

甾体 14-脱氢和 11 α -羟基化反应的两种不同微生物转化

徐诗伟 徐 清* 法幼华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 节杆菌 犁头霉 多步转化反应 16 β -甲基-11 α ,17 α 21-三羟基孕甾-14-二烯-3,20-二酮

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0651-03

采用两种不同的微生物进行连续的或混合的转化,对甾体化合物进行多步反应,已有不少关于 C₁₁脱氢和 11(α 或 β)或 16 α -羟基化的报道。它可减少中间产物的分离步骤,起到简化工艺,降低生产成本的效果,有时还可抑制不需要的副反应的产生,促进所需产物的形成^[1~4]。本工作以来自梯可吉宁(Tigogenin)的 16 β -甲基-3 β ,17 α 21-三羟基-5 α -孕甾-20-酮-21-醋酸酯(I)作为底物,采用微生物转化方法制备 16 β -甲基-11 α ,17 α 21-三羟基孕甾-14-二烯-3,20-二酮(III),III是合成高效肾上腺皮质激素倍他美松(Betamethasone)类药物的重要前体^[5]。在转化过程中,要求微生物既能氧化底物的 C₃-羟基为酮基,并在 C₁₁和 C₁₄上同时引入两个双键,又能实施 C₁₁-羟基化和 C₂₁-醋酸酯水解。国外采用化学法脱氢,然后用霉菌引入 11 α -羟基。我们在过去研究^[6,7]的基础上,又筛选到 C₁₄脱氢能力很强的节杆菌(*Arthrobacter* sp.) AX86,用它和一株具有 11 α -羟基化能力的犁头霉(*Ab-sidia* sp.) A28 配合^[8],以两步转化或一步连续转化的不同发酵工艺得到所需产物。本文简要介绍这两种转化工艺的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

节杆菌 AX86 和犁头霉 A28 均由筛选得到,分别在牛肉汁和土豆汁琼脂斜面上保存,液体培养基按前报道^[6,8]配制。

1.2 甾体化合物

16 β -甲基-3 β ,17 α 21-三羟基-5 α -孕甾-20-酮-21-醋酸酯(底物 I)和 16 β -甲基-17 α 21-二羟基孕甾-14-二烯-3,20-二酮(中间产物,II)由东北制药总厂提供;样品 16 β -甲基-11 α ,17 α 21-三羟基孕甾-14-二烯-3,20-二酮(产物,III)由美国先令制药公司赠送。

1.3 培养和转化

1.3.1 节杆菌转化 I:取牛肉汁斜面生长好节杆菌接种含 40 mL 培养基 250 mL 三角瓶,30℃,200 r/min 振荡培养 24

h,按 4% 种量移入含 500 mL 培养基 3L 三角瓶,待菌生长好后投加适量氯化钴溶液以抑制甾核的降解,并加入底物进行转化。

1.3.2 犁头霉转化 II:取土豆汁斜面孢子接种含 40 mL 培养基 250 mL 三角瓶,28℃,180 r/min 振荡培养 24 h,然后移至含 400 mL 培养基 3L 三角瓶,待菌丝体生长好后投加 II 作为底物,转化条件与培养相同。

1.3.3 节杆菌和犁头霉连续转化:节杆菌和犁头霉培养均在含 400 mL 培养基 3L 三角瓶中进行,转化时先将氯化钴溶液和底物加入至已培养好的节杆菌发酵液中,然后待脱氢反应进行到一定程度时,再将已生长好的犁头霉菌丝体(过滤收集)加入,继续转化直至底物完全消失。

1.4 分析方法

取适量转化液用等量醋酸乙酯抽提,提取液进行色谱分析。

1.4.1 硅胶 TLC 定性分析:检测 II 形成展开剂氯仿-丙酮 8:1;检测 III 形成展开剂氯仿-丙酮-无水乙醇 18:1:1;显色剂均为 3% 磷钼酸乙醇溶液;II 和 III 还可直接用 254 nm 紫外分析仪观察其吸收斑点。

1.4.2 反相 HPLC 定量分析:根据峰高值以外标法测定 II 和 III 的转化情况,色谱条件同前报道^[8]。

1.5 中间产物和产物的提取与鉴定

II 提取与鉴定同前报道^[7];III 提取是将转化后发酵液过滤除去菌丝,滤液用醋酸乙酯提取,提取液减压浓缩,残余物用溶剂洗涤即得产物,乙醇重结晶得分析样品,进行熔点、比旋值、元素分析和波谱等各项物理性质测定,以确认其化学结构。

