

文章编号: 1004-0374(2013)10-0958-08

合成生物技术生产甾体激素中间体的研究展望

刘 夺, 张 莹, 周 晓*, 元英进

(天津大学化工学院系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072)

摘 要: 甾体类药物是销售额仅次于抗生素的世界第二大类药物, 不同的甾体药物分子结构均由甾体激素中间体衍生而来。甾体激素中间体的传统生产方法包括植物提取皂素法和化学全合成法, 其对环境有害, 反应产物结构不唯一且成本较高, 不利于工业化生产。目前主要的生产工艺是利用微生物对特殊原料进行转化的半合成法, 但会遇到微生物酶转化率低、发酵周期长等问题。合成生物学的出现为构建利用糖为唯一碳源生产甾体激素中间体的人工细胞提供了理论上的可行性和可靠的技术支持。重点综述了合成生物技术在甾体激素中间体生产中的应用, 以有利于工业发酵的酿酒酵母、分枝杆菌等为底盘细胞, 通过引入外源合成功能模块, 实现胆甾醇、雄烯二酮等甾体激素中间体的生物合成, 并对合成生物技术在医药生产方式转变中的应用进行了展望, 以期推动甾体类药物生物制造技术的进步。

关键词: 甾体激素中间体; 植物提取皂素法; 化学全合成法; 半合成法; 合成生物技术
中图分类号: O629.23; Q812 **文献标志码:** A

Research prospects of synthetic biotechnology in steroid hormone intermediate production

LIU Duo, ZHANG Ying, ZHOU Xiao*, YUAN Ying-Jin

(Key Laboratory of Systems Bioengineering of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Steroid drugs have become the second one in the world pharmaceutical market, right after the antibiotics. All types of steroid drugs are derived from the steroid hormone intermediates. For the production of steroid hormone intermediates, traditional methods include plant saponin extraction method and total synthesis method. Both of them are detrimental to environment, yield the mixing of different structural products, and too expensive for industrial production. At present, the common method is semi-synthesis which uses certain raw material and microorganisms, while faces the problems such as low enzyme conversion rate and long fermentation period. The advent of synthetic biology provides a theoretical basis and reliable technical support for constructing artificial cells that can synthesize steroid hormone intermediates using sugar as the sole carbon resource. This review summarized the application of synthetic biotechnology in the production of steroid hormone intermediates. Cholesterol, androstendione and other steroid intermediates can be synthesized by introducing exogenous synthetic function modules, using *Saccharomyces cerevisiae* and mycobacteria as chassis suitable for industrial fermentation. Furthermore, the application of synthetic biotechnology is also discussed in changing pharmaceutical production mode, expecting to promote the progress of steroid biological pharmaceutical technologies.

Key words: steroid hormone intermediates; plant saponin extraction method; total synthesis method; semi-synthesis method; synthetic biotechnology

收稿日期: 2013-06-03; 修回日期: 2013-07-31

基金项目: 国际高科技研究发展计划(“863”计划)(2012AA02A701); 国家自然科学基金项目(21206114); 天津市自然科学基金项目(12JCQNJC03800)

*通信作者: E-mail: zhouriyaoyao@tju.edu.cn; Tel: 18722178216

甾体类药物是指分子结构中含有环戊烷多氢菲母核结构的激素类药物, 典型品种有地塞米松、泼尼松、倍他米松、氢化可的松等(图1)。甾体类药物的合成和应用与抗生素并称为二十世纪医药工业最引人注目的两大成果, 在制备保健品、治疗呼吸系统疾病、内分泌失调、肿瘤等疾病方面有着显著的临床作用^[1]。甾体类药物年销售额大于400亿美元, 约占世界医药产品总额的10%。作为制备各种甾体类药物的原材料, 甾体激素中间体应用广泛、种类繁多, 具有重要的医药价值和巨大的市场需求。我国是生产甾体药物中间体的主要国家, 2009年国内甾体激素原料药及中间体出口总量为743.25吨, 出口总金额3.7亿美元^[2]。随着各国经济发展和居民生活水平提高, 人们对甾体类药物的需求将不断增加, 甾体激素中间体的市场空间广阔。如何开发出甾体药物及其中间体的新型生产技术, 降低成本与生产污染, 提高附加值与生产效率, 成为关系着我国医药产业发展的重要命题。

甾体激素中间体的生产工艺经历了植物提取皂素法、化学全合成法、半合成法、新型的微生物合成法等几个阶段。虽然工业上仍以半合成法为主, 但合成生物学的出现, 建立了一种新型的微生物合成法。它只利用糖为唯一碳源, 通过人工构建的功能微生物, 即可生产特定结构的甾体激素中间体,

