

植物甾醇微生物转化制备甾体药物中间体的研究进展*

张裕卿 王东青

(天津大学化工学院化学工程系 天津 300072)

摘要: 微生物选择性降解植物甾醇侧链获取甾体药物合成的重要中间体雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (4-AD) 和雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (ADD) 对于我国制药行业具有重要意义。现存文献资料对该领域缺乏全面系统的分析总结, 从甾醇侧链微生物转化的机理、途径及其收率的影响因素等几个方面综述了近几年的研究进展, 并对此领域的发展趋势进行了展望。

关键词: 植物甾醇, 微生物转化, 甾体药物中间体, 选择性降解

中图分类号: O629 Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0142-05

Advances in Microbial Transformation of Phytosterol into Steroid Medicine Intermediates*

ZHANG Yu-Qing WANG Dong-Qing

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: Microbial selective side-chain degradation of phytosterol, which can obtain the steroid medicine intermediate compounds - androst-4-ene-3, 17-dione (4-AD) and androsta-1, 4-diene-3, 17-dione (ADD), has an important meaning to pharmacy. There is no systematic literature concerned in existence. Its mechanism, approaches, influencing factors and so on over these years were fully reviewed in the paper. The trend of development in the area is expanded.

Key words: Phytosterol, Microbial transformation, Steroid medicine intermediates, Selective degradation

甾体激素药物是仅次于抗生素的第二类药物, 由于其结构极其复杂, 目前利用全合成的方法比较困难, 通常以具有甾体母核结构的天然产物为原料采用半合成的方法改造后制得。以前生产甾体激素类药物以薯蓣皂素为起始原料, 但自 20 世纪 70 年代以来, 薯蓣资源日渐枯竭, 皂素价格不断上涨, 促使国内外一些公司寻找和开发新的甾体激素药物的原料。植物甾醇的结构特点决定了它可以作为甾体激素药物半合成的原料。但是, 植物甾醇侧链利用化学手段难以降解, 长期以来被当作废物处理。微生物选择性降解甾体侧链技术的发展使这些廉价易得的甾醇充分利用成为可能。

1 植物甾醇的微生物转化

植物甾醇 (结构如图 1 所示) 具有甾体激素所需的环戊烷多氢菲母核部分, 而且都具有 A/B, C/D 角甲基, 其 4 个环结构合乎激素立体化学排布的要求, 易于转变为

* 中国博士后科学基金 (No. 413395-0306)

天津大学青年教师基金资助项目 (No. 411716)

天津市科技攻关计划 (No. 033180811)

通讯作者 Tel: 022-81838383, 022-27890470, E-mail: zhangguqing@tju.edu.cn

收稿日期: 2005-07-21, 修回日期: 2005-08-30

甾体激素所需的 Δ^4 -3-酮的结构。过去,人们常用化学试剂氧化甾醇得到 C-17 酮化合物,但是由于 C-17 位侧链的存在,氧化反应的副产物很多。并且除了 C-17 位外,还可能在 C-20, 24 位发生氧化反应,结果除得到所需的羰基化合物外还有含羟基、羧基内酯类的一些化合物生成,因此利用化学手段降解植物甾醇得到 C-17 酮化合物的收率相当低。

微生物将甾醇 C-17 位长链断裂得到的 C-17 酮化合物,以雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (androst-4-ene-3, 17-dione, 简称 4-AD) 和雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (androsta-1, 4-diene-3, 17-dione, 简称 ADD) (结构如图 2 所示) 最为重要。对 4-AD 和 ADD 的活性部位进行结构改造,可以合成出多种甾体药物。

早在 20 世纪 60 年代, Sih 等就发现某些微生物可以切除胆甾醇的饱和侧链而得到 ADD。70 年代,日本人有马启利用微生物降解胆甾醇生产 ADD 获得成功。自 20 世纪 80 年代以来,微生物降解甾醇生成 ADD、4-AD 技术得到充分发展。

