

# 分枝杆菌转化植物甾醇定向积累甾药中间体的代谢工程研究进展

李辉, 郭霞凌

(大邦(湖南)生物制药有限公司, 长沙 410221)

**摘要:**甾体激素类药物在医药工业中地位突出,是仅次于抗生素的第二大类化学药物。甾体激素类药物的合成往往依赖于AD、ADD、 $9\alpha$ -OH-AD、4-BNA等关键中间体的高质量生产,工业微生物转化植物甾醇发酵生产甾药中间体已成为当今甾体药物工业发展的主流。综述了工业分枝杆菌转化植物甾醇的代谢途径、关键酶系和分子机制,归纳了近年来利用基因工程技术对分枝杆菌植物甾醇代谢途径进行改造以定向积累目标甾药中间体的研究进展,并对未来的研究方向进行了预测,以期甾药中间体的绿色生物制造提供有价值的参考。

**关键词:**分枝杆菌;植物甾醇;生物转化;甾药中间体;代谢途径;代谢工程

中图分类号:R93;Q81

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)04-0125-08

## Advance in metabolic engineering for bioconversion of phytosterols into steroid metabolites by *Mycobacterium* sp.

LI Hui, GUO Xialing

(Argus Pharmaceuticals Co., Ltd., Changsha 410221, China)

**Abstract:** Steroid hormone drug is an important category in the pharmaceutical industry, and is the second largest drug after antibiotic. The synthesis of almost all steroid hormone drug starts from the quality production of steroid metabolites such as AD, ADD,  $9\alpha$ -OH-AD and 4-BNA. Bioconversion of phytosterols into steroid metabolites has become the mainstream of industrial production of steroid drugs. The metabolic pathway, key enzymes and molecular mechanism involved in phytosterols degradation by *Mycobacterium* sp. were reviewed, and the research progress on using genetic engineering technology to modify the phytosterol metabolic pathway of *Mycobacterium* sp. to accumulate target steroid metabolites in recent years were summarized. The future research direction was predicted in order to provide a valuable reference for the green biological manufacture of steroid metabolites.

**Key words:** *Mycobacterium* sp.; phytosterols; bioconversion; steroid metabolites; metabolic pathway; metabolic engineering

甾体激素类药物是一类分子结构中含有环戊烷并多氢菲母核结构,具有很强的抗感染、抗过敏、抗病毒和抗休克等药理活性的药物,对人体生命活动起着非常重要的调节作用<sup>[1]</sup>,临床上被广泛应用于抗皮炎(氟轻松、地塞米松等)、抗哮喘(氟替卡松、

布地奈德等)、抗肿瘤(福美司坦、氟维司群等)、抗前列腺增生(度他雄胺、非那雄胺等)、抗骨质疏松(癸酸诺龙、美替诺龙等)、利尿降压(螺内酯、依普利酮等)、麻醉肌松(维库溴铵、罗库溴铵等)、避孕(曲美孕酮、米非司酮等)和保胎(黄体酮、烯丙雌醇等)等方面。目前国内外已上市的甾体激素类药物达400余种,已成为仅次于抗生素的第二大类化学药物<sup>[2]</sup>。

甾体药物构型复杂,工业上主要采用半合成法

收稿日期:2021-08-27;修回日期:2021-09-28

作者简介:李辉(1986),男,工程师,硕士,主要从事发酵工程与代谢工程育种研究(E-mail)liyuhui868@163.com。

通信作者:郭霞凌,博士(E-mail)xialingguo@qq.com。

生产,人们最初以从动物内脏提炼出的胆酸作为起始原料制备胆酸类甾体药物。20世纪40年代,美国化学家 Marker 利用薯蓣皂素经八步反应实现了孕甾酮的合成,开创了以天然植物皂苷元为起始原料制备醋酸双烯醇酮再进一步合成其他甾体药物的工艺路线<sup>[3-4]</sup>,并一直沿用至今。大约在同一时期,美国 Upjohn 公司开创了以从混合植物甾醇中分离出的豆甾醇为原料的工艺路线,通过化学法切断豆甾醇 C22 双键再经结构修饰改造后合成包含四大基础皮质激素在内的多种甾体药物<sup>[5]</sup>。两种工艺路线的推广应用与创新改进,大力推动了甾体药物的产业发展,为人类带来了大量的甾体药物,但均存在环境污染和资源浪费的弊端。1952年,Upjohn 公司 Peterson 等发现黑根霉(*Rhizopus nigricans*)可将孕甾酮一步转化为 $11\alpha$ -羟基孕甾酮,转化率高且专一性强,轻易解决了可的松合成过程中难以完成的反应,开创了微生物转化甾体化合物的先河,也掀起了甾体化合物微生物转化的研究热潮<sup>[6]</sup>。经过半个多世纪的发展,微生物转化技术已成为许多甾体药物或其中间体合成路线中不可缺少的关键技术,并逐步替代传统薯蓣皂素合成工艺成为当今甾体药物生产的主流。

植物甾醇是一类提取自植物油脂中的天然活性物质,主要包括菜籽甾醇、菜油甾醇、豆甾醇和 $\beta$ -谷甾醇。油脂加工副产物中蕴藏着极为丰富的植物甾醇资源,如菜籽油脚中含有10%左右的植物甾醇,脱臭馏出物中植物甾醇含量高达20%以上<sup>[7]</sup>。然而长期以来,这些廉价的天然植物甾醇资源并没有得到充分利用,因此植物甾醇的综合开发具有重大的经济效益和社会效益。植物甾醇与甾体药物的主体结构均是甾核,不同的只是侧链与双键的差异,植物甾醇的这些结构特点决定了其可以作为甾体药物半合成的原料。利用微生物转化植物甾醇得到雄甾-4-烯-3,17-二酮(Androst-4-ene-3,17-dione, AD)、雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(Androst-1,4-end-3,17-dione, ADD)、 $9\alpha$ -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮( $9\alpha$ -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione,  $9\alpha$ -OH-AD)、 $21$ -羟基- $20$ -甲基孕甾-4-烯-3-酮( $21$ -Hydroxy- $20$ -methylpregn-4-en-3-one, Bisnoralcohol, 4-BNA)等关键甾药中间体,再由其生产高附加值的甾体药物,已成为甾体医药工业普遍的生产技术,不仅有效提高了天然植物甾醇资源的利用率,还大大促进了甾体医药工业的发展。本文从代谢工程角度出发,综述了分枝杆菌转化植物甾醇生产甾药中间

