

用新月弯孢霉 11 β -羟基化 16 α -甲基化合物 RS-21 醋酸酯

黄淑惠 徐诗伟 法幼华*

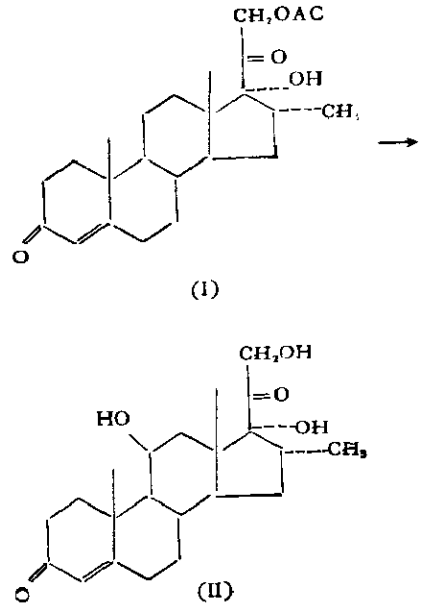
(中国科学院微生物研究所,北京)

对新月弯孢霉 AS3.4381 的菌丝体转化 16 α -甲基 Reichstein's 化合物 S21-醋酸酯 (I) 生成 16 α -甲基氢化可的松 (II) 进行了研究。培养 24h 的菌丝体的 11 β -羟基化活性最高; 乙醇对此羟基化活性的抑制作用明显。当 (I) 浓度为 0.15%, 转化 72h, 产物 (II) 的重量收率为 55.4%。

关键词 新月弯孢霉; 11 β -羟基化; 16 α -甲基氢化可的松

Shull 和 Kita 报导用新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) 转化多种甾体化合物, 可以得到相应的 11 β -羟基衍生物^[1]。化合物 RS 经新月弯孢霉在 11 β -位导入羟基就可生成氢化可的松。这一反应很有生产价值。不过, 在这一转化中还产生一定量的 14 α -羟基衍生物^[2], 严重影响氢化可的松的收率。通过改变发酵条件难于改变这一现象^[3]。J. de Fline 发现, 在甾体化合物分子的 C-14 位附近的 α 面引入较大的取代基, 如 17 α -羟基或醋酸酯和 16 α -甲基, 可造成 14 α -位立体障碍, 抑制 14 α -羟基化活性, 提高 11 β -羟基化收率^[4]。荷兰 Gist 药厂用化合物 RS-17 α -醋酸酯为转化底物, 获得了高收率的氢化可的松及氢化可的松 17 α -醋酸酯混合物, 后者很易水解变成氢化可的松^[5]。最近 Schoettle, Ohlson, Petzoldt 等用各种 17 α -位取代的化合物 RS 作为转化底物都得到了满意的结果^[6-8]。

45%。但也产生 14 α -羟基衍生物。本文用 16 α -甲基取代的化合物 RS-21-醋酸酯为底物 (I), 研究弯孢霉 AS3.4381 转化成 16 α -甲基氢化可的松 (II)。



本文于 1987 年 3 月 26 日收到。

¹H-NMR 由中国医学科学院抗生素研究所核磁共振组 (FX100, 100MHz), MS 由本院化学研究所质谱组 (MS-50, EI) 协助测定, 特此致谢。

* 通讯联系人

我们曾对分离和收集的 18 株弯孢霉属菌株转化化合物 RS-21-醋酸酯的情况进行了分析测定。发现被测菌株都具有 11 β -羟基化能力。其中 AS 3.4381 菌株的活性最强。氢化可的松转化率约为

材 料 和 方 法

(一) 微生物

弯孢霉 AS 3.4381 菌株培养在土豆汁琼脂平板上, 菌丝向四周蔓延生长, 由白色逐渐变为褐绿色。气生菌丝不茂盛, 菌丝多分枝, 有隔, 直径为 3—5 微米。孢子梗单生直立, 直径约 4—5 微米, 长约 120 微米, 分生孢子灰绿色, 弯曲, 着生于孢子梗顶端, 多数丛生, 少数轮生, 约 7—10 × 21—25 微米。一般分三个隔, 有的四隔, 其中第三个细胞(由着生处计算)比其它细胞大, 色深。根据工业真菌学纲要^[9]定名为新月弯孢霉。

(二) 培养基

固体培养基: 土豆汁琼脂。

液体培养基: 葡萄糖 10g, 玉米浆 20g, 黄豆粉 3g, 自来水 1000ml, 用 NaOH 溶液调 pH 至 6.5。每个 250ml 三角瓶装 40ml, 3000ml 三角瓶装 400ml, 1.05kg/cm² 30min 灭菌。

(三) 菌的培养

用无菌生理盐水洗下在土豆汁琼脂斜面上已生长 5—7 天的培养物, 接种液体培养基, 29℃ 振荡培养 (200r/min, 振幅 2.5cm) 24h 作为一级种液, 以 10% 种量接入新鲜培养基。在同样条件下进行二级培养 24h。

(四) 甾体化合物

16 α -甲基化合物 RS-21-醋酸酯由天津制药厂提供。

(五) 甾体化合物转化

转化条件试验: 将二级培养液经离心后收集的湿菌体 600mg 置于含 20ml 自来水的三角瓶中 (湿菌体含水量约 80%), 充分振荡使菌体分散, 投加 0.1% (以发酵液计) 甾体底物。3000ml 三角瓶试验是直接向已生长好的菌液中投加甾体化合物, 其浓度为 0.15%。转化条件同菌培养条件。

(六) 产物分析、提取与鉴定

转化条件试验: 用等体积的醋酸乙酯提取滤除菌丝体的转化液, 分层后取 100 μ l 有机相进行 TLC 分析, 薄板用硅胶 GF254, 展开剂为氯仿-无水乙醇 (92:8), 用波长为 254nm 的紫外灯检出产物斑点。乙醇洗脱, 用紫外分光光度计于波长 241nm 处测定 OD 值, 根据 ϵ 值计算含量^[10]。

3000ml 三角瓶试验: 取转化完全的发酵液用醋酸乙酯提取, 减压浓缩近干, 用醋酸丁酯洗涤, 即得结晶的产物。从氯仿-甲醇重结晶得分析样品, 进行熔点、比旋值、元素分析及各项光谱测定。

结 果 和 讨 论

(一) 转化条件的初步探讨

1. 培菌过程中, pH 值和菌丝体量的变化以及菌龄对转化的影响: 在四天的培养期内, 定时取样测定培养液的 pH 值、菌量以及由不同生长期的菌丝体转化甾体底物的活性变化。由图 1 可见, 培养初期, 培养液中 pH 有一短暂的下降过程, 即由 pH 6.5 降至 5.8。12h 后开始回升, 直到 72h 达 8.5。菌生长主要在 24h 内。

取等量不同生长期的菌丝体进行转化, 图 1 表明在生长对数期的菌丝体转化活性较强, 此期间 pH 也不超过 7.0。培养菌体在 24h 后, pH 上升到 7 以上, 生长减弱, 菌丝体转化活性降低。这一结果说明, 对数生长期的培养物有较强的活性, 用这

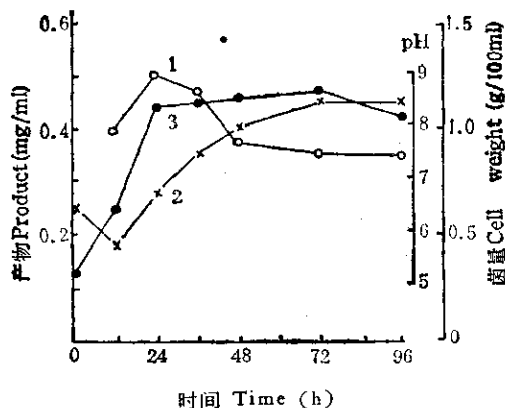


图 1 培菌过程中, pH 值和菌量的变化及其菌龄对转化的影响

Fig. 1 Time course of pH and cell weight and effect of ages of the inoculum on transformation

1. 产物 Product
2. pH
3. 菌量 Cell dry weight

一时期的菌丝体进行转化,其产物生成量最高。

2. 溶剂对转化的影响: 由于甾体底物的水溶性极小,为了提高底物的分散度,增加与菌体的接触面,一般将甾体化合物先用有机溶剂配制,然后投加。试验首先比较了四种有机溶剂对转化的影响(转化液中,溶剂的浓度均为 2%)。图 2 的结果表明,甲醇和二甲亚砜较好,二甲基甲酰胺较差,而乙醇有强的抑制作用。同时又比较了甲醇浓度对转化的影响(图 3),随着甲醇浓度的提高,转化活性逐步下降。因此,必须注意权衡甲醇的利弊,发挥其有利的效果。

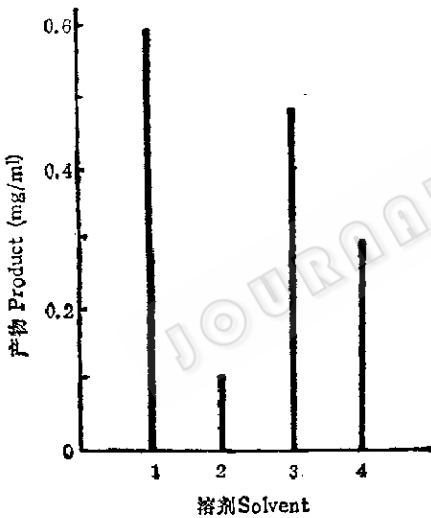


图 2 不同溶剂对转化的影响

Fig. 2 Effect of various solvent on transformation

1. 甲醇 Methanol
2. 乙醇 Ethanol
3. 二甲亚砜 Dimethyl sulfoxide
4. 二甲基甲酰胺 Dimethyl formamide

3. 底物浓度对转化的影响: 取 0.1、0.15 和 0.2% 三种不同浓度的底物投加,在同样条件下转化,发现随着底物浓度的增加,产物达到最高值的时间相应延缓(图

