

环糊精促进 *Burkholderia cepacia* 转化胆固醇生成胆甾-4-烯-3,6-二酮

武迪, 张玲, 吴梦棋, 孙柳青, 王武, 杨海麟*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: *Burkholderia cepacia* 可转化胆固醇生成甾体激素药物前体。通过质谱、红外光谱、核磁共振光谱等技术鉴定出一种有较高医药用价值的转化产物为胆甾-4-烯-3,6-二酮, 但胆固醇的疏水性导致其转化得率较低。添加环糊精提高目标产物的转化得率, 并考察环糊精对细胞生长及底物包埋情况的影响。分别选取多种环糊精(与胆固醇的摩尔比为 1:1)添加到转化体系, 结果表明, 甲基- β -环糊精和羟乙基- β -环糊精对提高胆甾-4-烯-3,6-二酮摩尔转化得率效果显著, 分别是对照组的 27.55 倍和 37.95 倍。进一步优化羟乙基- β -环糊精的添加比例, 当其添加量与底物胆固醇的摩尔比为 2:1 时, 产物胆甾-4-烯-3,6-二酮转化得率是摩尔比为 1:1 时的 1.59 倍。红外光谱表征 2 mol 羟乙基- β -环糊精与 1 mol 底物胆固醇的包络络合情况, 发现 2 mol 的羟乙基- β -环糊精可有效对胆固醇甾核的 A 环、侧链的 26-C 和 27-C 进行包被, 形成稳定的包络物。羟乙基- β -环糊精可有效包被底物胆固醇, 进而提高产物胆甾-4-烯-3,6-二酮的产率, 为微生物转化生产胆甾-4-烯-3,6-二酮提供借鉴。

关键词: 环糊精; *Burkholderia cepacia*; 胆固醇; 胆甾-4-烯-3,6-二酮; 生物转化

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2021)07-0089-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.07.011

Burkholderia cepacia Bioconverts Cholesterol to Cholest-4-ene-3,6-Dione Promoted by Cyclodextrin

WU Di, ZHANG Ling, WU Mengqi, SUN Liuqing, WANG Wu, YANG Hailin*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Cholesterol can be converted by *Burkholderia cepacia* into a series of steroid hormone prodrugs. A conversion product of cholesterol with higher medicinal value was identified as cholest-4-ene-3,6-dione by mass spectrometry, infrared spectrum and nuclear magnetic resonance spectroscopy, however, the hydrophobicity of cholesterol resulted in a relatively low conversion yield. Cyclodextrin was used to increase the conversion yield of the target product, and the effects of cyclodextrin on cell growth and substrate embedding were investigated. Multiple cyclodextrins were added to the conversion system and the molar ratio of methyl- β -cyclodextrin to cholesterol was 1:1. The results showed that the molar conversion yield of cholest-4-ene-3,6-dione was significantly improved when methyl- β -cyclodextrin or hydroxyethyl- β -cyclodextrin was added, which was 27.55

收稿日期: 2020-01-02

基金项目: 江苏省产学研项目(BY2016022-40)。

* 通信作者: 杨海麟(1971—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物发酵方面的研究。E-mail: yanghailin@jiangnan.edu.cn

times and 37.95 times higher than the control group, respectively. The addition ratio of hydroxyethyl- β -cyclodextrin and cholesterol was further optimized. And it was found that when the molar ratio of the two substances was 2:1, the conversion yield of cholest-4-ene-3,6-dione was 1.59 times as high as that achieved at the molar ratio of 1:1. Infrared spectroscopy was used to characterize the inclusion complexation of 2 mol hydroxyethyl- β -cyclodextrin with 1 mol substrate cholesterol. It was found that the A ring of the steroid nucleus, 26-C and 27-C of the side chain of cholesterol could be effectively wrapped by 2 mol of hydroxyethyl- β -cyclodextrin, respectively, to form a stable inclusion. Cholesterol could be effectively coated by hydroxyethyl- β -cyclodextrin, and the yield of cholest-4-ene-3,6-dione was improved, which could be used as a reference for the microbial transformation of cholest-4-ene-3,6-dione.

