

制备 13 β -乙基-3-甲氧基-8, 14-开链-1,3,5(10), 9(11)-雌四烯-17 β -醇-14-酮的微生物学研究

法幼华 徐诗伟 马树恒

(中国科学院微生物研究所,北京)

张 莲 芳

(北京第三制药厂,北京)

调查了 10 属酵母共 104 株形成一种光学活性的 13 β -乙基-3-甲氧基-8, 14-开链-1, 3, 5(10), 9(11)-雌四烯-17 β -醇-14-酮的能力。发现酵母属酵母具较强的活性。啤酒酵母 AS2.346 是一株最好的菌,它能使底物几乎全部转化成产物。用这菌株研究了酵母细胞的培养和转化条件。在发酵过程中,观察到了“假结晶发酵”现象。在最适条件下, [葡萄糖 4—4.5% 和玉米浆 2—2.5%, 微酸性条件下培养的幼龄酵母细胞, 转化 pH 中性, 31 $^{\circ}$ C 并通气, 乙醇浓度不高于 3% (体积/体积)。] 产物收率达 85—90%。

在甾体激素中, 人们把天然雌激素的构型定为 D-构型, 凡与天然雌激素构型相同的激素都属 D-构型。经临床试验证明, 只有天然构型的甾体激素才具有生物活性。但用化学方法合成甾体化合物时, 往往只能得到消旋性的混合物, 即包括左右旋光的二种异构体, 其中之一是不需的, 必须通过化学技术进行分离, 理论上最高分离收率仅为 50%, 这在工业生产上是不经济的。

已经证明, 微生物具有对甾体转换作用的立体专一性。Schering AG 小组^[1,2] 在全合成甾体激素中, 第一个成功地利用微生物学的方法, 有选择地不对称还原一种非甾体化合物的某一碳原子, 得到了单一构型的具光学活性的化合物, 此化合物再通过化学环化作用, 就可以生成具光学活性的甾体化合物。之后, 又有不少类似的报道, 所用的微生物包括酵母、霉菌和细菌^[3-7]。

国内在全合成雌性激素炔雌醇中, 曾选得一株啤酒酵母 AS2.346, 能解决产物

的光学活性问题, 并在全合成光学活性 18-甲基炔诺酮中使用过^[8]。

本实验首先以全合成 18-甲基炔诺酮的一种中间体, 13 β -乙基-3-甲氧基-8, 14-开链-1, 3, 5(10), 9(11)-甾四烯-14, 17-二酮 (以下简称底物) 为原料, 比较了 104 株酵母菌不对称还原 17-酮为 17 β -醇生成 13 β -乙基-17 β -羟基-3-甲氧基-8, 14-开链-1, 3, 5(10), 9(11)-甾四烯-14-酮 (以下简称产物) 的能力。确证啤酒酵母 AS2.346 是一株活性很强的菌株。同时以此菌为材料, 试验了各种条件对其不对称还原能力的影响, 并简单介绍了 240 升罐发酵试验结果和产物的检定情况。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

属酵母共 104 株均由中国科学院微生物研究所菌种保藏组供给。

(二) 培养基组成

葡萄糖 5%, 玉米浆 2.5%, pH 4.5, 15 磅 20

本文于 1977 年 12 月 23 日收到。

分灭菌。

(三) 酵母菌的培养

200 毫升三角瓶装 20 毫升培养液, 接入酵母试管斜面一环, 于 28℃ 旋转式摇床(振幅 6 厘米, 转速 180 转/分)振荡培养 20 小时, 作为种液, 按 5% (体积) 接种同样组成的新鲜培养基, 在相同条件下培养 24 小时。

(四) 转化反应

转化反应条件同培养条件。初筛是在已生长好的酵母菌液内直接投加事先溶于乙醇的底物, 底物浓度为 0.2%。转化 72 小时。复筛和转化条件试验均是将生长好的酵母细胞通过离心收取, 按每 100 毫升自来水加 1 克含水约 80% 的鲜酵母制成细胞悬浮液, 细胞浓度为 1×10^8 /毫升, 然后同法投加底物, 底物浓度为 0.5%, 转化 48 小时。

