

犁头霉 11 α -羟基化制备 16 β -甲基-11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮

徐诗伟 徐清* 法幼华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 选育到一株对 16 β -甲基-17 α ,21-二羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮(II a) 11 α -羟基化活性强的犁头霉 A28 菌株,并发现底物 21-乙酰化(II b)可明显提高 11 α -羟基化的能力。在适宜的转化条件下,II b 投料浓度 0.5%,产物 16 β -甲基-11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮(III)收率为 73%。结构经波谱分析确认。

关键词 犁头霉,11 α -羟基化,16 β -甲基-11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0482-03

16 β -甲基-17 α ,21-二羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮(II a)或其 21-醋酸酯(II b)可用一步微生物法,或用常规的多步化学法由相应的化合物 16 β -甲基-3 β ,17 α ,21-三羟基-5 α -孕甾-20-酮-21-醋酸酯(I)经 A 环 C₃-氧化和 C_{1,4}-脱氢作用制备^[1~3]。然后继续在 C 环上引入 11 α -羟基,现均采用微生物法,使用的微生物常为霉菌^[4,5]。我们曾用节杆菌(*Arthrobacter sp.*)Ax86 一步微生物转化来源于梯可吉宁(tigogenin)的中间体(I)得到 II a,再由犁头霉(*Absidia sp.*)A28 11 α -羟基化得到产物 16 β -甲基-11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮(III),III 是合成倍他美松类药物的重要前体。本文主要报道犁头霉 A28 11 α -羟基化作用的底物选择以及转化 II b 的条件研究。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

霉菌以土豆汁琼脂斜面保存。液体培养基组成为(g/L):葡萄糖 10,玉米浆 15,黄豆饼粉 3,自来水配制,10%NaOH 溶液调至 pH6.4,250mL 三角瓶装 40mL 培养基,3L 三角瓶装 400mL 培养基,112.6 $^{\circ}$ C 湿热灭菌 20min。

1.2 培养与转化

取土豆汁斜面上生长好的霉菌用无菌水洗下其孢子,然后接到盛有培养基的三角瓶中,28 $^{\circ}$ C,180

r/min 振荡培养 24h,以 10%(V/V)接种量移入新鲜培养基,待二级菌丝生长好后投加预先用乙醇溶解的底物,继续在相同培养条件进行转化。

1.3 分析方法

产物转化率的测定采用 HPLC 法,取一定量发酵转化液用 2 倍体积醋酸乙酯萃取,待酯层澄清后,取 2 μ L 进样,使用 Gilson HPLC 仪, μ -Bondapak C18 柱,流动相甲醇:水(60:40),流量 1mL/min;UV 254nm 检测,用峰高值以外标法定量。在测定标准样品 0.3~2.7 μ g/ μ L 浓度范围内与峰高值有良好的线性关系。

1.4 产物提取

转化终止,滤出菌丝体用水洗涤,洗液与滤液合并,用醋酸乙酯提取 3 次,提取液置旋转蒸发器减压浓缩除去溶剂,残余物用少量氯仿洗涤即得产物,经乙醇重结晶后进行物理性质测定。

2 结果与讨论

2.1 几株霉菌 11 α -羟基化能力的比较

表 1 对几株具有 11-羟基化能力的霉菌转化底物(II a)生成产物(III)进行了比较。由此可见,犁头霉 A28 对底物 11 α -羟基化能力最强,且生成副产物 11 β -羟基异构体量也甚少,故为一株较为理想的 11 α -羟基化菌。

表 1 霉菌 11 α -羟基化能力的比较Table 1 Capability of 11 α -hydroxylation by several fungi strains

Strains	Product(Ⅲ)		Substrate (Ⅱa)
	(11 α -hydroxy)	(11 β -hydroxy)	
<i>Aspergillus ochraceus</i> 09	+	--	+++
<i>Rhizopus nigricans</i> 08	+	--	+++
<i>Curvularia lunata</i> AS3.4381	--	++	++
<i>Metarhizium sp.</i> 88	++	--	++
<i>Absidia sp.</i> 28	+++	±	±

