



Nederland

⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8102648**

⑲ NL

- ⑤④ **Werkwijze ter bereiding van androstaan-steroiden.**
- ⑤① Int.Cl³: C12P 33/00, C07J 1/00.
- ⑦① Aanvrager: Mitsubishi Chemical Industries Limited te Tokio.
- ⑦④ Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

- ②① Aanvraag Nr. 8102648.
- ②② Ingediend 1 juni 1981.
- ③② Voorrang vanaf 17 juni 1980.
- ③③ Land van voorrang: Japan (JP).
- ③① Nummer van de voorrangsaanvraag: 81943/80 .
- ⑥② - -

- ④③ Ter inzage gelegd 18 januari 1982.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

N.O. 30.193

Werkwijze ter bereiding van androstaan-steroiden.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze ter bereiding van androstaan-steroiden en meer in het bijzonder op een verbetering van het cultuurmedium, dat bij de fermentatieve produktie van androstaan-steroiden wordt gebruikt.

- 5 Het is algemeen bekend, dat een androstaan-steroïde bereid kan worden door microbiologische omzetting van een sterol met een microorganisme behorende tot het geslacht *Mycobacterium* (onderstaand afgekort als "M"). Deze methode brengt echter enkele nadelen met zich mee, omdat de opbrengst aan het gewenste steroïde nog
10 niet bevredigend is en de produktiesnelheid klein is.

- Eveneens is het bekend, dat bij de steroïde-fermentatie, waarbij progesteron op de plaats 11 α wordt gehydroxyleerd met behulp van Rhizopus nigricans, een van de fungi, het substraat (dat wil zeggen progesteron) in een hogere concentratie kan worden toege-
15 voegd door het in verloop van de incubatie toe te voegen als een mengsel met ruwe eierdooier, in vergelijking met de gevallen, waarin progesteron als een oplossing in aceton wordt toegevoegd zonder ruwe eierdooier te gebruiken (Japanse octrooi-publicatie no. 9765/1957).

- 20 De uitvinding is nu gelegen in een werkwijze voor het bereiden van een androstaan-steroïde door microbiologische omzetting van een sterolsubstraat met een microorganisme behorende tot het geslacht M, waarbij het toegepaste medium ten minste 0,1 gew.% eierdooier, betrokken op het droge gewicht, bevat.

- 25 De androstaan-steroiden, die volgens de werkwijze van de uitvinding kunnen worden bereid, zijn androst-4- α -een-3,17-dion (onderstaand afgekort als "4AD"), androsta-1,4-dien-3,17-dion ("ADD"), 9 α -hydroxyandrost-4- α -een-3,17-dion ("9 α -OH-4AD"), dehydroepiandrosteron ("DHA"), dehydrotestosteron ("DHT"), testosteron ("TSN") als-
30 mede elk ander androstaan-steroïde, waarvan volgens de stand der techniek bekend is, dat dit door microbiologische omzetting van een sterolsubstraat met een microorganisme behorende tot M. kan worden bereid. Van deze androstaan-steroiden zijn 4AD, ADD en 9 α -OH-4AD van bijzonder belang als tussenprodukten voor de synthe-
35 se van diverse steroiden.

Het microorganisme, dat bij de werkwijze volgens de uitvinding worden toegepast, kan elk microorganisme zijn, dat behoort

8102648

tot het geslacht *M.* en in staat is het gewenste androstaan-steroïde te vormen. Bij voorkeur is het microörganisme een mutant, die geen of slechts in geringe hoeveelheden de enzymen vormt, welke het androstaan-steroïde afbreken.

- 5 Voorbeelden van dergelijke mutanten en de daarmee als hoofdprodukten gevormde androstaan-steroïden zijn samengevat in tabel A.

Tabel A

Androstaan-
steroïde

Microörganisme

	<i>M. parafortuitum</i> complex MCI-0801
	" MCI-0802
	<i>M. vaccae</i> MCI-1102
A D D	" MCI-1103
	" MCI-1115
	<i>M. diernhoferi</i> MCI-1298
	" MCI-1299
	<i>M. sp.</i> NRRL B-3683
4 A D	<i>M. parafortuitum</i> complex MCI-0807
	<i>M. sp.</i> NRRL B-3805
	<i>M. vaccae</i> MCI-1104
9 α -OH-4AD	" MCI-1117
	<i>M. parafortuitum</i> MCI-1297
	<i>M. fortuitum</i> NRRL B-8119

- 10 Het sterol, dat als substraat bij de uitvinding wordt toegepast, omvat diverse sterolen, C-3 ester- of ether-derivaten daarvan alsmede de tussenprodukten, die bij de oxydatie daarvan worden gevormd.

- 15 Sterolen bezitten een hydroxylgroep aan C-3, gewoonlijk een dubbele binding aan C-5, een zijketen met 8 tot 10 koolstofatomen aan C-17 en in sommige gevallen een dubbele binding aan C-7, C-8, C-9 (11) en dergelijke, van de perhydrocyclopentanofenantreen-kern, hoewel het cyclopentaanfenantreen-kern ook verzadigd kan zijn.

