

5 α - $\Delta^{9(11)}$ -16 α -甲基-3 β ,17 α ,21-三羟基-孕甾烯-3 β , 21-双醋酸酯-20 酮的微生物转化

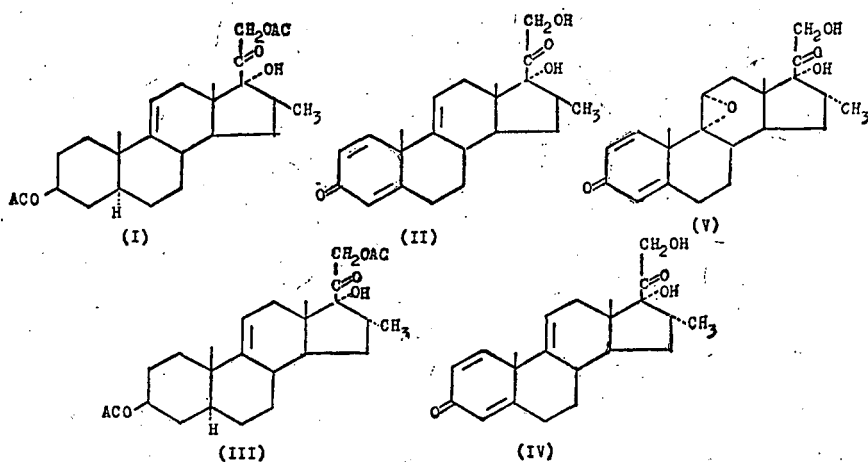
张丽青* 王敬一

(中国科学院上海有机化学研究所)

提要 简单节杆菌 A₁ 及耻垢杆菌 MS₁ 两种菌混合培养转化地塞米松中间体 5 α - $\Delta^{9(11)}$ -16 α -甲基-3 β ,17 β ,21-三羟基-孕甾烯-3 β ,21-双醋酸酯-20 酮 (III) 可得到 16 α -甲基- $\Delta^{1,4,9(11)}$ -孕甾烯-17 α ,21-双羟基-3,20 双酮(IV) (65%收率) 及少量的 16 α -甲基- $\Delta^{1,4}$ -孕甾烯-9 α ,11 α -环氧-17 α ,21 双羟基-3,20 双酮(V)。

关键词 微生物转化; 简单节杆菌; 耻垢杆菌; 混合培养, 地塞米松

前文⁽¹⁾我们曾报道用诺卡氏菌和节杆菌混合培养转化 5 α - $\Delta^{9(11)}$ -16 β -甲基-3 β ,17 α ,21-三羟基-孕甾烯-3 β ,21-双醋酸酯-20 酮(I), 获得 1,4 位脱氢产物(II)。我国生产地塞米松的原料亦是蕃麻皂素, 因此, 我们考虑将这一微生物方法应用于地塞米松中间体——5 α - $\Delta^{9(11)}$ -16 α -甲基-3 β ,17 α ,21-三羟基-孕甾烯-3 β ,21-双醋酸酯-20 酮(III)的转化, 结果亦能得到 1,4 位脱氢产物(IV)。另外, 我们又筛选了一些其它菌株, 发现以简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex* A₁) 与耻垢杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* MS₁) 混合培养转化 (III) 为最好。如底物用微粒结晶的水混悬液投料, 投料浓度 0.5% 时, (IV) 的重量收率达 65% 左右, 按克分子计算收率可达 80% 左右。中间体(III)由上海第十二制药厂提供。



本文于 1985 年 11 月 13 日收到。

* 现在工作单位中国科学院上海生物工程实验基地

试验方法及结果

一. 试验菌株

Bacteria for test	No. for testing bacteria	Remarks
<i>Nocardia</i> sp	NO.76816	From lab. of Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai
Ditto	N ₁	From Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai
Ditto	N ₃	From Biological Department of Shanghai, Fu Dan University, Shanghai
<i>Mycobacterium phlei</i>	My	From Shanghai Second Military College of Medicine
<i>Bacillus</i> sp	B ₄	From lab. of Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	MS ₁	Ditto
<i>Arthrobacter simplex</i>	A ₁	Ditto

