

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

81032

Patent dodatkowy
do patentu

MKP C07c 169/00

Zgłoszono: 22.08.1970 (P. 142830)

Pierwszeństwo:

Int. Cl.² C07J 1/00

Zgłoszenie ogłoszono: 05.04.1973

Opis patentowy opublikowano: 20.01.1976

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Biblioteka

Twórcy wynalazku: —

Uprawniony z patentu: Richter Gedeon Vegyészeti Gyár R.T. Budapeszt (Węgry)

Sposób mikrobiologicznego odwodorniania kortikosteroidów w położeniu C—1,2

Przedmiotem wynalazku jest sposób mikrobiologicznego odwodorniania kortikosteroidów w położeniu C—1,2.

Znane jest odwodornienie pierścienia A steroidów w pozycji 1, 2 i dzisiaj jeszcze jest najważniejszą mikrobiologiczną reakcją, przeprowadzaną w skali przemysłowej. Sposób ten zastosowano przy wytwarzaniu androsta-diendionu (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 2844513), prednisonu (szwedzki opis patentowy nr 212999) i wielu innych podstawionych, odwodornionych w położeniu 1, 2 kortikosteroidów (np. opisy patentowe St. Zjedn. Am. nr 2938834 i 3037912).

Ze względu na duże znaczenie reakcji mikrobiologicznej opracowano, właśnie dla niej szereg sposobów postępowania, które w zasadzie różnią się między sobą jedynie użytym szczepem drobnoustroju. Następujące drobnoustroje posiadają zdolność odwodorniania steroidów w położeniu 1, 2: *Arthrobacter simplex*, *Corynebacterium Hoagii* (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 2837464), *Bacterium cyclooxidans* (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 3022226), *Bacterium mycoides* (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 3037013), *Bacterium havaniensis* (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 3037914), *Alcaligenes faecalis* (węgierski opis patentowy nr 151374).

Wspólną cechą wymienionych sposobów jest przeprowadzenie przemiany substratu steroidowego w głównym naczyniu fermentacyjnym jednocześnie z założeniem w nim hodowli, lub bezpośrednio po tym. Innymi słowy, po odpowiednim przygotowaniu podłoża zaszczepia się je drobnoustrojem, posiadającym zdolność odwodorniania jak również wprowadza się, równocześnie z zaszczepieniem hodowlą lub bezpośrednio po tym substrat steroidowy, wysycony w położeniu 1, 2.

W przypadku *Arthrobacter simplex* i *Corynebacterium* enzym dehydrogenaza 1,2-steroidowa ze względu na swój indukcyjny charakter nie znajduje się pierwotnie w komórkach bakteryjnych (węgierski opis patentowy nr 149062) lecz powstaje dopiero w obecności steroidu pod wpływem dodania steroidu. Dodany substrat steroidowy wywołuje najpierw syntezę enzymu. Po wytworzeniu odpowiedniej ilości enzymu rozpoczyna się reakcja odwodorniania, której szybkość narasta proporcjonalnie do syntezy enzymu. W przypadku, gdy hodowla drobnoustroju, synteza enzymu i odwodornienie steroidu przebiegają równolegle zdarza się często, że hodowla bakteryjna wykazuje najwyższą aktywność enzymu po zakończeniu reakcji odwodorniania. W ten sposób przekształcenie następuje przy znacznie niższych, niż optymalne lub maksymalne, stężeniach enzymu.

Tę stratę podwyższa jeszcze znany fakt, że w przypadku gdy do hodowli dodaje się steroidu, wówczas inne enzymy bakteryjne rozkładają go do połączeń o niższej liczbie atomów węgla w następstwie czego cała cząsteczka zostaje wykorzystana w przemianach metabolicznych jako źródło węgla (np. Z. Naturforsch. 18b, 988, 1963). Rozkład przebiega z dużą szybkością. Wobec tego jednym z istotniejszych etapów mikrobiologicznego odwodornienia steroidów w położeniu 1, 2 jest przerwanie reakcji w ciągu paru minut w określonym momencie, w którym nastąpiło całkowite odwodornienie natomiast rozpad jeszcze nie osiągnął istotnych wartości. Szybkie określenie odpowiedniego momentu i szybkie przerwanie reakcji wiąże się z wieloma zagadnieniami.

Dla zmniejszenia występującego, w czasie odwodornienia, rozkładu steroidu proponuje się, w podanych niżej opisach patentowych, zastosowanie odpowiednich substancji dodatkowych. W istocie hamują one przemianę drobnoustroju, a zwłaszcza funkcji powodujących rozkład enzymów i zmniejszają w ten sposób metabolizowanie steroidu. Takimi substancjami dodatkowymi są np. alkohol, lub β -fenylo-naftyloamina (brytyjski opis patentowy nr 908976), antybiotyki (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 3010876), azydek sodowy, kwas monooctowy i inne inhibitory aktywności enzymatycznej (japoński opis patentowy nr 25644/67).

Przy zastosowaniu tych inhibitorów uzyskiwano stale podwyższone ilości produktu, odwodornionego w położeniu 1, 2. W ten sposób wykazano, że bez substancji dodatkowych w zasadzie związek steroidowy jest rozkładany przez enzymy bakteryjne. Ujemna strona zastosowania substancji hamujących funkcje komórkowe polega na tym, że w ich obecności jednocześnie ulega zahamowaniu synteza 1,2-dehydrogenazy steroidowej, lub osłabienie jej czynności, następstwem czego jest znaczne przedłużenie czasu przemiany substratu. Zgodnie z japońskim opisem patentowym odwodornienie hydrokortizonu uzyskuje się dopiero po upływie 48–60 godzin.

W porównaniu ze znanymi sposobami węgierski opis patentowy nr 149062 stanowi istotny postęp. Zgodnie z tym opisem po stwierdzeniu indukcyjnego charakteru enzymu wprowadza się początkowo niewielką ilość steroidu indukującego. W ten sposób zapoczątkowana zostaje synteza enzymu, 1,2-dehydrogenazy, a mający ulec przekształceniu substrat steroidowy wprowadza się do hodowli, już zawierającej aktywny enzym. Do indukcji 1,2-dehydrogenazy steroidowej nadają się w jednakowym stopniu związki szeregu androstanu i pregnanu. Odwodornienie kortikosteroidu przez hodowlę, zawierającą enzym, ulega po indukcji przyspieszeniu i dokonuje się szybciej. Umożliwiło to wprowadzanie mającego ulec przemianie steroidu nie do stężonej hodowli lecz do rozcieńczonej w stosunku 1 : 10 do 1 : 20. Zastosowanie rozcieńczonej hodowli jest bardzo korzystne, gdyż w ten sposób można wyeliminować zakładanie hodowli w dużym rozmiarze. Dzięki temu zmniejsza się również niekorzystne, rozkładające steroidy, działanie hodowli. Ten ostatni efekt osiąga się częściowo przez to, że w podłożu, w którym odbywa się przemiana, ulega zmniejszeniu liczba bakterii, powodujących rozkład. Dzieje się to częściowo dzięki temu, że resztkowe substancje odżywcze, w pierwszym rzędzie związki zawierające azot, sprzyjające wykorzystaniu steroidu jako źródła węgla, zawarte w podłożu są rozcieńczone. Z rozcieńczonej, nie zawierającej dodatkowych substancji, hodowli można łatwiej wyekstrahować odwodorniony produkt. Uzyskany krystaliczny związek praktycznie nie zawiera żadnych obcych zanieczyszczeń.

Węgierski opis patentowy nr 149062 obok wyliczonych istotnych korzyści zawiera również szereg nierozwiązanych problemów. Przy zastosowaniu, zgodnie z ustalonym sposobem postępowania, rozcieńczonej hodowli można przeprowadzić odwodornienie jedynie w stosunkowo niskim stężeniu. Uzyskany produkt nie zawsze odpowiada wymogom jakościowym, zawierając nieodwodorniony, wysycony w położeniu 1, 2 substrat steroidowy w wyższym odsetku niż 2% dopuszczalne według farmakopei. Jest to szczególnie niekorzystne, gdyż usunięcie, na drodze chemicznej, nieprzereagowanego substratu, różniącego się jedynie jednym wiązaniem podwójnym od uzyskanego produktu, jest połączone z dużymi stratami, w rezultacie więc wydajność produktu odpowiedniej jakości jest bardzo niska.

W sposobie według wynalazku uzyskuje się korzyści, wynikające z zastosowania oddzielnie przeprowadzonej indukcji 1,2-dehydrogenazy steroidowej przy jednoczesnym wyeliminowaniu szkodliwych skutków. Zgodnie z wynalazkiem w okresie fazy indukcyjnej przez wywołanie wtórnego wzrostu uzyskuje się taki poziom enzymu, który przekracza poprzednio osiągalny o rząd wielkości i który również umożliwia podwyższenie stężenia substratu w fazie odwodornienia jak i pozwala na uzyskanie produktu odpowiedniej jakości z dobrą wydajnością. Podwyższenie rzędu wielkości zawartości 1,2-dehydrogenazy steroidowej w hodowli w fazie indukcji osiąga się w sposób następujący.

Hodowlę wybranego drobnoustroju przeprowadza się na odpowiednim, znanym podłożu, korzystnie podłożu zawierającym glukozę i aminokwasy tak długo, aż wzrost ulegnie zahamowaniu (gęstość optyczna osiągnie najwyższą wartość), gdy ulegną wyczerpaniu niezbędne składniki podłoża służące jako źródło węgla cukry, kwasy organiczne lub aminokwasy, lub użyte jako źródło azotu aminokwasy, sole amonowe lub azotowe. W hodowli, doprowadzonej w ten sposób do fazy stacjonarnej, wywołuje się wtórny wzrost dodając nowe źródła węgla i azotu w takiej ilości, którą bakterie zużyją w ciągu 2–5 godzin. (Określanie składników odżywczych

według: H.J. Conn: Manual of Microbiological Methods-Soc. Am. Bact. 1957). Wybór źródła węgla lub azotu, które należy dodać następuje po stwierdzeniu braku wyczerpanej substancji, odżywczej. Źródło węgla i/lub azotu dodaje się w postaci wodnego roztworu, którego objętość nie może przekraczać 1/5 objętości hodowli.

Jednocześnie z dodaniem nowego źródła węgla i/lub azotu wprowadza się do hodowli steroid indukujący. Pod jego wpływem zawartość 1,2-dehydrogenazy steroidowej w hodowli osiąga maksymalną wartość w ciągu 2–5 godzin wtórnego wzrostu. Induktor można dodawać w dwojaki sposób: bądź w postaci zawiesiny steroidu, w postaci stałej, w wodnym roztworze składników odżywczych bądź też rozpuszcza się go w organicznym rozpuszczalniku. W ostatnim przypadku obydwa roztwory to znaczy wodny roztwór składników odżywczych i roztwór steroidu w ograniczonym rozpuszczalniku miesza się razem i dopiero wówczas wprowadza do hodowli. W przypadku, gdy z powodu małej ilości wody indukujący steroid wytrąca się w postaci grubych kryształów wówczas rozpuszcza się on w hodowli wolnej. W ten sposób uniemożliwia się szybki rozkład induktora, a tym samym zabezpiecza się stały jego poziom w czasie trwania okresu indukcji. W okresie indukcji hodowlę inkubuje się w temperaturze 20°–40°C przy stałym napowietrzaniu.

Poziom dehydrogenazy steroidowej określa się, w czasie trwania okresu indukcji, metodą Sih i Benetta (Bioch. Bioph. A. 56.584.1962). Zgodnie z tym sposobem postępowania poziom enzymu wzrasta w ciągu 2–5 godzin do wartości 150–400 jednostek/ml w przeciwieństwie do 25–40 j/ml uzyskiwanych w metodzie według węgierskiego opisu patentowego nr 149062, uzyskuje się więc 3–15-krotne podwyższenie poziomu enzymu.

Wynalazek polega na stwierdzeniu, że szybkość indukcji 1,2-dehydrogenazy steroidowej i wysokość dające go się osiągnąć poziomu enzymu są wówczas najwyższe, gdy hodowlę indukuje się w fazie przyrostu, to znaczy, w fazie zarówno aktywnego pobierania substancji odżywczych jak i aktywnej przemiany materii drobnoustrojów. Na podłożu z niedoborem składników odżywczych, w fazie stacjonarnej i przy obecności jedynie steroidu nie można uzyskać znacznej ilości enzymu.

