

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 3044/87

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : C12P 33/16

(22) Anmeldetag: 18.11.1987

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 1.1993

(45) Ausgabetag: 27. 9.1993

(30) Priorität:

18.11.1986 HU 4757/86 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

DE-OS 2647895 US-PS 4221868  
JP-OS55-85397 JP-OS55-138395  
DE-OS3123413 DD-PS 249284 DD-PS 248145 DD-PS 232167

(73) Patentinhaber:

RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR R.T.  
BUDAPEST (HU).

(72) Erfinder:

JEKKEL ANTONIA DR.  
BUDAPEST (HU).  
ALBRECHT KAROLY  
BUDAPEST (HU).

(72) Erfinder:

AMBRUS GABOR DIPL.ING. DR.  
BUDAPEST (HU).  
LANG TIBOR DIPL.ING. DR.  
BUDAPEST (HU).  
SZABO ISTVAN MIHALY DR.  
BUDAPEST (HU).  
ILKOY EVA DIPL.ING.  
BUDAPEST (HU).  
KÖNCZÖL KALMAN DIPL.ING.  
BUDAPEST (HU).  
MORAVCSIK IMRE DIPL.ING.  
BUDAPEST (HU).  
HANTOS GABOR  
BUDAPEST (HU).  
SIMONOVITS EMULIA DIPL.ING.  
BUDAPEST (HU).  
LENGYEL ZSUZSANNA DR.  
BUDAPEST (HU).  
VIDA ZSUZSANNA DIPL.ING.  
BUDAPEST (HU).  
CSAJAGI EVA  
PECS (HU).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON 9ALPHA-HYDROXY-4-ANDROSTEN-3,17-DION

(57) Vorgeschlagen wird ein neues Verfahren zur Herstellung von 9-alpha-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion aus natürlichen Sterinen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder aus einem Gemisch derselben durch belüftete, submerse Fermentation eines enzymdefekten, Sterin abbauenden Mikroorganismus in einem Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Mineralsalze enthaltenden Nährmedium, und durch Isolieren des entstehenden Produktes. Erfindungsgemäß wird das für den Seitenkettenabbau vorgesehene Sterin oder Steringemisch mit der Kultur eines 1,2-Steroiddehydrogenase-Aktivität nicht enthaltenden Stammes der neuen Mycobacterium roseum Species, welcher fähig ist, natürliche Sterine abzubauen, vorzugsweise mit dem Mycobacterium roseum sp. nov. 1108/1 Stamm, der in der Nationalen Sammlung von Landwirtschaftlichen und Industriellen Mikroorganismen, Budapest, Ungarn unter der Zugriffsnummer NCAIM B (P) 000339 deponiert ist, gezüchtet.

AT 396 480 B

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion durch mikrobiologischen Seitenkettenabbau von natürlichen Sterinen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder aus einem Gemisch derselben durch belüftete, submerse Fermentation eines enzymdefekten, Sterin abbauenden Mikroorganismus in einem Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Mineralsalze enthaltenden Nährmedium, und Isolieren des entstehenden Produktes.

9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion ist ein wichtiges Ausgangsmaterial für die Synthese von Corticosteroid-Arzneimitteln [V. Van Rheenen, K. P. Shephard: J. Org. Chem. 44, 1582 (1979)].

In der Patentliteratur sind Verfahren, die 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion durch mikrobiologische Hydroxylierung von Steroiden mit Androstanskelett herstellen, wohl bekannt. Die Hydroxylierung von 4-Androsten-3,17-dion mit *Nocardia corallina* (Britische Patentschrift Nr. 862 701) und *Nocardia canicruria* (US-Patentschrift Nr. 4 397 947) - beide aus der *Nocardia* Gattung - oder mit *Corynebacterium equi* (Japanische Offenlegungsschrift Nr. 79-147998), einem Mitglied der *Corynebacterium* Gattung, ergibt 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion.

Ein *Corynespora cassicola* Pilz aus der *Caliciales* Gattung hydroxyliert 4-Androsten-3,17-dion in 9 $\alpha$ -Stellung (Japanische Offenlegungsschrift Nr. 80-77897), während *Circinella muscae* der *Mucorales* Gattung Testosteron in 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion umwandelt [P. G. Rao: Indian J. Chem. 1, 314 (1963)].

Seit kurzem wird 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion durch mikrobiologische Konversion von Sterinen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs hergestellt. Gemäß der Patentliteratur wird diese Konversion mit folgenden Mikroorganismus durchgeführt: *Mycobacterium fortuitum* (US Patentschriften Nr. 4 175 006 und 4 035 236), *Mycobacterium parafortuitum* (Japanische Offenlegungsschrift Nr. 80-138395) und *Mycobacterium vaccae* (Japanische Offenlegungsschriften Nr. 80-085397 und 82-0897).

Sterine, besonders jene pflanzlichen Ursprungs ( $\beta$ -Sitosterin, Campesterin), sind wenig kostspielige, leicht zugängliche Ausgangsstoffe. So kann die Produktion von 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion durch den Abbau von natürlichen Sterinen wirtschaftlich vorteilhaft sein.

Während der industriellen Realisation des obigen Verfahrens für den Seitenkettenabbau von Sterinen wurde aber gefunden, daß sich die Fermentation ziemlich verzögert und die Ausbeuten an 9-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion viel zu niedrig sind.

Im Laufe unserer Untersuchungen wurden aus unterschiedlichen Erdproben gemäß dem Verfahren von G. E. Peterson und Mitarbeiter [J. Lipid Research 3, 275 (1962)] Sitosterin abbauende Mikroorganismen isoliert. Aus diesen, an Sterinen wachsenden Mikroorganismen wurde ein *Mycobacterium* Stamm selektiert, und seine Mutanten wurden mit einer von und früher entwickelten mutagenen Behandlung von Spheroplasten hergestellt. Gemäß dieser Methode wurde der selektierte Stamm in einer Glycin und Vancomycin enthaltende Nährlösung gezüchtet, dann wurde die Zellwand des Mikroorganismus durch Lysozym-Behandlung aufgelöst und die erhaltenen Sphäroplaste und/oder Protoplaste wurden in einem mit Saccharose osmotisch stabilisierten Medium mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin behandelt. Nach dieser mutagenen Behandlung wurden die Sphäroplaste und/oder Protoplaste in osmotisch stabilisiertem, festem Agarmedium, bei einer Temperatur, die optimal für den Wuchs des Mikroorganismus ist, zwecks Regenerierung der Zellwand inkubiert.

