

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

ZYGZEA

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

● 中国中文核心期刊

● 中国生物医学核心期刊

● 中国期刊方阵入选期刊

● 中国科技核心期刊

● 中国科学引文数据库来源期刊

● 中国药学会系列期刊

本期导读：

生物转化甾醇制备甾体药物中间体研究进展

吴杰群，徐顺清，王 鸿，苏为科，储消和

药效动力学研究中流式细胞术方法学验证概述

高恩惠，陈 探，马 璟，程远国，朱 晰



微信号：cjph-cjph



主 办

上海医药工业研究院

中国药学会

中国化学制药工业协会

2020年7月

第51卷

Vol.51 No.7

ISSN 1001-8255



9 771001 825206

07>

中国医药工业杂志

二〇二〇年

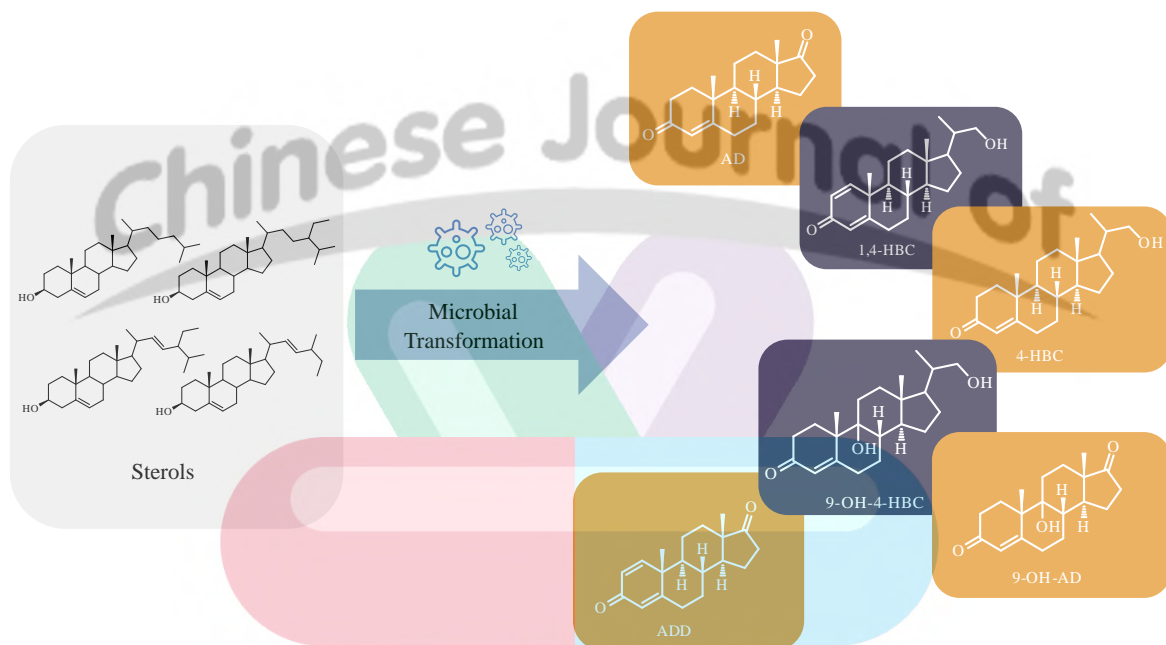
第五十一卷

第七期

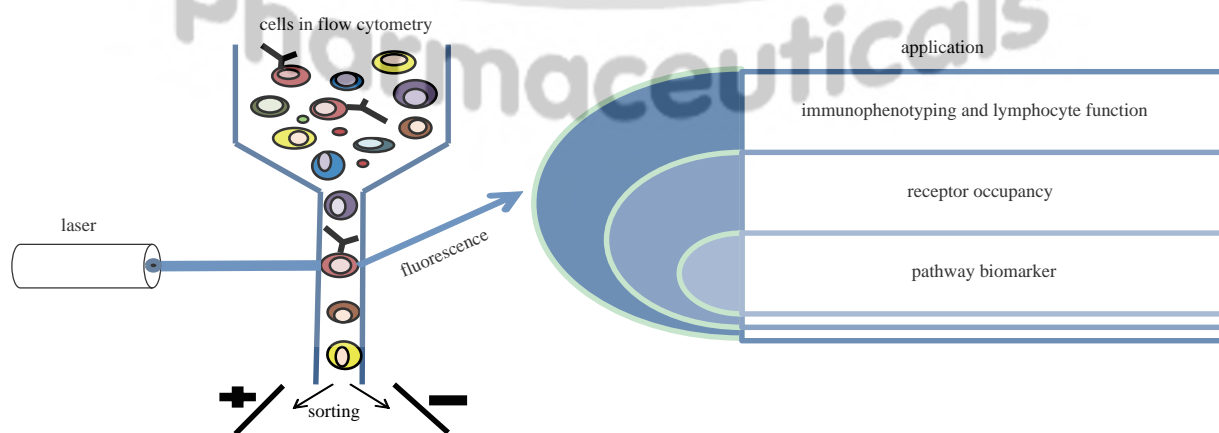
第801-946页

· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

- 801** 生物转化甾醇制备甾体药物中间体研究进展·····吴杰群, 徐顺清, 王 鸿, 苏为科, 储消和*
Progress in the Preparation of Steroid Drug Intermediates by Microbial Transformation of Sterols
·····WU J Q, XU S Q, WANG H, SU W K, CHU X H*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.001

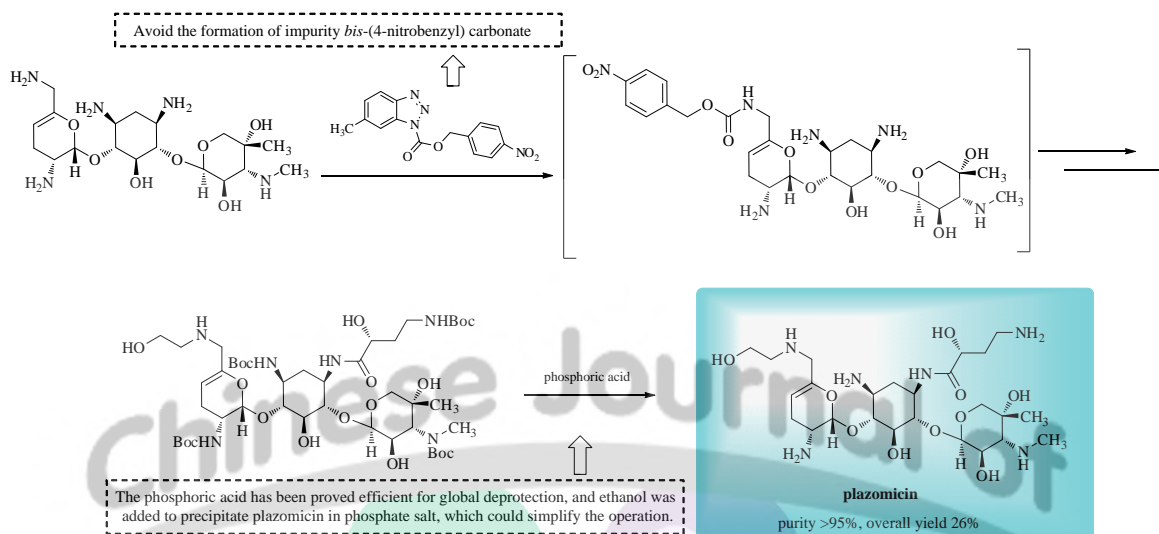


- 815** 药效动力学研究中流式细胞术方法学验证概述··高恩惠, 陈 探, 马 璟, 程远国*, 朱 晰
Overview of Validation of Flow Cytometry-based Methodology in Pharmacodynamic Study
·····GAO E H, CHEN T, MA J, CHENG Y G*, ZHU X
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.002

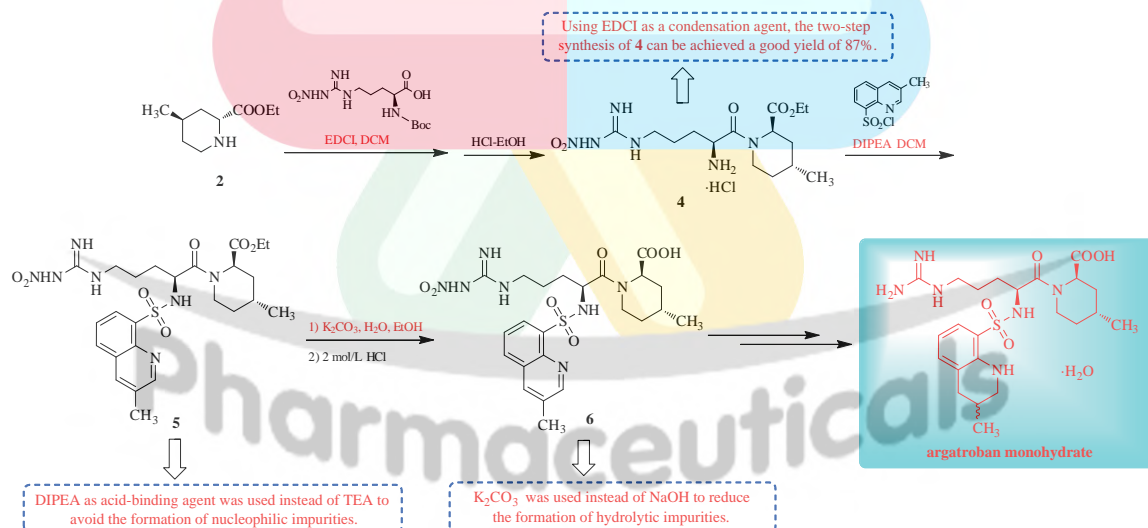


Flow cytometry detects surface and internal antibodies of cells, which has been used in immunophenotyping and lymphocyte function analysis, receptor occupancy analysis and pathway analysis in the development of drugs for cancers and immune diseases.

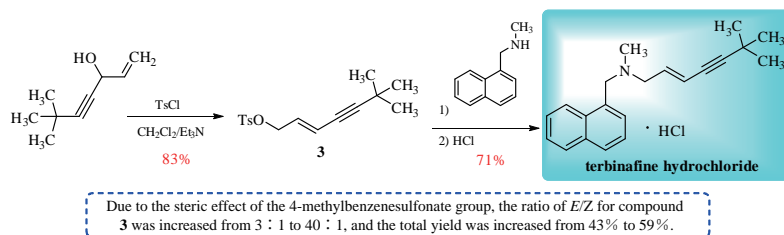
- 823** 普拉佐米星的合成工艺优化.....吕裕斌, 郑直, 郑鹏, 胡志*, 王国平
Improved Synthetic Process of Plazomicin.....LÜ Y B, ZHENG Z, ZHENG M, HU Z*, WANG G P
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.003



- 828** 阿加曲班一水合物的合成工艺改进.....吴空, 张立, 张乃华, 裴洪凤, 张贵民*
Improved Synthetic Process of Argatroban Monohydrate.....WU K, ZHANG L, ZHANG N H, PEI H F, ZHANG G M*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.004

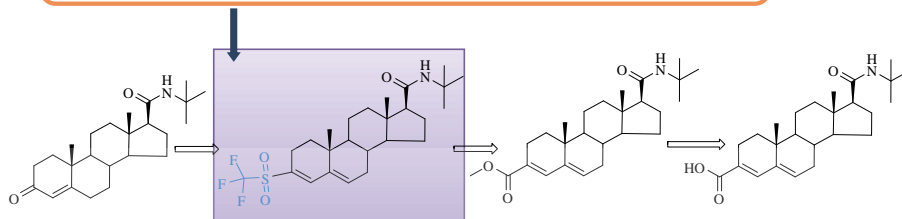


- 834** 盐酸特比萘芬的合成工艺优化.....蔡基玮, 杨康, 刘通, 冀亚飞, 赵建宏*
Improved Synthetic Process of Terbinafine Hydrochloride.....CAI J W, YANG K, LIU T, JI Y F, ZHAO J H*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.005



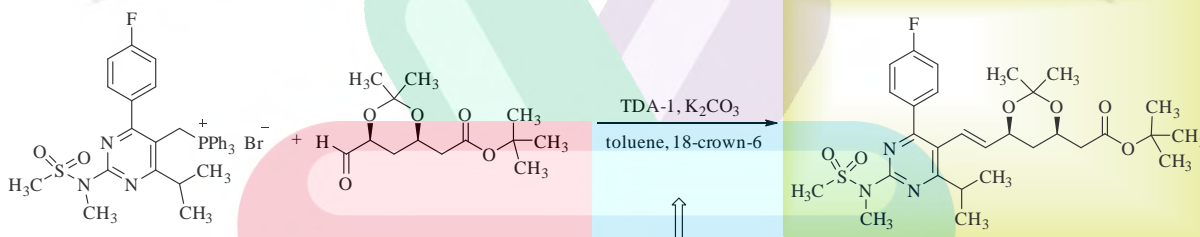
- 837** 爱普列特的合成工艺改进.....何 秋, 华庆松, 李 霞, 俞 波*
Improved Synthesis of Epristeride.....HE Q, HUA Q S, LI X, YU B*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.006

This method, without 1,1,2,2-tetrafluoro-2-(1,1,2,2-tetrafluoroethoxy) ethanesulfonyl fluoride, has mild reaction conditions and simple operation.



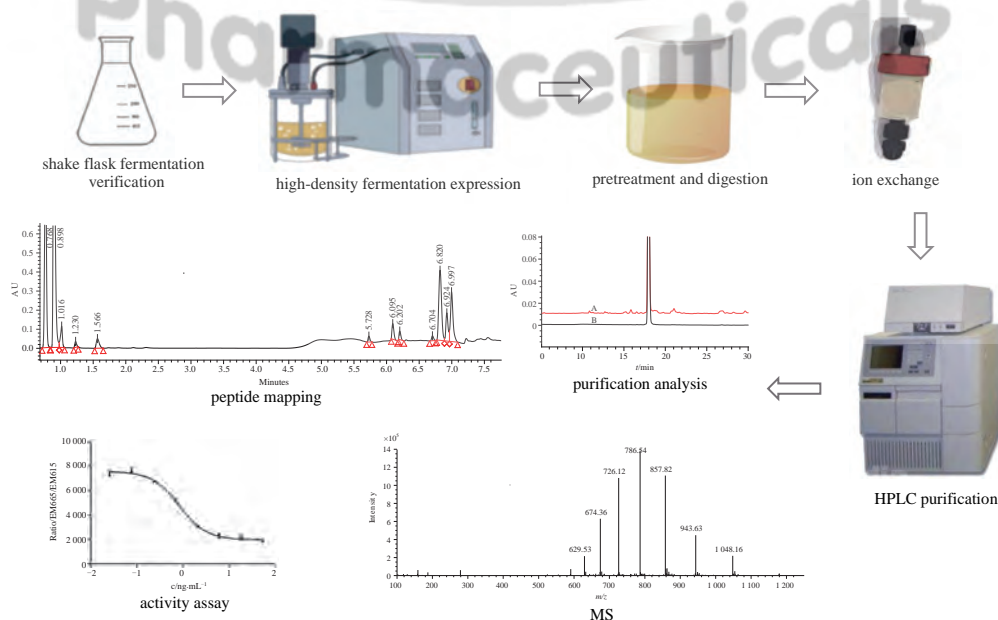
Epristeride was prepared with an overall yield of 50.9% and a purity of 99.93%.

- 840** 瑞舒伐他汀钙关键中间体的合成工艺优化.....王本利, 黄文波, 王学应, 韩忠丽, 张贵民*
Improved Synthetic Process for the Key Intermediate of Rosuvastatin Calcium.....
.....WANG B L, HUANG W B, WANG X Y, HAN Z L, ZHANG G M*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.007

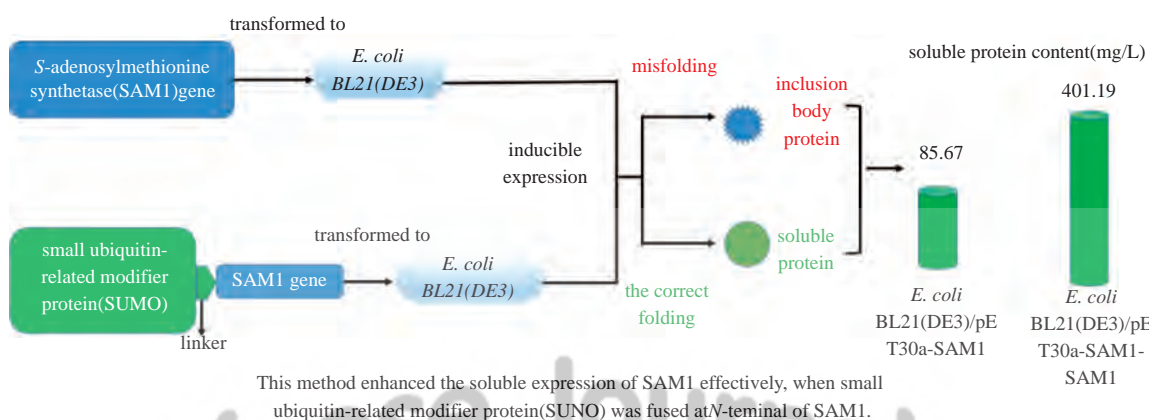


The yield was increased to 93% and the production of Z-isomer was effectively reduced ($E/Z > 4500:1$) with *tris*[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]amine (TDA-1) as a phase transfer catalyst and crown ether as a catalyst.

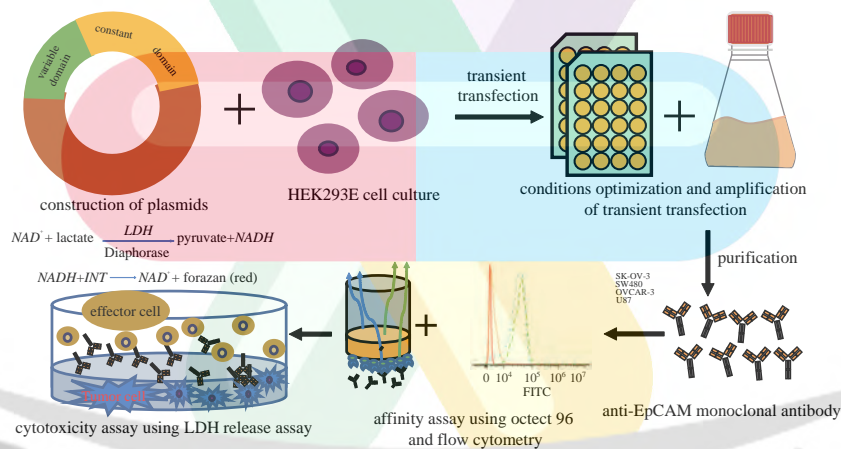
- 843** 重组人甲状旁腺激素的生产工艺研究.....李珊珊, 黄宗庆, 马 洁, 陆伟根, 路建光*
Production Technology of Recombinant Human Parathyroid Hormone.....
.....LI S S, HUANG Z Q, MA J, LU W G, LU J G*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.008



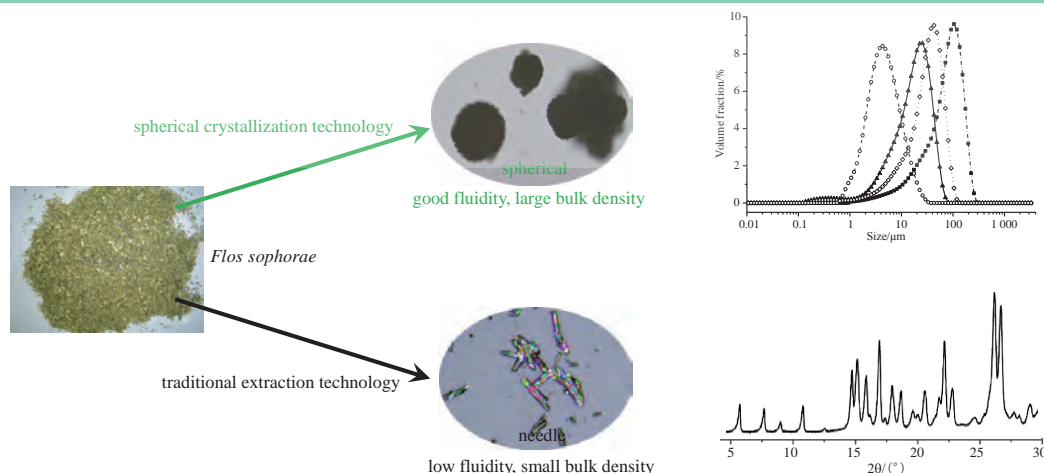
- 849** *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的原核可溶性表达及其转化应用……周晶辉, 赵士敏, 许 岗*
Prokaryotic Soluble Expression and Transformation Application of *S*-Adenosylmethionine Synthetase Gene……ZHOU J H, ZHAO S M, XU G*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.009



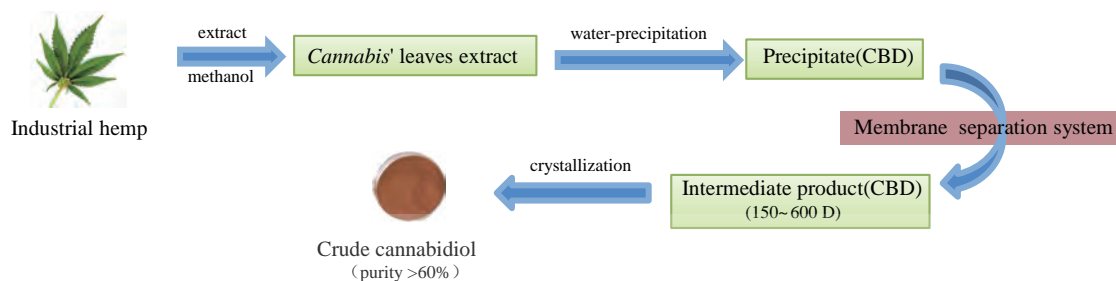
- 856** 重组抗人上皮黏附因子人源化单克隆抗体的瞬时表达及体外活性检测……王 磊, 边延林, 朱建伟, 张宝红*
Transient Expression and *in vitro* Activity Test of Recombinant Humanized Anti-EpCAM Monoclonal Antibody……WANG L, BIAN Y L, ZHU J W, ZHANG B H*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.010



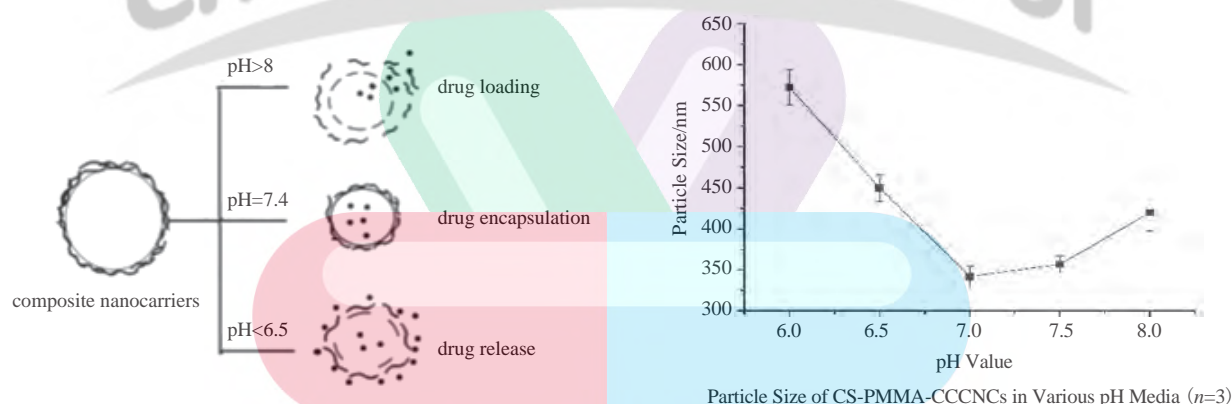
- 866** 槐米中球形芸香苷的制备……姜 侠, 刘振华, 韩晓茹, 王语诺, 王 冠*
Preparation of Spherical Rutin from Flos Sophorae……JIANG X, LIU Z H, HAN X R, WANG Y N, WANG G*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.011



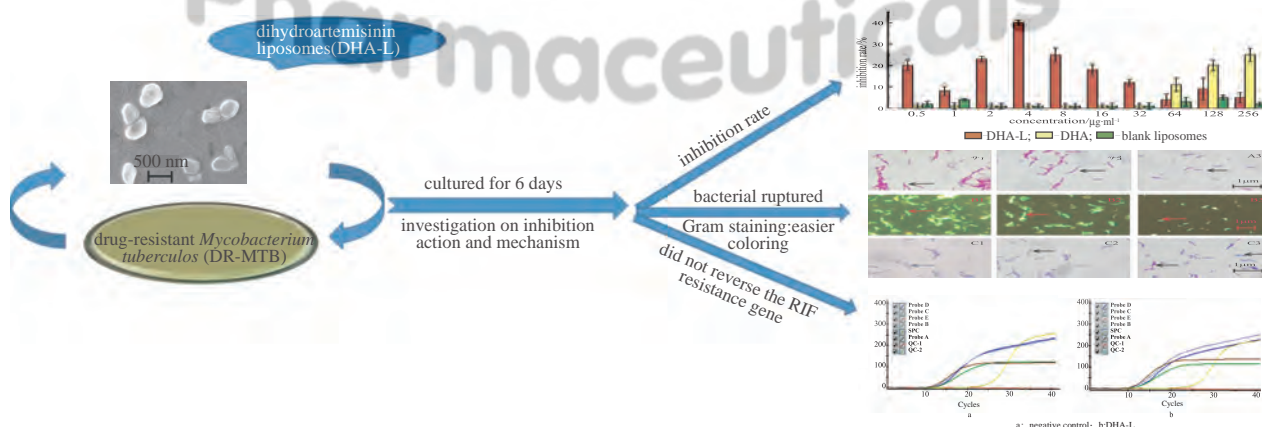
- 871** 膜分离技术在工业提取大麻二酚中的应用……郑 玲, 唐晓欢, 严明娟, 彭 澎, 陈梦达*
Application of Membrane Separation Technology in Industrial Extraction of Cannabidiol
……ZHENG L, TANG X H, YAN M J, PENG P, CHEN M D*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.012



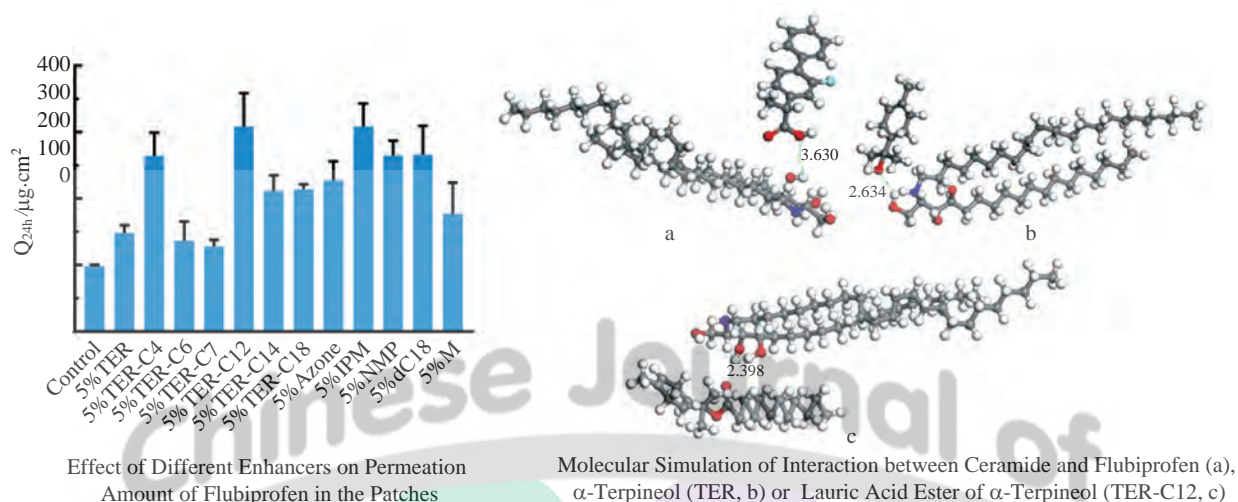
- 874** 碳酸钙复合纳米载体的制备及体外评价……雷 宇, 赵健辉, 王艺娇, 谷峙樾, 刘占军*
Preparation and *in vitro* Evaluation of Calcium Carbonate Composite Nanocarriers……
……LEI Y, ZHAO J H, WANG Y J, GU Z Y, LIU Z J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.013



