



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 14.02.78 (P. 204613)

Pierwszeństwo: 14.02.77 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 23.10.78

Opis patentowy opublikowano: 24.11.1981

Int. Cl.² C07D 311/78
//C07C 35/32
//C12D 13/00

CZYTELNIA

Urząd Patentowy

Twórcy wynalazku: Thomas Richard Pyke, Marion Patricia Salmond

Uprawniony z patentu: The Upjohn Co., Kalamazoo (Stany Zjednoczone
Ameryki)

**Sposób selektywnego wytwarzania hemiketalu
3 α -H-4 α -(3'-propionylo)-7 α β -metylosześciowodoroidano-
dionu-1,5**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób selektywnego wytwarzania hemiketalu 3 α -H-4 α -(3'-propionylo)-7 α β -metylosześciowodoroidanodionu-1,5 o wzorze 1 na drodze fermentacji.

Przekształcanie sterydów przez drobnoustroje było przedmiotem obszernych badań i wielu publikacji. Najwcześniejszymi były prace Mamoli i Vercellone z roku 1937 opublikowane w Ber. 70, 470 i Ber. 70, 2079. Autorzy ci opisali redukcję 17-ketosterydów do 17 β -hydroksysterydów przy użyciu fermentujących drożdży. W okresie późniejszym, w 1952 roku Peterson i Murray zastrzegli proces 11 α -hydroksylacji progesteronu przeprowadzany przy użyciu grzybów *Rhizopus nigricans* (opis patentowy St. Zjedn. Ameryki nr 2602769). Jeszcze później Kraychy i współpracownicy w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 3684657 w 1972 roku zastrzegli selektywny proces mikrobiologicznego rozkładu grupy alkilowej w położeniu 17 w cząsteczce sterydu przez fermentację sterydu posiadającego alkilowy łańcuch boczny w położeniu 17 o przynajmniej 8 atomach węgla, przy użyciu szczepu *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 w celu uzyskania androsteno-4-dionu-3,17, androstadieno-1,4-dionu-3,17 oraz 20 α -hydroksymetylopregnadien-1,4-onu-3.

Następnie Marsheck i jego współpracownicy w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki nr 3759791 w 1973 roku zastrzegli selektywny, mikrobiologiczny sposób wytwarzania androsteno-4-dionu-3,17 przez fermentację sterydu z grupy cholestanu lub

2

stigmastanu o przynajmniej 8 atomach węgla w alkilowym łańcuchu bocznym w położeniu 17, przeprowadzanej przy użyciu szczepu *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805.

5 W publikacji K. Schuberta, K.-H. Bohme i C. Horholda pod tytułem: „Wytwarzanie niskocząsteczkowych produktów rozkładu progesteronu za pomocą drobnoustrojów”, *Steroids* 4, 581—596 (1964) opisano wytwarzanie trójcyklicznych produktów pośrednich w procesie rozkładu progesteronu przy użyciu szczepu *Mycobacterium smegmatis*.

10 Szczep stosowany w sposobie według wynalazku, czyli *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 opisano w równoległych zgłoszeniach patentowych dokonanych w St. Zjedn. Ameryki z dnia 17 listopada 1975 roku i z dnia 26 listopada 1976 roku. Warunki procesu podane w tych zgłoszeniach nie zapewniają jednak optymalnych korzystnych warunków wytwarzania związków o wzorze 1.

15 Z polskiego opisu patentowego nr 106849 znany jest sposób wytwarzania 3 α -H-4 α -(3'-hydroksypropylo)-7 α β -metylosześciowodoroidanu polegający na hodowaniu *Mycobacterium fortuitum* NRRL-8129 w pożywce wodnej w warunkach tlenowych, w obecności odpowiedniego steroidu. Jednak ten znany sposób nie zapewnia wysokiej wydajności związku o wzorze 1.

20 Nieoczekiwanie stwierdzono, że bezpośredni wpływ na kierunek następującej podczas fermenta-

cji reakcji rozkładu steroidów, ma wartość pH fermentującej pożywki.

