

# 微生物胆固醇氧化酶的研究进展

马玉超

(北京林业大学生物科学与技术学院)

**摘要:** 胆固醇氧化酶是细菌 FAD 依赖的黄素蛋白,能够高效地氧化固醇类物质的  $3\beta$ -羟基基团,完成胆固醇代谢的第一步反应。胆固醇氧化酶具有重要的应用价值:在生物催化方面,可用于生产多种固醇类物质;农业上作为抗虫蛋白,对棉铃虫幼虫具有显著的抗虫效果;医学上用于检测血清中胆固醇的含量。这些重要的应用促进了人们从不同来源的微生物中分离、纯化胆固醇氧化酶,详细研究其结构与功能的关系。本文综述了产胆固醇氧化酶的微生物种类、酶的类型与结构、酶的催化机理及胆固醇氧化酶的应用等的最新研究进展,并展望了未来的研究重点。

**关键词:** 胆固醇; 胆固醇氧化酶; 催化机制; 生物抗虫; 生物催化

中图分类号: Q935 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2012)06-0148-04

MA Yu-chao. **Advances in cholesterol oxidase from microorganism.** *Journal of Beijing Forestry University* (2012) **34** (6) 148-151 [Ch, 21 ref.] College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

Cholesterol oxidase is a bacterial FAD-dependent flavoprotein that efficiently oxidates steroidal  $3\beta$ -hydroxy group to catalyze the first step in cholesterol metabolism. Cholesterol oxidase is an enzyme with great commercial value and has been used in biocatalysis for producing a variety of steroids, as an insecticidal protein against the cotton boll weevil larvae in agriculture and, in particular, as a diagnostic enzyme for determining serum levels of cholesterol. These important applications promote the researchers to isolate the cholesterol oxidase producers, purify the enzyme and reveal the relationship between structure and function. This review focused on the recent progress about the microbial species of producing cholesterol oxidase, the type and structure, the catalytic mechanism and the application of cholesterol oxidase. The key of future research was prospected.

**Key words** cholesterol; cholesterol oxidase; catalytic mechanism; biological anti-pest; biocatalysis

胆固醇氧化酶 (ChOx, EC 1.1.3.6),即  $3\beta$ -脱氢胆固醇氧化酶,在降解胆固醇或其他天然甾醇的最初一步充当催化剂,是一种双功能的黄素酶,催化类固醇底物的氧化,催化反应需要类固醇环的  $3\beta$ -位置具有羟基基团<sup>[1]</sup>。在许多细菌中都发现具有此酶,被分为 2 种类型:一种是与 FAD 辅因子非共价结合的酶;另一种是辅因子以共价形式结合的酶<sup>[2]</sup>。该酶在一个活性位点可催化 2 步反应:胆固醇经胆甾 5-烯-3 脱氢胆固醇氧化酶初始氧化生成胆甾 5-烯-3-酮和  $H_2O_2$ ,胆甾 5-烯-3-酮进一步异构化生成胆甾 4-烯-3-酮作为最后的产物<sup>[3]</sup>。过氧化氢形成的能力已经允许用胆固醇氧化酶来分析胆固醇的临床和食品标本耦合分析。这种性能,可以用其来检测血液中胆固醇的含量,也可以用来降解或

转化食物中的胆固醇。此外,在农业上它还能有效抑制鳞翅目等昆虫的生长繁殖,是一种有效的生物杀虫剂<sup>[1,4]</sup>。因此,胆固醇氧化酶的来源、结构、生物学功能及高效工业化生产已成为当前研究的热点。

## 1 胆固醇氧化酶的微生物来源

1944 年, Turfitt<sup>[5]</sup> 首次从 *Rhodococcus erythropolis* 中分离了胆固醇氧化酶,并研究了其特征。从此,人们发现许多微生物(尤其是放线菌)都能产胆固醇氧化酶。这些微生物用这种酶代谢  $3\beta$ -羟基基团醇生成酮类固醇,随后逐步降解成丙酸盐和醋酸盐,为细菌生长提供碳源和能源<sup>[6]</sup>。

目前已报道的能够产生胆固醇氧化酶的微生物

收稿日期: 2012-01-12

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (BLYX200923)、林业公益性行业科研专项 (201304409)、北京市科技新星项目 (2011033)、“十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAC09B03)、教育部博士点基金项目。

作者简介: 马玉超,副教授。主要研究方向: 微生物资源的开发与利用。电话: 010-62336016 Email: mayuchao@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学 162 信箱。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

