

文章编号 1672-6634(2024)02-0101-10

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2023110012

生物法合成熊去氧胆酸研究进展

张雪¹, 张悦¹, 刘梦雨¹, 栾浩妮¹, 宋鹏¹, 周正松², 王飞¹, 徐伟¹

(1. 聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059; 2. 山东奥克特生物科技有限公司, 山东 聊城 252800)

摘要 熊去氧胆酸(UDCA)是治疗肝胆疾病的基础性药物,对某些癌症和神经系统疾病也有辅助治疗作用。化学工艺合成 UDCA 对环境不友好、收率低,尚不能满足生产需求;生物法合成 UDCA 具有转化率高、节省能源、对环境友好的特点,目前是 UDCA 合成的研究发展方向。生物法合成是以廉价易得的鹅去氧胆酸(CDCA)、胆酸(CA)或石胆酸(LCA)为底物,通过 7 α -HSDH、7 β -HSDH、LDH 和 GDH 四种酶催化合成 UDCA,合成方法分为游离酶催化和全细胞合成,其中游离酶催化常采用“一锅两步法”或“一锅一步法”合成 UDCA;全细胞催化是以构建的工程细胞作为反应容器,利用细胞表达的酶系催化合成 UDCA。本文综述了游离酶催化和全细胞合成 UDCA 的相关用酶、合成方式及合成工艺的研究进展,为 UDCA 的研究生产提供技术参考。

关键词 熊去氧胆酸;生物法合成;游离酶催化合成;全细胞合成

中图分类号 R975

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Bio-Synthesis Progress of Ursodeoxycholic Acid

ZHANG Xue¹, ZHANG Yue¹, LIU Mengyu¹, LUAN Haoni¹, SONG Peng¹,
ZHOU Zhengsong², WANG Fei¹, XU Wei¹

(1. School of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. Shandong Aokete Biotechnology Co. Ltd., Liaocheng 252800, China)

Abstract Ursodeoxycholic acid(UDCA) is a fundamental medication in the treatment of hepatobiliary diseases and used as an adjuvant in the treatment of certain cancers and neurological disorders. The chemical synthesis method of UDCA is environmentally unfriendly, low yields output and cannot be fully met the production demand yet. In contrast, the biosynthesis of UDCA is characterized by high conversion rates, low energy conservation, and environmental friendliness. At present, it represent the direction of research and development for UDCA synthesis. Availabled substrates are utilized for biosynthesis such as chenodeoxycholic acid (CDCA), cholic acid (CA), or lithocholic acid (LCA). substrates are catalyzed by four enzymes: 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase (7 α -HSDH), 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase (7 β -HSDH), Lactate dehydrogenase(LDH), and Glucose dehydrogenase(GDH). There are two methods for synthesizing UDCA. It includes free enzyme catalysis and whole-cell synthesis. Free enzyme catalysis method

收稿日期:2023-11-28

基金项目:国家自然科学基金青年项目(82304838);山东省自然科学基金面上项目(ZR2022MC159)资助

通信作者:王飞,男,汉族,博士,讲师,研究方向:天然药物生物活性研究,E-mail: wangfei@lcu.edu.cn;徐伟,男,汉族,博士,副教授,研究方向:食品生物技术,E-mail: xuwei@lcu.edu.cn.

are subdivided into “one-pot two-step” and “one-pot one-step”. Whole-cell catalysis uses engineered cells as reaction vessels. The synthesis of UDCA is catalyzed by enzyme systems of cell. This paper reviews This article gives an overview of the enzymes involved, synthesis methods and the progress in synthesis technology for both free enzyme catalysis and whole-cell synthesis of UDCA. It provides technical references for the research and production of UDCA.

Key words ursodeoxycholic acid; biological synthesis; free enzyme-catalyzed synthesis; whole-cell synthesis

0 引言

熊去氧胆酸(UDCA)是一种内源性胆汁酸,具有溶解胆结石,治疗胆汁淤积、胆源性胰腺炎、原发性胆管炎、结肠炎(癌)、(非)酒精性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、药物性肝炎和改善肝移植效果的作用^[1]。最新研究发现,UDCA 还可介导并影响癌症基因组中致癌信号通路调控,用于癌症治疗^[2];可特异性调控细胞凋亡阈值,诱导细胞自噬和凋亡,抑制癌细胞生长^[3];在治疗进行性神经系统疾病时,UDCA 还能够改善受损线粒体功能,发挥神经保护作用^[4]。新冠期间,UDCA 还被证实具有降低新冠感染率和重症率的临床效果^[5]。

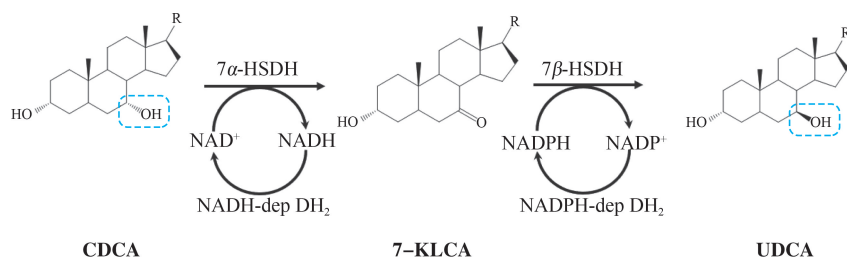
UDCA 是从北极熊胆汁中发现的一种天然活性产物,1902 年由 Hammarsten 命名,后续研究证实,UDCA 与其它内源性胆汁酸相比,在治疗胆囊和肝脏疾病方面表现出更好疗效。目前,UDCA 是美国食品和药物管理局(FDA)唯一批准治疗原发性胆汁性肝硬化的药物。生物法合成 UDCA 相对于化学合成具有绿色、高效和安全等特点。因此,利用胆汁酸类底物生物合成 UDCA 逐渐成为研究发展方向。生物法合成 UDCA 主要有游离酶催化合成和全细胞合成^[6]。游离酶催化合成以鹅去氧胆酸(CDCA)或胆酸(CA)为底物,通过多酶级联催化合成 UDCA;全细胞合成是在微生物培养过程中加入 CDCA 或石胆酸(LCA)底物,利用微生物全细胞催化将底物转化为 UDCA。

