### 基于酶催化与代谢工程策略的稀有人参皂苷高效制备研究进展

何天竺,邹 睿,王伟楠\*

广东医科大学,广东天然药物研究与开发重点实验室,广东东莞 523808



专家简介: 王伟楠,北京大学博士,美国 Virginia Commonwealth University 访问学者, 广东医科大学教授、博士生导师、吉林省 D类人才。曾任吉林省教育厅中药生物转化 重点实验室主任,主要从事中药化学成分/活性天然产物分离、分析、鉴定、次级代谢调 控与生物活性研究。主持并完成国家自然科学基金青年项目1项、吉林省科技厅重点 研发项目1项、吉林省科技厅青年科学基金1项、吉林省发改委产业技术研究与开发项 目1项、吉林省教育厅重点项目1项和吉林省中医药管理局项目1项;重点参与了国家科 技支撑计划项目1项、国家自然科学基金面上项目2项、吉林省重大科技攻关项目2项 以及其他省部级项目10余项;获得吉林省科技进步二等奖1项(第2名);发表学术论文 50余篇,其中以第一或通信作者身份发表 SCI论文20余篇;授权国家发明专利6项。

摘 要:稀有人参皂苷是人参药材及其加工产品体内发挥生物活性的主要物质基础,具有极高的应用价值和 市场前景。由于稀有人参皂苷在天然人参植物中的含量极低,其高效制备策略成为人参研究领域的热点。通过结 合现代生物转化技术与代谢工程方法,利用特定酶系及细胞工厂可实现高效、定向、绿色的稀有人参皂苷制备与合 成。这些方法不仅提高了稀有人参皂苷的储备与化学多样性,还有效解决了传统化学方法中存在的环境友好性和 副产物等问题。因此,该文综述了近年来关于稀有人参皂苷酶催化和代谢工程研究的进展,为打破行业技术壁垒、 推动人参相关产业的高速发展提供参考和理论依据。

关键词: 人参皂苷; 生物催化; 代谢工程; 绿色加工 DOI: 10.20227/j.cnki.2096-3610.2025.01.001

# Research progress on the efficient preparation of rare ginsenosides based on enzymatic catalysis and metabolic engineering strategies

#### HE Tianzhu, ZOU Rui, WANG Weinan\*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Natural Drugs Research and Development, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

Abstract: Rare ginsenosides are the primary bioactive substances in ginseng and its processed products, possessing significant application value and market potential. However, due to their extremely low natural abundance in ginseng plants, efficient preparation strategies have become a focal point in ginseng research. By integrating modern biotransformation technologies with metabolic engineering approaches, the use of specific enzyme systems and microbial cell factories enables the efficient, targeted, and eco-friendly synthesis of rare ginsenosides. These methods not only enhance the reserves and chemical diversity of rare ginsenosides but also address environmental concerns and by-product issues associated with traditional chemical methods. This review summarizes recent progress in enzymatic catalysis and metabolic engineering research on rare ginsenosides, providing insights and theoretical foundations to overcome industry technical barriers and promote the rapid development of ginseng-related industries.

Key words: ginsenosides; biocatalysis; metabolic engineering; green processing

收稿日期: 2024-12-10

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81703643),吉林省发展和改革委员会项目(2022C42-7),吉林省科技厅项目 (YDZJ202201ZYTS267)

作者简介: 何天竺, 女, 博士, 讲师, E-mail: htz1986\_tina@163.com

通信作者: 王伟楠, 男, 博士, 教授, E-mail: cnweinanwang@gdmu.edu.cn

Vol. 43 No. 1

Feb. 2025

人参(Panax ginseng C.A. Mey.)被誉为"百草之 王",是我国的"名片中药"之一,其产业规模在中药 行业中多年以来一直占据领先地位[1]。人参皂苷是 人参属药用植物(人参、西洋参、三七等)的主要活性 物质,也是《中国药典》中"人参"项下规定的指标性 成分,对阐释人参药材的传统功效机制、指导临床合 理用药、助推人参资源创新开发和保障人参产业的 高质量可持续发展有着至关重要的作用四。目前,已 从人参的不同药用部位(包括根、叶、果实和花蕾)中 分离和鉴定得到超过150种人参皂苷[3]。根据其化 学骨架和连接的糖基特点,人参皂苷主要分为3种 类型:(1) 达玛烷型(Dammarane, DA) 皂苷, 包括原 人参二醇型(Protopanaxadiol, PPD)和原人参三醇型 (Protopanaxatriol, PPT)的四环三萜皂苷;(2)齐墩 果酸型(Oleanolic acid, OA),以齐墩果酸为骨架的 五环三萜人参皂苷;(3)奥克梯隆型(Ocotillol-type,

OT) 皂苷, C17 侧链中含有呋喃环的四环三萜皂 苷[4-6]。根据人参皂苷的来源还可以将该类成分粗 略地分为"原型人参皂苷"和"稀有人参皂苷"两种。 其中,能够直接从人参自然资源中高效富集且含量 较高的为原型人参皂苷,主要包括Rg1、Re、Rf、 Rb1、Ro、Rc、Rb2和Rd,但这类成分普遍在胃肠道 中的吸收较差,生物利用度较低四。稀有人参皂苷 是从原型人参皂苷衍生的次级代谢产物,包括F2、 Rg3, Rh2, Compound K (C-K), Compound O (C-O)、Compound Y(C-Y)、Rg2、Rh1 和 F1 等<sup>[8]</sup>。稀有 人参皂苷的化学多样性较强,生物活性丰富,包括抗 癌、抗炎、抗心血管疾病、抗糖尿病,以及对神经系统 和肝脏的保护作用等,与原型人参皂苷相比,显示出 更优越的体内代谢行为和药理作用效果,因此成为 人参皂苷类物质新药开发的主要原料和研究对象<sup>[9]</sup>。 人参中主要原型皂苷与稀有皂苷的相关信息见表1。

表1 人参中主要原型皂苷与稀有皂苷的相关信息

| 序号   | 人参皂苷 | 分子量   | 分子式                    | 化学结构   | 结构类型 |
|------|------|-------|------------------------|--|------|
| 原型皂苷 |      |       |                        |  |      |
| 1    | Rgl  | 800   | $C_{42}H_{72}O_{14}$   |  | PPT  |
| 2    | Re   | 946   | $C_{48}H_{82}O_{18}\\$ | $HO = \begin{pmatrix} HO_{i} & HO_{i} & HO_{i} \\ HO & $ | PPT  |
| 3    | Rf   | 800   | $C_{42}H_{72}O_{14}$   |  | PPT  |
| 4    | Rb1  | 1 108 | $C_{54}H_{92}O_{23}$   | $HO_{hO''} O_{H} O_{hO''} O_{hO''} O_{H} O_{hO''} $   | PPD  |

| 续表1       |      |       |                      |  |      |  |
|-----------|------|-------|----------------------|--|------|--|
| 序号        | 人参皂苷 | 分子量   | 分子式                  | 化学结构   | 结构类型 |  |
| 5         | Ro   | 956   | $C_{48}H_{76}O_{19}$ |  | OA   |  |
| 6         | Rb2  | 1 078 | $C_{53}H_{90}O_{22}$ | Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho<br>Ho | PPD  |  |
| 7         | Rc   | 1 078 | $C_{53}H_{90}O_{22}$ |  | PPD  |  |
| 8         | Rd   | 946   | $C_{48}H_{82}O_{18}$ | HO + O + O + O + O + O + O + O + O + O +   | PPD  |  |
| 稀有皂苷<br>1 | Rg3  | 784   | $C_{42}H_{72}O_{13}$ |  | PPD  |  |
| 2         | F2   | 784   | $C_{42}H_{72}O_{13}$ |  | PPD  |  |
| 3         | C-K  | 622   | $C_{36}H_{62}O_8$    |  | PPD  |  |
| 4         | Rh2  | 622   | $C_{36}H_{62}O_8$    |  | PPD  |  |

| 续表1 |                    |     |                      |  |      |  |  |
|-----|--------------------|-----|----------------------|--|------|--|--|
| 序号  | 人参皂苷               | 分子量 | 分子式                  | 化学结构   | 结构类型 |  |  |
| 5   | Gypenoside<br>XVII | 946 | $C_{48}H_{82}O_{18}$ | $HO \xrightarrow{OH}_{HO', -O} \xrightarrow{OH}_{HO$ | PPD  |  |  |
| 6   | Gypenoside<br>LXXV | 784 | $C_{42}H_{72}O_{13}$ |  | PPD  |  |  |
| 7   | C-0                | 916 | $C_{47}H_{80}O_{17}$ |  | PPD  |  |  |
| 8   | C-Y                | 754 | $C_{41}H_{70}O_{12}$ |  | PPD  |  |  |
| 9   | Rg2                | 784 | $C_{42}H_{72}O_{13}$ |  | РРТ  |  |  |
| 10  | F1                 | 638 | $C_{36}H_{62}O_9$    |  | РРТ  |  |  |
| 11  | Rh1                | 638 | $C_{36}H_{62}O_9$    |  | РРТ  |  |  |

然而,稀有人参皂苷在天然人参植物中含量极 低,这对其开发和应用造成了相当大的限制<sup>[10]</sup>。因 此,近年来稀有人参皂苷的制备已成为人参领域的 研究热点。传统制备稀有人参皂苷的方法主要涉 及热处理、酸水解、碱水解等策略<sup>[11]</sup>。然而,这些方 法往往导致副产物过多、环境友好度低、反应剧烈 且难以控制等问题。相比之下,生物转化法具有高 效、绿色、反应条件温和等优点,是近10年以来稀有 人参皂苷制备的主要技术手段[12]。生物转化方法包 括酶法和微生物发酵法。尽管微生物发酵成本低、 操作简单,但在生物安全性和遗传稳定性方面存在 挑战[13]。酶法相比微生物表现出更高的特异性和转 化效率,具有广阔的应用前景[14]。例如,以人参皂苷 Rg3为主要成分的参一胶囊,就是通过酶转化的方 式使Rg3含量提高了410倍,产量提高了270倍,纯 度达到95%以上。目前,参一胶囊已成功制备上 市,并作为抗肿瘤辅助药物应用在临床一线[15]。