为建立新型的生物制药技术开拓了发展思路, 奠定了研究基础。

1 传统生产工艺的应用

1.1 植物提取皂素法

植物皂素是生产甾体类药物的重要原料, 其分子结构无法通过全化学合成获得, 因此只能通过植物提取的方式获取^[3]。目前工业上提取的植物皂素包括薯蓣皂素、剑麻皂素和番麻皂素, 其中尤以薯蓣皂素为主, 是200余种甾体激素药物的原材料。作为薯蓣皂素的重要来源, 黄姜已成为我国生产甾体原料的最主要药源作物^[4]。工业上最初采用直接酸水解法提取薯蓣皂素, 即把黄姜粉碎, 用稀酸加热回流进行水解, 水解产物用水或饱和碳酸钠水溶液洗涤至中性, 置于80℃烘干后, 再用汽油、石油醚等溶剂提取皂素^[5]。

植物提取皂素有如下明显弊端:(1)由于植物细胞壁比较坚韧, 提取过程需配合使用生物酶以及大量酸和有机溶剂, 导致排出的废水污染物中pH值、BOD、COD等含量均超标^[6-7]; (2)黄姜是一种农作物, 生长对地理位置要求严格, 利用其提取薯蓣皂素, 必将面临工业生产受制于农作物生长的问题, 会导致生产具有明显的周期性, 产量不稳定, 不利于连续生产; (3)提取后不能被二次利用的残

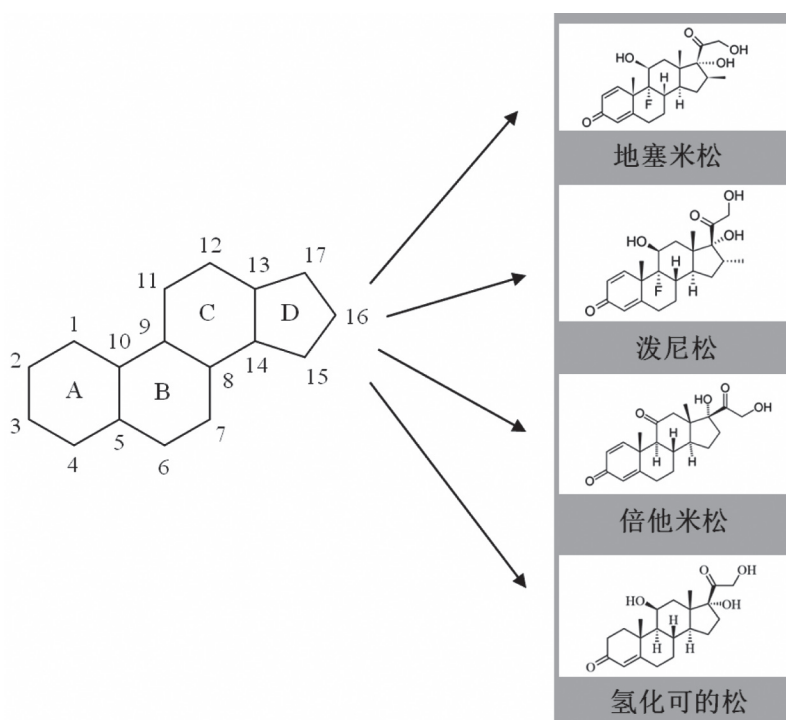


图1 环戊烷多氢菲母核结构及典型甾体类药物品种

渣堆放会占用土地资源,大量的渗透液又可能污染地下水,造成潜在的威胁^[8]。由此可见,通过植物提取法生产甾体激素中间体包含诸多弊端,亟需其他生产工艺的出现。

1.2 化学全合成法

甾体类中间体化学全合成的关键步骤是环戊烷多氢菲母核的构建(图1)。最初的合成方法以A环或AB环起始,依次连接C环、D环,但该路线反应流程过长,并无过多经济价值^[9]。20世纪50年代,随着各种立体专一性反应的发现,以往最后引入的D环在合成前期就能引入^[10]。然而,合成产物均为消旋化合物,一般只有一个对应体具有生理活性,另一个无作用甚至有反作用,因此,涉及到手性拆分的问题。上世纪70年代后期,不对称合成开始出现,通过在CD环上引入符合天然甾体构型的手性中心以得到光学活性甾体^[11]。与此同时,生物模拟多烯环合法(仿生环合法)的出现,实现了具有适当位置的多烯烃一步直接合成天然构型的甾体骨架ABCD环。此后,环加成法、重排反应、分子内Heck反应等均在甾体类的全合成上得到广泛应用^[12]。

由于甾体分子的母核结构复杂,化学全合成工艺流程长、反应步骤多、副产物去除复杂、能耗高且易对环境造成污染,限制了甾体药物的生产和应用。因此,探索高效、绿色的合成方法是甾体激素中间体生产工艺发展过程中的首要任务。

