



Patent dodatkowy
do patentu _____

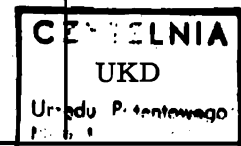
Kl. 6 b, 16/03

Zgłoszono: 04. IV. 1968 (P 126 211)

Pierwszeństwo: _____

MKP C 12 d
9/00

Opublikowano: 9. V. 1970



Współtwórcy wynalazku: mgr Jadwiga Dmochowska, dr Antoni Sie-
wiński, doc. dr Andrzej Nespiak

Właściciel patentu: Wyższa Szkoła Rolnicza (Katedra Chemii Ogólnej),
Wrocław (Polska)

Sposób równoczesnego otrzymywania androsteronu i epiandrosteronu

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób równocze-
snego otrzymywania androsteronu i epiandrosteronu na drodze mikrobiologicznej. Oba powyższe hormony stosuje się w leczeniu ze względu na ich działanie regulujące rozwój męskich cech płciowych.

Znane są zarówno chemiczne i mikrobiologiczne sposoby otrzymywania tych związków.

Androsteron otrzymuje się na drodze chemicznej dwoma sposobami. W sposobie pierwszym, materiałem wyjściowym jest androstenolon, w którym redukuje się podwójne wiązanie, a następnie przeprowadza się epimeryzację grupy alkoholowej na C-3.

Drugą znaną metodą chemiczną jest redukcja ketonu na C-3 w 5 α -androstan-3,17-dionie prowadząca do mieszaniny androsteronu i epiandrosteronu, którą rozdziela się przy pomocy digitoniny.

W metodach opierających się na transformacjach mikrobiologicznych steroidów, które prowadzą do otrzymania androsteronu stosuje się jako czynnik przekształcający, wydzielony ferment z *Pseudomonas testosteroni* lub *Nocardia restrictus*. Surowcem w tych fermentacjach jest 5 α -androstan-3,17-dion, 5 α -androstan-3 α , 17 β -diol lub octan 5 α -androstan-3-ol-17-onu. Epiandrosteron otrzymuje się mikrobiologicznie z 5 α -androstan-3,17-dionu przy pomocy *Streptomyces griseus*.

Sposób otrzymywania androsteronu i epiandro-

2

steronu na drodze chemicznej jest skomplikowany, a rozdzielanie mieszaniny produktów wymaga stosowania digitoniny. Przy opisanym natomiast sposobie mikrobiologicznym napotyka się na trudności w izolowaniu czystego preparatu enzymatycznego zdolnego do selektywnej transformacji substratów.

Celem wynalazku jest znalezienie prostej metody otrzymywania androsteronu i epiandrosteronu oraz ich rozdzielania. Cel ten został osiągnięty na drodze mikrobiologicznej transformacji androsten-dionu lub testosteronu za pomocą szczepu z gatunku *Rhodotorula mucilaginosa*. Szczep ten izolowano z torfu sfangowego z torfowiska Zieleniec w okolicach Kłodzka. Identyfikację szczepu przeprowadzono na podstawie właściwości morfologicznych i fizjologicznych według metod podanych w monografii: J. LODDER, N. J. W. KREGER van RIJ „The Yeasts” North-Holland Publishing Company Amsterdam, 1967.

Cechy makroskopowe szczepu: kolonia na agarze maltozowym śluzowata o powierzchni gładkiej, lśniącej, koloru różowo-czerwonego.

Cechy mikroskopowe: komórki po trzech dniach na agarze maltozowym okrągłe lub owalne, ułożone pojedynczo lub parami wielkości 5–6/3–4,5 μ .

Asymilacja cukrów według podanej metody LODDERA i KREGERA: glukoza ++, galakto-

za +, sacharoza ++, maltoza +, laktoza —, asymilacja azotanów (KNO_3): brak.

Głównymi produktami przekształcenia androstendionu lub testosteronu są mieszaniny zawierające do 75% androsteronu i epiandrosteronu w prawie równych ilościach wagowych obu składników bez względu na to, z którego substratu (androstendionu czy testosteronu) zostały otrzymane. Izolowania mieszaniny produktów dokonuje się chloroformem, a rozdzielanie ich przebiega na drodze chromatografii kolumnowej.

Sposób według wynalazku polega na wprowadzeniu do 3–5-dniowej wodnej kultury wyżej wymienionego szczepu należącego do gatunku *Rhodotorula mucilaginosa* androstendionu, jak i testosteronu w ilościach 100–120 mg/litr kultury. Czynnikiem transformującym androstendion, jak i testosteron jest układ enzymatyczny zawarty w żywych komórkach gatunku *Rhodotorula mucilaginosa*.