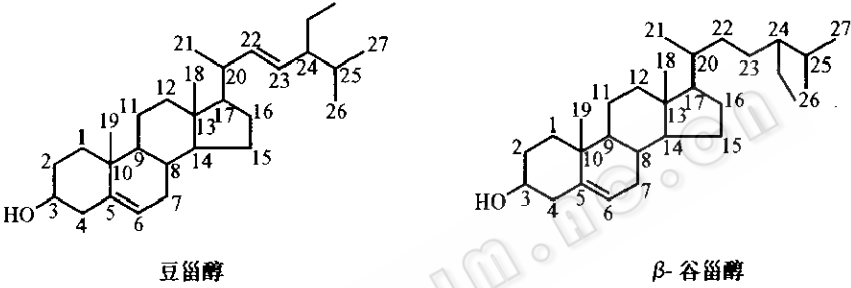


图 1 甾醇和 β-谷甾醇的化学结构

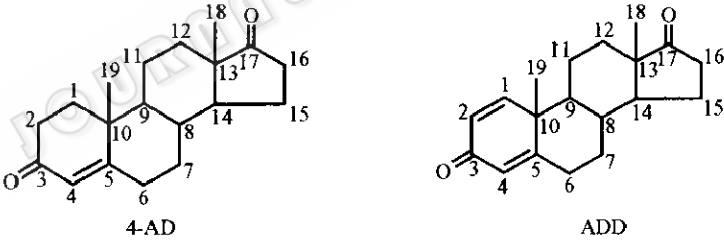


图 2 4-AD 和 ADD 的化学结构

诺卡氏菌、分枝杆菌、节杆菌和假单胞杆菌等微生物都能将甾醇类化合物作为碳源利用,而使甾醇降解。其中分枝杆菌应用最为广泛。Dias 等^[1]将从油脂脱臭馏出物中富集的植物甾醇混合物用分枝杆菌 NRRLB-3805 处理得到 4-AD 和 ADD,且收率相当高。袁东超等^[2]用分枝杆菌 JY-1 降解大豆甾醇,4-AD 和 ADD 收率高达 50% 以上。Pérez C 等^[3]在研究榨糖废渣中植物甾醇降解时使用的也是分枝杆菌。

甾体微生物转化是利用微生物的酶对甾体底物的某一部位进行特定的化学反应来获得一定的产物。在转化过程中,甾体并不是微生物代谢途径中起生理作用的物质,它最终会被微生物分解成 CO_2 和 H_2O 。张 辉等^[4]发现,大豆甾醇直接用微生物处理,所得产物主要是 CO_2 和 H_2O 。因此,要想得到 4-AD 和 ADD,必须选择性控制微生物降解甾体侧链。

2 微生物选择性降解甾醇侧链

微生物对甾醇作用产生 4-AD 和 ADD 主要包括侧链的降解, C-3 位羟基氧化成酮基以及 C-5, 6 位双键的氢化。其中, 起决定作用的是侧链的降解。甾醇侧链的降解开始于 C-27 位的羟化, 然后经过氧化, 最终截断于 C-17 位。选择性控制微生物降解侧链的途径主要有以下两种: 加入酶抑制剂以及利用诱变技术。

2.1 加入酶抑制剂 甾醇的微生物转化实际上是利用微生物的酶对甾醇的某一部位进行特定的化学反应来获得一定的产物, 加入酶抑制剂后, 抑制剂与酶活性有关的部位结合改变了酶活性中心的结构(构象)与性质, 从而引起酶活力下降。

ADD 的降解过程如图 3 所示。其中, 9 位的羟基化是 ADD 降解的关键, 该反应是在 9- α 羟化酶的作用下进行的, 要抑制 ADD 的降解, 必须抑制 9- α 羟化酶的活性。9- α 羟化酶中有的蛋白质以 Fe^{2+} 作为必需金属离子, 除去或取代了这一金属离子就使酶丧失了部分活性, 故可以选用能除去这些金属离子的化学试剂来抑制该酶的活性。根据抑制剂的作用机理, 降低 9- α 羟化酶活性的化合物主要有两类。一类是根据“中心离子竞争机制”, 以 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 等来取代 Fe^{2+} ; 另一类是根据“配位体竞争机制”, 加入 Fe^{2+} 的络合剂, 如 α , α' -联吡啶, 邻菲罗啉, 8-羟基喹啉等。

