

A 环饱和甾体的微生物转化作用

I. 用 17 α -甲基表雄醇制备去氢 17 α -甲基睾丸素

法幼华 徐诗伟

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文比较了诺卡氏菌 (*Nocardia*) 和节杆菌 (*Arthrobacter*) 两属共 62 株菌株对 17 α -甲基表雄醇 (I) 和 17 α -甲基睾丸素 (III) 的脱氢能力, 以找出生产去氢 17 α -甲基睾丸素 (IV) 的菌种。根据这些微生物的脱氢特点, 它们的转化作用可以分以下四种类型:

(1) I $\xrightarrow{\times}$ III $\xrightarrow{\times}$ IV (2) I \longrightarrow III \longrightarrow IV (3) I \longrightarrow III $\xrightarrow{\times}$ IV (4) I $\xrightarrow{\times}$ III \longrightarrow IV

从第二种转化类型的微生物中选到一株能彻底氧化 (I) 的节杆菌 9-2。在它的培养基质中加硫酸钴可抑制去氢 17 α -甲基睾丸素 (IV) 的降解, 从而使产物 (IV) 大量积累。

脱氢的最适 pH 为 6, 溶解甾体底物用的乙醇浓度为 2%。在此条件下, 去氢 17 α -甲基睾丸素 (IV) 的转化率超过 85%。

去氢 17 α -甲基睾丸素 (Dehydro-17 α -methyl-testosterone) 又称大力补 (Dianabol) 是一种蛋白同化激素, 有促进人体氮代谢, 增加蛋白质合成的作用。它比 17 α -甲基睾丸素 (17 α -methyl-testosterone) 同化效应强, 雄性化副作用小^[1]。近年来还报道对治疗再生障碍性贫血有较好的疗效^[2]。

目前已有不少关于用微生物法在 17 α -甲基睾丸素的 A 环上引入 C₁ 双键生成去氢 17 α -甲基睾丸素的报道^[3-8]。能引起这一反应的微生物种类很多, 其中有些菌还能在 A 环饱和的甾体中引入 Δ^1 和 Δ^4 双键^[9, 10]。Büki 等比较了一株局限诺卡氏菌 (*Nocardia restrictus*) 和一株草分枝杆菌 (*Mycobacterium phlei*) 对各种 17 α -甲基-17 β -羟基-雄甾烷类甾体的转化作用^[11]。Protiva 等的试验结果表明不同的微生物按不同的代谢途径转化 17 α -甲基-17 β -羟基-5 α -雄甾烷-3-酮^[12]。

本文比较了诺卡氏菌和节杆菌两属微生物共 62 株菌在甾体 A 环的 C₁ 和 C₄ 位脱氢能力, 并对氧化力很强的节杆菌 9-2

菌株转化 17 α -甲基表雄醇累积去氢 17 α -甲基睾丸素的条件进行了研究。

材料和方法

(一) 试验菌

由我所细菌和放线菌分类组提供。

(二) 甾体

17 α -甲基表雄醇 (I) 和氢化 17 α -甲基睾丸素 (II) 由南宁第二制药厂提供; 17 α -甲基睾丸素 (III) 由上海第十二制药厂提供; 去氢 17 α -甲基睾丸素 (IV) 由四川生物研究所提供。

(三) 培养基 (%)

葡萄糖 1, 玉米浆 2, K₂HPO₄·3H₂O 0.1, 自来水配制, 用 NaOH 溶液调至 pH 7.2, 每 200 毫升摇瓶装 40 毫升培养基, 15 磅 20 分灭菌。

(四) 培养

取在肉汁斜面上已生长好的培养物接种摇瓶, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 小时作为种液, 按 5% 的接种量 (体积比) 接种到新鲜培养基上, 在相同的条件下培养。

(五) 转化

甾体 A 环脱氢能力的比较试验, 是在已培养

本文于 1979 年 4 月 12 日收到。

24 小时的菌液内投加 4% 的甾体乙醇溶液 0.5 毫升,在同样的条件下继续转化 12 小时。在累积去氢 17 α -甲基甾丸素 (IV) 的条件试验中,底物的投加浓度增加一倍,并加 5% 硫酸钴 ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 水溶液 0.4 毫升,抑制甾核的降解。一般转化 40 小时。

