



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

## 《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：生产胆固醇酿酒酵母菌株的构建与优化  
作者：李根, 樊旭倩, 阿皮耶提·如则麦麦提, 骆健美, 樊飞宇, 张学礼  
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250059  
收稿日期: 2025-03-24  
网络首发日期: 2026-01-29  
引用格式: 李根, 樊旭倩, 阿皮耶提·如则麦麦提, 骆健美, 樊飞宇, 张学礼. 生产胆固醇酿酒酵母菌株的构建与优化[J/OL]. 天津科技大学学报.  
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250059>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



## 生产胆固醇酿酒酵母菌株的构建与优化

李根<sup>1</sup>, 樊旭倩<sup>2</sup>, 阿皮耶提 如则麦提<sup>1</sup>, 骆健美<sup>1</sup>, 樊飞宇<sup>2</sup>, 张学礼<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

**摘要:** 为了解决传统胆固醇生产工艺存在生物安全风险及环境污染等问题, 采用合成生物学与代谢工程策略, 系统重构酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 胆固醇合成途径。通过增强甲羟戊酸 (MVA) 途径关键酶表达强度, 增加异源 24-脱氢胆固醇还原酶基因拷贝数, 优化后鲨烯途径代谢流分配以及结合过氧化物酶体工程强化前体供应, 构建高效合成胆固醇的工程菌株 CHO224。结果表明: 菌株 CHO224 摇瓶发酵的胆固醇产量达 784.11 mg/L, 是初代菌株 CHO011 的 24.8 倍; 最终通过发酵工艺优化, 在 5 L 高密度发酵罐中进行精准发酵, 胆固醇产量达 4.71 g/L, 是初代菌株 CHO011 的 149 倍。本研究为胆固醇及其衍生物的绿色生产提供了可借鉴的途径优化策略与菌株构建方式。

**关键词:** 胆固醇; 酿酒酵母; 甾体化合物; 高密度发酵

中图分类号: Q789

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

## Construction and Optimization of Cholesterol-Producing *Saccharomyces cerevisiae* Strain

LI Gen<sup>1</sup>, FAN Xuqian<sup>2</sup>, RUZEMAIMAITI Apiyeti<sup>1</sup>, LUO Jianmei<sup>1</sup>, FAN Feiyu<sup>2</sup>, ZHANG Xueli<sup>2</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** Traditional cholesterol production processes face challenges including biosafety risks and environmental pollution. This study systematically reconstructed the cholesterol biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic biology and metabolic engineering strategies. Key approaches included enhancing the expression of enzymes in the mevalonate (MVA) pathway, increasing the copy number of the heterologous *GgDHCR24* gene (encoding 24-dehydrocholesterol reductase), optimizing metabolic flux distribution in the post-squalene pathway, and integrating peroxisome engineering to strengthen precursor supply. An engineered strain CHO224 was constructed for efficient cholesterol production. The results showed that in shake flask fermentation, the cholesterol yield reached 784.11 mg/L, representing a 24.8-fold increase over the initial strain CHO011. Optimization of the fermentation process enabled high-density cultivation in a 5-L bioreactor, achieving a final titer of 4.71 g/L, a 149-fold improvement relative to the initial strain CHO011. This study provides a referential approach to optimizing production strategies and strain construction for the green production of cholesterol and its derivatives.

**Key words:** cholesterol; *Saccharomyces cerevisiae*; steroid; high-density fermentation

收稿日期: 2025-03-24; 修回日期: 2025-06-13

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年科学基金项目 (32225031); 国家自然科学基金面上项目 (32271482)

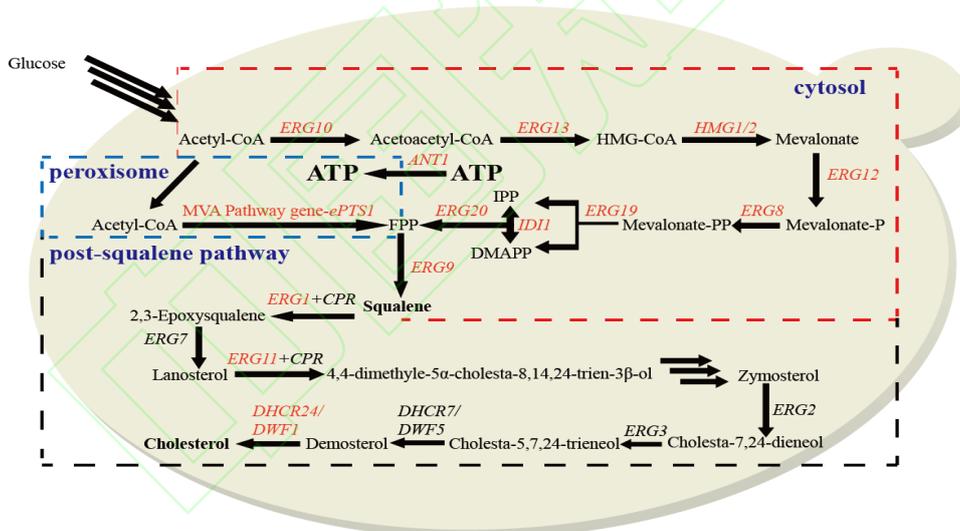
作者简介: 李根 (1993—), 男, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 张学礼, 研究员, zhang\_xl@tib.cas.cn

