

甾体微生物转化国内外近期研究应用进展

杨顺楷
生物催化与分子进化实验室
中国科学院成都生物研究所
2011年12月22-23日 上海 世易

甾体药业大国地位及作用

- 七步法合成醋酸可的松中的霉菌氧化——11 α -OH
- 薯蓣皂素 \rightarrow RSA \rightarrow 11 β -OH-RS (氢化可的松, 蓝色犁头霉AS3.65)
- 倍他米松中间体格氏物的 $\Delta^{1,2}$ 微生物脱氢 (A. simplex AS 69, Y \geq 80%)
- 全合成袂雌醇环戊酮中间体C₁₇-酮经由葡萄糖酵母2.346还原为C₁₇ β -OH; 由去氢表雄酮制屈螺酮中间体的7,15-位微生物羟基化
- 依普利酮中间体坎利酮经由根霉SIPI-0602的11 α -OH, AD(D)相应中间体的C₁₁-OH; 去氢氢化可的松的微生物16-位微生物羟基化; 毛霉的14-位羟基化
- 薯蓣植化提取物——地奥心血康

全球半合成甾体原料的现状与发展趋势

- 半合成原料的多元化: 全球四大基础皮质激素 (氢化可的松, 可的松, 强的松, 强的松龙) 超过800t/a (Brock微生物生物学, 2003)
- 薯蓣皂素 \rightarrow 双烯
- 藩蓣皂素/剑蓣皂素
- 胆固醇/胆酸
- 植物甾醇 (分离豆甾醇化学法制孕酮) \rightarrow AD, ADD; 9 α -OH-AD
- 化学物理法自植物甾醇分离豆甾醇制孕酮, 菜油甾醇内酯; 提高谷甾醇富集度, 有利于微生物发酵断侧链工艺过程, 增加目标产物得率

薯蓣甾体总皂苷提取物中药新药

- ◆ 地奥心血康与国内甾体激素药物生产依赖薯蓣皂素生药原料的PK
- ◆ 现况: 地奥公司收购薯蓣干姜片, 20000t/a, 折合皂素400t;
- ◆ 发展: 过GMP认证; 关键是要尽快挤占进入欧美境外市场
- ◆ 国内甾体激素药物企业需要半合成原料薯蓣皂素干t/a级

工业上重要的甾体生物转化

反应类型	反应底物和产物	微生物
11 α -羟基化	黄体酮 \rightarrow 11 α -黄体酮	黑根霉(<i>Rhizopus nigricans</i>)
11 β -羟基化	化合物S或其醋酸酯 \rightarrow 氢化可的松	新月弯孢霉(<i>Curvularia lunata</i>) 蓝色犁头霉(<i>Absidia coerulea</i>)
16 α -羟基化	9 α -氟氢可的松 \rightarrow 9 α -氟-16 α -羟基化可的松	玫瑰产色链霉菌(<i>Streptomyces oseoehromogenus</i>)及其它放线菌
C ₁₉ -羟基化	化合物S \rightarrow 19-羟甲基化合物S	球墨孢霉(<i>Nigraspora spherical</i>)
C _{1,2} -脱氢	氢化可的松 \rightarrow 氢化泼尼松	芝麻丝核菌(<i>Corticium sasakii</i>)
A环芳构化	19-去甲基睾酮 \rightarrow 雌二醇	简单节杆菌(<i>Arthrobacter simplex</i>)
水解反应	21-醋酸妊娠醇 \rightarrow 去氧皮质醇	拳丸素假单胞杆菌(<i>Pseudomonas simplex</i>) 中毛棒杆菌(<i>Corynebacterium mediolanum</i>)
边链降解	胆固醇 \rightarrow ADD	分枝杆菌(<i>Mycobacterium sp.</i>); 戈登氏菌