体的研究进展,重点讨论了植物甾醇代谢途径、关键酶系和代谢工程改造进展等方面的问题,并展望了未来的研究方向。

## 1 植物甾醇转化微生物与分枝杆菌

研究表明,许多微生物都能将一些甾醇类化合物作为碳源利用,从而使其部分或完全降解,例如诺卡氏菌(*Nocardia* spp.)、红球菌(*Rhodococcus* spp.)、分枝杆菌(*Mycobacterium* spp.)、简单节杆菌(*Arthrobacter* spp.)、棒状杆菌(*Corynebacterium* spp.)和短杆菌(*Brevibacterium* spp.)等<sup>[8]</sup>。在降解甾醇类化合物的众多微生物菌属中,分枝杆菌(*Mycobacterium* spp.)和红球菌(*Rhodococcus* spp.)属能够高效积累关键甾药中间体AD、ADD或 $9\alpha$ -OH-AD等,因而引起研究者的广泛关注<sup>[9]</sup>。而在转化植物甾醇产甾药中间体的工业分枝杆菌属中,以新金分枝杆菌(*Mycolicibacterium neoaurum*)、偶发分枝杆菌(*Mycobacter foruitum*)和耻垢分枝杆菌(*Mycolicibacterium smegmatis*)的应用最为广泛。早在1944年Turfit<sup>[10]</sup>报道了分枝杆菌能够利用植物甾醇和胆固醇作为唯一碳源进行生长繁殖,但该菌株除了降解甾体侧链外,还能进一步降解甾体骨架,因此不能用于甾药中间体的生产。1969年Arima等<sup>[11]</sup>通过外源添加抑制剂的方法抑制了甾核的降解反应并成功生产ADD,从此开始了分枝杆菌降解各种甾醇合成甾药中间体的研究。1972年Marsheck等<sup>[12]</sup>用诱变方法筛选到分枝杆菌突变株*Mycobacterium* sp. NRRLB-3683,该菌株无需添加抑制剂即可以有效地降解胆固醇、植物甾醇等甾体化合物的侧链积累ADD和少量AD,该菌株进一步诱变得到了丧失C1,2脱氢酶活力的*Mycobacterium* sp. NRRLB-3805,其可高效积累AD。自20世纪80年代以来,分枝杆菌降解植物甾醇生产四大甾药中间体AD、ADD、 $9\alpha$ -OH-AD、4-BNA的技术得到充分发展并逐步应用于大规模工业化生产。

## 2 分枝杆菌转化植物甾醇的代谢途径与分子机制

以植物甾醇为起始原料的微生物转化技术是目前制备关键甾药中间体的主要途径,因此植物甾醇代谢途径的解析一直是该领域的研究热点。近年来,随着分枝杆菌中植物甾醇降解基因簇的克隆与功能分析,植物甾醇降解产物的分离与结构鉴定,分枝杆菌中植物甾醇代谢途径中的大部分环节已经被阐明,并提出了可能的甾醇代谢途径<sup>[13-14]</sup>。但是,由于分枝杆菌转化植物甾醇是一个极其复杂的多酶催化过程,目前对于植物甾醇代谢途径的解析并不完全。分枝杆菌转化植物甾醇的代谢途径主要分为

植物甾醇母核初步氧化、侧链降解、母核继续氧化和母核断裂4个阶段。

### 2.1 分枝杆菌转化植物甾醇的母核初步氧化过程

植物甾醇的分解代谢始于 C3 位  $\beta$  羟基氧化为  $\beta$  酮基和 C5,6 位双键异构化为 C4,5 位双键,参与该催化过程的酶系主要是  $3\beta$ -羟基甾体脱氢酶 ( $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase,  $3\beta$ -HSD) 和/或胆固醇氧化酶 (Cholesterol oxidase, Cho),可连续催化甾醇 C3 位羟基脱氢和 C5,6 位双键异构化。在 *M. neoaurum* ATCC 25795 中胆固醇氧化酶 (ChoM1 与 ChoM2) 是参与氧化脱氢与异构化阶段的关键酶<sup>[15]</sup>,*M. neoaurum* ATCC 25795 基因组中虽然存在  $3\beta$ -HSD,但其不是植物甾醇代谢所必需的酶。在分枝杆菌 *M. tuberculosis* 与 *M. smegmatis* 中催化这一阶段的关键酶是  $3\beta$ -HSD<sup>[16-17]</sup>,Cho 虽然参与了该步生物催化过程,但该酶在甾醇代谢中无法发挥决定性作用。 $3\beta$ -HSD 和 Cho 均需要以  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$  作为辅酶,编码基因均位于植物甾醇降解基因簇之外,也均受转录抑制因子 KstR 调控。

### 2.2 分枝杆菌转化植物甾醇的侧链降解过程

经  $3\beta$ -HSD/Cho 催化后,植物甾醇氧化为植物甾醇-4-烯-3-酮,由此开始植物甾醇侧链的降

解。侧链降解的第一步为 C27 位末端的氧化反应,由甾醇 C27 单加氧酶 (steroid C-27 monooxygenase, SMO) 催化,该酶是细胞色素 P450 加氧酶超家族中的一类,如 CYP125 等<sup>[18]</sup>。来源于 *M. tuberculosis* 的 CYP125A1 可以在 C27 位进行羟基化反应生成 27-羟基-4-烯-3-酮,并进一步氧化生成甾醇 C27 羧酸<sup>[19]</sup>。甾醇 C27 羧酸通过酰基 CoA 连接酶 (Fad) 进行酯化反应得到甾醇 C27-羧酰 CoA,进入类  $\beta$ -氧化过程。甾醇 C27-羧酰 CoA 经酰基 CoA 脱氢酶 (FadE family)、甲基巴豆酰化酶、烯酰 CoA 水合酶 (FadB family)、 $\beta$ -烯酰 CoA 脱氢酶和  $\beta$ -酮酰 CoA 硫解酶 (FadA family) 等类  $\beta$ -氧化酶系催化后,脱去一分子丙酰 CoA。然后经过 3 轮类似的类  $\beta$ -氧化,甾醇 C27-羧酰 CoA 侧链完全降解,生成 C19-甾体中间体 4-AD 以及三分子丙酰 CoA 和一分子乙酰 CoA<sup>[20-21]</sup>。在部分积累 C22-甾体中间体的菌株中,侧链不完全氧化,类  $\beta$ -氧化仅完成两轮,先后释放两分子丙酰 CoA 和一分子乙酰 CoA,形成 C22 位酮基化合物 4-BNA 和 3-羰基-23,24-去甲胆甾-4-烯-22-羧酸 (3-oxo-23,24-bisnorchol-4-en-22-oic acid, 4-BNC) 等中间体<sup>[22]</sup>。分枝杆菌转化植物甾醇的母核初步氧化与侧链降解途径如图 1 所示。

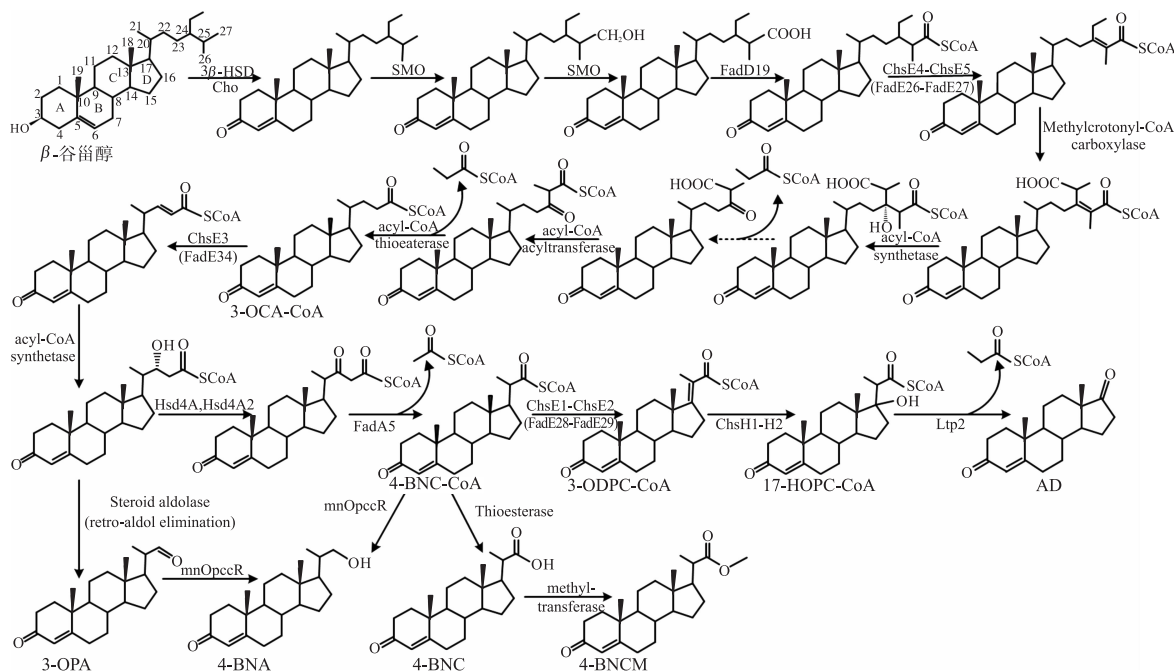


图 1 分枝杆菌转化植物甾醇的母核初步氧化与侧链降解途径

### 2.3 分枝杆菌转化植物甾醇的母核继续氧化过程

植物甾醇母核的继续氧化主要涉及重要甾药中间体 AD、ADD、 $9\alpha$ -OH-AD, 睾酮 (Testosterone, TS) 和宝丹酮 (Blodenone, BD) 等之间的相互转化

过程。该阶段涉及的重要酶系主要有 3-甾酮- $\Delta 1$ -脱氢酶 (3-Ketosteroid- $\Delta 1$ -dehydrogenase, KstD)、3-甾酮- $9\alpha$ -羟化酶系统 (3-Ketosteroid- $9\alpha$ -hydroxylase, KSH) 和  $17\beta$ -羟基甾体脱氢酶

( $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase,  $17\beta$ HSD4)。KstD 是一种 FAD 依赖型脱氢酶,能不可逆地催化甾体 A 环的 C1,2 位脱氢形成碳碳双键。分枝杆菌中往往存在多个 KstD 同工酶,功能差异的 KstD 同工酶在甾醇代谢过程中可参与不同甾体底物的降解,以保证对不同底物的高度适应性<sup>[23-24]</sup>。KSH 由末端加氧酶 3-甾酮- $9\alpha$  羟化酶(KshA)与 3-甾酮- $9\alpha$ -羟基化酶还原酶(KshB)双组分构成,其中:KshA 是主反应进行的活性中心,其与甾体物质的特异性结合是 KSH 进行  $9\alpha$ -羟基化反应的关键;KshB 是 KshA 的还原组件,负责将来自 NADH 的还原力传递给 KshA,使其从氧化态重新回到还原态并不断地在甾体的位置产生羟化反应。多数分枝杆菌中也含有多个 KshA 同工酶,在一些  $9\alpha$ -OH-AD 的积累菌中,其种类更为丰富<sup>[25-27]</sup>。 $17\beta$ HSD4 能可逆性地催化甾酮 C17 位的羟基和酮基之间的氧化/还原反应,实现 AD 和 TS 以及 ADD 和 BD 之间的相互转化<sup>[28]</sup>。 $17\beta$ HSD4 还具有  $\beta$ -羟酰-CoA-脱氢酶活性,是催化侧链降解第二轮类  $\beta$ -氧化过程中的关键酶,hsd4A 基因的缺失会导致 C22 代谢中间体的积累。分枝杆菌转化植物甾醇的母核继续氧化途径如图 2 所示。

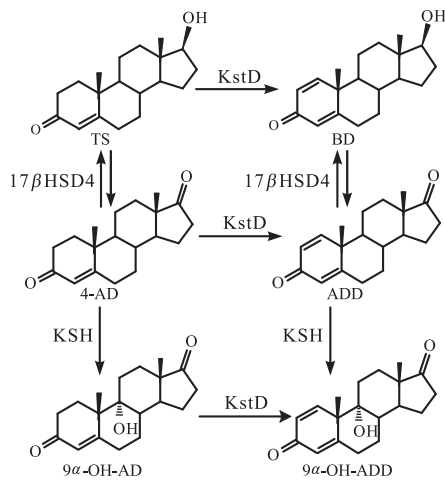


图 2 分枝杆菌转化植物甾醇的母核继续氧化途径

#### 2.4 分枝杆菌转化植物甾醇的母核断裂过程

AD 经 KSH 催化形成  $9\alpha$ -OH-AD,但  $9\alpha$ -OH-AD 并不是甾体转化的最终产物,可经 KstD 协同催化最终生成具有不稳定结构的  $9$ -OH-ADD, $9$ -OH-ADD 母核 A 环芳构化后使 B 环 C9,10 位键断裂异构为 3-羟基- $9,10$ -断裂雄甾- $1,3,5$ -三烯- $9,17$ -二酮(3-HSA)。随后 3-HSA 在 Hsa 家族环降解蛋白 3-HSA 羟化酶(HsaAB)、 $2,3$ -二羟基苯基双加氧酶(HsaC)和  $4,9$ -DHSA-水解酶(HsaD)连续催化作用下降解为  $1,5$ -二氧代-

$7\alpha\beta$ -甲基- $3\alpha\alpha$ -六氢茛满- $4\alpha$ -丙酸(HIP)和  $2$ -hydroxhexa- $2,4$ -dienoic acid<sup>[29-30]</sup>。HIP 是甾体母核降解途径中的一个关键中间产物,HIP 经酰基 CoA 合酶 FadD3 催化生成 HIP-CoA,从而在 A 环和 B 环降解完成后启动 C 环和 D 环的分解代谢<sup>[31]</sup>。 $2$ -hydroxhexa- $2,4$ -dienoic acid 经 HsaEFG 催化降解为丙酮酸盐和丙酸盐,最终被降解为  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ ,能量被用于微生物自身的新陈代谢。分枝杆菌转化植物甾醇的母核断裂降解途径如图 3 所示。

### 3 分枝杆菌转化植物甾醇代谢工程改造

优质高产的菌种是实现微生物高效发酵生产药物的关键,诱变育种技术在获得甾体生物转化工业分枝杆菌的过程中发挥了关键作用并取得了巨大成功,已经选育出能高效转化植物甾醇分别生产 AD、ADD、 $9\alpha$ -OH-AD、 $4$ -BNA 的工业生产菌种。但传统诱变育种往往存在一定的盲目性、随机性和不可预测性,很难使菌株的代谢途径朝人们所希望的方向定向进化。随着工业微生物遗传育种技术的不断创新,传统诱变育种已向高效、精准、定向的分子设计育种转变。分枝杆菌转化植物甾醇代谢途径的分子基础与调控机制已经得到部分阐明,为利用代谢工程技术理性化改造工业分枝杆菌,获得高产和优产菌株以及创造新的甾药中间体提供了可行性,分枝杆菌转化植物甾醇代谢工程改造的常见思路主要有提升细胞通透性和植物甾醇底物利用率、过表达或敲除植物甾醇降解途径中的关键酶基因、阻断分支代谢途径等。

#### 3.1 提升细胞通透性和植物甾醇底物利用率

植物甾醇属脂溶性化合物,在水中溶解度很低,而植物甾醇转化酶系大多属于胞内酶,植物甾醇底物只有扩散进入细胞才能被生物转化,所以细胞壁的通透性是植物甾醇转化成功与否的关键。研究表明,植物甾醇的摄取是由 Mce4 转运系统介导的主动运输过程,需要能量和跨膜蛋白的协助<sup>[32]</sup>。提高 Mce4 转运系统的活性,理论上将有助于提高分枝杆菌对底物植物甾醇的转化效率,但张怀成<sup>[33]</sup>尝试提高 Mce4 基因簇中的 *sup4A/B* 基因的拷贝数实现转运功能的强化,最终效果并不显著,由此推测 *sup4A/B* 基因可能与其他一些蛋白以复合体的形式在 Mce4 转运系统中起作用。He 等<sup>[34]</sup>将来自结核分枝杆菌的 Mce4 转运系统关键基因 *yrbE4A*、*yrbE4B* 和 ATP 酶编码基因 *mceG* 在分枝杆菌 MS136 中共表达,组成的植物甾醇转运系统 *mceG-yrbE4A-yrbE4B* 对植物甾醇的摄取能力有了明显的提高,在植物甾醇投料量为  $13.2$  g 条件下, $9\alpha$ -OH-AD 最大产量由  $5.06$  g 提高至  $6.02$  g,产物得率提高了  $19\%$ 。



