

# 酿酒酵母合成木栓酮及其衍生物的研究现状及展望

张凯月, 邹旭, 张晨烁, 王洋\*, 余源\*

华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

张凯月, 邹旭, 张晨烁, 王洋, 余源. 酿酒酵母合成木栓酮及其衍生物的研究现状及展望[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4220-4236.

ZHANG Kaiyue, ZOU Xu, ZHANG Chenshuo, WANG Yang, YU Yuan. Research status and prospect of the synthesis of friedelin and its derivatives by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4220-4236.

**摘要:** 木栓酮及其衍生物在植物中普遍存在且种类繁多, 具有丰富的生理药理学活性。木栓酮衍生物是以木栓酮为骨架经细胞色素氧化酶 P450 (cytochrome P450, CYP450)及 UDP 葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)修饰而来。植物中天然木栓酮及其衍生物的含量极低, 传统的萃取分离和化学合成效率低、能耗高且污染环境, 因此, 利用酿酒酵母作为宿主菌生产木栓酮及其衍生物是一种高效且环保的策略。本文从增加前体含量、提高酶活性和产物合成的亚细胞定位等方面介绍并展望了木栓酮在酿酒酵母中高效生产的策略, 并介绍了目前几种常见的木栓酮衍生物研究现状, 从根据碳骨架相似性挖掘 CYP450、蛋白质工程改造 CYP450 和合成代谢基因簇的挖掘等方面展望了木栓酮衍生物的合成途径解析的新思路。

**关键词:** 酿酒酵母; 木栓烷型五环三萜; 代谢途径; 合成生物学

## Research status and prospect of the synthesis of friedelin and its derivatives by *Saccharomyces cerevisiae*

ZHANG Kaiyue, ZOU Xu, ZHANG Chenshuo, WANG Yang\*, YU Yuan\*

School of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei, China

**Abstract:** Friedelin and its derivatives are ubiquitous in plants, with a wide variety of physiological and pharmacological activities. The derivatives of friedelin are modified from friedelin by cytochrome P450 oxidase (CYP450) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT). Because of the extremely low content of natural friedelin and its derivatives in plants, the traditional extraction and chemical synthesis methods

资助项目: 国家自然科学基金(32171430); 河北省自然科学基金(B2021209008); 华北理工大学省属高校基本科研业务费项目(JQN2020003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32171430), the Natural Science Foundation of Hebei Province (B2021209008), and the Basic Scientific Research Business Cost Project of Provincial Universities for North China University of Science and Technology (JQN2020003).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Yang, wangy@ncst.edu.cn; YU Yuan, yuyuan@ncst.edu.cn

Received: 2022-11-25; Accepted: 2023-03-21; Published online: 2023-04-12

are inefficient, energy-consuming, and pollute the environment. Therefore, using *Saccharomyces cerevisiae* as the host bacteria to produce friedelin and its derivatives is an efficient and environmentally friendly approach. In this paper, we introduced and looked forward to the efficient production of friedelin in *S. cerevisiae* from the aspects of increasing precursor content, improving enzyme activity, and subcellular localization of product synthesis. In addition, this paper reviewed the current research status of several common friedelin derivatives, and put forward new ways for the synthesis of friedelin derivatives from the aspects of mining CYP450 based on carbon skeleton similarity, modifying CYP450 by protein engineering, and mining the gene clusters involved in the synthesis.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; pentacyclic triterpene of friedelanes; metabolic pathway; synthetic biology

木栓酮及其衍生物属于木栓烷型五环三萜化合物, 是广泛分布于自然界中的植物次级代谢产物<sup>[1]</sup>, 在卫矛科<sup>[2-3]</sup>、大戟科<sup>[4]</sup>、藤黄科<sup>[5]</sup>等植物中含量丰富。从植物中分离鉴定的木栓酮衍生物种类繁多, 较常见的有雷公藤红素(celastrol)、美登木酸(polypunonic acid)、海棠果醛(canophyllal)、去甲泽拉木醛(demethylzeylasteral)、粉蕊黄杨酮醇(pachysonol), 还包括一些研究较少的三萜化合物, 如雷公藤酮(triptonide)、雷公藤酚 A (wilforol A)、3-氧代木栓烷-28-醛(3-oxofriedelan-28-al)、3,12-二氧代木栓烷(3,12-dioxofriedelane)等<sup>[6]</sup>。大量研究表明, 木栓酮衍生物具有抗炎、抗肿瘤、抗肥胖、治疗艾滋病、免疫抑制、保护神经组织等生物功效<sup>[7-8]</sup>, 在食品、医疗、化妆品等行业应用广泛。

作为植物的次级代谢产物, 天然木栓酮及其衍生物的含量极低。传统获取方法主要分为萃取法和化学合成法。植物萃取法存在资源有限、生长周期长、含量低、破坏植被和污染环境等问题<sup>[9]</sup>, 化学合成法不但污染环境, 而且存在成本高、分离纯化困难、产品得率低等缺点<sup>[10]</sup>。合成生物学和分子生物学的快速发展为木栓酮及其衍生物的人工生产提供了更环保、更高效的生产方式。微生物具有繁殖迅速、代谢旺盛等特点, 已有多种微生物被选作宿主菌来生产萜类化合物。将代谢工程和蛋白质工程技术相结合, 通过多基因协同

表达与调控进行异源产物“从头合成”的优势更加明显。酿酒酵母属于安全的食品级微生物, 遗传背景清晰, 具有多种营养缺陷型筛选标记, 可形成稳定的底盘宿主<sup>[11]</sup>。此外, 酿酒酵母具有内源性甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径, 能够为萜类的合成提供更多的前体; 细胞中完整的内膜结构不仅有利于(3S)-2,3-氧化鲨烯环化酶(2,3-oxidosqualene cyclase, OSC)或者细胞色素氧化酶 P450 (cytochrome P450, CYP450)等膜蛋白的锚定, 而且保证了植物来源萜类合酶或 CYP450 的正确折叠加工<sup>[12]</sup>。通过对酵母细胞进行抗逆改造, 提高其对酸、碱、高温的耐受性, 也为实现木栓酮及其衍生物的工业化生产奠定了基础<sup>[13]</sup>。

合成途径解析是实现酿酒酵母异源合成木栓酮及其衍生物的关键。目前研究人员已经在酿酒酵母中构建了木栓酮的从头合成途径, 但大多数木栓酮衍生物的代谢途径尚不明确。木栓酮衍生物是以木栓酮骨架为基础, 经 CYP450 及 UDP 葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)修饰而来。通过分析木栓酮衍生物与木栓酮的结构差异, 直接利用催化功能类似的 CYP450、UGT 或者通过蛋白质工程对其进行改造, 可尝试解析木栓酮衍生物的合成途径。此外, 利用生物信息学方法预测植物次级代谢产物合成基因簇, 将基因簇克隆并异源表达, 最终实现次级代谢产物合成途径的解析(图 1)。

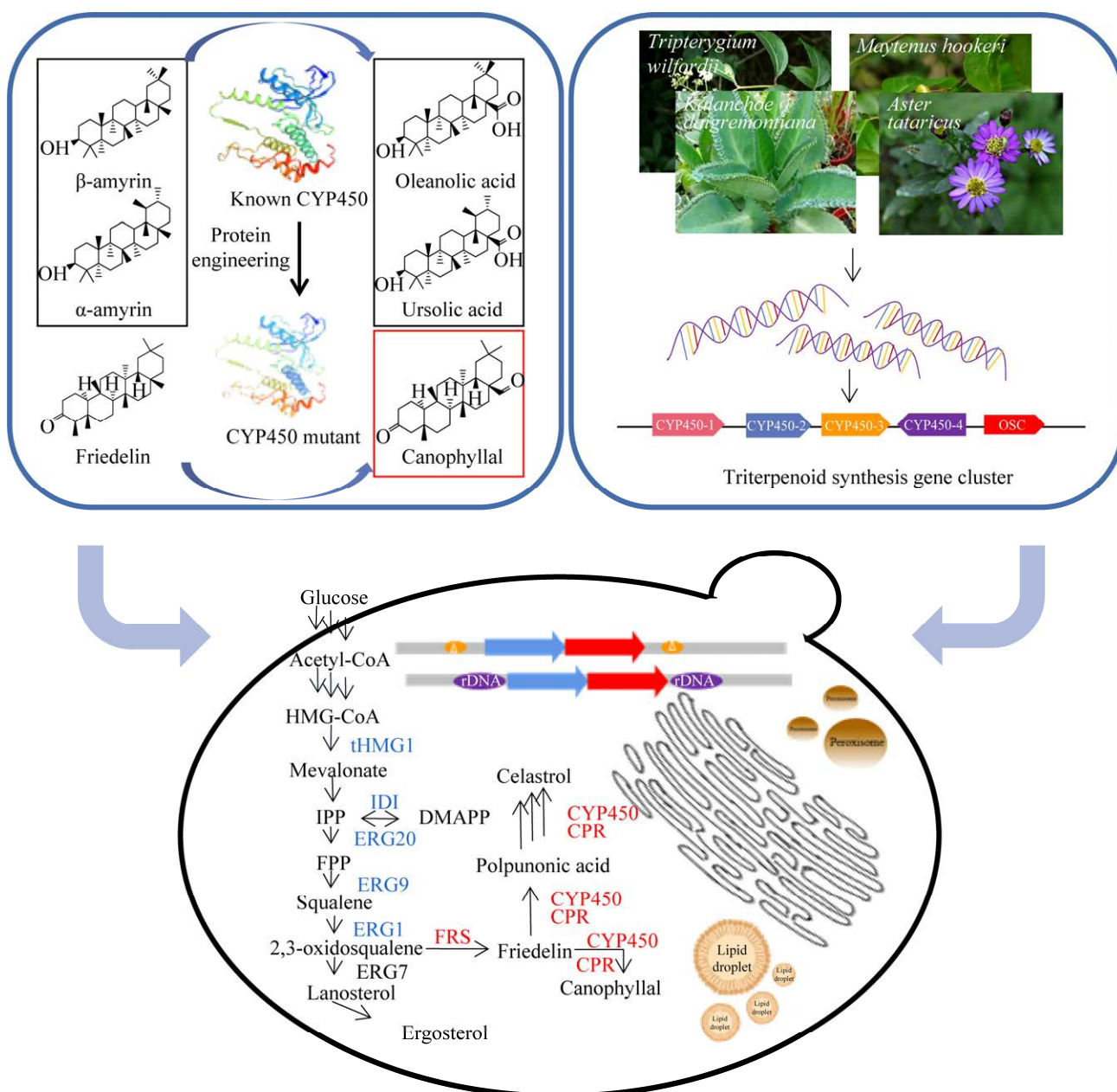


图 1 酿酒酵母中木栓酮及其衍生物的合成 tHMG1: 截短的羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶; IDI: 异戊烯基焦磷酸异构酶; ERG20: 法呢基焦磷酸合酶; ERG9: 角鲨烯合成酶; ERG1: 鲨烯单加氧酶; ERG7: 羊毛甾醇合酶; FRS: 木栓酮合酶; CPR: 细胞色素 P450 还原酶

