

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA  
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

239932

(11) (B2)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 12 P 33/00  
C 07 J 1/00  
C 07 J 5/00

(22) Přihlášeno 24 09 82  
(21) PV 6856-82  
(32) (31)(33) Právo přednosti od 28 09 81  
(2785/81) Maďarská lidová republika

(40) Zveřejněno 16 01 85

(45) Vydáno 15 05 87

(72) Autor vynálezu

(73) Majitel patentu

UDRVARDY NAGY ÉVA dr.; BARTHO ISTVÁN ing.; HANTOS GÁBOR dipl. chem.;  
TRINN MÁRIA ing.; VIDÁ ZSUZSA ing.; SZEJTLI JÓZSEF dr. ing.;  
STADLER ÁGNES dr. ing.; HABON ILONA ing.; BALÁZS MÁRTA,  
BUDAPEŠT (MLR)

RICHTER GEDEON VEGYÉSZETI GYÁR R. T. BUDAPEŠT,  
CHINOLIN GYÓGYSZER- ÉS VEGYÉSZETI TERMÉKEK GYÁRÁ RT., BUDAPEŠT (MLR)

(54) Způsob zintenzivnění mikrobiologické přeměny steroidů

Způsob zintenzivnění mikrobiologické přeměny steroidů, s použitím pomocných látek, při němž se mikrobiologická přeměna provádí za přítomnosti alfa-, beta- nebo gama-cykloextrinu nebo za přítomnosti libovolné směsi těchto látek v množství 0,2 až 3 moly na 1 mol steroidního substrátu a po skončení přeměny se cykloextrin popřípadě ze systému regeneruje a vrací zpět k mikrobiologické přeměně.

Vynález se týká způsobu zintenzivnění mikrobiologické přeměny steroidních sloučenin použitím přísady na bázi cyklodextrinu.

Při výrobě steroidních sloučenin často dochází k tomu, že se jeden stupeň vícestupňové syntézy těchto látek provádí při využití specifické funkce některého mikroorganismu. Buňky mikroorganismu, enzymy, extrahované z těchto buněk, popřípadě fixované buňky nebo fixované enzymy z těchto buněk se používají při biologických způsobech přeměny, které probíhají ve vodném prostředí. Přestože tyto enzymatické reakce ve svrhu uvedeném prostředí probíhají velmi standardně, mají současně ve srovnání s reakcemi, probíhajícími v organických rozpouštědlech tu podstatnou nevýhodu, že steroidní sloučeniny jsou nespolehlivě rozpustné ve vodě. Rozpustnost celé řady steroidních sloučenin ve vodě je velmi malá, což v řadě případů znamená, že jejich výsledná koncentrace je nižší než koncentrace, při které biologické způsoby přeměny jsou ještě proveditelné z ekonomického hlediska.

V případě známých způsobů se v průběhu reakce obvykle nachází určité množství substrátu nebo určité množství výsledného steroidního produktu v průběhu reakce v pevné formě. Rozpouštění substrátu z uvedené pevné fáze může určovat výslednou reakční rychlost v případě heterogenní velikosti částic je rychlost rozpouštění při zvyšování průměru částic nerozpouštěného podílu stále nižší. Může dokonce dojít k tomu, že v důsledku špatného rozpouštění se reakce sama zastaví před dosažením požadované přeměny.

Ke zvýšení rozpustnosti steroidního substrátu ve vodě nebo ke zrychlenému rozpouštění produktu byla navrhována celá řada postupů.

V britském patentu č. 1 211 356 se k dosažení homogenního rozptýleného substrátu před reakcí přiváděný steroid mechanicky disperguje. Podle US patentu č. 4 124 607 se substrát s jemnými zrny připravuje v odděleném stupni tak, že se steroidní roztok, získaný podle v organickém rozpouštědle disperguje ve vodě a pak se rozpouštědlo odděluje. Je možno také postupovat tak, že se steroidní sloučenina rozpustí v organickém rozpouštědle a vysrážení se provádí až v průběhu biologické přeměny. Podle maďarského patentu č. 149 678 se rozpouštědlo, použité k rozpouštění substrátu, například pyridin nebo kyselina octová, před počátkem biologické přeměny neutralizuje a rozpustnost se zlepšuje v případě alkoholu přidáním chloridů alkalických kovů a chloridů kovů alkalických zemin.