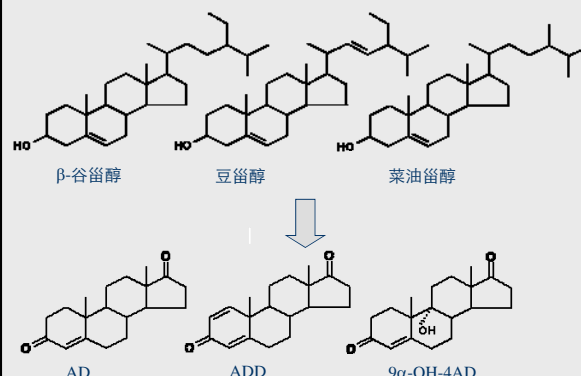
甾体微生物转化国内外近期研究应用进展

- 微生物发酵断植物甾醇侧链生产17-酮甾体研究与开发
- 微生物羟基化国内研究进展

微生物发酵断植物甾醇侧链 生产17-酮甾体研究与开发

- ◆ 国外200立方米发酵罐工业生产
- ◆ 国内引进欧洲耻垢杆菌发酵植物甾醇全套技术, 70立方米发酵罐工业规模年产AD百吨级
- ◆ 产品: AD, ADD
- ◆ 近期R&D热点: 9 α -OH-AD; 含卤糖皮质激素中间体
- ◆ 市场: 1000t/a, 份额年增长: > 10%
- ◆ 菌种: 分枝杆菌 NRRL-3805; 戈登氏菌

微生物转化植物甾醇生产3种有用甾体终产物



17-酮甾体的发酵生产

底物 (g/L)	微生物	主产物	产率(%)
羊毛甾-7,9 (11-二烯-3-醇) (0.25)	分枝杆菌NRRL B-3805	4,8(14)-ADD-3,17-二酮	30
3 β -乙酰氧-19-胆甾-5-烯胆甾醇 (0.5)	<i>Moraxella sp</i>	雌酮	15
胆甾醇 (1.0)	分枝杆菌NRRL B-3805	睾丸酮	51
麦角固醇 (0.3)	分枝杆菌NRRL B-3805	AD	35
麦角固醇 (0.3)	分枝杆菌NRRL B-3683	ADD	30
α -谷甾醇 (1.0)	分枝杆菌NRRL B-3805	AD	25
α -谷甾醇 (1.0)	分枝杆菌NRRL B-3683	ADD	20
β -谷甾醇 (1.0)	分枝杆菌NRRL B-3805	AD	90
β -谷甾醇 (5.0)	分枝杆菌 <i>Mycobacterium sp.</i> VKM Ac-1815D ET1	AD	72
植物甾醇 (10)	分枝杆菌NRRL MB-3683	AD	90
植物甾醇 (30)	分枝杆菌NRRL MB-3683	AD	80

微生物发酵断植物甾醇侧链 生产17-酮甾体研究与开发

微生物断甾醇侧链菌种选育和选择

- 俄罗斯学者由分枝杆菌1815D/2-4M; 放线菌类新进展
- 多代谷甾醇选择压力/突变选择 \rightarrow 9 α -OH-AD
- 李维等的定向富集分离培养出戈登氏菌(*Gordonia neofelifaecis*)转化胆固醇, 优势积累ADD(87.2%); 表明当前从天然源采样, 分离具有甾醇降解用途菌株的重要性

微生物发酵断植物甾醇侧链 生产17-酮甾体研究与开发

菌种的细胞生理、酶学活性及生物催化过程

- VKMAc-1815D \rightarrow 9 α -OH-AD
- XAD. Amberlite EP-60的应用
- 胞壁透性/氨基糖苷类抗生素抗性选育
- AD(D)/C₁₇ β -还原 \rightarrow 睾丸酮

微生物发酵断植物甾醇侧链 生产17-酮甾体研究与开发

相关酶的细胞学定位及生物反应器

- 1817D Δ^1 -脱氢酶: 胞液/膜酶结合蛋白
Mr,58000 \pm 2000Da
- 诺卡氏菌, 60.5KDa; 红球菌56KDa
- AD的去结构化, 9 α -OH-ADD \rightarrow CO₂+H₂O

微生物发酵断植物甾醇侧链 生产17-酮甾体研究与开发

发酵工艺选择和甾醇原料合理利用

- 两步发酵法：
 - 植物甾醇→AD
 - AD→9 α -OH-AD
 - 菌种：诺卡氏菌、棒杆菌、红球菌
- 一步发酵法：分枝杆菌突变株发酵甾醇→9 α -OH-AD

