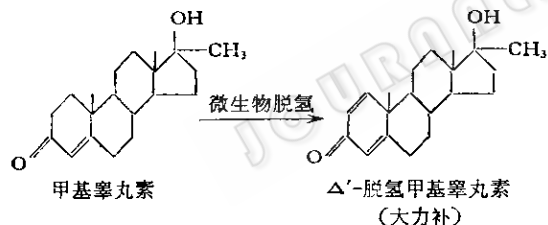


微生物法转化大力补 (Dianabol) 的研究*

四川省生物研究所大力补组

Δ^1 -脱氢甲基睾丸素的商品名称为大力补 (Dianabol), 是一种蛋白同化激素, 能有效促进人体内蛋白质合成, 钙、磷、钾、水分的蓄积, 其功效与性激素睾丸素、甲基睾丸素相比, 具有同化效应强, 男性化副作用小的特点。据文献报道, 大力补在临床上已用于晚期乳腺癌病人, 大面积烧伤病人的治疗, 对骨质疏松症、发育阻滞症等均有疗效。其合成法, 有化学合成和微生物法转化。微生物转化大力补, 系从甲基睾丸素 A 环 1 位微生物脱氢而成, 免除了化学合成方法因催化剂二氧化硒带来的毒性。微生物转化的作用为:



转 化 条 件

(一) 材料

1. 菌种 *Arthrobacter Simplex*

2. 斜面种子培养基 牛肉膏 1%, 葡萄糖 1%, 琼脂 2%, pH = 7。

3. 发酵培养基 玉米浆 0.5%, 葡萄糖 0.5%, 消化蛋白胨 0.25%, 磷酸二氢钾 0.1%, pH 调至 6.7。

转化条件试验, 在摇瓶上进行, 摇床间温度 $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 转化过程中一般用硫酸-乙醇试剂检查转化终点, 实验结束用薄层层析检查转化效果, 同时与硫酸-乙醇检试反应进行印证。

(二) 投料

试验用液体投料方式, 将甲基睾丸素先用乙醇溶解后加入发酵液中, 进行转化。对投料浓度与转化影响和投料时乙醇浓度与转化关系进行实验。

1. 投料浓度: 为试验菌种脱氢能力, 进行投料浓度的对比试验。用摇瓶发酵, 硫酸-乙醇反应检查转化情况。实验采用二种浓度: (1) 按 0.1% 投料浓度; (2) 按 0.01% 投料浓度。结果见表 1。

* 此项研究为继续原四川省薯芋协作组工作, 原参加单位有四川抗菌素工业研究所, 成都生物制品研究所。成都市化工研究所 1972 年参加了发酵试验部分。

表1 投料浓度与转化情况

投料浓度	转化情况检查		硫酸—乙醇反应			紫外吸收(毫微米)	
	转化时间(小时)	转化终点检查	72	96	120	120	>120
0.01%			—	±	—	246	246
0.1%			—	±	—	246	246

注: ±表示萤光微弱 —表示萤光消失

甲基羧丸素紫外吸收峰: $\lambda_{max}^{EtOH} = 241.5$ (毫微米)

硫酸—乙醇试剂检查, 甲基羧丸素有强萤光反应, 大力补无此反应。

从表1看出: 按0.1%投料浓度投入甲基羧丸素, 经120小时转化, 测定结果达到脱氢终点。

2. 乙醇浓度: 为了解在转化中乙醇浓度对脱氢影响, 我们采用了在罐上培菌。投料后, 取罐内发酵液分装三角瓶进行摇床振荡培养; 以1000毫升三角瓶装量100毫升发酵液, 按如下处理: ① 2%乙醇浓度(对照); ② 分装时补加乙醇至4%浓度; ③ 补加乙醇至7%。结果见表2。

表2 乙醇浓度对脱氢影响

乙醇浓度	转化情况检查		硫酸—乙醇反应		
	转化时间(小时)	转化终点检查	48	72	96
2%			—	+	±
4%			++	+	±
7%			+++	++	++