胆固醇 (C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O) 作为具有环戊烷多氢菲母核结构的甾类化合物<sup>[1]</sup>, 在生物体系中具有多重生理功能。胆固醇不仅是动物细胞膜的结构组分, 通过调控膜流动性参与细胞增殖与分化过程<sup>[2]</sup>, 还作为关键代谢前体物质参与多种生命必需分子的生物合成, 包括胆汁酸、维生素 D<sub>3</sub> 及甾体激素 (如糖皮质激素、性激素)<sup>[3]</sup>, 这种独特的生物学价值使其在医药与化工领域获得广泛应用。基于甾体母核结构的化学可修饰性, 胆固醇被广泛用于合成孕烯醇酮<sup>[4]</sup>、雄甾-4-烯-3,17-二酮 (AD)<sup>[5]</sup> 和 黄体酮<sup>[6]</sup> 等高附加值甾类药物中间体, 这些衍生物在抗炎、内分泌调节及生殖医学领域具有重要临床价值<sup>[7]</sup>。同时, 胆固醇的脂水两亲性特征使其在药物制剂中可作为脂质体膜材料、乳化剂及软膏基质等药用辅料<sup>[8]</sup>。在化妆品领域, 胆固醇常被添加到护肤品中起到保湿功能<sup>[9]</sup>。此外, 胆固醇作为多种激素的前体物质, 可缩短虾的脱皮周期, 具

有促进其脱皮生长的功效<sup>[10]</sup>。

当前工业生产胆固醇主要依赖两种技术路线。第一种方式是以脑组织、脊髓等动物组织为原料提取胆固醇<sup>[11]</sup>, 但存在感染朊病毒、病原微生物污染等风险, 可能引发病患传播<sup>[12]</sup>。另一种方式是当前主流工业生产方式, 主要利用色谱法、溴化法、分子蒸馏法和超临界萃取法等化学工艺对羊毛脂进行分离<sup>[13]</sup>, 但受到原料供应不稳定、工艺能耗高、有机溶剂残留污染及副产物分离复杂等技术问题影响, 限制了胆固醇产业的绿色生产。

本研究采用合成生物学与代谢工程策略, 系统重构酿酒酵母胆固醇合成途径 (图 1), 通过增强 MVA 途径关键酶表达强度, 过表达胆固醇合成关键基因 *GgDHCR24*, 结合有针对性的后鲨烯途径调控以及过氧化物酶体工程等多轮模块化优化, 构建高效生产胆固醇的酿酒酵母细胞工厂。



注: 红色标注基因为本研究改造基因

图 1 胆固醇代谢途径

Fig. 1 Cholesterol metabolic pathway

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、质粒与主要试剂

菌株与质粒见表 1。San Prep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒, 美国 Axygen 公司; San Prep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 酵母营养缺陷型培养基 (SD-Ura), 北京泛基诺

科技有限公司; 胆固醇标准品, 上海源叶生物科技有限公司; PCR 扩增酶, 宝日医生物技术 (北京) 有限公司。引物的合成与测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成, 异源基因由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 1.2 培养基

YPD 培养基: 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖。

YP 诱导培养基: 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 乙醇, 1% 半乳糖。

营养缺陷型合成培养基 (SD-Ura): 0.67% 酵母氮基 (不含 Ura), 2% 葡萄糖。

LB 培养基: 0.5% NaCl, 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨基青霉素。

上述液体培养基加 2% 琼脂粉配制相应的固体培养基。

### 1.3 酿酒酵母重组、转化与验证

将 500  $\mu\text{L}$  过夜培养物转移到 3 mL YPD 培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养, 直到细胞密度 (600 nm 处吸光度  $A_{600}$ ) 达到 0.8~1.5; 12000 r/min 离心 1 min 收集细胞, 并用蒸馏水洗涤 2 次。将酵母细胞重悬于 1 mL 预处理试剂 (100 mmol/L LiAc、10 mmol/L

