甾体药物合成中一步分离的各种发酵工艺

法幼华
（中国科学院微生物研究所，北京 100080）

从 1952 年 peterson 和 Murry 发现黑根霉（*Rhizopus nigricans*）能在甾体分子的 C_{11} 位导入羟基以后[1]，科学家们相继发现了能在甾体分子的不同部位进行反应的各种不同的微生物以及每种微生物所能引起的反应类型[2,3]。从此，用微生物的方法改造修饰甾体分子结构已成为多种甾体药物或其中间体合成路线中的关键技术。目前，在甾体药物的工业生产中最常见的微生物转化反应为 C_{11} 位（α 位或 β 位）的羟化作用，C_{16}α 位的羟化作用；C_1 和 C_4 位的脱氢作用；C_{17} 位的不对称还原作用以及甾醇侧链的选择性降解和 A 环的芳构化等。

有些甾体药物在全部合成过程中需要由不同的微生物参加二步或二步以上的反应。如对每步反应的产物进行提取、分离，势必造成人力、物力和时间的浪费。如从化合物"S"(RS)开始合成去氢氢化可的松，需要连续的两步微生物转化反应。第一步先由霉菌导入 11β-羟基，得到氢化可的松。第二步再由细菌在其 C_1 位上引入双键。在合成去炎松的过程中，一般采用 9α-氟-氢化可的松为微生物转化的底物，通过两步微生物转化反应生成 9α-氟-16α-羟基-去氢氢化可的松。它先由放线菌导入 16α-羟基，再由细菌在第一步所得的产物上引入 C_1 双键。如果能把上述提及的两步微生物转化反应连续进行，或者把有关的微生物混合在一起培养、转化，或分别培养后混合转化，而不分离第一步反应的产物，就会使整个工艺简化，并可节约大量提取用的有机溶剂，降低成本。下面介绍国内外有关两步微生物反应，一步分离终产物的各种发酵工艺以及一般的规律。

1 两种微生物分别培养后顺序转化

McAleer 等是最早将两种微生物进行的两步甾体转化反应连续化的研究者[4]。他们以孕酮为底物，用培养好的 *Wejnowi graminis* 将其转化为 21-羟基孕酮，再用新月弯孢霉（*Cuvularia lunata*）引入 11β-羟基，最后生成氢化可的松。Spalla 等先用中毛棒杆菌（*Corynebacterium medielanum*）转化 11-脱氧皮质甾醇的 Δ^5-3β-羟基为 Δ^4-3-酮，然后再在短刺

1993-03-11 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

小克银汉霉(*Cunninghamella blakesleana*)的作用下导入11β-羟基生成氢化可的松[5]。1978年德国专利报道了用二步连续发酵法将Δ^5-16α-甲基-11-脱氧皮质甾醇转化成Δ^{14}-11α-羟基衍生物获得成功[6]。具体的步骤是用棕曲霉(*Aspergillus ochraceus*)转化底物，待大部分底物转成11α-羟基衍生物时(约12小时)，加入迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)。该菌能将底物的Δ^5异构为Δ^4结构并引入C_1-双键，最终得到所需要的16α-甲基-去氢氢化可的松。自70年代初瑞典的科学家用固定化细胞转化甾体以来，已有许多成功的例子。最近，日本名古屋大学的Mazumder等又成功地采用两种不同的固定化微生物，连续转化RS得到了去氢氢化可的松[7]。

