

节杆菌 9-2 对皮质甾类 C-20 羰基的还原作用

1. 底物结构对还原作用的影响

法幼华 马树恒

(中国科学院微生物研究所, 北京)

许多微生物, 包括细菌、放线菌、霉菌和酵母的一些属能还原甾体 C-20 羰基生成 C-20 羟基^[1-3]。这一反应经常与 Δ^1 -脱氢作用, 3-羟基的氧化作用, $\Delta^3 \rightarrow \Delta^4$ 的异构化反应或者降解侧链等反应同时出现。虽然这一反应本身的经济意义不大, 但由于它在许多重要的转化反应中以一种不需要的副反应出现, 使转化产物变得复杂, 主要产物收率下降, 因而研究这一转化机制仍具有实际的意义。本文主要报道甾体结构对节杆菌 (*Arthrobacter*) 9-2 还原皮质甾类 C-20 羰基的影响。

材料和方法

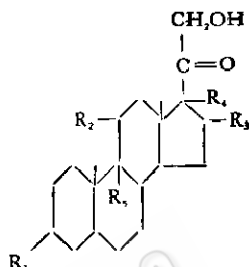
(一) 菌种: 节杆菌 9-2

(二) 菌培养及甾体转化: 培养基组成, 培养方法及转化方法同前报^[3]。

(三) 转化产物的提取与鉴别: 转化结束后, 用乙酸乙酯抽提, TLC 定性测定, 展开剂为氯仿: 无水乙醇 (94:6)。用 2,4-二硝基苯肼 (DNPH)^[4] 和红四氮唑 (TPTZ)^[5] 显色剂分别喷雾显色, 根据 Δ^4 -3-酮基甾体和 $\Delta^{1,4}$ -3-酮基甾体对 DNPH 显色剂灵敏度的差异以及 TPTZ 试剂与皮质甾类结构中的 α -乙酮醇 (α -ketol) 基反应产生红色, 20-羰基被还原后不显色的特征, 可初步鉴定该菌有无 C_1 或 $C_{1,4}$ 脱氢和还原 C-20 羰基的能力。

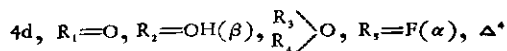
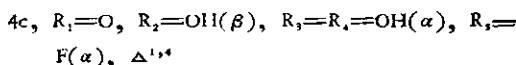
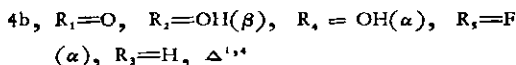
结果与讨论

试验了 19 种皮质甾体化合物, 根据取代基的不同, 将它们归纳为四类: 第一类的 C-17 位无羟基, 第二类 C-17 位有羟基, 第三类除了 C-17 位有羟基外, C-16 位还被羟基或甲基所取代, 第四类 C-17 位也具羟基, 但在 C-9 位上还含有卤素氟。(见图示):



- 1a, $R_1=O$, $R_2=R_3=R_4=R_5=H$, Δ^4
 1b, $R_1=O$, $R_2=OH(\beta)$, $R_3=R_4=R_5=H$, Δ^4
 1c, $R_1=R_2=O$, $R_3=R_4=R_5=H$, Δ^4
 2a, $R_1=OH(\beta)$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_2=R_3=R_5=H$, $\Delta^{1,4}$
 2b, $R_1=O$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_2=R_3=R_5=H$, Δ^4
 2c, $R_1=O$, $R_2=OH(\beta)$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_3=R_5=H$, Δ^4
 2d, $R_1=R_2=O$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_3=R_5=H$, Δ^4
 2e, $R_1=R_2=O$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_3=R_5=H$, $\Delta^{1,4}$
 2f, $R_1=O$, $R_2=R_4=OH(\alpha)$, $R_3=R_5=H$, Δ^4
 2g, $R_1=O$, $R_2=OH(\beta)$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_3=R_5=H$, $\Delta^{1,4}$
 3a, $R_1=OH(\beta)$, $R_3=CH_3(\alpha)$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_2=R_5=H$, $\Delta^{1,4}$
 3b, $R_1=OH(\beta)$, $R_3=CH_3(\beta)$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_2=R_5=H$, $\Delta^{1,4}$
 3c, $R_1=O$, $R_3=CH_3(\alpha)$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_2=R_5=H$, Δ^4
 3d, $R_1=O$, $R_2=R_4=OH(\alpha)$, $R_3=CH_3(\alpha)$, $R_5=H$, Δ^4
 3e, $R_1=O$, $R_2=OH(\beta)$, $R_3=CH_3(\alpha)$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_5=H$, Δ^4
 4a, $R_1=O$, $R_2=OH(\beta)$, $R_4=OH(\alpha)$, $R_3=F(\alpha)$, $R_5=H$, Δ^4