DTT、0.6 mol/L 山梨醇和 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 中, 25  $^{\circ}\text{C}$  静置 25 min; 静置结束后用 1 mol/L 预冷山梨醇洗涤 1 次, 然后将细胞重悬于 60  $\mu\text{L}$  预冷的 1 mol/L 山梨醇中, 并与 CRISPR/Cas9 质粒和供体序列 DNA 混合。将混合物转移到 0.2 cm 间隙的电击杯中, 在冰上静置 5 min。使用基因脉冲仪 (Bio-Rad, Hercules, CA) 以 2.7 kV 电压电穿孔。电穿孔后立即将细胞稀释在 1 mL 冰冷 1 mol/L 山梨醇中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 孵育 60 min。将样品涂抹在 SD-Ura 平板上, 30  $^{\circ}\text{C}$  下培养 2~3 d, 以筛选出阳性转化子。为验证基因型, 将单个菌落接种到 10  $\mu\text{L}$  20 mmol/L NaOH 溶液中, 98  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 40 min 以释放基因组 DNA。将 2  $\mu\text{L}$  的裂解液直接用作 PCR 模板, 使用验证引物验证重组菌株。

表 1 菌株与质粒

Tab. 1 Strains and plasmids

菌名	描述	来源
BY4742	<i>S. cerevisiae</i> S288c, <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3<math>\Delta</math>1</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> , <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> , <i>MET15</i> , <i>ura3<math>\Delta</math>0</i>	实验室保存
CHO011	BY4742, <i>GAL1-7-10::T<sub>ADH1</sub>-StDWF5-P<sub>GAL10/1</sub>-GgDHCR24-T<sub>CWP2</sub></i>	本研究
CHO012	CHO011, <i>LPP1:: (P<sub>TPI1</sub>-iHMG1-T<sub>ADH2</sub>)-(T<sub>TEF1</sub>-ERG13-P<sub>FBA1</sub>)-(P<sub>PDC1</sub>-ERG10-T<sub>SPG5</sub>);</i> <i>MOT3:: (P<sub>PDC1</sub>-ERG9-T<sub>TDH2</sub>)-(T<sub>PGL1</sub>-ID11-P<sub>TDH3</sub>)-(P<sub>FBA1</sub>-ERG20-T<sub>ADH2</sub>);</i> <i>DPP1:: (P<sub>PDC1</sub>-ERG8-T<sub>ADH1</sub>)-(P<sub>FBA1</sub>-ERG12-T<sub>ENO2</sub>)-(P<sub>ENO1</sub>-ERG19-T<sub>CPS1</sub>)</i>	本研究
CHO013	CHO012, <i>ERG5:: (P<sub>GAL10/1</sub>-GgDHCR24-T<sub>CWP2</sub>)</i>	本研究
CHO014	CHO012, <i>ERG5:: (T<sub>ADH1</sub>-GgDHCR24-P<sub>GAL10/1</sub>-GgDHCR24-T<sub>CWP2</sub>)</i>	本研究
CHO115	CHO013, <i>GRE3:: (T<sub>ADH1</sub>-ERG1-P<sub>GAL10/1</sub>-ERG11-T<sub>CYC1</sub>)</i>	本研究
CHO116	CHO013, <i>GRE3:: (T<sub>ADH1</sub>-ERG1-P<sub>GAL10/1</sub>-CaCYP51-T<sub>CYC1</sub>)</i>	本研究
CHO117	CHO013, <i>GRE3:: (T<sub>ADH1</sub>-ERG1-P<sub>GAL10/1</sub>-HmCYP51-T<sub>CYC1</sub>)</i>	本研究
CHO118	CHO013, <i>GRE3:: (T<sub>ADH1</sub>-ERG1-P<sub>GAL10/1</sub>-RnCYP51-T<sub>CYC1</sub>)</i>	本研究
CHO119	CHO013, <i>GRE3:: (T<sub>ADH1</sub>-ERG1-P<sub>GAL10/1</sub>-CaCYP51-T<sub>CYC1</sub>)</i>	本研究
CHO120	CHO013, <i>GRE3:: (T<sub>ADH1</sub>-ERG1-P<sub>GAL10/1</sub>-HmCYP51-T<sub>CYC1</sub>)</i>	本研究
CHO121	CHO013, <i>GRE3:: (T<sub>ADH1</sub>-ERG1-P<sub>GAL10/1</sub>-RnCYP51-T<sub>CYC1</sub>)</i>	本研究
CHO119	<i>ATF2:: (P<sub>GAL7</sub>-iHMG1-ePTS1-T<sub>ADH2</sub>)-(T<sub>PGL1</sub>-ePTS1-ID11-P<sub>GAL10/1</sub>-ERG19-ePTS1-T<sub>CPS1</sub>)</i>	
CHO222	<i>ROX1:: (P<sub>GAL7</sub>-ERG20-ePTS1-T<sub>ADH2</sub>)-(T<sub>CPS1</sub>-ERG19-PTS1-P<sub>GAL10/1</sub>-ERG10-PTS1-T<sub>SPG5</sub>)</i> <i>LEU2:: (P<sub>GAL7</sub>-ERG8-ePTS1-T<sub>ADH1</sub>)-(T<sub>TEF1</sub>-ePTS1-ERG13-P<sub>GAL10/1</sub>-ERG12-ePTS1-T<sub>ENO2</sub>)</i>	本研究
CHO223	CHO222, <i>YJL064W:: T<sub>ADH2</sub>-ACS2-P<sub>GAL10/1</sub>-ASCI-T<sub>CPS1</sub></i>	本研究
CHO224	CHO223, <i>CIT2:: (P<sub>GAL7</sub>-ANT1-T<sub>SPG5</sub>)-(T<sub>FBA1</sub>-IDP2-P<sub>GAL10/1</sub>-IDP3-T<sub>TEF1</sub>)</i>	本研究
pM-Cas9-sgRNA	URA3, P <sub>RNA</sub> -sgRNA, P <sub>TEF1</sub> -Cas9, ARS	实验室保存

