

青蒿素组合生物合成的研究进展

刘硕谦¹, 田 娜², 李 娟¹, 刘仲华^{1,2*}, 黄建安¹

(1. 湖南农业大学 湖南省天然产物工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128;

2. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要:青蒿素是来自菊科艾属植物青蒿 *Artemisia annua* 中的一种抗疟有效成分, 近年国际市场对其需求量快速增长。组合生物合成法将成为制备青蒿素的主要有效手段, 在该研究领域也取得了重要进展。综述了青蒿素生物合成途径、高产青蒿素工程菌的构建以及青蒿素组合生物合成的基因调控等方面的最新研究进展, 分析了该领域目前面临的新问题与困难, 并探讨未来的发展趋势。

关键词:组合生物合成, 青蒿素, 疟疾, 代谢工程

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2007)09-1425-07

Advances in studies on combinatorial biosynthesis of artemisinin

LIU Shuo-qian¹, TIAN Na², LI Juan¹, LIU Zhong-hua^{1,2}, HUANG Jian-an¹

(1. Hunan Provincial Engineering and Technology Research Center of Natural Products, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; 2. Horticulture and Gardening College of Hunan

Agriculture University, Changsha 410128, China)

Key words: combinatorial biosynthesis, artemisinin, malaria, metabolic engineering

疟疾是流行范围最广、历史最长、危害最大的人类寄生虫传染病, 长期以来一直是第三世界国家发病率和死亡率最高的病种之一。目前全球每年发生 3~5 亿起疟疾感染病例, 其中死亡人数达一百万之多^[1]。由于疟疾致病微生物疟原虫 *Plasmodium falciparum* 具有对多种药物的耐药性, 从而导致疟疾的防治工作很难取得令人满意的效果^[2]。虽然已有一些化学合成抗疟药物问世, 但其效果和安全性还有待严格的临床验证, 估计至少需要 5 年时间才能实现商品化^[3]。青蒿素 (artemisinin) 是我国学者首次从菊科艾属植物青蒿 (又称黄花蒿) *Artemisia annua* L. 中分离得到的一种倍半萜内酯过氧化物, 能有效抑制疟原虫的肌浆-内质网 ATP 酶 (SERCA)^[4], 是治疗疟疾的特效药, 特别是对脑型疟疾和抗氯喹恶性疟疾的疗效更为突出。药用青蒿素是从青蒿植株的叶片及花蕾中提取的, 由于青蒿中青蒿素量不高 (0.01%~0.6%), 而且提取环节复杂, 费时费力, 致使青蒿素的生产成本高, 产量低, 无法满足市场需求^[5]。因此, 如何有效制备青蒿素一直是近年来研究的热点问题。虽然有报道利用化学合成的方法获得了青蒿素, 但由于青蒿素有多个手性碳原子, 使得合成步骤非常复杂、产率低、成本高, 从而很难应用于工业化生产^[6]。随着基因工程等生物技术的快速发展, 特别是自 20 世纪 90 年代, 组合生物合成 (combinatorial biosynthesis) 概念的提出, 标志着人类应用生物技术又迈进了一个崭新的阶

段^[7]。组合生物合成是指将不同生物体来源的基因组合在微生物体内生产生物活性物质的方法^[7]。本文就组合生物合成技术在青蒿素规模化制备方面的应用作一综述。

1 青蒿素生物合成途径

青蒿素的生物合成途径属于植物类异戊二烯代谢途径。目前已发现植物类异戊二烯的生物合成至少存在甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 和由丙酮酸起始的 5-磷酸脱氧木酮糖 (deoxyxylulose 5-phosphate, DXP) 两条途径^[8]。青蒿素等倍半萜类物质的生物合成途径属于 MVA 途径, 该途径在细胞质中进行。2003 年, 王红等^[9]对青蒿素的生物合成途径做了较全面的综述, 但近年来又取得了新的进展, 提出了许多新的甚至不同的观点, 本文从以下两方面进行阐述。

1.1 从紫穗槐-4, 11-二烯 (amorpha-4, 11-diene) 到青蒿酸和二氢青蒿酸: 紫穗槐-4, 11-二烯是青蒿素的第一个特异性前体物质, 是由法呢基焦磷酸 (FPP) 在紫穗槐-4, 11-二烯合酶 (ADS) 的催化下发生自身环化而生成^[10, 11]。紫穗槐-4, 11-二烯含有一个烯丙基结构, 很容易在细胞色素 P450 或脱氢酶作用下氧化生成相应的醇、醛和酸等化合物^[12~14]。Woerdenbag 等^[15]首次从青蒿根组织中分离得到了紫穗槐-4, 11-二烯的氧化产物青蒿醇 (artemisinic alcohol)。2005 年, Berte 等^[16]利用气-质联用法首次在青蒿的叶及其腺毛体中检测到了青蒿醇、二氢青蒿醇 (dihydro-artemisinic alcohol)、

收稿日期: 2007-01-31

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (06JJ30010); 湖南省教育厅优秀青年基金资助项目 (06B041)

