

研究报告

利用 *Pseudonocardia* sp. 微生物转化制备骨化醇类化合物栗飞红¹ 陈向东^{1*} 汪辉¹ 纪乃琪¹ 王雪萌² 鲍张杰¹ 任聪¹

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009)

(2. 南京海融医药科技股份有限公司 江苏 南京 210009)

摘要: 【背景】近年来骨化醇类化合物(活性维生素 D 及其类似物)在肿瘤治疗、免疫调节中的作用逐渐被发现,药用价值显著,但目前化学合成法制备困难,因此高效制备骨化醇类化合物成为研究热点。【目的】利用假诺卡氏菌(*Pseudonocardia* sp.)转化骨化醇类底物分子并提高转化率。【方法】从化学合成方法常用的原料及中间体中筛选能被有效转化的底物分子,利用单因素及正交试验对转化条件进行优化。【结果】筛选到阿法骨化醇(Alfacalcidol, 1 α -(OH)VD₃)、艾地骨化醇中间体(Eldecalcitol intermediate, AD-M07)、帕立骨化醇中间体(Paricalcitol intermediate, PC-M07) 3 种底物分子,分别被转化为骨化三醇(Calcitriol, 1 α ,25(OH)₂VD₃)、艾地骨化醇中间体(Eldecalcitol intermediate, AD-M08)、帕立骨化醇(Paricalcitol, PC)。确定最优转化条件:蛋白胨 20.0 g/L,葡萄糖 15.0 g/L,部分甲基化的 β -环糊精(PMCD) 0.5% (质量体积比),转化温度 25–30 °C,接种量 5%–10% (体积比),转化时间 72、72、96 h,底物浓度 1.2、0.6、0.6 mg/mL,初始 pH 6.0–8.0。在此条件下 3 种底物的最高转化率分别达到 85%、96%、75%。【结论】通过转化条件的优化 3 种产物的转化率大幅提高,为更加快速高效地利用微生物转化法制备骨化醇类化合物提供参考。

关键词: 微生物转化, 骨化醇类化合物, 假诺卡氏菌属

Preparation of calcified alcohols analogues by bioconversion using *Pseudonocardia* sp.LI Fei-Hong¹ CHEN Xiang-Dong^{1*} WANG Hui¹ JI Nai-Qi¹ WANG Xue-Meng²
BAO Zhang-Jie¹ REN Cong¹

(1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(2. Nanjing Heron Pharmaceutical Science and Technology Co. Ltd., Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: [Background] Recently, the medicinal value of calcified alcohols analogues (active vitamin D and its analogues) in the treatment of tumors therapy and immune regulation has gradually been discovered and examined. However, as the current method for chemical synthesis is complex

Foundation item: Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PPZY2015A057)

*Corresponding author: E-mail: chenxd@cpu.edu.cn

Received: November 22, 2017; **Accepted:** January 30, 2018; **Published online** (www.cnki.net): April 04, 2018

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PPZY2015A057)

*通信作者: E-mail: chenxd@cpu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-22; **接受日期:** 2018-01-30; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-04-04

and difficult, more efficient preparation method of calcified alcohols analogues becomes a hot research focus. **[Objective]** In order to bioconvert the substrates of calcified alcohols analogues using *Pseudonocardia* sp. and further improve the bioconversion rate. **[Methods]** Raw materials and intermediates commonly used in chemical synthesis were bioconverted with *Pseudonocardia* sp. to find appropriate substrates. The bioconversion conditions were optimized by single factor method and orthogonal test. **[Results]** Alfacalcidol (1α -(OH)VD₃), eldecalcitol intermediate (AD-M07) and paricalcitol intermediate (PC-M07) were bioconverted into calcitriol ($1\alpha,25$ (OH)₂VD₃), eldecalcitol intermediate (AD-M08) and paricalcitol (PC). The optimal bioconversion conditions of the above three substrates (1α -(OH)VD₃, AD-M07, PC-M07) were as follows: peptone 20.0 g/L, glucose 15.0 g/L, PMCD 0.5%, temperature 25 °C to 30 °C, inoculation quantity 5% to 10%, bioconversion time 72, 72, 96 h, substrates concentration 1.2, 0.6, 0.6 mg/mL, initial pH 6.0 to 8.0. Under the above conditions, the maximum bioconversion rate of the three products is 85%, 96%, 75% respectively. **[Conclusion]** By optimizing the bioconversion conditions, the bioconversion rate of the three products was markedly increased, which provides a good reference for more efficient preparation of calcified alcohols analogues by bioconversion.

Keywords: Bioconversion, Calcified alcohols analogues, *Pseudonocardia* sp.

骨化醇类化合物是活性维生素 D 及其类似物的统称, 包括骨化三醇^[1]、艾地骨化醇、马沙骨化醇^[2]、度骨化醇^[3]、帕立骨化醇^[4]等, 在治疗骨质疏松、甲状腺功能亢进、肾功能不全引起的并发症等疾病中疗效显著^[5-7]。目前, 国内外骨化醇系列化合物的生产方式主要是有机化学全合成的方法, 合成步骤非常复杂且试剂昂贵, 收率较低, 产物特异性差, 造成骨化醇类原料药价格昂贵且被少数制药公司垄断^[8-9]。生物转化法为骨化醇类化合物的制备开辟了一条新的道路, 与化学合成法相比, 微生物转化法工艺简单、反应条件温和、成本低^[10]。国内外研究者筛选到包括灰色链霉菌 (*Streptomyces griseolus*)、反硝化红环菌 (*Sterolibacterium denitrificans*)、自养假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia autotrophica*) 等多种可以应用于骨化醇类化合物合成过程的微生物菌株^[11-14], 而自养加诺卡氏菌在众多转化菌株中对底物的转化率相对较稳定^[15]。但是目前自养加诺卡氏菌在制备骨化醇类化合物的应用中仍然有很多需要解决的问题, 这也限制了其在工业化中的应用, 如: 转化率不高、底物浓度低等。

