

# 培他美松中间体 (17 $\alpha$ -羟基-16 $\beta$ -甲基孕甾-4,9(11)二烯-3,20-二酮)微生物脱氢的研究

四川省生物研究所  
(成都)

上海第十二制药厂  
(上海)

从 47 株对甲基辜丸素 A 环 1 位具有脱氢能力菌株<sup>[1]</sup>中, 选出了 3 株对培他美松中间体 17 $\alpha$ -羟基-16 $\beta$ -甲基孕甾-4,9(11)二烯-3,20-二酮有转化能力的优良菌株 A69-1、A69-2、G1-1。

对 A69-1 菌株转化甾体的条件进行了初步研究,发现培养基成分、通气量、金属离子、乙醇浓度和青霉素等与脱氢强度有关。进一步放大试验证明,通气量是转化工艺条件的关键。300 升发酵罐试验产品收得率近 70%。

四川生物研究所科技人员遵照毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,坚持开门办科研,在 1973 年上海第十二制药厂合成 17 $\alpha$ -羟基-16 $\beta$ 甲基孕甾-4,9(11)二烯-3,20-二酮的基础上,在党委领导下两个单位共同协作,又进一步用发酵法将上述中间体转化成新的脱氢化合物,为我国医药工业填补了一项空白。

## 一、菌种的筛选

### (一) 菌种来源

四川生物研究所菌种保藏组提供。菌株保存在酵母膏、葡萄糖琼脂斜面培养基上。

### (二) 筛选培养基成份(%)

葡萄糖 0.5、玉米浆 0.5、蛋白胨 0.25、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, pH 7.0 (以 2NH<sub>4</sub>OH 调)。自来水配制、用 500 毫升三角瓶、每瓶装 25 毫升、1 公斤/厘米<sup>2</sup> 压力、灭菌 30 分钟备用。

### (三) 筛选方法

将 47 株细菌分别由斜面上挑取一环,接入盛有筛选培养基的三角瓶中,在旋转式摇床上(偏心距 0.5 厘米,转速 210 次/分)于 29℃ 振荡培养 24 小时,按万分之一浓

度向培养液内投入中间体,以 2% V/V 甲醇为载体溶液,转化 72 小时,鉴定转化产物。

### (四) 转化产物的提取与鉴别

取发酵液 10 毫升,用 10 毫升氯仿抽提,吸取抽提液 5 毫升,于水浴中浓缩至干,加 0.2 毫升甲醇溶液溶解,进行薄层层析,并以标准样品对照鉴别转化产物。薄层层析用硅胶 G 制板。在 100℃ 活化半小时,以苯:乙酸乙酯(7:3)作展开剂,用

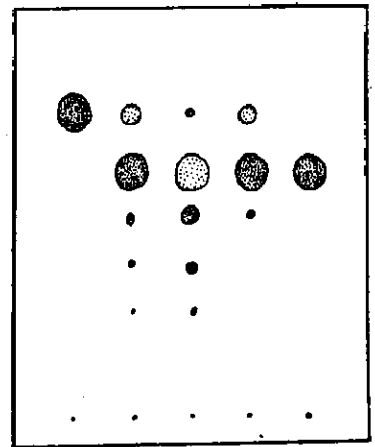


图 1 A<sub>69-1</sub>、A<sub>69-2</sub>、G<sub>1-1</sub> 3 菌株对中间体转化情况。

本文于 1976 年 10 月 6 日收到。

10% 磷钼酸液或硫酸香格兰显色。

### (五) 结果

以 17 $\alpha$ -羟基-16 $\beta$ -甲基孕甾-4, 9 (11) 二烯-3, 20-二酮为底物对 47 株菌进行筛选, 发现 A<sub>69-1</sub>、A<sub>69-1</sub>、G<sub>1-1</sub> 3 株具有较强的脱氢能力。转化产物以 A<sub>69-1</sub>、G<sub>1-1</sub> 较纯, A<sub>69-2</sub> 除有 A 环(1) 位脱氢产物外、尚杂有少量副产物(图 1)。A<sub>69-1</sub>、A<sub>69-2</sub> 菌株为单

纯节杆菌 (*Arthrobacter simplex*)。

## 二、发酵条件对脱氢的影响

### (一) 几种培养基对脱氢转化与培养基中单因子对菌体生长的影响

用几种培养基(表 1)进行了转化条件试验。

试验表明, 含乳酸钠、酵母膏的培养基

表 1 几种培养基对转化的影响

培养基	组 分 (%)						转化情况*
	葡萄糖	玉米浆	酵母膏	乳酸钠	蛋白胨	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
A	0.5	0.5			0.25	0.1	+++ -
B			1.0	0.5			++++
C			1.0	0.8		0.1	++++
D	0.6	0.6			0.3	0.13	+++ -
E	0.6	0.6		0.5	0.3	0.13	++++
F	0.8	0.8			0.4	0.2	+++ -

