

· 综述 ·

药用活性成分的植物酶生物转化研究进展

郭玉婷, 王剑文*, 孙晓飞, 周建芹

(苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 利用植物酶进行生物转化已成为药用活性成分研究的重要手段。植物酶的多样性、特异性为药用活性成分生物转化提供了可能, 其潜力有待进一步开发, 并将在医药产业中得到应用。综述了植物酶生物转化的发展概况, 介绍了植物转化酶的提取、纯化及固定化方法, 重点归纳了植物酶生物转化的类型及活性产物。

关键词: 生物转化; 植物酶; 药用活性成分

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)12-1890-05

Advances in studies on biotransformation of medicinal active components by catalysis of plant enzymes

GUO Yu-ting, WANG Jian-wen, SUN Xiao-fei, ZHOU Jian-qin

(School of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Key words: biotransformation; plant enzymes; medicinal active components

生物转化(biotransformation 或 bioconversion)是利用细胞、器官或酶等生物体系进行催化的反应, 实质是一种酶催化的反应。由于生物转化反应的多样性, 参与的酶也多种多样, 微生物及其酶作为催化剂应用于大规模化学品生产初见端倪, 如在农用化学品、精细化学品、大宗化学品、药物及高分子材料等领域中的应用。Straathof 等^[1]重点综述了工业化应用的微生物及其酶生物转化过程。植物细胞中存在参与催化氧化、还原、羟基化、甲基化、酯化、葡萄糖基化、异构化等多种反应的酶, 是药物活性成分生物转化所必需的催化剂。近年, 已先后建立了悬浮培养细胞、固定化细胞、器官培养物、毛状根培养物等多种生物转化系统, 开展了植物细胞或器官培养生物转化药物活性成分。然而, 在整体细胞或器官进行生物转化时, 底物进入植物细胞后可能被多种酶代谢途径转化, 受多种外界因素影响, 而且复杂的混合产物给下游分离工艺带来困难, 降低了产物的转化率。因而, 植物酶被认为是较佳的转化系统。已有多种催化重要反应的植物酶被分离, 如用于合成异羟基洋地黄毒苷(digoxin)的洋地黄毒苷 12 β -羟基化酶, 用于将莨菪碱(hyoscyamine)转化为东莨菪碱(scopolamine)的莨菪碱 6 β -羟基化酶^[2], 以及用于紫杉醇半合成的 C₁₀-去乙酰酶、C₇-木糖酶等^[3]。但有关植物酶生物转化研究, 尚未见专门的综述报道。本文综述了植物酶生物转化的发展概况, 介绍了植物转化酶的提取、纯化及固定化方法, 以及植物酶生物转化的类型及活性产物, 为植物酶生物转化的应用和发展提供参考。

1 植物酶生物转化的发展概况

在植物细胞培养技术的基础上, 通过微生物转化的提示, 人们将生物转化研究拓展到了植物细胞上, 利用植物体内纷繁复杂且具个体特异性的酶类进行生物转化。早在 20 世纪 70 年代, 人们尝试着用植物细胞作为生物转化系统来转化一些外源底物并取得了一些进展。1977 年 Alfermann 等^[4]成功地用毛花洋地黄 *Digitalis lanata* Ehrh. 细胞对 β -甲基洋地黄毒苷的 C₁₂ 进行 β -羟基化, 这一反应即利用洋地黄毒苷 12 β -羟基化酶的催化作用。随后, 1987 年 Petersen 等^[5]利用洋地黄毒苷 12 β -羟基化酶直接实现了上述生物转化, 他们的研究开辟了植物酶生物转化在药用成分上应用的先河。之后, 用于生物转化研究的植物酶的种类有所增加, 研究者对长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don、莨菪 *Hyoscyamus niger* L.、蛇根木 *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz、喀西茄 *Solanum khasianum* C. B. Clarke 中的一些酶进行了生物转化的研究^[2], 其中长春花中的异胡豆苷合成酶(strictosidine synthase)、过氧化物酶、AMP 脱氨基酶、磷酸甲羟戊酸激酶等多种酶都被分离出来, 并进行转化研究, 得到了多种活性化合物, 如氰醇、儿茶酚、 β -羟基夹竹桃麻素、7S-7-氧二氢蒂巴因[(7S)-salutaridinol]。Dhingra 等^[6]利用从黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中分得氧化还原酶, 通过青蒿乙素的生物转化, 得到重要的抗疟药物——青蒿素, 这更增加了人们对植物酶生物转化的研究兴趣。人参皂苷 Rh₂ 是抗肿瘤成分, 是配合放疗、化疗增效减毒的首选药物, 但仅占