(五) 分析方法

取转化后的发酵液, 用等量乙酸乙酯抽提一次, 取一定量进行薄板层析, 并以标准样品对照。薄板层析用上海萤光化学厂的硅胶 GF 制板, 于 100℃ 活化 1 小时。以苯: 丙酮(9:1)作展开剂。薄板在紫外光显影灯下观察出现的吸收斑点, 也

可用 5% 硫酸乙醇溶液喷洒后加热显色。根据斑点的 R_f 值以及面积大小, 颜色深浅, 初步确定有无转化能力及其强弱。转化率的测定是将紫外光显影灯下出现的斑点划出并刮下, 用 95% 乙醇洗脱, 于紫外分光光度计 267 毫微米处测定光密度, 按下式计算产物对底物的转化率。

$$\text{转化率}(\%) = \frac{\text{产物的光密度值}}{\text{底物的光密度值} + \text{产物的光密度值}} \times 100\%$$

(六) 产物的提取和检定

发酵液离心, 沉淀用乙酸乙醇或乙醇抽提 4—5 次, 提取液减压浓缩, 浓缩液冷却后固化, 用环己烷或石油醚: 乙酸乙酯(50:1)洗涤, 过滤, 烘干, 得产物结晶。必要时进一步精制, 最后测定产物的熔点、比旋值、紫外光谱、红外光谱及碳氢元素分析等各项理化性质。

结 果

(一) 酵母菌的不对称还原反应

底物经酵母一步不对称还原反应生成产物, 反应方程式如图 1

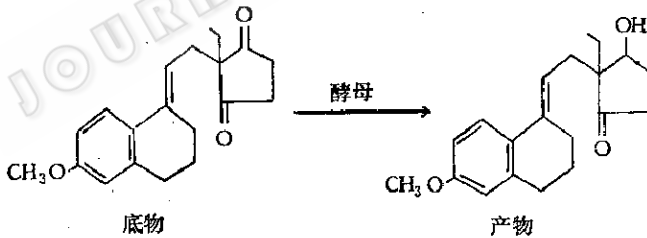


图 1 反应方程式

(二) 菌种筛选

筛选 10 属酵母菌共 104 株。初筛结果表明所有被测菌种均有转化底物的能力, 只是能力强弱不一。有些菌株还产生其它副产物。复筛时除去了转化力弱和产生副产物的菌株。经多次比较, 得到 13 株转化作用较强的菌, 其中除 2 株属德巴利酵母属 (*Debaryomyces*) 外, 其它 11 株均为酵母属 (*Sacchromyces*) 酵母。确证啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) AS2.346 是一株最好的菌。

(三) 结晶转化的观察

在转化过程中, 用显微镜连续观察发酵液, 可以看到从底物转化成产物的过程中, 有一结晶形状的变化过程。开始底物是不定型的小颗粒, 分散在溶液中。随着转化作用的继续, 底物不断减少, 同时却出现了六角形的柱状产物结晶。发酵终止时, 底物颗粒完全消失, 而成堆的产物结晶大量累积在发酵液中(图版 I-1, 2, 3)。

(四) 培养条件对酵母生长量及转化

能力的影响

1. 培养时间的影响

于酵母培养的不同时间取样测定细胞干物重, 结果表明, 随着培养时间的延长, 细胞量逐渐增加, 当培养到 40 小时, 细胞干物重可达 1 克/100 毫升。用不同培养期的酵母细胞进行转化, 结果表明, 幼龄细胞转化活性强(见图 2)。培养 32 小时后的细胞, 转化活性显著减弱。

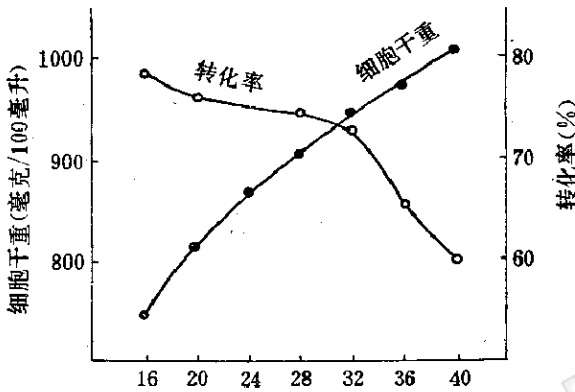


图 2 培养时间对酵母生长及其转化的影响

2. pH 的影响

酵母在不同 pH 的培养液内生长结果表明(见图 3), pH 4—6 范围内, 酵母细胞增长情况基本相同, pH 大于 6 时生长受抑制, 细胞量反而减少。不同 pH 培养液培养的细胞, 其转化活性不同, 培养液以 pH 4 时培养的细胞转化活性最强。

