DOI:10.12441/spyswjs.20230613001 [文章编号] 1673-1689(2025)01-0125-07

乳糖诱导重组大肠杆菌高效表达 3-甾酮-Δ^1-脱氢酶的研究

胡 青[1] 吕德强[1] 王 烨[1] 宋士奎[1] 苏正定[1,2*]

(1. 湖北工业大学生物与食品学院,湖北 武汉 430068; 2. 武汉艾默佳华生物科技有限公司,湖北 武汉 430027)

摘要:【目的】探索乳糖代替异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导3-甾酮-Δ^1-脱氢酶(KstD)在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) BL21(DE3)中高效表达的可行性。**【方法】**首先通过IPTG诱导获得大量高活性可溶性重组蛋白SZD-KstD,在摇瓶培养条件下对乳糖诱导表达参数进行了系统优化,随后在15 L发酵罐中开展了高密度发酵试验。重点考察了添加时间、乳糖诱导方式、诱导时间以及碳、氮源的补料工艺等关键工艺参数对重组蛋白SZD-KstD表达的影响。**【结果】**在终浓度为0.2 mmol/L的乳糖诱导下获得最大量的重组蛋白SZD-KstD和菌体量,由于乳糖同时可作为碳源被利用,采用3次分批添加乳糖的效果优于一次性添加。在乳糖诱导体系中重组蛋白SZD-KstD表达量可达39.58%,与常规IPTG诱导效果无明显差异。**【结论】**乳糖作为廉价、高效的诱导剂可以代替高价格的IPTG用于KstD的规模化发酵,为生物酶法制备甾体药物提供了一个新思路,同时也为其他重组蛋白的生产提供了借鉴。

关键词:重组大肠杆菌;3-甾酮-Δ^1-脱氢酶;乳糖诱导;高密度发酵

Lactose-induced Efficient Expression of 3-Ketosteroid-Δ^1-Dehydrogenase in Recombinant *Escherichia coli*

HU Qing[1] *LYU Deqiang*[1] *WANG Ye*[1] *SONG Shikui*[1] *SU Zhengding*[1,2*]

(1. College of Biology and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China; 2. Wuhan Amersino Biodevelop Inc., Wuhan 430027, China)

Abstract: [**Objective**] To investigate the feasibility of substituting lactose for isopropyl-*β*-*D*-1-thiogalactopyranoside (IPTG) in inducing efficient expression of 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase (KstD) in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3). [**Method**] Upon the established IPTG-induced protocol for obtaining high yields of soluble and catalytically active recombinant protein SZD-KstD, the lactose induction parameters under shake-flask culture conditions were optimized. Subsequently, high-density fermentation was conducted in a 15 L bioreactor. Critical process parameters influencing expression of the recombinant protein SZD-KstD were evaluated, including addition time, lactose induction method, induction duration, and carbon/nitrogen feeding protocols. [**Result**] The maximum amounts of SZD-KstD and bacteria were obtained under the induction with lactose at the final concentration of 0.2 mmol/L. Since lactose can be used as a carbon source at the same time, adding lactose in three batches outperformed adding it in one batch. Under lactose induction conditions, SZD-KstD accounted for 39.58% of total soluble protein content, which was not significantly different from that under IPTG induction. [**Conclusion**] Lactose, as a cheap and efficient inducer, can replace IPTG for the large-scale fermentation of KstD, which solves a major problem for the

通信作者:苏正定(1965—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事细胞信号传导机制和结构生物学、糖尿病和癌症靶向药物设计及甾体生物转化新技术研究。Email:zhengdingsu@hbut.edu.cn

收稿日期:2023-06-13 **修回日期:**2023-08-20

preparation of steroid drugs by bioenzyme method and provides a reference for the production of other recombinant proteins.

Keywords: recombinant *Escherichia coli*; 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase; lactose induction; high-density fermentation

