生物资源　2026,48(5):494～508
*Biotic Resources*

综述

**DOI**:10.14188/j.ajsh.20260033

# 尿苷二磷酸糖基转移酶的改造策略及其在生物合成中的应用

贾照森[1],苏家贤[2],罗祖良[2],王崇楠[2],涂冬萍[3],朱梦娇[2*],李　光[1,4*]

(1. 黑龙江中医药大学 药学院,黑龙江 哈尔滨 150000;
2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室,北京 100193;
3. 广西中医药大学 药学院,广西 南宁 530200;
4. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 云南分所,云南 景洪 666100)

**摘要**:大部分天然的尿苷二磷酸糖基转移酶(UGT)普遍存在催化活性低、稳定性差以及底物区域选择性不佳等问题,难以满足天然产物工业化生产的要求,蛋白质工程策略为突破上述瓶颈提供了有效途径。围绕定向进化、半理性设计和理性设计三类策略,系统概述了UGT的分子改造方法;定向进化通过构建随机突变文库与高通量筛选,不依赖结构信息,但文库容量巨大;半理性设计融合计算预测与聚焦式饱和突变,可显著缩小筛选规模;理性设计则基于三维结构进行定点改造,靶向性最强且文库最小。在此基础上,总结了工程化UGT在黄酮类、萜类及生物碱等天然产物生物合成中的代表性应用,彰显了改造酶在催化效率、区域选择性和底物谱拓展等方面的显著提升。总而言之,越来越多的新技术助力UGT的工程改造,为天然产物的绿色生物制造提供参考。

**关键词**:尿苷二磷酸糖基转移酶;蛋白质工程;理性设计;定向进化;生物合成
**中图分类号**:S668.1　　文献标志码:A　　文章编号:2096-3491(2026)05-0494-15

# Strategies for uridine diphosphate glycosyltransferase modification and their applications in biosynthesis

**JIA Zhaosen[1], SU Jiaxian[2], LUO Zuliang[2], WANG Chongnan[2], TU Dongping[3], ZHU Mengjiao[2*], LI Guang[1,4*]**

(1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, Heilongjiang, China;
2. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;
3. School of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China;
4. Yunnan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Jinghong 666100, Yunnan, China)

**Abstract**: Most natural uridine diphosphate glycosyltransferases (UGTs) generally suffer from low catalytic activity, poor stability, and poor substrate specificity, making it difficult to meet the requirements for the industrial production of natural products. Protein engineering strategies offer an effective approach to overcoming these bottlenecks. This paper

收稿日期:2026-06-16　修回日期:2026-09-08　接受日期:2026-10-19
作者简介:贾照森(1998-),男,硕士生,研究方向为合成生物学,E-mail:15035007045@163.com
*通信作者:李光(1985-),男,博士,研究员,研究方向为民族药药理及开发,民族药质量控制,E-mail:gli@implad.ac.cn;朱梦娇(1990-),女,博士,助理研究员,研究方向为合成生物学,E-mail:mjzhu@implad.ac.cn
基金项目:北京市自然科学基金(7252244);广西重点研发计划项目(桂科AB25069119;桂科FN2600640161);广西中医药大学-柳药集团青年科技创新能力提升计划专项(GL-2023-03)

引用格式:贾照森,苏家贤,罗祖良,等.尿苷二磷酸糖基转移酶的改造策略及其在生物合成中的应用[J].生物资源,2026,48(5):494-508.
Jia Z S, Su J X, Luo Z L, et al. Strategies for uridine diphosphate glycosyltransferase modification and their applications in biosynthesis [J]. Biotic Resources, 2026, 48(5): 494-508.

systematically reviews methods for the molecular modification of UGTs, focusing on three strategies of directed evolution, semi-rational design, and rational design. Directed evolution relies on the construction of random mutation libraries and high-throughput screening, without depending on structural information, but requires a massive library size. Semi-rational design combined with computational prediction and focused saturation mutagenesis can significantly reduce the scale of screening. Rational design, based on three-dimensional structures, enables site-specific modifications, offering the highest specificity and the smallest library size. Based on this, the paper summarizes representative applications of engineered UGTs in the biosynthesis of natural products such as flavonoids, terpenoids, and alkaloids, highlights the significant improvements in catalytic efficiency, site specificity, and substrate scope achieved by the modified enzymes. In summary, an increasing number of new technologies are facilitating the engineering of UGTs, providing a reference for the green biomanufacturing of natural products.

**Key words**: uridine diphosphate glycosyltransferase (UGT); protein engineering; rational design; directed evolution; biosynthesis

## 0 引 言

天然产物(natural products,NPs)是指自然界中由生物(如植物、动物和微生物)产生的具有药理学或生物学活性的次级代谢产物,主要包括黄酮、萜类、生物碱、酚酸和酰胺等,许多成分已被应用于治疗疾病,同时在新药研发领域也具有广阔前景[1]。这些产物通过多种代谢途径合成,包括糖基化、磷酸化、乙酰化和甲基化等多种修饰方式。在这些修饰过程中,糖基化是一个普遍且重要的步骤,经糖基化后,许多天然产物的稳定性和水溶性得到提高,因而常以糖苷形式存在[2]。糖基化修饰通常是生物合成天然产物的最后一步反应,能够显著改变次级代谢产物的理化特性和生物活性。在天然产物的糖基化修饰过程中,尿苷二磷酸糖基转移酶(uridine diphosphate glycosyltransferase,UGT)扮演着重要的角色[3]。然而,大部分天然来源的UGT存在催化活性低、稳定性差和底物专一性不足等问题,极大阻碍了其在工业中的应用,因此,需要寻找新的UGT并对其进行分子改造以解决上述瓶颈[4]。

天然产物的获取方式主要是从植物组织中直接提取或通过多步化学反应进行合成,但这类传统方式普遍存在成本高昂、产率偏低以及环境污染等问题。近年来,随着合成生物学技术的快速发展,通过精准解析天然产物的代谢通路并组装优化合成模块,利用微生物细胞工厂进行天然产物的异源生物合成,逐渐成为该领域的研究热点[5]。本文将从UGT的分子改造策略及其在生物合成中的应用两个方面系统综述UGT的研究进展,以期为相关研究提供有价值的参考。

## 1 UGT的介绍

### 1.1 UGT的分类

糖基转移酶(glycosyltransferases,GTs)是一类催化糖苷键生成的酶,其核心功能是利用核苷酸二磷酸糖作为活性供体,将糖基转移至不同的受体分子上。在生物体的糖基化进程中,常见的受体底物包括蛋白质、脂质、糖类以及多种小分子物质等[6]。所有的GTs均收录于碳水化合物活性酶(carbohydrate active enzymes,CAZy)数据库[7]中。该数据库根据氨基酸序列相似性、底物催化性质及C端保守序列的差异,将GTs划分为不同的家族[8]。随着基因组测序技术的快速进步,根据CAZy数据库记录(https://www.cazy.org/,截止2026年9月4日),GT家族数量已增至140个。其中,GT1是最大的家族,该家族成员在C端均含有一段由44个氨基酸组成的保守序列,通常称为PSPG(plant secondary product glycosyltransferase)序列,且均以UDP-糖作为糖基供体,因此该家族被统称为尿苷二磷酸糖基转移酶(UGT)家族[9]。根据GTs命名委员会对UGT家族的命名规则,基于氨基酸序列一致性,UGT超家族可进一步细分为UGT家族(以首位数字表示,同源性约45%或更高)、UGT亚家族(以家族编号后的字母表示,同源性约60%或更高)以及UGT基因(以亚家族字母后的数字表示,同源性约100%)。此外,部分家族根据来源进行分类,具体规则为:数字1~50代表动物来源,51~70代表真菌/酵母来源,71~100代表植物来源,101~200代表细菌来源。

### 1.2 UGT的结构

基于对大量蛋白质序列和糖基转移酶晶体结构的解析,目前已知的糖基转移酶主要有GT-A、GT-B、GT-C、GT-D和GT-E五种蛋白质结构折叠

类型(图1)。结构研究表明,UGT在整体折叠类型上属于GT-B型,由N端结构域和C端结构域组成,其中N端结构域负责结合受体底物,C端结构域则结合供体底物,两个结构域之间的裂隙构成了酶的催化活性位点[10]。虽然CAZy数据库中收录了84 000多个GT1基因序列(数据来源于CAZy数据库GT家族统计页面及GT1家族序列列表,截止2026年9月4日),但仅记录了93个UGT的3D结构信息,其中26个来自细菌,67个来自真核生物(来源于CAZy数据库中GT1家族的3D结构统计),约占已知UGT序列总数的千分之一。同时,经过功能验证的UGT也十分有限(表1)。由此可见,目前仍有大量UGT的蛋白质三维结构和具体生化功能尚不明确。因此,阐明更多UGT的结构并完成其功能表征,是当前UGT研究领域面临的主要挑战。

### 1.3 UGT的催化机制

糖基化反应的催化机制根据反应前后异头碳构型的变化可分为反转型和保留型两种[22],前者导致中心构型翻转,后者则在转移过程中完整维持原有构型(图2)。UGT属于反转型酶,其催化产物在C1位发生构型翻转[23]。深入研究发现,UGT采用$S_N2$-like催化机制。以最具代表性的O-UGT为例,其糖基化过程主要依赖活性位点上的Asp、His或Glu残基对糖受体进行活化:通过夺取受体氧原子上的质子,使其转变为高活性的过渡态亲核中心,进而精准进攻糖供体的异头碳位点,最终在供体与受体分子间形成稳定的糖苷键。

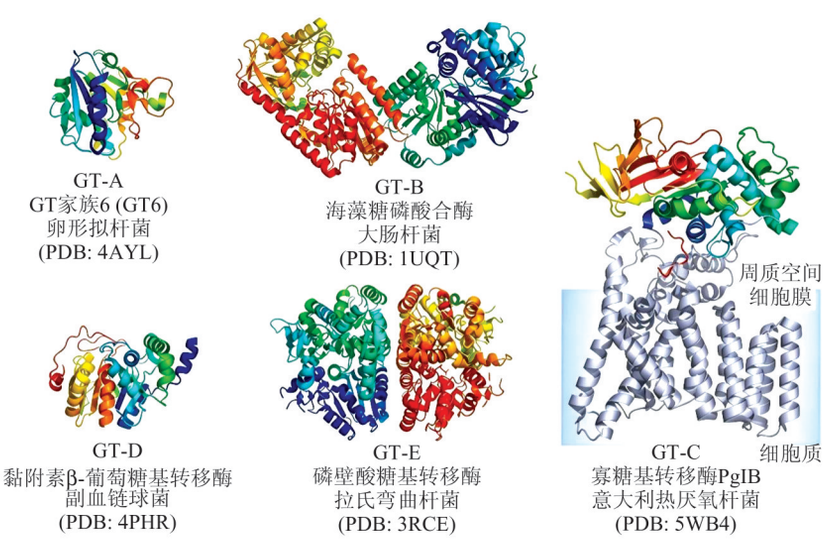


**图1 糖基转移酶的5种蛋白质折叠类型[11]**

**Figure 1 Five protein fold types of glycosyltransferases[11]**

**表1 功能已验证的代表性尿苷二磷酸糖基转移酶**

**Table 1 Representative UGTs with verified functions**

| 名称 | 来源 | 功能 | 参考文献 |
|---|---|---|---|
| UGT94-289-3 | 罗汉果(*Siraitia grosvenorii*) | 参与罗汉果苷Ⅴ的合成 | [12] |
| UGT86C11 | 穿心莲(*Andrographis paniculata*) | 特异性催化C19-O-葡萄糖基化,参与新穿心莲内酯的合成 | [13] |
| Bc7OUGT | 射干(*Belamcanda chinensis*) | 既可催化鸢尾苷的生成,又可催化鸢尾苷的水解(脱糖基化),参与植物的化学防御 | [14] |
| PgUGT74AE2 | 人参(*Panax ginseng*) | 参与人参皂苷Rh2的合成 | [15] |
| UGT71B6 | 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) | 糖基化脱落酸的天然(+)−对映体,参与脱落酸的稳态调控 | [16] |
| UGT73B6 | 红景天(*Rhodiola rosea*) | 参与红景天苷的合成 | [17] |
| UGT79A18 | 假马齿苋(*Bacopa monnieri*) | 催化假酸枣仁苷元的糖基化,合成三萜类皂苷假马齿苋皂苷 | [18] |
| UGT76G1 | 甜叶菊(*Stevia rebaudiana*) | 合成莱鲍迪苷A和莱鲍迪苷M | [19] |
| UGT2B7 | 智人(*Homo sapiens*) | 催化类固醇、吗啡、非甾体抗炎药等的葡萄糖醛酸化反应,增加其水溶性,促进排泄 | [20] |
| UGTYjiC | 地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) | 参与黄酮类化合物葡萄糖苷衍生物的合成 | [21] |

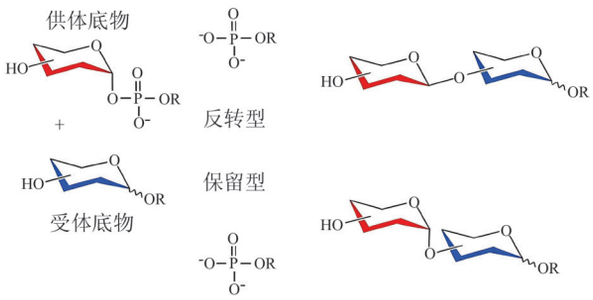


**图2 尿苷二磷酸糖基转移酶的2种催化机制[6]**

**Figure 2 Two catalytic mechanisms of UGT**

### 1.4 UGT介导糖基化的生物学功能

天然产物的理化属性及生物学表现深受UGT糖基化修饰的影响。糖基单元连接到底物分子上可明显改变天然产物的水溶性、结构稳定性以及生物利用度，从而调控其生物学功能，这些功能广泛体现在次生代谢产物的性质优化、植物激素稳态调节、逆境防御响应以及外源物质解毒等多个层面[3]。

萜类物质经植物UGT完成糖基化修饰后，可改变相应苷元的含量水平与生理活性强度，这对提高目标产物的产量和品质的优化具有重要应用价值。例如，SgUGT94-289-3可通过持续催化罗汉果苷Ⅱe及随后的一系列中间糖苷产物，最终合成高甜度的罗汉果苷Ⅴ和赛门苷I[12]。UGT除了参与高价值次生代谢产物的合成外，还对植物的生长发育调控和逆境应答具有重要影响。在化学防御机制方面，白云杉的针叶受云杉蚜虫侵害后，其体内的PgUGT5b可将原本无毒性的松针苷等糖苷类物质转化为具有毒性的羟基苯乙酮，从而实现化学防御功能[24]。

### 1.5 UGT在应用中遇到的问题

尽管UGT在理论和应用层面均展现出良好的前景，但其自身固有的一些缺陷严重限制了它在大规模工业上的应用。首先，许多天然来源的UGT普遍存在催化活性低下和稳定性较差的问题。以甘草次酸的糖基化为例，天然UGT在酵母表达系统中的催化效率很低，目标产物产量仅达8.1 μmol/L，远低于工业生产的经济性要求[25]。同时，多数植物来源的UGT还存在异源表达效率低、可溶性差以及规模化制备困难等问题。例如，拟南芥来源的糖基转移酶UGT73C5具有良好的市场应用价值，但在大肠杆菌中异源表达时极易形成无活性的包涵体，严重限制了其工业应用[26]。其次，天然UGT对某些底物的区域选择性较差，催化过程中常常生成多种副产物，这不仅增加了下游分离纯化的难度和成本，也降低了目标产物的纯度。以木犀草素为例，其分子结构中含有7-OH、4′-OH和3′-OH等多个可糖基化位点，UGT95A1虽对3′-O位表现出一定偏好性，但仍会同时生成7-O-葡萄糖苷、4′-O-葡萄糖苷以及双糖基化产物，导致目标产物纯度不足，限制了其在黄酮类药物合成中的进一步应用[27]。最后，在生物合成途径中，糖基供体UDP-糖的成本十分高昂，外源添加UDP-糖的费用在糖苷合成总成本中占据很高比例，严重制约了糖基化反应的规模化应用[28]。综上所述，对UGT进行深入的分子改造以提升其综合性能，具有十分重要的理论意义和应用价值。

## 2 UGT的改造策略

UGT工程化改造通常采用定向进化、半理性设计和理性设计这3种主流的蛋白质工程策略(图3)。这3种策略对酶蛋白结构信息的依赖程度依次递增，而所需筛选的突变体文库规模则依次递减。策略选择应由目标性状、可用先验信息、筛选能力和后续放大要求共同决定。

### 2.1 定向进化

定向进化(directed evolution)是一种通过模拟自然进化机制，人为制造大量随机突变，并利用合适的筛选方法从突变文库中获取性能优化突变体的技术[29]，已被广泛用于改变和优化蛋白质的各项功能，识别活性更高、底物特异性更强的酶变体。其基本实验流程包括：首先对目标酶进行随机突变、定点饱和诱变以构建庞大的基因突变体文库；随后借助高通量筛选或选择手段从中富集表型得到性能改善的突变体；再以筛选到的优势突变体为亲本模板进入下一轮进化，如此反复迭代，直至获得性能满足需求的最优变体。定向进化的一个显著优势在于无需对酶蛋白的精细结构信息和复杂催化机制有深入了解，其成功的关键在于构建高质量的突变文库并建立与之匹配、可靠的高通量筛选方法[30]。在突变文库构建方面，常用易错PCR(error-prone PCR，ep-PCR)[31]和DNA改组(DNA shuffling)[32]等随机突变技术，以及更为理性的定点饱和诱变(site-saturation mutagenesis，SSM)[33]等方法来获得大量突变体。

