

节杆菌 9-2 对皮质甾类 C_{20} -酮基的还原作用

II. 转化 3β , 17α , 21 -三羟基- 5α -孕甾-20 酮

马树恒 法幼华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

根据多项物理性质, 包括熔点、比旋值、分子旋光度、紫外光谱、红外光谱、核磁共振、质谱等的测定, 确定节杆菌 (*Arthrobacter*) 9-2 生物转化 3β , 17α , 21 -三羟基- 5α -孕甾-3-酮 (I) 所生成的产物 (II) 的分子结构为 17α , 20 , 21 -三羟基-孕甾-1, 4-二烯-3-酮, 其中 C_{20} -羟基的构型是 β -型。并讨论了该菌转化 (I) 的可能途径。

关键词 节杆菌 9-2; 皮质甾类; 还原; C_{20} - β -羟基

微生物还原甾体化合物分子结构中 C_{20} -酮基形成相应羟基的现象极为普遍, 所形成的羟基构型与转化用的微生物种类有关。极长红酵母 (*Rhodotorula longissima*) 还原孕酮 (Progesterone) 的 20 -酮基为相应的 α -构型羟基^[1], 而薄青霉 (*Penicillium lilacinum*) 及浅紫色链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*) 还原同一甾体却形成相应的 β -构型羟基^[2-3], 粘性红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 还原 Reichstein 的化合物 “S” 及其 1-脱氢衍生物后的 20 -羟基都是 α -构型^[4], 而球形分枝杆菌 (*Mycobacterium globiforme*) 和简单棒状杆菌 (*Corynebacterium simplex*) 还原上述两种化合物所产生 20 -羟基为 β -构型^[5-6]。

前文^[7]曾报道节杆菌 (*Arthrobacter*) 9-2 能还原 3β , 17α , 21 -三羟基- 5α -孕甾-20-酮 (I) 的 20 -酮基为相应的 20 -羟基 (II)。本文将报道该菌积累 (II) 的条件, 并对其结构及 20 -羟基的构型进行鉴定。

材料与 方法

(一) 试验菌种

节杆菌 9-2^[8]。

(二) 菌培养及甾体转化

培养基组成、培养方法及转化方法基本同前^[8]。甾体底物浓度为 0.1%, 转化 72 小时。在积累产物的试验中, 用 2L 摇瓶装 600ml 培养基。

(三) 甾体底物

3β , 17α , 21 -三羟基- 5α -孕甾-20-酮 (I) 由南宁第二制药厂提供。

(四) 产物的分析方法

定性分析同前^[7]。薄层层析后分别用 2, 4-二硝基苯肼 (DNPN) 和红四氮唑 (TPTZ) 显色。定量分析是将样品层析后, 将在紫外灯下观察到的吸收斑点刮下, 收集在小试管中, 加 5ml 95% 乙醇, 振摇 1 分钟, 离心, 取上清液于 244nm 波长处测定吸光度。

(五) 产物 (II) 的提取与分离

转化结束后, 发酵液用醋酸丁酯抽提三次, 将酯层合并, 用 5% NaHCO_3 水溶液洗涤, 用无水 Na_2SO_4 脱水过夜, 减压下除去溶剂得固状物, 用薄层层析分离主要产物 (II), 用少量醋酸乙酯和石油醚混合液 (1:3, V/V) 洗, 再用醋酸乙酯重结晶, 得白色粉状物, 供分析用。

(六) 产物 (II) 结构及其 20 -羟基构型的鉴

本文于 1985 年 10 月 22 日收到。

定

1. 按常规方法测定产物(II)的熔点、比旋值、紫外光谱、红外光谱、核磁共振、质谱等项物理性质,确定(II)的分子结构。

2. 按 Takahashi 和 Uchibrori 的方法^[4],用醋酸酐-吡啶处理产物(II),制成双酯衍生物(VI)后,进行上述各项物理性质的测定,确定(VI)的分子结构。