Figure 1 Synthesis of friedelin and its derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. tHMG1: Truncated hydroxy methylglutaryl coenzyme A reductase; IDI: Isopentenyl pyrophosphate Isomerase; ERG20: Farnesyl pyrophosphate synthase; ERG9: Squalene synthase; ERG1: Squalene monooxygenase; ERG7: Lanosterol synthase; FRS: Friedelin synthase; CPR: Cytochrome P450 reductase.

## 1 木栓酮高效合成的策略

来源于雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)的 OSC (*TwOSC1*、*TwOSC3*)<sup>[14]</sup>、刺叶美登木(*Maytenus ilicifolia*)的 OSC (*MiFRS*)<sup>[15]</sup>、山杨(*Populus davidiana*)的 OSC (*PdFRS*)<sup>[16]</sup>和大叶落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)的 OSC (*KdFRS*)<sup>[1]</sup>能够催化(3S)-2,3-氧化鲨烯合成木栓酮。Zhou 等<sup>[14]</sup>和 Gao 等<sup>[17]</sup>将 *TwOSC1* 引入酿酒酵母细胞中构建了木栓酮的从头合成体系,并对酵母基因组上与木栓酮合成的相关基因进行修饰,木栓酮的最终产量为 63.91 mg/L, 仍然在毫克级别。由于木栓酮是其衍生物合成的基础,因此需要进一步提高木栓酮的产量,为木栓酮衍生物的合成积累更多的前体。目前,参考在酿酒酵母中其他萜类化合物实现高效表达的策略,有望进一步提高木栓酮的产量。

### 1.1 过表达 MVA 途径关键基因

在酿酒酵母异源合成萜类化合物的过程中,过表达 MVA 途径中的关键基因,如 *tHMG1*、*ERG1*、*ERG9*、*ERG13*、*ERG20*、*IDI* 等可以显著增加前体物质的含量,提高萜类化合物的产量<sup>[18-19]</sup>。Bröker 等<sup>[20]</sup>在酿酒酵母中引入羽扇豆醇合酶(*TklUP*),过表达 *tHMG1* 和 *ERG13* 后,鲨烯和羽扇豆醇的产量分别提高了 11 倍和 16.5 倍。Zhao 等<sup>[21]</sup>过表达 *tHMG1*、*ERG9*、*ERG1* 后,酿酒酵母中齐墩果酸的产量提高了 7.6 倍。Li 等<sup>[22]</sup>过表达 MVA 途径的关键基因,将鲨烯的产量提高到 978.24 mg/L,并结合代谢途径中对电子供体的需求,过表达 NADH 激酶 *POS5* 提供更多的 NADPH,使鲨烯的产量提高了 27.5 倍,进一步过表达来源于玉米的乙醇脱氢酶 *ADH2* 和乙醛脱氢酶 *ADA*,改善工程菌株对高浓度乙醇的适应性,通过乙醇补料分批发酵,最终获得了 9.47 g/L 的鲨烯产量。Gao 等<sup>[17]</sup>在酿酒酵母中过表达 *tHMG1*、*ERG20*、*ERG9*、*EGR1* 后, *MiFRS*、*PdFRS*、*TwOSC1*<sup>T502E</sup> 的木栓酮产量分别为 1.83、

3.75 和 6.5 mg/L,比野生型产量提高约 4.7、5.3 和 6.5 倍。因此,酿酒酵母合成木栓酮的过程中,过表达 MVA 途径关键基因能够为木栓酮的合成积累更多的前体,进而有效提高木栓酮的产量。

### 1.2 抑制副产物合成途径

酿酒酵母中(3S)-2,3-氧化鲨烯在 *ERG7* 的催化下能够合成羊毛甾醇<sup>[23]</sup>,引入木栓酮合成途径后,两条途径会竞争性消耗(3S)-2,3-氧化鲨烯<sup>[24-25]</sup>。将竞争途径中的相关基因敲除或抑制,能够增加(3S)-2,3-氧化鲨烯向木栓酮合成代谢途径的通量<sup>[26]</sup>。酿酒酵母中的羊毛甾醇能够转变为麦角固醇作为其细胞膜的重要组成部分,是酿酒酵母生长过程中的必需物质,因此只能抑制羊毛甾醇<sup>[27]</sup>。Zhang 等<sup>[28]</sup>使用弱启动子 *HXT1* 替换 *ERG20* 天然启动子抑制法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)的合成,增强了牻牛儿焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)作为关键前体的供应。受甲硫氨酸及铜离子抑制的 *MET3* 启动子和 *CTR3* 启动子也常被用于酿酒酵母中降低基因表达的手段,Bröker 等<sup>[20]</sup>使用 *CTR3* 启动子替换 *ERG7* 启动子后,(3S)-2,3-氧化鲨烯含量明显增加,且羊毛甾醇和麦角固醇含量降低到野生型的五分之一。微小 RNA 干扰技术也能够实现对基因表达的抑制作用,Wang 等<sup>[29]</sup>针对 *ERG7* 基因设计反义片段,可明显抑制酿酒酵母中合成羊毛甾醇基因的表达量。此外,Yang 等<sup>[30]</sup>将吡啶-3-乙酸胺水解酶(*iaaH*)与 *ERG9* 蛋白融合表达,利用生长素诱导的蛋白降解系统控制 *ERG9* 的表达量,将  $\alpha$ -法尼烯的产量提高了 80%。利用群体感应调节蛋白降解需要寻找合适的诱导剂,具有一定的局限性,Peng 等<sup>[31]</sup>开发了一种不使用诱导剂和阻遏物降解 *ERG9* 蛋白的方法,使橙花叔醇的产量提高了 86%。因此,可通过弱启动子替换、RNA 干扰及蛋白降解等方法下调酿酒酵母中影响木栓酮合成的基因表达量。

酿酒酵母中存在抑制萜类或甾醇化合物合成的因子,敲除相关基因能够一步提高木栓酮的产量<sup>[32]</sup>。Gao 等<sup>[17]</sup>将酿酒酵母基因组上的 *rox1*、*bts1*、*YPL062W* 和 *YJL064W* 敲除后,木栓酮产量达到 $(19.75 \pm 2.78)$  mg/L,是野生型的 20 倍。常用的基因敲除方法包括同源重组<sup>[33]</sup>和 CRISPR/Cas9 技术<sup>[34]</sup>。同源重组是利用 PCR 仪扩增出与目标基因具有同源序列的片段,转化至酿酒酵母中将目标基因截断或替换,利用营养缺陷型培养基筛选出成功敲除目标基因的菌株。*ROX1* 基因编码 MVA 途径中负调控因子,Bröker 等<sup>[20]</sup>利用同源重组基因敲除将酿酒酵母中的 *ROX1* 替换成 *tHMG1* 和 *ERG13*,在敲除基因的基础上过表达 MVA 途径关键基因。由于同源重组基因敲除需要使用筛选标记,因此具有一定的局限性,CRISPR/Cas9 技术不受筛选标记的限制,成本更低且敲除效率更高,缺点是易脱靶<sup>[35]</sup>,对 gRNA 的设计要求较高。Zhang 等<sup>[36]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术敲除酿酒酵母中的 *ura3*、*trp1*、*leu2* 和 *his3* 基因,构建了多倍体酿酒酵母菌株的营养缺陷型突变体,为酿酒酵母基因组整合提供了底盘菌株。

### 1.3 蛋白质工程提高关键酶活性

(3S)-2,3-氧化鲨烯环化酶[(3S)-2,3-oxidosqualene cyclase, OSCs]是合成木栓酮等五环三萜化合物的关键基因,但数据库中木栓酮合酶的数量较少且催化活性低。通过 SWISS-MODEL 构建木栓酮合酶的三维结构并进行底物对接,利用定向进化、理性或半理性设计对保守区域及附近关键氨基酸残基进行突变,能够有效提高其催化活性<sup>[37]</sup>。Zhou 等<sup>[14]</sup>对木栓酮合酶 *TwOSC1* 进行定点突变得到突变体 *TwOSC1*<sup>T502E</sup>,将木栓酮产量从 7.35 mg/L 提高到 10.63 mg/L。Mazzeu 等<sup>[38]</sup>将木栓酮合酶 *MiFRS* 进行定点突变得到突变体 *MiFRS*<sup>M549S</sup>,木栓酮产量从 0.2 mg/L 提高到 0.4 mg/L,但产生  $\alpha$ -香树脂醇和  $\beta$ -香树脂醇的合

