

## A 环饱和甾体的微生物转化作用

### IV. 节杆菌 9-2 菌株的环氧化反应

法幼华 徐诗伟

(中国科学院微生物研究所, 北京)

经各项理化性质包括熔点、比旋值、紫外、红外吸收光谱、核磁共振谱、质谱及元素分析等项的鉴定, 证明节杆菌 9-2 在低浓度 (0.02%) 的氯化钴存在下, 氧化 16 $\beta$ -甲基-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-三羟基-5 $\alpha$ - $\Delta^9(11)$  孕甾烯-20-酮-21-醋酸酯 (I) 的产物是 16 $\beta$ -甲基-9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -环氧-17 $\alpha$ , 21-二羟基- $\Delta^{11,14}$  孕甾二烯-3, 20-二酮 (IV), 收率 48.8%。

试验还发现氯化钴是调节产物 16 $\beta$ -甲基-17 $\alpha$ , 21-二羟基- $\Delta^{11,14}$  孕甾三烯-3, 20-二酮 (II) 和 (IV) 累积量的有效因素; 进一步讨论了该菌环氧化作用的机制。

**关键词** 节杆菌; 环氧化反应

我们前已发现节杆菌 (*Arthrobacter*) 9-2 菌株在不含或低浓度的氯化钴条件下转化 16 $\beta$ -甲基-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-三羟基-5 $\alpha$ - $\Delta^9(11)$  孕甾烯-20-酮-21-醋酸酯 (I) 主要形成一种极性较大的化合物 (IV)<sup>[1]</sup>。本文报道该化合物 (IV) 的发酵及分离鉴定结果, 并对这一转化途径进行讨论。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌种

节杆菌 9-2<sup>[2]</sup>。

#### (二) 甾体底物

16 $\beta$ -甲基-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-三羟基-5 $\alpha$ - $\Delta^9(11)$  孕甾烯-20-酮-21-醋酸酯 (I) 由上海第九制药厂提供。

#### (三) 培养基

培养基组成同前报<sup>[2]</sup>。每 200ml 三角瓶装 40ml 培养基, 15 磅 20min 灭菌。

#### (四) 培养

取肉汁斜面上已生长好的培养物接种三角瓶, 30℃ 振荡培养 24h 作为种液, 按 5% (V/V) 的接种量接入新鲜培养基, 并继续进行培养。

#### (五) 甾体的转化

在培养 22h 的 40ml 菌液内, 投加含 5% 甾体

底物乙醇溶液 0.8ml (投料浓度 1mg/ml<sub>2</sub>) 并按试验要求添加一定量的 2.5% 氯化钴 (CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) 溶液, 然后在与培养相同的条件下进行转化。

#### (六) 产物的定量分析

产物 (II) 和 (IV) 的定量测定方法基本同前报<sup>[1]</sup>。即用硅胶 TLC 斑点洗脱法分别于 237nm 和 238nm 波长处测定吸光度, 计算含量时所用的  $\epsilon$  值分别为 15800<sup>[3]</sup> 和 14100<sup>[4]</sup>。

#### (七) 产物 (IV) 的制备及鉴定

在投加甾体底物的同时添加 0.02% (按发酵液体积计, 下同) 氯化钴。转化 28h 后, 取 10 只三角瓶的发酵液用醋酸丁酯按常规法提取, 提取液减压下蒸去溶剂, 冷却抽滤, 用少量溶剂洗涤结晶物, 以正己烷丙酮重结晶, 最后进行产物 (IV) 的熔点、比旋值、光谱及元素分析等项测定。

## 实 验 结 果

### (一) 氯化钴对形成产物 (II) 和 (IV) 的调控作用

本文于 1983 年 4 月 4 日收到。

<sup>1</sup>HNMR 由中国科学院化学研究所核磁组 (RMN-250 型, 250 MHz); MS 由军事医学科学院质谱组 (MAT-711) 协助测定, 特此致谢。

表 1 氯化钴对形成产物 (II) 和 (IV) 的影响

Table 1 Effect of cobaltous chloride on formation of products (II) and (IV)

时间 Time(h) 产物* Products(mg/ml) 氯化钴浓度 CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O(%)	22		45		68	
	II	IV	II	IV	II	IV
0	0	0.39	0	0.21	0	0.15
0.02	tr.	0.46	0	0.38	0	0.35
0.04	0.30	tr.	0.14	0.44	tr.	0.39
0.06	0.34	tr.	0.35	tr.	0.35	tr.
0.08	0.29	tr.	0.62	tr.	0.55	tr.