注: +有萤光 ++有强的萤光 ±萤光微弱

从表2看出: 2%、4%乙醇浓度对该菌的脱氢影响差异不大; 但当增为7%乙醇浓度时, 表现对该菌脱氢有不利影响, 培养结束时观察到液面周围瓶壁上均无菌体粘附, 说明乙醇浓度过高时, 使菌的生长直接受到抑制。

(三) 通气量

为了解通气量对转化的影响, 确定合适的通气量, 我们分别研究了通气量与菌体增殖的关系, 以及对脱氢的影响。

1. 通气量与菌体生长的关系 用1000毫升三角瓶装量为15毫升、30毫升、50毫升、100毫升4种不同装量处理, 每处理二瓶, 灭菌后接种斜面上生长菌体—金耳, 于28—29℃振荡培养, 每隔3小时, 取样测菌体生长, 以消光值绘制生长曲线图(见图1)。

图1表明通气量大, 菌体生长快。不同处理, 菌体生长表现的趋势是一致的。

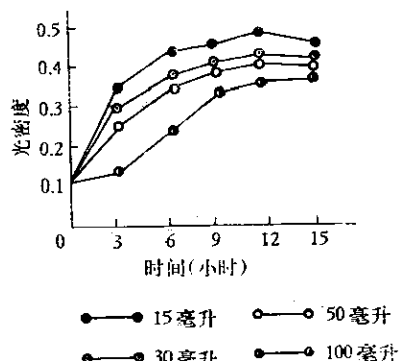


图1 通气量与菌体生长的关系

2. 通气量对脱氢的影响 用30升发酵罐, 罐温 $29 \pm 1^\circ\text{C}$, 培养16小时, 按0.1%甲基羧丸素(2%乙醇浓度)投料, 搅拌2小时后, 再按处理取液分装, 于 $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 继续振荡培养至96小时取样检查, 结果见表3。

表3 通气量对转化脱氢的影响

装量(毫升)	转化(小时)		96	
	转化时间(小时)	转化终点检查	硫酸—乙醇反应	薄层层析
20		+	—	呈一个点
50		++	+	呈二个点(带甲羧痕迹)
100		++	+	呈二个点(带甲羧痕迹)
150		++	++	呈二个点(带甲羧)
200		++	++	呈二个点(带甲羧)

注: —表示无萤光反应 +表示尚有萤光 ++表示萤光反应强。

我们曾单用摇瓶进行过多次通气量试验, 均未得到结果。以后改为先在发酵罐培菌、投料, 然后再分装摇瓶作风量试验, 便得到较明显的结果, 即摇瓶装量越少, 转化愈完全、装量最小者脱氢快, 脱氢完全, 转化96小时, 用硫酸—乙醇测试无萤光反应, 薄层板上呈色一点为大力补, 说明通气量与脱氢影响极为明显。

(四) 表面活性剂与转化

有资料报道添加表面活性剂有助于菌体转化。我们曾试验过吐温40、吐温60、吐温80、乙二胺四乙酸二钠、硬脂酸、去污剂等, 除加去污剂有促进转化趋势外, 其它均不表现有效。当发酵液中加入去污剂时, 观察到对菌生长与产生脱氢酶均不受影响。实验表明, 有促进转化的作用。

30 升 罐 试 验

(一) 菌种

与培养基均同条件试验。

(二) 种子培养

将生长良好的斜面种子接入液体种子培养基,以 1000 毫升三角瓶装量为 100 毫升,种子培养经过 8 小时加诱导剂二滴(按每毫升乙醇溶 50 毫克甲基睾丸素),摇床间温度控制在 $29^{\circ}\text{C} \pm 1$ 培养 24 小时。

(三) 罐上培菌、投料、转化终点控制

接种后经培菌 8 小时加诱导剂,按每毫升乙醇溶 50 毫克甲基睾丸素的乙醇溶液 5 毫升,投料前先测脱氢酶活力,视酶活力情况在接种后 15—20 小时内进行投料。取样测定脱氢酶活力、萤光反应以控制转化终点,放罐前作板层层析鉴定,检查是否到达终点,然后确定放罐。产品检验结果列于表 4。