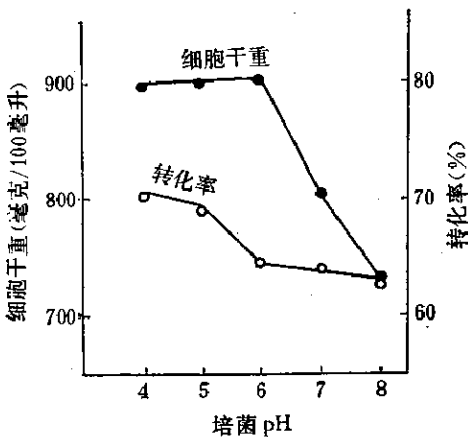


图 3 培养 pH 对酵母细胞生长及转化的影响

表 1 培养基中葡萄糖与玉米浆含量对酵母细胞量及转化率影响

葡萄糖 (%)	玉米浆 (%)	终 pH	细胞干重(毫克/100毫升)	转化率 (%)
4.0	2.0	4.6	736	72.9
5.0	2.0	4.6	744	68.6
6.0	2.0	4.6	766	53.3
5.0	2.0	4.6	744	68.6
5.0	2.5	4.8	806	64.9
5.0	3.0	5.1	864	22.3

3. 葡萄糖与玉米浆含量的影响

表 1 结果指出, 培养基内葡萄糖与玉米浆的含量会影响酵母细胞的生长量及其转化活性。当玉米浆含量为 2% 时, 葡萄糖浓度由 4% 增至 6%, 细胞量虽有增加, 但不明显。当把葡萄糖的浓度固定为 5%, 改变玉米浆浓度时, 发现玉米浆浓度愈高, 则酵母细胞量愈高, 但酵母细胞的生长量与其酶活性并不一致。玉米浆浓度高时虽可得到较大量的酵母细胞, 但所得酵母细胞转化活性却较低。采用浓度为葡萄糖 4—5% 和玉米浆 2—2.5% 组成的培养基培养酵母时, 对酵母细胞的生长及其转化活性都较为有利。