与构建突变文库同等重要的是，如何从庞大的突变体库中快速、准确地筛选出性能提升的目标变体，这是定向进化改造的关键步骤。GTs的酶活性检测通常通过监测底物消耗和产物形成来间接评估。其主要方法包括放射性同位素标记、高效液相色谱、荧光标记、酶联免疫吸附测定及碳水化合物微阵列等[34]。其中，放射性同位素法灵敏度极高，但操作繁琐、成本昂贵；基于核苷二磷酸(NDP)释放的

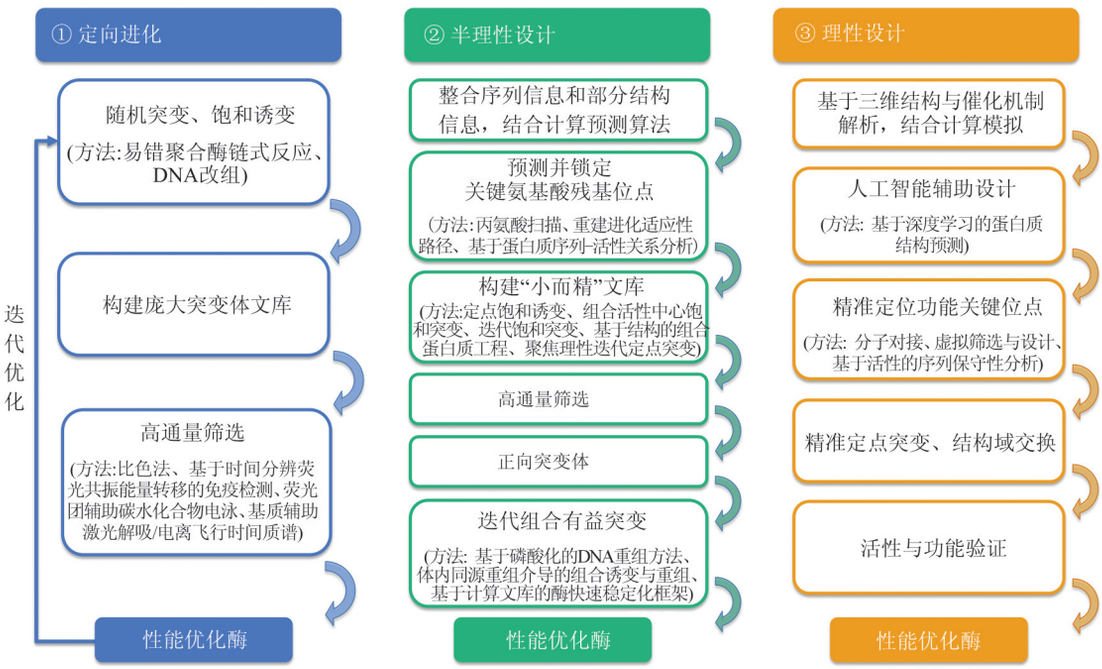


**图 3　尿苷二磷酸糖基转移酶的分子改造策略**

**Figure 3　Molecular modification strategies of UGT**

检测法经济便捷,却仅适用于Leloir型GTs且灵敏度有限;荧光法和微阵列方法适用范围广,却易受荧光剂干扰或背景信号影响产生假阳性;质谱分析准确快速,但仪器昂贵、难以普及,且特殊糖基底物或探针的设计与合成具有较高技术门槛[34]。为突破上述局限,研究者开发了多种针对性检测技术:利用磷酸酶-孔雀石绿比色法定量NDP的释放[35];基于时间分辨荧光共振能量转移(time-resolved fluorescence resonance energy transfer,TR-FRET)的免疫检测实现了均相、高灵敏的核苷酸检测[36];荧光团辅助碳水化合物电泳(fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis,FACE)[37]和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry,MALDI-TOF-MS)[38]则提供了高分辨率的产物分析方法。因此,为了更好地研究GTs的活性,需要通过多种技术手段的合理组合与互为补充,来实现对糖基转移酶活性的全面生化表征,这也为UGT定向进化中筛选策略的选择提供了多样化的技术选项。

正是基于上述突变文库构建与高通量筛选方法的发展,定向进化策略在UGT的分子改造中取得了丰硕成果。研究者选取来自罗汉果的糖基转移酶UGT74AC1,先解析了其晶体结构,进而通过定向进化和工程改造获得了多个性能优异的突变体,使该酶在三萜皂苷糖基化反应中的催化效率提升了$10^2$至$10^4$倍,底物谱也得到拓展[39]。之后,该团队继续采用定向进化结合理性设计对UGT74AC2进行改造,最优突变体提高了对水飞蓟宾的区域选择性[40]。

### 2.2　半理性设计

半理性设计属于蛋白质工程改造的中间型策略,介于非理性定向进化与完全理性设计两类技术路径之间。它通过整合蛋白质的序列信息、结构信息和功能信息,并结合计算预测算法,预先筛选出有潜力的目标改造位点并限制该位点氨基酸的多样性。这种方法能够显著减小所需构建的突变文库规模,同时通过综合考虑进化可变性、拓扑结构约束和催化机制等因素,有效提升突变文库的功能性和命中率[41]。半理性设计的主要流程是借助计算机建模预测关键氨基酸残基位点,并结合丙氨酸扫描实验加以验证,从而锁定热点残基。随后,围绕这些热点,通过定点饱和诱变、组合活性中心饱和突变(combinatorial active-site saturation test,CAST)以及迭代饱和突变(iterative saturation mutagenesis,ISM)等策略构建"小而精"的系列突变体文库,并借助合适的高通量筛选方法获取正向突变体。在这一核心流程的基础上,研究者从多个层面开发出更具针对性的策略:在先验知识层面,重建进化适应性路径(reconstructing evolutionary adaptive paths,REAP)与基于蛋白质序列-活性关系分析(protein sequence-activity relationship analysis,ProSAR)等方

法，从进化轨迹与功能数据中统计推断关键位点，丰富了热点识别的维度；在文库构建层面，基于结构的组合蛋白质工程（structure-based combinatorial protein engineering，SCOPE）与聚焦理性迭代定点突变（focused rational iterative site-specific mutagenesis，FRISM）在结构指导下对多位点进行有序组合或聚焦迭代，将CAST/ISM的理念推向更高精度。为实现这些复杂组合设计的高效组装，基于磷酸化的DNA重组方法（phosphorylation-based DNA recombination，PTRec）和体内同源重组介导的组合诱变与重组（mutagenic organized recombination process by homologous *in vivo* grouping，MORPHING）等底层重组技术，提供了精确拼接多突变片段的有力工具。尤其值得关注的是，基于计算文库的酶快速稳定化框架（framework for rapid enzyme stabilization by computational libraries，FRESCO）方法将计算预测稳定化突变、实验验证与有益单点突变的迭代组合融为一体，以极小筛选规模实现酶的快速稳定化[42]。

在半理性设计应用于UGT改造方面，研究者们已取得了一些引人注目的进展。例如，针对底物与酶活性口袋之间的空间位阻影响酶催化效率的问题，Wang等[43]基于对UGT85A1结构的分析，采用FRISM方法对预测的关键位点进行两轮定点饱和突变，获得了最佳突变体F217V。该突变体拥有更大的底物结合口袋，使底物与酶的结合更为便利，催化活性因此显著提高。同时，针对葡萄糖基转移酶UGT88F12、UGT72B27与UGT92G6开展了半理性设计及定向工程改造[44]，扩大了这些酶的底物结合口袋，有效提升了其催化效能，生成了更多的黄酮醇单糖苷和二糖苷。

### 2.3 理性设计

理性设计（rational design）是一种基于蛋白质三维结构与催化机制，通过计算模拟和结构生物学分析精准定位功能关键位点，再利用定点突变等分子生物学技术对目标位点进行定向改造，从而实现酶催化性能定向优化的酶分子改造策略[45]。相较于另外两种改造策略，理性设计的优势在于突变位点明确、文库规模小、筛选效率高、结果可预测性强，尤其适合对特定功能位点进行精准改造。随着对糖基转移酶研究的深入，基于结构生物学已解析出许多糖基转移酶的晶体结构，这有助于进一步了解其结构与功能的关系，为理性改造奠定重要基础。随着计算机生物学的快速发展，计算机辅助设计已成为连接结构分析与实验验证的重要桥梁。例如，分子对接可预测底物结合模式和关键相互作用位点，分子动力学模拟可阐明动态构象变化如何支撑酶功能，而虚拟筛选与设计则能快速缩小实验范围，通过构建虚拟突变体文库并预测其性能实现精确设计[46]。因此，通过解析糖基转移酶的蛋白结构，分析预测活性口袋附近的关键氨基酸位点，并利用特定工具对其进行改造，可以有效改良酶的催化特性。例如，在对PgUGT进行结构建模时，采用了同源建模与深度学习算法相结合的技术路径，随后借助FireProt分析及设计工具，最终筛选得到16个潜在的定点突变位点[47]。经单突变体验证及有利突变的组合叠加后，成功获得性能最优的突变体Mut18，其最适反应温度提升至40 ℃，催化活性达野生型酶的3.2倍，同时热稳定性也得到明显改善。同理，对PpUGT78B进行了计算机建模和分子对接分析，筛选出糖供体和受体的潜在结合位点，并对目标位点进行定点突变，提高了该酶的催化活性[48]。此外，对来自苜蓿的UGT71G1进行定点诱变，突变体显著改变了对槲皮素糖基化的区域选择性[49]。虽然计算机辅助设计实现了UGT的精细化改造，但对于信息有限的复杂性状，定向进化也展现出独特优势，是理性设计的重要补充。先对CaUGT3同源建模和分子动力学模拟，再进行定点饱和突变构建文库，最后筛选出最优突变体T145V/N375Q，不仅增强了酶的活性，还调整了其糖基供体的偏好性[50]。

除了直接利用三维结构信息进行改造，基于序列保守性的分析策略也为理性设计提供了强有力支撑。在长期自然进化过程中，对蛋白质折叠维持与空间结构完整性具有关键作用的氨基酸残基被高度保留，形成序列保守区域。基于活性的序列保守性分析（activity-based sequence conservation analysis，ASCA）是一类关键的生物信息学分析手段，可用于挖掘、识别并预测蛋白质活性位点及其对应的生物学功能。该方法通过比较不同物种来源的同源蛋白序列，筛选出在进化过程中高度保守、序列不变且结构稳定的关键氨基酸残基。对于能够特异性催化特定底物的酶分子，其活性中心往往存在这类保守性功能残基；借助多重序列比对，将蛋白序列中的非共识残基定点替换为家族共识残基，可以有效优化酶的底物结合能力，提升底物特异性和催化活性[51]。例如，为了改造优化UGTMS1，收集了8个来自不同物种的UGT序列，与UGTMS1进行多重序列比对，从中筛选出19个潜在突变位点[52]。经多轮组合突变，最优突变体M7的催化活性提升了351倍。

随着催化机制的逐步阐明，理性设计开始将操

作单元从个别氨基酸残基提升至结构域层级,结构域交换策略便由此衍生,为酶分子改造开辟了新路径。UGT具有高度保守的三级结构和相对明确的基本功能,这一特点使得通过不同UGT间的结构域替换,能够有效识别关键氨基酸并实现功能修饰。结构域交换策略从理性设计原理衍生而来,尤其适用于同一家族内具有高度序列相似性和结构保守性的酶[53]。在明确SbCGTa和SbCGTb晶体结构的基础上,于活性口袋附近进行了11次氨基酸交换,结果显示SbCGTa-11aa突变体丧失了原有活性,而SbCGTb-11aa突变体的功能特征则变得与SbCGTa相当[54]。

近年来,人工智能技术在UGT改造领域的应用受到了广泛关注,其核心价值在于提升蛋白质结构预测、功能预测与突变体筛选的效率。在结构预测层面,AlphaFold及其升级版本AlphaFold3的出现显著加速了蛋白质三维结构的获取过程,使研究者能够在缺乏实验解析结构的情况下获得UGT的高质量结构模型,这为后续的分子对接、虚拟筛选以及热点残基识别提供了重要基础[55]。AlphaFold3进一步拓展至蛋白质与几乎所有生物分子(包括配体、核酸和其他蛋白)相互作用的预测,这为UGT与糖供体/受体底物结合模式的初步探索提供了便利[55]。但是,目前AlphaFold主要预测蛋白质的静态结构,它难以准确捕捉酶在催化循环中的构象变化、底物结合诱导的适应过程以及催化中间态的动态特征。因此,AlphaFold预测结构信息并不能替代X射线晶体学、核磁共振或冷冻电镜等实验方法所提供的高分辨率结构信息。这表明AI结构预测可以为后续的实验解析提供有价值的初始模型,但预测结果必须经过实验验证才能用于指导理性设计。在功能预测与设计层面,人工智能辅助的蛋白质设计方法能够高效挖掘酶序列与功能之间的复杂关系,实现催化活性、稳定性及选择性等多重性质的协同优化[56]。深度学习模型CVAE架构可挖掘酶序列与功能之间的复杂关系,预测UGT突变体的结构与底物特异性的关联[57]。研究者还开发了名为Meta-UGT的计算框架,用于预测UGT介导下药物小分子的代谢位点[58]。这些工具有望缩小实验筛选的范围、提高突变体设计的靶向性。

与此同时,当前AI驱动UGT改造仍面临多重局限。其一,AI的预测能力在很大程度上依赖于高质量且标准化的实验数据,但目前已知UGT动力学参数、区域选择性和宿主表达数据有限,限制了AI模型的推广应用。其二,AI预测的优秀突变体在异源宿主中表达时往往表现不稳定,计算模型对酶在复杂细胞环境中的折叠效率、可溶性及与其他蛋白的相互作用缺乏建模能力。其三,现有实验通量远低于AI预测所需的验证规模,这凸显了构建更严谨的测试与评估框架的重要性[46]。因此,人工智能在UGT改造中应定位为一种辅助性工具,其核心贡献在于参与实验方案的优化、辅助结构模型的阐明和指导宿主细胞工程改造等层面,但不可完全替代传统的结构生物学分析、生化实验验证及定向进化的迭代筛选。

### 2.4 UGT改造策略的比较与选择

综合上述分析,3种策略各有明确的适用场景与互补关系。对于结构和催化机制信息不足、但具备高通量筛选条件的UGT,尤其是以扩大底物谱或改善多种复杂性能为目标时,应优先采用定向进化;对于已有序列、同源模型或初步热点信息,但尚不足以准确解释催化机制的UGT,宜采用半理性设计,通过构建聚焦文库提高筛选效率;对于具有可靠实验结构、底物结合模型及明确功能位点的UGT,尤其在调控区域选择性、糖供体偏好或已知催化瓶颈时,可优先采用理性设计。实际研究中3类策略并非完全独立,而是相互组合,例如先用理性或半理性方法缩小搜索空间,再以饱和突变或定向进化验证和迭代,也可从定向进化命中位点反推结构机制。结构指导的半理性改造已被用于同时调整UGT活性和产物选择性。目前多项具有代表性的UGT改造研究采用了“半理性设计确定热点”和“饱和突变库筛选”的组合策略。因此,改造策略的高效组合,并建立从“结构预测”到“聚焦突变”,再到“功能验证”的迭代改造流程,是突破UGT工业化应用瓶颈的关键所在。为便于研究者根据自身研究对象的特征和实验室条件做出合理选择,现将3种策略的多维度比较汇总于表2。

## 3 UGT在生物合成中的应用

利用生物合成途径生产天然产物具有良好的市场前景,全球范围内的研究热度也持续高涨。然而,天然来源的UGT所存在的各种缺陷严重限制了相关生物合成进程。经过分子改造后的工程化UGT,不仅克服了天然UGT在催化效率、区域选择性和底物适应性方面的诸多局限,也为复杂糖苷化合物的绿色合成提供了创新解决方案。从黄酮类化合物到三萜皂苷,从高甜度的甜菊糖苷到具有重要应用价值的天然产物,UGT的工程化应用正在有力推动多个领域向可持续的生产模式转变。

表2 三种UGT改造策略的多维度比较

Table 2 Multidimensional comparison of three UGT modification strategies

| 比较维度 | 定向进化 | 半理性设计 | 理性设计 |
|---|---|---|---|
| 结构/机制信息需求 | 低;可在结构未知时实施 | 中;常需序列、同源模型或局部结构信息 | 高;依赖可靠结构、底物构象与催化机制 |
| 文库规模 | 通常较大 | 较少,聚焦若干热点位点 | 通常最小,以少量候选突变为主 |
| 筛选通量需求 | 高;筛选体系往往是主要瓶颈 | 中;仍需实验筛选验证 | 低至中;需精确的功能测定验证 |
| 优先性能目标 | 多性状探索、底物谱拓展、缺乏结构信息的目标 | 活性、选择性与稳定性的定向优化 | 区域选择性、供体/受体识别及已知机制位点的精确调控 |
| 主要优势 | 探索范围广,不依赖预先假设,可能找到意想不到的有益突变 | 比完全随机筛选省时,通常更容易获得有效突变,兼顾搜索范围与实验成本 | 候选数量少,突变原因比较容易解释 |
| 主要局限 | 建库与筛选成本高 | 依赖热点预测和结构质量,可能遗漏真正重要的位点 | 静态结构难覆盖构象动态,预测结果不能替代实验 |
| 工业化适配场景 | 关键位点未知,希望扩大底物谱或同时改进多个性能。适合迭代筛选耐高温、耐溶剂等复杂表型 | 已经大致知道可能重要的位点,希望兼顾成功率和实验成本。适合在有限通量下联合优化多项指标 | 已明确某个结构位点或催化瓶颈,希望进行精准调控,需要表达、稳定性和放大验证 |
| 组合使用建议 | 先广泛探索,再对优势变体开展机制分析 | 对已知热点进行饱和突变和组合优化 | 用于提出小规模候选位点,再接饱和突变或定向进化验证 |

注:“高/中/低”和规模描述均为相对等级,实际结果受建库方式、结构质量、筛选体系及目标性状影响,不代表固定阈值。3类策略在实践中常交叉或组合使用。

Note: “high/medium/low” and the scale descriptions are relative ratings. Actual results depend on the library construction method, structural quality, screening system, and target trait, and do not represent fixed thresholds. In practice, the three categories of strategies are often used in combination or in an overlapping manner.

