

Research
Bio-Manufacturing—Review

从他汀类药物的发现、发展和创新看生物制造的重要性

汤晓玲^{a,b}, 俞佳薇^{a,b}, 耿宇恒^{a,b}, 王嘉瑞^{a,b}, 郑仁朝^{a,b}, 郑裕国^{a,b,*}

^a Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

^b Engineering Research Center of Bioconversion and Biopurification of the Ministry of Education, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 August 2021

Revised 20 February 2022

Accepted 8 April 2022

Available online 20 April 2023

关键词

生物制造
他汀类药物
微生物发酵
生物转化
化学-酶法合成

摘要

先进工业的快速发展正在引发化学品生产模式的变革。生物制造是在细胞及其组分介导下进行物质加工与合成的绿色先进生产方式,具有原子经济性高、副反应少、过程需求适应性强及环境友好等优势,可以革新加工原料供给、强化和优化生产过程、提升产品质量。生物制造的重要性在他汀类药物的发现、发展和创新过程中得到了有力体现。他汀类药物作为治疗和预防心脑血管病的基石,开创了心脑血管病治疗的新纪元,在人类医药发展史上具有重要意义。从微生物发酵生产第一代他汀类药物、生物合成生产第二代他汀类药物到化学-酶法合成第三代他汀类药物,可以看到生物制造技术对他汀类药物的巨大推动力,对变革生产路线与生产工艺、降低碳排放、提高生产效率具有重要意义。随着前沿生物制造技术的发展及与多学科的交叉融合,生物制造技术将形成他汀类药物新的生产力,进一步推动其健康可持续发展。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

随着先进工业的快速发展,传统化学制造过程的劣势日益明显,特别体现在生产成本、制造步骤和三废排放等方面[1]。一般来说,药物的分子结构日益复杂,具有多个手性活性中心和功能基团,其合成过程冗长,需不断进行保护/去保护和分离。此外,手性化学品的光学纯度要求高,需要反复富集,势必导致低生产率及大量副产物和污染物的产生,因此制造过程往往无法达到工业化的要求。

生物制造是指利用生物体机能进行物质加工与合成的绿色生产方式[2]。相较于传统的化学路线,生物制造具

有高原子经济性、严格的区域、立体和化学选择性、副反应少和过程可控等优点。生物制造的应用涵盖化学、制药、农业、食品和环保等多个领域。作为一场新型的“工业革命”,生物制造正在改变着物质的生产方式,实现生产原料、制造工程、产品性质的重大革新,促进经济和社会的可持续发展。事实上,生物制造已被许多国家列为科技发展的战略重点[3]。

先进技术的涌现、工程工艺的革新以及市场需求的推动共同促进了生物制造的发展和应用。例如,青霉素被意外发现后,其抗菌活性得到鉴定,纯化工艺得到建立,并随着微生物学技术的进步,其培养条件得到了优化。当这些技术被有序地动态嵌入到工程系统中时,青霉素实现了

* Corresponding author.

E-mail address: zhengyg@zjut.edu.cn (Y.-G. Zheng).

规模化生产，被开发成为治病救人的重大药物[4]。同样，技术进步、工程创新的推动和市场需求的拉动，使阿维菌素[5]和井冈霉素[6-7]等重要化合物从被发现到被成功研制成对付寄生虫病和水稻纹枯病的新药[8]，价格进入“平民阶段”。在本文中，从他汀类药物的发现、发展和创新阐述了生物制造的重要性及使经济发展向绿色低碳、无毒低毒、可持续发展模式转型的推动作用。

2. 他汀类药物的发现与发展

随着现代社会人类生活方式的改变，心脑血管疾病的发病率和死亡率不断增加，成为威胁人类健康和生命的一大原因。据相关报道，我国心脑血管疾病患者人数已达3.3亿人，居世界首位，患病率仍在上升。高脂血症是心脑血管疾病的危险信号。它主要表现为高水平的低密度脂蛋白（LDL）——一种胆固醇转运蛋白——积聚在血管壁上并引起动脉硬化，导致各种心血管相关疾病。临床证明，降低体内低密度脂蛋白水平，可以有效控制缺血性心脑血管疾病的风险。

他汀类药物是治疗高脂血症相关疾病最重要的药物，占有较大的市场份额。人体胆固醇合成过程中，羟甲基戊二酰-辅酶A（HMG-CoA）还原酶（HMGCR）是限速酶，它可以催化HMG-CoA还原为重要的胆固醇中间体甲羟戊酸[9]。他汀类药物的结构类似于HMG-CoA，但对HMGCR有更高的亲和力。他们通过阻断细胞内甘油三酯

生物合成途径，防止动脉内部斑块的积聚，并通过竞争性抑制HMG-CoA来减少胆固醇合成。同时，他汀类药物促进LDL受体的活性，加速LDL的分解代谢，起到消除血清胆固醇的作用[9-10]。自20世纪70年代发现第一个胆固醇合成抑制剂美伐他汀以来，他汀类药物迅速发展，相继实现微生物发酵生产第一代他汀类药物、生物合成生产第二代他汀类药物到化学-酶法合成第三代他汀类药物，成为治疗心脑血管疾病发展史上的里程碑式药物[10]（图1）。从热力学的角度来看，第一代他汀类药物没有焓变优化，第三代他汀类药物表现出更有利的结合焓，表明它们比之前的他汀类药物家族表现出更高的热力学稳定性[11-12]。

在第一代到第三代他汀类药物的制造过程中，生物制造技术发挥了关键作用。生物制造的核心技术如菌株选育、微生物发酵、酶筛选和改造以及生物催化转化等，为他汀类药物的开发提供了强有力的技术支持（图2）。

3. 第一代他汀类药物的生产

3.1. 第一代他汀类药物

微生物是药物生产的巨大宝库。青霉素和链霉素等抗生素、放线菌素D等抗肿瘤药物以及洛伐他汀和阿卡波糖等酶抑制剂的许多药物，最初都是从微生物中发现的。1976年，首次在柠檬青霉菌（*P. citrinum*）的发酵液中发现美伐他汀[13]，该类药物通过抑制HMGCR活性和降低体内胆固醇含量来控制低胆固醇血症[14-15]。在美伐他