Sposób selektywnego wytwarzania hemiketalu $3\alpha\text{-H-4}\alpha\text{-[3'-propionilo]-7}\beta\text{-metylosześciowodoroidanodionu-1,5}$ o wzorze 1 według wynalazku polega na hodowaniu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 w wodnej pożywce, w warunkach tlenowych, w obecności sterydu zawierającego ewentualnie alkilowy łańcuch boczny o 2—10 atomach węgla w położeniu 17, przy czym wartość pH pożywki utrzymuje się w zakresie około 3,0—6,0.

Przykładami odpowiednich sterydów są sitosterol, cholesterol, stigmasterol, kampesterol i tym podobne sterydy posiadające w położeniu 17 alkilowy łańcuch o 2—10 atomach węgla i androsteno-4-dion-3,17, androstadieno-1,4-dion-3,17, dehydoroepiandrosteron, testosteron i kwas typu bisnor (kwas 3-ketobisnorcholeno-4-karboksylowy-22). Te substraty sterydowe można stosować zarówno w postaci czystej jak i w postaci surowej.

W brzeczce fermentacyjnej otrzymuje się również mniejsze ilości hemiacetalu $3\alpha\text{-H-4}\alpha\text{-[3'-propanolo]-5}\alpha\text{-hydroksy-7}\beta\text{-metylosześciowodoroidanonu-1}$ o wzorze 2.

δ -laktone kwasu $3\alpha\text{-H-4}\alpha\text{-[3'-etylenokarboksyl]-5}\alpha\text{-hydroksy-7}\beta\text{-metylosześciowodoroidanonu-1}$ o wzorze 3,

$3\alpha\text{-H-4}\alpha\text{-[3'-propanolo]5}\alpha\text{-hydroksy-7}\beta\text{-metylosześciowodoroidanonu-1}$ o wzorze 4

i kwasu $3\alpha\text{-H-4}\alpha\text{-[3'-etylenokarboksyl]-7}\beta\text{-metylosześciowodoroidanodionu-1,5}$ o wzorze 5.

Podczas selektywnego rozkładu sterydów z lub bez alkilowego łańcucha bocznego w położeniu 17 o 2—10 atomach węgla, prowadzonego przy wartości pH 3,0—6,0, następuje nagromadzenie w brzeczce fermentacyjnej w ilości przeważającej związku o wzorze 1.

W celu otrzymania szczepu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 szczep *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 poddawano mutacji i otrzymywano laboratoryjnie zmutowany drobnoustrój. W Katalogu ATCC z roku 1974 pod hasłem ATCC 6842 zamieszczono następującą informację „J. C. Cruz 2. Cold abscess. Acta Med. Rio de Janeiro 1:1 (1936). Medium 90 37C”. Szczep *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 rozkłada sterole sposobem nieselektywnym do związku o niskim ciężarze cząsteczkowym, to znaczy do CO_2 i H_2O . Tym samym drobnoustrój ten nie nadaje się do stosowania jako czynnik selektywnie rozkładający sterydy.

Proces mutacji szczepu *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 przeprowadzany przy użyciu nitrozoguanidyny wytwarza mutant, który selektywnie rozkłada sterydy z lub bez alkilowego łańcucha bocznego w położeniu 17 o 2—10 atomach węgla, przy czym otrzymuje się związek o wzorze 1 w ilości dominującej w brzeczce fermentacyjnej. Ten zmutowany drobnoustrój *Mycobacterium fortuitum* uzyskany jak wspomniano NRRL B-8129 w kolekcji Northern Regional Laboratory U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, U.S.A., gdzie go zdeponowano. Podhodowle tego drobnoustroju można łatwo uzyskać z depozytu. Zrozumiałe jest, że dostępność hodowli nie stanowi zgody na stosowanie w praktyce sposobu według wynalazku, w zakresie

uszczuplającym prawa wynikające z patentu i zagwarantowane przepisami państwowymi.

Morfologia i wrażliwość na leki szczepu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 są nierozróżnialne z odpowiednimi cechami szczepu rodzicielskiego *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842. Obydwie hodowle *Mycobacterium fortuitum* są odporne na działanie kwasu, są nieruchliwe i nie wytwarzają zarodników oraz należą do rodziny *Mycobacteriaceae* do rzędu *Actinomycetales*. Zgodnie z klasyfikacją Runyona (Runyon E.H., 1959, Med. Clin. North America 43, 273) należą do niechromogennej IV grupy *Mycobacterium*, to znaczy wzrastają szybko w niskiej temperaturze i dają niezabarwione kolonie na stosunkowo prostej pożywce.

