中国科学: 生命科学 2025 年 第 55 卷 第 10 期: 2061 ~ 2079
SCIENTIA SINICA Vitae lifecn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
评 述 中国知名大学及研究院所专栏 天津大学合成生物学20周年专辑

甾体类产物合成酶的研究进展

陈广辉[1], 李春妮[1], 寇博闻[2], 肖文海[2], 姚明东[1*], 王颖[1*]

1. 合成生物技术全国重点实验室, 教育部合成生物学前沿科学中心, 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300072
2. 天津大学生命科学学院, 天津 300072
* 联系人, E-mail: mingdong.yao@tju.edu.cn; ying.wang@tju.edu.cn

收稿日期: 2025-06-30; 接受日期: 2025-09-01; 网络版发表日期: 2025-09-25
国家重点研发计划(批准号: 2024YFA0917100)和中央引导地方科技发展资金(批准号: 24ZYCGSY00030)资助

摘要 甾体化合物是仅次于抗生素的第二大类药物, 其医药市场需求巨大. 由于甾体分子结构复杂且构型多样, 因此其生物合成凭借高效精准的催化优势, 成为极具潜力的绿色合成模式. 本文聚焦于甾体生物合成途径关键酶的研究, 综述了甾醇、激素、甾体皂苷、强心苷及胆汁酸等主要甾体分子的生物合成的研究进展, 重点阐述了关键酶及催化过程的优化改造策略和成效, 同时对未来甾体类产物绿色生物制造领域的发展和技术突破进行展望.

关键词 甾体类化合物, 生物合成, 关键酶, 酶改造

甾体类化合物是一种重要的具有生物活性的物质, 它不仅是合成甾醇、胆汁酸、维生素D、神经甾体、类固醇激素等的重要物质基础, 更具有重要的生理学与医学意义[1,2]. 在药物领域, 全球获准授权的甾体药物有400余种, 在医药领域的市场需求仅次于抗生素, 而且未来的需求还会增加. 除此之外, 甾体在环境[3]、化工[4]、农业[5]等领域, 也有着广阔的应用前景. 部分甾体类药物属于激素类药物, 对机体具有重要调控作用, 被开发成为抗真菌、抗炎、抗过敏、抗肿瘤药[6]. 如氢化可的松用于抗炎治疗, 地塞米松在癌症和重症感染治疗中表现出显著疗效[7,8]. 甾体类药物大多是从具有甾体骨架的天然产物出发, 经过结构改造得到. 甾体药物的工业化生产主要有化学合成法和微生物转化法两种. 目前, 主要是以植物源中分离的皂素物质作为主要原料, 通过化学手段制备药物重要的中间产物, 存在着生产成本高、合成路线长、副产物处理困难和环境污染大等诸多问题, 化学合成法已逐渐难以满足甾体工业化生产的需求[9,10]. 而微生物转化则是利用特定酶催化底物, 将其转化为附加值更高的产物, 这一过程实质上是一种酶催化, 其特异性和手性选择性都很高, 能够很好地解决目前化学合成中存在的问题.

近年来, 随着“模块设计-路径组装-系统优化”等合成生物学技术的不断发展, 研究者们利用先进的生物学工具以及人工智能技术来预测和设计新的甾体分子, 对新型甾体类化合物进行结构改造与组装, 大大简化了复杂甾体的合成路径[11]. 此外, 研究者们还致力于开发甾体化合物的从头合成路线, 以实现甾体类药物的“绿色化”生产. 甾体类天然产物是一类具有环戊烷并多氢菲核心骨架的四环三萜化合物, 共有的核心

引用格式: 陈广辉, 李春妮, 寇博闻, 等. 甾体类产物合成酶的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 2061–2079
Chen G H, Li C N, Kou B W, et al. Recent advances in the biosynthesis enzymes of steroidal natural products (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 2061–2079, doi: 10.1360/SSV-2025-0199

© 2025《中国科学》杂志社

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

母核结构是由A, B, C三个完整封闭的六元环和一个五元环D环组成的, 通过在甾体母核基础上C17位引入不同侧链, 形成五类重要的天然甾体分子, 包括甾醇类、激素类、甾体皂苷类、强心苷类、胆汁酸类(图1), 这些类型甾体分子的代表性产物都展现出重要研究意义和研究价值.

甾体分子的生物合成过程依据其结构特性可以分为两部分, 首先是共有母核结构的形成, 这种复杂保守的多环结构的生物合成过程是长期趋同进化的结果, 其合成酶及反应具有高度的相似性; 其次不同类型的甾体分子在C17侧链修饰(如烷基、酮基、内酯环、羧基、糖基化等)上表现出显著差异, 其本质是由酶催化的高度特异性所决定, 各类氧化酶、羟化酶、转移酶等通过精准识别底物位点, 驱动了甾体分子的特异性修饰, 从而形成不同结构和功能的甾体分子(图2). 尽管对甾体合成路径中的关键酶(如CYP450家族、3β-羟基类固醇脱氢酶等)的催化机制研究已有系统阐释[12,13], 但如何通过酶工程改造突破天然催化效率瓶颈、实现复杂甾体的高效生物合成, 仍是当前绿色制药领域的研究热点. 因此, 本文聚焦于甾体合成路径中关键酶的工程化策略, 重点阐述了形成不同甾体结构及其衍生物的转化酶的挖掘与改造, 揭示它们如何

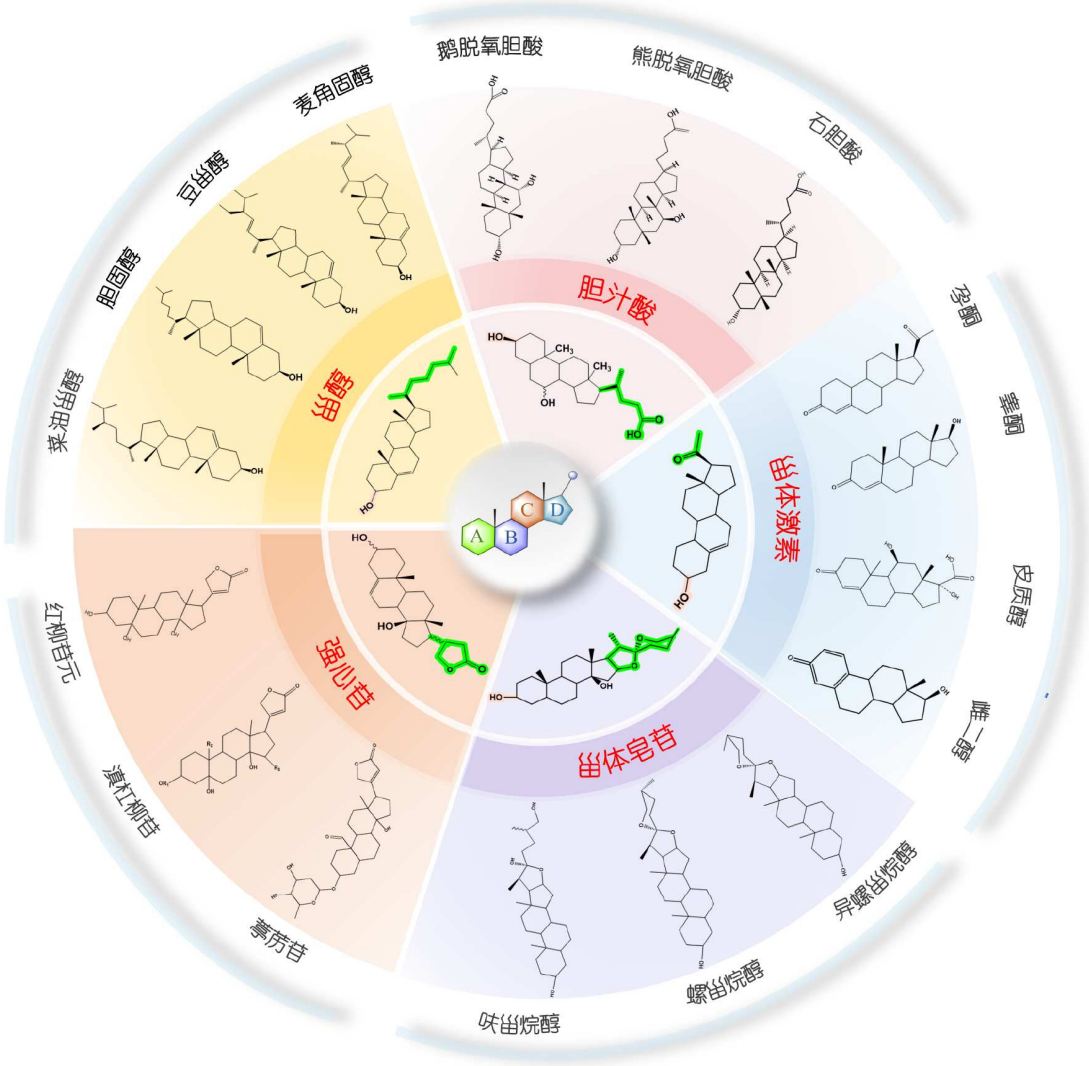

图 1 甾体结构分类
Figure 1 Classification of steroid structures

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

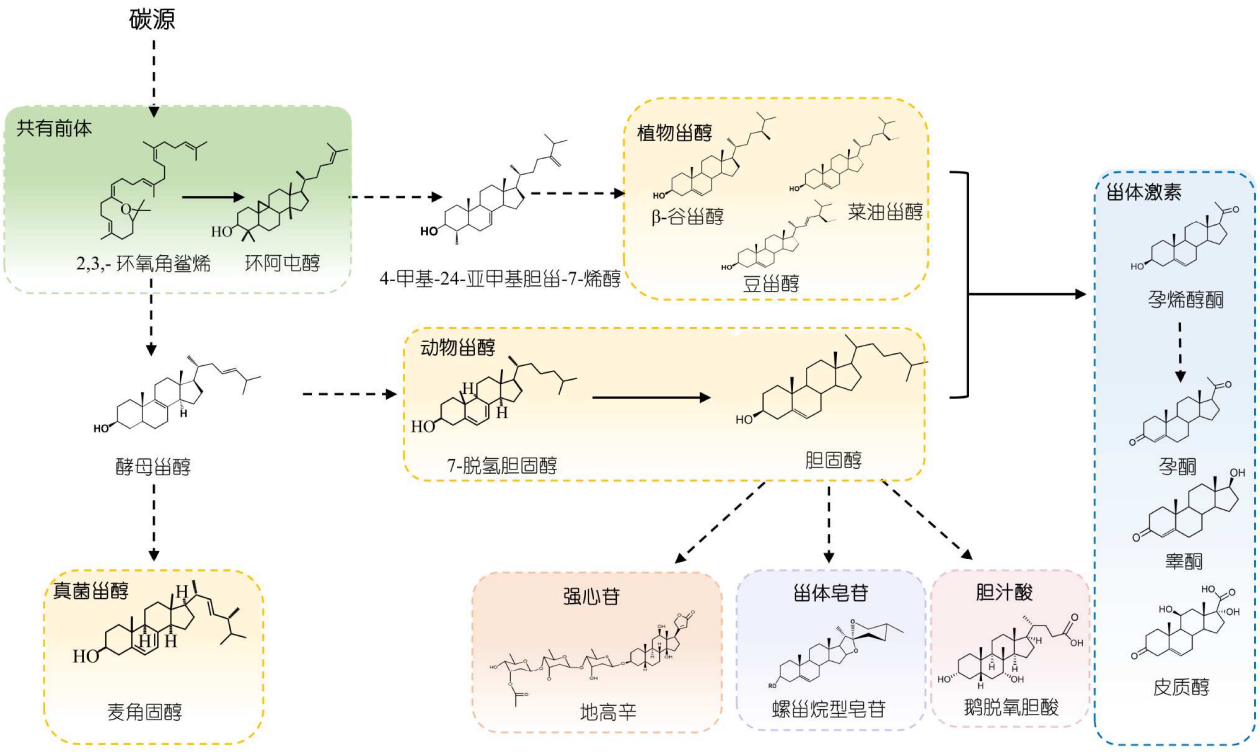

图 2　甾体类化合物合成路径
Figure 2　Synthetic pathways of steroid compounds

共同作用于生物大分子的形成与修饰，从而为理解各甾体类化合物合成的基本机制提供更为丰富的视角.