2 两种微生物分别培养后混合转化

在甾体转化中，采用两种微生物分别培养然后混合转化的早期工作是由Shull和Kimurs报道的。前者用培养好的草分枝杆菌(*Mycobaccerium phlei*)菌液稀释新月弯孢霉的培养物，用此混合菌液转化RS，一步生成去氢氢化可的松[8]。后者是将培养好的球形芽孢杆菌(*Bacillus spaericus*)和新月弯孢霉混合，经一步转化使RS变成去氢氢化可的松[9]。Lee等发现，在用简单节杆菌(*Arthrobacter simplex*)和产玫瑰色链霉菌(*Streptomyces-roseochromogenus*)的混合培养液转化9α-氟-氢化可的松制备9α-氟-16α-羟基-去氢氢化可的松时，有抑制甾体20-酮基还原酶活性的作用，因此可以防止副产物20β-羟基衍生物的生成[10]。作者等在用诺卡氏菌62菌株(*Nocardia* sp.62)和蓝色梨头霉(*Absidia coerulea* AS 3.65)转化5α-3β，17α-二羟基-娠烷-20-酮-21-醋酸酯时发现，诺卡氏菌的水解活性较弱，而其C_1-脱氢酶活性则很强。如用该菌株单独转化上述底物就会形成多种转化中间体(RS，RS-21-醋酸酯和Δ^1-RS等)。由于蓝色梨头霉有很强的水解酶活性，并且具有11β-羟化酶，因此将这两株菌的培养物混合后转化。转化期间只生成少量的RS醋酸酯和微量的Δ^1-RS，其主要中间产物是RS，终产物是氢化可的松[11]。陈家任等用分别培养的球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* AS69)和简单节杆菌69-2菌株混合转化16α-甲基-17α，21-二羟基-孕甾-4-烯-3，20-二酮-21-醋酸酯时发现，由于转化中逐步形成的11α-羟基衍生物被简单节杆菌连续地进一步转化，这一动态过程对白僵菌起到解除11α-羟基物对11α-羟化酶的反馈抑制作用，而对节杆菌则起到类似分别投料的效果，避免高浓度的11α-羟基产物对脱氢酶活力的抑制[12]。Ryu等提出，在用两种不同的微生物混合发酵时，其转化的顺序是随底物和微生物种类的不同而有区别。一般可分两类：一类是当第一步反应完成后再进行第二步反应；另一类是两步反应同时进行[13]。他们在用棕曲霉和简单节杆菌混合转化16α-羟基-RS制备Δ^1-11α，16α-二羟基-RS时，比较了多种混合的方法后发现，用在磷酸缓冲液中的棕曲霉菌丝体先转化底物24小时，然后加入节杆菌的丙酮干粉制备物，效果最好，可以得到较高产量的Δ^1-11α，16α-二羟基RS[14]。

近年来，我们在开发利用梯告吉宁(Tigogenin)为原料生产高效皮质激素——地塞美松和倍他美松时，均采用了混合转化的发酵工艺引入11位羟基和C_1和C_4二个双键，不但收率高而且工艺简单，是一种有效和实用的生产方法[15]。

3 两种微生物混合培养与转化

1980年日本大阪大学的Yoshida报道[16]，把简单节杆菌和产玫瑰色链霉菌放在同一发酵罐内培养，然后加入甾体底物9α-氟-氢化可的松进行转化。根据对转化过程中产物的分析测定发现，简单节杆菌的Δ^1-脱氢作用约在10小时内完成，10小时后才产生16α-羟化酶。这说明两种微生物虽在一起生长，但Δ^1-和16α-羟化两步反应还是一前一后顺序进行的。他们还发现在这一转化中，两种微生物所产生的Δ^1-脱氢酶、20-酮基还原酶以及16α-羟化酶的最适pH并不相同。因此可以通过调节转化过程中的pH，使反应向着所需要的方向发展，积累更

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

多的16α-羟基-9α-氟-去氢氢化可的松。另外，由于两种微生物的生长速度不同，在混合培养时，放线菌对细菌又有一定的抑制作用，因此在接种时需加大细菌的接种量才能得到满意的转化结果。

参 考 文 献

[1] Peterson D H, Murry H C. J Am Chem Soc. 1952, **74**: 1872.

[2] Charney W, Herzog H L. (A Handbook), New York Academic Press. 1967.

[3] Kieslich K. Steroid Conversion. In: Economic Microbiology ed. by Rose A H. New York Academic Press. 1980. 370—413

[4] McAlear W, *et al*. Oxygenation of steroids in the 11, 17 and 21 positions by mixed cultures. US Patent 1875132. 1959.

[5] Spalla C, *et al*. Production of hydrocortisone by multiple fermentation. US Patent 3030278. 1962.

[6] Potzeldt K. 11α-Hydroxy-3-oxo-($\Delta^{1,4}$)-steroids Ger. Offen, 2715854. 1978.

[7] Maznmder T K, *et al*. Appl Microbiol Biotechnol. 1985, **21**: 154—164.

[8] Shull G M, Verfathren zur Herstellung von Prednisolone, Ger. Patent 1050335. 1959.

[9] Kimurs T. Shinogi Research Laboratory Report. 1962, **12**: 180.

[10] Lee B K, *et al*. J Gen Microbial. 1969, **55**: 145—153.

[11] 法幼华，马树恒，苏起恒等. 微生物学报. 1981, **21**: 489—492.

[12] 陈家任，潘自莲，曾本秀等. 微生物学报. 1991, **31**: 308—314.

[13] Ryu D Y, *et al*. Biotech Bioeng. 1969, **11**: 1255—1270.

[14] Lee B K, et al. Biotech Bioeng. 1971, **13**: 503—515.

[15] 法幼华，徐诗伟. 用梯告吉宁制备地塞美松和倍他美松微生物$C_{1,4}$-脱氢及C_{11}-羟化的一步发酵. 第四届全国甾体药物学术年会论文集. 1990, 63—65.

[16] Yoshida T, *et al*. European J Appl Microbiol Biotechol. 1981, 11: 81—88.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn