DOI:10.12441/spyswjs.20220505002 [文章编号] 1673-1689(2024)10-0001-11

重要活性维生素25-羟基维生素D_3生产技术研究进展

徐志南[1,2] 田书毓[1,2] 毕 可[1,2] 黄 磊[1,2] 连佳长[1,2]

(1. 浙江大学化学工程与生物工程学院,浙江 杭州 310013;2. 浙江大学生物工程研究所,浙江 杭州 310013)

摘要:25-羟基维生素D_3(25-hydroxyvitamin D_3,25(OH)VD_3)是维生素D_3(vitamin D_3,VD_3)在人和动物体内发挥作用的主要存在形式,具有比VD_3更高的生物效价,且能大大减轻肝脏代谢负担,因而成为具有重要发展前景的食品和饲料添加剂。目前主要通过从天然原料和食品加工副产物中提取天然甾醇,再经多步化学反应实现小规模生产。但这一生产路线存在原料来源受限、天然甾醇分离纯化难度大、后续化学合成步骤多和产率低等缺点。近年来随着合成生物学的快速发展,已涌现多种生物催化生产和利用合成生物学技术构建工程酵母生产等新技术。作者首先介绍了化学全合成和化学半合成法的优缺点,综述了以VD_3为原料通过生物催化合成25(OH)VD_3的研究进展,重点介绍了工程酵母生物合成25(OH)VD_3的最新技术,对其工业化生产技术的发展前景开展较深入的探讨。

关键词:25-羟基维生素D_3;生物合成;生物转化;维生素D_3

Research Progress on Efficient Production Technologies of Important Active Vitamin 25-Hydroxyvitamin D_3

XU Zhinan[1,2] *TIAN Shuyu*[1,2] *BI Ke*[1,2] *HUANG Lei*[1,2] *LIAN Jiazhang*[1,2]

(1. College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310013, China; 2. Institute of Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310013, China)

Abstract: 25-Hydroxyvitamin D_3 (25-hydroxyvitamin D3,25(OH)VD_3) is recognized as the primary active metabolite of vitamin D_3 (VD_3) in humans and animals. Compared with VD_3, higher physiological potency is exhibited, and the metabolic burden on the liver is significantly reduced, making it regarded as an important food and feed additive with growing market demand. At present, 25(OH)VD_3 is primarily produced on a small scale through chemical derivatization using sterols isolated from natural raw materials. However, several limitations are associated with this production process, including restricted raw material sources, the high cost of natural sterol separation and purification, and low overall yield due to the numerous chemical synthesis steps involved. With the rapid advancement of synthetic biology, various promising technologies have been developed, including the biotransformation of intermediates in the VD_3 synthetic pathway and even one-step production from glucose using engineered yeast. In this review, the advantages and disadvantages of total or semi-synthesis methods were introduced first, followed by a summary of the biotransformation of 25(OH)VD_3 from VD_3, and a detailed discussion is provided on the latest advances in the biosynthesis of 25(OH)VD_3 from glucose using engineered yeast. It is expected that this work will facilitate the exploration of promising industrial strategies for 25(OH)VD_3 in the future.

Keywords: 25-hydroxyvitamin D_3; biosynthesis; biotransformation; vitamin D_3

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2021YFC2103200);浙江省重点研发择优资助项目(2021C03006)。

通信作者:徐志南(1966—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事生物制药和合成生物学研究。E-mail:znxu@zju.edu.cn

收稿日期:2022-05-05 **修回日期:**2022-12-10

25(OH)VD_3是VD_3在人和动物体内主要的血液循环代谢物[1]，其生物效价是VD_3的3~5倍[2]。25(OH)VD_3在促进人和动物骨骼生长发育中具有重要作用，缺乏25(OH)VD_3会导致进行性骨质流失、佝偻病和骨折[3]。此外，25(OH)VD_3还在生殖、免疫、代谢和心血管等系统中发挥保护功能[4-7]。血清中25(OH)VD_3水平过低不仅会增加呼吸道感染的风险[8-10]，还与COVID-19的预防及治疗密切相关[11-12]。在畜牧养殖行业中，以25(OH)VD_3代替VD_3作为饲料添加剂，可以有效提高动物血清中25(OH)VD_3的水平，更高效地发挥其生理作用[13]。例如，25(OH)VD_3在家禽饲料中作为日粮添加剂，不仅能够显著促进其生长[14]，还能有效提高家禽的免疫力和繁殖能力[15]。

目前25(OH)VD_3的生产规模相对较小，主要依赖于生物-化学耦合法，即从生物组织中提取甾醇原料，再经连续化学反应合成。此类原料在自然个体中的含量较低，提取工艺复杂，难以满足日益增长的工业生产需求。如何低成本、大规模地获得合成原料仍是25(OH)VD_3工业化生产所面临的挑战。此外，现有的化学合成技术因步骤烦琐、转化率低且副产物多，不仅增加了生产成本，还带来了环境污染等诸多问题，限制了25(OH)VD_3工业化生产的进一步发展。

随着合成生物学的发展，利用重组表达动物或微生物来源的VD_3羟化酶催化VD_3转化为25(OH)VD_3的新方法逐渐建立。生物催化法具有反应条件温和、成本低廉、环境友好等优点。如图1所示，为进一步摆脱对甾醇原料的依赖，以葡萄糖为起始原料，通过从头合成获得25(OH)VD_3的光催化前体25-羟基-7-脱氢胆固醇(25-hydroxy-7-dehydrocholesterol，25-OH-7-DHC)，是一种有望替代传统生物-化学耦合法的新型合成策略。作者进一步介绍了25(OH)VD_3的4种生产技术及研究进展，并对其研究方向进行了展望。

1 化学全合成

化学全合成的思路包括分别合成A环和CD环两部分，再通过缩合或偶联等方法将两部分组装起来形成目标产物。Kabat等[16]以2-环戊烯酮为原料，经过9步反应制得A环，然后与CD环进行偶联，最终通过1-脱氧环丙基乙烯基醇在溶剂中进行分解