收稿日期: 2006-06-01

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(05KJB360120); 苏州大学医学发展基金项目(EE132514)

作者简介: 郭玉婷(1982—), 女, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术。

* 通讯作者 王剑文 Tel: (0512)65880025 E-mail: jwwang@suda.edu.cn

人参总皂苷的 0.02%。金凤燮等^[7]发现 4 种人参皂苷糖苷酶,建立了利用栽培人参中量较高的皂苷 Rb、Re、Rd、Rg₁ 等生产人参皂苷 Rh₂ 等稀有皂苷的转化方法,人参二醇类皂苷酶转化率高达 60%,实现了人参稀有皂苷 Rh₂ 的工业化生产,该研究获得 2003 年度国家技术发明奖二等奖。他们的研究为生物转化中植物酶制剂的工业化应用提供了范例。

2 植物转化酶的提取、纯化和固定

虽然从经济角度看,酶非常适用于药物的生产,但是在选择酶进行生物转化时,要求在分离过程中酶活性没有大的损失,这就给植物转化酶的制备工艺增加了难度。目前已有多种分离提取技术被应用于植物转化酶的制备中。

2.1 植物转化酶的提取和纯化:由于植物转化酶的种类繁多,性质、来源、用途等都有差异,提取和纯化方法也因酶而异。对于植物转化酶的提取纯化,根据酶分子的不同特性可采用以下几种方法:根据酶分子结构差异可采用离心分离、凝胶过滤(葡聚糖凝胶 Sephadex-G、聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Gel、琼脂糖凝胶 Sepharose 等)、透析与超滤方法;根据酶分子电荷性质不同可采用离子交换色谱、聚集色谱、电泳技术、等电聚焦方法;根据酶分子专一性结合的分方法有亲和色谱、共价色谱。在纯化植物细胞色素单加氧酶(cytochrome P₄₅₀ monooxygenase)时,先差速离心制备微粒体膜,然后用非离子型去污剂(Triton X-114 和胆酸钠)增溶,经饱和硫酸沉淀后,选择弱阴阳离子交换材料和凝胶材料进一步纯化。氨基-Octyl-琼脂糖凝胶和 Mono Q 凝胶柱较好,而 DEAE 凝胶柱对酶可能有损害,染料亲和柱及配体亲和柱也较常用^[8]。Dhingra 等^[9]从黄花蒿中提取分离氧化还原酶时,采用凝胶 CL-6B 亲和柱及 DEAE 凝胶柱等进行纯化。植物转化酶的纯化往往需经过连续几步的色谱纯化过程,Schulte^[10]在长春花中提取磷酸甲羟戊酸激酶(5-phosphomevalonate kinase)时,经过了 5 个色谱柱的纯化过程,分别应用 Q Sepharose、Phenyl Sepharose、Sephacryl S200、Mono Q 及 Shodex KW803 进行 5 步纯化。Warzecha 等^[11]应用连续的色谱方法(离子交换色谱、羟基磷灰石柱色谱、凝胶过滤和 Mono Q、Mono P 快速蛋白液相色谱)从蛇根木细胞中分离纯化得到糖苷酶 raucaffricine-O-β-D-glucosidase,比原细胞中的酶活富集了 1 200 倍。

2.2 植物转化酶的固定:植物酶主要以游离和固定化形式应用于药用活性成分的生物转化,如从杏仁中分离到的(R)-醇蒴酶已被广泛应用,其固定化酶柱生产(R)-醇蒴的能力已达到 130 kg/(m³·h)^[12]。目前能应用于植物转化酶固定化的方法主要有载体结合法、包埋法和交联法,其中应用最多的为载体结合法(物理吸附、离子结合和共价结合等方式)。物理吸附是酶固定化最简单的方法,常用的吸附材料有胶原质、氧化铝、多孔玻璃、纤维素及离子交换树脂等;离子结合法固定化酶不如共价结合法得到的酶牢固,但固定化操作简单,成本也较低。当使用分子较大的先导化合物时,会出现与酶混合较慢的问题。此时微囊化包埋法则是首选,其中合适的聚合体材料有羟甲基纤维素、明胶、硝酸纤维素和聚酰胺。