本实验室前期工作从泥土样品中筛选到一株放线菌, 经鉴定为假诺卡氏菌, 本研究利用这株假

诺卡氏菌作为转化菌株, 从常见的化学合成骨化醇类化合物的甾体和非甾体类原料及中间体中筛选出能够被有效转化为骨化醇类化合物的底物分子, 并通过转化条件的优化提高转化率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

假诺卡氏菌由中国药科大学微生物学教研室保藏。

1.1.2 培养基

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母提取物 2.0, L-天冬酰胺 1.0, K₂HPO₄ 0.5。初级转化培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母提取物 2.0, 黄豆粉 1.5, K₂HPO₄ 0.4, NaCl 0.4, CaCO₃ 2.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

甾体和非甾体类原料及中间体(表 1), 南京海融医药科技股份有限公司; 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; 500 MHz 核磁共振仪, Bruker 公司。

1.2 假诺卡氏菌种子液的制备

菌种经斜面活化后制备菌悬液, 取 2 mL 接种于 50 mL 种子培养基中, 28 °C、200 r/min 摇瓶培养, 每 24 h 取样测菌体干重(g/L), 绘制假诺卡氏菌生长曲线, 选取对数生长期作为种子液。

表 1 本文所用的甾体与非甾体类底物

Table 1 The steroids and non-steroidal substrates used in this paper

甾体类化合物 Steroids	非甾体类化合物 Non-steroidal
Cholesterol	Vitamin D ₂
7-Dehydrocholesterol	Vitamin D ₃
Eldecalcitol intermediate (AD-M04)	Paricalcitol intermediate (PC-M07)
Eldecalcitol intermediate (AD-M07)	1 α -(OH)VD ₃

1.3 底物筛选及产物分离与鉴定

1.3.1 底物的筛选

从 8 种化学合成骨化醇类化合物常用甾体和非甾体类原料及中间体中筛选出能被假诺卡氏菌转化获得骨化醇类化合物的底物。转化过程如下：取 2 mL 种子液接种于 50 mL 初级转化培养基中，28 °C、200 r/min 培养 72 h 后菌浓度达到 10^8 CFU/mL，加入底物终浓度为 0.3 mg/mL 乙醇溶液，28 °C、200 r/min 转化 72 h 后取发酵液与甲醇按 1:1 的体积比混合均匀，4 °C、10 000 r/min 离心 10 min，取上清进行 HPLC 检测。

1.3.2 产物分离纯化与结构鉴定方法

发酵液与乙酸乙酯按 1:1 (体积比)混合，4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 后取上层有机相，用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，旋转蒸发浓缩后进行硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯=2:1, 体积比)分离，洗脱液经薄层色谱法初步检测后旋转蒸发浓缩致干得到白色粉末，用甲醇溶解后进行 HPLC 检测和制备纯化，利用核磁和质谱进行结构确认。

1.4 助溶剂对转化率的影响

1.4.1 不同助溶剂对转化率的影响

制备骨化醇类化合物的底物均属于脂溶性化合物，在培养基中的溶解性差，且底物分子需要进入细胞内才能被胞内酶转化^[16]，而助溶剂可以提高底物在转化体系中的溶解性。使用初级转化培养基，添加底物前向各摇瓶中分别加入 1% (质量体积比)部分甲基化的 β -环糊精(PMCD)、吐温-80、Triton X-100、乳酸链球菌素(Nisin, 0.5 mg/mL)，并设置

空白对照组，28 °C、200 r/min 转化 72 h，取样进行 HPLC 检测。

1.4.2 助溶剂浓度对转化率的影响

设置助溶剂浓度梯度 0–2% (体积比)，与底物同时添加到转化体系中，28 °C、200 r/min 转化 72 h，取样检测底物转化率。

1.5 转化培养基的优化

1.5.1 不同氮源对转化率的影响

在初级转化培养基的基础上，分别添加 20.0 g/L 的蛋白胨、黄豆粉、鱼粉、NH₄Cl、NH₄NO₃、KNO₃、NH₄H₂PO₄、玉米浆作为转化培养基氮源，28 °C 转化 72 h，取样检测底物转化率。

1.5.2 不同碳源对转化率的影响

在初级转化培养基的基础上，分别添加 15.0 g/L 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘油、可溶性淀粉作为转化培养基碳源，28 °C 转化 72 h，取样检测底物转化率。

1.6 单因素试验优化转化条件

在初始转化条件[接种量 5% (体积比)，接种后 72 h 加底物，底物浓度 0.3 mg/mL，转化温度 28 °C，pH 自然，200 r/min，转化 72 h]的基础上，通过单因素试验分别考察接种量(4%–10%)、转化温度(20–35 °C)、初始 pH 4.0–9.0、底物浓度(0.3–2.0 mg/mL)、底物添加时间点(0–48 h)对转化率的影响。利用单因素实验优化后的底物浓度、接种量、转化温度、初始 pH、底物添加时间点以及筛选到的助溶剂等条件进行底物转化，每 24 h 取样检测，确定各底物最佳转化时间。