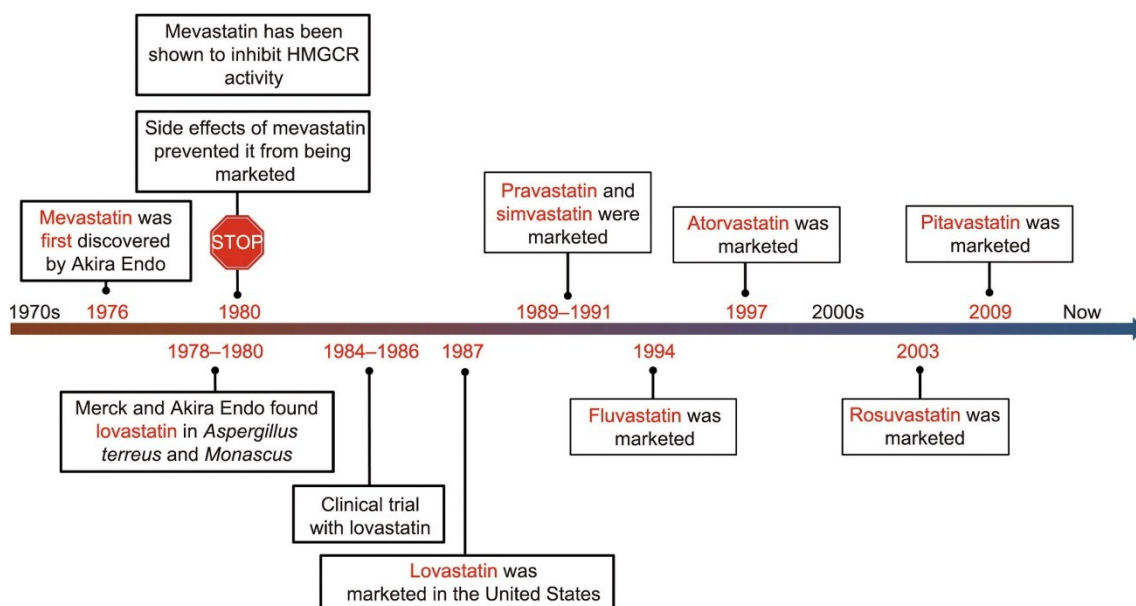


图1. 他汀类药物的发展历史。

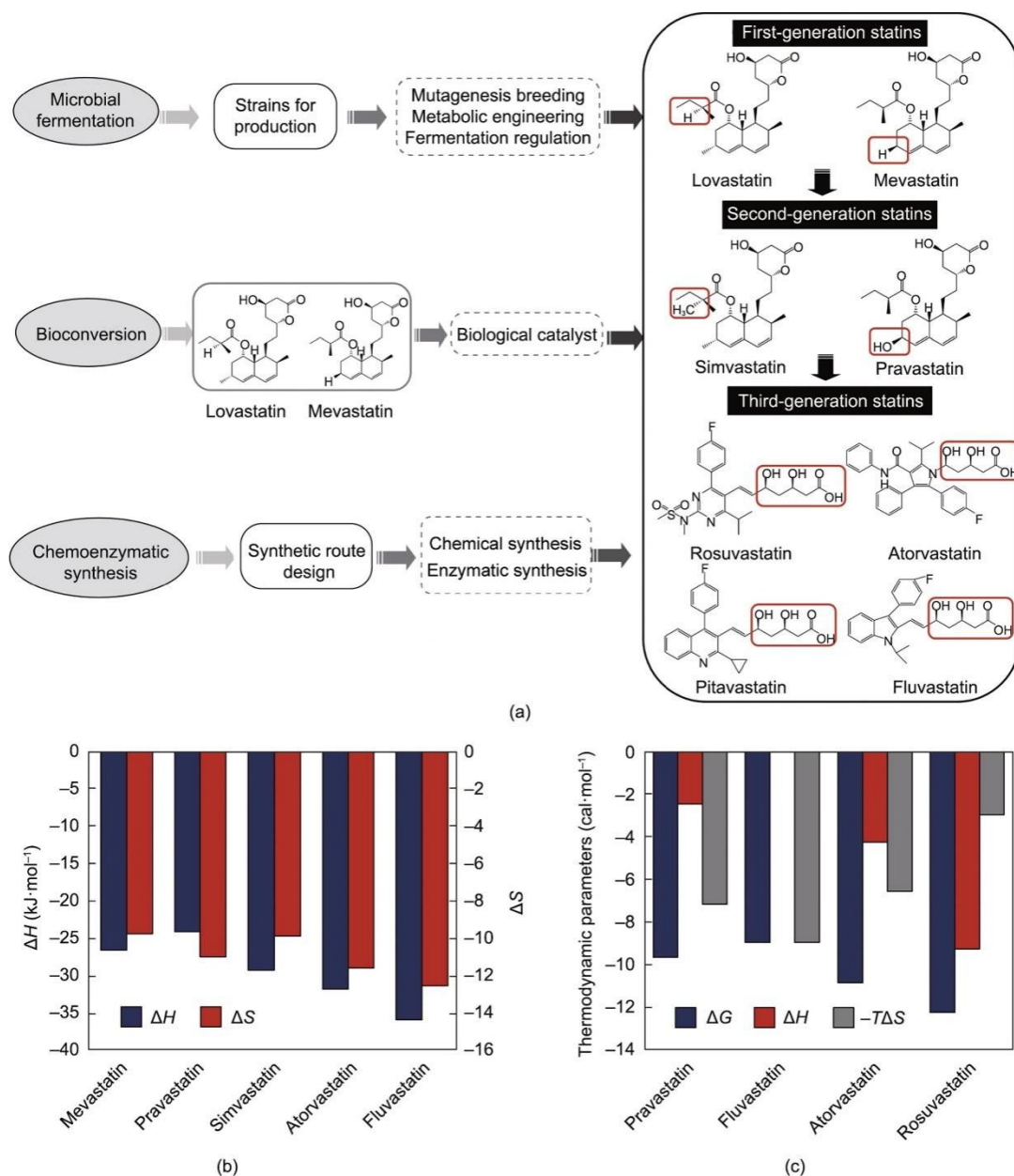


图2. (a) 第一代、第二代和第三代他汀类药物的生产路线概述。(b) 在25 °C和pH = 7.0下, 他汀分子与固定化人工膜相结合的 ΔH 和 ΔS 的热力学参数[12]。(c) 在25 °C和pH = 8.0下, 他汀分子与HMGCR结合的 ΔG 、 ΔH 和 $-T\Delta S$ 的热力学参数[11]。 ΔH 代表结合焓, ΔG 代表吉布斯自由能, ΔS 代表熵变, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 。

汀用于治疗患有杂合子家族性高胆固醇血症和合并高脂血症的患者时, 能够显著降低约30%的血清胆固醇, 为治疗这种致命疾病提供了新的思路[16]。因此, 美伐他汀成为20世纪80年代第一个被鉴定并首次用于临床的他汀类药物的活性化合物。然而, 在长时间高剂量使用美伐他汀治疗狗的实验中发现, 美伐他汀增加了实验中狗患恶性淋巴瘤的比例, 因此该药物在1990年代初期被撤出市场[10]。在这之后又在红曲霉(*Monascus*)代谢产物中发现了一种可强烈抑制胆固醇合成的活性物质, 并被命名为红曲霉素K(MK)。该物质能够降低胆固醇水平并

优先降低低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平[17]。另一种具有类似美伐他汀结构的化合物甲维诺林, 是在土曲霉(*A. terreus*)中发现的[18], 并在后来被命名为洛伐他汀[10]。1987年, 洛伐他汀被美国食品药品监督管理局批准上市。同年销售额超过2.6亿美元, 是年销售额最高的药物[19]。第一代他汀类药物美伐他汀和洛伐他汀是从微生物中发现的, 且随着微生物的筛选和鉴定、高效育种、代谢工程和智能发酵调控等技术的发展, 其生产规模得到进一步扩大, 在高脂血症相关疾病治疗史上取得了突破。

3.2. 从微生物中生产第一代他汀类药物

第一代他汀类药物最初在真菌中被发现，这些真菌可产生具有复杂化学结构的代谢产物，用于生产高价值的产品。土曲霉、红曲霉、青霉、斑纹孢霉、链霉、拟青霉、木霉和平菇等真菌的代谢产物中都含有他汀类药物的活性成分[20–26]。其中，红曲霉和土曲霉是主要的宿主菌株。

3.2.1. 生产菌株

在中国，红曲霉的发酵产物用作食品和保健品已有1000多年的历史，后来扩展到美国、日本、韩国、泰国和印度尼西亚等其他国家[26]。红曲霉的次生代谢产物含有多种活性物质，因此赋予了该菌种多种功能，包括降低血脂和血压水平、调节血氨和抗肿瘤活性。代谢产物中的重要成分包括桔霉素、红曲素、二氢莫那可林、 γ -氨基丁酸和二聚酸[27–29]。红曲霉中的他汀类成分非常复杂。除了众所周知的MK之外，还包括莫那可林J (MJ)、莫那可林L、莫那可林X、二氢莫那可林K和二氢莫那可林L [10]。研究人员采用外源诱导的策略，通过高效液相色谱法和桔霉素相关基因分析方法，筛选获得了一株MK产量较高的菌株[30]。当用薯蓣培养该菌株时，MK的产量略有增加[31]，并对发酵过程进行了优化。然而，红曲霉的洛伐他汀生产水平仍然较低，限制了其工业化发展。除红曲霉外，土曲霉已被证明能以更高的产量生产他汀类药物的活性成分[32]。作为最初被发现的洛伐他汀的强效生产菌，其生产工艺不断得到改进，成为了洛伐他汀的最佳生产菌株，被广泛用于第一代他汀类药物的工业生产。为了提高土曲霉的产量，进行了包括诱变育种、代谢工程和发酵调控的大量研究，以满足工业生产的要求。

3.2.2. 提高第一代他汀类药物生产的策略

(1) 诱变育种。由于利用从自然环境中分离的野生土曲霉生产他汀类药物的能力较低，因此进行了随机诱变以提高其生产潜力。物理诱变主要涉及紫外线 (UV) 照射和高辐射重离子束，而化学诱变通常包括乙基甲磺酸 (EMS)、*N*-甲基-*N'*-亚硝基-*N*-硝基脒和亚硝酸[32–35]。在最近的一项研究中，经过数轮UV辐射诱变育种，土曲霉的洛伐他汀产量增加了两倍，并且菌株对洛伐他汀的耐受性显著增强[34–35]。Mukhtar等[36]通过联合应用UV辐射和亚硝酸获得了一株高产洛伐他汀的菌株。与野生型相比，该菌株的洛伐他汀产量增加了3.5倍。Vilches Ferrón等[33]通过EMS诱变后获得了一株新菌株，其洛伐他汀产量是野生型的4倍。此外，还有将物理诱变与化学诱变相结合的方法。Sreedevi等[37]使用UV辐射和EMS

诱变获得突变株，其最高产突变株的产量为663 mg·L⁻¹，是原始菌株的1.8倍。

(2) 代谢工程。基于对他汀类药物生物合成代谢途径分子机制的理解，代谢调控已成为提高微生物生产力的有效策略[20]。Hasan等[38–39]通过替换启动子的方法来维持关键酶的表达水平处于最适状态，将洛伐他汀的产量提高了40%以上。与此同时，过表达关键酶乙酰-CoA羧化酶并且阻断竞争途径，如地曲霉素类物质的生物合成，以减少代谢流的分散。基于此，洛伐他汀的产量进一步提高了80%。Askenazi等[40]通过综合评估基因表达相关代谢产物的生产，将全局基因表达模式与特定代谢产物的生产相关联。采用这种方法，成功地构建了高产菌株，洛伐他汀的产量提高了9倍。

(3) 发酵调控。发酵过程是微生物生产目标产品的一个极其重要的环节，直接关系到生产效率和产品质量。高效的发酵调控对于提高微生物生产力具有重大意义。研究表明，由土曲霉生产的洛伐他汀产量受到碳、氮等营养物质的影响。其他诸如搅拌、温度、pH值和水分含量等环境因素也会影响洛伐他汀的产量。因此，为了进一步提高洛伐他汀的产量，建立了发酵调控策略[41–42]。研究人员考虑了洛伐他汀生产菌株的生长和代谢之间的协同作用，以调节全局发酵[36,43–44]。Mukhtar等[36]优化了高产菌株的各种培养条件，并将其扩展到实验室规模的发酵罐中，使洛伐他汀的产量增加了8倍。Ansari等[43]研究了气泡柱生物反应器中气泡大小等流体动力学行为对土曲霉生长和洛伐他汀产量的影响。当气泡直径为0.18 cm时，洛伐他汀的最高产量达到了443 mg·L⁻¹。在此条件下，洛伐他汀的产量分别比气泡直径为0.36 cm和0.09 cm时高了1.7倍和3.5倍。Raina等[44]通过丁内酯诱导首次提出了洛伐他汀产量的增加与其生物合成基因*lovB*和*lovF*的转录水平变化之间的相关性。丁内酯的加入可以刺激土曲霉产生代谢产物，并显著增加洛伐他汀的产量。在他们的研究中，向浸没培养物中外源添加100 nmol·L⁻¹的丁内酯I，洛伐他汀的产量与对照组相比增加了2.5倍。上述代谢调控不仅显著提高了微生物生产第一代他汀类药物的生产力，还促进了他汀类药物的工业化进程。

4. 第二代他汀类药物的生产

第二代他汀类药物是第一代他汀类药物的衍生物，包括普伐他汀和辛伐他汀。普伐他汀是美伐他汀的羟基衍生物，最初从喂养美伐他汀ML-236B（与美伐他汀密切相关的化合物，最初从桔青霉中分离出来）的狗的尿液中分

离出来，这表明普伐他汀可以由美伐他汀产生。普伐他汀选择性抑制肝脏和小肠中的胆固醇合成，而外周细胞的胆固醇合成基本上不受影响[45]，因此普伐他汀适用于高胆固醇血症的一级和二级预防。1991年，普伐他汀被证明可以显著降低心脏病的发病率，该他汀类药物很快被批准在欧洲和美国上市。

辛伐他汀是洛伐他汀的甲基化衍生物。辛伐他汀与洛伐他汀的化学结构之间的差异在于辛伐他汀的C8位丁酸侧链的 α -碳原子比洛伐他汀多一个甲基基团[46]。与洛伐他汀相比，辛伐他汀在降低LDL-C方面表现出更强的活性，副作用更少。结果表明，两剂洛伐他汀的临床活性与一剂辛伐他汀相当[47]。随着生物技术的应用和生产工艺的创新，辛伐他汀的成本已经显著降低，而其药效却有所提高。2006年，辛伐他汀成为全球第二畅销的他汀类药物。