Szczepy *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 i *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 wyraźnie różnią się między sobą działaniem na cząsteczki sterydów. Jak wspomniano powyżej szczep *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 rozkłada sterydy, podczas gdy szczep *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 rozkłada je selektywnie, a szczególnie przy wartości pH 3,0—6,0. Ta właściwość szczepu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129, jak wspomniano powyżej, czyni go wysoce użytecznym.

Proces mutacji szczepu *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 do szczepu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 przeprowadza się przy użyciu nitrozoguanidyny. Chociaż sposoby przeprowadzania mutacji są zwykle znane, to jednak nie jest znany sposób pozwalający przewidzieć lub choćby sugerować typ mutantu(jeśli on powstanie, po przeprowadzeniu wybranego sposobu mutacji).

Selektywny sposób wytwarzania związku o wzorze 1 według wynalazku przeprowadza się we wzrastającej hodowli szczepu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 przez dodanie do hodowli w czasie inkubacji wybranego sterydu lub przez wprowadzenie sterydu do podłoża hodowlanego przed zaszczepieniem. Steryd można dodać pojedynczo lub w kombinacji z innym sterydem.

Korzystnie, lecz nie wyłącznie, steryd stosuje się w hodowli w stężeniu około 0,1 do około 100 gramów/litr. Hodowla wzrasta na pożywce wzrostowej zawierającej źródło węgla, na przykład, przyswajalne węglowodany oraz źródło azotu, na przykład, przyswajalny związek azotu lub substancje białkowe.

Jako korzystne źródło węgla stosuje się glikozę, brunatny cukier, sacharozę, glicerynę, skrobię kukurydzianą, laktozę, dekstrynę, melasy i tym podobne. Jako korzystne źródła azotu stosuje się namok kukurydziany, drożdże, rozłożone drożdże browarnicze ze stałymi substancjami z mleka, mąkę sojową, mąkę z ziaren bawełny, mąkę kukurydzianą, stałe substancje z mleka, pankreatynowy wyciąg z kazeiny, mączkę rybną, mocznik, stałe odpady gorzelnicze, ciekły pepton zwierzęcy, odpady mięsne i kostne, sole amoniowe i tym podobne.

Można stosować dowolne kombinacje wymienionych źródeł węgla i azotu. Do pożywki fermentacyjnej nie należy dodawać śladowych ilości metali, na przykład, cynku, magnezu, manganu, kobaltu, żelaza i tym podobnych, ponieważ jako składniki pożywki stosuje się wodę wodociągową i inne skład-

niki w stanie nieoczyszczonym. Przed wyjałowieniem wartość pH pożywki doprowadza się do około 6,5. Wartość pH nastawia się przy użyciu mocnej zasady, na przykład, wodorotlenku sodowego, wodorotlenku potasowego i tym podobnych.

Jak wspomniano cechą sposobu według wynalazku jest utrzymanie wartości pH w czasie przeprowadzania fermentacji na poziomie około 5,5 lub niższym w celu uzyskania związku o wzorze 1 w ilości przeważającej. Wartość pH utrzymuje się praktycznie w zakresie od około 3,0 do około 6,0. Utrzymywanie tej wartości pH osiąga się sposobami dobrze znanymi w tej dziedzinie, na przykład, przy użyciu CaCO_3 lub buforu fosforanowego, które zawarte są w pożywce lub przez ustalenie wartości pH przy użyciu zasady, na przykład wodorotlenkiem sodowym, wodorotlenkiem amonowym lub podobnym albo przy użyciu kwasu, na przykład kwasu solnego, kwasu siarkowego lub tym podobnych.

Ponadto wartość pH można utrzymywać na pożądanym poziomie przy użyciu nadmiaru składników pożywki, które w wyniku rozkładu metabolicznego powodują obniżenie wartości pH. Przykłady takich związków obejmują rozpuszczalne sole amonowe, węglowodany, takie jak glikoza i inne jedno- lub dwucukry, skrobie i inne wielocukry oraz oleje i tłuszcze, takie jak smalec i olej sojowy.