(六) 分析方法

1. 定性分析:用等量乙酸乙酯抽提转化后的发酵液,取 50 微升于薄板点样层析,并以已知样品作为对照,薄板用硅胶 G_{125} 铺板,100℃ 活化 1 小时后使用。用乙酸乙酯:环己烷 (1:1) 溶剂系统展开,展开后晾干,于紫外检示灯下可观察到具有不同 R_f 值的 17 α -甲基甾丸素 (III) 和去氢 17 α -甲基甾丸素 (IV) 的吸收斑点,轻轻标出后再用 3% 磷钼酸乙醇溶液喷雾并加热显色,除了 (III) 显蓝紫色外,其它甾体均显蓝色。

2. 定量分析^[11]:取 40 微升抽提液置于 5 毫升比色管内,蒸发除去酯,加入 5 毫升 95% 乙醇,摇匀,分别于 244 毫微米和 265 毫微米波长处测定光密度值 (D),按下式计算 (III) 和 (IV) 的总转化率 (T):

$$T^{\Delta' + \Delta''}(\%) = \frac{97.5 \times D_{244} \text{ 毫微米}}{W} \times 100\% \quad (1)$$

式中 Δ' 、 Δ'' 分别表示 (III) 和 (IV); W 为 40 微升样品中投加底物的微克量;97.5 为 (IV) 标准曲线的斜率倒数。

其中 Δ' 和 Δ'' 各占的百分比,可由 265 毫微米和 244 毫微米波长处的吸收比求出,计算式如下:

$$\Delta''(\%) = 231x - 33.1 \quad (2)$$

$$\Delta'(\%) = 100 - \Delta'' \quad (3)$$

式中 x 为吸收比,231 和 33.1 分别是吸收比标准曲线的斜率和截距。

(IV) 的转化率

$$T^{\Delta''}(\%) = T^{\Delta' + \Delta''} \times \Delta'' \times 100\% \quad (4)$$

(III) 的转化率

$$T^{\Delta'}(\%) = T^{\Delta' + \Delta''} - T^{\Delta''} \quad (5)$$

(七) 产物的提取和鉴定

发酵液用两倍体积乙酸乙酯分三次抽提,抽提液合并,减压浓缩,浓缩液冷却后固化析出结晶,粗产物用丙酮-乙醚重结晶。最后产物经薄层层析、熔点、比旋值、紫外光谱、红外光谱和碳

氢元素分析等各项物化性质的鉴定。

实验结果

(一) 诺卡氏菌和节杆菌转化甾体的能力

测定了两属微生物共 62 株菌转化 17 α -甲基表雄醇(I)和 17 α -甲基甾丸素(III)的能力,根据这些菌对底物脱氢能力的不同,可将它们分为四种类型。

第一类微生物没有脱氢能力,底物于发酵后不发生任何变化。第二类微生物能在 C_{11} 和 C_{14} 位上导入双键并能彻底降解这两种甾体底物,转化的中间体主要是去氢 17 α -甲基甾丸素 (IV)。在转化 (I) 的早期,可测得较多量的 (III)。第三类微生物主要累积中间体 (III) 但也能彻底降解所生成的脱氢产物。第四类微生物不能转化 (I),而能使 (III) 脱氢生成 (IV)。下列各式分别表示这四类微生物转化 (I) 和 (III) 的能力。

第一类: $\text{I} \not\rightarrow \text{III} \not\rightarrow \text{IV}$

第二类: $\text{I} \rightarrow \text{III} \rightarrow \text{IV}$

第三类: $\text{I} \rightarrow \text{III} \not\rightarrow \text{IV}$

第四类: $\text{I} \not\rightarrow \text{III} \rightarrow \text{IV}$

根据薄层层析的结果还表明,第二和第三类微生物在转化底物 (I) 生成 (III) 或 (IV) 之前,底物的 3 β -羟基首先被氧化成 3-酮基,但对 (I) 没有活性的第一和第四类微生物,也不能使这种 3-酮基甾体起脱氢作用。

(二) 节杆菌 9-2 的代谢途径

从第二种转化类型的微生物中,选到一株降解 17 α -甲基表雄醇 (I) 能力很强的节杆菌 9-2 菌株。这株菌在适宜的条件下,转化 20 小时后发酵液中就测不到任何甾体物质 (图 1)。转化过程的分析表明,转化的中间体有氢化 17 α -甲基甾丸素 (II), 17 α -甲基甾丸素 (III) 和去氢 17 α -甲基甾

