

引用格式:袁瑛姿,钟泓卉,杨雨潼,等. 酵母合成环黄芪醇的研究进展[J]. 北京化工大学学报(自然科学版),2023,50(3): 14-26.

YUAN YingZi, ZHONG HongHui, YANG YuTong, et al. Advances in the production of cycloastragenol using engineered yeast[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2023,50(3):14-26.

酵母合成环黄芪醇的研究进展

袁瑛姿^{1,2} 钟泓卉^{1,2} 杨雨潼^{1,2} 姚欢^{1,2} 张晓玲^{1,2} 王峰³ 魏勇军^{1,2*}

(1. 郑州大学 药学院, 郑州 450001; 2. 郑州大学 合成生物学实验室, 郑州 450001;

3. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 黄芪是一种重要的中药材,为豆科植物黄芪的干燥根,含有黄酮类、多糖类、皂苷类等多种成分。环黄芪醇主要由黄芪中的黄芪甲苷转化而成,具有抗氧化、抗衰老等多种生物活性。但是现有的环黄芪醇生产策略依赖于中药提取,难以大规模生产。合成生物学技术的快速发展为构建酵母细胞工厂用于高效生产多种植物天然产物提供了基础,也为环黄芪醇的大规模高效合成提供了解决方案。本文综述了现有环黄芪醇的制备方法,对环黄芪醇合成途径及关键酶、萜类合成代谢途径调控等进行了阐述和讨论。未来,通过表达环黄芪醇的关键合成酶基因,并设计和构建酿酒酵母细胞工厂以提高萜类合成代谢通量,有望实现环黄芪醇的酵母合成。

关键词: 环黄芪醇; 酿酒酵母; 微生物细胞工厂; 氧化角鲨烯环化酶; 细胞色素 P450

中图分类号: Q939.9 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2023.03.002

引言

中药黄芪(*Astragali radix*)是重要的临床大宗药材之一,为蒙古黄芪和膜荚黄芪的干燥根。研究表明,黄芪具有调节免疫、抗衰老、抗氧化、抗菌等多种药理活性^[1]。黄芪含有复杂多样的天然产物,其中黄酮类、多糖类和皂苷类为主要的药用活性成分。黄芪中黄酮类活性成分主要包括黄酮、异黄酮、异黄烷、紫檀烷等,具有抗氧化^[2]、抗肿瘤^[3]、改善心血管功能^[4]、预防骨质疏松^[5]等药理作用。黄芪多糖主要有杂多糖、葡聚糖两大类,具有抗肿瘤^[6]、抗炎^[7]、保护心脏^[8]等药理活性。黄芪皂苷类成分包括 Cycloartane 型四环三萜、Oleanane 型五环三萜及其他萜类^[9]。黄芪甲苷的活性形式——环黄芪醇具有抑制脑缺血时脑细胞凋亡和神经炎症、维持血脑屏障^[10]等药理作用。此外,环黄芪醇还是目前发现的唯一具有端粒酶

活性的小分子萜类化合物,除了能够治疗神经退行性疾病^[11],还具有抑制心肌纤维化^[12]、增强抗肿瘤免疫^[13]等作用,是抗衰老药物研发中的热门分子^[14]。因此,黄芪已广泛应用于医药、日化、保健食品、禽畜饲料等多个领域。

环黄芪醇主要通过转化黄芪中的黄芪甲苷获取,但是现有的制备方法存在诸多不足,导致其难以低成本大规模生产。合成生物学方法可以帮助构建具有高产率、高纯度产物的可控生产平台,合成复杂多样的植物天然产物,并进一步揭示植物次生代谢合成途径及其关键酶^[15]。目前,运用合成生物学方法已成功在酵母中异源合成了甘草次酸^[16]、人参皂苷^[17-19]、柴胡皂苷元^[20]、罗汉果苷^[21]等植物萜类天然产物,其中部分萜类天然产物的酵母合成已进行了产业化尝试,这为环黄芪醇在酵母等微生物中的合成提供了参考。本文综述了环黄芪醇的生物合成关键酶挖掘、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)底盘细胞改造,并对环黄芪醇的酵母高效合成进行了讨论。

1 环黄芪醇的现有制备方法

环黄芪醇在黄芪中含量极低,难以直接获取。可以通过黄芪种植和组织培养技术获取黄芪甲苷,

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(32111530179)

第一作者: 女,2003年生,本科生

* 通信联系人

E-mail: yongjunwei@zzu.edu.cn

然后采用酸解法、Smith 降解法、酶和微生物水解法等手段将黄芪甲苷转化为环黄芪醇。

酸解法可以水解黄芪甲苷生成环黄芪醇,常用硫酸、盐酸、乙酸在水或稀醇溶液中进行。楚治良等^[22]将黄芪甲苷粉末加入到含有盐酸、甲醇和三氯甲烷的反应体系中,反应6天后,环黄芪醇的收率可达45%以上。Smith 降解法是制备环黄芪醇的常用方法,使用高碘酸选择性氧化黄芪甲苷中的羟基,并进一步经硼氢化合物还原得到多糖醇,然后在酸性条件下多糖醇发生特异性水解,生成环黄芪醇。Feng 等^[23]采用 Smith 法降解黄芪甲苷制备环黄芪醇,对试剂用量优化后,环黄芪醇的转化产率可达80%以上。

酶和微生物水解法的原理是利用 β -葡萄糖苷酶和 β -木糖苷酶等多种糖基水解酶水解黄芪甲苷的多种糖苷键,从而得到环黄芪醇。Cheng 等^[24]筛选并克隆了 *Phycoccus* sp. Soil748 (Bgps) 中的 β -葡萄糖苷酶,对该酶的最适温度和 pH 等酶学特性进行了研究,发现在 45 °C、pH7.0、底物质量浓度为 80 mg/mL 的条件下,该酶水解黄芪甲苷的转化率可达 99.2%。Li 等^[25]从 *Dictyoglomus thermophilum* 中克隆纯化得到 β -葡萄糖苷酶 Dth3 和 β -木糖苷酶 Xln-DT,并通过体外实验验证了酶活特性,在最优条件(75 °C, pH5.5)下,Dth3 和 Xln-DT 共催化可以在 3 h 内将 1 g/L 黄芪甲苷转化为 0.63 g/L 环黄芪醇,摩尔转化效率可达 94.5%。Cheng 等^[26]在 *Pichia pastoris* 和 *Escherichia coli* 中进行密码子优化后表达了重组 β -木糖苷酶 Xyl-T,在特定的温度和 pH 下经过两步酶催化反应,该酶可以将 20 g 黄芪甲苷转化为 12.02 g 环黄芪醇,环黄芪醇收率达到 96.5%。此外,双歧杆菌和乳酸菌等人体肠道菌和部分其他环境微生物也具有将黄芪甲苷转化为环黄芪醇的能力^[27-28]。未来,应用宏基因组学、培养组学等微生物组学方法,有望获取更多高效的微生物和糖基水解酶用于环黄芪醇的制备^[29-33]。