Proces przeprowadzi się w ciągu około 72 godzin do 15 dni. W czasie procesu przekształcania stosuje się temperaturę w zakresie 25—37°C, korzystnie na poziomie 31°C. Zawartość naczynia, w którym przeprowadza się przekształcenie, napowietrza się wyjałowionym powietrzem i miesza, w celu ułatwienia wzrostu drobnoustroju i zwiększenia skuteczności procesu przekształcania.

Po zakończeniu przekształcania, co stwierdza się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej przy użyciu płytek pokrytych żelem krzemionkowym (E. Merck, Darmstadt) i układu rozwijającego złożonego z octanu etylu i cykloheksanu w stosunku objętości 2:3, przekształcony steryd wydziela się sposobami dobrze znanymi w tej dziedzinie.

Na przykład, fermentacyjną mieszaninę reakcyjną po przekształceniu, zawierającą ciecz fermentacyjną i komórki, można ekstrahować nie mieszającymi się z wodą rozpuszczalnikami sterydów. Odpowiednimi rozpuszczalnikami są chlorek metalenu, który jest korzystny, chloroform, czterochlorek węgla, chlorek etylenu, trójchloroetylen, eter, octan amylu, benzen i tym podobne.

Sposobem alternatywnym, fermentacyjną ciecz i komórki, w pierwszym etapie można rozdzielać znanymi sposobami, na przykład, przez sączenie lub wirowanie, po czym oddzielnie ekstrahować odpowiednimi rozpuszczalnikami. Komórki można ekstrahować zarówno mieszającymi jak i nie mieszającymi się z wodą rozpuszczalnikami. Ciecz fermentacyjną uwolnioną od komórek można ekstrahować rozpuszczalnikami nie mieszającymi się z wodą.

Następnie ekstrakty sączy się przez ziemię okrzemkową i pod zmniejszonym ciśnieniem oddestylowuje się przesącz w celu otrzymania suchej pozostałości. Pozostałość tę zawierającą przekształcony steryd, następnie rozpuszcza się w miesza-

nie 10% chloroformu w rozpuszczalniku Skellysolve B i chromatografuje na żelu krzemionkowym przy użyciu rozpuszczalnika Skellysolve B (mieszanina izomerycznych heksanów i jego mieszaniny ze 5 wzrastającą ilością octanu etylu, jako rozpuszczalnika rozwijającego. W ten sposób eluuje się wytwarzany związek. Po krystalizacji z octanu etylu otrzymuje się mieszaninę dwóch epimerów w stosunku 1:1 związku o wzorze 1, o temperaturze topnienia 100—112°C. Krystaliczny produkt otrzymuje się przy zastosowaniu, na przykład octanu etylu jako rozpuszczalnika. Przekształcony steryd można również uzyskać przez oddestylowanie rozpuszczalnika z cieczy otrzymanej po dekantacji.

Związek o wzorze 1 jest użytecznym produktem pośrednim stosowanym w chemicznej syntezie sterydów. Na przykład, można go przeprowadzić w substancję wyjściową dla procesu znanego z opisu patentowego St. Zjedn. Ameryki nr 3880884, 10 w którym opisano sposób przeprowadzania totalnej syntezy użytecznych 19-norsterydów. Przekształcenie w substancje wyjściowe przeprowadza się sposobami opisanymi w J.A.C.S. 85, 2135-2137.

Następujące przykłady ilustrują sposób według wynalazku. Wszystkie procenty są procentami wagowymi, a wszystkie propozycje w mieszaninach rozpuszczalników są objętościowe, jeśli nie zaznaczono, że jest inaczej.

30 **Przykład I.** Wytwarzanie mutantu szczepu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 ze szczepu *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842

a) Mutageneza nitrozoguanidynowa

35 Komórki szczepu *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 poddaje się wzrostowi w temperaturze 28°C, w wyjałowionej pożywce posiewowej o następującym składzie:

bulion odżywczy (Difco) 8 g/litr
ekstrakt z drożdży 1 g/litr
propionian sodowy 0,5 g/litr
woda destylowana do 1 litra

45 Wartość pH mieszaniny doprowadza się do 7,0 roztworem wodorotlenku sodowego, po czym całość wyjaławia się w temperaturze 121°C w ciągu 20 minut.

