DOI:10.12441/spyswjs.20231202003 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0054-09

3-甾酮-9α-羟基化酶的C-1,2位脱氢和C-9位羟基化双重特性的研究

吕德强[1] 马倩倩[1] 胡 青[1] 董新林[1] 何建新[1] 苏正定[1] 宋士奎[2*]

(1. 湖北工业大学生物工程与食品学院,湖北 武汉 430068; 2. 新疆师范大学生命科学学院,新疆 乌鲁木齐 830017)

摘要:【目的】验证来自新金分枝杆菌(*Mycobacterium neoaurum*) NRRL B-3805的3-甾酮-9α-羟基化酶(KSH)是否具有C-9位羟基化和C-1,2位脱氢功能。**【方法】**将*ksh*基因中的加氧酶组分*kshA395*和还原酶组分*kshB122*分别在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) BL21(DE3)中进行异源表达,以4-雄烯-3,17-二酮(4-AD)为底物,分别用KshA395、KshB122以及两者等比例混合对其进行酶催化反应。通过对反应体系优化构建pET28a-*kshB-kshA*等融合质粒,对KSH的双组分酶进行共表达,并以4-AD为底物进行酶催化反应。**【结果】**KshA395和KshB122均对4-AD表现出脱氢功能,产物为1,4-雄二烯-3,17-二酮(ADD),未出现羟基化作用;等比例混合的KSH双组分酶在催化4-AD过程中,前期表现出强烈的C-9位羟基化作用,后期羟基化功能关闭,转为C-1,2位脱氢功能。KSH的双组分融合蛋白,包括KshB122-MBP-KshA395、MBP-KshB122-MBP-KshA395、MBP-KshB122-KshA395,在催化4-AD前期表现出C-9位羟基化作用,后期转变为C-1,2位脱氢作用;而KshB122-KshA395仅表现出C-1,2位脱氢作用,未表现出羟基化作用。**【结论】**在甾醇降解途径中,KSH可以同时承担羟基化及脱氢功能,且先在C-9位羟基化,随后在C-1,2位脱氢,导致甾醇母核B环打开。

关键词:3-甾酮-9α-羟基化酶;C-1,2位脱氢;C-9位羟基化;4-雄烯-3,17-二酮;3-羟基-9,10-断裂雄甾-1,3,5(10)-三烯-9,17-二酮

Dehydrogenation at C-1,2 and Hydroxylation at C-9 by 3-Ketosteroid-9α-hydroxylase

LYU Deqiang[1] *MA Qianqian*[1] *HU Qing*[1] *DONG Xinlin*[1] *HE Jianxin*[1]
SU Zhengding[1] *SONG Shikui*[2*]

(1. School of Biological Engineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China; 2. School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830017, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of the study is to verify the roles of 3-ketosteroid-9α-hydroxylase (KSH) from *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805 in hydroxylation at C-9 and dehydrogenation at C-1, 2. [**Method**] The oxygenase component *kshA395* and the reductase component *kshB122* from *ksh* were heterologously expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3) respectively. With 4-androstene-3, 17-dione (4-AD) as substrate, the enzyme-catalyzed reactions were carried out with KshA395, KshB122, and mixture of KshA395 and KshB122 in a ratio of 1∶1. Furthermore, the reaction system was optimized, and fusion plasmids such as pET28a-*kshB-kshA* were constructed for co-expression of the two-component enzyme of KSH. In addition, the enzyme-catalyzed reaction was performed with 4-AD as the substrate. [**Result**] Both KshA395 and KshB122 showed dehydrogenation on 4-AD, and the product was 1, 4-androstene-3, 17-dione (ADD), with no hydroxylation. The two-component enzyme of KSH,

通信作者:宋士奎(1990—),男,博士,讲师,主要从事通过微生物代谢工程、酶工程和合成生物学用于生物制药工艺的研究。E-mail:songshikui036@gmail.com

收稿日期:2023-12-02 **修回日期:**2024-02-26

which was mixed in a ratio of 1∶1, showed strong hydroxylation at C-9 in phase 1 of the reaction. In phase 2, hydroxylation was shut down, and dehydrogenation at C-1,2 of 4-AD was turned on. The fusion proteins of KSH, such as KshB122-MBP-KshA395, MBP-KshB122-MBP-KshA395, and MBP-KshB122-KshA395, showed hydroxylation at C-9 in phase 1 and dehydrogenation at C-1,2 in phase 2 of the reaction. Nevertheless, KshB122-KshA395 showed only dehydrogenation at C-1,2 and no hydroxylation. [**Conclusion**] In the sterol degradation pathway, KSH can play a role in both hydroxylation and dehydrogenation. It first plays a role in hydroxylation at C-9 and then dehydrogenation at C-1,2, which leads to the degradation of the ring-B in steroids.