微生物发酵断植物甾醇侧链 生产17-酮甾体研究与开发

有机溶剂介质中的双相转化

- 红球菌静息细胞作生物催化剂
- 双相转化：邻苯二甲酸酯-缓冲液
- AD → 90% 9 α -OH-AD

微生物发酵断植物甾醇侧链 生产17-酮甾体研究与开发

甾醇原料的选择

- 豆油废料资源化：微生物转化预处理
 - ∴底物纯度=甾尔油谷甾醇
 - 市场需求2000t/a
- 植物甾醇作底物生物转化存在植源性种属差异：植化成分组成导致的发酵过程衰减效应

微生物发酵断植物甾醇侧链 生产17-酮甾体研究与开发

国内的研究与开发进展

- 植物甾醇的开发利用
- 我国甾体生物资源的理性化开发利用：
 - 薯蓣皂素/蕃麻皂素/剑麻皂素
- 金沙江干热河谷蕃麻皂素资源的开发研究：
 - 有巨大的开发利用潜力
 - Ref：《天然产物研究与开发》2007，19（4）：696

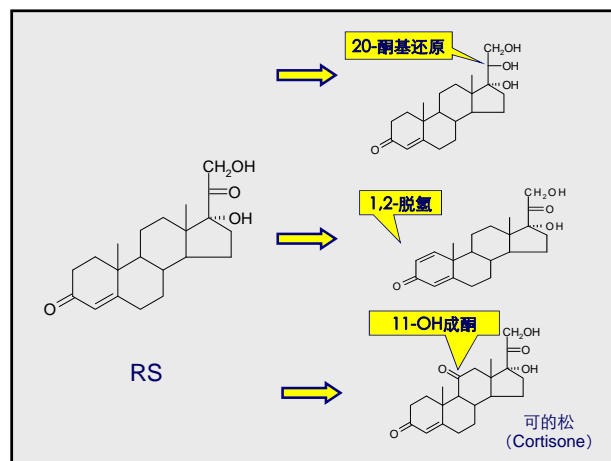
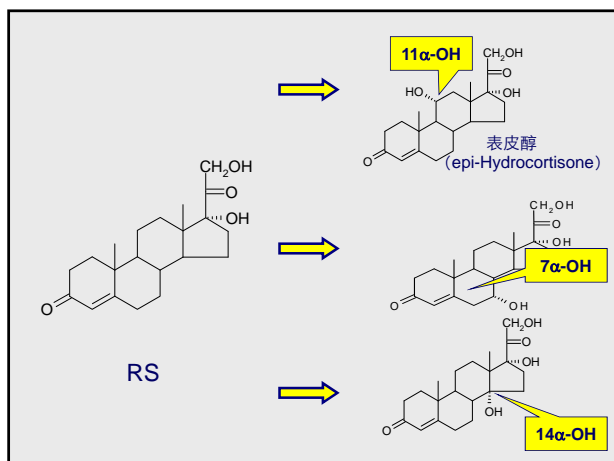
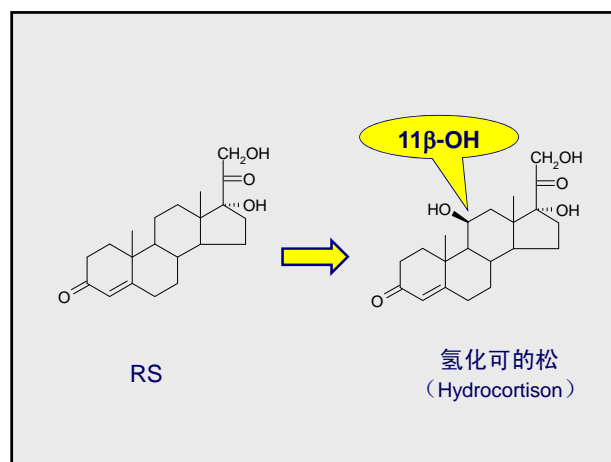
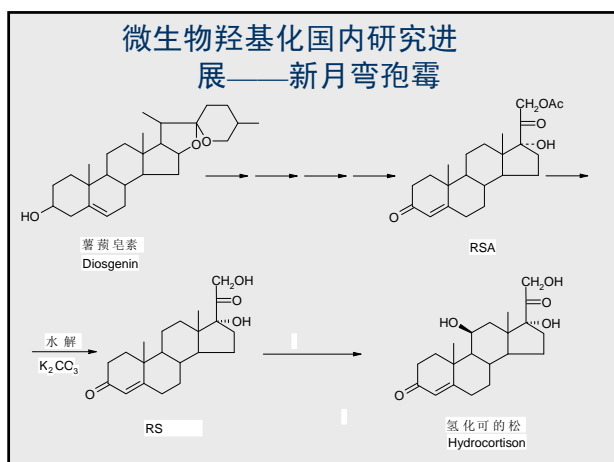
微生物羟基化国内研究进展

