

植物异戊二烯生物反应器研究进展

肖丹^{1,2}, 杨洪岩^{1,2}, 由香玲¹, 吴昊^{1,2*}

1. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 东北林业大学大庆生物技术研究院, 黑龙江 大庆 163316

摘要: 异戊二烯类化合物是一种在自然界广泛存在的植物次生代谢产物。异戊二烯类化合物在植物中扮演着重要角色, 既参与植物的生长发育过程, 也参与调节植物与环境之间的关系。同时, 异戊二烯类化合物在农业、医药、化工等多个领域中也具有重要价值。许多高价值的异戊二烯类化合物在自然界中的产量很低, 限制了对应的研究利用。目前, 利用植物生物反应器来调控异戊二烯类化合物的合成是生命科学研究热点之一。在不断深入研究异戊二烯类化合物合成代谢途径的同时, 开发利用了植物生物反应器生产异戊二烯类产物的技术, 这些生产技术的开发又反过来推动对异戊二烯类化合物合成代谢途径的深入了解。综述了植物异戊二烯类化合物的合成、调控及异戊二烯生物反应器的研究进展, 以期为促进其生物合成提供参考。

关键词: 异戊二烯类化合物; 植物生物反应器; 异戊烯焦磷酸; 异戊二烯生物反应器; 萜类生物反应器

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)24-3641-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.025

Research progress on bioreactors for plant isoprene

XIAO Dan^{1,2}, YANG Hong-yan^{1,2}, YOU Xiang-ling¹, WU Hao^{1,2}

1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2. Daqing Bio-Tech Institute, Northeast Forestry University, Daqing 163316, China

Abstract: Isoprenoid compounds, a kind of plant secondary metabolites, are widely distributed in nature. They play important roles not only in plant growth and development process, but also in the regulation of relationship between plants and environment. Besides its biological function, the isoprenoid compounds have great economic values in many fields, such as agriculture, medicine, chemical industry, and so on. However, the yield of many isoprenoid compounds with high economic value in nature is very low, which limits the research and use of isoprenoid compounds. Now, using plant bioreactor to regulate the synthesis of isoprenoid compounds is a focus of life sciences, and there are many deep researches on synthesis and metabolic pathways of isoprenoid compounds, which could promote the isoprenoid compounds production technologies with plant bioreactor. At the same time, the development of these technologies bring more deep understanding of the isoprenoid compounds synthesis metabolic pathways. We reviewed the development of metabolic synthesis and regulation of isoprenoid compounds and research progress on bioreactor, which will provide a quick reference for isoprenoid compounds synthesis research.

Key words: isoprenoid compounds; plant bioreactor; isopentenyl pyrophosphate; isoprene bioreactor; terpenes bioreactor

异戊二烯类化合物是植物代谢产物中结构和功能最多样化的化合物之一。据估计, 自然界已知的异戊二烯类化合物有 50 多万种, 其中紫杉醇、橡胶、青蒿素和皂苷等最为人熟知^[1]。在植物体中, 异戊二烯类化合物发挥着重要的作用, 作为初级代谢产

物可以维持细胞膜的流动性、电子运输、呼吸作用、光合作用、调节生长和发育; 而作为次级代谢产物则可作为信号参与抵御环境、微生物和害虫的胁迫^[2]。在人类生活中, 异戊二烯类化合物也扮演着重要角色, 如人们日常生活中的汽车用轮胎、香水及精油,

收稿日期: 2014-06-30

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (DL13BAX02); 大庆市创新能力建设项目 (SCX-2012-04); 大庆高新区科技专项资金项目 (DQGX2012KJ006)

作者简介: 肖丹 (1991—), 女, 硕士在读, 研究方向为人参生物反应器。Tel: 15104531139 E-mail: 915493846@qq.com

*通信作者 吴昊, 男, 博士, 主要从事植物生物反应器研究。Tel: (0459)6040420 E-mail: 15845811168@163.com

用于治疗肿瘤的紫杉醇及皂苷等均为异戊二烯类化合物。虽然异戊二烯类化合物具有重要的应用价值,但是在植物中异戊二烯类化合物的量往往很低,例如具有抗疟疾作用的青蒿素在青蒿中的量仅为青蒿叶片干质量的 0.02%~1.09%^[3],而抗癌特效药紫杉醇在红豆杉树皮中的量只有 0.015%^[4]。对于产量少而价值巨大的异戊二烯类化合物而言,利用植物生物反应器方法提高异戊二烯类化合物的产量成为一种可供选择的方向。

植物生物反应器是指利用植物细胞、组织、器官或整株为载体,来生产具有重要功能与价值的蛋白质、抗体或次生代谢产物^[5]。近年来,植物生物反应器的研究和应用随着植物分子生物学的飞速发展取得了长足的进步。国内外研究者利用分子水平上的代谢调控和代谢工程等技术手段来遗传改造植物的异戊二烯类化合物次生代谢,以提高异戊二烯类化合物的代谢量。

本文以目前国内外研究的热点——单萜、双萜、三萜及倍半萜类等异戊二烯类化合物为例,简述异戊二烯类化合物的合成调控及异戊二烯生物反应器的研究现状及发展对策,为提高异戊二烯类化合物产量提供参考。

1 异戊二烯类化合物的合成及调控作用

随着市场对异戊二烯类化合物的需求不断增加,促使人们不断深入研究异戊二烯类化合物合成的代谢途径。合成代谢途径的不断明确推动了越来越多的异戊二烯类化合物被了解、研究和利用,但在植物中天然异戊二烯类化合物的量稀少阻碍了其工业化生产的进程。如何提高异戊二烯类化合物的合成成为迫切需要解决的问题之一。而在研究如何提高其合成代谢之前,首先要了解异戊二烯类化合物的合成途径。