甾体药物是临床上除抗生素之外的第二大类重要药物[1-2]，尤其是甾核A环C-1，2位发生脱氢反应形成双键结构时，药物抗炎效能呈现数量级提升。以醋酸脱氢可的松为典型代表，通过C-1，2位脱氢反应对醋酸可的松进行结构修饰，其抗炎活性较前体化合物提高约3倍，并且减少了水钠潴留等副作用[3-4]。KstD是分枝杆菌降解甾醇途径中的关键酶之一[5]，可特异性地催化3-甾酮类固醇母核A环的C-1，2位脱氢生成碳碳双键（C═C）[6-8]，其在类固醇分解代谢中的重要作用引起了较多关注[9-10]，例如，4-雄烯-3，17-二酮（AD）在KstD的催化下生成1，4-雄甾二烯-3，17-二酮（ADD）[11-12]（见图1）。但是KstD属于细胞膜结合蛋白，表达量低、可溶性差、不稳定，从而限制了KstD的规模化应用[13]。作者所在团队前期通过构建pET28b（+）重组蛋白表达系统，成功筛选出具有工业化应用前景的KstD高产工程菌株。尽管IPTG因其高效诱导特性被广泛应用于实验室规模的重组蛋白表达，但其成本过高及对宿主细胞的生长抑制效应严重制约了产业化应用。国内外已有用乳糖成功替代IPTG发酵的报道[14-17]，乳糖作为天然双糖诱导剂，不仅具备良好的生物相容性和经济性，还可通过β-半乳糖苷酶介导的代谢途径生成有效诱导剂——异乳糖[18-19]，因此乳糖是最有可能替代IPTG的诱导剂。相较于IPTG不可逆的持续诱导机制，乳糖的动态诱导模式更适于工业发酵过程的精确调控，乳糖替代策略在规模化生产中具有可行性，可作为降低重组蛋白生产成本的重要技术路径[20]。

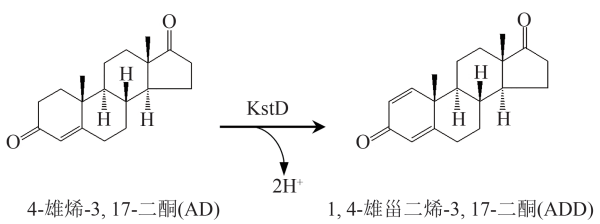


图1 KstD催化AD合成ADD

Fig. 1 KstD catalyzes synthesis of ADD from AD

作者所在课题组前期已完成*Mycobacterium neoaurum* HGMS2.中有关KstD的基因在大肠杆菌表达载体上的异源表达，在KstD（相对分子质量63 200）的N-端或C-端融合高溶解性SZD，从而形成可溶性的融合蛋白SZD-KstD（相对分子质量102 000），成功构建了表达可溶性重组蛋白SZD-KstD的大肠杆菌[21-22]，这株菌接近于工业生产菌株*Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805。作者在IPTG诱导获得大量高活性可溶性重组蛋白SZD-KstD的基础上，摸索了用廉价乳糖代替IPTG诱导重组蛋白的发酵工艺，包括对添加时间、乳糖诱导方式、诱导时间和碳、氮补料工艺等关键因素进行分析比较，确定了最佳的发酵工艺参数，为KstD的规模化发酵和其他基因工程重组蛋白的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酵母粉、蛋白胨：OXOID公司；IPTG、卡那霉素：SIGMA公司；乳糖、卡那抗生素、泡敌、2，6-二氯酚靛酚（DCPIP）、吩嗪硫酸甲酯（PMS）、AD和ADD的标准样品：湖北共同生物科技有限公司；甲醇、氯化钠、Tris-base、甘油、乳糖、氢氧化钠等其他化学试剂：国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

卧式摇床：RS-232型，上海智城分析仪器制造有限公司；高效液相色谱仪：1525EF型，美国Waters公司；分光光度计：NanoDrop2000C型，美国Thermo Fisher Scientific公司；高速冷冻离心机：LYNX 6000型，美国Thermo Fisher Scientific公司；超声波破碎仪：JY92-IIN型，宁波新芝生物科技有限公司；高压均质机：AH-1500型，安拓思纳米技术（苏州）有限公司。

1.3 培养基

LB固体平板培养基：蛋白胨10 g/L、酵母粉5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂粉20 g/L、卡那霉素0.2 g/L，pH 7.0；LB液体培养基：蛋白胨10 g/L、酵母粉