Aus den regenerierten Bakterienkolonien wurden jene Mutanten, die die Sterinseitenkette abspalten und gleichzeitig mit hoher Ausbeute Steroide mit Androstan-Skelett anreichern konnten, selektiert. Für Selektionszwecke wurden die obige Kolonien in natürliche Sterine (Sitosterin, Cholesterin) und 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion enthaltenden, minimales Agarmedium oder Glycerin als Kohlenstoffquelle enthaltenden Agarnährboden geimpft. Jene Stämme, die in Nährböden, die Glycerin und natürliche Sterine enthalten, gut wuchsen, dagegen in 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion enthaltendem Medium überhaupt nicht wachsen konnten, wurden selektiert.

14 000 Isolate wurden für ihre Fähigkeit, Sterine abzubauen zu können, mit dieser Methode überprüft. Jene Stämme, die keine 1,2-Steroiddehydrogenase Aktivität besaßen und größere Mengen von 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion mittels Abbau von natürlichen Sterinen anreichern konnten, wurden isoliert, und der Stamm, der die größte Ausbeute an 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion ergab, wurde selektiert. Während der taxonomischen Identifizierung konnte dieser Stamm in keine bekannte *Mycobacterienart* eingestuft werden, er wurde als eine neue Species innerhalb dieser Gattung erkannt. Die Hauptmerkmale der neuen Species, die während der taxonomischen Vergleichsprüfung mit bekannten, Sterine umsetzenden Bakterien verglichen wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Der neue Stamm wurde *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 genannt.

Tabelle 1

5 Taxonomische Vergleichsuntersuchung von *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 und bekannten schnell wachsenden, Steroiden abbauenden *Mycobacterien* gemäß ausgewählten diagnostischen Merkmalen

10		M. roseum sp. nov.	M. phlei	M. fortuitum	M. vaccae	M. smegmatis
15	Pigmentation der Kolonien	Rot	Orange scoto- chromogen	Farblos	Gelb, photo- u. scotochro- mogen	Farblos
20	Wuchs bei 6 °C	+++	-	-	-	-
	Wuchs an MacConkey Agar	-	-	+++	-	-
25	Wärmebeständigkeit bei 60 °C/4 Stunden	+++	+++	-	-	-
30	Tween-80 Hydrolyse	+++	+++	Variabel	+++	+++
	Säurebildung an Arabinose	-	+++	-	?	+++
35	Dulcit	-	-	-	-	+++
	Fruktose	+++	+++	+++	+++	+++
40	Galactose	-	+++	-	-	+++
	Inosit	-	-	-	+++	+++
	Mannit	-	+++	-	+++	+++
45	Mannose	+++	+++	+++	+++	+++
	Sorbit	+	+++	-	Variabel	+++
	Trehalose	+++	+++	+++	+++	+++
50	Xylose	±; +++	+++	-	+++	+++

55 *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 ist ein neues Taxon der *Mycobacterien* Gattung, der auf  
Speciesniveau differenziert werden kann. Dieser Organismus, der bei 45 °C nicht mehr proliferiert, unterscheidet  
sich merklich von *Mycobacterium phlei*, das auch noch bei 52 °C aktiv bleibt, Citrat und Succinat als  
Kohlenstoffquelle benützt, Säure aus Arabinose, Galactose und Mannit bildet und tiefgelbe und orangefarbene  
Kolonien formt, ferner noch von *Mycobacterium smegmatis*, das - ähnlich zu *Mycobacterium phlei* - auch an  
60 Citrat und Succinat, außerdem noch an Oxalat und Benzoat wachsen kann, was *Mycobacterium roseum* sp. nov.

1108/1 nicht zu tun fähig ist. Im Gegensatz zu *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 bildet *Mycobacterium smegmatis* außerdem noch Säure an beinahe allen diagnostischen Kohlenstoffquellen, wie Arabinose, Galactose, Sorbit, Mannit, Inosit und Fructose. *Mycobacterium smegmatis* kann eine vierstündige Hitzebehandlung bei 60 °C nicht überleben und bildet keine Pigmente. *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 kann auch von *Mycobacterium fortuitum* differenziert werden, da dieses immer farblose Kolonien hat und bei niedriger Temperatur nicht wachsen kann. *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 ist ein schnell wachsendes *Mycobacterium* mit charakteristischer roter Pigmentation, ist psychrophil (kältebeständig) und kann sich selbst bei 6 °C in der Form von reifen, roten Kolonien vermehren, während die *Mycobacterium fortuitum* Stämme schon bei 17 °C gehemmt werden. Die 100 %-ige, tiefröte Endopigmentation der Kolonien und Kulturen von *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 ist von höchster taxonomischer Bedeutung, da Good (1985) bei der Reihenuntersuchung von einer großen Zahl, mehr als 500 *Mycobacterium fortuitum* Stämmen, keinen einzigen mit Pigmentation vorfand, und so *Mycobacterium fortuitum* für pigmentfrei und nicht-photochromogen erklärte.

Es ist auch eine wichtige Differenz, daß *Mycobacterium fortuitum* Stämme gut an MacConkey-Agar wachsen, während *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 das nur in Spuren tun kann. Weiterhin besteht auch ein großer Unterschied in der Wärmebeständigkeit. *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 ist nicht nur kältebeständig, sondern auch wärmebeständig. Die ganze Population kann eine vierstündige Wärmebehandlung bei 60 °C überleben, während dieselbe Behandlung die ganze Zellenmasse von *Mycobacterium fortuitum* zerstört. Xylose als Kohlenstoffquelle benützend - die kein Substrat für Säurebildung bei *Mycobacterium fortuitum* ist - kann *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 mit einer bestimmten Variabilität Säure bilden, also ist die Säureproduktionsrate des Stammes für Monate hoch und wieder für Monate niedrig. Abschließend können die meist gelben, photochromogenen Stämme von *Mycobacterium vaccae* und *Mycobacterium parafortuitum*, die gemäß Literaturangaben taxonomisch als identisch zu betrachten sind, von *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 unterschieden werden, in dem sie Citrat und Succinat als Kohlenstoffquelle benützen, keine Wärmebeständigkeit bei 60 °C haben, und Säure aus Inosit und Mannit produzieren.

