

植物糖基转移酶的功能表征及类黄酮糖苷的微生物生产

季佳童^{1,2}, 张宏娇^{2*}, 尹文兵^{1,2,3*}

1 中国科学技术大学 生命科学与医学部, 安徽 合肥

2 中国科学院微生物研究所, 微生物多样性与资源创新利用全国重点实验室, 北京

3 中国科学院大学 医学院, 北京

季佳童, 张宏娇, 尹文兵. 植物糖基转移酶的功能表征及类黄酮糖苷的微生物生产[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3671-3685.

Ji Jiatong, ZHANG Hongjiao, YIN Wenbing. Functional characterization of plant glycosyltransferases and microbial production of flavonoid glycosides[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(8): 3671-3685.

摘要: 【目的】研究茶树 (*Camellia sinensis*)、野菊花 (*Chrysanthemum indicum*) 以及拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 来源的 3 个 UDP-葡萄糖基转移酶 CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 的底物特异性并比较它们的催化效率。【方法】利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 表达植物糖基转移酶重组蛋白, 将体外纯化得到的重组蛋白分别与黄酮、黄烷酮等 6 个黄酮类化合物进行体外酶促反应, 通过液相质谱联用 (LC-MS) 及标准品比对确定糖苷产物, 借助高效液相色谱 (HPLC) 峰面积计算底物转化率。【结果】体外酶促反应结果显示, 3 个糖基转移酶 CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 具有宽泛的底物特异性, 对柚皮素、圣草酚、异樱花素、橙皮素、芹菜素和金合欢素 6 个黄酮类化合物具有催化活性, 生成的主要产物是类黄酮-7-O-葡萄糖苷。其中, CiUGT11 和 UGT73B1 对橙皮素和柚皮素的转化率分别达到了 96%。利用高效的糖基转移酶基因 *CiUGT11* 和 *UGT73B1* 在大肠杆菌中成功异源合成橙皮素-7-O-葡萄糖苷和柚皮素-7-O-葡萄糖苷。【结论】植物糖基转移酶 CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 具有宽泛的底物识别能力, 主要作用于黄酮类化合物的 C7-OH 位置, 其中 CiUGT11 和 UGT73B1 对 6 个黄酮类化合物具有较高的催化活性, 本研究为微生物高效生产类黄酮糖苷化合物提供了候选基因元件。

关键词: 糖基转移酶; 底物杂泛性; 类黄酮-7-O-葡萄糖苷; 大肠杆菌

资助项目: 国家自然科学基金(32400062); 中国博士后基金(2024M753451)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32400062) and the China Postdoctoral Science Foundation (2024M753451).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Hongjiao, zhanghj@im.ac.cn; YIN Wenbing, yinwb@im.ac.cn

Received: 2025-01-25; Accepted: 2025-03-15; Published online: 2025-05-29

Functional characterization of plant glycosyltransferases and microbial production of flavonoid glycosides

JI Jiatong^{1,2}, ZHANG Hongjiao^{2*}, YIN Wenbing^{1,2,3*}

1 Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Microbial Diversity and Innovative Utilization, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

3 Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Abstract: [Objective] To systematically investigate the substrate promiscuity and catalytic performance of three UDP-glycosyltransferases: CsUGT75L12 (*Camellia sinensis*), CiUGT11 (*Chrysanthemum indicum*), and UGT73B1 (*Arabidopsis thaliana*). [Methods] The recombinant proteins of plant glycosyltransferases were heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified for *in vitro* enzymatic assays. *In vitro* enzymatic reactions of the purified recombinant proteins were performed with six flavonoids including flavones (apigenin and acacetin) and flavanones (naringenin, eriodictyol, isosakuranetin, and hesperetin). The enzymatic products were characterized by HPLC and LC-MS and the conversion rates were calculated through comparative HPLC peak area analysis. [Results] CsUGT75L12, CiUGT11, and UGT73B1 exhibited broad substrate promiscuity towards the six tested flavonoids. The primary products were identified as flavonoid-7-*O*-glucosides. Notably, CiUGT11 and UGT73B1 demonstrated exceptional catalytic efficiency, achieving >96% conversion rates for hesperetin and naringenin. Leveraging this activity, we engineered *CiUGT11* and *UGT73B1* with high efficiency to produce hesperetin-7-*O*-glucoside and naringenin-7-*O*-glucoside through precursor feeding in *E. coli*. [Conclusion] The three glycosyltransferases display remarkable versatility in flavonoid recognition, with conserved preference for the C7-OH position. CiUGT11 and UGT73B1 show high catalytic efficiency for six flavonoids. These findings provide candidate gene elements for the efficient microbial production of flavonoid glycosides.

Keywords: glycosyltransferase; substrate promiscuity; flavonoid-7-*O*-glucoside; *Escherichia coli*

黄酮类化合物是一种广泛存在于植物中的多酚次级代谢产物，也是多种药用植物的有效成分^[1]，其具有抗炎^[2]、抗菌^[3]、抗癌^[4]、抗氧化^[5]等多种生物活性，在心血管疾病^[6]和神经退行性疾病^[7]方面也具有巨大的治疗潜力。然而，天然黄酮类化合物由于其结构特性，水溶性低、稳定性差，限制了其在生物制剂方面的开发^[8]。通过结构修饰提高黄酮类化合物在水相中的溶解性是一种有效的策略^[9]。目前常见的结构修饰

包括糖基化、甲基化、异戊烯基化等，其中糖基化是提高黄酮类化合物水溶性和生物利用度的有效途径^[10]。例如，槲皮素经糖基化修饰后生成的槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷可通过葡萄糖转运蛋白的作用被肠道吸收，再水解为糖苷配基被小肠吸收，从而极大地提高了黄酮类化合物的生物利用度^[11]。

植物中黄酮类化合物的糖基化通常由尿苷二磷酸依赖性糖基转移酶(UDP glycosyltransferase,

UGT)催化,将UDP-葡萄糖、UDP-鼠李糖、UDP-半乳糖等糖基供体转移到黄酮苷元的不同位点上生成结构多样的类黄酮糖苷^[9]。其中,类黄酮-7-*O*-葡萄糖苷在植物中较为常见^[12],例如具有保肝和抗癌活性的水飞蓟素-7-*O*-葡萄糖苷^[13],具有抗糖尿病活性的山奈酚-7-*O*-葡萄糖苷和芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷^[14],以及具有抗氧化和治疗胃损伤潜力的木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷^[15]。此外,黄芩素-7-*O*-葡萄糖苷^[16]、槲皮素-7-*O*-葡萄糖苷、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、山奈酚-7-*O*-葡萄糖苷等已成功实现了微生物生产^[17]。尽管目前已鉴定出许多催化类黄酮-7-*O*-葡萄糖基化的糖基转移酶,但大多数研究仅针对单个糖基转移酶的功能表征,尚未有同时对多个糖基转移酶进行功能表征和催化效率比较的报道,这使得在微生物中生产类黄酮-7-*O*-葡萄糖苷时需要大量筛选和比对糖基转移酶的催化效率。

本研究通过提取茶树(*Camellia sinensis*)、野菊花(*Chrysanthemum indicum*)以及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的3个UDP-葡萄糖基转移酶CsUGT75L12、CiUGT11和UGT73B1的体外重组蛋白,并与柚皮素、圣草酚、异樱花素、橙皮素、芹菜素和金合欢素6种黄酮类化

合物(图1)进行体外反应,探究3个UDP-葡萄糖基转移酶的功能。同时,通过添加前体橙皮素和柚皮素,在大肠杆菌中探究了CiUGT11和UGT73B1的底物转化效率。本研究为微生物异源合成类黄酮糖苷鉴定了高效的糖基转移酶元件,旨在助力类黄酮糖苷在微生物中的高效生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 用于构建重组蛋白表达载体以及质粒扩增,*E. coli* BL21(DE3)用于重组蛋白的表达。*E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)和载体pET28a均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

柚皮素,上海麦克林生化科技股份有限公司;圣草酚,成都仪睿生物科技有限公司;异樱花素、异樱花素-7-*O*-葡萄糖苷、金合欢素-7-*O*-葡萄糖苷,四川维克奇生物科技有限公司;橙皮素、橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷,上海笛柏生物科技有限公司;芹菜素,上海阿拉丁生化科技

