

## 银杏酚酸生物活性及合成途径研究进展

冯致<sup>1,2</sup>, 杨竣茹<sup>2</sup>, 李萌<sup>2</sup>, 王惠<sup>2</sup>, 杨果<sup>2</sup>, 杨婷婷<sup>2</sup>, 刘艳玲<sup>2</sup>, 王义强<sup>1,2\*</sup> (1. 中南林业科技大学林业生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410004; 2. 中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室, 湖南长沙 410004)

**摘要** 银杏酚酸是有多种应用前景的活性成分, 其生物合成途径及其调控机制研究日益增多, 逐渐成为研究热点。概述了银杏酚酸生物活性, 介绍了由脂肪酸合成和聚酮合成共同构成的银杏酚酸合成途径, 总结了合成中所涉及关键酶(ACP、KAS、SAD、PKSⅢ、PKS-cyclase)的相关生化与分子生物学研究进展。最后, 展望了未来研究的方向。该研究为银杏酚酸生物合成调控进一步深入研究提供参考。

**关键词** 银杏酚酸; 生物活性; 合成途径; 关键酶; 聚酮合成

中图分类号 TQ 914 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)23-0035-09

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.23.009

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### Research Progress of the Biological Activities and Synthesis Pathways of Ginkgo Phenolic Acids

FENG Zhi<sup>1,2</sup>, YANG Jun-ru<sup>2</sup>, LI Meng<sup>2</sup> et al (1. Hunan Provincial Key Laboratory for Forestry Biotechnology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004; 2. Key Lab of Non-wood Forest Nurturing and Protection of National Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

**Abstract** Ginkgo phenolic acid is an active component with a variety of application prospects. Its biosynthetic pathways and regulatory mechanisms have been gotten more studies and become a research hotspot. In this research, the bioactive of ginkgo phenolic acid was summarized, the biosynthetic pathway of ginkgo phenolic acid composed of fatty acid synthesis and polyketide synthesis was described, then the biochemical and molecular biology research advances of key enzymes (ACP, KAS, SAD, PKSⅢ and PKS-cyclase) was analyzed and expected. This research provided references for further study on the regulation of ginkgo phenolic acid biosynthesis.

**Key words** Ginkgo phenolic acid; Bioactivity; Synthetic pathway; Key enzyme; Polyketide synthesis

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是现存地球上最古老的树种,有“金色活化石”的称号,作为我国特有的经济裸子植物,集食用(白果)、药用(叶、白果)和观赏等多种价值于一体。银杏白果(种仁)是我国著名保健干果,作为一种营养价值高的药食同源食材,所含白果醇类物质(ginnol)是潜在抗“2019-nCoV”病毒的活性成分<sup>[1]</sup>。银杏叶片富含黄酮类与内酯类物质,以丙酮-水为提取剂的银杏叶提取物(Extraction of *Ginkgo biloba*, EGB)可进一步富集两种活性物质,达到有效治疗心脑血管疾病的目的<sup>[2]</sup>;银杏以其独特的叶形、金黄的叶色、挺拔的树势成为世界著名的园林绿化观赏树种。目前,银杏已在医药、食品、化妆品、盆景和木材等行业有深入的开发,是我国当前及未来农村经济振兴和美丽中国建设的关键经济树种之一。自20世纪70年代以来,我国的银杏资源快速增长,现有资源占全世界的80%以上,除海南、黑龙江和内蒙古3省外,其他各省均有分布(含引种)。当前,全国银杏栽培面积超过33.33万hm<sup>2</sup>,年产白果约11000t、干青叶约10000t,银杏栽培生产第一产业年产值约20亿元,银杏加工、制药(银杏叶药)第二产业年产值达100亿元以上,然而每年因生产废弃外种皮约30000t。张心慧等<sup>[3]</sup>研究结果表明,外种皮中含有银杏酚酸、黄酮、萜内酯和多糖等活性物质,而Itokawa等<sup>[4]</sup>研究表明,银杏酚酸是银杏中除了银杏

内酯和银杏黄酮之外的另一类重要的活性物质,具有杀菌、抑菌、抗炎、抗病毒及驱虫、杀虫作用,极具开发价值。因此,大量废弃的外种皮在污染环境的同时也造成资源的浪费。

20世纪70年代, Gellerman等<sup>[5-7]</sup>从银杏叶、未成熟种仁和成熟外种皮检测到酚脂类物质—银杏酚酸,随后的定量测定显示,银杏酚酸富集于成熟的外种皮中;王杰等<sup>[8]</sup>和李洪庆等<sup>[9]</sup>利用质谱检测技术从银杏酸性提取物中鉴定出4种银杏酸和2种银杏酚;现代医学研究证明,银杏酚酸具有一定的致敏性毒性和细胞毒性,可抗细菌和真菌增长,具有杀灭害虫的功效。已有大田栽培实验证明,银杏酚酸可作为生物源农药进行开发,未来或能在医药和化妆品等多领域进行应用。但相较于银杏黄酮和萜内酯等药理活性明确的物质,银杏酚酸的生物合成途径、调控机制和衍生物功效等未得到深入研究,使得抑制银杏酚酸合成的分子生物学技术和发酵高产银杏酚酸的工程应用研发缓慢,从而阻碍银杏产业的进一步开拓。

鉴于此,笔者概述了近年来银杏酚酸生物活性研究基础,详述了由脂肪酸合成和聚酮合成共同构成的银杏酚酸合成途径,总结了合成中所涉及关键酶的催化机制,展望了未来研究的方向,旨在为银杏酚酸的后续研究提供参考和理论支撑。

### 1 银杏酚酸生物活性

银杏酚酸属于酚脂家族的一员,该家族中有4大类,包括烷基酚(alkylphenols)、烷基间苯二酚(alkylresorcinols)、漆酸(anacardic acids)和烷基儿茶酚(alkylcatechols)<sup>[10]</sup>。它们是植物中一类次生代谢产物,不同种类的植物可能含独有的酚脂类物质,主要生理功能是抗生物或非生物类胁迫。

**1.1 银杏酚酸组成与理化性质** 银杏酚酸为银杏重要次生代谢产物,属漆酚酸类物质,包括银杏酸(gingolic acid)、银

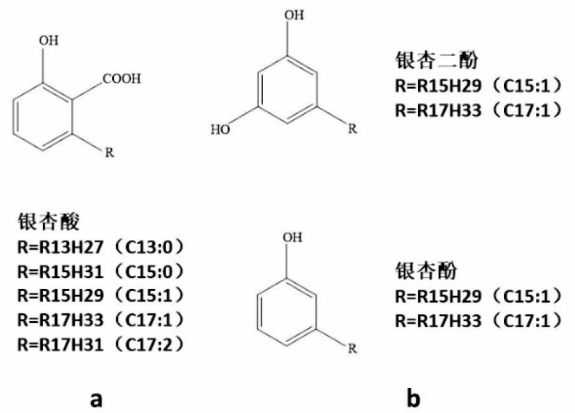
**基金项目** 国家重点研发计划专项(2019YFD1100403, 2017YFD0600701); 国家自然科学基金项目(31570682); 湖南省研究生创新工程和专业能力提升工程项目(CX20200733)。

**作者简介** 冯致(1996—),男,湖北武汉人,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学;杨竣茹,女,山东临沂人,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学。冯致和杨竣茹为共同第一作者。\*通信作者,教授,博士,博士生导师,从事生物化学与分子生物学研究。

**收稿日期** 2020-06-15; **修回日期** 2020-07-15

银杏酚(ginkgol)和银杏二酚(bilobol)3类成分<sup>[11]</sup>。银杏酸是侧链长度为13、15、17且侧链双键数为0~2的2-羟基-6-烷(烯)基-苯甲酸(图1a),目前共分离鉴定5种,分别是白果新酸、白果酸、氢化白果酸、十七烷一烯基银杏酸和十七烷二烯基银杏酸。银杏酚是侧链长度为15、17,侧链双键数为1的3-烷(烯)基苯酚,共2种;银杏二酚是侧链长度为15、17,侧链双键数为2的5-烷(烯)基间苯二酚(图1b),共2种。牻牛儿苗家族(*Geraniaceae family*)的天竺葵(*Pelargonium hortorum*)<sup>[12]</sup>、漆科家族(*Anacardiaceae family*)的栲如树(*Anacardium occidentale*)<sup>[13]</sup>等植物也含有漆酚酸类物质,其烷基/烯基侧链长度、不饱和键数目有区别,但化学结构与银杏酚酸相似。银杏酸是银杏酚酸的主要物质,占整个酸性提取物的90%。5种银杏酸所占比例不同,主要是白果酸(含量50%),其次是十七烷一烯基银杏酸(22%)和白果新酸(20%)<sup>[14]</sup>(图2)。随着科学技术的发展,在银杏叶、外种皮和种仁中均检测出银杏酸,不同品种(株系)的银杏叶总银杏酸含量约为14.576 5~23.681 3 mg/g<sup>[15]</sup>,成熟的种仁总银杏