1.1 异戊烯焦磷酸 (IPP) 的合成

研究发现,IPP 是所有异戊二烯类化合物合成的共同前体,在植物中其合成途径有 2 个,分别是甲羟戊酸途径 (MVA) 和 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径 (MEP)。MVA 途径主要发生在细胞质和内质网中,其中的酶分布于不同的亚细胞间隔中,参与甾醇、倍半萜、辅酶 Q 及三萜等次生代谢产物的生物合成;而 MEP 途径主要发生在质体中,该途径的酶由核基因组编码,主要参与二萜、单萜、类胡萝卜素等的生物合成^[6]。在 MVA 途径中,乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 在一系列酶的催化作用下形成

IPP,而来自于质体的 IPP 合成途径 MEP 是由 3 磷酸甘油醛 (GA-3P) 和丙酮酸 (pyruvate) 在各种酶的作用下合成的 (图 1)。

MVA 和 MEP 这 2 条异戊二烯代谢途径也不是绝对地隔绝开来。近年来,有研究表明部分代谢中间产物能够通过质体膜进行交换^[6]。Laule 等^[7]研究指出在拟南芥幼苗中使用洛伐他汀抑制 MVA 途径后观察到甾醇的合成,这可能是由 MEP 途径合成的。而 2009 年,Gerber 等^[8]研究发现 MEP 途径的中间体可形成甾醇,也可直接进入细胞质中的异戊二烯蛋白。但这些研究只是初步证实 2 条代谢途径存在交换现象,二者是如何交换的,且其他的中间产物是否也存在交换现象,这些问题都有待于深入研究。

1.2 线性异戊二烯类化合物的合成

由 IPP (C₅) 缩合而成的线性聚合物用简单的链长度来定义,如 C₁₀、C₁₅、C₂₀ 等。首先进行 C₁₀ 的合成,IPP 和二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 通过牻牛儿基焦磷酸酶 (geranyl diphosphate synthase, GPPS) 作用缩合形成牻牛儿基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP),GPP 是合成大多数单萜化合物的前体物质。Michael 等^[9]在研究转基因 GPPS-SSU 番茄时发现在细胞质中增加 GPP 的代谢通量可以提高单萜的合成量,说明 GPP 为单萜化合物的合成前体。

其次,C₁₅ 的法呢基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 是 GPP 在法呢基焦磷酸酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPPS) 作用下与 IPP 缩合形成,FPP 是倍半萜化合物的前体物质。Mohammad 等^[10]研究酿酒酵母的工程代谢过程中发现在甲羟戊酸途径过程中 FPP 是倍半萜的直接前体,提高 FPP 的合成量可以增加倍半萜的产量。

两分子的 FPP 在鲨烯合成酶 (squalene synthase) 的作用下形成 C₃₀ 的鲨烯 (squalene)。鲨烯不仅是固醇和油菜素内酯的前体,也是三萜皂苷的合成前体^[11]。Kim 等^[12]在其研究中指出鲨烯对柴胡甾醇及三萜中间体有直接的调节作用,且在茉莉酸甲酯的诱导作用下鲨烯合酶可以过度表达,柴胡生产量也有所增加。Cécile 等^[13]指出在植物王国中从鲨烯到芸苔素是类固醇代谢和信号通路途径,鲨烯的合成与类固醇的代谢息息相关。