另外,随着基因组学、转录组学和蛋白质组学技 术的蓬勃发展,以及生物合成策略的持续进步,为在 微生物细胞中重建生物合成途径,以生产具有更复 杂结构的下游产物铺平了道路169。与酶法制备稀有 人参皂苷相比,基于模式细胞工厂的代谢工程能够 从简单原料出发,定向合成既定结构的稀有人参皂 苷,具有可持续性和成本优势四。但代谢工程技术 的门槛较高,尤其是涉及工业生产时的产量和纯化 问题是主要的挑战。而酶法虽然受限于成本和稳定 性,但其工艺简单,转化效率高、特异性强,产品纯度 高,与代谢工程取长补短可以极大程度的满足稀有 皂苷产业化的需求。因此,本文归纳了近些年来人 参皂苷生物转化酶和代谢调控研究的主要进展,从 中挖掘出与稀有人参皂苷生物催化合成直接相关的 糖苷酶与糖基转移酶,并剖析利用酿酒酵母等微生 物细胞工厂生产稀有人参皂苷的实例。通过这些发 现与总结,为稀有人参皂苷的高效、低成本、规模化 制备提供技术支持和依据,为相关人参健康产品和 新药的研发与产业化奠定理论基础。

## 稀有人参皂苷的构效关系——揭秘其潜在的生物活性密码

近年来,稀有人参皂苷的关注度居高不下,究其 原因是其生物活性普遍强于原型人参皂苷。例如, 经过蒸制的人参、三七和西洋参在治疗癌症、心血管 疾病和认知障碍方面比生品表现出更好的疗效,因 为蒸制过程可以显著提高稀有人参皂苷的含量<sup>[18]</sup>。 现代药理学研究表明稀有人参皂苷生物活性的多样 性与其独特的化学结构有关。影响稀有人参皂苷疗 效的关键因素包括:糖分子的数量、糖键的连接方式、C-17侧链上的修饰和C20位的立体构型。

关于糖分子数量对稀有人参皂苷生物活性的影 响最初在抗肿瘤研究中发现。例如,天然存在的人 参皂苷Rb1和Rc几乎没有抗肿瘤作用,而稀有人参 皂苷Rg3和Rh2则表现出强大的疗效。针对一些特 定的肿瘤类型,随着人参皂苷中糖基数量的减少,其 抗肿瘤效果逐步增强。其中,不含糖基的PPD(皂苷 元)的作用最为显著,有望成为抗肿瘤治疗的候选药 物[19]。因此,现在普遍认为增加糖基数量会削弱人 参皂苷的疗效。其原因可能与人参皂苷的疏水特性 有关,糖基的存在降低了整个分子的亲脂性,使其难 以穿透细胞膜[20]。然而,在某些情况下,连接糖基较 少的人参皂苷元反而显示出更弱的生物活性。例 如,晚期糖基化终产物(AGE)是糖尿病相关血管并 发症的重要标志物,人参皂苷元PPD和PPT对AGE 的抑制活性IC50值分别为451.45、449.23 μmol/L;相 对而言,在不同位置分别连接1个糖基的人参皂苷 Rh2(C3位糖基)、Rh1(C6位糖基)和C-K(C20位糖 基)的IC50值分别为3.38、8.42、10.85 µmol/L,远高 于它们的苷元。这表明糖基的引入在稀有人参皂苷 的某些药理作用中起到关键的作用[21]。

糖的连接位置是影响稀有人参皂苷生物活性的另一个因素。在抗肿瘤作用方面,大多数活性较好的化合物是糖基连接在C3位的PPD型皂苷,而非糖基连接在C6位的PPT型皂苷<sup>[22]</sup>。有研究者为了阐明这种构效差异开展了一系列实验,结果表明,C3位的糖基有助于人参皂苷在体内更长时间的循环,并增强其对肿瘤的主动靶向能力<sup>[23]</sup>。PPD型人参皂苷与PPT型相比在抗糖基化、抑制血管紧张素转换酶、抗雄激素非依赖型前列腺癌等领域也表现出更强的作用效果。通过应用分子模拟对接实验初步揭示了潜在的构效差异机制:PPT型皂苷C6位的糖基增加了这些分子与靶蛋白之间的空间位阻,导致靶点亲和力显著低于PPD型皂苷<sup>[21,24-25]</sup>。

另外,达玛烷型皂苷C17位脂肪侧链上(C20-27)的结构修饰对其生物活性有着显著的影响。针 对阿尔茨海默病的治疗,Zhang等<sup>[26]</sup>利用转基因秀 丽隐杆线虫对17种人参皂苷进行活性筛选,研究发 现人参皂苷 Rk3 的作用效果显著强于人参皂苷 Rh1,而二者唯一的区别就是 Rk3 在 C20 位的羟基 脱水在C20 和 C21 位之间形成一个新的双键。Ma 等<sup>[27]</sup>发现,含有 C20-22 双键的稀有人参皂苷对 HL-60 和 Hep-G2 细胞系显示出强大的肿瘤细胞抑制作 用,IC50 值分别为 10.32、24.33 μmol/L。有报道指 出,人参皂苷插入生物膜中的取向受 C17 侧链上的 氧化还原程度和羟基位置的影响,在某些情况下, 消除C24-25位的双键可提高生物活性<sup>[28]</sup>。例如,通 过还原Rg3中C24-25位的双键,得到了化学稳定的 二氢人参皂苷Rg3(2H-Rg3),其显示出比Rg3更显 著的抗血小板聚集作用<sup>[29]</sup>。此外,将C24-25位双键 水合之后在C-25位置添加羟基可显著影响稀有人 参皂苷的药理活性与生物利用度,尤其在抗肿瘤方 面,一些C25-OH衍生物甚至比其原型化合物活性 强几十倍,可以作为非常有发展前景的抗肿瘤候选 药物<sup>[30]</sup>。本人课题组利用生物转化技术大量催化合 成了系列C25-OH稀有皂苷衍生物,其中包括新化 合物4个;对它们进行抗炎和心肌细胞保护的活性 筛选,初步总结了构效关系,进一步证实了C24-25 位双键水合对稀有人参皂苷活性的重要影响<sup>[31-34]</sup>。

最后,蒸制或酸水解引起的人参皂苷在C20位的脱糖基化通常会导致从20(S)-型向20(R)-型稀 有人参皂苷的差向异构化,如20(R)-Rg3、20(R)-Rh2 和20(R)-Rs3等<sup>[35]</sup>。针对同一药理模型,这些差向 异构体的生物活性往往差异较大,甚至会出现反向 结果。拿人参皂苷Rg3和Rh2的抗肿瘤研究举例, 针对不同的肿瘤细胞系和作用靶点,有的研究证明 S构型活性更强,有的研究则表明R型活性更 强<sup>[36-38]</sup>。一些研究者通过实验初步证明了,导致这 种差异化结果的主要原因是跟目标靶点结合口袋 的氨基酸残基排布和疏水性有关,但关于稀有皂苷 (S/R)差向异构体构效关系的研究目前没有得到具 有规律性的结果<sup>[39-41]</sup>。稀有人参皂苷的一般构效 关系见图1。



#### 2 稀有人参皂苷的酶催化制备研究进展

2.1 PPD型稀有人参皂苷的酶催化研究

人参皂苷Rg3是PPD型稀有人参皂苷的代表性化合物,也是第一个获批新药应用于临床辅助治疗

癌症的人参皂苷类药物,因此对于Rg3的制备一直 以来都是稀有人参皂苷酶催化领域的热点[42]。目前 可以作为底物进行人参皂苷Rg3制备的原型皂苷主 要有 Rb1、Rb2、Rc 和 Rb3,但无论选择哪种底物,均 需先将其转化为Rd,才能进一步生成Rg3。为了生 成人参皂苷Rd,Rb1、Rb2、Rc和Rb3需要分别将C20 外侧的糖基水解掉。然而,有别于人参皂苷Rb1在 C20外侧的葡萄糖基, Rb2、Rc和Rb3的C20外侧位 置分别为阿拉伯吡喃糖基、阿拉伯呋喃糖基和木糖 基。而自然界中能够水解以上糖苷键的酶相对葡萄 糖苷酶而言比较罕见,因此,人参皂苷Rb1是转化制 备Rg3最为常用的底物,其转化途径为:Rb1→Rd→ Rg3<sup>[43]</sup>。通过筛选不同的酶,一些研究者成功实现了 以Rb2和Rc为底物的20(S)-Rg3酶促转化。这些酶 相对于一般的葡萄糖苷酶,热稳定性普遍较强,可以 在90℃下保持酶的催化活性;并且反应专属性较 好,仅水解皂苷Rb2和Rc的C20末端糖苷键生成皂 苷Rd;通过进一步与葡萄糖苷酶联合应用,可以将 20(S)-Rg3的摩尔转化率提高到98.19%,显著降低 了稀有人参皂苷20(S)-Rg3的制备成本[44-45]。

一般而言,C3位的糖苷键相对于C20位更难水 解,这可能与C3所在的四环三萜骨架对糖苷酶进攻 该位点造成空间位阻所致。随着C3位外侧的糖基 水解之后,C20位糖基保持不变的难度就会越大。 例如,在人参皂苷Rb1生物转化的过程中,如果出现 了C3位糖苷键优先水解的情况,那么就会生成另外 2种稀有皂苷Gypenoside XVII(GypXVII)和Gypenoside LXXV(GypLXXV)。一些研究者利用来自 *Bifidobacterium dentium*的重组糖苷酶,将Rb1的C3 位外侧葡萄糖基水解以生成GypXVII,经过反应条 件优化后,摩尔转化率可以达到100%<sup>[46]</sup>。

