of plant-derived natural products have been summarized as well as different strategies, which will be helpful for the systematic and in-depth study in the synthesis and transformation of plant-derived natural products.

Key words: microbial cell factories; plant-derived natural products; biotransformation; terpenoids; flavones; alkaloids

收稿日期: 2019-06-04 修回日期: 2019-07-13

通信作者: 李春(1970—), 男, 博士, 教授, lichun@bit.edu.cn

第一作者: 薛海洁(1990—), 女, 博士研究生, xuehaijie0424@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(21736002, 21606018); 国家杰出青年科学基金项目(21425624)

引用本文: 薛海洁, 王颖, 李春. 植物天然产物的微生物合成与转化[J]. 化工学报, 2019, 70(10): 3825–3835

Citation: XUE Haijie, WANG Ying, LI Chun. Microbial synthesis and transformation of plant-derived natural products[J]. CIESC Journal, 2019, 70(10): 3825–3835

引 言

植物天然产物包括多种结构不同的化合物,如黄酮、萜类、皂苷、生物碱、甾醇、多酚等,是一类结构比较复杂且具有特殊性质和功能的次级代谢产物,这些次级产物对植物的直接存活是非必需的,但是在植物的生存和繁殖中起着极其重要的作用^[1]。植物天然产物具有多样化的结构,大部分具有非常好的生理活性,从而被广泛应用于医药、食品、香料、化妆品和化工等多个领域,与人们的生活息息相关,也受到越来越多的关注。目前,植物天然产物的获得主要是从植物中直接提取,然而植物的生长周期较长,占用大量的土地资源,且受自然环境的影响较大。此外,黄酮、萜类等次级代谢产物在植物中的含量极低,提取的过程中需要耗费大量的酸、碱等有机试剂,易造成环境污染,这也使得从植物中提取这类化合物存在提取成本高、能耗高、资源短缺等问题。因此,改变这种传统的提取模式,寻找一种环境友好且高效的新型生产模式受到越来越多的关注。同时,多数的植物天然产物的溶解性以及生物利用度都非常低,难以达到理想效果,因此对部分植物天然产物的后修饰也是目前研究的一个热点。

随着合成生物学的不断发展,微生物细胞工厂的出现为解决这一问题提供了一个新的思路。与传统的植物提取法相比,细胞工厂具有生长快速、可利用廉价碳源、大规模发酵可控、不占用耕地、不受气候因素影响等优点,已经成为多种植物天然产物微生物异源合成的一个主流研究方向。同时测序技术的快速发展也为植物天然产物合成途径的解析以及在细胞工厂中的重新设计和生物转化提供了数据基础。通过对细胞的遗传物质和代谢过程进行改造,使其成为理想的底盘宿主,并利用细胞工厂转化和合成植物天然产物可以改变传统的制备模式,具有非常重要的意义。如图 1 所示植物天然产物合成途径可通过乙酰-CoA、莽草酸、类异戊二烯等共同的中间产物与微生物细胞内源的中间产物有机结合在一起,从而实现多种不同结构化合物在微生物细胞工厂中的从头合成。

1 微生物细胞工厂合成植物天然产物

人类利用微生物来制造多种食品、饮料、药物已有很长的历史,如利用微生物发酵生产酒类等。

近年来随着多种研究技术,如转录组学技术、基因组测序技术、蛋白质工程、计算系统生物学和合成生物学等的不断发展,已经有越来越多结构复杂的植物天然产物实现了利用微生物细胞工厂合成^[2-4]。

1.1 萜类化合物的微生物合成

萜类化合物是一类以五碳单元异戊二烯(C_5H_8)为结构基础的植物次级代谢产物,其在自然界中的种类最多,结构也最多样,目前已经发现 8000 多种结构类型不同的萜类化合物^[5],结构的多样性决定了萜类化合物生理活性和功能的多样性。例如甘草次酸^[6]、齐敦果酸^[7]和熊果酸^[8]具有保肝护肝、抗肿瘤的功效;青蒿素是从植物黄花蒿茎叶中提取的倍半萜内酯化合物,是有效的抗疟疾药物;紫杉醇是从植物红豆杉树皮中提取的二萜化合物,是天然抗癌药物^[9];番茄红素在抗氧化方面发挥功能^[10]。此外,橙花椒醇^[11]和广藿香醇^[12]具有香气,是香水香料制备的重要材料。由于萜类化合物在食品、药品、化妆品等多个行业的应用都非常广泛,使得市场需求不断增长,这也推动了微生物细胞工厂高效生产萜烯化合物研究的快速发展。目前,已经通过合成生物学的方法构建出多种能够生产萜烯化合物的细胞工厂,并实现了多种目标产物的高效生产,如微生物合成青蒿酸已经实现了工业化生产,利用酿酒酵母工程菌株合成人参皂苷 Rh2 的产量已达到 2.25 g/L。Biggs 等^[13]通过平衡 CYP450 模块表达,对 P450 酶 N 端跨膜域进行修饰等方法,成功在大肠杆菌内实现了氧化紫杉烷的合成,并通过组学分析和反应器放大相结合的方法,使产量达到 570 mg/L。Zhu 等^[6]将来源于乌拉尔甘草的 β 香树脂醇 C-11 氧化酶(unigene25647)和来自蒺藜苜蓿的 CYP72A63 引入到酿酒酵母中,成功实现了甘草次酸的合成,并通过过表达 MVA 途径增加前体物质的供应以及 P450 氧化还原系统的优化,使甘草次酸的产量达到 18.9 mg/L,是目前已报道的最高产量。通过过表达 MVA 途径关键酶增加前体物的供应,利用酶工程的方法提高关键酶的催化活性以及植物来源膜蛋白在原核宿主中的溶解性,利用组学技术挖掘具有更高催化活性和特异性的新型酶分子以及发酵优化等手段实现了多种萜类化合物的微生物合成。在表 1 中对目前已经成功实现微生物细胞工厂生产萜烯类化合物进行了总结。

