

A 环饱和甾体的微生物转化作用

II. 降解 5α - Δ^{16} - 3β -羟基-孕甾烯-20-酮- 3β -醋酸酯为 $\Delta^{1,4}$ -雄甾二烯-3, 17-二酮

徐诗伟 法幼华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

节杆菌 9-2 能彻底降解 5α - Δ^{16} - 3β -羟基-孕甾烯-20-酮- 3β -醋酸酯 (I) 形成二氧化碳和水。在它的培养基中添加钴离子可抑制甾核的进一步降解, 从而积累中间产物 $\Delta^{1,4}$ -雄甾二烯-3, 17-二酮 (VI)。

经分析鉴定, 该菌株在钴离子存在下降解 (I) 主要途径是 (I) \rightarrow 5α - Δ^{16} - 3β -羟基-孕甾烯-20-酮 (II) \rightarrow 5α - Δ^{16} -孕甾烯-3, 20-二酮 (III) \rightarrow $\Delta^{4,16}$ -孕甾二烯-3, 20-二酮 (IV) \rightarrow $\Delta^{1,4,16}$ -孕甾三烯-3, 20-二酮 (V) \rightarrow (VI)。

在最适条件下 (氯化钴浓度 0.06%; 乙醇浓度 1—2%; pH 7—8), (VI) 的转化率可达 70%

近年来, 在寻找生产甾体激素药物的新资源方面有报道采用微生物法选择性地降解甾醇侧链, 生产一些甾体激素药物的中间体^[1-3]。 $\Delta^{1,4}$ -雄甾二烯-3, 17-二酮 ($\Delta^{1,4}$ -Androstadiene-3, 17-dione, 简称 ADD) 就是其中一种, 它是合成各种甾体激素药物如雌激素、孕激素等的重要中间体^[6,7]。我国两广、福建等地盛产剑麻, 在提取麻之后的废渣液中含有较丰富的皂素——梯可吉宁 (Tigogenin)^[8]。我们曾利用这一副产品, 用节杆菌 (Arthrobacter) 9-2 菌株成功地转化由梯可吉宁制得的一个中间体 17 α -甲基表雄醇为去氢-17 α -甲基睾丸甾酮^[9]。本文将报道该菌株在钴离子存在下, 降解另一个中间体 5α - Δ^{16} - 3β -羟基-孕甾烯-20-酮- 3β -醋酸酯 (5α - Δ^{16} -Pregnen- 3β -acetoxy-20-one) 为 ADD 的研究, 并初步探讨它的降解代谢途径。

材料和方法

(一) 菌种

节杆菌 9-2 (见前报^[9])。

(二) 甾体

5α - Δ^{16} - 3β -羟基-孕甾烯-20-酮- 3β -醋酸酯由福州制药厂和南宁制药二厂提供; ADD 和 $\Delta^{4,16}$ -雄甾二烯-3, 17-二酮 ($\Delta^{4,16}$ -Androstaene-3, 17-dione, 简称 4AD) 为美国 Sigma 化学公司产品。

(三) 培养基

培养基组成同前报^[9]。每 200ml 三角瓶装 40ml 培养基, 3000ml 三角瓶装 600ml 培养基, 15 磅 20 分钟灭菌。

(四) 培养

取肉汁斜面上已生长好的培养物接种于 200ml 三角瓶, 29℃ 振荡培养 22 小时作为种液, 按 4% (V/V) 的接种量接入新鲜培养基中, 在相同条件下培养。

本文于 1981 年 2 月 24 日收到。

(五) 甾体的转化

研究降解代谢途径是在已培养 22 小时的 600ml 培养基内,加入含 2.5% 甾体底物的乙醇溶液 24ml 和含 5% 硫酸钴 ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 溶液 6ml 中进行。累积 ADD 的试验则是在 40ml 菌液中,添加含 2.5% 氯化钴 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 溶液 0.96ml 以及含 5% 甾体底物的乙醇溶液 0.8 ml, 在相同条件下转化 52 小时。

(六) 降解代谢中间体的分离及鉴定

分离降解代谢中间体,取转化 16 小时的发酵液用醋酸乙酯抽提三次,抽提液用蒸馏水洗涤后经无水硫酸钠干燥,减压浓缩近干,残余物溶于少量丙酮,点样于薄层板。薄板用 Merck 硅胶 GF_{254} 铺制(20×20 cm, 厚 0.8mm),110℃活化半小时