FPP 也可以在牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS) 的

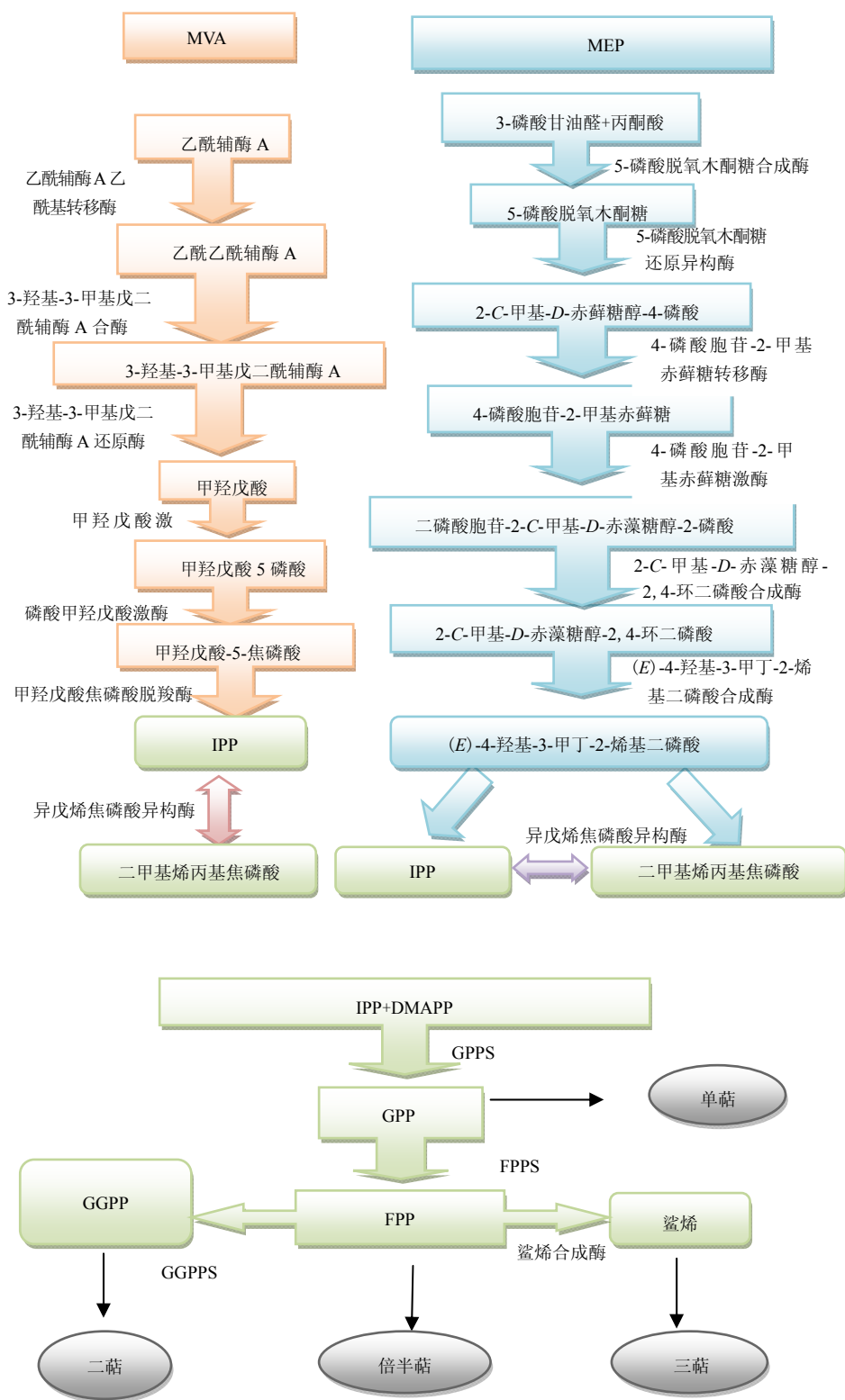


图 1 异戊二烯代谢流程图 (实线箭头表示中间有一系列酶促反应)

Fig. 1 Isoprene metabolic flow chart (solid arrows refer to a series of enzymatic reactions)

作用下与 IPP 缩合形成 C₂₀ 的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (GGPP), GGPP 是二萜类化合物的合成前体。在云杉中萜烯树脂的合成受到 GGPPS

的影响^[14], GGPP 在鼠尾草二萜合酶 *SscTPS1* 催化环化以及氧化的条件下形成双环二萜醇类香苏醇^[15]。

1.3 异戊二烯类化合物的修饰

随着异戊二烯途径的发展,不同长度的线性异戊二烯类化合物可以聚合环化形成基本骨架,然后再通过氧化还原、异构化、替代和共轭反应得到各种异戊二烯类化合物高端产品,如香叶醇、金合欢醇、丹参酮、紫杉醇、人参皂苷等。香叶醇是 GPP 在香叶醇合酶的催化下形成^[16],紫杉醇则是 GGPP 经过紫杉二烯合成酶(TS)催化环化生成紫杉二烯,然后在紫杉烯 5 α 羟基化酶(T5 α H)、紫杉烯醇 5 α 乙酰氧化基转移酶(TDAT)、紫杉烷 10 β 羟基化酶(T10 β H)、紫杉烷 13 α 羟基化酶(T13 α H)和 5 个酰基转移酶等的催化氧化、羟基化、乙酰化的反应下最终合成紫杉醇^[17]。

另外,通过其他途径缩合异戊烯链合成化合物可以形成混合异戊二烯类化合物。这些分支合成混合异戊二烯类化合物的通路是异戊二烯类化合物合成途径必不可少的,如甾醇、油菜素内酯、细胞分裂素类、醌类、叶绿素、维生素 E、类胡萝卜素、脱落酸和赤霉素(GA)。油菜素内酯的合成首先甾烯还原成芸苔甾醇后,在甾醇体和侧链上发生一系列羟化和氧化步骤的同时伴随着 C-6 位置的酮基化,最后转化为油菜素内酯^[18]。类胡萝卜素是 GGPP 在八氢番茄红素合成酶(PSY)、八氢番茄红素脱氢酶(PDS)、番茄红素 B-环化酶(LYCB)等催化环化下形成的^[19]。GA 首先是由 FPP 在 GGPPS 的作用下与 IPP 缩合形成 C₂₀ 的 GGPP,之后在古巴焦磷酸合成酶(CPS)的作用下形成古巴焦磷酸(CPP),接着由内根-贝壳杉烯合成酶(KS)将其环化为 GA 的前体物内根-贝壳杉烯酸,然后转化为 GA12-醛,最后 GA12-醛被氧化、羟基化等催化为其他各种 C₂₀-GA 及 C₁₉-GA^[20]。

正是由于异戊二烯类化合物的各种修饰而形成多种多样的高级混合异戊二烯类化合物,这些化合物不仅对人类生活起着重要作用,也对植物的生理发育具有调节作用。

1.4 异戊二烯类化合物的调控作用

异戊二烯类化合物在植物生理发育及协调植物与环境关系等方面具有一定的调节作用,如异戊二烯类初级代谢产物有 GA、脱落酸、细胞分裂素等,还有异戊二烯类次级代谢产物类胡萝卜素衍生物独角金内酯及独角金内酯类化合物,这些都可以参与调节植物的生长发育^[21]。此外,有研究发现其他异戊二烯类化合物也能以新的方式来调节植

物生长发育。Verbitskiy 等^[22]发现一种异戊二烯相关蛋白参与 RNA 编辑线粒体呼吸链相关基因;Xiao 等^[23]则发现 MEP 途径中间代谢物 methylerythritol cyclodiphosphate (MEcPP),可以引发特定的胁迫应答核编码质体蛋白的表达。而 Moller 等^[24]则发现异戊二烯类化合物可以调节蛋白质与蛋白质之间的相互作用,从而影响其生物作用。除了异戊烯甲基化对植物生理的作用以外,异戊二烯类化合物甾醇可以与许多蛋白质相互作用,调节激酶活动^[25]。异戊二烯类化合物对植物的生物钟也有深远的影响^[26-27]。植物为了抵御外界环境、微生物及昆虫的侵害,也会分泌一些异戊二烯类化合物,如典型的萜类化合物^[11]。综上所述,异戊二烯类化合物在调节植物生长、发育及环境适应过程中均起着重要作用^[28]。