\* “++++” 转化情况良好, “+++ -” 稍差。

对菌生长有利。转化效果较好。

为进一步研究培养基中单因子的影响。一组将乳酸钠浓度固定为 0.5%, 改变

酵母膏浓度, 另一组将酵母膏浓度固定为 2%, 改变乳酸钠浓度, 结果见图 2、3。

从图 2、图 3 看出: 培养基中酵母膏

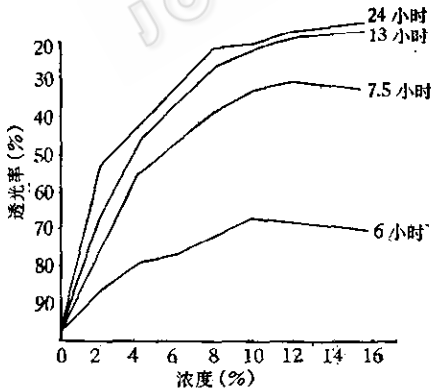


图 2 酵母膏浓度对菌体生长影响

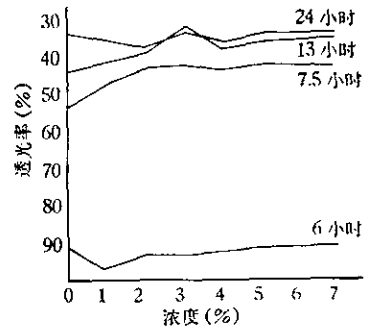


图 3 乳酸钠浓度对菌体生长影响

浓度对菌体生长量起着决定性作用。

### (二) 通气量对培他美松中间体脱氢影响

取 500 毫升三角瓶分别装 100 和 50

毫升培养基接入菌液 2 毫升。培养 14 小时, 按 1% 浓度投入中间体、置摇瓶机上转化 72 小时, 取样检查脱氢情况, 结果表明, 通气量不足, 影响转化率(见表 2)。

表2 通气条件与培他美松中间体脱氢影响

处 理	变 化 通 气 条 件	转 化 率 (%)
减 小 通 气*	500 毫升瓶装 100 毫升发酵液	40
加 大 通 气**	500 毫升瓶装 50 毫升发酵液	95
对 照	500 毫升瓶装 100 毫升发酵液	90

\* 加厚瓶口覆盖纱布以减小通气量。

\*\* 投料后取出 50 毫升。

### (三) 300 升罐的通气量与酶活力和转化的关系

在 300 升罐试验中，重点观察了通气量与酶活力和转化率的关系。验证了通气量是转化的关键条件。

测定酶活力，是在投料后不同时间取

出发酵液 5 毫升，加入 1—2 滴 1% 氯化三苯基四氮唑 (T.T.C) 水溶液，30℃ 保温，观察一分钟内发酵液是否变红，其变色快慢和深浅表示酶活力强度，若无呈色反应则表示无酶活性。同时测定转化力，计算转化率。

表3 通气量与酶活力转化效果

编 号	通 气 量 (V/V/分)	酶 活 测 定		转 化 率 (%)
		测 定 时 间 (投料后小时)	*酶活情况	
1	1:0.03	12	-	10
2	1:0.05	18	-	50
3	1:0.10	36	-	80
4	1:0.20	44	-	90
5	1:0.25—0.30	48	+	95

\* “-” 表示无酶活力。“+” 表示有酶活力

结果表明在 1:0.25—0.3 (V/V/分) 的通气量条件下，转化 48 小时仍保持酶活力此时适于出料。

### (四) 投料时间、溶媒浓度及投料浓度与转化力的关系

分别在培养 14 小时、18 小时、24 小时投入中间体、对转化率无明显区别。放大试验用乙醇作载体溶剂。乙醇浓度对中间体脱氢影响试验结果表明：乙醇浓度以

6—7% 为合适 (见表 4)。

投料浓度：筛选菌株时用万分之一浓度，做条件试验时将浓度提高至千分之一，最高达百分之一一点五浓度时也能达到转化要求。

### (五) 添加金属离子和青霉素 G 对转化率的影响

分别于发酵液中加入  $Fe^{++}$ 、 $Fe^{+++}$ 、 $Zn^{++}$ 、 $Mn^{++}$ 、 $Mg^{++}$ 、 $Cu^{++}$  等金属离子和青霉素 G 等，转化 72 小时后，比较脱氢情况，结果见表 5。结果表明， $Fe^{++}$ 、 $Fe^{+++}$  和  $Cu^{++}$  对脱氢有明显抑制作用，而  $Zn^{++}$ 、 $Mg^{++}$ 、 $Mn^{++}$  及青霉素对脱氢则都有促进作用。

