

## [综述]

## 甾体类药物生物合成研究进展

李成汉，赵淑娟\*

(上海中医药大学中药研究所，中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点研究室，中药标准化教育部重点实验室，上海市复方中药重点实验室，上海 201203)

**摘要：**甾体类药物具有重要生理功能，在传统中药与现代医学中均占据重要地位。许多中药，如薯蓣、熊胆、蟾酥等，富含甾体类活性成分，衍生药物包括维生素D、甾体激素、胆汁酸类药物，展现出抗炎、免疫调节、降血脂等多种药理活性。传统甾体类药物的生产依赖化学合成和动植物提取，但存在合成过程复杂、成本高、资源有限等问题。目前，生物合成逐渐成为一种替代方案。本文聚焦甾体类药物生物合成的研究进展，重点总结了维生素D3、雄烯二酮、牛磺熊去氧胆酸的合成路径，阐述了代谢途径与关键酶的挖掘、酶工程改造、代谢工程优化、发酵工艺改进的研究成果。同时，对尚未开发的珍稀甾体类化合物在生物合成领域的未来发展方向进行了展望，以期为其进一步发展提供参考。

**关键词：**甾体类药物；生物合成；代谢工程；维生素D3；雄烯二酮；牛磺熊去氧胆酸

中图分类号：R284.3

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2025)11-3671-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.020

甾体类化合物是许多中药的关键活性成分。夹竹桃中的植物强心苷可用于治疗心力衰竭；蟾蜍二烯酸类化合物是名贵中药蟾酥的主要成分，具有抗肿瘤、强心作用；熊胆中的胆汁酸类化合物可护肝利胆；薯蓣中的甾体皂苷是甾体激素药物的重要前体；人参、三七等药材富含甾体皂苷，具有抗肿瘤、心脑血管保护作用。此外，维生素D、甾体生物碱、昆虫激素等甾体化合物广泛存在于中药中，具有抗炎、免疫调节、降血脂等活性。这些化合物为现代药物开发提供了重要的分子基础。

甾体类药物获取方法主要包括从天然产物中提取、化学合成、生物合成。天然提取方法虽然纯度较高但是产量有限；化学合成甾体类化合物存在生产成本高、工艺复杂、环境污染等问题。如以薯蓣皂素等天然甾体为原料制备雄烯二酮的半化学合成法，该法合成步骤长，生产效率低，污染严重<sup>[1]</sup>。生物合成方法通过生物技术手段生产甾体类化合物，具有绿色环保、可持续发展的优势，从而备受关注。

目前，甾体类药物的生物合成主要方法有2类，第一类是利用廉价且易得的天然原料为底物，通过酶促反应或全细胞催化技术将其高效转化为目标化合物；第二类则针对底物获取困难的情况，采用从头合成技术，利用宿主细胞的自身代谢产物合成目标化合物。本文旨在综述典型的甾体药物的生物合成，通过对现有研究成果的系统整理与

分析，以期为更多甾体类药物的生物合成研究提供借鉴。

## 1 代表性甾体类药物

### 1.1 生物转化

1.1.1 甾体激素 目前，大部分的类固醇激素类药物的合成策略都是先采用生物合成法得到中间体，再通过化学修饰法得到终产物。C-19中间体可用于化学合成几乎所有种类的类固醇激素，过程见图1。而其中研究较为广泛的就是雄烯二酮。

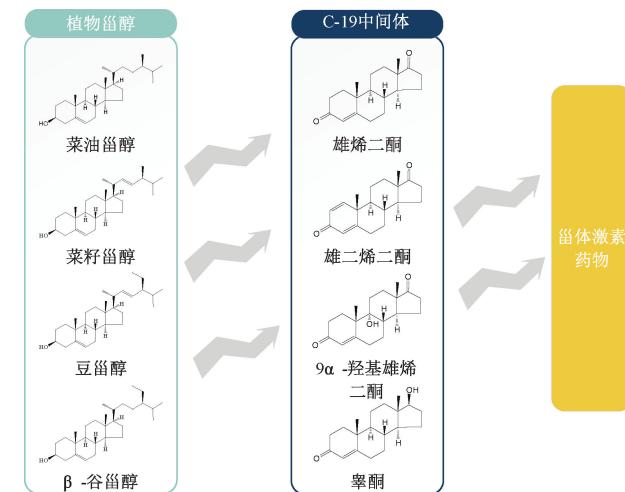


图1 甾体激素药物生物合成途径

收稿日期：2025-01-06

基金项目：上海市中央引导地方科技发展资金项目（YDZX20223100001004）

作者简介：李成汉（1999—），男，硕士生，从事中药新资源与生物技术研究。Tel：18792204107，E-mail：18792204107@139.com

\*通信作者：赵淑娟（1971—），女，博士，研究员，博士生导师，从事中药生物技术与资源可持续利用研究。E-mail：zhaoshujuan@126.com

雄烯二酮属于天然类固醇，它是大多数药用活性类固醇生物合成中的前体化合物，是应用最广泛的C-19中间体之一<sup>[2]</sup>。全球雄烯二酮化合物的市场规模极大，因此，从更廉价的甾醇底物生产雄烯二酮具有巨大的商业潜力。而植物甾醇因其较低的成本及易于转化为类固醇中间体的特点，已成为首选底物，其中豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇、菜油甾醇是植物界中较为丰富的甾醇成分<sup>[3]</sup>。

Wovcha等<sup>[4]</sup>从甾醇降解菌株偶发分枝杆菌ATCC-6842中分离得到一系列在甾醇降解途径不同阶段受到阻断的突变体，能有效生成雄烯二酮的突变型分枝杆菌。Dias等<sup>[5]</sup>研究微生物将工业废料中的甾醇转化为雄烯二酮的过程，结果表明，某些分枝杆菌能选择性地降解甾醇的侧链生成雄烯二酮，该研究奠定了植物甾醇作为制备雄烯二酮重要起始原料的基础。

