

微生物合成根皮素及其糖苷研究进展*

刘金丛¹ 刘雪¹ 於洪建² 赵广荣^{1**}

(1 天津大学化工学院 教育部合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300072)

(2 天津市益倍生物科技集团 天津 300450)

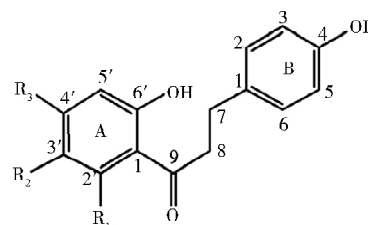
摘要 根皮素及其糖苷是二氢查耳酮类天然产物,具有抗氧化、抗炎和抑菌等多种生理活性,可应用于食品、药品、化妆品等行业。目前,根皮素及其糖苷主要从植物中提取,但含量低、组分复杂制约了高效、低成本的分离制备。随着合成生物学的发展,工程微生物生产根皮素及其糖苷将是一种有潜力的方法。综述了微生物合成根皮素及其糖苷的关键基因鉴定、代谢途径重构和优化策略,并针对酶的特异性差、副产物多等问题提出了技术对策。

关键词 根皮素 根皮素糖苷 微生物合成 代谢工程 合成生物学

中图分类号 Q819

根皮素(phloretin)及其糖苷是二氢查耳酮类的植物天然产物,广泛存在于蔷薇科苹果属植物中,与查耳酮类的黄酮不同之处在于A环和B环之间的7~8位碳原子之间为饱和键^[1](图1)。根皮素抗氧化活性极强,并具有广泛的抑菌活性,能够开发为防腐剂应用于食品行业^[2-3]。此外,根皮素的2'-糖苷产物根皮苷(phlorizin)具有降血糖作用,主要靶点是钠-葡萄糖协同转运蛋白2(sodium-dependent glucose transporters 2, SGLT-2)。以根皮苷为模型药效团,模拟设计和化学合成的多种SGLT2抑制剂已经批准上市,应用于治疗糖尿病^[4]。根皮素的4'-糖苷产物三叶苷(trilobatin)的甜度约为蔗糖的300倍,可作为食品添加剂和商用的甜味剂^[5]。根皮素的3'-糖苷产物诺瑟法根(nothofagin)是很强的抗氧化剂,同时具有肾脏疾病治疗的潜力^[6]。因此,根皮素及其糖苷产物在医药、食品、化妆品等各个领域都有着巨大的市场应用前景。

目前根皮素及其糖苷产物主要从植物中提取分离获取^[7],但其常常与柚皮素、黄烷酮、黄烷醇及其他一些类黄酮类物质共同存在,而且含量较低,造成分离纯化工艺复杂,大规模、高纯度制备受到限制。近年来,随着代谢工程以及合成生物学技术的迅速发展,对微生物进行代谢工程改造,构建细胞工厂合成天然产物



R₁=R₃=OH R₂=H Phloretin
R₁=O-Glc R₃=OH R₂=H Phlorizin
R₁=OH R₂=O-Glc R₃=H Trilobatin
R₁=R₃=OH R₂=C-Glc Nothofagin

图1 根皮素及其糖苷化合物结构

Fig.1 Structures of phloretin and its glucosides

成为研究热点^[8-9]。但是,微生物中根皮素及其糖苷的生物合成途径长、反应复杂,对以发酵糖为原料的工程菌的设计、构建和优化带来诸多挑战。本文系统综述了微生物合成根皮素及其糖苷的新进展,包括根皮素及其糖苷合成的关键基因鉴定、微生物代谢途径的重构和优化,并对存在的问题探讨了可能的技术对策。

1 微生物合成根皮素

1.1 根皮素生物合成途径关键基因的鉴定

根皮素与柚皮素查耳酮结构相似(图2),其生物合成都属于苯丙烷途径。柚皮素查耳酮的生物合成途径已被解析,从苯丙氨酸出发,经过苯丙氨酸氨解酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、肉桂酸4-羟化酶

收稿日期: 2020-05-31 修回日期: 2020-06-25

* 国家自然科学基金(31870077)资助项目

**通讯作者,电子邮箱: grzhao@tju.edu.cn

(cinnamate-4-hydroxylase, C4H) 和细胞色素 P450 还原酶(cytochrome P450 reductase, CPR) 催化, 生成 4-香豆酸; 在 4-香豆酰-CoA 连接酶(4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL) 催化下, 生成 4-香豆酰-CoA; 在查耳酮合成酶

(chalcone synthase, CHS) 催化下, 1 分子 4-香豆酰-CoA 和 3 分子丙二酰-CoA 发生克莱森(Claisen) 缩合, 生成柚皮素查耳酮, 紧接着发生自发反应或在查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI) 催化下生成柚皮素(图 2)。

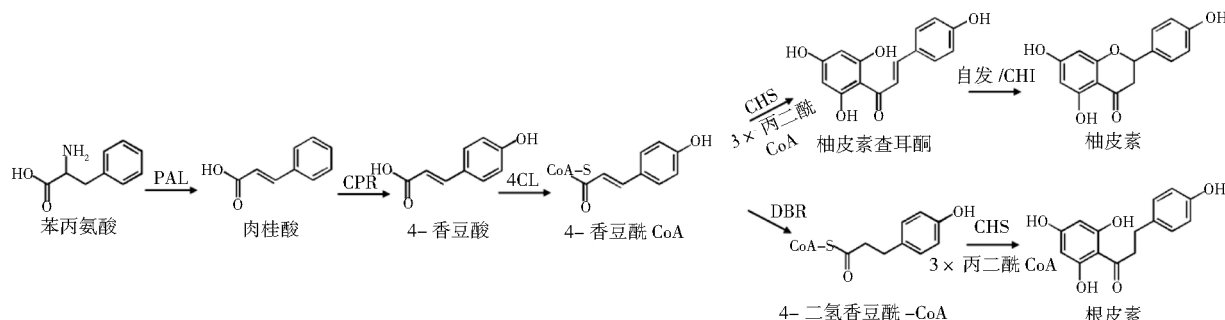


图 2 根皮素和柚皮素生物合成途径

Fig. 2 Biosynthesis pathway of phloretin and naringenin

PAL: phenylalanine ammonia lyase, CPR: cytochrome P450 reductase, 4CL: 4-coumarate-CoA ligase, DBR: double-bond reductase, CHS: chalcone synthase, CHI: chalcone isomerase

基于根皮素的结构和查耳酮合成途径, Avadhani 等^[6]推测 4-二氢香豆酸可能是根皮素合成的前体, 但放射性同位素标记肉桂酸实验表明, 植物中 4-香豆酸是根皮素生物合成的前体, 而不是 4-二氢香豆酸。Gosch 等^[11]将 4-香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 及苹果中酶提取物进行离体反应, 同时检测到根皮素和柚皮素; 但将酶提取物失活后, 加入重组的 CHS 和 CHI, 只有产物柚皮素。该研究表明苹果植物中确实存在双键还原酶(double-bond reductase, DBR), 催化 4-香豆酰-CoA 还原生成 4-二氢香豆酰-CoA, 进而被 CHS 催化合成根皮素。采用同源克隆策略, Dare 等^[12]和 Ibdah 等^[13]以拟南芥(*Arabidopsis*) 来源的烯酰基载体蛋白还原酶和烯酰-CoA 还原酶基因序列为模板, 从苹果的表达式标签数据库中筛选并实验鉴定出三种 NADPH 依赖型 DBR, 能催化底物 4-香豆酰 CoA 生成 4-二氢香豆酰 CoA, 由此解析了根皮素的生物合成途径(图 2)。Gosch 等^[11]和 Yahya 等^[14]研究了苹果中的多种 CHS, 但都能以 4-香豆酰-CoA 为底物合成查耳酮, 以 4-二氢香豆酰-CoA 为底物合成根皮素, 没有发现和鉴定出对 4-二氢香豆酰-CoA 具有立体和结构选择性的特异 CHS。可见, CHS 是查耳酮和根皮素合成的共有酶。在不同的植物中, 由于 CHS 底物及其丰度不同, 导致合成了不同黄酮类产物。

1.2 微生物中根皮素代谢途径的重构

微生物中存在合成芳香氨基酸的代谢途径, 可从苯丙氨酸的代谢节点切入, 由异源的 PAL、C4H/CPR、4CL、

DBR、CHS 等重构根皮素代谢途径(图 3), 在工程微生物中合成根皮素。非常意外的是, 其他酶都能在酵母等微生物中实现功能, 唯独植物来源的 DBR 在微生物中不起作用^[6-11]。在酵母中异源表达其他黄酮合成途径时, 却检测到了根皮素^[13], 据此推测酵母中存在内源酶参与了从 4-香豆酰辅酶 A 到根皮素的代谢过程。随后 Lehka 等^[14]通过基因敲除和过表达的体内实验, 从酵母中鉴定了 Tsc13 和 Dfg10 两个内源酶, 这两种酶可能参与将 4-香豆酰辅酶 A 还原生成 4-二氢香豆酰辅酶 A 的反应。Eichenberger 等^[17]进一步测试了酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母、细枝真杆菌和丙酮丁醇梭菌等微生物来源以及拟南芥、苹果、棉花、覆盆子等植物来源的同源 DBR, 发现只有酿酒酵母的 Tsc13 具有 DBR 功能。在此基础上, 在酿酒酵母中异源表达 PAL、C4H、CPR1、At4CL2、HaCHS 和酵母内源的 Tsc13 成功实现了根皮素的从头合成, 发酵合成了 42.7 mg/L 根皮素^[17]。此外, Eichenberger 等^[17]从合成根皮素时, 检测到约 40 mg/L 的 4-二氢香豆酸, 表明酵母内存在一种未知的酶, 能将 4-二氢香豆酰 CoA 还原生成 4-二氢香豆酸, 同时 HaCHS 催化 4-二氢香豆酰 CoA 效率较低, 是主要的限速步骤。

利用 4CL 的底物宽泛性, 直接添加 4-二氢香豆酸作为前体, 是微生物合成根皮素的另一种策略。在酿酒酵母中异源表达 4CL 和 CHS, 添加前体 4-二氢香豆酸, 可合成根皮素^[18-19](表 1)。然而在大肠杆菌中异源表达 4CL 和 CHS, 在产物中检测到了微量的根皮素^[20]。

在酵母中合成根皮素时,除生成副产物柚皮素外,另一个副产物是二氢-双去甲基-洋高宁(dihydro-bisnoryangonin, 2H-BNY)。CHS 催化根皮素合成过程中,4-二氢香豆酰辅酶 A 结合 2 分子丙二酰辅酶 A,随后发生 C5→C1 环化生成脱轨产物 2H-BNY(图 3)。以 4-二氢香豆酸为前体,在酵母中异源表达拟南芥的 At4CL 和金丝桃的 HaCHS,催化合成 36mg/L 根皮素,但同时检测到 2.0mg/L 的 2H-BNY^[8]。在离体实验中,除了 2H-BNY 之外,地钱的 MpCHS 催化 4-二氢香豆酰-CoA 缩合 3 分子丙二酰-CoA,发生 C5→C1 环化生成脱轨副产物二氢-香豆酰三乙酸内酯(dihydro-coumaroyltriaceticacid lactone, 2H-CTAL)^[9](图 3)。

1.4 微生物合成根皮素的代谢途径优化

1.4.1 查尔酮合成酶筛选提高根皮素代谢流 为了减少柚皮素的合成,筛选 CHS 将有利于提高产物根皮素合成强度。在酵母从头合成根皮素代谢途径中,Eichenberger 等^[7]测试 8 种植物来源的 CHS,结果表明,金丝桃的 HaCHS 合成根皮素的产量最高(42.7mg/L),苹果的 CHS2、CHS1,大麦的 CHS2,梨的 CHS1(21.0 mg/L~12.0 mg/L)次之,矮牵牛和高粱的 CHS 合成根皮素最少(1.0 mg/L)。除了大麦的 CHS2 几乎没有生成副产物以外,其他 CHS 都生成一定量副产物柚皮素。

CHS 不仅决定副产物柚皮素的生成,也决定脱轨产物 2H-BNY 的产生。中国科学院天津工业生物技术研究所江会峰研究组^[9]在酵母中对 14 种植物来源的 CHS 进行筛选,结果表明,灯盏花的 ErbCHS 合成根皮素的能力最高(63.3mg/L),相比向日葵的 HeaCHS 提高了 30%,脱轨产物 2H-BNY 的占比从 33% 下降到 25%。除了 ErbCHS 以外,高粱的 CHS、沙梨的 CHS 也表现出较好的根皮素合成活性,和 ErbCHS 相比,根皮素产量略低,2H-BNY 无明显增加。其他来源 CHS,如黄芪的 CHS、柑桔的 CHS、连翘的 CHS 以及苹果的 CHS2 表现出较为相似的活性,根皮素产量较低,但副产物 2H-BNY 较多。而欧芹的 CHS、葡萄的 CHS、矮牵牛的 CHS 和苹果的 CHS1,合成根皮素和 2H-BNY 都较少,整体活性较低。

除了筛选策略以外,对 CHS 酶进行突变改造,以提高根皮素合成能力。Yu 等^[10]对地钱的 MpCHS1 进行突变改造,研究了不同突变体对根皮素合成的影响。与野生型相比,活性腔内的突变体 I266V,对根皮素合

成几乎没有影响,但脱轨产物 2H-CTAL 却增加了约 1.4 倍;对活性腔外的 383~385 位点进行突变,根皮素产量提高近 1.5 倍,同时 2H-CTAL 降低约一半^[10]。此外,结构分析显示,MpCHS1 的 α -螺旋的区域(残基 278~295)与 CHS 同源序列的保守区域差异较大,将该区域置换为首蓿 MsCHS 的对应残基,根皮素产量提高约 1.2 倍^[11]。

1.4.2 增加丙二酰辅酶 A 供应提高根皮素产量 在 CHS 催化下,1 分子 4-二氢香豆酰-CoA 需要和 3 分子丙二酰-CoA 发生 Claisen 缩合反应生成 1 分子根皮素,为了提高微生物合成根皮素的效率,对底盘细胞的基因组进行必要改造,增加丙二酰-CoA 的供应,能显著提高根皮素的合成能力。江会峰研究组^[9]将醇脱氢酶基因 ADH2、醛脱氢酶基因 ALD6、乙酰-CoA 合成酶基因整合在酵母染色体上,同时质粒表达丙二酸转运基因,增加丙二酰-CoA 的供应,使根皮素合成提高到 83.2mg/L,2H-BNY 占比从 25% 降至 17%。在 5L 发酵罐,进行补料流加,发酵 60h,合成了 452.6mg/L 根皮素^[9]。进一步在 YORW Δ 17 位点上回补 *his1* 和 *ade2* 基因,改善了工程酵母菌株的生长。在 5L 发酵罐中,补料发酵 60h,合成了 619.5mg/L 根皮素^[9]。

2 微生物合成根皮素糖苷

2.1 糖苷合成酶的系统发育

根据黄酮的糖基化修饰底物位点的特异性,糖基转移酶(glycosyltransferases, GTs)分为 O-糖基转移酶(O-UDP-glycosyltransferase, OGT)和 C-糖基转移酶(C-glycosyltransferase, CGT)。以根皮素为底物,对报道催化功能明确的 18 个糖基转移酶的氨基酸序列,采用邻接法构建系统发育树。如图 4 所示,根皮素糖基转移酶分为 2 大类群。OGT 催化根皮素的 2'或 4'位碳氧糖基化,CGT 催化根皮素的 3'或 5'位碳碳糖基化。根皮素 OGT 与 CGT 在进化上相对独立,执行不同的位置功能,赋予产物不同特性。

2.1.1 OGT 的特异性 目前已经鉴定出多个根皮素的 O-糖基转移酶,但底物特异性却各不相同。苹果的 UGT88F1 和 UGT88F8 同源性达到 82.2%,具有严格的底物特异性,在体外实验中以根皮素为单一底物,在根皮素 2'位碳氧糖基化,催化生成根皮苷^[2]。苹果的 MdPGT1 和梨的 UGT88F2 分别与 UGT88F1 同源性达到 99.8% 和 99.2%,特异性催化根皮苷的生成^[23-25]。

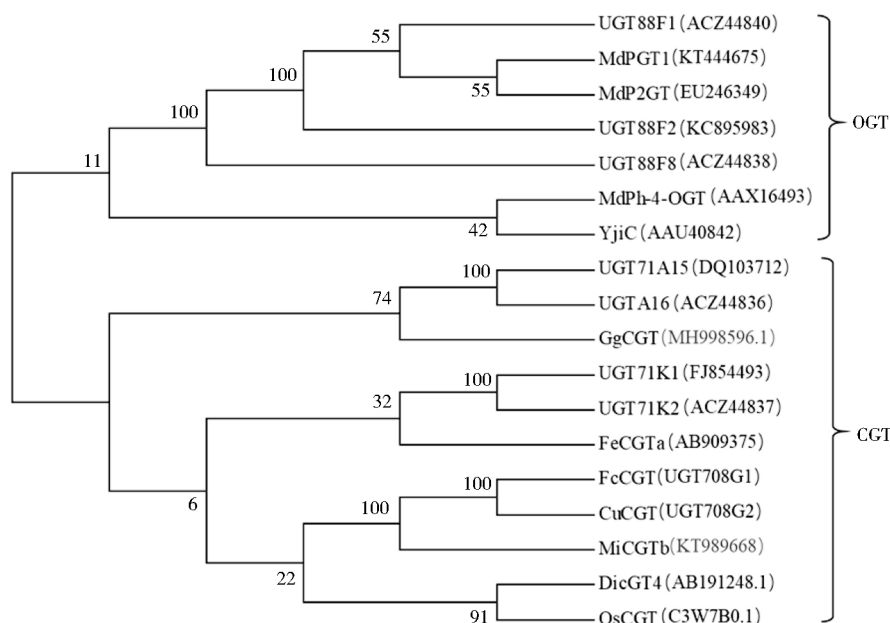


图4 根皮素糖基转移酶的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of selected phloretin glycosyltransferases

Genbank accession number for each protein is shown in brackets

除了 UGT88F1 等少数具有底物和位置的特异性外,从苹果和梨中鉴定出多种糖基转移酶却表现出底物宽泛性,这与不同植物的主要底物和细胞内环境是一致的。如苹果的 UGT A15 和 UGT71K1、梨的 UGT71K2 和 UGT A16 的区域选择性较低,它们具有 2'-OGT 功能,却同时表现出 4'-OGT 活性,生成三叶苷^[23]。这四种酶与 UGT88F1 的同源性在 33.4% ~ 34.0% 之间,在以根皮素为底物时,这四种酶主要合成根皮苷,只有少量的三叶苷生成,这与苹果属植物中以根皮苷为主要糖苷衍生物、三叶苷含量较低是一致的。尽管苹果的 MdP2'-GT 和 UGT88F1 同源性高达 98.8%,但 MdP2'-GT 却表现出更广泛的底物接受性和区域特异性,除了催化生成根皮苷外,也可催化山奈酚和槲皮素等中间环 3 位、异甘草素物质 B 环 4 位、木犀草素 7 位的糖基化^[24]。结构分析表明, MdP2'-GT 具有 $\alpha/\beta/\alpha/\beta$ 结构,相比 UGT88F1 的 $\beta/\alpha/\beta$ 折叠多一个 α -螺旋结构,创造更有利的疏水环境,为底物和 MdP2'-GT 之间提供稳定的相互作用。MdP2'-GT 的受体结合袋中甘氨酸残基提供了较小的侧链,为底物赋予足够的空间可利用性,使 MdP2'-GT 表现出更高的底物宽泛性和催化活性^[24]。苹果的 MdPh-4'-OGT 与 UGT88F1 同源性为 22.8%,对底物的选择也比较宽泛,可高效催化根皮素的 4'位碳氧糖

基化,同时接受槲皮素、柚皮素、儿茶素、花青素等多种底物发生糖基化^[25]。这可能是由于关键活性位点差异影响了酶的底物结合口袋和与底物特异性结合。地衣芽孢杆菌的 YjiC 糖基转移酶特异性低,催化多种黄酮类物质不同位点的糖基化,也包括根皮素的 2'位和 4'位糖基化^[26]。

2.1.2 CGT 的特异性 相比较 OGT,CGT 的特异性较强。水稻的 OsCGT 和荞麦的 FeCGTa 可特异性催化根皮素 3'-糖基化生成诺瑟法根^[29-31],是南非茶中重要的抗氧化活性物质。有些 3'-CGT 可催化根皮素的双糖基化,如金橘的 FeCGT 和蜜橘的 CuCGT、甘草的 GgCGT 催化根皮素 3'位糖基化生成诺瑟法根,随后在 5'位发生糖基化反应,生成 3'-5'-二-C-根皮苷(3',5'-di-C-glucosylphloretin)^[31-33]。研究表明,GgCGT 的关键位点 G389K 突变可使 GgCGT 失去二-C-糖基化功能,转变为单一的 3'位 C-糖基化酶^[33]。

尽管 OGT 和 CGT 在进化上相对独立,但也存在个别例外酶。UGT71A15、UGT A16 和 UGT71K1、UGT71K2 虽然在进化树上处于 CGT 分支,却具有 OGT 的催化活性,因而不属于 CGT(图4)。此外,还发现了 O-糖基化和 C-糖基化的双功能酶,如芒果的 MiCGTb 具有 O-糖基水解和 C-糖基化的双重功能,先催化根皮苷去 O-糖基,紧接着 C-糖基化,生成诺瑟法根^[33]。

2.2 微生物合成根皮素糖苷

对根皮素的微生物合成途径进一步拓展,表达根皮素糖基转移酶基因,便可在微生物中从头合成根皮素糖苷。在合成根皮素的酵母中,分别表达 MdUGT88F1、MdUGT88A1、PcUGT88F2 和 DcGT4,发现只有 MdUGT88A1 和 PcUGT88F2 能有效合成根皮苷,产量接近为 65 mg/L^[17]。采取相同思路,在合成根皮素的酵母中表达 OseCGT,合成了 59 mg/L 诺瑟法根;表达 AtUGT73B2、AtUGT76D1 和 AtUGT84B1,只有 AtUGT73B2 具有功能,催化合成 32.8 mg/L 三叶苷和 1.6 mg/L 根皮苷^[17]。

3 总结与展望

植物中根皮素及其糖苷生物合成途径中的主要酶得到鉴定,为微生物合成奠定了基础。目前只在酿酒酵母中实现了从葡萄糖合成根皮素及其糖苷的合成途径,但关键功能酶催化活性不足和生成多种副产物问题还没有得到根本解决。扩大物种范围,广泛地挖掘具有底物特异性、产物专一性的 4CL、DBR、CHS 仍然是重构途径主要的技术挑战。使用不同菌种,理性分配代谢途径,优化发酵过程,也是切实可行的技术对策。为了改进和提高微生物发酵根皮素及其糖苷的产量及其种类,未来的研究重点应主要集中在几下方面。

