白木香中倍半萜合酶基因的克隆与功能研究

凌鸽雨[1,2], 张方晴[1,2], 米芯雨[1,2], 关范圆[1,2], 侯　婕[1,2], 张雨路[1,2], 邢苾瑶[1,2], 王　娟[1,2], 王晓晖[1,2], 刘　晓[1,2], 史社坡[1,2*]

(1. 北京中医药大学, 北京中医药研究院, 中药现代研究中心, 北京 102488;　2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: 沉香是瑞香科植物白木香等在受到外界伤害刺激后产生的具有特殊香味的树脂, 兼具药用和香用价值。倍半萜类化合物是沉香具有特征性香气和生物活性的主要成分之一, 然而, 沉香中倍半萜类化合物的生物合成机制尚未完全阐明。本研究从茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导的白木香愈伤组织中克隆并鉴定出3条倍半萜合酶基因*AsTPS2*、*AsTPS10*和*AsTPS41*。通过在大肠杆菌中表达纯化, 成功获得可溶性重组蛋白。体外酶反应发现AsTPS2和AsTPS10具有相似功能, 不仅能够催化法尼基焦磷酸 (FPP) 产生*α*-葎草烯和*β*-石竹烯, 还能催化香叶基焦磷酸 (GPP) 产生链状单萜香叶醇、橙花醇和单环单萜*α*-松油醇、异蒲勒醇。AsTPS41则催化FPP产生*β*-榄香烯、*α*-愈创木烯和*δ*-愈创木烯, 同时也能够催化GPP生成香叶醇、橙花醇和*α*-松油醇。利用AlphaFold3对AsTPS2和AsTPS10的蛋白结构进行模拟并进行对接分析, 发现二者虽氨基酸序列不同 (一致性83.5%), 但在活性腔周围的氨基酸残基及其构象完全相同, 因而表现出相同的催化活性。进一步对AsTPS2活性腔周围的关键氨基酸进行位点突变, 单点突变体Y411A在保持AsTPS2功能的前提下产生了2个新产物*β*-榄香烯和shyobunol; 双点突变体G410A-Y411A在Y411基础上, 产生4个新产物, 分别为*α*-榄香醇、橙花叔醇、*trans*-法尼醇和pogostol。单点突变体C449A产物中*β*-石竹烯的占比由野生AsTPS2中的7.2%提升至55.1%。在上述研究基础上, 构建了AsTPS2及其突变体AsTPS2^{C449A}、AsTPS41的酿酒酵母表达体系, 经分离制备并结合NMR图谱分析, 鉴定了产物*α*-葎草烯、*β*-石竹烯和*δ*-愈创木烯的结构。上述研究结果, 不仅为研究沉香形成的分子机制提供参考, 而且也为进一步揭示沉香倍半萜生物合成后修饰相关酶的研究奠定基础。

关键词: 白木香; 沉香; 倍半萜; 萜类合酶; 单萜

中图分类号: Q946.5　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2026)07-2773-11

Cloning and functional characterization of sesquiterpene synthases from *Aquilaria sinensis*

LING Ge-yu[1,2], ZHANG Fang-qing[1,2], MI Xin-yu[1,2], GUAN Fan-yuan[1,2], HOU Jie[1,2], ZHANG Yu-lu[1,2], XING Bi-yao[1,2], WANG Juan[1,2], WANG Xiao-hui[1,2], LIU Xiao[1,2], SHI She-po[1,2*]

(*1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;　2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China*)

Abstract: Agarwood is an aromatic resin produced by *Aquilaria sinensis* and other plants of the Thymelaeaceae family in response to external injury. It is valued both medicinally and as a fragrance material. Sesquiterpenoids are key components responsible for the characteristic aroma and bioactivity of agarwood, but their biosynthetic pathway remains incompletely elucidated. In this study, three sesquiterpene synthase genes *AsTPS2*, *AsTPS10*, and

收稿日期: 2026-02-10;　修回日期: 2026-04-28.
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82574536).
*通讯作者 E-mail: shishepo@163.com
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0185

AsTPS41, were cloned and identified from methyl jasmonate (MeJA)-induced callus of *A. sinensis*. Recombinant proteins were obtained by expression and purification in *Escherichia coli*. *In vitro* enzymatic assays revealed that AsTPS2 and AsTPS10 exhibit similar functions: Both catalyze farnesyl diphosphate (FPP) to produce α-humulene and β-caryophyllene, and also convert geranyl diphosphate (GPP) into acyclic monoterpenes (geraniol and nerol) as well as monocyclic monoterpenes (α-terpineol and isopulegol). AsTPS41 catalyzes FPP to form β-elemene, α-guaiene, and δ-guaiene, while also acting on GPP to generate geraniol, nerol, and α-terpineol. Protein modeling and docking of AsTPS2 and AsTPS10 using AlphaFold3 and AutoDock Vina indicated that, despite sharing 83.5% sequence identity, residues lining their active cavities are completely identical, supporting their overlapping catalytic activities. Further site-directed mutagenesis was performed on key amino acids lining the active cavity of AsTPS2. The single-site mutant Y411A generated two new products, β-elemene and shyobunol, while retaining the functionality of AsTPS2. Building upon Y411A, the double-site mutant G410A-Y411A produced four additional new products: α-Elemol, nerolidol, *trans*-farnesol, and pogostol. In the single-site mutant C449A, the proportion of β-caryophyllene increased from 7.2% in wild-type AsTPS2 to 55.1%. Based on these findings, a *Saccharomyces cerevisiae* expression system was established for AsTPS2, its mutant AsTPS2^{C449A}, and AsTPS41. Following isolation and structural analysis by nuclear magnetic resonance (NMR), the products α-humulene, β-caryophyllene, and δ-guaiene were identified. These results provide insights into the molecular mechanisms underlying agarwood formation and lay a foundation for further research on enzymes involved in the post-modification steps of agarwood sesquiterpenoid biosynthesis.

Key words: *Aquilaria sinensis*; agarwood; sesquiterpene; sesquiterpene synthase; monoterpene

沉香是瑞香科植物白木香*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg遭受外界机械损伤或微生物侵染后形成的芳香性树脂[1-3]。其独特迷人的香气使其在全球香料产业中具有极高价值, 包括香水生产和芳香疗法。作为传统中药, 沉香具有纳气平喘、温中止呕、行气止痛等功效, 常用于缓解胸腹胀痛、胃寒呕吐及肾虚气逆喘急等症状。现代药理研究证实, 沉香具有广泛的生物活性, 包括抗菌[4]、抗炎[5,6]、抗哮喘[7]、抗肿瘤[8]、抗抑郁[9]和胃黏膜细胞保护活性[10]等。

沉香的主要药效成分为2-(2-苯乙基)色酮类和倍半萜。其中倍半萜类成分具有独特的香味和挥发性, 与沉香的香味直接相关, 而苯乙基色酮类成分在常温下虽不容易挥发, 但在加热时很容易裂解产生结构多样的芳香分子, 对焚香中沉香的特殊香味同样具有重要作用[11-14]。迄今为止, 已从沉香中分离鉴定出210多个倍半萜类化合物, 根据其骨架类型主要分为: 沉香呋喃烷型、螺旋烷型、桉叶烷型、杜松烷型、艾里莫酚烷型、前香草烷型、愈创木烷型及蛇麻烷型等[15,16]。值得注意的是, 健康白木香中几乎不含苯乙基色酮和倍半萜类成分, 这表明沉香的形成与苯乙基色酮和倍半萜等防御代谢产物的生物合成密切相关[2,17]。因此, 解析这些防御代谢产物的生物合成及调控机制, 对于揭示沉香形成的分子机制及人为调控白木香结香过程具有重要意义。