作者简介: 刘硕谦 (1977—), 男, 助理研究员, 在读博士研究生, 从事植物次生代谢基因工程研究。

E-mail: liushuoqian@126.com shuoqianliu@yahoo.com

* 通讯作者 刘仲华 Tel: (0731) 4635304 Fax: (0731) 4635306 E-mail: larkin-liu@163.com

青蒿醛 (artemisinic aldehyde)、二氢青蒿醛 (dihydro-artemisinic aldehyde)。同时,通过一系列酶学实验证实了在非可溶性细胞色素 P450 单氧化酶立体选择性催化下,紫穗槐-4,11-二烯羟基化生成青蒿醇^[16],随后,青蒿醇在脱氢酶的作用下氧化生成青蒿醛,青蒿醛在还原酶作用下生成二氢青蒿醛,二氢青蒿醛在脱氢酶作用下进一步氧化生成二氢青蒿酸。由此,提出了紫穗槐-4,11-二烯→青蒿醇→青蒿醛→二氢青蒿醛→二氢青蒿酸生成合成框架,Bouwmeester 从化学能的角度对该途径进行了合理的解释^[17]。此后,Teoh^[18]和 Ro^[19]及其合作者先后从青蒿花芽腺毛体中克隆了细胞色素 P450 单氧化酶编码基因 *CYP71AV1*。Teoh 等^[18]发现 *CYP71AV1* 基因在酵母中的异源表达产物能体外催化紫穗槐-4,11-二烯氧化反应生成青蒿醇,继而依次向青蒿醛和青蒿酸转化。Ro 等^[19]将 *CYP71AV1* 基因克隆入工程酵母菌,体内获得了青蒿醇、青蒿醛和青蒿酸。因此,紫穗槐-4,11-二烯似乎还存在另外一条氧化途径,即紫穗槐-4,11-二烯→青蒿醇→青蒿醛→青蒿酸途径,P450 单氧化酶能催化该途径的 3 步氧化反应。

1.2 从青蒿酸或二氢青蒿酸到青蒿素:以前人们认为青蒿酸首先还原生成二氢青蒿酸,然后再经过多步复杂的反应转化为青蒿素。近年研究结果表明,青蒿素与二氢青蒿酸之间并没有发生相互转化^[16]。汪猷等^[20,21]用放射性同位素标记的方法,证明了青蒿酸是青蒿素 B (arteannuin B) 和青蒿素的共同前体。Sangwan 等^[22]用 ¹⁴C 标记的青蒿酸饲喂青蒿小枝,随后在青蒿素 B 和青蒿素中均检测到放射性,表明青蒿酸是青蒿素 B 和青蒿素的共同前体。Nair 等^[23]利用粗提的部分纯化的青蒿叶片提取物在体外实现了由青蒿素 B 向青蒿素的转变,提出了青蒿素 B 是青蒿酸转变成青蒿素的中间产物。Bharel 等^[24]发现青蒿叶细胞提取液能将青蒿酸、青蒿素 B 以及二氢青蒿素 B 转变为青蒿素,认为青蒿酸首先转化为青蒿素 B,然后还原成二氢青蒿素 B,二氢青蒿素 B 能迅速转化为青蒿素。Abdin 等^[25]对转化青蒿酸的青蒿叶细胞提取液进行了分离纯化,得到两种不同相对分子质量大小的蛋白质,证实了这两种蛋白质参与了青蒿酸向青蒿素的转化。Dhingra 等^[26-27]同样采用青蒿叶无细胞体系成功实现了青蒿素 B 向青蒿素的转化,并分离与鉴定了参与该转化反应的酶蛋白。2006 年,Tatineni 等^[28]利用微生物 *Microbacterium trichotecenolyticum* 发酵产物,以青蒿素 B 为底物,结果获得了青蒿素,并在微生物的发酵产物中分离到一种未知酶,该酶负责青蒿素 B 向青蒿素的转化。

同样,二氢青蒿酸可通过一条独立于青蒿酸的途径转变成青蒿素,但研究者认为由二氢青蒿酸向青蒿素的转化对青蒿生物合成青蒿素的意义不大^[29]。Wallaart 等^[30,31]从青蒿中分离得到二氢青蒿酸和二氢青蒿酸氢过氧化物,在体外模拟植物体内存在的光化学反应条件下,二氢青蒿酸可转化成青蒿素,在反应的中间产物中检测到二氢青蒿酸氢过氧化物,因而认为从二氢青蒿酸向青蒿素转变的过程不需要酶的参与,在具光致敏性质的化合物的激发下自发完成。Sy 等^[32]发现二

氢青蒿酸在有机溶液中能发生自发氧化反应,缓慢转化为青蒿素。进一步的实验表明二氢青蒿酸分子中 C-12 羧基对其自发的氧化反应有促进作用。C-12 羧基的作用主要表现在 $\Delta 4,5$ 双键加氧需要 C-12 羧基;同时,该基团能催化随后的二氢青蒿酸氢过氧化物的 Hock 裂解;此外,青蒿素的 1,2,4-三氧烷环结构的形成也离不开该基团的参与^[33]。Brown 等^[34]将同位素标记的二氢青蒿酸通过青蒿植株的根饲喂青蒿植株,结果几天后在青蒿植株地上部分检测到具放射性的青蒿素及其他 C-12 羧基倍半萜类化合物,其中 15 种化合物已知在青蒿体内自然存在。Brown 等认为二氢青蒿酸在体内首先通过 $\Delta 4,5$ 双键与单线氧反应生成氢过氧化物,该反应可能需要致敏化合物(如植物色素)的参与,随后,该氢过氧化物经过与体外相同的 3 步自发反应(Hock 裂解、三线氧加成和环化反应)生成青蒿素。在该研究中,Brown 等还注意到同位素标记的青蒿素占青蒿中总青蒿素的比例非常小,从而推测,青蒿植株体内富集的青蒿素可能主要是由青蒿酸转化而来,而二氢青蒿酸的贡献较小^[34]。

