

表达 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶降解植物甾醇合成雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮

张乐乐¹, 张显¹, 邵明龙¹, 陈榕榕¹, 饶志明¹, 李会², 许正宏²

1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

张乐乐, 张显, 邵明龙, 等. 表达 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶降解植物甾醇合成雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1589–1600.

Zhang LL, Zhang X, Shao ML, et al. Overexpressing 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase for degrading phytosterols into androst-1,4-diene-3,17-dione. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1589–1600.

摘 要: 构建分枝杆菌表达载体 pMTac 并在分枝杆菌 *Mycobacterium neoaurum* JC-12 中加强表达甾醇降解过程中的关键酶 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 (KSDD) 以提高雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮 (ADD) 的产量。将 pMF41 的启动子 *pACE* 替换成 *tac* 启动子构建载体 pMTac, 在分枝杆菌中分别表达报告基因绿色荧光蛋白 (GFP) 和关键酶 KSDD, 通过 GFP 亮度和 KSDD 酶活验证 *tac* 启动子在 *M. neoaurum* JC-12 中的效果, 并发酵验证加强表达 KSDD 对产物 ADD 的影响。荧光显微照片表明两个载体均能在 *M. neoaurum* JC-12 表达 GFP, 但 *tac* 启动子的效果比 *pACE* 强。酶活测定结果为重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* 破碎细胞上清液中 KSDD 酶活比原始菌提高了 6.53 倍, 比 *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* 提高了 4.36 倍。摇瓶发酵显示重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* ADD 的产量比原始菌提高了 22.2%, 由 4.86 g/L 提高到 5.94 g/L, 而 AD 的产量由 0.92 g/L 减少到 0.17 g/L, 降低了 81.5%; 与 *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* 比, ADD 产量提高了 12.7%, AD 降低了 71.2%。以 20 g/L 植物甾醇为底物, 5 L 发酵罐中重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* 的 ADD 产量达到 10.28 g/L。结果表明, 构建的新型表达载体 pMTac 适用于在 *M. neoaurum* JC-12 中加强表达关键酶 KSDD, 而且在 *M. neoaurum* JC-12 中过量表达 KSDD 有助于 ADD 产量的提高, 为目前报道的发酵法利用新金色分枝杆菌降解植物甾醇合成 ADD 的最高水平。

关键词: *Mycobacterium neoaurum* JC-12, 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶, *tac* 启动子, 雄甾-4-烯-3,17-二酮, 雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮

Received: November 24, 2014; **Accepted:** January 26, 2015

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB725202), National High Technology Research and Development Programs of China (No. 2011AA02A211), National Natural Science Foundation of China (No. 21276110), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51306A), a Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

Corresponding author: Zhiming Rao. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB725202), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A211), 国家自然科学基金 (No. 21276110), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP51306A), 江苏高校优势学科建设工程项目资助。

Overexpressing 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase for degrading phytosterols into androst-1,4-diene-3,17-dione

Lele Zhang¹, Xian Zhang¹, Minglong Shao¹, Rongrong Chen¹, Zhiming Rao¹, Hui Li², and Zhenghong Xu²

¹ The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: We constructed plasmid pMTac to overexpress 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase (KSDD) in *Mycobacterium neoaurum* JC-12 for improving androst-1,4-diene-3,17-dione (ADD) production. To construct pMTac, *pACE* promoter on pMF41 was replaced by *tac* promoter, and then four recombinants were constructed, which were *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*gfp*, *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*gfp*, *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* and *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd*. Fluorescence detection results show that much more green fluorescent protein (GFP) was expressed in *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* than *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd*. The activity of KSDD was 2.41 U/mg in *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd*, 6.53-fold as that of *M. neoaurum* JC-12 and 4.36-fold as that of *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd*. In shake flask fermentation, ADD production of *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* was 5.94 g/L, increased about 22.2 % compared to the original strain *M. neoaurum* JC-12 and 12.7% to *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd*. AD (4-androstene-3,17-dione) production of JC-12/pMTac-*ksdd* was 0.17 g/L, decreased 81.5% compared to *M. neoaurum* JC-12 and 71.2% to *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd*. In the 5 L fermenter, 20 g/L phytosterols was used as substrate, ADD production of *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* was improved to 10.28 g/L. pMTac is favorable for expressing KSDD in *M. neoaurum* JC-12, and overexpression of KSDD has beneficial effect on ADD producing, and it is the highest level ever reported using fermentation method in *M. neoaurum*.

Keywords: *Mycobacterium neoaurum* JC-12, 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase, *tac* promoter, 4-androstene-3,17-dione, androst-1,4-diene-3,17-dione

甾体类药物是仅次于抗生素的一大类药物, 广泛应用于抗肿瘤、消炎、抗菌、抗病毒、抗真菌、抗雌激素、抗惊厥等领域^[1]。全球每年对甾体类药物的需求量超过 100 万 t, 总价值超 100 亿美元^[2]。甾体药物中间体的合成一般采用微生物转化法^[3-4]。植物甾醇作为合成甾体激素类药物中间体的原料, 具有廉价易得, 微生物易于降解其侧链等特点^[5-6]。微生物代谢植物甾醇的主要中间产物有雄甾-4-烯-3,17-二酮(4-androstene-3,17-dione, AD)、雄甾-1,4-二烯

-3,17-二酮 (Androst-1,4-diene-3,17-dione, ADD)、睾酮、宝丹酮、9OH-AD 等, 其中 AD 和 ADD 市场需求量最高, 因此利用廉价的底物植物甾醇高效合成 AD 和 ADD 具有巨大的商业价值^[7]。