5 g/L、NaCl 10 g/L，pH 7.0；2-YT液体培养基：蛋白胨16 g/L、酵母粉10 g/L、NaCl 5 g/L，pH 7.0；改良的2-YT液体培养基：蛋白胨16 g/L、酵母粉10 g/L、NaCl 5 g/L、甘油4 g/L、KH_2PO_4 17 mmol/L、K_2HPO_4 72 mmol/L，pH 7.0；改良的TB液体培养基：蛋白胨12 g/L、酵母粉24 g/L、甘油4 g/L、KH_2PO_4 17 mmol/L、K_2HPO_4 72 mmol/L，pH 7.0；发酵培养基：蛋白胨12 g/L、酵母粉24 g/L、甘油4 g/L、NaCl 5 g/L、NH_4Cl 4 g/L、$NaHPO_4$ 6 g/L、KH_2PO_4 4 g/L、$MgSO_4$ 1.6 g/L、消泡剂0.2 mL，pH 7.0；乳糖诱导液：乳糖35 g/L；补料液：甘油400 g/L、酵母粉50 g/L。

1.4　方法

1.4.1　生物量及表达量分析

生物量分析：取适量发酵液，按一定倍数稀释后在600 nm波长下检测其吸光度，吸光度控制在0.2~0.4。用吸光度×稀释倍数得到OD_{600}值，用OD_{600}值表征生物量。细胞质量分析：取适量发酵液，于10 000 r/min离心20 min，弃去上清液后所得菌体质量即为细胞质量（以湿菌质量计）。将培养结束后的发酵液破碎离心并收集破碎液，经过变性预处理后进行SDS-PAGE分离检测，用软件分析表达的重组蛋白SZD-KstD在总蛋白质中的占比，记为重组蛋白SZD-KstD的表达量。

1.4.2　重组蛋白SZD-KstD制备及酶活性测定

将构建好的重组菌接种于3 mL含卡那霉素的LB培养基中，置于37 ℃振荡培养10~12 h，然后按接种体积分数5%转接于50 mL含卡那霉素的LB培养基中，37 ℃振荡培养至OD_{600}值为0.8，加入0.5 mmol/L的IPTG溶液，23 ℃诱导18 h后收集菌体，在4 ℃以12 000 r/min离心10 min，将菌体用pH 8.0的Tris-HCl缓冲液清洗3次，最后用5 mL缓冲液重悬菌体。利用超声破碎仪对菌体进行破碎处理，在4 ℃以12 000 r/min离心30 min，收集的上清液即为粗酶液。

SZD-KstD酶活性测定参考文献[21]。1 mL的反应体系包括：1.5 mmol/L PMS、40 μmol/L DCPIP、250 mmol/L底物AD（溶于甲醇）、50 mmol/L Tris-HCl缓冲液（pH 7.0）、KstD酶液。在30 ℃、波长600 nm下检测吸光度的变化得出相应的DCPIP还原量。酶活性测定标准：在标准反应条件下（pH 7.0，30 ℃），将每分钟催化还原1 μmol DCPIP所需的酶量定义为1个酶活力单位（U）。

1.4.3　摇瓶乳糖诱导条件优化

为验证乳糖替代IPTG作为诱导剂的可行性，首先在摇瓶中分别用0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L的乳糖诱导KstD表达并与IPTG比较，确定最佳的乳糖诱导浓度；然后对乳糖诱导的温度以及时间进行筛选，以确定最佳的乳糖诱导温度和时间。在细胞培养期间进行取样并检测波长600 nm处的OD值。当OD_{600}值为1.0~1.5时，降温并添加乳糖进行诱导直至培养结束。离心收集大肠杆菌细胞沉淀，高压均质破碎后，采用8 g/dL的SDS-PAGE蛋白胶，通过SDS-PAGE对重组蛋白SZD-KstD的表达情况进行分析。