根据以上研究结果,结合更早报道的有关青蒿素及植物类异戊二烯类化合物的生物合成研究成果,可以初步总结出青蒿素的生物合成途径(图 1)。从图 1 可以看出,青蒿素的合成是首先由乙酰辅酶 A 经 MVA 途径生成 FPP,然后在 ADS 酶作用下 FPP 环化生成紫穗槐-4,11-二烯,在 P450 的作用下紫穗槐-4,11-二烯氧化生成青蒿醇和青蒿醛,青蒿醛可能经过两条独立的氧化途径最后生成青蒿素,其中青蒿酸氧化途径可能是青蒿素主要的生物合成途径。

2 工程大肠杆菌生产青蒿素

2.1 DXP 途径的基因调控:FPP 是大肠杆菌合成辅酶 Q 和细胞壁必不可少的物质,同时它又是青蒿素等具有重要药理作用的类异戊二烯生物合成的先导物质,这为利用大肠杆菌生产青蒿素提供了必需的物质基础。在大肠杆菌等原核生物中,FPP 是由异戊烯基焦磷酸(IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)在酶的作用下合成,细胞中 IPP 和 DMAPP 的量对大肠杆菌生产类异戊二烯化合物的效率非常重要^[35]。一般情况下,原核生物 IPP 和 DMAPP 都是来自于 DXP 的生物合成途径,与 MVA 途径不同,该途径中 IPP 和 DMAPP 的合成需经过两个不同的分支,从而增加了其生物合成的基因调控复杂性。Sandmann^[36]和 Huang^[37]及其合作者的研究表明,DXP 途径合成 IPP 和 DMAPP 的不足是大肠杆菌高效生产类异戊二烯化合物的主要障碍。1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)是 DXP 途径的起始酶,它对 IPP 和 DMAPP 的合成至关重要。Cunningham 等^[38]将藻青菌和植物 *LytB* 基因(功能尚未清楚)导入产类胡萝卜素工程菌,均能显著提高类胡萝卜素的产量,该基因表达产物可能起到平衡工程菌体内 IPP 和 DMAPP 相对量的作用。Kajiwarra 等^[39]将 IPP 异构酶编码基因 *idi* 在细菌中过量表达,结果提高了类异戊二烯的积累量。显然,通过对 DXP 途径关键酶的基因调控,在一定程度上提高了类异戊二烯化合物的产量,但由于 DXP 代谢途径调控复杂,特别是 IPP 和