3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶 (KSDD, EC 1.3.99.4) 在甾体化合物代谢中具有重要的作用^[8-11], 它催化 AD 脱去 2 个氢生成 ADD, 同时也可催化 9OH-AD 合成 9OH-ADD, 9OH-ADD 随后自发打开母核进而被进一步降解成 CO₂ 和 H₂O。基因敲除实验已经验证 KSDD 是甾醇代谢过程中

关键酶, 敲除 KSDD 的编码基因将不能获得 ADD^[12-15]。目前, 由于没有合适的工具——表达载体, 利用分子生物学方法对分枝杆菌进行改造生产 ADD 比较困难^[16]。虽然已有对 KSDD 同源加强表达的研究, 但并未给出具体的酶活数据及蛋白表达情况^[15,17]。分枝杆菌 *Mycobacterium neoaurum* 能够降解植物甾醇合成激素类药物中间体^[18-21]。*M. neoaurum* JC-12 是本研究室从土壤中筛选到的菌株, 具有降解植物甾醇合成 AD 和 ADD 的能力。实验室前期克隆表达出 *M. neoaurum* JC-12 的 *ksdd* 基因, 并对 KSDD 的转化能力进行了研究^[22]。在分枝杆菌中加强表达 KSDD 是促进 ADD 高效生产的一个重要途径。然而, 分枝杆菌表达系统还不完善, 缺乏高效表达载体, 这已成为目前分枝杆菌降解植物甾醇合成药物中间体研究中的瓶颈。*tac* 启动子是 *trp* 启动子和 *lacUV5* 的拼接杂合启动子, 在大肠杆菌中具有很高的转录水平, 用于钝齿棒杆菌、黄色短杆菌和谷氨酸棒杆菌等阳性菌表达基因, 也有较高的表达效率^[23]。

所以, 本研究构建了具有 *tac* 启动子的分枝杆菌表达载体, 并通过表达绿色荧光蛋白 GFP 验证其在 *M. neoaurum* JC-12 中的高效表达, 为后续在分枝杆菌中高效表达 KSDD 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

M. neoaurum JC-12 由本实验筛选并保存, *Escherichia coli* JM109 及用于提供绿色荧光蛋白报告基因的质粒 pCAMBIA1302 和 pETac 由本实验保存, 分枝杆菌表达载体 pMF41 由上海

公共卫生中心范小勇博士惠赠。

1.2 培养方法

1.2.1 大肠杆菌的培养

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 如需固体培养基, 加入 2% 琼脂。旋转式摇床 160 r/min, 37 °C, 转化子筛选条件: 加入卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL。

1.2.2 分枝杆菌的培养

活化培养基 (g/L): 葡萄糖 5, 蛋白胨 5, 牛肉膏 5, 甘油 15, NaCl 15, pH 7.0。

摇瓶发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3, $MnCl_2$ 0.000 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 植物甾醇 10, 环糊精 30, pH 7.0 (250 mL 三角瓶, 装液量 50 mL)。感受态制备培养基: LB + 0.2% Tween 80。旋转式摇床转速为 160 r/min, 30 °C, 转化子筛选条件: 加入卡那霉素终浓度为 30 μ g/mL。

发酵罐培养基 (g/L): 植物甾醇 20, 环糊精 60, 其余同摇瓶发酵培养基 (5 L 发酵罐, 装液量 2 L)。转速 400 r/min, 30 °C, 通气量 1 vvm, 发酵过程中流加葡萄糖 (母液浓度为 800 g/L)。

1.3 主要试剂与仪器

基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、抗生素、PCR 引物、2,6-二氯酚靛酚 (DCPIP) 及吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 等购自上海生工生物工程有限公司; *Taq* 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司; 植物甾醇 (大豆甾醇 $\geq 95\%$) 购自礼来生物技术 (湖州) 有限公司; ADD 及 AD 标准样品购自 Sigma 公司。PCR 仪为 BIO-RAD C1000; 电转化仪为 BIO-RAD pulse controller (Gene Pulser); 荧光显微镜为 Nikon ECLIPSE 50。

1.4 表达载体 pMTac 的构建

根据 *tac* 启动子的序列设计引物 (表 1): *tac*-F 和 *tac*-R。以 pETac 载体为模板, 以 *tac*-F 和 *tac*-R 为引物, 进行 PCR 扩增。条件为: 95 °C 变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 保温 5 min。PCR 产物和质粒 pMF41 经 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切, T4 DNA 连接酶 16 °C 连接纯化后的产物, 转化大肠杆菌 JM109, 阳性转化子酶切电泳验证。

1.5 *tac* 启动子在分枝杆菌中的表达

1.5.1 绿色荧光蛋白表达菌株的构建

根据 GenBank 中登记的绿色荧光蛋白基因 *gfp* 设计引物 (表 1): *gfp*-F1、*gfp*-F2 和 *gfp*-R。以 pCambia1302 为模板, 分别以 *gfp*-F1 和 *gfp*-R、*gfp*-F2 和 *gfp*-R 为上下游引物, PCR 扩增片段经双酶切后分别连接到经同样双酶切的 pMF41 和 pMTac 上, 得重组载体 pMF41-*gfp* 和 pMTac-*gfp*。采用电击转化法将空载体及重组载体电转到 *M. neoaurum* JC-12 中, 用终浓度为 30 µg/mL 的固体培养筛选阳性转化子, 并提质

