

创建酿酒酵母细胞工厂高效生产人参皂苷前体达玛烯二醇 II

王冬^{1,2}, 刘怡^{1,2}, 许骄阳^{1,2}, 王金鹤^{1,2}, 戴住波^{1,2*}, 张学礼^{1,2}, 黄璐琦³

(1. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308; 2. 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308; 3. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

摘要: 人参皂苷是名贵药材西洋参和人参的主要活性成分, 其中达玛烯二醇 II 为人参皂苷类成分生物合成途径中的重要中间体。为构建高产人参皂苷前体达玛烯二醇 II 的细胞工厂, 本研究在优化过甲羟戊酸途径 (MVA 途径) 工程菌的基础上, 通过基因模块组合优化的方法获得能显著提高三萜前体的功能模块 C30-M: 分别由丹参法尼基焦磷酸合酶 (SmFPS) 和拟南芥鲨烯合酶 (AtSQS2) 组成, 其鲨烯的含量能达到 $67.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 约占细胞干重的 6.74%; 在进一步工作中, 发现来源于拟南芥的 2,3-环氧鲨烯合酶 (AtSQE2) 能提高下游中间体羊毛甾醇的产量到 $47.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 为对照菌含量的 22 倍; 然后, 通过调控达玛烯二醇 II 合酶基因的表达和采用反义 RNA 技术对麦角固醇合成途径中的 *ERG7* 基因进行调控及发酵工艺优化等策略, 首次将三萜合成通量提高到 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 级别, 创建出产量能达到 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 达玛烯二醇 II 的高效酵母细胞工厂, 为达玛烷型人参皂苷的产业化合成奠定了坚实的基础。

关键词: 人参皂苷; 达玛烯二醇 II; 酿酒酵母; 合成生物学; 微生物细胞工厂

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1233-09

Construction of efficient yeast cell factories for production of ginsenosides precursor dammarenediol-II

WANG Dong^{1,2}, LIU Yi^{1,2}, XU Jiao-yang^{1,2}, WANG Jin-he^{1,2}, DAI Zhu-bo^{1,2*},
ZHANG Xue-li^{1,2}, HUANG Lu-qi³

(1. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; 2. Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; 3. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: Dammarenediol-II is an important precursor in the biosynthesis pathway of ginsenosides which are the main active components of *Panax quinquefolius* and *Panax ginseng*. For constructing a dammarenediol-II-producing cell factory, the triterpenoid precursors of yeast are improved significantly by the modular pathway engineering strategy on the basis of an MVA optimized strain. The strain overexpressing *Salvia miltiorrhiza* SmFPS and *Arabidopsis thaliana* AtSQS2 could yield $67.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ squalene, accounting for about 6.74% of cell dry weight. In our further work, an *Arabidopsis thaliana* 2,3-oxidosqualene synthase AtSQE2 was found to be able to increase the downstream lanosterol yield by 22-fold, reaching $47.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Then, regulating dammarenediol-II synthase gene expression, using anti-sense RNA technology for regulation of *ERG7* in the ergosterol pathway, and optimizing fermentation process were successively performed. Finally, the synthesis flux of triterpenes was increased to $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for the first time, and we constructed an efficient cell factory that can produce $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dammarenediol-II, which lays a solid foundation of industrial synthesis of dammarane-type

收稿日期: 2018-05-29; 修回日期: 2018-06-19.

基金项目: 中国科学院青年创新促进会项目 (2015138).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-22-84861946, E-mail: dai_zb@tib.cas.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0503

ginsenosides.

Key words: ginsenosides; dammarediol-II; *Sacchromyces cerevisiae*; synthetic biology; microbial cell factories

人参皂苷 (ginsenosides) 是西洋参 (*Panax quinquefolius*)、人参 (*Panax ginseng*) 和三七 (*Panax notoginseng*) 等药用植物中的主要活性成分, 在中枢神经系统、心血管系统、内分泌系统及免疫系统方面具有广泛的药理学活性^[1-4]。人参皂苷属于三萜类化合物, 由苷元和糖基两部分组成。依据苷元特征, 人参皂苷主要可分达玛型四环三萜和齐墩果烷型五环三萜, 其中主要为原人参二醇和原人参三醇衍生的达玛型, 包括人参皂苷 CK、Rh2、Rg3 和 Rg1 等; 及含量较低的齐墩果烷型人参皂苷 Ro。

人参皂苷在西洋参和人参中的含量较低, 有限的天然资源及人工种植西洋参和人参存在栽培周期长 (超过 4 年)、连作障碍、农药及重金属残留等问题, 极大的限制了人参皂苷的应用和推广^[5]。利用合成生物学原理, 设计和改造微生物生产天然产物被认为是一种最有潜力的替代方法^[6]。在人参皂苷的异源合成方面, 虽然取得了不错的进展, 如中国科学院天津工业生物技术研究所和中国中医科学院中药资源中心合作, 在国际上首次创建出原人参二醇生产能力达到每升克级的酿酒酵母细胞工厂^[7]; 随后又构建出能同时合成原人参二醇、原人参三醇和齐墩果酸三种人参基本皂苷元的酿酒酵母细胞^[8]; 另外, Zhou 等^[9]鉴定出具有合成人参皂苷 Rh2、Rg3 活性的糖基转移酶 UGTPg45、UGTPg29, 并成功构建出能生产 $2.145 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ DCW Rh2 和 $3.49 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ DCW Rg3 的酿酒酵母细胞工厂; Jung 等^[10]从人参转录组中挖掘出能催化 PPD/CK 形成 Rh2/F2 的糖基转移酶 PgUGT74AE2 及能催化 Rh2/F2 形成 Rg3/Rd 的糖基转移酶 PgUGT94Q2, 并构建出能生产 $1.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg3 的酵母细胞工厂; Yang 等^[11]从枯草芽孢杆菌中克隆到一个能分别催化达玛烯二醇 II C3 位和 C20 位、原人参二醇和原人参三醇 C3 位和 C12 位发生糖基化反应生成非天然的人参皂苷 $3\beta\text{-O-Glc-DM}$ 、 $3\beta,20\text{S-di-O-Glc-DM}$ 、 $3\beta,12\beta\text{-di-O-Glc-PPD}$ 和 $3\beta,12\beta\text{-di-O-Glc-PPT}$ 的酶 UGT109A1, 通过抗癌活性分析发现, $3\beta,12\beta\text{-di-O-Glc-PPT}$ 的抗肺癌活性高于人参皂苷中抗肺癌活性最高的 Rg3, 并最终构建出一株可生产 $9.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $3\beta,12\beta\text{-di-O-Glc-PPT}$ 的酵母细胞工厂。但是从产业化水平来看, 目前微生物细胞工厂的生产能力还需要

