生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):317-327

基于P450scc系统的酿酒酵母从头合成孕烯醇酮细胞工厂的构建与优化

董旭芳[1] 童颖佳[1] 刘伟[1] 史劲松[1] 许正宏[2] 李会[1*]
（1.江南大学生命科学与健康工程学院,无锡 214122; 2.四川大学轻工科学与工程学院,成都 610065）

摘 要： 【目的】孕烯醇酮是多种甾体激素药物合成的关键前体，具有重要的应用价值，但其传统化学合成过程复杂、环境负担较重。以酿酒酵母为底盘构建孕烯醇酮的生物合成体系，为其绿色、高效生产提供新的技术路径。【方法】以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母重组菌株CY03为研究对象，引入不同来源的P450scc系统，比较其在酿酒酵母中的催化性能，筛选获得最优酶组合；进一步利用酿酒酵母rDNA多拷贝位点实现P450scc系统的多拷贝整合以提高表达水平；同时尝试通过蛋白融合策略增强CYP87A4与其氧化还原伴侣ATR1之间的电子传递效率；并对培养基碳源、氮源及无机盐等关键因素进行优化，以提升孕烯醇酮合成水平。【结果】洋地黄（*Digitalis lanata*）来源的CYP87A4与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）来源的ATR1组合表现出最优催化性能，孕烯醇酮产量达3.75 mg/L。通过rDNA位点实现P450scc系统多拷贝整合后，成功筛选到拷贝数为5的工程菌株，将孕烯醇酮产量提升至14.51 mg/L，为单拷贝菌株的3.87倍。蛋白融合策略未能进一步提高孕烯醇酮合成效率。经培养基条件优化，在20 g/L葡萄糖、10 g/L酵母粉、20 g/L蛋白胨并添加0.3 g/L钾离子（K^+）的条件下，孕烯醇酮产量进一步提高至16.82 mg/L。【结论】成功构建并优化了酿酒酵母从头合成孕烯醇酮的生物合成体系，通过P450scc系统来源筛选、多拷贝整合及发酵条件优化显著提高了产量，为甾体类化合物的微生物绿色制造提供了可行的工程策略和实验依据。

关键词： 酿酒酵母；孕烯醇酮；从头合成；培养基优化
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0189

Construction and Optimization of *de novo* Pregnenolone Cell Factory Based on the P450scc System in *Saccharomyces cerevisiae*

DONG Xu-fang[1] TONG Ying-jia[1] LIU Wei[1] SHI Jin-song[1] XU Zheng-hong[2] LI Hui[1*]
（1. *School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi* 214122; 2. *College of Light Industry Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu* 610065）

Abstract: 【Objective】 Pregnenolone serves as a key precursor for synthesizing various steroid hormones, holding significant industrial applications. However, its traditional chemical synthesis process is complex and environmentally burdensome. Constructing a pregnenolone biosynthesis system using *Saccharomyces cerevisiae* as a chassis provides a new technological pathway for its green and efficient production. 【Method】 The recombinant strain CY03 of *S. cerevisiae*, previously constructed in our laboratory for high-yield campesterol production, was taken as the research object. P450scc systems from different sources were introduced into *S. cerevisiae* to compare their catalytic performance, and the optimal enzyme combination was screened out. The multi-copy sites of *S. cerevisiae* rDNA were further utilized to achieve multi-copy integration of the P450scc system, thereby enhancing its expression. Concurrently, we attempted to enhance the electron transport efficiency between CYP87A4 and its redox partner ATR1 using protein fusion strategies. We also optimized key factors in the culture medium, including carbon source, nitrogen source, and inorganic salts, to enhance pregnenolone synthesis. 【Result】 The combination of CYP87A4 from *Digitalis lanata* and ATR1 from *Arabidopsis thaliana* exhibited the best catalytic performance, achieving a pregnenolone titer of 3.75 mg/L. After multi-

收稿日期：2026-02-06
基金项目：国家自然科学基金项目（22578169），中央高校基本科研业务费专项资金资助（JUSRP202504023）
*通信作者：李会 lihui@jiangnan.edu.cn

copy integration of the P450scc system at the rDNA locus, a recombinant strain with a copy number of 5 was successfully screened, which increased the pregnenolone production to 14.51 mg/L, which was 3.87 times higher than that of the single-copy strain. The protein fusion strategy failed to further enhance the efficiency of pregnenolone synthesis. Through optimization of the culture medium conditions, the pregnenolone production was further increased to 16.82 mg/L under the following conditions: 20 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, and 0.3 g/L K^+.【Conclusion】We successfully constructed and optimized a biosynthetic system for *de novo* pregnenolone synthesis in *S. cerevisiae*. By screening P450scc system sources, performing multi-copy integration, and optimizing fermentation conditions, we significantly enhanced the yield. This study provides a feasible engineering strategy and an experimental basis for the green microbial manufacturing of steroid compounds.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; pregnenolone; *de novo* synthesis; culture medium optimization

甾体化合物是广泛存在于自然界中的一类天然产物，其基本母核结构为环戊烷多氢菲[1]。目前，全球甾体类药物品种已超过400种，广泛应用于抗肿瘤、抗炎、抗过敏、免疫调节及生殖发育疾病治疗等领域，是仅次于抗生素的第二大类药物[2-3]。孕烯醇酮是甾体化合物生物合成途径中的关键中间体，也是糖皮质激素、盐皮质激素以及性激素等多种重要甾体药物的共同前体[4]。目前，孕烯醇酮的生产主要依赖于化学合成，合成步骤复杂且伴有环境的污染[5]。随着甾体类药物在临床治疗和健康管理领域中的持续应用，对孕烯醇酮等甾体前体化合物的需求逐渐增长，开发高效、稳定且具有可持续性的生产技术已成为甾体类化合物制造领域的重要研究方向之一[6]。

利用微生物从头合成孕烯醇酮具有碳源简单、投料成本低和底物利用率高等优势，因而被认为是替代传统化学合成的潜在途径[7]。该策略通常以酵母为底盘细胞，基于酵母内源的麦角甾醇合成途径，敲除ERG5并异源表达DHCR7，可实现菜油甾醇的合成。在此基础上，进一步引入细胞色素P450侧链降解系统（P450scc），即可催化甾醇侧链的断裂反应，从而生成孕烯醇酮（图1）。其中，P450scc系统是孕烯醇酮合成的关键限速酶，该系统由一个细胞色素P450依赖性单加氧酶（P450酶）及氧化还原伴侣组成。不同来源的P450scc系统也存在着差异：哺乳动物源的P450scc系统定位于线粒体，由P450酶、