1.7 正交试验

在优化转化培养基成分及转化条件的单因素试验基础上，选择适当的单因素：PMCD 浓度、底物浓度、转化时间、初始 pH 进行正交试验，确定各底物的最佳转化条件。

1.8 数据分析

采用统计学软件 GraphPad Prism 5.0 和 SPSS 19.0 处理实验数据， $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 假诺卡氏菌种子液的制备

生长曲线如图 1 所示, 菌株在 0–48 h 处于生长迟滞期, 50 h 后进入对数生长期, 7 d 后进入平稳生长期, 培养 9 d 未见明显衰亡, 选取相对较稳定的对数生长期 72 h 的菌株作为种子。

2.2 底物筛选及产物的分离鉴定

经过高效液相色谱及核磁和质谱鉴定, 确定阿法骨化醇[Alfacalcidol, 1α -(OH)VD₃]、艾地骨化醇中间体(Eldecalcitol intermediate 07, AD-M07)、帕立骨化醇中间体(Paricalcitol intermediate 07, PC-M07)可分别被转化为骨化三醇[Calcitriol, $1\alpha,25$ -(OH)₂VD₃]、艾地骨化醇中间体(Eldecalcitol intermediate 08, AD-M08) 和 帕 立 骨 化 醇 (Paricalcitol, PC) 3 种重要的骨化醇类化合物及中间体。经高效液相色谱条件的摸索, 确定 3 种产物均用梯度洗脱法检测, AD-M08 和 $1\alpha,25$ -(OH)₂VD₃ 使用 YMC-Pack ODS-AQ 柱, 150 mm×4 mm, 柱温 30 °C, 流速分别为 1.7、1.2 mL/min; PC 使用 Xtimate C18 柱, 250 mm×4.6 mm, 柱温 40 °C, 流速 2 mL/min, 流动相 A 泵为水, B 泵为乙腈, HPLC 梯度洗脱时间与 B 泵乙腈浓度(体积比)见表 2。各产物的高效液相色谱图如图 2 所示, 在此检测条件下 AD-M08 的保留时间为 4.69 min, PC 的保留时间为 39.08 min, $1\alpha,25$ -(OH)₂VD₃ 的保留时间为 10.05 min。

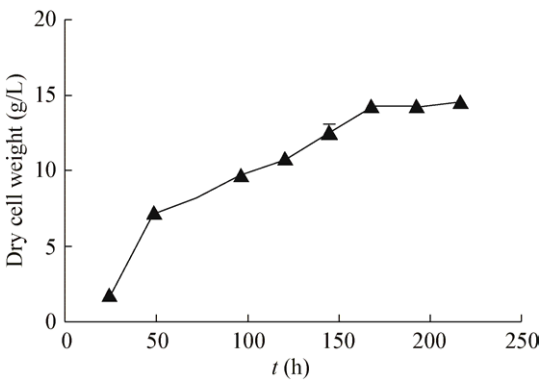


图 1 假诺卡氏菌生长曲线
Figure 1 The growth curves of strain *Pseudonocardia* sp.

表 2 产物 HPLC 检测条件

Table 2 High-performance liquid chromatogram detection conditions of the products

AD-M08		$1\alpha,25$ (OH) ₂ VD ₃		PC	
时间	B 泵	时间	B 泵	时间	B 泵
Time	B Pump	Time	B Pump	Time	B Pump
(h)	(%)	(h)	(%)	(h)	(%)
0	75	0	60	0	60
15	77	10	60	10	60
20	90	15	100	30	53
30	90	25	100	40	53
32	75	26	60	45	100
40	75	35	60	50	100
—	—	—	—	60	0

Note: —: The end.

2.3 助溶剂对转化率的影响

2.3.1 不同助溶剂对底物转化率的影响

不同助溶剂对转化率的影响差异显著($P<0.05$), 如图 3 所示, Nisin 和 Triton X-100 对转化率没有显著的促进作用, 与对照组相比反而有一些抑制作用, 原因可能是 Nisin 和 Triton X-100 破坏了菌体的细胞结构, 进而影响了胞内酶的活性; Tween-80 和 PMCD 对转化起到了促进作用, PMCD 相对于 Tween-80 更有助于转化, 且 Tween-80 的沸点较高, 在后续产物分离纯化过程中去除困难, 所以选 PMCD 作为助溶剂。

2.3.2 不同 PMCD 浓度对转化率的影响

不同浓度 PMCD (质量体积比)对转化率的影响有显著的差异($P<0.05$)(图 4), $1\alpha,25$ -(OH)₂VD₃ 的产率在 PMCD 0.25%–0.5% 之间最高, 而当 PMCD 浓度大于 0.5% 时 $1\alpha,25$ -(OH)₂VD₃ 的产率明显下降, 帕立骨化醇和艾地骨化醇的产率在 PMCD 0.5%–1.5% 之间最高, 大于 1.5% 后产率明显下降。

2.4 培养基的优化

2.4.1 不同氮源对底物转化率的影响

含不同氮源的转化培养基对转化率的影响有显著差异($P<0.05$), 且转化率均高于空白对照组, 如图 5 所示, 无机氮源对于底物的转化率比有机氮源低, 有机氮源中蛋白胨、黄豆粉、鱼粉蛋白胨的