(五) 各种条件对酵母细胞转化底物的影响

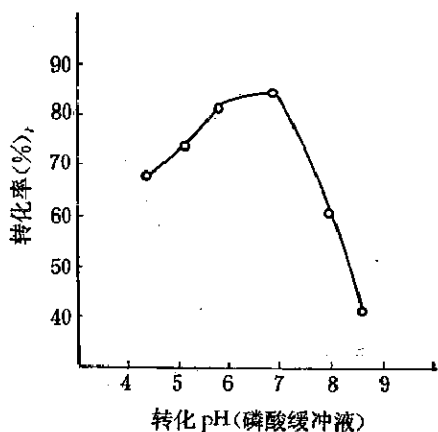
1. pH

以不同 pH 的磷酸缓冲液(0.1M)制备酵母细胞悬液进行转化, 结果表明, 转化的最适 pH 为微酸性到中性(5.5—7)。

另用不同 pH 的自来水配制细胞悬浮液进行转化。由于自来水没有缓冲作用, 转化液的起始 pH 偏高一些, 对转化是有利的, 可以加速转化作用(图 4a, b)。

2. 细胞浓度

改变转化时悬浮液中酵母细胞浓度, 转化速度将明显改变。图 5 列举三种细胞浓度转化结果, 说明浓度低转化慢。用相当于 1 克/100 毫升干物重的细胞浓度, 转



a

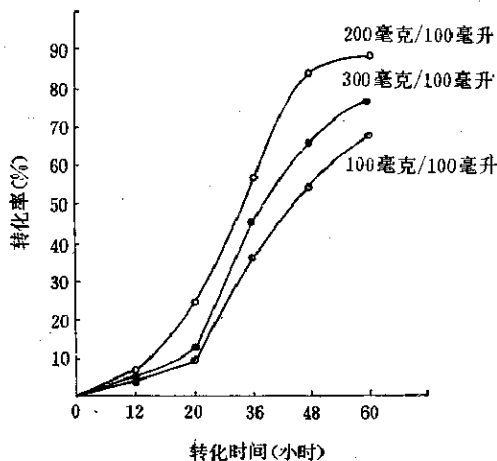
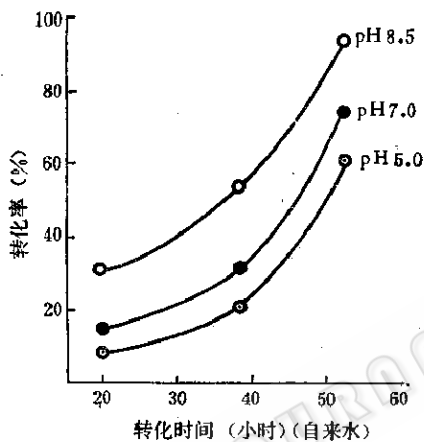


图5 细胞浓度对转化的影响



b

图4 pH对转化的影响

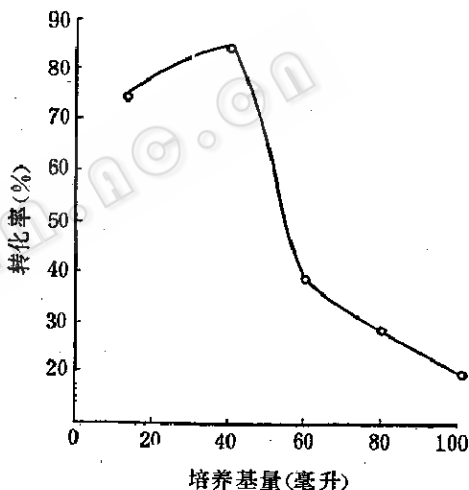


图6 通气量对转化的影响

化速度最快。但当把细胞浓度增至 1.5 克/100 毫升时, 转化速度反而变慢。这一现象将在后面讨论。

3. 通气量

于 200 毫升三角瓶内装不同体积的细胞悬浮液进行转化, 结果发现装量愈多转化愈差, 以装量 40 毫升的转化率最高(见图6)。说明通气量对转化作用影响明显。

4. 温度

在不同温度下转化结果表明, 转化最适温度为 31℃ 左右。温度超过 34℃ 时, 转化作用基本停止(图7)。

5. 底物和乙醇浓度

表 2 是底物和乙醇浓度对转化的影响

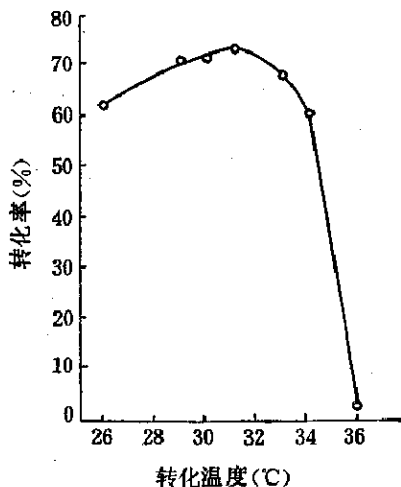


图7 温度对转化的影响

表2 底物和乙醇对转化的影响

组别	投料浓度 (%)	乙醇浓度 (%)	投料次数 (次)	转化时间 (小时)	转化率 (%)
A	0.5	0	1	48	0
	0.5	2	1	48	66.4
B	0.5	5	1	48	4.3
	0.5	5	2	48	65.3
C	1.2	6	1	96	1.3
	1.2	6	2	96	93.7
	1.2	6	3	96	92.1
D	1.2	6	3	72	86.0
	1.6	8	4	96	82.6
	2.0	10	5	120	86.2

试验结果,说明底物浓度在 2% 以内,不影响细胞的转化活性。在转化过程中,必须有乙醇存在,而高浓度的乙醇对微生物有毒害作用,如一次加入 5% 以上的乙醇会严重抑制转化,但如果把 5—6% 的乙醇分二次(间隔 4—5 小时)加入,即每次加入浓度为 3% 以下,就不影响酵母细胞的正常转化。

