

• 天然产物生物合成 •

史社坡 北京中医药大学研究员、博士生导师。2006年7月于北京大学获博士学位；2006年10月–2011年1月，先后在香港科技大学、东京大学、美国华盛顿州立大学等地从事天然产物生物合成与调控相关研究，目前研究方向为中药活性成分发现及合成生物学。主持国家重点研发计划（子课题）、国家自然科学基金、北京市自然科学基金、教育部新世纪优秀人才项目等课题多项；作为骨干人员获国家科技进步二等奖（排名6）、教育部科技进步二等奖（排名3）、李时珍医药创新奖（排名2）等奖励。



产姜黄素大肠杆菌工程菌的构建

张乐, 丁宁, 海燕, 闫雅茹, 李娜, 李赛男, 屠鹏飞, 刘晓, 史社坡

北京中医药大学 中药现代研究中心, 北京 100029

张乐, 丁宁, 海燕, 等. 产姜黄素大肠杆菌工程菌的构建. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2077-2084.

Zhang L, Ding N, Hai Y, et al. Production of curcumin by engineered *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2077-2084.

摘要: 姜黄素是姜科植物的特征性成分, 具有重要的药理活性。文中利用姜黄素生物合成关键酶 β -酮酰辅酶A合酶 (Diketide-CoA synthase, DCS) 基因和姜黄素合酶 (Curcumin synthase, CURS) 基因构建非天然融合基因 *DCS::CURS*, 并将其与 4-香豆酰辅酶A连接酶 (4-coumarate coenzyme A ligase, 4CL) 和乙酰辅酶A羧化酶 (Acetyl coenzyme A carboxylase, ACC) 基因共同引入大肠杆菌 *Escherichia coli*, 构建由阿魏酸合成姜黄素的工程大肠杆菌, 利用 LB 培养基和改良的 M9 培养基进行两步发酵。通过对生长培养阶段诱导蛋白表达方法和发酵培养阶段接种菌体量、培养基组成及发酵培养时间等条件的优化, 并在发酵培养阶段加入大孔吸附树脂降低产物在培养液中的累积等方法, 姜黄素的合成产率达到 386.8 mg/L。本研究首次将非天然融合基因 *DCS::CURS* 用于合成姜黄素工程菌的构建, 得到了姜黄素产率较高的大肠杆菌菌株, 为后续通过进一步复杂的代谢网络优化、构建姜黄素合成能力更强的工程菌提供参考。

关键词: 大肠杆菌, 姜黄素, 非天然融合蛋白, 工程菌

Received: December 28, 2020; **Accepted:** March 18, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81773842).

Corresponding authors: Xiao Liu. Tel/Fax: +86-10-64286350; E-mail: fcliuxiao@163.com

Shepo Shi. Tel/Fax: +86-10-64286350; E-mail: shishepo@163.com

国家自然科学基金 (No. 81773842) 资助。

网络出版时间: 2021-04-02

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210401.1534.002.html>

Production of curcumin by engineered *Escherichia coli*

Le Zhang, Ning Ding, Yan Hai, Yaru Yan, Na Li, Sainan Li, Pengfei Tu, Xiao Liu, and Shepo Shi

Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Curcumin is exclusively isolated from Zingiberaceae plants with a broad spectrum of bioactivities. In the present study, we used the diketide-CoA synthase (DCS) and curcumin synthase (CURS) genes to construct a non-natural fusion gene encoding diketide-CoA synthase::curcumin synthase (DCS::CURS). This fusion protein, together with the acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) and the 4-coumarate coenzyme A ligase (4CL), were introduced into *Escherichia coli* for the production of curcumin from ferulic acid. The process is divided into two stages, the growth stage using LB medium and the fermentation stage using the modified M9 medium. The yield of curcumin reached 386.8 mg/L by optimizing the induction of protein expression in the growth stage, and optimizing the inoculum volume, medium composition and fermentation time in the fermentation stage, as well as the addition of macroporous resin AB-8 into the second medium to attenuate the toxicity of the end product. The exploitation of the non-natural fusion protein DCS::CURS for the production of curcumin provides a new alternative to further promoting the production of curcumin and the related analogues.