Podle britského patentu č. 1 083 204 se zlepšuje rozpustnost steroidního substrátu v reakčním prostředí tak, že se přidává některé z organických rozpouštědel, s výhodou dimethylsulfoxid, a to současně se substrátem nebo po jeho uvedení do reakční směsi. Je také možno postupovat tak, že se rozpustnost steroidního substrátu zajišťuje pomocí rozpouštědel nemísitelných s vodou, v tomto případě je umožněna rychlá výměna látek velkou hraniční plochou ve vzniklé emulzi, jak je uvedeno například v publikaci Biotechn. Bioeng. 21, 39 (1979). Ve farmaceutickém průmyslu se často používá činidel, napomáhajících rozpouštění. Podle NSR patentu č. 1 543 431 je možno podstatně zvýšit výtěžek androstendionu při jeho výrobě z 4-kollesten-3-onu přidáním činidel tohoto typu.

Známa řešení mohou zmenšit nevýhody, spojené se špatnou rozpustností steroidního substrátu ve vodě, nejsou však ekonomické nebo mají nepříznivé účinky na celý systém. Například v případě, že se vyrobí substrát v mikrokrytalické formě, znamená to nutnost většího počtu pracovních stupňů při technologickém postupu a mimoto dochází ke ztrátám výsledného materiálu. Podle jiných pozorování dochází také k poškození mikroorganismu při delším působení organického rozpouštědla, zejména v množství, jehož je zapotřebí k dostatečnému zvýšení rozpustnosti steroidu ve vodě, jak bylo popsáno například v publikaci Steroids, 12, 525/1968).

V případě, že se používá činidel, usnadňujících rozpouštění, dochází současně ke tvorbě pěny, což ztěžuje dostatečné provzdušňování systému, v němž probíhá biologická přeměna.

Vynález si klade za úkol navrhnout způsob, který by na jedné straně odstraňoval nevýhody známých postupů, na druhé straně by při provádění tohoto způsobu mělo dojít ke zintenzivnění mikrobiologické přeměny steroidů.

Nyní bylo zjištěno, že cyklodextriny je možno použít v systémech pro biologickou přeměnu ke zlepšení rozpustnosti steroidních molekul ve vodě, v případě nerozpustného zbytku ke zvýšení rychlosti jeho rozpouštění a tím k podstatnému zvýšení rychlosti biologické přeměny a mimoto v daném systému k zábraně zpomalení reakce při vzniku většího výsledného produktu a k zábraně blokady reakce působením některých sterických skupin ve steroidních molekulách. Cyklodextriny alfa- a beta- nebo jejich směsi mají katalytický účinek při hydrolýze esterů. V případě, že mikroorganismus má dvě nebo větší počet funkcí, může dojít k selektivnímu ovlivnění poměru mezi reakčními produkty. Dochází tedy ke zintenzivnění celé přeměny,

Předmětem vynálezu je způsob zintenzivnění mikrobiologické přeměny steroidů, s použitím pomocných látek, který se provádí tak, že se mikrobiologická přeměna uskutečňuje za přítomnosti alfa-, beta- nebo gama-cyklodextrinu nebo za přítomnosti libovolné směsi těchto látek v množství 0,2 až 3 moly na 1 mol steroidního substrátu a po skončení přeměny se cyklodextrin popřípadě ze systému regeneruje a vrací zpět k mikrobiologické přeměně. Pod pojmem "cyklodextrin", se dále rozumí alfa-, beta- nebo gama-cyklodextrin nebo libovolná směs těchto látek. Před počátkem mikrobiologické přeměny, při jejím začátku nebo v průběhu přeměny se přidává na 1 mol substrátu celkem 0,2 až 3 moly cyklodextrinu. Podle jednoho z možných provedení se přidává odpovídající cyklodextrin před přívodem substrátu do směsi pro biologickou přeměnu.

Podle dalšího možného provedení se směsí substrát s cyklodextrinem a vzniklý inkluzní komplex nebo jeho vodný roztok nebo jeho suspenze se pak přidávají do prostředí pro biologickou přeměnu. Podle dalšího možného provedení se cyklodextrin přidává jako takový nebo ve formě inkluzního komplexu se substrátem, popřípadě ve formě vodného roztoku nebo suspenze inkluzního komplexu v průběhu mikrobiologické reakce, obvykle po dosažení 30 až 50% přeměny. Roztok cyklodextrinu nebo inkluzního komplexu cyklodextrinu a substrátu je možno před přívodem do prostředí pro biologickou přeměnu sterilizovat nebo je možno tyto látky sterilizovat společně s prostředím pro biologickou přeměnu. Cyklodextrin je možno získat z vodného prostředí pro biologickou přeměnu tak, že se steroid extrahuje organickým rozpouštědlem a cyklodextrin se vysráží přidáním rozpouštědla, které silně snižuje jeho rozpustnost, s výhodou hexanu a pak se odfiltruje a popřípadě suší.