成,丧失了特异性。Souza-Moreira 等<sup>[39]</sup>将 *MiFRS* 的 *Leu*<sup>482</sup> 突变成 *Val* 后,不仅降低了木栓酮的产量,还产生了  $\beta$ -香树脂醇;当突变成 *Thr* 后, *MiFRS*<sup>Leu482Thr</sup> 完全变成了  $\beta$ -香树脂醇合酶;然而突变成 *Ile* 后并未影响木栓酮的合成,证明了 *MiFRS* 序列中位于 DCTAE 保守区域附近催化天冬氨酸的 *Leu*<sup>482</sup> 对木栓酮的合成具有重要作用。Wang 等<sup>[1]</sup>根据 *KdFRS* 与其他 OSC 蛋白序列的差异,推测 *Ala*<sup>79</sup>、*Ser*<sup>127</sup>、*Gln*<sup>172</sup>、*His*<sup>278</sup>、*Lys*<sup>350</sup>、*Phe*<sup>423</sup>、*Ile*<sup>323</sup> 和 *Thr*<sup>733</sup> 可能对 (3S)-2,3-氧化鲨烯环化形成木栓酮具有重要作用,并且根据人类羊毛甾醇的三维结构模型推测出 *His*<sup>103</sup>、*Leu*<sup>249</sup>、*Gln*<sup>297</sup>、*Phe*<sup>497</sup>、*Thr*<sup>367</sup> 和 *Thr*<sup>370</sup> 位于活性中心或其附近,对 *KdFRS* 的蛋白质工程改造具有重要的参考价值。

### 1.4 亚细胞器中木栓酮的合成

木栓酮合酶属于膜蛋白,在酿酒酵母中的亚细胞定位比较模糊。由于合成区域和储存的限制,木栓酮合酶亚细胞定位对木栓酮的产量影响较大。酿酒酵母中有膜的亚细胞器包括过氧化物酶体、内质网和线粒体,将生物合成途径靶向到亚细胞器中能够消除代谢串扰并提高区域化途径效率<sup>[40]</sup>。Liu 等<sup>[41]</sup>利用过氧化物酶体作为亚细胞器合成角鲨烯,其产量提高了 138 倍。内质网是合成和折叠蛋白质的动态细胞器,扩展内质网空间能够提高异源基因的表达效率, Kim 等<sup>[42]</sup>过表达脂质合成转录因子复合物(lipid synthesis transcription factor complex, INO2)明显扩大酿酒酵母中内质网的膜表面积,角鲨烯的产量增加约 71 倍;Arendt 等<sup>[43]</sup>敲除磷脂酸磷酸酶 *PAH1* 导致内质网面积扩张,促进了酿酒酵母中三萜的合成和积累, $\beta$ -香树脂醇及其衍生物产量分别提高了 8 倍和 16 倍;Hansen 等<sup>[32]</sup>敲除与内质网相关蛋白降解机制有关的泛素结合酶 *UBC7*<sup>[44]</sup>,使木栓酮的产量提高了 4 倍。线粒体中有足够的乙酰辅酶 A 和氧化还原当量供应,因此被认为是萜烯

生物合成的优越场所, Zhu 等<sup>[45]</sup>提出了一种细胞质与线粒体工程的组合策略, 经过两步发酵将酿酒酵母中角鲨烯的产量提高到 21.1 g/L。此外, 亚细胞器还能产物提供储存场所, Yu 等<sup>[46]</sup>通过在酿酒酵母中过表达甘油三酯合成途径中的二酰甘油酰基转移酶 DGA1, 增加脂滴含量, 为  $\alpha$ -香树脂醇提供更多的储存场所, 进而提高其产量。因此, 修饰酿酒酵母中与亚细胞器相关的基因, 为木栓酮合酶提供更多的附着位点, 增加木栓酮在胞内的储存空间, 其产量可能会得到进一步提高。

## 2 木栓酮衍生物的研究现状

木栓酮衍生物是以木栓酮为骨架, 由 CYP450 及 UGT 修饰而来。较为常见的有雷公藤红素、美登木酸和海棠果醛等(图 2)。

### 2.1 雷公藤红素

雷公藤红素是从雷公藤中分离出的一种活性成分, 具有多种生理药理学活性, 比如抗肿瘤、免疫抑制与抗炎、抗神经退行性疾病、抗逆转录病毒和降血压等<sup>[47]</sup>, 在临床医学领域表现出巨大的应用

潜力。目前已经解析雷公藤红素合成前体物质美登木酸的代谢途径, 但对雷公藤红素的代谢途径尚不明确。Zhou 等<sup>[14,48]</sup>从雷公藤中挖掘到 CYP712K1, 证明木栓酮在 TwCYP712K1 的催化下经过醇、醛、酸三步氧化后合成美登木酸, 并推测在多种 CYP450 的作用下, 美登木酸的 C2 位、C3 位经过多步氧化合成雷公藤红素, 其中美登木酸、雷公藤酸 A、雷公藤酸 C 都是雷公藤红素合成途径的中间物质。

### 2.2 美登木酸

美登木酸是来源于美登木根皮中的一种活性成分, 具有抗炎、镇痛等生理药理学活性<sup>[49]</sup>。与木栓酮结构相比, 美登木酸的 C29 位发生羧基化反应。Hansen 等<sup>[32]</sup>发现 CYP712 家族中的 CYP712K1、CYP712K2 和 CYP712K3 可以氧化木栓酮合成美登木酸, 根据美登木酸的产量确定了 CYP712K1 的活性最高, 并从酵母培养基中提取到滴度为 1.4 mg/L 的美登木酸; Bicalho 等<sup>[15]</sup>发现 CYP712K4 也具有催化木栓酮 C29 位发生醇、醛、酸三步氧化生成美登木酸的功能。美登木酸合成途径的解析为其在酿酒酵母中的从头合成奠定了理论基础。

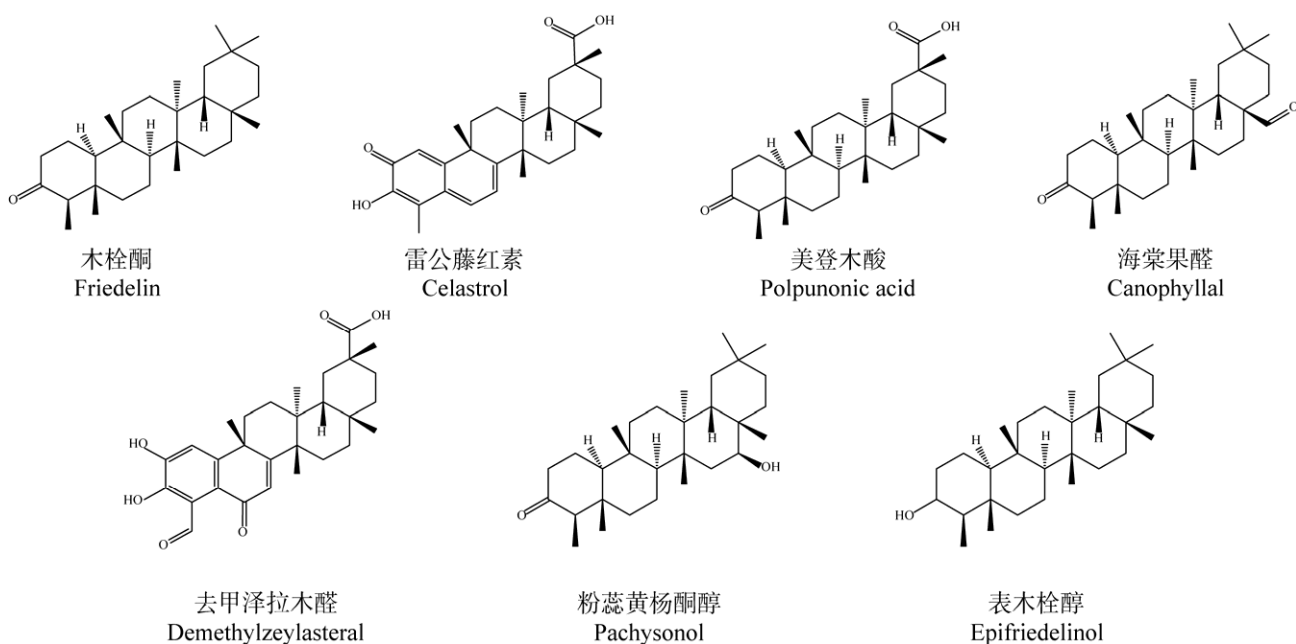


图 2 常见的木栓烷型三萜化合物

Figure 2 Common triterpenoids of friedelane type.

## 2.3 海棠果醛

海棠果醛是从雷公藤<sup>[50]</sup>和台湾蒲桃(*Syzygium formosanum*)<sup>[51]</sup>等植物中分离出的一种木栓酮衍生物,但目前对其生理药理学活性及合成途径的研究相对较少。与木栓酮结构相比,海棠果醛是木栓酮碳骨架的 C28 位醛基化衍生物,与  $\alpha$ -香树脂醇、 $\beta$ -香树脂醇和羽扇豆醇在具有 C28 位氧化功能的 CYP450 氧化酶(CYP716A15、CYP716A12)催化下<sup>[52]</sup>, C28 位发生羧基化反应后分别合成的熊果酸<sup>[53]</sup>、齐墩果酸<sup>[21]</sup>和桦木酸<sup>[54]</sup>结构相似。

## 2.4 表木栓醇

表木栓醇是木栓酮碳骨架的 C3 位发生氧化还原反应,羰基发生羟基化的衍生物,广泛存在于紫菀(*Aster tataricus*)、大理卫矛(*Euonymus amygdalifolius*)等多种药用植物中,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗疟疾、保护神经等生物活性<sup>[55-56]</sup>。目前,表木栓醇生理药理学活性的研究较多,其生物合成途径尚不明确。

## 2.5 去甲泽拉木醛

20 世纪 90 年代,去甲泽拉木醛首次从雷公藤根皮中分离鉴定<sup>[57]</sup>。去甲泽拉木醛具有抗癌、抗炎、免疫抑制、抗病毒和抗菌等多种生物活性<sup>[58]</sup>,其获取方式主要是从植物中提取,生物合成途径尚不明确。与木栓酮结构相比,去甲泽拉木醛碳骨架的 C2 位、C3 位、C6 位、C24 位和 C29 位上发生了多次氧化还原反应,雷公藤酚 A 与去甲泽拉木醛仅在 C24 位有差异,推测雷公藤酚 A 可能是去甲泽拉木醛合成途径的中间代谢产物<sup>[6]</sup>。去甲泽拉木醛毒性较小且在雷公藤根皮中含量丰富,其作用靶点也与雷公藤红素不同,解析去甲泽拉木醛合成途径对药物利用的研究和开发具有重要作用。