后备用。以醋酸乙酯:环己烷 1:1 上行法展开后,取出薄层板,让溶剂挥尽,置于紫外检示灯下将各吸收谱带轻轻标出,分别刮下用醋酸乙酯洗脱,洗脱液在减压下除去溶剂,然后分别以丙酮或正己烷-丙酮重结晶,得到的各种组份进行薄层色谱、熔点、比旋值、紫外光谱、红外光谱以及元素分析等理化性质的鉴定。

(七) 发酵液中 ADD 的定量测定

用等量醋酸乙酯抽提转化后的发酵液,取 50μl 按上述方法进行薄层色谱,并以已知样品作对照,取 ADD 的紫外吸收斑点于比色管中,用 5ml 95% 乙醇洗脱,洗脱液经离心澄清后在 751 型分光光度计波长为 243nm 处测定吸光度,按 ADD 克分子消光系数为 16200 计算其含量^[11]。

表 1 降解代谢中间体的理化性质
Table 1 Physical and chemical properties of degraded intermediates.

	II	III	IV	V ¹⁾	VI
R_F	0.50	0.73	0.59	0.44	0.32
FLC Col. ¹⁾	黄 Yellow	黄褐 Yellowish brown	褐 Brown	橙 Orange	红 Red
MP °C ²⁾	203—205 ^a (202—204) ^[12a]	209—210 ^a (211—213) ^[12b]	185—187 ^a (186—188) ^[12c]	207—209 ^b (208—211) ^[13]	139—140 ^b (140—141) ^[11]
$[\alpha]_D^{25}$ ³⁾	+42.5 (0.504)	+72.2 (0.482)	+154.5 (0.536)	+110.3 (0.504)	+112.2 (0.508)
UV λ_{max}^{EtOH} nm (ϵ)	240 (9500)	239 (9800)	240 (25500)	241 (19500)	243 (16000)
IR ν_{max}^{KBr} cm ⁻¹	3450 1655 1585	1715 1655 1585	1680 1660 1615 1590	1660 1630 1605 1590	1735 1655 1620 1605
Anal. ⁴⁾ %	C 79.83 (79.70)	80.05 (80.21)	80.46 (80.72)	81.14 (81.22)	80.00 (80.24)
	H 10.27 (10.19)	9.81 (9.62)	9.31 (9.03)	8.45 (8.44)	8.57 (8.51)

1) 用浓硫酸喷雾加热显色。
2) a. 用丙酮重结晶, b. 用正己烷-丙酮重结晶; 括号内为文献值。
3) 以氯仿为溶剂, 括号内为测定浓度。
4) 括号内为计算值。
5) 与 4AD 混熔下降, 4AD 与浓硫酸显绿色。

结果与讨论

(一) 节杆菌 9-2 的降解途径

1. 各种降解代谢中间体的分离和鉴定

用 2 个 3000ml 三角瓶进行培菌和转化试验。取转化 16 小时的发酵液经抽提、浓缩, 残余物用硅胶薄层色谱法分离, 得到六条主要谱带: 带 1 (R_f 0.78—0.85); 带 2 (R_f 0.70—0.75); 带 3 (R_f 0.56—0.62); 带 4 (R_f 0.50—0.54); 带 5 (R_f 0.41—0.50) 和带 6 (R_f 0.31—0.39)。经洗脱分别制得 I (85mg); III (164 mg); IV (170 mg); II (48mg); V (225 mg) 和 VI (105 mg)。再经溶剂结晶后进行各项理化性质的鉴定(表 1), 确定了 II 是 5α - Δ^{16} - 3β -羟基-孕甾烯-20-酮 (5α - Δ^{16} -Pregnen-3- β ol-20-one); III 是 5α - Δ^{16} -孕甾烯-3,20-二酮 (5α - Δ^{16} -Pregnen-3,20-dione); IV 是 $\Delta^{1,16}$ -孕甾二烯-3,20-二酮 ($\Delta^{1,16}$ -Pregnadiene-3,20-dione); V 是 $\Delta^{1,4,16}$ -孕甾三烯-3,20-二酮 ($\Delta^{1,4,16}$ -Pregnatriene-3,20-dione) 和 VI 是 ADD。而 I 则是回收的未转化的底物, 薄层色谱 R_f 0.83, 与浓硫酸显黄色, 熔点 161—162℃。

