

# 转化 $5\alpha$ -娠烷- $3\beta$ , $17\alpha$ -二羟基-20-酮-21-醋酸酯为氢化可的松

## 诺卡氏菌 62-1 菌株和蓝色梨头霉 AS3.65 的协同转化

法幼华 马树恒 苏起恒 黄淑惠

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文研究了诺卡氏菌 (*Nocardia*) 62-1 菌株和蓝色梨头霉 (*Absidia coerulea*) AS3.65 在一起, 转化  $5\alpha$ -娠烷- $3\beta$ ,  $17\alpha$ -二羟基-20-酮-21-醋酸酯一步生成氢化可的松的协同转化作用。由于诺卡氏菌 62-1 菌株的水解酶活性弱,  $\Delta^1$ -脱氢酶的活性强, 所以在单独转化中形成 RSA, RS 和  $\Delta^1$ -RS 等多种产物, 但蓝色梨头霉有很强的水解酶活性并具  $11\beta$ -羟化酶, 所以在和诺卡氏菌的协同转化中, 只测到少量 RSA 和微量不测得的  $\Delta^1$ -RS, 生成的主要中间产物是 RS, 它紧接着进一步转化成氢化可的松, 这是一种理想的转化方法。

氢化可的松 (Hydrocortisone) 是国内外需求量较大的一种肾上腺皮质激素药物, 过去均采用薯蓣皂素 (Diosgenin) 为原料制备, 近年来由于原料供应不足。为此, 寻找代用品和开发原料新资源已成为各国研究的目标<sup>[1-6]</sup>。

我国南方盛产剑麻, 其叶脉纤维能制绳索, 是一种重要的经济作物, 在制麻工业去纤维后的废叶汁中, 经提取水解可得到大量与薯蓣皂素结构相类似的剑麻皂素, 主要为梯柯吉宁 (Tigogenin) 和海柯吉宁 (Hecogenin) 等<sup>[7-10]</sup>。如能利用这些物质生产氢化可的松与各种甾体激素药物, 不仅能解决甾体激素药物生产的原料缺乏问题, 而且将使农副产品得到综合利用。

我们用来自梯柯吉宁的中间体,  $5\alpha$ -娠烷- $3\beta$ ,  $17\alpha$ -二羟基-20-酮-21-醋酸酯为底物, 通过微生物转化法制备氢化可的松。在这一转化中, 由于所用底物的甾核是饱和的, 所以要求微生物既能实施  $C_4$ -位脱氢又能导入  $11\beta$ -羟基的反应, 与此同时又能

改变甾体 A 环的 3 位羟基为酮基并水解掉  $C_{21}$ -位上的醋酸酯。过去在用薯蓣皂素为原料制备氢化可的松的研究中, 已经选到一株  $11\beta$ -羟化菌。本工作的目的是筛选一株脱氢菌, 并研究该菌株与  $11\beta$ -羟化菌协同转化, 一次完成由底物到产物的各步反应, 最终生成氢化可的松的转化作用。

## 材料与方法

### (一) 菌种

蓝色梨头霉 (*Absidia coerulea*) AS3.65。

细菌 [包括诺卡氏菌 (*Nocardia*)] 由我所细菌及放线菌组提供。

### (二) 甾体化合物

$5\alpha$ -娠烷  $3\beta$ ,  $17\alpha$ -二羟基-20-酮-21-醋酸酯, 由南宁第二制药厂提供 (简称底物)

氢化可的松 (简称产物)

Reichstein's 化合物 S-21-醋酸酯 (简称 RSA)

Reichstein's 化合物 S (简称 RS)

$\Delta^1$ -Reichstein's 化合物 S (简称  $\Delta^1$ -RS)

本文于 1980 年 4 月 28 日收到。

### (三) 培养基

1. 细菌用培养基组成(%): 葡萄糖 1, 玉米浆 2,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.1 自来水配制, 用 NaOH 溶液调至 pH7.2, 250 毫升三角瓶装 50 毫升, 15 磅 20 分灭菌。

