

# 人参皂苷生物合成及生产工艺研究进展

徐先智,丁晓萌,杨欣,赵天悦,郑东然,张贺,王宇\*

东北林业大学生命科学学院,哈尔滨 150040

**摘要:**人参皂苷是人参属植物中的主要药效成分,具有极好的医学应用前景。然而,天然人参皂苷量极低,无法满足当今医疗保健的需求。近年来,随着生命科学领域中各项技术的飞速发展,研究者们已解析了部分人参皂苷合成途径的关键酶基因,并通过分子生物学方法调控关键酶基因来提高人参皂苷的产量。同时,利用转基因和合成生物学手段将关键酶基因转入烟草和酵母细胞中,构建人参皂苷合成代谢通路达到大量生产人参皂苷的目的。本文综述了人参皂苷生物合成途径中关键酶基因的相关研究及人参皂苷生产工艺的研究进展。

**关键词:**人参皂苷;合成途径;转基因植物;合成生物学;生产工艺

中图分类号:

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0184-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.027

## Advanced research achievements of ginsenoside biosynthesis and production technology process

XU Xian-zhi, DING Xiao-meng, YANG Xin, ZHAO Tian-yue, ZHENG Dong-ran, ZHANG He, WANG Yu\*

<sup>1</sup>College of life science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** Ginsenosides, the main pharmacodynamic components of ginseng, had an excellent prospect of medical application. However, the amounts of natural ginsenosides are extremely low to meet the high demand of medical care. In recent years, with the rapid technological development in life science, researchers have characterized the key enzymes of the ginsenosides biosynthesis pathway, and have improved ginsenosides production through regulating these key enzymes by molecular biology approach. At the same time, they have introduced the key enzyme genes into tobacco and yeast cells to construct the heterology ginsenosides biosynthesis pathway for enhance the production of ginsenosides in the pharmaceutical industry. In this review, we summarized the recent researches about the key enzymes in the ginsenosides biosynthesis and ginsenosides production by latest technologies.

**Key words:** ginsenoside; synthetic pathway; transgenic plants; synthetic biology; production process

人参(*Panax ginseng* C. A. Mayer)是亚洲国家传统药材,已有几千年的药用历史,其发挥生理功能的主要成分是三萜皂苷,即人参皂苷<sup>[1,2]</sup>。人参皂苷广泛分布在人参属植物的大部分组织器官中,包括根、茎、叶等组织器官,其中含量最高的是根部。根据人参皂苷糖苷配基骨架结构的不同,可将人参皂苷分为达玛烷型和齐墩果烷型,其中达玛烷型是人参皂苷的主要类型,而齐墩果烷型人参皂苷种类极少<sup>[3]</sup>。目前,从人参属植物中发现并鉴定出的达玛

烷型人参皂苷已超过110种<sup>[4]</sup>。根据达玛烷型人参皂苷苷元的羟基化程度可分成三种类型:原人参二醇(protopanaxadiol, PPD)、原人参三醇(protopanaxatriol, PPT)和拟人参皂苷<sup>[5]</sup>。在对人参有效成分的研究过程中发现人参皂苷具有多种生物学功能,有抗癌、抗炎症、抗衰老、神经保护和免疫调节等作用<sup>[6,7]</sup>。本文综述了近年来人参皂苷生物合成途径中涉及的关键酶功能的相关研究进展及利用植物细胞培养、不定根、转基因植物和酵母工程菌进行人参皂苷生物合成的相关研究,为提高人参皂苷的产量,为达到工业级生产人参皂苷奠定基础。

### 1 人参皂苷的生物合成途径

人参属植物合成人参皂苷的途径有两种,其中甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径存在于细胞质中,

收稿日期:2019-05-06 接受日期:2019-08-06

基金项目:大学生创新创业训练计划(201810225507);黑龙江省应用技术与开发计划(GY2016ZB0097);中央高校基本科研业务费专项(2572018CP04)

\*通信作者 Tel:86-013351019901; E-mail:lyhshen@126.com

是人参皂苷生物合成的主要途径;甲基赤藓糖醇(methylerythritol phosphate, MEP)途径存在于叶绿体中<sup>[8]</sup>。Zhao等<sup>[9]</sup>通过对人参皂苷合成所涉及的生物途径的研究,发现MVA和MEP途径在人参代谢产物的产生上相互补偿,协同调控。

人参皂苷生物合成途径可以大致分为三个环节:葡萄糖经一系列酶促反应生成异戊烯焦磷酸

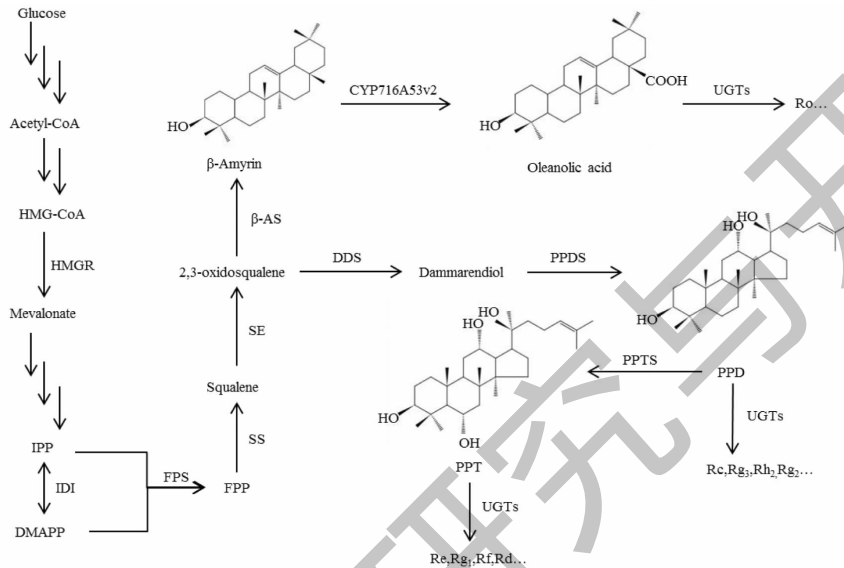


图1 人参皂苷生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of ginsenosides in *Panax ginseng*.