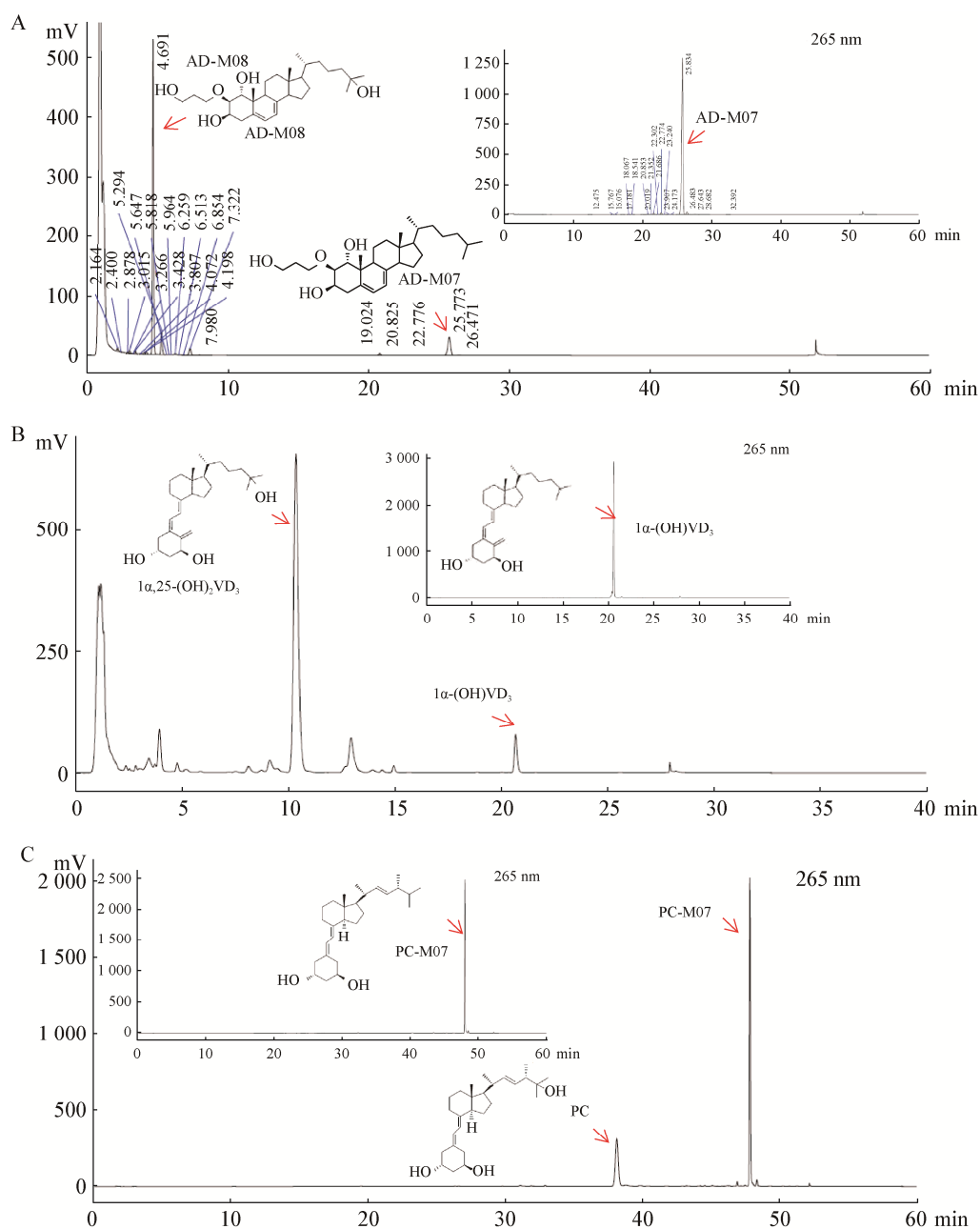


图 2 转化产物的高效液相色谱检测图谱

Figure 2 High-performance liquid chromatogram of products

Note: A: AD-M08; B: 1α,25-(OH)₂VD₃; C: PC.

转化率较高，但是黄豆粉本身为不溶性，不利于产物的后处理，而鱼粉蛋白胨自身营养过于丰富，在转化过程中易产生气泡，在利用发酵罐放大生产中不利于转化反应的进行，所以综合考虑最终选择蛋白胨作为转化培养基的氮源。

2.4.2 不同碳源对底物转化率的影响

含不同碳源的转化培养基对转化率的影响有显著差异($P < 0.05$), 且均高于空白对照组, 从图 6 可以看出 3 种底物的最佳碳源都是葡萄糖, 其次是甘油, 同为速效碳源的蔗糖对 PC 和 1α,25-(OH)₂VD₃

的转化促进作用不显著, 对 AD-M08 的转化有一定促进作用, 乳糖和可溶性淀粉作为迟效碳源对 PC 和 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 的转化促进作用不明显, 对 AD-M08 的转化具有一定促进作用, 综合考虑经济及转化率等因素选择葡萄糖作为转化培养基的碳源。