### 1.4 菌株发酵

挑取单克隆菌株接种到 3 mL YPD 培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 过夜培养, 待  $A_{600}=2$ , 按照 10% 接种量转到含 15 mL YPD 培养基的 100 mL 锥形瓶

中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 摇瓶培养 48 h。将发酵液转移至 50 mL 离心管中, 6000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 加入 15 mL 新鲜的诱导培养基, 混匀后转移至 100 mL 锥形瓶中继续发酵 96 h。

### 1.5 皂化与萃取

取 1 mL 发酵菌液经 12000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液并收集菌体细胞, 用 1 mL 超纯水洗涤 2 次后重悬于 1 mL 3 mol/L 盐酸溶液中, 100 °C 裂解 10 min; 随后以 12000 r/min 离心 5 min, 弃去酸性上清液, 再次通过 2 次超纯水洗涤, 彻底去除残留酸液。将菌体沉淀均匀分散于 20% NaOH/甲醇混合溶液, 65 °C 恒温水浴中持续皂化反应 4~6 h; 待皂化完成后向体系内加入 1 mL 正己烷, 经 10 min 涡旋振荡萃取; 12000 r/min 离心 1 min, 吸取上层有机相并经 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤, 最终将萃取液转移至液相样品瓶中, 用于后续检测分析。

### 1.6 定性与定量分析

气相色谱-质谱(GC-MS)定性分析条件: Thermo Scientific Trace1300 GC/Orbitrap Exploris GC 240 型气相色谱-高分辨质谱联用仪, HP-5 色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ); 初始温度 100 °C, 保持 1 min, 以 20 °C/min 的速率升温至 300 °C, 保持 15 min; 进样量 1  $\mu\text{L}$ 。

气相色谱(GC)定量分析条件: Shimadzu GC 2010 Pro 型高效气相色谱仪, DB-35 色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ); 初始温度 100 °C, 保持 1 min, 随后以 50 °C/min 的速率升温至 300 °C, 保持 30 min; 进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。

### 1.7 高密度发酵

高密度发酵工艺: 将 200 mL 种子液接种至装有 2 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中发酵。

发酵参数: 温度 30 °C, pH 5.0, 溶氧维持 30% (通过搅拌转速 200~1000 r/min 与空气流量 2.0~9.0 L/min 动态联动调节)。

补料策略: 初期待培养基碳源耗尽后, 补充葡萄糖至  $A_{600}=150$ , 随后加入半乳糖诱导表达体系, 同时将碳源调整为乙醇; 当溶氧水平超过 40% 时, 补加乙醇, 使发酵液中乙醇质量浓度稳定于 5 g/L。

### 1.8 数据分析

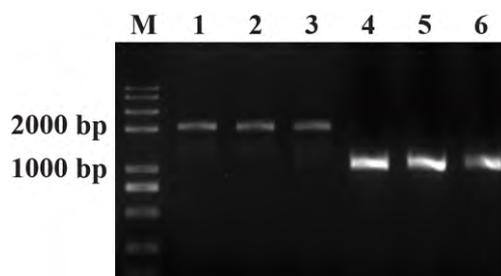
利用 GraphPad Prism 9 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。统计显著性表示:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*),  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*), 表示组间差异显著性依次增强。

## 2 结果与讨论

### 2.1 构建生产胆固醇酿酒酵母重组菌株

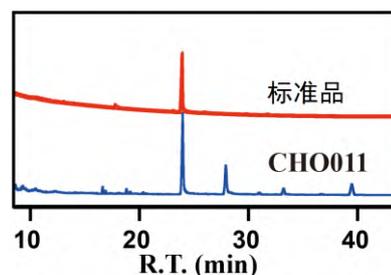
为了构建高效合成胆固醇酿酒酵母细胞工厂, 本研究依托酿酒酵母内源麦角固醇途径, 将实验室前期筛选到的土豆 (*Solanum tuberosum* L.) 来源 7-脱氢胆固醇还原酶基因 (*StDWF5*) 和家鸡 (*Gallus gallus*) 来源 24-脱氢胆固醇还原酶基因 (*GgDHCR24*)<sup>[14]</sup> 经密码子优化后, 搭载诱导性启动子  $P_{GALI}$  和  $P_{GALI0}$ , 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 将这 2 个功能模块表达盒插入野生型酵母菌株 BY4742 基因组中, 转化子经过 SD-Ura 固体培养基筛选、菌落 PCR 验证 (图 2) 后得到胆固醇底盘菌 CHO011。