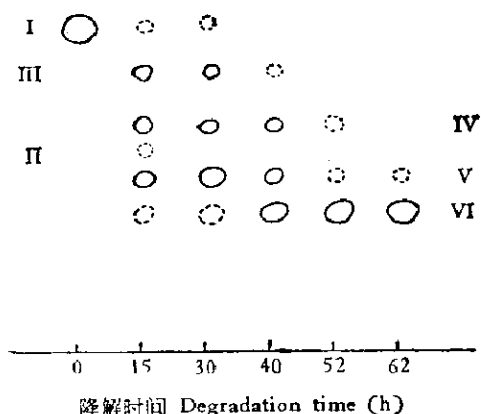


图 1 降解产物的薄层色谱

Fig. 1 TLC of degradation products

(虚线表示量较微)

(Dotted lines indicate a trace of steroids)

2. 降解的代谢途径

节杆菌 9-2 是一株降解 5α - Δ^{16} - 3β -羟基-孕甾烯-20-酮- 3β -醋酸酯(I)能力很强的菌株。在适宜条件下, 转化 16 小时之后发酵液中就测不到任何甾体的中间体了。但在培养液中添加一定浓度的钴离子, 就可抑制 ADD (VI) 的进一步降解。其降解过程的薄层色谱(图 1)表明转化 15 小时取样各种代谢中间体 (II—VI) 均可在硅胶薄层板上以不同的 R_f 值呈现紫外吸收斑点, 但 (VI) 的生成量较少, 后期逐渐增多。该菌对 5α - Δ^{16} - 3β -羟基孕甾烯-20-酮 (II) 的氧化能力也很强, 因而 (II) 在降解前期仅有少量检出。随着转化的进程, 5α - Δ^{16} -孕甾烯-3,20-二酮 (III)、 $\Delta^{1,16}$ -孕甾二烯-3,20-二酮 (IV) 和 $\Delta^{1,4,16}$ -孕甾三烯-3,20-二酮 (V) 均逐渐减少, 最后 (VI) 大量被积累下来。根据上述结果可以推测它的降解代谢途径是按图 2 顺序进行的。

图 2 表明, 节杆菌 9-2 降解 (I) 时, 首先水解 A 环上 3β -醋酸酯, 并氧化成酮基, 继之脱去 C₄ 和 C₁ 位的氢, 然后降解 C₁₇ 位上的侧链为 17-烯醇, 进而异构化转为 17-酮基而成 ADD (VI)。(VI) 又可进一步被降解最终得到二氧化碳和水。前人曾对 ADD 的降解提出了两种不相关的降解途径, 一种是 D 环内酯化后, 继之开环^[14,15]; 另一种是 B 环破裂, 伴随 A 环的芳香化^[16,17]。近年来, 在微生物降解甾醇的研究中, 已证实 ADD 的进一步降解是通过后一种途径, 其中 9α -羟基化作用是引起甾核破裂的关键一步, 许多螯合剂如 α , α' -联吡啶或金属离子如 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 均可有效地抑制这一活性^[18,19]。我们用节杆菌 9-2 降解 (I) 时添加钴离子能选择性地阻碍甾核的进一步降解。由此推测本转化中 ADD 进一步降解与甾醇相似是由 9α -羟基化作