Zintenzivnění mikrobiologické přeměny steroidů podle vynálezu je velmi výhodné, protože zajišťuje zvýšení reakční rychlosti a tím zkrácení doby reakce, současně je možno zvýšit koncentraci substrátu v prostředí, odstraňuje se nepříznivý vliv hromadění výsledného produktu, z většího počtu možných reakcí je možno katalyzovat požadovanou reakci a je také možno zvýšit selektivitu mikrobiologického postupu.

Inkluzní komplex cyklodextrinu se steroidním substrátem je možno vyrobit různými způsoby. Podle jednoho způsobu se k prostředí pro biologickou přeměnu přidá vodný roztok požadovaného cyklodextrinu určité koncentrace a k němu se přidá steroidní substrát, čímž vznikne inkluzní komplex. (Varianta 1).

Je také možno postupovat tak, že se vyloučí přímé přidávání steroidu do systému a v odděleném tanku se vyrobí vodný roztok inkluzního komplexu substrátu s cyklodextrinem, který se sterilizuje filtrací a pak se přidá do prostředí pro biologickou přeměnu (varianta 2). Za přítomnosti určitého množství vody je možno směs cyklodextrinu a steroidu překrystalovat za vzniku krystalického komplexu steroidu s cyklodextrinem, který je možno použít při biologické přeměně, která nevyžaduje sterilizaci, v pevné formě (varianta 3).

Cykloextriny jsou polymery glukózy přírodního původu, které sestávají z velkých kruhů ze 6, 7 nebo 8 glukózových jednotek. Jejich struktura je charakterizována zvláštním uspořádáním hydroxylových skupin. Všechny sekundární hydroxylové skupiny se nacházejí na stejném okraji kruhu, primární hydroxylové skupiny se nacházejí na opačném okraji. V důsledku toho je zevní plocha kruhu hydrofilní a z tohoto důvodu jsou cykloextriny rozpustné ve vodě.

Vnitřní strana kruhu je hydrofóbní. Cykloextriny mohou vytvářet s molekulami odpovídající velikosti a tvaru inkluzní komplexy. Cykloextrin s obsahem 6 glukopyranózových jednotek je alfa-cykloextrin, beta-cykloextrin je tvořen 7 glukopyranózovými jednotkami a gama-cykloextrin je tvořen 8 glukopyranózovými jednotkami. Podle své vazby se nazývají cykloextriny také cykloamylozy. Komplexy steroidních molekul s cykloextrinem již byly sledovány v průběhu zkoumání většího počtu farmakologických účinných látek a látek, napomáhajících rozpouštění, jak bylo popsáno například v publikaci Lech a Pauli: J. Pharm. Sci. 55, 32 (1966). V případě testosteronu a kortisonacetátu byl stanoven i pravděpodobný stechiometrický poměr jednotlivých složek. Zvětšenou rozpustností se zvyšovala naděje na lepší vstřebávání farmaceutických účinných látek. Až dosud však nebyly cykloextriny nikdy použity k zintenzivnění reakce mikrobiologické přeměny steroidních substrátů. Bylo prokázáno, že komplex steroidního substrátu s cykloextrinem podléhá ve vodném prostředí rychle disociaci a v systému pro biologickou přeměnu je v dynamické rovnováze s volnými molekulami steroidu a s molekulami cykloextrinu. V systému pro biologickou přeměnu, který obsahuje pevný steroid v suspenzi závisí okamžitá koncentrace rozpuštěného podílu, na který může působit enzym, vždy na rychlosti rozpouštění substrátu a na rychlosti enzymatické reakce. V případě, že rozpouštění je pomalé, zůstává v průběhu reakce koncentrace steroidního roztoku daleko pod nasycením a reakce trvá podle základních pravidel enzymatických reakcí podstatně déle.

Naproti tomu z inkluzního komplexu s cykloextrinem se substrát uvolňuje prakticky okamžitě. Množství rozpuštěného substrátu zůstává proto v tomto případě stále v průběhu celého postupu až do jeho konce a dosahuje nasycení, takže je možno zajistit maximální rychlost přeměny pro danou enzymatickou reakci.