Keywords: 3-ketosteroid-9α-hydroxylase; dehydrogenation at C-1,2; hydroxylation at C-9; 4-androstene-3,17-dione; 3-hydroxy-9,10-seconandrost-1,3,5(10)-triene-9,17-dione

9-羟基-4-雄烯-3,17-二酮(9-OH-AD)和ADD是合成β-美松、地塞米松等甾体激素药物的重要中间体[1]。目前工业上生产9-OH-AD和ADD主要采用微生物转化法[2],4-AD是它们的共同前体。KSH是微生物代谢途径中4-AD生物转化为9-OH-AD的关键酶,广泛存在于分枝杆菌、诺卡氏菌、红球菌等微生物中[3-4]。KSH可以在甾体B环的C-9位上引入一个羟基[5],由末端加氧酶(KshA)和铁氧还蛋白还原酶(KshB)组成。其中KshB负责将电子传递给KshA的铁硫簇中心,然后在O_2的参与下以KshA为底物引入羟基,羟基化反应伴随着NADH氧化成NAD^+过程[6-8]。而4-AD生物转化为ADD的关键酶是3-甾酮-Δ^1-脱氢酶(KstD),它是一种黄素蛋白依赖型脱氢酶,能在黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的参与下消除甾核A环C-1,2位的2个氢原子形成双键[9]。KstD广泛存在于分枝杆菌、简单节杆菌和红球菌等微生物体内。

在微生物降解甾醇途径中,KSH在甾醇多环结构中引入9α-羟基,与KstD在C-1,2位脱氢过程结合[10]生成不稳定的9-羟基-1,4-雄二烯-3,17-二酮(9-OH-ADD)[11]。由于分子势能过高,9-OH-ADD母核B环上C-9与C-10之间的键断裂,异构为3-羟基-9,10-断裂雄甾-1,3,5(10)-三烯-9,17-二酮(3-HSA)[12-13],见图1。

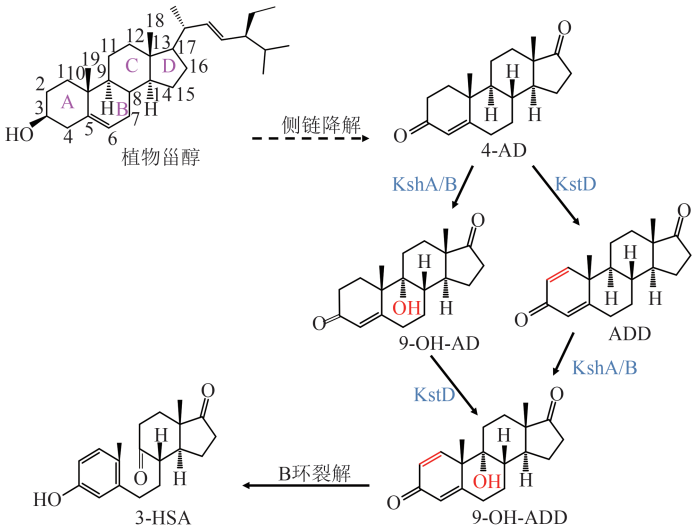


图1　植物甾醇的开环机制

Fig. 1　Ring-opening mechanism of phytosterols

新金分枝杆菌NRRL B-3805能够摄取植物甾醇,降解侧链基团并积累4-AD[14-17]。研究发现,在NRRL B-3805发酵植物甾醇的过程中,KstD的C-1,2位脱氢活性会影响产物9-OH-AD的积累,产生副产物ADD[18-19]。作者所在课题组在前期研究中敲除了新金分枝杆菌NRRL B-3805中的*kstd*基因,并以植物甾醇为底物进行发酵,发现仍可产生少量的ADD,因此推测KSH可能具有C-1,2位脱氢功能。作者将分枝杆菌的*ksh*基因*kshA395*和*kshB122*提取出来,并在大肠杆菌中异

源表达，构建 *kshA395* 和 *kshB122* 共表达质粒并导入大肠杆菌进行表达。选择合适的助溶剂及电子受体优化酶反应体系，在转化效率最佳的条件下，用 KSH 重组蛋白催化 4-AD，同时以催化 ADD 为对照，检测产物是否存在 3-HSA。该研究可作为微生物代谢降解甾醇途径的补充，为相关甾体药物中间体的生物合成提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

菌株和质粒信息见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株/质粒		描述	来源
菌株	*E. coli* BL21（DE3）	用于试验所需酶的表达	作者所在实验室
质粒	pET28a-*kshA395*	携带 *kshA395* 的 pET28a 质粒	作者所在实验室
	pET28a-*kshB122*	携带 *kshB122* 的 pET28a 质粒	作者所在实验室
	pET28a-MBP-*kshA395*	携带 MBP-*kshA395* 的 pET28a 质粒	作者所在实验室
	pET28a-MBP-*kshB122*	携带 MBP-*kshB122* 的 pET28a 质粒	作者所在实验室
	pET28a-MBP-*kshB122*-MBP-*kshA395*	携带 MBP-*kshB122*-MBP-*kshA395* 的 pET28a 质粒	作者所在实验室
	pET28a-MBP-*kshB122-KkshA395*	携带 MBP-*kshB122-kshA395* 的 pET28a 质粒	作者所在实验室
	pET28a-*kshB122*-MBP-*kshA395*	携带 *kshB122*-MBP-*kshA395* 的 pET28a 质粒	作者所在实验室
	pET28a-*kshB122-kshA395*	携带 *kshB122-kshA395* 的 pET28a 质粒	作者所在实验室