本文于 1984 年 3 月 24 日收到。



从节杆菌 9-2 转化 19 种皮质甾类 (1a—c, 2a—g, 3a—c, 4a—d) 的结果来看, 该菌能氧化所有被测甾体形成 $\Delta^{1,4}$ -3-酮基甾体, 转化后按 DNPH 法均不显色或显色慢, 其中有三种 A 环饱和的甾体 (2a, 3a 和 3b) 在氧化中先形成 Δ^4 -3-酮基甾体, 继之再被氧化成 $\Delta^{1,4}$ -3-酮基甾体。其还原 20-羰基的能力与甾体结构中所含的取代基部位有关, 按 TPTZ 法喷雾显色, 转化后只有 2a—g 不显色, 其余均显色。C-17 位没有羟基的甾体 (1a—c), 其 20-羰基都不被还原, 有羟基的 (2a—g) 则全部被还原, 这一结果与 Kogan 所报道^[6]的完全一致, 说明 C-17 位羟基是还原皮质甾类 C-20 位上羰基所必需的条件, 但即使甾体底物具有 17-羟基, 如果 C-16 位也被取代 (3a—c) 或者 C-9 位有卤素氟 (4a—d), 则 20-羰基的还原作用仍可被抑制。Lee 等^[7]认为, 用微生物法转化 9 α -氟氢化可的松 (9 α -Fluoro hydrocortisone) 制备去炎松 (Triamcinolone) 时, 用一株具 20-羰基还原能力的 Δ^1 -脱氢细菌和一株具 16 α -羟化能力的链霉菌混合培养, 由于微生物的相互作用可抑制 Δ^1 -脱氢细菌的 20-羰基还原酶活性。Yoshida 等^[8]则认为, 在上述混合培养中 20-羰基

还原酶的产生及其反应活性可由 pH 调控。根据本试验的结果分析, 作者认为在混合培养中, 20-羰基还原酶活性被抑制的原因, 很可能是由于在转化过程中, 底物被 Δ^1 -脱氢细菌脱氢后的中间体, 紧接着被链霉菌在 C-16 位上导入了一个羟基, 从而阻碍了 20-羰基还原作用的发生。利用微生物在转化反应中对甾体结构的特异性要求, 选择合适的底物对定向转化及提高产物收率都有实际的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Marsheck, W. J.: In "Progress in Industrial Microbiology", ed. D. J. D. Hockenhull Vol. 10 pp. 51—103, 1971. Livingstone, London.
- [2] Iizuka, H. and A. Naito: Microbial Conversion of Steroids and Alkaloids. University of Tokyo Press, Tokyo, 1981.
- [3] 法幼华、徐诗伟: 微生物学报, 20(2): 185—190, 1980.
- [4] Reineke, L. M.: Anal. Chem., 28(12): 1853—1858, 1956.
- [5] Burton, R. B. et al.: J. Biol. Chem., 88(2): 763—771, 1951.
- [6] Kogan, L. M. et al.: Khim. Prir. Soedin., 6(1): 38—47, 1970.
- [7] Lee, B. K. et al.: J. Gen. Microbiol., 55(1): 145—153, 1969.
- [8] Yoshida, T. et al.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 11(2): 81—88, 1981.