但是,采用凝胶包埋法固定酶时,会产生传质阻力,特别是对大分子底物,这是此系统的不足之处。随着固定化培养的深入研究,各种限制因素的逐步解决,会有越来越多的次级代谢产物通过固定化酶来进行生产。李红等^[13]采用悬浮交联法制备壳聚糖微球,并以壳聚糖微球为载体,采用吸附-交联法制备固定化木瓜蛋白酶,并在此基础上研制了壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶填充床式反应器以降解酪蛋白。酪蛋白的降解产物不仅是婴幼儿不可缺少的营养物质,而且具有免疫调节作用和抑制血压升高等功能。固定化木瓜蛋白酶活力达 38.49 U/g 载体,活力回收为 66.6%。壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的部分酶学性质的研究表明:固定化酶对底物酪蛋白的亲合力比溶液酶的提高约 7.6 倍;固定化酶的 pH 稳定性在 7.0 左右,热稳定性在 15~35 °C;固定化酶的操作半衰期较长,为 25 d。根据上述酶的固定化方法、固定化酶性质和应用形式等具体情况而试制的填充床式反应器,在填充 10 g 酶活力为 81.3 U/g 载体的壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶,底物(0.5%酪蛋白溶液,内含 20 mmol/L Cys 和 1 mmol/L EDTA)逆流上行、20 °C 恒温 and 8 mL/h 的恒速等条件下连续反应 16 d,其生产强度在第 2 天达到最高[0.096 g/(L·h)],转化率在 1~4 d 内达 9.71%~98.56%。说明壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶填充床反应器对酪蛋白具有良好的酶解能力。

3 植物酶生物转化的类型和活性产物

生物转化药用活性成分的植物酶主要有木瓜蛋白酶、醇氨氧化酶、环化酶、酚氧化酶、卤过氧化物酶、脂肪合酶、细胞色素 P₄₅₀单加氧酶及 α-氧化酶、莨菪酶 β-羟化酶和葡萄糖苷酶等^[2],其中区域选择性羟基化、糖基化酶的应用已为改良药物的生产提供了有力的手段。

3.1 羟基化酶:立体选择性和立体专一地在某一分子的各个部位引入羟基是植物细胞培养物对内源性底物进行生物转化的一类重要反应。在生物转化反应中,羟基化反应是最重要的反应之一。虽然它也属于氧化还原反应,但是由于其在生物转化中占有很重要的位置,因而把它单独列出。

植物细胞中的羟基化酶可有选择地在底物分子的特定区域和特定基团上引入羟基而使外源底物发生转化。酚氧化酶(phenoloxidases)能区域特异性催化一元酚生成儿茶酚。Pras 等^[14]通过对刺痒蚕豆 *Mucuna pruriens* (L.) DC. 细胞培养物中分离的酚氧化酶,以 7-羟基-N,N-二丙基-2-氨基四氢萘(7-hydroxy N-di-n-propyl-2-aminotetralin, 7-OH DPAT)为底物进行区域性邻位羟基化,得到一种重要的多巴胺能药物:7,8-二羟基-N,N-二丙基-2-氨基四氢萘(7,8-dihydroxy N-di-n-propyl-2-aminotetralin, 7,8-(OH)₂DPAT)(图 1)。

Yamada 等利用从莨菪的根培养物中分离得到的天仙子胺 β-羟化酶,将天仙子胺羟基化生成 β-羟基天仙子胺和东莨菪碱^[2]。在羟基化反应中,细胞色素单加氧酶起重要的作用。细胞色素 P₄₅₀是广泛存在于动植物及细胞、真菌等细胞内的,与内质网、线粒体、质体、高尔基体等细胞器膜结合的一类具有混合功能的血红素氧化酶系。许多实验证明,

