

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-002

重要甾体化合物的化学酶法合成研究进展

郑梦梦^{1,2}, 刘犇犇^{1,2}, 林芝^{1,2}, 瞿旭东^{1,2}

(¹上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240; ²上海交通大学张江高等研究院, 上海 201203)

摘要: 甾体化合物因其多功能生物活性和理化特性备受生物医药行业的高度重视, 被誉为自然界的“生命之钥”。随着植物甾醇代谢途径的不断解析, 国内逐渐形成了“植物甾醇原料-甾体药物中间体-甾体药物”的工业合成路线。日益发展的甾药行业需要不断开发新的合成技术推进甾体药物自上而下高效合成。基于生物信息学、合成生物学、代谢工程以及酶工程的快速发展, 甾体化合物的合成技术也取得了重大突破。本文对重要甾体化合物的最新合成进展, 包括甾体药物中间体的多样化合成、复杂甾体的化学酶法合成和酵母从头合成植物甾醇原料等方面进行了综述, 特别强调了近年来P450羟化酶、3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、还原酶以及酶级联参与的化学酶法在高效简易合成复杂甾体药物中的代表性工作; 在此基础上, 也从新一代甾药中间体的开发、新型甾体生物催化剂的挖掘、以分枝杆菌为底盘的甾体合成途径的构建等方面对甾体化合物未来的研究机会和挑战进行了展望。

关键词: 甾体化合物; 底盘菌株; 化学酶法; 区域-立体选择性; 酶级联

中图分类号: Q816 文献标志码: A

Recent advances in chemoenzymatic synthesis of important steroids

ZHENG Mengmeng^{1,2}, LIU Benben^{1,2}, LIN Zhi^{1,2}, QU Xudong^{1,2}

(¹State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; ²Zhangjiang Institute for Advanced Study, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201203, China)

Abstract: Steroids exhibit a range of biological activities and are commonly described as the ‘key to life’ in nature. Steroidal-based medications have emerged as the second largest pharmaceutical category following antibiotics, owing to their remarkable bioactivities such as anti-infective, anti-inflammatory, anti-allergic, and antitumor properties. This category encompasses more than 400 drug compounds, representing approximately 17% of FDA-approved medications. The synthesis of steroidal products continues to attract significant attention due to their diverse bioactivities and physicochemical characteristics in pharmaceutical applications. With the increasing demand for steroidal drugs and the fluctuating availability of sapogenin resources, the use of *Mycobacteria* to convert inexpensive phytosterols to produce key intermediates for steroid drugs has been established as the most mature and sustainable

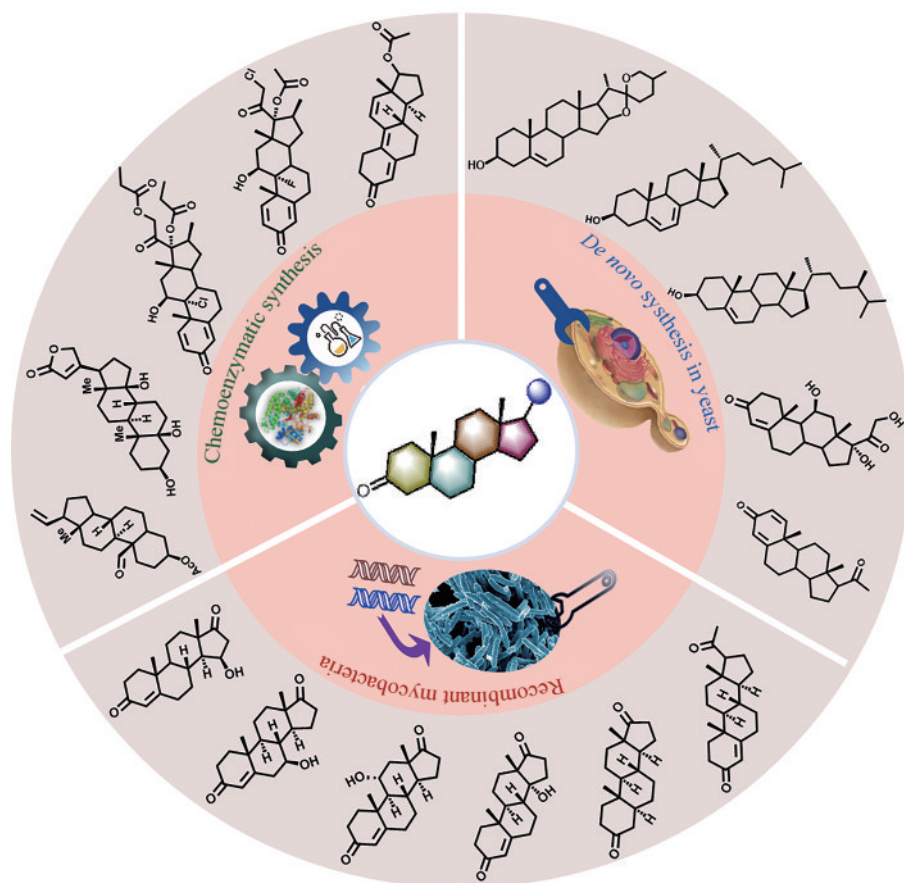
收稿日期: 2024-01-02 修回日期: 2024-03-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (32301216)

引用本文: 郑梦梦, 刘犇犇, 林芝, 瞿旭东. 重要甾体化合物的化学酶法合成研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(5): 941-959

Citation: ZHENG Mengmeng, LIU Benben, LIN Zhi, QU Xudong. Recent advances in chemoenzymatic synthesis of important steroids[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(5): 941-959

industrial route. However, the complex structure of steroids, particularly their highly oxygenated skeleton, poses challenges for the well-established semi-synthesis route of complex steroid medications. Recent strides in bioinformatics and genetics have significantly advanced the studies on synthesis of steroidal compounds. This review highlights recent advancements in the synthesis of high-value steroids, including the diverse steroid drug intermediate production *via* external steroidal modifying enzymes expression in engineered *Mycobacteria*, chemo-enzymatic synthesis of complex steroids, and yeast-based *de novo* synthesis. It specifically highlights the significant achievements in the chemo-enzymatic synthesis, which combines the precise site- and stereoselectivity of enzymatic transformations with the efficiency of chemosynthesis, enabling the concise synthesis of complex steroidal products. Recent advancements in chemoenzymatic strategies, especially those involving P450 hydroxylase, 3-sterone- Δ^1 -dehydrogenase, reductase, and enzyme cascades, have significantly contributed to the efficient and straightforward synthesis of complex steroid medications. On this basis, the future research opportunities and challenges are also discussed, aiming to provide a reference for the efficient development of more value-added steroid compounds, including the development of new generation steroid intermediates, the discovery of novel steroid biocatalysts, and the establishment of steroid synthesis pathways in mycobacteria.



Keywords: steroids; chassis strains; chemoenzymatic; regio- and stereoselective; enzyme cascade

甾体化合物是一类含有“环戊烷并多氢菲”母核结构的重要天然产物，在食品、医药、农业

等领域有着广泛的应用，甾体药物因具有优良的抗感染、抗炎、抗过敏、抗肿瘤等生物活性，在

化学药物体系中占据重要地位^[1]。目前全球生产的甾体类药物已超过400种, 约占FDA批准药物的17%, 主要包括甾体激素类药物、甾醇类药物、甾体皂苷类药物、强心苷类药物和甾体生物碱, 年销售额超过1000亿美元, 是现今仅次于抗生素的第二大类药物家族^[2-3]。甾体药物的合成一直是学术界和工业界的研究热点, 此前“薯蓣-双烯”的化学半合成路线存在严重弊端, 限制了甾体的规模化生产。随着对甾体药物需求的不断增加以及植物甾醇代谢途径的逐渐解析, 具有来源广泛、价格低廉等优点的植物甾醇开始广泛应用于孕激素和皮质激素等甾体药物的生产, 目前微生物转化植物甾醇生产的高附加值甾药中间体, 作为甾药产业的基石, 成为最先进的甾药制备技术^[4]。然而, 复杂多样的甾体药物的高效合成仍面临巨大挑战, 现有甾体化合物生物合成面临酶催化元件效率不高、化学半合成步骤烦琐且产率低等问题。随着生物信息学、合成生物学以及酶工程的快速发展, 甾体修饰元件逐渐被挖掘和改造, 极大简化了复杂甾体的半合成路线, 此外, 研究者们还致力于开发甾体化合物的从头合成, 从而真正实现甾体药物的绿色制造。本文对近几年甾药中间体的多样化生产、复杂甾体药物的化学酶法合成以及植物甾醇在酵母中的从头合成等方面的研究工作进行了系统综述(图1)。

1 甾药中间体的多样化生产

随着分枝杆菌甾醇降解途径中关键酶系及其催化机理的解析, 代谢工程和合成生物学等策略应用于甾体药物关键中间体生产菌株的构建, 目前已实现甾药关键中间体 C_{19} -甾体(4-AD、4-ADD、9-OH-AD、TS)、 C_{22} -甾体(4-HBC、1-4-HBC、9-OH-HBC)以及甾醇母核降解甾体(HIL、HIP)的高效生产^[2, 5-9]。从这些分子出发, 结合化学半合成或微生物转化, 已实现肾上腺皮质激素、孕激素等几乎所有甾体激素药物的生产。基于分枝杆菌代谢途径解析及理性代谢工程改造生产上述甾药中间体的工作取得了重要进展且已被研究者系统综述^[4-6], 本部分主要对近几年以工程化的分枝杆菌为底盘宿主, 引入外源基因, 实现甾药中间

体的多样化生产的工作进展进行归纳。

分枝杆菌除了具有降解植物甾醇的能力外, 其特殊的细胞壁结构使其在发酵过程中具有非常强的甾体底物耐受性。鉴于分枝杆菌无与伦比的甾体生产性能, 近年来研究人员也尝试以工程化分枝杆菌为底盘细胞, 高效表达外源的甾体修饰酶基因, 从而实现对上述甾药前体(4-AD、4-ADD、4-HBC等)的定向修饰, 以获得新型多样化的甾药中间体。

2017年, Fernández-Cabezón等^[10]将来自睾酮假单胞菌和新月弯孢霉的甾体 $C_{17\beta}$ 还原酶基因(17 β -HSD)分别在耻垢分枝杆菌中进行过表达, 利用静息细胞转化的方式以高产率转化植物甾醇合成睾酮(testosterone, TS)。2019年, 王敏课题组^[11]将来自齿垢密螺旋体的5 α -还原酶基因进行优化, 并成功在工程改造的产4-AD的分枝杆菌中表达, 实现了从廉价植物甾醇到5 α -androstene-3, 17-dione(5 α -AD)的一锅法生物合成; 2021年, 该课题组将不同来源的 $C_{17\beta}$ 脱氢酶在生产4-ADD的分枝杆菌中表达, 并结合辅因子再生工程, 构建了宝丹酮(boldenone, BD)的一步生物合成策略^[12]。2021年, Felpeto-Santero等^[13]将来自米根霉的11 α -羟基化酶(CYP509C12)基因优化后导入工程改造的耻垢分枝杆菌中, 完成了重要羟化甾药中间体(11 α -OH-AD和11 α -OH-ADD)的绿色发酵生产。随后, 该课题组采取类似策略, 在耻垢分枝杆菌中共表达来自于新月弯孢霉的甾体 $C_{14\alpha}$ 羟化酶(CYP103168)和其还原酶(CPR64795)基因, 将廉价植物甾醇一步转化为抗癌甾药前体14 α -OH-AD和14 α -OH-ADD^[14]。2023年, 王敏课题组^[15]在高产4-AD的新金色分枝杆菌中导入不同真菌来源的甾体 $C_{14\alpha}$ -羟化酶基因, 并共表达电子传递系统, 同样实现了原料植物甾醇到14 α -OH-AD的一步规模化生物转化, 且产量达到0.22 g/L, 该工作为14 α -OH-AD工业化生产提供了模式菌株, 充分展示了分枝杆菌作为真菌来源基因表达底盘的巨大应用潜力。