Keywords: *Escherichia coli*, curcumin, non-natural fusion protein, engineered bacteria

姜黄素是姜黄、郁金、生姜等姜科植物的特征成分，具有多种药理活性，如抗炎、抗 HIV、抗肿瘤、清除自由基等^[1-3]。此外，姜黄素还可以作为食用色素应用于食品工业^[4]。大量文献报道姜黄素在预防和治疗疾病方面有巨大潜力^[5-8]，但目前姜黄素主要依靠从植物中提取分离或者有机合成的方法进行制备。由于植物生长周期长，单纯依靠植物进行提取制备，土地成本及分离制备成本高，自然资源消耗大；有机合成制备姜黄素的方法也存在试剂环境不友好等问题。

近几年来，合成生物学作为新兴学科，在天然产物的绿色合成与制造方面引起了高度关注^[9-10]，一系列活性天然产物，如青蒿素^[11]、紫杉醇^[12]、吗啡^[13]、人参皂苷^[14]、红景天苷^[15]、秋水仙碱^[16]、灯盏花乙素^[17]等的合成生物学研究都取得了突破性的进展。我国当前也把合成生物技术列入战略性、前瞻性重点研究方向。在植物体内，姜黄素是由苯丙素途径合成，酪氨酸解氨酶 (Tyrosine aminonialase, TAL)、4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-coumarate coenzyme A ligase, 4CL)、 β -酮酰辅酶 A 合酶 (Diketide-CoA synthase, DCS) 和姜黄

素合酶 (Curcumin synthase, CURS) 参与姜黄素的生物合成，其中 DCS 和 CURS 是合成姜黄素的关键限速酶^[18]。Rodrigues 等将拟南芥中的 4CL、姜黄中的 DCS 和 CURS1 引入大肠杆菌，成功以阿魏酸为底物合成姜黄素 (70 mg/L)^[19]，经过对一系列发酵培养条件如诱导剂浓度、诱导时间、培养基组成等多个因素的考察优化，姜黄素的产率达到 353 mg/L^[20]。同时，该课题组研究人员还尝试将来自黏红酵母 *Rhodotorula glutinis* 的 TAL、西班牙糖丝菌 *Saccharothrix espanaensis* 的 4-香豆酸 3-羟化酶 (C3H)、紫花苜蓿 *Medicago sativa* 的咖啡酰辅酶 A-3-O-甲基转移酶 (CCoAOMT) 引入大肠杆菌，以酪氨酸为底物合成姜黄素，但产率仅为 0.2 mg/L^[19]。与姜黄中的 DCS 和 CURS 分步催化合成姜黄素相比，Katsuyama 等从水稻 *Oryza sativa* 中克隆鉴定的姜黄素合酶 (CUS) 能够直接催化阿魏酰辅酶 A 生成姜黄素及其类似物^[21]，进一步将深红酵母 *Rhodotorula rubra* 中的 PAL、紫草 *Lithospermum erythrorhizon* 中的 4CL 与 CUS 一起引入大肠杆菌，可从酪氨酸或阿魏酸合成姜黄素及其类似物，其中以阿魏酸为底物时，姜黄

素产率为 100 mg/L 左右^[22]。此外,也有将 CUS 与其他来源的 TAL、4CL、C3H、CoMT 一起引入大肠杆菌^[23],或者尝试将 CUS 在米曲霉 *Aspergillus oryzae* 中表达等方法合成姜黄素,但姜黄素产率均较低^[24]。

前期研究中,我们成功从鲜姜中克隆鉴定了一个新的姜黄素合酶 (ZoCURS),ZoCURS 能够接受阿魏酰辅酶 A 为底物,与从姜黄中克隆的 DCS 一起两步催化合成姜黄素。进一步构建非天然融合蛋白 DCS::ZoCURS 发现,新构建的融合蛋白不仅能够行使 DCS 和 ZoCURS 两步合成姜黄素的功能,而且 DCS::ZoCURS 在体外酶反应中能够明显提高姜黄素的产率^[25]。因此,我们尝试将来自拟南芥中编码 4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4CL) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 的基因与非天然融合基因 DCS::ZoCURS 引入大肠杆菌,构建的工程菌成功以阿魏酸为底物合成姜黄素,结合在培养液中加入大孔吸附树脂等简单方法,使姜黄素在所构建的工程大肠杆菌 (1 L 摇瓶) 中的合成产量达到 386.8 mg/L。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