## 2.6 粉蕊黄杨酮醇

粉蕊黄杨酮醇是广藿香(*Pogostemon cablin*)<sup>[59]</sup>、岩蒿(*Artemisia rupestris*)<sup>[60]</sup>、丁香(*Syzygium aromaticum*)<sup>[61]</sup>等多种药用植物的活

性成分,具有消炎、抗菌、抗氧化、镇痛、降血压、抗癌和免疫抑制等生物学活性<sup>[62]</sup>。与木栓酮结构相比,粉蕊黄杨酮醇是木栓酮 C16 位羟基化衍生物,目前在  $\alpha$ -香树脂醇和  $\beta$ -香树脂醇的研究中已经报道了多种具有 C16 羟化反应的 CYP450 氧化酶,如 CYP716A11<sup>[63]</sup>、CYP716A2<sup>[64]</sup>、CYP716Y1<sup>[65]</sup>和 CYP87D16<sup>[66]</sup>。

# 3 木栓酮衍生物代谢途径解析

由于大多数木栓酮衍生物的合成途径尚不明确,无法实现其在酿酒酵母中的从头合成,限制了木栓酮衍生物的工业化生产及广泛应用。通过分析木栓酮衍生物和其他五环三萜类化合物碳骨架的相似性,对生产木栓酮衍生物的植物基因组进行合成代谢基因簇挖掘,尝试对木栓酮衍生物合成途径的解析。

## 3.1 根据碳骨架相似性挖掘 CYP450

$\alpha$ -香树脂醇、 $\beta$ -香树脂醇和木栓酮都是由 (3S)-2'3-氧化鲨烯环化而成。与木栓酮衍生物相比,对  $\alpha$ -香树脂醇和  $\beta$ -香树脂醇衍生物的合成途径研究更为深入(图 3)。细胞色素氧化酶 CYP85 的亚家族成员 CYP716A 能够氧化五环三萜碳骨架的 C28 位,Dale 等<sup>[67]</sup>分析了 16 种可以将  $\beta$ -香树脂醇的 C28 位氧化形成齐墩果酸的 CYP716A 家族蛋白,包括 CYP716A12、CYP716A147、CYP716A48、CYP716A15、CYP716AL1 和 CYP716A52v2 等。Li 等<sup>[68]</sup>对来源于秤星树(*Ilex asprella*)的 CYP716A210 进行了功能分析,结果表明 CYP716A210 具有催化  $\alpha$ -香树脂醇 C28 位氧化形成熊果酸的功能。Moses 等<sup>[69]</sup>表明 CYP716Y1 可催化  $\alpha$ -香树脂醇的 C16 $\alpha$  发生羟基化反应,与木栓酮衍生物为粉蕊黄杨酮醇相似。木栓酮衍生物雷公藤酸 C 与美登木酸的结构差异是 C2 位羟基化,CYP716C11 能够催化齐墩果酸和熊果酸的 C2 发生羟基化反应<sup>[64]</sup>,美登木酸的 C2 位发生羟基化反应后可生成雷公藤酸 C。

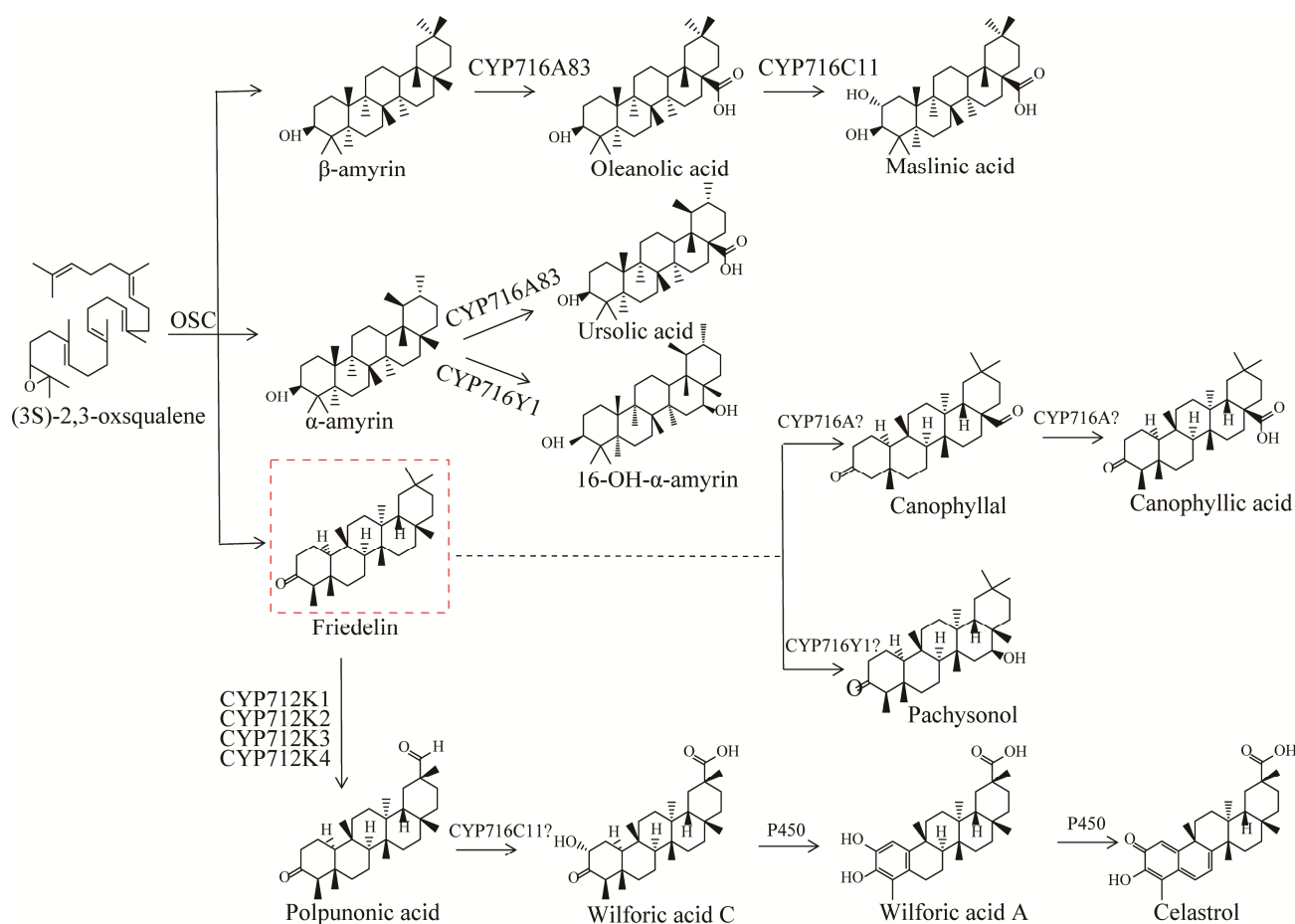


图3 木栓酮衍生物的合成途径

Figure 3 Metabolic pathway of friedelin derivatives.

### 3.2 CYP450 的蛋白质工程改造

CYP450 是一大类末端单加氧酶, 主要参与次级代谢产物的后修饰过程, 与萜类的多样性密切相关(表 1), 由 CYP450 催化的次级代谢产物结构也为进一步的糖基化反应提供了必要基团。由于 CYP450 催化特异性较强, 根据五环三萜碳骨架相似性挖掘 CYP450 并不能完全解析木栓酮衍生物的合成途径, 利用蛋白质工程改造获得具有新功能的 CYP450 能够为解析多种木栓酮衍生物的合成代谢途径提供有价值的参考资料。Abelak 等<sup>[78]</sup>构建了 CYP2J2 野生型和突变型的底物分子对接模型, 成功预测出 CYP2J2 的关键氨基酸残基并利用蛋白质工程对其进行改造, 使

其底物特异性发生明显改变。O'Hanlon 等<sup>[79]</sup>利用突变型 CYP450<sub>BM3</sub> (CYP102A1) 实现了苯胺的直接单羟基化, 表明利用蛋白质工程改造能够赋予 CYP102A1 新功能以实现环链或侧链位点的选择性羟基化。Gober 等<sup>[80]</sup>将 CYP450 保守区域的 Phe (F393) 突变为 His 或 Ala 后, CYP450 的血红素还原潜力的互补增加且促进环丙烷化产物的转化, 表明这些突变在 4 种不同的 CYP450 (P450<sub>BM3h</sub>、CYP142、P450<sub>Biol</sub> 和 CYP119) 骨架中赋予了非天然催化作用。CYP154C5 可催化类固醇 16 $\alpha$  发生羟基化, Bracco 等<sup>[81]</sup>利用蛋白质工程构建的突变体 CYP154C5 F92A 不仅具有 16 $\alpha$ -羟基化功能, 还具有 21-羟基化功能(图 4)。

