

# 甾体化合物的微生物转化

法 幼 华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

## 知 识 介 绍

甾体化合物是一类含有环戊烷多氢菲核的化合物(见图1),广泛存在于动、植物和微生物细胞中。比较重要的甾体化合物有胆甾醇、胆酸、肾上腺皮质激素、孕激素、性激素、植物皂素、甾体有机碱等。已知各种激素在机体内起着调节机体生理代谢的作用,因而甾体化合物具有临床治疗效果。如肾上腺皮质激素可治疗各种炎症、胶原性疾病、过敏性休克等,各种性激素是医治性机能衰退和内分泌失调的主要药物,也是口服避孕药的成分。近来还发现甾体药物有降压和抗癌作用。

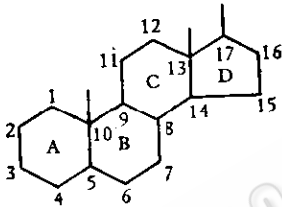


图1 甾体化合物的基本结构

以天然甾体化合物为原料用化学方法半合成甾体药物,步骤繁多,得率低,因而在利用微生物转化甾体化合物前,无法大量生产这类药物。目前利用微生物的甾体转化功能,已经为化学合成新的甾体药物制备出许多有用的中间体。我国自1958年起,利用微生物转化法生产甾体药物,目前已能生产国外有的主要甾体药物,如可的松、氢化可的松、强的松、强的松龙、地塞美松、确炎舒松、肤轻松等。

## 应用微生物转化甾体的历史

1937年 Mamoli 和 Vercellone 发现一株发酵用的酵母菌可以还原甾体的17位酮基为17 $\beta$ -羟基<sup>[1]</sup>。1943年 Turfitt 又发现胆甾醇可作为诺卡氏菌生长的唯一碳源<sup>[2]</sup>。但由于当时人们对微生物转化甾体的重要性尚未认识,所以

这些工作未受到人们重视。

1949年 Hench 等<sup>[3]</sup>发现肾上腺皮质激素(可的松)对治疗风湿性关节炎有显著疗效。但化学合成非常困难。就在同时, Heckter 等<sup>[4]</sup>发现,肾上腺的匀浆能使氧原子导入脱氧皮质甾酮的11位碳原子上使之变成皮质甾酮。在这一工作的启发下, Murray 和 Peterson<sup>[5]</sup>成功地用黑根霉使孕酮的11位羟基化成为11 $\alpha$ -羟基孕酮,而且收率很高。后来进一步证明,微生物在改造甾体结构方面有着惊人的能力,它所实现的转化作用,常常是化学合成方法难以完成的。而且,一种微生物可在一种甾体的不同部位引起改变,也可使不同甾体发生同一类变化;各种不同微生物又能对一种甾体产生同样的反应或不同的反应。从此微生物被应用到甾体化合物的转化中,使甾体药物的研究、生产和应用迅速发展起来。

## 微生物转化甾体反应的类型<sup>[6-9]</sup>

微生物转化甾体反应的类型包括氧化、还原、酯化、水解、酰胺化、异构化、分子重排、侧链降解、折离外消旋体等。

现已了解,除了3、4、6 $\alpha$ -、13、14 $\beta$ 位外,甾体核中的其它碳原子均可由于微生物的作用导入羟基。其中最主要的是由霉菌引起的11 $\alpha$ -和11 $\beta$ -羟基化作用,这一反应是各种皮质激素合成中不可缺少的一步。例如生产可的松需要进行11 $\alpha$ -羟基化反应,生产氢化可的松需要进行11 $\beta$ -羟基化反应,制备确炎舒松可用链霉菌导入16 $\alpha$ -位羟基。另外,有一些微生物具有19-位羟基化的能力,而这是制备19-去甲基甾体化合物的一步重要反应,不过转化率一般极低,尚不能在生产上应用。

据已有报道,甾体化合物分子内部的脱氢

作用,可以在 1、4、7、9(11)、14 和 16 位发生。由于所有高效皮质激素药物中都含有 C<sub>1</sub> 双键,因 C<sub>1</sub> 位脱氢反应有重要的实用意义,能在 C<sub>1</sub> 位导入双键的微生物有节杆菌、分枝杆菌、棒状杆菌、假单胞杆菌等属。工业生产中多用简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) 完成这步反应,转化率都在 90% 以上。某些微生物也能转化 A 环饱和的甾体,生成 C<sub>4</sub> 位或 C<sub>14</sub> 位脱氢的衍生物。例如某些诺卡氏菌有较强的 C<sub>4</sub> 位脱氢的能力,有的还可使 C<sub>19</sub> 位被取代的甾醇的 A 环发生芳化。还有许多细菌和诺卡氏菌在抑制剂存在下,降解各种动植物甾醇(如胆甾醇或豆甾醇的侧链),同时伴有 A 环脱氢作用。这在生产上有实际意义。在曲霉或青霉菌株中,较普遍存在从 17-位切断甾体侧链形成 17-酮基或 17-羟基甾体化合物的能力,通常也伴有 C<sub>1</sub> 位的脱氢作用。反应产物是有活性的雄性激素 1-去氢睾酮或甾甾-1,4-二烯-3,7-二酮;有些微生物则转化形成睾甾内酯(*testolactone*)或 1-去氢睾甾内酯,并继续通过打开 B 环,彻底分解甾体核。