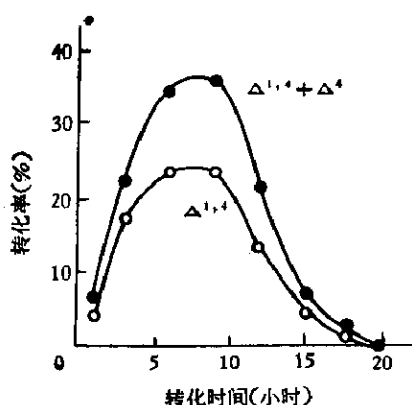


图1 转化过程(不加硫酸钴)

丸素(IV)。早期(III)和(IV)生成量的比例较小,以后逐渐增大。由于所形成的(IV)又不断被进一步降解,所以不能大量累积下来。根据这些结果可以认为它的代谢途径是按图2顺序进行的。

(三) 抑制剂对代谢产物降解作用的影响

比较了八种化合物对抑制代谢产物降解,累积去氢 17 α -甲基甾丸素(IV)的效

果。表1表明抑制剂对抑制产物的降解作用决定于化合物的种类及其使用浓度。在试验的几种化合物中,硫酸钴的效果最好。它既不影响微生物的脱氢活性,又能有效地抑制(IV)的进一步降解,因而(IV)在发酵液中大量地累积下来。图3还表明随着硫酸钴浓度的增加,所生成的代谢产物(IV)越来越稳定,但浓度太高会使转化速度减慢。在本试验的条件下,硫酸钴的添加浓度应不低于万分之五。

(四) 乙醇对转化的影响

图4的结果表明,节杆菌9-2能直接转化粉末状甾体底物。但用这种投料方式,甾体的颗粒度较大,所以总转化率仅38%。预先用2%的乙醇(体积/体积)使甾体溶解后投加,总转化率可以提高到90%以上,但乙醇浓度不能太高,否则会给微生物本身带来毒害作用。此外乙醇对这株菌所含两种脱氢酶(C₁和C₄)活性的影响相同,不论乙醇的浓度有何变化,(IV)和(III)