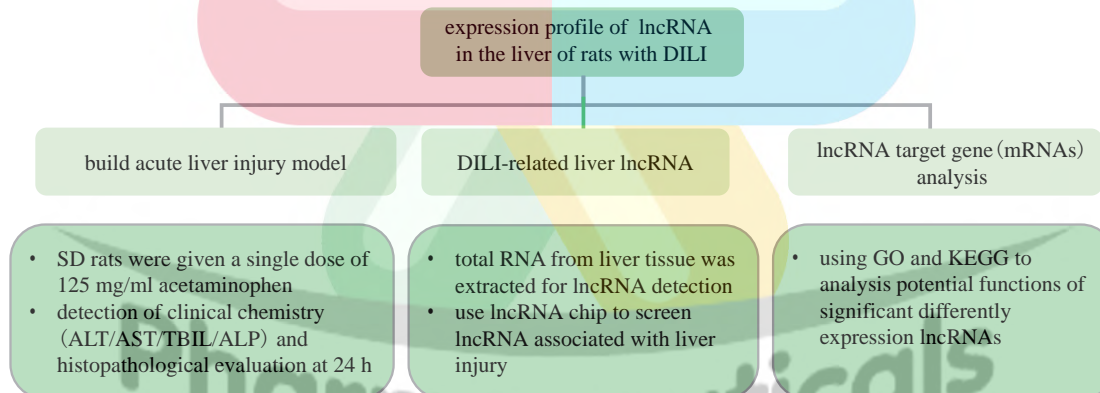
- 882** 双氢青蒿素脂质体的制备及抑制耐药结核分枝杆菌机制的考察……古秀娟, 曾娅莉*, 邓建军, 乔 刚
Preparation of Dihydroartemisinin Liposomes and Investigation on Mechanism of Inhibition of
Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*……GU X J, ZENG Y L*, DENG J J, QIAO G
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.014



- 889 α -萜品醇脂肪酸酯及有机胺对氟比洛芬经皮透过的影响.....张金伟, 初天哲, 帅秋艳, 岳永利, 赵利刚*
Effects of Fatty Acid Esters of α -Terpineol and Organic Amines on Transdermal Permeation of Flubiprofen.....ZHANG J W, CHU T Z, SHUAI Q Y, YUE Y L, ZHAO L G*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.015

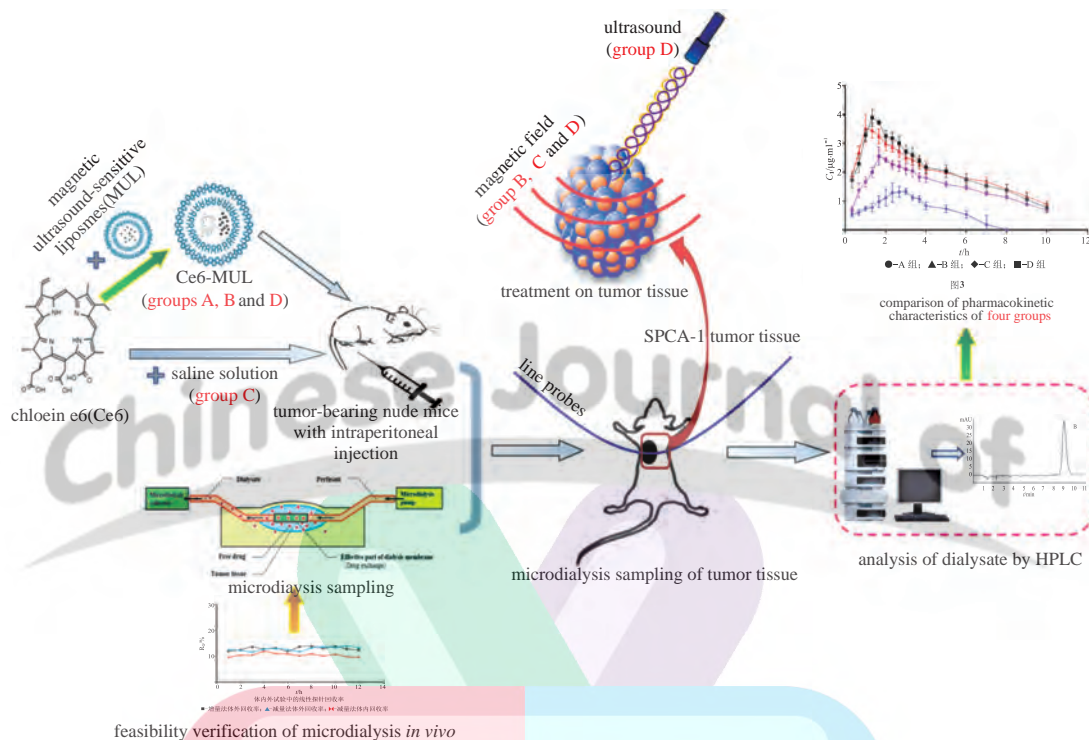


- 897 长链非编码 RNA 在药物性肝损伤大鼠肝脏中表达谱的变化.....夏天飞, 汤纳平, 邱云良, 李 华, 马 璟*
Expression Profile of Long Non-coding RNA in the Liver of Rats with Drug Induced Liver Injury.....XIA T F, TANG N P, QIU Y L, LI H, MA J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.016

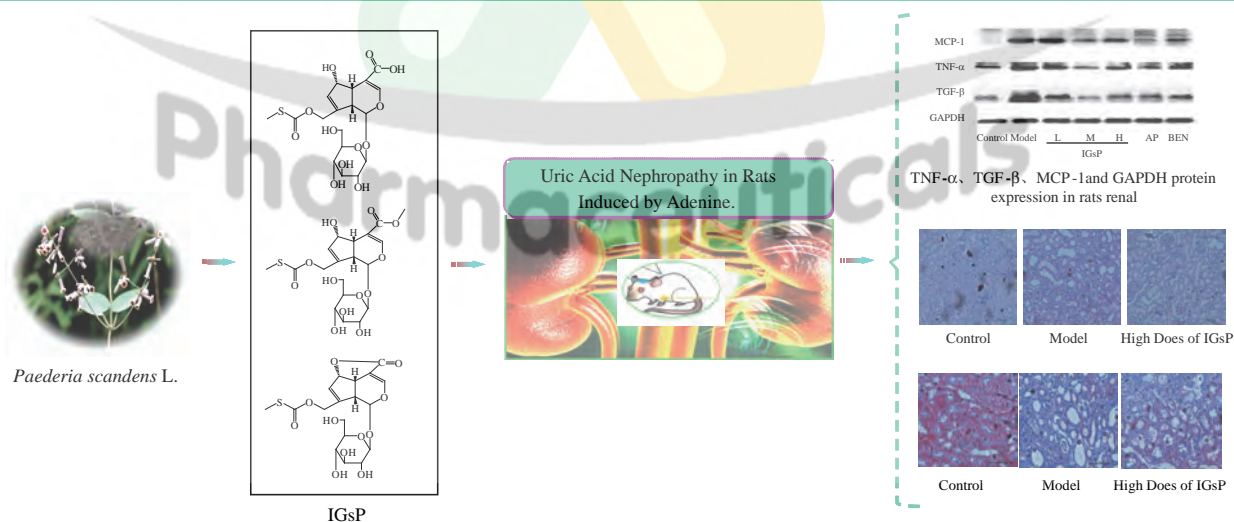


- The data of clinical chemistry analysis and histopathology assessment at 24 h showed that the animal acute liver injury model was successfully established.
- The expression profile of lncRNA in the liver of DILI SD rats suggested that 902 lncRNAs changed more than 2-fold ($P < 0.05$) compared with the liver of normal SD rats, of which 566 were up-regulated and 336 were down-regulated.
- lncRNA target gene (mRNAs) analysis and regulatory pathway analysis showed that mRNAs mainly participated in the occurrence or development of DILI by regulating energy homeostasis, oxidoreductase activity, immune system pathways, cytochrome P450 enzyme activity, cell proliferation and apoptosis.

- 902 利用微透析技术进行二氢卟吩e6 磁性声敏脂质体的肿瘤局部药动学研究.....田金洁, 张祚德, 贺 怡, 谢 波, 凌家俊*
Local Pharmacokinetics of Chlorin e6-loaded Magnetic Ultrasound-sensitive Liposomes in Tumor Tissue Based on Microdialysis Technique.....TIAN J J, ZHANG Z D, HE Y, XIE B, LING J J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.017



- 908 鸡矢藤环烯醚萜苷类化合物在尿酸性肾病中的应用.....吴剑霞, 乐心逸, 张 蓓, 沈龙海, 吴 彤, 周海凤*
Application of Iridiod Glycosides from *Paederia scandens* L. on Uric Acid Nephropathy.....WU J X, LE X Y, ZHANG B, SHEN L H, WU T, ZHOU H F*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.018

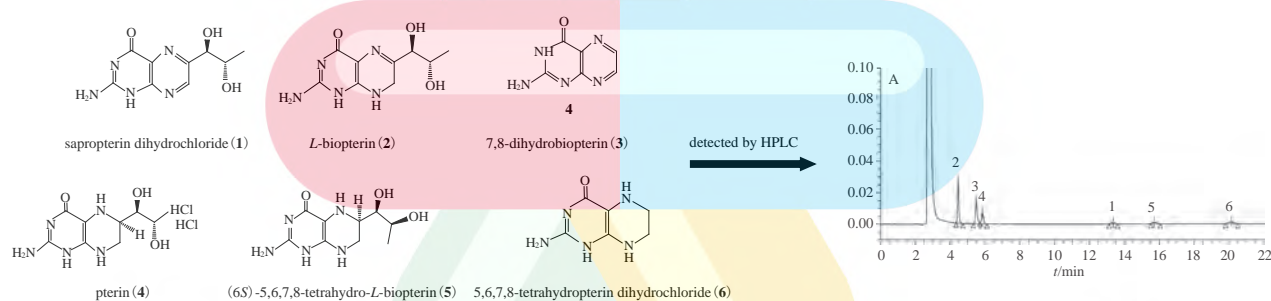


Compared with the model group, different doses of the IGsP could reduce the serum levels of uric acid (UA), urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cre) of rats with uric acid nephropathy in a time- and dose-dependent manner, and the effect of reducing uric acid in the high dose group was similar to that in the positive control group. The same dosage of the IGsP could reduce the renal index of rats with uric acid nephropathy and improve the pathological damage of kidneys of the rats.

- 916** 齿痛消炎灵颗粒中 22 种成分的 HPLC-MS/MS 法测定……张子建, 樊雪艳, 马红云, 王春英*
Simultaneous Determination of Twenty-two Components in *Chitong Xiaoyanling* Granules by HPLC-MS/MS……ZHANG Z J, FAN X Y, MA H Y, WANG C Y*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.019

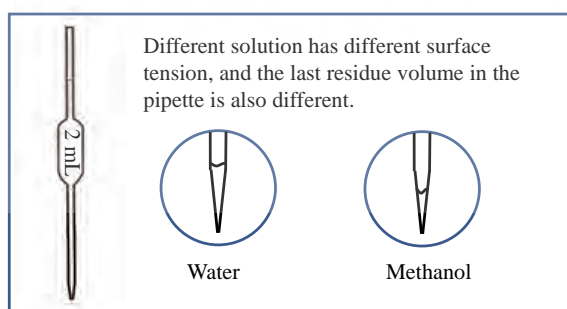


- 926** 盐酸沙丙蝶呤片有关物质的 HPLC 法测定……员 荣, 冯 中*, 刘 凯, 聂德平, 张贵民
Determination of Related Substances in Sapropterin Dihydrochloride Tablet……YUAN R, FENG Z*, LIU K, NIE D P, ZHANG G M
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.020



A new method was established for determination of sapropterin dihydrochloride (1) and five related substances.

- 930** 依达拉奉注射液含量测定方法的改进……韩遵圣, 吴 松, 李天磊, 戚 燕, 张 驰*
Problems and Solutions for Determination of Edaravone Injection……HAN Z S, WU S, LI T L, QI Y, ZHANG C*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.021



- 933 中国药械组合产品的开发、应用与监管现状.....魏宝康, 王 健
Development, Application and Regulation of Drug-device Combination Products in China.....
..... WEI B K, WANG J
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.022

- 938 制药企业空调净化系统常见问题分析及建议.....蔡远广, 江映珠, 谢正福, 邝振达
Analysis and Suggestions on Common Problems of Air Conditioning Purification System in
Pharmaceutical Enterprises.....CAI Y G, JIANG Y Z, XIE Z F, KUANG Z D
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.023

- 943 基于 SAS 的四参数回归计算法相对效价置信区间的计算.....黄 卓, 邓罗佳, 张 岳*
Computation of Relative Potency and Confidence Interval of Four-parameter Regression Calculation
Method Based on SAS.....HUANG Z, DENG L J, ZHANG Y*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.024

· 其他 ·

广告索引 (946)



2020 年《中国医药工业杂志》征订信息

《中国医药工业杂志》是由上海医药工业研究院主管，上海医药工业研究院、中国药学会和中国化学制药工业协会主办的全国性医药科技刊物。

《中国医药工业杂志》是我国医药工业领域中办刊历史最长的医药期刊。自 1970 年 11 月创刊以来，《中国医药工业杂志》始终以报道我国医药工业和科研中的成果和经验为宗旨，刊载了大量反映中国医药工业发展水平的论文和论著，积累了丰富的第一手原始资料；同时密切关注国际上制药技术的发展新动向，刊登有指导意义的综述和专论。

《中国医药工业杂志》是全国中文核心期刊，“中国期刊方阵”入选期刊，中国生物医学核心期刊，中国科技核心期刊和中国科学引文数据库来源期刊，国家权威数据库中国知网（CNKI）收录期刊，多次荣获全国优秀科技期刊奖，上海市优秀科技期刊奖，华东地区优秀期刊奖。多年来一直入选“CA 千种表”，并位于全国医药期刊的前列，还被中国生物学文摘，中国药文学文摘，中国化学文摘，*Analytical Abstracts*（分析文摘），*Biological Abstracts*（生物文摘）等中外数据库和文摘所收摘。