粒酶切验证。

1.5.2 GFP 的荧光检测

重组菌 pMF41-*gfp* 培养至 OD_{600} 为 0.8 左右时, 加入终浓度为 0.02% 乙酰胺诱导, 继续培养 24 h。重组菌 pMTac-*gfp* 不需诱导。取重组菌发酵液, 离心收集细胞, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液洗涤 3 次, 重悬, 稀释至适当浓度取少许于载玻片上, 盖上盖玻片, 在 Nikon ECLIPSE 50 荧光显微镜下观察。以原始菌 *M. neoaurum* JC-12 作为对照。

1.6 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶加强表达

1.6.1 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶加强表达菌株的构建

根据分枝杆菌 JC-12 的 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶编码基因 *ksdd* 设计引物 (表 1): *ksdd*-F1、*ksdd*-F2 和 *ksdd*-R。以分枝杆菌 JC-12 基因组 DNA 为模板, 同上得到重组表达载体 pMF41-*ksdd* 和 pMTac-*ksdd*, 并电转化至 *M. neoaurum* JC-12 中。

1.6.2 KSDD 表达及酶活测定

重组菌 pMF41-*ksdd* 培养至 OD_{600} 为 0.8 左右时, 加入终浓度为 0.02% 乙酰胺诱导, 继续培

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this research

Primers	Sequences (5'-3')	Restriction sites
<i>tac</i> -F	GCTCTAGAGGAGCTTATCGACTGCAC	<i>Xba</i> I
<i>tac</i> -R	CGGGATCCTTCTGTTTCCTGTGTGAA	<i>Bam</i> H I
<i>gfp</i> -F1	CGCGGATCCATGGTAGATCTGACTAGT	<i>Bam</i> H I
<i>gfp</i> -F2	CGCGGATCCAAAGGAGGGAAATCATGGTAATCTGAC	<i>Bam</i> H I
<i>gfp</i> -R	ACCGGAATTCTCACACGTGGTGGTGGTGGT	<i>Eco</i> R I
<i>ksdd</i> -F1	CGCGGATCCATGTTCTACATGACAGCCCAGG	<i>Bam</i> H I
<i>ksdd</i> -F2	CGCGGATCCAAAGGAGGGAAATCATGTTCTACATGACAGC	<i>Bam</i> H I
<i>ksdd</i> -R	ACCGGAATTCTTAGGCCTTCCAGCGAGATG	<i>Eco</i> R I

Restriction sites were underlined.

养 24 h。重组菌 pMTac-*ksdd* 不需诱导。取重组菌发酵液,离心收集细胞,50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液洗涤 3 次,重悬,超声波破碎细胞,8 000 r/min 离心 30 min 后得破碎细胞上清液。12% SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

采用 PMS-DCPIP 法测定 KSDD 酶活。KSDD 脱去底物 AD 的两个氢生成 ADD,蛋白自身的 FAD 接受脱去的 2H^+ 和 2e^- 成 FADH_2 , 然后 FADH_2 将 DCPIP 还原,DCPIP 在 600 nm 处有吸收峰。3 mL 反应混合物由 100 μL 粗酶液、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)、40 $\mu\text{mol/L}$ 2,6-二氯酚靛酚 (DCPIP)、1.5 mmol/L 吩嗪硫甲酯 (PMS)、500 $\mu\text{mol/L}$ AD (溶于 2% 的甲醇) 所组成,检测 600 nm 处的吸光值变化。酶活单位定义:将在 1 min 内还原 1 μmol DCPIP 所需的酶量定义为一个酶活单位 (U)。

1.7 重组分枝杆菌的发酵实验

1.7.1 摇瓶发酵条件

摇瓶发酵条件为:250 mL 三角瓶,50 mL 装液量,10%接种量,30 $^{\circ}\text{C}$,160 r/min。重组菌 pMF41-*ksdd* 接种后培养 5 h 添加终浓度为 0.02% 的乙酰胺。从发酵 48 h 开始取样,每隔 24 h 取一次,共取样 6 次,即发酵周期为 168 h。

1.7.2 5 L 发酵罐发酵条件

将活化好的种子接种至 2 L 发酵培养基中,10%接种量,30 $^{\circ}\text{C}$,400 r/min,pH 维持在 7.0–7.5。每隔 12 h 取一次样,测定葡萄糖浓度、菌体量^[18]及 AD 和 ADD 的产量。

1.7.3 发酵产物的检测

分枝杆菌 JC-12 降解植物甾醇的主要产物是 AD 和 ADD。AD 和 ADD 在 254 nm 处均有吸收峰,因此可以采用高效液相色谱法 (HPLC) 对产物进行定量的分析。取 1 mL 发酵液,加入

5 mL 乙酸乙酯萃取,漩涡振荡充分混匀,0.22 μm 尼龙滤膜过滤。HPLC 条件:色谱柱:Dimosil C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μL);流动相:70%甲醇 ($V_{\text{甲醇}}/V_{\text{水}}=7:3$);检测器与检测波长:UV 检测器,254 nm;进样量:10 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 mL/min。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pMTac 的构建

PCR 所得大小约 250 bp 左右的 *tac* 启动子片段经 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切后,连接同样双酶切的载体 pMF41,得到新载体 pMTac。构建过程及酶切验证见图 1。