黄芪种植占用土地,黄芪的生长易受气候、温度和湿度等多种因素影响,并且收获的黄芪中有效物质的含量不统一,难以进行规模化、标准化生产。黄芪幼苗的根中皂苷含量较高,是进行组织培养的理想部位。通过优化培养条件,可以使黄芪在组织培养过程中积累丰富的黄芪皂苷。Jiao 等^[34]对黄芪毛状根培养 36 d 后,黄芪毛状根中总生物量可达 15.79 g/L (干重),总黄芪皂苷累积含量达到

2.657 mg/g (干重),与田间种植3年的黄芪生根中总黄芪皂苷的含量(2.435 mg/g (干重))相近。

植物组织培养不占用土地,但需严格控制环境条件,并且培养过程中容易被污染,因此通过组织培养技术大规模获取黄芪生物质的成本较高。酸解法、Smith 降解法制备环黄芪醇的成本也较高,并且需要使用多种化学试剂,生产过程易造成环境污染;酶和微生物水解法制备的环黄芪醇产物的分离纯化困难,不利于应用推广。因此,亟待开发其他绿色可持续发展的环黄芪醇制备方法。

2 环黄芪醇生物合成的关键酶

黄芪植物中生物合成三萜皂苷的途径可分为以下3部分。

(1) 三萜皂苷的通用前体异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)的合成。植物具有两条合成萜类前体 IPP 的途径:一条是甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径,主要存在于植物细胞质中;另一条是 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径,主要存在于植物细胞质体区室内。经异戊烯基焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI)催化,IPP 与 DMAPP 可实现相互转化。

(2) IPP 在多种酶的催化下聚合得到 2,3-氧化角鲨烯,然后经氧化角鲨烯环化酶(2,3-oxidosqualene cyclase, OSC)催化得到不同的三萜骨架。

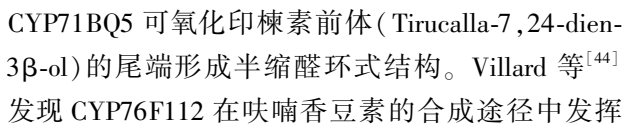
(3) 三萜骨架在细胞色素 P450 (cytochrome P450s, CYP450s)、UDP-糖基转移酶(UDP-glycosyl transferase, UGT)等修饰下合成多种三萜类化合物。

在以上合成三萜皂苷的途径中,OSC、CYP450s 等酶在合成多样化的三萜化合物方面发挥了重要作用,是植物三萜化合物生物合成中的关键酶。

2.1 氧化角鲨烯环化酶

OSC 是三萜皂苷下游合成阶段的第一个限速酶,可催化 2,3-氧化角鲨烯环化生成三萜骨架。Liu 等^[35]将雷公藤 OSC 基因进行了异源表达,发现 TwOSC4 和 TwOSC6 是环阿屯醇合酶。Chen 等^[36]从 *Astragalus membranaceus* 中克隆了两个 OSC 基因,并对其在膜荚黄芪中的功能进行了研究,发现 AmOSC3 与环阿屯醇的合成有关。Huang 等^[37]从 *Camellia sasanqua* 中发掘了 7 种 OSC 基因并在酵母中进行了功能表征,最终确定 CsOSC5 和 CsOSC7 为

C16、C25 位有羟基,C21 与 C24 位环氧化为五元环,推测环阿屯醇可能经 CYP450 羟基化与环氧化后转变为环黄芩醇。本文分析了催化与环阿屯醇骨架相似的化合物的 CYP450s,筛选了具有催化四环三萜皂苷与甾醇等的环氧化和羟基化活性的 7 种 CYP450s,并通过比对等方法进一步从 Genbank 数据库中筛选了 38 条相关序列,以邻接法建立了系统发育树,结果见图 1。在此基础上,本文从 Plant Cytochrome P450 Database、Uniprot 和 PubChem 下载了部分 CYP450s 的 PDB 数据和环阿屯醇 SDF 数据,采用 PCPLD 和 AlphaFold-P450 工具(<http://p450.biodesign.ac.cn/>)预测了部分 CYP450s 与环阿屯醇的分子对接,并运用 UCSF ChimeraX 进行了可视化处理,结果见图 2。



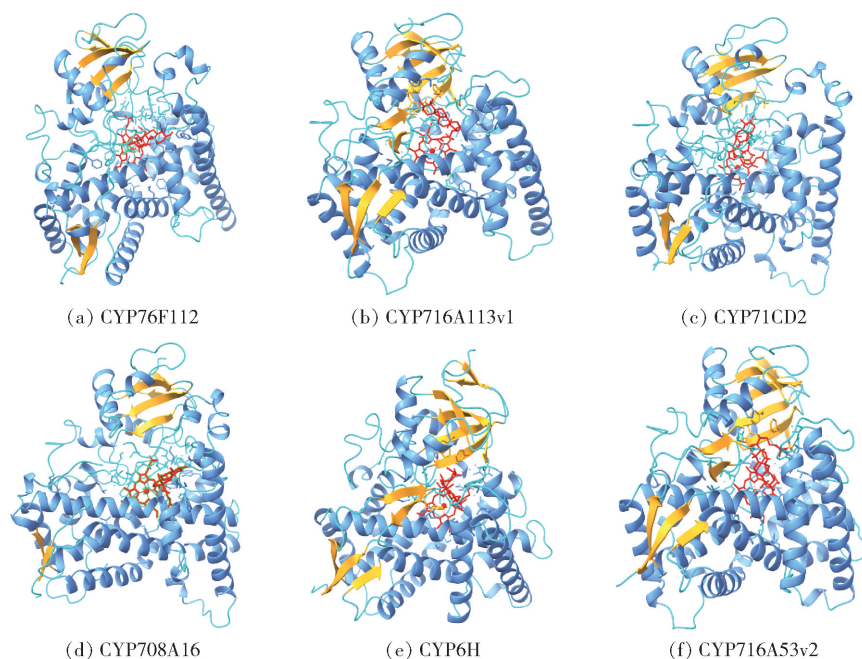


图2 部分 CYP450s 与环阿屯醇的分子对接

Fig. 2 Molecular docking between some CYP450s and cycloartenol

着重要的环化作用。Takase 等^[45]对多种 CYP450s 在葫芦素生物合成中的作用进行了研究,他们将 CYP81AQ19 与葫芦二烯醇合酶在酵母中共表达,发现 CYP81AQ19 具有烯丙基羟基化活性;经过温和的酸处理后,可引发产物 C23-OH 基团异构化为 C25-OH 以及双键迁移。有研究表明 CYP716A12 和其他 CYP716A 亚家族酶大多为 C28 氧化酶^[46],但部分 CYP716A 具有 C6 羟基化活性,例如 CYP716A53v2 可羟基化原萆二醇的 C6 位,得到原萆三醇^[47]。将 CYP6H 在酿酒酵母中进行表达,也可实现外源性原萆二醇 C6 位的羟基化^[48]。Mietinen 等^[49]通过酵母表征了不同药用植物的 CYP716 酶,他们从耬斗菜 (*Aquilegia coerulea*) 中鉴定出 CYP716A113v1,该酶可能参与甾体皂苷的生物合成,能够羟化甾体皂苷前体环阿屯醇或酵母甾醇前体等其他四环三萜类化合物,但其具体氧化部位未知。Dong 等^[50]研究确定了葫芦素生物合成途径中的 2 个 CYP450s,证明了 CYP708A16 可催化葫芦二烯醇转化为 16- β -羟基葫芦二烯醇。