2. 梨头霉用培养基组成(%): 葡萄糖 2, 玉米浆 2,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.2, 自来水配制, 用 NaOH 溶液调至 pH6.2, 500 毫升三角瓶装 100 毫升, 15 磅 20 分钟灭菌。

### (四) 微生物的培养及菌体的收获

1. 细菌: 取在牛肉汁斜面上已生长好的培养物接种到细菌培养基内, 30℃ 振荡培养 24 小时作为种液, 按 5% 的接种量(体积比)接种新鲜培养基, 培养 30 小时, 菌液经 3000 转/分离心 20 分钟, 倾除上清液, 收集菌体细胞备用。

2. 梨头霉: 将已生长好的培养物用无菌水制孢子悬浮液接种到霉菌用培养基内, 30℃ 振荡培养 32 小时, 双层纱布过滤, 收取菌丝后用自来水充分洗涤, 压除水份得湿菌体(含水量约 76%)备用。

### (五) 转化

将细菌的菌体细胞用 pH6.0, 0.2M 的磷酸缓冲液配制成光密度约 0.9 左右的菌悬液 20 毫升, 添加 1% 底物的乙醇溶液 0.8 毫升, 同时加入 0.6 克梨头霉湿菌体, 摇床 30℃ 振荡转化 24 小时。

### (六) 分析方法

1. 定性分析: 20 毫升转化后的转化液用 6 毫升乙酸乙酯提取, 取 100 微升提取液于薄板点样层析, 并以已知样品对照, 薄板用硅胶 GF<sub>254</sub> 铺板, 100℃ 活化 1 小时后使用, 用氯仿: 无水乙醇 (92:8) 溶剂系统展开, 结束后晾干, 于波长 254 毫微米的紫外检示灯下观察出现的吸收斑点, 并用 0.15% 的 2, 4-二硝基苯酚乙醇溶液喷雾显色。

2. 定量分析: 同定性时所用的方法提取并薄层层析, 将紫外检示灯下观察到的氢化可的松, RSA、RS 和  $\Delta^1$ -RS 等化合物的斑点轻轻标出, 然后分别刮下, 置比色管中加 5 毫升 95% 的乙醇, 振摇 1 分钟后, 3,000 转/分离心 10 分钟, 取清液于紫外分光光度计 242 毫微米波长处测定光密度值。

## 结果与讨论

### (一) C<sub>4</sub>-脱氢菌的筛选

为了简便起见, 在筛选试验中, 采用直接将甾体底物加到已生长好的微生物培养液中进行转化的方法。薄板层析观察结果, 根据吸收斑点大小、颜色的深浅, 比较脱氢能力的强弱。共测定了诺卡氏菌、分枝杆菌、棒状杆菌、节杆菌、假单胞杆菌和球形芽胞杆菌等 61 株微生物的转化情况, 结果发现只有诺卡氏菌 62-1 菌株的转化产物中有较多的 RS, 因而选用这株菌作为本试验的脱氢菌株。

### (二) 诺卡氏菌 62-1 菌株的转化

用诺卡氏菌 62-1 菌株单独转化底物, 于不同时期取样分析, 发现转化过程中出现三种主要产物 (RSA、RS 和  $\Delta^1$ -RS), 由此可以证明此菌除了含有能在 C<sub>4</sub> 和 C<sub>1</sub>-位导入双键, 以及转变 3 羟基为 3-酮基的各种脱氢酶外, 还有 C<sub>21</sub>-醋酸酯水解酶。从图 1 可以看出, 底物的 3 位羟基首先转变成 3 位酮同时脱去 C<sub>4</sub>-位一分子的氢形成 RSA, 再经水解酶除去 C<sub>21</sub> 位的醋酸酯变成 RS, 与此同时, 一部分 RS 又被继续脱去 C<sub>1</sub>-位的氢变成  $\Delta^1$ -RS, 因而在转化的 24—