2 微生物催化半合成法生产甾体激素类药物

微生物半合成法生产甾体激素类药物,是利用特殊微生物作为反应器,将特殊非糖原料转化为甾体类产品的的方法。它的出现很大程度上改进了生产工艺路线,弥补了植物提取法与化学全合成法的缺陷。

2.1 以植物皂素为原料的半合成法

利用特定微生物,以植物皂素为原料,可在甾体母核的任何位置进行羟化反应,使甾体分子具有药用活性^[13]。甾体的羟化酶都是细胞色素P450依赖型单加氧酶,属于末端氧化酶,能将一摩尔分子氧引入底物,并需要一个NADPH提供电子转移系统^[14]。常见的甾体微生物羟化反应及所用微生物见表1。

2.2 以动植物甾醇为原料的半合成法

由于植物皂素的提取会带来一系列问题,目前世界上的先进国家大多以动植物甾醇为起始原料进行微生物降解侧链,得到重要中间体C-17酮甾体,如雄甾-4-烯-3,17-二酮(4AD)、雄甾-1,4-二烯-3,17-

表1 常见的细胞色素P450酶催化的甾体羟化反应

甾体羟化反应类型	转化微生物
6 β	自耐热性芽孢杆菌
7 α	串珠镰刀菌、布拉克须霉
11 α	棕曲霉、烟曲霉、黑根霉
11 β	月状旋孢腔菌
15 α	雷斯青霉
15 β	巨大芽孢杆菌
16 α	玫瑰产色链霉菌

二酮(ADD)和9 α -OH-AD后进一步制备甾体药物^[15]。

作为工业生产的废物,动物甾醇,如胆甾醇,以及植物甾醇,如豆甾醇、 β -谷甾醇、菜油甾醇等原料来源丰富,且具有甾体母核,是合成甾体激素中间体的理想原料^[16-17]。因此,利用微生物进行动植物甾体的侧链降解,在工业化应用中具有重要地位。常见的动植物甾醇侧链降解及所用微生物见表2。

利用微生物转化进行化学反应修饰,进而合成甾体激素中间体,与传统提取方法相比具有如下优点:(1)生产过程尽量避免或减少工业强酸、强碱的使用,改善操作条件;(2)微生物转化法专一性强,具有较好的立体选择性和区域选择性^[18]。但是,其仍有不足。一方面,特殊底物甾体类物质通常具有较强的疏水性,使得其难以扩散进入细胞与转化酶接触反应,从而导致转化率降低;另一方面,分支杆菌发酵是细菌发酵,不像酵母等真菌发酵一样具有很强的鲁棒性,灭菌成本高,在一定程度上限制了半合成法生产甾体激素中间体的工业化应用^[19]。

我国传统的甾体激素药物生产还主要以薯蓣皂素的化学降解得到基本中间体C21甾体的双烯物技术为主。近年来,我国从国外引进2条生产线,开始了微生物发酵植物甾醇生产4AD的先进生物制造工艺,标志着我国进入了国际先进水平的行列。然而,4AD作为C19甾体中间体用于生产雄性激素、蛋白同化激素类有一定优势,但是要在C17酮位置应用化学法引入双羟丙酮侧链生产A环具有4-烯-3-酮结构的第一代肾上腺皮质激素尚需时日。我国在甾体药物生产中应用的微生物转化反应包括C11-羟基化、C1,2-脱氢。这些微生物转化反应长期以来是甾体药物生产中的薄弱环节,资源利用率不高,与国外差距较大。因此,重视生物制造的研究应用,实现绿色制造的可持续发展对提高资源利用率、降低能耗、环境友好意义重大^[20]。

表2 常见的微生物降解动植物甾醇侧链反应

底物	转化微生物	主要产物
羊毛甾-7,9(11)-二烯-3-醇	分枝杆菌NRRL B-3805	4,8(14)-ADD-3,27-二酮
3 β -乙酰氧-19-胆甾-5-烯胆甾醇	莫拉克斯氏菌	雌酮
胆甾醇	分枝杆菌NRRL B-3805	睾酮
麦角甾醇	分枝杆菌NRRL B-3805	AD
	分枝杆菌NRRL B-3683	ADD
α -谷甾醇	分枝杆菌NRRL B-3805	AD
	分枝杆菌NRRL B-3683	ADD
β -谷甾醇	分枝杆菌NRRL B-3805	AD
	分枝杆菌VKM Ac-1815D ET1	AD
植物甾醇	分枝杆菌MB 3683	AD

3 合成生物技术在甾体激素类药物生产中的应用及展望

3.1 合成生物技术在异戊二烯途径下游药物生产的应用

合成生物学旨在工程学思想指导下,设计构建新生物元件、模块、系统,或赋予天然系统具有新功能、新用途,以满足人类的需求。合成生物技术的出现,已经在医药、能源、环境等方面取得了标志性突破^[21]。其中,已经有多项工作针对细胞异戊二烯途径下游药物生产开展研究。以细胞内源的异戊二烯焦磷酸(IPP)为前体分子,通过多种聚合、修饰和降解的生物反应,可以合成多种重要的萜烯类药物,包括青蒿素、紫杉醇、丹参酮、人参皂苷等,以及甾体激素类药物,包括黄体酮、雄烯二酮等。

