

# 微生物降解甾醇侧链转化雄甾-4-烯-3, 17-二酮的研究进展

杨 英<sup>1,2</sup> 姜绍通<sup>1</sup>

(合肥工业大学生物与食品工程学院 合肥 230009)<sup>1</sup> (安徽建筑工业学院环境工程系 合肥 230022)<sup>2</sup>

**摘要:** 甾体激素类药物是临床上不可缺少的一类重要药物。雄甾-4-烯-3, 17-二酮是甾体激素类药物不可替代的中间体, 对机体起着非常重要的调节作用。可以说几乎所有甾体激素类药物都是以其作为起始原料进行生产的。近年来研究表明, 通过微生物转化技术, 将甾醇侧链选择性切除, 可得到甾体药物的这一关键中间体。综述了该项技术近期的研究进展, 指出该领域工业化生产尚待解决的问题。

**关键词:** 微生物降解, 雄甾-4-烯-3, 17-二酮, 生物转化, 甾体化合物

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0142-04

## Advance in Degrading Side Chain of Sterols of Getting Androst-4-Ene-3, 17-Dione by Microorganism

YANG Ying<sup>1,2</sup> JIANG Shao-Tong<sup>1</sup>

(College of Food and biological, Hefei University of Technology, Hefei 230009)<sup>1</sup>

(Department of Environment Engineering, Anhui Institute of Architecture Hefei 230022)<sup>2</sup>

**Abstract:** Sterols hormones plays an indispensable role in clinic. Androst-4-ene-3, 17-dione is a middling product of sterol hormones for which can not be substituted and have an very important regulative effect in organism. We can say that almost of hormonal medicines are made of androst-4-ene-3, 17-dione. Recently, many researches showed that some microorganisms have the capacity to carry out the selective side chain degradation of sterols and get androst-4-ene-3, 17-dione. This paper described the recent advance of the technique in this area. There still some question in this area should be taken into consideration in industry production.

**Key words:** Microbial degradation; Androst-4-ene-3, 17-dione, Bioconversion, Sterols

雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (androst-4-ene-3, 17-dione, 简称: 雄烯二酮或 AD) 是甾体激素类药物不可替代的中间体, 对机体起着非常重要的调节作用。可以说几乎所有甾体激素类药物都是以 AD 作为起始原料进行生产的。如用于生产性激素、孕激素、蛋白同化激素及皮质激素, 又可用于合成氢化可的松, 氢化泼尼松, 6 $\alpha$ -氢化泼尼松、黄体酮、雌烯醇、地塞米松等 100 余种药物, 也是直接用于生产抗早孕米非司酮和各类计划生育用药的必不可少的基本原料。如今 AD 不断被一些发达国家用于开发和生产新的医药主品, 如福美司坦 (Formestane 或 Lentaron), 等及类固醇类激素免疫抗原等, 目前全世界范围内, AD 的应用领域日益拓宽, 用 AD 做原材料生产的医药品种不断增加, 为世界的广大患者带来了福音。