经 YPD 培养基发酵培养, 利用 GC 色谱和质谱 (MS) 对 CHO011 发酵产物进行分析, 结果如图 3 所示。由图 3 (a) 可知, 蓝色产物峰与红色胆固醇标准品峰出峰时间一致, 初步推测发酵产物中含有胆固醇。由图 3 (b) 可知, 检测到  $m/z$  386 的分子离子峰, 该峰对应胆固醇的分子式  $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$  (相对分子质量 386.65); 同时检测到  $m/z$  43、105、145、213、275、301 等碎片离子峰, 这些峰反映了甾核与侧链的裂解特征。结合右侧化学结构 (含羟基、双键及异辛基侧链), 进一步确认该产物为胆固醇。经测定, CHO011 发酵最终胆固醇摇瓶产量为 31.6 mg/L。

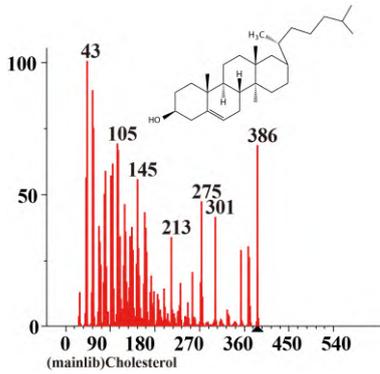


M. DNA Marker; 1-3 泳道. *StDWF5* 表达盒验证条带, 2115 bp; 4-6 泳道. *GgDHCR24* 表达盒验证条带, 1023 bp。

图 2 胆固醇合成菌株 CHO011 菌落 PCR 验证凝胶电泳  
Fig. 2 Gel electrophoresis results of colony PCR verification for the cholesterol-producing strain CHO011



(a) 摇瓶发酵产物检测 GC 图谱



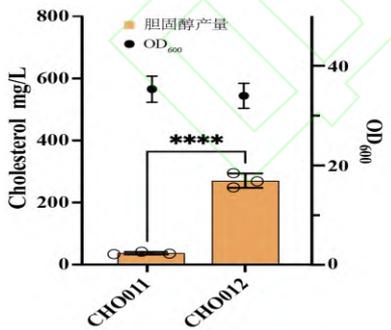
(b) 底盘菌株 CHO011 培养液提取物的 GC-MS 图谱

图 3 CHO011 重组菌株摇瓶发酵产物分析

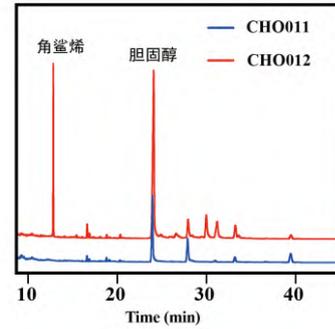
Fig. 3 Analysis of shake flask fermentation products of recombinant strain CHO011

### 2.2 增强酿酒酵母胞质 MVA 途径

通过增加前体物质的供给是提高下游产物产量有效的调控手段。Xiao 等<sup>[15]</sup>通过增加角鲨烯前体的供给,提高胆固醇硫酸盐的产量。为了进一步提高胆固醇产量,将酿酒酵母 MVA 途径 9 个基因 *ERG10*、*ERG13*、*tHMG1*、*ERG12*、*ERG8*、*ERG19*、*ID11*、*ERG20*、*ERG9* 分别搭载糖酵解途径强启动子构建表达盒片段,并利用 CRISPR/Cas9 技术和同源重组技术将表达盒片段插入酿酒酵母 CHO011 基因组中进行过表达。同时,通过敲除法尼醇途径关键基因 *DPPI* 及 *LPP1* 获得重组菌株 CHO012。增强 MVA 途径提高胆固醇产量结果如图 4 所示。菌株 CHO012 胆固醇摇瓶产量为 260.9 mg/L,产量增加了约 7.3 倍;与此同时,角鲨烯出现积累,产量为 367.21 mg/L。