Keywords: cyclodextrin, *Burkholderia cepacia*, cholesterol, cholest-4-ene-3,6-dione, bioconversion

胆固醇是一种重要的甾醇化合物,可以作为甾体类药物的原料^[1]。有些微生物可以切除胆固醇饱和侧链、氧化甾核特定部位,从而得到多种有药用价值的衍生物^[2-4]。利用 *Mycobacterium* sp.将胆固醇转化为睾酮(TS)^[5];利用 *Arthrobacter simplex* 降解胆固醇成功生产了雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)^[6];利用 *Rhodococcus* sp.将胆固醇转化为胆甾-4-烯-3-酮^[7]。除上述衍生物外,胆固醇还可被微生物转化为胆甾-4-烯-3,6-二酮^[8]。

胆甾-4-烯-3,6-二酮可应用于制备治疗或预防神经元损伤药物^[9],亦可用于制造脂质代谢改善剂、饮食品 and 动物饲料^[10],比胆甾-4-烯-3-酮具有更高的医药用价值。胆甾-4-烯-3,6-二酮可通过化学方法合成^[11],但化学合成法需使用大量强氧化剂且反应条件剧烈,也可通过微生物的甾体转化获得胆甾-4-烯-3,6-二酮。目前微生物转化甾醇获得胆甾-4-烯-3-酮的报道较多^[12-14],但获得胆甾-4-烯-3,6-二酮的报道较少。

底物胆固醇为疏水性有机化合物,不利于与转化体系中细胞的接触和反应,降低了产物的得率。可将胆固醇用有机溶剂溶解后加入转化体系来解决这一问题^[8],但有机溶剂易挥发、易燃易爆、污染环境、对菌体的生长毒害较大,且操作者长时间暴露于有机溶剂环境中,会对其神经系统及呼吸系统造成损伤。因此,可探索选取更环保廉价的促溶剂。

环糊精(cyclodextrin,简称 CD)具有截顶圆锥状空腔结构,内腔疏水,外壁亲水。对其进行适当的化学修饰,可以得到一系列具有修饰基团的环糊精衍生物,它们可与疏水性物质形成包结络合物,促进

反应的进行。在甾体的转化反应中应用环糊精及其衍生物具有成功的案例^[15-18]。向 *Saccharomyces cerevisiae* 转化雄烯二酮(AD)的体系中添加 α -环糊精(α -CD)可使其转化率提高 44.44%^[19];利用 *Nocardioideis simplex* 转化 AD 生成 ADD 的过程中,添加 β -环糊精(β -CD)使产物转化率达 25%^[20];在 β -CD 存在下,*Rhizopus nigricans* 对孕酮的生物转化反应速度几乎提高了两倍^[21]。然而,在甾体生物转化体系中应用环糊精促溶获得胆甾-4-烯-3,6-二酮的研究目前尚未有报道。

作者前期筛选鉴定获得了一株能够转化胆固醇的 *Burkholderia cepacia* ZWS15(*B. cepacia*, 保藏编号为 CCTCC NO:M2017661),从 *B.cepacia* 转化胆固醇的体系中分离并鉴定出胆甾-4-烯-3,6-二酮,考察环糊精种类和添加摩尔比对细胞生长、产物转化率的影响。选取最优的环糊精种类,考察其对胆固醇官能团的包埋效果,以期环糊精在生物转化胆固醇合成胆甾-4-烯-3,6-二酮的工业应用提供参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Burkholderia cepacia ZWS15(CCTCC M2017661)由作者所在实验室前期筛选并鉴定。固体培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 10,琼脂粉 20;种子培养基(LB 培养基,g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 10;发酵培养基(g/L):蔗糖 5,酵母粉 15,NaNO₃ 2,K₂HPO₄·3H₂O 2,KCl 0.5,MgCl₂ 1.35,MnCl₂ 0.01,CaCl₂ 0.055,MgSO₄ 1,胆固醇 2(即 5.18

mmol/L);转化培养基(g/L):环糊精具体添加量不同,其余同发酵培养基。 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精、甲基- β -环糊精、羟乙基- β -环糊精、2-羟丙基- β -环糊精、胆固醇、乙酸乙酯、异丙醇、乙腈:均购于国药公司;硅胶板(GF254):购于烟台新诺化工有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 取在-40℃甘油管保存的 *B. cepacia* ZWS15,于固体培养基划线分离,在37℃恒温培养箱倒置培养24~26 h,挑取单菌落接种于50 mL LB液体培养基中,于37℃、200 r/min摇床培养12 h,即为处于对数生长期的种子液^[22]。

1.2.2 羟乙基- β -环糊精-胆固醇包合物的制备 称取羟乙基- β -环糊精与胆固醇,使其摩尔比为2:1。将羟乙基- β -环糊精与胆固醇置于盛有10 mL转化培养基的50 mL离心管中,使用超声细胞破碎仪进行超声乳化,功率400 W,工作时间2 s,间歇时间2 s,超声乳化15 min。

1.2.3 *Burkholderia cepacia* 生长细胞转化胆固醇 将处于对数生长期的种子液按体积分数5%接种到装有10 mL转化培养基的50 mL摇瓶中。转化培养基中含2 g/L胆固醇,环糊精与胆固醇的摩尔比为1:1。将摇瓶置于30℃、200 r/min全温摇床柜中培养2 d,通过煮沸或直接用乙酸乙酯萃取终止转化。