主要有: 诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、短杆菌属 (*Brevibacter*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、节杆菌属 (*Arthrobacterium*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等<sup>[4, 7-8]</sup>。有些微生物能产生细胞内膜结合的胆固醇氧化酶, 如 *Rhodococcus equi*、*Arthrobacter*、*Mycobacterium*、*Rhodococcus erythropolis* 和 *Rhodococcus rhodochrous*, 而 *Brevibacterium sterolicum*、*Pseudomonas*、*Schizophyllum commune*、*Streptovericillum cholesterolicum* 和 *Streptomyces violascens* 能够产生胞外酶<sup>[7]</sup>。一般情况下, 胆固醇氧化酶需要结合 FAD 辅因子以发挥它们的活性(共价与非共价结合辅因子); 但有一个例外, 来源于  $\gamma$ -*Proteobacterium* Y-134 的胆固醇氧化酶, 该酶被报道共价结合 FMN 作为辅因子<sup>[9]</sup>。通过比较发现 Y-134 的胆固醇氧化酶与其他已知酶具有不同的底物特异性, 主要区别在于前者对于孕烯醇酮和麦角固醇是无活性的。

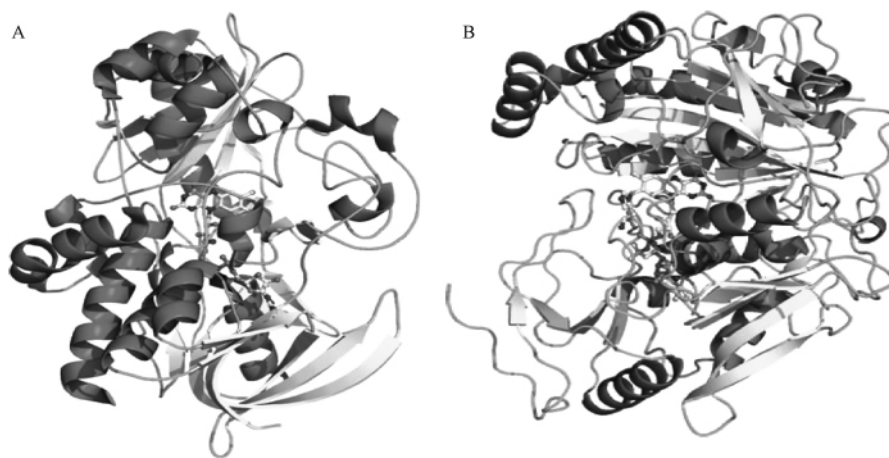
在胆固醇氧化酶产生菌中, *R. equi* ATCC21387 显示高的胆固醇氧化酶活性, 但是由于其具有高的致病性而限制了该微生物菌体的商业应用。此菌株中 *choE* 基因的编码胆固醇氧化酶与 *Streptomyces* spp. 其他分泌型胆固醇氧化酶具有同源性; 与 *M. tuberculosis* 和 *Mycobacterium leprae* 的胆固醇氧化酶也具有明显的相似性。*R. erythropolis* 既产生胞内

的, 也产生胞外的胆固醇氧化酶, 生长 70 h 后 2 种类型胆固醇氧化酶活性最高, 达到 365 U/L 和 1.7 U/g<sup>[10]</sup>。*R. erythropolis* IMET 7185 也能产生诱导型胆固醇氧化酶: 添加 1 g/L 的胆固醇, 胆固醇氧化酶的产量增加 5 倍, 达到 3.3 U/g。相比之下, 来源于 *Burkholderia cepacia* 的胆固醇氧化酶不被胆固醇诱导, 这株细菌可产生 13 U/L 的胆固醇氧化酶。目前报道的最高酶活水平是非致病菌 *Streptomyces* sp. 的发酵液经蛋白纯化后达到大约 2 500 U/L<sup>[4]</sup>。

## 2 胆固醇氧化酶的类型与结构

### 2.1 胆固醇氧化酶的类型

胆固醇氧化酶是一种单聚黄素蛋白, 大多数酶分子紧密结合一分子的黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 作为辅基 (图 1)<sup>[3]</sup>。根据结合形式不同分为 2 种类型: 一种是与 FAD 辅酶紧密结合但属非共价结合蛋白 (class I) (图 1A), 属于葡萄糖-甲醇-胆碱 (GMC) 氧化还原酶家族<sup>[2]</sup>; 另一种是辅酶共价的结合于一个组氨酸残基 (class II) (图 1B), 属于香草醇 4-羟基-3-甲氧基苯甲醇氧化酶 (VAO) 家族, 它包含一个推测的黄素折叠<sup>[2]</sup>。虽然这 2 种酶有着同样的催化活性, 但是它们不存在序列同源性, 在氧化还原作用和动力学特征方面也存在很大差异, 分属于不同的蛋白家族<sup>[4]</sup>。