Aufgrund der obigen diagnostischen Merkmale wird *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 als ein Mitglied der neuen, schnell wachsenden *Mycobacterienspezies* betrachtet. Dieser Stamm wird als "typischer Stamm" bezeichnet, und die neue Spezies wird *roseum* genannt (*Mycobacterium roseum* sp. nov.). Das Adjektiv *roseum* weist auf die charakteristische rosa bis tiefröte Farbe der Spezies hin.

Die taxonomische Vergleichsuntersuchung der neuen Spezies und der bekannten *Mycobacterienspezies* wurde aufgrund der nachfolgenden Literatur ausgeführt: H. C. Good: Ann. Rev. Microbiol. 39, 347-69 (1985) und Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, The William-Wilkins Company, Baltimore, 1975.

Die taxonomischen Merkmale von *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Taxonomie von *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1

	N = negativ	P = positiv	(P) = schwach positiv
	Gelatin-Hydrolyse		N
	Stärke-Hydrolyse		N
	Tween-40 Hydrolyse		P
	Tween-80 Hydrolyse		P
	Phosphatase-Aktivität		P
	Catalase-Aktivität		P
	Oxydase-Aktivität		P
	Urease-Aktivität		P
	Ammoniabildung aus Nitrat		N
	Nitritbildung aus Nitrat		P
	Adeninabbau		P
	Äsculinabbau		P
	Hypoxanthinabbau		N
	Xanthinabbau		N
	Auflösung von Tyrosin		N
	<u>Verbrauch als einzige Kohlenstoffquelle:</u>		
	Adonit		N
	Arabinose		N

Tabelle 2 (Fortsetzung)

5	Dulcit	N
	Fructose	P
	Galactose	N
	Glycerin	P
	Glucose	P
10	Inosit	N
	Stärke	N
	Lactose	N
	Maltose	N
	Mannit	N
15	Mannose	P
	Mucinsäure	N
	Raffinose	N
	Rhamnose	N
	Xylose	N
20	Calciumlaktat	P
	Natriumacetat	N
	Natriumbenzoat	N
	Natriumcitrat	N
	Natriumgluconat	N
25	Natriummalonat	N
	Natriumoxalat	N
	Natriumpyruvat	N
	Natriumsalicylat	N
	Natriumsuccinat	N
30	<u>Verbrauch als einzige Stickstoffquelle:</u>	
	Ammoniumphosphat	P
	Ammoniumcarbonat	P
	Ammoniumchlorid	N
	Ammoniumnitrat	P
35	Ammoniumsulfat	P
	Calciumnitrat	P
	Kaliumnitrat	P
40	<u>Säurebildung aus</u>	
	Adonit	P
	Arabinose	N
	Dextrin	N
	Dulcit	N
45	Fructose	P
	Galactose	N
	Glycerin	P
	Glucose	P
	Inosit	N
50	Inulin	N
	Stärke	N
	Lactose	N
	Mannit	N
	Mannose	P
55	Melicitose	N
	Raffinose	N
	Saccharose	P
	Salycin	(P)
	Sorbit	P
60	Sorbose	N
	Trehalose	P
	Xylose	P (variabel)

Tabelle 2 (Fortsetzung)