读者对象：医药、生物、化工等行业的生产、科研、教学、经营管理人员以及卫生系统的临床药学人员。

主要栏目：专论与综述、研究论文（化学药物与合成技术、微生物药物与生物技术、中药与天然药物、药物制剂、药理与临床、药品分析与质控、药物分离与纯化技术、制药装备与包装、实验技术等）、药学管理与信息、有机合成文摘、生物技术文摘和制剂技术文摘等。

本刊为月刊，每月 10 日出版，定价 20 元，全年 240 元。邮发代号：4-205。

订阅回执单

年 月 日

| | | | | | |
|------|------|------|--|----|--|
| 订阅单位 | | | | | |
| 详细地址 | | | | | |
| 收件人 | | 联系电话 | | 邮编 | |
| 全年订价 | 240元 | 份数 | | 金额 | |

请将此回执寄回或传真至我刊发行部（复印有效）

邮局汇款 地 址：上海市静安区北京西路1320号，邮编：200040

银行汇款 开户银行：上海银行大通支行

单位名称：上海数图健康医药科技有限公司

帐 号：00002086885

编辑部联系：电话 021-62793151，传真 021-62473200，电子邮箱 cjph@pharmadl.com

发行部联系：电话 021-62896800，传真 021-62473200，电子邮箱 fxb@pharmadl.com

广告部联系：电话 021-62896800，传真 021-62473200，电子邮箱 lsj@pharmadl.com

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2020年第51卷 第7期 7月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.51 No.7 July 10, 2020

©All Rights Reserved

| | | | |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------|--|
| 主 管 | 上海医药工业研究院 | Director | Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry |
| 主 办 | 上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会 | Sponsor | Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association |
| 总 编 辑 | 周伟澄 | Managing Editor | ZHOU Weicheng |
| 副 总 编 辑 | 黄志红, 刘玲玲 | Associate Managing Editor | HUANG Zhihong, LIU Lingling |
| 责 任 编 辑 | 刘玲玲 | Executive Editor | LIU Lingling |
| 编 辑 出 版 | 《中国医药工业杂志》编辑部 | Edited by | Editorial Board of Chinese Journal of Pharmaceuticals |
| 编 辑 部 地 址 | 上海市北京西路1320号(200040) | Address for Foreign Subscriber | 1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China |
| 电 话 | 021-62793151 | Tel | 0 086-21-62793151 |
| 传 真 | 021-62473200 | Fax | 0 086-21-62473200 |
| 电 子 邮 箱 | cjph@pharmadl.com | E-mail | cjph@pharmadl.com |
| 网 址 | www.cjph.com.cn www.pharmadl.com | Web Site | http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com |
| 广告发行联系 | | | |
| 电 话 | 021-62126987, 62473200 | Tel | 021-62126987, 62473200 |
| 传 真 | 021-62473200 | Fax | 021-62473200 |
| 电 子 邮 箱 | ouyy@pharmadl.com | E-mail | ouyy@pharmadl.com |
| 印 刷 | 上海欧阳印刷厂有限公司 | Printed by | Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd. |
| 发 行 范 围 | 公开发行 | | |
| 国 内 发 行 | 上海市邮政公司报刊发行局 | Domestic Distributed by | Shanghai Post Company Newspaper Issuance Bureau |
| 国 外 发 行 | 中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044) | Abroad Distributed by | China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China) |
| 国 内 订 阅 | 全国各地邮政局 | | |

* 通信联系人; 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*146*zh*P*20.00* *24*2020-07

版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205

国外邮发代号 M6070



CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



微信号: cjph-cjph



微博: weibo.com/cjph

《中国医药工业杂志》第十六届编辑委员会
EDITORIAL BOARD OF 《CHINESE JOURNAL OF PHARMACEUTICALS》
(以姓名拼音为序)

名誉主编 (HONORARY EDITOR-IN-CHIEF)

桑国卫* (SANG Guowei)

主任编委 (EDITOR-IN-CHIEF)

陈芬儿* (CHEN Fener)

顾问 (CONSULTANT)

白 骅 (BAI Hua)

孔德云 (KONG Deyun)

吴晓明 (WU Xiaoming)

陈凯先* (CHEN Kaixian)

李绍顺 (LI Shaoshun)

杨胜利* (YANG Shengli)

丁 健* (DING Jian)

沈竞康 (SHEN Jingkang)

朱宝泉 (ZHU Baoquan)

侯惠民* (HOU Huimin)

王广基* (WANG Guangji)

副主任编委 (ASSOCIATE EDITOR-IN-CHIEF) (△常务副主任编委)

陈代杰△ (CHEN Daijie)

林剑秋 (LIN Jianqiu)

王军志* (WANG Junzhi)

张 霁 (ZHANG Ji)

周伟澄△ (ZHOU Weicheng)

陈桂良 (CHEN Guiliang)

潘广成 (PAN Guangcheng)

魏树源 (WEI Shuyuan)

张万斌 (ZHANG Wanbin)

朱建伟 (ZHU Jianwei)

胡文浩 (HU Wenhao)

唐 岳 (TANG Yue)

杨 超 (YANG Chao)

张绪穆 (ZHANG Xumu)

李明华 (LI Minghua)

王 浩△ (WANG Hao)

张贵民 (ZHANG Guimin)

周 斌 (ZHOU Bin)

编委 (MEMBER OF THE EDITORIAL BOARD)

蔡正艳 (CAI Zhengyan)

程卯生 (CHENG Maosheng)

范代娣 (FAN Daidi)

甘 勇 (GAN Yong)

何 军 (HE Jun)

胡又佳 (HU Youjia)

李范珠 (LI Fanzhu)

刘玲玲 (LIU Lingling)

龙亚秋 (LONG Yaqiu)

罗国强 (LUO Guoqiang)

潘红娟 (PAN Hongjuan)

沈 琦 (SHEN Qi)

孙小强 (SUN Xiaoqiang)

涂家生 (TU Jiasheng)

王 健 (WANG Jian)

王玉成 (WANG Yucheng)

吴 勇 (WU Yong)

杨苏蓓 (YANG Subei)

张福利 (ZHANG Fuli)

张卫东 (ZHANG Weidong)

赵文杰 (ZHAO Wenjie)

钟为慧 (ZHONG Weihui)

朱建英 (ZHU Jianying)

常 艳 (CHANG Yan)

邓卫平 (DENG Weiping)

方 浩 (FANG Hao)

干荣富 (GAN Rongfu)

何 菱 (HE Ling)

黄则度 (HUANG Zedu)

李建其 (LI Jianqi)

刘新泳 (LIU Xinyong)

卢 懿 (LU Yi)

罗一斌 (LUO Yibin)

潘卫三 (PAN Weisan)

宋秋玲 (SONG Qiuling)

孙 逊 (SUN Xun)

涂 涛 (TU Tao)

王 旻 (WANG Min)

吴传斌 (WU Chuanbin)

吴勇琪 (WU Yongqi)

杨玉社 (YANG Yushe)

张启明 (ZHANG Qiming)

张英俊 (ZHANG Yingjun)

郑高伟 (ZHENG Gaowei)

周虎臣 (ZHOU Huchen)

朱雪焱 (ZHU Xueyan)

陈少欣 (CHEN Shaoxin)

丁锦希 (DING Jinxi)

冯 军 (FENG Jun)

古双喜 (GU Shuangxi)

何严萍 (HE Yanping)

黄志红 (HUANG Zhihong)

李三鸣 (LI Sanming)

刘 忠 (LIU Zhong)

陆伟根 (LU Weigen)

吕 扬 (LÜ Yang)

朴虎日 (PIAO Huri)

苏为科 (SU Weike)

汤 磊 (TANG Lei)

屠永锐 (TU Yongrui)

王全瑞 (WANG Quanrui)

吴 彤 (WU Tong)

杨立荣 (YANG Lirong)

殷 明 (YIN Ming)

张庆伟 (ZHANG Qingwei)

张志荣 (ZHANG Zhirong)

郑起平 (ZHENG Qiping)

周建平 (ZHOU Jianping)

庄春林 (ZHUANG Chunlin)

陈笑艳 (CHEN Xiaoyan)

董 琳 (DONG Lin)

傅 磊 (FU Lei)

郭 文 (GUO Wen)

胡海峰 (HU Haifeng)

金 拓 (JIN Tuo)

刘东飞 (LIU Dongfei)

柳 红 (LIU Hong)

陆伟跃 (LU Weiyue)

马 璟 (MA Jing)

邵 蓉 (SHAO Rong)

孙会敏 (SUN Huimin)

陶 涛 (TAO Tao)

王建新 (WANG Jianxin)

王 彦 (WANG Yan)

吴 伟 (WU Wei)

杨 明 (YANG Ming)

尤启冬 (YOU Qidong)

张庆文 (ZHANG Qingwen)

赵临襄 (ZHAO Linxiang)

钟大放 (ZHONG Dafang)

周一萌 (ZHOU Yimeng)

*院士

《中国医药工业杂志》编辑部成员 (EDITORIAL STAFF)

总编辑 (Managing Editor): 周伟澄 (ZHOU Weicheng)

副总编辑 (Associate Managing Editor): 黄志红 (HUANG Zhihong), 刘玲玲 (LIU Lingling)

责任编辑 (Editor): 刘玲玲 (LIU Lingling) (兼), 王 盈 (WANG Ying), 许文倩 (XU Wenqian), 刘艺楠 (LIU Yinan)

美术编辑 (Art Editor): 沈建成 (SHEN Jiancheng), 陆燕玲 (LU Yanling), 钱苗苗 (QIAN Miaomiao)

编辑助理 (Editorial Assistant): 韦旭华 (WEI Xuhua)

广告、发行负责 (Advertisement Manager): 李朝凤 (LI Chaofeng), 刘敬岩 (LIU Jingyan), 金 雷 (JIN Lei), 欧阳怡 (OUYANG Yi)

承办单位: 上海数图健康医药科技有限公司

协办单位: 鲁南制药集团股份有限公司; 山东罗欣药业集团股份有限公司; 浙江海正集团有限公司

专论 Perspectives

生物转化甾醇制备甾体药物中间体研究进展

吴杰群, 徐顺清, 王 鸿, 苏为科, 储消和*

(浙江工业大学长三角绿色制药协同创新中心, 浙江杭州 310014)

摘要: 甾体激素类药物在制药行业至关重要, 在医疗领域的应用范围不断扩大。甾体药物中间体是生产甾体激素类药物不可缺少的关键原料, 因此其制备工艺的研究一直是甾体药物研究领域的热点之一。本文主要综述了利用生物转化甾醇制备甾体药物中间体的研究进展, 并对该领域存在的问题进行总结和分析, 展望了生物转化甾醇制备甾体药物中间体的未来发展趋势, 为其进一步发展提供借鉴。

关键词: 甾醇; 生物转化; 甾体药物中间体

中图分类号: R915; R97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-8255(2020)07-0801-14

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.07.001

Progress in the Preparation of Steroid Drug Intermediates by Microbial Transformation of Sterols

WU Jiequn, XU Shunqing, WANG Hong, SU Weike, CHU Xiaohe*

(Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

ABSTRACT: Steroidal compounds are very important to pharmaceutical preparations and widely used in the medical field. Steroid drug intermediates are essential for producing these compounds. Therefore, research on the preparation of steroid drug intermediates has been one of the hot spots in the field of steroid drugs. This article mainly reviews the research progress of microbial transformation of sterols to prepare steroidal drug intermediates, summarizes and analyzes the problems with the field of steroidal drug intermediates, and discusses the future development trend.

Key Words: sterol; microbial transformation; steroid drug intermediate



【专家介绍】 苏为科, 教授, 浙江省特级专家, 浙江省有突出贡献的专家, 享受国务院政府特殊津贴。现任长三角绿色制药协同创新中心执行主任, 国家化学原料药合成工程技术研究中心常务副主任, 浙江工业大学药学院院长等职。长期从事化学制药过程有毒有害物质的替代、高效催化、过程强化等技术研发, 以及机械化学在药物合成、动植物有效成分提取、药物制剂过程中的应用研究。主持或负责完成国家“十一五”科技支撑计划、重大国际合作、自然科学基金等国家级项目10余项、省部级项目10余项, 已有20余项重大科技成果实现产业化。发表SCI收录论文140余篇, 授权发明专利70余项。以第一获奖人身份获国家科技发明二等奖1项, 省部级科技成果一等奖5项、中国专利优秀奖1项。Tel: 0571-88320899。E-mail: suweike@zjut.edu.cn。

甾体激素类药物对人类身体机能起着重要的调节作用,在医疗领域应用范围不断扩大,已经广泛用于消炎、避孕,以及治疗心血管疾病、肿瘤、人体器官移植排异、内分泌失调和老年性疾病等^[1],是临床上非常重要的治疗药物。

甾体类化合物是一类包含特殊结构甾烷核的萜类脂质,其甾烷核由4个烷环组成(图1),是制备甾体激素类药物的重要原料。甾体类化合物在自然界中广泛存在,文献报道的已有250多种。这些甾体类化合物广泛存在于植物(如植物甾醇、薯蓣皂苷和油菜素甾醇)、动物(如胆固醇、皮质类激素、糖皮质激素、盐皮质激素、性激素、雄激素、雌激素、胆汁酸、维生素D和神经甾体,以及昆虫中的蜕皮甾体)、酵母和真菌(如麦角固醇和麦角甾醇)中^[2-3]。

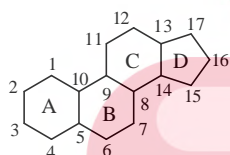


图1 甾体类化合物的甾烷核结构

Fig.1 Sterol Nucleus Structure of Steroids

甾体类化合物虽然在自然界中广泛存在,但对于巨大的医疗市场需求,其产量还是相对不足的。当前甾体类化合物主要来源于各种甾体中间体,它们是一些包含甾烷核的分子(图2),主要有4-雄烯-3,17-二酮(AD)、1,4-雄二烯-3,17-二酮(ADD)、9-羟基-4-雄烯-3,17-二酮(9-OH-AD)、22-羟基-23,24-二降胆-4-烯-3-酮(4-HBC)、22-羟基-23,24-二降胆-1,4-二烯-3-酮(1,4-HBC)和9,22-二羟基-23,24-二降胆-4-烯-3-酮(9-OH-4-HBC)等。