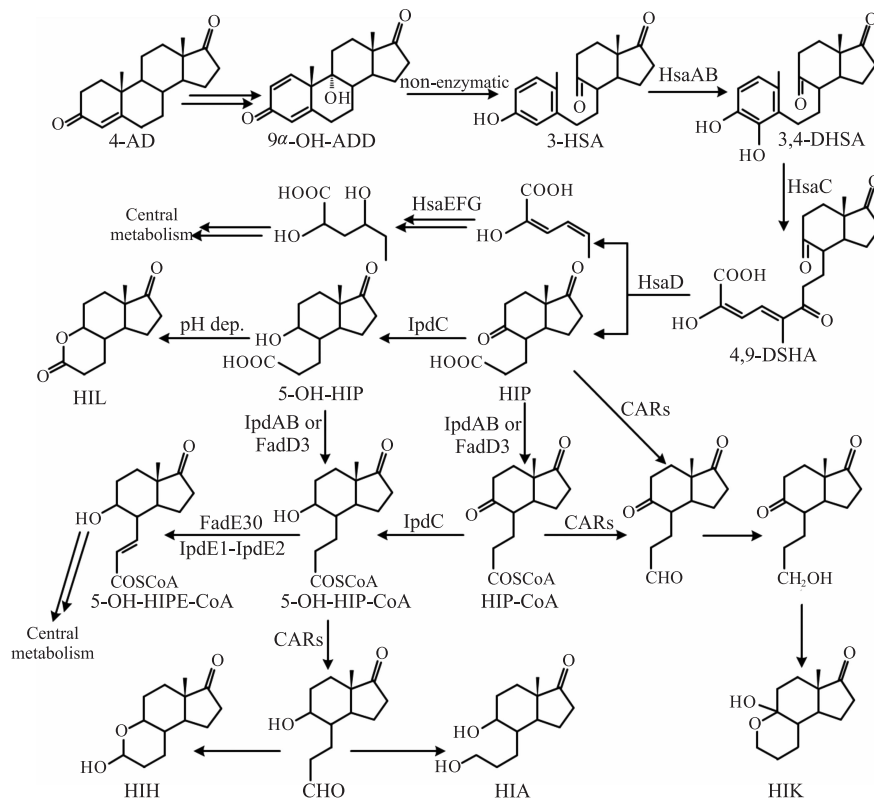


图 3 分枝杆菌转化植物甾醇的母核断裂降解途径

分枝杆菌细胞膜外的分枝菌酸被膜结构,为菌体细胞提供了一个致密的屏障层,然而该结构却严重影响了菌株对甾醇底物的利用效率。通过删除与细胞被膜形成有关的一些关键基因,理论上可提升细胞通透性和植物甾醇利用率,进而提高工业分枝杆菌对植物甾醇的代谢效率。Xiong 等<sup>[35]</sup>在野生型 *M. neoaurum* ATCC 25795 中删除膜蛋白 3 编码基因 *mmpL3*,细胞通透性提升约 23.4%,对植物甾醇的利用效率提升约 15.6%。随后在 4-BNA 生产菌株中删除 *mmpL3*,使 BNA 产量提升约 24.7%。Xiong 等<sup>[36]</sup>继续在  $9\alpha$ -OH-AD 生产菌株中删除分枝菌酸合成过程中的一个酰基载体蛋白合成酶的编码基因 *kasB*, $9\alpha$ -OH-AD 的产量提升了 1.4 倍,进一步证明分枝杆菌细胞壁的确是影响植物甾醇摄取转化的关键因素,而干扰细胞壁的主要成分分枝菌酸的正常合成,可显著提高细胞壁的通透性,从而增加分枝杆菌对植物甾醇的转化能力。

### 3.2 过表达或敲除植物甾醇代谢途径中的关键基因

植物甾醇氧化成甾酮是植物甾醇代谢的第一步反应和限速步骤,胆固醇氧化酶(Cho)在这步反应过程中扮演着十分重要的角色,是影响底物摄取和跨膜转运的关键因素。通过强化工业分枝杆菌中 *Cho* 基因的表达,可有效提高菌株对底物植物甾醇的摄取与转化能力,从而实现植物甾醇的高效转化

与产量提高。Yao 等<sup>[15]</sup>从 *M. neoaurum* ATCC 25795 中鉴定了两种不同细胞分布方式的 Cho 同工酶 ChoM1 与 ChoM2,并通过强化胞外分泌型 ChoM2 的过表达,显著改善了菌体摄取底物的能力和底物转化效率,以 15 g/L 植物甾醇底物发酵时,ADD 产量达到 5.57 g/L,较改造前提高了 45%。

SMO 是催化植物甾醇侧链降解过程的第一步酶,邵明龙<sup>[37]</sup>从 *M. neoaurum* JC-12 中鉴定了 3 个 SMO 同工酶 SMO1、SMO2 和 SMO3 均具有侧链末端氧化功能,其中 SMO2 作用最为显著,通过过量表达 SMO2 将 ADD 产量从 3.48 g/L 提升至 4.96 g/L,提高了 42.5%。进一步在 KSH 基因敲除突变株的基础上共表达植物甾醇代谢关键酶 ChoM2、SMO2 和 KstD,从源头上提高植物甾醇代谢通量,显著提高了工程菌转化植物甾醇合成 ADD 的能力,ADD 产量高达 12.4 g/L。

*kstD* 基因编码的 KstD 是 AD 转化为 ADD 的关键酶,工业分枝杆菌中存在的多个 KstD 同工酶展现出不同的底物选择性,能够作用于菌株相关途径中的不同代谢步骤。在分枝杆菌中将 *kstD* 基因失活或强化表达,能够实现 AD 或 ADD 产量的提高或实现其中一种产物的单产优产。KSH 是 AD 转化为  $9\alpha$ -OH-AD 的关键酶,KSH 与 KstD 协同催化引起的甾体母核降解是不利于  $9\alpha$ -OH-AD 稳定积累的重要诱因,在 KstD 彻底失活的基础上强化 KSH

基因的表达以弱化  $9\alpha$ -OH-AD 的降解并增加 AD 的转化是获得无 KstD 影响的  $9\alpha$ -OH-AD 高产菌株的有效途径。Wei 等<sup>[38]</sup>通过对 *M. neoaurum* NwIB-01 中关键基因 *kstD* 的敲除与强化,分别构建了能够富集中间体 AD 与 ADD 的工程菌,且显著提高了底物利用率。李梦等<sup>[39]</sup>在 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 中鉴定了 3 个具有脱氢活力的基因 *kstD1*、*kstD2* 和 *kstD3*,单独敲除 *kstD1* 时能够产生  $9\alpha$ -OH-AD,但  $9\alpha$ -OH-AD 会随着转化时间的延长而降解,同时敲除 *kstD1*、*kstD2* 和 *kstD3* 的菌株以 5 g/L 植物甾醇为底物时,转化 14 d 内  $9\alpha$ -OH-AD 能够稳定存在,产量可达 2.86 g/L。曹慧锦等<sup>[40]</sup>在主产 AD 的菌株中过表达 *kshA* 和 *kshB*,获得了一株可直接转化植物甾醇生产  $9\alpha$ -OH-AD 的工程菌株 *Mycobacterium* sp. TFZ 3215,产物中  $9\alpha$ -OH-AD 的含量由 1.7% 提高至 94.7%,AD 的含量由 80.1% 降至 3.4%,通过对发酵体系的优化, $9\alpha$ -OH-AD 产量高达 7.53 g/L。

### 3.3 C22 甾药中间体工程菌以及母核降解工程菌的构建

C22 甾药中间体是一类重要的甾药前体,其中以 4-BNA 最为典型,BNA 由于其侧链的结构特点使其能够通过简单的步骤合成多种具有重大商业价值的产品,如黄体酮、氢化可的松等。4-BNA 作为分枝杆菌甾醇代谢的副产物,产量极低(目前文献报道最高的产率仅有 20% 左右),构建能高效专一转化植物甾醇生产双降醇 4-BNA 的工程菌,对甾体药物的工业生产具有重要的意义。Xu 等<sup>[28]</sup>通过对 *M. neoaurum* ATCC 25795 中的双功能酶基因 *hsd4A* 进行敲除,使 4-BNA 和 1,4-BNA 积累增加,产物中 1,4-BNA 的比例可达 97%,而 AD(D) 等 C17 代谢产物消失。通过对 *kstD* 和 *kshA* 基因进行联合调控,构建了可分别生产 C22 甾药中间体 4-BNA、1,4-BNA 和  $9\alpha$ -OH-BNA 的高产工程菌,所得菌株转化 40 g/L 植物甾醇可分别积累 15.75 g/L 4-BNA、18.23 g/L 1,4-BNA 和 10.72 g/L  $9\alpha$ -OH-BNA,开创了代谢工程改造分枝杆菌生产 C22 甾药中间体的先河。Peng 等<sup>[41]</sup>在 *M. neoaurum* CCTCC AB2019054 中单独敲除 *hsd4A* 基因并没有达到高效积累 4-BNA 的目的,但在该菌株中发现了一条与 *hsd4A* 功能互补但又相互独立的 4-BNA 形成途径,并发现四电子还原酶基因 *mnOpcR* 同时参与了两条途径的代谢过程。在此基础上通过失活或者过表达双功能还原酶 *mnOpcR*,可分别高效专一地实现 4-AD 和 4-BNA 的高产。

在 *kstD*-*hsd4A* 共敲除菌株 mJTU2 中强化 *mnOpcR* 表达,可以高达 93% 的转化率将植物甾醇转化为 4-BNA。而在出发菌株 AB2019054 中敲除 *mnOpcR* 基因,则彻底阻断了 4-BNA 的形成并将 AD 产量提高了 16%。*M. neoaurum* ATCC 25795 与 *M. neoaurum* CCTCC AB2019054 中 *hsd4A* 基因敲除后代谢产物的差异,可能是由两株菌株中 *mnOpcR* 酶活差异所致。

谷内酯( $\delta$ -Lactone, HIL, A 环降解物)是植物甾醇母核 A/B 环和侧链发生降解,而 C/D 环保持完整的一种甾体代谢中间体,可用于合成一些高端甾体药物或中间体如 19-去甲-4-雄烯二酮、米非司酮、雌酚酮和雌二醇等。现有谷内酯发酵生产菌株均是通过传统的诱变育种获得,这些菌株制备谷内酯产率较低,并且副产物多,导致分离纯化困难、生产成本低。谷内酯生产菌株的构建关键在于阻断植物甾醇母核 C/D 环的降解。Liu 等<sup>[42]</sup>在 *M. fortuitum* strain ATCC6841 中敲除母核断裂降解途径中的酰基-CoA 连接酶基因 *fadD3* 和羧酸还原酶基因 *cars*,构建了一株可高效积累谷内酯的工程菌。

