

节杆菌 82 菌株降解胆甾醇生成 3-氧代-联原胆烷-1, 4-二烯-22-酸*

法幼华 苏起恒

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

从 19 株有降解胆甾醇能力的微生物中, 筛选出一株节杆菌 (*Arthrobacter*) 82 菌株, 它在含硫酸钴的培养基中转化胆甾醇和积累 3-氧代-联原胆烷-1, 4-二烯-22-酸 (BNC)。转化过程中形成的主要中间物为胆甾烯酮 (Cholestenone)。降低培养基中葡萄糖的浓度并增加玉米浆的量, 可促进胆甾烯酮侧链的降解, 有利于 BNC 的积累。BNC 可在酸性溶液中形成结晶并沉淀下来, 故适宜于离心收集。用传统的理化方法及光谱分析技术测定了产物的结构及特性。

关键词 胆甾醇; 节杆菌 82 菌株; 3-氧代-联原胆烷-1, 4-二烯-22-酸

微生物降解甾醇类侧链所形成的 17-酮基甾体, 如雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (4AD)、雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (ADD) 等化合物是合成性激素、蛋白同化激素或安体舒通等的理想中间体^[1-4]。但用它们合成 C-17 位上带有 2 个碳侧链的皮质甾类和孕甾类药物仍较困难。有不少关于微生物选择性降解甾醇侧链以产生带不同长度侧链的甾体化合物的报道^[5-7], 其中带有三碳侧链的降解产物, 可用化学方法转化成二碳的侧链^[8-10]。因此将是甾醇类原料生产 C₂₁ 甾类药物的潜在有用中间体。

本文从一些能降解胆甾醇的微生物中^[11], 筛选到一株主要积累 3-氧代-联原胆烷-1, 4-二烯-22-酸 (BNC) 的节杆菌 82 菌株, 并研究了该菌株产 BNC 的条件。

材料和方法

(一) 微生物

共筛选 19 株能降解胆甾醇的微生物, 包括 6 株节杆菌 (*Arthrobacter* sp.), 6 株诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.) 和 7 株分枝杆菌 (*Mycobacteria* sp.)。

(二) 发酵

微生物在含葡萄糖 1%, 玉米浆 2.5%, K₂HPO₄ 0.1%, pH7 的培养液中, 29℃ 振荡培养 2 天后, 投加 0.25% 胆甾醇, 同时加入一定量的能抑制甾核分解的抑制剂——硫酸钴, 继续转化 3—4 天。

(三) 甾醇降解产物的分析

转化终止后, 发酵液在酸性 (pH1—2) 条件下, 用乙酸乙酯抽提, 取抽提液进行薄层层析, 以已知标准样品作对照, 展开剂为环己烷-丙酮 (8:2)。展层后, 在紫外检测灯下划出斑点, 刮取后, 再用 95% 乙醇洗脱, 然后用紫外分光光度计在 243nm 处进行定量测定。

(四) BNC 的分离和鉴定

BNC 的分离采用两种方法。一种是转化终止后, 用 1mol/L H₂SO₄ 溶液酸化发酵液到 pH1—2, 用等体积乙酸乙酯抽提 3 次, 合并抽提液, 加无水硫酸钠脱水, 过夜后, 在 50℃ 水浴下减压浓缩除去溶剂, 得固状物, 用少量溶剂洗涤后得粗品,

本文于 1990 年 8 月 23 日收到。

* 本工作属国家重点科技攻关 (75-71 07-02) 课题。

甄亚静副教授协助进行 BNC 的鉴定, 特此致谢。

再用丙酮重结晶。

另一种方法是先将发酵液调至 pH 10—12, 离心除去菌体及杂质, 上清液用 6mol/L 调到 pH1—2, 静置过夜。离心除去上清液, 沉淀物用有机溶剂抽提, 抽提液再用酸性水洗, 然后浓缩, 即可得到较纯的 BNC。