(a) 过表达 MVA 途径 9 个基因评价胆固醇产物合成能力



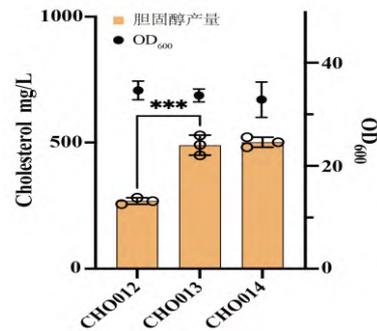
(b) 重组菌株 CHO011 与 CHO012 摇瓶发酵产物 GC 图谱

图 4 增强 MVA 途径提高胆固醇产量

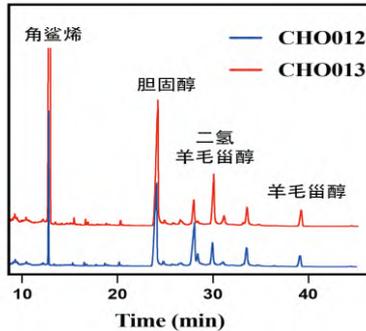
Fig. 4 Enhancing the MVA pathway to increase cholesterol production

### 2.3 增强关键功能基因拷贝数提高胆固醇产量

为了探究引入的胆固醇合成关键基因对胆固醇产量的影响。本研究在 CHO012 尝试过表达不同拷贝数 *GgDHCR24* 基因表达盒的重组菌株 CHO013 和 CHO014,以增强其表达强度,结果如图 5 所示。由图 5 (a) 可知,CHO013 胆固醇摇瓶产量为 489.52 mg/L,提高了约 87.6%,而 CHO014 胆固醇产量为 501.35 mg/L,产量已无明显变化。图 5 (b) 可知,CHO013 菌株发酵产物中除角鲨烯积累外,产生了 24,25-二氢羊毛甾醇等副产物的积累。这表明后鲨烯途径关键酶 *ERG1* 的表达强度无法将剩余的角鲨烯进行及时转化,同时 *GgDHCR24* 基因缺乏良好的特异性,该酶同时可以对羊毛甾醇的 24,25 位 C=C 烯键进行还原,从而产生副产物 24,25-二氢羊毛甾醇等的积累。



(a) 增加不同拷贝数 *GgDHCR24* 胆固醇合成能力的比较



(b) 重组菌株 CHO012、CHO013 摇瓶发酵产物 GC 图谱

图 5 过表达胆固醇关键基因 *GgDHCR24* 提高胆固醇产量

Fig. 5 Overexpression of the cholesterol key gene *GgDHCR24* to enhance cholesterol production

### 2.4 后鲨烯途径关键基因的筛选

Lepesheva 等<sup>[16]</sup>报道了人源、大鼠源和白色念珠菌源的羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶对 24,25-二氢羊毛甾醇催化活性较好, 因此通过对酿酒酵母本源角鲨烯环氧化酶基因 *ERG1* 和拟南芥源角鲨烯环氧化酶基因 *AtSQE2*, 分别组合酿酒酵母本源、人源、大鼠源和白色念珠菌源的 14 $\alpha$ -去甲基酶基因进行过表达, 从而使角鲨烯流向下游产物, 同时增强 14 $\alpha$ -去甲基酶的表达强度, 以降低 24,25-二氢羊毛甾醇等副产物的产生。

针对角鲨烯和 24,25-二氢羊毛甾醇的积累问题, 在 CHO013 菌株中过表达角鲨烯环氧化酶及 14 $\alpha$ -去甲基酶, 发酵结果如图 6 所示, 重组菌株 CHO119 中的 *ERG1-CaCYP51* 为最优组合, 摇瓶发酵产量为 694.47 mg/L, 胆固醇产量增加了 41.9%。在中间产物积累方面, 角鲨烯和副产物产量相比 CHO013 菌株的均有所降低, 角鲨烯产量为 114.62 mg/L, 降低了 75.9%; 羊毛甾醇产量为 45.04 mg/L, 降低了 8.9%; 24,25-二氢羊毛甾醇产量为 18.05 mg/L, 降低了 80.4%。

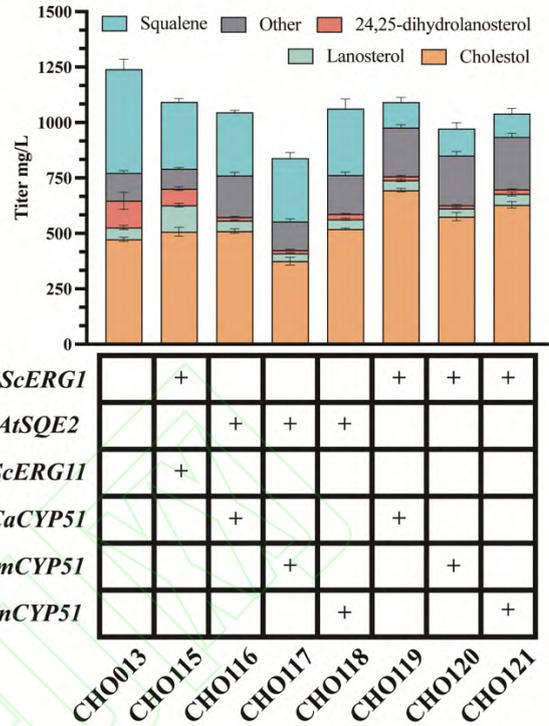


图 6 筛选角鲨烯环氧化酶和 14 $\alpha$ -去甲基酶组合以获得最佳催化活性的重组菌株

Fig. 6 Screening of squalene epoxidase and 14 $\alpha$ -demethylase combinations to obtain recombinant strains with optimal catalytic activity.

