

• 产业培育推进 •

朱敦明 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师，天津市生物催化技术工程中心主任。《Enzyme and Microbial Technology》、《生物工程学报》和《微生物学报》编委；中国微生物学会酶工程专业委员会委员，中国生物工程学会氨基酸专业委员会委员，中国药学会制药工程专业委员会委员。研究方向为合成化学与合成生物学的交叉领域，在 *Nat Catal*、*Angew Chem*、*ACS Catal* 等刊物发表研究论文 150 多篇，邀请综述和专著章节 10 多篇，出版英文专著“Chemo-Enzymatic Cascade Reactions”，授权专利 30 余项，成功实现天冬氨酸绿色生产、关键甾体药物中间体生物合成等 5 项技术转让应用于工业化生产。应邀在 Gordon Research Conferences 和 Engineering Conference International 等国际著名学术会议做大会邀请报告，担任首届 Protein Engineering Gordon Research Conferences (2023) 共同主席。



吴洽庆 博士，中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师。主要研究兴趣在于生物催化剂及其在有机合成反应中的应用和基因工程药物的开发与研究。近 3 年来在 *Nat Catal*、*Angew Chem*、*ACS Catal*、*Adv Synth Catal* 等学术期刊上发表学术论文 20 余篇，授权发明专利 24 件，主持国家级、中科院和天津市重点研究项目 3 项。三项生物催化与转化项目在企业成功产业化，并产生良好经济和社会效益，其中“系列甾体药物核心原料的转化菌种构建和绿色生物制造关键技术开发”在合作企业建成国内首条千吨级规模的柔性全自动智能化工厂。



系列甾体药物关键中间体转化菌种构建及智能化生产应用

冯进辉^{1,2}，张汝金³，张峥斌³，吴洽庆^{1,2}，朱敦明^{1,2}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所，天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心，天津 300308

3 浙江仙居君业药业有限公司，浙江 台州 317300

冯进辉，张汝金，张峥斌，吴洽庆，朱敦明. 系列甾体药物关键中间体转化菌种构建及智能化生产应用. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4335-4342.

FENG JH, ZHANG RJ, ZHANG ZB, WU QQ, ZHU DM. Construction of strains for bioconversion of steroid key intermediates and intelligent industrial production. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4335-4342.

摘要: 甾体激素药物是仅次于抗生素的第二大类药物，当前甾体工业的初始原料已经由从黄姜

Received: July 28, 2022; **Accepted:** September 14, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905300); Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-001)

Corresponding authors: WU Qiaqing. E-mail: wu_qq@tib.cas.cn

ZHU Dunming. E-mail: zhu_dm@tib.cas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0905300); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目 (TSBICIP-KJGG-001)

等植物中提取的薯蓣皂素转向植物甾醇。作为食用油工业的副产物，植物甾醇来源广泛，价格低廉，经微生物转化后可生成雄烯二酮 (androstenedione, AD)、雄二烯二酮 (androstadiendione, ADD)、9 α -羟基-雄烯二酮 (9 α -hydroxy-androstenedione, 9 α -OH-AD) 等一系列化合物，这些关键中间体可用于甾体药物合成。甾体代谢途径长、副产物多、调控复杂，传统的微生物筛选、诱变育种方法和油水两相转化体系已经不适于当前的工业生产需求。文中以笔者团队与浙江仙居君业药业有限公司联合开发的新一代甾体药物关键中间体的转化菌株构建和智能化生产为例，综述甾体药物中间体菌种改造和转化工艺开发及其在产业化应用中的进展。未来，随着合成生物学技术的发展，有望开发出更适于甾体药物合成的新一代中间体；乃至以葡萄糖等为原料，使用微生物直接合成甾体原料药。这些生物技术 (biotechnology, BT) 创建的新一代菌株在基于信息化、智能化技术 (intelligent technology, IT) 建设的现代工厂中的应用，将会形成更高效、更绿色的生产方式，并产生显著的社会效益和经济价值。

关键词：甾体类药物；关键中间体；微生物转化；雄烯二酮；智能工厂

Construction of strains for bioconversion of steroid key intermediates and intelligent industrial production