## 4 结语

通过工业分枝杆菌降解低附加值植物甾醇生产关键甾药中间体,在甾体激素类药物工业化生产中起着非常重要的作用。随着生物信息学、蛋白组学、转录组学和代谢组学等研究手段的发展,分枝杆菌转化植物甾醇的代谢途径逐步得到阐明,大多数代谢步骤的酶催化反应机理和部分调控机制得到鉴定。通过对分枝杆菌降解植物甾醇途径中的关键基因进行定向调控与改造,已经实现了 AD、ADD、 $9\alpha$ -OH-AD、4-BNA、1,4-BNA、 $9\alpha$ -OH-BNA 和 HIL 等多数 C19 类、少数 C22 类和极少数开环降解类甾药中间体的积累,且有效克服了分枝杆菌诱变育种中副产物多(AD、ADD 等 C19 中间体与 4-BNA 等 C22 中间体混合存在而难以进行高效分离)、甾体母核开环阻断不彻底等难题。但有关 TS、BD、4-BNC 等工程菌的构建与应用的报道尚不多见,说明对植物甾醇降解机制还需要更加深入的研究。未来的研究方向应该是进一步补充和完善植物甾醇降解机理,发掘更多的功能基因和调控因子,为开发更多高效定向积累特定组分甾药中间体提供理论指导,促进甾体药物的绿色生产和可持续发展。尤其是在全基因组水平上鉴定并深入研究与植物甾醇代谢有关的同工酶基因、多功能基因、未知功能基因和调控基因,将有助于从全局和细节揭示植物甾

醇代谢机制的复杂性,从而克服植物甾醇代谢途径改造过程中所遇到的问题和瓶颈。

#### 参考文献:

- [1] 刘夺,张莹,周晓,等. 合成生物技术生产甾体激素中间体的研究展望[J]. 生命科学, 2013,25(10):958-965.
- [2] DONNOVA M V, EGOROVA O V. Microbial steroid transformations: current state and prospects [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94(6):1423-1447.
- [3] MARKER R E. Sterols. CXIII. Sapogenins. XLII. The conversion of the sapogenins to the pregnenolones [J]. J Am Oil Chem Soc, 2002, 62(12):3350-3352.
- [4] LAVEAGA G S. Uncommon trajectories; steroid hormones, Mexican peasants, and the search for a wild yam [J]. Stud History Philos Sci Part C, 2006, 36(4):743-760.
- [5] 杨顺楷. 当前我国甾体激素药业半合成原料凸现趋势: 薯蓣皂素 PK 4AD (三) [EB/OL]. [2021-08-27]. <http://blog.sciencenet.cn/blog-64804-826266.html>.
- [6] MAHATO S B, GARAI S. Advances in microbial steroid biotransformation [J]. Steroids, 1997, 62(4):332-345.
- [7] 张裕卿,王东青. 植物甾醇微生物转化制备甾体药物中间体的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 142-146.
- [8] WANG Y, TONG X D. Microbial biotransformation; recent developments on steroid drugs [J]. Recent Patents Biotechnol, 2009, 3(2): 141-153.
- [9] 阳飞,闵勇,刘晓艳,等. 甾类化合物微生物转化与分解代谢机制研究进展 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2743-2762.
- [10] TURFIT G E. Microbiological agencies in the degradation of sterols. I. The cholesterol-decomposing organisms of soils [J]. J Bacteriol, 1944, 47(6):487-490.
- [11] ARIMA K, NAGASAWA M, BAE M, et al. Microbial transformation of sterols. Part I. Decomposition of cholesterol by microorganisms [J]. Agric Biol Chem, 1969, 33(11):1636-1643.
- [12] MARSHECK W J, KRAYCHY S, MUIR R D. Microbial degradation of sterols [J]. Appl Environ Microbiol, 1972, 23(1):72-77.
- [13] GEIZE R V D, YAM K, HEUSER T, et al. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2007, 1044(6): 1947-1952.
- [14] SCHNAPPINGER D, EHRT S, VOSKUIL M, et al. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages [J]. J Exp Med, 2003, 198(5): 693-704.
- [15] YAO K, WANG F Q, ZHANG H C, et al. Identification and engineering of cholesterol oxidases involved in the initial step of sterols catabolism in *Mycobacterium neoaurum* [J]. Metab Eng, 2013, 15:75-87.
- [16] YANG X, DUBNAU E, SMITH I, et al. Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase [J]. Biochemistry, 2007, 46(31): 9058-9067.
- [17] UHÍA I, GALÁN B, MORALES V, et al. Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc2155 [J]. Environ Microbiol, 2011, 13(4): 943-959.
- [18] CAPYK J K, KALSCHUEER R, STEWART G R, et al. Mycobacterial cytochrome p450 125 (cyp125) catalyzes the terminal hydroxylation of c27 steroids [J]. J Biol Chem, 2009, 284(51):35534-35542.
- [19] OUELLET H, GUAN S, JOHNSTON J B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one [J]. Mol Microbiol, 2010, 77(3):730-742.
- [20] SZENTIRMAI A. Microbial physiology of sidechain degradation of sterols [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 1990, 6(2):101-115.
- [21] JENNIFER E G, JEFFREY D G, MICHAEL A D, et al. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for *Mycobacterial* growth and cholesterol catabolism [J/OL]. PLoS Pathogens, 2011, 7(9): e1102251 [2021-08-01]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002251>.
- [22] 姚抗. 分枝杆菌甾醇转化机制的解析及其代谢工程改造应用于制备重要甾药中间体的研究 [D]. 上海:华东理工大学, 2014.
- [23] BRZOSTEK A. Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis* [J]. Microbiology, 2005, 151(7):2393-2402.
- [24] ROHMAN A, DIJKSTRA B W. The role and mechanism of microbial 3-ketosteroid  $\Delta 1$ -dehydrogenases in steroid breakdown [J/OL]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019, 191: 105366 [2021-08-01]. <http://www.socolar.com/Article/Index?aid=100001902126&jid=100000002919>.
- [25] JENNA K C, IGOR D A, NATALIE C S, et al. Characterization of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase, a rieske oxygenase in the cholesterol degradation pathway of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Biol Chem, 2009, 284(15): 9937-9946.
- [26] WEI W, FAN S, WANG F, et al. A new steroid-transforming strain of *Mycobacterium neoaurum* and cloning of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase in NwIB-01 [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 162(5):