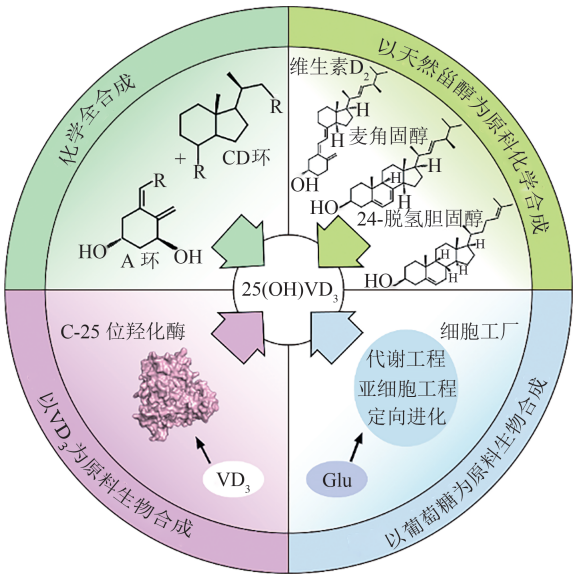


图1 25(OH)VD_3生产技术方法概述

Fig. 1 Overview of production technology and method of 25(OH)VD_3

重排，获得25(OH)VD_3的产率为13.5%。在化学全合成过程中，CD环的高效合成是研究的关键。Marczak等[17]开发了一种7步合成CD环的方法，采用双Mukaiyama-Michael共轭加成法，最终CD环的总产率为7%。但该合成途径副产物较多，导致产率低且分离难度大。为了解决这一问题，Michalak等[18]开发了新的CD环合成路径，经过6步反应，最终产率提高至31%。目前，化学全合成法仅限于文献报道，所需试剂和催化剂价格较高，且A环和CD环分别合成后再进行偶联，反应步骤烦琐，总产率通常低于10%，无法实现工业化生产。

2 以天然甾醇为原料化学合成

25(OH)VD_3的化学半合成通常是从天然产物或食品加工副产物中分离提取结构相近的天然甾醇，再经过一系列化学反应合成活性VD_3。由于各种原料具有不同的甾醇结构，因此需要采用不同的合成策略，如图2所示。一般的合成流程是先合成25-OH-7-DHC，再通过光催化开环和热异构化生成25(OH)VD_3。

2.1 天然甾醇原料的获取

麦角固醇是合成25(OH)VD_3的原料之一，在酵母和真菌中含量较为丰富，工业上主要通过酵母菌菌体和各种真菌废弃菌丝体分离纯化获得[19]。有研究者尝试从抗生素废菌渣中提取麦角

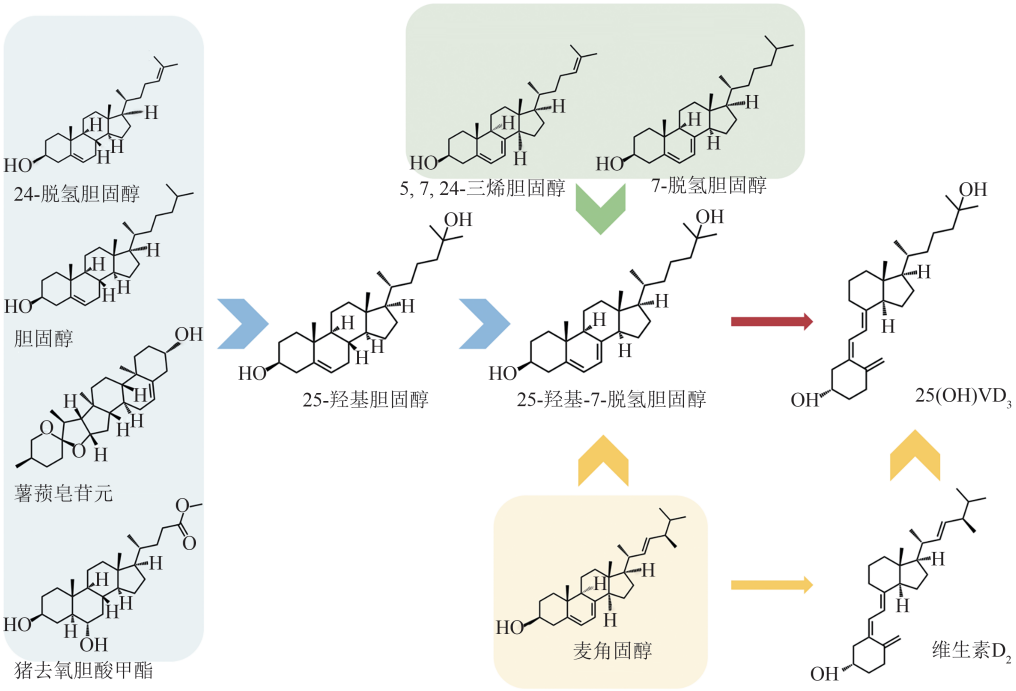


图2　从原料到25(OH)VD_3的合成思路概述

Fig. 2　Overview of synthetic ideas from raw materials to 25(OH)VD_3

固醇。经过条件优化，从青霉素菌丝体中提取的麦角固醇纯度可达70%，提取率为95%[20]。有研究表明，从红曲菌废渣中一次性综合提取红曲色素、粗蛋白质、麦角固醇和壳聚糖，其中麦角固醇得率为4.16%[21]。

羊毛脂和猪脑中胆固醇含量较为丰富，因此作为原料被广泛应用于工业生产胆固醇[22]。从羊毛脂衍生物羊毛醇中提取的胆甾醇产品纯度高于90%，产率可达77%。猪去氧胆酸甲酯也是一种有潜力的合成原料，可从提取胆红素后的“废料”猪胆粉中继续提取，纯度大于98%[23]。薯蓣皂苷元则主要由薯蓣植物经酸水解获得[24]，可利用赤霉菌糖苷酶将黄姜薯蓣皂苷转化为薯蓣皂苷元，转化率可达60%[25]。以薯蓣皂苷元为原料的主要优势在于其产量高、价格低廉。

2.2　以25-羟基胆固醇为中间化合物的合成途径

25-羟基胆固醇是合成25(OH)VD_3的重要中间化合物。如图2中的蓝色路径所示，提取的胆固醇、薯蓣皂苷元、24-脱氢胆固醇以及猪去氧胆酸甲酯都要先经过一系列化学反应转化为25-羟基胆固醇。王建塔等[26]以胆固醇为原料，经4步反应合成了25-羟基胆固醇，产率为62.7%。彭逸华等[27]以猪去氧胆酸甲酯为原料合成25-羟基胆固醇，产率为20.6%。金灿等[28]报道了一种以24-脱氢胆固醇为原料，以25-羟基胆固醇为中间体合成25(OH)VD_3的8步反应工艺路线，总产率为34%，目前已实现工业化生产。林静容等[29]利用薯蓣皂苷元的完整骨架，经16步反应合成了1α,25-二羟基维生素D_3的光化学前体，产率为7.6%。该途径中间体为25-羟基胆固醇，表明薯蓣皂苷元也具有合成25-OH-7-DHC的潜力。但合成途径冗长、总产率较低，有待开发更高效的合成方法。