通过对甾体中间体进行化学合成或者生物催化修饰制备各种甾体药物原料如睾酮(TS)、宝丹酮(BD)、可的松、泼尼松和地塞米松等(图3),这些甾体药物原料可进一步生产成为甾体激素类药物并应用于临床医疗。

在生物催化技术制备甾体中间体技术开发之前,传统生产工艺制备甾体中间体的主要方法是从薯蓣属植物中提取薯蓣皂苷等类固醇中间体原料,然后经多步化学合成制成甾体中间体。也有研究者直接从动、植物组织液中提取甾体中间体或者由非甾体化合物经过多步化学法直接合成,这些制备甾体中间体的生产工艺比较复杂,产率低,能耗高,对环境污染严重,不能满足甾体中间体工业可持续发展的要求^[1]。

随着甾体激素类药物需求日益激增,传统植物来源薯蓣皂苷资源逐渐枯竭,研究者不断寻求其他甾体化合物的生产制备途径。利用可以降解甾醇的微生物生物催化制备甾醇类化合物是生产制备甾体中间体和甾体药物的有效途径。当前油脂工业副产物中蕴藏着极为丰富的植物甾醇资源,这些副产物常常被当作废弃物处理,这无疑是对自然资源的极大浪费。利用微生物转化技术将这些廉价的甾醇资源转化成有价值的甾体药物中间体(图4),这将会大大促进甾体药物工业的发展。

1 生物转化甾醇制备甾体中间体的优势

利用微生物对含有甾烷母核的甾醇化合物如植物甾醇分子(主要有胆固醇、谷甾醇、豆甾醇和麦角甾醇)的特定部位进行分子修饰,这些分子修饰常常具有立体选择性,并且可以在一个催化反应中同时完成几步分子修饰,最终形成各种甾体中间体。这些分子修饰通过化学合成几乎很难完成,但是在生物催化过程中可以较容易地实现。与化学合成方法制备甾体中间体相比,生物催化与转化的制备条件比较温和,不存在容易造成甾体分子降解的条件(高温或者极端pH值),底物转化率高;同时分离提取工艺简单,产生的污染物较少,对环境更加友好,满足可持续性发展的需求。

收稿日期: 2019-07-08

作者简介: 吴杰群(1981—), 男, 博士, 从事工业微生物菌种的代谢工程改造研究。

Tel: 0571-88320940

E-mail: Jiequnwu@zjut.edu.cn

通信联系人: 储消和(1968—), 男, 教授, 从事甾体激素药物研究。

Tel: 0572-8012230

E-mail: chuxhe@zjut.edu.cn

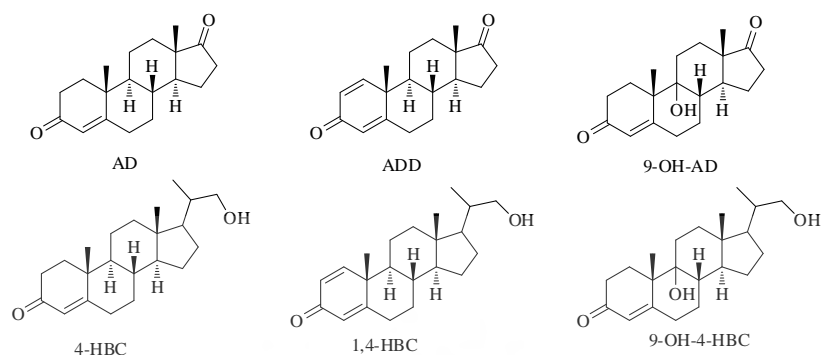


图2 主要的甾体中间体
Fig.2 Main Steroid Intermediates

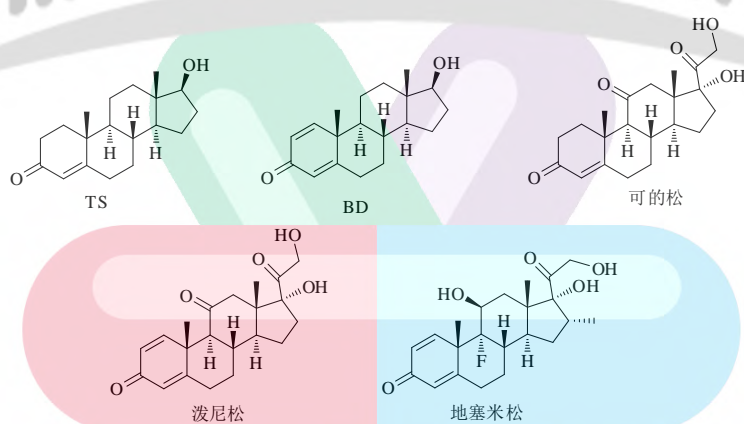


图3 甾体药物原料
Fig.3 Steroid Drug Raw Materials

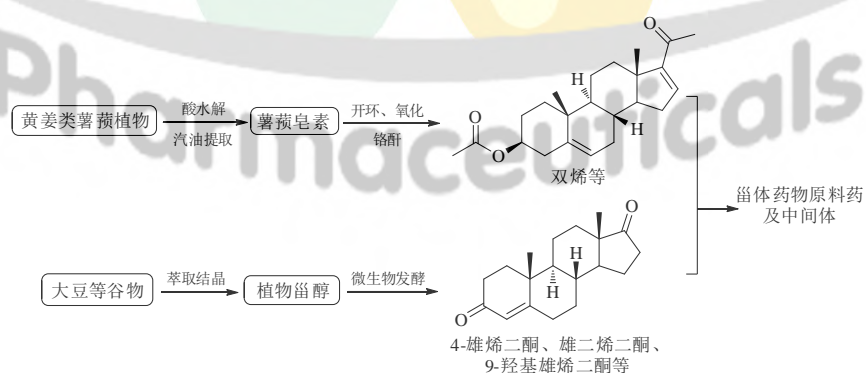


图4 甾体中间体获取的主要路线
Fig.4 Main Routes of Obtaining Steroid Intermediates

2 生物转化甾醇制备甾体中间体的催化机制

研究发现有些微生物可降解甾醇类物质并将其作为碳源, 首先甾醇的侧链被微生物降解, 然后经过多步催化反应降解为 CO_2 和 H_2O 。微生物选择性降解甾醇侧链涉及多种酶参与的连续催化反应, 整个催化过程复杂。

微生物对甾醇的降解利用主要涉及甾醇的摄取、C17 位的脂肪族侧链氧化切割和 C4 位氧化、C1 位脱氢和 C9 位羟基化、甾核的氧化和降解^[4]。具体过程如图 5 所示: (1) 疏水性甾醇分子与细胞表面直接接触, 通过细胞表面的多个转运系统逐渐被吸收进入细胞, 进一步参与细胞代谢途径。(2) 在微生物体内多种酶的共同参与下, C17 位的脂肪族侧链经 7 步 β -氧化反应被氧化切割而缩短, 最终氧化为酮基。在此过程中 C3 位的羟基在氧化酶的作用下氧化为酮基, C4 位在脱氢酶的作用下形成一个烯键, 进而形成甾体中间体 AD。若在此过程中 C17 位的侧链被不完全氧化切割则形成异丙基, 异丙基进一步被羟化酶羟基化, 则最终形成甾体中间体 4-HBC。(3) 在 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的作用下, AD 的 C1-C2 位脱氢形成烯键得到 ADD, ADD 进一步在 3-甾酮-9 α -羟化酶的作用下 C9 位被羟基化形成 9-羟基-1,4-雄二烯-3,17-二酮 (9-OH-ADD)。AD 也可以在 3-甾酮-9 α -羟化酶的作用下, C9 位被羟基化形成 9-OH-AD, 9-OH-AD 在 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的作用下 C1-C2 位脱氢形成烯键得到 9-OH-ADD。4-HBC 在 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的作用下, C1-C2 位脱氢形成烯键得到 1,4-HBC, 1,4-HBC 在 3-甾酮-9 α -羟化酶的作用下 C9 位被羟基化形成 9,22-二羟基-23,24-二降胆-1,4-二烯-3-酮 (9-OH-1,4-HBC); 4-HBC 也可以在 3-甾酮-9 α -羟化酶的作用下, C9 位被羟基化形成 9-OH-4-HBC, 再在 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的作用下 9-OH-4-HBC 的 C1-C2 位脱氢形成烯键得到 9-OH-1,4-HBC。(4) 9-OH-ADD 和 9-OH-1,4-HBC 在 C1 和 C4 位有 2 个烯键, 同时 C9 位有羟基, 在此结构下甾核的 A 环和 B 环会发生自发开环, 通过 3 步催化反应逐步降解为 CO_2 和 H_2O 。因此, 在微生物对甾醇的降解过程中一般不

会有 9-OH-ADD 和 9-OH-1,4-HBC 等甾体中间体的积累^[5-6]。

3 生物转化甾醇制备甾体中间体的研究现状

利用微生物转化植物甾醇制备甾体中间体主要经历 2 个发展阶段。第一阶段是传统微生物转化植物甾醇制备甾体中间体, 首先从自然界中筛选可以降解植物甾醇产生甾体中间体的微生物, 然后对微生物的发酵转化工艺不断优化, 从而不断提高微生物催化法制备甾体中间体的生产水平, 其进展主要包括甾醇原料的挖掘和微生物菌种筛选与诱变两方面。第二阶段是采用分子生物学技术构建工程菌生物转化植物甾醇制备甾体中间体。随着微生物对甾醇降解代谢途径中各个基因功能的不断解析, 研究者已初步绘制了完整的甾醇代谢图谱。在此基础上通过对代谢途径过程中的关键基因进行强化表达或对旁路副产物途径的酶基因进行弱化或者敲除, 提高底物转化率和产品纯度, 简化提取工艺, 从而降低生产成本。

3.1 甾醇原料挖掘

利用具有甾烷核结构的廉价化合物作为甾醇底物原料生产甾体中间体是目前常用的方法。但是随着植物来源的薯蓣皂苷原料的日益枯竭, 人们开始不断开拓新的植物甾醇资源。植物甾醇主要来源于油脂的生产废渣及其他工业废弃物, 如豆油、油菜籽、制糖废渣及造纸废水等, 甾体微生物利用这些废弃物中的甾醇底物可以生产制备甾体中间体。表 1 对新发现的甾体中间体生产制备的原料进行了总结。Perez 等在甘蔗泥中发酵培养分枝杆菌, 该微生物的转化液中能检测到甾体中间体 AD 和 ADD, 表明分枝杆菌可将甘蔗泥中的植物甾醇转化为甾体中间体, 为甾体中间体的生产制备开辟了新的原料途径^[7]。Aurasorn 等用水稻胚芽和小麦胚芽乙醇提取物作为植物甾醇原料生物转化制备 AD 和 ADD, 产量分别达到 (180 ± 27) 和 $(31 \pm 11.4) \text{ mg/L}$, 底物转化率 65%^[8]。Pattana 等对微生物转化法制备 AD 和 ADD 的植物甾醇来源进行了筛选, 筛选出几种含植物甾醇的植物油作为生产基质。结果表明, 使用菜籽油时 AD 和 ADD 产量最高, 椰子油和棕榈

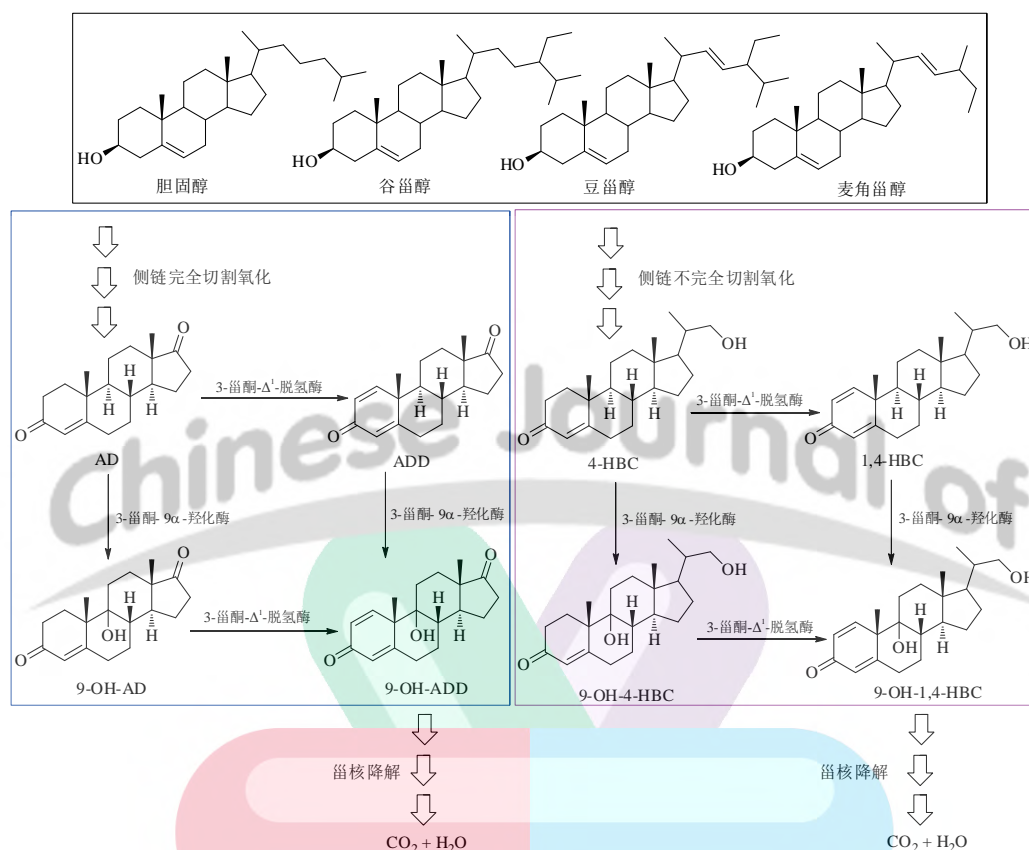


图5 微生物对甾醇的降解代谢过程

Fig.5 Degradation and Metabolism of Sterols by Microorganisms

油产量较低,可能是油中植物甾醇种类和结构影响着底物转化效率,该研究为植物甾醇的来源提供了新的途径^[9]。

表1 新发现的甾醇原料

Tab.1 Newly Discovered Sterol Raw Materials

| 微生物 | 甾醇底物 | 产物 | 参考文献 |
|------|----------------|--------|------|
| 分枝杆菌 | 甘蔗泥 | AD、ADD | [7] |
| 分枝杆菌 | 水稻胚芽和小麦胚芽乙醇提取物 | AD、ADD | [8] |
| 分枝杆菌 | 菜籽油、椰子油、棕榈油 | AD、ADD | [9] |

