

· 综 述 ·

三萜皂苷生物合成相关糖基转移酶研究进展

周宸, 巩婷, 陈晶晶, 陈天娇, 杨金玲, 朱平

中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室 国家卫生健康委员会天然药物生物合成重点实验室 & 中国医学科学院酶与天然药物生物催化重点实验室, 北京 100050

周宸, 巩婷, 陈晶晶, 陈天娇, 杨金玲, 朱平. 三萜皂苷生物合成相关糖基转移酶研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1004-1024.

ZHOU C, GONG T, CHEN JJ, CHEN TJ, YANG JL, ZHU P. The glycosyltransferases involved in triterpenoid saponin biosynthesis: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1004-1024.

摘 要: 三萜皂苷具有独特的化学性质和丰富的药理活性, 在医药、保健品、化妆品、食品添加剂、农业等方面被广泛应用。尿苷二磷酸 (UDP) 依赖的糖基转移酶 (UGTs) 是催化三萜皂苷生成的关键酶, 对三萜皂苷的结构及其药理活性多样性的形成有重要作用。文中基于 UGTs 来源及受体底物结构类型对参与植物三萜皂苷生物合成的 UGTs 进行了综述, 并展望了 UGTs 在基于合成生物学技术实现三萜皂苷异源生物合成方面的应用前景, 以期三萜皂苷生物合成相关研究提供参考。

关键词: 尿苷二磷酸依赖的糖基转移酶 (UGTs); 三萜皂苷; 糖基化; 天然产物; 生物合成

The glycosyltransferases involved in triterpenoid saponin biosynthesis: a review

ZHOU Chen, GONG Ting, CHEN Jingjing, CHEN Tianjiao, YANG Jinling, ZHU Ping

NHC Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products, CAMS Key Laboratory of Enzyme and Biocatalysis of Natural Drugs, State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Triterpenoid saponins are widely used in medicine, health cares, cosmetics, food additives and agriculture because of their unique chemical properties and rich pharmacological activities.

Received: August 3, 2021; **Accepted:** September 6, 2021; **Published online:** October 15, 2021

Supported by: Natural Science Foundation of Beijing, China (7212158); National Natural Science Foundation of China (81673341); PUMC Disciplines Construction Project of Synthetic Biology (201920100801)

Corresponding authors: YANG Jinling. Tel: +86-10-63165199; E-mail: yangjl@imm.ac.cn

ZHU Ping. Tel: +86-10-63165199; E-mail: zhuping@imm.ac.cn

基金项目: 北京市自然科学基金 (7212158); 国家自然科学基金 (81673341); 北京协和医学院-合成生物学学科建设 (201920100801)

UDP-dependent glycosyltransferases (UGTs) are the key enzymes involved in triterpenoid saponin biosynthesis, and play important roles in the diversity of triterpenoid saponin structures and pharmacological activities. This review summarized the UGTs involved in plant triterpenoid saponin biosynthesis based on the sources of UGTs and the types of receptors. Moreover, the application of UGTs in heterologous biosynthesis of triterpenoid saponins based on synthetic biology was also discussed.

Keywords: UDP-dependent glycosyltransferase; triterpenoid saponin; glycosylation; natural product; biosynthesis

三萜是一类基本母核由 6 个异戊二烯单元 (C_5H_8) 组成的含有 30 个碳原子的萜类化合物, 以游离形式或与糖结合成苷或成酯的形式存在于生物体内。三萜皂苷广泛分布于双子叶植物中, 是许多珍贵中草药的主要有效成分, 如人参皂苷、大豆皂苷、罗汉果苷、柴胡皂苷等, 具有抗炎、抗真菌、抗微生物、抗寄生虫和抗肿瘤等多种药理活性。三萜皂苷由于三萜苷元结构各异, 及在糖基数量、位置及类型上有所差异而显现出丰富的结构与活性多样性。根据基本碳骨架可将三萜类化合物分为直链三萜、二环三萜、三环三萜、四环三萜和五环三萜, 在植物中以四环三萜和五环三萜为主, 其中四环三萜类主要有达玛烷型、羊毛脂烷型、环阿屯型、葫芦烷型等; 五环三萜类主要有齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扇豆烷型等。三萜类化合物的生物合成起始于两分子异戊烯焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 和一分子二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 的缩合, 在法尼基焦磷酸合酶 (FPPS) 的催化下形成 C_{15} 分子法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP), 两分子 FPP“头-头”缩合形成的线性 C_{30} 分子角鲨烯, 再经氧化得到具有三萜骨架的重要前体 2,3-氧化鲨烯。2,3-氧化鲨烯在不同氧化鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclases, OSCs) 作用下进入分支代谢途径, 生成各种环状前体, 该反应也是产生三萜结构多样

性的关键。环化三萜经细胞色素 P450 酶 (CYP450s) 氧化, 再经糖基化反应生成各种植物三萜皂苷^[1-2]。

在植物次级代谢产物的生物合成过程中, 糖基化修饰会影响受体分子的生物活性、水溶性及稳定性, 对植物次级代谢产物的结构及其药理活性多样性的形成有重要作用。糖基化反应由糖基转移酶 (glycosyltransferases, GTs) 催化, 将糖基从活化的供体分子转移到受体分子上, 生成种类丰富的糖苷类化合物^[3]。糖基转移酶是高度分歧的多源基因家族, 广泛存在于有机体中, 常以单糖、二糖、多糖、磷酸糖、尿苷二磷酸-葡萄糖 (UDP-glucose, UDP-Glc)、尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸 (UDP-glucuronic acid, UDP-GlcA) 等为糖基供体^[4]。根据已收集的 GTs 氨基酸序列的一致性, 碳水化合物活性酶数据库 (CAZy, <http://www.cazy.org/>) 将 GTs 分为 114 个家族, 其中 GT1 家族常以尿苷二磷酸-糖为糖基供体, 被称为尿苷二磷酸依赖的糖基转移酶 (UDP-dependent glycosyltransferases, UGTs, EC 2.4.1.17), 目前已分离鉴定了约 29 000 种 UGTs, 广泛分布于古细菌、细菌、病毒和真核生物中。文中基于 UGTs 来源及受体底物结构类型对已确定功能的参与植物三萜皂苷糖基化的 UGTs (表 1) 进行综述, 以期三萜皂苷生物合成相关研究提供参考。(如无特殊说明, 文中提到的糖基化反应默认以 UDP-Glc 作为糖基供体。)

表 1 公共数据库获得的参与植物三萜糖基化的 UGTs

Table 1 Functional UGTs involved in the glycosylation of plant triterpenoids which are available in public databases

	UGTs	Species	Donors	Acceptors	Accession No.
Eukaryote plant	UGRh2GT	<i>Panax ginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh2	–
	UGT74AE2	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	PPD, ginsenoside CK	QEA68969
	UGT94Q2	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh2, F2	QEA68983
	UGTPg45	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	PPD	AKA44586
	UGTPg29	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh2	AKA44579
	UGTPg1	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	PPD, PPT	A0A068J840
	UGTPg100	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	PPT	A0A0K0PVW1
	UGTPg101	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	PPT, ginsenoside F1	A0A0K0PVM5
	UGTPg71A29	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh1, Rd	–
	UGT94Q15	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh2	–
	UGT94Q15-V1	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	Calenduloside E	–
	UGT94Q3	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh1	–
	UGT94Q6	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rd, F1, CK	–
	PgUGT94Q13	<i>P. ginseng</i>	UDP-Glc、 UDP-Xyl	Ginsenoside Rg1, Rh1	–
	Pq3-O-UGT1	<i>Panax quiquefolium</i>	UDP-Glc	PPD	ALE15279
	Pq3-O-UGT2	<i>P. quiquefolium</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh2, F2	ALE15280
	Pq-PPT-6, 20-O-UGT1	<i>P. quiquefolium</i>	UDP-Glc	PPT, ginsenoside F1	QEV87497
	UGRdGT	<i>Panax notoginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rd	–
	Pn1-31	<i>P. notoginseng</i>	UDP-Glc	PPD	–
	Pn3-29	<i>P. notoginseng</i>	UDP-Glc	PPD, PPT, ginsenoside Rg3	–
	Pn3-31	<i>P. notoginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh2	–
	Pn3-32	<i>P. notoginseng</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rd, F1	–
	Pn3-32-i5	<i>P. notoginseng</i>	UDP-Xyl	Ginsenoside Rg1	–
	GpUGT23	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	UDP-Glc	Ginsenoside CK, F2, Rd, F1	–
	UGT74AC1	<i>Momordica grosvenori</i>	UDP-Glc	Mogrol	K7NBW3
	UGT720-269-1	<i>M. grosvenori</i>	UDP-Glc	Mogrol, mogroside I -A1	–
	UGT94-289-3	<i>M. grosvenori</i>	UDP-Glc	Mogroside II E, mogroside IIIx	–
	PjmUGT1	<i>Panax japonicus</i>	UDP-Glc	Calenduloside E, Zingibroside R1	–
	PjmUGT2	<i>P. japonicus</i>	UDP-Glc	Calenduloside E, Chikusetsuponin IVa	–
	UGT73AE1	<i>Carthamus tinctorius</i>	UDP-Glc	Glycyrrhetic acid	AJT58578
	UGT73F17	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	UDP-Glc	Glycyrrhizic acid	AXS75258
	UGT73K1	<i>Medicago truncatula</i>	UDP-Glc	Hederagenin, soyasapogenol B, E	AAW56091

(待续)

(续表 1)

	UGTs	Species	Donors	Acceptors	Accession No.
	UGT71G1	<i>M. truncatula</i>	UDP-Glc	Medicagenic acid	AAW56092
	UGT73F3	<i>M. truncatula</i>	UDP-Glc	Hederagenin	ACT34898
	UGT73P2	<i>Glycine max</i>	UDP-Gal	SBMG	BAI99584
	UGT91H4	<i>G. max</i>	UDP-Rha	Soyasaponin III	NP_001240857
	UGT73F4	<i>G. max</i>	UDP-Xyl	A0- α g	BAM29363
	UGT73F2	<i>G. max</i>	UDP-Glc	A0- α g	BAM29362
	UGT91H9	<i>G. max</i>	UDP-Glc	Soyasaponin III	NP_001348424
	UGT73P10	<i>G. max</i>	UDP-Ara	SBMG	BBD84861
	UGT74M1	<i>Saponaria vaccaria</i>	UDP-Glc	Gypsogenic acid	ABK76266
	UGT74Q1	<i>Nigella sativa</i>	UDP-Glc, UDP-GlcNAc	Hederagenin, α -hederin	–
	UGT85P1	<i>N. sativa</i>	UDP-Glc	Hederagenin	–
	UGT73C10	<i>Barbarea vulgaris</i>	UDP-Glc	Oleanolic acid, hederagenin	AFN26666
	UGT73C21	<i>B. vulgaris</i>	UDP-Glc	Oleanolic acid, hederagenin	AVW82175
	UGT74AG5	<i>Ilex asprella</i>	UDP-Glc	Ursolic acid, oleanolic acid, Hederagenin, et al	–
	UGT73AH1	<i>Centella asiatica</i>	UDP-Glc	Asiatic acid	AUR26623
	UGT73AD1	<i>C. asiatica</i>	UDP-Glc	Asiatic acid, madecassic acid	ALD84259
Mammal	UGT1A4	<i>Homo sapiens</i>	UDP-GlcA	PPD	AAV32629
Microrganism	YojK1	<i>Bacillus subtilis</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh1	AGC59684
	YjiC1	<i>B. subtilis</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh1	AGC59683
	BSGT1	<i>B. subtilis</i>	UDP-Glc	Ginsenoside F1	ANP92054
	UGT109A1	<i>B. subtilis</i>	UDP-Glc	DM, PPD, PPT	ASY97769
	Bs-YjiC	<i>B. subtilis</i>	UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc	PPD, PPT, ginsenoside Rg3	7BOV_A
	BsUGT489	<i>B. subtilis</i>	UDP-Glc	Celastrol	WP_003220489
	BsGT110	<i>B. subtilis</i>	UDP-Glc	Celastrol	WP_003220110
	LRGT	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	UDP-Glc	Ginsenoside Rh2	ASD55035
Prokaryote	UGT51	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UDP-Glc	PPD, cholesterol, sitosterol, ergosterol, et al	Q06321
	UGT51B1	<i>Pichia pastoris</i>	UDP-Glc	Cholesterol, sitosterol, ergosterol, et al	Q9Y751
	UGT51C1	<i>Candida albicans</i>	UDP-Glc	Cholesterol, sitosterol, ergosterol, et al	XP_718281
	UGT52	<i>Dictyostelium discoideum</i>	UDP-Glc	Cholesterol, sitosterol, ergosterol, et al	Q54IL5

Note: UDP-Glc: UDP-glucose; UDP-Xyl: UDP-xylose; UDP-Gal: UDP-galactose; UDP-Rha: UDP-rhamnose; UDP-Ara: UDP-arabinose; UDP-GlcA: UDP-glucuronic acid; UDP-GlcNAc: UDP-N-acetylglucosamine.

