

重组大肠杆菌催化橙皮素合成新橙皮苷

张萱¹, 刘世柯², 曾伟主², 周景文², 侯颖^{1*}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

张萱, 刘世柯, 曾伟主, 周景文, 侯颖. 重组大肠杆菌催化橙皮素合成新橙皮苷[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3011-3024.
ZHANG Xuan, LIU Shike, ZENG Weizhu, ZHOU Jingwen, HOU Ying. Production of neohesperidin from hesperetin by an engineered strain of *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3011-3024.

摘要: 新橙皮苷是一种黄酮糖苷, 广泛应用于食品和药品行业。目前新橙皮苷生产主要通过植物提取法, 需要大量的有机溶剂, 而生物转化法绿色环保、转化率高, 具有较高的经济效益。本研究在大肠杆菌中引入拟南芥来源的糖基转移酶 UGT73B2、葡萄来源的鼠李糖合酶 VvRHM-NRS 和柚子来源的鼠李糖转移酶 Cm1,2RhaT, 构建了新橙皮苷的生物合成路径。通过模块优化和糖基供体强化后, 重组菌株在 5 L 发酵罐中合成新橙皮苷的产量达到 4.64 g/L, 底物橙皮素的摩尔转化率为 45.8%, 这是目前报道的微生物中异源合成新橙皮苷的最高产量。本研究为新橙皮苷高产菌株的构建与应用奠定了基础, 也为代谢工程改造微生物生产其他黄酮糖苷提供了借鉴。

关键词: 新橙皮苷; 黄酮糖苷; 二磷酸尿苷-葡萄糖; 大肠杆菌

Production of neohesperidin from hesperetin by an engineered strain of *Escherichia coli*

ZHANG Xuan¹, LIU Shike², ZENG Weizhu², ZHOU Jingwen², HOU Ying^{1*}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Neohesperidin is a flavonoid glycoside widely used in the food and pharmaceutical industries. The current production of neohesperidin mainly relies on extraction from plants. Microbial fermentation demonstrates a promising prospect as an environmentally friendly, efficient, and economical method. In this study, we designed and constructed the biosynthetic

资助项目: 国家自然科学基金(32021005)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32021005).

*Corresponding author. E-mail: houying@tust.edu.cn

Received: 2023-11-21; Accepted: 2024-03-05

pathway of neohesperidin in an *Escherichia coli* strain by introducing the glycosyltransferase UGT73B2 from *Arabidopsis thaliana*, rhamnose synthase VvRHM-NRS from *Vitis vinifera*, and rhamnose transferase Cm1, 2RhaT from *Citrus maxima*. After optimization of the module and the uridine diphosphate (UDP)-glucose synthetic pathway, the engineered strain produced 4.64 g/L neohesperidin in a 5 L bioreactor, and the molar conversion rate of hesperetin was 45.8%. This has been the highest titer reported to date for the biosynthesis of neohesperidin in microorganisms. This study lays a foundation for the construction and application of strains with high yields of neohesperidin and provides a potential choice for the microbial production of other flavonoid glycosides.

Keywords: neohesperidin; flavonoid glycoside; uridine diphosphate (UDP)-glucose; *Escherichia coli*

黄酮是一类广泛分布于植物中的酚类化合物^[1]。在自然界中,黄酮一般以糖苷的形式存在。黄酮经过糖基化修饰后,通常表现出比其骨架更好的生物活性、溶解性以及生物利用度^[2]。糖链参与细胞分化、发育、免疫、衰老、信息传递等几乎所有生命过程,糖基化可以改变黄酮的生物活性、增加水溶性、减少毒副作用、提高特异性^[3]。源自柑橘类水果的新橙皮苷(neohesperidin, NHP)对多种疾病具有预防和治疗作用。新橙皮苷能够显著抑制不同来源的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性,在高血糖和糖尿病的治疗中发挥重要作用^[4]。新橙皮苷及其酯类衍生物丙烯基新橙皮苷酯可阻断细胞周期从G1期向S期转变,抑制MCF-7细胞的增殖并诱导细胞凋亡,是治疗人乳腺癌细胞的潜在因子^[5]。另外,新橙皮苷在食品工业中也具有重要的作用,被广泛用于合成新橙皮苷二氢查尔酮(neosperidin dihydrochalcone, NHDC)。NHDC是一种低热量的半合成甜味剂,其甜度约为蔗糖的1 500倍,其热量约为蔗糖的1/2 000^[6]。

目前,植物提取法是新橙皮苷的主要生产方法,但新橙皮苷在植物中含量较低,提取步骤复杂,且提取过程需要消耗大量有机溶剂,因此并

不经济环保^[7]。设计代谢路径进行从头合成或者通过酶催化和全细胞催化合成是新橙皮苷生产的有效方法。Frydman等利用烟草内源性7-O-葡萄糖基转移酶并表达黄烷酮-7-O-葡萄糖苷-2-O-鼠李糖基转移酶(flavanone-7-O-glucoside-2-O-rhamnosyltransferase, Cm1,2RhaT),在烟草中建立了从橙皮素合成新橙皮苷的生物合成途径^[8];研究发现,酿酒酵母中的糖苷水解酶会降解新橙皮苷,敲除相关水解酶有利于新橙皮苷和其他糖基化产物的积累。Li等通过敲除酿酒酵母内源糖基水解酶基因EXG1和SPR1,并表达糖基转移酶(UGT73C6),催化柚皮素的7-O位葡萄糖基化,进一步优化二磷酸尿苷(uridine diphosphate, UDP)-葡萄糖和莽草酸途径,柚皮素-7-O-葡萄糖苷摇瓶水平的发酵产量达到了136.7 mg/L^[9]。Xiao等在酿酒酵母中敲除了糖基水解酶EXG1、SPR1和EGH1,引入外源7-O-葡萄糖基转移酶AtUF7GT、鼠李糖合酶OIRHM-NRS、鼠李糖转移酶Cm1,6RhaT,并结合启动子组合优化和内源二磷酸尿苷葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)的合成,在摇瓶水平上添加400 mg/L橙皮素后合成了249 mg/L新橙皮苷^[10]。Liu等构建了含有羟基化模块和甲基化模块的工程大肠

杆菌合成橙皮素, 当添加 100 mg/L 柚皮素为底物时合成了 37.1 mg/L 橙皮素^[11]。随后, 又构建了从头合成柚皮素的底盘细胞, 并对 F4'OMT 进行定向进化, 降低其对底物柚皮素的偏好性, 最终生成 27.5 mg/L 橙皮素^[12]。目前, 新橙皮苷的合成仍不能满足实际生产需要, 亟须建立高效生产新橙皮苷的方法。

新橙皮苷的糖链由 α -L-鼠李糖基- β -D-葡萄糖苷组成。橙皮素在 7-O-葡萄糖转移酶催化下, 将 UDP-葡萄糖(UDP-glucose, UDPG)上的葡萄糖残基转移至橙皮素的 7-OH 上, 形成橙皮素-7-O-葡萄糖苷, 接着在 1,2-鼠李糖转移酶的催化下, 将 UDP-鼠李糖残基(UDP-rhamnose, UDP-Rha)转移至橙皮素-7-O-葡萄糖苷的葡萄糖苷残基上, 形成苦味的新橙皮苷(图 1)。本研究利用重组大肠杆菌进行新橙皮苷的合成, 以强化 UDP-葡萄糖的工程菌株 EG11 为出发菌株, 通过筛选糖基转移酶(glycosyl transferases, UGT)、鼠李糖基转移

酶以及模块微调相关基因的表达, 强化了产物合成的糖基化, 在摇瓶水平上考察了菌株发酵过程诱导剂浓度和诱导温度的影响, 并在 5 L 发酵罐水平进一步探究了催化过程中底物橙皮素添加方式对合成新橙皮苷的影响, 为新橙皮苷的生物合成奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 用于质粒构建, 出发菌株为大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) Δ *pgi* Δ *zwf* Δ *ugd* Δ *ostA* Δ *gcd* Δ *ushA*, pCDFDuet-1-*pgm-galU* 质粒带有链霉素抗性筛选标记。本研究所用菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基

发酵培养基(g/L): 甘油 5.0, 蛋白胨 12.0, 酵母提取物 24.0, KH_2PO_4 2.3, K_2HPO_4 16.4, 葡萄糖 10.0。

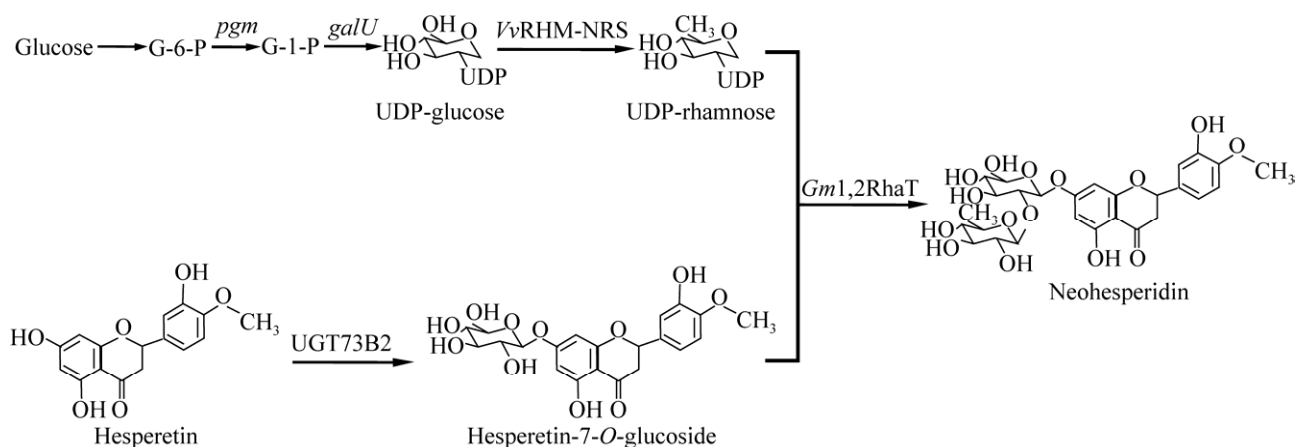


图 1 底物橙皮素合成新橙皮苷途径

Figure 1 Synthetic pathway of neohesperidin from hesperetin. G-6-P: Glucose 6-phosphate; G-1-P: Glucose 1-phosphate; *galU*: UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase; *pgm*: Phosphoglucomutase; UDP-glucose: Uridine diphosphate glucose; UDP-rhamnose: Uridine diphosphate rhamnose; *VvRHM*: Uridine diphosphate rhamnose-synthase from *Vitis vinifera*; *UGT73B2*: UDP-glycosyltransferase; *Gm1,2RhaT*: UDP-rhamnosyltransferase 1,2-rhamnosyltransferase from *Citrus maxima*.

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Name	Genotype	Source
Strains		
JM109	Wild type	Novagen
BL21(DE3)	Wild type	Novagen
EG11	BL21(DE3) Δ <i>pgi</i> Δ <i>zwf</i> Δ <i>ugd</i> Δ <i>otsA</i> Δ <i>gcd</i> Δ <i>ushA</i>	[13]
EG12	EG11 carrying pCDFDuet- <i>pgm-galU</i>	This study
NHP01	EG11 carrying pRSFDuet-1	This study
NHP02	EG11 carrying pRSFDuet-UGT73C6	This study
NHP03	EG11 carrying pRSFDuet-UGT73B2	This study
NHP04	EG11 carrying pRSFDuet- <i>Ap</i> UGT3	This study
NHP05	EG11 carrying pRSFDuet- <i>Cs</i> UGT73F1-14	This study
NHP06	EG11 carrying pRSFDuet- <i>Cs</i> UGT73F1-16	This study
NHP07	EG11 carrying pRSFDuet- <i>Md</i> UGT3	This study
NHP08	EG11 carrying pRSFDuet-1, pETDuet-1	This study
NHP09	EG11 carrying pRSFDuet1-UGT73B2, pETDuet- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	This study
NHP10	EG11 carrying pRSFDuet1-UGT73B2, pETDuet- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cp</i> 1,2RhaT	This study
NHP11	EG11 carrying pRSFDuet1-UGT73B2, pETDuet- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Ca</i> 1,2RhaT	This study
NHP12	EG11 carrying pRSFDuet1-UGT73B2, pETDuet- <i>Vv</i> RHM-NRS-C12RT1	This study
NHP13	EG11 carrying pACAYDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	This study
NHP14	EG11 carrying pCDFDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	This study
NHP15	EG11 carrying pETDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	This study
NHP16	EG11 carrying pRSFDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	This study
NHP18	EG12 carrying pETDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	This study
Plasmids		
pRSFDuet-1	Double T7 promoters, two MCS, RSF ori, Kan ^r	Novagen
pETDuet-1	Double T7 promoters, two MCS, ColE1 ori, Amp ^r	Novagen
pCDFDuet-1	Double T7 promoters, two MCS, CDF ori, Sm ^r	Novagen
pACAYDuet-1	Double T7 promoters, two MCS, P15A ori, Cm ^r	Novagen
pRSFDuet-UGT73C6	pRSFDuet-1 with UGT73C6 in MCS1	This study
pRSFDuet-UGT73B2	pRSFDuet-1 with UGT73B2 in MCS1	This study
pRSFDuet- <i>Ap</i> UGT3	pRSFDuet-1 with <i>Ap</i> UGT3 in MCS1	This study
pRSFDuet- <i>Cs</i> UGT73F1-14	pRSFDuet-1 with <i>Cs</i> UGT73F1-14 in MCS1	This study
pRSFDuet- <i>Cs</i> UGT73F1-16	pRSFDuet-1 with <i>Cs</i> UGT73F1-16 in MCS1	This study
pRSFDuet- <i>Md</i> UGT3	pRSFDuet-1 with <i>Md</i> UGT3 in MCS1	This study
pETDuet- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	pETDuet-1 with <i>Vv</i> RHM-NRS in MCS1 and <i>Cm</i> 1,2RhaT in MCS2	This study
pETDuet- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cp</i> 1,2RhaT	pETDuet-1 with <i>Vv</i> RHM-NRS in MCS1 and <i>Cp</i> 1,2RhaT in MCS2	This study
pETDuet- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Ca</i> 1,2RhaT	pETDuet-1 with <i>Vv</i> RHM-NRS in MCS1 and <i>Ca</i> 1,2RhaT in MCS2	This study
pETDuet- <i>Vv</i> RHM-NRS-C12RT1	pETDuet-1 with <i>Vv</i> RHM-NRS in MCS1 and C12RT1 in MCS2	This study
pACAYDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	pACAYDuet-1 with UGT73B2- <i>Vv</i> RHM n MCS1 and <i>Cm</i> 1,2RhaT in MCS2	This study
pCDFDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	pCDFDuet-1 with UGT73B2- <i>Vv</i> RHM n MCS1 and <i>Cm</i> 1,2RhaT in MCS2	This study
pETDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	pETDuet-1 with UGT73B2- <i>Vv</i> RHM n MCS1 and <i>Cm</i> 1,2RhaT in MCS2	This study
pRSFDuet-UGT73B2- <i>Vv</i> RHM-NRS- <i>Cm</i> 1,2RhaT	pRSFDuet-1 with UGT73B2- <i>Vv</i> RHM n MCS1 and <i>Cm</i> 1,2RhaT in MCS2	This study
pCDFDuet- <i>pgm-galU</i>	pCDFDuet-1 with <i>pgm</i> in MCS1 and <i>galU</i> in MCS2	This study

1.3 方法

1.3.1 质粒构建

为构建 pETDuet-VvRHM-NRS-Cm1,2RhaT, 使用引物对 pETDuet-F/pETDuet-R 将质粒 pETDuet-1 线性化, 用引物对 VvRHM-NRS-F/VvRHM-NRS-R 从合成基因 pUC57-VvRHM-NRS 中扩增 VvRHM-NRS 片段。每个引物与相邻片段之间具有同源互补序列, 用于连接构建质粒。通过胶回收试剂盒回收目的片段, 使用 Gibson 组装克隆试剂盒将合成基因上的 VvRHM-NRS 基因片段与线性化的 pETDuet-1 进行组装。然后, 通过 pETDuet-F/VvRHM-NRS-R 对 pETDuet-VvRHM-NRS 进行线性化处理, 用引物对 Cm1,2RhaT-F/Cm1,2RhaT-R 从合成基因 pUC57-Cm1,2RhaT 中扩增 Cm1,2RhaT 基因片段, 将 Cm1,2RhaT 基因片段和线性化的 pETDuet-VvRHM-NRS 组装成 pETDuet-VvRHM-NRS-Cm1,2RhaT。使用生工生物工程(上海)股份有限公司的即用型无缝克隆试剂盒连接 DNA 片段和构建质粒, 在 *E. coli* JM109 感受态中进行质粒扩增, 质粒提取后进行基因测序验证。磷酸葡萄糖变位酶(*pgm*)和 UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酸转移酶(*galU*)的基因以大肠杆菌 BL21(DE3)菌株

的基因组为模板进行扩增。本研究涉及的基因来源见表 2, 根据大肠杆菌表达系统进行了密码子优化, 由江苏赛索飞生物科技有限公司负责合成。本研究所用引物见表 3。

1.3.2 摇瓶发酵条件

从 LB 平板上挑取单菌落, 接种至装有 5 mL 种子培养基的 50 mL 三角瓶中培养, 培养基中根据需要补充相关抗生素(50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 链霉素或 100 mg/L 氨苄青霉素), 37 °C、220 r/min 培养 10–12 h, 以 2% 的接种量接种至含有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.8–1.0, 加入 1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG), 于 25 °C、220 r/min 培养 4 h 后, 加入 1 g/L 橙皮素(DMSO 溶解), 继续培养 72 h。

1.3.3 5 L 生物反应器中分批补料发酵条件

在 5 L 生物反应器(上海迪必尔生物工程有限公司)中进行补料分批发酵。将种子液在 LB 培养基中于 37 °C、220 r/min 条件下培养, 将 100 mL 种子培养物接种到 5 L 生物反应器中的 2.5 L 发酵培养基中, 加入相应的抗生素(50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 链霉素及 100 mg/L 氨苄青霉素)。

表 2 本研究涉及的基因

Table 2 Genes used in this study

Gene	Source	Accession number
<i>ApUGT3</i>	<i>Andrographis paniculate</i>	MH379335
<i>CsUGT76F1-14</i>	<i>Camellia sinensis</i>	KAH9766777
<i>CsUGT76F1-16</i>	<i>Camellia sinensis</i>	KAH9702172
<i>UGT73C6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	OAP07438
<i>UGT73B2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	OAO97622
<i>MdUGT</i>	<i>Malus domestica</i>	AY786997
<i>Cm1,2RhaT</i>	<i>Citrus maxima</i>	AY048882
<i>Ca1,2RhaT</i>	<i>Citrus aurantium</i>	KDO51358.1
<i>Cp1,2RhaT</i>	<i>Citrus paradisi</i>	AAL06646
<i>C12RT1</i>	<i>Citrus maxima</i>	Q8GVE3.2
<i>VvRHM-NRS</i>	<i>Vitis vinifera</i>	XP 002285634

表3 本研究使用的引物

Table 3 Primers used in this study

Primer name	Sequence(5'→3')
pRSFDuet-1-F	aagcttgcggccgataatgcttaagtc
pRSFDuet-1-R	caattcccctgtagaataattttgttaactttaataaggag atatacc
UGT73C6-F	atggcctttgagaaaaataatgaaccatttccacttc
UGT73C6-R	gcaagatatcatgcaattggcccaatctaacaattaa
UGT73B2-F	atgggtagtgtaccaccatagaaagcttcac
UGT73B2-R	caacgaccttaactctttatggaggagtttctcttaa
ApUGT3-F	atgggtaccattctcatattggtgtttggc
ApUGT3-R	gaagctgttgagatcatcggtatctctaagtga
73F1-14-F	atggaccaagaagggtagaagattggtt
73F1-14-R	ctttggagacttccacttccacactcagtaa
73F1-16-F	atggaccaagaagggtagaag
73F1-16-R	ctttcaccttccacactcagtaa
MdUGT-F	atggccaacacagattctgttg
MdUGT-R	caaggtttgaaagatgccagacactaa
pETDuet-1-F	tcgaacagaagaatcgtattgtacacgg
pETDuet-1-R	tcccctctagaataattttgttaactttaagaaggagata acc
Cm1,2RhaT-F	atgaacactaagcaccagaagaagc
Cm1,2RhaT-R	gtgtgtgcaattggttaagaagtcagtaa
Cp1,2RhaT-F	atggatacaaaaacccaagataagccatcc
Cp1,2RhaT-R	gttgcaattggttaagaagtcagtaa
Ca1,2RhaT-F	atggaatctaagttgcagaacaaaaagcc
Ca1,2RhaT-R	caattggttaaggttcccagctga
C12RT1-F	atggataccaagcaccagaataagc
C12RT1-R	atggcgaccataaccccg
VvRHM-NRS-F	atggcgaccataaccccg
VvRHM-NRS-R	ccgaagtgaagcgtcagtaa
pCDFDuet-1-F	ctcagctctgtaagaagaaccg
pCDFDuet-1-R	gtttaactttaataaggagatataccatgggc
pACYCDuet-1-F	ctcagctctgtaagaagaaccg
pACYCDuet-1-R	gtttaactttaataaggagatataccatgggc
Pgm-F	atggcaatcccaatcgtgcag
Pgm-R	ttgttagcgaagtctgaaaacgcgtaa
GalU-F	atggctgccattaatacgaaggt
GalU-R	cttgaagaagagatggcattaagaagtaa