感受态细胞 *Trans1-T1* 购自北京全式金生物技术有限公司;载体 pRSF-duet-1、pCDF-duet-1 购自 Novagen 公司。*LA Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTP mix、*Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I 及其他限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒和 PCR 纯化试剂盒购自 Axygen 公司。IPTG、氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素购自 Sigma 公司。PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,其他相关载体及试剂均由实验室自备。

LB 培养基: 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g NaCl, 加蒸馏水至 1 L, 102.9 kPa 高压蒸汽灭菌 15 min。

TB 培养基: 12 g 胰蛋白胨, 24 g 酵母提取物, 4 mL 甘油, 17 mmol KH₂PO₄, 72 mmol K₂HPO₄, pH 7.0, 加蒸馏水定容至 1 L, 102.9 kPa 高压蒸汽灭菌 15 min。

M9 培养基: Na₂PO₄·7H₂O 12.8 g, KH₂PO₄ 3.0 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1.0 g, 加蒸馏水 200 mL 溶解, 102.9 kPa 高压蒸汽灭菌 15 min。再加入 1 mol/L 的 MgSO₄ 2 mL、20% 的葡萄糖溶液 20 mL、1 mol/L 的 CaCl₂ 0.1 mL, 加灭菌双蒸水至 1 000 mL。

改良 M9 培养基: M9 培养基中加入 FeCl₃ 54 mg/L、ZnCl₂ 4 mg/L、CoCl₂ 4 mg/L、Na₂MoO₄ 4 mg/L、CuCl₂ 2 mg/L、H₂BO₃ 1 mg/L、VB₁ 340 mg/L、VB₅ 10.8 mg/L、VB₆ 2.8 mg/L、VB₂ 0.84 mg/L、烟酸 12.2 mg/L、生物素 0.12 mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 基因克隆、质粒及工程菌构建

根据 NCBI 中拟南芥的 4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4CL, GenBank 登录号: NM_104046.3)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC, GenBank 登录号: AY142630.1) 设计特异性引物 (引物序列见表 1), 从拟南芥的新鲜叶片中克隆相关基因全长序列。扩增获得的 DNA 全长片段用相应的限制性内切酶切后, 用 T4 DNA 连接酶分别插入载体 pET-28a、pRSF-duet-1、pCDF-duet-1 和 pET-22b 中。将获得的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 菌落 PCR 并测序验证。非天然融合蛋白 DCS::ZoCURS 的基因序列及质粒构建方法见前期报道^[25]。将不同的质粒组合, 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 于对应抗性平板上培养, 利用各基因特异性引物进行菌落 PCR, 筛选出含有所有目标基因的阳性克隆, 测序验证后获得工程菌株如下: ① pET-28a-4CL+pET-28a-DCS::ZoCURS; ② pET-28a-4CL+pET-28a-DCS::ZoCURS+pET-28a-ACC; ③ pRSF-duet-1-ACC+pCDF-duet-1-4CL+pET-22b-DCS::ZoCURS; ④ pRSF-duet-1-ACC-4CL+pET-22b-DCS::ZoCURS。

表 1 用于 PCR 扩增的引物

Table 1 Primers used for PCR amplification

Gene	Primer sequence (5'-3')	
<i>AtACC-1F</i>	<u>CCGGAATTC</u> ATGGACGCTTCTATGATTAC	(<i>EcoR</i> I)
<i>AtACC-1B</i>	CCGCTCGAGCTAAACCGTTGCGTTTGTC	(<i>Xho</i> I)
<i>AtACC-2F</i>	<u>CGGAATTC</u> GATGGACGCTTCTATGATTACCAATTC	(<i>EcoR</i> I)
<i>AtACC-2B</i>	TTGCGGCCGCCTAAACCGTTGCGTTTGTCAGATC	(<i>Not</i> I)
<i>At4CL-1F</i>	<u>GGGGTACC</u> ATGGCGCCACAAGAACAAGCAGTTTC	(<i>Kpn</i> I)
<i>At4CL-1B</i>	CCCTCGAGTCAGTGAAGAACAACCTTTGTTGATTTC	(<i>Xho</i> I)

The underlined sequences are the restriction sites.

