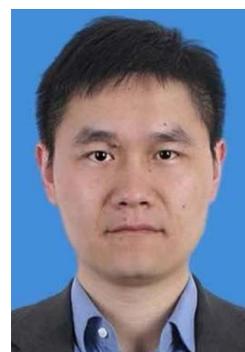


• 核心技术创新 •

张学礼 博士，中国科学院天津工业生物技术研究所研究员。研究方向为合成生物学与基因编辑。重点研究应用合成生物学与代谢工程技术构建高效微生物细胞工厂，生产氨基酸、维生素、材料化学品和植物天然产物；开发基因编辑技术用于遗传疾病的基因治疗。在 *Nat Biotechnol* 等期刊发表 SCI 论文 90 余篇，被引 3 800 余次。获授权中国专利 49 项和国际专利 10 项。开发出 14 个化学品的生物制造技术并实现技术转让，其中 L-丙氨酸、L-缬氨酸、丁二酸和 D-乳酸实现了万吨级产业化。L-丙氨酸技术支撑华恒生物在科创板上市。以第一完成人获中国轻工业联合会技术发明一等奖、中国专利优秀奖和中国产学研合作创新成果奖。



刘涛 博士，中国科学院天津工业生物技术研究所研究员。从事植物天然产物途径解析及微生物异源合成研究。首次发明微生物合成红景天苷、天麻素等技术，进入产业化实施阶段。在蛇床子素及苯乙醇苷等苯丙素天然产物途径解析及异源合成方面取得重要进展。在 *Metab Eng*、*Org Lett*、*ACS Synth Biol*、*Proc Natl Acad Sci*、*J Am Chem Soc*、*J Nat Prod*、*Phytochemistry* 等期刊发表论文 40 余篇，授权专利 20 余项，主持国家自然科学基金，国家重点研发计划，天津、云南及广东地方重点项目等 10 余项项目。



植物天然产物微生物重组合成研究进展

毕慧萍^{1,2#}，刘晓楠^{1,2#}，李清艳^{1,2}，程健^{1,2}，庄以彬^{1,2}，王冬^{1,2}，戴住波^{1,2}，江会锋^{1,2}，刘涛^{1,2}，张学礼^{1,2}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室，天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心，天津 300308

毕慧萍，刘晓楠，李清艳，程健，庄以彬，王冬，戴住波，江会锋，刘涛，张学礼. 植物天然产物微生物重组合成研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4263-4282.

BI HP, LIU XN, LI QY, CHENG J, ZHUANG YB, WANG D, DAI ZB, JIANG HF, LIU T, ZHANG XL. Advances in microbial synthesis of plant natural products. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4263-4282.

摘要：植物天然产物是小分子药物、营养品、化妆品、香精香料等的主要来源之一，在国民经

Received: July 29, 2022; **Accepted:** October 5, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31970065, 31770104); National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905100)

Corresponding authors: ZHANG Xueli. E-mail: zhang_xl@tib.cas.cn

LIU Tao. E-mail: liu_t@tib.cas.cn

#These authors contributed equally to this study

基金项目：国家自然科学基金 (31970065, 31770104); 国家重点研发计划 (2019YFA0905100)

济中发挥重要的作用。目前植物天然产物主要依赖于植物提取,这种生产方式占用耕地、生长周期长,而且植物活性成分往往含量低、生产成本高。通过解析植物天然产物生物合成途径,在微生物细胞中重构,创建细胞工厂,实现利用可再生原料发酵合成,为植物天然产物的供给提供了新的路线。本文重点介绍了中国科学院天津工业生物技术研究所萜类、黄酮类、苯丙素类等重要类型植物天然产物微生物重组合成方面的研究进展,简要探讨了当前研究面临的挑战及未来前景。

关键词: 植物天然产物; 合成生物学; 萜类; 黄酮类; 苯丙素类

Advances in microbial synthesis of plant natural products

BI Huiping^{1,2#}, LIU Xiaonan^{1,2#}, LI Qingyan^{1,2}, CHENG Jian^{1,2}, ZHUANG Yibin^{1,2}, WANG Dong^{1,2}, DAI Zubo^{1,2}, JIANG Huifeng^{1,2}, LIU Tao^{1,2}, ZHANG Xueli^{1,2}

1 Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

Abstract: Plant natural products are one of the main sources of small molecule drugs, nutraceuticals, cosmetics and fragrances, and play an important role in economy development. At present, the way of obtaining plant natural products mainly depends on direct extraction from plants, which is farm land occupying and time consuming. The contents of active ingredients in plants are usually low, and thus the production cost is high. By elucidating the biosynthetic pathways and reconstructing the pathways in microbial cells, plant natural products can be produced by fermentation using renewable raw materials. Microbial biosynthesis provides a new route for the supply of plant natural products. This review summarizes the research progress of microbial synthesis of terpenoids, flavonoids, phenylpropanoids and other important natural products of plants in Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences. Current research challenges and future prospects are also briefly discussed.

Keywords: plant natural products; synthetic biology; terpenoids; flavonoids; phenylpropanoids

天然产物是药物及其先导化合物的重要来源,1981–2019年间获批上市的药物中有1/4来源于天然产物及其衍生物^[1]。植物天然产物是小分子药物的重要来源之一,人类将植物作为药物使用的书面记录可以追溯到公元前2600年^[2],传统中医名著《本草纲目》记载药用植物逾1000种。植物天然产物在医药、保健品领域应用广泛,在农兽药、化妆品、香精香料等行业也具有重要应用价值^[3]。青蒿素、

紫杉醇、人参皂苷、吗啡、白藜芦醇及香叶醇等重要天然产物均来源于植物。传统植物天然产物的生产方式主要是植物提取。某些药用植物天然资源濒危、人工种植困难、生长周期长,且活性成分含量低、提取过程繁琐、收率低。天然产物化学合成,往往存在反应过程复杂、产率低、成本高及环境污染等问题。植物组织细胞培养中提取也是植物天然产物重要的获取方式,但植物组织细胞培养生产周期长、操作

步骤复杂、成本过高,也不利于扩大生产,商业化成功的案例包括小檗碱、紫杉醇前体及紫草素等,相对较少^[4]。基于合成生物学的原理,设计和创建微生物细胞工厂发酵生产植物天然产物,可以突破植物资源限制,为植物天然产物的绿色高效合成提供了新的路线。近年来,随着合成生物学的飞速发展,国内外同行在微生物异源发酵合成植物天然产物取得了重要进展,包括青蒿素、紫杉醇、大麻素、莨菪碱等诸多重要植物天然产物实现了微生物合成^[5-10]。中国科学院天津工业生物技术研究所是最早开展植物天然产物微生物重组合成的单位之一,本文重点介绍研究所在“人工本草”计划框架下,在萜类、黄酮类、苯丙素类等重要植物天

然产物微生物重组合成方面取得的系列进展(图1)。

1 萜类化合物微生物重组合成

萜类化合物广泛存在于自然界中,目前已超过8万种的萜类化合物被发现,其中大部分是药用植物中的有效成分^[11]。青蒿素、抗癌药物紫杉醇、具有保健作用人参皂苷及作为抗氧化剂的类胡萝卜素类化合物均属于萜类(图2)。

一线抗疟药物青蒿素(artemisinin),是由20世纪70年代中国中医科学院中药研究所屠呦呦先生(我国在自然科学领域的第1个诺贝尔奖得主)及其研究团队在我国传统中草药青蒿中发现的一种倍半萜类(C₁₅)化合物。过去

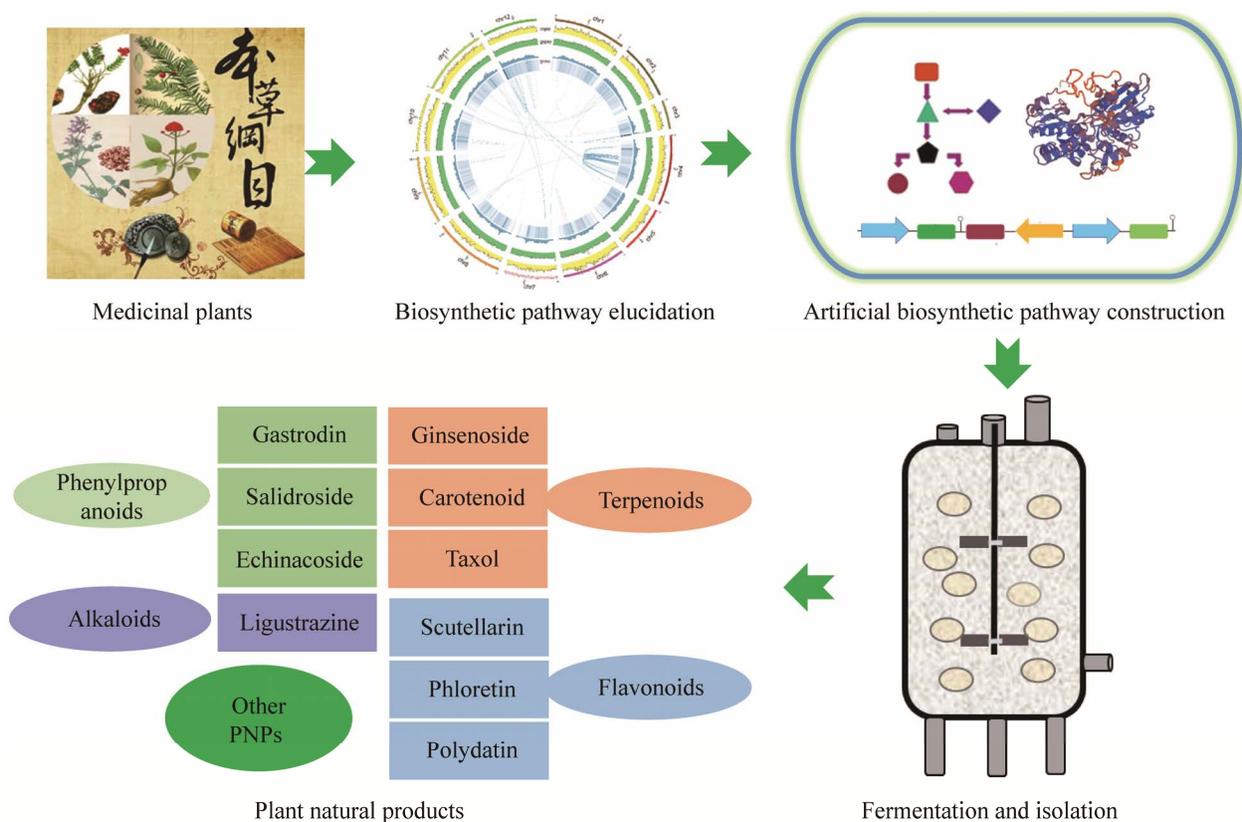


图1 植物天然产物微生物重组合成

Figure 1 Microbial synthesis of plant natural products.