显著提高, 因此构建前体供给充足的三萜底盘菌株是构建高产人参皂苷工程菌株的关键。

如图 1, 达玛烯二醇 II (dammarediol-II) 是达玛型人参皂苷生物合成的前体物质, 其基本单元异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP) 可由 MVA 途径或 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径分别合成; 然后, IPP 和 DMAPP 依次在法尼基焦磷酸合酶 (FPS) 和鲨烯合酶 (SQS) 的催化下形成法尼基焦磷酸 (FPP) 和三萜基本前体物质鲨烯 (SQ); 最后鲨烯可被 2,3-环氧鲨烯合酶 (SQE) 和达玛烯二醇 II 合酶 (DDS) 逐步催化形成达玛烯二醇 II^[7]。酿酒酵母是模式安全真核生物, 遗传背景清晰, 是构建人参皂苷细胞工厂的理想菌株。本研究在优化过 MVA 途径工程菌的基础上, 通过基因模块组合优化的方法获得能显著提高三萜前体的功能模块 C30-M; 在进一步工作中, 高酶活的 2,3-环氧鲨烯合酶 (AtSQE2) 被发现。然后, 通过调控达玛烯二醇 II 合酶基因的表达, 采用反义 RNA 技术对麦角固醇合成途径中的 *ERG7* 基因进行调控, 及发酵工艺优化等

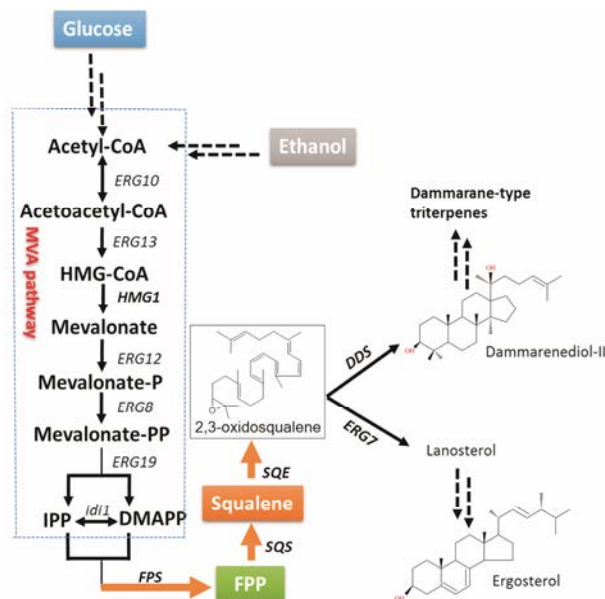


Figure 1 Ergosterol and dammarediol-II synthetic pathways in engineered yeast. Abbreviations: HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; IPP: Isopentenylidiphosphate; DMAPP: Dimethylallyldiphosphate; FPP: Farnesyl diphosphate; FPS: FPP synthase; SQS: Squalene synthase; SQE: Squalene epoxidase; DDS: Dammarediol-II synthase

策略, 最终构建出产量达到 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 达玛烯二醇 II 的高效酵母细胞工厂, 为达玛烷型人参皂苷的产业化合成奠定了坚实的基础。

材料与amp;方法

材料 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、酵母基因组 DNA 提取试剂盒、酵母质粒提取试剂盒、质粒小量快速提取试剂盒、DNA 清洁试剂盒与 DNA 回收试剂盒、氨苄青霉素、酵母选择培养基来源见文献^[10]; 羊毛甾醇、鲨烯和麦角固醇标准品购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 羽扇豆醇和达玛烯二醇 II 标准品购自

云南西力生物技术股份有限公司; 其他试剂均为分析纯。

培养基 按照文献^[12-14]配置 LB 培养基、SM-Ura 筛选培养基、SM-Ura-Trp 筛选培养基、SM-Ura-Trp-Leu 筛选培养基和高密度发酵培养基。SM-Ura-Trp-Leu-His 筛选培养基: 0.8% 酵母选择培养基 (四缺, Ura-Trp-Leu-His), 2% 葡萄糖。上述液体培养基加 2% 的 Agar 可配成相应的固体培养基。