### 3.1 参与黄酮类化合物的合成

黄酮类化合物是一类广泛存在于植物中的天然次生代谢产物,其核心结构特征为2-苯基色原酮骨架,即由两个苯环(A环和B环)通过一个含三个碳原子的桥(C3)连接而成的C6-C3-C6结构,具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤及护肝等多种生物活性[59]。在植物细胞中,黄酮苷元通常不稳定,因而经常发生糖基化等修饰,最终以糖苷形式储存于液泡中。已鉴定的植物类黄酮化合物超过9 000种,糖基化正是促成这种巨大结构多样性的关键因素[60]。然而,受植物体内产量和提取效率的限制,高价值黄酮苷的天然来源供给难以满足工业需求。UGT催化的糖基化是类黄酮生物合成的最后一步,直接影响其生物活性、代谢过程及在细胞中的溶解度。作为催化这一过程的关键酶,许多天然UGT自身存在的缺陷很难适配类黄酮结构的多样性,因此亟需通过分子改造来优化其催化性能。近年来,围绕黄酮类化合物的生物合成,对UGT的分子改造已能实现高度精准的区域选择性催化。从铁筷子植物中筛选得到黄酮7-O-糖基转移酶HtUGT73EW3,通过定向改造获得突变体Q85A,并偶联蔗糖合酶AtSuSy进行反应体系优化,使槲皮素7-O-葡萄糖苷的转化率显著提升,实现了底物的完全转化[61]。针对具有重要生物活性的黄酮5-O-糖苷缺乏高效合成方法的问题,对PhUGT进行了系统性分子改造,首次从芹菜素出发高效合成了芹菜素-5-O-葡萄糖苷(A5G)和芹菜素-5-O-木糖苷(A5X)[62]。研究者对MiCGT采用了半理性设计与定向进化的组合策略,获得最优突变体VFAH,其催化槲皮素的活性较野生型提高了120倍,同时对3-O-位表现出严格的糖基化选择性,且对多种类黄酮底物显示出更强的特异性,展现出良好的合成应用潜力[63]。表3汇总了经改造的UGT在黄酮类化合物生物合成中的应用实例。

### 3.2 参与萜类化合物的合成

萜类物质是一类以异戊二烯结构单元($C_5$)为基本骨架组装而成的天然有机分子,在自然界中分布极广、种类丰富,是不少药用植物发挥药效的核心活性组分[68]。该类化合物兼具抗肿瘤、抗病毒、抑菌、降血糖、抗氧化及抗寄生虫等多元生物活性,是先导化合物与临床药物开发的核心来源之一[69]。在植物体内,萜类化合物主要以糖苷形式存在,UGT负责将糖基从糖基供体转移至萜类苷元的羟基或羧基上,形成糖苷或糖酯。糖基化修饰能够显著改变萜类化合物的理化性质、生物活性乃至生理功能。萜类糖苷经济价值较高,但植物提取物中其含量通常很低,因而萜类糖苷的人工合成显得尤为重要。传统的化学糖基化往往需要冗长的保护与脱保护步骤,且存在特异性差、产率低等问题;相比之下,生物

**表3 工程化尿苷二磷酸糖基转移酶生物合成黄酮类化合物的案例汇总**

**Table 3 Case summary of flavonoid biosynthesis using engineered UGTs**

| 名称 | 来源 | 糖基受体 | 工程方法 | 工程结果 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| UGT71G1 | 蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) | 槲皮素和染料木黄酮 | 定点突变 | 改变了酶的区域选择性 | [49] |
| UGT71AP2 | 黄芩(*Scutellaria baicalensis*) | 黄酮类化合物 | 结构指导的理性设计 | 增强2′-OH的区域选择性,提高酶的催化效率 | [64] |
| UGT88F12、UGT72B27和UGT92G6 | 葡萄(*Vitis vinifera*) | 黄酮醇糖苷 | 基于结构的半理性设计 | 扩大酶的结合口袋,提高酶的催化活性 | [44] |
| HtUGT73EW3 | 铁筷子(*Helleborus thibetanus*) | 黄酮苷元和黄酮单糖苷 | 理性设计 | 提高了酶的催化活性,增加了底物的选择性 | [61] |
| PhUGT | 北美黍(*Panicum hallii*) | 芹菜素 | 定点突变和代谢工程 | 改变了酶的糖供体选择性 | [62] |
| MiCGT | 芒果(*Mangifera indica*) | 槲皮素 | 半理性设计和定向进化 | 提高了酶的催化活性 | [63] |
| PpUGT78B | 桃(*Prunus persica*) | 矢车菊素和槲皮素 | 理性设计 | 提高了酶的催化活性 | [48] |
| UGT75AJ2 | 高丛越橘(*Vaccinium corymbosum*) | 黄酮类化合物 | FRISM、基于结构的工程改造、活性位点分析 | 提高了酶的催化活性,提升了糖基供体的宽泛性 | [65] |
| GcCGT | 粗茎秦艽(*Gentiana crassicaulis*) | 黄酮类化合物 | 同源建模和定点突变技术 | 扩大了底物结合口袋 | [66] |
| TcCGT1 | 金莲花(*Trollius chinensis*) | 黄酮类化合物 | 基于结构的定点诱变 | 转换C-糖基化至O-糖基化 | [67] |

酶法合成萜类糖苷具有效率高、立体选择性和区域选择性好、过程直接灵活以及绿色环保等优势。近年来,为了推进UGT在萜类糖苷工业化生产中的应用,研究者通过半理性设计、定向进化和祖先序列重建等多种蛋白质工程策略对UGT进行系统改造,成功突破了天然酶的性能瓶颈,实现了多种高价值萜类糖苷的高效生物合成。例如,莱鲍迪苷M(Reb M)和莱鲍迪苷D(Reb D)具有低热量、高甜度的突出特点,但传统的植物提取法成本高昂、产量难以满足市场需求。因此,构建了催化甜菊苷生成Reb D的多酶反应体系,并对关键糖基转移酶UGT-SL2上的Asn358位点进行饱和突变,所得突变体Asn358Phe的酶活性显著提高,使Reb D的产量提升至野生型的1.6倍[70]。在Reb M合成方面,通过对UGT76G1进行理性改造,获得突变体T284S/M88L/L200A,该突变体对底物的亲和力明显增强、催化活性显著提升,优化反应条件后,其催化Reb D合成Reb M的产率高达90.50%[71]。人参皂苷是典型的三萜皂苷类化合物,野生人参中经糖基化修饰的皂苷种类超过80种,负责催化这些糖基化步骤的UGT因此展现出重要的改造价值和应用潜力。通过对UGTBL1进行半理性设计及组合改造,获得了突变体I62R/M320H/P321Y/N170A和M320W。前者在与蔗糖合酶AtSuSy的级联反应体系中,使人参皂苷Rh1的产量达到20.48 g/L,且6-O区域特异性提高至95.74%;后者在同样的级联反应中,实现了非天然人参皂苷3-O-Glc-PPT的高效合成,产量达18.04 g/L,3-O区域选择性达85.13%[72]。此外,借助体内定向进化策略,成功改造了UGTPg45并转入酵母底盘,最终实现人参皂苷Rh2的高效合成,浓度高达2.25 g/L[73]。表4汇总了经工程化改造的UGT在萜类化合物生物合成中的应用实例。

### 3.3 参与生物碱的合成

生物碱是一组主要含有碱性氮原子的天然化合物,具有显著且多样的生物活性[79]。托品烷类生物碱(tropane alkaloids,TAs)是一类具有重要药用价值的天然产物。部分托品烷类生物碱(包括莨菪碱和东莨菪碱)被用于治疗从神经毒剂中毒到帕金森病等各种神经肌肉疾病。UGT84A27可将苯基乳酸(PLA)糖基化生成托品烷生物碱的前体物质PLA葡萄糖苷,但天然UGT84A27对PLA的催化效率较低。为此,研究者首先对UGT84A27进行了同源建模,进而对活性口袋中的关键氨基酸残基进行定点突变,成功降低了UGT84A27对非目标底物的活性,改变了其底物选择倾向,为进一步提高其对PLA的催化特异性提供了结构依据[80]。在川贝母生物碱的合成研究中,从UGT73家族中鉴定出两个功能发生分化的UDP-糖基转移酶FuwI3GT和

