



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230174

数字出版日期: 2024-06-21; 数字出版网址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240620.1242.001>

## 基于辅酶调控产 $9\alpha$ -OH-AD 工程菌株构建 及其发酵工艺优化

高园园, 孙康, 石畅, 王雪梅, 申雁冰, 王敏

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 利用偶发分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*) MFT 降解植物甾醇生产  $9\alpha$ -羟基-雄烯二酮 ( $9\alpha$ -OH-AD) 过程中, 存在丙酰辅酶 A 过量积累及辅因子不平衡等问题, 影响菌株的转化效率。通过表达 *scpC* 降低胞内丙酰辅酶 A 含量, 并通过串联表达 *ndh* 解决植物甾醇侧链降解过程中胞内辅因子 I 不平衡的问题, 在此基础上表达 *AarC* 将琥珀酰辅酶 A 和乙酸盐转化为琥珀酸盐和乙酰辅酶 A, 增强三羧酸 (TCA) 循环。构建的重组工程菌株 MFT-*scpC*-*AarC*-*ndh* 经初步优化发酵后,  $9\alpha$ -OH-AD 产率达到 89.56%, 比原始菌株转化率提高了 37.86%。本研究为  $9\alpha$ -OH-AD 的工业化生产提供了理论基础和技术支持, 也为其他植物甾醇转化工程菌株的构建提供新策略。

**关键词:**  $9\alpha$ -羟基-雄烯二酮; 植物甾醇; 丙酰辅酶 A; 琥珀酰辅酶 A; 偶发分枝杆菌

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2024)05-0014-08

## Construction of $9\alpha$ -OH-AD Engineering Strain Based on Coenzyme Regulation and Optimization of Fermentation Process

GAO Yuanyuan, SUN Kang, SHI Chang, WANG Xuemei, SHEN Yanbing, WANG Min

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** In the process of using *Mycobacterium fortuitum* (MFT) to degrade phytosterols to produce  $9\alpha$ -hydroxy-androstenedione ( $9\alpha$ -OH-AD), issues such as excessive accumulation of propionyl-CoA and an imbalance of cofactors exist, affecting the efficiency of strain transformation. By expressing *scpC* to reduce intracellular propionyl-CoA content and by tandemly expressing *ndh* to address the intracellular cofactor I imbalance during the degradation of phytosterol side chains, and then *AarC* was expressed on this basis to convert succinyl-CoA and acetate into succinate and acetyl-CoA to enhancing the tricarboxylic acid (TCA) cycle. After preliminary optimization of the fermentation process, the constructed recombinant engineering strain MFT-*scpC*-*AarC*-*ndh* achieved a  $9\alpha$ -OH-AD conversion rate of 89.56%, which was 37.86% higher than that of the original strain. This study has provided a theoretical foundation and technical support for the industrial production of  $9\alpha$ -OH-AD, and also introduced new strategies for the construction of other phytosterol transformation engineering strains.

**Key words:**  $9\alpha$ -hydroxy-androstenedione; phytosterol; propionyl coenzyme A; succinyl coenzyme A; *Mycobacterium fortuitum*

### 引文格式:

高园园, 孙康, 石畅, 等. 基于辅酶调控产  $9\alpha$ -OH-AD 工程菌株构建及其发酵工艺优化[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(5): 14-21.

GAO Y Y, SUN K, SHI C, et al. Construction of  $9\alpha$ -OH-AD engineering strain based on coenzyme regulation and optimization of fermentation process[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2024, 39(5): 14-21.

收稿日期: 2023-09-20; 修回日期: 2024-02-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21978221); 天津市研究生科研创新项目 (2022SKY099)

作者简介: 高园园 (1997-), 女, 山东人, 硕士研究生; 通信作者: 王敏, 教授, minw@tust.edu.cn

9 $\alpha$ -羟基-雄烯二酮(9 $\alpha$ -OH-AD)作为重要的甾体药物前体物质<sup>[1-2]</sup>,能够合成可的松、地塞米松、氢化可的松、黄体酮、氟羟泼尼松龙等多种重要的甾体药物<sup>[3]</sup>,这些药物可在临床上被广泛应用于抗炎、抗肿瘤、抗病毒和抗真菌等治疗过程<sup>[4-7]</sup>。

目前,微生物利用植物甾醇(phytosterol, PS)生产9 $\alpha$ -OH-AD的方式主要有两种<sup>[8]</sup>:一种是两步合成法,先由一种微生物通过母核氧化,侧链降解等过程生成雄烯二酮(AD),再由另一种微生物进行羟基化反应生成9 $\alpha$ -OH-AD<sup>[9-10]</sup>;另一种是以植物甾醇为底物,通过一步发酵直接生成9 $\alpha$ -OH-AD<sup>[11]</sup>。曹慧锦等<sup>[12]</sup>通过表达KSH酶构建的工程菌在油-水双相的发酵体系中优化乳化体系,当底物植物甾醇质量浓度为10 g/L时,9 $\alpha$ -OH-AD的产量进一步提高至7.53 g/L,然而所构建的工程菌株却出现了副产物9 $\alpha$ ,22-二羟基-23,24-去甲胆甾-4-烯-3-酮(9-OH-BNA),需要进一步改造。Zhou等<sup>[13]</sup>在5 g/L植物甾醇底物浓度下通过增强甲基丙二酰通路,以未经处理的甘蔗糖蜜和废菌体水解液(HMC)为原料,在120 h内成功将9 $\alpha$ -OH-AD的转化率提高至95.04%,但转化周期较长。相比之下,王康等<sup>[14]</sup>通过优化rekshA和mtkshA基因构建的工程菌株,使9 $\alpha$ -OH-AD的得率达到97.09%。此外,沙宗焱等<sup>[15]</sup>采用了偶联羟化反应和辅酶再生体系产9 $\alpha$ -OH-AD菌株,并通过优化使转化率达到96.7%。尽管这两种方法都提高了转化率,但由于底物均为较为昂贵的AD,其经济性仍需进一步考虑。