Jednocześnie stwierdzono, jak również wykazano to ilościowo, że aktywna faza przemiany materii wywiera wprawdzie wyjątkowo korzystne działanie na syntezę enzymu, ale z innego punktu widzenia jest ona niekorzystna dla odwodornienia steroidu w położeniu 1, 2. W tej fazie bowiem rozkład steroidu jest najintensywniejszy jak również wysoka jest, niekorzystna, zdolność redukująca hodowli, co ujawnia się w zmniejszeniu ilości odwodornionego steroidu. Trudności te usuwa sposób według wynalazku, w którym hodowli, znajdującej się w fazie stacjonarnej, zapewnia się na okres indukcji, i to dokładnie na ten okres czasu, wtórny wzrost lub ponownie wywołaną aktywną przemianę materii. Właściwa reakcja mianowicie odwodornienie substratu steroidowego, rozpoczyna się z chwilą wystąpienia, po fazie indukcyjnej, określonego niedoboru składników odżywczych i ponownego przejścia hodowli w fazę stacjonarną.

Sposób według wynalazku sprzyja w znacznym stopniu syntezie enzymu, z jednoczesnym wyeliminowaniem występowania odwodorniania substancji odżywczych, zapewniających wzrost bakterii. Dzieje się to na skutek tego, że przy przemianie substratu steroidowego odwodornienie przebiega wyjątkowo szybko również i w hodowli rozcieńczonej i nie można stwierdzić ani rozkładu steroidu ani też redukcji steroidu. Stężenie hydrokortizonu, który ma być odwodorniony, wynosi w hodowli rozcieńczonej 1,2–1,6 g/l i reakcja zachodzi w ciągu 3–5 godzin, podczas gdy w hodowli nierozcieńczonej wartości te zgodnie z węgierskim opisem patentowym nr 149062 wynoszą odpowiednio 0,8–1,0 g/l i 6–10 godzin. Otrzymany związek odpowiada wymogom farmakopialnym, a wydajność w stosunku do ilości użytego hydrokortizonu wynosi do 90%.

Inny sposób wykorzystania uzyskanej, według wynalazku wyższej aktywności enzymatycznej 1,2-dehydrogenazy steroidowej w hodowli bakteryjnej polega na tym, że nie rozcieńcza się hodowli, która po fazie indukcyjnej weszła w fazę stacjonarną, lecz dodaje się ten sam hydrokortizon w 15–20-krotnie wyższej ilości w stosunku do uprzednio podanej. Przy tak wysokim stężeniu substratu przeprowadzają odwodornienie japońscy autorzy (szwajcarski opis patentowy nr 364260). Według tych znanych sposobów postępowania można otrzymać jednak tylko prednisolon o wysokiej zawartości, 5–10% hydrokortizonu (E. Kondo, E. Masuo: J. Gen. Appl. Microbiol. 7,113,1961). Dla zmniejszenia tej resztkowej zawartości hydrokortizonu sposób według wynalazku zapewnia wysoką aktywność dehydrogenazy i niską zdolność redukcyjną. Przy tym dla całkowitego przekształcenia utrzymuje się, stosując stałe dozowanie, takie stężenie substratu hydrokortizonowego, uwzględniając ewentualną wartość dyssolubilizacji, aby zapobiec tworzeniu się mieszanych kryształów, zawierających substrat i produkt. W przebiegu przeprowadzonej sposobem według wynalazku indukcji enzym zostaje wytworzony przed rozpoczęciem przekształcania substratu, a pożądaną szybkość stałego dozowania można ściśle wyliczyć, albo na podstawie, oznaczonej w okresie trwania indukcji, aktywności enzymu lub też na podstawie oznaczenia, w ciągu pierwszych godzin odwodorniania, szybkości reakcji.

Wysoka aktywność enzymatyczna hodowli ma szczególne znaczenie w takich przypadkach, kiedy odwodor-

nienie przeprowadza się bezpośrednio, za pomocą brzeczki po uprzednim przekształceniu mikrobiologicznym, bez izolowania wytworzonego produktu. W tym przypadku eliminuje się wiele problemów.

Przedmiotem wynalazku jest sposób odwodorniania kortikosteroidów w połozeniu 1, 2 przy użyciu odpowiednio zaindukowanej hodowli drobnoustrojów typu *Arthrobacter* i *Corynebacterium* polegający na tym, że indukcję enzymatyczną 1,2-dehydrogenazy steroidowej wywołuje się najpierw po zakończeniu wzrostu bakterii w fazie stacjonarnej, dodając do hodowli 0,02 do 0,2 g/l steroidu szeregu androstanu lub pregnanu, przy czym jednocześnie dodaje się źródło węgla i/lub azotu w ilości zapewniającej 0,01–0,1% stężenia i wywołując wtórny wzrost w okresie trwania indukcji. Wówczas dodaje się do hodowli, o podwyższonej aktywności, kortikosteroid, wysycony w połozeniu 1, 2, bezpośrednio lub po uprzednim rozcieńczeniu. Po zakończonym odwodornieniu izoluje się znanym sposobem, wytworzony produkt.