产物 BNC 的鉴定包括熔点、元素分析、紫外、红外、质谱和核磁共振等项的测定。

结 果

(一) 产 BNC 菌株的筛选

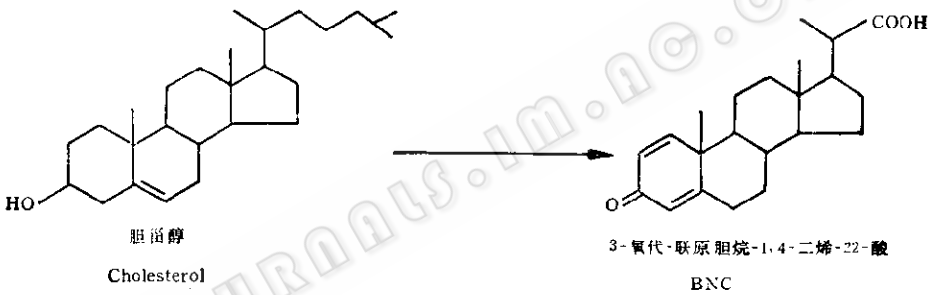


图1 节杆菌 82 菌株转化胆固醇为 BNC 的反应式

Fig 1 Reactive formula of the conversion of cholesterol to BNC by *Arthrobacter* 82

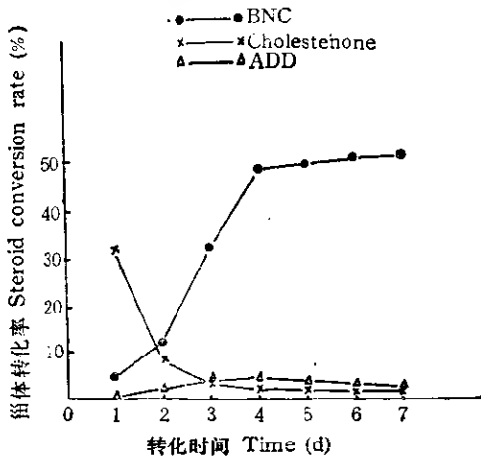


图2 节杆菌 82 菌株转化胆固醇积累的主要产物

Fig. 2 Accumulation of main metabolites from cholesterol by *Arthrobacter* 82

对 19 株有降解胆甾醇能力的微生物 (包括分枝杆菌 7 株、诺卡氏菌 6 株及节杆菌 6 株)进行了积累 BNC 的测定,发现有 4 株分枝杆菌、4 株节杆菌和 1 株诺卡氏菌在有甾核降解抑制剂的条件下能降解胆甾醇,并积累 BNC(图 1)。其中节杆菌 82 是一株较好的菌株,能转化胆甾醇主要生成 BNC,因此我们采用该菌株进行以下的条件试验。

(二) 节杆菌82菌株对胆甾醇的转化

在转化胆甾醇的不同时间,取样分析发酵液中转化产物的变化,图 2 表明节杆菌 82 菌株转化胆甾醇首先氧化成胆甾烯

酮 (Cholestenone), 再进一步降解侧链生成 BNC, 也有部份在 C-17 和 C-20 之间断裂形成 ADD。从薄层层析谱上还可检出有微量 20-羧基-娠烷-4-烯-3-酮和 4 AD。BNC 的生成量从第 2 天到第 4 天呈直线上升,最高转化率达 50% 左右。

(三) 硫酸钴浓度对积累 BNC 的影响

在投加胆甾醇时,添加不同浓度的硫酸钴(甾核降解抑制剂),待转化 3 天后测定甾体代谢产物。结果表明硫酸钴浓度低于 0.05% 时,不能积累任何转化产物,随着硫酸钴浓度从 0.075 到 0.125%,BNC 的积累量逐渐增加,转化率最高达 55%。浓度继

表 1 硫酸钴浓度对胆甾醇转化的影响

Table 1 Effect of cobalt sulfate concentration on cholesterol conversion

硫酸钴 Cobalt sulfate (%)	甾体转化率 Steroid conversion rate (%)		
	BNC	ADD	cholestenone
0	—	—	—
0.05	—	—	—
0.075	26.8	0.61	—
0.10	43.5	0.64	—
0.125	55.4	2.3	—
0.15	52.8	2.0	0.64
0.20	51.6	2.3	2.3
0.25	45.2	2.1	2.1