6. 各种添加物

转化时在细胞悬浮液中添加葡萄糖或各种盐类,试验证明,酵母的这一转化作用不需葡萄糖作为外来能源,大部分盐类浓度在 0.02% 以下对转化影响不大。但浓度 0.2% 时,除 Mo^{6+} 以外, Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 等对转化都有较明显的抑制作用。 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 则是此菌还原酶的强抑制剂(表 3)。

7. 收获细胞活性的保存

取于冰箱(4—10℃)保存不同时间的酵母细胞进行转化活性测定,结果,酵母细胞在冰箱存放 15 天,转化活性仍保持稳定(表 4)。

8. 转化作用全过程

于转化的不同时间取样测定,转化过程中 pH 及转化率的变化见图 8。图 8 说明,转化率在 48 小时之前呈直线上升,延

表3 各种添加物对酵母转化的影响

添加物	浓度 (%)	转化率 (%)
不加		75.0
葡萄糖	0.5	73.8
NaCl	0.9	73.6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	73.4
	0.2	52.9
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	74.8
	0.2	30.7
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	69.9
	0.2	6.7
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	78.2
	0.2	42.2
$\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	0.02	0
	0.2	0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02	0
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02	78.2
	0.2	73.6
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02	76.0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02	75.5
CaCl_2	0.02	76.3

表4 酵母细胞转化活性保存试验

存放时间(天)	转化率 (%)
1	80.3
4	74.6
7	76.4
11	73.4
15	79.1

续到 96 小时,转化前期 pH 迅速下降。当转化接近终止时, pH 又趋向回升。

(六) 罐发酵试验和产物的理化检定

于 240 升发酵罐进行培菌和转化试验。为防止产生泡沫,培菌时添加 0.03% 泡敌作为消泡剂。采用二级种子接种,培养 14—16 小时后,离心收取酵母细胞,用自来水制成细胞悬浮液,调 pH 至中性。然后将事先溶于乙醇的甾体底物分四次加入,总投料浓度为 1%。共进行四批罐发酵,转化率平均为 96%,最高达 98.4%。转

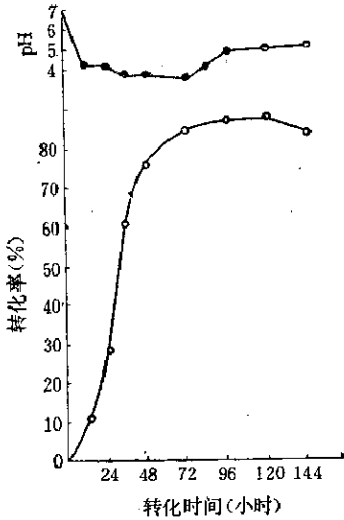


图 8 转化作用全过程

化过程中,转化率和 pH 变化情况与摇瓶结果完全一致,但罐发酵比摇瓶速度快。产物重量收率为 85—90%,纯度为 95—97.5%。产物结晶用乙酸乙酯:石油醚(2:1)重结晶,其熔点范围在 91—91.2℃。比旋值为 $[\alpha]_D^{18} = +15^\circ (C=1, \text{二氧六环})$ 。紫外测定用乙醇作溶剂,测得最大吸收峰为 267 毫微米,克分子消光系数为 20400。红外分析以氯仿作溶剂,测定波数范围在 650—3650 厘米⁻¹时,解析结果为 1490, 1520(苯基), 1630[9(11)-双键], 1760(14-酮基), 3550(17-羟基)。碳氢元素分析,理论值: C 76.45, H 8.33; 测定值: C 77.06, H 8.47。

讨 论

利用微生物的不对称还原作用在全合成制备甾体激素中解决了化合物的光学活性问题。我们在用不同属酵母转化底物为产物的试验中,证明酵母属酵母的转化能力较强,其中啤酒酵母 AS2.346 是一株立体专一性很强的菌株,它能使底物几乎全部