CYP450s 在植物进化的过程中可能获得新的活性,例如苔藓植物 (*Calohypnum plumiforme*) 独立进化出 2 个莫内酯生物合成基因簇,它们与水稻相关酶的特性相同,但属于不同的 P450 家族^[51]。此外,利用整合系统发育分析、蛋白质结构计算和数据驱

动设计 (data driven design) 等方法,重新设计改造 CYP87D20 等多功能酶的活性位点,有望将其转变为高效的葫芦二烯醇 C11 羟化酶^[52-53]。未来,除了从黄芪中挖掘环黄芪醇合成所需的 CYP450s 外,还可以通过多组学技术在多种植物中获取环黄芪醇合酶。

3 酿酒酵母底盘细胞的构建与优化

酿酒酵母、大肠杆菌等微生物是异源合成多种植物天然产物的主要底盘细胞。大肠杆菌具有发酵周期短(2~3 d)、萜类合成途径简单和不分流等优势。目前,已在大肠杆菌中实现了环阿屯醇的合成^[54],但是大肠杆菌缺少细胞器,CYP450s 在大肠杆菌等细菌中通常难以表达^[55]。此外,大肠杆菌内的 MEP 途径多用于合成酮类、醇类和酸类等化合物,较少用于萜类合成^[56]。酵母具有 MVA 代谢途径,能够提供三萜合成所需的前体物质^[57-58];酿酒酵母具有内质网、高尔基体、过氧化物酶体等亚细胞结构,有利于植物源关键酶基因的表达^[59],并且能够为植物三萜类化合物母核的合成提供适宜的反应场所;酵母还能对萜类母核进行糖基化、羟基化等修饰。目前,已在酵母中实现了多种三萜苷元及皂苷的异源生物合成^[60-63],这为酵母合成环黄芪醇提供了参考。此外,酿酒酵母也被认定为安全的微生物

(generally recognized as safe, GRAS)^[64], 已广泛应用于多种食品、药品的合成^[65-67], 因此是环黄芪醇生物合成的理想宿主^[68]。

图3显示了工程酿酒酵母中环黄芪醇的代谢途径。在酵母内源 MVA 途径中, 葡萄糖经糖酵解途径, 经乙醛脱氢酶(ALDH)、乙酰辅酶 A 合酶(ACS) 催化后, 生成重要的合成底物——乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)。乙酰辅酶 A 在乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶(ERG10)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶(ERG13)、HMG-CoA 还原酶(HMGR)、甲戊二酸激酶(ERG12)、磷酸戊二酸激酶(ERG8)、法尼二磷酸合酶(ERG20) 等酶的催化下反应生成 IPP, 经异戊

烯基焦磷酸异构酶(IDI1) 催化, 生成 DMAPP。之后, DMAPP 在香叶基焦磷酸合酶(geranyl pyrophosphate synthetase, GPS)、法尼基焦磷酸合酶(farnesyl pyrophosphate synthetase, FPS)、角鲨烯合酶(squalene synthase, SS)、角鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE) 等的作用下, 生成 2,3-氧化角鲨烯。在 OSCs 的作用下, 2,3-氧化角鲨烯通过“椅-船-椅”式构象变化形成环阿屯醇^[69-70]。最后, 环阿屯醇经 CYP450s 羟基化、环氧化等结构修饰, 生成环黄芪醇。通过酵母生成环黄芪醇, 仍需对酵母细胞进行代谢工程和合成生物学改造, 以增加前体供应, 并高效表达环黄芪醇合成的关键酶基因。

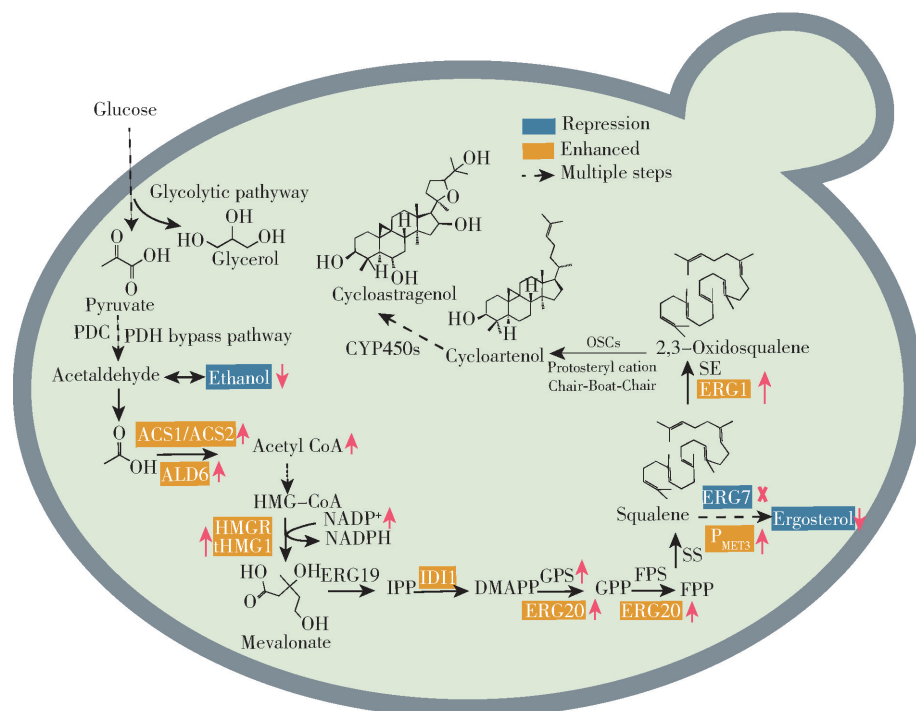


图3 工程酿酒酵母中环黄芪醇的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathways of cycloastragenol in engineered *Saccharomyces cerevisiae*