A. *Streptomyces hygroscopicus* 的非共价结合形式的酶 (SChOx);

B. 来源于 *Brevibacterium sterolicum* 的共价结合酶 (BsChOx); FAD 辅因子以球-棒形式标记

图 1 胆固醇氧化酶的三维结构<sup>[3]</sup>

Fig. 1 3D structure of ChOx

### 2.2 胆固醇氧化酶的结构

目前已报道的各种微生物来源的胆固醇氧化酶均为单体, 以 FAD 为辅基, 接受电子进入氧化磷酸化途径并提供微生物细胞所需的能量, 有些胆固醇氧化酶需要金属离子作为辅基。该酶存在 3 个活性

中心: 底物结合活性中心, 决定酶与底物的亲和能力; 氧化活性中心, 催化胆固醇的氧化; 异构化活性中心, 催化中间产物异构化为终产物<sup>[1]</sup>。

胆固醇氧化酶存在于许多细菌中, 这些黄素酶存在大量的不同序列, 说明蛋白质结构上存在明显

不同。对于许多 FAD 酶,都具有多个甘氨酸残基 (GXGXXG) 的一致序列,后面是 D/E,大约 20 个氨基酸长,是核酸结合区域<sup>[11-12]</sup>。这是许多核酸结合蛋白的特征,在核酸和蛋白质互作方面显现出非常关键的作用,有助于辅因子的正确结合。非共价形式的胆固醇氧化酶展示了同样的甘氨酸一致序列 (G17-X-G19-X-G21-G/A22),后面跟一个谷氨酸 (E40),说明存在着核酸结合结构域;然而,在共价结合胆固醇氧化酶中,此一致序列是完全不存在的,说明此类型的酶很可能缺少核酸结合结构域<sup>[13]</sup>。

来源于 *Streptomyces hygroscopicus* 的非共价结合形式的酶 (SChOx) 和来源于 *Brevibacterium sterolicum* 的共价结合酶 (BsChOx) 的高度溶解结晶结构已经被解析,为每种蛋白提供一个全面的折叠结构<sup>[14-15]</sup>。这 2 种形式的酶的拓扑结构明显不同 (图 1)。虽然 2 种酶都被定义为根据功能由 2 个结构域组成 (FAD 结合结构域和底物结合结构域);但是根据拓扑结构,它们可以被认为是单一结构域蛋白,因为蛋白在辅因子结合功能区 and 底物结合功能区或者说催化残基之间来回弯曲。

### 3 胆固醇氧化酶的催化机理

胆固醇氧化酶的催化可分为 3 个化学转化 (图 2)。第 1 步催化转化叫作还原性的半反应,是类固醇环的 3 位的醇功能基团的脱氢反应。产生 2 个还原性的电子被转移给黄素辅因子,该辅因子在此过程中被还原。第 2 步催化反应,还原性的黄素与分子氧反应产生氧化性的酶和过氧化氢 (氧化性的半反应)。最后,氧化型的类固醇发生异构化反应,类固醇环上的双键从  $\Delta 5-6$  转移到  $\Delta 4-5$ ,形成最终产物胆甾-4-烯-3-酮。一般来说,异构化反应的速度比中间体胆甾-5-烯-3-酮从酶上释放的速度要快<sup>[1,16]</sup>。

### 4 胆固醇氧化酶的应用

#### 4.1 在医学上的应用

胆固醇是动物组织细胞所不可缺少的重要物质,不仅参与形成细胞膜,而且是合成胆汁酸、维生素 D 以及甾体激素的原料,在体内有着广泛的生理作用。但体内过多的胆固醇却是引起冠心病、动脉硬化和心肌梗塞的危险因素之一。目前欧美等发达国家冠心病的死亡率已经超过所有癌症死亡率的总和,占总死亡率的 27.4%<sup>[17]</sup>;因此,胆固醇水平是肝功能、胆汁功能、肾疾病、甲状腺功能和肠吸收功能的一个信号。胆固醇氧化酶能够催化胆固醇氧化成为胆甾-4-烯-3-酮,是一个有用的分析工具,被用来检测各种样品中的胆固醇含量,评估动脉硬化、血