1.2.2 培养方法及产物分析定量

将含有不同质粒的重组菌株按 1:50 (V/V) 的比例接种到具有相应抗性的 LB 培养基中培养过夜,活化后的菌液按照 1:100 (V/V) 比例接种到含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基 (第一培养基/生长培养基) 中,在 37 °C 下培养至菌液 OD_{600} 值为 0.4–0.6 时加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG,调节温度至 20 °C 继续振荡培养 5 h; 4 °C、4 000 r/min 离心,收集菌体。将收集的菌体接种到 LB 培养基 (第二培养基/发酵培养基) 中 (0.5 g 菌体/20 mL 培养基),并加入 $CaCO_3$ (40 g/L)、山梨醇 (5 g/L)、阿魏酸 (3 mmol/L)。继续振荡培养 48 h,上清液和沉淀分别经乙酸乙酯和甲醇提取,合并提取液,减压蒸干溶剂,甲醇复溶,利用岛津 LCMS-IT-TOF 液质联用仪 (Shimadzu, Japan) 分析姜黄素的生成及含量。液相检测条件:色谱柱 Agilent Eclipse XDB C_{18} 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, I.D. 5 μm),流速:1.0 mL/min,流动相:乙腈-水 (含 0.1% 甲酸)。梯度洗脱:–5 min, 5% 乙腈; 5–40 min, 5%–40% 乙腈; 40–45 min, 40%–80% 乙腈。为计算姜黄素的含量,利用液相色谱法建立姜黄素标准品的标准曲线,以峰面积 (y) 和化合物浓度 (x) 进行线性回归 ($y=0.020 1x+3 679.3$, $R^2=0.999 5$),根据标准曲线计算姜黄素的含量。姜黄素的制备与纯化:50 mL 发酵培养后的培养液,超声破碎,乙酸乙酯提取 3 次,合并提取液浓缩蒸干,经柱色谱纯化后,利用 HRESIMS、 1H NMR 数据进行鉴定。

姜黄素: 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): 3.82 (6H, s), 6.03 (2H, s), 6.72 (2H, d, $J=16.0$ Hz), 6.80 (2H, d, $J=8.0$ Hz), 7.12 (2H, brd, $J=8.0$ Hz), 7.30 (2H, brs), 7.51 (2H, d, $J=16.0$ Hz); HRESIMS m/z 369.135 7 [M+H] $^+$ (calcd for $C_{21}H_{21}O_6$, 369.133 8)。

1.2.3 培养条件考查

分别考查诱导培养阶段诱导剂加入时菌体 OD_{600} 值 (培养至 OD_{600} 值分别为 0.4、0.5 和 0.6)、诱导剂 IPTG 浓度 (0.4 mmol/L、0.6 mmol/L 和 1 mmol/L)、诱导表达时间 (4 h、5 h、6 h 和 8 h),发酵培养阶段发酵培养基组成 (LB、TB、M9、改良 M9),上述考查实验平行开展,每个因素实验重复 3 次,且仅保持被考查因素为变量,其他因素固定,其余操作同 1.2.2 进行。

取上述综合最佳参数组合,对发酵培养阶段的相关因素包括接种菌体量 (每 20 mL 培养 0.5 g、1.0 g、2.0 g 和 2.5 g 菌体)、发酵培养时间 (8 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h) 进行平行考查,即保持被考查因素为变量,其他因素固定,其余实验操作同 1.2.2。

2 结果与分析

2.1 姜黄素关键合成步骤在大肠杆菌中的构建

日本学者研究发现姜黄素是由 β -酮酰辅酶 A 合酶 (Diketide-CoA synthase, DCS) 和姜黄素合酶 (Curcumin synthase, CURS) 两个植物聚酮合酶共同作用的结果。首先,DCS 催化阿魏酰辅酶 A 与一分子丙二酰辅酶 A 缩合形成 β -酮酰辅酶 A