1.2.4 薄层层析分离提取转化产物 采用萃取法提取产物。用2倍体积乙酸乙酯与转化液混合,200 r/min摇床中振荡10 min,6 000 r/min离心10 min,取上层乙酸乙酯。重复上述步骤,合并有机相。经真空旋转蒸发仪浓缩有机相,用GF254硅胶板(20 cm×20 cm,1.5~2 mm)分离产物,以 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{无水乙醚}}=2:3$ 作为展开剂。

1.2.5 质谱、核磁和红外光谱鉴定产物结构 质谱分析(LC-MS)检测产物的相对分子质量(沃特世质谱仪MALDI SYNAPT MS);核磁共振碳谱(^{13}C -NMR)、核磁共振氢谱(^1H -NMR)测定产物碳和质子的信号(布鲁克核磁共振波谱仪Aduance III 400 MHz),温度25℃,溶剂 CDCl_3 ,以四甲基硅烷(TMS)作为内标;傅立叶变换红外光谱仪(FT-IR)检测产物的官能团(赛默飞红外光谱仪Nicolet is10)。为进一步确认产物结构,除对测得的数据进行分析外,还将获得的数据与相关文献和National Institute of Advanced Industrial Science and

Technology数据库中的信息进行比对。

1.2.6 高效液相对产物定量分析 用高效液相色谱法(HPLC)定量分析产物。色谱柱为ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6 mm×250 mm,5 μm), $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{异丙醇}}=90:10$ 作为流动相,流量0.8 mL/min,进样量10 μL ,检测波长249 nm,柱温30℃,每批次做3个平行实验。

取分离鉴定后的纯产物作为标准品。用异丙醇溶解产物,配制成不同浓度梯度的溶液,0.45 μm 有机膜过滤后进行HPLC测定。以产物质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标做曲线,所得即为产物标准曲线。

根据上述标准曲线计算产物产量,根据下式计算产物的转化率^[23]:

$$\text{产物转化率}(\%) = \frac{c_1}{c_2} \times \frac{M_2}{M_1} \times 100\%$$

式中: c_1 为产物质量浓度,mg/mL; c_2 为底物初始质量浓度,mg/mL; M_1 为产物摩尔质量,g/mol; M_2 为底物摩尔质量,g/mol。

2 结果与讨论

2.1 *B. cepacia* 转化胆固醇的产物结构鉴定

菌株在LB培养基活化后接种于发酵培养基,在200 r/min、30℃全温摇瓶柜中培养2 d,按1.2.4中方法分离纯化其中一种转化产物。

利用LC-MS、FT-IR、NMR等技术对该物质的相对分子质量、官能团、C及质子信号等结构信息进行了鉴定。经LC-MS检测该产物相对分子质量为398.4。

图1为该物质的红外光谱图,1 700.32和1 682.67 cm^{-1} 、1 603.52 cm^{-1} 的吸收峰分别是 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动吸收峰,表明该物质中含有两个 $\text{C}=\text{O}$ 和一个 $\text{C}=\text{C}$,推测其分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_2$ 。在误差范围内,这与Hunter AC等报道的胆甾-4-烯-3,6-二酮红外光谱信息一致^[24]。

通过 ^{13}C -NMR测定不同位碳的化学位移(δ),确认该产物酮基的数量和位置,见图2(a), ^{13}C -NMR(101 MHz,Chloroform-*d*)信息详见表1。其中 δ 202.31与 δ 199.69是酮基的特征吸收峰,表示C6和C3位为酮基。 δ 161.07和 δ 125.44是碳碳双键的特征吸收峰,双键位于C4和C5之间。这与Hunter AC等报道的胆甾-4-烯-3,6-二酮核磁共振

碳谱信息一致^[24]。

通过 ¹H-NMR 谱测定该产物氢原子总数及特定位的质子信号,见图 2(b)。δ 7.07 为 CDCl₃ 特征吸收峰。δ 6.17 为单峰,是 C4 位上的一个 H,以该峰为标峰,对谱图积分,氢原子总数为 42。¹H-NMR (400 MHz,Chloroform-*d*) 信息见表 2。在误差范围内,与 CUI JG 等报道的胆甾-4-烯-3,6-二酮核磁共振氢谱一致^[25]。