酸含量约为0.11 mg/g<sup>[14]</sup>,外种皮中总银杏酸含量可达到28.78 mg/g<sup>[16]</sup>。

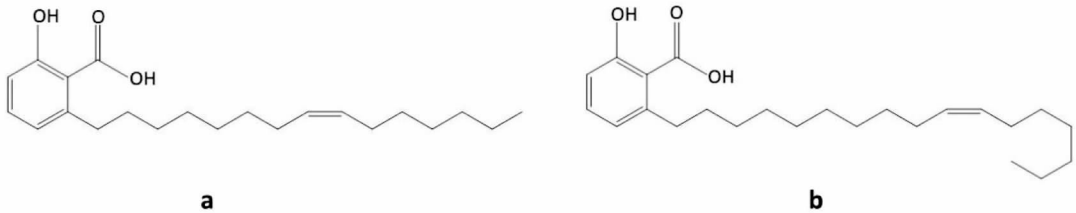


注:a. 银杏酸;b. 银杏酚

Note:a. Ginkgolic acid;b. Ginkgol

图1 银杏酚酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of ginkgolic acids



注:a. 白果酸;b. 十七烷一烯基银杏酸

Note:a. Ginkgolic acid;b. Heptadecanoenyl ginkgolic acid

图2 2种主要的银杏酸的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of two major ginkgolic acids

银杏酚酸的熔点在41~42℃,常温下纯品呈现油状或者粉末状,难溶于水或乙醇等极性溶剂,易溶于轻质石油醚等非极性溶剂,且在饱和的石油醚溶剂中会以晶体的形式析出<sup>[17]</sup>。在溶液中,酚酸苯环上的羟基和羧基电离产生弱酸性,可发生酯化和皂化反应,经酯化或皂化的银杏酚酸更易于萃取、分离,达到提纯的效果。银杏酚酸的熔点约为136℃、沸点约为500℃,在200℃时酚酸苯环上的羧基会发生脱羧反应释放CO<sub>2</sub>,利用温度梯度法可以对其进行分离。因此,根据理化性质研究,在银杏产品加工中常采用“热风蒸煮处理”“银杏酚酸超声波辅助提取树脂吸附”“中药配伍”等方法进行脱酚酸处理以达到脱毒目的。Chen等<sup>[18]</sup>最新研究表明,将漆酶固定化在新型电纺纳米纤维毡上可催化降解银杏酚酸。但是上述脱酚酸方法存在成本高昂、操作难度大等缺点,不易作为大规模脱毒使用。

**1.2 银杏酚酸的生物学活性** 银杏酚酸有抗菌、抗虫、致敏、细胞毒性和抗癌等作用,利用其多样的生物学活性,可以在农业生产、医疗保健等领域开发应用。

**1.2.1 抗菌作用。**银杏酸是6-烷基水杨酸,有广泛抗菌性,对枯草杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、绿脓杆菌以及多种革兰氏阴性和阳性菌均有抑制作用<sup>[19-20]</sup>。其酸性提取剂对水稻纹枯病菌、番茄青枯病菌、苹果炭疽菌、玉米

大斑菌和赤霉菌均有抑制作用,抗菌效果与一些抗真菌类药物相当<sup>[21]</sup>。徐立春等<sup>[22]</sup>研究表明,0.1%的白果酸(15:1)抑制真菌的有效率为92%,而0.5%克霉唑抑制真菌有效率仅为68%。Muroi等<sup>[23]</sup>研究表明,银杏酸与标准抗菌药物在杀灭抗甲氧西林金黄色葡萄球菌时有协同作用,在48h内同时使用的菌体杀灭活性比单一药物杀灭效果至少高100倍。

**1.2.2 抗虫作用。**现已证明银杏酚酸对蚜虫、蛴螬、菜青虫、红蜘蛛、桑螵、稻螟及其他咀嚼口器昆虫有明显的杀灭作用<sup>[20]</sup>。石启田<sup>[24]</sup>在防治蚜虫试验中发现银杏酚酸提取物的杀灭效果与农药吡虫啉相当。邓业成等<sup>[25]</sup>利用不同极性的外种皮提取液进行触杀试验,发现其对褐飞虱子、桃蚜、红蜘蛛和菜粉蝶幼虫有较强杀灭作用。

**1.2.3 致敏作用。**1934年Hill等<sup>[26]</sup>报道了银杏中某种活性物质会对皮肤产生强烈的糜烂作用,1969年Gellermen分别从腰果和银杏种实中分离得到漆酚酸类物质,并指出其对皮肤有强烈致敏作用<sup>[5]</sup>。成亮等<sup>[27]</sup>报道显示,白果酸(C15:1)通过代谢作用转化成银杏酚,经进一步氧化反应形成邻苯二酚引起过敏反应。Vincieri等<sup>[28]</sup>研究显示,银杏酚酸可以抑制糖代谢中的多种脱氢酶活性。Ahlemeyer等<sup>[29]</sup>发现银杏酸对甘油-3-磷酸脱氢酶有竞争性抑制作用。有关学者推测

银杏酚酸具有双极性(亲水性和亲脂性),可以抑制机体或器官相关酶活性,进而影响代谢导致过敏<sup>[30]</sup>。

**1.2.4 细胞毒性。**银杏酚酸具有亲水和亲脂基团,能跨膜结合在细胞膜上,造成细胞死亡。Al-Yahya 等<sup>[31]</sup>用含有银杏酚酸的银杏提取物对雄性大鼠进行毒性试验,结果表明提取物能造成生殖细胞等染色体丢失,影响大鼠的正常生殖功能。Ahlemeyer 等<sup>[29]</sup>发现银杏酚酸具有神经毒性,可导致小鸡晶胚神经细胞的死亡。近几年研究人员对多种银杏酚酸的毒性分别进行研究,Jiang 等<sup>[32]</sup>发现白果酸(C15:1)能引起氧化应激反应并造成嘌呤代谢紊乱诱导大鼠肝细胞损伤。Yao 等<sup>[33]</sup>发现十七烷一烯基银杏酚酸(C17:1)对 HepG2 细胞的毒性与时间和剂量呈正比,通过介导 CYP1A 和 CYP3A 代谢作用增强细胞毒性。研究表明,在银杏酚酸中,白果新酸(C13:0)、白果酸(C15:1)和十七烷一烯基银杏酚酸(C17:1)毒性较强,其他酚酸类物质能与 3 种银杏酚酸共同作用增加细胞毒性。

**1.2.5 抗癌作用。**银杏酚酸具有细胞毒性,能起到抗癌作用。Qiao 等<sup>[34]</sup>发现银杏酚酸能诱导磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)的激活来抑制结肠癌细胞的增殖、迁移。Liang 等<sup>[35]</sup>发现银杏酚酸能抑制 ROS 调控的 STAT3/JAK2 信号通路抑制胃癌细胞的增殖。Liu 等<sup>[36]</sup>研究结果表明银杏酚酸会阻滞结肠癌细胞分裂 G0/G1 期的过渡,导致癌细胞死亡,而体外细胞试验表明,银杏酚酸能抑制癌症细胞的增殖、迁移并激活相关酶促使细胞凋亡,未来或成为一种辅助抗癌药物用于肿瘤治疗。

## 2 银杏酚酸生物合成

20 世纪 70 年代,美国 Minnesota University 的 Gellerman 利用 14C 标记法对银杏酚酸合成途径进行了初步探索。20 世纪 90 年代,Walters 等<sup>[37]</sup>利用气液色谱法(GLC trapping)对从液相色谱(HPLC)提取的标记单甲基脂酰类物质进行分析,确定了天竺葵中漆酸(2-羟基-6-烷(烯)基-苯甲酸)的具体合成步骤。Singhal<sup>[38]</sup>和 Narnoliya 等<sup>[39]</sup>进一步探究了漆酸合成关键酶的种类和功能。

**2.1 银杏酚酸生物合成途径** Gellerman 等<sup>[6-7]</sup>认为银杏酚酸的芳香环和长链烷基/烯基是分步合成的,根据试验推论分为 3 部分:①丙二酰-CoA 与乙酰-CoA 经脂肪酸合成反应形成游离的棕榈油酰-CoA 和油酰-CoA;②长链酰基 CoA 经聚酮合成形成银杏酚酸;③银杏酚酸脱去苯环的羧基,氧化还原成银杏酚等物质。

