

生物转化及其在药物合成上的应用

赵丙勇¹, 杨永红^{1*}, 王 东², 张颖君², 杨崇仁²

(1. 云南农业大学, 云南省植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201;

2. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204)

摘要: 介绍了生物转化的研究现状, 一些新技术在生物转化上的应用, 以及生物转化在手性药物和天然药物合成中较传统的化学合成和天然提取方法具有的明显优势。应在天然创新药物的研究设计中, 在各个环节都注重生物新技术的应用, 还应注重提倡学科交叉。

关键词: 生物转化; 生物催化; 手性药物; 天然药物

中图分类号: TQ 460.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)06-0765-05

Biotransformation and Its Application in the Pharmaceutical Synthesis

ZHAO Bing-yong¹, YANG Yong-hong¹, WANG Dong², ZHANG Ying-jun², YANG Chong-ren²

(1. The Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan Province, Y A U, Kunming 650201, China;

2. The State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Present research conditions of biotransformation and applications of some new technologies in this field are reported in the paper. Obvious superiority of biotransformation in synthesis of chiral and natural drugs to the traditional chemical synthesis and the extraction of natural product is also reported in this paper. We should take advantage of appliments of some new biotechnologies in the research design of natural creative medicines, and we should also advocate the exchange of subjects.

Key words: biotransformation; biocatalysis; chiral drugs; natural drugs

生物转化 (biotransformation) 也称生物催化 (biocatalysis), 是指应用生物反应器 (酶及多酶系统包括微生物, 动植物细胞等) 对前体化合物进行结构修饰和改造, 合成新型的有机化合物。其实质是利用生物体系本身所产生的酶对外源化合物进行酶催化反应, 催化反应类型几乎包括所有的体外有机化学反应, 如: 羟基化、氧化、脱氢、氢化、还原、水解、水合、酯化、酯转移、脱水、脱羧、酰化、胺化、异构化和芳构化等。生物转化大多是在室温或中性环境中进行, 具有无毒、无污染、低能耗、高效率、高选择性等优点。生物转化还可以合成化学上难以合成的物质, 特别是复杂的天然活性物质。同时, 采用化学合成—生物转化相结合的合成方法,

可以充分发挥二者的长处, 实现优势互补。

1 生物转化研究现状

1.1 微生物转化

微生物转化是利用微生物代谢过程中产生的酶使底物进行有机反应, 故又称微生物酶法转化。微生物转化可用完整的微生物细胞或从微生物细胞中提取的酶作为生物催化剂, 其区域和立体选择性强、反应条件温和、操作简便、成本较低、公害少, 且能完成一些有机化学合成难以进行的反应, 受到有机化学家、药物化学家和微生物学家们的极大重视, 成为生物转化技术中发展最迅速的分支之一。

如: 雷公藤在传统中药中用于治疗多种疾病,

包括风湿性关节炎、肾炎、系统性红斑狼疮和皮肤病,也应用于男性节育,从其中分离到的雷公藤内酯是雷公藤的主要活性成分,但由于其较强的毒性而使其应用受到限制。NING L L 等^[1]从 31 株微生物中筛选出短刺小克银汉霉 *Cunninghamella blakesleana* AS 3.970 对雷公藤内酯进行微生物转化,得到 7 个产物,其中 4 个为新化合物,且都具有对人肿瘤细胞株的细胞毒效应。

青蒿素是 1972 年我国学者从传统中药青蒿中分离出的一种高效、低毒、对脑型和抗氯喹恶性疟疾有特殊疗效的抗疟药物。占纪勋等用华根霉和雅致小克银汉霉转化青蒿素,得到去氧青蒿素、3 α -羟基去氧青蒿素和 9 β -羟基青蒿素,其中 9 β -羟基青蒿素为新化合物^[2];占纪勋等还利用其它的微生物对青蒿素进行生物转化研究,得到 4 个产物,分别为 10 β -羟基青蒿素(1)、去氧青蒿素(2)、9 β -羟基青蒿素(3)及 3 β -羟基青蒿素(4),其中 1 和 4 均为新化合物。并用体外培养的人恶性疟原虫 FCC1/HN 株,测定青蒿素及这几个产物的抗疟效应,结果 4 个转化产物的抗疟活性比青蒿素均有不同程度的降低,其中 10 β -羟基青蒿素活性较好^[3]。