- 20 Voorbeelden van dergelijke sterolen zijn cholesterol, stigmasterol, campesterol, β -sitosterol, ergosterol, brassicasterol, fucosterol, lanosterol, agnosterol, dihydrolanosterol, dihydroagnosterol en α -sitosterol. In het bijzonder verdienen cholesterol, campesterol en β -sitosterol de voorkeur.

C-3-esterderivaten van 3β -OH sterolen en anorganische zuren, bijvoorbeeld zwavelzuur, of organische zuren, bijvoorbeeld vetzu-

ren, kunnen ook als uitgangsmaterialen voor de werkwijze van de uitvinding worden toegepast. Voorbeelden van dergelijke C-3 esterderivaten zijn cholesterylolaat, cholesterylpalmitaat en cholesterylsulfaat.

5 Verder kunnen C-3 etherderivaten, die bijvoorbeeld verkregen worden door additie van epoxyalkaan aan de 3β -OH van sterolen, als uitgangsmateriaal voor de werkwijze volgens de uitvinding worden toegepast. Een voorbeeld van dergelijke C-3 etherderivaten is polyoxyethyleen-cholesterylether.

10 Het zal zonder meer duidelijk zijn, dat wolwas en lanoline, die elk de bovenbeschreven C-3 esterderivaten van de sterolen bevatten; cholesterol bevattende wolalcohol, die verkregen wordt door hydrolyse van lanoline; en een C-3 etherderivaat, de polyoxyethyleen-lanoline-alcohollether, die verkregen wordt door omzetting
15 van wolalcohol met epoxyethaan, als uitgangsmaterialen voor de werkwijze van de uitvinding kunnen worden gebruikt.

Sterolen bevattende natuurprodukten en omzettingsprodukten, zoals afvalolie, die verkregen wordt bij het zuiveren van visolie of inktvisolie door deze met alkali te wassen, gedesodoriseerd
20 schuim en bezinksel van plantaardige oliën, en chinese houtolie kunnen eveneens als uitgangsmaterialen voor de werkwijze van de uitvinding worden gebruikt.

Bovendien kunnen tussenprodukten, die bij de oxydatie van sterolen of C-3 ester- of ether-derivaten daarvan worden gevormd,
25 eveneens als uitgangsmateriaal (substraten) voor de werkwijze van de uitvinding worden toegepast. De door oxydatie verkregen tussenprodukten zijn de 4-een-3-on- of 1,4-dieen-3-on-derivaten van sterolen of C-3 ester- of ether-derivaten daarvan, bijvoorbeeld
cholest-4-een-3-on, cholesta-4,22-dieen-3-on, 3β -hydroxy-23,24-
30 bis-norchol-5-een-22-zuur, 3-oxo-23,24-bisnorchol-4-een-22-zuur (onderstaand afgekort als "4BN"), 3-oxopregna-4,17(20)-dieen-20-carbonzuur, methylester van 3-oxopregna-4,17(20)-dieen-20-carbonzuur, cholzuur, lithocholzuur en dergelijke.

Een essentieel aspect van de uitvinding is, dat een medium
35 wordt gebruikt, dat ten minste 0,1 gew.% eierdooier, betrokken op het droge gewicht, bevat.

De eierdooier kan in elke ruwe, droge of bevroren vorm verkeren. De eierdooier kan van het eiwit zijn afgescheiden. Eveneens kan het gehele ei, waarin de dooier niet van het eiwit is afge-
40 scheiden, worden gebruikt en in dergelijke gevallen worden de

eierdoppen gewoonlijk verwijderd. Van deze vormen van eierdooier wordt droge eierdooier op de meest geschikte wijze bij de technische uitvoering gebruikt.

Het gehalte aan eierdooier in het medium dient ten minste
 5 0,1 gew.% te bedragen, betrokken op de eierdooier als droge stof, terwijl een hoeveelheid van niet meer dan 3 gew.% eierdooier in het algemeen bevredigend is. Indien de hoeveelheid eierdooier te klein is zal niet een aanzienlijk effect van de toevoeging van eierdooier worden bereikt. Het gebruik van een overmatige grote hoeveelheid
 10 eierdooier verdient daarentegen niet de voorkeur, omdat dit de neiging bezit een remmende invloed op de microörganismen uit te oefenen. Gewoonlijk bedraagt het watergehalte van ruwe eierdooiers
 45 tot 50 gew.%.

Behalve de eierdooier worden aan het bij de werkwijze van de
 15 uitvinding toegepaste cultuurmedium koolstofbronnen, stikstofbronnen en anorganische stoffen in voldoende hoeveelheden toegevoegd.

Voorbeelden van de koolstofbronnen zijn koolwaterstoffen, zoals normale paraffinen, α -alkenen en xyleen; alcoholen, zoals methanol, ethanol, glycerol en hogere alcoholen; organische zuren,
 20 zoals barnsteen zuur, azijnzuur en hogere vetzuren en zouten daarvan; glyceriden, oliën en vetten, zoals soja-olie en katoenzaadolie; en sacchariden, zoals zetmeel, maltose, sucrose, glucose en rhamnose.