天竺葵(*Pelargonium hortorum*)是牻牛儿苗科植物,它的毛状体仅会分泌漆酸(银杏酚同系物),是现有研究漆酸合成途径的最佳物种。野生型天竺葵分泌侧链烷基饱和的漆酸,而抗虫型分泌侧链单不饱和漆酸(C15:1 和 C17:1)。研究发现天竺葵的单不饱和漆酸与 2 种银杏酚(白果酸(C15:1)和十七一烯基银杏酚(C17:1))除双键位置有差别外,分子结构完全相同。Hesk 等<sup>[12]</sup>对野生型和抗虫型天竺葵差异基因及代谢物进行比较,初步揭示了漆酸合成的分子机制。研究人员利用 RNA-seq 技术构建天竺葵 cDNA 转录组数据库,通

过基因注释比对和差异性表达分析,鉴定合成关键基因是 III 型聚酮合成酶(Polyketide Synthases III, PKS III)基因和硬脂酰-ACP 脱氢酶(Stearoyl-ACP Desaturase, SAD)基因。以白果酸(15:1)和十七烷一烯基银杏酚(17:1)为例,阐释银杏酚酸的合成调控途径:

**2.1.1 烷基侧链的合成。**漆酚酸的合成首先基于棕榈油酸和油酸的合成,即烷基侧链的合成(图 3)。储存的蔗糖糖酵解成磷酸烯醇式丙酮酸,在丙酮酸激酶(Pyruvate kinase)变构作用下形成丙酮酸由细胞质进入质体,再由丙酮酸脱氢酶(Pyruvate Dehydrogenase, PDH)催化生成乙酰-CoA,为脂肪酸提供起始 2C 分子。乙酰-CoA 在乙酰-CoA 羧化酶(Acetyl-CoA Carboxylase, ACC)催化下形成丙二酰-CoA。转酰基酶(Transacylase, TA)将 CoA 分子替换为酰基载体蛋白(Acyl Carrier Protein, ACP)形成丙二酰-ACP。丙二酰-ACP 脱去羧基得到乙酰-ACP,并在酮酯酰合成酶 III( $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase III, KASIII)作用下缩合循环形成初始物 4C 酰基-ACP。4C 酰基-ACP 经酮酯酰合成酶 I( $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase I, KASI)多次缩合催化形成棕榈酰-ACP(C16:0 ACP),并由  $\Delta 9$ -硬脂酰-ACP 去饱和酶( $\Delta 9$ -Stearoyl-ACP Desaturase, SAD)脱氢成棕榈油酰-ACP( $\Delta 9$  C16:1 ACP),再经酮酯酰合成酶 II( $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase II, KASII)催化生成油酰-ACP( $\Delta 11$  C18:1 ACP)。质体中的棕榈油酰-ACP 和油酰-ACP 分别在硫酯酶 A(Thioesterase, TE/FatA)和硫酯酶 B(Thioesterase, TE/FatB)作用下脱去酰基载体蛋白(ACP),形成游离的不饱和脂肪酸<sup>[40]</sup>。最后,游离脂肪酸在质体外膜的酮酯酰-CoA 合成酶(Acyl-CoA Synthase, ACS)作用下形成棕榈油酰-CoA( $\Delta 9$  C16:1 CoA)和油酰-CoA( $\Delta 11$  C18:1 CoA)转移至细胞质,成为 2 种银杏酚的重要前体物质。

然而银杏酚酸和天竺葵中漆酚酸的脂肪酸合成途径有差别,白果酸(C15:1)和十七烷一烯基银杏酚(C17:1)的合成前体是棕榈油酸( $\Delta 9$  C16:1)和油酸( $\Delta 11$  C18:1),而 2 种单烯侧链漆酸的合成前体是棕榈油酸( $\Delta 11$  C16:1)和油酸( $\Delta 13$  C18:1)。而常见的  $\omega$ -7 脂肪酸(棕榈油酸( $\Delta 9$  C16:1)和油酸( $\Delta 11$  C18:1))能在许多野生植物和藻类中以棕榈酰-ACP(C16:0 ACP)为前体经去饱和、聚酮等反应形成。Schultz 等<sup>[41]</sup>研究发现,天竺葵中 1 种新型脂酰 ACP 去饱和酶对肉豆蔻酰-ACP(C14:0 ACP)进行脱氢形成十四碳一烯酰-ACP( $\Delta 9$  C14:1),再经聚酮等反应下形成 2 种单不饱和脂肪酸(棕榈油酸( $\Delta 11$  C16:1)和油酸( $\Delta 13$  C18:1))。因此,银杏酚酸前体脂肪酸的合成途径相较于天竺葵的漆酸更易探究。

Singhal<sup>[38]</sup>对天竺葵中单不饱和和脂肪酸(棕榈油酸和油酸)合成的相关基因进行鉴定和表达验证,结果表明当组织中酰基载体蛋白(Acyl carrier proteins, ACPs)、酮酯酰合成酶(KASs)和硫酯酶(TEs)的基因表达量较高时,脂肪酸含量及漆酸含量较高。酰基载体蛋白(ACP)作为中间保守载体,是脂肪酸合成过程的中心,它与酰基-ACP 去饱和酶(Acyl-

ACP Desaturase, AAD)共同作用使酰基链去饱和,改变饱和和非饱和脂肪酸含量比例,也能与酮酯酰-ACP合成酶

(KAS)一同作为限速酶调控酚酸的合成速率。

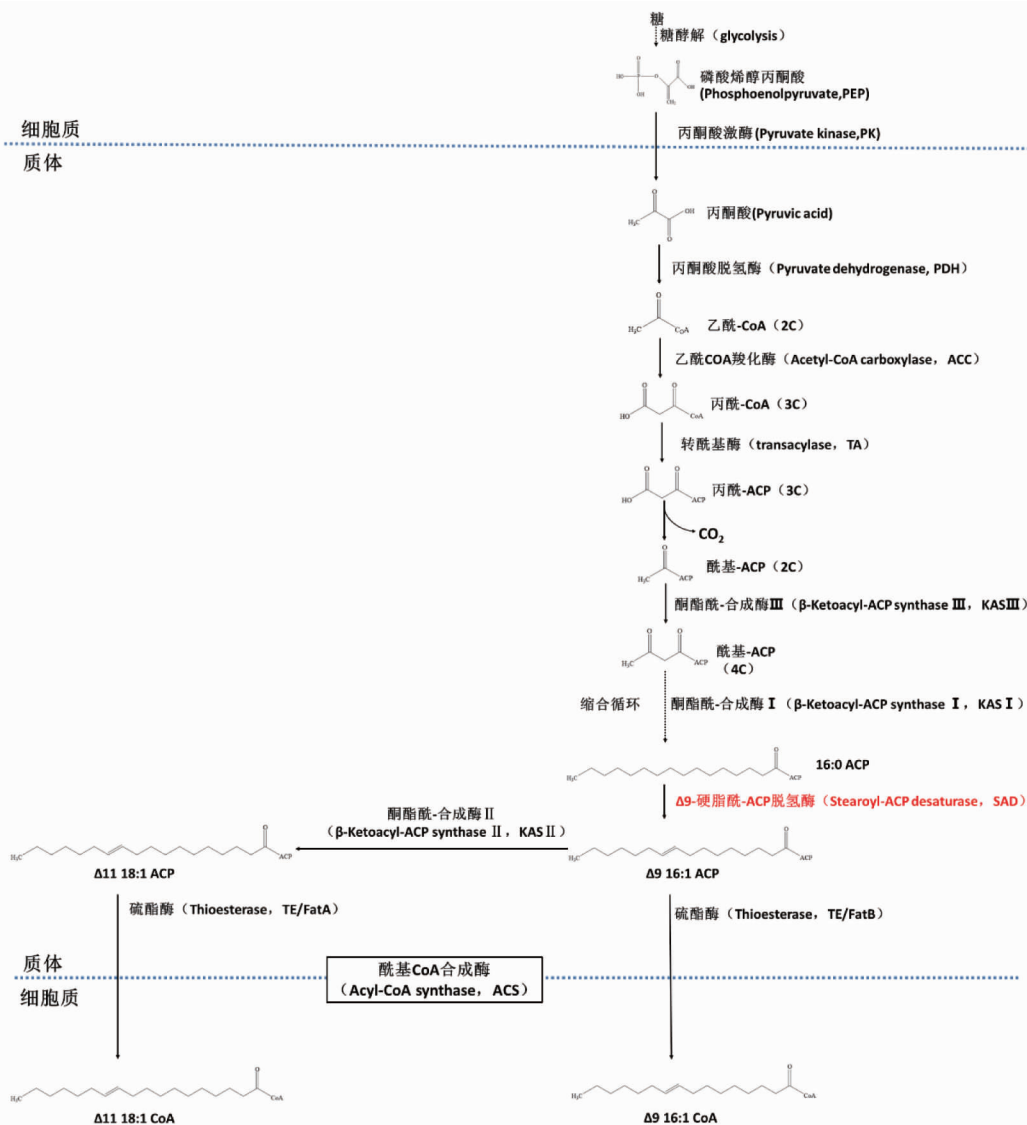


图3  $\Delta^9$  棕榈油酸和  $\Delta^{11}$  油酸的合成途径

Fig. 3 Synthetic route of  $\Delta^9$  palmitoleic acid and  $\Delta^{11}$  oleic acid