1 游离酶催化合成 UDCA

游离酶催化合成 UDCA 以 CDCA、CA 或者 LCA 为出发底物,其中大部分研究主要集中在 CDCA 和 CA。一方面,CDCA 和 CA 来自家禽(鸡、鸭、鹅)和牛胆汁,原料资源丰富,价格便宜;另一方面,CDCA 和 CA 转化合成 UDCA 使用的羟基类固醇脱氢酶催化效率高,而目前真正实现全过程酶催化合成 UDCA 的只有底物 CDCA。

1.1 CDCA 底物合成 UDCA

CDCA C-7 羟基差向异构化后即转化为 UDCA。以 CDCA 为底物合成 UDCA 涉及两种关键酶:7 α -羟基类固醇脱氢酶(7 α -HSDH)和 7 β -羟基类固醇脱氢酶(7 β -HSDH)。7 α -HSDH 催化 CDCA 氧化脱氢生成 7-酮石胆酸(7-KLCA),7 β -HSDH 进一步催化 7-KLCA 加氢还原生成 UDCA,如图 1 所示。



注:R=4-戊酸;蓝色方框:C-7 羟基。 Note: R= 4-valeric acid; Blue box: C-7 hydroxy.

图 1 7 α -HSDH 和 7 β -HSDH 催化 CDCA 合成 UDCA

Fig. 1 7 α -HSDH and 7 β -HSDH catalyze the synthesis of UDCA from CDCA

7 α -HSDH 和 7 β -HSDH 同属短链脱氢酶/还原酶(SDR)家族,早期发现的 7 α -HSDHs 大部分从好氧菌或厌氧菌中分离得到。近年来,通过同源比对^[7-9]或宏基因组学方法^[10]从黑熊粪便中发现的 7 α -HSDH 数量较多,已报道的 7 α -HSDHs 如表 1 所示。

表 1 已报道的 7α -HSDH
Table 1 The reported 7α -HSDHs

序号 (No.)	基因(蛋白)序列 ID (Gene (protein) sequence ID)	微生物来源 (Microbial sources)	辅酶 (Coenzymes)	文献 (References)
1	GenBank: WP_046653274.1	<i>Brevundimonas sp</i>	NAD ⁺	[11]
2	GenBank: MH743112	黑熊粪便微生物 (Black bear faecal microbes)	NADP ⁺	[7]
3	GenBank: MG516982	黑熊粪便微生物 (Black bear faecal microbes)	NADP ⁺	[8]
4	GenBank: KF356399	<i>Comamonas testosteroni</i>	NADP ⁺	[9]
5	SI-a-1 (code in literature)	黑熊粪便微生物 (Black bear faecal microbes)	NADP ⁺	[10]
6	SI-a-2 (code in literature)			
7	H1-a-1 (code in literature)			
8	H1-a-2 (code in literature)			
9	Y1-a-1 (code in literature)			
11	GenBank: AAA53556.1	<i>Clostridium sordellii</i>	NADP ⁺	[12]
12	GenBank: AAB61151.1	<i>Eubacterium sp</i>	NADP ⁺	[13]
13	GenBank: JN191345.1	<i>Clostridium absonum</i>	NADP ⁺	[14]
14	GenBank: WP_011860631.1	<i>Clostridium difficile</i>	NADP ⁺	[15]
15	GenBank: KXH01569.1	<i>Escherichia coli</i>	NAD ⁺	[16]
16	GenBank: OGX95366.1	<i>Bacteroides fragilis</i>	NAD ⁺	[17]
17	—	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	NAD ⁺	[18]

除了上述功能验证的 7α -HSDHs,在 NCBI RefSeq 数据库中搜索“ 7α -hydroxysteroid dehydrogenase”关键词,已能搜寻到 1 200 多个条目。

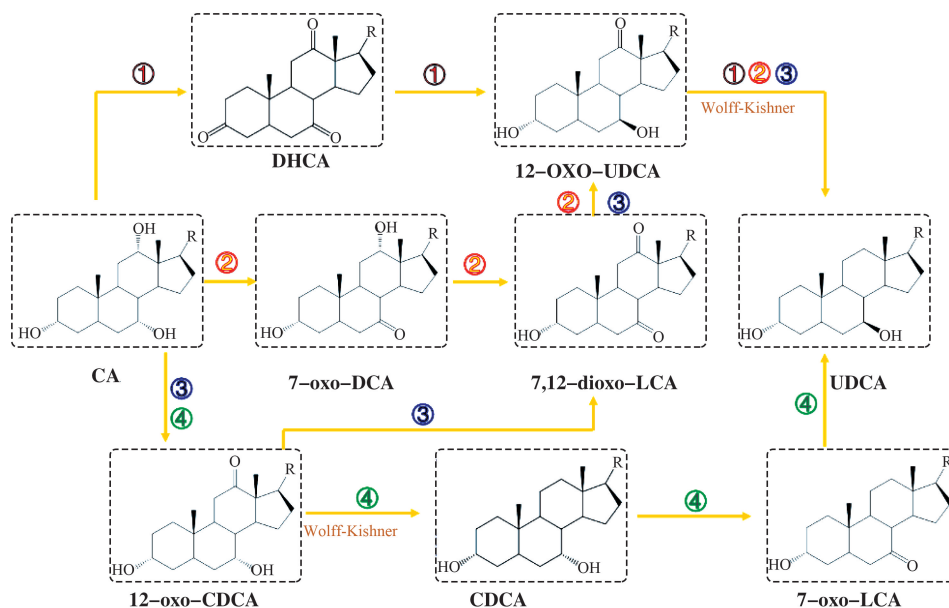
与 7α -HSDH 不同,用于生物转化的 7β -HSDH 报道数量较少,如表 2 所示,而且 7β -HSDH 的比酶活和酶稳定性都较差^[19,20],只有一个来源于野生型 *Clostridium absonum* 的 7β -HSDH 用于 UDCA 工业化合成工艺中^[21,22]; 7β -HSDH 几乎都以 NADPH 为辅酶,目前为止,只发现四种 NAD⁺ 依赖性 7β -HSDH: 蛋白序列已报道的三种分别来自 *Lactobacillus spicheri*^[23]、*Roseococcus sp.*^[24] 和 *Candidatus Ligilactobacillus*^[25]; 另一种蛋白序列鲜见报道的来自 *Xanthomonas maltophilia*^[18]。

