

微生物学方法制备 16 α -甲基-11 α , 17 α , 21-三羟基孕甾-1, 4-二烯-3, 20-二酮

陈家任 蒲自莲 曾本秀 张小若*

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

本文报道了简单节杆菌 A69-2 和球孢白僵菌 AS69 同时存在下对 16 α -甲基-17 α -羟基孕甾-4-烯-3, 20-二酮-21-醋酸酯 (16MRSA) 的协同转化作用。这种协同转化作用既能解除 16 α -甲基-11 α , 17 α , 21-三羟基孕甾-4-烯-3, 20-二酮 (16M11 α HC) 对球孢白僵菌 AS69 的 11 α 羟化酶的抑制作用, 又可降低高浓度的 16M11 α HC 对节杆菌 A69-2 脱氢酶活性的影响, 同时还能抑制节杆菌脱氢过程的副反应。在底物浓度为 0.15% (W/V) 时, 16 α -甲基-11 α , 17 α , 21-三羟基孕甾-1, 4-二烯-3, 20-二酮 (16MDHC) 的收率约 50%, 故是制备 16MDHC 的一种理想的微生物学方法。

关键词 协同转化; 16 α -甲基化合物 SA

地塞米松是一种高效含氟肾皮质激素, 其抗炎作用强, 且副作用小^[1]。用薯蓣皂素为原料半合成地塞米松, 是由多步化学合成和生物合成的复杂反应过程, 而甾核 A 环引入 C₁₋₂ 双键和 C₁₁ 氧原子, 是分别由两道生物反应工序独立进行, 反应的底物浓度和转化产率都较低。研究同时引入 C₁₋₂ 双键和 C₁₁ 氧原子的新工艺, 将有助于提高地塞米松合成工艺的水平。

作者用 16 MRSA 为底物, 研究了白僵菌、新月弯孢霉、犁头霉和节杆菌 A69-2 对 16MRSA 的协同转化作用。本文报道通过节杆菌 A69-2 和球孢白僵菌 AS69 的协同转化作用, 而一步实现从底物到 16MDHC 的水解、羟化和脱氢反应。

材料与方 法

(一) 菌种

简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*)

A69-2, 由本所菌种保藏组提供。

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*)

AS69, 系本组筛选得到, 保存在马铃薯琼脂斜面。

(二) 甾体化合物

16 MRSA, 16 α -甲基-17 α , 21-二羟基孕甾-4-烯-3, 20-二酮 (16MRS), 16M11 α HC 和 16MDHC 均由天津制药厂提供。

(三) 培养基

简单节杆菌发酵培养基见前文^[2]。球孢白僵菌发酵培养基成分 (%): 葡萄糖 1.2, 玉米浆 1.0, 酵母膏 0.13, 蛋白胨 0.30, 氯化钾 0.10, 磷酸氢二铵 0.12, 灭菌前 pH 6.0。

(四) 培养与转化

简单节杆菌单菌株转化的培养与转化方法见前文^[2]。球孢白僵菌单菌株培养与转化是把种液以 10% (V/V) 的接种量移入上述培养液中 (每 500ml 三角瓶内盛 100ml), 在旋转式摇瓶机上 28 \pm 1 $^{\circ}$ C 振荡培养 30-36 小时, 加入 (50 mg/ml)

本文于 1990 年 2 月 5 日收到。

* 现在地址: 澳大利亚, 墨尔本。

16MRSa 乙醇溶液 2ml, 相同条件下继续振荡培养 48 小时。两种菌株混合转化是分别进行单菌株培养, 然后把球孢白僵菌加入到简单节杆菌培养液中, 加入 16MRSa 后, 在 28—30℃ 继续振荡培养 48 小时。

(五) 分析方法

1. 定性分析: 在 5ml 转化液中加入 2ml 三氯甲烷提取, 取 5—10 μ l 作点样, 层析, 并用已知样品对照。薄层层析用硅胶 G: 硅胶 G₂₅₄ (5:1W/W) 混合铺板, 醋酸甲酯: 二氯甲烷 (7:3V/V) 溶剂系统展开。挥去溶剂后, 于 254nm 下观察层析板上的紫外吸收斑点, 或用硫酸香格蓝溶液加热显迹。

2. 定量分析: 用高压液相色谱法, 或将样品经薄层展开后, 用岛津 TLC 扫描仪 CS-910 扫描, 参比波长为 420nm, 测定波长为 240nm。

结果与讨论

(一) 白僵菌 AS69 对 16MRSa 的转化

在球孢白僵菌进行单菌转化时, 经不同时间取样, 分析发酵液中主要存在三种甾体化合物, 即 16M11 α HC, 16MRS 和 16MRSa。从图 1 各甾体化合物的消长看出, 16MRSa 在酯酶的作用下先生成

16MRS, 再经羟化酶引入 C₁₁ 位氧原子。从图 1 还可看出, 白僵菌 AS69 对 16MRS 的氧化速度随发酵进程而明显减慢。当 16MRSa 浓度达 0.2% (W/V) 时, 氧化 36 小时取样分析, 发现在转化液中仍残存着相当数量的 16MRS。若采用分批投料或添加葡萄糖作外加能源, 改善氧化速度的幅度不大。为了进一步阐明其原因, 在投加 16MRSa 的同时, 向培养基中添加不同

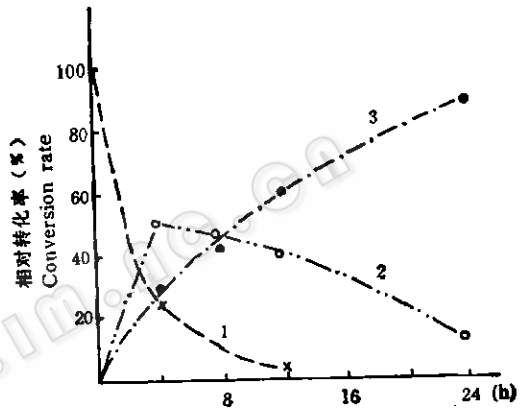


图 1 球孢白僵菌 AS69 对 16MRSa 的转化过程
Fig. 1 The typical time course of the conversion reaction of 16 MRSa with *B. bassiana* AS69

- 1. 残留 16MRSa Residual 16MRSa
- 2. 酯酶水解产物 16MRS Formed 16MRS by lipase
- 3. 羟化产物 16M11 α HC Hyaroxylated products 16M11 α HC

表 1 16M11 α HC 对球孢白僵菌 AS69 羟化酶的抑制作用

Table 1 The inhibition of 16M11 α HC concentration on hydroxylation of *B. bassiana* AS69

No.	16MRSa (mg/ml)	加入 Added 16M11 α HC (mg/ml)	转化产物 Conversion production		残留物 Residue 16MRSa (mg/ml)
			16M11 α HC* (mg/ml)	16MRS (mg/ml)	
1	1.0	0.0	0.68	0.24	0.08
2	1.0	0.5	0.56	0.37	0.07
3	1.0	1.0	0.45	0.47	0.08
4	1.0	2.0	0.24	0.68	0.08

* 16M11 α HC 转化量 = 发酵液中 16M11 α HC - 加入 16M11 α HC。

Conversion 16M11 α HC = 16M11 α HC content in the broth - added content.

量的 16M11 α HC。表 1 结果表明,随着外加 16M11 α HC 量的增加,16M11 α HC 的生成量逐渐减少,发酵液中 16MRS 积累量明显上升,而 16MRS 残留量却没有差异,说明 16M11 α HC 对球孢白僵菌 AS69C₁₁ 羟化酶有明显的抑制作用,且对酯化酶无不良影响

(二) 简单节杆菌 A69-2 对 16M11 α HC 的转化

简单节杆菌 A69-2 单菌转化 16M11 α HC 的过程见图 2。从图 2 中可以看出,其转化率随 16M11 α HC 含量的增加而下降,而 16MDHC 生成量先增加,后急剧减少,这说明 16M11 α HC 浓度过高对简单节杆菌 A69-2 有明显毒害。选择适当的 16M11 α