然而,进一步将GypXVII的C3位剩余糖基进行 水解以生成GypLXXV却很难实现专属性转化,往 往伴随着C20位糖基的水解而生成F2或C-K<sup>[47-50]</sup>。

与人参皂苷 Rg3 相似, C-K 的酶催化过程也是 从人参皂苷 Rb1、Rb2 和 Rc开始,形成中间产物 Rd 之后,进一步水解完成的。区别在于, C-K 是由 Rd 水解掉C3位的两个葡萄糖基形成的,其主要的转化 途径为(Rb1、Rb2、Rc)→Rd→F2→C-K,其难度要 大于 Rd水解掉C20位的糖基生成 Rg3,因此C-K 摩 尔转化率一般为60%~80%<sup>[51]</sup>。为进一步提高 C-K 的转化率,一些研究者通过蛋白质工程策略对已知 的 β-糖苷酶进行定向进化,开发出耐高温的突变 酶,可以通过转化 Rb1、Rb2 和 Rc,实现100%的 C-K 转化率,展现出极高的工业化生产潜力<sup>[52-53]</sup>。从转 化速率上看, Rb1是 Rb2和 Rc的近2倍,这也说明 了,葡萄糖苷键相对阿拉伯糖苷键更易于水解。为 降低稀有人参皂苷 C-K的生产成本,研究者们尝试 利用人参总皂苷或者人参皂苷粗提物作为底物开 展酶转化研究,取得了一些有意义的成果。例如, Jeong 等<sup>[54]</sup>从 Aspergillus niger KACC 46495中提取 了高效胞外糖苷酶,通过羧甲基纤维素(CMC)诱导 增强其糖苷水解活性之后,可以在9h内将6.0g/L 的 PPD型人参皂苷混合物转化为2.8g/L C-K,摩尔 转化率达到80%,生产率为313 mg/(L·h)。

人参皂苷C-K的同分异构体Rh2也是一种极具 药用价值的稀有皂苷,主要是通过水解人参皂苷 Rg3的C3位外侧葡萄糖基或F2的C20位葡萄糖基 生成的。然而,以人参皂苷Rg3或F2为底物制备 Rh2的成本较高,当以人参皂苷Rb1为底物时,目前 发现的单一糖苷酶很难实现从Rb1→Rh2的专属反 应,往往从Rd开始分化,一部分生成F2和C-K,而 另一部分生成Rg3和Rh2<sup>[55]</sup>。应用组合酶法将能够 水解特定位点和特定数量糖基的糖苷酶进行理性 设计,可以实现人参皂苷Rh2的定向转化。该过程 主要分为两个阶段:首先,利用特定糖苷酶将Rb1和 Rd等上游皂苷转化为中间产物 Rg3;然后通过加热 使第一步的糖苷酶失活,再引入能够定向水解 Rg3 的 C3 位外侧糖基的糖苷酶,将 Rg3 完全转化为 Rh2。目前这种策略不仅仅应用在单体皂苷转化, 而且在 PPD 型皂苷混合物转化生成 Rh2 方面也取 得了良好的进展<sup>[56-57]</sup>。

除了以上酶之外,还有一些糖苷酶具有复杂的 底物选择范围或区域选择性,可以转化多种皂苷底 物生成不同的稀有人参皂苷。这些酶主要分为3种 情况:(1)针对不同皂苷的同一位点均可发生反应, 说明该酶的区域选择性较好且底物选择范围较宽, 可以针对不同生物活性的构效关系需求定向拓展化 学多样性<sup>[58]</sup>;(2)针对同一皂苷的不同位点均可发生 反应,说明该酶的底物选择性较强,但区域选择性较 差,可以用来做某种皂苷的结构修饰与衍生物制 备<sup>[59]</sup>;(3)针对不同皂苷的不同位点均可发生反应,说 明该酶是一种广谱的糖苷水解酶,适用于对纯度要 求不高的皂苷粗提物的生物催化<sup>[60-62]</sup>。PPD型稀有 人参皂苷酶催化制备路线图见图2,PPD型稀有皂苷 的酶催化相关参数见表2。

整体而言,PPD型稀有人参皂苷的酶转化研究



图2 PPD型稀有人参皂苷酶催化制备路线图

#### 表2 PPD型稀有皂苷的酶催化相关参数

| 稀有皂苷    | 催化酶  | 来源   | 反应条件  | 转化率                          | 转化途径   | 参考<br>文献 |
|---------|--|--|---|------------------------------|--|----------|
| Rg3     | β-葡萄糖苷酶  | Lactobacillus ginsenosidi-<br>mutans EMML 3041T      | рН 7.5、55 °С  | 74.6%                        | $Rb1 \rightarrow Rd \rightarrow Rg3$   | [43]     |
|         | β-木糖苷酶<br>Tpexyl3;β-葡萄糖<br>苷酶<br>Tpebgl3             | Thermotoga petrophila<br>DSM13995                    | рН 5.0 <sub>\</sub> 75 °С                             | 95%                          | Rb2/Rc→Rd→Rg3  | [44]     |
|         | β-糖苷酶 Tpebgl1/<br>Tpebgl3;α-L-阿拉<br>伯呋喃糖苷酶<br>Tt-Afs | Thermotoga petrophila 、<br>Thermotoga thermarum      | pH 5.0 ∖90 °C   | 98.19%                       | $Rc \rightarrow Rd \rightarrow Rg3$<br>$Rb1/Rb2 \rightarrow Rd \rightarrow Rg3$  | [45]     |
| GypXVII | β-葡萄糖苷酶  | Bifidobacterium dentium                              | рН 5.4 <sub>\</sub> 35 ℃                              | 100%                         | Rb1→GypXVII  | [46]     |
| GypLXXV | β-葡萄糖苷酶<br>BglG167b                                  | <i>Microbacterium</i> sp.<br>Gsoil 167               | рН 7.0、37 °С  | -                            | Rb1→GypXVII→<br>GypLXXV  | [47]     |
| F2      | β-葡萄糖苷酶  | Enterococcus gallinarum<br>GM2                       | рН 7.0、40 °С  | 45%                          | $Rb1 \rightarrow GypXVII/Rd \rightarrow F2$  | [48]     |
| C-K     | β-葡萄糖苷酶  | Terrabacter ginsenosidimutans<br>sp. nov. Gsoil 3082 | рН 7.0、37 °С  | _                            | Rb1→GypXVII→<br>GypLXXV→C-K  | [49]     |
|         | β-葡萄糖苷酶<br>BglAg-762                                 | Arachidicoccus ginsenosidi-<br>mutans sp. nov. BS20T | рН 7.5、50 °С  | _                            | Rb1→GypXVII→F2→<br>C-K   | [50]     |
|         | β-葡萄糖苷酶<br>GH3-1/GH3-2                               | Penicillium oxalicum                                 | -   | 60% ~<br>80%                 | Rb1/Rb2/Rc→C-K   | [51]     |
|         | β-糖苷酶  | Sulfolobus solfataricus                              | рН 4.5 ∖95 °С   | 97%                          | $Rc \rightarrow Rd \rightarrow F2 \rightarrow C-K$   | [52]     |
|         | β-葡萄糖苷酶  | Caldicellulosiruptor bescii                          | рН 5.5 <sub>\</sub> 80 °С                             | 100%                         | $(Rb1/Rb2/Rc) \rightarrow Rd \rightarrow F2 \rightarrow C-K$   | [53]     |
|         | 胞外糖苷酶  | Aspergillus niger KACC<br>46495                      | рН 5.0 、55 °С   | 80%                          | $\begin{array}{l} Rb1 \rightarrow Rd \rightarrow F2 \rightarrow C-K \\ Rb2 \rightarrow (Rd/C-O) \rightarrow (F2/C-Y) \rightarrow C-K \\ Rc \rightarrow (Rd/Compound Mc1, \\ C-Mc1) \rightarrow (F2/Compound Mc, C-Mc) \rightarrow C-K \end{array}$ | [54]     |
|         | β-葡萄糖苷酶  | Fomitella fraxinea                                   | рН 4.5 \45 °С   | -                            | $Rb1 \rightarrow Rd \rightarrow F2 \rightarrow C-K$  | [60]     |
|         | β-葡萄糖苷酶<br>Ginsenosidase Type-I                      | Aspergillus sp. agl-84                               | рН 5.0 <sub>\</sub> 45 °С                             | 63.3%                        | $Rd \rightarrow F2 \rightarrow C-K$  | [61]     |
|         | β-葡萄糖苷酶  | Armillaria mellea                                    | pH 4.0 ~ 4.5<br>C-K:45 ~<br>50 °C,C-Mc:<br>55 ~ 60 °C | C-Mc:<br>43%;<br>C-K:<br>48% | $Rc \rightarrow Rd \rightarrow F2 \rightarrow C-K$   | [59]     |
|         | Snailase   | _  | рН 5.5、50 °С  | -                            | Rb1/Rd→C-K<br>Rb2→C-K<br>Rc→C-K/F2→C-K   | [62]     |
|         | β-葡萄糖苷酶  | Penicillium decumbens                                | рН 4.0、60 °С  | -                            | $Rb1 \rightarrow Rd \rightarrow GypXVII \rightarrow F2$<br>$\rightarrow C-K$   | [55]     |