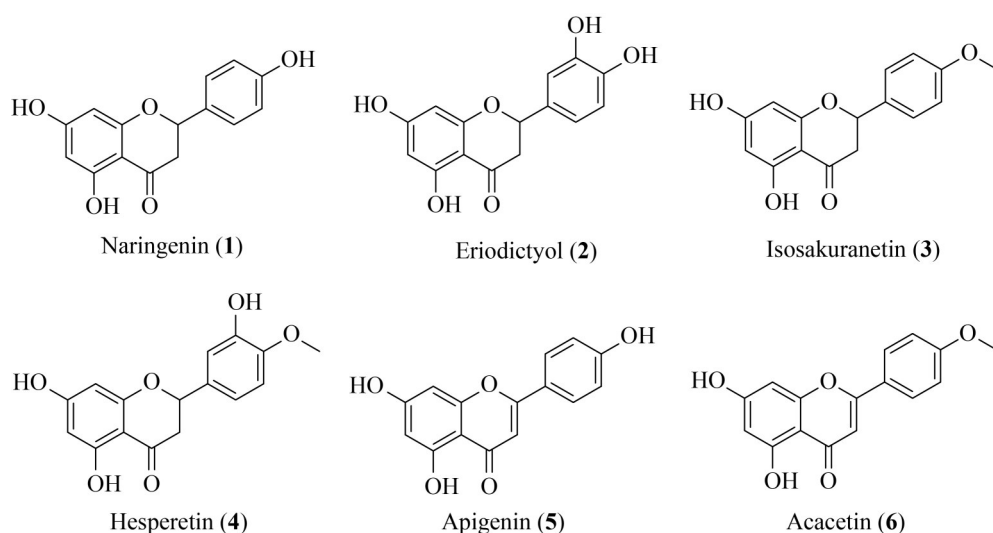


图1 黄酮类化合物1-6的化学结构

Figure 1 Chemical structures of flavonoids (1-6).

股份有限公司；金合欢素，上海吉至生化科技有限公司；柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷、圣草酚-7-*O*-葡萄糖苷，成都麦德生科技有限公司；芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷，成都普思生物科技股份有限公司。所有标准品均使用 DMSO 溶解。V-ELUTE Gel Mini Purification Kit、Fast Plasmid Miniprep Kit，北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

PCR 仪，Bio-Rad 公司；核酸凝胶电泳仪，北京君意东方电泳设备有限公司；紫外可见分光光度计，上海佑科仪器仪表有限公司；高效液相色谱仪，Waters 公司；高效液相色谱-质谱联用仪，Agilent 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): Tryptone 10.0, NaCl 10.0, Yeast extract 5.0, Agar 16.0 (液体培养基不加)。LB 液体培养基用于摇瓶发酵，LB 固体培养基用于菌株活化和大肠杆菌转化。

1.2 重组蛋白表达载体构建

拟南芥 cDNA 由本实验室保存，*CsUGT75L12* 和 *CiUGT11* 基因序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成。使用高保真聚合酶 TransStart[®] FastPfu 扩增目的基因，工具载体 pET28a 使用限制性内切酶 *Bam*H I 进行线性化。PCR 产物和线性化产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，使用 V-ELUTE Gel Mini Purification Kit 将条带大小正确的片段进行胶回收。

使用 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 将 *CsUGT75L12*、*CiUGT11*、*UGT73B1* 基因片段分别与 pET28a 载体片段进行一步连接，连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中，转化的菌液涂布于含 50 μ g/L 卡那霉素(Kan)的 LB 平板上筛选阳性克隆。挑取阳性单克隆进行菌落 PCR 验证，将验证正确的单克隆用 5 mL 液体 LB (含 50 μ g/L Kan)培养基扩大培养，按照 Fast Plasmid Miniprep Kit 说明书进行质粒提取，质粒测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成，将测序正确的重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中，挑取单克隆菌落于 LB 液体培养基

扩大培养后保存在 33% 甘油中，置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 蛋白提取与纯化

以 UGT73B1 为例，将携带 pET28a-*UGT73B1* 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 菌液接种至 5 mL LB 液体培养基中(含 50 μ g/L Kan)，在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养过夜作为种子液。将种子液以 1:500 的比例接种于 500 mL LB (含 50 μ g/L Kan)，37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 (以 LB 液体培养基为空白对照)，加入 50 μ L 1 mol/L IPTG，16 $^{\circ}$ C、200 r/min 低温诱导蛋白表达 18–24 h。最后在 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

蛋白提取与纯化(全程在冰上操作): 1 L 菌液于 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 15 min 后的菌体加入预冷的裂解缓冲液(50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，300 mmol/L NaCl，10 mmol/L Imidazole，pH 8.0)重悬菌体，使用超声波细胞破碎仪进行破碎(功率 200 W，破碎 10 s，间歇 10 s，共计 30 min)。裂解液用低温高速离心机在 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 20 min。将上清液转移至 50 mL 离心管，加入 800 μ L 镍胶，低温孵育 2 h，将混合液转移至亲和柱，重复过滤 3 次，使镍胶保留在亲和柱中。使用裂解缓冲液冲洗，同时取 10 μ L 洗脱液与 100 μ L Bradford 试剂反应至试剂不显蓝色；再用洗脱液 A (50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、300 mmol/L NaCl、15 mmol/L Imidazole，pH 8.0)洗脱，至 Bradford 试剂不显蓝色；随后加入 7.5 mL 洗脱液 B (50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、300 mmol/L NaCl、25 mmol/L Imidazole，pH 8.0)，至 Bradford 试剂不显蓝色；加入 1 mL 洗脱液 C (50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、300 mmol/L NaCl、125 mmol/L Imidazole，pH 8.0)，冰浴 8 min，收集流出液，重复洗脱 2 次并收集流出液。将含有目标蛋白的流出液转移至脱盐柱，弃滤液，加入 3.5 mL 储存液(50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl、10%

Glycerol, pH 7.5), 待 Bradford 试剂显蓝色反应后开始收集流出液即目的蛋白。目的蛋白用液氮速冻, 于 -80°C 保存。使用 NanoDrop 测定蛋白浓度。

取 $50\ \mu\text{L}$ 重组蛋白样品, 加入 $10\ \mu\text{L}$ $6\times$ protein loading buffer, 100°C 高温煮沸 15 min, 取 $15\ \mu\text{L}$ 样品进行 SDS-PAGE (120 V、1 h)。电泳结束后将蛋白胶转移至染色皿中, 加入 10 mL 考马斯亮蓝染液, 置于脱色摇床染色 15 min, 去除染液, 加入脱色液 (45% methanol、10% acetic acid、45% distilled water) 过夜脱色至蛋白条带清晰。

1.4 糖基转移酶体外酶促反应

以柚皮素(1)为底物, UDP-葡萄糖(UDPG)为糖基供体, 与 3 个葡萄糖基转移酶进行体外酶促反应。酶促反应体系: 2 mmol/L UDPG, 1 mmol/L 底物, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L CaCl_2 , 25 μg 蛋白, 总体积为 $50\ \mu\text{L}$ 。对照组反应体系与实验组相同, 但使用 100°C 灭活 15 min 的蛋白。反应在 37°C 下进行 4 h 后, 加入等体积的色谱甲醇终止反应, 随后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 HPLC 和 LC-MS 分析。HPLC 检测条件: 使用 C18 色谱柱 ($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}\times 5\ \mu\text{m}$, Waters 公司), 流动相为色谱甲醇(A)-0.1% 甲酸水(D), 流速为 1 mL/min。梯度洗脱程序为: 0-20 min, 20%-100% A; 20-25 min, 100% A; 25-30 min, 20% A。进样量为 $10\ \mu\text{L}$ 。LC-MS 检测条件: 使用 C18 色谱柱 ($3\ \text{mm}\times 50\ \text{mm}\times 3\ \mu\text{m}$, Bonna-Agela Technologies 公司), 流动相为色谱乙腈(B)-0.1% 甲酸水(D), 流速为 0.5 mL/min。梯度洗脱程序为: 0-30 min, 5%-100% B; 30-35 min, 100% B; 35-45 min, 5% B。进样量为 $5\ \mu\text{L}$ 。

1.5 体外酶促反应底物转化率分析

根据体外酶促反应的 HPLC 结果, 分别统计对照组与实验组中底物的峰面积, 以对照组底物峰面积为 100%, 计算实验组中底物的转化率。

1.6 类黄酮-7-O-葡萄糖苷产量测定

以 UGT73B1 为例, 制备携带 pET28a-UGT73B1 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 种子液, 按 1:500 比例接种于 30 mL 液体 LB 培养基, 37°C 、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8。加入 $3\ \mu\text{L}$ 1 mol/L IPTG 和不同浓度的底物(终浓度为 100、200、300、400、500 mg/L), 对照组不加底物。在 16°C 、200 r/min 培养 36 h, 每组 3 个平行。取 3 mL 培养液, 加入等体积乙酸乙酯萃取, 超声 30 min 后用真空离心浓缩仪将有机相蒸干, 加入 $200\ \mu\text{L}$ 色谱甲醇溶解样品。以 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液进行 HPLC 分析, 分析方法与 1.4 节一致。