2.2 犁头霉转化Ⅱa及其21-醋酸酯(Ⅱb)的比较

表 2 结果表明犁头霉 A28 转化Ⅱa和Ⅱb均可形成产物(Ⅲ)。但不同的是以Ⅱa为底物时,其浓度达到或超过 0.15% 时,11 α -羟基化酶活性急剧下降,说明Ⅱa浓度过高,对该菌有明显毒害作用。而选择 21-乙酰化(Ⅱb)为底物时,该菌在引入 11 α -羟基同时,完成 C₂₁-OAC 水解为羟基,即可解除Ⅱa对 11 α -羟基化酶的抑制作用。从而显著提高羟基化速度,即使Ⅱb浓度提高到 0.8%,Ⅲ生成量仍可超过 5mg/mL 以上。这可能是以具有 $\Delta^1,4$ -3-酮结构的甾体作为底物时,因亲水性增强,影响 11 α -羟基化酶的活性及作用部位;而 21-乙酰化后既可提高基质的亲脂性,也有利于底物通过膜脂双层结构进入细胞内反应。

表 2 犁头霉 11 α -羟基化Ⅱa与Ⅱb的比较Table 2 11 α -hydroxylation of substrateⅡa orⅡb by *Absidia sp.*28

% of Substrate	Ⅱa			Ⅱb		
	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5	0.8
Concentration						
Conversion time/h	28	48	72	72	84	96
Production/(mg·mL ⁻¹)	0.685	0.120	0.052	2.07	3.64	5.14
Conversion/%	65.6	7.7	2.5	73.7	77.8	68.7

2.3 犁头霉对Ⅱb的转化条件实验

2.3.1 溶剂对转化的影响:投料前,分别将Ⅱb浓度 0.5% 转化 72h,下同)预先溶解于一些能与水混溶溶剂中,浓度按培养基计为 2%(V/V)。表 3 结果表明所选择乙醇、二甲基甲酰胺(DMF),二甲基亚砜(DMSO)和丙酮等几种溶剂均比固体粉末投料(同时添加适量表面活性剂吐温 80)时转化率明显提高,以底物配制乙醇溶液加入,产物转化率最高。

将Ⅱb以不同乙醇量配制成溶液投料,由图 1 可见乙醇浓度在 2%~4% 范围内产物转化率最高;

达到 5% 时,羟基化酶活性明显受到抑制;而 7% 乙醇转化几乎不能进行。这一结果表明,潜溶剂的使用不仅可改善亲脂性甾体底物的弱水溶性,促进转化有利于合成方向;但也由于其混溶性常会引起酶活性的降低,因此溶剂用量必须严格控制^[6]。

表 3 溶剂对 11 α -羟基化的影响Table 3 Effect of cosolvents on 11 α -hydroxylation

Cosolvent	No	Ethanol	DMF	DMSO	Acetone
Conversion/%	48.6	69.4	63.0	67.0	65.1

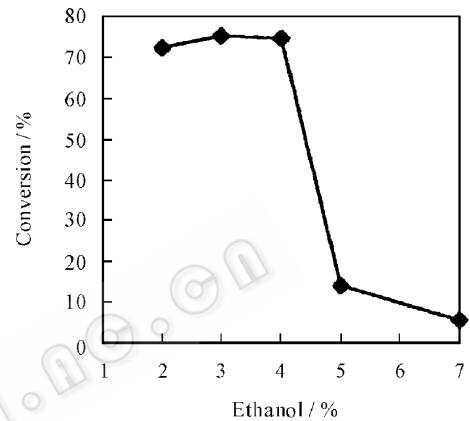


图 1 乙醇浓度对转化的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on conversion

2.3.2 通气量对转化的影响:以 250mL 三角瓶内分别装不同体积的培养基,按比例接种孢子悬浮液(约 6×10^5 个孢子/mL)转化,结果表明装量在 20~40mL 范围内具有较高的羟基化活力,超过 40mL 对转化不利(图 2)。说明通气量对 11 α -羟基化酶的氧化作用影响是较为显著的。

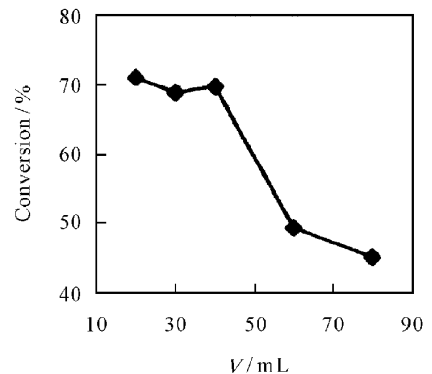


图 2 通气量对转化的影响

Fig. 2 Effect of aeration on conversion

2.3.3 转化 pH 的影响 转化前将已培养好的菌液(pH5.8)分别调至 pH4.4~9.0。转化结果表明犁头霉 A28 11 α -羟基化酶最适 pH 为 5.8~7.0(图 3)。