FENG Jinhui^{1,2}, ZHANG Rujin³, ZHANG Zhengbin³, WU Qiaqing^{1,2}, ZHU Dunming^{1,2}

1 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

3 Zhejiang Xianju Junye Pharmaceutical Co. Ltd., Taizhou 317300, Zhejiang, China

Abstract: Steroidal hormone pharmaceuticals are the second largest class of medicines after antibiotics. At present, the initial materials of the steroidal industry have shifted from sapogenins, which were extracted from plants of the genus *Dioscorea* to phytosterols. As a byproduct of soybean oil production, phytosterols are readily available and of low prices. Androstenedione (AD), androstadiendione (ADD), 9 α -hydroxy-androstenedione (9 α -OH-AD) and a series of key intermediates used in the synthesis of steroidal pharmaceuticals can be produced from phytosterols by microbial transformation. Nevertheless, due to the long metabolic pathways, the byproducts and the complex regulation, traditional microbial screening, mutagenizing methods and the oil-water biphasic transformation systems are no longer suitable for current industrial production. A new generation strains for the production of key steroidal pharmaceutical intermediates have been constructed and an intelligent production process has been jointly developed by us and Zhejiang Xianju Junye Pharmaceutical Co. Ltd.. Taking these products and processes as an example, this article reviews the improvement of strains for the production of steroidal pharmaceutical intermediates and the development of biotransformation process on an industrial scale. With the development of synthetic biology, it is expected to develop a new generation of intermediates which are more suitable for the synthesis of steroidal medicines. Moreover, *de novo* biosynthesis the steroidal active pharmaceutical ingredients from glucose is also

expected. The application of these new-generation strains constructed by biotechnology (BT) in modern factories based on informatization and intelligent technology (IT) will be more efficient and greener, and create remarkable social and economic values.

Keywords: steroidal pharmaceuticals; key intermediates; microbial transformation; androstenedione; intelligent factory

甾体激素药物是仅次于抗生素的第二大类药物, 2021年, 全球市场规模超10亿美元的甾体类药物就有5种 (<https://njardarson.lab.arizona.edu/content/top-pharmaceuticals-poster>)。当前甾体工业的初始原料正在由从黄姜等植物中提取的薯蓣皂素转变为油脂工业的下脚料植物甾醇。自20世纪40年代发现有微生物可以降解植物甾醇以来, 已有多种微生物报道可以降解植物甾醇得到雄烯二酮 (androstenedione, AD) 等化合物, 如: 分枝杆菌 (*Mycobacterium* sp.)^[1-2]、红球菌 (*Rhodococcus* sp.)^[3-4]、诺卡氏菌 (*Norcardia* sp.)^[5]和假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)^[6-7]等。在20世纪60-90年代, 科研人员通过传统诱变筛选技术和添加抑制剂抑制关键酶活力等方法, 开发了一系列制备AD、雄二烯二酮 (androstadiendione, ADD)、9 α -羟基-雄烯二酮 (9 α -hydroxy-androstenedione, 9 α -OH-AD)^[8]和谷内酯 (sitolactone, HIL)^[9]的菌株及转化工艺, 这些化合物是合成甾体药物的关键中间体, 全球年需求量约3 000 t。但由于甾体代谢途径复杂, 中间代谢产物和副产物众多 (图1), 且甾体化合物性质相近, 难以分离纯化, 导致AD、ADD等重要甾体药物核心原料价格高昂, 使得我国甾体药物关键原料一直依赖黄姜种植、从薯蓣皂素合成甾体药物原料药的格局没有打破。植物甾醇替代薯蓣皂素作为甾体药物关键中间体的来源是有效解决黄姜种植、提取薯蓣皂素及后期化学加工生产过程中占用耕地、“三废”

排放量大、环境污染严重等问题的有效策略和手段^[10]。通过基因工程、合成生物学技术方法对野生菌进行改造, 从而获得高转化率、高产物纯度的新菌株, 及转化过程优化等成为科学界和甾体药物行业的研究热点^[8]。

1 国内外植物甾醇转化为甾体药物中间体菌种的构建及转化体系优化

植物甾醇作为食用油工业的副产物, 具有来源广泛、价格低廉等优点。21世纪以来, 随着甾醇代谢途径及相关基因簇的解析, 代谢工程和合成生物学等方法应用于甾体药物关键中间体生产菌株构建, 新一代基因工程生产菌逐渐应用于甾体药物关键中间体的生产。