| 续表 2        |                                      |  |                            |        |  |          |  |
|-------------|--------------------------------------|--|----------------------------|--------|--|----------|--|
| 稀有皂苷        | 催化酶                                  | 来源   | 反应条件                       | 转化率    | 转化途径   | 参考<br>文献 |  |
| Rh2         | β-葡萄糖苷酶                              | Penicillium decumbens  | рН 4.0、60 °С               | -      | $Rg3 \rightarrow Rh2$  | [55]     |  |
|             | β-葡萄糖苷酶<br>BglSk、BglBX10、<br>Abf22-3 | Saccharibacillus kuerlensis  | pH 7.0 $37$ →<br>80→37 °C  | 100%   | $Rb1/Rc/Rd \rightarrow Rg3 \rightarrow Rh2$  | [56]     |  |
|             | β-葡萄糖苷酶<br>Bgp1/BglPm                | Paenibacillus mucilaginosus ;<br>Microbacterium esteraro-<br>maticum | рН 8.0 <sub>2</sub> 25 °С  | 68.32% | PPD型皂苷混合物→Rh2  | [57]     |  |
|             | β-半乳糖苷酶                              | Aspergillus oryzae   | рН 4.5 \50 °С              | 100%   | $Rb1 \rightarrow GypXVII$<br>$Rb2 \rightarrow C-O/Rc/Rd \rightarrow C-$<br>MC1/F2<br>$Rg3 \rightarrow Rh2$ | [58]     |  |
|             | Snailase                             | -  | рН 5.5 \50 °С              | -      | $Rg3 \rightarrow Rh2$  | [62]     |  |
| C-Y         | β-葡萄糖苷酶                              | Fomitella fraxinea   | рН 4.5 \45 °С              | -      | $Rb2 \rightarrow C-O \rightarrow C-Y$  | [60]     |  |
| C-Mx        | β-葡萄糖苷酶<br>Ginsenosidase<br>Type-I   | Aspergillus sp. agl-84   | рН 5.0 <sub>\</sub> 45 °С  | 63.3%  | $Rb3 \rightarrow C-Mx1 \rightarrow C-Mx$   | [61]     |  |
| C-Mc        | β-葡萄糖苷酶                              | Armillaria mellea  | pH 4.0 ~ 4.5<br>55 ~ 60 °C | 43%    | $Rc \rightarrow C-Mc1 \rightarrow C-Mc$  | [59]     |  |
| 20(S/R)-PPD | Snailase                             | -  | рН 5.5 50 °С               | -      | $Rg3 \rightarrow 20(S/R)-PPD$  | [62]     |  |

开展较为深入,几个主要的原型人参皂苷C3位和 C20位的糖基水解酶均有报道,考虑到单体皂苷的 成本较高,目前的研究以人参总皂苷或PPD型皂苷 混合物为底物进行复杂体系的酶催化为主要趋势, 以推进PPD型稀有人参皂苷的工业化开发和利用 为主要目的。

2.2 PPT型稀有人参皂苷的酶催化研究

PPD和PPT型皂苷在人参植物中的含量随季节 性变化的趋势相似。有意思的是,人参根部富含 PPT和PPD型皂苷,而地上部分(如叶、茎和花)主要 以PPD型皂苷为主<sup>[53]</sup>。尽管 PPT型和 PPD型皂苷 在结构上高度相似,仅在糖苷键原子和羟基位置上 有所区别,但是关于 PPT型皂苷的酶催化制备研究 相对 PPD型较少,可能是因为 PPT型皂苷中新增的 C6位糖苷键更难被水解。

在PPT型皂苷中,人参皂苷Rg2、Rh1和F1是研究最为深入的稀有皂苷成分。其中Rh1和F1是同分异构体,具有不同的葡萄糖基连接位置:Rh1的葡萄糖基连接在C6位,而F1的葡萄糖基连接在C20位。因此,同时在C6和C20位连接有葡萄糖基的人参皂苷Re和Rg1就成为了制备稀有人参皂苷F1或Rh1最常用的底物。从转化效果上看,利用Rg1转化生成F1只需要水解掉C20位的葡萄糖基,而从

Re生成F1则需要同时水解掉C6位外侧的鼠李糖 基和C20位的葡萄糖基,因此,以Rg1为底物催化制 备F1的效率要高得多,通过优化之后可以达到 100%的转化率<sup>[64]</sup>。反之,如果是以Re或者富含Re 的PPT型总皂苷为底物催化制备F1,转化效率会显 著下降,摩尔转化率很难超过75%<sup>[65-67]</sup>。

值得注意的是,当以人参皂苷 Re 为底物制备 Rh1的时候,虽然也会产生一定比例的 Rg2,但转化 途径通常为:Re→Rg1→Rh1,而不是 Re→Rg2→ Rh1。因为,虽然人参皂苷 Rg2与Rh1相比,仅仅是 在C6位糖链外侧多了1个鼠李糖,但能够直接水解 该鼠李糖生成Rh1的糖苷酶较为少见,尤其是能够 连续水解Re的C20位葡萄糖基和C6位末端的鼠李 糖的糖苷酶罕有报道。相对而言,稀有人参皂苷 Rg2连有两个糖基,且都在C6位,分别为近侧的葡 萄糖基和外侧的鼠李糖基。与其他PPT型人参皂 苷相比,人参皂苷 Re的结构与Rg2最为相似,仅在 C20位多了1个葡萄糖基。因此,关于稀有人参皂 苷 Rg2的制备研究均以人参皂苷 Re为底物开展的, 而人参皂苷 Rh1的酶工程底物主要来源于人参皂苷 Rg1或 Rf<sup>62,68-69</sup>。

一般而言,提高反应温度可以加快糖苷键水解的进程,尤其对于PPT型皂苷C6位这种难于水解的

糖苷键,耐热酶的筛选更为重要。这些耐热糖苷酶 主要来源于嗜热微生物,用于高效分解环境中的复 杂碳水化合物,为微生物自身代谢提供能量。它们 之所以能在高温下保持活性,主要归因于其分子结 构的高度优化,包括更多的盐桥和氢键、更紧密的 三级结构、疏水性核心的增强以及柔性区域的减 少;此外,其亚基间的强结合、表面电荷分布的优化 以及减少疏水表面暴露也大大提升了热稳定性<sup>[70]</sup>。 目前,研究者们发现的耐热糖苷酶不仅可以在85 ℃ 的高温下实现 Re→Rg2(摩尔转化率100%)和 Rg1 → Rh1(摩尔转化率95.6%)的高效转化,甚至可以 将 Rf和 Rg1转化为苷元 PPT [摩尔转化率71%,生产 率283 mg/(L·h)],进一步拓展了PPT型稀有皂苷的制备途径<sup>[71-72]</sup>。PPT型稀有人参皂苷酶催化制备路线图见图3,PPT型稀有皂苷酶催化相关参数见表3。

当前关于稀有人参皂苷酶催化制备的研究主要集中在利用不同的糖苷酶水解PPD型皂苷C3、C20位和PPT型皂苷C6、C20位置的糖苷键,以改变糖链结构,获得具有更高生物活性的物质。尽管已有多种来源的糖苷酶可用于这一目的,但由于部分酶对目标位点的立体选择性较低或催化效率不足,使其在工业化生产中的实际应用受到限制。因此,挖掘天然存在的、具有多样化底物选择性和催化活



Rh1
图3 PPT型稀有人参皂苷酶催化制备路线图

| 稀有皂苷 | 催化酶          | 来源   | 反应条件                      | 转化率                    | 转化途径                                | 参考<br>文献 |
|------|--------------|--|---------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------|
| F1   | β-葡萄糖苷酶BglSk | Sanguibacter keddieii                          | рН 8.0 <u>25</u> °C       | 100%                   | $Rg1 \rightarrow F1$                | [64]     |
|      | 6-O-糖苷酶      | Aspergillus sp. g383                           | рН 5.0、45 °С              | 75%                    | $Re \rightarrow Rg1 \rightarrow F1$ | [65]     |
|      | Cellulase KN | Aspergillus niger                              | рН 5.0 \50 °С             | -                      | PPT型人参皂苷粗提物<br>→F1                  | [66]     |
|      | β-葡萄糖苷酶BgpA  | Terrabacter ginsenosidi-<br>mutans Gsoil 3082T | рН 7.5 <sub>37</sub> °С   | -                      | PPT皂苷混合物→F1                         | [67]     |
| Rh1  | β-葡萄糖苷酶BGL1  | Aspergillus niger                              | рН 7.5 ∖37 °С             | -                      | Rf→Rh1                              | [68]     |
|      | Snailase     | -  | рН 5.5 \50 °С             | -                      | Rf→Rh1                              | [62]     |
|      | β-葡萄糖苷酶BglQM | <i>Mucilaginibacter</i><br>sp. strain QM49     | рН 8.0、30 °С              | -                      | $Rg1 \rightarrow -Rh1$              | [69]     |
|      | β-葡萄糖苷酶BGL3T | <i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069T          | рН 5.5 <sub>85</sub> °С   | Re:96.3%;<br>Rg1:95.6% | $Rg1 \rightarrow Rh1$               | [71]     |
|      | β-葡萄糖苷酶      | Thermotoga neapolitana<br>DSM 4359             | рН 5.0 \85 °С             | Re:100%;<br>Rf:71%     | Rf→Rg1                              | [72]     |
| Rg2  | β-葡萄糖苷酶BglQM | <i>Mucilaginibacter</i> sp.<br>strain QM49     | рН 8.0、30 °С              | _                      | Re→-Rg2                             | [69]     |
|      | β-葡萄糖苷酶BGL3T | Thermotoga thermarum<br>DSM 5069T              | рН 5.5 <sub>\</sub> 85 °С | -                      | Re→Rg2                              | [71]     |
|      | β-葡萄糖苷酶      | Thermotoga neapolitana<br>DSM 4359             | рН 5.0 \85 °С             | -                      | Re→Rg2                              | [72]     |