质粒、菌株及引物 本次研究所用的质粒、菌株及引物序列信息分别见表 1 和表 2, 功能基因来源见表 3。

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Source
Plasmids		
pEASY-Blunt simple	Cloning vector for blunt ligation, <i>Amp</i> , <i>Km</i>	TransGen Biotech
pHIS3-TRP1	Cloning <i>HIS3</i> and <i>TRP1</i> marker into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pGAL80-LEU2	Cloning <i>GAL80</i> and <i>LEU2</i> marker into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pNDT80-HIS3	Cloning <i>NDT80</i> and <i>HIS3</i> marker into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM2-ERG9	Cloning <i>P_{PGK1}-ERG9-T_{ADH1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM2-AtSQS2	Cloning <i>P_{PGK1}-AtSQS2-T_{ADH1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM2-PgSQS	Cloning <i>P_{PGK1}-PgSQS-T_{ADH1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM3-ERG20	Cloning <i>P_{TEF1}-ERG20-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM3-SmFPS	Cloning <i>P_{TEF1}-SmFPS-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM3-GgFPS	Cloning <i>P_{TEF1}-GgFPS-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM3-LUS	Cloning <i>P_{TEF1}-LUS-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM2-AtSQE1	Cloning <i>P_{PGK1}-AtSQE1-T_{ADH1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM2-AtSQE2	Cloning <i>P_{PGK1}-AtSQE2-T_{ADH1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM2-AtSQE3	Cloning <i>P_{PGK1}-AtSQE3-T_{ADH1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM4-AtSQE2	Cloning <i>P_{TDH3}-AtSQE2-T_{TP1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pRS313-DDS	Cloning <i>P_{TEF1}-DDS-T_{CYC1}</i> cassette into pRS313, <i>LEU2</i> marker	Lab collection
pRS425-DDS	Cloning <i>P_{TEF1}-DDS-T_{CYC1}</i> cassette into pRS425, <i>LEU2</i> marker	Lab collection
pM3-ERG7-500-5	Cloning <i>P_{TEF1}-ERG7-500-5-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM3-ERG7-500-3	Cloning <i>P_{TEF1}-ERG7-500-3-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM3-ERG7-820-1171	Cloning <i>P_{TEF1}-ERG7-820-1171-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
pM3-ERG7 ORF	Cloning <i>P_{TEF1}-ERG7 ORF-T_{CYC1}</i> cassette into pEASY-Blunt simple	Lab collection
Strains		
NK2-SQ	<i>P_{PGK1}-tHMG1-T_{ADH1}</i> , <i>P_{PDC1}-ERG12-T_{ADH2}</i> , <i>P_{ENO2}-IDII-T_{PDC1}</i> , <i>P_{PYK1}-ERG19-T_{PGI1}</i> , <i>P_{FBA1}-ERG13-T_{TDH2}</i> , <i>P_{TDH3}-ERG8-T_{TP1}</i> and <i>P_{TEF1}-ERG10-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>URA3</i> marker were integrated into <i>GAL7</i> site of CEN.PK2-1D	Lin et al. ^[12]
NK2-SQ01	<i>P_{PGK1}-ERG9-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-ERG20-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
NK2-SQ02	<i>P_{PGK1}-ERG9-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-GgFPS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
NK2-SQ03	<i>P_{PGK1}-ERG9-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-SmFPS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
NK2-SQ04	<i>P_{PGK1}-PgSQS-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-ERG20-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
NK2-SQ05	<i>P_{PGK1}-PgSQS-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-GgFPS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
NK2-SQ06	<i>P_{PGK1}-PgSQS-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-SmFPS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
NK2-SQ07	<i>P_{PGK1}-AtSQS2-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-ERG20-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
NK2-SQ08	<i>P_{PGK1}-AtSQS2-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-GgFPS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
NK2-SQ09	<i>P_{PGK1}-AtSQS2-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-SmFPS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>TRP1</i> marker were integrated into <i>HIS3</i> site of NK2-SQ	This study
LUP01	<i>P_{TEF1}-LUP-T_{CYC1}</i> cassette together with <i>LEU2</i> marker were integrated into <i>GAL80</i> site of NK2-SQ09	This study
LUP02	<i>P_{PGK1}-ERG1-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-LUS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>LEU2</i> marker were integrated into <i>GAL80</i> site of NK2-SQ09	This study
LUP03	<i>P_{PGK1}-AtSQE1-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-LUS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>LEU2</i> marker were integrated into <i>GAL80</i> site of NK2-SQ09	This study
LUP04	<i>P_{PGK1}-AtSQE1-T_{ADH1}</i> , <i>P_{TEF1}-LUS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>LEU2</i> marker were integrated into <i>GAL80</i> site of NK2-SQ09	This study

Name	Description	Source
LUP05	<i>P_{PGK1}-AtSQE1-T_{ADHI}, P_{TEF1}-LUS-T_{CYC1}</i> cassettes together with <i>LEU2</i> marker were integrated into <i>GAL80</i> site of NK2-SQ09	This study
WD-2091	<i>P_{PGK1}-AtSQS2-T_{ADHI}, P_{TDH3}-AtSQE2-T_{TP1}, P_{TEF1}-SmFPS-T_{CYC1}</i> cassettes together with TRP1 marker were integrated into HIS3 site of NK2-SQ	This study
313-DD	pRS313-DDS integrated into WD-2091	This study
425-DD	pRS425-DDS integrated into WD-2091	This study
DD01	<i>P_{TEF1}-ERG7-500-5-T_{CYC1}</i> cassette together with <i>HIS3</i> marker were integrated into <i>NDT80</i> site of 425-DD	This study
DD02	<i>P_{TEF1}-ERG7-500-3-T_{CYC1}</i> cassette together with <i>HIS3</i> marker were integrated into <i>NDT80</i> site of 425-DD	This study
DD03	<i>P_{TEF1}-ERG7-820-1171-T_{CYC1}</i> cassette together with <i>HIS3</i> marker were integrated into <i>NDT80</i> site of 425-DD	This study
DD04	<i>P_{TEF1}-ERG7 ORF-T_{CYC1}</i> cassette together with <i>HIS3</i> marker were integrated into <i>NDT80</i> site of 425-DD	This study