“—” 无产物 No products

“—” 产物极少 Few product

表 2 抑制剂添加时间对积累产物的影响

Table 2 Effect of various time of addition inhibitor on accumulation products

抑制剂添加时间 Inhibitor added time (h)	甾体转化率 Steroid conversion rate (%)			
	BNC	ADD	4AD	cholestenone
胆甾醇添加前 4h 4h before cholesterol added	33.4	7.41	3.74	10.52
胆甾醇添加前 2h 2h before cholesterol added	45.1	9.20	1.26	3.74
与胆甾醇同时加 Added with cholesterol	45.1	2.81	—	0.90
胆甾醇添加后 2h 2h after cholesterol added	38.5	1.00	—	—
胆甾醇添加后 4h 4h after cholesterol added	25.5	0.86	—	—

“—” 无产物. No products

“—” 产物极少 Few product

续提高,对积累 BNC 不利,还影响胆甾烯酮的降解(表 1,图 3)。

(四) 硫酸钴添加时间对积累 BNC 的影响

比较了 5 种不同的添加硫酸钴时间(投胆甾醇前 4 小时;前 2 小时;与胆甾醇同时加;投胆甾醇后 2 小时;后 4 小时)对积累 BNC 的影响。结果指出,如在投胆甾醇前 4 小时加硫酸钴,可形成较多的胆甾烯酮、ADD 和 4AD;在投胆甾醇后再加硫酸钴,则随着添加时间的顺延,主产物 BNC 的积累量随之减少。因此,添加硫酸

钴的最佳时间以和胆甾醇同时加为好(表 2)。

(五) 乙醇浓度的影响

用不同量的乙醇溶解胆甾醇后再投加,转化后的结果列于表 3。当乙醇浓度在 5% (V/V) 以上时,随着浓度的增加,BNC 的生成量逐步减少。乙醇浓度高,主要影响胆甾烯酮的降解。若乙醇浓度低于 6.25%,则转化液中没有胆甾烯酮的积累;超过此浓度,特别在 8% 以上时,基本上没有 BNC 生成。

(六) 葡萄糖浓度对转化的影响

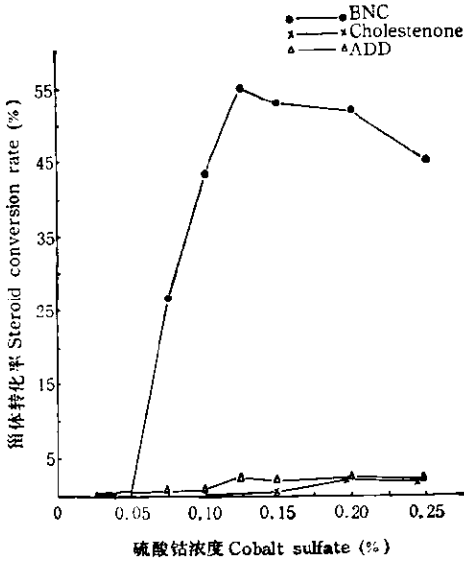


图3 硫酸钴浓度对节杆菌 82 菌株积累 BNC 的影响
Fig. 3 Effect of cobalt sulfate concentration on accumulation of BNC by *Arthrobacter* 82

表 3 乙醇浓度对胆甾醇转化的影响

Table 3 Effect of alcohol concentration on cholesterol conversion

乙醇 Alcohol (%)	BNC 转化率 Conversion rate (%)	胆甾烯酮生成情况 Cholestenone production
5.0	45	-
6.25	36	-
7.50	25	++
8.75	±	+++
10.0	-	++++

“-” 无产物 No product

“++++” 产物多 Many products

在配制培养基时，分别添加不同浓度的葡萄糖，结果发现葡萄糖浓度越高，BNC 的产量越低。在高浓度葡萄糖条件下，似乎抑制了脂族侧链的断裂，从而积累较多的胆甾烯酮，因此对积累 BNC 来说，培养基中葡萄糖浓度不能高于 1% (图 4)。