2021年, 苏正定课题组^[16]将红球菌来源的高活性甾体 $C_{9\alpha}$ 羟基化酶基因(*kshA*)整合至分枝杆菌基因组中, 发现其代谢产物9 α -OH-AD的积累量得到显著提高。2022年, Donova团队^[17]将来自于

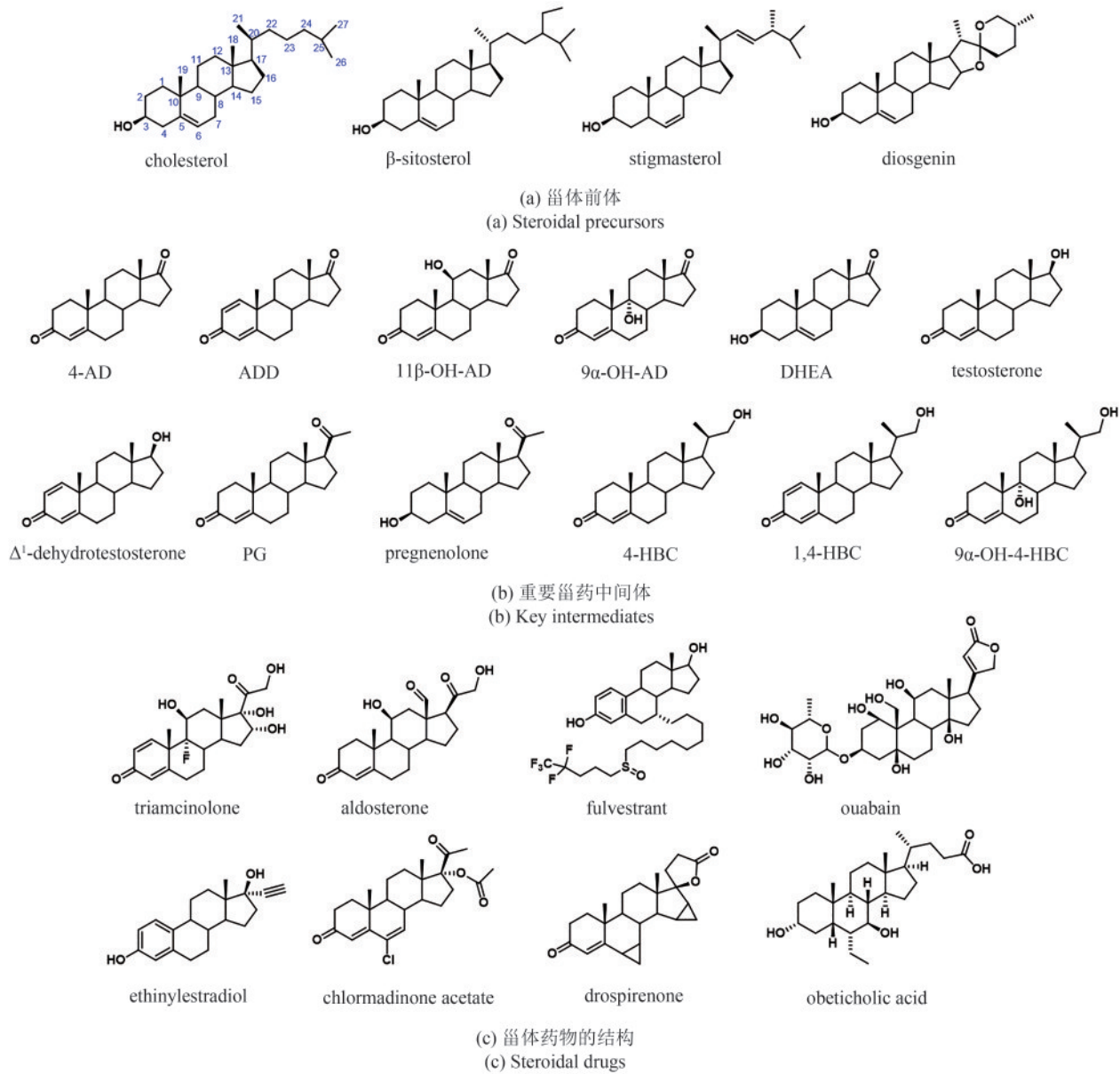


图1 部分甾体前体、重要甾药中间体和甾体药物的结构

Fig. 1 Structures of some steroidal precursors, key intermediates and steroidal drugs

巨大芽孢杆菌的P450基因 *CYP106A1* 和 *CYP106A2* 在工程化耻垢分枝杆菌中分别进行异源表达，均成功实现了 11β -OH-AD 的绿色合成。

在胆固醇的代谢途径中，甾体侧链裂解酶 P450_{scc} 可催化胆固醇合成孕烯醇酮，2022年，魏东芝团队^[18]报道来源于哺乳动物的 P450_{scc} (*CYP11A1*) 亦可催化 4-HBC 侧链断裂生成甾药重要中间体黄体酮 (PG)，随后将 *CYP11A1* 导入高产 4-HBC 的新金色分枝杆菌中，进一步结合蛋白-辅助蛋白嵌合体构建、辅因子工程等策略，首次

实现了植物甾醇到黄体酮的绿色可持续发酵生产，产量达 235 mg/L。同年，该团队以产 4-AD 的新金色分枝杆菌为底盘菌株，异源表达来自巨大芽孢杆菌的 P450-BM3 的突变体 (mP450-BM3)，结合辅因子 NADPH 再生体系，构建了从植物甾醇到 7 β -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮 (7 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, 7 β -OH-AD) 的绿色生产菌株，产量达 164.52 mg/L^[19] (图2)。上述研究结果表明，对工程化的分枝杆菌底盘细胞进行合理设计改造后可以赋予其新的甾体修饰功能，重组工程

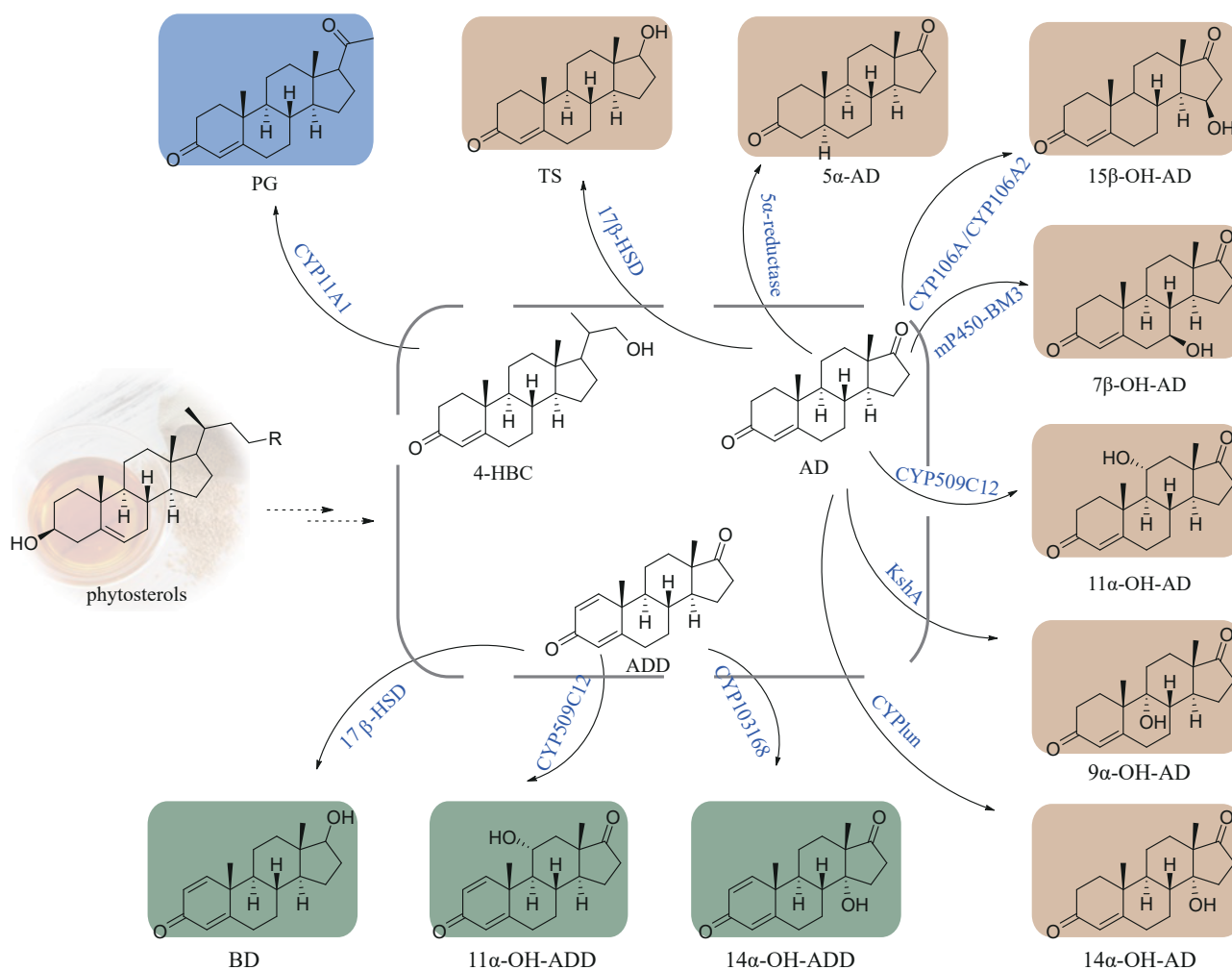


图2 分枝杆菌底盘用于甾体中间体的多样化生产

Fig. 2 Diversified production of steroid intermediates in Mycobacteria

菌株可利用植物甾醇或其他廉价甾体化合物为原料，高效合成更多高附加值的甾体中间体，从而简化复杂甾体的合成路线。

2 复杂高氧化态甾体的化学酶法合成

基于分枝杆菌转化植物甾醇高效生产系列甾体中间体，甾体的生产也形成了以上述关键中间为前体，结合化学半合成或微生物转化规模化生产的成熟工业路线。然而，复杂高氧化态甾体的半合成仍面临以下挑战：一是关键甾体中间体的骨架基本只含有甾体母核，缺乏重要取代基团，因此制备复杂甾体药物需要对合成前体进行羟基化、脱氢/还原、酯化和烷基化等特定修饰；二是由于甾体骨架中以惰性C—H键为主，其半合成依

赖于烦琐的预官能团化和基团保护等冗长复杂的操作，导致合成效率低且环境污染严重；三是由于甾体富含C-sp³的立体构型，化学催化官能团化往往难以实现较高的区域选择性和立体选择性，产生多种立体异构体导致分离和纯化收率低下。

随着生物信息学和酶工程的快速发展，酶催化已成为解决化学合成难题的有力工具，可为目标分子提供更经济高效的合成策略。酶催化可以避免预官能团化、基团保护等其他烦琐的步骤，同时实现特定的区域选择性和立体选择性。此外，酶易于进行定向进化，从而产生活性显著提升或具有“非天然”功能的生物催化剂^[20-23]。因此，酶催化通过提供手性起始单元或催化后期官能团化等，在设计复杂天然产物的非天然合成路线方面具有广泛的应用。化学酶法则结合了无与伦比的