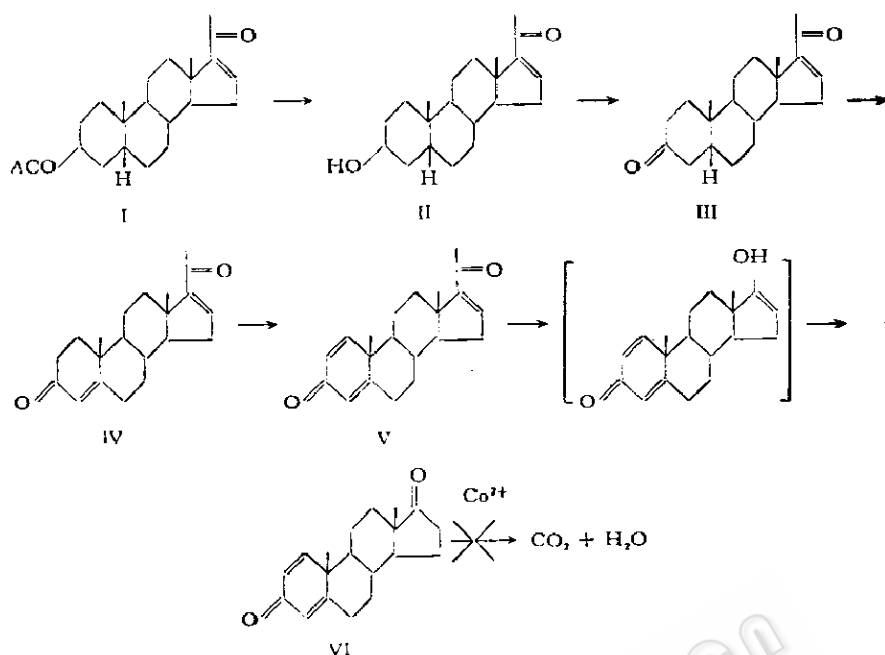


图 2 降解的途径

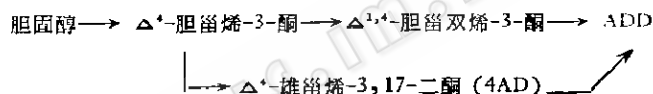
Fig. 2 Probable degradation pathway of $5\alpha\text{-}\Delta^{16}\text{-pregnen-3}\beta\text{-acetoxy-20-one}$ by *Arthrobacter* 9-2.

图 3 氯化钴浓度对累积 ADD 的影响

Fig. 3 Effect of concentration of cobaltous chloride on accumulation of ADD.

用开始的。

另一方面, 据报道^[28]微生物降解胆固醇的途径除了经过 $\Delta^{1,4}$ -胆甾双烯-3-酮到 ADD 外, 还存在经过 4AD 的交替途径 (如上式)。也就是说, 胆固醇侧链的降解可发生在 Δ^4 -胆甾烯-3-酮和 $\Delta^{1,4}$ -胆甾双烯-3-酮两者之中。在本试验条件下, 我们尚未检出和分离到 4AD, 因而认为节杆菌 9-2 降解 (I) 的侧链主要是发生在 (V) 以后。

(二) 节杆菌 9-2 累积 ADD 试验

1. 钴离子浓度的影响: 上述试验已表明, 钴离子能有效地抑制 ADD 的进一步降解。根据不同的氯化钴浓度 (W/V) 对累积 ADD 的比较试验 (图 3), 发现氯化钴添加浓度为 0.06% 是较适宜的。在此浓度下, ADD 的累积量既大又较稳定。氯

化钴浓度 0.1% 虽也可达到同样的效果, 但整个转化过程后延。

2. 乙醇的影响: 图 4 结果表明, 节杆菌 9-2 能直接转化细粉末状底物 (I)。预

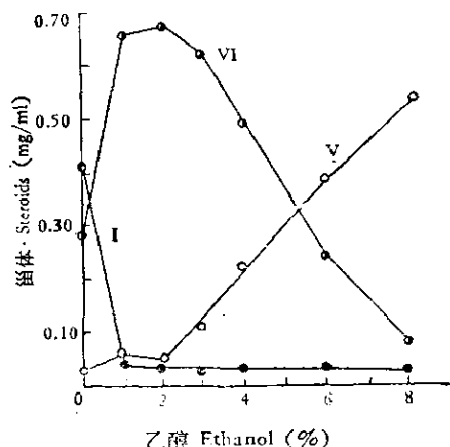


图 4 乙醇对降解的影响

Fig. 4 Effect of ethanol on degradation.

先将 (I) 溶解于乙醇中, 转化活性可明显提高, 累积 ADD 的最适乙醇浓度是 1—2% (V/V)。从前述的代谢途径中, 已知节杆菌 9-2 除了具有酯水解酶和脱氢酶外, 还有侧链降解酶。当乙醇浓度由 3% 增加到 8% 时, ADD 的累积量虽明显地降低, 但 $\Delta^{1,4,16}$ -孕甾三烯-3, 20-二酮 (V) 的量却相应地增加。这一现象表明, 高浓度的乙醇主要抑制了甾体的侧链降解酶的活性。

3. pH 的影响: 试验了不同转化 pH 对累积 ADD 的影响(图 5)表明转化最适 pH 为 7—8。酸性不利于转化, pH 5 以

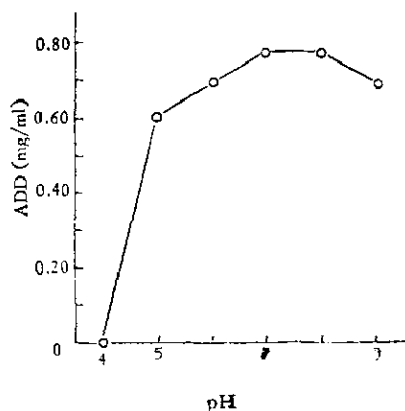


图 5 pH 对累积 ADD 的影响

Fig. 5 Effect of pH on accumulation of ADD.