3.2 菌种筛选和诱变

微生物菌种的筛选对于工业微生物的发展起着至关重要的作用。多年来研究人员已经从环境中筛选出了很多能产生甾体中间体的微生物,并且对微生物的甾醇转化能力进行研究(表2)。Pattana等研究了从土壤中筛选到的13株微生物转化植物甾醇的能力,发现2株分枝杆菌可以将谷甾醇转化为

AD和ADD,总转化率81.83%^[10]。Lin等从玉米粉和大豆粉中分离到1株串珠镰刀菌,可将植物甾醇转化为AD、ADD^[11]。Alok等从64株真菌中筛选到1株能够将谷甾醇生物转化为AD的微生物,该菌株具有出色的转化能力^[12]。Preeti等从土壤中分离出1株诺卡菌,该菌能够选择性地切割胆甾醇的侧链产生ADD,底物转化率可达到90%^[13]。Priti等筛选到1株金黄杆菌,可实现胆固醇向ADD的生物转化^[14]。Liu等筛选到1株戈登菌,可将胆固醇转化为以ADD为主的5种代谢产物,转化率达到87.2%^[15]。

诱变育种是菌种改良的重要途径。微生物在选择性氧化降解甾醇侧链的过程中,胞内3-甾酮-9α-羟化酶和3-甾酮-Δ¹-脱氢酶同时存在会导致甾体母核自发开环,从而使底物转化率降低。如果通过化学或者物理诱变过程得到能降解甾醇侧链而

表2 微生物菌种筛选研究进展

Tab.2 Advances in Screening of Microbial Strains

| 筛选来源 | 微生物 | 底物 | 产物 | 参考文献 |
|---------|------|------|--------|------|
| 土壤 | 分枝杆菌 | 谷甾醇 | AD、ADD | [10] |
| 玉米粉、大豆粉 | 真菌 | 植物甾醇 | AD、ADD | [11] |
| - | 真菌 | 谷甾醇 | AD | [12] |
| 土壤 | 诺卡氏菌 | 胆固醇 | ADD | [13] |
| - | 金黄杆菌 | 胆固醇 | ADD | [14] |
| - | 放线菌 | 胆固醇 | AD、ADD | [15] |

不降解甾体母核结构的突变菌种,底物转化率会得到极大提高。对于甾体微生物的诱变育种,已有研究者进行了许多工作,见表3。付磊等对分枝杆菌 HCCB004 进行紫外-激光复合诱变,筛选到1株可以将植物甾醇转化为4-HBC的突变菌株,而出发菌株不产生4-HBC^[16]。Liu等对1株能够转化植物甾醇的分枝杆菌进行大气室温等离子体诱变(ARTP)处理后,筛选到1株代号ZADF-4的新金色分枝杆菌突变体,该菌株的AD和ADD产量达到(6.28±0.11)和(0.82±0.05)g/L,转化率从48.3%提高到60.3%^[17]。Donova等将分枝杆菌进行化学诱变和紫外诱变,筛选到1株可以产生以9-OH-AD作为主要转化产物的突变株,摩尔转化率50%,该菌株不能降解9-OH-AD,但能降解ADD^[18]。

表3 微生物菌种诱变研究进展

Tab.3 Advances in Mutagenesis of Microbial Strains

| 微生物 | 诱变方法 | 底物 | 产物 | 参考文献 |
|------|-----------|------|------------|------|
| 分枝杆菌 | 紫外-激光复合诱变 | 植物甾醇 | 4-HBC | [16] |
| 分枝杆菌 | ARTP | 植物甾醇 | AD、ADD | [17] |
| 分枝杆菌 | 化学诱变和紫外诱变 | 谷甾醇 | AD、9-OH-AD | [18] |

3.3 甾体微生物的基因工程改造

采用传统微生物转化法生产甾体中间体,底物转化率低、产品纯度不高、提取分离困难、产品质量不可控,因此生产成本比较高。为了解决上述问题,当前甾体生物转化技术的开发逐步从传统微生物诱变转向代谢工程定向改造,相关研究进展如表4所示。

3.3.1 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因工程改造

研究表明,通过基因工程技术在微生物中过量表达3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因*kadD*,可增强3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶KSDD的表达,使甾核的C1-C2位形成烯键产生新的甾体中间体如ADD、1,4-HBC和BD等,进而开发出新的甾体药物原料。若将3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因*kadD*敲除,甾体中间体将不能进一步形成C1-C2位脱氢的双烯甾体中间体,从而避免甾核被进一步自发开环降解为CO₂和H₂O,提

表4 甾体基因工程菌研究进展

Tab.4 Advances in Steroid Genetically Engineered Bacteria

| 底物 | 微生物 | 基因改造途径 | 产物 | 参考文献 |
|------|----------|---|---------------------------------------|------|
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶突变和表达 | ADD、AD | [19] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 失活或强化3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶表达 | AD、ADD | [20] |
| AD | 节杆菌、毕赤酵母 | 节杆菌表达3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶,毕赤酵母表达17 β -羟甾体脱氢酶 | BD | [21] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 强化3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶表达 | ADD | [22] |
| AD | 芽孢杆菌 | 在芽孢杆菌中异源表达分枝杆菌3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 | ADD | [23] |
| AD | 大肠埃希菌 | 在大肠埃希菌中异源表达分枝杆菌3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 | ADD | [24] |
| AD | 芽孢杆菌 | 在芽孢杆菌中异源表达节杆菌3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 | ADD | [25] |
| AD | 大肠埃希菌 | 在大肠埃希菌中异源表达放线菌3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 | ADD | [26] |
| AD | 棒杆菌 | 在棒杆菌中异源表达分枝杆菌3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 | ADD | [27] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 加强表达分枝杆菌3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 | ADD | [28] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 敲除3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因 <i>kstD</i> ,强化3-甾酮-9 α -羟化酶基因 <i>ksh</i> 表达 | AD、9-OH-AD | [29] |
| AD | 芽孢杆菌 | 在芽孢杆菌中异源表达3-甾酮-9 α -羟化酶和葡萄糖脱氢酶 | 9-OH-AD | [30] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 甾体代谢工程改造 | 4-HBC | [31] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 甾体代谢工程改造 | AD、ADD、9-OH-AD、4-HBC、1,4-HBC、9-OH-HBC | [32] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 细胞甾醇转运系统改造 | 9-OH-AD | [33] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | σ 因子基因 <i>sigD</i> 敲除,强化甾体代谢关键基因 <i>choM2</i> 表达 | 9-OH-AD | [34] |

高甾体中间体的产量。

Shao 等对新金分枝杆菌突变体进行测序分析,发现该菌的 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因出现了 Val366 到 Ser366 的氨基酸突变,突变菌可以大幅度提高甾醇转化过程中 ADD/AD 的产生比率,将 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因在分枝杆菌中加强表达后,ADD 的纯度得到提高^[19]。Wei 等对分枝杆菌中 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因进行敲除后,几乎没有 ADD 生成;加强 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因的表达后,AD/ADD 比率从 1 : 2.4 提高到 1 : 51.5,ADD 纯度得到大幅度提高,表明 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶是控制 AD/ADD 比率的关键因素^[20]。Tang 等利用节杆菌中 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶和重组毕赤酵母 GS115 中表达的 17 β -羟甾体脱氢酶组合转化 AD 制备 BD,通过优化 AD 向 BD 转化的条件,5.0 g/L AD 转化获得了 4.2 g/L BD,产率 83%,该研究为生物转化制备 BD 提供了一种有效的方法,也可用于生产其他难以直接获得的甾体化合物^[21]。Wei 等采用基因工程技术对分枝杆菌中的 2 个 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶同工酶基因 *kstDM* 和 *kstDA* 进行加强表达,促使 AD 转化为 ADD,使得甾醇过程中的 ADD 纯度得到提高,ADD 摩尔产率达到 98.60%^[22]。Zhang 等将分枝杆菌中参与类固醇代谢的 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因 *ksdD* 在芽孢杆菌中异源表达,该工程菌株可以催化 AD 转化为 ADD,重组枯草杆菌催化 AD 的转化率达到 65.7%,比对照组高 18 倍左右,同时极大地缩短了转化时间^[23]。

Shao 等在大肠埃希菌中异源表达分枝杆菌 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因 *ksdD*,实现了 AD 向 ADD 的生物转化,ADD 产量可达 5.7 g/L^[24]。Li 等在芽孢杆菌中异源表达节杆菌 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因 *ksdD*,重组菌酶活性与节杆菌相比提高了 30 倍左右,并且枯草杆菌重组 ADD 的转化水平提高了 10 倍左右^[25]。Wang 等在大肠埃希菌中异源表达放线菌 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因 *ksdD*,实现了 AD 向 ADD 的生物转化,在优化的转化条件下,ADD 转化率达 96%^[26]。Zhang 等在棒杆菌中异源表达分枝杆菌 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因 *ksdD*,重组菌的酶表达水平高

于原始菌的 1.6 倍,实现了 AD 向 ADD 的生物转化,ADD 转化率约 83.87%,而原始菌仅为 3.56%^[27]。张乐乐等在分枝杆菌 *Mycobacterium neoaurum* JC-12 中加强表达甾醇降解过程中的关键酶 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 *KSDD* 以提高 ADD 的产量,ADD 产量从 4.86 g/L 提高到 5.94 g/L,5 L 发酵罐培养 ADD 产量达到 10.28 g/L^[28]。Yao 等从新金分枝杆菌 ATCC 25795 中鉴定出 3 种 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶同工酶,3 种酶都被敲除后微生物转化甾醇产生 9-OH-AD 的产量提高到 6.02 g/L,可能是 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶敲除后 9-OH-AD 不能进一步形成 9-OH-ADD,从而避免甾核被进一步降解为 CO₂ 和 H₂O,提高了 9-OH-AD 的产量^[29]。

3.3.2 3-甾酮-9 α -羟化酶基因工程改造

研究表明通过基因工程技术在微生物中过量表达 3-甾酮-9 α -羟化酶基因 *ksh*,可以增强 3-甾酮-9 α -羟化酶 *KSH* 表达,在甾核的 C9 位形成羟基,从而形成新的甾体中间体如 9-OH-AD、9-OH-HBC 和 9-OH-1,4-HBC,进而开发出新的甾体药物原料。

Yao 等在新金分枝杆菌 ATCC 25795 加强 3-甾酮-9 α -羟化酶基因 *ksh* 表达后,9-OH-AD 的产量提高到 7.33 g/L^[29]。Zhang 等成功克隆了新金杆菌 JC-12 中的 3-甾酮-9 α -羟化酶基因 *ksh*,并在枯草芽孢杆菌加强表达,以重组枯草芽孢杆菌细胞进行细胞静息转化,该菌可将 AD 转化为 9-OH-AD,同时在该菌中共表达葡萄糖脱氢酶 *GDH*,构建了辅酶 I 再生系统,可以将 AD 羟基化过程中产生的氧化型辅酶 I (NAD⁺) 还原成还原型辅酶 I (NADH),再次被羟基化过程循环利用,有效地催化了 AD 生物转化为 9-OH-AD 的过程,转化率为 90.4%,生产率为 0.45 g·L⁻¹·h⁻¹^[30]。

3.3.3 构建代谢工程甾体微生物

微生物体内的甾醇代谢途径需要多步酶催化反应以及多个基因的协同作用,因此对单个基因进行基因工程改造很难得到性质优良的基因工程菌株。利用代谢工程技术构建不同的基因工程菌,通过对不同的生物催化反应过程进行组合,构建出有特定催化功能的基因工程菌来进行生物催化,制备出不

同结构和功能的甾体中间体。越来越多的研究者根据甾醇代谢途径对多个相关基因进行改造, 加强主链代谢途径基因的表达, 弱化或者敲除侧链代谢基因的表达, 使得代谢途径向合成目标甾体中间体的方向进行, 以提高底物转化率以及单一甾体中间体的纯度、提升甾体中间体的生产制备水平。

Xiong 等采用修饰分枝杆菌中甾醇分解代谢途径的策略生产甾体药物中间体 4-HBC; 对甾醇代谢途径中关键基因进行基因工程改造, 强化表达海藻糖跨膜转运蛋白基因 *mmpL3*, 增加细胞膜通透性, 提高细胞对甾醇分子的摄取速度; 强化代谢关键基因 *choM1*、*choM2*、*cyp125* 和 *fadA5* 的表达, 提高细胞内甾醇代谢效率, 以提升细胞的 4-HBC 生产能力, 最终 4-HBC 产量达到 7.59 g/L, 产量提高 20.3%^[31]。Xu 等对甾醇代谢途径中具有 17 β - 羟类固醇脱氢酶和 β - 羟基酰辅酶 A 脱氢酶双功能酶的编码基因 *hsd4a* 进行工程改造, 工程菌株的 3 种 4-HBC 类似物产率可达到 0.127、0.109 和 0.074 g \cdot L⁻¹ \cdot h⁻¹, 同时证实 *hsd4a* 在甾醇分解代谢中发挥双重功能, 缺失 *hsd4a* 导致 4-HBC 及其类似物的产生, 说明 *hsd4a* 在甾醇侧链降解中起着关键作用^[32]。He 等对分枝杆菌的甾醇转运系统进行基因工程改造, 将结核分枝杆菌中的甾醇转运系统在新金分枝杆菌中重建, 共表达能量代谢关键基因 *mceG* 和 2 个膜蛋白基因 *yrbE4A*、*yrbE4B*, 重组菌的 9-OH-AD 产量达到 5.7 g/L, 提高了 20%^[33]。Xiong 等研究表明, σ 因子会对微生物降解甾醇为 9-OH-AD 的转化产生负调控, 缺失 σ 因子基因 *sigD* 后 9-OH-AD 的产量提高 18.9%, 在此基础上加强甾醇代谢关键基因 *choM2* 的表达, 重组菌的 9-OH-AD 产量从 8.37 g/L 提高到 10.27 g/L, 提高了 22.5%^[34]。