此后，一系列的宿主菌株被用于合成雄烯二酮。Vidal等<sup>[6]</sup>利用高浓度 $\beta$ -谷甾醇培养基进行菌株筛选，成功从分枝杆菌属中分离出适于植物甾醇生物转化的优势菌株。Malaviya等<sup>[7]</sup>通过生物信息学技术在数据库中筛选出米曲霉和构巢曲霉FGSCA4作为具有潜在合成雄烯二酮能力的菌株。目前已报道多种微生物能够代谢植物甾醇生成雄烯二酮。然而，这些微生物的代谢途径尚未被系统解析，相关机制的深入研究将是未来工作的重点。

雄烯二酮的从头合成也有报道。Zhang等<sup>[8]</sup>利用解脂耶氏酵母实现了从头合成雄烯二酮，产量达 $(7.71\pm 0.21)$  mg/L。然而，就工业化生产来讲，从头合成雄烯二酮还需克服产量太低、路线复杂、中间产物产生等难点。

睾酮也是一种合成类固醇激素药物的重要C-19中间体。Hamada等<sup>[9]</sup>首次报道了绿色地钱细胞悬浮液能够立体选择性地还原雄烯二酮的C-17位的羰基，生成睾酮作为主要代谢产物。

从雄烯二酮到睾酮仅需要一步C-17位羰基还原的酶催

化反应。Pajic等<sup>[10]</sup>发现，裂殖酵母细胞浆中存在还原型辅酶I（nicotinamide adenine dinucleotide, NADH）和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH）依赖性的羟基类固醇脱氢酶，能催化雄烯二酮转化为睾酮。Guevara等<sup>[11]</sup>在赤红球菌Chol-4中诱导从真菌来源的17 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶发生过表达，该工程菌株能够转化雄烯二酮产生睾酮，见图2。

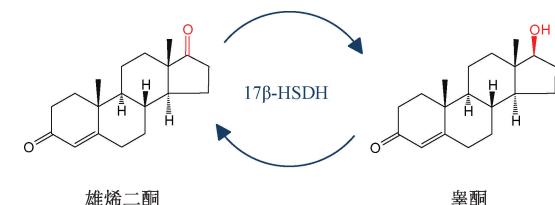


图2 雄烯二酮与睾酮转化途径

1.1.2 胆汁酸 胆汁酸中富含多种活性成分，包括熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、甘氨胆酸，在胆汁淤积性肝病、胆石症、脂肪肝、胆管炎等疾病的治疗中具有重要价值<sup>[12-13]</sup>。

熊胆是一种珍贵的中药材，其主要活性成分为熊去氧胆酸或其结合型胆汁酸——牛磺熊去氧胆酸。两者可用于治疗胆汁淤积性肝病、胆结石、原发性胆汁性胆管炎等疾病，并在保护肝细胞、延缓肝纤维化方面发挥重要作用。熊去氧胆酸已获得美国食品药品监督管理局的批准用于治疗原发性胆汁性肝硬化，在改善患者生存率和延缓疾病进展方面具有显著作用<sup>[14]</sup>。

熊去氧胆酸生物合成有2条路径，第一条是以鹅去氧胆酸为底物，7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶催化鹅去氧胆酸生成7-酮石胆酸，7 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶催化7-酮石胆酸生成熊去氧胆酸；第二条是以石胆酸为底物，通过P450单加氧酶在7号位引入羟基，直接生成熊去氧胆酸<sup>[15]</sup>，见图3。

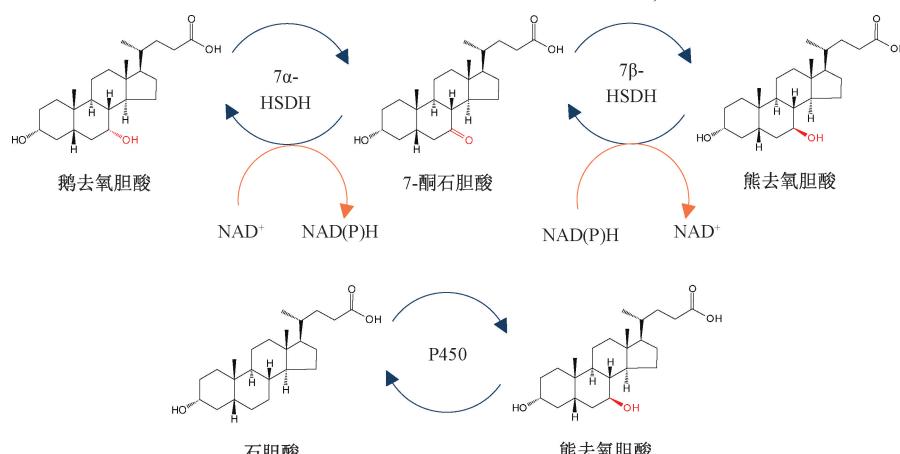


图3 合成熊去氧胆酸的2种途径

7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶在许多微生物中有发现，广泛存在于肠道菌群中。目前已报道的7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶来源于真杆菌株VPI12708<sup>[16]</sup>、大肠杆菌HB101<sup>[17]</sup>、沙地梭菌

ATCC9714<sup>[18]</sup>、脆弱杆菌ATCC25285<sup>[19]</sup>、异常梭状芽孢杆菌<sup>[20]</sup>等。Tang等<sup>[21]</sup>从黑熊粪便样本中克隆得到的一种编码新型嗜酸性7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶。Ji等<sup>[22]</sup>从黑熊肠道

宏基因组中克隆出一个编码 $7\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶的新基因。Lou等<sup>[23]</sup>表征了一种具有良好工业应用潜力的新型热稳定性 $7\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶。