Natuurlijke voedingsbronnen, die koolstofbronnen, stikstof-
 25 bronnen en andere voedingselementen bevatten, kunnen in het cultuurmedium worden opgenomen. Voorbeelden van dergelijke natuurlijke voedingsbronnen zijn melasse, zoals hoogwaardige melasse en xylose melasse; bagasse, maiskolven, alfalfa, maisweekvloei stof, oplosbare residuen uit de destilleerderijen, mieki (een waterige
 30 oplossing van een aminozurenmengsel, dat bereid wordt door hydrolyse van sojabonenmeel met HCl), vismeel, zemelen, vleesextract, gist, gistextract, aardappel extract, moutextract, gluten, pepton, glutaminaten, asparagine, glycine, caseïne, caseïne-hydrolysaat, ondermelk; bij de winning van plantaardige oliën verkregen resi-
 35 du's, zoals sojabonenkoek, raapzaadafval, sesammeel, lijnzaadmeel, katoenzaadmeel; en olie houdende zaden en olie houdende vruchten, zoals hele sojabonen, raapzaad, sesam, lijnzaad en katoenzaad.

Voorbeelden van de anorganische stoffen zijn stikstofbronnen, zoals ammoniumsulfaat, ammoniumchloride en dergelijke; kalium- en
 40 fosforbronnen, zoals dikaliumwaterstoffosfaat; zouten van ijzer,

koper, magnesium, mangaan,^{kobalt,} /zink, calcium en dergelijke; en as-resten van natuurprodukten, zoals melasse. Indien noodzakelijk kunnen andere toevoegsels, bijvoorbeeld vitaminen, worden toegevoegd.

- 5 De samenstelling van het cultuurmedium is afhankelijk van het toegepaste microorganisme. Koolstofbronnen, stikstofbronnen, kalium, fosfor en magnesium zijn kritische componenten in het cultuur-medium.

Een algemeen bekend schuim werend middel, bijvoorbeeld polyoxyalkyleenglycol, kan, indien noodzakelijk, in het cultuurmedium worden opgenomen. Het behoeft echter niet altijd te worden toegevoegd.

Bij voorkeur wordt aan het medium een oppervlakte-actieve stof toegevoegd, omdat het werkzaam is als een emulgeermiddel voor de sterolen. Oppervlakte-actieve stoffen, die de voorkeur verdienen, zijn de niet-ionogene of anionogene oppervlakte-actieve stoffen, bijvoorbeeld polyoxyethyleensorbitan-monostearaat, sorbitan-monopalmitaat en polyoxyethyleen-glycolmonostearaat.

De bebroedingstemperatuur bedraagt gewoonlijk 20 tot 40°C en ligt bij voorkeur binnen het traject van ongeveer 25 tot 35°C.

In het algemeen wordt de pH van het cultuurmedium ingesteld op 5 tot 10, bij voorkeur 6 tot 9. Daar het bij de uitvinding toegepaste microorganisme tot het geslacht M. behoort, kan het zelfs in stand blijven in een medium met een hoger pH-waarde van ongeveer 10.

25 In het algemeen wordt het sterol, dat als uitgangsmateriaal voor de werkwijze van de uitvinding wordt gebruikt, tezamen met het medium gesteriliseerd, hoewel het ook aan het medium kan worden toegevoegd hetzij ineens hetzij in gedeelten na het begin van de bebroeding. In het laatstgenoemde geval wordt het sterol na sterilisering door droge of natte warmte toegevoegd hetzij als zodanig hetzij in de vorm van een oplossing in een geschikt oplosmiddel, zoals dimethylformamide of als een fijndisperse suspensie, die bereid wordt door middel van behandeling met ultrasone trillingen. Het verdient de voorkeur gelijktijdig een oppervlakte-actieve stof toe te voegen in verband met de versnelde emulgering van het sterolsubstraat, die door een dergelijke toevoeging wordt bereikt.

De bebroedingstijd is niet kritisch. In het algemeen neemt de hoeveelheid van het gevormde androstaan-steroïde twee dagen na de toevoeging van het sterol-uitgangsmateriaal snel toe. De hoeveelheid van het gevormde androstaan-steroïde neemt daar geleide-

lijk in verloop van de bebroedingstijd toe. Een bebroedingstijd van meer dan 20 dagen is echter voor een economische uitvoering van weinig belang.

Na afloop van de bebroeding kan het androstaan-steroïde, dat
 5 zich in de fermentatie-bouillon heeft opgehoopt, op elke gebruikelijke wijze worden verzameld, geïsoleerd en gezuiverd. Zo kan de bouillon bijvoorbeeld worden geëxtraheerd met verscheidene volumina van een met water niet-mengbaar organisch oplosmiddel, zoals ethylacetaat. Het extract wordt daarna gedestilleerd om het oplos-
 10 middel te verwijderen, waarna het resterende steroïde-mengsel aan kolomchromatografie wordt onderworpen onder toepassing van poreuze hars, kiezelgel, aluminiumoxide en dergelijke als adsorbens en petroleumether, benzeen, chloroform, ether, aceton, methanol, ethylacetaat en dergelijke als elueermiddel voor het isoleren van
 15 het gewenste androstaan-steroïde.