Při jiném typu reakcí pro přeměnu steroidů může dojít k tomu, že výsledný produkt při své tvorbě zpomaluje nebo zastavuje reakci v případě, že se váže na enzym nebo na povrch buňky. Vzhledem k odlišné struktuře substrátu a molekuly výsledného produktu k tomuto jevu při použití komplexu s cykloextrinem nedochází. Podle nejnovějších sledování je možno zvolit tak příznivé reakční podmínky, při nichž se výsledný steroid převádí na komplex s cykloextrinem, aniž by tím byla zhoršena dostupnost původního steroidního substrátu. V případě, že stálost komplexu substrátu s cykloextrinem překročí stálost komplexu výsledného produktu s cykloextrinem, je možno postupovat tak, že se cykloextrin přidává do reakční směsi pouze v tom případě, že se v systému nachází přebytek reakčního produktu.

Bylo také prokázáno, že je možno příznivě ovlivnit enzymatickou hydrolýzu esterifikovaných steroidních molekul tvorbou odpovídajícího komplexu s alfa- a/nebo beta-cykloextrinem. Je možno to vysvětlit katalytickým účinkem, který vyplývá ze struktury cykloextrinu.

V případě různých biologických přeměn bylo možno také pozorovat, že tvorba komplexu s cykloextrinem má za následek další různé změny, které mohou vést v případě komplexu s odpovídající stálostí například k tomu, že se zmenšuje rychlost reakce pro některou konfiguraci nebo dojde k téměř úplnému vyloučení jednoho typu reakce.

Tvorba inkluzních komplexů a účinek na zintenzivnění biologické přeměny platí obecně zejména pro sloučeniny steroanového typu. S určitými úpravami je možno příznivě ovlivnit také přeměny, při nichž dochází k tvorbě estranových, androstanových, pregnanových, cholestanových, stigmastanových sloučenin a nosteranových, tak jak je uvedeno v následujících příkladech, které však nemají sloužit k ovlivnění rozsahu vynálezu.

## P ř í k l a d 1

Substrát: hydrokortison

Mikroorganismus: *Arthrobacter simplex* (ATCC 6 946)

alfa-cykloextrin, zvýšení rychlosti

Přidávání substrátu: 1. varianta

Agarová kultura *Arthrobacter simplex* (ATCC 6 946) se promyje fyziologickým roztokem soli a 5 ml této suspenze se naočkuje následující živná půda: glukóza 0,3 %, enzymaticky hydrolyzovaný kasein 0,5 %, extrakt z kvasnic 0,1 %, pH 6,7. Roztek se doplní vodou na 100 ml a sterilizuje v Erlenmeyerově baňce o obsahu 500 ml. Kultivace se provádí při teplotě 32 °C na třepačce při 230 výkyvech po dobu 18 hodin, pak se přidá 5 mg hydrokortisonu v 0,5 ml metanolu a přivádí se požadovaný enzym. Enzym se přivádí 3 hodiny za týchž podmínek, při nichž se provádí kultivace. Kultura, obsahující 50 ml delta-1-dehydrogenázy jako enzymu se vloží do Erlenmeyerovy baňky o obsahu 3 litry s obsahem 950 ml sterilizované vody přeměna se provádí s dvacetinásobně zředěnou aktivní kulturou. Substrát obsahuje 2 g hydrokortisonu, reakce probíhá následujícím způsobem:

20 g alfa-cykloextrinu se přidá ke kultuře, po jeho rozpuštění se rozpustí hydrokortison ve 20 ml metanolu s obsahem 10 % hmot. chloridu vápenatého. Získaný roztok se přidá ke kultuře s obsahem alfa-cykloextrinu. Přeměna probíhá při teplotě 32 °C na svrchu uvedeném zařízení 5 hodin. Přítomnost alfa-cykloextrinu brání v průběhu přivedu substrátu do vodného prostředí jeho vysrážení, přeměna substrátu po jeho rozpuštění probíhá rychleji než v systému, v němž se substrát nachází jako suspenze. Doba přeměny substrátu bez cykloextrinu je 8 hodin. Na konci přeměny je možno ve fermentačním prostředí prokázat 1 920 µg/ml prednisonu, 40 µg/ml 20-beta-hydroxyprednisonu a 8 µg/ml hydrokortisonu.

## P ř í k l a d 2

Substrát: 17alfa-metyltestosteron (androstanový derivát)

Mikroorganismus: *Arthrobacter simplex* (ATCC 6 946)

Beta-cykloextrin, odstranění brzdicího účinku výsledného produktu

Přidávání substrátu: varianta 1.