3. 根据 Fieser 和 Fieser 的方法^[5],以氯仿为溶剂,分别测定产物(II)及其双酯衍生物(VI)的分子旋光度,以确证产物(II)分子结构中 20-羟基的构型。

结果与讨论

(一) 抑制剂的选择

节杆菌 9-2 具有很强的降解甾核的能力,但必须添加抑制剂才能在发酵液中积累产物^[6]。为了选择积累产物(II)的适宜抑制剂和添加浓度,进行了下述试验。在

投加甾体底物(I)进行转化的同时,分别加入不同的抑制剂,52 小时后测定各种抑制剂对转化的影响(表 1)。结果表明,添加 0.05% 的硫酸钴,对抑制 9-2 菌株降解甾核有明显效果。发酵液中积累大量产物(II),加 0.075% 硫酸镍或 8-羟基喹啉也有一定的抑制作用。 α, α' -联吡啶和邻菲绕啉无抑制作用,所试底物转化后全部被分解。

(二) pH 对产物(II)积累的影响

取生长 24 小时的菌液,经离心收获菌体,用 0.15M 不同 pH 的磷酸缓冲液分别配制不同 pH 值的菌悬液,并在其中投加甾体进行转化,24 小时后测定产物(II)的相对生成量。图 1 表明,9-2 菌株还原(I)生成(II)的最适 pH 在 6—7 之间,这一性质与商品(Boehringer, Mannheim) 20 β -羟基甾体脱氢酶(20-HSDH)的最适 pH 近

表 1 各种抑制剂对转化的影响
Table 1 Effect of inhibitor on bioconversion

抑制剂 Inhibitor	浓度(%) Concentration	甾体 Steroid	
		II	I
不加 None	0	—	—
硫酸钴 CoSO ₄	0.05	++++	—
	0.075	++++	—
硫酸镍 NiSO ₄	0.05	—	—
	0.075	+++	—
8-羟基喹啉 8-hydroxyquinoline	0.05	—	—
	0.075	++	—
α, α' -联吡啶 α, α' -bipyridine	0.05	—	—
	0.075	—	—
邻菲绕啉 o-phenanthroline	0.05	—	—
	0.075	—	—

似^[10]。

(三) 转化过程的分析

分析测定了五天内不同转化时间的样品。发现在这一过程中共出现四种转化产物(II—V)。根据定性分析用 DNPN 显色的结果,初步证明产物(III)和(V)都是 C_3 -脱氢的衍生物,(II)和(IV)都是 C_{14} -脱氢的衍生物。用 TPTZ 显色,推测(II)和(V)的 20-酮基已被还原,这四种甾体产物的生成情况见图 2。由图 2 推测,

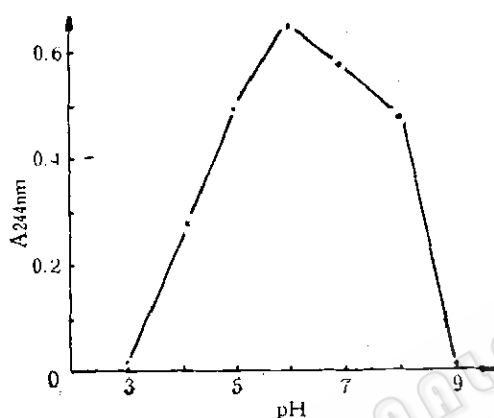


图 1 pH 对转化的影响

Fig. 1 Effect of pH on bioconversion

甾体底物(I)在节杆菌 9-2 的作用下,首先氧化 C_3 -羟基为酮基,并导入 C_4 -双键形成 Δ^4 -3-酮基甾体(III),随后进一步脱氢成为 $\Delta^{1,4}$ -3-酮基甾体(IV),接着又由该菌的 20-羟基还原酶还原(IV)的 20-酮基为羟基生成 20-羟基- $\Delta^{1,4}$ -3-酮基甾体(II)。这是该菌在有抑制剂的情况下,生物转化甾体底物(I)的主要途径。另外,在这一转化过程中,有一部分中间产物(III)的 20-酮基先被还原成 20-羟基形成 20-羟基- Δ^4 -3 酮甾体(V),此化合物虽生成量不多,但比较稳定,它能否进一步脱氢转化成(II),还是与(II)在发酵液中保持动态平衡,尚待研究。图 3 是节杆菌 9-2 生