5	<u>Wuchs an</u>	
	2 % Natriumchlorid	P
	4 % Natriumchlorid	P
	6 % Natriumchlorid	P
	10 % Natriumchlorid	N
10	MacConkey-Agar	N
	Wuchs bei 6 °C	P
	<u>Wärmebeständigkeit:</u>	
	60 °C/4 Stunden	P
15	<p>Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von 9<math>\alpha</math>-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion ist somit dadurch gekennzeichnet, daß das für den Seitenkettenabbau vorgesehene Sterin oder Steringemisch mit der Kultur eines 1,2-Steroiddehydrogenase-Aktivität nicht enthaltenden Stammes der neuen <i>Mycobacterium roseum</i> Species, welcher fähig ist, natürliche Sterine abzubauen, vorzugsweise mit dem <i>Mycobacterium roseum</i> sp. nov. 1108/1</p>	
20	<p>Stamm, der in der Nationalen Sammlung von Landwirtschaftlichen und Industriellen Mikroorganismen, Budapest, Ungarn unter der Zugriffsnummer NCAIM B (P) 000339 deponiert ist, gezüchtet wird.</p>	
	<p>Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung wird der Seitenkettenabbau mit <i>Mycobacterium roseum</i> sp. nov. 1108/1 durchgeführt. Der selektierte Stamm ist wegen seinem Mangel an 1,2-Steroiddehydrogenase-Aktivität und kräftigem Wuchs besonders für die Fermentation geeignet. Es ist auch günstig, daß das Nährmedium keine kostspieligen Ingredienzien benötigt, so kann der Stamm außer Stickstoffquellen natürlichen Ursprungs (Sojabohnenmehl, Erdnußmehl, Maisquellwasser, Caseinhydrolysat, Hefeextrakt) auch anorganische Stickstoffquellen nutzen.</p>	
25	<p>Gemäß den DE-OS 26 47 895, US-PS 4 221 868, JP-OS 55-85397, JP-OS 55-138395, DE-OS 31 23 413 und der DD-PS 249 284 wird die Fermentbrühe nach der Fermentation nicht aufgearbeitet, sondern es wird nur mittels verschiedener Methoden der 9<math>\alpha</math>-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion-Gehalt der Fermentbrühe bestimmt. Details der Bestimmung werden nicht dargelegt, so daß eigentlich nicht beurteilt werden kann, ob bei diesen Messungen tatsächlich nur der 9<math>\alpha</math>-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion-Gehalt, oder aber auch andere - bei der Fermentation entstehende - Steroide mit verwandter Struktur bestimmt werden.</p>	
30	<p>Im Falle der DD-PS 248 145 und 232 167 ist bereits auch von Isolation die Rede, die angegebenen Ausbeuten können jedoch nicht ausgewertet werden, da in bezug auf die isolierten Verbindungen keinerlei Identifikationsangabe gemacht wird. Es kann nicht festgestellt werden, was für eine Qualität das Produkt besitzt. Bei einer Fermentation entstehen auch zahlreiche Verbindungen mit ähnlicher Struktur. Aus der Beschreibung geht nicht hervor, in welchem Ausmaß die Verunreinigungen vom Zielprodukt entfernt wurden.</p>	
35	<p>Die bekannten Verfahren können daher nicht mit dem erfindungsgemäßen Verfahren verglichen werden.</p>	
40	<p>Die DE-OS 26 47 895 betrifft die Herstellung von 9<math>\alpha</math>-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion (im weiteren 9-OH-4AD) durch Fermentation. Bei diesem Verfahren wird der Mikroorganismus <i>Mycobacterium fortuitum</i> NRRL B-8119 in Gegenwart von eine C<sub>2-10</sub>-Alkylkette enthaltendem Sterin auf wässrigem Nährboden unter aeroben Bedingungen gezüchtet. Die Zeitdauer der Umwandlung beträgt 72-360 Stunden. Die Ausführungsbeispiele der Beschreibung enthalten keine Zahlenangaben, so daß die Wirksamkeit des Verfahrens nicht mit der des erfindungsgemäßen Verfahrens verglichen werden kann.</p>	
45	<p>Gemäß der DE-OS 31 23 413 wird über den Abbau der Seitenketten von Sterolen 9-OH-4AD hergestellt, indem man einen zum Stamm <i>Mycobacterium</i> gehörenden Mikroorganismus in einem mindestens 0,1 Gew.-% Eigelb (auf die Trockensubstanz berechnet) enthaltenden Nährmedium züchtet. Die Fermentation erfolgt mit den Stämmen <i>M. vaccae</i> MCI-1104, <i>M. vaccae</i> MCI-1117, <i>M. parafortuitum</i> MCI-1297 und <i>M. parafortuitum</i> NRRL B-8119. Zeitdauer der Fermentation: 48 - 480 Stunden.</p>	
50	<p>Gemäß Beispiel 1 kann, ausgehend von 10 g Cholesterin, nach 140-stündiger Fermentation die Entstehung von 1,65 g, nach 210-stündiger Fermentation die Entstehung von 1,85 g 9-OH-4AD nachgewiesen werden.</p>	
	<p>Gemäß Beispiel 2 konnte, ausgehend von 750 mg Cholesterin nach 144-stündiger Fermentation die Entstehung von 95 mg, nach 192-stündiger Fermentation die Entstehung von 115 mg 9-OH-4AD nachgewiesen werden.</p>	
55	<p>Gemäß Beispiel 3 konnten, ausgehend von 750 mg rohem Sitosterin nach 140 Stunden in der Fermentbrühe 57 mg, ausgehend von 750 mg eines 2:1-Gemisches aus <math>\beta</math>-Sitosterin und Campesterin 62 mg 9-OH-4AD nachgewiesen werden.</p>	
	<p>Gemäß Beispiel 10 entstanden aus 24 g Cholesterin nach 160-stündiger Fermentation 2,88 g, nach 168-stündiger Fermentation 3,28 g 9-OH-4AD.</p>	
60	<p>Die US-PS 4 221 868 beschreibt nicht die Herstellung von 9<math>\alpha</math>-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion, sondern die</p>	

mikrobiologische Herstellung von 9 $\alpha$ -Hydroxytestosteron, 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-keto-bisnorchol-4-en-22-ol und 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-keto-bisnorchol-en-22-säure.

Gemäß der JP-OS 55-85397 erfolgt der Abbau der Seitenketten von Sterolen mit Mutantenstämmen von *Mycobacterium vaccae* (MCI-1104, MCI-1117). Zeitdauer der Fermentation: kürzer als 20 Tage, vorzugsweise 6-9 Tage.

Gemäß dem Ausführungsbeispiel konnten bei der Fermentation von 1 g Cholesterin nach 200 Stunden gaschromatographisch 0,83 g 9-OH-4AD in der Fermentbrühe nachgewiesen werden.

Der Abbau der Sterolseitenkette erfolgt gemäß der JP-OS 55-138395 mit Hilfe des Mutantenstammes *Mycobacterium parafortuitum* (MCI-1297).

Zeitdauer der Fermentation: 210 Stunden. Gemäß dem Ausführungsbeispiel konnten, ausgehend von 10 g Sterol bei Stillstand der Fermentation 1,38 g 9-OH-4AD gaschromatographisch nachgewiesen werden.

Gemäß der nicht vorveröffentlichten DD-PS 249 284 wird aus Sterolen 9-OH-4AD derart hergestellt, daß die Umwandlung mit einem Stamm der Mikroorganismenart *Mycobacterium vaccae* erfolgt und in das wässrige Nährmedium das Sterol gegebenenfalls in Form eines Steroltensid-Präparates gegeben wird.

Gemäß dem Beispiel 1 entstanden nach 96-stündiger Fermentation aus 10 g Sitosterin durchschnittlich 330 mg 9-OH-4AD (auf Grund der dünnstichtchromatographischen Auswertung). Gemäß dem Beispiel 2 entstanden aus 500 mg Sitosterin 90,6 mg 9-OH-4AD, gemäß Beispiel 3 aus 10 g Sitosterin 120 mg 9-OH-4AD, gemäß Beispiel 4 aus 500 mg Sitosterin 206 mg 9-OH-4AD.

Die mikrobiologische Herstellung von 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion aus Sterolen erfolgt gemäß der DD-PS 248 145, indem man die Umwandlung in Gegenwart eines Polyäthylenoxyd-Polypropylenoxyd-Blockpolymers einer Molekülmasse von 1000 - 3500 mit dem Stamm *Mycobacterium fortuitum* ZIMET 10851 vornimmt.