(七) 玉米浆浓度对转化的影响

节杆菌 82 菌株在不同浓度的玉米浆培养基中生长，然后投加胆甾醇，转化结果

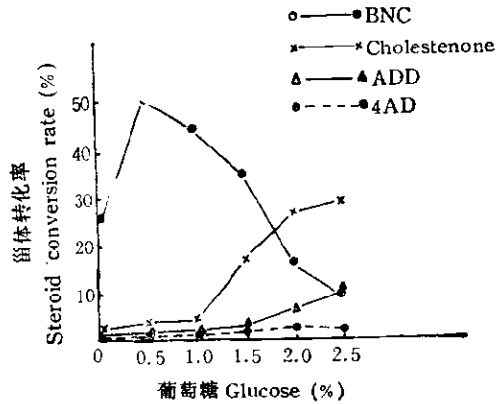


图 4 葡萄糖浓度对胆甾醇转化的影响
Fig. 4 Effect of glucose concentration on cholesterol conversion

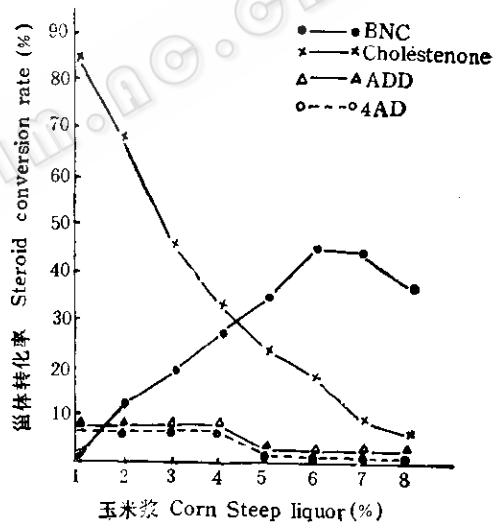


图 5 玉米浆*浓度对胆甾醇转化的影响
Fig. 5 Effect of corn steep liquor concentration on cholesterol conversion

(图 5) 表明，降解胆甾醇所生成的胆甾烯酮随玉米浆浓度的提高而减少，而 BNC 的生成量则不断增加。说明玉米浆有促进胆甾烯酮侧链部份降解的作用。当玉米浆浓度为 6—7% 时，BNC 产量最高。

* 本试验用的是工业用玉米浆，较稀，6% 约相当于华北制药厂生化试剂玉米浆浓度的 2.5%。

(八) 通气量对转化的影响

在 250ml 摇瓶中装入不同体积的培养基, 转化结果(图 6)表明, 通气量明显影响 BNC 的生成量。装量从 20ml 增加到 80ml, BNC 的转化率由 56.8% 下降到 46.0%。

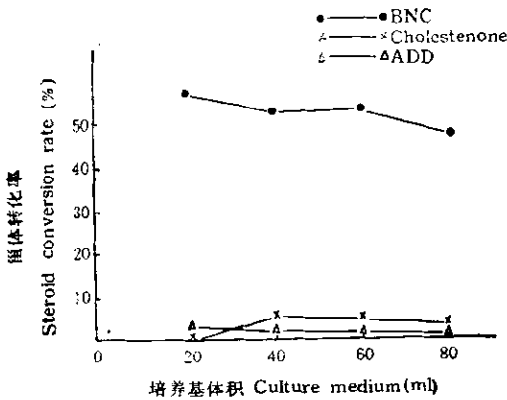


图 6 通气量对积累产物的影响

Fig. 6 Effect of aeration rate on accumulation product

(九) 产物的理化鉴定

m.p. 236.7—237.5°C (未校正); UV $\lambda_{\text{Max}}^{\text{EtOH}}$ (nm) 243.5; IR $\nu_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) 1720 (COOH), 1657, 1614, 1602 ($\Delta^4 - 3 = 0$); MS m/z M^+ 与 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_3$ 一致; $^1\text{HNMR}$ $\delta_{\text{Me}_2\text{Si}^{\text{CDCl}_3}}$ (ppm) 0.76 (3H, s, 19CH₃), 1.24 (3H, s, 18CH₃), 6.09 (1H, br, s, 4-H), 6.28 (1H, dd, J = 10 and 2Hz, 2-H), 7.0 (1H, d, J = 10Hz, 1-H); $^{13}\text{C-NMR}$ $\delta_{\text{Me}_2\text{Si}^{\text{CDCl}_3}}$ (ppm) 12.3 (C-21, q), 17.1 (C-18, q), 18.8 (C-19, q), 22.9 (C-11, t), 24.6 (C-15, t), 27.3 (C-12, t), 32.9 (C-7, t), 33.7 (C-6, t), 35.6 (C-8, d), 39.3 (C-16, t), 42.6 (C-13, s), 42.8 (C-20, d), 43.6 (C-10, s), 52.3 (C-17, d), 52.4 (C-9, d), 55.1 (C-14, d), 123.7 (C-4, d), 127.3 (C-2, d), 155.9 (C-1, d), 169.3 (C-5, s), 181.9 (C-22, s), 186.3 (C-