分枝杆菌代谢植物甾醇侧链降解是由多辅因子参与并伴随着大量高能化合物生成的过程。乙酰辅酶A、琥珀酰辅酶A及丙酰辅酶A等辅酶A类物质,在分枝杆菌转化甾醇过程中对维持菌体内部代谢流和能量供应的平衡起着重要的作用。侧链降解速率的提高,意味着产生相对更多的丙酰辅酶A、乙酰辅酶A等短链分子,并对细胞产生毒害作用进而降低生产强度<sup>[16-18]</sup>。研究<sup>[17]</sup>表明丙酰辅酶A-琥珀酰辅酶A转移酶(scpc)是生物合成丙酸途径中的限速酶,可将丙酰辅酶A一步转化成琥珀酰辅酶A,消耗细菌胞内过量的丙酰辅酶A,降低丙酰辅酶A的毒害作用。而琥珀酰辅酶A-乙酸辅酶A转移酶(AarC)能够取代异柠檬酸循环中的琥珀酰辅酶A合成酶,将琥珀酰辅酶A和乙酸盐转化为琥珀酸盐和乙酰辅酶A,从而增强三羧酸(TCA)循环<sup>[18-19]</sup>。为了保持细胞内辅因子的动态平衡,聚焦于呼吸链中NADH脱

氢酶NDH-II(ndh)。通过调节NADH/NAD<sup>+</sup>的比值解决辅酶I代谢失衡的问题,从而降低甾醇转化过程中辅因子不平衡产生的抑制作用<sup>[20-23]</sup>,促进产物9 $\alpha$ -OH-AD的高效生产。

目前对于植物甾醇侧链降解过程中尚存在丙酰辅酶A积累产生的毒害作用和辅酶I代谢失衡等问题,所产生的丙酰辅酶A的研究多数集中在现已报道的内源代谢途径上,而外源引入丙酰辅酶A代谢途径能否调控丙酰辅酶A代谢及其对PS转化的影响等还不明晰。因此,本研究以9 $\alpha$ -OH-AD的主要生产菌株偶发分枝杆菌为研究对象,通过引入外源丙酰辅酶A代谢途径,加强植物甾醇侧链降解产生的丙酰辅酶A的代谢,消耗过量的丙酰辅酶A,调节辅因子的供给和平衡,在减毒的同时能提高甾醇侧链降解的速率,基于辅酶调控的9 $\alpha$ -OH-AD高效生产菌株构建策略的形成,可为其他甾醇转化菌株的改造提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)MFT、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 和BL21(DE3)、醋酸菌(*Acetobacter*)均为本实验室保藏,质粒pMV261(分枝杆菌-大肠杆菌穿梭质粒,含hsp60启动子,Kan<sup>R</sup>)由Dr. W. R. Jacobs Jr.教授惠赠。

#### 1.1.2 培养基

LB培养基(g/L):酵母提取物5,胰蛋白胨10,NaCl 10。

偶发分枝杆菌种子培养基(g/L):磷酸氢二铵1.5,酵母粉9,甘油10,磷酸二氢钠0.5,磷酸氢二钠0.5,吐温-80 0.5,pH 7.0~7.3。

偶发分枝杆菌发酵培养基(g/L):硫酸铵1.8,尿素0.3,磷酸二氢钠0.8,磷酸氢二钠0.7,吐温-80 0.2,甘油9,甲基- $\beta$ -环糊精15.8,pH 7.0~7.3。

#### 1.1.3 试剂

植物甾醇,中粮天科生物工程(天津)有限公司;9 $\alpha$ -羟基-雄烯二酮,上海源叶生物科技有限公司;基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,美国Omega BioTek公司;限制性内切酶、DNA聚合酶、DNA连接酶,Takara公司;辅酶I NAD(H)含量检测试剂盒、ATP含量检测试剂盒,北京索莱宝科技

有限公司;其他试剂均为分析纯试剂,国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 重组菌株的构建

首先根据已报道的 *scpC*、*ndh*、*AarC* 的基因序列设计引物(表 1),采用细菌基因组试剂盒分别提取 *Escherichia coli* BL21(DE3)、*Mycobacterium fortuitum* (MFT)、*Acetobacter* 基因组 DNA,并以获得的基因组序列为模板,通过表 1 中的引物对目的基因进行序列扩增。将获得的基因片段与穿梭质粒 pMV261 经限制性内切酶酶切后进行连接,分别获得重组表达质粒 pMV261-*scpC*、pMV261-*scpC*-*ndh*、pMV261-*scpC*-*ndh*-*AarC*。后续将成功构建的重组质粒用电击转化法分别转入偶发分枝杆菌感受态细胞中,30℃培养,挑取阳性克隆子,经金唯智公司测序验证后,获得分别含有目的基因 *scpC*、*ndh* 及 *AarC* 的重组偶发分枝杆菌。