1　甾体生物合成共有路径与关键酶研究进展

甾体类化合物的合成起始于一条由乙酰辅酶A (Acetyl-CoA)到环阿屯醇(CAS)的代谢路径(图3). 该核心路径可系统划分为三个连续的代谢阶段：从乙酰辅酶A开始，经过经典的甲羟戊酸(MVA)通路，再经过异戊烯基焦磷酸(isopentenylpyrophosphate，IPP)的合成，形成C5的重要前体物——异戊烯基焦磷酸. 第二阶段是C10与C15前体的组装: IPP发生可逆异构化，生成二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallylpyrophosphate，DMAPP). 随后，IPP与DMAPP在牻牛儿基焦磷酸合成酶(GPPS)的催化下，依次发生头尾缩合反应：先生成C10中间产物——牻牛儿基焦磷酸(GPP)，然后IPP再进一步和法尼基焦磷酸合成酶(FPPS)进行缩合，得到C15产品法尼基焦磷酸(FPP). 第三阶段是C30骨架(鲨烯)的形成与环氧化：第三阶段通过鲨烯合成酶(squalene synthase，SQS)的“头对头”缩合，除去焦磷酸，同时进行分子内的重组，得到鲨烯(squalene). 随后，鲨烯在鲨烯环氧酶(squalene epoxidase，SQE)的催化下，以氧气为氧源，在鲨烯分子的特定双键上进行环氧化反应，生成具有环氧结构的2,3-氧化鲨烯(2,3-oxidosqualene). 此2,3-氧化鲨烯作为关键的代谢分支点，经羊毛甾醇合酶(LSS)催化主要生成动物固醇(如胆固醇)的前体羊毛甾醇；而经环阿屯醇合酶(CAS)催化则主要生成植物固醇(如β-谷甾醇)及甾体皂苷、强心苷等复杂甾体的共同前体环阿屯醇(cycloartenol synthase，CAS).

1.1　MVA途径中的关键酶——HMGR

3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)作为甲羟戊酸(MVA)途径中的关键限速酶，其活性不仅对植物甾醇的生物合成具有决定性作用，还在植物正常生长发育进程中发挥着核心调控功能. HMGR的C末端催化结构域具有很强的保守性，可以分为L，N，S三

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

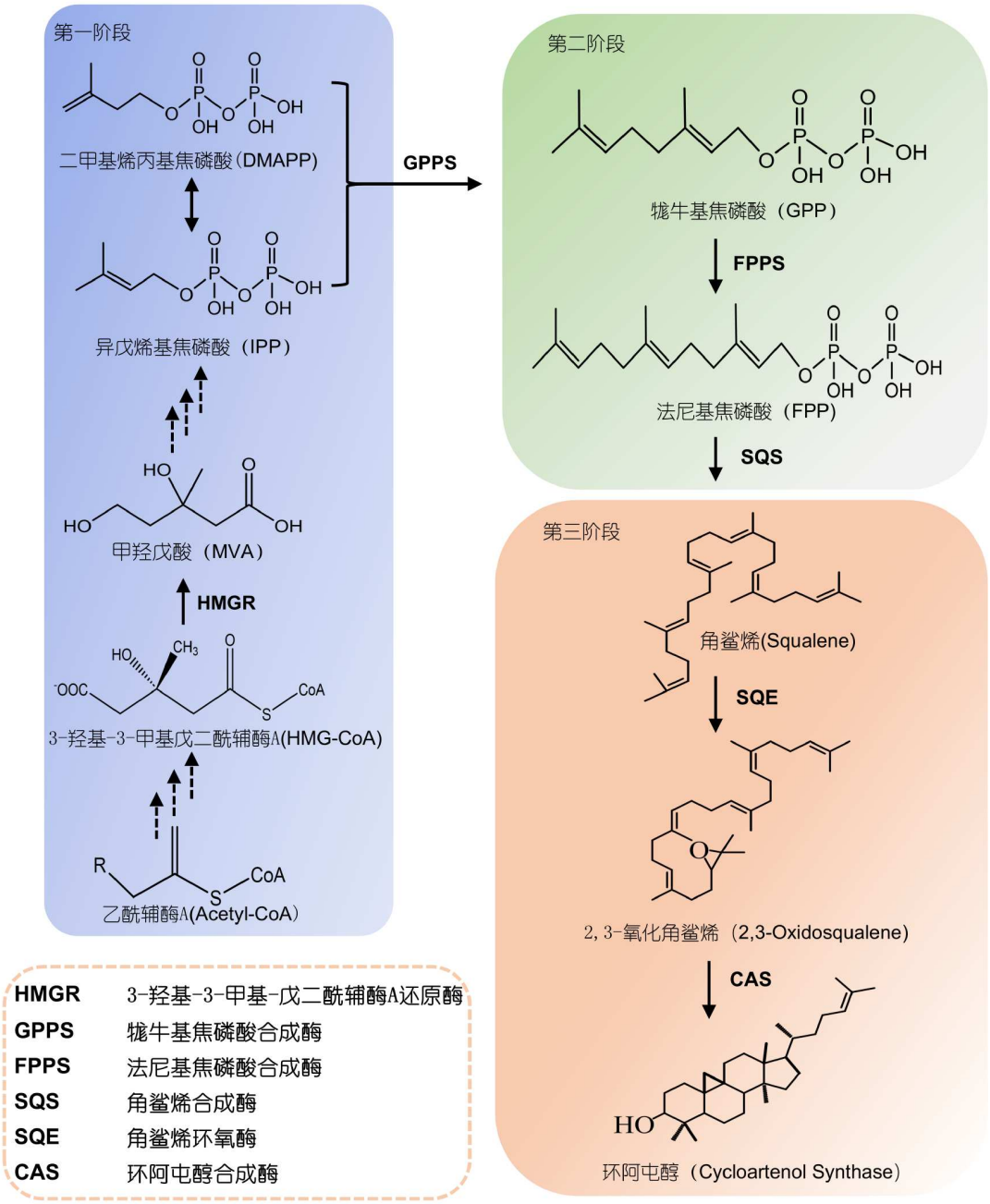

图 3 共有前体的合成路径
Figure 3 Synthetic pathways of common precursors of steroids

个亚区. L区和S区包含HMG-CoA和NADP(H)的结合位点各两个, 它们在HMGR的催化结构域(第426~888位氨基酸)上形成一个紧密的四聚体(图4)[14]. 此外, HMGR包含一个重要的甾醇感应结构域(SSD), 该结构域在MVA途径的反馈调节和酶降解过程中发挥关键作用. SSD内多个保守氨基酸残基是感知MVA途径下游产物(如法尼基焦磷酸FPP和氧化甾醇)的关键位点. 研究证实, 对S215A, L219F等残基进行突变, 会导致HMGR降解速率发生显著变化[15]. 基于HMGR的结构特性, Ro等人[16]构建了N端结构域截短的HMG1p

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

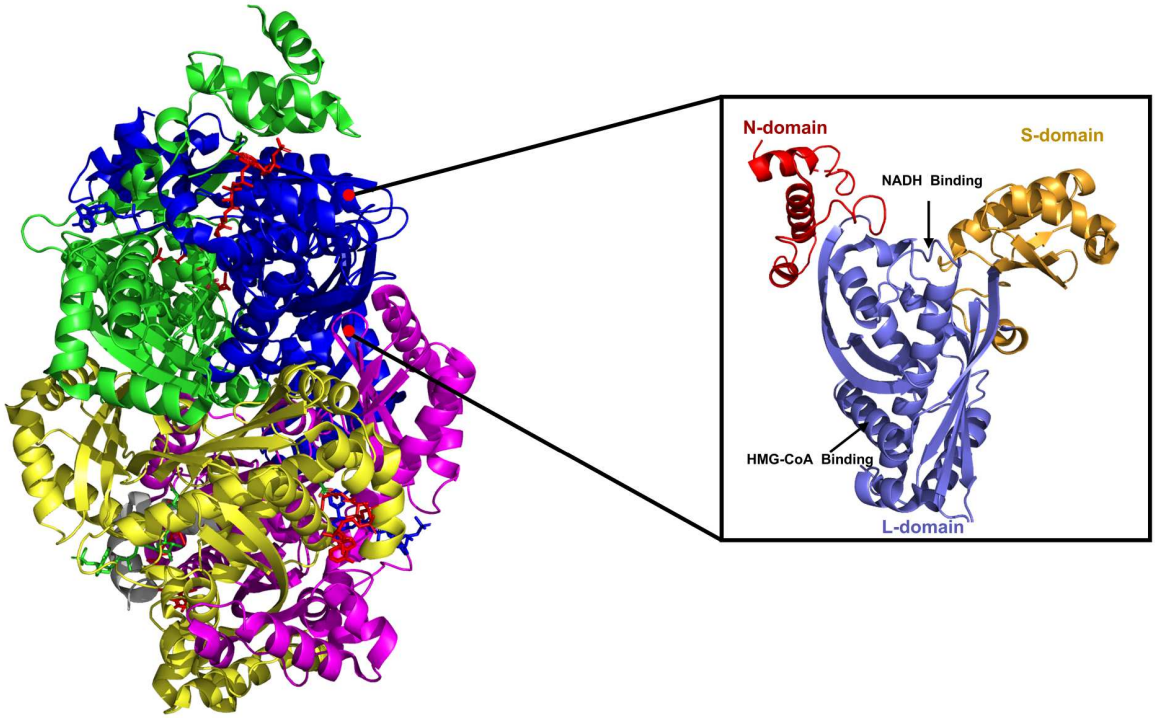

图 4　HMGR酶结构. 图片修改自文献[14](开放获取)
Figure 4　The structure of HMGR enzyme. Adapted from ref. [14] (Open access)

(tHMGR), 并在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中内源过表达tHMGR. 结果表明, 紫穗槐二烯的产量增加了近5倍, 充分验证了该改造策略的有效性. 除结构改造外, 多样化的工程策略也被用于优化HMGR性能. 在酶源筛选方面, 研究者通过广泛比对不同物种来源的HMGR, 发现粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的HMGR酶(*Ef*HMGR)具有良好的催化活性, 在单倍体酵母菌株和工业酵母菌株中分别使角鲨烯产量提升59倍和8.7倍[17]. 在糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中, 采用融合表达策略将HMGR与磷酸转乙酰化酶(PTA)、木酮糖-5-磷酸酮酯(XPK)融合表达, 成功促使类胡萝卜素产量达到野生型菌株的3倍(4.5 mg/g DW)[18]. 魏东芝课题组[19]创新性地采用多策略联合优化方法, 将HMGR与ERG20等关键酶类进行融合, 并通甾醇响应型启动子(ERG8p)及泛素化修饰体系, 对HMGR表达进行动态调控, 最终番茄红素产量达到10.2 g/L. 这些研究将为HMGR在生物合成中的深入利用奠定基础.