国外早在上世纪 60 年代末就以 8-羟基喹啉作为分枝杆菌降解甾体的抑制剂来防止甾体母核的断裂。

张 辉等^[4]在研究节杆菌 A-6 降解豆甾醇时, 考察了 7 种抑制剂—— α , α' -联吡啶, 邻菲罗啉, 8-羟基喹啉, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 亚甲基蓝, 发现最适抑制剂为质量分数为 0.06% 的 NiSO_4 , 此时, 豆甾醇的转化率为 72%, ADD 的产率达到 30%, 已经接近工业生产经济收率。

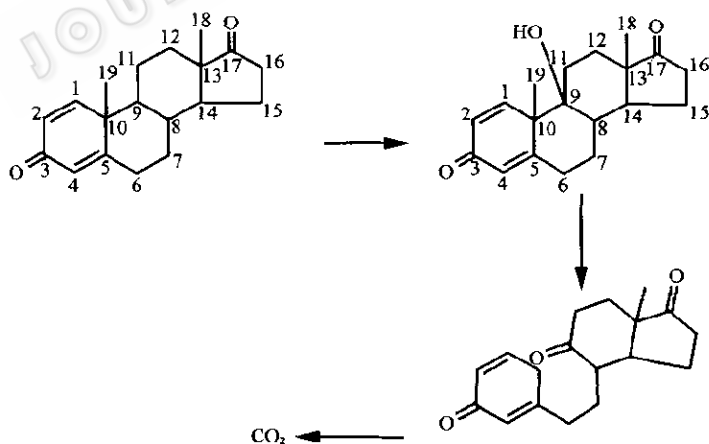


图 3 ADD 的降解过程

车成彬等^[5]在用分枝杆菌 M_{66} 降解大豆甾醇时, 采用质量分数 0.03% 的 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为抑制剂, 甾醇的转化率达 60% 以上。

抑制剂的加入, 使 9- α 羟化酶的活性降低, 从一定程度上抑制了甾体母核的降解, 但同时也会使菌株生长受到抑制, 目的产物的收率降低, 副产物增多。

2.2 利用诱变技术 通过诱变技术可得到选择性降解甾醇侧链而不破坏甾体母核的突变型。突变型由于酶的缺损,可使甾醇不完全降解,发酵液中会大量积累 4-AD 和 ADD。传统的诱变方法有紫外线照射,激光诱变,加入化学诱变剂等。

早在 1978 年, Wovcha 等就用诱变方法处理分枝杆菌得到失去某些特性的突变型,用这些突变型作用于甾醇可以保持甾体母核不被破坏而只有侧链降解。

吴宝华等^[6]用紫外线照射再用 NTG (N^1 -甲基- N^2 -亚硝基- N^3 -硝基胍) 处理的复合诱变技术处理节杆菌 A-6, 所得到的一个 ADD 分解酶缺陷型菌株对豆甾醇的降解率可达 95% 以上, ADD 收率可达 45%。

李莹等^[7]采用紫外诱变与激光诱变相结合处理产 4-AD 菌株 - 分枝杆菌 HC-CB004, 得到了一株高产优质突变株 L-3-195, 4-AD 收率提高了 116%, 且纯度很高, 没有结构类似的 ADD 产生。

随着基因工程技术的进展, 有研究者从基因方面考虑寻找非致病微生物菌落, 经过诱变等方式处理获得突变菌株^[8,9]。Ranjit 等构建了一株含有质粒 pJL1 的节杆菌, 能对甾醇侧链进行选择性的降解。pJL1 能转化 3-氧胆甾-4-烯-24-酸到 AD, 但无 C-1, 2 脱氢作用, 因此不会导致甾体母核的破裂。

3 影响植物甾醇侧链降解收率的因素

3.1 发酵液中植物甾醇的溶解度 微生物选择性降解甾醇侧链很大程度上受限于甾醇底物在发酵水溶液中的溶解度。甾醇是脂溶性化合物, 在水中的溶解度很低, 因此反应中甾醇的有效浓度相当低, 这就导致反应速度和转化率偏低。因此, 应采取措施提高甾醇底物的溶解度, 使甾醇与微生物细胞有良好的接触从而提高产物收率。

甾醇底物溶解于有机溶剂后加至发酵液中进行转化是一种常用的方法。但是, 有机溶剂影响微生物细胞结构和代谢过程, 导致除了得到所需产物以外还有许多别的杂质。

将甾醇用超声波均匀分散于发酵液中也是一种有效的方法。陈知本等^[10]将 β -谷甾醇用超声波乳化后加入到发酵液中, 结果发现产率大大提高。

环糊精可以作为某些甾体药物的稳定剂和增溶剂。Hesslink 等^[11]在用分枝杆菌 NRRL-B3683 降解甾醇时加入了环糊精, 结果发现不但不会影响细胞生长速度, 而且可以提高 AD (D) 产率。

3.2 微生物细胞膜的通透性 甾体微生物降解缓慢的原因不仅在于发酵液中底物和产物溶解度低, 也在于它们进出微生物细胞的速度也很低。因此改变微生物细胞膜的通透性使甾醇底物及其转化产物能自由地出入细胞, 也是促进侧链降解的有效方法。

Sedlacek 等^[12]研究发现, 肽聚糖合成抑制剂甘氨酸的存在使分枝杆菌细胞的转化活性提高近 3 倍, 从而使反应产率成倍提高。

Korycka-Machala 等^[13]研究表明, 聚阳离子 (例如, 鱼精蛋白, 聚乙烯亚胺) 能增加疏水化合物对分枝杆菌细胞壁的渗透, 发酵液中有鱼精蛋白存在时, β -谷甾醇的转化率提高了 3 倍。

4 非水相中的甾醇微生物转化

随着非水酶学的发展,人们开始对非水相中甾体的微生物转化进行研究。Dias 等^[14]研究了固定化分枝杆菌细胞在水不溶性有机溶剂中对甾醇侧链的降解,将细胞固定在硅藻土上,用邻苯二甲酸双(2-乙基己基)酯(具有良好的生物相容性及甾醇溶解性)作为转化培养基,结果大大提高了 β -谷甾醇的摩尔转化率。

5 展望

植物甾醇经微生物作用转化成甾体药物中间体是微生物技术在制药行业中应用的重要领域,近几年来得到快速发展,但是人们对于甾醇微生物转化相关的酶的种类、作用特点、抑制剂选择、诱变菌株培育的研究还远远不够。今后对于甾醇微生物转化的热点主要在于:微生物基因工程作为转化改进手段的新应用;固定化酶或固定化细胞技术在非水相发酵液中的应用;利用环糊精提高产率的操作。随着现代生物技术的进展,甾醇的微生物转化将会进入一个崭新的阶段。

参 考 文 献

- [1] Dias A C P, Fernandes P, Cabral J M S, *et al.* *Bioresour Technol*, 2002, **82**: 253 ~ 260.
- [2] 袁东超,董艳苓,杜连祥. 天津轻工业学院学报, 2003, **18** (4): 11 ~ 13.
- [3] Pérez C, Falero A, Hung B R, *et al.* *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, **32** (3): 83 ~ 86.
- [4] 张 辉,姜文勇,牟宏晶. 哈尔滨理工大学学报, 2000, **5** (4): 75 ~ 78.
- [5] 车成彬,刘景春,吴宝华. 哈尔滨理工大学学报, 2002, **7** (1): 93 ~ 95.
- [6] 吴宝华,李 菁,欧阳利华,等. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2002, **18** (4): 88 ~ 92.
- [7] 李 莹,戈 梅,王 旻. 中国医药工业杂志, 2003, **34** (7): 322 ~ 324.
- [8] van der Geize R, Hessels G I, van Gerwen R, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (5): 2029 ~ 2036.
- [9] van der Geize R, Hessels G I, van Gerwen R, *et al.* *Mol Microbiol*, 2002, **45** (4): 1007.
- [10] 陈知本,熊 那,朱巧庆. 中国药科大学学报, 1991, **22** (4): 221 ~ 224.
- [11] Hesselink P G M, van Vliet S, de Vries H, *et al.* *Enzyme Microb Tech*, 1989, **11** (7): 398 ~ 404.
- [12] Sedlaczek L, Lisowska K, Korycka M, *et al.* *Appl Microbiol Biot*, 1999, **52** (4): 563 ~ 571.
- [13] Korycka-Machala M, Zi lkowski A, Rumijowska-Galewicz A, *et al.* *Microbiology*, 2001, **147**: 769 ~ 2781.
- [14] Dias A C P, Cabral J M S, Pinheiro H M. *Enzyme Microb Tech*, 1994, **16** (8): 708 ~ 714.