3.1 生物大数据挖掘新酶,突破根皮素及其糖苷合成途径的瓶颈

深入解析根皮素及其糖苷的生物合成途径,挖掘活性高、特异性强的关键功能酶元件,提高合成效率,减少副产物。在植物中,并未检测到根皮素的脱轨产物,但在酵母中进行异源表达黄酮途径,就产生大量脱轨产物。推测可能存在某种辅助蛋白,使 CHS 在植物细胞内环境下不发生脱轨^[64]。同时,CHS 对 4-香豆酰-CoA 亲和性高于 4-二氢香豆酰-CoA,是生成副产物柚皮素的主要原因。除了特异性的根皮素 2'-糖基化酶外,还没有鉴定出根皮素 4'-位专一性的糖基转移酶。以根皮素及其糖苷丰富的蔷薇科、多穗科等植物为材料,进行转录组和代谢物组的跨组学分析,将基因表达与中间代谢物偶联,进行细胞内的共表达代谢分析^[65],从而发现新基因,鉴定途径中对 4-二氢香豆酰-CoA 特异的 CHS。采用蛋白质相互作用的研究方法,发现和鉴定植物细胞内 CHS 反应组成及其辅助蛋白,解析 CHS 复合物的催化机理,从而指导在微生物中重构根皮素的异源途径。

从植物以外的生物中,挖掘参与根皮素的合成酶。

虽然在酵母中鉴定出了 Tsc13 能催化 4-香豆酰-CoA 生成 4-二氢香豆酰-CoA,但该酶是 6 次跨膜蛋白,难以在大肠杆菌等细菌中异源表达应用。在植物乳杆菌中鉴定出 4-香豆酸还原酶,能在体外催化 4-香豆酸双键的加氢还原反应,生成 4-二氢香豆酸^[66]。红球菌^[67]和蓝藻^[68]可将查耳酮还原为二氢查耳酮,还没有被异源表达证实其功能。从这些微生物基因组中挖掘烯还原酶,可望用于构建微生物中多途径根皮素异源合成,同时减轻脱轨产物生成。

3.2 蛋白质工程创新高活性功能酶,提高催化效率

对 4CL 和 CHS 进行理性设计和突变改造,筛选对底物特异性、产物专一性的功能酶。根皮素、柚皮素等多种黄酮类化合物可对生物调控蛋白 TtgR 等做出响应^[69],因此可设计生物感应系统以简化 4CL、CHS 随机突变体的筛选,以获得高效催化 4-二氢香豆酰-CoA 连接反应的 4CL 以及根皮素合成的 CHS。不同来源的 CHS 的酶促反应中,生成脱轨产物的种类和含量差异较大。目前已经有多种 CHS 的晶体结构和催化机理得到解析^[64],起催化功能的底物结合口袋、辅酶 A 结合腔和环化口袋等结构上的稍许改动对其底物特异性、延伸长度和环化方式有很大影响。可通过模拟对接预测,进行饱和突变和组合突变,通过理性设计,结合生物传感筛选,获得底物特异性和产物专一强的 4CL 和 CHS,用于微生物发酵合成根皮素。

3.3 研发建立混菌培养系统,强化发酵过程

从分子生源结构看,根皮素的前体是二氢香豆酸和乙酰-CoA,分属来源于糖酵解和芳香氨基酸代谢,而且需要磷酸戊糖途径供应还原力。对于根皮素糖苷,糖基供体 UDP-葡萄糖含量低也是限制因素。即使对底盘细胞代谢的深度改造,单菌很难全面满足根皮素的高效碳代谢和能量代谢。近年来发展了混菌发酵的共培养模式,已经在白藜芦醇^[41]、姜黄素^[42]、花青素^[43]等黄酮产物的微生物合成中得到应用。本实验室采用双菌系统,共培养发酵红景天苷产量达到 6 g/L、阿克拉苷 D2 产量达到 2.9 g/L^[44-45]。混菌共培养可期待成为解决根皮素及其糖苷微生物合成的有效技术。

参考文献

- [1] Mariadoss A V A, Vinyagam R, Rajamanickam V, et al. Pharmacological aspects and potential use of phloretin: a systemic review. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2019,