Gemäß Beispiel 7 wird, ausgehend von 2 kg Sterolgemisch (90 % Sitosterin und 10 % Campesterin) nach 72-stündiger Fermentation 500 g 9-OH-4AD enthaltende Fermentbrühe hergestellt.

In Beispiel 9 werden, ausgehend von 10 g Sterolgemisch 3 g 9-OH-4AD isoliert.

In Beispiel 10 werden, ausgehend von 10 g Sterolgemisch 4 g 9-OH-4AD isoliert.

Gemäß Beispiel 11 werden aus 10 g Sitosterin 3,7 g, gemäß Beispiel 12 aus 10 g Sitosterin 4,5 g, gemäß Beispiel 13 aus 10 g Sitosterin 4,5 g, gemäß Beispiel 14 aus 10 g Sitosterin 4,0 g 9-OH-4AD hergestellt.

Gemäß der DD-PS 232 167 wird 9-OH-4AD aus Sterolen hergestellt, indem der Abbau mit einem Stamm der Art *M. fortuitum* erfolgt und während der Umwandlung ein fein verteiltes, festes, hydrophobes organisches Polymer zum Nährmedium gegeben wird.

Im Beispiel 1 werden aus 10 g Sitosterin nach 48-stündiger Fermentation 5 g 9-OH-4AD hergestellt.

Wie nachfolgend gezeigt wird, gelingt es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, ausgehend von Sitosterin (Stamm *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1) nach siebentägiger Fermentation Fermentbrühen bereits mit einer 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion-Konzentration von 15000  $\mu$ g/ml herzustellen.

Keines der oben erwähnten bekannten Verfahren gewährleistet innerhalb so kurzer Zeit in der Fermentbrühe eine solch hohe 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion-Konzentration.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren können Kohlenstoffquellen, die in der Fermentationsindustrie üblich sind, wie Glucose, Fructose, Saccharose, Melasse, Glycerin und Fette, günstig eingesetzt werden. Der Metallionenbedarf wird durch den Metallgehalt der Nährmedienkomponenten natürlichen Ursprungs gedeckt.

Da die Sterin-Substrate den Wuchs des Stammes nicht beeinflussen, können diese zusammen mit dem Nährmedium vor dem Inokulieren sterilisiert werden.

Die Gegenwart von Polyoxyäthylen-sorbitanmonooleat (Tween-80) im Nährmedium sichert günstigen, einheitlichen und kräftigen Wuchs. Die Züchtung und biologische Umwandlung können zwischen 28 °C und 37 °C, vorzugsweise bei 32 °C durchgeführt werden. Der Fortschritt der Umwandlung wird dünnstichtchromatographisch verfolgt. Die Konversionsperiode ist kurz, beträgt 100 bis 120 Stunden.

Anhand der Versuchungsergebnisse wird 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion als Hauptprodukt durch *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 in hohen Ausbeuten aus natürlichen Sterinen hergestellt. In der Fermentationsbrühe werden auch kleinere Mengen von Produkten mit teilweise abgebauter Seitenkette angereichert, wie 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-chole-22-säure-methylester, 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-chole-22-säure, 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-säure und 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-aldehyd.

Es ist vorteilhaft, die Zellen des Mikroorganismus mittels Filtrieren oder Zentrifugieren abzutrennen. Die mikrobiologischen Konversionsprodukte, die an der Zellenmasse adsorbiert sind, können mit Alkoholen, z. B. mit Methanol, abgewaschen werden, während jene in der Kulturbrühe mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel, wie chlorierte Kohlenwasserstoffe oder Äthylacetat, nach Ansäuerung der Brühe auf pH 2 extrahiert werden.

Das Hauptprodukt, 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion wird von den in kleineren Mengen anwesenden Nebenprodukten mittels Säulenchromatographie oder präparativer Dünnschichtchromatographie und nachfolgendem Kristallisieren getrennt.

Die Struktur der isolierten Konversionsprodukte wurde mit UV, IR, PMR und Massenspektrometrie aufgeklärt.

Die Erfindung wird an Hand der nachstehenden Beispiele näher erläutert, ohne den Schutzzumfang auf diese Beispiele einzuschränken.

### Beispiel 1

- 5 Aus 4 - 5 Tage alten Kartoffel-Glucose-Schrägar Kolonien von *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1 wird mit 10 ml sterilem Wasser eine Zellsuspension zubereitet. Mit 5 ml dieser Suspension wird in einem 3 l Erlenmeyerkolben 800 ml eines sterilen UFR Inoculummediums der folgenden Zusammensetzung beimpft:

10	Glycerin	8,0 g
	Carbamid	0,4 g
	Sojamehl	1,6 g
	Hefeextrakt	0,8 g
	Ammoniumchlorid	2,4 g
	Calciumcarbonat	2,4 g
15	Dibasisches Kaliumphosphat	0,4 g
	Magnesiumsulfat-Wasser 1:7	0,4 g
	Ferrichlorid-Wasser 1:6	0,4 g
	Tween-80	0,4 g
	In 800 ml Leitungswasser	

20

Vor dem Sterilisieren wird das Nährmedium auf pH 2 angesäuert und 45 Minuten lang bei 121 °C sterilisiert. Der Kolben wird drei Tage lang bei 32 °C auf einem Rotationsschüttler (340 U/Minute, Durchmesser 3,5 cm) inkubiert. Mit dieser Vorkultur wird dann 5 l eines 60 Minuten lang bei 121 °C sterilisierten UHF-Mediums in einem 10 l Fermenter inkubiert. Zusammensetzung des UHF-Mediums:

25

	Glycerin	50 g
	Ammoniumchlorid	15 g
	Calciumcarbonat	15 g
	Sojamehl	10 g
30	Dibasisches Kaliumphosphat	2,5 g
	Carbamid	2,5 g
	β-Sitosterin-Campesterin Gemisch (2:1)	100 g
	Polypropylenglycol	30 g
	Tween-80	10 g
35	In 5 Liter Leitungswasser	

Vor dem Sterilisieren wird der pH-Wert des Nährmediums auf 7 eingestellt.