倍半萜类化合物是一大类结构极其多样化的天然产物, 分布广泛, 它们在生物体的自我防御和个体信息交流中发挥重要作用, 同时也是药品和香料生产的重要资源。这些结构各异的倍半萜类化合物通常以法尼基焦磷酸 (FPP) 为共同前体, 由功能多样的萜烯合成酶 (terpene synthases, TPSs) 催化生成, 然后在细胞色素P450酶 (cytochrome P450s, CYP450s)、酰基转移酶 (acyltransferases, ATs) 等后修饰酶的作用下, 进一步增加倍半萜结构的多样性[18,19]。沉香作为一种名贵香料, 其中倍半萜类成分生物合成研究备受关注。目前已从瑞香科植物白木香等物种中分离鉴定出23个TPSs。2020年Ding等[20]报道了白木香全基因组序列信息, Li和Ran等[21,22]基于公开的基因组信息, 对白木香基因组中的TPSs进行了分析, 发现32条编码TPS的候选基因序列。虽然目前已有20多个TPSs被报道, 但其体外酶反应主要催化合成蛇麻烷型、愈创木烷和桉叶烷型等少数几种倍半萜母核[23-27]。2024年Li等[28]报道了能够催化合成桉叶烷型倍半萜母核的AsTPS13和AsTPS14。但从目前公布的基因组信息来看, 基因组中还有多个候选TPSs的功能未被表征, 且目前从沉香中分离报道的倍半萜类成分中还有多种母核结构的生物合成关键酶尚未揭示, 关于下游对倍半萜母核进行后修饰的关键酶如CYP450s等更未见报道。

本文作者所在团队致力于沉香形成机制相关研究, 前期建立了稳定的白木香愈伤组织及悬浮细胞培养体系, 成功解析了沉香特征性成分苯乙基色酮的生物合成途径及关键催化酶[29-32]。利用已构建的组织培

养体系, 课题组同时也在开展沉香中倍半萜类成分的生物合成及调控机制研究。本文报道从茉莉酸甲酯诱导的白木香愈伤组织中克隆鉴定3个TPSs, 结合体外酶反应发现其不仅能够接受FPP生成多个倍半萜, 同时也能催化香叶基焦磷酸 (GPP) 生成多个单萜。利用酵母表达体系, 对生成的倍半萜主产物进行了分离制备和结构鉴定。基于分子对接, 对AsTPS2的关键氨基酸残基进行突变, 初步探讨了氨基酸残基与生成产物之间的关系。本文结果将为研究沉香形成的分子机制提供参考, 同时也为进一步揭示沉香倍半萜生物合成后修饰酶的研究奠定基础。

材料与方法

样品与试剂 本研究所选用的白木香植株 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg来自广东省中山市, 目前培育于实验室; 白木香愈伤组织由植株嫩茎诱导而成。*α*-萘乙酸 (NAA, 货号: N8010)、6-苄基氨基嘌呤 (6-BA, 货号: A8170)、维生素B5 (VB5, 货号: D8170) 购自北京索莱宝科技有限公司; 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D, 货号: D806765)、激动素 (KT, 货号: K812229) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司。底物: FPP (货号: F6892) 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; GPP, (货号: G922189) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司。标准品: *α*-葎草烯 (货号: TN1373) 购自上海陶术生物科技股份有限公司; *β*-石竹烯 (货号: C-32520) 购自天津希恩思奥普德科技有限公司; *α*-愈创木烯 (货号: GC49335) 购自上海宏叶生物科技有限公司; *β*-榄香烯 (货号: Y256120) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司等。生物试剂: Plant RNA Kit (货号: R6827) 购自美国Omega Bio-Tek公司; HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (货号: R312)、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (货号: DC301)、5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit (货号: C601) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (货号: T2001) 购自美国Zymo Research生物科技公司; Fast Mutagenesis System定点突变试剂盒 (货号: FM111) 购自北京全式金生物技术有限公司。

菌株与载体 大肠杆菌表达载体pET-28a(+)为实验室长期保有; 大肠杆菌感受态细胞DH5*α* (货号: C502)、BL21(DE3) (货号: C504) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 酵母表达载体pGB315 (*URA*, T_{CyC1}-ERG20-P_{GAL1}-P_{GAL10}-FgJ03939-T_{ADH1}) 及酿酒酵母底盘细胞YZL141由中国科学院深圳先进技术研究院卞光凯教授赠予[33]。以pGB315为模板构建含有酶切位点*Sac* I和*Eco*R I的酵母表达载体, 命名为pYeast。

仪器 Nano Drop 2000C分光光度计 (美国Thermo Fisher Scientific公司); Mastercycler X40梯度PCR仪 (德国艾本德股份公司); 5977A气相色谱−质谱联用仪 (美国Agilent Technologies公司)。

愈伤组织培养 在无菌条件下, 将灭菌后的白木香嫩茎切割成适当大小, 培养于Murashige-Skoog固体培养基中, 培养基额外添加2 μg·mL^{-1} NAA、1 μg·mL^{-1} 2,4-D、1 μg·mL^{-1} KT、1 μg·mL^{-1} 6-BA和1 μg·mL^{-1} VB5, 培养于25 ℃弱光条件下。数周后, 将长势良好的、疏松的愈伤组织, 切割成适当大小, 转移至新鲜培养基中, 每隔半月继代一次。

总RNA的提取与cDNA合成 取疏松、呈淡黄白色的白木香愈伤组织置于含有100 μmol·L^{-1} MeJA的MS培养基中诱导处理48 h后, 取少量愈伤组织液氮速冻并研磨成粉, 使用植物总RNA提取试剂盒提取总RNA, 分光光度计Nano Drop 2000C测定其浓度, 并利用1.2%琼脂糖凝胶检测RNA的完整性。使用逆转录试剂盒HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit将总RNA反转录合成cDNA, 用于后续的基因克隆。

候选倍半萜合酶的挖掘及筛选 倍半萜合酶具有DDxxD、NSE/DTE和R(R)x8W等多个保守基序, 根据Pfam数据库 (https://pfam.xfam.org) 收录的萜类合酶家族蛋白的保守域文件PF19086 (terpene synthase family 2, C-terminal metal binding), PF03936 (terpene synthase family, metal binding domain) 和PF01397 (terpene synthase, N-terminal domain), 使用TBtool Simple HMM search构建隐马尔可夫模型 (hidden Markov model, HMM), 基于白木香悬浮细胞转录组测序数据, 对潜在倍半萜合酶基因序列进行筛选。利用NCBI CD-Search (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) 进行结构域验证 (E-value阈值为0.01), 剔除不完整序列, 保留序列长度在1 000～2 500 bp的序列, 去除氨基酸序列相似度 > 98%的冗余序列, 最终得到候选倍半萜合酶基因序列。

使用软件ClustalW进行氨基酸序列比对, 将文件导入TBtools, 采用最大似然法构建进化树 (循环数1 000); 在线网站iTOL (https://itol.embl.de) 对进化树进一步可视化。

倍半萜合酶的克隆及质粒构建 根据白木香转录组数据中筛选出的18条*AsTPS*序列设计基因特异性引物 (表1)。以合成的cDNA为模板进行PCR扩增, 扩增体系如下: cDNA 1 μL, 上下游引物各2 μL, dNTP Mix 1 μL, 2×Phanta MAX Super-Fidelity DNA Polymerase 25 μL, ddH_2O 18 μL。PCR程序: 95 ℃预变性3 min; 95 ℃变性15 s, 55 ℃退火15 s, 72 ℃延伸1 min, 30个

循环; 72 ℃最终延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶检测, 并利用DNA纯化试剂盒FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit进行胶回收纯化后, 连接至pCE2 TA/Blunt-Zero载体, 经测序确认其序列正确。