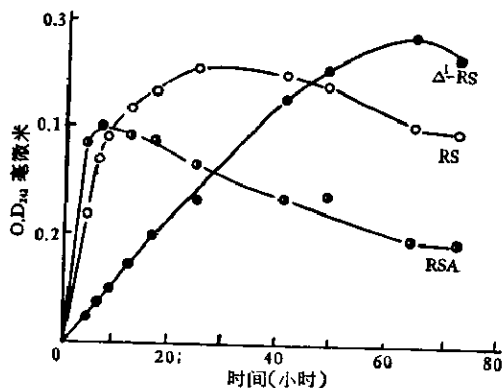


图 1 诺卡氏菌 62-1 菌株单独转化底物时产物的生成情况

1) 72 型分光光度计, 光程 1 厘米, 波长 620 毫微米。

48 小时, 似乎 RS 的量变化不大, 实际上这是一种动态平衡。转化初期,  $\Delta^1$ -RS 的量比较少, 随着转化时间的延长,  $\Delta^1$ -RS 的量逐渐增加, 推测很可能 C<sub>1</sub>-脱氢的酶活性是由 RS 诱导产生的, 此菌的 C<sub>21</sub>-醋酸酯水解能力较差, 转化 72 小时仍有相当一部

分 RSA 的 C<sub>21</sub>-醋酸酯不能被水解。图 2 是诺卡氏菌 62-1 菌株转化底物的可能途径。

### (三) 诺卡氏菌 62-1 菌株与蓝色梨头霉 AS3.65 的协同转化

由于诺卡氏菌 62-1 菌株的 C<sub>21</sub>-水解能力弱, 因而转化产物中含有大量的 RSA 不能变成 RS, 另外转化中还形成大量的  $\Delta^1$ -RS, 为此如用这株菌单独转化得到 RS 是不理想的。已知蓝色梨头霉 AS3.65 能在 RS 的 11 $\beta$ -位上导入羟基, 并有较强的水解酶活性, 所以我们设想用它和诺卡氏菌 62-1 菌株协同转化, 以弥补 62-1 菌株水解能力的不足, 同时 AS3.65 还可以直接进一步羟化水解后的 RS 生成氢化可的松, 使四步反应一步完成, 试验结果与预想的完全一致, 底物经两株菌协同转化 12 小时, RS 的生成量比 62-1 菌株单独转化时增加了一倍, 只在转化的初期出现少量 RSA, 转化中间产物 RSA 和 RS 在 20 小时内几乎全部消失, 所生成的 RS 很快由梨头霉直接氧化导入 11 $\beta$ -羟基生成氢化可的松 (图 3), 只能测到微量的  $\Delta^1$ -RS。根据各种产