由于第二代他汀类药物与第一代具有高度的结构相似性，通过将微生物发酵和高效生物转化相结合，实现了他汀类药物传统生产工艺的转型，降低了生产成本，并实现显著的节能减排。

4.1. 普伐他汀生产的两步发酵工艺

普伐他汀在6 β 位有一个羟基(-OH)，这是对美伐他汀骨架的结构修饰。由于常规合成方法对普伐他汀的羟基化并不容易，因此只有少数化学方法被报道用于生产普伐他汀[48]。普伐他汀的合成可以通过微生物发酵和生物转化两步过程实现。随着发酵工程技术的发展，对生产美伐他汀的微生物菌株进行了优化，以进行高密度发酵，从而通过美伐他汀的羟基化转化为普伐他汀(图3)。

到目前为止，已经研究了各种微生物，包括放线菌、微孢子菌、链霉菌和假诺卡菌[49-51]，以确定它们在6 β 位对美伐他汀进行羟基化形成普伐他汀的能力。通过广泛的筛选，毛霉早期被发现对美伐他汀的羟基化有效，转化率在30%~90%之间。然而，毛霉对美伐他汀非常敏感，美伐他汀内酯形式的底物浓度达到0.05%以上便无法耐受。为了克服这一限制，进行了高产菌株的培育。研究人员对

黄链霉进行了多轮UV诱变，并采用高通量筛选策略获得了耐美伐他汀菌株S33-1。此外，还建立了在线监测方法以维持美伐他汀的浓度在最佳水平。结果表明，在美伐他汀浓度保持恒定的情况下，美伐他汀向普伐他汀的生物转化率达到91% [52]。在另一种替代方案中，尝试在反应体系中间歇性添加美伐他汀，并以马杜拉放线菌作为生物催化剂，以增加普伐他汀的产量。结果表明，普伐他汀的产量达到了 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过进一步调节马杜拉放线菌的发酵过程，细胞生物量和转化率均得到了提高[53]。

4.2. 普伐他汀生物合成的关键酶

尽管多种微生物具有将美伐他汀转化为普伐他汀的活性，但负责转化的关键酶不同。到目前为止，细胞色素P450(CYP450)单加氧酶和一种新的水解酶系统，已被证明对普伐他汀的生产有效。CYP450是一种含有血红素的酶，属于广泛分布于自然界的单加氧酶类。CYP450可以催化多种类型的反应，如羟基化、环氧化、醇和醛氧化、O-去烷基化、N-去烷基化、氧化脱卤和氧化C-C键断裂[54]。因此，它参与了真核生物和原核生物中许多重要的代谢途径。从东方拟无枝酸菌中鉴定并克隆了一种新的CYP450基因。当用它转化美伐他汀时，除了在底物的正确C6位置进行羟基化外，还得到了其立体异构体6-epi-普伐他汀，这表明该酶的立体选择性不理想。因此对该酶进行了分子修饰。基于结构-功能关系分析，确定了酶活性位点的电子密度和构象景观对酶催化过程中的立体化学具有影响。随后采用易错聚合酶链反应(PCR)策略筛选获得了一株P450突变体，其普伐他汀与6-epi-普伐他汀的比例从3:97增加到96:4。此外，研究人员通过插入P450突变体改造了产生抗生素的产黄青霉(*P. chrysogenum*)，以构建普伐他汀的一步发酵路径[55]。通过敲除青霉素生物合成基因、增强美伐他汀基因簇的表达以及降低产黄青霉中的酯酶活性，他汀类前体物质美伐他汀的产量显著增加。在此基础上，通过将P450突变体与Rhf还原酶融合并随机整合到工程菌株中，在10 L补料分批发酵中，普伐他汀产量达到 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ [55-56]。

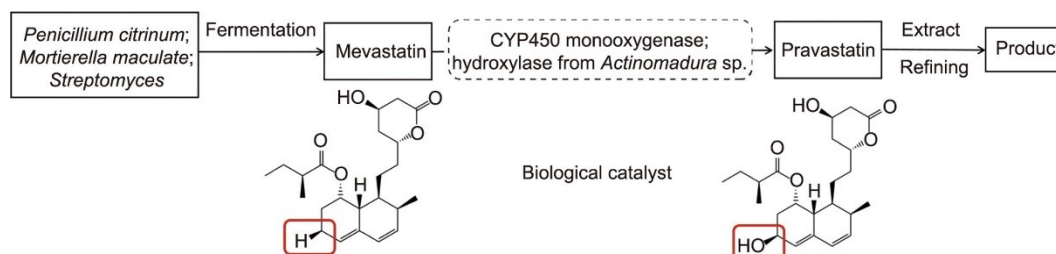


图3. 普伐他汀生产的两步发酵工艺。美伐他汀首先通过微生物发酵生产，然后生物转化为普伐他汀。CYP450：细胞色素P450。

在放线菌中发现的另一种将美伐他汀转化为普伐他汀的羟化酶需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 或还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酯 (NADPH) 作为辅因子。与正常的 CYP450 单加氧酶相比, 这种羟化酶不依赖美伐他汀诱导, 并且不会被一氧化碳 (CO) 灭活, 因此在普伐他汀生产中显示出工业潜力。

4.3. 用洛伐他汀生产辛伐他汀

传统的辛伐他汀生产主要涉及侧链合成和直接甲基化。洛伐他汀经历多个反应步骤, 包括水解、内酯化、对 C11 和 C13 位羟基的三甲基硅烷化保护、 α -二甲基丁酰氯的酰化和去保护等。随后, 在 C8 丁酸酯侧链的 α -碳上加入一个甲基基团, 得到辛伐他汀, 如图 4 [57–60] 所示。这种化学合成的缺点包括综合收率低 (50%~80%), 对甲苯、锂金属、二甲基酰胺和溴甲烷等有毒试剂的需求过量, 以及产生大量液体废物[61–64]。

随着生物制造技术的发展, 生物催化转化作为生产辛伐他汀的一种手段已被引入工业生产。从化学结构上看, 辛伐他汀与洛伐他汀相比只在丁酸酯侧链的 C8 位置多一个甲基[61]。因此理论上, 洛伐他汀可以通过甲基转移酶一步转化为辛伐他汀。甲基转移酶已经得到开发并应用于

高效催化红霉素制备克拉霉素, 为构建辛伐他汀生物合成新途径提供了重要的指导。然而, 迄今为止尚未发现对洛伐他汀具有理想催化活性的甲基转移酶, 辛伐他汀的一步生物合成仍在探索中。

在土曲霉的洛伐他汀生物合成途径中, 乙酸和丙二酸的二碳和三碳单位通过由 *lovB/lovC* 编码的聚酮合酶和由 *lovA* 编码的 P450 加氧酶缩合成 MJ。同时, 由 *lovF* 编码的二酮合酶催化乙酸和丙二酸合成甲基丁酸侧链, 由 *lovD* 编码的酰基转移酶将其转移到 MJ 的 C8 位羟基上, 从而生成洛伐他汀。另一方面, MJ 可以通过酰基转移酶以 α -二甲基丁酰-*N*-乙酰半胱氨酸硫酸酯为酰基供体直接转化为洛伐他汀 (图 4)。因此, MJ 是洛伐他汀和辛伐他汀的前体。洛伐他汀生物合成途径的中断或洛伐他汀的水解为辛伐他汀的生产提供了重要的底物。

当前研究已经证明阻断二酮合酶或酰基转移酶的活性会导致 MJ 的积累。然而, 现有菌株的发酵水平仍然较低, 无法满足辛伐他汀的工业生产需求。近几十年来, 辛伐他汀主要由洛伐他汀经化学水解和酶催化合成。洛伐他汀通过微生物发酵产生后, 水解形成 MJ, 在酰基转移酶的作用下进一步酰化为辛伐他汀[65–67]。研究人员从土曲霉中获得了一种对酰基底物和酰基受体具有广泛的特异

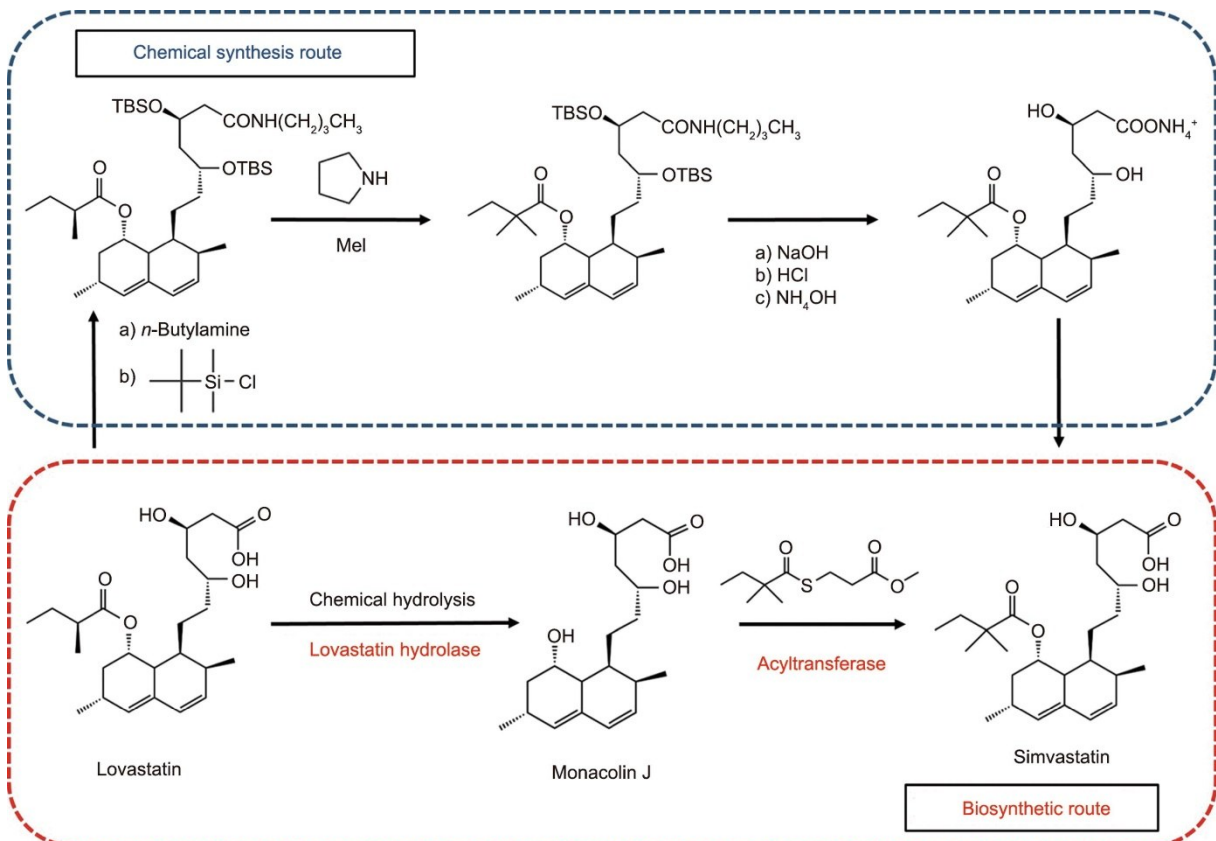


图 4. 辛伐他汀的合成途径, 包括化学途径和生物合成途径。TBS: 叔丁基二甲基硅烷; MeI: 碘甲烷。

性的酰基转移酶 LovD, 并对其进行了改善催化性能的改造。在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达酶后, 建立了由 MJ 合成辛伐他汀的全细胞催化生物合成系统[68]。同时, 一种活化的可渗透膜的底物 α -二甲基丁酰 (DMB) -*S*-甲基-巯基丙酸酯被发现是酰基转移酶的有效酰基供体。因此, 在不依赖化学保护的情况下, 底物转化率可达到 99%, 最终产品的提取收率达到 90%, 纯度为 98% [64]。