3.1 强化细胞质内源乙酰辅酶 A 的合成

细胞质中, 乙酰辅酶 A 主要通过乙酰辅酶 A 合酶(ACS1、ACS2) 途径合成^[71]。在酿酒酵母中过表达 ACS1 和 ACS2 可以使乙酰辅酶 A 的合成产量提高 2 到 5 倍, 从而增加其在细胞质中的浓度^[72]。同时, 乙酰辅酶 A 与乙醛酸生成苹果酸是细胞质和过氧化物酶体中乙醛酸循环的重要环节, 抑制柠檬酸合酶(CIT2) 和苹果酸合酶(MLS1) 的表达可以减少乙酰辅酶 A 的损失^[73]。酵母细胞中, 同时提高乙酰和辅酶 A 的合成, 能够大幅增加乙酰辅酶 A 及下游产物的产量^[74]。

3.2 在细胞质中构建外源乙酰辅酶 A 的合成途径

在酿酒酵母中引入外源乙酰辅酶 A 合成途径可以提高乙酰辅酶 A 的合成效率。Meadows 等^[75]使用 4 种非天然代谢反应重组酿酒酵母的中心碳代谢, 降低了胞质乙酰辅酶 A 生物合成对 ATP 的需求和 CO₂ 的生成量, 有利于经济高效地合成乙酰辅酶 A。Kozak 等^[76]在酿酒酵母中表达乙酰乙醛脱氢酶(A-ALD), 结果显示乙酰乙醛脱氢酶能够合成乙酰辅酶 A。乙酰辅酶 A 可以在柠檬酸裂解酶(ACL) 的催化下直接由柠檬酸获得, 而酿酒酵母中缺少 ACL 基因^[77]。Lian 等^[78]在酿酒酵母的细胞质中表达外

源 ACL 基因,促进了乙酰辅酶 A 的生成。

酿酒酵母中存在运输乙酰辅酶 A 的(乙酰)肉毒碱穿梭系统,但是由于其无法合成肉毒碱,线粒体中的乙酰辅酶 A 无法被转运到细胞质中^[73]。线粒体中的乙酰辅酶 A 合成途径消耗更少的能量^[79],且乙酰辅酶 A 主要在线粒体中产生,因此,在细胞质中构建线粒体中的丙酮酸脱氢酶复合体具有重要意义。Lian 等^[80]将丙酮酸脱氢酶复合体在酵母细胞质中表达,使目标产物的产量大为提升。此外,在线粒体中构建 MVA 途径,具有提高乙酰辅酶 A 相关产物产量的潜能,例如 Lv 等^[81]通过此方法使异戊二烯的产量达到 2 527 mg/L。但是线粒体为酵母细胞能量的来源,应尽量避免在线粒体中进行萜类相关产物的合成。

3.3 解除产物对酿酒酵母的毒副作用以及改善前体合成途径

以酿酒酵母为底盘细胞合成环黄芪醇,需要对酿酒酵母底盘细胞进行适当改造,消除其在合成过程中的多种限制,从而提高目标产物的产量。酿酒酵母在发酵生产过程中产生的部分代谢产物会对酿酒酵母细胞产生毒副作用,从而降低酿酒酵母的生物量。王雅楠等^[82]通过在酿酒酵母中过量表达 Spnox 基因,使重组菌株胞内总 NADH 氧化酶活性提高了 49%,NADH/NAD⁺ 比例降低了 9%,减少了酿酒酵母中乙醇的合成,这为减少环黄芪醇合成过程中乙醇等代谢产物对酿酒酵母的影响提供了思路。

为了满足酿酒酵母细胞本身的生物代谢途径和环黄芪醇合成途径对前体物质的需要,提高关键酶基因在工程菌中的表达量是强化前体物质合成的最直接方法。HMGR 是 MVA 途径的第一个限速酶,过表达 N 端截短的 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 HMGR (tHMGI) 可以促进代谢流向 MVA 途径转移,降低法尼基焦磷酸的反馈抑制,从而提高 MVA 途径中间产物的生成量^[83]。在构建具有原人参二醇合成途径的酿酒酵母中,过表达编码该酶功能区的基因 tHMGI 后,原人参二醇产量提升为原产量的 9.7 倍^[84];此外,过表达 IDI1、ERG10、ERG20 基因和角鲨烯合酶基因(ERG9)等也可以提高前体物质的供应^[85]。ERG1 基因的表达产物可以将角鲨烯氧化成 2,3-氧化角鲨烯,因此过表达 ERG1 基因可以促进 2,3-氧化角鲨烯的生成。

3.4 筛选高活性异源关键酶基因

酵母细胞不具有环阿屯醇合酶、CYP450s 等环黄芪醇合成所需的关键酶^[86]。部分外源基因在酿酒酵母内难以表达或表达量较低^[87],导致关键酶的活性不高,因此,需要筛选并优化异源基因的表达^[88]。针对异源基因表达时存在的密码子偏好性问题,可以根据酿酒酵母的密码子特点,对相关基因进行密码子优化;针对异源酶活性低等问题,则可以通过定向进化、理性设计等蛋白质工程方法提高其活性和特异性^[89]。酿酒酵母中缺少植物来源的酶翻译、酶修饰能力和亚细胞结构,导致植物天然产物合成所需的 CYP450s 等关键酶存在折叠错误、表达水平低和催化效率差等问题。未来,改善酵母底盘细胞特性,提高酵母表达 CYP450s 等植物天然产物合成关键酶的能力,对实现植物活性天然产物的酵母合成至关重要。

3.5 抑制羊毛甾醇竞争途径

环阿屯醇合酶(CAS)可以催化 2,3-氧化角鲨烯为环黄芪醇的前体环阿屯醇,不同的氧化角鲨烯环化酶会催化 2,3-氧化角鲨烯环化成不同的化合物,并与环阿屯醇竞争前体,其中环阿屯醇合成最主要的竞争途径是羊毛甾醇的合成。酿酒酵母的 ERG7 基因编码的羊毛甾醇合酶可以催化 2,3-氧化角鲨烯生成羊毛甾醇,再经过一系列反应合成细胞膜中的成分麦角甾醇,从而降低环阿屯醇的产量^[90-91]。由于麦角甾醇是构成细胞膜的主要成分,因此无法完全敲除 ERG7 基因进行调控。

启动子工程可以有效调控酵母基因的表达^[92]。将 ERG7 基因的启动子替换为弱启动子,降低该基因的转录水平,可以减少羊毛甾醇的合成。P_{CTR3} 启动子受铜离子浓度影响,以该启动子替换酿酒酵母的 ERG7 基因启动子后,在培养基中添加高浓度铜离子,可显著抑制 ERG7 基因的转录^[93]。同理,也可以利用蛋氨酸和甲硫氨酸抑制性启动子 P_{MET3} 替换 ERG7 基因启动子,在培养基中添加蛋氨酸或甲硫氨酸,可以抑制 ERG7 基因的表达^[94]。在酿酒酵母细胞中构建 CRISPR/dCas9 系统,将 dCas9 基因整合到酿酒酵母基因组中,表达出作用于 ERG7 的 dCas9 蛋白,也可以抑制羊毛甾醇的合成^[95]。此外,还可以利用反义 RNA 技术抑制 ERG7 基因的表达^[96],但是由于此技术的操作过程繁琐、成本较高,目前已很少使用。