注:葡萄糖;乙酰辅酶A;3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A;3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶;甲羟戊酸;异戊烯焦磷酸;二甲基丙烯焦磷酸;法尼基焦磷酸酶;法尼基焦磷酸;角鲨烯合酶;角鲨烯;角鲨烯环氧酶;2,3-环氧角鲨烯; $\beta$ -香树素合酶; $\beta$ -香树素;达玛烯二醇合酶;达玛烯二醇;原人参二醇合酶;原人参三醇合酶;细胞色素P450;齐墩果酸;原人参二醇;原人参三醇;UDP-糖基转移酶;人参皂苷。Note:Glucose;Acetyl-CoA;HMG-CoA;3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA;HMGR;3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase;Mevalonate;IPP;Isopentenyl diphosphate;DMAPP;Dimethylallyl diphosphate;FPS;Farnesyl diphosphate synthase;FPP;Farnesyl diphosphate;SS;Squalene synthase;Squalene;SE;Squalene epoxidase;2,3-oxidosqualene; $\beta$ -AS; $\beta$ -Amyrin synthase; $\beta$ -Amyrin;DDS;Dammarendiol-II synthase;Dammarendiol;PPDS;Protopanaxadiol synthase;PPTS;Protopanaxatriol synthase;CYP;Cytochrome P450;Oleanolic acid;PPD;Protopanaxadiol;PPT;Protopanaxatriol;UGTs;UDP-Glycosyltransferases;Ro, Rh<sub>2</sub>, Rc, Rg<sub>3</sub>, Re, Rg<sub>1</sub>, Rf, Rd, Rg<sub>2</sub>

### 1.1 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(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)是MVA途径中的第一个限速酶,催化3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-COA)还原成甲羟戊酸,该酶促反应在萜类化合物合成中有重要作用<sup>[11]</sup>。HMGRs通过调节前体IPP和DMAPP的合成直接调控人参皂苷的生成量。研究初期,在人参中发现HMGRs基因有两个拷贝:*PgHMGR1*和*PgHMGR2*,后随测序技术的发展,经基因组测序发现人参中有八个HMGRs基因,其中四个基因与*PgHMGR1*序列相似度很高(平均相似度达

(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基丙烯焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP);IPP和DMAPP被转化为2,3-环氧角鲨烯(2,3-oxidosqualene);合成的2,3-环氧角鲨烯经环化、羟基化和糖基化修饰生成不同种类的人参皂苷<sup>[10]</sup>。整个生物合成过程包括一系列的关键酶参与的多个酶促反应,下文总结了人参皂苷生物合成途径中关键酶的相关研究。

94.25%),另外四个基因与*PgHMGR2*相似度很高(平均相似度为93.26%)<sup>[12]</sup>。Kim等<sup>[13]</sup>通过对人参HMGR启动子的活性分析发现*PgHMGR1*和*PgHMGR2*在人参属植物根系中都是有活性的,持续在黑暗条件下培养会提高*PgHMGR1*的表达量和总皂苷的合成量。此外,采用特异性抑制剂洛伐他汀(mevinolin)会竞争性抑制HMGR的酶活性,显著降低根系中人参皂苷的总含量。相比之下,过表达*PgHMGR1*会在人参中引起三萜类化合物的大量合成。多个HMGRs基因的存在是人参属植物的共同特性,增加了HMGR表达调控的复杂性<sup>[14]</sup>。综上所述, HMGRs在人参皂苷生物合成中发挥重要作用。

## 1.2 角鲨烯合酶

角鲨烯合酶(squalene synthase, SS)可催化两分子的法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)合成角鲨烯(squalene)。人参中有三个 SS 基因,均具有催化合成角鲨烯的功能<sup>[15]</sup>。其中 *PgSS1* 的过度表达会导致人参甾醇和三萜化合物合成途径中下游基因上调表达,导致甾醇和人参皂苷含量显著升高<sup>[15]</sup>。Kim 等<sup>[16]</sup>发现 *PgSS1* 的表达无组织特异性,但 *PgSS2* 和 *PgSS3* 的 mRNAs 仅能在根等特定组织检测到。Jiang 等<sup>[17]</sup>构建了人参 SS 基因的 RNA 干扰载体,通过农杆菌转化法将载体导入人参愈伤组织中。与未转化的愈伤组织相比,已转化的愈伤组织 SS 表达量降低了 21.2%,导致人参皂苷前体物质角鲨烯的合成量减少。以上研究结果说明,角鲨烯合酶是影响人参皂苷合成的关键酶,可以人为调控 SS 基因的表达直接控制人参皂苷的合成。

## 1.3 角鲨烯环氧酶

角鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)是 MVA 途径中的另一个限速酶,催化角鲨烯环化生成 2,3-环氧角鲨烯,是植物甾醇和三萜类化合物生物合成途径中的第一步氧化反应<sup>[18]</sup>。人参中有两个 SE 基因,*PgSE1* 的转录本在人参各器官中均大量表达,而 *PgSE2* 仅在叶柄和花芽中较弱表达<sup>[19]</sup>。Han 等<sup>[20]</sup>从人参 cDNA 文库中克隆得到 *PgSE1* 和 *PgSE2*,利用 RNAi 干涉人参中 *PgSE1* 的转录,人参皂苷的积累受抑制,在沉默 *PgSE1* 的同时导致 *PgSE2* 和环烯醇合成酶基因表达显著上调,导致甾醇合成量增加。上述研究表明,人参 *PgSE1* 和 *PgSE2* 基因的功能存在差异,其中 *PgSE1* 负责调节人参皂苷的合成,而 *PgSE2* 负责调节植物甾醇的合成<sup>[20]</sup>。Jiang 等<sup>[21]</sup>研究了人参总皂苷及其单体的积累与 SS 和 SE 在不同器官表达的关系,发现 14 个器官中 SS 和 SE 的表达水平存在显著差异,且与总皂苷和单体(Re、Rg<sub>1</sub>、Rd、Rb<sub>1</sub>)的积累呈正相关。2,3-环氧角鲨烯的合成对人参皂苷的合成至关重要,下一步的酶促反应导致人参皂苷的类型开始出现分化,2,3-环氧角鲨烯是人参皂苷合成的转折点。