接种量、初始温度、搅拌速度和空气流量分别为10%、37 °C、200 r/min 和 2.5 vvm。生物反应器

中的溶氧通过搅拌数(200–600 r/min)自动控制维持在30%。当 OD_{600} 达到30时,将温度降至最适温度,并添加IPTG和葡萄糖,使其终浓度分别为0.5 mmol/L和10 g/L。将含有100 g/L酵母提取物和300 g/L甘油的补充培养基(500 mL)按10 mL/L的流速添加到发酵液中,使用300 g/L葡萄糖补充培养基将葡萄糖浓度维持在10 g/L,整个发酵过程中通过自动添加4 mol/L NaOH将培养基pH值维持在7.0。

1.3.4 HPLC 检测方法

取0.5 mL发酵液与0.5 mL甲醇混合,振荡5 min, 13 500 r/min离心5 min,上清液过膜备用。使用Waters Symmetry C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,流动相A相为超纯水(0.1%三氟乙酸),B相为甲醇(0.1%三氟乙酸);进样量为10 μL,流速为1 mL/min,柱温为35 °C,检测波长为290 nm,梯度洗脱程序为:0–0.1 min B相为10%,0.1–10.0 min B相从10%线性增加至40%,10.0–20.0 min B相从40%线性增加至60%,20–22 min B相从60%线性减少至10%,22.0–25.0 min B相稳定在10%。

2 结果与分析

2.1 橙皮素-7-O-葡萄糖基转移酶的筛选

根据之前的研究报道合成了不同来源的糖基转移酶基因,其中,CsUGT76F1-14和CsUGT76F1-16是来源于茶(*Camellia sinensis*)的黄酮-7-O-葡萄糖基转移酶,能催化橙皮素形成橙皮素-7-O-葡萄糖苷^[17];UGT73B2和UGT73C6是拟南芥来源的糖基转移酶,能以柚皮素作为底物合成柚皮素-7-O-葡萄糖苷^[9];ApUGT3和MdUGT3是分别来源于穿心莲(*Andrographis paniculate*)和苹果(*Malus domestica*)的黄酮7-O-葡萄糖基转移酶^[18-19]。将不同的UGT基因分别克隆至pRSFDuet-1载体,测序正确的重组质粒分

别转化 EG11 获得相应重组菌株 NHP01–NHP06, 按照 1.3.2 的培养方法进行发酵, 结果如图 2 所示。除拟南芥来源的 UGT73C6 外, 其他 UGT 都具备催化橙皮素合成橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷的能力。糖基转移酶具有底物特异性, UGT73C6 并不能以橙皮素作为底物进行 7 位-OH 的糖基化。ApUGT3、CsUGT76F1-14、CsUGT76F1-16、MdUGT 催化橙皮素分别得到 649.2、681.8、692.1、684.4 mg/L 橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷。在所有的糖基转移酶中, 催化效果最好的是 UGT73B2, 橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷产量达到 921.8 mg/L, 是表达其他 UGT 重组质粒时的 1.33–1.42 倍。因此, 后续研究使用 UGT73B2 催化橙皮素合成橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷。

2.2 鼠李糖基转移酶的筛选

UDP-鼠李糖作为橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷识别的糖基供体, 对于新橙皮苷的生物合成至关重要。UDP-鼠李糖的生物合成以 NAD^+ 和 NADPH 为辅因子, 在 UDP-葡萄糖 4,6-脱水酶和核苷酸-鼠李糖 3,5-表异构酶/4-还原酶的 3 步反应中催化 UDPG 得到^[20]。大肠杆菌没有内源 UDP-鼠李糖合成路径, 需要外源引入鼠李糖合酶将 UDPG 转化成 UDP-鼠李糖。尽管 VvRHM 可以将 UDP-

葡萄糖转化为 UDP-鼠李糖, 但反应需要的辅因子的供应限制了鼠李糖基化产物的合成^[21]。

VvRHM-NRS 是将葡萄(*Vitis vinifera*)来源的鼠李糖合成酶的 N 端与拟南芥的双功能酶(NRS/ER)融合得到的辅因子自给自足型的融合酶^[22], 本研究中使用该酶用于催化 UDPG 合成 UDP-Rha。

研究表明, 柚子来源的鼠李糖基转移酶 Cm1,2RhaT、C12RT1 对黄酮-7-*O*-葡萄糖苷具有特异性^[23-24], 其中 Cm1,2RhaT 能以柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷为受体, 合成柚皮苷^[25], Cm1,2RhaT 也能利用橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷合成新橙皮苷^[10]。通过 NCBI 检索具有 1,2 鼠李糖转移酶功能的同工酶得到酸橙(*Citrus aurantium*)来源的 Ca1,2RhaT 和葡萄柚(*Citrus paradisi*)来源的 Cp1,2RhaT^[26-27]。以 NHP02 为出发菌株, 使用 pETDuet-1 质粒表达 VvRHM-NRS 与不同的鼠李糖基转移酶(Cm1,2RhaT、Cp1,2RhaT、Ca1,2RhaT、C12RT1), 同时表达质粒 pRSFDuet-UGT73B2, 构建重组菌株 NHP07–NHP10, 培养方法同 1.3.2, 结果如图 3 所示。柚子来源的鼠李糖转移酶 Cm1,2RhaT 合成的新橙皮苷含量为 235.2 mg/L, 而橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷的含量为 259.3 mg/L,

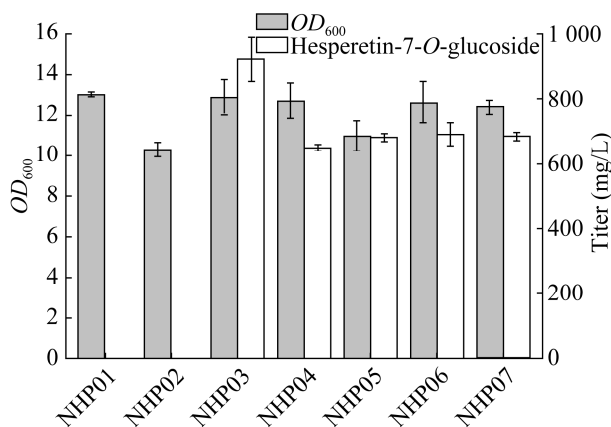


图 2 不同糖基转移酶的筛选

Figure 2 Selection of glycosyltransferases.

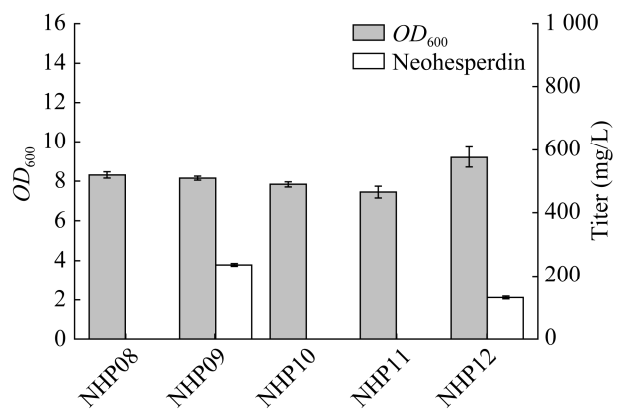


图 3 不同鼠李糖基转移酶的筛选

Figure 3 Selection of rhamnosyltransferase.