2.2 *tac* 启动子在分枝杆菌中强度的分析

2.2.1 绿色荧光蛋白表达菌株的构建

PCR 所得的大小为 760 bp 左右的 *gfp* 基因片段经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后,分别连接到相应的经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的 pMF41 和 pMTac,获得重组载体 pMF41-*gfp* 和 pMTac-*gfp*。酶切验证见图 2。通过电转化法将重组载体转化至 *M. neoaurum* JC-12,获得重组菌。

2.2.2 GFP 的荧光检测

取表达后的重组菌,缓冲液洗涤 3 次,涂在玻璃载玻片上,荧光显微镜下观察,结果见图 3。荧光照片的结果显示,原始菌 *M. neoaurum* JC-12 无荧光;*M. neoaurum* JC-12/pMF41-*gfp* 和 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*gfp* 都有荧光亮度,但是 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*gfp* 的亮度明显高于 *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*gfp*,说明 *tac* 启动子可以用于分枝杆菌中表达基因,而且强度高于 *pACE*。重组菌和对照菌的诱导表达条件及荧光显微镜观察条件均相同。

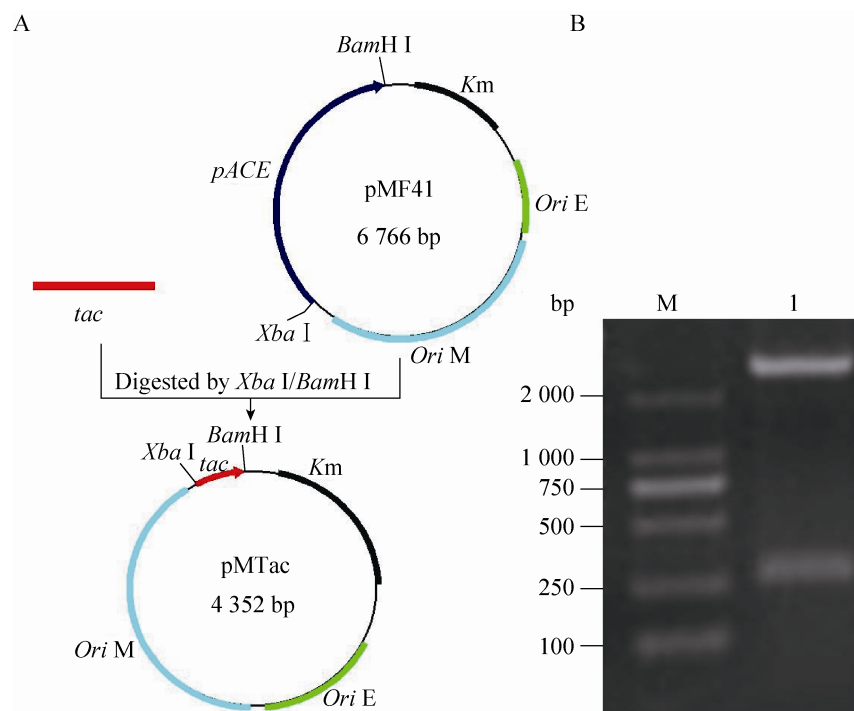


图1 新型载体 pMTac 的构建 (A) 及酶切验证 (B)

Fig. 1 Construction (A) and identification (B) of the plasmid pMTac. M: DL2 000 DNA marker; 1: pMTac digested with *Bam*H I and *Xba* I.

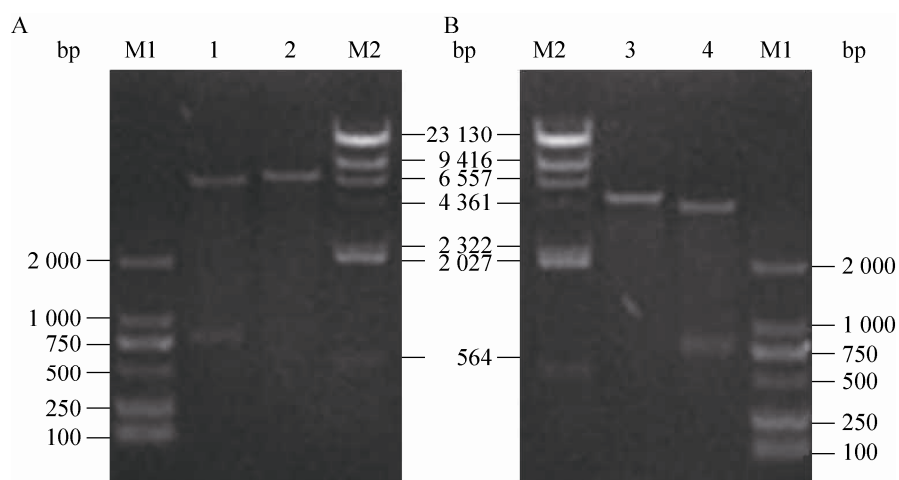


图2 重组质粒 pMF41-*gfp* (A) 和 pMTac-*gfp* (B) 的酶切验证

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMF41-*gfp* (A) and pMTac-*gfp* (B). M1: DL2 000 DNA marker; 1: pMF41-*gfp* digested with *Bam*H I and *Eco*R I; 2: pMF41-*gfp* digested with *Bam*H I; M2: λ -*Hind* III DNA marker; 3: pMTac-*gfp* digested with *Bam*H I; 4: pMTac-*gfp* digested with *Bam*H I and *Eco*R I.