- 1446 – 1456.
- [27] VAN D, HESSELS G I, GERWEN R V, et al. Molecular and functional characterization of kshA and kshB, encoding two components of 3 – ketosteroid 9 $\alpha$  – hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1 [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 45 (4):1007 – 1018.
- [28] XU L Q, LIU Y J, YAO K, et al. Unraveling and engineering the production of 23, 24 – bisnorcholenic steroids in sterol metabolism[J/OL]. *Nature*, 2016, 6: 21928 [2021 – 08 – 01]. <https://www.nature.com/articles/step21928>.
- [29] DRESEN C, LIN Y C, D'ANGELO I, et al. A flavin – dependent monooxygenase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol catabolism [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29): 22264 – 22275.
- [30] LACK N, LOWE E D, JIE L, et al. Structure of HsaD, a steroid – degrading hydrolase, from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Acta Crystallogr*, 2008, 64(1):2 – 7.
- [31] CASABON I, CROWE A M, LIU J, et al. FadD3 is an acyl – CoA synthetase that initiates catabolism of cholesterol rings C and D in actinobacteria [J]. *Mol Microbiol*, 2013, 87(2):269 – 283.
- [32] MOHN W W, VAN D, STEWART G R, et al. The actinobacterial mce4 locus encodes a steroid transporter [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (51):35368 – 35374.
- [33] 张怀成. 针对甾体毒害和转运等问题促进分枝杆菌转化甾醇高产雄甾烯酮的研究[D]. 上海:华东理工大学,2013.
- [34] HE K, SUN H, SONG H. Engineering phytosterol transport system in *Mycobacterium* sp. strain MS136 enhances production of 9 $\alpha$  – hydroxy – 4 – androstene – 3, 17 – dione[J]. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(4):1 – 6.
- [35] XIONG L B, LIU H H, XU L Q, et al. Improving the production of 22 – hydroxy – 23, 24 – bisnorchol – 4 – ene – 3 – one from sterols in *Mycobacterium neoaurum* by increasing cell permeability and modifying multiple genes [J]. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1):89 – 99.
- [36] XIONG L B, LIU H H, ZHAO M, et al. Enhancing the bioconversion of phytosterols to steroidal intermediates by the deficiency of *kasB* in the cell wall synthesis of *Mycobacterium neoaurum*[J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19 (1):80 – 92.
- [37] 邵明龙. 代谢工程改造微生物合成甾体药物中间体 ADD 和 TS[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2017.
- [38] WEI W, WANG F Q, FAN S Y, et al. Inactivation and augmentation of the primary 3 – ketosteroid – 1 – dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB – 01: biotransformation of soybean phytosterols to 4 – androstene – 3, 17 – dione or 1, 4 – androstadiene – 3, 17 – dione[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13):4578 – 4582.
- [39] 李梦, 李雪梅, 冯进辉, 等. 耻垢分枝杆菌中 3 – 甾酮 –  $\Delta$ 1 – 脱氢酶对植物甾醇转化积累 9 $\alpha$  – 羟基雄甾 – 4 – 烯 – 3, 17 – 二酮的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(4): 739 – 746.
- [40] 曹慧锦, 马治国, 刘相岑, 等. 降解植物甾醇产 9 $\alpha$  – 羟基雄烯二酮工程菌株构建及发酵工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14):101 – 107.
- [41] PENG H D, WANG Y, JIANG K, et al. A dual role reductase from phytosterols catabolism enables the efficient production of valuable steroid precursors[J]. *Ang Chem Int Edit*, 2020, 60(10): 5414 – 5420.
- [42] LIU N, FENG J H, ZHANG R, et al. Efficient microbial synthesis of key steroidal intermediates from bio – renewable phytosterols by genetically modified *Mycobacterium fortuitum* strains[J]. *Green Chem*, 2019, 21(15):4076 – 4083.
- 
- (上接第 124 页)
- [26] 许丽君. 固定化葡萄糖氧化酶的制备及稳定性研究 [J]. *化学教育*, 2015, 36(2):33 – 38.
- [27] 刘苑皓, 赵兴秀, 舒梨, 等. 多酚氧化酶的固定化及其酶学性质研究[J]. *中国调味品*, 2020, 45(5):33 – 41.
- [28] 肖安风, 游洪燕, 倪辉, 等. 聚乙烯醇和海藻酸钠固定化柚苷酶的制备及其性质[J]. *中国食品学报*, 2015, 15 (3):15 – 23.
- [29] 赵磊, 唐婧, 王成涛. 脂肪酶在尼龙网上的固定化及其酶学性质研究[J]. *食品科学*, 2013, 34(9):210 – 215.
- [30] SHEELU G, KAVITHA G, FADNAVIS N W. Efficient immobilization of lecithase in gelatin hydrogel and degumming of rice bran oil using a spinning basket reactor [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2008, 85(8): 739 – 748.
- [31] LI X X, LI D M, WANG W F, et al. Immobilization of SMG1 – F278N lipase onto a novel epoxy resin: characterization and its application in synthesis of partial glycerides[J]. *J Mol Catal B – Enzym*, 2016 (133): 154 – 160.
- [32] DOS SANTOS J C S, GARCIA – GALAN C, RODRIGUES R C, et al. Improving the catalytic properties of immobilized lecithase via physical coating with ionic polymers [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2014 (60): 1 – 8.
- [33] 雷生姣, 王可兴, 吕晓燕, 等. 聚乙烯醇 – 海藻酸钙固定化柚苷酶[J]. *食品科学*, 2011, 32(3):138 – 143.