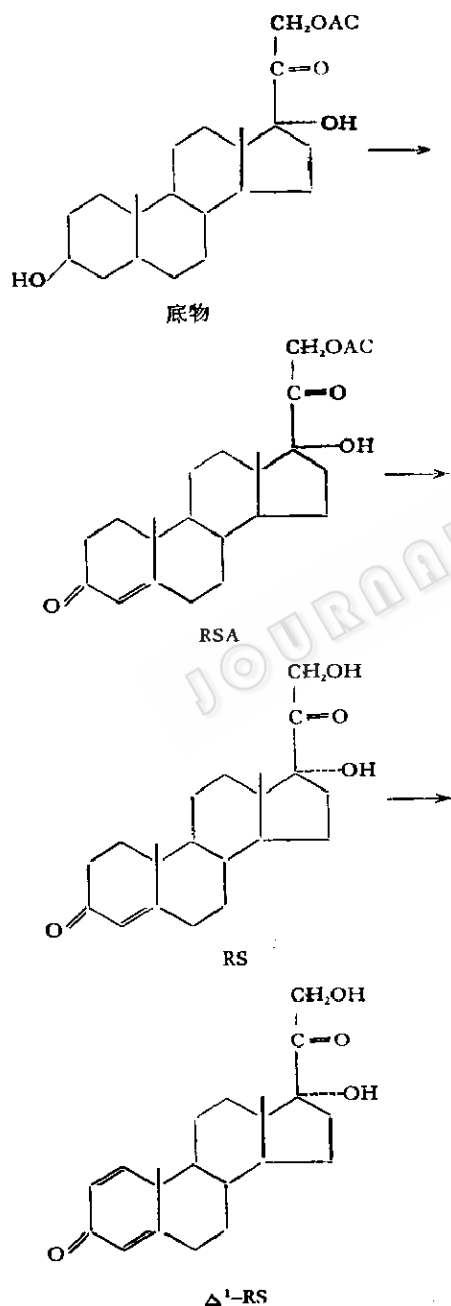


图 2 推测诺卡氏菌 62-1 菌株单独转化底物的途径

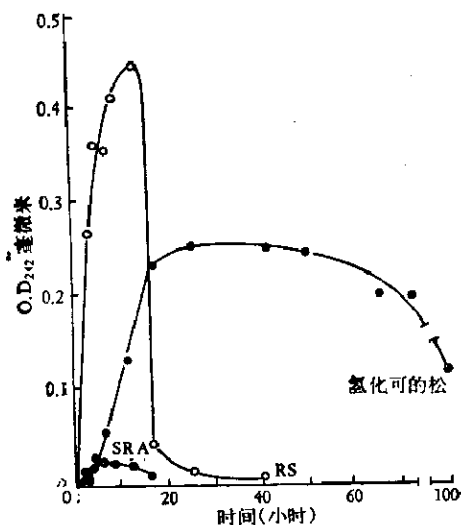


图 3 诺卡氏菌与梨头霉协同转化底物时产物的生成情况

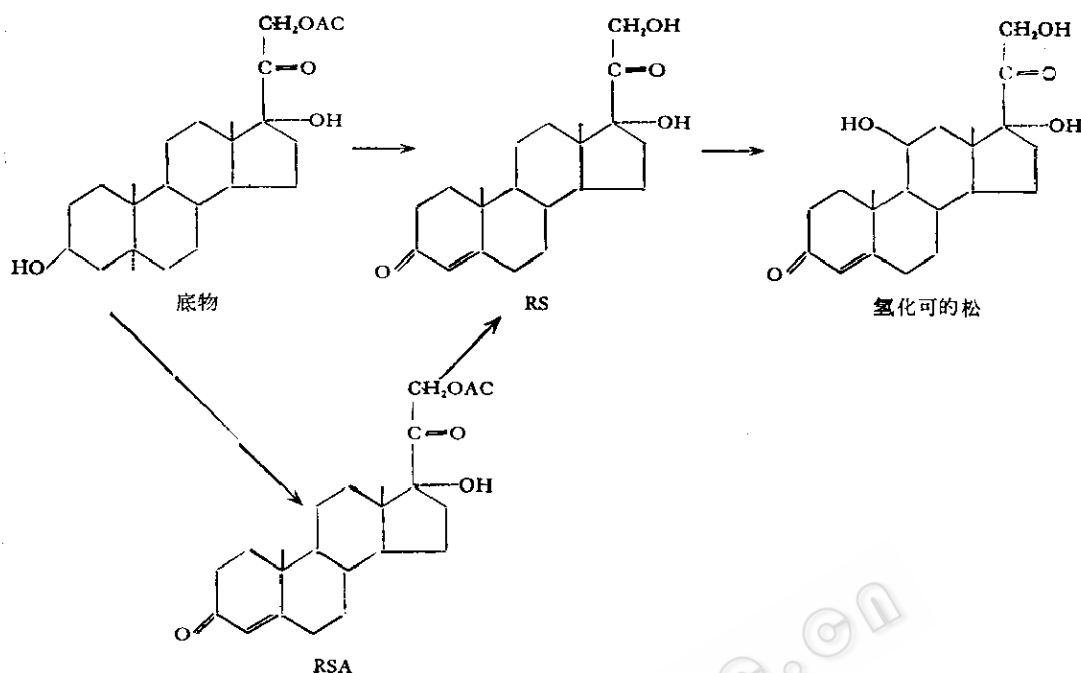


图4 推测诺卡氏菌与梨头霉协同转化底物的主要途径

物出现的情况,初步可以推测两株菌协同转化底物的主要途径如图4。

已有不少关于用两种菌混合转化制备各种甾体激素药物的报道<sup>[11-14]</sup>, Lee 等专门研究了混合转化生产确炎舒松 (Triamcinolone) 时,各种酶诱导和抑制作用的现象,并证明用两种菌混合转化生产确炎舒松具有二个优点,一是可以节省一步中间体的分离手续,另外还可以抑制不需要的20-酮基还原酶的产生,从而更好地控制转化<sup>[15]</sup>。我们用诺卡氏菌 62-1 菌株和蓝色梨头霉 AS3.65 两株菌协同转化5 $\alpha$ -娠烷-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -二羟基-20 酮-21-醋酸酯,它发挥了两株菌各自的特长,即利用梨头霉较强的水解酶活性,以及诺卡氏菌的脱氢活性,使底物很快先变成所需要的 RS,为梨头霉进一步导入 11 $\beta$ -羟基提供了转化的中间体;另一方面,紧接着的 11 $\beta$ -羟化作用还抑制了诺卡氏菌 C<sub>11</sub>-脱氢酶的活性,产物中只发现微量诺卡氏菌单独转化底物时所产生

的  $\Delta^1$ -RS,因而这是一种理想的转化方法。

## 参 考 文 献

- [1] 段士道:医药工业,1980 年第一期,29—35 页。
- [2] 長泽道太郎:石油と微生物, No. 19, 1—12, 1978。
- [3] 今日幸男:发酵と工业, 35(10):49—51, 1977。
- [4] Martin, C. K. A.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 22: 29—58, 1977。
- [5] Conner, A. H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 32(2): 310—311, 1976。
- [6] Applezweig, N.: *Chem. Week.*, 115(2): 31—36, 1974。
- [7] 吴照华,王式齐:化学学报, 36(2): 149—153, 1978。
- [8] 南宁“六二六”制药厂:医药工业,1977 年第 12 期,22—23 页。
- [9] 从浦珠等:化学学报, 34(3): 179—195, 1976。
- [10] 陈延镛,林小聪:医药工业,1978 年第 7 期,1—6 页。
- [11] Shull, G. M.: Ger. Patent, 1,050 835, 1959。