Table 2 Primers used in this work

Primer	Sequence (5' to 3')
X1-M-pEASY-r-t-F	CTTGCAAATGCCATTTGTGTCAGATGTTATAATATCTGTGCGCTTTAATTAAGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGT
ZD-His3 interg.-1	TTTATATAATGTATAATTCATT
1-M-pEASY-PGK1-F	CTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCTTAATTAACGCACAGATATTATAAC
3G-1-M-ADHt-TDH3-R	CCTCCGCGTCATTAACACTTCTTTGTTGTTGACGCTAACATCAACGC TAGTATTCGCGCATGCCGGTAGAGGTGTGG
3G-3-M-ADHt-TDH3-F	CAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGC ATGCCGAATACTAGCGTTGAATGTTAGCGTC
3G-3-M-TPI1t-TEF1-R	AGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGGTGTGTGGGGGATCACTT TAATTA TCTATATAACAGTTGAAATTTGGA
3G-2-M-TPI1t-TEF1-F	GTCATTTTCGCGTTGAGAAGATGTTCTTATCCAAATTTCAACTGT- TATATAGATTAATTAAGTGATCCCCACAC
M-CYC1t-pEASY-R	CGTATTACAATTCCTGGCCGCTGTTTACAACTCGTGTACTGGG AAAACCTGGCGGCTTGGCCGATTCAATTAATGC
ZD-His3 interg.-2	CATTCTATACGTGTCATTCTGA
X2-M-pEASY-r-t-R	CGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGCGGCCCTGCATTAATGAATCGCCAACGCGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
1-M-ADHt-TEF1-R	GGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGGTGTGTGGGGATCACTTTAATTAATCGGCATGCCGGTAGAGGTG
2-M-ADHt-TEF1-F	GGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGCATGCCGATTAATTAAGTGATCCCCA
X1-Xp-pEASY-M13R-F	CCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCG
X2-Xp-pEASY-M13F-R	CCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA
Xp-M-pEASY-M13R-F	GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGTCACACAGGAAACA GCTATGACC
Xp-M-pEASY-M13F-R	CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGACGACGTTGTAA ACGACGGCCAGT
GAL80-interg.-1	GGTTACCAGATCTACACCGTTCGGATTTC
GAL80-interg.-2	ACAACATTTGGTCACTAAATCGATATTTTAC
NDT80-interg.-1	CATCATAAGGAATTCGGGATTCTCCCAT
NDT80-interg.-2	CTGGCTTTAAAAAATGGATAAAAAAGGGATG
SacII-PGK1	GCGCCGCGGACGCACAGATATTATAACATC
SacII-pTEF1	GCGCCGCGGAGTGATCCCCACACACCATAGCTT
Pac-pTDH3	GCGTTAATTAATACTAGCGTTGAATGTTAGCGTCA
ERG20-ASC1	TCGCGGCGGCCCTATTGCTTCTCTTGTAACATTTG
GgFPS-ASC1	GCGGCGCGCTCATTTCTGGCGTTGTAGATCTTCT
SmFPS-ASC1	GCGGCGCGCTTATTCTGCCTCTTGATATCTTGCC
ERG9-ASC1	GCGGCGCGCTCACGCTCTGTGTAAAGTGATATA
AtSQS2-ASC1	GCGGCGCGCTCAGTTTGCTCTGAGATATGCAAAGAC
PgSQS-ASC1	GCGGCGCGCTCACTGTTTGTTCAGTAGAGGT
LUS-ASC1	GCGGCGCGCTTAGTAGGAGTGAGCACATAAACT
ERG1-ASC1	GCGGCGCGCTTAACCAATCAACTACCAAACAAA
AtSQE1-ASC1	GCGGCGCGCCTATGAACATTTGTTTCTCCAACCTG
AtSQE2-ASC1	GCGGCGCGCTCATTGAGGAGAAGAAGAAGGAG
AtSQE3-ASC1	GCGGCGCGCTTAAGGAGGAGCAGGTATATGGCAGG
SpgDDS-ASC1	GCGGCGCGCTCATATCTTTAATTGTTGATGCTTAGG
ERG7-500-5-ASC1	GCGGCGCGCTGTTTCCGGATATTGTGTTAAAATTTCAAG
ERG7-500-3-ASC1	GCGGCGCGCCACGCATCAGAATCGCCATCGAATTC
ERG7-820-1171-ASC1	GCGGCGCGCAACTTCTCCAAGAACAGGAATACCGTATGTG
ERG7-ASC1	GCGGCGCGCC ATGACAGAAATTTATTCTGACACAATC

Continued

Table 3 Gene annotations

Gene	Function	Source
<i>ERG9</i>	Squalene synthase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>AtSQS2</i>	Squalene synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>PgSQS</i>	Squalene synthase	<i>Panax ginseng</i>
<i>ERG20</i>	FPP synthase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>SmFPS</i>	FPP synthase	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
<i>GgFPS</i>	FPP synthase	<i>Glycyrrhizaglabra</i>
<i>ERG1</i>	2,3-oxidosqualene synthase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>AtSQE1</i>	2,3-oxidosqualene synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtSQE2</i>	2,3-oxidosqualene synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtSQE3</i>	2,3-oxidosqualene synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>LUS</i>	Lupeol synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>SpGDDS</i>	Dammareniol-II synthase	<i>Panax ginseng</i>
<i>ERG7</i>	Lanosterol synthase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

NK2-SQ01~NK2-SQ09 菌株的构建 在 SM-Ura 培养基中活化菌株 NK2-SQ, 并用醋酸锂法制备感受态细胞。按照表 4 的引物搭配方案, 并参照文献^[12]的菌株构建方法构建菌株 NK2-SQ01~NK2-SQ09。

Table 4 Modules amplification proposal

Template	Primers	Module
pM2-ERG9 (PgSQS or AtSQS2)	1-M-pEASY-PGK1-F 1-M-ADHt-TEF1-R	<i>P_{PGK1}-ERG9</i> (<i>PgSQS</i> or <i>AtSQS2</i>)- <i>T_{ADH1}</i>
pM3-ERG20 (GgFPS or SmFPS)	2-M-ADHt-TEF1-F M-CYC1t-pEASY-R	<i>P_{TEF1}-ERG20</i> (<i>GgFPS</i> or <i>SmFPS</i>)- <i>T_{CYC1}</i>
pHIS3-TRP1	X1-M-pEASY-r-t-F ZD-His3 interg.-1	Helper fragment of <i>HIS3</i> site
pHIS3-TRP1	ZD-His3 interg.-2 X2-M-pEASY-r-t-R	<i>TRP1</i> marker and the helper fragment of <i>HIS3</i> site

LUP01~LUP05 菌株的构建 在 SM-URA-TRP 培养基中活化菌株 NK2-SQ09, 并用醋酸锂法制备感受态细胞。按照表 5 的引物搭配方案, 并参照文献^[12]的菌株构建方法构建菌株 LUP01~LUP05。

WD-2091 菌株的构建 在 SM-Ura 培养基中活化菌株 NK2-SQ, 并用醋酸锂法制备感受态细胞。按照表 6 的引物搭配方案, 并参照文献^[12]的菌株构建方法构建菌株 WD-2091。

313-DD 和 425-DD 菌株的构建 在 SM-Ura-Trp 培养基中活化菌株 WD-2091, 并用醋酸锂法制备感受态细胞。参照文献^[13]的菌株构建方法构建菌株