1.2 黄酮类化合物的微生物合成

黄酮类化合物是一类具有 2-苯基色原酮结构

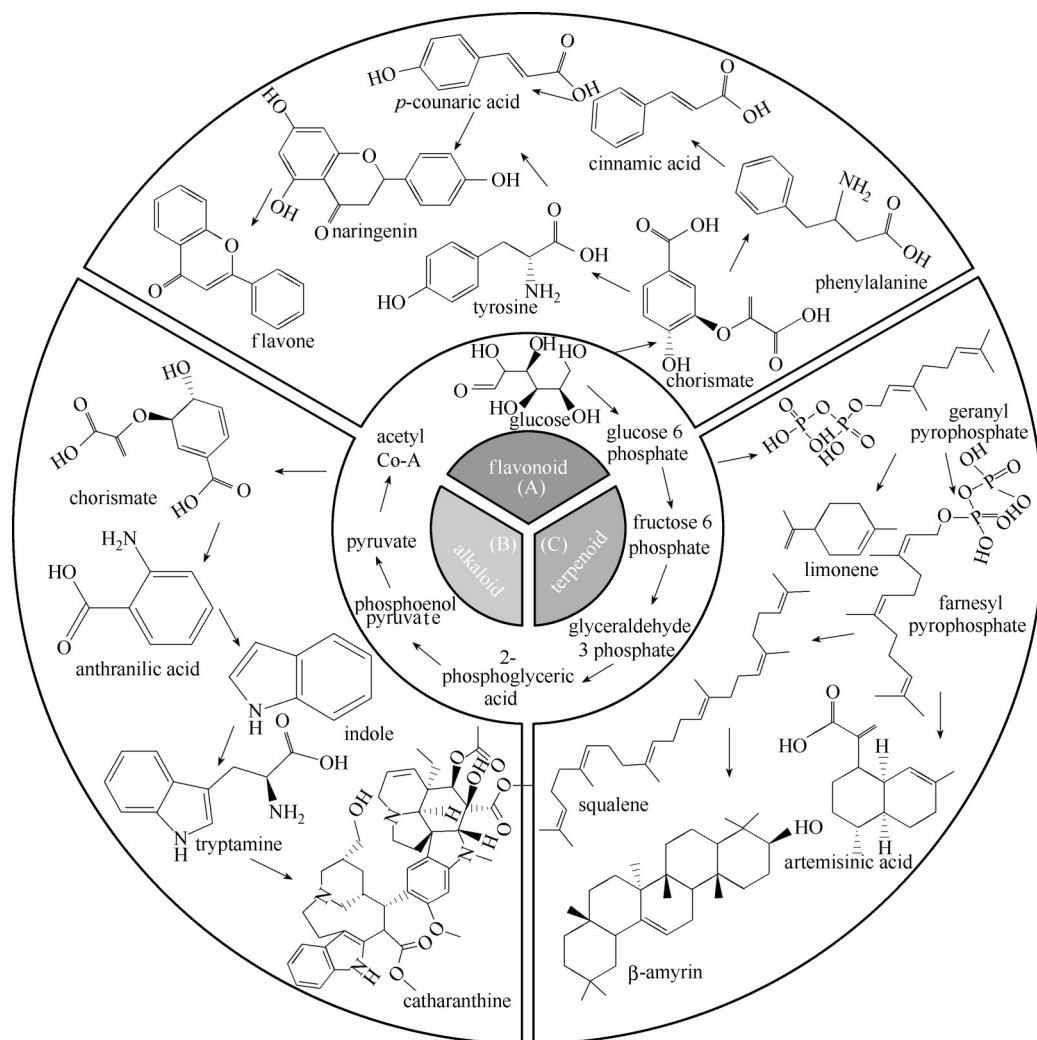


图1 植物天然产物:黄酮、萜类和生物碱的生物合成途径

Fig.1 Plant-derived products: biosynthesis of flavonoids, terpenoids and alkaloids

的化合物,广泛存在于蕨类植物和高等植物中,作为植物生长的次级代谢产物,黄酮类化合物的合成能够帮助植物对抗各种生物和非生物胁迫,如紫外线辐射、微生物感染、物理和自由基损伤等^[42-43]。同时,黄酮也具有多种生物活性,如抗氧化、抗病毒、抗菌、抗肿瘤及降血糖等,在人类生活中,黄酮主要是通过食用植物源性食品进入人体,并在预防各种疾病(自由基引起心血管疾病和神经退行性疾病,帕金森症和阿尔茨海默症)方面发挥关键作用。如类黄酮能够清除体内产生的活性氧(ROS)和活性氮(RNS)自由基^[44],大豆黄酮具有增强免疫调节作用,苦荞黄酮具有较好的抗氧化活性,芦丁具有抗衰老和抗疲劳作用,甘草黄酮具有抗菌、抑菌作用,黄芩茎叶总黄酮具有降血脂作用,芹菜苷配基具有诱导肿瘤细胞凋亡和抗炎的作用。此外,还有研究发现黄酮类化合物在癌症和糖尿病的预防和治疗中也

发挥重要作用。近年来对黄酮类化合物的研究也越来越成熟,已有部分黄酮类化合物的合成途径被成功解析,例如柚皮素是多种黄酮类化合物合成的重要前体物质,首先是以苯丙氨酸或酪氨酸为底物生成肉桂酸,再经肉桂酸-4-羟化酶(C4H)和4-香豆酰辅酶A连接酶(4CL)的一系列催化反应生成对香豆酰辅酶A,其次经查尔酮合酶(CHS)、查尔酮还原酶(CHR)和查尔酮异构酶(CHI)三种酶的催化生成柚皮素和甘草素^[45]。Miyahisa等^[46]通过异源表达分别来源于酵母、蓝色链霉菌、甘草和葛根的PAL、CCL、CHS和CHI基因,在大肠杆菌中成功合成量松属素,再通过引入来源于谷氨酸棒状杆菌的accBC和dtsR1基因,促进了前体物质乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A的合成,进一步通过发酵优化使产量达到58 mg/L。已有研究者通过解除酪氨酸的反馈抑制、敲除竞争途径和增加磷酸烯醇式丙酮酸的供应,提高