乙酰辅酶 A、法尼基焦磷酸、异戊二烯、异戊烯

基焦磷酸、角鲨烯是酵母中环黄芪醇合成的重要前体或中间产物,可通过多种优化策略提高其合成产量,从而提高环阿屯醇的合成效率。目前,三萜类化合物绞股蓝皂苷、人参皂苷 Rg3、人参皂苷

CK、双环单萜化合物桉叶素、萜醇化合物芳樟醇、黄酮类化合物柚皮素等均在酵母中实现了高效合成(表 1),这为环黄芪醇在酵母中的高效合成提供了参考。

表 1 酿酒酵母细胞工厂高效合成策略
Table 1 Efficient synthesis strategies for cell factories in *S. cerevisiae*

产物	优化策略	优化后产量的增加情况	参考文献
乙酰辅酶 A	过表达 ACS1 基因	增加 2.19 倍	[72]
乙酰辅酶 A	过表达 ACS2 基因	增加 5.02 倍	[72]
法尼醇	过表达 tHMGRI、ERG20 基因	由 <0.1 mg/L 增加至 5.08 mg/L	[97]
异戊二烯	线粒体中建立 MVA 途径	增加至 2 527 mg/L	[81]
角鲨烯	过表达 tHMG1 和 LYS2 基因	由 9.6 mg/L 增加至 150.9 mg/L	[98]
绞股蓝皂苷	引入 UDPG 酶系	由微量增加至 15.9 mg/L	[99]
人参皂苷 Rg3	过表达 UDPG 生物合成基因	增加至 51 mg/L	[99]
人参皂苷 CK	过表达 Pn3-29 基因模块	由 21.8 mg/(L·OD) 增加至 41.3 mg/(L·OD)	[100]
桉叶素	过表达 IDII 基因	增加至 485 mg/L	[101]
芳樟醇	过表达 IDII 基因	由 (59.85 ± 4.05) mg/L 增加至 (127.71 ± 7.68) mg/L	[102]
α-檀香烯	过表达 ALD6、acs ^{L641P} _{SE} 、ERG10 基因;敲除 CIT2 和 MLS1 基因	增加至 8.29 mg/L	[73]
柚皮素	过表达泛酸激酶和 PDH 旁路途径	增加 24.4 倍	[74]
β-香树脂醇	用弱启动子替换 ERG7 启动子	产量提高 50%	[94]

4 总结与展望

目前,环黄芪醇下游合成途径中 CYP450s 等关键酶的结构修饰的专一性较低,部分关键酶的催化机制未知,在酿酒酵母中异源表达高效关键酶基因有待进一步研究。未来,为实现环黄芪醇的酵母合成,可加强以下几方面的研究工作:

(1)利用多组学技术和合成生物学技术,从黄芪中的环黄芪醇高效合成部位挖掘环黄芪醇合成途径的关键酶;

(2)探究环黄芪醇在酿酒酵母中的异源合成途径,进一步筛选与酵母系统匹配中环黄芪醇合成关键酶基因;

(3)通过启动子替换、基因敲除、基因过表达等手段,结合基因编辑技术,可以强化环黄芪醇的合成代谢途径、抑制竞争途径的代谢通量、减少中间代谢产物的积累,从而提高环黄芪醇在酵母中的合成产率、速率和得率(titer, rate and yield, TRY)。

通过合成生物学研究,有望大量获取具有市场

竞争力的环黄芪醇产品,这样不仅能够实现绿色生物制造,还能够为实现碳中和、碳达峰提供帮助。

参考文献:

[1] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203 – 3207.

ZHANG Q, GAO W Y, MAN S L. Chemical composition and pharmacological activities of Astragali Radix [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(21): 3203 – 3207. (in Chinese)

[2] DING W J, CHEN G H, DENG S H, et al. Calycosin protects against oxidative stress-induced cardiomyocyte apoptosis by activating aldehyde dehydrogenase 2 [J]. Phytotherapy Research, 2023, 37(1): 35 – 49.

[3] 杨冰, 于桂红, 李明雨, 等. 基于“补气固表”探究黄芪黄酮组分抑制 C57BL/6 荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(23): 5184 – 5190.

YANG B, YU G H, LI M Y, et al. Mechanism of fla-

- vonoid components in Astragali Radix in inhibiting tumor growth and immunoregulation in C57BL/6 tumor bearing mice based on “invigorating Qi for consolidation of exterior” [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(23): 5184–5190. (in Chinese)
- [4] CHEN G H, XU H L, XU T, et al. Calycosin reduces myocardial fibrosis and improves cardiac function in post-myocardial infarction mice by suppressing TGFBR1 signaling pathways[J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154277.
- [5] KONG X H, WANG F, NIU Y B, et al. A comparative study on the effect of promoting the osteogenic function of osteoblasts using isoflavones from Radix Astragalus[J]. Phytotherapy Research, 2018, 32(1): 115–124.
- [6] LI W F, HU X Y, WANG S P, et al. Characterization and anti-tumor bioactivity of astragalus polysaccharides by immunomodulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 985–997.
- [7] DONG N, LI X R, XUE C Y, et al. Astragalus polysaccharides alleviates LPS-induced inflammation via the NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(7–8): 5525–5540.
- [8] LIU T L, ZHANG M J, NIU H Y, et al. Astragalus polysaccharide from Astragalus Melittin ameliorates inflammation via suppressing the activation of TLR-4/NF- κ B p65 signal pathway and protects mice from CVB3-induced virus myocarditis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 179–186.
- [9] SU H F, SHAKER S, KUANG Y, et al. Phytochemistry and cardiovascular protective effects of Huang-Qi (*Astragali Radix*) [J]. Medicinal Research Reviews, 2021, 41(4): 1999–2038.
- [10] LI M, LI S C, DOU B K, et al. Cycloastragenol upregulates SIRT1 expression, attenuates apoptosis and suppresses neuroinflammation after brain ischemia [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2020, 41(8): 1025–1032.
- [11] IKRAM M, JO M H, CHOE K, et al. Cycloastragenol, a triterpenoid saponin, regulates oxidative stress, neurotrophic dysfunctions, neuroinflammation and apoptotic cell death in neurodegenerative conditions[J]. Cells, 2021, 10(10): 2719.
- [12] WAN Y, XU L, WANG Y X, et al. Preventive effects of astragaloside IV and its active sapogenin cycloastragenol on cardiac fibrosis of mice by inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. European Journal of Pharmacology, 2018, 833: 545–554.
- [13] DENG G L, ZHOU L S, WANG B L, et al. Targeting cathepsin B by cycloastragenol enhances antitumor immunity of CD8 T cells via inhibiting MHC-I degradation[J]. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2022, 10(10): e004874.
- [14] 张阳煊, 袁洋, 孙曼婷, 等. 环黄芪醇抗衰老药理作用的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(10): 2078–2084.
- ZHANG Y H, YUAN Y, SUN M T, et al. Research progress of anti-aging pharmacological effect of cycloastragalol [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2021, 43(10): 2078–2084. (in Chinese)
- [15] CRAVENS A, PAYNE J, SMOLKE C D. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 2142.
- [16] ZHU M, WANG C X, SUN W T, et al. Boosting 11-oxo- β -amyrin and glycyrrhetic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via pairing novel oxidation and reduction system from legume plants [J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 43–50.
- [17] 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.
- [18] WANG P P, WEI Y J, FAN Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts [J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 97–105.
- [19] WEI W, WANG P P, WEI Y J, 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.
- [20] MOSES T, POLLIER J, ALMAGRO L, et al. Combinatorial biosynthesis of sapogenins 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.
- [21] ITKIN M, DAVIDOVICH-RIKANATI R, COHEN S, et al. The biosynthetic pathway of the nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from *Siraitia grosvenorii* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(47): E7619–E7628.
- [22] 楚治良, 王好锋, 韩静, 等. 中药单体环黄芪醇的制备方法[J]. 实用医药杂志, 2019, 36(9): 822–824.
- CHU Z L, WANG H F, HAN J, et al. Study on the preparation of TCM cycloastragenol [J]. Practical Journal