1.2　角鲨烯合酶和环氧角鲨烯合酶的研究

早期关于角鲨烯合成酶的研究多为基因的克隆与功能鉴定[20~22]. 近年来, 随着生物技术的发展, 该研究逐渐延伸到酶工程、亚细胞调控和合成生物学等多个方面. 在酵母、植物和细菌等多个微生物体系中, 角鲨烯产量中均取得显著提升, 利用基因过表达、敲除、关键酶的活性位点突变、与下游合酶融合表达、转录因子调控及实验室适应性进化等方法, 有效提高了角鲨烯和环氧角鲨烯的产量. Gao等人[23]首次从云南重楼(*Paris polyphylla*)克隆了角鲨烯合酶基因*Pp*SQS1, 并通过体外酶活实验证明该蛋白具有催化法尼基焦磷酸(FDP)的活性. 该课题组通过qRT-PCR实验表征, *Pp*SQS1在地下茎组织中高表达, 与甾体皂苷的积累部位一致, 这一发现揭示*Pp*SQS1参与植物甾体皂苷生物合成途径. 研究者通过截短苹果树角鲨烯合成酶(*Cv*SQS)的C端部分氨基酸, 构建了截短的*Cv*SQS蛋白, 并证实了其保留了将FPP转化为角鲨烯的活性[23], 为后续酶工程改造提供了重要思路. 在亚细胞水平的研究中, 研究人员通过过氧化物酶体靶向信号(如SKL)将SQS靶向至相应的细胞器, 有效地降低了细胞质中的代谢负担. 与此同时, 利用线粒体定位技术, 将MVA代谢路径关键酶定位到细胞线粒体中, 解除细胞

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

质中NADPH的竞争，使其产率提高了40%[24]. 在微生物体系统方面，Huang等人[25]首次报道了*Mortierella alpine*来源的角鲨烯合酶(SQS)，并进行了生物学分析. 他们以Asp186, Lys201等关键氨基酸为靶点, 通过基因截短和定点突变来提高酶的催化选择性. 如*E186K*基因的突变可将该酶的催化效率提升3.4倍，同时对FPP的亲和度提升至原来的2倍，该策略为实现角鲨烯的高效生物合成提供了重要的科学依据. 值得注意的是, 黄柄藻角鲨烯合成酶(*Af*SQS)具有特殊的空间结构特征. 虽然其催化结构域与人和锥虫来源的结构域类似, 但其C端含有一个特殊的、高度极性的螺旋结构域, 该结构域可能涉及蛋白质-蛋白质的相互作用以及与细胞膜的结合[26]. 近年来，陈坚院士团队[27]在过氧化物酶体工程方面取得重大突破，通过将角鲨烯生物合成路径涉及的关键酶引入过氧化物酶体中(使用如CRMV, GKSKL等靶向肽段)，使角鲨烯的产量显著提高至1.94 g/L(190.6 mg/g DCW), 较对照株增产63%. 在此基础上，利用丙氨酸扫描法替换角鲨烯环氧化酶(SQE)活性位点附近的氨基酸，以减小空间位阻并增强底物结合能力. 由此获得的V249H/L343A突变体显著提高了麦角固醇的合成能力. 在5 L的生物反应器中，麦角甾醇产量可达3.34 g/L，较野生型提高了64%[28]. 未来研究有望进一步利用多种组学数据资源以及人工智能技术的辅助设计方法提升细胞工厂的设计效率，而且还能为实现更为精确和高效的构建过程提供强大支持.

1.3 环阿屯醇酶的研究

环阿屯醇(CAS)是胆固醇等其他甾体类化合物的重要前体物，环阿屯醇合成酶(CAS)可选择性地将2,3-氧化鲨烯环化为环阿屯醇，经2,3-氧化鲨烯在C-20位置发生脱氢反应，得到含有正碳离子的甾醇中间体. 随后，将C-20上的负电性转移到C-9上，引发该位点的环化反应, 最终生成环阿屯醇[29].

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的*At*CAS1基因是植物界中首个从2,3-氧化角鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclase, OSC)家族中成功克隆的功能基因. 同时, 环阿屯醇是一种重要的生物活性物质, 在植物次级代谢中起着重要的作用[30]. 研究人员成功克隆了来自红树林植物*Rhizophora stylosa* Griff和*Kandelia candel*的环阿屯醇酶基因*Rs*CAS和*Kc*CAS，并对其进行了酶活力分析. 进化树显示，这两个基因是双子叶植物环阿屯醇酶的新成员. 这些发现不仅为红树林植物甾醇合成调控奠定基础, 也为探索红树林植物抗逆性的机制开辟了新的途径[31]. Fan等人[32]对平贝及珠参属植物进行了初步研究，发现 CAS参与了皂苷的合成. 此外，还发现了3个OSC候选基因 (*Aa*OSCR12, *Aa*OSCL6, *Aa*OSCL10)，通过酵母及烟草异源表达, 发现仅*Aa*OSCR12能够将2,3-氧化角鲨烯制成环阿屯醇. 对比*Aa*OSCR12与无活性的*Aa*OSCL10, 研究人员对*Aa*OSCL12进行了53个氨基酸差异分析，利用AlphaFold2建模锁定249~761区域为关键结构域. 通过对10个保守位点进行突变，确定6个关键催化位点(257H, 369N, 448T, 507V, 558P, 616Y), 使其完全失活, 进而构建了*Aa*OSCL10-6M, 其合成率为0.9%. 在此基础上，该菌株的481位氨基酸位点存在空间位阻效应，且该位点的催化活性较*Aa*OSCL10-6M提高了104倍. 在酶改造方面，研究人员利用定向进化技术, 获得了一株能高效合成羊毛甾醇88%、帕克醇12%的突变株, 并发现His477位点突变显著改变了酶的催化特性以及产物选择性[33]. Lodeiro等人[34]在此基础上, 利用同源建模与定点突变技术构建了羊毛甾醇合酶, 并对其进行了突变, 获得了99%羊毛甾醇合成酶. 这些研究将为环阿屯醇酶的功能改造提供新思路, 并为进一步优化植物甾醇合成途径提供重要的理论支撑.

2 不同类别甾体专有路径及关键酶的研究进展

2.1 甾醇类化合物关键酶的研究

甾醇作为甾体类天然产物的重要分支，其分子结构以环戊烷多氢菲(甾核)为骨架，特征性地包含C-3位羟基以及C-17位连接的8~10碳脂肪侧链(图1). 根据侧链结构差异，甾醇可分为植物甾醇、动物甾醇和真菌甾醇三大类. 所有甾醇的生物合成均始于共同前体2,3-环氧角鲨烯，经甾核环化、侧链修饰、双键异构化及氧化还原反应等步骤，最终形成各类甾醇的特异性结构. 不同类型甾醇的合成依赖特定酶促反应，形成不同的合成过程(图5). 因此，深入解析和改造生物合成途径中的关键酶，是提升目标甾醇产量的核心策略.

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

2.1.1　植物甾醇生物合成关键酶的研究

植物甾醇种类繁多、功能多样，在植物的生长发育过程中发挥重要作用[35]，其合成以2,3-环氧角鲨烯为起始物，经环化、甲基化修饰、双键异构化等得到C24-烷基甾醇(如菜油甾醇、β-谷甾醇、豆甾醇)(图5). 途径中关键酶种类繁多，这里主要对途径中的关键酶24-甲基转移酶(sterol C-24 methyltransferase, SMT)，甾醇-C22-去饱和酶(cytochrome P450 family 710 sub-family A, CYP710)和Δ^7-甾醇双键还原酶(Δ^7-sterol reductase, DHCR7)等酶的研究进展进行阐述.

SMT是甾醇结构中重要的C-24位的甲基化修饰，是植物固醇代谢途径中的重要限速酶. 这一过程不仅会改变植物固醇的分子结构，而且会对细胞膜流动性、信号传导和抗逆性产生重要作用[36,37]. SMT是一类由*S*-腺苷甲硫氨酸(SAM)组成的具有“Rossmann折叠”功能的蛋白. 目前，已从巴黎多叶(*Paris polyphylla*)[36]、雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)[37]、拟南芥[38]等多种植物中成功克隆并实现异源表达. 近期，Xiao等人[39]研究进一步揭示了SMT亚型的功能特异性：拟南芥SMT2/SMT3双突变体仅缺失C-24乙基甾醇(β-谷甾醇与豆甾醇)，而C-24甲基甾醇(如菜油甾醇)合成以及油菜素内酯生物合成未受影响. 研究者通过在酿酒酵母中异源表达植物SMT，并结合甾体骨架合成酶(如2,3-氧化鲨烯环化酶)，可高效从头合成复杂甾醇，使产率提高10倍以上[39].

CYP710属于细胞色素P450超家族，能在β-谷甾醇C-22位插入一个Δ^{22}-双键，生成豆甾醇. CYP710是P450家族中的一员，其家族中含有多个重要的功能区域(如螺旋K, I和血红素结合基序)[40]. 其典型结构包含一个内质网膜锚定的跨膜螺旋域(TMH)和胞质催化域，近期研究表明番茄(*Solanum lycopersicum*) CYP710A11的TMH对其功能不可或缺，截除该域会导致酶活性丧失[41]. 目前，CYP710基因已从拟南芥、番茄[42]、烟草(*Nicotiana tabacum*)[43]、日本皂荚(*Gleditsia japonica Miq*)[44]等多种植物中克隆，并在大肠杆菌或酵母系统中成功表达. Aboobucker等人[45]证实了玉米(*Zea mays*)CYP710A8基因其在豆甾醇合成中的核心作用. 在合成生物学应用中，通过在酿酒酵母中重

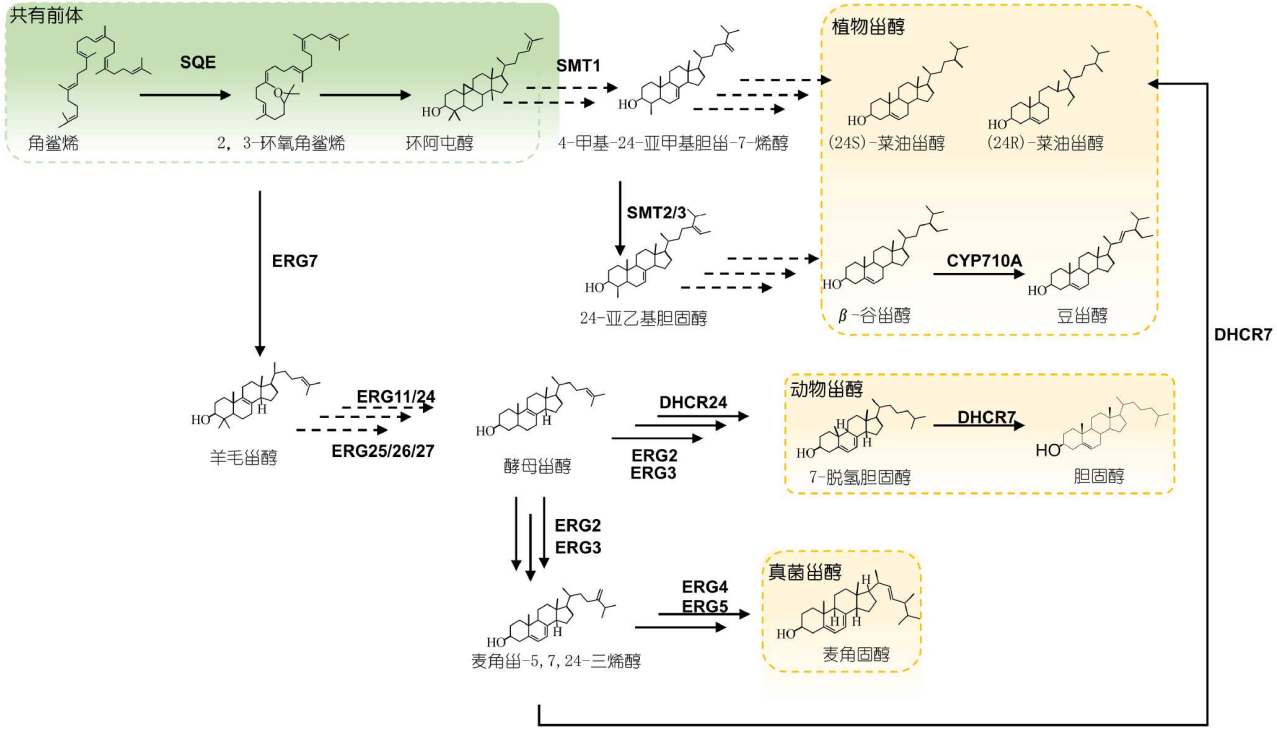

图 5　主要甾醇的生物合成路径
Figure 5　Biosynthetic pathways of major sterols

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

构包含CYP710A1和2,3-氧化鲨烯环化酶的协同路径, 已实现豆甾醇的高效从头合成, 产量可达2.15 g/L[46]. 同时, Meng等人[44]过表达特定CYP710(如CYP710A157)还能提升酵母对高碱胁迫(500 mmol/L Na_2CO_3)的耐受性, 为抗碱性工程菌的培育奠定基础.