表 1 利用微生物合成萜类物质及其前体

Table 1 Synthesis of terpenoids and precursors by microorganisms

萜类		调控优化策略	底盘细胞	产量
单萜	芳樟醇	过表达 tHMG1, 结合下调 ERG9, 成功合成芳樟醇	酿酒酵母	95 $\mu\text{g/L}$ ^[14-15]
	柠檬烯	过表达异源 MVA 途径并蛋白质组分析	大肠杆菌	605 mg/L ^[16-17]
	桉烯	过表达异源合成途径, 优化发酵条件	大肠杆菌	2.65 g/L ^[18]
	香叶醇	异源表达来源于罗勒的香叶醇合酶, 敲除 <i>yigB</i> 基因, 并整合异源 MVA 途径	大肠杆菌	182.5 mg/L ^[19]
	月桂烯	过表达异源 MVA 途径和 GPPS, 优化发酵条件	大肠杆菌	58.19 mg/L ^[20]
	蒎烯	筛选最优组合酶, 融合表达, 抑制分支途径	大肠杆菌	32.4 mg/L ^[21]
倍半萜	异雪松醇	异源表达合成酶, 过表达 tHMG1 与 <i>upc2-1</i>	酿酒酵母	0.37 mg/L ^[22]
	青蒿酸	改造 MVA 途径, 引入外源合成途径, 青蒿酸产量为 32 mg/L ; 整体优化上下游模块, 筛选新酶, 优化发酵条件, 减少分支途径	酿酒酵母	25 g/L ^[23-24]
	α -檀香烯	MVA 途径优化, 增加前体和辅因子供应, 增加转录因子的活力; 葡萄糖诱导 ERG9 表达, 降低分支途径, 过表达 tHMGR, 敲除 LPP1	酿酒酵母	92 mg/L ^[25]
	椒二醇	宿主遗传改造, 降低 FPP 分支途径, 过表达合成途径	酿酒酵母	50 mg/L ^[26]
	圆柚酮	异源表达合成途径	酿酒酵母	Ref.[27]
	紫穗槐-4,11-二烯	密码子优化、模块替换、启动子优化、支架设计改造, 两相培养, 过表达 HMGS 与 HMGR	大肠杆菌	27.4 g/L ^[28]
	次丹参酮二烯	融合表达 SmCPS, SmKSL, BST1, FPPS, 过表达 tHMG1, <i>upc2-1</i> , 添加新的 GGPP 合酶, 分批补料	酿酒酵母	488 mg/L ^[29]
	铁锈醇	在次丹参酮二烯合成基础上, 引入 CYP76AH1	酿酒酵母	10.5 mg/L ^[30]
	泪杉醇	利用 CYP450 氧化酶催化多样性, 结合基因挖掘、组合表达、蛋白质结构模拟与改造	酿酒酵母	96 mg/L ^[31]
	鼠尾草酸	解析合成途径, 酶分子模拟改造	酿酒酵母	2.74 mg/L ^[32]
二萜	紫杉二烯	异源表达合成途径, 功能模块精确调控, 降低产物毒性	大肠杆菌	1 g/L ^[32]
	5 α 羟化紫杉二烯醇	模块化优化, 酶工程设计改造关键酶	大肠杆菌	58 mg/L ^[32]
	氧化紫杉烷	平衡 CYP450 模块表达, 酶 N 端修饰, 组学分析, 反应器放大	大肠杆菌	570 mg/L ^[13]
	左旋海松二烯	途径改造与酶定向进化	大肠杆菌	700 mg/L ^[33]
	香紫苏醇	异源表达合成途径与功能基因筛选	大肠杆菌	1.5 g/L ^[34]
	原人参二醇	异源表达合成途径, MVA 途径优化, 提高前体供应, 调控代谢途径	酿酒酵母	15.9 mg/L ^[35]
	人参皂苷	基因挖掘, 构建异源表达途径	酿酒酵母	2 g/L ^[36]
三萜	β -香树脂醇	优化 MVA 途径, 提高前体供应, 产量达到 88.6 mg/L ; 在此基础上, 强化基因表达, 优化发酵条件	酿酒酵母	138.8 mg/L ^[6]
	3-O-葡萄糖集刺囊酸	共表达多个关键基因, 利用甲基- β -环糊精使产物分泌到胞外	酿酒酵母	Ref.[37]
	达玛烯二醇	重构合成途径	大肠杆菌	8.6 mg/L ^[38]
	甘草次酸	重构合成途径, 匹配 CYP450 酶于 P450 还原酶 CPR	酿酒酵母	18.9 mg/L ^[6]
	β -胡萝卜素	引入外源 MVA 途径, 调控基因表达	大肠杆菌	2.1 g/L ^[39]
四萜	虾青素	筛选并引入不同物种的叶黄素合成途径, 加强 IPP 合成	大肠杆菌	1.4 mg/g ^[40]
	番茄红素	低拷贝质粒与培养条件优化	大肠杆菌	260 mg/L ^[41]

了宿主细胞内酪氨酸的合成水平, 促进了柚皮素在大肠杆菌中的合成。目前, 通过引入 CHI 和 CHS 等黄酮合成的关键酶以及增加前体物质丙二酰辅酶 A、酪氨酸和苯丙氨酸等的供应等方法成功地在 大肠杆菌、酿酒酵母和链霉菌等微生物细胞中合成了黄酮类化合物^[47]。表 2 列出了近年来利用微生物细胞工厂合成黄酮类化合物的实例。

1.3 生物碱类化合物的微生物合成

生物碱是一类含氮的杂环化合物, 是中草药中的活性成分, 在许多情况下, 可用于医药用途, 如止

咳成分可待因、麻黄的抗哮喘成分麻黄碱、阿片中的镇痛成分吗啡、颠茄的解痉成分阿托品等^[64]。生物碱根据含氮结构的不同可分为多种类型, 且不同类型的生物碱都有其特定的合成途径, 如吲哚生物碱由莽草酸途径合成色氨酸进而生成吲哚类生物碱, 已有一些研究开创性地在酵母或大肠杆菌等微生物细胞中构建了复杂的生物碱合成途径, 如异胡豆苷^[65]和阿片类药物^[66]等。近年来在罂粟中发现了一个由 10 个基因合成紫堇碱的生物途径^[67], 实现了氢化小檗碱和去甲劳单碱^[68]的微生物生物合成。目