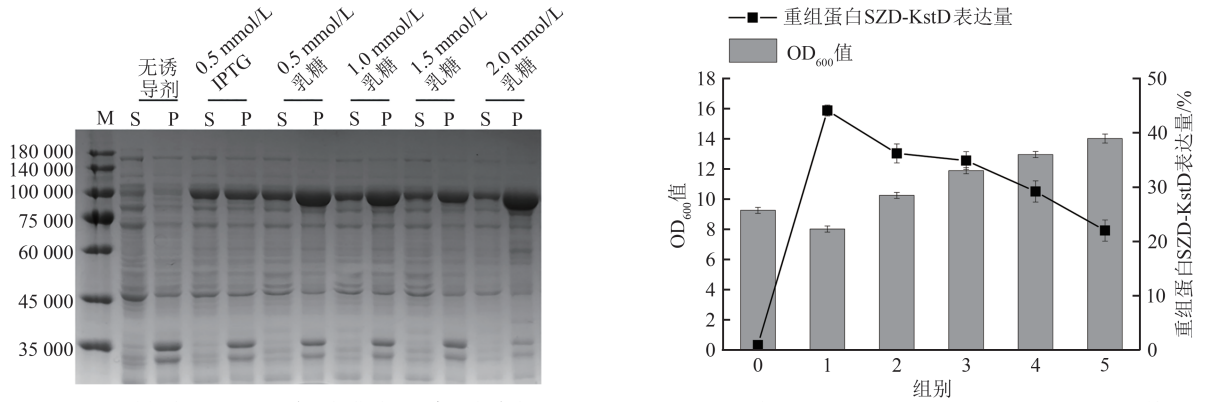
1.4.4　15 L发酵罐分批补料发酵

将单菌落接种于100 μL LB培养基（含抗生素）中，37 ℃下200 r/min振荡培养5~8 h，转接至3 mL的LB培养基（含抗生素）中过夜培养。继续进行扩大培养，以体积分数5%接种到500 mL的2-YT培养基（含抗生素）中培养8 h，制备成种子液。以体积分数5%接种到15 L发酵罐中，用体积分数40%的NaOH溶液调节发酵培养基的pH至7.2，灭菌后以接种体积分数5%加入发酵培养基中。通气量1.5 L/min，转速600 r/min，通过补料液的加入维持溶氧率在30%左右，当补料时间为10 h左右或OD_{600}值为25~30时开始降温，添加诱导液使重组蛋白SZD-KstD表达，直至发酵结束。

2　结果与讨论

2.1　摇瓶中乳糖最佳诱导浓度的确定

重组菌分别在0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L的乳糖中于25 ℃诱导10 h，以0.5 mmol/L的IPTG为对照，测定重组蛋白SZD-KstD表达情况。如图2（a）所示，在乳糖诱导下均有重组蛋白SZD-KstD表达，且表达量随着乳糖浓度的增加逐渐增大，同时生物量也有增加趋势。在1.0 mmol/L乳糖诱导下，重组蛋白SZD-KstD表达量达到最高，为41.54%，见图2（b）。因乳糖进入细胞是主动运输过程，需要系列酶的参与，故在工程菌生长至OD_{600}值为1.0~1.5且在生物量较大时加入乳糖诱导剂，以期实现重组蛋白SZD-KstD的高效表达，有利于基因重组蛋白的规模化生产。



M—蛋白质marker；S—大肠杆菌破胞后离心上清液；P—大肠杆菌破胞沉淀。

(a) 不同浓度乳糖诱导重组蛋白SZD-KstD表达的SDS-PAGE分析

0—无诱导；1—0.5 mmol/L IPTG；2—0.5 mmol/L乳糖；3—1.0 mmol/L乳糖；4—1.5 mmol/L乳糖；5—2.0 mmol/L乳糖。