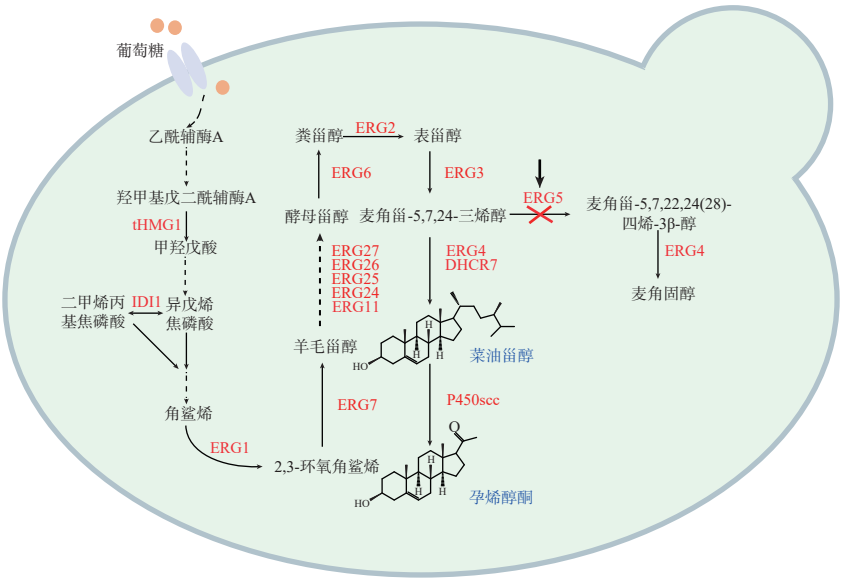


图1 酿酒酵母中孕烯醇酮合成途径

Fig. 1 Pregnenolone synthesis pathway in *S. cerevisiae*

铁氧还原蛋白还原酶（ADR）和铁氧还原蛋白（ADX）3种蛋白组成；而植物来源的P450scc系统定位于内质网，仅含有P450酶和NADPH依赖型P450还原酶（CPR）两种蛋白[8]。

与原核生物相比，真核宿主（如酿酒酵母）具备完整的甲羟戊酸途径、适配真核来源细胞色素P450酶的细胞膜体系，以及较为完善的翻译后修饰机制和良好的代谢工程改造潜力，已成为实现孕烯醇酮从头合成的重要微生物细胞工厂[9-11]。1998年，Duport等[12]通过引入牛源（*Bos taurus*）的CYP11A1、ADX和ADR，首次在酿酒酵母中实现了孕烯醇酮的从头合成。2023年，Carroll等[13]挖掘并在酿酒酵母中表达了来源于洋地黄（*Digitalis lanata*）的细胞色素P450酶CYP87A4及来源于拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的氧化还原伴侣ATR1，首次将植物源的P450scc系统用于孕烯醇酮的从头合成。2025年，梅世豪等[14]以酿酒酵母为底盘细胞，组合短尾猫（*Lynx rufus*）来源的CYP11A1和解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）来源的ADR、ADX，在5 L发酵罐中将孕烯醇酮的产量提高至116.43 mg/L。尽管在酵母中已成功实现了孕烯醇酮的从头合成并取得了一定的进展，但其产量普遍较低，仍受多重因素制约，主要包括：酿酒酵母内源甾醇代谢网络复杂，存在竞争通路与调控限制；外源引入的P450酶与其氧化还原伴侣之间适配性不足；以及P450scc系统催化活性较低等问题。

基于此，本研究以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母CY03为底盘菌株，通过引入外源P450scc系统，构建从葡萄糖到孕烯醇酮的完整生物合成途径。在此基础上，系统比较不同动物源和植物源的P450scc系统在酿酒酵母中的催化性能，筛选获得适配性更优的酶组合；进一步通过rDNA位点实现P450scc系统的多拷贝整合，以提高关键酶的表达水平；同时尝试采用蛋白融合工程提高电子传递效率，并结合培养基优化，提升重组菌株的整体发酵性能，为孕烯醇酮及其下游甾体化合物的绿色生物制造提供可行策略。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株、质粒及引物　本文所用的所有质粒通过测序验证，菌株和质粒见附表1，所使用的引物见附表2。

1.1.2　试剂　2×Phanta Max Master Mix、ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V3、质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；DNA Marker，TaKaRa公司；酵母粉、胰蛋白胨，英国Oxoid公司；蛋白胨、5-FOA（5-氟乳清酸）、PEG4000，生工生物工程（上海）股份有限公司；琼脂粉，赛国生物科技有限公司；YNB（无氨基酸酵母氮源）、ssDNA（鲑鱼精DNA），牛肉粉，北京索莱宝科技有限公司；乙酸锂二水合物，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；菜油甾醇标品、孕烯醇酮标品，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；其他试剂均为分析纯，国药化学试剂有限公司。

1.1.3　培养基　LB培养基：10 g/L氯化钠，10 g/L蛋白胨，5 g/L酵母粉。固体培养基加入2%的琼脂粉。121 ℃灭菌20 min。必要时添加氨苄抗生素，终浓度为100 μg/mL。

YPD培养基：20 g/L葡萄糖，20 g/L蛋白胨，10 g/L酵母粉。固体培养基加入2%的琼脂粉。115 ℃灭菌30 min。

SD培养基：20 g/L葡萄糖，6.7 g/L酵母氮源，可按需要添加10 mL/L 100×尿嘧啶（Ura）母液，10 mL/L 100×组氨酸（His）母液，10 mL/L 100×亮氨酸（Leu）母液，10 mL/L 100×色氨酸（Trp）母液。固体培养基加入2%的琼脂粉。115 ℃灭菌30 min。其中SD-Leu培养基：在SD培养基基础上添加10 mL/L 100×尿嘧啶（Ura）母液，10 mL/L 100×组氨酸（His）母液，10 mL/L 100×色氨酸（Trp）母液。

1.1.4　主要仪器与设备　超净工作台，苏净集团安泰公司；PCR仪，美国Bio-Rad公司；恒温金属浴，杭州奥盛仪器公司；生化培养箱，上海跃进医疗器械厂；HYL-C3组合式摇床，太仓市强乐实验设备有限公司；1260 Infinity II液相色谱系统，美国安捷伦科技公司；紫外分光光度计，上海翱艺仪器；数字式涡旋振荡器，奥然科学技术有限公司；NanoDrop 2000分光光度计，赛默飞世尔科技（中国）有限公司。