Indukovaná kultura získaná způsobem podle příkladu 1 se pětkrát zředí a k delta-1-dehydrogenaci metyltestosteronu se použije na začátku přeměny roztok 1,0 g metyltestosteronu v 10 ml metanolu, který se přivádí do systému. Přeměna se sleduje chromatografií na tenké vrstvě. Substrát se ze systému vylučuje a v průběhu kontinuálního rozpouštění dochází k jeho dehydrogenaci. Při dosažení koncentrace přibližně 400 µg/ml delta-1-metyltestosteronu se do systému přidá 6,0 g beta-cykloextrinu. Tato přísada vytváří komplex se vznikajícím produktem, což je velmi důležité, protože jinak dochází ke zpomalení enzymatické reakce, protože převaha výsledného produktu reakci zpomaluje. Tvorba komplexu s beta-cykloextrinem probíhá přibližně pětkrát intenzivněji než tvorba komplexu se substrátem. Přidávání se provádí ve druhé hodině a inkubace se provádí až do 6. hodiny při sledování chromatografií na tenké vrstvě.

Obsah steroidů ve fermentačním prostředí na konci fermentace je 970 µg/ml delta-1-metyltestosteronu, 6 µg/ml metyltestosteronu. Bez přidání cykloextrinu se reakce zastaví při zbývajícím koncentraci substrátu 100 až 120 µg/ml.

## P ř í k l a d 3

Substrát: 5-pregnen-3beta,17alfa,21-triol-20-on-21-acetát (acylovaný pregnenový derivát)

Mikroorganismus: *Flavobacterium lucecoloratum* (NIB 9 324)

Gama-cykloextrin se přidává podle varianty 3.

Kulturou *Flavobacterium lucecoloratum* (NCIB 9 324) ze šikmého agaru se naočkuje 200 ml živného prostředí v Erlenmeyerových baňkách o obsahu 750 ml. Kultivace se provádí 20 hodin při teplotě 30 °C na třepačce s 230 výkyvy. Touto kulturou se naočkuje 5 litrů sterilního vodného prostředí téhož složení v laboratorním fermentoru. Prostředí obsahuje 1,0 % hmot. extraktu z kvasnic 0,1 % hmot. di/hydrogenfosforečnanu draselného a 0,4 % hmot. hydrogenfosforečnanu draselného. K naočkování živnému prostředí se přidá 250 mg substrátu v roztoku v 1,5 ml dimetylformamidu. Roztok se sterilizuje filtrací. Přítomnost substrátu umožňuje tvorbu potřebných enzymů při růstu kultury. Po 12 hodinách kultivace je počet bakterií a enzymatická účinnost vhodná k počátku biologické přeměny a přidá se tedy 100 g pregnen-3beta-17alfa,21-trihydroxy-20,21-acetátu ke kultuře, k níž se předem přidá gama-cykloextrin.

Postupuje se následujícím způsobem:

100 g substrátu se homogenizuje se stejným množstvím gama-cykloextrinu a 200 ml vody 20 minut, v průběhu této doby vytvoří určitý podíl substrátu s cykloextrinem snadno rozpustný komplex. Suspenze se míchá ve fermentoru a inkubuje dalších 11 hodin tak dlouho, až se substrát spotřebuje. V laboratorním fermentoru se udržuje teplota 30 °C. Prostředí se míchá při 420 otáčkách za minutu a provzdušňuje rychlostí 0,5 litru za minutu. Přeměna se sleduje chromatografií na tenké vrstvě. Obsah steroidů ve fermentačním prostředí po ukončení přeměny je 9 020 µg/ml 4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dionu a 30 µg/ml substrátu. Bez cykloextrinu by bylo možno biologickou přeměnu provádět až při množství 10 g substrátu v 1 litru.

## P ř í k l a d 4

Substrát: 4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dion-17-acetát (acylovaný kortikosteroid)

Mikroorganismus: *Curvularia prasadii* (IMI 71 475)

Beta-cykloextrin, katalýza hydrolýzy esteru

Přívod substrátu podle varianty 1.

Suspenzí spór, získaných omytím kultury *Curvularia prasadii* (IMI 71 475) na šikmém agaru se naočkuje 100 ml živného prostředí v Erlenmeyerových baňkách o objemu 500 ml. Živné prostředí obsahuje 1,0 % hmot. sojové mouky, 0,3 % hmot. kukuřičného výluhu, 0,3 % hmot. kukuřičného škrobu a 0,5 % hmot. sladového extraktu při pH 6,2. Kultura se inkubuje 24 hodin při teplotě 25 °C, 10 ml této kultury se pak použije k naočkování 100 ml živného prostředí v baňkách stejné velikosti. Živné prostředí v tomto případě neobsahuje sladový extrakt, jinak má stejné složení jako svrchu. Mikroorganismus se inkubuje při teplotě 26 °C na třepačce; v průběhu jeho růstu se po 16 hodinách přidá substrát, a to 4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dionacetát.