## 1.4 达玛烯二醇合酶和 $\beta$ -香树素合酶

氧化角鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclases, OSCs)是人参皂苷生物合成途径中的关键酶,催化 2,3-氧化角鲨烯环化,合成达玛烯二醇或  $\beta$ -香树素<sup>[22]</sup>。OSCs 属于多基因家族,从人参属植物中分离出的参与人参皂苷合成的 OSCs 基因有:达玛烯

二醇合酶(dammarenediol-II synthase, DDS)基因和  $\beta$ -香树素合酶( $\beta$ -amyrin synthase,  $\beta$ -AS)基因<sup>[23]</sup>。这两个基因的作用底物均为 2,3-氧化角鲨烯,其中经 DDS 催化产生达玛烯二醇,是达玛烷型人参皂苷合成的前体,而经  $\beta$ -AS 催化产生的  $\beta$ -香树素,再经糖基转移酶修饰合成齐墩果烷型人参皂苷<sup>[23]</sup>。Niu 等<sup>[24]</sup>从三七中克隆出的 *PnDDS* 与人参中的 *DDS* 基因具有 99% 的相似性,说明人参属植物中 *DDS* 基因是高度保守的。Yin 等<sup>[25]</sup>通过分析人参皂苷含量与关键酶活性和转录水平的相关性,发现 *DDS* 酶活性与总皂苷含量在不同年龄阶段存在显著的相关性(*DDS* 酶活性高,总皂苷增量显著;*DDS* 酶活性降低,总皂苷增量减缓),为深入研究人参皂苷生物合成提供了重要信息。Lee 等<sup>[26]</sup>将 *PgDDS* 基因导入烟草叶片中,合成的达玛烯二醇提高了烟草对烟草花叶病毒的抗性。OSCs 的作用决定了人参皂苷的类型,奠定了人参皂苷多样性的基础。

## 1.5 细胞色素 P450

细胞色素 P450s (cytochrome P450s, CYP450s)属于氧化酶超家族,在植物次生代谢产物的生物合成中发挥着重要作用。特定的 CYP450s 参与人参皂苷生物合成中特定人参皂苷苷元的羟基化反应。CYP450s 属于多基因家族,在已报道的人参属植物 CYP450s 基因中,有三个基因与人参皂苷生物合成紧密相关。体外酶活检测结果显示:CYP716A47 催化达玛烯二醇氧化生成 PPD,再经糖基化合成的人参皂苷均被称为原人参二醇型人参皂苷<sup>[27]</sup>。另外两个基因属于 CYP716A 亚家族:CYP716A53v2 催化 PPD 氧化生成 PPT,合成的人参皂苷属于原人参三醇型<sup>[3]</sup>,与原人参二醇型均属于达玛烷型;而 CYP716A52v2 催化  $\beta$ -香树素生成的齐墩果酸,属于齐墩果烷型人参皂苷<sup>[28]</sup>。CYP450s 在 OSCs 的基础上进一步增加了人参皂苷类型的多样化。

## 1.6 尿苷二磷酸(UDP)-糖基转移酶

尿苷二磷酸(UDP)-糖基转移酶(UDP-glycosyltransferases, UGTs)催化人参皂苷苷元的糖基化修饰是人参皂苷生物合成途径中的重要步骤,添加糖基的位置、数量与种类的不同导致了人参皂苷的生物活性和药用性质的变化<sup>[29]</sup>。UGTs 是人参皂苷生物合成途径中的关键酶类,具有高度特异性。根据氨基酸序列同源性可以将糖基转移酶分为 100 多个家族,糖基转移酶第 1 家族(GT1)是植物中成员数目最多的一类,它利用 UDP-糖作为活化的供体分子来

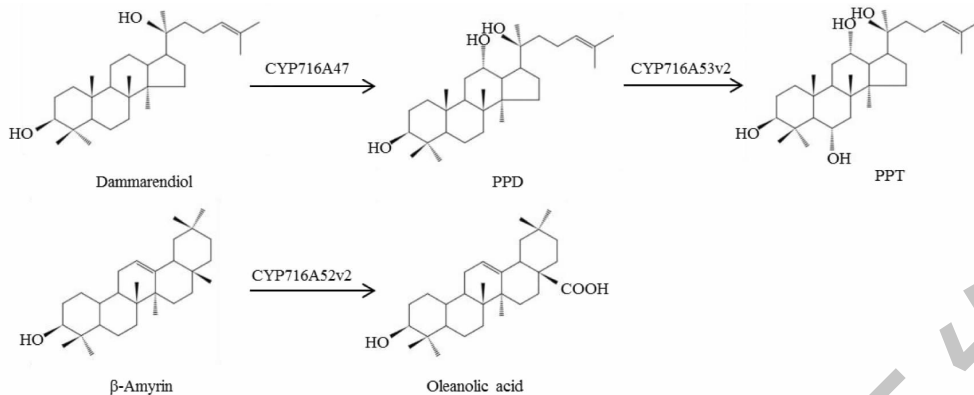


图2 细胞色素 P450 催化人参皂苷羟基化反应示意图

Fig. 2 Cytochrome P450 catalytic hydroxylation ginsenosides.