以上述辛伐他汀的合成途径为灵感, 研究人员还专注于探索洛伐他汀水解生成 MJ 的生物步骤, 以取代化学水解过程, 从而实现更高的原子经济性和更大的环境友好性[69]。近年来, 从产黄青霉中鉴定出一种新的酯酶 PcEST; 相比于以往报道的水解酶, 它对洛伐他汀体外水解生成 MJ 的催化效率高了近 232 倍。当在具有工业生产洛伐他汀能力的土曲霉中过表达 PcEST 时, 通过一步发酵和转化洛伐他汀高效产生 MJ, 收率约为 95%。通过进一步与酰基转移酶的联合应用, 有望完全通过生物方法实现辛伐他汀的生产, 解决化学步骤所带来的瓶颈问题 (图 4)。

4.4. 辛伐他汀生产中涉及的关键酶

4.4.1. 洛伐他汀水解酶 PcEST

具有工业应用潜力的洛伐他汀水解酶非常有限。早在 1997 年, 默克公司就分离和纯化了一种特异的洛伐他汀酯酶。2004 年, Morgan 等[70]报道了另一种特异性洛伐他汀酯酶 EcBla4。然而, 报道的洛伐他汀酯酶的高 K_m 值限制了它们在 MJ 生产中的应用。而当洛伐他汀酯酶 PcEST 从产黄青霉中被鉴定和表征时, 其对洛伐他汀的高活性使得一步法生产 MJ 成为了可能。对 PcEST 进行定向进化后, 有益突变体 Q140L 的溶解度提高了 2.2 倍, 全细胞活性提高了 18 倍, 并且 T_{50}^{10} 值增加了 3 °C (T_{50}^{10} 定义为在热处理 10 min 后, 初始酶活性减少 50% 的温度) [71]。揭示了 PcEST 及其突变体的催化机制和结构-功能关系: 催化三联体、活性位点周围的氢键网络以及特异底物结合通道共同决定了 PcEST 对洛伐他汀水解的催化效率。在此基础上, 进一步对 PcEST 进行了理性设计, 并获得了突变体 D106A, 该突变体具有更高的可溶性表达和热稳定性 [72]。以携带 PcEST 突变体的土曲霉为宿主菌株, 生成的洛伐他汀完全转化为 MJ, 以更有效的方式实现了 MJ 的一步生物法生产。

4.4.2. 酰基转移酶 LovD

酰基转移酶在将 MJ 转化为洛伐他汀或辛伐他汀的关键步骤中起着重要作用, 因此其开发和应用对于构建第二代他汀类药物的生物合成途径具有重大意义。2006 年,

研究人员从曲霉中克隆了编码酰基转移酶的 *lovD* 基因, 并在大肠杆菌中进行过表达。该酶能够选择性地将 α -甲基丁酰基转移至 MJ 的 C8 羟基, 从而产生洛伐他汀。随后发现, LovD 可以通过酰基-CoA 硫酯直接催化 MJ 的酰化反应, 因此, 可利用 α -二甲基丁酰基-*S*-甲基硫代乙酸酯作为底物合成辛伐他汀。研究人员将 LovD 中的两个半胱氨酸残基替换为丙氨酸残基, 提高了酶的催化性能。突变体经过高密度发酵, 在 18 h 内将 45 mmol·L⁻¹ 的 MJ 钠盐转化为辛伐他汀钠盐[61,68,73]。此外, 对天然酶 LovD 进行改造, 使其能够接受游离的非天然酰基供体 α -二甲基丁酰基-*S*-甲基巯基丙酸酯, 并且不再需要酰基载体蛋白。所得突变体在合成辛伐他汀方面的效率是野生型 LovD 的 1000 倍[74]。最终, 建立了一个用于合成辛伐他汀的全细胞生物催化平台。在生物制造中, 使用 LovD 催化生产辛伐他汀具有许多优点, 如减少了叔丁基二甲基氯化硅烷、碘甲烷和正丁基锂等有毒有害物质的使用。由于反应在常温常压下进行, 因此能源效率得到提高。唯一的副产物 3-巯基丙酸甲酯可以回收利用, 主要废液可以在生物处理设施中进行生物降解。

5. 第三代他汀类药物的生产

第三代他汀类药物包括罗伐司汀、阿托伐他汀、氟伐他汀和匹伐他汀。与第一、二代他汀类药物相比, 第三代他汀类药物具有更好的降脂效果, 半衰期较长, 对肝脏、肾脏毒性更少, 目前是预防和治疗高脂血症的首选药物, 并在国际市场上拥有重要地位, 年销售额快速增长。阿托伐他汀钙最初由辉瑞制药有限公司在美国推出, 并以商标名 Lipitor 获得美国 FDA 批准。该药物连续 9 年成为世界医药市场的销售冠军, 并是人类医药销售历史中唯一一种销售额超过 1000 亿美元的单一化合物药物。罗伊司瑞林和匹伐他汀具有更好的肝脏选择性和肌肉安全性, 小剂量使用能有效降低 LDL-C 水平。此外, 它们被肝脏代谢较少, 因此具有较低的肝毒性。

第三代他汀类药物均含有以手性二醇结构为主要药效团的通用侧链[75], 该侧链的合成对这些他汀类药物的生产具有重要意义。然而, 由于手性二醇侧链中含有两个手性羟基, 可生成 4 个差向异构体, 因此手性中心的独立立体选择性构建极其困难, 合成成本占他汀类材料总成本的一半。长期以来, 第三代他汀类药物的合成极具挑战性。在过去的几十年中, 科学家相继开发了多种合成手性二元醇侧链的化学方法, 包括单羰基还原法、二羰基还原法、醛酮还原偶联形成法和环氧化物不对称开环法[76-78]。

然而，这些方法普遍存在对映体和非对映体过量值低、贵金属催化剂成本高、反应条件苛刻等问题。例如，在阿托伐他汀的合成过程中，使用廉价易得的4-氯乙酰乙酸乙酯(A3)作为起始原料，经过催化合成(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(A4)，再进一步催化合成(R)-4-氰基-3-羟基丁酸乙酯(A5)，A5是位于5'-位置的第一个R构型手性中心。A3到A5的化学脱卤氰化需要三个步骤：三甲基甲硅烷基保护、氰化钠氰化、去保护。产品收率仅为56.7% [76]。在A5到A7的过程中（在3'-位置第二个手性中心的构建中），试剂硼烷在低温条件下使用。目标产物的对映体破坏率(de)值始终低于98%，为了提高光学纯度，需要多次纯化步骤，导致生产效率低[77-78]。

随着酶工程的发展，对阿托伐他汀合成的关键合成步骤进行了重构，以满足工业需求，相应的酶也被开发应用于构建第三代他汀类药物的合成，包括羰基还原酶(CR)和卤水合醇脱卤酶(HHDH)。CR是构建手性二醇侧链手性羟基的重要酶，因为它催化氧化底物上烟酰胺环的不对称氢转移[79]。HHDH能够通过一种分子内亲核取代机制有选择地催化环氧化物转化为O-卤代醇[80]。在CR和HHDH的共同应用下，通过简单的反应步骤，在温和的反应条件下，成功地构建了手性二醇侧链的两个手性中心，并具有高的生物合成效率。

在阿托伐他汀合成中，CR应用于将A3还原为A4 [81]，再通过HHDH进行生物脱卤反应，生成手性二元醇单元的

第一个手性中心[82]。接着，A5被转化为6-氰基-(5R)-羟基-3-羰基己酸叔丁酯(A6)，然后被还原为6-氰基-(3R,5R)-叔丁基二羟基己酸酯(A7) [图(5)] [83-84]，该化合物与2,2-二甲氧基丙烷(DMP)反应得到(4R,6R)-6-氰甲基-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环己烷-4-叔丁基乙酸酯(A8)。通过上述三步生物催化合成，所有手性中心均已建立。相对于传统化学步骤，A8的酶催化路线省去了硼烷、氢氧化钾、甲醇、四氢呋喃和液氮的使用。通过氢化、母核羧化、水解和重结晶等附加步骤，手性二醇侧链成功用于阿托伐他汀钙的合成。通过以上方式，成功地建立了阿托伐他汀钙的工业生产链[83]。

最近，利用含2-去氧核糖-5-磷酸醛缩酮缩酮酶(DEXA)催化的羟醛缩合反应构建了新的他汀类药物合成路线[85-86] (图6)。结合HHDH应用，预计能获得光学纯度高的超级他汀，如罗伐司汀和阿托伐他汀。已经从不同的微生物中报道和表征了一些DEXA，包括芽孢杆菌、丁酸高热型菌、耶尔森氏菌、空气生气球菌、温泉菌和变形链球菌[87-91]。然而，大多数野生型酶对乙醛的亲合力较低，限制了它们的应用[92]。因此，需要进一步研究才能实现该途径的实际应用。