1 真核生物 UGTs

1.1 植物 UGTs

1.1.1 以达玛烷型四环三萜为底物

达玛烷型三萜皂苷是五加科植物人参 (*Panax ginseng*)、西洋参 (*Panax quiquefolium*)、三七 (*Panax notoginseng*) 和葫芦科植物绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum*) 等的主要活性成分, 其结构特点是 C8- β -角甲基。人参、西洋参、三七植物体内最主要的三萜皂苷是人参皂苷 (ginsenoside), 具有抗肿瘤、保护心血管系统、治疗神经退行性疾病、改善记忆功能、调节免疫功能等作用, 拥有较好的临床应用价值^[5]。在 UGTs 作用下, 单糖连接到达玛烯二醇-II (DM)、原人参二醇 (PPD) 和原人参三醇 (PPT) 苷元上, 形成多种天然及非天然人参皂苷。

目前关于达玛烷型三萜皂苷的生物合成研究较为深入, 已从人参属植物中分离并鉴定了多种 UGTs, 解析了多种达玛烷型皂苷的生物合成途径 (图 1)。He 等^[6]从人参悬浮细胞中纯化并鉴定了 UGRh2GT, 其能够延长 Rh2 的 C3-糖链生成人参皂苷 Rg3, 把农业研究常用的二次饱和 D-最优设计应用于生化实验, 观察 pH 和温度对酶活性的影响确定了该酶的最适反应条件。Jung 等^[7]对人参转录组进行分析, 表征了 2 个 UGTs: PgUGT74AE2 对 PPD 和 CK 的 C3-OH 进行糖基化, 产物分别为人参皂苷 Rh2 和 F2; PgUGT94Q2 进一步延长 Rh2 和 F2 的 C3-糖链, 分别生成人参皂苷 Rg3 和 Rd。张婷婷等^[8]通过体外酶促反应证明了 PgUGT74AE2 也能够糖基化 PPT 的 C3-OH 生成一种新型原人参三醇型皂苷 3-O- β -D-吡喃葡萄糖-达玛烷-24-烯-3 β ,6 α ,12 β ,20S-三醇。Wang 等^[9]利用 NCBI 公布的表达序列标签数据和 cDNA 数据库, 相继克隆出对 PPD 及 PPD 型人参皂苷有糖基化作

用的 UGTs: 糖基化 C20-OH 的 UGTPg1 (PgUGT71A53)、糖基化 C3-OH 的 UGTPg45 (PgUGT74AE4) 和延长 C3-糖链的 UGTPg29, 在酿酒酵母中成功构建了人参皂苷 CK、Rh2 和 Rg3 的生物合成途径。Wei 等^[10]证明除了以 PPD 为底物外, UGTPg1 也能以 PPT 为底物催化 C20-OH 糖基化生成人参皂苷 F1。此外, 还从人参中分离出 2 个与 UGTPg1 序列一致性较高 (>84%) 的 UGTs: UGTPg100 (PgUGT71A54) 和 UGTPg101 (PgUGT71A55)。UGTPg100 催化 PPT 的 C6-OH 糖基化生成人参皂苷 Rh1, UGTPg101 催化 PPT 的 C20-OH 糖基化生成人参皂苷 F1, 再进一步催化 C6-OH 糖基化生成人参皂苷 Rg1。Jung 等^[11]还从人参中鉴定出 PgUGT71A27, 能糖基化 PPD、Rh2、Rg3 和 PPT 的 C20-OH 分别生成人参皂苷 CK、F2、Rd 和 F1。

前述 UGTs 主要负责对各种皂苷或苷元的羟基进行糖基化, 但大部分人参皂苷在骨架的同一位置上会连接两个或两个以上糖基, 因此越来越多的研究者将目光聚焦在催化糖链延长的 UGTs 上。Lu 等^[12]从人参中分离并鉴定了 UGTPg71A29, 能够糖基化人参皂苷 Rh1 的 C20-OH 生成人参皂苷 Rg1, 还能够延长人参皂苷 Rd 的 C20-糖链, 生成人参皂苷 Rb1。Yang 等^[13]分析了 UGT94 家族 UGTs 的多样性, 揭示了人参中参与三萜皂苷糖链延伸的一系列 UGTs: PgUGT94Q15 能够延长人参皂苷 Rh2、F2 的 C3-糖链分别生成 Rg3 和 Rd; PgUGT94Q15-V1 延长金盏花苷 E (calenduloside E) 的 C3-糖链生成姜状三七皂苷 R1 (zingibroside R1), 同时二者都能延长 3-O- β -Glc 齐墩果酸 (3GOA) 的 C3-糖链生成 3-O- $[\beta$ -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖]-齐墩果酸; PgUGT94Q3 延长 C6-糖链, 催化人参皂苷 Rh1 生成 Rf; PgUGT94Q6 延长 C20-糖链, 催化人参皂苷 Rd、F1、CK 分

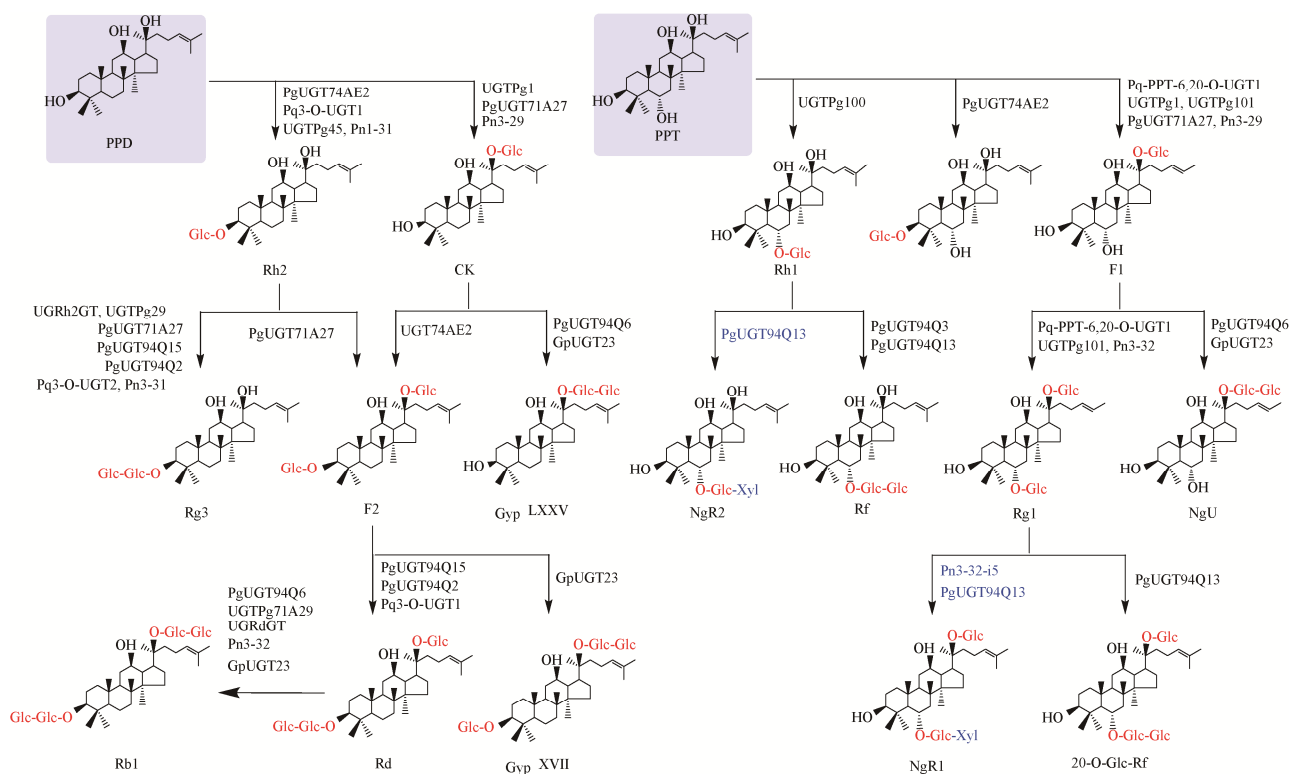


图 1 植物 UGTs 催化的达玛烷型三萜苷元的糖基化反应

Figure 1 Glycosylation of damarane-type tetracyclic triterpenoids by plant UGTs. UDP-Glc: UDP-glucose; UDP-Xyl: UDP-xylose.