表4 乙醇浓度与中间体的转化

编 号	乙醇浓度 (%)	转化情况 (%)
1	4	75
2	6	95
3	7	95
4	9	40
5	15	5

表5 金属离子、青霉素对脱氢的影响

编号	添加物	添加物浓度(克分子)	转化率(%)
1	Fe <sup>++</sup>	1×10 <sup>-4</sup>	80
2	Fe <sup>+++</sup>	1×10 <sup>-4</sup>	60
3	Fe <sup>+++</sup>	1×10 <sup>-1</sup>	75
4	Zn <sup>++</sup>	1×10 <sup>-4</sup>	97
5	Mn <sup>++</sup>	1×10 <sup>-1</sup>	94
6	Mg <sup>++</sup>	1×10 <sup>-1</sup>	95
7	Cu <sup>++</sup>	1×10 <sup>-1</sup>	80
8	青霉素G	30 ppm	97
9	不添加	—	90

### 三、产品的提取与鉴定

发酵终止后按以下方法提取:

#### 溶媒法

将发酵液用氯仿或乙酸乙酯按 1:1, 1:0.5 (V/V) 的比例抽提 3 次, 合并提取

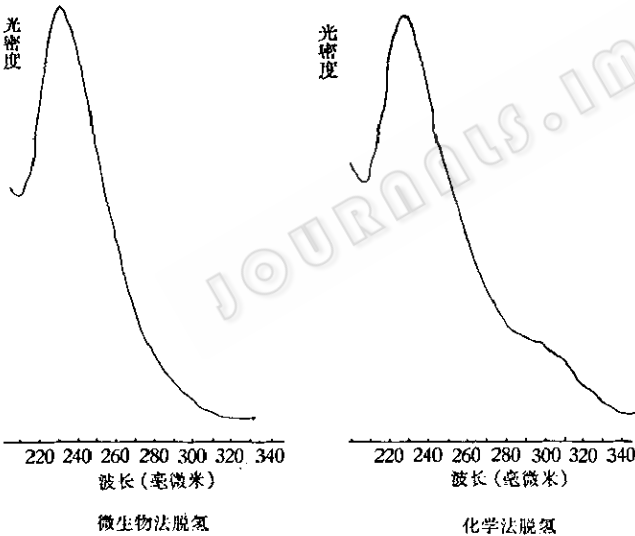


图4 紫外图谱

液, 以无水硫酸钠脱水、过滤、滤液浓缩近干, 用丙酮洗, 放置得粗品。用 5000 毫升三角瓶进行的 25 批试验平均收率达 77.7%。

#### 过滤法

将发酵液加热至 80℃, 过滤、滤饼用丙酮提取, 抽提液减压浓缩得粗品。用 5000 毫升三角瓶进行的 22 批试验平均收率 81.7%。所提取的粗品经精制或纯化得到纯品, 测定紫外吸收光谱(用 SP 600 型紫外分光光度计)及红外吸收光谱(用 SP 1200 型红外分光光度计), 与化学脱氢产品

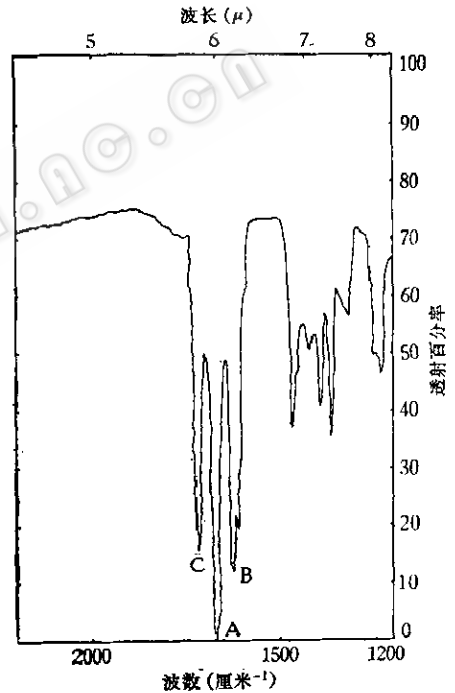


图5 红外图谱

培他美松——KB, A. 1650 B. 1610 C. 1700

17α-羟基-16β-甲基孕甾-1, 4, 9(11) 三烯-3, 20 二酮一致(图 4-1, 图 4-2)。

熔点: 168—170℃。

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +40 度(1% 乙醇)。

### 四、300 升罐试验

#### (一) 发酵培养基(%)

葡萄糖 0.6, 蛋白胨 0.3, 玉米浆 0.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.13, 调 pH 7.0, 过滤。消沫剂为硅油 284 p 0.07。