注: Dammarendiol: 达玛烯二醇; CYP: Cytochrome P450 细胞色素 P450;  $\beta$ -Amyrin:  $\beta$ -香素树; Oleanolic acid: 齐墩果酸; PPD: Protopanaxadiol 原人参二醇; PPT: Protopanaxatriol 原人参三醇

催化目标代谢物骨架的糖基化<sup>[30-32]</sup>。到目前为止, 在人参中已经鉴定出 9 种参与达玛烷型人参皂苷生物合成的 UGTs<sup>[33]</sup>。不同的 UGTs 转移的糖基种类或糖基位置不同, 导致了不同种人参皂苷结构和功能的多样性。UGTs 主要是添加糖基到 PPD 型人参皂苷的 C3-OH 和/或 C20-OH 上、PPT 型人参皂苷的 C6-OH 和/或 C20-OH 上, 添加的糖类包括葡萄糖 (Glc)、阿拉伯糖 (Ara)、鼠李糖 (Rha) 和木糖 (Xyl) 等<sup>[34]</sup>。Jung 等<sup>[35]</sup> 对人参转录组进行测序和重新组装, 鉴定出两种 UGTs 基因: *PgUGT74AE2* 和 *PgUGT94Q2*, 其中编码产生的 *PgUGT74AE2* 催化葡萄糖转移到 PPD 和 CK 的 C3-OH 上, 分别合成人参

皂苷 Rh<sub>2</sub> 和 F2; *PgUGT94Q2* 催化葡萄糖转移到 Rh<sub>2</sub> 和 F2 上, 分别得到人参皂苷 Rg3 和 Rd。Lu 等<sup>[36]</sup> 发现一种糖基转移酶: UGT<sub>Pg71A29</sub>, 其可以糖基化修饰人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 的 C20-OH 和转移葡萄糖残基到 Rd 上, 分别产生人参皂苷 Rg1 和 Rb1。Yan 等<sup>[37]</sup> 鉴定出了一些合成新化合物 Compound K 的糖基化中间体, 包括达玛烯二醇、PPD、Rh<sub>2</sub> 和 Rh<sub>3</sub>, 经 UGT-Pg1 催化产生 CK。随着现代分子生物学技术的不断革新, 对人参皂苷生物合成途径的深入研究, 未来将会有更多的 UGTs 基因被挖掘、鉴定出来, 人参皂苷生物合成的多样化调控机制也将会更加清晰。

表 1 常见人参皂苷的分类与糖基类型

Table 1 Classification and glycosylation of common ginsenosides

人参皂苷类型 Type of ginsenosides	结构通式 General structure	种类 Category	糖基类型 Type of sugar base			
			R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
达玛烷型 Dammarene		R <sub>b1</sub>	Glc - Glc	Glc - Glc	-	-
		R <sub>b2</sub>	Glc - Glc	Glc - Ara (p)	-	-
		R <sub>b3</sub>	Glc - Glc	Glc - Xly	-	-
		Rh <sub>2</sub>	Glc	H	-	-
		Rg <sub>3</sub>	Glc - Glc	H	-	-
		Rd	Glc - Glc	Glc	-	-
		F2	Glc	Glc	-	-
PPT 型 PPT type		CK	H	Glc	-	-
		Re	Glc - Glc	Glc - Ara (f)	-	-
		Rg <sub>2</sub>	-	Glc - Rha	H	-
		Rh <sub>1</sub>	-	Glc	H	-

续表 1 (Continued Tab. 1)

人参皂苷类型 Type of ginsenosides	结构通式 General structure	种类 Category	糖基类型 Type of sugar base			
			R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
齐墩果烷型 Oleanane		F1	-	H	Glc	-
		Rf	-	Glc - Glc	Glc	-
		Re	-	Glc - Rha	Glc	-
		Rg1	-	Glc	Glc	-
		RO	Glc - Glc	-	-	Glc
		ROA	Glc - Glc	-	-	Glc - Glc

注:Glc:葡萄糖;Ara(p)、Ara(f):阿拉伯糖;Rha:鼠李糖;Xyl:木糖。  
Note:Glc:glucose;Ara(p),Ara(f):arabinose;Rha:rhamnose;Xyl:xylose.

## 2 人参皂苷的生产工艺开发

人参属于多年生草本植物,田间栽培需 4~6 年,且易受温度、光照、水分、土壤等环境因素的影响,同时大规模种植会占用大面积的林地,对土壤营养的损耗也是十分巨大的。为了避免这些不利因素,研究者们将生物技术方法广泛应用到人参皂苷生产中,以期获得大量的人参皂苷<sup>[38]</sup>。

### 2.1 组织培养

人参的组织培养技术主要有参悬浮细胞培养、人参不定根培养和生物反应器培养方法<sup>[39-41]</sup>。

利用人参悬浮细胞培养生产人参皂苷的过程中,通常以人参根、幼叶等作为外植体,经过愈伤组织诱导培养基诱导产生愈伤组织,再经过继代培养后选取生长旺盛及形态合适的细胞团置于液体培养基中振荡培养,获得人参悬浮培养细胞系。Le 等<sup>[42]</sup>通过添加了 1.0 mg/L 2,4-D 和 40 g/L 蔗糖的 MS 培养基培养野生人参细胞悬液,发现短期培养人参悬浮细胞在第二周时达到最大生物量 222.19 g/L,而长期培养时生物量在第一周缓慢增加,在第三周达到最大(133.35 g/L)并在接下来的四周中保持稳定。此外,研究表明所用培养基中的成分对人参皂苷合成有较大影响,如磷酸盐、氮元素对植物细胞中人参皂苷产量有显著影响<sup>[41]</sup>。培养基中添加的硝态氮与氨氮的比例越高,三种主要人参属植物的悬浮培养细胞中皂苷总产量越高,说明培养基中氮元素的含量影响人参皂苷的合成。Kochan 等<sup>[43]</sup>在添加 0.83 mmol/L 磷酸盐、12.4 mmol/L 硝酸盐和 0.5 mmol/L 铵的改良 B5 培养基中培养人参悬浮细胞,28 天后检测的 6 种人参皂苷(Rb1、Rb2、Rc、Rd、

Re 和 Rg1)的总含量最高(12.45 mg/g 干重),是标准 B5 培养基的 1.93 倍,表明改良后的培养基对人参皂苷的合成有益。在人参和三七的悬浮细胞培养中添加浓度 200 μmol/L 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)会增加人参皂苷,特别是 PPD 的合成量<sup>[44]</sup>。这些工作为今后优化人参细胞的悬浮培养技术提供了新的思路。