- 11 α -OH, 黑根霉 / 环氧孕酮 → 可的松
- 11 β -OH, 蓝色犁头霉 / RSA → 氢化可的松
- 转化方式：一次发酵直接转化
- 新月弯孢霉11 β -OH, 2003-现在的R&D; 其它

氢化可的松生物转化新工艺

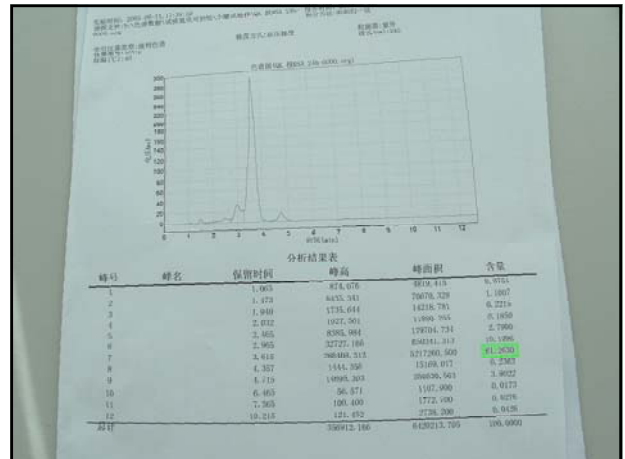
微生物生长/生物转化阶段分开操作的优点

- 避开底物和/或产物对微生物生长的有害影响
- 可直观确立优化的细胞浓度对应转化速率（因细胞密度恒定），且在细胞悬浮介质中有较高的反应速率
- 不需要严格无菌操作，因为缺乏微生物生长培养条件
- 产物回收易：从简单的缓冲液较之从复杂的液体转化介质中分离转化产物容易得多
- 各别发酵参数（如：pH、通气量等）可借助转化阶段无微生物生长（或影响）得以优化选择



制备实验结果				
批次	日期	发酵罐型及转化方式	HC收率 (%)	备注
1	2003.5	2L玻璃罐, 菌丝缓冲液转化RSA	44.7	蓝色犁头霉 AS3.65
		2L玻璃罐, 菌丝缓冲液转化RS	61.9	新月弯孢霉 AS 3.4381
2	2005.3	2L玻璃罐, 菌丝缓冲液双轮序列转化RS	57.6	新月弯孢霉
3	2005.6	2L玻璃罐, 菌丝缓冲液, 批式转化RS-β-CD	57.8	新月弯孢霉
4	2006.4	10L玻璃罐, 菌丝缓冲液, 批式转化RS	51.8	新月弯孢霉
5	2006.4	10L玻璃罐, 菌丝缓冲液, 批式转化RS	56.4	新月弯孢霉
6	2006.5	10L玻璃罐, 菌丝缓冲液双轮序列转化RS	58.8	新月弯孢霉
7	2009.12	5L玻璃自控罐, 菌丝缓冲液批式转化RS	61.0	新月弯孢霉
统计分析		均值=57.9% SD=3.30 n=7		

