

总状毛霉对 4-烯-3-酮甾体的生物转化研究

葛文中¹, 李楠¹, 单丽红², 刘宏民²

(¹黑龙江八一农垦大学生命科技学院 大庆 163319)

(²郑州大学化学系 郑州 450001)

摘要:从土样中筛选到一株能转化甾体的菌株,经形态观察,鉴定为总状毛霉(*Mucor racemosus*)。首次利用该菌株对 4-烯-3-酮类甾体衍生物进行生物转化,目的是合成具有潜在活性的羟基类 4-烯-3-酮衍生物。转化条件为 27℃, 220r/min 振荡培养 4d。转化产物经乙酸乙酯萃取,用硅胶柱层析法分离,通过红外、质谱和核磁分析确定了甾体转化产物的化学结构。黄体酮生物转化得到的产物是 14 α -羟基-4-孕甾烯-3,20-二酮和 7 α ,14 α -二羟基-4-孕甾烯-3,20-二酮;4-雄烯二酮的转化产物是 14 α -羟基-雄甾-4-烯-3,17-二酮、14 α ,17 β -二羟基-雄甾-4-烯-3-酮和 6 α ,17 β -二羟基-雄甾-4-烯-3-酮。研究结果表明总状毛霉具有转化甾体的能力,对 4-烯-3-酮类甾体进行生物转化的主要产物是 14 α -羟基甾体衍生物。

关键词:生物转化;总状毛霉;14 α -羟基化;甾体

中图分类号:Q935 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-6209(2007)03-0540-04

14 α -羟基甾体具有重要的生理活性和药用价值,已经成为人们研究的热点^[1,2]。国外研究人员发现 14 α -羟基-5 β ,14 β -孕甾烷的 C3 糖苷衍生物与心肌中的强心苷受体发生较强的作用^[3]。14 α -羟基-雄甾-4-烯-3,17-二酮是制备激素的有用中间体,6 β ,14 α -二羟基-雄甾-4-烯-3,17-二酮及 14 α -羟基-雄甾-4-烯-3,6,17-三酮具有雄激素活性,能够有效地抑制乳腺癌细胞,14 α -羟基-雄甾-4-烯-3,6,17-三酮则抑制人体胎盘和子宫肿瘤中的芳香化酶活性与雌激素的生成^[4,5]。

微生物对甾体底物的羟基化反应,具有区域选择性和立体选择性,在甾体的生物转化中具有重要的地位和意义。Hu 等^[6]研究了不同菌种转化不同底物的 14 α -羟基化反应,发现梨形卷枝霉[*Thamnostylum*(= *Helicostylum*) *piriforme* ATCC 8992]在生成 14 α -羟基黄体酮时具有较高的选择性,而灰蓝毛霉(*Mucor griseo-cyanus* ATCC 1207a)更适合于制备雄烯二酮和睾酮的羟基衍生物。日本已经有专利^[7]报道了不同菌株转化雄甾-4-烯-3,17-二酮制备 14 α -羟基-雄甾-4-烯-3,17-二酮。

总状毛霉是真核类微生物,可以分泌蛋白酶,主要用于腐乳的生产^[8]。总状毛霉能产生一定活力的凝乳酶^[9],将牛奶中的蛋白质凝结并排出乳清。在亲水载体聚乙烯醇凝胶(PVA-gel)上的脂酶能在无水介质中催化乙酸对硝基苯酯(p-NPA)等化合物水解和酯的合成^[10]。

但到目前为止,尚未见有利用总状毛霉对甾体衍生物进行生物转化的文献报道。本研究为从土壤中筛选具有转化甾体药物中间体的真菌,并获得有药用价值的甾体化合物。

经过菌种鉴定,发现一株总状毛霉菌株(*Mucor racemosus*,编号 ACCC 0401)对不同结构的 4-烯-3-酮类甾体药物中间体进行了生物转化,获得具有巨大生物活性潜力的 14 α -羟基甾体衍生物。本研究结果为利用真菌的转化功能设计和开发新药提供了良好的理论和与应用基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:总状毛霉(*M. racemosus* ACCC 0401),自筛,由中国微生物菌种保藏管理委员会农业微生物保藏中心(ACCC)鉴定。

1.1.2 培养基:①分离培养基:每升水含马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 20g,黄体酮 0.2g。②斜面培养基:每升水含马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 20g, pH 自然。③发酵培养液:每升水含蛋白胨 12g,葡萄糖 30g,磷酸二氢钾 1.3g,酵母膏 1g,用 1mol/L HCl 调解 pH 为 4.5。