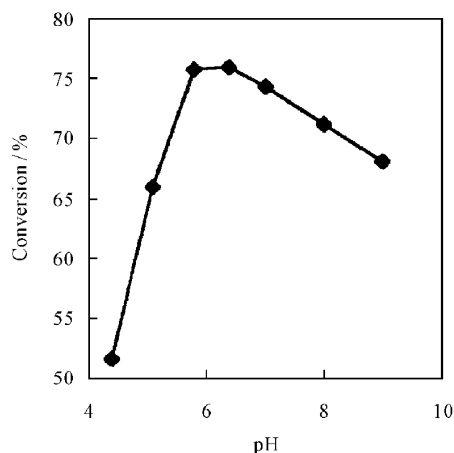


图 3 转化 pH 的影响

Fig.3 Effect of pH on conversion

2.3.4 底物浓度对转化的影响:取 0.2% ,0.4% 和 0.5% 三种不同 II b 浓度。于相同条件下转化 结果表明(图 4)随着 II b 浓度增加,产物达到最高转化率 时间也相应延迟。而 II b 浓度为 0.5% 时,转化 84h 转化率可超过 75%。

2.3.5 产物的提取:用 4 个 3L 三角瓶进行实验,

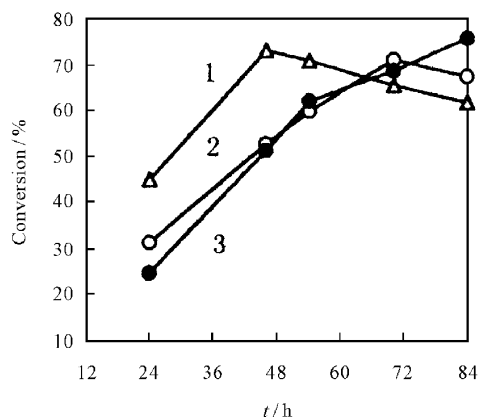


图 4 不同底物浓度的转化时间过程

Fig.4 Time course of conversion in different II b substrate concentration 1. 0.2% 2. 0.4% 3. 0.5%

II b 浓度 0.5% ,共投底物 8g 转化 78h ,合并发酵液 经提取得类白色结晶物 5.47g ,MP 218.3 ~ 220.9℃ ;克分子收率 73.1% ,乙醇重结晶得分析样品 MP221.3~222.8℃ [α] D ₂₀²⁵ + 73.0℃ (C 0.5 ,二氧 六环); UV λ_{max}^{MeOH} 247nm (ϵ , 17400); IR、MS 和 ¹HNMR 均符合结构特征。

参 考 文 献

- [1] 徐诗伟 . 中国医药工业杂志 ,1996 ,27(9) :422 ~ 430
- [2] 广州第八制药厂中试室 . 医药工业 ,1980 ,8 :3 ~ 8
- [3] Rausser R ,Lyncheski A M ,Harris H *et al.* *J Org Chem* ,1966 ,31(1) :26 ~ 31
- [4] Ilavsky J ,Plains P ,Herzog H L. US Pat ,1961 ,3013945
- [5] Petzoldt K ,Kieslich K ,Weber A *et al.* Ger Offen ,1981 2940285
- [6] Matson SL. US Pat ,1989 4800162

Studies on the Production of 16 β -methyl-11 α ,17 α 21-trihydroxy-1 4-pregnadiene-3 20-dione from 16 β -methyl-17 α 21-dihydroxy-1 4-pregnadiene-3 20-dione-21-acetate by *Absidia*

XU Shi-Wei XU Qing FA You-Hua

(Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080)

Abstract An *Absidia* sp. 28 strain was shown to have higher activity of 11 α -hydroxylation using 16 β -methyl-17 α ,21-dihydroxy-1 4-pregnadiene-3 20-dione as a substrate. It was found that 21-acetylation of substrate could increase 11 α -hydroxylation rate conspicuously. The yield of the 11 α -hydroxylation by this strain was 73% in the conversion of 0.5% concentration of 21-acetated substrate under optimum conditions.

Key words *Absidia* ,11 α -hydroxylation ,16 β -methyl-11 α ,17 α 21-trihydroxy-1 4-pregnadiene-3 20-dione