生物催化和精巧的化学合成,在高效合成生物活性天然产物及其类似物以探索其构效关系等应用中具有巨大的潜力^[24-30]。基于甾体羟化酶、酮还原酶和脱氢酶的发现和改造,使得甾体合成中的三个重要反应(区域选择性和立体选择性羟化、脱氢和酮还原)可利用生物催化的方式高效进行,鉴于化学酶法的合成优势,近年来研究者开始探索将上述生物催化与精巧的化学合成相结合来设计复杂甾体药物的人工合成路线,并取得了一系列重要进展。

2.1 P450羟化酶参与的化学酶法合成

定向羟化是甾体工业的核心技术之一,是合成高附加值甾体药物的关键步骤。羟化可以增加甾体化合物的极性,影响其细胞分泌、毒性及跨细胞膜的外排作用,所以与极性较低的非羟化甾体相比,羟化甾体通常表现出更高的生物活性^[31-32]。此外,羟基作为一个合成“抓手”,能够为化学合成提供关键中间体,有助于将更复杂的取代基引入甾体骨架中。对未活化的C—H键进行定向羟化被认为是有机化学中最具挑战的反应,而生物催化羟化具有较高的区域选择性和立体选择性,且反应条件温和、环境友好,随着基因组学和转录组学的进步,甾体骨架的羟化酶已陆续被挖掘并鉴定,极大促进了甾体生物羟化的

进程^[33-36]。

9 α -羟化是甾体的重要羟化修饰之一,C9位羟基的引入为甾体C9位的卤化提供了关键前体,可用于制造地塞米松、倍他米松等高附加值的甾体药物^[37]。甾体C9 α 羟化是由3-甾酮-9 α -羟化酶(KSH)催化,双组分Rieske型非血红素单加氧酶KSH由末端加氧酶KshA和铁氧还蛋白还原酶KshB组成,主要来源于分枝杆菌和红球菌,目前多个KSH被鉴定并用于高附加值甾体的合成中^[38-39]。

开环甾体是一大类高度氧化的甾体化合物,其中9,11-开环甾醇含独特的断裂四环碳骨架,具有抗组胺、抗增殖、抗炎等多种生物活性^[40-41]。2021年,Marek Köllö等^[42]建立了化学酶法合成9,11-开环甾醇的路线。该策略以商业化的氢化可的松(hydrocortisone, **1**)为起始底物,以过表达来自红球菌的*kshA5*和*kshB*基因的大肠杆菌作为生物催化剂,通过全细胞催化实现了化合物**1**和**2**的高效选择性羟化得到化合物**3**和**4**,结合一步化学氧化裂解,化合物**3**和**4**有效地转换为相应的9,11-开环甾体**5**和**6**(图3)。该高效绿色的化学酶法路线为合成结构多样化的9,11-开环甾醇提供了参考依据。

C19-OH甾体是一类活性多样的天然产物,具有重要的药学价值,甾体C19位羟化也是合成

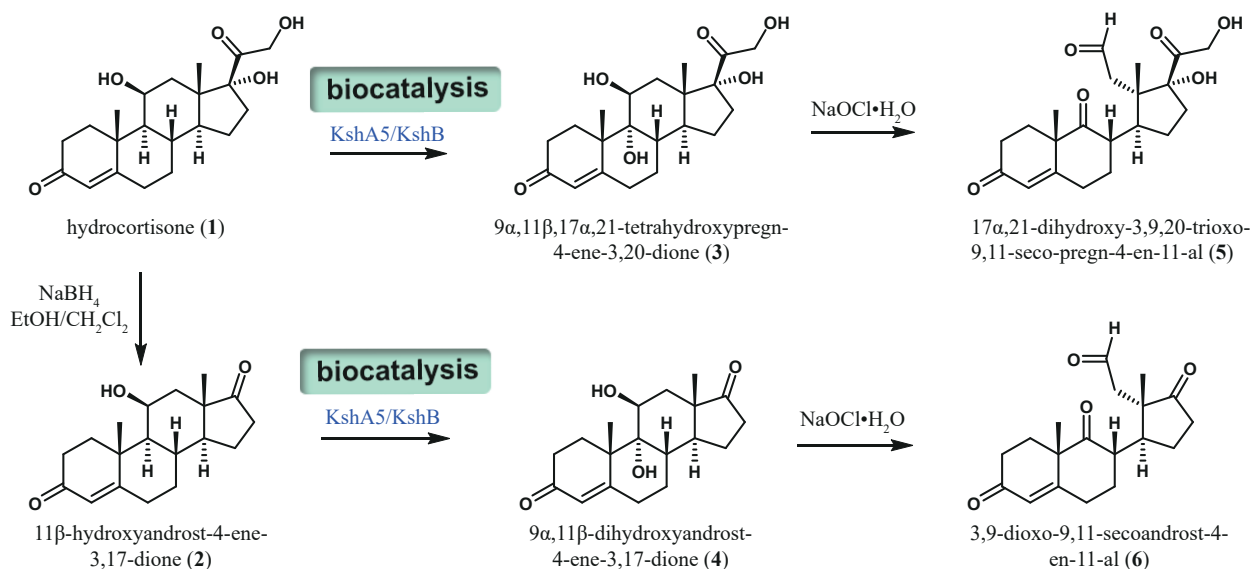


图3 化学酶法合成9,11-secosterols (**5**,**6**)

Fig. 3 Chemoenzymatic synthesis of 9,11-secosterols (**5**,**6**)

C19去甲甾药的关键步骤^[43-44]。由于C19-甲基的空间位阻效应及自身反应惰性，化学合成难以实现C19位的羟基化修饰，2018年，朱敦明和吴怡庆团队^[45]报道了第一例来源于 *Thanatephorus cucumeris* NBRC 6298 的甾体C19位羟化酶 (STH10)，可催化脱氧可的松C19位和C11位的羟基化。在此工作前提下，本课题组和周强辉团队^[46]合作开发了一种高效普适的策略用于合成系列重要C19羟化甾体。以真菌 *Thanatephorus cucumeris* NBRC 6298 为生物催化剂，通过优化发酵条件和底物结构修饰，成功打造了由廉价甾体原料17-乙酰皮质酮 (7b) 直接克级制备C19-羟化可托多松 (8) 的方法。化合物8可经一步化学脱羟基或侧链的氧化断裂形成甾体药物的关键中间体9和10，而此前合成9和10则需要八步以上化学反应且产率低下。在此高效生物催化甾体C19羟化方法的基础上，我们结合3~8步化学转化，完成了六种19-羟化孕甾烷 (11~15b) 的首次合成，并对甾体 sclerosteroid B

的结构进行了修正 (图4)。该化学酶法合成策略相比于目前的化学全合成方法更加高效经济，在工业生产中更具潜力，后续结合酶工程改造等手段，扩展C19羟化酶的底物谱，将极大推进C19-OH甾体及复杂高附加值活性甾体的高效合成。

C14官能团化甾体，包括自然界中广泛存在的C14 α -OH和C14 β -OH甾体，具有重要的生物活性，部分已被成功应用于临床治疗中^[47-48]。甾体C14位C(sp³)-H键的反应惰性及空间位阻效应导致该位置的官能团化极具挑战。2019年，张学礼团队^[49]在菌株新月弯孢霉 (*C. lunatus* NRRL 2380) 中鉴定甾体C14羟化酶 (P450*lun*)，通过在酿酒酵母中异源表达，P450*lun*对4-AD显示出很好的C14羟化区域选择性，但是对C17含取代基的甾体底物区域选择性很差。受到前期化学酶法在高效合成复杂甾体中的启发，2023年，本课题组和周强辉团队^[50]进一步开发了一种高效的C14官能团化甾体的化学酶法合成策略。我们从新月弯孢霉 (*C. lunatus*

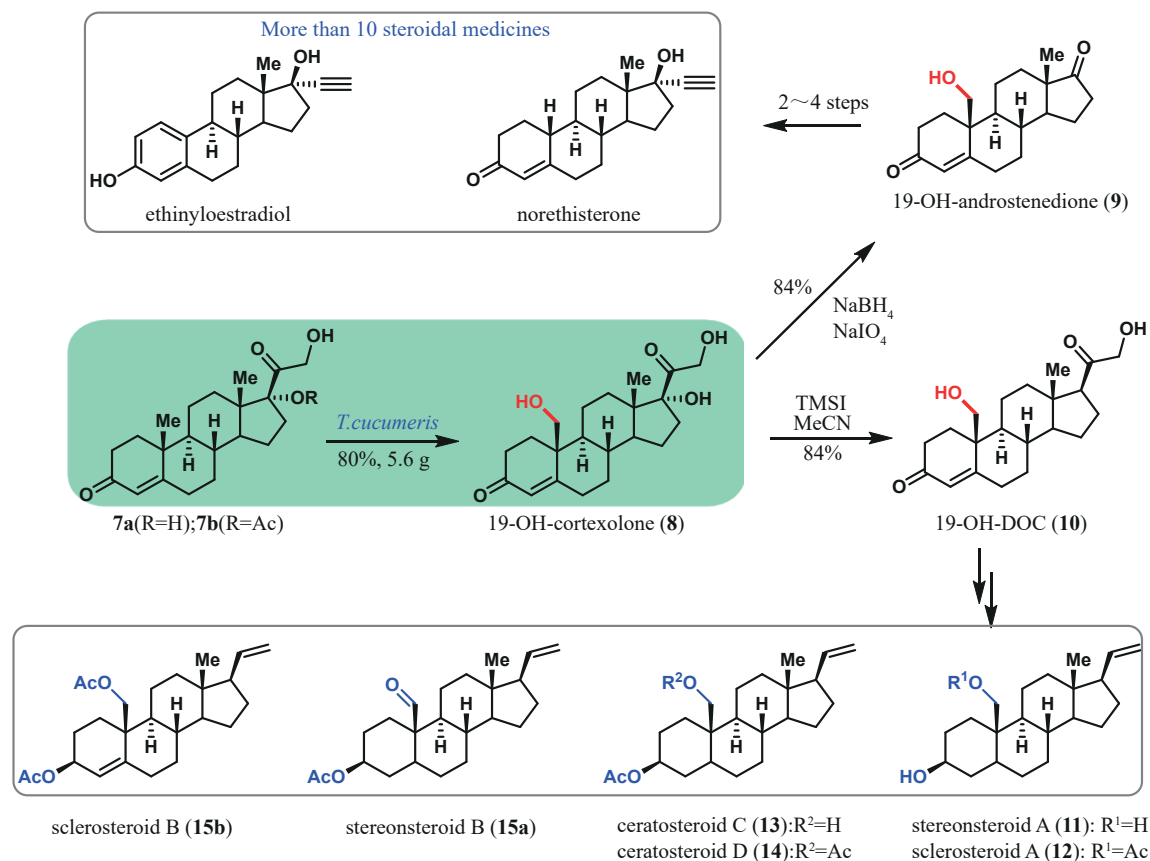


图4 C19官能团化甾体的化学酶法合成

Fig. 4 Chemoenzymatic synthesis of C19-functionalized steroids

CGMCC 3.3589) 中挖掘鉴定到一个新型的具有高催化活性和底物宽泛性的甾体 C14 α -羟化酶 (CYP14A), 基于 RoseTTaFold 从头预测和分子对接, 建立了 CYP14A 甾体底物的结合模型, 进一步结合定点饱和突变和组合突变策略, 获得了催化效率和区域特异性显著提高的突变体。