DHCR7是植物甾醇合成途径中的关键酶, 催化Δ^7-甾醇双键还原生成Δ^5双键, 是菜油甾醇合成的关键酶. 目前, DHCR7已在拟南芥、水稻(*Oryza sativa*)和酿酒酵母等物种中被成功鉴定与表征. 近期研究表明, 在中国舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)中, DHCR7 主要在雌性肝脏特异性表达且定位于胞质, 其转录受转录因子E2F1的显著激活调控[47]. 在合成生物学应用中, Zhou等人[48]利用CRISPR/Cas9技术将酿酒酵母内源的ERG5基因替换为不同来源的DHCR7, 其中表达巴沙鱼(*Pangasianodon hypophthalmus*)DHCR7的菌株Zw507菜油甾醇产量达216.93 mg/L; 将基因拷贝数增至3份后, 产量进一步提升至302.27 mg/L, 并在5 L发酵罐中实现了916.88 mg/L的高效合成. Yang等人[49]的研究进一步拓展了应用范围, 通过评估不同来源DHCR7合成24-亚甲基胆固醇的能力, 发现非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)DHCR7活性最优(178 mg/L), 其基因组多拷贝整合使产量增至225 mg/L.

2.1.2 动物甾醇生物合成关键酶的研究

动物甾醇(如胆固醇)以2,3-环氧鲨烯为起始, 经过多个氧化去甲基过程, 得到7-脱氢胆固醇(7-DHC), 再经过Δ^7-甾醇还原酶(DHCR7)的双键还原, 最后将其转化为胆固醇. 该途径涉及多种关键酶, 本节重点综述Δ^{24}-甾醇还原酶(DHCR24), DHCR7及相关甾醇合成基因(ERG)簇的研究进展.

Δ^{24}-甾醇还原酶(DHCR24)催化胆固醇合成通路的限速步骤, 利用NADPH还原Δ^{24}双键. 研究者已从家鸡(*Gallus gallus*)[50]、家牛(*Bos taurus*)[51]、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)[51]等物种中克隆其基因用于异源表达. Guo等人[50]筛选11个来源的DHCR24进行了初步的研究, 发现鸡源*Gg*DHCR24在酿酒酵母中能够产生1.07 g/L的7-DHC. Dong等人[51]证实牛源*Bt*DHCR24在解脂耶氏酵母*(Yarrowia lipolytica)*中表现出优异的表达适应性, 并通过代谢改造获得3.5 g/L的高效表达, 该研究突出了其与宿主适配关系的重要意义.

DHCR7不但是植物甾醇合成途径中的关键酶, 还是胆固醇生物合成的终端限速酶. 在酶学方面, Chen等人[52]对牛源*Bt*DHCR7进行了合理的改造, 通过对其催化结构和催化位点上的芳香族残基进行定点改造, 在电子传递链(ETE)上引入了极性残基, 最终获得高效突变体*Mu*DHCR7(M4), 使胆固醇产量提升至191 mg/L(为野生型的5.93倍). Bi等人[53]则将后角鲨烯途径中多个酶(DHCR24, ERG2-ERG3, ERG27-ERG26-ERG25)与ePTS1进行了融合, 靶向过氧化物酶体作为特异性合成区室, 将7-DHC摇瓶中的滴度达到640.77 mg/L. Guo等人[54]通过共表达脂滴(LD)靶向的ERG2/3与DHCR24模块, 同时表达内质网(ER)靶向的ERG1/11/24模块, 并进一步将ERG25/26/27模块靶向LD, 最终将7-DHC滴度提高至360.6 mg/L. 鉴于Fe^{2+}是7-DHC合成途径中ERG1, ERG3, ERG11, ERG25等关键酶的重要辅助因子(促进酶-底物复合物形成), Wei等人[55]通过优化痕量元素Fe^{2+}和Mg^{2+}的培养基浓度来调控7-DHC的产量, 显著提高了7-DHC的效价(提升41.4%).

2.1.3 真菌甾醇生物合成关键酶的研究

以麦角甾醇为代表的真菌固醇, 其代谢途径与植物固醇类似, 但其主要特点是需经过一系列麦角固醇合成途径(ERG)所编码的一类酶来实现.

近年来, 对烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)[56]、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)[57]及帚枝霉(*Sarocladium terricola*)[58]中的ERG基因家族成员进行了大量的生物活性分析. Li等人[56]在烟曲霉中发现报道了两个位于内质网膜上, 但在细胞存活过程中起着关键作用的Erg24A/B, 发现若双基因共失活则会导致菌体死亡, 而单基因缺失仅部分抑制麦角甾醇合成并破坏离子稳态. Shang等人[57]则在米曲霉中鉴定出同源酶*Ao*Erg24A/*Ao*Erg24B(同样定位于ER), 并证实过表达*Ao*Erg24A可使麦角甾醇产量提升1.6倍.

在作用机制解析方面, Jordá等人[59]揭示了ERG基因受铁离子的精密双向调控: 在缺铁条件下, 转录因子Upc2/Ecm22激活ERG基因表达; 而在铁充足时, 血红素依赖因子Hap1会招募Tup1共抑制子阻遏转录. 这种调控网络能够动态平衡麦角甾醇合成, 有效防止角鲨烯、羊毛甾醇等有毒中间体的积累.

在合成生物学应用中, 研究者通过酶工程策略显著提升麦角甾醇产量. Derkacz等人[60]构建了白色念珠

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

菌ERG11^{K143R}点突变体，使麦角甾醇含量提高1.9倍且不影响菌体生长. Liang等人[61]则采用了更深入的计算驱动理性设计：利用Rosetta Cartddg虚拟饱和突变和Discovery Studio(DS)软件，对Erg11p活性位点及羊毛甾醇配体5 Å范围内的残基进行丙氨酸扫描和定点饱和突变，成功锁定关键残基F384. 由此获得的F384E突变体在5 L发酵罐中实现了3.07 g/L的高产.

2.2　激素类化合物关键酶的研究

甾体激素(类固醇激素)是一大类以环戊烷多氢菲作为骨架结构的天然活性物质，尽管甾体激素的甾核结构相同，但是C3，C11，C17等位点不同的取代基决定着不同类型的甾体激素具有不同的生物学作用. 其中，C17位点的官能团构型尤为关键，它既是鉴别甾体激素类别的主要标志物，又是决定分子识别和功能发挥的重要因素[62]. 根据生理功能和作用部位的不同，甾体激素主要可分为性激素(孕激素、雄激素和雌激素)和肾上腺皮质激素(糖皮质激素和盐皮质激素)两大类.

在激素类化合物的生物合成路径中，胆固醇和部分植物甾醇(菜油甾醇、β-谷甾醇、豆甾醇等)可以作为前体分子，在细胞色素P450酶系的催化作用下转化为孕烯醇酮，随后通过一系列酶的修饰最终产生具有不同生理活性的甾体激素(图6). 激素类产物参与调节

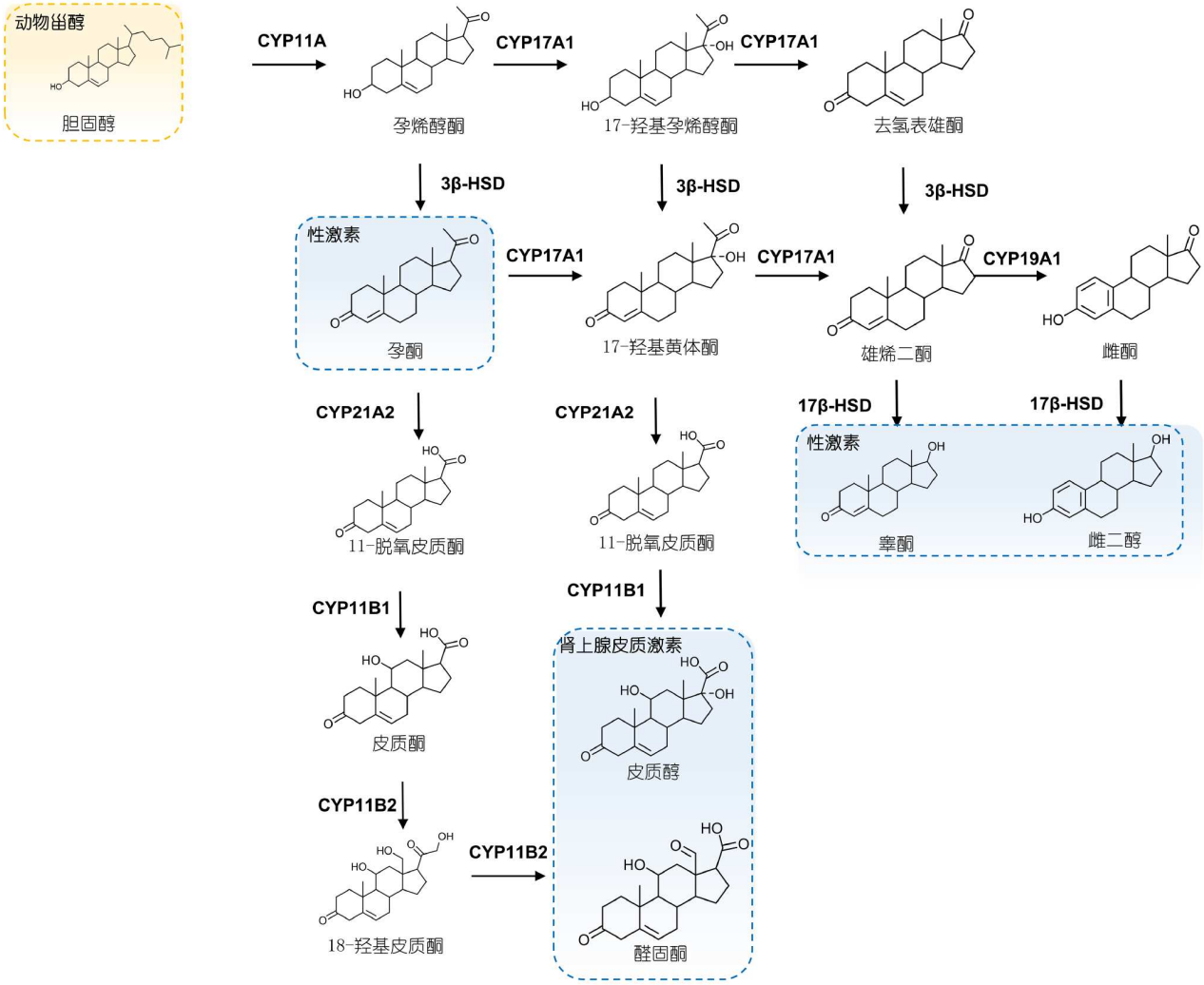

图 6　主要甾体激素的生物合成路径
Figure 6　Biosynthetic pathways of major steroid hormones

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

生长发育、生殖、代谢及免疫稳态等一系列生命过程. 由于传统的甾体激素类化合物的合成过程存在步骤繁琐、条件苛刻以及环境污染等问题, 但基于生物催化的合成策略有显著优势, 例如反应条件温和、催化效率高、绿色环保等, 这些优势使其成为甾体激素化合物合成的重要替代方案.