## 1 国内外研究进展

为满足上述增长的需求, 已有大批研究者致力于类固醇激素的体外合成, 而其中

通讯作者 Tel: 0551-2873389, E-mail: yangying5918@163.com

收稿日期: 2006-04-14, 修回日期: 2006-06-20

之一涉及用微生物制备类固醇激素前体。Mamoli 和 Verzellone (Ber. ' 70470 和 Ber. ' 702079, 1937) 报道通过酵母发酵将 17-酮-类固醇还原成 17-D-羟类固醇。还有, Peterson 和 Murray 在美国专利 No. 2, 602, 769 中公开了一种用根霉属真菌产生孕酮的 11- $\alpha$ -羟化方法, 以及 Kraychy 在美国专利 NO. 3, 684, 657 中公开了一种用分枝杆菌属从包含 17-烷基的类固醇生成雄-4-烯-3, 17-二酮, 雄-1, 4-烯-3, 17-二酮和 20  $\alpha$ -羟甲基孕-1, 4-二烯-3-酮的方法<sup>[1]</sup>。50 年代, 美国 Upjohn 公司首先利用侧链上有双链的大豆甾醇和麦角甾醇为原料生产出雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (AD) 及雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (ADD) 并以此作为合成甾体药物的原料<sup>[2]</sup>。近年来, 由于甾体药物应用量逐年增加, 人们的目光又转到在动植物界中含量较多的胆甾醇, 谷甾醇, 菜油甾醇等, 并被认为是具有巨大潜能的甾体激素类药物的起始原料<sup>[3]</sup>。20 世纪 60 年代中期, 由 Sih 等首先发现有些微生物可以选择性降解切除甾醇的饱和侧链而得到 AD 和 ADD, 70 年代初, 日本的有马启利用微生物降解胆甾醇生产 ADD 获得成功, 受到许多制药公司的高度重视<sup>[4,5]</sup>。为了大量生产类固醇激素, 研究者试图使用甾醇为唯一碳源分离微生物和改变甾醇结构用作发酵的底物, 并用能防止甾醇降解的化学添加剂来提高类固醇的收得率, 这一努力已获得很大进展 (Marsheck 等, *Applied Microbiology*, 23 (1): 72 ~ 77, 1972)。此外, 埃及国家研究中心生物与天然产品化学系的 Lotfy 和 Sallam 等研究发现, 利用磷酸盐缓冲液调节底物培养基 pH 值 5.5 ~ 7.38 可提高生物降解 AD、ADD 的转化率<sup>[6]</sup>。Upjohn 公司在美国专利 No. 4, 293, 644 中描述了一种通过一分枝杆菌 (ATCC 29472) 的突变株从多种类固醇中得到以高产量的雄-4-烯-3, 17-二酮 (AD) 为主, 并有少量雄-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (ADD) 的产物的方法。以后的研究发现节杆菌, 诺卡氏菌和分枝杆菌等微生物均可用于直接切除甾醇的饱和侧链, 在一定条件下得到 AD 和 ADD, 这使得微生物转化工业化生产成为可能。

国内在这方面也作了一系列的研究。王敬一, 殷芝华, 周维善在对  $\beta$ -谷甾醇侧链的降解产生  $\Delta^4$ -雄甾-3, 17-二酮的研究中发现: AD 产物的积累与培养基中葡萄糖的多少有关, 结果证明葡萄糖过高不利于 AD 的转化<sup>[7]</sup>。自 80 年代以来, 微生物降解甾醇生成 AD 甾体技术得到充分发展并在工业上得到广泛应用。我国从国内外来源的诸多菌株中筛选到 (*Mycrobacterium phlei* 93201,) 在 9 $\alpha$ -羟化酶抑制剂 2, 2'-联吡啶存在下能将  $\beta$ -谷甾醇降解为 ADD 及微量 AD 的菌株。

## 2 雄甾-4-烯-3, 17-二酮的制备途径

由于甾体化合物分子结构十分复杂, 用人工合成需要经过复杂的反应过程, 使总收率很低, 成本较高, 目前世界上甾体药物大多数是利用以具有甾体骨架的天然产物进行结构改造而成<sup>[8]</sup>, 目前雄烯二酮的制备存在两种途径。

其一是薯蓣皂甙元途径: 从野生中药材“穿地龙”中植物提取、化学合成 (图 1)。工艺十分复杂, 消耗成本很高, 而且污染环境。

其二是微生物转化途径: 由于薯蓣皂素资源的日渐枯竭, 价格昂贵, 故目前以薯蓣皂素为原料的工业体系逐渐被以自然界丰富存在的动植物甾醇为原料的工业体系所代替, 以自然界丰富存在的动植物甾醇为原料, 通过微生物发酵技术将甾醇侧链选择性切除得到 AD (图 2)。该方法充分利用和发挥资源优势, 摆脱了原材料来源因“穿地龙”、黄姜供应受季节、地域等自然因素对生产的制约, 不仅可及时满足国内外市场