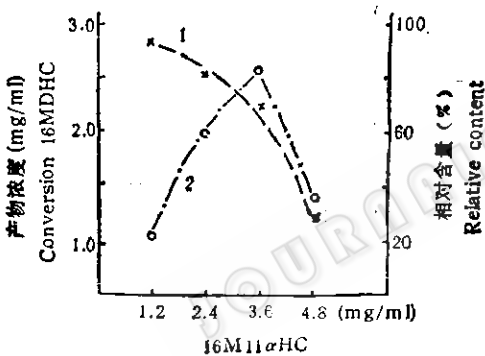


图 2 16M11 α HC 浓度对节杆菌 A69-2 脱氢的影响

Fig. 2 Effect of 16M11 α HC concentration on the formation of 16MDHC with A69-2

1. 转化率 Conversion rate
2. 16MDHC 生成量 Formed 16MDHC

表 2 球孢白僵菌代谢物对节杆菌脱氢的影响

Table 2 Effect of the metabolites of *B. bassiana* AS69 on the 16MDHC accumulation

No.	1	2	3	4	5	6
加入代谢物 Added metabolites (V/V)	0.0	5.0	12.5	25.0	50.0	菌丝 mycelia
C1-2 转化率 The conversion rate of C1-2(%)	74.0	73.0	75.8	59.6	43.2	77.1

注: 加入菌丝量为节杆菌发酵液 20ml 的菌量。
Content of mycelia in 20ml broth.

HC 浓度,可同时获得较大的转化量和理想的转化率。

(三) 简单节杆菌 A69-2 和球孢白僵菌 AS69 的协同转化

1. 白僵菌代谢物对简单节杆菌脱氢作用的影响: 在简单节杆菌单菌株培养 0 小时和 6 小时,分别接入 5%(V/V) 种量的球孢白僵菌种子液,继续在节杆菌最适条件下培养和转化。实验结果表明,发酵过程中尽管发酵液的酸碱度维持在节杆菌脱氢的最适 pH 范围,但在溶液中只存在 16MRS,16M11 α HC 和微量的 16MRS,这说明节杆菌的脱氢作用受到了完全抑制。为了进一步阐明其原因,首先把二菌株分别进行单菌株培养,然后在简单节杆菌单菌株转化过程中,分别添加球孢白僵菌菌丝体和不等量的滤除菌丝的球孢白僵菌代谢物。试验结果(表 2)看出,添加球孢白僵菌菌丝体或少量的白僵菌代谢物对节杆菌的脱氢作用无不良影响。随着添加代谢物量的增加,脱氢转化率逐渐下降,而 pH 基本不变,说明球孢白僵菌代谢物对简单节杆菌 C1-2 脱氢酶活性有抑制作用。

2. 节杆菌 A69-2 对球孢白僵菌 AS69 羟化影响: 在球孢白僵菌 AS69 的羟化过程中,不同时间加入节杆菌 A69-2,能迅速而明显地减少发酵液中 16MRS 残留量,加快羟化过程。推测这可能是由于白僵菌羟化产物 16M11 α HC 一生成,就不不断地被节

杆菌 A69-2 转化成 16MDHC, 这个动态过程解除了羟化产物 16M11 α HC 对羟化酶的抑制作用。

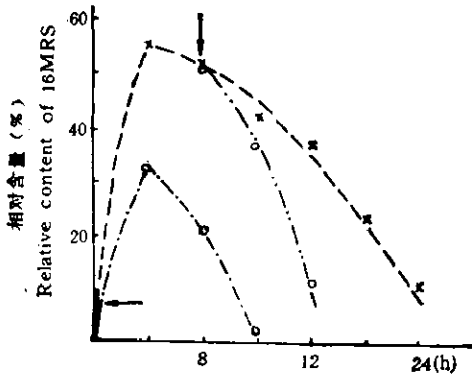


图 3 节杆菌 *A. simplex* 对球孢白僵菌 AS69 羟化的影响

Fig. 3 Effect of the culture of *A. simplex* A69-2 on 11 α -hydroxylation of *B. bassiana* AS69