1.2 试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶：日本宝生物工程株式会社；质粒提取试剂盒、核酸片段纯化试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；DNA 引物：武汉天一华煜基因科技有限公司；蛋白胨、酵母粉：英国奥科赛德公司；乙酸乙酯、吐温-80、甘油、异丙醇、环糊精、原型辅酶I（NADH）、吩嗪硫酸甲酯（PMS）：中国医药集团有限公司；卡那霉素、Tris-HCl：上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.3 仪器与设备

高速落地离心机：Sorvall LYNX 6000 型，美国 Thermo Fisher 科技公司；台式高速离心机：Micro17 型，美国 Thermo Fisher 科技公司；微量分光光度计：NanoDrop 2000c 型，美国 Thermo Fisher 科技公司；PCR 基因扩增仪：Veriti™ 96-Well 型，美国 Thermo Fisher 科技公司；核酸紫外检测仪：ChemiDoc XRS 型，英国 Bio-Rad 公司；DNA 电泳仪：JY300C 型，北京君意东方电泳设备有限公司；恒温培养箱：DH3600B II 型，天津泰斯特仪器有限公司；生物安全柜：HR40-IIA2 型，青岛海尔股份有限公司；−80 ℃超低温冰箱：TSE600V 型，美国 Thermo Fisher 科技公司；−20 ℃低温冰箱：DW-YL270 型，中科美菱低温科技股份有限公司；电子分析天平：OHAUS 型，冒险家智能科技（上海）有限公司；高效液相色谱仪：2498/1525 EF 型；美国 Waters 公司；三重四极杆质谱仪：TSQ Quantis™ Plus 型，美国 Thermo Fisher 科技公司；核磁共振分析仪：MicroMR20-025V 型，上海纽迈电子科技有限公司；蛋白质纯化仪：ÄKTA pure™ T 型，美国 Cytiva 公司。

1.4 重组质粒的构建

从新金分枝杆菌 NRRL B-3805 中提取基因组，扩增出 *kshA395* 和 *kshB122* 基因片段。然后利用酶切位点连接到 pET28a 和 pET28a-MBP 载体上。为了实现 *kshA395* 和 *kshB122* 双基因的融合表达，设计融合 PCR 引物，利用载体的不同酶切位点将这 2 个基因片段连接到 pET28a-MBP 质粒中，并在构建过程中加入核糖体结合位点 SD 序列。将构建的重组质粒及重组大肠杆菌送至武汉天一华煜基因科技有限公司进行测序。

1.5 KSH 蛋白在大肠杆菌中的异源表达、鉴定与纯化

将构建的表达质粒通过热激法转化至 *E. coli* BL21（DE3）中，然后将重组大肠杆菌在 37 ℃摇床培养至菌液 OD_{600} 值为 0.6，将温度调至 18 ℃，并添加 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导表达。分别在 6、10、22 h 取样，收集菌泥，并用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.0）重悬，高压均质处理后于 12 000 r/min 离心 30 min，得到上清液与沉淀，采用 SDS-PAGE

检测蛋白质表达情况。其他融合蛋白的表达参照最优条件。

使用Ni-NTA纯化法对KshA395及KshB122进行纯化，取上述方法所得上清液作为样品，进样缓冲液为：缓冲液A（25 mmol/L Tris，50 mmol/L NaCl，10 mmol/L咪唑，5 mmol/L β-巯基乙醇）和缓冲液B（25 mmol/L Tris，50 mmol/L NaCl，300 mmol/L咪唑，5 mmol/L β-巯基乙醇）。具体步骤为：1）用5倍柱体积的ddH_2O冲洗镍柱；2）用8倍柱体积的缓冲液A冲洗平衡；3）样品通过蠕动泵泵入镍柱；4）设置蛋白质纯化系统的洗脱程序，使用缓冲液B进行梯度洗脱，收集洗脱液并进行SDS-PAGE检测。

1.6　酶活性的测定

酶活性测定体系包括：500 μL的50 mmol/L Tris-HCl缓冲液（pH 7.0）、100 μmol的NADH和20 μg酶[20-21]。底物是甲醇溶解的250 μmol/L的4-AD溶液，测定温度为25 ℃，采用微量分光光度计的动力学程序，在340 nm处连续记录NADH的氧化量，摩尔吸光系数ε=6.22 L/（mol·cm）。

参照1.5的方法获得细胞破碎液，于12 000 r/min离心30 min，上清液即为粗酶液。在粗酶液中分别添加质量分数0.5%的底物、体积分数2%的吐温-80、质量分数0.2%的NADH，在30 ℃摇床上进行反应。设置阴性对照，每隔1 d取样，直至第5天反应结束并取样检测。

1.7　助溶剂的选择

助溶剂对促进酶反应的催化进程十分重要，常用于维持脂溶性底物在水相中的分散，以提高底物的利用率[22-23]。由于本研究中使用的底物在水相中的溶解度较低，如果不添加助溶剂则无法体现KSH的实际催化效果。因此，在KSH双组分酶与4-AD的反应体系中分别添加体积分数2%的甘油、异丙醇、环糊精、吐温-80作为助溶剂。其他条件保持不变，同时设置空白对照组。反应2 d后取样，并在层析板上观察转化效率。