别生成 Rb1、三七皂苷 U 和绞股蓝皂苷 LXXV (gypenoside LXXV)。这些 UGTs 存在于同一植物体内，序列一致性很高，但功能不同，其进化机制有待进一步研究。

Lu 等从西洋参中分离得到 Pq3-O-UGT1^[14] 和 Pq3-O-UGT2^[15]，前者催化 PPD 的 C3-OH 糖基化生成人参皂苷 Rh2，后者延长 Rh2 和 F2 的 C3-糖链生成人参皂苷 Rg3 和 Rd。Feng 等^[16] 又克隆得到 Pq-PPT-6,20-O-UGT1，能够催化 PPT 的 C20-OH 糖基化生成人参皂苷 F1，再进一步催化 F1 的 C6-OH 糖基化生成人参皂苷 Rg1。

Yue 等^[17] 从三七的悬浮细胞中纯化出 UGRdGT，能够延长人参皂苷 Rd 的 C20-糖链生成 Rb1，通过酶促反应体系优化使 Rd 向 Rb1

的体外生物转化率达到 80%以上。Wang 等^[18] 建立了一个基于“plug-and-play”模式的合成生物学平台对三七功能基因进行筛选，获得一系列 UGTs：Pn1-31 催化 PPD 的 C3-OH 糖基化；Pn3-29 催化 PPD、Rg3 和 PPT 的 C20-OH 糖基化；Pn3-31 延长 Rh2 的 C3-糖链；Pn3-32 分别延长 Rd 和 F1 的 C20-糖链，还解析了人参皂苷 Rh2、CK、Rg3、Rd、Rb1、F1 和 Rg1 在三七体内的生物合成过程。此外，还鉴定出 1 个 UDP-木糖 (UDP-xylose, UDP-Xyl) 依赖的糖基转移酶 Pn3-32-i5，能延长人参皂苷 Rg1 的 C6-糖链生成三七皂苷 NgR1。Li 等^[19] 又探索了三七和人参中能够以 UDP-Xyl 为糖基供体延长 PPT 型人参皂苷 C6-糖链的 UGTs，获得的 10 个 UGTs (PnUGT94Q14、PnUGT94Q14-V1、PnUGT94Q14-

V2、PnUGT94Q14-V3、PnUGT94Q27、PgUGT94Q10-V1、PgUGT94Q11-V1、PgUGT94Q11-V2、PgUGT94Q12、PgUGT94Q13) 都能糖基化人参皂苷 Rg1 和 Rh1 分别生成三七皂苷 NgR1 和 NgR2, 其中 PgUGT94Q13 与前述的 Pn3-32-i5 有 96% 的序列一致性。同时发现这些 UGTs 也能以 UDP-Glc 为供体催化 Rg1 和 Rh1 分别生成人参皂苷 20-O-Glc-Rf 和 Rf, 但各个 UGT 对不同糖基供体的催化效率有一定差异, 例如 PgUGT94Q13 对 UDP-Xyl 有明显的偏好性。

绞股蓝是一种葫芦科草本植物, 是除五加科人参属植物外唯一产人参皂苷的植物。绞股蓝的某些优良植株中人参皂苷的含量甚至高于人参, 所以也被称为“南方人参”或“第二人参”。部分绞股蓝皂苷的结构与人参皂苷相似甚至完全相同, 例如绞股蓝皂苷 III、IV、VIII 和 XII 分别与人参皂苷 Rb1、Rb3、Rd 和 F2 对应。Jung 等^[11]从绞股蓝中分离到 GpUGT23, 能够延长人参皂苷 CK、F2、Rd 和 F1 的 C20-糖链分别生成绞股蓝皂苷 LXXV、绞股蓝皂苷 XVII、人参皂苷 Rb1 和三七皂苷 U。Liang 等^[20]利用结合 SMRT 和 NGS 技术的杂交测序策略分析绞股蓝的转录组, 分离出与 PgUGT94Q2 序列一致性为 50% 的 GpUGT35, 归属于 UGT94 家族。在 MeJA 处理实验中, GpUGT35 表现出与 SS、SE 和 HMGR 相似的表达模式, 因此 GpUGT35 被认为是负责绞股蓝皂苷生物合成的候选酶, 但具体的催化功能有待进一步研究。

1.1.2 以葫芦烷型四环三萜为底物

罗汉果苷 (mogrosin) 是葫芦烷型三萜皂苷的一种, 是传统中药材罗汉果 (*Momordica grosvenori* Swingle) 的主要活性成分, 有镇咳祛痰、润肺保肝、润肠通便、降血糖等功效。Dai 等^[21]对罗汉果果实进行 RNA 测序和全基因组表达谱分析, 成功鉴定出 UGT74AC1, 体外

酶活性测定证明其能糖基化罗汉果醇 (mogrol) 的 C3-OH 生成罗汉果苷 I E。Li 等^[22]利用 X 射线衍射技术解析了 UGT74AC1 的晶体结构, 通过定向进化获得一系列突变体, 其中突变体 M7 对罗汉果醇的催化效率提高了 4.17×10^4 倍。此外, 与野生型酶相比, 这些突变体表现出更强的底物杂泛性, 能催化泻根甜苷元、PPD、PPT、赤芝酸、灵芝酸、松苓新酸等 10 种三萜苷元的 C3-OH 糖基化。Itkin 等^[23]对近 100 个发育中的罗汉果果实表达的基因进行体外功能验证, 鉴定出催化罗汉果醇生成罗汉果苷 V 一系列糖基化反应的 UGTs: UGT720-269-1 首先糖基化罗汉果醇的 C24-OH 生成罗汉果苷 I-A1, 接着糖基化 C3-OH 生成罗汉果苷 II E; UGT94-289-3 首先延长罗汉果苷 II E 的 C24-糖链生成罗汉果苷 IIIx, 接着进入分支, 继续在 C3-和 C24-糖链加上糖基, 分别生成罗汉果苷 IV-A 和赛门苷 (siamenoside), 最后生成 C3 位有 2 个糖基、C24 位有 3 个糖基的罗汉果苷 V (图 2)。

1.1.3 以齐墩果烷型五环三萜为底物

齐墩果烷型五环三萜苷元及皂苷在植物界分布广、数目多, 具有多种生物活性。从植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 中得到的甘草酸和甘草次酸有促肾上腺皮质激素 (ACTH) 样生物活性^[24]; 柴胡皂苷有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、调节内分泌等作用, 可应用于肾病、肝纤维化、肿瘤等疾病的治疗^[25], 还可能用于治疗新型冠状病毒 COVID-19^[26]; 人参、竹节参 (*Panax japonicus*)、牛膝 (*Achyranthes bidentata*) 等植物中存在的人参皂苷 R₀ 有抗炎、保护心血管系统、抗病毒、保肝、护胃、抗肥胖等多种药理作用^[27]; 金盏花苷 E 可抑制体内肿瘤细胞生长, 具有抗肿瘤活性^[28]。

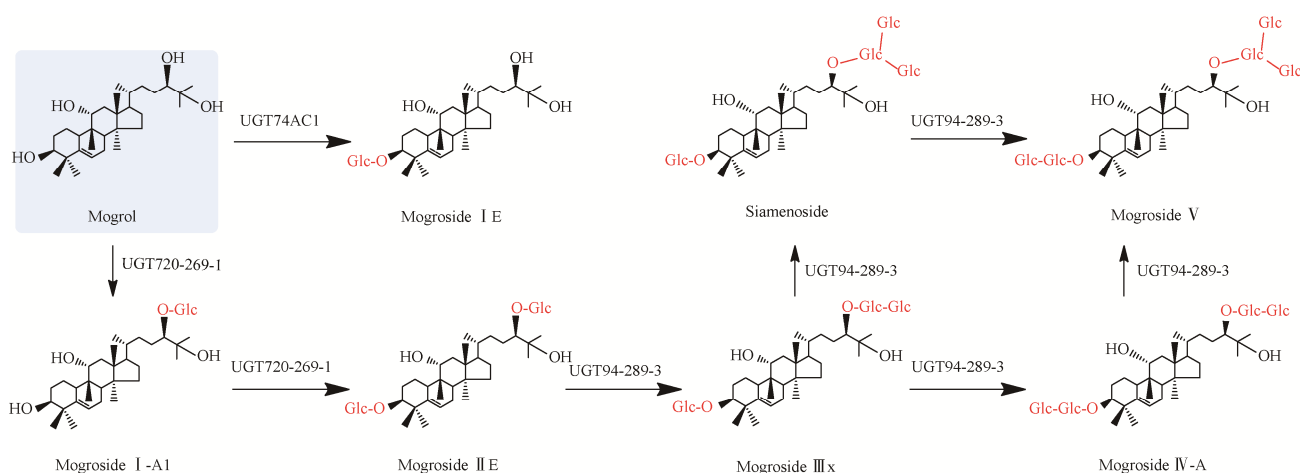


图2 植物 UGTs 催化的葫芦烷型三萜苷元的糖基化反应

Figure 2 Glycosylation of cucurane-type tetracyclic triterpenoids by plant UGT. UDP-Glc: UDP-glucose.

Tang 等^[29]从竹节参 (*P. japonicus* var. *major*) 中分离并鉴定了 2 个 UGTs: PjmUGT1 糖基化金盏花苷 E 和姜状三七皂苷 R1 的 C28-COOH 分别生成竹节人参皂苷 IVa (chikusetsuponin IVa) 和人参皂苷 R₀; PjmUGT2 延长金盏花苷 E 和竹节人参皂苷 IVa 的 C3-糖链分别生成姜状三七皂苷 R1 和人参皂苷 R₀ (图 3)。Meesapyodsuk 等^[30]从石竹科植物王不留行 (*Saponaria vaccaria*) 中分离到 UGT74M1, 主要在植物根和叶中表达, 催化丝石竹酸 (gypsogenic acid) 的 C28-COOH 糖基化生成相应的单糖苷。Scholz 等^[31]从毛茛科植物黑种草 (*Nigella sativa*) 中分离到能糖基化常春藤皂苷元 (hederagenin) 的两个 UGTs: UGT74Q1 和 UGT85P1。其中 UGT74Q1 与 UGT74M1 序列一致性达 59%, 具有较近的亲缘关系。UGT74Q1 能够糖基化常春藤皂苷元和 α -常春藤苷的 C28-COOH, 且在催化常春藤皂苷元时, 除了以 UDP-Glc 为供体外, 还能以 UDP-N-乙酰葡萄糖胺 (UDP-N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc) 为糖基供体; UGT85P1 糖基化常春藤皂苷元的 C3-OH 或

C24-OH, 而对 α -常春藤苷无催化活性。UGT85P1 归属于 UGT85 家族, 除三萜化合物外, 还可接受二萜、羟基扁桃腈、类黄酮或玉米素等多种底物。Xie 等^[32]从菊科植物红花 (*Carthamus tinctorius*) 中分离到 UGT73AE1, 其具有底物杂泛性, 能够催化木质素、类黄酮、香豆素、蒽醌、三萜等多种具有亲核基团 (-SH、-OH 或 -NH₂) 的芳香化合物的糖基化, 且产物通常有更好的药物活性。对于三萜类化合物, UGT73AE1 能够糖基化甘草次酸 (glycyrrhetic acid) 的 C30-COOH 形成葡萄糖酯, 但转化率仅有 10%。Xu 等^[33]对豆科植物甘草进行转录组测序分析, 筛选得到一种独特的 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 GuUGAT, 能够催化甘草次酸的连续两步葡萄糖醛酸化直接生成甘草酸 (glycyrrhizic acid)。甘草次酸向甘草酸的转化还可由 2 个 UGTs 分步催化完成, 由 GuGT14 催化甘草次酸的 C3-OH 葡萄糖醛酸化^[34], 再由 UGT73P12 催化 C3 位第二步葡萄糖醛酸化得到甘草酸^[35]。He 等^[36]从甘草中分离得到 UGT73F17, 其与刺果甘草 (*Glycyrrhiza echinata*) 的异黄

酮葡萄糖基转移酶 UGT73F1^[37]的序列一致性达 71%，能够催化甘草酸的 C30-COOH 糖基化生成甘草皂苷 A3 (licorice saponin A3)。UGT73F17 也具有一定的底物杂泛性，但有严格的区域选择性，只糖基化五环三萜或其皂苷的 C30-/C29-COOH。