2 异戊二烯生物反应器

异戊二烯类化合物可分为初级代谢物及次级代谢物。异戊二烯次级代谢物包括单萜、倍半萜、二萜、三萜等。这些次级代谢物对人类生活具有重要作用,如单萜类香叶醇、芳樟醇广泛用于香料工业,倍半萜青蒿素是重要的抗疟疾药物之一,二萜紫杉醇具有显著的抗肿瘤活性,还有三萜皂苷是名贵中药人参的主要药效成分。随着研究和利用的深入,市场对这些化合物的需求日益增加,但是在植物中它们的量很少,达不到产业化生产的需求。为了提高异戊二烯次级代谢物的合成,植物生物反应器是一种可行性手段。通过植物生物反应器技术来对异戊二烯化合物合成途径进行生物改造,增加达到异戊二烯类化合物代谢量的研究报道有很多,这些研究为异戊二烯类次生代谢化合物代谢量的提高提供了理论依据。

2.1 单萜类生物反应器

2.1.1 香叶醇 香叶醇(geraniol)又名牻牛儿醇,是一种单萜醇,主要存在于天竺葵、芸香草、香茅、玫瑰等植物中。其广泛应用于香料工业、制药、食品配料等领域,同时也是汽油的理想替代品。

合成香叶醇的前体物质是 GPP, GPP 在香叶醇合酶(geraniol synthase, GES)的作用下合成香叶醇。对于如何增加香叶醇的产量有很多方案,利用植物次生代谢生物反应器是其中一种,且有很多关于这方面的报道。如 Masakapalli 等^[16]研究发现在转基因烟草毛状根中过表达来自缬草的香叶醇合酶(pGES)及来自拟南芥的香叶基焦磷酸合酶

(pGPPS), 增加了香叶醇的合成代谢。Anneli 等^[29]在 20 L 生物反应器中培养被转入缙草香叶醇合酶基因 (VoGES) 的转基因烟草毛状根, 最高能获得 31.3 $\mu\text{g/g}$ 干质量的香叶醇。所以, 从植物生物反应器方面着手, 调节香叶醇合成途径, 可以达到提高香叶醇产量的目的。

2.1.2 芳樟醇 芳樟醇 (linalool) 是一种重要的非环单萜, 广泛应用于如食品、医药、香化、日化等领域, 具有重要经济价值。很多植物都能合成芳樟醇, 如在金鱼草的花瓣中能得到芳樟醇^[30]。在天然芳香植物中芳樟醇的量很低且难以提取, 化学合成价格昂贵, 还有微生物产量低等限制条件, 阻碍了其工业化生产的进程。通过采用改变植物芳樟醇合成途径关键酶基因的表达等植物生物反应器技术来提高芳樟醇的合成是一种可行的方法。

在植物中芳樟醇是 GPP 在芳樟醇合酶 (linalool synthase, LIS) 的催化作用下形成的。在富有芳樟醇的仙女扇植物中, 其柱头、花柱和花瓣中均能发现高转录的 LIS^[31], 酿酒酵母过度表达 LIS 基因, 可以提高芳樟醇的量^[32], 这些都可说明 LIS 在芳樟醇合成过程中扮演的重要角色。而通过调节 LIS 在植物中的表达来提高芳樟醇的产量, 是目前生产芳樟醇的方式之一。Isabel 等^[33]将仙女扇中的 LIS 基因转入宽叶薰衣草并过表达, 可以提高芳樟醇的产量, 特别是在嫩叶中芳樟醇的量能提高 10 倍。Murioz 等^[34]将芳樟醇合成途径中第一个酶基因 DXS 和最后一个酶基因 LIS 转入穗薰衣草中, 提高了叶 (359%) 和花 (74%) 的精油产量。由此可看出对芳樟醇合成途径关键酶基因进行调控, 可以提高芳樟醇的代谢量。

2.2 倍半萜类生物反应器

2.2.1 青蒿素 青蒿素 (artemisinin) 是一种非常优良且应用广泛的抗疟药, 具有活性高、毒副作用小等特点。由于其良好的药效, 使其市场需求量很大, 而目前青蒿素主要从植物中提取出来, 量稀少, 所以其出售价格昂贵, 难以广泛应用。建立一种方便、快捷、廉价的生产青蒿素的方法将是未来解决青蒿素来源问题的必经之路。

随着调控青蒿素合成途径中主要酶的克隆与鉴定, 青蒿素合成途径已基本清晰。青蒿素的合成首先是 FPP 在紫穗槐-4, 11-二烯合酶 (amorpha-4, 11-diene synthase, ADS) 的作用下环化形成青蒿素的中间体紫穗槐-4, 11-二烯, 然后在紫穗槐-4, 11-

二烯氧化酶 (amorpha-4, 11-diene oxidase, AMO) 的作用下被氧化形成青蒿醇、青蒿醛, 之后由青蒿醛还原酶 (artemisinic aldehyde Δ^{11} (13) reductase, DBR2) 催化形成二氢青蒿醛, 再由乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase1, ALDH1) 催化生成青蒿素的直接前体物质二氢青蒿酸 (dihydroartemisinic acid), 最后二氢青蒿酸通过一系列酶反应或非酶反应形成青蒿素^[35]。