1.8　电子受体的选择

Geize等[24]认为KSH通过铁离子的价态变化激活底物4-AD转化为9-OH-AD，该过程所需的电子由NADH传递。为探究电子受体对KSH酶催化效果的影响，在KSH双组分酶与4-AD的反应体系中分别添加质量分数0.2%的NADH和PMS，同时设置空白对照组。反应2 d后取样，观察转化效率。

1.9　产物分析

采用薄层层析硅胶板（2.5 cm×7.5 cm）检测底物的消耗与产物的生成情况，以V（乙酸乙酯）∶V（石油醚）=3∶2为展开剂，展开后用体积分数20%的硫酸乙醇溶液喷洒层析板，随后于100 ℃烘烤5~10 min，直至层析板上显现出清晰的底物或产物点，并与标准品的样点大小及相对迁移进行比较。以V（甲醇）∶V（水）=6∶4为流动相，使用LC-MS对目标产物进行检测。以$CDCl_3$为溶剂，使用核磁共振分析仪对目标产物进行^1H谱和^{13}C谱扫描，并用Mestrenova 14.0.0处理核磁数据。

2　结果与讨论

2.1　KshA395和KshB122蛋白在大肠杆菌中的异源表达、鉴定及纯化结果

由于BL21-KshA395和BL21-KshB122的蛋白质表达量过低，故采用带有MBP标签的重组大肠杆菌BL21-MBP-KshA395和BL21-MBP-KshB122来表达所需蛋白质，这2种目的蛋白质相对分子质量的理论值分别为84 800和93 500。实际表达蛋白质的SDS-PAGE检测结果与理论值相符，表明目的蛋白质表达成功，且诱导时间为22 h时，蛋白质在上清液中的表达量较高，见图2。

2.2　KSH及其融合蛋白的酶活性分析

KSH及其融合蛋白的酶活性结果见表2。添加MBP标签使单组分酶KshA395、KshB122的酶活性分别下降了6.4%和9.1%，融合蛋白MBP-KshB122-MBP-KshA395、KshB122-MBP-KshA395的酶活性较KshB122-KshA395分别提高了28.6%和12.2%，MBP-KshB122-KshA395的酶活性较KshB122-KshA395下降了15.8%。

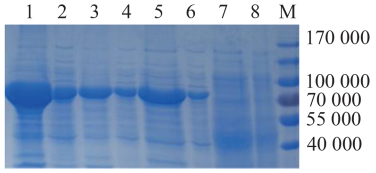
2.3　KshA395和KshB122单组分酶催化4-AD与ADD结果

按照1.6的方法分别进行BL21-pET28a、BL21-pET28a-KshA395和BL21-pET28a-KshB122的酶催化试验，结果见图3~4。阴性对照组大肠杆菌破碎液上清液无转化效果，KshA395和KshB122分别单独催化4-AD时，反应液中均只能检测到类似ADD的生成，且底物反应不完全；两者分别单独催化ADD时，检测不到产物生成。

2.4　KshA395和KshB122双组分酶催化4-AD与ADD结果

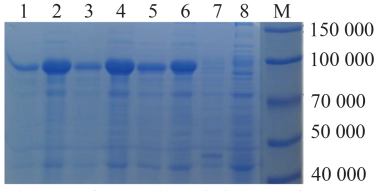
按最优表达条件获得KshA395和KshB122的酶

液，等比例混合进行酶反应，检测结果见图5~6。以4-AD为底物的双组分酶催化反应，在第2天检测到最多的类似9-OH-AD的产物点P1，以及少量类似ADD的产物点P2。反应至第5天，P1被消耗，出现了另一未知产物点P3，但仍有少量P2存在。以ADD为底物的双组分酶催化反应，也检测到一个未知产物点P4。



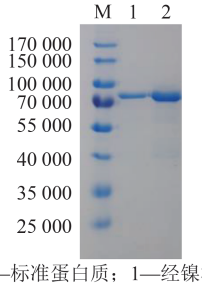
1—诱导22 h的沉淀；2—诱导22 h的上清液；3—诱导10 h的沉淀；4—诱导10 h的上清液；5—诱导6 h的沉淀；6—诱导6 h的上清液；7—诱导22 h的对照组沉淀；8—诱导22 h的对照组上清液；M—标准蛋白质。

(a) MBP-KshA395的SDS-PAGE结果



1—诱导22 h的沉淀；2—诱导22 h的上清液；3—诱导10 h的沉淀；4—诱导10 h的上清液；5—诱导6 h的沉淀；6—诱导6 h的上清液；7—诱导22 h的对照组沉淀；8—诱导22 h的对照组上清液；M—标准蛋白质。

(b) MBP-KshB122的SDS-PAGE结果



M—标准蛋白质；1—经镍柱纯化后的MBP-KshB122蛋白；2—经镍柱纯化后的MBP-KshA395蛋白。

(c) MBP-KshA395和MBP-KshB122经镍柱纯化后的SDS-PAGE结果

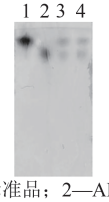
图2 重组大肠杆菌表达MBP-KshA395和MBP-KshB122的SDS-PAGE分析