- × 对照 Control
- ↓ 加入节杆菌培养物 Added the culture of A69-2

3. 两菌株的协同转化: 根据节杆菌 A69-2 和白僵菌 AS69 单菌株转化的结果,

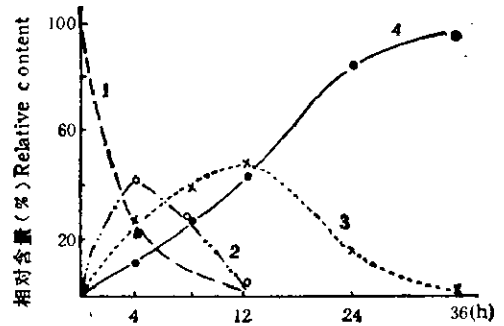


图 4 节杆菌和球孢白僵菌对 16MRS 的协同转化
Fig. 4 The Typical experimental results of an associated conversion with *A. simplex* A69-2 and *B. bassiana* AS69

1. 残留 16MRS Residual 16MRS
2. 酯酶水解物 16MRS Formed 16MRS by lipase
3. 羟化产物 16M11 α HC Hydroxylated products 16M11 α HC
4. 终产物 16MDHC End products 16MDHC

我们进行了以 A69-2 菌和 AS69 菌协同转化 16MRS 的试验。从图 4 可以看出, 在整个转化过程中, 16M11 α HC 浓度始终处在较低水平上, 这不仅明显提高白僵菌 AS69 羟化速度, 并且起到类似多次分批投

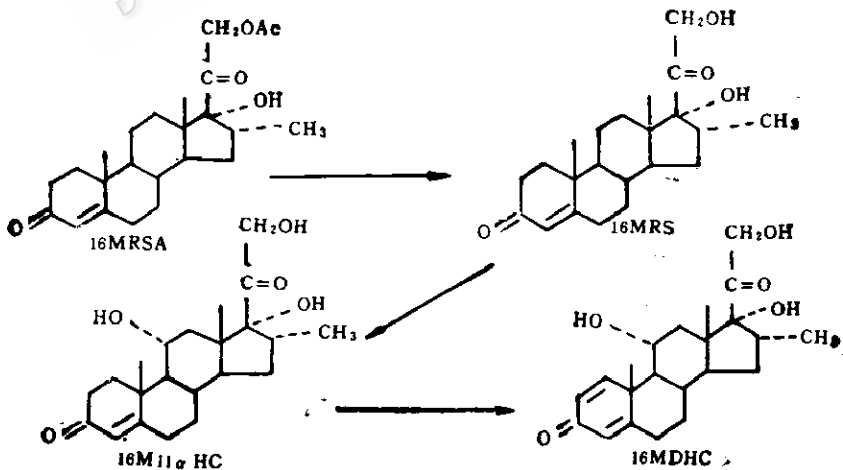


图 5 两菌株协同转化 16MRS 主要途径的推测

Fig. 5 Proposed pathway for an associated transformation of 16MRS to 16MDHC with *A. simplex* A69-2 and *B. bassiana* AS69