倍半萜合酶的表达 以含有*AsTPS2*、*AsTPS10*和*AsTPS41*基因的T载体为模板, 使用带有酶切位点*Eco*R I/*Hind* III的引物进行扩增, 并连接至pET-28a(+)载体中, 转化至大肠杆菌感受态细胞DH5*α*后, 选取阳性单克隆菌株再次测序确认序列正确。将测序正确的质粒*AsTPS2*-pET-28a、*AsTPS10*-pET-28a和*AsTPS41*-pET-28a转化至BL21(DE3) 感受态细胞中, 参考课题组前期报道的方法进行重组蛋白的表达与纯化[34]。使用Nano Drop 2000C分光光度计测定目标蛋白质浓度。

体外酶促反应及检测条件 酶反应总体积为100 μL, 包含25 mmol·L^{-1} Tris-HCl (pH 7.0)、100 mmol·L^{-1} $MgSO_4$、5 mmol·L^{-1} DTT、5%甘油, 46 μmol·L^{-1} FPP、50 μg可溶性目标蛋白。在30 ℃恒温水浴锅中反应12 h后加入等量乙酸乙酯涡旋萃取10 min, 15 000 r·min^{-1}离心15 min后取上清液进行GC-MS测定。

GC-MS条件设置: 柱温箱温度50 ℃, 进样口温度250 ℃; 载气为氦气; 恒压模式, 压力为120 kPa; 总流速20 mL·min^{-1}, 柱流速2 mL·min^{-1}; 不分流。程序升温设置: 初始柱温50 ℃, 保持5 min; 10 ℃·min^{-1}升至300 ℃, 保持5 min。MS参数设置: 电离模式为EI, 电子能70 eV; 离子源温度220 ℃; 质量扫描范围50～500 amu。

倍半萜合酶在酿酒酵母中的表达及产物分离纯化 使用带有酶切位点*Sac* I/*Eco*R I的引物对基因序列*AsTPS2*、*AsTPS10*和*AsTPS41*进行扩增, 得到含有同源臂的基因片段, 并连接至pYeast酵母表达载体中, 转化至大肠杆菌感受态细胞DH5*α*后, 选取阳性单克隆菌株进行测序。使用酵母转化试剂盒Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit, 将测序正确的质粒*AsTPS2*-pYeast、*AsTPS10*-pYeast和*AsTPS41*-pYeast转化至酿酒酵母YZL141中。酵母培养参考Bian等[33]的方法; 酵母发酵液使用2倍量乙酸乙酯萃取2次, 提取液合并浓缩, 得酵母发酵产物总浸膏。经两次硅胶柱色谱分离纯化 (洗脱剂100%正己烷) 得到纯品。

蛋白质结构模拟、分子对接及定点突变 首先采用AlphaFold3对3个AsTPS进行蛋白质三维结构建模; 继而使用AutoDock Vina将底物FPP对接到AsTPS的活性口袋中; 最后, 利用PyMOL软件对最优对接构象进行可视化, 并分析其相互作用细节。

设计定点突变引物, 并使用Fast Mutagenesis System定点突变试剂盒进行突变与质粒消化。PCR体系: 质粒*AsTPS2*-pET-28a 1 μL, 上下游引物各1 μL, 2× *TransStart FastPfu* Fly PCR SuperMix 25 μL, Nuclease-free Water 22 μL。PCR程序: 94 ℃预变性3 min; 94 ℃变性20 s, 55 ℃退火20 s, 72 ℃延伸1 min, 30个循环; 72 ℃最终延伸10 min。加1 μL DMT酶于PCR产物中, 混匀, 37 ℃孵育1 h。将5 μL DMT消化产物加入50 μL感受态细胞DH5*α*, 参照“倍半萜合酶的表达”项下方法对突变体进行蛋白表达与纯化。

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5′-3′)
AsTPS2-F	ATGTCAGCTGCTCAGGTCTCACC
AsTPS2-R	TCATATAGTAATTGGATGGACCAGCA
AsTPS10-F	ATGTCTCCTGCTCAGGTCGT
AsTPS10-R	TTATATGGTGACAGGATGAACTAGC
AsTPS41-F	ATGTCTTCGGCAAAACTAGGTT
AsTPS41-R	TCAGATTTCAATAGCATGACGCA

结果

1 茉莉酸甲酯诱导白木香愈伤组织的成分分析

文献[24]报道, MeJA能诱导沉香生树培养细胞产生*α*-愈创木烯、*α*-葎草烯和*δ*-愈创木烯等倍半萜。基于此, 使用100 μmol·L^{-1}的MeJA处理白木香愈伤组织, 并通过GC-MS检测其在诱导处理12、24、48 h时倍半萜的生成情况。结果表明, 在0、12、24 h样品中均未检测到倍半萜类化合物, 而48 h处理样品中, 检测到了*β*-榄香烯 (**M-1**)、*α*-愈创木烯 (**M-2**)、*α*-葎草烯 (**M-3**)、*δ*-愈创木烯 (**M-4**) 及羟基化倍半萜 (+)-雪松醇 (**M-5**)、蓝桉醇 (**M-6**)、长叶醇 (**M-7**) 和widdrol (**M-8**), 其中**M-1**～**M-5**已与标准品比对确认 (图1)。

2 *AsTPS2*、*AsTPS10*及*AsTPS41*的克隆

基于隐马尔可夫模型 (HMM) 从白木香愈伤组织转录组数据中初步筛选出72条潜在的倍半萜合酶基因。剔除保守结构域不完整、相似度98%以上的冗余片段, 仅保留长度为1 000～2 500 bp之间且具有完整开放阅读框的基因序列, 共得到18条候选倍半萜合酶基因序列。

以MeJA诱导48 h后的白木香愈伤组织为植物样本提取总RNA, 并以反转录获得的cDNA为模板进行扩增, 成功克隆出8条倍半萜合酶基因。其余基因可能由于在愈伤组织中表达量过低或存在时空表达存在差异而未能获得。通过后续功能验证, 其中3条具有倍半萜合酶活性, 将其与Ran等[22]利用公开的白木香基因组数据, 筛选出的32条候选倍半萜合酶序列 (*AsTPS1*～*AsTPS32*) 进行比对, 其中*AsTPS36*与*AsTPS10*序列完全一致, *AsTPS26*与*AsTPS2*的序列仅156位氨基酸不同, *AsTPS41*与*AsTPS1*序列具有98.7%的一致性。因AsTPS26和AsTPS36的功能已有报道且序列和公开的

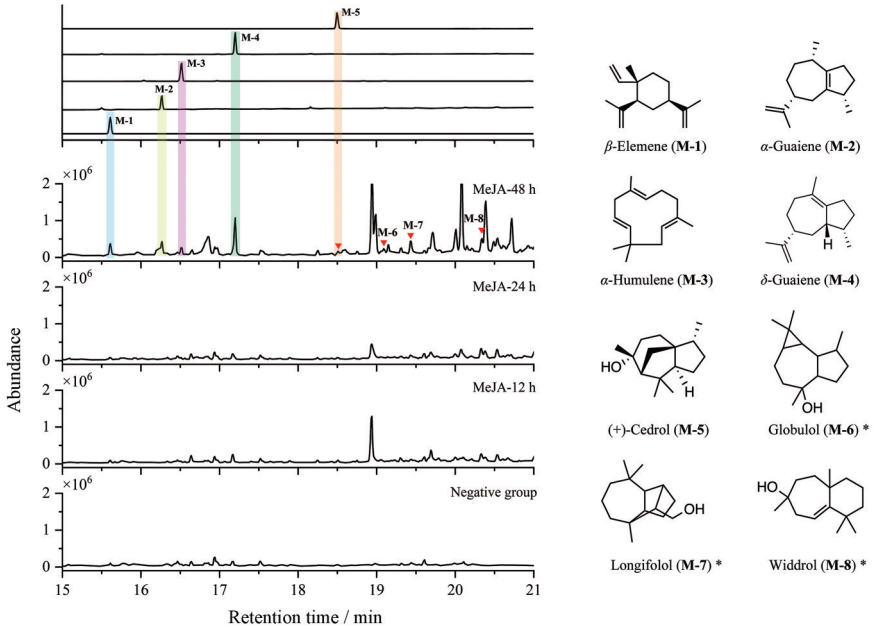


Figure 1 Analysis of sesquiterpenoids in MeJA-induced callus of *Aquilaria sinensis*. The red inverted triangles indicate hydroxylated sesquiterpenoids, and the asterisks mark the prediction results from the NIST database