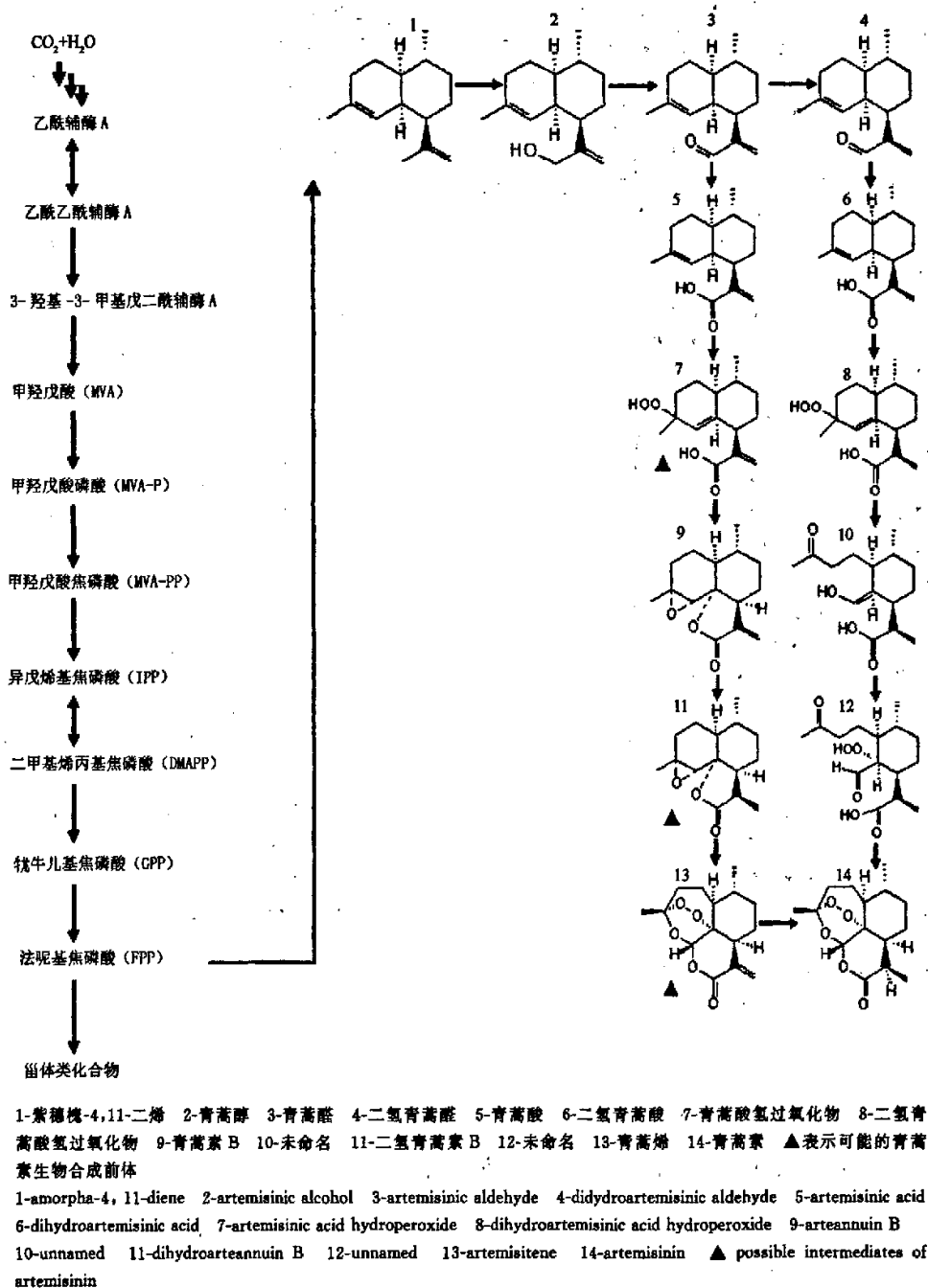


图1 推测的青蒿素生物合成途径

Fig. 1 Proposed pathway of artemisinin biosynthesis

DMAPP 存在两个生物合成分支,从而制约了目标物质产量的进一步提高。

2.2 外源 MVA 途径的构建: Martin 等^[40]绕过 DXP 途径,将酵母中 MVA 途径中 8 个关键酶基因组合,在大肠杆菌体内构建一条外源 MVA 途径。将 MVA 途径 8 个关键酶基因分解成两个操纵子,其中大肠杆菌乙酰辅酶 A 硫解酶基因 *atoB*、酵母 HMG (3-羟基-3-甲基戊二酰)辅酶 A 合酶基因

HMGs 和酵母去调节区 HMG 辅酶 A 还原酶基因 *iHMGs* 组装在同一个质粒载体 pMevT 中构成操纵子 MevT,而将酵母甲羟戊酸激酶基因 *ERG12*、酵母磷酸甲羟戊酸激酶基因 *ERG8*、酵母甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶基因 *MVD1*、大肠杆菌 IPP 异构酶基因 *idi* 和大肠杆菌 FPP 合酶基因 *ispA* 组装在另一个质粒载体 pMBIS 中构成操纵子 MBIS。将两质粒同时转入大肠杆菌,结果 8 个基因在该工程菌中全部表达,

并大量富集了FPP。虽然由于FPP的过量富集导致大肠杆菌停止生长,但该菌株为高效生产倍半萜类化合物提供了良好物质基础。Zahiri等^[41]的研究就是一个典型的应用实例,他们将根瘤农杆菌聚异戊烯焦磷酸合酶基因*ddsA*转入该工程菌,辅酶Q10最高产量达2428 μg/g干细胞,其产量为转野生大肠杆菌的6倍左右,且不需添加MVA而直接以葡萄糖为原料。其研究还表明,MVA途径构建在两个操纵子中较在一个操纵子中表达所积累的代谢目标产物水平要高^[41]。Pitera等^[42]增强了pMevT的表达,但必须同时额外增加*tHMGR*的表达量,以保证HMG辅酶A(HMG-CoA)能快速转化为MVA,消除其对宿主细胞的毒害作用,结果进一步积累了目标产物。

2.3 青蒿素生物合成相关基因的导入:2001年,Martin等^[43]将青蒿中*ADS*基因导入大肠杆菌,获得了紫穗槐-4,11-二烯,并消除了FPP对工程菌的毒害作用。但是,由于密码子的偏爱性,青蒿中的*ADS*基因在大肠杆菌中表达非常有限。为了提高植物*ADS*基因在大肠杆菌中的表达水平,Martin及其合作者后来采用点突变的方法,对*ADS*基因密码子进行了优化,结果紫穗槐-4,11-二烯产量提高了30~100倍^[40]。Picaud等^[44]深入研究了不同菌株、不同的诱导剂以及诱导剂浓度对*ADS*基因表达的影响,结果发现3因素对*ADS*的表达影响不大,但是在培养基中添加2.5 mmol/L甜菜碱和660 mmol/L山梨醇后,虽然重组菌生长速度减慢了,而诱导剂浓度对*ADS*基因表达量影响较大,通过改善诱导剂的浓度,*ADS*的产量比对照提高了7倍。Newman等^[45]对发酵工艺进行了优化,利用Martin构建的紫穗槐-4,11-二烯工程菌,采用两相发酵法,使紫穗槐-4,11-二烯的产量达到0.48 g/L。

3 酵母工程菌生产青蒿素

3.1 青蒿素生物合成相关基因导入:酵母是单细胞真核生物,无论在蛋白质的翻译后加工、基因的表达调控还是生理生化上,都与植物十分相似,酵母表达系统是一种理想的植物细胞基因表达体系。Lindahl等^[46]分别利用质粒载体和整合载体将青蒿紫穗槐-4,11-二烯合酶基因转入酵母中,通过对转基因酵母的16 d培养,均积累了紫穗槐-4,11-二烯产物。其中,通过高拷贝酵母表达质粒pYeDP60获得的转*ADS*基因酵母,紫穗槐-4,11-二烯产量达600 μg/L;而通过同源基因重组方式将*ADS*基因整合到酵母染色体的转基因酵母,积累了100 μg/L紫穗槐-4,11-二烯。Ro等将青蒿*ADS*基因亚克隆入pRS425质粒,转入酵母细胞中,在GAL1启动子的控制下得到了表达,合成了4.4 mg/L的紫穗槐-4,11-二烯。此后,他们又将细胞色素P450氧化还原酶基因*CPR*通过由半乳糖启动子控制的质粒载体,转入转*ADS*基因的酵母中,但未检测到青蒿酸产物,而将青蒿中P450单氧化基因*CYP71AV1*与*CPR*同时转入,在半乳糖的诱导下,转基因酵母积累了青蒿酸。