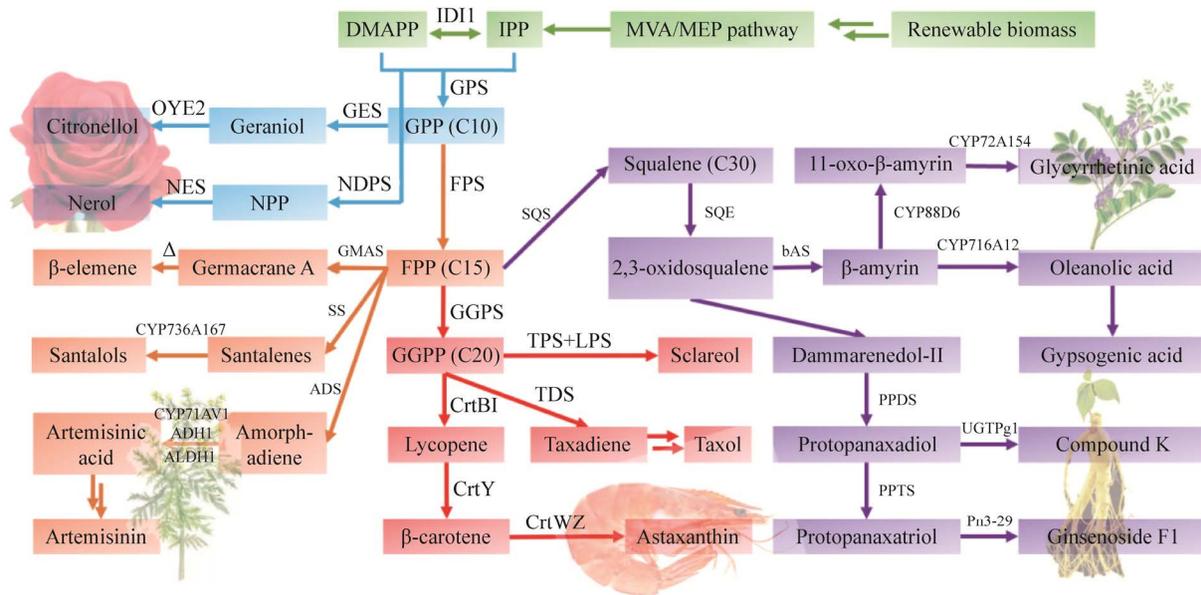


图 2 典型萜类化合物合成途径

Figure 2 Biosynthetic pathway of typical terpenoids.

的生产方式为从黄花蒿中直接提取。2013年, J.D. Keasling 教授在第 18 届生物化学与分子工程国际大会 (BME XVIII) 上介绍: 其团队历时 10 年, 实现了青蒿素在酵母中发酵生产, 产量高达 25 g/L, 进一步通过化学反应合成了青蒿素^[7]; 经过计算, 其在不到 100 m³ 发酵车间年产青蒿素能达到 35 t, 相当于我国近 3 000 hm² 耕地的种植产量。该项工作被认为是利用人工合成细胞生产植物源天然产物研究领域的里程碑^[12]。2021 年, 研究团队进一步用易错聚合酶链反应 (error-prone polymerase chain reaction, error-prone PCR) 方法对来自黄花蒿的 CYP71AV1 进行饱和突变, 获得的 8 位点组合突变体使青蒿素的发酵水平大幅提高至 45 g/L^[13]。

国内研究学者在萜类化合物的人工细胞合成方面也取得了喜人的进展, 如中国科学院上海植物生理生态研究所, 在人参和三七中挖掘了多个糖基转移酶, 较全面地解析了人参和三七皂苷的生物合成途径, 相关糖基转移酶的专利已经

进入多个国家和地区进行审查并获得授权^[14-15]。同时, 该研究所在天然甜味剂甜菊糖的生物合成方面也取得重要进展^[16-17]。武汉大学为了提高酵母细胞对番茄红素的承载能力, 重点提高胞内脂滴的主要成分甘油三酯的代谢流, 并以番茄红素多双键的特点, 调控脂质合成中不饱和脂肪酸的含量以及脂滴的大小, 从而提高细胞对其的承载能力, 实现番茄红素在胞内的高含量存储和番茄红素的高产^[18]。中国科学院天津工业生物技术研究所 (以下简称“天津工业生物所”) 主要在萜类香精、人参/三七皂苷、三萜酸、类胡萝卜素和紫杉醇等生物合成上取得了进展。

1.1 萜类香精

全球香精香料市场广阔, 檀香醇、广藿香醇、β-榄香烯、玫瑰精油等萜类精油广泛应用于日化品、食品和药品等领域。β-榄香烯是从姜科植物温郁金、莪术等药用植物中提取的国家一类抗癌药物的有效成分。天然来源的 β-榄香烯因其含量低、类似物组成复杂等原因, 导

致其分离成本过高。天津工业生物所与中国中医科学院中药资源中心合作,利用代谢工程与合成生物学技术提高酿酒酵母中萜类的生物合成通量和产物兼容性。在此基础上,进行吉玛烯 A 合成酶的蛋白质工程改造和高产吉玛烯 A 工程菌创建,并成功开发吉玛烯 A 热转化为 β -榄香烯的耦合工艺,最终将高纯度 β -榄香烯的获得成本降为植物提取的 0.15%^[19]。

玫瑰精油被认为是世界上最昂贵的精油之一,被称为“精油之后”,其主要成分为香茅醇、香叶醇和橙花醇。天津工业生物所以天然玫瑰精油的发酵生产为案例,筛选到代谢截流效果显著的 ERG7 启动子元件。通过 ERG7 启动子的应用,以及香茅醇生物合成模块的表达及优化,最终获得在 5 L 发酵罐中香茅醇的产量能达到 6 g/L 的工程菌。在此基础上,香叶醇-香茅醇合成模块和橙花醇合成模块被整合到同一底盘菌株中,创建了国际上首个同时生产天然玫瑰精油 3 种主要单萜组分的“玫瑰酵母”菌株 rose-yeast 1.0,其组分比例为香茅醇 (62%)、香叶醇 (27%) 和橙花醇 (10%),与天然大马士革玫瑰精油中 3 种组分的比例接近,在国际标准认证 ISO98422003 范围内^[20]。Rose-yeast 1.0 在 5 L 发酵罐中混合精油产量能达到 5 g/L,预计未来综合成本将节约 90%。

1.2 人参皂苷

人参皂苷是名贵中药人参和西洋参的有效成分,是原人参二醇、原人参三醇和齐墩果酸三类苷元在糖基转移酶的催化下形成的系列混合物的总称,具有抗肿瘤、降血糖、促免疫等功能^[21-23]。天津工业生物所与中国中医科学院中药资源中心合作,在酿酒酵母中首次成功构建原人参二醇的生物合成途径,并且发现鲨烯环氧酶在控制三萜化合物的生物合成中起关键作用^[24]。在此基础上,通过提高关键基因的表

达活性,将原人参二醇的产量提高了 262 倍。再通过双相发酵工艺优化,最终将原人参二醇的产量提高至 1 g/L^[12]。2018 年,合作团队公开报道了将细胞工厂三萜合成通量提高到 10 g/L 级别的构建方案,创建出产量能达到 15 g/L 人参皂苷前体的高效酵母细胞工厂^[25]。另外,将齐墩果酸、原人参二醇和原人参三醇这 3 个功能模块导入同一底盘细胞,获得能同时合成 3 种人参基本皂苷元的第一代基于多组分概念的“人参酵母”细胞工厂^[26]。在苷元后修饰方面,结合转录组和生物信息学分析构建了一个三七的候选糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferases, UGTs) 因元件库,并利用“即插即用”生物合成途径解析平台,成功实现了三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、Rb1 和 Rd 等主要三七活性皂苷成分 (占三七总皂苷比例的 60%) 的生物合成途径高效、低成本解析^[27]。2021 年,团队发现原人参二醇合酶 (protopanaxadiol synthase, PPDS) 定位于内质网,而底物达玛烯二醇-II (dammarenediol II, DD) 主要存在于脂滴,在异源工程菌中证实了反应底物与酶存在区室化分隔的推论。利用脂滴膜蛋白 Pln1p 将 PPDS 靶向 DD 的储存细胞器-脂滴,为该酶反应重建了新的反应区室,显著提高了原人参二醇的生产效率。进一步引入人参皂苷 CK 的高效合成模块,获得了在 5 L 发酵罐中能生产 5 g/L 人参皂苷 CK 的工程菌^[28]。