表 1 CYP450 在五环三萜化生物合成中的作用

Table 1 The role of CYP450 in pentacyclic triterpenoid biosynthesis

CYP450 家族/亚家族	催化反应	催化底物	催化产物	参考文献
CYP450 family/subfamily	Catalytic reaction	Catalytic substrate	Catalytic product	Reference
CYP716A52v2	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇	齐墩果酸	[70]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin	Oleanolic acid	
CYP716A86	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇	齐墩果酸	[63]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin	Oleanolic acid	
CYP716A17	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇	齐墩果酸	[52]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin	Oleanolic acid	
CYP716A78	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇	齐墩果酸	[71]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin	Oleanolic acid	
CYP716A79	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇	齐墩果酸	[71]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin	Oleanolic acid	
CYP716A110	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇	齐墩果酸	[63]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin	Oleanolic acid	
CYP716A83	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇/ $\alpha$ -香树脂醇	齐墩果酸/熊果酸	[63]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin/ $\alpha$ -amyrin	Oleanolic acid/Ursolic acid	
CYP716A80	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇/ $\alpha$ -香树脂醇	齐墩果酸/熊果酸	[64]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin/ $\alpha$ -amyrin	Oleanolic acid/Ursolic acid	
CYP716A81	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇/ $\alpha$ -香树脂醇	齐墩果酸/熊果酸	[64]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin/ $\alpha$ -amyrin	Oleanolic acid/Ursolic acid	
CYP716A252	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇/ $\alpha$ -香树脂醇	齐墩果酸/熊果酸	[52]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin/ $\alpha$ -amyrin	Oleanolic acid/Ursolic acid	
CYP716A253	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇/ $\alpha$ -香树脂醇	齐墩果酸/熊果酸	[72]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin/ $\alpha$ -amyrin	Oleanolic acid/Ursolic acid	
CYP716A15	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇/ $\alpha$ -香树脂醇/羽扇豆醇	齐墩果酸/熊果酸/桦木酸	[52]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin/ $\alpha$ -amyrin/Lupeol	Oleanolic acid/Ursolic acid/ Betulinic acid	
CYP716A180	C28 氧化	羽扇豆醇	桦木酸	[73]
	C28 oxidation	Lupeol	Betulinic acid	
CYP716A12	C28 氧化	$\beta$ -香树脂醇/ $\alpha$ -香树脂醇/羽扇豆醇	齐墩果酸/熊果酸/桦木酸	[52]
	C28 oxidation	$\beta$ -amyrin/ $\alpha$ -amyrin/Lupeol	Oleanolic acid/Ursolic acid/ Betulinic acid	
CYP716A179	C28 氧化/C22 $\alpha$ 羟化	$\beta$ -香树脂醇/ $\alpha$ -香树脂醇/羽扇豆醇	齐墩果酸/熊果酸/桦木酸	[74]
	C28oxidation/C22 $\alpha$ hydroxylation	$\beta$ -amyrin/ $\alpha$ -amyrin/Lupeol	Oleanolic acid/Ursolic acid/ Betulinic acid	
CYP716A14v2	C3 氧化	$\alpha$ -香树脂醇/ $\beta$ -香树脂醇	$\alpha$ -香树脂酮/ $\beta$ -香树脂酮	[75]
	C3 oxidation	$\alpha$ -amyrin/ $\beta$ -amyrin	$\alpha$ -amyrenone/ $\beta$ -amyrenone	
CYP716C11	C2 $\alpha$ 氧化	齐墩果酸	山楂酸	[63]
	C2 $\alpha$ oxidation	Oleanolic acid	Maslinic acid	
CYP716E26	C6 羟化	$\beta$ -香树脂醇	曼陀罗二醇	[63]
	C6 hydroxylation	$\beta$ -amyrin	Daturadiol	
CYP716A2	C16/C22 $\alpha$ /C18 羟化	$\alpha$ -香树脂醇/羽扇豆醇	22-羟基- $\alpha$ -香树脂醇/桦木醇	[64]
	C16/C22 $\alpha$ /C18 hydroxylation	$\alpha$ -amyrin/Lupeol	22-OH- $\alpha$ -amyrin /Betulin	

(待续)

(续表 1)

CYP450 家族/亚家族	催化反应	催化底物	催化产物	参考文献
CYP450 family/subfamily	Catalytic reaction	Catalytic substrate	Catalytic product	Reference
CYP716Y1	C16 $\alpha$ 羟化	$\alpha$ -香树脂醇/ $\beta$ -香树脂醇	16-羟基- $\alpha$ -香树脂醇/16-羟基- $\beta$ -香树脂醇	[65]
	C16 $\alpha$ hydroxylation	$\alpha$ -amyrin/ $\beta$ -amyrin	16-OH- $\alpha$ -amyrin/16-OH- $\beta$ -amyrin	
CYP87D16	C16 $\alpha$ 羟化	$\beta$ -香树脂醇	16-羟基- $\beta$ -香树脂醇	[66]
	C16 $\alpha$ hydroxylation	$\beta$ -amyrin	16-OH- $\beta$ -amyrin	
CYP716A141	C16 $\alpha$ 羟化	$\beta$ -香树脂醇/齐墩果酸	马尼拉二醇/椰油酸	[63]
	C16 $\alpha$ hydroxylation	$\beta$ -amyrin/Oleanolic acid	Maniladiol/Coconut acid	
CYP72A63	C30 氧化	$\beta$ -香树脂醇	甘草次酸	[76]
	C30 oxidation	$\beta$ -amyrin	Glycyrrhetic acid	
CYP72A154	C30 氧化	$\beta$ -香树脂醇/11-氧- $\beta$ -香树脂醇	30-羟基- $\beta$ -香树脂醇	[76]
	C30 oxidation	$\beta$ -amyrin/11-O- $\beta$ -amyrin	30-OH- $\beta$ -amyrin	
CYP88D6	C11 氧化	$\beta$ -香树脂醇	11-氧- $\beta$ -香树脂醇	[77]
	C11 oxidation	$\beta$ -amyrin	11-O- $\beta$ -amyrin	
CYP712K1/K2/K3	C29 氧化	木栓酮	美登木酸	[32]
	C29 oxidation	Friedelin	Polpunonic acid	
CYP712K4	C29 氧化	木栓酮	美登木酸	[15]
	C29 oxidation	Friedelin	Polpunonic acid	

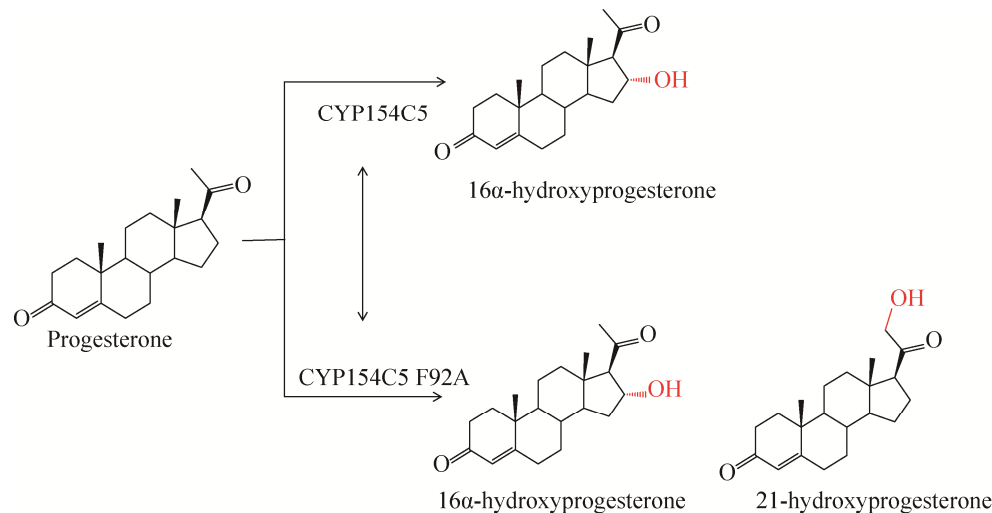


图 4 蛋白质工程改造 CYP154C5 后获得新功能  
Figure 4 The new function of CYP154C5 was obtained by protein engineering.

3.3 合成代谢基因簇的挖掘

富含木栓酮及其衍生物的植物基因组存在木栓酮合酶和 CYP450 氧化酶基因,挖掘相关基因簇是解析木栓酮衍生物代谢途径的有效方式。随着基因组测序技术和生物学信息技术的快速

发展,已从多种植物及微生物中挖掘次级代谢基因簇并鉴定产物。付加芳等<sup>[82]</sup>对褐黄孢链霉菌 (*Streptomyces gilvosporeus*)的全基因组序列进行基因预测、功能注释、进化分析和共线性分析后,成功挖掘到次级代谢产物合成的基因簇,并预测

了纳他霉素的合成途径。Hashimoto 等<sup>[83]</sup>从高贵链霉菌(*Streptomyces nobilis*)中挖掘到沙漠霉素的生物合成候选基因簇,将其引入异源宿主菌中进行表达,沙漠霉素的平均产量超过 130 mg/L。Shuai 等<sup>[84]</sup>从放线菌 *Kutzneria albida* 中鉴定了次级代谢产物 huimycin 的生物合成基因簇,并挖掘到 7 个合成途径中的基因,成功实现了 huimycin 的异源表达。Massimo 等<sup>[85]</sup>分析比较了 5 种曲霉菌的赭曲霉毒素 A 生物合成基因簇并鉴定出参与其生物合成的环化酶基因 *otaY*,为赭曲霉毒素 A 的生物合成奠定了理论基础。

## 4 结论及展望

木栓酮及其衍生物具有丰富的生物学活性,但在自然界中含量极低,传统植物萃取和化学合成存在资源匮乏、成本高、效率低、破坏生态等问题,利用酿酒酵母作为宿主菌构建木栓酮及其衍生物的头合成途径是最为高效且环保的策略。目前,木栓酮的合成途径已经解析并在酿酒酵母中实现了异源表达,但其产量远未达到工业化生产的要求,需要进一步提高木栓酮在酿酒酵母中的产量。以往的研究主要集中在 MVA 通路基因的过表达,以增加酿酒酵母中木栓酮的合成。然而,仅仅采用代谢工程并不能将木栓酮的产量提高至工业化的水平。木栓酮合酶催化活性较差是导致木栓酮产率较低的主要瓶颈。因此,通过蛋白质工程重构木栓酮合酶是进一步提高其产量的有效策略,但目前得到的突变体 *TwOSC1*<sup>T502E</sup> 和 *MiFRS*<sup>M549S</sup> 对木栓酮产量的提升并不显著,而 *TwOSC3*、*KdFRS* 和 *PdFRS* 在蛋白质工程改造方面尚未展开深入研究。此外,在酿酒酵母中过表达二酰甘油酰基转移酶 *DGA1* 能够增加脂滴含量,为木栓酮在细胞内的储存提供更多场所。利用酿酒酵母基因组多拷贝位点整合 MVA 通路关键酶基因和木栓酮合酶基因,既