2.3 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶加强表达

2.3.1 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶加强表达菌株的构建

以提取的 *M. neoaurum* JC-12 基因组 DNA 为模板 PCR 得到 *ksdd* 基因片段, 同上述方法获得重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* 和 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd*。酶切验证见图 4。

2.3.2 KSDD 的表达及酶活测定

重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* 经乙酰胺诱导 *ksdd* 表达, *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* 不需诱导, 处理后获得破细

胞上清液。SDS-PAGE 验证 KSDD 表达情况(图 5)。结果表明 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* 的破细胞上清液与 *M. neoaurum* JC-12 相比在 60 kDa 附近有一条蛋白条带加粗, 而且与这条蛋白条带与 KSDD 蛋白大小相同。*M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* 破细胞上清液与 *M. neoaurum* JC-12 相比没有明显加粗的条带。

表达后的重组菌, 超声波破碎细胞, 离心得粗酶液, 参照 1.6.2 的方法测定粗酶液中 KSDD 的活性, 结果见表 2。重组菌 *M. neoaurum*

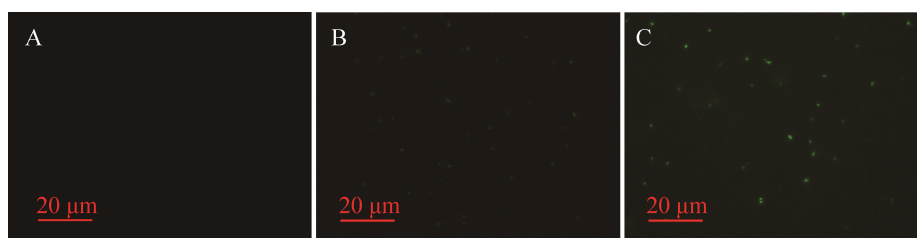


图 3 分枝杆菌 JC-12 细胞中绿色荧光蛋白的检测

Fig. 3 Observation of GFP in *M. neoaurum* JC-12 and the recombinants. (A) *M. neoaurum* JC-12. (B) *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd*. (C) *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd*.

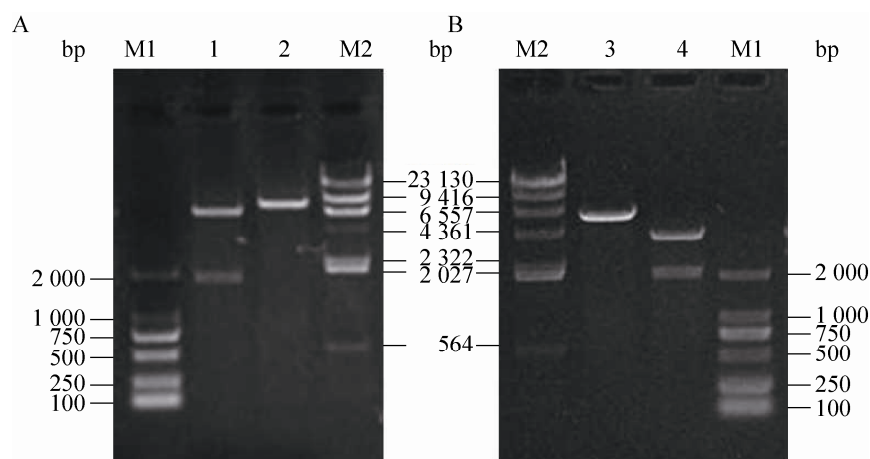


图 4 重组质粒 pMF41-*ksdd* (A) 和 pMTac-*ksdd* (B) 的酶切验证

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pMF41-*ksdd* (A) and pMTac-*ksdd* (B). M1: DL2 000 DNA marker; 1: pMF41-*ksdd* digested with *Bam*H I and *Eco*R I; 2: pMF41-*ksdd* digested with *Bam*H I; M2: λ -*Hind* III DNA marker; 3: pMTac-*ksdd* digested with *Bam*H I; 4: pMTac-*ksdd* digested with *Bam*H I and *Eco*R I.

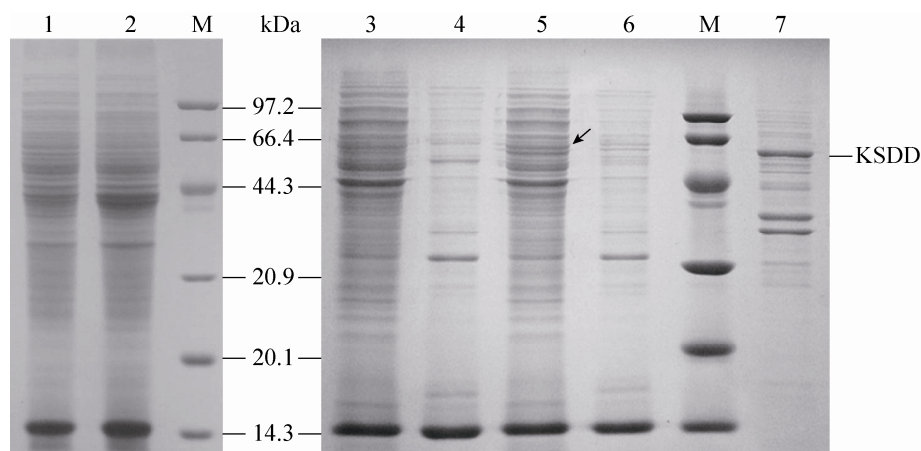


图5 重组菌蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expressed protein. 1: the supernatant fraction of *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd*; 2, 3: the supernatant fraction of *M. neoaurum* JC-12; 4: the sediment fraction of *M. neoaurum* JC-12; 5: the supernatant fraction of *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd*; 6: the sediment fraction of *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd*; 7: the sediment fraction of *E. coli* JM109/pMTac-*ksdd*; M: protein marker.