表2 微生物合成黄酮类化合物及其产量

Table 2 Microbial synthesis of flavonoids and their yield

产物	前体物质	异源基因及来源	底盘细胞	产量
柚皮素	L-酪氨酸	<i>R. rubra</i> (PAL), <i>S. coelicolor</i> A3 (ScCCL), <i>G. echinata</i> (CHS)	大肠杆菌	Ref.[48]
香豆素	苯丙氨酸	<i>P. trichocarpa</i> , <i>P. deltooides</i> (PAL, C4H, CPR)	酿酒酵母	Ref.[49]
柚皮素	葡萄糖	<i>R. capsulatus</i> (TAL), <i>A. thaliana</i> (4CL, CHS)	大肠杆菌	20.8 mg/L ^[50]
松属素	苯丙氨酸	<i>C. glutamicum</i> (accBC and dtsR1)	大肠杆菌	58 mg/L ^[46]
芹黄素	L-酪氨酸	<i>R. rubra</i> (PAL), <i>S. coelicolor</i> (ScCCL), <i>G. echinata</i> (CHS), <i>P. lobata</i> (CHI), <i>P.</i>	大肠杆菌	13 g/L ^[51]
5,7-二羟黄酮	苯丙氨酸	<i>crispum</i> (FS1), <i>C. glutamicum</i> (accBC and dtsR1)		9.4 mg/L ^[51]
山柰酚	L-酪氨酸	<i>R. rubra</i> (PAL), <i>S. coelicolor</i> A3(2) (ScCCL), <i>G. echinata</i> (CHS), <i>P. lobata</i> (CHI)	大肠杆菌	15.1 mg/L ^[51]
姜黄素	苯丙氨酸	<i>Citrus species</i> (F3H, FLS), <i>C. glutamicum</i> (accBC and dtsR1)	大肠杆菌	1.1 mg/L ^[51]
白藜芦醇	苯丙氨酸	<i>P. deltooides</i> (PAL, CPR), <i>G. max</i> (C4H, 4CL), <i>V. vinifera</i> (RS)	酿酒酵母	0.29 mg/L ^[52]
山柰酚	苯丙氨酸	<i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltooides</i> (PAL, CPR), <i>G. max</i> (C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H), <i>S.</i>	酿酒酵母	1.3 mg/L ^[52]
槲皮苷		<i>tuberosum</i> (FLS)		N
香豆素酸				0.26 mg/L
柚皮素				0.38 mg/L
柚皮素	葡萄糖	<i>A. thaliana</i> (4CL3, CHS1, CHI1, C4H and PAL1, CPR CHS3), <i>R. capsulatus</i> (TAL1)	酿酒酵母	112.9 mg/L ^[53]
圣草素	葡萄糖	<i>R. glutinis</i> (TAL), <i>P. crispum</i> (4CL), <i>P. X hybrida</i> (CHS), <i>M. sativa</i> (CHI), <i>C.</i>	大肠杆菌	107 mg/L ^[54]
	L-酪氨酸	<i>glutamicum</i> (accBC, dtsR1), <i>E. coli</i> BL21(DE3) (acs)		
4-香豆酸	葡萄糖	<i>S. espanaensis</i> (TAL,C3H), <i>A. thaliana</i> (COM)	大肠杆菌	974 mg/L ^[55]
咖啡酸				150 mg/L
阿魏酸				196 mg/L
4-O-葡萄糖基白藜芦醇	葡萄糖	<i>S. espanaensis</i> (TAL), <i>A. hypogaea</i> (STS), <i>S. coelicolor</i> A3(2) (ScCCL)	大肠杆菌	7.5 mg/L ^[56]
樱花素	葡萄糖	<i>S. espanaensis</i> (TAL), <i>O. sativa</i> (4CL), <i>Populus euramericana</i> (CHS), <i>O. sativa</i> (NOMT), <i>E. coli</i> (ppsA, tktA, aroGfbr, tyrAfbr)	大肠杆菌	40.1 mg/L ^[57]
白藜芦醇	香豆酸	<i>A. thaliana</i> (4CL1), <i>V. vinifera</i> (STS) <i>E. coli</i> (ACC/BirA) (Cerulenin added)	大肠杆菌	2340 mg/L ^[58]
儿茶酸	圣草素	<i>C. sinensis</i> (F3H), <i>A. andraeanum</i> (FDR), <i>D. uncinatum</i> (DuLAR)	大肠杆菌	910.9 mg/L ^[59]
白皮杉醇	咖啡酸	<i>A. thaliana</i> (4CL1), <i>A. hypogaea</i> (STS)	大肠杆菌	13.3 mg/L ^[60]
7-O-甲基香橙素	香豆酸	<i>P. crispum</i> (Pc4CL-2), <i>P. hybrid</i> (PhCHS), <i>M. sativa</i> (CHI), <i>A. thaliana</i> (F3H), <i>S. avermitilis</i> (OMT), <i>N. farcinica</i> (AccBC, birA, acs)	大肠杆菌	2.7 mg/L ^[61]
柚皮素	香豆酸	<i>S. coelicolor</i> (CCL), <i>A. thaliana</i> (CHS)	委内瑞拉链霉菌	4 mg/L ^[62]
柚皮素	葡萄糖	<i>R. glutinis</i> (TAL), <i>P. crispum</i> (4CL), <i>P. hybrida</i> (CHS), <i>M. sativa</i> (CHI), <i>G. hybrida</i>	耶氏解脂酵母	71.2 mg/L ^[63]
花旗松素	葡萄糖	(F3'H), <i>C. roseus</i> (CPR), <i>Y. lipolytica</i> (ACS2, ACC1)		48.1 mg/L

前最具有挑战的是那可丁合成途径的解析和重构,那可丁是一种天然的苯酞喹啉生物碱类药物,其传统的生产方式是从罂粟中提取,是一种安全的非麻醉性镇咳药物,在全世界已有50多年的使用历史。同时那可丁还被证明具有抗癌活性,但其治疗癌症所需的剂量远高于用作咳嗽抑制剂时的剂量,因此市场需求量逐渐增大。由于罂粟种植需要极其严格的管控措施且易受到害虫、气候等因素的影响,使其市场供应有较大的不稳定因素,因此研究者着眼于微生物从头合成喹啉生物碱。那可丁的微生物合成需要表达25个异源基因,且中间产物的含量

极低难以检测,同时这些来源于植物的基因多数位于复杂的细胞器上,如位于膜结构上的酶有七个,其中包括五个细胞色素P450酶,这也增加了构建其微生物合成途径的难度^[69]。但是值得一提的是目前已有研究者实现了利用酿酒酵母从头合成那可丁,在整个合成途径中过表达了6个内源基因,同时异源表达了分别来源于细菌、植物和哺乳动物等生物的25个基因,再通过酶工程、代谢途径和发酵条件优化等手段,使那可丁的浓度达到了2.2 mg/L,比初始菌株提高了18000倍^[70]。此外,长春碱和长春新碱是应用最为广泛的2种天然植物抗肿瘤药物,广

表 3 微生物合成生物碱类化合物
Table 3 Microbial synthesis of alkaloids

产物	前体物质	异源基因及来源	底盘细胞	产量
小檗碱	(S)-网状番荔枝碱	<i>C. japonica</i> (CAS), <i>P. somniferum</i> (MTI, BBE), <i>A. thaliana</i> (ATR1), <i>C. japonica</i> (STOX)	酿酒酵母	Ref.[71]
四氢小檗碱	(S)-网状番荔枝碱	<i>C. japonica</i> (CAS), <i>P. somniferum</i> (MT1, BBE), <i>A. thaliana</i> (ATR1)	酿酒酵母	1.8 mg/L ^[71]
木兰花碱	多巴胺	<i>M. luteus</i> (MAO), <i>C. japonica</i> (NCS, 6OMT, CYP80G2, CNMT,4OMT)	大肠杆菌 酿酒酵母	7.2 mg/L ^[72]
蒂巴因	葡萄糖 甘油	<i>R. solanacearum</i> (TYR), <i>P. putida</i> (DODC), <i>M. luteus</i> (MAO), <i>A. thaliana</i> (ATR2), <i>P. somniferum</i> (SalScut, SalR, SalAT)	大肠杆菌	2.1 mg/L ^[73]
吗啡	蒂巴因	<i>P. somniferum</i> (T6ODM,COR,CODM)	酿酒酵母	131 mg/L ^[74]
(S)-网状番荔枝碱	甘油	<i>M. luteus</i> (MAO), <i>P. putida</i> (DODC), <i>R. solanacearum</i> (TYR), <i>C. japonica</i> (NCS,6OMT, CNMT,4OMT)	大肠杆菌	46.0 mg/L ^[75]
血根碱	去甲劳单碱	<i>A. thaliana</i> (ATR1), <i>E. californica</i> (CFS,STS,P6H), <i>P. somniferum</i> (6OMT,OMT,TNMT)	酿酒酵母	80 μg/L ^[76]
那可丁	去甲劳单碱	<i>P. somniferum</i> (MT1, MT2, MT3, SDR1, TNMT, CYP82Y1, CYP82X2), <i>C. japonica</i> (CAS), 四氢小檗碱 <i>A. thaliana</i> (ATR1)	酿酒酵母	14.8 μmol/L ^[77]