Niżej podane przykłady wyjaśniają bliżej sposób według wynalazku nie ograniczając jednak jego zakresu.

Przykład I. 5 litrów wyjałowionego podłoża, o wartości pH 6,8–7,0, zawierającego 0,5% glukozy, 0,3% bursztynianu amonowego, 0,1% wyciągu drożdżowego i 0,1% fosforanu jednopotasowego zaszczepia się zawiesiną hodowli *Corynebacterium fascians*. Hodowlę prowadzi się przez 14 godzin w temperaturze 35°C, przy stałym mieszaniu i napowietrzaniu, przez dostarczanie tlenu w ilości 80 mM/litr/godzinę, aż do momentu wykorzystania, zawartego w podłożu, bursztynianu amonowego. Wówczas wprowadza się do hodowli 0,5 l jałowego, 0,8% roztworu bursztynianu amonowego, w którym zawieszono 0,5 g hydrokortizonu. Hodowlę prowadzi się, w ten sam sposób, przez dalsze 5 godzin. W tym czasie ilość bakterii wzrasta o około 20%, a aktywność 1,2-dehydrogenazy steroidowej kształtuje się w sposób następujący:

0 godzin po dodaniu	3,5 j/ml
1 " "	17,0 "
2 " "	40,0 "
4 " "	93,0 "
5 " "	107,0 "
6 " "	112,0 "

Natomiast, gdy (w myśl węgierskiego opisu patentowego nr 149.062) po takiej samej hodowli wstępnej równoległe z dodaniem hydrokortizonu w ilości 0,1 mg/ml przeprowadza się 2-godziną indukcję uzyskuje się aktywność rzędu jedynie 18 j/ml.

Przykład II. w 750 ml kolbie Erlenmeyera wyjaławia się 250 ml podłoża, zawierającego 0,4% glukozy, 0,4% peptonu i 0,4% wyciągu drożdżowego. Podłoże zaszczepia się hodowlą *Arthrobacter simplex* i inkubuje w temperaturze 35°C na trzęsawce tak długo, aż stwierdzi się na podstawie określenia liczby bakterii (gęstość optyczna) początek fazy stacjonarnej. Następuje to w 19–20 godzinie hodowli. Wówczas rozpuszcza się 0,2 g glukozy w 10 ml wody, a 10 mg prednisolonu (steroid indukujący) rozpuszcza się w 2 ml metanolu. Obydwa roztwory się miesza i dodaje do hodowli, po czym prowadzi się inkubację przez dalsze 4 godziny. Po tym czasie aktywność hodowli wynosi 189 j/ml. Zawartość kolby wlewa się do 4750 ml jałowej wody i tą rozcieńczoną, aktywną hodowlą przeprowadza się odwodornienie 8 g (a więc 1,6 g/l) hydrokortizonu. Dodaje się go po rozpuszczeniu w metanolu, zawierającym 10% chlorku potasowego, w 4 porcjach, co dwie godziny. Inkubację prowadzi się przy 35°C, przy stałym mieszaniu i przewietrzaniu zapewniającym dostarczanie tlenu w ilości 80 mM/litr/godzinę. Po 8 godzinach nie stwierdza się na podstawie chromatografii cienkowarstwowej obecności hydrokortizonu w brzeczce. Brzeczkę ekstrahuje się 0,3 objętością octanu etylowego, ekstrakt odwadnia się i zagęszcza. Resztkowa zawartość hydrokortizonu w uzyskanym krystalicznym preparacie prednisolonu (7,1 g) wynosi 1,0%.