1.2　方法

1.2.1　质粒及菌株构建　目的基因由天霖生物科技

（无锡）有限公司根据酿酒酵母密码子优化后进行基因合成，以附表2中的引物对目的基因及pESC-Leu质粒进行PCR反应，扩增得到带有同源臂的目的基因片段及线性化载体，产物使用胶回收试剂盒回收。对线性化的pESC-Leu载体及目的基因片段进行同源重组连接后转入*E. coli* JM109感受态，挑取LB平板上单菌落进行菌落PCR和测序验证。验证无误后挑选单菌落接种于10 mL LB培养基中，使用质粒小量制备试剂盒提取重组质粒。通过PCR反应扩增获得目的片段，包括目的基因表达盒片段（启动子、目的基因、终止子），以及基因整合位点上下游500–1 000 bp同源臂序列和用于筛选的氨基酸片段（Leu/Ura/Trp/His）；各目的片段间存在20–40 bp的同源臂，通过化学转化的方式将各DNA片段共转化至酵母细胞中，通过同源重组整合至酿酒酵母基因组中。

1.2.2 酿酒酵母细胞感受态的制备和转化 挑取酿酒酵母单菌落于10 mL YPD培养基中过夜培养；吸取1 mL菌液转移到1.5 mL离心管中，6 000 r/min离心1 min，弃去培养基；使用1 mL无菌水清洗细胞，6 000 r/min离心1 min，弃上清，重复清洗两遍；使用1 mL 0.1 mol/L LiAc重悬细胞，4 ℃静置10 min，4 000 r/min离心5 min，弃去900 μL上清，剩余100 μL混匀重悬菌体；将50%(w/v) PEG4000 480 μL；1 mol/L LiAc 72 μL；10%单链ssDNA 40 μL；共转化的片段混合物28 μL；按照以上顺序，分别加入置于冰上的LiAc-细胞混合液内，高速涡旋1 min，使其充分混匀；将转化体系于30 ℃培养箱内静置30 min；加入72 μL二甲基亚砜（DMSO）轻柔混匀；42 ℃热激30 min，4 000 r/min离心1 min，弃上清，加入100 μL的5 mmol/L $CaCl_2$混匀重悬菌体，静置5–10 min，涂布于营养缺陷型平板。30 ℃培养箱中培养2–4 d，挑取单菌落进行菌落PCR和测序验证。

1.2.3 重组酵母菌株的发酵培养 在10 mL YPD培养基中接种平板上活化得到的单克隆重组菌株，于30 ℃，220 r/min培养24 h至OD_{600}约为5–6；然后以初始OD_{600}为0.2转接至50 mL YPD培养基中，在同等培养条件下连续发酵120 h。

1.2.4 孕烯醇酮的提取与检测 取10 mL发酵培养液于10 mL离心管中，8 000 r/min离心5 min，弃上清，将菌体转移至2 mL EP管，加入800 μL含20%氢氧化钾的50%乙醇溶液，在涡旋振荡器中2 700 r/min震荡5 min，于80 ℃的金属浴中进行皂化4 h，反应结束后，待其自然冷却至室温，加入800 μL的正己烷于涡旋振荡器中2 700 r/min振荡20 min，再将反应液于8 000 r/min离心5 min，取上层有机相过0.22 μm有机滤膜后经高效液相色谱仪进行分析。

高效液相色谱仪为Agilent 1260，色谱柱为Agilent 5 TC-C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）。孕烯醇酮的检测条件：流动相为乙腈∶水（v∶v）=70%∶30%，柱温为30 ℃，流速为1.0 mL/min，检测波长为203 nm，单次进样量为20 μL。

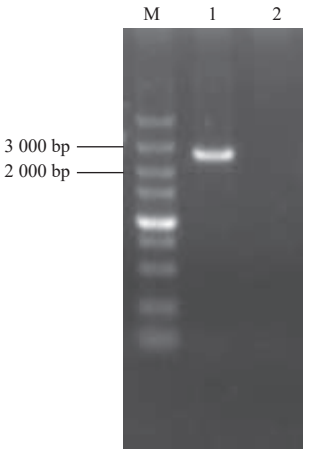
孕烯醇酮标准品的配置：称取10 mg孕烯醇酮，溶于10 mL 100%的甲醇作为孕烯醇酮母液。将此浓度的孕烯醇酮母液依次用100%的甲醇稀释成5、10、20、50、100 mg/L，通过0.22 μm有机系滤膜过滤，使用安捷伦高效液相色谱仪检测。

1.2.5 RNA提取和实时荧光定量PCR分析 挑取单菌落接入10 mL YPD培养基中，30 ℃，220 r/min培养72 h后，取1 mL菌液离心弃上清，加入200 μL ddH_2O悬浮细胞并加入3 μL溶壁酶轻柔混匀，于30 ℃条件下破壁处理1 h。然后根据RNA提取试剂盒提取酵母RNA。将已提取好的mRNA反转录成cDNA，再将cDNA的浓度稀释至20 ng/μL作为模板，利用SYBR®GreenI试剂进行Real-time PCR，内参基因选择*ACT1*。

2 结果

2.1 孕烯醇酮合成途径的构建

为构建高效合成孕烯醇酮的重组菌株，本研究以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母菌株CY03作为出发菌株，其菜油甾醇产量可达625.6 mg/L，其中游离菜油甾醇含量为70.6 mg/L。选择家牛（*Bos taurus*）来源的P450scc系统作为催化模块，包括细胞色素P450酶CYP11A1及其氧化还原伴侣ADX和ADR。利用酿酒酵母的同源重组机制，将P_{GAL1}-*CYP11A1*-P_{GAL1}-*ADX*-P_{GAL10}-*ADR*表达盒整合至酿酒酵母基因组的*ARS1114*位点。菌落PCR结果如图2所示，与对照相比，重组菌株的PCR产物在2 000–3 000 bp处存在明显单一条带，与正确条带大小（2 584 bp）一致。将条带大小正确的单菌落进一步测序验证，结果显示P450scc系统已成功整合至基因