- 40 Die inokulierte Kulturbrühe wird in ein Wasserbad von 32 °C gesetzt, die Fermentation wird bei einer Rührgeschwindigkeit von 350 U/Minute, erst unter Belüftung von 90 l/Stunde, nach abnehmendem Schäumen bei 150 l/Stunde, 120 Stunden lang fortgesetzt, und die aus dem β-Sitosterin-Campesterin (2:1) Gemisch umgesetzten Konversionsprodukte werden isoliert.

Die Sterin-Konversionsprodukte in einem Liter Kulturbrühe, die am Anfang 20 g rohes Sitosterin (β-Sitosterin-Campesterin 2:1) enthielt, werden folgendermaßen isoliert.

- 45 Die Zellenmasse der Kulturbrühe wird filtriert, und die darauf adsorbierten Sterin-Konversionsprodukte sowie die nicht umgesetzten Ausgangsstoffe werden dreimal mit je 200 ml Methanol ausgewaschen. Die vereinten Methanol-Eluate werden im Vakuum eingedampft. Der Rückstand beträgt 12 g.

- 50 Das Filtrat der Kulturbrühe wird mit 2 N Schwefelsäure auf pH 2 angesäuert. Das ausfallende Präzipitat, ein Gemisch von 9α-Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-cholen-22-säure und 9α-Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-säure wird filtriert und 4 Stunden lang im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Ausbeute: 1 g Säuregemisch. Das Filtrat wird zweimal mit 200 ml Äthylacetat extrahiert, die vereinten Äthylacetat-Extrakte werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand beträgt 3,1 g.

- 55 Die aus der Zellenmasse und aus der angesäuerten Kulturbrühe gewonnenen rohen Konversionsprodukte werden vereint und an einer aus 250 g Silicasäure bestehenden Säule chromatographiert. Als Entwicklungslösung werden n-Heptan - Äthylacetat Gemische, die stufenweise immer größere Mengen von Äthylacetat enthalten, eingesetzt. Nicht transformierte Ausgangsmaterialien werden mit einem n-Heptan - Äthylacetat Gemisch, das 25 % Äthylacetat enthält, eluiert. Bei dem Eindampfen dieser Fraktionen werden 1,5 g des β-Sitosterin-Campesterin Gemisches gewonnen. Eluierung wird mit einem Gemisch von n-Heptan - Äthylacetat (6:4) fortgesetzt. Die vereinten Fraktionen werden im Vakuum eingedampft, und der Rückstand wird aus Aceton umkristallisiert.

60

Ausbeute: 0,3 g 9α-Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-cholen-22-säure-methylester, Schmp. 212-216 °C.

Eluierung mit dem weiteren n-Heptan - Äthylacetat (55:45) Gemisch, Einengen im Vakuum der



entsprechenden Fraktionen und Umkristallisieren aus Aceton ergibt 0,1 g 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-aldehyd, Schmp. 204-209 °C.

- 5 Weitere Eluierung mit einem 45:55 Gemisch von n-Heptan und Äthylacetat, Einengen im Vakuum der entsprechenden Fraktionen und Umkristallisieren des Rückstandes aus Methanol ergibt 5,7 g 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion, Schmp. 219-221 °C,  $[\alpha]_D^{20} = +180^\circ$  (c = 1, Chloroform).

- 10 Eluierung mit einem nächsten n-Heptan-Äthylacetat (3:7) Gemisch und Einengen im Vakuum der entsprechenden Fraktionen gibt einen Rückstand, der aus einem Gemisch von 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-cholen-22-säure und 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-säure besteht. Dieser Rückstand wird mit dem nach Ansäuerung der Kulturbühe gewonnenem Säuregemisch vereint und das ganze Gemisch wird zweimal aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 0,4 g chromatographisch reine 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-säure, Schmp. 242-248 °C.

- 15 Das in der Mutterlauge des Umkristallisierens zurückgebliebene Gemisch von 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-cholen-22-säure und 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-säure wird mit präparativer Dünnschichtchromatographie in Komponenten geteilt [Adsorbent: Gemisch von Kieselgel G (Reanal, Budapest) und Kieselgel 60 HF<sub>254-366</sub> (Reanal, Budapest) (2:1), Entwicklungslösungsmittel: Benzol-Aceton (1:1)].

Ausbeute: 0,1 g chromatographisch reine 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-cholen-22-säure (Schmp. 258-262 °C) und 0,2 g 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-säure.

### Beispiel 2

- 20 Sitosterin-Abbau mit dem Stamm *Mycobacterium roseum* sp. nov. 1108/1, NCAIM B (P) 000339

Von der 4 - 5 Tage alten, auf Schrägagar mit Kartoffelglucose gezüchteten Kultur des Stammes *Mycobacterium* sp. 1108/1 wird mit 10 ml sterilem Wasser eine Zellsuspension hergestellt, und mit 5 ml dieser werden 800 ml eines in einem 3 Liter-Erlenmeyerkolben sterilisierten MI-Inoculum-Nährbodens geimpft. Der MI-Nährboden hat folgende Zusammensetzung:

- |    |                                 |       |
|----|---------------------------------|-------|
| 25 | Glucose                         | 8,0 g |
|    | Sojamehl                        | 1,6 g |
|    | Harnstoff                       | 0,4 g |
|    | Hefeextrakt                     | 0,8 g |
| 30 | Ammoniumchlorid                 | 2,4 g |
|    | Kaliumdihydrogenphosphat        | 0,4 g |
|    | Magnesiumsulfat-Wasser (1:7)    | 0,4 g |
|    | Eisen(III)-chlorid-Wasser (1:6) | 0,4 g |
|    | Tween 80                        | 0,4 g |
| 35 | in 800 ml Leitungswasser.       |       |

Der pH-Wert des Nährbodens wird vor dem Sterilisieren auf 7,0 eingestellt, und die Sterilisation erfolgt 45 Minuten lang bei 121 °C.