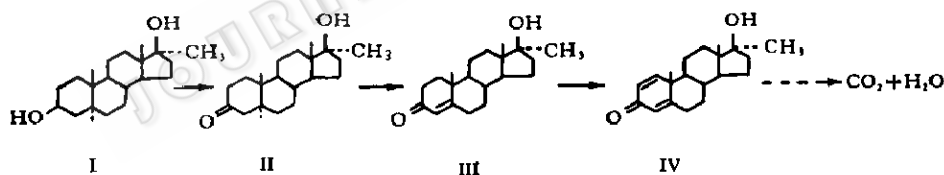


图2 代谢途径

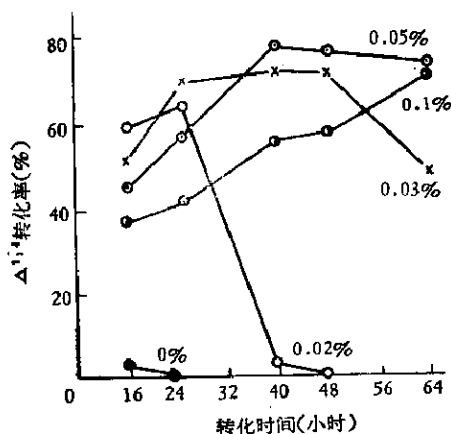


图3 硫酸钴浓度对转化的影响

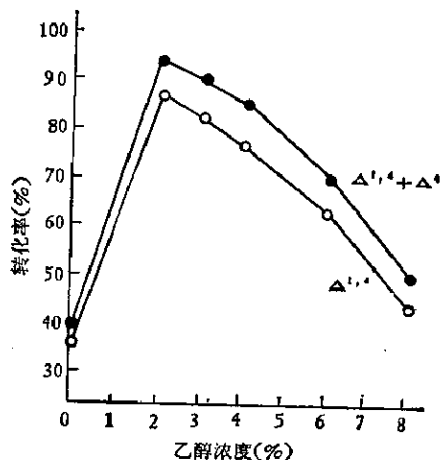


图4 乙醇浓度对转化的影响

表 1 各种抑制剂对转化的影响

抑制剂	浓度 (%)	转化率(%)		$\Delta^{1,4}/\Delta^4$	剩余底物
		$\Delta^{1,4}+\Delta^4$	$\Delta^{1,4}$		
α,α' -联吡啶	0.03	7.8	7.8		—
	0.05	5.9	5.9		—
邻菲绕啉	0.03	32.7	15.9	0.9	+
	0.05	32.2	13.3	0.7	+
8-羟基喹啉	0.03	48.8	39.8	4.4	+
	0.05	53.0	43.6	4.6	+
$\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03	83.0	71.8	6.4	—
	0.05	87.2	77.6	8.1	—
$\text{NiSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	0	0		—
	0.10	69.2	53.4	3.4	—
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05	0	0		—
	0.10	0	0		—
SbCl_3	0.01	62.5	53.6	6.0	+
	0.03	56.9	48.0	5.4	+
次甲基蓝	0.005	28.3	26.3	13.2	+
	0.01	33.9	31.2	11.5	+
不加		0	0		—

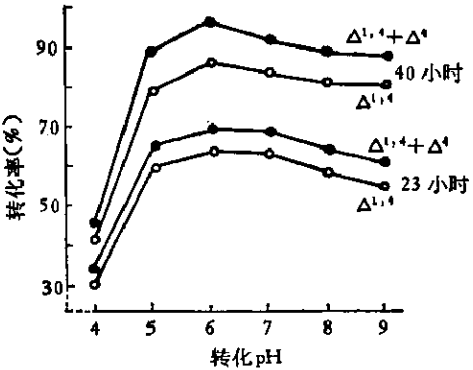


图 5 pH 对转化的影响

(C=C) 厘米⁻¹; 碳氢元素分析: C₂₀H₂₈O₂ (分子量 300.42), 理论值: C79.95; H9.39; 测定值: C79.60; H9.37。

讨 论

根据诺卡氏菌和节杆菌两属菌对甾体 A 环脱氢能力的差异, 将这些微生物分为四类。这与各类微生物所含的酶系及代谢途径不同有关。第一类微生物没有脱氢能力, 说明它们不含所需要的脱氢酶。第二、三类微生物虽都能彻底分解 17 α -甲基表雄醇 (I), 但两者的代谢途径不同, 前者先脱去 C₄ 位上的氢, 再脱去 C₁ 位上的氢, (III) 是其中的中间体, 由 (III) 生成 (IV) 后再进一步降解; 后者在 C₄ 位脱氢后生成的 (III) 不由 (IV) 降解。第四类微生物只能使 C₄ 具双键的甾体脱氢, 而不能使 A 环饱和的甾体脱去 C₁ 位的氢, 所以不能转化 (I), 说明这类微生物只有 C₁ 脱氢酶, 而且这种酶对底物的结构有一定的要求。

所有的转化产物都可被继续降解成 CO₂ 和 H₂O。已知 9 α -羟化酶是引起甾核破裂的关键酶^[4,7], 可以通过化学改造甾体结构和选择性破坏这一酶系的方法, 或采用变异菌株等手段来防止这一作用的发生^[25-29]。我们用硫酸钴作为抑制剂取得了

的生成量总是按相同的比例变化。
(五) pH 对转化的影响
转化前先将已培养好的菌液用盐酸和氢氧化钠分别调到 pH4—9, 转化结果表明, 节杆菌 9-2 脱氢酶的最适 pH 为 6 左右, 但偏碱性条件比偏酸性对转化有利。同乙醇的作用一样, 不同的 pH 只影响转化速度, 并不改变两种脱氢酶的脱氢比例 (图 5)。

(六) 产物的物化性质
从发酵液中得到的粗产物, 薄层层析分析表明主要是去氢 17 α -甲基甾丸素 (IV)。粗结晶物经丙酮-乙醚重结晶, 可以得到纯 (IV), 熔点范围 162—164℃; 比旋值 $[\alpha]_D^{25} = 0$ (C = 1.1, 氯仿); 紫外最大吸收峰为 245 毫微米 (乙醇), 克分子消光系数为 15450; 红外光谱 (KBr) 解析结果为 3440 (—OH), 1660 (C=O), 1615, 1590