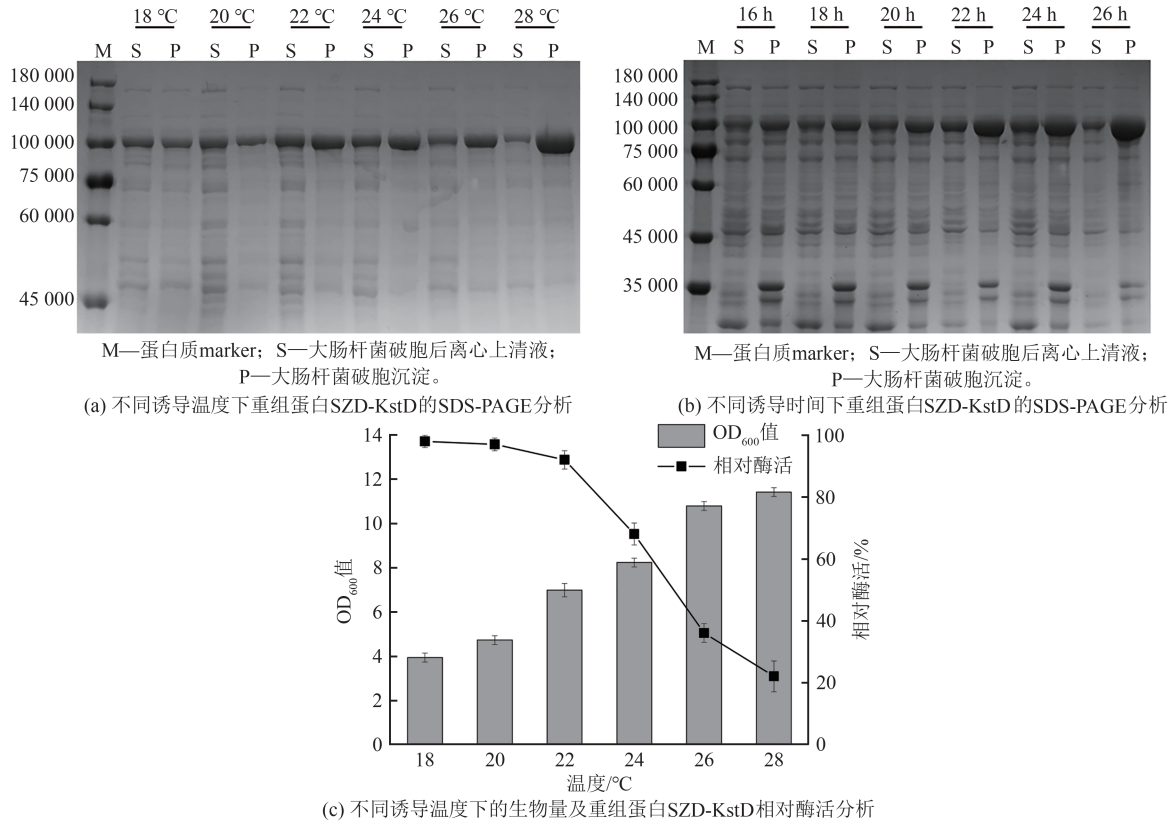
(b) 不同浓度乳糖诱导下的生物量及重组蛋白SZD-KstD表达量

图 2　摇瓶中乳糖浓度对重组蛋白 SZD-KstD 表达的影响

Fig. 2　Effect of lactose concentration in the shake flask on the expression of recombinant protein SZD-KstD

2.2　乳糖最佳诱导浓度下诱导温度、时间对重组蛋白 SZD-KstD 表达的影响

利用 SDS-PAGE 分析诱导温度、时间对重组蛋白 SZD-KstD 表达的影响。诱导温度为 18、20、22 ℃时，主要表达可溶性的重组蛋白 SZD-KstD；随着诱导温度的升高，重组蛋白 SZD-KstD 总表达量逐渐增大，但破胞后离心上清液中可溶性的重组蛋白 SZD-KstD 占比越来越小；当诱导温度为 28 ℃时，所表达的重组蛋白 SZD-KstD 几乎全部以包涵体的形式出现在沉淀中，见图 3(a)。在诱导时间为 18~20 h 时，出现最高的重组蛋白 SZD-KstD 表达量，且可溶性重组蛋白 SZD-KstD 占主要部分，诱导时间过长或过短均会使可溶性重组蛋白 SZD-KstD 表达量降低，见图 3(b)。如图 3(c)所



M—蛋白质marker；S—大肠杆菌破胞后离心上清液；P—大肠杆菌破胞沉淀。

(a) 不同诱导温度下重组蛋白SZD-KstD的SDS-PAGE分析

(b) 不同诱导时间下重组蛋白SZD-KstD的SDS-PAGE分析

(c) 不同诱导温度下的生物量及重组蛋白SZD-KstD相对酶活分析

图 3　乳糖诱导温度及时间对生物量及重组蛋白 SZD-KstD 表达的影响

Fig. 3　Effects of lactose induction temperature and duration on the biomass and expression of recombinant protein SZD-KstD

示，在最优的诱导时间内，18 ℃诱导表达的重组蛋白SZD-KstD相对酶活最高，但因为低温下菌体生长缓慢，所获得的菌体生物量较小；28 ℃诱导可获得较高的生物量，但重组蛋白SZD-KstD相对酶活较低。考虑到酶活性和生物量两者的平衡，在最佳温度22 ℃下进行诱导既可以获得高活性的重组蛋白SZD-KstD，又能得到较高的生物量。

2.3　15 L发酵罐中乳糖添加时间的确定

因重组蛋白SZD-KstD是在低温下诱导表达，过早添加诱导剂势必会影响生物量的增加，过晚添加又会影响重组蛋白SZD-KstD表达，选择合适的添加时间尤其重要，在保证获得高生物量的同时，也可以使重组蛋白SZD-KstD高效表达。如图4所示，在补料2~10 h时，生物量持续增加，在8~10 h达到最大增长速率，菌体处于对数生长中期，补料10 h后菌体增长的速度开始变缓，说明菌体进入对数生长后期。在补料2~10 h时添加诱导剂，均可获得较高活性的重组蛋白SZD-KstD，但随着补料时间延长，重组蛋白SZD-KstD的相对酶活逐渐降低，可能是由于菌体老化，表达能力降低导致。补料时间在10 h左右为最佳的诱导剂添加时间，所获得的重组蛋白SZD-KstD相对酶活高达91%，重组菌的OD_{600}值达到了60左右。