Wodną kulturę tego gatunku określa się kulturą rosnącą na pożywce sporządzonej przez rozpuszczenie w 1 l wody wodociągowej 20 g wyciągu słodowego, który zawiera 72% wagowych maltozy, 2% wagowych dekstryn, 4% wagowych substancji białkowych, 1% wagowych soli mineralnych i 18% wagowych wody. Fermentację prowadzi się w ciągu 10–20 dni, korzystnie w ciągu 14 dni od momentu dodania substratu, w temperaturze 22–28°C, korzystnie 27°C przy wartości pH = 4,5–6,0 korzystnie 5.

Zarówno przygotowanie kultury mikroorganizmu jak i następująca po nim fermentacja dodanego substratu przebiega przy wstrząsaniu reagujących mieszanin, które po ekstrakcji chloroformem rozdziela się chromatograficznie.

Czterodniowa hodowla wstępna szczepu jest najkorzystniejsza, bowiem wtedy osiąga się najintensywniejszy rozwój mikroorganizmu. Przedłużenie okresu wstępnego ponad cztery dni powoduje starzenie się kultury, co wpływa na zmniejszenie wydajności obu produktów. Kolejna fermentacja dwutygodniowa androstendionu lub testosteronu prowadzi do osiągnięcia najwyższej wydajności (do 75% mieszaniny obu produktów). Skracanie okresu fermentacji powoduje obniżenie wydajności produktów, dłuższa natomiast hodowla prowadzi do powstania dalszych produktów przemiany obok androsteronu i epiandrosteronu.

Optymalne ilości dodawanego substratu (androstendionu lub testosteronu) do 1,2 l pożywki z rosnącą w niej kulturą opisanego wyżej szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* wynoszą 100–120 mg. Dodatek większej ilości substratu do tej samej objętości kultury wodnej *Rhodotorula mucilaginosa* powoduje pozostanie materiału wyjściowego po reakcji mikrobiologicznej.

Temperatura 27°C i wartość pH = 5 przy wstrząsaniu stanowią najkorzystniejsze warunki dla opisywanego procesu. Podwyższenie temperatury powyżej 28°C lub obniżenie poniżej 22°C hamuje rozwój mikroorganizmu. Tak samo hamująco na jego rozwój wpływa zmiana wartości pH poniżej 4,5 i powyżej 6,0.

Wstrząsanie reagującego roztworu przyspiesza reakcję przemiany zarówno testosteronu, jak i androstendionu. Oba te substraty są nierozpuszczalne w wodzie, a wstrząsanie hodowli utrzymuje je cały czas w zawiesinie, co ułatwia kontakt obu reagujących związków z układem enzymatycznym komórek *Rhodotorula mucilaginosa*. Opisane warunki transformacji obu substratów stanowią najkorzystniejsze parametry znalezione w omawianej metodzie otrzymywania androsteronu i epiandrosteronu.

W porównaniu z przedstawionymi na wstępie metodami chemicznymi i mikrobiologicznymi sposób według wynalazku daje szereg korzyści — hodowlę opisanego szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* przeprowadza się prostym sposobem na pożywce maltozowej, przy czym fermentacja dodanych substratów przebiega przy pomocy całej kultury bez izolowania preparatu enzymatycznego. W czasie tego procesu przekształcenia androstendionu do androsteronu i epiandrosteronu zachodzą równocześnie redukcja podwójnego wiązania 4,5 do układu pierścieni A/B trans oraz redukcja grupy ketonowej na C-3 do obu alkoholi α i β . W testosteronie ma miejsce ta sama wielostopniowa transformacja oraz utlenienie alkoholu na C-17 do ketonu.

W znanych pracach mikrobiologicznych posługiwano się preparatami enzymatycznymi, których izolowanie jest pracochłonne i trudne. Jako substraty stosowane są natomiast 5 α -androstan-3, 17-dion, 5 α -androstan-3 α , 17 β -diol lub octan 5 α -androstan-3 α -ol-17-onu, które ulegają jedno-stopniowemu przekształceniu (redukcja ketonu na C-3, utlenienie alkoholu na C-17 lub hydroliza octanu na C-3). We wszystkich przypadkach substraty posiadają już konfigurację A/B trans.

Dotychczas znane metody mikrobiologiczne ze względu na skomplikowane materiały wyjściowe i posługiwanie się trudno dostępnymi preparatami enzymatycznymi są nieprzydatne do zastosowania w produkcji na skalę przemysłową.