\* tr. 表示痕迹量。

表 1 是节杆菌 9-2 在含不同浓度氯化钴的发酵液中的转化结果。由此表可以看出,在没有钴离子的条件下进行转化,主要产物是 (IV),但此产物并不稳定。添加 0.02% 或 0.04% 的氯化钴可以防止 (IV) 的迅速降解,从而使 (IV) 的累积量达约 0.45mg/ml。另外,从表中的结果还可发现氯化钴对该菌的环氧化酶活性有抑制作用。当浓度高于 0.06% 时,几乎不再有环氧化产物的形成,主要产物是 (II),最高累积量可超过 0.60mg/ml。

## (二) 产物 (IV) 的理化性质

发酵液按常规法处理后得到粗产物 (IV),以正己烷丙酮重结晶,收率 48.8%。其理化性质经测定为: MP 214—217°C;  $[\alpha]_D^{20} + 62.7$  (C, 0.5; 二氧六环); UV  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  (nm) 238,  $\epsilon$  14100; IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3650, 3450 (—OH), 1715 (20C=O), 1665 (3C=O), 1620, 1605 ( $\Delta^{1,4}$ ), 995 (9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -环氧), 900 ( $\Delta^{1,4}$ C=CH 平面外弯曲); <sup>1</sup>HNMR  $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$  (ppm) 0.85 (3H, s, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.04 (3H, d, J7 Hz, C<sub>16</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.50 (3H, s, C<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.37 (1H, d, J5 Hz, C<sub>11</sub>-H), 4.38 (2H, q, J18 Hz, C<sub>21</sub>-CH<sub>2</sub>OH), 6.12 (1H, s, C<sub>1</sub>-H), 6.20 (1H, d, J10 Hz, C<sub>2</sub>-H), 6.62 (1H, d, J10 Hz, C<sub>1</sub>-H); MS

m/e M<sup>+</sup> 372, 313 (M-CH<sub>2</sub>OHCO), 295 (M-CH<sub>2</sub>OHCO-H<sub>2</sub>O); Anal. C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>, 计算值: C, 70.94; H, 7.58; 测定值: C, 70.48; H, 7.61。

## 讨 论

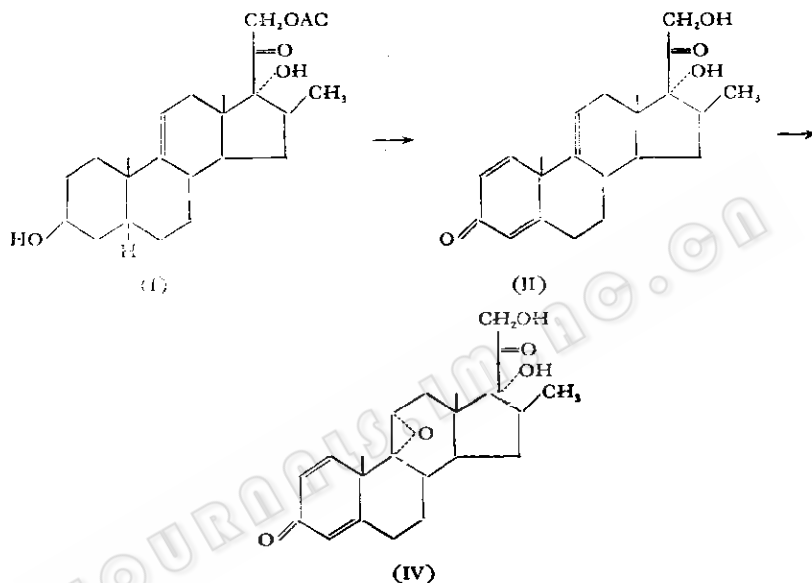
根据对产物各项理化性质的鉴定结果确证化合物 (IV) 是 16  $\beta$ -甲基-9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -环氧-17 $\alpha$ , 21-二羟基- $\Delta^{1,4}$  孕甾二烯-3, 20-二酮。