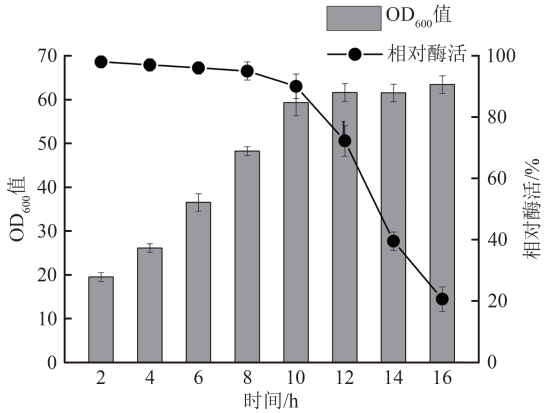
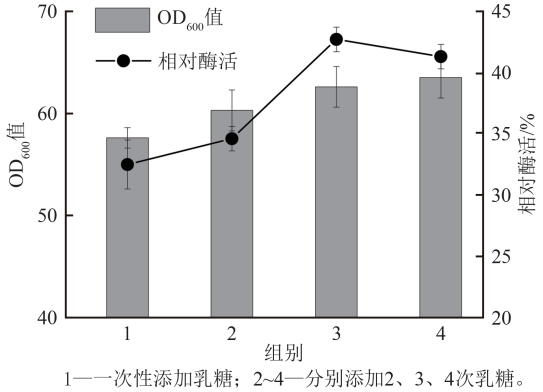


图4　不同乳糖添加时间下的生物量及重组蛋白SZD-KstD相对酶活分析

Fig. 4　Biomass and relative enzymatic activity of recombinant protein SZD-KstD at different lactose addition times

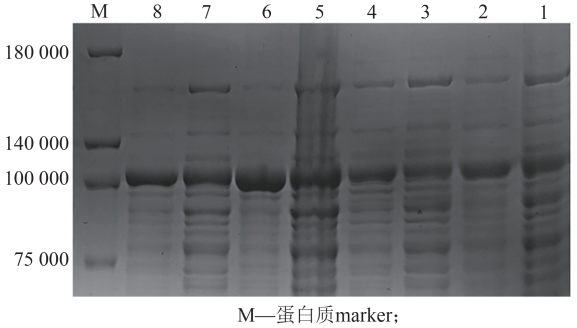
2.4　乳糖诱导方式对重组蛋白SZD-KstD表达的影响

考虑到乳糖可作为碳源被消耗利用，作者进一步考察了乳糖诱导方式对重组蛋白SZD-KstD表达的影响。一次性添加乳糖进行诱导的发酵结果显示，高浓度的乳糖会给菌体带来较大的负荷，影响重组蛋白SZD-KstD的正常表达。相比于一次性添加乳糖进行诱导，分3次添加乳糖的诱导效果更好，可能是乳糖的添加和消耗达到了平衡，且减轻了高浓度乳糖对菌体带来的负荷，使乳糖起到了可持续诱导的效果，见图5(a)。SDS-PAGE分析表明，一次性添加乳糖诱导表达的重组蛋白SZD-KstD总量较低，多次添加乳糖诱导表达的重组蛋白SZD-KstD总量随着添加次数的增加越来越多，见图5(b)。



1—一次性添加乳糖；2~4—分别添加2、3、4次乳糖。

(a) 不同诱导方式下的生物量及重组蛋白SZD-KstD相对酶活分析



M—蛋白质marker；

1~2—一次性添加乳糖诱导重组大肠杆菌破胞后离心上清液和沉淀；

3~4—2次添加乳糖诱导重组大肠杆菌破胞后离心上清液和沉淀；

5~6—3次添加乳糖诱导重组大肠杆菌破胞后离心上清液和沉淀；

7~8—4次添加乳糖诱导重组大肠杆菌破胞后离心上清液和沉淀。

(b) 不同诱导方式下重组蛋白SZD-KstD的SDS-PAGE分析

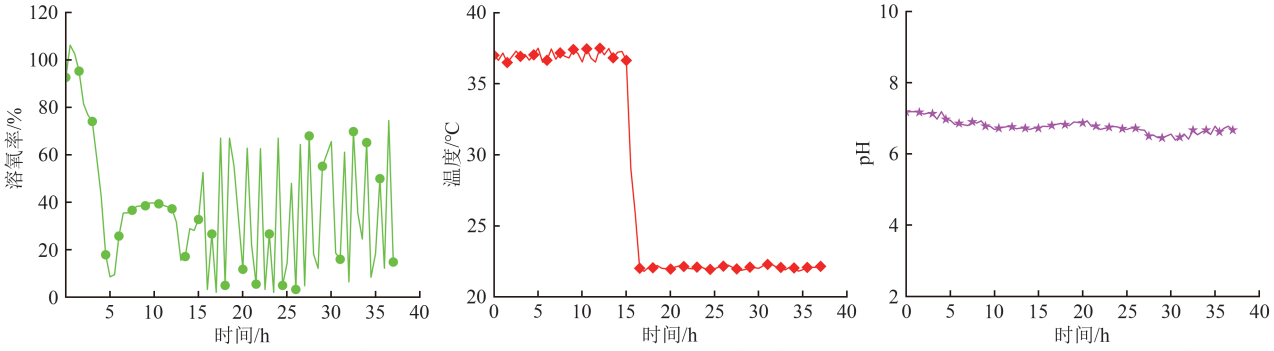
图5　15 L发酵罐中诱导方式对生物量及重组蛋白SZD-KstD表达的影响

Fig. 5　Effect of induction method on the biomass and expression of recombinant protein SZD-KstD in a 15 L bioreactor

2.5　优化后的溶氧动态反馈分批补料发酵

通过前期对发酵培养基、补料培养基、乳糖诱导参数等条件的优化，确定在改良的TB培养基中可以获得较高的生物量以及高活性的重组蛋白

SZD-KstD。基于上述研究，建立了 15 L 发酵罐的精密控制工艺：发酵全程在 600 r/min 条件下培养，采用溶氧动态反馈分批补料策略发酵，当溶氧率出现特征性回升拐点时启动营养补加程序，并通过实时调节补料速率将溶氧率维持在 20%~30%。菌体诱导前的生长阶段，温度控制在 37 ℃，当补料时间在 10 h 左右时，温度由 37 ℃降到 23 ℃后，约 16 h 时第一次补加乳糖诱导液，之后每隔 5 h 补加一次诱导液，分 3 次补加完毕，使乳糖终质量浓度为 35 g/L。在整个发酵过程中，pH 没有较大的变化（见图 6）。优化后所得细胞质量浓度为 81.6 g/L（以湿菌质量计），比摇瓶培养提升了近 10 倍，该研究为酶法合成甾体药物关键中间体的工业化生产奠定了技术基础。



(a) 工程菌发酵过程中溶氧率的变化　(b) 工程菌发酵过程中温度的变化　(c) 工程菌发酵过程中pH的变化

图 6　重组工程菌株溶氧动态反馈分批补料发酵的动态监测

Fig. 6　Real-time monitoring of dissolved oxygen dynamic feedback-controlled fed-batch fermentation with the recombinant strain

3　结论

作者利用乳糖作为诱导剂替代 IPTG，达到了和 IPTG 相近的诱导效果，通过系统优化诱导参数显著促进了可溶性重组蛋白 SZD-KstD 的表达，并在 15 L 发酵体系中建立了基于溶氧动态监测的分批补料控制体系，实现了发酵过程的精准调控。通过多次补加乳糖的策略，确定了分 3 次补加终质量浓度为 35 g/L 乳糖的诱导方式，并在诱导温度 22 ℃下进行分批补料发酵，重组蛋白 SZD-KstD 的酶活性高达 52.69×10^3 U/L，获得细胞质量浓度达到 80 g/L 以上，比摇瓶培养提升了近 10 倍。通过优化建立了规模化生产高活性重组蛋白 SZD-KstD 的高密度发酵工艺，解决了生物酶法制备 C1,2 位脱氢甾体药物的一个重大难题，为甾体药物行业提供了一种更有前景的生物转化方法。

参考文献

[1] DONOVA M V, EGOROVA O V. Microbial steroid transformations: current state and prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(6): 1423-1447.

[2] FERNÁNDEZ-CABEZÓN L, GALÁN B, GARCÍA J L. New insights on steroid biotechnology[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 958.

[3] ZHANG H T, TIAN Y, WANG J L, et al. Construction of engineered *Arthrobacter simplex* with improved performance for cortisone acetate biotransformation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(21): 9503-9514.

[4] SONG B, ZHOU Q, XUE H J, et al. IrrE improves organic solvent tolerance and Δ^1-dehydrogenation productivity of *Arthrobacter simplex*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(20): 5210-5220.

[5] GUEVARA G, FERNÁNDEZ H L, PERERA J, et al. Functional differentiation of 3-ketosteroid Δ^1-dehydrogenase isozymes in *Rhodococcus ruber* strain Chol-4[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 42.

[6] CHOI K P, MOLNÁR I, YAMASHITA M, et al. Purification and characterization of the 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase of *Arthrobacter simplex* produced in *Streptomyces lividans*[J]. Journal of Biochemistry, 1995, 117(5): 1043-1049.

[7] DONOVA M V. Transformation of steroids by Actinobacteria: a review[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2007, 43(1): 1-14.

[8] 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]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2017, 92(2): 350-357.

[9] WANG X J, FENG J H, ZHANG D L, et al. Characterization of new recombinant 3-ketosteroid-Δ^1-

dehydrogenases for the biotransformation of steroids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(15): 6049-6060.

[10] LUO J M, CUI H L, JIA H C, et al. Identification, biological characteristics, and active site residues of 3-ketosteroid Δ^1-dehydrogenase homologues from *Arthrobacter simplex*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(35): 9496-9512.

[11] ZHANG R J, XU X X, CAO H J, et al. Purification, characterization, and application of a high activity 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* DSM 1381[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(16): 6605-6616.

[12] MAO S H, WANG J W, LIU F F, et al. Engineering of 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase based site-directed saturation mutagenesis for efficient biotransformation of steroidal substrates[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 141.

[13] ROHMAN A, DIJKSTRA B W. The role and mechanism of microbial 3-ketosteroid Δ^1-dehydrogenases in steroid breakdown[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 191: 105366.

[14] WOYSKI D, CUPP-VICKERY J R. Enhanced expression of cytochrome P450s from *lac*-based plasmids using lactose as the inducer[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 388(2): 276-280.

[15] 陈亮，任随周，许玫英，等. 乳糖替代IPTG诱导脱色酶*TpmD*基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 微生物学通报，2009，36(4)：551-556.
CHEN L, REN S Z, XU M Y, et al. Over-expression of highly active triphenylmethane dyes decolorization enzyme (*TpmD*) induced by lactose instead of IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. Microbiology, 2009, 36(4): 551-556.(in Chinese)

[16] 丁岚，侯晓彦，王小红，等. 乳糖诱导葡萄球菌肠毒素A基因在大肠杆菌中的表达[J]. 食品与生物技术学报，2011，30(2)：255-260.
DING L, HOU X Y, WANG X H, et al. Lactose-induced expression of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(2): 255-260.(in Chinese)

[17] KWEON D H, HAN N S, PARK K M, et al. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(6): 537-542.

[18] JOBE A, BOURGEOIS S. *Lac* repressor-operator interaction: VI. the natural inducer of the *lac* operon [J]. Journal of Molecular Biology, 1972, 69(3): 397-408.

[19] 李春丽，陈其新，何国庆. 乳糖诱导植物甜蛋白*des*-pGlu1-Brazzein在大肠杆菌中的表达[J]. 生物工程学报，2006，22(6)：1021-1025.
LI C L, CHEN Q X, HE G Q. The influences of lactose as an inducer on expression of plant *des*-pGlu1-brazzein in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(6): 1021-1025.(in Chinese)

[20] KIM M, ELVIN C, BROWNLEE A, et al. High yield expression of recombinant pro-resilin: lactose-induced fermentation in *E. coli* and facile purification[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 52(1): 230-236.

[21] WANG H W, SONG S K, PENG F, et al. Whole-genome and enzymatic analyses of an androstenedione-producing *Mycobacterium* strain with residual phytosterol-degrading pathways[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 187.

[22] LI X, CHEN T, PENG F, et al. Efficient conversion of phytosterols into 4-androstene-3, 17-dione and its C1, 2-dehydrogenized and 9α-hydroxylated derivatives by engineered *Mycobacteria*[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 158.

（责任编辑：史润东东）