1.3 三萜酸

苹果、山楂、枇杷、枣和梨等水果表皮蜡质中含有微量的高值三萜酸类活性成分,包括科罗索酸、山楂酸、麦珠子酸和积雪草酸等化合物。它们在抗病毒、糖尿病控制和皮肤修复等方面有广泛用途,是一类重要的膳食补充剂^[29-31]。其中,科罗索酸在抗糖尿病方面有显著作用^[30],被认为是一种天然植物胰岛素。从原植物中直接提取是目前生产这类化合物的主要方式。为

了创建高效微生物细胞工厂实现这类药效化合物的发酵法生产,天津工业生物所团队开发了“即插即用”生物合成途径快速解析平台,包括植物组织培养、差异转录组测序分析和代谢物分析、候选基因在底盘细胞中的表征及化合物鉴定。利用这一平台,团队从药用植物山楂 P450 库中首次筛选到能催化齐墩果酸和乌索酸生成 2 位 α -羟化产物山楂酸和科罗素酸功能的 P450 酶 MAA45。在此基础上,创建出高效生产山楂酸和科罗素酸的酿酒酵母细胞工厂,产量分别达 384 mg/L 和 141 mg/L^[32-33]。

金铁锁皂苷为云南白药重要组方药金铁锁的活性成分,具有镇痛、抗炎和免疫调节等多重活性。在金铁锁转录组文库构建的基础上,结合“即插即用”生物合成途径快速解析平台,解析了 2 个参与金铁锁皂苷生物合成的 CYP 基因, CYP716A262 和 CYP72A567。将 CYP716A262 和 CYP72A567 转化底盘菌 BY-bAS,在酵母中重构了金铁锁皂苷元生物合成途径,获得的工程菌在 5 L 的生物反应器中生产的丝石竹皂苷元和皂皮酸的产量分别达到了 146.84 和 314.01 mg/L^[34]。

1.4 类胡萝卜素

类胡萝卜素在医药、营养品、化妆品以及食品领域具有重要用途。 β -胡萝卜素、番茄红素、虾青素是代表性的类胡萝卜素。天津工业生物所以类胡萝卜素为研究对象,从物质代谢调控、能量代谢调控和细胞生理调控这 3 个方面开展研究,较为系统地解析了微生物高效合成萜类化合物的调控机制^[35-41]。

在物质代谢方面,发现 IspG 和 IspH 是重要的限速步骤,并且这两个酶需要协同表达才能发挥作用。IspG 的单独过表达会导致有毒中间代谢物 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基 4-二磷酸 (1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate, HMBPP) 积累,严重抑制细胞生长代谢^[35];开发

了分子装置 dCas9-Lag,将 *Crt* 基因拉到细胞膜附近进行表达,增加了膜组分中类胡萝卜素转化酶的表达量,进一步提高了虾青素产量^[36];利用定向进化技术对 *CrtW* 进行突变,并精细调控 *CrtW* 和 *CrtZ* 表达,虾青素的含量占到总类胡萝卜素产量的 99%,最终使用 Cre-loxP 技术增加 *CrtW*、*CrtZ* 基因拷贝数,获得的工程菌虾青素在 5 L 发酵罐中产量达 0.88 g/L^[37],进一步工作中,虾青素的产量达 1.82 g/L^[38]。

在能量代谢方面,通过对中央代谢途径(磷酸戊糖和三羧酸循环的多尺度模块化调控,发现三羧酸循环的代谢通量是大肠杆菌好氧合成 NADPH 的最主要限制因素,解决了萜类化合物合成代谢中的还原力不平衡问题^[39]。

在细胞生理调控方面,系统研究了大肠杆菌细胞膜存储能力的限制因素,发现细胞膜形态和细胞膜组分合成能力是制约大肠杆菌细胞膜存储能力的关键因素。引入外源的膜折叠蛋白,能改变大肠杆菌的细胞膜形态,形成细胞膜向内的褶皱。增强甘油磷脂合成能力可以进一步增加细胞膜向内的褶皱,从而进一步增强细胞膜存储能力并显著提高萜类化合物的产量^[40]。进一步工作中,通过同时敲除大肠杆菌中基因 *tolR* 和 *nlpI*,开发了一种新型的人工膜囊泡转运系统 (artificial membrane vesicle trafficking system, AMVTS) 用于转运胡萝卜素。为了弥补因囊泡转运导致的膜成分损失,设计了磷脂乙醇胺的合成途径,最终建立了一种不同于基于天然蛋白的细胞运输系统的新型人工运输机制,为大肠杆菌转运各种疏水化合物提供可能^[41]。

1.5 紫杉醇

紫杉醇作为目前已发现的最优秀的天然抗癌药物之一,其生产方式主要依赖于从珍稀植物红豆杉中进行分离提取,但因含量稀少,生产能力受到极大限制^[42]。为了解决巨大的供需

矛盾, 科学家数十年深入的研究, 寻求利用合成生物学方法来生产此类药物。前期研究表明紫杉醇的生物合成从香叶基香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 开始需经历 19 步酶催化反应, 其中大约一半反应为细胞色素 P450 酶介导^[43]。虽然历经数十年研究, 但是紫杉醇生物合成途径至今尚未完全解析。与此同时, 利用微生物转化方法生产紫杉醇仍然处于起始阶段。紫杉二烯合酶 (taxadiene synthase, TS) 是紫杉醇合成途径中第一个关键酶, 它催化 GGPP 环化生产紫杉二烯母核^[44]。目前大肠杆菌、酿酒酵母、烟草细胞都已经被成功开发为生产紫杉烯的底盘细胞^[45-46]。随后, 经过紫杉烯-5 α -羟化酶 (CYP725A4) 的作用生成少量紫杉二烯-5 α -醇及多种副产物^[47-48]。在发酵产物中仅 10% 的紫杉二烯被转化成为目的产物紫杉二烯-5 α -醇, 即使利用通过开发表达紫杉二烯的大肠杆菌和表达 P450 基因的酿酒酵母双系统共培养系统以及酵母生产体系的优化后, 羟基化产物产量也都只有毫克级^[46,49]。其生物合成途径研究历经几十载, 但依然进展缓慢。红豆杉超大的基因组和紫杉醇复杂的代谢路线是其途径解析的主要限制因素。2021 年, 天津工业生物所与西北工业大学等单位合作完成了喜马拉雅红豆杉 (*Taxus wallichiana*) 超 10 Gb 的染色体水平的全基因组测序, 并通过复杂基因组组装与分析, 解析了红豆杉中生物合成紫杉醇的关键基因簇。通过对紫杉醇合成途径的起源与进化机制进行研究, 发现红豆杉几乎没有经历过明显的全基因组倍增事件, 而是发生了大量的基因串联重复事件。与紫杉醇合成密切相关的细胞色素 P450 酶家族与酰基转移酶家族, 通过串联复制都产生了超过 50 份基因拷贝。随着家族冗余基因的功能分化, 红豆杉进化出了非常复杂的代谢物合成和转录调控网络, 这为红豆

杉进化出极其复杂的紫杉醇合成途径提供了遗传基础^[50]。与此同时, 中国农业科学院农业基因组研究所黄三文与闫建斌团队通过对南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei*) 进行了全基因组测序, 成功组装了染色体级别的高质量参考基因组。该研究系统分析了紫杉醇合成相关基因的基因组定位与协同表达调控, 绘制了多个相关基因家族的基因组位置图谱, 特别揭示了细胞色素 P450 家族的基因组分布和调控规律^[51]。中国中医科学院中药研究所陈士林团队也报道了云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis*) 基于 10.7 Gb 序列组装成 12 条染色体的高质量基因组, 同样也发现了紫杉醇合成途径中的羟化酶基因家族呈现出显著的扩张趋势^[52]。红豆杉复杂基因组的成功组装和遗传学分析的突破将进一步推动紫杉醇合成途径的解析及其微生物异源合成的进步。

2 黄酮类化合物微生物重组合成

黄酮类化合物是一类广泛存在于植物中的重要次生代谢产物, 有抗菌、抗炎、抗癌、抗病毒等多种生理活性, 在人类健康与医疗领域具有广阔的应用前景^[53-55]。黄酮类的生物合成途径已经比较清晰: 首先苯丙氨酸经过苯丙氨酸裂解酶 (phenylalanine lyase, PAL) 催化生成肉桂酸; 肉桂酸经过肉桂酸 4-羟化酶 (cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H) 的催化生成对-香豆酸, 对-香豆酸也可以由酪氨酸直接脱氨基生成; 然后, 在对-香豆酸辅酶 A 连接酶 (*p*-coumaroyl-CoA ligase, 4CL) 的作用下, 将肉桂酸或香豆酸转化为相应的辅酶 A 酯; 在查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 的作用下, 辅酶 A 酯与丙二酰辅酶 A 以 1:3 的比例缩合生成查尔酮, 查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 催化查尔酮异构化生成柚皮素或松属素