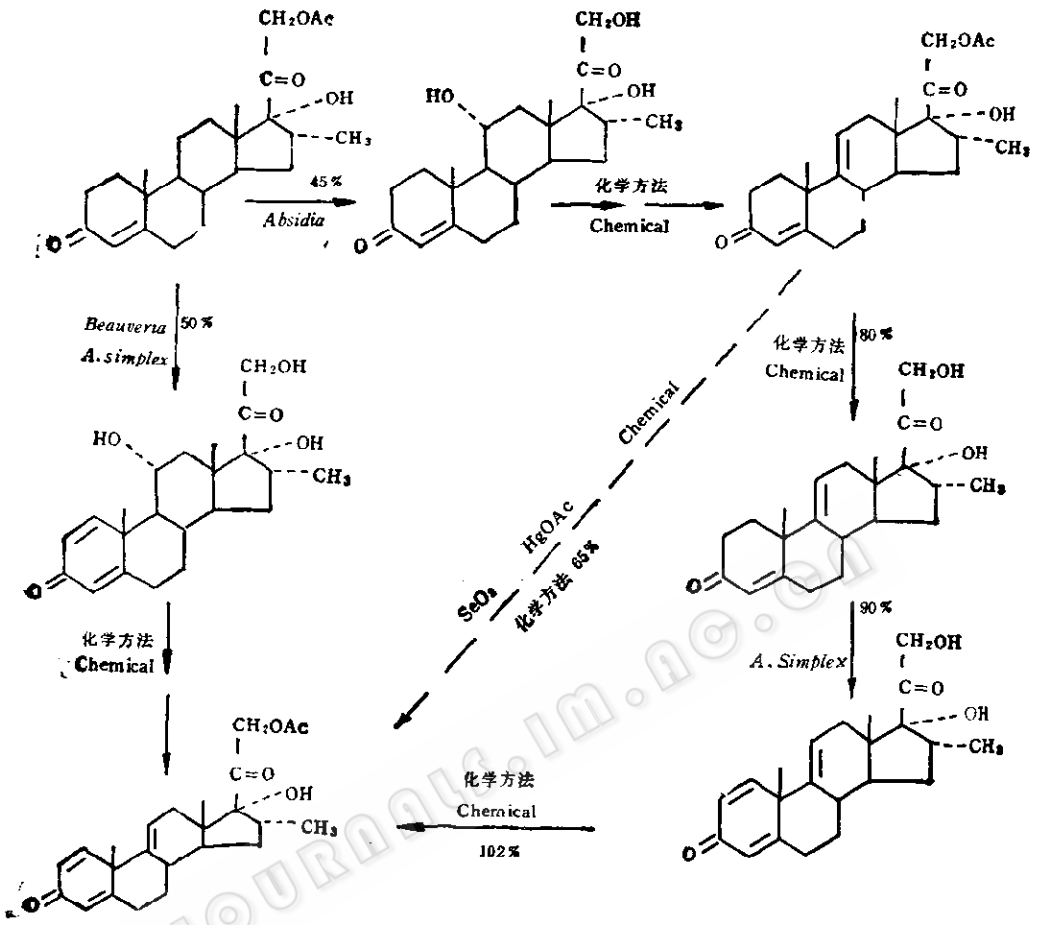


图 6 几种合成 16MDHC 方法的比较

Fig. 6 Comparison of methods of preparation of 16MDHC by chemical and microbial processes

料的作用，加快节杆菌 C_{1-2} 脱氢进程。根据两菌株协同转化过程中各种甾体化合物量的消长情况，初步推测两菌株协同转化 16MRSa 的主要途径见图 5。

在单菌株转化过程中，A69-2 对 16MRSa, 16MRS 和 16M11 α HC 的转化率分别是 21.0%、43.0% 和 76.1%。薄层层析结果表明，在两菌株协同转化过程中几乎检测不到 16MRSa 的 C_{1-2} 脱氢产物，这可能由于节杆菌脱氢酶对 16MRSa 活性较低，同时又受到酯酶水解作用的缘故，副产物明显减少。

(四) 收率试验和产物的理化性质

为考核两菌株协同转化的产率，先后进行四批试验，每批用 10 只 500ml 三角瓶，按常规程序进行。待协同转化完全后，用离心除去发酵液中的菌体，加入等量三氯乙烷提取，减压浓缩近干，粗品用少许氯仿、乙醇洗涤，在环己烷丙酮中重结晶，几批产品重量收率分别为 52.1%、48.8%、55.4% 和 57.4%。熔点为 196.4—198.3℃， UV_{max} 243.5nm, $IR^{KBr}(cm^{-1})$ 3445(—OH), 1712($C_{20}C=O$), 1658($\Delta^{14}3C=O$), 1616、1604 (Δ^{14}), 890($C=C$)。 1H NMR δ_{TMS}^{ppm}