甾体化合物的酯类化合物,特别是醋酸酯类化合物,常被用作转化的底物,许多微生物可以把它水解成游离的醇。另外,报道最多的是青霉和曲霉水解甾体不同部位的乙酰基。此反应专一性不强,转化率一般很高,而且能同时发生一些别的反应,如氧化 3-羟基为酮基和将  $\Delta^5$ -化合物异构成  $\Delta^4$ -甾体化合物。由于微生物又有使甾体化合物乙酰化的能力,因而推测它水解乙酰基的作用可能是可逆的。

微生物既可使甾体核的部分,也能在其侧链上引起还原反应。如  $\Delta^4$ -3-酮基甾体能被还原成 A 环饱和的甾体,并将 3-酮基转化成 3 $\alpha$ -或 3 $\beta$ -羟基。20-酮基甾体则被还原成 20-羟基甾体。这些反应的立体专一性较强,如用 C<sub>11</sub> 位含氧的甾体作为底物,往往不生成 3 $\beta$ -羟基化合物。有的细菌可使 17-羟基孕酮还原成 20 $\alpha$ -羟基衍生物,却使 17, 21-二羟基孕酮被还原成 20 $\beta$ -羟基衍生物。甾体的 20 酮基还原作用经常伴有 C<sub>1</sub> 位脱氢, C<sub>3</sub>-位羟基的氧化以及

$\Delta^5$ -转化为  $\Delta^4$ -双键的异构化反应。能使娠烯的 C<sub>16</sub> 位导入羟基的链霉菌都可使 20 $\alpha$ -位还原,在制备 16 $\alpha$ -羟基甾体时,要注意防止这种副反应。

许多微生物,特别是酵母菌,能专一地和有选择地还原某些甾体化合物的酮型中间体,结果使消旋体变成具有旋光活性的,这一反应在全合成甾体药物时已被采用,而且收率极佳。用全合成法得到的甾体,常常是外消旋体,还可以利用微生物使之发生不对称性的羟化、酰化或脱氢,结果便可以利用两个对映体的化学性质的差异,用常规化学分离技术分开。当然,这种方法从经济上考虑并不合理。

在微生物中普遍存在使  $\Delta^5$ -转位到  $\Delta^4$ -的异构化酶。因此在很多情况下,可以直接用含 C<sub>5</sub> 双键的化合物作为合成甾体药物原料,不必先进行 C<sub>5</sub>-双键的转位反应。

## 微生物转化甾体反应的机制

微生物转化甾体的每一步反应,都是由微生物细胞中特定的酶所催化的。一般在转化后的最终产物中常有几种代谢产物,其中之一是主要产物。

关于羟基化作用,用 <sup>18</sup>O<sub>2</sub> 研究的结果表明,氧原子来自空气中的分子。用 <sup>3</sup>H 标记的甾体试验表明,羟化作用时,是羟基直接取代了氢,羟基的构型和原来的氢原子相同<sup>[10]</sup>。已经得到 3 $\beta$ -羟基甾体氧化酶的结晶,证明它是一种典型的黄素蛋白<sup>[11]</sup>。用新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) 的无细胞抽提物进行甾体的羟化作用时需要 NADPH,而用棕曲霉 (*Aspergillus ochraceus*) 和局限诺卡氏菌的无细胞抽提物时,就不需要 NADPH。11 $\alpha$ -羟基孕酮能诱导棕曲霉 NRRL405 产生 11 $\alpha$ -和 6 $\beta$ -两个位置上的羟化活性,说明这株菌至少能产生两种诱导酶。黑曲霉 12 $\gamma$  的无细胞抽提物,经离心后上清液中 11 $\alpha$ -羟基化活性最高,沉淀中 11 $\beta$ -羟化活性最高。诺卡氏菌的无细胞抽提物具有很高的 9 $\alpha$ -羟化酶活性,它比由新月弯孢霉得到的羟化酶要稳定得多, KCN 对这一羟化反应有激活作