**2.1.2 酚脂苯环合成。**酚脂苯环合成是以高级脂肪酸为前体形成酚酸的关键环节,其合成途径见图4。以白果酸(C15:1)为例,首先经脂肪酸途径的棕榈油酰( $\Delta^9$  C16:1)以丙二酰-CoA为底物,在III型聚酮合成酶(Polyketide Synthase III, PKS III)的作用下,通过2次缩合反应,在酰基端增加4个碳原子;其次, C3位的酮基在酮基还原酶(PKS-ketoacyl-CoA reductase, KR)的作用下形成羟基并由脱水酶(PKS-dehydratase, DH)脱去一分子水形成双键;第三,经缩合聚合再在酰基端增加2个碳原子,此时, C2位的氢离子会与C7位的酮基靠近来保持4,15-二烯三肽中间体结构的稳定;第四,在保证C1位的酮基不会脱羧情况下,环化酶(PKS-Cyclase)催化C2位的氢离子与C7位的酮基发生类似于醇醛缩合(Aldol condensation)环化,并在脱水酶(PKS-dehydratase)的作用下成双键;第五,烯基还原酶(PKS-enoyl reductase, ER)催化六圆碳环上的酮基形成双键并芳构化,

它与C1羧基共同组成苯甲酸结构;最终形成单不饱和侧链的白果酸(C15:1)<sup>[37,39]</sup>。

植物III型聚酮合成酶(PKS III)是酚脂类物质(烷基酚、烷基间苯二酚、漆酸和烷基儿茶酚等)的限速酶<sup>[42]</sup>。查尔酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)和芪合酶(Stilbene synthase, STS)是其中最具代表的2个超家族,它们分别能够催化酰基链的C1和C6位缩合环化(克来森缩合, Claisen condensation)和C2和C7位缩合环化(醇醛缩合, Aldol condensation),形成酚类物质。但是漆酸类物质能催化C2位的氢离子与C7位的酮基缩合的同时保留C1位的羧基形成苯甲酸,这种保留了苯环羧基的聚酮环化反应在植物中较为少见。因此,III型聚酮合成酶(PKS III)、环化酶(PKS-Cyclase)和酮基还原酶(PKS-ketoacyl-CoA reductase, KR)等深入研究能进一步揭示银杏酸的合成机制,结合理化或生物技术手段控制银杏组织中酚酸的含量。

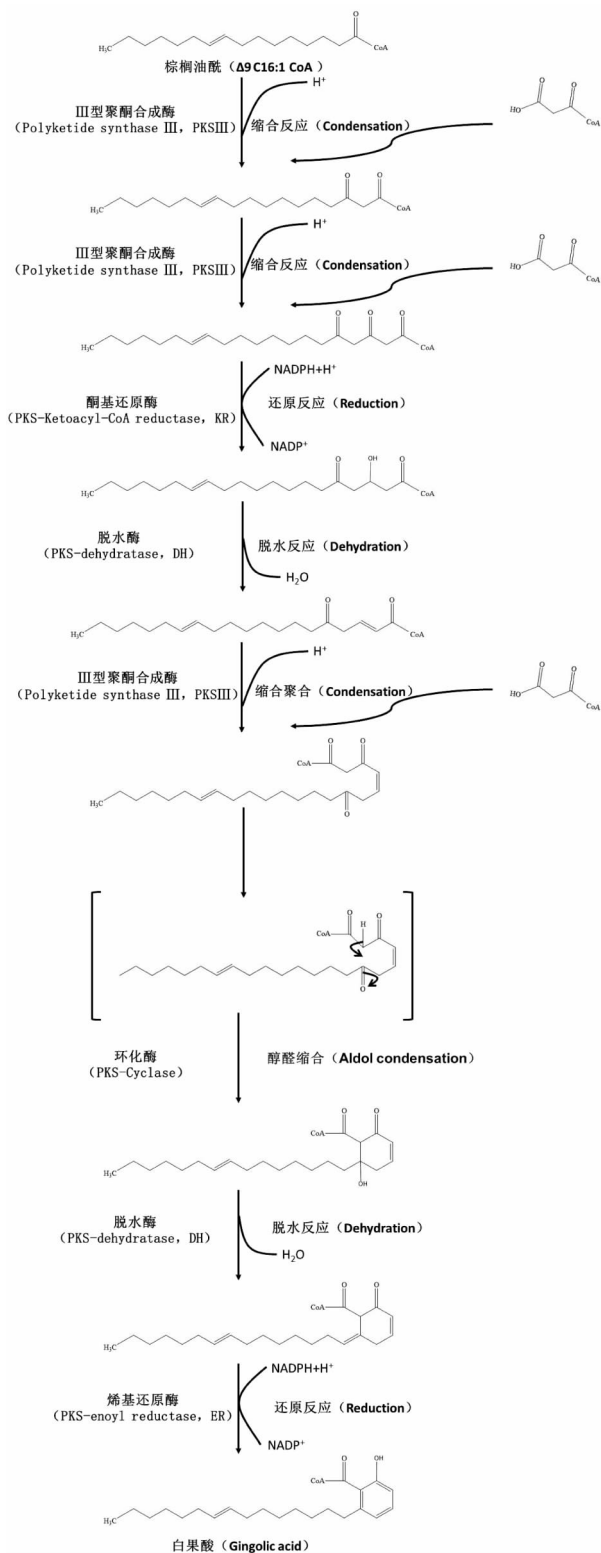


图4 白果酸的聚酮合成途径

Fig. 4 Synthetic route of polyketide of ginkgolic acid

**2.2 酚酸合成关键酶基因** 目前,酚酸合成关键酶基因研究的主要报道来源于漆酚酸,而银杏酚酸鲜有报道。酚酸合成途径分为2部分:脂肪酸合成与芳香环合成。其中酰基载体蛋白(ACP)、硬脂酰去饱和酶(SAD)、酮酯酰-ACP合成酶(KASs)、III型聚酮合成酶(PKSIII)、环化酶(PKS-Cyclase)是关键酶,决定漆酸类物质合成速率及含量比例。

**2.2.1 酰基载体蛋白(ACP)**。酰基载体蛋白(ACP)属于载体蛋白大家族,作为一类混合蛋白能够关联各种蛋白复合酶体系,将酰基链从一个酶中心位点转移到另一个酶中心位点。它还是硬脂酰-ACP去饱和酶(SAD)、脂酰基-ACP脱氢酶(Acyl-ACP hydrolase, AAH)的辅助因子,在脂肪酸合成(Fatty acid synthase, FAS)和聚酮合成(PKS)途径中起重要作用。

李孟军等<sup>[43]</sup>对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)等17个物种的酰基载体蛋白基因结构进行分析并划分为5类。其中,质粒型ACP基因家族(编码区由4个外显子和3个内含子组成)和线粒体型ACP基因家族(编码区由2个外显子和1个内含子组成)占整体比例最大,它们都有1个非常保守的丝氨酸位点能与4'-磷酸泛酰巯基乙胺辅基组结合,并激活holo-ACP发挥作用。ACP蛋白家族三级结构大多是一致的,由4个保守 $\alpha$ 螺旋组成,其中3个 $\alpha$ 螺旋(I, II, IV)相互平行,而 $\alpha$ 螺旋(III)垂直于螺旋中心,形成1个疏水结构腔,为各种酰基链提供庇护<sup>[44]</sup>。 $\alpha$ 螺旋II能与酮酯酰合成酶II( $\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase II, KAS II)相互作用进一步延长酰基链,被称为识别螺旋。Singhal<sup>[38]</sup>对天竺葵进行转录测序,筛选出漆酚酸合成有关的2个完整ACP蛋白cDNA序列(*Pxh1*和*Pxh2*),通过基因表达验证和系统发育分析显示,*Pxh1*和*Pxh2*基因在天竺葵毛状体组织有较高的表达,并且与芫荽(*Coriandrum sativum*)的十四碳一烯酸( $\Delta 9$  C14:1)生物合成ACP蛋白基因高度同源,能催化漆酸途径中脂肪酸的去饱和。