2.3　其他25-OH-7-DHC的合成途径

以C-7位已有双键的甾醇为原料合成25-OH-7-DHC时，通常不经过中间体25-羟基胆固醇，如图2所示。有研究者[30]从麦角固醇出发，提出了一种8步反应法，最终获得的25-OH-7-DHC总产率为30%。该合成条件非常温和，但后续分离纯化操作困难。此外，麦角固醇经光催化开环和热异构后可转化为维生素D_2(vitamin D_2, VD_2)。直接以VD_2为合成原料的优势在于省去了光催化步骤。以VD_2为底物，通过臭氧破坏侧链上的双键结构，再与有机磷修饰侧链发生Wittig反应，还原和去除保护基团得到25(OH)VD_3[31]。然而，反应的总产率仅为25%，且使用了污染环境的磷试剂，无法在工业生产中应用。以5,7,24-三烯胆固醇为原料，采

用 4 步法合成 25-OH-7-DHC，反应产率高达 72.4%[32]。但由于该原料较难获取，不适于大规模工业化生产。相比之下，与其结构相似的 7-脱氢胆固醇（7-dehydrocholesterol，7-DHC）具有成熟的工业生产链，因此以 7-DHC 为原料可有效降低成本并具有显著的工业化优势。有研究者以 7-DHC 为原料，用溴化铜催化 C-25 位酯化反应，再经 $LiAlH_4$ 还原得到 25-OH-7-DHC[33]。但反应的选择性差，导致副产物多，该方法仍需进一步优化。

2.4 25-OH-7-DHC 的开环与异构化

25-OH-7-DHC 转化为 25（OH）VD_3 与 7-DHC 转化为 VD_3 的过程类似，都需要经过光催化开环和热异构化两步。光催化步骤会无选择性地产生副产物光甾醇和速甾醇，导致目标产物产率较低，产物分离困难。已有研究者通过优化反应条件和升级反应器等工艺来解决这一问题。刘建刚等[34]通过控制转化率、反应温度等条件，减少了 7-DHC 光催化过程中副产物的生成，最终 VD_3 的总产率为 34%。Fuse 等[35]使用光微反应器替代传统的间歇反应器，采用两步连续流动法高效合成 VD_3，产率为 32%。Niu 等[36]成功制备了具有高发射效率的光致发光颗粒涂覆的基板，使 UVB 发射强度增加约 11 倍，同时降低了不利于反应的 UVC 辐射，使 VD_3 的产率提高了 42%。结果也表明，增强 UVB 照射有助于减少副反应的发生。

表 1 显示了已报道的化学半合成 25（OH）VD_3（包括 25-OH-7-DHC）的原料和产率。化学半合成法是目前工业生产中广泛使用的方法，但由于化学催化无法实现甾醇侧链的一步羟基化，需要进行多次的官能团保护与脱保护，导致反应步骤多、产率低。反应过程及原料提取中使用到大量的酸碱试剂和催化剂等有害成分，也会造成环境污染。化学半合成法依赖天然甾醇的供应，这不仅导致生产成本较高，还存在原料受时空限制和依赖进口等问题。

3 以 VD_3 为原料生物合成

以 VD_3 为原料的生物合成法可经一步催化反应直接获得 25（OH）VD_3，见图 3。合成方法的优化一般从以下 3 方面着手：VD_3 羟化酶及辅酶系统的选择、VD_3 羟化酶的定向进化和催化条件的优化。

3.1 VD_3 羟化酶及辅酶系统

VD_3 的 C-25 位羟化酶广泛存在于自然界中，绝大多数属于细胞色素 P450 酶（cytochrome P450 enzymes，CYP450s）家族，用于生产 25（OH）VD_3 的 CYP450s 重组系统见表 2。

表 1 化学半合成法的原料及产率

Table 1 Raw materials and yield of chemical semi-synthesis method

原料	反应步骤	25（OH）VD_3 产率/%	25-OH-7-DHC 产率/%	参考文献
麦角固醇	8	30	—	[30]
24-脱氢胆固醇	8	34	—	[28]
VD_2	7	25	—	[31]
5,7,24-三烯胆固醇	4	—	72.4	[32]

注：“—”表示文献中未提及。

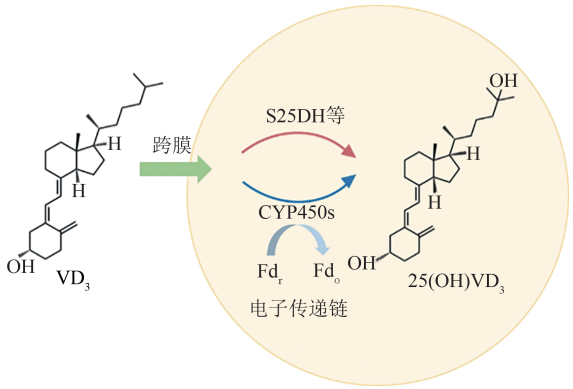


图 3 以 VD_3 为原料生物合成 25（OH）VD_3 的示意图

Fig. 3 Schematic diagram of biosynthesis of 25（OH）VD_3 from VD_3

电子传递链对 CYP450s 的催化效率至关重要，大多数 CYP450s 必须依赖一种或多种氧化还原分子伴侣。因此，在体外构建催化系统时需要添加辅因子 NAD（P）H 和电子传递链，在全细胞系统中也需要共表达辅助电子传递的氧化还原伴侣蛋白。目前，广泛使用的人工电子传递链有铁氧还蛋白（Fdx）-铁氧还蛋白还原酶（FdxR）和肾上腺素（Adx）-肾上腺素还原酶（AdxR）等[45-46]。CYP450s 催化反应时，电子的传递方向一般是 NAD（P）H→FdxR→Fdx→P450[47]，见图 4。此过程中，CYP450s、电子传递链、辅因子 NAD（P）H 和底物之间的相互选择非常重要。找到最适的组合方式可以显著提高酶的催化效率和区域选择性[48-49]。有研究表明，在磺酰脲 R7402 的代谢中，CYP105A1 与浅灰链霉菌中铁氧还蛋白 Fd-2 的共同催化活性是与菠菜 Fdx 共同催化活性的 15 倍左右[48]。有研究者将 CYP105A1 在大肠杆菌中表达并纯化，比较了以

表2　生产25(OH)VD_3的CYP450s重组系统概述

Table 2　Overview of recombinant CYP450s systems for production of 25(OH)VD_3

宿主菌	酶	转化时间/h	产量/(mg/L)	转化率/%	生产强度/(mg/(L·h))	参考文献
酿酒酵母	CYP2R1	24	0.385	9.6	0.016	[37]
红串红球菌	Vdh	16	342	10~17	21.38	[38]
	Vdh(T107A)	2	573	71.5	286.5	[39]
链霉菌	CYP105A2	72	20	10	0.278	[40]
	CYP105A1(R73V/R84A)	48	7.8	38.9	0.163	[41]
巨大芽孢杆菌	CYP109E1	24	24.5	31.4	1.021	[42]
	CYP109E1(I85A)	24	45.0	55.0	1.875	[42]
	CYP109A2	48	143	24.8	2.979	[43]
	CYP109A2(T103A)	48	282.7	49	5.890	[43]
	CYP27A1	48	80.81	70	1.684	[44]