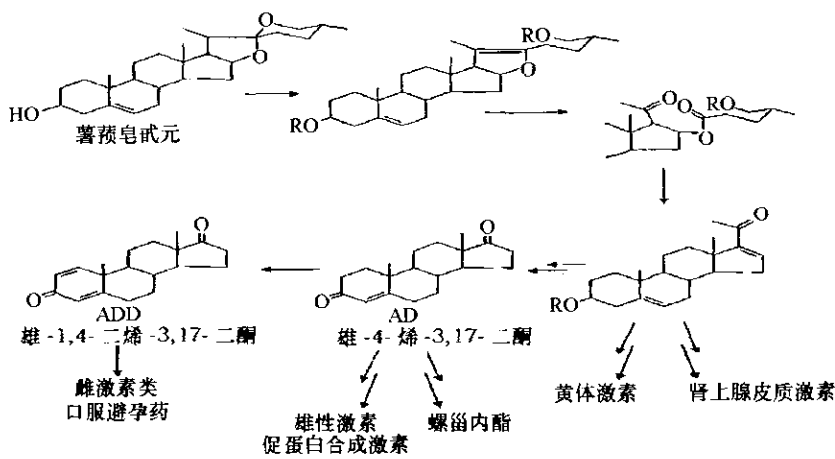


图1 用于制备 AD 的薯蓣皂甙元途径 (摘自文献 [9])

对 AD 日益扩大的需求, 而且对保护自然资源和生态环境、维护人类健康起了重大作用。

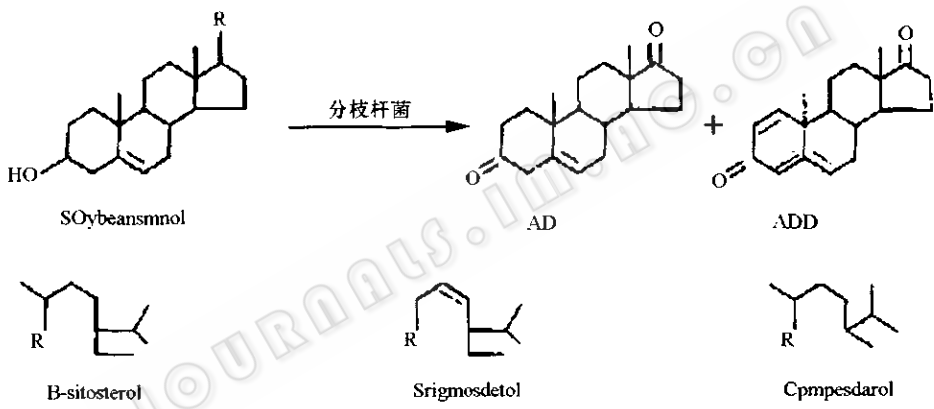


图2 生物降解甾醇转化生成 AD 的途径 (摘自文献 [13])

3 甾醇生物转换方法中所存在的问题

3.1 转化的最终产物典型的含有显著的 AD 和 ADD 由于产物 AD 和 ADD 具有相似的化学结构 仅在 C1, 2 位上存在单键与双键的差别, 将这两类甾类产物进行随后的分离是困难和昂贵的<sup>[9]</sup>, 为解决上述问题, 中国药科大学的李莹等分别采用紫外光、YAG 倍频脉冲激光、紫外光与倍频激光复合处理等方法, 以不同剂量对雄甾烯二酮 (AD) 转化菌进行诱变照射, 以期获得高产优质突变株且不再产生结构类似副产物雄甾二烯二酮<sup>[10]</sup> (ADD)。

3.2 甾醇底物在水溶液培养基中溶解度差和存在严重的产物 (底物) 抑制的问题 该问题困扰了整个甾类工业。甾醇是一种疏水性化合物, 在水中溶解度极低, 这就导致底物与微生物细胞不能很好的接触, 使转化率偏低及转化时间延长。采用超声破碎、表面活性剂及有机溶剂来溶解底物虽然取得了一定成果, 但表面活性剂和有机溶剂对细胞的活性有一定的抑制<sup>[11]</sup>, 从而制约了它的应用。中国药科大学生物制药学院郝雪秦, 许激扬等利用双水相系统对转化雄甾-1, 4 -二烯- 3, 17- 二酮的工艺进行了研究。