表3 PPT型稀有皂苷的酶催化相关参数

性的糖苷酶,同时深入研究其在底物生物转化过程 中的机制,对于推动稀有人参皂苷的生物修饰技术 和合成工程酶的开发至关重要。

#### 3 稀有人参皂苷的代谢工程研究进展

随着合成生物学技术的发展,利用微生物细胞 工厂合成稀有人参皂苷已成为一种有效方法,并在 近年来取得了显著进展,实现了包括C-K、Rh2、Rg3 和F2在内的多种稀有人参皂苷的从头合成。人参 皂苷基本化学骨架生物合成的途径已经非常明晰, 并且在其他文献中有详细的描述,其中达玛烷是稀 有人参皂苷的主要骨架类型[73-75]。在达玛烷骨架形 成后,通过细胞色素 P450(CYP450)和糖基转移 酶(GT)的催化生成各种不同的稀有人参皂苷(见 图 4)。在这个过程中,CYP450主要负责对骨架特 定位点进行氧化修饰,为连接特定糖基奠定基础<sup>[76]</sup>; 然后再通过GT催化特定位点羟基的糖苷化,该过 程是人参皂苷化学多样性的决定性步骤,也是稀有 皂苷合成途径中的最后一步和关键限速反应[77]。为 构建相关的生物合成工程菌,首先要打造能够高效 合成稀有人参皂苷基本骨架的底盘。在这些生物合 成底盘菌株中,酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae) 是1种稳定存在于单倍体和二倍体形式的单细胞真 核生物,其遗传操作技术成熟且相对简单,是代谢 工程研究中常用的模式生物[78-81]。同时,酿酒酵母 也被认为是萜类化合物合成的理想底盘细胞,这主要归因于其甲戊二羟酸(MVA)途径与萜类化合物的合成途径具有高度相似性。因此,关于稀有人参皂苷代谢工程的研究主要是以酿酒酵母作为底盘菌株开展的。

```
3.1 PPD型稀有人参皂苷的代谢工程研究进展
3.1.1 苷元 PPD 的代谢工程研究 PPD 是 PPD 型稀
有人参皂苷的基本骨架,也是稀有人参皂苷生物合
成发起的基石。在构建用于PPD生产的酿酒酵母
工程菌株时,首先需要引入达玛烷二醇合成酶
(Dammarenediol Synthase, DDS)和原人参二醇合成
酶(Protopanaxadiol Synthase, PPDS),以重构人参皂
苷的生物合成途径。有研究表明,通过在酿酒酵母
中异源表达来源于人参的PgDDS和PgPPDS,以及
拟南芥的AtCPR1,可以实现PPD的生物合成。同
时,过表达法尼基焦磷酸合成酶(FPS)、鲨烯合成酶
(SS)和鲨烯环氧化酶(SE)以增强前体供应,进而对
PgPPDS进行密码子优化提高其酶活性,可以将
PPD的产量提升至1189 mg/L<sup>[82]</sup>。通过优化酿酒酵
母中的MVA途径,例如对3-羟基-3-甲基戊二酰辅
酶A还原酶(HMGR)进行截短(tHMGR),可显著提
高萜类化合物(如鲨烯)的产量[83-84]。采用类似的代
谢工程策略,将来自不同植物的密码子优化的
DDS、PPDS、原人参三醇合成酶(Protopanaxadiol
Synthase, PPTS)和AtCPR1引入过表达tHMGR、SS
```



FPS:法尼基焦磷酸合成酶;SS:鲨烯合酶;SQ:鲨烯环氧化酶;DDS:达玛烯二醇合成酶;PPDS:原人参二醇合成酶;PPTS:原人 参三醇合成酶;UGTs:UDP-糖基转移酶

#### 图4 稀有人参皂苷的常规生物合成途径

和 SE 的酿酒酵母菌株中,可同时合成 PPD 和 PPT<sup>[85]</sup>。然而,这些工程菌株中 PPDS 的代谢通量较低,严重限制了 PPD 的转化效率,这成为影响 PPD 产量的关键因素之一。通过去除 PgPPDS 的跨膜区 域,并与 AtCPR1 融合后转入工程酵母菌株,可有效 提高 PPD 的转化效率,使达玛烷二醇(DM)到 PPD 的转化率达到 96.8%<sup>[86]</sup>。

需要注意的是,在DM转化为PPD的过程中会 产生活性氧自由基(ROS),其高积累会降低酵母细 胞活力。尤其是当用乙醇替代葡萄糖作为乙酰辅 酶A(acetyl-CoA)供体时,ROS的增加使酵母对乙 醇更敏感,在乙醇和ROS的双重应激下,酵母细胞 活性进一步下降<sup>[87]</sup>。转录因子YAP1可促使酵母产 生特定抗氧化剂,保护细胞免受ROS毒性影响,并 提高其对ROS的耐受性<sup>[88-89]</sup>。因此,表达YBP1可 帮助酵母消耗生长过程中产生的ROS,并通过表达 与细胞壁完整性相关的基因SSD1提高酵母对乙醇 的耐受性。经过上述代谢工程改造后的菌株,其 PPD的最终产量达到了(4.25±0.18)g/L<sup>[90]</sup>。

在MVA生源合成途径中,从acetyl-CoA到2,3-环氧鲨烯的合成需要10种酶的依次催化。通过模 块化工程策略优化 MVA 途径中的所有相关基因, 可促进 acetyl-CoA 的大量积累,使工程菌株中的 PPD产量达到8.09 g/L<sup>[91]</sup>。基于相同的模块化工程 策略,通过引入PPD后续合成所需的基因(包括 synPgDDS、synPgPPDS、synPgCPR1),并增加 synPgPPDS的拷贝数, PPD的产量可以进一步提高至 11.02 g/L<sup>[92]</sup>。此外,利用酵母细胞中代谢反应常集 中于特定细胞器的特点,通过过表达与过氧化物酶 体生成相关的基因(PEX34、PEX11和ATG3),增加 过氧化物酶体的拷贝数和膜面积,将PPD生物合成 途径重构于过氧化物酶体中,从而将PPD产量提高 了约78%[93]。除了上述代谢工程方法,还可以通过 优化 CYP450 酶的辅因子 NADPH 的供应,改善 CYP450的催化效率,从而进一步提高 PPD 的 产量[94]。

3.1.2 不同 PPD 型稀有人参皂苷的代谢工程研究 通过在高产 PPD 的工程菌株中引入对应的尿苷二

磷酸-糖基转移酶(UDP-glycosyltransferases, UGTs), 可实现不同PPD型稀有人参皂苷的合成,但在此过 程中PPD合成前体的优化必不可少。例如,酿酒酵 母中的磷酸酶LPP1负责将FPP转化为法尼醇,其失 活可减少 FPP 的消耗。将密码子优化的来源于三七 的C-K合酶基因SynPn3-29与尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG)合成途径基因整合到高产PPD酵母菌株的 LPP1基因位点,通过破坏LPP1基因失活该合成酶, 从而将更多代谢流引导至C-K生物合成途径,最终 使C-K产量达到1.17 g/L<sup>[95]</sup>。此外,UDPG供应不足 是限制皂苷高产的普遍问题,增加UDPG合成是1 种重要的策略。PGM2和UGP1分别编码磷酸葡萄 糖变位酶2和UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶1,共 同参与UDPG的合成<sup>[96]</sup>。在高产PPD的菌株中过表 达PGM2和UGP1,并以甘油和乙醇为碳源,可以使 C-K产量提高到(1.70±0.16)g/L<sup>[97]</sup>。除了增强 UDPG的供应,降低 UDPG 的消耗也可以进一步提 高C-K的产量。Wang等<sup>[98]</sup>通过删除FKS1、GLC3和 ALG5基因,显著降低UDPG在细胞壁合成、糖原代 谢和蛋白质糖基化中的消耗,优化了UDPG的代谢 流向 C-K 的糖基化途径, 使 C-K 产量从 3.98 g/L 提 高至 5.74 g/L。此外,细胞器分区化策略也可提高 C-K的产量。Shi等1991利用酵母PLN1蛋白将原定位 于内质网的PPDS 酶靶向到脂质体,将中间体达玛 烷二醇到 PPD 的转化效率从 17.4% 提高至 86%;然 后通过调控脂质体的体积和形态,优化中间体的储 存和酶促反应环境,使C-K的产量在5L发酵罐中 达到5g/L,是传统内质网策略的5倍。

通过在产 PPD 的酿酒酵母中引入糖基转移酶 UGTPg45,可以将PPD的C3位羟基进行糖基化而 获得稀有人参皂苷 Rh2。然而,由于 UGTPg45 催化 效率较低, Rh2的产量仅为1.45 μmol/g(细胞干质 量,DCW)<sup>[100]</sup>。随后,通过挖掘三七转录组数据库, 发现了1种催化效率更高的糖基转移酶UGTPn17。 将其引入PPD生产菌株,并以乙醇为发酵碳源,Rh2 的产量提升至354.69 mg/L<sup>[101]</sup>。一些研究者发现,来 自酿酒酵母的糖基转移酶UGT51可催化PPD转化 为Rh2,但野生型的菌株转化效率较低。利用基于 结构信息的半理性蛋白工程策略,获得了突变体 M7-1,其对 PPD 的转化率达到 100%。引入突变酶 后,通过减少Rh2降解并增强UDPG前体供应,使 Rh2的产量从 0.0032 mg/g DCW 提高到 0.39 mg/g DCW。进一步通过基因拷贝数增加、启动子工程和 代谢工程优化,最终将Rh2的产量提高至2.25g/L,

较初始菌株提升了900倍以上[102-103]。

稀有人参皂苷 Rh2的C3位葡萄糖链可通过进 一步的糖基化修饰生成另一种稀有人参皂苷 Rg3。 例如,在产 PPD 的酿酒酵母菌株基因组中整合 PgUGT74AE2和PgUGT94Q2两种UGT基因,可实 现Rg3的生产,产量约为1.3 mg/L<sup>[104]</sup>。通过人参转 录组数据库,鉴定出UGTPg45基因,将其整合到酿 酒酵母底盘后生成 Rg3的产量为3.49 μmol/g DCW<sup>[100]</sup>。然而,UGT催化效率低下是限制 Rg3产 量的主要原因。从三七的基因组和转录组数据中 筛选得到一种催化效率较高的UGT PnUGT33。将 该酶引入酿酒酵母,并结合UDPG合成相关基因的 表达,使 Rg3的产量显著提高至51 mg/L<sup>[105]</sup>。