M：DNA marker；1：重组菌株CE01；2：对照菌株CY03

M: DNA marker; 1: recombinant strain CE01; 2: control strain CY03

图2　重组菌株CE01的验证

Fig. 2　Identification of strain CE01

组中，重组菌株CE01构建完成。

对菌株的发酵产物分别进行HPLC和LC-MS检测。HPLC检测结果（图3-A–C）显示，重组菌株CE01发酵样品中出现与孕烯醇酮标准品保留时间一致的色谱峰（RT=7.5 min），而对照菌株CY03发酵样品在相同保留时间处未见该峰。质谱检测结果（图3-D–E）显示，样品与标准品的主要特征峰基本一致，均检测到分子离子峰*m/z* 317［M+H］$^+$及其关键碎片离子（*m/z* 299、*m/z* 281），且碎片离子的相对丰度比与标准品一致。上述结果表明，整合P450scc系统的酿酒酵母重组菌株CE01能够有效催化菜油甾醇生成孕烯醇酮，其产量为302 μg/L。

2.2　不同来源的P450scc组分的筛选

为提高P450scc系统各组分之间的适配性，选取文献报道催化效果较好的多种来源酶元件进行组合配对，包括动物源的牛（*Bos taurus*）、野猪（*Sus scrofa*）和人（*Homo sapiens*）来源的CYP11A1、ADX和ADR，以及植物源的洋地黄（*Digitalis lanata*）来源的CYP87A4和拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）来源的ATR1。将不同组合的P450scc系统分别整合至酿酒酵母基因组的*ARS1114*位点（图4-A），最终构建了7株酿酒酵母重组菌株CE01–CE07。在摇瓶水平对上述重组菌株进行发酵验证，结果如图4-B所示。7种不同组合的重组菌株均能够检测到孕烯醇酮的生成，其中，菌株CE07（含有洋地黄来源的CYP87A4与拟南芥来源的ATR1）表现出最高的孕烯醇酮产量，达到3.75 mg/L。

2.3　P450scc系统的多拷贝整合

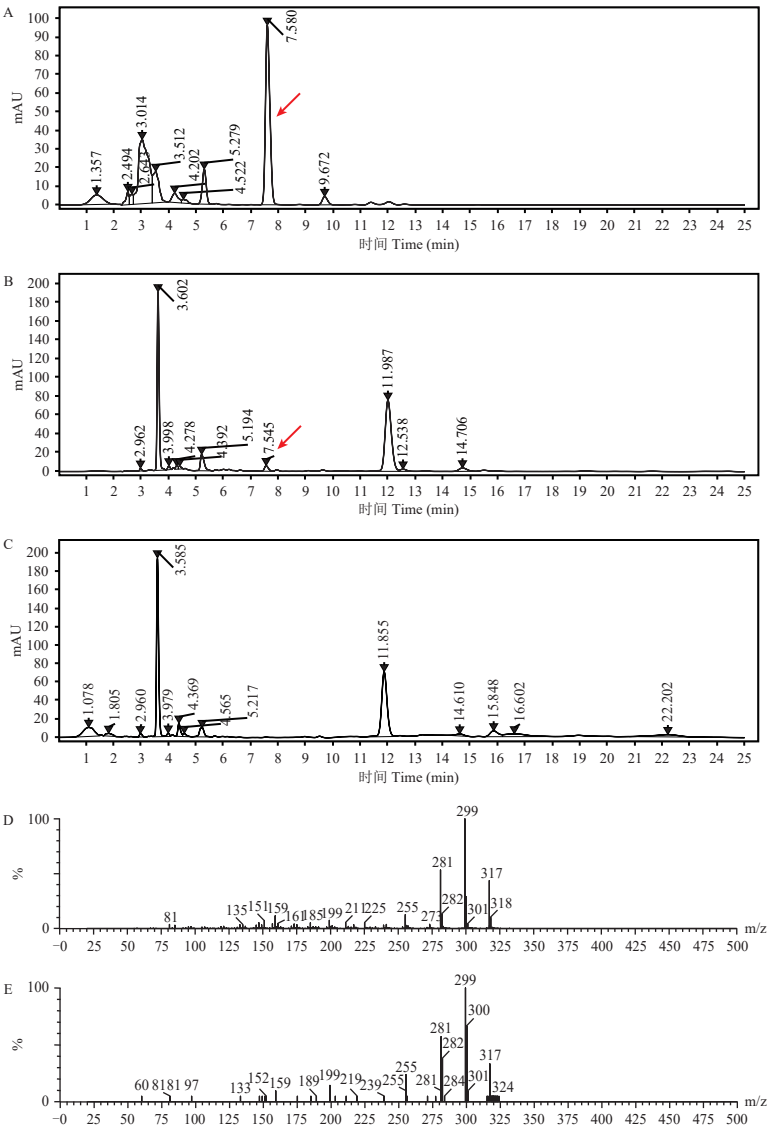
为进一步提高P450scc系统的表达水平，利用酵母基因组中的rDNA位点实现P450scc系统的多拷贝整合（图5-A）。通过PCR扩增rDNA位点上下游500–1 000 bp的同源臂、P_{GAL1}-*CYP87A4*-P_{GAL10}-*ATR1*表达盒以及Leu营养缺陷型标签，将上述片段共转化至菌株CY03中，获得8株阳性转化子。对获得的重组菌株进行摇瓶水平发酵验证，结果如图5-B所示。与对照菌株相比，重组菌株CE08-8的孕烯醇酮产量显著提高，达到14.51 mg/L，为对照组的3.87倍。为进一步验证多拷贝整合效果，采用实时荧光定量PCR（RT-qPCR）对菌株CE08-8与CE07中CYP87A4的转录水平进行分析，结果如图5-C所示，CE08-8中CYP87A4的转录水平显著高于CE07。进一步测定表明，重组菌株CE08-8中P450scc系统的拷贝数约为5。

2.4　P450scc系统的蛋白融合

为提高CYP87A4与其氧化还原伴侣ATR1之间的电子传递效率，尝试采用蛋白融合策略以缩短两者之间的物理距离，并考察不同长度连接肽及融合顺序对孕烯醇酮合成的影响。分别构建表达盒P_{GAL1}-*CYP87A4*-$(GGGGS)_2$-*ATR1*、P_{GAL1}-*ATR1*-$(GGGGS)_2$-*CYP87A4*、P_{GAL1}-*CYP87A4*-$(GGGGS)_3$-*ATR1*以及P_{GAL1}-*ATR1*-$(GGGGS)_3$-*CYP87A4*，并将其整合至酿酒酵母CY03的基因组中，获得重组菌株CE09–CE12（图6-A）。对上述重组菌株进行摇瓶水平发酵验证，结果如图6-B所示。与对照菌株相比，CE09–CE12中孕烯醇酮的产量均有所下降，说明通过蛋白linker连接CYP87A4与ATR1并未有效提高孕烯醇酮的合成水平。