**2.2.2 酮酯酰-ACP合成酶(KASs)**。在脂肪酸合成酶(Fatty acid synthase, FAS)复合体的作用下,以丙二酰-ACP为底物经多次缩合循环形成银杏酸前体棕榈油酸( $\Delta 9$  C16:1)和油酸( $\Delta 11$  C18:1)。脂肪酸合成酶复合体由3种酮酯酰-ACP合成酶(KASs)所构成,属于cond-enzymes超家族蛋白,它们都是含有KAS保守结构域、无信号肽的疏水性脂溶蛋白。KASIII催化丙二酰-CoA和乙酰-CoA聚合成起始酰基链(3-酮丁酰-ACP);KAS I催化酰基链与丙二酰-ACP的聚合,形成6C-16C的脂肪酸;KAS II催化丙二酰-ACP与棕榈酸缩合,生成18C脂肪酸。在紫苏<sup>[45]</sup>和陆地棉<sup>[46]</sup>等植物中KASII是氨基酸长度约为500 aa、略偏酸性的非分泌蛋白,它决定C16:C18脂肪酸的比值,能调控植物抗寒性。研究人员从天竺葵转录组中得到7个酮酯酰-ACP合成酶(KASs)基因,其中*PxKAS[a]*、*PxKAS[b]*和*PxKAS[c]*在天竺葵的毛状体组织中有高且稳定的表达,而在其他组织中基因表达量较低。进一步对毛状体进行温度梯度(18、23和28℃)处理,结果显示3个基因的表达量随温度的升高而降低,与脂肪酸(棕榈油酸( $\Delta 11$  C16:1)和油酸( $\Delta 13$  C18:1))及漆酸含量呈正相关,或参与漆酸合成途径。进化分析表明,天竺葵的KAS基因家族与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和大豆(*Glycine Max*)的酮酯酰合成酶基因(KAS)高度同源,相关催化机制较明晰。然而,银杏酮酯酰-ACP合成酶(KAS)的分子研究甚少,

白果酸(C15:1)和十七烷一烯基银杏酸(C17:1)的前体棕榈油酸( $\Delta 9$  C16:1)和油酸( $\Delta 11$  C18:1)作为重要的单烯不饱和脂肪酸是如何受到银杏的酮酰基-ACP合成酶家族的调控,有待深入探究。

**2.2.3 硬脂酰-ACP去饱和酶(SAD)。**硬脂酰-ACP去饱和酶(SAD)是植物中唯一已知的可溶性去饱和酶家族,它能调控饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例。其中, $\Delta 9$ 硬脂酰-ACP去饱和酶在植物中的研究最广泛,它能催化酰基链C9位与C10位脱氢形成第1个双键。SAD蛋白是一个同源二聚体,由属于酰基-ACP去饱和酶家族和属于铁蛋白家族的保守结构域组成。位于SAD保守区的4个 $\alpha$ 螺旋形成1个四螺旋束结构,埋藏着1个对称的Fe-O-Fe二铁簇催化中心,它们共同构成酶活中心用于酰基链脱氢<sup>[47]</sup>。蛋白晶体结构显示,SAD酶有1个从分子表面延伸至内部的深槽,可以容纳18C的酰基链与槽底部的二铁中心结合,发生氧化还原反应。这样1个槽体结构也能容纳16C和14C的酰基链发生反应,但催化运转速率较低<sup>[48]</sup>。

Schultz等<sup>[41]</sup>在天竺葵cDNA文库中筛选出一个新型酰基-ACP去饱和酶,通过基因序列比对发现与蓖麻子(*Castor bean*)硬脂酰-ACP去饱和酶基因(*SAD*)高度同源,利用大肠杆菌(*E. coli*)遗传转化验证结果显示,新型基因可催化肉豆蔻酰-ACP(C14:0)脱氢形成十四碳一烯酰-ACP( $\Delta 9$  C14:1),因此将其命名为肉豆蔻酰-ACP去饱和酶基因(*MAD*,  $\Delta 9$  14:0-ACP desaturase)。Singhal<sup>[38]</sup>基因表达检测和烟草(*Nicotiana tabacum*)遗传转化验证结果显示,肉豆蔻酰-ACP去饱和酶(*MAD*)所催化的产物——十四碳一烯酰-ACP( $\Delta 9$  C14:1)是棕榈油酰-ACP( $\Delta 11$  C16:1)和油酰-ACP( $\Delta 13$  C18:1)的关键前体。通过对酶活性、脂肪酸含量和酚酸含量检测发现,肉豆蔻酰-ACP去饱和酶(*MAD*,  $\Delta 9$  14:0-ACP desaturase)的活性决定了棕榈油酰-ACP( $\Delta 11$  C16:1)和油酰-ACP( $\Delta 13$  C18:1)的含量,进而调控2种单烯侧链漆酸(C22:1和C24:1)的含量。另外, Singhal<sup>[38]</sup>设置温度梯度(18、23和28℃)探究天竺葵毛状体组织中相关酶基因的表达变化,发现肉豆蔻酰-ACP去饱和酶基因(*MAD*,  $\Delta 9$  14:0-ACP desaturase)和硬脂酰-ACP去饱和酶基因(*SAD*,  $\Delta 9$  18:0-ACP desaturase)的表达量随着温度的升高而降低。

Wang等<sup>[49]</sup>从银杏叶片cDNA文库克隆了1个硬脂酰-ACP去饱和酶基因(*SAD*,  $\Delta 9$  18:0-ACP desaturase)并对银杏叶片进行温度胁迫处理(4、15和45℃),结果显示在低温(4℃)和常温(15℃)作用下基因的表达量高,而在高温(45℃)作用下基因表达量要比对照组低数倍。随后,刘新亮等<sup>[50]</sup>分析表明,*GbSAD*基因能编码一段链长412aa、分子量47kDa的肽链,聚类分析显示与其他裸子植物的硬脂酰-ACP去饱和酶(*SAD*)氨基酸序列相似度较高。外源喷施激素实验表明,*GbSAD*基因的表达不受脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)和乙烯(ETH)的调控,但水杨酸(SA)会激活基因的表达,其表达量最高值是对照组的9.7倍,说明SA可能参与脂肪酸合成途径的调控。

天竺葵中特有的肉豆蔻酰-ACP去饱和酶(*MAD*,  $\Delta 9$  14:0-ACP desaturase)和银杏的硬脂酰-ACP去饱和酶(*GbSAD*,  $\Delta 9$  18:0-ACP desaturase)都对温度敏感且在低温下活性高,2种酶都属于植物唯一的水溶性去饱和酶,在功能结构上相似度较高。因此,对于银杏硬脂酰-ACP去饱和酶(*GbSAD*,  $\Delta 9$  18:0-ACP desaturase)进行同源性功能验证,将会进一步明晰银杏酚酸的合成机制。

**2.2.4 III型聚酮合酶(PKSIII)。**聚酮合酶分为3类:①PKSI,称为模块PKS,由若干个多功能多肽组成,每1个多肽都分别携带有独特的、非重复使用催化结构域。②PKSII,称为迭代或者芳香式PKS,它是1个多酶复合体的迭代体系,通过一套可重复使用的结构域在重复的反应步骤中多次用来催化酚聚酮结构的生成。③PKSIII,称为查尔酮合酶,与前2类PKS酶家族完全不同,它能重复使用同源双基蛋白,不依赖ACP及其活性位点4'-磷酸泛酰基硫基乙胺的激活,也无需通过ACP活化酰基-CoA底物,能直接与酰基-CoA进行反应。尽管不同类型PKS结构机制不同,但它们都是利用酮基合酶(Ketosynthase,KS)结构域或亚基催化C-C键的形成,使酰基-CoA脱羧缩合延长碳链。