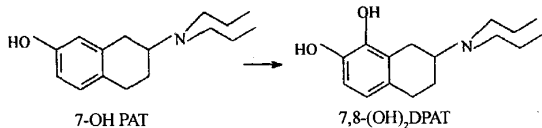


图 1 从 7-OH DPAT 到 7,8-(OH)₂DPAT 的生物转化

Fig. 1 Biotransformation from 7-OH DPAT to 7,8-(OH)₂DPAT

P₄₅₀参与脂肪酸的羟化和环氧化,其中短中链的脂肪酸,如葵酸、肉豆蔻酸、月桂酸等在救荒野豌豆 *Vicia sativa* L.、菊芋 *Helianthus tuberosus* L. 和小麦 *Triticum aestivum* Linn. 中可被 P₄₅₀催化,进行从 C₈ 到 C₁₄位的羟化反应,在菊芋中催化月桂酸羟化的 P₄₅₀也可催化月桂酸的不饱和类似物的环氧化^[15]。长链脂肪酸,如棕榈酸、油酸、亚油酸等均发现有 P₄₅₀催化的羟化反应。单萜化合物,如柠檬烯、蒎烯、刺柏烯、樟脑、托品醇、松香二烯等均可被 P₄₅₀进行羟化修饰。柠檬烯的羟化在许多植物中都存在,但有立体特异性,在不同植物中有不同的羟化位置,因而产物也不同:在辣薄荷 *Mentha piperita* L. 中生成薄荷酮;在留兰香 *M. spicata* L. (*M. viridis* L.) 中生成反式藏红花醇;在紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britton 中则生成紫苏醛^[16]。Park 等^[17]从欧薄荷 *M. longifolia* (L.) Huds. 细胞悬浮培养物中分离得到细胞色素 P₄₅₀单加氧酶,该酶能够催化(-)-4R-异胡椒酮生成(-)-7-羟基异胡椒酮。Kraker 等^[18]在菊苣 *Cichorium intybus* L. 的根中发现一种细胞色素 P₄₅₀酶——吉马烯羟基化酶 [(+)-germacrene A hydroxylase]及木香烯内酯合成相关的一系列酶,以焦磷酸金合欢酯(FPP)为底物得到木香烯内酯,此化合物是植物中倍半萜内酯合成的关键中间产物。在甾体母核的 4 个环结构中含有许多次甲基,采用化学方法进行羟化反应时,除了 C₁₇位上可通过化学方法导入羟基外,其他位置都很难导入,因此采用化学方法进行甾体羟化反应是非常困难的。而植物细胞内的羟基化酶能特异性地在甾体母核次甲基上引入羟基。例如毛地黄细胞中的 12-羟基化酶(一种细胞色素单加氧酶)可以特异性地将 β-甲基毛地黄毒苷 C₁₂羟基化使之转化为临床上使用的 β-甲基地高辛^[4]。这在甾体的转化中显得特别重要,因为不同位置 and 不同基团的羟基化甾体具有不同的生理活性。

3.2 氧化还原酶类

3.2.1 醇与酮之间的转化:植物细胞培养物可以催化醇、酮之间的转化。培养细胞的对映体选择性氧化作用对于手性药物的制备具有重要意义。烟草 *Nicotiana tabacum* L. 细胞培养液能将单环和双环单萜醇的羟基进行对映选择性氧化,该细胞匀浆可区分 *p*-methan-2-ol、bicyclo [2.2.1]heptan-2-ol 和 bicyclo [3.1.1]heptan-3-ol 衍生物的构型异构体,并且选择某一构型的羟基来氧化,将 *RS*-borneol 及 *RS*-isborneol 转化成 1*R*,4*R*-camphor,其光学纯度可达 90%~95%^[19]。这种构型选择性的转化对于制备光学纯化合物来说极为有用。烟草培养细胞可以还原酮,其中氢进攻发生在羰基基团的反面,从而给出 *S* 构型的羟基化合物。烟草细胞对脂环醇及脂

环酮的转化是可逆的,其反应是由 NAD⁺ 依赖的醇脱氢酶所决定的,平衡的位置是由脂环的大小所决定,六元环时有利于形成醇,五元、七元及八元环时则相反,这一反应的平衡常数与氧化反应产物中羰基碳的¹³C-NMR 化学位移值相关^[2]。