Table 5 Modules amplification proposal

Template	Primer	Module
LUP01		
pM3-LUS	Xp-M-pEASY-M13R-F Xp-M-pEASY-M13F-R	<i>P_{TEF1}-LUS-T_{CYC1}</i>
pGAL80-LEU2	X1-Xp-pEASY-M13R-F GAL80-interg.-2	Helper fragment of <i>GAL80</i> site
pGAL80-LEU2	GAL80-interg.-1 X2-Xp-pEASY-M13F-R	<i>LEU2</i> marker and the helper fragment of <i>GAL80</i> site
LUP02-LUP05		
pM2-ERG1 (AtSQE1 or AtSQE2 or AtSQE3)	1-M-pEASY-PGK1-F 1-M-ADHt-TEF1-R	<i>P_{PGK1}-ERG1</i> (<i>AtSQE1</i> or <i>AtSQE2</i> or <i>AtSQE3</i>)- <i>T_{ADH1}</i>
pM3-LUS	2-M-ADHt-TEF1-F M-CYC1t-pEASY-R	<i>P_{TEF1}-LUS-T_{CYC1}</i>
pGAL80-LEU2	X1-Xp-pEASY-M13R-F GAL80-interg.-2	Helper fragment of <i>GAL80</i> site
pGAL80-LEU2	GAL80-interg.-1 X2-Xp-pEASY-M13F-R	<i>LEU2</i> marker and the helper fragment of <i>GAL80</i> site

Table 6 Modules amplification proposal

Template	Primer	Module
pM2-AtSQS2	1-M-pEASY-PGK1-F 3G-1-M-ADHt-TDH3-R	<i>P_{PGK1}-AtSQS2-T_{ADH1}</i>
pM4-AtSQE2	3G-3-M-ADHt-TDH3-F 3G-3-M-TPI1t-TEF1-R	<i>P_{TDH3}-AtSQE2-T_{TPI1}</i>
pM3-SmFPS	3G-2-M-TPI1t-TEF1-F M-CYC1t-pEASY-R	<i>P_{TEF1}-SmFPS-T_{CYC1}</i>
pHIS3-TRP1	X1-M-pEASY-r-t-F ZD-His3 interg.-1	Helper fragment of <i>HIS3</i> site
pHIS3-TRP1	ZD-His3 interg.-2 X2-M-pEASY-r-t-R	<i>TRP1</i> marker and the helper fragment of <i>HIS3</i> site

313-DD 和 425-DD。

DD01~DD04 菌株的构建 在 SM-Ura-Trp-Leu 培养基中活化菌株 425-DD, 并用醋酸锂法制备感受态细胞。按照表 7 的引物搭配方案, 并参照文献^[12]的菌株构建方法构建菌株 DD01~DD04。

菌株摇瓶发酵方法及产物提取方法 挑取平板上的单克隆于相应液体培养基中, 30 °C、250 r·min⁻¹ 过夜制备种子液。将种子液接种至含 15 mL 相应液体培养基的 100 mL 的三角瓶中, 30 °C、250 r·min⁻¹ 振荡培养 6 天后, 进行产物的提取。产物提取的方法如下: 取 2 mL 的发酵液于破碎管中, 13 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 去培养基, 无菌水清洗后, 加入适量玻璃珠 (直

Table 7 Modules amplification proposal

Template	Primer	Module
pM3-ERG7-500-5 (ERG7-500-3 or ERG7-820-1171 or ERG7 ORF)	Xp-M-pEASY-M13R-F Xp-M-pEASY-M13F-R	<i>P_{TEF1}-ERG7-500-5</i> (<i>ERG7-500-3</i> or <i>ERG7-820-1171</i> or <i>ERG7 ORF</i>)- <i>T_{CYC1}</i>
pNDT80-HIS3	X1-Xp-pEASY-M13R-F NDT80-interg.-2	Helper fragment of <i>NDT80</i> site
pNDT80-HIS3	NDT80-interg.-1 X2-Xp-pEASY-M13F-R	<i>HIS3</i> marker and the helper fragment of <i>NDT80</i> site

径为 0.5 mm) 和 0.5 mL 萃取剂 (丙酮-甲醇=1:1), 震荡破碎 5 min, 超声破碎 30 min, $1.3 \times 10^3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 取上清。重复处理第 3 次, 合并上清。上清过 0.22 μm 有机尼龙滤膜后备用。

高密度发酵方法 挑取平板上的单克隆至装有 SD-Ura-His-Leu-Trp 培养基的试管, 30°C 、 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养过夜; 吸取 500 μL 菌液至装有 50 mL SD-Ura-His-Leu-Trp 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30°C 、 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 24 h; 分别吸取 2 mL 菌液至 3 个装有 100 mL 种子培养基的 1 L 三角瓶中, 30°C 、 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 48 h; 最后经火焰接种环, 将种子液加入含 3 L 发酵培养基的 7 L 发酵罐中。发酵过程中参数设定值分别为: 温度 30°C , pH 5.0, 溶氧 30%, 通气流量 $3 \sim 20 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 搅拌转速 $300 \sim 1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 溶氧与搅拌转速、通气级联。补料策略为: 溶氧值大于 60% 时, 向发酵罐中加入补料培养基至发酵液中乙醇浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每 12 h 检测 A_{600} 、羊毛甾醇、鲨烯、麦角固醇和达玛烯二醇 II 的含量。

羊毛甾醇、鲨烯、麦角固醇、羽扇豆醇的检测方法 GC-MS 测定: 进样口温度 300°C , 进样体积 1 μL , 不分流, 溶剂延时 12 min; 色谱柱: HP-5ms ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.5 \mu\text{m}$); 色谱条件: 80°C , 1 min; $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 到 300°C 保温 18 min; MS 条件: SIM: 69、109、135、363 和 411; 羊毛甾醇、鲨烯、麦角固醇和羽扇豆醇标准品用于定性和定量分析。

达玛烯二醇 II 的检测方法 HPLC 测定: DAD 检测器, Waters Symmetry[®] C18 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为水, 等梯度洗脱, A:B 为 90:10, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测时间 20 min, 柱温 30°C , 检测波长 203 nm; 达玛烯二醇 II 的标准品用于定性和定量分析。