PKSIII家族种类繁多,查尔酮合酶(Chalcone Synthase, CHS)和芪合酶(STS)是最早被发现且最具代表性的2个家族,它们的氨基酸序列相似度为60%~75%<sup>[42]</sup>。查尔酮合酶(CHS)家族广泛存在于植物中,是分子量为40~45kDa的蛋白同源二聚体,利用高度保守的活性中心(Cys-His-Asn的组合结构)以3个丙二酰-CoA为底物催化香豆蔻CoA的碳链延长,形成四肽中间环结构<sup>[42,51-52]</sup>。四肽中间环的C6氢离子与C1酮基会发生克莱森缩合反应(Claisen condensation)形成碳六元环,然后芳构化成二苯基丙烯酮,又称为查尔酮(图5)。查尔酮是黄酮类物质合成的重要前体。芪合酶(STS)在植物和微生物(如链霉菌属、酵母和细菌)中有报道,分子量约为43kDa,由2个亚基组成的二聚体,拥有特异性保守结构域IPNS(F)AGAIAGN的蛋白,与查尔酮合酶(CHS)高度同源<sup>[53]</sup>。STS酶以香豆蔻CoA为底物形成四肽中间环结构,四肽中间环的C7酮基与C2氢离子会发生醇醛缩合缩合反应(Aldol condensation)形成碳六元环,然后芳构化形成植保素白藜芦醇苷<sup>[54]</sup>(图5)。Singhal<sup>[38]</sup>在天竺葵(*Pelargonium hortorum*)中鉴定出1种2型酮酰基CoA合成酶(KCS2, Keto-acyl CoA synthase 2),它的三级空间结构与III型聚酮合酶(PKSIII)相似,推测其参与漆酸合成途径中环化缩合反应。酮酰基CoA合成酶(KCS)作为超长链脂肪酸(Very long chain fatty acids, VLCFAs)合成过程中催化第一步缩合反应的限速酶,其基因家族研究主要集中在模式植物拟南芥上,而少有在其他植物中的研究报道。Costaglioli等<sup>[55]</sup>根据基因同源性和遗传进化分析,将拟南芥中21个KCS基因成员分为4个亚组(*FAE1*、*KCS1*、*FDH*和*CER6*)。其中*FAE1*基因是由James等<sup>[56]</sup>最早利用转座子标签法所克隆得到的KCS家族基因,*FAE1*的氨基酸序列与其他的聚酮缩合酶(查尔酮合酶(CHS)、芪合酶(STS)和III型酮酰基-ACP

合成酶(KASIII))具有高度的同源性。

不同物种的酮酯酰 CoA 合成酶(KCS)具有不同的底物特异性。银杏酚酸属漆酚酸类物质,其途径中特有的Ⅲ型聚酮合成酶(PKSⅢ)在功能结构上或与天竺葵的 2 型酮酯基 CoA 合成酶(Keto-acyl CoA synthase 2)相类似。此外,漆酚酸途径的聚酮合成酶与芪化酶(STS)都会识别四肽中间环的

C7 酮基与 C2 氢离子发生醇醛缩合反应形成碳六元环,不同的是芪化酶(STS)在醇醛缩合环化反应中会发生脱羧反应,使 C1 位的酮基氧化释放二氧化碳,而漆酚酸的聚酮环化过程中却保留了 C1 位酮基,并由氢离子(H<sup>+</sup>)取代 CoA 形成苯甲酸结构。目前该催化机制尚不清楚,有待进一步研究。

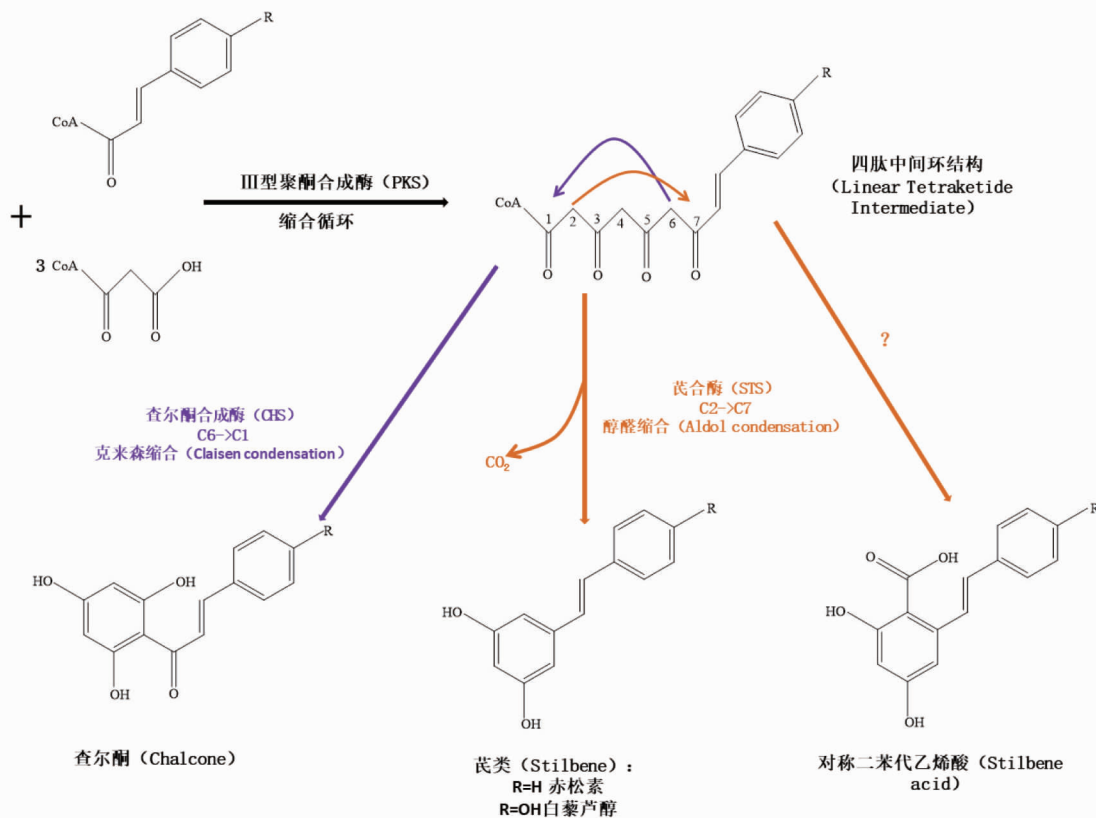


图 5 CHS 和 STS 的催化机制

Fig. 5 Catalytic mechanism of CHS and STS

**2.2.5 聚酮环化酶(PKS-cyclase)。**2,4-二羟基-6-戊基苯甲酸(Olivetolic acid)又称作橄榄醇酸,是合成大麻素的重要前体。Gagne 等<sup>[57]</sup>发现己酰-CoA 在大麻的 PKSⅢ(TKS)的催化下合成含有 12 个碳的四肽中间环结构。若 TKS 酶继续催化,酰基链 C2 位与 C7 位缩合环化并释放 CO<sub>2</sub>,得到 3,5-二羟基戊苯(Olivetol);而由 PKS 环化酶(Olivetolic acid cyclase, OAC)所催化缩合环化反应会保留 C1 位羧基,得到 2,4-二羟基-6-戊基苯甲酸(Olivetolic acid)。蛋白功能分析表明,OAC 酶含有特有的 β-α-β-β-α-α-β 拓扑结构,能催化酰基 C2 位和 C7 位环化缩合并保留羧基。OAC 是一种含有二聚 α+β 桶状结构域(Dimeric α+β barrel protein, DABB)的新功能蛋白,这种蛋白主要存在于细菌、真菌和植物中。除了大麻的橄榄醇酸环化酶 CsOAC 外,植物 DABB 类蛋白主要来自热稳定性蛋白家族(heat stable protein, HS),它们与链霉菌属(*Streptomyces species*)的聚酮环化酶在结构上非常相似<sup>[58]</sup>。DABB 蛋白是一种小蛋白(12 kDa, 101 aa),它与 PKS Ⅲ均定位于细胞质,通过引导四肽中间产物的折叠起到伴侣作用(Chaperone like role),最终形成含有苯甲酸结构的物

质。Gagne 等<sup>[51]</sup>的研究为漆酚酸合成的聚酮环化保留了 C1 位酮基,形成苯甲酸催化过程提供新的参考和思路。

### 3 展望

20 世纪 60 年代,银杏酚酸被鉴定为银杏外种皮的活性物质之一,随着高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)技术的普及和 NMR(核磁共振技术)检测精度的提高,现已能从银杏叶和果等组织中分离鉴定出常见的 5 种银杏酸和 4 种银杏酚。银杏酚酸属漆酚酸类物质,特有的两性(疏水性和亲水性)使其在医疗、化工、美容和病虫害防治等多项领域已得到应用。其中,白果酸(C15:1)更是被 Fukuda 等<sup>[59]</sup>证明能阻止小泛素相关修饰蛋白(Small ubiquitin-related modifier proteins, SUMO)的酰基化来调控细胞的相关功能,被视为治疗癌症和神经性疾病的潜在药物,值得研究和开发。

除银杏以外,漆酚酸类物质还在檳如树(腰果树)、漆树、开心果和天竺葵等经济作物中被分离鉴定。Schultz 等<sup>[60]</sup>对漆酚酸合成进行试验,研究结果表明将 14C 标记的柠檬酸、丙酰-CoA、油酰-CoA、醋酸、肉豆蔻酸和棕榈酸 6 种底物与天竺葵的毛状体细胞共同孵育,只有油酰-CoA(C18:1)作为