Přidává se 0,12 g substrátu v roztoku ve 3 ml metanolu. Pak se kultura dále inkubuje přičemž dochází k hydroxylaci v poloze 11beta, čímž vzniká hydrokortison-17-acetát. Ve 20. hodině přeměny, sledované chromatografií na tenké vrstvě, zbývá ještě 10 % hmot. substrátu.

Pak se přidá 0,96 g beta-cykloextrinu. Cykloextrin působí katalyticky na enzymatickou hydrolýzu acetylové skupiny steroidní molekuly, takže ve zbývajících dobách biologické přeměny se kromě zpomalující se hydroxylace odštěpuje acetylová skupina. Po dalších 3 hodinách je možno postup přerušit.

Fermentační prostředí na konci biologické přeměny obsahuje hydrokortison (4-pregnen-11beta, 17alfa, 21-trihydroxy-3, 20-dion) v množství 0,730 µg/ml, 0,185 µg/ml hydrokortison-17acetátu, 0,005 µg/ml 4-pregnen-17alfa, 21-dihydroxy-3, 20-dion-17-acetátu a 0,040 µg/ml 4-pregnen-17alfa, 21-dihydroxy-3, 20-dion.

P ř í k l a d 5

Substrát: hydrokortison

Mikroorganismus: *Arthrobacter simplex* (ATCC 6 946)

Beta-cykloextrin, zvýšení rychlosti reakce

Přidání substrátu: varianta 2.

Kultura *Arthrobacter simplex* (ATCC 6 946) získaná na pevné živné půdě se omyje a 30 ml suspenze této kultury se použije k naočkování 5 litrů sterilního živného prostředí v laboratorním fermentoru.

Živné prostředí obsahuje 0,3 % hmot. glukózy, 0,3 % hmot. peptonu, 0,1 % hmot. extraktu z kvasnic při pH 6,8. Kultura se pěstuje při teplotě 35 °C a při 240 otáčkách za minutu při provzdušňování 0,5 litry vzduchu na 1 litr živného prostředí za minutu 20 hodin. Pak se použije 1 litr kultury k naočkování 9 litrů sterilního živného prostředí v laboratorním fermentoru. Prostedí obsahuje 0,5 % hmot. glukózy, 0,5 % hmot. peptonu, 0,4 % hmot. extraktu z kvasnic při pH 6,8.

Kultura se pěstuje při teplotě 35 °C a 600 otáčkách za minutu při provzdušňování 0,3 litry vzduchu na 1 litr prostředí za minutu celkem 18 hodin a pak se k indukci tvorby enzymu přidá roztok 0,5 g hydrokortisonu v 50 ml metanolu. Směs se inkubuje ještě 4 hodiny, načež se aktivní kultura uloží do zařízení, odolného proti kyselinám a prostředí se dále zpracovává.

V uvedeném zařízení bylo předem připraveno prostředí pro biologickou přeměnu tak, že se 90 litrů vody z vodovodu a 1 200 g beta-cykloextrinu zahřeje na 100 °C a prostředí se při této teplotě sterilizuje 20 minut a pak zchladí na 35 °C. Pak se rozpustí 1,0 g 2-metyl-1,4-naftochinonu a 400 g hydrokortisonu ve 4 litrech metanolu s obsahem 400 g chloridu vápenatého, roztok se sterilizuje filtrací a přidá se do zařízení. Pak se do zařízení přidá ještě svrchu uvedená kultura, čímž počne probíhat biologická přeměna. V průběhu přeměny se nachází steroidní substrát prakticky v roztoku, což je důležité z toho důvodu, že se tímto způsobem vylučuje možnost krystalizace při počátku vylučování výsledného produktu z prostředí. Jinak se totiž mohou tvořit smíšené krystaly substrátu a výsledného produktu.

Při biologické přeměně se udržuje teplota na 35 °C při 180 otáčkách za minutu a provzdušňování 0,6 litry vzduchu na 1 litr prostředí za minutu. Podle výsledků chromatografie na tenké vrstvě se reakce přeruší při obsahu substrátu 2 % hmot. a fermentační prostředí se pak dvakrát extrahuje ethylacetátem v protiproudu v zařízení, které dovoluje přítomnost pevného podílu. Extrakt se odpaří ve vakuu při teplotě nepřevyšující 40 °C na koncentraci 8 g/litr, čímž se získá přibližně 50 litrů prvního koncentrátu, přidá se směs 40 g aktivního uhlí a 100 g celitu a směs se dále koncentruje až na přibližně 2 litry, přičemž dojde ke krystalizaci. Suspenze se zchladí na 5 až 10 °C a po několika hodinách se zfiltruje.