二. 菌株斜面培养

同参考文献(1)。

三. 菌株筛选

文献报道^(2~7)棒状杆菌(*Corynebacterium simplex*), 诺卡氏菌(*Nocardia* sp.), 芽孢杆菌(*Bacillus*), 分枝杆菌(*Mycobacterium* sp.)及耻垢杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)等均能使A环脱氢之能力。我所保藏的节杆菌A₁, 只能使A环1,2位脱氢, 而上述其它菌株虽能使1,2及4,5位同时脱氢, 但得到的是 $\Delta^{1,4}$ 与 $\Delta^{4,5}$ 的混合物, 这两种产物较难分纯。因此我们采用节杆菌A₁与上述其它菌株各个混合培养进行筛选, 以提高(IV)的收率。筛选方法⁽¹⁾, 用250 ml三角瓶盛培养液50 ml, 灭菌后, 接种上述菌株及节杆菌斜面各一支。振荡培养(110次/min), 30°C培养16 h左右, 将(III)用乙醇溶解(乙醇浓度为发酵液的4%, 共投料浓度为0.1%)后加入发酵液中, 并加吐温-80 0.01%, 继续振摇, 每隔24 h取样分析。共转化48 h。有三株菌与节杆菌混合转化较好, 其结果是: 诺卡氏菌No.76816(IV)的收率为44.2%, 诺卡氏菌N₃为39.3%, 耻垢杆菌MS₁为57.5%。以耻垢杆菌与节杆菌A₁混合转化为最好。

四. 产物定量分析

采用纸层析法滤纸(杭州新华3号)用30%丙二醇甲醇溶液浸过后点样, 展开剂: 石油醚(60-90°C)一氯仿一醋酸乙酯(20:4:3), 在紫外灯254 nm下画出斑点, 剪下, 用5 ml 95%乙醇洗脱, 240 nm波长(751型紫外分光光度计)测定OD值, 根据比耳公式计算收率。

五. 产物(IV)及(V)的鉴定**

按照方法(三), 将化合物(III)用耻垢杆菌及节杆菌混合菌种转化48 h。发酵液用乙酸

** 化合物的熔点测定之温度计均未校正。

乙酯提取, 浓缩, 然后用硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析(20×20 cm), 氯仿-丙酮 9:1 展开。将几块板上分离的相同谱带合并, 用丙酮洗脱, 浓缩后分别得到化合物(IV)及(V), 进行物化性质鉴定。

化合物(IV): 熔点 224~227°C; 与化学合成的地塞米松中间体(IV)(已知品)的混熔不下降。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 240 nm (log ϵ 4.19); IR $\nu_{\max} \text{cm}^{-1}$ 3430, 3200(-OH), 1725(C=O), 1660(α, β 不饱和酮), 1610, 1640(CH=CH), 910(CH=CH); MS m/z M⁺356, 341(M-CH₃), 297(M-C₂H₅O₂); ¹HNMR(CDCl₃) δ 0.74(3 H, s, C₁₈-CH₃), 0.94(3 H, d, J=6.8, C₁₆-CH₃), 1.42(3 H, s, C₁₉-CH₃), 4.45(2 H, AB 型 J=20, C₂₁-CH₂OH), 5.53(1 H, J=4.8, C₁₁-H), 6.08(1 H, s, C₄-H), 6.29(1 H, d, J=10, C₂-H), 7.19(1 H, d, J=10.8, C₁-H)。根据上述数据证明(IV)的结构为 16 α -甲基- $\Delta^{1,4,9(11)}$ 孕甾三烯-17 α , 21-二羟基-3, 20 双酮。

化合物(V): 熔点 229~232°C; UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 240 nm (log ϵ 4.18); IR $\nu_{\max} \text{cm}^{-1}$ 3370, 3470(-OH) 1710, 1660(α, β 不饱和酮) 1610, 1630(CH=CH), 997(92, 112环氧); MS m/z , M⁺373, 354(M-H₂O), 313(M-C₂H₅O₂); ¹HNMR(CDCl₃) δ 0.84(3 H, s, C₁₈-CH₃), 0.9(3 H, d, J=7.6, C₁₆-CH₃), 1.54(3 H, s, C₁₉-CH₃), 3.36(1 H, d, J=4.8, C₁₁-H), 4.42(2 H, AB 型, J=20.8), C₂₁-CH₂OH), 6.17(1 H, s, C₄-H), 6.23(1 H, d, J=11.2, C₂-H), 6.63(1 H, d, J=10, C₁-H), 从 IR 997 cm^{-1} 9 α , 11 α 环氧特征峰和 ¹HNMR δ 3.36 C₁₁-环氧化学位移这两点来看, 化合物(V)可能是(IV)的 9, 11 α 环氧化合物, 且与已知化合物(IV)的 9, 11 β -环氧化合物混熔有降低。硅胶薄层层析 Rf 值也不一致, 前者为 0.26, 后者为 0.14, 证实(V)为(IV)的 9, 11 α -环氧化合物^(1,12)。

六. 发酵条件的选择

以下试验都是用耻垢杆菌 MS₁ 与节杆菌 A₁ 混合菌种转化。投料浓度为 0.1%, 转化时间为 48 h, 温度为 30°C。

1. 培养基的选择

Tab 1. Seven kinds of medium and their conversion results

Content	Medium						
	1	2	3	4	5	6	7
KCL	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.05%	0.02%	—
FeSO ₄ ·H ₂ O	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	—
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	—	0.02%	0.1%
NaNO ₃	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	—	1.5%	—
Glucose	3%	3%	2%	2%	—	2%	—
Corn steep liquor	2%	2%	—	—	—	—	—
Yeast extract	—	0.1%	0.5%	0.5%	0.4%	0.5%	0.6%
Peptone	—	—	0.25%	1%	1%	0.25%	—
NH ₄ NO ₃	—	—	—	—	0.6%	—	1.6%
Maltose	—	—	—	—	6%	—	—
pH	6.7	6.7	6.9	7.0	natural	7.0	6.7
Yield of compound	48.3%	52.7%	57.8%	29.7%	16.2%	36.2%	55%

从表 1 看出以培养基 3 号转化为好, 因此下列实验均采用 3 号的配方。

2. 投料时 pH 对转化的影响

Tab 2. Effect of pH

pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
Yield of compound(IV)	—	39.3%	43.9%	50.6%	56.1%	50.8%	—

从表中数据可看出 pH 以 7.5 左右为好。

3. 温度对转化的影响 我们试验了两种 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $32 \pm 2^\circ\text{C}$ 两种温度的转化, 前者(IV)的收率为 47.1%, 后者(IV)的收率为 52.7%。看来温度偏高一些(32°C 左右)转化收率较高。

4. 金属离子对转化的影响^(4,7) 化合物(III)在投料后 2 h, 加入下列各种金属离子, 其浓度都为 1×10^{-4} 克离子。

Tab 3. Effect of metal ion

Metal ion	—	Mn [#]	Zn [#]	Ca [#]	Mg [#]	Al [#]	Cu [#]	Fe [#]
Yield of compound(IV)	47.1%	55%	47.6%	35.3%	39.3%	32.3%	40%	32.3%

表 3 显示 Mn⁺⁺ 对转化有些促进作用。

七. 5 liter 大摇瓶实验

采用两级发酵, 每瓶盛培养液 400 ml, 灭菌后, 接入已培养 24 小时的耻垢杆菌及节杆菌各一小瓶(50 ml/250 ml 三角瓶)。 $32 \sim 34^\circ\text{C}$ 下振荡培养 16 h, 加入 0.5 g(III)/16 ml 95%乙醇, 吐温 80 及泡敌各一滴。2 小时后, 加 1×10^{-4} 克离子 Mn⁺⁺。转化 48 小时后, 用 1:2 体积的醋酸乙酯提取 3 次, 浓缩、结晶用乙醚洗涤后得白色产物(IV), 结果见表 4。

Tab 4. The result from 5 liter flask

No.	Compound (III) (g)	Conversion product (IV)		
		Weight (g)	MP. °C	Yield(W/W)
1	0.5	0.283	218~220	56.7
2	0.5	0.287	222~230	56.2
3	0.5	0.288	203~211	57.7
4	0.5	0.264	212~222	52.8
5	0.5	0.268	211~223	53.7

八. 提高投料浓度试验

用溶媒(如乙醇)溶解底物投料, 使投料浓度受到限制, 因提高溶媒浓度对菌有抑制作用, 而影响转化。故欲提高投料浓度需用固体(微粒结晶)投料, 底物颗粒越小, 与菌的接触面越大, 有利于转化。我们采用两种不同的方法: 水析法⁽⁸⁾及用胶体研磨制成微粒结晶($1 \sim 3 \mu$)投料, 浓度为 0.5%, 收率均可达 65%左右。

Tab 5. Micro-crystalline compound (III) transformed by mixed culture

No*	Compound (III) (g)	Compound (IV)		Yield	
		Weight (g)	MP. °C	W/w	W/mele.
1	2	1.289	222~230	64.5%	80.8%
2	2.5	1.688	224~229	67.4%	84.4%
3	2.5	1.632	225~229	65.1%	81.6%
4	2.52	1.699	220~228	67.4%	84.5%
5	2.48	1.679	222~230	67.8%	85%

* No. 1~3 substrates were dissolved in EtOH and then precipitated in water; No.4~5 substrates were ground by colloid mill

将化合物(IV)与水以 1:5 体积混合, 加吐温-80 0.1%, 用胶体磨反复研磨几次, 使成 1~3 μ 微粒, 作投料用。培养及转化条件与底物浓度略有不同, 培养基改用 2 号培养基, 它菌生长的多, 培养 16 h 后, 加入(III)10 mg 诱导 2 h, 再投入(III)240 mg, 再隔 2 h 后加 Ni^{++} (1×10^{-2} 克离子)^(9,10), 转化 96 h。

讨 论

我们曾分别用单一的耻垢杆菌(MS_1)或简单节杆菌(A_1)转化化合物(III), 发现耻垢杆菌(MS_1)水解 C_3 , C_{21} 位醋酸酯的能力及 $C_{4,5}$ 位脱氢能力均较强, 而对 $C_{1,2}$ 脱氢较弱, 因此单用此菌就得到 $C_{4,5}$ 脱氢及 $C_{1,4}$ 脱氢的混合物, 难获得产率较高的化合物(IV)。而节杆菌 A_1 对 $C_{1,2}$ 脱氢能力较强, 对醋酸酯的水解能力较差, 且付产物(V)主要是由节杆菌 A_1 转化产生的。因此, 我们采用上述两种菌混合培养而使化合物(IV)的得率提高。

当两种菌培养在 3 号培养基中, 投料浓度提高至 0.5%, 转化 96 h, 尚有较多原料没有转化。但在 2 号培养基中, 混合菌生长量较多, 转化虽较快, 但化合物(V)生成亦较多。加入 $NiSO_4$, 能抑制(V)的产生, 而使(IV)的产率提高至 65% 左右。

致谢 上海第十二制药厂冯显敏参加部分工作。

参 考 文 献

- 张丽青等. 5α - $\Delta^{(11)}$ - 16β 甲基- 3β , 17α , 21 -三羟基-孕甾烯- 3β , 21 -双醋酸酯- 20 酮和 5α , 17α -甲基- 17β -羟基-雄甾- 3 酮的微生物转化. 药学报 1981;16:356.
- Knodo E. Steroid 1-dehydrogenation by a crude enzyme preparation from *Arthrobacter simplex*. *Agr Biol Chem* 1963;27:69.
- Levy HR, et al. Bacterial oxidation of steroid. I. Ring A dehydrogenatons by intact cells. *J Biol Chem* 1959;234:2009.
- Levy HR, et al. Bacterial oxidation of steroids. II. Studies on the enzymatic mechanism of ring A dehydrogenation. *Ibid* 1959;234:2014.
- 中国科学院有机化学研究所第四室 402 组. 用耻垢杆菌 MS_1 使 $3\beta, 17\alpha, 21$ -三羟基- 11 酮基- 5α -孕甾- 21 醋酸酯转化成可的松的研究. 有机化学 1976;3:19.
- Kluepfel D, et al. The microbiological dehydrogenation of 16β methyl- 5α -dehydrocortisone. *Experientia* 1962;18:441.
- 四川省微生物研究所等. 倍他米松中间体(17α -羟基- 16β -甲基孕甾- $4,9(11)$ -二烯- $3,20$ 酮)微生物脱氢的研究. 微生物学报 1977;17:41.
- 陈玖等. 微生物转化制备 17α -甲基- 17β -羟基- $\Delta^{1,4}$ -雄甾二烯- 3 酮. 医药工业 1983;4:7.
- Nagasawa M, et al. Microbial transformation of sterols. part v. Inhibitors of microbial degradation of cholesterol. *Agr Biol Chem* 1970;34:838.
- 法幼华等. A 环饱和甾体的微生物转化作用. I. 用 17α -甲基表雄醇制备去氢 17α -甲基睾丸素. 微生物学报 1980;20:185.
- Coronelli C, et al. An epoxidation by *Corynebacterium simplex*. *Experientia* 1964;20:208.

MICROBIAL TRANSFORMATION OF 16α -METHYL- 5α - $\Delta^{9(11)}$ -
PREGNENE- 3β , 17α , 21-TRIOL-20-ONE- 3β , 21-DIACETATE

ZHANG Li-Qing and WANG Jing-Yi

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai)

ABSTRACT Incubation of 16α -Methyl- 5α - $\Delta^{9(11)}$ -Pregnene- 3β , 17α , 21-triol-20-one 3β , 21-diacetate (III) with a mixed culture of *Mycobacterium smegmatis* (MS₁) and *Arthrobacter simplex* (A₁) gave 16α -methyl-1,4,9(11) Pregnatriene- 17α , 21-dihydroxy-3,20-dione (IV) (65% yield) and a small amount of 16α -methyl- $\Delta^{1,4}$ -pregnadiene- 9α , 11α -epoxy- 17α , 21-diol-3, 20-dione (V). At 0.5% substrate concentration, Ni ion was shown to be needed to inhibit the production of the by-product compound(V) and increase the yield of compound(IV).

Key words Microbial transformation; *Arthrobacter simplex*; *Mycobacterium smegmatis*; Mixed culture; Dexamethasone