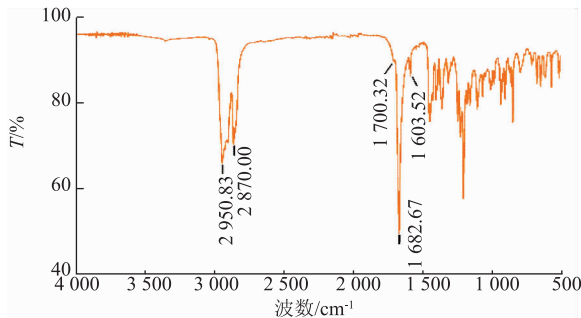


图 1 胆固醇转化产物红外光谱分析
Fig. 1 FT-IR analysis of cholesterol conversion product

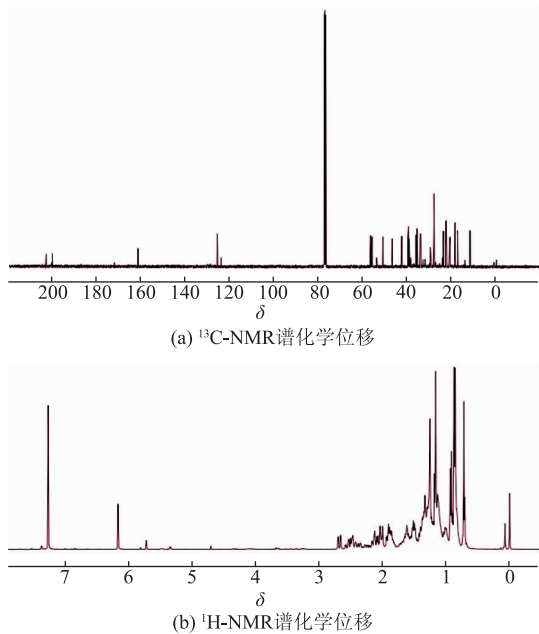


图 2 胆固醇转化产物核磁共振波谱
Fig. 2 NMR spectra of cholesterol conversion product

表 1 鉴定产物与胆甾-4-烯-3,6-二酮 ¹³C-NMR 谱对比

Table 1 Comparison of ¹³C-NMR spectrum of the product identified here with that of cholest-4-ene-3,6-dione

C 位	胆甾-4-烯-3,6-二酮 ^[24] δ _c	作者鉴定产物 δ _c
1	39.45	39.46
2	36.05	35.67
3	199.69	199.48
4	125.42	125.44
5	161.18	161.07
6	202.43	202.31
7	35.50	34.22
8	35.66	35.54
9	50.95	50.99
10	39.82	39.81
11	20.86	20.88
12	38.80	36.07
13	42.52	42.54
14	56.53	56.55
15	23.78	23.80
16	33.94	29.71
17	55.94	55.97
18	11.88	11.89
19	18.64	18.65
20	34.20	33.97
21	17.48	17.51
22	39.12	39.14
23	23.95	23.97
24	46.79	46.81
25	28.00	28.01
26	22.54	22.55
27	22.80	22.81

表 2 鉴定产物与胆甾-4-烯-3,6-二酮 ¹H-NMR 谱的对比

Table 2 Comparison of ¹H-NMR spectrum of the product identified here with that of cholest-4-ene-3,6-dione

质子	胆甾-4-烯-3,6-二酮 ^[25] δ _H	作者鉴定产物 δ _H
C ₂ -βH	2.546	2.47
C ₇ -αH	2.706	2.62
C ₄ -H	6.196	6.17
18-CH ₃	0.746	0.72
19-CH ₃	1.172	1.12

续表 2

质子	胆甾-4-烯-3,6-二酮 ^[25] δ_{H}	作者鉴定产物 δ_{H}
21-CH ₃	0.952	0.92
26-CH ₃	0.899	0.87
27-CH ₃	0.886	0.87

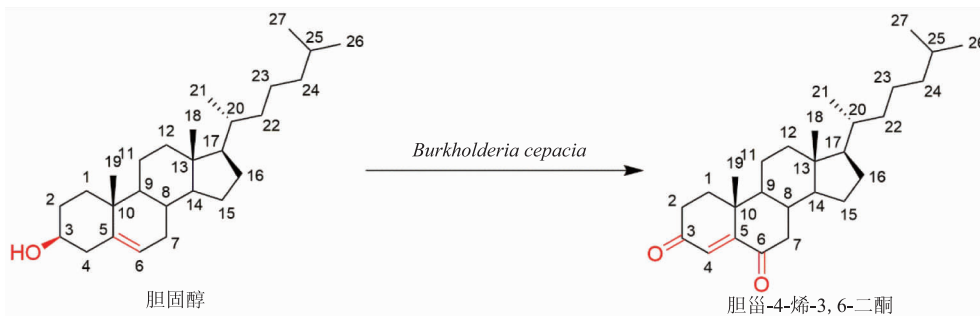


图 3 *B. cepacia* 转化胆固醇生成胆甾-4-烯-3,6-二酮

Fig. 3 Biotransformation of cholesterol to cholest-4-ene-3,6-dione by *B. cepacia*