能为木栓酮合成提供更多的前体物质,又可以稳定异源基因的表达。利用 CRISPR/Cas9 技术将酿酒酵母中抑制生物膜合成的相关基因(*pah1*、*ubc7*)敲除,可以为木栓酮合酶等膜结合蛋白提供更多的附着位点,进一步提高木栓酮的产量。

另外,木栓酮衍生物合成代谢途径的解析也是目前亟待解决的问题。根据木栓酮衍生物化合物的骨架相似性,发现海棠果醛与香树脂醇衍生物齐墩果酸和熊果酸的结构十分相似,推测引入 CYP716A 家族基因能够催化木栓酮碳骨架的 C28 位进行连续氧化反应生成海棠果酸,而海棠果醛作为其中间代谢产物,其合成途径的解析需要继续挖掘更多功能特异的 C28 位 CYP450 氧化酶,将木栓酮 C28 位的催化反应终止在醛基化水平。粉蕊黄杨酮醇是木栓酮 C16 位羟基化衍生物,目前在  $\alpha$ -香树脂醇和  $\beta$ -香树脂醇的研究中已经报道了多种具有 C16 羟化反应的 CYP450 氧化酶,如 CYP716A11<sup>[63]</sup>、CYP716A2<sup>[64]</sup>、CYP716Y1<sup>[65]</sup>和 CYP87D16<sup>[66]</sup>。通过底物结构相似性挖掘催化功能相似的 C16 位 CYP450 氧化酶,将为粉蕊黄杨酮醇合成代谢途径的解析提供重要的参考资料。然而 CYP450 家族中香豆酸-3-羟化酶(C3H)在绿原酸合成途径中负责苯环 C3 位的羟基化反应<sup>[86]</sup>,挖掘与 C3H 同家族的 CYP450 可能为表木栓醇合成途径的解析提供新的思路。挖掘来源于高产木栓酮衍生物植物的五环三萜类化合物 C28 位(CYP85 的亚家族)、C30 位(CYP72 的亚家族) CYP450 氧化酶、C16 位羟化酶(CYP716Y 的亚家族)和 CYP85 的亚家族 C2 位羟化酶等,能够为解析多种木栓酮衍生物的合成代谢途径提供有价值的参考资料。通过对已知功能的 CYP450 活性中心关键氨基酸残基进行预测,利用蛋白质工程对其进行理性和半理性改造,能够获得具有新功能的 CYP450 氧化酶,为解析木栓酮衍生物合成途径

提供新思路(图 5)。植物中存在的基因簇多与萜类化合物及其衍生物的合成相关<sup>[87]</sup>, 可尝试对富含木栓酮及其衍生物的植物基因组进行分析, 预测与其合成代谢相关的基因簇, 利用分子生物学与合成生物学手段对候选基因簇进行克隆与异源表达, 并对最终产物进行分离鉴定, 从中挖掘出与合成途径相关的关键基因, 都将为木栓酮衍生物代谢途径的解析提供新思路。

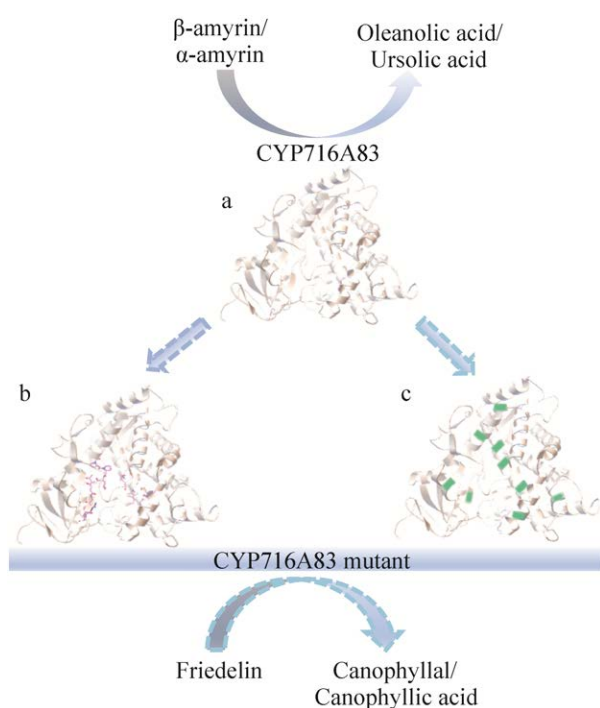


图 5 蛋白质工程改造 CYP716A83  
a: CYP716A83 野生型; b: 蛋白质工程优化疏水口袋; c: 关键氨基酸位点突变

Figure 5 Protein engineering modified CYP716A83. a: CYP716A83 wild-type; b: Protein engineering optimized hydrophobic pockets; c: Key amino acid sites with mutations.

## REFERENCES

[1] WANG ZH, YEATS T, HAN H, JETTER R. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*: enzymes catalyzing up to 10 rearrangement steps yielding friedelin and other

triterpenoids[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(39): 29703-29712.

[2] 宁若男, 贾冬玲, 王晓婧, 徐佳琦. 独子藤中 1 个新的木栓烷型三萜[J]. 中草药, 2022, 53(2): 342-346.

NING RN, JIA DL, WANG XJ, XU JQ. A new friedelane triterpene from *Celastrus monospermus*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(2): 342-346 (in Chinese).

[3] 陈耀祖, 刘家良, 黄慧民, 海景. 巧茶中木栓烷型三萜的分离和结构鉴定[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(2): 123-134.

CHEN YZ, LIU JL, HUANG HM, HAI J. Isolation and structural identification of the triterpenes of *Catha exulis*[J]. Journal of South China Agricultural University, 1998, 19(2): 123-134 (in Chinese).

[4] 李平, 隆李萍, 陶娥, 王森, 齐世洲, 刘婷, 高慧媛. 雀儿舌头化学成分分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(10): 1197-1203.

LI PING, LONG LP, TAO E, WANG M, QI SZ, LIU T, GAO HY. Isolation and identification of chemical constituents from *Leptopus chinensis* (Bunge) Pojark[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2022, 39(10): 1197-1203 (in Chinese).

[5] 王辉, 熊志勇, 陈泽宇, 曾和平. 滇南红厚壳叶中木栓内酯的分离、结构鉴定及诱导干细胞增殖作用[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2010, 32(6): 690-694.

WANG H, XIONG ZY, CHEN ZY, ZENG HP. Separation, structural characterization and inducing proliferation activity of Friedelin-3,4-lactone from *Calophyllum polyanthum*[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2010, 32(6): 690-694 (in Chinese).

[6] 陈铭祥, 杨雪梅, 廖泽纯, 郑鸿宇, 黄丽乔, 郑明彬. 独子藤茎脂溶性化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(2): 336-344.

CHEN MX, YANG XM, LIAO ZC, ZHENG HY, HUANG LQ, ZHENG MB. Chemical constituents from lipophilic parts of stems of *Celastrus monospermus*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(2): 336-344 (in Chinese).

[7] LIMA NM, de MARQUI SR, ANDRADE TJAS, SILVA DHS. Phytochemical, metabolic profiling and antiparasitic potential from *Inga semialata* leaves (Fabaceae)[J]. Natural Product Research, 2022, 36(7): 1898-1903.

[8] VISTUBA JP, PIOVEZAN M, PIZZOLATTI MG, REBELO AM, AZEVEDO MS, VITALI L, COSTA ACO, AMADEU MICKE G. Increasing the instrumental

- throughput of gas chromatography method using multiple injections in a single experimental run: application in determination of friedelan-3-ol and friedelin in *Maytenus ilicifolia*[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1274: 159-164.
- [9] 胡智慧, 湛柄旭, 于爱群, 肖冬光. 代谢工程改造酿酒酵母合成植物萜类 D-柠檬烯的策略[J]. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1542-1550.
- HU ZH, CHEN BX, YU AQ, XIAO DG. Strategies of metabolic engineering *Saccharomyces cerevisiae* to produce plant-derived D-limonene[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(9): 1542-1550 (in Chinese).
- [10] WU SQ, SCHALK M, CLARK A, MILES RB, COATES R, CHAPPELL J. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(11): 1441-1447.
- [11] 李媛, 张爱丽, 周伟, 钱子刚. 酿酒酵母基因工程菌的构建及工艺优化研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2016, 25(18): 5-7.
- LI Y, ZHANG AL, ZHOU W, QIAN ZG. Current progress on the construction and optimization of genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy*, 2016, 25(18): 5-7 (in Chinese).
- [12] MOSES T, POLLIER J, THEVELEIN JM, GOOSSENS A. Bioengineering of plant (tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro*[J]. *New Phytologist*, 2013, 200(1): 27-43.
- [13] YAO Z, ZHOU PP, SU BM, SU SS, YE LD, YU HW. Enhanced isoprene production by reconstruction of metabolic balance between strengthened precursor supply and improved isoprene synthase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(9): 2308-2316.
- [14] ZHOU JW, HU TY, GAO LH, SU P, ZHANG YF, ZHAO YJ, CHEN S, TU LC, SONG YD, WANG X, HUANG LQ, GAO W. Friedelane-type triterpene cyclase in celastrol biosynthesis from *Tripterygium wilfordii* and its application for triterpenes biosynthesis in yeast[J]. *New Phytologist*, 2019, 223(2): 722-735.
- [15] BICALHO KU, SANTONI MM, ARENDT P, ZANELLI CF, FURLAN M, GOOSSENS A, POLLIER J. CYP712K4 catalyzes the C-29 oxidation of friedelin in the *Maytenus ilicifolia* quinone methide triterpenoid biosynthesis pathway[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(11): 2510-2522.
- [16] HAN JY, AHN CH, ADHIKARI PB, KONDETI S, CHOI YE. Functional characterization of an oxidosqualene cyclase (*PdFRS*) encoding a monofunctional friedelin synthase in *Populus davidiana*[J]. *Planta*, 2019, 249(1): 95-111.
- [17] GAO HY, ZHAO H, HU TY, JIANG ZQ, XIA M, ZHANG YF, LU Y, LIU Y, YIN Y, CHEN XC, LUO YF, ZHOU JW, WANG JD, GAO J, GAO W, HUANG LQ. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level friedelin *via* genetic manipulation[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 805429.
- [18] LIU JJ, CHEN C, WAN XK, YAO G, BAO SH, WANG FL, WANG K, SONG TY, HAN PG, JIANG H. Identification of the sesquiterpene synthase *AcTPS1* and high production of (-)-germacrene D in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 89.
- [19] YU Y, CHANG PC, YU H, REN HY, HONG DN, LI ZY, WANG Y, SONG H, HUO YX, LI C. Productive amyrin synthases for efficient  $\alpha$ -amyrin synthesis in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(10): 2391-2402.
- [20] BRÖKER JN, MÜLLER B, van DEENEN N, PRÜFER D, GRONOVER CS. Upregulating the mevalonate pathway and repressing sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* enhances the production of triterpenes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(16): 6923-6934.
- [21] ZHAO YJ, FAN JJ, WANG C, FANG XD, LI C. Enhancing oleanolic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 257: 339-343.
- [22] LI T, LIU GS, ZHOU W, JIANG M, REN YH, TAO XY, LIU M, ZHAO M, WANG FQ, GAO B, WEI DZ. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to overproduce squalene[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(7): 2132-2138.
- [23] 李月, 庞亚如, 成旭, 李春, 吕波. 酿酒酵母中胆固醇生物合成与优化的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(11): 4869-4885.
- LI Y, PANG YR, CHENG X, LI C, LÜ B. Biosynthesis and optimization of cholesterol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(11): 4869-4885 (in Chinese).
- [24] 刘远, 屠李婵, 卢望, 夏梦, 高伟. 雷公藤中 2,3-氧化鲨烯环化酶基因家族分析及功能表征[J]. *药学报*, 2019, 60(11): 2510-2522.