与 $7\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶类似, $7\beta$ -羟基类固醇脱氢酶通常也在微生物和动物的肝脏和肠道菌群中被发现。目前已报道的 $7\beta$ -羟基类固醇脱氢酶来源于消化链球菌菌株b-52、产气真杆菌ATCC25986<sup>[24]</sup>、异常梭状芽孢杆菌ATCC#27555<sup>[25]</sup>、瘤胃球菌<sup>[26]</sup>、卵磷脂酶-脂肪酶阴性的梭菌<sup>[27]</sup>、雄性兔肝微粒体<sup>[28]</sup>、嗜麦芽黄单胞菌<sup>[29]</sup>、产气真杆菌DSM3979<sup>[30]</sup>、乳杆菌<sup>[31]</sup>等。

P450单加氧酶也有发掘。Zhou等<sup>[32]</sup>从木贼镰刀菌HG18中筛选出一种新的P450羟化酶，并成功在毕赤酵母中异源表达，毕赤酵母对石胆酸的全细胞催化证实了该酶可以催化7位进行 $\beta$ -羟基化，为后续新的合成路线开辟道路。

## 1.2 从头合成

**1.2.1 角鲨烯** 角鲨烯是所有甾体类化合物的共同前体。角鲨烯在生物体内通过2种主要途径合成，一种是甲羟戊酸途径，另一种是甲基赤藓糖途径，见图4。甲羟戊酸途径是通过羟甲基戊二酰辅酶A(hydroxy methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶等一系列关键酶的协同催化，将乙酰辅酶A转化为角鲨烯<sup>[33]</sup>。甲基赤藓糖途径通过1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶等关键酶，将丙酮酸和甘油醛-3-磷酸转化为异戊烯焦磷酸和二甲基烯丙基焦磷酸，继而通过焦磷酸异戊烯转移酶合成泛醇焦磷酸，最终由角鲨烯合酶催化生成角鲨烯<sup>[34]</sup>。甲基赤藓糖途径存在于绝大多数细菌以及植物细胞的叶绿体中，代谢产物进一步用于植物体内的甾体类化合物生物合成过程<sup>[35]</sup>。

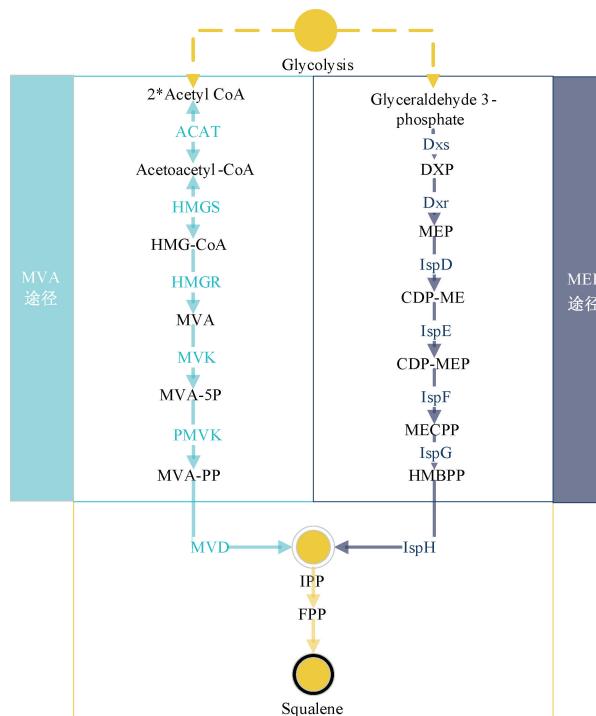


图4 角鲨烯合成的2种途径

甾体类化合物的从头合成过程中，角鲨烯作为关键的共同前体，其合成量对最终产物的产率至关重要。因此，许多代谢工程改造策略旨在提升角鲨烯的含量，以提高甾体类化合物的合成效率。

**1.2.2 维生素D** 维生素D是一种重要的脂溶性维生素，可以促进钙、磷的吸收以及骨骼和牙齿的矿化，还能增强机体对感染和自体免疫疾病的抵御能力<sup>[36]</sup>。维生素D有2种形式，分别为维生素D3和维生素D2<sup>[37]</sup>。目前市场上维生素D的补剂主要是维生素D3。7-脱羟基胆固醇在紫外线照射下能够有效转化为维生素D3。因此，7-脱羟基胆固醇是为生物合成的目标产物<sup>[38]</sup>。

Avruch等<sup>[39]</sup>阻断了酵母合成麦角固醇的途径，结果发现酿酒酵母积累了大量前体甾醇化合物，为维生素D3生物合成开发提供了潜在的来源。Lang等<sup>[40]</sup>通过异源表达小鼠和人类的C-8甾醇异构酶、C-5甾醇去饱和酶及甾醇C24-还原酶基因，并失活ETS相关基因(ETS-related gene, ERG)5、ERG6，成功获得了能够合成7-脱羟基胆固醇的酵母菌。酿酒酵母是7-脱羟基胆固醇合成的理想宿主，其内源性麦角甾醇代谢途径可提供充足的前体化合物，通过外源表达关键基因DHCR24，并借助其自身的甾醇代谢相关基因，即可实现7-脱羟基胆固醇的高效从头合成。后续研究主要集中于关键基因DHCR24的筛选与改造，以及宿主酿酒酵母代谢途径的优化。