- 19(13):1060-1067.
- [2] Zheng W, Chen C, Zhang C, et al. The protective effect of phloretin in osteoarthritis: an in vitro and in vivo study. *Food & Function*, 2018, 9(1):263-278.
- [3] 冯甜, 王力彬, 周楠, 等. 根皮素的研究进展. *转化医学杂志*, 2017, 6(1):42-46.
- Feng T, Wang L, Zhou N, et al. Advance in studies on phloretin. *Translational Medicine Journal*, 2017, 6(1):42-46.
- [4] Bays H. Sodium glucose co-transporter type 2 (sglt2) inhibitors: targeting the kidney to improve glycemic control in diabetes mellitus. *Diabetes Therapy*, 2013, 4(2):195-220.
- [5] Lei L, Huang B, Liu A, et al. Enzymatic production of natural sweetener trilobatin from citrus flavanone naringin using immobilised α -l-rhamnosidase as the catalyst. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(9):2097-2103.
- [6] Yang S, Lee C, Lee B S, et al. Renal protective effects of aspalathin and nothofagin from rooibos (*Aspalathus linearis*) in a mouse model of sepsis. *Pharmacological Reports*, 2018, 70(6):1195-1201.
- [7] 崔树梅, 曹孟岑, 杨雪晨, 等. 根皮素在化妆品中的应用. *日用化学工业*, 2018, 48(2):113-118.
- Cui S M, Cao M C, Yang X C, et al. Applications of phloretin in cosmetics. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2018, 48(2):113-118.
- [8] Cravens A, Payne J, Smolke C D. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. *Nature Communications*, 2019, 10(1):2142.
- [9] Yang D, Park S Y, Park Y S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for natural product biosynthesis. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(7):745-765.
- [10] Avadhani P N, Towers G H. Fate of phenylalanine-C14 and cinnamic acid-C14 in *Malus* in relation to phloridzin synthesis. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1961, 39(10):1605-1616.
- [11] Gosch C, Halbwirth H, Kuhn J, et al. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh). *Plant Science*, 2009, 176(2):223-231.
- [12] Dare A P, Tomes S, Cooney J M, et al. The role of enoyl reductase genes in phloridzin biosynthesis in apple. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2013, 72:54-61.
- [13] Ibdah M, Berim A, Martens S, et al. Identification and cloning of an NADPH-dependent hydroxycinnamoyl-CoA double bond reductase involved in dihydrochalcone formation in *Malus x domestica* Borkh. *Phytochemistry*, 2014, 107:24-31.
- [14] Yahyaa M, Ali S, Davidovich-Rikanati R, et al. Characterization of three chalcone synthase-like genes from apple (*Malus x domestica* Borkh). *Phytochemistry*, 2017, 140:125-133.
- [15] Jiang H, Wood K V, Morgan J A. Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6):2962-2969.
- [16] Lehka B J, Eichenberger M, Bjorn-Yoshimoto W E, et al. Improving heterologous production of phenylpropanoids in *Saccharomyces cerevisiae* by tackling an unwanted side reaction of Tsc13, an endogenous double bond reductase. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(1):fox004.
- [17] Eichenberger M, Lehka B J, Folly C, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for de novo production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties. *Metabolic Engineering*, 2017, 39:80-89.
- [18] Werner S R, Chen H, Jiang H, et al, 2010. Synthesis of non-natural flavanones and dihydrochalcones in metabolically engineered yeast. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2010, 66(3):257-263.
- [19] Jiang C, Liu X, Chen X, et al. Raising the production of phloretin by alleviation of by-product of chalcone synthase in the engineered yeast. *Science China Life Sciences*, 2020, doi: 10.1007/s11427-019-1634-8.
- [20] Watts K T, Lee P C, Schmidt-Dannert C. Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *ChemBioChem*, 2004, 5(4):500-507.
- [21] Yu H N, Liu X Y, Gao S, et al. Structural and biochemical characterization of the plant type III polyketide synthases of the liverwort, *Marchantia paleacea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 125:95-105.
- [22] Elejalde-Palmett C, Billet K, Lanoue A, et al. Genome-wide identification and biochemical characterization of the UGT88F subfamily in *Malus x domestica* Borkh. *Phytochemistry*, 2019, 157:135-144.
- [23] Gosch C, Halbwirth H, Schneider B, et al. Cloning and heterologous expression of glycosyltransferases from *Malus x domestica* and *Pyrus communis*, which convert phloretin to phloretin 2'-O-glucoside (phloridzin). *Plant Science*, 2009, 178(3):299-306.
- [24] Gosch C, Flachowsky H, Halbwirth H, et al. Substrate specificity and contribution of the glycosyltransferase UGT71A15 to phloridzin biosynthesis. *Trees-Structure and Function*, 2012, 26(1):259-271.
- [25] Jugdé H, Nguy D, Moller I, et al. Isolation and characterization of a novel glycosyltransferase that converts phloretin to phlorizin, a potent antioxidant in apple. *FEBS Journal*, 2008, 275(15):3804-3814.
- [26] Zhang T, Liang J, Wang P, et al. Purification and

- characterization of a novel phloretin-2'-O-glycosyltransferase favoring phloridzin biosynthesis. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35274.
- [27] Yahyaa M, Davidovich-Rikanati R, Eyal Y, et al. Identification and characterization of UDP-glucose: Phloretin 4'-O-glycosyltransferase from *Malus x domestica* Borkh. *Phytochemistry*, 2016, 130: 47-55.
- [28] Pandey R P, Li T F, Kim E H, et al. Enzymatic synthesis of novel phloretin glucosides. *Applied & Environmental Microbiology*, 2013, 79(11): 3516-3521.
- [29] Bungaruang L, Gutmann A, Nidetzky B. Leloir glycosyltransferases and natural product glycosylation: Biocatalytic synthesis of the C-glucoside nothofagin, a major antioxidant of redbush herbal tea. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2013, 355(14-15): 2757-2763.
- [30] Nagatomo Y, Usui S, Ito T, et al. Purification, molecular cloning and functional characterization of flavonoid C-glycosyltransferases from *Fagopyrum esculentum* M. (buckwheat) cotyledon. *The Plant Journal*, 2014, 80(3): 437-448.
- [31] Ito T, Fujimoto S, Suito F, et al. C-glycosyltransferases catalyzing the formation of di-C-glucosyl flavonoids in citrus plants. *Plant Journal*, 2017, 91(2): 187-198.
- [32] Zhang M, Li F D, Li K, et al. Functional characterization and structural basis of an efficient di-C-glycosyltransferase from *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(7): 3506-3512.
- [33] Chen D, Sun L, Chen R, et al. Enzymatic synthesis of acylphloroglucinol 3-C-glucosides from 2-O-glucosides using a C-glycosyltransferase from *Mangifera indica*. *Chemistry A European Journal*, 2016, 22(17): 5873-5877.
- [34] Ban Z, Qin H, Mitchell A J, et al. Noncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in *Humulus lupulus* are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(22): E5223-E5232.
- [35] Medema M H, Osbourn A. Computational genomic identification and functional reconstitution of plant natural product biosynthetic pathways. *Nature Product Reports*, 2016, 33(8): 951-962.
- [36] Santamaría L, Reverón I, López de Felipe F, et al. Unravelling the reduction pathway as an alternative metabolic route to hydroxycinnamate decarboxylation in *Lactobacillus plantarum*. *Applied & Environmental Microbiology*, 2018, 84(15): e01123-18.
- [37] Stompor M, Kałuzny M, Zarowaka B. Biotechnological methods for chalcone reduction using whole cells of *Lactobacillus*, *Rhodococcus* and *Rhodotorula* strains as a way to produce new derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8371-8384.
- [38] Zyska B, Anioł M, Lipok J. Highly effective, regiospecific reduction of chalcone by cyanobacteria leads to the formation of dihydrochalcone: two steps towards natural sweetness. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 136-151.
- [39] Xiong D, Lu S, Wu J, et al. Improving key enzyme activity in phenylpropanoid pathway with a designed biosensor. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 115-123.
- [40] Morita H, Wong C P, Abe I. How structural subtleties lead to molecular diversity for the type III polyketide synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(41): 15121-15136.
- [41] Camacho-Zaragoza J M, Hernández-Chávez G, Moreno-Avitia F, et al. Engineering of a microbial coculture of *Escherichia coli* strains for the biosynthesis of resveratrol. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 163.
- [42] Fang Z, Jones J A, Zhou J, et al. Engineering *Escherichia coli* co-cultures for production of curcuminoids from glucose. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(5): 1700576.
- [44] Akdemir H, Silva A, Zha J, et al. Production of pyranocanthocyanins using *Escherichia coli* co-cultures. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 290-298.
- [44] Liu X, Li X B, Jiang J, et al. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 243-253.
- [45] Liu X, Li L, Liu J, et al. Metabolic engineering *Escherichia coli* for efficient production of icariside D2. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 261.

Recent Advances in Microbial Production of Phloretin and Its Glycosides

LIU Jin-cong¹ LIU Xue¹ YU Hong-jian² ZHAO Guang-rong¹

(¹ School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Frontier Science Center for Synthetic Biology

and Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Tianjin 300072, China)

(² Ubasio Biotech Co., Ltd., Tianjin 300450, China)

Abstract Phloretin and its glycosides are natural dihydrochalcones with various physiological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-bacterial activities, and have potential application in food, pharmaceutical, and cosmetics industries. At present, phloretin and its glycosides are mainly extracted from plants. However, the low content and complex components make it difficult to prepare products with high efficiency and low cost. With the development of metabolic engineering and synthetic biology, microbial production of phloretin and its glycosides has become an alternative approach. This article reviews the identification of key genes, the reconstruction of synthetic pathways and optimization strategies for the biosynthesis of phloretin and its glycosides. Finally, the potential strategies to solve existing problems as unspecific enzymes and the formation of multiple byproducts were proposed.

Key words Phloretin Phloretin-glycosides Microbial production Metabolic engineering Synthetic biology

致 谢

近期为本刊审稿的专家(按拼音首字母排列):

白仲虎 卞小莹 陈世贤 戴卓君 邓 涛 董文飞 董 瑜 杜昱光 段志广 付 钰
高大明 戈 钧 郭正彦 何康敏 侯 进 霍毅欣 姜 平 姜 韬 蒋利和 李 春
李得见 李茹姣 李 寅 梁前进 林东强 刘定斌 刘贤勇 刘旭霞 刘 寅 卢大儒
马兴元 马迎飞 潘 杰 秦成峰 邱晓忠 史训龙 史仲平 孙强明 唐海东 王 兰
王文元 王学昭 王艳丽 吴绵斌 信丰学 徐 虹 徐正仁 许海燕 杨艳萍 姚 刚
尹焕才 于 波 于湘晖 张 翀 张春义 张俊祥 周 燕 朱传凤