泛应用于何杰金氏病、急性淋巴细胞型白血病、恶性淋巴瘤等疾病的治疗。目前长春碱和长春新碱的部分合成途径已经被解析,是由 3 α (S)-异胡豆苷分别经过多步酶促反应生成文多灵和长春质碱,再由两者缩合生成 α -3,4-脱水长春碱,进而生成长春碱和长春新碱。2015 年英国约翰英纳斯中心的 Brown 等^[65]在酿酒酵母中成功重构了 3 α (S)-异胡豆苷的合成途径,实现了 3 α (S)-异胡豆苷的从头合成,产量达到 0.5 mg/L,但是到目前为止长春碱和长春新碱的微生物合成途径仍在探索中。表 3 中总结了近几年利用微生物细胞工厂合成生物碱的实例,及其在合成途径中不同酶的来源。

2 植物天然产物的微生物后修饰

植物天然产物是一类具有广泛生物活性的化合物,是新药发现的重要来源之一,据统计,全世界已上市的化学药品中有 53% 来自天然产物及其衍生物^[78]。然而未经修饰的植物天然产物也有很多局限性,如其溶解性差、活性较低、生物利用度低等,往往需要经过结构修饰来降低植物天然产物的局限性。如可以通过糖基化、羟基化、甲基化和卤化等一系列的结构后修饰来提高其结构复杂性、溶解性和生理活性,尤其是药用化合物,可以通过结构修饰增强化合物的药理活性、改善生物利用度,从而提高植物天然产物的成药性^[79]。目前常用的天然产物后修饰方法包括化学合成和微生物催化两种,其中化学方法的研究比较早,也已经得到广

泛的应用。但是化学的修饰方法存在很多无法避免的缺点,例如反应的步骤复杂、目标产物的收率低、反应条件往往十分苛刻等。与化学方法相比,酶催化或微生物催化法具有选择性强、反应条件温和、环境友好等特点而被广泛应用。其中微生物因其易于培养、发酵周期短、发酵条件可控、易于实现工业化等特点而成为目前研究最为广泛的催化方法。

2.1 糖基化修饰

糖基化是一种非常重要的天然产物后修饰方式,在增加天然产物的生物活性或降低不良反应等方面具有非常显著的效果,例如对甘草次酸和罗汉果苷元糖基化后得到单葡萄糖醛酸甘草次酸和罗汉果皂苷,可以大幅度提高苷元的甜度,分别是蔗糖的 941 倍和 300 倍^[80]。因此对糖基转移酶和糖苷合成酶的天然产物特异性糖基化修饰的研究也越来越受重视。

萜类化合物广泛存在于植物和微生物中,具有多种生理学活性,但是三萜苷元的溶解性和极性较差,限制其生物利用度,因此需要进行结构修饰以提高其生物利用度。萜类苷元的糖基化通常是利用糖基转移酶将一个或多个亲水性的糖部分与疏水性的配基结合^[81],从糖中引入羟基和羧基进一步改善其理化特性,从而提高萜类化合物的生物活性。三萜苷元是萜类化合物中的典型代表,也是对糖基化反应研究最为广泛的一类萜类化合物。如人参皂苷是西洋参属植物的主要活性成分,已经利用糖基转移酶实现了 2 个非天然人参皂苷和 4 个天

然人参皂苷(Rh2、Rg3、RF1和Rh1)在酿酒酵母中的成功合成^[82]。Liu等^[83]在酿酒酵母中引入两个糖基转移酶BvEc和SaEc均能在甘草次酸的C-3位引入一个葡萄糖基生成单葡萄糖基甘草次酸。三萜苷

元的糖基化位点也有较大的差异,通常在C-3和/或C-28位置连接糖链,在某些情况下也会在C-4、C-16、C-20、C-21、C-22和/或C-23位置上引入糖链。此外,引入的单糖单元通常是葡萄糖、葡萄糖醛酸、

表4 已鉴定的糖基转移酶及其反应底物和糖基化位点

Table 4 Identified glycosyltransferases and their reaction substrates and glycosylation sites

No.	基因名称	植物来源	底物	糖基化位点
1	UGT71G1	<i>Medicago truncatula</i>	medicagenic acid UDP- glucose	C-3, 28 ^[84]
2	UGT73AD1	<i>Centella asiatica</i>	asiatic acid, madecassic acid UDP- glucose	C-28 ^[85]
3	UGT73AE1	<i>Carthamus tinctorius</i>	glycyrrhethinic acid UDP- glucose	C-3 ^[86]
4	UGT73AH1	<i>Centella asiatica</i>	asiatic acid UDP- glucose	C-28
5	UGT73C10	<i>Barbarea vulgaris</i>	hederagenin, oleanolic acid UDP- glucose	C-3
6	UGT73C11	<i>Barbarea vulgaris</i>	hederagenin, oleanolic acid, glycyrrhethinic acid UDP- glucose	C-3 ^[87]
7	UGT73C12	<i>Barbarea vulgaris</i>	hederagenin, oleanolic acid UDP- glucose	C-3
8	UGT73C13	<i>Barbarea vulgaris</i>	hederagenin, oleanolic acid UDP-glucose	C-3
9	UGT73F2	<i>Glycine max</i>	saponin A0- α UDP-xylose	C-22 ^[83]
10	UGT73F3	<i>Medicago truncatula</i>	hederagenin UDP- glucose	C-28 ^[88]
11	UGT73F4	<i>Glycine max</i>	saponin A0- α UDP-xylose	C-22 ^[83]
12	UGT73K1	<i>Medicago truncatula</i>	hederagenin, soyasapogenols B and E UDP-glucose	C-3, 28 ^[88]
13	UGT74AE2	<i>Panax quinquefolium</i>	protopanaxadiol UDP-glucose	C-3 ^[89]
14	UGT74M1	<i>Vaccaria hispanica</i>	gypsogenic acid UDP-glucose	C-28 ^[90]
15	UGT94Q2	<i>Panax quinquefolium</i>	ginsenoside Rh2 UDP-glucose	C-3 ^[91]
16	UGTPg1	<i>Panax ginseng</i>	protopanaxadiol UDP-glucose	C-3 ^[88]
17	UGTPg100	<i>Panax ginseng</i>	ginsenoside RF1, protopanaxatriol UDP-glucose	C-6
18	UGTPg101	<i>Panax ginseng</i>	ginsenoside RF1, protopanaxatriol UDP-glucose	C-6, 20
19	Pg3-O-UGT1	<i>Panax quinquefolium</i>	protopanaxadiol UDP-glucose	C-3
20	GmSGT2	<i>Glycine max</i>	soyasapogenol B monoglucuronide UDP-galactose	C-3 ^[92]
21	GmSGT3	<i>Glycine max</i>	soyasaponin III UDP-rhamnose	C-3 ^[92]