结果

1 高效三萜功能模块 C30-M 的构建

鲨烯是三萜生物合成途径的通用前体, 课题组前期研究发过表达 FPS 和 SQS 可以增加三萜化合物及固醇的产量^[7]。本研究中, 为了进一步提高三萜底盘菌中三萜前体的合成通量, 通过基因模块组合优化的方法, 将不同植物中来源的 FPS 和 SQS 分别进行模块化组装后整合到经过 MVA 途径优化的 NK2-SQ 菌株中, 转化子经过缺陷培养基筛选后, 分别用相应的引物进行 PCR 验证和测序, 测序正确的菌株命名为 NK2-SQ01~NK2-SQ09。

由发酵结果 (图 2) 可以看出, 组合表达 FPS 和 SQS 后, 工程菌株鲨烯的产量均有不同程度的增加; 在三种不同来源的 FPS 中, 丹参来源的 SmFPS 效果最佳; 在三种不同来源的 SQS 中, 拟南芥来源的 AtSQS2 效果最佳; SmFPS 和 AtSQS2 二者的组合可使工程菌株鲨烯的含量进一步提高 72.8%, 达到 $67.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

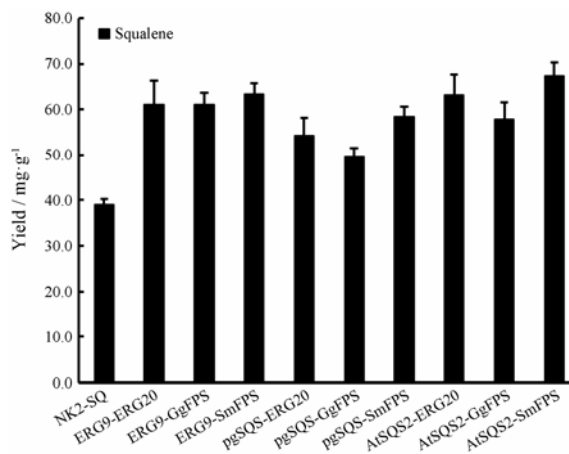


Figure 2 Squalene yield by engineered yeast. From left to right: NK2-SQ, NK2-SQ01~NK2-SQ09

2 AtSQE2 能显著提高底盘菌 2,3-环氧鲨烯的合成通量

2,3-环氧鲨烯合酶 (squaleneepoxidase, SQE) 可催化鲨烯形成 2,3-环氧鲨烯, 该酶 (ERG1 基因编码) 被认为是麦角固醇生物合成途径限速酶之一, 过表达该酶可以增加固醇及三萜化合物的产量^[7,15]。为进一步筛选到高活性的 SQE, 首先将来源于拟南芥的 AtSQE1、AtSQE2、AtSQE3 和酿酒酵母来源的 ERG1 等 4 个 2,3-环氧鲨烯合酶基因与羽扇豆醇合成酶基因 LUS 整合至工程菌株 NK2-SQ09 的染色体上, 获得工程菌株 LUP02~LUP05, 单独整合 LUS 的表达盒工程菌为对照菌株 LUP01。在此基础上分析工程菌中 2,3-环氧鲨烯的前体鲨烯与产物羽扇豆醇和羊毛甾醇产量变化获得目标基因。

发酵 6 天后的样品检测结果显示, 与对照菌株 LUP01 相比, 过表达 ERG1 和 AtSQE3 的 LUP02 和 LUP05 菌株, 并不能增加羽扇豆醇的产量, 该结果可能是 ERG1 和 AtSQE3 酶活较低且麦角固醇生物合成途径受到严格控制造成的^[16]; 但过表达 AtSQE1 和 AtSQE2 的 LUP03 和 LUP04 菌株羽扇豆醇的含量分别提高了 232% 和 217% (图 3)。然后, 对其他关键代谢物的产量进行测定后发现, LUP04 菌株羊毛甾醇的含量是 LUP03 菌株 5.97 倍, 达到 $47.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 且

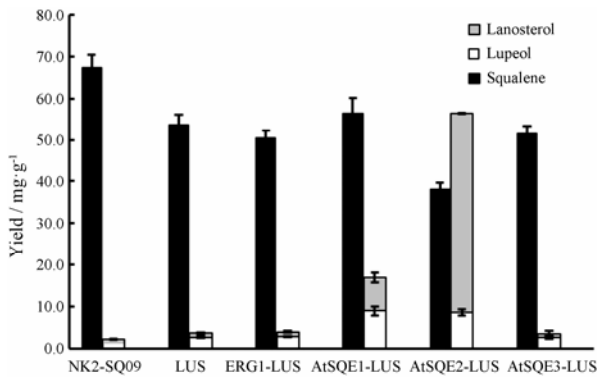


Figure 3 Lupeol, lanosterol and squalene yield by engineered yeast. From left to right: NK2-SQ09, LUP01-LUP05

LUP04 鲨烯的产量较出发菌株 NK2-SQ09 降低最多, 达到 43%。综上所述, 最终获得能显著提高 2,3-环氧鲨烯合成通量的 2,3-环氧鲨烯合酶 AtSQE2。

3 高萜底盘构建及达玛烯二醇 II 酵母细胞工厂的创建

在完成甲羟戊酸途径 (MVA 途径) 优化的工程菌基础上, 通过基因模块组合优化的方法将三萜合成通量的关键基因 *AtSQE2*、*SmFPS* 和 *AtSQS2* 分别与强启动子 TDH3、TEF1 和 PGK1 及相应的终止子连接后, 共同整合至 NK2-SQ 菌株的 *HIS3* 位点, 构建出三萜底盘细胞 WD-2091。然后, 使用不同拷贝数质粒对达玛烯二醇 II 合酶基因的表达做了进一步调控: 将密码子优化过的人参来源达玛烯二醇 II 合酶基因 *SpgDDS* 与强启动子 TEF1 及终止子 *CYC1t* 相连后, 分别连入高拷贝质粒 pRS425 及低拷贝 pRS313 中, 构建出质粒 pRS425-DDS 及 pRS313-DDS; 最后将 pRS425-DDS 及 pRS313-DDS 分别转入三萜底盘细胞 WD-2091 中, 构建出工程菌 313-DD 和 425-DD。