氢化可的松是重要的甾体激素类药物。我国氢化可的松的生产一直以 RSA(17 α -羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮-21-醋酸酯)为底物,由蓝色犁头霉(*Absidia coerulea*)在 C11- β 位引入羟基而得。自从 1953 年 Pfizer 公司报道以新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)生产氢化可的松以来,经过对菌种及工艺条件等方面的不断优化,该菌一直沿用至今。我国目前已成功的筛选出转化 RSA 为氢化可的松的新月弯孢霉 C4 菌株,并发现与现行生产中使用的蓝色犁头霉相比,最突出的优点就是副产物少^[4]。

1.2 植物培养物生物转化

植物培养物生物转化系统是在植物细胞培养技术的基础上移植微生物转化技术而建立起来的。植物培养物生物转化与微生物转化相比,生物倍增时间较长,产生酶的种类较少且酶量低微。然而,植物中具有许多微生物中不存在的独特的酶,它们可以催化一定的反应生成许多复杂的化合物,甚至是新化合物。目前,用作生物转化系统的植物细胞培养物主要有悬浮培养细胞、悬浮培养器官(茎尖、根)、固定化细胞、毛状根和植物酶制剂。

伴随着生物转化机理研究的深入以及基因组学、蛋白质组学和蛋白质定向进化技术等现代生物技术的飞速发展,人们对植物细胞生物转化系统转化药用

活性成分进行了许多工作,并取得了一定的成就。

韩健等^[5]用悬浮培养长春花和银杏细胞能将青蒿素转化为 3 α -羟基去氧青蒿素。

斑蝥属传统中药,具有破血消癥、攻毒蚀疮等功效,中医临床用于治疗癥瘕肿块、积年顽癣等病症。现代研究表明,斑蝥的主要有效成分为斑蝥素。该成分具有显著的抗肿瘤活性,对原发性肝癌、S180 实体瘤等均具有显著疗效,其机制主要是通过诱导细胞凋亡^[6]。与一般抗肿瘤药物不同的是,斑蝥素在抑制肿瘤的同时,还可促进骨髓产生白细胞。但是,临床观察表明斑蝥素对黏膜组织,尤其是对胃肠道、尿道和肾脏等表现出强烈的毒性和刺激作用^[7]。这些不良反应严重影响了斑蝥素的临床应用。叶敏等^[8]利用桔梗细胞悬浮培养体系对斑蝥素进行了生物转化,分离得到了羰基还原为羟基的一对差向异构体 1 α -羟基斑蝥素(I)和 1 β -羟基斑蝥素(II),证明桔梗细胞培养体系对斑蝥素有较强的选择性还原作用。I 和 II 结构中的 1-OH 属半缩醛羟基,性质活泼,在溶液状态下易发生翻转,故二者以混合物的形式存在,难以分离。MC C 曾用 Pd/C 加氢还原的方法,以去甲斑蝥素为底物制备得到类似的加氢产物 III,亦为一混合物^[9]。抗肿瘤试验结果表明 III 对于大肠癌细胞株表现出显著的选择性细胞毒活性,提示加氢反应对于类似物的抗肿瘤作用具有一定的意义。I 和 II 尚待作抗肿瘤活性的进一步研究。

去氢表雄酮是在人体肾上腺皮质中合成的 C₁₉ 肾上腺甾类化合物。刘颖等^[10]利用唐古特山莨菪毛状根液体悬浮培养体系对去氢表雄酮进行生物转化,分离得到 5 个转化产物。