表 3 分离产物与胆甾-4-烯-3-酮的结构信息对比

Table 3 Comparison of structural information between the isolated product of this study and cholest-4-en-3-one

结构特征	相对分子质量	6-C	4-H
胆甾-4-烯-3-酮 ^[26]	384.4	32.95	5.725
作者鉴定产物	398.4	202.31	6.17

2.2 不同种类环糊精对胆甾-4-烯-3,6-二酮产率的影响

由于环糊精及其衍生物具有内腔疏水, 外壁亲水的特性, 且在生物转化过程中环糊精仅对细胞的形态造成小幅度影响而不至于使其凋亡, 提高了菌体细胞的通透性, 有助于生物转化的进行^[27]。故选取 α -环糊精(α -CD)、 β -环糊精(β -CD)、 γ -环糊精(γ -CD)、甲基- β -环糊精(M- β -CD)、羟乙基- β -环糊精(HE- β -CD)、羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)分别加入 *B. cepacia* 转化胆固醇的体系中, 考察对胆甾-4-烯-3,6-二酮产率的影响。

在转化过程中恒定胆固醇的初始添加量为 2 g/L (即 5.18 mmol/L)。按环糊精与胆固醇摩尔比 1:1 向转化培养基中添加环糊精并转化 2 d, 环糊精及胆固醇预先使用 60 W 超声波乳化 15 min。

不同种类环糊精及衍生物对胆甾-4-烯-3,6-

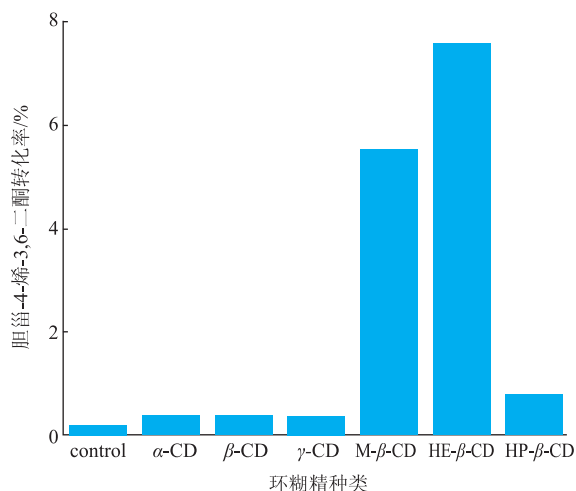
综上所述, 在误差范围内, 该产物质谱、红外光谱、核磁共振波谱信息鉴定该物质为胆甾-4-烯-3,6-二酮, 见图 3。

对比类似酮基产物的基本结构信息见表 3, 进一步确定 *Burkholderia cepacia* ZWS15 转化胆固醇的产物为胆甾-4-烯-3,6-二酮, 而不是目前报道较多的胆甾-4-烯-3-酮。

二酮转化率的影响见图 4(a)。由于胆固醇的低水溶度, 不添加任何环糊精时, 胆甾-4-烯-3,6-二酮的转化率仅为 0.2%。添加 M- β -CD、HE- β -CD 的实验组, 胆甾-4-烯-3,6-二酮转化率大幅提高, 分别为对照组的 27.55 倍和 37.95 倍。在 α -CD、 β -CD、 γ -CD、HP- β -CD 存在下, 胆甾-4-烯-3,6-二酮的转化率约为对照组的 1.75~3.95 倍。

进一步考察了 HE- β -CD 添加量对转化率的影响, 结果见图 4(b)。当 HE- β -CD 与胆固醇摩尔比为 2:1 时, 胆甾-4-烯-3,6-二酮转化率为 12.1%, 比 HE- β -CD 与胆固醇摩尔比为 1:1 的转化率提高了 59.42%。

与对照组(不添加环糊精)相比, 所选的环糊精均能促进胆甾-4-烯-3,6-二酮的生成, 表明这几种环糊精对胆固醇都有不同程度的包被^[28-29]。产物转化率最高的为添加羟乙基- β -环糊精 (HE- β -CD) 组。当 HE- β -CD 与胆固醇的摩尔比为 2:1 时, 产物的转化率不仅是对照组(不添加环糊精)的 60 倍, 还比 HE- β -CD 与胆固醇的摩尔比为 1:1 组的转化率提高了 59.42%。与其他环糊精相比, 羟乙基- β -环糊精(HE- β -CD)可能更有效包被了胆固醇的官能团, 提高了与细菌细胞的接触效率, 从而提高了产物的转化率。