用,  $\text{Ni}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  等有明显的抑制作用。

微生物中使甾体化合物脱氢的酶很易提取, 这些脱氢酶都是诱导酶<sup>[12]</sup>。脱氢反应不需分子氧, 可用一些氧化还原染料, 如二氮蒽甲硫酸盐或 2, 6-二氯蒽酚等作受氢体。大多数脱氢酶都含有巯基, 所以可与硫和二巯基结合的试剂均抑制脱氢活性。不同微生物的甾体脱氢酶系不完全一样, 如 *Septomyxa affinis* 能使  $5\alpha$ -,  $5\beta$ -, 和 4, 5-位不饱和的甾体以及带有 11 位或其它部位羟基的甾体导入  $\text{C}_{-1}$  双键; 而诺卡氏菌还能使  $5\alpha$ -和  $5\beta$ -位饱和的甾体, 在  $\text{C}_{-1}$  和  $\text{C}_{-4}$  位导入双键; 辜甾酮假单胞菌 (*Pseudomonas testosteroni*) 的酶系不能使  $\text{C}_{-11}$  位氧化了的甾体化合物脱氢。试验证明, 局限诺卡氏菌的甾体  $\text{C}_{-1}$ -脱氢酶含有一种黄素辅基; 维生素  $\text{K}_2$  是球形芽孢杆菌的甾体脱氢酶的辅酶。

由辜甾酮假单胞菌得到的  $\Delta^5$ -3-酮基甾体异构酶是研究得最彻底的酶。它的活性极强, 每分钟每个酶分子能转化  $1.6 \times 10^7$  分子的雄甾-5-烯-3, 17-二酮为雌甾-4-烯-3, 17-二酮。同位素试验表明, 这一反应是一种直接的(或分子内的)质子转移过程,  $\Delta^5$ -3-酮基甾体底物的  $4\beta$ -位上的质子直接转移到了  $6\beta$ -位置上。

## 甾体微生物转化研究的新进展

近数年来, 甾体微生物转化研究取得了不少进展, 主要是工艺方面的改进和开发新资源方面。

在工艺方面, 1975 年有人设计了连续发酵系统<sup>[13]</sup>和序列化混合培养的方法<sup>[14,15]</sup>。还有人用孢子进行转化甾体。用固定化细胞转化甾体的工作也在积极开展<sup>[16,17]</sup>。为了防止转化产物对微生物的抑制作用, 采用了添加树脂或在水不溶性介质中进行反应的措施, 取得了好效果<sup>[18,19]</sup>。

为了开辟原料新来源, 许多国家研究了胆甾醇, 豆甾醇, 以及与薯蓣皂素结构相似但带有侧链的海可吉宁, 梯可吉宁等薯蓣皂素的转化。在用这些新原料时, 必须先除去其侧链而

保留甾体核。方法是改造结构, 添加抑制剂和选育突变株<sup>[20-22]</sup>。我国不少单位对开发利用薯蓣皂素进行了大量微生物转化的研究工作, 现在已能用海可吉宁的中间体生产  $\beta$ -美松, 用梯可吉宁的中间体生产去氢- $17\alpha$ -甲基辜丸素(大力补)<sup>[23]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Mamoli, L. and A. Vercellme: *Ber.*, **70**: 2079, 1937.
- [2] Turfitt, G. E.: *Biochem. J.*, **37**: 115, 1943.
- [3] Hench, P. S. et al.: *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic*, **24**: 181, 1949.
- [4] Heckter, O. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **71**: 3261, 1949.
- [5] Murray, H. C. and D. H. Peterson: US Patent 2,602,769, 1952.
- [6] 中国科学院微生物研究所编:《微生物在工业上的应用》, 科学出版社, 北京, 1970, 第 118—128 页。
- [7] Charney, W. and H. L. Herzog: *Microbial Transformation of Steroids*, Academic Press, New York, 1967.
- [8] Marshech, W. J.: *Appl. Microbiol.*, **23**: 72, 1972.
- [9] Murray, H. C.: *Ind. Microbiol.*: 79—105, 1976.
- [10] Corey, E. J. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2338, 1958.
- [11] Uwajima, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 2345, 1973.
- [12] Sih, C. J. and H. J. Whitlock: *Ann. Rev. Biochem.*, **37**: 661, 1968.
- [13] Dewey, D. et al.: *Process Biochem.*, **10**: 15, 1975.
- [14] Lee, B. K. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **55**: 145, 1969.
- [15] Vézine, C. et al.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **10**: 221, 1968.
- [16] Mosbach, K. and P. O. Lansson: *Biotech. Bioeng.*, **12**: 19, 1970.
- [17] Lansson, P. O. et al.: *Nature*, **263**: 796, 1976.
- [18] Martin, C. K. A. and F. Wagner: Transformation of Compounds by Microorganisms, *5th International Fermentation Symposium, June 28—July 3, 1967/4th International Specialized Symposium on Yeast*, Abstracts of Papers (ed. by Dellweg, H.) Verlag Versuchs-und Lehranstalt für Spiritusfabrikation und Fermentations Technologie, Berlin, 1976, p. 17—14.
- [19] Lilly, M. D. et al.: *ibid.*, p. 17—13.
- [20] Sih, C. J. et al.: *J.A.C.S.*, **87**: 2765, 1965.
- [21] Nagasawa, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**: 838, 1970.
- [22] Upjohn Co.: US Patent, 4,098,647, 1978.
- [23] 法幼华、徐诗伟: 微生物学报, **20**: 185—189, 1980.