5.1. 参与第三代他汀类药物生产的关键酶

5.1.1. 第三代他汀类药物合成关键酶HHDH

为了将关键的生物催化步骤引入第三代他汀的化学酶

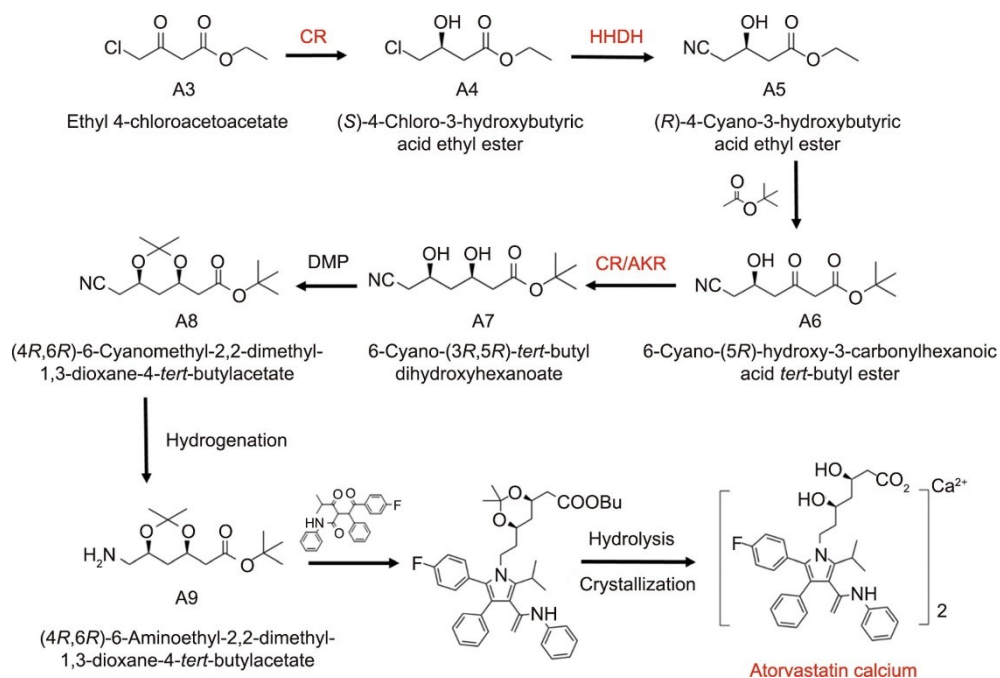


图5. 阿托伐他汀钙的合成路线。引入了羰基还原酶(CR)和卤醇脱卤酶(HHDH)催化的步骤，用于构建A5和A7手性中心。AKR: 醛酮还原酶; DMP: 2,2-二甲氧基丙烷。

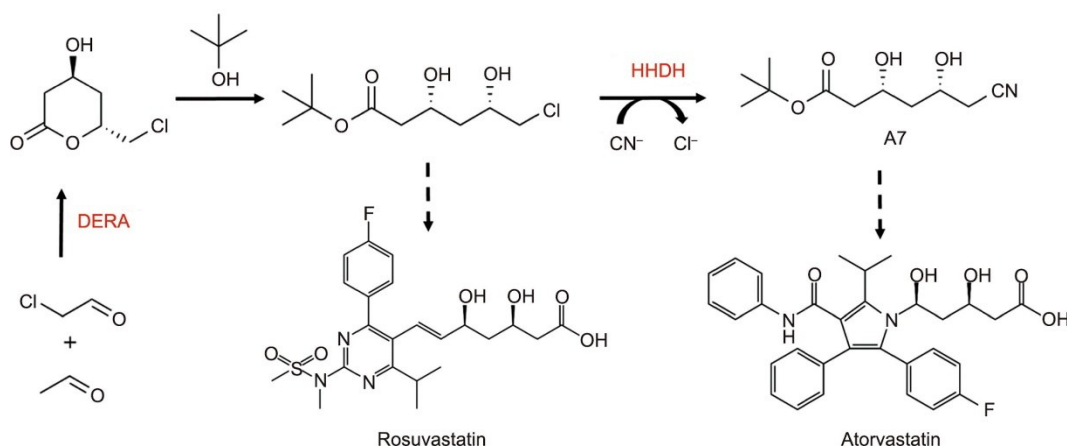


图6. 阿托伐他汀和瑞舒伐他汀与酶促醛醇反应的合成路线。

法系统中，研究人员致力于鉴定和筛选具有催化潜力的新型HHDH，建立了基于叠氮离子与Fe³⁺显色反应的HHDH活性高通量筛选技术，并对*Parvibaculum lavamentivorans* DS-1中的HHDH进行了筛选和突变[93–94]。在从2500个菌落中快速筛选后，获得了两个突变体，F176M和A187R，其相对活性分别比野生型高2.1倍和1.8倍。通过改变两个氨基酸残基的协同突变，双重突变体F176M/A187R展现出2.8倍的催化活性提升[93]。通过对酶催化口袋和产物进出通道的改造，大大提高了其工业应用性能[95]。对于来自放射性农杆菌（HhcC）的HHDH，通过分子对接和动力学模拟等手段，锚定了关键氨基酸残基并进行了改造，经过筛选得到的突变体活性增加了15倍。

5.1.2. 第三代他汀类药物合成关键酶CR

基因挖掘策略在发现基于蛋白质数据库的新酶方面显示出良好的实际应用前景。一系列CR被筛选出来以有效用于合成第三代他汀中间体[97]。由于在阿托伐他汀的合成路线中，试剂2,4-二硝基苯肼和A6形成了一个红褐色肼衍生物，其颜色与A6的浓度呈正相关，因此创造了一种高通量筛选方法，通过使用2,4-二硝基苯肼和A6之间的颜色反应以提高CR在A6到A7的反应步骤中的活性[98]。对辅酶结合区和底物催化口袋附近的关键氨基酸残基进行了合理的设计。通过酶工程技术，获得了一种对辅酶具有高亲和力以及优异的催化活性和立体选择性的新型CR，从而在构建阿托伐他汀钙的手性中心方面具有良好的工业性能。

此外，醛酮还原酶（AKR）也可以像CR一样将A6还原为A7[99]。Luo等[100]根据同源建模和分子对接的方法，对*Kluyveromyces lactis*来源的醛酮还原酶（*KIAKR*）进行了理性设计。突变体*KIAKR*-Y295W-W296L（M1）的最高催化效率达到12.37 s⁻¹·(mmol·L)⁻¹，

比野生型*KIAKR*高出11.25倍。为了进一步提高其催化性能，对M1进行了半理性设计，得到了突变型*KIAKR*-Y295W-W296L-I125V-S30P-Q212R-I63W（M8）。M8的催化效率值为36.31 s⁻¹·(mmol·L)⁻¹，比出发酶M1高出1.9倍[101]。为了实现原位辅因子的再生，研究者构建了一个强的M8和来自西伯利亚微生物*Exiguobacterium sibiricum*（EsGDH）的葡萄糖脱氢酶（GDH）的共表达系统，开发了一种具有增加底物负荷和降低细胞培养负担的生物催化方法[83]。在这些优化条件下，M8与EsGDH一起作为辅因子再生剂，能够在1.5 h内将高达80 g·L⁻¹的A6完全转化为A7，时空产率为660 g·L⁻¹·d⁻¹[101]。

5.2. 生产过程强化

通过具有恒定溶解氧反馈调节的补料分批发酵模式，建立了表达CR和HHDH的重组菌株的高密度发酵策略[102]。在50 L间歇式生物反应器中补充Zn²⁺后，细胞生物量增加，最大HHDH活性增加9.80%[103]。Liu等[104]在500 L和5000 L发酵罐中对含有CR的重组大肠杆菌进行发酵，生物量和比活性分别达到约9.7 g·L⁻¹干细胞重量（DCW）和15 750 U·g⁻¹ DCW，以及11.0 g·L⁻¹ DCW和19 210 U·g⁻¹ DCW。所得细胞成功应用于A7的高效生产。在含有400 g·L⁻¹底物的5000 L生物反应器中，在30 °C下放大合成A7，时空产率为13.7 mmol·L⁻¹·h⁻¹·g⁻¹ DCW。

Zhang等[105]使用含有CR和GDH的重组大肠杆菌细胞高效地生产A7。反应12 h后，底物转化率达到98.8%，收率为95.6%，底物浓度为350 g·L⁻¹时对映体过量（*ee*）值大于99.0%。此外，采用分批补料策略将底物浓度提高到400 g·L⁻¹。反应12 h后，产物收率提高到98.5%，时空收率为1182.3 g·L⁻¹·d⁻¹，这是文献中CR-GDH偶联体系的最高值。

此外，Xue等[106]和Wan等[107]研究了包括生物还

原 A3、生物去卤 A4 和氧化（图 7）在内的单元反应的热力学。通过上述三个酶催化的步骤耦合，从 A3 到 A5 的转化得到了显著改善。当 A3 的输入量为 $280 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 时，底物转化率达到 100%，A5 的 *ee* 值大于 99%。与先前文献报道的最先进的辉瑞-科德西斯技术相比，多酶“一锅法”（one-pot）催化工艺的底物用量和时空产率翻了一番。

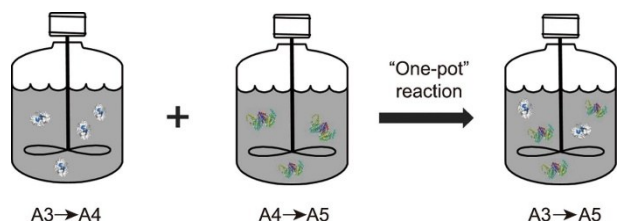


图 7. 通过 A3 生物还原、A4 生物脱卤和氧化反应的组合，以“一锅法”合成 A5。

固定化技术被广泛应用于提高酶或重组细胞的稳定性和重复使用性。例如，Wang 等[111]最先开发了采用 Celite-聚乙烯亚胺-戊二醛（GA）固定化细胞表达催化合成手性 A7 的 CR。在他们的工作中，固定化细胞的稳定性得到了提高。特别是在热稳定性方面，固定化细胞的半衰期在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 下延长至 120 min，比游离细胞提高了两倍。应用固定化重组细胞实现了每年 200 t A8 的生产。通过计算可知，与全化学合成相比，在该过程中原材料的消耗减少了 88.6%，能源消耗减少了 70% 以上，总生产成本降低了约 54% [77-78,83,111]。为了增加生物催化剂的稳定性和可回收性，Qiu 等[112]和 Liu 等[113]利用活性炭吸附、金属-有机框架聚咪唑框架（ZIF-8）涂层和 GA 交联的组合固定技术。他们将此固定化方法应用于共表达 GDH 和 CR 的重组大肠杆菌细胞。在优化条件下，固定化细胞的活性恢复率达到 82.6%。固定化生物催化剂可用于 9 个批次，实现每克固定化细胞催化获得 23.75 g 总产物，非对映异构体过量为 99.5% 以上。此外，开发了基于 CR 和 NADP^+ 固定化策略的自给自足生物催化剂，催化剂成本持续下降。