转化成产物。没有出现用葡萄汁酵母 (*Saccharomyces uvarum*) 转化所形成的 14 α -羟基-17-酮基衍生物等副产物^[9]。

底物在鲜酵母自来水悬浮液中转化,不需添加任何外来能源。可根据要求随时调节 pH, 不易污染。鲜酵母还可冷藏贮备,使用方便。

Kondo^[20] 用简单节杆菌转化氧化可的松为 Δ^1 -脱氢衍生物时,根据一种特异的“假结晶发酵”现象,直接投加粉碎了的固体物质进行转化,避免了有机溶剂对微生物的毒害作用,从而使投料浓度提高到 5%。本试验所用酵母,在转化底物形成产物的发酵中,也存在同样的“假结晶发酵”现象。但转化过程中必须有乙醇存在,这和 Szenfirmri 的结果一致^[9]。乙醇在转化中是否起诱导剂作用,尚待实验证明。由于绝大部分产物能随酵母细胞一起通过离心收集,因而发酵液离心后弃去上清液损失微小。这样既减少了提取用溶媒的消耗,又便利了提取工艺。另外,这种转化现象还减少了产物对微生物的抑制毒性,所以进一步提高投料浓度将是有可能的。乙醇的抑制作用可以通过分次投料来克服。

试验说明,在培菌阶段必须注意不但要使酵母生长好,也要考虑到细胞能有高的酶活性。增加细胞浓度可以加速转化。但过多的细胞为什么不相应地加速转化速度? 原因可能是这种转化作用是需氧的,大量的细胞呼吸作用消耗了有限的氧,从而影响了转化。通气量的试验结果证实了这一关系。这一结果与 Гуляя 等^[21] 的结果相反。控制转化条件,如 pH、温度、通气量等,不但可以使转化完全而且速度加快。对提高收率和缩短发酵周期都是有利的。

参 考 文 献

- [1] Gibian, H., K. Kieslich, and H. J. Koch, et al.: *Teranedrom Letter*, **21**, 2321, 1966.
- [2] Rufer, C., H. Kosmol, E. Schroder, and K. Kieslich, et al.: *Ann. Chem.*, **702**: 141—148, 1967.
- [3] Campillo, C. C.: *MX. Pat.*, 91013, 1968.
- [4] Takeda: *Chem. Ind. Ltd., ND. Pat.*, 6810, 400, 1969.
- [5] Searle, G. D. and Co.: *US. Pat.*, 3481, 974, 1969.
- [6] Narberth, G. G. and G. C. Buzby: *US. Pat.*, 3549, 499, 1970.
- [7] Buzby, G. C., G. G. Narberth and E. L. Buhle: *US. Pat.*, 3697, 379, 1972.
- [8] 中国科学院上海有机化学研究所甾族激素组: *化学通报*, **5**: 23—25, 1976.
- [9] Szentirmai, A., Z. Szelezcky and E. Tomorkeny: *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **22** (4): 463—470, 1975.
- [10] Kondo, F. and E. Masuo: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7** (2): 113—117, 1961.
- [11] Гуляя, В. Е., Е. Г. крютгенко, Н. Н. Пат-тэнь, И ПР.: *прик. Биох. Микобиология* **11** (5): 657—661, 1975.

STUDIES ON THE MICROBIOLOGICAL PREPARATION OF 13 β ETHYL-3-METHOXY-8, 14-SECO-1, 3, 5(10), 9(11)- ESTRATETRAENE-17 β -OL, 14-ONE

Fa You-hua, Xu Shi-wei and Ma Shu-heng
(*The Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Zhang Lian-fang
(*Beijing Third Medicinal Factory, Beijing*)

The capability of producing optically active 13 β -ethyl-3-methoxy-8, 14-seco-1, 3, 5(10), 9(11)-estratetraene-17 β -ol, 14-one in 104 strains of yeast belonging to 10 genera were examined. Among them, *Sacchromyces* was found to be preferable to others. *S. cerevisiae* strain As 2.346 was shown to be most effective and it could convert the substrate to product almost completely. The culture and fermentation conditions of *S. cerevi-*

siae strain As 2.346 were studied. During the fermentation process, a "pseudo-crystallo-fermentation phenomenon" was observed. In optimum conditions [the young yeast cells were cultured on a weak acid medium containing 4—4.5% glucose and 2—2.5% corn extract, at neutral pH and 31°C with aeration and EtOH feed concentration not more than 3% (vol/vol)], the yield of the product of this strain was 85—90 per cent.