- of Medicine & Pharmacy, 2019, 36(9): 822–824. (in Chinese)
- [23] FENG L M, LIN X H, HUANG F X, et al. Smith degradation, an efficient method for the preparation of cycloastragenol from astragaloside IV [J]. Fitoterapia, 2014, 95: 42–50.
- [24] CHENG L Y, ZHANG H, LIANG H, et al. Enzymatic bioconversion of cycloastragenol-6-O- β -D-glucoside into cycloastragenol by a novel recombinant β -glucosidase from *Phycoccus* sp. Soil748 [J]. Process Biochemistry, 2020, 90: 81–88.
- [25] LI Q, WU T, ZHAO L G, et al. Highly efficient biotransformation of astragaloside IV to cycloastragenol by sugar-stimulated β -glucosidase and β -xylosidase from *Dicthyoglomus thermophilum* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(12): 1882–1893.
- [26] CHENG L Y, ZHANG H, CUI H Y, et al. Efficient production of the anti-aging drug cycloastragenol: insight from two glycosidases by enzyme mining [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(23): 9991–10004.
- [27] WANG L M, CHEN Y. Efficient biotransformation of astragaloside IV to cycloastragenol by *Bacillus* sp. LG-502 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 183(4): 1488–1502.
- [28] TAKEUCHI D M, KISHINO S, OZEKI Y, et al. Analysis of astragaloside IV metabolism to cycloastragenol in human gut microorganism, bifidobacteria, and lactic acid bacteria [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2022, 86(10): 1467–1475.
- [29] LIANG J W, MAI W N, WANG J, et al. Performance and microbial communities of a novel integrated industrial-scale pulp and paper wastewater treatment plant [J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 278: 123896.
- [30] WANG J, LIANG J W, LI Y H, et al. Characterization of efficient xylanases from industrial-scale pulp and paper wastewater treatment microbiota [J]. AMB Express, 2021, 11: 19.
- [31] 魏勇军, 李晓琪, 戢博阳, 等. 肠道菌群与宿主关系解析及肠道菌群调控/合成研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2022, 52(2): 249–265.
- WEI Y J, LI X Q, JI B Y, et al. Recent advances on the recovery, modulation and synthetic biology of gut microbiota and hosts [J]. Scientia Sinica (Vitae), 2022, 52(2): 249–265. (in Chinese)
- [32] MIAO Q, ZHANG X L, WANG Y T, et al. Characterization of novel pectinolytic enzymes derived from the efficient lignocellulose degradation microbiota [J]. Biomolecules, 2022, 12(10): 1388.
- [33] YANG Y D, QU L B, MIJAKOVIC I, et al. Advances in the human skin microbiota and its roles in cutaneous diseases [J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 176.
- [34] JIAO J, GAI Q Y, FU Y J, et al. Optimization of *Astragalus membranaceus* hairy roots induction and culture conditions for augmentation production of astragalosides [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 120: 1117–1130.
- [35] LIU Y, ZHOU J W, HU T Y, et al. Identification and functional characterization of squalene epoxidases and oxidosqualene cyclases from *Tripterygium wilfordii* [J]. Plant Cell Reports, 2020, 39(3): 409–418.
- [36] CHEN K, ZHANG M, XU L L, et al. Identification of oxidosqualene cyclases associated with saponin biosynthesis from *Astragalus membranaceus* reveals a conserved motif important for catalytic function [J]. Journal of Advanced Research, 2023, 43: 247–257.
- [37] HUANG L F, HU Y E, HUANG R S, et al. Oxidosqualene cyclases involved in the biosynthesis of diverse triterpenes in *Camellia sasanqua* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(26): 8075–8084.
- [38] GUO S Y, YIN Y, LEI T, et al. A cycloartenol synthase from the steroidal saponin biosynthesis pathway of *Paris polyphylla* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2021, 23(4): 353–362.
- [39] KAWANO N, ICHINOSE K, EBIZUKA Y. Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding oxidosqualene cyclases from *Costus speciosus* [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(4): 477–482.
- [40] GIRVAN H M, MUNRO A W. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2016, 31: 136–145.
- [41] GUENGERICH F P, MUNRO A W. Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(24): 17065–17073.
- [42] MALHOTRA K, FRANKE J. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated tailoring of triterpenoids and steroids in plants [J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2022, 18: 1289–1310.
- [43] HODGSON H, DE LA PEÑA R, STEPHENSON M J, et al. Identification of key enzymes responsible for protolimonoid biosynthesis in plants: opening the door to aza-