之后, CURS 再催化 β -酮酰辅酶 A 与另一分子阿魏酰辅酶 A 缩合生成姜黄素^[18]。然而, 由 DCS 和 CURS 体外催化合成姜黄素, 需要以价格昂贵、合成困难的酰基辅酶 A 硫酸酯为底物, 无法用于姜黄素的大量合成与生产。在植物体内, 4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4CL) 可以将阿魏酸转化为阿魏酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 可以将代谢过程中的乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A。因此, 将编码 4CL、ACC、DCS、CURS 四个关键酶的基因引入大肠杆菌 (图 1), 再加上大肠杆菌自身代谢过程中产生的部分丙二酰辅酶 A, 可以实现大肠杆菌中以阿魏酸为底物合成姜黄素。课题组在前期研究中发现非天然融合蛋白 DCS::ZoCURS 能够催化阿魏酸辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 缩合生成姜黄素, 与 DCS、CURS 分步催化合成姜黄素相比, 姜黄素的产率提高 1 倍。因此, 本研究中尝试将前期构建的非天然融合蛋白 DCS::ZoCURS 引入大肠杆菌, 而 4-香豆酰辅酶 A 连接酶基因 (4CL) 则克隆自拟南芥。为了提高大肠杆菌体内丙二酰辅酶 A 的合成能力, 我们还在大肠杆菌中引入从拟南芥中克隆的能够催化乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A 的乙酰辅酶 A 羧化酶基因 ACC。

将上述 3 个基因连接到表达载体 pET-28a 中,

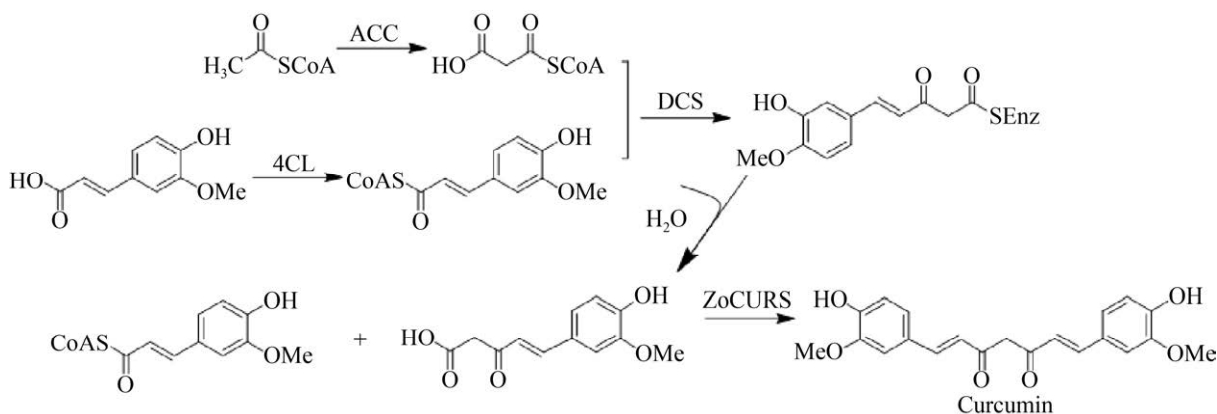


图 1 姜黄素的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of curcumin.

并构建不同质粒组合的工程菌株①和菌株②, 考察姜黄素的生成量。结果表明, 携带 ACC 基因的工程菌株②合成姜黄素的量为 (15.74±2.27) mg/L, 约为未携带 ACC 基因工程菌株① ((3.07±1.14) mg/L) 的 3 倍。因此, 我们以菌株②对相关参数逐个进行考察。

2.2 培养条件考察

首先利用菌株②考察在生长培养阶段, 诱导剂加入时间、浓度及诱导表达时间长短对姜黄素合成的影响。结果显示 (图 2A-C), 在生长培养阶段, 当 OD_{600} 值在 0.5 时加入诱导剂 0.6 mmol/L 继续诱导表达 5 h 的条件下, 有利于姜黄素的合成。

