

王彩云, 张晓东, 沈 涛, 等. 龙胆苦苷生物合成途径研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 4-10.

龙胆苦苷生物合成途径研究进展

王彩云¹, 张晓东², 沈 涛², 李 涛², 李富生¹, 王元忠³

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201; 2. 玉溪师范学院资源与环境学院, 云南玉溪 653100;

3. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南昆明 650223)

摘要:龙胆苦苷属裂环烯醚萜类化合物, 是传统中药龙胆的主要有效成分, 具有抗炎、保肝、利胆、健胃、抗肿瘤等药理活性, 其生物合成途径可分为异戊烯基焦磷酸合成、裂环番木鳖酸生物合成和龙胆苦苷生物合成 3 个阶段, 受脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶、脱氧木酮糖磷酸盐还原异构酶、细胞色素 P450 等多种酶的调控。本文综述了近年龙胆苦苷生物合成及其调控机制的研究现状, 旨在为龙胆苦苷生物合成及其调控机制的进一步研究提供参考。

关键词:龙胆苦苷; 生物合成; MVA; MEP; 转录因子

中图分类号:R284.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)03-0004-06

龙胆苦苷(gentiopicroside)广泛存在于龙胆科植物中, 是滇龙胆(*Gentiana rigescens*)等药用植物中一类重要的次生代谢产物^[1], 也是龙胆泻肝丸等 180 多种中药产品的主要药效成分。现代药理学研究证实, 龙胆苦苷具有保肝、利胆、镇痛、抗炎、抗菌、健胃、抗肿瘤以及诱发神经轴突生长等作用^[2-5]。目前, 龙胆苦苷主要从滇龙胆、秦艽(*Gentiana macrophylla*)等野生植物中提取, 但随着龙胆苦苷需求量的剧增, 野生药用植物不能完全满足市场需求^[6]。因此, 对龙胆苦苷生物合成途径进行研究, 利用基因工程、代谢工程等手段生产龙胆苦苷势在必行, 明确龙胆苦苷的生物合成途径及其调控机制是利用生物技术手段生产龙胆苦苷的前提。

近年来, 龙胆苦苷因其独特的药用价值以及在临床上的广泛应用^[7], 受到国内外学者的广泛关注, 并在龙胆苦苷的提取、含量测定、含量影响因素、药代动力学^[8]、生物转化^[9]和结构修饰等方面取得了大量科研成果。本文从目前已知的单萜生物合成途径出发, 以近年的研究成果为依据, 归纳出龙胆苦苷的基本合成途径, 综述了龙胆苦苷的理化性质、生物合成途径以及该途径中关键酶的研究现状, 以期龙胆苦苷的开发和利用提供参考。

1 龙胆苦苷的理化性质

龙胆苦苷分子式为 $C_{16}H_{20}O_9$, 分子量为 356.3246, 化学名为 5-ethenyl-6-(β -D-glucopyranosyloxy)-5,6-dihydro-1H,3H-pyrano[3,4-O]pyran-1-one。龙胆苦苷

纯品为白色粉末或淡黄(红)色针状结晶, 有内酯苷类化合物的颜色反应, 其表观油水分配系数理论值为 -1.41, 23℃ 下的表观油水分配系数为 $\lg P = -1.21$ ^[10], 表明龙胆苦苷的亲水性较强, 脂溶性较差, 易溶解于水、甲醇及乙醇等溶剂。龙胆苦苷在龙胆科植物中普遍存在, 于 1854 年首次从龙胆科植物黄龙胆(*Gentiana lutea*)中分离得到^[11]; 1961 年, Canonica 等初步获得龙胆苦苷的化学结构^[12]; 1968 年, Inouye 等最终确定了龙胆苦苷的化学结构(图 1)^[13]。

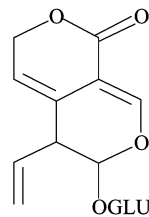


图1 龙胆苦苷的化学结构

2 龙胆苦苷生物合成途径

龙胆苦苷属于单萜类化合物, 其生物合成途径主要分为 3 个阶段: (1) 通过甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径和 2-甲基-赤藓醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径合成异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP); (2) IPP 经过不同的酶促反应合成裂环番木鳖酸; (3) 裂环番木鳖酸依次经过獐牙菜苷、獐牙菜苦苷, 最终形成龙胆苦苷。

Coscia 等于 1967 年用¹⁴C 标记 *Swertia carolinensis* 的甲羟戊酸, 发现龙胆苦苷中出现¹⁴C, 表明龙胆苦苷起始于甲羟戊酸途径^[14]。据笔者所在课题组前期对滇龙胆三年生根、茎转录组测序研究发现, 龙胆苦苷生物合成调控基因在 MEP 途径中上调, 表明龙胆苦苷生物合成主要来源于 MEP 途径, 部分来源于 MVA 途径。龙胆苦苷生物合成的第一阶段与一般的单萜类化合物在萜类基本骨架合成阶段完全相同, 即首先在细胞质中通过 MVA 途径或者在质体中通过 MEP 途径合成萜类前体物质 IPP, 然后转化为 GPP^[15]。MVA 途径自被人类发现至今已有半个世纪, 其生物合成途径比较清楚, 该途径首

收稿日期: 2013-07-01

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81260608); 国家科技支撑计划(编号: 2011BAI13B02-04); 科技型中小企业技术创新基金(编号: 12C26215306388); 云南省技术创新人才培养项目(编号: 2010CI068); 云南省科技计划(编号: 2010GG026, 2012AE002); 云南省自然科学基金(编号: 2013FZ150, 2013FZ151); 云南省非公有制经济发展专项[编号: (2010)114]。

作者简介: 王彩云(1989—), 女, 云南宣威人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源评价与利用。E-mail: wangcaiyun0716@126.com。