- 2021, 56(12): 3370-3376.
- LIU Y, TU LC, LU Y, XIA M, GAO W. Identification and functional characterization of 2,3-oxidosqualene cyclase genes family in *Tripterygium wilfordii*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(12): 3370-3376 (in Chinese).
- [25] 陈翠玉, 庞亚如, 陈泉冰, 李春, 吕波. 环氧角鲨烯环化酶在三萜化合物生物合成中的进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 443-459.
- CHEN CY, PANG YR, CHEN QB, LI C, LÜ B. Oxidosqualene cyclases in triterpenoids biosynthesis: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 443-459 (in Chinese).
- [26] 李佳秀, 蔡倩茹, 吴杰群. 萜类化合物在酿酒酵母中的合成生物学研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(12): 199-207.
- LI JX, CAI QR, WU JQ. Research progresses on the synthetic biology of terpenes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(12): 199-207 (in Chinese).
- [27] TESKE B, TARAMINO S, BHUIYAN MA, KUMARASWAMI NS, RANDALL SK, BARBUCH R, ECKSTEIN J, BALLIANO G, BARD M. Genetic analyses involving interactions between the ergosterol biosynthetic enzymes, lanosterol synthase (Erg7p) and 3-ketoreductase (Erg27p), in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1781(8): 359-366.
- [28] ZHANG YY, WANG J, CAO XS, LIU W, YU H, YE LD. High-level production of linalool by engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring dual mevalonate pathways in mitochondria and cytoplasm[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 134: 109462.
- [29] WANG QH, GAO LL, LIANG HC, DU GH, GONG T, YANG JL, ZHU P. Downregulation of lanosterol synthase gene expression by antisense RNA technology in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2015, 50(1): 118-122.
- [30] YANG XY, LIU JH, ZHANG J, SHEN Y, QI QS, BAO XM, HOU J. Quorum sensing-mediated protein degradation for dynamic metabolic pathway control in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2021, 64: 85-94.
- [31] PENG BY, PLAN MR, CHRYSANTHOPOULOS P, HODSON MP, NIELSEN LK, VICKERS CE. A squalene synthase protein degradation method for improved sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 209-219.
- [32] HANSEN NL, MIETTINEN K, ZHAO Y, IGNEA C, ANDREADELLI A, RAADAM MH, MAKRIAS AM, MØLLER BL, STÆRK D, BAK S, KAMPRANIS SC. Integrating pathway elucidation with yeast engineering to produce polypunonic acid the precursor of the anti-obesity agent celastrol[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 15.
- [33] 郭婷, 代易颖, 陈孔翔, 高莉, 张克亚, 曹志远, 王冠儒, 兰利琼, 卿人伟. 同源重组敲除三角褐指藻基因的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2017, 54(1): 173-177.
- GUO T, DAI YY, CHEN KX, GAO L, ZHANG KY, CAO ZY, WANG GR, LAN LQ, QING RW. The research of gene knockout via homologous recombination in *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2017, 54(1): 173-177 (in Chinese).
- [34] 于鲲, 薛佳琪, 王进宽, 余永涛. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在丝状真菌中的应用[J]. 生物技术进展, 2022, 12(5): 696-704.
- YU K, XUE JQ, WANG JK, YU YT. Research progress on application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in filamentous fungi[J]. Current Biotechnology, 2022, 12(5): 696-704 (in Chinese).
- [35] WANG XL, WU YJ, YEE JK. Detection of CRISPR/Cas9-generated off-target effect by integration-defective lentiviral vector[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N J), 2020, 2162: 243-260.
- [36] ZHANG GC, KONG II, KIM H, LIU JJ, CATE JHD, JIN YS. Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7694-7701.
- [37] MING DM, CHEN R, HUANG H. Amino-acid network clique analysis of protein mutation non-additive effects: a case study of lysozyme[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(5): 1427.
- [38] MAZZEU BF, SOUZA-MOREIRA TM, OLIVEIRA AA, REMLINGER M, FELIPPE LG, VALENTINI SR, GUIDO RVC, ZANELLI CF, FURLAN M. The methionine 549 and leucine 552 residues of friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia* are important for substrate binding specificity[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, 26(22): 6806.
- [39] SOUZA-MOREIRA TM, ALVES TB, PINHEIRO KA, FELIPPE LG, de LIMA GMA, WATANABE TF, BARBOSA CC, SANTOS VAFFM, LOPES NP,

- VALENTINI SR, GUIDO RVC, FURLAN M, ZANELLI CF. Friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia*: leucine 482 plays an essential role in the production of the most rearranged pentacyclic triterpene[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 36858.
- [40] HAMMER SK, AVALOS JL. Harnessing yeast organelles for metabolic engineering[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(8): 823-832.
- [41] LIU GS, LI T, ZHOU W, JIANG M, TAO XY, LIU M, ZHAO M, REN YH, GAO B, WANG FQ, WEI DZ. The yeast peroxisome: a dynamic storage depot and subcellular factory for squalene overproduction[J]. Metabolic Engineering, 2020, 57: 151-161.
- [42] KIM JE, JANG IS, SON SH, KO YJ, CHO BK, KIM SC, LEE JY. Tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum for functional assembly of terpene synthesis pathway[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 50-59.
- [43] ARENDT P, MIETTINEN K, POLLIER J, de RYCKE R, CALLEWAERT N, GOOSSENS A. An endoplasmic reticulum-engineered yeast platform for overproduction of triterpenoids[J]. Metabolic Engineering, 2017, 40: 165-175.
- [44] IGNEA C, TRIKKA FA, KOURTZELIS I, ARGIRIOU A, KANELIS AK, KAMPRANIS SC, MAKRIAS AM. Positive genetic interactors of HMG2 identify a new set of genetic perturbations for improving sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 162.
- [45] ZHU ZT, DU MM, GAO B, TAO XY, ZHAO M, REN YH, WANG FQ, WEI DZ. Metabolic compartmentalization in yeast mitochondria: burden and solution for squalene overproduction[J]. Metabolic Engineering, 2021, 68: 232-245.
- [46] YU Y, RASOOL A, LIU HR, LÜ B, CHANG PC, SONG H, WANG Y, LI C. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for high yield production of  $\alpha$ -amyrin via synergistic remodeling of  $\alpha$ -amyrin synthase and expanding the storage pool[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 72-83.
- [47] LI ZX, ZHANG JY, DUAN XL, ZHAO GA, ZHANG M. Celastrol: a promising agent fighting against cardiovascular diseases[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2022, 11(8): 1597.
- [48] ZHOU JW, HU TY, LIU Y, TU LC, SONG YD, LU Y, ZHANG YF, TONG YR, ZHAO YJ, SU P, WU XY, HUANG LQ, GAO W. Cytochrome P450 catalyses the 29-carboxyl group formation of celastrol[J]. Phytochemistry, 2021, 190: 112868.
- [49] HENNEH IT, ARMAH FA, AMEYAW EO, BINEY RP, OBESE E, BOAKYE-GYASI E, ADAKUDUGU EA, EKOR M. Analgesic effect of *Ziziphus abyssinica* involves inhibition of inflammatory mediators and modulation of KATP channels, opioidergic and nitric pathways[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 714722.
- [50] LI P, SHEN SX, LIU LX, XU JH, MA XH, SHI DM, ZHANG ZQ. A new demethyl abietane diterpenoid from the roots of *Tripterygium wilfordii*[J]. Natural Product Research, 2020, 34(21): 3094-3100.
- [51] CHANG CW, WU TS, HSIEH YS, KUO SC, CHAO PD. Terpenoids of *Syzygium formosanum*[J]. Journal of Natural Products, 1999, 62(2): 327-328.
- [52] HUANG LL, LI J, YE HC, LI CF, WANG H, LIU BY, ZHANG YS. Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*[J]. Planta, 2012, 236(5): 1571-1581.
- [53] FUKUSHIMA EO, SEKI H, OHYAMA K, ONO E, UMEMOTO N, MIZUTANI M, SAITO K, MURANAKA T. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis[J]. Plant & Cell Physiology, 2011, 52(12): 2050-2061.
- [54] WU JN, NIU YW, BAKUR A, LI H, CHEN QH. Cell-free production of pentacyclic triterpenoid compound betulinic acid from betulin by the engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2017, 22(7): 1075.
- [55] NG TB, LIU F, LU Y, CHENG CH, Wang Z. Antioxidant activity of compounds from the medicinal herb *Aster tataricus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2003, 136(2): 109-115.
- [56] 张慧颖, 付兴情, 蔡义玲, 李宜焱, 张建英, 左爱学. 大理卫矛乙醇提取物的化学成分研究[J]. 中国药房, 2018, 29(2): 176-179.
- ZHANG HY, FU XQ, CAI YL, LI DY, ZHANG JY, ZUO AX. Study on chemical constituents of ethanol extract from *Euonymus amygdalifolius*[J]. China Pharmacy, 2018, 29(2): 176-179 (in Chinese).
- [57] 杨春欣. 去甲泽拉木醛的研究及展望[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(3): 268-269.
- YANG CX. Research and prospects of demethylzelamide[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2018, 38(3): 268-269 (in Chinese).