1.1.3 试剂和仪器:试剂雄甾-4-烯-3,17-二酮(4-雄烯二酮)和 4-孕甾烯-3,20-二酮(黄体酮)购自湖南正驰药业有限公司,熔点使用 WC-1 型显微熔点仪测定,温度计未经校正;IR 谱使用 BIO-RAD 公司 FTS-40 型红外分光光度计测定, KBr 压片;¹H NMR、¹³C NMR 使用瑞士 Bruker DPX-400 型超导核磁共振仪测定;EMI-MS 用 Bruker Esquire3000 离子阱液相色谱电喷雾质谱仪测定。

1.2 薄层层析法(TLC)

将硅胶 G 制备成 0.25mm 厚的硅胶薄层层析板(20cm × 5cm),氯仿:乙酸乙酯 = 1:1(V/V)作展开剂,浓硫酸:甲醇

基金项目:黑龙江省教育厅科研基金项目(10551221)

作者简介:葛文中(1963-),男,山东日照人,副教授,博士,现主要从事生物制药的教学与科研工作。E-mail: wenzhongg@126.com

收稿日期:2006-09-06 接受日期:2006-09-29 修回日期:2006-12-28

= 1:1 为显色剂。样品用上行展开法展开,吹干后显色剂喷雾,电热板上加热显色。

1.3 菌种分离与筛选

取 1g 土壤置于已灭菌的试管中,加 10mL 无菌水后,漩涡振荡器振荡摇匀,静置后,取上清液,滴于分离培养基上,再用玻璃棒涂匀,然后置于 27°C 恒温培养箱中培养 1~5d。从分离培养基上挑取单菌落,转移到分离培养基上。相同条件下继续培养 1~5d,根据形态判断,将纯的菌株转移到斜面培养基上,并编号保存。将甾体底物进行发酵培养(详见 1.5 甾体转化试验),发酵液用乙酸乙酯萃取后,用硅胶薄层析法(TLC)检测,根据 TLC 检测结果,筛选出具有转化甾体能力的菌株。

1.4 总状毛霉菌丝体重量测定

在总状毛霉的斜面培养基试管中加入 10mL 无菌水后,轻轻刮下菌体,转移至已灭菌的干燥试管中,用漩涡振荡器振荡摇匀。用微量移液器吸取 200 μ L,加到灭过菌的盛有 100mL 发酵培养液的 500mL 锥形瓶中,27°C 下恒温振荡培养。在培养 8h、12h、24h、36h、48h、60h 和 72h 时,每次取出 3 瓶,分别用恒温的滤纸过滤。滤纸自然晾干后,置于 80°C 干燥箱中干燥 1d。取出滤纸,冷却后称量,记下重量,该重量与滤纸的重量差即为菌丝体的重量。取 3 瓶平均值。最后得到总状毛霉菌株的生长曲线。

1.5 甾体转化试验

取斜面菌种 1 支,在生物安全橱中,接种于经灭菌的盛有 50mL 发酵液的 250mL 锥形瓶中。27°C,220r/min 振荡培养 2d。将 1.5g 甾体底物溶于 30mL 丙酮中,在每瓶菌液中加入 2mL 丙酮溶液,相同条件下继续发酵培养 4d。

1.6 甾体转化产物的分离与鉴定

将发酵液和菌丝体用乙酸乙酯萃取 6 次后,合并有机相,真空旋转蒸发仪蒸去溶剂,40°C 下真空干燥。将干燥后的萃取物,以氯仿:乙酸乙酯体系作洗脱剂,利用硅胶柱层析法进行分离。分离后得到的化合物以红外、质谱和核磁分析鉴定结构。

2 结果

2.1 菌种的分离与筛选

选取河床、沟渠、农作物耕地、山地、果园等不同生态环境进行土样样品的采集,主要采集树木、农作物、蔬菜等植物的根部土壤。在进行菌种筛选时,在 1000mL 马铃薯琼脂培养基中加入 0.2g 黄体酮,配成固体培养基,使筛选的菌种能够适应含有甾体物质的条件,同时也可以自然淘汰一部分在有甾体物质的条件下不能生存的菌株,以提高筛选效率。