通信作者: 王元忠, 助理研究员, 主要从事药用植物资源评价与利用的研究。E-mail: boletus@126.com。

先由 3 分子的乙酰 - CoA 在乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶和乙酰乙酰辅酶 A 合酶作用下缩合形成 3 - 羟基 - 3 - 甲基戊二酰 - CoA (HMG - CoA), 缩合产物在其还原酶 (HMGR) 的催化作用下被还原成 MVA, 再经过脱羧和磷酸化反应生成 GPP^[16]。MEP 途径是在脱氧木酮糖 - 5 - 磷酸合成酶 (DXS) 的缩合作用下, 由 1 分子 3 - 磷酸甘油醛和 1 分子丙酮酸生成 1 分子的 1 - 脱氧木酮糖 - 5 - 磷酸 (DXP), 并在其还原异构酶的催化作用下转化为 2 - 甲基 - 赤藓醇 - 4 - 磷酸 (MEP), MEP 再依次经过 2 - 甲基赤藓醇 - 4 - 磷酸胞苷转移酶、4 - 二磷酸胞苷 - 2 - 甲基赤藓糖激酶、2 - 甲基 - 赤藓醇 - 2,4 - 环二磷酸合酶、1 - 羟基 - 2 - 甲基 - 2 - 丁烯基 - 4 - 焦磷酸合酶催化生成 1 - 羟基 - 2 - 甲基 - 2 - 丁烯基 - 4 - 焦磷酸 (HMBPP), 接着由异戊烯基焦磷酸激酶催化 HMBPP 生成 IPP, IPP 和二甲基丙烯基焦磷酸 (DMAPP) 之间的转换由 IPP 异构酶 (IDI) 来完成^[17]。

龙胆苦苷生物合成第二阶段, 即裂环番木鳖酸生物合成阶段, 以 GPP 为前体, 脱磷酸形成香叶醇。从香叶醇到裂环番木鳖酸的合成大约需要 11 个酶促步骤, 目前只有 5 个被鉴定, 即 P450 依赖性香叶醇 10 - 羟化酶 (G10H)、无环单萜伯醇脱氢酶 (ADH)、单萜环化酶 (MC)、S - 腺苷 - L - 蛋氨酸: 马钱苷酸甲基转移酶 (LAMT) 和 P450 依赖性裂环番木鳖酸合成酶 (SLS)^[18]。该阶段 IPP 和 DMAPP 在 GPPS 的催化作用下生成 GPP, GPP 合成后需要进行复杂的开环、环化和糖基化步骤, 即 GPP 经香叶醇合成酶催化合成香叶醇, 香叶醇 C - 2 位置在细胞色素 P450 还原酶和香叶醇 10 - 羟化酶的催化作用下生成 10 - 脱氧香叶醇, 这是裂环番木鳖酸生物合成的最重要的步骤。10 - 脱氧香叶醇被 10 - 羟基香叶醇氧化还原酶 (10HGO) 氧化, 在 NADPH 氧化还原酶存在时, 生成 10 - 氧香叶醛, 接着在单萜环化酶的催化下形成琉蚁二醛 (iridodial), 经缩醛反应形成 iridotial, 经过不断反应形成 7 - 脱氧番木鳖酸 (deoxyloganic acid), 在 7 - 脱氧番木鳖酸 7 - 羟化酶作用下生成马钱苷酸, 在 S - 腺苷 - L - 蛋氨酸: 马钱苷酸甲基转移酶的催化作用下生成番木鳖酸, SLS 催化番木鳖酸形成裂环番木鳖酸 (secologanin)^[18-19]。Coscia 等发现牻牛儿基焦磷酸能并入到 *Swertia carolinensis* 的有效成分番木鳖酸, 进一步证明了 GPP 是龙胆苦苷生物合成的中间物^[20]。1969 年, Coscia 等证明番木鳖酸是龙胆苦苷生物合成的前体^[21], 这一结论同时也由 Inouye 和 Gröger 这 2 个课题组分别在三花龙胆和长柄獐牙菜 (*Swertia petiolata*) 中得到证实。

在龙胆苦苷生物合成的最后一个阶段, 裂环番木鳖酸经过不断的衍化生成獐牙菜苷 (sweroside)、獐牙菜苦苷 (swertiamarin), 最终脱羟基形成龙胆苦苷^[22]。Inouye 等于 1967 年通过前体饲养试验证明在三花龙胆 (*Gentiana triflora*) 中甲基戊酸内酯被并入到龙胆苦苷中; 同时也出现在日本獐牙菜 (*Swertia japonica*) 的獐牙菜苷和獐牙菜苦苷中, 獐牙菜苷中 ¹⁴C 的含量约是獐牙菜苦苷含量的 6 倍, 表明獐牙菜苷是獐牙菜苦苷的前体^[14]。Tan 等经过试验证明裂环番木鳖酸是龙胆苦苷等裂环萜类化合物的关键中间物^[23]。随后, Inouye 等采用同位素示踪獐牙菜苷, 并证明它是龙胆草 (*Gentiana scabra*) 中龙胆苦苷生物合成的一个中间物^[24]。Jensen 等研究表明, 在龙胆科植物中普遍存在着獐牙菜苷到

獐牙菜苦苷再到龙胆苦苷的生物转化^[22]。

目前, 主要采用同位素示踪法, 通过产物来反推其生物合成途径, 并加以验证, 是完善环萜类化合物次生代谢合成的一般策略。目前, 龙胆苦苷的完整合成途径并不完全清楚, 其基本的反应步骤如图 2 所示。

3 龙胆苦苷生物合成途径中的关键酶

随着龙胆苦苷需求量的剧增, 其生物合成途径中的关键酶也备受关注。在龙胆苦苷的生物合成途径中, IPP 合成阶段的大部分酶基因已被广泛克隆和研究; 第二阶段 (即裂环番木鳖酸生物合成阶段) 只克隆到 6 个基因, 其余 5 个基因还有待进一步研究; 第三阶段从獐牙菜苷到獐牙菜苦苷再到龙胆苦苷的衍化机制并不清楚。

3.1 3 - 羟基 - 3 - 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶

3 - 羟基 - 3 - 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG - CoA reductase, HMGR) 催化 3 - 羟基 - 3 - 甲基戊二酰辅酶 A (HMG - CoA) 转化为 MVA, 这是一个不可逆过程, 故 HMGR 被认为是 MVA 途径中的第一个限速步骤; HMGR 在类异戊二烯的生物合成中起重要作用, 也是细胞质萜类代谢中的重要调控位点^[26]。植物中 HMGR 组成一个多基因家族, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 HMGR 酶由 *HMG1* 和 *HMG2* 基因编码^[27]; 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中含有 3 个 *HMGR* 基因; 番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中含有 4 个 *HMGR* 基因; 而在动物中仅发现 1 个 *HMGR* 基因。目前该基因已在杜仲橡胶 (*Eucommia ulmoides*)^[28] 等植物和李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)^[29] 等细菌中被克隆和研究。