等黄酮母核^[56-57]；这些母核可进一步修饰为各式各样的黄酮结构^[58]。近年来，随着微生物代谢工程与合成生物学研究的不断深入，构建微生物底盘合成黄酮类化合物的生产方式可以提供一种高效低廉的替代方案。目前，多种模式微生物包括大肠杆菌、酵母菌、链霉菌、谷氨酸棒杆菌等正逐渐被应用于黄酮类化合物的生物合成^[58]。为了优化工业化生产黄酮的微生物细胞工厂，研究人员进行了多层次的尝试，包括关键酶挖掘、改造；增加前体物质如苯丙氨酸、丙二酰辅酶 A 的供应；动态调控；微生物共培养技术开发；生物合成的底盘细胞范围扩展；开发高通量筛选与动态调节检测技术等^[56-57,59-61]。但是，目前大多数黄酮类化合物的微生物发酵产量保持在毫克级别^[59]。与此同时，异源基因与工程菌的适配性、合成过程中产物得率、关键酶活性提升、中间代谢产物毒性、发酵生产工艺的优化等仍然是微生物生产黄酮类化合物亟待解决的关键问题^[59-61]。天津工业生物所团队也在灯盏乙素、虎杖苷及根皮素等黄酮类化合物微生物重组合成方面取得了一些进展 (图 3)。

2.1 灯盏乙素

灯盏乙素是菊科植物灯盏花的主要活性成分，作为治疗心脑血管疾病的特效药物已被制成各种剂型应用于临床。灯盏乙素主要结构特征是 6 位的羟基化和 7 位的糖基化修饰。2018 年天津工业生物所研究人员首先根据灯盏花基因组和转录组的测序数据对灯盏花基因进行了重注释，通过近缘物种代谢物分析和 P450 基因的家谱进化及表达分析，获取在灯盏花中高表达的、菊科植物特有的 P450 酶，并通过构建穿梭质粒表达载体进行高通量筛选，筛选出可以将芹菜素转化成野黄芩素的黄酮 6-羟化酶。研究团队开发了基于 Golden gate 组装和酿酒酵母本身高效的同源重组相结合的 M2S 的构建策略，随后

在产芹菜素底盘菌中导入灯盏花来源的黄酮 6-羟化酶、P450 还原酶、黄酮 7-糖基转移酶以及 UDP-葡萄糖脱氢酶等基因，成功构建了可以产灯盏乙素的酿酒酵母工程菌株，从而实现灯盏乙素的从头合成。该研究不仅为灯盏乙素提供了新的来源，而且为天然产物代谢工程研究提供了一个整合基因组学和合成生物学的研究范例^[62]。

近年来，非模式菌株解脂耶氏酵母由于其广泛的底物谱、前体物质充足、良好的耐受性、无 Crabtree 效应，脱颖而出成为一个有吸引力的宿主。近期，天津工业生物所团队以敲除 KU70、并且基因组中已经整合 Cas9 蛋白的解脂耶氏酵母 W29 作为出发菌株，通过对灯盏乙素合成途径的构建及模块化优化、关键基因进行组合筛选、不同物种来源的同工酶筛选降低副产物灯盏甲素的比例、代谢工程改造以及发酵优化，从而实现灯盏乙素在解脂耶氏酵母中的高效合成，产量是酿酒酵母中报道的 3 倍，并且灯盏乙素的生产比例从 36.9% 提升到 80.0% 以上^[63]。

2.2 虎杖苷

虎杖苷是传统中草药虎杖的主要活性成分之一，具有抗癌、抗氧化、抗休克、抗炎等药理活性，虎杖苷是白藜芦醇的 3 位糖基化产物，相比白藜芦醇具有更好的结构稳定性和生物活性。2021 年天津工业生物所团队通过对虎杖植株不同组织进行代谢物分析、转录组测序和生物信息学分析，获得 9 个在虎杖根中高表达的糖基转移酶候选序列。将 9 个糖基转移酶候选基因在过表达 UDP-葡萄糖供给模块的底盘菌株进行功能验证，获得了催化白藜芦醇生成虎杖苷的目标基因。研究团队将 Gibson 组装与 M2S 基因整合技术相结合应用于酿酒酵母底盘构建大大提升了底盘构建效率，实现了虎杖苷的微生物重组合成，通过代谢工程改造以及分

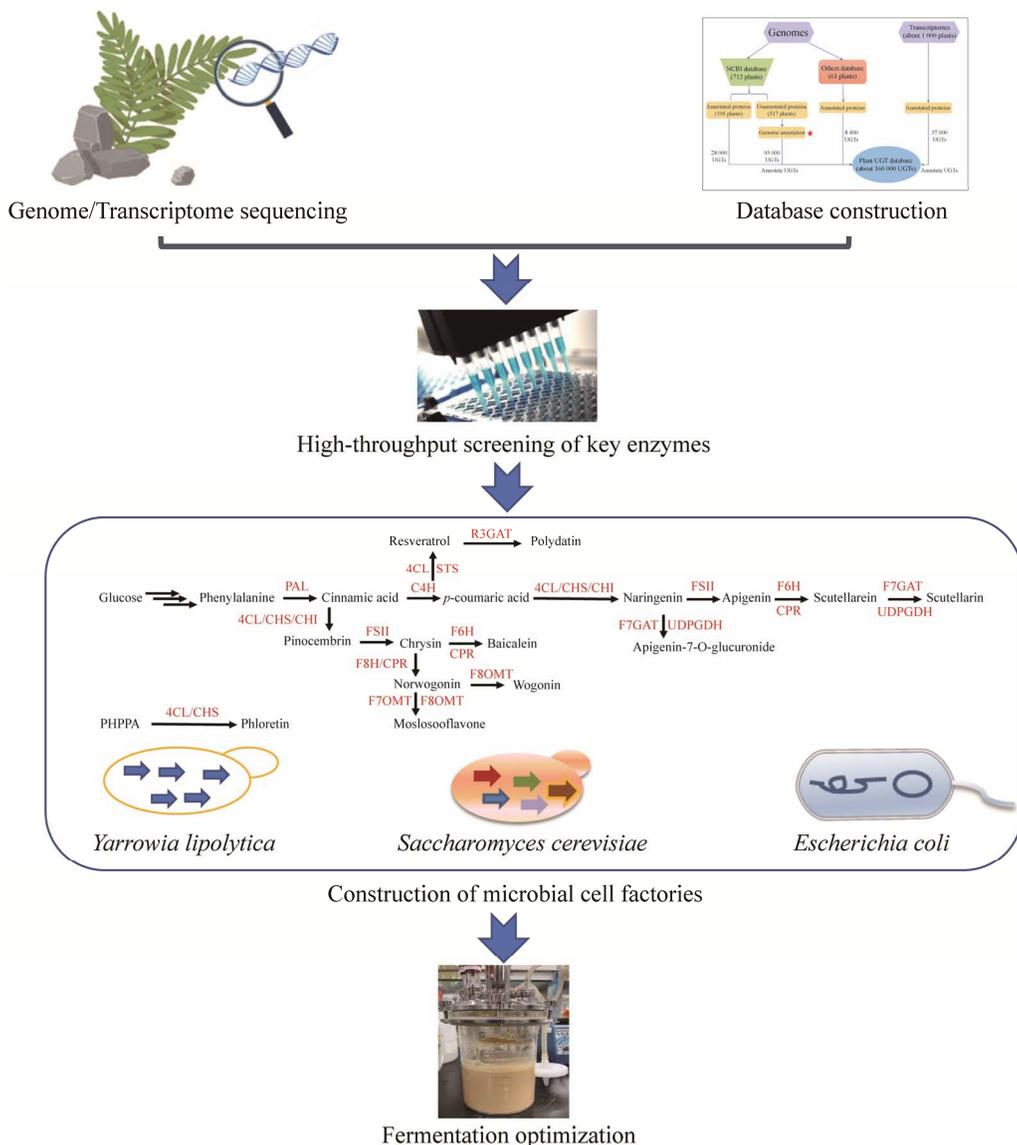


图3 黄酮类化合物微生物重组合成
Figure 3 Microbial synthesis of flavonoids.

批补料发酵优化进一步提高虎杖苷的产量，达到 545 mg/L^[64]。

2.3 根皮素

根皮素是一种天然皮肤美白剂，然而植物中根皮素生物合成途径较长，因此目前已报道的利用天然途径合成根皮素的细胞工厂产量都很低。Jiang 等在酵母中构建了高效的两步法合成根皮素的人工途径。在研究过程中，发现 1/3

的发酵原料都转化成了副产物，导致原料转化率较低。而副产物产生的主要原因是关键催化酶的活性不足和主要前体供给不足。为此，天津工业生物所团队从 14 种高产黄酮类化合物的传统植物中筛选获得了高活性的关键酶查尔酮合成酶 CHS；然后又通过两种策略提高了根皮素合成核心前体丙二酰-辅酶 A 的产量，一是通过代谢途径优化增强了细胞内源性的丙二酰-辅

酸^[75], 以及结构更为复杂的鬼臼毒素类化合物^[76], 都已经实现了重组合成。天津工业生物所团队也在天麻素、红景天苷等苯丙素类化合物的微生物重组合成方面取得了系列进展 (图 4)。

3.1 天麻素

天麻素是我国名贵中药材天麻的主要活性成分, 临床上广泛应用于神经衰弱、眩晕、头痛及癫痫的辅助治疗。天麻为我国 34 种名贵中药之一, 作为 II 级保护植物被列入中国国家重点保护野生植物名录中。天麻素的制备主要有植物提取及化学合成。天麻野生资源珍稀, 功效成分含量低 (约为 0.4%), 而常用的提取工程序复杂、产率低, 导致植物提取天麻素价格高昂。已报道的化学合成方法大都存在产率低、成本较高和污染严重等缺点。植物中天麻素的生物合成通路至今还未解析清楚。2016 年天津工业生物所团队以大肠杆菌莽草酸通路的分支酸为前体, 通过在大肠杆菌中引入来源于诺卡氏菌的羧酸还原酶 (carboxylic acid reductase, CAR) 及枯草芽孢杆菌的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (phosphopantetheinyl transferase, Sfp), 并利用大肠杆菌内源的醇脱氢酶 (alcoholdehydrogenases, ADHs) 等, 构建了天麻素苷元对羟基苜醇的从头合成通路, 然后引入植物红景天来源的糖基转移酶 UGT73B6, 并对其进行了定向进化改造提高其催化专一性, 创建了天麻素大肠杆菌合成通路, 摇瓶发酵产量达 545 mg/L^[77]。通过进一步调控莽草酸通路、UDP-葡萄糖通路、NADPH 还原力供给, 对糖基转移酶进行突变和筛选, 优化发酵条件, 显著提高了天麻素产量。目前, 以葡萄糖为原料的天麻素生产成本预计在 500 元/kg, 低于植物提取成本的 1/200, 化学合成成本的 1/2。