利用长春花和桔梗植物细胞悬浮体系对雷公藤内酯进行生物转化,得到相同的转化产物雷公藤内酯三醇^[11]。

2 新技术在生物转化上的应用

2.1 生物催化剂的固定化

为了更好地利用生物转化系统的反应,系统中的催化剂不但要稳定而且能够重复使用,实现连续性操作。使用生物催化剂固定化系统可以满足这一要求。同时,一般的生物反应都是在水相中进行的,而有机合成大多是在有机相中进行。因此,可以利用生物催化剂的固定化,使生物催化剂在有机溶剂中发挥更高的催化效率,并且使有机溶剂引起的酶变性抗性显著增强。目前,常用于固定化的载体有聚丙烯酰胺

(PAA)、聚氨基甲酸乙酯(PU)、海藻酸盐凝胶、二氧基硅氧烷、葡聚糖凝胶、聚乙烯醇(PVA)等。

1980年 AIFERMANN 等首次使用固定化的 *D. lanata* 细胞成功地将 β -甲基洋地黄毒苷转化为 β -地高辛后,这一技术迅速发展成为新型的生物转化系统并在1985年开始实现实用化。石屹峰等^[12]在固定化细胞技术的基础上,还研究出渗透交联固定化细胞技术,既提高了固定化细胞的稳定性,又提高了固定化细胞的表现酶活性。

LLANES 等^[13]研究了硅藻土固定化 *Mycobacterium* sp. NRRLB-3805 细胞对谷甾醇的侧链降解,考察了不同的硅藻土材料和颗粒大小对转化率的影响。

脂质体固定化细胞既不破坏细胞的完整性,而且还能保持适当的酶活性。此外,脂质体还可以克服由于使用有机溶剂而带来的副反应^[14]。LLANES 等^[15]用脂质体固定化 *cr* sp. ATCC 6946 细胞来研究 AD(雄甾-4-烯-3,17-二酮)的生物转化。

2.2 分子定向进化技术

分子定向进化技术又称分子进化法、体外进化法和直接进化法。与自然进化不同的是,定向进化技术是在人为引发条件下发生,并通过选择突变后的突变种群来保留某一方向的进化而排除其他方向突变,整个进化过程完全是被事先定向的。

酶的定向进化是对酶进行修饰的最新方法,它不仅能使酶演化出非天然特性,还能定向进化某一代谢途径,而且可以改善酶的稳定性、底物特异性、对映体选择性等,并在抗体库、DNA 结合位点定向进化、抗辐射性等方面也有广泛的应用,极大地拓展了蛋白质工程学的研究范围,为指导应用(如药物设计等)奠定了理论基础。

分子定向进化技术已被用于上百个酶的进化。如枯草杆菌蛋白酶 E 在有机溶液中(60% DMF)的活性提高了170倍; β -内酰胺酶的耐抗菌素 cefotaxime 浓度提高了32 000倍等^[16]。

2.3 双水相系统在生物转化过程中的应用

双水相概念是 Albertsson 最先提出的,最早是用于生物大分子和酶的分离纯化当中,但是近年来也逐渐地应用于酶或细胞的生物转化中。双水相生物转化技术主要应用于不溶底物的转化或是有产物抑制的反应,因为它可以将细胞限于一相而产物迅速萃取到另一相中,这样可以减少产物抑制或者缩短产物在细胞附近的停留时间来阻止产物的

降解。即使产物是高毒性或高度不稳定的,双水相系统中的反应也是专一的,而且还可以使细胞回收,实现连续发酵,这将有可能扩大到工业化水平。

郝雪秦等^[17]利用混合植物甾醇(45% β -谷甾醇,30% 豆甾醇,25% 菜油甾醇)作为底物筛选适合菌株 *Mycobacterium* HCCB006 转化生产雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)的双水相系统,并用表面活性剂对系统进行进一步的优化。

另外,有机溶剂/水两液相体系以及浊点系统在生物转化中的应用、基因工程菌构建技术、超临界流体技术、抗体酶、反胶束酶、交联酶晶体等新技术和方法的发展及完善,以及生物转化和组合化学的结合,也极大的推动了生物转化和生物催化的基础和应用研究。

3 生物转化在药物合成上的应用

大多数药物,都具有极其复杂的结构,其理化性质和生理活性都与其分子的立体构型有关,尤其是生理活性对结构要求很严格,往往涉及到光学异构体。因此,应用通常的化学方法进行人工合成或结构修饰改造都是比较困难的。生物转化技术可以弥补化学合成的不足,在药物合成上具有重要的应用价值。