3.2 脱氧木酮糖 - 5 - 磷酸合成酶

脱氧木酮糖 - 5 - 磷酸合成酶 (1 - deoxy - D - xylulose - 5 - phosphate synthase, DXS), 催化 MEP 途径第一步反应, 是 MEP 途径的第 1 个关键酶, 它能与焦磷酸硫胺素 (thiamine pyrophosphate, TPP) 共同作用, 使丙酮酸脱羧后与 3 - 磷酸甘油醛合成 1 - 脱氧木酮糖 - 5 - 磷酸 (1 - deoxy - D - xylulose - 5 - phosphate, DXP)^[30]。DXS 是 MEP 途径中植物萜类物质合成的第一个限速酶, 该基因过量表达可促进下游相关萜类化合物的积累。Peebles 等在长春花 (*Catharanthus roseus*) 萜类生物碱生物合成的研究中发现, *DXS* 的超表达导致阿吗碱、洛柯定碱、水甘草碱等产物的大量增加, 表明 *DXS* 在萜类生物合成中起重要作用^[31]。Estévez 等对拟南芥突变体 *clal - 1* 进行研究发现, *DXS* 对植物叶绿体及白色体的发育具有重要作用, 主要表现在当突变体缺失 *DXS* 基因时呈现“白化”特征, 添加脱氧木酮糖后有新的色素生成^[32]。目前, 已从玉米 (*Zea mays*)^[33]、番茄^[34]、银杏 (*Ginkgo biloba*)^[35] 等植物中获得 *DXS* 基因。近年来, 大量研究表明 *DXS* 在类异戊二烯的 MEP 生物合成途径中起重要作用^[36-37]。

3.3 脱氧木酮糖磷酸盐还原异构酶

脱氧木酮糖磷酸盐还原异构酶 (1 - deoxy - D - xylulose - 5 - phosphate reductoisomerase, DXR) 存在于质体中的 MEP 途径中, DXP 通过 DXR 催化, 以 NADPH 为还原剂, 依赖二价阳离子, 经原子重排和还原生成 MEP, 从而把 DXP 引入 MEP 途径^[38]。DXR 是 MEP 途径中的第 2 个限速酶, 也是细胞质体中类异戊二烯化合物代谢的重要调控位点。Carretero 等研究

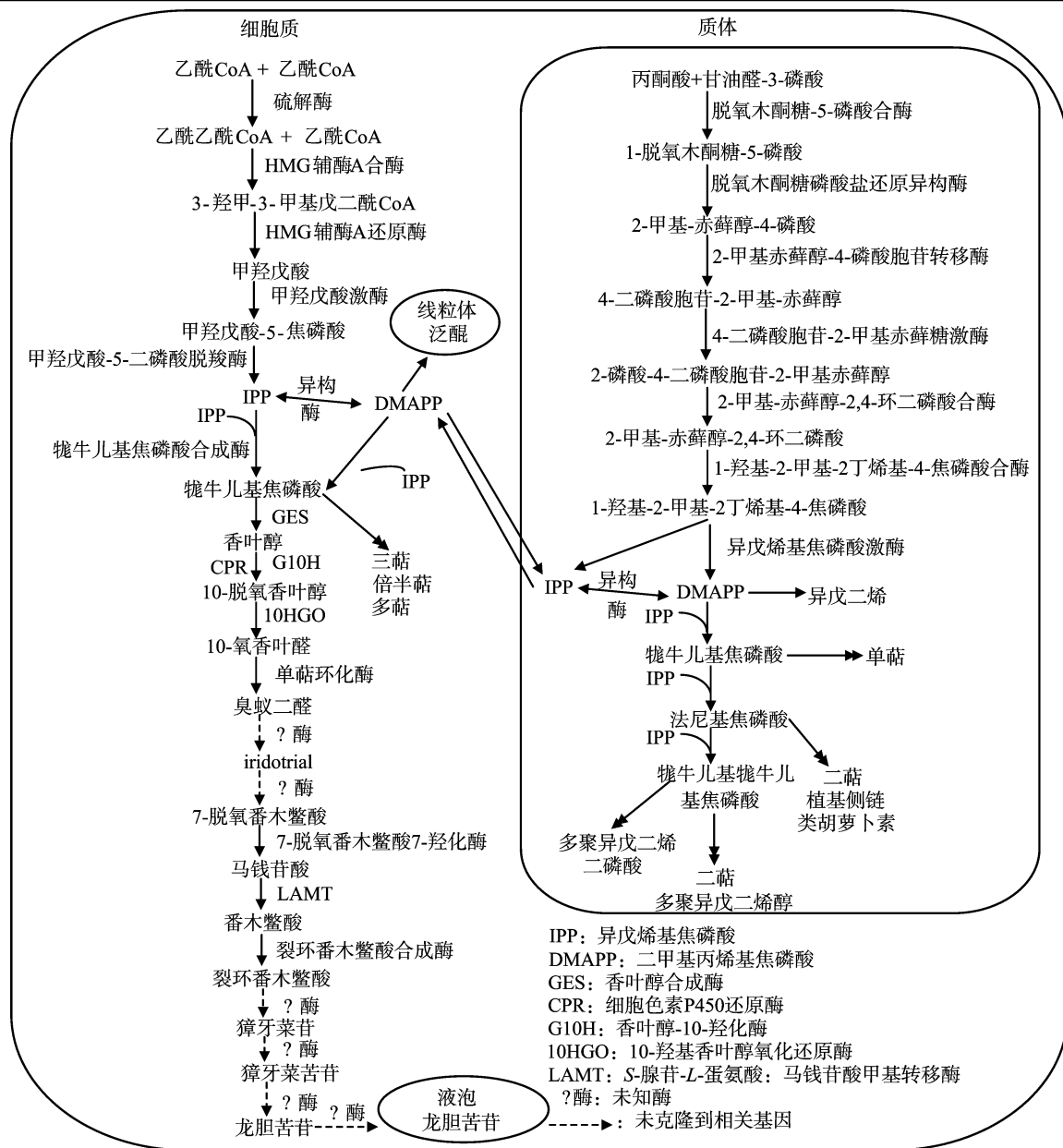


图2 龙胆苦苷的生物合成途径^[18-19, 22, 25]