物转化(I)的可能途径。

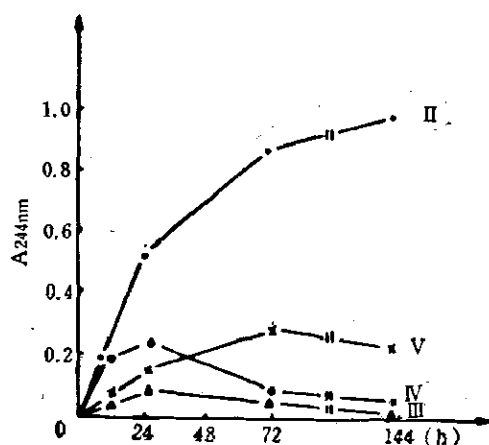


图 2 节杆菌 9-2 转化(I)的过程
Fig. 2 Time course of bioconversion of (I) by *Arthobacter* 9-2

(四) 产物(II)结构的鉴定

产物(II)的各项物理常数如下:

m. p. 192—194°C; $[\alpha]_D^{20} + 19^\circ$; (C = 1, CHCl_3); $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm) 246, $\epsilon = 15, 200$; $\text{IR } \gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 3400 (—OH), 1664, 1600 ($\Delta^{1,4} - 3\text{C} = 0$); $\text{MS (m/e)} M^+ + 1$ 347, 328 (M— H_2O), 310 (M—2 H_2O), 285 (M— $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}$); 267 (M— $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$); $^1\text{HNMR } \delta_{\text{Me}_2\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$ (ppm) 0.85 (3H, s, $\text{C}_{18}-\text{CH}_3$), 1.21 (3H, s, $\text{C}_{19}-\text{CH}_3$), 3.80 (3H, s, 20, 21— $\text{CH}_2\text{OAC}-\text{CHOAC}$), 6.04 (1H, s, C_4-H), 6.20 (1H, d, J 10Hz, C_5-H), 7.06 (1H, d, J 10Hz, C_1-H)

产物(II)经醋酸酐-吡啶处理后,得双酯衍生物(VI),各项物理常数的测定结果如下:

m. p. 176—178°C; $[\alpha]_D^{20} + 112^\circ$, (C = 0.5; CHCl_3); $\text{UV } \lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm) 244, $\epsilon = 18,000$; $\text{IR } \gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 3410 (OH), 1660, 1615, 1600 ($\Delta^{1,4}-3\text{C} = 0$), 1735, 1245, 1230 (20, 21—OAC); $\text{MS (m/e)} M^+ 430, 412$