美国加州大学伯克利分校的 Jay Keasling 教授是利用合成生物技术生产青蒿素的领军人物。2003年,该课题组首次在大肠杆菌中成功表达从青蒿中克隆的功能基因,得到了产量为 3.1 mg/L 的青蒿二烯^[22]。2006年,Keasling 课题组在酵母菌中导入青蒿二烯合成酶基因及 P450 氧化酶及还原酶基因,实现了青蒿酸的生产,产量达到 115 mg/L^[23]。2008年,他们对工程化的产青蒿酸酵母菌进行优化,发酵得到 1 g/L 的青蒿酸^[24]。在此基础上,该课题组设计了人工蛋白支架,对大肠杆菌中不同反应酶以不同分子数捆绑在一起,协同作用降低中间代谢物积累,提高产物合成效率达 77 倍^[25]。2009年,通过基因来源的重新选择替换和工业发酵过程的优化,他们进一步在大肠杆菌中实现了青蒿二烯的高效生产,平均产量达到 27.4 g/L^[26]。2013年,该组在青蒿二烯之后又引入 5 个外源反应酶或辅助蛋白形成的模块,使得青蒿酸的产量达到 25 g/L 的高水

平,具有直接工业化的巨大价值^[27]。

抗癌药物紫杉醇的生物合成也是合成生物技术替代传统植物源药物提取的典型实例。2001年,德州农工大学的 Huang 等^[28]在大肠杆菌中首次实现了紫杉二烯的生物合成,产量为 1.3 mg/L。2004年,西班牙巴塞罗那大学的 Besumbes 等^[29]在拟南芥中实现了紫杉二烯的合成,产量为 600 ng/L。2005年,德国 Darmstadt 技术大学的 Engels 等^[30]在酵母中合成了紫杉二烯,产量达到 8.77 mg/L。2006年,DeJong 等^[31]在酵母菌实现了紫杉二烯 -5 α -醇的合成,产量约为 25 μ g/L。2010年,麻省理工学院的 Stephanopoulos 课题组在大肠杆菌中成功实现了紫杉二烯的合成,产量高达 (1020 \pm 80) mg/L^[32]。在国内也有若干家单位从事紫杉醇的生物合成研究。中国医学科学院的 Wang 等^[33-34]于 2005 年分别在大肠杆菌和酵母菌中成功构建紫杉二烯的合成途径。2011年,Meng 等^[35]在大肠杆菌中构建了紫杉二烯合成途径,最终发酵可产生 (876 \pm 60) mg/L 的紫杉二烯。

丹参酮来源于中药,具有抗肿瘤的效果,近年来受到很高的关注度。2012年,中国科学院大连化学物理研究所的 Zhou 等^[36]以酿酒酵母为底盘细胞,最终构建了如下模块:过表达 *tHMG1*,融合表达 *BST1* 和 *ERG20*,同时融合表达 *SmKSL* 和 *SmCPS*,使次丹参酮二烯产量达到了 12.5 mg/L;利用 15 L 规模发酵罐培养携带高效 *Miltiradiene* 合成途径的酵母工程菌,产量达到 365 mg/L。

植物源药物提取导致的高污染、物种资源破坏等生态环境问题日益突出,迫切需要研究开发基于新功能元件与模块库平台的合成生物技术,以促进资源依赖型医药产品从天然提取生产模式向微生物合成的工业模式转变。

3.2 合成生物技术应用于构建生产甾体激素中间体的底盘细胞

动物及人体内的甾体激素类分子均来自胆固醇的合成,而胆固醇的合成路径中鲨烯(squalene)到酵母固醇(zymosterol)的路径与酵母中的路径基本相同,且后续一些酶也具有同工作用,只是末端产物分别为胆固醇和麦角固醇。因此,酿酒酵母作为基因工程、代谢工程常用菌株,基因操作工具方便,便于培养和大规模发酵,且遗传背景较清晰,次生代谢产物较单一,能简化代谢工程产物的纯化^[37],是理想的真核蛋白表达系统之一,适合作为固醇类物质人工合成的底盘细胞。