Fig. 2 SDS-PAGE of recombinant *E. coli* expressing MBP-KshA395 and MBP-KshB122

表2 KSH及其融合蛋白的酶活性

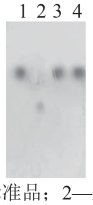
Table 2 Enzyme activities of KSH and its fusion proteins

KSH及其融合蛋白	酶活性/(U/mg)
KshA395	53.3±8.8
KshB122	76.8±6.5
MBP-KshA395	49.9±6.5
MBP-KshB122	69.8±9.3
MBP-KshB122-MBP-KshA395	74.1±8.1
MBP-KshB122-KshA395	48.5±5.8
KshB122-MBP-KshA395	64.6±7.7
KshB122-KshA395	57.6±7.9



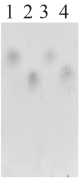
1—4-AD标准品；2—ADD标准品；3—KshA395催化样品；4—KshB122催化样品。

(a) KshA395和KshB122催化4-AD的结果



1—4-AD标准品；2—ADD标准品；3—KshA395催化样品；4—KshB122催化样品。

(b) KshA395和KshB122催化ADD的结果

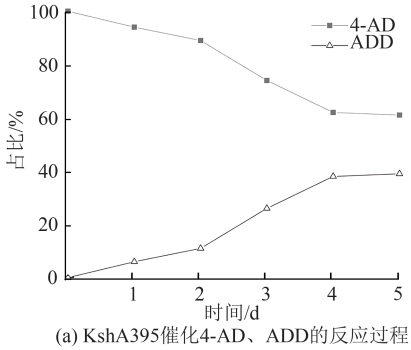


1—4-AD标准品；2—ADD标准品；3—大肠杆菌破碎液催化4-AD；4—大肠杆菌破碎液催化ADD。

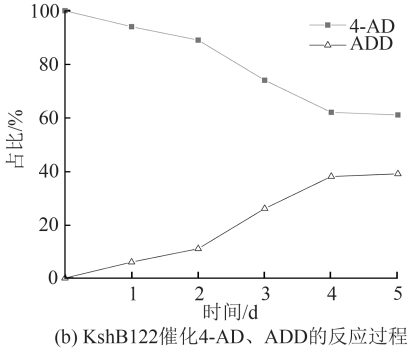
(c) 大肠杆菌破碎液催化结果

图3 KshA395和KshB122催化4-AD、ADD的薄层层析结果

Fig. 3 TLC results of reactions catalyzed by KshA395 and KshB122 with 4-AD and ADD as substrates



(a) KshA395催化4-AD、ADD的反应过程



(b) KshB122催化4-AD、ADD的反应过程

图4 KshA395和KshB122催化4-AD、ADD的反应过程

Fig. 4 Reaction processes of 4-AD and ADD catalyzed by KshA395 and KshB122



1—4-AD标准品；2—9-OH-AD标准品；3—ADD标准品；4—双组分酶催化2 d样品；5—双组分酶催化5 d样品。

(a) KshA395和KshB122双组分酶催化4-AD结果



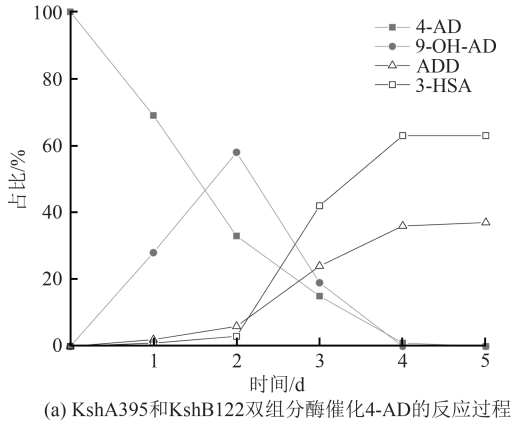
1—ADD标准品；2—4-AD标准品；3—双组分酶催化2 d样品；4—双组分酶催化5 d样品。

(b) KshA395和KshB122双组分酶催化ADD结果

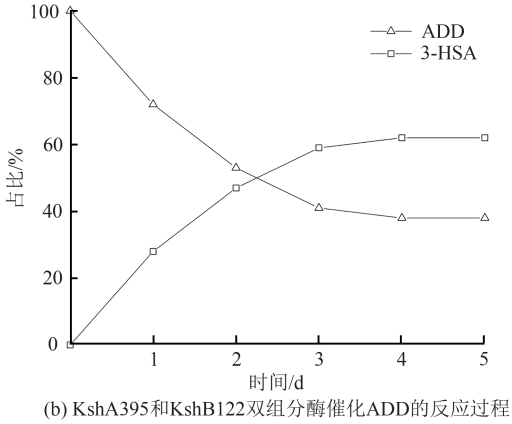
图5　KshA395和KshB122共同催化4-AD、ADD的薄层层析分析结果

Fig. 5　TLC results of reactions co-catalyzed by KshA395 and KshB122 with 4-AD and ADD as substrates