下转化活性受抑制。

4. ADD 的形成过程及形成量: 图 6 展示了节杆菌 9-2 在降解 (I) 过程中累积 ADD 的情况。转化 50 小时之前, ADD 的累积量呈直线上升, 60 小时之后下降, 最高转化率约 70%。

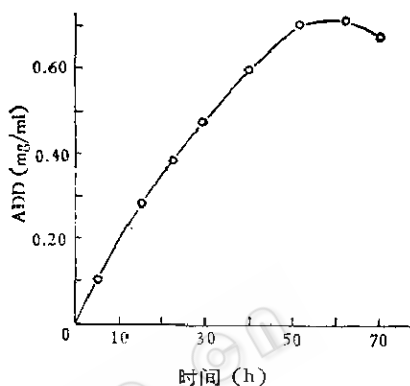


图 6 ADD 的形成过程

Fig. 6 Time course of ADD production

取 600ml 已转化 54 小时的发酵液按常规处理得油状物, 用硅胶薄层色谱法分离得 ADD 粗品 395 mg, 用正己烷-丙酮重结晶得白色结晶物 365mg, MP. 138—140°C, $[\alpha]_D^{25} + 107.6 (C, 0.524; CHCl_3)$, 重量收率约 60%。

参 考 文 献

- [1] Arima, K. et al.: Japan Patent, 504, 508, 1967.
- [2] Van der Waas et al.: Dutch Patent Appl., 6, 537, 718, 1967.
- [3] Wix, G. et al.: Steroids, 11(3): 401—413, 1968.
- [4] Marsheek, W. J. et al.: U. S. Patent, 3, 759, 791, 1973.
- [5] Schering, A. G.: U. S. Patent, 4, 170, 518, 1979.
- [6] 長天道太郎: 石油と微生物, 19: 1—12, 1978.
- [7] 今田幸男: 発酵と工業, 37(6): 561—563, 1979.
- [8] 陈延儒等: 医药工业, 10: 7—8, 1978.
- [9] 祛幼华、徐诗伟: 微生物学报, 20(2): 185—190, 1980.
- [10] 广州第八制药厂: 医药工业, 8: 4—5, 1978.

- [11] Levy, H. R. and P. Talalay: *J. Biol. Chem.*, **234**(8): 2009—2013, 1959.
- [12] Elsevier's Encyclopedia of Organic Chemistry, 14S., Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1959, a. 2242S, b. 2795S, c. 2780S.
- [13] Weston, G. O. et al.: *Brit.*, **854**, 343, 1960.
- [14] Prairie, R. C. and P. Talalay: *Biochemistry*, **2**(1): 205—208, 1963.
- [15] Holmlund, C. E. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**: 105—110, 1963.
- [16] Dodson, R. M. and R. D. Muir: *J. Am. Chem. Soc.*, **83**(22): 4627—4631, 1961.
- [17] Sih, C. J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **62**(3): 541—547, 1962.
- [18] Nagasawa, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**(11): 1644—1650, 1969.
- [19] Nagasawa, M. et al.: *Ibid.*, **34**(6): 838—844, 1970.

THE MICROBIAL TRANSFORMATION OF RING-A SATURATED STEROIDS

II. DEGRADATION OF Δ^{16} -ALLOPREGNEN-3 β -ACETOXY-20-ONE TO Δ^{14} -ANDROSTADIENE-3,17-DIONE

Xu Shiwei Fa Youhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of *Arthrobacter* No. 9-2 was able to degrade Δ^{16} -allopregnen-3 β -acetoxy-20-one (I) to carbon dioxide and water completely. The degradation of Δ^{14} -androstadiene-3, 17-dione (VI) could be inhibited by the addition of Co^{2+} to the culture medium, thus enabling a high accumulation of product VI.

The degradation processes of I by *Arthrobacter* No. 9-2 was also investigated through identification of the products. The degradation scheme was believed to be as follows: $\text{I} \rightarrow \Delta^{16}$ -allopregnen

3 β -ol-20-one (II) $\rightarrow \Delta^{16}$ -allopregnen-3,20-dione (III) $\rightarrow \Delta^{4,6,16}$ -pregnadiene-3, 20-dione (IV) $\rightarrow \Delta^{14,16}$ -pregnatriene-3,20-dione (V) \rightarrow VI.

The optimal conditions for accumulation of product VI were: pH 7—8; ethanol final concentration 1—2% (V/V) to dissolve the substrate I $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.06% (W/V) to inhibit degradation of the product VI. Under such conditions the yield of microbial transformation of I to VI was 70%.