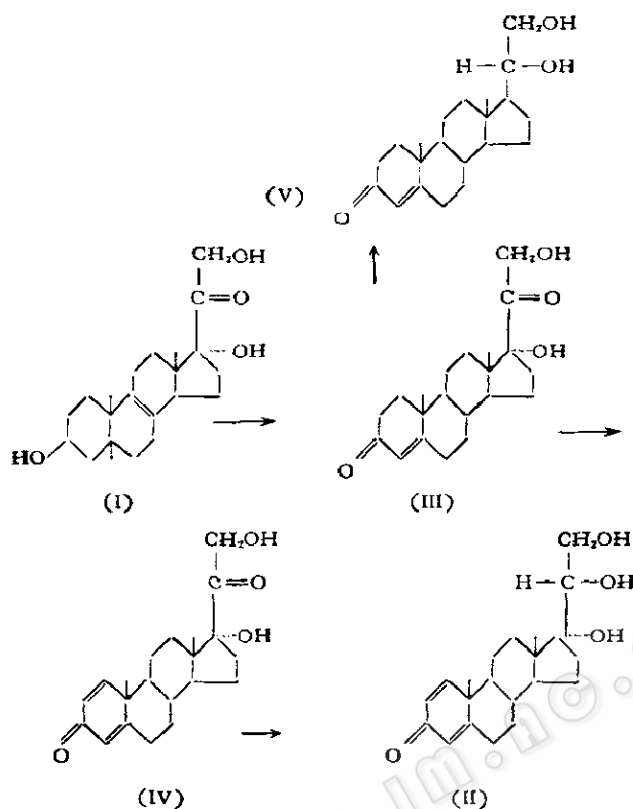


图3 节杆菌9-2转化底物(I)的可能途径

Fig.3 Possible bioconversion pathway of substrate (I) by *Arthrobacter* 9-2

(M-H₂O), 371 (M-CH₂-C(=O)-O), 311
 $\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$ (ppm) 0.78 (3H, s, C₁₈-CH₃), 1.18 (3H, s, C₁₉-CH₃), 2.00, 2.08 (6H, two s, 20, 21-COCH₃), 4.05—4.60 (2H, q, 21-CH₂OAC), 5.34 (1H, q, J 4Hz, 20 α -H), 6.04 (1H, s, C₄-H), 6.20 (1H, d, J 10Hz, C₂-H), 7.06 (1H, d, J 10Hz, C₁-H)。

通过上述物理常数的分析,证明产物(II)是底物(I)的20-羟基- $\Delta^{1,4}$ -3-酮基甾体,其分子结构为17 α , 20, 21-三羟基-孕甾-1,4-二烯-3-酮基。酯化后的化合物

(VI)是产物(II)的20, 21-二酯衍生物,其分子结构为17 α -20, 21-三羟基-孕甾-1,4-二烯-3-酮-20, 21-醋酸酯。

根据分子旋光度测定结果,产物(II):
 $M_D^{Alcohol} = +67.1^\circ$, 二酯化合物(VI):

$$M_D^{Acetate} = +481.6^\circ,$$

确证产物(II)的C₂₀-羟基是 β -构型。

参考文献

- [1] Chang, V. M. and D. R. Idler: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**(87): 1277—1285, 1961.
- [2] Sebek, O. K. et al.: *J. Bacteriol.*, **83**(67): 1327—1331, 1962.
- [3] Fried, J. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**: 5764—5765, 1953.
- [4] Iakahashi, T. and Y. Uchibori: *Agr. Biol. Chem.*, (Japan), **26**(2): 89—97, 1962.
- [5] Skryabin, H. K. et al.: *Dokl. Akad. Nauk. USSR*, **B215**: 737—739, 1974.
- [6] Sutter, D. et al.: *J. Org. Chem.*, **22**: 578—579,

1957.
[7] 法幼华、马树恒: 微生物学报, 25(1): 89—90, 1985.
[8] 法幼华、徐诗伟: 微生物学报, 20(2): 185—190, 1980.

- [9] Fieser, L. F. and M. Fieser: "Steroids" Maruzen, Chapt. 19, p. 614, 1959.
[10] Cremonesi, P. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 17(8): 1101—1108, 1975.

MICROBIAL REDUCTION OF C_{20} -KETO OF CORTICOSTEROIDS BY *ARTHROBACTER* 9-2

II. Bioconversion of $3\beta, 17\alpha, 21$ -Triol- 5α -Pregnan-3-one

Ma Shuheng Fa Youhua

(Institute of Microbiology, Academic Sinica, Beijing)

According to the determination of various physical characteristics, including melting point, rotational analysis and spectrum analysis (UV, IR, ^1H NMR and MS), it was confirmed that the molecular structure of product (II) which formed from bioconversion of $3\beta, 17\alpha, 21$ -triol- 5α -pregnan-20-one (I) by *Arthrobacter* 9-2 is $17\alpha, 20, 21$ -triol-pregnen-1,4-dien-3-one and the configuration of the hydroxyl at

C_{20} -position is β -form. A probable bioconversion pathway of (I) by *Arthrobacter* 9-2 was discussed.

Key words

Arthrobacter 9-2; Corticosteroids; Reduction; C_{20} - β -hydroxyl