Achnine 等^[38]利用表达序列标签和基因组序列进行分析，从豆科模式植物蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中预测到 300 多个 UGTs 基因，又通过 MeJA 诱导培养系统以及基于 DNA 序列的转录谱分析、目标化合物分析方法进行筛选，最终鉴定了 2 个 UGTs：特异性作用于常春藤皂苷元、大豆甾醇 B 和 E 的 UGT73K1，以及特异性作用于苜蓿酸的 UGT71G1。后者还对槲皮素和某些异黄酮有糖基化作用，且强于对三萜苷元的催化。Naoumkina 等^[39]利用综合基因表达聚类分析鉴定了蒺藜苜蓿中参与三萜骨架糖基化的候选基因，体外功能验证确定了 UGT73F3 对三萜苷元及山奈酚有催化活性，其中对常春藤皂苷元 C28-COOH 的催化活性最强。豆科模式植物大豆 (*Glycine max*) 的主要活性成分大豆皂苷属于齐墩果烷型三萜皂苷，有抗脂质氧化、抗自由基、增强免疫调节、抗肿瘤和抗病毒等多种生理功能，在食品、药品及化妆品领域已有初步应用。大豆皂苷 (soyasaponin) 根据苷元结构不同可分为 A 类、B 类、E 类和 DDMP 类^[40]。A 类皂苷是以大豆甾醇 (soyasapogenol) A 为苷元的双糖链皂苷，C3-OH 和 C22-OH 各连接一条糖链；B 类和 E 类皂苷是以大豆甾醇 B 和 E 为苷元的单糖链皂苷，仅在 C3-OH 上连接一条糖链；DDMP 类皂苷是以大豆甾醇 B 为配基，在其 C22-OH 上结合 2,3-二氢-2,5-二羟-6-甲基-4H-吡喃-4-酮 (DDMP) 的单糖皂苷。与大豆甾醇 A 相比，大豆甾醇 B 和 E 缺少 C21-OH。大豆皂苷糖链的组成可以由基因位点控制，如

Sg-1、*Sg-3* 和 *Sg-4*。Shibuya 等^[41]分析了大豆皂苷 I 的生物合成途径，大豆皂苷 I 是由大豆甾醇 B 经连续糖基化反应获得，C3-OH 首先连接一个葡萄糖醛酸生成单葡萄糖醛酸大豆甾醇 B (SBMG)，UGT73P2 (GmSGT2) 催化 SBMG 的 C3-糖链半乳糖糖基化生成大豆皂苷 III，最后 UGT91H4 (GmSGT3) 以 UDP-鼠李糖 (UDP-rhamnose, UDP-Rha) 为供体，进一步延长 C3-糖链生成大豆皂苷 I。Sayama 等^[42]对控制大豆甾醇 A 的 C22-糖链末端糖基多样性的 *Sg-1* 基因位点进行分析，从多个等位基因中鉴定出两种 UGTs：Sg-1^a (UGT73F4) 特异性催化 A0- α 皂苷 C22-阿拉伯糖残基糖基化；Sg-1^b (UGT73F2) 特异性催化 A0- α 皂苷 C22-阿拉伯糖残基葡萄糖基化。Yano 等^[43]从大豆中克隆鉴定了编码 UGT91H9 的 *Sg-3* 基因位点，UGT91H9 与 UGT91H4 序列一致性达 72%，二者都负责大豆皂苷 III 的 C3-糖链末端糖基化，但 UGT91H9 以 UDP-Glc 为供体。Takagi 等^[44]发现 *Sg-4* 基因编码的 UGT73P10 是 UGT73P2 的同源物，能够以 UDP-阿拉伯糖 (UDP-arabinose, UDP-Ara) 为供体糖基化 SBMG 的 C3-糖链，生成大豆皂苷 IV。

Augustin 等^[45]从十字花科植物欧洲山芥 (*Barbarea vulgaris*) 和花叶欧洲山芥 (*Barbarea variegata*) 的 cDNA 文库中筛选到能糖基化齐墩果酸 (oleanolic acid) 的 BvUGT1，与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 来源的 UGT73C5 (催化油菜素内酯和油菜素甾酮的 C23-OH 糖基化^[46]) 的序列一致性达 83%。接着又从 G 型和 P 型植物中分离鉴定了 4 个 BvUGT1 的同源 UGTs：UGT73C10、UGT73C11、UGT73C12 和 UGT73C13。这 4 个酶均能催化齐墩果酸和常春藤皂苷元的 C3-OH 糖基化，生成相应的 3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷；UGT73C12 和 UGT73C13 还

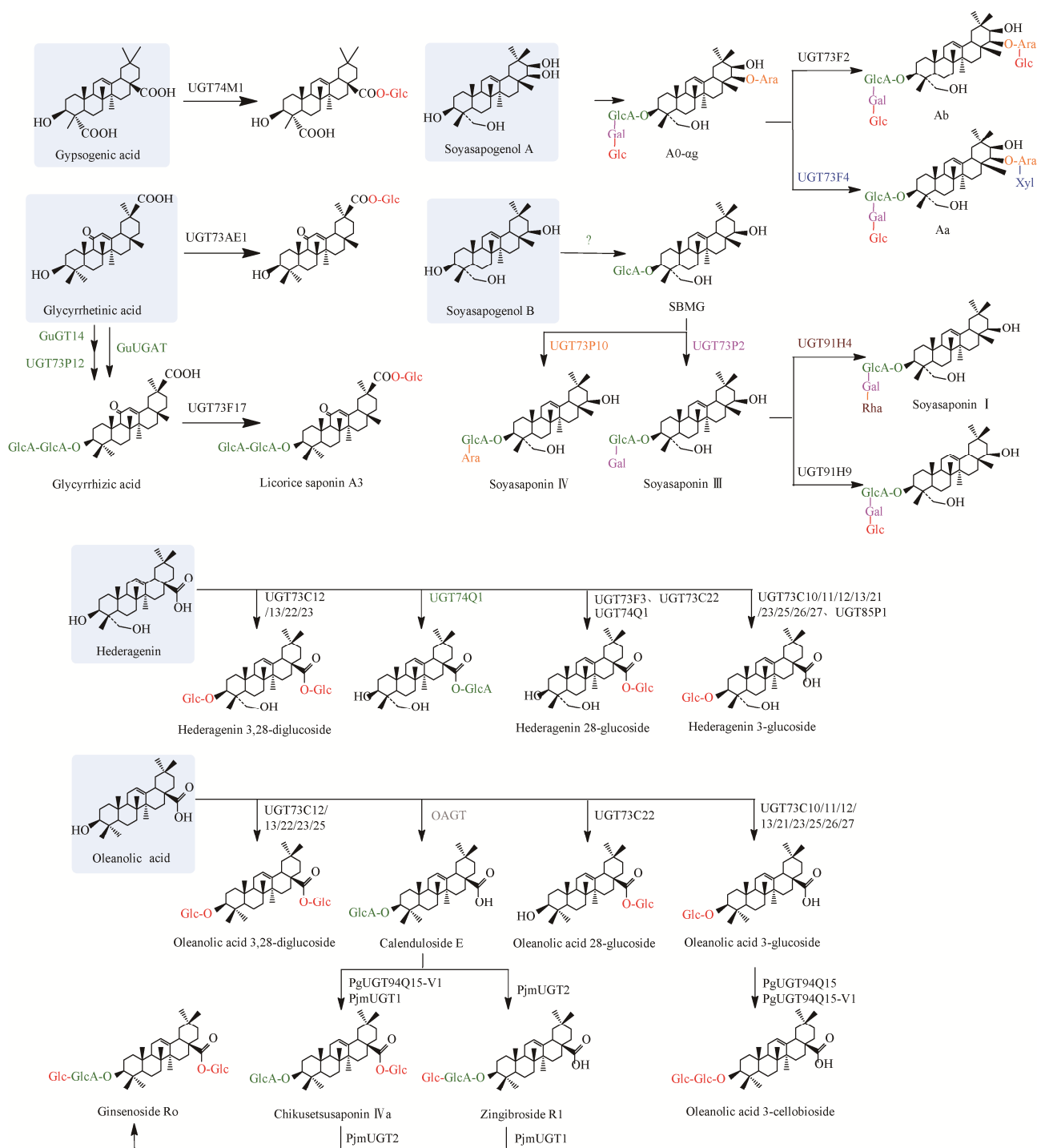


图3 植物 UGTs 催化的齐墩果烷型三萜苷元的糖基化反应 UDP-Glc: UDP-葡萄糖; UDP-Xyl: UDP-木糖; UDP-Gal: UDP-半乳糖; UDP-Rha: UDP-鼠李糖; UDP-Ara: UDP-阿拉伯糖; UDP-GlcA: UDP-葡萄糖醛酸

Figure 3 Glycosylation of oleanane-type pentacyclic triterpenoids by plant UGTs. UDP-Glc: UDP-glucose; UDP-Xyl: UDP-xylose; UDP-Gal: UDP-galactose; UDP-Rha: UDP-rhamnose; UDP-Ara: UDP-arabinose; UDP-GlcA: UDP-glucuronic acid.

能同时糖基化齐墩果酸和常春藤皂苷元的 C3-OH 和 C28-COOH, 生成 3,28-二葡萄糖苷。Erthmann 等^[47]从欧洲山芥中又鉴定出一系列 UGT73C 亚家族的 UGTs (UGT73C21、UGT73C22、UGT73C23、UGT73C25、UGT73C26、UGT73C27), 都能以齐墩果酸和常春藤皂苷元为底物, 催化 C3-OH 和/或 C28-COOH 糖基化, 表明 UGTs 在欧洲山芥中存在多样性。

1.1.4 以乌苏烷型五环三萜为底物

乌苏烷型三萜大多是乌苏酸 (ursolic acid) 的衍生物, 在植物界分布广泛, 具有显著的药理活性。研究表明, 乌苏酸在体外对多种肿瘤细胞株的生长有抑制作用^[48], 如 A549 人肺腺癌细胞、P388 和 L1210 白血病细胞、Burkitt 淋巴瘤 P3HR1 细胞等; 积雪草苷、羟基积雪草苷对肿瘤细胞 MK-1、B16F10、HeLa 的增殖有

抑制作用。Ji 等^[49]从梅叶冬青 (*Ilex asprella*) 的转录组中分离出 UGT74AG5, 能够糖基化乌苏酸的 C28-COOH 生成乌苏酸 28-O-β-D-吡喃葡萄糖苷, 还能催化齐墩果酸、常春藤皂苷元和毛冬青皂苷元 A 的 C28-COOH 糖基化生成相应单糖苷, 说明 UGT74AG5 对五环三萜酸的 C28-COOH 具有区域特异性。Kim 等^[50]从积雪草 (*Centella asiatica* L.) Urban 中鉴定出 UGT73AH1, 能糖基化积雪草酸 (asiatic acid) 的 C28-COOH 生成相应单糖苷, 但对其他位置 C2α-、C3β-及 C23-OH 是否有催化作用尚不明确。De Costa 等^[51]又鉴定出积雪草 UGT73AD1 基因, 体外表达确定 UGT73AD1 能够特异性糖基化积雪草酸和羟基积雪草酸 (madecassic acid) 的 C28-COOH, 生成对应的单糖苷, 但最终生成积雪草苷 (asiaticoside) 和羟基积雪草苷 (madecassoside) 的 UGTs 尚需进一步研究 (图 4)。