Gewoonlijk kunnen echter de bebroedingsomstandigheden en het extractie-oplosmiddel zo worden gekozen, dat het door oplosmiddel-extractie van de fermentatie-bouillon verkregen extract in hoofdzaak het gewenste androstaan-steroïde bevat. In dergelijke gevallen
 20 len kunnen zuivere kristallen van het androstaan-steroïde worden gewonnen zonder chromatografische behandeling door het extract te destilleren teneinde het oplosmiddel te verwijderen en het residu vervolgens aan herhaalde herkristallisatie uit aceton, hexaan, cyclohexaan en dergelijke te onderwerpen.

Volgens de werkwijze van de uitvinding wordt het effect van
 25 de afsplitsing van de zijketen van een sterol verbeterd en wordt het gewenste androstaan-steroïde met een aanzienlijk hogere snelheid gevormd in vergelijking met de gevallen, waarbij een medium wordt gebruikt, dat vrij van eierdooier is. De opbrengst van het
 30 androstaan-steroïde, betrokken op het uitgangsmateriaal, wordt eveneens verhoogd. Dankzij de verhoogde snelheid van de afbraak van het sterol-uitgangsmateriaal is het bovendien mogelijk het sterol in een hogere concentratie toe te voeren in vergelijking met de gevallen, waarbij geen eierdooier wordt toegevoegd. Deze
 35 gunstige aspecten geven, in zijn geheel genomen, aanleiding tot een aanzienlijke toename van de produktiviteit van het androstaan-steroïde, waardoor de onderhavige uitvinding van groot economisch belang is.

Het eierdooiermateriaal, dat bij de werkwijze volgens de uit-
 40 vinding wordt gebruikt, is zeer goedkoop in vergelijking met het

produkt en dit is een ander belangrijk aspect van de uitvinding.

Nu de uitvinding in het algemeen is beschreven, kan een meer volledig inzicht worden verkregen aan de hand van bepaalde voorbeelden, die hierbij alleen ter toelichting worden verschaft en
5 de uitvinding op generlei wijze beperken.

In deze voorbeelden werd de analyse van de androstaan-steroiden uitgevoerd door gaschromatografie en zijn alle daarin vermelde percentage gewichtspercentages.

Voorbeeld I

10 Een entmedium (pH van 7,2) met de volgende samenstelling wordt bereid:

- 1,0 % glucose
- 1,0 % vleesextract
- 1,0 % pepton, en
- 15 rest - water.

In een schudkolf van 500 ml worden 100 ml van het entmedium gebracht. De kolf en de inhoud worden gesteriliseerd door gedurende een periode van 15 minuten bij een temperatuur van 120°C in een autoclaaf te behandelen. Het medium wordt geënt met een oog

20 M. parafortuitum MCI-1297 waarna het geënte medium gedurende een periode van 48 uren wordt bebroed bij een temperatuur van 30°C op een heen en weer bewegende schudinrichting met een slag van 7 cm bij 120 slagen per minuut.

In elk van twintig schudkolven van elk 500 ml, die verdeeld
25 worden in twee groepen, welke elk tien kolven omvatten, worden 50 ml van een hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0) gebracht, dat de volgende samenstelling bezit:

- 5,0 % verpoederde hele sojabonen
- 1,5 % gist
- 30 0,15 % K_2HPO_4
- 0,5 % sojaolie
- 0,1 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0,1 % siloxanolie (door Shin-etsu Chemical Industry Co., Ltd. in de handel gebracht onder de merknaam "KM-70")
- 35 2,0 % cholesterol
- 1,0 % droge eierdooier, en
- rest - water.

De kolven en de inhoud daarvan worden gedurende een periode van 20 minuten bij een temperatuur van 120°C gesteriliseerd door
40 behandeling in een autoclaaf. Elk van de kolven wordt geënt met

2 ml van de op de bovenbeschreven wijze verkregen entcultuur-
bouillon. De eigenlijke fermentatie wordt aangevangen bij een tem-
peratuur van 30°C op een heen en weer bewegende schudinrichting
met een slag van 7 cm bij 120 slagen per minuut. De bebroeding van
5 de eerste en van de tweede groep wordt beëindigd na verloop van
140 uren, respectievelijk 210 uren, gerekend vanaf het moment van
het begin van de bebroeding. De verenigde fermentatie-bouillon van
elke groep wordt tweemaal met 1 liter ethylacetaat geëxtraheerd.

Nadat het verenigde extract is afgefiltreerd om al het onop-
10 losbare materiaal, zoals cellen, te verwijderen, wordt het steroïde-
gehalte van het filtraat door gaschromatografische analyse bepaald.
Uit de analyse blijkt, dat de extracten van de eerste en de tweede
groep 1,65 g respectievelijk 1,85 g van het gevormde 9α-OH-4AD
bevatten.

15 Het bovenstaande voorschrift wordt herhaald onder toepassing
van hetzelfde hoofd fermentatiemedium, waaraan echter geen eier-
dooier-materiaal wordt toegevoegd. Het bebroeden van de eerste
groep en de tweede groep (welke groepen elk tienkolven omvatten,
dat wil zeggen, dat in totaal twintig kolven worden toegepast)
20 wordt beëindigd na verloop van ongeveer 140 uren respectievelijk
210 uren, gerekend vanaf het begin van de bebroeding, waarna de
fermentatie-bouillon op dezelfde wijze wordt geëxtraheerd. Uit de
analyse van de extracten met betrekking tot het steroïde-gehalte
blijkt, dat de extracten van de eerste en de tweede groep 0,94 g,
25 respectievelijk 1,38 g 9α-OH-4AD bevatten.

Voorbeeld II

Een entmedium (pH van 7,2) met de volgende samenstelling
wordt bereid:

1,0 % glucose
30 1,0 % vleesextract
1,0 % pepton, en
rest - water.

In een schudkolf van 500 ml worden 100 ml van het entmedium
gebracht. De kolf en de inhoud worden gedurende een periode van
35 15 minuten bij een temperatuur van 120°C gesteriliseerd door be-
handeling in een autoclaaf. Het medium wordt geënt met een oog
M. vaccae MCI-1104, waarna het geënte medium gedurende een periode
van 48 uren bij een temperatuur van 30°C wordt bebroed op een heen
en weer bewegende schudinrichting met een slag van 7 cm bij 120
40 slagen per minuut.

8102648

Elk van twee schudkolven van 500 ml, die elk 50 ml van een hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0, gesteriliseerd door gedurende 20 minuten bij 120°C in de autoclaaf te behandelen) met de volgende samenstelling:

- 5 4,0 % verpoederde ontvette sojabonen
 2,0 % gist
 1,0 % sojaolie
 1,0 % rijstdoppen
 0,2 % NaNO_3
 10 0,1 % K_2HPO_4
 0,1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 1,5 % cholesterol
 0,5 % droge eierdooier, en
 rest - water bevatten
- 15 wordt met 20 ml van de op de bovenbeschreven wijze bereide ent-cultuur-bouillon geënt. De eigenlijke fermentatie wordt bij 30°C uitgevoerd op een heen en weer bewegende schudinrichting met een slag van 7 cm bij 100 slagen per minuut. De fermentatie wordt gedurende 144 uren in de ene kolf en gedurende 192 uren in de andere
- 20 kolf voortgezet. Elke fermentatie-bouillon wordt dan tweemaal met telkens 100 ml ethylacetaat geëxtraheerd. Uit de analyse van de extracten blijkt, dat deze extracten 95 mg, respectievelijk 115 mg 9 α -OH-4AD bevatten.

- Het bovenstaande voorschrift wordt met hetzelfde hoofd fermentatiemedium herhaald, waaraan echter geen eierdooiermateriaal is
- 25 toegevoegd. Op dezelfde wijze wordt de fermentatie in de twee kolven 144 uren, respectievelijk 192 uren na het begin van de eigenlijke fermentatie beëindigd. Uit de analyse van de extracten met betrekking tot het steroïde-gehalte blijkt, dat zij 52 mg, respectievelijk 98 mg 9 α -OH-4AD bevatten.
- 30

Voorbeeld III

- Het in voorbeeld II beschreven voorschrift wordt herhaald, waarbij echter ruw β -sitosterol (een 8 : 1 : 1 mengsel van β -sitosterol, campesterol en α -sitosterol), een 2 : 1 mengsel van β -sitosterol en campesterol, stigmasterol, cholest-4- α -3-on, cholesteryl-oleaat of 4BN als substraat in plaats van het cholesterol
- 35 wordt gebruikt en de eigenlijke fermentatie gedurende 140 uren wordt voortgezet. De hoeveelheden 9 α -OH-4AD, die zich in de bouillon ophopen, blijken uit tabel B.

Tabel B

Sterol	9 α -OH-4AD (mg) toevoeging van eierdooier	
	ja	neen
ruw β -sitosterol	57	38
β -sitosterol + campesterol	62	39
stigmasterol	10	7
cholest-4-een-3-on	43	22
cholesteryl-oleaat	5	4
4BN	12	6

Voorbeeld IV

Een entmedium (pH van 7,2) met de volgende samenstelling wordt bereid:

- 1,0 % glucose
 5 1,0 % vleesextract
 1,0 % pepton, en
 rest - water.

In een schudkolf van 500 ml worden 100 ml van het entmedium gebracht. De kolf en de inhoud worden gedurende een periode van
 10 15 minuten bij een temperatuur van 120°C gesteriliseerd door behandeling in een autoclaaf. Het medium wordt geënt met een oog M. parafortuitum complex MCI 0801, waarna het geënte medium gedurende een periode van 48 uren bij een temperatuur van 30°C wordt bebroed op een heen en weer bewegende schudinrichting met een slag
 15 van 7 cm bij 120 slagen per minuut.