随着对青蒿素生物合成途径的不断研究与认识, 通过改造和调控青蒿素生物合成代谢途径提高青蒿素的产量成了科学家们研究的热点。虽然青蒿素合成途径已基本清晰, 但关于紫穗槐-4, 11-二烯之后的具体合成通路还不清楚, 所以现在对于青蒿素的合成都是化学半合成。ADS 是青蒿素生物合成途径下游的第一个特异性酶, 所以许多科研人员通过研究 ADS 基因的调控来控制青蒿素的产量。2005 年, Bertea 等^[36]以青蒿叶片微粒体酶催化紫穗槐-4, 11-二烯, 在对产物进行检测时发现青蒿醇的存在, 然后将产物青蒿醇与紫穗槐-4, 11-二烯进行结构对比, 发现它们结构相似, 推测青蒿中存在 1 个能将紫穗槐-4, 11-二烯催化生成青蒿醇的 P450 羟化酶。2006 年, Ro 等^[37]从青蒿腺毛中克隆得到了紫穗槐-4, 11-二烯合酶基因 *CYP71AV1*, 该基因属于细胞色素 P450 酶基因的一种, 并对其进行了功能鉴定, 结果发现 ADS 能连续催化紫穗槐-4, 11-二烯形成青蒿醇、青蒿醛和青蒿酸, 之后从不同的青蒿株系上克隆到了 *CYP71AV1* 基因。Teoh 等^[38]也对细胞色素 P450 *CYP71AV1* 进行研究, 发现其对二氢青蒿醛没有活力, 然后通过从青蒿中收集 cDNA 表达序列标签 (EST), 对比找出具有替代催化氧化酶的同源物 ALDH1, ALDH1 能催化二氢青蒿醛, 而对其他醛类成分的影响有限。也有人通过研究青蒿素合成途径上游基因来达到提高青蒿素产量的目的。Han 等^[39]最早将青蒿素代谢途径上的关键酶 FPS (farnesyl diphosphate synthase) 基因导入到青蒿植株, 且过量表达 FPS 基因, 结果显示转基因青蒿比非转基因青蒿中青蒿素的量提高了 34.4%, 转基因青蒿中青蒿素量最高约为 0.9% (干质量)。而 Ro 等^[37]过量表达了 MVA 途径的限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR) 和 FPPS 基因, 结果显著提高了青蒿酸的产量。还可对合成途径中所有关键酶进行调控来增加青蒿素代谢, 如

Westfall 等^[40]通过采用强启动子对青蒿素代谢途径的所有途径酶基因进行过表达, 结果发现过表达产生的青蒿酸与对照组相比产量提高了 2 倍, 紫穗槐-4, 11-二烯的产量也提高了 5 倍。

通过调节青蒿素合成途径关键酶基因的表达, 利用植物生物反应器来制备青蒿素及其中间体, 使其产量不受环境和土壤的制约, 且能在短时间内获得大量青蒿素, 能有效降低青蒿素的价格, 有利于对青蒿素的利用。

2.2.2 金合欢醇 金合欢醇也称为法尼醇 (farnesol), 是链状倍半萜化合物, 既是重要的高级香料之一, 也是重要的生物活性物质和医药活性物质中间体。金合欢醇在自然界资源分布广泛, 报道金合欢醇主要存在于植物的花、叶、种子的精油中, 如香茅精油、橙花精油、玫瑰精油等^[41]。金合欢醇的提取主要来源于植物, 但是其在植物中的量很少且产量纯度较低, 无法进行工业化生产。化学合成所需条件苛刻, 效率低而耗费大, 不能进行产业化合成。为了获得更多的金合欢醇, 急需探索其他的合成方法。

金合欢醇的合成在异戊二烯合成途径过程中是从 FPP 开始的。FPP 经过复杂的脱磷酸及倍半萜烯合酶的作用合成金合欢醇^[42]。研究发现一个倍半萜烯合酶 TPS1 可以把玉蜀黍的 FPP 催化形成金合欢醇^[43]。在正常酵母培养基中添加鲨烯合成酶抑制剂可以增加金合欢醇的产量^[44], 这说明 FPP 对金合欢醇的合成具有重要作用, 而将角鲨烯合酶基因 (ERG9) 的启动子转变为甲羟戊酸转移酶 (MET 3) 则使金合欢醇的产量达到了 20 mg/L。上述实验表明通过对植物金合欢醇合成途径的调控可以达到提高金合欢醇产量的目的, 所以研究异戊二烯生物反应器, 对产金合欢醇植物进行转基因及调控合成途径, 对金合欢醇的生产具有深远的意义。

2.3 二萜类生物反应器

2.3.1 丹参酮 丹参酮 (tanshinone) 是从我国常用的传统中药丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 中分离提取得到的具有抑菌作用的脂溶性菲醌化合物。丹参酮可分为丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 II_B、隐丹参酮、异隐丹参酮等 10 余个丹参酮单体, 其中隐丹参酮、二氢丹参酮 II、羟基丹参酮、丹参酸甲酯、丹参酮 II_B 不仅具有抗菌作用, 还有抗炎、降温作用^[45]。现代药理学研究表明丹参酮对心脑血管疾病、癌症、延缓衰老等方面起到良好的疗效^[46]。目

前对于丹参酮生产的研究主要集中在利用丹参发根生产丹参酮的研究上。首次关于丹参毛状根获得的报道是 1993 年 Zhi 等^[47]利用不同发根农杆菌侵染丹参无菌苗获得了丹参毛状根, 并通过 HPLC 检测丹参毛状根及培养基, 发现 7 种丹参酮类化合物和无色的铁锈醇的存在。2001 年, Chen 等^[48]研究发现酵母提取物对丹参毛状根具有促进生长作用, 并且能提高丹参酮类化合物和丹酚酸类化合物的合成, 并且建立了 LC-MS 法同时检测丹参毛状根中丹参酮类和丹酚酸类化合物。2007 年, 王学勇^[49]则研究发现诱导子茉莉酸甲酯 (MeJA) 能显著促进丹参毛状根中丹参酮类成分的积累。2011 年, 沈双^[50]研究表明减少 MS 培养基中的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 可以促进丹参毛状根的生长和丹参酮 II_A 的生成, 而过多的 NH_4NO_3 则不利于丹参毛状根的生长, 也不利于丹参酮类成分的积累和释放。目前, 丹参毛状根培养虽然被认为是获得丹参有用次生代谢产物的重要途径, 但还是存在目标次生代谢产物产量低等问题, 即使为了提高丹参中有用次生代谢产物而添加各种诱导子, 但增加有限, 不能满足产业化生产。