基因组序列基本一致, 因此分别以AsTPS2、AsTPS10命名。考虑到*AsTPS41*的序列与公开的基因组中*AsTPS1*的序列不完全相同, 且AsTPS1的功能尚未报道, 本文中仍以AsTPS41进行命名。序列分析显示, *AsTPS2*全长1 671 bp, 编码556个氨基酸, 预测蛋白质分子质量约为64.03 kDa; *AsTPS10*全长1 674 bp, 编码557个氨基酸, 预测分子质量约为63.80 kDa; *AsTPS41*全长1 644 bp, 编码547个氨基酸, 预测分子质量约为63.84 kDa。

将以上3条萜类合酶与文献[22-28]已报道的20条具有活性的参与沉香中倍半萜化合物合成的萜类合酶进行系统进化分析, AsTPS2、AsTPS10与已知的*α*-葎草烯合酶 (AcHS1～3、AsTPS3) 聚在同一分支, AsTPS41则与GS3等10条*δ*-愈创木烯合酶位于同一分支 (图2)。

3 AsTPS2、AsTPS10及AsTPS41的功能表征

体外酶催化反应发现, AsTPS2和AsTPS10均能催化FPP生成*α*-葎草烯 (**F3**), 同时伴有约5%～7% *β*-石竹烯 (**F2**) 生成, 两个酶的产物产量无明显差异。AsTPS41

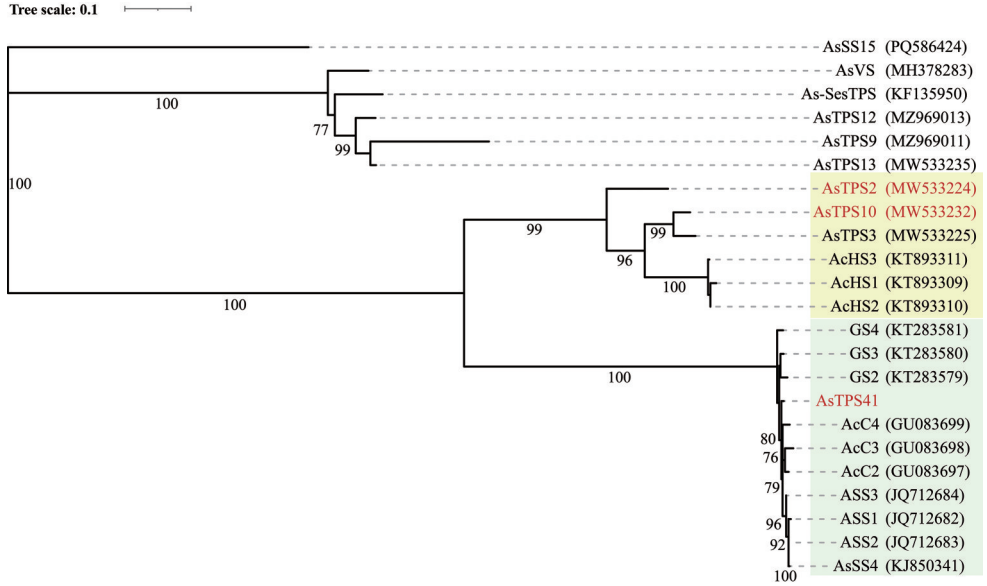


Figure 2 Phylogenetic analysis of sesquiterpene synthase from *A. sinenesis*, *A. crassna* and *A. microcarpa*. Yellow block indicates *α*-humulene synthases, green block indicates *δ*-guaiene synthases

催化FPP生成主产物*β*-榄香烯 (**F1**, 89.1%); 同时生成少量的*α*-愈创木烯 (**F41-2**, 1.1%)、*δ*-愈创木烯 (**F41-3**, 4.2%) 和未知产物 **F41-4** (5.6%, 图3A、B)。**F41-4** 在NIST库中与*β*-榄香烯 (**F1**) 的质谱高度一致 (图3C), 但与其保留时间不同。文献报道愈创木烯和榄香烯均是FPP经C1-C10环化后生成吉玛烯A, 并以此为中间体产生的[18]; 且吉玛烯A中间体重排后可同时产生*β*-榄香烯与 (−)-*cis*-*β*-榄香烯[35], 故推测 **F41-4** 可能为 **F1** 的异构体 (−)-*cis*-*β*-榄香烯。沉香中除含有大量的倍半萜外, 文献[16]报道还含有单萜, 因此, 进一步考察了上述3个倍半萜合酶是否能够催化GPP生成单萜类化合物。结果显示, AsTPS2和AsTPS10均可催化GPP产生单萜产物, 包括*α*-松油醇 (**G1**)、橙花醇 (**G2**)、异蒲勒醇 (**G3**) 和香叶醇 (**G4**)。其中, **G4** 为主产物, 而其他3个产物仅质谱可检测到。AsTPS10的体外酶反应中还检出了微量柠檬醛 (**G5**)。而AsTPS41则催化FPP生成*α*-松油醇 (**G1**)、橙花醇 (**G2**) 和香叶醇 (**G4**), 未检出异蒲勒醇 (**G3**) 和柠檬醛 (**G5**) 的生成 (图3D、E), 其中 **G1**、**G2**、**G4**、**G5** 经标准品比对, **G3** 为NIST数据库预测结构 (图3F)。

4 蛋白质结构模拟、分子对接及定点突变

AsTPS2和AsTPS10的氨基酸序列一致性为83.5%, 编码二者的基因均存在于公开的基因组数据中, 虽然为不同基因, 但二者具有相同的催化特性。利用

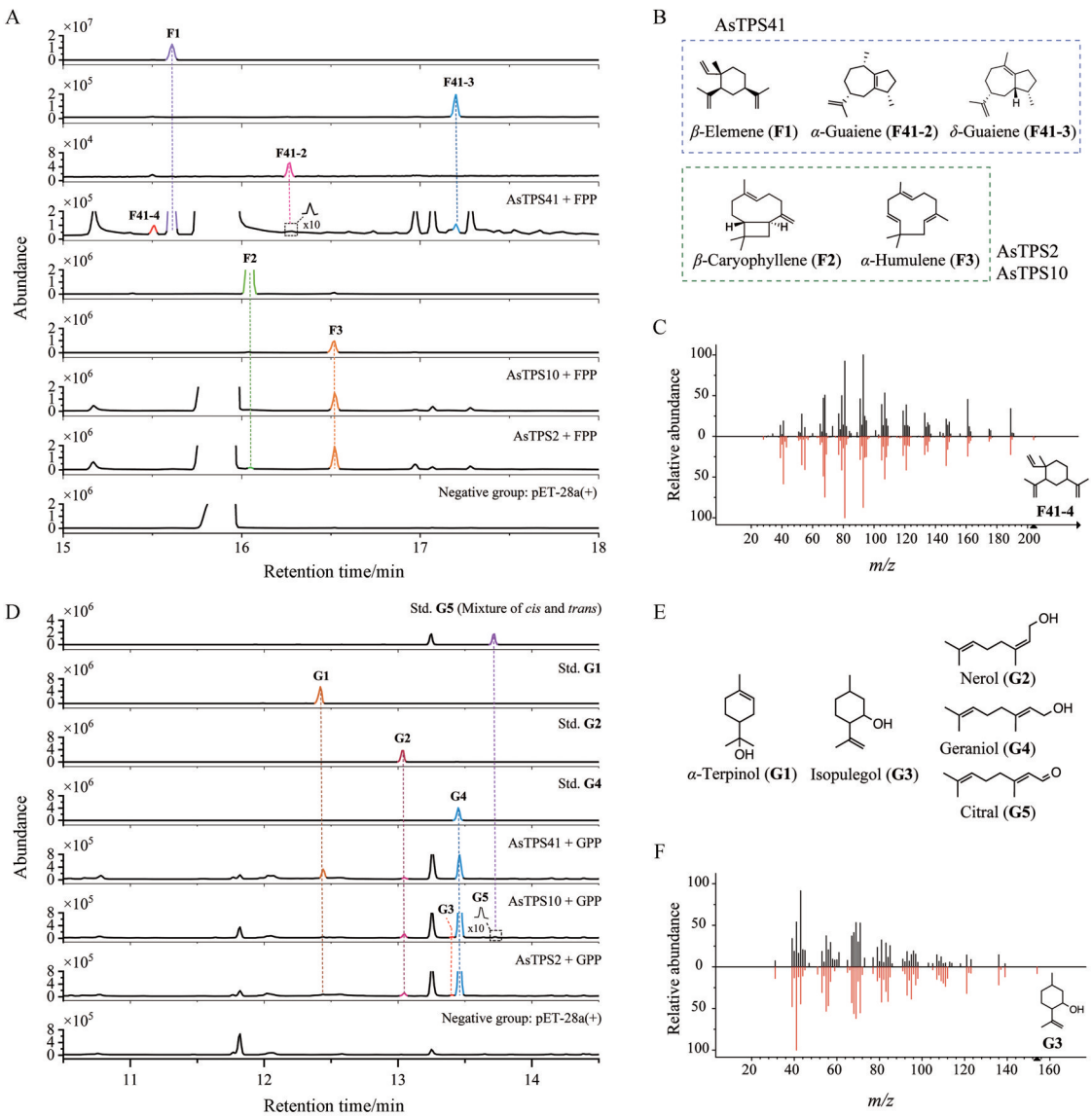


Figure 3 *In vitro* enzyme activity assay of AsTPS2, AsTPS10, and AsTPS41. A: Catalysis of farnesyl diphosphate (FPP) to form sesquiterpenoids; B: Structures of the sesquiterpenoid products; C: Comparison of the mass spectrum of product **F41-4** (black) and the NIST library mass spectrum (red); D: Catalysis of geranyl diphosphate (GPP) to form monoterpenoids; E: Structures of the monoterpenoid products; F: Comparison of the mass spectrum of **G3** (black) and the NIST library mass spectrum (red)

AlphaFold3 分别预测其三维结构, 并与底物 FPP 进行分子对接分析, 结果发现二者在底物结合腔周围 (< 5 Å) 的氨基酸残基完全一致 (图 4), 因此二者显示相同的催化特性。

近年来, 随着蛋白质结构预测与从头设计技术的突破性进展, 通过理性改造和定向进化特定酶结构, 不仅能优化酶产物组成, 更有可能合成全新结构。因此, 作者考虑利用蛋白结构模拟和分子对接, 尝试对 AsTPS2 活性腔周围的关键氨基酸残基进行突变, 探讨氨基酸残基与酶催化活性之间的关系。

首先, 对 AsTPS2 活性空腔周围的 33 个氨基酸残基及保守基序的 21 个氨基酸进行丙氨酸扫描突变, 分析各突变体的催化活性, 并根据第一轮突变结果, 对关键位点进行组合突变。单点突变体 G410A、Y411A 和 C449A 中 *β*-石竹烯增幅明显, 相较于野生型分别增长了 78%、107% 和 183%, C449A 是唯一 *β*-石竹烯产量高于 *α*-蒎草烯的突变体。突变体 Y411A 不仅生成 *α*-蒎草烯和 *β*-石竹烯, 同时生成 *β*-榄香烯和 shyobunol (**F6**)。进一步进行组合突变, 得到 2 个双点突变体 Y411A-C449A、G410A-Y411A。其中双点突变体 Y411A-C449A 中 **F1** 进一步提高, 相较于 Y411A 增长 155%, 且保留时间 19.26 min 处 **F6** 信号消失 (图 5A、B)。与野生型 AsTPS2 相比, 双点突变体 G410A-Y411A 的倍半萜总产量降低, 新增多个羟化倍半萜信号 (**F4**～**F8**), 统计突变体的产物占比后发现, 羟化产物高达 69% (图 5C)。

文献[36,37]报道了 DDxxD、R(R)x8W 和 NSE/DTE 保守基序对于保持萜类合酶的功能非常关键, 针对以上保守基序突变可能导致酶活性或产物组成改变。本研究将 NSE/DTE 保守基序 D453、D454 位点突变为丙氨酸后, *β*-石竹烯产量均提高, 分别为野生型的 1.73、1.50 倍 (图 5D)。DDxxD 的 3 个氨基酸突变为丙氨酸, 分别为 D307A、D308A、D311A, 发现 3 个突变体均只产生 *α*-蒎草烯, 但其产量有不同程度降低, 保守基序中第一个 (D307) 和第 3 个天冬氨酸 (D311) 突变后, 活性损失严重。结合文献[36]与对接分析 (图 5E), 天冬氨酸富集区域 (DDxxD) 因对焦磷酸基团的稳定具有重要作用, 因而突变后酶催化活性发生改变。在保守基序 R(R)x8W 中, 位点 R270、W279 突变为丙氨酸后, 酶活性丧失。

5 酿酒酵母发酵制备及产物鉴定

将构建好的酵母表达质粒 *AsTPS2*-pYeast 和其突变体 *AsTPS2*^{C449A}-pYeast、*AsTPS41*-pYeast 转化到高产 FPP 前体的酿酒酵母工程菌 YZL141 中, 成功获得产物 *α*-蒎草烯、*β*-石竹烯、*δ*-愈创木烯, 经 NMR 数据鉴定其结构。结果显示, 酵母体系中, AsTPS2 和 AsTPS10 仅能产生大量 **F3**, 未检出 **F2**, 因此利用突变体 AsTPS2^{C449A} 菌株制备分离并鉴定 **F2** 的结构。其中 AsTPS41 的发酵产物以 **F41-3** 为主, 伴随少量 **F41-2**, 未检出 **F1** (图 6)。酵母发酵浸膏经硅胶柱色谱分离纯化, 根据分离纯化获得的单体量计算得到 3 个产物的产率, *α*-蒎草烯 (**F3**) 为 56.5 mg·L^{-1}; *β*-石竹烯 (**F2**) 为 10.5 mg·L^{-1}; *δ*-愈创木烯 (**F41-3**) 为 2.6 mg·L^{-1}。

化合物 **F3**: 无色油状液体, 具有芳香气味; 经 NIST 数据库比对为 *α*-humulene, *m/z* 204, 分子式 $C_{15}H_{24}$。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 1.09 (6H, s, H-12, H-13), 1.46 (3H, s, H-15), 1.66 (3H, s, H-14), 1.94 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1), 2.05-2.10 (4H, m, H-4, H-5), 2.53 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, H-8), 4.90 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2), 4.95 (1H, br. t, *J* = 7.0 Hz, H-6), 5.18 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-10), 5.62 (1H, dt, *J* = 16.0, 7.5 Hz, H-9); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 42.0 (C-1), 125.0 (C-2), 133.1 (C-3), 39.8 (C-4), 23.4 (C-5), 125.9 (C-6), 139.2 (C-7), 40.4 (C-8), 127.7 (C-9), 141.0 (C-10), 37.4 (C-11), 27.1 (C-12, C-13) 17.9 (C-14), 15.1 (C-15)。该化合物的核磁信号与文献[38]报道一致, 最终确定化合物 **F3** 为 *α*-蒎草烯。

化合物 **F2**: 无色油状液体, 具有芳香气味; 经 NIST 数据库比对为 *β*-caryophyllene, *m/z* 204, 分子式为 $C_{15}H_{24}$。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 1.00 (3H, s,

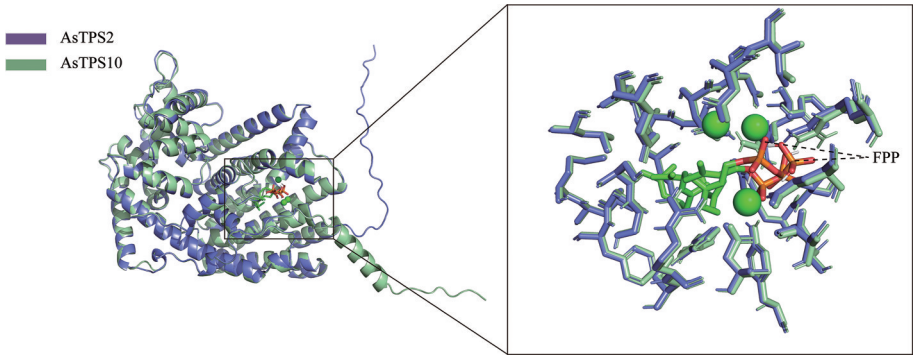


Figure 4 Protein structure alignment of AsTPS2 and AsTPS10. The green spheres are Mg^{2+}

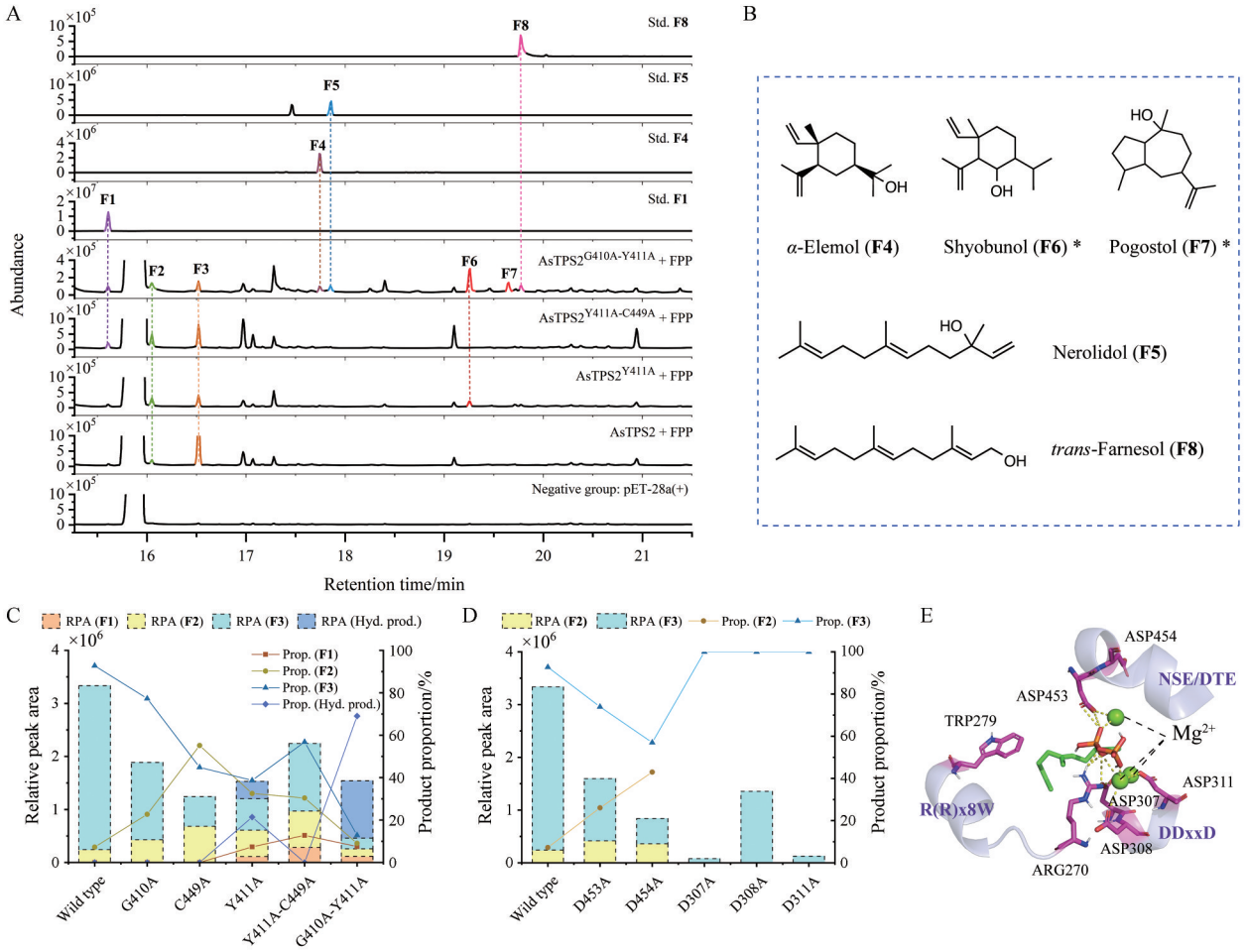


Figure 5 Functional characterization of AsTPS2 mutants. A: *In vitro* enzymatic activity analysis of AsTPS2 mutants with FPP as the substrate; B: Sesquiterpenoids products of AsTPS2$^{G410A-Y411A}$ (**F2** and **F4** were identified by NMR; **F1**, **F4**, **F5**, and **F8** were confirmed by authentic standards; **F6** and **F7** were predicted *via* the NIST database); C: Product proportion analysis of the mutants (RPA: Relative peak area; Prop.: Product proportion; Hyd. prod.: Hydroxylated products); D: Product proportion analysis of conserved motif-based mutants; E: Molecular docking visualization of key conserved motif residues with the substrate FPP

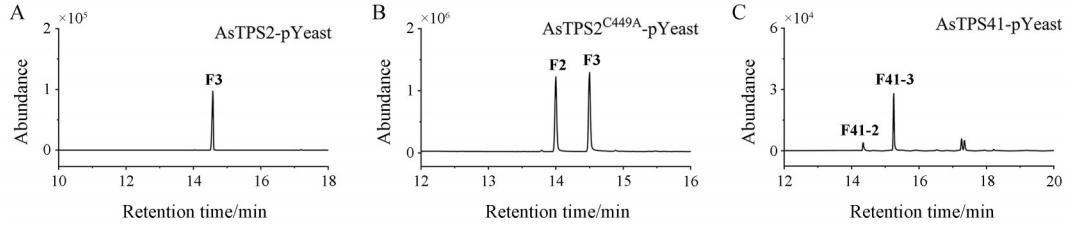


Figure 6 GC-MS analysis of AsTPS41, AsTPS2 and its mutant AsTPS2^{C449A} yeast fermentation. A and C show the extracted ion chromatograms (EIC) at *m/z* 204, and B shows the total ion chromatogram (TIC)

H-13), 1.03 (3H, s, H-12), 1.50 (2H, m, H-9), 1.62 (3H, s, H-14), 1.63 (2H, m, H-1), 1.69 (1H, m, H-10), 1.94 (1H, td, J = 12.0, 6.0 Hz, H-8a), 2.01 (H, m, H-4a), 2.04 (2H, m, H-5a), 2.11 (1H, dt, J = 12.0, 4.0 Hz, H-8b), 2.22 (H, m, H-4b), 2.32 (1H, m, H-2), 2.36 (1H, m, H-5b), 4.83 (1H, br.s, H-15a), 4.94 (1H, br.s, H-15b), 5.31 (1H, dd, J = 10.0, 5.0 Hz, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 40.4 (C-1), 48.5 (C-2), 154.7 (C-3), 34.8 (C-4), 28.4 (C-5), 124.3 (C-6), 135.6 (C-7), 39.9 (C-8), 29.4 (C-9), 53.6 (C-10), 33.0 (C-11), 22.7 (C-12), 16.3 (C-13), 30.1 (C-14), 111.7 (C-15)。该化合物的核磁信号与文献[38,39]报道一致，确定化合物**F2**为β-石竹烯。

化合物**F41-3**：无色油状液体，具有木质芳香气味。经NIST数据库比对为δ-guaiene，*m/z* 204，分子式

为$C_{15}H_{24}$。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 0.90 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-15), 1.03 (1H, m, H-6a), 1.27 (1H, m, H-8a), 1.35 (1H, m, H-3a), 1.62 (1H, m, H-6b), 1.67 (3H, s, H-14), 1.68 (1H, m, H-3b), 1.70 (3H, s, H-13), 1.73 (1H, m, H-8b), 2.00 (1H, dd, J = 14.0, 7.5 Hz, H-9a), 2.09 (1H, m, H-7), 2.12 (1H, m, H-4), 2.20 (1H, m, H-9b), 2.23 (1H, m, H-2b), 2.32 (1H, m, H-2a), 2.47 (1H, m, H-5), 4.63 (1H, br.s, H-12a), 4.65 (1H, br.s, H-12b); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 142.1 (C-1), 30.4 (C-2), 33.1 (C-3), 38.8 (C-4), 46.1 (C-5), 32.6 (C-6), 50.8 (C-7), 31.8 (C-8), 33.7 (C-9), 128.8 (C-10), 152.5 (C-11), 108.0 (C-12), 20.9 (C-13), 22.2 (C-14), 15.4 (C-15)。该化合物的核磁信号与文献[40]报道一致, 确定化合物**F41-3**为*δ*-愈创木烯。

讨论

本研究从茉莉酸甲酯诱导白木香愈伤组织中克隆鉴定3个倍半萜合酶, 其中AsTPS26和AsTPS36的功能已有报道且序列和公开的基因组序列基本一致, 因此分别以AsTPS2、AsTPS10命名; AsTPS41与白木香基因组AsTPS1氨基酸序列一致性为98.72%, 但AsTPS1目前尚未报道其活性。AsTPS41虽与报道的AcC4[24]序列一致性高达98.5%且均具有催化功能, 但其产物组成有较大差异。在体外酶活性分析中, AsTPS41产物以*β*-榄香烯异构体 (94.7%) 为主, 伴有少量*δ*-愈创木烯和*α*-愈创木烯生成, 而AcC4中*δ*-愈创木烯和*α*-愈创木烯是主产物, 含有微量*α*-葎草烯。研究过程中发现, 3条TPSs在酵母体内的催化活性与大肠杆菌表达体系存在一定差异, 尤其是AsTPS41, 在酿酒酵母表达体系中, 催化产物以*δ*-愈创木烯为主, 未检出*β*-榄香烯异构体, 这可能是体内外复杂微环境不同及前体浓度不同等因素引起[41,42]。后续利用酵母表达体系, 对包括*α*-葎草烯、*β*-石竹烯、*δ*-愈创木烯3个主产物进行了制备纯化, 结合NMR测定鉴定其准确结构, 其他酶反应产物尽可能通过与对照品比对进行结构鉴定, 个别难以获得对照品的微量产物通过NIST库对比进行结构预测, 并在文中进行了明确说明。

本研究中报道的3条萜类合酶体外催化FPP生成倍半萜类产物, 同时也能够催化GPP生成单萜类产物。而文献[43]中报道的AsTPS9和AsTPS12除了催化合成倍半萜外, 体外也具有催化生成单萜的能力, 但上述酶是否在植物体内参与沉香中单萜的合成, 尚需进一步的深入研究, 其可能受前体浓度、基因表达调控及复杂代谢网络等多因素影响。

目前文献[23-28]中已报道的倍半萜合酶中, 明确鉴定的产物主要为蛇麻烷型、愈创木烷和桉叶烷型等几种骨架, 并不能涵盖沉香中的众多倍半萜骨架类型。白木香作为多年生木本植物, 其基因表达具有高度的时间特异性和组织特异性, 参与倍半萜形成的萜类合酶可能仅在特定的发育阶段、组织部位, 或特定的诱导条件下才短暂、低丰度地表达。此外, MeJA等信号分子能够在一定程度上刺激萜类合酶的表达, 但不同倍半萜合酶对信号的响应阈值可能存在显著差异, 导致常规条件下难以扩增获得目标基因。因此, 后续研究中可以通过分析不同诱导条件下, 白木香愈伤组织中倍半萜的积累情况, 获得能够高效积累目标倍半萜母核的白木香愈伤组织样品, 结合转录组测序进行未知倍半萜合酶基因的鉴定。此外也可以结合系统的生信分析, 对白木香基因组中尚未鉴定功能的倍半萜合酶基因进行功能预测分析, 合成其完整序列进行功能鉴定。

本研究中通过对活性腔周围氨基酸的丙氨酸扫描突变, 发现C449位点是*α*-葎草烯和*β*-石竹烯产物分化的关键位点, 能够显著提高*β*-石竹烯的产量及比例; 单点突变体Y411A和双点突变体Y411A-C449A、G410A-Y411A能够在保证野生型基因的催化活性之外形成新产物, 其中, G410A-Y411A突变体能够实现多种羟基化倍半萜的生成, 极大增强了AsTPS2的催化产物宽泛性。我们推测, 这两个位点的协同作用, 改变了原本严格控制的环化与重排路径, 使得碳正离子中间体更容易被水分子直接淬灭, 从而生成多种羟化倍半萜产物, 至于突变体为什么能够产生和野生型倍半萜合酶不一样的产物, 其机制有待进一步通过分子动力学模拟计算等方法进行深入探究, 并在此基础上设计新的突变体, 进一步优化改造, 方能获得更有价值的结果, 相关研究也在进行中。

作者贡献: 凌鸽雨进行文献调研、实验实施、数据采集及分析与文章撰写; 张方晴参与实验实施; 米芯雨、关范圆参与实验数据分析; 侯婕、张雨路、邢芯瑶、王娟、王晓晖、刘晓参与文献调研及分析; 史社坡负责实验设计与文章审阅。

利益冲突: 不存在任何利益冲突。

References

[1] Tan CS, Isa NM, Ismail I, et al. Agarwood induction: Current developments and future perspectives [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 122-135.

[2] Liu YY, Chen HQ, Yang Y, et al. Whole-tree agarwood-inducing technique: An efficient novel technique for producing high-quality agarwood in cultivated *Aquilaria sinensis* trees [J]. Molecules, 2013, 18: 3086-3106.

[3] Li W, Chen HQ, Wang H, et al. Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: Chemistry, biological activities and biosynthesis [J]. Nat Prod Rep, 2021, 38: 528-565.

[4] Chen HQ, Yang Y, Xue J, et al. Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees [J]. Molecules, 2011, 16: 4884-4896.

[5] Yadav D, Mudgal V, Agrawal J, et al. Molecular docking and ADME studies of natural compounds of agarwood oil for topical anti-inflammatory activity [J]. Curr Comput Aided Drug Des, 2013, 9: 360-370.

[6] Alamil JMR, Paudel KR, Chan Y, et al. Rediscovering the therapeutic potential of agarwood in the management of chronic inflammatory diseases [J]. Molecules, 2022, 27: 3038.

[7] Wang CH, Peng DQ, Liu YY, et al. Anti-asthmatic effect of agarwood alcohol extract in mice and its mechanism [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 4214-4221.

[8] Hashim YZY, Phirdaous A, Azura A. Screening of anticancer activity from agarwood essential oil [J]. Pharmacognosy Res, 2014, 6: 191-195.

[9] Zhang SN, Chen XQ, Wang CH, et al. Antidepressant activity of agarwood essential oil: A mechanistic study on inflammatory and neuroprotective signaling pathways [J]. Pharmaceuticals, 2025, 18: 255-271.

[10] Ma JL, Huo HX, Zhang H, et al. 2-(2-Phenylethyl) chromone-enriched extract of the resinous heartwood of Chinese agarwood (*Aquilaria sinensis*) protects against taurocholic acid-induced gastric epithelial cells apoptosis through Perk/eIF2*α*/CHOP pathway [J]. Phytomedicine, 2022, 98: 153935.

[11] Li CY, Zha WJ, Li W, et al. Advances in the biosynthesis of terpenoids and their ecological functions in plant resistance [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 11561.

[12] Yang LY, Cheng J, Chen JJ, et al. Biological activities of sesquiterpenoids: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2023, 30: 289-298.

[13] Wang YM, Wang ZB, Sun YP, et al. Research progress on chemical structure and biological activity of sesquiterpenes from *Atractylodes* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 299-309.

[14] Li SW, Shi HZ, Chang WQ, et al. Eudesmane sesquiterpenes from Chinese liverwort are substrates of Cdrs and display antifungal activity by targeting Erg6 and Erg11 of *Candida albicans* [J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25: 5764-5771.

[15] Wang YY, Hou WC, Wei JH, et al. Research progress on sesquiterpenoids in Aquilariae Lignum Resinatum and their biological activities and predictive analysis on quality marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 1191-1209.

[16] Peng DQ, Wang CH, Liu YY, et al. Research progress on the chemical constituents of Aquilariae Lignum Resinatum and their pharmacological activities [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2021, 38: 358-365.

[17] Zhang Z, Gao ZH, Wei JH, et al. The mechanical wound transcriptome of three-year-old *Aquilaria sinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2012, 47: 1106-1110.

[18] Pan XM, Li HX, Dong LB. Engineering class I terpene synthases for skeletal diversity: Strategies and applications [J]. Nat Prod Rep, 2026, 43: 227-270.

[19] Gao SX, Rong M, Peng JX, et al. Cloning and expression analysis of cytochrome P450 *AsCYP71D1* from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 3123-3129.

[20] Ding XP, Mei WL, Lin Q, et al. Genome sequence of the agarwood tree *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng: The first chromosome-level draft genome in the thymelaeceae family [J]. GigaScience, 2020, 9: giaa013.

[21] Li RS, Zhu JH, Guo D, et al. Genome-wide identification and expression analysis of terpene synthase gene family in *Aquilaria sinensis* [J]. Plant Physiol Biochem, 2021, 164: 185-194.

[22] Ran JD, Li Y, Wen X, et al. Identification of sesquiterpene synthase genes in the genome of *Aquilaria sinensis* and characterization of an *α*-humulene synthase [J]. J For Res, 2023, 34: 1117-1131.

[23] Kumeta Y, Ito M. Characterization of *α*-humulene synthases responsible for the production of sesquiterpenes induced by methyl jasmonate in *Aquilaria* cell culture [J]. J Nat Med, 2016, 70: 452-459.

[24] Kumeta Y, Ito M. Characterization of *δ*-guaiene synthases from culturesred cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. Plant Physiol, 2010, 154: 1998-2007.

[25] Kurosaki F, Hirohashi S, Katoh T, et al. Cloning and characterization of *δ*-guaiene synthase genes encoding a sesquiterpene cyclase from *Aquilaria microcarpa* cell cultures [J]. Am J Plant Sci, 2015, 6: 2603-2611.

[26] Xu YH, Zhang Z, Wang MX, et al. Identification of genes related to agarwood formation: Transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 227.

[27] Lang L, Guo QM, Zhang Z, et al. Cloning, prokaryotic expression, and functional identification of a sesquiterpene synthase gene (*AsSS4*) from *Aquilaria sinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2014, 49: 1724-1729.

[28] Li GQ, Chen Y, Wen X, et al. Cloning and functional analysis of novel terpene synthase genes from *Aquilaria sinensis* and insights into the biosynthesis of sesquiterpene [J]. Ind Crops Prod, 2024, 217: 118835.

[29] Wang XH, Gao BW, Nakashima Y, et al. Identification of a diarylpentanoid-producing polyketide synthase revealing an unusual biosynthetic pathway of 2-(2-phenylethyl) chromones in agarwood [J]. Nat Commun, 2022, 13: 348-359.

[30] Wang BB, Hai Y, Zhang L, et al. Identification of *O*-methyltrans-

ferases potentially contributing to the structural diversity of 2-(2-phenylethyl) chromones in agarwood [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72: 13297-13307.

[31] Zhang ML, Fan JP, Zhang ZK, et al. Characterization of an α-ketoglutarate-dependent oxygenase involved in converting 2-(2-phenylethyl)chromones into 2-styrylchromones in agarwood [J]. Plant J, 2025, 121: e70068.

[32] Mi XY, Guan FY, Zheng YY, et al. *Aquilaria sinensis* MYB-like transcription factor AsMYB1 promotes 2- (2-phenylethyl)chromone biosynthesis through interacting with 14-3-3 family protein AsGRF1 [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23: 5800-5816.

[33] Bian GK, Hou AW, Yuan YJ, et al. Metabolic engineering-based rapid characterization of a sesquiterpene cyclase and the skeletons of fusariumdiene and fusagramineol from *Fusarium graminearum* [J]. Org Lett, 2018, 20: 1626-1629.

[34] Ding N, Hai Y, Wang XH, et al. Cloning and expression analysis of chalcone isomerase from *Aquilaria sinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 630-638.

[35] Liu YH, Chen R, Xie T. Research on biosynthesis of anticancer drug elemene and key enzyme Germacrane A synthase [J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 2022, 38: 1322-1334.

[36] Little DB, Croteau RB. Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases δ-selinene synthase and γ-humulene synthaseq [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 402: 120-135.

[37] Yoshikuni Y, Ferrin TE, Keasling JD. Designed divergent evolution of enzyme function [J]. Nature, 2006, 440: 1078-1082.

[38] Ragasa CY, Espineli DL, Agoo EMG, et al. Chemical constituents of *Cinnamomum cebuense* [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11: 264-268.

[39] Guella G, Chiasera G, N'Diaye I, et al. Xenicane diterpenes revisited: Thermal (*E*) → (*Z*) isomerization and conformational motions. A unifying picture [J]. Helv Chim Acta, 1994, 77: 1203-1221.

[40] Rakotonirainy O, Gaydou EM, Faure R, et al. Sesquiterpenes from patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil. Assignment of the proton and carbon-^{13}NMR spectra [J]. J Essent Oil Res, 1997, 9: 321-327.

[41] Lubertozzi D, Keasling JD. Expression of a synthetic *Artemesia annua* amorphadiene synthase in *Aspergillus nidulans* yields altered product distribution [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35: 1191-1198.

[42] Luo P, Lv JM, Zhen HT, et al. Identification of two novel sesterterpene skeletons offers the first experimental evidence for the cyclization mechanism of mangicdiene synthase [J]. Chin Chem Lett, 2026, 37: 111042.

[43] Yu CC, Gao SX, Rong M, et al. Identification and characterization of novel sesquiterpene synthases TPS9 and TPS12 from *Aquilaria sinensis* [J]. PeerJ, 2023, 11: e15818.