Elk van tien schudkolven van 500 ml, die elk 50 ml van een hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0, gesteriliseerd door gedurende 20 minuten bij 120°C in de autoclaaf te behandelen) met de volgende samenstelling:

- 20 4,0 % verpoederde hele sojabonen
 0,2 % NaNO₃
 0,2 % K₂HPO₄
 0,1 % MgSO₄·7H₂O
 1,0 % cholesterol, en
 25 rest - water bevatten

wordt met 2 ml van de op de bovenbeschreven wijze bereide ent-cultuurbouillon geënt. Elk van een andere tien schudkolven van 500 ml, die elk 50 ml van een hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0, op dezelfde wijze gesteriliseerd) met dezelfde samenstelling als

8102648

bovenstaand vermeld, ^{bevatten}afgezien van het feit, dat het bovendien 1,0 % droog eierdooiermateriaal bevat, wordt met 2 ml van dezelfde entcultuur-bouillon geënt. De eigenlijke fermentatie wordt aangevangen bij 30°C op een heen en weer bewegende schudmachine met een
 5 slag van 7 cm bij 120 slagen per minuut en na 112 uren voor vijf kolven en na 170 uren voor de andere vijf kolven beëindigd. De verenigde fermentatie-bouillons van de eerste vijf kolven en van de tweede vijf kolven worden elk met twee hoeveelheden van 1 liter ethylacetaat geëxtraheerd.

10 Na het affiltreren van het extract voor het verwijderen van mogelijk onoplosbaar materiaal wordt het ADD-gehalte van het filtraat bepaald door gaschromatografie. De resultaten blijken uit tabel C.

<u>Tabel C</u>		
Gevormde hoeveelheid ADD (g)		
bebroedingstijd (uren)		
Toevoeging van eierdooier	112	170
neen	0,16	0,48
ja	0,47	0,61

Voorbeeld V

15 Een entmedium (pH van 7,2) met de volgende samenstelling wordt bereid:

- 1,0 % glucose
- 1,0 % vleesextract
- 1,0 % pepton, en

20 rest - water

In een schudkolf van 500 ml worden 100 ml van het entmedium gebracht. De kolf en de inhoud worden gedurende een periode van 15 minuten bij een temperatuur van 120°C gesteriliseerd door behandeling in een autoclaaf. Het medium wordt met een oog

25 M. parafortuitum complex MCI 0802 geënt, waarna het geënte medium gedurende een periode van 48 uren bij een temperatuur van 30°C wordt bebroed op een heen en weer bewegende schudinrichting met een slag van 7 cm bij 120 slagen per minuut.

30 Met 20 ml van deze entcultuur-bouillon worden elk van twee schudkolven van 6 liter, die elk 800 ml van een hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0, gesteriliseerd door 20 minuten bij 120°C in een autoclaaf te behandelen) met de volgende samenstelling:

8102648

- 2,0 % verpoederde hele sojabonen
 2,0 % gist
 4,0 % glycerol
 0,2 % NaNO_3
 5 0,2 % K_2HPO_4
 0,1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 1,5 % cholesterol, en
 rest - water

en elk van twee schudkolven van 6 liter, die elk 800 ml van een
 10 hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0, op dezelfde wijze gesterili-
 seerd) met dezelfde samenstelling als bovenstaand vermeld afgezien
 van de toevoeging van 1,5 % droog eierdooiermateriaal, geënt. De
 eigenlijke fermentatie bij elke groep wordt bij 30°C aangevangen
 op een heen en weer bewegende schudmachine met een slag van 7 cm
 15 bij 100 slagen per minuut en gedurende 130 uren in de ene kolf en
 gedurende 180 uren in de andere kolf voortgezet. Elke op deze wijze
 verkregen fermentatie-bouillon wordt met 2,4 liter ethylacetaat
 geëxtraheerd.

De ADD-gehalten van de extracten worden door gaschromatografie
 20 bepaald. De resultaten blijken uit tabel D.

Tabel D

Gevormde hoeveelheid ADD (g)

Begroedingstijd (uren)		
	130	180
Toevoeging van eierdooier		
neen	1,65	2,65
ja	2,65	3,27

Voorbeeld VI

Een entmedium (pH van 7,2) met de volgende samenstelling
 wordt bereid:

- 1,0 % glucose
 25 1,0 % vleesextract
 1,0 % pepton, en
 rest - water.

In een schudkolf van 500 ml worden 100 ml van het entmedium
 gebracht. De kolf en de inhoud worden gedurende een periode van
 30 15 minuten bij een temperatuur van 120°C gesteriliseerd door be-
 handeling in een autoclaaf. Het medium wordt geënt met een oog
 M. parafortuitum complex MCI 0807, waarna het geënte medium gedu-

rende een periode van 48 uren bij een temperatuur van 30°C wordt bebroed op een heen en weer bewegende schudinrichting met een slag van 7 cm per 120 slagen per minuut.

Met 2 ml van deze entcultuur-bouillon wordt een schudkolf van 5 500 ml geënt, die 100 ml van een hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0, gesteriliseerd door 20 minuten bij 120°C in een autoclaaf te behandelen) met de volgende samenstelling bevat:

4,0 % verpoederde hele sojabonen
 0,2 % NaNO_3
 10 0,2 % K_2HPO_4
 0,1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 2,0 % cholesterol
 verschillende percentage eierdooier, en
 rest - water.