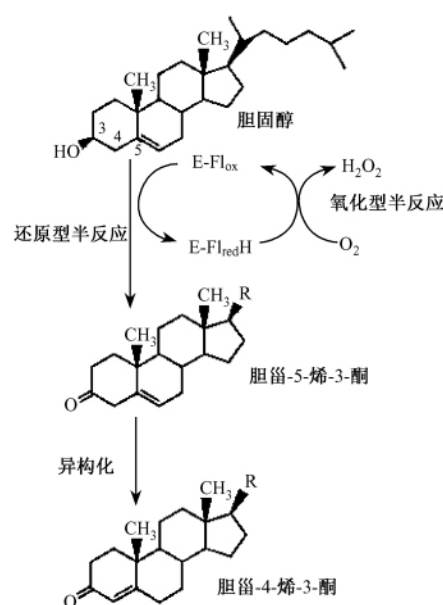


图 2 胆固醇氧化酶的催化机理<sup>[1]</sup>

Fig. 2 Reaction mechanism catalyzed by ChOx

栓症、心脏血管疾病和其他脂类疾病<sup>[4]</sup>。

医学上利用胆固醇氧化酶检测血清中胆固醇水平的原理是:由于大多数在血液样品中出现的胆固醇已经被酯化了,所以需要首先用胆固醇酯酶 (EC 3.1.1.13) 温浴后产生自由的胆固醇,再经胆固醇氧化酶氧化;最后,在一种过氧化物酶 (EC 1.11.1.7) 催化下产生过氧化氢,过氧化氢和一种芳香族的染料 (4-氨基安替比林和苯酚等) 形成一种容易测量的染料 (如一种红色的苯醌染料)<sup>[2]</sup>。

#### 4.2 在农业中的应用

在 1993 年, Monsanto Co. (St Louis, MO, USA) 对 1 万多个微生物发酵滤液进行随机筛选,发现培养液中有一种高度有效的蛋白,能够杀死棉铃虫,应用组织学和生物化学研究鉴定该蛋白为胆固醇氧化酶 (50% 的致死浓度为 20.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,这与苏云金芽孢杆菌蛋白抗其他害虫的生物活性相当)<sup>[18]</sup>。胆固醇氧化酶氧化高等真核生物细胞膜双分子层中的胆固醇生成胆甾-4-烯-3-酮,更改了细胞的脂膜结构,因此,该酶能有效地抑制一些昆虫的生长繁殖,是一种生物杀虫剂。目前,已证实该酶能够破坏中肠上皮细胞膜,当它进入一些鞘翅目 (如 *Anthonomus grandis grandis* (棉铃象甲)) 和鳞翅目 (例如 *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Pectinophora gossypiella*) 幼虫体内时,展现其潜在的杀虫能力<sup>[3-4]</sup>。

转基因植物产生的杀虫蛋白 (如苏云金芽孢杆菌毒蛋白) 目前已经应用于几种主要农作物来控制害虫的破坏。胆固醇氧化酶在转化的烟草中表达,叶子中合成水平一般大约在 5~50  $\mu\text{g}/\text{g}$  鲜质量,但是胆固醇氧化酶的表达导致植物在发育过程中产生

严重的畸形。当该酶与叶绿体定位肽融合表达成熟的(去掉信号肽)和全长的酶时,转基因烟草的表型发育正常;而且叶子组织由于表达了胆固醇氧化酶而产生了棉铃幼虫的杀虫活性。当在液泡中或定位于叶绿体中表达时,胆固醇氧化酶在烟草体内代谢植物甾醇类。转基因烟草在液泡中表达胆固醇氧化酶累积低水平的饱和固酮,而转基因烟草叶绿体定位表达胆固醇氧化酶维持一个高水平的固酮的累积,并且表型和发育也正常。这说明,胆固醇氧化酶可以改善甾醇效率,影响细胞分裂或在类固醇激素中影响油菜素内酯的生物合成<sup>[19]</sup>。

### 4.3 生物催化方面的应用

胆固醇氧化酶具有广泛的底物特异性,能够高效地氧化 $\Delta^5$ -羟基类固醇的3-OH基团,同时伴随着 $\Delta^5$ 到 $\Delta^4$ 的异构化,为工业类固醇药物生产提供有用的中间体。例如:*R. equi* DSM 89-133被用来转化胆固醇和其他的甾醇生产雄甾-4-烯-3,17-二酮和雄甾-14-烯-3,17-二酮,在培养基中添加乙酸条件下,胆固醇转化率高达82%。通过在5-雄甾烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -三醇-17-辛酸的C-17位增加一个C8-酯,随后再用猪酯酶去除酯类中间体而获得7 $\beta$ -羟基(甾)酮<sup>[20-21]</sup>。