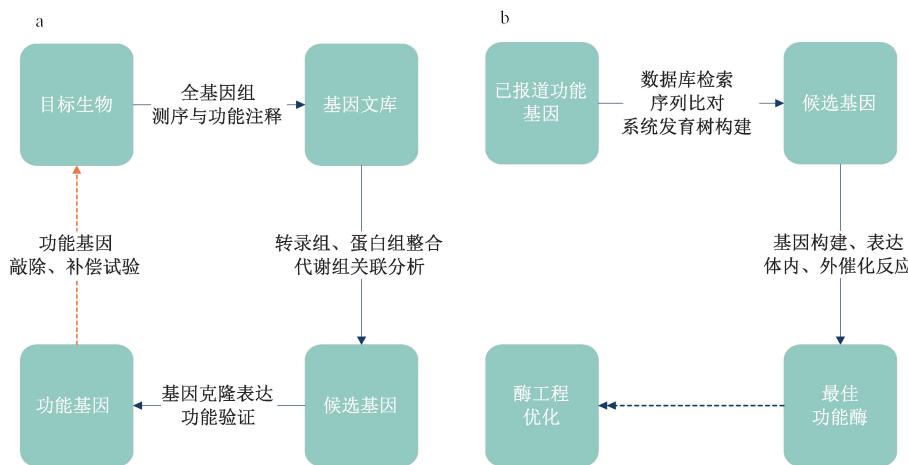
## 2 甾体类化合物生物合成常用策略

**2.1 代谢通路以及关键酶挖掘** 代谢途径和关键酶的挖掘是合成生物学中的起始步骤。对未报道的酶，首先获取目标生物的全基因组信息，再结合转录组、蛋白组、代谢组的差异表达与富集分析，初步筛选出可能的目标基因集合，验证其功能，见图5。在雄烯二酮的生物合成研究中，Rodríguez-García等<sup>[41]</sup>对新金分枝杆菌NRRLB-3805的完整基因组进行测序，为后续的关键基因挖掘奠定了基础。Wang等<sup>[42]</sup>通过全基因组测序和酶学分析研究能够降解植物甾醇生成雄烯二酮的新金分枝杆菌HGMS2菌株，发现了5组关键催化酶，为雄烯二酮合成菌株的工程改造提供了新的见解。在熊去氧胆酸的合成中，Huang等<sup>[43]</sup>基于结构引导的基因组挖掘方法，发现了一种新的NADH依赖性 $7\beta$ -羟基类固醇脱氢酶，它能提高7-酮石胆酸和NADH的催化效率。

将酶的序列进行基因库和蛋白库中的序列比对，构建系统发育树，将相近的酶归为同一集合，最终通过功能筛选实验，确定活性和性能最佳的酶。在合成7-脱羟基胆固醇时，Guo等<sup>[44]</sup>对7种脊椎动物、2种植物、1种无脊椎动物、1种真菌，总计11个来源的DHCR24基因进行筛选，结果发现鸡的DHCR24基因中7-脱羟基胆固醇活性最高。

## 2.2 酶工程改造

**2.2.1 定向进化** 酶的定向进化是模拟自然进化过程，在体外进行酶基因的人工随机突变。该过程首先建立突变基因文库，随后在人工控制下，通过定向选择筛选出具有优



注: a 表示未报道功能的基因挖掘流程, b 表示已知功能基因的筛选挖掘流程。

图 5 基因挖掘路流程示意图

异催化特性的酶突变体<sup>[45]</sup>。Huang 等<sup>[46]</sup>采用定向进化策略筛选出 NADP<sup>+</sup>依赖性、高催化效率、高底物浓度的耐受性的 7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶, 最佳突变体对熊去氧胆酸和 NADP<sup>+</sup>的催化效率分别提高了 10、14 倍。Zheng 等<sup>[47]</sup>提出了一种多目标定向进化策略用于提高 7 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶的活性、热稳定性和最适 pH 值。Wang 等<sup>[48]</sup>对来自瘤胃球菌的 NADH 依赖性的 7 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶进行了机器学习引导的蛋白质工程改造, 结合随机森林、高斯朴素贝叶斯分类器、高斯过程回归等方法, 得到了最佳变体。

**2.2.2 理性设计** 酶的理性设计是一种基于酶的三维结构信息、催化机制和底物特性, 系统地、理论性地设计酶的优化方案的方法。与传统的随机突变法相比, 理性设计更加依赖于对酶结构的深入理解, 并基于这些知识预测突变对酶性能的影响。

在雄烯二酮生物合成中, Ding 等<sup>[49]</sup>通过分子对接和分子动力学模拟揭示了雄烯二酮与 17 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 3 的底物结合口袋及结合方式, 通过合理的设计策略调控关键残基的疏水性和极性, 最终获得的变体的睾酮产量达 3.98 g/L。

在熊去氧胆酸的生物合成中, Kim 等<sup>[50]</sup>展示了载脂蛋白-7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶结构, 该结构具有开放构象的内在柔性特性, 为 7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶反应机制提供了新的见解。Savino 等<sup>[51]</sup>解析了产气荚膜梭菌的 7 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶晶体结构并进行诱变实验, 结果表明, 酶结构中存在一个保守的 NADPH 结合位点与酶的独特立体选择性相关联。Grobe 等<sup>[52]</sup>改造了细胞色素 P450 单加氧酶 CYP107D1, 使其能够立体和区域选择性地羟基化石胆酸的 C-7 位, 从而产生熊去氧胆酸。

**2.2.3 半理性设计** 酶的半理性设计是一种结合了理性设计与随机突变的优势的酶工程方法。它通过对酶的结构和功能进行有限的理性分析, 并结合实验数据来指导突变的设计, 进而优化酶的性能。相比全理性设计, 半理性设计通常不要求对酶的详细结构进行全面预测, 而是依赖已有

的知识、经验以及计算方法优化酶的特性。Pan 等<sup>[53]</sup>对从亚洲黑熊的肠道微生物组中克隆得到 7 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶的 Thr15 和 Arg16 残基的辅因子结合位点, 并设计其突变, 从突变体筛选出了显示与底物的结合更强的优秀个体。

3 种酶工程改造策略比较见图 6、表 1。



图 6 定向进化、理想设计、半理性设计策略步骤

## 2.3 代谢工程策略

**2.3.1 推拉阻断策略** 代谢工程优化中, 推拉阻断策略通过基因过表达和敲除来实现代谢流的优化, 可分为推动策略、拉动策略、阻断策略。推动策略通过上调相关酶的表达来增加底物向途径前体的通量流动; 拉动策略通过表达末端酶以增强末端产品的生成; 阻断策略阻断竞争性途径, 消除对途径中间体的消耗, 进一步优化代谢流向目标产物<sup>[54]</sup>, 见图 7。