另外,在人参不定根中生物量和人参皂苷合成量相对其他组织较高,且在大规模培养过程中易于控制,因此不定根的培养被认为是利用组织培养方法提高人参皂苷产量的另一种有效方法<sup>[40]</sup>。人参不定根可以直接由人参愈伤组织诱导产生,一般在 MS 培养基中添加外源激素即可诱导产生不定根。不定根培养可以通过补加某些物质来提高人参皂苷在培养物中的积累,如 MeJA 和水杨酸(salicylic acid, SA)能促进人参皂苷在培养物中的积累,这可能是因为 MeJA 和 SA 能诱导悬浮培养的愈伤组织产生应激反应,促进了人参皂苷的积累<sup>[45]</sup>。此外,植物激素——吲哚丁酸与 MeJA 共同作用可协同诱导人参不定根生长,诱导不定根培养中人参皂苷积累量比单独用 MeJA 处理增加近 7 倍,具有抑制不定根生长、促进产物积累的作用<sup>[46]</sup>。

近年来,建立了人参属植物毛状根的生物反应器培养方法。发根农杆菌(*A. rhizogenes*) (根瘤菌科,农杆菌属)侵染人参的过程中,可在侵染部位或附近产生毛状根。通过根瘤菌侵染人参根建立人参毛状根培养体系,使人参毛状根生长快、稳定性好、适应性强,可用于生物反应器规模化生产,提高人参皂苷的产量。被发根农杆菌侵染后的人参毛状根比

未侵染的生长快,且毛状根的生物量和人参皂苷含量更高,如 Rg1 人参皂苷<sup>[47]</sup>。被侵染的人参毛状根可以用于人参皂苷的大规模生产<sup>[48]</sup>。

## 2.2 化学诱导

人参属植物细胞中人参皂苷的积累易受生物和非生物诱导因子刺激的影响。为了促进人参皂苷的生物合成,前人研究了多种诱导因子对人参皂苷合成的影响,包括生物和非生物的诱导因子,如生物诱导因子有 MeJA、乙烯利、半乳糖醛酸、葡糖胺聚糖、多不饱和脂肪酸、SA、茉莉酸(jasmonic acid, JA)等;非生物诱导因子有硫酸铜、硫酸镍、钒、氯化钠、一氧化氮、超声、渗透压等。这些诱导因子通过活化苯丙氨酸解氨酶(是一种与植物抗逆性密切相关的酶)来刺激人参皂苷的生物合成<sup>[49]</sup>。众多诱导因子中,MeJA 已被证明是诱导人参各组织、细胞培养体系的人参皂苷合成的最高效诱导因子。Wang 等<sup>[50]</sup>分析了 MeJA 对人参不定根培养的影响,发现与对照组相比 SE 和 DDS 基因表达上调,总皂苷产量增加,添加 10 mg/L MeJA 持续 24 h 内总皂苷含量最高,是对照组的 4.76 倍。Kochan 等<sup>[51]</sup>发现在人参毛状根培养中添加 MeJA,可刺激人参皂苷生物合成途径中 SS 基因的表达,并且经研究发现 SS 基因启动子中存在 MeJA 的作用元件。研究发现,JA 是在植物抗性中起关键作用的信号分子<sup>[52]</sup>。MeJA 的作用可能是通过诱导产生内源 JA 而发挥的<sup>[44]</sup>。此外,JA 本身也能诱导人参皂苷的产量增加,如三七中的人参皂苷 Rb1 和 Rg3,说明 JA 作为一种化学信号在人参皂苷生物合成中发挥重要作用<sup>[44]</sup>。该化学信号通过膜表面的环氧化酶传递到细胞核内,激活转录因子(包括 WRKY 和 MYB),调控人参皂苷生物合成相关基因的表达<sup>[33,54]</sup>。不同诱导因子对不同的人参皂苷的诱导作用不同,这可能与人参皂苷的生物活性有关。对人参皂苷生物合成途径中各种关键酶基因的深入研究,将有利于阐明各种诱导因素对人参皂苷作用的机理。

## 2.3 转基因植物

尽管在组织与细胞培养方面对人参皂苷的生物合成做了大量的研究,但生产效率仍相对较低。植物的代谢工程是生产植物次生代谢物的另一种有效技术,因此,近年来研究者们探索通过植物的代谢工程,来实现转基因植物大量合成人参皂苷的目的,如利用异源表达体系,通过转基因烟草合成目标人参皂苷。

达玛烯二醇是一种具有药理活性的四环三萜类

化合物,是人参皂苷合成过程中的一种重要的中间产物,由 DDS 催化 2,3-氧化角鲨烯环化产生<sup>[55]</sup>。DDS 的编码基因是 *PgDDS*, Han 等<sup>[56]</sup>建立了转基因烟草细胞悬浮培养体系生产达玛烯二醇,通过农杆菌转化的方法,将从人参中分离的 *PgDDS* 导入烟草基因组,在 35S 启动子的驱动下高量表达,细胞悬液中达玛烯二醇的产量在培养 3 周后达到 573  $\mu\text{g/g}$  (干重),相当于每升生产 5.2 mg 达玛烯二醇。Chun 等<sup>[57]</sup>通过烟草转基因技术共表达 *PgDDS* 和 *CYP716A47* 基因后获得细胞系,进行悬浮培养建立了 PPD 生产体系,并用 2,4-D 诱导处理显著提高了达玛烯二醇(783.8  $\mu\text{g/g}$  干重)和 PPD(用 250 mL 摇瓶培养和 5 L 气升式生物反应器培养的 PPD 产量分别达到 166.9  $\mu\text{g/g}$  和 980.9  $\mu\text{g/g}$  干重)的产量。研究发现,口服人参或人参皂苷后在哺乳动物器官中检验到的主要功能成分是 Compound K,但在人参属植物中从未证实 CK 的存在<sup>[58]</sup>,主要原因是下游的糖基转移酶将 CK 进一步糖基化修饰生成 Rd。目前,主要是通过 PPD 型人参皂苷(如 Rb1, Rb2, Rd 和 Rc)去糖基化生产 CK<sup>[59]</sup>。然而,去糖基过程特异性较差,获得 CK 纯度较低。此外,三萜类化合物骨架复杂,运用化学全合成的方法大规模生产 CK 是不切实际的<sup>[8]</sup>。Gwak 等<sup>[60]</sup>从人参中分离出 3 个基因(*PgDDS*、*CYP716A47* 和 *UGT71A28*)共表达在转基因烟草中生产 CK,不同转基因株系叶片中 CK 的浓度在 1.55 ~ 2.64  $\mu\text{g/g}$  干重之间。但是,烟草中 CK 的产生将导致植物生长发育迟缓,结实率下降,发现 CK、PPD 和达玛烯二醇在转基因烟草中具有较强的细胞毒性作用。此外,通过快速隔离和分泌所产生的化学物质可提高转基因烟草植物对有毒化学物质的耐受性<sup>[60]</sup>。综上所述,通过转基因植物大量生产人参皂苷的方法仍需要不断地探索与提升。