2.2 菌丝体生长曲线

通过对不同培养时间的菌丝体干重计算,发现总状毛霉 ACCC 0401 菌株在接种后 0~10h 为菌丝生长延滞期,10~24h 为指数生长期,24~72h 为稳定生长期(图 1)。对于该菌种,24h 后(即指数生长末期)进行投料较为合适。

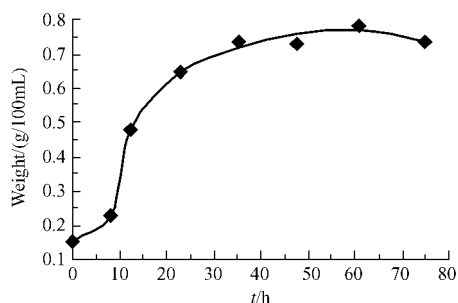


图 1 菌丝生长曲线

Fig. 1 Microbial growth curve of *M. racemosus*.

2.3 生物转化产物的分离

在用硅胶柱层析分离产物时,曾经选用了丙酮:石油醚、氯仿:丙酮、氯仿:甲醇、乙酸乙酯:石油醚、氯仿:乙酸乙酯体系进行试验。结果发现,分离 4-孕甾烯-3,20-二酮(1)的生物转化产物,以氯仿:乙酸乙酯 = 1:1 作展开剂,可成功将混合物各成分分开,分别得到化合物 3 和化合物 4。在柱层析分离雄甾-4-烯-3,17-二酮(2)转化产物时,选用氯仿:乙酸乙酯体系进行梯度洗脱分离,各成分达到分离。用氯仿:乙酸乙酯 = 1:5 作流动相进行洗脱得到化合物 5。然后以氯仿:乙酸乙酯 = 1:3 洗脱得到化合物 6,以氯仿:乙酸乙酯 = 1:1 洗脱得到化合物 7。甾体生物转化路线如图 2 所示。

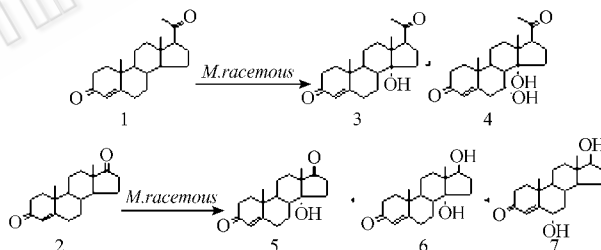


图 2 甾体生物转化路线

Fig. 2 Biotransformation of steroids by *M. racemosus*.

2.4 生物转化产物的结构鉴定

以 4-烯-3-酮类甾体为底物,经过总状毛霉的转化,结果发现底物 4-孕甾烯-3,20-二酮和雄甾-4-烯-3,17-二酮都发生 14 α -羟基化反应。4-孕甾烯-3,20-二酮在总状毛霉作用下,主要发生 14 α -羟基化反应,获得产物 14 α -羟基-4-孕甾烯-3,20-二酮(3)和 7 α ,14 α -二羟基-4-孕甾烯-3,20-二酮(4)。化合物的结构鉴定数据如下:

14 α -羟基-4-孕甾烯-3,20-二酮(3) 收率:40.2%; mp: 177.2~179.0°C; IR (cm⁻¹) 3478, 2949, 2869, 1696, 1650, 1455, 1358, 1234, 1206, 1182, 1143, 1058; ¹H NMR δ : 5.74 (m, H-4), 3.23 (dd, J = 8.6, 18.6 Hz, H-17), 0.78 (s, H-18), 1.20 (s, H-19), 2.13 (s, H-21); ¹³C NMR δ : 35.8 (C-1), 34.0 (C-2), 199.5 (C-3), 124.0 (C-4), 170.4 (C-5), 32.6 (C-6), 27.1 (C-7), 38.2 (C-8), 46.3 (C-9), 38.6 (C-10), 20.1 (C-11), 30.9 (C-12), 47.9 (C-13), 85.2 (C-14), 33.4 (C-15), 21.3 (C-16), 59.4 (C-17), 17.2 (C-18), 17.2 (C-19), 208.3 (C-20),