3.1 手性药物的合成

手性药物是指有药理活性的对映纯化合物,在生物体的手性环境中,分子之间的严格手性匹配是分子识别的基础。手性药物的生产分为化学法和生物学法。化学方法手性拆分难度大,试剂昂贵,且造成资源浪费和环境污染,不利于工业化生产;生物转化法较化学合成具有明显优势。生物转化实质是酶促反应,酶促反应具有化学选择性、区域选择性、和对映体选择性,利用酶的这些性质可以合成手性药物。合成手性药物的生物转化反应大致可分为两类:一类是把外消旋体拆分为两个光活性的对映体;另一类是从外消旋体或前手性的前体出发,通过催化反应得到不对称的光学活性产物。

如:R(-)-扁桃酸及其衍生物是重要的药物中间体和精细化工中间体。近年来国外有报道采用微生物法不对称还原芳香酮、 β -酮酯和其它一些脂肪酮。国内曾报道采用面包酵母不对称还原苯乙酮及其衍生物制备手性醇^[18],但尚未见采用生物催化合成 R(-)-扁桃酸系列化合物及相关菌种筛选的报道。黄雅燕等^[19]在此方面作了 R(-)-扁桃酸脱氢酶产生菌的筛选。李忠琴等^[20]

又利用生物转化的方法作了 R(-)-扁桃酸及其衍生物的手性合成,并都取得了一定的成果。

3.2 天然药物的合成

目前天然药物的生产主要靠从天然植物中提取或化学合成的方法来完成,这样势必会造成天然野生资源储存量的下降,野生资源遭到破坏;而化学合成污染严重;并且从植物中提取和化学合成都存在工序烦琐,劳动强度大,生产成本高的问题。通过生物转化可以克服这些弊端。生物转化较天然提取和化学合成有如下优势:

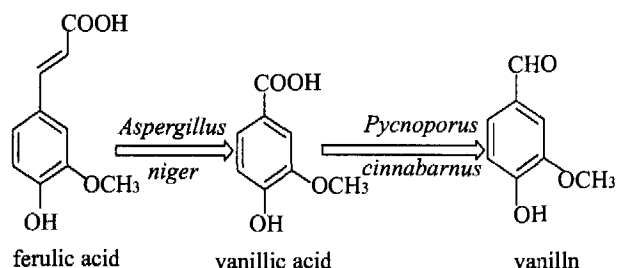
(1)作为天然药物发挥药效活性的物质基础,天然活性成分往往含量低、结构复杂、合成困难。从野生植物中寻找原料难以满足工业生产的需要,人工栽培也存在着成本高,周期长,产量难以保证的问题。为此,急需开发针对特定有效成分或组分的天然药物的生产技术,生物转化可以替代传统的从植物中提取的方法。

(2)就天然资源来讲,某种植物中不可能仅含有一种活性成分,往往有一些生源关系相近或结构类似的化合物。单纯依靠从天然资源中提取分离费时、费力、浪费资源。因此,可以以生物转化为途径,寻找合适的反应器,以期获得具有更好生理活性的化合物。

(3)生物转化属于绿色化学,保护环境,符合可持续发展战略。

如:香草醛(Vanillin)目前主要由化学方法合成制备,根据美国和欧盟的规定,合成香草醛在农产品和食品添加剂中的使用会引起法律方面的争议,再加上消费者的喜好,更促进了生物技术方法生产香草醛的研究^[21]。由此促使研究人员去寻找生产天然香草醛的替代方法。利用微生物转化天然前体生产的天然等同(nature-identical, NI)的香草醛,称为“生物香草素”(bio-vanillin),可以代替从香荚兰豆荚中提取的价格昂贵的天然香草醛^[22]。