2.5　发酵培养基的单因素优化

2.5.1　发酵培养基的碳源优化　为获得孕烯醇酮生产的最佳碳源，探究了不同碳源种类（葡萄糖、果糖、蔗糖、木糖、乳糖和麦芽糖）对菌株生长及孕烯醇酮产量的影响。各碳源的初始添加浓度为20 g/L，发酵结果如图7-A所示，以木糖和乳糖为碳源时，菌体几乎不生长，且未检测到孕烯醇酮生



A：孕烯醇酮标准品的HPLC图；B：重组菌株CE01发酵样品的HPLC图；C：对照菌株CY03发酵样品的HPLC图；D：孕烯醇酮标准品的MS图；E：重组菌株CE01发酵样品的MS图

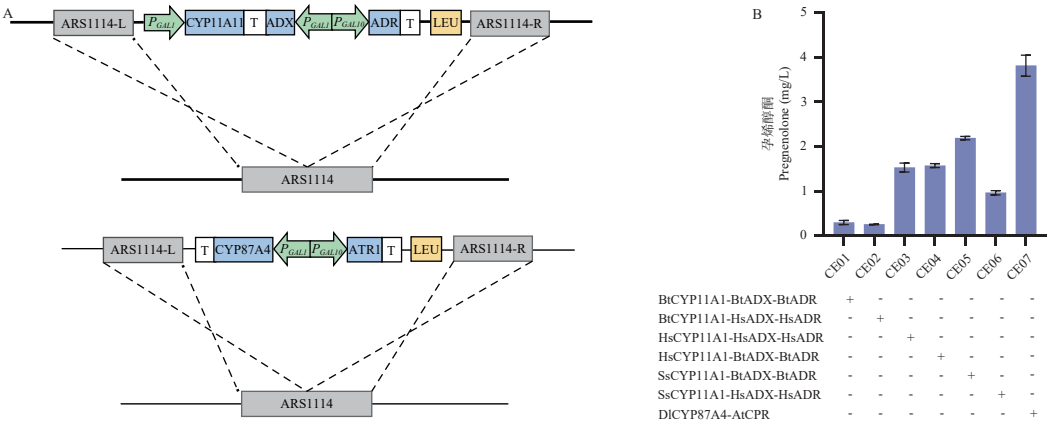
A: HPLC chromatogram of the pregnenolone standard; B: HPLC chromatogram of the fermentation sample from the recombinant strain CE01; C: HPLC chromatogram of the fermentation sample from the control strain CY03; D: MS spectrum of the pregnenolone standard; E: MS spectrum of the fermentation sample from the recombinant strain CE01

图3 重组菌株发酵产物的结构鉴定

Fig. 3 Structural identification of the fermentation products of the recombinant strains

成；以葡萄糖和果糖为碳源时，孕烯醇酮产量较高且相近，其中以果糖为碳源时菌体生长状况最好。进一步计算以葡萄糖和果糖为碳源时的单位菌体孕烯醇酮产量，结果表明，以果糖为碳源时单位菌体产量为1.08 mg/L/OD_{600}，而以葡萄糖为碳源时为1.23 mg/L/OD_{600}。综合单位菌体产量及原料成本等因素，选择葡萄糖作为后续实验的最佳碳源。

在确定葡萄糖为最佳碳源后，设置其初始浓度为10、20、30、40和50 g/L进行下一步优化。发酵结果如图7-B所示，当葡萄糖浓度为20 g/L时，菌体生长水平（OD_{600}）和孕烯醇酮产量均达到最高；随着葡萄糖浓度的进一步提高，菌体生长受到抑制，孕烯醇酮产量亦随之下降。因此，确定20 g/L为葡萄糖的最适添加浓度。

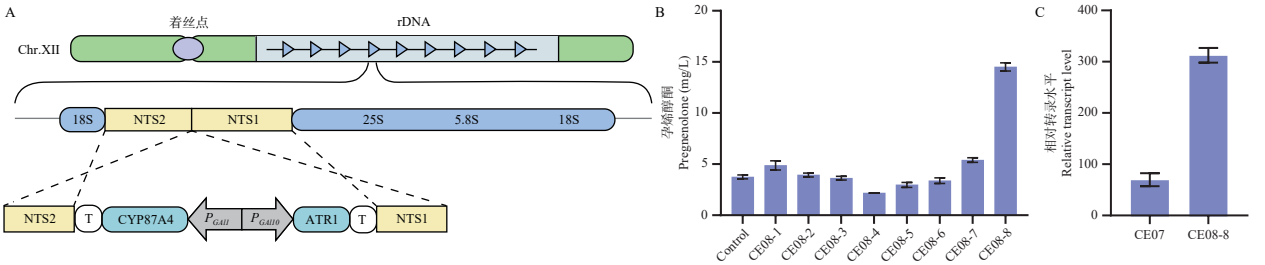


A：基因表达盒整合示意图；B：不同来源P450scc系统组合配对的孕烯醇酮产量

A: Diagram of gene expression cassette integration; B: the production of pregnenolone in different combinations of P450scc systems from different sources

图4　不同来源的P450scc系统的组合对孕烯醇酮产量的影响

Fig. 4　Effect of combined of P450scc systems from different sources on the production of pregnenolone

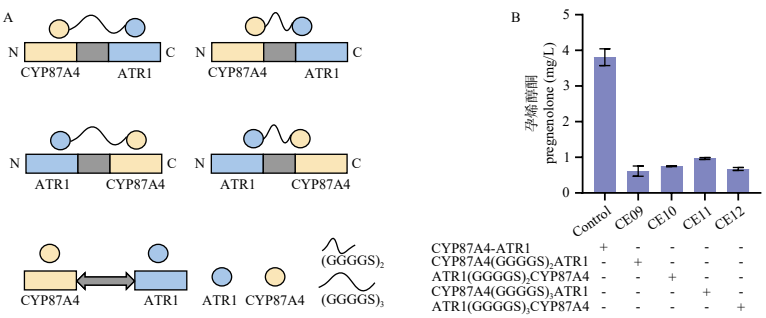


A：rDNA位点多拷贝整合示意图；B：多拷贝整合P450scc系统的孕烯醇酮产量；C：CYP87A4的相对转录水平

A: Diagram of multi-copy integration of rDNA; B: the production of pregnenolone in the multi-copy integrated P450scc system; C: the relative transcriptional level of CYP87A4