底物橙皮素的摩尔转化率为 11.6%；同样，柚子来源的鼠李糖转移酶 C12RT1 催化合成 131.2 mg/L 的新橙皮苷，橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷的含量为 52.0 mg/L。中间产物的剩余量说明鼠李糖基化是橙皮素糖基化修饰的关键步骤，可能是由于 UDP-Rha 供给不足和糖基转移酶的低活性限制了新橙皮苷的合成。

2.3 拷贝数对新橙皮苷合成的影响

基于上述结果，进一步将橙皮素糖基化反应需要的 3 个酶 UGT73B2、VvRHM-NRS、Cm1,2RhaT 分别构建到不同拷贝数的质粒 pACYCDuet-1 (拷贝数为 10)、pCDFDuet-1 (拷贝数为 20)、pETDuet-1 (拷贝数为 40)、pRSFDuet-1 (拷贝数为 100) 上，以 EG11 为出发菌株进行表达，得到重组菌株 NHP13-NHP16 (图 4A)，用于调控基因表达，探究不同拷贝数下新橙皮苷的合成情况，从而筛选出更适合表达糖基化途径的重组菌株，结果如图 4B 所示。最佳组合是 pETDuet-UGT73B2-VvRHM-NRS-Cm1,2RhaT，能够检测到 268.2 mg/L 新橙皮苷的合成，是以 pCDFDuet-1

为表达框时的 2.8 倍，而 pACYCDuet-1、pRSFDuet-1 中合成的新橙皮苷含量分别为 163.4 mg/L 和 190.2 mg/L，在 pCDFDuet-1 中合成的新橙皮苷含量最低为 96.12 mg/L。结果表明，在一定范围内新橙皮苷的产量与拷贝数呈正相关，当质粒拷贝数从 10 增加到 40，新橙皮苷的产量增加约 1.6 倍，但继续增加质粒拷贝数反而会导致产量下降。

2.4 强化 UDPG 途径对新橙皮苷合成的影响

新橙皮苷的合成受 UDPG 和 UDP-Rha 供给的影响，UDPG 的充足供给有利于下游代谢产物的积累，从而增强新橙皮苷的合成。Pei 等通过增强磷酸葡萄糖变位酶和 UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶的表达强化了 UDPG 的供给，进而增强了糖苷产物的合成^[28]。为了进一步提高胞内 UDPG 的积累，以 pCDFDuet-1 为载体，构建 pCDFDuet-1-pgm-galU 质粒，与质粒(pETDuet-UGT73B2-VvRHM-NRS-Cm1,2RhaT)一起在 EG11 中表达，得到重组菌株 NHP18 (图 5A)，结果如图 5B 所示。通过过量表达 *pgm* 和 *galU*，获得的重组菌

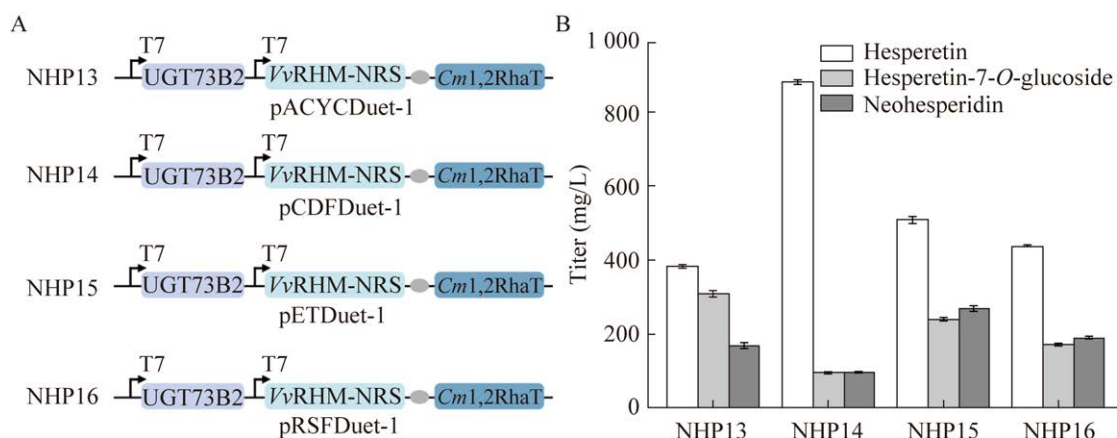


图 4 拷贝数对新橙皮苷合成的影响

Figure 4 Effect of different copy numbers of plasmids on biosynthesis of neohesperidin. A: Construction of different strains to optimize the neohesperidin synthesis pathway. B: Changes of neohesperidin titer by different copy numbers of plasmids.

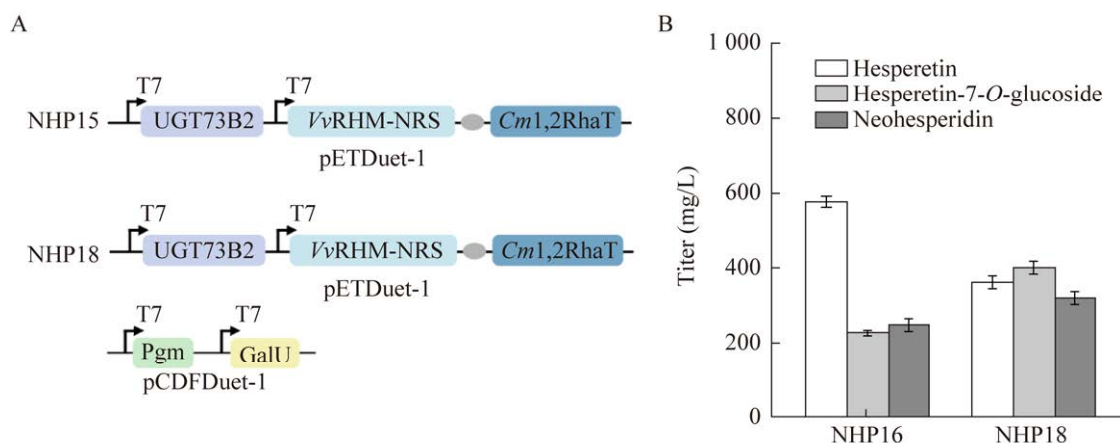


图5 过表达 *pgm* 和 *galU* 增加 UDPG 通量

Figure 5 Increasing UDPG flux by overexpressing *pgm* and *galU*. A: Construction of chassis cells NHP15 and NHP18. In strain NHP18, the gene *UGT73B2*, *VvRHM-NRS* and *Cm1,2RhaT* were expressed with plasmid pETDuet-1, while the genes *pgm* and *galU* were expressed with plasmid pCDFDuet-1. B: Changes of neohesperidin titer via overexpressing *pgm* and *galU*.