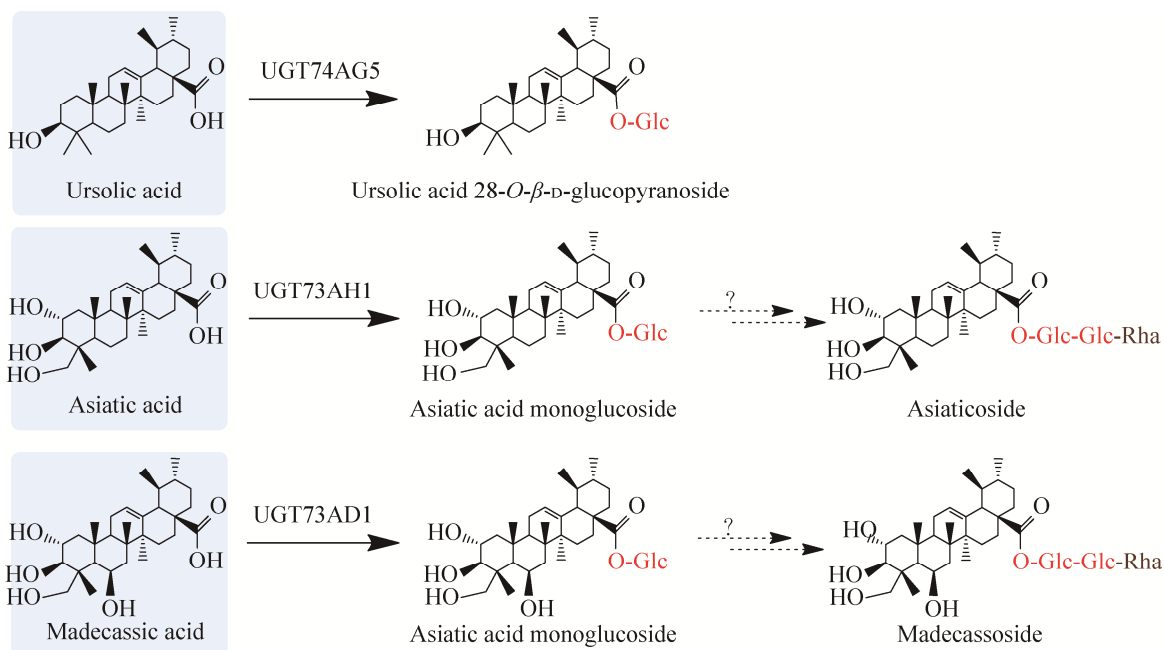


图 4 植物 UGTs 催化的乌苏烷型三萜苷元的糖基化反应 UDP-Glc: UDP-葡萄糖; UDP-Rha: UDP-鼠李糖

Figure 4 Glycosylation of ursane-type pentacyclic triterpenoids by plant UGTs. UDP-Glc: UDP-glucose; UDP-Rha: UDP-rhamnose.

1.2 动物 UGTs

UGTs 在动物体内也普遍存在。哺乳动物 UGTs 以 UDP-GlcA 为供体,催化许多内源底物及毒物的糖基化,负责内外源性化合物体内代谢消除和解毒的过程。Li 等^[52]从人 (*Homo sapiens*) 肝微粒体中获得了参与化合物代谢的 12 种同工酶,通过功能鉴定确定了 UGT1A4 是参与 PPD 葡萄糖醛酸化的主要同工酶,能在 UDP-GlcA 存在的情况下,催化 PPD 的 C3-OH 发生葡萄糖醛酸化反应,生成 PPD-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷 (PPDG) (图 5)。在非哺乳动物体内同样可见 UGTs 的广泛分布,如鸟类^[53]、鱼类^[54]和昆虫^[55]等。刘增虎^[56]从鳞翅目昆虫家蚕体内克隆得到的 BmUGT4965 对黄酮类化合物有糖基化作用,在家蚕体内通过糖基化产物发挥抗氧化作用。王渊明^[57]从鲤科鱼属脊椎动物斑马鱼体内鉴定了 40 个具有葡萄糖醛酸化活性的 UGTs,分为 UGT1、UGT2、UGT5 三个家族,UGT1 家族成员对大多数酚类底物及胆红素和双氯芬酸有催化作用,UGT5 家族成员对酚类和类固醇类底物有催化作用。目前尚未有报道非哺乳动物来源的 UGTs 对三萜类底物有糖基化作用。

1.3 真核微生物 UGTs

除植物和动物外,UGTs 在部分原生生物和真菌中也有发现,如幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter*

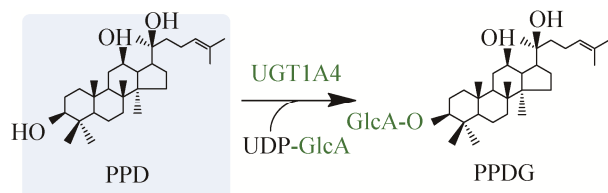


图 5 人源 UGT 催化的三萜苷元糖基化反应
Figure 5 Glycosylation of triterpenoids by human UGT. UDP-GlcA: UDP-glucuronic acid.

pylori)、盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*)、蘑菇 (*Agaricus campestris*) 等,主要催化甾醇类化合物糖基化^[58]。Warnecke 等^[59]从不同种类酵母以及盘基网柄菌中克隆鉴定出 4 个与植物甾醇糖基转移酶 UGT80A1、UGT80A2 序列相似的 UGTs: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 UGT51、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 的 UGT51B1、白假丝酵母 (*Candida albicans*) 的 UGT51C1 和盘基网柄菌的 UGT52,可以使多种甾醇如胆固醇、谷甾醇和麦角甾醇等发生糖基化,生成相应甾醇葡萄糖苷。Zhuang 等^[60]发现酿酒酵母 UGT51 还能催化 PPD 的 C3-OH 糖基化生成 Rh2 (图 6),但转化率仅有 13%。对 UGT51 进行半理性设计,获得的突变体 M7-1 与野生型相比催化效率提高约 1 800 倍。

2 原核生物 UGTs

近年来,从原核生物中鉴定的一些 UGTs 在三萜皂苷的结构修饰方面也有广泛应用 (图 7)。Luo 等^[61]从枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CCTCC AB2012913 中克隆出 3 个 UGT 基因 *ydhE1*、*yojK1* 和 *yjiC1*,在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中成功表达并纯化。体外功能验证发现 YojK1 和 YjiC1 能催化人参皂苷 Rh1 的 C3-OH 的糖基化,且 YjiC1 的催化活性高于 YojK1,实现了非天然人参皂苷

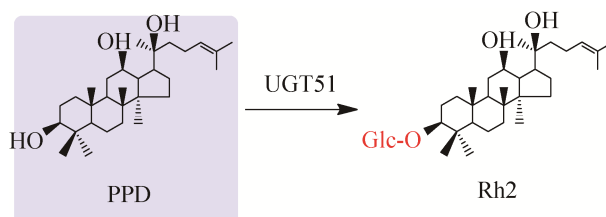


图 6 真核微生物 UGT 催化的三萜苷元糖基化反应
Figure 6 Glycosylation of triterpenoids by eukaryotic microbial UGT. UDP-Glc: UDP-glucose.

3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-6-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-20(*S*)-原人参三醇的体外酶促合成,该化合物是第一个被报道的在 C3 位和 C6 位同时连有 β -葡萄糖基的三萜皂苷。Wang 等^[62]从枯草芽孢杆菌 KCTC1022 中克隆得到糖基转移酶 BSGT1,证明其能够催化人参皂苷 F1 的 C3-OH 糖基化生成非天然人参皂苷 (20*S*)-3 β ,6 α ,12 β ,20-四羟达玛烷-24-烯-20-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (I a),药理活性评价发现 I a 能够下调酪氨酸酶活性从而减少 B16BL6 细胞内黑色素合成,且效果强于人参皂苷 F1。Liang 等^[63]从枯草芽孢杆菌 CTCC 63501 中克隆到糖基转移酶 UGT109A1,能催化 DM 的 C3-OH 和 C20-OH、PPD 和 PPT 的 C3-OH 和 C12-OH 糖基化分别生成非天然人参皂苷 3 β -*O*-Glc-DM、3 β ,20*S*-di-*O*-Glc-DM、3 β ,12 β -di-*O*-Glc-PPD 和 3 β ,12 β -di-*O*-Glc-PPT,这些非天然人参皂苷均有良好的抗癌活性,其中 3 β ,12 β -di-*O*-Glc-PPD 的抗癌活性最高。Dai 等^[64]从枯草芽孢杆菌 168 中分离到糖基转移酶 Bs-YjiC,体外酶促反应验证了其底物杂泛性,能以 UDP-Glc 为供体糖基化黄酮类、苯酮类、姜黄素类、木质素类、三萜类等带有不同亲核基团的化合物,生成多种糖基化产物。序列比对发现枯草芽孢杆菌 168 的 Bs-YjiC 与枯草芽孢杆菌 CTCC 63501 的 UGT109A1 氨基酸序列一致性高达 94.39%。对于三萜类化合物, Bs-YjiC 能够糖基化 PPD 及 PPD 型人参皂苷的 C3-和/或 C12-OH,生成天然人参皂苷 Rh2 和非天然人参皂苷 F12 (3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-12-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-20(*S*)-原人参二醇);或糖基化 PPT 及 PPT 型人参皂苷的 C3-、C6-和/或 C12-OH,生成天然人参皂苷 Rh1 和 4 种非天然人参皂苷(3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-20(*S*)-原人参三醇、3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-6-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-20(*S*)-原人参三醇、

3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-12-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-20(*S*)-原人参三醇、3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-6-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-12-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-20(*S*)-原人参三醇)。Bs-YjiC 还能以 UDP-半乳糖 (UDP-galucose, UDP-Gal) 和 UDP-GlcNAc 为供体糖基化 PPT 生成其他单糖苷,但产物多样性和转化效率都降低^[65-66]。Hu 等^[67]还证明了 Bs-YjiC 可选择性糖基化人参皂苷 Rg3 的 C12-OH,生成非天然人参皂苷 Rd12,其对多种癌细胞(如结肠癌、胃癌、肺癌细胞)的抑制活性远强于 Rg3。

Wang 等^[68]从鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 中分离到 1 种糖基转移酶 LRGT,功能鉴定发现其能延长人参皂苷 Rh2 的 C3-糖链,生成 2 种新型非天然人参皂苷:葡糖基 Rh2 ((20*S*)-3 β ,12 β ,20-四羟达玛烷-24-烯-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖 (1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷),其分子式和分子量与 Rg3 相同,但 C3 位的第二个葡萄糖以 C6-C1 键连接,是 Rg3 的异构体 (C2-C1);二葡糖基 Rh2((20*S*)-3 β ,12 β ,20-四羟达玛烷-24-烯-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖 (1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷),在 Rh2 的 C3-OH 以 C6-C1 键连接 2 个葡萄糖基。药理活性研究发现二葡糖基 Rh2 在 10 μ mol/L 浓度下对 A549 肺癌细胞的作用强于 Rh2 和 Rg3,而对正常细胞的毒性弱于 Rh2 和 Rg3,有望成为新的候选抗癌药物。

Chang 等^[69]对多种芽孢杆菌属的 UGTs 进行筛选,得到能糖基化雷公藤红素 C29-COOH 的 BsUGT489 和 BsGT110,后者活性更强。雷公藤红素 (celastrol) 是一个典型的木栓烷型三萜类化合物,具有多种生物活性,但其潜在的毒性和低水溶性限制了它的应用,糖基化生成的雷公藤红素-29-*O*- β -葡萄糖苷能保持良好活性同时毒性降低、水溶性提高,具有更好的成药性。