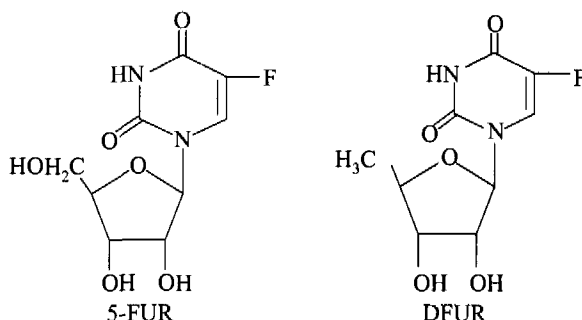
目前,香草醛的生物转化研究成功的例子^[23-26]主要如下图所示。



(4)在工业上,可以利用天然菌或工程菌体内

特定的酶完成药物合成工艺中的关键步骤,其常常为某些化学合成难以进行(步骤多,加去保护基)或不能进行的反应,且转化产物立体构型单一,条件温和,收率高。

如:5-氟尿苷(简称 5-FUR)是抗肿瘤核苷药物脱氧氟尿苷(Floxuridine,简称 DFUR)的合成中间体,结构式如下:



采用化学合成法生产 DFUR 时,由于反应过程中需将碱基或核糖残基的部分基团进行保护,而且产物为多种核苷异构体和其它副产品的混合物,需要进一步分离,因此耗时费力、收率很低(约 10%)。

阮期平等^[27]通过物理化学方法诱变产气肠杆菌(*E. aerogenes*),筛选出一种突变株 EAM-Z1,并以此作为酶源酶法合成 DFUR 的中间体 5-氟尿苷。张绍谭等^[28]在此基础上作了利用产气肠杆菌 EAM-Z1 转化合成 5-氟尿苷的转化率影响因素的研究。

4 结论

(1)生物转化是一个充满机遇与挑战的研究热点,它具有原料来源广、制备简单、质量好及环境污染小等优点,可在一定程度上减轻野生资源不足的状况,同时也可生产一些化学法无法生产或生产成本高或对环境产生不良影响的新材料。

(2)国内外的大量研究证明,生物转化在药物的结构修饰和创新药物的合成方面具有重要作用。尤其是在外消旋体的拆分和对映纯化合物的合成方面发挥了独特的优势作用。

(3)目前的生物转化研究虽已取得了许多重要的研究成果,但仍存在一定的盲目性。比如:生物转化体系的筛选,还未建立起统一的资源库,尚未形成一套科学、规范的研究方法,这样势必会浪费大量的人力和物力资源;而对转化底物的筛选也应以其生理活性或以发现全新的药物为基础。