图5　rDNA位点多拷贝整合P450scc系统对孕烯醇酮产量的影响

Fig. 5　Effect of multi-copy integration of rDNA sites on the P450scc system on the production of pregnenolone



A：CYP87A4与ATR1蛋白融合示意图；B：蛋白融合孕烯醇酮的产量

A: Diagram of the fusion of CYP87A4 with ATR1 protein; B: production of pregnenolone in the protein fusion strain

图6　蛋白融合工程对孕烯醇酮生产的影响

Fig. 6　Effect of protein fusion engineering on the production of pregnenolone

2.5.2　发酵培养基的氮源优化　在优化碳源的基础上，进一步考察了不同氮源对菌株生长及孕烯醇酮产量的影响，选用组合氮源1（酵母粉：蛋白胨，1∶2）、组合氮源2（酵母粉：胰蛋白胨，1∶2），单

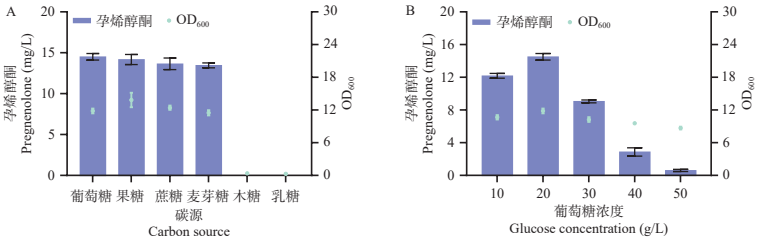


图7 碳源种类(A)和浓度(B)对孕烯醇酮合成的影响

Fig. 7 Effect of carbon sources types (A) and concentration (B) on the production of pregnenolone

一氮源酵母粉、蛋白胨、牛肉粉、玉米浆进行培养基氮源种类的优化，氮源的添加浓度为30 g/L。发酵结果如图8-A所示，以酵母粉为氮源时，菌体生长状况最好，以组合氮源1为氮源时，孕烯醇酮产量最高，故选择组合氮源1（酵母粉：蛋白胨，1：2）为最佳氮源并进行浓度优化。

在确定组合氮源1为最佳氮源后，设置其初始浓度为10、20、30、40和50 g/L进行下一步优化。发酵结果如图8-B所示，菌体OD_{600}随着氮源浓度的增加而上升，当氮源浓度为30 g/L时，孕烯醇酮产量最高，随着浓度的继续增加，孕烯醇酮的产量未有显著变化，故选择30 g/L为组合氮源1的最适浓度。

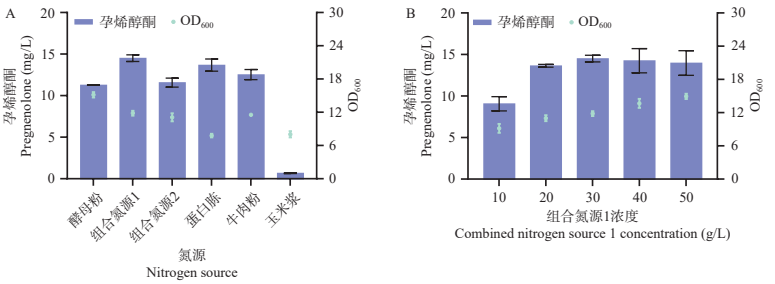


图8 氮源种类(A)和浓度(B)对孕烯醇酮合成的影响

Fig. 8 Effect of nitrogen sources types (A) and concentration (B) on the production of pregnenolone

2.5.3 发酵培养基的金属离子优化 在前期碳、氮源优化的基础上，进一步考察了不同金属离子Cu^{2+}、Ca^{2+}、Na^{+}、K^{+}、Mg^{2+}、Fe^{3+}对菌株生长及孕烯醇酮产量的影响，金属离子的添加浓度设置为0.2 g/L，发酵结果如图9-A所示，添加Cu^{2+}对孕烯醇酮的合成有明显的抑制作用，添加K^{+}对菌体生长有促进作用，且有效提升孕烯醇酮的合成，故选择K^{+}为最适金属离子（无机盐）。

在确定添加K^{+}对重组菌株生成孕烯醇酮有促进作用后，设置其初始浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L进行下一步优化，发酵如图9-B所示，K^{+}浓度为0.3 g/L时，孕烯醇酮的产量达到最高，随着K^{+}浓度的继续增加，孕烯醇酮的产量有所下降，故选择0.3 g/L为K^{+}的最适添加浓度。

综上结果所述，最佳培养基为：20 g/L葡萄糖、10 g/L酵母粉、20 g/L蛋白胨，并在此基础上添加0.3 g/L K^{+}，重组菌株CE08-8从头合成孕烯醇酮的产量达到16.82 mg/L，较培养基优化前（14.51 mg/L）提高了15.92%。

3 讨论

在酿酒酵母从头合成孕烯醇酮的代谢途径中，菜油甾醇是直接前体物质，其含量直接影响孕烯醇酮的合成[15]。因此，本研究以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母菌株CY03为出发菌株，通过引入外源P450scc系统，成功构建了从葡萄糖到孕烯醇酮的完整代谢途径。整合牛源P450scc系统（CYP11A1、ADX和ADR）后获得的重组菌株CE01，经发酵验证孕烯醇酮产量为302 μg/L。该结果表明

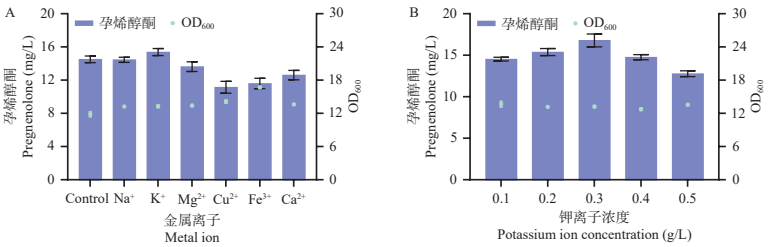


图9　金属离子种类(A)及浓度(B)对孕烯醇酮合成的影响

Fig. 9　Effect of metal ions types (A) and concentrations (B) on the production of pregnenolone