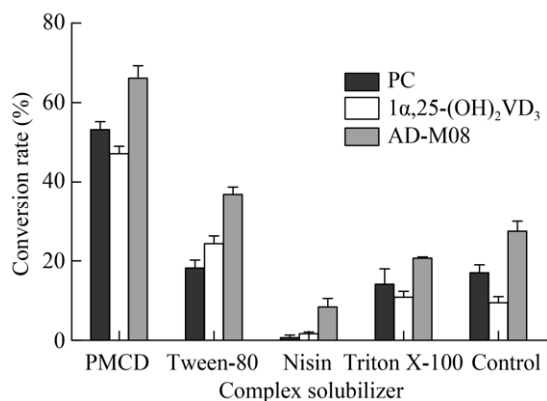


图3 不同助溶剂对转化率的影响

Figure 3 Effect of different complex solubilizer on the conversion rate

2.5 转化条件对底物转化率的影响

不同底物浓度对转化率的影响有显著差异 ($P<0.05$), 如图 7A 所示, PC 和 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 的得率在底物浓度为 0.6–1.2 mg/mL 时较高, 高于 1.2 mg/mL 时转化率逐渐下降, 所以选择 1.2 mg/mL 作为最佳转化浓度, 而 AD-M08 的得率在底物浓

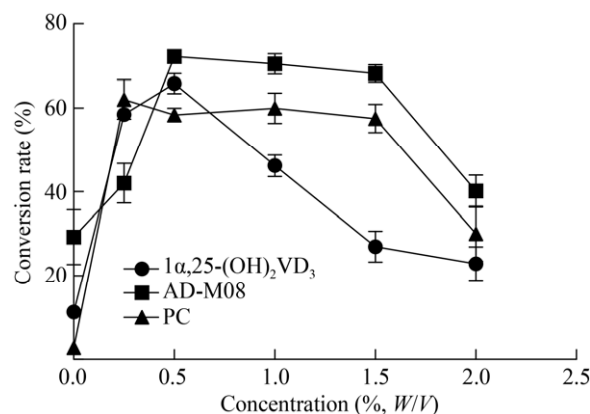


图4 不同 PMCD 浓度对底物转化率的影响

Figure 4 Effect of different concentration of PMCD on the conversion rate

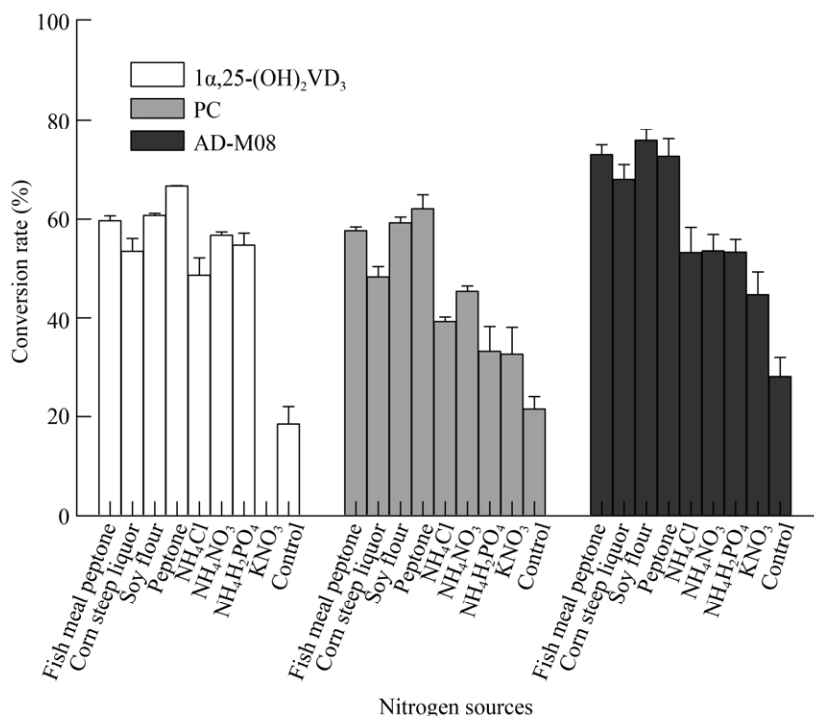


图5 不同氮源对转化率的影响

Figure 5 Effect of different nitrogen sources on the conversion rate

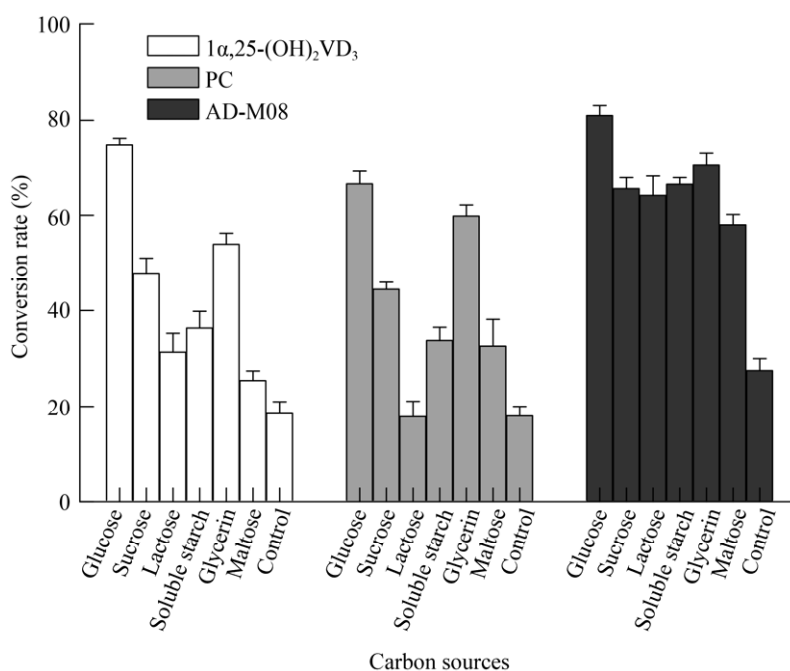


图6 碳源对转化率的影响

Figure 6 Effect of the carbon sources on the conversion rate

度超过 0.6 mg/mL 即出现明显下降趋势, 所以 AD-M08 的最佳浓度为 0.6 mg/mL。不同温度下底物的转化率有显著差异($P<0.05$), 如图 7B 所示, 3 种底物的最适转化温度均在 25–30 °C 之间。接种量对转化率的影响见图 7C, 在 5%–10% 之间转化率相对稳定, 选择接种量 6% 作为本实验的接种量。