很好的效果。最后在转化发酵液中累积了大量的去氢 17 α -甲基睾丸素 (IV)。

此外, 节杆菌 9-2 的 C₁ 和 C₄ 两种脱氢酶, 对乙醇和 pH 的反应没有差别。不论乙醇浓度和发酵液的 pH 如何变化, (III) 和 (IV) 的生成量均按相同的比例变化。它们的最适 pH 都是 6, 与睾酮假单胞杆菌 (*Pseudomonas testosterone*)^[20], 简单节杆菌 (*A. simplex*)^[21] 和局限诺卡氏菌^[22] 不同。但总的看来, 都是碱性比酸性条件对脱氢有利。

参 考 文 献

- [1] Bradshaw, J. A. et al.: *J. Surg.*, 99(4): 600—607, 1960.
- [2] Shahidi, N. T.: *New Engl. J. Med.*, 289(2): 72—80, 1973.
- [3] Vischer, E. et al.: *Helv. Chim. Acta*, (fasc. 6): 1502—1507, 1955.
- [4] Bremer, O. L. and Henning, O. B. Loreck: *Brit.* 917,081, 1963.
- [5] Ахрем, А. А. и др.: *Изв. Акад. Наук СССР. Серия Химич.* (11) 2625—2626, 1969.
- [6] Wieslawski, K. et al.: *Pol.*, 56,331, 1968.
- [7] Ахрем, А. А. и Н. Е. Войшвилло: *Прикл. Биохим и микробиол.*, 6(6):654—659, 1970.
- [8] 四川省生物研究所大力补组: *微生物学通报*, 1(4):6—9, 1974.
- [9] Stoudt, T. H. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 74(1): 280—281, 1958.
- [10] Kluepfel, D. and C. Coronelli: *Experimentia*, 48(10): 441—442, 1962.
- [11] Böki, K. G. et al.: *Acta Microbial Acad. Sci. Hung.*, 16(3): 253—259, 1969.
- [12] Protiva, J. and V. Schwarz: *Folia Microbiol.*, 15(5): 318—324, 1970.
- [13] Ivashkiv, E.: *Biotech. Bioeng.*, 13(4): 561—567, 1971.
- [14] Dodson, R. M. and R. D. Muir: *J.A.C.S.*, 80(18): 5004—5005, 1958.
- [15] Sih, C. J.: *Biochem. Biophys. Acta*, 62: 541—547, 1962.
- [16] Sih, C. J. et al.: *J.A.C.S.*, 87(12): 2765—2766, 1965.
- [17] Wix, G. et al.: *Steroids* 11(3): 401—413, 1968.
- [18] Nagasawa M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 34(6): 838—844, 1970.
- [19] Marshech, W. J. et al.: *Appl. Microbiol.*, 23(1): 72—77, 1972.
- [20] Levy, H. R. and P. Talalay: *J. Biol. Chem.*, 234(8): 2014—2021, 1959.
- [21] Knodo, E.: *Agr. Biol. Chem.*, 27(1): 69—70, 1963.
- [22] Sih, C. J. and R. E. Bennett: *Biochem. Biophys. Acta*, 56(3): 584—592, 1962.

THE MICROBIAL DEHYDROGENATION OF RING-A SATURATED STEROIDS

I. PREPARATION OF DEHYDRO-17 α -METHYL-TESTOSTERONE FROM 17 α -METHYL-ANDROSTANE-3 β , 17 β -DIOL

Fa You-hua Xu Shi-wei

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

In this study, the dehydrogenation abilities of sixty two strains of microorganisms (belonging to the genera *Nocardia* and *Arthrobacter*) on 17 α -methyl-5 α -androstane-3 β , 17 β -diol (I) and 17 α -methyl-testosterone (III) were compared. Results showed that on the basis of the characteristics of dehydrogenation in these microorganisms, four patterns of microbial transformation were identified:

- (1) I \nrightarrow III \nrightarrow IV
- (2) I \rightarrow III \rightarrow IV
- (3) I \rightarrow III \nrightarrow IV
- (4) I \nrightarrow III \rightarrow IV

An *Arthrobacter* 9-2 strain which can oxidize (I) completely was selected from the second pattern of microbial transformation. Addition of CoSO₄ in its cultural medium inhibited the degradation of dehydro-17 α -methyl-testosterone (IV), so that the product was greatly accumulated.

The optimal pH of dehydrogenation was about 6, and the optimal concentration of ethanol used to dissolve the substrate was 2%. Under these conditions, the transformation rate of the dehydro-17 α -methyl-testosterone (IV) was over 85%.