Fd-2和菠菜Fdx作为电子供体对VD_3催化性质的影响[50]。结果显示，两者中CYP105A1的电子传输效率几乎相同，表明整体电子传输效率的关键步骤可能因底物而异。Fu等[51]在CYP105A1的体外重组系统中引入了不动杆菌(*Acinetobacter*)的电子传递链AciB (Fdx)-AciC(FdxR)，结果显示与NAD(P)H相比，电子传递链更倾向于优先利用NADH，表明电子传递蛋白对辅因子有选择偏好性。

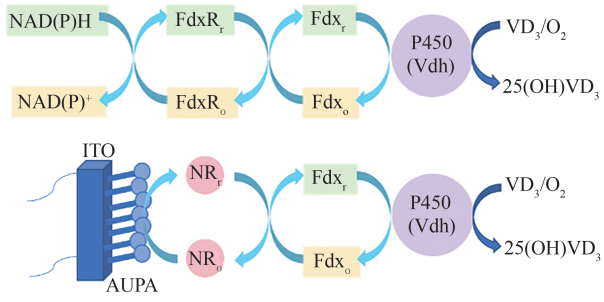


图4　经典CYP450s电子传递链和电化学P450系统

Fig. 4　Classical CYP450s electron transport chain and electrochemical P450 system

即使宿主细胞自身可以表达内源性氧化还原伴侣蛋白，CYP450s和氧化还原伴侣蛋白的共表达仍是增强其催化性能所必需的。自养假诺卡氏菌(*Pseudonocardia autotrophica*)中天然存在CYP450s电子供体系统，然而有研究表明将Vdh单独表达时，其对VD_3的C-25位羟化活性较弱；当与氧化还原伴侣蛋白ThcC和ThcD共表达时，C-25位羟化活性提高了约6倍[52]。

与上述生物供电子系统不同，有研究者创新性地构建了电化学P450系统[47]，如图4所示。筛选到最适合的有机介质中性红，使用氨基十一烷基磷酸改变氧化铟锡电极表面的亲水性，有效抑制了氧气分子被还原成活性氧，延缓电极表面酶的失活并避免了电子流的浪费。在此系统下采用Vdh粗提物电解30 min，25(OH)VD_3产量是常规NAD(P)H系统产量的2倍。

非CYP450s虽然在VD_3羟化酶中占比较小，但体外催化试验证明，其具有优异的区域选择性，同时无需构建复杂的电子传递链。使用来自真菌灰盖拟鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)的过氧化物酶，以0.05 mmol/L的VD_3为底物，体外催化60 min内完全转化为25(OH)VD_3，区域选择性达到100%[53]。相较于CYP450s，该过氧化物酶不依赖复杂的电子供体系统，具有良好的区域选择性，是一种有潜力的工业生物催化剂。

有研究报道了一种来自厌氧反硝化菌*Sterolibacterium denitrificans*的类固醇C-25位羟化酶S25DH，该酶属于DMSO还原酶家族的钼酶，能够在无氧条件下催化羟基和氧原子转移反应[54]。在2-羟丙基-β-环糊精和电化学再生电子受体$K_3[Fe(CN)_6]$的存在下，*Sterolibacterium denitrificans*粗提物可以在胆固醇诱导条件下高效催化VD_3转化为单一产物25(OH)VD_3，底物转化率超过99%。但S25DH难以从野生菌中富集，且对氧敏感、不稳定，同时野生菌粗提物中含有多种同工酶，这在很大程度上限制了其应用。因此有研究者利用β变形杆菌纲中具有反硝化功能的陶厄氏菌(*Thauera aromatica*)构建了S25DH的异源表达平台，成功表达了4种具有不同底物特异性的S25DH同工酶[55]。其中，S25DH1是4种同工酶中将VD_3羟化为

25(OH)VD_3的最佳催化剂，在陶厄氏菌中催化产量较野生菌提高了6.4倍。通过陶厄氏菌粗提物转化VD_3，不仅提升了VD_3转化率且缩短了催化时间，同时降低了对氧环境的敏感性。此外，由于陶厄氏菌中缺乏类固醇降解酶，利用其粗提物进行VD_3转化时无须额外添加$AgNO_3$等降解抑制剂，降低了催化成本，同时也降低了类似复杂物分离的难度。

另外，研究发现粉蓝烟草等多种茄科植物组织的脂质中含有7-DHC、VD_3和25(OH)VD_3等，表明其体内可能含有其他VD_3代谢相关酶[56]。Tang等[57]以VD_3为唯一碳源，从土壤中分离得到一株蜡样芽孢杆菌。通过优化催化条件和溶剂体系，最终在5 L生物反应器中获得830 mg/L的25(OH)VD_3，产率为41.5%。以上研究均表明还有新的VD_3羟化酶等待开发。

3.2 VD_3羟化酶的定向进化

底物与酶的结合方式、酶的构象(开放或闭合)以及酶的局部柔性都对催化活性有较大影响。对于一些羟化酶来说，VD_3并不是最适天然底物，意味着底物结合口袋并不是针对VD_3的最佳结构，这为通过改变酶结构来提高酶活性提供了可行性。

随机突变结合高通量筛选获得高产突变体是定向进化中常用的手段。Fujii等[52]在自养假诺卡氏菌的Vdh酶中引入随机突变，筛选出与活性相关的8个氨基酸位点，最终得到一个活性提高了21.6倍的最佳4位点组合突变体Vdh-K1(T70R/V156L/E216M/E384R)。Yasutake等[58-59]使用X射线衍射法测定了Vdh-WT及Vdh-K1与底物结合的结构。结果表明，4个氨基酸的取代使酶构象从开放状态变为闭合状态，增强了与氧化还原伴侣蛋白的亲和力。

计算机技术的高速发展为酶的半理性设计带来突破性进展。通过分子模拟和分子对接，可以更加高效和准确地分析酶的结构以及酶与底物的结合位置。有研究者通过分子动力学模拟和调控分子动力学模拟，比较了Vdh突变体Vdh-K1在结构、结合自由能以及酶与底物之间相互作用力等方面的变化。通过半理性设计，构建了新的Vdh突变体VdhT107A，其羟化活性约为野生型的80倍[39,60]。Winn等[61]通过丙氨酸扫描突变CYP105A1底物结合口袋的3个精氨酸残基，发现了两个酶活性增强的突变体R73A和R84A。Hayashi等[62]在此基础上构建了双突变体R73V/R84A，以1α(OH)VD_3为底物，测得其25-位羟基化突变体的K_{cat}/K_m值比野生型高435倍。有研究者通过分子对接和丙氨酸扫描突变，发现CYP109E1的I85A突变体对VD_3的C-25位选择性增强[42]。同时，通过丙氨酸扫描突变筛出CYP109A2的高活性突变体T103A，配合反应条件优化后，25(OH)VD_3的产量提高了5倍，达到282.7 mg/L[43]。