50 Komórki wzrastają do gęstości około 5×10^8 /ml, po czym oddziela się je przez wirowanie, przemywa równą objętością wyjałowionego 0,1 m roztworu cytrynianu sodowego o wartości pH 5,6. Przemyte komórki ponownie zawieszają się w takiej samej ilości buforu cytrynianowego i próbkę zawiesiny pobiera w celu oznaczenia liczby komórek, a następnie dodaje się nitrozoguanidynę w takiej ilości by jej końcowe stężenie wynosiło 50 $\mu\text{g/ml}$. Zawiesinę komórek inkubuje się w temperaturze 37°C w łaźni wodnej w ciągu 30 minut, po czym ponownie pobiera się próbkę w celu oznaczenia.

60 Następnie przez wirowanie oddziela się komórki, przemywa je równą objętością wyjałowionego 0,1 m roztworu fosforanu potasowego o wartości pH 7,0. Na koniec komórki zawieszają się w pożywce o minimalnej zawartości soli, pozbawionej źródła węgla, 65 o następującym składzie:

7

NH ₄ NO ₃	1,0	g/litr
K ₂ HPO ₄	0,25	g/litr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	g/litr
NaCl	0,005	g/litr
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	g/litr
woda destylowana	do 1 litra	

Wartość pH mieszaniny doprowadza się do 7,0 i n roztworem kwasu solnego, po czym całość wyjąława się w temperaturze 121°C w ciągu 20 minut. Następnie komórki wylewa się na płytki w celu wybrania mutantów.

b) Wybieranie i izolowanie mutantu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129

Zmutowane komórki, uzyskane sposobem opisanym powyżej, rozcieńcza się i rozsiewa na płytkach zawierających pożywkę o następującym składzie: (zmodyfikowana pożywka Fransera i Jorrela, 1963 J. Biol. Chem. 205, str. 291—295):

gliceryna	10,0	g/litr
Na ₂ HPO ₄	8,4	g/litr
KH ₂ PO ₄	4,5	g/litr
NH ₄ Cl	2,0	g/litr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	g/litr
FeCl ₃ ·CH ₂ O	0,05	g/litr
woda destylowana	do 1 litra	

Następnie dodaje się agar w ilości 15 g/litr i całość wyjąława się w autoklawie w temperaturze 121°C w ciągu 30 minut, po czym wylewa na wyjąławione płytki Petriego.

Prowadzenie hodowli na takiej pożywce pozwala na wyeliminowanie większości żywieniowych auksetrofów, wytwarzanych w procesie mutagenyzy, na przykład pożądanym witamin, czynników wzrostu i tym podobnych, które usuwa się stosując określoną pod względem chemicznym pożywkę. Po inkubacji w temperaturze 28°C w ciągu 7 dni uzyskane kolonie przenosi się na płytki testowe nadające się do przeprowadzania wybierania mutantu i następnie ponownie przenosi się na płytki kontrolne zawierające pożywkę glicerynową.

Płytki testowe przygotowuje się sposobem opisanym przez G. E. Petersona, M. L. Lewisa i J. R. Davisa w 1962 w artykule „Preparation of uniform dispersions of cholesterol nad other water-insoluble carbon sources in agar media” J. Lipid Researh 3, 275—276. Pożywkę o minimalnej zawartości soli zawartą na takich płytkach opisano powyżej w części a) przykładu.

Następnie dodaje się agar w ilości 15 g/litr i odpowiednio źródło węgla w ilości 1,0 g/litr, takie jak sitosterol lub androstenodion (AD), po czym uzyskaną zawiesinę wyjąława się w autoklawie w temperaturze 121°C w ciągu 30 minut. Wyjąławioną, gorącą mieszaninę wylewa się do wyjąławionego mieszalnika, miesza się w ciągu kilku minut, po czym wylewa się na wyjąławione płytki Petriego.