1.1 甾体药物关键中间体生产菌株改造

在AD菌株构建方面, José L. García等在耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 中敲除9-羟化酶的B亚基 (*kshB*) 和1,2-脱氢酶 (*kstD*) 基因, 构建了基因工程菌, 当底物浓度为10 g/L时, 88%-90%的底物甾醇转化为产物AD, 但同时有10%-11%的底物转化为副产物22-羟基-23,24-二降胆-4-烯-3-酮 (22-hydroxy-23,24-bisnorchol-4-ene-3-one, BA)^[12-14]。在ADD菌株构建方面, 同样是José L. García等在*M. smegmatis*中敲除*kshB*后, 当底物浓度为20 g/L时, 55%-70%的底物甾醇转化为产物ADD, 有22%-30%转化为副产物AD, 同时还检测到其

菌体对底物的摄入严重不足,这也是严重制约植物甾醇转化为甾体药物关键中间体技术应用的因素之一。

科研人员在提高膜通透性及通过反应体系提高底物溶解度方面开展了研究工作,在一定程度上提高了菌株转化植物甾醇的效率。高兴强等在使用分枝杆菌代谢植物甾醇合成 9α -OH-AD的反应中,使用大豆油(添加浓度为25%–30%)和葵花籽油等,增大了底物的分散性更利于底物的转化^[22]。Smith等利用*Mycobacterium* sp.代谢胆固醇,在培养体系中添加2%的Tween-80与胆固醇浑浊液,使达到同样效果的代谢时间缩短2–3 d^[23]。Korycka-Machala等的研究表明聚阳离子(例如鱼精蛋白)能增加不溶于水性物质对分枝杆菌细胞膜的渗透,当发酵液中添加鱼精蛋白时, β -谷甾醇的代谢速率提高了3倍^[24]。周龙飞等将非离子表面活性剂壬基酚乙氧乙氧醚(TX-40)用于*Mycobacterium* sp. LY-1转化植物甾醇生产 9α -OH-AD,使 9α -OH-AD的摩尔得率较添加18%大豆油时提高了11.0%^[25]。许桢楠等考察不同助溶剂与TX-40复配对菌株转化植物甾醇的影响,并通过正交实验的方法确定最适的复配比例。进而尝试添加分枝杆菌细胞膜的抑制剂,建立有利于分枝杆菌转化植物甾醇的两相转化体系,进一步提高分枝杆菌转化植物甾醇生成目标产物的能力^[26]。

大规模工业化生产大多以植物油来提高植物甾醇的分散性,从而提高投料浓度和生产强度。该工艺简单、稳定、可操作性强,但也存在有机溶剂使用量大、分离纯化工艺复杂、难以实现自动化和连续化等不足。结合自身菌种特点,中国科学院天津工业生物技术研究所与浙江仙居君业药业有限公司的科研人员一起建立了植物甾醇微油转化生产工艺,大幅提升了植物甾醇的底物投料浓度,并以此为基础建立

了连续生产工艺,摩尔产率达75%–90%,发酵萃取液产物纯度不低于92%,生产强度可达200–300 g/(m³·h),大幅提高了菌株的时空转化率和生产强度。

2 系列植物甾醇转化生产甾体药物中间体菌种的智能化产业实施

在2012年之前,浙江仙居君业药业有限公司受困于技术方面的因素,公司生产甾体药物的基础核心母核原料是外购的双烯。双烯以种植的黄姜为起始原料,经强酸分解提取薯蓣皂素后,通过化学裂解的方式制取,生产过程中产生大量的强酸废水,处理成本很高。随着国家环保要求的日益提高,造成了双烯原料供应不足,价格飞涨,降低了公司的市场竞争力。