3.4 产生新的甾体中间体

微生物除了能降解甾醇产生甾体中间体外, 生物体内一些特殊的酶类还能使甾体中间体发生羟化反应、脱氢反应、羰基化反应和氢化反应等, 可对甾体中间体分子进一步修饰产生新的甾体中间体, 从而开发出新的甾体药物原料。相关研究进展见表 5。Xiong 等利用白僵菌对 AD 进行生物转化, 发现

白僵菌可以对 AD 进行不同位点的羟基化修饰, 产生 TS 等甾体中间体, 为生物法制备 AD 衍生化甾体中间体提供了新的途径^[35]。Manosroi 等利用芽孢杆菌和节杆菌实现了黄体酮向 ADD 的生物催化, 利用羟丙基- β - 环糊精复合体转化工艺, ADD 产量达到 2.82 g/L, 转化率 98.44%, 产量提高 35 倍^[36]。Hosseinabadi 等应用 1 株曲霉转化 ADD, 生成了 3 个新的甾体中间体 BD、11 α - 羟基-1,4- 雄二烯-3,17- 二酮 (11 α -OH-ADD) 和 12 β - 羟基-1,4- 雄二烯-3,17- 二酮 (12 β -OH-ADD), 该研究为以甾体中间体为底物制备新的甾体中间体提供了借鉴^[37]。

表 5 新的甾体中间体研究进展

Tab.5 Advances in New Steroid Intermediates

| 微生物 | 底物 | 催化反应 | 产物 | 参考文献 |
|----------|-----|-----------|-----|------|
| 白僵菌 | AD | 羟基化 | TS等 | [35] |
| 芽孢杆菌、节杆菌 | 黄体酮 | 侧链切割、脱氢反应 | ADD | [36] |
| 曲霉 | ADD | 羟基化 | BD等 | [37] |

3.5 甾体中间体转化条件研究

微生物选择性降解植物甾醇侧链和对不同部位的酶催化修饰是在细胞内多种酶的共同作用下进行的。要实现酶对甾醇分子的催化修饰, 细胞内的酶类就必须与甾醇分子直接接触。但是甾醇底物一般具有较强的疏水性, 在水中的溶解度非常低, 几乎不溶于水, 再加上甾体酶类属于胞内酶, 甾醇底物只有扩散进入细胞与酶接触才能进行催化反应。微生物细胞壁和细胞膜的存在影响底物与酶的有效接触, 造成转化率偏低、发酵时间延长。因此, 如何提高甾醇底物的溶解性, 加速底物和产物分子的传递, 构建合理、有效的生物转化体系是提高甾体转化反应效率的关键因素^[38]。近年来, 国内外的科研人员对甾体中间体转化条件进行了系统研究 (表 6), 具体如下。

3.5.1 发酵乳化体系研究

为了解决发酵转化过程中甾醇底物的低溶解性问题, 研究人员对发酵乳化体系进行了大量的研究, 主要是使用表面活性剂和促溶剂增加底物溶解性, 从而加速甾醇底物的转化。

表面活性剂和促溶剂可以增加底物的溶解性。

表 6 甾体中间体转化条件的研究进展

Tab.6 Advances in Research on Steroid Intermediate Transformation Conditions

| 底物 | 微生物 | 转化条件优化 | 产物 | 参考文献 |
|------|--------------|-----------|------------------------------|------|
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 表面活性剂增溶 | AD | [39] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 乳化体系优化 | AD | [40] |
| 胆固醇 | 分枝杆菌 | 表面活性剂增溶 | AD、ADD | [41] |
| 谷甾醇 | 分枝杆菌 | 细胞通透性优化 | AD | [42] |
| 谷甾醇 | 分枝杆菌 | 培养基碳源优化 | AD、ADD | [43] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 培养温度优化 | AD、ADD、 4-HBC、 1,4-HBC | [44] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 发酵参数响应面优化 | AD | [45] |
| AD | 类诺卡菌 | 发酵参数优化 | ADD | [46] |
| 植物甾醇 | 分枝杆菌 | 发酵策略优化 | ADD | [47] |
| 胆固醇 | 节杆菌、 分枝杆菌 | 发酵策略优化 | ADD | [48] |
| 胆固醇 | 分枝杆菌 | 固定化细胞转化 | ADD | [49] |

表面活性剂在水中形成“胶束”，难溶性底物根据自身的化学性质，以不同方式与胶束相互作用，底物分子分散在胶束中，从而使溶解度增大。将表面活性剂与甾体底物混合制成乳液，可在一定程度上提高底物的有效溶解度。环糊精是一种环状寡聚糖，易溶于水，其疏水性空腔能够通过范德华力及氢键作用与疏水性分子结合，其作为促溶剂能与甾体化合物形成镶嵌复合物，增大其溶解度，加速底物向细胞内转移，从而加速微生物转化反应。Rodrigo 等对植物甾醇转化的无溶剂转化体系进行了优化研究，研究表明在无溶剂植物甾醇微分散体中，添加表面活性剂 DK-Ester P160，可以有效提高植物甾醇的转化效率，该转化体系是一种高效、环保的甾醇转化技术^[39]。Malaviya 等对微生物发酵甾醇过程中的乳化体系进行优化，研究了油、表面活性剂和水相的比例对甾醇转化的影响，形成的微乳液增溶了疏水甾醇底物的溶解度，同时使得细胞壁的结构变弱、细胞的通透性加强，从而提高细胞对甾醇分子的摄取速度，加速转化过程^[40]。卵磷脂可改变细胞膜脂质成分的结构，增加膜的通透性，从而提高了甾醇侧链转化的速率。Wang 等研究了分枝杆菌转化胆固醇过程中卵磷脂对发酵转化速率的影响，卵磷脂有助于溶解胆固醇，产生稳定的卵磷脂胆固醇悬浮液，可用于增强生物转化的速率和底物转化率，

而且卵磷脂对微生物生长无影响^[41]。

3.5.2 改变细胞壁（膜）的通透性

微生物对甾醇的降解是一个缓慢的过程，其原因不仅在于底物和产物的溶解度很低，还在于它们进出微生物细胞的速度很慢。因为甾体转化酶属于胞内酶，甾体分子必须穿过细胞壁和细胞膜与酶反应，所以细胞壁和细胞膜的通透性对甾体转化成功与否非常重要。一些表面活性剂及细胞膜生物合成抑制剂等可以改变细胞壁和细胞膜的完整性和通透性，从而能影响疏水性及亲水性物质在细胞内外的渗透运输，进一步影响微生物对甾醇降解代谢的速率。

Malaviya 等对细胞内甾醇的转运效率影响因素进行了研究，考察了在乙胺丁醇、青霉素、多黏菌素和杆菌肽存在下细胞壁通透性的变化对谷甾醇生物转化为 AD 的影响。结果表明杆菌肽可以增加细胞壁对疏水性甾醇的渗透性，增加细胞内甾醇的转运，从而提高 AD 的产量。杆菌肽可以作为有效增强细胞壁渗透性的添加物，加速微生物对甾醇的转化^[42]。不同的碳源也能影响微生物细胞壁的组成，研究发现甘油能提高分枝杆菌细胞壁的疏水性，使用甘油为碳源时，细胞壁比以葡萄糖和果糖为碳源的薄 40%。Yin 等对分枝杆菌转化甾醇制备甾体中间体的发酵培养基碳源进行了优化，发现葡萄糖有利于菌体的生长，但不利于甾体的转化，丙醇和异丙醇作为唯一碳源有利于甾体的转化^[43]。

3.5.3 甾体发酵转化参数和转化策略优化

当前许多研究者对甾体微生物的发酵转化参数和策略进行了研究，通过优化发酵转化条件来提高甾体中间体生产制备的水平。Xu 等研究了微生物转化植物甾醇过程中温度对甾核降解的影响。结果表明培养温度从 30 ℃ 提高到 37 ℃，甾核降解率从 39.9% 降至 17.6%，推测可能是 3-甾酮-9 α -羟化酶的活性受到抑制，减少了 9-OH-ADD 和 9-OH-1,4-HBC 的生成，避免了甾体进一步降解为二氧化碳和水，这些研究为减少植物甾醇的降解提供了一种简便方法^[44]。Zhang 等对 1 株新金分枝杆菌降解植物甾醇生物转化制备 AD 进行了研究。对生物

转化过程的发酵参数进行了响应面优化, AD 的最大产量可达到 5.96 g/L, 最大转化率为 94.69%, 增加了 10.66%^[45]。Luthra 等在优化缓冲剂成分、诱导剂、底物、温度、pH 值、细胞量和环糊精类型等转化条件的基础上, 应用类诺卡菌实现了从 AD 向 ADD 的转化, ADD 产量得到提高^[46]。Shao 等对分枝杆菌发酵转化植物甾醇制备 ADD 的发酵工艺进行优化, 采用三阶段发酵策略, 以果糖为初始碳源, 以葡萄糖为原料进行补料两段发酵以维持菌株的代谢, 后期补加植物甾醇发酵转化制备 ADD, 产量达到 18.6 g/L, 发酵周期从 168 h 缩短到 120 h^[47]。Rong 等通过有机硅空心球 (OSHS) 提高了 β -谷甾醇的溶解分散性, 实现其向 11α -OH-ADD 的生物转化, 转化率提高至 87.11%, 产物的产量提高了 1.5 倍^[48]。

3.5.4 固定化细胞转化技术制备甾体中间体

由于甾醇底物在水中的溶解度低, 目前多采用有机溶剂或表面活性剂等溶媒来增加底物溶解度, 但这些溶媒会对微生物产生毒害作用, 而采用

细胞固定化技术可以减少溶媒的毒性。同时细胞固定化技术可以实现甾体中间体的半连续化生产, 利于产物的分离以及细胞的重复使用。Lee 等将有甾醇转化能力的分枝杆菌细胞进行固定化, 利用固定化细胞转化技术实现了胆固醇向 ADD 的生物转化, ADD 的转化率达到 77%, 固定化细胞的半衰期长达 45 d, 细胞利用率得到提高, 而且产物分离提取容易^[49]。

4 生物转化甾醇制备甾体中间体面临的挑战

当前生物转化甾醇制备甾体中间体面临许多机遇和挑战 (图 6), 主要是利用合成生物学和系统生物学途径对甾体中间体制备的技术路线进行优化设计, 从而实现甾体中间体制备技术的长久发展。

4.1 甾体转化工艺急需优化

由于甾醇底物的高度疏水性, 甾醇底物很难进入微生物细胞被生物催化。目前, 生物转化甾醇的发酵工艺还处于两步 (生长和转化) 两相 (水相和溶媒相) 发酵阶段, 发酵工艺比较复杂, 整体生产水平较低。行业内急需对甾体生物发酵的转化工艺

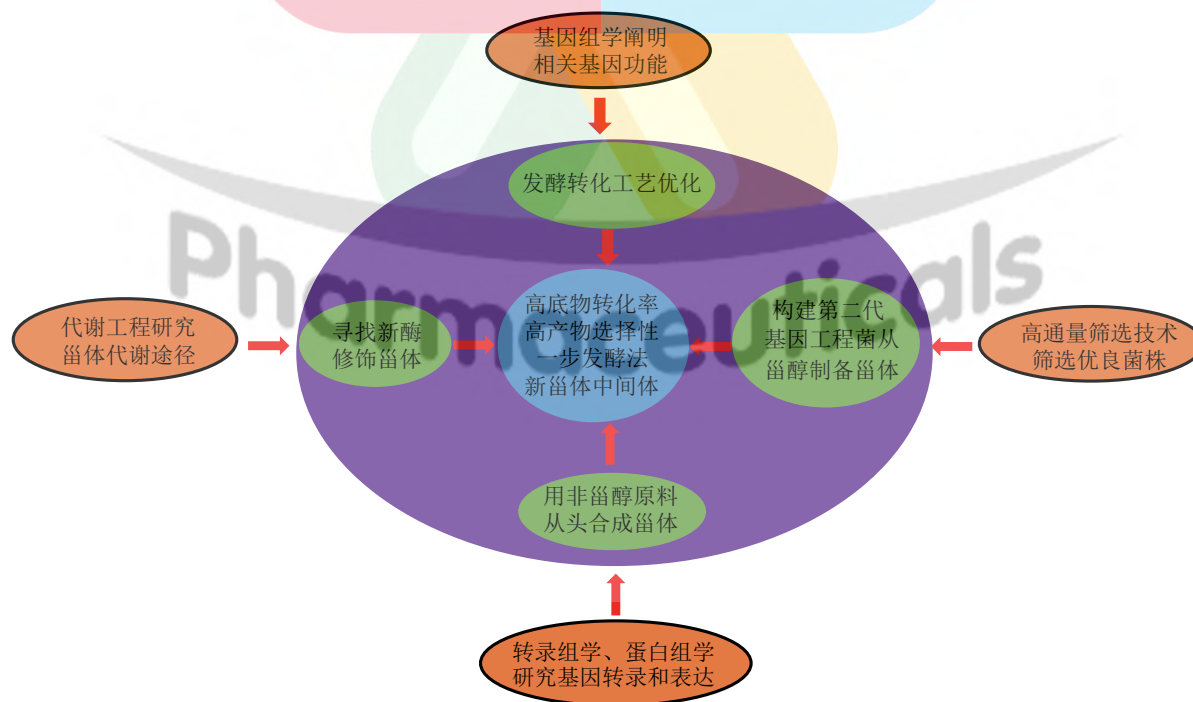


图 6 甾体中间体制备面临的机遇和挑战

Fig.6 Opportunities and Challenges in the Preparation of Steroid Intermediates

进行优化,对甾醇底物进行修饰和改造,增加其水溶性。同时对微生物进行细胞通透性改造,提高对底物的摄取率,并对发酵工艺和乳化体系不断优化,早日实现高底物转化率、高选择性产物的一步(生长和转化同时进行)一相(水相)发酵,从而提高甾体中间体的生产水平。

4.2 构建第二代甾体基因工程菌

现在对微生物降解植物甾醇制备甾体中间体的研究已有了较快的发展,已经从传统的微生物生物催化制备甾体中间体发展到根据甾醇代谢途径构建基因工程菌生物催化制备甾体中间体的阶段,甾体中间体的生产水平得到了较大提高,但是产生的甾体中间体种类还是较少,主要聚焦于AD、ADD、9-OH-AD、4-HBC、1,4-HBC和9-OH-HBC等少数种类。这些中间体的种类目前不能满足甾体药物的发展,因此应该加快寻找新的甾体修饰酶,利用生物技术产生新的甾体化合物。