$7\alpha, 14\alpha$ -二羟基-4-孕甾烯-3, 20-二酮(4) 收率: 33.7%; mp 227.8 ~ 229.0°C; IR (cm^{-1}) 3471, 3411, 2945, 2888, 1678, 1627, 1415, 1355, 1283, 1200, 1058; $^1\text{H NMR}$ δ : 5.58 (m, H-4), 4.11 (m, H-7), 3.08 (m, H-17), 0.64 (s, H-18), 1.14 (s, H-19), 2.03 (s, H-21); $^{13}\text{C NMR}$ δ : 35.4 (C-1), 33.9 (C-2), 197.8 (C-3), 125.9 (C-4), 168.7 (C-5), 40.8 (C-6), 68.6 (C-7), 39.3 (C-8), 39.3 (C-9), 38.4 (C-10), 19.8 (C-11), 30.7 (C-12), 47.7 (C-13), 84.8 (C-14), 32.8 (C-15), 21.3 (C-16), 59.0 (C-17), 16.8 (C-18), 16.8 (C-19), 210.1 (C-20), 31.4 (C-21); MS m/z 383 [M + K] $^+$ 。

14α -羟基-雄甾-4-烯-3, 17-二酮(5) 收率: 15.2%; mp: 246.3°C (分解); IR (cm^{-1}) 3427, 2948, 2864, 1742, 1655, 1612, 1447, 1362, 1272, 1228, 1192, 1019, 879; $^1\text{H NMR}$ δ : 5.73 (m, H-4), 1.05 (s, H-18), 1.22 (s, H-19); $^{13}\text{C NMR}$ δ : 35.7 (C-1), 33.9 (C-2), 199.4 (C-3), 124.2 (C-4), 169.7 (C-5), 32.3 (C-6), 25.6 (C-7), 37.9 (C-8), 46.9 (C-9), 38.7 (C-10), 19.1 (C-11), 24.5 (C-12), 52.5 (C-13), 80.8 (C-14), 30.3 (C-15), 33.0 (C-16), 218.7 (C-17), 17.9 (C-18), 17.3 (C-19); MS m/z 325 [M + Na] $^+$, 341 [M + K] $^+$ 。

$14\alpha, 17\beta$ -二羟基-雄甾-4-烯-3-酮(6) 收率: 10.6%; mp: 85.3 ~ 86.8°C [$\alpha_D^{20} = 96.8^\circ$ (C = 0.126, MeOH)]; IR (cm^{-1}) 3432, 2940, 2865, 1733, 1659, 1452, 1376, 1351, 1277, 1236, 1045; $^1\text{H NMR}$ δ : 5.73 (m, H-4), 4.33 (m, H-17), 0.91 (s, H-18), 1.21 (s, H-19); $^{13}\text{C NMR}$ δ : 35.8 (C-1), 34.0 (C-2), 199.6 (C-3), 123.9 (C-4), 170.7 (C-5), 32.7 (C-6), 29.6 (C-7), 38.9 (C-8), 46.8 (C-9), 38.7 (C-10), 19.7 (C-11), 28.6 (C-12), 47.0 (C-13), 83.3 (C-14), 26.1 (C-15), 32.5 (C-16), 78.6 (C-17), 14.9 (C-18), 17.2 (C-19); MS m/z : 327 [M + Na] $^+$, 343 [M + K] $^+$ 。

$6\alpha, 17\beta$ -二羟基-雄甾-4-烯-3-酮(7) 收率: 61.5%; mp: 99.1 ~ 101.3°C; IR (cm^{-1}) 3419, 2943, 2869, 1730, 1661, 1414, 1380, 1230, 1049, 1017; $^1\text{H NMR}$ δ : 5.83 (m, H-4), 4.37 (dd, J = 2.6, 5.3 Hz, H-6), 3.67 (dd, J = 8.4, 17.0 Hz, H-17), 0.83 (s, H-18), 1.40 (s, H-19); $^{13}\text{C NMR}$ δ : 37.1 (C-1), 34.3 (C-2), 200.4 (C-3), 126.4 (C-4), 168.2 (C-5), 73.1 (C-6), 38.0 (C-7), 29.8 (C-8), 53.7 (C-9), 38.0 (C-10), 20.6 (C-11), 36.4 (C-12), 42.9 (C-13), 50.5 (C-14), 23.3 (C-15), 30.5 (C-16), 81.7 (C-17), 11.1 (C-18), 19.6 (C-19); MS m/z : 327 [M + Na] $^+$, 343 [M + K] $^+$ 。

2.5 菌种的鉴定

经对采自黑龙江省密山地区的山林土样进行真菌分离和筛选, 获得9个菌株, 其中一株具有较强的转化甾体能力。该菌株经中国农业微生物菌种保藏管理中心鉴定为接合菌亚门(Zygomycotina)毛霉科(Mucoraceae)毛霉属(Mucor)的总状毛霉(*M. racemosus*)编号为 ACCC 0401, 该菌的形态描述, 如下^[11, 12]:

在 PDA 培养基上 27°C 培养, 菌丝生长迅速, 菌落初为白色, 后变为黄褐色, 气生菌丝发达, 菌丛较高, 5 ~ 15mm。菌

丝无假根, 孢囊梗单生, 单轴分枝, 不卷曲。孢囊梗末端产生孢子囊。孢子囊初无色, 后变褐色或灰色, 直径 20 ~ 80 μm , 囊壁具微刺。囊轴倒卵形, 椭圆形, 筒形, 梨形, 基部平截, 直径 20 ~ 60 μm , 浅褐色, 具囊颈。孢囊孢子宽椭圆形至近球形, 灰色, 壁光滑, 直径 2.7 ~ 5.2 μm (图 3)。

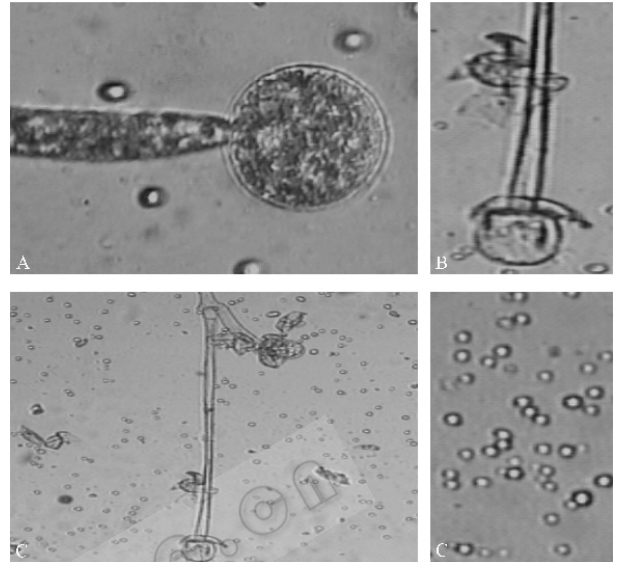


图 3 总状毛霉形态

Fig. 3 Morphological characters of *M. racemosus*. A and B: Sporangium (400 \times); C Sporangium (100 \times); D Sporangiospore (100 \times).

3 讨论

在萃取发酵液和菌丝体时, 选择了不同的溶剂进行试验。结果发现, 用氯仿萃取时, 容易产生乳化现象, 不易分离, 而且萃取时间较长。在选用极性较大、水溶性较小的叔丁醇时, 尽管萃取效果好, 但很容易将发酵液中的杂质也萃取出来, 这样不利于转化产物的分离, 而且叔丁醇价格较贵。用乙酸乙酯萃取时, 无乳化现象, 萃取液容易分离, 效果良好。

尽管人们对甾体生物转化的机理研究还不甚清楚, 从生物转化产物中可以推断化合物 1 发生 14α -羟基化后又发生 7α -羟基化, 因为产物中没有其他的 7α -羟基黄体酮存在。雄甾-4-烯-3, 17-二酮发生羟基化的位置主要是 14α 位, 还有少量发生在 6α 位上, 同时底物的 C17 羰基还原成醇。这些羟基化产物说明, 总状毛霉对 4-烯-3-酮类甾体具有引入 14α -羟基的立体选择性。在真菌类生物转化中甾体分子与 P450 酶的结合是通过甾体中 A 环和 D 环的氧取代基进行的^[6, 13]。上述结果表明, 底物的结构与引入羟基官能团的位置的关系, 很可能是由于这些官能团形成酶-底物络合^[6, 13]。甾体 A 环中共轭羰基(C3)结构的存, 对于底物在酶的活化部位中的紧密结合及合适取向都是非常重要的^[13], 因而底物将选择性地, 在 14α 位发生羟基化反应。产物中有部分 7 -羟基和 17 -羟基甾体衍生物, 在同一转化培养体系中总状毛霉产生了羟基化酶和还原酶, 说明 P450 酶系中酶的多样性。

从土样中筛选到一株能转化甾体的菌株, 经形态观察, © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

鉴定为总状毛霉(*M. racemosus* ACCC 0401)。首次以总状毛霉对不同结构底物甾体药物中间体的生物转化进行了系统的研究,发现总状毛霉对不同结构底物的羟基化反应具有立体选择性,对4-烯-3-酮类甾体主要发生14 α -羟基化反应。对生物转化得到的具有生物活性潜力的14 α -羟基甾体衍生物,通过红外、质谱、核磁分析,确定了生物转化产物的化学结构。

参 考 文 献

- [1] Finamore E, Minale L, Riccio RR, et al. Novel marine polyhydroxylated steroids from the starfish *Myxoderm platyacanthum*. *J Org Chem*, 1991, **56**(3): 1146 - 1153.
- [2] Riccio R, Minale R, Iorizzi M, et al. Starfish saponins. Part 34. Novel steroidal glycoside /sulphates from the starfish *Asterias*. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1988 **1**(6): 1337 - 1347.
- [3] Templeton JF, Setiloane P, Sashi KVP, et al. Pregnanes that bind to the digitalis receptor: synthesis of 14-hydroxy-5 β ,14 β -pregnane glycosides from digitoxin and digitogenin. *J Med Chem*, 1991, **34**(9): 2778 - 2782.
- [4] Yoagioka H, Asada S, Fujita S. Process for production of 6 β ,14 α -dihydroxy-4-androstene-3,17-dione. European Patent, 1994, 599, 658 (Nippon Kayaku, KK).
- [5] Madyastha KM, Oseph T. Studies on the 14 α -hydroxylation of

progesterone in *Mucor piriformis*. *J Steroid Biochem Mol Bio*, 1993, **45**(6): 563 - 569.

- [6] Hu SH, Genain G, Azerad R. Microbial transformations of steroids: Contribution to 14 α -hydroxylations. *Steroids*, 1995, **60**(4): 337 - 352.
- [7] Asada S. Microbial manufacture of 14 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione. Japanese Patent, 1994, 06, 225, 791 (Nippon Kayaku, KK).
- [8] 李幼筠. 中国腐乳的现代研究. *中国酿造*, 2006, **154**(1): 4 - 7.
- [9] 孙 键 宋晓红. 总状毛霉凝乳酶的研制和初步应用. *微生物学通报*, 1994, **21**(1): 25 - 29.
- [10] Szczesna-Antczak M, Antczak T, Rzycka M, et al. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. *J Mol Catal Part B: Enzym*, 2002, **19** - **20**: 261 - 268.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海:上海科学技术出版社, 1979.
- [12] 中国科学院微生物研究所. 菌种保藏手册. 北京:科学出版社, 1980.
- [13] Holland HL. Recent advances in applied and mechanistic aspects of the enzymatic hydroxylation of steroids by whole-cell biocatalysts. *Steroids*, 1999, **64**(3): 178 - 186.

Microbial transformation of 4-ene-3-one steroids by *Mucor racemosus*

GE Wen-zhong^{1*}, LI Nan¹, SHAN Li-hong², LIU Hong-min²

(¹ College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Agricultural University, Daqing 163319, China)

(² Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: A steroid-converting fungus isolated from soil samples, was identified as *Mucor racemosus* according to its morphological characters. The application of *M. racemosus* for biotransformation of 4-ene-3-one steroids had been investigated to obtain hydroxylated derivatives of 4-ene-3-one steroids. The substrates were incubated with *M. racemosus* in rotary shaker (220 rpm) culture for a period of four days at 27°C. All of the fermentation media were exhaustively extracted with ethyl acetate and filtered to separate the both from the mycelium. The transformation products were separated on silica gel column chromatography. Each microbial metabolite was characterized by spectroscopic methods such as IR, MS and NMR. Fermentation of progesterone yielded 14 α -hydroxypregn-4-en-3,20-dione and 7 α ,14 α -dihydroxypregn-4-en-3,20-dione. Incubation of androstenedione resulted in three transformation products: 14,17-dihydroxyandrost-4-en-3-one, 14 α ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one and 6 α ,17 β -dihydroxyandrost-4-en-3-one. This fungus was found to biotransformation steroids. The results showed that the fermentation of 4-ene-3-one steroids with *M. racemosus* yielded mainly 14 α -hydroxy steroids.

Keywords: Microbial transformation; *Mucor racemosus*; 14 α -Hydroxylation; steroids

Foundation item: Scientific Research Found of Heilongjiang Provincial Education Department (10551221)

* Corresponding author. Tel: 86-459-6819299; Fax: 86-459-6819290; E-mail: wenzhongg@126.com

Received 16 September 2006/Accepted: 29 September 2006/Revised: 28 December 2006