- [58] SUN XJ, SHEN BY, YU H, WU WH, SHENG RL, FANG YW, GUO RH. Therapeutic potential of demethylzeylasteral, a triterpenoid of the genus *Tripterygium wilfordii*[J]. *Fitoterapia*, 2022, 163: 105333.
- [59] YANG Y, KINOSHITA K, KOYAMA K, TAKAHASHI K, TAI T, NUNOURA Y, WATANABE K. Anti-emetic principles of *Pogostemon cablin* (blanco) Benth[J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 1999, 6(2): 89-93.
- [60] LAN JE, LI XJ, ZHU XF, SUN ZL, HE JM, ZLOH M, GIBBONS S, MU Q. Flavonoids from *Artemisia rupestris* and their synergistic antibacterial effects on drug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Natural Product Research*, 2021, 35(11): 1881-1886.
- [61] RYU B, KIM HM, LEE JS, LEE CK, SEZIRAHIGA J, WOO JH, CHOI JH, JANG DS. New flavonol glucuronides from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(15): 3048-3053.
- [62] CHEN JR, XIE XF, LI MT, XIONG QY, LI GM, ZHANG HQ, CHEN GR, XU X, YIN YP, PENG F, PENG C. Pharmacological activities and mechanisms of action of *Pogostemon cablin* Benth: a review[J]. *Chinese Medicine*, 2021, 16(1): 5.
- [63] MIETTINEN K, POLLIER J, BUYST D, ARENDT P, CSUK R, SOMMERWERK S, MOSES T, MERTENS J, SONAWANE PD, PAUWELS L, AHARONI A, MARTINS J, NELSON DR, GOOSSENS A. The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14153.
- [64] YASUMOTO S, FUKUSHIMA EO, SEKI H, MURANAKA T. Novel triterpene oxidizing activity of *Arabidopsis thaliana* CYP716A subfamily enzymes[J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(4): 533-540.
- [65] WANG J, LI JX, LI JL, LIU SJ, WU XL, LI J, GAO WY. 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.
- [66] MOSES T, POLLIER J, FAIZAL A, APERS S, PIETERS L, THEVELEIN JM, GEELEN D, GOOSSENS A. Unraveling the triterpenoid saponin biosynthesis of the African shrub *Maesa lanceolata*[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 122-135.
- [67] DALE MP, MOSES T, JOHNSTON EJ, ROSSER SJ. A systematic comparison of triterpenoid biosynthetic enzymes for the production of oleanolic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0231980.
- [68] LI L, LIN SM, CHEN YY, WANG YQ, XIAO LH, YE XF, SUN L, ZHAN RT, XU H. Cytochrome P450 monooxygenase/cytochrome P450 reductase Bi-enzymatic system isolated from *Ilex asprella* for regio-specific oxidation of pentacyclic triterpenoids[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 831401.
- [69] MOSES T, POLLIER J, ALMAGRO L, BUYST D, van MONTAGU M, PEDREÑO MA, MARTINS JC, THEVELEIN JM, GOOSSENS A. Combinatorial biosynthesis of sapogenins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 $\alpha$  hydroxylase from *Bupleurum falcatum*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(4): 1634-1639.
- [70] HAN JY, KIM MJ, BAN YW, HWANG HS, CHOI YE. The involvement of  $\beta$ -amyrin 28-oxidase (CYP716A52v2) in oleanane-type ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2013, 54(12): 2034-2046.
- [71] FIALLOS-JURADO J, POLLIER J, MOSES T, ARENDT P, BARRIGA-MEDINA N, MORILLO E, ARAHANA V, de LOURDES TORRES M, GOOSSENS A, LEON-REYES A. Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in *Chenopodium quinoa* leaves[J]. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology*, 2016, 250: 188-197.
- [72] MISRA RC, SHARMA S, SANDEEP, GARG A, CHANOTIYA CS, GHOSH S. Two CYP716A subfamily cytochrome P450 monooxygenases of sweet basil play similar but nonredundant roles in ursane- and oleanane-type pentacyclic triterpene biosynthesis[J]. *New Phytologist*, 2017, 214(2): 706-720.
- [73] YASUMOTO S, SEKI H, SHIMIZU Y, FUKUSHIMA EO, MURANAKA T. Functional characterization of CYP716 family P450 enzymes in triterpenoid biosynthesis in tomato[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 21.
- [74] TAMURA K, SEKI H, SUZUKI H, KOJOMA M, SAITO K, MURANAKA T. CYP716A179 functions as a triterpene C-28 oxidase in tissue-cultured stolons of *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(3): 437-445.
- [75] MOSES T, POLLIER J, SHEN Q, SOETAERT S, REED J, ERFFELINCK ML, van NIEUWERBURGH FCW,

- VANDEN BR, OSBOURN A, THEVELEIN JM, DEFORCE D, TANG KX, GOOSSENS A. OSC2 and CYP716A14v2 catalyze the biosynthesis of triterpenoids for the cuticle of aerial organs of *Artemisia annua*[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(1): 286-301.
- [76] 杨杰, 詹亚光, 肖佳雷, 尹静. 细胞色素 P450 在植物三萜和甾醇骨架修饰中的功能研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2018, 48(10): 1065-1083.
- YANG J, ZHAN YG, XIAO JL, YIN J. Advances in the function of cytochrome P450 in structural modifications of triterpenoid and sterol skeletons in plants[J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2018, 48(10): 1065-1083 (in Chinese).
- [77] SEKI H, OHYAMA K, SAWAI S, MIZUTANI M, OHNISHI T, SUDO H, AKASHI T, AOKI T, SAITO K, MURANAKA T. Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(37): 14204-14209.
- [78] ABELAK KK, BISHOP-BAILEY D, NOBELI I. Molecular dynamics simulations of the interaction of wild type and mutant human CYP2J2 with polyunsaturated fatty acids[J]. *BMC Research Notes*, 2019, 12(1): 760.
- [79] O'HANLON JA, REN XK, MORRIS M, WONG LL, ROBERTSON J. Hydroxylation of anilides by engineered cytochrome P450<sub>BM3</sub>[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017, 15(41): 8780-8787.
- [80] GOBER JG, RYDEEN AE, SCHWOCHERT TD, GIBSON-O'GRADY EJ, BRUSTAD EM. Enhancing cytochrome P450-mediated non-natural cyclopropanation by mutation of a conserved second-shell residue[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(6): 1416-1426.
- [81] BRACCO P, WIJMA HJ, NICOLAI B, ALEXANDER RODRIGUEZ BUITRAGO J, KLÜNEMANN T, VILA A, SCHREPPE P, BLANKENFELDT W, JANSSEN DB, SCHALLMEY A. CYP154C5 regioselectivity in steroid hydroxylation explored by substrate modifications and protein engineering[J]. *ChemBioChem*, 2021, 22(6): 1099-1110.
- [82] 付加芳, 张晶, 张严洁, 杨纯, 曹广祥, 宗工理. 纳他霉素高产菌株 *Streptomyces gilvosporeus* F607 基因组及其生物合成基因簇分析[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2312-2325.
- FU JF, ZHANG J, ZHANG YJ, YANG C, CAO GX, ZONG GL. Analysis of genome sequence and natamycin biosynthetic gene cluster on high producing strain *Streptomyces gilvosporeus* F607[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2312-2325 (in Chinese).
- [83] HASHIMOTO T, KOZONE I, HASHIMOTO J, SUENAGA H, FUJIE M, SATOH N, IKEDA H, SHIN-YA K. Identification, cloning and heterologous expression of biosynthetic gene cluster for desertomycin[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2020, 73(9): 650-654.
- [84] SHUAI H, MYRONOVSKIY M, NADMID S, LUZHETSKYY A. Identification of a biosynthetic gene cluster responsible for the production of a new pyrrolopyrimidine natural product-huimycin[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(7): 1074.
- [85] MASSIMO F, ANTONIA G, CARLA C, LUCIA G, MICHELE S, BAKER SCOTT E, GIANCARLO P. Evidence of the involvement of a cyclase gene in the biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*[J]. *Toxins*, 2021, 13(12): 892.
- [86] ZHAO L, WANG DJ, LIU J, YU XF, WANG RY, WEI Y, WEN CW, OU YANG Z. Transcriptomic analysis of key genes involved in chlorogenic acid biosynthetic pathway and characterization of *MaHCT* from *Morus alba* L.[J]. *Protein Expression and Purification*, 2019, 156: 25-35.
- [87] 吕海舟, 刘琬菁, 何柳, 徐志超, 罗红梅. 植物次生代谢基因簇研究进展[J]. *植物科学学报*, 2017, 35(4): 609-610, 612.
- LÜ HZ, LIU WJ, HE L, XU ZC, LUO HM. Advances on the study of gene clusters involved in plant secondary metabolism[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(4): 609-610, 612 (in Chinese).