3.3 催化条件的优化

VD_3难溶于水，而全细胞催化系统要求底物能较好地溶解在体系中并尽可能多地跨膜进入细胞。因此，最常用的优化方法是添加环糊精和表面活性剂等物质，使VD_3与这些物质复合形成乳浊液以提高其溶解度。在红串红球菌中表达Vdh时发现，当体系中存在质量分数0.05%的部分甲基化β-环糊精(partially methylated β-cyclodextrin，PMCD)溶液时，与不添加PMCD的对照组相比，其C-25位羟化活性显著增强约10倍[52]。在放线菌进行VD_3羟化时，通过加入不同表面活性剂与β-环糊精共同作用，最终使羟化产物的产量提高了2倍[63]。此外可以通过直接改变宿主细胞膜通透性使VD_3更容易进入细胞。Imoto等[38]使用靶向lipid II的羊毛硫抗生素乳酸链球菌素处理红串红球菌细胞，形成乳酸链球菌素-lipid II复合物，在红串红球菌细胞膜上形成直径为2.0~2.5 nm的孔洞，有利于VD_3-PMCD复合物进入细胞内部。反应16 h后，VD_3的羟基化率为52.5%，比未添加乳酸链球菌素的对照组提高了2.8倍。Yasutake等[39]将此复合物与高活性突变体VdhT107A结合，转化效率提升约14倍。

4 以葡萄糖为原料生物合成

无论是化学合成法还是生物合成法，目前均以天然甾醇或VD_3为底物。但天然提取法对时空条件的要求或半合成法对原料的高纯度要求都促使人们寻找更为可控且成本更低的生产方式。近年来合成生物学的迅速发展为许多天然产物合成提供了新的思路和方法，有希望以更为廉价的葡萄糖为原料，不受时空因素影响而获得25(OH)VD_3的稳定产出。

酿酒酵母具有良好的生物安全性，且体内具备合成萜烯和甾醇的甲羟戊酸(mevalonate，MVA)途径，是合成25(OH)VD_3理想的底盘细胞[64]。Hohmann等[65]描述了一种在酿酒酵母中从头合成

25-OH-7-DHC的方法，通过敲除*erg5*和*erg6*基因，同时引入24-脱氢胆固醇还原酶（24-dehydrocholesterol resuctase，DHCR24），酿酒酵母可产生重要前体7-DHC。通过表达胆固醇C-25位羟化酶，将7-DHC催化转化为25-OH-7-DHC。此外，还在大肠杆菌中表达并纯化了CYP46A1[66]。体外重组催化试验表明，CYP46A1可催化7-DHC转化为24-OH-7-DHC和25-OH-7-DHC，其中25-OH-7-DHC为主要产物。这表明CYP46A1是一种有潜力的催化酶。

酿酒酵母中合成25-OH-7-DHC涉及多条代谢途径的协同作用，如图5所示。其中，MVA途径是细胞利用葡萄糖合成萜类化合物的主要代谢途径，围绕该途径的研究为人工合成天然产物提供了坚实基础。例如，通过对MVA途径关键酶tHMG1进行定向进化，阻断竞争代谢途径，可以引导代谢流向目标产物，从而提高代谢通量。Guo等[67]以酿酒酵母为底盘细胞，从11种来源的DHCR24中筛选出7-DHC产量最高的原鸡（*Gallus gallus*）来源的DHCR24，逐步调整DHCR24的转录水平，使7-DHC的累积量增加27.5%。阻断竞争路径，增加DHCR24的拷贝数，删除参与脂质代谢的*NEM1*基因以促进脂滴积累，最终在5 L生物反应器中使7-DHC产量达到1.07 g/L。

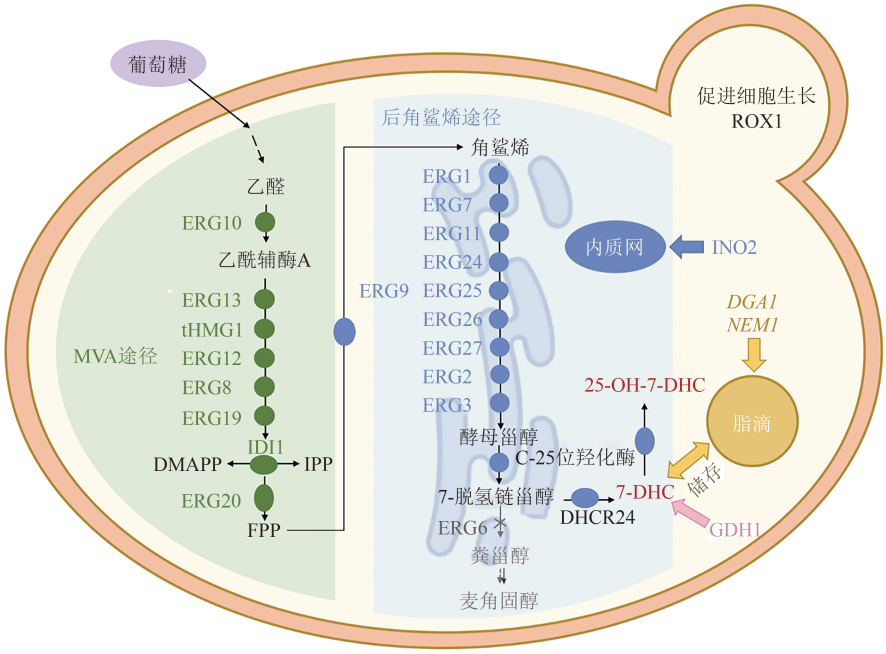


图5　酿酒酵母中合成25-OH-7-DHC的途径概述

Fig. 5　Overview of the pathway for the synthesis of 25-OH-7-DHC in *Saccharomyces cerevisiae*

近年来，代谢途径区室化逐渐成为研究热点。许多参与萜类合成代谢的酶定位于细胞的内质网。有研究者尝试过表达INO2调控内质网大小，上调内质网上相关酶的转录水平，从而提高目的产物的产量[68]。Guo等[69]通过重新定位角鲨烯途径的亚细胞位置，共表达靶向脂滴的DHCR24、ERG2/3和ERG25/26/27，以及靶向内质网的ERG1/11/24，将7-DHC的产量提高至360.6 mg/L。Qu等[70]通过7个基因过表达，敲除缺氧基因的血红素依赖性抑制剂ROX1以促进细胞生长，敲除$NADP^+$依赖性谷氨酸脱氢酶GDH1增强代谢流，进一步提高7-DHC产量。此外还利用CRISPRi系统筛选出了ERG6启动子的最佳结合位点，最终在3 L生物反应器中使7-DHC产量突破1 328 mg/L。