2020 年该团队在酿酒酵母中实现天麻素的从头合成^[78]。首先鉴定了一个在酿酒酵母中能

实现糖基化对羟基苜醇合成天麻素的糖基转移酶 AsUGT。通过在酿酒酵母中过表达来自诺卡氏菌的羧酸还原酶 CAR、谷氨酸棒杆菌中的磷酸泛酰巯基乙胺转移酶 PPTcg-1、大肠杆菌的分支酸丙酮酸裂解酶 UbiC 和酿酒酵母 ARO4 的突变体蛋白 ARO4^{K229L}, 实现了天麻素在酿酒酵母中的从头合成。进而通过在基因组 rDNA 和 δ -位点 DNA 进行天麻素合成途径基因及多个前体合成途径基因的多拷贝整合, 提高了天麻素产量, 在简单培养基的摇瓶发酵培养中, 天麻素产量达 2.1 g/L, 相对于起始菌株提高了 175 倍。

3.2 红景天苷

红景天苷是我国传统藏药红景天主要活性成分之一, 具有抗缺氧、抗疲劳等多种生物活性。红景天苷目前主要来源于植物提取, 但红景天野生植物资源匮乏, 红景天苷含量低, 提取工艺复杂, 难以获得大量高纯单体化合物, 大大限制了其研究和应用。2014 年天津工业生物所团队利用莽草酸通路后修饰, 通过整合来自酿酒酵母、大肠杆菌和植物红景天的基因, 设计创建人工合成通路实现大肠杆菌从头合成红景天苷^[79]。通过糖基转移酶的筛选和定向进化改造结合代谢调控等工作, 获得一个高产红景天苷的工程菌。经过进一步的发酵条件优化, 目前大肠杆菌生产红景天产率为 10 g/(d·L), 成本仅为植物提取的 1/40, 具备工业应用潜力。2018 年该研究团队报道了酿酒酵母从头合成红景天苷, 通过表达欧芹来源的芳香醛合酶 PcAAS, 将植物中酪醇合成通路引入酿酒酵母, 提高了酿酒酵母工程菌生产酪醇的能力, 并对不同来源的糖基转移酶 UGTs 进行了优选, 实现了酿酒酵母从头合成红景天苷, 通过解除反馈抑制、增强酪氨酸合成途径代谢流、染色体整合表达, 5 L 发酵罐红景天苷产量达 732.5 mg/L^[80]。

2018 年来自美国麻省理工学院的 Weng 团队解析了植物红景天中的红景天苷合成通路,并实现了酿酒酵母异源合成红景天苷^[81]。2016 年国内外科学家陆续报道了大肠杆菌和酿酒酵母合成红景天苷,在代谢调控、混菌培养等方面取得了重要的进展^[82-86]。

3.3 络塞维类化合物

络塞维是玫瑰红景天特征活性成分。络塞 (Rosin) 及其衍生物络塞维 (Rosavin) 和络塞琳 (Rosarin), 这 3 种肉桂醇糖苷化合物统称为络塞维复合物, 是玫瑰红景天的特有成分。其中络塞维是主要活性成分, 也是常用来评价玫瑰红景天提取物质量的重要标志物, 在玫瑰红景天提取物中, 络塞维复合物含量要求不低于 3%。络塞维具有多种有益的药理作用, 如益智、抗癌、免疫调节、抗抑郁、抗辐射等。但是玫瑰红景天资源珍稀, 大大限制了络塞维的药理机制研究与应用。全球市场对玫瑰红景天提取物的需求不断增高, 价格逐年攀升, 提取物原料价格已达 1 000 元/kg 左右 (络塞维含量 3%), 且已经供不应求^[87]。2006 年, Patov 等报道了络塞维的化学合成^[88]。但是化学合成步骤较多, 产率低成本高, 环境污染严重。络塞维的生物合成机制至今还未解析。2017 年研究人员通过引入植物、微生物来源的苯丙氨酸氨解酶、肉桂酰辅酶 A 连接酶、肉桂酰辅酶 A 还原酶, 并利用大肠杆菌内源的醇脱氢酶或酮醛还原酶, 在大肠杆菌中构建了一条肉桂醇合成通路。利用糖基转移酶的底物宽泛性特点, 将拟南芥来源的 AtUGT73C5 引入上述产肉桂醇的大肠杆菌中, 实现了络塞的合成^[89]。2019 年, 该团队通过引入长春花来源的糖链延伸葡萄糖基转移酶 CaUGT3, 在大肠杆菌工程菌中实现了 7 种络塞维类化合物的从头合成, 包括肉桂醇二葡萄糖苷 (络塞维 B) 等 6 种非天然化合物^[90]。

2022 年, 该团队通过理性设计将 1,6-葡萄糖基转移酶 CaUGT3 改造成以 UDP-木糖为首选供体底物的新型糖基转移酶 CaUGT3^{T145V/N375Q}, 继而在大肠杆菌中创建了 UDP-木糖从头合成通路, 将改造的糖基转移酶和 UDP-木糖以及络塞生物合成途径组装到苯丙氨酸高产大肠杆菌菌株中, 实现了天然稀少络塞维类化合物络塞维 E (Rosavin E) 的从头合成^[91]。

3.4 迷迭香酸类化合物

迷迭香酸最早是从迷迭香中分离得到的一种水溶性天然酚酸类化合物, 在唇形科、紫草科、葫芦科和伞形科等植物中分布较为广泛, 尤以唇形科和紫草科中含量最高。迷迭香酸具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等活性, 在制药、食品、保健品、化妆品等领域具有重要价值。迷迭香酸目前多采用提取分离技术从植物中获取, 但是提取方法较烦琐、得率低, 且纯度不高, 难以满足市场需求。国内外研究团队报道了利用植物悬浮细胞培养及微生物重组合成来生产迷迭香酸^[92-93]。2016 年研究人员通过引入来自拟南芥的香豆酰辅酶 A 连接酶 At4CL、大肠杆菌的 4-羟基苯基乳酸-3-羟化酶 (4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase, HpaBC)、来自乳杆菌的乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 以及来自彩叶草的迷迭香酸合酶 (rosmarinic acid synthase, RAS) CbRAS, 通过在培养基中添加咖啡酸, 实现了大肠杆菌发酵生产迷迭香酸, 产量达 130 mg/L, 同时发现该重组菌株能合成 55 mg/L 的迷迭香酸类似物咖啡酰苯基乳酸^[94]。此外, 该团队还报道了利用大肠杆菌生物转化合成迷迭香酸类似物, 过表达 At4CL 和 CbRAS, 并分别添加不同的 At4CL 的底物包括咖啡酸、香豆酸、阿魏酸、4-羟基苯丙酸和 3,4-二羟基苯丙酸, 以及 CbRAS 的底物苯基乳酸、4-羟基苯基乳酸、3,4-二羟基苯基乳酸、扁桃酸和酪醇, 检测到包

括迷迭香酸在内的共 21 个结构类似物的生成^[95], 为微生物合成新活性成分提供了参考。2019 年美国 MIT 研究团队通过多组学分析结合体内体外基因功能验证解析了植物 *Phacelia campanularia* 中的迷迭香酸生物合成通路^[96]。2020 年 Babaei 等在酿酒酵母中表达植物迷迭香酸合成途径, 并通过正交设计优化基因表达强度, 利用葡萄糖合成了 5.93 mg/L 迷迭香酸^[75]。

3.5 复杂苯乙醇苷类化合物合成通路解析

植物来源的苯乙醇苷 (phenylethanoid glycosides, PhGs) 类天然产物是一类重要的芳香族化合物, 具有广泛的药理活性, 苯乙醇苷类化合物以红景天苷为母核, 中心葡萄糖基上常连有苯丙烯酸或各种糖基 (包括五碳糖、六碳糖)。目前至少有 572 种苯乙醇苷类化合物从不同植物中分离并鉴定, 仅有红景天苷的生物合成途径被解析, 对复杂 PhGs 的合成途径知之甚少, 但根据其结构特点推测这类化合物具有类似的生物合成过程, 以松果菊苷为例, 其合成单元包括莽草酸起源的苷元羟基酪醇和酰基辅酶 A, 2 个 UDP-葡萄糖, 1 个 UDP-鼠李糖, 在糖基转移酶和酰基转移酶 BAHD 的作用下组装成松果菊苷。粗壮女贞 (*Ligustrum robustum*) 为木犀科女贞属植物, 从中已分离毛蕊花糖苷、松果菊苷、紫茎女贞苷 A、紫茎女贞苷 B 等 20 多种 PhGs, 部分化合物的最高含量达干重 10% 以上, 且粗壮女贞在不同生长时期, 叶片中 PhGs 组成成分会发生改变。研究团队以 PhGs 含量高种类多的 *L. robustum* 为研究对象, 使用转录组分析、体外酶活验证的方法, 解析植物主要累积 PhGs 的生物合成途径, 鉴定了参与复杂苯乙醇苷类化合物紫茎女贞苷 B 生物合成的 3 个糖基转移酶: 其中葡萄糖基转移酶 UGT85AF8 催化酪醇合成红景天苷; 鼠李糖基转移酶 UGT79G7 催