株 NHP18 产生的新橙皮苷含量为 319.0 mg/L, 比 NHP15 的 247.2 mg/L 提高了 29%。

2.5 摇瓶发酵条件的优化

2.5.1 IPTG 浓度对新橙皮苷产量的影响

基于 T7 启动子的表达系统需要以 IPTG 为诱导剂, IPTG 浓度对细胞生长和蛋白表达有显著影响^[29]。本研究需要使用葡萄糖作为糖基供体 UDPG 的初始底物,故使用 IPTG 诱导重组蛋白的表达。基于前期实验结果,选择工程菌株 NHP18 进行摇瓶水平上的发酵优化。在大肠杆菌中, T7 启动子需要以 IPTG 为诱导剂启动异源蛋白的表达,为了评估 IPTG 添加量对新橙皮苷合成的影响,对比了 5 个不同浓度的 IPTG (0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L),结果如图 6 所示。在 IPTG 添加量为 0.25 mmol/L 时新橙皮苷产量最高,达到 339.6 mg/L,最终 OD_{600} 为 13.7,在 IPTG 的浓度为 0.50 mmol/L 和 0.75 mmol/L 时最终产量变化不大,分别为 233.1 和 221.2 mg/L,但添加 0.1 mmol/L IPTG 时新橙皮苷产量最低为 167.7 mg/L。另外,可以看出过高的 IPTG 浓度对细胞生长有不利影响,最终 OD_{600} 仅为 7.6。

因此 0.25 mmol/L 为 IPTG 添加的最适浓度。

2.5.2 温度对新橙皮苷产量的影响

在发酵过程中,诱导温度是影响细胞生长和酶表达的主要因素。在 37 °C 左右的温度下,菌株可以获得更高的生长速率和细胞密度。虽然酶的合成速率也增加,但表达的酶易形成包涵体。相反,降低诱导温度可以增加重组酶的溶解度,但细胞生长速度会减慢,并且会影响全细胞催化时酶的活性。因此,通常需要评估不同的发酵温度,以保持细胞生长和酶表达之间的平衡。在添加 0.25 mmol/L IPTG 的基础上,对比了不同诱导温度(20、25、30、37 °C)对新橙皮苷合成的影响,结果如图 7 所示。在 30 °C 下新橙皮苷产量最高,72 h 积累 586.1 mg/L,约为 25 °C 时产量的 2 倍,底物橙皮素的摩尔转化率为 29%。在 37 °C 下新橙皮苷产量最低,只有 157.0 mg/L,仅为 30 °C 时的 27%。虽然在一定范围内体外催化温度越高,越有利于产物合成,但在重组菌中选择适合的温度有利于途径酶的可溶性表达,有助于提高新橙皮苷的合成。

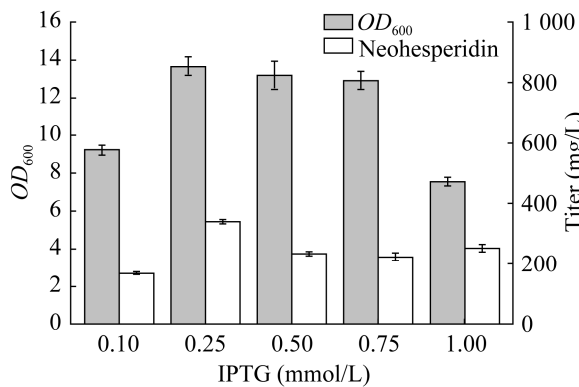


图6 IPTG浓度对新橙皮苷产量的影响

Figure 6 Effect of IPTG concentration on synthesis of neohesperidin.

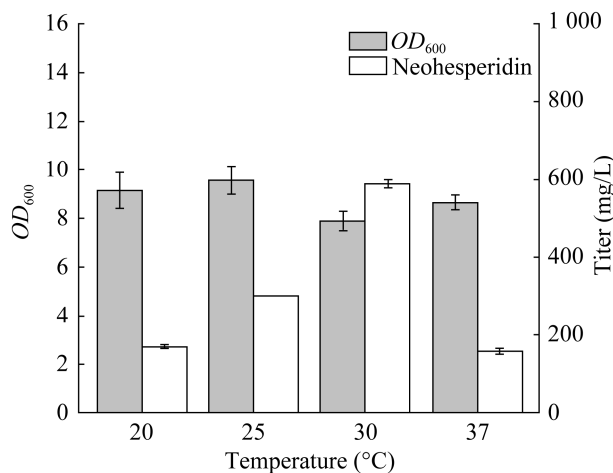


图7 发酵温度对新橙皮苷产量的影响

Figure 7 Effect of temperature concentration on synthesis of neohesperidin.

2.6 5 L 发酵验证及优化

基于摇瓶水平上优化得到的菌株最适生长条件,为进一步提高新橙皮苷的生成量,在5 L发酵罐中进行放大培养。在EG12中通过代谢工程的手段强化UDPG前体6-磷酸葡萄糖(glucose 6-phosphate, G-6-P)的供应,敲除糖酵解途径中的关键基因6-磷酸葡萄糖异构酶(*pgi*)和磷酸戊糖途径中的关键基因6-磷酸葡萄糖1-脱氢酶(*zwf*),从而使G-6-P再流向UDPG合成,提高糖基供体UDPG的供给。然而,阻断糖酵解途径,驱动过多的G-6-P进入UDPG合成,

可能会影响细胞的正常代谢。参考1.3.3的方法进行培养,在12 h时将温度降至30 °C,加入0.25 mmol/L IPTG,继续培养至84 h。在发酵16 h加入3 g/L橙皮素,结果见图8A,在12 h时 OD_{600} 为30,在48 h时 OD_{600} 达到最高值为88,48 h后 OD_{600} 维持在80–85,发酵84 h后获得1.85 g/L新橙皮苷和83.4 mg/L橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷。又对比了在发酵16 h和24 h时分两次添加总浓度为3 g/L橙皮素,结果如图8B所示,在20–44 h期间新橙皮苷迅速积累,随后,橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷和新橙皮苷积累速率趋于平缓,84 h后产生2.67 g/L的新橙皮苷和0.40 g/L橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷。为进一步提高新橙皮苷的产量,在发酵的16、28和40 h添加总浓度为5 g/L橙皮素,结果如图8C所示,在12 h时 OD_{600} 为26,在48 h时 OD_{600} 达到59,橙皮素消耗速率快,同时橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷和新橙皮苷的积累量逐渐增加,发酵36 h后,橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷的积累量维持在1.0–1.2之间,新橙皮苷保持较高的合成效率,发酵84 h后新橙皮苷的产量为4.64 g/L和橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷的积累量为1.09 g/L,底物橙皮素的摩尔转化率为45.8%,是菌株NHP18在摇瓶水平摩尔转化率的3.9倍。

3 讨论与结论

黄酮类化合物经糖基化修饰后形成的黄酮类糖苷具有良好的生物利用度,在医药领域具有很高的利用价值^[31]。随着合成生物学技术以及转录组高通量测序技术的发展,越来越多的糖基转移酶被鉴定出来,但这些糖基转移酶多数表现出区域特异性,不同的糖基转移酶对糖供体和底物受体表现出明显的偏好性^[32]。相比于其余糖基转移酶,针对1,2-鼠李糖基转移酶的研究相对较少^[33–34]。