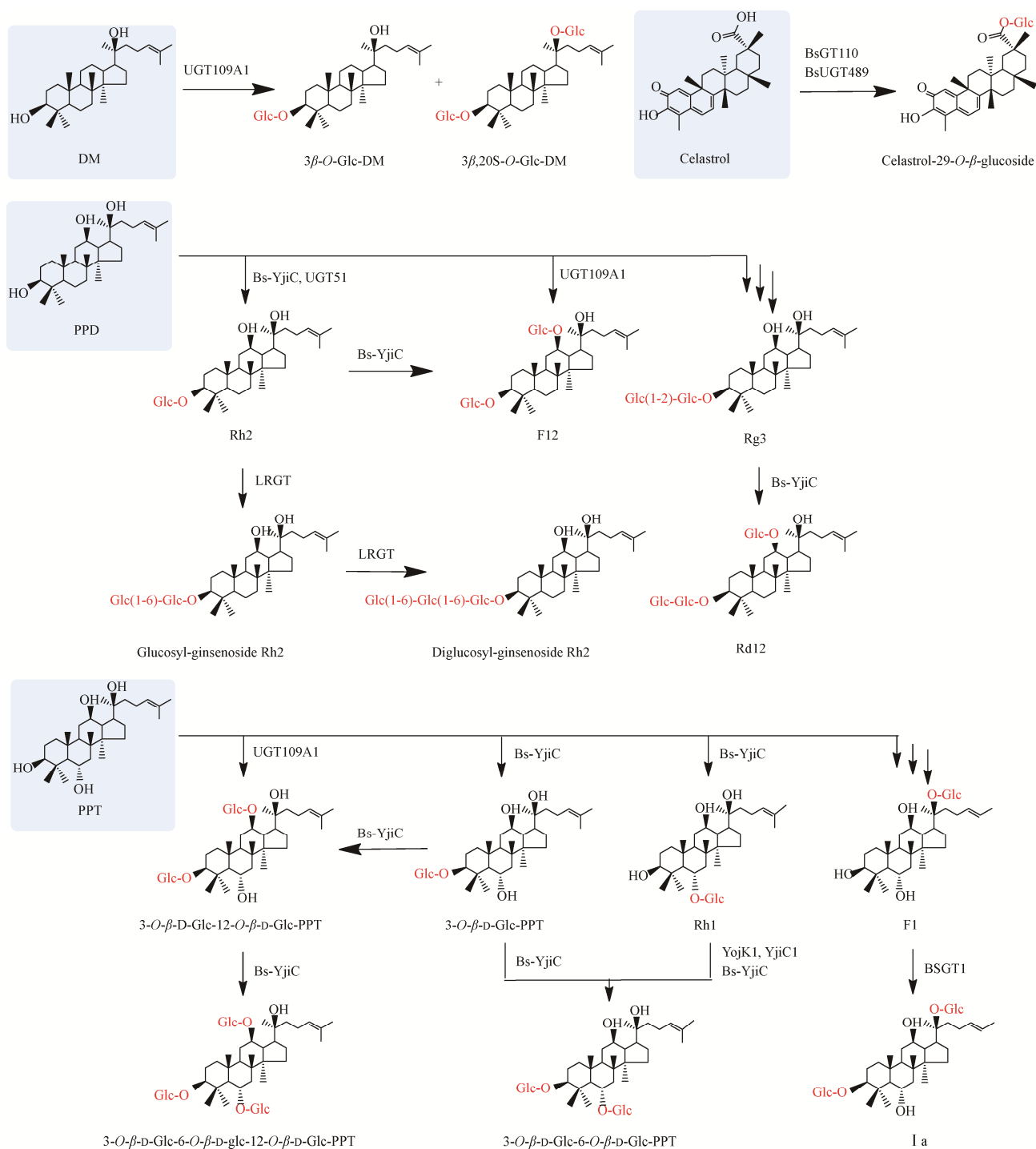


图7 原核生物 UGTs 催化的三萜苷元糖基化反应

Figure 7 Glycosylation of triterpenoids by prokaryotic UGTs. UDP-Glc: UDP-glucose.

3 UGTs 的基本结构特点

随着结晶自动化技术、X 射线衍射技术等

蛋白质结晶和分析技术的飞速发展,越来越多的 UGTs 的晶体结构被解析^[70-72],对于蛋白质结构的研究愈发清晰。UGTs 属于经典的 GT-B

结构, 由 2 个不同的 Rossmann 样结构域组成, 即 C 端结构域和 N 端结构域, 这 2 个结构域由几个平行的 β -折叠连接到 α -螺旋上, 形成 $\beta/\alpha/\beta$ 型结构^[73]。C 端结构域通常比 N 端结构域保守度更高, 主要负责识别糖基供体。在植物 UGTs 的 C 端都存在一段约 44 个氨基酸组成的保守

序列, 被称为植物次级代谢产物糖基转移酶 (PSPG) 基序^[74](图 8)。其中第 44 个氨基酸是高度保守的谷氨酰胺(Q), 很大程度上决定了 UGTs 对 UDP-Glc 的选择性。在大豆 UGT73P2^[41]和 UGT73P10^[44]序列中, 该位置的 Q 被组氨酸(H)替换后葡萄糖基化活性分别转变为半乳糖

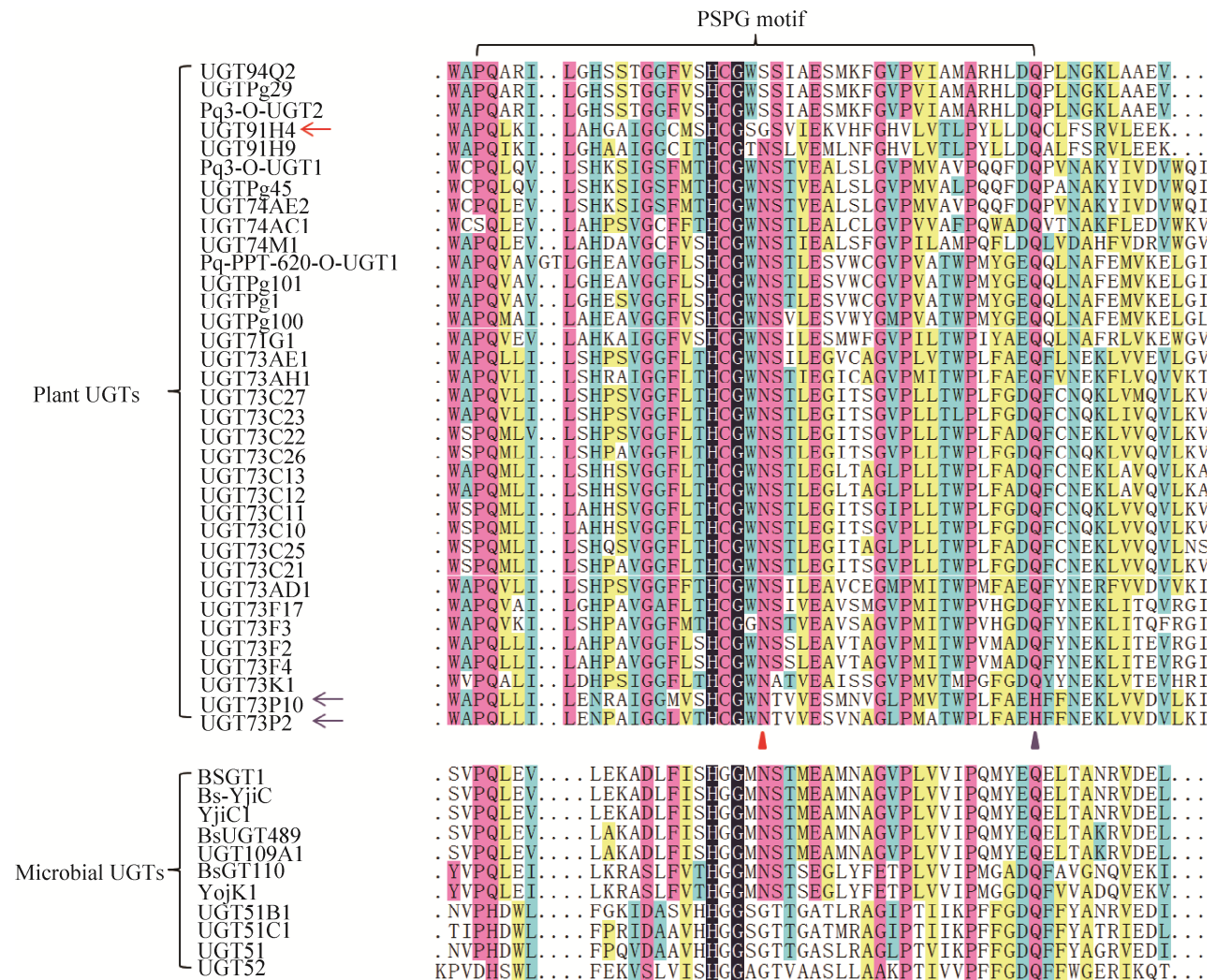


图 8 UGTs 的 PSPG 基序部分的序列比对结果

Figure 8 Sequence alignment of UGTs showing the PSPG motif. Different colors represent the levels of conservatism of amino acids at different location. White: the conservatism of amino acids (CAA)<33%; yellow: 33%≤CAA<50%; green: 50%≤CAA<75%; purple: 75%≤CAA<100%; black: CAA=100%.

基化活性和阿拉伯糖基化活性。PSPG 基序第 23 位的天冬酰胺(N)也是与 UGTs 供体选择性相关的关键位点,在 UGT91H4^[41]序列中,该位置的极性氨基酸 N 被替换为非极性的甘氨酸(G)后葡萄糖基化活性即转变为鼠李糖基化活性,但在 UGTPg29^[9]、UGT94Q2^[7]及 Pq3-O-UGT2^[15]中,该位置替换成同为极性氨基酸的丝氨酸(S),未影响 UGTs 的糖基供体选择性。除此之外,也有一些 UGTs 同时具有多种供体选择性,以不同的 UDP-糖为供体催化同一底物糖基化。例如, PgUGT94Q13^[19]对人参皂苷 Rg1 和 Rh1 的糖基化可以同时利用 UDP-Glc 和 UDP-Xyl 作为供体,但对 UDP-Xyl 有明显的偏好性; Bs-YjiC^[66]对 PPT 除了有葡萄糖基化活性外,还能以 UDP-Gal 和 UDP-GlcNAc 为供体催化 PPT 半乳糖基化或乙酰葡萄糖基化生成其他单糖苷,但产物多样性和转化效率都降低,表明 Bs-YjiC 对 UDP-Glc 也具有偏好性。与植物来源的 UGTs 相比,微生物 UGTs 的 C 端也有一段与 PSPG 基序类似的保守序列,除了几个必要的保持糖基化活性的位点外,其他位点保守度很低,表明微生物 UGTs 可能具有更广的底物杂泛性,但目前未发现其中决定供体选择性的关键氨基酸残基。

N 端结构域主要负责底物受体的识别与结合, N 端保守性较低是造成 UGTs 底物杂泛性的主要原因。同一个 UGT 可以催化多种结构不同的底物糖基化, UGT73AE1^[32]能够催化包括木质素、类黄酮、香豆素、蒽醌、三萜等多种结构类型的芳香型苷元糖基化,且糖基化产物有更好的药物活性;通过定向进化获得的 UGT74AC1^[22]突变体 M7 也表现出底物杂泛性,能催化泻根甜苷元、PPD、PPT、赤芝酸、灵芝酸、松苓新酸等 10 种三萜苷元的 C3-OH 糖基化; Bs-YjiC 也能糖基化黄酮类、苯酮类、姜黄

素类、木质素类、三萜类等多种带有不同亲核基团-OH、-NH₂、-SH 的化合物,生成多种糖基化产物^[64]。部分 UGTs 的底物选择较为专一,但可以同时糖基化同一底物的不同位点,生成多种糖基化产物,增加了糖苷类化合物的多样性。这种情况在微生物 UGTs 中更为突出, UGT109A1^[63]和 Bs-YjiC^[65-66]都能够葡萄糖基化人参皂苷元 DM、PPD 或 PPT 的不同位点,生成一系列天然及非天然人参皂苷。

从前述的酶功能中可以发现,不同来源 UGTs 的糖基化活性有重叠,人参来源的 PgUGT74AE2^[7]和 UGTPg45^[9]、三七来源的 Pn1-31^[18]、西洋参来源的 Pq3-O-UGT1^[14]、枯草芽孢杆菌来源的 Bs-YjiC^[65]、酿酒酵母来源的 UGT51^[60]以及人源 UGT1A4^[52]都能够催化 PPD 的 C3-OH 糖基化。另外,前几种 UGTs 还能催化 PPD 葡萄糖基化生成人参皂苷 Rh2,而 UGT1A4 催化葡萄糖醛酸化生成 PPDG;人参 PgUGT94Q2^[7]、PgUGT94Q15^[13]、UGTPg29^[9]、UGRh2GT^[6]、PgUGT71A27^[11]、三七 Pn3-31^[18]、西洋参 Pq3-O-UGT2^[15]以及鼠李糖乳杆菌来源的 LRGT^[68]都能够延长 Rh2 的 C3-葡萄糖链,人参属植物来源的 UGTs 催化产物是人参皂苷 Rg3,而 LRGT 的催化产物葡糖基 Rh2 是 Rg3 的异构体,第二个葡萄糖基以 C6-C1 键连接。欧洲山芥的一系列 UGT73C 亚家族的 UGTs 都能以齐墩果酸和常春藤皂苷元为底物,催化 C3-OH 和/或 C28-COOH 糖基化,而产物比例有所不同^[45-47]。

我们从 NCBI 获得了参与三萜皂苷生物合成的 48 个植物、微生物及哺乳动物来源的 UGTs 序列,对它们进行了系统进化分析(图 9),同为欧洲山芥来源的 10 个 UGT73C 亚家族成员间功能高度相似,序列一致性高达 87.27%。这种情况在不同植物来源的 UGTs 间也有存在, Pq3-O-UGT1 与 PgUGT74AE2、UGTPg45 三者

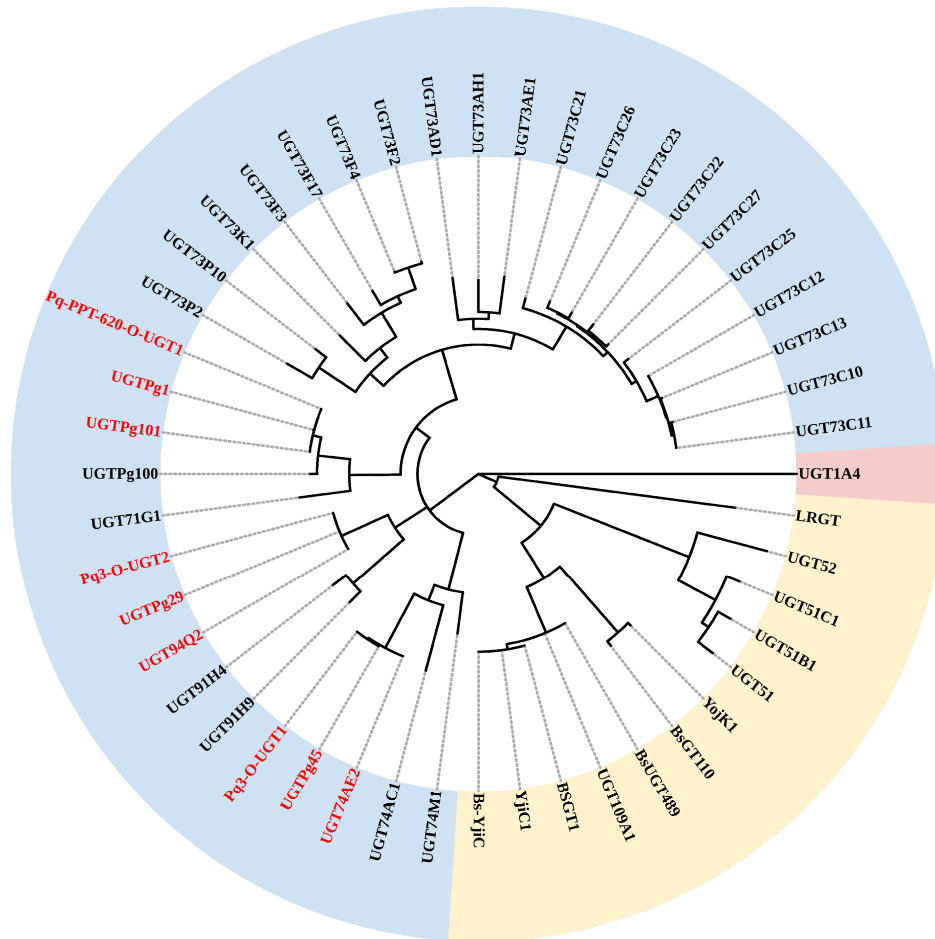


图9 多种来源 UGTs 的系统进化树

Figure 9 Phylogenetic trees of multiple sources of UGTs. Blue: plant UGTs; orange: eukaryotic microbial and prokaryotic UGTs; purple: human UGT. The UGTs in red show high similarity of amino acid sequence with each other.

的一致性达 98.40%, Pq3-O-UGT2 与 PgUGT94Q2、UGTPg29 三者的一致性达 99.77%, Pq-PPT-6, 20-O-UGT1 与 UGTPg101 的一致性达 99.58%。系统进化分析发现, 各组功能相似的 UGTs 间也存在较近的进化关系, 表明所属植物人参和西洋参之间也有密切的进化关系。而对于微生物来源的 UGT51 和 Bs-YjiC, 即使功能类似, 亲缘关系也较远。

4 结论

糖基化反应在植物生长发育过程中以及天

然药物的生物合成中均有重要作用, 利用糖基转移酶还可以实现很多天然产物的定向生物转化, 从而获得结构新颖、活性丰富的糖苷类化合物。在异源系统如微生物或植物中设计合成皂苷类化合物时, UGTs 的鉴定是关键。许多 UGTs 对糖基供体和底物受体具有杂泛性, 通过发现新型 UGTs 并对其结构改造, 不仅可以显著提高三萜皂苷在异源系统中的产量, 甚至还能获得许多具有生物活性的新型非天然化合物。

随着越来越多的 UGTs 得到功能鉴定, 已

有大量三萜皂苷的生物合成途径被解析^[75]。利用代谢工程对大肠杆菌、酿酒酵母等微生物系统进行合理设计及改造,并结合 DNA 重组、模块化途径工程、蛋白质工程等技术^[76],已经成功实现齐墩果酸^[77]、甘草次酸^[78]、人参皂苷 CK^[79]、Rh2^[9]、三七皂苷 NgR1、NgR2^[19]、罗汉果苷 V^[23]等多种三萜苷元及皂苷的异源生物合成。可以预见,随着基因组测序技术的不断完善,UGTs 的相关研究会越来越深入,同时随着微生物系统的改造以及生物元件的设计与组装等技术手段的不断发展,越来越多的三萜皂苷将会基于合成生物学技术实现高效异源的生物合成。

REFERENCES

- [1] Kim YJ, Zhang DB, Yang DC. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6): 717-735.
- [2] Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 2011, 72(6): 435-457.
- [3] Paquette S, Moller BL, Bak S. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry*, 2003, 62(3): 399-413.
- [4] Jones P, Vogt T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, 2001, 213(2): 164-174.
- [5] Chen CF, Chiou WF, Zhang JT. Comparison of the pharmacological effects of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(9): 1103-1108.
- [6] He YP, Yue CJ. Establishment of measurement system of ginsenoside Rh2 glycosyltransferase activity. *Me Plant*, 2010, 1(4): 58-60.
- [7] Jung SC, Kim W, Park SC, et al. Two ginseng UDP-glycosyltransferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(12): 2177-2188.
- [8] 张婷婷, 梁会超, 巩婷, 等. 人参糖基转移酶 PgUGT74AE2 催化生成新型人参三醇皂苷研究. *药学学报*, 2018, 53(9): 1565-1570. Zhang TT, Liang HC, Gong T, et al. Studies on the enzymatic synthesis of a new PPT-type ginsenoside via UDP-glycosyltransferase PgUGT74AE2 from *Panax ginseng*. *Acta Pharm Sin*, 2018, 53(9): 1565-1570 (in Chinese).
- [9] Wang P, Wei Y, Fan Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts. *Metab Eng*, 2015, 29: 97-105.
- [10] Wei W, Wang P, Wei Y, et al. Characterization of *Panax ginseng* UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F1 and Rh1 in metabolically engineered yeasts. *Mol Plant*, 2015, 8(9): 1412-1424.
- [11] Jung SC. Reconstruction and optimization of the biosynthetic pathway for the mass production of minor ginsenosides[D]. Korea: Korea Advanced Institute of Science and Technology, 2015.
- [12] Lu J, Yao L, Li JX, et al. Characterization of UDP-glycosyltransferase involved in biosynthesis of ginsenosides Rg₁ and Rb₁ and identification of critical conserved amino acid residues for its function. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(36): 9446-9455.
- [13] Yang C, Li C, Wei W, et al. The unprecedented diversity of UGT94-family UDP-glycosyltransferases in *Panax* plants and their contribution to ginsenoside biosynthesis. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15394.
- [14] Lu C, Zhao SJ, Wang XS. Functional regulation of a UDP-glucosyltransferase gene (*Pq3-O-UGT1*) by RNA interference and overexpression in *Panax quinquefolius*. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2017, 129(3): 445-456.
- [15] Lu C, Zhao S, Wei G, et al. Functional regulation of ginsenoside biosynthesis by RNA interferences of a UDP-glycosyltransferase gene in *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 111: 67-76.
- [16] Feng PC, Li GX, Wang XS, et al. Identification and RNAi-based gene silencing of a novel UDP-glycosyltransferase from *Panax quinquefolius*. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2021, 144(3): 567-576.
- [17] Yue CJ, Zhong JJ. Purification and characterization of UDPG: ginsenoside Rd glucosyltransferase from suspended cells of *Panax notoginseng*. *Process Biochem*, 2005, 40(12): 3742-3748.
- [18] 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. *Metab Eng*, 2020, 61: 131-140.
- [19] 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*. *Metab Eng*, 2021, 66: 87-97.
- [20] Liang TT, Zou LQ, Sun SJ, et al. Hybrid sequencing of the *Gynostemma pentaphyllum* transcriptome provides new insights into gypenoside biosynthesis. *BMC Genom*, 2019, 20(1): 632.
- [21] Dai L, Liu C, Zhu Y, et al. Functional characterization of cucurbitadienol synthase and triterpene glycosyltransferase involved in biosynthesis of mogrosides from *Siraitia grosvenorii*. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56(6): 1172-1182.
- [22] Li J, Yang JG, Mu SC, et al. Efficient O-glycosylation of triterpenes enabled by protein engineering of plant glycosyltransferase UGT74AC1. *ACS Catal*, 2020, 10(6): 3629-3639.
- [23] Itkin M, Davidovich-Rikanati R, Cohen S, et al. The biosynthetic pathway of the nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from *Siraitia grosvenorii*. *PNAS*, 2016, 113(47): E7619-E7628.
- [24] Wang CC, Chen LH, Xu CQ, et al. A comprehensive review for phytochemical, pharmacological, and biosynthesis studies on *Glycyrrhiza* spp. *Am J Chin Med*, 2020, 48(1): 17-45.
- [25] Li XQ, Song YN, Wang SJ, et al. Saikosaponins: a review of pharmacological effects. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(5): 399-411.
- [26] Bahbah EI, Negida A, Nabet MS. Purposing Saikosaponins for the treatment of COVID-19. *Med Hypotheses*, 2020, 140: 109782.
- [27] Matsuda H, Samukawa K, Kubo M. Anti-inflammatory activity of ginsenoside Ro. *Planta Med*, 1990, 56(1) 19-23.
- [28] Wang SN, Chen XL, Cheng J, et al. Calunduloside E inhibits HepG2 cell proliferation and migration via p38/JNK-HMGB1 signalling axis. *J Pharmacol Sci*, 2021, 147(1): 18-26.
- [29] Tang JR, Chen G, Lu YC, et al. Identification of two UDP-glycosyltransferases involved in the main oleanane-type ginsenosides in *Panax japonicus* var. *major*. *Planta*, 2021, 253(5): 91.
- [30] Meesapyodsuk D, Balsevich J, Reed DW, et al. Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs encoding β -amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. *Plant Physiol*, 2007, 143(2): 959-969.
- [31] Rahimi S, Kim J, Mijakovic I, et al. Triterpenoid-biosynthetic UDP-glycosyltransferases from plants. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(7): 107394.
- [32] Xie K, Chen R, Li J, et al. Exploring the catalytic promiscuity of a new glycosyltransferase from *Carthamus tinctorius*. *Org Lett*, 2014, 16(18): 4874-4877.
- [33] Xu G, Cai W, Gao W, et al. A novel glucuronosyltransferase has an unprecedented ability to catalyse continuous two-step glucuronosylation of glycyrrhetic acid to yield glycyrrhizin. *New Phytol*, 2016, 212(1): 123-135.
- [34] Chen K, Hu ZM, Song W, et al. Diversity of O-glycosyltransferases contributes to the biosynthesis of flavonoid and triterpenoid glycosides in *Glycyrrhiza uralensis*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(8): 1858-1866.
- [35] Nomura Y, Seki H, Suzuki T, et al. Functional specialization of UDP-glycosyltransferase 73P12 in licorice to produce a sweet triterpenoid saponin, glycyrrhizin. *Plant J*, 2019, 99(6): 1127-1143.
- [36] He J, Chen K, Hu ZM, et al. UGT73F17, a new glycosyltransferase from *Glycyrrhiza uralensis*, catalyzes the regiospecific glycosylation of pentacyclic triterpenoids. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54(62): 8594-8597.
- [37] Nagashima S, Inagaki R, Kubo A, et al. cDNA cloning and expression of isoflavonoid-specific glucosyltransferase from *Glycyrrhiza echinata* cell-suspension cultures. *Planta*, 2004, 218(3): 456-459.
- [38] Achnine L, Huhman DV, Farag MA, et al. Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, 2005, 41(6): 875-887.
- [39] Naoumkina MA, Modolo LV, Huhman DV, et al. Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 850-866.
- [40] 全吉淑, 尹学哲, 田中真实, 等. 大豆胚轴中 B 类、E 类和 DDMP 大豆皂甙的分离纯化. *食品科学*, 2003, 24(2): 107-109.
- Quan JS, Yin XZ, TANAKA M, et al. Isolation and purification of group B, group E and DDMP- saponins

- from soybean hypocotyl. *Food Sci*, 2003, 24(2): 107-109 (in Chinese).
- [41] Shibuya M, Nishimura K, Yasuyama N, et al. Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycine max*. *FEBS Lett*, 2010, 584(11): 2258-2264.
- [42] Sayama T, Ono E, Takagi K, et al. The *Sg-1* glycosyltransferase locus regulates structural diversity of triterpenoid saponins of soybean. *Plant Cell*, 2012, 24(5): 2123-2138.
- [43] Yano R, Takagi K, Tochigi S, et al. Isolation and characterization of the soybean *Sg-3* gene that is involved in genetic variation in sugar chain composition at the C-3 position in soyasaponins. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(4): 792-805.
- [44] Takagi K, Yano R, Tochigi S, et al. Genetic and functional characterization of *Sg-4* glycosyltransferase involved in the formation of sugar chain structure at the C-3 position of soybean saponins. *Phytochemistry*, 2018, 156: 96-105.
- [45] Augustin JM, Drok S, Shinoda T, et al. UDP-glycosyltransferases from the UGT73C subfamily in *Barbarea vulgaris* catalyze saponin 3-O-glucosylation in saponin-mediated insect resistance. *Plant Physiol*, 2012, 160(4): 1881-1895.
- [46] Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, et al. The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *PNAS*, 2005, 102(42): 15253-15258.
- [47] Erthmann PØ, Agerbirk N, Bak S. A tandem array of UDP-glycosyltransferases from the UGT73C subfamily glycosylate saponin, forming a spectrum of mono- and bisdesmosidic saponins. *Plant Mol Biol*, 2018, 97(1-2): 37-55.
- [48] Glaser T, Winter S, Groscurth P, et al. Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. *Br J Cancer*, 1999, 80(5-6): 756-765.
- [49] Ji XY, Lin SM, Chen YY, et al. Identification of α -amyrin 28-carboxylase and glycosyltransferase from *Ilex asprella* and production of ursolic acid 28-O- β -D-glucopyranoside in engineered yeast. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 612.
- [50] Kim OT, Jin ML, Lee DY, et al. Characterization of the asiatic acid glucosyltransferase, UGT73AH1, involved in asiaticoside biosynthesis in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2630.
- [51] De Costa F, Barber CJS, Kim YB, et al. Molecular cloning of an ester-forming triterpenoid: UDP-glucose 28-O-glucosyltransferase involved in saponin biosynthesis from the medicinal plant *Centella asiatica*. *Plant Sci*, 2017, 262: 9-17.
- [52] Li J, He C, Fang L, et al. Identification of human UDP-glucuronosyltransferase 1A4 as the major isozyme responsible for the glucuronidation of 20(S)-protopanaxadiol in human liver microsomes. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 205.
- [53] Kawai YK, Ikenaka Y, Ishizuka M, et al. The evolution of UDP-glycosyl/glucuronosyltransferase 1E (UGT1E) genes in bird lineages is linked to feeding habits but UGT2 genes is not. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205266.
- [54] George SG, Taylor B. Molecular evidence for multiple UDP-glucuronosyltransferase gene families in fish. *Mar Environ Res*, 2002, 54(3-5): 253-257.
- [55] Ahn SJ, Vogel H, Heckel DG. Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. *Insect Biochem Mol Biol*, 2012, 42(2): 133-147.
- [56] 刘增虎. 家蚕尿苷二磷酸—葡萄糖基转移酶基因 BmUGT4965 的克隆和真核表达[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
Liu ZH. Cloning and eukaryotic expression of uridine diphosphate-glucosyltransferase gene BmUGT4965 in the silkworm, *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Southwest University, 2010 (in Chinese).
- [57] 王渊明. 克隆和鉴定斑马鱼 UGT 超家族揭示了一类新颖的药物代谢 UDP-葡萄糖醛酸转移酶[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
Wang YM. Cloning and characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveal a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2015 (in Chinese).
- [58] Grille S, Zaslowski A, Thiele S, et al. The functions of steryl glycosides come to those who wait: recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog Lipid Res*. 2010; 49(3): 262-288.
- [59] Warnecke D, Erdmann R, Fahl A, et al. Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, 1999, 274(19): 13048-13059.
- [60] Zhuang Y, Yang GY, Chen X, et al. Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh2 in yeast via repurposing

- a key promiscuous microbial enzyme. *Metab Eng*, 2017, 42: 25-32.
- [61] Luo SL, Dang LZ, Zhang KQ, et al. Cloning and heterologous expression of UDP-glycosyltransferase genes from *Bacillus subtilis* and its application in the glycosylation of ginsenoside Rh₁. *Lett Appl Microbiol*, 2015, 60(1): 72-78.
- [62] Wang DD, Jin Y, Wang C, et al. Rare ginsenoside Ia synthesized from F1 by cloning and overexpression of the UDP-glycosyltransferase gene from *Bacillus subtilis*: synthesis, characterization, and *in vitro* melanogenesis inhibition activity in BL6B16 cells. *J Ginseng Res*, 2018, 42(1): 42-49.
- [63] Liang H, Hu Z, Zhang T, et al. Production of a bioactive unnatural ginsenoside by metabolically engineered yeasts based on a new UDP-glycosyltransferase from *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*, 2017, 44: 60-69.
- [64] Dai LH, Li J, Yao PY, et al. Exploiting the aglycon promiscuity of glycosyltransferase Bs-YjiC from *Bacillus subtilis* and its application in synthesis of glycosides. *J Biotechnol*, 2017, 248: 69-76.
- [65] Dai L, Liu C, Li J, et al. One-pot synthesis of ginsenoside Rh₂ and bioactive unnatural ginsenoside by coupling promiscuous glycosyltransferase from *Bacillus subtilis* 168 to sucrose synthase. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(11): 2830-2837.
- [66] Dai LH, Li J, Yang JG, et al. Use of a promiscuous glycosyltransferase from *Bacillus subtilis* 168 for the enzymatic synthesis of novel protopanaxatriol-type ginsenosides. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(4): 943-949.
- [67] Hu YM, Li H, Qu YY, et al. Biocatalytic synthesis of a novel bioactive ginsenoside using UDP-glycosyltransferase from *Bacillus subtilis* 168. *Catalysts*, 2020, 10(3): 289.
- [68] Wang DD, Kim YJ, Baek NI, et al. Glycosyltransformation of ginsenoside Rh₂ into two novel ginsenosides using recombinant glycosyltransferase from *Lactobacillus rhamnosus* and its *in vitro* applications. *J Ginseng Res*, 2021, 45(1): 48-57.
- [69] Chang TS, Wang TY, Chiang CM, et al. Biotransformation of celastrol to a novel, well-soluble, low-toxic and anti-oxidative celastrol-29-*O*- β -glucoside by *Bacillus* glycosyltransferases. *J Biosci Bioeng*, 2021, 131(2): 176-182.
- [70] Li L, Modolo LV, Escamilla-Trevino LL, et al. Crystal structure of *Medicago truncatula* UGT85H2—insights into the structural basis of a multifunctional (*Iso*)flavonoid glycosyltransferase. *J Mol Biol*, 2007, 370(5): 951-963.
- [71] Radomska-Pandya A, Bratton SM, Redinbo MR, et al. The crystal structure of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 C-terminal end is the first mammalian UGT target to be revealed: the significance for human UGTs from both the 1A and 2B families. *Drug Metab Rev*, 2010, 42(1): 133-144.
- [72] Dai L, Qin L, Hu Y, et al. Structural dissection of unnatural ginsenoside-biosynthetic UDP-glycosyltransferase Bs-YjiC from *Bacillus subtilis* for substrate promiscuity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 73-78.
- [73] Liang DM, Liu JH, Wu H, et al. Glycosyltransferases: mechanisms and applications in natural product development. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(22): 8350-8374.
- [74] Rahimi S, Kim J, Mijakovic I, et al. Triterpenoid-biosynthetic UDP-glycosyltransferases from plants. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(7): 107394.
- [75] Yao L, Lu J, Wang J, et al. Advances in biosynthesis of triterpenoid saponins in medicinal plants. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(6): 417-424.
- [76] Luo Y, Li BZ, Liu D, et al. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(15): 5265-5290.
- [77] Zhao YJ, Fan JJ, Wang C, et al. Enhancing oleanolic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol*, 2018, 257: 339-343.
- [78] Zhu M, Wang CX, Sun WT, et al. Boosting 11-oxo- β -amyrin and glycyrrhetic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via pairing novel oxidation and reduction system from legume plants. *Metab Eng*, 2018, 45: 43-50.
- [79] Wang P, Wang J, Zhao G, et al. Systematic optimization of the yeast cell factory for sustainable and high efficiency production of bioactive ginsenoside compound K. *Synth Syst Biotechnol*, 2021, 6(2): 69-76.

(本文责编 陈宏宇)