4.3 从非甾醇原料从头合成甾体中间体

目前利用合成生物学和系统生物学方法已经成功构建了许多基因工程菌,并成功应用于高附加值化合物的工业化生产,然而在甾体工业中构建从头合成甾体药物的基因工程菌的探索较少。研究者在酿酒酵母中重现了内源的甾醇生物合成代谢途径,利用简单碳源(例如半乳糖、乙醇)在重组菌株中产生甾醇底物,产生的甾醇底物作为类固醇多酶异源合成途径的前体物质,再引入哺乳动物类固醇生物合成途径合成孕酮和氢化可的松获得成功^[50-52]。从简单的非甾体物质(如简单碳源)直接生物合成甾体中间体,目前也有少量报道。如天津大学合成生物学前沿科学中心采用解脂耶氏酵母为底盘细胞,以葡萄糖、油脂等为碳源实现甾体药物重要中间体孕烯醇酮、菜油甾醇的生物全合成^[53-54];在酿酒酵母中实现7-脱氢胆固醇的生物全合成^[55]。

随着国家环保战略的实施,环保因素已成为制约传统甾体原料药合成产业发展的瓶颈。开发甾体药物及其中间体的新型生产技术、降低成本与生产污染、提高附加值与生产效率,是我国甾体药物产业发展的迫切需求。基于合成生物学原理,构建以

淀粉、葡萄糖等初级原料为起始前体从头合成甾体激素的人工细胞,是当前甾体激素产业的绿色发展和可持续发展的最有效技术路线。国内近期的研究主要集中在关键催化模块优化和植物甾醇降解体系,对从头合成甾体激素的人工细胞的构建尚处于萌芽阶段。复杂天然产物从头合成人工细胞构建的研究,如萜烯类、生物碱和黄酮类物质等,在国内外都呈现井喷式发展,尤其基于合成生物学技术在微生物体内重构长路径复杂天然产物合成路径的研究突飞猛进,比如近期阿片类药物(吗啡)和大麻素的全生物合成充分展示了从头合成人工细胞的巨大潜力和切实的可行性^[56-57]。甾体激素作为具有复杂结构的重大医药产品,其生物合成的未来趋势必将是以合成生物技术创制从头合成细胞为发展方向。通过对关键酶定向改造、底盘细胞和重构路径适配性研究、适应全新人工细胞的过程技术开发等相关研究,甾体从头合成技术必将取得突破。我国在甾体激素研究方面已有良好的研究基础和能力,特别是以强大甾体激素产业为支撑,应尽快建立起具有我国独立知识产权的技术体系和研究生态,进一步突破当前甾体激素产业发展瓶颈,往绿色、高效的方向发展,将使我国在该领域达到国际先进水平。

参考文献:

- [1] 王 鸿,周启春,邵燕燕,等. 雄烯二酮的微生物生产与转化研究进展[J]. 浙江工业大学学报, 2015, 43(6): 611-617.
- [2] FERNANDES P, CABRAL J M. Phytosterols: applications and recovery methods [J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98(12): 2335-2350.
- [3] HANNICH J T, UMEBAYASHI K, RIEZMAN H. Distribution and functions of sterols and sphingolipids [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(5): a004762.
- [4] GIORGI V, MENÉNDEZ P, GARCÍA-CARNELLI C. Microbial transformation of cholesterol: reactions and practical aspects—an update [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35(9): 131.
- [5] ROBERT V G, KATHERINE Y, THOMAS H, et al. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in

- macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**(6): 1947-1952.
- [6] DONOVA M V, EGOVA O V. Microbial steroid transformations: current state and prospects [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **94**(6): 1423-1447.
- [7] PEREZ C, FALERO A, HUNG B R, *et al.* Bioconversion of phytosterols to androstanes by mycobacteria growing on sugar cane mud [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, **32**(3): 83-86.
- [8] AURASORN S, PATTANA S. Production of 4-androstene-3,17-dione and 1,4-androstadiene-3,17-dione from rice germ and wheat germ extracts by *Mycobacterium* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, **38**: 1595-1602.
- [9] PATTANA S, AURASORN S. Utilization of phytosterol-containing vegetable oils as a substrate for production of androst-4-ene-3,17-dione and androsta-1,4-diene-3,17-dione by using *Mycobacterium* sp. [J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2016, **8**: 18-23.
- [10] PATTANA S, UTHAI W, AURASORN S. Biotransformation of various natural sterols to androstenediones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2006, **41**(1/2): 49-54.
- [11] LIN Y, SONG X, FU J, *et al.* Microbial transformation of phytosterol in corn flour and soybean flour to 4-androstene-3,17-dione by *Fusarium moniliforme* Sheld [J]. *Bioresour Technol*, 2009, **100**(5): 1864-1867.
- [12] ALOK M, JAMES G. Rapid screening and isolation of a fungus for sitosterol to androstenedione biotransformation [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, **158**(2): 374-386.
- [13] PREETI S, PARVEZ S S, PRITI S, *et al.* Biotransformation of cholesterol to 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) by *Nocardia* species [J]. *Ann Microbiol*, 2012, **62**: 1651-1659.
- [14] PRITI N C, BHUSHAN L C, SUDHIR B C. Cholesterol biotransformation to androsta-1,4-diene-3,17-dione by growing cells of *Chryseobacterium gleum* [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, **32**(5): 695-699.
- [15] LIU Y C, CHEN G Y, GE F L, *et al.* Efficient biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione by a newly isolated actinomycete *Gordonia neofelifaecis* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, **27**: 759-765.
- [16] 付磊, 李莹, 王旻, 等. 微生物转化植物甾醇产物20-羟基-23,24-二降胆-4-烯-3-酮的鉴定[J]. 药学进展, 2004, **28**(4): 177-178.
- [17] LIU C, ZHANG X, RAO Z M, *et al.* Mutation breeding of high 4-androstene-3,17-dione-producing *Mycobacterium neoaurum* ZADF-4 by atmospheric and room temperature plasma treatment [J]. *J Zhejiang Univ Sci B: Biomed Biotechnol*, 2015, **16**(4): 286-295.
- [18] DONOVA M V, GULEVSKAYA S A, DOVBNYA D V, *et al.* *Mycobacterium* sp. mutant strain producing 9 α -hydroxyandrostene-3,17-dione from sitosterol [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**: 671-678.
- [19] SHAO M L, ZHANG X, RAO Z M, *et al.* A mutant form of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase gives altered androst-1,4-diene-3,17-dione/androst-4-ene-3,17-dione molar ratios in steroid biotransformations by *Mycobacterium neoaurum* ST-095 [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, **43**: 691-701.
- [20] WEI W, WANG F Q, FAN S Y, *et al.* Inactivation and augmentation of the primary 3-ketosteroid- Δ^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.
- [21] TANG R, SHEN Y B, WANG M, *et al.* Highly efficient synthesis of boldenone from androst-4-ene-3,17-dione by *Arthrobacter simplex* and *Pichia pastoris* ordered biotransformation [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2019, **42**(6): 933-940.
- [22] WEI W, FAN S Y, WANG F Q, *et al.* Accumulation of androstadiene-dione by overexpression of heterologous 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01 [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, **30**: 1947-1954.
- [23] ZHANG W Q, SHAO M L, RAO Z M, *et al.* Bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione by recombinant *Bacillus subtilis* expressing *ksdd* gene encoding 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12 [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, **135**: 36-42.
- [24] SHAO M L, CHEN Y L, ZHANG X, *et al.* Enhanced intracellular soluble production of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* in *Escherichia coli* and its application in the

- androst-1,4-diene-3,17-dione production [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2017, **92**: 350-357.
- [25] LI Y, LU F, SUN T, *et al.* Expression of *ksdd* gene encoding 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* in *Bacillus subtilis* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, **44**: 563-568.
- [26] WANG W Y, GE F L, MA C H, *et al.* Heterologous expression and characterization of a 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Gordonia neofelifaecis* and its utilization in the bioconversion of androst-4,9(11)-dien-3,17-dione [J]. *3 Biotech*, 2017, **7**: 19.
- [27] ZHANG X, WU D, YANG T W, *et al.* Over-expression of *Mycobacterium neoaurum* 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase in *Corynebacterium crenatum* for efficient bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione [J]. *Electron J Biotechnol*, 2016, **24**: 84-90.
- [28] 张乐乐, 张显, 邵明龙, 等. 表达3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶降解植物甾醇合成雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮[J]. 生物工程学报, 2015, **31**(11): 1589-1600.
- [29] YAO K, XU L Q, WEI F Q, *et al.* Characterization and engineering of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase and 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase in *Mycobacterium neoaurum* ATCC25795 to produce 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione through the catabolism of sterols [J]. *Metab Eng*, 2014, **24**: 181-191.
- [30] ZHANG X, RAO Z M, ZHANG L L, *et al.* Efficient 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione production by engineered *Bacillus subtilis* co-expressing *Mycobacterium neoaurum* 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase and *B. subtilis* glucose 1-dehydrogenase with NADH regeneration [J]. *SpringerPlus*, 2016, **5**: 1207.
- [31] 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**: 89.
- [32] XU L Q, LIU Y J, YAO K, *et al.* Unraveling and engineering the production of 23,24-bisnorcholenic steroids in sterol metabolism [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 21928.
- [33] HE K, SUN H, SONG H. Engineering phytosterol transport system in *Mycobacterium* sp. strain MS136 enhances production of 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione [J]. *Biotechnol Lett*, 2018, **40**: 673-678.
- [34] XIONG L B, LIU H H, XU L Q, *et al.* Role identification and application of *sigD* in the transformation of soybean phytosterol to 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione in *Mycobacterium neoaurum* [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, **65**(3): 626-631.
- [35] XIONG Z G, WEI Q, CHEN H M, *et al.* Microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione by *Beauveria bassiana* [J]. *Steroids*, 2006, **71**(11/12): 979-983.
- [36] MANOSROI A, SUDA S, JIRADEJ M. Enhancement of androstadienedione production from progesterone by biotransformation using the hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation technique [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, **108**(1/2): 132-136.
- [37] HOSSEINABADI T, HOSSEIN V, BAHMAN N, *et al.* Fungal transformation of androsta-1,4-diene-3,17-dione by *Aspergillus brasiliensis* [J]. *Daru J Pharm Sci*, 2014, **22**(1): 71.
- [38] 张小燕, 阮晖, 何国庆. 微生物降解植物甾醇侧链生产雄甾烯二酮的研究进展[J]. 中国食品学报, 2012, **12**(7): 162-170.
- [39] RODRIGO A M, CEDRIC L, ALEJANDRO A. Efficient bioconversion of high concentration phytosterol microdispersion to 4-androstene-3,17-dione (AD) by *Mycobacterium* sp. B3805 [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, **185**: 494-506.
- [40] MALAVIYA A, JAMES G. Nutrient broth/PEG200/TritonX114/Tween80/chloroform microemulsion as a reservoir of solubilized sitosterol for biotransformation to androstenedione [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, **35**(11): 1435-1440.
- [41] WANG Z F, HUANG Y L, JAMES F R, *et al.* Lecithin-enhanced biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione and androsta-4-ene-3,17-dione [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2002, **77**(12): 1349-1357.
- [42] MALAVIYA A, JAMES G. Enhanced biotransformation of sitosterol to androstenedione by *Mycobacterium* sp. using cell wall permeabilizing antibiotics [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, **35**(11): 1235-1239.
- [43] YIN Y L. Effects of different carbon sources on growth, membrane permeability, β -sitosterol consumption, androstadienedione and androstenedione production by *Mycobacterium neoaurum* [J]. *Interdiscip Sci: Comput Life Sci*, 2016, **8**: 102-107.

- [44] XU X W, GAO Q, FENG J X, *et al.* Influence of temperature on nucleus degradation of 4-androstene-3,17-dione in phytosterol biotransformation by *Mycobacterium* sp. [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2015, **61**: 63-68.
- [45] ZHANG X Y, YONG P, SU Z R, *et al.* Optimization of biotransformation from phytosterol to androstenedione by a mutant *Mycobacterium neoaurum* ZJUVN-08 [J]. *J Zhejiang Univ Sci B: Biomed Biotechnol*, 2013, **14**(2): 132-143.
- [46] LUTHRA U, SNEHA K, ADITI T, *et al.* Biotransformation of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione by *Nocardioides simplex* [J]. *WJPPS*, 2015, **4**(11): 1935-1943.
- [47] SHAO M L, ZHANG X, RAO Z M, *et al.* Enhanced production of androst-1,4-diene-3,17-dione by *Mycobacterium neoaurum* JC-12 using three-stage fermentation strategy [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(9): e0137658.
- [48] RONG S F, WANG J W, LI Q, *et al.* The enhanced production of 11 α -hydroxyandrost-1,4-diene-3,17-dione based on the application of organic silica hollow spheres in the biotransformation of β -sitosterol [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2017, **92**(1): 69-75.
- [49] LEE C Y, LIU W H. Production of androst-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using immobilized growing cells of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 adsorbed on solid carriers [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **36**(5): 598-603.
- [50] DUPORT C, SPAGNOLI R, DEGRYSE E, *et al.* Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(2): 186-189.
- [51] SZCZEBARA F M, CHANDELIER C, VILLERET C, *et al.* Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 143-149.
- [52] LORENA F C, BEATRIZ G, JOSE L G. New insights on steroid biotechnology [J]. *Front Microbiol*, 2018, **9**: 958.
- [53] Zhang R, Zhang Y, Wang Y, *et al.* Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, **8**(12): 2666-2678.
- [54] ZHANG Y, WANG Y, YAO M, *et al.* Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, **39**(7): 1033-1039.
- [55] GUO X J, XIAO W H, WANG Y, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 7-dehydrocholesterol overproduction [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2018, **11**(1): 192.
- [56] GALANIE S, THODEY K, TRENCHARD I J, *et al.* Complete biosynthesis of opioids in yeast [J]. *Science*, 2015, **349**(6252): 1095-1100.
- [57] LUO X Z, REITER M A, ESPAUX L, *et al.* Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast [J]. *Nature*, 2019, **567**(7746): 123-126.