JC-12/pMTac-*ksdd*破细胞上清液中KSDD的活性为 (2.41 ± 0.05) U/mg, 比原始菌提高了 6.53 倍, 而且较重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* 提高了 4.36 倍, 其中酶活单位 U/mg 的 mg 是指破细胞上清液即粗酶液中的蛋白含量。

酶活测定结果与重组菌的 GFP 荧光检测结果相一致, 再次证明 *tac* 启动子在分枝杆菌中有作用且强度高于 *pACE*, 定量验证了 *tac* 启动子在分枝杆菌中强度。

表2 重组菌株 KSDD 酶活的测定

Table 2 The KSDD activities of recombinant cells

Strains	Enzyme activity (U/mg)
<i>M. neoaurum</i> JC-12	0.32±0.02
<i>M. neoaurum</i> JC-12/pMF41- <i>ksdd</i>	0.45±0.06
<i>M. neoaurum</i> JC-12/pMTac- <i>ksdd</i>	2.41±0.05

2.4 发酵结果

2.4.1 摇瓶发酵

以 10 g/L 植物甾醇为底物, 环糊精为底物助溶剂进行发酵。菌株活化 48 h 后以 10% 的接种量接种到发酵培养基中, 每组 3 个平行, 结果取平均值。

发酵结果如图 6, 原始菌、重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* 和 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* 发酵 7 d 的 ADD 产量分别为 4.86 g/L、5.27 g/L 和 5.94 g/L。重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* ADD 的产量比原始菌提高了 22.2%, 比 *M. neoaurum* JC-12/pMF41-*ksdd* 提高了 12.7%; 同时, AD 的产量由原始菌的 0.92 g/L 降低到 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* 的 0.17 g/L, 重组菌 AD 降低了 81.5%。发酵过程中 ADD 与 AD 的摩尔比值也产生了变化。整个发酵过程中重组菌

M. neoaurum JC-12/pMTac-*ksdd* 的 ADD/AD 值都高于原始菌, 168 h 时 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* 的 ADD/AD 值为 34.9 : 1, 而原始菌的 ADD/AD 值为 5.3 : 1。这是由于重组菌中加强表达了 KSDD, 它催化 AD 进一步转化成 ADD。

从以上数据可以看出, 加强表达 KSDD 不仅可以提高 ADD 产量, 降低 AD 的量, 还可以缩短发酵周期至少 48 h。

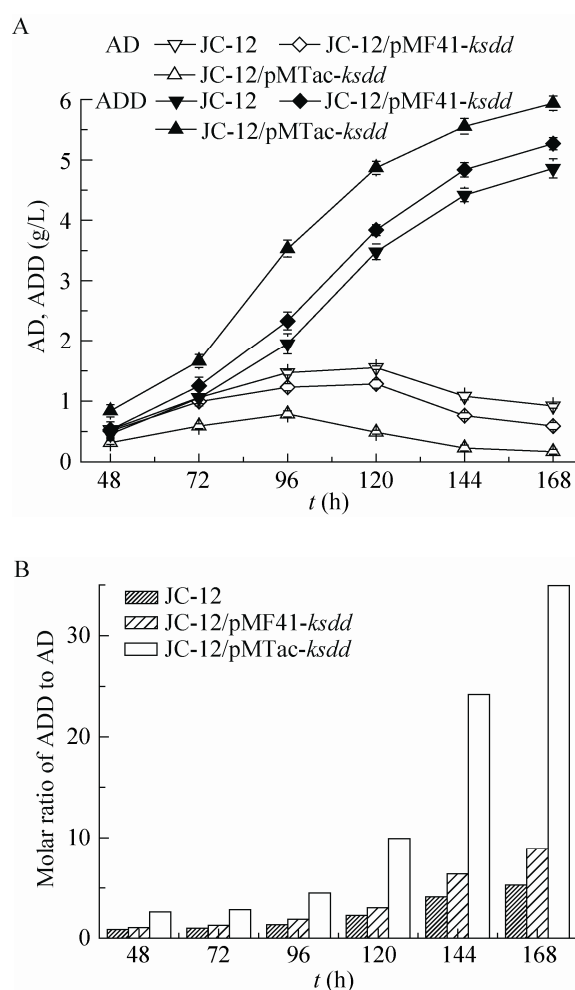


图6 摇瓶发酵结果

Fig. 6 Datas of flask fermentation. (A) Production of AD and ADD. (B) The molar ratio of ADD to AD.

2.4.2 5 L 发酵罐发酵结果

以 20 g/L 植物甾醇为底物, 环糊精为底物助溶剂进行发酵。菌株活化 48 h 后以 10% 的接种量接种到发酵罐中。发酵 72 h 开始流加葡萄糖, 维持葡萄糖浓度在 4~5 g/L 左右 (图 7)。

发酵 168 h 后重组菌 *M. neoaurum* JC-12/pMTac-*ksdd* 的 ADD 产量达到 10.28 g/L, 比原始菌提高了 25.1%, AD 的产量为 0.24 g/L, 比原始菌降低了 80.6%。