3.2 MVA途径的分子调控:3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶(HMGR)催化HMG-CoA形成MVA,由于MVA的形

成是一个不可逆过程,因此HMGR被认为是动物、植物、真菌可能也是昆虫的类异戊二烯代谢途径的一个限速酶^[47]。酵母菌中存在Hmg1p和Hmg2p两种同功HMGR,分别由*HMGR1*和*HMGR2*基因编码,均含有一个催化结构域和一个调控结构域。Donald等^[48]将去除调控区序列的*HMGR1*基因(*tHMGR*)导入酵母菌中,结果HMGR的表达量提高,从而酵母中角鲨烯的水平提高了10倍^[49]。Ro等用同样方法使得工程酵母菌生产紫穗槐-4,11-二烯的能力提高了5倍。角鲨烯合酶(*ERG9*)促进FPP向角鲨烯转变,不利于青蒿素的合成。Ro等将外源*ERG9*基因克隆入蛋氨酸抑制性启动子PMET3,与酵母中同源基因重组,在蛋氨酸的存在下抑制了酵母中的*ERG9*的表达,从而使紫穗槐-4,11-二烯的积累量提高了2倍。Davies等的研究发现UPC2是酵母细胞中一个重要转录因子,调控固醇生物合成,经半域突变后UPC2活性得以提高。Ro等通过过量表达半域突变等位基因*upc2-1*,在一定程度上提高了紫穗槐-4,11-二烯的产量;而过量表达FPP合酶基因*EGR20*,对紫穗槐-4,11-二烯积累影响不大。Ro等^[19]综合以上所有调控措施,结果紫穗槐-4,11-二烯的产量达153 mg/L,较Martin等利用工程大肠杆菌生产紫穗槐-4,11-二烯的产量提高了500倍。

3.3 丙酮酸脱氢酶旁路(pyruvate dehydrogenase bypass)调控:虽然通过对MVA生物合成途径的调控,有效提高了紫穗槐-4,11-二烯的量,但MVA生物合成途径的起始物乙酰辅酶A的供应不足是进一步提高产量的瓶颈。Boubekeur等发现酵母中存在一个丙酮酸脱氢酶旁路,该途径通过丙酮酸脱羧酶、细胞质乙酰脱氢酶和乙酰辅酶A合成酶的共同作用,将丙酮酸转变成乙酰辅酶A。由于乙酰辅酶A不能从线粒体转到细胞质中,因此该途径是酵母细胞质合成乙酰辅酶A的主要途径,对该途径中关键基因的调控是调节酵母细胞质中乙酰辅酶A水平的重要手段。Shiba等^[49]分别利用高拷贝质粒载体和整合载体,将酵母细胞中的丙酮酸脱氢酶基因*ALD6*过量表达,结果该酶的活性分别提高了19倍和4.6倍,但是紫穗槐-4,11-二烯的量却反而下降了。对酵母乙酰辅酶A合酶基因*ACS1*过表达的研究表明,乙酰辅酶A合酶的活性提高了2倍左右,并且紫穗槐-4,11-二烯的量提高了8%~23%。乙酰辅酶A合酶存在一个乙酰基化位点,其活性受乙酰基化和去乙酰基化调控。Starari等^[50]对沙门氏杆菌乙酰辅酶A合酶调控进行了深入的研究,结果发现,乙酰基转移酶对乙酰辅酶A合酶609位点的赖氨酸乙酰基化,则乙酰辅酶A合酶失活,NADP依赖性Sir2蛋白催化乙酰辅酶A合酶脱去乙酰基,从而使其恢复酶活性。在后续的研究中,将乙酰辅酶A合酶641位的脯氨酸替换为亮氨酸,可阻止乙酰辅酶A合酶的乙酰基化反应,使细胞能一直维持其酶活性。由于沙门氏杆菌乙酰辅酶A合酶乙酰基化位点与酵母菌具有高度保守性,因此酵母乙酰辅酶A合酶存在与沙门氏杆菌相似的翻译后调控机制。基于此,Shiba等^[49]通过高拷贝质粒载体将沙门氏杆菌乙酰辅酶A合酶去乙酰基化位点基因*L641P*与*ALD6*基因转入Ro等构建的产紫穗

槐-4,11-二烯工程酵母中,结果紫穗槐-4,11-二烯的量提高了1.9倍。

4 问题与展望

青蒿素作为治疗疟疾的特效药,在国际市场上供不应求。自从青蒿素被发现以来,科学家们便通过各种手段试图提高青蒿素的产量,但未能取得突破性进展。近年来,随着组合生物合成技术的迅速发展,为低成本获取青蒿素开辟了一条新途径,并已表现出非常诱人的前景,但要真正实现工业化生产,还有很多路要走。