表 2 已报道的 7β -HSDH
Table 2 The reported 7β -HSDHs

序号 (No.)	基因(蛋白)序列 ID (Gene (protein) sequence ID)	微生物来源 (Microbial sources)	辅酶 (Coenzymes)	文献 (References)
1	GenBank: JN191345.1	<i>Clostridium absonum</i>	NADPH	[14]
2	—	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	NADH	[18]
3	GenBank: ZP0177306.1	<i>Collinsella aerofaciens</i>	NADPH	[26]
4	GenBank: ZP02041813	<i>Ruminococcus gnavus</i>	NADPH	[27]
5	GenBank: WP015528793	<i>Ruminococcus torques</i>	NADPH	[19]
6	Engineered	<i>Ruminococcus torques</i>	NADPH	[19]
7	GenBank: WP006236005	<i>Collinsella aerofaciens</i>	NADPH	[20]
8	Engineered	<i>Collinsella aerofaciens</i>	NADPH	[20]
9	Y1-b-1 (code in literature)	黑熊粪便微生物 (Black bear faecal microbes)	NADPH	[10]
10	WP_045806907.1	<i>Lactobacillus spicheri</i>	NADH	[23]
11	WP_213611802.1	<i>Roseococcus sp.</i>	NADH	[24]
12	Genbank: HIX02396	<i>Candidatus Ligilactobacillus</i>	NADH	[25]

1.2 CA 底物合成 UDCA

CA 是目前最丰富和最便宜的胆汁酸, CA 广泛存在于牛、羊、猪的胆汁中, 其中牛胆汁中含量最为丰富, 1 000 mL 牛胆汁中胆酸含量达到 44 g。从 CA 合成 UDCA 有四条路径^[28], 如图 2 所示, 但每条路径均需要借助 Wolff-Kishner 反应还原中间产物的 C-12 羰基为亚甲基^[29], 所以, 目前尚无法实现以胆酸为底物全过程生物合成 UDCA。



注: DHCA: 脱氢胆酸; 12-oxo-UDCA: 12-酮-熊去氧胆酸; CA: 胆酸; 7-oxo-DCA: 7-酮-石胆酸; 7,12-dioxo-LCA: 7,12-酮石胆酸; UDCA: 熊去氧胆酸; 12-oxo-CDCA: 12-酮-鹅去氧胆酸; CDCA: 鹅去氧胆酸; R=4-戊酸 ①: 合成路线 1; ②: 合成路线 2; ③: 合成路线 3; ④: 合成路线 4。

Note: DHCA: dehydrocholic acid; 12-oxo-UDCA: 12-keto-ursodeoxycholic acid; CA: Cholic acid; 7-oxo-DCA: 7-keto-lithocholic acid; 7,12-dioxo-LCA: 7,12-ketocholic acid; UDCA: ursodeoxycholic acid; 12-oxo-CDCA: 12-keto-chenodeoxycholic acid; CDCA: chenodeoxycholic acid; R= 4-valeric acid 1: Synthesis route 1; ②: Synthesis route 2; ③: Synthesis route 3; ④: Synthesis route 4.

图 2 CA 合成 UDCA 路线

Fig. 2 The routes of UDCA synthesis from CA

1.3 LCA 底物合成 UDCA

LCA 也存在于牛、羊和猪等养殖动物的胆汁中, 是肉类加工产业丰富、廉价的副产物。从结构式观察, 以 LCA 为底物合成 UDCA, 仅需实现 LCA C-7 羟基化即可, 如图 3 所示。

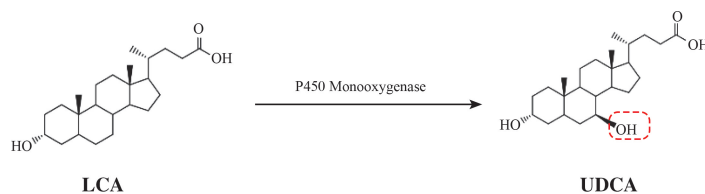


图 3 P450 单加氧酶催化 LCA 生成 UDCA

Fig. 3 P450 monooxygenase catalyzes LCA to generate UDCA

P450 单加氧酶能够催化这一反应, 然而 P450 单加氧酶在实际应用中面临诸多挑战: 其利用 O_2 的催化过程高度依赖辅因子 NAD(P)H 和还原伴侣蛋白复合体, 复杂的蛋白复合物构造降低了 P450 单加氧酶的稳定性和催化效率。目前, 只有少数微生物可以将 LCA 转化成 UDCA, 而通过游离 P450 单加氧酶催化 LCA 合成 UDCA, 只有 Grobe 等报道的一个工程化细胞色素 P450 单加氧酶 OleP^[30]。

1.4 游离酶催化 UDCA 合成的方式

以 CDCA 为底物, 采用游离酶催化合成 UDCA 是现今最具发展潜力的生物合成方法, 其在成本、转化率和成熟度上相较于其它两种底物优势明显。以 CDCA 为底物合成 UDCA 一般采用“一锅两步法”和