- dirachtin production[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(34): 17096–17104.
- [44] VILLARD C, MUNAKATA R, KITAJIMA S, et al. A new P450 involved in the furanocoumarin pathway underlies a recent case of convergent evolution[J]. New Phytologist, 2021, 231(5): 1923–1939.
- [45] TAKASE S, KERA K, NAGASHIMA Y, et al. Allylic hydroxylation of triterpenoids by a plant cytochrome P450 triggers key chemical transformations that produce a variety of bitter compounds[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(49): 18662–18673.
- [46] YASUMOTO S, FUKUSHIMA E O, SEKI H, et al. Novel triterpene oxidizing activity of *Arabidopsis thaliana* CYP716A subfamily enzymes[J]. FEBS Letters, 2016, 590(4): 533–540.
- [47] HAN J Y, HWANG H S, CHOI S W, et al. Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(9): 1535–1545.
- [48] WANG L, ZHAO S J, LIANG Y L, et al. Identification of the protopanaxatriol synthase gene CYP6H for ginsenoside biosynthesis in *Panax quinquefolius*[J]. Functional & Integrative Genomics, 2014, 14(3): 559–570.
- [49] MIETTINEN K, POLLIER J, BUYST D, et al. The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis[J]. Nature Communications, 2017, 8: 14153.
- [50] DONG L, ALMEIDA A, POLLIER J, et al. An independent evolutionary origin for insect deterrent cucurbitacins in *Iberis amara*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(11): 4659–4673.
- [51] ZHANG J, PETERS R J. Why are momilactones always associated with biosynthetic gene clusters in plants? [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(25): 13867–13869.
- [52] LI D W, MA Y S, ZHOU Y, et al. A structural and data-driven approach to engineering a plant cytochrome P450 enzyme[J]. Science China Life Sciences, 2019, 62(7): 873–882.
- [53] ZHANG X P, LUO W, YAO Y Y, et al. Enhanced chemoselectivity of a plant cytochrome P450 through protein engineering of surface and catalytic residues[J]. aBIOTECH, 2021, 2(3): 215–225.
- [54] TAKEMURA M, TANAKA R, MISAWA N. Pathway engineering for the production of β -amyrin and cycloartenol in *Escherichia coli*—a method to biosynthesize plant-derived triterpene skeletons in *E. coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(17): 6615–6625.
- [55] AJIKUMAR P K, XIAO W H, TYO K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science, 2010, 330(6000): 70–74.
- [56] JARBOE L R, ZHANG X, WANG X, et al. Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals; contributions of synthetic biology[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 2010: 761042.
- [57] KAMPRANIS S C, MAKRIS A M. Developing a yeast cell factory for the production of terpenoids[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2012, 3(4): e201210006.
- [58] 李冰, 张传波, 宋凯, 等. 生物合成稀有人参皂苷的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(6): 71–88.
- LI B, ZHANG C B, SONG K, et al. Research progress in biosynthesis of rare ginsenosides[J]. China Biotechnology, 2021, 41(6): 71–88. (in Chinese)
- [59] 陈明凯, 叶丽丹, 于洪巍. 代谢改造酿酒酵母合成萜类化合物的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2085–2104.
- CHEN M K, YE L D, YU H W. Advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terpenoids biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(6): 2085–2104. (in Chinese)
- [60] YANG C S, LI C J, WEI W, et al. The unprecedented diversity of UGT94-family UDP-glycosyltransferases in *Panax* plants and their contribution to ginsenoside biosynthesis[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 15394.
- [61] PENG J J, WANG L, WANG M G, et al. Yeast synthetic biology for the production of *Lycium barbarum* polysaccharides[J]. Molecules, 2021, 26(6): 1641.
- [62] WEI Y J, JI B Y, LEDESMA-AMARO R, et al. Editorial: engineering yeast to produce plant natural products [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 798097.
- [63] WEI Y J. Yeast synthetic biology for the production of terpenoids derived from traditional Chinese medicinal plants [M] // HARZEVILI F D. Synthetic biology of yeasts: tools and applications. Cham: Springer International Publishing, 2022: 181–205.
- [64] PARAPOULI M, VASILEIADIS A, AFENDRA A S, et

- al. Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications [J]. AIMS Microbiology, 2020, 6(1): 1–31.
- [65] WEI Y J, GOSSING M, BERGENHOLM D, et al. Increasing cocoa butter-like lipid production of *Saccharomyces cerevisiae* by expression of selected cocoa genes [J]. AMB Express, 2017, 7(1): 34.
- [66] WEI Y J, SIEWERS V, NIELSEN J. Cocoa butter-like lipid production ability of non-oleaginous and oleaginous yeasts under nitrogen-limited culture conditions [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(9): 3577–3585.
- [67] BERGENHOLM D, GOSSING M, WEI Y J, et al. Modulation of saturation and chain length of fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* for production of cocoa butter-like lipids [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(4): 932–942.
- [68] 石玉松, 王冬, 李荣生, 等. 创建酿酒酵母细胞工厂发酵生产人参皂苷 Rh₂ [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(3): 651–658.
- SHI Y S, WANG D, LI R S, et al. Construction of cell factories for high production of ginsenoside Rh₂ in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(3): 651–658. (in Chinese)
- [69] 陈翠玉, 庞亚如, 陈泉冰, 等. 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 C Y, PANG Y R, CHEN Q B, et al. Oxidosqualene cyclases in triterpenoids biosynthesis: a review [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 443–459. (in Chinese)
- [70] 徐圆圆, 陈仲, 贾黎明, 等. 植物三萜皂苷生物合成途径及调控机制研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2021, 51(5): 525–555.
- XU Y Y, CHEN Z, JIA L M, et al. Advances in understanding of the biosynthetic pathway and regulatory mechanism of triterpenoid saponins in plants [J]. Scientia Sinica (Vitae), 2021, 51(5): 525–555. (in Chinese)
- [71] SHIBA Y, PARADISE E M, KIRBY J, et al. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids [J]. Metabolic Engineering, 2007, 9: 160–168.
- [72] 陈孚江, 周景文, 史仲平, 等. 乙酰辅酶 A 合成代谢对酿酒酵母生理功能的影响 [J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1172–1179.
- CHEN F J, ZHOU J W, SHI Z P, et al. Effect of acetyl-CoA synthase gene overexpression on physiological function of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(9): 1172–1179. (in Chinese)
- [73] CHEN Y, DAVIET L, SCHALK M, et al. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism [J]. Metabolic Engineering, 2013, 15: 48–54.
- [74] LIU W, ZHANG B, JIANG R. Improving acetyl-CoA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via the overexpression of pantothenate kinase and PDH bypass [J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 41.
- [75] MEADOWS A L, HAWKINS K M, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production [J]. Nature, 2016, 537(7622): 694–697.
- [76] KOZAK B U, VAN ROSSUM H M, BENJAMIN K R, et al. Replacement of the *Saccharomyces cerevisiae* acetyl-CoA synthetases by alternative pathways for cytosolic acetyl-CoA synthesis [J]. Metabolic Engineering, 2014, 21: 46–59.
- [77] HYNES M J, MURRAY S L. ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans* [J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(7): 1039–1048.
- [78] LIAN J, SI T, NAIR N U, et al. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 139–149.
- [79] VICKERS C E, WILLIAMS T C, PENG B, et al. Recent advances in synthetic biology for engineering isoprenoid production in yeast [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2017, 40: 47–56.
- [80] LIAN J, ZHAO H. Functional reconstitution of a pyruvate dehydrogenase in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae* through lipoylation machinery engineering [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 689–697.
- [81] LV X M, WANG F, ZHOU P P, et al. Dual regulation of cytoplasmic and mitochondrial acetyl-CoA utilization for improved isoprene production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Nature Communications, 2016, 7(1): 12851.
- [82] 王雅楠, 宋育阳, 刘延琳, 等. 过量表达 NADH 氧化酶降低酿酒酵母乙醇合成的研究 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(4): 23–29.
- WANG Y N, SONG Y Y, LIU Y L, et al. Reduction of ethanol yield by NADH oxidase overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(4): 23–29.