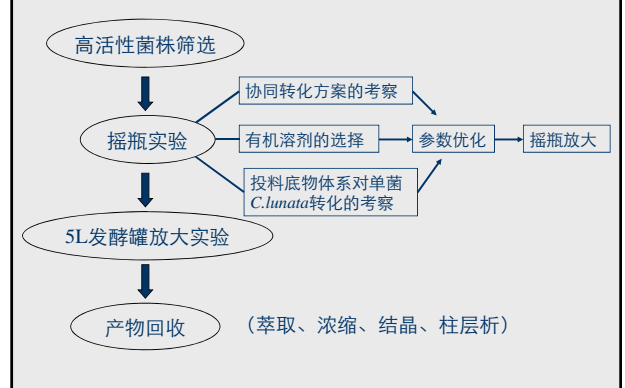


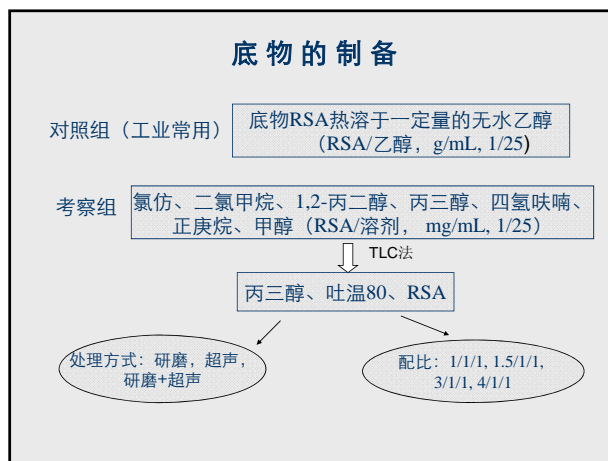
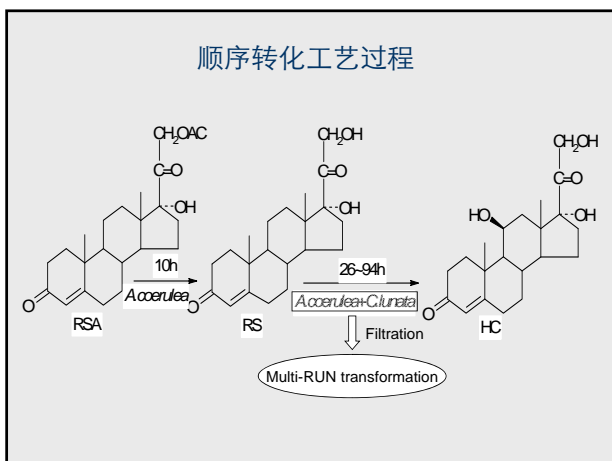
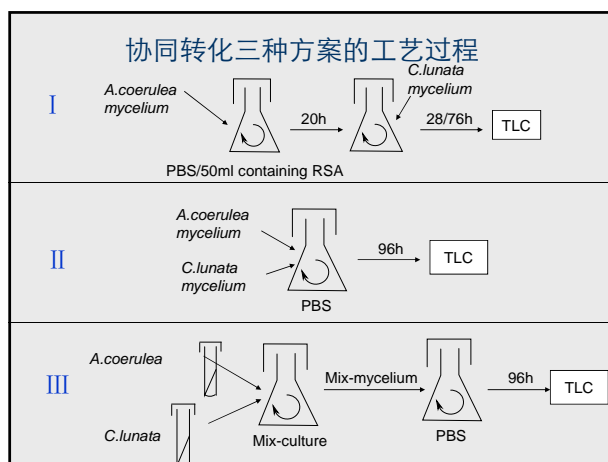
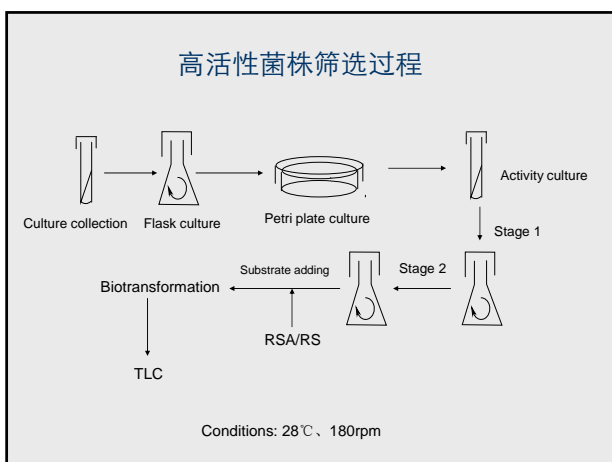