在前用节杆菌 9-2 转化 A 环饱和甾体化合物时,发现在不加抑制剂的情况下,在 A 环引入  $\Delta^{1,4}$  之后,由于受 9 $\alpha$ -羟化酶的作用,引起甾核 B 环的破裂,最后导致整个甾核的降解<sup>[2,5]</sup>。本试验所用的甾体底物 (I) 在 C<sub>5(11)</sub> 位上具有双键,转化的产物现已证明是 (IV),可见在这一转化中除了 C<sub>11,4</sub> 脱氢外,并没有在 C<sub>9</sub> 位上发生羟基化作用,而是进行  $\Delta^{9(11)}$  的环氧化反应。已有报道证明能在饱和甾体母核的某一碳原子中引入一个直立羟基的微生物,也能使其相应的不饱和甾体的同一碳原子上引进环氧基团,而且此环氧的构型与羟基相同<sup>[6-8]</sup>。我们的结果进一步证明了这一规律。看来 9 $\alpha$ -羟化酶和 9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -环氧化酶具有共同的活性部位,只是底物的

$\Delta^{9(11)}$  结构, 对  $9\alpha$ -羟化酶产生了竞争性抑制作用, 使环氧化酶的活性明显表现而已。

另外, 我们曾用氯化钴作为  $9\alpha$ -羟化酶活性的有效抑制剂<sup>[2,5]</sup>。而在本试验中, 发现它既能防止 (IV) 的进一步降解, 也

能抑制环氧化酶的活性, 这就更进一步表明,  $9\alpha$ -羟化酶和  $9\alpha, 11\alpha$ -环氧化酶属性的雷同。根据这一结果, 也可通过氯化钴的添加量, 控制转化 (I) 的进程, 累积不同的产物(表 1)。转化途径如下:



### 参 考 文 献

- [1] 徐诗伟, 法幼华: 微生物学报, **24**(1): 46—49, 1984。
- [2] 法幼华, 徐诗伟: 微生物学报, **20**(2): 185—190, 1980。
- [3] Carrington, T. R. et al.: *J. Chem. Soc.*, 4560—4572, 1961。

- [4] Coronelli, C. et al.: *Experientia*, **20**(4): 208—209, 1964。
- [5] 徐诗伟, 法幼华: 微生物学报, **22**(4): 361—366, 1982。
- [6] Bloom, B. M. and G. M. Shull: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**(21): 5767—5768, 1955。
- [7] Kurosawa, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **25**(11): 838—843, 1961。
- [8] Sih, C. J.: *J. Bacteriol.*, **84**(2): 382, 1962。

## THE MICROBIAL TRANSFORMATION OF RING-A SATURATED STEROIDS

### IV. EPOXIDATION OF *ARTHROBACTER* NO. 9-2

Fa Youhua Xu Shiwei

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Determination of several physical-chemical characteristics including melting point, specific rotation, ultra-violet absorption spectrum, infrared absorption spectrum, nuclear magnetic resonance, mass spectrum and element composition etc. indicated that an oxidation product of 16 $\beta$ -methyl-5 $\alpha$ - $\Delta^4$ -pregnene-3  $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-20-one-21-acetate (I) converted by *Arthrobacter* No. 9-2 was identified as 16 $\beta$ -

methyl-9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -epoxy- $\Delta^1$ , 4-pregnadiene-17 $\alpha$ , 21-diol-3, 20-dione (IV). It was found that cobaltous chloride was an efficient factor for regulating the accumulation of products 16 $\beta$ -methyl- $\Delta^1$ , 4,9(11)-pregnatriene-17 $\alpha$ , 21-diol-3, 20-dione (II) and (IV). The mechanism of epoxidation by *Arthrobacter* No. 9-2 was discussed.

#### Key words

*Arthrobacter*; epoxidation