转化培养基初始 pH 对转化率的影响有显著差异($P<0.05$), 如图 7D 所示, 1α,25-(OH)₂VD₃、PC、AD-M08 的最佳初始 pH 分别为 8.0、6.0、8.0。底物添加时间点对转化率的影响见图 7E, 底物添加时间对转化率的影响不显著($P>0.05$), 综合考虑选择在接种后 24 h 添加底物。不同转化时间 3 种底物的转化率均有显著差异($P<0.05$), 如图 7F 所示, PC 在转化 96 h 后产率达到最高值, 而 AD-M08 和 1α,25-(OH)₂VD₃ 在转化 72 h 即达到最大转化率, 所以确定 1α-(OH)VD₃ 和 AD-M07 的转化时间为 72 h, PC-M07 的最佳转化时间为 96 h。

2.6 正交试验

在单因素试验结果基础上进行正交设计, 采用

L₉(3⁴)进行四因素三水平的正交试验, 因素水平表见表 3, 结果分析见表 4。

由表 4 极差分析可知, 所选的 4 种转化影响因素对 1α,25-(OH)₂VD₃ 转化率的影响大小为: PMCD 浓度>pH>底物浓度>转化时间, 比较各因素的不同水平, 得到最佳组合为 A₃B₂C₃D₂, 即底物浓度为 1.2 mg/mL, PMCD 浓度为 0.5% (质量体积比), pH 值为 8.0, 转化时间为 72 h; 对 PC 转化率的影响大小为: 转化时间>pH>底物浓度>PMCD 浓度, 最佳组合为 A₁B₂C₂D₃, 即底物浓度 0.6 mg/mL, PMCD 浓度 0.5% (质量体积比), pH 值为 6.0, 转化时间为 96 h; 对 AD 转化率的影响大小为: 底物浓度>pH>PMCD 浓度>转化时间, 比较各因素不同水平, 得到最佳组合为 A₁B₃C₃D₂, 即底物浓度为 0.6 mg/mL, PMCD 浓度为 1% (质量体积比), pH 值为 8.0, 转化时间为 72 h。在以上条件下进行验证实验, 取样检测各底物转化率, 结果如图 8 所示, 1α,25-(OH)₂VD₃、AD、PC 的最高转化率分别可以达到 85%、96%、75%。