W metodach chemicznych natomiast stosowano również substraty, które bądź to posiadały już układ pierścieni A/B trans, bądź to wymagały kilkustopniowych procesów prowadzących do opisywanych produktów. Rozdział produktów wymagał zastosowania digitoniny i rozkładu digitonidu.

Metoda mikrobiologiczna według wynalazku transformacji androstendionu lub testosteronu prowadząca do mieszaniny androsteronu i epiandrosteronu jest więc od przedstawionych sposobów korzystniejsza ze względu na przeprowadzenie kilkustopniowego przekształcenia w jednej reakcji, a w rozdziale chromatograficznym unika się stosowania digitoniny. Osiągnięto wydajności do 75% mieszaniny (w stosunku do ilości dodanego do kultury wodnej substratu) o prawie równej ilości androsteronu i epiandrosteronu.

Wynalazek wyjaśniają bliżej następujące przykłady:

Przykład I. W czterech kolbach o pojemności 2 l, zawierających po 1,2 l sterylnej pożywki maltozowej otrzymanej przez rozpuszczenie 20 g

ekstraktu słodowego o składzie podanym wyżej w jednym l wody wodociągowej, zaszczepia się wyżej opisany szczep *Rhodotorula mucilaginosa*. Po czterech dniach wzrostu szczepu przy wstrząsaniu w temperaturze 27°C i przy wartości pH = 5 dodaje się do każdej kolby po 110 mg androstendionu rozpuszczonego w 1,5 ml acetonu. Fermentację prowadzi się przy wstrząsaniu w ciągu 14 dni.

Roztwór metabolityczny zawierający zawiesinę zarodników po dodaniu 200 ml metanolu do każdej kolby wstrząsa się dodatkowo w ciągu 1 godziny. Następnie połączoną zawartość czterech kolb ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem w porcjach po 1,2 l. Ekstrakty chloroformowe łączy się, suszy nad bezwodnym Na₂SO₄. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika organicznego otrzymuje się 450 mg półkrystalicznych produktów przemiany androstendionu — izoluje się większą ilość produktów niż dodaje, ze względu na zanieczyszczenia metabolitami własnymi *Rhodotorula mucilaginosa*.

450 mg produktów przemiany chromatografuje się pod 150 mm Hg nadciśnienia na 60 g żelu krzemionkowego o średniej średnicy poniżej 0,08 mm mieszaniną benzenu i metanolu o stosunku objętościowym 100:2,5. W wyniku otrzymuje się 45 mg 5α-androstan-3,17-dionu, 7 mg androstendionu, 25 mg testosteronu oraz 325 mg mieszaniny androsteronu i epiandrosteronu. Z kolei w trzykrotnej chromatografii 325 mg mieszaniny na 40 g krzemianu magnezu I aktywności eluentem benzen-metanol o stosunku objętościowym

100:5 uzyskuje się 170 mg androsteronu i 155 mg epiandrosteronu.

Przykład II. Sposób postępowania taki sam, jak w przykładzie I, z tym, że do każdej kolby dodaje się po 110 mg testosteronu. Pozostałe czynności przeprowadza się w analogiczny sposób. Izoluje się po fermentacji 450 mg mieszaniny produktów zawierających zanieczyszczenia, pochodzące z metabolitów własnych *Rhodotorula mucilaginosa*. W wyniku chromatografii z 450 mg produktów przemiany otrzymuje się 38 mg 5α-androstan-3,17-dionu, 10 mg androstendionu, 65 mg testosteronu i 295 mg mieszaniny androsteronu i epiandrosteronu. Trzykrotna chromatografia 295 mg mieszaniny na 35 g krzemianu magnezu daje 150 mg androsteronu i 135 mg epiandrosteronu.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób równoczesnego otrzymywania androsteronu i epiandrosteronu na drodze mikrobiologicznej **znamienny tym**, że do 3—5-dniowej kultury wodnej szczepu należącego do gatunku *Rhodotorula mucilaginosa* dodaje się androstendion lub testosteron w ilościach 100—120 mg/litr kultury wodnej, po czym prowadzi się fermentację wstrząsaną w ciągu 10—20 dni w temperaturze 22—28°C przy wartości pH = 4,5—6,0, a następnie ekstrahuje się chloroformem mieszaninę, zawierającą jako główne produkty androsteron i epiandrosteron, które z kolei rozdziela się na drodze chromatograficznej.