## 2.4 合成生物学方法

应用合成生物学的理论知识和技术设计于人参皂苷的生物合成中,将人参皂苷生物合成途径中的关键酶基因转入到微生物底盘细胞中,构建人参皂苷生物合成的代谢通路,平衡与优化外源基因的表达与底盘细胞内部环境相适应,以实现人参皂苷持续高效地生产。

### 2.4.1 工程酵母菌——人参皂苷生产的微生物工厂

目前,利用工程酵母菌生产人参皂苷已被视为一种高效的生产方法,例如 Rg3、Rh2、Compound K、PPD、PPT 和齐墩果酸等。近年来,许多合成生物学

工具已被开发出来,用于将酵母细胞改造成生产高价值代谢产物的细胞工厂,包括生物合成途径的快速组装<sup>[61]</sup>,调节外源基因的表达<sup>[62]</sup>,并将酶定位到特殊的亚细胞区域或支架<sup>[63,64]</sup>。此外,真核细胞可为外源酶基因的功能表达提供翻译后修饰。因此,研究者们常把酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为底盘细胞生产人参皂苷,已取得显著成果。主要策略是通过对酵母菌中的一些影响人参皂苷合成的关键基因的改造来提高人参皂苷的产量。Dai等<sup>[65,66]</sup>将催化合成人参皂苷苷元前体的酶基因进行改造,促进苷元的合成,使重组后的酵母细胞可分别产生17.2 mg/L PPD,15.9 mg/L PPT和21.4 mg/L 齐墩果酸。Wang等<sup>[67]</sup>克隆并鉴定了两种UGTs:UGTPg45和UGTPg29,在两种UGTs和生产PPD的酵母底盘基础上,建立了酵母细胞工厂,通过葡萄糖生产Rh2和Rg3。Wang等<sup>[68]</sup>构建了一个新的生产PPD的底盘菌株,主要方法是过度表达MVA途径

中的13个酶基因和优化酵母细胞色素P450酶的表达水平,从而提高了PPD的产量。在摇瓶培养中可产生529.0 mg/L PPD,在10 L补料分批发酵中可产生11.02 g/L PPD。此外,通过对UGTPg45基因改造建立的酵母细胞工厂,得到迄今为止报道的最大的人参皂苷Rh2产量,179.3 mg/L的摇瓶培养和2.25 g/L的10 L补料分批发酵。Yan等<sup>[45]</sup>利用UGTPg1的表达及对其他关键酶基因的改造,如PgHMGRs,得到CK产量达1.4 mg/L的酵母细胞。Li等<sup>[69]</sup>研究发现利用耶式解脂酵母(*Y. lipolytica*)生产CK,可将产量提高到30.4 g/L,在5 L的发酵罐中进行补料分批发酵,CK的产量可进一步增加到161.8 ± 9.8 g/L。这是首次报道利用耶式解脂酵母生产CK在微生物细胞中的最高产量。这些工作体现出利用微生物细胞工厂大规模生产高质量、高生物学活性化合物的潜能,为未来开发更高效生产人参皂苷的微生物细胞奠定了基础。

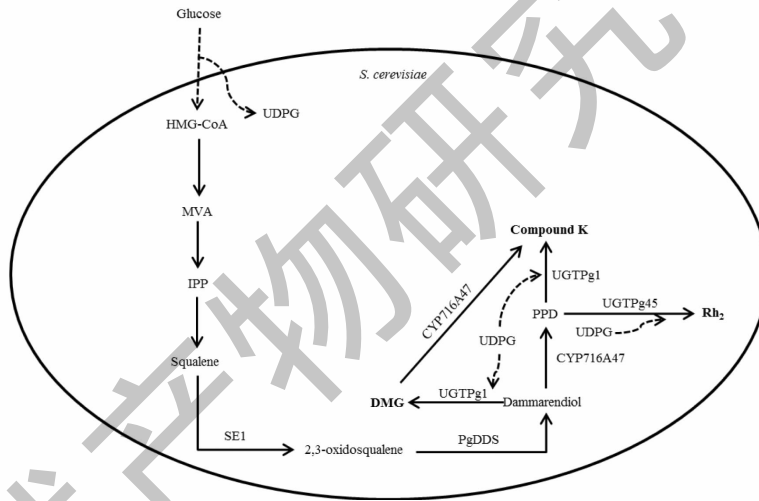


图3 酿酒酵母(*S. cerevisiae*)生产人参皂苷 Compound K

Fig. 6 *S. cerevisiae* production of ginsenoside Compound K.