#### (二) 接种量

接种 15—20 只茄式瓶中培养的新鲜种子, 用无菌水洗入梨式瓶接入罐内。

#### (三) 温度

培养细菌用  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ , 投料后升温至  $31 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

#### (四) 投料时指标

当发酵液的透光度为  $40 \pm 2\%$ , pH 6.7—7.2 时, 加 T. T. C 溶液入发酵液中,  $30^\circ\text{C}$  保温 1 分钟显色, 镜检菌体整齐收缩, 无杂菌即可投料。

#### (五) 投料浓度

0.7—1%, 乙醇浓度 7%, 投料后加入青霉素浓度 30 ppm。

#### (六) 通气量

1:0.2—0.3 V/V/分。

#### (七) 转化时间

48—70 小时。

发酵达到所需转化率后, 加热发酵液至  $80^\circ\text{C}$  过滤, 滤饼用丙酮, 乙醇或甲醇抽提浓缩得粗品, 或直接进行提纯。

分析所得产品, 熔点、比旋度、紫外和红外吸收光谱等各项数据与化学脱氢产品完全一致, 达到药典标准。

表 6 300 升罐试验结果

编号	培养基装量(升)	投料量(克)	粗品量(克)	粗品收率(%)	纯化精制收率(%)
1	170/300	1190	1080	90.0	60
2	170/300	1200	1120	88.5	69.5
3	170/300	1200	1040	86.6	—

## 讨 论

我们利用  $17\alpha$ -羟基- $16\beta$  甲基孕甾-

4,9 (11) 二烯-3, 20-二酮为中间体。进行化学脱氢在研制培他美松时曾采用过二氧化硒、二氯二氟醌 (D、D、Q) 脱氢结果均不理想。采用二氧化硒, 在不同条件脱氢 21 位甲基亦会氧化, 致使收率仅为 35% 左右, 用 D、D、Q 脱氢, 结果  $\Delta^5$  与  $\Delta^{1,4}$  间有一平衡过程, 经分离后收率约为 50%, 增加 D、D、Q 配比、延长或调节 pH 值, 则均会产生  $\Delta^6$  化合物。因此, 化学脱氢法产率不高。试验用微生物法脱氢<sup>[8-10]</sup>、转化率达 85% 至 90%、收率在 90% 以上, 质量符合要求, 若经 1 次分离可得高纯度产品, 收率亦在 70% 以上。

## 参 考 资 料

- [1] 四川生物研究所: 微生物学通报, 1(4): 6—9, 1974。
- [2] 小沢光: 常用新药药理, 第 8 版, 1971。
- [3] Hart, F. D.: *Brit. J. Clinical Practice*, 14: 955, 1960。
- [4] Bork, K. H. et al.: U. S. Patent 3064015。
- [5] Taub, D. et al.: U. S. Patent 3053865。
- [6] Wendler, N. L. et al.: U. S. Patent 2973375。
- [7] Mannhardt, H. J. et al.: U. S. Patent 3074977。
- [8] Charney, W. et al.: *Microbiological Transformation of Steroids*, New York Academic Press, 1965。
- [9] Kondo, E. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7: 113—117, 1961。
- [10] Готовцева, В. А. и др.: *Микробиология*, 44 (6): 1010, 1975。

## STUDIES ON MICROBIAL DEHYDROGENATION OF BETAMETHASONE INTERMEDIATE $17\alpha$ -hydroxy- $16\beta$ -methyl-pregn-4, 9(11)-diene-3, 20-dione

Sichuan Institute of Biology

(Chengdu)

Shanghai Twelfth Medicinal Factory

(Shanghai)

Three Strains A<sub>69-1</sub>, A<sub>69-2</sub>, C<sub>1-1</sub> were selected from 47 strains that are capable of conversion methyltestosterone. Each screened strain possesses strong  $\Delta^1$ -dehydrogenating activity to the betamethasone intermediate  $17\alpha$ -hydroxy- $16\beta$ -methyl-pregn-4, 9(11)-diene-3, 20-dione.

Primary studies on transformation conditions of A<sub>69-1</sub> were carried out, Et

was found that medium, aeration, metal ion, concentration of ethanol and feeding of penicillin are closely effectual to microbial dehydrogenation. Further experiments proved a quantity of aeration in the key transformation process, which in a fermentor of 3001, the yield about 70%.