Matečný loup se sráží pětinasobkem diisopropyléteru, načež se zchladí a zfiltruje.

Získá se 375 g výsledného produktu s následujícími vlastnostmi:

|                       |            |         |
|-----------------------|------------|---------|
| Čistota               | 98         | % hmot. |
| ztráta při sušení     | 1          | % hmot  |
| sulfátový popel       | 0,1        | % hmot  |
| zbytek hydrokortisonu | 1,2        | % hmot  |
| další steroidy        | 0,35       | % hmot  |
| teplota tání          | 234 až 236 | °C      |

$$[\alpha]_D^{20} = +98^\circ \text{ (diózan, } c = 1 \text{ \% hmot.)}.$$

Ke zpětnému získání beta-cyklohextrinu se extrakt míchá s 1 litrem cyklohexanu hodinu při teplotě 18 až 20 °C. Vzniklý pevný podíl se oddělí filtrací, uvede se v suspenzi v 1 litru vody a cyklohexan se odstraní ze směsi varem destilací s vodní parou. Vodná suspenze beta-cyklohextrinu se udržuje přes noc na teplotě 5 až 10 °C, krystaly se oddělí filtrací a suší ve vakuu. Tímto způsobem se získá 700 g beta-cyklohextrinu, který je možno znovu použít.

#### P ř í k l a d y 6 až 11

Následující mikrobiologické přeměny se provádějí analogickým způsobem jako v příkladech 1 až 5 za podmínek, uvedených v těchto příkladech, cyklohextrin se použije ke zintenzivnění jednotlivých reakcí.

#### P ř í k l a d 6

Substrát: sitosterol

Mikroorganismus: Mycobacterium sp. (NRRL B 3 805)

Beta-cyklohextrin: zvýšení koncentrace

Přidávání substrátu: varianta 1

Výsledný produkt: androsta-14-dien-4,17-dion

Odbourávání postranního řetězce ze substrátu se provádí způsobem podle publikace W. J. Marscheck, S. Kraychi a R. D. Muir (1972) Appl. Microbiol. 23, 72. při použití steroidu a cyklohextrinu v molárním poměru 1:0,2.

Živné prostředí obsahuje 0,5 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O. V případě, že se bez cyklohextrinu získá koncentrace 1 g/litr sitosterolu, je možno při stejné době přeměny 170 hodin působením cyklohextrinu zvýšit koncentraci sitosterolu na 2 g/litr.

#### P ř í k l a d 7

Substrát: progesteron

Mikroorganismus: Ophiobolus herpotrichus

Beta-cyklohextrin: úplná přeměna

Substrát se přidává podle varianty 1



Výsledný produkt: 21-dihydroxyprogesteron

Reakce se provádí způsobem podle publikace Meystre a další *Helv. Chim. Acta* **37**, 1 548 (1954) při použití molárního poměru steroidu a cyklodextrinu 1:0,2. Živným prostředím je pivovarský zákvas, v němž se pěstuje mikroorganismus 3 dny, pak se přidává acetonový roztok progesteronu jako substrátu až do dosažení koncentrace 0,25 g/litr. Bez použití cyklodextrinu trvá přeměna další 3 dny a zbytek substrátu je téměř 25 %. V případě, že se 24 až 30 hodin po začátku přeměny přidá cykloextrin, je zbytek substrátu podstatně nižší.

P ř í k l a d 8

Substrát: 4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dion (Reichstein-S)

Mikroorganismus: *Curvularia lunata* (IFO 49)

Beta-cyklodextrin: ovlivnění poměru reakčních produktů.

Přidávání substrátu: varianta 1

Hlavní produkt: hydrokortison

Reakce se provádí způsobem podle publikace Kondo E. a Mitsugi T., *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **35**, 521 (1961). Použije se molární poměr steroidu a cyklodextrinu 1:0,3. Bez přidání cyklodextrinu se v průběhu biologické přeměny získá 35 až 40 % hmot. 6-beta-hydroxy-4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dionu, 15 až 20 % hmot. 11alfa-hydroxy-4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dionu a přibližně 5 % hmot. 7,14alfa-dihydroxy- a 15 % hmot. 6-beta-14alfa-dihydroxy-4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dionu. V případě, že se v hodině 0 biologické přeměny přidá ke směsi beta-cyklodextrinu ve svrchu uvedeném poměru, je možno zvýšit množství 11alfa-hydroxy-4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dionu (epi-hydrokortisonu) na dvojnásobek.