德国柏林工业大学的Christine Lang课题组对酿酒酵母内源固醇生物合成途径中的关键调控基因进行了研究,通过上调基因*tHMGR*的表达,使酵母固醇前体物角鲨烯的产量提高了40倍^[38];为进一步促进角鲨烯向固醇类物质的转化,该课题组对内源关键基因角鲨烯环氧酶基因(*ERG1*)和羊毛固醇C-14去甲基化醇酶基因(*ERG11*)进行过表达,使角鲨烯下游总固醇产量较野生菌株提高了3倍^[39]。在该课题组发表的专利中,通过引入来自小鼠和人的C-8甾醇异构酶基因(*ERG2*)、C-5甾醇去饱和酶基因(*ERG3*)以及甾醇C24-还原酶基因(*DHCR24*),并将C-22甾醇脱氢酶基因(*ERG5*)和甾醇C24-甲基转移酶基因(*ERG6*)失活且截短的HMG-CoA还原酶基因(*tHMG1*)过表达,获得了能合成7-脱氢胆甾醇、麦角甾-5,7-二烯醇及中间代谢物的重组酵母菌株^[40]。

荷兰的Hans-Peter课题组也实现了通过酵母生产非酵母的甾醇,通过上调*HMG1*的截短基因,敲除*ERG5*和*ERG6*基因,并引入脊椎动物来源的甾醇C24-还原酶DHCR24,成功在酵母中生产7-脱氢胆甾醇。进一步地,他们将脊椎动物胆固醇C25-羟化酶与7-脱氢胆甾醇和麦角固醇结合,获得了生产25-羟基-7-脱氢胆甾醇和25-羟基麦角固醇的酵母菌株^[41]。

2011年,瑞士日内瓦大学与奥地利格拉茨工业大学合作研究,通过敲除固醇C-24甲基转移酶基因*ERG6*和固醇C-22脱氢酶基因*ERG5*,分别引入非洲爪产蟾、人源、鱼源的固醇C-7还原酶、固醇C-24还原酶,构建得到稳定生产胆固醇的酵母菌株RH6829。他们的研究表明,鱼源的基因表达效果最佳,胆固醇产量约为1 mg/L细胞湿重。为了进一步研究胆固醇的合成对细胞膜蛋白的影响,

该课题组对三种细胞膜溶质的转运因子Tat2p、Pdr12p、Can1p进行了分析,发现胆固醇的合成对色氨酸和精氨酸的吸收均有显著影响,但与麦角固醇相比,胆固醇合成菌株对弱有机酸的抗性降低^[42]。

3.3 合成生物技术应用于构建生产甾体激素中间体的元件挖掘与检验

经过优化改造的酿酒酵母底盘细胞具备了合成外源胆固醇及其分子类似物的能力,在此基础上,添加人工设计的反应路径,可使其合成甾体类分子。动物细胞中,降解胆固醇侧链至剩余一个酮基的反应由细胞色素酶CYP11A1及其伴随蛋白铁氧还蛋白ADX和铁氧还蛋白还原酶ADR合作完成。俄罗斯罗蒙诺索夫莫斯科州立大学Kovaleva教授领导的课题组针对靶向于膜结构的细胞色素P450酶开展了多年的研究。1993年,该课题组利用酿酒酵母成功表达动物源的P450酶。在该项工作中,将人体的细胞色素P450IID6酶的氨基酸末端序列进行不同程度的截断,以考察其对P450IID6酶定位于酵母内质网的影响^[43]。1994年,该课题组在酿酒酵母中成功表达人活性细胞色素P450IIIA4酶,研究其对异源化学物质的代谢作用,在以P450IIIA4酶催化合成甾体激素羟甲雄二烯酮方面取得突破性成果,奠定了利用酵母细胞进行生物制药的基础^[44]。1996年,该课题组开展了在酵母中表达人细胞色素P450酶的机理性研究,利用酵母表达系统作为工具,研究P450酶对多种因子诱导的影响及其机制^[45]。1996年,他们在大肠杆菌中成功表达了经过序列修饰的铁氧还蛋白ADX与铁氧还蛋白还原酶ADR的前体,这两种蛋白是与P450scc搭配的关键蛋白,是酵母能够合成甾体激素药物前体的核心蛋白^[46]。1998~2000年,在该课题组发表的成果中,陆续研究了酵母线粒体中的蛋白水解作用^[47],外源蛋白转运进酵母线粒体时是否对蛋白水解酶及分子伴侣的功能造成影响^[48],以及胆固醇底物添加对转运进酵母线粒体的CYP11A1酶的影响^[49]。2006年,该课题组首次尝试将酵母内源的D-乳酸脱氢酶信号肽添加到外源细胞色素酶CYP11A1p(即P450scc)的前端,成功令其靶向酵母线粒体的内膜^[50]。2008年,该课题组系统研究了不同信号肽对CYP11A1酶的定位及活性影响,这些信号肽分别涉及到线粒体内膜定位的3种不同机制以及基质定位机制;同时包含了内源信号肽与外源信号肽,是利用人工添加信号肽实现外源元件功能的合成生物学代表工作^[51]。