“一锅一步法”。

“一锅两步法”采用分步反应:第一步,7 α -HSDH 催化 CDCA 生成 7-KLCA,反应完成后灭酶(或与第二步反应实现空间隔离),第二步,添加 7 β -HSDH,催化 7-KLCA 生成 UDCA。“一锅两步法”转化率高;但承载底物浓度低,效率低,耗时长^[31,32]。“一锅一步法”将 7 α -HSDH、7 β -HSDH、底物和其它辅料一并加入反应釜进行反应。“一锅一步”法承载底物浓度高;因为中间步骤无需升温、降温,所以效率高,节省能源;但受限于酶的反应平衡,底物转化率低,后续纯化工艺复杂^[31,32]。

为了提高羟基类固醇脱氢酶的使用效率,无论采用“一锅两步法”还是“一锅一步法”,都可以对酶进行固定化后再使用。Yang 等利用酶固定化技术提高了 7 α -HSDH 和 7 β -HSDH 的活性和热稳定性,共固定化在 EP-0.5-C 时,7 α -HSDH 和 7 β -HSDH 的催化效率和重复使用性得到提高^[33];Zheng 等将 7 α -HSDH/乳酸脱氢酶(LDH)以及 7 β -HSDH/葡萄糖脱氢酶(GDH)分别固定在环氧树脂 ES-103 上制得固定化酶 LDH-7 α HSDH@ES-103 和 7 β HSDH-GDH@ES-103,用于催化 CDCA 合成 UDCA,并通过在两个连续填充床反应器中使用固定化酶实现了 CDCA 连续生产 UDCA^[32]。

1.5 UDCA 合成酶的蛋白质工程

天然羟基类固醇脱氢酶由于活性差、存在底物抑制,难以满足工业应用要求,为了提高酶法合成 UDCA 的效率和转化率,蛋白质工程技术应用于 UDCA 合成酶的改造以提高酶的稳定性、活力、增强酶的高浓度底物耐受性,甚至用于改变酶的辅酶特异性从而降低生产成本。

Huang 等采用定向进化和高通量筛选相结合的方法,提高了 *Clostridium absonum* 中 7 α -HSDH 的催化效率和底物耐受浓度^[34];Zheng 等采用易错 PCR、DNA shuffling 和定点突变等技术定向进化来自 *Ruminococcus torques* 的 7 β -HSDH,改善了 7 β -HSDH 的活性、热稳定性和最适 pH^[19];现已报道的 7 β -HSDH 几乎都严格依赖于 NADPH,然而,与 NADPH 相比,NADH 更为廉价,是羟基类固醇脱氢酶合成 UDCA 的优先选择辅因子。You 等基于 7 β -HSDH 酶的结构分析和保守序列比对,对源自 *Ruminococcus torques* 的重组 7 β -HSDH 进行了工程设计,改变了其辅助因子依赖特异性^[35]。

1.6 UDCA 合成的辅酶再生策略

催化 CDCA 或 CA 合成 UDCA 的酶都属于羟基类固醇脱氢酶,这类酶的典型特征是反应都需要 NAD(H)或者 NADP(H)辅酶^[36]。理论上,消耗多少底物就需要消耗等摩尔量辅酶,而这些辅酶往往价格昂贵,从经济角度考虑,加大辅酶用量是不可行的,因此,羟基类固醇脱氢酶在使用时必须提供高效、低成本的辅酶再生系统。UDCA 酶法合成中的氧化型辅酶 I (NAD⁺)和还原性辅酶 II (NADPH)都是通过酶法再生,实现循环利用。Zheng 等在以 CDCA 为底物两步法合成 UDCA 过程中以乳酸脱氢酶(LDH)和葡萄糖脱氢酶(GDH)分别作为 NAD⁺和 NADPH 的再生酶^[31];Liu 等在将 7-KLCA 转化为 UDCA 时,用醇脱氢酶 ADH-TE 氧化异丙醇实现 NADPH 再生^[26];Pedrini 等用甲酸脱氢酶(ADH)实现辅酶循环用于合成熊果胆酸(UCA)和 UDCA^[18];Zheng 等在 7-KLCA 生成 UDCA 的过程中,使用 GDH 用于 NADPH 再生循环利用^[32];秦和平等以 L-苹果酸/苹果酸脱氢酶系统循环 NAD⁺,用于还原 7K-LCA 生成 UDCA^[37];Chen 等利用黄素氧化还原酶(FR)和黄素单核苷酸(FMN)为原料,建立了 NAD⁺再生体系,又以醇脱氢酶和异丙醇为原料,建立了 NADPH 再生体系,在一个锅内实现了 CDCA 到 UDCA 的完全转化^[11];Bovara 等使用 α -酮戊二酸/GLDH 和葡萄糖/GDH 系统实现了以胆酸为底物合成 12-酮-UDCA^[21];Sun 等在全细胞催化 DHCA 合成 12-酮-UDCA 时,将 3 α -HSDH、7 β -HSDH 和 GDH 在同一大肠杆菌中共表达,GDH 用于 NAD(P)H 再生^[38];Carrea 等在以 CA 为原料,用 12 α -HSDH 合成 12-酮-CDCA 的过程中,将 12 α -HSDH 和谷氨酸脱氢酶共固定化,谷氨酸脱氢酶用于 NADP⁺再生,高效循环制备 12-酮-CDCA^[39];在化学-酶法制备 UDCA 的过程中,同样也可以使用 LDH 实现 NAD⁺循环再生^[40]。可用于 NAD(H)和 NADP(H)再生的辅酶有很多种,并各具特点(表 3)。