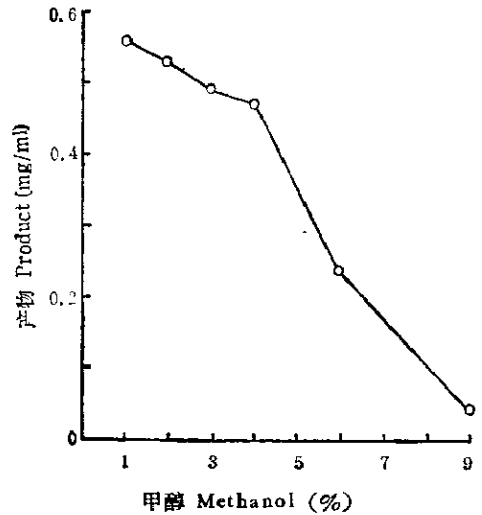


图 3 甲醇浓度对转化的影响
Fig. 3 Effect of methanol on transformation

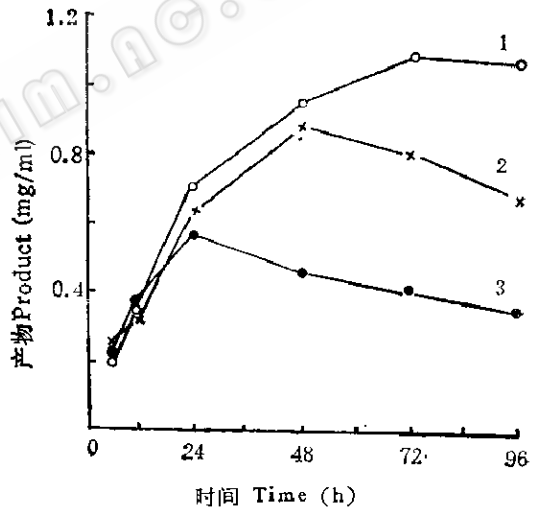


图 4 甾体底物浓度对转化的影响
Fig. 4 Effect of substrate on transformation

1. 0.2%
2. 0.15%
3. 0.1%

4)。当达到最高量后,继续延长转化时间,产物量均会下降。说明生成的产物不稳定。为获得高收率,转化期间及时取样分析是不可忽视的措施。

(二) 3L 三角瓶试验

试验用 2 个 3000ml 三角瓶投加甾体底物 1.2g,转化 72h 后经提取得产物 665

mg, m. p. 214—221 $^{\circ}$ C, 收率 55.4%。

(三) 产物鉴定

上述产物经重结晶得分析样品。m. p. 222—224 $^{\circ}$ C; $[\alpha]_D^{25} + 112.3$ (C, 1.1; 二氧六环), [文献值^[10]: m. p. 220—222 $^{\circ}$ C; $[\alpha]_D^{25} + 110$ (C, 1.0; 二氧六环)], Anal. C₂₂H₃₂O₅, 计算值: C, 70.18; H, 8.56, 测定值: C, 70.01; H, 8.31; IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹) 3420(-OH), 1705(20C=O) 1640, 1605 (Δ^4 -3C=O)。UV λ_{max}^{MeOH} (nm) 241(ϵ 15600); ¹HNMR $\delta_{TMS}^{CDCl_3}$ (ppm) 0.86 (3H, s, C₁₈-CH₃); 0.99(3H, d, J6.8, C₁₆-CH₃) 1.46 (3H, s, C₁₉-CH₃) 2.88 (1H, s, C₁₇-OH), 4.42 (1H, d, J5, C₁₁-H), 4.46 (2H, AB 型, J18, C₂₁-CH₂OH), 5.67 (1H, s, C₄-H); MS m/e M⁺ 376, 358 (M-H₂O), 346 (M-2CH₃), 328 (M-2CH₃-H₂O), 317 (M-CH₂OHCO), 299 (M-CH₂OHCO-H₂O), 281 (M-CH₂OHCO-2H₂O)。

根据上述测定结果证明, 转化产物是 16 α -甲基氢化可的松。其经磺酯化脱酯一

步反应即可 Δ^9 化, 而且收率比相应 11 α -羟基衍生物高^[11,12], 这对进一步合成地塞美松类药物是较为有利的。

参 考 文 献

- [1] Shull, G. M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 763, 1955.
- [2] 水村俊昭: 盐野义研究所年报, 12: 166—189, 1962.
- [3] Dulaney, E. L. et al.: *Appl. Microbiol.*, 7(5): 276, 1959.
- [4] De Fline, J.: *Fermentation Advances* (ed. D. Perlman), Academic Press, London & New York, p. 385, 1969.
- [5] Netherlands Pat. Appl., 6, 605, 514, 1966.
- [6] Sgoettle, E. et al.: *Ger. Offen.* 2, 803, 661, 1979.
- [7] Ohlson, S. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1(10): 1—9, 1980.
- [8] Petzoldt, K. et al.: *U. S. Pat.*, 4, 353, 985, 1982.
- [9] George Smith (徐浩译): *工业真菌学纲要*, 科学出版社, 北京, p. 101, 1959.
- [10] Canonica, L. et al.: *Gazz. Chim. Ital.*, 93(4): 368—377, 1963.
- [11] 上海第十二制药厂: *医药工业*, 4: 22—32, 1976.
- [12] Hazen, G. G. et al.: *J. Org. Chem.*, 29(7): 1930—1939, 1964.

11 β -HYDROXYLATION OF 16 α -METHYL-REICHSTEIN'S COMPOUND S 21-ACETATE BY *CURVULARIA LUNATA*

Huang Shuhui Xu Shiwei Fa Youhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The conversion of 16 α -methyl-Reichstein's compound S 21-acetate(I) to 16 α -methyl-hydrocortisone (II) by the mycelium *Curvularia lunata* AS3.4381 was studied. Maximal 11 β -hydroxylating activity of the mycelium was found during cultivation of the microorganism by 24h. Inhibition of the ethanol to the 11 β -

hydroxylating activity was obvious. The yield of 55.4%(II) (W/W) could be achieved during conversion of 0.15% substrate at 72 h.

Key words

Curvularia lunata; 11 β -hydroxylation; 16 α -methylhydrocortisone