重要中间产物7-DHC具有的脂溶性特性使其在细胞中的存储空间成为限制产量的因素之一。此外，7-DHC合成途径中涉及大量脂溶性中间产物，此类物质的过量积累对细胞具有一定的毒害作用。为脂溶性物质提供充足的储存空间，不仅可以有效引导代谢流向目标产物，还能降低因过度积累而导致的细胞毒性。针对脂滴改造的研究已取得一些进展。例如，过表达*DGA1*基因可增大脂滴体积，从而提高脂溶性产物的产量[71]；在脂滴表面构建蛋白质支架，能够将部分代谢途径整合至脂滴表

面，促进产物生成后高效转运至脂滴内，提高产物积累量[72]。目前对于脂滴功能的应用仍受限于对其内环境的认知不足，脂滴的氧化还原平衡、代谢物进出机制等关键问题尚需进一步研究。未来，根据代谢途径中各组分的特点，利用合成生物学技术分别将其优化组装于适配的细胞器中，实现多细胞器协同合作，或将成为高效合成目标产物的探索方向。

5 展望

随着国民健康意识的提升以及畜牧业的高质量发展，25(OH)VD_3的市场需求逐渐增长，呈现持续向好的发展趋势。目前，工业生产主要采用生物-化学耦合法，尽管25(OH)VD_3体外酶催化和全细胞催化合成均取得了一定进展，但实现大规模工业化应用仍面临诸多挑战。如何利用简单的廉价碳源在细胞中从头合成25(OH)VD_3，已成为研究难点和热点。25-OH-7-DHC作为25(OH)VD_3的光催化前体，其生物全合成路径已取得初步进展，但仍需持续寻找更高效的C-25位羟化酶，同时优化代谢途径，通过亚细胞和细胞水平的整体调控来提高碳代谢流效率。生物全合成25(OH)VD_3的关键在于开发酶催化方法以替代现有的光催化方法，这需要挖掘更多具有相关催化活性的新型酶，建立更高效、更环保的合成体系。

参考文献

[1] GÖRING H. Vitamin D in nature: a product of synthesis and/or degradation of cell membrane components[J]. Biochemistry (Moscow), 2018, 83(11): 1350-1357.

[2] 徐宏建，李昕，王丽华，等. 25羟基维生素D_3的生理功能及其在动物生产中的应用[J]. 动物营养学报，2020，32(4)：1491-1498.
XU H J, LI X, WANG L H, et al. Physiological function of 25-hydroxyvitamin D_3 and its application in animal production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(4): 1491-1498. (in Chinese)

[3] ABE S, KASHII M, SHIMADA T, et al. Relationship between distal radius fracture severity and 25-hydroxyvitamin-D level among perimenopausal and postmenopausal women[J]. Bone & Joint Open, 2022, 3(3): 261-267.

[4] XU H J, WANG L H, ZHANG Q Y, et al. Effects of 25-hydroxyvitamin D_3 on growth performance, fecal scores, vitamin D_3 metabolites, antioxidant status, and inflammatory and stress-related parameters in weaning calves[J]. Animal Feed Science and Technology, 2021, 281: 114946.

[5] DUNN J A, JEFFERSON K, MACDONALD D, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D is associated with increased bladder cancer risk: a systematic review and evidence of a potential mechanism[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 188: 134-140.

[6] 冯冠智，徐宏建，王丽华，等. 25羟基维生素D_3和维生素D_3对荷斯坦种公牛精液品质和血清生化指标的影响[J]. 动物营养学报，2021，33(10)：5729-5737.
FENG G Z, XU H J, WANG L H, et al. Effects of 25-hydroxyvitamin D_3 and vitamin D_3 on semen quality and serum biochemical indices of Holstein bulls[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(10): 5729-5737. (in Chinese)

[7] GRANT W B, ALANOUTI F, BOUCHER B J, et al. A narrative review of the evidence for variations in serum 25-hydroxyvitamin D concentration thresholds for optimal health[J]. Nutrients, 2022, 14(3): 639.

[8] MAMANI M, MUCELI N, GHASEMI B H R, et al. Association between serum concentration of 25-hydroxyvitamin D and community-acquired pneumonia: a case-control study[J]. International Journal of General Medicine, 2017, 10: 423-429.

[9] LI W, CHENG X F, GUO L Y, et al. Association between serum 25-hydroxyvitamin D concentration and pulmonary infection in children[J]. Medicine, 2018, 97(1): e9060.

[10] JAFFEY J A, LAPPIN M R, RINGOLD R, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and infectious respiratory disease complex in shelter dogs[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2021, 35(1): 472-479.

[11] AKBAR M R, WIBOWO A, PRANATA R, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D (vitamin D) level is associated with susceptibility to COVID-19, severity, and mortality: a systematic review and meta-analysis[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 660420.

[12] MAGHBOOLI Z, SAHRAIAN M A, EBRAHIMI M, et al. Vitamin D sufficiency, a serum 25-hydroxyvitamin D at least 30 ng/mL reduced risk for adverse clinical outcomes in patients with COVID-19 infection[J]. PLoS ONE, 2020, 15(9): e0239799.

[13] JETTER A, EGLI A, DAWSON-HUGHES B, et al. Pharmacokinetics of oral vitamin D_3 and calcifediol[J]. Bone, 2014, 59: 14-19.

[14] 王丽华，徐宏建，张全宇，等. 不同剂量25羟基维生素D_3对断奶前犊牛生长性能、营养物质表观消化率、血浆代谢物及粪便菌群的影响[J]. 动物营养学报，2022，34(1)：404-412.

WANG L H，XU H J，ZHANG Q Y，et al. Effect of different doses of 25-hydroxyvitamin D_3 on growth performance，nutrient apparent digestibility，plasma metabolites and fecal flora of pre-weaning calves[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition，2022，34(1)：404-412.(in Chinese)

[15] 王海洲，曹金党，秦甜甜. 25-羟基维生素D_3的生物学特性及其在生猪饲粮中的应用研究进展[J]. 养猪，2021(1)：45-48.
WANG H Z，CAO J D，QIN T T. Biological characteristics of 25 hydroxyvitamin D_3 and its application in pig diet[J]. Swine Production，2021(1)：45-48.(in Chinese)

[16] KABAT M M，KIEGIEL J，COHEN N，et al. Convergent synthesis of vitamin D_3 metabolites. Control of the stereoselectivity in samarium-induced cyclopropanations of cyclopentenes[J]. The Journal of Organic Chemistry，1996，61(1)：118-124.

[17] MARCZAK S，MICHALAK K，WICHA J. Short total synthesis of the CD rings-side chain fragment of 25-hydroxyvitamin D_3 and de-AB-cholestane derivatives，involving two tandem Mukaiyama-Michael conjugate additions[J]. Tetrahedron Letters，1995，36(30)：5425-5428.

[18] MICHALAK K，STEPANENKO W，WICHA J. New diastereoselective approach to *trans*-hydrindane derivatives. Synthesis of a 8-phenylsulphonyl-A，B-descholestane derivative，a precursor to 25-hydroxyvitamin D_3 [J]. Tetrahedron Letters，1996，37(42)：7657-7658.

[19] 曹龙辉，李晓珺，赵文红，等. 麦角甾醇的研究进展[J]. 中国酿造，2014，33(4)：9-12.
CAO L H，LI X J，ZHAO W H，et al. Research progress on ergosterol[J]. China Brewing，2014，33(4)：9-12.(in Chinese)

[20] 刘玲，吴正奇，王雄，等. 青霉素菌丝体中麦角固醇分离和纯化研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版)，2013，35(2)：232-235.
LIU L，WU Z Q，WANG X，et al. Study on extraction of ergosterol from penicillin mycelium [J]. Journal of Hubei University (Natural Science)，2013，35(2)：232-235.(in Chinese)

[21] 董晔，杨姿，贾梦琦，等. 红曲废菌渣中有效成分的综合提取工艺[J]. 食品工业科技，2018，39(3)：158-166.
DONG Y，YANG Z，JIA M Q，et al. The integrated extraction process of effective ingredients from monascus mycelium[J]. Science and Technology of Food Industry，2018，39(3)：158-166.(in Chinese)

[22] 胡芬，谭兰兰，杨景昌，等. 从羊毛醇中提取胆甾醇的工艺研究[J]. 化学研究与应用，2008，20(11)：1441-1446.
HU F，TAN L L，YANG J C，et al. Study on the extraction process of cholesterol from lanolin alcohol[J]. Chemical Research and Application，2008，20(11)：1441-1446.(in Chinese)

[23] 邓启华，姚颖，刘婷，等. 猪胆汁中三种主要胆汁酸的提取分离[J]. 中国生化药物杂志，2012，33(4)：405-407.
DENG Q H，YAO Y，LIU T，et al. The extraction and purification of three kinds of bile acids from pig bile[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics，2012，33(4)：405-407.(in Chinese)

[24] 张肖冲，李明慧，高岩，等. 薯蓣皂苷元提取方法及研究进展[J]. 吉林农业，2018(7)：68-69.
ZHANG X C，LI M H，GAO Y，et al. Extraction methods and research progress of diosgenin [J]. Agriculture of Jilin，2018(7)：68-69.(in Chinese)

[25] 杨南南，李会，吴燕，等. *Gibberella intermedia* WX12产特异性糖苷酶的发酵工艺优化[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(10)：1028-1034.
YANG N N，LI H，WU Y，et al. Optimization of culture conditions for specific production of glycosidase from *Gibberella intermedia* WX12 [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2016，35(10)：1028-1034.(in Chinese)

[26] 王建塔，陈文章，夏晶，等. 二甲基二氧杂环丙烷的制备及在25-羟基胆固醇合成中的应用[J]. 化学试剂，2017，39(6)：668-670.
WANG J T，CHEN W Z，XIA J，et al. Preparation of dimethyldioxirane and its application in the synthesis of 25-hydroxycholesterol[J]. Chemical Reagents，2017，39(6)：668-670.(in Chinese)

[27] 彭逸华，温业淳，陈毓群. 1α，25-双羟基维生素D3的合成研究：从猪去氧胆酸甲酯合成25-羟基胆固醇[J]. 化学学报，1985，43(7)：698-701.
PENG Y H，WEN Y C，CHEN Y Q. Studies on synthesis of 1α，25-dihydroxy vitamin D_3：synthesis of the key intermediate 25-hydro-xycholesterol from methyl hyodeoxycholate[J]. Acta Chimica Sinica，1985，43(7)：698-701.(in Chinese)

[28] 金灿，苏为科，王子强，等. 一种25-羟基-7-脱氢胆固醇的合成方法：CN201510251926.2[P]. 2016-08-24.

[29] 林静容，王玉春，许启海，等. 利用薯蓣皂甙元完整骨架形式合成1α，25-二羟基维生素D_3[J]. 化学学报，2007，65(16)：1685-1692.
LIN J R，WANG Y C，XU Q H，et al. Formal synthesis of 1α，25-dihydroxyvitamin D_3 by utilizing the intact skeleton of diosgenin[J]. Acta Chimica Sinica，2007，65(16)：1685-1692.(in Chinese)

[30] SCHERLITZ-HOFMANN I，DUBS M，PROUSA R，

et al. Synthesis of 25-hydroxyprovitamin D_3 from ergosterol: a mild method for the cleavage of hetero diels-alder adducts leading to steroidal 5, 7-dienes [J]. Synthesis, 1999, 1999(8): 1331-1334.

[31] ANDREWS D R, BARTON D H R, HESSE R H, et al. Synthesis of 25-hydroxy-and 1.alpha., 25-dihydroxy vitamin D_3 from vitamin D_2 (calciferol)[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1986, 51(25): 4819-4828.

[32] SUN B, JIN C, SU W K. A novel facile synthesis of cholesta-5, 7-diene-3β, 25-diol, the precursor of 25-hydroxyvitamin D_3[J]. Journal of Chemical Research, 2016, 40(4): 213-215.

[33] 孙彬. 1α-羟基维生素D_3原及25-羟基维生素D_3的合成[D]. 杭州:浙江工业大学, 2016.

[34] 刘建刚, 王子强. 维生素D_3的合成工艺改进[J]. 合成化学, 2015, 23(8): 760-762.
LIU J G, WANG Z Q. Process improvement on the synthesis of vitamin D_3[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2015, 23(8): 760-762.(in Chinese)

[35] FUSE S, TANABE N, YOSHIDA M, et al. Continuous-flow synthesis of vitamin D_3[J]. Chemical Communications, 2010(46): 8722-8724.

[36] NIU W H, ZHENG Y Z, LI Y, et al. Photochemical microfluidic synthesis of vitamin D_3 by improved light sources with photoluminescent substrates [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2021, 29: 204-211.

[37] YASUDA K, ENDO M, IKUSHIRO S, et al. UV-dependent production of 25-hydroxyvitamin D_2 in the recombinant yeast cells expressing human CYP2R1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 434(2): 311-315.

[38] 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.

[39] YASUTAKE Y, NISHIOKA T, IMOTO N, et al. A single mutation at the ferredoxin binding site of P450 Vdh enables efficient biocatalytic production of 25-hydroxyvitamin D_3[J]. Chembiochem, 2013, 14(17): 2284-2291.

[40] KAWAUCHI H, SASAKI J, ADACHI T, et al. Cloning and nucleotide sequence of a bacterial cytochrome *P*-450_{VD25} gene encoding Vitamin D_3 25-hydroxylase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1994, 1219(1): 179-183.