表 4 30 升罐产品检验结果

检 验 日 期	粗 结 晶			再 结 晶			纯 度 (%)
	重 量 (克)	熔 点 ($^{\circ}\text{C}$)	旋光 ($[\alpha]_D$ 氯仿)	重 量 (克)	熔 点	旋光 ($[\alpha]_D$ 氯仿)	
1970年 2月10日	4.6	142	—	1.4	160— 162	+3.3	246 96
1972年 3月20日	—	—	—	0.64	161— 164	+6.4	— 93
1972年 5月11日	—	—	—	0.85	164— 166	0	244.5 100
1972年 6月19日	—	—	—	0.34	154— 155	+8	245.0 91
1972年 7月8日	2.3	133— 146	+40.8	—	160— 163	-1.0	244.5 100
1972年 9月18日	1.9	131— 138	+35.6	—	160— 162	+1.4	245 98

脱氢酶活力测定和脱氢终点的测定方法

(一) 脱氢酶活力测定

取样 2 毫升,加 1% TTC (氯化三苯基四氮唑) 二滴,置 37°C 水浴上观察酶活力反应强弱,如酶活力强,在 30 秒内溶液即已变红。

(二) 脱氢终点测定

1. 硫酸—乙醇反应

溶液配制:将 45 毫升浓硫酸徐徐滴加于冰冷却的乙醇中,保存于 0°C 冰箱中备用。

测定方法:取样 5 毫升加等体积乙酸乙酯,振荡后分层,吸取上层液 2 毫升,置沸水浴上蒸干,冷却后加硫酸—乙醇液 2 毫升,置沸水中 5 分钟显色,若无萤光反应,表示达到转化终点。

2. 薄层层析鉴定

(1) 板层条件:用硅胶 G 铺板 100°C 活化半小时。

溶剂系统:醋酸乙酯:苯 = 3:7

显色剂:3% 磷钼酸乙醇溶液,或 1% 茴香醛,2% 体积/体积硫酸—醋酸溶液。

(2) 点样:取样 2 至 5 毫升加等量乙酸乙酯提取,置水浴蒸干加少量无水乙醇,用玻璃毛细管点样与已知药物(化学合成大力补)对照点样,比较 R_f 值。

提 取 结 晶

(一) 提取

发酵液加热 $60-70^{\circ}\text{C}$,处理半小时,冷到室温,用乙酸乙酯抽提。第一次抽提用量发酵液:乙酸乙酯 = 1:0.5 (体积比),摇动后静置分层;第二次抽提发酵液:乙酸乙酯 = 1:0.3;第三次抽提发酵液:乙酸乙酯 = 1:0.2。三次提取液合并。用 0.2% 碳酸氢钠洗涤 2 次,0.2% 盐酸洗涤 2 次,无离子水洗涤 3 次,加无水硫酸钠脱水,减压浓缩(回收乙酸乙酯)。