接下来对第二培养基 (发酵培养基) 的组成进行考察, 结果表明菌株②在生长培养基相同 (均为 LB 培养基) 的情况下, 第二培养基组成不同, 对姜黄素的合成影响非常明显 (图 2D), 其中在 M9 改良培养基中合成姜黄素最高, 达到 (70.09±1.02) mg/L。相比之下, 虽然改良后的 M9 培养基仅仅是在 M9 培养基的基础上加入了 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等金属离子以及 VB₅、VB₆、核黄素等, 但在发酵培养阶段, 菌体的生长状态及成活时间明显改善, 因此有充裕时间促使姜黄素合成, 这可能是姜黄素产率明显提高的原因。

选择上述优化后的最佳诱导培养条件, 利用改良的 M9 培养基作为发酵培养基, 以菌株②进一步对其发酵培养阶段接种菌体量和发酵培养时间对姜黄素合成的影响进行考察, 结果 (图 2E-F) 显示加入菌体量为 1 g/20 mL, 发酵培养 48 h 有利于获得较高产率的姜黄素, 姜黄素的产率均在 150 mg/L 以上。

非常意外的是, 当我们将构建的含有 pRSF-duet-1-ACC、pCDF-duet-1-4CL、pET-22b-DCS::ZoCURS 质粒的菌株③在上述优化后的条

件下进行姜黄素的合成时, 姜黄素的含量明显升高, 同样条件下, 培养液的黄色和菌株②相比显示肉眼可见的加深, 考虑到姜黄素的累积浓度过高, 可能会影响菌体细胞的存活, 我们在发酵培养 8 h 后, 向培养液中加入了经灭菌的 AB-8 大孔吸附树脂 (每 100 mL 加入树脂 2 g), 培养液中的姜黄素被大孔吸附树脂吸附而迅速变浅, 进一步振荡培养 72 h, 发现大量菌体死亡, 此时按 1.2.2 中的方法测定姜黄素的产率达到 386.8 mg/L (图 3), 高出文献报道的最高值 353 mg/L (同一菌株, 作

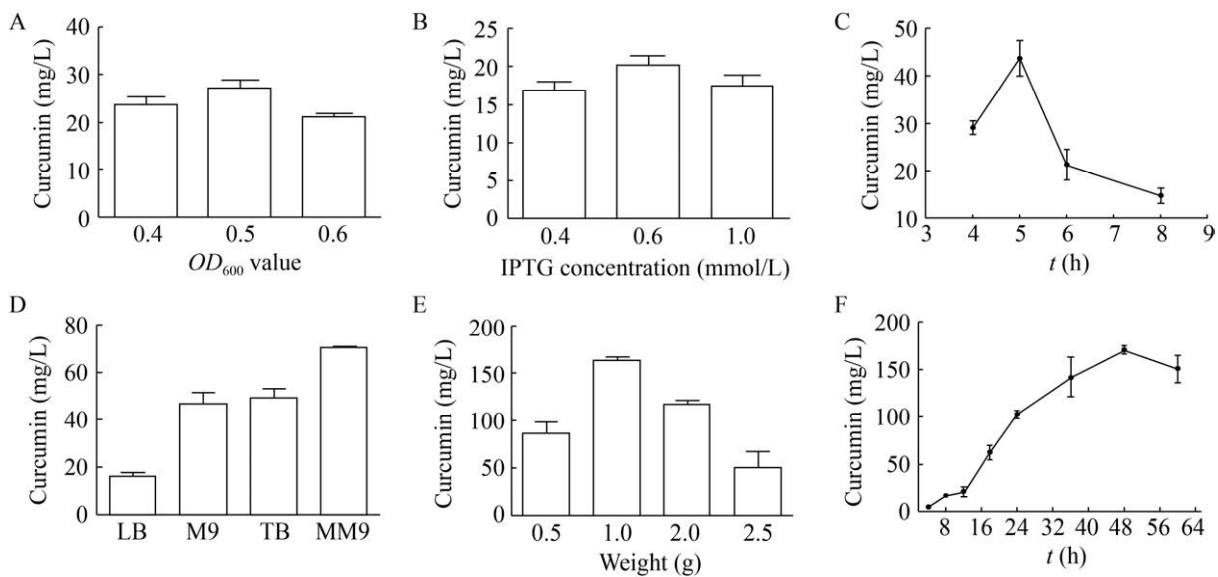


图 2 不同因素对姜黄素生成的影响

Fig. 2 Effects of different factors on curcumin production. (A) Addition of IPTG at different OD_{600} value. (B) Different IPTG concentration. (C) Different induction time of IPTG. (D) Different medium used in the second stage. (E) Different cell weight transferred. (F) Fermentation time.