以该高效绿色的生物催化剂为平台, 获得了一系列 C14 α -OH 甾体, 为合成高附加值甾体药物提供了重要的羟化中间体。将上述 C14 α -OH 甾体进行一步化学消除转化为相应的 Δ^14 烯烃, 基于烯烃基团的活泼性, 通过自由基加成和亲电加成反应实现了甾体 C14 位的高效多样官能团化 (环氧化、 β -OH、F、Cl、N3、Seph、alkyl、NCO、cyclopropane)。利用该高效的化学酶法合成策略, 以羟化甾体底物 (17) 为前体, 实现了天然产物 periplogenin 的 7 步简洁无保护基合成和强心苷药物 (+)-digitoxigenin 及其三种非对映异构体的高效合成, 充分展示了该策略在复杂甾体合成中的强大应用潜力 [图 5(a) 和 (b)]。与此同时, 戈惠明团队^[51] 也报道了 C14 β -OH 甾体的化学酶法合成策略。他们利用真菌微生物转化 4-AD 合成高效合成 C14 α -OH-AD (23), 并以此为底物偶联化学合成建立了两类强心苷天然产物 (+)-digitoxigenin 和 bufogenin B 的化学酶法合成路线 [图 5(c)]。

2.2 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶参与的化学酶法合成

3-甾酮- Δ^1 -脱氢是甾体药物合成过程中最重要的反应之一, 双键的引入通常会增强甾体药物活性或赋予其新的生理活性。例如, 泼尼松龙的抗炎能力是氢化可的松的 4 倍, 是可的松的 5 倍^[52]。鉴于化学脱氢效率低且区域-立体选择性差, 在生物制药行业中通常借助生物催化的手段将双键引入到甾体母核中, 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 (KstD) 是负责甾体 Δ^1 -脱氢的关键酶, 并得到了广泛的研究和应用^[53-54]。据报道, 多种含 KstD 的真菌和细菌可催化不同甾体底物的 C1 (2) 位脱氢, 其中节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) 和诺卡氏菌 (*Nocardioides simplex*) 因其优越的生物转化效率在工业界广泛应用^[55-56]。2018 年, 郭灿城团队^[57] 以 9 α -OH-AD (29) 为起始原料, 利用 *A. simplex* 和 *N. simplex* 为

生物催化剂, 分别以 22.9% 和 38.5% 的总收率完成了重要甾体药物倍他米松 (30) 和氟轻松丙酮酯 (31) 的化学酶法合成 [图 6(a) 和 (b)]。此化学酶法合成路线革新了倍他米松和氟丙酮的生产模式, 在成本、安全性和环境友好方面具有显著优势。

随着基因组学和转录组学的发展, 不同微生物来源的 KstD 酶逐渐被挖掘鉴定, 并将其在其他模式底盘宿主 (芽孢杆菌、大肠杆菌、毕赤酵母等) 中进行异源表达和催化应用, 从而避免了野生菌生物转化过程中的副产物积累。此外, 对已鉴定的 KstD 进行酶工程改造, 使得这类生物催化剂展示出更强的有机溶剂耐受性和优异的甾体 Δ^1 -脱氢活性^[58-60]。2022 年, Wang 等^[61] 从丙酸杆菌中纯化了一种新型的 Δ^1 -脱氢酶 (PrKstD), 其具有高效的催化活性和底物谱宽泛性, 可催化 18 种甾体化合物的 Δ^1 -脱氢, 并有效转化高浓度氢化可的松 (80 g/L) 生成泼尼龙松, 转化率高达 90% 以上。同年, 陈芬儿团队^[62] 通过对来自 *M. smegmatis* mc² 155 的 KstD (MsKstD1) 进行酶工程改造, 得到的 4 突变体 KstD (MK4) 成功阻断了甾体底物与酶的非催化空腔结合, 从而提高了其催化效率。2024 年, 该团队^[63] 将高效催化剂 KM4 应用到 16 β -甲基皮质激素的合成中, 结合 Mn 催化氧化还原水合等化学合成手段, 实现了二丙酸倍氯米松 (beclomethasone dipropionate, 33)、丙酸氯倍他米松 (clobetasol propionate, 34) 和二丙酸倍他米松 (betamethasone dipropionate, 35) 的简洁不对称合成, 该化学酶法合成路线的实用性和简洁性也为其他相关甾体合成提供了指导 [图 6(c)]。

2.3 还原酶参与的化学酶法合成

甾体药物的合成过程常涉及酮基的高区域和立体选择性还原, 醇脱氢酶 (ADH, 也称酮还原酶, KRED) 是工业规模合成药物中间体最广泛使用的生物催化剂之一, 可以实现非甾体醛或非甾体酮的立体还原 (图 7)。在从非甾体起始原料全合成 C19-去甲基甾体的过程中, 36 的立体选择性还原为合成多种激素避孕药 (去氧孕烯、炔诺孕酮、孕二烯酮) 提供了关键手性前体。但只有 13-(R)-乙基二甲酚可用于合成避孕激素, 然而化学还

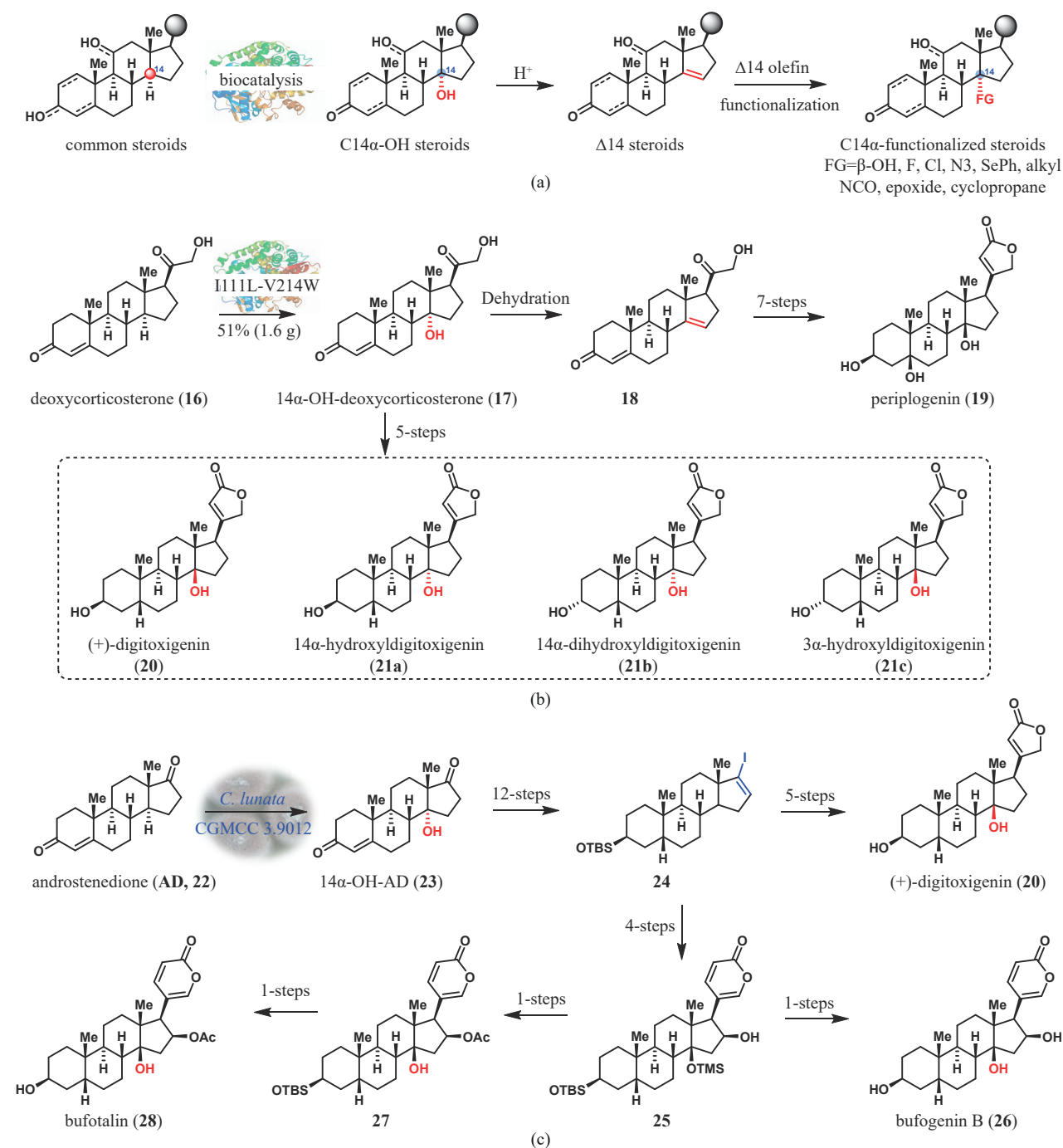


图5 C14官能团化甾体的化学酶法合成

Fig. 5 Chemoenzymatic synthesis of C14-functionalized steroids

原 **36** 通常导致产率低且对映选择性差。生物催化还原酶具有较高的区域-立体选择性，其中酮还原酶 (KRED1-Pglu) 可还原 **36**，提供所需的立体异构体 (13*R*, 17*S*)-仲二酮 (**37**)，具有出色的立体选择性 (>98% ee)^[64]。2019年，马延和团队^[65] 筛选到一种新的酮还原酶 (RasADH)，并通过活性位

点的饱和突变获得了突变体 (F12)，可以高达 94% 的产率催化 **36** 生成 **37**，进一步结合化学合成可实现避孕药的简洁合成。

脱氢表雄酮 (DHEA, **39**) 是一种重要的内源性甾体激素，也是合成甾体激素类药物的重要中间体^[66]。2016年，Fryszkowska等^[67] 设计了一条从