发现,拟南芥中 *DXR* 基因的超表达能够增加 MEP 衍生质体类异戊二烯(如叶绿素和类胡萝卜素)的积累,表明 *DXR* 在 MEP 途径的调控中起重要作用^[39]。Xing 等对拟南芥 *dxr* 突变体进行研究发现,*DXR* 基因的破坏会导致拟南芥突变体植株白化、矮小以及毛状体起始缺陷和气孔关闭,表明 *DXR* 基因在植物生长发育过程中起重要作用^[40]。近年来,*DXR* 在植物生长和发育过程以及 MEP 途径中的重要作用引起人们的广泛关注。目前,*DXR* 基因已在细菌、藻类、植物、原生动物中发现,但在人体中并未发现。

3.4 2-甲基赤藓醇-4-磷酸胞苷转移酶

2-甲基赤藓醇-4-磷酸胞苷转移酶(2-C-methylerythritol-4-phosphate cytidyltransferase, MECT)属于胞嘧啶转移酶家族的一个成员,参与 MEP 途径的第三步酶促反应,将二磷酸胞苷(CDP)和 MEP 连接生成 4-二磷酸胞苷-2-甲基-赤藓醇(CDP-ME),该反应依赖于胞苷三磷酸

(CTP)^[30]。目前,已从拟南芥、银杏等植物中发现该基因,但其编码酶的相关功能研究并未见报道。为了验证 MECT 在萜类生物合成中的作用,Rohdich 等用¹⁴C 标记 MECT,结果发现生成带有¹⁴C 标记的 CDP-ME;将大肠埃希菌(*Escherichia coli*) MECT 基因转入辣椒,发现 CDP-ME 在质体中参与类胡萝卜素的生物合成,表明 MECT 与次生代谢产物合成有关^[41]。

3.5 2-甲基-赤藓醇-2,4-环二磷酸合酶

2-甲基-赤藓醇-2,4-环二磷酸合酶(2-C-methyl-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, MECPS)是 MEP 途径上的第 5 个酶,催化 CDP-MEP 生成 2-甲基-赤藓醇-2,4-环二磷酸(ME-cPP)。目前,Buetow 等已在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中证实 MECPS 具有潜在的药物功能测定作用,可作为治疗靶点^[42]。Burlat 等经 Northern 杂交和原位杂交发现 MECPS 与 MEP 途径中 *DXS*、*DXR* 基

因以及下游途径中的香叶醇 10-羟化酶 (*G10H*) 基因类似, 显示出相同的细胞特异表达模式, 表明 MECPS 在次生代谢产物的生物合成中起重要作用^[43]。

3.6 异戊烯基转移酶

异戊烯基转移酶 (prenyltransferase, PTs) 催化 IPP 缩合成非环式的 GPP, 这是萜类合成中的重要过程。该基因已在紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*)^[44]、苦参 (*Sophora flavescens*)^[45]、白羽扇豆 (*Lupinus albus*)^[46] 等植物中被广泛研究。近年来, Nickerson 等研究发现 PTs 与胆固醇的代谢有关^[47]; Akhtar 等经研究证实了番茄中顺式异戊烯基转移酶 (*cis*-prenyltransferase, CPTs) 与长链多聚类异戊二烯的合成有关, 含有至少 5 个异戊二烯单位^[48]。

3.7 牻牛儿基焦磷酸合成酶

牻牛儿基焦磷酸合成酶 (geranyl pyrophosphate synthase, GPPS) 是异戊二烯途径中一个很重要的酶, 目前对 GPPS 的研究主要集中在其对单萜和倍半萜的影响^[49]。GPPS 催化 IPP 形成 GPP, 是植物单萜生物合成中的一个关键酶, 在吸引传粉者和次生代谢产物的防御中起重要作用^[50]。GPPS 在多种植物中被分离, 但有关其调控机制的研究很少。Martin 等对葡萄 (*Vitis vinifera*) 中 *VtGPPS* 的转录进行分析, 表明 *VtGPPS* 基因在单萜生物合成中起重要作用^[51]。Chang 等研究发现欧薄荷 (*Mentha piperita*) 中的 *MpGPPS* 包含 2 个具有催化功能的大亚基和 2 个非催化的具有调控功能的小亚基, 并且证实与薄荷醇的生物合成有关^[52]。

3.8 香叶醇合成酶

香叶醇合成酶 (geraniol synthase, GES) 是单萜芳香化合物香叶醇产生过程中的关键酶。Yoko 等的¹⁸O 同位素示踪试验研究结果表明 GES 催化牻牛儿基焦磷酸生成香叶醇, 几乎专一性地在罗勒腺体中产生, 在同型二聚体蛋白中存在活性, 且需要 Mn^{2+} 作为二价金属辅因子来激活^[53]。Marc 等研究结果表明酵母菌株 *erg20K197G* 中 *GES* 在 YNB (酵母氮源基质) 中的表达导致大量单萜化合物 (香叶醇、沉香醇、香茅醇、橙花醇) 的生物合成, 且 *GES* 的表达导致香叶醇产量高出 16 倍; 推断出 GPP 的不稳定导致 GES 特异性损失, 不会导致香叶醇单萜合成酶功能的损失, 但会使其失活^[54]。目前, 已在罗勒、紫苏、长春花中克隆到相关基因。罗勒 *GES* 可以用于评估单萜在不同植物中的异源表达谱。Marc 等用根瘤农杆菌转化葡萄, 用浸花法转化拟南芥, 农杆菌渗透瞬时表达烟草叶片均获得罗勒 *GES* 转基因植株, 并在叶片中检测到高含量的香叶醇; 另外, 在大肠杆菌转化株培养基中检测到香叶醇^[55]。