3.2.2 羰基的还原:利用植物培养物将酮和醛还原成相应的醇已有很多报道。烟草细胞对 1*R*,4*R* 及 1*S*,4*S*-dihydrocarvonas、1*S*,4*S*-及 1*R*,4*S*-iso-clihydrocarvonas、1*R*,4*S*-menthane、1*R*,4*R*-及 1*S*,4*S*-carvomenthones 等化合物的还原是立体特异的,在这个还原反应中,氢优先从羰基的背面发动攻击,结果在这个位置上产生具有 *S* 手性的羟基化合物^[19]。利用悬浮培养的林烟草 *N. sylvestris* Spegaz. et Comes 和长春花细胞及它们的无细胞抽提物也都能进行这类反应。由于过氧化物酶细胞外分泌,在适当的条件下,反应 40 min 后,底物的转化率达到 87%^[20]。

3.2.3 环氧化作用:环氧化作用对于倍半萜化合物的结构修饰是非常有用的。Sakui 等^[21]利用莪术 *Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc. 悬浮细胞培养物对吉马酮(germacrone)进行环氧化修饰。Park 等^[22]利用欧薄荷细胞悬浮培养物对(-)-4*R*-isopiperitenone 进行生物转化,产生 3 个羟基衍生物和两个环氧化衍生物,即(-)-7-hydroxyisopiperitenone 及其葡萄糖苷。Piazza 等通过薄膜固定的燕麦 *Avena sativa* L. 细胞中的过氧化物酶来环氧化脂肪酸,反应底物中油酸比反应油更有效。Vitali 等^[23]从长穗决明 *Cassia didymobotrya* Fresen. 细胞悬浮培养物中分离纯化的酸性过氧化物酶能催化 4,3',4'-三羟基查耳酮和 4,3',4'-三羟基-3-甲氧基查耳酮转化成相应的二氢黄酮类化合物。

3.2.4 C=C 双键的还原:用植物培养细胞氢化双键已有一些报道,如烟草培养细胞可氢化 4*R*-和 4*S*-carvonas 中羰基邻位的 C=C 双键,但这些细胞不能氢化甲基乙烯基中的 C=C 双键^[19]。烟草培养细胞及从其中分得的酶对 4*R*-carvone 环外双键氢化反应的立体化学表明:共轭的 C=C 双键被位置选择性地还原了,氢加成具有立体特异性,即氢从正面进攻 carvone-1 位,从反面进攻其 C₆ 位,得到 1*R*,4*R*-dihydrocarvone,参与反应的 2 个氢分别来自培养介质及 NADH 中的 pro-4*R* 氢。植物培养细胞可区分马鞭草烯酮的构型异构体,并且选择地只还原 1*S*,5*S*-构型的底物^[19]。悬浮培养的腐生型眼虫长变胞藻 *Astasia longa* Pringsheim 含有 2 种不同的烯酮还原酶,能将(-)-香芹酮的双键还原,同时还能将酮基还原并在烯丙基位进行羟化,结果在香芹酮的 C₂ 位区域选择性羟化,产生新二氢香芹醇^[24]。

3.2.5 过氧键的形成:Dhingra 等^[6]从黄花蒿叶中提取出一种氧化还原酶可将青蒿素 B(arteannuin B)结构中增加一过氧键,转化得到青蒿素(图 2)。青蒿素是抗疟疾的重要药物,是植物黄花蒿的有效成分。由于受植物资源有限及提取效率低等诸多因素的限制,生物转化方法制备青蒿素成为可行的方法之一。可根据植物生长周期的规律性,在黄花蒿中含 arteannuin B 量较多的时期进行生物转化。

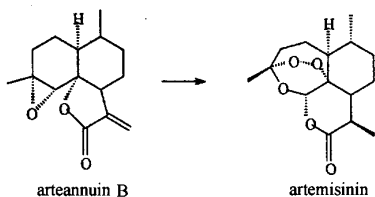


图 2 从 arteannuin B 到 artemisinin 的生物转化
Fig. 2 Biotransformation from arteannuin B to artemisinin