首先,要尽快阐明青蒿素的完全生物合成途径。虽然利用工程微生物生产青蒿素取得了重大的进展,但目前还只能生产青蒿酸,由青蒿酸到青蒿素的转化还未能微生物体内完成^[10]。其主要原因是青蒿素的生物合成途径还未完全阐明。目前,青蒿酸和二氢青蒿酸的生物合成途径已完全了解,从二氢青蒿酸到青蒿素的途径与机制也在近年被揭示。但是,从青蒿酸到青蒿素的转化途径目前还没明确。目前主要有两个假说,其一是认为青蒿酸首先转化为二氢青蒿酸,然后再经过二氢青蒿酸的途径,但近年的研究结果并不支持这种假说;其二,是认为青蒿酸有一条独立于二氢青蒿酸的转化途径,虽然该途径还未完全弄清楚,但已有更多的研究支持这种说法,并且目前的研究结果显示,该途径可能是青蒿素在青蒿体内的主要生物合成途径,与二氢青蒿酸自发氧化途径不同,至少有两种酶参与。因此,综合现代分离纯化技术、现代仪器分析检测技术和同位素标记等技术,进一步深入探讨青蒿素的生物合成途径是非常必要的。

其次,克隆青蒿素生物合成相关的新基因。从青蒿素组合生物合成研究的发展历程可以看出,从ADS基因的发现到成功实现利用微生物高效生产青蒿素第一个特异前体紫穗槐-4,11-二烯,中间只用了2年多的时间,而细胞色素P450单氧化酶基因的克隆与青蒿酸的酵母工程菌的生产几乎在同一年内完成。因此,可以说青蒿素生物合成相关基因不但是在微生物中构建完整的青蒿素合成途径所必不可少的元件,也是推进该研究领域划时代发展的重要因素。青蒿酸的生物合成相关基因均已克隆,虽然有一些研究者已经分离或部分分离了参与青蒿酸向青蒿素转化的相关蛋白酶,但还未见相关蛋白序列分析的报道,更无相关基因的克隆与功能研究。由此可见,青蒿素生物合成新基因分离也是该研究领域必需尽快解决的问题。

再次,组合生物合成相关基础研究还需加强。组合生物合成已成为生产具有重要药理活性物质研究领域中的热点和重点研究方向,并日益表现出了它的优越性。另一方面,组合生物合成的有效运用也依赖于快速方便的基因操作技术的发展。将庞大的生物合成基因簇在异源体系中成功表达的同时,也表现出各种问题。其中最突出的问题是当外源基因或途径导入后,宿主细胞内部严格的基因调控系统被破坏,导致基因表达和酶活性失去平衡。同样,过量表达微生物单个基因也会导致宿主细胞前体物质或其生长、繁殖所需的能量过度消耗^[52],或者对过量的外源蛋白产生抗拒反应。酶蛋

白总活性的失衡会严重影响细胞代谢的正常碳代谢流,在细胞内积累一些对细胞毒害作用的中间体或副产物,从而降低微生物的繁殖速度和产率。因此,如何开发新的高效宿主-载体系统,如何有效平衡外源生物合成途径,仍然是该领域的研究重点。

此外,发酵工艺的改良与创新对实现组合生物合成青蒿素工业化生产具有重要意义。利用代谢工程改造的微生物合成青蒿素,还处在实验室水平,目前还未实现工业化生产。应用现代发酵工程技术,建立高效的菌株发酵和产品纯化回收工艺,是实现青蒿素工程微生物规模化生产的必由途径。因此,发酵工艺的改良与创新也是今后一个重要的研究方向。

总之,虽然目前还没有构建青蒿素的完全生物合成途径,但有理由相信,在不久的将来,利用廉价易得的碳源为底物的微生物生物合成法将成为制备青蒿素的主要方法。

References

- [1] World Health Organization. *World Malaria Report* [R]. 2005.
- [2] Korenromp E L, Williams B G, Gouws E, *et al.* Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy [J]. *Lancet Infect Dis*, 2003(3): 349-358.
- [3] Vennerstrom J L, Arbe-Barnes S, Brun R, *et al.* Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate [J]. *Nature*, 2004, 430(7002): 900-904.
- [4] Eckstein-Ludwig U, Webb R J, van Goethem I D A, *et al.* Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum* [J]. *Nature*, 2003, 424: 957-961.
- [5] Enserink M. Infectious diseases: source of new hope against malaria is in short supply [J]. *Science*, 2005, 307(5706): 33.
- [6] Yadav J S, Babu R S, Sabitha G. Total synthesis of (+) artemisinin [J]. *Archive Org Chem*, 2003, 3: 125-139.
- [7] Julsing M K, Koulman A, Woerdenbag H J, *et al.* Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites [J]. *Biomol Eng*, 2006, 23(6): 265-279.
- [8] Lichenthaler H K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 47-65.
- [9] Wang H, Ye H C, Liu B Y. Advances in molecular regulation of artemisinin biosynthesis [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2003, 19(6): 646-650.
- [10] Bouwmeester H J, Wallart T E, Janssen M H A, *et al.* Amorpho-4-11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 843-854.
- [11] Picaud S, Mercke P, He X, *et al.* Amorpho-4, 11-diene synthase: mechanism and stereochemistry of the enzymatic cyclization of farnesyl diphosphate [J]. *Archives Biochem Biophys*, 2006, 448: 150-155.
- [12] Sangwan R S, Singh-Sangwan N, Luthra R. Metabolism of acyclic monoterpenes, partial purification and properties of geraniol dehydrogenase from lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) [J]. *J Plant Physiol*, 1993, 142(2): 129-134.
- [13] Funk C, Croteau R. Diterpenoid resin acid biosynthesis in conifers: characterization of two cytochrome P450-dependent monooxygenases and an aldehyde dehydrogenase involved in abietic acid biosynthesis [J]. *Archives Biochem Biophys*, 1994, 308(1): 258-266.
- [14] De Kraker J W, Franssen M C R, Dalm M C F, *et al.* Biosynthesis of germacrene carboxylic acid in chicory roots;