注:UDPG:UDP-Glucose 尿嘧啶核苷二磷酸葡萄糖;CYP: Cytochrome P450 细胞色素 P450;PgDDS: *Panax Ginseng* dammarendiol-II synthase 人参达玛烯二醇合酶。

表2 人参皂苷生物生产工艺比较

Table 2 Comparison of biological production technology of ginsenoside

生产工艺 Production process	方法 Method	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
组织培养 Tissue culture	悬浮细胞	人为控制培养条件;方便操作	不适用与大规模培养;产量较低
	不定根培养	不定根生物量和皂苷产量高,大规模培养稳定性较高	产量低;耗时长;生产效率相对较低;人工操作量大,成本高
化学诱导 Chemical elicitors	生物诱导 非生物诱导	操作简便;适合联用;	成本高;影响植物细胞生长发育;机制未阐明;对人和环境有危害

续表 2(Continued Tab. 2)

生产工艺 Production process	方法 Method	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
转基因植物 Transgenic plants	基因工程	非人参属植物获得永久遗传性状;生产效率相对较高;	外源基因产物对植物有毒性,影响植物生长发育;作用机制未阐明
合成生物学 Synthetic biology	构建工程酵母细胞	标准化生产体系;以大规模生产;皂苷产量高;微生物繁殖代谢快	需深刻了解宿主细胞;不断平衡与优化;前期过程复杂

### 3 总结与展望

由于人参皂苷在医学上的重要作用,因此对其化学结构、药用活性、生物合成酶和生产工艺等方面的研究备受关注。到目前为止,已知的人参皂苷有 150 多种,具有多种多样的生理功能,且仍有潜在的功能待研究发现。人参在田间耗时和费力的种植,推动了细胞和组织培养、化学诱导、转基因植物等生物生产技术的发展,特别是转基因植物,如 *DDS*、*CYPs*、*UGTs* 等基因的共表达显著提高了人参皂苷的产量。但是,对转基因植物中外源基因表达造成不利影响的作用机制仍有待深入研究。近年来,构建有人参皂苷生物合成代谢通路的酵母细胞,为人参皂苷广泛应用于医学提供了廉价高效的工业化生产平台。但是,对驱动人参皂苷合成的机制和导致人参皂苷种类多样化的潜在问题,及人参皂苷在特定组织合成后向目标组织的转运机制仍有待阐明。未来,对人参皂苷生物合成途径中功能酶基因的进一步挖掘,将使其合成路径更加清晰,更利于人工改造和生产;对人参皂苷结构与功能的深入认识,将允许对皂苷结构进行修改,以获得更有益的功能。此外,对人参皂苷生物合成机制的不断深入研究,必将为人参皂苷低成本、高质量、高效率、大规模生产开辟新的途径。

#### 参考文献

- Kim YJ, et al. Ginsenoside profiles and related gene expression during foliation in *Panax ginseng* Meyer [J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(1):66-72.
- Choi KT. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C A Meyer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29:1109-1118.
- Han JY, et al. The cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52:2062-2073.
- Yang WZ, et al. Saponins in the genus *Panax* L. (Araliaceae): a systematic review of their chemical diversity [J]. *Phytochemistry*, 2014, 106:7-24.
- Ahn SI, et al. Analysis of ginsenosides and non-saponin components of red ginseng from landraces and new varieties [J]. *Korean J Hortic Sci*, 2016, 34:790-798.
- Mancuso C, et al. *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*: From pharmacology to toxicology [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 107:362-372.
- Park SY, et al. Systems-level mechanisms of action of *Panax ginseng*: a network pharmacological approach [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42:98-106.
- Kim YJ, et al. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33:717-735.
- Zhao S, et al. Both the mevalonate and the non-mevalonate pathways are involved in ginsenoside biosynthesis [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33:393-400.
- Wang J, et al. Advances in study of ginsenoside biosynthesis pathway in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Acta Physiol Plant*, 2012, 34:397-403.
- Yang J, et al. Progress on the studies of the key enzymes of ginsenoside biosynthesis [J]. *Molecules*, 2018, 23:5893.
- Xu J, et al. *Panax ginseng* genome examination for ginsenoside biosynthesis [J]. *Gigascience*, 2017.
- Kim Y, et al. Functional analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase encoding genes in triterpene saponin-producing ginseng [J]. *Plant physiol*, 2014, 165:373-387.
- Kochan E, et al. Abscisic acid regulates the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene promoter and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy root cultures [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:13106.
- Jiang D, et al. Molecular cloning and functional analysis of squalene synthase (SS) in *Panax notoginseng* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95:658-666.
- Kim T, et al. Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52:125-137.
- Jiang S, et al. Interference vector construction of *Panax ginseng*'s SQS gene and transformation callus [J]. *J Jilin Univ: Sci (吉林大学学报:理学版)*, 2011, 49:1136-1140.
- Vincken JP, et al. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68:275-297.