- 40 Der Kolben wird bei 32 °C in einem Mühlensieb-Rüttler (250 Umdrehungen/Minute, Ablenkung 2,5 cm) 2 Tage lang gerüttelt, dann werden mit der erhaltenen Inoculum-Kultur 4,2 Liter eines MF-Nährbodens geimpft, der in einem 10 Liter-Laborfermentor 60 Minuten lang bei 121 °C sterilisiert wurde.

Der MF-Nährboden wird wie folgt hergestellt.

- 45 50 g Glucose, 10 g Sojamehl, 2,5 g Harnstoff, 15 g Ammoniumchlorid und 2,5 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in 1,5 Liter Leitungswasser gekocht. Der so hergestellte Grundnährboden wird unter ständigem Rühren einer 150 g Sitosterin (2:1 Gemisch aus  $\beta$ -Sitosterin und Campesterin), 40 g Polypropylenglycol, 10 g Tween 80 und 800 ml Leitungswasser enthaltenden, eine Stunde lang bei 121 °C sterilisierten Sitosterinschmelze zugesetzt, dann wird mit heißem Leitungswasser auf 4 Liter ergänzt. Der so erhaltene Nährboden wird eine Stunde lang bei 121 °C sterilisiert, danach werden 15 g in 200 ml Leitungswasser extra sterilisiertes Kalziumcarbonat zugesetzt.

- 50 Die durch das Impfen mit MF-Nährboden erhaltene Kultur wird 24 Stunden lang, unter Zuleitung von 100 Liter/Stunde Luft von oben bei 32 °C mit einer Umdrehungszahl von 750/Minute gerührt. Dann wird die Fermentation 6 Tage lang derart fortgesetzt, daß von unten 300 Liter/Stunde Luft in die mit 750 Umdrehungen/Minute gerührte Kultur geleitet wird. Am Ende der Fermentation erreicht die 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion-Konzentration einen Wert von 15 000  $\mu$ g/ml. Die Bestimmung der 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion Konzentration, erfolgt aus dem Äthylacetat-Extrakt der Fermentbrühe-Proben mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

- 60 Nach Beendigung der Fermentation werden die Zellen durch Zentrifugieren aus der Fermentbrühe isoliert, von denen die Sterinabbauprodukte und der nicht umgebildete Ausgangsstoff dreimal mit 500 ml Methanol abgelöst werden. Das vereinigte Methanol-Eluat wird im Vakuum eingedampft. So erhält man 130 g Rohprodukt. Aus der Fermentbrühe wird der nach dem Zentrifugieren erhaltene Überstand zweimal mit 500 ml Äthylacetat extrahiert. Der vereinigte Äthylacetat-Extrakt wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum

- eingedampft. So erhält man weitere 13,5 g Rohprodukt. Die beiden Rohprodukt-Fractionen werden vereinigt und in 750 ml Diisopropyläther suspendiert, dann wird die Suspension 1 Stunde lang gerührt und danach bei 5 °C eine Nacht lang stehengelassen. Der abgeschiedene kristalline Niederschlag wird abfiltriert, zweimal mit je 100 ml Diisopropyläther gewaschen, dann im Vakuum getrocknet. Das so erhaltene Produkt wird in 1 Liter
- 5 Methanol heiß aufgelöst, und die Lösung wird mit 3,5 g Aktivkohle geklärt. Dann wird die Lösung abfiltriert und die Aktivkohle mit 100 ml Methanol gewaschen. Nach Eindampfen des Filtrats und der Waschflüssigkeit erhält man 70,1 g 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion einer Reinheit von 87 %. Durch seine Umkristallisierung aus Toluol kann man zu reinem 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion gelangen. Schmelzpunkt: 219 - 220 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +180$  (c = 1, Chloroform).
- 10 Bei Eindampfen der Diisopropyläther-Mutterlauge und der Waschflüssigkeit im Vakuum erhält man 65,2 g öligen Rest. Die im Eindampfstrest befindlichen Steroide werden durch Chromatografieren an einer aus 600 g Kieselsäure bereiteten Säule, mit Gemischen von n-Heptan und Äthylacetat mit allmählich ansteigendem Äthylacetat-Gehalt voneinander getrennt. Nach Eindampfen der sich mit dem 25 % Äthylacetat enthaltendem Gemisch von n-Heptan und Äthylacetat ablösenden chromatographischen Fractionen gelangt man zu 3,5 g
- 15 Gemisch von  $\beta$ -Sitosterin und Campesterin. Nach Eindampfen der sich mit 40 % Äthylacetat enthaltendem Gemisch von n-Heptan und Äthylacetat ablösenden chromatographischen Fractionen und Umkristallisieren des Eindampfstrestes aus Aceton erhält man 4,1 g 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-cholen-22-säure-methylester.
- Schmelzpunkt: 212 - 216 °C.
- 20 Ultraviolettes Spektrum (EtOH):  $\lambda_{\max}$  242 nm.
- Infrarotes Spektrum (KBr):  $\nu$  OH 3395,  $\nu$  C=O 1730 (Ester) 1650 (3-er Keton),  $\nu$  C=C 1615  $\text{cm}^{-1}$ .
- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 5,8 s (H-4), 3,6 s ( $\text{OCH}_3$ ), 1,3 s (3 H-19), 1,2 d (3 H-21), 0,7 s (3 H-18) ppm.
- Massenspektrum: Molekül-Ion ( $m/z$ ): 374.
- 25 Charakteristische Ionen ( $m/z$ ): 374, 180, 151, 137, 136, 124, 109, 81.
- Nach Eindampfen im Vakuum der sich mit den 55 % Äthylacetat enthaltenden Gemischen von n-Heptan und Äthylacetat ablösenden Fractionen und Umkristallisieren des Eindampfstrestes aus Methanol erhält man 5,1 g 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion. Der Eindampfstrest der Mutterlauge des Umkristallisierens wird mittels präparativer Dünnschichtchromatographie, unter Verwendung eines 8:2 Gemisches von Benzol und Aceton als
- 30 Entwickler gereinigt. So erhält man 0,45 g 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion und 0,45 g 9 $\alpha$ ,22-Dihydroxy-23,24-dinor-4-cholen-3-on. Letzteres wird aus Aceton umkristallisiert.
- Schmelzpunkt: 179 - 180 °C.
- 35 Ultraviolettes Spektrum (EtOH):  $\lambda_{\max}$  241 nm.
- Infrarotes Farbbild (KBr):  $\nu$  OH 3600-3200, max. 3415,  $\nu$  C=O 1657 (3-er Keton),  $\nu$  C=C 1620  $\text{cm}^{-1}$ .
- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 5,85 s (H-4), 3,5 ABXm (2 H-22), 1,3 s (3 H-19), 1,05 d (3H-21), 0,75 s (3 H-18) ppm.
- Massenspektrum: Molekül-Ion ( $m/z$ ): 346.
- 40 Charakteristische Ionen ( $m/z$ ): 346, 328, 151, 137, 136, 124, 121, 93.
- Nach Eindampfen der sich mit 60 % Äthylacetat enthaltendem Gemisch von n-Heptan und Äthylacetat ablösenden Fractionen und Umkristallisieren des Eindampfstrestes aus Methanol erhält man 0,42 g 9 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Dihydroxy-4-androsten-3-on.
- 45 Schmelzpunkt: 196 - 199 °C.
- Ultraviolettes Spektrum (EtOH):  $\lambda_{\max}$  241 nm.
- Infrarotes Spektrum (KBr):  $\nu$  OH 3500-3200, max. 3455,  $\nu$  C=O 1660 (3-er Keton),  $\nu$  C=C 1605  $\text{cm}^{-1}$ .
- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 5,75 s (H-4), 3,5 m (H-17), 1,25 s (3 H-19), 0,7 s (3 H-18) ppm.
- 50 Massenspektrum: Molekül-Ion ( $m/z$ ): 304.
- Charakteristische Ionen ( $m/z$ ): 304, 168, 150, 137, 136, 124, 109, 108.
- Die sich mit dem 70 % Äthylacetat enthaltendem Gemisch von n-Heptan und Äthylacetat ablösenden Fractionen werden im Vakuum eingedampft. Der Eindampfstrest wird mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (entwickelndes Lösungsmittel 1:1 Gemisch von Benzol und Aceton) gereinigt. Die das sich von der Schicht ablösende, stärker apolare Produkt enthaltende Fraction (240 mg) wird in 5 ml Methanol aufgelöst, dann mit 20 ml Äthylacetat verdünnt. Die erhaltene Lösung wird zweimal mit 5 ml Wasser gewaschen, dann im Vakuum eingedampft. Nach Umkristallisieren des Eindampfstrestes aus Äthylacetat erhält man 155 mg 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladien-22-säure.