(ppm) 0.86(3H, S, C₁₈-CH₃), 0.97(3H, d, J = 7Hz, C₁₆-CH₃), 1.42(3H, S, C₁₉-CH₃), 4.38, 4.53(AB, 2H, J = 18Hz, C₂₁-CH₂OH), 6.05(1H, SC₄-H), 6.17(1H, d, J = 10Hz, C₂-H), 7.86(1H, d, J = 10 Hz, C₁-H)。元素分析: 计算值 C = 70.55, H = 8.08; 实验值 C = 70.71, H = 8.16。

以薯蓣皂素为原料半合成地塞米松过程中, 从 16MRSA 制备 16 甲基-1, 4, 9(11)-孕甾烯化合物可经过不同途径。图 6 表明, 采用两菌株协同转化一步制备 16 MDHC, 并以此合成 16 甲基-1, 4, 9(11)-孕甾烯化合物是一条比较理想的工艺路线。

随着甾体化合物新资源、新工艺、新品种的开发, 许多学者研究了不同种微生物的混合培养和对甾体化合物的协同转化作用^[3, 4]。Spull^[5]报道了新月弯孢霉和分枝杆菌协同转化制备强的松龙。法幼华等^[6]研究了蓝色犁头霉和诺卡氏菌协同转化制备氢化可的松。Witter^[7], 张丽青^[8]分别报道了两株细菌, 细菌和诺卡氏菌的协同转化。Lee^[9]研究了节杆菌和新月弯孢霉协同转化过程脱氢酶和 C₂₀-酮基还原酶的诱导和表达。Yoshida^[10]研究了两菌株协同转化制备 9 α -氟氢化可的松过程的最

优动力学参数和随 pH 变化的数学模型。在研究两种菌协同转化 16MRSA 的过程中, 我们发现球孢白僵菌 AS69 也是简单节杆菌 A69-2 的一株较好的协同转化菌, 它既能解除 16M11 α HC 对 11 α -羟化酶的抑制作用, 明显提高羟化速度, 又起到类似分批投料的效果, 减少 16M11 α HC 高浓度对节杆菌 A69-2 脱氢酶活性的影响, 并可省去羟化产物的提取和分离手续, 有利于改善生产工艺, 使之更为合理。

参 考 文 献

- [1] 小泽光: 化学の领域, 24(4): 297, 1968.
- [2] 陈家任等: 微生物学报, 23(4): 351-355, 1983.
- [3] David, E. et al.: Appl. Microbiol., 24, edited by Perlman, D., Academic Press, New York and London, pp.159-160, 1978.
- [4] Schoettle, E. et al.: Ger. Offen, 2803661, 1979.
- [5] Spuller, C. et al.: DS Patent, 3030278, 1962.
- [6] 法幼华等: 微生物学报, 21(4): 489-492, 1981.
- [7] Winter, J.: J. Steroid Chem., 16(2): 97-105, 1982.
- [8] 张丽青等: 有机化学, 3: 171-173, 1981.
- [9] Lee, B. K. et al.: J. Gen. Microbiol., 61(1): 97-105, 1970.
- [10] Yoshida, T. et al.: Eur. J. Appl. Microbiol., Biotechnol., 11(1): 81-86, 1981.

MICROBIOLOGICAL PREPARATION OF 16 α -METHYL-11 α , 17 α , 21-TRIHYDROXYL-PREGN-1,4-DIENE-3,20-DIONE

Chen Jiaren Pu Zilian Ceng Benxin Zhang Xiaoruo*

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu)

An association transformation of 16 α -methyl-RSA to 16 α -methyl-11 α , 17, 21-trihydroxyl-pregn-1, 4-diene-3,20-dione by *Arthro bacter simpler* A69-2 with *Beauveria basiana* A69 together was studied. It was shown that association conversion with A69-2 and AS69 can increase the rate of enzymic 11-hydroxylation of 16 α -methyl-RSA. It also can reduce the effect of 11 α -hydroxyl-16 α -methyl-RS concentration on C₁₋₂ dehydrogenation of A69-2 and markedly inhibit the production

of undesirable by-products. The yield rate of 48—57% was obtained under 0.15% (W/V) steroid concentration. The approach was considered to be an ideal method for the steroid transformation.

Key words

Association transformation; 16 α -methyl-RSA

* Present address: Sydney, Australia