脂氧合酶(lipoxygenases, LOX)是一种非血红素含铁酶类,且立体和区域选择性很强。LOX 能催化具有顺,顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸的加氧反应,生成氢过氧化物。大豆脂氧合酶和氧化物裂解酶已被用来对植物不饱和脂肪酸的转化。Fauconnier 等^[25]在马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 块茎中分离出 LOX,对底物过氧化得到酶代谢的前体化合物——经过氧化脂肪酸。

3.3 水解酶类:在番木瓜树 *Carica papaya* L. 的树叶和果实中存在大量木瓜蛋白酶(papain),此酶为肽链内切酶,能水解肽键,甚至酯键。对精氨酸和赖氨酸残基的羧基端肽键敏感,但专一性差。Speicher 等^[26]对地钱 *Marchantia polymorpha* L.、鹿角苔 *Riccia fluitans* L.、地钱属植物 *M. plicata* Nees. & Mont.、花萼苔属植物 *Asterella blumeana* (Nees.) Kachroo 细胞水解酶进行研究,发现上述植物的水解酶可以立体专一性水解 R 构型底物,得到光学纯度相当高的 R 型醇,其中地钱中水解酶生物转化得 R-(+)-醇,对映体过量值达到 88%,剩下 S-(-)-底物达到 96%对映体过量值,见图 3 据此这些水解酶可用于手性化合物的拆分。

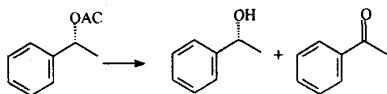


图 3 地钱中的水解酶生物转化
Fig. 3 Biotransformation by hydrolases from *M. polymorpha*

3.4 裂合酶类:醇腈醛化酶(oxynitrilases)是立体选择酶类,它们只产生一个对映异构体。此类酶常用于催化将 HCN 加到醛或酮上的反应,已用于合成具有光学活性的氰醇化合物,是重要的活性先导物。光学纯氰醇是合成农药拟除虫菊酯的原料,同时还是合成 α -羟基酸、 α -羟酮、胆胺、氨基乙醇、咪唑和杂环化合物等的重要中间体。根据对底物对映异构体的选择性,此类酶可以分为 R-和 S-醇腈醛化酶。蔷薇科植物中有 R-醇腈醛化酶,尤其是在苦杏仁中分离得到的 R-醇腈醛化酶已被广泛应用^[2]。另外在橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell.-Arg.、高粱 *Sorghum vulgare* Pers.、木薯 *Manihot esculenta* Crantz 中提取的 S-醇腈醛化酶对具有不同取代基的底物转化时,可以合成 80%~100%对映体过量值光学对映异构体^[27]。

3.5 糖基化酶:植物细胞培养物中的糖基化酶能对各种各样的外源化合物,如苯酚、苯丙酸及其类似物等进行糖基化。

由于微生物转化和化学合成难以完成这个反应,因此植物酶类在这方面起到重要作用。Parry 等^[28]利用从紫花苜蓿 *Medicago sativa* L. 细胞悬浮培养物中分离到的 O-葡萄糖基转移酶,对槲皮素进行葡萄糖基化,得到槲皮素-3-O-葡萄糖苷,即异槲皮苷。由于酶的催化作用必须发生在酶和底物的结构相互契合的基础上,因此,生物转化反应要求底物具有一定的结构特征。Bouhouche 等发现悬浮培养的积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 细胞糖基化外源 3-demethylthiocolchicine 时产生的糖基转移酶粗提物的活性会被过量的 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 抑制,但不被过量的 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 抑制,且该粗提物具有较宽的底物范围,对于不同结构的外源底物,糖基化率也不同。Hirata 等在研究悬浮培养的白色烟草细胞糖基化羧基苯甲酸的 3 种异构体时,发现只有伯醇基被糖基化,且酚羟基的取代位置会影响伯醇基的糖基化率,糖基化率是间位 > 对位 > 邻位。