配制柚皮素-7-O-葡萄糖苷标准液, 浓度梯度为 0.5、0.2、0.1、0.05、0.02、0.01 mg/mL, 用 HPLC 分析(分析方法与 1.4 节一致)。根据峰面积以及标准品进样量制作标准曲线, 根据回归方程计算柚皮素-7-O-葡萄糖苷的产量。

1.7 数据处理和统计分析

液质数据由 MestReNova 14.0.0 软件分析处理, 琼脂糖凝胶图由 Adobe Photoshop CS6 软件处理, 底物转化率由 Origin 2024 软件处理, 类黄酮-7-O-葡萄糖苷产量柱状图由 GraphPad Prism 处理。

2 结果与分析

2.1 植物糖基转移酶的蛋白表达与纯化

2.1.1 糖基转移酶表达载体构建

通过文献调研获取 3 种植物来源的 UDP-葡萄糖基转移酶 CsUGT75L12 (GenBank 登录号为 ALO19892.1)^[18]、CiUGT11 (GenBank 登录号为 WIF29794.1)^[19]、UGT73B1 (GenBank 登录号为 NP_567955.1)^[20] 的 cDNA 序列, 使用 SnapGene 设计引物(表 1)。以拟南芥的 cDNA 为模板扩增糖基转移酶基因 UGT73B1; 以基因合成序列为模板分别扩增糖基转移酶基因 CsUGT75L12 和 CiUGT11。扩增得到的 UGT73B1、CsUGT75L12

表1 用于克隆糖基转移酶基因的引物

Table 1 Primers for amplification of glycosyltransferase genes

Primers name	Primer sequences (5'→3')
CsUGT75L12-F	GTGGACAGCAAATGGGTCGCATGGTGAACACGGACAC
CsUGT75L12-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTGAGGCAATCACCACCGAC
CiUGT11-F	AGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCATGGACTCCGCGGCGAC
CiUGT11-R	GTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTGTTGAAGTTGTTAGTGCCGGTCC
UGT73B1-F	GTGGACAGCAAATGGGTCGCATGGGAACTCCTGTCAAG
UGT73B1-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTACCTTCTCTTTTGCAGTTAACTAAC

和 *CiUGT11* 条带大小分别是 1 464、1 416 和 1 416 bp (图 2)。通过与 pET28a 载体片段一步克隆分别获得 3 个重组质粒 pET28a-*UGT73B1*、pET28a-*CsUGT75L12* 和 pET28a-*CiUGT11*。基因测序结果显示, 3 个重组蛋白表达载体中的目的基因序列正确。

2.1.2 糖基转移酶蛋白表达与纯化

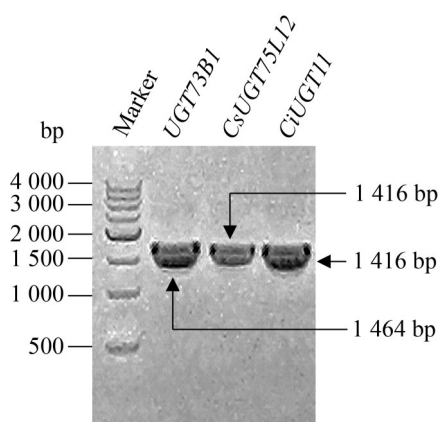
将测序正确的 pET28a-*CsUGT75L12*、pET28a-*CiUGT11* 和 pET28a-*UGT73B1* 表达载体分别转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 使用 LB 液体培养基进行扩大培养, 经 0.1 mol/L IPTG、16 °C 低温诱导蛋白表达 18–24 h。将菌体低温超声破碎后, 上清经 Ni-亲和柱纯化, 最终使用含 125 mmol/L 咪唑的洗脱液获得重组蛋

白。纯化得到的重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析。蛋白质相对分子量预测网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)结果显示, *CsUGT75L12*、*CiUGT11*、*UGT73B1* 重组蛋白的相对分子量分别为 57.4、56.6、59.8 kDa。SDS-PAGE 分析显示, *CsUGT75L12* 和 *CiUGT11* 重组蛋白在靠近 55.0 kDa 上方有明显条带, *UGT73B1* 重组蛋白在 55–70 kDa 有一个明显条带, 这与预期的重组蛋白大小相符(图 3)。上述结果表明, 本研究成功获取了 3 个植物糖基转移酶 *CsUGT75L12*、*CiUGT11*、*UGT73B1* 的体外重组蛋白。

2.2 植物糖基转移酶的功能表征

2.2.1 糖基转移酶功能验证

据文献[21]报道, *CsUGT75L12*、*CiUGT11* 和 *UGT73B1* 均能以柚皮素为底物催化合成柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷。为验证本研究纯化得到的 3 个糖基转移酶的功能, 以柚皮素(1)为催化受体、UDPG 为供体, 分别与 3 个葡萄糖基转移酶进行体外酶促反应。HPLC 结果分析显示, 与对照组相比, 3 组酶促反应产物均产生了新的化合物峰 1a, 通过与柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷标准品比对发现 1a 与柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷标准品的保留时间一致(图 4、5A)。LC-MS 结果显示 1a 的分子量与柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷一致, 因此确定 1a 是柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷(图 6)。上述结果表明 *CsUGT75L12*、*CiUGT11* 和 *UGT73B1* 均能够催化柚皮素(1)的 C7-OH 位置发生糖基化修饰。

图2 *CsUGT75L12*、*CiUGT11*和*UGT73B1*基因的凝胶电泳图Figure 2 Gel electrophoresis of *CsUGT75L12*, *CiUGT11* and *UGT73B1*.

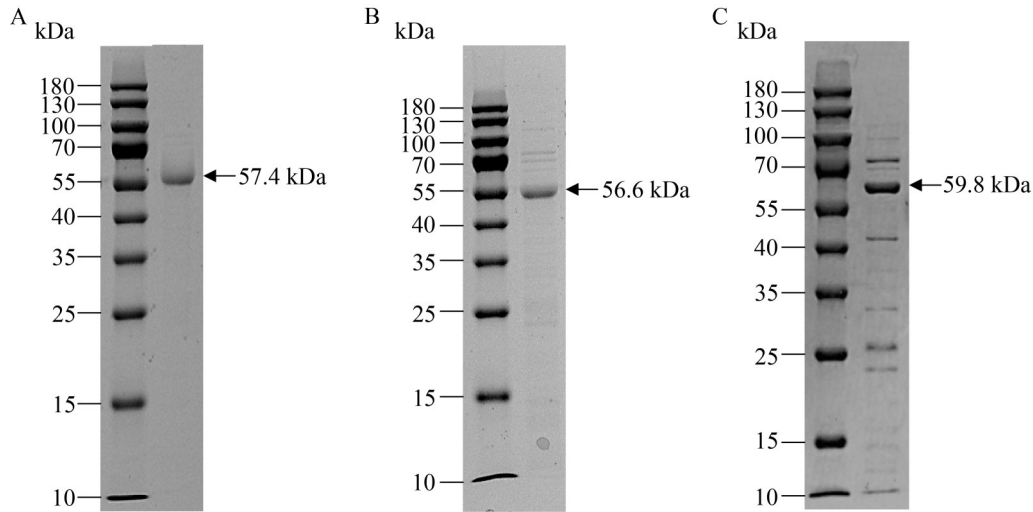


图3 CsUGT75L12 (A)、CiUGT11 (B)和UGT73B1 (C)重组蛋白的SDS-PAGE结果

Figure 3 SDS-PAGE analysis result of recombinant proteins CsUGT75L12 (A), CiUGT11 (B), and UGT73B1 (C).

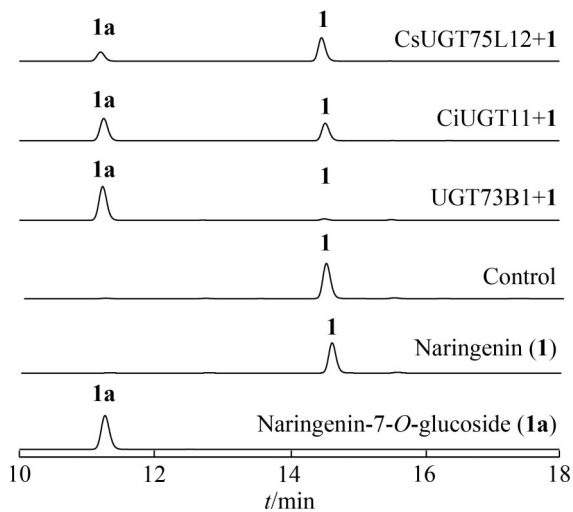


图4 三个糖基转移酶催化柚皮素(1)的酶促反应产物的HPLC分析结果

Figure 4 HPLC analysis results of the enzymatic reaction products of three glycosyltransferases catalyzing naringenin (1) as the acceptor.