浙江仙居君业药业有限公司与中国科学院天津工业生物技术研究所合作,提前布局,组建甾体生物转化联合实验室,开展生物合成技术转化植物甾醇生产AD等甾体药物基础母核原料的研发攻关工作,突破了AD等菌种构建和生物转化工艺,获得独立知识产权菌种。在此技术基础上,融合自动化、数字化、信息化技术,成功建成了国内首创、国际领先的甾体药物核心原料柔性智能生产线,实现了甾体母核到原料药(去氢表雄酮,DHEA)全产业链的高效生物催化生产装置,突破了甾体药物制造过程中的高耗能、高污染瓶颈,建成了一座年产千吨级的甾体核心原料药关键中间体的绿色生物制造的智能工厂(图2)。

2.1 项目应用情况

“甾体药物核心原料的数字智能化绿色生物制造”项目是所企双方发挥各自优势十年通力合作的结晶。该项目于2019年列入国家发改委和工信部技术改造项目,2020年被认定为浙



图2 浙江仙居君业药业有限公司甾体核心原料生产中央控制室 (A) 及车间 (B)

Figure 2 Zhejiang Xianju Junye Pharmaceutical Co. Ltd. central control room (A) and the production workshop (B) for the steroidal key intermediates.

江省甾体药物智能工厂。目前, 该项目已投资 2.6 亿元, 其中智能化设备投资达 2 亿元, 实现了 AD、 9α -OH-AD、BA 等五大关键甾体药物中间体的发酵车间、提取车间、动力车间和罐区、环保站的全程自动化、绿色化, 形成了年产 1 000 t 核心原料的生产能力, 新增产值 10 亿元。这也是国内唯一一家甾体药物核心原料的自动化生产工厂。

2.2 项目的示范作用

君业药业攻克医药产业数字化转型的难题, 依托工业 APP、工业互联网平台和数据源, 从价值链、业务链、数据链 3 个维度打造年产千吨级的甾体药物“智能工厂”, 大步迈向“新智造”、迈向“未来工厂”。在工业互联网平台中设置生产原料供应模块、工艺监控模块、能耗监控模块等 9 大模块, 实现从原料采购、入库到过程使用、产出、质量情况的全流程数据贯通, 以“透明工厂”优化企业日常运营和管理。攻克了复杂分子药物原料生物法合成的核心关键技术, 首创数字智能化连续发酵、连续提取的自动化工艺, 解决了高浓度连续投料、细胞活性稳定、产物抑制即时解除等难题, 实现参数调

控、物料转移、设备清洗等各项操作的“一键式”远程控制, 显著提高了生产效率和生产集约化水平, 提高生产效率, 降低人工成本。对每台设备进行精细化管理, 通过大数据分析进行预防性维保, 大幅降低设备故障停机频率, 减少维护成本, 提高设备维护人员工作效率。同时, 对能耗成本展开精细化管理, 制定水、电、汽全维度用能统计分析报表, 通过数据分析优化生产过程控制、热量回收等措施, 不断优化企业用能管理, 实现低碳生产。

本项目为医药化工绿色转型升级做出了示范。台州地区山清水秀, 但医药化工产业集中。本项目建成了国内首个药物发酵、提取、精制全流程自动化、连续化生产的智能工厂, 率先实现甾体药物中间体的清洁生产。与行业现行工艺相比, 本项目实现了“一高五低”: 即生产效率提高 50%、挥发性有机化合物 (volatile organic compounds, VOC) 排放减少 70%、废水排放减少 30%、发酵菌渣降低 40%、能耗减少 40%、人工降低 70%。本项目为医药化工通过生物制造实现绿色化生产做出了示范, 是生物技术-信息技术 (biotechnology-information technology,

BT-IT) 结合的经典案例。

本项目解决了区域甾体医药产业发展原料供应瓶颈问题。台州地区作为国家科技部批准的唯一的甾体类药物产业基地, 各类甾体药物生产企业数十家, 甾体激素原料药产能约占全球 30% 的份额以上。目前甾体药物起始原料供应问题严重制约了台州地区甾体医药行业各家企业的产品竞争力, 君业药业有限公司千吨级核心甾体药物起始原料项目的投产, 彻底解决了台州地区甾体药物生产企业的原料供应的瓶颈问题, 将大大提升区域企业的产品竞争力, 促进台州地区甾体药物生产基地做大做强。