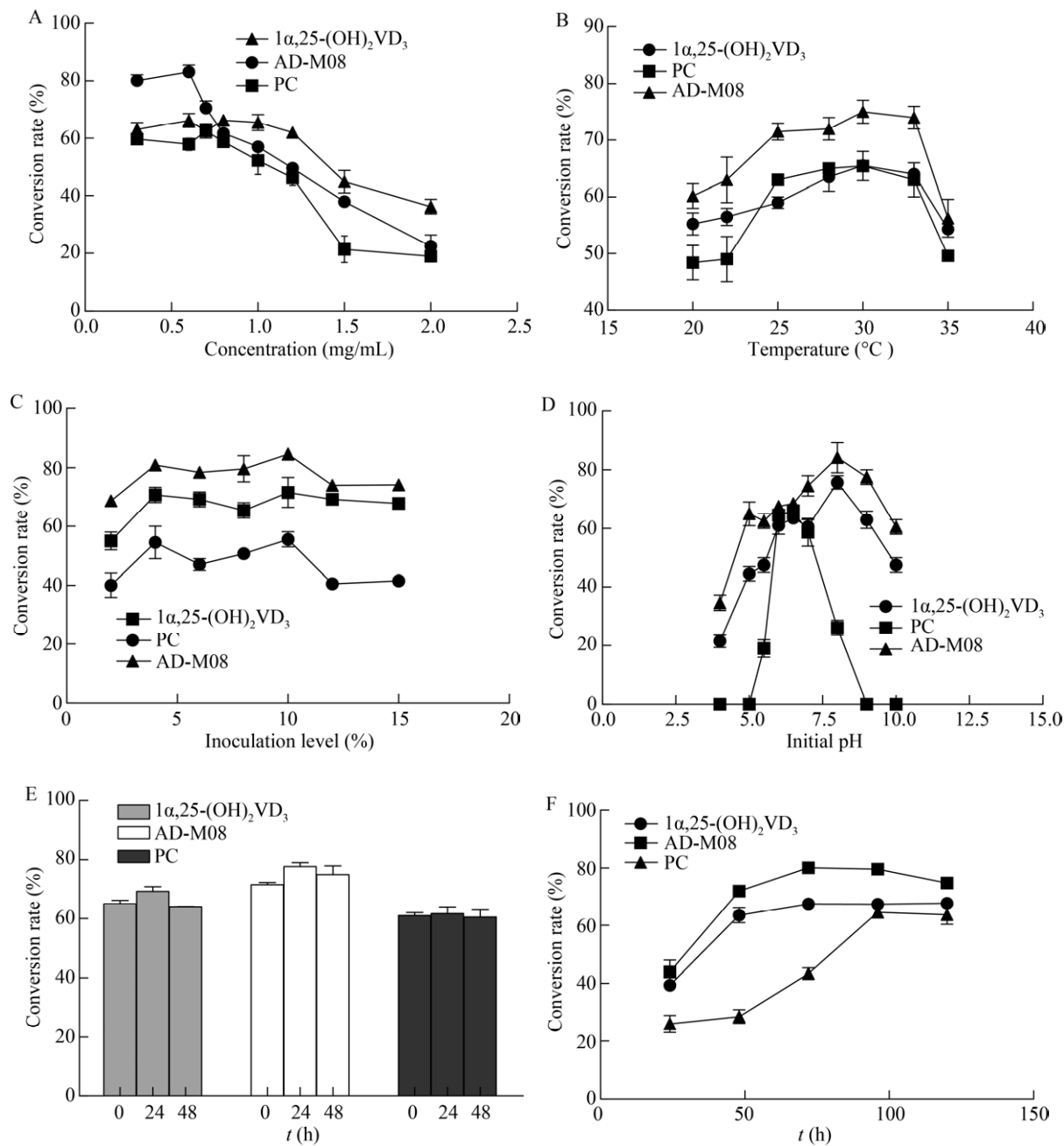


图 7 转化条件对转化率的影响
Figure 7 Effect of conversion conditions on conversion rate

表 3 正交试验因素与水平设计
Table 3 Factors and levels of orthogonal test

因素 Factor	A 底物浓度 Substrate (mg/mL)	B PMCD 浓度 PMCD (% , W/V)	C pH	D 转化时间 Time (h)
1	0.6	0.2	4.0	48
2	0.8	0.5	6.0	72
3	1.2	1.0	8.0	96

表 4 正交试验结果与极差分析

Table 4 Results and range analysis of orthogonal test

Test		A	B	C	D	Conversion rate (%)		
						1 α ,25-(OH) $_2$ VD $_3$	PC	AD-M08
1 α ,25-(OH) $_2$ VD $_3$	1	3	2	3	1	76.65	43.56	49.09
	2	3	3	1	2	45.03	38.28	36.83
	3	2	1	3	2	55.09	43.46	78.45
	4	2	3	2	1	47.20	35.22	80.66
	5	2	2	1	3	62.09	46.25	52.03
	6	1	3	3	3	51.66	57.06	86.04
	7	1	1	1	1	43.06	36.06	50.44
	8	3	1	2	3	54.32	60.88	41.33
	9	1	2	2	2	78.06	62.09	89.03
PC	K_1	57.59	50.82	50.06	55.63			
	K_2	54.79	72.27	59.86	59.39			
	K_3	58.67	47.96	61.13	56.02			
	R	3.88	24.31	11.07	3.76			
AD-M08	K_1	51.74	46.80	40.19	38.28			
	K_2	41.64	50.63	52.73	47.94			
	K_3	47.57	43.52	48.03	54.73			
	R	10.10	7.11	12.54	16.45			

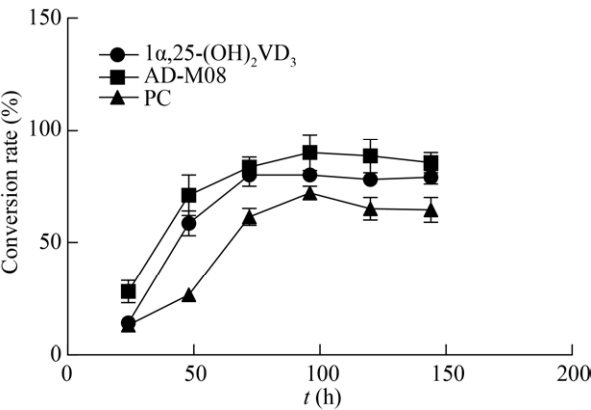


图 8 最优条件下的转化结果
Figure 8 Bioconversion results in optimal conditions

3 讨论与结论

骨化醇类化合物原料药在药用领域应用十分广泛，除了传统的钙磷调节外，还包括抑制肿瘤细胞增殖、免疫调节、心血管疾病治疗以及抑制甲状旁腺激素分泌^[17-18]等，20 世纪 80 年代发现骨化三醇有诱导白血病细胞分化成单核巨噬细胞的能力。

艾地骨化醇是目前治疗骨质疏松的一线药物，在骨钙动员和肠钙吸收方面的效果优于骨化三醇。帕立骨化醇在治疗慢性肾病引起的并发症中疗效显著且副作用小^[19]。微生物转化法制备骨化醇类化合物始于 20 世纪 90 年代，最先由日本、美国、瑞典投入研究，但截至目前仅停留在第一代骨化醇类化合物的应用中，而且制备工艺处于保密阶段，所以研究骨化醇类化合物原料药的制备工艺对我国医药事业的发展具有重要意义。

本研究利用微生物转化法从有机合成骨化醇类化合物的原料及中间体中成功筛选出 3 种底物分子，首次发现 1 α -(OH)VD $_3$ 、AD-M07、PC-M07 可同时被假诺卡氏菌生物转化，分别获得 1 α ,25-(OH) $_2$ VD $_3$ 、AD-M08、PC 三种重要骨化醇类化合物及中间体，说明假诺卡氏菌具有广谱的底物羟基化作用，可以尝试更多骨化醇类相关底物或其他脂溶性化合物的微生物转化。