新近研究进展

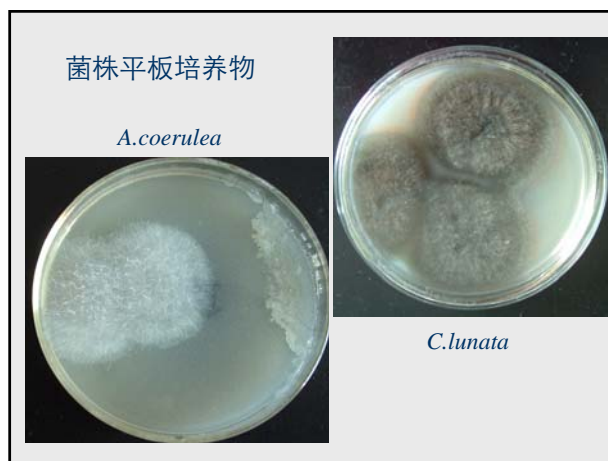
双菌多轮序列协同转化RSA制HC的研究

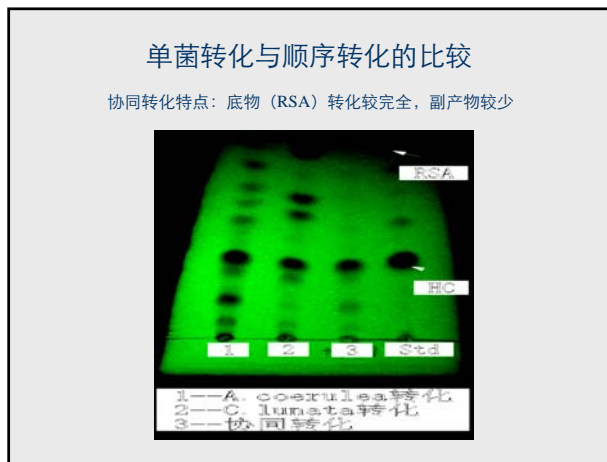
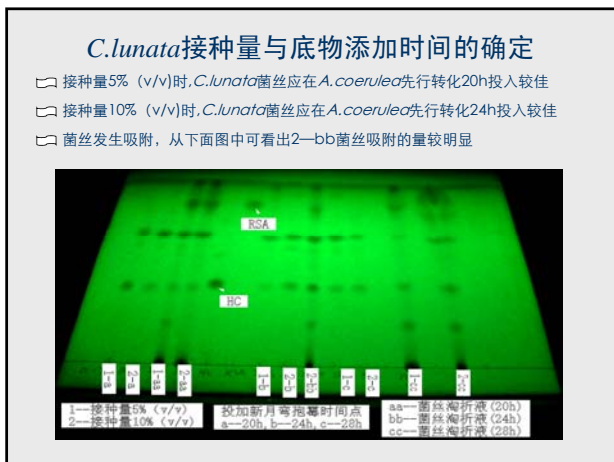
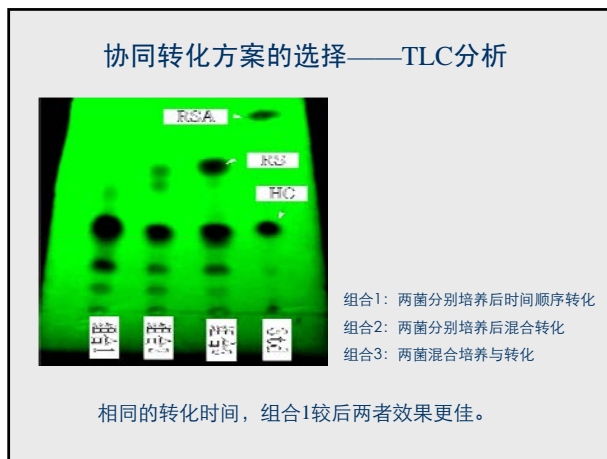
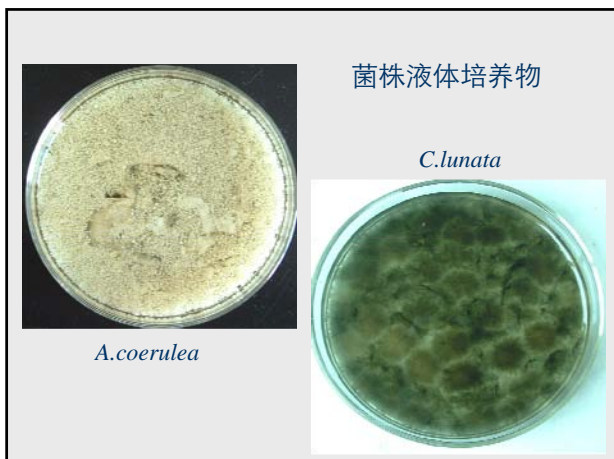
技术路线