[41] HAYASHI K, YASUDA K, SUGIMOTO H, et al. Three-step hydroxylation of vitamin D_3 by a genetically engineered CYP105A1[J]. The FEBS Journal, 2010, 277(19): 3999-4009.

[42] ABDULMUGHNI A, JÓŹWIK I K, PUTKARADZE N, et al. Characterization of cytochrome P450 CYP109E1 from *Bacillus megaterium* as a novel vitamin D_3 hydroxylase[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 243: 38-47.

[43] ABDULMUGHNI A, ERICHSEN B, HENSEL J, et al. Improvement of the 25-hydroxyvitamin D_3 production in a CYP109A2-expressing *Bacillus megaterium* system [J]. Journal of Biotechnology, 2021, 325: 355-359.

[44] SHINKYO R, SAKAKI T, KAMAKURA M, et al. Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 324(1): 451-457.

[45] HANNEMANN F, BICHET A, EWEN K M, et al. Cytochrome P450 systems: biological variations of electron transport chains[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects, 2007, 1770(3): 330-344.

[46] LYAKHOVICH V, MISHIN V, POKROVSKY A. Relationship between the reduction of oxygen, artificial acceptors and cytochrome *P*-450 by NADPH-cytochrome *c* reductase[J]. Biochemical Journal, 1977, 168(2): 133-139.

[47] MIE Y, YASUTAKE Y, TAKAYAMA H, et al. Electrochemically boosted cytochrome P450 reaction that efficiently produces 25-hydroxyvitamin D_3[J]. Journal of Catalysis, 2020, 384: 30-36.

[48] WAXMAN D J, WALSH C. Phenobarbital-induced rat liver cytochrome *P*-450: purification and characterization of two closely related isozymic forms [J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(17): 10446-10457.

[49] O'KEEFE D P, GIBSON K J, EMPTAGE M H, et al. Ferredoxins from two sulfonylurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus*[J]. Biochemistry, 1991, 30(2): 447-455.

[50] SAWADA N, SAKAKI T, YONEDA S, et al. Conversion of vitamin D_3 to 1α, 25-dihydroxyvitamin D_3 by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320(1): 156-164.

[51] FU B, REN Q, MA J, et al. Enhancing the production of physiologically active vitamin D_3 by engineering the hydroxylase CYP105A1 and the electron transport chain [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2022, 38(1): 14.

[52] FUJII Y, KABUMOTO H, NISHIMURA K, et al. Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D_3 hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*[J]. Biochemical and Biophysical Research

Communications，2009，385(2)：170-175.

[53] BABOT E D，RÍO J C，KALUM L，et al. Regioselective hydroxylation in the production of 25-hydroxyvitamin D by *Coprinopsis cinerea* peroxygenase[J]. ChemCatChem，2015，7(2)：283-290.

[54] 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.

[55] JACOBY C，EIPPER J，WARNKE M，et al. Four molybdenum-dependent steroid C-25 hydroxylases：heterologous overproduction，role in steroid degradation，and application for 25-hydroxyvitamin D_3 synthesis[J]. mBio，2018，9(3)：10.1128/mbio. 00694-18.

[56] BOLAND R，SKLIAR M，CURINO A，et al. Vitamin D compounds in plants[J]. Plant Science，2003，164(3)：357-369.

[57] TANG D D，LIU W，HUANG L，et al. Efficient biotransformation of vitamin D_3 to 25-hydroxyvitamin D_3 by a newly isolated *Bacillus cereus* strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2020，104(2)：765-774.

[58] YASUTAKE Y，FUJII Y，CHEON W K，et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of vitamin D_3 hydroxylase，a novel cytochrome P450 isolated from *Pseudonocardia autotrophica*[J]. Acta Crystallographica Section F：Structural Biology and Crystallization Communications，2009，65(4)：372-375.

[59] YASUTAKE Y，FUJII Y，NISHIOKA T，et al. Structural evidence for enhancement of sequential vitamin D_3 hydroxylation activities by directed evolution of cytochrome P450 vitamin D_3 hydroxylase[J]. Journal of Biological Chemistry，2010，285(41)：31193-31201.

[60] FUKUNISHI H，YAGI H，KAMIJO K，et al. Role of a mutated residue at the entrance of the substrate access channel in cytochrome P450 engineered for vitamin D_3 hydroxylation activity[J]. Biochemistry，2011，50(39)：8302-8310.

[61] WINN P J，LÜDEMANN S K，GAUGES R，et al. Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2002，99(8)：5361-5366.

[62] HAYASHI K，SUGIMOTO H，SHINKYO R，et al. Structure-based design of a highly active vitamin D hydroxylase from *Streptomyces griseolus* CYP105A1[J]. Biochemistry，2008，47(46)：11964-11972.

[63] 王国盼，苏宏飞，韦春葵，等. 表面活性剂与β-环化糊精共同作用对放线菌羟基化维生素D_3的影响[J]. 食品工业科技，2013，34(12)：173-176.
WANG X P，SU H F，WEI C K，et al. Effect of surfactant and β-cyclodextrin on vitamin D_3 hydroxylased by actinomyces[J]. Science and Technology of Food Industry，2013，34(12)：173-176.(in Chinese)

[64] XU X H，LIU Y F，DU G C，et al. Microbial chassis development for natural product biosynthesis[J]. Trends in Biotechnology，2020，38(7)：779-796.

[65] HOHMANN H P，LEHMANN M，MERKAMM M，et al. Production of non-yeast sterols by yeast：U.S. Patent 9，624，521[P]. 2017-4-18.

[66] GOYAL S，XIAO Y，PORTER N A，et al. Oxidation of 7-dehydrocholesterol and desmosterol by human cytochrome P450 46A1[J]. Journal of Lipid Research，2014，55(9)：1933-1943.

[67] GUO X J，XIAO W H，WANG Y，et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 7-dehydrocholesterol overproduction[J]. Biotechnology for Biofuels，2018，11：1-14.

[68] ARENDT P，MIETTINEN K，POLLIER J，et al. An endoplasmic reticulum-engineered yeast platform for overproduction of triterpenoids[J]. Metabolic Engineering，2017，40：165-175.

[69] GUO X J，YAO M D，XIAO W H，et al. Compartmentalized reconstitution of post-squalene pathway for 7-dehydrocholesterol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in Microbiology，2021，12：663973.

[70] QU L S，XIU X，SUN G Y，et al. Engineered yeast for efficient de novo synthesis of 7-dehydrocholesterol[J]. Biotechnology and Bioengineering，2022，119(5)：1278-1289.

[71] WEI L J，KWAK S，LIU J J，et al. Improved squalene production through increasing lipid contents in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering，2018，115(7)：1793-1800.

[72] LIN J L，ZHU J，WHEELDON I. Synthetic protein scaffolds for biosynthetic pathway colocalization on lipid droplet membranes[J]. ACS Synthetic Biology，2017，6(8)：1534-1544.

（责任编辑：史润东东）