Przykład III. 200 litrów podłoża, o wartości pH w granicach 6,8–7,0, zawierającego 0,5% glukozy, 0,1% asparaginy, 0,2% wyciągu namokowego kukurydzy wyjaławia się w tanku fermentacyjnym. Następnie zaszczepia się go 10 l hodowli *Arthrobacter simplex* i prowadzi hodowlę w temperaturze 35°C, przy stałym mieszaniu i przewietrzaniu, zapewniającym dopływ tlenu w ilości 120 mM/litr/godzinę. Po 14 godzinach zawartość aminokwasów w hodowli wynosi 0,02%. Wówczas przygotowuje się roztwór 25 g histydyny w 1000 ml wody i roztwór 25 g hydrokortizonu w 300 ml metanolu, zawierającego 10% chlorku potasowego. Obydwa roztwory łączy się i wprowadza do hodowli. Indukcja trwa trzy godziny. Według próby, pobranej w trzeciej godzinie, aktywność hodowli wynosi 420 j/ml, co odpowiada szybkości przekształcania hydrokortizonu 57 ml/min.

Hodowlę, zawierającą 1,2-dehydrogenazę steroidową rozcieńcza się wodą w stosunku 1 : 20 do 4000 l. Natychmiast po rozcieńczeniu dodaje się 3,2 kg, a po 2 godzinach 1,6 kg hydrokortizonu (razem 4,8 kg = 1,2 g/l). Po upływie 1 godziny chromatografia cienkowarstwowa nie wykazuje już zawartości hydrokortizonu. Wówczas ekstrahuje się trzykrotnie brzeczkę połową objętości chloroformu, wyciąg klaruje się węglem

i supercellem, a następnie zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 20 l. Produkt wykrystalizowuje się w zwykły sposób, odsąca i suszy. Wydajność: 4,2 kg prednisolonu. Jakość preparatu odpowiada podanej w przykładzie II.

Przykład IV. Do hodowli, zawierającej 1,2-dehydrogenazę, zgodnie z przykładem III dodaje się hydrokortizonu w ilości 20 g/l w następujący sposób: 4 kg rozdrobnionego hydrokortizonu zawiesza się w 16 l wody, w której rozpuszczono 100 g Tween'u 80 (emulgatora), a następnie dodaje się 4 l metanolu, w obecności którego zawiesina bardziej się nadaje do dawkowania. Zawiesinę wprowadza się za pomocą homogenizatora, z szybkością 11,4 g hydrokortizonu/minutę. W drugiej i szóstej godzinie wprowadzania stosuje się jednogodzinne przerwy, dla przeprowadzenia kontrolnych analiz. Przekształcanie odbywa się w temperaturze 35°C, przy stałym mieszaniu i przewietrzaniu, zapewniającym dopływ tlenu w ilości 80 mM/litr/godzinę. Przekształcanie kontroluje się mikroskopowo, a po zniknięciu ziarenek hydrokortizonu (dominują igły prednisolonu) przeprowadza się kontrolę za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Fermentację przerywa się gdy zawartość reszkowa hydrokortizonu wynosi poniżej 2%. Czas potrzebny do przekształcenia wynosi 10–12 godzin.

Kryształ prednisolonu oddziela się od płynu fermentacyjnego za pomocą separatora. Rozpuszcza się je następnie w 40 litrach mieszaniny chloroformu i metanolu (w stosunku 1 : 1), roztwór przesącza przez pozbawiony bakterii, sączek Seitz'a EK, klaruje 100 g aktywnego węgla, zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem i krystalizuje. Reszkowa zawartość hydrokortizonu w uzyskanych 3,45 kg prednisolonu wynosi 1,8%.

Przykład V. Do 6 l 24-godzinnej hodowli szczepu *Curvularia prasadii*, na podłożu zawierającym 1,5% glukozy i 2,5% wyciągu namokowego kukurydzy dodaje się 6 g związku Reichsteina-S, rozpuszczonego w 60 ml metanolu, zawierającego 10% chlorku potasowego. Inkubację przeprowadza się w temperaturze 26°C, przy stałym mieszaniu i napowietrzaniu, zapewniającym dopływ tlenu w ilości 80 mM/litr/godzinę. Co 4 godziny przeprowadza się kontrolę za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po upływie 28 godzin, po zniknięciu związku Reichsteina-S pobiera się próbkę (I) i bada przy pomocy chromatografii bibułowej (wyniki w tabeli I). Hodowlę przesącza się, a do przesączu, który według wyników chromatografii bibułowej zawiera w przeważającej ilości hydrokortizon, wprowadza się 300 ml hodowli *Arthrobacter simplex* (przykład III). Inkubację prowadzi się w temperaturze 35°C, sposobem opisanym w przykładzie III. Na podstawie wyników badań, przeprowadzonych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, po 4 godzinach pobiera się następną (II) próbkę, do badań za pomocą chromatografii bibułowej. Wyniki analiz:

	badanie I	badanie II
związek Reichsteina-S/RS/	12 gamma/ml	
hydrokortizon	608 "	—
11-o<-OH-RS	5 "	—
14-o<-OH-RS	82 "	—
1,2-dehydro-RS	—	10 gamma/ml
prednisolon	—	560 "
20-βOH-prednisolon	—	16 "
1,2-dehydro-14-o<-OH-RS	—	75 gamma/ml

w dalszym ciągu produkt uzyskuje się według sposobu, podanego w przykładzie III. Wydajność: 3,1 g prednisolonu.

Przykład VI. 500 ml jałowego podłoża, zawierającego 0,3% glukozy i 0,3% peptonu zaszczenia się hodowlą *Arthrobacter simplex*. Hodowlę przeprowadza się następnie na trzęsawce w temperaturze 35°C aż do uzyskania fazy stacjonarnej (przez około 20 godzin). Wprowadza się wówczas substancję odżywcze, a mianowicie 0,25 g glukozy i 0,15 g glicyny dla zabezpieczenia wzrostu w okresie indukcji. Indukcję inicjuje się przez dawkowanie roztworu 100 ml 17-o<-metylo-testosteronu w 10 ml metanolu. Po 5 godzinnej indukcji na trzęsawce, w temperaturze 35°C aktywność 1,2-dehydrogenazy steroidowej wynosi 220 jednostek na ml hodowli. Wówczas rozcieńcza się 500 ml hodowli 4500 ml wody i przy stałym mieszaniu dodaje się roztwór 4 g związku Reichsteina-S w 50 ml metanolu, zawierającego 10% CaCl₂. Odwodornianie następuje przy stałym mieszaniu i napowietrzaniu. Przekształcenie substratu, które dokonuje się w ciągu 16 godzin, kontroluje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. W 16 godzinie pobiera się próbkę, celem przeprowadzenia chromatografii bibułowej, której wyniki przedstawiają się w sposób następujący:

T a b e l a II

Związek Reichsteina-S (RS)	2 gamma/ml płynu fermentacyjnego
1,2-dehydro RS	710 gamma/ml "
20-β-oksy-RS	30 gamma/ml "

Brzeczke fermentacyjną ekstrahuje się trzykrotnie 0,3 objętościami octanu etylowego, wyodrębnia produkt znanym sposobem i uzyskuje 3,28 g związku 1,2-dehydro-Reichstein-S.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób mikrobiologicznego odwodorniania kortikosteroidów w położeniu C—1, 2 za pomocą szczepów typu *Arthrobacter* lub *Corynebacterium* przez stosowanie wywołanej w następstwie hodowli, indukcji enzymatycznej, poprzedzającej odwodornienie, z n a m i e n n y t y m, że indukcję enzymatyczną 1,2-dehydrogenazy steroidowej wywołuje się najpierw po zakończeniu wzrostu bakterii, na początku fazy stacjonarnej, dodając do hodowli 0,02—0,2 mg/ml steroidu szeregu androstanu lub pregnanu, przy czym jednocześnie dodaje się źródło węgla i/lub azotu w ilości, zapewniającej 0,01—0,1% stężenia, wywołując wtórny wzrost w okresie trwania inkubacji i od razu lub porcjami dodaje się do hodowli o podwyższonej aktywności kortikosteroid, wysycony w położeniu 1,2 bezpośrednio lub po uprzednim rozcieńczeniu, a następnie przeprowadza się w znany sposób odwodornienie i wyodrębnienie otrzymanego produktu.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że do hodowli dodaje się steroid indukujący w postaci grubej krystalicznej, lub pod postacią wodnej zawiesiny lub też w formie kryształów, wytrąconych z organicznego roztworu, za pomocą niewielkiej ilości wody.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że wprowadza się do hodowli mono— lub dwusacharyd w momencie rozpoczynania się indukcji.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że wprowadza się do hodowli w momencie rozpoczynania się indukcji, aminokwasy, lub związek naturalny zawierający je, korzystnie wyciąg namokowy kukurydzy

5. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że wprowadza się do hodowli, w momencie rozpoczynania się indukcji, sole amonowe kwasu organicznego, korzystnie bursztynian amonowy.

6. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że steroid stanowiący substrat wprowadza się metodą ciągłą z szybkością, odpowiadającą szybkości odwodorniania.