在 7-脱羟基胆固醇生物合成中, Guo 等<sup>[44]</sup>过表达所有甲羟戊酸途径基因来增加前体库, 并敲除 ERG5、ERG6 基因阻断竞争性麦角固醇生物合成途径, 以减少前体的消耗。

表1 定向进化、理想设计、半理性设计策略比较

特性	定向进化	理性设计	半理性设计
设计依据	完全基于随机变异	基于结构与功能信息	结合结构信息与随机变异
依赖性	不依赖于结构数据	高度依赖结构数据	适度依赖结构数据
变异范围	突变范围广泛, 变异随机	精确选择特定位点突变	选择关键位点进行随机突变
筛选效率	非常高, 但筛选到的变异可能不理想	较低, 依赖于精确设计	较高, 通过结合随机突变加速筛选
适用性	不需要任何结构信息, 适用于未知酶	对于已知结构的酶优化效果好	适用于已知结构信息但不完全的酶
实验复杂性	低, 直接通过高通量筛选获得变异	高, 需要计算机模拟与分子动力学	中等, 需要结合随与定点突变

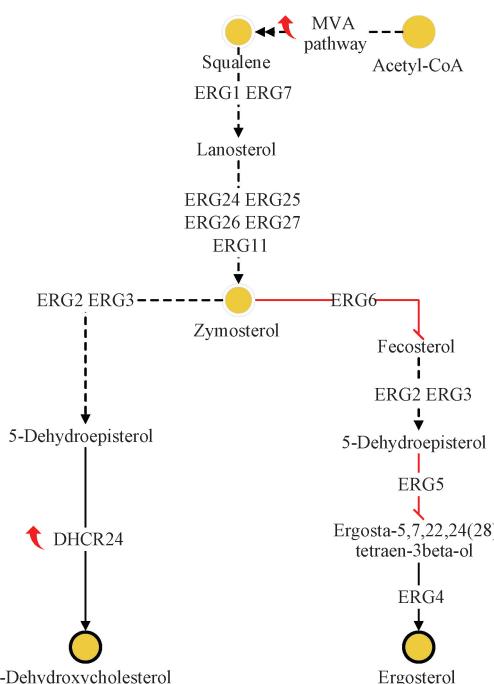


图7 推拉阻断策略在7-脱羟基胆固醇生物合成中的应用

Qu 等<sup>[55]</sup>过表达关键基因 DHCR24 及一系列途径相关基因, 再抑制竞争性内源甾醇代谢途径基因表达, 最终将 7-脱羟基胆固醇的滴度提高至 1 328 mg/L。

2.3.2 辅因子工程 辅因子在生化反应中充当氧化还原载体和能量转移剂, 是参与酶催化反应的关键因素之一, 其供应量很大程度的影响反应的效率与产量。

在 7-脱羟基胆固醇的生物合成中, 针对异源表达催化酶 DHCR24 的辅因子供给不足的问题有 2 种策略, 一种是增强宿主内源辅因子合成途径, 提高辅因子水平; 另一种是构建辅因子再生循环系统。Su 等<sup>[56]</sup>引入水形成 NADH 氧化酶和替代氧化酶, 促进辅因子 NADH/NAD<sup>+</sup>的再生循环, 解决氧化还原失衡的问题, 使 7-脱羟基胆固醇产量提高了 74.4%。Xiu 等<sup>[57]</sup>过表达葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、线粒体 NADH 激酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶来增强酿酒酵母的 NADPH 再生, 并引入来自肺炎链球菌的 NADH 氧化酶和荚膜组织胞浆菌的替代氧化酶基因以实现 NADH 的工程化再生。

在雄烯二酮的生物合成中, Zhou 等<sup>[58]</sup>提出了一种创新的辅因子工程策略, 构建了基于柠檬酸和丙酮酸的无效循环, 有效降低细胞内 ATP 和丙酰辅酶 A 水平, 并提升 NAD<sup>+</sup>/NADH 比值和细胞活力, 最终使雄烯二酮的转化率从 60.6% 提高至 97.3%。

2.3.3 空间工程 空间工程通过模拟多酶复合体和利用细胞内区室化作用, 优化途径的空间分布和组织结构。与原核生物相比, 真核生物具备丰富的膜结构和细胞器, 为许多膜依赖性酶提供了理想的反应环境。因此, 在真核生物中构建代谢途径时, 需要考虑酶的空间定位问题, 以确保酶在适宜的细胞区室中发挥最大活性, 从而有效促进目标代谢产物的合成。

在 7-脱羟基胆固醇生物合成中, Guo 等<sup>[59]</sup>为解决代谢流不平衡的问题, 重建代谢途径分区, 优化角鲨烯酶的亚细胞定位, 从而促进 7-脱羟基胆固醇的合成。Xiu 等<sup>[60]</sup>利用内质网区室化策略重塑 7-脱羟基胆固醇的合成途径。Bi 等<sup>[61]</sup>采用亚细胞器改造策略, 选择过氧化物酶体作为 7-脱羟基胆固醇生产的制造细胞器, 并重新定位过氧化物酶体中的后角鲨烯合成途径, 实施多种策略以增强区室化效应, 最终在 10L 台式发酵罐中 7-脱羟基胆固醇产量达 4.28 g/L。Xiu 等<sup>[57]</sup>通过重建后角鲨烯途径, 将 7-脱羟基胆固醇产量提高了 28.7%。

2.4 发酵工程优化 培养基是否适宜微生物的生长或代谢产物的积累, 直接影响最终产品的得率。微生物菌体的生长、初级代谢产物的合成及次级代谢过程的生物合成机理极为复杂, 受多个因素的影响, 包括培养基成分、培养温度、pH 值、发酵时间、菌种的理化特性、发酵工艺等。因此, 优化微生物培养基的组成, 确保其能够提供最佳的生长和代谢环境尤为重要。