与其他异戊二烯类化合物一样, 二萜类化合物丹参酮的合成途径上游是 MVA 和 MEP, 而下游途径是从二萜化合物合成前体 GGPP 开始的。而关于从 GGPP 开始的丹参酮下游合成途径的相关研究还很少, 其中的步骤还不是很清楚。二萜合酶是合成二萜类化合物的关键酶, 是以 GGPP 为起始底物, 经过一系列的离子异构化、环化、氧化等形成各种二萜类化合物。目前已经发现的二萜类化合物有柯巴基焦磷酸合酶 (copalyl diphosphate synthase, CPS) 和类贝壳杉烯合酶 (kaunene synthase like, KSL)^[51], 以及细胞色素 P450 酶等。研究表明 CPS 催化 GGPP 生成丹参酮前体物质柯巴基焦磷酸 (copalyl diphosphate, CPP), 之后 KSL 催化 CPP 合成次丹参酮二烯 (miltiradiene), 然后细胞色素 P450 酶 CYP76AH1 基因催化丹参酮二烯生成铁锈醇^[52], 最后再由其他的 P450 酶参与剩下的二萜化合物催化合成步骤。随着科技的日益进步和分子生物学的快速发展, 丹参酮合成途径过程中大量未知基因的克隆与鉴定, 使丹参酮合成代谢途径得到了不断的认识。深入研究丹参酮生物合成的代谢途径及关键酶基因, 利用植物基因工程技术改造丹参酮合成代谢途径, 将关键酶基因导入到丹参毛状根中过表达, 同时结合诱导子对转基因毛状根的诱导, 来达到提

高丹参酮产量的目的是目前最常用的方法。这为提高丹参中有效次生代谢产物的量提供了基础理论依据,并推动了丹参生物反应器的研究。

2.3.2 紫杉醇 紫杉醇 (taxol) 是一种复杂的三环二萜类化合物,具有抗癌活性,是目前临床上被广泛使用的最有效的抗癌药物之一。目前在临床上紫杉醇主要用于治疗乳腺癌、子宫癌、肺癌等恶性肿瘤。随着医学科技的不断发展,对于紫杉醇的研究不断深入,临床用途不断拓宽,导致市场上对紫杉醇的需求不断增长。但是紫杉醇的药源植物红豆杉生长周期长,且其主要存在于树皮中,量甚微。面对市场上对紫杉醇不断增长的需求,市场缺口巨大,供不应求,所以紫杉醇资源短缺是目前急需解决的问题。通过植物次生代谢生物反应器技术来制备紫杉醇将是未来紫杉醇生产的主要方式之一。

紫杉醇最早是在1971年由美国的Wall等分离自短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 树皮中。随着对紫杉醇研究的不断深入,紫杉醇生物合成途径过程中以GGPP为前体的合成步骤大约有20步酶促反应^[53],其中半数关键酶基因已经被克隆和表达鉴定,其反应过程已基本明确。GGPP在紫杉二烯合成酶(TS)催化环化下生成紫杉二烯是紫杉醇合成途径的第一步反应,之后再在一系列酶如紫杉烯5 α 羟基化酶(T5 α H)、紫杉烯醇5 α -乙酰氧化基转移酶(TDAT)、紫杉烷10 β -羟基化酶(T10 β H)、紫杉烷13 α -羟基化酶(T13 α H)和5个酰基转移酶等的催化氧化、羟基化、乙酰化的反应下最终合成目标次生代谢产物紫杉醇。

目前紫杉醇的生产主要通过红豆杉细胞悬浮培养提取^[54]、化学半合成^[55]及产紫杉醇内生菌发酵^[56]等,但产量依然很低,达不到产业化生产的目的。而紫杉醇的合成过程,尤其是其中的一些慢反应步骤机制的阐明,为利用植物代谢工程技术改变紫杉醇生物合成基因,调控紫杉醇的代谢途径关键酶的转移与表达从而提高红豆杉细胞中紫杉醇的量可能是今后有效的方法之一。关于这方面也有许多研究报告,如胡凯等^[17]研究向短叶红豆杉内生真菌XT5转化紫杉二烯合成酶基因,结果发现转基因内生真菌XT5-TS-2的紫杉醇量得到了大幅提高,其最高产量为423.983 4 $\mu\text{g/L}$,比原始菌株XT5提高了53.19%,这说明了紫杉二烯合成酶基因的转化能够有效提高紫杉醇产量。苗莉云^[57]在中国红豆杉细胞中过表达C-13苯丙素侧链CoA-乙酰转移酶(C-13

phenylpropanoid side chain-CoA acetyltransferase, BAPT)基因,检测结果表明过表达Bapt基因提高了紫杉醇产量,转基因细胞的紫杉醇产量是未转化细胞的1.87倍,达到37.4 $\mu\text{g/g}$ 。

所以利用现代生物学技术改造紫杉醇合成代谢途径,探索紫杉醇代谢途径关键酶调控机制,开发利用红豆杉植物生物反应器来解决紫杉醇产量是目前最有效的方法之一。

2.4 三萜类生物反应器

人参皂苷是传统名贵中药人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的主要药效成分,现代药理学研究认为人参不仅对中枢神经、心血管、免疫、内分泌系统等方面具有药理作用,还表现出抗肿瘤、抗应激、抗氧化和强劲的抗真菌活性。由于其独特的药理学活性,国内市场上对人参的需求量日益增加,人参产量供不应求。由于人参产量低,资源十分稀缺,而且人参皂苷在人参中的量非常少,仅为4.0%~5.0%^[58]。因此人参皂苷的利用受到限制,这导致了人参皂苷价格昂贵,长期供不应求。

目前人参皂苷生物合成途径中的多种酶基因已被克隆鉴定出来,其生物合成途径已基本明确。首先由植物三萜的共同前体鲨烯(squalene)在鲨烯合成酶的催化下生成2,3-氧化鲨烯,然后在达玛烷合成酶的作用下形成达玛烯二醇-II,之后在CYP716A47、CYP716A53V2等一系列酶的氧化、环化、羟基化反应最终合成各种人参皂苷^[11]。