PPD的C3和C20位羟基可通过糖基化修饰生成稀有人参皂苷F2。通过CRISPR/Cas9系统将DDS、PpDS、PgUGT74AE2、UGTPg1和AtCPR2整合到酿酒酵母基因组中,成功实现了F2的生物合成,但初始产量较低,仅为1.2 mg/L。进一步研究发现,敲除HXK2基因可以增强糖酵解向MVA途径的代谢流量,从而促进外源三萜类化合物的生物合成;过表达转录激活因子HAC1可以提高外源酶的表达水平,使F2的产量达到原始菌株的1.9倍;优化CYP450还原酶CPR的表达,提升了达玛烷二醇到PPD的转化效率,突破F2合成的限速步骤;然后敲低广谱葡萄糖苷酶EGH1的表达,减少了其对F2的C3糖基的水解作用。通过这些代谢工程策略相结合,将F2的最终产量提高至21.0 mg/L<sup>[106]</sup>。

#### 3.2 PPT型稀有人参皂苷的代谢工程研究进展

PPD在CYP716A53v2的催化下可合成PPT,随 后通过UGTs进行糖基化修饰以合成人参皂苷 PPT 型皂苷。通过在酿酒酵母中异源表达DDS、 CYP716A47、CYP716A53v2和AtCPR1,可实现PPT 的生产[107]。进一步的蛋白质工程策略和半理性设 计显著提高了CYP716A53v2的特异性和催化活性。 在高产PPD的酵母底盘菌株中引入该酶,使PPT的 产量超过 5.0 g/L<sup>[108]</sup>。Wei 等<sup>[109]</sup>通过对人参转录组 文库中潜在的UGTs进行筛选,挖掘出两个能够参 与PPT型稀有皂苷生物合成的UGTs——UGTPg1 和UGTPg100。将UGTPg1引入产PPT的酵母菌 株,可对PPT的C20位羟基进行糖基化修饰,生成稀 有人参皂苷F1;而UGTPg100可对PPT的C6位羟基 进行糖基化修饰,生成稀有人参皂苷Rh1。为进一 步提升F1和Rh1的产量,作者通过同源模拟技术和 点突变验证发现了影响这两种酶催化活性的关键

氨基酸残基,并对其进行了定向进化,最终将人参 皂苷F1和Rh1的产量分别提高到42.1 mg/L和 92.8 mg/L的规模。以UDP-鼠李糖为糖基供体,通 过对人参皂苷Rh1的C6位葡萄糖链进行进一步糖 基化修饰,可生成另一种PPT型稀有人参皂苷Rg2。 Li等<sup>[110]</sup>在酵母菌株中引入了PgDDS、CYP716A47、 CYP716A53v2和PgUGT71A54,以及从人参转录组 数据中鉴定的鼠李糖基转移酶基因PgUGT94,通过 引入来源于拟南芥的AtRHM2,实现了将UDPG转 化为UDP-鼠李糖的生物合成路径,最终在酵母中 重构了Rg2的生物合成途径。为了进一步提高Rg2 的产量,研究者对synPgUGT94进行了关键位点的 氨基酸突变,并在酵母菌株中引入了突变体,同时 增加了PgUGT71A54的基因拷贝数。在代谢工程 策略的辅助发酵中,Rg2的最终产量达到1.3 g/L。

利用代谢工程的手段制备稀有人参皂苷的核心 是能够在皂苷骨架上不同位点加上特定种类和数量 的糖基。因此,挖掘与稀有人参皂苷相关的UGT基 因并提高其催化效率是提升微生物细胞工厂生产能 力的关键。目前大多数应用的UGTs来自人参属植 物,但其他植物和微生物中也存在大量未被开发的 UGT基因。通过高通量测序技术和生物信息学深 入分析植物和微生物的基因组、转录组和蛋白质组 数据,有望发现更多具有潜力的UGTs。基于定量质 谱和荧光的高通量酶活性检测技术,以及其他高通 量筛选方法,可快速检测酶活性并高效筛选优质 UGTs。此外,借助人工智能技术,对稀有人参皂苷 UGTs的晶体结构进行同源建模和活性口袋分析,结 合理设计和结构修饰,可显著提高其催化效率。

#### 4 小结与展望

当前酶催化和代谢工程的研究进展为稀有人 参皂苷的高效工业化生产提供了重要的参数和技 术支持,但目前仍存在一些需要进一步解决的问 题。从酶催化角度而言,面临的主要挑战包括:糖 苷酶对糖基位置的特异性和底物适用性不足,导致 副产物生成或转化率低,同时部分关键糖基位点的 水解难度较大进一步降低了效率;某些糖苷酶在高 温、高pH等工业化条件下稳定性不足,且酶的高成 本和难以回收限制了其大规模应用。此外,用于转 化的主流人参皂苷前体来源有限且提取成本高,而 稀有人参皂苷的结构与药理活性关系研究尚不充 分,也为工艺优化带来理论上的局限性。代谢工程 方面存在的问题主要有:底物供应不足是高效生产 的重要瓶颈,需要通过增强供应和减少消耗来提升 产量;代谢通量的不合理分配会导致资源浪费并阻 碍目标产物的积累;合成路径涉及多步酶促反应, 路径优化不足和工程菌株设计的局限性进一步限 制了生产效率。未来的研究方向应集中在以下几 方面:开发更多具有高特异性和高转化效率的工程 酶,进一步提升稀有人参皂苷的产量与纯度;应用 基因工程和蛋白质工程技术优化糖苷酶的结构与 功能,以满足不同稀有人参皂苷的产业化需求;利 用合成生物学手段构建更加精准的代谢调控网络; 通过细胞器分区化和动态代谢流量控制优化代谢 通路;进一步开发智能化发酵技术以实现过程自动 化和生产高效化。通过这些改进,不仅能实现稀有 人参皂苷的高效绿色生产,还可为其他复杂天然产 物的生物合成提供技术借鉴。

#### 参考文献:

- [1] 李耿, 王华, 董政起, 等. 中国人参产业发展现状及趋势分析[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(17): 4818-4828.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [3] HOU M, WANG R, ZHAO S, et al. Ginsenosides in *Panax* genus and their biosynthesis[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11 (7): 1813-1834.
- [4] YANG J L, HU Z F, ZHANG T T, et al. Progress on the studies of the key enzymes of ginsenoside biosynthesis[J]. Molecules, 2018, 23(3): 589.
- [5] NIU X N, LUO W, LV C N, et al. Research progress on naturally-occurring and semi-synthetic ocotillol-type ginsenosides in the genus Panax L. (Araliaceae)[J]. Chin J Nat Med, 2021, 19(9): 648-655.
- [6] PIAO X, ZHANG H, KANG J P, et al. Advances in saponin diversity of Panax ginseng[J]. Molecules, 2020, 25: 3452.
- [7] PAN W, XUE B, YANG C, et al. Biopharmaceutical characters and bioavailability improving strategies of ginsenosides[J]. Fitoterapia, 2018, 129: 272-282.
- [8] ZHAO M, XIAO Y, CHANG Y, et al. Methanol-involved heterogeneous transformation of ginsenoside Rb1 to rare ginsenosides using heteropolyacids embedded in mesoporous silica with HPLC-MS investigation[J]. J Ginseng Res, 2024, 48(4): 366-372.
- [9] FAN W, FAN L, WANG Z, et al. Rare ginsenosides: a unique perspective of ginseng research[J]. J Adv Res, 2024, 66: 303-328.
- [10] CAO L, WU H, ZHANG H, et al. Highly efficient production of diverse rare ginsenosides using combinatorial biotechnology[J]. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(6): 1615-1627.

- [11] LI W, WU X, WU M, et al. Ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to ion mobility quadrupole timeof-flight mass spectrometry profiling and unveiling the transformation of ginsenosides by the dual conditions of citric acid and high-pressure steaming[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2022, 36(20): e9363.
- [12] EOM S J, KIM K T, PAIK H D. Microbial bioconversion of ginsenosides in Panax ginseng and their improved bioactivities[J]. Food Rev Int, 2018, 34(7): 698-712.
- [13] LIU Z, LI J X, WANG C Z, et al. Microbial conversion of protopanaxadiol-type ginsenosides by the edible and medicinal mushroom Schizophyllum commune: a green biotransformation strategy[J]. ACS Omega, 2019, 4(8): 13114-13123.
- [14] HU Y, LI Y, CAO Y, et al. Advancements in enzymatic biotransformation and bioactivities of rare ginsenosides: a review[J]. J Biotechnol, 2024, 392: 78-89.
- [15] LIU X, ZHANG Z, LIU J, et al. Ginsenoside Rg3 improves cyclophosphamide-induced immunocompetence in Balb/c mice[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 98-111.
- [16] LI M, MA M, WU Z, et al. Advances in the biosynthesis and metabolic engineering of rare ginsenosides[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2023, 107(11): 3391-3404.
- [17] NIELSEN J. Yeast systems biology: model organism and cell factory[J]. Biotechnol J, 2019, 14(9): e1800421.
- [18] CHOPRA P, CHHILLAR H, KIM Y J, et al. Phytochemistry of ginsenosides: recent advancements and emerging roles[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023,63(5): 613-640.
- [19] QI L W, WANG C Z, YUAN C S. American ginseng: potential structure-function relationship in cancer chemoprevention[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(7): 947-954.
- [20] LUO B Y, JIANG J L, FANG Y F, et al. The effects of ginsenosides on platelet aggregation and vascular intima in the treatment of cardiovascular diseases: from molecular mechanisms to clinical applications[J]. Pharmacol Res, 2020, 159: 105031.
- [21] ALI M Y, JANNAT S, RAHMAN M M. Ginsenoside derivatives inhibit advanced glycation end-product formation and glucose-fructose mediated protein glycation in vitro via a specific structure-activity relationship[J]. Bioorg Chem, 2021, 111: 104844.
- [22] POPOVICH D G, KITTS D D. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line[J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 406(1): 1-8.
- [23] CHEN C, XIA J X, REN H W, et al. Effect of the structure of ginsenosides on the in vivo fate of their liposomes[J]. Asian J Pharm Sci, 2022, 17(2): 219-229.
- [24] LI W, LIU Y, ZHANG J W, et al. Anti-androgenindependent prostate cancer effects of ginsenoside metabo-

lites in vitro: mechanism and possible structure-activity relationship investigation[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(1): 49-57.