AD-M08 是在 AD-M07 的 25 位碳原子上添加

羟基, 这一中间体利用化学方法很难实现, 而且特异性差, 容易出现异构体, 利用假诺卡氏菌微生物转化法一步即可获得单一结构的 AD-M08 中间体, 最优条件下转化率可以达到 96%, 为艾地骨化醇的制备提供了一条新的途径。1 α ,25-(OH) $_2$ VD $_3$ 是第一代骨化醇类化合物, 在最优条件下的转化率为 85%, 达到了日本 Yasutake 等^[20]的最高转化率, 而且底物浓度提高了 3 倍, 将极大地提高我国工业化生产 1 α ,25-(OH) $_2$ VD $_3$ 的效率。最优条件下 PC 的转化率达到了 75%, 转化率较目前最新报道高 20%, 且底物浓度由 0.5 mg/mL 提高到了 1.2 mg/mL^[21]。但是目前的优化工艺仍然有不足之处, 由于菌株生长缓慢, 整个生产周期需要一周时间, 这对于利用发酵罐进行工业化大生产非常不利。后期实验正在积极进行菌种改造, 利用 DNA 重组技术将假诺卡氏菌胞内发挥主要功能的酶在合适的宿主中表达, 缩短转化周期, 达到高效制备以上 3 种骨化醇类化合物的目的。

REFERENCES

- [1] Deluca HF, Schnoes HK. Vitamin D: recent advances[J]. Annual Review of Biochemistry, 1983, 52: 411-439
- [2] Zhao GD. Synthesis of maxacalcitol, eldecacitol and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ analogues[D]. Ji'nan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2017 (in Chinese)
赵国栋. 活性维生素 D $_3$ 类药物马沙骨化醇和艾尔骨化醇及其衍生物的合成研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2017
- [3] Sun B, Xu HG, Wen P, et al. Synthesis of doxercalciferol[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2009, 18(13): 1243-1244 (in Chinese)
孙博, 徐红贵, 文鹏, 等. 度骨化醇的合成[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(13): 1243-1244
- [4] Slatopolsky E, Cozzolino M, Lu Y, et al. Efficacy of 19-nor-1,25-(OH) $_2$ D $_2$ in the prevention and treatment of hyperparathyroid bone disease in experimental uremia[J]. Kidney International, 2003, 63(6): 2020-2027
- [5] Tang BMP, Eslick GD, Nowson C, et al. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis[J]. The Lancet, 2007, 370(9588): 657-666
- [6] Griffin MD, Lutz WH, Phan VA, et al. Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 270(3): 701-708
- [7] Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics[J]. Nature Reviews Cancer, 2007, 7(9): 684-700
- [8] Deluca HF, Schnoes HK, Perlman KL. Intermediates for the synthesis of 19-nor vitamin D compounds: U.S. Patent 5086191[P]. 1992-02-04
- [9] Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system[J]. Endocrine Reviews, 1995, 16(2): 200-257
- [10] Zhang YQ, Wang DQ. Advances in microbial transformation of phytosterol into steroid medicine intermediates[J]. Microbiology China, 2006, 33(2): 142-146 (in Chinese)
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[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 142-146
- [11] Sasaki J, Mikami A, Mizoue K, et al. Transformation of 25-and 1 α -hydroxyvitamin D $_3$ to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ by using *Streptomyces* sp. strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(10): 2841-2846
- [12] Sawada N, Sakaki T, Yoneda S, et al. Conversion of vitamin D $_3$ to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320(1): 156-164
- [13] Li BJ, Li YX, Bai DM, et al. Whole-cell biotransformation systems for reduction of prochiral carbonyl compounds to chiral alcohol in *Escherichia coli*[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6750
- [14] Warnke M, Jung T, Dermer J, et al. 25-Hydroxyvitamin D $_3$ synthesis by enzymatic steroid side-chain hydroxylation with water[J]. Angewandte Chemie, 2016, 128(5): 1913-1916
- [15] Takeda K, Asou T, Matsuda A, et al. Application of cyclodextrin to microbial transformation of vitamin D $_3$ to 25-hydroxyvitamin D $_3$ and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 78(5): 380-382
- [16] Imoto N, Nishioka T, Tamura T. Permeabilization induced by lipid II-targeting lantibiotic nisin and its effect on the bioconversion of vitamin D $_3$ to 25-hydroxyvitamin D $_3$ by *Rhodococcus erythropolis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 405(3): 393-398
- [17] Lin ZT, Li W. The roles of vitamin D and its analogs in inflammatory diseases[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2016, 16(11): 1242-1261
- [18] Cheung FSG, Lovicu FJ, Reichardt JKV. Current progress in using vitamin D and its analogs for cancer prevention and treatment[J]. Expert Review of Anticancer Therapy, 2012, 12(6): 811-837
- [19] Abe E, Miyaura C, Sakagami H, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981, 78(8): 4990-4994
- [20] Yasutake Y, Tamura T. Efficient production of active form of vitamin D $_3$ by microbial conversion[J]. Synthesiology English Edition, 2012, 4(4): 227-235
- [21] Luo JQ, Jiang F, Song WQ, et al. Synthesis of paricalcitol: a novel strategy combining chemical and microbial transformations[J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2017, 43(3): 323-327