Schmelzpunkt: 242 - 248 °C.

Ultraviolettes Spektrum (EtOH):  $\lambda_{\max}$  237 nm.

Infrarotes Spektrum (KBr):  $\nu$  OH 3600-3300, max. 3500 (9 $\alpha$ -Hydroxylgruppe), 3200-2200 (22-er Säure),  $\nu$  C=O 1665 (3-er Keton, 22-er Säure),  $\nu$  C=C 1615 cm<sup>-1</sup>.

5 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 5,85 (H-4), 1,9 s (3 H-21), 1,3 s (3 H-19), 1,0 s (3 H-18) ppm.

Massenspektrum: Molekül-Ion ( $m/z$ ): 358.

Charakteristische Ionen ( $m/z$ ): 358, 340, 137, 136, 133, 124, 121, 109.

10 Die das von der Schicht abgelöste, stärker polare Produkt enthaltende Fraktion (460 mg) wird in 10 ml Methanol gelöst, und es werden 0,5 ml 10 %-ige methanolische Salzsäure zugesetzt, dann wird mit 30 ml Äthylacetat verdünnt. Die erhaltene Lösung wird zweimal mit je 10 ml Wasser gewaschen, dann eingedampft. Nach Umkristallisieren des Eindampfrestes aus Aceton erhält man 210 mg 9 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-4-cholen-22-säure.

15 Schmelzpunkt: 258 - 262 °C.

Ultraviolettes Spektrum (EtOH):  $\lambda_{\max}$  241 nm.

Infrarotes Spektrum (KBr):  $\nu$  OH 3650-3300, max. 3450 (9 $\alpha$ -Hydroxylgruppe), 3200-2300 (22-er Säure),  $\nu$  C=O 1720 (22-er Säure), 1665 (3-er Keton) cm<sup>-1</sup>.

20 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 5,8 s (H-4), 1,3 s (3 H-19), 1,15 d (3 H-21), 0,7 (3 H-18) ppm.

Massenspektrum: Molekül-Ion ( $m/z$ ): 360.

Charakteristische Ionen ( $m/z$ ): 360, 237, 224, 206, 151, 137, 136, 124.

25

## PATENTANSPRÜCHE

30

1. Verfahren zur Herstellung von 9 $\alpha$ -Hydroxy-4-androsten-3,17-dion aus natürlichen Sterinen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder aus einem Gemisch derselben durch belüftete, submerse Fermentation eines enzymdefekten, Sterin abbauenden Mikroorganismus in einem Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Mineralsalze enthaltenden Nährmedium, und Isolieren des entstehenden Produktes, dadurch gekennzeichnet, daß das für den Seitenkettenabbau vorgesehene Sterin oder Steringemisch mit der Kultur eines 1,2-Steroiddehydrogenase-Aktivität nicht enthaltenden Stammes der neuen Mycobacterium roseum Species, welcher fähig ist, natürliche Sterine abzubauen, vorzugsweise mit dem Mycobacterium roseum sp. nov. 1108/1 Stamm, der in der Nationalen Sammlung von Landwirtschaftlichen und Industriellen Mikroorganismen, Budapest, Ungarn unter der Zugriffsnummer NCAIM B (P) 000339 deponiert ist, gezüchtet wird.

40

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von  $\beta$ -Sitosterin und Campesterin (2:1) als Sterin natürlichen Ursprungs eingesetzt wird.

45