P450scc系统能够在酿酒酵母中实现功能性表达。不同物种来源的P450scc系统在氨基酸序列、结构特征和催化性能上存在显著差异[14-15]。通过对不同来源P450scc系统进行组合配对，发现洋地黄来源的CYP87A4与拟南芥来源的ATR1组合构建的重组菌CE07表现出最佳的催化性能，孕烯醇酮产量达到3.75 mg/L，显著高于哺乳动物源的P450scc系统。已有研究表明，菜油甾醇在酿酒酵母中的合成主要发生于内质网，其中大部分经甾醇酰基转移酶（ARE1/ARE2）催化形成甾醇酯并储存于脂质体疏水核心，仅有少量以游离形式存在[16]。植物来源的P450scc系统同样定位于内质网，而哺乳动物来源的P450scc系统定位于线粒体，需将菜油甾醇从内质网转运至线粒体后方可完成催化反应[17]。由于植物来源的P450scc系统与底物菜油甾醇合成场所高度重合，避免了复杂的跨膜转运过程，从而在酿酒酵母中表现出更高的催化效率。

酿酒酵母的核糖体DNA（rDNA）位点是位于第十二号染色体上的高度串联重复序列，由约100–200个串联重复的rDNA单元组成，每个单元包含35S rRNA、5S rRNA基因及非转录间隔区（NTS）[18]。利用同源重组技术，可将外源基因定向整合至rDNA重复单元中，从而获得稳定遗传的多拷贝表达。基于rDNA多拷贝位点的基因组整合策略已经被广泛应用于工程酵母中甾体化合物的合成。曲丽莎[19]通过*Ty1*位点增加DHCR24拷贝数，7-脱氢胆固醇产量提升120%。Qin等[20]在酿酒酵母*Ty2*位点实现关键酶DHCR7的多拷贝整合，菜油甾醇的产量提升78.6%。本研究采用rDNA位点实现P450scc系统的多拷贝整合，多拷贝整合菌株CE08-8的孕烯醇酮产量提升至14.51 mg/L，为单拷贝菌株的3.87倍。该结果表明，多拷贝整合策略能够有效提高外源P450scc系统的表达水平，从而提高孕烯醇酮的产量。

CPR作为细胞色素P450酶的电子供体，在催化循环中起着关键作用，理论上缩短P450酶与CPR之间的物理距离有助于提高电子传递效率[21]。然而，本研究中CYP87A4与ATR1的蛋白融合反而导致孕烯醇酮产量下降。推测其原因可能在于天然状态下CYP87A4与ATR1能够通过动态、瞬时的相互作用完成电子传递，而融合蛋白限制了二者的构象灵活性，使其固定于非最优空间构型，从而抑制了催化活性[22]。

培养基成分是影响酿酒酵母发酵性能的重要因素。其中，碳源直接调控着菌体生长、代谢通量分配及目标产物合成效率[23-24]；氮源则与碳源协同作用，维持代谢平衡并促进产物积累[25]；金属离子（无机盐）作为微生物发酵所必需的辅助因子，在酶激活、结构稳定、信号传导及氧化还原反应中发挥重要作用[26-27]。本研究对重组菌株的培养基成分进行了优化，结果显示葡萄糖为最适碳源，而以木糖或乳糖作为碳源时菌体几乎不生长，这是由于酿酒酵母缺乏高效的木糖转运系统和木糖代谢途径，几乎无法利用木糖生长；同时由于缺乏β-半乳糖苷酶和乳糖透酶等关键酶，也不能利用乳糖[28-29]。葡萄糖的最适浓度为20 g/L，随着浓度的进一步提高，菌体OD_{600}与孕烯醇酮产量均出现下降，这可能是由于在高浓度的葡萄糖下，克拉伯效应（Crabtree）增强，糖酵解通量剧增，乙醇过量积累，使得细胞能量利用效率下降，碳流更多流向乙醇而非目标代谢通路，且乙醇对细胞生长和代谢具有一定的毒性[30]；氮源优化结果显示，当酵母粉和蛋白胨浓度满足菌体生长需求后，其变化对孕烯

醇酮合成影响不显著，说明氮源并非限制性因素。此外，在培养基中添加0.3 g/L钾离子（K^+）能显著促进孕烯醇酮合成，可能与其维持细胞内离子稳态、增强代谢活性有关[31]。在优化培养基条件下（20 g/L葡萄糖、10 g/L酵母粉、20 g/L蛋白胨和0.3 g/L钾离子），孕烯醇酮产量提升至16.82 mg/L，较优化前提高15.92%，表明发酵培养基成分对孕烯醇酮合成具有重要影响。

尽管本研究已实现了孕烯醇酮在酿酒酵母中的从头合成，但仍存在进一步的优化空间。后续研究可通过调控甾醇的酯化与水解过程，提高游离菜油甾醇的含量以增加前体供应[32]。其次，P450scc系统的催化效率仍是孕烯醇酮合成的主要限制因素，可通过定向进化或酶工程手段提升其催化活性与底物特异性[33]。此外，利用葡萄糖从头合成孕烯醇酮需要消耗大量的NADPH，胞内NADPH/$NADP^+$比例也影响着P450scc系统的催化效率，因此可通过过表达磷酸戊糖途径关键基因（如*ZWF1*和*GND1*）或引入外源辅因子再生系统（如NOX酶）来增强NADPH供应[34]。

4 结论

以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母为底盘菌株，构建了从葡萄糖到孕烯醇酮的从头合成途径。通过筛选不同来源的P450scc系统、增加P450scc系统的拷贝数及对P450scc系统进行蛋白融合等策略，有效提升了重组菌株孕烯醇酮的产量。通过系统的发酵培养基优化，重组菌株CE08-8孕烯醇酮产量达到16.82 mg/L。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260429170105_NewsFile_34.pdf）。

参考文献

[1] Wang Y, Gui JH. Recent advances in the efficient synthesis of steroid natural products: emerging methods and strategies [J]. Chem Soc Rev, 2025, 54(14): 6807-6831.

[2] Chen GH, Li CN, Kou BW, et al. Recent advances in the biosynthesis enzymes of steroidal natural products [J]. Sci Sin-Vitae, 2025, 55(10): 2061-2079.