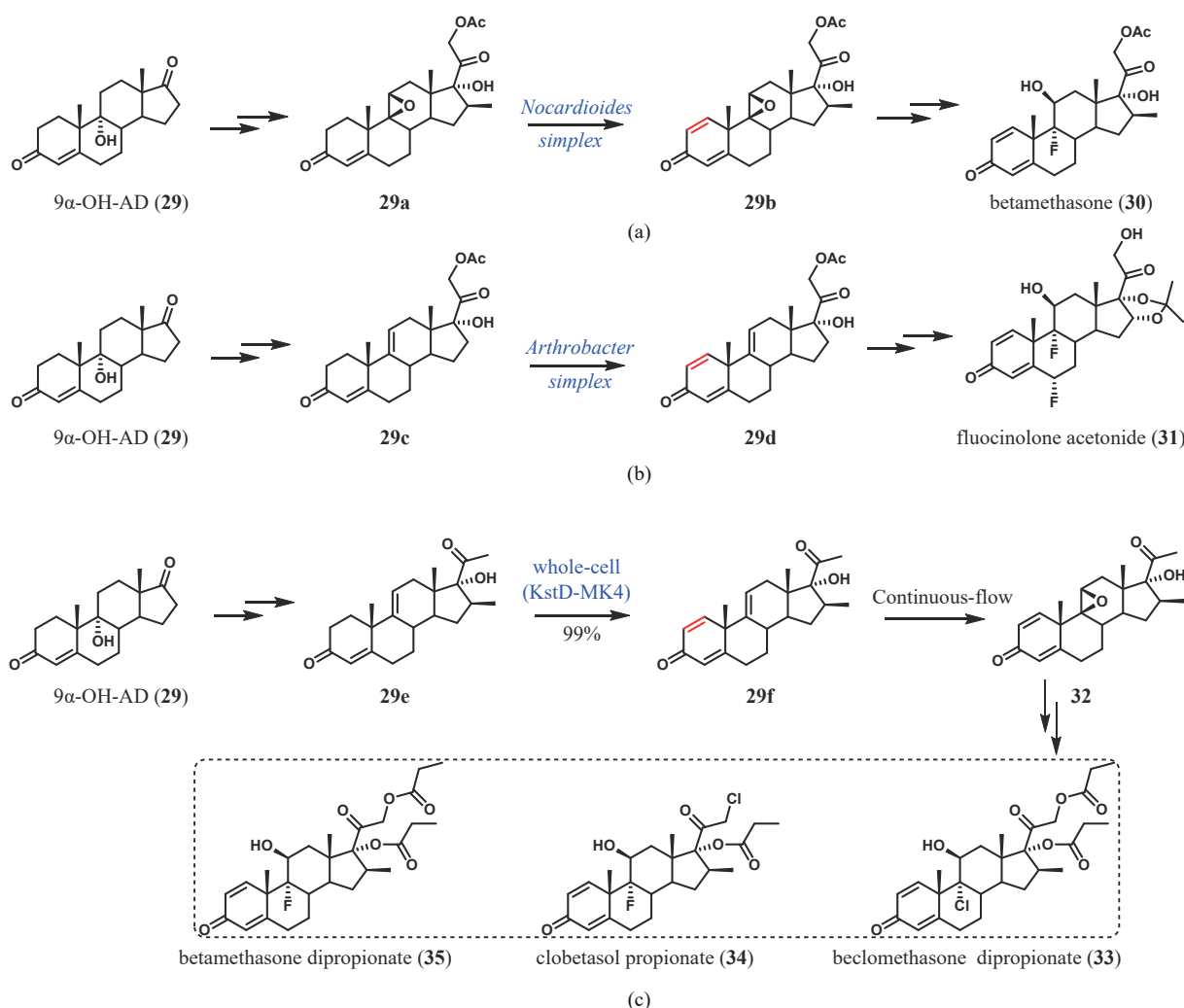


图6 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶参与的松类甾药的化学酶法合成

Fig. 6 3-Sterone- Δ^1 -dehydrogenase involved in the chemoenzymatic synthesis of pine steroids

4-AD (22) 转化为 DHEA (39) 和醋酸去氢表雄酮 (DHEA acetate, 40) 的化学酶法合成途径。该策略的关键是将 5-雄烯-3,17-二酮 (5-AD, 38) 高区域和立体选择性地还原为 39, 作者筛选了近 400 个来自鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas wittichii*) 的商业化酮还原酶, 最佳还原酶可催化 38 到 39 的 99% 的非对映选择性转化, 且该酶在高底物浓度 (150 g/L) 下表现出优异的鲁棒性和溶剂稳定性。该化学酶促路线使用廉价的植物甾醇降解产物 (4-AD) 作为起始材料, 4-AD 到 5-AD 异构化以及最终的乙酰化过程均适合进一步工业化放大生产。

黄体酮 (PG, 43) 是合成甾药的重要前体, 以植物甾醇降解的中间体 4-HBC (41) 为前体进行化学半合成是 43 的工业生产路线之一。然而分

枝杆菌转化植物甾醇合成 41 的产率低下, 此外, 41 到 43 化学合成效率低且涉及有毒试剂参与。为了解决合成 43 的上述两大问题, 2021 年, 本课题组^[2] 解析了一个参与植物甾醇代谢途径的双功能还原酶 mnOpccR, 其参与植物甾醇降解途径产生 41 的两个独立分支。通过在新金色分枝杆菌中阻断产 4-AD 的分支途径同时强化表达 mnOpccR, 构建了从植物甾醇到 36 的高产菌株, 转化率达 93%。结合 TEMPO 氧化, 实现了 41 到 43 的高效转化。这一微生物转化与化学合成相结合的策略, 为 43 的工业化规模生产提供了一条更绿色、经济、可持续的路线。

2.4 酶级联参与的化学酶法合成

不同生物催化剂之间往往具有很好的兼容性,

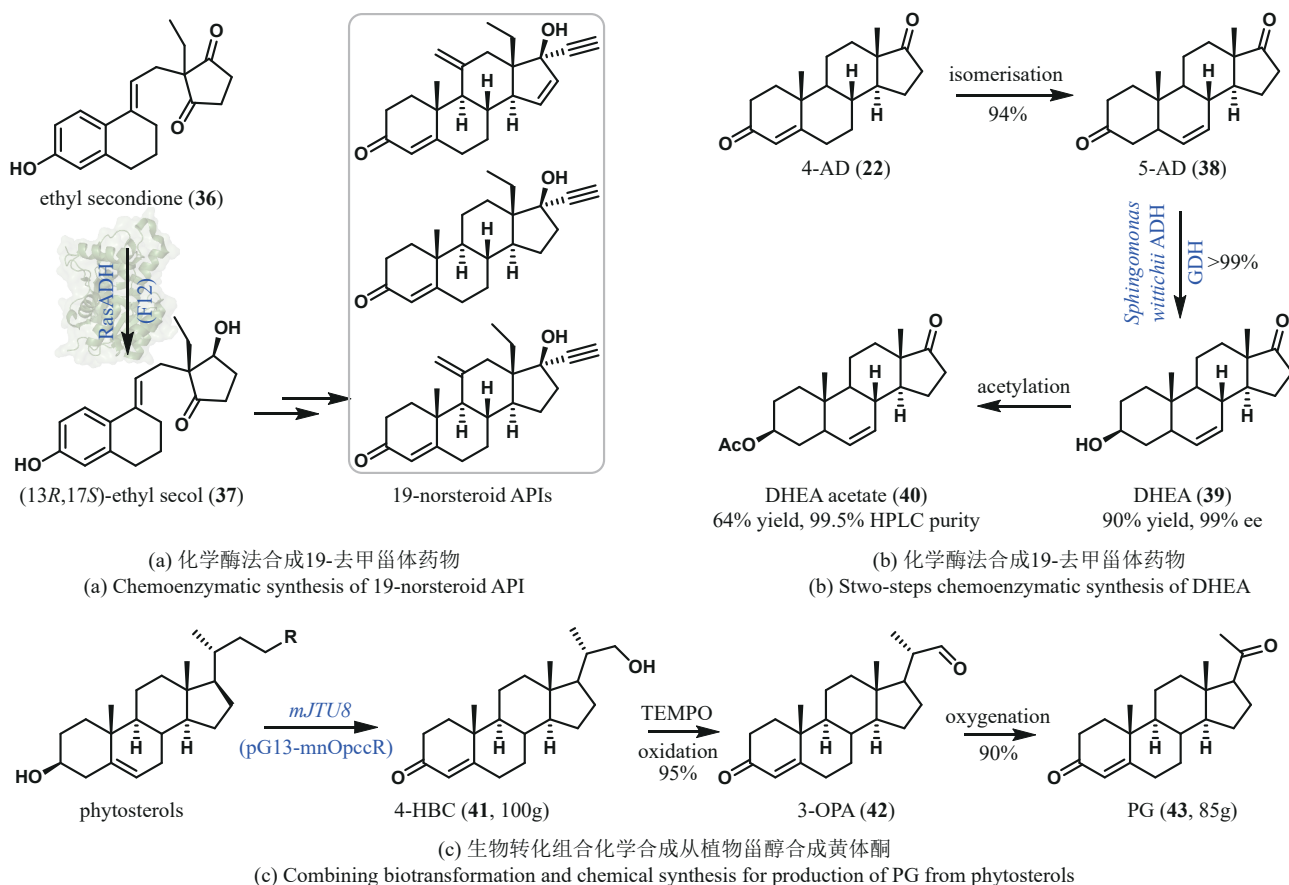


图7 还原酶参与的甾体药物化学酶法合成

Fig. 7 Reductase-mediated chemoenzymatic synthesis of steroids

相较于传统化学反应，多酶催化过程更容易实现一锅法 (one-pot) 反应。近年来，在设计甾体药物的合成路线时，研究者尝试将酶级联策略应用于甾体的化学酶法合成途径中，从而开发出更加绿色可持续的甾体合成工艺。

在熊脱氧胆酸 (UDCA) 的合成历程中，随着甾体修饰酶 (如 3α -HSDH、 7α -HSDH、 7β -HSDH、 12α -HSDH 和 7β -羟化酶) 的相继鉴定，开发了从胆酸 (CA) 或鹅去氧胆酸 (CDCA) 到 UDCA 的多条酶级联和化学酶法合成途径^[68-74]。近几年，许建和团队^[75-79] 基于酶工程改造、辅因子工程等策略建立了从 CDCA 合成 UDCA 的高效多酶级联合成工艺，UDCA 的产量可达 942 g/(L·d)。随后，结合酶固定化工程，实现了 UDCA 高达 88.5 g/(L·d) 的惊人产量。

群勃龙 (17 β -hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one, **50**) 是一种强效蛋白同化激素，由于在 C11 和 C12 之间存在双键，具有更强的合成代谢作用而成为

甾酮的替代品。2022 年，李爱涛团队^[80] 将工业用甾体 C11 α 羟化酶与合适的 17 β -酮基还原酶相结合，实现了从 **46** 到 **49** 的 C11-羟基化/17 β -酮还原的级联生物催化，关键中间体 **49** 经化学脱水在 C11-C12 处引入双键合成群勃龙。该策略的关键是挖掘甾体底物 **46** 的 C11 α -羟化酶，他们通过筛选实验室中的 P450-BM3 突变体文库，发现突变体 LG-23 对 **46** 和 **48** 分别显示出 90% 和 78% 的 C11 α 羟化选择性。为了进一步提升 C11 羟化的区域选择性，在分子动力学 (MD) 模拟的指导下进行了酶工程改造，突变体 LG-23/T438S 对两种底物都表现出优异的活性且转化率大于 95%。结合已报道的 17 β -酮基还原酶 (17 β -HSDcI)，构建了将 **46** 转化为 **49** 的重组大肠杆菌底盘 (LG-23/T438S+HSDcI)，实现了 **46** 到 **49** 的一锅法转化。利用甲苯磺酸对 **49** 进行化学脱水，得到群勃龙 (**50**)，最后以 90% 的收率实现 **50** 到醋酸群勃龙 (**51**) 的克级酯化，该酯化衍生物已被广泛应用于兽药领域。近期，利用上述类似合

成策略, 李爱涛团队^[81]实现了脱氢诺龙醋酸酯(54)的高效生产。通过一锅生物催化52的C7 β -羟基化/17 β -酮还原产生C7 β -羟基诺龙(53)。53经化学脱水和酯化合成54, 总产率为93%, 为C7为官能团化甾体药物如氟维司群、替勃龙和米勃龙的关键前体的高效合成提供了关键中间体。

将酶级联体系与流式生物催化反应器相结合, 2023年, 黄则度团队^[82]以高时空产率实现了宝丹酮(BD)和其前药宝丹酮十一烯酸酯(boldenone undecylenate)的化学酶法不对称合成。该策略以4-AD为合成前体, 通过筛选可将4-AD和1,4-AD高效转化为TS和BD的甾体C17 β -还原酶(17 β -CR)以及可将4-AD和TS高效转化为1,4-AD和BD的3-酮基- Δ^1 -脱氢酶(ReKstD), 构建在大肠杆菌的生物催化级联反应体系, 实现了4-

AD到BD的一锅法级联转化。此外, 基于分子动力学模拟和酶工程改造, 得到了效率显著提升的ReKstD突变体ReM2, 通过调整反应条件, 增强两种酶的溶剂耐受性并结合辅因子再生手段, 将BD的时空产率提高到1.09 g/(L·h)。将上述一锅法级联反应在流式反应器中进行, 最终BD的时空产量达到10.83 g/(L·h), 这也是迄今为止报道的BD生物催化合成的最高记录。最后, 通过串联流动式的酯化反应, 以98.9%的转化率和75%的产率实现了宝丹酮十一烯酸酯的高效简洁合成(图8)。