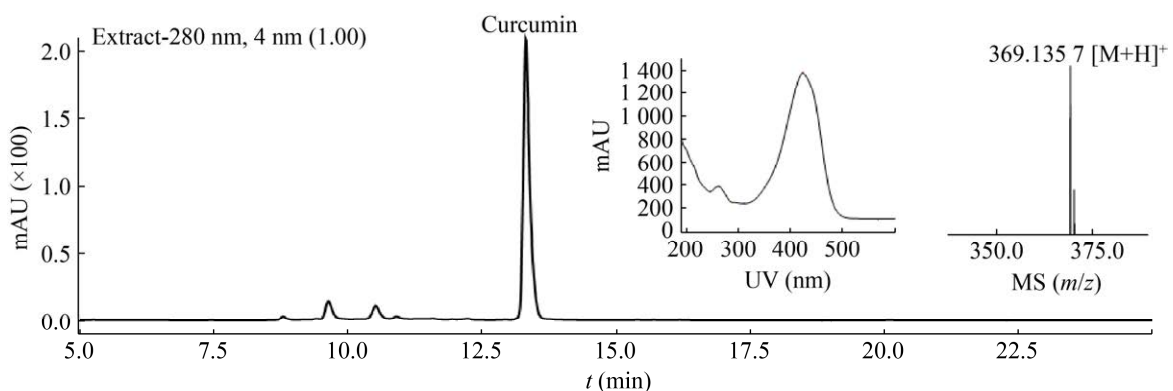


图 3 工程大肠杆菌中合成姜黄素的 LC-MS 图谱

Fig. 3 LC-MS chromatogram of the curcumin produced by engineered *E. coli*.

者在未进行系列条件优化前,姜黄素的产率仅为 70 mg/L)。因此,我们进一步构建了含有 ACC 和 4CL 基因融合表达的载体 pRSF-duet-1-ACC-4CL,并将其与 pET-22b-DCS::ZoCURS 一起引入大肠杆菌构建了菌株④,在上述同样的条件下进行发酵培养,希望进一步提高姜黄素的产率,但遗憾的是,菌株④合成姜黄素的产率没有升高,反而降低。这可能是由于构建融合载体降低了 ACC 和 4CL 基因的表达。考虑到所用菌株均为大肠杆菌 BL21(DE3),并且本研究的主要目的是想考察将非天然融合基因 DCS::ZoCURS 引入大肠杆菌后合成姜黄素的可行性,我们没有再继续对菌株③的发酵培养条件作深入系统的考察与优化。

在前期研究中^[25],我们发现非天然融合蛋白 DCS::ZoCURS 不仅能够接受以阿魏酰辅酶 A 为底物生成姜黄素,同时还可以接受以 4-羟基苯丙酰辅酶 A、肉桂酰辅酶 A、4-香豆酰辅酶 A 为底物,生成姜黄素的类似物,而 4CL 也可以催化合成上述阿魏酰辅酶 A 类似物的合成。因此,我们尝试以 4-羟基苯丙酸、4-香豆酸为底物,同样可以检测到相应的姜黄素类似物的合成,但由于缺乏相关的对照品,其产率没有进行进一步的准确测定。

3 结论

通过构建含有乙酰辅酶 A 羧化酶基因 ACC、4-香豆酰辅酶 A 连接酶基因 4CL、非天然融合基因 DCS::ZoCURS 的大肠杆菌,成功实现从阿魏酸合成姜黄素,最高产率达到 386.8 mg/L。证明非天然融合基因 DCS::ZoCURS 可以用于构建合成姜黄素及其类似物的相关工程菌,为后续通过进一步复杂的代谢网络优化、构建姜黄素合成能力更强的工程菌提供参考。