5.3. 结晶技术和质量控制

结晶技术是产品精制过程中的重要步骤。然而，均质多晶现象的普遍存在，使得产品的单晶制备难度较大。为了解决产品纯度问题，研究人员建立了阿托伐他汀钙前体合成工艺，该前体由 (4*R*,6*R*)-6-氨基乙基-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-4-叔丁基乙酸酯（A9）和母体核融合而成。通过优化阿托伐他汀钙前体的水解和盐处理过程（包括脱氟、环氧化、甲氧化和杂质降解），成功地制备了高纯度的阿托伐他汀钙晶体[116-118]，为建立阿托伐他汀钙质量保

证体系提供了技术支持。

在第三代他汀类药物生产中，酶催化反应在生物制造过程中起着主要作用[119]。这种反应满足绿色化学的要求，因为该反应在温和的反应条件下，利用水作为反应介质，于常温下进行反应。这种方法避免了传统有机合成中常用的功能化激活、保护和去保护等步骤[120]。基于酶设计和修饰的核心技术、高度的化学-酶耦合和反应与分离的良好匹配，可以建立高效生产目标产品的化学酶合成过程，从而利用现代生物制造技术实现成功的产业化。

6. 结论与展望

从第一代他汀类药物的微生物发酵、第二代他汀类药物的生物转化到第三代他汀类药物的化学酶法合成，可以清楚地看到生物制造贯穿他汀类药物研发的全过程。随着药物分子的复杂性和工业标准的提高，传统的合成工艺已不能满足工业化的要求。此外，经济社会发展面临资源减少、环境污染加剧等严峻挑战。因此，迫切需要在原料供应、加工方式、产品升级等方面进行绿色转型，实现协调可持续发展。生物制造是生物产业技术与工程的核心融合。其应用范围涵盖从资源、技术到产业的价值链，包括医药、农业、能源、材料、环保等领域的现代生物技术。

迄今为止，包括他汀类药物在内的多批次化学品，通过生物制造实现了绿色生产工艺，为现代工业化进程提供了很好的范例。展望未来，随着生物信息学、合成生物学、蛋白质工程等前沿生物技术的进步，以及系统工程、过程工程、信息技术、管理科学等多学科的融合，生物制造有望向更智能的流程迈进，实现深度机器学习设计、多参数在线监测、工业流程智能调控。例如，成簇规律间隔的短回文重复序列（CRISPR）干扰筛选等基因编辑技术的发展，为以精确和高通量的方式绘制复杂的原核遗传网络提供了一种强大的工具[121-122]。它的应用极大地促进了微生物细胞工厂的工程化和规范化，以实现高效的化学生产。随着微生物微滴培养系统和基于凝胶微滴的高通量筛选等技术的出现，可以构建微生物筛选、培养和适应性进化的一体化平台，促进高产微生物的筛选和培养效率[123-124]。多组学分析的进步使得能够重新设计更强大的方法来破译生命密码，这将直接消除筛选步骤，为生物制造提供更大的便利[125]。同样，随着生物信息学的发展，可以很容易地重新设计具有优异催化性能的酶，以拓宽其在生物制造中的应用[126]。此外，生物过程的智能控制和新型生物反应器的开发应用将是必然趋势，将共同推动生物制造产业的高质量发展和升级。

致谢

本研究得到了国家重点研发计划(2018YFA0901400)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Xiao-Ling Tang, Jia-Wei Yu, Yu-Heng Geng, Jia-Rui Wang, Ren-Chao Zheng, and Yu-Guo Zheng declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Erythropel HC, Zimmerman JB, de Winter TM, Petitjean L, Melnikov F, Lam CH, et al. The Green ChemistREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chem* 2018;20(9):1929–61.
- [2] Zhang YHP, Sun J, Ma Y. Biomanufacturing: history and perspective. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2017;44(4–5):773–84.
- [3] Lv Y, Su H, Tan T. Editorial for special issue on green biomanufacturing. *Synth Syst Biotechnol* 2020;5(4):361–2.
- [4] Barreiro C, García-Estrada C. Proteomics and *Penicillium chrysogenum*: unveiling the secrets behind penicillin production. *J Proteomics* 2019; 198: 119–31.
- [5] Dzharfarov MK, Vasilevich FI, Mirzaev MN. Production of avermectins: biotechnologies and organic synthesis. *Sel' skokhozyaistvennaya Biol* 2019; 54(2):199–215.
- [6] Chen X, Fan Y, Zheng Y, Shen Y. Properties and production of valienamine and its related analogues. *Chem Rev* 2003;103(5):1955–78.
- [7] Lu YL, Zhou Y, Li JF, Xu JJ, Bao YL, Chen XL. Research progress for preparation and purification of validoxylamine A. *Agrochemicals* 2017;56(6): 395–9. Chinese.
- [8] Mitsuishi M, Cao J, Bártolo P, Friedrich D, Shih AJ, Rajurkar K, et al. Biomanufacturing. *CIRP Ann* 2013;62(2):585–606.
- [9] Barrios-González J, Miranda RU. Biotechnological production and applications of statins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85(4):869–83.
- [10] Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B* 2010;86(5):484–93.
- [11] Carbonell T, Freire E. Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. *Biochemistry* 2005;44(35):11741–8.
- [12] Sarr FS, André C, Guillaume YC. Statins (HMG-coenzyme A reductase inhibitors) – biomimetic membrane binding mechanism investigated by molecular chromatography. *J Chromatogr B* 2008;868(1–2):20–7.
- [13] Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot* 1976;29(12):1346–8.
- [14] Endo A. Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *J Med Chem* 1985;28(4): 401–5.
- [15] Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochim Biophys Acta* 1979;575(2):266–76.
- [16] Yamamoto A, Sudo H, Endo A. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1980;35(3):259–66.
- [17] Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot* 1979;32(8):852–4.
- [18] Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(7):3957–61.
- [19] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 1986;25(7):583–602.
- [20] Barrios-González J, Pérez-Sánchez A, Bibián ME. New knowledge about the biosynthesis of lovastatin and its production by fermentation of *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104(21):8979–98.
- [21] Chen CH, Hu HY, Cho YC, Hsu WH. Screening of compactin-resistant microorganisms capable of converting compactin to pravastatin. *Curr Microbiol* 2006;53(2):108–12.
- [22] Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58(5):555–64.
- [23] Syed MB, Rajasimman M. Fermentative production and optimization of mevastatin in submerged fermentation using *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Rep* 2015;6:124–8.
- [24] Zaffer Ahmad M, Panda BP, Javed S, Ali M. Production of mevastatin by solid-state fermentation using wheat bran as substrate. *Res J Microbiol* 2006; 1(5):443–7.
- [25] Coton M, Hymery N, Piqueras J, Poirier E, Mounier J, Coton E, et al. *Monascus* spp. used in wheat kernel solid-state fermentations: growth, extrolite production and citrinin cytotoxicity. *World Mycotoxin J* 2019;12(3):223–32.
- [26] Javed S, Bukhari SA, Ali M, Sajjad-ur-Rehman. Estimation of antifungal activity of mevastatin produced by *Aspergillus terreus* GCBL-03 on pretreated substrate in solid state fermentation. *Curr Pharm Biotechnol* 2016;17(3):291–8.
- [27] Wang TH, Lin TF. *Monascus* rice products. *Adv Food Nutr Res* 2007; 53: 123–59.
- [28] Lin YL, Wang TH, Lee MH, Su NW. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;77(5):965–73.
- [29] Ghosh S, Dam B. Genome shuffling improves pigment and other bioactive compound production in *Monascus purpureus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104(24):10451–63.
- [30] Feng Y, Chen W, Chen F. A *Monascus pilosus* MS-1 strain with high-yield monacolin K but no citrinin. *Food Sci Biotechnol* 2016;25(4):1115–22.
- [31] Lee CL, Hung HK, Wang JJ, Pan TM. Red mold dioscorea has greater hypolipidemic and antiatherosclerotic effect than traditional red mold rice and unfermented dioscorea in hamsters. *J Agric Food Chem* 2007;55(17):7162–9.
- [32] Subhan M, Faryal R, Macreadie I. Exploitation of *Aspergillus terreus* for the production of natural statins. *J Fungi* 2016;2(2):13.
- [33] Vilches Ferrón MA, Casas López JL, Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM, Chisti Y. Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World J Microbiol Biotechnol* 2005;21(2):123–5.
- [34] Vinci VA, Hoerner TD, Coffman AD, Schimmel TG, Dabora RL, Kirpekar AC, et al. Mutants of a lovastatin-hyperproducing *Aspergillus terreus* deficient in the production of sulochrin. *J Ind Microbiol* 1991;8:113–9.
- [35] Jia Z, Zhang X, Zhao Y, Cao X. Enhancement of lovastatin production by supplementing polyketide antibiotics to the submerged culture of *Aspergillus terreus*. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;160(7):2014–25.
- [36] Mukhtar H, Ijaz SS, Ikram-ul-Haq. Upstream and downstream processing of lovastatin by *Aspergillus terreus*. *Cell Biochem Biophys* 2014;70(1):309–20.
- [37] Sreedevi K, Venkateswara R, Lakshmi NJ, Fareedullah MD. Strain improvement of *Aspergillus terreus* for the enhanced production of lovastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor. *J Microbiol Biotechnol Res* 2011;1(2):96–100.
- [38] Hasan H, Abd Rahim MH, Campbell L, Carter D, Abbas A, Montoya A. Overexpression of acetyl-CoA carboxylase in *Aspergillus terreus* to increase lovastatin production. *New Biotechnol* 2018;44:64–71.
- [39] Hasan H, Abd Rahim MH, Campbell L, Carter D, Abbas A, Montoya A. Improved lovastatin production by inhibiting (+) -geodin biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *New Biotechnol* 2019;52:19–24.
- [40] Askenazi M, Driggers EM, Holtzman DA, Norman TC, Iverson S, Zimmer DP, et al. Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. *Nat Biotechnol* 2003;21(2): 150–6.
- [41] Mulder KC, Mulinari F, Franco OL, Soares MSF, Magalhães BS, Parachin NS. Lovastatin production: from molecular basis to industrial process optimization. *Biotechnol Adv* 2015;33(6 Pt 1):648–65.
- [42] Boruta T, Bizukoje M. Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. *World J Microbiol Biotechnol* 2017; 33(2):34.
- [43] Ansari S, Jalili H, Bizukoje M, Amrane A. Influence of the construction of porous spargers on lovastatin production by *Aspergillus terreus* ATCC 20,542 in a laboratory bubble column. *Bioprocess Biosyst Eng* 2019;42(7):1205–13.
- [44] Raina S, De Vizio D, Palonen EK, Odell M, Brandt AM, Soini JT, et al. Is quorum sensing involved in lovastatin production in the filamentous fungus *Aspergillus terreus*? *Process Biochem* 2012;47(5):843–52.