化桂叶苷 A 生成桂叶苷 B; 鼠李糖基转移酶 UGT79A19 催化桂叶苷 B 生成紫茎女贞苷 B。此外, 在多种产 PhGs 的植物 (包括地黄、油橄榄、芝麻、肉苁蓉) 中发现了 UGT79G7 同源基因 (一致性约 80%), 经体外实验验证均具有相同催化功能, 表明了 UGT79G7 负责的糖基化反应在植物 PhGs 合成过程中发挥重要作用。UGT79G7、UGT79A19 等糖基转移酶的功能鉴定不仅为 PhGs 生物合成解析提供了参考, 而且为 PhGs 微生物重组合成提供了功能元件^[97]。

4 生物碱类化合物微生物重组合成

生物碱是一类活性较强的含氮有机化合物, 在中药材中广泛存在, 生物碱的化学结构复杂多样, 用于医药领域已经有上千年的历史。天然抗癌药物喜树碱、长春新碱及镇痛药吗啡都属于生物碱。近几年, 随着生物碱类天然产物生物合成途径的解析, 微生物重组合成生物碱类研究也取得了一定的进展。最近, 含有 7 个环的咪唑类生物碱马钱子碱的生物合成通路得到解析^[98]。2015 年美国斯坦福大学的科学家将 20 多个来自细菌、植物、动物以及酵母本身的功能基因导入酿酒酵母中, 实现了阿片类生物碱的从头生物合成^[99]。2020 年该团队又实现了托品烷生物碱莨菪碱的微生物重组合成^[9]。国内科学家也在生物碱合成机制解析及重组合成方面取得了一些进展。西南大学等研究团队于 2018 年和 2020 年鉴定了托品烷生物碱关键中间体 littorine 利托林生物合成途径中的 3 个酶, 苯丙酮酸还原酶 (phenylpyruvic acid reductase, PPAR)、苯基乳酸糖基转移酶 UGT1 和利托林合酶 (littorine synthase, LS)^[100-101]。2021 年中国科学院昆明植物研究所团队与西南大学团队合作, 发现并鉴定了莨菪碱生物合成途径中催化

莨菪醛生成莨菪碱的关键酶莨菪醛脱氢酶,标志着以莨菪碱为代表的药用托品烷类化合物的生物合成途径得以完整解析,为基于合成生物学的莨菪碱药物的异源生产奠定了基础^[102]。川芎嗪是从广泛使用的中药川芎中提取的生物活性成分,是一类吡嗪生物碱,天津工业生物所团队在川芎嗪的微生物重组合成过程中,通过对甲醛缩合酶的定向进化、前 14 个密码子的优化以及引入重叠基因,将川芎嗪关键前体乙偶姻合成产量提高了 40 倍,通过进一步优化反应条件使得川芎嗪产量达到 94 g/L^[103]。

5 P450 和糖基转移酶数据库建设

植物细胞色素 P450 酶在植物天然产物多样性和功能修饰方面发挥着重要的作用^[104]。已有多达 1 000 000 条植物 P450 酶序列被发现,861 个植物 P450 酶得以鉴定功能 (<https://erda.dk/public/vgrid/PlantP450/table.html>),这些 P450 酶主要来源于 53 个 P450 酶家族。其序列与功能相比,植物 P450 酶的三级结构研究更加稀少,但是目前只有 7 个植物 P450 酶的晶体结构被报道 (CYP73A33、CYP74A1、CYP74A2、CYP76AH1、CYP90B1、CYP97A3、CYP97C1),这严重地限制了 P450 酶的功能鉴定和修饰改造。为了解决这个问题,天津工业生物所团队开发了一种基于 AlphaFold 同源建模和分子动力学结构优化的方法用于构建高分辨率的 P450 三维结构 (plant cytochrome P450 comparative modelling, PCPCM); 同时为了辅助研究人员分析 P450 酶底物结合及催化机理,研究人员也开发了 P450 酶自动化对接程序 (plant cytochrome P450 ligand docking, PCPLD),这极大地方便了研究人员对 P450 酶复合体作用模式的分析。此外,基于 PCPCM 和 PCPLD,研究人员也构建了一套 P450 酶挖掘和筛选流程,这大大加快了天然产物合

成途径中相关 P450 酶的挖掘和相关功能分析研究^[105]。

UDP-糖基转移酶 UGTs 介导的糖基化是植物中最重要的后修饰之一。近些年来,许多生物活性分子合成途径中的关键 UGTs 成功鉴定,植物 UGTs 的研究获得科学家们广泛的关注。目前,已有数千种植物进行了基因组或转录组测序,研究团队通过整合不同来源的数据,开发了一个从植物基因组直接注释 UGTs 的方法 (GMind: <https://github.com/JiangLab2020/GMind>)。基于该方法,构建了一个系统全面的植物 UGT 数据库 (pUGTdb) (<https://pugtdb.biodesign.ac.cn/>)。应用该数据库平台首次成功挖掘出虎杖苷合成途径中的关键 UGT 基因 *PcR3GAT*^[64]。本研究不仅开发了针对植物 UGTs 的基因注释、功能注释及同源蛋白搜索的工具,而且还提供了一个系统全面的植物 UGT 数据库平台,极大地促进了关于植物 UGT 的基因挖掘、功能鉴定及重要植物天然产物的生物合成研究。

6 总结与展望

植物天然产物重组合成是合成生物学的重点研究方向之一,其以工程化的设计理念,对生物体进行有目标的设计与改造,有望为人类面临的资源、环境等领域的重大挑战提供新的解决方案^[106]。目前天津工业生物所已搭建起涵盖基因元件挖掘、酶设计改造、合成途径优化、发酵放大与分离纯化等的植物天然产物重组合成全链条研发平台,包括药物、营养品及香精香料等若干重要天然产物的微生物重组合成已取得突破,有望实现工业化生产。据统计,已知的植物天然产物超过 20 万种,我国的药用植物在 1 万种以上,随着人工智能、自动化及高通量等技术的不断进步及其在合成生物学领域的应用,植物天然产物的重组合成将迎来重要

的机遇。

同时,植物天然产物的重组合成技术还处在发展阶段,有许多问题需要解决。首先,大多数植物天然产物生物合成途径还未解析,大大制约了其微生物重组合成。随着测序技术的飞速发展,越来越多的“本草植物”基因组得到解析,基因组、转录组数据库日渐庞大。不同于微生物,大多数植物天然产物合成途径的基因在基因组上并非成簇存在。生物合成通路解析与功能元件挖掘数据量及工作量相对庞杂,如何实现智能化挖掘与高通量筛选成为迫切需要解决的问题。尽管已经有研究人员将机器学习应用于植物基因功能预测^[107],但受限植物天然产物合成功能元件数据库尚不完善、关键功能元件催化专一性难以预测等因素,成功案例还十分有限。借鉴化学逆合成思想,采用生物逆合成算法的生物合成途径及酶的预测及设计工具也在不断发展中^[108-110]。基于组学数据,开发可靠性高的机器学习工具用于功能元件挖掘及生物合成通路设计,并结合高通量自动化平台进行筛选鉴定,有望突破未知生物合成通路的制约。

其次,如何更好地平衡异源合成途径与微生物自身生长代谢之间的关系,也是植物天然产物微生物重组合成必须解决的问题。一方面可以利用不断发展的基因编辑与代谢调控工具,实现微生物代谢流的智能调控,平衡细胞生长与产物合成,提高微生物合成植物天然产物效率。另一方面,需要考虑目标产物的存储与运输,通过区室化、外排通道等手段缓解产物合成对微生物底盘的影响。另外,针对某些植物天然产物的特性,考虑酶的亚细胞定位和不同细胞器酶的协同催化等因素,基于植物底盘的天然产物重组合成也成为新的方案之一^[111]。

最后,近年来,越来越多的重要植物天然

产物实现了重组合成,具有广阔的应用前景。通过合成生物学手段实现某些珍稀中药活性成分的重组合成,得到大量高纯单体,将推进其药效和药理功能研究,为后续新药研发提供重要候选化合物,为中药现代化提供有力支撑。大量的关键药物中间体的获得,将为通过化学修饰合成多样的天然产物衍生物以及新药的研发奠定基础。但是,对于某些功能明确的重要植物天然产物,其基因重组合成产物市场准入方面还存在限制。目前我国对转基因产品的界定仍然比较模糊,法规与制度建设滞后于科技发展^[112]。也希望我国合理借鉴其他国家的监管经验,推进相关法律法规出台,明确各类产品的申报及审批流程,建立生物活性、安全性评价以及市场准入标准,推动微生物重组合成植物天然产物的产业应用。

REFERENCES

- [1] Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv*, 2015, 33: 1582-1614.
- [2] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*, 2020, 83: 770-803.
- [3] David B, Wolfender J, Dias DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem Rev*, 2015, 14: 299-315.
- [4] Hidalgo D, Sanchez R, Lalaleo L, et al. Biotechnological production of pharmaceuticals and biopharmaceuticals in plant cell and organ cultures. *Curr Med Chem*, 2018, 25(30): 3577-3596.
- [5] Courdavault V, O'Connor SE, Jensen MK, et al. Metabolic engineering for plant natural products biosynthesis: new procedures, concrete achievements and remaining limits. *Nat Prod Rep*, 2021, 15: 2145-2153.
- [6] 戴住波, 王勇, 周志华, 等. 植物天然产物合成生物学研究. *中国科学院院刊*, 2018, 33(11): 1228-1238. Dai ZB, Wang Y, Zhou ZH, et al. Synthetic biology for production of plant-derived natural products. *Bull Chin*