### 2.5 利用过氧化物酶体工程增加胆固醇产量

利用过氧化物酶体工程, 将关键基因定位于过氧化物酶体中, 可增加产物的产量。Dusséaux 等<sup>[17]</sup>将完整的 MVA 途径定位到酿酒酵母过氧化物酶体, 并将完整的柠檬烯途径转移到过氧化物酶体中, 柠檬烯产量较细胞质途径提高 125 倍。Liu 等<sup>[18]</sup>将角鲨烯合成途径关键酶定位到解脂耶氏酵母过氧化物酶体中, 并通过增强辅因子供应, 切断竞争途径, 角鲨烯产量达 11 g/L。基于上述案例, 本研究首先利用过氧化物酶体靶向基因 (*ePTS1*) 将 MVA 途径 9 个基因定位于过氧化物酶体, 以增加角鲨烯前体供应; 随后, 通过敲除过氧化物酶体柠檬酸合酶 (*CIT2*), 减少乙酰辅酶 A 向线粒体的分流, 同时过表达乙酰辅酶 A 合成酶 (*ACS1* 和 *ACS2*), 增强过氧化物酶体内乙酰辅酶 A 的合成; 最后, 通过过表达过氧化物酶体膜腺苷酸转运蛋白 (*ANT1*), 异柠檬酸脱氢酶 (*IDP2* 和 *IDP3*), 增强辅因子 ATP 及 NADPH 向过氧化物酶体供应, 构成重组菌株 CHO224, 发酵结果如图 7 所示。菌株 CHO224 的胆固醇产量为 784.11 mg/L, 较

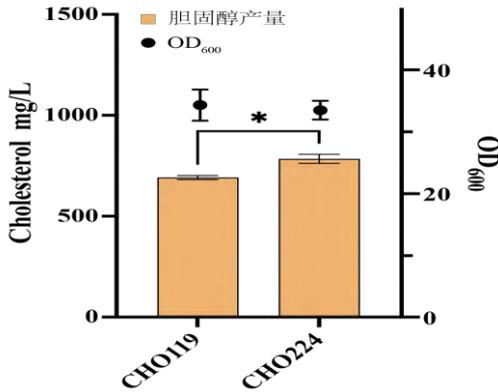


图 7 利用过氧化物酶体工程构建工程菌株评价胆固醇产物合成能力

Fig. 7 Evaluation of cholesterol product synthesis capacity using peroxisome engineering to construct engineered strains

### 2.6 高密度批次补料发酵评价

为了进一步验证重组菌株胆固醇的合成能力,对 CHO224 菌株进行高密度发酵评估与工艺优化,开发菌株生长与产物生产解偶联的发酵工艺。首先,利用葡萄糖确保菌株快速生长,待  $A_{600}=150$  时,将补料碳源切换为乙醇,并加入半乳糖诱导。添加半乳糖诱导后,每 12 h 对代谢产物进行检测,最终 120 h 后胆固醇产量不再增加,胆固醇产量为 4.71 g/L,主要副产物羊毛甾醇产量为 376.89 mg/L,二氢羊毛甾醇产量为 302.78 mg/L (图 8)。目前微生物细胞工厂的设计中,胆固醇尚未作为最终目标产物被直接高效合成,而是作为其他高附加值类固醇化合物合成途径中的中间体或副产物存在<sup>[19-20]</sup>。本研究构建的 CHO224 重组菌株通过底盘菌株改造和精准发酵调控,实现了以胆固醇为直接目标产物的高效微生物合成。