(二) 结晶

将乙酸乙酯提取液于 $65-70^{\circ}\text{C}$ 水浴中减压浓缩至一定容积,移入烧杯,加石油醚即析出粗晶体,或将浓缩液置冰箱析出结晶。

产 物 鉴 定

我们试验方法和数据如下。

(一) 熔点

用熔点测定仪测定 6 次,产品熔点范围在 $162-166^{\circ}\text{C}$ 之间。

(二) 比旋度*

$[\alpha]_D 0-8^{\circ}$ ($C = 1.0$, 氯仿)。

(三) 紫外

用紫外分光光度计测定,紫外吸收峰在 $244.5-245$ 毫微米范围。

* 比旋度测定:由四川抗菌素工业研究所代为测定。

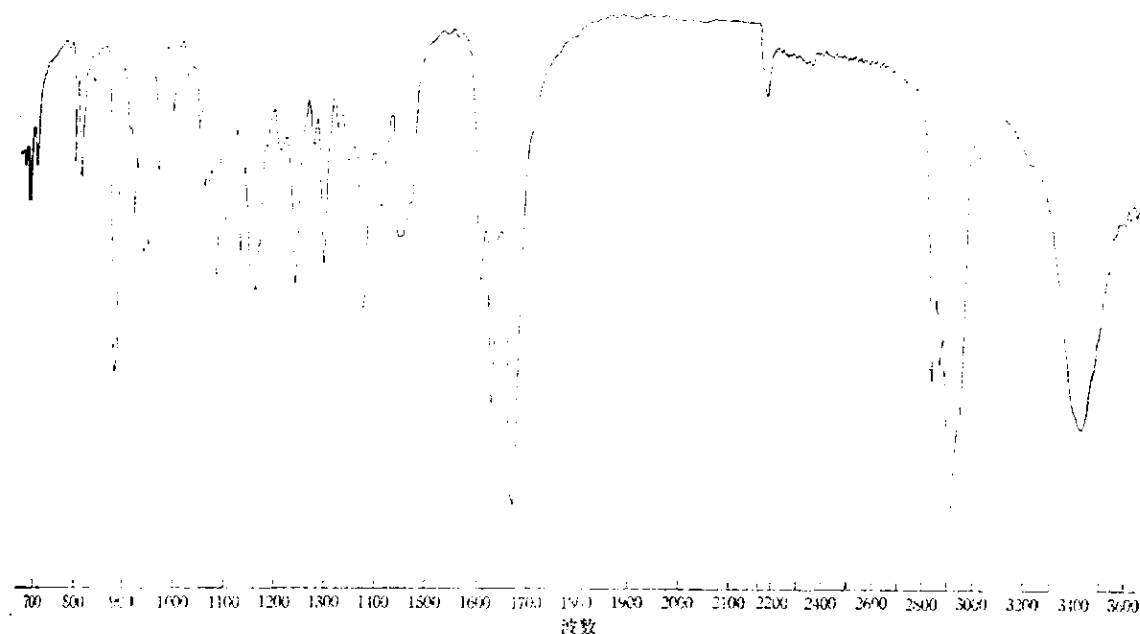


图 2 红 外 光 谱 测 定

表 5 用吉拉尔特试剂 T(Girard-T) 分离不纯产品效果

实 验	测 定 分 离	熔 点 (m. p.) 比 旋 光 度 ($(\alpha)_D^{25}$)				紫 外 吸 收 (毫 微 米)		重 量 (毫 克)			
		分 离 前	分 离 后	分 离 前	分 离 后	分 离 前	分 离 后	分 离 前	分 离 后		
		第 9 次转化不纯物 (1972年10月 9 日)		133—146℃	160—163℃	+40.8°	-1.0°	—	244.5	1000	280
		第10次转化不纯物 (1972年10月 9 日)		131—138℃	160—162℃	+35.6°	+1.4°	—	245.0	1000	380
		各 次 发 酵 粗 品 (1972年10月 6 日)		146—149.5℃	157—161℃	+17°	+3.0°	—	245.0	3000	1000

(四) 红外*

微生物转化大力补红外光谱结果同标准红外图谱比较完全一致。如图 2 所示, KBr 压片, 在测定波数范围 650—3650 厘米⁻¹ 时, 解析结果为:

1605 厘米⁻¹ 一位双键; 1630 厘米⁻¹ 四位双键;
1670 厘米⁻¹ 三位酮基。

带甲基羧丸素非纯品的分离纯制

在发酵过程中, 当转化不完全时, 可将转化不完全

的晶体用吉拉尔特试剂 T (Girard-T) 和甲基羧丸素反应, 生成一种水溶性缩合物, 把溶于水与不溶于水的大力补分开。我们使用吉拉尔特试剂 T (Girard-T)。对三次发酵中转化不完全的大力补结晶, 再进行分离纯制, 其结果见表 5。

从表 5 看出, 含有甲基羧丸素的不纯转化产物, 经用吉拉尔特试剂 T 的分离可得到纯度较高的大力补。

* 红外测定: 由四川省化学研究所代为测定。