传统培养基优化方法分为 4 步。第一步是单因素优化, 单一的改变某一培养基成分来观察其对菌体生长以及发酵产物生产的影响, 筛选出显著影响因素。第二步是 Plackett-Burman 实验, 一种用于筛选影响某个响应变量的关键因素的统计实验设计方法, 常用于初步的因素筛选, 一般用来筛选出关键影响因素。第三步是最陡爬坡实验, 筛选到的关键因素进行最陡爬坡实验, 确定关键因素的取值区间。第四步是响应面法, 确定了关键因素以及其取值区间, 则进行响应面法试验, 预测最佳的关键因素取值。在雄烯二酮的生物转化中, Zhang 等<sup>[62]</sup>通过部分因子设计和响应面分析法对新分离的突变株新金分枝杆菌 ZJUVN-08 进行工艺优化, 在最优工艺条件下产量达 5.96 g/L。此外, 利用机器学习算法对大量实验数据进行建模与分析, 能够有效识别影响发酵过程的重要因素, 并预测不同培养基成分对微生物生长及代谢产物生成的影响, 从而实现更加精准和高效的培养基优化。

不同的发酵策略可以通过调控环境条件 (如温度、pH

值、溶氧量等)或发酵过程本身(如补料策略、分批发酵、双相发酵等)来提高生产效率、增加产物产量、降低成本或改善产品质量。常见的发酵策略包括补料、连续发酵、双相发酵等。

在雄烯二酮的生物合成中,Arabi等<sup>[63]</sup>利用有机单相和有机-水双相体系,成功通过微藻的全细胞催化,将雄烯二酮还原生成睾酮。Zhou等<sup>[64]</sup>通过重复分批发酵,将生物转化周期从30 d缩短至17 d,且生产效率较亲本菌株提升了13.75倍。

7-脱羟基胆固醇是脂溶性胆固醇,在水中溶解度低,不适用于一般的发酵工艺策略。Ke等<sup>[65]</sup>通过引入双相发酵系统,促进7-脱羟基胆固醇的分泌和富集,使得7-脱羟基胆固醇的产量达到28.2 mg/g,相较于原始菌株提高了41.4%。

在熊去氧胆酸的生物合成中,Shi等<sup>[66]</sup>以廉价且易得的鸡胆粉为原料,通过全细胞催化工艺,实现了理想的牛磺熊去氧胆酸与牛磺鹅脱氧胆酸比例的产物生成。Xu等<sup>[67]</sup>开发了一种特殊的深槽静态工艺来促进从牛磺鹅脱氧胆酸到牛磺熊去氧胆酸的转化,以最佳发酵条件进行转化产量达到35 g。

### 3 结语与展望

传统中药中富含多种甾体类化合物,例如强心苷类、甾体皂苷类、牛磺熊去氧胆酸等,这些天然产物及其衍生物已在临床治疗中得到广泛应用。然而,当前甾体类化合物的生物合成领域仍面临诸多难题与挑战,亟待进一步的研究探索与工艺优化。

以熊去氧胆酸为例,早期在代谢通路挖掘和酶工程优化方面取得了显著进展,但在代谢工程策略的系统应用和后续发酵工艺优化领域仍存在较大空白。维生素D3的生物合成虽然取得了一定研究进展,但关键酶DHCR24的功能改造尚未得到充分研究。未来的工作应聚焦于酶的优化改造及其催化效率的提升。此外,雄烯二酮的生物转化已达到较高产量,但其合成关键通路和核心酶的挖掘与优化仍有提升空间,以进一步利用酶工程和代谢工程技术实现更高效的生产。同样,对于一些稀有甾体类化合物,例如蟾蜍二烯酸类化合物,目前的研究仍停留在代谢通路挖掘阶段,具体的生物合成路径尚未明确,未来在这一领域的深度挖掘具有广阔前景。

近年来,随着高通量筛选技术、机器学习驱动的酶改造技术以及智能化过程控制等新兴技术的不断引入,甾体类药物的生物合成与发酵工艺逐步向规模化放大迈进。这些技术进展将为甾体类药物的高效合成与规模化生产提供切实可行的解决方案,推动中药及相关领域的持续创新与发展。

### 参考文献:

- [1] 徐彩丽,童晓青,张越非.从生物发酵下脚料中回收甾体化合物的工艺研究[J].广东化工,2023,50(14):47-49;43.
- [2] Rokade R, Ravindran S, Singh P, et al. Microbial biotransformation for the production of steroid medicament[J]. *Second Metab Sources Appl*, 2018, 2018: 55268172.
- [3] Fernandes P, Cabral J M S. Phytosterols: applications and recovery methods[J]. *Bioresource Technol*, 2007, 98 ( 12 ): 2335-2350.
- [4] Wovcha M G, Antosz F J, Knight J C, et al. Bioconversion of sitosterol to useful steroid intermediates by mutants of *Mycobacterium fortuitum*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 531(3): 308-321.
- [5] Dias A C P, Fernandes P, Cabral J M S, et al. Isolation of a biodegradable sterol-rich fraction from industrial wastes[J]. *Bioresource Technol*, 2002, 82(3): 253-260.
- [6] Vidal M, Becerra J, Mondaca M A, et al. Selection of *Mycobacterium* sp. strains with capacity to biotransform high concentrations of beta-sitosterol[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2001, 57(3): 385-389.
- [7] Malaviya A and Gomes J. Rapid screening and isolation of a fungus for sitosterol to androstenedione biotransformation[J]. *Appl Biochem Biotech*, 2009, 158(2): 374-386.
- [8] Zhang R S, Yao M D, Ma H D, et al. Modular coculture to reduce substrate competition and off-target intermediates in androstenedione biosynthesis[J]. *ACS Synth Biol*, 2023, 12(3): 788-799.
- [9] Hamada H, Kawabe S. Biotransformation of 4-androstene-3, 17-dione by green cell suspension of *Marchantia polymorpha*: stereoselective reduction at carbon 17[J]. *Life Sci*, 1991, 48(7): 613-615.
- [10] Pajic T, Vitas M, Zigon D, et al. Biotransformation of steroids by the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Yeast*, 1999, 15(8): 639-645.
- [11] Guevara G, Olortegui Flores Y, Fernández de Las Heras L, et al. Metabolic engineering of *Rhodococcus ruber* Chol-4: A cell factory for testosterone production[J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0220492.
- [12] 周奕帆,孙敬方.熊去氧胆酸生物合成优化策略及应用[J].医药论坛杂志,2024,45(15):1672-1679.
- [13] Staels B, Fonseca V A. Bile acids and metabolic regulation[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(suppl\_2): S237-S245.
- [14] Shah R A, Kowdley K V. Current and potential treatments for primary biliary cholangitis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(3): 306-315.
- [15] Eggert T, Bakonyi D, Hummel W. Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid[J]. *J Biotechnol*, 2014, 191: 11-21.
- [16] Baron S F, Franklund C V, Hylemon P B. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for bile acid 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(15): 4558-4569.
- [17] Yoshimoto T, Higashi H, Kanatani A, et al. Cloning and sequencing of the 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the