**表4 工程化尿苷二磷酸糖基转移酶生物合成萜类化合物的案例汇总**

**Table 4 Case summary of terpenoid biosynthesis using engineered UGTs**

| 名称 | 来源 | 糖基受体 | 工程方法 | 工程结果 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| UGTSL2 | 番茄(*Solanum lycopersicum*) | 莱鲍迪苷A | 理性设计 | 提高了酶的催化效率 | [70] |
| UGTBL1 | 地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) | 原人参三醇 | 理性设计 | 提高了酶的催化效率和底物专一性 | [74] |
| BvUGT | 贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*) | 莱鲍迪苷A | 半理性设计 | 酶的催化活性翻倍 | [75] |
| UGT76G1 | 甜叶菊(*Stevia rebaudiana*) | 莱鲍迪苷D | 理性改造 | 酶与底物亲和力增强、催化活性显著提升 | [71] |
| UGT94D1、UGT94E13 | 芝麻(*Sesamum indicum*)、栀子(*Gardenia jasminoides*) | 莱鲍迪苷D | 定向进化 | 突变体与AtSuSy搭建级联催化反应,分别高效合成了Reb M2与Reb M8 | [76] |
| UGTBL1 | 地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) | 原人参三醇 | 半理性设计及组合改造 | 增强酶的区域选择性 | [72] |
| UGT51 | 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) | 原人参二醇 | 半理性设计 | 提高了酶的催化效率 | [77] |
| UGTPg45 | 人参(*Panax ginseng*) | 原人参二醇 | 定向进化 | 提高了酶的催化效率 | [73] |
| UGT74AC1 | 罗汉果(*Siraitia grosvenorii*) | 罗汉醇 | 定向进化和基于序列/结构的工程改造 | 提高了酶的催化效率,增强酶的底物选择性 | [39] |
| OsUGT91C1 | 水稻(*Oryza sativa*) | 甜菊苷和甜菊糖苷A | 理性设计 | 提高了酶的催化效率和区域选择性 | [78] |

FuwS3GT[81]。通过定点突变实验证实,第201位的色氨酸残基是决定其能否识别异甾体生物碱(如西贝母碱)的关键开关,将该位点引入FuwS3GT(即L201W突变)可使其获得催化西贝母碱糖基化的新能力,反之将FuwI3GT相应位点突变(即W201L突变)则会导致活性丧失。这一重要发现为理性改造糖基转移酶的底物特异性、合成异源生物碱糖苷提供了极具价值的参考。

### 3.4 参与其他天然化合物的生成

除了参与黄酮类化合物、萜类化合物以及生物碱的生物合成外,UGT还广泛参与其他天然产物的合成过程。例如,酚酸是一类分子结构中带有酚环的有机酸,在植物类群中分布极为普遍,依据母核结构可划分为苯甲酸衍生物(如原儿茶酸、没食子酸)与肉桂酸衍生物(如咖啡酸、阿魏酸)两类,具备优异的抗氧化活性[82]。UGT89B1的同源蛋白Rs89B1对苯甲酸类酚酸的糖基化功能进行了详细表征,并通过对酶的环区(loop region)进行定点突变,成功改造了该酶对羟基苯甲酸、香草酸等多种酚酸类底物的催化活性与底物识别能力[83]。研究表明,即便在远离酶活性识别位点的环区引入突变,也可有效改变酶与底物之间的亲和力,这为改造酶的活性提供了一条全新途径。有研究者鉴定了两种新型的真菌酚类糖基转移酶UGT58A1和UGT59A1,它们对没食子酸、阿魏酸、咖啡酸等多种酚酸表现出较好的区域选择性和立体选择性[84]。随后,通过突变分析明确了这类酶采用acceptor-His-Asp三联体催化机制,关键残基的突变可以有效调控酶对酚酸底物的催化活性与底物谱范围,这为酚酸糖苷的合成提供了新型生物催化剂选择。酰胺类化合物属于羧酸衍生物,是羧基上的羟基被氨基或取代氨基替换后得到的产物,这类物质是合成医药、农药、染料等多种精细化学品的关键中间体,也是性能优良的工业溶剂,相关研究在过去百年间已得到广泛开展[85]。有学者开发了一种胺类化合物的糖基化修饰新方法,其原理是在弱碱性条件下,胺与二氧化碳反应首先生成氨基甲酸碱金属盐,随后该中间体经UGT催化,最终生成氨基甲酸糖酯类产物[86]。这项工作为通过改造UGT来合成酰胺/氨基甲酸酯类糖苷化合物提供了酶催化机制方面的重要参考,并展示了此类糖基化产物在药物前体化修饰中的巨大应用潜力。

## 4 展 望

UGT在天然产物的生物合成过程中发挥着核心作用。将天然产物的完整生物合成途径重构于微生物细胞中,为这些高价值化合物的生产提供了更加可持续和环保的替代方案。UGT对天然产物分子的糖基化修饰直接决定了这些天然产物的最终生

物活性,然而许多天然UGT常常无法满足实际应用和工业生产的要求。

研究者已对天然UGT进行了多种类型的分子改造尝试,主要包括定向进化、半理性设计和理性设计3种策略。尽管这些策略在提升UGT活性、选择性与稳定性方面取得了显著成果,但其进一步发展仍面临若干关键问题的制约。首先,值得注意的是,当前许多UGT的三维结构及其与底物相互作用的精细分子机制尚未完全阐明,且部分UGT的异源蛋白表达与纯化仍然存在较大困难,UGT的分子改造研究仍面临诸多挑战。例如,使用定向进化策略改造UGT时,采用随机突变往往会构建出规模极其庞大的突变文库,极大增加了后续筛选的工作量和难度。因此,亟需开发高效且通用的高通量筛选方法。同时,现有的高通量筛选方法多以光谱和质谱作为检测手段,单独使用光谱或质谱往往无法满足所有类型酶的筛选需求,未来必然是多种筛选方法联合使用。除提高筛选效率外,创建高质量、精准的突变体文库对推动定向进化的成功同样至关重要。

此外,在当前UGT改造研究中,绝大多数研究成果仍停留在实验室规模验证阶段,从“酶性能改善”到“工业化生物制造”之间尚存多重系统性瓶颈。这些瓶颈至少包含4个方面:第一,改造酶在工业条件下的操作稳定性(高底物浓度、有机溶剂耐受、长时间反应稳定性)往往不及其在实验室条件下的表现;第二,UDP-糖供体成本居高不下,单批次反应中占比可达总成本的50%以上,亟需高效的低成本供体再生系统(如偶联蔗糖合酶);第三,多数植物源UGT在微生物宿主中的可溶性表达水平低下,规模化制备的产量瓶颈尚未突破;第四,改造酶整合至细胞工厂时,前体供应、辅因子再生、代谢流分配及产物转运等环节的“木桶效应”常被忽视,单一环节的短板即可制约整条路径的通量。上述挑战已超越酶分子本身的性能范畴,构成了实现工业应用的核心障碍。

展望未来,结构生物学、机器学习与多组学方法的整合将是UGT分子改造的主流发展方向。冷冻电镜和AlphaFold等结构解析技术的进步将持续降低UGT结构信息的获取门槛,使更多家族成员可进行理性设计;机器学习辅助的虚拟筛选有望进一步缩小实验验证范围,并实现多点位的协同优化;自动化高通量实验平台将缩短改造周期。但需要清醒认识到,AI预测的结构仍需实验验证,尤其是在涉及底物结合构象、酶动态过程和催化中间态时;AI预测的优秀突变体仍需系统的宿主适配和过程优化才能实现工业应用。因此,未来UGT研究的核心挑战已不再局限于“如何进一步提升酶的催化效率”,而在于“如何将高性能酶转化为可工业化放大的生物过程”,这是一个涉及酶稳定性工程、供体再生系统开发、宿主适配优化、过程工程放大及下游分离纯化的系统性工程问题。随着对UGT研究的持续深入以及合成生物学工具的创新,天然产物生物合成的规模化与工业化应用有望逐步推进。

## 参考文献


[1] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(3): 629-661.

[2] Hu S Y, Wang B X, Pei L, et al. Advances and challenges in biomanufacturing of glycosylation of natural products[J]. Fermentation, 2024, 10(7): 349.

[3] 于安东, 刘琳, 龙瑞才, 等. 植物UDP-糖基转移酶(UGT)的功能及应用前景[J]. 植物生理学报, 2022, 58(4): 631-642.
Yu A D, Liu L, Long R C, et al. Function and application prospect of plant UDP-glycosyltransferase (UGT) [J]. Plant Physiology Journal, 2022, 58(4): 631-642.

[4] 郭芳, 张良, 冯旭东, 等. 植物源UDP-糖基转移酶及其分子改造[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(9): 78-91.
Guo F, Zhang L, Feng X D, et al. Plant-derived UDP-glycosyltransferase and its molecular modification [J]. China Biotechnology, 2021, 41(9): 78-91.