(4)天然创新药物的研究设计中,在各个环节都注重新技术的应用,同时还应注重提高中国生物

转化机构的装备能力,提倡学科交叉。可以预见,生物转化将是21世纪化学工业最富生命力的技术之一。

参考文献

- [1] NING L L, ZHAN J X, QU G Q, et al. . Biotransformation of triptolide by *Cunninghamella blakesleana* [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(23): 4209 - 4213.
- [2] ZHAN J X, GUO H Z, HAN J, et al. . Biotransformation of artemisinin by fermentation of *Rhizopus chinensis* and *Cunninghamella elegans* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2002, 33(10): 869 - 872.
- [3] 占纪勋,魏秋芬,单成启,等. 四个青蒿素生物转化产物抗体外培养恶性疟原虫活性研究[J]. *中国热带医学*, 2003, 3(1): 17 - 18.
- [4] 杜连祥,王敏,王赓,等. 转化 RSA 为氢化可的松的新月弯孢霉筛选[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(1): 44 - 48.
- [5] HAN J, DAI J G, CUI Y J, et al. . Biotransformation of artemisinin by *Catharanthus roseus* and *Ginkgo biloba* cell suspension cultures [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2003, 34(2): 166 - 168.
- [6] JIN W, WANG Y W, ZHOU Z X, et al. . The effects of cantharidin on HL - 60 and QGY7703 cell lines [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2001, 29(4): 42 - 43.
- [7] WANG C C, WU C H, HSIEH K J, et al. . Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells [J]. *Toxicology*, 2000, 147: 77 - 87.
- [8] 叶敏,戴均贵,果德安. 桔梗细胞悬浮培养体系对斑蝥素的生物转化[J]. *中草药*, 2003, 34(10): 869 - 871.
- [9] MCCLUSKEY A, BOWYER M C, COLLINS E, et al. . Anhydride modified cantharidin analogues: synthesis, inhibition of protein phosphatases 1 and 2A and anticancer activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10: 1687 - 1690.
- [10] 刘颖,程克棣,朱平,等. 唐古特山莨菪毛状根对去氢表雄酮的生物转化[J]. *药学学报*, 2004, 39(6): 445 - 448.
- [11] NING L L, HAN J, ZHANG X Y, et al. . Biotransformation of triptolide and triptonide by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 6(2): 93 - 97.
- [12] 石屹峰,金凤燮,吴怡莹,等. 利用渗透交联固定化细胞促进生物转化[J]. *生物工程学报*, 1997, 12(增): 111 - 113.
- [13] LLANES N, FERNANDES P, LEON R, et al. . Conversion of β - sitosterol by *Mycobacterium* sp. NRRL B - 3805 cells immobilized on Celite supports [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 11(4): 523 - 530.
- [14] FERNANDES P, CRUZ A, PINHEIRO H M, et al. . Microbial conversion of steroid compounds: recent developments [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 32(6): 688 - 705.
- [15] LLANES N, PENDAS J, FALERO A, et al. . Conversion of liposomal 4 - androsten - 3, 17 - dione by *A. simplex* immobilized cells in calcium pectate [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 80(1): 131 - 133.
- [16] 卢定强,韦萍,周华,等. 生物转化与生物催化的研究进展[J]. *化工进展*, 2004, 23(6): 585 - 589.
- [17] 郝雪秦,许激扬,陈代杰,等. 利用双水相系统转化雄甾 - 1, 4 - 二烯 - 3, 17 - 二酮的研究[J]. *药物生物技术*, 2003, 10(3): 169 - 173.
- [18] 刘湘,孙培东,李明,等. 面包酵母用于苯乙酮的不对称还原研究[J]. *分子催化*, 2002, 16(2): 107 - 110.
- [19] 黄雅燕,肖美添,李忠琴,等. R(-) - 扁桃酸脱氢酶产生菌的筛选[J]. *药物生物技术*, 2003, 10(4): 223 - 225.
- [20] 李忠琴,许小平,黄雅燕,等. R(-) - 扁桃酸及其衍生物的手性合成[J]. *中国新医药*, 2004, 3(2): 84 - 85.
- [21] 李永红,郑志强,孙志浩. TLC 方法同时监测生物转化过程中的阿魏酸、香草酸和香草醛[J]. *郑州工程学院学报*, 2003, 24(1): 35 - 37.
- [22] 郑志强,朱书峰,孙志浩. 微生物转化方法生产香草酸与香草醛的初步研究[J]. *工业微生物*, 2002, 32(4): 1 - 6.
- [23] LESAGE - MEESSEN L, STENTELAIRE C, LOMAS - COLO A, et al. . Fungal transformation of ferulic acid from sugar beet pulp to natural vanillin [J]. *J Sci Food Agric*, 1999, 79: 487 - 490.
- [24] BONNIN E, BRUNEL M, GOUY Y, et al. . *Aspergillus niger* I - 1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533, selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin, are also able to produce cell wall polysaccharide - degrading enzymes and feruloyl esterases [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28(1): 70 - 80.
- [25] 王明君. 微生物转化香草酸生产香草醛[J]. *食品与发酵工业*, 2004, (2): 43 - 47.
- [26] 张莉力,迟玉杰. 微生物转化阿魏酸生产香兰素的研究[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(2): 47 - 49.
- [27] 阮期平,周长林,窦洁,等. 5 - 氟尿苷的微生物转化[J]. *微生物学报*, 2002, 42(1): 117 - 119.
- [28] 张绍谭,倪孟祥,张文婷,等. 利用产气肠杆菌 EAM - Z1 转化合成 5 - 氟尿苷的转化率影响因素的研究[J]. *药物生物技术*, 2005, 12(1): 32 - 35.