(a) 不同种类环糊精对胆甾-4-烯-3,6-二酮转化率的影响

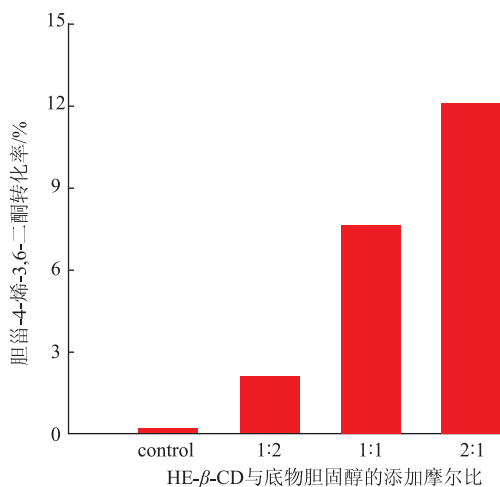
(b) HE- β -CD与底物不同添加比例对胆甾-4-烯-3,6-二酮转化率的影响

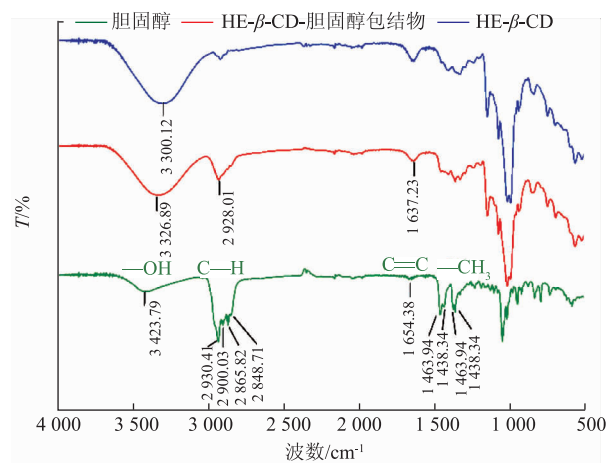
图4 环糊精对胆甾-4-烯-3,6-二酮转化率的影响

Fig. 4 Effect of cyclodextrin on the yield of cholest-4-ene-3,6-dione

2.3 红外光谱检测羟乙基- β -环糊精对胆固醇官能团的包埋

为了进一步表征 HE- β -CD 对胆固醇官能团或部位的包埋情况,分别对胆固醇、HE- β -CD-胆固醇包合物(摩尔比为 2:1)和 HE- β -CD 进行红外光谱分析,结果见图 5。

3 423.79 cm^{-1} 为胆固醇 C3 位羟基伸缩振动吸收峰,在 HE- β -CD/胆固醇包合物的红外谱图中,羟基伸缩振动吸收峰依然存在,这说明羟基没有被 HE- β -CD 包埋;而羟基伸缩振动频率向低频位移至 3 326.89 cm^{-1} ,表明胆固醇与 HE- β -CD 的羟基之间可能形成了氢键。2 930.41、2 900.03、2 865.82、2 848.71 cm^{-1} 为饱和烃的 C—H 伸缩振动吸收峰,

图5 红外光谱分析羟乙基- β -环糊精包埋胆固醇效果Fig. 5 FT-IR spectra of HE- β -CD-embedded cholesterol

在 HE- β -CD/胆固醇包合物中,这些吸收峰的强度明显减弱,说明胆固醇该处基团被 HE- β -CD 包结。胆固醇 1 654.38 cm^{-1} 碳碳双键吸收峰在 HE- β -CD/胆固醇包合物中依然存在,表明 C5 和 C6 间的—C=C—没有被包埋,根据胆固醇的结构式分析,HE- β -CD 将胆固醇甾核 A 环包埋。

胆固醇 C26、27 位偕二甲基于 1 463.94、1 376.34 cm^{-1} 裂分为双峰 (1 463.94、1 438.34 cm^{-1} 为一个甲基吸收峰;1 376.34、1 364.71 cm^{-1} 为另一个甲基吸收峰),双峰信号在 HE- β -CD/胆固醇包合物中几乎消失,表明侧链的 C26、27 位甲基均被 HE- β -CD 包埋。

综合上述,HE- β -CD 与胆固醇的摩尔比为 2:1 时之所以能够提高胆甾-4-烯-3,6-二酮的转化率,可能是因为 HE- β -CD 通过分子间的非极性共价键对底物胆固醇甾核的 A 环、侧链的 C26 和 C27 进行包被,形成稳定的包结物(见图 6),进而提高了胆固醇与菌体的接触效率^[30]。

3 结语

作者对 *Burkholderia cepacia* ZWS15 转化胆固醇的产物进行分离纯化,通过 LC-MS、FT-IR、NMR 等技术进行结构鉴定,获得了一种产物胆甾-4-烯-3,6-二酮。

通过考察 6 种环糊精 (α -CD、 β -CD、 γ -CD、M- β -CD、HE- β -CD、HP- β -CD)对菌体的影响,这几种环糊精的添加几乎不影响菌体的生长。