[5] 胡海涛, 吕小妹. 微生物细胞工厂合成植物类黄酮:关键酶挖掘及异源生物合成[J]. 食品科学, 2025, 46(13): 1-17.
Hu H T, Lü X M. Production of plant flavonoids in microbial cell factories: key enzyme mining and heterologous biosynthesis[J]. Food Science, 2025, 46(13): 1-17.

[6] Lairson L L, Henrissat B, Davies G J, et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms [J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, 77: 521-555.

[7] Drula E, Garron M L, Dogan S, et al. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature [J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D571-D577.

[8] Campbell J A, Davies G J, Bulone V, et al. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities[J]. The Biochemical Journal, 1997, 326(Pt 3): 929-939.

[9] MacKenzie P I, Owens I S, Burchell B, et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recom-

mended nomenclature update based on evolutionary divergence [J]. Pharmacogenetics, 1997, 7 (4): 255-269.

[10] Moréra S, Larivière L, Kurzeck J, et al. High resolution crystal structures of T4 phage β-glucosyltransferase: induced fit and effect of substrate and metal binding [J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 311 (3): 569-577.

[11] Mestrom L, Przypis M, Kowalczykiewicz D, et al. Leloir glycosyltransferases in applied biocatalysis: a multidisciplinary approach [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(21): 5263.

[12] Itkin M, Davidovich-Rikanati R, Cohen S, et al. The biosynthetic pathway of the nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from *Siraitia grosvenorii* [J]. PNAS, 2016, 113(47): E7619-E7628.

[13] Srivastava P, Garg A, Misra R C, et al. UGT86C11 is a novel plant UDP-glycosyltransferase involved in labdane diterpene biosynthesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, 297(3): 101045.

[14] Cheng W J, Fang X T, Guan Z F, et al. Functional characterization and structural basis of a reversible glycosyltransferase involves in plant chemical defence [J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21 (12): 2611-2624.

[15] Jung S C, Kim W, Park S C, et al. Two ginseng UDP-glycosyltransferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd [J]. Plant & Cell Physiology, 2014, 55(12): 2177-2188.

[16] Priest D M, Jackson R G, Ashford D A, et al. The use of abscisic acid analogues to analyse the substrate selectivity of UGT71B6, a UDP-glycosyltransferase of *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Letters, 2005, 579(20): 4454-4458.

[17] Ma L Q, Liu B Y, Gao D Y, et al. Molecular cloning and overexpression of a novel UDP-glucosyltransferase elevating salidroside levels in *Rhodiola sachalinensis* [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(7): 989-999.

[18] Kumar S, Singh N, Lahane V, et al. Methyl jasmonate inducible UGT79A18 is a novel glycosyltransferase involved in the bacoside biosynthetic pathway in *Bacopa monnieri* [J]. Physiologia Plantarum, 2024, 176(2): e14260.

[19] Olsson K, Carlsen S, Semmler A, et al. Microbial production of next-generation *Stevia* sweeteners [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 207.

[20] Radominska-Pandya A, Bratton S M, Redinbo M R, et al. The crystal structure of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 C-terminal end is the first mammalian UGT target to be revealed: the significance for human UGTs from both the 1A and 2B families [J]. Drug Metabolism Reviews, 2010, 42(1): 133-144.

[21] Pandey R P, Gurung R B, Parajuli P, et al. Assessing acceptor substrate promiscuity of YjiC-mediated glycosylation toward flavonoids [J]. Carbohydrate Research, 2014, 393: 26-31.

[22] Liang D M, Liu J H, Wu H, et al. Glycosyltransferases: mechanisms and applications in natural product development [J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44 (22): 8350-8374.

[23] Lafite P, Marroun S, Coadou G, et al. S-glycosyltransferase UGT74B1 can glycosylate both S- and O-acceptors: mechanistic insights through substrate specificity [J]. Molecular Catalysis, 2019, 479: 110631.

[24] Mageroy M H, Jancsik S, Man Saint Yuen M, et al. A conifer UDP-sugar dependent glycosyltransferase contributes to acetophenone metabolism and defense against insects [J]. Plant Physiology, 2017, 175(2): 641-651.

[25] Cao W J, Wang J, Feng X D, et al. Optimized anchor and cell wall engineering boost UDP-glycosyltransferase display for glycyrrhetinic acid glycosylation in *Komagataella phaffii* [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2026, 91: 60-68.

[26] 方红辉, 倪晔, 周婕妤, 等. 糖基转移酶UGT73C5在大肠杆菌中的可溶性表达研究 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(2): 1-7.
Fang H H, Ni Y, Zhou J Y, et al. Soluble expression of glycosyltransferase UGT73C5 in *Escherichia coli* [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(2): 1-7.

[27] Sirirungruang S, Blay V, Scott Y F, et al. Structural and biochemical basis for regiospecificity of the flavonoid glycosyltransferase UGT95A1 [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2024, 300(9): 107602.

[28] De Bruyn F, Maertens J, Beauprez J, et al. Biotechnological advances in UDP-sugar based glycosylation of small molecules [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(2): 288-302.

[29] Wang Y J, Xue P, Cao M F, et al. Directed evolution: methodologies and applications [J]. Chemical Reviews, 2021, 121(20): 12384-12444.

[30] Yoav S, Stern J, Salama-Alber O, et al. Directed evolution of *Clostridium thermocellum* β-glucosidase A towards enhanced thermostability [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4701.

[31] Cirino P C, Mayer K M, Umeno D. Generating mutant libraries using error-prone PCR [M]//Directed evolution library creation: methods and protocols. Totowa,

NJ: Humana Press, 2003: 3-9.

[32] Stemmer W P C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling [J]. Nature, 1994, 370 (6488): 389-391.

[33] Siloto R M P, Weselake R J. Site saturation mutagenesis: methods and applications in protein engineering[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2012, 1 (3): 181-189.

[34] Khaled G, Benvegnu T, Amin K, et al. Glycosyltransferase enzymatic assays: Overview and comparative analysis [J]. Analytical Biochemistry, 2025, 702: 115826.

[35] Jiang W P, Ethen C, Prather B, et al. Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay [J]. The FASEB Journal, 2011, 25(S1): 540.4.

[36] Zielinski T, Reichman M, Donover P S, et al. Development and validation of a universal high-throughput UDP-glycosyltransferase assay with a time-resolved FRET signal[J]. Assay and Drug Development Technologies, 2016, 14(4): 240-251.

[37] Jackson P. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis: a new technology for the analysis of glycans [J]. Biochemical Society Transactions, 1993, 21(1): 121-125.

[38] Sanchez-Ruiz A, Serna S, Ruiz N, et al. MALDI-TOF mass spectrometric analysis of enzyme activity and lectin trapping on an array of N-glycans [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2011, 50 (8): 1801-1804.

[39] Li J, Yang J G, Mu S C, et al. Efficient O-glycosylation of triterpenes enabled by protein engineering of plant glycosyltransferase UGT74AC1[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(6): 3629-3639.

[40] Li J, Qu G, Shang N, et al. Near-perfect control of the regioselective glucosylation enabled by rational design of glycosyltransferases [J]. Green Synthesis and Catalysis, 2021, 2(1): 45-53.

[41] Lutz S. Beyond directed evolution: semi-rational protein engineering and design[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(6): 734-743.

[42] Wijma H J, Floor R J, Jekel P A, et al. Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization[J]. Protein Engineering Design & Selection Peds, 2014, 27 (2): 49-58..

[43] Wang X R, Wang L, Chen Q H, et al. Efficient production of hydroxysalidroside in *Escherichia coli* via enhanced glycosylation and semi-rational design of UGT85A1[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2025, 10(2): 638-649.

[44] Joshi R, Trinkl J, Haugeneder A, et al. Semirational design and engineering of grapevine glucosyltransferases for enhanced activity and modified product selectivity [J]. Glycobiology, 2019, 29(11): 765-775.

[45] Song Z D, Zhang Q F, Wu W H, et al. Rational design of enzyme activity and enantioselectivity[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1129149.

[46] Wang R J, Wang C, Du J K. Plant UGTs: functional diversity, catalytic mechanisms and rational design for metabolic engineering [J]. Biotechnology Advances, 2026, 89: 108872.

[47] 陈美琪. 糖基转移酶级联反应体系构建及其在甜菊糖苷中的合成研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022.
Chen M Q. Construction of glycosyltransferase cascade reaction system and its synthesis in stevioside [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.

[48] 景如玉. 基于工程菌系统的桃花青素糖基转移酶UGT的活性特征分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2023.
Jing R Y. Analysis of activity characteristics of peach anthocyanin glycosyltransferase UGT based on engineered bacterial system [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2023.

[49] He X Z, Wang X Q, Dixon R A. Mutational analysis of the *Medicago* glycosyltransferase UGT71G1 reveals residues that control regioselectivity for (iso) flavonoid glycosylation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(45): 34441-34447.