半乳糖、鼠李糖、木糖和阿拉伯糖等。在生物体内糖基化过程是由糖基转移酶催化完成的,而且植物中含有大量的糖基转移酶,目前已经在拟南芥基因组中鉴定出 120 多个编码糖基转移酶 1 家族的基因。由于三萜苷元的特定位点糖基化需要特异性的糖基转移酶催化,因此三萜皂苷的合成过程存在很大的困难,到目前为止只有 21 个与三萜皂苷合成相关的糖基转移酶被鉴定,表 4 对这些已鉴定的糖基转移酶及其来源和糖基化位点进行总结。

2.2 甲基化修饰

甲基化修饰是天然产物修饰中存在较为普遍的一种后修饰方式,甲基化修饰后往往可以优化天然产物的生理活性,其中黄酮类化合物的甲基化修饰最为普遍。黄酮类化合物的甲基化有一定的特异性,如黄酮的 C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7 和 C-8 位上可以发生甲基化修饰。在植物体内,甲基化的黄酮产物能够提高植物抵御外界伤害的能力,同时甲基化后黄酮产物的生物利用度提高,如甲基化后其在生物体内和动物肝脏中的转运能力增强,也使其抗癌活性增强^[93]。目前对黄酮甲基化的研究以及甲基化酶的挖掘也越来越多,如灰色链霉菌中存在特异性的酶能够催化槲皮苷和非瑟酮的 C-3 和 C-4 位发生甲基化^[94]。研究者对 27 种微生物细胞进行检测,发现曲霉属的真菌能够特异性地将 7-羟基黄酮催化生产 7-甲氧基黄酮和 3,4-二羟基-7-甲氧基黄酮。小克银汉霉菌 AS 能够催化去甲苦参酮生成苦参酮^[95]。

2.3 卤化修饰

化学修饰法,包括不同官能团相互转化和加成(例如酰化、烷基化和卤化)等,在天然产物的合成和药物修饰中起着关键作用^[96]。那可丁是典型的生物碱药物,具有镇定、平喘作用,而且有研究发现那可丁的卤代衍生物对某些癌细胞株具有更高的治疗潜力,说明对那可丁进行卤代修饰后能够提高其生物活性。然而,由于那可丁的结构复杂,生物合成过程困难,且市场上缺乏那可丁合成的中间体,使得那可丁衍生物的数量和多样性都受到很大的限制。目前,那可丁在酿酒酵母中从头合成途径的构建也为利用中间产物生产那可丁衍生物提供了有效途径。研究者通过在那可丁合成菌株的培养基中添加带有不同卤素修饰的酪氨酸,从而成功获得含有不同修饰基团的那可丁合成中间体^[70]。

3 结 论

目前,植物天然产物的主要来源是从植物中直接提取,由于存在破坏生态、占用耕地等诸多问题,因此寻找新的获取方式迫在眉睫。化学合成的方法已有悠久的历史,且技术成熟,是获取植物天然产物的另一方式。然而,由于植物天然产物的结构和性质多样,大部分合成途径复杂,很多产物尚未实现化学合成或者存在反应条件苛刻、副产物多等缺点,因此化学合成法并不是一种绿色经济的生产模式。相比之下利用微生物细胞合成植物天然产物具有反应条件温和、环境友好等优点,并且利用微生物发酵可以快速合成结构复杂的天然产物,这不仅大大缩短了合成的周期,而且原料便宜易得,整个发酵过程更加可控,同时还能减少对植株的砍伐和大量有机溶剂及酸碱的使用,是未来植物天然产物生产的良好模式,具有很大的工业化应用潜力。

近年来,合成生物学、代谢工程、测序技术以及组学技术的发展为代谢途径的解析、微生物细胞工厂的构建和改造提供了理论和技术基础,利用微生物细胞工厂合成具有高附加值的植物天然产物已取得较大的进展。常用的微生物合成策略主要包括在异源宿主中引入代谢途径、代谢网络调控、蛋白质工程以及改变宿主细胞的碳代谢流等。本文对目前利用微生物合成不同种类植物天然产物的现状进行了综述,包括不同的代谢调控及宿主改造方法,对于后续植物天然产物的微生物合成具有重要的指导作用。虽然目前植物天然产物的微生物合成与转化已经取得不错的成果,但仍存在较大的挑战,严重限制了其工业化应用。例如,由于细胞内的微环境较为复杂,植物天然产物合成的外源途径与微生物细胞的适配性较差而导致合成效率不高;很多植物天然产物对细胞具有一定的毒性,产物的转运与传质过程不明确,从而造成细胞生长受限、产物积累量低;胞内产物及中间代谢产物的提取和检测缺少高通量的方法也是微生物细胞工厂在植物天然产物合成与转化过程中存在的一个瓶颈。随着人们对健康和生活质量的要求不断提高,对植物天然产物的需求也在不断增加,高效微生物细胞工厂的构建将会受到越来越多的关注。在现有成果的基础上解决上述挑战将有助于实现微生物合成植物天然产物的工业化应用,这对减轻环境