2.2.1 性激素合成关键酶的研究

性激素主要包括孕激素(如孕酮)、雄激素(如睾酮)和雌激素(如雌二醇), 它们在生殖系统发育、第二性征建立及代谢稳态维持中发挥重要作用.

孕酮(progesterone)的合成直接依赖于P450scc和3β-羟基类固醇脱氢酶(3β-hydroxysteroid dehydrogenase, 3β-HSD)的连续催化[63]. 为提升孕酮及其前体的生物合成效率, 目前已有多种工程策略被成功应用: 其中, Liu等人[64]在新金色分枝杆菌中, 融合表达突变型人源CYP11A1与肾上腺皮质铁氧还蛋白还原酶并同时使用以光驱动NADPH再生的InP纳米颗粒系统, 从而使得孕酮产量达到(0.235±0.05) g/L并较之前相比提升84倍; 周景文团队[52]在酿酒酵母中分步改造7-脱氢胆固醇还原酶(7-dehydrocholesterol reductase)、P450scc的电子传递残基, 使得碳流电子传递组件与NADPH再生途径得到优化, 实现了胆固醇(1.78 g/L)和孕烯醇酮(0.83 g/L)的高水平生产. Li等人[65]则在通光藤(*Marsdenia tenacissima*(*Roxb.*)*Wight et* Arn)中筛选并克隆P450scc编码基因(*Mt*CYP150与*Mt*CYP108)和3β-HSD编码基因(*Mt*HSD5与*Mt*HSD6), 将其异源表达于酿酒酵母底盘细胞后, 结合胆固醇合成途径强化(如过表达HMGR)、电子传递链优化及分批补料发酵, 最终在5 L罐实现孕酮产量达到1.06 g/L. 当前研究聚焦于发掘新型酶资源、深入探究酶的催化机制并整合电子传递的优化、辅因子的再生及先进发酵工艺等方向, 从而发展更高效的孕酮生物合成体系.

睾酮(testosterone)则直接取决于前体雄烯二酮(androstenedione)经17β-羟基类固醇脱氢酶(17β-hydroxysteroid dehydrogenase, 17β-HSD)催化的C17位特异性还原生成, 其催化特性也是影响睾酮产量与纯度的关键. 为此, Guevara等人[66]采用靶向基因敲除策略, 构建红球菌Chol-4四基因突变株, 敲除3-酮甾醇Δ1-脱氢酶(3-ketosteroid Δ1-dehydrogenase)和3-酮甾醇-9α-羟化酶(3-ketosteroid 9α-hydroxylase)等基因阻断雄烯二酮分解代谢途径, 同时异源表达弯孢菌(*Curvularia lunata*)来源的17β-HSD并优化辅因子再生, 最终实现了从4-雄烯-3,17-二酮中以61%的摩尔转化率生产睾酮. 同时, Ding等人[67]基于同源建模与分子动力学模拟, 对17β-HSD3进行G186R/Y195W突变, 使毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的睾酮产量达到了3.98 g/L, 较野生型提升了297%; 此外, Ortega-de Los Ríos等人[68]利用CRISPR-Cas9技术敲除构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的类固醇11α-羟化酶基因来消除副产物, 同时过表达弯孢菌17β-HSD, 可将超过80%的雄烯二酮(0.1 g/L)转化为睾酮; 近年来也有研究团队尝试整合多步的反应过程, 例如, Wei等人[69]开发了创新双功能酶系统, 筛选微生物源酮还原酶KR-2实现4-雄烯二酮一步还原为睾酮, 并通过间歇真空法移除抑制性副产物丙酮, 在优化体系(65.8 g/L 4-雄烯二酮, 10%异丙醇)中反应52小时后, 使睾酮产量达65.42 g/L, 展现出了睾酮生物合成的良好工业应用前景.

2.2.2 肾上腺皮质激素合成关键酶的研究

肾上腺皮质激素包括糖皮质激素和盐皮质激素, 分别以皮质醇、醛固酮为代表, 它们在应激反应和电解质平衡调节等过程中起关键作用.

皮质醇(cortisol)的生物合成涉及多种细胞色素P450酶的联合作用, 其中细胞色素P450 17A1(cytochrome P450 17A1, CYP17A1)是决定皮质醇前体生成的一种关键限速酶. 首先是对单酶和电子传递效率进行优化, 其中Chen等人[70]对人源CYP17A1(hCYP17A1)进行密码子优化, 在此基础上共表达猪源的CPR_{YP}以及热带假丝酵母来源的$G6PDH_c$, 从而在毕赤酵母中实现底物(孕酮)转化效率达46.88%; 后续该团队[71]基于牛源CYP17A1构建的R347A突变体, 共表达细胞色素P450还原酶CPR_{YP}、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶ZWF_C和转运蛋白TP_{CH}, 最终实现了17α-羟基孕酮(17α-hydroxyprogesterone, 17α-OHP)的产量达到(0.2348±0.0101) g/L. Du等人[72]在毕赤酵母CPR_{YP}-ZWF_C-TP_{CH}系统基础上, 开发了CYP17A1-A105Y突变体, 完全消除了16-羟基化活性, 使17α-OHP产量最终达到了(0.106±0.0032) g/L. 除此之外, Pan等人[73]在大肠杆菌中构建了P450三模块反应系统(hyg4), 包含17AM, 21M和11BM, 进一步优化培养条件和反应参数后, 实现了从孕酮到皮质醇的一步合成, 最终使皮

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

质醇总产量达到16.82 μmol/L. 综上, 从单酶工程和电子传递网络的优化, 再到全细胞工厂的系统性整合, 构建起较为完整的皮质醇合成路径, 不断突破着皮质醇的生物合成瓶颈.

醛固酮(cortisol)的18-位点特异性氧化是由醛固酮合成酶(cytochrome P450 11B2, CYP11B2)催化完成的, 其酶工程的探索和改造在近些年也取得了突破性的进展. Valentín-Goyco等人[74]对11β-羟化酶(cytochrome P450 11B1, CYP11B1)中第320位氨基酸进行V320A和A320V突变, 并通过酶活性测定和结合动力学等监测手段, 揭示了CYP11B2实现从11-脱氧皮质酮(11-deoxycorticosterone)到醛固酮连续3步转化的关键是该酶的慢解离特性. 之后, Takeda等人[75]证实了通过DNA甲基化可以负调控CYP11B2和CYP11B1的表达、影响转录因子的结合活性以及与甲基-CpG结合蛋白2 (methyl-CpG binding protein 2, MECP2)相互作用机制, 从而调控醛固酮合成. Brixius-Anderko等人[76]发现肾上腺皮质铁氧还蛋白通过变构效应促进CYP11B2活性位点的底物结合构象, 从而有利于18-羟基皮质酮合成, 进而为后续的酶工程改造和生物合成提供结构基础.

2.3　甾体苷类化合物关键酶的研究

2.3.1　甾体皂苷类化合物关键酶的研究

甾体皂苷是一类重要的糖基皂苷, 具有独特的螺甾烷结构. 其分子由糖和苷元两部分构成. 甾体皂苷分子中含有27个碳原子, C17位含氧螺杂环, 根据螺甾烷骨架中C-25的立体构型及环合方式的差异, 可将分为螺甾烷醇类、异螺甾烷醇类、及呋甾烷醇类三大结构类型[77], 其中, 螺甾烷型皂苷在自然界中分布最为普遍, 主要在百合、薯蓣科以及一些中药里含有这种成分, 如重楼皂苷、知母皂苷、薯蓣皂苷等. 目前, 科研人员已从近200种植物中发现了甾体皂苷类成分[78], 这些成分在植物中的分布特点与其组织特异性表达密切相关, 在药理作用方面, 甾体皂苷类药物具有良好的保护心血管的作用, 可有效降低血压, 降低心脏病发生风险[79~81].

甾体皂苷的合成由胆固醇等特异性修饰反应生成甾体皂苷, 关键酶包括细胞色素P450氧化酶(CYP450) (图7)以及糖基转移酶(SGTase)[82]. Cheng等人[83]通过基因组分析, 从植物、动物和酵母的基因组鉴定出*Dzin*CYP90G6和*Dzin*CYP94D144, 证明它们是薯蓣皂苷元代谢产物中的关键P450酶, 并重构了其生物合成通路, 使其产率达到10 mg/L. 该研究团队随后在多个rDNA区导入了一个胆固醇22-羟基化酶*Vc*CYP90B27, 并将其与多个P450酶的编码序列进行了随机组合, 对CYP(P450)和P450(P450s)的比值进行了优化, 将薯蓣皂苷的含量由毫克提升至克量级, 为工业化生产提供了新的途径[84].

2.3.2　强心苷类化合物关键酶的研究

强心苷类化合物结构主要由三部分构成: C-3位的糖基、甾体母核、C-17位不饱和内酯环. 天然强心苷类化合物的结构分类可按照C-17位不饱和内酯环特征进行分类, 主要分为两大类型: 一类是C-17位连接六元不饱和内酯环(α-吡喃酮结构)的乙型强心苷; 另一类是C-17位连接五元不饱和内酯环(α-呋喃酮结构)的甲型强心甾[85]. 强心苷类药物的最关键的药理效应为显著提升心肌收缩力, 基于此特性, 在临床治疗中长久以来被作为强心类药物应用[86].

自然界中强心苷类化合物的来源具有广泛的多样性, 主要来源于植物和动物两大类别, 植物来源的强心苷类成分主要以糖苷类形式存在[87], 动物来源的强心甾主要为蟾蜍二烯内酯类(乙型强心甾)[88]. 强心苷类化合物在植物中的生物合成途径主要是: 甲羟戊酸→胆固醇→孕烯醇酮→孕酮→强心甾类[89~91]. 强心甾-3-*O*-糖苷主要是从植物中分离提取或者通过糖基化修饰获得. 随着合成生物学与生物信息学的快速发展, 许多新挖掘到的糖基转移酶已成为当今研究热点[92]. 在植物中, 糖基转移酶(UGT)基因家族广泛存在且数量庞大. 目前拟南芥的基因组中已鉴定出多达107个UGT基因. 其中, 部分基因的功能已经得到了明确的解析, 例如UGT73C6, UGT78D1, UGT74F2和UGT75C1等[93,94]. 已报道的UGT序列同源性相对较低, 蛋白结构以及末端结构域高度相似, UDP-葡萄糖(UDP-glucose, UDP-glu)主要与保守序列PSPG最后一位的谷氨酰胺互作[94]. 2008年, Thorson团队[95]对糖苷转移酶OleD的关键氨基酸残基进行替换ASP(A242V/S132F/P67T), 以改变其底物特异性和催化效率, 三重突变体表现出显著提高的催化效率和底物广谱性, 在对其底物杂泛性的研究中首次报道了对洋地黄毒苷元的C-3位糖基化, Wen等人[96]首次从药用植物马利筋