表 1 引物  
Tab. 1 Primers

引物名称	序列
<i>scpC</i> -f	ggccaagacaattgcggatccAATGGAACTCAGTG GACAAGGATG
<i>scpC</i> -r	tactcgacatcgataagctTTAACCCAGCATCGAG CCG
<i>scpC</i> - <i>ndh</i> -f	tcgatgctgggttaaagcttCGAGAAGGAGATATAAT GAGCCATCCCGGAGCTA
<i>scpC</i> - <i>ndh</i> -r	tgctgagcagtcgacgtagcCTAGGACGCGGCCTTC TCG
<i>scpC</i> - <i>ndh</i> - <i>AarC</i> -f	atgctggccggctgagaattCGAGAAGGAGATATAA TGAGCCATC
<i>scpC</i> - <i>ndh</i> - <i>AarC</i> -r	tactcgacatcgataagcttCTAGGACGCGGCCTTC TCG

### 1.2.2 培养与转化

将-80℃保存的偶发分枝杆菌划线于斜面上活化,37℃培养2~3d。

用适量的吐温-80水洗活化后的斜面,调整  $A_{600}$  在 0.8~1.2 之间后以 3% 的接种量接种到种子培养基中,30℃、200 r/min 培养至对数生长期。按 8% 的接种量转接至含 5 g/L 植物甾醇的发酵培养基中,30℃、200 r/min 培养 2~3 d,并于培养过程中取样。

### 1.2.3 产物 9 $\alpha$ -OH-AD 的检测及定量分析

将重组及原始菌株进行摇瓶发酵培养,分别取不同时间段的发酵液,加入等体积乙酸乙酯萃取,取 100  $\mu$ L 上清液挥干,加入适量流动相复溶,经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后进行液相色谱检测<sup>[13]</sup>。

采用高效液相色谱法(HPLC)测定 9 $\alpha$ -OH-AD 的含量。检测条件:Phenomenex C18(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)色谱柱,流动相为甲醇与水(体积比为 80:20),流量为 1 mL/min,进样量为 10  $\mu$ L,检测波长为 254 nm,柱温为 30℃。配制一定浓度的 AD 标准品并绘制标准曲线,每个样品通过峰面积关联标准曲线,从而计算得到 9 $\alpha$ -OH-AD 的产率。

### 1.2.4 胞内丙酰辅酶 A 的检测

将重组及原始菌株进行摇瓶发酵培养,分别取不同时间段的发酵液离心、破碎、冷冻后干燥,加入适量流动相复溶,利用 HPLC 对胞内丙酰辅酶 A 含量进行检测<sup>[13]</sup>。分析条件:Phenomenex C18(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)色谱柱,流动相为乙腈(A)与乙酸铵溶液(B)(体积比为 2:98),检测波长为 260 nm;柱温为 30℃,进样量为 20  $\mu$ L,流量为 0.8 mL/min,梯度洗脱条件为 2%~12% A(0~5 min)、12%~38% A(>5~15 min)、38% A(>15~17 min)、38%~2% A(>17~19 min),洗脱 20 min 后停止采集,根据峰面积计算胞内丙酰辅酶 A 相对含量。

### 1.2.5 胞内 NAD<sup>+</sup>、NADH 和 ATP 的检测

将重组菌株及原始菌株进行摇瓶发酵培养,分别取不同时间段的发酵液离心破碎。分别按照辅酶 I NAD(H)及 ATP 含量检测试剂盒的测定方法检测胞内 NAD<sup>+</sup>、NADH 和 ATP 的含量。

### 1.2.6 发酵工艺优化

底物浓度:偶发分枝杆菌发酵培养基其他组分不变,植物甾醇的投料量分别为 5、7、10 g/L,每个条件设置 3 组平行实验,并于培养过程中取样。

甲基- $\beta$ -环糊精(RM- $\beta$ -CD)添加比例:偶发分枝杆菌发酵培养基其他组分不变,植物甾醇投料量为 7 g/L,分别选用底物和甲基- $\beta$ -环糊精的摩尔质量比为 1:1 和 1:2 的比例进行实验,每个条件设置 3 组平行实验,并于培养过程中取样。

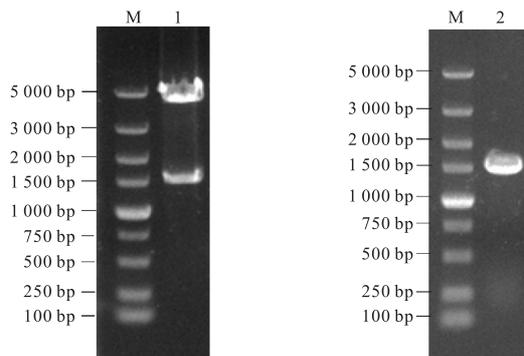
底物投料时间:偶发分枝杆菌发酵培养基其他组分不变,植物甾醇投料量为 7 g/L,底物和甲基- $\beta$ -环糊精的摩尔质量比为 1:2,分别在 0 h 和 24 h 进行底物投料,每个条件设置 3 组平行实验,并于培养过程中取样。