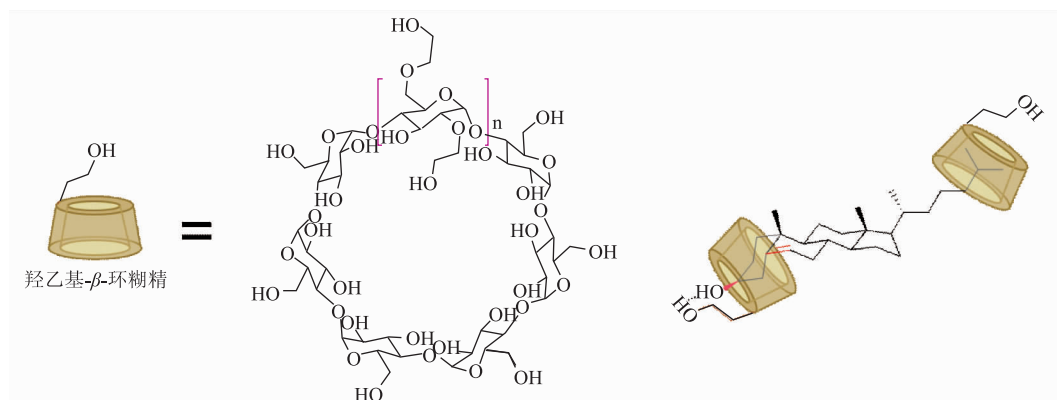


图6 羟乙基-β-环糊精与胆固醇包结物构象示意图

Fig. 6 Schematic diagram of the conformation of hydroxyethyl-β-cyclodextrin and cholesterol inclusion complex

向转化培养基中添加与胆固醇摩尔比为 1:1 的环糊精,发现添加 α -CD、 β -CD、 γ -CD、HP- β -CD 的体系中,胆甾-4-烯-3,6-二酮的转化率约为对照组的 1.75~3.95 倍;添加 β -CD 种类的转化体系中,M- β -CD 和 HE- β -CD 的效果较好,转化率分别为对照组的 27.55 倍和 37.95 倍。

进一步考察了 HE- β -CD 与底物胆固醇摩尔比对产物转化得率的影响,发现当二者摩尔比为 2:1 时,胆甾-4-烯-3,6-二酮摩尔转化率为 12.1%,比

HE- β -CD 与胆固醇摩尔比为 1:1 的转化率提高了 59.42%。

对 2 mol HE- β -CD 与 1 mol 胆固醇的包合物进行红外光谱分析,结果表明,胆固醇甾核的 A 环及侧链的 C26、C27 信号在包合物中消失,推测可能是因为 2 mol HE- β -CD 可通过分子间的非极性共价键与 1 mol 胆固醇形成了稳定的包结物,这为 HE- β -CD 在生物转化合成胆甾-4-烯-3,6-二酮的工业应用提供了借鉴。

参考文献:

- [1] FERNÁNDEZ-CABEZÓN L, GALÁN B, GARCÍA J L. New insights on steroid biotechnology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 958-967.
- [2] GIORGI V, MENÉNDEZP, GARCÍA-CARNELLI C. Microbial transformation of cholesterol: reactions and practical aspects—an update[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(9): 131-139.
- [3] GALÁN B, UHÍA I, GARCÍA-FERNÁNDEZ E, et al. *Mycobacterium smegmatis* is a suitable cell factory for the production of steroidic synthons[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(1): 138-150.
- [4] DONOVA MV. Steroid bioconversions[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1645: 1-13.
- [5] LIU WH, LO CK. Production of testosterone from cholesterol using a single-step microbial transformation of *Mycobacterium* sp. [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, 19(4): 269-272.
- [6] NAGASAWA M, BAE J, TAMURA G, et al. Microbial transformation of sterols Part II. cleavage of sterol side chains by microorganisms[J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 1969, 33(11): 1644-1650.
- [7] 郭倩, 张铁雨, 冯进辉, 等. 高效转化胆固醇菌株的筛选、鉴定及转化条件优化 [J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(1): 101-106.
- [8] AONO R, DOUKYU N, KOBAYASHI H, et al. Oxidative bioconversion of cholesterol by *Pseudomonas* sp. strain ST200 in a water-organic solvent two-phase system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(7): 2518-2523.
- [9] 张静夏, 颜光美, 银巍, 等. 胆甾-4-烯-3,6-二酮在制备治疗或预防神经元损伤药物中的应用[P]. 中国专利: 108042547, 2018-05-18.
- [10] 铃木邦夫, 长岛直, 长桥真也. 甾醇的 5-烯-3-酮衍生物或 3,6-二酮衍生物的制造方法, 脂质代谢改善剂、饮食品以及动物饲料的制造方法和分析方法[P]. 中国专利: 101006184, 2007-07-25.
- [11] ZHANG W, WANG L, ZHANG L, et al. Synthesis and biological evaluation of steroidal derivatives as selective inhibitors of AKR1B10[J]. *Steroids*, 2014, 86: 39-44.

- [12] WU K, LI W, SONG J, et al. Production, purification, and identification of cholest-4-en-3-one produced by cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. in aqueous/organic biphasic system[J]. **Biochemistry Insights**, 2015, 8(Suppl 1): 1-8.
- [13] SHAO M L, RAO Z M, ZHANG X, et al. Bioconversion of cholesterol to 4-cholesten-3-one by recombinant *Bacillus subtilis* expressing choM gene encoding cholesterol oxidase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2015, 90: 1811-1820.
- [14] LIU W H, HORNG W C, TSAI M S. Bioconversion of cholesterol to cholest-4-en-3-one in aqueous/organic solvent two-phase reactors[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1996, 18(3): 184-189.
- [15] SARAPHANCHOTIWITTHAYA A, SRIPALAKIT P. Production of 4-androstene-3, 17-dione and 1, 4-androstadiene-3, 17-dione from rice germ and wheat germ extracts by *Mycobacterium* sp[J]. **Biotechnology Letters**, 2016, 38(9): 1595-1602.
- [16] FENYVESI É, PUSKÁS I, SZENTE L. Applications of steroid drugs entrapped in cyclodextrins[J]. **Environmental Chemistry Letters**, 2019, 17: 375-391.
- [17] CAIRA M R, BOURNE S A, SAMSODIEN H, et al. Inclusion complexes of 2-methoxyestradiol with dimethylated and permethylated β -cyclodextrins: models for cyclodextrin-steroid interaction[J]. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, 2015, 11: 2616-2630.
- [18] ZHANG X Y, PENG Y, SU Z R, et al. Optimization of biotransformation from phytosterol to androstenedione by a mutant *Mycobacterium neoaurum* ZJUVN-08[J]. **Journal of Zhejiang University Science B**, 2013, 14(2): 132-143.
- [19] LIU J, WANG L, SHEN Y, et al. Effect of β -cyclodextrins derivatives on steroids biotransformation by *Arthrobacter simplex*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2018, 185(4): 1004-1013.
- [20] LUTHRA U, KHADPEKAR S, TRIVEDI A, et al. Biotransformation of 4-androstene-3, 17-dione to androst-1, 4-diene-3, 17-dione by *Nocardioides simplex*[J]. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2015, 4(11): 1935-1943.
- [21] ROGLIĆ U, ŽNIDARŠIČ-PLAZL P, PLAZL I. The influence of β -cyclodextrin on the kinetics of progesterone transformation by *Rhizopus nigricans*[J]. **Biocatalysis**, 2005, 23(5): 299-305.
- [22] 孙柳青, 吴梦棋, 张玲, 等. *Burkholderia cepacia* 中具有解脂作用的胆固醇酯酶的酶学特性[J]. **食品与发酵工业**, 2019, 45(14): 9-14.
- [23] MANCILLA RA, LITTLE C, AMOROSO A. Efficient bioconversion of high concentration phytosterol microdispersion to 4-androstene-3, 17-dione (AD) by *Mycobacterium* sp. B3805[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2018, 185(2): 494-506.
- [24] HUNTER AC, PRIEST SM. An efficient one-pot synthesis generating 4-ene-3, 6-dione functionalised steroids from steroidal 5-en-3 β -ols using a modified Jones oxidation methodology[J]. **Steroids**, 2006, 71(1): 30-33.
- [25] CUI J G, WANG H, HUANG Y M, et al. Synthesis and cytotoxic analysis of some disodium 3 β , 6 β -dihydroxysteroidisulfates[J]. **Steroids**, 2009, 13(74): 1057-1060.
- [26] TENG J I, SMITH L L. Sterol peroxidation by *Pseudomonas fluorescens* cholesterol oxidase[J]. **Steroids**, 1996, 61(11): 627-633.
- [27] SHEN Y, LIANG J, LI H, et al. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-mediated alterations in cell permeability, lipid and protein profiles of steroid-transforming *Arthrobacter simplex*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015, 99(1): 387-397.
- [28] 申雁冰. 羟丙基- β -环糊精对分枝杆菌降解植物甾醇的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2008.
- [29] MA Y H, WANG M, FAN Z, et al. The influence of host - guest inclusion complex formation on the biotransformation of cortisone acetate Δ^1 -dehydrogenation[J]. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2009, 117: 146-151.
- [30] SHEN Y B, WANG M, LI H N, et al. Influence of hydroxypropyl- β - cyclodextrin on phytosterol biotransformation by different strains of *Mycobacterium neoaurum*[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2012, 39(9): 1253-1259.