2.2.2 糖基转移酶底物特异性研究

糖基转移酶宽泛的底物特异性是糖苷产物多样化的一个重要因素^[22]。本研究将 CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 重组蛋白分别与柚皮素

(1)、圣草酚(2)、异樱花素(3)、橙皮素(4)、芹菜素(5)和金合欢素(6)进行体外酶促反应,以探究它们的底物特异性。

在以柚皮素(1)为底物的催化反应体系中,HPLC 分析结果显示,CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 催化 1 生成了一个新化合物峰(1a),经标准品比对以及 LC-MS 分析可知,1a ($t=6.39$ min, $m/z=435.100$ $[M+H]^+$, $m/z=457.200$ $[M+Na]^+$, $m/z=891.200$ $[2M+Na]^+$)为柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷(图 5A、6A)。

在以圣草酚(2)为底物的催化反应体系中,HPLC 分析结果显示,CsUGT75L12 未与底物 2 发生反应,CiUGT11 催化 2 生成了一个化合物峰(2a),UGT73B1 催化 2 生成了 3 个化合物峰(2a、2b、2c)。经过进一步地标准品比对以及 LC-MS 分析,可鉴定 2a ($t=5.50$ min, $m/z=451.200$ $[M+H]^+$, $m/z=473.100$ $[M+Na]^+$)为圣草酚-7-*O*-葡萄糖苷(图 5B、6B);根据分子量推测 2b ($t=4.58$ min, $m/z=613.200$ $[M+H]^+$, $m/z=635.200$ $[M+Na]^+$) (图 5B、6C)和 2c ($t=5.06$ min, $m/z=613.200$ $[M+H]^+$, $m/z=635.200$ $[M+Na]^+$)为圣草酚的双葡萄糖基化修饰产物(图 5B、6D)。

在以异樱花素(3)为底物的催化反应体系中, HPLC 分析结果显示, CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 催化 3 生成了一个新化合物峰(3a), 经标准品比对以及 LC-MS 分析, 可鉴定 3a ($t=8.59$ min, $m/z=449.200$ [M+H]⁺, $m/z=471.200$ [M+Na]⁺, $m/z=919.300$ [2M+Na]⁺)为异樱花素-7-*O*-葡萄糖苷(图 5C、6E)。

在以橙皮素(4)为底物的催化反应体系中, HPLC 分析结果显示, CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 催化 4 生成了一个新化合物峰(4a), 经标准品比对以及 LC-MS 分析, 可鉴定 4a ($t=6.83$ min, $m/z=465.100$ [M+H]⁺, $m/z=487.200$ [M+Na]⁺)为橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷(图 5D、6F)。

在以芹菜素(5)为底物的催化反应体系中, HPLC 分析结果显示, CsUGT75L12 催化 5 生成了一个新化合物峰(5a), CiUGT11 和 UGT73B1 催化 5 生成了 2 个新化合物峰(5a、5b), 经标准品比对以及 LC-MS 分析, 可鉴定 5a ($t=6.71$ min, $m/z=433.100$ [M+H]⁺, $m/z=455.200$ [M+Na]⁺, $m/z=887.200$ [2M+Na]⁺)为芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷(图 5E、6G); 根据分子量推测 5b ($t=5.01$ min, $m/z=595.200$ [M+H]⁺, $m/z=617.200$ [M+Na]⁺)为芹菜素的双葡萄糖基化修饰产物(图 5E、6H)。

在以金合欢素(6)为底物的催化反应体系中, HPLC 分析结果显示, CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 催化 6 生成了一个新化合物峰(6a), 经标准品比对以及 LC-MS 分析, 可鉴定 6a ($t=8.84$ min, $m/z=447.100$ [M+H]⁺, $m/z=469.100$ [M+Na]⁺, $m/z=915.300$ [2M+Na]⁺)为金合欢素-7-*O*-葡萄糖苷(图 5F、6I)。

以上体外酶促反应实验结果表明, 植物糖基转移酶 CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 具有宽泛的底物特异性, 能够识别黄酮、黄酮酮 2 种类型的黄酮类化合物, 并在 C7-OH 位置进行 UDP-葡萄糖基化, 生成相应的单糖苷产物。这一发现为类黄酮-7-*O*-葡萄糖苷的生产提供了候选基因。

2.2.3 糖基转移酶催化效率结果分析

对 CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 重组蛋白与 6 个黄酮类化合物的体外酶促反应结果的进一步分析发现, 在相同的体外酶促反应条件下, UGT73B1 催化柚皮素(1)生成柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷(1a)的效率最高(图 7A); UGT73B1 催化圣草酚(2)生成圣草酚-7-*O*-葡萄糖苷(2a)的效率最高(图 7B); CiUGT11 催化异樱花素(3)、橙皮素(4)、芹菜素(5)、金合欢素(6)生成对应的异樱花素-7-*O*-葡萄糖苷(3a)、橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷(4a)、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷(5a)、金合欢素-7-*O*-葡萄糖苷(6a)效率最高(图 7C-7F)。其中 CsUGT75L12 未与圣草酚发生反应, CiUGT11 和 UGT73B1 对橙皮素(4)和柚皮素(1)的催化效率达到了 96%。上述结果表明, UGT73B1 和 CiUGT11 分别对柚皮素(1)和橙皮素(4)有较高的底物偏好性, 为利用合成生物学的方法生产类黄酮-7-*O*-葡萄糖苷提供了候选基因。

2.3 大肠杆菌中异源生产类黄酮-7-*O*-葡萄糖苷

植物中的类黄酮糖苷由 UGT 合成, 通常以 *O*-糖苷的形式存在^[23]。其中类黄酮-7-*O*-葡萄糖苷因其抗炎、抗癌和治疗心血管疾病等多种生物活性引起了广泛关注^[24], 例如柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷(1a), 又名普鲁宁, 具有显著的降血脂和治疗糖尿病功效^[25]; 橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷(4a)具有多种药理活性, 是合成高价值甜味剂新橙皮苷二氢查尔酮的关键前体^[26]。大肠杆菌能够利用葡萄糖合成 UDPG, 进而合成自身代谢网络中相关的大分子物质, 是异源合成类黄酮糖苷的常用微生物宿主^[27]。因此, 利用体外酶促反应筛选出的高效糖基转移酶 UGT73B1 和 CiUGT11 在大肠杆菌中异源合成柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷和橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷, 以探究 UGT73B1 和 CiUGT11 在微生物中异源生产类黄酮-7-*O*-葡萄糖苷的潜力。