- expressed enzyme[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(7): 2173-2179.
- [18] Coleman J P, Hudson L L, Adams M J. Characterization and regulation of the NADP-linked 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Clostridium sordellii*[J]. *J Bacteriol*, 1994, 176(16): 4865-4874.
- [19] Bennett M J, McKnight S L, Coleman J P. Cloning and characterization of the NAD-dependent 7alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Bacteroides fragilis*[J]. *Curr Microbiol*, 2003, 47(6): 475-484.
- [20] Ferrandi E E, Bertolesi G M, Polentini F, et al. In search of sustainable chemical processes: cloning, recombinant expression, and functional characterization of the 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases from *Clostridium absonum*[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2012, 95(5): 1221-1233.
- [21] Tang S J, Pan Y P, Lou D S, et al. Structural and functional characterization of a novel acidophilic 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase[J]. *Protein Sci*, 2019, 28(5): 910-919.
- [22] Ji S L, Pan Y P, Zhu L C, et al. A novel 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase: Magnesium ion significantly enhances its activity and thermostability[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 177: 111-118.
- [23] Lou D S, Cao Y Y, Duan H T, et al. Characterization of a novel thermostable 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase[J]. *Protein Pept Lett*, 2024, 31(2): 153-160.
- [24] Hirano S, Masuda N. Characterization of NADP-dependent 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenases from *Peptostreptococcus productus* and *Eubacterium aerofaciens*[J]. *Appl Environ Microb*, 1982, 43(5): 1057-1063.
- [25] Macdonald I A, White B A, Hylemon P B. Separation of 7 alpha- and 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities from *Clostridium absonum* ATCC# 27555 and cellular response of this organism to bile acid inducers[J]. *J Lipid Res*, 1983, 24(9): 1119-1126.
- [26] Akao T, Akao T, Kobashi K. Purification and characterization of 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus* sp. of human intestine[J]. *J Biochem*, 1987, 102(3): 613-619.
- [27] Edenharder R, Pfützner M, Hammann R. NADP-dependent 3 beta-, 7 alpha- and 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities from a lecithinase-lipase-negative *Clostridium* species 25.11. c[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 1002(1): 37-44.
- [28] Shiotsuki H, Maeda Y, Chijiwa K. Purification and characterization of 7beta-hydroxysteroid dehydrogenase from rabbit liver microsomes[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 91(3): 185-190.
- [29] Pedrini P, Andreotti E, Guerrini A, et al. Xanthomonas maltophilia CBS 897.97 as a source of new 7beta- and 7alpha-hydroxysteroid dehydrogenases and cholylglycine hydrolase: improved biotransformations of bile acids[J]. *Steroids*, 2006, 71(3): 189-198.
- [30] Liu L, Aigner A, Schmid R D. Identification, cloning, heterologous expression, and characterization of a NADPH-dependent 7 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Collinsella* aerofaciens[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2011, 90(1): 127-135.
- [31] Tonin F, Otten L G, Arends I W C E. NAD $^+$ -dependent enzymatic route for the epimerization of hydroxysteroids[J]. *Chemsuschem*, 2019, 12(13): 3192-3203.
- [32] Zhou Z R, Liu F, Li S, et al. A fungal P450 enzyme from *Fusarium equiseti* HG18 with 7 $\beta$ -hydroxylase activity in biosynthesis of ursodeoxycholic acid[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2024, 240: 106507.
- [33] Valachovič M, Hapala I. Biosynthetic approaches to squalene production: the case of yeast[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1494: 95-106.
- [34] Xu W, Ma X, Wang Y. Production of squalene by microbes: an update[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2016, 32(12): 195.
- [35] 高扬乐, 谢梦斯, 李力. 利用不同底盘细胞开展生物合成萜类化合物的研究进展[J]. 药物生物技术, 2022, 29(1): 95-101.
- [36] Wei X J, Pandohee J, Xu B J. Recent developments and emerging trends in dietary vitamin D sources and biological conversion[J]. *Crit Rev Food Sci*, 2024, 64 ( 28 ): 10121-10137.
- [37] Black L, Lucas R, Sherriff J, et al. In pursuit of vitamin D in plants[J]. *Nutrients*, 2017, 9(2): 136.
- [38] Bikle D D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications[J]. *Chem Biol*, 2014, 21(3): 319-329.
- [39] Avruch L, Fischer S, Pierce H, et al. The induced biosynthesis of 7-dehydrocholesterols in yeast: potential sources of new provitamin D3 analogs[J]. *Can J Biochem*, 1976, 54 ( 7 ): 657-665.
- [40] Lang C, Veen M. Preparation of 7-dehydrocholesterol and/or the biosynthetic intermediates and/or secondary products thereof in transgenic organisms: US, 20170198328[P]. 2017-07-13.
- [41] Rodríguez-García A, Fernández-Alegre E, Morales A, et al. Complete genome sequence of "Mycobacterium neoaurum" NRRL B-3805, an androstanedione (AD) producer for industrial biotransformation of sterols[J]. *J Biotechnol*, 2016, 224: 64-65.
- [42] Wang H W, Song S K, Peng F, et al. Whole-genome and enzymatic analyses of an androstanedione-producing *Mycobacterium* strain with residual phytosterol-degrading pathways[J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 187.
- [43] Huang B, Yang K, Amanze C, et al. Sequence and structure-guided discovery of a novel NADH-dependent 7 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase for efficient biosynthesis of ursodeoxycholic acid[J]. *Bioorg Chem*, 2023, 131: 106340.
- [44] Guo X J, Xiao W H, Wang Y, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 7-dehydrocholesterol overproduction[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 192.
- [45] 韩双艳, 郭勇. 酶工程[M]. 5 版. 北京: 中国科技出版传媒股份有限公司, 2024.
- [46] Huang B, Zhao Q, Zhou J H, et al. Enhanced activity and substrate tolerance of 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase by directed evolution for 7-ketolithocholic acid production[J]. *Appl*