REFERENCES

- [1] Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*, 2005, 41(13): 1955-1968.
- [2] Hewlings SF, Kalman DS. Curcumin: a review of its effects on human health. *Foods*, 2017, 6(10): 92.
- [3] Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao XB. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1033.
- [4] 李宏梁. 食品添加剂安全与应用. 北京: 化学工业出版社, 2012: 142-144.
Li HL. *Food Additive Safety and Application*. Beijing: Chemical Industry Press, 2012: 142-144 (in Chinese).
- [5] Park W, Amin ARM, Chen ZG, et al. New perspectives of curcumin in cancer prevention. *Cancer Prev Res*, 2013, 6(5): 387-400.
- [6] Wang CZ, Qi LW, Yuan CS. Cancer chemoprevention effects of ginger and its active constituents: potential for new drug discovery. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7): 1351-1363.
- [7] Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, et al. Curcumin and health. *Molecules*, 2016, 21(3): 264-285.
- [8] Fujisawa S, Atsumi T, Ishihara M, et al. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. *Anticancer Res*, 2004, 24(2B): 563-569.
- [9] 王勇. 新本草计划——基于合成生物学的药用植物活性代谢物研究. *生物工程学报*, 2017, 33(3): 478-485.
Wang Y. New materia medica project: synthetic biology based bioactive metabolites research in medicinal plant. *Chin J Biotech*, 2017, 33(3): 478-485 (in Chinese).
- [10] 王俊姝, 祁庆生. 合成生物学与代谢工程. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1296-1302.
Wang JS, Qi QS. Synthetic biology for metabolic engineering — a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1296-1302 (in Chinese).
- [11] Paddon CJ, Keasling JD. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(5): 355-367.
- [12] Biggs BW, Lim CG, Sagliani K, et al. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(12): 3209-3214.

- [13] Thodey K, Galanie S, Smolke CD. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(10): 837-844.
- [14] Wang PP, Wei YJ, Fan Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts. *Metab Eng*, 2015, 29: 97-105.
- [15] 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.
- [16] Nett RS, Lau W, Sattely ES. Discovery and engineering of colchicine alkaloid biosynthesis. *Nature*, 2020, 584(7819): 148-153.
- [17] Liu XN, Cheng J, Zhang GH, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 448-457.
- [18] Katsuyama Y, Kita T, Funa N, et al. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. *J Biol Chem*, 2009, 284(17): 11160-11170.
- [19] Rodrigues JL, Araújo RG, Prather KLJ, et al. Production of curcuminoids from tyrosine by a metabolically engineered *Escherichia coli* using caffeic acid as an intermediate. *Biotechnol J*, 2015, 10(4): 599-609.
- [20] Couto MR, Rodrigues JL, Rodrigues LR. Optimization of fermentation conditions for the production of curcumin by engineered *Escherichia coli*. *J R Soc Interface*, 2017, 14(133): 20170470.
- [21] Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funa N, et al. *In vitro* synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from *Oryza sativa*. *J Biol Chem*, 2007, 282(52): 37702-37709.
- [22] Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funa N, et al. Production of curcuminoids by *Escherichia coli* carrying an artificial biosynthesis pathway. *Microbiol*, 2008, 154(9): 2620-2628.
- [23] Wang SY, Zhang SW, Xiao AF, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of various phenylpropanoid derivatives. *Metab Eng*, 2015, 29: 153-159.
- [24] Kan E, Katsuyama Y, Maruyama J, et al. Production of the plant polyketide curcumin in *Aspergillus oryzae*: strengthening malonyl-CoA supply for yield improvement. *Biosci Biotech Biochem*, 2019, 83(7): 1372-1381.
- [25] Zhang L, Gao BW, Wang XH, et al. Identification of a new curcumin synthase from ginger and construction of a curcuminoid-producing unnatural fusion protein diketide-CoA synthase: curcumin synthase. *RSC Adv*, 2016, 6(15): 12519-12524.

(本文责编 陈宏宇)