对上述检测到的未知产物进行提取分析，用LC-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR等技术确定其结构，LC-MS结果见图7。产物P1、P2、P3的质荷比分别为303.195 2、285.185 0、301.179 2，与标准品吻合。P3的^{1}H谱与^{13}C谱显示其C-9与C-10因C—C键断裂，化学位移发生较大变化，确定产物P1为9-OH-AD，P2为ADD，P3与P4均为3-HSA。由KSH双组分酶催化ADD生成3-HSA，说明KSH具有C-9位羟基化功能；而由KSH双组分酶催化4-AD也生成3-HSA，说明KSH同样具有C-1,2位脱氢功能。



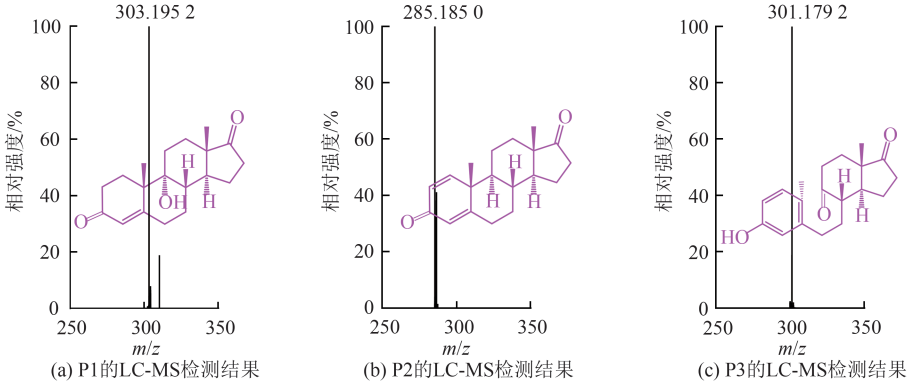
(a) KshA395和KshB122双组分酶催化4-AD的反应过程



(b) KshA395和KshB122双组分酶催化ADD的反应过程

图6　KshA395和KshB122共同催化4-AD、ADD的反应过程

Fig. 6　Reaction processes of 4-AD and ADD are co-catalyzed by KshA395 and KshB122