3.9 细胞色素 P450 还原酶

细胞色素 P450 还原酶 (cytochrome P450 reductase, CPR) 是真核生物的一个膜结合黄素蛋白, 是细胞色素 P450 单加氧酶的催化反应所必须的, 因为它在电子传递中的功能是从 NADPH 到细胞色素 P450 蛋白。许多 P450 蛋白与香叶醇到裂环番木鳖酸的生物合成有关, 包括香叶醇 10-羟化酶、7-脱氧番木鳖酸 7-羟化酶和裂环番木鳖酸合成酶^[56]。Shen 等通过 RT-qPCR 研究发现, 细胞色素 P450 单加氧酶 (*cyp71aw1*) 在转基因黄花蒿植株转录水平上具有较高的表达量; HPLC 分析显示在 *cyp71aw1* 和细胞色素 P450 还原酶 (*cpr*) 的过表达植株中, 青蒿素的含量明显增加, 表明 *cyp71aw1*、*cpr*

基因的过表达增加了黄花蒿 (*Artemisia annua*) 中青蒿素的含量^[57]。细胞色素 P450 单加氧酶与内源性化合物的生物合成和外源性物质的分解代谢有关, 他们的活性依赖于细胞色素 P450 还原酶。

3.10 细胞色素 P450

细胞色素 P450 形成植物蛋白的大家族, 参与生物碱、萜类、类苯基丙烷等代谢产物的产生。P450 蛋白基因在植物基因组中的数量占总注释基因的 1%, 表明植物中的大量反应依赖于各种 P450^[58]。在植物次生代谢过程中, P450 催化羟基化反应和单加氧反应, 另外还涉及到一些非常规反应, 如甲二氧基-桥形成和石碳酸偶联反应等^[59]。Chang 等研究发现细胞色素 P450 参与龙胆苦苷的分解代谢^[7]; 在龙胆苦苷生物合成途径中, 许多反应都是通过细胞色素 P450 蛋白进行催化的; 单萜和倍半萜的基本碳氢骨架形成后, 经 P450 加氧酶催化而发生羟基化反应^[60]。Sung 等研究发现在龙胆苦苷生物合成中, 香叶醇-10-羟化酶 (Geraniol 10-hydroxylase, G10H) 是一个极其重要的酶, 它是 CYP76B6 家族中的一个细胞色素 P450 单加氧酶, 在 C-10 位置羟基化单萜香叶醇产生 10-羟基香叶醇, 是单萜和吲哚生物碱生物合成过程中裂环番木鳖酸产生的重要调控酶, 也是不同植物中环烯醚萜类形成的第一个关键酶^[61]。Wang 等从川西獐牙菜 (*Swertia musotii*) 中克隆到香叶醇 10-羟化酶基因, 并证实它具有香叶醇羟基化的催化活性^[62]。

3.11 7-脱氧番木鳖酸 7-羟化酶

Katano 等研究表明 7-脱氧番木鳖酸 7-羟化酶 (7-deoxyloganin 7-hydroxylase, DL7H) 能催化 7-脱氧番木鳖酸转化为番木鳖酸, 具有 7-脱氧番木鳖酸的底物特异性, 在金银花 (*Lonicera japonica*) 细胞悬浮培养物的微粒体中检测到其活性依赖于 NADPH 和分子氧, 该酶学反应能被一氧化碳和许多细胞色素 P450 抑制剂 (尤其是酮康唑) 抑制, 表明该反应能被细胞色素 P450 介导^[63]。

3.12 裂环番木鳖酸合成酶

裂环番木鳖酸合成酶 (secologanin synthase, SLS) 在番木鳖酸形成裂环番木鳖酸的过程中催化环戊烷的氧化还原反应, 属于细胞色素 P450 家族中 CYP72A1 亚家族成员, 在长春花单萜生物合成中被鉴定^[64-65]。Yamamoto 等首次从金银花的细胞悬浮培养微粒体中检测到 SLS^[66]。SLS 在反应中的作用依赖于 NADPH 和分子氧, 能被一氧化碳和细胞色素 P450 抑制剂阻断, 表明该反应受细胞色素 P450 调节。

4 展望

龙胆苦苷的生物合成途径是一个受多基因调控的、非常复杂的动态变化过程。随着分子生物学和代谢组学的发展, 龙胆苦苷生物合成途径的基本框架和相关酶的研究已取得了一定的进展, 但还有许多细节步骤不清楚, 其生物合成途径仍有许多问题亟待解决。(1) 香叶醇是裂环番木鳖酸生物合成的关键中间物, 但香叶醇到裂环番木鳖酸之间的具体酶促反应至今还不清楚。在龙胆苦苷生物合成过程中, 从裂环番木鳖酸到獐牙菜苷、獐牙菜苦苷以及龙胆苦苷之间的反应机制也不清楚, 需要通过试验进一步研究。(2) 龙胆苦苷的生物合成中, MVA 和 MEP 途径中的酶大部分已被系统地研究, 环

烯萜酚类化合物生物合成过程中的调控酶只有细胞色素 P450、G10H、SLS 等被广泛研究,有关单萜环化酶、LAMT 等的研究很少,而其他反应过程,如臭蚁二醛到 7-脱氧番木鳖酸、獐牙菜苷与獐牙菜苦苷以及龙胆苦苷之间的酶未见报道。(3)代谢产物的生物合成途径都是由结构基因和调控基因共同调控的,龙胆苦苷生物合成途径中的部分结构基因和个别调控基因仅在部分植物中被克隆,如 WRKY 转录因子被报道间接参与龙胆苦苷的生物合成过程,但并未对其具体调控机制进行深入研究。目前,龙胆科植物的基因组还未被测序,在今后的研究中,需要通过对龙胆科具有代表性的药材(如龙胆或秦艽等)进行转录组测序,挖掘该途径中大量的结构基因和调控基因,并对其功能进行研究,进而从分子生物学水平阐明龙胆苦苷生物合成途径及其调控机制。因而,了解植物中龙胆苦苷的生物合成途径及其调控机理,并采用基因工程手段来生产龙胆苦苷,对野生龙胆资源的保护和解决市场上龙胆等药材的供需矛盾都具有重要的理论价值和实践价值。

参考文献:

- [1] Wang Y M, Xu M, Wang D, et al. Review on “Long – Dan”, one of the traditional Chinese medicinal herbs recorded in Chinese Pharmacopoeia[J]. Nat Prod Bioprospect, 2012, 2(1): 1 – 10.
- [2] Wang C G, Zhang T, Cui X M, et al. Hepatoprotective effects of a Chinese herbal formula, longyin decoction, on carbon – tetrachloride – induced liver injury in chickens[J]. Evid – Based Compl Alt, 2013; 1 – 9.
- [3] Wang Y M, Xu M, Wang D, et al. Anti – inflammatory compounds of “Qin – Jiao”, the roots of *Gentiana dahurica* (Gentianaceae) [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(2): 341 – 348.
- [4] Jia L Y, Guo H Y, Jia B Z, et al. Anti – tumour activities and a high – performance liquid chromatography mass spectrometric method for analysis of the constituents of *Lomatogonium carinthiacum* [J]. Nat Prod Res, 2011, 25(2): 100 – 107.
- [5] Chiba K, Yamazaki M, Kikuchi M, et al. New physiological function of secoiridoids; neuritogenic activity in PC12h cells[J]. J Nat Med, 2011, 65(1): 186 – 190.
- [6] 李智敏, 刘 莉, 李晚谊, 等. 滇龙胆的药用资源研究与开发进展 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(增刊): 485 – 487.
- [7] Chang – Liao W L, Chien C F, Lin L C, et al. Isolation of gentiopicroside from *Gentianae Radix* and its pharmacokinetics on liver ischemia/reperfusion rats[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(2): 668 – 673.
- [8] Liu S B, Ma L, Guo H J, et al. Gentiopicroside attenuates morphine rewarding effect through downregulation of GluN2B receptors in nucleus accumbens[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(8): 652 – 658.
- [9] Wang C L, Liu J L, Liu Z L, et al. Biomimetic transformation of gentiopicroside to erythrocentaurin[J]. Chinese Chem Lett, 2009, 20(2): 150 – 152.
- [10] 赵文娜, 尚平平, 孙文基. HPLC 法测定龙胆苦苷的表观油水分配系数[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1093 – 1095.
- [11] 赵 晔. 桃叶珊瑚苷和龙胆苦苷的热性能与生物代谢研究 [D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [12] Canonica L, Pelizzoni F, Manitto P, et al. Structure of gentiopicroside [J]. Tetrahedron, 1961, 16(1/2/3/4): 192 – 200.
- [13] Inouye H, Yoshida T, Nakamura Y, et al. Die stereochemie einiger secoiridoidglucoside und die revision der struktur des gentiopicrosids

- [J]. Tetrahedron Lett, 1968, 9(42): 4429 – 4432.
- [14] Coscia C J, Guarnaccia R. Biosynthesis of gentiopicroside, a novel monoterpene[J]. J Am Chem Soc, 1967, 89(5): 1280 – 1281.
- [15] 石 磊, 葛 锋, 刘迪秋, 等. 三七总皂苷生物合成与关键酶调控的研究进展[J]. 西北植物学报, 2010, 30(11): 2358 – 2364.
- [16] Chappell J, Wolf F, Proulx J, et al. Is the reaction catalyzed by 3 – hydroxy – 3 – methylglutaryl coenzyme A reductase a rate – limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? [J]. Plant Physiol, 1995, 109(4): 1337 – 1343.
- [17] Seemann M, Sum Bui B T, Wolff M, et al. Isoprenoid biosynthesis in plant chloroplasts via the MEP pathway: direct thylakoid/ferredoxin – dependent photoreduction of GcpE/IspG [J]. FEBS Lett, 2006, 580(6): 1547 – 1552.
- [18] Suttapanta N. Characterization of G10H promoter and isolation of WRKY transcription factors involved in *Catharanthus* terpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway [D]. Kentucky: University of Kentucky Doctoral Dissertations, 2011.
- [19] Sun P, Song S H, Zhou L L, et al. Transcriptome analysis reveals putative genes involved in iridoid biosynthesis in *Rehmannia glutinosa* [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(10): 13748 – 13763.
- [20] Coscia C J, Guarnaccia R. Natural occurrence and biosynthesis of a cyclopentanoid monoterpene carboxylic acid [J]. Chem Commun, 1968(3): 138 – 140.
- [21] Coscia C J, Botta L, Guarnaccia R. On the mechanism of iridoid and secoiridoid monoterpene biosynthesis [J]. Arch Biochem Biophys, 1970, 136(2): 498 – 506.
- [22] Jensen S R, Schripsema J. Chemotaxonomy and pharmacology of *Gentianaceae* [M]//Struwe L, Albert V A. Gentianaceae: systematics and natural history. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 573 – 631.
- [23] Tan R X, Wolfender J L, Zhang L X, et al. Acyl secoiridoids and antifungal constituents from *Gentiana macrophylla* [J]. Phytochemistry, 1996, 42(5): 1305 – 1313.
- [24] Inouye H, Nakamura Y. Über die monoterpenglucoside und verwandte naturstoffe – XIV: Die struktur der beiden stark bitter schmeckenden glucoside amarogentin und amaruswerin aus *Swertia japonica* [J]. Tetrahedron, 1971, 27(10): 1951 – 1966.
- [25] Laboratories K. Terpenoid backbone biosynthesis – *Arabidopsis thaliana* (thale cress) [EB/OL]. (2012 – 06 – 26) [2013 – 06 – 30]. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ath00900.
- [26] Liao P, Zhou W, Zhang L, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a new gene encoding 3 – hydroxy – 3 – methylglutaryl coenzyme A reductase from *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31(3): 565 – 572.
- [27] Enfissi E M, Fraser P D, Lois L M, et al. Metabolic engineering of the mevalonate and non – mevalonate isopentenyl diphosphate – forming pathways for the production of health – promoting isoprenoids in tomato [J]. Plant Biotechnol J, 2005, 3(1): 17 – 27.
- [28] Jiang J H, Kai G Y, Cao X Y, et al. Molecular cloning of a HMG – CoA reductase gene from *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. Bioscience Rep, 2006, 26(2): 171 – 181.
- [29] Heuston S, Begley M, Davey M S, et al. HmgR, a key enzyme in the mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis, is essential for growth of *Listeria monocytogenes* EGDe [J]. Microbiology, 2012, 158 (Pt 7): 1684 – 1693.