- 19 Lucas WJ, et al. The plant vascular system; evolution, development and functions [J]. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55: 294-388.
- 20 Han JY, et al. Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 36-46.
- 21 Jiang S, et al. Correlation between ginsenoside accumulation and SQS and SQE gene expression in different organs of *Panax quinquefolius* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2011, 42: 579-584.
- 22 Li D, et al. Heterologous biosynthesis of triterpenoid dammarenediol-II in engineered *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38: 603-609.
- 23 Suzuki M, et al. Lanosterol synthase in dicotyledonous plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 565-571.
- 24 Niu Y, et al. Expression profiling of the triterpene saponin biosynthesis genes FPS, SS, SE, and DS in the medicinal plant *Panax notoginseng* [J]. *Gene*, 2014, 533: 295-303.
- 25 Yin J, et al. Study on the correlation between gene expression and enzyme activity of seven key enzymes and ginsenoside content in ginseng in over time in Ji'an, China [J]. *Int J Mol Sci*, 2017.
- 26 Lee MH, et al. Dammarenediol-II production confers TMV tolerance in transgenic tobacco expressing *Panax ginseng* dammarenediol-II synthase [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 173-182.
- 27 Han JY, et al. Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 1535-1545.
- 28 Han JY, et al. The involvement of beta-amyrin 28-oxidase (CYP716A52v2) in oleanane-type ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54: 2034-2046.
- 29 Bowles D, et al. Glycosyltransferases; managers of small molecules [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 254-263.
- 30 Seki H, et al. P450s and UGTs; key players in the structural diversity of triterpenoid saponins [J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 1463-1471.
- 31 Anders N, et al. Glycosyl transferases in family 61 mediate arabinofuranosyl transfer onto xylan in grasses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 989-993.
- 32 Parvathy ST, et al. Functional analysis of a cryptic promoter from *Arabidopsis thaliana* reveals bidirectionality [J]. *Plant Biote Rep*, 2016, 10: 241-255.
- 33 Lu C, et al. Functional analysis of the promoter of a UDP-glycosyltransferase gene from *Panax quinquefolius* [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2018, 135: 381-393.
- 34 Yang JL, et al. Progress on the studies of the key enzymes of ginsenoside biosynthesis [J]. *Molecules*, 2018.
- 35 Jung SC, et al. Two ginseng UDP-glycosyltransferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 2177-2188.
- 36 Lu J, et al. Characterization of UDP-glycosyltransferase involved in biosynthesis of ginsenosides Rg(1) and Rb-1 and identification of critical conserved amino acid residues for its function [J]. *J Agr Food Chem*, 2018, 66: 9446-9455.
- 37 Yan X, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast [J]. *Cell Res*, 2014, 24: 770-773.
- 38 Murthy HN, et al. Ginsenosides: prospective for sustainable biotechnological production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 6243-6254.
- 39 Lee J, et al. Cell culture system versus adventitious root culture system in Asian and American ginseng: a collation [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2018, 132: 295-302.
- 40 Murthy HN, et al. Quality, safety and efficacy profiling of ginseng adventitious roots produced *in vitro* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 7309-7317.
- 41 Ali M, et al. Sucrose-enhanced biosynthesis of medicinally important antioxidant secondary metabolites in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2016, 39: 1945-1954.
- 42 Le K, et al. Ginsenoside accumulation profiles in long- and short-term cell suspension and adventitious root cultures in *Panax ginseng* [J]. *Hortic Environ Biotechnol*, 2019, 60: 125-134.
- 43 Kochan E, et al. Nitrogen and phosphorus as the factors affecting ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor [J]. *Acta Physiol Plant*, 2016, 38: 1496.
- 44 Hu FX, et al. Role of jasmonic acid in alteration of ginsenoside heterogeneity in elicited cell cultures of *Panax notoginseng* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 104: 513-516.
- 45 Eibl R, et al. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries; current state and future trends [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 8661-8675.
- 46 Kim YS, et al. Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 1789-1792.
- 47 Sivakumar G, et al. Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures [J]. *Eng Life Sci*, 2005, 5: 333-342.
- 48 Saeed S, et al. Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth., a high

- valued endangered medicinal plant [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2017, 23: 229-237.
- 49 Qian ZG, et al. Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signals for plant secondary metabolism [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 86: 809-816.
- 50 Wang J, et al. Effect of methyl jasmonate on the ginsenoside content of *Panax ginseng* adventitious root cultures and on the genes involved in triterpene biosynthesis [J]. *Res Chem Intermediat*, 2013, 39: 1973-1980.
- 51 Kochan E, et al. Methyl jasmonate as a control factor of the synthase squalene gene promoter and ginsenoside production in American ginseng hairy root cultured in shake flasks and a nutrient sprinkle bioreactor [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, 115: 182-193.
- 52 Gutjahr C, et al. Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22: 763-772.
- 53 Subramaniyam S, et al. Transcript expression profiling for adventitious roots of *Panax ginseng* Meyer [J]. *Gene*, 2014, 546 (1): 89-96.
- 54 Geyter ND, et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 349-359.
- 55 Han JY, et al. Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarediol synthase gene in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 1653-1662.
- 56 Han J, et al. Production of dammarediol-II triterpene in a cell suspension culture of transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33: 225-233.
- 57 Chun JH, et al. Production of the dammarene sapogenin (protopanaxadiol) in transgenic tobacco plants and cultured cells by heterologous expression of PgDDS and CYP716A47 [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34: 1551-1560.
- 58 Hasegawa H. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials; metabolic activation of ginsenoside; deglycosylation by intestinal bacteria and esterification with fatty acid [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 95: 153-157.
- 59 Lee J, et al. Compound K, a ginsenoside metabolite, plays an antiinflammatory role in macrophages by targeting the AKT1-mediated signaling pathway [J]. *J Gins Res*, 2019, 43: 154-160.
- 60 Gwak YS, et al. Heterologous production of a ginsenoside saponin (compound K) and its precursors in transgenic tobacco impairs the vegetative and reproductive growth [J]. *Planta*, 2017, 245: 1105-1119.
- 61 Shao Z, et al. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37 (2): e16.
- 62 Dai Z, et al. Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 2845-2853.
- 63 Farhi M, et al. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids [J]. *Metab Eng*, 2011, 13: 474-481.
- 64 Avalos JL, et al. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 335-341.
- 65 Dai Z, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides [J]. *Metab Eng*, 2013, 20: 146-156.
- 66 Dai Z, et al. Producing aglycons of ginsenosides in baker's yeast [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 3698.
- 67 Wang P, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts [J]. *Metab Eng*, 2015, 29: 97-105.
- 68 Wang P, et al. Synthesizing ginsenoside Rh2 in *Saccharomyces cerevisiae* cell factory at high-efficiency [J]. *Cell Discov*, 2019, 5: 5.
- 69 Li D, et al. Production of triterpene ginsenoside compound K in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 2581-2588.
- (上接第 199 页)
- 52 Cui C, et al. Discussion on the mechanism of acupuncture treatment of cardiovascular diseases based on intestinal flora [J]. *Guang J Chin Med (光明中医)*, 2018, 33: 939-941.
- 53 Yang W, et al. Attenuation of streptozotocin-induced diabetic retinopathy with low molecular weight fucoidan via inhibition of vascular endothelial growth factor [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 115: 96-105.
- 54 Yanagibayashi S, et al. Novel hydrocolloid-sheet as wound dressing to stimulate healing-impaired wound healing in diabetic db/db mice [J]. *Bio-med Mater Eng*, 2012, 22: 301-310.
- 55 Ho TT, et al. Tuning polyelectrolyte multilayer structure by exploiting natural variation in fucoidan chemistry [J]. *Soft Matter*, 2015, 11: 2110-2124.
- 56 Presti I, D'orazio G, et al. Evaluation of the probiotic properties of new lactobacillus and bifidobacterium strains and their *in vitro* effect [J]. *App Microbiol Biotec*, 2015, 99: 5613-5626.