双水相概念是 Albertsson 最先提出的, 双水相是由两种高聚物溶液或一种高聚物和一种盐溶液组成, 在特定的溶液浓度下将形成互不相溶的两相, 它可以将细胞限于一相而产物迅速萃取到另一相中, 这样可以减少产物抑制或者缩短产物在细胞附近的停留时间来阻止产物的降解。即使产物是高毒性或高度不稳定性的, 双水相系统中的反应也是专一的<sup>[12]</sup>, 而且还可以使细胞回收成为可能, 从而实现连续发酵, 这将有可能会扩大到工业化水平。

**3.3 原材料问题** 甾醇发酵生产中种子培养基和发酵培养基使用的糖蜜-Refiner 糖蜜 (BC 糖), 是生产甜菜糖厂的废糖蜜 “Refiner’s molasses”。质量很不稳定, 年年都有变化, 其质量的好坏直接影响转化率。这是一个有待解决的问题。

#### 4 展望

居国际前沿的最新 “微生物发酵提取 AD” 工业化生产技术, 不仅从根本上改变了薯蓣皂素法生产某些甾体药物如性激素、蛋白同化激素等步骤多, 得率低, 价格贵等不足之处, 还可充分利用和发挥资源优势, 摆脱了原材料来源因 “穿地龙”、黄姜供应受季节、地域等自然因素对生产的制约, 而且对保护自然资源和生态环境、维护人类健康起了重大作用。据统计, 目前 AD 国际市场的年需求量合计约 1,010 吨 (不包括中国)。而目前世界市场的供应量合计约 610 吨, 综合统计缺口 400 吨, 总体上需大于供, 随着甾体类激素药物生产的不断发展, 对 AD 的需求, 在相当长的时期内, 将以年增长率 8~10% 的势头, 保持稳定增长。

我国是 AD 生产、使用和出口的大国之一, 用传统方法提取皂素合成生产 AD 已有 6~7 年的历史, 由于技术因素及原材料供应受季节因素的影响, 提取皂素严重污染环境, 生产成本低, 因而绝大多数企业没有形成规模化生产, 产量远不能满足国内外日益发展的市场需求。生物降解甾醇侧链转化 AD 技术, 原材料采用生产维生素 E 或豆油的副产品甾醇, 糖蜜和其它常规的发酵用化工产品, 在国内的推广将为我国填补一项 “世界前沿技术” 空白。

#### 参考文献

- [1] 卢承权, 金明国, 尹源泰, 等. 具有将甾醇转化为雄 4-烯-3, 17 二酮能力的微生物及其制备方法. 中华人民共和国知识产权局 02809664.9, 2004.6.23.
- [2] Arima K, Nagasawa M, Bae M, *et al.* *Agri Boil Chem*, 1969, **33**: 1636.
- [3] 张 辉, 姜文勇, 牟宏晶. 哈尔滨理工大学学报, 2000, **5** (4): 75~78.
- [4] Arima K, Nagasawa M, Bae M, *et al.* *Agri Boil Chem*, 1969, **33**: 1636.
- [5] Nagasawa M, Watanabe N, Hashiba H, *et al.* *Agri Boil Chem*, 1970, **34**: 798.
- [6] Lotfy A R S, Abdel-Monem El-Refai, Hassan A. *Process Biochemistry*, 2005, **40**: 203~206.
- [7] 王敬一, 殷芝华, 周维善. 药学学报, 1991, **27** (1): 22.
- [8] 韩广甸, 温宏艳. 有机化学, 1992, **12**: 233~240.
- [9] J P 库特尼, E J 赫灵顿, G 斯帕索夫. 将植物甾醇发酵制备雄二烯二酮的方法. 中华人民共和国知识产权局. 03804973.2, 2005.7.13.
- [10] 李 莹, 戈 梅, 陈代杰, 等. 中国医药工业杂志, 2003, **34** (7): 322~324.
- [11] 郝雪秦, 许激扬, 陈代杰, 等. 生物技术, 2003, **10** (3): 169~173.
- [12] Freeman A, Woodley J M, Lilly M D. *Biotecnol*, 1993, **11**: 1007.
- [13] 王凤清, 王 敏, 路福平. 药物生物技术, 2003, **10** (3): 177~180.