- [12] Schering, A. G.: Neth. Appl., 13,595, 1977。
- [13] Karl, P.: Ger. Offen, 2,715,854, 1978。
- [14] Schoettle, E. et al.: Ger. Offen, 2,803,661, 1979。
- [15] Lee, B. K. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 55 (1): 145—153, 1969。

**CONVERSION OF  $5\alpha$ -PREGNANE- $3\beta$ ,  $17\alpha$ -DIOL-20-ONE-21-  
ACETATE TO HYDROCORTISONE AN ASSOCIATED  
TRANSFORMATION OF *NOCARDIA* SP. 62-1  
AND *ABSIDIA COERULEA* AS 3.65**

Fa Youhua Ma Shuheng Su Qiheng Huang Shuhui  
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

An associated transformation of  $5\alpha$ -pregnane- $3\beta$ ,  $17\alpha$ -diol-20-one-21-acetate to hydrocortisone by *Nocardia* sp. 62-1 together with *Absidia coerulea* AS 3.65 was studied. Because the activity of hydrolytic enzyme was weak and the activity of  $\Delta^1$ -dehydrogenase was stronger, the products including RSA, RS and  $\Delta^1$ -RS were formed in the single transformation by *Nocardia* sp. 62-1. *A. coerulea*,

however, had abundant hydrolytic enzyme and  $11\beta$ -hydroxylase, so that only a few RSA and trace of undesirable  $\Delta^1$ -RS were detected, and the main intermediate product was RS, which subsequently being converted to hydrocortisone in the associated transformation. Therefore, this approach was considered to be an ideal method for the transformation.