本项目提高了国家甾体药物产业安全性。作为国内唯一一家具有完整知识产权的甾体药物起始原料生产线, 实现了甾体药物 5 大关键原料中间体的全覆盖、共生产线、高质量生产, 生产工艺、环境保护、产品质量等指标均达到世界一流水平, 能满足国内甾体药物起始原料 50% 的市场需求, 有力地保障了我国甾体药物供应链的稳定与安全。

3 展望

我国甾体药物关键中间体生产方式正在快速由以黄姜等植物提取改造薯蓣皂素结构的化学法转变为生物转化植物甾醇(油脂工业副产品)制造法, 逐步实现了初始原料的替代。在这一技术替代的过程中, 中国科学院天津工业生物技术研究所针对国家、市场和企业的实际需求, 开发了系列甾体药物中间体转化菌株, 有效保证了我国甾体药物原料供应的安全, 也助力企业提高了市场竞争力及发展壮大。

我们将利用调控元件对传统甾体药物中间体生产菌株继续优化, 提高摩尔产率和时空产率, 有效降低生产成本, 使企业的智能化生产工厂发挥出最大作用。我们也将与有机合成等

领域的专家密切配合, 基于重要甾体药物分子的逆合成分析, 利用合成生物学关键催化元件, 构建更适于甾体原料药合成的新一代中间体生物转化菌株, 降低化学合成难度, 建立更绿色环保的新合成工艺。同时, 我们也将与企业深入合作, 将数字信息技术应用于生物发酵转化过程, 提高菌株的鲁棒性, 使生产菌长时间保持高活力状态, 大幅降低生产成本, 实现最大程度的“节能减排”。合成生物学的发展, 有可能实现从葡萄糖等简单原料到甾体关键中间体乃至甾体原料药的直接生物合成, 彻底颠覆甾体药物的生产范式。

“路漫漫其修远兮, 吾将上下而求索”。在甾体药物关键中间体的生物制造方面, 我们将奋笔疾书属于这个时代的华彩篇章。

REFERENCES

- [1] Bragin EY, Shtratnikova VY, Dovbnya DV, et al. Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. strains. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 138: 41-53.
- [2] Van Der Geize R, Yam K, Heuser T, et al. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *PNAS*, 2007, 104(6): 1947-1952.
- [3] Rosloniec KZ, Wilbrink MH, Capyk JK, et al. Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Mol Microbiol*, 2009, 74(5): 1031-1043.
- [4] Yam KC, Okamoto S, Roberts JN, et al. Adventures in *Rhodococcus*-from steroids to explosives. *Can J Microbiol*, 2011, 57(3): 155-168.
- [5] Shtratnikova VY, Schelkunov MI, Fokina VV, et al. Genome-wide transcriptome profiling provides insight on cholesterol and lithocholate degradation mechanisms in *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. *Genes*, 2020, 11(10): 1229.
- [6] Owen RW, Mason AN, Bilton RF. The degradation of cholesterol by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under aerobic conditions. *J Lipid Res*, 1983, 24(11): 500-511.