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

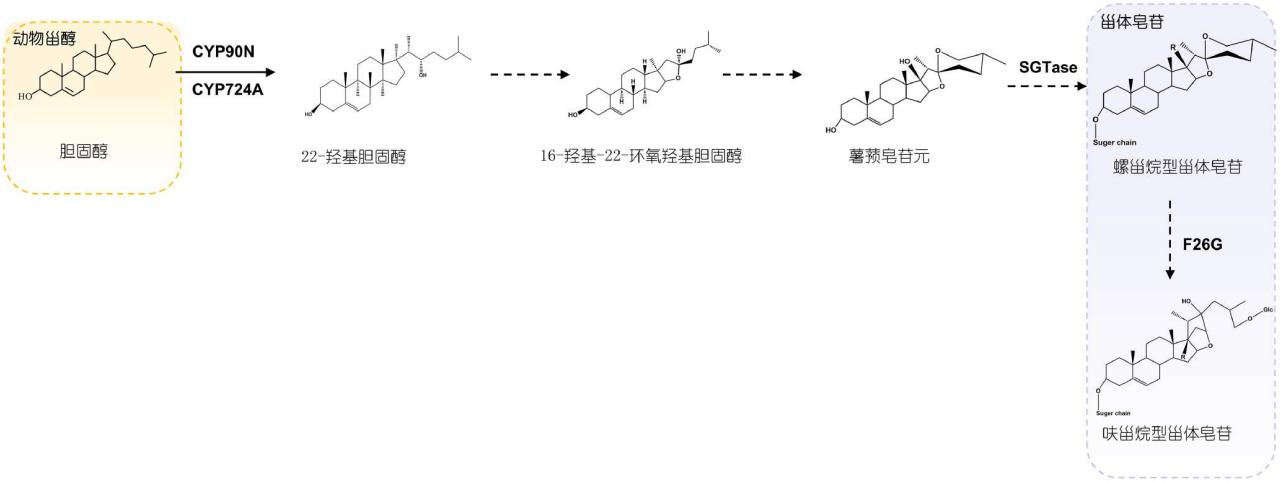

图 7 甾体皂苷元的生物合成路径
Figure 7 The biosynthetic pathway of steroidal saponins

(*Asclepias curassavica*)中发现了一种新型植物甾体糖基转移酶UGT74AN1. 该酶表现出显著的C-3位区域选择性糖基化能力, 可高效催化多种结构类型的强心甾苷元(包括甲型五元内酯环和乙型六元内酯环甾体). 在地高辛的生物合成中(图8), Carroll等人[97]通过对毛地黄叶片和根组织的转录组测序和分析, 首次鉴定出毛地黄中地高辛生物合成途径的甾体侧链裂解酶-*DlC*YP87A4, 通过蛋白质结构建模和定点突变实验, 鉴定出*DlC*YP87A4中两个关键氨基酸A355和L357, 解决了地高辛生物合成途径中一个长期存在的谜题, 为未来地高辛类似物的生物合成和药用价值的拓展奠定了基础.

2.4 胆汁酸类化合物关键酶的研究进展

胆汁酸的核心结构特征主要由一个甾体核心和一个五碳侧链组成, 胆汁酸的侧链通常连接一个羧基(COOH), 胆汁酸分子按侧链连接的基团结构不同可分为游离型和结合型, 游离型胆汁酸主要包括胆酸(cholic acid, CA)、脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)、鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic Acid, CDCA)和石胆酸(lithocholic acid, LCA); 结合型胆汁酸则包括甘氨胆酸(glycocholic acid, GCA)、甘氨鹅脱氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid, GCDCA)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)和牛磺鹅脱氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)等[98]. 胆汁酸作为胆固醇衍生的甾体化合物, 其来源以肝脏合成和肠道微生物转化为核心, 通过肠肝循环实现高效再利用. 胆汁酸是脂质、葡萄糖及能量代谢的“信号枢纽”, 并通过调控菌群与宿主之间的作用从而影响全身健康[99].

胆汁酸类化合物的合成途径主要包括经典途径和替代途径. 在经典途径中, CYP7A1催化胆固醇转化为7α-羟基胆固醇, CYP7A1通过3β-羟-δ-C27-类固醇脱羟酶(3β-HSD)转变为7α-羟-4-胆甾-3-酮基, 继而被CYP8B1催化形成CA和CDCA[100]. 其中, CYP7A1是此通路的限速酶(图9), 也是该途径的起始酶[101]. 在替代途径中, CYP27A1同样作为起始酶, 催化胆固醇转化为27-羟基胆固醇, 随后通过氧化甾醇7α-羟化酶(CYP7B1)催化7α-羟化, 最终生成CDCA. 在高脂饲料饲喂的胆石动物模型中, 研究者筛选出与胆石病相关的候选基因, 其中CYP7A1, CYP8B1和CYP7B1的表达显著下调, 推测它们可能是胆酸盐形成的重要调控因子[102]. 目前研究较为成熟和深入的是C-3′, C-7′和C-12′位的羟基等异构化胆汁酸, 这些异构化胆汁酸的合成与功能也在不断深入. 研究表明, 不同动物体内胆汁酸的种类差异显著, 例如, 啮齿动物能够进行C-6′位的羟基化及差向异构, 从而生成鼠胆酸(muricholic acid, MCA)和猪胆酸(hyocholic acid, HCA)等胆汁酸. 这些成分的不同与动物的饮食习惯、肠道微生物的种类、合成胆汁酸的物质和动物的生存特点有关. 未来可能会发现其他位置发生异构化或衍生化反应所形成的新型胆汁酸.

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

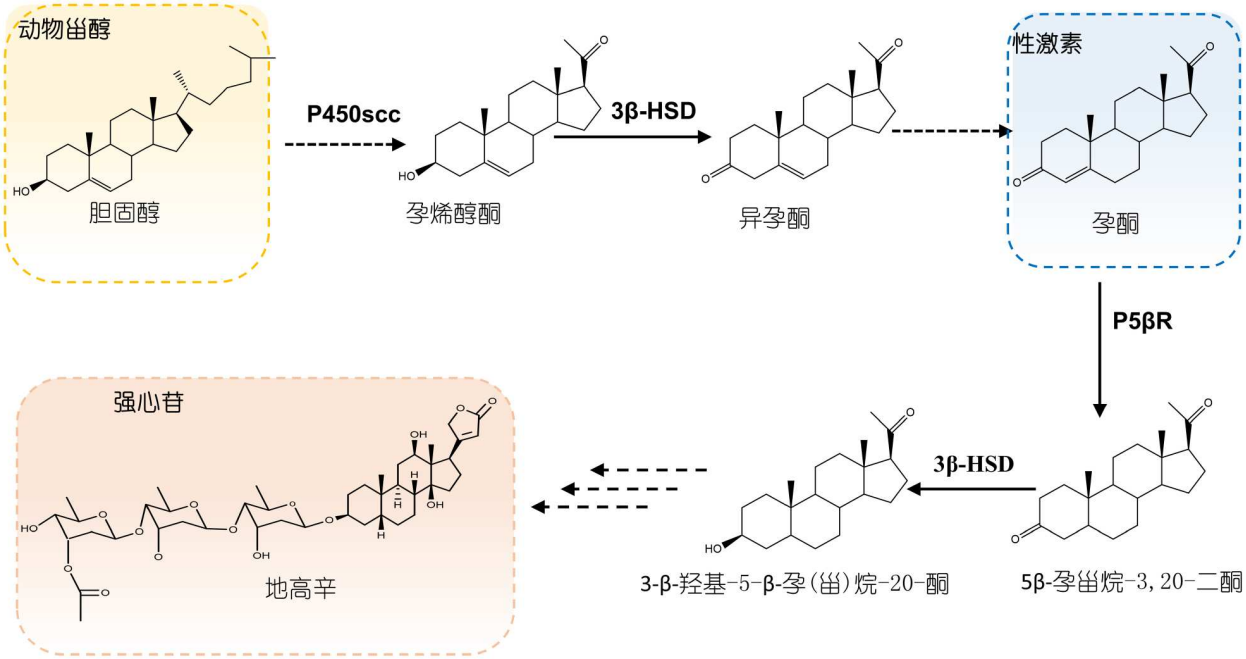

图 8　地高辛生物合成途径的关键步骤
Figure 8　Key steps of the digoxin biosynthetic pathway

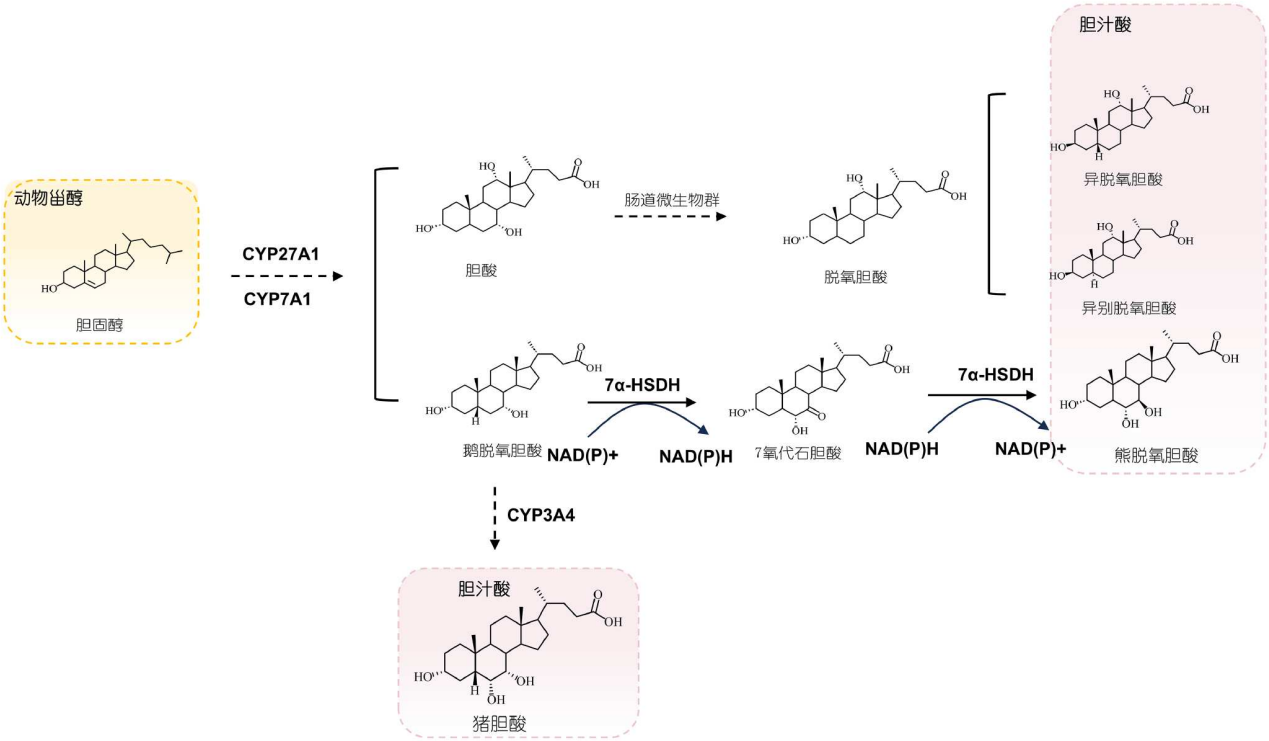

图 9　主要胆汁酸的生物合成途径
Figure 9　Biosynthetic pathways of major bile acids

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

3 挑战与展望

近年来, 甾体化合物的生物合成研究已有较大的发展, 但要实现其产业化还面临着重重困难. 首先, 复杂甾体化合物的生物代谢通路研究中还面临着诸多瓶颈: 复杂的皂苷、强心苷和特殊的胆汁酸异构体, 其下游的多步羟基化、糖基化和内酯环的生成等分子机理还不明确, 缺少对其催化机理和调节网络的系统认识, 从而无法对通路进行精确改造. 其次, 催化活性较低、依赖复杂的电子转移链、底物特异性强、异源表达难度大和稳定性不高等问题亟待突破. 羟化酶、脱氢酶和糖基转移酶等也面临着底物谱窄、区域/立体选择性差等问题. 此外, 在改造过程中, 长链甾体类化合物的生物合成过程需要耗费大量的物质(如乙酰-CoA、NADPH等)和能源(ATP), 导致机体的代谢负荷过重. 其中, 角鲨烯、羊毛甾醇等中间产物的累积会对生物体造成一定的危害, 而辅酶平衡失调和代谢流量分配不均则会影响最终产物的生物合成. 目前大部分甾体类化合物产品的产能还处于毫克到克级过渡阶段, 距离千吨级生产需求还有很大的距离, 而高成本、长流程和高污染的化学合成法迫使微生物制造技术加速迭代.