[3] Chen H, Wang YS, Zhang Y, et al. Reengineering of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and its sustainable application in *Citrus peel* processing industry [J]. New Biotechnol, 2025, 90: 155-162.

[4] 张羽. 菜油甾醇和孕烯醇酮在耶氏解脂酵母中的合成与优化 [D]. 天津: 天津大学, 2017.
Zhang Y. *De novo* synthesis and optimization of campesterol and pregnenolone in *Yarrowia lipolytica* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2017.

[5] Mendoza Lara DF, Hernández-Caballero ME, Terán JL, et al. Anticancer activities of natural and synthetic steroids: a review [J]. ACS Omega, 2025, 10(8): 7493-7509.

[6] Ting TY, Li YD, Bunawan H, et al. Current advancements in systems and synthetic biology studies of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biosci Bioeng, 2023, 135(4): 259-265.

[7] Zhang RS, Zhang Y, Wang Y, et al. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(12): 2666-2678.

[8] Jiang LH, Huang L, Cai J, et al. Functional expression of eukaryotic cytochrome P450s in yeast [J]. Biotech & Bioengineering, 2021, 118(3): 1050-1065.

[9] Xu SJ, Meng J, Zhang Q, et al. CILF: CRISPR/Cas9 based integration of large DNA fragments in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotech & Bioengineering, 2024, 121(12): 3906-3911.

[10] Mauersberger S, Novikova LA, Shkumatov VM. Cytochrome P450 expression in *Yarrowia lipolytica* and its use in steroid biotransformation [M]//Barth G. Yarrowia lipolytica: Biotechnological Applications. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013: 171-226.

[11] Xie YF, Fan CX, Piao MH, et al. Enhanced ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via rational multigenetic modification and two-stage fermentation [J]. Process Biochem, 2026, 161: 18-25.

[12] Duport C, Spagnoli R, Degryse E, et al. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(2): 186-189.

[13] Carroll E, Ravi Gopal B, Raghavan I, et al. A cytochrome P450 CYP87A4 imparts sterol side-chain cleavage in digoxin biosynthesis[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4042.

[14] 梅世豪, 张嵩林, 邵明龙, 等. 酿酒酵母高效合成孕烯醇酮细胞工厂的构建 [J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(17): 11-19.
Mei SH, Zhang SL, Shao ML, et al. Construction of a cell factory for efficient pregnenolone synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Ferment Ind, 2025, 51(17): 11-19.

[15] Liu W, Dong XF, Li HB, et al. Rewiring metabolism and restoring sterol homeostasis for overproduction of campesterol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Chem Eng J, 2025, 515: 163686.

[16] Jiang YQ, Sun ZJ, Lu KX, et al. Manipulation of sterol homeostasis for the production of 24-epi-ergosterol in industrial yeast [J]. Nat

Commun, 2023, 14: 437.

[17] Li RS, Guo S, Wang D, et al. Elucidation of the plant progesterone biosynthetic pathway and its application in a yeast cell factory [J]. Metab Eng, 2025, 90: 197-208.

[18] Zheng HH, Wang K, Xu XX, et al. Highly efficient *rDNA*-mediated multicopy integration based on the dynamic balance of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microb Biotechnol, 2022, 15(5): 1511-1524.

[19] 曲丽莎. 利用代谢工程改造酿酒酵母高效合成7-脱氢胆固醇 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
Qu LS. Engineered yeast for efficient *de novo* synthesis of 7-dehydrocholesterol [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.

[20] Qin ZJ, Zhang YL, Liu S, et al. Combining metabolic engineering and lipid droplet assembly to achieve campesterol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(9): 4814-4824.

[21] Qu GY, Song YF, Xu XH, et al. *De novo* biosynthesis of mogroside V by multiplexed engineered yeasts [J]. Metab Eng, 2025, 88: 160-171.

[22] Wang YY, Sun MC, Shen XL, et al. Engineering the cytochrome P450 oxidation system to enhance benzyl glucosinolate production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73(38): 24286-24294.

[23] Garcia-Albornoz M, Holman SW, Antonisse T, et al. A proteome-integrated, carbon source dependent genetic regulatory network in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol Omics, 2020, 16(1): 59-72.

[24] Lu XC, Chang MX, Li XY, et al. Metabolic engineering for sustainable xylitol production from diverse carbon sources in *Pichia pastoris* [J]. Microb Cell Fact, 2025, 24: 59.

[25] Wang YH, Zhu HX, Pan SY, et al. Effect of different nitrogen source and *Saccharomyces cerevisiae* strain on volatile sulfur compounds and their sensory effects in chardonnay wine [J]. Food Chem X, 2024, 24: 101793.

[26] Chen Y, Li FR, Mao JW, et al. Yeast optimizes metal utilization based on metabolic network and enzyme kinetics [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(12): e2020154118.

[27] Cheng YT, Luo LL, Tang H, et al. Engineering the microenvironment of P450s to enhance the production of diterpenoids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Acta Pharm Sin B, 2024, 14(10): 4608-4618.

[28] Tanaka K, Yukawa T, Bamba T, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for growth on xylose using an oxidative pathway [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2025, 109: 30.

[29] Zou J, Chen XH, Hu YH, et al. Uncoupling glucose sensing from GAL metabolism for heterologous lactose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnol Lett, 2021, 43(8): 1607-1616.

[30] Guo BY, Li YY, Liu YJ, et al. Reprogramming carbon flux to eliminate crabtree effect-associated ethanol production for high-yieldl-lactic acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73(49): 31274-31285.

[31] Kukovetz K, Cartolano M, Gebhardt M, et al. Yeast complementation assays provide limited information on functional features of K^+ channels [J]. Biophys Rep, 2025, 5(2): 100206.

[32] Petrisková L, Kodedová M, Balážová M, et al. Lipid droplets control the negative effect of non-yeast sterols in membranes of *Saccharomyces cerevisiae* under hypoxic stress [J]. BBA Mol Cell Biol Lipds, 2024, 1869(7): 159523.

[33] Chen QH, Wei WQ, Chao ZK, et al. Electron transfer engineering of artificially designed cell factory for complete biosynthesis of steroids [J]. Nat Commun, 2025, 16: 3740.

[34] Zhu Y, Yan XG, Li WG, et al. Cofactor-coupled cytochrome P450 engineering enables high-level biosynthesis of Asiatic acid in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Bioresour Technol, 2026, 441: 133558.

（责任编辑　朱琳峰）