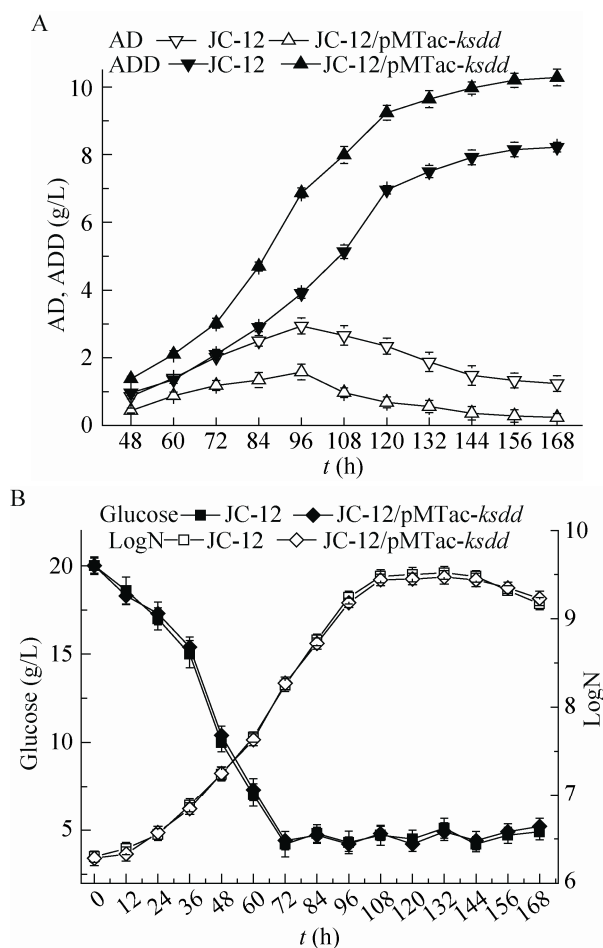


图7 5 L 发酵罐发酵结果

Fig. 7 Datas of 5 L fermenter fermentation. (A) Production of AD and ADD. (B) Concentration of glucose and strain growth, N is the number of CFU per milliliter of culture broth.

3 讨论

分枝杆菌可诱导表达载体 pMF41 由范小勇博士构建^[24], 用于在快速生长型分枝杆菌 *M. smegmatis* 中高水平表达分枝杆菌来源基因, 但它在慢速生长型分枝杆菌中不能高水平表达蛋白, 这可能是由于 pMF41 的启动子 *pACE* 来源于快速生长的 *M. smegmatis*, 且结构比较复杂。本研究室也通过实验证明 pMF41 不适用于慢速生长型分枝杆菌 *M. neoaurum* JC-12 表达蛋白, 因此构建了表达载体 pMTac。本研究比较了耻垢分枝杆菌乙酰胺酶基因启动子 *pACE* 和广宿主的 *tac* 启动子对 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因 *ksdd* 在 *M. neoaurum* JC-12 中表达的影响, GFP 荧光检测和 KSDD 酶活测定结果表明 *tac* 启动子在 JC-12 中能够启动基因的表达且强度高于 *pACE*。由于载体 pMTac 上没有 *lacI* 基因, 所以 pMTac 在分枝杆菌中实施组成型表达, 避免了诱导物 IPTG 对细胞的毒性, 这样更有利于工程菌大规模工业化发酵。

2007 年 Molchanova 等报道 *M. neoaurum* VKPM Ac-1656 以 10 g/L 胆固醇为底物发酵得到 5.5 g/L ADD, 但是在相同条件下这株菌对植物甾醇的利用非常缓慢, 发酵 5 d 都未检测到 ADD^[18]。2010 年 Wei 等报道了一株新金色分枝杆菌 NwIB-01, 以 15 g/L 植物甾醇为底物, 发酵罐发酵 96 h 获得 4.23 g/L ADD 和 1.76 g/L AD^[21], 并且随后通过加强表达关键酶 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶使 ADD 的产量提高至 4.96 g/L^[15]。2011 年 Andryushina 等通过添加助溶剂甲基- β -环糊精使 *M. neoaurum* Ac 1634 转化 30 g/L 大豆甾醇合成 AD 达 15.2 g/L, 但是没有 ADD 的积

累^[25]。张小燕从土壤中筛选出一株可以植物甾醇为唯一碳源的新金色分枝杆菌 *M. neoaurum* ZJUVN (AD 与 ADD 的产量比约为 10 : 1), 使用 N^+ 离子注入技术进行诱变得得到一株单产 AD 的菌株 *M. neoaurum* ZJUVN-08, 随后对培养基及转化条件进行了优化, 最终以 8.89 g/L 植物甾醇为底物转化得 5.96 g/L AD^[26-27]。

本研究室已研究 KSDD 的异源表达及转化性能, 它是甾醇代谢中的关键酶, 催化 AD 合成 ADD。一直以来, 由于没有合适的表达载体, 无法对 *M. neoaurum* JC-12 进行分子改造。而且产物 AD 和 ADD 的分离也是工业生产中的一大难题。新型表达载体 pMTac 的构建打破了这一束缚, 不仅实现了基因的加强表达, 使产物 ADD 的产量提高, AD 的产量降低, 并且缩短了发酵周期。

REFERENCES

- [1] Donova M, Egorova O. Microbial steroid transformations: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94(6): 1423–1447.
- [2] Bureik M, Bernhardt R. Modern Biooxidation: Enzymes, Reactions and Applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007: 155–176.
- [3] Tong W, Dong X. Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. Recent Pat Biotechnol, 2009, 3(2): 141–153.
- [4] Liang JJ, Wang WJ. Progress of biotransforming phytosterols into androstadienedione and androstenedione by microorganisms. Hubei Agric Sci, 2012, 51(7): 1309–1312 (in Chinese). 梁建军, 汪文俊. 微生物生物转化甾体化合物生产雄烯二酮研究进展. 湖北农业科学, 2012, 51(7): 1309–1312.
- [5] Fernandes P, Cabral JMS. Phytosterols: applications and recovery methods. Bioresour