- demonstration of a cytochrome P450 (+) germacrene a hydroxylase and NADP⁺-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125(4): 1930-1940.
- [15] Woerdenbag H J, Bos R, Salomons M C, *et al.* Volatile constituents of *Artemisia annua* L. [J]. *Flavour Fragrance J*, 1993, 8(3): 131-137.
- [16] Berteau C M, Freije J R, van Der Woude H, *et al.* Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Planta Med*, 2005, 71: 40-47.
- [17] Bogers R J, Craker L E, Langer D. *Medicinal and Aromatic Plants* [M]. Amsterdam: Springer, 2006.
- [18] Teoh K H, Polichuk D R, Reed D W, *et al.* *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal cyp71av1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 1411-1416.
- [19] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440(13): 940-943.
- [20] Wang Q, Xia Z Q, Zhou F Y, *et al.* Studies on biosynthesis of artemisinic acid (I), the key intermediate-*artemisinic acid* in biosynthesis of artemisinin and arteannuin B [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 1988, 46: 1152-1153.
- [21] Wang Q, Xia Z Q, Zhou F Y, *et al.* Studies on biosynthesis of artemisinin (N), Biosynthesis of artemisinin and arteannuin B by cell free extract of *Artemisia annua* L. leaf [J]. *Chin J Chem* (中国化学杂志), 1993, 11: 452-463.
- [22] Sangwan R S, Agarwal K, Kuthra R, *et al.* Biotransformation of artemisinic acid into arteannuin B and artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34: 1301-1302.
- [23] Nair M S R, Basile D V. Bioconversion of arteannuin B to artemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56: 1559-1566.
- [24] Bharel S, Gulati A, Abidin M Z, *et al.* Enzymatic synthesis of artemisinin from natural and synthetic precursors [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61: 633-636.
- [25] Abidin M Z, Israr M, Srivastava P S, *et al.* *In vitro* production of artemisinin: a novel antimalarial compound from *Artemisia annua* L. [J]. *J Med Arom Plant Sci*, 2000, 22 (4A): 378-384.
- [26] Dhingra V, Rajoli C, Narasu M L. Partial purification of proteins involved in the bioconversion of arteannuin B to artemisinin [J]. *Bioresour Technol*, 2000, 73: 279-282.
- [27] Dhingra V, Rajoli C, Narasu M L. Purification and characterization of enzyme involved in the bioconversion of arteannuin B to artemisinin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281: 558-561.
- [28] Tatineni R, Doddapaneni K K, Dalavayi S, *et al.* *Microbacterium trichotecenolyticum* enzyme mediated transformation of arteannuin B to artemisinin [J]. *Process Biochem*, 2006, 41(12): 2464-2467.
- [29] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of dihydroartemisinin acid in *Artemisia annua* Plants [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60: 1139-1159.
- [30] Wallaart T E, Van Uden W, Lubberink H G M, *et al.* Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its possible role in the biosynthesis of artemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 430-433.
- [31] Wallaart T E, Pras N, Quax W J. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid hydroperoxide from *Artemisia annua*: a novel biosynthetic precursor of artemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 1160-1162.
- [32] Sy L K, Brown G D. The mechanism of the spontaneous autoxidation of dihydroartemisinic acid [J]. *Tetrahedron*, 2002, 58: 879-908.
- [33] Sy L K, Brown G D. The role of the 12-carboxylic acid group in the spontaneous autoxidation of dihydroartemisinic acid [J]. *Tetrahedron*, 2002, 58: 909-923.
- [34] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60: 1139-1159.
- [35] Leyes A E, Baker J A, Hahn F M, *et al.* Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*, stereochemistry of the reaction catalyzed by isopentenyl diphosphate, dimethylallyl diphosphate isomerase [J]. *Chem Commun*, 1999: 717-718.
- [36] Sandmann G. Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: a powerful approach for the biosynthesis of novel structures [J]. *Chem Bio Chem*, 2002, 3: 629-635.
- [37] Huang Q L, Roessner C A, Croteau R, *et al.* Engineering *E. coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2001, 9: 2237-2242.
- [38] Cunningham F X, Lafond T P, Gantt E, *et al.* Evidence of a role for lytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182: 5841-5848.
- [39] Kajiwar S, Fraser P D, Kondo K, *et al.* Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosyntheses in *Escherichia coli* [J]. *Biochem J*, 1997, 324: 421-426.
- [40] Martin V J J, Pitera D J, Withers S T, *et al.* Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. *Nature Biotechnol*, 2003, 21(7): 796-802.
- [41] Zahiri H S, Yoon S H, Keasling J D, *et al.* Coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli* strains engineered with a heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway [J]. *Metabolic Eng*, 2006, 8: 406-416.
- [42] Pitera D J, Paddon C J, Newman J D, *et al.* Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Eng*, 2007, 9 (2): 193-207.
- [43] Martin V J J, Yoshikuni Y, Keasling J D. The *in vivo* synthesis of plant sesquiterpenes by *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 75: 497-503.
- [44] Picaud S, Olsson M E, Brodelius P E, *et al.* Improved conditions for production of recombinant plant sesquiterpene synthases in *Escherichia coli* [J]. *Protein Exp Purificat*, 2007, 5(1): 71-79.
- [45] Newman J D, Marshall J, Chang M, *et al.* High-level production of amorph-4, 11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95(4): 684-691.
- [46] Lindahl A L, Olsson M E, Mercke P, *et al.* Production of the artemisinin precursor amorph-4, 11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 571-580.
- [47] Hampton R, Dimster-Denk D, Rine J. The biology of HMGCoA reductase: the pros of contra-regulation [J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 140-145.
- [48] Donald K, Hampton R, Fritz I. Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 3341-3344.
- [49] Shiba Y, Paradise E M, Kirby J, *et al.* Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids [J]. *Metabolic Eng*, 2007, 9(2): 160-168.
- [50] Starai V J, Escalante-Semerana J C. Identification of the

protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica* [J]. *J Mol Biol*, 2004, 340: 1005-1012.

- [51] Starai V J, Gardner J G, Escalante-Semerena J C. Residue Leu-641 of acetyl-CoA synthetase is critical for the acetylation of residue Lys-609 by the protein acetyltransferase

enzyme of *Salmonella enterica* [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 26200-26205.

- [52] Jones K L, Kim S W, Keasling J D. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria [J]. *Metab Eng*, 2000, 2: 328-338.

超临界 CO₂ 萃取工艺集成与中药提取分离现代化

雷华平¹, 葛发欢², 卜晓英¹

(1. 吉首大学 湖南省林产化工工程重点实验室, 湖南 张家界 427000; 2. 中药提取分离过程现代化国家工程研究中心, 广东 广州 510240)

摘 要: 分析了超临界 CO₂ 萃取技术应用于中药提取分离的优势和局限性。结合实例阐述了超临界 CO₂ 萃取技术与其他提取分离技术工艺集成用于中药提取分离的可行性和优越性。研究认为发展该工艺集成技术对实现中药现代化有重要意义。

关键词: 超临界 CO₂ 萃取; 工艺集成; 中药

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1431-03

Process integration of supercritical CO₂ extraction for modernization of extraction and separation of Chinese materia medica

LEI Hua-ping¹, GE Fa-huan², BU Xiao-ying¹

(1. Key Laboratory of Hunan Forest Product and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China; 2. National Engineering Center for Modernization of Extraction and Separation Processing of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China)

Key words: supercritical CO₂ extraction; process integration; Chinese materia medica

十多年来,国内超临界 CO₂ 萃取应用于中药提取分离走过了一条较为漫长的路,从最初的疑虑,到逐渐成为研究的热点,到现在其已成为中药现代化的关键技术之一。至今大量研究表明超临界 CO₂ 萃取技术应用于中药开发是可行的,并且显示了其独特的优越性。与传统的中药提取方法相比,超临界 CO₂ 萃取具有很多优点,但超临界 CO₂ 萃取也有某些局限性。本文结合中药提取分离过程现代化国家工程研究中心建设与发展过程中应用超临界 CO₂ 萃取技术的实践,阐述如何将超临界 CO₂ 萃取与其他提取分离技术集成,发挥它们工艺集成的优势,实现中药提取分离的现代化。

1 超临界 CO₂ 萃取是一种优越的提取分离技术

超临界 CO₂ 萃取作为一种单元技术,兼有高产率和高效率的特性。该技术萃取中药,提取率高,有效成分不被破坏;并且最大限度地获取有用成分的同时,能选择性地萃取与分离。通过优选萃取压力等条件可以将需要的某一类成分选择性地萃取出来,也可以通过优化分离条件选择性地将目标成分与杂质进行初步分离,从而富集目标成分。超临界

CO₂ 萃取技术从整体上看是一种单元技术,某种程度上,它又是一种集成技术,它集提取分离浓缩为一体,在萃取的同时就进行萃取物的分离与浓缩。对于添加夹带剂的萃取,也可通过多级分离将大部分夹带剂从萃取液中分离出来。

超临界 CO₂ 萃取中药,与传统方法相比,具有提取率高、操作温度低、中药有效成分不被破坏、无有机溶剂残留和工艺简单等优点^[1,2]。该技术对中药挥发油、脂肪油、香豆素、萜类、生物碱和酯类等有效成分的提取分离,基本可以独立完成,具有其他技术无可比拟的优越性。如利用超临界 CO₂ 技术从黄花蒿中萃取青蒿素,青蒿素是一种倍半萜,由于其分子中含有一个过氧基团,对湿热不稳定,用有机溶剂提取易被破坏分解;而用超临界 CO₂ 提取,提取率可达 92% 以上,收率提高了 1.9 倍^[3,4]。笔者用超临界 CO₂ 萃取技术制备鸦胆子油,发现该技术具有萃取收率高、产品品质好、工艺简单和生产周期短等优点,可利用脂肪酸、油中聚合物与甘油酯沸点的不同,完成脱胶过程,并可起到脱胶、脱臭、脱色效果,大大简化后续工艺^[5]。

收稿日期: 2006-11-17

基金项目: 湖南省科技计划项目 (06FJ3009)

作者简介: 雷华平 (1979—), 男, 湖南郴州人, 讲师, 硕士, 主要从事超临界 CO₂ 萃取技术与中草药提取分离现代化研究。

Tel: (0744) 8231386 E-mail: audenlei@163.com