2 实验结果

2.1 节杆菌转化 I

用 2 个 3L 三角瓶,II 的投加浓度为 0.3% (W/V),总量 3.0 g,转化 72 h,合并发酵液经提取得中间产物 II 2.13 g,mp202~205℃,收率 80.5%。正己烷-丙酮重结晶得分析样

品 mp203.4 ~ 205.0°C $[\alpha]_D^{25} + 109^\circ$ (C 0.624 ; dioxane);
 $UV\lambda_{max}^{MeOH}$ (nm) 244(ϵ 16 000); $IR\nu_{max}^{KBr}$ (cm^{-1}) 3430(OH), 1715
 (20C=0), 1650, 1600, 1590, 880($\Delta^1A-3C=0$); MSm/eM^+
 358 $^1H NMR\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$ (ppm) 0.9 Δ 3H s $C_{18}-CH_3$), 1.1 Δ 3H d ,
 1.7Hz, 16- CH_3), 1.24(3H s, $C_{19}-CH_3$), 2.98(1H s, $C_{17}-$
 OH) 4.44(2H, AB, J18Hz, $C_{21}-CH_2OH$) 6.12(1H bs, C_4-
 H) 6.29(1H dd, J10 2Hz, C_2-H) 7.12(1H d, J10Hz, C_1-
 H) $^{13}CNMR\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$ (ppm) 212.3(C_{20} s), 186.3(C_3 s), 169.8
 (C_5 s), 156.4(C_1 d), 127.0(C_2 d), 123.4(C_4 d), 89.1(C_{17} ,
 s) 68.5(C_{21} , t), 19.7(16 β - CH_3 , q), 18.7(C_{19} , q), 15.2(C_{18} ,
 q) 22.3 ~ 52.0 为甾核上其余各碳 ; Anal. $C_{22}H_{30}O_4$ 计算值
 (%) C 73.70 ; H 8.44 测定值 (%) : C 73.68 ; H 8.56。上
 述测定结果证实转化中间产物(II) 为 16 β -甲基-17 α 21-二羟
 基孕甾-1 4-二烯-3 20-二酮。

2.2 犁头霉转化 II

在 4 个 3L 三角瓶中投入由上述试验得到的 II 共 1.6 g
 (投料浓度 0.1) 转化 42 h 经提取得到 III 1.06 g, mp216.0 ~
 217.8°C, 收率 69.2% ; 与标准样品混合熔点不降低 ;
 $UV\lambda_{max}^{MeOH}$ (nm) 247(ϵ 17300); $MS m/e M^+$ 374, 279(M-
 $CH_2OHCO\cdot 2H_2O$)。

2.3 节杆菌和犁头霉连续转化

两菌混合连续转化用 2 个 3L 三角瓶共投 I 2.4 g, 投料
 浓度 0.3% , 转化 70 h, 经提取得产物 1.33 g, mp215.2 ~
 218.7°C, 收率 60.1%。用乙醇重结晶得分析样品 mp218.5
 ~ 220.4°C $[\alpha]_D^{25} + 71.6^\circ$ (C 0.524, dioxane); $UV\lambda_{max}^{MeOH}$ (nm)
 247(ϵ 17320); $IR\nu_{max}^{KBr}$ (cm^{-1}) 3460(OH), 1710(20C=0), 1650,
 1615, 890($\Delta^1A-3C=0$); $MS m/e M^+$ 374, 338(M-2 H_2O),
 279(M- $CH_2OHCO\cdot 2H_2O$); $^1HNMR\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$ (ppm) 0.9 Δ 3H s,
 $C_{18}-CH_3$), 1.08(3H d, J7Hz, 16- CH_3), 1.36(3H s, $C_{19}-$
 CH_3), 1.82(s, 11 $\alpha-H$), 4.03(1H, td, J_{11 β 9 α} 10Hz, J_{11 β 12 α}

10Hz, J_{11 β 12 β} 5Hz, 11 $\beta-H$), 4.40(2H, AB, J18Hz, $C_{21}-$
 CH_2OH) 6.07(1H s, C_4-H), 6.09(1H, dd, J_{1 2} 10Hz, J_{2 4}
 2Hz, C_2-H), 7.92(1H, d, J10Hz, C_1-H); $^{13}CNMR\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$
 (ppm) 213.8(C_{20} s), 189.3(C_3 s), 172.9(C_5 s), 162.9(C_1 ,
 d), 125.2(C_2 d), 124.9(C_4 d), 89.7(C_{17} s), 69.6(C_{21} , t),
 68.9(C_{11} , d), 61.8(C_9 , d) 20.5(16 β - CH_3 , q), 19.5(C_{19} , q),
 17.2(C_{18} , q) 34.7 ~ 51.0 为甾核上其他各碳 ; Anal. $C_{22}H_{30}O_5$
 计算值 (%) : C 70.57, H 8.07 ; 测定值 (%) : C 70.41, H ,
 7.92。根据上述各项分析可确认产物结构为 16 β -甲基-11 α ,
 17 α 21-三羟基孕甾-1 4-二烯-3 20-二酮。