发酵 6 天后发现: 工程菌 313-DD 和 425-DD (图 4) 均能生产较高产量的达玛烯二醇 II, 其中转入高拷贝质粒的 425-DD 工程菌达玛烯二醇 II 的含量是转入低拷贝质粒工程菌 313-DD 的 1.3 倍, 达到 $88.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 二者较 WD-2091 工程菌鲨烯的含量分别下降了 83.3% 和 81.9%, 羊毛甾醇的含量下降了 74.6% 和 88.6%; 另外, 与 NK2-SQ09 相比, WD-2091 菌株中三萜前体鲨烯的含量降低了 16.4%, 但羊毛甾醇的产量提高了 15.1 倍, 进一步说明 2,3-环氧鲨烯的供给在底盘菌中已显著提高 (图 5)。

4 抑制分支途径关键酶基因 *ERG7* 提高达玛烯二醇 II 的产量

在酿酒酵母中, *ERG7* 基因编码的羊毛甾醇合酶和达玛烯二醇 II 合酶竞争使用同一底物, 在本研究

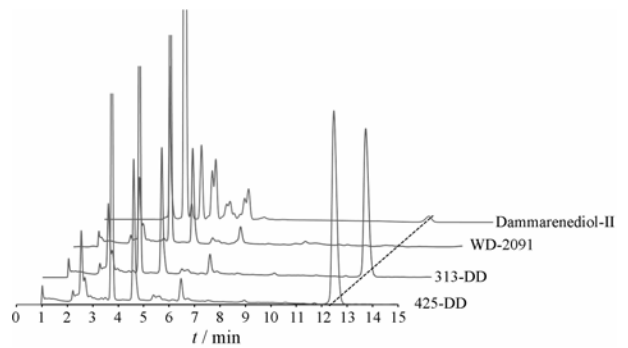


Figure 4 Product determination by HPLC

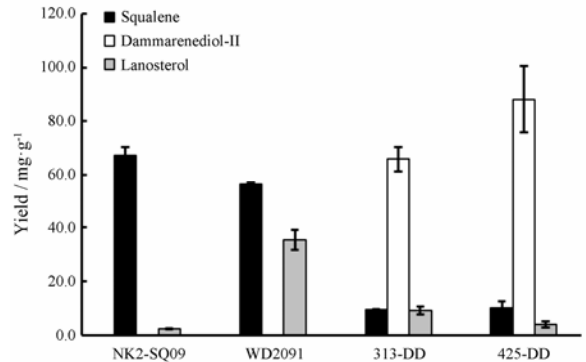


Figure 5 Dammarenediol-II, lanosterol and squalene yield by engineered yeast

中, 拟通过反义 RNA 技术下调 *ERG7* 的表达来提高人工酵母细胞中非羊毛甾醇型三萜化合物的积累, 进一步促进工程菌达玛烯二醇 II 的合成。

基于反义 RNA 的原理^[17], 本研究分别选取了 *ERG7* 基因的启动子、终止子、基因内部及完整 ORF 的 4 个核酸区域设计反义片段 (图 6), 构建相应的工程菌 DD01~DD04。发酵结果显示: 当对 *ERG7* 上游 500 bp 和阅读框架外 500 bp 进行干扰后, 达玛烯二醇 II 的产量下降, 而羊毛甾醇及鲨烯的产量增加; 当对 *ERG7* 整个开放阅读框架进行干扰时, 达玛烯二醇 II、羊毛甾醇及鲨烯的产量没有明显变化; 当对 *ERG7* 下游 500 bp 和阅读框架外 500 bp 或 *ERG7* 内部 820 bp 到 1171 bp 进行干扰后, 羊毛甾醇及鲨烯的合成量减少, 达玛烯二醇 II 分别提高 15.8% 和 16.2%, 达到 $102.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $102.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (图 7)。

5 高效达玛烯二醇 II 酵母细胞工厂的发酵工艺优化

在酿酒酵母中, 乙酰辅酶 A 是 MVA 途径的底物,

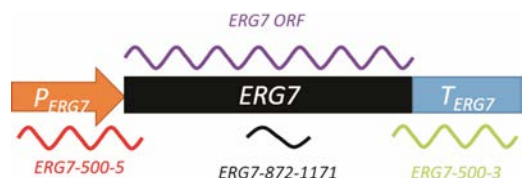


Figure 6 Anti-sense RNAs for *ERG7* knock-down

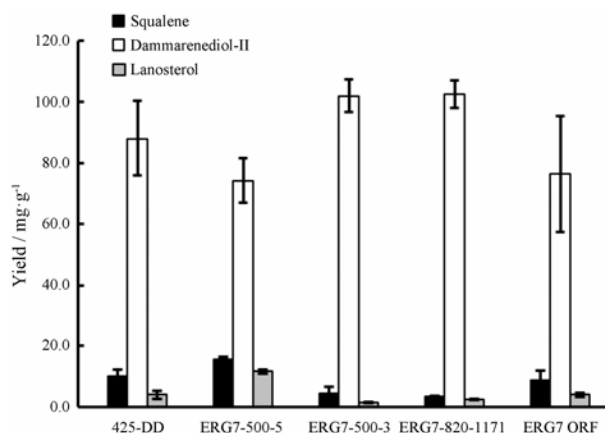


Figure 7 Damarenediol-II, lanosterol and squalene yield by engineered yeast. From left to right: 425-DD, DD01-DD04

它的供给决定了整个萜类及麦角固醇的代谢通量。当葡萄糖作为碳源时,由葡萄糖至乙酰辅酶 A 需要 13 步反应,且乙酰辅酶 A 是副产物;而当乙醇作为碳源时,由乙醇至乙酰辅酶 A 只需要三步反应,且基本上胞内所有碳代谢都源于乙酰辅酶 A,因而,直接以乙醇作为碳源补料可以缩短发酵时间并提升萜类化合物的产量^[15]。本研究在生物反应器中利用 DD03 菌株进行了发酵工艺的优化。

发酵结果显示,随着发酵时间的增加,生物量、达玛烯二醇 II 的含量及产量持续增加,发酵 120 h 时, A_{600} 和达玛烯二醇 II 的含量及产量分别达到 526、 $67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 与之相比,麦角固醇、羊毛甾醇和鲨烯的含量一直处于较低水平:60 h 后,三者的含量均在 $5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 以下;120 h 时,三者的含量分别为 3.3、4.3 和 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,分别占达玛烯二醇 II 含量的 4.9%、6.4% 和 2.5% (图 8 和图 9)。该结果表明,整个萜类合成方向代谢流大部分用于达玛烯二醇 II 化合物的合成。

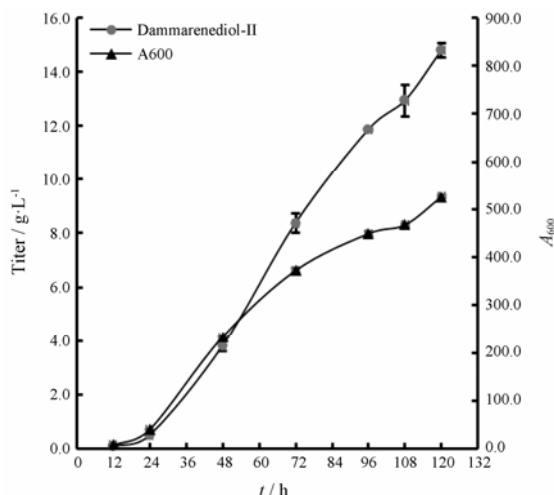


Figure 8 Titer of damarenediol-II and A_{600} during high cell density fermentation of DD03

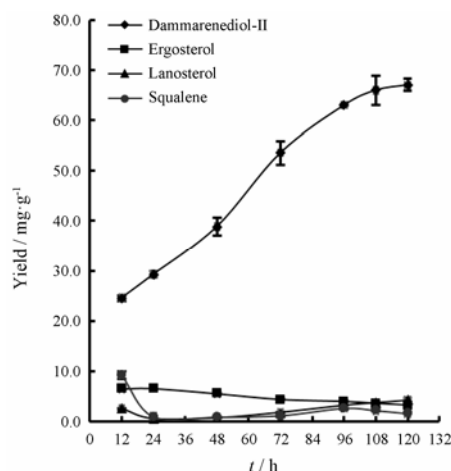


Figure 9 Yield of damarenediol-II, ergosterol, lanosterol and squalene during high cell density fermentation of DD03

讨论

利用合成生物学技术创建具有商业化潜力的细胞工厂是本领域的难点。虽然目前天然药物的生物合成途径解析及初级细胞工厂的创建已在国际上取得了重要进展,如 O'Connor 和 Sattely 研究组近期分别获得了抗癌药物长春花碱和依托泊苷元的完整生物合成途径; Smolke 研究组通过基因挖掘、途径优化和酶工程等手段,实现了生产蒂巴茵和氢可酮等阿片类生物碱化合物的微克每升级的初级酵母工程菌构建等^[18-20],但具有市场竞争力的天然药物微生物细胞工厂只有包括青蒿酸和 β -榄香烯等少数品种成功^[6,21]。

本研究以达玛烷型人参皂苷的关键前体达玛烯二醇 II 为研究案例,通过途径的模块化及组合优化、基因元件筛选、密码子优化、反义 RNA 技术、发酵工艺等技术策略综合应用,首次将三萜合成通量提高到 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 级别,构建出产量达到 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 达玛烯二醇 II 的高效酵母细胞工厂,为达玛烷型等三萜皂苷的产业化合成奠定了坚实的基础。

References

- [1] Christensen LP. Chapter 1 Ginsenosides: chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects [J]. Adv Food Nutr Res, 2009, 55: 1-99.
- [2] Qi LW, Wang CZ, Yuan CS. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity [J]. Phytochemistry, 2011, 72: 689-699.
- [3] Radad K, Moldzio R, Rausch WD. Ginsenosides and their CNS targets [J]. CNS Neurosci Ther, 2011, 17: 761.
- [4] Zhou W, Zhou P. Advances in the study of ginsenoside

- compound K [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 917–923.
- [5] Yang JL, Gao LL, Zhu P. Advances in the biosynthesis research of ginsenosides [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 170–178.
- [6] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496: 528–532.
- [7] Dai ZB, Liu Y, Zhang XN, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides [J]. *Metab Eng*, 2013, 20: 146–156.
- [8] Dai ZB, Wang BB, Liu Y, et al. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast [J]. *Sci Rep-UK*, 2014, 4: 3698–3698.
- [9] Wang PP, Wei YJ, Fan Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts [J]. *Metab Eng*, 2015, 29: 97–105.
- [10] Jung SC, Kim W, Park SC, et al. Two ginseng UDP-glycosyltransferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 2177–2188.
- [11] Liang HC, Hu ZF, Zhang TT, et al. Production of a bioactive unnatural ginsenoside by metabolically engineered yeasts based on a new UDP-glycosyltransferase from *Bacillus subtilis* [J]. *Metab Eng*, 2017, 44: 60–69.
- [12] Lin TT, Wang D, Dai ZB, et al. Construction of cell factories for production of lupeol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41: 1008–1015.
- [13] Li SL, Wang D, Liu Y, et al. Study of heterologous efficient synthesis of cucurbitadienol [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2017, 42: 3326–3331.
- [14] Lenihan JR, Tsuruta H, Diola D, et al. Developing an industrial artemisinic acid fermentation process to support the cost-effective production of antimalarial artemisinin-based combination therapies [J]. *Biotechnol Prog*, 2008, 24: 1026–1032.
- [15] Sun Y, Zhao HW, Ge F. The construction of over-expression vector for *Panax notoginseng* 5S gene and its transformation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 138–143.
- [16] Lorenz RT, Parks LW. Regulation of ergosterol biosynthesis and sterol uptake in a sterol-auxotrophic yeast [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169: 3707–3711.
- [17] Eguchi Y, Itoh T, Tomizawa JI. Antisense RNA [J]. *Annu Rev Biochem*, 1991, 60: 631.
- [18] Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast [J]. *Science*, 2015, 349: 1095–1100.
- [19] Caputi L, Franke J, Farrow SC, et al. Missing enzymes in the biosynthesis of the anticancer drug vinblastine in *Madagascar periwinkle* [J]. *Science*, 2018, 360: 1235–1239.
- [20] Lau W, Sattely ES. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone [J]. *Science*, 2015, 349: 1224–1228.
- [21] Zhang XL, Huang LQ, Dai ZB et al. A recombinant microorganism and its application: PCT/CN2017/109029 [P]. 2017-11-02.