目前人参皂苷的化学半合成、人参细胞悬浮培养、人参培养根生物反应器培养及产人参皂苷内生菌发酵等方法均可以生产人参皂苷。虽然人参培养根生物反应器培养被认为是最有前途的人参皂苷生产体系,但是,该体系人参培养根培养时间短,次生代谢产物积累量不足,所以获得的人参皂苷量往往较低,仍不足以进行工业化生产应用。随着对人参皂苷的重要药理活性认识的不断深入,其需求也不断增加,促进了人参皂苷合成途径研究的发展。为了提高人参皂苷的合成量,对合成途径的改造调控成为了关注的焦点。

Han等^[59]2011年首次对参与人参三萜皂苷合成的细胞色素P450酶进行了功能验证,研究发现将CYP716A47基因转入酿酒酵母,表达的重组蛋白能催化外源提供的达玛烯二醇-II的C-12位羟基化,而使其转化为原人参二醇,之后再进一步进行验证实验,将DS与CYP716A47同时转入酿酒酵母,原人

参二醇在重组菌株中被检测到,而且 *CYP716A47* 基因不仅可响应茉莉酸甲酯诱导表达量上调,而且转入过量表达 *SS* 基因的转基因人参植株后能使人参根中皂苷的产量提高。然后对原人参二醇合成原人参三醇进行了实验研究,结果表明 *CYP716A53V2* 是一个原人参二醇 6-羟化酶,能催化修饰原人参二醇合成原人参三醇。将 *CYP716A53V2* 导入重组酵母中,其异位表达的蛋白能催化加入到培养基中,原人参二醇生成原人参三醇。通过体外酶活性测定和液相色谱-大气压化学电离质谱(LC/APCI-MS)的结构确认 *CYP716A53V2* 基因催化原人参二醇生成原人参三醇,这是在达玛烷型三萜苷元在人参皂苷生物合成形成的重要一步^[11]。原人参二醇合成酶(*CYP716A47*)和人参三醇合酶(*CYP716A53V2*)通过遗传转化可以直接应用在微生物和植物中提高人参皂苷的产量,也可以用于生产人参皂苷代谢工程的研究。

通过改造调控人参皂苷的合成途径,利用转基因技术及植物生物反应器来生产人参皂苷,是解决皂苷药源问题的有效手段之一。

3 结语

通过利用植物生物反应器来调节异戊二烯类化合物的合成,达到提高异戊二烯类化合物代谢合成量的目的,不仅对异戊二烯类化合物产量提高有重要影响,而且对其他药用植物次生代谢物的工业化生产具有推动作用。对异戊二烯单萜类化合物合成途径下游关键酶基因进行过表达,增加了单萜类化合物的合成。改造异戊二烯倍半萜类化合物合成途径,调节关键酶基因的表达,可以达到提高异戊二烯倍半萜类化合物产量的目的。异戊二烯二萜类化合物则是在调节下游代谢途径酶基因及诱导子的作用下能增加其代谢量。还有异戊二烯三萜类化合物的合成受到合成途径影响因子的改造的影响。总之,对异戊二烯类化合物合成途径进行调节改造,利用植物生物反应器可以达到增加异戊二烯类化合物的产量的目的。

参考文献

[1] Zhao L, Chang W C, Xiao Y, *et al.* Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *Annual Rev Biochem*, 2013, 82: 497-530.
[2] Chandran S S, Kealey J T, Reeves C D. Microbial production of isoprenoids [J]. *Process Biochem*, 2011, 46(9): 1703-1710.

[3] 张小波, 郭兰萍, 黄璐琦. 我国黄花蒿中青蒿素含量的气候适宜性等级划分 [J]. *药学学报*, 2011, 46(4): 472-478.
[4] 周佳, 程新, 李昆太. 现代发酵技术在紫杉醇生产中的应用前景 [J]. *生物技术通报*, 2012(8): 59-63.
[5] 庞俊峰, 黄东光, 吴燕民. 植物生物反应器研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2011(1): 21-25.
[6] Eva V, Diana C, Wilhelm G. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 318-333.
[7] Laule O, Fürholz A, Chang H S, *et al.* Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2003, 100(11): 6866-6871.
[8] Gerber E, Hemmerlin A, Hartmann M, *et al.* The plastidial 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway provides the isoprenyl moiety for protein geranylgeranylation in tobacco BY-2 cells [J]. *Plant Cell Online*, 2009, 21(1): 285-300.
[9] Gutensohn M, Orlova I, Nguyen T T, *et al.* Cytosolic monoterpene biosynthesis is supported by plastid-generated geranyl diphosphate substrate in transgenic tomato fruits [J]. *Plant J*, 2013, 75(3): 351-363.
[10] Asadollahi M A, Maury J, Schalk M, *et al.* Enhancement of farnesyl diphosphate pool as direct precursor of sesquiterpenes through metabolic engineering of the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(1): 86-96.
[11] Han J Y, Hwang H S, Choi S W, *et al.* Cytochrome P450 *CYP716A53v2* catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(9): 1535-1545.
[12] Kim Y S, Cho J H, Park S, *et al.* Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum* [J]. *Planta*, 2011, 233(2): 343-355.
[13] Cécile V, Eugénie R, Christophe R. From squalene to brassinolide: the steroid metabolic and signaling pathways across the plant kingdom [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 1738-1757.
[14] Schmidt A, Waechter B, Temp U, *et al.* A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2): 639-655.
[15] Günnewich N, Higashi Y, Feng X H, *et al.* A diterpene