另一方面,分枝杆菌在降解甾醇侧链中的作用

也成功运用于合成生物技术。2007年, 荷兰格罗宁根大学的 Vander 等^[52]对红球菌 RHA1 中催化胆固醇降解的基因簇进行了研究, 认为分支杆菌中的一系列基因簇可以将胆固醇转化得到雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD)、雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)和 9 α -OH-AD 等甾体药物中间体, 这一发现揭示了胆固醇代谢对分支杆菌在巨噬细胞中存活的超能力有极其重要的作用。该研究组进一步研究分析了胆固醇的代谢过程, 发现 CYP125 是细胞色素 P450 单加氧酶, 利用 NADPH 催化胆固醇的 C26 位羟基化, 该反应是胆固醇侧链降解的关键首要步骤^[53]。2009年, 该研究组通过使编码 HIP-CoA 转移酶的基因 *ipdA*、*ipdB* 和编码 HIL-CoA 脱氢酶的基因 *ipdF* 失活, 得到 AD、ADD、9 α -OH-AD 等重要甾体中间体^[54-55]。他们的发现也为利用其他微生物实现甾体激素中间体的合成提供了新思路, 对实现甾体激素药物中间体工艺的多元化, 合理利用我国甾体植物源天然产物资源具有重要意义。

3.4 合成生物技术应用于构建生产甾体激素中间体的功能模块

在已经优化构建的酿酒酵母底盘细胞中, 以外源固醇分子为底物, 合理搭配元件, 构建人工合成功能模块, 可实现不同甾体激素中间体的合成, 这方面的研究工作主要围绕雄烯二酮的合成展开。

1998年, 法国国家科学研究所分子遗传学中心的 Denis Pompon 与 Transgene 公司合作研究, 敲除酵母内源基因固醇 C-22 脱氢酶, 同时引入拟南芥 C-7 还原酶, 共表达牛细胞侧链降解细胞色素 P450、ADX、ADR, 实现了单一碳源到孕烯醇酮的生物合成, 产量达到 60 mg/L; 该研究组进一步引入人源 3 β -羟基类固醇脱氢酶, 将孕烯醇酮转化为孕酮^[56]。2003年, 该中心膜蛋白工程实验室与 Transgene 公司和 Aventis 公司在此前研究的基础上, 通过引入哺乳动物蛋白 matP450scc (CYP11A1)、matADX、matADR、线粒体靶向的 ADX、CYP11B1、3 β HSD、CYP17A1、CYP21A1, 首次实现了酿酒酵母中氢化可的松的全生物合成; 而后该研究组又对路径进行了优化, 包括对 NCP1、ARH1 两个线粒体系统的调控以及敲除基因 *ATF2*、*GCY1*、*YPR1* 以抑制副产物的生成, 最终使氢化可的松的产量提高 23 倍, 达到 11.5 mg/L, 占总固醇的 70%^[57]。该课题组还对胆固醇的合成进行了研究, 在专利 US 2009/0239837 A1 中, 通过表达真菌系统中的 C7 还原酶和 C24 还原酶, 同时抑制 C24 甲基转移酶的

表达, 从而获得合成胆固醇的酵母菌株^[58]。此外, 他们还获得了多株生产固醇衍生物的基因工程菌株, 并发表了专利^[59-60]。

以上关于各种甾体激素中间体的研究不仅体现出酵母菌作为重组微生物的巨大应用前景, 更证明了从高等真核生物到微生物实现复杂生物合成途径的可行性, 为合成生物技术取代植物源提取法提供了有力的技术和理论支持^[61]。

3.5 合成生物技术在甾体激素中间体生产中的展望

将基因元件(启动子、转录调控区域、核糖体结合位点、开放阅读框、终止子等)依据工程化目标需要, 有机重构和连接起来, 便形成了功能基因模块。通过对已有生物网络加以利用, 同时引入新的功能基因模块, 表达出天然细胞不能合成或含量极低的产物。尽管合成生物技术开拓了新的生产方式, 但尚处于起步阶段, 对于生物合成路径较长的物质, 各种酶的反应并不完全, 容易产生限速步骤, 有待于进一步优化合成路径, 以提高产量。

合成生物技术生产甾体激素中间体, 常用的底盘细胞是酿酒酵母, 而作为底物的内源固醇是细胞膜结构的重要组成部分, 代谢路径调控严谨, 但仍有通过内源途径改造提高固醇含量的空间。此外, 脂肪酸合成是固醇类代谢的竞争路径, 前体均为乙酰辅酶 A, 因此, 如何使乙酰辅酶 A 的积累更多转化为内源固醇而非脂肪酸, 协调两条代谢路径的关系, 也是未来运用合成生物技术生产甾体激素中间体的研究重点。

在人工合成生物体系、人类健康、能源等领域的重大需求牵引下, 合成生物技术将不断发展。为了解决药物需求与环境、植物资源的突出矛盾, 需要设计构建高效的甾体激素生物合成平台及产品, 实现重要的植物源医药产品的从碳源合成出发, 以人工细胞合成替代天然提取, 为国民经济带来巨大效益的同时, 也为资源环境的合理利用、科技进步、产业调整、经济增长方式的转型提供巨大推动力, 从而提升我国的战略国际地位和综合国力。

[参 考 文 献]

- [1] 梁剑光, 黄鹏, 徐正军. 重要甾体医药中间体的微生物转化研究进展. 化工中间体, 2008, 4(11): 20-3
- [2] 陈合, 李庆娟. 黄姜副产物综合利用的研究进展. 食品与药品, 2007, 9(12A): 60-2
- [3] 徐有明, 李双来, 郭治成, 等. 薯蓣属植物基础研究进展与开发利用. 湖北林业科技, 2005, 3: 37-41
- [4] 孙欣, 邓良伟, 吴力斌. 皂素生产废水污染特点及治理

- 现状. 中国沼气, 2005, 23(1): 25-8
- [5] 罗星, 刘运美, 姚旭, 等. 从黄姜中提取薯蓣皂苷元的工艺研究. 中国民族民间医药杂志, 2010, 19(11): 38-9
- [6] 吕杰, 金湘, 毛培宏. 生物技术在薯蓣皂苷及其苷元生物合成中的应. 生物技术, 2009, 19(4): 88-90
- [7] 王庆宇, 金凤燮, 鱼红闪. 薯蓣皂苷元制备方法的研究. 安徽农业科学, 2011, 39(5): 2642-4
- [8] 杨磊, 肖长文, 祖元刚. 植物提取物生产过程中废水的治理. 森林工程, 2008, 24(4): 44-7
- [9] 蔡祖辉. 甾体全合成. 中国医药工业杂志, 1979, 6: 29-46
- [10] Velluz L, Valls J, Nominé G. Recent advances in the total synthesis of steroids. *Angew Chem Int*, 1965, 4(3): 181-200
- [11] 庄治平. 甾体不对称合成的研究. 应用化学, 1985, 2: 81-2
- [12] 孟程红. 甾体关键骨架 BCD 环的全合成方法学研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2012
- [13] 叶丽, 史济平. 甾体微生物转化在制药工业中的应用. 工业微生物, 2001, 31(4): 40-7
- [14] 杨顺楷, 易奎星, 杨亚力, 等. 甾体微生物转化C11 β -羟基化的研究进展. 生物加工过程, 2006, 4(2): 7-14
- [15] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 32(6): 688-705
- [16] 张裕卿, 王东青. 植物甾醇微生物转化制备甾体药物中间体的研究进展. 微生物学通报, 2006, 33(2): 142-6
- [17] 杨英, 姜绍通. 微生物降解甾醇侧链转化雄甾-4-烯-3, 17-二酮的研究进展. 微生物学通报, 2006, 33(6): 142-5
- [18] 梁建军, 汪文俊. 微生物生物转化甾体化合物生产雄烯二酮研究进展. 湖北农业科学, 2012, 51(7): 1309-12
- [19] 张春燕, 白宝星, 王明蓉. 甾体药物生物转化体系的研究进展. 国外医药抗生素分册, 2007, 28(5): 210-4
- [20] 杨顺楷, 杨亚力, 吴中柳, 等. 微生物发酵降解植物甾醇侧链生产17-酮甾体研究进展. 生物加工过程, 2010, 8(5): 69-77
- [21] 刘夺, 杜瑾, 赵广荣, 等. 合成生物学在医药及能源领域的应用. 化工学报, 2011, 62(9): 2391-7
- [22] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796-802
- [23] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-3
- [24] Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, et al. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC Biotechnol*, 2008, 8(1): 83
- [25] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753-9
- [26] Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, et al. High-level production of amorph-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4489
- [27] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-36
- [28] Huang Q, Roessner CA, Croteau R, et al. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorgan Med Chem*, 2001, 9(9): 2237-42
- [29] Besumbes Ó, Sauret GS, Phillips MA, et al. Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of taxol. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88(2): 168-75
- [30] Engels B, Dahm P, Jennewein S. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metab Engin*, 2008, 10(3): 201-6
- [31] DeJong JM, Liu Y, Bollon AP, et al. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(2): 212-24
- [32] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 70-4
- [33] Wang W, Kong J, Meng C, et al. Studies on the combinatorial biosynthesis of taxadiene in *Escherichia coli*. *Chn Pharmaceut J*, 2005, 40(18): 1428-31
- [34] Wang W, Meng C, Zhu P, et al. Preliminary study on metabolic engineering of yeast for producing taxadiene. *J Chn Biotechnol*, 2005, 25(8): 103-8
- [35] Meng H, Wang Y, Hua Q, et al. *In silico* analysis and experimental improvement of taxadiene heterologous biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2011, 16(2): 205-15
- [36] Zhou YJ, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 3234-41
- [37] 孔建强, 沈君豪, 黄勇. 酵母工程菌制备紫穗槐-4,11-二烯的研究. 药学学报, 2009, 44(11): 1297-303
- [38] Polakowski T, Stahl U, Lang C. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49: 66-71
- [39] Markus V, Stahl U, Lang C. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2003, 4: 87-95
- [40] Lang C, Markus V. Preparation of 7-dehydrocholesterol and/or the biosynthetic intermediates and/or secondary products thereof in transgenic organisms: US, 2006/0240508 [P]. 2006-10-26
- [41] Hohmann HP, Lehmann M, Merkamm M, et al. Production of non-yeast sterols by yeast: US, 20120231495 [P]. 2012-09-13
- [42] Cleiton MS, Tatjana ME, Schwabe HP, et al. A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance. *Metab Eng*, 2011, 13: 555-69
- [43] Krynetsky EY, Drutsa VL, Kovaleva IE, et al. Effects of amino-terminus truncation in human cytochrome

- P450IID6 on its insertion into the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1993, 336(1): 87-9
- [44] Krynetskii EI, Kovaleva IE, Luzikov VN. Heterologous expression of functionally active human cytochrome P-450s. Cytochrome P-450IIIA4 catalyzes the biotransformation of the anabolic steroid hormone methandrostenolone. Biokhimiia, 1994, 59(2): 282-7
- [45] Kovaleva IE, Krynetskii EY, Luzikov VN. Transgenic yeast expressing human cytochrome P450s can serve as a tool in studies of the mechanisms of their induction by various effectors. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(1): 129-32
- [46] Isaeva LV, Spiridonova VA, Liunovich D, et al. Synthesis in *Escherichia coli* and certain properties of hybrid protein consisting of a modified precursor of adrenodoxin reductase and shortened precursor of adrenodoxin. Biokhimiia, 1996, 61(8): 1448-59
- [47] Savel'ev AS, Novikova LA, Kovaleva IE, et al. ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. J Biol Chem, 1998, 273(32): 20596-602
- [48] Saveliev AS, Kovaleva IE, Novikova LA, et al. Can foreign proteins imported into yeast mitochondria interfere with PIM1p protease and/or chaperone function? Arch Biochem Biophys, 1999, 363(2): 373-6
- [49] Kovaleva IE, Grivennikov SI, Luzikov VN. On the effect of cholesterol on the fate of CYP11A1 imported into yeast mitochondria *in vivo*. Biochemistry (Mosc), 2000, 65(10): 1206-11
- [50] Minenko AN, Luzikov VN, Kovaleva IE. Use of the addressing sequence of yeast D-lactate dehydrogenase for insertion of CYP11A1p into the inner membrane of yeast mitochondria. Biochemistry (Mosc), 2006, 71(1): 32-8
- [51] Minenko AN, Novikova LA, Luzikov VN, et al. Import of hybrid forms of CYP11A1 into yeast mitochondria. Biochim Biophys Acta, 2008, 1780(10): 1121-30
- [52] Vander GR, Yam K, Heuser T, et al. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(6): 1947-52
- [53] Rosłonec KZ, Wilbrink MH, Capyk JK, et al. Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. Mol Microbiol, 2009, 74(5): 1031-43
- [54] Vander GR, Hessels G, Dijkhuizen L. Method for the production of modified steroid degrading microorganisms and their use: WIPO, 2009024572 [P]. 2009-2-27
- [55] Vander GR, Vander MP, Hessels G, et al. Identification of 3-ketosteroid 9- α -hydroxylase genes and microorganisms blocked in 3-ketosteroid 9- α -hydroxylase activity: US, 7223579 [P]. 2007-5-29
- [56] Dupont C, Spagnoli R, Degryse E, et al. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. Nat Biotechnol, 1998, 16(2): 186-9
- [57] Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. Nat Biotechnol, 2003, 21(2): 143-9
- [58] Pompon D, Dumas B, Spagnoli R. Cholesterol-producing yeast strains and uses thereof: US, 8211676 [P]. 2012-7-3
- [59] Spagnoli R, Achstetter T, Cauet G, et al. Yeast strains autonomously producing steroids: U.S. Patent 7,977,065 [P]. 2011-7-12
- [60] Dumas B, Cauet G, Degryse E, et al. Modified yeasts and uses thereof, in particular for producing steroid derivatives: US, 8173402 [P]. 2012-5-8
- [61] Dumas B, Brocard MC, Assemat LK, et al. Hydrocortisone made in yeast: metabolic engineering turns a unicellular microorganism into a drug-synthesizing factory. Biotechnol J, 2006, 1(3): 299-307