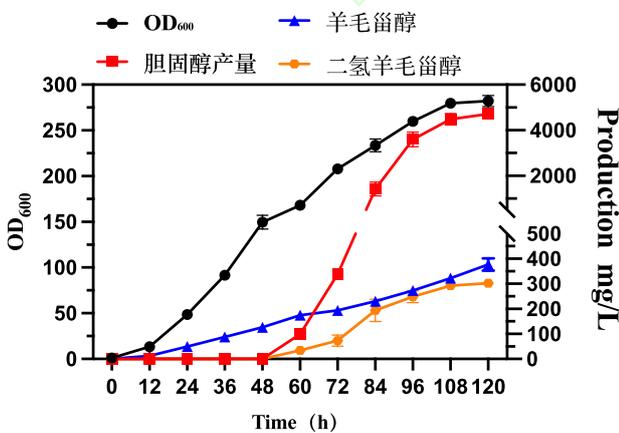


图 8 高密度发酵 CHO224 菌株生产胆固醇

Fig. 8 High-density fermentation of CHO224 strain for cholesterol production

### 3 结 语

本研究通过增强 MVA 途径关键酶表达强度,过表达胆固醇合成关键基因 *GgDHCR24*,结合有针对性的后鲨烯途径调控以及过氧化物酶体工程等多轮模块化优化,构建高效生产胆固醇重组酿酒酵母菌株 CHO224。经摇瓶发酵,菌株 CHO224 的胆固醇产量达 784.11 mg/L,并利用 5 L 发酵罐进行高密度发酵评估,最终产量为 4.71 g/L,是初代菌株 CHO011 的 149 倍。然而,在发酵过程中,仍然存在副产物产生,后续工作需要围绕调控后鲨烯途径进行。本研究建立的多模块协同优化策略及菌株实现方式,为胆固醇绿色合成提供了可行性借鉴。

### 参考文献:

- [1] LI L H, DUTKIEWICZ E P, HUANG Y C, et al. Analytical methods for cholesterol quantification[J]. Journal of food and drug analysis, 2019, 27(2): 375-386.
- [2] KHONDKER A, HUB J S, RHEINSTÄDTER M C. Steroid-steroid interactions in biological membranes: cholesterol and cortisone[J]. Chemistry and physics of lipids, 2019, 221: 193-197.
- [3] SUBCZYNSKI W K, PASENKIEWICZ-GIERULA M, WIDOMSKA J, et al. High cholesterol/low cholesterol: effects in biological membranes: a review[J]. Cell biochemistry and biophysics, 2017, 75(3/4): 369-385.
- [4] HARTZ P, STROHMAIER S J, EL-GAYAR B M, et al. Resurrection and characterization of ancestral CYP11A1 enzymes[J]. The FEBS journal, 2021, 288(22): 6510-6527.
- [5] ROHMAN A, DIJKSTRA B W. The role and mechanism of microbial 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenases in steroid breakdown[J]. The journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2019, 191:105366.
- [6] LI R, GUO S, WANG D, et al. Elucidation of the plant progesterone biosynthetic pathway and its application in a yeast cell factory[J]. Metabolic engineering, 2025, 90: 197-208.
- [7] CHRIST B, XU C, XU M, et al. Repeated evolution of cytochrome P450-mediated spiroketal steroid biosynthesis

- in plants[J]. Nature communications, 2019, 10(1): 3206.
- [8] BRIUGLIA M-L, ROTELLA C, MCFARLANE A, et al. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release[J]. Drug delivery and translational research, 2015, 5(3): 231-242.
- [9] 马志军, 薛家禄, 薛雯月, 等. 液晶用羊毛脂胆固醇的精制研究[J]. 创新科技, 2013, 13(9):65.
- [10] 柳晓峰. 2010 年中国饲用维生素市场回顾及 2011 年展望[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(4):15-20.
- [11] DING H, ZHAO D, GAO Y. Response surface optimization of cholesterol extraction from lanolin alcohol by selective solvent crystallization[J]. Chemical papers, 2016, 71(1): 71-79.
- [12] 孟亚娟, 贺稚非, 李洪军. 动物源胆固醇的生理功效及其开发应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(5):388-391.
- [13] PEI H, MA X, PAN Y, et al. Separation and purification of lanosterol, dihydrolanosterol, and cholesterol from lanolin by high-performance counter-current chromatography dual-mode elution method[J]. Journal of separation science, 2019, 42(12): 2171-2178.
- [14] XU L, WANG D, CHEN J, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for gram-scale diosgenin production[J]. Metabolic engineering, 2022, 70: 115-128.
- [15] XIAO F, LI D, PAN Y, et al. Establishing *Komagataella phaffii* as a cell factory for efficient production of cholesterol sulfate[J]. ACS Sustainable chemistry & engineering, 2024, 13(1): 174-186.
- [16] LEPESHEVA GI, WATERMAN MR. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms[J]. Biochim biophys acta. 2007, 1770(3): 467-477.
- [17] DUSSEAUX S, WAJN W T, LIU Y, et al. Transforming yeast peroxisomes into microfactories for the efficient production of high-value isoprenoids[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2020, 117(50): 31789-31799.
- [18] LIU GS, LI T, ZHOU W, et al. The yeast peroxisome: a dynamic storage depot and subcellular factory for squalene overproduction[J]. Metabolic engineering, 2020, 57: 151-161.
- [19] CHEN Q, WEI W, CHAO Z, et al. Electron transfer engineering of artificially designed cell factory for complete biosynthesis of steroids[J]. Nature communications, 2025, 16(1):3740.
- [20] SZCZEBARA F M, CHANDELIER C, VILLERET C, et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast[J]. Nature biotechnology, 2003, 21(2): 143-149.