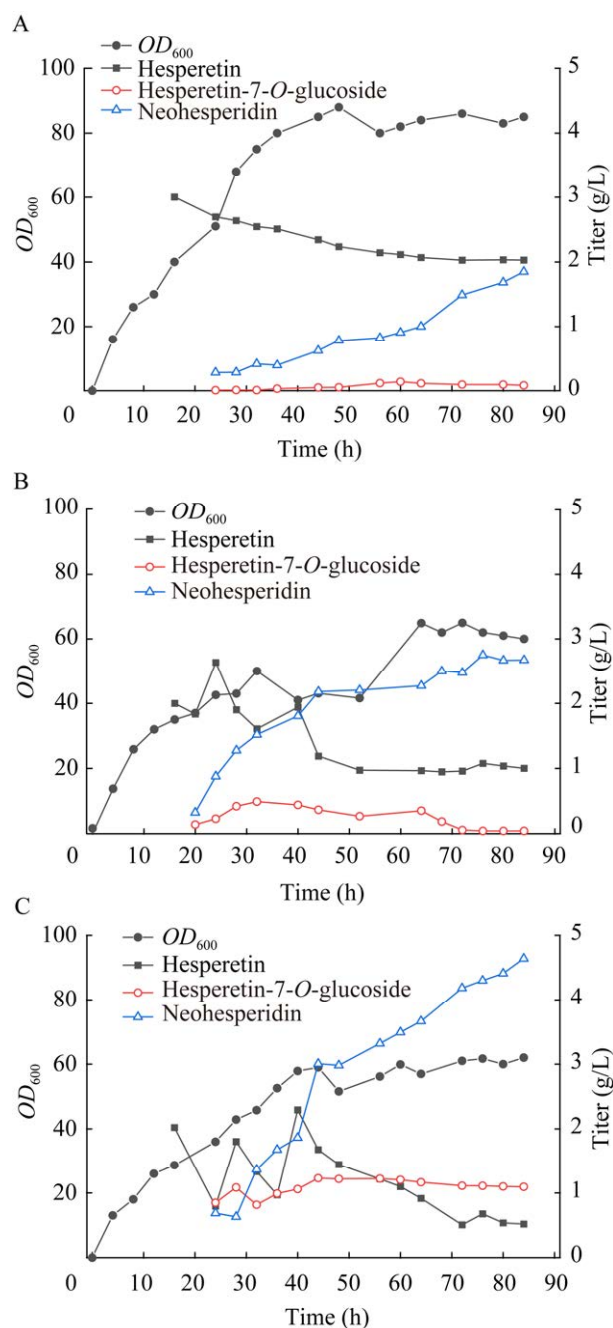


图8 不同添加方式下5 L发酵罐的橙皮素、橙皮素-7-O-葡萄糖苷、新橙皮苷含量以及细胞浓度

Figure 8 Titers and cell density of hesperetin, hesperetin-7-O-glucoside and neohesperidin in a 5 L fermenter under different adding ways. A: Adding 3 g/L hesperetin in one time. B: Adding 3 g/L hesperetin in two times. C: Adding 5 g/L hesperetin in three times.

本研究筛选出高效黄酮-7-O-葡萄糖基转移酶 UGT73B2, 引入不依赖 NADPH、可自给自足地将 UDP-葡萄糖转化为 UDP-鼠李糖的鼠李糖合酶(VvRHM-NRS)^[22], 以及鉴定催化橙皮素-7-O-葡萄糖苷合成新橙皮苷的鼠李糖基转移酶 *Cm1,2RhaT*。在摇瓶水平确定重组菌株适宜的催化条件, 并在 5 L 发酵罐上进行了放大试验, 最终新橙皮苷的产量达到 4.64 g/L, 这是目前报道的微生物异源合成新橙皮苷的最高产量。在新橙皮苷合成过程仍然有大量的橙皮素-7-O-葡萄糖苷剩余, 如何提高新橙皮苷的产率是异源合成黄酮类糖苷待解决的关键问题。

新橙皮苷是由糖基转移酶催化苷元橙皮素与 UDP-葡萄糖和 UDP-鼠李糖缀合而成。研究表明, 大肠杆菌内源拥有 UDPG 合成路径^[14]。UDPG 的充足供应对糖苷类化合物的生物合成至关重要。以往的研究表明, 强化菌株内源 UDPG 的供给有利于提高糖苷类化合物的合成。Leonard 等以大肠杆菌为宿主, 通过过量表达核苷二磷酸激酶编码基因 *ndk* 增强了 UDPG 的供应^[35], 最终使花青素产量提升至 113 mg/L。Shrestha 等通过引入异源 UDPG 生物合成基因, 增强了大肠杆菌合成 UDPG 的能力^[36]。本研究所用重组菌株 EG11 是以 *E. coli* BL21(DE3) 作为出发菌株, 通过阻断糖酵解通路和敲除 UDPG 旁路基因, 使其具备供应充足 UDPG 的能力^[13]。然而, 该菌株糖酵解途径中 2 个关键基因 *pgi* 和 *zwf* 已被敲除, 可能会对细胞代谢造成不利影响。tang 等在阻断糖酵解途径的同时, 引入甘油作为第二碳源, 通过调节甘油分解代谢和葡萄糖转化, 合成 UDPG 的同时兼顾细胞生长^[30]。因此, 本研究在发酵过程中添加了葡萄糖以促进 UDPG 的合成。同时, 还添加了甘油作为辅助碳源, 以保证工程菌株的正常生长。此外, 除了对菌株进行代谢工程改造, 也可以

利用定点突变、易错 PCR 和 DNA 重排等技术对糖基转移酶进行定向进化, 制备高活性糖基转移酶元件, 并解析酶结构与功能之间的“关系”^[37]。

REFERENCES

- [1] HUSSAIN T, TAN B, MURTAZA G, LIU G, RAHU N, SALEEM KALHORO M, HUSSAIN KALHORO D, ADEBOWALE TO, USMAN MAZHAR M, REHMAN ZU, MARTÍNEZ Y, AKBER KHAN S, YIN YL. Flavonoids and type 2 diabetes: evidence of efficacy in clinical and animal studies and delivery strategies to enhance their therapeutic efficacy[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 152: 104629.
- [2] XIAO JB. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: which show better biological significance?[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(9): 1874-1905.
- [3] VEITCH NC, GRAYER RJ. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins[J]. *Natural Product Reports*, 2008, 25(3): 555-611.
- [4] GANDHI GR, VASCONCELOS ABS, WU DT, LI HB, ANTONY PJ, LI H, GENG F, GURGEL RQ, NARAIN N, GAN RY. *Citrus* flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: a systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies[J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2907.
- [5] XIA N, WAN WJ, ZHU SM, LIU Q. Synthesis of hydrophobic propionyl neohesperidin ester using an immobilized enzyme and description of its anti-proliferative and pro-apoptotic effects on MCF-7 human breast cancer cells[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 1025.
- [6] ORTIZ AC, FIDELES SOM, REIS CHB, BELLINI MZ, PEREIRA ESBM, PILON JPG, de MARCHI MÂ, DETREGIACHI CRP, FLATO UAP, TRAZZI BFM, PAGANI BT, PONCE JB, GARDIZANI TP, VERONEZ FS, BUCHAIM DV, BUCHAIM RL. Therapeutic effects of *Citrus* flavonoids neohesperidin, hesperidin and its aglycone, hesperetin on bone health[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(5): 626.
- [7] ZHANG JK, ZHU XY, LUO FL, SUN CD, HUANG JZ, LI X, CHEN KS. Separation and purification of neohesperidin from the albedo of *Citrus reticulata* cv. *Suavissima* by combination of macroporous resin and high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2012, 35(1): 128-136.
- [8] FRYDMAN A, WEISSHAUS O, HUHMAN DV, SUMNER LW, BAR-PELED M, LEWINSOHN E, FLUHR R, GRESSEL J, EYAL Y. Metabolic engineering of plant cells for biotransformation of hesperidin into neohesperidin, a substrate for production of the low-calorie sweetener and flavor enhancer NHDC[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(25): 9708-9712.
- [9] LI HB, MA WJ, LYV Y, GAO S, ZHOU JW. Glycosylation modification enhances (2S)-naringenin production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(7): 2339-2347.
- [10] XIAO ZQ, WANG YT, LIU J, ZHANG SQ, TAN XJ, ZHAO YF, MAO JW, JIANG N, ZHOU JW, SHAN Y. Systematic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* chassis for efficient flavonoid-7-O-disaccharide biosynthesis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(9): 2740-2749.
- [11] LIU J, TIAN MM, WANG Z, XIAO FY, HUANG X, SHAN Y. Production of hesperetin from naringenin in an engineered *Escherichia coli* consortium[J]. *Journal of Biotechnology*, 2022, 347: 67-76.
- [12] LIU J, XIAO ZQ, ZHANG SQ, WANG Z, CHEN Y, SHAN Y. Restricting promiscuity of plant flavonoid 3'-hydroxylase and 4'-O-methyltransferase improves the biosynthesis of (2S)-hesperetin in *E. coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(25): 9826-9835.
- [13] LIU SK, LI D, QIN ZJ, ZENG WZ, ZHOU JW. Enhancing glycosylation of flavonoids by engineering the uridine diphosphate glucose supply in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(46): 17842-17851.
- [14] PEI JJ, SUN Q, ZHAO LG, SHI H, TANG F, CAO FL. Efficient biotransformation of luteolin to isoorientin through adjusting induction strategy, controlling acetic