上述酶级联催化表明, 在开发新的化学酶法合成路线中、酶工程可对天然催化剂进行有效改造, 赋予其新的催化功能以满足合成要求。与传统的全化学合成法相比, 酶催化简化了反应步骤且减少了副产物的产生, 成本降低的同时更加绿

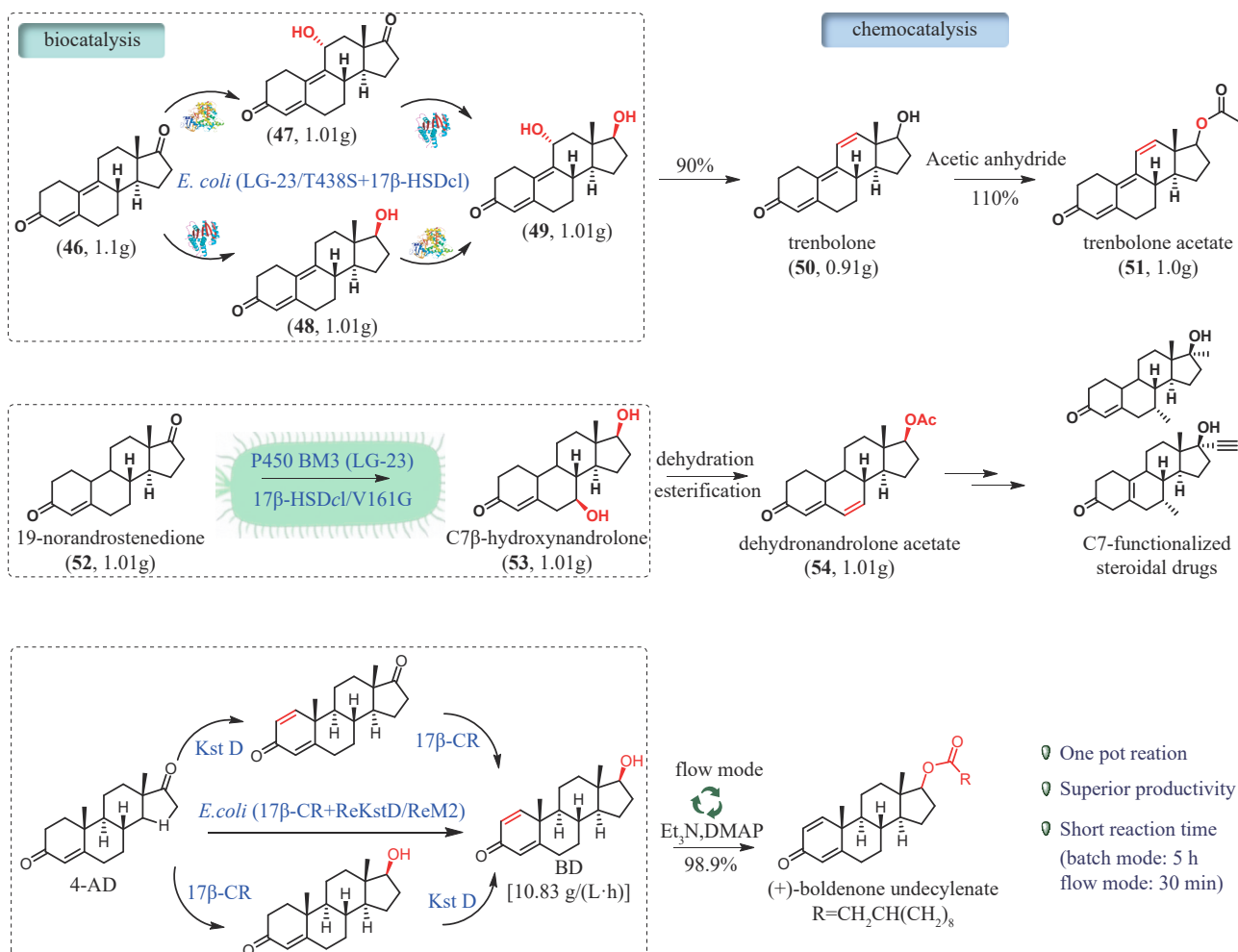


图8 酶级联参与的甾体的化学酶法合成

Fig. 8 Enzyme cascades in chemoenzymatic synthesis of steroids

色环保高效。此外，克级规模化甾体药物的合成也证明了化学酶法合成在实际工业应用中的巨大潜力以及流式生物催化反应器在高附加值化合物生产中的切实可行性。

3 酵母从头合成甾体原料

在微生物中从简单碳源出发自给自足合成甾体化合物，是甾体药物生产技术革新的重大方向，有望真正实现甾体药物的绿色生物制造。麦角甾醇合成途径是酵母中天然甾醇合成途径，与胆固醇和植物甾醇的生物合成共享许多中间体。因此，酵母作为合适的宿主，通过构建异源甾醇途径可用于高附加值甾体的从头合成。2003年，Dumas团队^[83]通过改变酵母内源的麦角甾醇合成路线，实现了氢化可的松的微生物全合成；数年后，Brocard-Masson等^[84]基于多拷贝基因整合表达，将氢化可的松的产量提升到了120 mg/L，充分展现了微生物全合成甾体化合物的巨大应用潜力。随着合成生物学和代谢工程技术的快速发展，在酵母底盘中重塑甾醇生物合成途径，已实现多种甾醇和甾体化合物从葡萄糖等简单碳源的从头生物合成^[85-87]。

7-脱氢胆固醇（7-dehydrocholesterol, 7-DHC）是生产维生素D₃的关键药物中间体，具有广泛的应用前景。2015年，元英进院士课题组^[88]首次在酿酒酵母实现了从葡萄糖到7-DHC的从头合成，开启了7-DHC在酵母中的全合成研究；随后，基于启动子工程策略使7-DHC的产量达到250.8 mg/L^[89]；2021年，该课题组通过关键酶的亚细胞定位解决代谢流失衡，进一步将7-DHC的产量提高到360.6 mg/L^[90]。2022年，刘龙课题组^[91]通过重建代谢网络，优化代谢通量分布等手段，同样构建了高效生产7-DHC的酵母底盘，摇瓶产量为365.5 mg/L；同年，该课题组基于基因过表达和内质网工程等手段，将工程酿酒酵母中7-DHC的发酵产量提高到455.6 mg/L，在5L发酵罐中达到2870 mg/L^[92]。与此同时，周景文课题组^[93]也实现了7-DHC在酵母中的从头合成，摇瓶产量649.5 mg/L，在5L发酵罐中为2.0 g/L。2023年，于洪巍团队^[94]通过组合调控内源性竞争途径、前

体供应和转化以及关键途径酶的亚细胞重定位，构建了新的7-DHC的酵母生产菌株，摇瓶产量为370.68 mg/L，在5 L发酵罐中的产量为1.56 g/L。

薯蓣皂苷（diosgenin）是合成各种甾体药物的重要原料，主要从人工栽培的薯蓣属植物中提取得到，2021年，张学礼团队^[95]解析了薯蓣皂苷的生物合成途径并通过在工程酵母中异源表达来自植物、动物和酵母的目的基因，实现了薯蓣皂苷在酵母中的从头合成，产量为10 mg/L。次年，通过优化合成途径、微调途径中的基因表达和消除竞争途径，进一步开发了有望规模化生产薯蓣皂苷的酵母菌菌株，高密度分批补料发酵使得产量达到2.03 g/L，是迄今为止报道的酵母从头合成薯蓣皂苷的最高产量^[96]。

植物甾醇是甾体药物合成的另一重要原料，2016年，元英进院士团队^[97]利用解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）为底盘，葵花籽油为碳源，引入外源7-脱氢胆固醇还原酶（DHCR7），建立了菜油甾醇（campesterol）的酵母生产菌株，产量达（453±24.7）mg/L。次年，该课题组^[98]基于关键基因的强化表达，使得菜油甾醇的产量提升至942 mg/L。2020年，Xu等研究者^[99]通过代谢工程、菌株进化和发酵工程重建了可生产多种植物甾醇的酵母菌株，各植物甾醇的产量分别为：油菜甾醇（约7 mg/L）、β-谷甾醇（约2 mg/L）、22-羟基油菜甾醇（约1 mg/L）和22-hydroxycampesterol-4-en-3-one（约4 mg/L）。2023年，该课题组在酵母中恢复甾醇酰基转移酶的活性同时增强上游FPP供应，构建了可产18.4 mg/L菜油甾醇的酵母菌株^[100]。2020年，孟永宏团队^[101]通过异源引入DHCR7，同样实现了菜油甾醇在解脂耶氏酵母中从头合成，并在5 L的生物反应器中培养最优的工程菌144 h，获得了837 mg/L的菜油甾醇产量。2021年，饶志明课题组^[102]基于过表达异源DHCR7与内源启动子工程策略，构建了产菜油甾醇的酿酒酵母菌株，通过5 L发酵罐进行补料分批发酵，实现了916.88 mg/L菜油甾醇的发酵生产。近期，张学礼团队^[103]基于高效的CRISPR/Cas9技术对工业酵母*Cyberlindnera jadinii*进行代谢途径改造，获得的工程菌株可在摇瓶发酵中合成92.1 mg/L的菜油甾醇，随后通过高密度补料分批发酵，菜

甾醇产量达到807 mg/L。

除了植物甾醇原料外,孕烯醇酮(pregnenolone)在酵母中的从头合成也早在1988年已实现^[104],但一直没有取得突破性进展。2019年,元英进院士团队^[105]在上述构建的产菜油甾醇的工程解脂耶氏酵母中引入哺乳动物来源的甾醇侧链裂解酶CYP11A1及其电子传递链,成功创建了一株孕烯醇酮产量为78.0 mg/L的解脂耶氏酵母工程菌。上述工作展现了酵母从头合成甾体化合物的可行性,但普遍存在甾体化合物产量低的问题,难以实现工业应用。若能通过有效平衡酵母中甾体合成代谢通路网络、挖掘并强化表达甾体转运蛋白等手段,建立甾体高产高耐受的酵母菌株,将有望实现甾体原料的规模化从头生产,彻底革新甾体原料的生产方式,实现甾体化合物的绿色生物制造。

4 总结和展望

基于微生物代谢途径解析,分枝杆菌转化植物甾醇生产甾药中间体已实现工业化生产,基于分枝杆菌调控机制的研究,魏东芝团队^[106-111]也取得了一系列进展,但植物甾醇降解途径的调控机制与部分关键酶的催化机理尚未完整阐明。上述问题的攻克,将建立更高效的工程化工业菌株,同时实现植物甾醇的可控降解,开发出更适用于高效合成甾体药物的新一代甾药中间体。此外,以工程化的分枝杆菌为底盘,导入外源甾体修饰基因,目前实现了更多高附加值的甾药中间体的绿色合成,但外源甾体修饰酶尤其是甾体羟化酶多为来源于真菌的膜蛋白,其在分枝杆菌中表达效率低下。因此基于生物信息学、计算生物学及深度学习技术,挖掘开发细菌来源的高活性甾体修饰酶,增强外源元件和底盘细胞的适配性,将建立更适用于工业化生产的甾体中间体生产菌株,为复杂甾体药物的合成提供多样化前体,简化其生产路线。

化学酶法合成具有高区域-立体选择性、高产率、环境友好等优势,为药物合成路线的设计和安全的工艺开发提供了全新途径。酶催化不仅用于全合成中的单一步骤,而且还以复杂的级联方式应用,可显著缩短合成路线或避免不必要的副