- Acad Sci, 2018, 33: 1228-1238 (in Chinese).
- [7] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528-532.
- [8] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330: 70-74.
- [9] Srinivasan P, Smolke CD. Biosynthesis of medicinal tropane alkaloids in yeast. *Nature*, 2020, 585(7826): 614-619.
- [10] Luo X, Reiter MA, D'Espaux L, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature*, 2019, 567: 123-126.
- [11] Chang MC, Eachus RA, Trieu W, et al. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(5): 274-277.
- [12] 王冬, 戴住波, 张学礼. 酵母人工合成细胞生产植物源天然产物. *微生物学报*, 2016, 56(3): 14.
Wang D, Dai ZB, Zhang XL. Production of plant-derived natural products in yeast cells. *Acta Microbiol Sin*, 2016, 56(3): 14 (in Chinese).
- [13] Paddon CJ, Jiang H, Kung SH. Amorpha-4,11-diene 12-monooxygenase variants and uses thereof (P). WO2021150960A1, 2021-07-29.
- [14] Zhou ZH, Wei W, Yan X, et al. Group of UDP-glycosyltransferase for catalyzing carbohydrate chain elongation, and application thereof (P). WOCN18087678, 2018-05-21.
- [15] Zhou ZH, Yan X, Fan Y, et al. Group of glycosyltransferases and use thereof (P). WOCN2013088819, 2014-06-09.
- [16] Wang J, Li S, Xiong Z, et al. Pathway mining-based integration of critical enzyme parts for *de novo* biosynthesis of steviolglycosides sweetener in *Escherichia coli*. *Cell Res*, 2016, 26(2): 258-261.
- [17] Sun Y, Chen Z, Li J, et al. Diterpenoid UDP-glycosyltransferases from Chinese sweet tea and *Ashitaba* complete the biosynthesis of rubusoside. *Mol Plant*, 2018, 11(10): 1308-1311.
- [18] Ma T, Shi B, Ye Z, et al. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene. *Metab Eng*, 2019, 52: 134-142.
- [19] 张学礼, 黄璐琦, 戴住波, 等. 一种重组菌及其用途: PCT/CN2017/109029, 2017-11-02.
- Zhang XL, Huang LQ, Dai ZB, et al. Recombinant yeast and use thereof: PCT/CN2017/109029, 2017-11-02 (in Chinese).
- [20] Li R, Wang K, Wang D, et al. Production of plant volatile terpenoids (rose oil) by yeast cell factories. *Green Chem*, 2021, 23(14): 5088-5096.
- [21] Lee SJ, Lee JS, Lee E, et al. The ginsenoside metabolite compound K inhibits hormone-independent breast cancer through downregulation of cyclin D1. *Journal of Functional Foods*, 2018, 46: 159-166.
- [22] Liao LM, Zhang Y, Lin SF, et al. In enzymatic transformation from protopanaxadiol ginsenoside Rb1 into rare ginsenoside C-K and its anti-cancer activity, 2nd International Conference on Biotechnology, Chemical and Materials Engineering (CBCME 2012), Xiamen, Peoples R China, Dec 28-29; Xiamen, Peoples R China, 2012; pp 752-755.
- [23] Lee KT, Jung TW, Lee HJ, et al. The antidiabetic effect of ginsenoside Rb2 via activation of AMPK. *Archives of Pharmacol Research*, 2011, 34(7): 1201-1208.
- [24] Dai Z, Liu Y, Zhang X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metab Eng*, 2013, 20: 146-156.
- [25] 王冬, 刘怡, 许骄阳, 等. 创建酿酒酵母细胞工厂高效生产人参皂苷前体达玛烯二醇II. *药学报*, 2018, 53(8): 1233-1241.
Wang D, Liu Y, Xu JY, et al. Construction of efficient yeast cell factories for production of ginsenosides precursor dammarenediol-II. *Acta Pharm Sin*, 2018, 53(8): 1233-1241 (in Chinese).
- [26] Dai Z, Wang B, Liu Y, Shi M, et al. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast. *Sci Rep*, 2014: 4.
- [27] Wang D, Wang J, Shi Y, et al. Elucidation of the complete biosynthetic pathway of the main triterpene glycosylation products of *Panax notoginseng* using a synthetic biology platform. *Metab Eng*, 2020, 61: 131-140.
- [28] Shi Y, Wang D, Li R, et al. Engineering yeast subcellular compartments for increased production of the lipophilic natural products ginsenosides. *Metab Eng*, 2021, 67: 104-111.
- [29] Bai X, Zhang Y, Jiang H, et al. Effects of maslinic acid on the proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 117-122.
- [30] Miura T, Ueda N, Yamada K, Fukushima M, et al. Antidiabetic effects of corosolic acid in KK-Ay diabetic mice. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(3): 585-587.

- [31] Bonte F, Dumas M, Chaudagne C, et al. Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis. *Planta Med*, 1994, 60(2): 133-135.
- [32] Dai Z, Liu Y, Sun Z, et al. Identification of a novel cytochrome P450 enzyme that catalyzes the C-2 α hydroxylation of pentacyclic triterpenoids and its application in yeast cell factories. *Metab Eng*, 2019, 51: 70-78.
- [33] 张学礼, 戴住波, 刘芸, 等. 三萜 2 位 α -羟化酶 MAA45 及其相关生物材料与它们在制备山楂酸和科罗索酸中的应用. ZL201610236283.9, 2019-02-26. Zhang XL, Dai ZB, Liu Y, et al. Triterpene 2 α -hydroxylase MAA45 and its related biomaterials and their application in the preparation of maslinic acid and corosolic acid: ZL201610236283.9, 2019-02-26 (in Chinese).
- [34] Li W, Ma X, Li G, et al. *De novo* biosynthesis of the oleanane-type triterpenoids of tunicosaponins in yeast. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(8): 1874-1881.
- [35] Li Q, Fan F, Gao X, et al. Balanced activation of IspG and IspH to eliminate MEP intermediate accumulation and improve isoprenoids production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2017, 44: 13-21.
- [36] Xie Q, Li S, Zhao D, et al. Manipulating the position of DNA expression cassettes using location tags fused to dCas9 (Cas9-Lag) to improve metabolic pathway efficiency. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 229.
- [37] Li D, Li Y, Xu JY, et al. Engineering CrtW and CrtZ for improving biosynthesis of astaxanthin in *Escherichia coli*. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(9): 666-676.
- [38] Zhang M, Gong Z, Tang J, et al. Improving astaxanthin production in *Escherichia coli* by co-utilizing CrtZ enzymes with different substrate preference. *Microb Cell Fact*, 2022, 21(1): 71.
- [39] Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42-50.
- [40] Wu T, Ye L, Zhao D, et al. Membrane engineering-a novel strategy to enhance the production and accumulation of β -carotene in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2017, 43(Pt A): 85-91.
- [41] Wu T, Li S, Ye L, et al. Engineering an artificial membrane vesicle trafficking system (AMVTS) for the excretion of β -carotene in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(5): 1037-1046.
- [42] Tong Y, Luo YF, Gao W. Biosynthesis of paclitaxel using synthetic biology. *Phytochem Rev*, 2021, 21: 863-877.
- [43] Croteau R, Ketchum RE, Long RM, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 75-97.
- [44] Van Rijn JPM, Escorcia AM, Thiel W. QM/MM study of the taxadiene synthase mechanism. *J Comput Chem*, 2019, 40: 1902-1910.
- [45] Li J, Mutanda I, Wang K, Yang L, et al. Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *Nat Commun*, 2019, 10: 4850.
- [46] Walls LE, Malci K, Nowrouzi B, et al. Optimizing the biosynthesis of oxygenated and acetylated taxol precursors in *Saccharomyces cerevisiae* using advanced bioprocessing strategies. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118: 279-293.
- [47] Edgar S, Zhou K, Qiao K, et al. Mechanistic insights into taxadiene epoxidation by taxadiene-5 α -hydroxylase. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 460-469.
- [48] Biggs BW, Rouck JE, Kambalyal A, et al. Orthogonal assays clarify the oxidative biochemistry of taxol P450 CYP725A4. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 1445-1451.
- [49] Zhou K, Qiao K, Edgar S, et al. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 377-383.
- [50] Cheng J, Wang X, Liu X, et al. Chromosome-level genome of Himalayan yew provides insights into the origin and evolution of the paclitaxel biosynthetic pathway. *Mol Plant*, 2021, 14: 1199-1209.
- [51] Xiong X, Gou J, Liao Q, et al. The taxus genome provides insights into paclitaxel biosynthesis. *Nat Plants*, 2021, 7: 1026-1036.
- [52] Song C, Fu F, Yang L, et al. Taxus yunnanensis genome offers insights into gymnosperm phylogeny and taxol production. *Commun Biol*, 2021, 4: 1203.
- [53] Shen N, Wang T, Gan Q, et al. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*, 2022, 383: 132531.
- [54] Gomes D, Rodrigues LR, Rodrigues JL. Perspectives on the design of microbial cell factories to produce prenylflavonoids. *Int J Food Microbiol*, 2022, 367: 109588.

- [55] Marsafari M, Samizadeh H, Rabiei B, et al. Biotechnological production of flavonoids: an update on plant metabolic engineering, microbial host selection, and genetically encoded biosensors. *Biotechnol J*, 2020, 15: e1900432.
- [56] Shah FLA, Ramzi AB, Baharum SN, et al. Recent advancement of engineering microbial hosts for the biotechnological production of flavonoids. *Mol Biol Rep*, 2019, 46: 6647-6659.
- [57] Pandey RP, Parajuli P, Koffas MA, et al. Microbial production of natural and non-natural flavonoids: pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnol Adv*, 2016, 34: 634-662.
- [58] Lou H, Hu L, Lu H, et al. Metabolic engineering of microbial cell factories for biosynthesis of flavonoids: a review. *Molecules*, 2021, 26: 4522-4538.
- [59] Sun J, Sun W, Zhang G, et al. High efficient production of plant flavonoids by microbial cell factories: challenges and opportunities. *Metab Eng*, 2022, 70: 143-154.
- [60] Li H, Lyv Y, Zhou S, et al. Microbial cell factories for the production of flavonoids-barriers and opportunities. *Bioresour Technol*, 2022, 360: 127538.
- [61] Zha J, Wu X, Gong G, et al. Pathway enzyme engineering for flavonoid production in recombinant microbes. *Metab Eng Commun*, 2019, 9: e00104.
- [62] Liu X, Cheng J, Zhang G, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nat Commun*, 2018, 9: 448.
- [63] Wang Y, Liu X, Chen B, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for scutellarin production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7: 958-964.
- [64] Liu T, Liu Y, Li L, et al. *De novo* biosynthesis of polydatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2021, 69: 5917-5925.
- [65] Jiang C, Liu X, Chen X, et al. Raising the production of phloretin by alleviation of by-product of chalcone synthase in the engineered yeast. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 1734-1743.
- [66] Duan L, Ding W, Liu X, et al. Biosynthesis and engineering of kaempferol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 165.
- [67] Liu X, Cheng J, Zhu X, et al. *De novo* biosynthesis of multiple pinocembrin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 3042-3051.
- [68] Bi H, Bai Y, Cai T, et al. Engineered short branched-chain acyl-CoA synthesis in *E. coli* and acylation of chloramphenicol to branched-chain derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(24): 10339-10348.
- [69] Zhou W, Zhuang Y, Bai Y, et al. Biosynthesis of phlorisovalerophenone and 4-hydroxy-6-isobutyl-2-pyrone in *Escherichia coli* from glucose. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 149.
- [70] Liu LQ, Liu H, Zhang W, et al. Engineering the biosynthesis of caffeic acid in *Saccharomyces cerevisiae* with heterologous enzyme combinations. *Engineering*, 2019, 5(2): 287-295.
- [71] Liu Q, Yu T, Li X, et al. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals. *Nat Commun*. 2019;10(1): 4976.
- [72] Chen Z, Sun X, Li Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial synthesis of monolignols. *Metab Eng*, 2017, 39: 102-109.
- [73] Yao YF, Wang CS, Qiao J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway. *Metab Eng*, 2013, 19: 79-87.
- [74] Li S, Liang C, Liu G, et al. *De novo* biosynthesis of chlorogenic acid using an artificial microbial community. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(9): 2816-2825.
- [75] Babaei M, Borja Zamfir GM, Chen X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for rosmarinic acid production. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(8): 1978-1988.
- [76] Schultz BJ, Kim SY, Lau W, et al. Total biosynthesis for milligram-scale production of etoposide intermediates in a plant chassis. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(49): 19231-19235.
- [77] Bai Y, Yin H, Bi H, et al. *De novo* biosynthesis of gastrodin in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2016, 35: 138-147.
- [78] Yin H, Hu T, Zhuang Y, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of gastrodin from glucose. *Microb Cell Fact*, 2022, 21(1): 18.
- [79] Bai Y, Bi H, Zhuang Y, et al. Production of salidroside in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Sci Rep*,

- 2014, 4: 6640.
- [80] Jiang J, Yin H, Wang S, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of salidroside from glucose. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(17): 4431-4438.
- [81] Torrens-Spence MP, Pluskal T, Li FS, et al. Complete pathway elucidation and heterologous reconstitution of *Rhodiola salidroside* biosynthesis. *Mol Plant*, 2018, 11(1): 205-217.
- [82] Chung D, Kim SY, Ahn JH. Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2578.
- [83] Liu X, Li XB, Jiang JL, et al. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides. *Metab Eng*, 2018, 47: 243-253.
- [84] Guo W, Huang Q, Feng Y, et al. Rewiring central carbon metabolism for tyrosol and salidroside production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(8): 2410-2419.
- [85] Liu H, Tian Y, Zhou Y, et al. Multi-modular engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-titre production of tyrosol and salidroside. *Microb Biotechnol*, 2021, 14(6): 2605-2616.
- [86] Li X, Zhou Z, Li W, et al. Design of stable and self-regulated microbial consortia for chemical synthesis. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1554.
- [87] 蔡岩, 苗志伟. 玫瑰红景天药用历史及功能简介. *化学通报*, 2021, 84: 1108-1119.
Cai Y, Miao ZW. Introduction to the medicinal history and functions of *Rhodiola Rosea*. *Chemistry*, 2021, 84: 1108-1119 (in Chinese).
- [88] Patov SA, Punegov VV, Kuchin AV. Synthesis of the *Rhodiola rosea* glycoside rosavin. *Chem Nat Compd*, 2006, 42: 397-399.
- [89] Zhou W, Bi H, Zhuang Y, et al. Production of cinnamyl alcohol glucoside from glucose in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 2129-2135.
- [90] Bi H, Wang S, Zhou W, et al. Producing Gram-scale unnatural rosavin analogues from glucose by engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 1931-1940.
- [91] Bi H, Qu G, Wang S, et al. Biosynthesis of a rosavin natural product in *Escherichia coli* by glycosyltransferase rational design and artificial pathway construction. *Metab Eng*, 2022, 69: 15-25.
- [92] Swamy MK, Sinniah UR, Ghasemzadeh A. Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(18): 7775-7793.
- [93] Khojasteh A, Mirjalili MH, Alcalde MA, et al. Powerful plant antioxidants: a new biosustainable approach to the production of rosmarinic acid. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(12): 1273.
- [94] Jiang J, Bi H, Zhuang Y, et al. Engineered synthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli* resulting production of a new intermediate, caffeoyl-phenyllactate. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(1): 81-88.
- [95] Zhuang Y, Jiang J, Bi H, et al. Synthesis of rosmarinic acid analogues in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(4): 619-627.
- [96] Levsh O, Pluskal T, Carballo V, et al. Independent evolution of rosmarinic acid biosynthesis in two sister families under the lamiids clade of flowering plants. *J Biol Chem*, 2019, 294(42): 15193-15205.
- [97] Yang Y, Wu Y, Zhuang Y, et al. Discovery of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of ligupurpurosides. *Org Lett*, 2021, 23(20): 7851-7854.
- [98] Hong B, Grzech D, Caputi L, et al. Biosynthesis of strychnine. *Nature*, 2022, 608(7924): E37.
- [99] Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 2015, 349(6252): 1095-1100.
- [100] Qiu F, Yang C, Yuan L, et al. A phenylpyruvic acid reductase is required for biosynthesis of tropane alkaloids. *Org Lett*, 2018, 20(24): 7807-7810.
- [101] Qiu F, Zeng J, Wang J, et al. Functional genomics analysis reveals two novel genes required for littorine biosynthesis. *New Phytol*, 2020, 225(5): 1906-1914.
- [102] Fei Qiu, Yijun Yan, Junlan Zeng, et al. Biochemical and metabolic insights into hyoscyamine dehydrogenase. *ACS Catalysis*, 2021, 11(5): 2912-2924.
- [103] Peng K, Guo D, Lou Q, et al. Synthesis of ligustrazine from acetaldehyde by a combined biological-chemical approach. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 2902-2908.
- [104] Liu X, Zhu X, Wang H, et al. Discovery and modification of cytochrome P450 for plant natural products biosynthesis. *Synth Syst Biotechnol*, 2020, 5: 187-199.
- [105] Wang H, Wang Q, Liu Y, Liao X, Chu H, Chang H, Cao Y, Li Z, Zhang T, Cheng J, Jiang H. PCPD: plant

- cytochrome P450 database and web-based tools for structural construction and ligand docking. *Synth Syst Biotechnol*, 2021, 2: 102-109.
- [106] Ding W, Jiang H. Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 125-133.
- [107] 张震, 曾雪城, 秦磊, 等. 微生物细胞工厂的智能设计进展. *化工学报*, 2021, 72(12): 6093-6108.
Zhang Z, Zeng XC, Qin L, et al. Intelligent design of microbial cell factory. *CIESC J*, 2021, 72(12): 6093-6108 (in Chinese).
- [108] Ding S, Tian Y, Cai P, et al. novoPathFinder: a webserver of designing novel-pathway with integrating GEM-model. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(W1): W477-W487.
- [109] Hadadi N, MohammadiPeyhani H, Miskovic L, et al. Enzyme annotation for orphan and novel reactions using knowledge of substrate reactive sites. *PNAS*, 2019, 116(15): 7298-7307.
- [110] Mahood EH, Kruse LH, Moghe GD. Machine learning: a powerful tool for gene function prediction in plants. *Appl Plant Sci*. 2020, 8(7): e11376.
- [111] Zhu X, Liu X, Liu T, Wang Y, et al. Synthetic biology of plant natural products: from pathway elucidation to engineered biosynthesis in plant cells. *Plant Commun*, 2021, 2: 100229.
- [112] 魏笑莲, 钱智玲, 陈巧巧, 等. 遗传改造微生物制造食品和饲料的监管要求及欧盟授权案例分析. *合成生物学*, 2021, 2(1): 121-133.
Wei XL, Qian ZL, Chen QQ, et al. Regulatory requirements for food and feed produced with genetically modified microorganisms. *Syn Bio J*, 2021, 2(1): 121-133 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)