3, s); Anal. $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_3$; 计算值%: C, 77.19; H, 8.77. 测定值%: C, 76.87; H, 8.92. 根据上述测定结果, 证明主产物为 BNC。

讨 论

我们曾报道节杆菌 82 菌株在营养培养基中培养后能分泌大量胞外胆甾醇氧化酶, 此酶能使胆甾醇转化成胆甾烯酮^[12]。

节杆菌 82 菌株在营养培养基中生长后能完全降解胆甾醇, 只有在甾核降解抑制剂——硫酸钴的存在下, 才能积累甾体产物。当培养基中葡萄糖浓度较低而玉米浆浓度较高时, 降解胆甾醇的主要产物是 BNC。提高葡萄糖或减少玉米浆的量而导致胆甾烯酮侧链降解受阻的原因, 很可能是在这样的条件下, 胆甾醇氧化酶生成量减少所致^[13]。

根据 BNC 的特性, 可采用酸法沉淀以分离产物。此法简便且不用有机溶剂, 故对工业生产甚有价值。

BNC 是微生物选择性降解胆甾醇的一个中间产物。如何既提高微生物的降解能力, 又能积累更多的 BNC, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Nagasawa, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**: 798, 1970.
- [2] Martin, C. K. A.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **22**: 29, 1977.
- [3] Imada, Y. and I. Nitta: *发酵工工業(日)*, **38**: 1117, 1980.
- [4] Kieslich, K.: *Economic Microbiology*, **5**: 369—465, (ed. Rose, A. H.), Academic Press, 1980.
- [5] Marsheck, W. J. et al.: *Appl. Microbiol.*, **23**: 72, 1972.
- [6] Hill, F. F. et al.: *Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**: 25, 1982.
- [7] Iida, M. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **63**: 559, 1985.
- [8] Trost, B. M. and Y. Tamaru: *J. Am.*

Chem. Soc., **99**: 3101, 1977.

- [9] Nitta, I. and H. Ueno: 有机合成化学 (日), **45**: 445, 1987.
- [10] Schonecker, B. 4th Symposium on Biochemical Aspects of Steroid Research, p. 24, Dec. 5-10, Holzgau/Erzgebirge, G. D. R., Abstract, 1988.
- [11] 于连生、法幼华: 中国微生物学会第四届代表大会论文摘要汇编, 第 176 页, 1982 年 10 月, 天津.
- [12] 法幼华、苏起恒: 微生物学报, **24**: 294, 1984.
- [13] 苏起恒、法幼华: 微生物学报, **31** (6): 449-453, 1991.

MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF 3-OXO-BISNORCHOLA-1, 4-DIEN-22-OIC ACID FROM CHOLESTEROL BY AN *ARTHROBACTER* 82

Fa Youhua Su Qiheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Among nineteen strains of *Arthrobacter* which showed to be able to decompose cholesterol in preliminary experiments, a strain of *Arthrobacter* 82 was selected for microbiological production of 3-oxo-bisnorchola-1,4-dien-22-oic-acid (BNC) from cholesterol. The yield is over of 50% weight per cent concentration of 0.25% in the presence of cobalt sulfate. The main intermediate in such a conversion process is cholestenone. Lower glucose and higher corn steep liquor

concentration were favorable for side chain degradation of cholestenone and more BNC could be produced. BNC was crystallized in acidic solution and obtained by centrifugation. The structure and characteristics of BNC has been identified by means of conventional physical, chemical and spectrometric techniques.

Key words

Cholesterol; *Arthrobacter* 82; 3-oxo-bisnorchola-1,4-dien-22-oic acid (BNC)