- [30] 刘万宏, 姚波, 祝顺琴, 等. 紫杉醇前体生物合成途径及生物技术研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1327–1331.
- [31] Peebles C A, Sander G W, Hughes E H, et al. The expression of 1 – deoxy – D – xylulose synthase and geraniol – 10 – hydroxylase or anthranilate synthase increases terpenoid indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots[J]. Metab Eng, 2011, 13(2): 234–240.
- [32] Estévez J M, Cantero A, Romero C, et al. Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1 – deoxyxylulose 5 – phosphate synthase of the 2 – C – methyl – D – erythritol – 4 – phosphate pathway in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2000, 124(1): 95–104.
- [33] Cordoba E, Porta H, Arroyo A, et al. Functional characterization of the three genes encoding 1 – deoxy – D – xylulose 5 – phosphate synthase in maize[J]. J Exp Bot, 2011, 62(6): 2023–2038.
- [34] Paetzold H, Garms S, Bartram S, et al. The isogene 1 – deoxy – D – xylulose 5 – phosphate synthase 2 controls isoprenoid profiles, precursor pathway allocation, and density of tomato trichomes[J]. Mol Plant, 2010, 3(5): 904–916.
- [35] Gong Y F, Liao Z H, Guo B H, et al. Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* *DXS* gene encoding 1 – deoxy – D – xylulose 5 – phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2 – C – methyl – D – erythritol 4 – phosphate pathway[J]. Planta Med, 2006, 72(4): 329–335.
- [36] Walter M H, Floss D S, Paetzold H, et al. Control of plastidial isoprenoid precursor supply: divergent 1 – deoxy – D – xylulose 5 – phosphate synthase (*DXS*) isogenes regulate the allocation to primary or secondary metabolism[M]//Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms. New York: Springer, 2013: 251–270.
- [37] Xiang S, Usunow G, Lange G, et al. 1 – deoxy – D – xylulose 5 – phosphate synthase(*DXS*), a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis[M]//Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms. New York: Springer, 2013: 17–28.
- [38] Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, et al. A 1 – deoxy – D – xylulose 5 – phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2 – C – methyl – D – erythritol 4 – phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis[J]. P Natl Acad Sci USA, 1998, 95(17): 9879–9884.
- [39] Carretero – Paulet L, Cairó A, Botella – Pavía P, et al. Enhanced flux through the methylerythritol 4 – phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5 – phosphate reductoisomerase[J]. Plant Mol Biol, 2006, 62(4/5): 683–695.
- [40] Xing S F, Miao J, Li S, et al. Disruption of the 1 – deoxy – D – xylulose – 5 – phosphate reductoisomerase (*DXR*) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis*[J]. Cell Res, 2010, 20(6): 688–700.
- [41] Rohdich F, Wungsintaweekul J, Fellermeier M, et al. Cytidine 5' – triphosphate – dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4 – diphosphocytidyl – 2 – C – methylerythritol[J]. P Natl Acad Sci USA, 1999, 96(21): 11758–11763.
- [42] Buetow L, Brown A C, Parish T, et al. The structure of Mycobacteria 2C – methyl – D – erythritol – 2, 4 – cyclodiphosphate synthase, an essential enzyme, provides a platform for drug discovery[J]. BMC Struct Biol, 2007, 7(68): 1–11.
- [43] Burlat V, Oudin A, Courtois M, et al. Co – expression of three MEP pathway genes and geraniol 10 – hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid – derived primary metabolites[J]. Plant J, 2004, 38(1): 131–141.
- [44] Ohara K, Mito K, Yazaki K. Homogeneous purification and characterization of LePGT1 – a membrane – bound aromatic substrate prenyltransferase involved in secondary metabolism of *Lithospermum erythrorhizon*[J]. FEBS J, 2013, 280(11): 2572–2580.
- [45] Sasaki K, Tsurumaru Y, Yamamoto H, et al. Molecular characterization of a membrane – bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*[J]. J Biol Chem, 2011, 286(27): 24125–24134.
- [46] Shen G, Huhman D, Lei Z, et al. Characterization of an isoflavonoid – specific prenyltransferase from *Lupinus albus* [J]. Plant Physiol, 2012, 159(1): 70–80.
- [47] Nickerson M L, Bosley A D, Weiss J S, et al. The UBIAD1 prenyltransferase links menaquinone – 4 synthesis to cholesterol metabolic enzymes[J]. Hum Mutat, 2013, 34(2): 317–329.
- [48] Akhtar T A, Matsuba Y, Schaubinhold I, et al. The tomato cis – prenyltransferase gene family[J]. Plant J, 2013, 73(4): 640–652.
- [49] Lewis M J, Prosser I M, Mohib A, et al. Cloning and characterisation of a prenyltransferase from the aphid *Myzus persicae* with potential involvement in alarm pheromone biosynthesis[J]. Insect Mol Biol, 2008, 17(4): 437–443.
- [50] Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world[J]. Nat Chem Biol, 2007, 3(7): 408–414.
- [51] Martin D M, Chiang A, Lund S T, et al. Biosynthesis of wine aroma: transcript profiles of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/nerolidol synthase parallel monoterpene glycoside accumulation in *Gewürztraminer grapes*[J]. Planta, 2012, 236(3): 919–929.
- [52] Chang T H, Hsieh F L, Ko T P, et al. Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation[J]. Plant Cell, 2010, 22(2): 454–467.
- [53] Iijima Y, Gang D R, Fridman E, et al. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil[J]. Plant Physiol, 2004, 134(1): 370–379.
- [54] Fischer M J C, Meyer S, Claudel P, et al. Determination of amino – acidic positions important for *Ocimum basilicum* geraniol synthase activity[J]. Adv Biosci Biotech, 2013, 4(2): 242–249.
- [55] Fischer M J C, Meyer S, Claudel P, et al. Specificity of *Ocimum basilicum* geraniol synthase modified by its expression in different heterologous systems[J]. J Biotechnol, 2013, 163(1): 24–29.
- [56] Huang F C, Sung P H, Do Y Y, et al. Differential expression and functional characterization of the NADPH cytochrome P450 reductase genes from *Nothapodytes foetida*[J]. Plant Sci, 2012, 190: 16–23.
- [57] Shen Q, Chen Y F, Wang T, et al. Overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase (*cyp71A1*) and cytochrome P450 reductase (*cpr*) genes increased artemisinin content in *Artemisia annua* (Asteraceae)[J]. Genet Mol Res, 2012, 11(3): 3298–3309.
- [58] Mizutani M, Ohta D. Diversification of P450 genes during land plant evolution[J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 291–315.
- [59] Mizutani M, Sato F. Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism[J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 507(1): 194–203.

刘海燕,黄 泉,高星爱,等. 农作物秸秆酶解制糖研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):10-12.

农作物秸秆酶解制糖研究进展

刘海燕,黄 泉,高星爱,赵新颖,谢 娇,张永锋

(吉林省农业科学院农村能源研究所,吉林长春 130033)

摘要:制糖是农作物秸秆生产燃料乙醇、化工醇等工业产品的关键步骤,其中采用酶解法实现农作物秸秆有效糖化是该领域的研究热点。简单介绍了酶解机理,并对直接酶解与预处理酶解的研究进展进行了综述。

关键词:农作物秸秆;酶解制糖;有效糖化

中图分类号: TQ914.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0010-03

我国是农业大国,每年可产生农作物秸秆 7 亿多 t,近年来,随着我国农村能源结构的变化与集约化生产的发展,秸秆逐步成为一种无用的负担物,秸秆就地焚烧日趋严重,产生的烟雾已成为一大社会公害^[1]。每年有大量的秸秆被就地燃烧,既污染环境,又浪费资源^[2]。秸秆的主要成分为纤维、半纤维和木质素,以其为原料,通过酸解或酶解法结合生物转化法制备 2,3-二丁醇、乙醇、甘油三酯、化工醇等工业产品原料,既可避免环境污染,又可实现生物质能源的高效利用,带来较大的经济和社会效益^[3]。然而,无论利用农作物秸秆生产何种产品,纤维原料制糖(包括葡萄糖和木糖)率都是影响整条工艺生产线的重要因素^[4]。只有当木质纤维素通过酶解作用转化为葡萄糖、木糖等单糖后,才能通过发酵过程转化为各种生物能源。因此,在木质纤维素转化能源的过程中,纤维素的酶解糖化是最关键的步骤,也是木质纤维素能源化转化过程中的限制性步骤。目前,纤维素水解糖化的主要途径有化学法水解和酶法水解。酶法水解因其工艺条件温和、设备要求简单、能耗低、副产物较少、对环境友好等优点得到广泛的应用^[5],如何采用酶解方式实现玉米秸秆有效糖化仍然

是该领域的研究热点^[6]。

1 酶解机理

玉米秸秆、麦类秸秆、水稻秸秆等均属木质纤维类生物物质,主要成分为纤维素(约占 40%)、木质素(20%~30%)和半纤维素(20%~30%),这 3 种成分的重量占植物纤维质原料总重量的 80%~95%^[7]。纤维素降解木质纤维素的酶主要有降解纤维素的纤维素酶、降解半纤维素的木聚糖酶和降解木质素的漆酶^[1]。

纤维素酶是将纤维素降解为葡萄糖过程中起作用的几个酶的总称,包括内切葡聚糖酶(1,4- β -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.4)、外切葡聚糖酶(1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91)和纤维二糖酶(1,4- β -D-glucosidase, EC 3.2.1.21)。纤维素酶水解纤维素的机制至今尚不十分清楚,普遍认为是 3 种酶组分的协同作用的结果,但各组分是如何作用的,尤其是对 C₁、C_x 的作用方式,许多专家学者持有不同的看法。一种观点是改进的 C₁-C_x 假说: C₁ 酶首先作用于纤维素的结晶区,使其膨胀变成无定型纤维素,再由 C_x 分解无定型纤维素为纤维二糖,最后由 β -葡萄糖苷酶分解为葡萄糖;另一种观点是顺序作用的 C_x-C₁ 假说:首先由 C_x 酶在纤维素的非结晶区部位切割,产生带有非还原性末端的小纤维素分子,再由 C₁ 酶以纤维二糖为单位,从末端进行切割,最后由 β -葡萄糖苷酶水解为葡萄糖^[8]。

半纤维素的主要组成成分是木聚糖,半纤维素成分的复杂结构也决定它们的降解需要多种酶的协同作用。降解酶包括内切酶 β -木聚糖酶(1,4- β -D-xylanxylanohydrolase, EC 3.2.1.8)、 β -甘露聚糖酶(1,4- β -D-mannanmanno-

收稿日期:2013-08-02

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD14B05);中国农业科技东北创新中心博士后科研工作站项目(编号:129080);吉林省人社厅博士后项目。

作者简介:刘海燕(1976—),女,吉林蛟河人,博士,副研究员,从事农作物秸秆能源化利用的研究。Tel: (0431)87063806。

通信作者:张永锋,研究员,从事循环农业方面的研究。Tel: (0431)85077001;E-mail: nkyzhf@126.com。

[60] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story[J]. Genome Biol, 2000, 1(6): 1-9.

[61] Sung P H, Huang F C, Do Y Y, et al. Functional expression of geraniol 10-hydroxylase reveals its dual function in the biosynthesis of terpenoid and phenylpropanoid[J]. J Agr Food Chem, 2011, 59(9): 4637-4643.

[62] Wang J F, Liu Y L, Cai Y F, et al. Cloning and functional analysis of geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 from *Swertia mussotii* Franch[J]. Biosci Biotech Bioch, 2010, 74(8): 1583-1590.

[63] Katano N, Yamamoto H, Iio R, et al. 7-deoxyloganin 7-hydroxylase in *Lonicera japonica* cell cultures[J]. Phytochemistry, 2001, 58

(1): 53-58.

[64] Saigo H, Hattori M, Kashima H, et al. Reaction graph kernels predict EC numbers of unknown enzymatic reactions in plant secondary metabolism[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(Suppl 1): S31-S37.

[65] Sun Y Z, Luo H M, Li Y, et al. Pyrosequencing of the *Camptotheca acuminata* transcriptome reveals putative genes involved in camptothecin biosynthesis and transport[J]. BMC Genomics, 2011, 12(Suppl 2): S533-S540.

[66] Yamamoto H, Katano N, Ooi A, et al. Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450[J]. Phytochemistry, 2000, 53(1): 7-12.