## 2 结果与分析

### 2.1 消耗丙酰辅酶 A 菌株的构建及转化性能分析

研究<sup>[24-25]</sup>表明 *scpC* 编码的丙酰辅酶 A-琥珀酰

辅酶 A 转移酶, 可将丙酰辅酶 A 一步转化成琥珀酰辅酶。因此, 为了消耗胞内过量积累的丙酰辅酶 A, 解除其对菌株的毒害作用, 增强菌株活力, 提高偶发分枝杆菌植物甾醇的转化效率, 构建了菌株 MFT-scpC。如图 1 所示, 分子水平验证正确即重组菌株 MFT-scpC 构建成功。



(a) 双酶切验证 (b) PCR 验证

M. DNA marker; 1. 重组质粒 pMV261-scpC 的双酶切验证; 2. 重组质粒 pMV261-scpC 的 PCR 验证。

图 1 重组菌株 MFT-scpC 的验证

Fig. 1 Validation of recombinant strain MFT-scpC

将重组菌 MFT-scpC 和原始菌 MFT 进行发酵转化, MFT 和 MFT-scpC 胞内丙酰辅酶 A 水平测定结果如图 2 所示, 在发酵过程中重组菌 MFT-scpC 的胞内丙酰辅酶 A 含量较原始菌 MFT 均有所下降, 过表达 *scpC* 可减少生产中后期丙酰辅酶 A 的积累, 且重组菌株 MFT-scpC 的胞内丙酰辅酶 A 水平降低明显, 在 84 h 时, 胞内丙酰辅酶 A 水平比 MFT 低 28.5%。

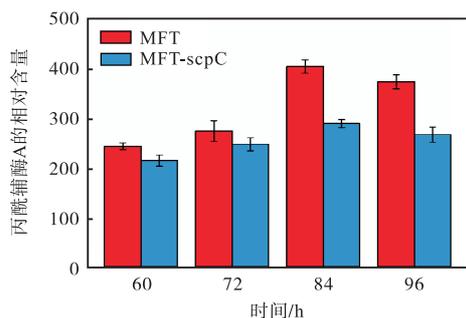


图 2 MFT 和 MFT-scpC 胞内丙酰辅酶 A 水平测定

Fig. 2 Measurements of intracellular propionyl-CoA level of MFT and MFT-scpC

*scpC* 过表达对 9 $\alpha$ -OH-AD 产率的影响如图 3 所示。在过表达 *scpC* 后的重组菌株 9 $\alpha$ -OH-AD 的产率达 59.15%, 比同期的原始菌株提高了 7.45%。这表明 *scpC* 基因具有将丙酰辅酶 A 代谢为琥珀酸辅酶 A、消耗胞内过量积累的丙酰辅酶 A 的功能, 并且丙酰

辅酶 A 积累后会影响到菌株对植物甾醇转化的效率, 进而影响 9 $\alpha$ -OH-AD 的产率。

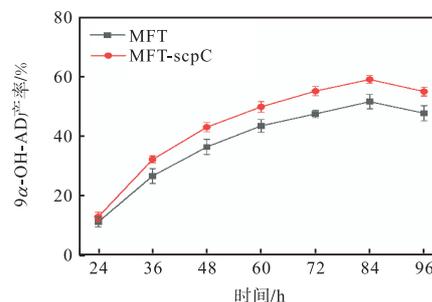
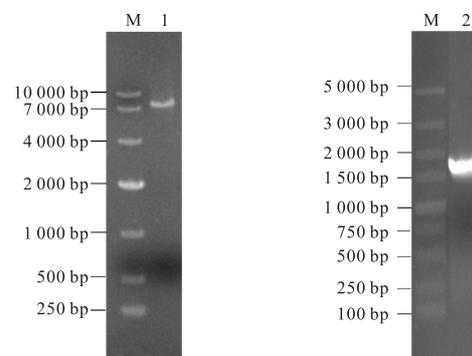


图 3 *scpC* 过表达对 9 $\alpha$ -OH-AD 产率的影响

Fig. 3 Effect of *scpC* overexpression on the conversion of 9 $\alpha$ -OH-AD

## 2.2 过表达分枝杆菌 *ndh* 基因菌株的构建及转化分析

为了防止在偶发分枝杆菌利用植物甾醇生产 9 $\alpha$ -OH-AD 的过程中生成大量 NADH, 造成胞内 NAD<sup>+</sup>/NADH 的比例失衡<sup>[19,21]</sup>, 选用分枝杆菌的 *ndh* 基因构建串联表达菌株, 以期提高 9 $\alpha$ -OH-AD 的产率。因此, 构建了串联表达菌株 MFT-scpC-*ndh* (图 4), 分子水平验证正确即重组菌株 MFT-scpC-*ndh* 构建成功。



(a) 单酶切验证 (b) PCR 验证

M. DNA marker; 1. 重组质粒 pMV261-scpC-*ndh* 的单酶切验证; 2. 重组质粒 pMV261-scpC-*ndh* 的 PCR 验证。

图 4 重组菌株 MFT-scpC-*ndh* 的验证

Fig. 4 Validation of recombinant strain MFT-scpC-*ndh*

*ndh* 基因能将 NADH 转换成 NAD<sup>+</sup>, 对胞内氧化还原和辅因子平衡起关键作用。当 NADH 与 NAD<sup>+</sup> 比值高时, *ndh* 可氧化更多的 NADH。MFT 和 MFT-scpC-*ndh* 的 NAD<sup>+</sup>/NADH 比值测定结果如图 5 所示。*ndh* 在 MFT 中的过表达可以在一定程度上降低 NADH 的水平, 提高 NAD<sup>+</sup>/NADH 比值。在发酵 48 h 后能够有效降低胞内 NADH 水平, 在 72 h 时, MFT-scpC-*ndh* 胞内 NAD<sup>+</sup>/NADH 的比值由 0.89 提高到