污染、提高生产效率、降低生产成本具有非常重要的现实意义。

参考文献

- [1] Williams D H, Stone M J, Hauck P R, et al. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? [J]. Journal of Natural Products, 1989, **52**(6): 1189–1208.
- [2] Choi Y J, Lee S Y. Microbial production of short-chain alkanes[J]. Nature, 2013, **502**(7472): 571–574.
- [3] Heider S A, Peters-Wendisch P, Wendisch V F, et al. Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, **98**(10): 4355–4368.
- [4] George K W, Alonso-Gutierrez J, Keasling J D, et al. Isoprenoid drugs, biofuels, and chemicals—artemisinin, farnesene, and beyond[J]. Advances in Biochemical Engineering–Biotechnology, 2015, **148**: 355–389.
- [5] Pemberton T A, Chen M, Harris G G, et al. Exploring the influence of domain architecture on the catalytic function of diterpene synthases[J]. Biochemistry, 2017, **56**(14): 2010–2023.
- [6] Zhu M, Wang C, Sun W, et al. Boosting 11-oxo-beta-amylin and glycyrrhetic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via pairing novel oxidation and reduction system from legume plants [J]. Metabolic Engineering, 2018, **45**: 43–50.
- [7] Zhao Y, Fan J, Wang C, et al. Enhancing oleanolic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technology, 2018, **257**: 339–343.
- [8] Kim K A, Lee J S, Park H J, et al. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes[J]. Life Sciences, 2004, **74**(22): 2769–2779.
- [9] Vanegas K G, Lehka B J, Mortensen U H. SWITCH: a dynamic CRISPR tool for genome engineering and metabolic pathway control for cell factory construction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, **16**(1): 25.
- [10] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets[J]. Nature Biotechnology, 2005, **23**(5): 612–616.
- [11] Chan W K, Tan L T, Chan K G, et al. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities[J]. Molecules, 2016, **21**(5): 529.
- [12] Hu G, Peng C, Xie X, et al. Availability, pharmaceuticals, security, pharmacokinetics, and pharmacological activities of patchouli alcohol[J]. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, **2017**: 4850612.
- [13] Biggs B W, Lim C G, Sagliani K, et al. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, **113**(12): 3209–3214.
- [14] Rico J, Pardo E, Orejas M. Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, **76**(19): 6449–6454.
- [15] Amiri P, Shahpiri A, Asadollahi M A, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for linalool production[J]. Biotechnology Letters, 2016, **38**(3): 503–508.
- [16] Alonso-Gutierrez J, Chan R, Bath T S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production[J]. Metabolic Engineering, 2013, **19**: 33–41.
- [17] Alonso-Gutierrez J, Kim E M, Bath T S, et al. Principal component analysis of proteomics (PCAP) as a tool to direct metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2015, **28**: 123–133.
- [18] Zhang H, Liu Q, Cao Y, et al. Microbial production of sabinene—a new terpene-based precursor of advanced biofuel[J]. Microbial Cell Factories, 2014, **13**(1): 20.
- [19] Zhou J, Wang C, Yoon S H, et al. Engineering *Escherichia coli* for selective geraniol production with minimized endogenous dehydrogenation[J]. Journal of Biotechnology, 2014, **169**: 42–50.
- [20] Kim E M, Eom J H, Um Y, et al. Microbial synthesis of myrcene by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Journal Agricultural and Food Chemistry, 2015, **63**(18): 4606–4612.
- [21] Sarria S, Wong B, Martín H G, et al. Microbial synthesis of pinene [J]. ACS Synthetic Biology, 2014, **3**(7): 466–475.
- [22] Jackson B E, Hart-Wells E A, Matsuda S P. Metabolic engineering to produce sesquiterpenes in yeast[J]. Organic Letters, 2003, **5**(10): 1629–1632.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Scheler U, Brandt W, Porzel A, et al. Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast[J]. Nature Communications, 2016, **7**: 12942.
- [26] Takahashi S, Yeo Y, Greenhagen B T, et al. Metabolic engineering of sesquiterpene metabolism in yeast[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, **97**(1): 170–181.
- [27] Cankar K, Van Houwelingen A, Bosch D, et al. A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene[J]. FEBS Letters, 2011, **585**(1): 178–182.
- [28] Tsuruta H, Paddon C J, Eng D, et al. High-level production of amorph-4, 11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2009, **4**(2): e4489.
- [29] Zhou Y J, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, **134**(6): 3234–3241.
- [30] Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, **110**(29): 12108–12113.
- [31] Ignea C, Ioannou E, Georgantea P, et al. Reconstructing the chemical diversity of labdane-type diterpene biosynthesis in yeast [J]. Metabolic Engineering, 2015, **28**: 91–103.
- [32] Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. Science, 2010, **330**(6000): 70–74.
- [33] Leonard E, Ajikumar P K, Thayer K, et al. Combining metabolic

- and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control[J]. Proceedings of the National Academy Science United States of America, 2010, **107** (31): 13654–13659.
- [34] Schalk M, Pastore L, Mirata M A, et al. Toward a biosynthetic route to sclareol and amber odorants[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, **134**(46): 18900–18903.
- [35] Dai Z, Wang B, Liu Y, et al. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast[J]. Scientific Reports, 2014, **4**: 3698.
- [36] Wang P, Wei Y, Fan Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts[J]. Metabolic Engineering, 2015, **29**: 97–105.
- [37] Moses T, Pollier J, Almagro L, et al. Combinatorial biosynthesis of saponins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 α hydroxylase from *Bupleurum falcatum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, **111**(4): 1634–1639.
- [38] Li D, Zhang Q, Zhou Z, et al. Heterologous biosynthesis of triterpenoid dammarenediol-II in engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2016, **38**(4): 603–609.
- [39] Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production[J]. Metabolic Engineering, 2013, **17**: 42–50.
- [40] Lemuth K, Steuer K, Albermann C. Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved *in vivo* biosynthesis of astaxanthin[J]. Microbial Cell Factories, 2011, **10**(1): 29.
- [41] Kim S W, Kim J B, Ryu J M, et al. High-level production of lycopene in metabolically engineered *E. coli*[J]. Process Biochemistry, 2009, **44**(8): 899–905.
- [42] Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, **5**(3): 218–223.
- [43] Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review [J]. Environmental Chemistry Letters, 2006, **4**(3): 147–157.
- [44] Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, **13**(10): 572–584.
- [45] Kumar S, Pandey A K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview[J]. Scientific World Journal, 2013, **2013**: 162750.
- [46] Miyahisa I, Kaneko M, Funa N, et al. Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, **68** (4): 498–504.
- [47] Wang Y, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, **91**(4): 949–956.
- [48] Hwang E I, Kaneko M, Ohnishi Y, et al. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(5): 2699–2706.
- [49] Ro D K, Douglas C J. Reconstitution of the entry point of plant phenylpropanoid metabolism in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): implications for control of metabolic flux into the phenylpropanoid pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, **279**(4): 2600–2607.
- [50] Watts K T, Lee P C, Schmidt–Dannert C. Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. ChemBiochem, 2004, **5**(4): 500–507.
- [51] Miyahisa I, Funa N, Ohnishi Y, et al. Combinatorial biosynthesis of flavones and flavonols in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, **71**(1): 53–58.
- [52] Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2009, **11**(6): 355–366.
- [53] Koopman F, Beekwilder J, Crimi B, et al. De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbial Cell Factories, 2012, **11**(1): 155.
- [54] Zhu S, Wu J, Du G, et al. Efficient synthesis of eriodictyol from L-tyrosine in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, **80**(10): 3072–3080.
- [55] Kang S Y, Lee J K, Choi O, et al. Biosynthesis of methylated resveratrol analogs through the construction of an artificial biosynthetic pathway in *E. coli*[J]. BMC Biotechnology, 2014, **14** (1): 67.
- [56] Hong Y S, Ahn J S, Sohng J K, et al. Construction of artificial biosynthetic pathways for resveratrol glucoside derivatives[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, **24**(5): 614–618.
- [57] Kim M J, Kim B G, Ahn J H. Biosynthesis of bioactive O-methylated flavonoids in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, **97**(16): 7195–7204.
- [58] Lim C G, Fowler Z L, Hueller T, et al. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, **77**(10): 3451–3460.
- [59] Zhao S, Jones J A, Lachance D M, et al. Improvement of catechin production in *Escherichia coli* through combinatorial metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2015, **28**: 43–53.
- [60] Watts K T, Lee P C, Schmidt–Dannert C. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. BMC Biotechnology, 2006, **6**(1): 22.
- [61] Malla S, Koffas M A, Kazlauskas R J, et al. Production of 7-O-methyl aromadendrin, a medicinally valuable flavonoid, in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, **78**(3): 684–694.
- [62] Park S R, Yoon J A, Paik J H, et al. Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*[J]. Journal Biotechnology, 2009, **141**(3/4): 181–188.
- [63] Lv Y, Edwards H, Zhou J, et al. Combining 26 S rDNA and the Cre–loxP system for iterative gene integration and efficient marker curation in *Yarrowia lipolytica*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, **8** (3): 568–576.
- [64] Hussain S A, Panjagari N R, Singh R R, et al. Potential herbs and herbal nutraceuticals: food applications and their interactions with food components[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, **55**(1): 94–122.
- [65] Brown S, Clastre M, Courdavault V, et al. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast[J]. Proceedings of the National Academy Science United States of America, 2015, **112**(11): 3205–3210.
- [66] Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast[J]. Science, 2015, **349**(6252): 1095–1100.
- [67] Dang T T T, Chen X, Facchini P J. Acetylation serves as a protective group in noscapine biosynthesis in opium poppy[J]. Nature Chemical Biology, 2015, **11**(2): 104.
- [68] Li Y, Smolke C D. Engineering biosynthesis of the anticancer

- alkaloid noscapine in yeast[J]. *Nature Communications*, 2016, **7**: 12137.
- [69] Urlacher V B, Girhard M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application[J]. *Trends in Biotechnology*, 2012, **30**(1): 26–36.
- [70] Li Y, Li S, Thodey K, et al. Complete biosynthesis of noscapine and halogenated alkaloids in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy Science United States of America*, 2018, **115**(17): E3922–E3931.
- [71] Galanie S, Smolke C D. Optimization of yeast-based production of medicinal protoberberine alkaloids[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, **14**: 144.
- [72] Minami H, Kim J S, Ikezawa N, et al. Microbial production of plant benzylisoquinoline alkaloids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, **105**(21): 7393–7398.
- [73] Nakagawa A, Matsumura E, Koyanagi T, et al. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2016, **7**(1):10390.
- [74] Thodey K, Galanie S, Smolke C D. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, **10**(10): 837.
- [75] Nakagawa A, Minami H, Kim J S, et al. A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids[J]. *Nature Communications*, 2011, **2**(1): 326.
- [76] Trenchard I J, Smolke C D. Engineering strategies for the fermentative production of plant alkaloids in yeast[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, **30**: 96–104.
- [77] Li Y, Smolke C D. Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast[J]. *Nature Communications*, 2016, **7**: 12137.
- [78] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years[J]. *Journal of Natural Products*, 2007, **70**(3): 461–477.
- [79] Choi S H, Kim H S, Yoon Y J, et al. Glycosyltransferase and its application to glycodiversification of natural products[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2012, **18**(4): 1208–1212.
- [80] Zhao Y, Lv B, Feng X, et al. Perspective on biotransformation and de novo biosynthesis of licorice constituents[J]. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2017, **65**(51): 11147–11156.
- [81] Osbourn A. Saponins and plant defence—a soap story[J]. *Trends in Plant Science*, 1996, **1**(1): 4–9.
- [82] Wei W, Wang P, Wei Y, et al. Characterization of *Panax ginseng* UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F1 and Rh1 in metabolically engineered yeasts[J]. *Molecular Plant*, 2015, **8**(9): 1412–1424.
- [83] Liu X, Zhang L, Feng X, et al. Biosynthesis of glycyrrhetic acid-3-O-monoglucose using glycosyltransferase UGT73C11 from *Barbarea vulgaris*[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2017, **56**(51): 14949–14958.
- [84] Achnine L, Huhman D V, Farag M A, et al. Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula* [J]. *Plant Journal*, 2005, **41**(6): 875–887.
- [85] De Costa F, Barber C J S, Kim Y B, et al. Molecular cloning of an ester-forming triterpenoid: UDP-glucose 28-O-glucosyltransferase involved in saponin biosynthesis from the medicinal plant *Centella asiatica*[J]. *Plant Science*, 2017, **262**: 9–17.
- [86] Xie K, Chen R, Li J, et al. Exploring the catalytic promiscuity of a new glycosyltransferase from *Carthamus tinctorius*[J]. *Organic Letters*, 2014, **16**(18): 4874–4877.
- [87] Sayama T, Ono E, Takagi K, et al. The Sg-1 glycosyltransferase locus regulates structural diversity of triterpenoid saponins of soybean[J]. *The Plant Cell*, 2012, **24**(5): 2123–2138.
- [88] Yan X, Fan Y, Wei W, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast[J]. *Cell Research*, 2014, **24**(6): 770–773.
- [89] Wang J, Li J, Li J, et al. Transcriptome profiling shows gene regulation patterns in ginsenoside pathway in response to methyl jasmonate in *Panax quinquefolium* adventitious root[J]. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 37263.
- [90] Meesapyodsuk D, Balsevich J, Reed D W, et al. Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs encoding beta-amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase[J]. *Plant Physiology*, 2007, **143**(2): 959–969.
- [91] Jung S C, Kim W, Park S C, et al. Two ginseng UDP-glycosyltransferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, **55**(12): 2177–2188.
- [92] Shibuya M, Nishimura K, Yasuyama N, et al. Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycine max*[J]. *FEBS Letters*, 2010, **584**(11): 2258–2264.
- [93] Bernini R, Crisante F, Ginnasi M C. A convenient and safe O-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC) [J]. *Molecules*, 2011, **16**(2): 1418–1425.
- [94] Walle T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2007, **17**(5): 354–362.
- [95] Shi Y Q, Xin X L, Zhang H C, et al. Microbial transformation of Norkurarinone by *Cunninghamella blakesleana* AS 3.970[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2012, **14**(9): 906–912.
- [96] Carey J S, Laffan D, Thomson C, et al. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2006, **4**(12): 2337–2347.