- synthase from the clary sage *Salvia sclarea* catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to (8*R*)-hydroxy-copalyl diphosphate [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 93-99.
- [16] Masakapalli S K, Ritala A, Dong L. Metabolic flux phenotype of tobacco hairy roots engineered for increased geraniol production [J]. *Phytochemistry*, 2014, 99: 73-85.
- [17] 胡凯, 王微. 紫杉二烯合成酶基因转化红豆杉内生真菌 XT5 的研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2): 748-750.
- [18] 姜树坤, 黄成, 徐正进. 粳稻株高 QTL 与赤霉素和油菜素内酯合成及信号转导基因相关分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(14): 2829-2838.
- [19] 杨秋玲. 类胡萝卜素合成途径终产物脱落酸的合成调控与生物学效应 [J]. 天津农业科学, 2011, 17(5): 24-27.
- [20] 李保珠, 赵翔, 安国勇. 赤霉素的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(1): 1-5.
- [21] Alder A. The path from beta-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone [J]. *Science*, 2012, 335(674): 1348-1351.
- [22] Verbitskiy D, Zehrmann A, van der Merwe J A. The PPR protein encoded by the LOVASTATIN INSENSITIVE 1 gene is involved in RNA editing at three sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2010, 61(3): 446-455.
- [23] Xiao Y, Savchenko T, Baidoo E E. Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes [J]. *Cell*, 2012, 149(7): 1525-1535.
- [24] Moller B L. Dynamic metabolons [J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1328-1329.
- [25] Li X Y, Gianoulis T A, Yip K Y, et al. Extensive *in vivo* metabolite-protein interactions revealed by large-scale systematic analyses [J]. *Cell*, 2010, 143(4): 639-650.
- [26] Loivamäki M, Louis S, Cinege G, et al. Circadian rhythms of isoprene biosynthesis in grey poplar leaves [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(1): 540-551.
- [27] Barta C, Loreto F. The relationship between the methyl-erythritol phosphate pathway leading to emission of volatile isoprenoids and abscisic acid content in leaves [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1676-1683.
- [28] Günnewich N, Higashi Y, Feng X H, et al. A diterpene synthase from the clary sage *Salvia sclarea* catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to (8*R*)-hydroxy-copalyl diphosphate [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 93-99.
- [29] Ritala A, Dong L, Imseng N, et al. Evaluation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) hairy roots for the production of geraniol, the first committed step in terpenoid indole alkaloid pathway [J]. *J Biotechnol*, 2014, 176: 20-28.
- [30] Nagegowda D A, Gutensohn M, Wilkerson C G, et al. Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers [J]. *Plant J*, 2008, 55(2): 224-239.
- [31] Dudareva N, Cseke L, Blanc V M, et al. Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of *S*-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(7): 1137-1148.
- [32] Rico J, Pardo E, Orejas M. Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(19): 6449-6454.
- [33] Mendoza-Poudereux I, Muñoz-Bertomeu J, Navarro A, et al. Enhanced levels of *S*-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in spike lavender leaves [J]. *Metab Eng*, 2014, 23: 136-144.
- [34] Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, et al. Up-regulation of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(3): 890-900.
- [35] 孔建强. 青蒿素的合成生物学研究进展 [J]. 药学学报, 2013, 48(2): 193-205.
- [36] Berteau C M, Freije J R, Van der Woude H, et al. Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Planta Med*, 2005, 71(1): 40-47.
- [37] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440(780): 940-943.
- [38] Teoh K H, Polichuk D R, Reed D W, et al. Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Botany*, 2009, 87(6): 635-642.
- [39] Han J L, Liu B Y, Ye H C, et al. Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48(4): 482-487.
- [40] Westfall P, Pitera D J, Lenihan J R. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(3): 111-118.

- [41] Mracek M H. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis* [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(2): 183-185.
- [42] Cheng A X, Xiang C Y, Li J X, et al. The rice(E)-betacaryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes [J]. *Phytochemistry* 2007, 68(12): 1632-1641.
- [43] Schnee C, Köllner T G, Gershenzon J, et al. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (*E*)-beta-farnesene, (*E*)-nerolidol, and (*E, E*)-farnesol after herbivore damage [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 2049-2060.
- [44] Muramatsu M, Ohto C, Obata S, et al. Various oils and detergents enhance the microbial production of farnesol and related prenyl alcohols [J]. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(3): 263-267.
- [45] 赵 杨, 陆 茵, 郑仕中, 等. 隐丹参酮的药理作用研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(11): 1839-1841.
- [46] 吴 昊, 何招兵, 吴汉斌. 丹参酮的药理作用研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2005, 14(10): 1382-1385.
- [47] Zhi B H, Alfermann A W. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(3): 699-703.
- [48] Chen H, Chena F, C. Fhiu C K. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(1): 100-105.
- [49] 王学勇. 丹参毛状根基因诱导表达分析及其有效成分生物合成基因的克隆研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2007.
- [50] 沈 双. 培养基中不同营养元素对丹参毛状根生长及丹参酮类积累的影响 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2011, (3): 130-136.
- [51] 何云飞. 二萜合酶的研究进展 [J]. *药学学报*, 2011, 46(9): 1019-1025.
- [52] Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2013, 110(29): 12108-12113.
- [53] 高明波. 紫杉醇和紫杉烷的生物合成途径研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2010, 45(24): 1900-1903.
- [54] Patil R A, Kolewe M E, Normanly J, et al. Contribution of taxane biosynthetic pathway gene expression to observed variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures [J]. *Biotechnol J*, 2012, 7(3): 418-427.
- [55] 唐 培, 王锋鹏. 近年来紫杉醇的合成研究进展 [J]. *有机化学*, 2013, 33(3): 458-468.
- [56] 张昕欣. 微生物发酵法生产紫杉醇的研究进展 [J]. *化工进展*, 2012, 31(2): 392-396.
- [57] 苗莉云. 过表达 Bap1 基因提高中国红豆杉细胞的紫杉醇产量 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(6): 549-554.
- [58] Wilis R B H, Du X W, Stuart D L. Changes in ginsenosides in Australian-grown American ginseng plants (*Panax quinquefolium* L.) [J]. *Aust J Exp Agric*, 2002, 42(8): 1119-1123.
- [59] Han J Y, Kim H J, Kwon Y S. 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(12): 2062-2073.