15 De eigenlijke fermentatie wordt gedurende 110 uren bij 30°C uitgevoerd op een heen en weer bewegende schudmachine met een slag van 7 cm bij 120 slagen per minuut, waarna de verkregen fermentatie-bouillon tweemaal met telkens 200 ml ethylacetaat wordt ge-extraheerd.

20 Het verenigde extract wordt afgefiltreerd om mogelijk onoplosbaar materiaal, zoals cellen, te verwijderen, waarna het filtraat door gaschromatografie op 4AD wordt onderzocht. De resultaten blijken uit tabel E.

Tabel E

<u>Droge eierdooier, %</u>	<u>Gevormd 4AD (g)</u>
0	0,20
0,1	0,29
0,2	0,31
0,3	0,39
0,5	0,45
0,7	0,50
1,0	0,50
1,5	0,48
2,0	0,42
3,0	0,40
4,0	0,30
7,0	0,25

Voorbeeld VII

25 Een entmedium (pH van 7,2) met de volgende samenstelling wordt bereid:

8102648

1,0 % glucose
 1,0 % vleesextract
 1,0 % pepton, en
 rest - water.

- 5 In een schudkolf van 500 ml worden 100 ml van het entmedium gebracht. De kolf en de inhoud worden gesteriliseerd door gedurende 15 minuten bij een temperatuur van 120°C in een autoclaaf te behandelen. Het medium wordt geënt met een oog M. parafortuitum complex MCI 0807, waarna het geënte medium gedurende een periode
 10 van 48 uren bij een temperatuur van 30°C wordt bebroed op een heen en weer bewegende schudinrichting met een slag van 7 cm bij 120 slagen per minuut.

Met 20 ml van de entcultuur-bouillon wordt elk van twee schudkolven van 6 liter geënt, die elk 800 ml van een hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0, gesteriliseerd door 20 minuten bij 120°C in een autoclaaf te behandelen) met de volgende samenstelling bevatten:

- 2,0 % verpoederde ontvette sojabonen
 2,0 % gist
 1,0 % droog eierdooiermateriaal
 20 0,2 % NaNO_3
 0,2 % K_2HPO_4
 0,1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 2,0 % cholesterol, en
 rest - water.

- 25 Het fermentatie-medium in de ene kolf bevat geen eierdooiermateriaal. De eigenlijke fermentatie wordt bij 30°C uitgevoerd op een heen en weer bewegende schudinrichting met een slag van 7 cm bij 100 slagen per minuut. Tijdens de fermentatie worden met tussenpozen monster van 20 ml getrokken en wordt elk monster met
 30 60 ml ethylacetaat geëxtraheerd en onderzocht. Het 4AD-gehalte van het extract blijkt uit tabel F.

Tabel F

Bebroedingstijd (uren)	4AD (mg) Toevoeging van eierdooier	
	neen	ja
48	7	27
72	20	57
96	37	82
120	52	100
144	77	105
168	90	105
192	95	100

Voorbeeld VIII

Het in voorbeeld VI beschreven voorschrift wordt herhaald, waarbij echter het droge eierdooiermateriaal wordt vervangen door ruwe eierdooier. De resultaten zijn samengevat in tabel G.

Tabel G

Ruwe eierdooier, %	Gevormd 4AD (g)
0	0,20
0,2	0,30
0,5	0,39
1,0	0,44
2,0	0,50
4,0	0,41
8,0	0,27

5 Voorbeeld IX

Het in voorbeeld VI beschreven voorschrift wordt herhaald, waarbij echter het droge eierdooiermateriaal wordt vervangen door hele eieren (waarvan de doppen zijn verwijderd). De resultaten blijken uit tabel H.

Tabel H

Hele eieren, %	Gevormd 4AD (g)
0	0,20
0,5	0,29
1,0	0,35
1,5	0,40
3,0	0,47
5,0	0,50
10,0	0,38

8102648

Voorbeeld X

Een entmedium (pH van 7,2) met de volgende samenstelling wordt bereid:

- 1,0 % glucose,
- 5 1,0 % vleesextract,
- 1,0 % pepton, en
- rest - water.

In een schudkolf van 500 ml worden 100 ml van het entmedium gebracht. De kolf en de inhoud worden gesteriliseerd door gedurende een periode van 15 minuten bij een temperatuur van 120°C in een autoclaaf te behandelen. Het medium wordt geënt met een oog *M. fortuitum* NRRL B-8119, waarna het geënte medium gedurende een periode van 48 uren bij een temperatuur van 30°C wordt bebroed op een heen en weer bewegende schudinrichting met een slag van 15 7 cm bij 120 slagen per minuut.