- Technol, 2007, 98(12): 2335–2350.
- [6] Zhang YQ, Wang DQ. Advances in microbial transformation of phytosterol into steroid medicine intermediates. Microbiol China, 2006, 33(2): 142–146 (in Chinese).
张裕卿, 王东青. 植物甾醇微生物转化制备甾体药物中间体的研究进展. 微生物学通报, 2006, 33(2): 142–146.
- [7] Malaviya A, Gomes J. Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. Bioresour Technol, 2008, 99(15): 6725–6737.
- [8] Itagaki E, Wakabayashi T, Hatta T. Purification and characterization of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. Prot Struct Mol Enzymol, 1990, 1038(1): 60–67.
- [9] Morii S, Fujii C, Miyoshi T, et al. 3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase of *Rhodococcus rhodochrous*: sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. J Biochem, 1998, 124(5): 1026–1032.
- [10] Van der Geize R, Hessels GI, Dijkhuizen L. Molecular and functional characterization of the *kstD2* gene of *Rhodococcus erythropolis* SQ1 encoding a second 3-ketosteroid δ^1 -dehydrogenase isoenzyme. Microbiol, 2002, 148(10): 3285–3292.
- [11] Yin-Ru C, Ismail W, Gallien S, et al. Cholest-4-en-3-one- Δ^1 -dehydrogenase, a flavoprotein catalyzing the second step in anoxic cholesterol metabolism. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(1): 107–113.
- [12] Anna B, Śliwiński T, Rumijowska-Galewicz A, et al. Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology, 2005, 151(7): 2393–2402.
- [13] Van der Geize R, Hessels GI. Targeted disruption of the *kstD* gene encoding a 3-ketosteroid δ^1 -dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5): 2029–2036.
- [14] Van der Geize R, Hessels GI, Van Gerwen R, et al. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205(2): 197–202.
- [15] Wei W, Wang FQ, Fan SY, et al. Inactivation and augmentation of the primary 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01: biotransformation of soybean phytosterols to 4-androstene-3,17-dione or 1,4-androstadiene-3,17-dione. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(13): 4578–4582.
- [16] Mulder MA, Zappe H, Steyn LM. *Mycobacterial* promoters. Tuber Lung Dis, 1997, 78(5): 211–223.
- [17] Wei W, Fan SY, Wang FQ, et al. Accumulation of androstadiene-dione by overexpression of heterologous 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(7): 1947–1954.
- [18] Molchanova M, Andryushina V, Savinova T, et al. Preparation of androsta-1,4-diene-3,17-dione from sterols using *Mycobacterium neoaurum* VKPM Ac-1656 strain. Russ J Bioorg Chem, 2007, 33(3): 354–358.
- [19] Rodina N, Molchanova M, Voishvillo N, et al. Conversion of phytosterols into androstenedione by *Mycobacterium neoaurum*. Appl Biochem Microbiol, 2008, 44(1): 48–54.
- [20] Voishvillo NE, Andryushina VA, Savinova TS, et al. Identification of a new steroid-transforming strain of *Mycobacteria* as *Mycobacterium neoaurum*. Appl Biochem Microbiol, 2003, 39(2): 152–157.
- [21] Wei W, Fan S, Wang F, et al. A new steroid-transforming strain of *Mycobacterium neoaurum* and cloning of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in NwIB-01. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 162(5): 1446–1456.
- [22] Zhang W, Shao M, Rao Z, et al. Bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione by recombinant *Bacillus subtilis* expressing *ksdd* gene encoding 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase

- from *Mycobacterium neoaurum* JC-12. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013, 135(1): 36–42.
- [23] Xu DQ. Construction of vector systems for *Brevibacterium flavum* and its L-valine production metabolic engineering[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010 (in Chinese).
徐大庆. 黄色短杆菌载体系统的构建及其产L-缬氨酸代谢工程育种的初步研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [24] Fan XY. Establishment of the novel expression systems in *Mycobacteria* and their application for recombinant BCG[D]. Shanghai: Fudan University, 2008 (in Chinese).
范小勇. 分支杆菌新型表达系统的建立及其在基因重组卡介苗研究中的应用[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [25] Andryushina VA, Rodina NV, Stytsenko TS, et al. Conversion of soybean sterols into 3,17-diketosteroids using actinobacteria *Mycobacterium neoaurum*, *Pimelobacter simplex*, and *Rhodococcus erythropolis*. Appl Biochem Microbiol, 2011, 47(3): 270–273.
- [26] Zhang XY. Studies on biotransformation from phytosterol to androstenedione by *Mycobacterium neoaurum* ZJUVN-08[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013 (in Chinese).
张小燕. 新金分枝杆菌 ZJUVN-08 转化植物甾醇合成雄甾烯二酮的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [27] Zhang XY, Peng Y, Su ZR, et al. Optimization of biotransformation from phytosterol to androstenedione by a mutant *Mycobacterium neoaurum* ZJUVN-08. J Zhejiang Univ: Sci B (Biomed Biotechnol), 2013, 14(2): 132–143.

(本文责编 陈宏宇)