- (in Chinese)
- [83] 高扬乐, 谢梦斯, 李力. 利用不同底盘细胞开展生物合成萜类化合物的研究进展[J]. 药物生物技术, 2022, 29(1): 95–101.
- GAO Y L, XIE M S, LI L. Research progress in biosynthesis of terpenoids using different chassis cells[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2022, 29(1): 95–101. (in Chinese)
- [84] 梁会超, 胡宗凤, 梁兰, 等. 过表达 HMGR 催化结构域以优化酵母工程菌原人参二醇代谢途径的研究[J]. 药学研究, 2016, 35(8): 444–448, 493.
- LIANG H C, HU Z F, LIANG L, et al. Optimization of the protopanaxadiol metabolic pathway by overexpression of the catalytic domain of HMGR in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2016, 35(8): 444–448, 493. (in Chinese)
- [85] WESTFALL P J, PITERA D J, LENIHAN J R, et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(3): E111–E118.
- [86] SUN J C, XU X, XUE Z Y, et al. Functional analysis of a rice oxidosqualene cyclase through total gene synthesis[J]. Molecular Plant, 2013, 6(5): 1726–1729.
- [87] 于欣水, 曾钰, 李洁, 等. MHF 组蛋白折叠复合体组分编码基因 MHF1 过表达对重组酿酒酵母纤维素酶生产的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(1): 75–83.
- YU X S, ZENG Y, LI J, et al. Effects of overexpression of the MHF histone fold complex component encoding gene MHF1 on production of cellulase by the recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2019, 46(1): 75–83. (in Chinese)
- [88] WANG M G, WEI Y J, JI B Y, et al. Advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for cocoa butter equivalent production[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 594081.
- [89] GUAN R B, WANG M G, GUAN Z H, et al. Metabolic engineering for glycyrrhetic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 588255.
- [90] 朱明. 酿酒酵母合成甘草次酸的途径构建与调控[D]. 天津: 天津大学, 2017.
- ZHU M. Construction and regulation of glycyrrhetic acid synthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Tianjin: Tianjin University, 2017. (in Chinese)
- [91] 曹龙辉, 李晓珺, 赵文红, 等. 麦角甾醇的研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(4): 9–12.
- CAO L H, LI X J, ZHAO W H, et al. Research progress on ergosterol[J]. China Brewing, 2014, 33(4): 9–12. (in Chinese)
- [92] TANG H T, WU Y L, DENG J L, et al. Promoter architecture and promoter engineering in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolites, 2020, 10(8): 320.
- [93] ASADOLLAHI M A, MAURY J, MØLLER K, et al. Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 99(3): 666–677.
- [94] KIRBY J, ROMANINI D W, PARADISE E M, et al. Engineering triterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*— β -amyrin synthase from *Artemisia annua* [J]. The FEBS Journal, 2008, 275(8): 1852–1859.
- [95] JENSEN E D, FERREIRA R, JAKOČIŪNAS T, et al. Transcriptional reprogramming in yeast using dCas9 and combinatorial gRNA strategies[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 46.
- [96] 王庆华, 高丽丽, 梁会超, 等. 利用反义 RNA 技术抑制酿酒酵母羊毛甾醇合酶基因的表达[J]. 药学学报, 2015, 50(1): 118–122.
- WANG Q H, GAO L L, LIANG H C, et al. Downregulation of lanosterol synthase gene expression by antisense RNA technology in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2015, 50(1): 118–122. (in Chinese)
- [97] 郭俊琪, 王征, 张伟欣, 等. 代谢工程改造酿酒酵母提高法尼醇产量[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1257–1268.
- GUO J Q, WANG Z, ZHANG W X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve farnesol production [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1257–1268. (in Chinese)
- [98] DAI Z B, WANG B B, LIU Y, et al. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 3698.
- [99] JIANG Z Q, GAO H Y, LIU R, et al. Key glycosyltransferase genes of *Panax notoginseng*: identification and engineering yeast construction of rare ginsenosides[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(7): 2394–2404.
- [100] SHI Y S, WANG D, LI R S, et al. Engineering yeast subcellular compartments for increased production of the lipophilic natural products ginsenosides[J]. Metabolic

- Engineering, 2021, 67: 104 – 111.
- [101] IGNEA C, CVETKOVIC I, LOUPASSAKI S, et al. Improving yeast strains using recyclable integration cassettes, for the production of plant terpenoids[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 4.
- [102] 孙明雪, 刘继栋, 堵国成, 等. 调控酿酒酵母类异戊

二烯合成途径强化芳樟醇合成[J]. 生物工程学报, 2013, 29(6): 751 – 759.

SUN M X, LIU J D, DU G C, et al. Regulation of isoprenoid pathway for enhanced production of linalool in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(6): 751 – 759. (in Chinese)

Advances in the production of cycloastragenol using engineered yeast

YUAN YingZi^{1,2} ZHONG HongHui^{1,2} YANG YuTong^{1,2} YAO Huan^{1,2}
ZHANG XiaoLing^{1,2} WANG Zheng³ WEI YongJun^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001;

2. Laboratory of Synthetic Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001;

3. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: *Astragali radix* is an important Chinese herbal medicine. It is the dried root of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao or *A. membranaceus* (Fisch.) Bge., which contains flavonoids, polysaccharides, saponins and other components. Cycloastragenol is mainly converted from astragaloside in *A. radix* and has many biological activities such as anti-oxidation and anti-aging. However, current production strategy of cycloastragenol relies on the extraction of traditional Chinese medicine, which is difficult to carry out on a large scale. The rapid development of synthetic biotechnology provides the basis for constructing yeast cell factories to produce a variety of plant natural products with high efficiency and gives a solution for the large-scale and efficient synthesis of cycloastragenol. The available preparation methods of cycloastragenol are reviewed. The synthesis pathway and key enzymes for cycloastragenol and the regulation of the terpenoid synthesis metabolic pathway are described and discussed. In future, it can be expected that yeast synthesis of cycloastragenol will be achieved by expressing the key synthase genes of cycloastragenol and designing and constructing a *Saccharomyces cerevisiae* cell factory to increase the metabolic flux of terpenoid synthesis.

Key words: cycloastragenol; *Saccharomyces cerevisiae*; microbial cell factory; oxidosqualene cyclase; cytochrome

P450

(责任编辑:于少云)