- Met 20 ml van de entcultuur-bouillon worden elk van twee schudkolven van 6 liter geënt, die 800 ml van een hoofd fermentatie-medium (pH van 7,0, gesteriliseerd door 20 minuten bij 120°C in een autoclaaf te behandelen) met de volgende samenstelling:
- 20 4,0 % verpoederd hele sojabonen
 - 0,8 % sojaolie
 - 0,2 % NaNO_3
 - 0,2 % K_2HPO_4
 - 0,1 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 25 1,5 % cholesterol, en
 - rest - water

alsmede elk van twee schudkolven van 6 liter, die elk 800 ml van een hoofd fermentatiemedium (pH van 7,0, op dezelfde wijze gesteriliseerd) met dezelfde samenstelling als bovenstaand vermeld bevatten afgezien van de toevoeging van 1,0 % droog eierdooiermateriaal. Met de eigenlijke fermentatie wordt bij elke groep bij 30°C aangevangen op een heen en weer bewegende schudmachine met een slag van 7 cm bij 100 slagen per minuut en wordt de fermentatie gedurende 120 uren voor de ene kolf en gedurende 168 uren voor de 35 andere kolf voortgezet. Elk van de op deze wijze verkregen fermentatie-bouillons wordt met 2,4 liter ethylacetaat geëxtraheerd.

De 9 α -OH-4AD-gehalten van de extracten worden door gaschromatografie bepaald. De resultaten zijn in tabel I vermeld.

Tabel I

Gevormde hoeveelheid 9 α -OH-4AD (g)		
Bebroedingstijd (uren)		
Toevoeging van eierdooier		
	120	168
neen	1,75	2,77
ja	2,88	3,28

Voorbeeld XI

Het in voorbeeld X beschreven voorschrift wordt herhaald, waarbij echter M. fortuitum NRRL B-8119 vervangen wordt door M. sp. NRRL B-3683. De ADD-gehalten van de extracten blijken uit 5 tabel J.

Tabel J

Gevormde hoeveelheid ADD (g)		
Bebroedingstijd (uren)		
Toevoeging van eierdooier		
	120	168
neen	2,01	3,12
ja	2,64	3,25

Voorbeeld XII

Het in voorbeeld X beschreven voorschrift wordt herhaald, waarbij echter M. fortuitum NRRL B-8119 vervangen wordt door M. sp. NRRL B-3805. De 4AD-gehalten van de extracten blijken uit 10 de onderstaande tabel K.

Tabel K

Gevormde hoeveelheid 4AD (g)		
Bebroedingstijd (uren)		
Toevoeging van eierdooier		
	120	168
neen	1,68	3,85
ja	3,51	4,10

Na deze volledige beschrijving van de uitvinding zal het elke vakman met normale vakbekwaamheid duidelijk zijn, dat de vele wijzigingen en modificaties kunnen worden toegepast zonder buiten de grondgedachte of het kader van de uitvinding te treden, zoals 15 hier is beschreven.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze ter bereiding van een androstaan-steroïde door microbiologische omzetting van een sterolsubstraat met een micro-organisme behorende tot het geslacht *Mycobacterium*, met het
5 kenmerk, dat men een cultuurmedium toepast, dat ten minste 0,1 gew.% eierdooier, betrokken op het droge gewicht, bevat.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het androstaan-steroïde androst-4-een-3,17-dion, androsta-1,4-dieen-3,17-dion en/of 9 α -hydroxyandrost-4-een-3,17-
10 dion is.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het sterolsubstraat een substraat van de groep van sterolen, C-3 esterderivaten en C-3 etherderivaten ervan en door oxydatie daarvan gevormde tussenprodukten is.

15 4. Werkwijze volgens een der conclusies 1 tot 3, met het kenmerk, dat het microörganisme een mutant is, dat weinig of geen enzymen vormt, die het androstaan-steroïde afbreken.

5. Werkwijze volgens een der conclusies 1 tot 4, met het kenmerk, dat het microörganisme een mutant is, die
20 behoort tot *Mycobacterium parafortuitum* complex.

6. Werkwijze volgens een der conclusies 1 tot 4, met het kenmerk, dat het microörganisme een mutant is, die behoort tot *Mycobacterium vaccae*.

7. Werkwijze volgens een der conclusies 1 tot 5, met het kenmerk, dat het microörganisme *Mycobacterium parafortuitum* complex MCI 0801 of MCI 0802 is en het androstaan-steroïde androsta-1,4-dieen-3,17-dion is.
25

8. Werkwijze volgens een der conclusies 1 tot 5, met het kenmerk, dat het microörganisme *Mycobacterium parafortuitum* complex MCI 0807 is en het androstaan-steroïde androst-4-een-3,17-dion is.
30

9. Werkwijze volgens een der conclusies 1 tot 4 en 6, met het kenmerk, dat het microörganisme *Mycobacterium vaccae* MCI 1104 of MCI 1117 is en het androstaan-steroïde 9 α -hydroxy-androst-4-een-3,17-dion is.
35

10. Werkwijze volgens een der conclusies 1 tot 4, met het kenmerk, dat het microörganisme *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 is en het androstaan-steroïde androsta-1,4-dieen-3,17-dion is.

40 11. Werkwijze volgens een der conclusies 1 tot 4, met

8102648

h e t k e n m e r k, dat het microörganisme Mycobacterium
sp. NRRL B-3805 is en het androstaan-steroïde androst-4-een-
3,17-dion is.

* * * * *