有效碳源参与了漆酸的合成,而其他物质偏向于三酰甘油的合成,来形成可储存脂质。因此,棕榈油酰-CoA(C16:1)和油酰-CoA(C18:1)等被认定为研究漆酚酸合成的重要前体物质。然而,银杏酚酸作为银杏特有的植保素,其合成途径及调控在分子进化上具有特殊及保守性,目前有关银杏酚酸合成调控的研究主要集中在脂质转录组和代谢组学分析,而聚酮合成机制的探索以及相关基因克隆的研究报道较少,因此有待深入挖掘。

MYB和WRKY转录因子可以调控Ⅲ型聚酮合成酶(PKSⅢ)家族成员基因的表达,影响有抗性效应的次生代谢产物的含量变化。而漆酚酸的合成关键限速酶是一种与酮酯酰CoA合成酶(KCS)高度同源的Ⅲ型聚酮合成酶(PKSⅢ)。Eckermann等<sup>[61]</sup>研究发现,除草剂氯乙酰胺甲草胺(metazachlor)能使超长链脂肪酸(VLFAS)合成中的限速酶(酮酯酰CoA合成酶(KCS))以及Ⅲ型聚酮合成酶家族的查尔酮合成酶(CHS)和芪合酶(STS)失活。氯乙酰胺甲草胺(metazachlor)能结合在相关酶的关键位点半胱氨酸上,使缩合延长反应无法正常进行,未来对通过银杏悬浮细胞系验证该化学物质是否也能使漆酚酸合成Ⅲ型聚酮合成酶(PKSⅢ)失活,可进一步明晰银杏酚酸合成中Ⅲ型聚酮合成酶(PKSⅢ)的催化功能和调控机制。这些调控机制的逐步阐明会为低产或高产酚酸银杏细胞株系培育提供理论与实践指导。

## 参考文献

[1] 马婧,霍晓乾,陈茜,等.基于Mpro和PLP筛选潜在抗新型冠状病毒中药研究[J].中国中药杂志,2020,45(6):1219-1224.

[2] 汪素娟,康安,狄留庆,等.银杏叶提取物主要活性成分药理学研究进展[J].中草药,2013,44(5):626-631.

[3] 张心慧,郭起荣,汪贵斌,等.银杏外种皮研究进展[J].黑龙江农业科学,2018(11):156-160.

[4] ITOKAWA H, TOTSUKA N, NAKAHARA K, et al. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. [J]. Chemical & pharmaceutical bulletin, 1987, 35(7):3016-3020.

[5] GELLERMAN J L, SCHLENK H. Preparation of <sup>14</sup>C-labeled fatty and anacardic acids from *Ginkgo biloba* [J]. Lipids, 1969, 4(6):484-487.

[6] GELLERMAN J L, ANDERSON W H, SCHLENK H. Biosynthesis of anacardic acids from acetate in *Ginkgo biloba* [J]. Lipids, 1974, 9(9):722-725.

[7] GELLERMAN J L, ANDERSON W H, SCHLENK H. Synthesis of anacardic acids in seeds of *Ginkgo biloba* [J]. Biochimica et biophysica acta, 1976, 431(1):16-21.

[8] 王杰,余碧玉,刘向龙,等.银杏外种皮化学成分分离和鉴定[J].中草药,1995,26(6):290-292,328.

[9] 李洪庆,何照范,张勇民,等.银杏外种皮羟基酚及羟基酚酸类成分研究[J].中草药,2004,35(1):18-20.

[10] KOZUBEK A, TYMAN J H. Bioactive phenolic lipids [J]. Studies in natural products chemistry, 2005, 30:111-190.

[11] 曹福亮.中国银杏志[M].北京:中国林业出版社,2007.

[12] HESK D, CRAIG R, MUMMA R O. Comparison of anacardic acid biosynthetic capability between insect-resistant and-susceptible geraniums [J]. Journal of chemical ecology, 1992, 18(8):1349-1364.

[13] GEDAM P H, SAMPATHKUMARAN P S. Cashew nut shell liquid: Extraction, chemistry and applications [J]. Progress in organic coatings, 1986, 14(2):115-157.

[14] 吴海霞,吴彩娥,刘金达,等.银杏种仁酚酸的纯化、鉴定及其抑菌活性分析[J].中国食品学报,2015,15(3):207-215.

[15] 田紫平,喻微,何贵州,等.HPLC测定银杏叶中总银杏酸的含量[J].微量元素与健康研究,2015,32(2):36-37,47.

[16] 何静仁.银杏酸的变应原性及致过敏作用机制研究[D].武汉:华中农业大学,2003.

[17] 刘俊峰.白果粉中银杏酚酸脱除工艺研究[D].泰安:山东农业大学,2017.

[18] CHEN H Y, CHENG K C, HSU R J, et al. Enzymatic degradation of ginkgolic acid by laccase immobilized on novel electrospun nanofiber mat [J]. Journal of the science of food and agriculture, 2020, 100(6):2705-2712.

[19] 梁立兴.银杏外种皮的研究现状及开发利用前景[J].中国资源综合利用,2003,21(10):12-14.

[20] 赵成林.银杏外种皮中酸性成分的提取与药用探讨[J].中草药,1997,28(4):250-251.

[21] 冀玉良.银杏外种皮提取液抑制农作物病原菌的初步研究[J].安徽农业科学,2005,33(9):1598-1603.

[22] 徐立春,童鲲,顾维戎,等.银杏外种皮中间体提取物抑制真菌生长的实验研究[J].中药材,1990,13(6):36-37.

[23] MUROI H, KUBO I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of applied bacteriology, 1996, 80(4):387-394.

[24] 石启田.银杏酚酸类物质防治农业害虫的研究[J].林产化学与工业,2004,24(2):84-87.

[25] 邓业成,徐汉虹,雷玲.银杏提取物对3种农业害虫的触杀活性[J].华南农业大学学报,2004,25(3):61-63.

[26] HILL G A, MATTACOTTI V, GRAHAM W D. The toxic principle of the poison ivy [J]. Journal of the American chemical society, 1934, 56(12):2736-2738.

[27] 成亮,楼凤昌.银杏外种皮中银杏酚酸的研究概况[J].药学进展,2004,28(5):209-213.

[28] VINCIGRI F F, VINCENZINI M T, VANNI P. Extraction of active compounds from sarcostema of *Ginkgo biloba* seed: Inhibition on some dehydrogenases activity [J]. Journal article, 2013, 63(2):79-82.

[29] AHLEMEYER B, SELKE D, SCHAPER C, et al. Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C [J]. European journal of pharmacology, 2001, 430(1):1-7.

[30] 杨剑峰,吴彩娥.白果致过敏成分及其致敏机理研究进展[J].食品科技,2009,34(6):282-286.

[31] AL-YAHYA A A, AL-MAJED A A, AL-BEKAIRI A M, et al. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of *Ginkgo biloba* in Swiss albino mice [J]. Journal of ethnopharmacology, 2006, 107(2):222-228.

[32] JIANG L, SI Z H, LI M H, et al. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics study of liver damage induced by ginkgolic acid (15:1) in mice [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2017, 136:44-54.

[33] YAO Q Q, LI L, XU M C, et al. The metabolism and hepatotoxicity of ginkgolic acid (17:1) *in vitro* [J]. Chinese journal of natural medicines, 2018, 16(11):829-837.

[34] QIAO L N, ZHENG J B, JIN X Z, et al. Ginkgolic acid inhibits the invasiveness of colon cancer cells through AMPK activation [J]. Oncology letters, 2017, 14(5):5831-5838.

[35] LIANG J R, YANG H. Ginkgolic acid (GA) suppresses gastric cancer growth by inducing apoptosis and suppressing STAT3/JAK2 signaling regulated by ROS [J/OL]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2020, 125 [2020-03-21]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109585>.

[36] LIU Y X, YANG B, ZHANG L R, et al. Ginkgolic acid induces interplay between apoptosis and autophagy regulated by ROS generation in colon cancer [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2018, 498(1):246-253.

[37] WALTERS D S, CRAIG R, MUMMA R O. Fatty acid incorporation in the biosynthesis of anacardic acids of geraniums [J]. Phytochemistry, 1990, 29(6):1815-1822.

[38] SINGHAL R A. Identification and characterization of genes involved in metabolism of n5 monoene precursors to n5 anacardic acids in the trichomes of *Pelargonium x hortorum* [D]. Louisville: University of Louisville, 2016.

[39] NARNOLIYA L K, KAUSHAL G, SINGH S P, et al. *De novo* transcriptome analysis of rose-scented geranium provides insights into the metabolic specificity of terpene and tartaric acid biosynthesis [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1):1-14.

[40] 吴永美,毛雪,王书建,等.植物 $\omega$ -7脂肪酸的系统代谢工程[J].植物学报,2011,46(5):575-585.