表 3 生物合成 UDCA 常用辅酶再生体系

Table 3 Common coenzyme regeneration systems for biosynthesis of UDCA

脱氢酶 (Dehydrogenases)	再生辅酶种类 (Coenzyme types)	反应 (Reaction)	特点 (Characteristics)	文献 (References)
乳酸脱氢酶 (LDH)	NAD ⁺ 再生 (NAD ⁺ regeneration)	丙酮酸还原生成 L- 乳酸(Pyruvate reduction to form L-lactic acid)	酶比活高、用酶成本低;氧化还原能力低,多数不能再生 NADP ⁺ (High specific enzyme activity and low enzyme cost; The REDOX capacity is weak and most of them can- not regenerate NADP ⁺)	[41,42]
	NAD(P) ⁺ 再生(NAD(P) ⁺ regeneration)	α -酮戊二酸还原 生成 L-谷氨酸 (alpha-Ketoglutaric acid to reduction to form L-glutamate)	常用辅酶再生体系,可以结合生产有用产物 L- α -氨基己二 酸;酶成本高 (Commonly used coenzyme regeneration system and can be combined to produce useful products L- α -aminoadipic acid; High enzyme cost)	
葡萄糖脱 氢酶(GDH)	NAD(P)H 再生 (NAD(P)H ⁺ regeneration)	葡萄糖氧化生成 葡萄糖酸 (Glucose oxidization to form gluconic acid)	稳定性好,对 NAD ⁺ 和 NADP ⁺ 都有很高的比活性;价格 高;产物葡萄糖酸内脂粘稠,加大产物分离难度 (Good stability and high specific activity to both NAD ⁺ and NADP ⁺ ; high price; the product gluconolactone is sticky, which makes the separation of the product more difficult)	[44,45]
	NADH 再生 (NADH ⁺ regeneration)	甲酸氧化生成二氧化碳 (Formic acid oxidization to form carbon dioxide)	甲酸和二氧化碳对酶无毒且易于去除;只产生 CO ₂ 一种副 产物,且反应不可逆;酶活低、用酶成本高;特异性差,对有 机溶剂敏感 (Formic acid and carbon dioxide are non-toxic to enzymes and easy to remove; CO ₂ is one only by-product; the reac- tion is irreversible; enzyme activity is low and enzyme cost is high; specificity is poor and enzymes are sensitive to or- ganic solvents)	
醇脱氢酶 (ADH)	NADH 和 NADPH 再生(NADH and NADPH regeneration)	乙醇氧化生成乙醛 (Ethanol oxidization to form acetaldehyde)	价格适中,乙醇与乙醛具有挥发性,易于从反应体系去除; 氧化还原能力低,若不及时去除乙醇和乙醛,会抑制酶活性 (Moderate price, ethanol and acetaldehyde are volatile and easy to remove from the reaction system; low redox capaci- ty, if ethanol and acetaldehyde are not removed in time, it will inhibit enzyme activity)	[47-49]

2 全细胞合成 UDCA

全细胞合成是一种具有诸多优势的新型催化模式,尤其在涉及多步酶催化反应,在合成诸多药物中间体等方向体现了巨大的应用前景和工业价值。全细胞合成 UDCA 的研究始于研究者发现野生微生物可以将 CDCA 或 LCA 转化为 UDCA^[50-52]。但野生微生物只能承载浓度极低的底物(微摩尔或几毫摩尔 CDCA),底物浓度一旦增加,微生物生长受抑制,且转化率极低。2013 年,Kollerov 等又筛选了不同种属的放线菌和丝状真菌,考察它们转化 LCA 生成 UDCA 的能力,首次鉴定出 10 种可以直接将 LCA 转化成 UDCA 的微生物菌株^[53]。CDCA 全细胞合成 UDCA 示意图如图 4 所示。

某些微生物之所以可以将 CDCA 或 LCA 转化为 UDCA,是因为微生物自身产生了相关的转化酶:将 CDCA 转化为 UDCA 的微生物自身产生 7 α -HSDH 和 7 β -HSDH;将 LCA 转化为 UDCA 的微生物自身产生 P450 单加氧酶。这些微生物成为后期研究羟基类固醇脱氢酶或 P450 单加氧酶基因序列的重要来源。但野生微生物相关羟基类固醇脱氢酶表达量低,酶活性低,底物浓度增加后还会抑制菌体生长和转化。所以,相关细胞转化研究一度鲜有研究者问津。直到利用工程菌株,尤其是大肠杆菌异源表达相关羟基类固醇脱氢

酶,并用这些工程菌转化 CDCA 合成 UDCA 取得了良好效果,相关全细胞催化研究才重新进入人们的视野。相较于游离酶催化,全细胞催化可以利用微生物细胞自身的辅酶再生体系,并省去了菌体破碎制酶步骤,从而显示出优势。对于 LCA 转化合成 UDCA,因为受限于 P450 单加氧酶资源欠缺、反应条件苛刻,相关研究尚未取得突破性进展。