(a) P1的LC-MS检测结果　(b) P2的LC-MS检测结果　(c) P3的LC-MS检测结果

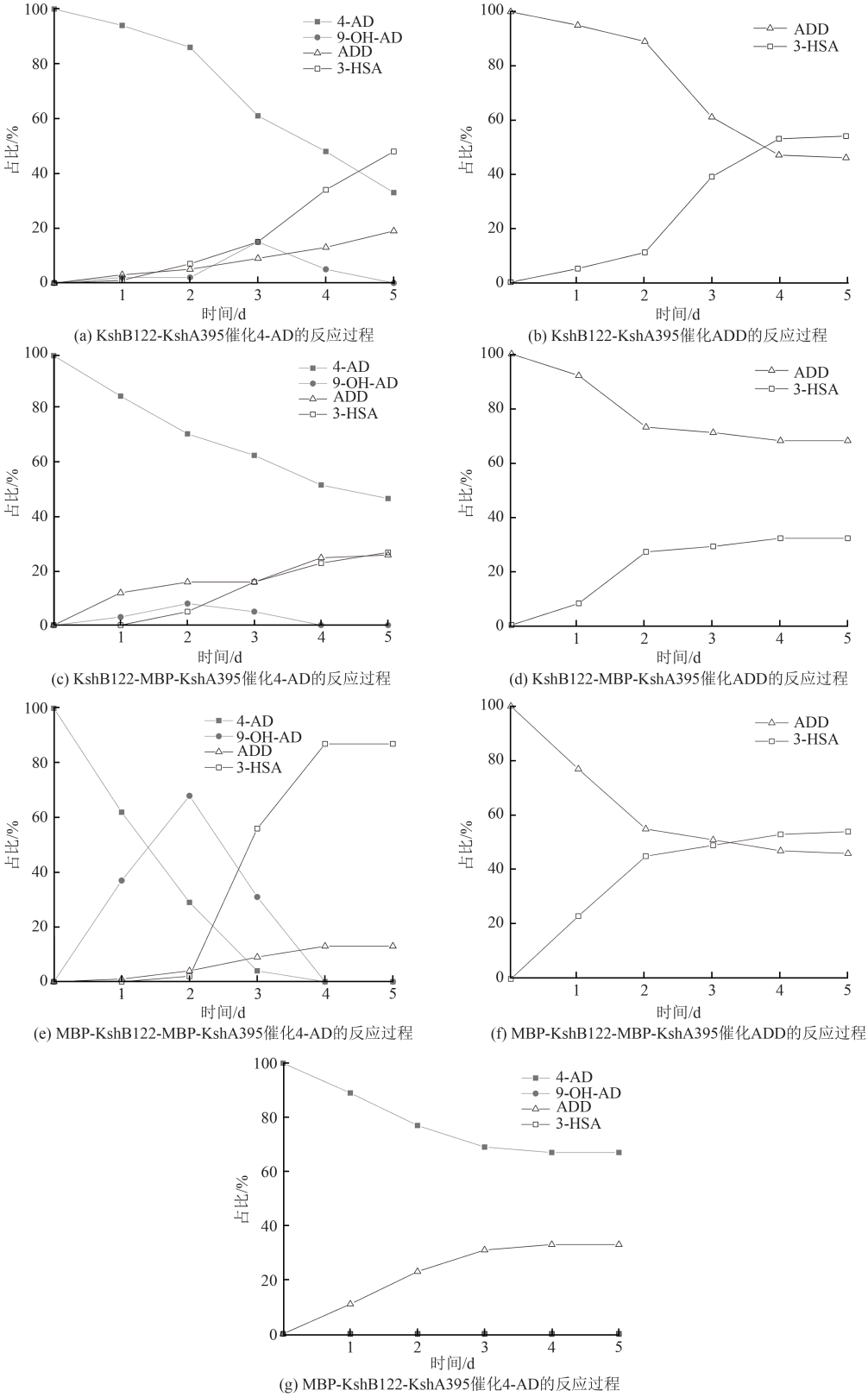
图7　KshA395和KshB122双组分酶催化4-AD和ADD的产物分析

Fig. 7　Products of reactions co-catalyzed by KshA399 and KshB122 with 4-AD and ADD as substrates

2.5　KSH融合蛋白催化4-AD与ADD结果

为消除KSH双组分酶在不同环境中表达对酶反应的影响，构建了多种共表达KshA395和KshB122蛋白的重组大肠杆菌（即BL21-KshB122-KshA395、BL21-KshB122-MBP-KshA395、BL21-MBP-KshB122-KshA395），研究KSH融合蛋白是否具有C-1,2位脱氢、C-9位羟基化双功能以及对转化效率的影响，结果见图8。除MBP-KshB122-KshA395仅有C-1,2位脱氢功能外，其他融合蛋白均具有C-1,2

位脱氢、C-9位羟基化双功能，且羟基化产物主要集中在1~3 d，而在3~5 d脱氢作用更为显著。其中MBP-KshB122-MBP-KshA395对4-AD的转化效率最高。



(a) KshB122-KshA395催化4-AD的反应过程
(b) KshB122-KshA395催化ADD的反应过程
(c) KshB122-MBP-KshA395催化4-AD的反应过程
(d) KshB122-MBP-KshA395催化ADD的反应过程
(e) MBP-KshB122-MBP-KshA395催化4-AD的反应过程
(f) MBP-KshB122-MBP-KshA395催化ADD的反应过程
(g) MBP-KshB122-KshA395催化4-AD的反应过程

图 8　KSH融合蛋白催化4-AD和ADD的反应过程

Fig. 8　Processes of reactions catalyzed by KSH fusion proteins with 4-AD and ADD as substrates

以上结果表明，KSH具有双重功能特性，其不仅在催化4-AD形成9-OH-AD的过程中发挥重要作用，还能催化4-AD的C-1，2位脱氢，导致甾醇母核B环打开。这可能是分枝杆菌体内完成甾醇母核代谢降解过程的重要环节，而分枝杆菌细胞内的KSH是否具有与异源表达的KSH相同的双重功能，还有待进一步验证。新金分枝杆菌NRRL B-3805的KshA和KshB还存在同工酶[7,16]，对于这些同工酶是否也具有相同的双重特性，有待进一步验证。

2.6　助溶剂对酶反应的影响

以KSH双组分酶催化4-AD反应为测试对象，不同助溶剂对底物相对转化率的影响见图9。结果表明，吐温-80是KSH酶反应最适宜的助溶剂，其相对转化率是对照组的1.5倍。

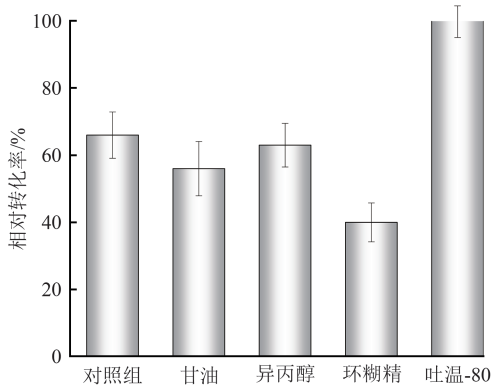


图9　助溶剂对酶反应的影响

Fig. 9　Effects of solubilizers on enzyme-catalyzed reaction

2.7　电子受体对酶反应的影响

以KSH双组分酶催化4-AD反应为测试对象，不同电子受体对底物相对转化率的影响见图10。

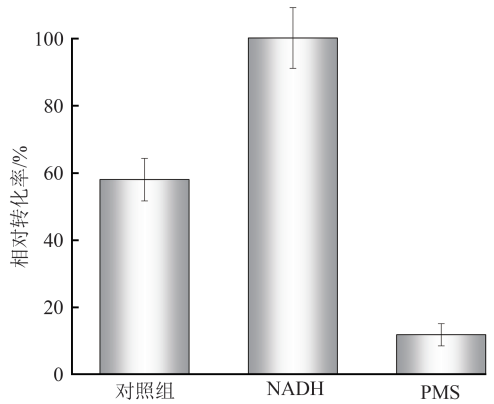


图10　电子受体对酶反应的影响

Fig. 10　Effects of electron acceptors on enzyme-catalyzed reaction

结果表明，NADH是KSH酶反应最适宜的电子受体，其相对转化率是对照组的1.7倍。

3　结论

来自新金分枝杆菌NRRL B-3805的*ksh*基因在大肠杆菌中异源表达的KshA395、KshB122及其融合蛋白，不仅对4-AD的C-9位有羟基化作用，而且对其C-1，2位有脱氢作用。在酶反应前期，KSH表现出C-9位羟基化作用，后期羟基化作用关闭，转而表现出C-1，2位脱氢作用。因此，在不需要KstD参与的情况下，KSH就能完成从4-AD到3-HSA的生物转化。该研究为甾体药物中间体4-AD、9-OH-AD和3-HSA的生产策略提供了新的思路，同时为基于KSH开发新的甾体药物合成途径提供了理论基础。

参考文献

[1] HANSON J R. Steroids: partial synthesis in medicinal chemistry[J]. Natural Product Reports, 2007, 24(6): 1342-1349.