反应,在复杂活性药物的合成方面显示出了巨大的潜力。挖掘和开发具有新功能、高催化活性和鲁棒性的甾体生物催化剂是推动化学酶策略应用的关键。随着发现/创造的催化工具越来越多样,结合化学合成的精巧设计,将实现复杂天然产物非天然合成路线的定制,推动甾体药物及其类似物更高效、简洁、规模化的合成。

从简单碳源出发直接合成甾体药物的可行性已在酵母中证实,并实现了薯蓣皂苷、菜油甾醇、7-脱氢胆固醇等多种重要甾体的从头合成。尽管酵母作为底盘菌株可创建甾醇合成途径,对接其自身的甾醇转化途径,并具有遗传操作成熟等优势,但酵母对高浓度疏水甾体底物的耐受性差且对异源蛋白的分泌能力低,利用其从头合成甾体化合物的产量一直很难满足工业化需求,限制了在制药和工业生产中的广泛应用。相比酵母而言,分枝杆菌作为生产甾体化合物的工业菌株,可实现甾体化合物的规模化生产。在分枝杆菌底盘中构建甾醇合成途径,并结合该菌自身的甾醇转化功能,将有望实现在分枝杆菌中从头合成目标甾体化合物,真正实现甾体化合物的工业化绿色制造,随着甾醇合成途径的完整解析和代谢工程的快速发展,这一方向的发展未来将带来重大的实际成果。我国是甾体原料药及制剂的主要供应国,产量占世界1/3以上,但却不是甾体药物生产的强国,很大程度都受限于甾体合成技术的落后,研究者应以甾体绿色合成为主,多种合成途径并进的方式,推动我国甾体药物行业的发展。

参 考 文 献

- [1] WANG F Q, YAO K, WEI D Z. From soybean phytosterols to steroid hormones[M/OL]//Soybean and health. Rijeka, Croatia: InTech(2011-09-12) [2023-12-01]. <https://www.intechopen.com/chapters/19751>.
- [2] PENG H D, WANG Y Y, JIANG K, et al. A dual role reductase from phytosterols catabolism enables the efficient production of valuable steroid precursors[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(10): 5414-5420.
- [3] DONOVA M V, EGOVA O V. Microbial steroid transformations: current state and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1423-1447.
- [4] TONG W Y, DONG X. Microbial biotransformation: recent

- developments on steroid drugs[J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2009, 3(2): 141-153.
- [5] FENG J H, WU Q Q, ZHU D M, et al. Biotransformation enables innovations toward green synthesis of steroidal pharmaceuticals[J]. *ChemSusChem*, 2022, 15(9): e202102399.
- [6] 熊亮斌, 宋璐, 赵云秋, 等. 甾体化合物绿色生物制造: 从生物转化到微生物从头合成[J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 942-963.
- XIONG L B, SONG L, ZHAO Y Q, et al. Green biomanufacturing of steroids: from biotransformation to *de novo* synthesis by microorganisms[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(6): 942-963.
- [7] FERNÁNDEZ-CABEZÓN L, GALÁN B, GARCÍA J L. New insights on steroid biotechnology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 958.
- [8] ZHANG Y, XIAO P Y, PAN D L, et al. New insights into the modification of the non-core metabolic pathway of steroids in *Mycolicibacterium* and the application of fermentation biotechnology in C-19 steroid production[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(6): 5236.
- [9] SONG S K, HE J X, GAO M, et al. Loop pathways are responsible for tuning the accumulation of C19- and C22-steroid intermediates in the mycobacterial phytosterol degradation pathway[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 19.
- [10] FERNÁNDEZ-CABEZÓN L, GALÁN B, GARCÍA J L. Engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(1): 151-161.
- [11] ZHAO Y Q, SHEN Y B, MA S, et al. Production of 5 α -androstene-3,17-dione from phytosterols by co-expression of 5 α -reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in engineered *Mycobacterium neoaurum*[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(7): 1809-1815.
- [12] TANG R, REN X X, XIA M L, et al. Efficient one-step biocatalytic multienzyme cascade strategy for direct conversion of phytosterol to C-17-hydroxylated steroids[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(24): e0032121.
- [13] FELPETO-SANTERO C, GALÁN B, GARCÍA J L. Production of 11 α -hydroxysteroids from sterols in a single fermentation step by *Mycolicibacterium smegmatis*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(6): 2514-2524.
- [14] FELPETO-SANTERO C, GALÁN B, GARCÍA J L. Engineering the steroid hydroxylating system from *Cochliobolus lunatus* in *Mycolicibacterium smegmatis*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(7): 1499.
- [15] ZHANG C W, SHEN Y B, GAO Y Y, et al. Efficient production of 14 α -OH-AD by engineered *Mycolicibacterium neoaurum* via coupled cofactor and reconstructed electron transport system[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2023, 3(2): 358-369.
- [16] LI X, CHEN T, PENG F, et al. Efficient conversion of phytosterols into 4-androstene-3,17-dione and its C1, 2-dehydrogenized and 9 α -hydroxylated derivatives by engineered *Mycobacteria*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 158.
- [17] KARPOV M V, NIKOLAEVA V M, FOKINA V V, et al. Creation and functional analysis of *Mycolicibacterium smegmatis* recombinant strains carrying the bacillary cytochromes CYP106A1 and CYP106A2 genes[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2022, 58(9): 947-957.
- [18] LIU K, WANG F Q, LIU K, et al. Light-driven progesterone production by InP-(*M. neoaurum*) biohybrid system[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 93.
- [19] ZHAO Y Q, LIU Y J, JI W T, et al. One-pot biosynthesis of 7 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from phytosterols by cofactor regeneration system in engineered *Mycolicibacterium neoaurum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 59.
- [20] ABAS H, BLENCOWE P, BROOKFIELD J, et al. Selective hydroxylation of C(sp³)-H bonds in steroids[J]. *Chemistry*, 2023, 29(4): e202301066.
- [21] RUDROFF F, MIHOVILOVIC M D, GRÖGER H, et al. Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis[J]. *Nature Catalysis*, 2018, 1: 12-22.
- [22] CHAKRABARTY S, ROMERO E O, PYSER J B, et al. Chemoenzymatic total synthesis of natural products[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(6): 1374-1384.
- [23] KILLE S, ZILLY F E, ACEVEDO J P, et al. Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution[J]. *Nature Chemistry*, 2011, 3(9): 738-743.
- [24] KASPAR F, SCHALLMEY A. Chemo-enzymatic synthesis of natural products and their analogs[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 77: 102759.
- [25] LI F Z, DENG H P, RENATA H. Chemoenzymatic approaches for exploring structure-activity relationship studies of bioactive natural products[J]. *Nature Synthesis*, 2023, 2: 708-718.
- [26] LI J, AMATUNI A, RENATA H. Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of bioactive natural products[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 55: 111-118.
- [27] PAULSEL T Q, WILLIAMS G J. Current state-of-the-art toward chemoenzymatic synthesis of polyketide natural products[J]. *ChemBioChem*, 2023, 24(21): e202300386.
- [28] RODDAN R, CARTER E M, THAIR B, et al. Chemoenzymatic approaches to plant natural product inspired compounds[J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(7): 1375-1382.
- [29] STOUT C N, WASFY N M, CHEN F, et al. Charting the evolution of chemoenzymatic strategies in the syntheses of complex natural products[J]. *Journal of the American*

- Chemical Society, 2023, 145(33): 18161-18181.
- [30] VANABLE E P, HABGOOD L G, PATRONE J D. Current progress in the chemoenzymatic synthesis of natural products [J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6373.
- [31] LATHE R. Steroid and sterol 7-hydroxylation: ancient pathways[J]. *Steroids*, 2002, 67(12): 967-977.
- [32] LI H P, LIU H M, GE W Z, et al. Synthesis of 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone and 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone [J]. *Steroids*, 2005, 70(14): 970-973.
- [33] ZHU R, LIU Y, YANG Y Y, et al. Cytochrome P450 monooxygenases catalyse steroid nucleus hydroxylation with regio- and stereo-selectivity[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2022, 364(16): 2701-2719.
- [34] SZALENIEC M, WOJTKIEWICZ A M, BERNHARDT R, et al. Bacterial steroid hydroxylases: enzyme classes, their functions and comparison of their catalytic mechanisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(19): 8153-8171.
- [35] ZHANG X D, PENG Y Q, ZHAO J, et al. Bacterial cytochrome P450-catalyzed regio- and stereoselective steroid hydroxylation enabled by directed evolution and rational design [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2020, 7(1): 2.
- [36] WANG L, WU X W, GAO C H, et al. A fungal P450 enzyme from *Fusarium graminearum* with unique 12 β -steroid hydroxylation activity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(3): 22.
- [37] FERNANDES P, CRUZ A, ANGELOVA B, et al. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(6): 688-705.
- [38] CAPYK J K, D'ANGELO I, STRYNADKA N C, et al. Characterization of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase, a Rieske oxygenase in the cholesterol degradation pathway of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(15): 9937-9946.
- [39] LIU H H, XU L Q, YAO K, et al. Engineered 3-ketosteroid 9 α -hydroxylases in *Mycobacterium neoaurum*: an efficient platform for production of steroid drugs[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(14): e02777-17.
- [40] CHANG Y C, LAI K H, KUMAR S, et al. ¹H NMR-based isolation of anti-inflammatory 9, 11-secosteroids from the octocoral *Simularia leptocladus*[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(5): 271.
- [41] HE Y Q, LEE CAPLAN S, SCESA P, et al. Cyclized 9, 11-secosterol enol-ethers from the Gorgonian *Pseudopterogorgia americana*[J]. *Steroids*, 2017, 125: 47-53.
- [42] KÖLLO M, KASARI M, KASARI V, et al. Designed whole-cell-catalysis-assisted synthesis of 9,11-secosteroids[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2021, 17: 581-588.
- [43] RENATA H, ZHOU Q H, DÜNSTL G, et al. Development of a concise synthesis of ouabagenin and hydroxylated corticosteroid analogues[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(3): 1330-1340.
- [44] KAPLAN W, KHATRI H R, NAGORNY P. Concise enantioselective total synthesis of cardiotoxic steroids 19-hydroxysarmentogenin and trewianin aglycone[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(22): 7194-7198.
- [45] LU W, CHEN X, FENG J H, et al. A fungal P450 enzyme from *Thanatephorus cucumeris* with steroid hydroxylation capabilities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(13): e00503-18.
- [46] WANG J L, ZHANG Y N, LIU H H, et al. A biocatalytic hydroxylation-enabled unified approach to C19-hydroxylated steroids[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3378.
- [47] EL-SEEDI H R, KHALIFA S A M, TAHER E A, et al. Cardenolides: insights from chemical structure and pharmacological utility[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 141: 123-175.
- [48] ZHONG Y, ZHAO C, WU W Y, et al. Total synthesis, chemical modification and structure-activity relationship of bufadienolides[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 189: 112038.
- [49] CHEN J, TANG J L, XI Y Y, et al. Production of 14 α -hydroxysteroids by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* biocatalyst expressing of a fungal steroid 14 α -hydroxylation system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(20): 8363-8374.
- [50] SONG F Z, ZHENG M M, WANG J L, et al. Chemoenzymatic synthesis of C14-functionalized steroids[J]. *Nature Synthesis*, 2023, 2: 729-739.
- [51] ZHAO Y, ZHANG B, SUN Z Q, et al. Biocatalytic C14-hydroxylation on androstenedione enabled modular synthesis of cardiotoxic steroids[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(16): 9839-9845.
- [52] SAMUEL S, NGUYEN T, CHOI H A. Pharmacologic characteristics of corticosteroids[J]. *Journal of Neurocritical Care*, 2017, 10(2): 53-59.
- [53] ZHANG B, ZHOU D F, LI M J, et al. Progress of 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases for steroid production[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2024, 4(2): 631-660.
- [54] PETRUSMA M, VAN DER GEIZE R, DIJKHUIZEN L. 3-Ketosteroid 9 α -hydroxylase enzymes: Rieske non-heme monooxygenases essential for bacterial steroid degradation[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 106(1): 157-172.
- [55] CHENG H J, SUN Y H, CHANG H W, et al. Compatible solutes adaptive alterations in *Arthrobacter simplex* during exposure to ethanol, and the effect of trehalose on the stress resistance and biotransformation performance[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(5): 895-908.

- [56] LUO J M, ZHU W C, CAO S T, et al. Improving biotransformation efficiency of *Arthrobacter simplex* by enhancement of cell stress tolerance and enzyme activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(2): 704-716.
- [57] TANG J, ZENG C L, XIE L Y, et al. Improved synthesis of fluocinolone acetonide and process research of 6 α ,9 α -fluorination[J]. Chemistry Letters, 2018, 47(1): 110-112.
- [58] 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.
- [59] WÓJCIK P, GLANOWSKI M, WOJTKIEWICZ A M, et al. Universal capability of 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases to catalyze Δ^1 -dehydrogenation of C17-substituted steroids[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 119.
- [60] WU Y, MA J N, SHI J H, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Arthrobacter simplex* in response to cortisone acetate and its mutants with improved Δ^1 -dehydrogenation efficiency[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(16): 6376-6388.
- [61] WANG Y, ZHANG R, FENG J H, et al. A new 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase with high activity and broad substrate scope for efficient transformation of hydrocortisone at high substrate concentration[J]. Microorganisms, 2022, 10(3): 508.
- [62] ZHANG Y J, LIU M J, WANG H J, et al. Focused mutagenesis in non-catalytic cavity for improving catalytic efficiency of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase[J]. Molecular Catalysis, 2022, 531: 112661.
- [63] WEI J H, ZHANG Y J, LIU M J, et al. Divergent chemo- and biocatalytic route to 16 β -methylcorticoids: asymmetric synthesis of betamethasone dipropionate, clobetasol propionate, and beclomethasone dipropionate[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2024, 63(4): e202313952.
- [64] CONTENTE M L, MOLINARI F, SERRA I, et al. Stereoselective enzymatic reduction of ethyl secodione: preparation of a key intermediate for the total synthesis of steroids[J]. European Journal of Organic Chemistry, 2016, 2016(7): 1260-1263.
- [65] CHEN X, ZHANG H L, MARIA-SOLANO M A, et al. Efficient reductive desymmetrization of bulky 1,3-cyclodiketones enabled by structure-guided directed evolution of a carbonyl reductase[J]. Nature Catalysis, 2019, 2: 931-941.
- [66] DING H X, LIU K K C, SAKYA S M, et al. Synthetic approaches to the 2011 new drugs[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, 21(11): 2795-2825.
- [67] FRYSZKOWSKA A, PETERSON J, DAVIES N L, et al. Development of a chemoenzymatic process for dehydroepiandrosterone acetate synthesis[J]. Organic Process Research & Development, 2016, 20(8): 1520-1528.
- [68] MONTI D, FERRANDI E E, ZANELATO I, et al. One-pot multienzymatic synthesis of 12-ketoursodeoxycholic acid: subtle cofactor specificities rule the reaction equilibria of five biocatalysts working in a row[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2009, 351(9): 1303-1311.
- [69] SUN B Q, KANTZOW C, BRESCH S, et al. Multi-enzymatic one-pot reduction of dehydrocholic acid to 12-ketoursodeoxycholic acid with whole-cell biocatalysts[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(1): 68-77.
- [70] TONIN F, ARENDS I W C E. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review [J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2018, 14: 470-483.
- [71] LIU L, BRAUN M, GEBHARDT G, et al. One-step synthesis of 12-ketoursodeoxycholic acid from dehydrocholic acid using a multienzymatic system[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(2): 633-639.
- [72] SHI S C, YOU Z N, ZHOU K, et al. Efficient synthesis of 12-oxochenodeoxycholic acid using a 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Rhodococcus ruber*[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2019, 361(20): 4661-4668.
- [73] GROBE S, BADENHORST C P S, BAYER T, et al. Engineering regioselectivity of a P450 monooxygenase enables the synthesis of ursodeoxycholic acid via 7 β -hydroxylation of lithocholic acid[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(2): 753-757.
- [74] YOU Z N, CHEN Q, SHI S C, et al. Switching cofactor dependence of 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase for cost-effective production of ursodeoxycholic acid[J]. ACS Catalysis, 2019, 9(1): 466-473.
- [75] ZHENG M M, WANG R F, LI C X, et al. Two-step enzymatic synthesis of ursodeoxycholic acid with a new 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus torques*[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(4): 598-604.
- [76] ZHENG M M, CHEN F F, LI H, et al. Continuous production of ursodeoxycholic acid by using two cascade reactors with co-immobilized enzymes[J]. ChemBioChem, 2018, 19(4): 347-353.
- [77] LI H P, YOU Z N, LIU Y Y, et al. Continuous-flow microreactor-enhanced clean NAD⁺ regeneration for biosynthesis of 7-oxo-lithocholic acid[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2022, 10(1): 456-463.
- [78] ZHENG M M, CHEN K C, WANG R F, et al. Engineering 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase for enhanced ursodeoxycholic acid production by multiobjective directed evolution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(6): 1178-1185.
- [79] JI Q Z, TAN J, ZHU L C, et al. Preparing tauroursodeoxycholic

- acid (TUDCA) using a double-enzyme-coupled system[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 105: 1-9.
- [80] PENG Y Q, GAO C H, ZHANG Z L, et al. A chemoenzymatic strategy for the synthesis of steroid drugs enabled by P450 monooxygenase-mediated steroidal core modification[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(5): 2907-2914.
- [81] ZHANG Z L, GAO C H, ZHAO J, et al. A designed chemoenzymatic route for efficient synthesis of 6-dehydronandrolone acetate: a key precursor in the synthesis of C7-functionalized steroidal drugs[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(19): 13111-13116.
- [82] ZHANG Y J, LIU M J, YANG Z X, et al. Batch and continuous flow asymmetric synthesis of anabolic-androgenic steroids via a single-cell biocatalytic Δ^1 -dehydrogenation and C17 β -carbonyl reduction cascade[J]. *Green Chemistry*, 2023, 25(8): 3223-3235.
- [83] SZCZEBARA F M, CHANDELIER C, VILLERET C, et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(2): 143-149.
- [84] BROCARD-MASSON C, BONNIN I, DUMAS B. Process for preparing genetically transformed yeasts capable of producing a molecule of interest at a high titre: US20140186885[P]. 2014-07-03.
- [85] GU Y H, JIAO X, YE L D, et al. Metabolic engineering strategies for *de novo* biosynthesis of sterols and steroids in yeast[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 110.
- [86] XU S H, LI Y R. Yeast as a promising heterologous host for steroid bioproduction[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47: 829-843.
- [87] JIANG Y Q, LIN J P. Recent progress in strategies for steroid production in yeasts[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2022, 38(6): 93.
- [88] 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.
- [89] GUO X J, XIAO W H, WANG Y, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 7-dehydrocholesterol overproduction[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 192.
- [90] 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]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 663973.
- [91] QU L S, XIU X, SUN G Y, et al. Engineered yeast for efficient *de novo* synthesis of 7-dehydrocholesterol[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(5): 1278-1289.
- [92] XIU X, SUN Y, WU Y K, et al. Modular remodeling of sterol metabolism for overproduction of 7-dehydrocholesterol in engineered yeast[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 360: 127572.
- [93] WEI W Q, GAO S, YI Q, et al. Reengineering of 7-dehydrocholesterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* using combined pathway and organelle strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 978074.
- [94] GU Y H, CHEN S H, JIAO X, et al. Combinatorial metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved production of 7-dehydrocholesterol[J]. *Engineering Microbiology*, 2023, 3: 100100.
- [95] CHENG J, CHEN J, LIU X N, et al. The origin and evolution of the diosgenin biosynthetic pathway in yam[J]. *Plant Communications*, 2021, 2(1): 100079.
- [96] XU L P, WANG D, CHEN J, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for gram-scale diosgenin production [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 70: 115-128.
- [97] DU H X, XIAO W H, WANG Y, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for campesterol overproduction[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146773.
- [98] ZHANG Y, WANG Y, YAO M D, et al. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(7): 1033-1039.
- [99] XU S H, CHEN C, LI Y R. Engineering of phytosterol-producing yeast platforms for functional reconstitution of downstream biosynthetic pathways[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(11): 3157-3170.
- [100] XU S H, TENG X X, LI Y R. Optimization of campesterol-producing yeast strains as a feasible platform for the functional reconstitution of plant membrane-bound enzymes[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(4): 1109-1118.
- [101] QIAN Y D, TAN S Y, DONG G R, et al. Increased campesterol synthesis by improving lipid content in engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(16): 7165-7175.
- [102] 周武林, 高惠芳, 吴玉玲, 等. 重组酿酒酵母生物合成菜油甾醇[J]. *化工学报*, 2021, 72(8): 4314-4324.
- ZHOU W L, GAO H F, WU Y L, et al. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for biosynthesis of campesterol[J]. *CIESC Journal*, 2021, 72(8): 4314-4324.
- [103] GU L S, ZHANG R X, FAN X Q, et al. Development of CRISPR/Cas9-based genome editing tools for polyploid yeast *Cyberlindnera jadinii* and its application in engineering heterologous steroid-producing strains[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(10): 2947-2960.
- [104] DUPORT C, SPAGNOLI R, DEGRYSE E, et al. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(2): 186-189.
- [105] ZHANG R S, ZHANG Y, WANG Y, et al. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450_{sec} system[J].

- ACS Synthetic Biology, 2019, 8(12): 2666-2678.
- [106] 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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(3): 626-631.
- [107] LIU M, ZHU Z T, TAO X Y, et al. Single nucleotide polymorphism analysis for the production of valuable steroid intermediates in *Mycobacterium neoaurum*[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(11): 1881-1892.
- [108] LIU M, ZHU Z T, TAO X Y, et al. RNA-Seq analysis uncovers non-coding small RNA system of *Mycobacterium neoaurum* in the metabolism of sterols to accumulate steroid intermediates [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 64.
- [109] XIONG L B, SUN W J, LIU Y J, et al. Enhancement of 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione production from soybean phytosterols by deficiency of a regulated intramembrane proteolysis metalloprotease in *Mycobacterium neoaurum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(48): 10520-10525.
- [110] LIU M, XIONG L B, TAO X Y, et al. Integrated transcriptome and proteome studies reveal the underlying mechanisms for sterol catabolism and steroid production in *Mycobacterium neoaurum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(34): 9147-9157.
- [111] LIU M, XIONG L B, TAO X Y, et al. Metabolic adaptation of *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795 in the catabolism of sterols for producing important steroid intermediates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(45): 12141-12150.



通讯作者: 瞿旭东(1980—),男,博士,教授,博士生导师。研究方向为天然骨架的定向生物合成。

E-mail: quxd@sjtu.edu.cn



第一作者: 郑梦梦(1993—),女,博士后。研究方向为天然产物生物合成。

E-mail: sjtu7126164@sjtu.edu.cn