- [45] Park JW, Lee JK, Kwon TJ, Yi DH, Kim YJ, Moon SH, et al. Bioconversion of compactin into pravastatin by *Streptomyces* sp. *Biotechnol Lett* 2003;25(21):1827–31.
- [46] Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 1992;33(11):1569–82.
- [47] Yamashita H, Tsubokawa S, Endo A. Microbial hydroxylation of compactin (ML-236B) and monacolin K. *J Antibiot* 1985;38(5):605–9.
- [48] Serizawa N. Biochemical and molecular approaches for production of pravastatin, a potent cholesterol-lowering drug. *Biotechnol Annu Rev* 1996;2:373–89.
- [49] Ahmad A, Mujeeb M, Kapoor R, Panda B. In situ bioconversion of compactin to pravastatin by *Actinomyces* species in fermentation broth of *Penicillium citrinum*. *Chem Pap* 2013;67(6):667–71.
- [50] Mei MQ, Ji XM, Gao XL, Chen Y, Li Y, Yao Y, et al., inventors; Shanghai Techwell Biopharmaceutical Co., Ltd., assignee. Microorganism and the process for preparation of pravastatin sodium. United States patent US 7582464. 2009 Sep 1.
- [51] Ahmad A, Panda BP, Mujeeb M. Screening of nutrient parameters for mevastatin production by *Penicillium citrinum* MTCC 1256 under submerged fermentation using the Plackett–Burman design. *J Pharm Bioallied Sci* 2010;2(1):44–6.
- [52] Dzhavakhiya VV, Voinova TM, Glagoleva EV, Petukhov DV, Ovchinnikov AI, Kartashov MI, et al. Strain improvement of *Streptomyces xanthochromogenes* RIA 1098 for enhanced pravastatin production at high compactin concentrations. *Indian J Microbiol* 2015;55(4):440–6.
- [53] Peng Y, Yashpbe J, Demain AL. Biotransformation of compactin to pravastatin by *Actinomyces* sp. 2966. *J Antibiot* 1997;50(12):1032–5.
- [54] Zhong X, Qian J, Guo H, Hu Y, Liu M. Biosynthesis of sucrose-6-acetate catalyzed by surfactant-coated *Candida rugosa* lipase immobilized on sol–gel supports. *Bioprocess Biosyst Eng* 2014;37(5):813–8.
- [55] McLean KJ, Hans M, Meijrink B, van Scheppingen WB, Vollebregt A, Tee KL, et al. Single-step fermentative production of the cholesterol-lowering drug pravastatin via reprogramming of *Penicillium chrysogenum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(9):2847–52.
- [56] Ito S, Matsuoka T, Watanabe I, Kagasaki T, Serizawa N, Hata T. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of cytochrome P450_{sta-2} from *Streptomyces carbophilus* involved in production of pravastatin sodium, a tissue-selective inhibitor of HMG-CoA reductase. *Acta Crystallogr D* 1999;55(6):1209–11.
- [57] Slettinger M, Verhoeven TR, Volante RP, inventors; Merck and Co., Inc., assignee. Process for C-methylation of 2-methylbutyrates. United States patent US 4582915A. 1986 Apr 15.
- [58] Askin D, Verhoeven TR, Liu TMH, Shinkai I. Synthesis of synvinolin: extremely high conversion alkylation of an ester enolate. *J Org Chem* 1991;56(16):4929–32.
- [59] Dabak K, Adiyaman M. A new method for the synthesis of antihypercholesterolemic agent simvastatin. *Helv Chim Acta* 2003;86(3):673–7.
- [60] Hoffman WF, Smith RL, Willard AK, inventors; MSD Technology, L.P., Merck Capital Resources, Inc., assignees. Antihypercholesterolemic compounds. United States patent US 4444784A. 1984 Apr 24.
- [61] Verhoeven TR, Askin D, inventors; Technology, L.P. MSD, assignee. Process for α -C-alkylation of the 8-acyl group on mevinolin and analogs thereof. United States patent US 4820850A. 1989 Apr 11.
- [62] Kumar Y, Thaper RK, Misra S, Kumar SMD, Khanna JM, inventors; Sun Pharmaceutical Industries, Ltd., assignee. Process for manufacturing simvastatin from lovastatin or mevinolinic acid. United States patent US 5763646A. 1998 Jun 9.
- [63] Joshi NS, Bhirud S, Rao K, inventors; PharmaceuticalsGlenmark, Ltd., assignee. Process for the preparation of simvastatin. United States patent US 20050239885A1. 2005 Oct 27.
- [64] Xie X, Tang Y. Efficient synthesis of simvastatin by use of whole-cell biocatalysis. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(7):2054–60.
- [65] Sorensen JL, Auclair K, Kennedy J, Hutchinson CR, Vederas JC. Transformations of cyclic nonaketides by *Aspergillus terreus* mutants blocked for lovastatin biosynthesis at the *lovA* and *lovC* genes. *Org Biomol Chem* 2003;1(1):50–9.
- [66] Gao X, Xie X, Pashkov I, Sawaya MR, Laidman J, Zhang W, et al. Directed evolution and structural characterization of a simvastatin synthase. *Chem Biol* 2009;16(10):1064–74.
- [67] Hutchinson CR, Kennedy J, Park C, Kendrew S, Auclair K, Vederas J. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Anton Leeuw* 2000;78(3):287–95.
- [68] Xie X, Watanabe K, Wojcicki WA, Wang CCC, Tang Y. Biosynthesis of lovastatin analogs with a broadly specific acyltransferase. *Chem Biol* 2006;13(11):1161–9.
- [69] Huang X, Liang Y, Yang Y, Lu X. Single-step production of the simvastatin precursor monacolin J by engineering of an industrial strain of *Aspergillus terreus*. *Metab Eng* 2017;42:109–14.
- [70] Morgan B, Burk M, Levin M, Zhu ZL, Chaplin J, Kustedjo K, et al., inventors; BASF Enzymes LLC, assignee. Methods for making simvastatin and intermediates. United States patent US 7700329B2. 2010 Apr 20.
- [71] Liang B, Huang X, Teng Y, Liang Y, Yang Y, Zheng L, et al. Enhanced single-step bioproduction of the simvastatin precursor monacolin J in an industrial strain of *Aspergillus terreus* by employing the evolved lovastatin hydrolase. *Biotechnol J* 2018;13(6):1800094.
- [72] Liang Y, Lu X. Structural insights into the catalytic mechanism of lovastatin hydrolase. *J Biol Chem* 2020;295(4):1047–55.
- [73] Xie X, Pashkov I, Gao X, Guerrero JL, Yeates TO, Tang Y. Rational improvement of simvastatin synthase solubility in *Escherichia coli* leads to higher whole-cell biocatalytic activity. *Biotechnol Bioeng* 2009;102(1):20–8.
- [74] Jiménez-Osés G, Osuna S, Gao X, Sawaya MR, Gilson L, Collier SJ, et al. The role of distant mutations and allosteric regulation on LovD active site dynamics. *Nat Chem Biol* 2014;10(6):431–6.
- [75] Wolberg M, Filho MV, Bode S, Geilenkirchen P, Feldmann R, Liese A, et al. Chemoenzymatic synthesis of the chiral side-chain of statins: application of an alcohol dehydrogenase catalysed ketone reduction on a large scale. *Bioprocess Biosyst Eng* 2008;31(3):183–91.
- [76] Lv SX, Guo YH, Wang YP, Wang XJ, Xiang WS. Synthesis of (R)-4-cyano-3-hydroxybutyric acid ethyl ester. *Chin J Org Chem* 2009;29(12):1997–9. Chinese.
- [77] Kumar Y, Kumar SMD, Sathyanarayana S, inventors; LaboratoriesRanbaxy, Ltd., assignee. Process for the production of atorvastatin calcium in amorphous form. United States patent US 20090216029A1. 2009 Aug 27.
- [78] Wang ZL, Ying J, Lin SC, Yao ZY, Deng WP, Du WT. Progress in synthesis of atorvastatin calcium. *Chin J Mod Appl Pharm* 2011;28(5):423–8. Chinese.
- [79] Zheng YG, Yin HH, Yu DF, Chen X, Tang XL, Zhang XJ, et al. Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;101(3):987–1001.
- [80] Hasnaoui-Dijoux G, Majeric' Elenkov M, Lutje Spelberg JH, Hauer B, Janssen DB. Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening. *ChemBiochem* 2008;9(7):1048–51.
- [81] Liu ZQ, Ye JJ, Shen ZY, Hong HB, Yan JB, Lin Y, et al. Upscale production of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by using carbonyl reductase coupled with glucose dehydrogenase in aqueous-organic solvent system. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99(5):2119–29.
- [82] Wan NW, Liu ZQ, Xue F, Shen ZY, Zheng YG. A one-step biocatalytic process for (S)-4-chloro-3-hydroxybutyronitrile using halohydrin dehalogenase: a chiral building block for atorvastatin. *ChemCatChem* 2015;7(16):2446–50.
- [83] Wang YJ, Shen W, Luo X, Liu ZQ, Zheng YG. Enhanced diastereoselective synthesis of t-butyl 6-cyano-(3R,5R)-dihydroxyhexanoate by using aldo-keto reductase and glucose dehydrogenase co-producing engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2017;33(5):1235–42.
- [84] Li X, Ma M, Xin X, Tang Y, Zhao G, Xiao X. Efficient acylation of gastrodin by *Aspergillus oryzae* whole-cells in non-aqueous media. *RSC Adv* 2019;9(29):16701–12.
- [85] Barbas III CF, Wang YF, Wong CH. Deoxyribose-5-phosphate aldolase as a synthetic catalyst. *J Am Chem Soc* 1990;112(5):2013–204.
- [86] Ošljaj M, Cluzeau J, Orkić D, Kopitar G, Mrak P, Časar Z. A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis. *PLoS One* 2013;8(5):e62250.
- [87] Kim YM, Choi NS, Kim YO, Son DH, Chang YH, Song JJ, et al. Expression and characterization of a novel deoxyribose 5-phosphate aldolase from *Paenibacillus* sp. EA001. *J Microbiol Biotechnol* 2010;20(6):995–1000.
- [88] Kim YM, Chang YH, Choi NS, Kim Y, Song JJ, Kim JS. Cloning, expression, and characterization of a new deoxyribose 5-phosphate aldolase from *Yersinia* sp. EA015. *Protein Expr Purif* 2009;68(2):196–200.
- [89] Han TK, Zhu Z, Dao ML. Identification, molecular cloning, and sequence analysis of a deoxyribose aldolase in *Streptococcus mutans* GS-5. *Curr Microbiol* 2004;48(3):230–6.
- [90] Yin XP, Wang QY, Zhao SJ, Du PF, Xie KL, Jin P, et al. Cloning and characterization of a thermostable 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase from *Aciduliprofundum boonei*. *Afr J Biotechnol* 2011;10(72):16260–6.
- [91] Lokanath NK, Shiromizu I, Ohshima N, Nodake Y, Sugahara M, Yokoyama S, et al. Structure of aldolase from *Thermus thermophilus* HB8 showing the

- contribution of oligomeric state to thermostability. *Acta Crystallogr D* 2004; 60(10):1816–23.
- [92] You ZY, Liu ZQ, Zheng YG, Shen YC. Characterization and application of a newly synthesized 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013;40(1):29–39.
- [93] Wan NW, Liu ZQ, Xue F, Huang K, Tang LJ, Zheng YG. An efficient high-throughput screening assay for rapid directed evolution of halohydrin dehalogenase for preparation of β -substituted alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99(9):4019–29.
- [94] Liu ZQ, Zheng YG, Wan NW, Shen YC, inventors; Zhejiang University of Technology, assignee. [Mutants of haloalcohol dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* and their application]. Chinese patent CN 10474557B. 2015 Jul 1. Chinese.
- [95] Zhang XJ, Deng HZ, Liu N, Gong YC, Liu ZQ, Zheng YG. Molecular modification of a halohydrin dehalogenase for kinetic regulation to synthesize optically pure (*S*)-epichlorohydrin. *Bioresour Technol* 2019;276:154–60.
- [96] Luo Y, Chen Y, Ma H, Tian Z, Zhang Y, Zhang J. Enhancing the biocatalytic manufacture of the key intermediate of atorvastatin by focused directed evolution of halohydrin dehalogenase. *Sci Rep* 2017;7(1):42064.
- [97] Qin YL, Ruan T, Hou HS, Hou YL, Yang ZH, Quan C. A novel thermal stable carbonyl reductase from *Bacillus cereus* by gene mining as biocatalyst for β -carbonyl ester asymmetric reduction reaction. *Catal Lett* 2019;149(2):610–8.
- [98] Liu ZQ, Yin HH, Zhang XJ, Zhou R, Wang YM, Zheng YG. Improvement of carbonyl reductase activity for the bioproduction of *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate. *Bioorg Chem* 2018;80:733–40.
- [99] Yu H, Qiu S, Cheng F, Cheng YN, Wang YJ, Zheng YG. Improving the catalytic efficiency of aldo-keto reductase *KmAKR* towards *t*-butyl 6-cyano-(3*R*,5*R*)-dihydroxyhexanoate via semi-rational design. *Bioorg Chem* 2019; 90: 103018.
- [100] Luo X, Wang YJ, Shen W, Zheng YG. Activity improvement of a *Kluyveromyces lactis* aldo-keto reductase *KIAKR* via rational design. *J Biotechnol* 2016;224:20–6.
- [101] Shen W, Chen Y, Qiu S, Wang DN, Wang YJ, Zheng YG. Semi-rational engineering of a *Kluyveromyces lactis* aldo-keto reductase *KIAKR* for improved catalytic efficiency towards *t*-butyl 6-cyano- (3*R*,5*R*)-dihydroxyhexanoate. *Enzyme Microb Technol* 2020;132:109413.
- [102] You ZY, Liu ZQ, Zheng YG. Characterization of a newly synthesized carbonyl reductase and construction of a biocatalytic process for the synthesis of ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate with high space–time yield. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98(4):1671–80.
- [103] Li X, Luo YD, Pan DR, Shi XD, Tan YL, Li ZH. Effect of Zn²⁺ on halohydrin dehalogenase expression and accumulation through multi-parameter correlation research with *Escherichia coli* P84A/MC1061. *Bioengineered* 2017; 8(5): 585–93.
- [104] Liu ZQ, Hu ZL, Zhang XJ, Tang XL, Cheng F, Xue YP, et al. Large-scale synthesis of *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate by a stereoselective carbonyl reductase with high substrate concentration and product yield. *Biotechnol Prog* 2017;33(3):612–20.
- [105] Zhang XJ, Zheng L, Wu D, Zhou R, Liu ZQ, Zheng YG. Production of *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate using carbonyl reductase coupled with glucose dehydrogenase with high space–time yield. *Biotechnol Prog* 2020;36(1):e2900.
- [106] Xue F, Liu ZQ, Wang YJ, Wan NW, Zheng YG. Biochemical characterization and biosynthetic application of a halohydrin dehalogenase from *Tistrella mobilis* ZJB1405. *J Mol Catal B* 2015;115:105–12.
- [107] Wan NW, Liu ZQ, Huang K, Shen ZY, Xue F, Zheng YG, et al. Synthesis of ethyl (*R*)-4-cyano-3-hydroxybutyrate in high concentration using a novel halohydrin dehalogenase HHDH-PL from *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1. *RSC Adv* 2014;4(109):64027–31.
- [108] Giver LJ, Newman LM, Mundorff E, Huisman GW, Jenne SJ, Zhu J, et al., inventors; Codexis, Inc., assignee. Compositions and methods for producing stereoisomerically pure statins and synthetic intermediates therefor. United States patent US 20110195465. 2011 Aug 11.
- [109] Giver LJ, Newman LM, Mundorff E, Huisman GW, Jenne SJ, Zhu J, et al., inventors; Codexis, Inc., assignee. Polynucleotides encoding ketoreductases for producing stereoisomerically pure statins and synthetic intermediates therefor. United States patent US 20130040364. 2013 Feb 14.
- [110] Giver LJ, Newman LM, Mundorff E, Huisman GW, Jenne SJ, Zhu J, et al., inventors; Codexis, Inc., assignee. Compositions and methods for producing stereoisomerically pure statins and synthetic intermediates therefor. United States patent US 20080248539. 2008 Oct 9.
- [111] Wang YJ, Chen XP, Shen W, Liu ZQ, Zheng YG. Chiral diol *t*-butyl 6-cyano-(3*R*,5*R*)-dihydroxyhexanoate synthesis catalyzed by immobilized cells of carbonyl reductase and glucose dehydrogenase co-expression *E. coli*. *Biochem Eng J* 2017;128:54–62.
- [112] Qiu S, Wang YJ, Yu H, Cheng F, Zheng YG. *t*-Butyl 6-cyano- (3*R*,5*R*)-dihydroxyhexanoate synthesis via asymmetric reduction by immobilized cells of carbonyl reductase and glucose dehydrogenase co-expression *E. coli*. *Process Biochem* 2019;80:43–51.
- [113] Liu ZQ, Zheng YG, Zhang XJ, Yao DK, Wang YJ, Zheng L, et al., inventors; Zhejiang University of Technology, assignee. [Immobilization of carbonyl reductase cells by genetically engineered bacteria and its application]. Chinese patent CN 107653238A. 2018 Feb 2. Chinese.
- [114] Zhang XJ, Wang WZ, Zhou R, Liu ZQ, Zheng YG. Asymmetric synthesis of *tert*-butyl (3*R*,5*S*)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate using a self-sufficient biocatalyst based on carbonyl reductase and cofactor co-immobilization. *Bioprocess Biosyst Eng* 2020;43(1):21–31.
- [115] Liu ZQ, Zhang XJ, Zheng YG, Wang WZ, Wu D, inventors; Zhejiang University of Technology, assignee. [Preparation and application of carbonyl reductase-coenzyme NADP⁺ co-immobilized enzyme]. Chinese patent CN 110423741A. 2019 Nov 8. Chinese.
- [116] Zhou KL, Liu H, Chen ZR, Hong HB, Sun Y, Wang YD, et al., inventors; Zhejiang Lepu Pharmaceutical Co., Ltd., assignee. [Preparation method of high purity crystalline atorvastatin sodium]. Chinese patent CN 100503564. 2009 Jun 24. Chinese.
- [117] Zhou JW, Yang DW, inventors; Zhejiang Lepu Pharmaceutical Co., Ltd., assignee. [Method for refining atorvastatin intermediate]. Chinese patent CN 101205209B. 2010 Jun 2. Chinese.
- [118] Zhou KL, Liu H, Chen ZR, Hong HB, Sun Y, Wang YD, et al., inventors; Zhejiang Lepu Pharmaceutical Co., Ltd., assignee. [Preparation method of high purity atorvastatin calcium]. Chinese patent CN 100484920. 2009 May6. Chinese.
- [119] Rosenthal K, Lütz S. Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry. *Curr Opin Green Sustainable Chem* 2018;11:58–64.
- [120] Hoyos P, Pace V, Alcántara A. Biocatalyzed synthesis of statins: a sustainable strategy for the preparation of valuable drugs. *Catalysts* 2019;9(3):260.
- [121] Wang T, Guan C, Guo J, Liu B, Wu Y, Xie Z, et al. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance. *Nat Commun* 2018;9(1):2475.
- [122] Mo XH, Zhang H, Wang TM, Zhang C, Zhang C, Xing XH, et al. Establishment of CRISPR interference in *Methylorubrum extorquens* and application of rapidly mining a new phytoene desaturase involved in carotenoid biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104(10):4515–32.
- [123] Jian X, Guo X, Wang J, Tan ZL, Xing XH, Wang L, et al. Microbial microdroplet culture system (MMC): an integrated platform for automated, high-throughput microbial cultivation and adaptive evolution. *Biotechnol Bioeng* 2020;117(6):1724–37.
- [124] Ma C, Tan ZL, Lin Y, Han S, Xing X, Zhang C. Gel microdroplet-based high-throughput screening for directed evolution of xylanase-producing *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* 2019;128(6):662–8.
- [125] Feng H, Yuan Y, Yang Z, Xing XH, Zhang C. Genome-wide genotype-phenotype associations in microbes. *J Biosci Bioeng* 2021;132(1):1–8.
- [126] Cui Y, Wang Y, Tian W, Bu Y, Li T, Cui X, et al. Development of a versatile and efficient C–N lyase platform for asymmetric hydroamination via computational enzyme redesign. *Nat Catal* 2021;4(5):364–73.