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

[3] HUANG C L, CHEN Y R, LIU W H. Production of androstenones from phytosterol by mutants of *Mycobacterium* sp.[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 296-300.

[4] 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.

[5] PETRUSMA M, DIJKHUIZEN L, GEIZE R. Structural features in the KshA terminal oxygenase protein that determine substrate preference of 3-ketosteroid 9α-hydroxylase enzymes[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(1): 115-121.

[6] CAPYK J K, D'ANGELO I, STRYNADKA N C, et al. Characterization of 3-ketosteroid 9α-hydroxylase, a rieske oxygenase in the cholesterol degradation pathway of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(15): 9937-9946.

[7] RODRÍGUEZ-GARCÍA A, FERNÁNDEZ-ALEGRE E, MORALES A, et al. Complete genome sequence of '*Mycobacterium neoaurum*' NRRL B-3805, an androstenedione (AD) producer for industrial biotransformation of sterols[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 224: 64-65.

[8] CAPYK J K, CASABON I, GRUNINGER R, et al. Activity of 3-ketosteroid 9α-hydroxylase (KshAB) indicates cholesterol side chain and ring degradation occur simultaneously in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(47): 40717-40724.

[9] 姚抗. 分枝杆菌甾醇代谢机制的解析以及其代谢工程改造应用于制备重要甾药中间体的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014.

[10] GEIZE R, HESSELS G I, NIENHUIS-KUIPER M, et al. Characterization of a second *Rhodococcus erythropolis* SQ1 3-ketosteroid 9α-hydroxylase activity comprising a terminal oxygenase homologue, KshA2, active with oxygenase-reductase component KshB[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23): 7197-7203.

[11] PÉREZ C, FALERO A, DUC H L, et al. A very efficient bioconversion of soybean phytosterols mixtures to androstanes by mycobacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(8): 719-723.

[12] GARCÍA J L, UHÍA I, GALÁN B. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria[J]. Microbial Biotechnology, 2012, 5(6): 679-699.

[13] NUNES V O, DE CASTRO VANZELLOTTI N, FRAGA J L, et al. Biotransformation of phytosterols into androstenedione: a technological prospecting study[J]. Molecules, 2022, 27(10): 3164.

[14] MARSHECK W J, KRAYCHY S, MUIR R D. Microbial degradation of sterols[J]. Applied Microbiology, 1972, 23(1): 72-77.

[15] BARREIRO C, MORALES A, VÁZQUEZ-IGLESIAS I, et al. Intra- and extra-cellular proteome analyses of steroid-producer mycobacteria[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1645: 73-92.

[16] LI X M, ZHANG R, LI J J, et al. The function of steroid terminal monooxygenase in cholesterol or phytosterol degradation by the *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2023, 3(4): 585-592.

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

[18] 袁家代, 陈贵英, 程世君, 等. 3-甾酮-9α-羟基化酶基因在分枝杆菌中的异源表达与9α-羟基雄烯二酮的制备[J]. 生物工程学报, 2015, 31(4): 523-533.
YUAN J D, CHEN G Y, CHENG S J, et al. Accumulation of 9α-hydroxy-4-androstene-3, 17-dione by co-expressing *kshA* and *kshB* encoding component of 3-ketosteroid-9α-hydroxylase in *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(4): 523-533. (in Chinese)

[19] LORAINE J K, SMITH M C M. Genetic techniques for manipulation of the phytosterol biotransformation strain *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805[J]. Microbial Steroids: Methods and Protocols, 2017: 93-108.

[20] PETRUSMA M, HESSELS G, DIJKHUIZEN L, et al. Multiplicity of 3-ketosteroid-9α-hydroxylase enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 for specific degradation of different classes of steroids[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(15): 3931-3940.

[21] 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.

[22] SARAPHANCHOTIWITTHAYA A, SRIPALAKIT P. 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]. Biotechnology Letters, 2016, 38(9): 1595-1602.

[23] 武迪, 张玲, 吴梦棋, 等. 环糊精促进 *Burkholderia cepacia* 转化胆固醇生成胆甾-4-烯-3, 6-二酮[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(7): 89-96.
WU D, ZHANG L, WU M Q, et al. *Burkholderia cepacia* bioconverts cholesterol to cholest-4-ene-3, 6-dione promoted by cyclodextrin[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(7): 89-96. (in Chinese)

[24] GEIZE R, HESSELS G I, GERWEN R, et al. Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9α-hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(4): 1007-1018.

（责任编辑：刘冬梅）