- Microbiol Biot*, 2019, 103(6): 2665-2674.
- [47] Zheng M M, Chen K C, Wang R F, et al. Engineering 7 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase for enhanced ursodeoxycholic acid production by multiobjective directed evolution[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(6): 1178-1185.
- [48] Wang M Q, You Z N, Yang B Y, et al. Machine-learning-guided engineering of an NADH-dependent 7 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase for economic synthesis of ursodeoxycholic acid[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(49): 19672-19681.
- [49] Ding J J, You S P, Zhang J X, et al. Rational design of 1713-hydroxysteroid dehydrogenase type3 for improving testosterone production with an engineered *Pichia pastoris*[J]. *Bioresource Technol*, 2021, 341: 125833.
- [50] Kim K H, Lee C W, Pardhe B D, et al. Crystal structure of an apo 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase reveals key structural changes induced by substrate and co-factor binding[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2021, 212: 105945.
- [51] Savino S, Ferrandi E E, Forneris F, et al. Structural and biochemical insights into 7 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase stereoselectivity[J]. *Proteins*, 2016, 84(6): 859-865.
- [52] Grobe S, Badenhorst C P S, Bayer T, et al. Engineering regioselectivity of a P450 monooxygenase enables the synthesis of ursodeoxycholic acid via 7 $\beta$ -hydroxylation of lithocholic acid[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(2): 753-757.
- [53] Pan Y P, Zhu L C, Tan J, et al. Engineering the cofactor binding site of 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase for improvement of catalytic activity, thermostability, and alteration of substrate preference[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 258 ( Pt 1): 128847.
- [54] Volk M J, Tran V G, Tan S I, et al. Metabolic engineering: methodologies and applications[J]. *Chem Rev*, 2023, 123(9): 5521-5570.
- [55] Qu L S, Xiu X, Sun G Y, et al. Engineered yeast for efficient *de novo* synthesis of 7-dehydrocholesterol[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 119(5): 1278-1289.
- [56] Su W, Xiao W H, Wang Y, et al. Alleviating redox imbalance enhances 7-dehydrocholesterol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130840.
- [57] Xiu X, Xu X H, Wu Y K, et al. Hyperproduction of 7-dehydrocholesterol by rewiring the post-squalene module in lipid droplets of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metab Eng*, 2024, 86: 147-156.
- [58] Zhou X L, Zhang Y, Shen Y B, et al. Efficient repeated batch production of androstenedione using untreated cane molasses by *Mycobacterium neoaurum* driven by ATP futile cycle[J]. *Bioresource Technol*, 2020, 309: 123307.
- [59] Guo X J, Yao M D, Xiao W H, et al. Compartmentalized reconstitution of post-squalene pathway for 7-dehydrocholesterol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 663973.
- [60] Xiu X, Sun Y, Wu Y K, et al. Modular remodeling of sterol metabolism for overproduction of 7-dehydrocholesterol in engineered yeast[J]. *Bioresource Technol*, 2022, 360: 127572.
- [61] Bi K, Wang W G, Tang D D, et al. Engineering sub-organelles of a diploid *Saccharomyces cerevisiae* to enhance the production of 7-dehydrocholesterol[J]. *Metab Eng*, 2024, 84: 169-179.
- [62] Zhang X Y, Peng Y, 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*, 2013, 14(2): 132-143.
- [63] Arabi H, Yazdi M T, Faramarzi M A. Application of organic mono-phase and organic-aqueous two-liquid-phase systems in microalgal conversion of androst-4-en-3, 17-dione by *Nostoc muscorum*[J]. *Biocatal Biotransfor*, 2009, 27(3): 219-225.
- [64] Zhou X L, Zhang Y, Shen Y B, et al. Efficient production of androstenedione by repeated batch fermentation in waste cooking oil media through regulating NAD<sup>+</sup>/NADH ratio and strengthening cell vitality of *Mycobacterium neoaurum*[J]. *Bioresource Technol*, 2019, 279: 209-217.
- [65] Ke X, Pan Z H, Du H F, et al. Secretory production of 7-dehydrocholesterol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnol J*, 2023, 18(12): e2300056.
- [66] Shi J, Wang J, Yu L, et al. Rapidly directional biotransformation of tauroursodeoxycholic acid through engineered *Escherichia coli*[J]. *J Ind Microbiol Biotech*, 2017, 44(7): 1073-1082.
- [67] Xu Y P, Yang L, Zhao S J, et al. Large-scale production of tauroursodeoxycholic acid products through fermentation optimization of engineered *Escherichia coli* cell factory[J]. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 34.