- [25] CHEN R J Y, CHUNG T Y, LI F Y, et al. Effect of sugar positions in ginsenosides and their inhibitory potency on Na+/K+-ATPase activity[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(1): 61-69.
- [26] ZHANG M, QIAN F, LIU Q L, et al. Evaluation of structure-activity relationships of ginsenosides against amyloid β-induced pathological behaviours in transgenic *Caenorhabditis elegans*[J]. RSC Adv, 2017, 7(64): 40095-40104.
- [27] MA L Y, ZHOU Q L, YANG X W. New SIRT1 activator from alkaline hydrolysate of total saponins in the stemsleaves of *Panax ginseng*[J]. Bioorgan Med Chem Lett, 2015, 25(22): 5321-5325.
- [28] ATTELE A S, WU J A, YUAN C S. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions[J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58(11): 1685-1693.
- [29] LEE W M, KIM S D, PARK M H, et al. Inhibitory mechanisms of dihydroginsenoside Rg3 in platelet aggregation: critical roles of ERK2 and cAMP[J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(11): 1531-1536.
- [30] QU F Z, ZHAO C, CAO J Q, et al. One-pot synthesis, anti-tumor evaluation and structure-activity relationships of novel 25-OCH3-PPD derivatives[J]. Medchemcomm, 2017, 8(9): 1845-1849.
- [31] SUI X, LIU J, XIN Y, et al. Highly regioselective biotransformation of ginsenoside Rg1 to 25-OH derivatives of 20 (S/R)-Rh1 by *Cordyceps sinensis*[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2020, 30(21): 127504.
- [32] LIU J, XIN Y, QIU Z, et al. Cordyceps sinensis-mediated biotransformation of notoginsenoside R1 into 25-OH-20 (S/R)-R2 with elevated cardioprotective effect against DOXinduced cell injury[J]. RSC Adv, 2022, 12(21): 12938-12946.
- [33] WANG W, LIU J, XIN Y, et al. Highly regioselective bioconversion of ginsenoside Re into 20(S/R)-Rf2 by an optimized culture of *Cordyceps sinensis*[J]. New J Chem, 2020, 44: 14005-14014.
- [34] LIU J, XIN Y, QIU Z, et al. Bioconversion of ginsenoside Rf into its hydrated derivative with elevated antiinflammatory effect by a highly specific biocatalytic system of *Cordyceps sinensis*[J]. Chem Biodivers, 2023, 20(4): e202200421.
- [35] WANG C, LIU J, DENG J, et al. Advances in the chemistry, pharmacological diversity, and metabolism of 20(R) ginseng saponins[J]. J Ginseng Res, 2020, 44(1): 14-23.
- [36] CHEONG J H, KIM H, HONG M J, et al. Stereoisomerspecific anticancer activities of ginsenoside Rg3 and Rh2

- [37] LV Q, RONG N, LIU L J, et al. Antitumoral activity of (20R)- and (20S)-ginsenoside Rh2 on transplanted hepatocellular carcinoma in mice[J]. Planta Med, 2016, 82(8): 705-711.
- [38] LI G, ZHANG X X, LIN L, et al. Preparation of ginsenoside Rg3 and protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells[J]. J Chem-Ny, 2014, 2014(4): 1-6.
- [39] KWOK H H, GUO G L, LAU J K, et al. Stereoisomers ginsenosides-20(S) -Rg and -20(R) -Rg differentially induce angiogenesis through peroxisome proliferatoractivated receptor-gamma[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83 (7): 893-902.
- [40] KANG D I, LEE J Y, YANG J Y, et al. Evidence that the tertiary structure of 20(S)-ginsenoside Rg(3) with tight hydrophobic packing near the chiral center is important for Na(+) channel regulation[J]. Biochem Bioph Res Comm, 2005, 333(4): 1194-1201.
- [41] YANG Q, WANG N, ZHANG J, et al. In vitro and in silico evaluation of stereoselective effect of ginsenoside isomers on platelet P2Y(12) receptor[J]. Phytomed, 2019, 64: 152899.
- [42] WANG Z Z, KONG L L, CHEN N H. Ginsenoside Rg3. In: Natural small molecule drugs from plants[M]. Springer, Singapore, 2018: 509-514.
- [43] SIDDIQI M Z, SRINIVASAN S, PARK H Y, et al. Exploration and characterization of novel glycoside hydrolases from the whole genome of Lactobacillus ginsenosidimutans and enriched production of minor ginsenoside Rg3(S) by a recombinant enzymatic process[J]. Biomolecules, 2020, 10 (2): 288.
- [44] ZHANG S, XIE J, ZHAO L, et al. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable β-xylosidase from *Thermotoga petrophila* and cooperated transformation of ginsenoside extract to ginsenoside 20(S)-Rg3 with a β-glucosidase[J]. Bioorg Chem, 2019, 85: 159-167.
- [45] ZHANG S, LUO J, XIE J, et al. Cooperated biotransformation of ginsenoside extracts into ginsenoside 20(S)-Rg3 by three thermostable glycosidases[J]. J Appl Microbiol, 2020, 128(3): 721-734.
- [46] ZHOU K, ZHANG Y, ZHOU Y, et al. Production of gypenoside XVII from ginsenoside Rb1 by enzymatic transformation and their anti-inflammatory activity in vitro and in vivo[J]. Molecules, 2023, 28(19): 7001.
- [47] CUI C H, KIM D J, JUNG S C, et al. Enhanced production of gypenoside LXXV using a novel ginsenosidetransforming  $\beta$ -glucosidase from ginseng-cultivating soil

bacteria and its anti-cancer property[J]. Molecules, 2017, 22(5): 844.

- [48] YAN C, HAO C, DONG W, et al. Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside F2 by recombinant β-glucosidase from rat intestinal *Enterococcus gallinarum*[J]. Biotechnol Bioprocess Eng, 2021, 26(6): 968-975.
- [49] AN D S, CUI C H, LEE H G, et al. Identification and characterization of a novel *Terrabacter ginsenosidimutans* sp. nov. β-glucosidase that transforms ginsenoside Rb1 into the rare gypenosides XVII and LXXV[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(17): 5827-5836.
- [50] SIDDIQI M Z, SHAFI S M, IM W T. Complete genome sequencing of *Arachidicoccus ginsenosidimutans* sp. nov., and its application for production of minor ginsenosides by finding a novel ginsenoside-transforming β-glucosidase [J]. RSC Adv, 2017, 7(74): 46745-46759.
- [51] GAO J, WANG J, CUI J, et al. Purification and characterization of two novel β-glucosidases from *Penicillium* oxalicum and their application in bioactive ginsenoside production[J]. Biocatal Biotransformation, 2014, 32(4): 199-207.
- [52] CHOI J H, SHIN K C, OH D K. An L213A variant of βglycosidase from *Sulfolobus solfataricus* with increased α-L-arabinofuranosidase activity converts ginsenoside Rc to compound K[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191018.
- [53] SHIN K C, KIM T H, CHOI J H, et al. Complete biotransformation of protopanaxadiol-type ginsenosides to 20-O-βglucopyranosyl-20(S) -protopanaxadiol using a novel and thermostable β-glucosidase[J]. J Agr Food Chem, 2018, 66 (11): 2822-2829.
- [54] JEONG E B, KIM S A, SHIN K C, et al. Biotransformation of protopanaxadiol-type ginsenosides in Korean ginseng extract into food-available compound K by an extracellular enzyme from *Aspergillus niger*[J]. J Microbiol Biotechnol, 2020, 30(10): 1560.
- [55] KIM S Y, LEE H N, HONG S J, et al. Enhanced biotransformation of the minor ginsenosides in red ginseng extract by *Penicillium decumbens* beta-glucosidase[J]. Enzym Microb Technol, 2022, 153: 109941.
- [56] SIDDIQI M Z, XIMENES H A, SONG B K, et al. Enhanced production of ginsenoside Rh2(S) from PPD-type major ginsenosides using BglSk cloned from *Saccharibacillus kuerlensis* together with two glycosidase in series[J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(8): 4668-4676.
- [57] CAO L, WU H, ZHANG H, et al. Highly efficient production of diverse rare ginsenosides using combinatorial biotechnology[J]. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(6): 1615-1627.
- [58] KIM Y S, KIM D Y, KANG D W, et al. Hydrolysis of the outer  $\beta$ -(1, 2)-d-glucose linkage at the C-3 position of

ginsenosides by a commercial  $\beta$ -galactosidase and its use in the production of minor ginsenosides[J]. Biocatal Biotransformation, 2019, 37(1): 53-58.