- ### 分析方法
- ◆ 薄层层析法
 - ◆ 半定量分析法
 - ◆ 目视比较法, 色斑颜色和面积
 - ◆ 储备液标样, TLC同板比较
 - ◆ HPLC法--定量分析 / Time course curve



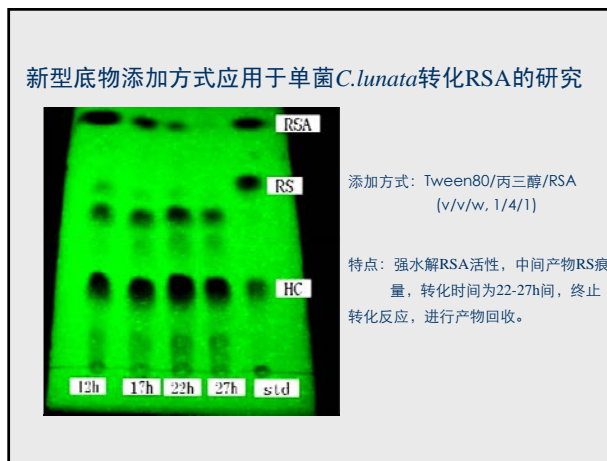


协同菌丝体在Tween80/丙三醇潜溶剂转化介质中的摇瓶放大制备试验

第1轮至第3轮转化的投料浓度分别为3、1.5和1g/L

批次	轮次 RUN	^a m(投料) /g	^m (粗品) /g	^b m(回收底物) /g	^c m(HC) /g	^p (得率) %	T(熔点) /°C
1	3	4.4	4.23	0.3	2.1	51.2	212-214
2	2	3.6	3.5	0.6	1.6	51.6	210-214
3	3	4.4	4.25	0.3	2.2	53.7	208-210

* $p = \frac{c-m}{a-b} \times 100\%$



小 结

- ◆ *A.coerulea*和*C.lunata*构成的顺序转化较单菌转化，有利于减少副产物的量，生物催化剂反复利用3-6轮仍具有活性，HC产率和生物催化剂利用率得到明显提高，具有工业应用潜力。
大——参见《生物加工过程》2009,6
- ◆ 新建立底物投料方式即Tween80/丙三醇/RSA(v/v/w, 1/3/1), 较传统的乙醇/RSA(v/w, 25/1)投料方式，投料浓度提高1-3%，转化时间缩短24-36h，协同催化剂利用3轮批具有较稳定的催化活性；实验室摇瓶放大制备实验HC平均收率达52%，较传统提高5-7%，具有潜在的工业应用价值。
- ◆ 结论2所建立的底物投料方式——应用单菌*C.lunata*转化RSA，表现出强的水解和羟化反应活性，省去了RSA→RS的化学水解步骤，过程中产生的副产物种类少，较传统单菌*A.coerulea*转化RS，化学-生物工艺更加紧凑，值得深入研究。

初步结论

- ◆ 利用筛选出的新月弯孢霉和/或兰色犁头霉经由单菌和/或双菌组合生物转化条件下，比较考察生物转化底物RS或RSA制氢化可的松工艺条件。
- ◆ 借助实验发酵罐的克量制备实验，新月弯孢霉工艺接近国际水平（60%，RS计）；双菌组合转化RSA工艺有新意，克量制备实验产率52%，较国内工业产率（45%）显著提高。
- ◆ 这在发展我国的糖皮质激素药业，提高薯蓣皂素资源利用率，突破瓶颈C11-β羟基化发酵工艺，发展生物制造氢化可的松产业经济（100t/a）具有工业应用前景。

Thank You



中国科学院成都生物研究所

Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences