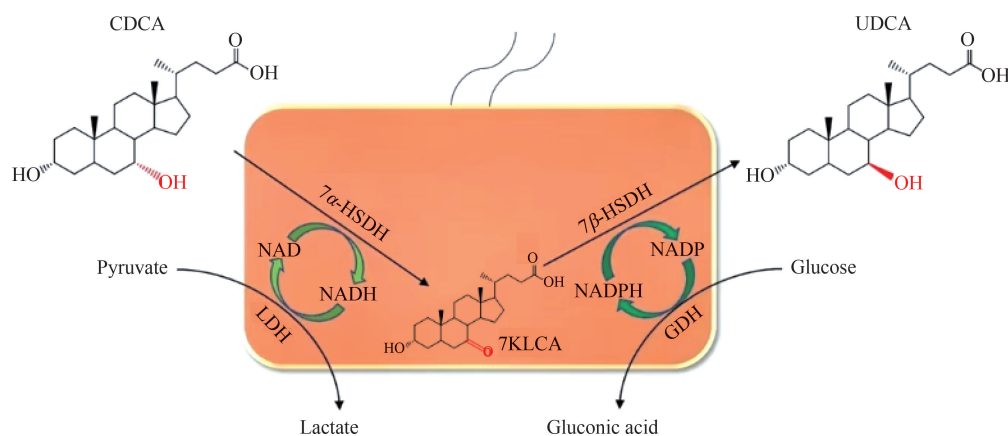


图4 CDCA 全细胞合成 UDCA 示意图

Fig. 4 Schematic diagram of whole-cell synthesis of UDCA from CDCA

Shi 等报道了整合 7α -HSDH 和 7β -HSDH 的大肠杆菌工程细胞将牛磺酸鹅去氧胆酸(TCDCA)转化为牛磺酸熊去氧胆酸(TUDCA),同样可以实现 CDCA 到 UDCA 的转化^[54]。之后,他们又开发了深槽静态工艺,控制转化后的 TUDCA 与 TCDCA 比例与药材引流熊胆粉的比例相近,提供了一种利用微生物细胞工厂从鸡胆粉生产人工熊胆粉替代品的方法^[55]。最近,该课题组又构建了表达两种酶的酿酒酵母宿主菌,从食品和药品安全的角度来看,酿酒酵母属于 GRAS 菌株,安全性相较于大肠杆菌更高^[56]。

Sun 等则实现了 12-酮-UDCA 的全细胞合成。12-酮-UDCA 是 UDCA 化学-酶法合成的关键中间产物^[38]。将 3α -HSDH、 7β -HSDH 和来自 *Bacillus subtilis* 的葡萄糖脱氢酶(GDH)在同一株 BL21(DE3)大肠杆菌细胞中共表达,构建了另一种单菌株全细胞催化系统,该体系在 4.5 h 内将 DHCA 转化为 12-酮-UDCA 的转化率大于 99.5%。

Chen 等使用黄素氧化还原酶(FR)和黄素单核苷酸(FMN)开发了一个 NAD^+ 再生系统,FR/FMN 系统随后偶联来自 *Brevundimonas* sp. 的 NAD^+ 依赖性 7α -HSDH,将 CDCA 氧化成 7-KLCA^[11]。当大肠杆菌全细胞共同表达该 7α -HSDH 和 FR 时,可将 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ CDCA 完全转化为 7-KLCA。对于 7-KLCA 的还原,则采用了来自 *Clostridium* sp. NADPH 依赖性的 7β -HSDH,来自 *Thermoanaerobacter brockii* 的醇脱氢酶(TbADH)和异丙醇作为辅酶再生系统,该大肠杆菌进行全细胞催化时, $40\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 7-KLCA 被还原为 UDCA,其转化率为 26%,而两种细胞采用“一锅一步法”反应时, $12.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ CDCA 完全转化为 UDCA。

3 结论与展望

与化学合成相比,生物合成 UDCA 已经表现出优越性,并且已经实现以 CDCA 为底物合成 UDCA 的工业化生产过程,但在实际生产中仍存在一定局限性。首先,所用酶(特别是 7β -HSDH)不稳定,在反应体系中酶活损失较快;其次,酶反应体系对底物的承载浓度还较低,一些酶受产物或中间产物抑制作用严重,现在大多数已发表的酶催化反应在 $10\sim 20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内进行,距离工业化应用(一般认为应达到 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$)尚有较大差距。虽然大肠杆菌异源表达系统对现有羟基类固醇脱氢酶的表达量都比较可观,酶的来源已不是主要限制因素,但生产过程中机械剪切力对酶造成的物理损伤,容易造成酶活损失,导致酶的回收率下降。酶在催化反应中的可回收性、及重复利用仍需进一步解决。此外,辅酶用量优化和全细胞催化在工业应用中的潜力仍需继续挖掘。而以 LCA 为底物合成 UDCA 的生物转化因为 P450 单加氧酶的实际催化能力限制,

距离工业应用仍然较远。上述问题是限制各种生物转化法工业化生产 UDCA 的主要因素。此外,生物合成途径有时还会涉及到微生物的致病性评定问题,需要开发大肠杆菌以外的高效异源表达系统。

酶是生物合成 UDCA 工艺中较为核心的成分,因此需要进一步拓展酶来源,开发新酶的筛选程序,以及加强蛋白质工程领域对酶的改造力度,预计将来会产生可在大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度底物下应用的生物催化剂,而应用固定化酶技术和使用重组全细胞催化将极大降低催化成本,并有利于产品的分离和提纯,提高产品质量。综上所述,生物合成 UDCA 下一步的研究重点应是:(1) 开发“一锅一步法”和全细胞催化法:挖掘或进化辅酶专一性羟基类固醇和辅酶再生酶,并要兼顾酶活和底物高承载量需求;(2) 从细菌和放线菌等微生物资源筛选转化 LCA 合成 UDCA 的野生菌株,并解析其中 C-7 羟基化 P450 单加氧酶,进一步通过蛋白质工程技术加以改造,达到工业应用要求,充分利用 LCA 等原料资源。

参 考 文 献

- [1] SONG P, ZHANG X, FENG W, et al. Biological synthesis of ursodeoxycholic acid[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1140662.
- [2] LUGINI A, VERNA S, BUZZACCHINO F, et al. 1134P Prevention of hepatic toxicities associated with anaplastic lymphoma kinase inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer by administration of ursodeoxycholic acid: analysis from the monoinstitutional analysis[J]. *Ann Oncol*, 2022, 33(S7): 1069.
- [3] CHEN W, FENG Z L, SUN Q. A novel ursodeoxycholic acid-chitosan-folate conjugates for the delivery of calcitriol for cancer therapy[J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2022, 73: 103410.
- [4] HUANG F. Ursodeoxycholic acid as a potential alternative therapeutic approach for neurodegenerative disorders: effects on cell apoptosis, oxidative stress and inflammation in the brain[J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 18: 100348.
- [5] BREVINI T, MAES M, WEBB G J, et al. FXR inhibition may protect from SARS-CoV-2 infection by reducing ACE2[J]. *Nature (London)*, 2023, 615(7950): 134-142.
- [6] EGGERT T, BAKONYI D, HUMMEL W. Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid[J]. *J Biotechnol*, 2014, 191: 11-21.
- [7] TANG S J, PAN Y P, LUO D S, et al. Structural and functional characterization of a novel acidophilic 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase[J]. *Protein Sci*, 2019, 28(5): 910-919.
- [8] JI S L, PAN Y P, ZHU L C, et al. A novel 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase: magnesium ion significantly enhances its activity and thermostability[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 177: 111-118.
- [9] JI W, CHEN Y N, ZHANG H, et al. Cloning, expression and characterization of a putative 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase in *Corynebacterium jeikeium* ATCC 49239[J]. *Microbiol Res*, 2014, 169(2): 148-154.
- [10] SONG C, WANG B C, TAN J, et al. Discovery of tauroursodeoxycholic acid biotransformation enzymes from the gut microbiome of black bears using metagenomics[J]. *Sci Rep-UK*, 2017, 7 (1): 45495.
- [11] CHEN X, CUI Y, FENG J, et al. Flavin oxidoreductase-mediated regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide with dioxygen and catalytic amount of flavin mononucleotide for one-pot multi-enzymatic preparation of ursodeoxycholic acid[J]. *Adv Synth Catal*, 2019, 361(11): 2497-2504.
- [12] COLEMAN J P, HUDSON L L, et al. Characterization and regulation of the NADP-linked 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Clostridium sordellii*[J]. *J Bacteriol*, 1994, 176(16): 4865-4874.
- [13] BARON S F, FRANKLUND C V, HYLEMON P B. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for bile acid 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(15): 4558-4569.
- [14] ELISA F E, MARIA B G, FAUSTO P, et al. In search of sustainable chemical processes: cloning, recombinant expression, and functional characterization of the 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Clostridium absonum*[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2012, 95(5): 1221-1233.
- [15] BAKONYI D, HUMMEL W. Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel NADP⁺-dependent 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium difficile* and its application for the oxidation of bile acids[J]. *Enzyme Microb Tech*, 2016, 99: 16-24.
- [16] YOSHIMOTO T, HIGASHI H, KANATANI A, et al. Cloning and sequencing of the 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(7): 2173-2179.

- [17] BENNETT M J, MCKNIGHT S L, COLEMAN J P. Cloning and characterization of the NAD-dependent 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Bacteroides fragilis*[J]. Current Microbiol, 2003, 47(6): 475-484.
- [18] PEDRINI P, ANDREOTTI E, GUERRINI A, et al. Xanthomonas maltophilia CBS 897. 97 as a source of new 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenases and cholyglycine hydrolase: improved biotransformations of bile acids steroids[J]. Steroids, 2006, 71(3): 189-198.
- [19] ZHENG M M, CHEN K C, WANG R F, et al. Engineering 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase for enhanced ursodeoxycholic acid production by multiobjective directed evolution[J]. J Agr Food Chem, 2017, 65(6): 1178-1185.
- [20] HUMMEL W, BAKONYI D. 7-beta-hydroxysteroid dehydrogenase mutants and process for the preparation of ursodeoxycholic acid: 2016016213[P]. 2016-02-04.
- [21] BOVARA R, CARREA G, RIVA S, et al. A new enzymatic route to the synthesis of 12-ketoursodeoxycholic acid[J]. Biotechnol Lett, 1996, 18(3): 305-308.
- [22] MONTI D, OTTOLINA G, CARREA G, et al. Redox reactions catalyzed by isolated enzymes[J]. Chem Rev, 2011, 111(7): 4111-4140.
- [23] TONIN F, OTTEN L G, ARENDS I W. NAD⁺-dependent enzymatic route for the epimerization of hydroxysteroids[J]. ChemSusChem, 2018, 12(13): 3192-3203.
- [24] YANG B, YOU Z, XUE J, et al. Clean enzymatic production of ursodeoxycholic acid enabled by a newly identified NADH-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase[J]. Molecular Catalysis, 2023, 537: 112946.
- [25] HUANG B, YANG K, AMANZE C, et al. Sequence and structure-guided discovery of a novel NADH-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase for efficient biosynthesis of ursodeoxycholic acid[J]. Bioorganic Chemistry, 2023, 131: 106340.
- [26] LIU L, AIGNER A, SCHMID R D. Identification, cloning, heterologous expression, and characterization of a NADPH-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Collinsella aerofaciens*[J]. Appl Microbiol Biot, 2011, 90(1): 127-135.
- [27] LEE J Y, ARAI H, NAKAMURA Y, et al. Contribution of the 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus gnavus* N53 to ursodeoxycholic acid formation in the human colon[J]. J lipid res, 2013, 54(11): 3062-3069.
- [28] TONIN F, ARENDS I W. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review[J]. Beilstein J Org Chem, 2018, 14(1): 470-483.
- [29] NEWMAN S G, GU L, LESNIAK C, et al. Rapid wolff-kishner reductions in a silicon carbide microreactor[J]. Green Chem, 2014, 16(1): 176-180.
- [30] GROBE S, BADENHORST C P S, Bayer T, et al. Engineering regioselectivity of a P450 monooxygenase enables the synthesis of ursodeoxycholic acid via 7 β -hydroxylation of lithocholic acid[J]. Angew Chem Int Edit, 2020, 60(2): 753-757.
- [31] ZHENG M M, WANG R F, LI C X, et al. Two-step enzymatic synthesis of ursodeoxycholic acid with a new 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus torques*[J]. Process Biochem, 2015, 50(4): 598-604.
- [32] ZHENG M M, CHEN F F, LI H, et al. Continuous production of ursodeoxycholic acid by using two cascade reactors with co-immobilized enzymes[J]. ChemBioChem, 2017, 19(4): 347-353.
- [33] YANG Q, WANG B, ZHANG Z, et al. The effects of macromolecular crowding and surface charge on the properties of an immobilized enzyme: activity, thermal stability, catalytic efficiency and reusability[J]. RSC Advances, 2017, 7(60): 38028-38036.
- [34] HUANG B, ZHAO Q, ZHOU J, et al. Enhanced activity and substrate tolerance of 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase by directed evolution for 7-ketolithocholic acid production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(6): 2665-2674.
- [35] YOU Z N, CHEN Q, SHI S C, et al. Switching cofactor dependence of 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase for cost-effective production of ursodeoxycholic Acid[J]. ACS Catalysis, 2018, 9(1): 466-473.
- [36] KAVANAGH K L, JÖRNVALL H, Persson B, et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily; functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(24): 3895-3906.
- [37] 秦和平, 张和平, 钟义华, 等. 一种酶促法合成熊去氧胆酸的方法: 108251491A[P]. 2018-07-06.
- [38] SUN B, KANTZOW C, BRESCH S, et al. Multi-enzymatic one-pot reduction of dehydrocholic acid to 12-keto-ursodeoxycholic acid with whole-cell biocatalysts[J]. Biotechnol Bioeng, 2012, 110(1): 68-77.
- [39] CARREA G, BOVARA R, LONGHI R, et al. Preparation of 12-ketochenodeoxycholic acid from cholic acid using coimmobilized 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase and glutamate dehydrogenase with NADP⁺ cycling at high efficiency[J]. Enzyme Microb Tech, 1985, 7(12): 597-600.
- [40] GIOVANNINI P P, GRANDINI A, PERRONE D, et al. 7 α - and 12 α -Hydroxysteroid dehydrogenases from *Acinetobacter calcoaceticus*

- lwoffii; a new integrated chemo-enzymatic route to ursodeoxycholic acid[J]. *Steroids*, 2008, 73(14): 1385-1390.
- [41] NATHALIE B, THIERRY F, DOMINIQUE G, et al. Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* sub-sp. *Bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*[J]. *FFBS Letters*, 1991, 290(1): 61-64.
- [42] ZHOU Q, SHAO W L. Molecular genetic characterization of the thermostable L-lactate dehydrogenase gene (ldhL) of *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 and biochemical characterization of the enzyme[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2010, 75(4): 526-530.
- [43] TIAN G M, WANG Q, WEI X T, et al. Glutamate dehydrogenase (RocG) in *Bacillus licheniformis* WX-02: enzymatic properties and specific functions in glutamic acid synthesis for poly- γ -glutamic acid production[J]. *Enzyme Microb Tech*, 2017, 99: 9-15.
- [44] NAGAO T, MITAMURA T, WANG X H, et al. Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(15): 5013-5020.
- [45] XU Z, JING K, LIU Y, et al. High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration [J]. *J Ind Microbiol Biot*, 2006, 34(1): 83-90.
- [46] ALLEN S J, HOLBROOK J J. Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylica*[J]. *Gene*, 1995, 162(1): 99-104.
- [47] PENNACCHIO A, PUCCI B, SECUNDO F, et al. Purification and characterization of a novel recombinant highly enantioselective short-chain NAD(H)-dependent alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus*[J]. *Appl Environ Microb*, 2008, 74(13): 3949-3958.
- [48] HOLLMANN F, KLEEB A, OTTO K, et al. Coupled chemoenzymatic transfer hydrogenation catalysis for enantioselective reduction and oxidation reactions[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(21): 3512-3519.
- [49] HÖLLRIGL V, HOLLMANN F, KLEEB A C, et al. TADH, the thermostable alcohol dehydrogenase from *Thermus* sp. ATN1: a versatile new biocatalyst for organic synthesis[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2008, 81(2): 263-273.
- [50] MACDONALD I A, HUTCHISON D M, FORREST T P. Formation of urso- and ursodeoxy-cholic acids from primary bile acids by *Clostridium absonum*[J]. *J lipid res*, 1981, 22(3): 458-466.
- [51] MACDONALD I A, ROCHON Y P, HUTCHISON D M, et al. Formation of ursodeoxycholic acid from chenodeoxycholic acid by a 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-elaborating *Eubacterium aerofaciens* strain cocultured with 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase-elaborating organisms[J]. *Appl environ microbiol*, 1982, 44(5): 1187-1195.
- [52] SAWADA H, KULPRECHA S, NILUBOL N, et al. Microbial production of ursodeoxycholic acid from lithocholic acid by *Fusarium equiseti* M41[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 44(6): 1249-1252.
- [53] KOLLEROV V V, MONTI D, DESHCHEREVSKAYA N O, et al. Hydroxylation of lithocholic acid by selected *Actinobacteria* and *Filamentous fungi*[J]. *Steroids*, 2013, 78(3): 370-378.
- [54] SHI J, WANG J, YU L, et al. Rapidly directional biotransformation of tauroursodeoxycholic acid through engineered *Escherichia coli* [J]. *J Ind Microbiol Biot*, 2017, 44(7): 1073-1082.
- [55] XU Y, YANG L, ZHAO S, et al. Large-scale production of tauroursodeoxycholic acid products through fermentation optimization of engineered *Escherichia coli* cell factory[J]. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 34.
- [56] JIN L, YANG L, ZHAO S, et al. A green strategy to produce potential substitute resource for bear bile using engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioresour Bioprocess*, 2022, 9(1): 1-10.

(责任编辑:刘庆松)