[41] SCHULTZ D J, CAHOON E B, SHANKLIN J, et al. Expression of a  $\Delta^9$  14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of  $\omega^5$  anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium xhortorum*) [J]. Proceedings of the national academy of sciences,



- 1996,93(16):8771-8775.
- [42] SHI S P, MORITA H, WANIBUCHI K, et al. Enzymatic synthesis of plant polyketides[J]. *Current organic synthesis*, 2008, 5(3): 250-266.
- [43] 李孟军, 史占良, 郭进考, 等. 植物酰基载体蛋白基因家族序列分析[J]. *华北农学报*, 2010, 25(S1): 1-6.
- [44] KOGLIN A, MOFID M R, LÖHR F, et al. Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases[J]. *Science*, 2006, 312(5771): 273-276.
- [45] 李璐, 梁倩, 安茜, 等. 紫苏  $\beta$ -酮脂酰 ACP 合成酶基因家族生物信息学分析[J]. *山西农业科学*, 2017, 45(3): 321-324.
- [46] 郝青婷. 陆地棉  $\beta$ -酮脂酰-ACP 合成酶II(KASII) 家族基因鉴定与功能分析[D]. 太谷: 山西农业大学, 2018, 59.
- [47] KACHROO A, SHANKLIN J, WHITTLE E, et al. The *Arabidopsis* stearyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis[J]. *Plant molecular biology*, 2007, 63(2): 257-271.
- [48] TAHA R S, ISMAIL I, ZAINAL Z, et al. The stearyl-acyl-carrier-protein desaturase promoter (*Des*) from oil palm confers fruit-specific GUS expression in transgenic tomato[J]. *Journal of plant physiology*, 2012, 169(13): 1290-1300.
- [49] WANG H L, CAO F L, ZHANG X W, et al. Cloning and expression of stearyl-ACP desaturase and two oleate desaturases genes from *Ginkgo biloba* L. [J]. *Plant molecular biology reporter*, 2013, 31(3): 633-648.
- [50] 刘新亮, 蔡金峰, 王欢利, 等. 银杏 *GbSAD* 基因对非生物胁迫的响应及原核表达[J]. *东北林业大学学报*, 2015, 43(12): 1-6.
- [51] NAKANO C, OZAWA H, AKANUMA G, et al. Biosynthesis of aliphatic polyketides by type III polyketide synthase and methyltransferase in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of bacteriology*, 2009, 191(15): 4916-4923.
- [52] JEZ J M, AUSTIN M B, FERRER J L, et al. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases[J]. *Chemistry & biology*, 2000, 7(12): 919-930.
- [53] 刘晶莹, 佟少明, 侯和胜. 芪合酶基因的研究进展与应用现状[J]. *天津农业科学*, 2015, 21(4): 24-27.
- [54] AUSTIN M B, BOWMAN M E, FERRER J, et al. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases[J]. *Chemistry & biology*, 2004, 11(9): 1179-1194.
- [55] COSTAGLIOLI P, JOUBÈS J, GARCIA C, et al. Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1734(3): 247-258.
- [56] JAMES D W, JR, LIM E, KELLER J, et al. Directed tagging of the *Arabidopsis* *FATTY ACID ELONGATION1 (FAE1)* gene with the maize transposon *Activator*[J]. *The plant cell*, 1995, 7(3): 309-319.
- [57] GAGNE S J, STOUT J M, LIU E, et al. Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2012, 109(31): 12811-12816.
- [58] 麦麦提艾力·阿卜杜纳斯尔, 马纪. 新型多功能蛋白家族 DABB 类蛋白研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(12): 5460-5472.
- [59] FUKUDA I, ITO A, HIRAI G, et al. Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate[J]. *Chemistry & biology*, 2009, 16(2): 133-140.
- [60] SCHULTZ D J, WICKRAMASINGHE N S, KLINGE C M. Chapter six - Anacardic acid biosynthesis and bioactivity[M]//ROMEO J T. *Recent advances in phytochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2006: 131-156.
- [61] ECKERMANN C, MATTHES B, NIMTZ M, et al. Covalent binding of chloroacetamide herbicides to the active site cysteine of plant type III polyketide synthases[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(6): 1045-1054.

(上接第 34 页)

- [23] 沈明丽, 许丽梅, 肖肖萌, 等. 电感耦合等离子体发射光谱法测定茶叶中的微量元素[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(31): 72-75.
- [24] 李玉红, 赵维, 古元梓. 电感耦合等离子体发射光谱法测定茶叶中元素[J]. *广州化工*, 2017, 45(8): 118-120.
- [25] GHUNIEM M M, KHORSHED M A, RDA M, et al. Assessment of the potential health risk of heavy metal exposure from the consumption of herbal, black and green tea[J]. *Journal of scientific & technical research*, 2019, 16(1): 11810-11817.
- [26] 董瑞, 刘艳明, 赵发, 等. 电感耦合等离子体质谱法同时测定茶叶中的铅、砷、镉、镉[J]. *食品安全导刊*, 2019(27): 80-81.
- [27] 刘文政, 贾亚琪, 李磊, 等. 微波消解-电感耦合等离子体质谱法同时测定茶叶中的 10 种金属元素[J]. *微量元素与健康研究*, 2020, 37(1): 50-53.
- [28] 刘岗松, 张建辉, 汪霞丽, 等. 不完全消解-同位素稀释-电感耦合等离子体质谱法测定茶叶中铅的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(18): 4935-4939.
- [29] 章剑羽, 王国庆, 马桂岑, 等. 离子色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定茶叶中 4 种砷形态[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(7): 255-262.
- [30] 陈贵宇, 潘煜辰, 李清清, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子质谱法分析富硒茶叶中硒的形态[J]. *食品科学*, 2018, 39(8): 155-159.
- [31] 董照峰, 赵宇, 李俊, 等. 商洛市茶园产地环境及茶叶重金属污染风险评估及修复[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(3): 227-232.
- [32] 刘松, 周富强, 李雪澜, 等. 微波消解-ICP-AES 法同时测定贵州茶叶中的砷、铅、镉、镉[J]. *食品工业*, 2019, 40(12): 334-337.
- [33] 唐爱玲. 微波消解-四级杆电感耦合等离子体质谱法测定茶叶中有益和有害金属[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(31): 91-93.
- [34] 苏新国, 段俊. 凤凰单枞乌龙茶重金属污染风险评估[J]. *食品科学*, 2008, 29(7): 375-377.
- [35] 李培, 杨琰宇, 谢云飞, 等. 差分脉冲伏安法检测茶叶中痕量铅的研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(23): 301-305.
- [36] MELUCCI D, LOCATELLI M, LOCATELLI C. Trace level voltammetric determination of heavy metals and total mercury in tea matrices (*Camellia sinensis*) [J]. *Food and chemical toxicology*, 2013, 62: 901-907.
- [37] 周睿璐, 付大友, 李雪梅, 等. 试纸法快速检测茶叶中铅含量的研究[J]. *应用化工*, 2017, 46(7): 1318-1320, 1324.
- [38] 李国权, 邢为飞, 戚雪勇, 等. X-射线荧光峰值法测定茶叶中无机元素质量分数[J]. *江苏大学学报(自然科学版)*, 2016, 37(5): 536-540.
- [39] 于巧玲, 吕鹏程, 杜府. 茶叶中镉的激光诱导击穿光谱快速检测及等离子体参数[J]. *化工技术与开发*, 2019, 48(4): 30-33, 47.
- [40] 缪德仁, 李晓, 杨婉秋. 云南凤庆茶叶中铜、铅、锌、镉、铬和砷的健康风险评估[J]. *昆明学院学报*, 2019, 41(3): 56-60.
- [41] 颜媛, 张琼, 朱丽江, 等. 云南省保山市不同茶叶中重金属浸出特征分析[J]. *昆明学院学报*, 2016, 38(3): 43-48, 61.
- [42] 唐琦平, 王学伟, 缪德仁. 云南省不同产区普洱生茶中金属元素浸出特性分析[J]. *昆明学院学报*, 2016, 38(6): 38-42.
- [43] 肖涵, 申亮, 李焯. 云南省红河州茶叶中重金属含量及相关性分析[J]. *昆明学院学报*, 2015, 37(3): 30-33.
- [44] 瞿燕, 高原, 杨婉秋. 云南省普洱市茶叶中重金属及稀土总量分析[J]. *昆明学院学报*, 2015, 37(6): 34-38.
- [45] 李红梅. 标准物质质量控制及不确定度评定[M]. 北京: 中国质检出版社, 2014.
- [46] 国家质量监督检验检疫总局. 标准物质通用术语和定义: JJF 1005-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.