Ponieważ w procesie tym problemem jest skłonność do pienia, można tę skłonność ograniczyć stosując mieszanie w czasie gdy mieszanina jest gorąca i następnie przez ogrzewanie płomieniem powierzchni stopionych płytek agarowych. Tym sposobem uzyskuje się jednorodną zawiesinę nieroz-

8

puszczalnych w wodzie źródeł węgla, co pozwala uzyskać jednakowe lecz opalizujące płytki agarowe.

Kolonie, które wzrastają na kontrolnych płytkach, lecz nie wzrastają na płytkach testowych zawierających AD jako jedyne źródło węgla, oczyszcza się drogą wysiewu kreskowego na płytkach zawierających pożywkę agarową. Po wzroście w temperaturze 28°C poszczególne klonie wybiera się z płytek zawierających pożywkę agarową wyjąławioną łopatką dentystyczną i ponownie bada się za pomocą wysiewu na pokratkowanych płytkach zawierających AD jako źródło węgla. Oczyszczone izolaty, które wykazują fenotyp różny od hodowli rodzicielskiej sprawdza się następnie w wytrząsanych kolbach.

c) Sprawdzanie w wytrząsanych kolbach

W kolbach trząsawkowych o pojemności 500 ml umieszcza się 100 ml pożywki do przekształcania o następującym składzie:

gliceryna	10,0	g/litr
Na ₂ HPO ₄	8,4	g/litr
KH ₂ PO ₄	4,5	g/litr
NH ₄ Cl	2,0	g/litr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	g/litr
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,05	g/litr
woda destylowana	do 1 litra	

Do mieszaniny dodaje się mąkę sojową w ilości 1 g/litr miesza i następnie dodaje się sitosterol w ilości 10 g/litr i również miesza. Kolby wyjąława się w autoklawie, w temperaturze 121°C w ciągu 20 minut, oziębia się do temperatury 28°C i zaszczepia 10 ml hodowli posiewowej uzyskanej następującym sposobem:

Oczyszczone izolaty uzyskane sposobem opisanym w części b) poddaje się wzrostowi na skosach agarowych w temperaturze 28°C. Oczko czy komórka pobrana ze skosa stosuje się do zaszczepiania kolby o pojemności 500 ml zawierającej 100 ml wyjąławionej pożywki posiewowej o następującym składzie:

bulion odżywczy (Difco)	8	g/litr
ekstrakt z drożdży	1	g/litr
gliceryna	5	g/litr
woda destylowana	do 1 litra	

Wartość pH doprowadza się do 7,0 i n roztworem wodorotlenku sodowego, po czym kolby wyjąława się w autoklawie w temperaturze 121°C w ciągu 20 minut. Następnie kolby szczepi się i inkubuje w temperaturze 28° w ciągu 72 godzin.

Jak podano powyżej do każdej kolby o pojemności 500 ml dodaje się 100 ml wyjąławionej pożywki do przeprowadzania przekształcania i szczepi się 10 ml pożywki wzrostowej. Kolby inkubuje się w temperaturze 28—30°C, wytrząsa na trząsawce obrotowej i w różnych okresach czasu pobiera się z nich próbki. Pobrane próbki o objętości 10 ml poddaje się ekstrakcji przez wytrząsanie z trzema porcjami chlorku metylenu. Porcję ekstraktu poddaje się analizie metodą chromatografii cienkowarstwowej przy użyciu żelu krzemionkowego i układu rozpuszczalników opisanego powyżej, na przykład przy użyciu mieszaniny octanu etylu i cykloheksanu w

stosunku objętościowym 2:3 oraz za pomocą chromatografii gazowo-cieczowej. Obecność związków o wzorze 1 i 5 potwierdza selektywny rozkład sitosterolu za pomocą nowego mutantu uzyskanego ze szczepu rodzicielskiego *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842.

Przykład II. Przekształcanie sitosterolu w związek o wzorze 4.