- [7] Holert J, Alam I, Larsen M, et al. Genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain Chol1, a model organism for the degradation of bile salts and other steroid compounds. *Genome Announc*, 2013, 1(1): e00014-12.
- [8] Donova MV, Egorova OV. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(6): 1423-1447.
- [9] Ferreira NP, Robson PM, Bull JR, et al. The microbial production of 3 α -H-4 α -(3'-propionic acid)-5 α -hydroxy-7 β -methylhexahydro-indan-1-one- δ -lactone from cholesterol. *Biotechnol Lett*, 1984, 6(8): 517-522.
- [10] 雷灿. 薯蓣皂素清洁生产技术研究[D]. 恩施: 湖北民族大学, 2016.
Lei C. Environment-friendly extraction of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* rhizome[D]. Enshi: Hubei University for Nationalities, 2016 (in Chinese).
- [11] Crowe AM, Casabon I, Brown KL, et al. Catabolism of the last two steroid rings in *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *mBio*, 2017, 8(2): e00321-17.
- [12] García-Fernández J, Martínez I, Fernández-Cabezón L, et al. Bioconversion of phytosterols into androstadienedione by *Mycobacterium smegmatis* CECT 8331. *Methods Mol Biol*, 2017, 1645: 211-225.
- [13] Galán B, Uhía I, García-Fernández E, et al. *Mycobacterium smegmatis* is a suitable cell factory for the production of steroidal synthons. *Microb Biotechnol*, 2017, 10(1): 138-150.
- [14] Fernández-Cabezón L, García-Fernández E, Galán B, et al. Molecular characterization of a new gene cluster for steroid degradation in *Mycobacterium smegmatis*. *Environ Microbiol*, 2017, 19(7): 2546-2563.
- [15] Xiong LB, Sun WJ, Liu YJ, et al. Enhancement of 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione production from soybean phytosterols by deficiency of a regulated intramembrane proteolysis metalloprotease in *Mycobacterium neoaurum*. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(48): 10520-10525.
- [16] Xu LQ, Liu YJ, Yao K, et al. Unraveling and engineering the production of 23,24-bisnorcholesterol steroids in sterol metabolism. *Sci Rep*, 2016, 6: 21928.
- [17] Nakamatsu T, Beppu T, Arima K. Microbial degradation of steroids to hexahydroindanone derivatives. *Agr Biol Chem*, 1980, 44(7): 1469-1474.
- [18] Nakamatsu T, Beppu T, Arima K. Microbial production of 3 α -H-4 α -(3'-propionic acid)-5 α -hydroxy-7 β -methylhexahydro-1-indanone- δ -lactone from soybean sterol. *Agr Biol Chem*, 1983, 47(7): 1449-1454.
- [19] 王玉, 李雪梅, 冯进辉, 等. 一种生物合成 20-羟基-23,24-二降胆-4-烯-3-酮的分枝杆菌及合成方法, 中国, 201611054020.2, 2017-02-21.
Wang Y, Li XM, Feng JH, et al. *Mycobacterium* of biosynthetic 22-hydroxyl-23,24-bisnorcholesterol-4-ene-3-one and synthetic method thereof. CN, 201611054020.2, 2017-02-21 (in Chinese).
- [20] 马延和, 吴洽庆, 冯进辉, 等. 一种基因工程菌及其在制备 22-羟基-23,24-双降胆甾-4-烯-3-酮中的应用, 中国, 202011222278.5, 2020-11-05.
Ma YH, Wu QQ, Feng JH, et al. Genetically engineered bacterium and application thereof in preparation 22-hydroxyl-23,24-bisnorcholesterol-4-ene-3-one. CN, 202011222278.5, 2020-11-05 (in Chinese).
- [21] Liu N, Feng JH, Zhang R, et al. Efficient microbial synthesis of key steroidal intermediates from bio-renewable phytosterols by genetically modified *Mycobacterium fortuitum* strains. *Green Chem*, 2019, 21(15): 4076-4083.
- [22] 高兴强, 冯建勋, 花强, 等. 油水乳化体系中分枝杆菌转化植物甾醇产 9 α -羟基雄甾烯酮工艺研究. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2014, 40(4): 433-437.
Gao XQ, Feng JX, Hua Q, et al. Biotransformation of phytosterols to 9 α -hydroxyandrostenedione by *Mycobacterium* sp. in oil-water emulsion system. *J East China Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 2014, 40(4): 433-437 (in Chinese).
- [23] Smith M, Zahnley J, Pfeifer D, et al. Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* species in Tween 80 medium. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(5): 1425-1429.
- [24] Korycka-Machala M, Ziolkowski A, Rumijowska-Galewicz A, et al. Polycations increase the permeability of *Mycobacterium vaccae* cell envelopes to hydrophobic compounds. *Microbiology*, 2001, 147(10): 2769-2781.
- [25] Zhou LF, Li H, Xu YA, et al. Effects of a nonionic surfactant TX-40 on 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione biosynthesis and physiological properties of *Mycobacterium* sp. LY-1. *Process Biochem*, 2019, 87: 89-94.
- [26] 许桎楠, 李会, 周龙飞, 等. *Mycobacterium* sp. LY-1 高效转化植物甾醇两相体系的构建, 应用与环境生物学报, 2020, 26(4): 747-752.
Xu YN, Li H, Zhou LF, et al. Constructing the two-phase system for the highly efficient transformation of phytosterols by *Mycobacterium* sp. LY-1. *Chin J Appl Environ Biol*, 2020, 26(4): 747-752 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)