3 讨论

通常用两种不同的微生物进行甾体 C_{-1} 脱氢和 C_{-11} 羟
 基化反应均采用先羟化后脱氢的工艺程序。这是由于脱氢
 反应比羟基化反应快, 底物 A 环易形成 Δ^1A-3 -甾酮结构, 该
 化合物一般不稳定会很快进一步降解^[3,9,10]。本试验中所采
 用的转化程序与之相反, 不论是两菌分别以两步转化还是两
 菌混合连续转化, 都是先由节杆菌 C_1 脱氢 (含 C_{-3} 氧化), 再
 由犁头霉引入 C_{-11} 羟基。脱氢反应的产物比较稳定, 这可能
 由于反应是在含有甾核降解酶的抑制剂的条件下进行的, 王
 敬一等的工作也有类似情况^[11]。此外, 当犁头霉 A28 直接
 转化脱氢后的中间产物(II) 时, II 的浓度达到或超过
 0.15% , 11 α -羟基化能力就急剧下降, 这是由于过高浓度的 II
 对酶催化起着抑制作用。我们发现若将 II 的 C_{-21} 羟基乙酰
 化则可大幅度提高底物浓度并获得较高的羟化率^[8]。从这
 一点看, 如果两菌分别以两步转化, 则需将第一步脱氢反应
 的中间产物分离出并引入乙酰基后, 才适合于作为第二步羟
 基化反应的基质, 这在工艺上是比较繁琐的, 也是很经济的。
 综上所述, 从简化工艺、缩短周期以及提高收率等方面,
 节杆菌与犁头霉两菌一步连续转化比两菌分别以两步转化
 优越。

参 考 文 献

- [1] Lee B K, Ryu D Y, Thoma R W *et al.* *J Gen Microbiol* ,1969 **55** (1) :145~153
- [2] 近藤荣二. 化学与生物, 1978 **16** (19) :608~613
- [3] Petzoldt K. *Ger offen* ,1978 **27**:15854
- [4] 陈家任, 蒲自莲, 曾本秀等. 微生物学报, 1991 **31** (4) :308~314
- [5] Rausser R, Lynchski A M, Harris H *et al.* *J Org Chem* ,1966 **31** (1) :26~31
- [6] 法幼华, 徐诗伟. 微生物学报, 1980 **20** (2) :185~190
- [7] 徐诗伟, 法幼华. 微生物学报, 1984 **24** (1) :46~49 ;1985 **25** (2) :181~182 ;1990 **30** (1) :80~82
- [8] 徐诗伟, 徐清, 法幼华. 生物工程学报, 2000 **16** (4) :482~484
- [9] Mazumder T K. *Appl Microbiol Biotech* ,1985 **21** :154~161.
- [10] Lee B K, Brown W E, Ryu D Y *et al.* *Biotech Bioeng* ,1971 **13** :503~515.
- [11] 王敬一, 张丽青, 马如鸿等. 药学报, 1987 **22** (2) :141~144.

Two Different Fermentation Techniques of Steroid 14-dehydrogenation and 11 α -hydroxylation

XU Shi-Wei XU Qing FA You-Hua

(Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080)

Abstract Two kinds of micro-organism ,*Arthrobacter* sp. AX86 (14-dehydrogenator) and *Absidia* sp. A28 (11 α -hydroxylator) were used in this experiment. Two different fermentation techniques were performed to accomplish the multiple conversional reactions for producing 16 β -methyl-11 α ,17 α ,21-trihydroxy-14-pregnadiene-3,20-dione (III) from 16 β -methyl-3 β ,17 α ,21-trihydroxy-5 α -pregnane-20-one-21-acetate (I) : 1) To produce product (III) by means of a two-step fermentation method which were independently performed first by *Arthrobacter* and next by *Absidia* and 2) the product was obtained by a sequential fermentation system of aforesaid two micro-organisms in a single fermentor without isolation of the intermediates from the mixture. Our results showed that in both fermentation systems high yield of product was obtained. However , according to the technical simplicity , shorter duration of fermentation cycle and efficient yield of product , the second method is better than the first one.

Key words *Arthrobacter* , *Absidia* , multiple microbial conversion 16 β -methyl-11 α ,17 α ,21-trihydroxy-14-pregnadiene-3,20-dione