P ř í k l a d 9

Substrát: 16alfa-metyl-4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dion

Mikroorganismus: *Curvularia lunata* (ATCC 12 017)

Beta-cyklodextrin: zvýšení efektivity přeměny

Přidávání substrátu: varianta 1

Výsledný produkt: 11beta,17alfa,21-trihydroxy-16alfa-metyl-4-pregnen-3,20-dion (16alfa-metylhydrokortison)

Reakce se provádí způsobem podle publikace Canonica L. a další *Gass. Chim. Ital.* **93**, 368 (1963). Použije se molární poměr steroidu a cyklodextrinu 1:1. Bez použití cyklodextrinu vzniká hlavní výsledný produkt v množství přibližně 55 % hmot. V případě, že se v hodině 0 biologické přeměny přidá k reakční směsi beta-cyklodextrin ve svrchu uvedeném poměru, stoupne množství hlavního výsledného produktu o 5 až 10 %.

## P ř í k l a d 10

Substrát: 3beta,17alfa,21-trihydroxypregn-5-en-20-on-21-acetát

Mikroorganismus: *Flavobacterium dehydrogenans* (ATCC 13 930)

Beta-cykloextrin: zvýšení koncentrace

Přidávání substrátu: varianta 1

Výsledný produkt: 4-pregnen-17alfa,21-dihydroxy-3,20-dion

Reakce se provádí podle US patentu č. 3 009 936. Molární poměr steroidu a cykloextrinu je 1:0,3. Při použití cykloextrinu je možno získat dvojnásobek výsledného produktu.

## P ř í k l a d 11

Substrát: Lanatosid-A (digitalisový glukosid)

Mikroorganismus: *Streptomyces purpurascens*

Beta-cykloextrin: zvýšení koncentrace

Přidávání substrátu: varianta 1.

Reakce se provádí podle maďarského patentu č. 176 250. Použije se lanatosid-A a cykloextrin v molárním poměru 1:1. Bez použití cykloextrinu se přidává k dvoudenní kultuře *Streptomyces purpurascens* roztok lanatosidu-A v organickém rozpouštědle v koncentraci 0,5 g/litr. V případě, že se po dvou dnech kultivace přidá k reakční směsi v hodině 0 biologické přeměny beta-cykloextrin ve svrchu uvedeném poměru, je možno zvýšit koncentraci substrátu na 2 g/litr.

## P ř í k l a d 12

Substrát: Hydrokortison.

Mikroorganismus: *Arthobacter simplex* (ATTC 6 946).

Směs cykloextrinů: zvýšení rychlosti.

Přidávání substrátu: varianta 2.

Mikrobiologická přeměna se provádí obdobným způsobem jako v příkladu 5 s tím rozdílem, že se místo beta-cykloextrinu použije směs alfa-, beta- a gama-cykloextrinu v poměru 6:75:19. Množství a kvalita výsledného produktu stejně jako reakční rychlost byly stejné jako v příkladu 5.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob zintenzivnění mikrobiologické přeměny steroidů s použitím pomocných látek, vyznačující se tím, že se mikrobiologická přeměna provádí za přítomnosti alfa-, beta-, nebo gama-cykloextrinu nebo za přítomnosti libovolné směsi těchto látek v množství 0,2 až 3 moly na 1 mol steroidního substrátu a po skončení přeměny se cykloextrin popřípadě ze systému regeneruje a vrací zpět k mikrobiologické přeměně.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se cykloextrin přivádí do systému před počátkem mikrobiologické přeměny, při jejím začátku nebo v jejím průběhu

3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se odpovídající cykloextrin přivádí do systému pro mikrobiologickou přeměnu před přidáním substrátu.

4. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se k mikrobiologické přeměně použije inkluzního komplexu substrátu s cykloextrinem, s výhodou roztoku nebo suspenze inkluzního komplexu substrátu s cykloextrinem.

5. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se cykloextrin přivádí do systému po ukončení 35 až 50% mikrobiologické přeměny

6. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se cykloextrin nebo inkluzní komplex cykloextrinu se steroidním substrátem nebo roztok těchto látek sterilizuje před přívodem do prostředí pro mikrobiologickou přeměnu.

7. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se cykloextrin, přidáný do prostředí pro mikrobiologickou přeměnu sterilizuje spolu s tímto prostředím.

8. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se steroid extrahuje z vodného prostředí pro mikrobiologickou přeměnu organickým rozpouštědlem a cykloextrin se vysráží přidáním rozpouštědla, snižujícího jeho rozpustnost, s výhodou hexanu, načež se z rafinátu izoluje filtrací a po případném sušení se vrací zpět k mikrobiologické přeměně.