[50] Bi H P, Qu G, Wang S, et al. Biosynthesis of a rosavin natural product in *Escherichia coli* by glycosyltransferase rational design and artificial pathway construction [J]. Metabolic Engineering, 2022, 69: 15-25.

[51] Liu Y, Yan Z H, Lu X Y, et al. Improving the catalytic activity of isopentenyl phosphate kinase through protein coevolution analysis [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24117.

[52] Li J, Mu S C, Yang J G, et al. Glycosyltransferase engineering and multi-glycosylation routes development facilitating synthesis of high-intensity sweetener mogrosides[J]. iScience, 2022, 25(10): 105222.

[53] Osmani S A, Bak S, Møller B L. Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling[J]. Phytochemistry, 2009, 70(3): 325-347.

[54] Wang Z L, Gao H M, Wang S, et al. Dissection of the general two-step di-C-glycosylation pathway for the biosynthesis of (iso) schaftosides in higher plants [J].

PNAS, 2020, 117(48): 30816-30823.

[55] Malhotra Y, John J, Yadav D, et al. Advancements in protein structure prediction: a comparative overview of AlphaFold and its derivatives[J]. Computers in Biology and Medicine, 2025, 188: 109842.

[56] 杜军, 王霞, 许俊瑞, 等. 一种基于人工智能对糖基转移酶进行分子改造方法: CN119724342A[P]. 2025-03-28.
Du J, Wang X, Xu J R, et al. A method for molecular modification of glycosyltransferases based on artificial intelligence: CN119724342A[P]. 2025-03-28.

[57] Akere A, Chen S H, Liu X H, et al. Structure-based enzyme engineering improves donor-substrate recognition of *Arabidopsis thaliana* glycosyltransferases [J]. The Biochemical Journal, 2020, 477(15): 2791-2805.

[58] Huang M T, Lou C F, Wu Z R, et al. In silico prediction of UGT-mediated metabolism in drug-like molecules via graph neural network[J]. Journal of Cheminformatics, 2022, 14(1): 46.

[59] 文开新, 王成章, 严学兵, 等. 黄酮类化合物生物学活性研究进展[J]. 草业科学, 2010, 27(6): 115-122.
Wen K X, Wang C Z, Yan X B, et al. Research progress of flavonoids biological activity [J]. Pratacultural Science, 2010, 27(6): 115-122.

[60] Alseekh S, Perez de Souza L, Benina M, et al. The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function [J]. Phytochemistry, 2020, 174: 112347.

[61] 郭依萍. 黄酮7-O-糖基转移酶HtUGT73EW3的功能鉴定及定向改造[D]. 佛山: 佛山科学技术学院, 2024.
Guo Y P. Functional identification and directed modification of flavonoid 7-O-glycosyltransferase HtUGT73 EW3[D]. Foshan: Foshan University, 2024.

[62] Jia S T, Lu C N, Tong X Y, et al. Efficient and green production of flavone-5-O-glycosides by glycosyltransferases in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 277: 134477.

[63] Wen Z X, Zhang Z M, Zhong L, et al. Directed evolution of a plant glycosyltransferase for chemo- and regioselective glycosylation of pharmaceutically significant flavonoids[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(24): 14781-14790.

[64] Wang Z L, Du X Q, Ye G, et al. Functional characterization, structural basis, and protein engineering of a rare flavonoid 2′-O-glycosyltransferase from *Scutellaria baicalensis* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2024, 14(8): 3746-3759.

[65] Lu Y, Xie L H, Xie J H, et al. Comprehensive engineering of novel glycosyltransferase for efficient, donor-promiscuous, and regioselective glycosylation of flavonoids [J]. Science Advances, 2025, 11 (40): eadu5064.

[66] Bao Y O, Zhang M, Li H R, et al. Functional characterization and protein engineering of a glycosyltransferase GcCGT to produce flavone 6, 8-di-*C*- and 6-*C*-4′-*O*-glycosides [J]. ACS Catalysis, 2024, 14 (2): 1075-1082.

[67] He J B, Zhao P, Hu Z M, et al. Molecular and structural characterization of a promiscuous C-glycosyltransferase from *Trollius chinensis*[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(33): 11513-11520.

[68] 郑雪, 任家慧, 吴雨, 等. 萜类化合物的研究进展: 提取、鉴定、生物活性与作用靶点[J]. 食品科学, 2025, 46(23): 387-400.
Zheng X, Ren J H, Wu Y, et al. Advances in terpenoid research: extraction, identification, biological activities, and molecular targets [J]. Food Science, 2025, 46(23): 387-400.

[69] Liu Z Y, Xie L H, Chen W. Advancement of uridine diphosphate-dependent glycosyltransferases (UGTs) in the glycosylation modification of natural products and their protein engineering[J]. Food Quality and Safety, 2025, 9: fyaf005.

[70] Chen L L, Cai R X, Weng J Y, et al. Production of rebaudioside D from stevioside using a UGTSL2 Asn358Phe mutant in a multi-enzyme system[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(4): 974-983.

[71] 郭保党. 甜菊糖苷生物合成相关糖基转移酶的结构与功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
Guo B D. Structure and function of glycosyltransferases related to stevioside biosynthesis[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.

[72] Chu J L, Zhao L, Xu X L, et al. Evolving the 3-O/6-O regiospecificity of a microbial glycosyltransferase for efficient production of ginsenoside Rh1 and unnatural ginsenoside[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 261(Pt 1): 129678.

[73] Wang P P, Wei W, Ye W, et al. Synthesizing ginsenoside Rh2 in *Saccharomyces cerevisiae* cell factory at high-efficiency[J]. Cell Discovery, 2019, 5: 5.

[74] 何冰芳, 姜天玥, 储建林, 等. 糖基转移酶突变体及其在酶法制备稀有人参皂苷中的应用: CN116144623B[P]. 2025-10-28.
He B F, Jiang T Y, Chu J L, et al. Glycosyltransferase mutants and their application in enzymatic preparation of rare ginsenosides: CN116144623B[P]. 2025-10-28.

[75] 张政. 葡萄糖基转移酶的高效表达及其在合成莱鲍迪苷D中的应用[D]. 无锡:江南大学, 2024.
Zhang Z. Efficient expression of glucosyltransferase and its application in the synthesis of rebaudioside D[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024.

[76] 杨丽烽. 新型甜菊糖苷的酶法合成及相关糖基转移酶的改造与功能研究[D]. 无锡:江南大学, 2024.
Yang L F. Enzymatic synthesis of novel steviol glycosides and modification and functional study of related glycosyltransferases[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024.

[77] Zhuang Y, Yang G Y, Chen X H, et al. Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh2 in yeast via repurposing a key promiscuous microbial enzyme[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 25-32.

[78] 张金珠. 健康甜味剂甜菊糖苷糖基化关键酶的催化机制及理性改造[D]. 成都:四川大学, 2023.
Zhang J Z. Catalytic mechanism and rational transformation of key enzymes in glycosylation of stevioside, a healthy sweetener[D]. Chengdu: Sichuan University, 2023.

[79] Letchuman S, Madhuranga H D T, Madhurangi B L N K, et al. Alkaloids unveiled: a comprehensive analysis of novel therapeutic properties, mechanisms, and plant-based innovations[J]. Intelligent Pharmacy, 2025, 3(4): 268-276.

[80] Srinivasan P, Smolke C D. Biosynthesis of medicinal tropane alkaloids in yeast[J]. Nature, 2020, 585(7826): 614-619.

[81] Wang J J, Wang Z K, Wang H, et al. UDP-glucosyltransferases from UGT73 family catalyze 3-O-glucosylation of isosteroidal and steroidal alkaloids in *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*[J]. The Plant Journal, 2025, 121(5): e70042.

[82] 陈金祥. 酚酸抗氧化活性的构效关系及抗氧化机制的研究[D]. 太原:中北大学, 2020.
Chen J X. Study on antioxidant structure-activity relationship and mechanism of phenolic acids[D]. Taiyuan: North University of China, 2020.

[83] Ohashi H, Koma D, Yamanaka H, et al. Enzymatic properties of UDP-glycosyltransferase 89B1 from radish and modulation of enzyme catalytic activity *via* loop region mutation[J]. PLoS One, 2024, 19(2): e0299755.

[84] Xie K B, Dou X X, Chen R D, et al. Two novel fungal phenolic UDP glycosyltransferases from *Absidia coerulea* and *Rhizopus japonicus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(8): e03103-e03116.

[85] Meng N N, Shao J, Li H J, et al. Electrosynthesis of formamide from methanol and ammonia under ambient conditions[J]. Nature Communications, 2022, 13: 5452.

[86] Peng Z H, Xiao Q, Xia Y, et al. Stereoselective chemical N-glycoconjugation of amines via $CO_2$ incorporation[J]. Nature Communications, 2024, 15: 10373.