2.60。结果表明, *ndh* 在 MFT 中的过表达使胞内  $\text{NAD}^+$ 再生活性得到提高, 有利于  $\text{NAD}^+$ 依赖的代谢过程。

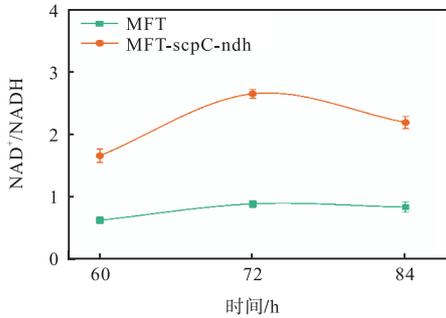


图5 MFT和MFT-scpC-ndh的 $\text{NAD}^+$ /NADH比值测定  
Fig. 5 Measurements of  $\text{NAD}^+$ /NADH ratio of MFT and MFT-scpC-ndh

作为呼吸链的关键起始酶, NADH 脱氢酶可在不产生质子动势的前提下将 NADH 转换成  $\text{NAD}^+$ 并将电子传递给泛醌, 其对胞内能量代谢起关键作用<sup>[26]</sup>。MFT 和 MFT-scpC-ndh 发酵过程中 ATP 的变化趋势如图 6 所示, *ndh* 基因在 MFT 中表达后, 相应的胞内 ATP 的水平也得到提升。发酵后期, ATP 急剧增加, 可以认为在偶发分枝杆菌中过表达 *ndh* 基因能在一定程度上增加了胞内 ATP 的含量<sup>[27-28]</sup>。

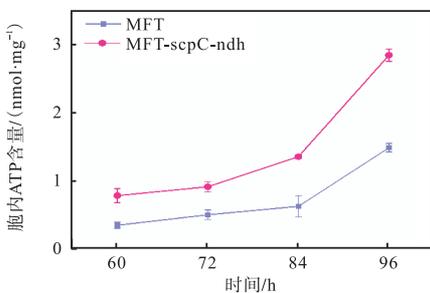


图6 MFT和MFT-scpC-ndh发酵过程中ATP的变化趋势  
Fig. 6 Change trend of ATP during fermentation of MFT and MFT-scpC-ndh

对重组菌 MFT-scpC-ndh 生产性能进行检测。*scpC* 与 *ndh* 串联表达对  $9\alpha\text{-OH-AD}$  产率的影响如图 7 所示。在发酵培养 72 h 后, 植物甾醇转化结果表明, *scpC* 和 *ndh* 共表达可提高菌株的转化能力, MFT-scpC-ndh 的产率最高为 65.33%, 比同期只过表达 *scpC* 基因的重组菌株提高了 6.18%。因此, 提高细胞内  $\text{NAD}^+$ /NADH 比值可以有效增强生产菌株的转化能力。

### 2.3 串联 *AarC* 基因菌株的构建及性能分析

由于 *scpC* 基因的强化表达使胞内大量丙酰辅酶 A 转变为琥珀酰辅酶 A, 而乙酸杆菌中 *AarC* 基因

参与琥珀酸辅酶 A 的代谢, 可将琥珀酸辅酶 A 转变为琥珀酸和乙酰辅酶 A<sup>[22]</sup>。因此, 构建了 MFT-scpC-ndh-AarC 过表达菌株(图 8), 分子水平验证正确即重组菌株 MFT-scpC-ndh-AarC 构建成功, 从而消耗琥珀酸辅酶 A, 提高植物甾醇的利用率及  $9\alpha\text{-OH-AD}$  的产率。

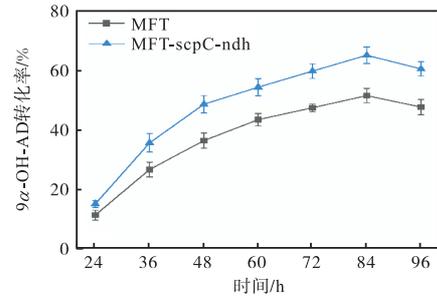
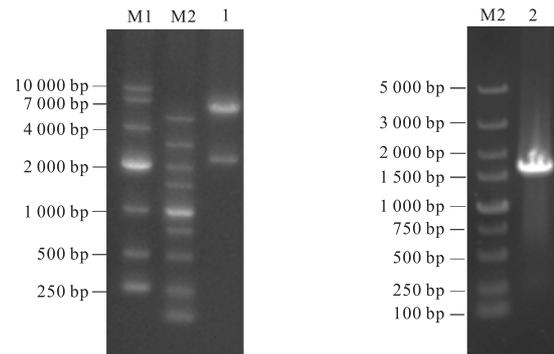


图7 *scpC* 与 *ndh* 串联表达对  $9\alpha\text{-OH-AD}$  产率的影响  
Fig. 7 Effect of *scpC* and *ndh* tandem expression on the conversion of  $9\alpha\text{-OH-AD}$



(a) 双酶切验证 (b) PCR 验证  
M1. 10 000 bp DNA marker; M2. 5 000 bp DNA marker; 1. 重组质粒 pMV261-*scpC-ndh-AarC* 的双酶切验证; 2. 重组质粒 pMV261-*scpC-ndh-AarC* 的 PCR 验证。

图8 重组菌株 MFT-scpC-ndh-AarC 的验证  
Fig. 8 Validation of recombinant strain MFT-scpC-ndh-AarC

将所构建的串联表达菌株和原始菌进行摇瓶发酵培养, *scpC-ndh-AarC* 串联表达对  $9\alpha\text{-OH-AD}$  产率的影响如图 9 所示。从图 9 中可以看出, 重组菌株 MFT-scpC-ndh-AarC 在发酵转化 84 h 时  $9\alpha\text{-OH-AD}$  产率最高可达 73.97%, 比同期串联表达基因 *scpC* 和 *ndh* 的重组菌株提高了 8.64%, 比原始菌 MFT 提高了 22.27%。结果表明, 引入外源丙酰辅酶 A 代谢途径结合辅因子调控策略, 能够加强植物甾醇侧链降解, 为  $9\alpha\text{-OH-AD}$  的高效生产提供优良菌株。

### 2.4 重组菌株发酵工艺优化

#### 2.4.1 底物质量浓度对植物甾醇转化的影响

由于植物甾醇在水中的溶解度低<sup>[29]</sup>, 导致不能

与菌体有效接触。为了探究底物质量浓度对  $9\alpha$ -OH-AD 发酵转化的影响,在发酵液中添加底物质量浓度分别为 5、7、10 g/L 的植物甾醇,底物质量浓度对植物甾醇转化的影响如图 10 所示。

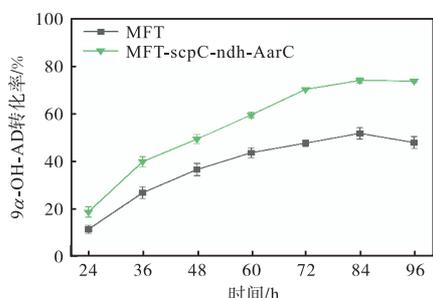


图 9 *scpC-ndh-AarC* 串联表达对  $9\alpha$ -OH-AD 产率的影响

Fig. 9 Effect of *scpC-ndh-AarC* tandem strain expression on the conversion of  $9\alpha$ -OH-AD

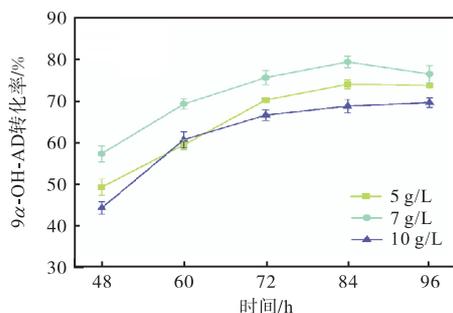


图 10 底物质量浓度对植物甾醇转化的影响

Fig. 10 Effect of substrate concentration on phytosterol conversion

从图 10 中可以看出,随着底物质量浓度的提高, $9\alpha$ -OH-AD 的产率也有一定的增加。当底物质量浓度为 7 g/L 时,植物甾醇的转化最优, $9\alpha$ -OH-AD 的产率可达 79.34%。但是,当发酵培养基中植物甾醇投料量增加到 10 g/L 时, $9\alpha$ -OH-AD 的产率开始下降。分析原因可能是植物甾醇本身的溶解度较低,底物质量浓度高会抑制菌株的转化,所以在底物质量浓度为 7 g/L 的基础上对基因工程菌进行进一步发酵条件优化。

#### 2.4.2 甲基- $\beta$ -环糊精添加比例对植物甾醇转化的影响

甲基- $\beta$ -环糊精是一种低聚环状化合物,可以与低水溶性的有机分子形成包合物,提高其水溶性和生物利用率<sup>[30-32]</sup>。此外,甲基- $\beta$ -环糊精处理分枝杆菌可以缓解甾体对电子传递链和细胞生长的抑制作用,然而过多添加甲基- $\beta$ -环糊精会对菌体细胞产生毒性作用,不利于植物甾醇的生物利用<sup>[33]</sup>。

为了进一步探究甲基- $\beta$ -环糊精的添加比例对  $9\alpha$ -OH-AD 转化的影响,分别选用底物和甲基- $\beta$ -环糊精的摩尔质量比为 1:1 和 1:2 的比例进行实验。助溶剂添加比例对植物甾醇转化的影响如图 11 所示。从图 11 中可以看出,当甲基- $\beta$ -环糊精的添加比例 PS:RM- $\beta$ -CD=1:2 时,产物的生成率最高,为 85.43%。因此,选择 PS:RM- $\beta$ -CD=1:2 作为最优的添加比例。

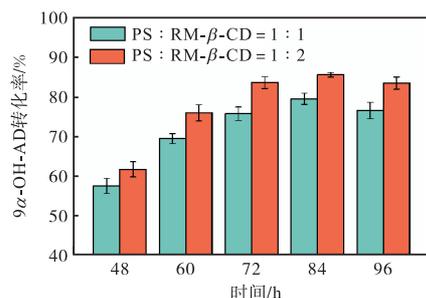


图 11 助溶剂添加比例对植物甾醇转化的影响

Fig. 11 Effect of co-solvent addition ratio on phytosterol conversion

#### 2.4.3 底物投料时间对植物甾醇转化的影响

确定了  $9\alpha$ -OH-AD 发酵转化的植物甾醇和甲基- $\beta$ -环糊精的最适比例之后,进一步探究植物甾醇的投料时间对  $9\alpha$ -OH-AD 产率的影响。底物投料时间对植物甾醇转化的影响结果如图 12 所示。发酵 24 h 后投入植物甾醇  $9\alpha$ -OH-AD 的产率更高,最高可达 89.56%,比未进行发酵工艺优化的产率提高了 37.86%,有效增加了植物甾醇的转化。

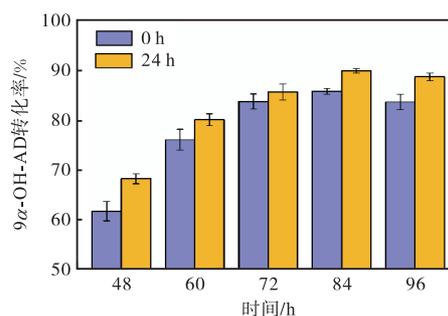


图 12 底物投料时间对植物甾醇转化的影响

Fig. 12 Effect of substrate injection time on phytosterol conversion

## 3 结 语

基于植物甾醇侧链降解过程中胞内丙酰辅酶 A 过量积累对菌株存在毒害作用及胞内辅因子不平衡的问题,运用基因工程手段,成功构建了过表达丙酰

辅酶 A-琥珀酸辅酶 A 转移酶 *scpC* 基因的菌株 MFT-*scpC*, 降低胞内丙酰辅酶 A 含量。在过表达 *scpC* 基因的基础上串联表达来源于偶发分枝杆菌自身的 *ndh* 基因, 降低了胞内 NADH 的水平, 改变胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 比值, 增强电子传递速率。通过引入琥珀酸辅酶 A 转移酶 *AarC* 基因, 成功构建菌株 MFT-*scpC*-*ndh*-*AarC*, 对该重组菌株的发酵条件进行优化, 在 24 h 投加底物(质量浓度为 7 g/L)、底物与甲基- $\beta$ -环糊精比例为 1 : 2 时, 重组菌株 9 $\alpha$ -OH-AD 的产率达到了 89.56%, 比未进行发酵工艺优化前的原始菌提高了 37.86%, 为 9 $\alpha$ -OH-AD 的高效生产提供了稳定优良的菌株。9 $\alpha$ -OH-AD 高效生产菌的获得, 进一步加强我国甾体药物生产行业的技术储备, 并可以在一定程度上推动相关产业的技术进步和升级。

#### 参考文献:

- [1] SONG L, KE J, LUO Z K, et al. Driving the conversion of phytosterol to 9 $\alpha$ -hydroxy-4-androstene-3, 17-dione in *Mycobacterium neoaurum* by engineering the supply and regeneration of flavin adenine dinucleotide[J]. *Biotechnology for biofuels*, 2023, 16(1) : 98.
- [2] SHTRATNIKOVA V Y, SCHELKUNOV M I, DOVBNYA D V, et al. Complete genome sequence of *Mycobacterium* sp. strain VKM Ac-1817D, capable of producing 9 $\alpha$ -hydroxy-androst-4-ene-3, 17-dione from phytosterol[J]. *Genome announcements*, 2015, 3(1) : e01447-14.
- [3] ZHANG J, ZHANG R, SONG S, et al. Whole-genome analysis of *Mycobacterium neoaurum* DSM 1381 and the validation of two key enzymes affecting C22 steroid intermediates in sterol metabolism[J]. *International journal of molecular sciences*, 2023, 24(7) : 6148.
- [4] XU L Q, LIU Y J, YAO K, et al. Unraveling and engineering the production of 23, 24-bisnorcholesterol steroids in sterol metabolism[J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 21928.
- [5] FERNANDEZ-CABEZON L, GALAN B, GARCIA J L. New insights on steroid biotechnology[J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9: 958.
- [6] WANG X, FENG J, ZHANG D, et al. Characterization of new recombinant 3-ketosteroid- $\Delta$ (1)-dehydrogenases for the biotransformation of steroids[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2017, 101(15) : 6049-6060.
- [7] 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.
- [8] SHAO M, ZHANG X, RAO Z, et al. Identification of steroid C27 monooxygenase isoenzymes involved in sterol catabolism and stepwise pathway engineering of *Mycobacterium neoaurum* for improved androst-1, 4-diene-3, 17-dione production[J]. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 2019, 46(5) : 635-647.
- [9] CHANG H, ZHANG H, ZHU L, et al. A combined strategy of metabolic pathway regulation and two-step bioprocess for improved 4-androstene-3, 17-dione production with an engineered *Mycobacterium neoaurum* [J]. *Biochemical engineering journal*, 2020, 164 : 107789.
- [10] 马洋, 王向栋, 王萌慧, 等. 高效转化植物甾醇为 9 $\alpha$ -OH-AD 的分枝杆菌诱变选育及工艺优化[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(7) : 1198-1206.
- [11] YAO K, XU L Q, WANG F Q, et al. Characterization and engineering of 3-ketosteroid- $\Delta$  1-dehydrogenase and 3-ketosteroid-9 $\alpha$ -hydroxylase in *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795 to produce 9 $\alpha$ -hydroxy-4-androstene-3, 17-dione through the catabolism of sterols[J]. *Metabolic engineering*, 2014, 24: 181-191.
- [12] 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.
- [13] ZHOU X, ZHANG Y, SHEN Y, et al. Economical production of androstenedione and 9 $\alpha$ -hydroxyandrostenedione using untreated cane molasses by recombinant mycobacteria[J]. *Bioresource technology*, 2019, 290: 121750.
- [14] 王康, 吴志革, 赵伟睿, 等. 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟基化酶基因的表达及其催化合成 9 $\alpha$ -羟基雄烯-4-烯-3, 17-二酮[J]. *生物加工过程*, 2018, 16(6) : 13-18.
- [15] 沙宗焱, 张显, 邵明龙, 等. 偶联羟化反应和辅酶再生体系产 9 $\alpha$ -羟基雄烯-4-烯-3, 17-二酮[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(7) : 3074-3081.
- [16] ZHANG Y, ZHOU X, WANG X, et al. Improving phytosterol biotransformation at low nitrogen levels by enhancing the methylcitrate cycle with transcriptional regulators *PrpR* and *GlnR* of *Mycobacterium neoaurum* [J]. *Microbial cell factories*, 2020, 19(1) : 13.
- [17] SUN H, YANG J, HE K, et al. Enhancing production of 9 $\alpha$ -hydroxy-androst-4-ene-3, 17-dione (9-OHAD) from

- phytosterols by metabolic pathway engineering of mycobacteria[J]. *Chemical engineering science*, 2021, 230: 116195.
- [18] WANG Z, AMMAR E M, ZHANG A, et al. Engineering *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for enhanced propionic acid fermentation: effects of overexpressing propionyl-CoA: succinate CoA transferase[J]. *Metabolic engineering*, 2015, 27: 46–56.
- [19] MURPHY J R, MULLINS E A, KAPPOCK T J. Functional dissection of the bipartite active site of the class I coenzyme A (CoA)-transferase succinyl-CoA: acetate CoA-transferase[J]. *Frontiers in chemistry*, 2016, 4: 23.
- [20] MULLINS E A, FRANCOIS J A, KAPPOCK T J. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA): acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti*[J]. *Journal of bacteriology*, 2008, 190(14): 4933–4940.
- [21] ZHAO E M, ZHANG Y, MEHL J, et al. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production[J]. *Nature*, 2018, 555(7698): 683–687.
- [22] LIU Y, LANDICK R, RAMAN S. A Regulatory NADH/NAD<sup>+</sup> redox biosensor for bacteria[J]. *ACS Synthetic biology*, 2019, 8(2): 264–273.
- [23] VILCHEZE C, WEINRICK B, LEUNG L W, et al. Plasticity of *Mycobacterium tuberculosis* NADH dehydrogenases and their role in virulence[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2018, 115(7): 1599–1604.
- [24] SHAO M, ZHAO Y, LIU Y, et al. Intracellular environment improvement of *Mycobacterium neoaurum* for enhancing androst-1,4-diene-3,17-dione production by manipulating NADH and reactive oxygen species levels[J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3841.
- [25] SU Z, ZHANG Z, YU J, et al. Combined enhancement of the propionyl-CoA metabolic pathway for efficient androstenedione production in *Mycobacterium neoaurum*[J]. *Microbial cell factories*, 2022, 21(1): 218.
- [26] SERAFINI A, TAN L, HORSWELL S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* requires glyoxylate shunt and reverse methylcitrate cycle for lactate and pyruvate metabolism[J]. *Molecular microbiology*, 2019, 112(4): 1284–1307.
- [27] SOUSA F M, SENA F V, BATISTA A P, et al. The key role of glutamate 172 in the mechanism of type II NADH: quinone oxidoreductase of *Staphylococcus aureus*[J]. *Biochimica et biophysica acta bioenergetics*, 2017, 1858(10): 823–832.
- [28] ZHOU X, ZHANG Y, SHEN Y, et al. Efficient repeated batch production of androstenedione using untreated cane molasses by *Mycobacterium neoaurum* driven by ATP futile cycle[J]. *Bioresource technology*, 2020, 309: 123307.
- [29] LI A, ZHU A, KONG D, et al. Water-dispersible phytosterol nanoparticles: preparation, characterization, and in vitro digestion[J]. *Frontiers in nutrition*, 2021, 8: 793009.
- [30] SADAQUAT H, AKHTAR M. Comparative effects of  $\beta$ -cyclodextrin, HP- $\beta$ -cyclodextrin and SBE- $\beta$ -cyclodextrin on the solubility and dissolution of docetaxel via inclusion complexation[J]. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 2020, 96(3/4): 333–351.
- [31] SHTRATNIKOVA V Y, SCHELKUNOV M I, DOVBNYA D V, et al. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on gene expression in microbial conversion of phytosterol[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2017, 101(11): 4659–4667.
- [32] KHOMUTOV S M, SUKHODOLSKAYA G V, DONOVA M V. The inhibitory effect of cyclodextrin on the degradation of 9 $\alpha$ -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione by *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D[J]. *Biocatalysis and biotransformation*, 2009, 25(5): 386–392.
- [33] ULLOTH J E, ALMAGUEL F G, PADILLA A, et al. Characterization of methyl- $\beta$ -cyclodextrin toxicity in NGF-differentiated PC12 cell death[J]. *Neuro toxicology*, 2007, 28(3): 613–621.