甾体化合物的生物合成已经由单纯的酶法化修饰到“分子-通路-细胞”的多级智能化调控的新阶段. 在此过程中, 通过人工智能与合成生物学的深度结合, 实现对甾体的深度挖掘、优化设计与调控, 从而打破目前的产能局限, 为甾体类药物、甾体皂苷类农药和化学品等行业的发展提供新的思路[103], 实现从实验室研究向工业化的过渡, 促进我国甾体生产的绿色创新和产业发展. 未来, 人工智能与合成生物学的深度融合将进一步推动关键催化酶的深度挖掘、优化设计和调控, 突破甾体生物制造现有产能极限, 为医药(如甾体激素药物)、农业(如甾体皂苷农药)及化工领域提供新的解决方案[103], 完成基础研究到产业化应用闭环模式贯通, 推动绿色生物制造技术的革新与产业升级.

参考文献

1 Wang F Q, Yao K, Wei D Z. From soybean phytosterols to steroid hormones. InTech, 2011, doi: 10.5772/18808

2 Baker M E. Origin and diversification of steroids: co-evolution of enzymes and nuclear receptors. Mol Cell Endocrinol, 2011, 334: 14–20

3 Chiang Y R, Wei S T, Wang P H, et al. Microbial degradation of steroid sex hormones: implications for environmental and ecological studies. Microb Biotechnol, 2020, 13: 926–949

4 Reinardy H C, Scarlett A G, Henry T B, et al. Aromatic naphthenic acids in oil sands process-affected water, resolved by GCxGC-MS, only weakly induce the gene for vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. Environ Sci Technol, 2013, 47: 6614–6620

5 Stong R A, Kolodny E, Kelsey R G, et al. Effect of plant sterols and tannins on *Phytophthora ramorum* growth and sporulation. J Chem Ecol, 2013, 39: 733–743

6 Lin Y L. Study on microbial transformation of steroid compounds (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Jinan: Shandong University, 2009 [林彦良. 甾体化合物微生物转化的研究. 博士学位论文. 济南: 山东大学, 2009]

7 Tong W Y, Dong X. Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. Recent Pat Biotechnol, 2009, 3: 141–153

8 Donova M V, Egorova O V. Microbial steroid transformations: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94: 1423–1447

9 Hanson J R. Steroids: reactions and partial synthesis. Nat Prod Rep, 2004, 21: 386

10 Zhang R, Liu X, Wang Y, et al. Identification, function, and application of 3-ketosteroid Δ1-dehydrogenase isozymes in *Mycobacterium neoaurum* DSM 1381 for the production of steroidic synthons. Microb Cell Fact, 2018, 17: 77

11 Zhao Y Q, Liu Y J, Ji W T, et al. One-pot biosynthesis of 7β-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from phytosterols by cofactor regeneration system in engineered *Mycolicibacterium neoaurum*. Microb Cell Fact, 2022, 21: 59

12 Mao S, Zhang L, Ge Z, et al. Microbial hydroxylation of steroids by *Penicillium decumbens*. J Mol Catal B: Enzym, 2016, 133: S346–S351

13 Mohn W W, Wilbrink M H, Casabon I, et al. Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp. J Bacteriol, 2012, 194: 6712–6719

14 Istvan E S, Palnitkar M, Buchanan S K, et al. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. EMBO J, 2000, 19: 819–830

15 Pourmand D. The role of the sterol sensing domain in HMG-CoA reductase regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation for Master’s Degree. San Diegp: University of California, 2010

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

16 Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature, 2006, 440: 940–943

17 Lu S, Zhou C, Guo X, et al. Enhancing fluxes through the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by engineering the HMGR and β-alanine metabolism. Microb Biotechnol, 2022, 15: 2292–2306

18 Wang R Q, Chen G, Chen S N, et al. Metabolic changes of *Neurospora crassa* in the presence of oleic acid for promoting lycopene production. J Biosci Bioeng, 2021, 132: 148–153

19 Zhou W, Ling R J, Yang Y C, et al. Engineering *Komagataella phaffii* to produce lycopene sustainably from glucose or methanol. Metab Eng, 2025, 90: 141–153

20 Wang Z, Guo H, Zhang Y, et al. DNA methylation of farnesyl pyrophosphate synthase, squalene synthase, and squalene epoxidase gene promoters and effect on the saponin content of eleutherococcus senticosus. Forests, 2019, 10: 1053

21 Hazra A, Dutta M, Dutta R, et al. Squalene synthase in plants—functional intricacy and evolutionary divergence while retaining a core catalytic structure. Plant Gene, 2023, 33: 100403

22 Wang Q, Chen B, Chen X, et al. Squalene epoxidase (SE) gene related to triterpenoid biosynthesis assists to select elite genotypes in medicinal plant: *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. Plant Physiol Biochem, 2023, 199: 107726

23 Gao J X, Chen Y G, Li D S, et al. Cloning and functional characterization of a squalene synthase from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. Chem Biodivers, 2021, 18: e2100342

24 Gohil N, Bhattacharjee G, Khambhati K, et al. Engineering strategies in microorganisms for the enhanced production of squalene: advances, challenges and opportunities. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 50

25 Huang D, Yao Y, Zhang H, et al. Directed optimization of a newly identified squalene synthase from *Mortierella alpine* based on sequence truncation and site-directed mutagenesis. J Industrial Microbiol Biotechnol, 2015, 42: 1341–1352

26 Malwal S R, Shang N, Liu W, et al. A structural and bioinformatics investigation of a fungal squalene synthase and comparisons with other membrane proteins. ACS Omega, 2022, 7: 22601–22612

27 Ning Y, Liu M, Ru Z, et al. Efficient synthesis of squalene by cytoplasmic-peroxisomal engineering and regulating lipid metabolism in *Yarrowia lipolytica*. Bioresource Tech, 2024, 395: 130379

28 Yin X, Wei W, Chen Q, et al. Reengineering the substrate tunnel to enhance the catalytic efficiency of squalene epoxidase. J Agric Food Chem, 2024, 72: 24599–24608

29 Sun Z Y, Zhao P, Ge X Z, et al. Pathway design and key enzyme analysis of diosgenin biosynthesis (in Chinese). Chin J Biotechnol, 2021, 37: 1178–1188 [孙忠义, 赵鹏, 葛喜珍, 等. 生物合成薯蓣皂素的途径设计及关键酶分析. 生物工程学报, 2021, 37: 1178–1188]

30 Corey E J, Matsuda S P, Bartel B. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 11628–11632

31 Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, et al. Cloning and functional expression of cycloartenol synthases from mangrove species *Rhizophora stylosa* Griff. and *Kandelia candel* (L.) Druce. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71: 1788–1792

32 Fan B, Ji Z, Zhu M, et al. Elucidation of the biosynthetic pathways of timosaponins reveals the antifungal mechanisms in *Anemarrhena asphodeloides*. J Adv Res, 2025, doi: 10.1016/j.jare.2025.01.049

33 Segura M J R, Lodeiro S, Meyer M M, et al. Directed evolution experiments reveal mutations at cycloartenol synthase residue His477 that dramatically alter catalysis. Org Lett, 2002, 4: 4459–4462

34 Lodeiro S, Schulz-Gasch T, Matsuda S P T. Enzyme redesign: two mutations cooperate to convert cycloartenol synthase into an accurate lanosterol synthase. J Am Chem Soc, 2005, 127: 14132–14133

35 Zhang X, Lin K, Li Y. Highlights to phytosterols accumulation and equilibrium in plants: biosynthetic pathway and feedback regulation. Plant Physiol Biochem, 2020, 155: 637–649

36 Guan H Y, Su P, Zhao Y J, et al. Cloning and functional analysis of two sterol-C24-methyltransferase 1 (*SMT1*) genes from *Paris polyphylla*. J Asian Nat Products Res, 2018, 20: 595–604

37 Guan H, Zhao Y, Su P, et al. Molecular cloning and functional identification of sterol C24-methyltransferase gene from *Tripterygium wilfordii*. Acta Pharm Sin B, 2017, 7: 603–609

38 Qian H P, Lin J X, Cui Y N. Functional study of key genes *SMT2* and *SMT3* in the sterol synthesis pathway in plant immunity (in Chinese). J Electron Microsc, 2021, 40: 170–177 [钱虹萍, 林金星, 崔亚宁. 固醇合成途径关键基因*SMT2*、*SMT3*在植物免疫中的功能研究. 电子显微

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

学报, 2021, 40: 170–177]

39 Xiao X, Lin W, Feng E, et al. Genome-wide identification of binding sites for SmTCP7a transcription factors of eggplant during bacterial wilt resistance by ChIP-Seq. Int J Mol Sci, 2022, 23: 6844

40 Morikawa T, Mizutani M, Ohta D. Cytochrome P450 subfamily CYP710A genes encode sterol C-22 desaturase in plants. Biochem Soc Trans, 2006, 34: 1202–1205

41 Gutiérrez-García L, Arró M, Altabella T, et al. Structural and functional analysis of tomato sterol C22 desaturase. BMC Plant Biol, 2021, 21: 141

42 Morikawa T, Mizutani M, Aoki N, et al. Cytochrome P450 *CYP710A* encodes the sterol C-22 desaturase in *Arabidopsis* and tomato. Plant Cell, 2006, 18: 1008–1022

43 Kharel A, Ziemann M, Rookes J, et al. Modulation of key sterol-related genes of *Nicotiana benthamiana* by phosphite treatment during infection with *Phytophthora cinnamomi*. Funct Plant Biol, 2025, 52: FP24251

44 Meng Z, Dong M, Xiao C, et al. Screening CYP450 genes from *Gleditsia japonica* Miq. and identifying *CYP710A157* and *CYP71D752* functions in the catalysis of echinocystic acid and betulin. Physiologia Plantarum, 2025, 177: e70176

45 Aboobucker S I, Showman L J, Lübberstedt T, et al. Maize *Zmcyp710a8* mutant as a tool to decipher the function of stigmasterol in plant metabolism. Front Plant Sci, 2021, 12: 732216

46 Zhao Y B, Yang L, Guo J Q, et al. A recombinant lipidemic arroyeasts with high stigmasterol production, its construction method, fermentation medium for stigmasterol production and its application (in Chinese). China patent CN202210255496.1. 2023 Feb 03 [赵云博, 杨璐, 郭建琦, 等. 一种高产豆甾醇的重组解脂亚罗酵母、其构建方法、用于产豆甾醇的发酵培养基及应用. 中国专利CN202210255496.1. 2023-02-03]

47 Wang J, Shi R, Yang Q, et al. Characterization and potential function of *7-dehydrocholesterol reductase* (*dhcr7*) and *lathosterol 5-desaturase* (*sc5d*) in *Cynoglossus semilaevis* sexual size dimorphism. Gene, 2023, 853: 147089

48 Zhou W L, Gao H F, Wu Y L, et al. Biosynthesis of campesterol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (in Chinese). J Chem Ind Eng, 2021, 72: 4314–4324 [周武林, 高惠芳, 吴玉玲, 等. 重组酿酒酵母生物合成菜油甾醇. 化工学报, 2021, 72: 4314–4324]

49 Yang J, Li C, Zhang Y. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 24-methylene-cholesterol production. Biomolecules, 2021, 11: 1710

50 Guo X J, Xiao W H, Wang Y, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 7-dehydrocholesterol overproduction. Biotechnol Biofuels, 2018, 11: 192

51 Dong T, Zhou X, Hou Z J, et al. Multiple strategies enhance 7-dehydrocholesterol production from kitchen waste by engineered *Yarrowia lipolytica*. J Agric Food Chem, 2025, 73: 693–705

52 Chen Q, Wei W, Chao Z, et al. Electron transfer engineering of artificially designed cell factory for complete biosynthesis of steroids. Nat Commun, 2025, 16: 3740

53 Bi K, Wang W, Tang D, et al. Engineering sub-organelles of a diploid *Saccharomyces cerevisiae* to enhance the production of 7-dehydrocholesterol. Metab Eng, 2024, 84: 169–179

54 Guo X J, Yao M D, Xiao W H, et al. Compartmentalized reconstitution of post-squalene pathway for 7-dehydrocholesterol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. Front Microbiol, 2021, 12: 663973

55 Wei W, Gao S, Yi Q, et al. Reengineering of 7-dehydrocholesterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* using combined pathway and organelle strategies. Front Microbiol, 2022, 13: 978074

56 Li Y, Dai M, Zhang Y, et al. The sterol C-14 reductase Erg24 is responsible for ergosterol biosynthesis and ion homeostasis in *Aspergillus fumigatus*. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105: 1253–1268

57 Shang Y, Jin Q, Li G, et al. Functional study of two ER localized sterol C-14 reductases in *Aspergillus oryzae*. 3 Biotech, 2024, 14: 136

58 Wang W, Nie Y, Liu X Y, et al. The genome and transcriptome of *Sarocladium terricola* provide insight into ergosterol biosynthesis. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1181287

59 Jordá T, Barba-Aliaga M, Rozès N, et al. Transcriptional regulation of ergosterol biosynthesis genes in response to iron deficiency. Environ Microbiol, 2022, 24: 5248–5260

60 Derkacz D, Bernat P, Krasowska A. K143R amino acid substitution in 14-α-demethylase (Erg11p) changes plasma membrane and cell wall structure of *Candida albicans*. Int J Mol Sci, 2022, 23: 1631

61 Liang R, Xu K, Wang X, et al. Rational design of lanosterol 14α-demethylase for ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. 3 Biotech, 2024, 14: 300

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

62 Khan S H, Dube N, Sudhakar N, et al. Ancient and modern mechanisms compete in progesterone receptor activation. RSC Chem Biol, 2024, 5: 518–529

63 Li N, Oakes J A, Storbeck K H, et al. The P450 side-chain cleavage enzyme Cyp11a2 facilitates steroidogenesis in zebrafish. J Endocrinol, 2020, 244: 309–321

64 Liu K, Wang F Q, Liu K, et al. Light-driven progesterone production by InP—(*M. neoaurum*) biohybrid system. Bioresour Bioprocess, 2022, 9: 93

65 Li R, Guo S, Wang D, et al. Elucidation of the plant progesterone biosynthetic pathway and its application in a yeast cell factory. Metab Eng, 2025, 90: 197–208

66 Guevara G, Olortegui Flores Y, Fernández de las Heras L, et al. Metabolic engineering of *Rhodococcus ruber* Chol-4: a cell factory for testosterone production. PLoS One, 2019, 14: e0220492

67 Ding J, You S, Zhang J, et al. Rational design of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type3 for improving testosterone production with an engineered *Pichia pastoris*. Bioresource Tech, 2021, 341: 125833

68 Ortega-de los Ríos L, Getino L, Galán B, et al. Unlocking testosterone production by biotransformation: engineering a fungal model of *Aspergillus nidulans* strain deficient in steroid 11α-hydroxylase activity and expressing 17β-hydroxysteroid dehydrogenase enzyme as proof of concept. Biomolecules, 2024, 14: 1502

69 Wei Y, Mei G, Zhao J, et al. Testosterone biosynthesis from 4-androstene-3,17-dione catalyzed via bifunctional ketoreductase. Fermentation, 2023, 9: 998

70 Chen K, Liu C, Shao M, et al. Enhancing the biotransformation efficiency of human CYP17A1 in *Pichia pastoris* by co-expressing CPR and glucose-6-phosphate dehydrogenase simultaneously. Syst Microbiol Biomanuf, 2024, 4: 102–111

71 Chen K, Liu C, Zhang X, et al. Identification of a novel cytochrome P450 17A1 enzyme and its molecular engineering. Catal Sci Technol, 2023, 13: 548–557

72 Du Y, Tian H, Li J, et al. A novel A105Y mutant of CYP17A1 exhibits almost perfect regioselectivity in the production of 17α-hydroxyprogesterone. J Agric Food Chem, 2024, 72: 24609–24619

73 Pan H, Chang S, Qu Y, et al. Hydrocortisone production using whole-cell biocatalysts in recombinant *Escherichia coli*. Biochem Eng J, 2023, 198: 109023

74 Valentín-Goyco J, Im S C, Auchus R J. Kinetics of intermediate release enhances P450 11B2-catalyzed aldosterone synthesis. Biochemistry, 2024, 63: 1026–1037

75 Takeda Y, Demura M, Kometani M, et al. Molecular and epigenetic control of aldosterone synthase, CYP11B2 and 11-hydroxylase, CYP11B1. Int J Mol Sci, 2023, 24: 5782

76 Brixius-Anderko S, Scott E E. Structural and functional insights into aldosterone synthase interaction with its redox partner protein adrenodoxin. J Biol Chem, 2021, 296: 100794

77 Zhao Y Z, Zhang Y Y, Han H, et al. Advances in the antitumor activities and mechanisms of action of steroidal saponins. Chin J Nat Meds, 2018, 16: 732–748

78 Upadhyay S, Jeena G S, Shikha G S, et al. Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and *in vitro* production. Planta, 2018, 248: 519–544

79 Yang Y G, Zhang J, Zhang J Y, et al. Research progress on chemical components and pharmacological activities of polyphylla plants (in Chinese). Chin Herb Med, 2016, 47: 3301–3323 [杨远贵, 张霁, 张金渝, 等. 重楼属植物化学成分及药理活性研究进展. 中草药, 2016, 47: 3301–3323]

80 Li W L. Overview of research progress of phytosterols (in Chinese). Beverage Ind, 2013, 16: 48–51 [李万林. 植物甾醇的研究进展概述. 饮料工业, 2013, 16: 48–51]

81 Li J X, Yu H S Song Y T, et al. Modern research progress of xanthophylla (in Chinese). Chin Med Guide, 2013, 11: 52–54 [李俊萱, 于海食, 宋雨婷, 等. 黄药子的现代研究进展. 中国医药指南, 2013, 11: 52–54]

82 Cárdenas P D, Sonawane P D, Heinig U, et al. The bitter side of the nightshades: genomics drives discovery in *Solanaceae steroidal* alkaloid metabolism. Phytochemistry, 2015, 113: 24–32

83 Cheng J, Chen J, Liu X, et al. The origin and evolution of the diosgenin biosynthetic pathway in yam. Plant Commun, 2021, 2: 100079

84 Xu L, Wang D, Chen J, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for gram-scale diosgenin production. Metab Eng, 2022, 70:

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

115–128
85 Tian D M, Cheng H Y, Jiang M M, et al. Cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana*. J Nat Prod, 2016, 79: 38–50
86 Prassas I, Diamandis E P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7: 926–935
87 Krenn L, Kopp B. Bufadienolides from animal and plant sources. Phytochemistry, 1998, 48: 1–29
88 Tian H Y, Ruan L J, Yu T, et al. Bufospirostenin A and bufogargarizin C, steroids with rearranged skeletons from the toad *Bufo bufo gargarizans*. J Nat Prod, 2017, 80: 1182–1186
89 Caspi E, Lewis D O. Progesterone: its possible role in the biosynthesis of cardenolides in *Digitalis lanata*. Science, 1967, 156: 519–520
90 Bennett R, Sauer H, Heftmann E. Progesterone metabolism in *Digitalis lanata*. Phytochemistry, 1968, 7: 41–50
91 Caspi E, Lewis D O, Piatak D M, et al. Biosynthesis of plant sterols. Conversion of cholesterol to pregnenolone in *Digitalis purpurea*. Experientia, 1966, 22: 506–507
92 Blanchard S, Thorson J. Enzymatic tools for engineering natural product glycosylation. Curr Opin Chem Biol, 2006, 10: 263–271
93 Jones P, Messner B, Nakajima J I, et al. UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 2003, 278: 43910–43918
94 Quiel J A, Bender J. Glucose conjugation of anthranilate by the *Arabidopsis* UGT74F2 glucosyltransferase is required for tryptophan mutant blue fluorescence. J Biol Chem, 2003, 278: 6275–6281
95 Gantt R W, Goff R D, Williams G J, et al. Probing the aglycon promiscuity of an engineered glycosyltransferase. Angew Chem Int Ed, 2008, 47: 8889–8892
96 Wen C, Huang W, Zhu X L, et al. UGT74AN1, a permissive glycosyltransferase from *Asclepias curassavica* for the regiospecific steroid 3-*O*-glycosylation. Org Lett, 2018, 20: 534–537
97 Carroll E, Ravi Gopal B, Raghavan I, et al. A cytochrome P450 CYP87A4 imparts sterol side-chain cleavage in digoxin biosynthesis. Nat Commun, 2023, 14: 4042
98 Zheng M, Chang C, Su Q, et al. Research progress on biosynthesis and application of functional bile acids (in Chinese). Food Sci, 2020, 46: 255–265 [郑苗, 常超, 苏琪, 等. 功能性胆汁酸生物合成及应用研究进展. 食品科学, 2025, 46: 255–265]
99 Luo Z, Li M, Yang J, et al. Ferulic acid attenuates high-fat diet-induced hypercholesterolemia by activating classic bile acid synthesis pathway. Front Nutr, 2022, 9: 976638
100 Jia W, Wei M, Rajani C, et al. Targeting the alternative bile acid synthetic pathway for metabolic diseases. Protein Cell, 2021, 12: 411–425
101 Shijing T, Yinping P, Qiong Y, et al. Synthesis of TUDCA from chicken bile: immobilized dual-enzymatic system for producing artificial bear bile substitute. Microb Cell Fact, 2024, 23: 326
102 Ren S, Marques D, Redford K, et al. Regulation of oxysterol 7α-hydroxylase (CYP7B1) in the rat. Metabolism, 2003, 52: 636–642
103 Yi D, Bayer T, Badenhorst C P S, et al. Recent trends in biocatalysis. Chem Soc Rev, 2021, 50: 8003–8049

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199

Recent advances in the biosynthesis enzymes of steroidal natural products

CHEN GuangHui[1], LI ChunNi[1], KOU BoWen[2], XIAO WenHai[2], YAO MingDong[1*] & WANG Ying[1*]

[1] *State Key Laboratory of Synthetic Biology, Frontiers Science Center for Synthetic Biology (Ministry of Education), School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300072, China*
[2] *School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China*
* *Corresponding authors, E-mail: mingdong.yao@tju.edu.cn; ying.wang@tju.edu.cn*

Steroid compounds represent the second largest class of pharmaceuticals after antibiotics, with substantial demand in the medical market. Due to the complex molecular architecture and diverse stereochemistry of steroids, their biosynthesis, with its highly efficient and precise catalytic advantages, has emerged as a highly promising green synthesis approach. This article focuses on the study of key enzymes involved in the biosynthetic pathways of steroids, providing a comprehensive review of recent advances in the biosynthesis of major steroid molecules such as sterols, hormones, steroid saponins, cardiac glycosides, and bile acids. Emphasis is also placed on the catalytic roles of key enzymes, the mechanisms of enzymatic reactions, and strategies for enzyme optimization and engineering, along with achieved outcomes. This article offers prospects for future developments and technological breakthroughs in the sustainable microbial production of steroidal compounds.

steroidal compounds, biosynthesis, key enzymes, enzyme modification

doi: 10.1360/SSV-2025-0199

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0199