糖基化产物具有以下的特点:苷键原子绝大多数是氧,目前只发现 1 例是氮;氧苷又包括酚苷、醇苷、酯苷;苷键的构型是 β 构型;糖的种类有葡萄糖、葡萄糖衍生物、果糖、鼠李糖、洋地黄糖、阿拉伯糖;外源化合物上糖链的连接位置有 1,2,3 处;糖链上糖的个数从一个到多个;内端糖常以 1,4、6 位,极少数以 2 位与外源化合物相连;糖与糖之间以 1-6、1-4 连接为主,极少数以 1-2 连接;外源化合物被糖基化后,其理化性质与生物活性会发生较大的改变,如水不溶性的化合物经糖基化后能转化为水溶性的化合物,其生物利用率也相应提高。如罂粟细胞培养物几乎能定量地将著名抗肝炎药物水飞蓟素(silymarin),选择性糖基化,所得 7-葡萄糖基水飞蓟素的生物利用率大大提高。丁酸可体外抑制肿瘤细胞,有效治疗白血病,但其在哺乳动物体内半衰期短,Kamel 等^[29]应用灰叶烟草 *N. plumbaginifolia* Viv. 细胞培养物将丁酸糖基化为丁酰葡萄糖(6-O-butyryl-D-glucose),增强了其疗效。红景天苷(salidroside)具有抗缺氧、抗寒冷、抗疲劳、抗微波辐射等功能,而且具有延缓机体衰老、防止老年疾病等功效,是一种很有发展前途的药物。红景天苷的来源主要是红景天属植物的地下根茎,但量甚微。许建峰等^[30]报道库页红景天 *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. 培养细胞中酪醇葡萄糖基转移酶的活性在其指数生长期达到最高。Xu 等^[31]研究了库叶红景天酪醇- β -D-葡萄糖苷转移酶的活性,通过此酶把酪醇糖基化为红景天苷,24 h 间隔连续 3 次投入 1 mmol/L 酪醇,95%酪醇转化为红景天苷。

4 展望

由于植物细胞存在一些独特的酶,其能完成化学合成和微生物转化难以完成的一些区域专一性修饰,催化立体专一性的反应,产生独特的手性产物。利用植物酶作为生物转化系统来合成药物,需要建立和发展新型、高效和简洁的合成方法,以简单易得的化合物为原料来合成重要的药物或药物中间体,特别是手性药物。虽然从经济上来看,酶制剂最适合用于药物的生产,特别是区域选择性糖基化作用和糖基化作用为药物的改构提供有力的手段。但是,选择酶制剂进行生

物转化反应时,要求能够从植物组织或细胞中分离出足够数量的酶而活性没有大的损失,希望比细胞系统转化效率高,还要确定所使用酶的特性和必需的因子,有时还需解决辅助因子的再生问题。只有解决了这些问题,才能更好地利用酶制剂进行有效和特异的生物转化反应。为此,要进一步加强具有新颖和独特的生物催化反应的植物酶筛选及反应机制的研究,加强组合生物转化反应和多酶催化的串联生物转化反应以及基因工程在生物转化合成中的应用等方面的研究。随着研究的不断深入,这一技术在医药产业上的广泛应用将为期不远。

References:

- [1] Straathof A J J, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 13: 548-556.
- [2] Giri A, Dhingra V, Giri C C, et al. Biotransformations using plant cells, organ cultures enzyme systems: current trends and future prospects [J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19: 175-199.
- [3] Hu S, Sun D A, Tian X, et al. Selective microbial hydroxylation and biological rearrangement of taxoids [J]. *Tetrahedron Lett*, 1997, 38: 2721-2724.
- [4] Alfermann A W. *Biotransformation of Cardiac Glycosides* [M]. New York: W Barz, 1977.
- [5] Petersen M, Alfermann A W, Reinhard E, et al. Immobilization of digitoxin 12 β -hydroxylase, a cytochrome P₄₅₀-dependent enzyme from cell cultures of *Digitalis lanata* [J]. *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 200-203.
- [6] Dhingra V, Chakrapani R, Lakshmi Narasu M. Partial purification of proteins involved in bioconversion of arteannuin B to artemisinin [J]. *Biores Technol*, 2000, 73: 279-282.
- [7] Lu Y H, Wang J W, Wei D Z. *Bioconversion on Natural Drugs (天然药物的生物转化)* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [8] Zhao J, Yang W J, Zhu W H. Cytochrome P₄₅₀ and plant secondary metabolism [J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 1999, 11: 127-131.
- [9] Dhingra V, Narasul M L. Purification and characterization of an enzyme involved in biochemical transformation of arteannuin B to artemisinin from *Artemisia annua* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281: 558-561.
- [10] Schulte A, Heijden R V, Verpoorte R. Purification and characterization of phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 975-983.
- [11] Warzecha H, Obitz P, Stockigt J. Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-O- β -D-glucosidase from plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50: 1099-1109.
- [12] Willeman W F, Straathof A J J, Heijnen J J. Reaction temperature optimization procedure for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase using a process model approach [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 30: 200-208.
- [13] Li H, Wang W J, Xu F C. Studies on preparation of chitosan microspheres and immobilization of papain on them [J]. *J South China Agric Univ (华南农业大学学报)*, 2000, 21(2): 49-53.
- [14] Pras N, Batterman S, Dijkstra D, et al. Continuous production of the pharmaceutical 7, 8-dihydroxy N-dinpropyl-2-aminotetralin using a phenoloxidase from cell cultures of *Mucuna pruriens* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1990, 23: 209-215.
- [15] Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. Plant cytochrome P₄₅₀ [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(6): 1491-1506.
- [16] Karp F, Mihaliak C A, Harris J L, et al. Monoterpene biosynthesis: specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*) and perilla (*Perilla frutescens*) leaves [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 276: 219-226.
- [17] Park S H, Chang Y J, Kim K Y, et al. Involvement of cytochrome P₄₅₀ in (-)-(4R)-isopiperitenone oxidation by cell suspension cultures of *Mentha piperita* [J]. *Microbiol Biotechnol*, 1999, 9: 147-149.
- [18] Kraker J W, Schurink M, Maurice C R, et al. Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59: 409-418.
- [19] Wang W J, Zou K. Advanced research on bioconversion of natural products [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 1990, 10: 550-551.
- [20] Botta B, Monache G D, Riccardi P, et al. Studies with plant cell cultures of *Cassia didymobotrya*; VII. Enzyme-catalyzed biotransformation of dibenzylbutanolides to podophyllotoxin analogues and related compounds [J]. *Heterocycles*, 1996, 43: 2443-2456.
- [21] Sakui N, Kuroyanagi M, Ishitobi Y, et al. Biotransformation of sesquiterpenes by cells of *Curcuma zedoaria* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 143-147.
- [22] Park S H, Kim S U. Modified monoterpenes from biotransformation of (-)-isopiperitenone by suspension cell culture of *Mentha piperita* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61: 354-357.
- [23] Vitali A, Botta B, Delle Monache G, et al. Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies [J]. *Biochemistry*, 1998, 331: 513-519.
- [24] Shimoda K, Hirata T. Biotransformation of enones with biocatalysts—two enone reductases from *Astasia longa* [J]. *J Mol Catal B: Enzyme*, 2000, 8: 255-264.
- [25] Fauconnier M L, Delcarte J, Jaziri M, et al. Fatty acid hydroperoxides biotransformation by potato tuber cell-free extracts [J]. *J Plant Physiol*, 2002, 159: 1055-1060.
- [26] Speicher A, Roeser H. Enantioselective hydrolase type bioco-conversions of exogenous substrates using cell suspension cultures of bryophytes [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, 13: 2365-2368.
- [27] Griengl H, Schwab H, Fechter M. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases [J]. *Trends Biotechnol*, 2000, 18: 252-256.
- [28] Parry A D, Edwards R. Characterization of O-glucosyltransferases with activities toward phenolic substrates in alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37: 655-661.
- [29] Kamel S, Brazier M, Desmet G, et al. Glucosylation of butyric acid by cell suspension culture of *Nicotiana glauca* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 1581-1583.
- [30] Xu J F, Feng P S. Regulation of metabolism for improved salidroside production in cell suspension culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 1998, 10: 8-14.
- [31] Xu J F, Su Z G, Feng P S. Activity of tyrosol glucosyltransferase and improved salidroside production through biotransformation of tyrosol in *Rhodiola sachalinensis* cell cultures [J]. *J Biotechnol*, 1998, 61: 69-73.