Stosuje się taką samą pożywkę jak w przykładzie I punkt c), z tą różnicą, że wartość pH doprowadza się do 6, 5, 4 n roztworem wodorotlenku sodowego. Uzyskaną pożywkę wyjaławia się przez ogrzewanie w temperaturze 121°C w ciągu 30 minut, po czym oziębia się do temperatury 28°C i zaszczepia 10 częściami hodowli posiewowej mutantu *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129, uzyskanego sposobem opisanym w przykładzie I punkt c). Zaszczepioną mieszaninę inkubuje się w temperaturze 28°C w ciągu 168 godzin, mieszając, w celu zapewnienia wzrostu głębinnego.

Pożądane jest utrzymywanie wartości pH na poziomie około 5,0 przez dodanie wodorotlenku sodowego lub kwasu, na przykład kwasu solnego. Postęp bioprzekształcenia śledzi się metodą chromatograficzną na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym, stosując jako układ rozpuszczalników mieszaninę cykloheksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 3:2.

Po zakończeniu bioprzekształcenia otrzymany produkt izoluje się w następujący sposób. Mieszaninę ekstrahuje się chlorkiem metylenu. Uzyskany ekstrakt sączy się przez warstwę ziemi okrzemkowej i z przesączu oddestylowuje się całkowicie rozpuszczalnik. Suchą pozostałość przesączu umieszcza się w 10% roztworze chloroformu w rozpuszczalniku Skellysolve B i poddaje się chromatografii na żelu krzemionkowym, przy użyciu jako układu rozwijającego mieszaniny rozpuszczalnika Skellysolve B ze stopniowo wzrastającą ilością octanu etylu. Tym sposobem wymywa się związek o wzorze 1, posiadający wartość $R_f=0,37$ oznaczoną metodą chromatografii cienkowarstwowej przy użyciu jako układu rozpuszczalników mieszaniny cykloheksanu i octanu etylu w stosunku 3:2. Związek o wzorze 1 ma temperaturę topnienia 100—112°C.

Przykład III. Stosując cholesterol zamiast sitosterolu i postępując sposobem opisanym w przykładzie II otrzymuje się związek o wzorze 1.

Przykład IV. Stosując stigmasterol zamiast sitosterolu i postępując sposobem opisanym w przykładzie I otrzymuje się związek o wzorze 1.

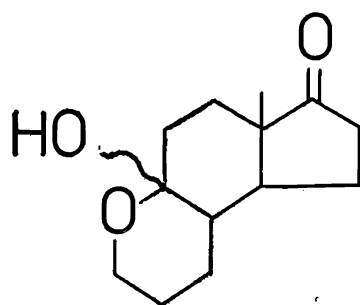
Przykład V. Stosując kampesterol zamiast sitosterolu i postępując sposobem opisanym w przykładzie II otrzymuje się związek o wzorze 1.

Przykład VI. Stosując łącznie z sitosterolem kombinację któregośkolwiek ze steroli wymienionych w przykładach II—V lub zamiast sitosterolu i postępując sposobem opisanym w przykładzie II otrzymuje się związek o wzorze 1.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób selektywnego wytwarzania hemiketalu 3 α -4- α -[3'-propionylo]-7 α β -metylosześciowodoroinandanodionu-1,5 o wzorze 1 polegający na hodowaniu *Mycobacterium fortuitum* NRRLB-8129 w wodnej pożywce, w warunkach tlenowych, w obecności sterydu ewentualnie zawierającego alkilowy łańcuch boczny o 2—10 atomach węgla, **znamienny tym**, że wartość pH pożywki utrzymuje się w zakresie około 3,0—6,0.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako steryd stosuje się sitosterol, cholesterol, stigmasterol, kampesterol, androsteno-4-dion-3,17, androstadieno-1,4-dion-3,17, dehydroepiandrosteron, testosteron lub kwas typu bisnor.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że szczep *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8129 hoduje się w wodnej pożywce, w warunkach tlenowych, w obecności mieszaniny dwóch lub większej liczby sterydów.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako mieszaninę sterydów stosuje się mieszaninę sterydów takich jak sitosterol, cholesterol, stigmasterol, kampesterol, androsteno-4-dion-3,17, androstadieno-1,4-dion-3,17, dehydroepiandrosteron, testosteron i kwas typu bisnor.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się pożywkę o wartości pH 5,0.

110 996



Wzór 1

LDA. Zakład 2. Zam. 587/81. Nakład 110 egz.

Cena 45 zł