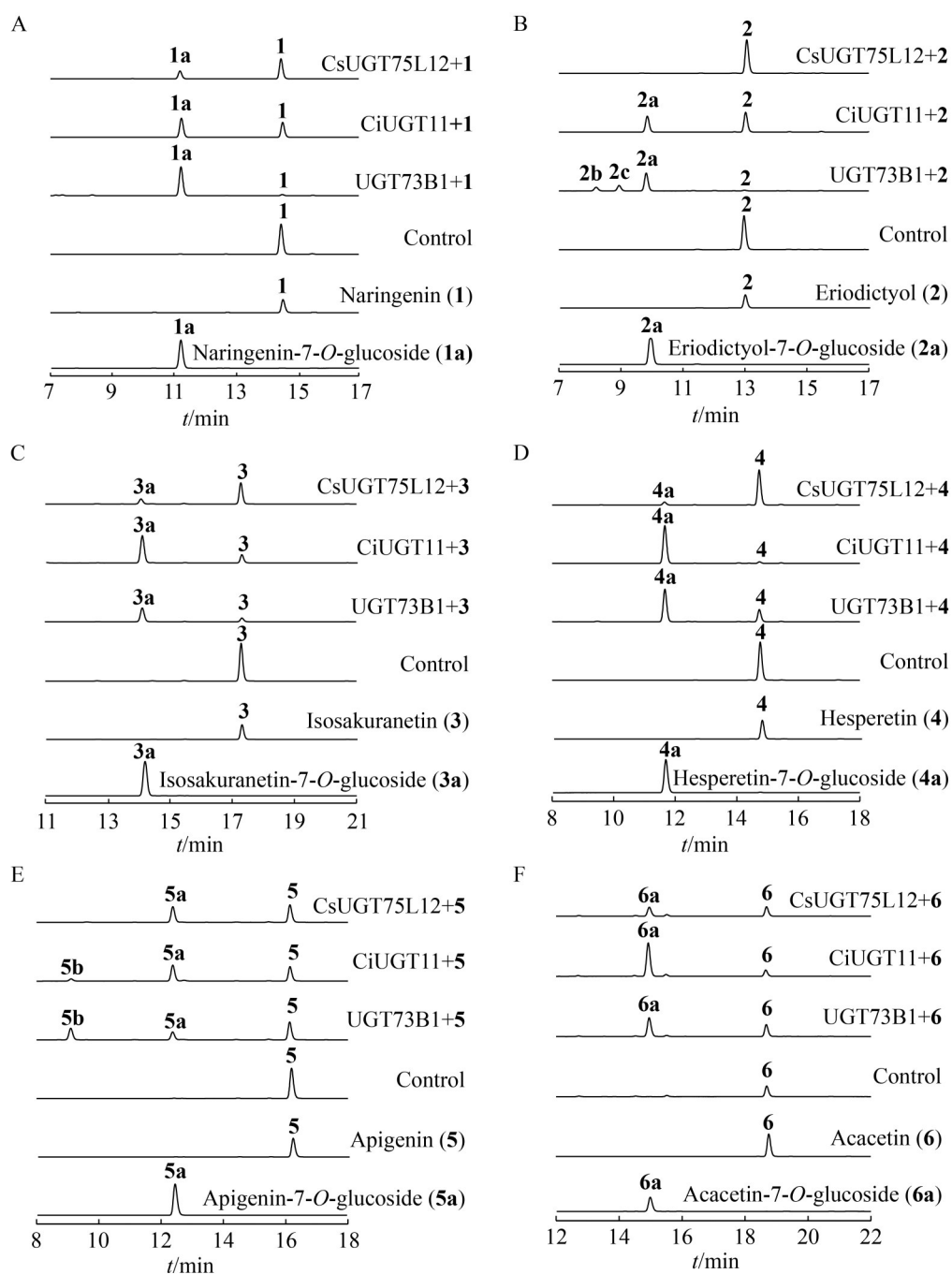


图5 三个糖基转移酶催化6个黄酮类化合物(1-6)的酶促反应产物的HPLC分析结果。A: 柚皮素(1)为底物; B: 圣草酚(2)为底物; C: 异樱花素(3)为底物; D: 橙皮素(4)为底物; E: 芹菜素(5)为底物; F: 金合欢素(6)为底物。

Figure 5 HPLC analysis results of the enzymatic reaction products of three glycosyltransferases catalyzing flavonoids (1-6) as the acceptors. A: Naringenin (1) as the substrate; B: Eriodictyol (2) as the substrate; C: Isosakuranetin (3) as the substrate; D: Hesperetin (4) as the substrate; E: Apigenin (5) as the substrate; F: Acacetin (6) as the substrate.

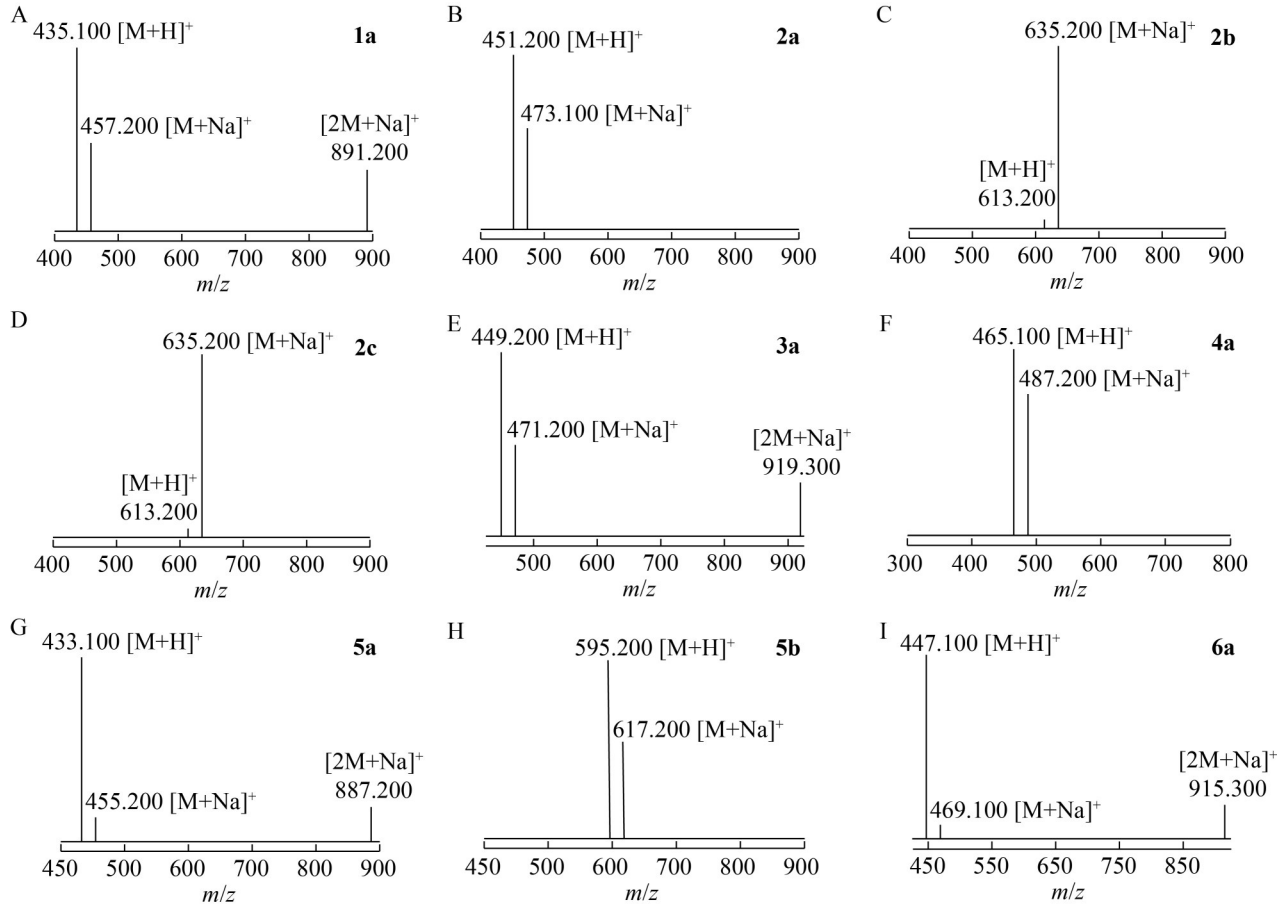


图6 糖基转移酶催化6个黄酮类化合物(1-6)的酶促反应产物的LC-MS分析结果。A: **1a**的质谱结果; B: **2a**的质谱结果; C: **2b**的质谱结果; D: **2c**的质谱结果; E: **3a**的质谱结果; F: **4a**的质谱结果; G: **5a**的质谱结果; H: **5b**的质谱结果; I: **6a**的质谱结果。

Figure 6 LC-MS analysis results of the enzymatic reaction products of glycosyltransferase catalyzing flavonoids (1-6) as the acceptors. A: ESI-MS spectrum of **1a**; B: ESI-MS spectrum of **2a**; C: ESI-MS spectrum of **2b**; D: ESI-MS spectrum of **2c**; E: ESI-MS spectrum of **3a**; F: ESI-MS spectrum of **4a**; G: ESI-MS spectrum of **5a**; H: ESI-MS spectrum of **5b**; I: ESI-MS spectrum of **6a**.

2.3.1 大肠杆菌中异源生产柚皮素-7-O-葡萄糖苷

为异源合成柚皮素-7-O-葡萄糖苷, 在携带 pET28a-UGT73B1 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中加入 IPTG 诱导 UGT73B1 蛋白表达, 同时添加 200 mg/L 柚皮素(**1**), 16 °C 培养 36 h 后, 使用乙酸乙酯萃取培养物并使用 HPLC 分析次级代谢产物。结果表明, 大肠杆菌成功合成柚皮素-7-O-葡萄糖苷(**1a**), 说明 UGT73B1 在大肠杆

菌体内成功表达, 并催化柚皮素与 UDPG 结合生成柚皮素-7-O-葡萄糖苷(图 8A、8B)。

为探究柚皮素添加浓度对柚皮素-7-O-葡萄糖苷产量的影响, 设置了 100-500 mg/L 共 5 个梯度的柚皮素浓度, 通过统计柚皮素-7-O-葡萄糖苷的峰面积, 并结合柚皮素-7-O-葡萄糖苷(**1a**)的标准曲线来计算 **1a** 的产量。如图 8D 所示, 随着柚皮素浓度的增加, 柚皮素-7-O-葡萄糖苷(**1a**)的产量逐渐上升, 在添加 500 mg/L 浓度的

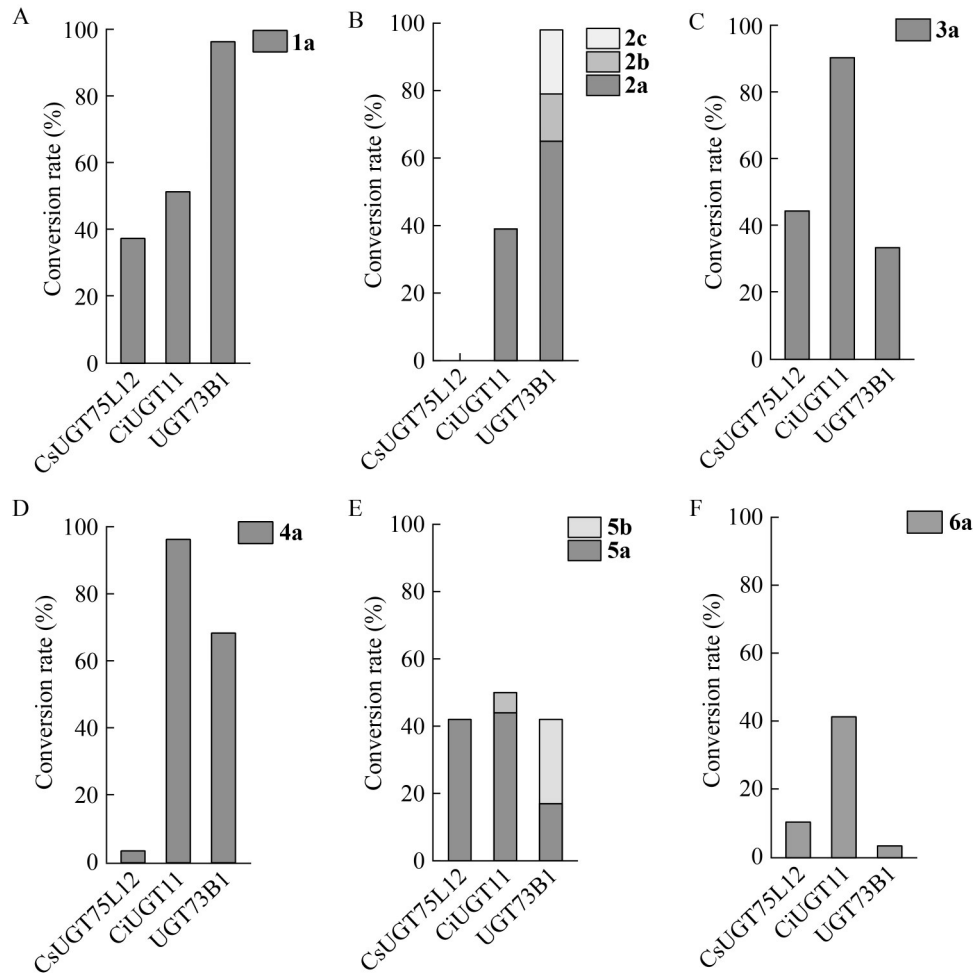


图7 三个糖基转移酶催化不同黄酮底物(1-6)的转化率分析。A: 柚皮素(1)为底物; B: 圣草酚(2)为底物; C: 异樱花素(3)为底物; D: 橙皮素(4)为底物; E: 芹菜素(5)为底物; F: 金合欢素(6)为底物。

Figure 7 Conversion rate of six flavonoids (1 - 6) catalyzed by three different glycosyltransferases. A: Naringenin (1) as the substrate; B: Eriodictyol (2) as the substrate; C: Isosakuranetin (3) as the substrate; D: Hesperetin (4) as the substrate; E: Apigenin (5) as the substrate; F: Acacetin (6) as the substrate.

柚皮素(1)时, 柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷(1a)的产量达到最高值, 约为 13.33 mg/L。

2.3.2 大肠杆菌中异源生产橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷

为了探究 CiUGT11 在大肠杆菌中对橙皮素(4)的催化活性, 本研究在携带 pET28a-CiUGT11 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)菌株中加入 IPTG 诱导 CiUGT11 蛋白表达, 并添加 200 mg/L 橙皮素(4), 通过 HPLC 分析以及标准品比对确定大肠杆菌

突变株产生橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷(4a), 说明 CiUGT11 在大肠杆菌体内成功表达, 并催化橙皮素(4)与 UDPG 结合生成橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷(图 9A、9B)。

通过添加不同浓度的橙皮素(4), 统计 4a 的 HPLC 峰面积, 计算出橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷(4a)的产量。如图 9D 所示, 随着橙皮素浓度的增加, 橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷(4a)的产量逐渐降低。在添加 100 mg/L 浓度的橙皮素(4)时, 橙皮素-7-*O*-葡萄糖苷(4a)的产量达到最高值, 约为

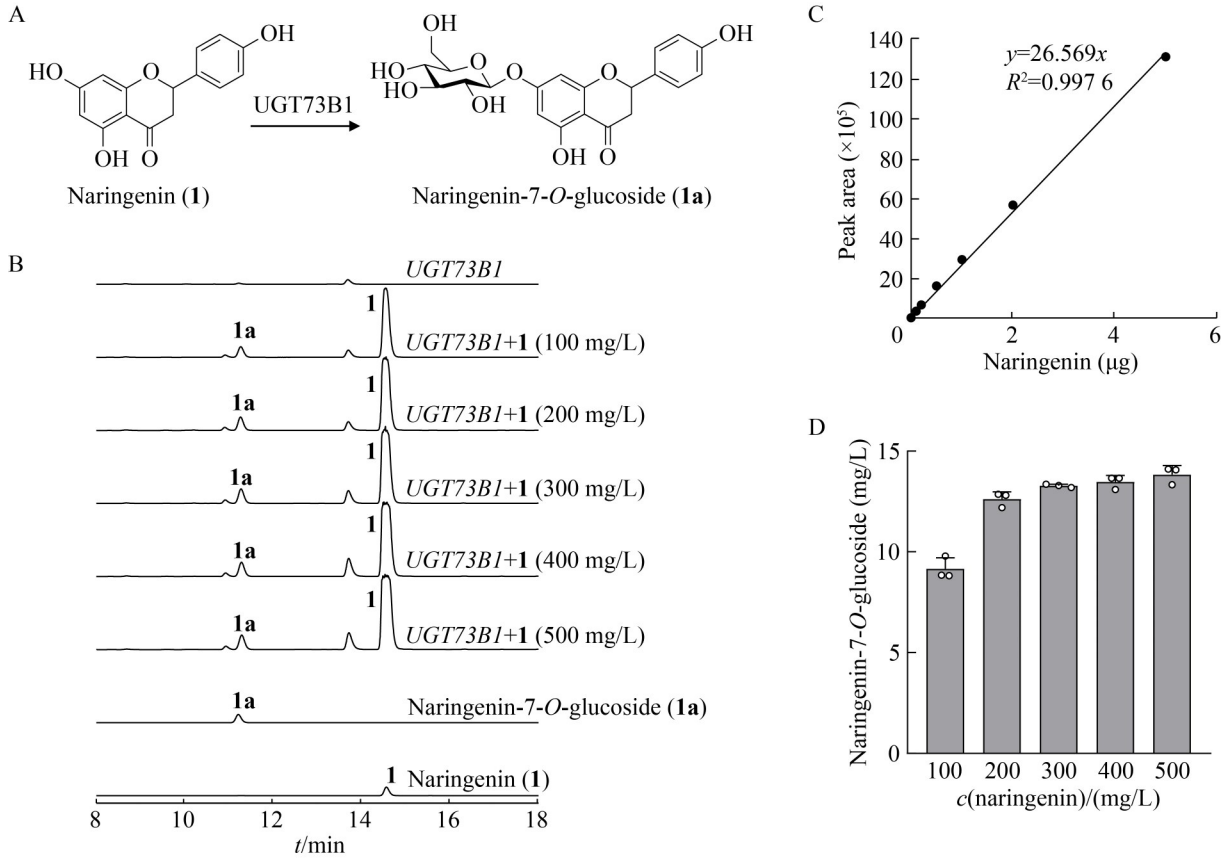


图8 *UGT73B1*大肠杆菌突变株利用柚皮素(1)合成柚皮素-7-O-葡萄糖苷(1a)的产量分析。A: *UGT73B1*催化柚皮素(1)生成柚皮素-7-O-葡萄糖苷(1a)的生物合成途径; B: HPLC分析*UGT73B1*大肠杆菌突变株合成类黄酮糖苷1a; C: 柚皮素-7-O-葡萄糖苷的标准曲线; D: 添加不同浓度柚皮素时, 柚皮素-7-O-葡萄糖苷的产量分析。

Figure 8 Yield analysis of naringenin-7-O-glucoside (1a) produced by *Escherichia coli* carrying *UGT73B1* when feeding naringenin (1). A: Biosynthetic pathway of naringenin-7-O-glucoside (1a) catalyzed by *UGT73B1* using naringenin (1) as the substrate; B: HPLC analysis of the production of naringenin-7-O-glucoside (1a) produced by *E. coli* carrying *UGT73B1*; C: Standard curve of naringenin-7-O-glucoside; D: Yield analysis of naringenin-7-O-glucoside (1a) after feeding different concentrations of naringenin.

23.30 mg/L, 推测可能是橙皮素-7-O-葡萄糖苷对CiUGT11产生了反馈抑制, 或者是高浓度的橙皮素底物对大肠杆菌产生了代谢负担, 导致橙皮素-7-O-葡萄糖苷产量降低。

3 讨论与结论

本研究利用大肠杆菌 BL21(DE3)重组表达并纯化了3个植物源UDP-葡萄糖基转移酶

CsUGT75L12、CiUGT11和UGT73B1, 通过体外酶促反应实验初步探究了这3个重组酶的底物特异性。体外酶促反应结果显示, CsUGT75L12、CiUGT11和UGT73B1均能够催化柚皮素、圣草酚(CsUGT75L12除外)、异樱花素、橙皮素、芹菜素和金合欢素6个黄酮类化合物生成对应的类黄酮-7-O-葡萄糖苷, 这与3个糖基转移酶所报道的主要作用于C7-OH位点的功能相符。然

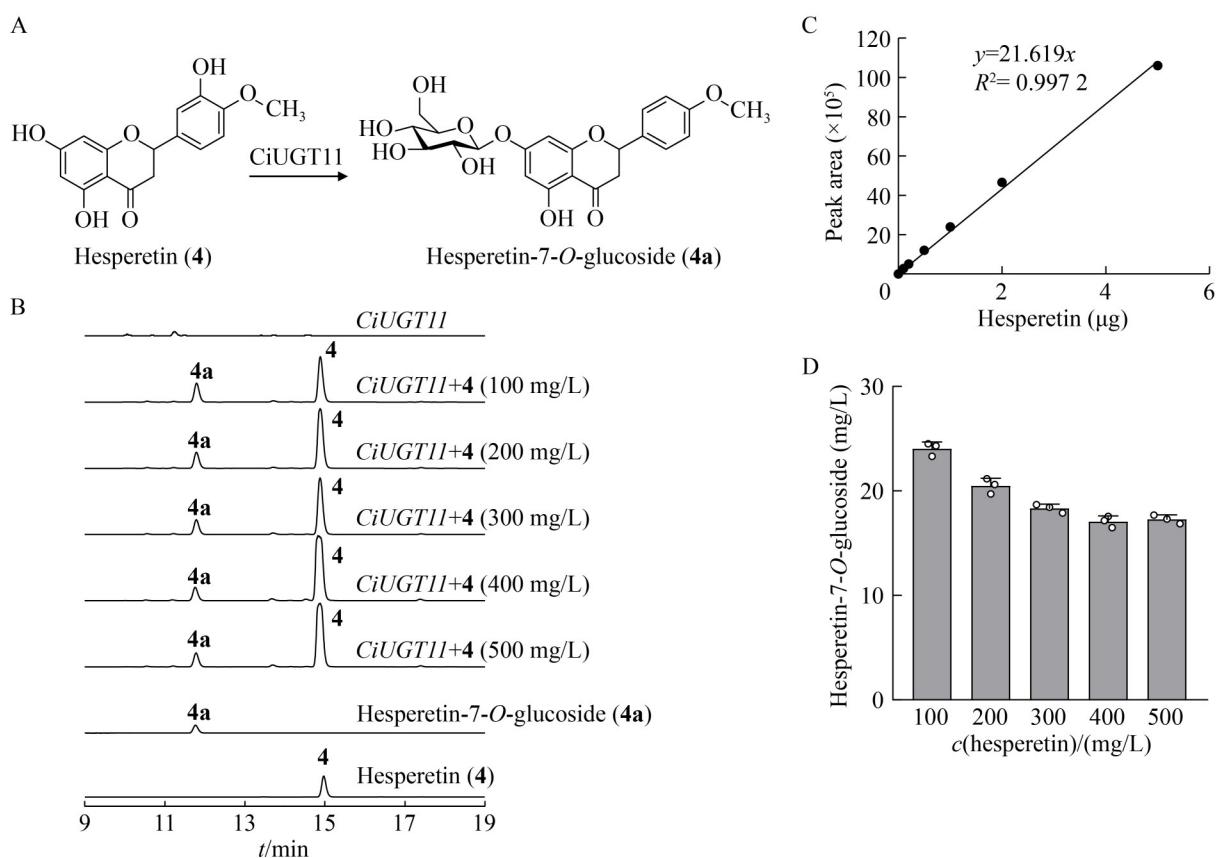


图9 *CiUGT11*大肠杆菌突变株利用橙皮素(4)生成橙皮素-7-O-葡萄糖苷(4a)的产量分析。A: *CiUGT11*催化橙皮素(4)生成橙皮素-7-O-葡萄糖苷(4a)的生物合成途径; B: HPLC分析*CiUGT11*大肠杆菌突变株合成类黄酮糖苷4a; C: 橙皮素-7-O-葡萄糖苷的标准曲线; D: 添加不同浓度橙皮素时, 橙皮素-7-O-葡萄糖苷的产量分析。

Figure 9 Yield analysis of hesperetin-7-O-glucoside (4a) produced by *Escherichia coli* carrying *CiUGT11* when feeding hesperetin (4). A: Biosynthetic pathway of hesperetin-7-O-glucoside (4a) catalyzed by *CiUGT11* using hesperetin (4) as the substrate; B: HPLC analysis of the production of hesperetin-7-O-glucoside (4a) produced by *E. coli* carrying *CiUGT11*; C: Standard curve of hesperetin-7-O-glucoside; D: Yield analysis of hesperetin-7-O-glucoside (4a) after feeding different concentrations of hesperetin.

而, 也有例外情况: 除了生成类黄酮 7-O-葡萄糖苷外, *CiUGT11* 还催化圣草酚和芹菜素合成了相应的双糖苷产物 2b 和 5b。据文献报道, *CiUGT11* 不仅作用于黄酮类化合物的 C7-OH, 还能够催化 C3'-OH 和 C4'-OH 的糖基化修饰^[19], 而圣草酚和芹菜素均具有 C4'-OH, 因此初步推测双糖苷产物 2b 和 5b 分别为圣草酚-7,4'-O-二葡萄糖苷和芹菜素-7,4'-O-二葡萄糖苷。此外, 尽管 *UGT73B1* 未被报道具有除 C7-OH 之外的

糖基化修饰位点, 但有文献称 *UGT73B1* 与来自三花龙胆(*Gentiana triflora*)的花青素-3'-O-葡萄糖基转移酶(AB076697.1)具有 42.1% 的氨基酸序列相似性^[20]。基于此, 推测 2c 可能是圣草酚-7,3'-O-二葡萄糖苷。若想进一步确认作用位点, 还需要结合其他分析方法(如核磁共振分析)来鉴定 2b、2c 和 5b 的化合物结构。

尽管 3 个糖基转移酶对 6 个黄酮类化合物具有宽泛的底物特异性, 但它们的催化效率却

有所不同。例如, CiUGT11 和 UGT73B1 对橙皮素和柚皮素具有较高的底物偏好性, 其转化率分别达到了 96%。经文献调研, 推测其原因可能是部分糖基转移酶的受体口袋和结构环境会对口袋入口处的受体分子有一定的选择性^[28], 这可能是 CiUGT11 和 UGT73B1 对橙皮素和柚皮素有较高转化率的一个重要因素。然而, CiUGT11 和 UGT73B1 在大肠杆菌中的催化产物合成效率不高, 且添加的底物有大量剩余, 推测是细胞内 UDPG 供应不足。经文献调研, 野生型大肠杆菌细胞可以合成 UDPG, 但其在细胞内的浓度通常很低^[29]。后续可以通过过表达 UDPG 合成途径的 2 个关键基因——磷酸葡萄糖变位酶基因和 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因来增加 UDPG 的供应。此外, 阻断糖酵解过程中葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)向果糖-6-磷酸(F-6-P)的代谢途径, 使 G-6-P 定向合成葡萄糖-1-磷酸(G-1-P)也是增加 UDPG 代谢通量的有效途径^[30]。

综上所述, 本研究探究了 3 个植物源 UDP-葡萄糖基转移酶 CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 的底物特异性。体外酶促反应结果表明, CsUGT75L12、CiUGT11 和 UGT73B1 具有宽泛的底物识别功能, 能够催化多种黄酮类化合物生成相应的糖苷产物。其中, CiUGT11 和 UGT73B1 对黄酮类化合物具有较高的催化效率。利用 CiUGT11 和 UGT73B1 在大肠杆菌中成功异源合成橙皮素-7-O-葡萄糖苷和柚皮素-7-O-葡萄糖苷, 为利用合成生物学方法和代谢工程手段生产类黄酮-7-O-葡萄糖苷化合物奠定了基础。

作者贡献声明

季佳童: 实验操作、数据分析、论文撰写和修改; 张宏娇、尹文兵: 实验设计、数据分析、论文审阅和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] ABBAS M, SAEED F, ANJUM FM, AFZAAL M, TUFAIL T, BASHIR MS, ISHTIAQ A, HUSSAIN S, SULERIA HAR. Natural polyphenols: an overview[J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(8): 1689-1699.
- [2] WANG X, CAO YJ, CHEN SY, LIN JC, BIAN JS, HUANG DJ. Anti-inflammation activity of flavones and their structure-activity relationship[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(26): 7285-7302.
- [3] GÓRNIAK I, BARTOSZEWSKI R, KRÓLICZEWSKI J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2019, 18(1): 241-272.
- [4] KOPUSTINSKIENE DM, JAKSTAS V, SAVICKAS A, BERNATONIENE J. Flavonoids as anticancer agents[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 457.
- [5] WANG Y, QIAN J, CAO JP, WANG DL, LIU CR, YANG RX, LI X, SUN CD. Antioxidant capacity, anticancer ability and flavonoids composition of 35 *Citrus (Citrus reticulata* Blanco) varieties[J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1114.
- [6] XU H, YU SL, LIN CX, DONG DJ, XIAO JB, YE YB, WANG MF. Roles of flavonoids in ischemic heart disease: cardioprotective effects and mechanisms against myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155409.
- [7] MAHER P. The potential of flavonoids for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12): 3056.
- [8] 胥鑫萌, 童天娇, 刘伟, 刘军海. 黄酮类化合物的糖基化修饰[J]. *皮革与化工*, 2022, 39(3): 30-34.
- [9] XU XM, TONG TJ, LIU W, LIU JH. Glycosylation modification of flavonoids[J]. *Leather and Chemicals*, 2022, 39(3): 30-34 (in Chinese).
- [10] YANG B, LIU HL, YANG JL, GUPTA VK, JIANG YM. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 79: 116-124.
- [11] SHIMODA K, HAMADA H. Production of hesperetin glycosides by *Xanthomonas campestris* and cyclodextrin glucanotransferase and their anti-allergic activities[J]. *Nutrients*, 2010, 2(2): 171-180.
- [12] WANG WY, SUN CX, MAO LK, MA PH, LIU FG, YANG J, GAO YX. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 56: 21-38.
- [13] WANG MY, JI QS, LAI B, LIU YR, MEI KR. Structure-function and engineering of plant UDP-glycosyltransferase[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2023, 21: 5358-5371.
- [14] BIDART GN, PUTKARADZE N, FREDSLUND F, KJELDSSEN C, RUIZ AG, DUUS JØ, TEZE D, WELNER DH. Family 1 glycosyltransferase UGT706F8 from *Zea mays* selectively catalyzes the synthesis of silibinin 7-O-β-D-glucoside[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(16): 5078-5083.

- [14] NISHINA A, SATO D, YAMAMOTO J, KOBAYASHI-HATTORI K, HIRAI Y, KIMURA H. Antidiabetic-like effects of naringenin-7-*O*-glucoside from edible *Chrysanthemum* 'kotobuki' and naringenin by activation of the PI3K/Akt pathway and PPAR γ [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2019, 16(1): e1800434.
- [15] ANTONISAMY P, SUBASH-BABU P, ALBERT-BASKAR A, ALSHATWI AA, ARAVINTHAN A, IGNACIMUTHU S, CHOI KC, LEE SC, KIM JH. Experimental study on gastroprotective efficacy and mechanisms of luteolin-7-*O*-glucoside isolated from *Ophiorrhiza mungos* Linn. in different experimental models[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 25: 302-313.
- [16] ZHANG XM, XIE JC, CAO SP, ZHANG HY, PEI JJ, BU S, ZHAO LG. Efficient production of the glycosylated derivatives of baicalein in engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(9): 2831-2842.
- [17] DORJJUGDER N, TAGUCHI G. Production of flavonoid 7-*O*-glucosides by bioconversion using *Escherichia coli* expressing a 7-*O*-glucosyltransferase from tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2022, 194(7): 3320-3329.
- [18] DAI XL, SHI XX, YANG CL, ZHAO XY, ZHUANG JH, LIU YJ, GAO LP, XIA T. Two UDP-glycosyltransferases catalyze the biosynthesis of bitter flavonoid 7-*O*-neohesperidoside through sequential glycosylation in tea plants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(7): 2354-2365.
- [19] DENG YN, YANG P, ZHANG QL, WU QW, FENG LF, SHI WJ, PENG Q, DING L, TAN XK, ZHAN RT, MA DM. Genomic insights into the evolution of flavonoid biosynthesis and *O*-methyltransferase and glucosyltransferase in *Chrysanthemum indicum*[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(2): 113725.
- [20] KIM JH, KIM BG, PARK Y, KO JH, LIM CE, LIM J, LIM Y, AHN JH. Characterization of flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(6): 1471-1477.
- [21] DAI XL, ZHUANG JH, WU YL, WANG PQ, ZHAO GF, LIU YJ, JIANG XL, GAO LP, XIA T. Identification of a flavonoid glucosyltransferase involved in 7-OH site glycosylation in tea plants (*Camellia sinensis*)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 5926.
- [22] LI M, ZHOU Y, WEN ZX, NI Q, ZHOU ZQ, LIU YL, ZHOU Q, JIA ZC, GUO B, MA YH, CHEN B, ZHANG ZM, WANG JB. An efficient C-glycoside production platform enabled by rationally tuning the chemoselectivity of glycosyltransferases[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 8893.
- [23] KIM BG, YANG SM, KIM SY, CHA MN, AHN JH. Biosynthesis and production of glycosylated flavonoids in *Escherichia coli*: current state and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 2979-2988.
- [24] LIU XY, WANG PF, LI R, HYDEN B, AN XY, JING RY, ZHAO XL, ZHANG Y, QIAO HY, HAN Y, ZHANG XY, XU JZ, CHEN HJ, CAO HB. Cellular and metabolic characteristics of peach anther-derived callus[J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 311: 111796.
- [25] JUNG HA, ALI MY, BHAKTA HK, MIN BS, CHOI JS. Prunin is a highly potent flavonoid from *Prunus davidiana* stems that inhibits protein tyrosine phosphatase 1B and stimulates glucose uptake in insulin-resistant HepG2 cells[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2017, 40(1): 37-48.
- [26] WANG CQ, CHEN L, WANG ZD, ZHU SM. An alkali substrate feeding engineering conversion platform for hesperetin 7-*O*-glucoside biosynthesis[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2024, 59(7): 4461-4469.
- [27] AN DG, YANG SM, KIM BG, AHN JH. Biosynthesis of two quercetin *O*-diglycosides in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(6): 841-849.
- [28] MURAYAMA K, KATO-MURAYAMA M, HOSAKA T, OKITSU N, TANAKA Y, SHIROUZU M. Molecular basis of ligand recognition specificity of flavone glucosyltransferases in *Nemophila menziesii*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2024, 753: 109926.
- [29] MAO ZC, SHIN HD, CHEN RR. Engineering the *E. coli* UDP-glucose synthesis pathway for oligosaccharide synthesis[J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(2): 369-374.
- [30] 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.