- acid, and increasing UDP-glucose supply in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(1): 331-340.
- [15] LIANG DM, LIU JH, WU H, WANG BB, ZHU HJ, QIAO JJ. Glycosyltransferases: mechanisms and applications in natural product development[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(22): 8350-8374.
- [16] MCARTHUR JB, CHEN X. Glycosyltransferase engineering for carbohydrate synthesis[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(1): 129-142.
- [17] LIU XG, LIN CL, MA XD, TAN Y, WANG JZ, ZENG M. Functional characterization of a flavonoid glycosyltransferase in sweet orange (*Citrus sinensis*)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 166.
- [18] LI Y, GAO W, HUANG LQ. Identification of a flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase from *Andrographis paniculata*[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2020, 22(3): 279-286.
- [19] WU BP, LIU XH, XU K, ZHANG B. Genome-wide characterization, evolution and expression profiling of UDP-glycosyltransferase family in pomelo (*Citrus grandis*) fruit[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 459.
- [20] WAGSTAFF BA, ZORZOLI A, DORFMUELLER HC. NDP-rhamnose biosynthesis and rhamnosyltransferases: building diverse glycoconjugates in nature[J]. *The Biochemical Journal*, 2021, 478(4): 685-701.
- [21] GU N, QIU C, ZHAO LG, ZHANG LH, PEI JJ. Enhancing UDP-rhamnose supply for rhamnosylation of flavonoids in *Escherichia coli* by regulating the modular pathway and improving NADPH availability[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(35): 9513-9523.
- [22] PEI JJ, CHEN AN, SUN Q, ZHAO LG, CAO FL, TANG F. Construction of a novel UDP-rhamnose regeneration system by a two-enzyme reaction system and application in glycosylation of flavonoid[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 139: 33-42.
- [23] FRYDMAN A, WEISSHAUS O, BAR-PELED M, HUHMANN DV, SUMNER LW, MARIN FR, LEWINSOHN E, FLUHR R, GRESSEL J, EYAL Y. *Citrus* fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene *Cml2RhaT* encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of *Citrus*[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2004, 40(1): 88-100.
- [24] FRYDMAN A, LIBERMAN R, HUHMANN DV, CARMELI-WEISSBERG M, SAPIR-MIR M, OPHIR R, SUMNER LW, EYAL Y. The molecular and enzymatic basis of bitter/non-bitter flavor of citrus fruit: evolution of branch-forming rhamnosyltransferases under domestication[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2013, 73(1): 166-178.
- [25] OHASHI T, HASEGAWA Y, MISAKI R, FUJIYAMA K. Substrate preference of citrus naringenin rhamnosyltransferases and their application to flavonoid glycoside production in fission yeast[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(2): 687-696.
- [26] WANG HJ, WANG L, CHEN JB, HU ML, FANG F, ZHOU JW. Promoting FADH₂ regeneration of hydroxylation for high-level production of hydroxytyrosol from glycerol in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(44): 16681-16690.
- [27] 王彩霞, 陈士林, 薛强, 苏新尧, 刘佳柔, 于宛彤. 一种鼠李糖转移酶基因、制备方法及其表达和应用: CN114231545b[P]. 2023-06-20.
- WANG CX, CHEN SL, XUE Q, SU XY, LIU JR, YU WT. Rhamnosyltransferase gene, preparation method and application of rhamnosyltransferase gene: CN114231545B[P]. 2023-06-20 (in Chinese).
- [28] PEI JJ, DONG P, WU T, ZHAO LG, FANG XY, CAO FL, TANG F, YUE YD. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for astragalin biosynthesis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(42): 7966-7972.
- [29] EINSFELDT K, SEVERO JÚNIOR JB, CORRÊA ARGONDISSO AP, MEDEIROS MA, ALVES TLM, ALMEIDA RV, LARENTIS AL. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid

- stability[J]. *Vaccine*, 2011, 29(41): 7136-7143.
- [30] TANG EJ, SHEN XL, WANG J, SUN XX, YUAN QP. Synergetic utilization of glucose and glycerol for efficient *myo*-inositol biosynthesis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(4): 1247-1252.
- [31] AKHTER S, ARMAN MSI, TAYAB MA, ISLAM MN, XIAO JB. Recent advances in the biosynthesis, bioavailability, toxicology, pharmacology, and controlled release of citrus neohesperidin[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022: 1-20.
- [32] FALCONE FERREYRA ML, RODRIGUEZ E, CASAS MI, LABADIE G, GROTEWOLD E, CASATI P. Identification of a bifunctional maize C- and O-glucosyltransferase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(44): 31678-31688.
- [33] MRUDULAKUMARI VASUDEVAN U, LEE EY. Flavonoids, terpenoids, and polyketide antibiotics: role of glycosylation and biocatalytic tactics in engineering glycosylation[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 41: 107550.
- [34] JI Y, LI BZ, QIAO M, LI JM, XU H, ZHANG LH, ZHANG X. Advances on the *in vivo* and *in vitro* glycosylations of flavonoids[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(15): 6587-6600.
- [35] LEONARD E, YAN YJ, FOWLER ZL, LI Z, LIM CG, LIM KH, KOFFAS MAG. Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, 5(2): 257-265.
- [36] SHRESTHA A, PANDEY RP, DHAKAL D, PARAJULI P, SOHNG JK. Biosynthesis of flavone C-glucosides in engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(3): 1251-1267.
- [37] YANG S, HOU XD, DENG ZW, YANG LF, PING Q, YUAN ZB, ZHANG Y, RAO YJ. Improving the thermostability of glycosyltransferase YojK by targeting mutagenesis for highly efficient biosynthesis of rebaudioside D[J]. *Molecular Catalysis*, 2023, 535: 112898.

(本文责编 郝丽芳)