- [59] UPADHYAYA J, YOON M S, KIM M J, et al. Purification and characterization of a novel ginsenoside Rc-hydrolyzing β-glucosidase from Armillaria mellea mycelia[J]. AMB Express, 2016, 6: 1-13.
- [60] KIM D W, LEE W J, GEBRU Y A, et al. Production of minor ginsenosides C-K and CY from naturally occurring major ginsenosides using crude β-glucosidase preparation from submerged culture of *Fomitella fraxinea*[J]. Molecules, 2021, 26(16): 4820.
- [61] YUE H, LIU C, HAN Y, et al. Preparation of minor ginsenosides C-K and C-Mx from protopanaxadiol ginsenosides of American ginseng leaves by an enzyme from *Aspergillus* sp. agl-84 strain[J]. Process Biochem, 2021, 103: 50-59.
- [62] FAN J, ZHANG M, AI Z, et al. Highly regioselective hydrolysis of the glycosidic bonds in ginsenosides catalyzed by snailase[J]. Process Biochem, 2021, 103: 114-122.
- [63] KIM D, KIM M, RANA G S, et al. Seasonal variation and possible biosynthetic pathway of ginsenosides in Korean ginseng *Panax ginseng Meyer*[J]. Molecules, 2018, 23(7): 1824.
- [64] KIM J K, CUI C H, YOON M H, et al. Bioconversion of major ginsenosides Rg1 to minor ginsenoside F1 using novel recombinant ginsenoside hydrolyzing glycosidase cloned from *Sanguibacter keddieii* and enzyme characterization[J]. J Biotechnol, 2012, 161(3): 294-301.
- [65] ZHENG S, LIU C, XU S, et al. Ginsenoside F1 preparation from ginsenosides Re and Rg1 mixture of ginseng leaves by a 6-O-glycoside-ginsenosidase from *Aspergillus* sp. g383 strain[J]. Process Biochem, 2023, 131: 59-66.
- [66] WANG Y, CHOI KD, YU H, et al. Production of ginsenoside F1 using commercial enzyme Cellulase KN[J]. J Ginseng Res, 2016, 40(2): 121-126.
- [67] AN D S, CUI C H, SIDDIQI M Z, et al. Gram-scale production of ginsenoside F1 using a recombinant bacterial β-glucosidase[J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27(9): 1559-1565.
- [68] RUAN C C, ZHANG H, ZHANG L X, et al. Biotransformation of ginsenoside Rf to Rh1 by recombinant β-glucosidase[J]. Molecules, 2009, 14(6): 2043-2048.
- [69] CUI C H, LIU Q M, KIM J K, et al. Identification and characterization of a *Mucilaginibacter* sp. strain QM49 β-glucosidase and its use in the production of the pharmaceutically active minor ginsenosides (S)-Rh1 and (S)-Rg2[J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(19): 5788-5798.
- [70] 刘蕊,柳雨,李巧峰,等.糖苷酶耐热性改造策略与应用[J].生物工程学报,2021,37(6):1919-1930.

- [71] PEI J, WU T, YAO T, et al. Biotransformation of ginsenosides Re and Rg1 into Rg2 and Rh1 by thermostable β -glucosidase from *Thermotoga thermarum*[J]. Chem Nat Compd, 2017, 53: 472-477.
- [72] BI Y F, WANG X Z, JIANG S, et al. Enzymatic transformation of ginsenosides Re, Rg1, and Rf to ginsenosides Rg2 and aglycon PPT by using β-glucosidase from *Thermotoga neapolitana*[J]. Biotechnol Lett, 2019, 41: 613-623.
- [73] XU J, CHU Y, LIAO B, et al. Panax ginseng genome examination for ginsenoside biosynthesis[J]. Gigascience, 2017, 6: 1-15.
- [74] THIMMAPPA R, GEISLER K, LOUVEAU T, et al. Triterpene biosynthesis in plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 2014, 65: 225-257.
- [75] LIANG Y, ZHAO S. Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis[J]. Plant Biol (Stuttg), 2008, 10: 415-421.
- [76] KIM Y J, ZHANG D, YANG D C. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides[J]. Biotechnol Adv, 2015, 33: 717-735.
- [77] JUNG S C, KIM W, PARK S C, et al. Two ginseng UDPglycosyltransferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd [J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55: 2177-2188.
- [78] AN T, LI L, LIN Y, et al. Characterization of guaiene synthases from *Stellera chamaejasme* L. flowers and their application in de novo production of (-)-rotundone in yeast [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68: 3214-3219.
- [79] HUANG J, ZHA W, AN T, et al. Identification of RoCYP01 (CYP716A155) enables construction of engineered yeast for high-yield production of betulinic acid[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103: 7029-7039.
- [80] MITSUI R, NISHIKAWA R, YAMADA R, et al. Construction of yeast producing patchoulol by global metabolic engineering strategy[J]. Biotechnol Bioeng, 2020, 117: 1348-1356.
- [81] ZHA W, AN T, LI T, et al. Reconstruction of the biosynthetic pathway of santalols under control of the GAL regulatory system in yeast[J]. ACS Synth Biol, 2020, 9: 449-456.
- [82] DAI Z, LIU Y, ZHANG X, et al. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for production of ginsenosides [J]. Metab Eng, 2013, 20: 146-156.
- [83] DONALD K A, HAMPTON R Y, FRITZ I B. Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 3341-3344.
- [84] 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: 6449-6454.
- [85] DAI Z, WANG B, LIU Y, et al. Producing aglycons of

ginsenosides in bakers' yeast[J]. Sci Rep, 2014, 4: 3698.

- [86] ZHAO F, BAI P, LIU T, et al. Optimization of a cytochrome P450 oxidation system for enhancing protopanaxadiol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnol Bioeng, 2016, 113: 1787-1795.
- [87] ZHAO F, BAI P, NAN W, et al. A modular engineering strategy for high-level production of protopanaxadiol from ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. AIChE J, 2018, 65: 866-874.
- [88] D'AUTREAUX B, TOLEDANO M B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(10): 813-824.
- [89] GULSHAN K, LEE S S, MOYE-ROWLEY W S. Differential oxidant tolerance determined by the key transcription factor Yap1 is controlled by levels of the Yap1-binding protein, Ybp1[J]. J Biol Chem, 2011, 286: 34071-34081.
- [90] ZHAO F, DU Y, BAI P, et al. Enhancing Saccharomyces cerevisiae reactive oxygen species and ethanol stress tolerance for high-level production of protopanoxadiol[J]. Bioresour Technol, 2017, 227: 308-316.
- [91] ZHAO F, BAI P, NAN W, et al. A modular engineering strategy for high-level production of protopanaxadiol from ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. AIChE J, 2018, 65: 866-874.
- [92] WANG P, WEI W, YE W, et al. Synthesizing ginsenoside Rh2 in Saccharomyces cerevisiae cell factory at highefficiency[J]. Cell Discov, 2019, 5: 5.
- [93] CHOI B H, KANG H J, KIM S C, et al. Organelle engineering in yeast: enhanced production of protopanaxadiol through manipulation of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microorganisms, 2022, 10: 650.
- [94] KIM J E, JANG I S, SUNG B H, et al. Rerouting of NADPH synthetic pathways for increased protopanaxadiol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Sci Rep, 2018, 8: 15820.
- [95] WANG D, WANG J, SHI Y, et al. Elucidation of the complete biosynthetic pathway of the main triterpene glycosylation products of *Panax notoginseng* using a synthetic biology platform[J]. Metab Eng, 2020, 61: 131-140.
- [96] WANG H, YANG Y, LIN L, et al. Engineering Saccharomyces cerevisiae with the deletion of endogenous glucosidases for the production of flavonoid glucosides[J]. Microb Cell Fact, 2016, 15: 134.
- [97] NAN W, ZHAO F, ZHANG C, et al. Promotion of compound K production in *Saccharomyces cerevisiae* by glycerol[J]. Microb Cell Fact, 2020, 19: 41.
- [98] WANG P, WEI W, ZHAO G, et al. Systematic optimization of the yeast cell factory for sustainable and high-efficiency production of bioactive ginsenoside compound K[J]. Synth

Syst Biotechnol, 2021, 6: 69-76.

- [99] SHI Y, WANG D, LI R, et al. Engineering yeast subcellular compartments for increased production of the lipophilic natural products ginsenosides[J]. Metab Eng, 2021, 67: 104-111.
- [100] WANG P, WEI W, FAN Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts[J]. Metab Eng, 2015, 29: 97-105.
- [101] LI Y, LI J, DIAO M, et al. Characterization of a group of UDP-glycosyltransferases involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins of *Panax notoginseng*[J]. ACS Synth Biol, 2022, 11: 770-779.
- [102] WANG P, WEI W, YE W, et al. Synthesizing ginsenoside Rh2 in Saccharomyces cerevisiae cell factory at highefficiency[J]. Cell Discov, 2019, 5: 5.
- [103] ZHUANG Y, YANG G Y, CHEN X, et al. Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh2 in yeast via repurposing a key promiscuous microbial enzyme[J]. Metab Eng, 2017, 42: 25-32.
- [104] JUNG S C, KIM W, PARK S C, et al. Two ginseng UDPglycosyltransferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd[J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55: 2177-2188.
- [105] JIANG Z, GAO H, LIU R, et al. Key glycosyltransferase genes of *Panax notoginseng*: identification and engineering yeast construction of rare ginsenosides[J]. ACS Synth Biol, 2022, 11: 2394-2404.
- [106] JIANG F, ZHOU C, LI Y, et al. Metabolic engineering of yeasts for green and sustainable production of bioactive ginsenosides F2 and 3β, 20S-Di-O-Glc-DM[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 3167-3176.
- [107] 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: 1535-1545.
- [108] LI X, WANG Y, FAN Z, et al. High-level sustainable production of the characteristic protopanaxatriol-type saponins from Panax species in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metab Eng, 2021, 66: 87-97.
- [109] WEI W, WANG P, WEI Y, et al. Characterization of UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and bio*Panax ginsengsyntheses of bioactive ginsenosides F1* and Rh1 in metabolically engineered yeasts[J]. Mol Plant, 2015, 8: 1412-1424.
- [110] LI C, YAN X, XU Z, et al. Pathway elucidation of bioactive rhamnosylated ginsenosides in *Panax ginseng* and their de novo high-level production by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Commun Biol, 2022, 5: 775.

(责任编辑:刘建滔)