## 5 结论与展望

目前,国内外对于胆固醇氧化酶的来源、结构及催化反应机制及应用方面的研究已经取得了很好的研究进展。将来的分子生物学、生物化学和结构研究将使我们能够更深入地阐明胆固醇氧化酶在不同微生物有机体中的活性和作用,也能鉴定此黄素氧化酶的新功能。而且,更深入的生理学功能的研究也将阐明为什么会存在共价键和非共价键2种结合形式的FAD黄素蛋白。另外,由于胆固醇不溶于水,高效的胆固醇氧化反应系统也将随着胆固醇氧化酶的应用研究和新功能的发现会有新的突破。估计在不久的将来会有许多关于胆固醇氧化酶的研究,尤其是在未知的研究应用领域。

### 参 考 文 献

- [1] VRIELINK A, GHISLA S. Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features [J]. *FEBS J*, 2009, 276 (23): 6826-6843.
- [2] APARICIO J F, MARTÍN J F. Microbial cholesterol oxidases: bioconversion enzymes or signal proteins? [J]. *Mol Biosyst*, 2009, 4: 804-809.
- [3] POLLEGIONI L. Cholesterol oxidase: A model flavoprotein oxidase and a biotechnological tool [J]. *FEBS J*, 2009, 276 (23): 6825.
- [4] DOUKYU N. Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 825-837.
- [5] TURFITT G E. The microbiological degradation of steroids( II ): Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. [J]. *Biochem J*, 1944, 38 (5): 492-496.
- [6] TURFITT G E. The microbiological degradation of steroids( IV ): Fission of the steroid molecule [J]. *Biochem J*, 1948, 42 (3): 376-383.
- [7] MACLACHLAN J, WOTHERSPOON A T, ANSELL R O, et al. Cholesterol oxidase: Sources, physical properties and analytical applications [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 72 (5): 169-195.
- [8] POLLEGIONI L, PIUBELLI L, MOLLA G. Cholesterol oxidase: biotechnological applications [J]. *FEBS J*, 2009, 276 (23): 6857-6870.
- [9] ISOBE K, SHOJI K, NAKANISHI Y, et al. Purification and some properties of cholesterol oxidase stable in detergents from *γ-Proteobacterium* Y-434 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95 (3): 257-263.
- [10] SOJO M, BRU R, LOPEZ-MOLINA D, et al. Cell-linked and extracellular cholesterol oxidase activities from *Rhodococcus erythropolis* isolation and physiological characterization [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47 (5): 583-589.
- [11] CAVENER D R. GMC oxidoreductases: A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities [J]. *J Mol Biol*, 1992, 223 (3): 811-814.
- [12] EVENTOFF W, ROSSMANN M G. The evolution of dehydrogenases and kinases [J]. *CRC Crit Rev Biochem*, 1975, 3 (2): 111-140.
- [13] OHLSSON I, NORDSTROM B, BRANDEN C I. Structural and functional similarities within the coenzyme binding domains of dehydrogenases [J]. *J Mol Biol*, 1974, 89 (2): 339-354.
- [14] COULOMBE R, YUE K Q, GHISLA S, et al. Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (32): 30435-30441.
- [15] VRIELINK A, LLOYD L F, BLOW D M. Crystal structure of cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* refined at 1.8 Å resolution [J]. *J Mol Biol*, 1991, 219 (3): 533-554.
- [16] YUE Q K, KASS I J, SAMPSON N S, et al. Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants [J]. *Biochemistry*, 1999, 38 (14): 4277-4286.
- [17] POLLEGIONI L, WELS G, PILONE M S, et al. Kinetic mechanisms of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum* [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 264 (1): 140-151.
- [18] 牛天贵, 吕莹, 蔡同一, 等. 降解食品中胆固醇的芽胞杆菌 T12\_1 的筛选与应用研究 [J]. *中国农业大学学报*, 2001, 6 (1): 74-78.
- [19] PURCELL J P, GREENPLATE J T, JENNINGS M J, et al. Cholesterol oxidase: A potent insecticidal active against boll weevil larvae [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 196 (3): 1406-1413.
- [20] CORBIN D R, GREBENOK R J, OHNMEISS T H, et al. Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126 (3): 1116-1128.
- [21] LABAREE D, HOYTE R M, HOCHBERG R B. A direct stereoselective synthesis of 7 $\beta$ -hydroxytestosterone [J]. *Steroids*, 1997, 62 (6): 482-486.

(责任编辑 董晓燕)